



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107109447 B

(45) 授权公告日 2021. 07. 06

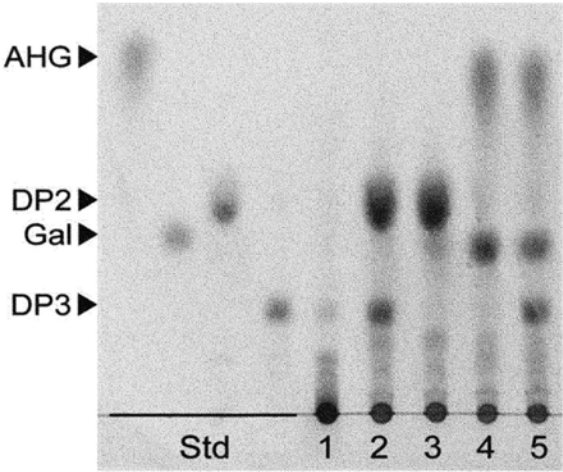
(21) 申请号 201580053892.4
(22) 申请日 2015.10.01
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107109447 A
(43) 申请公布日 2017.08.29
(30) 优先权数据
10-2014-0132401 2014.10.01 KR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.04.01
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2015/010384 2015.10.01
(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/053025 KO 2016.04.07
(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔市
(72) 发明人 金京宪 崔仁杰 李赞炯 尹银珠

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所
11410
代理人 唐雯
(51) Int.Cl.
C12P 19/02 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
(56) 对比文件
CN 1188510 A,1998.07.22
CN 101475914 A,2009.07.08
张力.新型 β -琼胶酶工程菌株的构建、重组表达及体外复性的研究.《中国学位论文全文数据库》.2007,
万小飞. β -琼胶酶的特性研究.《中国学位论文全文数据库》.2008,
审查员 李梦华

权利要求书1页 说明书7页
序列表10页 附图2页

(54) 发明名称
通过使用缓冲液预处理提高琼脂中单糖生产产率的方法

(57) 摘要
本发明涉及一种通过使用缓冲液预处理来改善琼脂中单糖的生产产率的方法,并且通过使用琼脂代替琼脂糖作为初始底物,使用缓冲液作为预处理溶液,并依次使用琼脂酶、琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶和 α -新琼脂二糖水解酶作为酶水解中使用的酶,而具有有效改善作为单糖的3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的效果。



1. 一种用于改善3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的方法,其包括:

在100℃至200℃下用pH 6至pH 9的缓冲液预处理琼脂1分钟至1小时,其中,所述缓冲液选自Tris-HCl、乙酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠和甘氨酸-NaOH组成的组中的一种或多种;以及

用琼脂酶、琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶和 α -新琼脂二糖水解酶顺序地水解经预处理的琼脂,

其中,所述琼脂酶由SEQ ID NO.1的氨基酸序列组成,

其中,所述琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶由SEQ ID NO.3的氨基酸序列组成,

其中,所述 α -新琼脂二糖水解酶由SEQ ID NO.5的氨基酸序列组成,并且

其中,用琼脂酶、琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶和 α -新琼脂二糖水解酶对经预处理的琼脂进行的每一次水解在20℃至40℃和0rpm至200rpm下进行30分钟至7天。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,在预处理中的缓冲液中,所述琼脂的浓度为0.1%至5% (重量/体积)。

3. 根据权利要求1所述的方法,其还包括:

在水解前对预处理产物进行中和。

通过使用缓冲液预处理提高琼脂中单糖生产产率的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种使用缓冲液作为预处理溶剂以从琼脂中酶促产生单糖来改善单糖例如3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的方法。

背景技术

[0002] 海藻与目前在各种领域中使用的木质纤维素或草本生物物质相比,具有低含量的不适用的组分例如木质素等,因此能够转化为单糖,其是用于更容易生产生物能源和生物化学的原材料。此外,由于海藻不使用生物物质资源,因此它们也没有由于生物物质资源的增能而引起的问题。由于这样的原因,海藻作为生物化学以及替代能量的生产中的重要生物物质已经受到关注(Wi等,Bioresour Technol,100(2009),第6658-6660页)。

[0003] 特别地,已经报道红藻(例如,苍耳(*Gelidium amansii*))是用于产生这样的生物能和生物化学物质的来源,并且还高度适用于医疗和化妆品领域,因为其成分琼脂低聚糖具有优异的生理特性,例如抗氧化、抗炎症、抗癌、抗过敏、美白、保湿活性等(Tomono等,美国专利No.76622291(2009),Enoki等,美国专利No.691143282(2005),Chen等,Food Technol Biotechnol.43(1)第29-36页(2005),Chen等,Nut J.5(31)第1-12(2006))。红藻具有琼脂糖作为主要成分,其是由 α -1,3键连接3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖作为基本单元的新琼脂二糖的聚合物,其通过 β -1,4键相互连接。

[0004] 发明人通过实验证明,包括新琼脂二糖的琼脂低聚糖的生理功能是由3,6-脱水-L-半乳糖引起的(Yun等,Appl Microbiol Biotechnol.97(7)第2961-70页(2013))。此外,通过温和的化学预处理代替化学处理来生产3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖的方法(Jol等,Anal Biochem.268,第213-222页(1999),Kim等,Bull Korean Soc.31(2)第511-514页(2010)),其在3,6-脱水-L-半乳糖的生产中具有非常低的产率和容易过度降解的问题,并且已经报道了酶糖化(韩国专利公开号2013-0085017)。

[0005] 琼脂低聚糖通过Aga50D降解为主要反应产物即新琼脂二糖和新琼脂三糖(D-半乳糖- β -1,4连接-3,6-脱水-L-半乳糖- α -1,3连接-D-半乳糖),所述Aga50D是在化学预处理后处理的外切型琼脂酶。之后,新琼脂二糖通过 α -新琼脂二糖水解酶SdNABH最终水解成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖(韩国专利公开号2010-0108241)。在该方法中,虽然预处理对于提高Aga50D的反应性是必要的,但是目前使用的用弱酸的温和化学预处理方法需要中和或冻干以用于随后的酶反应,从而产生大量的中和中产生的盐以及相当数量的处理费用。此外,当进行化学预处理时,主要降解3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖之间的 α -1,3键,并且当处理外切型 β -琼脂酶时,最终保留琼脂三糖,而不降解成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖,这也成为降低单糖的生产产率的原因。此外,到目前为止,在3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖的生产中,琼脂糖已经用作初始底物,并且通过重复数次的分离和纯化过程由红藻产生,因此是昂贵的。

[0006] 因此,需要开发能够简化整个过程、降低整个过程的成本并提高单糖的生产产率的工艺技术。

发明内容

[0007] [技术问题]

[0008] 本发明的目的是提供一种通过使用琼脂作为底物来提高单糖例如3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的方法,以简化生产过程并降低生产的单位成本,并且适当地使用预处理溶剂和在酶水解中使用的水解酶。

[0009] [技术方案]

[0010] 为了实现该目的,本发明提供了一种用于提高3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的方法,其包括:用pH6至9的缓冲液预处理琼脂;以及用琼脂酶、琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶(agarolytic β -galactosidase)和 α -新琼脂二糖水解酶顺序地水解经预处理的琼脂。

[0011] [有益效果]

[0012] 本发明具有有效地提高单糖例如3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的效果,其通过使用比琼脂糖便宜的琼脂作为初始底物和使用缓冲液作为预处理溶剂,并且依次应用琼脂酶、琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶和 α -新琼脂二糖水解酶作为酶水解所用的酶,大大减少了在预处理琼脂的中和中产生的盐的量,降低了生产的单位成本并简化了生产工艺。

