



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111629732 A

(43)申请公布日 2020.09.04

(21)申请号 201880086946.0

(22)申请日 2018.11.15

(30)优先权数据

10-2017-0154840 2017.11.20 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.07.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2018/014000 2018.11.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/098706 KO 2019.05.23

(71)申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔市城北区安岩路145(邮递区号:02841)

(72)发明人 金京宪 陈勇秀 尹银珠 俞素萝
李栽源

(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

代理人 杨文娟 臧建明

(51)Int.Cl.

A61K 31/7004(2006.01)

A61K 31/7016(2006.01)

A61K 31/729(2006.01)

A61K 8/60(2006.01)

A23L 33/125(2006.01)

C12P 19/04(2006.01)

C12P 19/18(2006.01)

C12N 9/10(2006.01)

A61Q 19/00(2006.01)

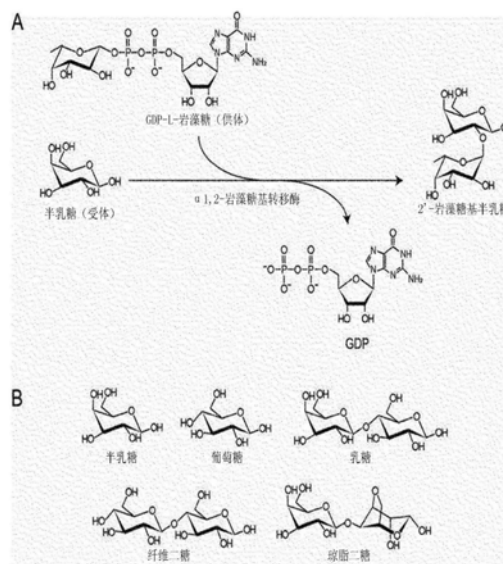
权利要求书2页 说明书11页
序列表4页 附图8页

(54)发明名称

各种新颖岩藻糖基低聚糖的制备方法和其用途

(57)摘要

本发明涉及一种用于各种新颖岩藻糖基低聚糖的制备方法和其用途。更具体地说,本发明允许通过使用GDP-L-岩藻糖供体和各种葡萄糖受体与 α -1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应来制备各种新颖岩藻糖基低聚糖并且建立其益生菌特性,且因此具有提供作为医药、食品、化妆产品等的材料的用途的效应。



1. 一种益生菌医药组成物, 包括由以下组成的族群中选出的的一种或多种岩藻糖基低聚糖: 2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基木糖以及2'-岩藻糖基琼脂二糖。

2. 根据权利要求1所述的益生菌医药组成物, 其中所述益生菌医药组成物促进有益肠道细菌的增殖并且抑制有害肠道细菌的生长。

3. 根据权利要求2所述的益生菌医药组成物, 其中所述有益肠道细菌是属于双歧杆菌属、乳杆菌属或链球菌属的菌株。

4. 根据权利要求3所述的益生菌医药组成物, 其中属于所述双歧杆菌属的菌株包括长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) ATCC 15697、两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) DSM 20082 或婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium kashiwanohence*) DSM 21854。

5. 一种益生菌化妆品组成物, 包括由以下组成的族群中选出的的一种或多种岩藻糖基低聚糖: 2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基木糖以及2'-岩藻糖基琼脂二糖。

6. 一种益生菌食品组成物, 包括由以下组成的族群中选出的的一种或多种岩藻糖基低聚糖: 2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基木糖以及2'-岩藻糖基琼脂二糖。

7. 一种制备岩藻糖基低聚糖的方法, 包括:

使糖受体 (sugar acceptor) 和 GDP-L-岩藻糖 (鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖) 供体与 α-1,2-岩藻糖基转移酶 (α-1,2-fucosyltransferase) 反应以产生岩藻糖基低聚糖,

其中所述糖受体包括由以下组成的族群中选出的的一种或多种: 葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖以及琼脂二糖, 以及

所述 α-1,2-岩藻糖基转移酶包括由 SEQ ID NOS:1 到 3 的氨基酸序列中选出的任何一个。

8. 根据权利要求7所述的制备岩藻糖基低聚糖的方法, 其中反应在 20°C 到 40°C 下执行 3 小时到 24 小时。

9. 一种制备岩藻糖基低聚糖的方法, 包括:

在存在糖受体 (sugar acceptor) 和甘油的情况下培养重组大肠杆菌或酵母菌, 所述重组大肠杆菌或酵母菌中引入用于表达参与用于产生 GDP-L-岩藻糖 (鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖) 的从头合成途径 (*De novo pathway*) 的 ManB、ManC、Gmd 以及 WcaG 的载体, 和用于表达 α-1,2-岩藻糖基转移酶 (α-1,2-fucosyltransferase) 的载体, 以及

从大肠杆菌培养物中分离并纯化岩藻糖基低聚糖,

其中所述糖受体包括由以下组成的族群中选出的的一种或多种: 葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖以及琼脂二糖, 以及

所述 α-1,2-岩藻糖基转移酶包括由 SEQ ID NOS:1 到 3 的氨基酸序列中选出的任何一个。

10. 根据权利要求9所述的制备岩藻糖基低聚糖的方法, 其中培养包括分批进料培养(Fed-batch culture)。

11. 根据权利要求10所述的制备岩藻糖基低聚糖的方法, 其中分批进料培养在25℃到37℃下执行2小时到60小时, 并且向其中添加IPTG (异丙基 β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷), 接着在20℃到30℃下分批进料培养60小时到150小时。

12. 一种改善个体的肠道健康的方法, 包括:

向所述个体给予益生菌医药组成物,

其中所述益生菌医药组成物包括由以下组成的族群中选出的一种或多种岩藻糖基低聚糖: 2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基木糖以及2'-岩藻糖基琼脂二糖。

13. 根据权利要求12所述的改善个体的肠道健康的方法, 其中所述益生菌医药组成物治疗胃灼热、消化不良、腹胀、腹泻、便秘以及胀气中的任一种。

各种新颖岩藻糖基低聚糖的制备方法和其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种通过使用GDP-L-岩藻糖供体和各种糖受体与 α -1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应来产生各种新颖岩藻糖基低聚糖的方法和其作为益生菌的用途。

背景技术

[0002] 益生菌是指通过有益肠道细菌选择性地发酵以改善肠道菌群并且有益于人体健康的物质。近年来,已经报告了关于人类疾病与肠道菌群之间的相关性的研究,且肠道菌群被认为是第二人类基因组,且因此本领域中的研究迅速地发展。具体地说,根据已经报告的研究结果,展示出肥胖症、糖尿病以及免疫功能是根据增加有益肠道菌群的分布来改善的,关于肠道菌群的研究正受到更多的关注。

[0003] 岩藻糖基低聚糖是母乳低聚糖的主要成分之一并且具有由益生菌微生物选择性发酵的益生菌的活性和预防肠道病原性微生物沉降的生理活性。除了肠道健康相关的生理活性外,岩藻糖基低聚糖已知能够增强记忆力并且预期有帮助预防痴呆症。

[0004] 在岩藻糖基低聚糖当中,众所周知的是作为二糖的岩藻糖基半乳糖(FGal)在用其治疗海马神经元时促进了神经细胞的生长。这表明FGal可以用作用于治疗神经系统相关疾病的药剂的可能性。

[0005] 随着全世界人口老龄化迅速地发展,患有神经疾病的患者的数量迅速地增加,且因此,对于研发有效治疗剂的需求也正在增加。举例来说,阿尔茨海默病疗法的全球市场预计在2023年将扩展到133亿美元,而帕金森病疗法的市场预计在2022年将扩展到47亿美元。然而,迄今为止,主要已研发了缓解症状的药物,且因此没有基础治疗的药物以使得无法满足全部需求,且因此,期望大大地扩展潜在的市场。此外,由于经济增长,预期第三世界的购买力扩展将有助于未来的市场增长。

[0006] 上文所描述的各种岩藻糖基低聚糖的生理活性,例如益生菌活性、记忆力增强以及促进神经细胞的生长预期将由岩藻糖单元产生,且因此本发明的发明人使用 α -1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应产生不同类型的岩藻糖基低聚糖且检验其作为益生菌的特性,且因此完成本发明。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明的一个目的是提供一种通过 α -1,2-岩藻糖基转移酶与GDP-L-岩藻糖供体和各种糖受体的酶反应来产生各种岩藻糖基低聚糖的方法。

[0009] 本发明的另一个目的是提供具有益生菌特性的岩藻糖基低聚糖的用途。

[0010] 技术解决方案

[0011] 根据本发明的一方面,提供有一种益生菌医药组成物,包含由以下组成的族群中选出的一种或多种岩藻糖基低聚糖:2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露

糖、2'-岩藻糖基木糖以及2'-岩藻糖基琼脂二糖。

[0012] 本发明还提供一种改善个体的肠道健康的方法,包含向个体给予益生菌医药组成物。

[0013] 本发明还提供一种益生菌化妆品组成物,包含由以下组成的族群中选出的的一种或多种岩藻糖基低聚糖:2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基木糖以及2'-岩藻糖基琼脂二糖。

[0014] 本发明还涉及一种益生菌食品组成物:包含由以下组成的族群中选出的的一种或多种岩藻糖基低聚糖:2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基木糖以及2'-岩藻糖基琼脂二糖。

