(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111629733 A
(43)申请公布日 2020.09.04

(21)申请号 201880086759.2

(22)申请日 2018.11.15

(30)优先权数据
10-2017-0153350 2017.11.16 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2018/014003 2018.11.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/098708 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 金东玄 俞素萝 赵庆纹 朴娜庭

(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 杨贝贝 臧建明

(51)Int.Cl.
A61K 31/729(2006.01)
A61K 35/74(2015.01)
A61K 35/745(2015.01)
A23L 33/10(2016.01)
A23L 33/135(2016.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

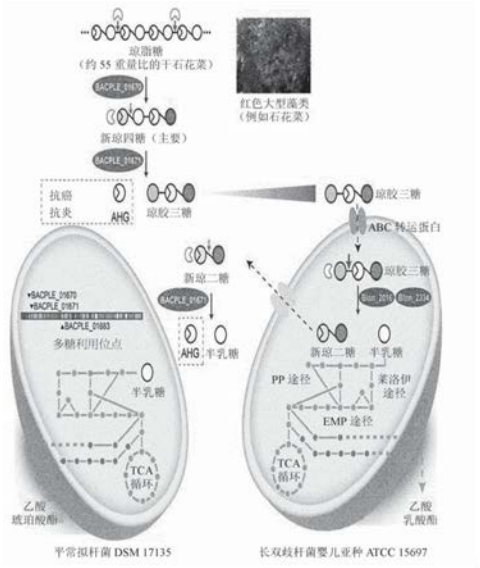
权利要求书2页 说明书14页
序列表12页 附图10页

(54)发明名称

用于产生海藻衍生的琼胶三糖的方法和其作为益生菌的用途

(57)摘要

本发明涉及一种用于产生海藻衍生的琼胶三糖的方法和其作为益生菌的用途。更具体来说,本发明研究作为益生菌的琼胶三糖的特性,其通过益生菌微生物选择性地代谢,从而使琼胶三糖能够在食品和药品领域中用作抗癌剂或抗炎剂,并且使琼胶三糖能够在红藻衍生的多糖在未经预处理的情况下酶水解之后以最小损失经由高效纯化以高产率获得。



CN 111629733 A

1.一种药品组合物,包括:

一种或多种底物,由琼脂、琼脂糖、新琼六糖和琼胶三糖组成的群组中选出;

平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株;以及

双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株。

2.根据权利要求1所述的药品组合物,其中所述平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株包括平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135菌株。

3.根据权利要求1所述的药品组合物,其中所述双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株由长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium Iongum subsp.infantis)ATCC 15697、长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium Iongum subsp.infantis)ATCC 17930、长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15702、两歧双歧杆菌(B.bifidum)DSM20082和柏之叶双歧杆菌(B.kashiwanohense)DSM 21854组成的群组中选出。

4.根据权利要求1所述的药品组合物,其中所述药品组合物通过分别源自平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135菌株的SEQ ID NO:1的β-琼胶酶(beta-agarase)和SEQID NO:2的新琼二糖水解酶(neo-agarobiose hydrolase)以及源自长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium Iongum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的SEQ ID NO:3或4的β-半乳糖苷酶(beta-galactosidase)将所述底物降解为3,6-脱水-L-半乳糖。

5.根据权利要求1所述的药品组合物,其中所述药品组合物用于预防或治疗癌症或炎性疾病。

6.一种食品组合物,包括:

一种或多种底物,由琼脂、琼脂糖、新琼六糖和琼胶三糖组成的群组中选出;

平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株;以及

双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株。

7.根据权利要求6所述的食品组合物,其中所述平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株包括平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135菌株。

8.根据权利要求6所述的食品组合物,其中所述双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株由长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium Iongum subsp.infantis)ATCC 15697、长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium Iongum subsp.infantis)ATCC 17930、长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium Iongum subsp.infantis)ATCC15702、两歧双歧杆菌(B.bifidum)DSM 20082和柏之叶双歧杆菌(B.kashiwanohense)DSM 21854组成的群组中选出。

9.根据权利要求6所述的食品组合物,其中所述食品组合物通过分别源自平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135菌株的SEQ ID NO:1的β-琼胶酶(beta-agarase)和SEQ ID NO:2的新琼二糖水解酶(neo-agarobiose hydrolase)以及源自长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium Iongum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的SEQ ID NO:3或4的β-半乳糖苷酶(beta-galactosidase)将所述底物降解为3,6-脱水-L-半乳糖。

10.根据权利要求1所述的食品组合物,其中所述食品组合物用于预防或缓解癌症或炎性疾病。

11.一种用于产生琼胶三糖的方法,包括:

使反应产物与SEQ ID NO:2或6的新琼二糖水解酶反应,其中所述反应产物通过使琼脂、琼脂糖或新琼六糖中的任何一种底物与SEQ ID NO:1或5的β-琼胶酶反应来获得;以及

经由尺寸排阻柱从所得产物中纯化琼胶三糖。

12.根据权利要求11所述的用于产生琼胶三糖的方法,其中SEQ ID NO:1的所述β-琼胶酶是源自平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135菌株的酶,且将琼脂、琼脂糖或新琼六糖用作所述底物,以降解为新琼四糖和新琼二糖。

13.根据权利要求11所述的用于产生琼胶三糖的方法,其中所述底物与所述β-琼胶酶的反应在30℃到60℃的温度条件下以0rpm到200rpm进行5分钟到12小时。

14.根据权利要求11所述的用于产生琼胶三糖的方法,其中SEQ ID NO:2的所述新琼二糖水解酶是源自平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135菌株的酶,且将新琼四糖或新琼二糖降解为琼胶三糖、半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖。

15.根据权利要求11所述的用于产生琼胶三糖的方法,其中所述底物和所述β-琼胶酶的所述反应产物与所述新琼二糖水解酶的反应在25℃到45℃的温度条件下以0rpm到200rpm进行30分钟到12小时。

16.一种用于治疗癌症或炎性疾病的方法,包括:向个体投与治疗有效量的药品组合物,

其中所述药品组合物包括:一种或多种底物,由琼脂、琼脂糖、新琼六糖和琼胶三糖组成的群组中选出;

平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株;以及

双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株。

17.根据权利要求16所述的用于治疗癌症或炎性疾病的方法,其中所述平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株包括平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135菌株。

18.根据权利要求16所述的用于治疗癌症或炎性疾病的方法,其中所述双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株由长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697、长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium Iongum subsp.infantis)ATCC 17930、长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium Iongum subsp.infantis)ATCC 15702、两歧双歧杆菌(B.bifidum)DSM 20082和柏之叶双歧杆菌(B.kashiwanohense)DSM 21854组成的群组中选出。

19.根据权利要求16所述的用于治疗癌症或炎性疾病的方法,其中所述癌症是结肠癌、宫颈癌、乳癌、胃癌和肝癌中的任何一个。

用于产生海藻衍生的琼胶三糖的方法和其作为益生菌的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于产生海藻衍生的琼胶三糖的方法和其作为益生菌的用途。

背景技术

[0002] 益生菌(Prebiotics)是指由肠道有益菌选择性地发酵以改善肠道菌群且有益于人体健康的物质。虽然最近已经报道了关于人类疾病与肠道菌群之间的相关性的研究,但已将肠道菌群认为是第二人类基因组,从而使得本领域中的研究已经迅速发展。特定来说,由于有研究结果报道,随着肠道有益菌群分布的增加,肥胖症、糖尿病和免疫功能得到改善,因此关于肠道菌群的研究已获得更多关注。

[0003] 已经由动物实验预测了作为构成红藻的主要多糖的琼脂糖的水解产物的益生菌效果。作为向患有因高脂饮食诱发的肥胖症的大鼠口服投与琼胶寡糖混合物的结果,确认作为肠道有益菌的双歧杆菌的分布程度增加。此外,琼胶寡糖混合物促进肠道低分子量脂肪酸的合成,且诱导免疫和抗炎功能相关基因的表达。另外,确认在通过两种类型的内切型β-琼胶酶酶促反应从琼脂糖产生新琼寡糖混合物的情况下,双歧杆菌和乳酸杆菌在新琼寡糖混合物的碳源条件下生长。然而,在此实验中,由于双歧杆菌和乳酸杆菌的生长测试不是在缺少新琼寡糖混合物作为对照的条件下进行的,因此存在如下问题:无法确切地知道生长是由培养基中的其它碳源引起的还是由新琼寡糖的代谢引起的。另外,确认当向大鼠模型投与新琼寡糖混合物时,双歧杆菌和乳酸杆菌的分布程度增加。

[0004] 如先前所描述,到目前为止,由于红藻衍生的寡糖的益生菌功能性研究已经使用了混合物而不是纯化的标准物质,因此根本不知道哪些有效指标成分会在实际上具有益生菌活性的同时在肠道菌群中产生变化。此外,不知道琼脂糖衍生的寡糖如何通过肠道有效益生菌微生物代谢。

[0005] 同时,构成红藻的主要多糖是琼脂糖,且琼脂糖是3,6-脱水-L-半乳糖(在下文中称为‘3,6-AHG’)和D-半乳糖(在下文中称为‘D-Gal’)经由α-1,3-键和β-1,4-键交替地连接在一起的聚合物。先前的研究建立了用于产生具有抗龋、抗炎、美白和保湿功能的AHG的工艺。通过使用弱酸、乙酸或低浓度中性缓冲液、Tris-HCl缓冲液(pH7.4)预处理底物来获得琼胶寡糖(agarooligosaccharides),且经由外切型β-琼胶酶II酶(exo-type β-agaraseII)促反应从琼胶寡糖中产生新琼二糖(neoagarobiose)。在这种情况下,存在如下缺点:琼胶三糖(agarotriose)也作为副产物产生,且为了将琼胶三糖降解成单糖AHG和半乳糖,需要引入一种称为琼胶降解β-半乳糖苷酶(agarolytic β-galactosidase,ABG)的额外酶。然而,经由各种文献,目前已知作为在先前研究中被视为用于产生AHG的副产物的寡糖的呈Gal-AHG-Gal形式的琼胶三糖,以促进身体的肠道功能中的有益菌且本身具有益生菌效果,但用于获得纯化的和纯的琼胶三糖的详细工艺技术在国内是未知的。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的是通过研究肠道有效益生菌微生物对琼胶三糖的代谢来提供琼胶三糖作为药品或食品物质的用途。

[0008] 本发明的另一目的是提供一种用于通过酶水解和纯化来制备琼胶三糖的方法。

[0009] 技术解决方法

[0010] 为了实现所述目的,本发明提供一种药品组合物,包含:由琼脂、琼脂糖、新琼六糖和琼胶三糖组成的群组中选出的一种或多种底物;平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株;以及双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株。

[0011] 本发明还提供一种用于治疗癌症或炎性疾病的方法,所述方法包含:向个体投与治疗有效量的药品组合物。

[0012] 本发明还提供一种食品组合物,包含:由琼脂、琼脂糖、新琼六糖和琼胶三糖组成的群组中选出的一种或多种底物;平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株;以及双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株。

[0013] 本发明还提供一种用于制备琼胶三糖的方法,所述方法包含:使反应产物与SEQ ID NO:2或6的新琼二糖水解酶反应,其中所述反应产物通过使琼脂、琼脂糖或新琼六糖中的任何一种底物与SEQ ID NO:1或5的β-琼胶酶反应来获得;以及经由尺寸排阻柱从所得产物中纯化琼胶三糖。

[0014] 有利效应

[0015] 本发明具有如下效果:本发明可通过研究作为益生菌的琼胶三糖的特性来在药品和食品领域中用作抗癌或抗炎物质,所述益生菌通过例如拟杆菌和双歧杆菌的益生菌微生物选择性地代谢。

[0016] 另外,本发明具有使琼胶三糖能够在红藻衍生的多糖在未经预处理的情况下酶水解之后以最小损失经由高效纯化以高产率获得的效果。

附图说明

[0017] 图1示出用于经由酶促反应从琼脂糖中产生具有不同聚合度的寡糖、新琼二糖和AHG的示意性视图。

[0018] 图2示出纯化多糖降解菌(S.degradans)2-40T衍生的内切型β-琼胶酶Aga16B、外切型β-琼胶酶Aga50D和α-新琼二糖水解酶SdNABH的重组蛋白的结果(A)、经由酶促反应从琼脂糖中产生具有不同聚合度的寡糖、新琼二糖和3,6-AHG的结果(B),以及经由琼脂糖与平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135衍生的内切型β-琼胶酶BpGH16A(BACPLE_01670)与新琼二糖水解酶BpGH117(BACPLE_01671)的酶反应产物的尺寸排阻色谱来纯化糖的结果(C)。

[0019] 图3示出在大肠杆菌中表达之后纯化肠道微生物平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM17135衍生的内切型β-琼胶酶BpGH16A(BACPLE_01670)和BpGH50(BACPLE_01683)和新琼二糖水解酶BpGH117(BACPLE_01671)的每一重组酶的结果(A)和进行酶促反应实验的结果(B)。

[0020] 图4示出经由平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135衍生的内切型β-琼胶酶BpGH16A(BACPLE_01670)与来自琼脂糖底物的新琼二糖水解酶BpGH117(BACPLE_01671)的酶促反应来产生琼胶三糖和AHG的结果。

[0021] 图5示出使用生物栅C(A:AHG、B:NeoDP2、C:AgaDP3、D:NeoDP4、E:AgaDP5、F:NeoDP6、G:葡萄糖、H:半乳糖、I:2FL)培养作为具有相应纯化的糖作为碳源的益生菌微生物的长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的结果。

[0022] 图6示出分析长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacteriumlongum subsp.infantis)ATCC15697菌株的琼胶三糖发酵曲线的结果(A:将AgaDP3、NeoDP2和半乳糖用作底物的结果;B:细胞密度和作为底物的乙酸和乳酸)。

[0023] 图7示出使用长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的粗酶溶液的琼胶三糖(A)和新琼二糖(B)的降解实验结果。

[0024] 图8示出在克隆长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的四个β-半乳糖苷酶编码基因(Blon_2016、Blon_2123、Blon_2334和Blon_2416)并且从大肠杆菌中产生和纯化重组蛋白之后进行酶促反应的结果(A:凝胶照片;B:TLC结果;C:琼胶三糖底物的相应酶的β-半乳糖苷酶比活性)。