附图说明

[0013] 图1显示了作为底物的预处理琼脂和通过与酶反应获得的产物的薄层色谱(TLC)结果:Std是标准,使用3,6-脱水-L-半乳糖(AHG)、新琼脂二糖(DP2)、半乳糖(Gal)和琼脂三糖(DP3),道1是预处理的琼脂,道2是用琼脂酶(Aga50D)处理预处理琼脂获得的产物,道3是用琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶(ABG)处理琼脂酶产物获得的产物,道4是用 α -新琼脂二糖水解酶(NABH)处理琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶产物获得的产物,道5是用NABH而没有用ABG处理琼脂酶产物获得的产物。

[0014] 图2显示了使用琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶(ABG)通过高效液相色谱法(HPLC)获得的3,6-脱水-L-半乳糖的生产产率的定量分析结果。

[0015] 图3显示了使用琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶(ABG)通过HPLC获得的D-半乳糖的生产产率的定量分析结果。

具体实施方式

[0016] 下面将详细描述本发明的构造。

[0017] 在说明书中描述数值范围时,术语“至”应当被理解为包括每个数值范围的阈值。例如,应当注意,pH 6至9是包括pH 6和pH 9的数值范围。

[0018] 本发明涉及一种提高3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的方法,其包括:用pH6至9的缓冲液预处理琼脂;以及用琼脂酶、琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶和 α -新琼脂二糖水解酶顺序地水解经预处理的琼脂。

[0019] 根据本发明的用于提高3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的方法的特征在于,通过使用比琼脂糖便宜的琼脂作为初始底物,用缓冲液作为预处理溶剂预处理底物,并使经预处理的琼脂与外切型琼脂酶例如Aga50D、琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶和 α -新琼脂二糖

水解酶顺序地反应,从而由水解产物获得单糖例如3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的高生产产率。

[0020] 下面将逐步详细描述根据本发明的用于提高3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的方法。

[0021] 第一步是用缓冲液预处理琼脂。

[0022] 缓冲液用于满足琼脂的酶水解的最佳要求,并且当被预处理时,即用水作为预处理溶剂加热时,由于胶凝效应难以实现酶水解。因此,将缓冲液加入到琼脂中以防止这种胶凝效应,并且作为缓冲液,可以使用特别地pH6至9的溶液,更特别地pH7至8的一种或至少两种中性溶液,例如Tris-HCl、乙酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠、甘氨酸-NaOH等。

[0023] 琼脂在缓冲液中的浓度优选为0.1至5%。例如,当缓冲液为20mL时,可以加入0.02至1g的琼脂。在上述范围内,可以有效地从琼脂中生产琼脂低聚糖。

[0024] 为了有效地从琼脂中生产琼脂低聚糖,用缓冲液的预处理可以在100至200℃下进行1分钟至1小时。

[0025] 此外,根据本发明的用于提高3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的方法可以还包括对预处理琼脂的中和。

[0026] 中和是为了满足酶水解的最佳条件,或换句话说,使预处理产物的pH为中性,即滴定至pH6至8。作为滴定溶剂,可以使用NaOH、氢氧化铵或盐酸(HCl)等,但本发明不限于此。

[0027] 在根据本发明的用于提高3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的方法中,第二步是通过对经预处理的琼脂进行酶水解来产生单糖。

[0028] 酶水解的特征在于使经预处理的琼脂与琼脂酶、琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶和 α -新琼脂二糖水解酶顺序地反应。

[0029] 通过预处理,用外切型琼脂酶使琼脂降解成琼脂低聚糖,其降解成例如新琼脂二糖和琼脂三糖(D-半乳糖- β -1,4连接-3,6-脱水-L-半乳糖- α -1,3连接-D-半乳糖),并且新琼脂二糖最终被 α -新琼脂二糖水解酶水解成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖。在此,在用 α -新琼脂二糖水解酶处理之前,当仅作用于琼脂三糖非还原端的半乳糖部分的琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶与琼脂酶反应产物反应时,可以有效地释放半乳糖。因此,本发明的方法能够通过依次处理琼脂酶、琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶和 α -新琼脂二糖水解酶来提高3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖的生产产率。

[0030] 水解可以在20至40℃的温度范围内在0至200rpm下进行30分钟至7天。

[0031] 将在下面详细描述酶。

[0032] 首先,降解琼脂低聚糖以产生新琼脂二糖和琼脂三糖的琼脂酶可以是用于裂解琼脂糖的3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖之间的 β -1,4-糖苷键的酶(以下称为“Aga50D”)。

[0033] 琼脂酶可以包括序列号1所示的氨基酸序列和相对于序列号1的序列具有80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上的序列同一性的氨基酸序列。

[0034] 琼脂酶可以源自糖酵母降解(*Saccharophagus degradans*) 2-40,但本发明不特别限于此。

[0035] 可以使用DNA片段转录和翻译琼脂酶,所述DNA片段即参与包括各个编码片段之间以及酶编码区之前和之后的区域之间的插入序列的多肽生产的编码基因。例如,琼脂酶可

以表示为序列号2的序列,但是本发明不限于此。

[0036] 随后,作为用于从琼脂低聚糖中释放半乳糖的琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶,本发明的酶的范围包括序列号3所示的氨基酸序列,并且还包括具有水解琼脂低聚糖活性的蛋白质作为来自具有一个或多个取代、缺失、转移和添加的酶的突变蛋白,并且优选地包括相对于序列号3所示的氨基酸序列具有80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上的序列同一性的氨基酸序列(以下称为“VejABG”)。

[0037] 琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶可以仅作用于琼脂低聚糖例如琼脂三糖的非还原端的半乳糖部分,并且可以来自弧菌属(*Vibrio* sp.)菌株EJY3。

[0038] 可以使用DNA片段转录和翻译琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶,所述DNA片段即参与包括各个编码片段之间以及酶编码区之前和之后的区域之间的插入序列的多肽生产的编码基因。例如,琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶可以表示为序列号4表示的序列,但是本发明不限于此。

[0039] 最后,作为能够将通过酶反应产生的新琼脂二糖降解为D-半乳糖和3,6-脱水-L-半乳糖的 α -新琼脂二糖水解酶,本发明的酶的范围可以包括序列号5所示的氨基酸序列,并且还包括具有水解新琼脂二糖的活性的蛋白质作为具有酶的取代、缺失、转移和添加中的至少一种的突变蛋白,并且优选地包括相对于序列号3所示的氨基酸序列具有80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上的序列同一性的氨基酸序列(以下称为“sdNABH”)。

[0040] α -新琼脂二糖水解酶可以来自糖酵母降解2-40,但本发明不特别限于此。

[0041] α -新琼脂二糖水解酶可以是DNA片段,所述DNA片段即参与包括各个编码片段之间以及酶编码区之前和之后的区域之间的插入序列的多肽生产的编码基因。例如, α -新琼脂二糖水解酶可以表示为序列号6所示的序列,但本发明不特别限于此。

[0042] 在本发明中,句子“多肽相对于另一序列以特定比率(例如,80%、85%、90%、95%或99%)具有序列同一性”是指,当两个序列比对时,序列以上述比率具有相同的氨基酸残基。比对和百分比同源性或同一性可以使用本领域已知的任何合适的软件程序来确定,例如在文献[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M.Ausubel等(eds) 1987Supplement 30section7.7.18)]。作为优选的程序,可以使用GCG Pile-up程序、FASTA (Pearson等,1988Proc.Natl Acad.Sci USA 85:2444-2448)和BLAST (BLAST Manual, Altschul等,Natl.Cent.Biotechnol.Inf.,Natl Lib.Med. (NCIB NLM NIH),Bethesda,MD和Altschul等,1997NAR25:3389-3402)。另一个优选的比对程序是ALIGN Plus (科学和教育软件,PA),优选地使用默认参数。本文使用的另一个序列软件程序是可以在序列软件包版本6.0 (遗传学计算机组,威斯康星大学,麦迪逊,WI)中使用的TFASTA数据搜索程序。