[0015] 本发明还提供一种产生岩藻糖基低聚糖的方法,包含使糖受体(sugar acceptor)和GDP-L-岩藻糖(鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖)供体与α-1,2-岩藻糖基转移酶(α-1,2-fucosyltransferase)反应以产生岩藻糖基低聚糖,

[0016] 其中糖受体包含由以下组成的族群中选出的的一种或多种:葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖以及琼脂二糖,以及

[0017] α-1,2-岩藻糖基转移酶包含由SEQ ID NOS:1到3的氨基酸序列中选出的任何一个。

[0018] 本发明还提供一种产生岩藻糖基低聚糖的方法,包含:在存在糖受体(sugar acceptor)和甘油的情况下培养重组大肠杆菌或酵母菌,所述重组大肠杆菌或酵母菌中引入用于表达参与用于产生GDP-L-岩藻糖(鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖)供体的从头合成途径(De novo pathway)的ManB、ManC、Gmd以及WcaG的载体;和用于表达α-1,2-岩藻糖基转移酶(α-1,2-fucosyltransferase)的载体;以及从大肠杆菌培养物中分离并纯化岩藻糖基低聚糖,

[0019] 其中糖受体包含由以下组成的族群中选出的的一种或多种:葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖以及琼脂二糖,以及

[0020] α-1,2-岩藻糖基转移酶包含由SEQ ID NOS:1到3的氨基酸序列中选出的任何一个。

[0021] 发明的有利效应

[0022] 本发明具有以下效应:提供一种使用GDP-L-岩藻糖供体和各种糖受体与α-1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应或通过将酶反应应用到重组大肠杆菌中的代谢工程技术来产生岩藻糖基低聚糖的方法。

[0023] 本发明还提供岩藻糖基低聚糖基于其益生菌特性而用作医疗、化妆品以及食品领域中的益生菌材料的效应。

附图说明

[0024] 图1是示出使用GDP-岩藻糖供体和各种糖受体通过α-1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应来产生不同类型的岩藻糖基低聚糖的视图。

[0025] 图2示出展示α-1,2-岩藻糖基转移酶与各种糖受体之间的反应性的测试结果。

[0026] 图3到图5示出通过使用GDP-L-岩藻糖供体和糖受体与 α -1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应所产生的岩藻糖基低聚糖的LC/MS分析结果,糖受体例如葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖以及琼脂二糖。

[0027] 图6示出使用重组大肠杆菌(A)产生2-岩藻糖基半乳糖和重组大肠杆菌的分批发酵结果(B)以及分批进料发酵结果(C)的视图。

[0028] 图7示出在重组大肠杆菌(A)的发酵液中使用G-10管柱通过尺寸排阻色谱来分离并且纯化的2-岩藻糖基半乳糖(B),使用2-岩藻糖基半乳糖作为底物以确认2-岩藻糖基半乳糖(D)的 α -1,2-糖苷键的 α -1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应结果,以及重组大肠杆菌的粗制酶溶液的 α -1,2-岩藻糖苷酶的酶反应结果,所述重组大肠杆菌包含作为对照的不含编码酶(C)的基因的空白载体。

[0029] 图8示出确认属于双歧杆菌属的菌株中2-岩藻糖基半乳糖的益生菌活性的结果。

[0030] 图9示出确认病原性微生物中2-岩藻糖基半乳糖的代谢的结果。

具体实施方式

[0031] 迄今为止,本发明的发明人首先通过酶反应和微生物发酵来产生岩藻糖基半乳糖(FGal)(美国专利第7,858,578号),迄今为止,所述岩藻糖基半乳糖仅通过化学合成来产生。此外,本发明人首先论证FGal是由双歧杆菌发酵的益生菌,双歧杆菌为益生菌微生物。具体地说,在各种糖受体当中,构成红藻的主要碳水化合物琼脂糖的二糖基础结构琼脂二糖首先用于产生2-岩藻糖基琼脂二糖。已知琼脂二糖为具有抗氧化效应、抗微生物效应、抗炎效应以及抗癌效应的生物活性物质,并且通过岩藻糖基化反应产生的2-岩藻糖基琼脂二糖是新材料且同时预计将是具有各种生理活性的材料。

[0032] 因此,本发明涉及一种益生菌医药组合物,包含由以下组成的族群中选出的的一种或多种岩藻糖基低聚糖:2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基木糖以及2'-岩藻糖基琼脂二糖。

[0033] 岩藻糖基低聚糖是促进有益肠道细菌的增殖,抑制有害肠道细菌生长并且不通过病原性微生物代谢的益生菌。此外,通过与沙门菌属、螺旋杆菌属、病原性大肠杆菌、诺如病毒以及类似物的粘附部位或受体部位结合,岩藻糖基低聚糖也可以预防病原性细菌和病毒感染人体和增殖。其中,2-岩藻糖基半乳糖可以通过促进神经细胞的生长而用作神经退行性疾病的治疗剂,神经退行性疾病例如帕金森病和阿尔茨海默病,并且2-岩藻糖基琼脂二糖也可以因琼脂二糖自身的特性而用作抗氧化剂、抗菌剂、抗炎剂以及抗癌剂,特性例如抗氧化特性、抗菌特性、抗炎特性以及抗癌特性。

[0034] 根据本发明的一个实施例,长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697通过细胞内岩藻糖苷酶将2-岩藻糖基半乳糖分解成半乳糖和岩藻糖并且使用这两者,且两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) DSM 20082将2-岩藻糖基半乳糖细胞外地分解成半乳糖和岩藻糖,并且然后只使用半乳糖。此外,可以看出,导致尿路感染、新生儿脑膜炎以及败血症的大肠杆菌(*E. coli*)和导致腹泻和菌血症的鼠伤寒沙门菌(*Salmonella enterica* serovar *typhimurium*)不能够代谢2-岩藻糖基半乳糖且为由益生菌微生物选择性地发酵的益生菌。

[0035] 岩藻糖基低聚糖可以通过使糖受体和GDP-L-岩藻糖(鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖)供体与α-1,2-岩藻糖基转移酶(α-1,2-fucosyltransferase)反应来产生。或者,可将重组大肠杆菌或酵母菌分别地培养在存在糖受体和甘油的情况下,所述重组大肠杆菌或酵母菌中引入用于表达参与用于产生GDP-L-岩藻糖的从头合成途径(De novo pathway)的ManB、ManC、Gmd以及WcaG的载体;和用于表达α-1,2-岩藻糖基转移酶的载体,并且可以通过分离和纯化从培养物中获取岩藻糖基低聚糖。

[0036] 如本文中所使用,术语“有益肠道细菌”具有作为“益生菌”的相同意义并且是指当摄入且到达肠道时对肠道环境具有有益影响的菌株,并且是指在胃酸和胆酸中存活以到达小肠且因此在肠道中增殖并沉降、在肠道中具有有益影响以及满足例如无毒性和非致病性条件的细菌。举例来说,有益肠道细菌包含属于乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)以及双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)的细菌。具体地说,有益肠道细菌是属于双歧杆菌属、乳杆菌属、链球菌属的菌株,更具体地是属于双歧杆菌属或链球菌属的菌株。再更具体地说,根据本发明的属于双歧杆菌属的菌株包含长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) DSM 20082或婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium kashiwanohence*) DSM 21854。属于乳杆菌属的菌株包含罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*),且属于链球菌属的菌株包含嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)。

[0037] 如本文中所使用,术语“有害肠道细菌”是指在摄入并到达肠道时对肠道环境具有不良影响的菌株。举例来说,有害肠道细菌包含属于铜绿假单胞菌属(*Pseudomonas aeruginosa*)、弧菌属(*Vibrio*)、葡萄球菌属(*staphylococcus*)、产气荚膜梭菌属(*Clostridium perfringens*)、真杆菌属(*Eubacterium*)以及拟杆菌属(*Bacteroides*)的菌株和硫酸盐还原剂(sulfate reducers)。具体地说,有害肠道细菌是属于产气荚膜梭菌属、真杆菌属或拟杆菌属的菌株。更具体地说,属于产气荚膜梭菌属的菌株包含艰难梭菌(*Clostridium difficile*)或产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)。属于真杆菌属的菌株包含粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*),且属于拟杆菌属的菌株包含脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)。

[0038] 本发明的益生菌医药组成物还可以包含医药学上可接受的载剂。

[0039] 医药学上可接受的载剂包含医学领域中普遍使用的载剂和媒剂,并且尤其包含离子交换树脂、矾土、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如人类血清白蛋白)、缓冲物质(例如各种磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾以及饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物)、水、盐或电解质(例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠以及锌盐)、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的基质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚芳酯、蜡、聚乙二醇或羊毛脂,但本发明不限于此。

[0040] 此外,除了上文所描述的成分以外,本发明的益生菌医药组成物还可以包含润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等。

