



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110291203 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 09

(21) 申请号 201780085824.5	(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205
(22) 申请日 2017.11.24	专利代理师 杨文娟 臧建明
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110291203 A	(51) Int.Cl.
(43) 申请公布日 2019.09.27	G12P 19/12 (2006.01)
(30) 优先权数据 10-2016-0165598 2016.12.07 KR	G12P 19/02 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.08.06	G12P 19/14 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/KR2017/013493 2017.11.24	(56) 对比文件
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/105932 KO 2018.06.14	CN 105745329 A, 2016.07.06
(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团	CN 102405282 A, 2012.04.04
地址 韩国首尔市城北区安岩路145	KR 20110072958 A, 2011.06.29
(72) 发明人 金京宪 李相贤 金东玄 尹银珠	NCBI.Accession No:WP 011467876.1. 《GenBank》.2016, Qusai Al Abdallah et al..The enzymatic Conversion of Major Algal and Cyanobacterial Carbohydrates to Bioethanol.《Front. Energy Res.》.2016,

审查员 马俊凯

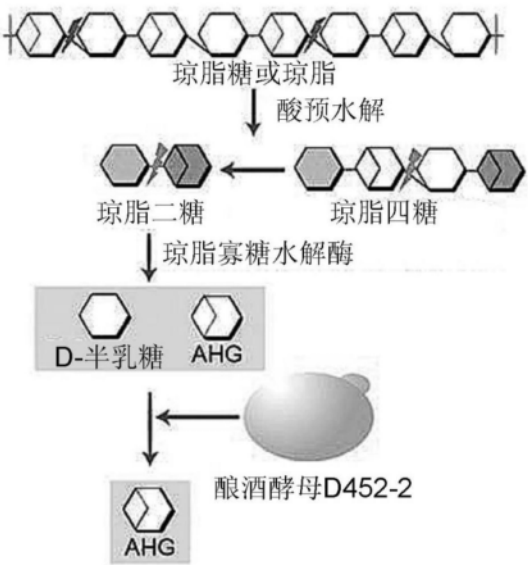
权利要求书1页 说明书10页
序列表5页 附图8页

(54) 发明名称

生产琼脂二糖及3,6-无水-L-半乳糖的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种生产琼脂二糖及3,6-无水-L-半乳糖的方法,且通过在琼脂糖或琼脂的酸处理、中和及酶促水解后的纯化期间使用微生物来提高3,6-无水-L-半乳糖的生产产率。



1. 一种生产3,6-无水-L-半乳糖的方法,包括:

使用作底物的以干重量计为10 w/v%到37 w/v%的量的琼脂糖或琼脂与浓度为0.1 w/v%到5 w/v%的磷酸在80℃到140℃下反应5分钟到500分钟,且执行中和以获得包含琼脂二糖的反应产物的步骤,

其中所述中和是通过向经所述磷酸处理的所述琼脂糖或所述琼脂中添加强碱以将所述反应产物的pH调整为5到7来执行,且所述强碱包括选自由NaOH、KOH、Ca(OH)₂及Ba(OH)₂组成的群组的一种或多种,

其中所述反应产物中的5-羟甲基糠醛的产率小于1.5 w/w%;

使所述反应产物与使用琼脂二糖作为底物的琼脂寡糖水解酶反应的步骤,所述琼脂寡糖水解酶如SEQ ID NO:1所示;以及

在通过上述步骤获得的水解产物存在下对微生物进行培养且从所得微生物培养液中获得3,6-无水-L-半乳糖的步骤,所述微生物具有代谢半乳糖的能力,

其中具有代谢半乳糖的能力的所述微生物是乳杆菌、双歧杆菌、芽孢杆菌、链霉菌、棒状杆菌、发酵单胞菌、大肠杆菌及酵母中的任一者。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述反应产物与所述琼脂寡糖水解酶之间的反应步骤是在介于20℃到40℃范围内的温度以及100 rpm到300 rpm下执行5小时到48小时。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中具有代谢半乳糖的能力的所述微生物是在厌氧条件下进行培养。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中获得所述3,6-无水-L-半乳糖的步骤是通过对所述所得微生物培养液进行离心分离或过滤来执行。

生产琼脂二糖及3,6-无水-L-半乳糖的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生产源自海藻的无水半乳糖的方法,其中在对琼脂糖或琼脂进行酸处理、中和及酶促水解之后在纯化工艺期间使用微生物来增大3,6-无水-L-半乳糖的生产产率。

背景技术

[0002] 构成红藻的主要多糖(polysaccharide)是琼脂糖(agarose),且琼脂糖是3,6-无水-L-半乳糖(3,6-anhydro-L-galactose)(以下被称为“AHG”)与D-半乳糖(D-galactose)通过 α -1,3连接及 β -1,4连接交替结合的聚合物。其中,AHG是具有防龋(anticariogenic)功能及结肠直肠癌预防功能以及美容增白及保湿功能的多功能高附加值材料。因此,从作为红藻的主要碳水化合物的琼脂或琼脂糖高效地生产AHG并对AHG进行高效地纯化是非常重要的。

[0003] 生产AHG的方法如下。首先,存在一种通过在高温下使用强酸对琼脂糖或琼脂(agar)进行水解来生产AHG的方法。这种方法价廉且简单,但缺点在于作为单糖的AHG及D-半乳糖在高温下会被分解成5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl furfural,5-HMF),从而导致AHG生产产率降低。第二,存在一种通过室温下使用酶对琼脂糖或琼脂进行水解来生产AHG的方法。然而,由于琼脂糖或琼脂的低溶解度,这种方法不能进行高浓度反应,且因此所生产的AHG的浓度非常低,且相应地使分离及纯化成本增加,从而导致AHG生产产率降低。第三,使用例如乙酸等弱酸将琼脂糖或琼脂分解成琼脂寡糖(agarooligosaccharides,AOSs),然后通过外型 β -琼脂糖 II(exo-type β -agarase II)的酶促反应将AOSs生成为新琼脂二糖(neoagarobiose,NAB)。然而,在这种情况下,会生成琼脂三糖(agarotriose)作为副产物,且需要引入称为琼脂裂解 β -半乳糖苷酶(agarolytic β -galactosidase,ABG)的额外的酶以对琼脂三糖进行分解。随后,可通过新琼脂二糖水解酶(neoagarobiose hydrolase,NABH)的酶促反应获得作为单糖的AHG及D-半乳糖。然而,当在预处理反应(其是此工艺的第一步)中使用乙酸时,在随后的中和工艺中会生成大量的盐。此外,由于必须通过发酵来单独地生产重组酶以生产用于反应的酶,因此所述工艺非常复杂且生产成本增加,从而导致经济效率降低。第四,存在一种在高温(170℃)下使用低浓度中性缓冲液的预处理方法,但是这种方法在大规模生产时需要高温及高压反应器。此外,在预处理工艺期间,AHG被过度分解为5-HMF,从而降低AHG生产产率。

发明内容

[0004] 技术问题

[0005] 本发明的目的是提供一种通过强酸处理及中和从琼脂糖或琼脂生产琼脂二糖(agarobiose)的方法。

[0006] 本发明的另一目的是提供一种通过在使琼脂糖或琼脂经历强酸处理、中和及酶促水解的条件下对微生物进行厌氧培养(anaerobic culturing)及需氧培养(aerobic

culturing) 来生产3,6-无水-L-半乳糖的方法。

[0007] 技术解决方案

[0008] 为了实现上述目的,本发明提供一种生产琼脂二糖的方法,所述方法包括:使用作底物(substrate)的以干重量(dry weight)计为10% (w/v) 到37% (w/v) 的量的琼脂糖或琼脂与浓度为0.1% (w/v) 到5% (w/v) 的强酸在80℃到140℃下反应5分钟到500分钟,且执行中和以获得包含琼脂二糖的反应产物,其中所述反应产物中的5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl furfural)的产率小于1.5% (w/w)。

[0009] 本发明还提供一种生产3,6-无水-L-半乳糖的方法,所述方法包括:使用作底物的以干重量计为10% (w/v) 到37% (w/v) 的量的琼脂糖或琼脂与浓度为0.1% (w/v) 到5% (w/v) 的强酸在80℃到140℃下反应5分钟到500分钟,且执行中和以获得包含琼脂二糖的反应产物的步骤,其中所述反应产物中的5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl furfural)的产率小于1.5% (w/w);

[0010] 使所述反应产物与使用琼脂二糖作为底物的琼脂寡糖水解酶(agarooligosaccharide hydrolase)反应的步骤;以及

[0011] 在通过上述步骤获得的水解产物存在下对微生物进行培养且从所得微生物培养液(microorganism culture broth)中获得3,6-无水-L-半乳糖的步骤,所述微生物具有代谢半乳糖的能力。