[0043] 本文使用的术语“蛋白质”和“多肽”可互换地用于本发明中。本发明使用常规的单字母或三字母代码用于氨基酸残基。

[0044] 在本发明中,关于细胞、核酸、蛋白质或载体使用的术语“重组”是指通过引入异源核酸或蛋白质或改变原始核酸或蛋白质来修饰细胞、核酸、蛋白质或载体,或所述细胞衍生自由此修饰的细胞。也就是说,例如,重组细胞表达在原始(非重组)形式的细胞中不存在的基因、异常表达基因或表达根本不表达的原始基因。

[0045] 本文中使用的术语“核酸”包括单链或双链DNA、RNA及其化学变体。术语“核酸”和

“多核苷酸”可以在本发明中互换使用。由于遗传密码简并，至少一个密码子可用于编码特定氨基酸，并且本发明包括编码特定氨基酸序列的多核苷酸。

[0046] 用于描述核酸序列插入细胞中的术语“引入”是指“转染”、“转化”或“转导”，包括将核酸序列整合入真核或原核细胞的描述，其中核酸序列整合到细胞（例如染色体、质粒、质体或线粒体DNA）的基因组中、转化成自主复制子或暂时表达。

[0047] 琼脂酶可以从糖酵母降解培养物的上清液中分离和纯化，并且可以根据遗传工程重组技术使用除了糖酵母降解以外的其它菌株或人工化学合成方法来产生和分离。

[0048] 琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶可以从弧菌属 (*Vibrio* sp.) 菌株EJY3的培养物的上清液中分离和纯化，并且可以根据基因工程重组技术使用除了弧菌属 (*Vibrio* sp.) 菌株EJY3以外的菌株或人工化学合成方法来产生和分离。

[0049] α -新琼脂二糖水解酶可以从糖酵母降解培养物的上清液中分离和纯化，并且可以根据基因工程重组技术使用除弧菌属 (*Vibrio* sp.) 菌株EJY3以外的菌株或人工化学合成方法来产生和分离。

[0050] 当使用重组技术时，可以使用用于促进常规重组蛋白（例如抗生素抗性基因或可用于亲和柱层析的报告蛋白或肽）表达的因子，这种技术对应的范围可以通过本领域普通技术人员实现。

[0051] 琼脂酶、琼脂糖分解 β -半乳糖苷酶和 α -新琼脂二糖的水解中的每一个可以在20至40℃的温度以及0至200rpm的速度的反应条件下进行30分钟至7天。更具体地，反应可以在25至35℃下进行10至24小时。

[0052] 在酶水解之后，接着可以用Aminex HPX-87H柱 (Bio-Rad, Richmond, CA) 的HPLC (Agilent 1100, Agilent, Waldbronn, 德国) 对3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖进行定量。

[0053] 当使用缓冲液作为预处理溶剂预处理琼脂时，根据本发明的提高3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率的方法可以获得3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的生产产率，类似于当使用琼脂糖作为初始底物时的那些，并且使用大约100倍更少的用于中和的滴定溶剂（例如NaOH），因此该方法适合于大规模生产系统。

[0054] 具体实施例

[0055] 下面将参考实施例详细描述本发明。然而，以下实施例仅用于举例说明本发明，本发明的范围不限于以下实施例。

[0056] <实施例1>重组酶的生产

[0057] 使用pET-21a作为载体以及Aga50D (EMBL ID: ADB81904)、NABH (EMBL ID: ADB81917) 和ABG (EMBL ID: CP003241) 酶在作为用于重组菌株的宿主的大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 中生产重组蛋白。通过将铺在50 μ g/mL添加氨苄青霉素的固体培养基上的宿主细胞转化获得的菌落再次接种在含有50 μ g/mL氨苄青霉素的Luria肉汤 (LB) 平板中，然后在37℃和220rpm下温育12小时 (20mL $\times$ 2) 用于种子培养。然后，将细胞接种在两个各含有1L LB肉汤的3L锥形瓶中，在相同条件下振荡培养3小时 (OD=0.8) 并在冰上冷却1小时，然后加入0.1mM IPTG以在16℃和120rpm下诱导表达12小时。将所得培养物离心分离 (6000rpm, 4℃, 15分钟) 以收集细胞，然后将所得细胞悬浮于20mM Tris缓冲液 (Tris-HCl, 1M NaCl pH8) 中，用超声波仪裂解，并离心分离 (16000rpm, 4℃, 60分钟)。使用HisTrap HP柱和HisTrap Q FF柱 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 从上清液中将酶分开和隔离，然后通过8% SDS-

PAGE鉴定。

[0058] <实施例2>用缓冲液预处理琼脂

[0059] 为了比较在使用20mM Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液的琼脂预处理和使用3%乙酸的琼脂糖预处理后的糖化,进行两种类型的预处理。将1g (5%) 琼脂与20mL的20mM Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液在170℃下混合5、10、15和20分钟,并且1.4g (7%) 琼脂糖与20mL的3%乙酸混合并在130℃下微波处理30分钟,从而进行水解。然后,使用1M NaOH将所得产物中和至pH 7,使用蒸馏水将琼脂和琼脂糖的最终浓度调节至4.5%。

[0060] 表1显示了根据预处理条件和初始底物的3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖的最终生产产率、HMF产生的量和中和溶剂的量。

[0061] [表1]

[0062]

预处理							酶水解	
方法	底物	底物浓度(%)	温度(°C)	时间(min)	中和剂(1M NaOH, mL)	HMF 产率 ^a (%)	半乳糖 产率 ^a (%)	AHG 产率 ^a (%)
缓冲液的预处理 ^b	琼脂	5	170	5	0.0±0.0	0.3±0.2	19.3±1.1	20.0±0.7

[0063]

				10	0.1±0.0	1.3±0.2	44.8±3.5	44.9±1.7
				15	0.3±0.0	3.9±0.1	26.4±0.5	39.1±0.1
				20	0.4±0.0	8.4±0.8	10.2±2.4	41.3±1.2
酸处理 ^c	琼脂糖	7	130	30	10.3±0.1	0.2±0.1	47.0±0.1	54.5±0.9

a: 通过 HPLC 检测产生的 HMF、半乳糖和 AHG，并且基于单糖的最大量表示为从初始底物的平均值±标准偏差。

b: 将 20 mM Tris-HCl 溶液(pH 7.5) 用作缓冲液。

c: 将 3%乙酸用于酸的预处理中。

[0064] 如表1中所示,与使用乙酸的琼脂糖预处理 (130℃,30分钟) 相比,在使用20mM Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液的琼脂预处理 (170℃,10分钟) 中显示6倍更高量的HMF产生,中和中使用的1M NaOH的量为100倍以下,其更适合于大规模生产系统。此外,在上述条件下,在两种情况下也显示了类似的3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖的生产产率。

[0065] <实施例3>用缓冲液预处理的预处理产物的酶促糖化方法

[0066] 将5mL实施例2的预处理产物依次与实施例1中制备的酶Aga50D (19.0U)、ABG (4.6U) 和NABH (14.5U) 反应。使每种酶在30℃下反应12小时,然后在沸水中灭活5分钟。为了证实ABG在该过程中的效果,只有两种酶例如Aga50D和NABH (不包括ABG) 在如上所述的相同条件下反应。

