



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105979798 A

(43)申请公布日 2016.09.28

(21)申请号 201480075012.9

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22)申请日 2014.12.11

代理人 史文静 黄革生

(30)优先权数据

13196704.4 2013.12.11 EP

(51)Int.Cl.

A23L 33/18(2016.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.08.05

A23C 3/02(2006.01)

A23C 9/13(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/077380 2014.12.11

A23C 9/152(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/086746 EN 2015.06.18

(71)申请人 杜邦营养生物科学有限公司

地址 丹麦哥本哈根

(72)发明人 M·K·拉尔森 J·F·克拉米尔

T·艾泽勒

权利要求书2页 说明书73页

序列表17页 附图8页

(54)发明名称

用于制备具有稳定低聚半乳糖含量的乳制
品的方法

(57)摘要

本发明描述了在不同的乳制品中通过使用
转半乳糖基化的 β -半乳糖苷酶原位生成稳定GOS
的方法。

1. 一种处理包含低聚半乳糖的乳基基质的方法,其中所述乳基基质包含具有转半乳糖基化活性的 β -半乳糖苷酶,所述方法包括在90°C至130°C范围内的温度(T)下热处理所述乳基基质至少x秒的时间段的步骤,以获得经热处理的乳制品,

其中x通过 $x = 153,377,215,802.625e^{-0.20378144T}$ 与温度T相关联;

其中在至少14天的时间段内低聚半乳糖的含量变化在0.4%(w/v)以内。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法在所述热处理步骤之前还包括用所述 β -半乳糖苷酶对所述乳基基质进行原位酶处理的步骤,以获得所述包含低聚半乳糖的乳基基质。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述 β -半乳糖苷酶具有高于100%的转半乳糖基化活性比率,诸如高于150%、175%或200%。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述 β -半乳糖苷酶是源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述温度是在90°C至119°C范围内的温度,诸如在90°C至100°C范围内的温度。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述时间段在至少0.01秒至最多1300秒的范围内,诸如在至少0.1秒至最多1300秒的范围内,或诸如在至少1秒至最多1300秒的范围内。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中在至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少8周、至少10周、至少12周或至少24周的时间段内,低聚半乳糖的含量变化在0.4%(w/v)以内。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述乳制品中的低聚半乳糖的量在0.5%至10%(w/v)以内,更优选的1%至8%(w/v)以内,更优选的1.5%至6%(w/v)以内,最优选的2%至5%(w/v)以内。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述乳制品基本上不具有残余的 β -半乳糖苷酶多肽活性,诸如低于0.0213LAU/ml、诸如低于0.0192LAU/ml、诸如低于0.017LAU/ml、诸如低于0.0149LAU/ml、诸如低于0.0149LAU/ml、诸如低于0.0107LAU/ml、诸如低于0.0085LAU/ml、诸如低于0.0064LAU/ml、诸如低于0.0043LAU/ml,或更优选的诸如低于0.00213LAU/ml。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中经过至少14天所测量的低聚半乳糖的含量变化在0.25%(w/v)以内,更优选的在0.2%(w/v)以内,更优选的在0.1%(w/v)以内,最优选的在0.05%(w/v)以内。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述乳基基质包含至少1%(w/v)的量的乳糖,更优选的至少2%(w/v)的量的乳糖,最优选的至少4%(w/v)的量的乳糖以及最多15%(w/v)的量的乳糖。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是源自两歧双歧杆菌的 β -半乳糖苷酶。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;和/或其中所述源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是

多肽,所述多肽具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和/或其中所述源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,所述多肽包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的多肽中的任一种;和/或其中所述源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的多肽中的任一种的截短片段,并且具有850个氨基酸残基的最小长度。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶包含选自下列的多肽:

a.包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多980个氨基酸残基组成,

b.包含与SEQ ID NO:2具有至少97%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多975个氨基酸残基组成,

c.包含与SEQ ID NO:3具有至少96.5%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多1300个氨基酸残基组成。

15.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述乳制品是饮用乳、甜乳、浓缩乳、乳清或发酵型乳制品。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述乳制品是发酵型乳制品,诸如选自下列的发酵型乳制品:酸奶、酪乳、Riazhenka、奶酪、法式鲜奶油、奶渣、乳酸菌(Acidophilus)乳品、Leben、Ayran、Kefir、Sauermilch和清爽干酪。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述酸奶是凝固型、搅拌型或饮用型酸奶。

用于制备具有稳定低聚半乳糖含量的乳制品的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于制备具有稳定低聚半乳糖(GOS)含量的乳制品的方法,并且涉及通过本方法制备富低聚半乳糖的乳制品。