[0041] 在一个实施例中,本发明的益生菌医药组成物可以适用于口服给药或肠胃外给药的各种制剂形式进行配制和使用。

[0042] 用于口服给药的制剂的非限制性实例包含糖衣片剂(troches)、口含片

(lozenge)、片剂、水性悬浮液、油性悬浮液、制备粉末、乳剂、硬胶囊、软胶囊、糖浆以及酞剂。

[0043] 为配制用于口服给药的本发明的益生菌医药组成物：可以使用粘合剂例如乳糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、胶淀粉 (Amylopectin)、纤维素 (Cellulose)、明胶 (Gelatin) 等、赋形剂例如磷酸二钙 (Dicalcium phosphate) 等、崩解剂例如玉米淀粉、甘薯淀粉等、润滑剂例如硬脂酸镁 (Magnesium stearate)、硬脂酸钙 (Calcium stearate)、硬脂酰反丁烯二酸钠 (Sodium stearyl fumarate)、聚乙二醇蜡 (Polyethylene glycol wax) 等；或类似物，并且还可使用甜味剂、芳香剂、糖浆等。

[0044] 此外，在胶囊的情况下，除了上述提及的材料以外，还可以使用液态载剂，例如脂肪油和类似物。

[0045] 用于肠胃外给药的制剂的非限制性实例可以包含注射剂、栓剂、呼吸性吸入粉末剂、喷雾剂、口腔喷雾剂、漱口剂、牙膏、软膏、涂敷粉末剂、油剂以及乳霜。

[0046] 为配制将用于肠胃外给药的本发明的益生菌医药组成物，可以使用无菌水溶液、非水性溶剂、悬浮液、乳剂、冻干制剂、用于外部涂敷的药剂等，并且可以使用作为非水溶剂和悬浮液的丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油、可注射酯例如油酸乙酯等。

[0047] 此外，更具体地说，当将本发明的益生菌医药组成物配制成注射剂时，本发明的益生菌医药组成物与稳定剂或缓冲剂混合于水中以制备溶液或悬浮液，接着制备成安瓿 (ampoule) 或小瓶 (vial) 单位剂型。此外，当将本发明的医药组成物配制成气雾剂时，可以将用于分散水分散剂或湿粉末剂的推进剂等与添加剂掺合。

[0048] 此外，当将本发明的益生菌医药组成物配制成软膏、乳霜等时，可以将动物油、植物油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅、膨润土、二氧化硅、滑石、氧化锌等用作载剂。

[0049] 本发明的益生菌医药组成物的药学有效量和有效剂量水平可以依据组成物的配制方法、给药方法、给药时间以和/或给药途径而变化，并且可以依据包含经由给予本发明的益生菌医药组成物将实现的反应类型和反应程度；给予组成物的个体的类型、年龄以及体重，一般健康状况、疾病的症状或严重程度、性别、饮食、排泄、对应个体在同时或不同时间使用的药品、其它组成物的成分等的各种因数和医学领域中众所周知的类似因数而变化，并且所属领域的普通技术人员可以判定并且处方用于针对性治疗的有效剂量。本发明的益生菌医药组成物可以一天给予一次或以多个剂量给予。因此，有效剂量并不意图以任何方式限制本发明的范围。

[0050] 本发明的医药组成物的给药途径和给药方法可以彼此独立，给药方法不受特别限制，并且给药途径和给药方法可以是只要使益生菌医药组成物能够到达对应部位的任意给药途径和给药方法。益生菌医药组成物可以口服给予或肠胃外给予。

[0051] 肠胃外给药可以是例如静脉内给药、腹膜内给药、肌肉内给药、经皮给药、皮下给药等，并且益生菌医药组成物可以涂覆或喷淋在患病部位或吸入，但本发明不限于此。

[0052] 本发明的益生菌医药组成物可以优选地以口服方式或通过注射给予。

[0053] 本发明还提供一种改善个体的肠道健康的方法，包含向个体给予益生菌医药组成物。

[0054] 根据本发明的改善肠道健康的方法包含治疗胃灼热、消化不良、腹胀、腹泻、便秘、

胀气等。

[0055] 如本文中所使用,术语“个体”是指包含哺乳动物的所有动物,哺乳动物包含小鼠、牲畜、人类等。

[0056] 在根据本发明的改善肠道健康的方法中,益生菌医药组成物的剂量、给药途径、给药方法等的详细描述与上文关于医药组成物所描述的那些相同。

[0057] 本发明还提供一种益生菌化妆品组成物,包含由以下组成的族群中选出的的一种或多种岩藻糖基低聚糖:2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基木糖以及2'-岩藻糖基琼脂二糖。

[0058] 包含岩藻糖的低聚糖可以展现稠化皮肤表皮层以缓解皱纹的功能性。因此,考虑到皮肤渗透性和吸收速率,岩藻糖基低聚糖可以展现极佳的抗皱纹活性。在岩藻糖基低聚糖当中,2'-岩藻糖基琼脂二糖可以有效地用于通过琼脂二糖自身的抗氧化活性和抗菌活性抑制或治疗特异反应、痤疮、皮屑等。

[0059] 本发明的化妆品组成物包含:水溶性维生素例如维生素B1、维生素B2、维生素B6、吡哆醇、吡哆醇盐酸盐、维生素B12、泛酸、烟酸、烟酸酰胺、叶酸、维生素C、维生素H等;油性维生素例如维生素A、胡萝卜素、维生素D2、维生素D3、维生素E(d1- α 生育酚、d- α 生育酚、d- α 生育酚等);聚合物肽例如胶原蛋白、水解胶原蛋白、明胶、弹性蛋白、水解弹性蛋白、角蛋白等;高分子多糖例如羟乙基纤维素、黄原胶、玻尿酸钠、硫酸软骨素或其盐(钠盐等)等;鞘脂例如神经酰胺、植物鞘氨醇、鞘氨醇糖脂等;或海藻提取物例如褐藻提取物、红藻提取物、绿藻提取物等。

[0060] 除了以上必不可少的成分以外,本发明的化妆品组成物还可以包含根据需要混合在一般化妆品中的其它成分。可以添加的其它混合成分可以包含油和脂肪成分:保湿剂、润肤剂、表面活性剂、有机和无机颜料、有机粉末剂、紫外线吸收剂、防腐剂、杀菌剂、抗氧化剂、植株提取物、pH调节剂、醇、染料、颜料、血液循环促进剂、冷却剂、止汗(制汗)剂、纯化水等。油和脂肪成分可以包含基于酯的油和脂肪、基于碳氢化合物的油和脂肪、基于有机硅的油和脂肪、基于氟的油和脂肪、动物油和脂肪、植物油和脂肪等。

[0061] 此外,可以添加的其它混合成分不限于以上实例,并且可以在不会不利地影响本发明的目标和效应的范围内混合。

[0062] 本发明的化妆品组成物可呈溶液、乳剂、粘性混合物等形式。

[0063] 本发明的化妆品组成物中所包含的成分可以包含化妆品组成物中作为活性成分普遍使用的成分,并且包含例如一般佐剂和载剂,例如稳定剂、增溶剂、维生素、颜料以及香精。

[0064] 本发明的化妆品组成物可以制备成本领域中通常制备的任何形式,并且其实例包含润肤液、柔肤水、爽肤水、乳液、收敛剂、乳剂、保湿乳、滋养乳、按摩霜、滋养霜、保湿霜、手霜、粉底、精华、滋养精华、面膜、肥皂、清洁泡沫剂、清洁乳剂、清洁霜、洗发剂、护发素、头发精华、洗发香波、染发液、焗油膏、身体乳液以及身体清洁剂。

[0065] 本发明还提供一种益生菌食品组成物,包含由以下组成的族群中选出的的一种或多种岩藻糖基低聚糖:2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基

木糖以及2'-岩藻糖基琼脂二糖。

[0066] 本发明的食品组成物可以用作健康功能性食品、食品添加剂或膳食补充剂。

[0067] 当用作食品添加剂时,可以根据通用方法适当地使用岩藻糖基低聚糖,例如直接地添加或与其它食品或食品成分组合混合。

[0068] 此外,将混合的岩藻糖基低聚糖的量可以根据使用目的(预防、健康或治疗性治疗)适当地改变,并且相对于食品组成物的总重量,介于优选地0.01重量%到95重量%,更优选地0.1重量%到80重量%的范围内。当量小于0.01重量%时,可以降低剂量有效性,并且当量大于95重量%时,可能存在配制困难。

[0069] 具体地说,当制备成食品或饮品时,本发明的岩藻糖基低聚糖以相对于原材料的总重量的15重量%或更小,优选地10重量%或更小的量添加。然而,在对于健康和卫生目的或对于健康控制目的而长期摄入的情况下,量可以低于在上述范围,并且由于不存在安全方面的问题,因此还可以使用大于上述范围的量的活性成分。

[0070] 食品的类型不受特别限制,但可以添加本发明的岩藻糖基低聚糖的食品的实例包含肉、香肠、面包、巧克力、糖果、零食、蜜饯、披萨、速食面条、其它面条、软糖、包含冰淇淋的乳制品、各种汤、饮品、茶、饮料、酒精饮料、维生素复合物等,并且包含所有寻常意义上的健康食品。

[0071] 当将本发明的食品组成物制备作为饮品时,食品组成物可以包含额外成分,例如各种风味增强剂或如一般饮品的天然碳水化合物。作为天然碳水化合物,可以使用单糖例如葡萄糖和果糖;二糖例如麦芽糖和蔗糖;天然甜味剂例如糊精和环糊精;以及合成甜味剂例如糖精和阿斯巴甜。相对于本发明的食品组成物的总重量,天然碳水化合物的含量为0.01重量%到10重量%,优选地0.01重量%到0.1重量%。