[0067] 使用Aminex HPX-87H柱 (Bio-Rad, Richmond, CA) 通过HPLC (Agilent 1100, Agilent, Waldbronn, 德国) 定量最终反应产物例如3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖。流动相是含有0.01M三氟乙酸的40% (v/v) 乙腈 (CH₃CN) 水溶液,并且在65℃和0.5mL/min的流速下

进行分析。

[0068] Aga50D的单位定义为在30℃下在20mM Tris-HCl缓冲液 (pH7) 中1分钟由琼脂糖产生的琼脂二糖的量。

[0069] ABG和NABH酶的单位定义为在20mM Tris-HCl缓冲液 (pH7) 中在30℃下1分钟从琼脂三糖和新琼脂二糖产生的D-半乳糖的量。

[0070] 如图1中所示,预处理后,当用ABG处理3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖两者10分钟时,检测到最高水平的生产产率。此外,当使用ABG时,3,6-脱水-L-半乳糖增加1.3倍,D-半乳糖增加1.8倍(参考图2和3)。

[0071] [工业实用性]

[0072] 本发明能够应用于生物乙醇生产的领域。

[0001]	序列表			
[0002]	<110> 高丽大学校产学协力团			
[0003]	<120> 通过使用缓冲液预处理提高琼脂中单糖生产产率的方法			
[0004]	<130> G17U13C0056P/CN			
[0005]	<150> KR 10-2014-0132401			
[0006]	<151> 2014-10-01			
[0007]	<160> 6			
[0008]	<170> PatentIn 版本 3.2			
[0009]	<210> 1			
[0010]	<211> 747			
[0011]	<212> PRT			
[0012]	<213> 糖酵母降解 2-40			
[0013]	<400> 1			
[0014]	Met	Leu	Phe	Asp
[0015]	1	5	10	15
[0016]	Leu	Asn	Ala	Arg
[0017]	20	25	30	
[0018]	Pro	Ser	Lys	Gly
[0019]	35	40	45	
[0020]	Thr	Gly	Leu	Ala
[0021]	50	55	60	
[0022]	Thr	Ser	Ala	Ser
[0023]	65	70	75	80
[0024]	Thr	Gln	Phe	Tyr
[0025]	85	90	95	
[0026]	Arg	Ser	Ile	Asp
[0027]	100	105	110	
[0028]	Leu	Ser	Gly	His
[0029]	115	120	125	
[0030]	Leu	Asn	Leu	Ala
[0031]	130	135	140	
[0032]	Asp	Asp	Arg	Gln
[0033]	145	150	155	160
[0034]	Ser	Gly	Ile	Ala
[0035]	165	170	175	
[0036]	Lys	Thr	Val	Ile
[0037]	180	185	190	
[0038]	Asp	Glu	Asn	Phe
[0039]	195	200	205	
[0040]	Lys	Val	Asp	Tyr
[0041]	210	215	220	

[0042]	Ala Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Leu Asp Gly Lys Pro Met Pro Ser		
[0043]	225	230	235 240
[0044]	Arg Ser Lys Phe Gly Gly Trp Leu Ala Gly Pro Lys Leu Lys Ala Thr		
[0045]	245	250	255
[0046]	Gly Tyr Phe Arg Thr Glu Lys Ile Asn Gly Lys Trp Met Leu Val Asp		
[0047]	260	265	270
[0048]	Pro Glu Gly Tyr Pro Tyr Phe Ala Thr Gly Leu Asp Ile Ile Arg Leu		
[0049]	275	280	285
[0050]	Ser Asn Ser Ser Thr Met Thr Gly Tyr Asp Tyr Asp Gln Ala Thr Val		
[0051]	290	295	300
[0052]	Ala Gln Arg Ser Ala Asp Asp Val Thr Pro Glu Asp Ser Lys Gly Leu		
[0053]	305	310	315 320
[0054]	Met Ala Val Ser Glu Lys Ser Phe Ala Thr Arg His Leu Ala Ser Pro		
[0055]	325	330	335
[0056]	Thr Arg Ala Ala Met Phe Asn Trp Leu Pro Asp Tyr Asp His Pro Leu		
[0057]	340	345	350
[0058]	Ala Asn His Tyr Asn Tyr Arg Arg Ser Ala His Ser Gly Pro Leu Lys		
[0059]	355	360	365
[0060]	Arg Gly Glu Ala Tyr Ser Phe Tyr Ser Ala Asn Leu Glu Arg Lys Tyr		
[0061]	370	375	380
[0062]	Gly Glu Thr Tyr Pro Gly Ser Tyr Leu Asp Lys Trp Arg Glu Val Thr		
[0063]	385	390	395 400
[0064]	Val Asp Arg Met Leu Asn Trp Gly Phe Thr Ser Leu Gly Asn Trp Thr		
[0065]	405	410	415
[0066]	Asp Pro Ala Tyr Tyr Asp Asn Asn Arg Ile Pro Phe Phe Ala Asn Gly		
[0067]	420	425	430
[0068]	Trp Val Ile Gly Asp Phe Lys Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Phe Trp		
[0069]	435	440	445
[0070]	Gly Ala Met Pro Asp Val Phe Asp Pro Glu Phe Lys Val Arg Ala Met		
[0071]	450	455	460
[0072]	Glu Thr Ala Arg Val Val Ser Glu Glu Ile Lys Asn Ser Pro Trp Cys		
[0073]	465	470	475 480
[0074]	Val Gly Val Phe Ile Asp Asn Glu Lys Ser Phe Gly Arg Pro Asp Ser		
[0075]	485	490	495
[0076]	Asp Lys Ala Gln Tyr Gly Ile Pro Ile His Thr Leu Gly Arg Pro Ser		
[0077]	500	505	510
[0078]	Glu Gly Val Pro Thr Arg Gln Ala Phe Ser Lys Leu Leu Lys Ala Lys		
[0079]	515	520	525
[0080]	Tyr Lys Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ala Trp Gly Leu Lys Leu Ser		
[0081]	530	535	540
[0082]	Ser Trp Ala Glu Phe Asp Leu Gly Val Asp Val Lys Ala Leu Pro Val		
[0083]	545	550	555 560