[0002] 发明背景

[0003] 低聚半乳糖(或半乳糖寡糖)(GOS)是在人体和动物体内不可消化的碳水化合物,其包含由糖苷键连接的两个或更多个半乳糖分子,通常情况下至多九个。GOS也可包含一个或多个葡萄糖分子。GOS的有益效果之一是它们充当益生元化合物的能力,其通过选择性地促进有益结肠微生物的增殖而向消费者提供生理益处。已确认的健康效应已使得GOS作为多种类型的食物的食品成分而愈受关注。

[0004] β -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)通常情况下将乳糖水解成为单糖D-葡萄糖和D-半乳糖。在 β -半乳糖苷酶的酶反应中,该酶水解乳糖并且瞬时地结合半乳糖单糖成为半乳糖-酶复合物。随即使用水来水解共价的半乳糖-酶中间体,从而导致D-半乳糖和D-葡萄糖的释放。然而,在高乳糖浓度情况下一些 β -半乳糖苷酶能够在名为转半乳糖基化作用的过程中将半乳糖转移到D-半乳糖或者D-葡萄糖的羟基基团上,由此产生了低聚半乳糖。在高乳糖浓度情况下多数 β -半乳糖苷酶能够将半乳糖转移到乳糖或者更高阶的低聚糖的羟基基团上。

[0005] 双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)通常用于乳品工业。包含双歧杆菌的制品的摄取还具有促进健康的效应。此效应不仅通过肠道内容物的较低的pH实现,而且还在其肠道菌群受到例如抗生素的摄取而干扰的个体中通过双歧杆菌重新形成肠道菌群的能力实现了此效应。此外,双歧杆菌具有竞争潜在有害的肠道微生物的潜能。

[0006] 已知低聚半乳糖提高了双歧杆菌的生长。有可能通过双歧杆菌利用低聚半乳糖作为碳源的独特能力而产生了这一效应。低聚半乳糖膳食补充剂据认为还具有若干长期疾病防护效应。例如,低聚半乳糖的摄入已经显示在小鼠中针对直肠癌的发展是高度保护性的。对于开发低廉且有效的方法来制备低聚半乳糖以用于在工业中来改善膳食补充剂以及乳制品而言存在极大关注。

[0007] 来自两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)DSM20215的截短约580氨基酸(BIF3-d3)的细胞外乳糖酶已经作为处于包含溶解于水的乳糖的溶液中的转半乳糖基化酶而受到了描述(Jørgensen等人(2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57:647-652)。WO 01/90317还描述了作为转半乳糖基化酶的截短变体(OLGA347),并且在WO 2012/010597中示出OLGA347将半乳糖部分转移到D-果糖、N-乙酰基-半乳糖胺和木糖上。

[0008] US2012/0040051描述了一种方法,其用于制备具有高低聚半乳糖(GOS)含量和低乳糖含量的可易于吸收的乳制品,以及用该方法制备增强的低聚半乳糖乳制品,其使用例如来自任意来源的乳糖酶,包括来自曲霉属(*Aspergillus*),酵母属(*Saccharomyces*)以及克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces*)的乳糖酶。

[0009] 使用来自环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)的 β -半乳糖苷酶通过乳糖溶液或脱脂乳进行的低聚半乳糖合成描述于The Journal of Agricultural and Food

Chemistry 2012,60,6391-6398。

[0010] W02008/037839公开了用于制备包含低聚半乳糖的制品的方法,其通过在添加果糖或者任选地乳糖后用 β -半乳糖苷酶来处理乳基原料并且终止该反应混合物的酶促反应来进行。

[0011] EP0458358公开了包含低聚半乳糖的脱脂乳粉末以及用于制备该物质的方法。其中所描述的过程包括将 β -半乳糖苷酶添加到浓缩的乳品中而产生酶促反应以及加热所述反应混合物至75-80°C来终止酶促反应,随后对反应混合物进行喷雾干燥。

[0012] US2006/0223140公开了转糖基方法以及具有转糖基活性的糖苷酶。

[0013] CN101396048涉及用于富低聚半乳糖的乳品的制备方法,其包括如下步骤:加热乳品、分离脂肪以得到脱脂乳、巴氏灭菌、冷却、通过固定化 β -半乳糖苷酶进行水解、UHT杀菌、冷却以及封装。

[0014] 在本发明中,低浓度乳糖到GOS的有效原位转化是通过使用 β -半乳糖苷酶进行乳基基质的处理而提供的,诸如来自具有SEQ ID no 1的887个氨基酸组成两歧双歧杆菌DSM20215的截短乳糖酶。