[0072] 本发明的食品组成物可以包含各种营养补充剂、维生素、电解质、香料、着色剂、果胶酸和其盐、褐藻酸和其盐、有机酸、保护性胶体增稠剂、pH调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇、在碳酸化饮品中使用的碳化剂等,并且可以包含用于制备天然果汁、果汁饮品以及植物饮品的果肉,但本发明不限于此。可以单独使用这些成分或可以使用其组合。这些添加剂的比例不受特别限制,但可以在相对于本发明的食品组成物的总重量的0.01重量%到0.1重量%的范围内。

[0073] 在对于健康和卫生目的或对于健康控制目的而长期摄入的情况下,由于不存在安全方面的问题,因此可以长时间段的摄入本发明的食品组成物。

[0074] 本发明还提供一种产生岩藻糖基低聚糖的方法,包含使糖受体(sugar acceptor)和GDP-L-岩藻糖(鸟苷5'-二磷酸- β -L-岩藻糖)供体与 α -1,2-岩藻糖基转移酶(α -1,2-fucosyltransferase)反应以产生岩藻糖基低聚糖。

[0075] 其中糖受体包含由以下组成的族群中选出的一种或多种:葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖以及琼脂二糖,以及

[0076] α -1,2-岩藻糖基转移酶包含由SEQ ID NOS:1到3的氨基酸序列中选出的任何一个。

[0077] 作为习知的用于产生岩藻糖基低聚糖的方法,化学合成2-岩藻糖基半乳糖是已知的,但这个方法具有复杂的合成工艺并且使用有机溶剂(例如吡啶、乙酸、二氯甲烷以及甲苯),并且甚至在许多工艺之后,可能只以衍生形式而不是以2-岩藻糖基半乳糖合成

(Kalovidouris SA等人,美国化学会志第127期:1340-1341 (2005))。

[0078] 然而,在根据本发明的产生岩藻糖基低聚糖的方法中,通过使糖受体和GDP-L-岩藻糖供体与 α -1,2-岩藻糖基转移酶反应,可以产生不是衍生形式的岩藻糖基低聚糖。此外,有可能使用各种糖受体产生不同类型的岩藻糖基低聚糖(见图1)。

[0079] 糖受体可以由以下组成的族群中选出:葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖以及琼脂二糖。

[0080] α -1,2-岩藻糖基转移酶可以从幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、大肠杆菌(*E.coli*) 0126等衍生,并且尤其可以包含由SEQ ID NOS:1到3的氨基酸序列中选出的任何一个。

[0081] 根据本发明的一个实施例, α -1,2-岩藻糖基转移酶根据糖受体的类型展示反应性的差异。举例来说,脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)衍生的WcfB对于纤维二糖、半乳糖以葡萄糖展现高活性,大肠杆菌(*E.coli*) 0126衍生的WbgL对于乳糖和半乳糖展现高活性,且幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)衍生的FucT2对于纤维二糖和半乳糖展现高活性。

[0082] 糖受体和GDP-L-岩藻糖供体与 α -1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应可以在20°C到40°C下执行3小时到24小时,更具体地说,在25°C到35°C下执行6小时到12小时。

[0083] 通过根据本发明的产生岩藻糖基低聚糖的方法所产生的岩藻糖基低聚糖可以是2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基乳糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基木糖或2'-岩藻糖基琼脂二糖。

[0084] 本发明还提供一种产生岩藻糖基低聚糖的方法,包含:在存在糖受体(sugar acceptor)和甘油的情况下培养重组大肠杆菌或酵母菌,所述重组大肠杆菌或酵母菌中引入用于表达参与用于产生GDP-L-岩藻糖(鸟苷5'-二磷酸- β -L-岩藻糖)供体的从头合成途径(De novo pathway)的ManB、ManC、Gmd以及WcaG的载体;和用于表达 α -1,2-岩藻糖基转移酶(α -1,2-fucosyltransferase)的载体;以及从大肠杆菌培养物中分离并且纯化岩藻糖基低聚糖,

[0085] 其中糖受体包含由以下组成的族群中选出的一种或多种:葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖以及琼脂二糖,以及

[0086] α -1,2-岩藻糖基转移酶包含由SEQ ID NOS:1到3的氨基酸序列中选出的任何一个。

[0087] 根据一种产生2-岩藻糖基乳糖的方法,2-岩藻糖基乳糖为岩藻糖基低聚糖,通过采用习知的微生物代谢工程技术的发酵,使用螺旋杆菌属衍生的岩藻糖基转移酶由乳糖产生2-岩藻糖基乳糖,但这是不利的,因为其并不可能产生各种岩藻糖基低聚糖。

[0088] 相比之下,根据根据本发明的产生岩藻糖基低聚糖的方法,可以通过采用微生物代谢工程技术的微生物发酵来产生不同类型的岩藻糖基低聚糖,并且为了这个目的,将其删除了用作糖受体的材料的代谢路径的大肠杆菌或酵母菌用作宿主,将从头合成途径引入到宿主中以产生GDP-1-岩藻糖作为供体,糖物质供应为受体、甘油用作碳源,以及引入 α -1,2-岩藻糖基转移酶,从而通过发酵来产生岩藻糖基低聚糖。因此,本发明的方法可以包含:

[0089] 建构用于表达参与用于产生在大肠杆菌中作为供体的GDP-L-岩藻糖(鸟苷5'-二

磷酸- β -L-岩藻糖)的从头合成途径(De novo pathway)的ManB、ManC、Gmd以及WcaG的载体和用于表达 α -1,2-岩藻糖基转移酶(α -1,2-fucosyltransferase)的载体;

[0090] 将载体引入到其中删除了用作糖受体的材料的代谢路径的大肠杆菌或酵母菌中以转化大肠杆菌或酵母菌;

[0091] 在糖受体存在的情况下使用甘油作为碳源来培养转化的大肠杆菌或酵母菌;以及

[0092] 从培养物中分离并且纯化岩藻糖基低聚糖。

[0093] 用于产生GDP-L-岩藻糖的从头合成途径是一种途径,其中通过使用果糖6P作为起始材料和甘露糖-6-磷酸异构酶(mannose-6-phosphate isomerase,ManM)、磷酸甘露糖变位酶(phosphomannomutase,ManB)、甘露糖-1-磷酸鸟苷基转移酶(mannose-1-phosphate guanosyltransferase,ManC)、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶(GDP-mannose-4,6-dehydratase,Gmd)以及GDP-L-岩藻糖合成酶(GDP-L-fucose synthase,WcaG),依序地产生中间产物例如甘露糖6P(mannose 6P)、甘露糖1P(mannose 1P)、GDP-D-甘露糖(GDP-D-mannose)以及GDP-4-酮-6-脱氧甘露糖(GDP-4-keto-6-deoxymannose)并且最终产生GDP-L-岩藻糖。

[0094] 所转化的大肠杆菌的培养物可以包含分批进料培养物(Fed-batch culture)。

[0095] 分批进料培养可以在25°C到37°C下执行2小时到60小时,并且可以添加IPTG(异丙基 β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷)且分批进料培养可以在20°C到30°C下执行60小时到150小时。

[0096] 在下文中,将参考以下实例进一步详细地描述本发明,但这些实例不意欲限制本发明的范围。

[0097] 发明的模式

[0098] <实例1>岩藻糖基低聚糖的合成

[0099] 为了产生各种岩藻糖基低聚糖,在GDP-岩藻糖供体和各种糖受体的条件下执行 α -1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应(图1)。

[0100] 作为 α -1,2-岩藻糖基转移酶,使用大肠杆菌(*E.coli*)衍生的WbgL(基因库:ABE98421.1)、幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)衍生的FucT2(基因库:AAC99764.1)以及从脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)衍生的WcfB(基因库:AAD40713.1)。将含有编码每种酶的基因的pET21a质体载体转化成大肠杆菌(*E.coli*)BL21(DE3)star。每种重组大肠杆菌是在37°C下和250rpm下培养直到OD 0.5为止,并且然后在16°C下和250rpm下使用0.1毫摩尔的IPTG诱导酶表达18小时。

[0101] 图1示出用于通过 α -1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应使用GDP岩藻糖供体和各种糖受体产生不同类型的岩藻糖基低聚糖的视图,其中使用糖受体进行其反应性的实验,糖受体例如葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖以及琼脂二糖。

[0102] 为了产生琼脂二糖,执行琼脂糖的酸水解。在90°C下使用2%磷酸使10%(w/w)琼脂糖进行酸水解反应3小时。在酸水解之后,将氢氧化钙添加到反应溶液中以中和且去除磷酸。

[0103] 针对 α -1,2-岩藻糖基转移酶与各种糖受体之间的酶反应性的实验按以下进行。允许2毫摩尔的GDP-岩藻糖供体、5毫摩尔的每种糖受体、1毫摩尔的1,4-二硫苏糖醇(DTT)、50毫摩尔的Tris-HCl(pH 7.0)以及5毫克/毫升的表达WbgL、FucT2或WcfB的大肠杆菌细胞内的粗酶溶液在30°C下和600rpm下反应12小时。