[0084]	Thr Asp Thr Leu Arg Ala Asp Tyr Ser Met Leu Leu Ser Ala Tyr Ala		
[0085]		565	570 575
[0086]	Asp Gln Tyr Phe Lys Val Val His Gly Ala Val Glu His Tyr Met Pro		
[0087]		580	585 590
[0088]	Asn His Leu Tyr Leu Gly Ala Arg Phe Pro Asp Trp Gly Met Pro Met		
[0089]		595	600 605
[0090]	Glu Val Val Lys Ala Ala Ala Lys Tyr Ala Asp Val Val Ser Tyr Asn		
[0091]		610	615 620
[0092]	Ser Tyr Lys Glu Gly Leu Pro Lys Gln Lys Trp Ala Phe Leu Ala Glu		
[0093]		625	630 635 640
[0094]	Leu Asp Lys Pro Ser Ile Ile Gly Glu Phe His Ile Gly Ala Met Asp		
[0095]		645	650 655
[0096]	His Gly Ser Tyr His Pro Gly Leu Ile His Ala Ala Ser Gln Ala Asp		
[0097]		660	665 670
[0098]	Arg Gly Glu Met Tyr Lys Asp Tyr Met Gln Ser Val Ile Asp Asn Pro		
[0099]		675	680 685
[0100]	Tyr Phe Val Gly Ala His Trp Phe Gln Tyr Met Asp Ser Pro Leu Thr		
[0101]		690	695 700
[0102]	Gly Arg Ala Tyr Asp Gly Glu Asn Tyr Asn Val Gly Phe Val Asp Val		
[0103]		705	710 715 720
[0104]	Thr Asp Thr Pro Tyr Gln Glu Met Val Asp Ala Ala Lys Glu Val Asn		
[0105]		725	730 735
[0106]	Ala Lys Ile Tyr Thr Glu Arg Leu Gly Ser Lys		
[0107]		740	745
[0108]	<210> 2		
[0109]	<211> 2244		
[0110]	<212> DNA		
[0111]	<213> 糖酵母降解 2-40		
[0112]	<400> 2		
[0113]	atgttattcg attttgaaaa cgatcaagtc ccttcaaata ttcatttttt aaatgcgcgt	60	
[0114]	gcaagtatag aaacctatac cggtataaat ggcgagccga gtaaagggtt aaagtgtggcg	120	
[0115]	atgcagtcca agcagcacag ttatactggc cttgccattg tgccagagca gccttgggat	180	
[0116]	tggagcgagt ttacctctgc tagcttgat ttcgatatag tcagtgttgg cgatcattcc	240	
[0117]	acacaatttt atttagatgt taccgaccaa aatggcgccg tgtttaccgg cagtattgat	300	
[0118]	attccagtgg gtaaaatgca atcgactac gccaaagtta gcggtcacga tttagaagtg	360	
[0119]	cccgatagtg gagacgttaa cgatttaaac ctgcctctg gcttgcgttc taaccgcct	420	
[0120]	acatggacat ctgacgatag gcagtttggt tggtgtggg gagtgaaaaa tttagatttg	480	
[0121]	tcgggcattg ctaaaatc gctaagtgtg caaagcgcaa tgcacgataa aacagttatt	540	
[0122]	atcgataata ttcgtattca acccaaccg ccgcaagatg aaaacttcct tgctggttg	600	
[0123]	gtagacgagt ttggccaaaa cgccaaagtt gattacaagg gtaaaatcca tagtttagaa	660	
[0124]	gaattgcatg cagcgcgcga tgtggaactg gccgagcttg atggcaagcc aatgcctagt	720	
[0125]	cgctctaagt ttggcggttg gttggccggc cccaagctaa aagctacagg gtactttcgc	780	

[0126]	acagaaaaaa ttaacggtaa atggatgcta gtagaccag aagggtaccc ttactttgct	840
[0127]	acgggttttag acattattcg cctatctaata tcatctacca tgactggta cgattacgat	900
[0128]	caagctactg ttgctcagcg ctctgccgac gatgtaacac ctgaagactc aaaaggttta	960
[0129]	atggcagtga gcgaaaaatc atttgctacg cgccacctag catcgccaac acgagcggca	1020
[0130]	atgtttaact ggttgccaga ttacgatcac cctctcgcaa atcattataa ctaccgtcgc	1080
[0131]	tctgcgcatt ccggccact gaaacgcggt gaagcctaca gcttctacag tgccaacctt	1140
[0132]	gagcgtaaat acggtgaaac ttaccccggt tcttacttgg ataagtggcg cgaagtaacg	1200
[0133]	gtagacagaa tgctaaactg gggctttacc tcgctaggca actggactga cccagcatat	1260
[0134]	tacgacaaca atcgcatacc gtttttcgcg aatggttggg taataggga ttttaaaacc	1320
[0135]	gtatctagcg gtgcggattt ttggggcgca atgccagatg tattcgacct agaatttaaa	1380
[0136]	gtgcgcgcta tggaaacggc acgcgtggtt tcagaagaaa ttaaaaatag cccttggtgc	1440
[0137]	gtaggggtat ttatcgataa cgaaaaaagc ttcggtcgcc ccgattccga taaggcgcaa	1500
[0138]	tacggtattc ccattcatac cctcggtcgc ccaagcgaag gtgtgcctac taggcaggcg	1560
[0139]	tttagtaagc tgcttaaagc caaatacaaa actatagccg cgtaaaca tgcctggggg	1620
[0140]	ttaaagctta gttcttgggc tgagtttgat ttgggcgtag atgtaaaagc gctgccggt	1680
[0141]	accgatactc tgcgcgcaga ttactcaatg ttactttcgg cctatgcgga ccaatatttt	1740
[0142]	aagggtgtac acggcgcggt tgaacattac atgccgaacc acttgtattt aggcgcacgc	1800
[0143]	tttctgatt ggggaatgcc aatggaggta gtgaaagctg ccgcaaaata cgccgatgtg	1860
[0144]	gtagctata attcctacaa agagggttg cctaagcaga agtgggcttt ttagcagag	1920
[0145]	ctagataagc cgagtataat cggtagttt cacatagtg ctatggatca cggttcgtat	1980
[0146]	caccccggtt taattcacgc tgcgtcgcag gccgatagag gtgaaatgta caaagattat	2040
[0147]	atgcaatcgg taattgataa cccctacttc gtaggcgcgc actggttcca gtatatggat	2100
[0148]	tcgccattaa cgggcagagc ttatgatggt gaaaactaca atgtgggtt tgtggatgt	2160
[0149]	accgacacgc cgtaccaaga aatggtggat gcagcaaaag aagtaaagc gaaaatatac	2220
[0150]	accgaaagc taggcagcaa ataa	2244
[0151]	<210>	3
[0152]	<211>	806
[0153]	<212>	PRT
[0154]	<213>	弧菌属 EJY3
[0155]	<400>	3
[0156]	Met His Asn Ser Pro Arg Ser Thr Thr Leu Phe Asn Asp Asn Trp Leu	
[0157]	1 5 10 15	
[0158]	Phe Gln Leu Ala Lys Asp Lys Pro Asn Thr Lys Gln Trp Ser Thr Val	
[0159]	20 25 30	
[0160]	Thr Leu Pro His Asp Trp Ser Val Ala Ser Ala Phe Ser Pro Gln Tyr	
[0161]	35 40 45	
[0162]	Asp Gly Ala Thr Gly Tyr Leu Pro Gly Gly Ile Gly Trp Tyr Lys Lys	
[0163]	50 55 60	
[0164]	Gln Phe Lys Asn Pro Leu Asn Lys His Tyr Ser Arg Cys Ile Leu Val	
[0165]	65 70 75 80	
[0166]	Phe Asp Gly Ile Tyr Asn Asn Ala Thr Ile Asn Ile Asn Gly Tyr Asp	
[0167]	85 90 95	