[0012] 有利效果

[0013] 根据本发明,通过以下方式来获得AHG而无需单独的现有纯化工艺:能够通过用强酸对琼脂糖或琼脂进行处理并对其进行中和来生产高浓度琼脂二糖的所建立的最优条件,以及使用琼脂二糖作为底物对酶进行培养且使用半乳糖作为底物对微生物进行培养,且因此可减少AHG损耗,从而提供以高产率获得AHG的效果。

附图说明

[0014] 图1a及图1b是示出从琼脂糖或琼脂生产AHG及其纯化的示意图,其中图1a图示出通过传统酶糖化生产AHG且使用微生物对AHG进行纯化的工艺,且图1b图示出本发明的AHG生产工艺。

[0015] 图2a是示出根据本发明的AHG生产工艺,在用0.5% (w/v) 的强酸对琼脂糖进行处理、然后在140℃下酸水解10分钟之后获得的液化程度的图,且图2b示出反应产物的薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)分析结果。

[0016] 图3a示出根据本发明的AHG生产工艺通过用0.5% (w/v)、1% (w/v) 或2% (w/v) 的磷酸对琼脂糖进行处理、然后在110℃下酸水解10分钟而获得的反应产物的TLC分析结果。

[0017] 图3b示出根据本发明的AHG生产工艺通过用2% (w/v) 的磷酸对琼脂糖进行处理、然后在110℃下酸水解10分钟而获得的反应产物的气相色谱(gas chromatography, GC)-飞行时间(time of flight, TOF)/质谱(mass spectrum, MS)分析结果。

[0018] 图4a示出重组琼脂寡糖水解酶的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析结果。

[0019] 图4b是示出通过使经过酸处理及中和的琼脂或琼脂糖与琼脂寡糖水解酶反应而获得的反应产物的TLC图像。

[0020] 图4c示出通过使经过酸处理及中和的琼脂或琼脂糖与琼脂寡糖水解酶反应而获得的反应产物的GC-TOF/MS分析结果。

[0021] 图5是一组TLC图像,其示出根据本发明的AHG生产工艺,在不同的酵母培养时间点,使用酵母(其为一般认为安全(Generally Recognized As Safe,GRAS)的微生物)从琼脂糖或琼脂确认AHG纯化的结果。

[0022] 图6示出根据本发明的AHG生产工艺在90℃下用浓度为1% (w/v)、2% (w/v)或3% (w/v)的磷酸对20% (w/v)的琼脂进行酸水解之后在不同时间点的糖化产率。

[0023] 图7a示出根据本发明的AHG生产工艺在用1% (w/v)的磷酸对琼脂进行处理且将经处理的琼脂在90℃下酸水解480分钟之后获得的反应产物的高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography,HPLC)分析结果。

[0024] 图7b示出根据本发明的AHG生产工艺在用2% (w/v)的磷酸对琼脂进行处理且将经处理的琼脂在90℃下酸水解480分钟之后获得的反应产物的HPLC分析结果。

[0025] 图7c示出根据本发明的AHG生产工艺在用3% (w/v)的磷酸对琼脂进行处理且将经处理的琼脂在90℃下酸水解480分钟之后获得的反应产物的HPLC分析结果。

具体实施方式

[0026] 在下文中,将详细阐述本发明的配置。

[0027] 本发明涉及一种生产琼脂二糖的方法,所述方法包括:使用作底物的以干重量计为10% (w/v)到37% (w/v)的量的琼脂糖或琼脂与浓度为0.1% (w/v)到5% (w/v)的强酸在80℃到140℃下反应5分钟到500分钟,且执行中和以获得包含琼脂二糖的反应产物,其中所述反应产物中的5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl furfural)的产率小于1.5% (w/w)。

[0028] 本发明还提供一种生产3,6-无水-L-半乳糖的方法,所述方法包括:使用作底物的以干重量计为10% (w/v)到37% (w/v)的量的琼脂糖或琼脂与浓度为0.1% (w/v)到5% (w/v)的磷酸在80℃到140℃下反应5分钟到500分钟,且执行中和以获得包含琼脂二糖的反应产物的步骤,其中所述反应产物中的5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl furfural)的产率小于1.5% (w/w);

[0029] 使所述反应产物与使用琼脂二糖作为底物的琼脂寡糖水解酶(agarooligosaccharide hydrolase)反应的步骤;以及

[0030] 在通过上述步骤获得的水解产物存在下对微生物进行培养且从所得微生物培养液中获得3,6-无水-L-半乳糖的步骤,所述微生物具有代谢半乳糖的能力。

[0031] 为了解决在传统已知的AHG生产方法中发现的问题,首先,本发明的发明人建立了即使当使用强酸来生产AHG且在高浓度下对琼脂糖或琼脂执行预处理反应时仍最少地生产5-HMF的条件,由此获得在高浓度下具有高产率的琼脂寡糖,特别是琼脂二糖(参见图1a及图1b)。第二,用强碱对在高浓度下以高产率获得的琼脂二糖及琼脂寡糖进行中和,且此时,通过中和生成的盐(例如,磷酸盐)不被除去,而是在下一步、即琼脂寡糖水解酶反应中用作缓冲溶液。第三,使用使琼脂二糖高效降解的琼脂寡糖水解酶在高浓度下生产AHG及D-半乳糖。第四,使用酵母对AHG进行纯化,所述酵母是对于人类而言一般认为安全(Generally Recognized As Safe,GRAS)的微生物。在厌氧或需氧条件下,作为酶反应产物的AHG及D-半乳糖在酵母培养期间被供应作为碳源,且其中,只有半乳糖可被选择性地代谢,从而对AHG

进行纯化(参见图1b)。此种纯化方法不使用对人体有害的有机溶剂,且由于在纯化工艺期间损失的AHG的量几乎没有,因此可以高产率获得纯化的AHG。

[0032] 在琼脂糖或琼脂的强酸处理中使用的强酸的浓度可介于0.1% (w/v) 到5% (w/v)、更具体来说0.5% (w/v) 到3% (w/v) 范围内。当强酸的浓度处于上述范围内时,通过琼脂糖或琼脂的强酸处理引起的5-HMF的生产可被最小化,且同时可生产高浓度的琼脂二糖,且因此可以高产率生产AHG。

[0033] 用强酸对琼脂糖或琼脂进行处理可为琼脂糖或琼脂与0.1% (w/v) 到5% (w/v) 的强酸在80℃到140℃下反应5分钟到500分钟。更具体来说,所述处理可为作为底物的琼脂糖与0.5% (w/v) 到2% (w/v) 的强酸在100℃到140℃下反应5分钟到20分钟。更具体来说,所述处理可为作为底物的琼脂与1% (w/v) 到3% (w/v) 的强酸在80℃到100℃下反应60分钟到480分钟。

[0034] 强酸可以是磷酸、硫酸、盐酸、硝酸等。更具体来说,强酸可以是磷酸。

[0035] 在用强酸对琼脂糖或琼脂进行处理之后,可生成包含高浓度的琼脂二糖的琼脂寡糖。

[0036] 以干重量计,在强酸处理中使用的琼脂糖或琼脂的量可介于10% (w/v) 到37% (w/v)、更具体来说15% (w/v) 到31% (w/v)、且更具体来说16.8%到30.7% (w/v) 范围内。当琼脂糖或琼脂的量处于上述范围内时,可获得90%、95%或98%的液化程度。当琼脂糖或琼脂的量处于上述范围之外时,可显著降低底物降解速率。

[0037] 通过向其中添加强碱,会将强酸处理的琼脂糖或琼脂中和成pH为5到7。

[0038] 作为强碱,可以使用NaOH、KOH、Ca(OH)₂、Ba(OH)₂等,但本发明不限于此。

[0039] 琼脂寡糖水解酶是将作为底物的琼脂二糖分解成D-半乳糖及3,6-无水-L-半乳糖的酶,且可包括SEQ ID NO:1所述的氨基酸序列。

[0040] 琼脂寡糖水解酶可通过DNA片段(即,编码基因)来进行转录(transcribe)及转译(translate),所述DNA片段参与生产多肽(polypeptide),包括各编码片段之间的插入序列以及酶编码区之前及之后的区。举例来说,琼脂寡糖水解酶可从SEQ ID NO:2所述的序列来转录及转译,但不特别受限于此。此外,作为具有酶的一次或多次取代、缺失、错位、添加等的突变蛋白,具有琼脂二糖水解活性的蛋白也处于本发明的酶的范围。优选地,琼脂寡糖水解酶包括与SEQ ID NO:1所述的氨基酸序列具有至少80%的同源性、至少85%的同源性、至少90%的同源性、至少93%的同源性、至少94%的同源性、至少95%的同源性、至少96%的同源性、至少97%的同源性、至少98%的同源性、至少99%的同源性的氨基酸序列。