[0015] 此外,在乳基乳制品应用中已发现在常规储存条件下原位制备的低聚半乳糖(GOS)的含量随时间推移并不稳定,并且高度依赖于乳基产品中极低量的残余 β -半乳糖苷酶活性。这一问题也存在于发酵型乳制品中,诸如,具有较低pH的酸奶,其中残余 β -半乳糖苷酶活性甚至降低更多。 β -半乳糖苷酶在乳基质中高度稳定并且在巴氏灭菌法中完全灭活 β -半乳糖苷酶需要与缓冲溶液相比的令人吃惊的高组合的处理时间和温度。因此,本发明描述了一种方法,其使得实现了将转半乳糖基化 β -半乳糖苷酶用于不同乳制品中原位生成稳定的GOS,而对重要的乳制品质量特征并无由残余 β -半乳糖苷酶活性导致的负面影响,诸如质地和口感。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明人已发现, β -半乳糖苷酶多肽,诸如本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽,是低聚半乳糖的有效生产者,例如,当在包含低浓度乳糖的组合物(诸如乳制品)中温育时原位进行,其中它们具有乳糖到GOS的高效转化从而产生更低量的游离乳糖。然而也发现产生的GOS的含量并不随着时间而稳定,甚至在通常施用于,例如酸奶生产的高温巴氏灭菌步骤(95°C,5分钟)后不稳定。乳制品中低聚半乳糖的存在具有提高有益微生物菌株(益生菌)生长的优点,诸如在产品本身中和/或消费产品的人或动物中的促健康性双歧杆菌属物种(*Bifidobacterium* sp.)。

[0018] 已发现GOS稳定性与源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽活性相关,并且令人吃惊地是已发现甚至是少量残余 β -半乳糖苷酶多肽活性(低至当前条件下所使用的初始活性的1.1%)亦足够降解所形成的GOS。这一过程甚至发生在低储存温度和低pH下,例如在酸奶中,其中源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽根据在缓冲液中的测量其在“标准”酸奶巴氏灭菌步骤(95°C,6分钟)后并无活性。

[0019] 本发明涉及特定的处理条件,其实现了低聚半乳糖从低乳糖浓度的溶液(例如乳或者用于酸奶生产的乳基)中高效原位生成。本发明的第二个方面涉及完全灭活 β -半乳糖苷酶多肽(诸如源自双歧杆菌属的活性 β -半乳糖苷酶)所需的特定灭活条件(巴氏灭菌时间与温度的关系),并且对于给定乳制品确保随时间稳定的GOS。

[0020] 本发明的一个方面涉及处理包含低聚半乳糖的乳基基质以获得具有稳定低聚半乳糖含量的乳制品的方法,其中所述乳基基质包含具有转半乳糖基化活性的活性 β -半乳糖苷酶,诸如源自双歧杆菌属的活性 β -半乳糖苷酶,该方法包括加热处理所述乳基基质以获得基本上不具有残余的 β -半乳糖苷酶多肽活性的步骤,诸如低于0.0213LAU/ml、诸如低于0.0192LAU/ml、诸如低于0.017LAU/ml、诸如低于0.0149LAU/ml、诸如低于0.0149LAU/ml、诸如低于0.0107LAU/ml、诸如低于0.0085LAU/ml、诸如低于0.0064LAU/ml、诸如低于0.0043LAU/ml,或者更优选地诸如低于0.00213LAU/ml(例如,如方法2中描述所测定)。

[0021] 重要的是具有便利的工业加工并且同时具有可接受的产品质量。已发现在130°C以上的温度热处理所述乳基基质,可产生产品的异味、变性、褐变,而在90°C以下的温度热处理导致对工业过程而言可能不相容的滞留时间。

[0022] 因此在本发明的另一个方面涉及处理包含低聚半乳糖的乳基基质的方法,其中所述乳基基质包含 β -半乳糖苷酶,诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶,其具有转半乳糖基化活性,该方法包括在90°C至130°C范围内的温度(T)热处理所述乳基基质至少x秒的时间段的步骤,以获得经热处理的乳制品,

[0023] 其中x通过 $x = 153,377,215,802.625e^{-0.20378144T}$ 与温度T相关联;

[0024] 其中在至少14天的时间段内低聚半乳糖的含量变化在0.4%(w/v)以内。在另一个方面,本发明涉及通过根据本发明的方法而获得的经热处理的乳制品。在另一个方面,本发明涉及根据本发明的方法而处理的乳基基质。