[0025] 图9示出作为属于长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacteriumlongum subsp.infantis)(A:长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 17930;B:长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15702)的其它菌株的长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacteriumlongum subsp.infantis)ATCC 17930和长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15702菌株对琼胶三糖的发酵能力的实验结果。

[0026] 图10示出两歧双歧杆菌(B.bifidum)DSM20082和柏之叶双歧杆菌(B.kashiwanohense)DSM21854菌株对琼胶三糖的发酵能力的实验结果(A:两歧双歧杆菌(B.bifidum)DSM20082;B:柏之叶双歧杆菌(B.kashiwanohense)DSM 21854)。

[0027] 图11示出琼胶三糖对人工胃液的稳定性测试结果(A:将TLC结果示出为图表;B:HPLC结果)。

[0028] 图12示出肠道微生物平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135和长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697对琼脂糖的代谢途径。

[0029] 图13示出从琼脂糖中产生和分离琼胶三糖的工艺的示意性视图(A:经由酸处理和酶糖化产生琼胶三糖的工艺;B:经由酶糖化产生和纯化AHG、D-Gal和琼胶三糖的工艺)。

[0030] 图14示出经由两步酶促反应从琼脂糖中产生琼胶三糖和使用尺寸排阻柱纯化琼胶三糖的结果(A:TLC结果;B:HPLC结果)。

[0031] 图15是示出经由平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135衍生的内切型β-琼胶酶BpGH16A(BACPLE_01670)的酶促反应从琼脂糖中产生的新琼四糖与新琼二糖的比率的HPLC定量分析结果。

[0032] 图16示出使用尺寸排阻柱来分析每一部分的分离程度的差异的TLC结果。

[0033] 图17示出使用HPLC KS-802糖柱来测量琼胶三糖的产率和纯度的结果。

具体实施方式

[0034] 本发明的发明人通过经由内切型β型琼胶酶和新琼二糖水解酶反应从作为构成红

藻的主要碳水化合物的琼脂糖中产生琼胶三糖，使用尺寸排阻色谱(size-exclusion chromatography)技术仅纯分离和纯化酶促反应产物当中的琼胶三糖，并且测试益生菌双歧杆菌对琼胶三糖的发酵能力来证明琼胶三糖的益生菌效果。另外，由于通过双歧杆菌对琼胶三糖的发酵所产生的新琼二糖可由来自作为肠道微生物的平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)的新琼二糖水解酶降解成半乳糖和3,6-AHG，且AHG是具有结肠癌预防和抗炎效果的生物活性物质，因此确认了琼胶三糖不仅可预期具有益生菌活性，而且还可预期具有例如经由肠道微生物的代谢的抗癌和抗炎的生物活性。

[0035] 因此，本发明提供一种药品组合物，包含：由琼脂、琼脂糖、新琼六糖和琼胶三糖组成的群组中选出的一种或多种底物；平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株；以及双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株。

[0036] 平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株可包含平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135菌株。

[0037] 双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株可包含长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 17930、长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15702、两歧双歧杆菌(B.bifidum)DSM 20082、柏之叶双歧杆菌(B.kashiwanohense)DSM 21854等。

[0038] 本发明的药品组合物的特征在于通过平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株和双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株将底物最终降解成3,6-AHG。

[0039] 更具体来说，3,6-AHG通过分别源自平常拟杆菌(Bacteroidesplebeius)DSM 17135菌株的SEQ ID NO:1的β-琼胶酶(beta-agarase)和SEQ ID NO:2的新琼二糖水解酶(neo-agarobiose hydrolase)以及源自长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的SEQ ID NO:3或4的β-半乳糖苷酶(beta-galactosidase)而从底物中降解。

[0040] β-琼胶酶是源自平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135的酶，且将琼脂、琼脂糖或新琼六糖用作底物，以将底物降解成新琼四糖和新琼二糖，且可由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示。

[0041] β-琼胶酶不仅可经由在酶的编码区之前和之后的区而且还可经由DNA片段来进行转录和转化，所述片段与包含个别编码片段之间的中间序列的多肽的产生相关联。另外，作为具有酶的取代、缺失、转座、添加等中的一个或多个的变体蛋白质的具有琼脂、琼脂糖或新琼六糖的水解活性蛋白质也包含在本发明的酶的范围中，并且优选地包含与SEQ ID NO:1中所列举的氨基酸序列具有80％或超过80％、85％或超过85％、90％或超过90％、93％或超过93％、94％或超过94％、95％或超过95％、96％或超过96％、97％或超过97％、98％或超过98％和99％或超过99％的序列一致性的氨基酸序列。

[0042] β-琼胶酶可从平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135培养物的上清液中分离与纯化，且可使用基因工程重组技术、人工化学合成方法等从除平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135之外的菌株中产生和分离。当使用基因工程重组技术时，所述β-琼胶酶可由转化的大肠杆菌的培养物产物的上清液或上清液流体替代，但技术不特别限于此。根据具体示范性实施例，β-琼胶酶可从用包含对β-琼胶酶进行编码的基因的核酸序列的重组载体转化的大肠杆菌或其培养物中获得。

[0043] 新琼二糖水解酶是源自平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135的酶,且将新琼四糖或新琼二糖用作底物,以将底物降解成琼胶三糖、半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖,且可由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示。

[0044] 新琼二糖水解酶不仅可经由在新琼二糖水解酶的编码区之前和之后的区而且还可经由DNA片段来进行转录和转化,所述片段与包含个别编码片段之间的中间序列的多肽的产生相关联。另外,作为具有酶的取代、缺失、转座、添加等中的一个或多个的变体蛋白质的具有琼脂、琼脂糖或新琼六糖的水解活性的蛋白质也包含在本发明的酶的范围中,并且优选地包含与SEQ ID NO:2中所公开的氨基酸序列具有80%或超过80%、85%或超过85%、90%或超过90%、93%或超过93%、94%或超过94%、95%或超过95%、96%或超过96%、97%或超过97%、98%或超过98%和99%或超过99%的序列一致性的氨基酸序列。

[0045] 新琼二糖水解酶可从平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135培养物的上清液中分离与纯化,且可使用基因工程重组技术、人工化学合成方法等从除平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135之外的菌株中产生和分离。当使用基因工程重组技术时,所述新琼二糖水解酶可由转化的大肠杆菌的培养物产物的上清液或上清液流体替代,但技术不特别限于此。根据具体示范性实施例,新琼二糖水解酶可从用包含对新琼二糖水解酶进行编码的基因的核酸序列的重组载体转化的大肠杆菌或其培养物中获得。

[0046] β-半乳糖苷酶是源自长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC15697且将琼胶三糖降解成新琼二糖和半乳糖的酶,是从Blon_2016、Blon_2334基因中产生的蛋白质,且可由SEQ ID NO:3或4的氨基酸序列表示。

[0047] β-半乳糖苷酶不仅可经由在酶的编码区之前及之后的区而且还可经由DNA片段来进行转录和转化,所述片段与包含个别编码片段之间的中间序列的多肽的产生相关联。另外,作为具有酶的取代、缺失、转座、添加等中的一个或多个的蛋白质变体的具有琼胶三糖的水解活性的蛋白质也包含在本发明的酶的范围中,并且优选地包含与SEQ ID NO:3或4中所公开的氨基酸序列具有80%或超过80%、85%或超过85%、90%或超过90%、93%或超过93%、94%或超过94%、95%或超过95%、96%或超过96%、97%或超过97%、98%或超过98%和99%或超过99%的序列一致性的氨基酸序列。

[0048] β-半乳糖苷酶可从长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697培养物的上清液中分离与纯化,且可使用基因工程重组技术、人工化学合成方法等从除长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697之外的菌株中产生和分离。当使用基因工程重组技术时,所述β-半乳糖苷酶可由转化的大肠杆菌的培养物产物的上清液或上清液流体替代,但技术不特别限于此。根据具体示范性实施例,β-琼胶酶可从用包含对β-琼胶酶进行编码的基因的核酸序列的重组载体转化的大肠杆菌或其培养物中获得。

[0049] 在本说明书中,“蛋白质”和“多肽”可互换地使用。

[0050] 在本发明中,多肽与另一序列具有具体比例的序列一致性(例如80%、85%、90%、95%或99%)的事实意味着当两个序列进行比对时,氨基酸残基在比较序列时的比例彼此相同。比对和百分比同源性或一致性可通过使用本领域中公开已知的任何合适的软件程序中所描述的那些文献(例如,文献[现代分子生物学实验指南[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F.M.奥斯贝等人(版),1987年,增刊30第7.7.18节)]来确定。优选程序

的实例包含:GCG累积程序、FASTA(皮尔逊等人,1988年美国科学院院刊85:2444-2448)和BLAST(BLAST手册,阿特舒尔等人,美国国立生物技术信息中心,国立医学图书馆(NCIB NLM NIH),马里兰州,贝塞斯达,阿特舒尔等人,1997年,NAR25:33893402)。另一优选比对程序是ALIGNPlus(科学和教育软件,PA),并且优选地是使用基本参数的比对程序。另一可获得的序列软件程序是序列软件包6.0版(遗传学计算机组,威斯康星州麦迪逊,威斯康星大学)中可获得的TFASTA数据搜索程序。

[0051] 如本文中所使用,术语“重组”在与细胞、核酸、蛋白质或载体结合使用时指示细胞、核酸、蛋白质或载体已通过引入异源核酸或蛋白质或改变原始核酸或蛋白质进行了改性,或指示细胞源自由此改性的细胞。也就是说,例如,重组细胞表达未在原始(非重组)形式的细胞内发现的基因,或替代地,重组细胞表达在表达时异常地表达或根本未表达的原始基因。

[0052] 在本说明书中,“核酸”涵盖单链或双链DNA和RNA以及其化学变体。“核酸”和“多核苷酸”在本申请案中可互换地使用。由于遗传密码简并,因此可使用一个或多个密码子,以便对具体氨基酸进行编码,且本发明涵盖对具体氨基酸序列进行编码的多核苷酸。

[0053] 将核酸序列插入到细胞中的术语“引入”是指“转染(transfection)”或“转化”或“转换(transduction)”,且包含将核酸序列整合到真核细胞或原核细胞中的参考,且在这种情况下,核酸序列整合到细胞的基因组(例如染色体、质体、色素体或线粒体DNA)中,且由此转化为自主复制子或被瞬时表达。

[0054] 本发明的药品组合物将琼脂、琼脂糖、新琼六糖或琼胶三糖代谢成具有抗炎和抗癌活性的3,6-AHG,且由此可用于预防或治疗癌症或炎性疾病。

[0055] 如本文中所使用,术语“预防”是指通过向个体投与本发明的药品组合物来抑制或延缓癌症或炎性疾病的发病的所有动作。

[0056] 如本文中所使用,术语“治疗”是指通过向个体投与本发明的药品组合物来改善或有益地改变癌症或炎性疾病的症状的所有动作。

[0057] 如本文中所使用,‘有效量’是指能够显现抗癌效果或抑制炎症的化合物的量。

[0058] 癌症可以是结肠癌、宫颈癌、乳癌、胃癌、肝癌等。

[0059] 如本文中所使用,‘抗炎效果’或‘抗炎活性’是指对炎症的抑制,且炎症是活体组织对某一刺激的防御反应中的一个,并且是指涉及三种情况的复杂损伤:组织退化、循环障碍和渗出和组织增生。更具体来说,炎症是先天免疫的一部分,且人类先天免疫识别病原体中具体存在的细胞表面图案。吞噬细胞将具有这种表面的细胞识别为异物并攻击病原体。如果病原体突破身体的物理屏障,那么就会出现炎性反应。炎性反应是为已经侵入伤口部位的微生物形成不利环境的非特异性防御动作。在炎性反应中,当伤口出现或外部致病源进入身体时,在初始阶段负责免疫反应的白细胞聚集并且表达细胞因子。因此,胞内细胞因子的表达水平是炎性反应激活的指标。

[0060] 炎性疾病包含例如水肿的一般炎性症状,且可包含炎性肠病、腹膜炎、骨髓炎、蜂窝组织炎、胰脏炎、创伤性休克、支气管性哮喘、过敏性鼻炎、囊性纤维化、急性支气管炎、慢性支气管炎、急性毛细支气管炎、慢性毛细支气管炎、骨关节炎、痛风、脊柱关节病、强直性脊柱炎、赖特尔综合征、牛皮癣性关节病、肠病性脊柱炎、青少年关节病、青少年强直性脊柱炎、反应性关节病、感染性关节炎、感染后关节炎、淋病性关节炎、结核性关节炎、病毒性关

节炎、真菌性关节炎、梅毒性关节炎、莱姆病、与‘血管炎综合征’相关联的关节炎、结节性多动脉炎、过敏性血管炎、葛雷克氏肉芽肿病、风湿性多肌痛、关节软骨细胞动脉炎、钙结晶沉积性关节病、假性痛风、非关节性风湿病、滑囊炎、腱鞘炎、上髁炎(网球肘)、神经性关节病(neuropathic ioint disease;或称为‘夏科氏关节病’)、关节血肿(hemarthrosic)、过敏性紫癜、肥大性骨关节病、多中心性网状组织细胞增生症、脊柱侧凸(scoliosis)、血色沉着病、血红蛋白病、高脂蛋白血症、低丙球蛋白血症、家族性地中海热(familial Mediterranean fever)、白塞氏病、全身性红斑狼疮、回归热、多发性硬化、败血症、败血性休克、急性呼吸窘迫综合征、多器官功能障碍综合征、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、急性肺损伤(acute lung injury)、支气管肺发育不良(broncho-pulmonary dysplasia)、2型糖尿病、动脉硬化、阿尔茨海默型老年痴呆、家族性寒冷型自身炎症性综合征(familial cold autoinflammatory syndrome)、穆-韦综合征(Muckle-Wells syndrome)、新生儿多系统炎性疾病(neonatal mutisystem inflammatory disease)、慢性婴儿神经性皮肤关节综合征(chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome)、成人斯蒂尔病(adult-onset Still′s disease)、接触性皮炎、葡萄胎(hydatidiform mole)、PAPA综合征、坏疽性脓皮病和痤疮(syndrome of pyogenic arthritis,pyoderma gangrenosum,and acne)、高免疫球蛋白D综合征(hyperimmunoglobulin d syndrome)、隐热蛋白相关周期性综合征(cryopyrin-associated periodic syndrome)等。