[0041] 琼脂寡糖水解酶可源自糖噬菌体降解菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T,但本发明不特别受限于此。

[0042] 琼脂寡糖水解酶可从糖噬菌体降解菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T的培养物的上清液中分离及纯化,且可通过以下方式产生及分离:使用基因重组技术从除糖噬菌体降解菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T以外的菌株中产生及分离;或通过人工化学合成方法来产生及分离。当使用重组技术时,可使用糖噬菌体降解菌的培养物上清液或上清液代替琼脂寡糖水解酶,但本发明不特别受限于此。根据一个实施例,琼脂寡糖水解酶可从用包含SEQ ID No:2所述的碱基序列(base sequence)的重组载体转化的大肠杆菌(*E.coli*)或其培养液获得。

[0043] 琼脂二糖与琼脂寡糖水解酶之间的反应可在20℃到40℃的温度以及100rpm到300rpm下执行5小时到48小时。更具体来说,其之间的反应可在30℃到40℃的温度下执行10小时到24小时。

[0044] 在本说明书中,用语“蛋白”及“多肽”可互换使用。

[0045] 在本发明中,与另一个序列具有特定百分比(例如,80%、85%、90%、95%或99%)的序列同源性(sequence homology)的多肽意指在将两个序列比对时所述两个序列根据序列比较而具有上述百分比的相同的氨基酸残基。可使用现有技术中已知的任何合适的软件程序(例如,在分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)(F.M.奥苏拜耳(F.M.Ausubel)等人),(编辑(eds))1987增补30节7.7.18中阐述的那些程序)来确定比对以及百分比同源性或同一性。优选的程序包括GCG堆积程序(GCG Pileup program)、FASTA(皮尔森(Pearson)等人,1988年美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)85:2444-2448)以及基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)(BLAST手册,阿尔丘尔(Altschul)等人,国家生物技术信息中心(Natl.Cent.Biotechnol.Inf.),国家图书馆医学院(美国国立卫生研究院(NCIB NLM NIH),马里兰州贝塞斯达(Bethesda,Md),以及阿尔丘尔等人,1997年NAR 25:3389-3402)。另一个优选的比对程序是比对+(ALIGN Plus)(科教软件(Scientific and Education Software),PA),其优选地使用基本参数。本文中可使用的再一个优选的序列软件程序是可在序列软件包版本6.0(遗传学计算机集团(Genetics Computer Group),威斯康星大学(University of Wisconsin),麦迪逊分校(Madison WI))中得到的TFASTA数据搜索程序。

[0046] 在本发明中,与细胞、核酸、蛋白或载体结合使用的用语“重组”指示通过引入异源核酸或蛋白或者改变固有核酸或蛋白对细胞、核酸、蛋白或载体进行改性,或者细胞源自这些改性的细胞。也就是说,重组细胞例如表达在固有(非重组)形式的细胞中未发现的基因,或表达在表达时异常表达或完全不表达的固有基因。

[0047] 在本说明书中,用语“核酸”囊括所有类型的单链或双链脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid,DNA)、核糖核酸(Ribonucleic Acid, RNA)及其化学变体。用语“核酸”与“多核苷酸”在本文中可互换使用。由于遗传密码是简并的,因此可使用一个或多个密码子来对特定的氨基酸进行编码,且本发明囊括对特定氨基酸序列进行编码的多核苷酸。

[0048] 用于阐述将核酸序列插入细胞中的用语“引入”是指“转染(transfection)”、“转化”或“转导(transduction)”,且囊括对将核酸序列整合到真核或原核细胞中的引用。在这种情况下,将核酸序列整合到细胞的基因组(例如,染色体、质粒、质体或线粒体DNA)中,并转化为自主复制子或进行临时表达。

[0049] 在本发明的生产3,6-无水-L-半乳糖的方法中,通过使用琼脂二糖作为底物的琼脂寡糖水解酶将琼脂二糖水解成D-半乳糖及AHG,且当在厌氧或需氧条件下将具有代谢半乳糖的能力的微生物与其一起培养时,半乳糖在微生物培养液中被消耗,且仅保留AHG。因此,不需要经历单独地从包含半乳糖及AHG的水解产物中对AHG进行纯化的另外的工艺。

[0050] 具有代谢半乳糖的能力的微生物可为以下中的任一种:乳酸菌,包括双歧杆菌及乳杆菌,例如干酪乳杆菌(L.casei)、嗜酸乳杆菌(L.acidophilus)、保加利亚乳杆菌(L.bulgaricus)、长芽孢杆菌(B.longum)、双歧杆菌(B.bifidum)、活性小瓶菌

(*Actiregularis*)等;芽孢杆菌;链霉菌;棒状杆菌;发酵单胞菌,例如运动发酵单胞菌(*Z.mobilis*)等;大肠杆菌(*Escherichia coli*);以及酵母,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*)等。这些是代谢半乳糖的上述无害GRAS微生物,且因此仅微生物及AHG保留在微生物培养液中。

[0051] 因此,通过对微生物培养液进行离心分离或过滤来除去微生物或细胞碎片而无需传统的纯化方法,且AHG保留在剩余的液体中,从而可以高产率获得AHG。

[0052] 具有代谢半乳糖的能力的微生物可在需氧或厌氧条件下进行培养。更优选地,微生物可在厌氧条件下进行培养,且厌氧培养条件(例如培养基、培养温度、时间等)可在所属领域中的技术人员所理解的范围内执行,且本发明不特别受限于此。

[0053] 在下文中,将参照根据本发明的实例更详细地阐述本发明,但是这些实例不旨在限制本发明的范围。

[0054] 本发明的方式

[0055] <实例1>建立酸水解条件

[0056] 当琼脂糖或琼脂用强酸水解时,AHG或D-半乳糖被过度分解并转化成5-HMF。因此,在微波消解系统(microwave digestion system)中使用通过对磷酸进行稀释而获得的稀磷酸来执行酸水解。

[0057] 为了检测稀磷酸的水解效果,首先,对所添加的底物的量进行优化。在140℃下使用0.5%(w/v)的磷酸将16.8%(w/v)、23.8%(w/v)、30.7%(w/v)或36.8%(w/v)的琼脂糖底物酸水解了10分钟。此时,所使用的琼脂糖的量是以干重量计。液化(liquefaction)程度被表达为通过以下方式获得的值的百分比:从所添加的琼脂糖的初始重量(g)中减去在经过酸水解及在12,000xg及4℃下离心分离30分钟之后在105℃下干燥12小时而获得的沉淀物的量(g),并将所得值除以所添加的琼脂糖的初始重量。

[0058] 结果,如图2a所示,当添加16.8%到30.7%的量的底物时,获得了98%或高于98%的液化程度,而在添加36.8%的底物的条件下得到的液化程度显著降低,即5%。从此结果确认到,如示出TLC测量结果的图2b所示,琼脂糖在添加36.8%的底物的条件下不能充分降解。在生产工艺中,添加高浓度的底物是非常重要的,这是因为可以尽可能高的浓度来生产作为最终产物的AHG。此外,可减少水及能量的消耗以及减小反应器的大小,且因此可降低生产成本。因此,通过选择30.7%(其是所添加的底物的最大量)来建立随后的酸水解条件。

[0059] 为了生产有效用于酸水解的琼脂寡糖、尤其是琼脂二糖,在110℃、120℃、130℃或140℃的反应温度下用0.5%(w/v)、1%(w/v)或2%(w/v)的磷酸执行水解5分钟或10分钟。

[0060] 表1示出根据水解条件确认液化程度以及琼脂二糖及5-HMF的产率的结果。

[0061] [表1]