[0025] 发明描述

[0026] 附图简述

[0027] 图1示出了乳基中(在实施例1中定义)BIF_917的残余LAU(描述于方法2)活性,其为以秒为单位的巴氏灭菌时间的函数,在:A)60°C,B)72°C和C)95°C。

[0028] 图2示出了磷酸钠缓冲液中(在实施例1中定义)BIF_917的残余LAU(描述于方法2)活性,其为以秒为单位的巴氏灭菌时间的函数,在:A)60°C,B)72°C和C)95°C。

[0029] 图3示出了无乳糖乳中(在实施例1中定义)BIF_917的残余LAU(描述于方法2)活性,其为以秒为单位的巴氏灭菌时间的函数,在:A)60°C,B)72°C和C)95°C。

[0030] 图4示出了用于在枯草芽孢杆菌中重组表达的BIF_1326变体的质粒图谱。

[0031] 图5示出了SDS-PAGE,其示出了使用HyperQ柱以NaCl梯度洗脱而纯化的截短变体。

[0032] 图6示出了转半乳糖基化活性的比率。比率是受体存在下的Abs420除以受体不存在下的Abs420乘以100来计算的。等于或者低于系数100的变体为纯水解变体,而在该水平以上反映了相对转半乳糖基化活性。

[0033] 图7示出了30°C下在酸奶基质中3小时所选变体的低聚半乳糖(GOS)生成效率。在这一实施例中,GOS是等于和高于DP3的积累量低聚糖。

[0034] 图8示出了SDS-PAGE凝胶,其示出了所表达的来自表2的不同变体和检测到的降解片段。下栏示出了降解带的放大和标识。

[0035] 图9示出了BIF_917在95°C和121°C下灭活所需时间的半对数曲线图。趋势线方程描述了温度与灭活时间之间的关系。

[0036] 序列列表

[0037] SEQ ID NO:1(在本文也称为(BIF_917))是SEQ ID NO:22的887个氨基酸的截短片

段。

[0038] SEQ ID NO:2(在本文也称为(BIF_995))是SEQ ID NO:22的965个氨基酸的截短片段。

[0039] SEQ ID NO:3(在本文也称为(BIF_1068))是SEQ ID NO:22的1038个氨基酸的截短片段。

[0040] SEQ ID NO:4(在本文也称为(BIF_1172))是SEQ ID NO:22的1142个氨基酸的截短片段。

[0041] SEQ ID NO:5(在本文也称为(BIF_1241))是SEQ ID NO:22的1211个氨基酸的截短片段。

[0042] SEQ ID NO:6(在本文也称为(BIF_1326))是SEQ ID NO:22的1296个氨基酸的截短片段。

[0043] SEQ ID NO:7是两歧双歧杆菌糖苷水解酶催化核心

[0044] SEQ ID NO:8是核苷酸序列,其编码来自两歧双歧杆菌DSM20215的胞外乳糖酶

[0045] SEQ ID NO:9是编码BIF_917的核苷酸序列

[0046] SEQ ID NO:10是编码BIF_995的核苷酸序列

[0047] SEQ ID NO:11是编码BIF_1068的核苷酸序列

[0048] SEQ ID NO:12是编码BIF_1172的核苷酸序列

[0049] SEQ ID NO:13是编码BIF_1241的核苷酸序列

[0050] SEQ ID NO:14是编码BIF_1326的核苷酸序列

[0051] SEQ ID NO:15是用于生成以上BIF变体的正向引物

[0052] SEQ ID NO:16是用于BIF_917的反向引物

[0053] SEQ ID NO:17是用于BIF_995的反向引物

[0054] SEQ ID NO:18是用于BIF_1068的反向引物

[0055] SEQ ID NO:19是用于BIF_1241的反向引物

[0056] SEQ ID NO:20是用于BIF_1326的反向引物

[0057] SEQ ID NO:21是用于BIF_1478的反向引物

[0058] SEQ ID NO:22是来自两歧双歧杆菌DSM20215的胞外乳糖酶。

[0059] SEQ ID NO:23是来自两歧双歧杆菌DSM20215的胞外乳糖酶的信号序列。

[0060] 详细描述

[0061] 定义

[0062] 根据详细描述,应用以下缩写和定义。应当指出,本文所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代,除非上下文另行明确指出。因此,例如,提到“多肽”包括多种此类多肽,并且提到“配方”包括提及一种或多种配方和本领域技术人员已知的它们的等同物,以此类推。