[0061] 本发明的药品组合物可还包含药学上可接受的载剂。

[0062] 药学上可接受的载剂包含通常在医学领域中使用的载剂和媒介物,且其具体实例包含离子交换树脂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如人血清蛋白)、缓冲液物质(例如各种磷酸、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和的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、氯化钠和锌盐)、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素类底物、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚芳酯、蜡、聚乙二醇、毛料等,但不限于此。

[0063] 此外,除了前述成分之外,本发明的药品组合物还可另外包含润滑剂、湿润剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等。

[0064] 作为一个方面,本发明的药品组合物可以适用于口服或非肠道投与的各种剂型配制和使用。

[0065] 用于口服投与的制剂的非限制性实例包含糖锭剂(troches)、锭剂(lozenge)、片剂、水悬浮液、油悬浮液、制备的粉末、颗粒剂、乳剂、硬胶囊、软胶囊、糖浆剂、酏剂等。

[0066] 为了配制用于口服投与的本发明的药品组合物,可使用粘合剂,例如乳糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、胶淀粉(Amylopectin)、纤维素(Cellulose)或明胶(Gelatin);赋形剂,例如磷酸二钙(Dicalciumphosphate);崩解剂,例如玉米淀粉或甘薯淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁(Magnesium stearate)、硬脂酸钙(Calcium stearate)、硬脂酰富马酸钠(Sodium stearyl fumarate)或聚乙二醇蜡(Polyethylene glycol wax)等,且还可使用甜味剂、芳香剂、糖浆剂等。

[0067] 此外,在胶囊的情况下,除了上述物质之外,还可进一步使用例如脂肪油的液体载剂。

[0068] 用于非肠道投与的制剂的非限制性实例包含注射剂、栓剂、呼吸吸入粉、气溶胶喷雾、口腔喷雾剂、口腔清洁剂、牙膏、软膏、涂敷粉末、油、乳膏等。

[0069] 为了配制用于非肠道投与的本发明的药品组合物，可使用无菌水溶液、非水溶剂、悬浮液、乳剂、冻干制剂、外用药剂等，且作为非水溶剂和悬浮液，可使用丙二醇、聚乙二醇、例如橄榄油的植物油、例如油酸乙酯的可注射酯等。

[0070] 此外，更具体来说，当将本发明的药品组合物配制成注射剂时，可将本发明的药品组合物与稳定剂或缓冲液在水中混合，以制备成溶液或悬浮液，然后将其配制成例如安瓿(ampoule)或小瓶(vial)的单位剂型。此外，当将本发明的药品组合物配制成气溶胶时，可将喷射剂等与添加剂混合以使水分散型浓缩物或湿粉末分散。

[0071] 此外，当将本发明的药品组合物配制成软膏、乳膏等时，可使用动物油、植物油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、二氧化硅、滑石、氧化锌等作为载剂来配制药品组合物。

[0072] 本发明的药品组合物的药学上有效的量和有效剂量可根据配制方法、投与模式、投与方案和/或投与途径等而变化，且可根据包含要经由本发明的药品组合物的投与实现的反应的类型和程度、组合物所投与至的个体的类型、年龄、体重和一般健康状况、疾病的症状或严重程度、性别、饮食、排泄、在对应个体中同时或在不同时间使用的药物、其它组合物的成分等的各种因素和医学领域中所熟知的类似因素而变化，且所需治疗的有效剂量可由本领域的普通技术人员容易地确定并开处方。本发明的药品组合物可每日投与一次或若干次。因此，剂量并不旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0073] 本发明的药品组合物的投与途径和投与模式可彼此独立，投与方法不受特别限制，且投与途径和投与模式可遵循任意的投与途径和投与模式，只要所述投与途径和投与模式使药品组合物能够到达所靶向的对应部位即可。药品组合物可以口服或非肠道方式投与。

[0074] 非肠道投与可使用例如静脉内投与、腹膜内投与、肌内投与、经皮投与、皮下投与等，还可使用用于将药品组合物施用或喷射到疾病部位上或吸入药品组合物的方法，但方法并不限于此。

[0075] 本发明的药品组合物可优选地口服投与或通过注射投与。

[0076] 本发明还提供一种用于治疗癌症或炎性疾病的方法，所述方法包含：向个体投与治疗有效量的药品组合物。

[0077] 如本文中所使用，术语“个体”是指包含哺乳动物的所有动物，哺乳动物包含大鼠、牲畜、人类等。

[0078] 在用于治疗本发明的癌症或炎性疾病的方法中，对药品组合物的剂量、投与途径、投与模式等的描述与上文关于药品组合物所描述的内容相同。另外，癌症或炎性疾病的类型也与上文关于药品组合物所描述的内容相同。

[0079] 本发明还提供一种食品组合物，包含：由琼脂、琼脂糖、新琼六糖和琼胶三糖组成的群组中选出的一种或多种底物；平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)菌株；以及双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株。

[0080] 可将食品组合物制备成通过胶囊化、粉化、悬浮液等制备的食品制剂。

[0081] 由于食品剂型可每日服用，因此食品剂型可被预期预防或缓解癌症或炎性疾病且

非常有用。

[0082] 食品类型不受特别限制,且包含例如乳制品、典型意义上的健康食品等。

[0083] 本发明还提供一种用于制备琼胶三糖的方法,所述方法包含:

[0084] 使反应产物与SEQ ID NO:2或6的新琼二糖水解酶反应,其中所述反应产物通过使琼脂、琼脂糖或新琼六糖中的任何一种底物与SEQ ID NO:1或5的β-琼胶酶反应来获得;以及

[0085] 经由尺寸排阻柱从所得产物中纯化琼胶三糖。

[0086] 在常规工艺(图13的A)的情况下,其中酶水解在弱酸预处理之后进行,在中和工艺中产生大量的盐,且当使用低浓度中性缓冲液时,预处理反应需要在高温(170℃)下进行,从而使得需要高温和高压反应器。此外,琼胶三糖的制造产率因集中于提高3,6-AHG的制造产率而相当低,且特定来说,用于预处理的乙酸产生难闻的气味。由于这些原因,在将琼胶三糖用作益生菌物质时可能存在问题。因此,用于制备本发明的琼胶三糖的方法通过以下方法来解决上述问题。

[0087] 首先,通过应用通常在琼胶三糖的产生期间产生作为琼胶三糖的前驱体的新琼四糖的β-琼胶酶来省略预处理工艺,且在温和条件下经由两步酶促反应(也就是说,内切型β-琼胶酶、新琼二糖水解酶)获得高产率的琼胶三糖、3,6-AHG和D-Gal。

[0088] 其次,在琼胶三糖的纯化期间,经由使用聚合度的差异的尺寸排阻生物P2凝胶柱(Size exclusion Bio-P2 Gel column),使用尺寸排阻色谱技术分离单糖和三糖,从而获得高纯度琼胶三糖(图13的B)。由于这种纯化工艺使用水作为流动相,而不使用对人体有害的有机溶剂,且在纯化工艺期间几乎没有琼胶三糖损失,因此所述纯化工艺得的优点是可获得纯化的高产率琼胶三糖。

[0089] β-琼胶酶将琼脂、琼脂糖或新琼六糖中的任何一种底物降解成新琼二糖和新琼四糖,所述新琼二糖和新琼四糖是新琼寡糖,可使用源自上述平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135菌株的SEQ ID NO:1的β-琼胶酶,或可使用SEQ ID NO:5的耐热琼胶酶,所述耐热琼胶酶将琼脂或琼脂糖用作底物,以将底物降解成新琼四糖和新琼六糖。

[0090] 耐热琼胶酶可源自多糖降解菌(Saccharophagus degradans)2-40^{T},但不特别限于此。

[0091] 耐热琼胶酶可从多糖降解菌(Saccharophagus degradans)2-40^{T}培养物产物的上清液中分离和纯化,且可使用基因工程重组技术、人工化学合成方法等从除多糖降解菌(Saccharophagus degradans)2-40^{T}之外的菌株中产生和分离。当使用基因工程重组技术时,所述耐热琼胶酶可由转化的大肠杆菌的培养物产物的上清液或上清液流体替代,但技术不特别限于此。

[0092] 琼脂、琼脂糖或新琼六糖中的任何一种底物与β-琼胶酶的反应可在30℃到60℃的温度条件下以0rpm到200rpm进行5分钟到12小时。

[0093] 新琼二糖水解酶将新琼二糖和新琼四糖降解成3,6-AHG、D-Gal和琼胶三糖,且可使用源自上述平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135的SEQ ID NO:2的新琼二糖水解酶,或可使用源自多糖降解菌(Saccharophagus degradans)2-40^{T}的SEQ ID NO:6的α-新琼二糖水解酶。

[0094] 多糖降解菌(Saccharophagus degradans)2-40^{T}衍生的α-新琼二糖水解酶可从多

糖降解菌(Saccharophagus degradans)2-40^{T}的培养物产物的上清液或上清液流体中分离与纯化，且可使用基因工程重组技术、人工化学合成方法等从除多糖降解菌(Saccharophagus degradans)2-40^{T}之外的菌株中产生和纯化。

[0095] β-琼胶酶的反应产物与新琼二糖水解酶的反应可在25℃到45℃的温度条件下以0rpm到200rpm进行30分钟到12小时。

[0096] 在获得由新琼二糖水解酶产生的单糖3,6-AHG和D-Gal以及三糖琼胶三糖之后，可使用尺寸排阻柱来获得具有高纯度和高产率的纯化的琼胶三糖。

[0097] 在下文中，将经由根据本发明的实例更详细地描述本发明，但本发明的范围不受下文中所提出的实例限制。

[0098] 实施本发明的方式

[0099] <实例1>通过β-琼胶酶降解琼脂糖的实验

[0100] 进行酶促反应以产生处于不同聚合度下的琼脂衍生的寡糖，包含来自作为构成红藻的主要碳水化合物的琼脂糖的琼胶三糖。首先，将1％(w/v)浓度的琼脂糖用作底物来进行Aga16B的酶促反应，所述Aga16B是多糖降解菌(S.degradans)2-40T衍生的内切型琼胶酶。在这种情况下，酶促反应在50℃和200rpm下进行2小时。

[0101] 作为酶促反应的结果，产生新琼四糖(DP4)和新琼六糖(DP6)(图2的B)。

[0102] 经由下一步酶、多糖降解菌(S.degradans)2-40T衍生的新琼二糖水解酶(SdNABH)和作为底物的反应产物的酶促反应来产生琼胶三糖(DP3)、琼胶五糖(DP5)和3,6-AHG。SdNABH酶促反应在30℃和200rpm下进行2小时。

[0103] 另外，经由Aga50D、多糖降解菌(S.degradans)2-40T衍生的外切型琼胶酶和作为底物的Aga16B反应产物的酶促反应来产生二糖体新琼二糖(DP2)。Aga50D酶促反应在30℃和200rpm下进行2小时。

[0104] 接下来，作为源自肠道微生物平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135的内切型β-琼胶酶的BpGH16A(BACPLE_01670)的酶促反应条件如下：酶加载量：每克琼脂糖8毫克的BpGH16A；缓冲液：20毫摩尔Tris-HCl(pH7.0)；以及反应温度和时间：40℃和2小时。

[0105] 新琼二糖水解酶BpGH117(BACPLE_01671)的酶促反应条件如下：酶加载量：每克新琼二糖4毫克的BpGH117；缓冲液：20毫摩尔Tris-HCl(pH7.0)；以及反应温度和时间：40℃和2小时。

[0106] 如图2的C中所示出，可经由源自肠道微生物平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135的琼脂降解相关的酶的反应组合从琼脂糖中产生琼胶三糖和3,6-AHG。作为通过TLC(薄层色谱)分析反应产物的结果，经由BpGH16A(BACPLE_01670)酶促反应从琼脂糖底物(泳道1)中产生新琼四糖(DP4)作为主要产物(泳道2)。其后，经由BpGH117(BACPLE_01671)酶促反应产生琼胶三糖和3,6-AHG(泳道2)。即使在两个酶同时反应时，也主要以与在两个酶顺序地反应时相同的方式产生琼胶三糖和3,6-AHG(泳道3)。

[0107] <实例2>平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135衍生的内切型β-琼胶酶BpGH16A(BACPLE_01670)和BpGH50(BACPLE_01683)与新琼二糖水解酶BpGH117(BACPLE_01671)的重组和酶促反应实验

[0108] 如图3中所示出，在平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135衍生的GH50家族酶BpGH50(BACPLE_01683)的情况下，未显现β-琼胶酶活性。

[0109] <实例3>经由平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)DSM 17135衍生的内切型β-琼胶酶BpGH16A(BACPLE_01670)与新琼二糖水解酶BpGH117(BACPLE_01671)的酶促反应从琼脂糖底物中产生琼胶三糖和AHG的实验

[0110] 通过尺寸排阻柱色谱来纯化经由相应纯化的重组酶Aga16B、Aga50D和SdNABH的反应产生的处于不同聚合度下的寡糖、新琼二糖和3,6-AHG。在这种情况下,将葡聚糖凝胶G-10用作尺寸排阻柱色谱的柱树脂。

[0111] 如图4中所示出,经由内切型β-琼胶酶BpGH16A(BACPLE_01670)与新琼二糖水解酶BpGH117(BACPLE_01671)的反应从琼脂糖中产生琼胶三糖和3,6-AHG。

[0112] <实例4>通过使用生物栅C,采用相应纯化的糖作为碳源来培养益生菌微生物长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的实验

[0113] 为了证明琼脂衍生的糖的益生菌效果,将包含琼胶三糖的每种纯化的糖用作单一碳源来监测作为双歧杆菌的长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的细胞生长。在这种情况下,作为培养组合物,使用10克/升的细菌蛋白胨、5克/升的酵母提取物、2克/升的K_2HPO_4酸酐、5克/升的乙酸钠酸酐、2克/升的柠檬酸三元NH_4、0.2克/升的七水合硫酸镁、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/升的半胱氨酸和5克/升的每种纯化的糖,且在37℃下进行培养。

[0114] 如图5中所示出,确认了长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株仅选择性地发酵各种纯化的糖当中的琼胶三糖。

[0115] <实例5>长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的琼胶三糖发酵曲线的分析

[0116] 为了监测发酵产物,在试管条件下培养长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株。

[0117] 如图6中所示出,长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697在浓度为5克/升琼胶三糖的碳源下将琼胶三糖降解成半乳糖和新琼二糖,且半乳糖在细胞中发酵以产生乙酸。新琼二糖在细胞外分泌和积聚,而不再在细胞中降解。