酸预处理条件		液化程度(%, w/w)	琼脂二糖产率(%, w/w)	5-HMF产率(%, w/w)
磷酸0.5% (w/v)	120°C, 10 min	18.5 ± 6.3	4.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0
	130°C, 5 min	91.1 ± 7.0	19.5 ± 5.2	0.2 ± 0.1
	130°C, 10 min	99.3 ± 0.1	44.7 ± 0.9	0.9 ± 0.0
	140°C, 5 min	99.0 ± 1.3	21.8 ± 5.1	0.2 ± 0.1
	140°C, 10 min	99.2 ± 0.1	57.2 ± 0.2	4.2 ± 0.3
磷酸1% (w/v)	110°C, 5 min	64.4 ± 9.7	10.5 ± 1.7	0.0 ± 0.0
	110°C, 10 min	99.4 ± 0.2	39.0 ± 1.4	0.2 ± 0.0
	120°C, 5 min	93.8 ± 0.7	24.3 ± 5.1	0.1 ± 0.0
	120°C, 10 min	99.7 ± 0.2	59.1 ± 3.7	0.5 ± 0.1
	130°C, 5 min	99.9 ± 0.4	66.1 ± 1.1	1.2 ± 0.3
	130°C, 10 min	99.2 ± 0.1	49.3 ± 10.4	7.3 ± 3.3
	140°C, 5 min	99.4 ± 0.1	62.5 ± 1.1	2.9 ± 0.6
	140°C, 10 min	98.4 ± 0.2	32.4 ± 0.8	11.1 ± 2.2
磷酸2% (w/v)	110°C, 5 min	99.6 ± 0.2	47.2 ± 7.1	0.2 ± 0.1
	110°C, 10 min	99.4 ± 0.3	70.0 ± 1.2	1.3 ± 0.6
	120°C, 5 min	99.3 ± 0.1	67.0 ± 2.6	0.8 ± 0.4
	120°C, 10 min	99.3 ± 0.1	64.4 ± 3.9	2.5 ± 1.3
	130°C, 5 min	99.3 ± 0.2	65.4 ± 2.1	2.1 ± 0.5
	130°C, 10 min	99.2 ± 0.2	44.6 ± 6.8	9.0 ± 2.3
	140°C, 5 min	99.5 ± 0.1	53.1 ± 6.9	5.7 ± 1.4
	140°C, 10 min	98.9 ± 0.1	25.2 ± 3.0	16.9 ± 1.9

[0063] 如表1所示,在0.5%的磷酸、120°C、10分钟及130°C、5分钟的条件和和在1%的磷酸、110°C、5分钟及120°C、5分钟的条件,表现出18.5%到93.8%的液化程度,由此确认到琼脂糖不能完全水解。然而,随着酸浓度及温度增加,单糖被过度分解,且因此5-HMF产率也增加。相比之下,随着酸浓度、温度及反应时间的增加,液化程度增加,且琼脂二糖产率也增加。

[0064] 为了根据上述条件对反应产物的类型进行分析,执行了TLC、GC/TOF-MS及HPLC分析。

[0065] 对于TLC,将1μl的酶反应产物装载到硅胶板上,并在由体积比(v/v/v)为3:1:1的正丁醇、乙醇及水的混合物组成的流动相上显影了2小时,然后使用10%的硫酸及0.2%的1,3-二羟基萘进行显色。

[0066] GC/TOF-MS分析的衍生化过程如下。将预处理反应产物以16,000xg离心分离5分钟,然后用速度袋对20μl的上清液进行了干燥。将在吡啶(pyridine)中的10μl的4% (w/v)的O-甲基羟胺盐酸盐(O-methylhydroxylamine hydrochloride)添加到干燥用于衍生化的样品中,且使其之间的反应在30°C下进行90分钟,然后向其中添加了45μl的N-甲基-N-(三甲基硅基)三氟乙酰胺(N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide),且使其之间的反应在37°C下进行30分钟。用于分析的装置条件如下。用于分析的柱是RTX-5Sil MS (30m × 0.25mm i.d., 25μm的膜厚度,瑞思泰康公司(Restek)),首先将柱温度在50°C下保持1分钟,并以20°C/min的加热速率升高到330°C,然后将温度在330°C下保持5分钟。以5的分流比率(split ratio)对1μl的各样品进行分析。

[0067] 对于HPLC分析,使用KS-802柱(昭和公司(Shodex))在80°C的柱温度及0.5mL/min的流速下对每一样品进行了分析。此时,使用水作为流动相。

[0068] 如图3a及表1所示,确认到尽管在较低浓度的磷酸条件下表现出较高的聚合程度(degree of polymerization,DP),然而DP为2的琼脂二糖主要随着酸浓度的增加而产生。在上述条件中,在1%的磷酸及130℃、5分钟的条件以及在2%的磷酸、110℃、10分钟及120℃、5分钟的条件下琼脂二糖产率最高,即,对于相应的条件来说为66.1%、67.0%及70.0%(参见图3b),且在上述条件下,5-HMF产率低,即,1.2%。

[0069] <实例2>琼脂寡糖水解酶(agarooligosaccharide hydrolase)的克隆、表达(Expression)及纯化

[0070] 使用糖噬菌体降解菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T (ATCC 43961)作为模板以及以下引物,通过聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)获得了对β-琼脂寡糖水解酶进行编码的基因:

[0071] 正向引物(forward primer):

[0072] 5'-ATACATATGAATAGACTTACACTACCGCCTTCTTCTCGT-3' (SEQ ID No:3);

[0073] 反向引物(reverse primer):

[0074] 5'-ATAGCGCCGCGCTCCTACTCGAGACAACTCAGCAAATGC-3' (SEQ ID No:4)。

[0075] 通过添加250μM的dNTP、20pmol的每种引物、1.5mM的MgCl₂、10μl的10x缓冲液、100ng的DNA模板及1单位的空斑形成单位(plaque forming unit,pfu)聚合酶制备了100μl的PCR反应混合物,且如下执行了PCR:在95℃下初始变性5分钟,然后是在95℃下变性1分钟的25个循环、在55℃下退火30秒,并且在72℃下延伸(extension)3分钟。通过PCR获得的DNA片段用NdeI/NotI限制酶(restriction enzyme)消解,在1%的琼脂糖凝胶上纯化,并扎接到用相同限制酶消解(digest)的pET21a质粒中,以为每种情况构建pET21a-Sde_Baga。

[0076] 将所构建的质粒引入大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3)中。为了对其中引入有琼脂寡糖水解酶基因的重组大肠杆菌进行预培养(pre-culture),将细胞在10mL的含有100μg/mL氨苄青霉素(ampicillin)的LB液(LB broth)中在50mL锥形管(50mL-conical tube)中在37℃下培养了9小时。此后,将2mL预培养溶液接种到100mL具有相同培养基组成的本发明培养液中,然后当使用光密度光谱仪(optical density spectroscope)使光密度值达到中期指数期(OD 0.4到0.6)时,添加了0.1mM的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside,IPTG)以在30℃下诱导(induction)16小时。然后,将细胞培养液在4℃下以16,000xg离心分离了20分钟,然后对细胞进行回收。将回收的细胞分散在30mL的缓冲液(20mM Tris-HCl,pH 7.4)中,然后使用超声波(sonicator)发生器对细胞进行裂解(lysis)。随后,将裂解物在4℃下以16,000xg离心分离了10分钟以收集上清液。使用海思泰普(Histrap)柱(5mL,GE卫生保健公司(GE Health Care))对包含在收集的上清液中的重组酶进行了纯化,然后使用SDS-PAGE凝胶对每种纯化的蛋白的大小进行了确认(参见图4a)。使用脱盐柱除去了用于蛋白纯化中的盐(咪唑(imidazole))。用二辛可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)测定法(BCA assay)对除去盐的重组蛋白酶的浓度进行了量化。

[0077] <实例3>使用琼脂二糖作为底物通过琼脂寡糖水解酶反应来生产AHG

[0078] 使30.7重量%(w/v)的琼脂糖及琼脂在实例1中建立的条件(即,2%的磷酸及110℃,10分钟)下反应(参见表2)。琼脂糖及琼脂两者的量均以干重量计。

[0079] 琼脂寡糖水解酶反应条件如下。使用5M的NaOH将在上述条件下获得的酸水解产物

中和成pH为5到6,然后使反应在37℃及200rpm下进行12小时。

[0080] 通过薄层色谱(thin layer chromatography,TLC)(参见图4b)以及GC/TOF-MS及HPLC(参见图4c)对酶促反应后获得的反应产物进行了分析,且TLC、GC/TOF-MS及HPLC分析条件与实例1中所使用的条件相同。

[0081] 如图4b及图4c所示,确认到琼脂二糖通过琼脂寡糖水解酶而被转化成AHG及D-半乳糖。此时,相对于所添加的琼脂糖的量(g)所获得的AHG产率为43.3%。