[0168]	Ile His Phe Gln Ala Tyr Gly Tyr Ala Pro Phe Asn Ile Glu Ile Thr		
[0169]	100	105	110
[0170]	Asp Tyr Leu Lys Ser Asp Asn Val Ile Thr Ile His Val Asp Arg Arg		
[0171]	115	120	125
[0172]	Arg Tyr Ile Asp Ser Arg Trp Tyr Thr Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp		
[0173]	130	135	140
[0174]	Ile Glu Met Val Leu Thr Lys Asp Val Phe Val Pro Ile Trp Glu Asn		
[0175]	145	150	155
[0176]	His Ile Lys Ala Ser Val Ser Ser Asn Gln Ile Gly His Ile His Gln		
[0177]	165	170	175
[0178]	Gln Leu Met Ile Glu Ala Lys Thr Lys Thr His Tyr Leu Thr Ile Val		
[0179]	180	185	190
[0180]	Ser Arg Leu Leu Glu Pro Asn Ser Asp Asn Cys Val Ala Thr Ala Arg		
[0181]	195	200	205
[0182]	Thr His Arg Ser Val Asn Asn Arg Glu Val Cys Asp Leu Glu Leu Thr		
[0183]	210	215	220
[0184]	Cys Asp Gln Leu Ser Leu Trp Ser Pro Asp Ser Pro Ile Leu Tyr Lys		
[0185]	225	230	235
[0186]	Leu Glu Thr Gln Ile Tyr Glu Asn Gly Cys Val Ile Asp Lys Val Ser		
[0187]	245	250	255
[0188]	Glu Asn Ile Gly Phe Arg Ser Ile Glu Phe Ser Pro Glu Gln Gly Phe		
[0189]	260	265	270
[0190]	Phe Leu Asn Gly Met Pro Thr Lys Val Arg Gly Val Cys Leu His His		
[0191]	275	280	285
[0192]	Asp Gly Gly Leu Val Gly Ala Ala Val Pro Asp Glu Ile Trp Ile Arg		
[0193]	290	295	300
[0194]	Arg Leu Ser Lys Leu Lys Gln Cys Gly Val Asn Ala Ile Arg Ile Ala		
[0195]	305	310	315
[0196]	His Asn Pro Ala Ser Lys Arg Leu Leu His Leu Cys Asp Thr Met Gly		
[0197]	325	330	335
[0198]	Phe Leu Val Gln Asp Glu Phe Phe Asp Glu Trp Asp Tyr Pro Lys Asp		
[0199]	340	345	350
[0200]	Lys Arg Leu Asn Met Gly Asn Gln His Asp Asp Phe Phe Ser Gln Cys		
[0201]	355	360	365
[0202]	Tyr Thr Glu His Phe Gln Thr Arg Ala Lys Thr Asp Leu Cys Asn Thr		
[0203]	370	375	380
[0204]	Leu Lys Cys His Ile Asn His Pro Ser Ile Phe Met Trp Ser Ile Gly		
[0205]	385	390	395
[0206]	Asn Glu Ile Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Asn Val Glu Ala Thr Gly Phe		
[0207]	405	410	415
[0208]	Phe Asp Ala Ser Trp Asp Gly Asn Tyr Phe Trp Ser Leu Pro Pro Asn		
[0209]	420	425	430

[0210]	Ser Pro Asp Glu Ile Lys Asp Lys Leu Lys Asn Leu Pro Gln His Thr		
[0211]	435	440	445
[0212]	Tyr Asp Ile Gly Lys Thr Ala Asn Lys Leu Ala Arg Trp Val Lys Ala		
[0213]	450	455	460
[0214]	Ile Asp Gln Thr Arg Pro Ile Thr Ala Asn Cys Ile Leu Pro Ser Ser		
[0215]	465	470	475
[0216]	Ser Tyr His Ser Gly Tyr Ala Asp Ala Leu Asp Val Ile Gly Phe Ser		
[0217]	485	490	495
[0218]	Tyr Arg Arg Val Val Tyr Asp Tyr Gly His Glu Ile Arg Pro Asn Leu		
[0219]	500	505	510
[0220]	Pro Ile Ile Gly Asn Glu Asn Leu Pro Gln Trp His Glu Trp Lys Ala		
[0221]	515	520	525
[0222]	Val Leu Glu Arg Asn His Val Ser Gly Leu Phe Leu Trp Thr Gly Ile		
[0223]	530	535	540
[0224]	Asn Tyr Met Gly Glu Ser His Gly Lys Trp Pro Val Arg Thr Thr Asp		
[0225]	545	550	555
[0226]	Ser Gly Leu Leu Asp Thr Ala Gly Phe Glu Lys Pro Ser Tyr Ala Leu		
[0227]	565	570	575
[0228]	Phe Lys Ser Leu Trp Thr Asp Glu Pro Tyr Val Lys Val Phe Thr Gln		
[0229]	580	585	590
[0230]	Arg Ala Asp Leu Thr Gln Leu Lys Phe Asp Glu Gln Thr Phe Val Ala		
[0231]	595	600	605
[0232]	Phe Glu His Asp Glu Asn Ala Trp Gln Lys Lys Leu Trp Val Trp Asp		
[0233]	610	615	620
[0234]	Glu Arg Asn Ser His Trp Asn Tyr Glu Asn Glu Gln Trp Val Thr Ile		
[0235]	625	630	635
[0236]	Glu Ala Tyr Ser Asn Cys Pro Gln Val Gln Leu Tyr Leu Asn Asp Glu		
[0237]	645	650	655
[0238]	Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Glu Lys Gln Ile Asp Arg Val Phe Arg		
[0239]	660	665	670
[0240]	Trp Ala Leu Pro Tyr Arg Ala Gly Lys Ile Ser Leu Val Gly Leu Lys		
[0241]	675	680	685
[0242]	Asn Asp Val Glu Val Thr Arg Asp Glu Ile Val Thr Ser Gly Val Pro		
[0243]	690	695	700
[0244]	Arg Lys Ile Ser Ile Val Asp Glu Thr His Glu Gly Ser Ser Ser Tyr		
[0245]	705	710	715
[0246]	Arg Gln Leu Ile Val Gln Met Leu Asp Lys Asp Asn His Pro Val Ser		
[0247]	725	730	735
[0248]	His Glu Glu Ala Leu Leu Glu Phe Arg Val Arg Gly Cys Glu Trp Ile		
[0249]	740	745	750
[0250]	Gly Ala Asp Asn Gly Ser Ile Ser Ser Ile Asn Ala Tyr Asn Ser Pro		
[0251]	755	760	765

[0252]	Thr Ile Ala Thr Arg His Gly Arg Val Leu Ala Val Val Lys Ser Ser	
[0253]	770	775 780
[0254]	Gln Gly Gln Ser Gly Asp Ile Glu Ile Tyr Ser Asn Ser Gly Val Lys	
[0255]	785	790 795 800
[0256]	Ala Ser Phe Ser Leu Leu	
[0257]	805	
[0258]	<210> 4	
[0259]	<211> 2421	
[0260]	<212> DNA	
[0261]	<213> 弧菌属 EJY3	
[0262]	<400> 4	
[0263]	atgcacaatt caccgagaag taccacatta tttaacgaca actggctttt tcagttggca	60
[0264]	aaagataaac cgaataccaa acaatggctg acggttacgc ttccccacga ttggagtgtg	120
[0265]	gcttcggcct tttctccaca gtatgatgga gccacgggtt acctacctgg gggaattgggt	180
[0266]	tggtacaaaa agcagtttaa aaatcctcta aataaacact attcgcgctg tatactcgtt	240
[0267]	tttgacggga ttacaacaa tgcaaccatt aatatcaatg gctatgatat acatttccaa	300
[0268]	gcgtatgggt atgcgccatt caatatagaa attactgatt acttgaaatc agacaatgta	360
[0269]	attactatcc atgtcgaatg acgcaggtat atcgacagta ggtggtatag aggttcaggt	420
[0270]	atttaccgtg atatagaaat ggttctaact aaggatgtgt ttgttcctat ttgggaaaat	480
[0271]	catataaaag cttccgttag ctcaaaccag attggccata tccaccagca actgatgatt	540
[0272]	gaagcaaaaa cgaaaacgca ttacttgaca attgtaagtc gtttgctcga gcccaattcc	600
[0273]	gataattgct tagctacagc tcgaacgcct cgttcagtga acaatcgaga agtatgtgat	660
[0274]	ttagaactaa cgtgtgatca actgagcctt tggagcccag attcaccaat tctttataag	720
[0275]	ttggaaactc aaatctacga aaatggctgc gtcattgata aggtatctga aaacattgggt	780
[0276]	tttcgtagca tagagtttcc gccagaacag gggtttttcc tcaatgggat gcccaactaa	840
[0277]	gtccgtgggg tctgccttca tcatgatggc ggactcgttg gcgctgccgt acctgatgaa	900
[0278]	atatggatac gtcggtgtgc aaagctcaaa caatgtgggt taaatgcaat aagaatcgca	960
[0279]	cacaaccag cctccaagcg tctattgcac ctctgtgaca cgatgggatt tctggtgcag	1020
[0280]	gatgagtttt ttgacgagtg ggattatcct aaagataaac gccttaacat gggcaaccaa	1080
[0281]	cacgatgact ttttcagcca atgttacacc gagcacttcc aaaccgagc aaaaaccgat	1140
[0282]	ctttgtaata cgttgaaatg ccatattaac catccatcaa tattcatgtg gagtattggc	1200
[0283]	aacgaaattg agtggacctc cccacgcaac gtcgaagcaa cgggcttttt tgatgcaagt	1260
[0284]	tgggatggga attatttctg gagcttacca cctaactctc ccgatgaaat aaaagataaa	1320
[0285]	ctcaaaaatt tgccacagca cacttatgat attgggaaaa ctgcgaacaa gcttgctcgt	1380
[0286]	tgggtaaaag ctatcgatca aactcgaccg attactgcca actgtatcct tccatcatcc	1440
[0287]	agctaccatt caggttacgc cgacgcgctc gatgtaattg gatttagtta tcgacgtgtt	1500
[0288]	gtatatgatt atgggcatga aatcagacct aacctgccga taatcggtta tgaaaattta	1560
[0289]	cctcaatggc atgaatggaa agcagtgtt gaacgcaacc atgtatccgg attgtttctt	1620
[0290]	tggactggaa tcaattatat gggagaatct catggtaaat ggctgtgaa aaccactgac	1680
[0291]	agcggcctgc tagacaccgc tgggtttgaa aaaccaagtt atgcgctttt taaatcgctg	1740
[0292]	tggacagacg aaccttatgt caaagtatct actcaacgag cagacttaac acaactgaag	1800
[0293]	tttgacgagc aaacttttgt tgcctttgaa catgatgaaa atgcttggca aaaaaatta	1860