[0104] 如图2所示,脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 衍生的WcfB对于纤维二糖、半乳糖以葡萄糖展现高活性,大肠杆菌 (*E.coli*) 0126衍生的WbgL对于乳糖和半乳糖展现高活性,且幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 衍生的FucT2对于纤维二糖和半乳糖展现高活性。

[0105] <实例2>各种糖受体的 α -1,2-岩藻糖基转移酶的酶反应

[0106] 岩藻糖基低聚糖是使用GDP-岩藻糖供体和半乳糖或葡萄糖作为受体通过WbgL的酶反应来产生的,其为 α -1,2-岩藻糖基转移酶。酶反应中所使用的糖受体是葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖以及琼脂二糖。酶反应条件如下:使用1毫克/毫升的每种重组大肠杆菌的细胞内粗酶溶液、0.2毫摩尔的GDP-岩藻糖供体、0.5毫摩尔的糖受体以及20毫摩尔的磷酸钠缓冲剂 (pH 6.0) 以允许酶反应在30℃下保持12小时。对反应产物进行LC/MS分析以确认准确的质量值。在LC/MS分析中,使用赛默飞世尔多孔石墨碳LC管柱(赛默飞世尔科技)并且使用正离子模式。两个流动相,例如25微摩尔氯化锂溶液作为流动相A和100%乙腈溶液作为流动相B,以0.2毫升/分钟的比率以及0%到80%的梯度流动41分钟。此时,管柱的温度保持在70℃下。源相关参数如下:1.5升/分钟的喷洒气体流、4.5千伏的界面电压、1.65千伏的检测器电压、200℃的弯曲脱溶剂化线 (CDL) 温度以及200℃的加热块温度。MS分析在100m/z到700m/z的范围内进行。

[0107] 如图3到图5中所示出,确认了每种糖受体都产生了2'-岩藻糖基葡萄糖、2'-岩藻糖基半乳糖、2'-岩藻糖基纤维二糖、2'-岩藻糖基乳糖、2'-岩藻糖基果糖、2'-岩藻糖基蔗糖、2'-岩藻糖基麦芽糖、2'-岩藻糖基甘露糖、2'-岩藻糖基木糖或2'-岩藻糖基琼脂二糖。

[0108] <实例3>使用代谢工程技术产生岩藻糖基半乳糖

[0109] 采用代谢工程从重组大肠杆菌产生FGal,其为生物活性物质,并且然后进行发酵。图6的A是使用重组大肠杆菌产生FGal的视图,其中为了在大肠杆菌细胞中产生GDP-岩藻糖供体,引入参与从头合成途径 (de novo pathway) 的酶ManB、ManC、Gmd以及WcaG并且将半乳糖供应为受体。为了使用半乳糖作为受体,将不能够代谢半乳糖的大肠杆菌 (*E.coli*) BL21 (DE3) 菌株用作宿主。幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 衍生的FucT2用作 α -1,2-岩藻糖基转移酶并且将甘油供应为碳源。在37℃下将重组大肠杆菌在含有2克/升的半乳糖和5克/升的甘油的LB培养液培养基中培养6小时,并且将IPTG添加到其中,接着在温度降低到25℃之后进行培养。

[0110] 如图6的B中所示出,在分批发酵90小时之后产生了1.7克/升的FGal。

[0111] 图6的C示出分批进料发酵结果,其中在90小时的发酵之后产生了约12克/升的FGal,并且在120小时的发酵之后产生了最大17.7克/升的FGal。

[0112] <实例4>检验通过代谢工程技术所产生的2-岩藻糖基半乳糖的结构

[0113] 为了确认经由重组大肠杆菌产生的FGal的结构,从培养物中纯化FGal。此时,将G-10管柱树脂和水用作流动相以执行尺寸排阻色谱,并且执行HPLC分析以确认纯化具有高纯度的FGal部分。在HPLC分析中,使用Rezex ROA-有机酸H+ (8%) 管柱(飞诺美公司),并且0.005N的硫酸溶液在50℃下以0.6毫升/分钟的速率流动。

[0114] 为了确认所纯化的FGal的 α -1,2-糖苷键,FGal作为底物经历从木薯黄单胞菌属 (*Xanthomonas manihotis*) 衍生的 α -1,2-岩藻糖苷酶的酶反应。

[0115] 为这个目的,将编码从木薯黄单胞菌属 (*Xanthomonas manihotis*) 衍生的 α -1,2-

岩藻糖苷酶 (NCBI参考序列:WP_017167782.1) 的基因引入到pETduet载体中,并且然后将载体转化成大肠杆菌 (*E.coli*) BL21 (DE3) 菌株。在酶反应期间,使用1毫克/毫升的FGal作为底物和使用1毫克/毫升的重组大肠杆菌的细胞内粗酶并且在30℃下在20毫摩尔的Tris-HCl缓冲剂 (pH 7.0) 中执行酶反应6小时。此时,作为对照,使用含有不含编码酶的基因的空白载体的重组大肠杆菌的细胞内粗酶来执行酶反应。

[0116] 如图7中所示出, α -1,2-糖苷键通过纯化的2FG的 α -1,2-岩藻糖苷酶的酶反应来检验。

[0117] <实例5>检验2-岩藻糖基半乳糖的益生菌特性

[0118] 为了检验FGal的益生菌效应,监测菌株例如长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum subsp.infantis*) ATCC 15697和两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) DSM 20082的细胞生长。此外,为了进行病原性微生物对发酵FGal的能力的测试,监测菌株例如大肠杆菌 (*E.coli*) 01:K1:H7和鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella enterica serovar typhimurium*) 的细胞生长。此时,培养基含有10克/升的细菌蛋白胨、5克/升的酵母提取物、2克/升的无水K₂HPO₄、5克/升的无水醋酸钠、2克/升的柠檬酸三铵、0.2克/升的硫酸镁七水合物、0.05克/升的硫酸锰、1毫升/升的吐温80 (聚山梨醇酯80)、0.5克/升的半胱氨酸以及3克/升的纯化FGal,并且在37℃下培养菌株。

[0119] 如图8中所示出,确认了两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) DSM 20082首先在细胞外将FGal分解成岩藻糖和半乳糖,并且然后代谢少量的半乳糖,以及长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum subsp.infantis*) ATCC 15697通过细胞内岩藻糖苷酶将FGal分解成半乳糖和岩藻糖并且使用两者。

[0120] 如图9中所示出,病原性微生物不能够代谢FGal。

[0121] 工业适用性

[0122] 根据本发明,岩藻糖基低聚糖可以基于其益生菌特性而用作医疗、化妆以及食品领域中的益生菌材料。

<110> 高丽大学校产学协力团
 <120> 各种新颖岩藻糖基低聚糖的制备方法和其用途
 <130> X18U13C0183
 <150> KR 10-2017-0154840
 <151> 2017-11-20
 <160> 3
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> 脆弱拟杆菌
 <400> 1

```

Met Leu Tyr Val Ile Leu Arg Gly Arg Leu Gly Asn Asn Leu Phe Gln
1           5           10           15
Ile Ala Thr Ala Ala Ser Leu Thr Gln Asn Phe Ile Phe Cys Thr Val
           20           25           30
Asn Lys Asp Gln Glu Arg Gln Val Leu Leu Tyr Lys Asp Ser Phe Phe
           35           40           45
Lys Asn Ile Lys Val Met Lys Gly Val Pro Asp Gly Ile Pro Tyr Tyr
           50           55           60
Lys Glu Pro Phe His Glu Phe Ser Arg Ile Pro Tyr Glu Glu Gly Lys
65           70           75           80
Asp Leu Ile Ile Asp Gly Tyr Phe Gln Ser Glu Lys Tyr Phe Lys Arg
           85           90           95
Ser Val Val Leu Asp Leu Tyr Arg Ile Thr Asp Glu Leu Arg Lys Lys
           100          105          110
Ile Trp Asn Ile Cys Gly Asn Ile Leu Glu Lys Gly Glu Thr Val Ser
           115          120          125
Ile His Val Arg Arg Gly Asp Tyr Leu Lys Leu Pro His Ala Leu Pro
           130          135          140
Phe Cys Gly Lys Ser Tyr Tyr Lys Asn Ala Ile Gln Tyr Ile Gly Glu
145          150          155          160
Asp Lys Ile Phe Ile Ile Cys Ser Asp Asp Ile Asp Trp Cys Lys Lys
           165          170          175
Asn Phe Ile Gly Lys Arg Tyr Tyr Phe Ile Glu Asn Thr Thr Pro Leu
           180          185          190
Leu Asp Leu Tyr Ile Gln Ser Leu Cys Thr His Asn Ile Ile Ser Asn
           195          200          205
  