[0082] <实例4>使用酵母进行AHG纯化

[0083] 在实例3中获得的反应产物是AHG及D-半乳糖,且执行酵母培养以除去D-半乳糖。作为酵母菌株,使用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)D452-2,且将此菌株在YPD液(YPD broth)中在30℃及200rpm下预培养了24小时。在培养后,将培养液以6,000xg离心分离了10分钟以获得细胞团块,将细胞团块用Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)洗涤,然后在相同条件下再次离心分离以获得细胞团块。

[0084] 为了进行培养,使用酶促反应产物即AHG及D-半乳糖作为碳源将酿酒酵母(*S.cerevisiae*)D452-2的细胞团块接种到含有3.35g/L酵母氮碱(yeast nitrogen base)及0.4g/L完全补充混合物(complete complementary mixture,CSM)的基本培养基中。将细胞团块在30℃及200rpm下培养42小时,然后执行TLC及GC-TOF/MS,由此确认到D-半乳糖被完全消耗并且仅剩余AHG(参见图5),且将AHG产率计算为33.2%(参见表2)。

[0085] [表2]

工艺		量(g)		产率(g产物/100g输入底物)	
		琼脂糖	琼脂	琼脂糖	琼脂
供应	初始底物	147.2	134.4	NA*	NA
[0086] 酸水解	琼脂二糖(DP2)	132.6	83.8	90.1	62.4
用琼脂寡糖水解酶处理	AHG/半乳糖	63.4/70.5	29.2/32.9	43.3/47.9	21.8/24.5
酵母发酵	AHG	48.8	22.5	33.2	16.7
*不适用					

[0087] <实例5>根据现有糖化工艺进行产率比较

[0088] 对根据本发明的糖化以及传统糖化工艺中的单糖产率及最大底物浓度进行了比较。其结果示于下表3中。

[0089] [表3]

琼脂糖糖化方法	乙酸预处理以及使用Aga50D、ABG及NaBH的酶促糖化 CH李等人(CH Lee et al.), 过程生物化学(Process Biochem) (2005)	Tris-HCl预处理以及使用Aga50D、ABG及NaBH的酶促糖化 CH李等人, 过程生物学(2005)	使用Aga16B、Aga50D及NaBH的酶促糖化	本发明
单糖产率(理论最大值的%)	50.5	44.9	72.5	62.6
最大底物浓度(w/v)	15%	5%	1%	30.7%

[0090]

[0091] 如表3所示,与在现有工艺中相比,在本发明的情况下最大底物浓度显著更高。

[0092] <实例6>建立琼脂的酸水解条件

[0093] 除了使用20% (w/w) 的琼脂作为底物以外以与实例1相同的方式使用1% (w/v)、2% (w/v) 或3% (w/v) 的磷酸在90℃的反应温度下执行水解480分钟(8小时)。

[0094] 如图6所示,在每一条件下得到的糖化产率随着时间增加。

[0095] 为了根据上述条件对反应产物的类型进行分析,以与实例1相同的方式执行了HPLC分析。

[0096] 如图7a到图7c所示,在1%的磷酸以及480分钟的条件,琼脂二糖的浓度为143.3g/L,在2%的磷酸及270分钟的条件,琼脂二糖的浓度为162.5g/L,且在3%的磷酸及150分钟的条件,琼脂二糖的浓度为172.7g/L。以所添加的琼脂的量计,这些产率分别对应于64%、73%及77%。作为副产物的5-HMF的量非常小,即在2%的磷酸及3%的磷酸条件下分别为4.4g/L及3.7g/L。本发明的方法的优点在于,不需要昂贵的高压反应器,这是因为酸水解是在相对低的温度下执行,且在工作时具有更高的安全性。

[0097] 工业适用性

[0098] 本发明可用于生产高产率的3,6-无水-L-半乳糖。

- <110> 高丽大学校产学协力团
- <120> 生产琼脂二糖及 3,6-无水-L-半乳糖的方法
- <130> X17U13C0188
- <150> KR 10-2016-0165598
- <151> 2016-12-07
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 444
- <212> PRT
- <213> 变形菌 2-40T (Saccharophagus degradans 2-40T)

[0001] <400> 1

Met Asn Arg Leu Thr Leu Pro Pro Ser Ser Arg Leu Arg Ser Lys Glu

1 5 10 15

Phe Thr Phe Gly Val Ala Thr Ser Ser Tyr Gln Ile Glu Gly Gly Ile

20 25 30

Asp Ser Arg Leu Pro Cys Asn Trp Asp Thr Phe Cys Glu Gln Pro Asn

35 40 45

Thr Ile Ile Asp Asn Thr Asn Gly Ala Ile Ala Cys Asp His Ile Asn

50 55 60

Arg Trp Gln Asp Asp Ile Glu Leu Ile Ala Asn Leu Gly Val Asp Ala

65 70 75 80

Tyr Arg Phe Ser Ile Ala Trp Gly Arg Val Ile Asn Leu Asp Gly Ser

85 90 95

	Leu Asn Asn Glu Gly Val Thr Phe Tyr Lys Asn Ile Leu Thr Lys Leu	
	100	105 110
	Arg Glu Lys Asn Leu Lys Ala Tyr Ile Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu	
	115	120 125
	Pro Gln His Leu Glu Asp Ala Gly Gly Trp Leu Asn Arg Asp Thr Ala	
	130	135 140
	Tyr Lys Phe Arg Asp Tyr Val Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Asp Asp	
	145	150 155 160
	Asp Val Phe Cys Tyr Thr Thr Leu Asn Glu Pro Phe Cys Ser Ala Tyr	
	165	170 175
	Leu Gly Tyr Glu Ile Gly Val His Ala Pro Gly Ile Lys Asp Leu Ala	
	180	185 190
[0002]	Ser Gly Arg Lys Ala Ala His His Leu Leu Leu Ala His Gly Leu Ala	
	195	200 205
	Met Gln Val Leu Arg Lys Asn Cys Pro Asn Ser Leu Ser Gly Ile Val	
	210	215 220
	Leu Asn Met Ser Pro Cys Tyr Ala Gly Ser Asn Ala Gln Ala Asp Ile	
	225	230 235 240
	Asp Ala Ala Lys Arg Ala Asp Asp Leu Leu Phe Gln Trp Tyr Ala Gln	
	245	250 255
	Pro Leu Leu Thr Gly Cys Tyr Pro Asp Ala Ile Asn Ser Leu Pro Asp	
	260	265 270
	Asn Ala Lys Pro Pro Ile Cys Glu Gly Asp Met Ala Leu Ile Ser Gln	
	275	280 285
	Pro Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Tyr Thr Arg Ala Val Phe Phe	

	290	295	300	
	Ala Asp Gly Asn Gly Gly Phe Thr Glu Gln Val Pro Glu Gly Val Glu			
	305	310	315	320
	Leu Thr Asp Met Gly Trp Glu Val Tyr Pro Gln Gly Leu Thr Asp Leu			
		325	330	335
	Leu Ile Asp Leu Asn Gln Arg Tyr Thr Leu Pro Pro Leu Leu Ile Thr			
	340	345	350	
	Glu Asn Gly Ala Ala Met Val Asp Glu Leu Val Asn Gly Glu Val Asn			
	355	360	365	
	Asp Ile Ala Arg Ile Asn Tyr Phe Gln Thr His Leu Gln Ala Val His			
	370	375	380	
	Asn Ala Ile Glu Gln Gly Val Asp Val Arg Gly Tyr Phe Ala Trp Ser			
[0003]	385	390	395	400
	Leu Met Asp Asn Phe Glu Trp Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Phe Gly			
		405	410	415
	Ile Thr Tyr Val Asp Tyr Gln Thr Gln Lys Arg Thr Leu Lys Ala Ser			
	420	425	430	
	Gly His Ala Phe Ala Glu Phe Val Ser Ser Arg Ser			
	435	440		
	<210> 2			
	<211> 1335			
	<212> DNA			
	<213> 变形菌 2-40T (Saccharophagus degradans 2-40T)			
	<400> 2			
	atgaatagac ttactactacc gccttcttct cgtttgcgca gcaaagagtt tacctttggt			60
	gttgcaacgt cgtcttacca aattgaaggc ggcatagatt ctgcctgcc ctgtaattgg			120