[0294] tgggtctggg acgaaagaaa ctgcactgg aattatgaaa atgagcaatg ggctactatc 1920
 [0295] gaagcctata gcaactgtcc gcaggtacaa ctctacctca acgatgagtt ggttggaacc 1980
 [0296] caacagttag aaaagcaaat cgacagagtc ttctgttggg ccttaccata tagagcagga 2040
 [0297] aagatctctc tggttggttt aaagaacgac gtagaggtaa ctagagatga aattgtcacg 2100
 [0298] tctggagtgc cgaggaagat ctcgattgta gatgaaaccc atgaagggtc aagctcatac 2160
 [0299] cggcaactta tagtccagat gcttgataaa gacaaccatc cagtgagtca tgaagaagca 2220
 [0300] ttgttagagt ttctgttctg cggttgtgaa tggattggag ccgataatgg cagtatatct 2280
 [0301] tctatcaacg catataatag cccaacgatt gctacacgtc atggcagagt tttagcagtt 2340
 [0302] gtaaaatcat cgcagggtca aagtgggtgat atcgaaattt actcaaattc aggagtgaaa 2400
 [0303] gcctcttttt cactacttta a 2421
 [0304] <210> 5
 [0305] <211> 368
 [0306] <212> PRT
 [0307] <213> 糖酵母降解 2-40
 [0308] <400> 5
 [0309] Met Ser Asp Ser Lys Val Asn Lys Lys Leu Ser Lys Ala Ser Leu Arg
 [0310] 1 5 10 15
 [0311] Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Asp Glu Lys Gly Pro Glu Trp Leu Phe Glu
 [0312] 20 25 30
 [0313] Phe Asp Ile Thr Pro Leu Lys Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val
 [0314] 35 40 45
 [0315] Ile Arg Arg Asp Pro Ser Ala Val Leu Lys Val Asp Asp Glu Tyr His
 [0316] 50 55 60
 [0317] Val Trp Tyr Thr Lys Gly Glu Gly Glu Thr Val Gly Phe Gly Ser Asp
 [0318] 65 70 75 80
 [0319] Asn Pro Glu Asp Lys Val Phe Pro Trp Asp Lys Thr Glu Val Trp His
 [0320] 85 90 95
 [0321] Ala Thr Ser Lys Asp Lys Ile Thr Trp Lys Glu Ile Gly Pro Ala Ile
 [0322] 100 105 110
 [0323] Gln Arg Gly Ala Ala Gly Ala Tyr Asp Asp Arg Ala Val Phe Thr Pro
 [0324] 115 120 125
 [0325] Glu Val Leu Arg His Asn Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val
 [0326] 130 135 140
 [0327] Lys Ala Pro Tyr Leu Asn Arg Ser Leu Glu His Ile Ala Ile Ala Tyr
 [0328] 145 150 155 160
 [0329] Ser Asp Ser Pro Phe Gly Pro Trp Thr Lys Ser Asp Ala Pro Ile Leu
 [0330] 165 170 175
 [0331] Ser Pro Glu Asn Asp Gly Val Trp Asp Thr Asp Glu Asp Asn Arg Phe
 [0332] 180 185 190
 [0333] Leu Val Lys Glu Lys Gly Ser Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro
 [0334] 195 200 205
 [0335] Cys Leu Met Phe Phe Asn Asn Arg Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu

[0336]	210	215	220
[0337]	Thr Met Gly Glu Ser Met Asn Met Gly Gly Arg Glu Ile Lys His Gly		
[0338]	225	230	235 240
[0339]	Val Ala Ile Ala Asp Ser Pro Leu Gly Pro Tyr Thr Lys Ser Glu Tyr		
[0340]	245	250	255
[0341]	Asn Pro Ile Thr Asn Ser Gly His Glu Val Ala Val Trp Pro Tyr Lys		
[0342]	260	265	270
[0343]	Gly Gly Met Ala Thr Met Leu Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr		
[0344]	275	280	285
[0345]	Cys Gln Trp Ala Glu Asp Gly Ile Asn Phe Asp Ile Met Ser His Ile		
[0346]	290	295	300
[0347]	Lys Gly Ala Pro Glu Ala Val Gly Phe Phe Arg Pro Glu Ser Asp Ser		
[0348]	305	310	315 320
[0349]	Asp Asp Pro Ile Ser Gly Ile Glu Trp Gly Leu Ser His Lys Tyr Asp		
[0350]	325	330	335
[0351]	Ala Ser Trp Asn Trp Asn Tyr Leu Cys Phe Phe Lys Thr Arg Arg Gln		
[0352]	340	345	350
[0353]	Val Leu Asp Ala Gly Ser Tyr Gln Gln Thr Gly Asp Ser Gly Ala Val		
[0354]	355	360	365
[0355]	<210> 6		
[0356]	<211> 1107		
[0357]	<212> DNA		
[0358]	<213> 糖酵母降解 2-40		
[0359]	<400> 6		
[0360]	atgagcgatt caaaagtaaa taaaaaattg agtaaagcta gcctgcgagc catagagcgc	60	
[0361]	ggctacgatg aaaaggggcc tgaatggctg tttgagtttg atattacccc actaaaaggc	120	
[0362]	gacttagcct acgaagaagg cgtaattcgt cgagacccca gcgcagtatt aaaggtggac	180	
[0363]	gatgaatatc acgttttgta caccaagggc gaaggtgaaa cagtaggctt cggcagcgac	240	
[0364]	aaccccgaaag acaaagtctt cccatgggat aaaacagaag tttggcacgc cacctctaaa	300	
[0365]	gataagatta cttgaaaga aattggccct gccatacaac gcggcgcagc tggggcatat	360	
[0366]	gatgaccgtg cagtgttcac ccccgaagtc ctgcgccata acggcaccta ctaccttgta	420	
[0367]	tatcaaacgg taaaagcgcc ctacttaaac cgatcgctag agcatatagc catcgcatac	480	
[0368]	agcgattccc cctttggccc atggaccaaa tccgatgcgc caattttaag ccagaaaaat	540	
[0369]	gacggcgttt gggatacga cgaagacaat cgatttttag taaaagagaa aggcagtttc	600	
[0370]	gatagccaca aagtacacga cccctgctta atgtttttta acaatcgttt ctacctgtat	660	
[0371]	tacaaaggcg agactatggg cgaaagcatg aacatgggcg gcagagaaat aaaacacggt	720	
[0372]	gtagccattg ccgactcgcc acttgggccc tacaccaaaa gcgaatacaa ccctattacc	780	
[0373]	aatagtggcc atgaagttgc cgtatggccc tacaaagggtg gaatggccac catgctaacc	840	
[0374]	accgacgggc cagaaaaaaa cacctgccag tgggcagaag acggcattaa ctttgacatt	900	
[0375]	atgtcgcata taaaaggcgc accagaagca gtaggttttt ttagaccaga aagcgatagc	960	
[0376]	gacgacccta taagcggcat tgaatggggg ctaagccaca agtacgacgc cagctggaac	1020	
[0377]	tggaactatc tatgcttttt taaaacgcgt cgacaagttt tagatgcagg tagctatcag	1080	