```

Ser Ser Phe Ser Trp Trp Gly Ala Trp Leu Asn Glu Asn Ser Asn Lys
 210 215 220
 Ile Val Ile Ala Pro Gln Met Trp Phe Gly Ile Ser Val Lys Leu Gly
 225 230 235 240
 Val Ser Asp Leu Leu Pro Val Ser Trp Val Arg Leu Pro Asn Asn Tyr
 245 250 255
 Thr Leu Gly Arg Tyr Cys Phe Ala Leu Tyr Lys Val Val Glu Asp Tyr
 260 265 270
 Leu Leu Asn Ile Leu Arg Leu Ile Trp Lys Arg Lys Lys Asn Met
 275 280 285
 <210> 2
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌 0126
 <400> 2
 Met Ser Ile Ile Arg Leu Gln Gly Gly Leu Gly Asn Gln Leu Phe Gln
 1 5 10 15
 Phe Ser Phe Gly Tyr Ala Leu Ser Lys Ile Asn Gly Thr Pro Leu Tyr
 20 25 30
 Phe Asp Ile Ser His Tyr Ala Glu Asn Asp Asp His Gly Gly Tyr Arg
 35 40 45
 Leu Asn Asn Leu Gln Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln Tyr Tyr Thr Pro
 50 55 60
 Lys Ile Asn Asn Ile Tyr Lys Leu Leu Val Arg Gly Ser Arg Leu Tyr
 65 70 75 80
 Pro Asp Ile Phe Leu Phe Leu Gly Phe Cys Asn Glu Phe His Ala Tyr
 85 90 95
 Gly Tyr Asp Phe Glu Tyr Ile Ala Gln Lys Trp Lys Ser Lys Lys Tyr
 100 105 110
 Ile Gly Tyr Trp Gln Ser Glu His Phe Phe His Lys His Ile Leu Asp
 115 120 125
 Leu Lys Glu Phe Phe Ile Pro Lys Asn Val Ser Glu Gln Ala Asn Leu
 130 135 140
 Leu Ala Ala Lys Ile Leu Glu Ser Gln Ser Ser Leu Ser Ile His Ile
 145 150 155 160
 Arg Arg Gly Asp Tyr Ile Lys Asn Lys Thr Ala Thr Leu Thr His Gly
 165 170 175
 Val Cys Ser Leu Glu Tyr Tyr Lys Lys Ala Leu Asn Lys Ile Arg Asp
 180 185 190

Leu Ala Met Ile Arg Asp Val Phe Ile Phe Ser Asp Asp Ile Phe Trp
 195 200 205
 Cys Lys Glu Asn Ile Glu Thr Leu Leu Ser Lys Lys Tyr Asn Ile Tyr
 210 215 220
 Tyr Ser Glu Asp Leu Ser Gln Glu Glu Asp Leu Trp Leu Met Ser Leu
 225 230 235 240
 Ala Asn His His Ile Ile Ala Asn Ser Ser Phe Ser Trp Trp Gly Ala
 245 250 255
 Tyr Leu Gly Ser Ser Ala Ser Gln Ile Val Ile Tyr Pro Thr Pro Trp
 260 265 270
 Tyr Asp Ile Thr Pro Lys Asn Thr Tyr Ile Pro Ile Val Asn His Trp
 275 280 285
 Ile Asn Val Asp Lys His Ser Ser Cys
 290 295
 <210> 3
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> 幽门螺旋杆菌
 <400> 3
 Met Ala Phe Lys Val Val Gln Ile Cys Gly Gly Leu Gly Asn Gln Met
 1 5 10 15
 Phe Gln Tyr Ala Phe Ala Lys Ser Leu Gln Lys His Leu Asn Thr Pro
 20 25 30
 Val Leu Leu Asp Thr Thr Ser Phe Asp Trp Ser Asn Arg Lys Met Gln
 35 40 45
 Leu Glu Leu Phe Pro Ile Asp Leu Pro Tyr Ala Asn Ala Lys Glu Ile
 50 55 60
 Ala Ile Ala Lys Met Gln His Leu Pro Lys Leu Val Arg Asp Ala Leu
 65 70 75 80
 Lys Tyr Ile Gly Phe Asp Arg Val Ser Gln Glu Ile Val Phe Glu Tyr
 85 90 95
 Glu Pro Lys Leu Leu Lys Pro Ser Arg Leu Thr Tyr Phe Phe Gly Tyr
 100 105 110
 Phe Gln Asp Pro Arg Tyr Phe Asp Ala Ile Ser Ser Leu Ile Lys Gln
 115 120 125
 Thr Phe Thr Leu Pro Pro Pro Pro Glu Asn Asn Lys Asn Asn Asn Lys
 130 135 140
 Lys Glu Glu Glu Tyr Gln Arg Lys Leu Ser Leu Ile Leu Ala Ala Lys
 145 150 155 160

Asn	Ser	Val	Phe	Val	His	Ile	Arg	Arg	Gly	Asp	Tyr	Val	Gly	Ile	Gly	
				165			170				175					
Cys	Gln	Leu	Gly	Ile	Asp	Tyr	Gln	Lys	Lys	Ala	Leu	Glu	Tyr	Met	Ala	
				180			185				190					
Lys	Arg	Val	Pro	Asn	Met	Glu	Leu	Phe	Val	Phe	Cys	Glu	Asp	Leu	Lys	
				195			200				205					
Phe	Thr	Gln	Asn	Leu	Asp	Leu	Gly	Tyr	Pro	Phe	Thr	Asp	Met	Thr	Thr	
				210			215				220					
Arg	Asp	Lys	Glu	Glu	Glu	Ala	Tyr	Trp	Asp	Met	Leu	Leu	Met	Gln	Ser	
225				230			235				240					
Cys	Lys	His	Gly	Ile	Ile	Ala	Asn	Ser	Thr	Tyr	Ser	Trp	Trp	Ala	Ala	
				245			250				255					
Tyr	Leu	Met	Glu	Asn	Pro	Glu	Lys	Ile	Ile	Ile	Gly	Pro	Lys	His	Trp	
				260			265				270					
Leu	Phe	Gly	His	Glu	Asn	Ile	Leu	Cys	Lys	Glu	Trp	Val	Lys	Ile	Glu	
				275			280				285					
Ser	His	Phe	Glu	Val	Lys	Ser	Gln	Lys	Tyr	Asn	Ala					
290				295			300									