	gatacgttct gtgagcagcc caataccatt attgataaca ccaacggcgc cattgcttgc	180
	gaccacataa atagatggca agacgatata gaacttattg ccaacctagg ggtagatgcc	240
	taccgctttt ctattgcgtg gggccgtgtt attaatttag acggcagcct caataatgaa	300
	ggcgttacat ttacaaaaa tattttaact aagcttcgcg aaaagaattt aaaagcttat	360
	ataacgctat accactggga ctgccacaa catttagaag atgctggcgg ctggcttaac	420
	cgcgataccg cctacaagti tcgcgactat gtaaacctta taaccaagc gcttgatgac	480
	gatgtatttt gctacacaac gttaaagcag ccttttgca gtgcctacct tggctatgaa	540
	attggtgtac acgcaccggg tataaaagac ttagccagtg ggcgcaaagc cgcacaccat	600
	ttattacttg cccatggctt agctatgcaa gtgctgcgaa aaaactgccc caatagtta	660
[0004]	agcggcatag tgttaaacad gagcccttgt tacgccggca gcaacgcaca agcagatata	720
	gatgcagcaa aacgcgcgga cgatttatta ttacagtggg atgcacaacc gctacttact	780
	ggctgctacc ctgatgcaat aaacagcctg ccagacaatg ccaaaccacc tatttgtgaa	840
	ggcgacatgg cgtaataag ccaaccttta gattatttag gccttaacta ctataccgc	900
	gcagtatttt ttgccgacgg taatggcggg ttaccgaac aagtacctga ggggttagag	960
	ctaaccgata tgggctggga agttaccgg caagccttaa ccgatttact aatagacct	1020
	aaccaacgct ataccctacc cccgttactt attaccgaaa acggcgcagc aatggtggac	1080
	gaacttgta acggcgaagt taacgatatt gccgaataa attattttca aaccattta	1140
	caagcggtag acaacgccat tgaacaagg gtgatgtac gcggttattt tgcttgagc	1200
	ctaattgata attttgagtg ggcactgggt tacagcaaac gattcgggtat tacctatga	1260

gattacaaa cacaaaagcg aacgctaaaa gccagcggcc acgcatttgc tgagtttgc 1320

tcgagtagga gctaa

1335

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 用于放大琼脂寡糖水解酶的顺向引物

[0005]