[0118] <实例6>使用长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的粗酶溶液的琼胶三糖和新琼二糖的降解实验

[0119] 为了确认琼胶三糖的代谢途径,对长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的粗酶溶液进行实验。为此目的,通过使在琼胶三糖条件下培养的长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacteriumlongum subsp.infantis)ATCC 15697的培养溶液离心(14,000rpm,5分钟,4℃)来分离细胞和培养基。通过对上清液进行硫酸铵沉淀来获得胞外粗酶。另外,对于包含胞内粗酶的无细胞提取物,通过使细胞重新悬浮在20毫摩尔Tris-HCl缓冲液中,然后通过超声处理使细胞裂解并且使裂解物离心来获得上清液粗酶。在粗酶实验期间,使用2毫克/毫升的粗酶和2毫克/毫升的琼胶三糖作为底物,来在30℃和200rpm的酶促反应条件下,在20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)中将进行反应2小时。

[0120] 如图7中所示出,确认了在包含胞内粗酶的无细胞提取物中发生了将琼胶三糖降解成半乳糖和新琼二糖的β-半乳糖苷酶反应。此外,确认了未显现粗酶对新琼二糖的活性。

[0121] <实例7>长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株的四个β-半乳糖苷酶编码基因(Blon_2016、Blon_2123、Blon_2334和Blon_2416)的重组蛋白产生和酶促反应实验

[0122] 为了确认哪种酶基因具有降解琼胶三糖的活性,在克隆长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697的所有四个β-半乳糖苷酶之后,通过在大肠杆菌中过量表达四个β-半乳糖苷酶且纯化每一酶蛋白质来测试酶活性。

[0123] 如图8中所示出,确认了两个酶基因Blon_2016和Blon_2334的蛋白质显现活性。

[0124] <实例8>属于长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)的其它菌株对琼胶三糖的发酵能力的实验

[0125] 为了确认琼胶三糖是否对除长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697菌株、长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 17930、长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacteriumlongum subsp.infantis)ATCC 15702、两歧双歧杆菌(B.bifidum)DSM 20082和柏之叶双歧杆菌(B.kashiwanohense)DSM 21854之外的益生菌微生物也具有益生菌效果,在琼胶三糖单一碳源条件下进行培养。

[0126] 如图9和图10中所示出,所有的四个益生菌微生物以与长双歧杆菌婴儿亚种(Bifidobacterium longum subsp.infantis)ATCC 15697相同的方式将琼胶三糖代谢且将琼胶三糖降解成半乳糖和新琼二糖,然后通过发酵半乳糖来产生乙酸。

[0127] <实例9>琼胶三糖对人工胃液的稳定性测试

[0128] 为了测试琼胶三糖是否可在无需降解的情况下到达肠道,使琼胶三糖每次都在人工胃液中反应,然后使用TLC和HPLC来确认琼胶三糖是否降解。

[0129] 如图11中所示出,确认在37℃下反应3小时之后,剩下80%或超过80%的琼胶三糖。

[0130] 根据所述结果,首先确认了琼胶三糖是新型红藻衍生的益生菌和由益生菌选择性地发酵的物质。琼胶三糖可通过来自海洋衍生的多糖降解菌(S.degradans)2-40T或肠道微生物衍生的平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)的琼胶酶和NABH的酶促作用产生(图12)。琼胶三糖由益生菌双歧杆菌的ABC转运蛋白相关基因转运到细胞内,且由胞内β-半乳糖苷酶降解成半乳糖和新琼二糖,且半乳糖用于乙酸发酵。此外,新琼二糖可通过来自肠道微生物平常拟杆菌(Bacteroidesplebeius)的新琼二糖水解酶在肠道中降解成半乳糖和3,6-AHG。由于将AHG称为具有结肠癌预防效果和抗炎功能性的生物活性物质,因此琼胶三糖不仅可显现益生菌活性,而且还可因经由通过肠道微生物双歧杆菌和平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)代谢而产生的AHG而显现结肠癌预防和抗炎生物活性(图12)。

[0131] <实例10>产生BACPLE_01670和NABH重组酶

[0132] 使用pET21a载体将平常拟杆菌(Bacteroides plebeius)衍生的β-琼胶酶水解酶BACPLE_01670基因引入到大肠杆菌(E.coli)BL21(DE3)中。为了预培养(pre-culture)引入基因的重组大肠杆菌,在50毫升锥形管中,在含有100微克/毫升的氨苄青霉素(ampicillin)的10毫升LB液体培养基中将重组大肠杆菌在37℃下培养9小时。其后,在将10毫升的预培养溶液接种于具有相同培养基组合物的1升的主培养溶液中之后,当光密度值(Optical density spectroscope)显示为生长到中期指数步骤(OD 0.4到0.6)时,向所述

主培养溶液中加入0.1毫摩尔异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),且通过在16℃下诱导16小时来表达胞内蛋白质。其后,将细胞培养溶液转移到500毫升试管中,且在4℃下以10,000rpm使其离心30分钟,然后获得细胞。为了预防蛋白质变性,再次释放收集在30毫升的Tris缓冲液(20毫摩尔Tris-HCl,pH 7.0)中的细胞,且使用超声波仪(sonicator)使细胞裂解(cell lysis)。其后,在4℃下以16,000rpm使细胞离心1小时。使用HisTrap柱(5毫升,通用电气医疗集团)纯化蛋白质,然后使用SDS-PAGE凝胶来确认每种纯化的蛋白质的尺寸。使用脱盐柱去除用于蛋白质纯化的盐(咪唑)。通过BCA分析方法来量化盐被去除的重组蛋白的浓度。

[0133] 接下来,使用pET21a载体将多糖降解菌(Saccharophagus degradans)2-40^{T}衍生的α-新琼二糖水解酶NABH基因引入到大肠杆菌(E.coli)BL21(DE3)中,且如上文所描述一般制备重组蛋白。

[0134] <实例11>BACPLE_01670与NABH的酶促反应

[0135] 在BACPLE_01670酶促反应期间,将1%(w/v)浓度琼脂糖用作底物,且在50℃和100rpm的条件下,在20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)中进行反应10小时。

[0136] 将BACPLE_01670酶促反应产物新琼四糖和新琼二糖用作底物来进行NABH酶促反应,且在37℃和100rpm的条件下进行酶促反应10小时。

[0137] 通过TLC分析每一步骤中的酶促反应之后的反应产物。对于TLC分析条件,将1微升的酶促反应产物加载到硅胶板上作为固定相,将呈3:1:1(v/v/v)的正丁醇:乙醇:水作为流动相溶剂洗脱1小时,然后使用乙醇中的10%的硫酸和乙醇中的0.2%的1,3-二羟基萘使其显色。

[0138] 如图14的A中所示出,琼脂糖经由内切型β-琼胶酶BACPLE_01670的酶促反应降解成新琼寡糖,且在这种情况下,主要产物是对应于作为聚合度(degree of polymerization,DP)的DP2和DP4的新琼二糖和新琼四糖。其后,经由α-琼胶酶新琼二糖水解酶(NABH)的酶促反应,从DP4中产生三糖琼胶三糖和3,6-AHG,且从DP2中产生D-半乳糖和3,6-AHG。

[0139] <实例12>BACPLE_01670酶促反应产物的HPLC分析

[0140] 在BACPLE_01670酶促反应期间产生的物质是新琼四糖(DP4)和新琼二糖(DP2)(图14的B)。其中,制造琼胶三糖的前驱体是新琼四糖,且DP4产物越多,可获得的琼胶三糖越多。为了确定DP4相对BACPLE_01670的收率,使用HPLC KS-802尺寸排阻柱来计算收率。

[0141] 如图15中所示出,关于BACPLE_01670的反应产物,获得了相对1克的琼脂糖得到0.795克的新琼四糖(每克琼脂糖0.795克新琼四糖)和0.205克的新琼二糖(每克琼脂糖0.205克新琼二糖)的结果。

[0142] <实例13>使用尺寸排阻柱(生物凝胶P2柱)分离DP3(琼胶三糖)和DP1(3,6-AHG,D-Gal)

[0143] 从实例10和实例11中获得的最终反应产物是3,6-AHG和D-Gal以及琼胶三糖,且使用糖分离柱将其中的3,6-AHG和D-Gal与琼胶三糖分离。使用机器AKTAprime(通用电气医疗集团)。对于用于分离糖的流动相,通过使经过三次处理的蒸馏水(Distilled water)以0.3毫升/分钟的流动速率流动来将柱稳定10分钟,然后用2毫升埃彭道夫管转移在注射2毫升的反应产物之后流过柱的1毫升的溶液,并经由TLC进行分析。TLC分析条件与实例11中的那

些条件相同。

[0144] 如图16中所示出,可确认的是,作为通过TLC分析部分收集的样品的结果,分离DP3(琼胶三糖)和DP1(3,6-AHG,D-Gal)。

[0145] <实例14>通过酶糖化对琼脂糖中琼胶三糖的产率和纯度进行HPLC定量分析并通过尺寸排阻柱进行分离

[0146] 在由TLC确认实例13中通过糖分离柱获得的琼胶三糖之后,收集具有高纯度的琼胶三糖的部分。将第55号到第61号部分收集在15毫升锥形管中,并且进行搅拌和充分混合。其后,经由HPLC KS-802柱,通过对7毫升的部分进行取样来分析产率和纯度。

[0147] 如图17中所示出,确认了从1克的琼脂糖中获得0.4克的琼胶三糖(每克琼脂糖0.4克NAB),且约90.2%的样品是琼胶三糖。

[0148] 工业适用性

[0149] 本发明可基于琼胶三糖的益生菌特性而在食品和药品领域中用作抗癌或抗炎剂。

<110> 高丽大学校产学协力团
<120> 琼胶三糖的产生方法和其作为益生菌的用途
<130> X18U13C0184
<150> KR10-2017-0153350
<151> 2017-11-16
<160> 6
<170> KopatentIn 2.0
<210> 1
<211> 316
<212> PRT
<213> 平常拟杆菌 DSM 17135
<400> 1

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

Gly Ser Trp Tyr Lys Asp Asp Lys Gly Thr Leu Trp Arg Asp Asp Phe
210 215 220
His Arg Val Gly Val Phe Trp Lys Asp Pro Phe Thr Leu Glu Tyr Tyr
225 230 235 240
Val Asp Gly Glu Leu Val Arg Thr Ile Ser Gly Lys Asp Ile Ile Asp
245 250 255
Pro Asn Asn Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Leu Val Lys Asp Met Asp Ile
260 265 270
Ile Ile Asn Met Glu Asp Gln Ser Trp Arg Ala Val Lys Gly Leu Ser
275 280 285
Pro Thr Asp Glu Glu Leu Lys Asn Val Glu Asp His Thr Phe Leu Val
290 295 300
Asp Trp Ile Arg Val Tyr Thr Leu Val Pro Glu Glu
305 310 315

<210> 2
<211> 402
<212> PRT
<213> 平常拟杆菌 DSM 17135
<400> 2

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

Arg Ser Val Phe Thr Pro Glu Val Met Glu Trp Lys Gly Lys Tyr Tyr
165 170 175
Leu Cys Tyr Gln Ala Val Lys Ser Pro Tyr Thr Val Arg Val Lys Asn
180 185 190
Thr Ile Gly Met Ala Cys Ala Asp Ser Pro Glu Gly Leu Trp Thr Lys
195 200 205
Thr Asp Lys Pro Val Leu Glu Pro Ser Asp Thr Gly Glu Trp Glu Gly
210 215 220
Asp Glu Asp Asn Arg Phe Lys Val Val Ser Lys Gly Asp Phe Asp Ser
225 230 235 240
His Lys Val His Asp Pro Cys Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Lys Phe Tyr
245 250 255
Met Tyr Tyr Lys Gly Glu Arg Met Gly Glu Glu Ile Thr Trp Gly Gly
260 265 270
Arg Glu Ile Lys His Gly Val Ala Ile Ala Glu Asn Pro Met Gly Pro
275 280 285
Tyr Val Lys Ser Glu Tyr Asn Pro Ile Ser Asn Ser Gly His Glu Val
290 295 300
Cys Val Trp Pro Tyr Lys Gly Gly Ile Ala Ser Leu Ile Thr Thr Asp
305 310 315 320
Gly Pro Glu Lys Asn Thr Leu Gln Trp Ser Pro Asp Gly Ile Asn Phe
325 330 335
Glu Ile Met Ser Val Val Lys Gly Ala Pro His Ala Ile Gly Leu Asn
340 345 350
Arg Ser Ala Asp Ala Glu Lys Glu Pro Thr Glu Ile Leu Arg Trp Gly
355 360 365
Leu Thr His Ile Tyr Asn Ser Ser Asp Tyr Gln Ser Ile Met Arg Phe
370 375 380
Ser Thr Trp Thr Leu Gln Thr His Thr Ala Lys Gly Glu Ser Lys Glu
385 390 395 400
Arg Lys

<210> 3
<211> 691
<212> PRT
<213> 长双歧杆菌婴儿亚种 ATCC 15697
<400> 3

Met Glu His Arg Ala Phe Lys Trp Pro Gln Pro Leu Ala Gly Asn Lys
1 5 10 15
Pro Arg Ile Trp Tyr Gly Gly Asp Tyr Asn Pro Asp Gln Trp Pro Glu

20 25 30

Glu Val Trp Asp Glu Asp Val Ala Leu Met Gln Gln Ala Gly Val Asn

35 40 45

Leu Val Ser Val Ala Ile Phe Ser Trp Ala Lys Leu Glu Pro Glu Glu

50 55 60

Gly Val Tyr Asp Phe Asp Trp Leu Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Gly