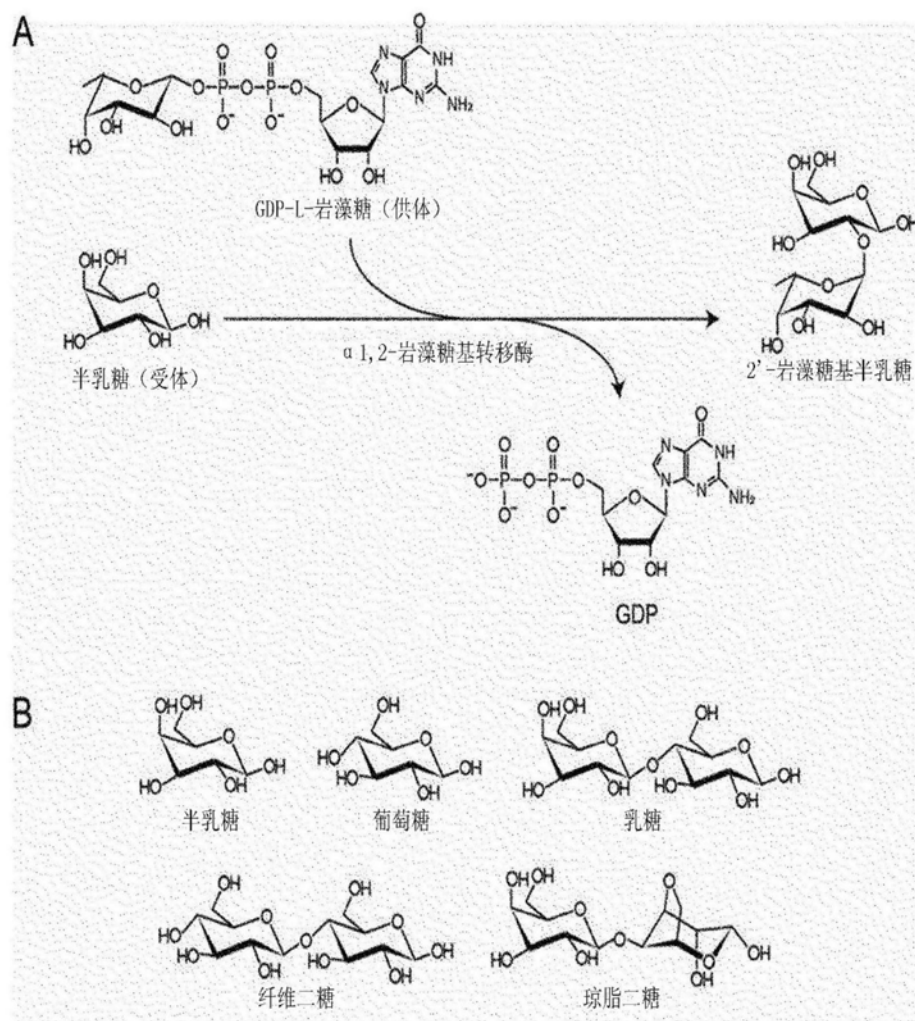


图1

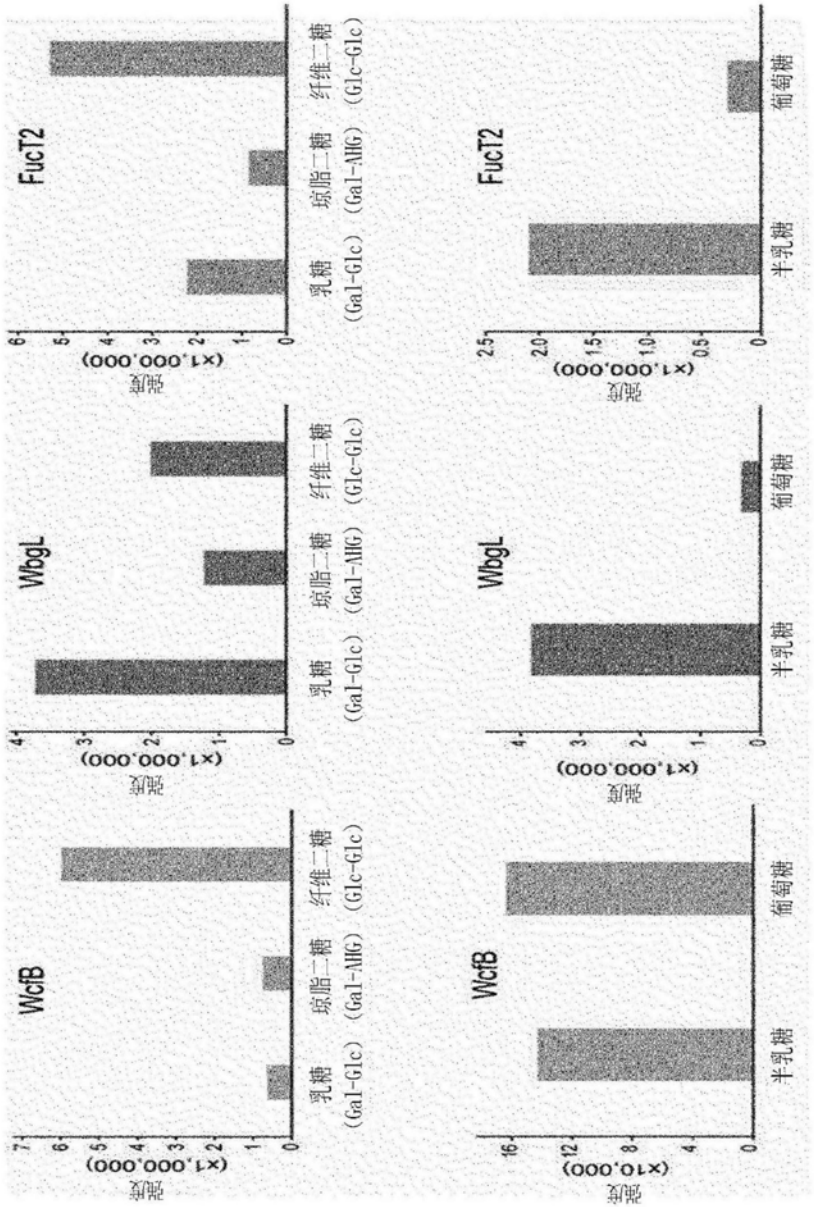


图2

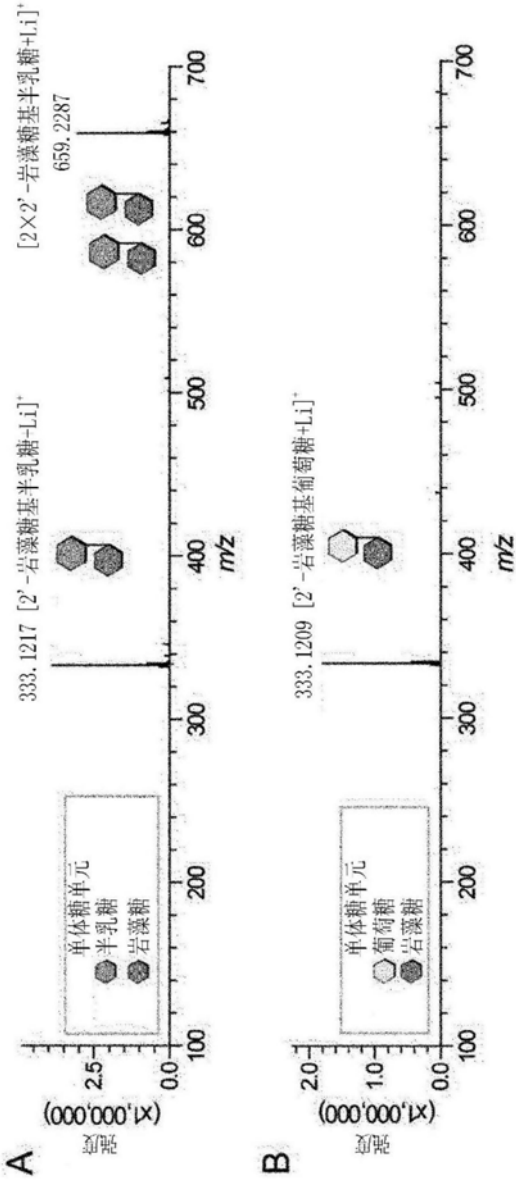


图3

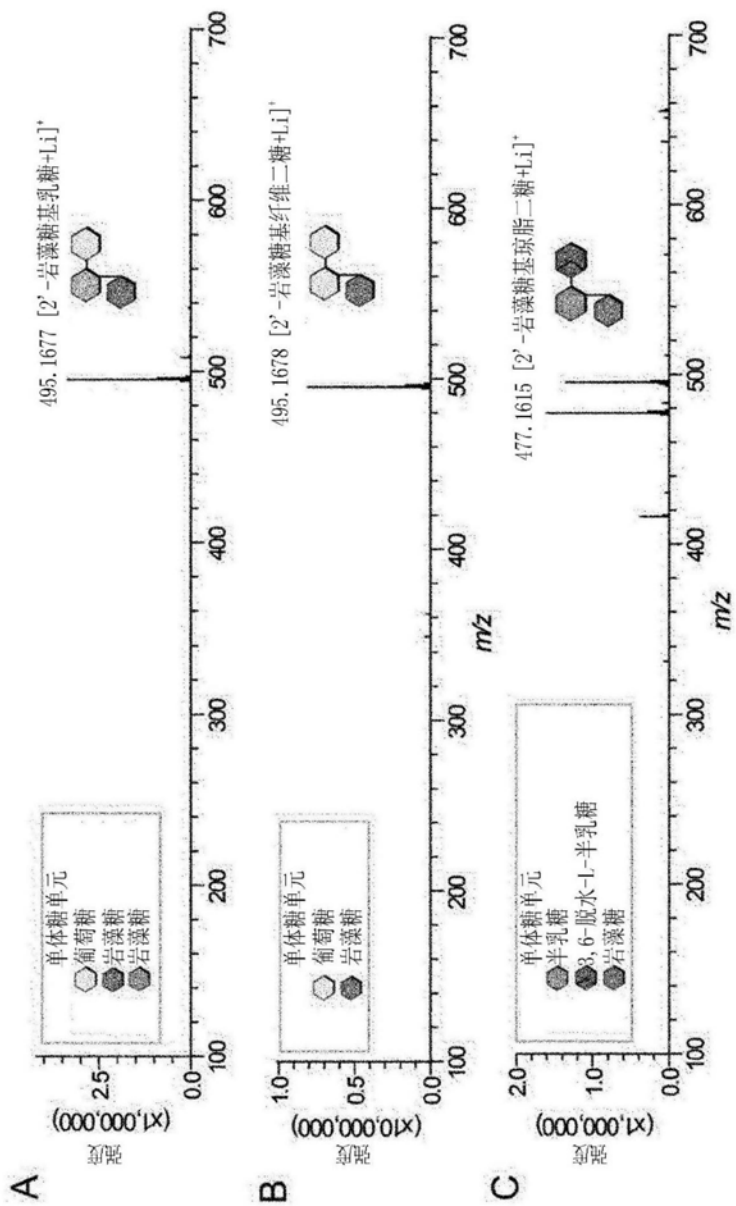


图4