[0378] caaacaggcg attccggagc agtataa 1107

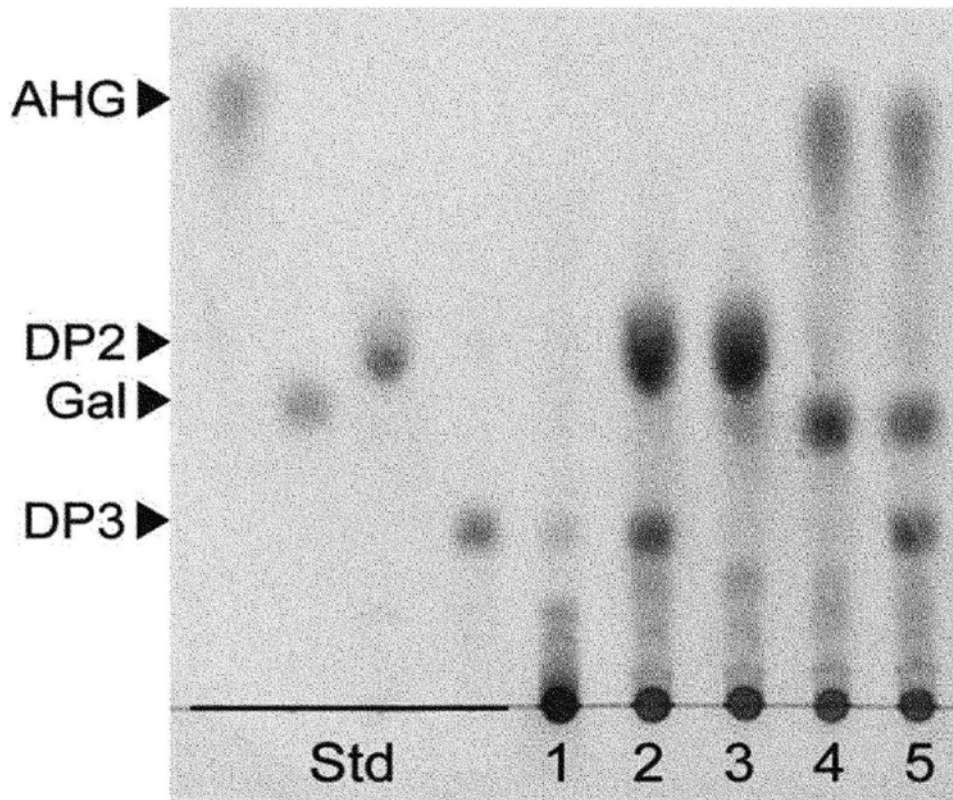


图1

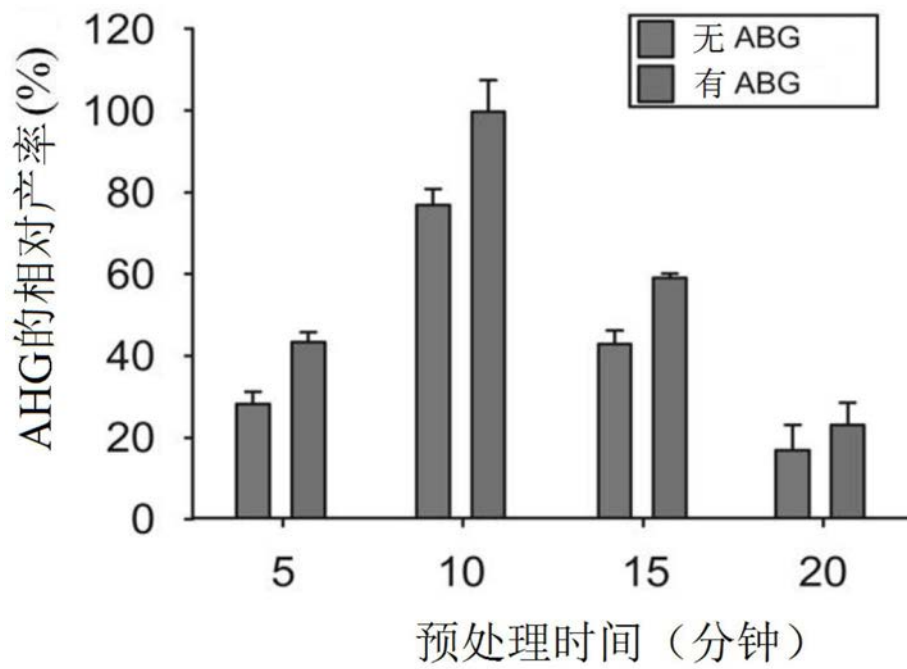


图2

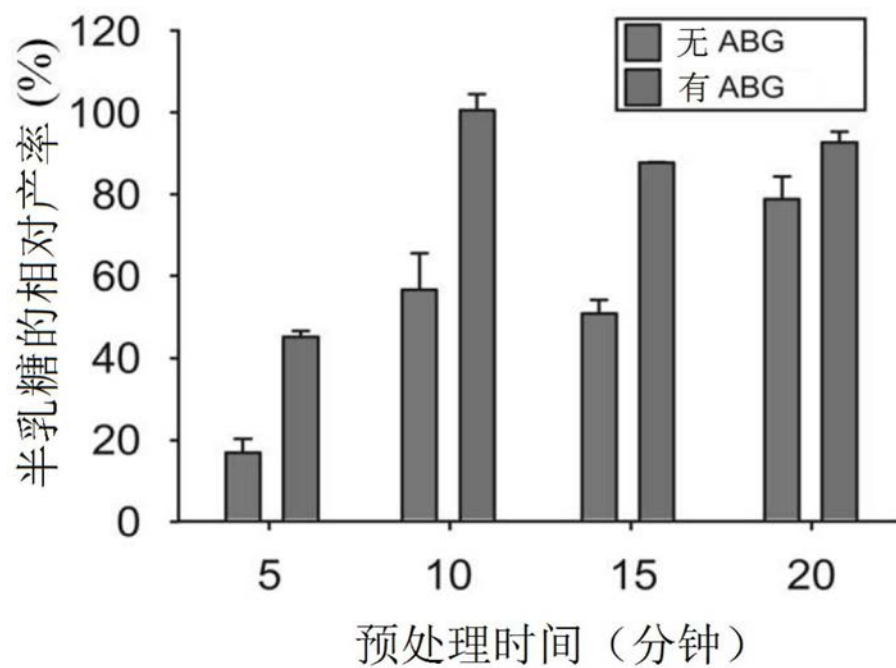


图3