65 70 75 80

Lys Ala Gly Ile Ala Val Asp Leu Ala Ser Gly Thr Ala Ser Pro Pro

85 90 95

Met Trp Met Thr Gln Ala His Pro Glu Ile Leu Trp Val Asp Tyr Arg

100 105 110

Gly Asp Val Cys Gln Pro Gly Ala Arg Gln His Trp Arg Ala Thr Ser

115 120 125

Pro Val Phe Leu Asp Tyr Ala Leu Asn Leu Cys Arg Lys Met Ala Glu

130 135 140

His Tyr Lys Asp Asn Pro Tyr Val Val Ser Trp His Val Ser Asn Glu

145 150 155 160

Tyr Gly Cys His Asn Arg Phe Asp Tyr Ser Glu Asp Ala Glu Arg Ala

165 170 175

Phe Gln Lys Trp Cys Glu Lys Lys Tyr Gly Thr Ile Asp Ala Val Asn

180 185 190

Asp Ala Trp Gly Thr Ala Phe Trp Ala Gln Arg Met Asn Asn Phe Ser

195 200 205

Glu Ile Ile Pro Pro Arg Phe Ile Gly Asp Gly Asn Phe Met Asn Pro

210 215 220

Gly Lys Leu Leu Asp Trp Lys Arg Phe Ser Ser Asp Ala Leu Leu Asp

225 230 235 240

Phe Tyr Lys Ala Glu Arg Asp Ala Leu Leu Glu Ile Ala Pro Lys Pro

245 250 255

Gln Thr Thr Asn Phe Met Val Ser Ala Gly Cys Thr Val Leu Asp Tyr

260 265 270

Asp Lys Trp Gly His Asp Val Asp Phe Val Ser Asn Asp His Tyr Phe

275 280 285

Ser Pro Gly Glu Ala His Phe Asp Glu Met Ala Tyr Ala Ala Cys Leu

290 295 300

Thr Asp Gly Ile Ala Arg Lys Asn Pro Trp Phe Leu Met Glu His Ser

305 310 315 320

Thr Ser Ala Val Asn Trp Arg Pro Thr Asn Tyr Arg Leu Glu Pro Gly

325 330 335

Glu Leu Val Arg Asp Ser Leu Ala His Leu Ala Met Gly Ala Asp Ala
340 345 350
Ile Cys Tyr Phe Gln Trp Arg Gln Ser Lys Ala Gly Ala Glu Lys Trp
355 360 365
His Ser Ala Met Val Pro His Ala Gly Pro Asp Ser Gln Ile Phe Arg
370 375 380
Asp Val Cys Glu Leu Gly Ala Asp Leu Asn Lys Leu Ala Asp Glu Gly
385 390 395 400
Leu Leu Ser Thr Lys Leu Val Lys Ser Lys Val Ala Ile Val Phe Asp
405 410 415
Tyr Glu Ser Gln Trp Ala Thr Glu His Thr Ala Thr Pro Thr Gln Glu
420 425 430
Val Arg His Trp Thr Glu Pro Leu Asp Trp Phe Arg Ala Leu Ala Asp
435 440 445
Asn Gly Leu Thr Ala Asp Val Val Pro Val Arg Gly Pro Trp Asp Glu
450 455 460
Tyr Glu Ala Val Val Leu Pro Ser Leu Ala Ile Leu Ser Glu Gln Thr
465 470 475 480
Thr Arg Arg Val Arg Glu Tyr Val Ala Asn Gly Gly Lys Leu Phe Val
485 490 495
Thr Tyr Tyr Thr Gly Leu Val Asp Asp Arg Asp His Val Trp Leu Gly
500 505 510
Gly Tyr Pro Gly Ser Ile Arg Asp Val Val Gly Val Arg Val Glu Glu
515 520 525
Phe Ala Pro Met Gly Thr Asp Ala Pro Gly Thr Met Asp His Leu Asp
530 535 540
Leu Asp Asn Gly Thr Val Ala His Asp Phe Ala Asp Val Ile Thr Ser
545 550 555 560
Val Ala Asp Thr Ala His Val Val Ala Ser Phe Lys Ala Asp Lys Trp
565 570 575
Thr Gly Phe Asp Gly Ala Pro Ala Ile Thr Val Asn Asp Phe Gly Asp
580 585 590
Gly Lys Ala Ala Tyr Val Gly Ala Arg Leu Gly Arg Glu Gly Leu Ala
595 600 605
Lys Ser Leu Pro Ala Leu Leu Glu Glu Leu Gly Ile Glu Thr Ser Ala
610 615 620
Glu Asp Asp Arg Gly Glu Val Leu Arg Val Glu Arg Ala Asp Glu Thr
625 630 635 640
Gly Glu Asn His Phe Val Phe Leu Phe Asn Arg Thr His Asp Val Ala

645 650 655
Val Val Asp Val Glu Gly Glu Pro Leu Val Ala Ser Leu Ala Gln Val
660 665 670
Asn Glu Ser Glu His Thr Ala Ala Ile Gln Pro Asn Gly Val Leu Val
675 680 685
Val Lys Leu
690

<210> 4
<211> 1023
<212> PRT
<213> 长双歧杆菌婴儿亚种 ATCC 15697
<400> 4
Met Thr Asp Val Thr His Val Asp Arg Ala Ser Gln Ala Trp Leu Thr
1 5 10 15
Asp Pro Thr Val Phe Glu Val Asn Arg Thr Pro Ala His Ser Ser His
20 25 30
Lys Trp Tyr Ala Arg Asp Pro Gln Ser Gly Gln Trp Ser Asp Leu Lys
35 40 45
Gln Ser Leu Asp Gly Glu Trp Arg Val Glu Val Val Gln Ala Ala Asp
50 55 60
Ile Asn Leu Glu Glu Glu Pro Ala Thr Ala Glu Ser Phe Asp Asp Ser
65 70 75 80
Ser Phe Glu Arg Ile Gln Val Pro Gly His Leu Gln Thr Ala Gly Leu
85 90 95
Met Asn His Lys Tyr Val Asn Val Gln Tyr Pro Trp Asp Gly His Glu
100 105 110
Asn Pro Leu Glu Pro Asn Ile Pro Glu Asn Asn His Val Ala Leu Tyr
115 120 125
Arg Arg Lys Phe Thr Val Ser Ala Pro Val Ala Asn Ala Lys Gln Ala
130 135 140
Gly Gly Ser Val Ser Ile Val Phe His Gly Met Ala Thr Ala Ile Tyr
145 150 155 160
Val Trp Val Asn Gly Ala Phe Val Gly Tyr Gly Glu Asp Gly Phe Thr
165 170 175
Pro Asn Glu Phe Asp Ile Thr Gly Leu Leu His Asp Gly Glu Asn Val
180 185 190
Val Ala Val Ala Cys Tyr Glu Tyr Ser Ser Ala Ser Trp Leu Glu Asp
195 200 205
Gln Asp Phe Trp Arg Leu His Gly Leu Phe Arg Ser Val Glu Leu Ala

210 215 220

Ala Arg Pro His Val His Ile Glu Asn Thr Gln Ile Glu Ala Asp Trp
225 230 235 240

Asp Pro Glu Ala Gly Thr Ala Ser Leu Asp Ala Ala Leu Thr Val Leu
245 250 255

Asn Ala Thr Asp Ala Ala Thr Val Arg Ala Thr Leu Lys Asp Ala Asp
260 265 270

Gly Asn Thr Val Trp Gln Thr Thr Gly Asp Ala Glu Ala Gln Thr Ala
275 280 285

Leu Ser Ser Gly Pro Leu Gln Gly Ile Glu Pro Trp Ser Ala Glu Ser
290 295 300

Pro Thr Leu Tyr Glu Leu Asp Val Asp Val Ile Asp Gln Ala Gly Asp
305 310 315 320

Val Ile Glu Cys Thr Ser Gln Lys Val Gly Phe Arg Arg Phe Arg Ile
325 330 335

Glu Asp Gly Ile Leu Thr Ile Asn Gly Lys Arg Ile Val Phe Lys Gly
340 345 350

Ala Asp Arg His Glu Phe Asp Ala Glu Arg Gly Arg Ala Ile Thr Glu
355 360 365

Gln Asp Met Ile Asp Asp Val Val Phe Cys Lys Arg His Asn Ile Asn
370 375 380

Ser Ile Arg Thr Ser His Tyr Pro Asn Gln Glu Arg Trp Tyr Glu Leu
385 390 395 400

Cys Asp Glu Tyr Gly Ile Tyr Leu Ile Asp Glu Thr Asn Leu Glu Ala
405 410 415

His Gly Ser Trp Ser Leu Pro Gly Asp Val Leu Thr Glu Asp Thr Ile
420 425 430

Val Pro Gly Ser Lys Arg Glu Trp Glu Gly Ala Cys Val Asp Arg Val
435 440 445

Asn Ser Met Met Arg Arg Asp Tyr Asn His Pro Ser Val Leu Ile Trp
450 455 460

Ser Leu Gly Asn Glu Ser Tyr Val Gly Asp Val Phe Arg Ala Met Tyr
465 470 475 480

Lys His Val His Asp Ile Asp Pro Asn Arg Pro Val His Tyr Glu Gly
485 490 495

Val Thr His Asn Arg Asp Tyr Asp Asp Val Thr Asp Ile Glu Thr Arg
500 505 510

Met Tyr Ser His Ala Asp Glu Ile Glu Lys Tyr Leu Lys Asp Asp Pro
515 520 525

Lys Lys Pro Tyr Leu Ser Cys Glu Tyr Met His Ala Met Gly Asn Ser
530 535 540
Val Gly Asn Met Asp Glu Tyr Thr Ala Leu Glu Arg Tyr Pro Lys Tyr
545 550 555 560
Gln Gly Gly Phe Ile Trp Asp Phe Ile Asp Gln Ala Ile Tyr Ala Thr
565 570 575
Gln Pro Asp Gly Thr Arg Ser Leu Arg Tyr Gly Gly Asp Phe Gly Asp
580 585 590
Arg Pro Ser Asp Tyr Glu Phe Ser Gly Asp Gly Leu Leu Phe Ala Asp
595 600 605
Arg Lys Pro Ser Pro Lys Ala Gln Glu Val Lys Gln Leu Tyr Ser Asn
610 615 620
Val His Ile Asp Val Thr Lys Asp Ser Val Ser Val Lys Asn Asp Asn
625 630 635 640
Leu Phe Thr Ala Thr Gly Asp Tyr Val Phe Val Leu Ser Val Leu Ala
645 650 655
Asp Gly Lys Pro Val Trp Gln Ser Thr Arg Arg Phe Asp Val Pro Ala
660 665 670
Gly Glu Thr Arg Thr Phe Asp Val Ala Trp Pro Val Ala Ala Tyr Arg
675 680 685
Ala Asp Ala Arg Glu Leu Val Leu Gln Val Ser Gln Arg Leu Ala Lys
690 695 700
Ala Thr Asp Trp Ala Glu Ser Gly Tyr Glu Leu Ala Phe Gly Gln Ala
705 710 715 720
Val Val Pro Ala Asp Ala Thr Ala Thr Pro Asp Thr Lys Pro Ala Asp
725 730 735
Gly Thr Ile Thr Val Gly Arg Trp Asn Ala Gly Val Arg Gly Ala Gly
740 745 750
Arg Glu Val Leu Leu Ser Arg Thr Gln Gly Gly Met Val Ser Tyr Thr
755 760 765
Phe Ala Gly Asn Glu Phe Val Leu Arg Arg Pro Ala Ile Thr Thr Phe
770 775 780
Arg Pro Leu Thr Asp Asn Asp Arg Gly Ala Gly His Gly Phe Glu Arg
785 790 795 800
Val Gln Trp Leu Gly Ala Gly Arg Tyr Ala Arg Cys Val Asp Asn Val
805 810 815
Leu Glu Gln Ile Asp Asp Ser Thr Leu Lys Gly Thr Tyr Thr Tyr Glu
820 825 830
Leu Ala Thr Ala Gln Arg Thr Lys Val Thr Val Ser Tyr Thr Ala His

835 840 845

Thr Asp Gly Arg Val Asn Leu His Val Glu Tyr Pro Gly Glu Gln Gly
850 855 860

Asp Leu Pro Thr Ile Pro Ala Phe Gly Ile Glu Trp Thr Leu Pro Val
865 870 875 880

Gln Tyr Thr Asn Leu Arg Phe Phe Gly Thr Gly Pro Glu Glu Thr Tyr
885 890 895

Leu Asp Arg Lys His Ala Lys Leu Gly Val Trp Asn Thr Asn Ala Phe
900 905 910

Ala Asp His Ala Pro Tyr Leu Met Pro Gln Glu Thr Gly Asn His Glu
915 920 925

Asp Val Arg Trp Ala Glu Ile Thr Asp Asp His Gly His Gly Met Arg
930 935 940

Val Ser Arg Ala Asp Gly Ala Ala Pro Phe Ala Val Ser Leu Leu Pro
945 950 955 960

Tyr Ser Ser Phe Met Leu Glu Glu Ala Gln His Gln Asp Glu Leu Pro
965 970 975

Lys Pro Lys His Met Phe Leu Arg Val Leu Ala Ala Gln Met Gly Val
980 985 990

Gly Gly Asp Asp Ser Trp Met Ser Pro Val His Pro Gln Tyr His Ile
995 1000 1005

Pro Ala Asp Lys Pro Ile Ser Leu Asp Val Asp Leu Glu Leu Ile
1010 1015 1020

<210> 5

<211> 598

<212> PRT

<213> 多糖降解菌 2-40

<400> 5

Met Lys Thr Thr Lys Cys Ala Leu Ala Ala Leu Phe Phe Ser Thr Pro
1 5 10 15

Leu Met Ala Ala Asp Trp Asp Gly Ile Pro Val Pro Ala Asp Pro Gly
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Trp Glu Leu Gln Ser Leu Ser Asp Asp Phe Asn Tyr
35 40 45

Ala Ala Pro Ala Asn Gly Lys Ser Thr Thr Phe Tyr Ser Arg Trp Ser
50 55 60

Glu Gly Phe Ile Asn Ala Trp Leu Gly Pro Gly Gln Thr Glu Phe Tyr
65 70 75 80

Gly Pro Asn Ala Ser Val Glu Gly Gly His Leu Ile Ile Lys Ala Thr

85 90 95

Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gln Ile Tyr Thr Gly Ala Ile His Ser Asn
100 105 110

Glu Ser Phe Thr Tyr Pro Leu Tyr Leu Glu Ala Arg Thr Lys Ile Thr
115 120 125

Asn Leu Thr Leu Ala Asn Ala Phe Trp Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr
130 135 140

Glu Glu Ile Asp Val Leu Glu Ser Tyr Gly Ser Asp Arg Ala Thr Glu
145 150 155 160

Thr Trp Phe Asp Glu Arg Leu His Leu Ser His His Val Phe Ile Arg
165 170 175

Gln Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Lys Asp Ala Gly Ser Trp Tyr Pro
180 185 190