[0063] 除非另有定义,否则本文所用的全部科技术语都具有本领域普通技术人员通常理解的含义。以下术语在下文提供。

[0064] 在本文的上下文中,“原位”应意指活性酶与乳基基质的组合。“转半乳糖基酶”意指除其它活性外还能够将半乳糖转移到D-半乳糖或者D-葡萄糖的羟基基团上从而产生低聚半乳糖的酶。在一个方面,转半乳糖基酶通过在乳糖中进行酶反应来鉴定,其中在任意给

定时间产生的半乳糖的量低于产生的葡萄糖的量。

[0065] 在本文的上下文中,术语“转半乳糖基化活性”意指将半乳糖部分转移到除水以外的分子上。可以根据反应中的任意给定时间产生的[葡萄糖]-[半乳糖]或者通过反应中的任意给定时间产生的GOS的直接定量来测量活性。可以以多种方法实施这一测量,诸如实施例中所示出的HPLC方法。当对转半乳糖基化活性的测量进行比较时,其在给定的初始乳糖浓度下实施,诸如例如,3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%(w/w)。在本文的上下文中,术语“ β -半乳糖苷酶活性”意指酶水解 β -半乳糖苷的能力,诸如例如,乳糖水解为葡萄糖和半乳糖单糖。在计算转半乳糖基化活性: β -半乳糖苷酶活性的情况下, β -半乳糖苷酶活性以反应中的任意给定时间产生的[半乳糖]来测量。可以以多种方法实施这一测量,诸如实施例中所示出的HPLC方法。

[0066] 在本文的上下文中,术语“具有转半乳糖基化活性的 β -半乳糖苷酶”意指转半乳糖基化活性比率在100%以上,诸如在150%、175%或200%以上的 β -半乳糖苷酶。

[0067] 具有转半乳糖基化活性的 β -半乳糖苷酶的示例可源自但不限于米曲霉菌(*Aspergillus oryzae*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、双歧杆菌属、嗜热脂肪土芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)(C.Oliveira等人/*Biotechnology Advances*29(2011)600-609)。

[0068] 在本文中,使用邻-硝基苯氧基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)的术语“转半乳糖基化活性的比率”如下计算:比率是受体存在下的Abs420除以受体不存在下的Abs420乘以100来计算的。等于或者低于系数100的变体为纯水解变体,而在该水平以上反映了相对转半乳糖基化活性。转半乳糖基化活性的比率= $(\text{Abs}420^{\text{纤维二糖}}/\text{Abs}420^{\text{无纤维二糖}})*100\%$,其中Abs420^{纤维二糖}是使用下文方法3所描述的在反应中包括纤维二糖的情况下在420nm下的吸光度读数,并且Abs420^{无纤维二糖}是使用下文方法3所描述的但是在反应中无纤维二糖的情况下在420nm的吸光度读数。上述方程仅对吸光度介于0.5和1.0之间的稀释液有效。

[0069] 在本文的上下文中,术语“转半乳糖基化活性: β -半乳糖苷酶活性的比率”意指([葡萄糖]-[半乳糖]/[半乳糖])。在本文的上下文中,术语[葡萄糖]意指由HPLC测量的以重量%为单位的葡萄糖浓度。在本文的上下文中,术语[半乳糖]意指由HPLC测量的以重量%为单位的半乳糖浓度。

[0070] 在本文的上下文中,术语“已转半乳糖基化的乳糖”意指半乳糖分子已共价连接到乳糖分子上,诸如例如,共价连接到该乳糖分子中任意的自由羟基基团上或者通过内部转半乳糖基化作用而生成,例如形成异乳糖。

[0071] 在本文的上下文中,本文公开的多肽在低聚半乳糖(GOS)生产中性能的评估在乳基测定法中检测。

[0072] 通过HPLC实施低聚半乳糖(GOS)、乳糖、葡萄糖以及半乳糖的定量。在Dionex ICS 3000上进行样品分析。IC参数如下:流动相:ddH₂O,流:等度,0,3ml/分钟,柱:RSO低聚糖柱,Ag⁺4%交联(Phenomenex,The Netherlands),柱温:70°C,进样体积:10 μ L,检测器:RI,积分:手动,样品制备:Milli-Q水中20倍稀释(0.1ml样品+1.9ml水),并且通过0.2 μ m注射器式过滤器进行过滤,定量:占标准品峰面积百分比的峰面积。使用GOS糖浆(Vivinal GOS, Friesland Food Domo,The Netherlands)作为GOS定量的标准品。此评估结果在表3中示

出,并且进一步描述于实施例1中。

[0073] 在本文的上下文中,术语“其多肽是冷冻干燥的”意指通过在适当的压力下并且以适当的除水时间段来对多肽的液体进行冷冻干燥而获得该多肽。

[0074] 在本文的上下文中,术语“其多肽是在溶液中”是指在溶剂中可溶而不析出溶液的多肽。用于此目的的溶剂包括多肽可存在于其中的任意环境,诸如含水缓冲液或者盐溶液、发酵液或者表达宿主的细胞质。