<400> 3

atacatatga atagacttac actaccgcct tcttctcgt

39

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 用于放大琼脂寡糖水解酶的反向引物

<400> 4

atagcggcgc cgctcctact cgagacaaac tcagcaaatg c

41

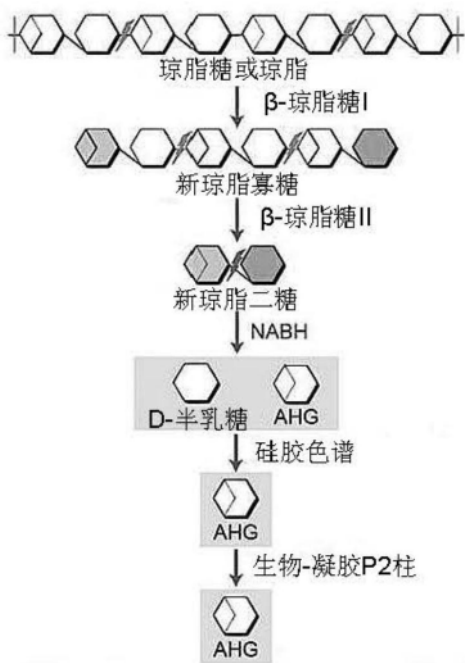


图1a

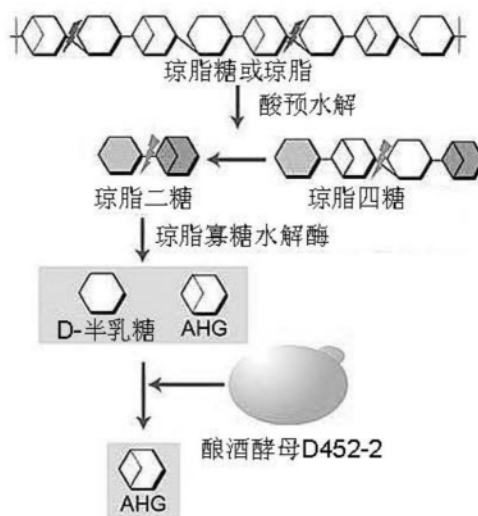


图1b

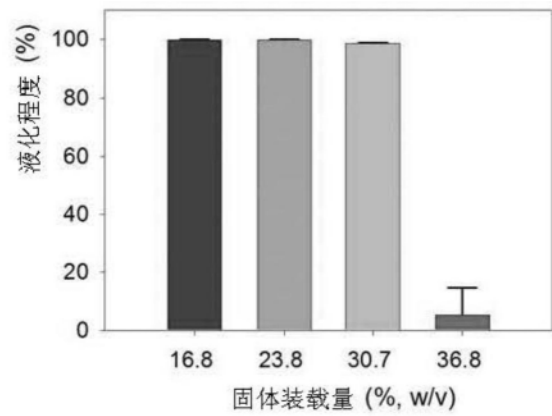


图2a

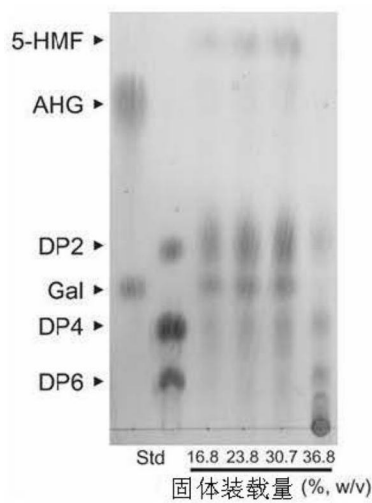


图2b

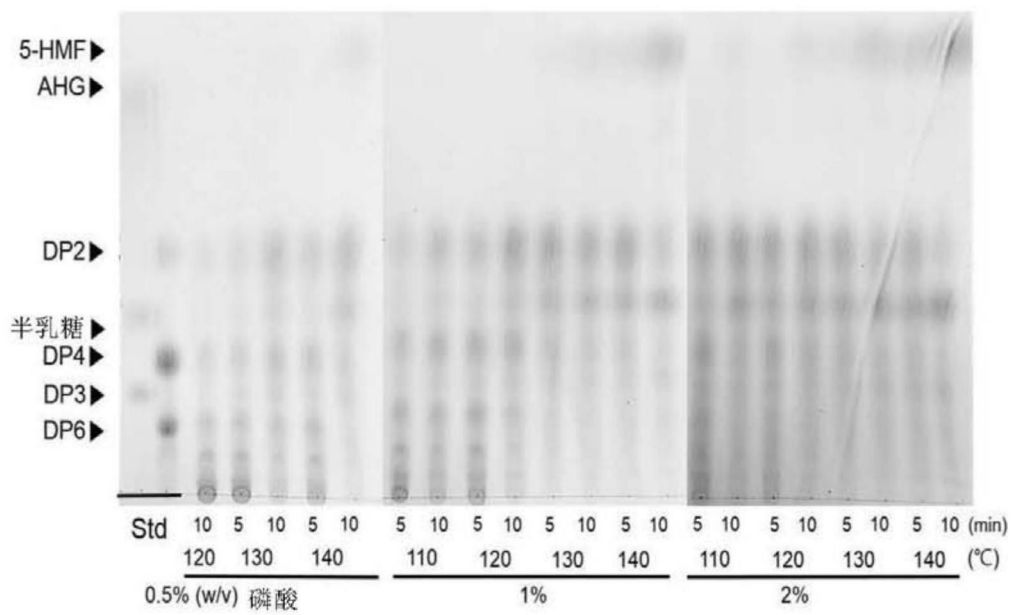


图3a