Asn Pro Asp Gly Gly Thr Trp Arg Asp Gln Phe Phe Arg Ile Gly Val
195 200 205

Tyr Trp Ile Asp Pro Trp Thr Leu Glu Tyr Tyr Val Asn Gly Glu Leu
210 215 220

Val Arg Thr Val Ser Gly Pro Glu Met Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr
225 230 235 240

Asn Gly Thr Gly Leu Ser Lys Pro Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Glu
245 250 255

His Gln Pro Trp Arg Asp Glu Gln Gly Thr Ala Pro Pro Thr Asp Ala
260 265 270

Glu Leu Ala Asp Ser Ser Arg Asn Gln Phe Leu Ile Asp Trp Val Arg
275 280 285

Phe Tyr Lys Pro Val Ala Ser Asn Asn Gly Gly Gly Asp Pro Gly Asn
290 295 300

Gly Gly Thr Pro Gly Asn Gly Gly Ser Gly Asp Thr Val Val Val Glu
305 310 315 320

Met Ala Asn Phe Ser Ala Thr Gly Lys Glu Gly Ser Ala Val Ala Gly
325 330 335

Asp Thr Phe Thr Gly Phe Asn Pro Ser Gly Ala Asn Asn Ile Asn Tyr
340 345 350

Asn Thr Leu Gly Asp Trp Ala Asp Tyr Thr Val Asn Phe Pro Ala Ala
355 360 365

Gly Asn Tyr Thr Val Asn Leu Ile Ala Ala Ser Pro Val Thr Ser Gly
370 375 380

Leu Gly Ala Asp Ile Leu Val Asp Ser Ser Tyr Ala Gly Thr Ile Pro
385 390 395 400

Val Ser Ser Thr Gly Ala Trp Glu Ile Tyr Asn Thr Phe Ser Leu Pro
405 410 415
Ser Ser Ile Tyr Ile Ala Ser Ala Gly Asn His Thr Ile Arg Val Gln
420 425 430
Ser Ser Gly Gly Ser Ala Trp Gln Trp Asn Gly Asp Glu Leu Arg Phe
435 440 445
Thr Gln Thr Asp Ala Asp Thr Gly Thr Asn Pro Pro Ser Thr Ala Ser
450 455 460
Ile Ala Val Glu Ala Glu Asn Phe Asn Ala Val Gly Gly Thr Phe Ser
465 470 475 480
Asp Gly Gln Ala Gln Pro Val Ser Val Tyr Thr Val Asn Gly Asn Thr
485 490 495
Ala Ile Asn Tyr Val Asn Gln Gly Asp Tyr Ala Asp Tyr Thr Ile Ala
500 505 510
Val Ala Gln Ala Gly Asn Tyr Thr Ile Ser Tyr Gln Ala Gly Ser Gly
515 520 525
Val Thr Gly Gly Ser Ile Glu Phe Leu Val Asn Glu Asn Gly Ser Trp
530 535 540
Ala Ser Lys Thr Val Thr Ala Val Pro Asn Gln Gly Trp Asp Asn Phe
545 550 555 560
Gln Pro Leu Asn Gly Gly Ser Val Tyr Leu Ser Ala Gly Thr His Gln
565 570 575
Val Arg Leu His Gly Ala Gly Ser Asn Asn Trp Gln Trp Asn Leu Asp
580 585 590
Lys Phe Thr Leu Ser Asn
595

<210> 6
<211> 368
<212> PRT
<213> 多糖降解菌 2-40
<400> 6
Met Ser Asp Ser Lys Val Asn Lys Lys Leu Ser Lys Ala Ser Leu Arg
1 5 10 15
Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Asp Glu Lys Gly Pro Glu Trp Leu Phe Glu
20 25 30
Phe Asp Ile Thr Pro Leu Lys Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val
35 40 45
Ile Arg Arg Asp Pro Ser Ala Val Leu Lys Val Asp Asp Glu Tyr His
50 55 60

Val Trp Tyr Thr Lys Gly Glu Gly Glu Thr Val Gly Phe Gly Ser Asp
65 70 75 80
Asn Pro Glu Asp Lys Val Phe Pro Trp Asp Lys Thr Glu Val Trp His
85 90 95
Ala Thr Ser Lys Asp Lys Ile Thr Trp Lys Glu Ile Gly Pro Ala Ile
100 105 110
Gln Arg Gly Ala Ala Gly Ala Tyr Asp Asp Arg Ala Val Phe Thr Pro
115 120 125
Glu Val Leu Arg His Asn Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val
130 135 140
Lys Ala Pro Tyr Leu Asn Arg Ser Leu Glu His Ile Ala Ile Ala Tyr
145 150 155 160
Ser Asp Ser Pro Phe Gly Pro Trp Thr Lys Ser Asp Ala Pro Ile Leu
165 170 175
Ser Pro Glu Asn Asp Gly Val Trp Asp Thr Asp Glu Asp Asn Arg Phe
180 185 190
Leu Val Lys Glu Lys Gly Ser Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro
195 200 205
Cys Leu Met Phe Phe Asn Asn Arg Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu
210 215 220
Thr Met Gly Glu Ser Met Asn Met Gly Gly Arg Glu Ile Lys His Gly
225 230 235 240
Val Ala Ile Ala Asp Ser Pro Leu Gly Pro Tyr Thr Lys Ser Glu Tyr
245 250 255
Asn Pro Ile Thr Asn Ser Gly His Glu Val Ala Val Trp Pro Tyr Lys
260 265 270
Gly Gly Met Ala Thr Met Leu Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr
275 280 285
Cys Gln Trp Ala Glu Asp Gly Ile Asn Phe Asp Ile Met Ser His Ile
290 295 300
Lys Gly Ala Pro Glu Ala Val Gly Phe Phe Arg Pro Glu Ser Asp Ser
305 310 315 320
Asp Asp Pro Ile Ser Gly Ile Glu Trp Gly Leu Ser His Lys Tyr Asp
325 330 335
Ala Ser Trp Asn Trp Asn Tyr Leu Cys Phe Phe Lys Thr Arg Arg Gln
340 345 350
Val Leu Asp Ala Gly Ser Tyr Gln Gln Thr Gly Asp Ser Gly Ala Val
355 360 365

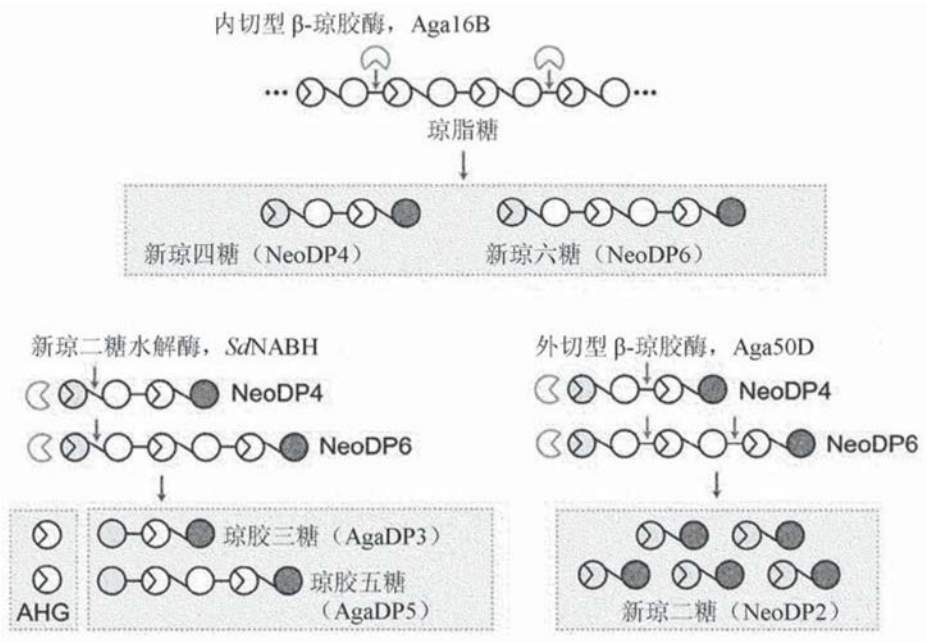

内切型β-琼胶酶，Aga16B
琼脂糖
新琼四糖（NeoDP4）
新琼六糖（NeoDP6）
新琼二糖水解酶，*Sd*NABH
NeoDP4
NeoDP6
AHG
琼胶三糖（AgaDP3）
琼胶五糖（AgaDP5）
外切型β-琼胶酶，Aga50D
NeoDP4
NeoDP6
新琼二糖（NeoDP2）

图1

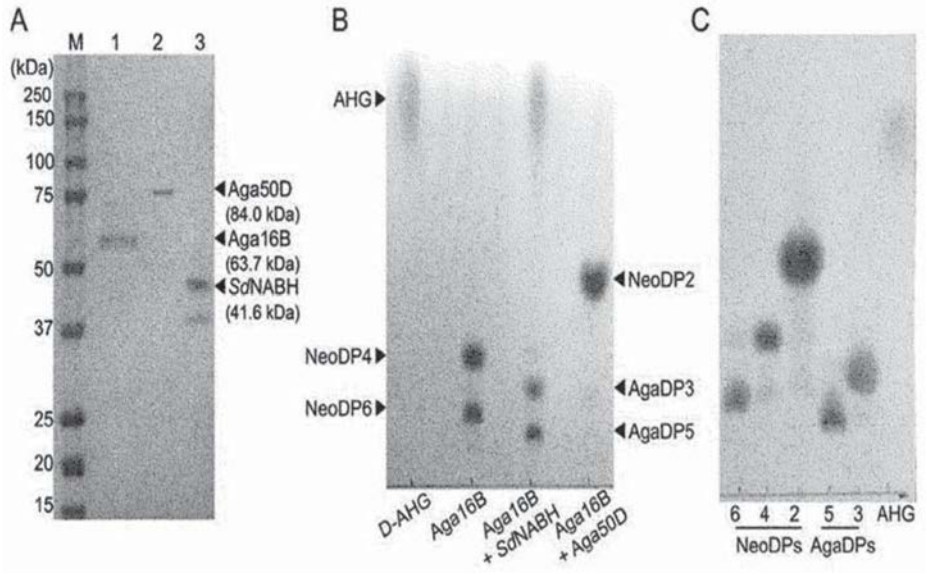

A
M 1 2 3
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
Aga50D
(84.0 kDa)
Aga16B
(63.7 kDa)
*Sd*NABH
(41.6 kDa)
B
AHG
NeoDP4
NeoDP6
NeoDP2
AgaDP3
AgaDP5
D-AHG
Aga16B
Aga16B + *Sd*NABH
Aga16B + Aga50D
C
6 4 2
5 3
AHG
NeoDPs
AgaDPs

图2

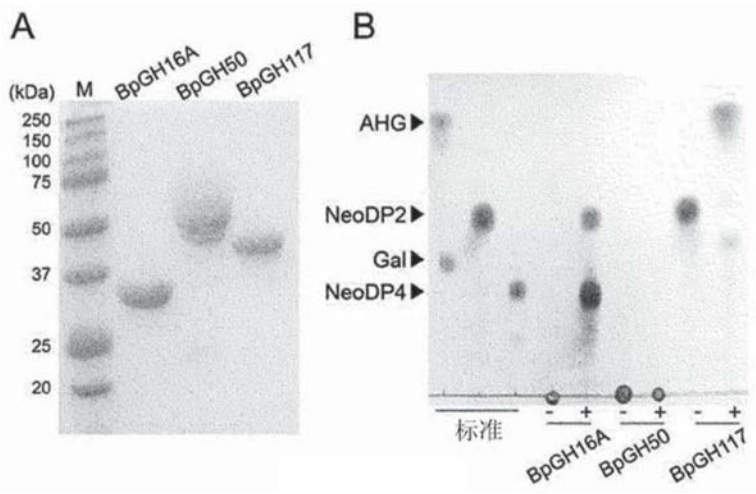

A
(kDa)
M
BpGH16A
BpGH50
BpGH117
250
150
100
75
50
37
25
20
B
AHG
NeoDP2
Gal
NeoDP4
- + - + - +
标准
BpGH16A
BpGH50
BpGH117

图3

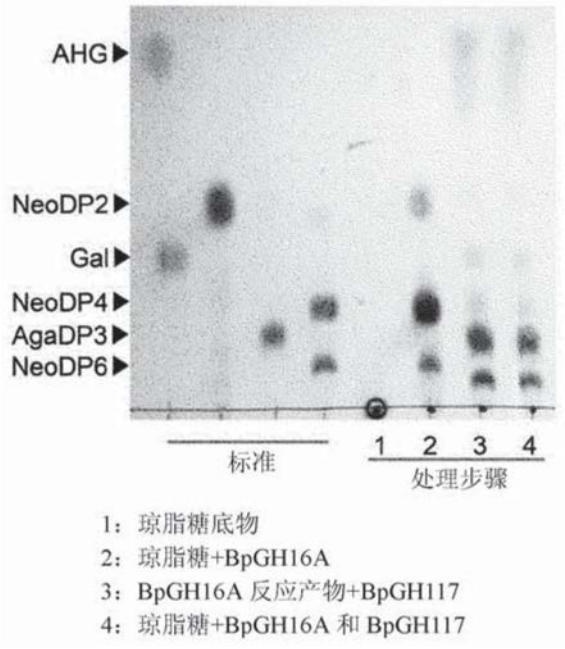

AHG
NeoDP2
Gal
NeoDP4
AgaDP3
NeoDP6
标准
1 2 3 4
处理步骤
1：琼脂糖底物
2：琼脂糖+BpGH16A
3：BpGH16A 反应产物+BpGH117
4：琼脂糖+BpGH16A 和 BpGH117