[0075] 在本文的上下文中,术语“稳定剂”意指用于稳定多肽的任何稳定剂,例如多元醇(诸如例如,甘油或者丙二醇)、糖或者糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物(例如,芳香硼酸酯)。在一个方面,稳定剂为甘油。

[0076] 在本文的上下文中,术语“碳水化合物物质”意指具有通式 $C_m(H_2O)_n$ 的有机化合物,即,仅由碳、氢和氧组成,后两者成2:1的原子比例,诸如二糖。

[0077] 在本文的上下文中,术语“二糖”是通过共价键结合在一起的两个单糖单元,所述共价键已知通过脱水反应形成糖苷键,其导致从一个单糖失去氢原子并从另一单糖失去羟基基团。未修饰的二糖的式为 $C_{12}H_{22}O_{11}$ 。在一个方面,二糖是乳果糖、海藻糖、鼠李糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、岩藻糖或纤维二糖。在另一个方面,二糖是乳糖。术语“分离的”意指多肽至少基本上不含至少一种其它组分,其与该序列在自然界中天然关联或者在自然界中存在。在一个方面,如本文所用的“分离的多肽”是指这样的多肽,其如SDS-PAGE所测定为至少30%纯度,至少40%纯度,至少60%纯度,至少80%纯度,至少90%纯度,以及至少95%纯度。

[0078] 术语“基本上纯的多肽”在本文意指多肽制备物,其包含最多10重量%,优选地最多8重量%,更优选地最多6重量%,更优选地最多5重量%,更优选地最多4重量%、最多3重量%,甚至更优选地最多2重量%,最优选地最多1重量%并且甚至最优选地最多0.5重量%的在天然情况下与之关联的其它多肽物质。因此,优选的是,基本上纯的多肽为占制备物中存在的全部多肽物质的至少92重量%纯度,优选地至少94重量%纯度,更优选地至少95重量%纯度,更优选地至少96重量%纯度,更优选地至少96重量%纯度,更优选地至少97重量%纯度,更优选地至少98重量%纯度,甚至更优选地至少99重量%纯度,最优选地至少99.5重量%纯度,并且甚至最优选地100重量%纯度。本文公开的多肽优选地处于基本上纯的形式。尤其是,优选的是多肽处于“基本上纯的形式”,既,该多肽制备物基本上不含在天然情况下与之关联的其它多肽物质。这可通过,例如,使用众所周知的重组方法或者通过经典纯化方法来制备该多肽而实现。此处,术语“基本上纯的多肽”与术语“分离的多肽”和“分离形式的多肽”是同义的。术语“纯化的”或者“纯”意指给定组分以高水平状态存在-例如,至少约51%纯度诸如至少51%纯度,或者至少约75%纯度诸如至少75%纯度,或者至少约80%纯度诸如至少80%纯度,或者至少约90%纯度诸如至少90%纯度,或者至少约95%纯度诸如至少95%的纯度,或者至少约98%纯度诸如至少98%的纯度。该组分理想地是组合物中存在的主要活性组分。与本发明相关的术语“微生物”,包括任意可能包含根据本发明的核苷酸序列或者编码具有本文所定义的特定性质的多肽的核苷酸序列和/或通过其获得的产物的“微生物”。在本文的上下文中,“微生物”可包括能够发酵乳品基质的任意细菌或者真菌。与本发明相关的术语“宿主细胞”包括任意细胞,其包含编码具有本文所定义的特定性质的多肽的核苷酸序列或表达载体,其如上述所描述并且用于生产具有本文所定义的特

定性质的多肽。在一个方面,所述生产为重组生产。

[0079] 术语“乳品”,在本发明的上下文中,应理解为从任意哺乳动物,诸如奶牛、绵羊、山羊、野牛(buffalo)或骆驼而获得的乳分泌物。

[0080] 在本文的上下文中,术语“乳基基质”意指任意生制和/或经加工的乳品物质或者源自乳品组分的物质。乳基基质可根据本领域已知的方法进行均质化和/或巴氏灭菌。

[0081] 如本文所用的“均质化”意指强度混合以获得可溶的悬浮液或乳液。其可经实施以用于将乳脂破碎成更小的尺寸,以便其不再从乳品中分离。这可通过迫使乳品在高压下通过小的孔来完成。本文所用的“巴氏灭菌”意指减少或消除乳基基质中活的生物体的存在,诸如微生物。优选地,通过保持指定时间段的指定温度和压力来达到巴氏灭菌。指定温度通常通过加热达到。可选择温度和持续时间以在乳品中杀灭或灭活某些细菌,诸如有害细菌,和/或灭活酶。随后可有急冷的步骤。