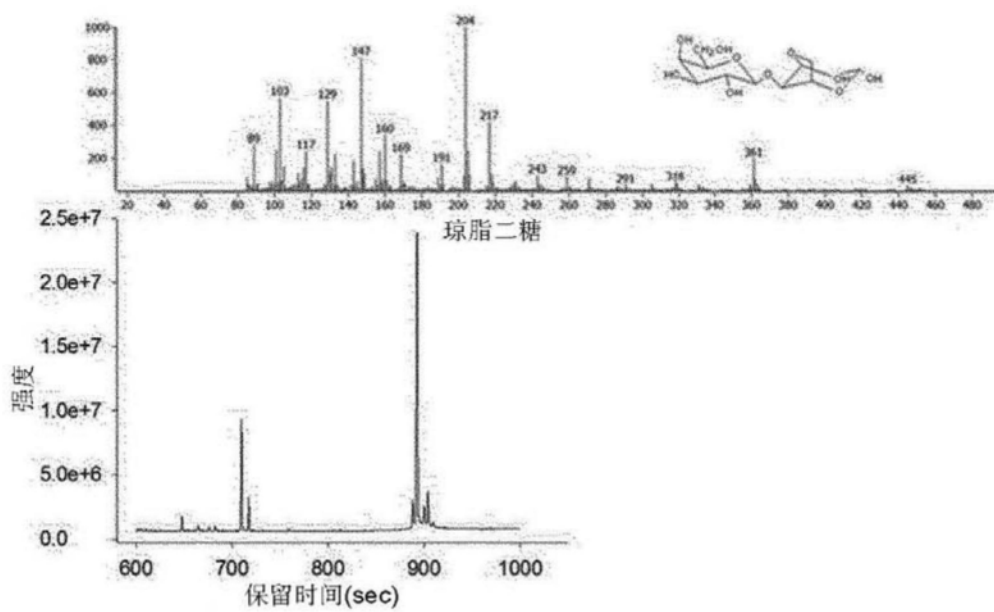


图3b

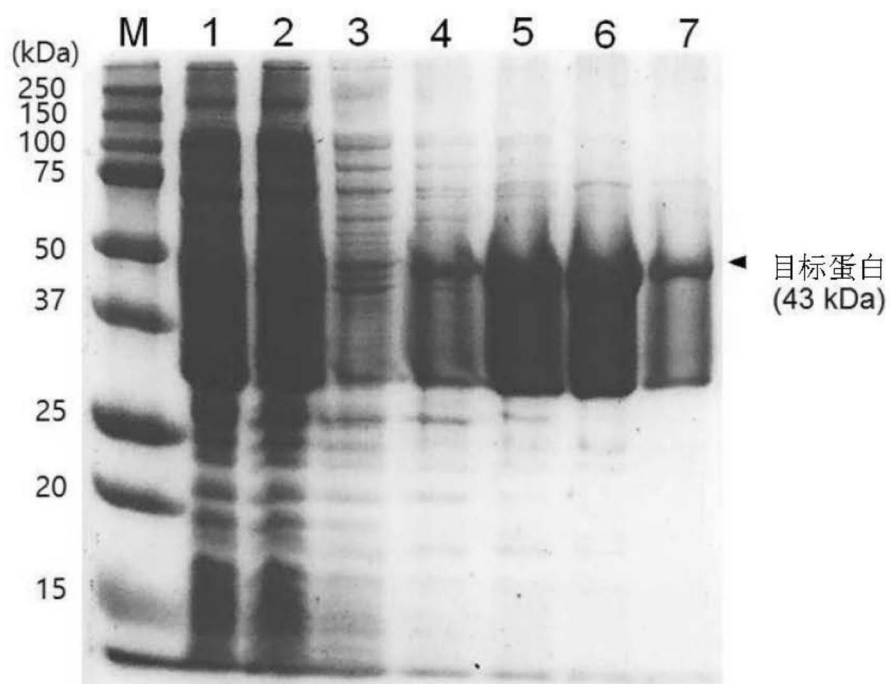


图4a

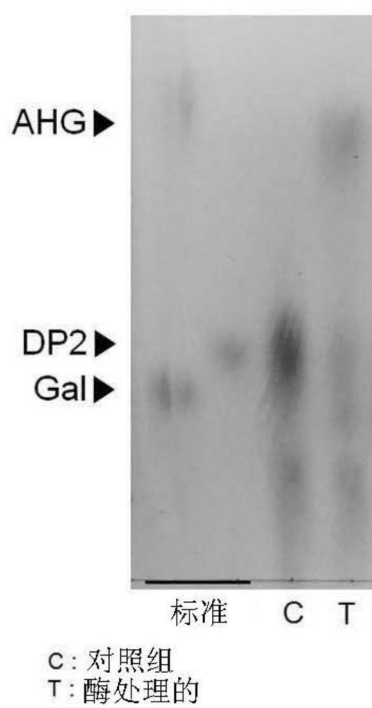


图4b

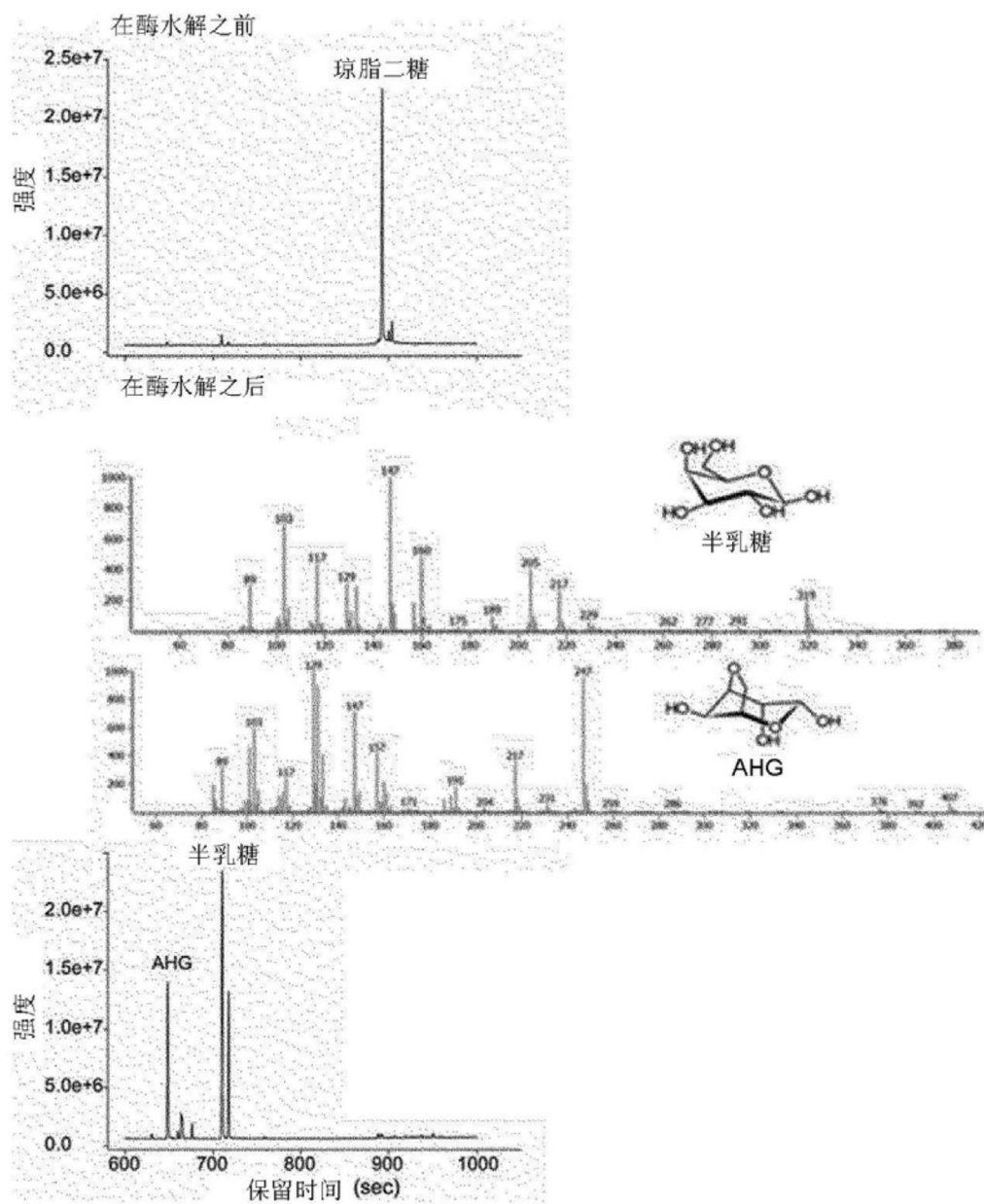


图4c

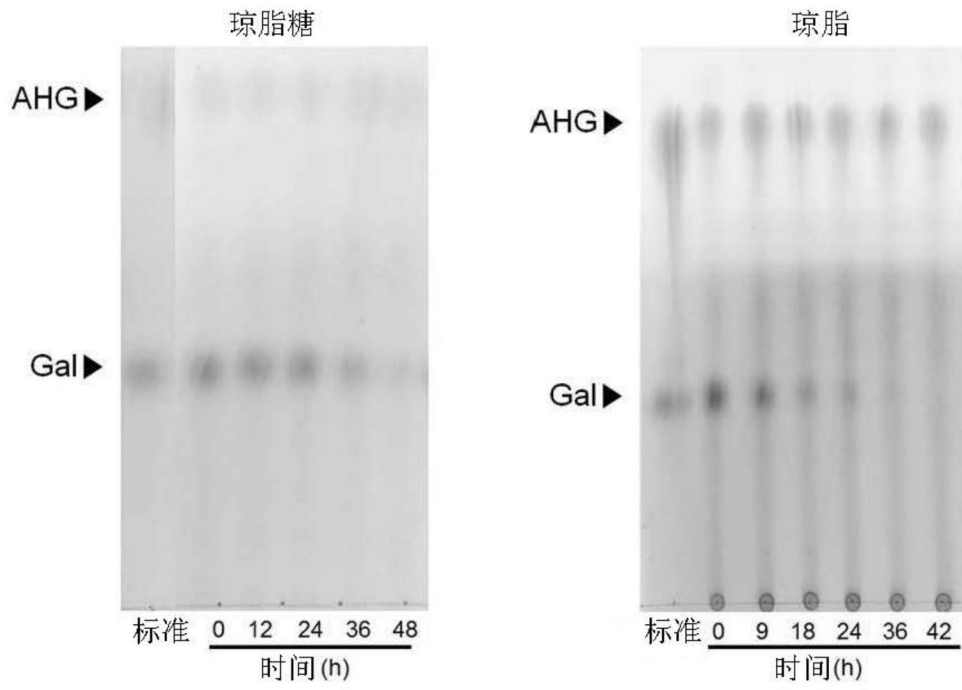


图5

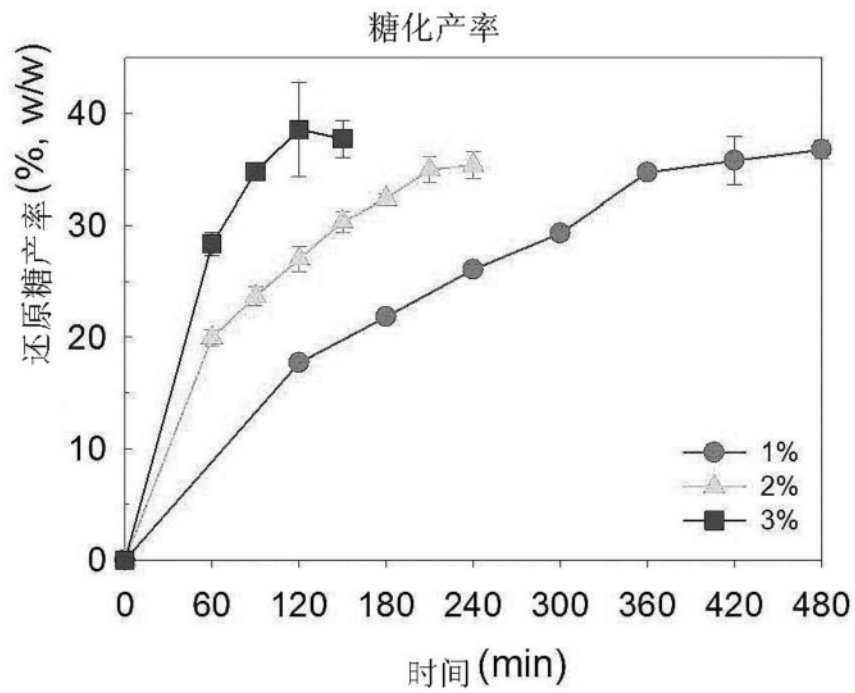


图6

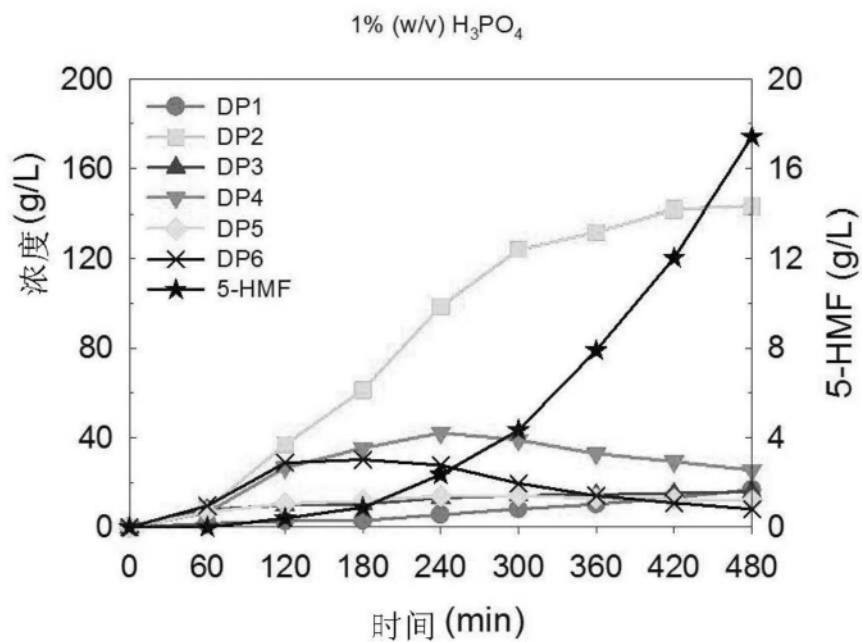


图7a

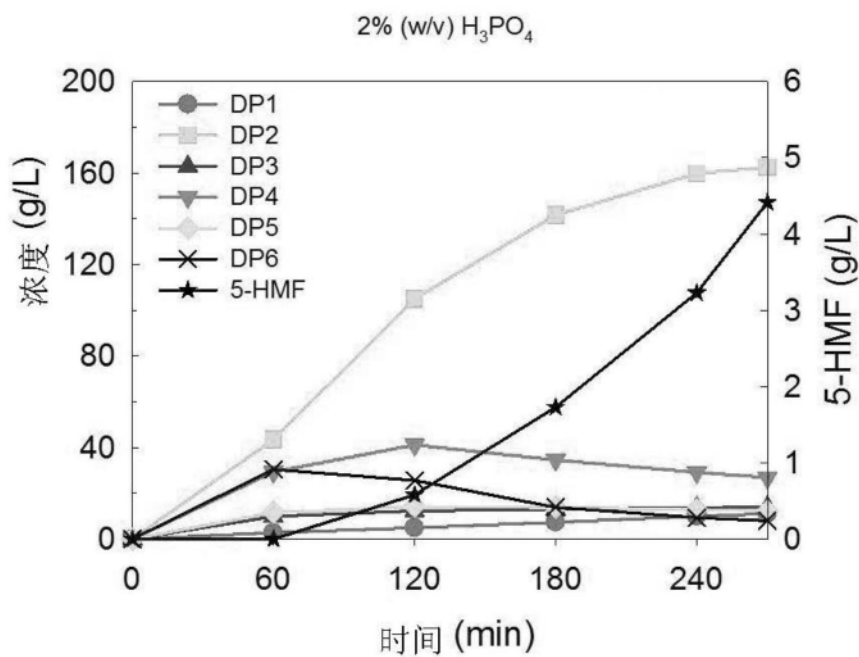


图7b

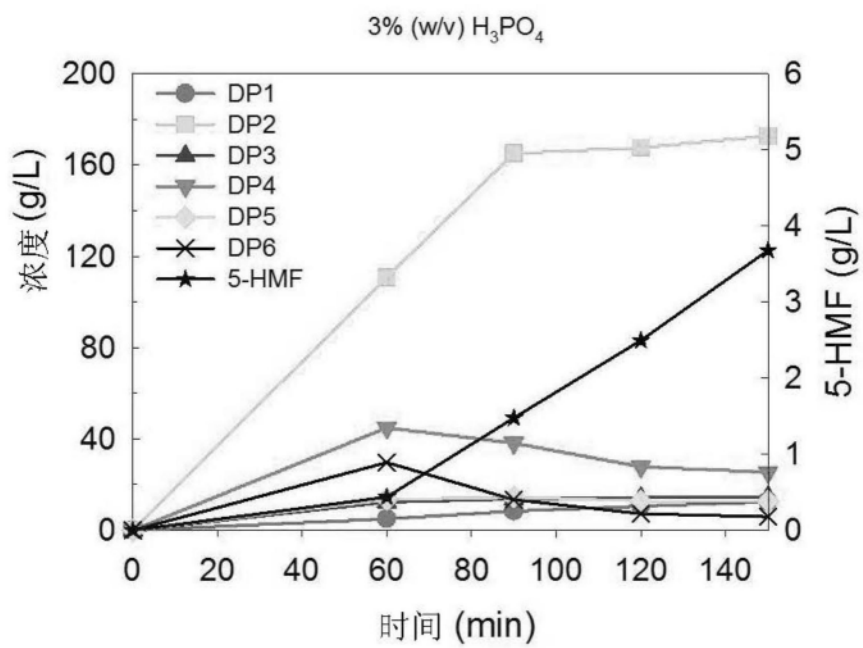


图7c