图4

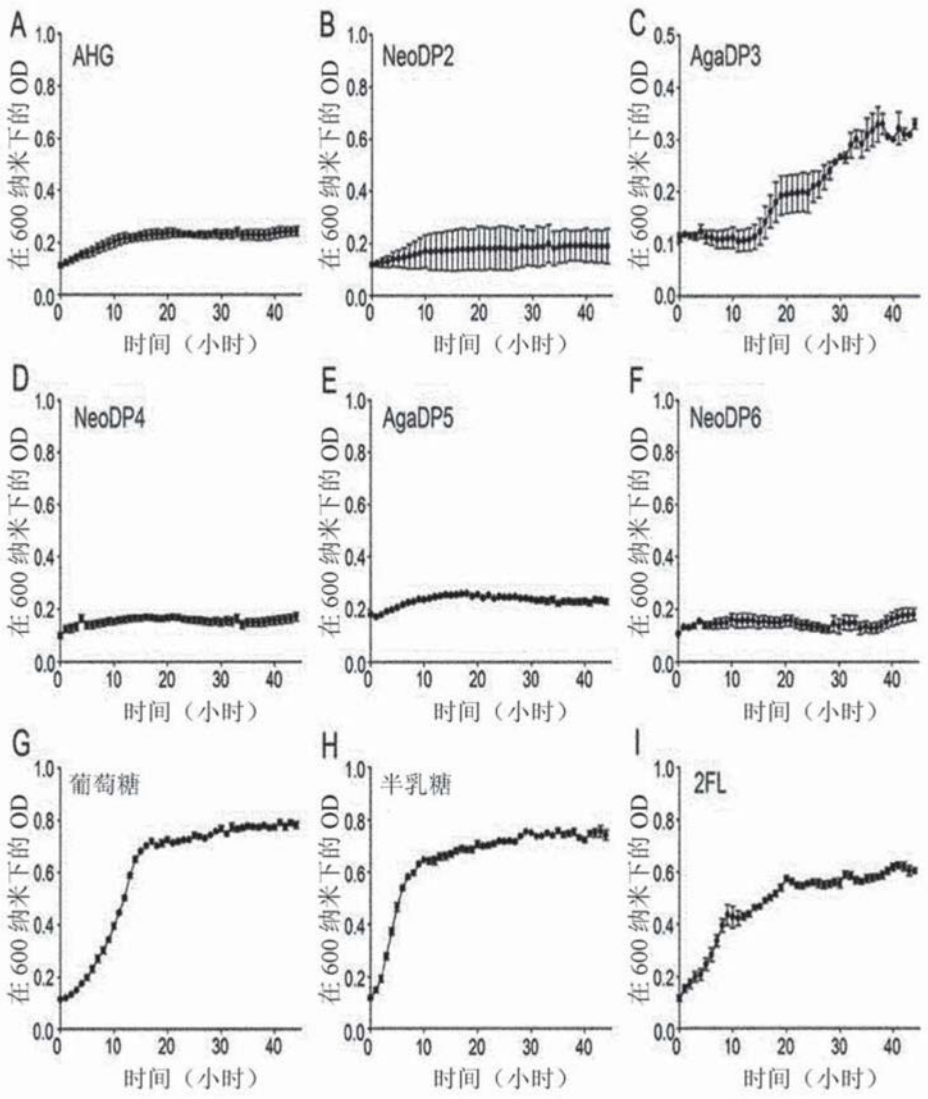

A
AHG
B
NeoDP2
C
AgaDP3
D
NeoDP4
E
AgaDP5
F
NeoDP6
G
葡萄糖
H
半乳糖
I
2FL
在600纳米下的OD
时间（小时）

图5

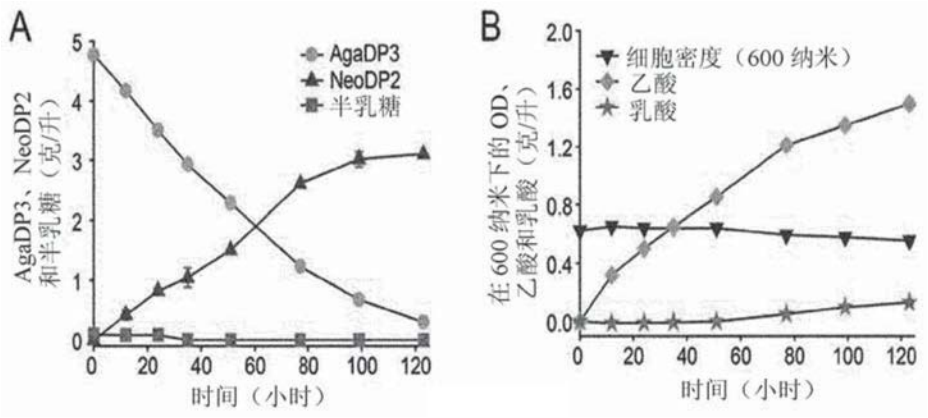

A
AgaDP3
NeoDP2
半乳糖
AgaDP3、NeoDP2和半乳糖（克/升）
时间（小时）
B
细胞密度（600纳米）
乙酸
乳酸
在600纳米下的OD、乙酸和乳酸（克/升）
时间（小时）

图6

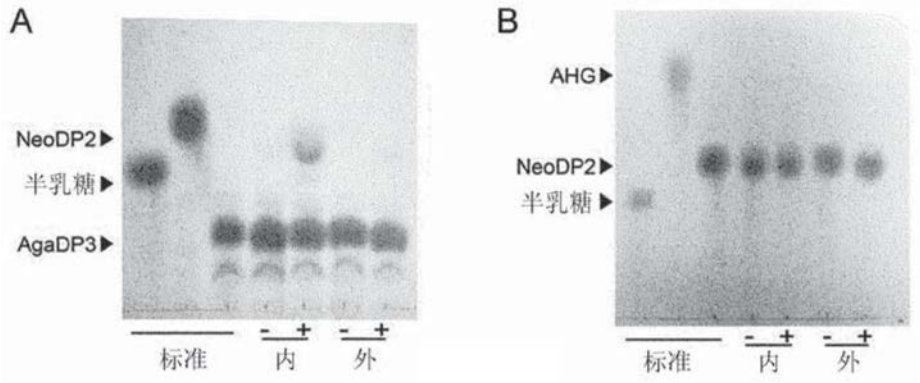

A
NeoDP2
半乳糖
AgaDP3
标准
内
外
B
AHG
NeoDP2
半乳糖
标准
内
外

图7

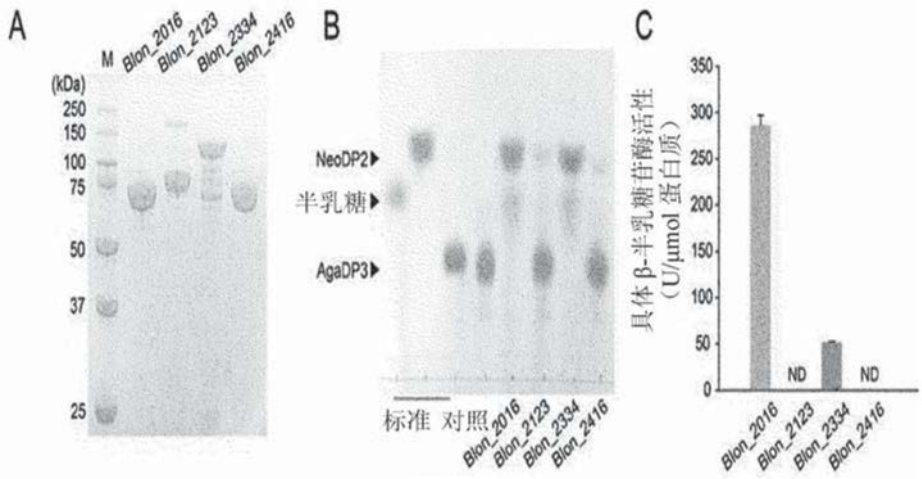

A
M
Blon_2016
Blon_2123
Blon_2334
Blon_2416
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
B
NeoDP2
半乳糖
AgaDP3
标准
对照
Blon_2016
Blon_2123
Blon_2334
Blon_2416
C
具体β-半乳糖苷酶活性
(U/μmol 蛋白质)
350
300
250
200
150
100
50
0
ND
ND
Blon_2016
Blon_2123
Blon_2334
Blon_2416

图8

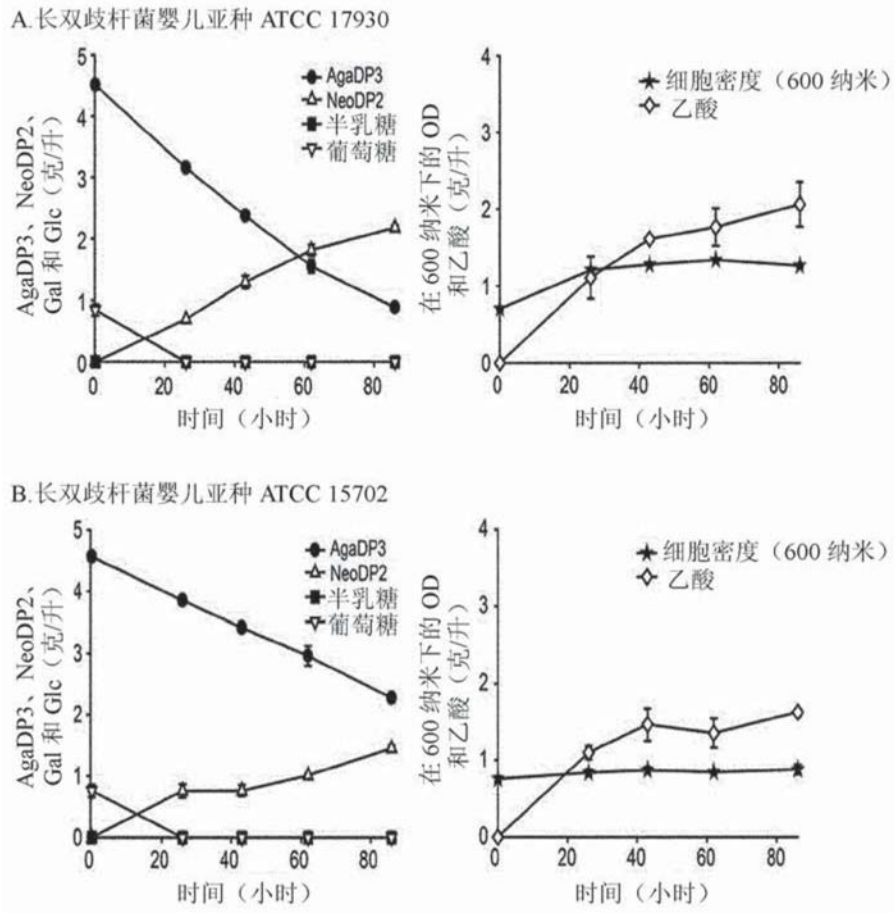

A.长双歧杆菌婴儿亚种 ATCC 17930
AgaDP3
NeoDP2
半乳糖
葡萄糖
AgaDP3、NeoDP2、Gal 和 Glc（克/升）
时间（小时）
细胞密度（600 纳米）
乙酸
在 600 纳米下的 OD 和乙酸（克/升）
时间（小时）
B.长双歧杆菌婴儿亚种 ATCC 15702
AgaDP3
NeoDP2
半乳糖
葡萄糖
AgaDP3、NeoDP2、Gal 和 Glc（克/升）
时间（小时）
细胞密度（600 纳米）
乙酸
在 600 纳米下的 OD 和乙酸（克/升）
时间（小时）

图9

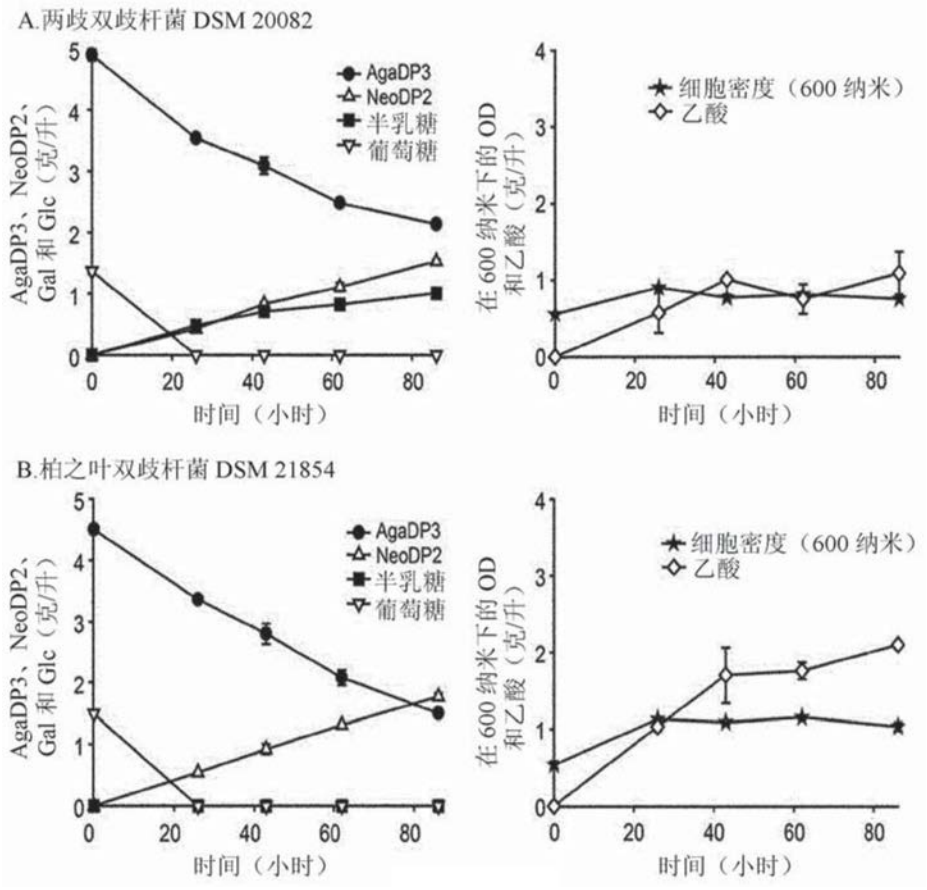

A.两歧双歧杆菌 DSM 20082
AgaDP3、NeoDP2、Gal 和 Glc（克/升）
AgaDP3
NeoDP2
半乳糖
葡萄糖
时间（小时）
在 600 纳米下的 OD 和乙酸（克/升）
细胞密度（600 纳米）
乙酸
时间（小时）
B.柏之叶双歧杆菌 DSM 21854
AgaDP3、NeoDP2、Gal 和 Glc（克/升）
AgaDP3
NeoDP2
半乳糖
葡萄糖
时间（小时）
在 600 纳米下的 OD 和乙酸（克/升）
细胞密度（600 纳米）
乙酸
时间（小时）