[0082] 本发明上下文中的“乳制品”可为任意食品产品,其中主要组分之一为乳基基质。优选地,该主要组分为乳基的。

[0083] 在本文的上下文中,“主要组分之一”意为具有组成占乳制品总干重超过20%的干物质的组分,优选地超过30%或者超过40%,而所述“主要组分”意为具有占乳制品总干重超过50%的干物质的组分,优选地超过60%或者超过70%。

[0084] 在本文的上下文中,“发酵型乳制品”应理解为任意乳制品,其中任意类型的发酵形成了生产过程的部分。发酵型乳制品的示例为如酸奶、酪乳、法式鲜奶油、奶渣和清爽干酪的产品。发酵型乳制品的另一示例为奶酪。在一个方面,酸奶是凝固型、搅拌型或者饮用型酸奶。在另一个方面,发酵型乳制品是乳酸菌(Acidophilus)乳品、Leben、Ayran、Kefir或Sauermilch。

[0085] 可通过本领域已知的任意方法制备发酵乳制品。

[0086] 术语“发酵”意指通过微生物(诸如起始物培养物)的作用将碳水化合物向醇或酸的转化。在一个方面,发酵包括乳糖到乳酸的转化。

[0087] 在本文的上下文中,“微生物”可包括能够发酵乳品基质的任何细菌或真菌。

[0088] 在本文的上下文中,术语“Pfam结构域”意指在鉴定为Pfam-A或者Pfam-B的蛋白序列内区域,鉴定基于多序列比对和隐马尔科夫基序的存在(“The Pfam protein families database”:R.D.Finn,J.Mistry,J.Tate,P.Coggill,A.Heger,J.E.Pollington,O.L.Gavin,P.Guneseckaran,G.Ceric,K.Forslund,L.Holm,E.L.Sonnhammer,S.R.Eddy,A.Bateman Nucleic Acids Research(2010)Database Issue 38:D211-222.)。Glyco_hydro2N(PF02837)、Glyco_hydro(PF00703)、Glyco_hydro 2C(PF02836)以及细菌Ig样结构域(组4)(PF07532)可引为Pfam结构域的示例。

[0089] 如本文所用“对应位置的位置”意指在特定查询多肽与参考多肽间进行的如本文描述的比对。随即以在具有最高序列同一性的比对中对应的氨基酸来鉴定对应于参比多肽中特定位置的位置。

[0090] “变体”或“多个变体”是指多肽或核苷酸。术语“变体”可与术语“突变体”互换使用。变体包括分别在氨基酸或者核苷酸序列上的一个或多个位置处的插入、置换、易位、截短和/或反转。短语“变体多肽”、“多肽变体”、“多肽”、“变体”和“变体酶”意指具有氨基酸序列的多肽/蛋白质,该序列具有或包含选定的氨基酸序列,或者与该选定的氨基酸序列相比

受到了修饰,该选定氨基酸序列诸如例如SEQ ID NO:1、2、3、4或者5。

[0091] 如本文所用,“参考酶”、“参考序列”、“参考多肽”意指酶和多肽,任意所述变体多肽是基于该酶和多肽的,例如SEQ ID NO:1、2、3、4或者5。“参考核酸”意指编码参考多肽的核苷酸序列。

[0092] 如本文所用,术语“参考序列”与“受试序列”可互换地使用。

[0093] 如本文所用,“查询序列”意指外来序列,其与参考序列进行了比对来检视其是否处于本发明的范围内。因此,此种查询序列可为,例如,现有技术的序列或者第三方序列。如本文所用,术语“序列”可指多肽序列或者核酸序列,这取决于上下文。如本文所用,术语“多肽序列”与“氨基酸序列”可互换地使用。“变体”的信号序列可与野生型芽孢杆菌信号肽的信号序列或者将分泌该多肽的任意信号序列相同或者不同。变体可作为包含异源多肽的融合蛋白质来表达。例如,变体可包含另一个蛋白质的信号肽或者设计用于协助所表达融合蛋白的识别和纯化的序列,诸如His-Tag序列。为了描述设想由本公开内容所涵盖的多种变体,将采用以下的命名以便参考。在置换包括数字和字母的情况下,例如,592P,则这是指{根据编号系统的位置/置换的氨基酸}。因此,例如,在592位氨基酸上成为脯氨酸的置换命名为592P。在置换包括字母、数字和字母的情况下,例如D592P,则这是指{初始的氨基酸/根据编号系统的位置/置换的氨基酸}。