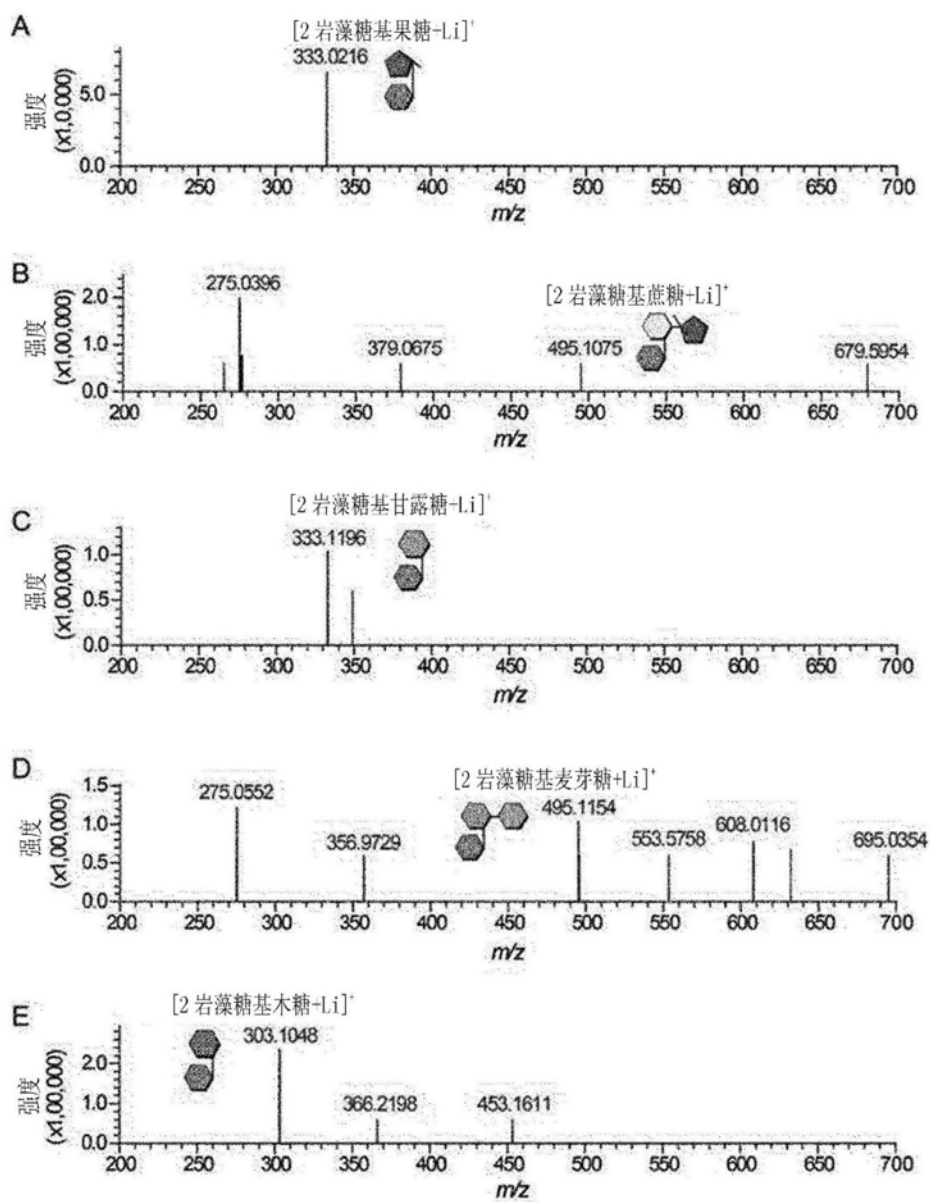


图5

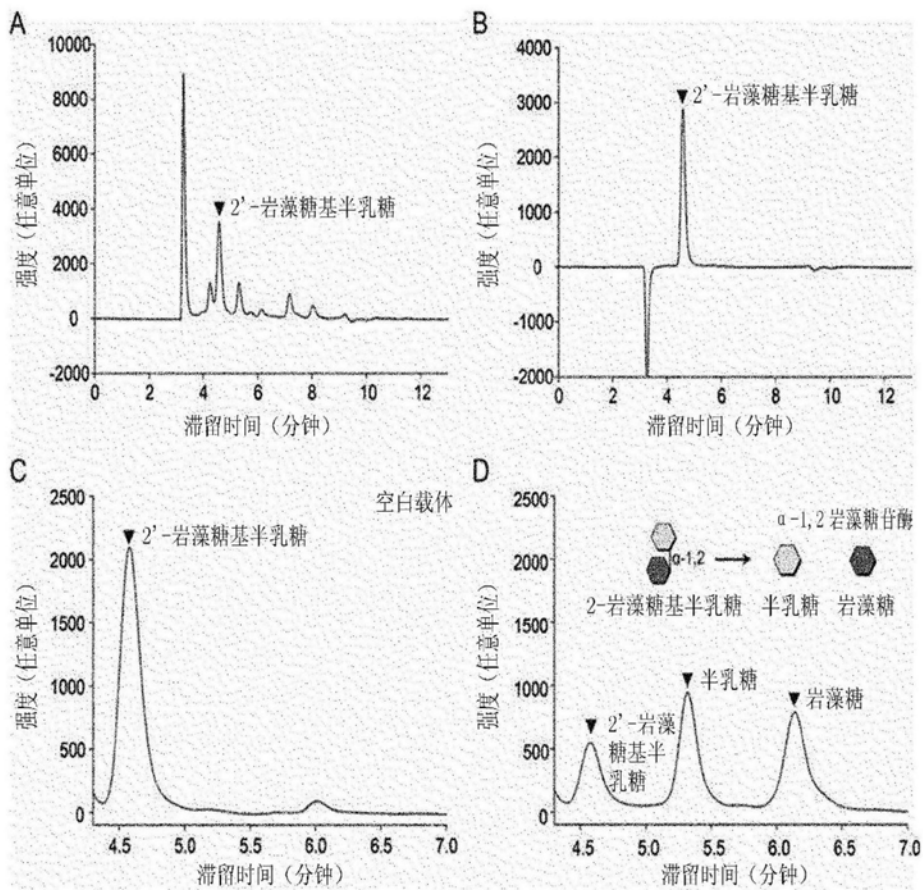


图7

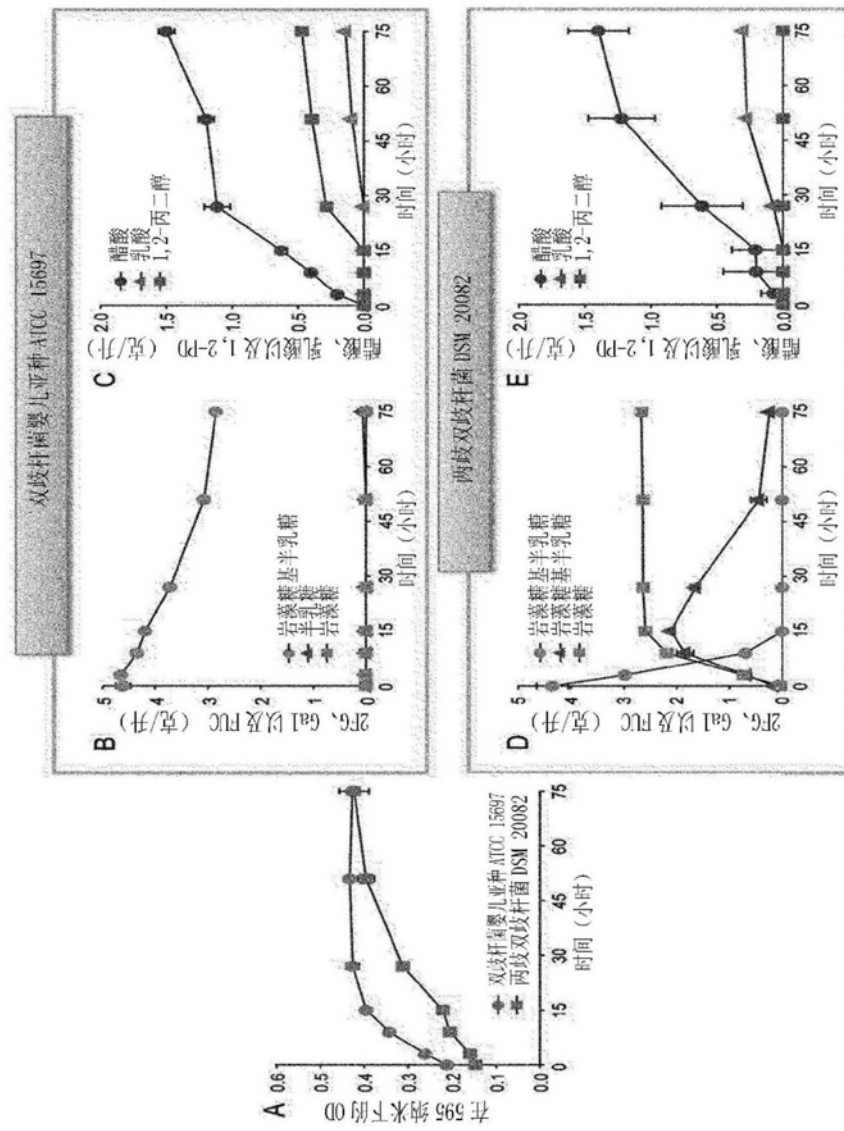


图8

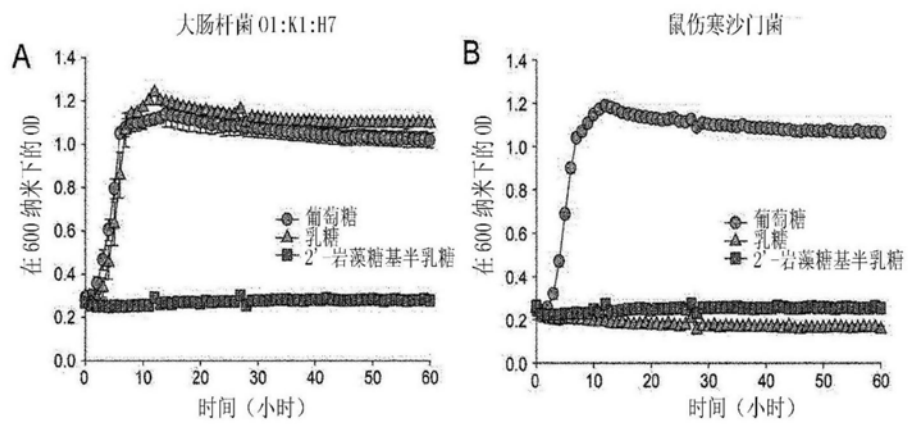


图9