图10

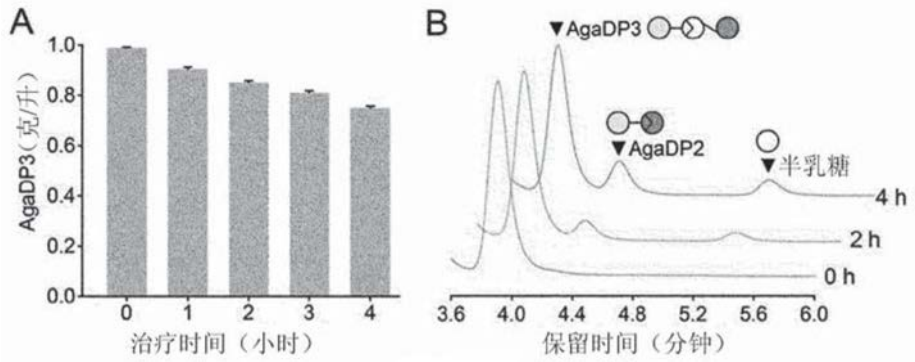

A
AgaDP3（克/升）
治疗时间（小时）
B
AgaDP3
AgaDP2
半乳糖
4 h
2 h
0 h
保留时间（分钟）

图11

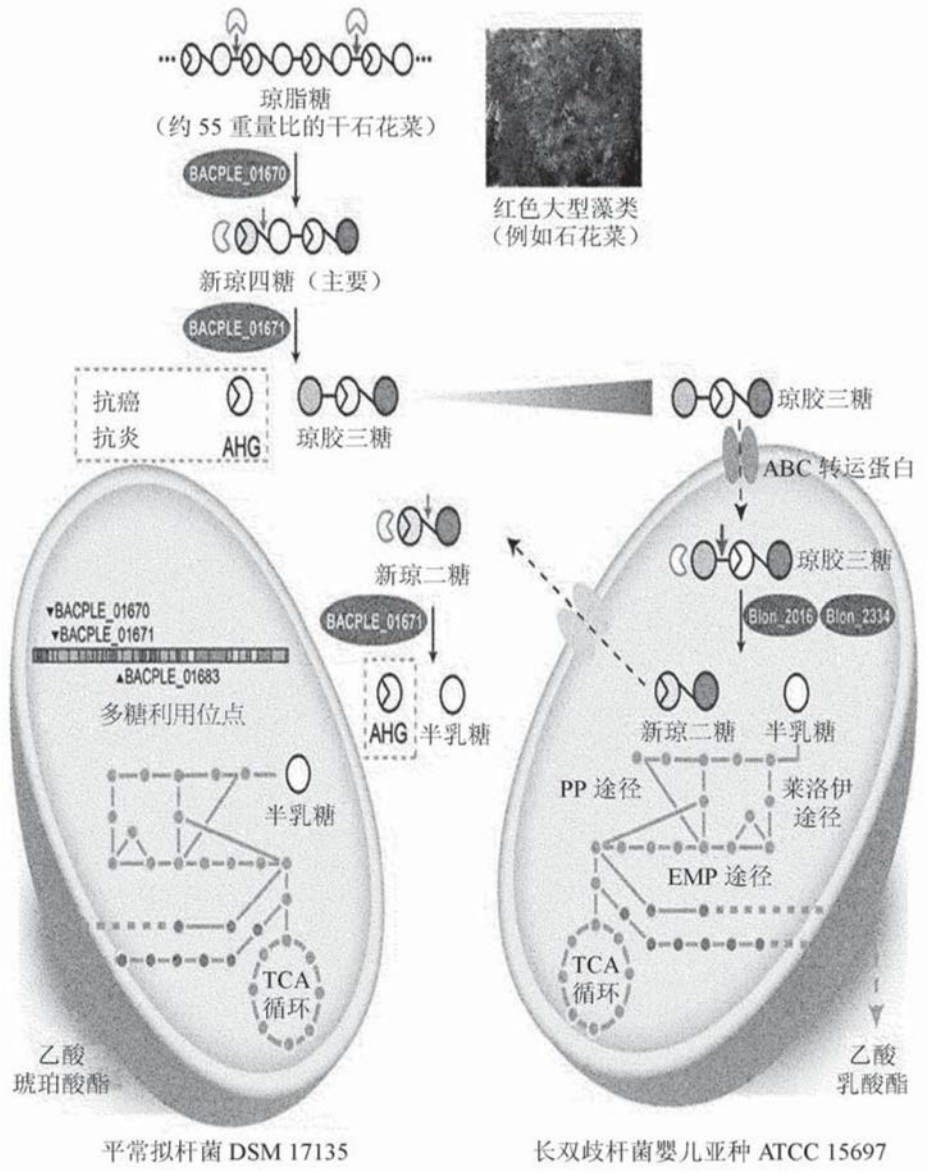

琼脂糖
（约 55 重量比的干石花菜）
BACPLE_01670
新琼四糖（主要）
BACPLE_01671
抗癌
抗炎
AHG
琼胶三糖
红色大型藻类
（例如石花菜）
琼胶三糖
ABC 转运蛋白
琼胶三糖
Blon_2016
Blon_2334
新琼二糖
半乳糖
新琼二糖
BACPLE_01671
AHG
半乳糖
▾BACPLE_01670
▾BACPLE_01671
▴BACPLE_01683
多糖利用位点
半乳糖
PP 途径
莱洛伊
途径
EMP 途径
TCA
循环
TCA
循环
乙酸
琥珀酸酯
乙酸
乳酸酯
平常拟杆菌 DSM 17135
长双歧杆菌婴儿亚种 ATCC 15697

图12

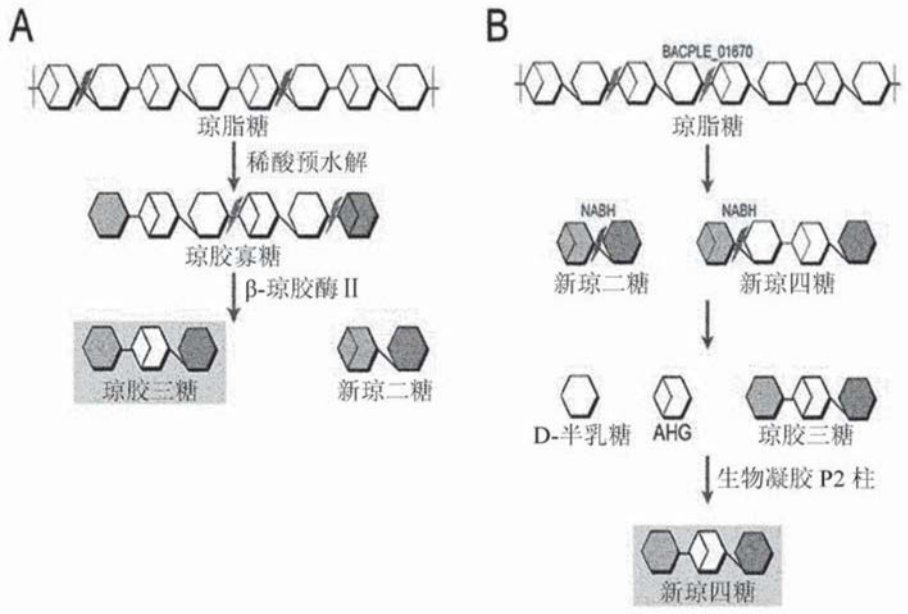

A
琼脂糖
稀酸预水解
琼胶寡糖
β-琼胶酶 II
琼胶三糖
新琼二糖
B
BACPLE_01670
琼脂糖
NABH
NABH
新琼二糖
新琼四糖
D-半乳糖
AHG
琼胶三糖
生物凝胶 P2 柱
新琼四糖

图13

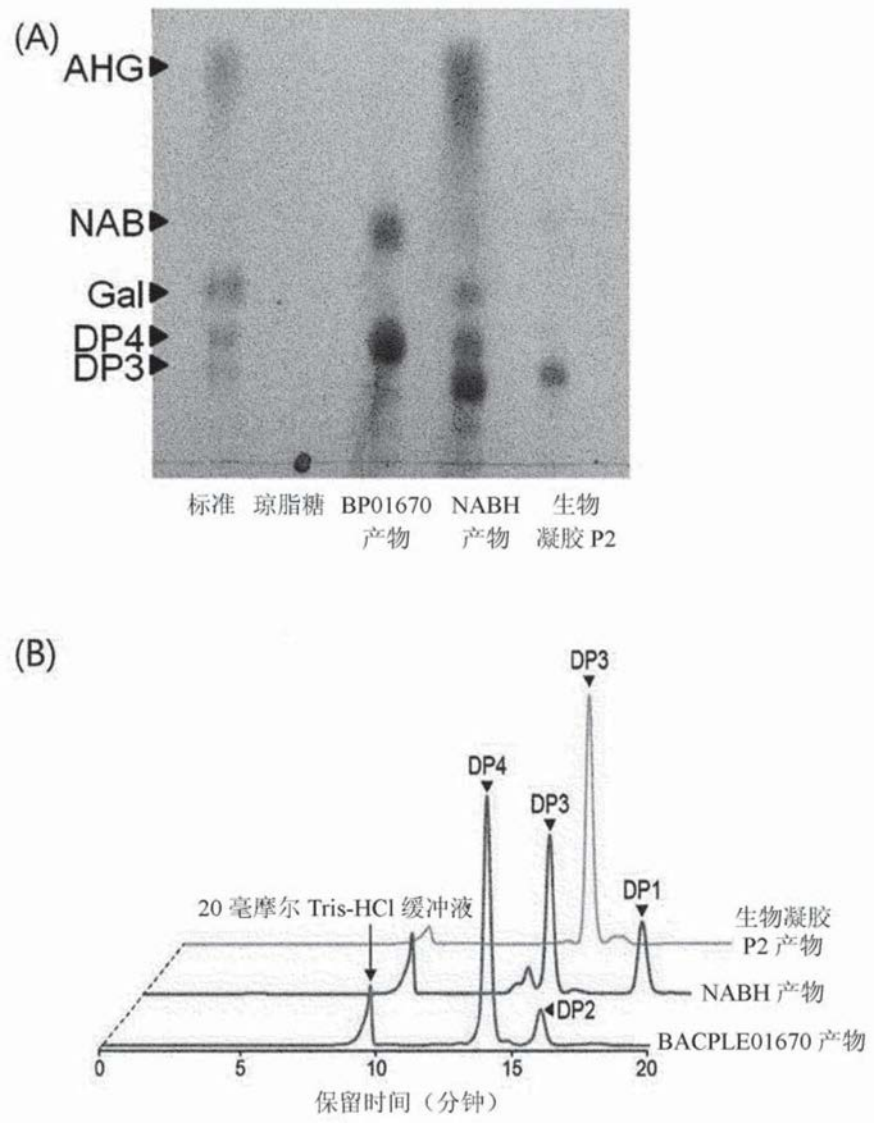

(A)
AHG
NAB
Gal
DP4
DP3
标准 琼脂糖 BP01670 产物 NABH 产物 生物凝胶 P2
(B)
DP3
DP4
DP3
DP1
20 毫摩尔 Tris-HCl 缓冲液
生物凝胶 P2 产物
NABH 产物
DP2
BACPLE01670 产物
0 5 10 15 20
保留时间（分钟）

图14

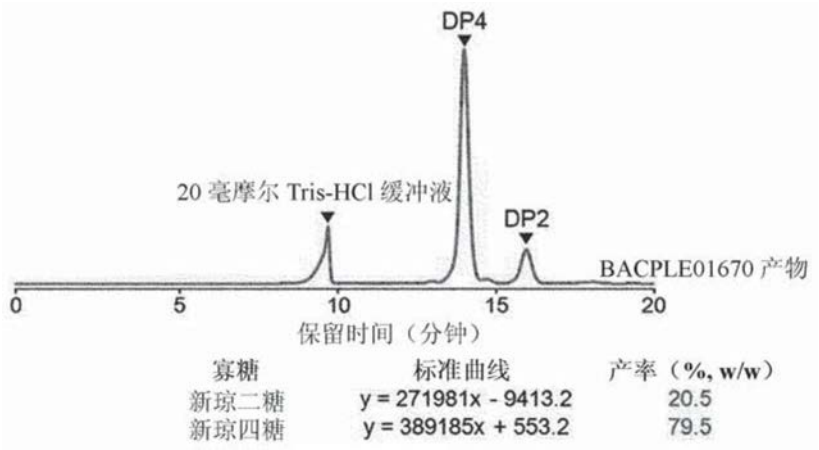

DP4
20 毫摩尔 Tris-HCl 缓冲液
DP2
BACPLE01670 产物
0 5 10 15 20
保留时间（分钟）
寡糖 标准曲线 产率（%, w/w）
新琼二糖 y = 271981x - 9413.2 20.5
新琼四糖 y = 389185x + 553.2 79.5

图15

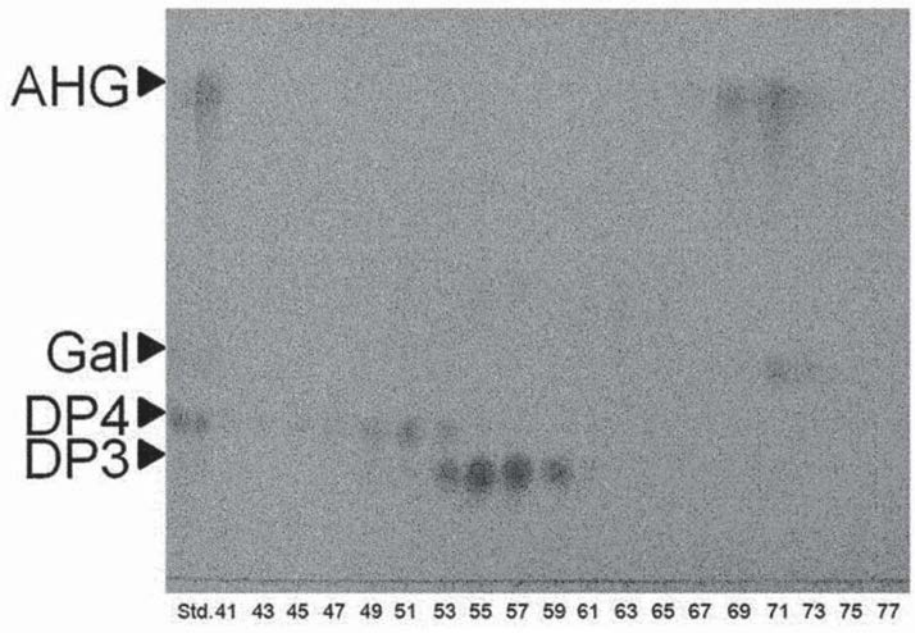


图16

琼胶三糖（DP3）	
纯度（%）	产率（%, w/w）
90.2	40.0

图17