[0094] 因此,例如,在592位上丙氨酸成为脯氨酸的置换命名为A592P。在两种或多种置换可能处于某一特定的位置的情况下,这将通过连续的字母来命名,其可任选地由左斜线“/”分开,例如,G303ED或者G303E/D。位置和置换是相对于例如SEQ ID NO:1、2、3、4或5列出的。例如,在另一序列中的对等位置可通过如下方式发现,将这一序列与SEQ ID NO:1、2、3、4或5之一进行比对以发现具有最高的百分比一致性的比对并且然后确定进行比对以对应SEQ ID NO:1、2、3、4或5之一的特定位置的氨基酸的氨基酸。此类比对以及某一序列作为第一参考的用途对于本领域的普通技术人员而言只是常规事项。如本文所用,术语“表达”是指这样的过程,多肽通过该过程基于基因的核酸序列进行生产。该过程包括转录和翻译两者。如本文所用,“多肽”与术语“氨基酸序列”、“酶”、“多肽”和/或“蛋白质”可互换地使用。如本文所用,“核苷酸序列”或“核酸序列”是指寡核苷酸序列或多核苷酸序列,以及其变体、同源物、片段和衍生物。核苷酸序列可为基因组、合成或重组来源的,并且其可以是双链的或单链的,无论是正义链还是反义链。如本文所用,术语“核苷酸序列”包括基因组DNA、cDNA、合成DNA以及RNA。“同源物”意指与主题氨基酸序列和主题核苷酸序列具有一定程度的一致性或者“同源性”的实体。在一个方面,该主题氨基酸序列为SEQ ID NO:1、2、3、4或5,并且该主题核苷酸序列优选地为SEQ ID NO:9、10、11、12或13。“同源序列”包括与另一序列具有特定百分比,例如80%、85%、90%、95%或者99%的序列同一性的多核苷酸或者多肽。百分比同一性意指,当比较两种序列时,该百分比的碱基或者氨基酸残基在比对时是相同的。在与该主题序列相比置换、缺失或者添加氨基酸的情况下,氨基酸序列并非相同。通常相对于主题蛋白质的成熟序列(即,例如,在信号序列移除后)来测量百分比序列同一性。通常,同源物应包含与主题氨基酸序列相同的活性位点残基。同源物还保持了酶活性,尽管与野生型相比该同源物可具有不同的酶性质。如本文所用,“杂交”包括一条核酸链通过碱基配对与互补链结合的过程,以及在聚合酶链反应(PCR)技术中所进行的扩增过程。该变体核酸可以单链或双链的DNA或RNA、RNA/DNA异源双链核酸分子或RNA/DNA共聚物存在。如本文所用,“共聚物”

是指包含核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸两者的单核酸链。变体核酸可经过密码子优化以进一步增加表达。

[0095] 如本文所用,“合成”化合物通过体外化学的或酶的合用来制备。其包括但不限于,使用用于宿主生物(诸如,酵母细胞宿主或者选择的其它表达宿主)的最优密码子而制成的变体核酸。

[0096] 如本文所用,“转化的细胞”包括细菌细胞和真菌细胞两者,其已通过使用重组DNA技术而进行转化。转化通常通过将一或多个核酸序列插入细胞而进行。所插入的核苷酸序列可为异源核苷酸序列,即,对待转化的细胞而言并非天然的序列,诸如,融合蛋白质。

[0097] 如本文所用,“可操作地连接”意指所描述的组分处于允许其以它们所预期的方式来发挥功能的关联中。例如,可操作地连接到编码序列上的调控序列以在相对于该控制序列而言相容的条件下实现了编码序列的表达的方式进行连接。如本文所用,术语“片段”在本文定义为具有从氨基和/或羧基端缺失一个或多个(若干)氨基酸的多肽,其中该片段具有活性。在一个方面,术语“片段”在本文定义为多肽,其在SEQ ID NO:1、2、3、4或5的多肽的氨基和/或羧基末端缺失了一个或多个(若干)氨基酸;其中该片段具有转半乳糖基化活性。

[0098] 如本文所用,术语“半乳糖结合结构域样”缩写为术语“GBD”并且两者可互换地使用。

[0099] 同一性程度

[0100] 两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性通过参数“同一性”进行描述。

[0101] 在一个实施方案中,查询序列和参考序列之间的序列同一性程度通过如下步骤确定:1)通过任何合适的比对程序,使用默认计分矩阵和默认空位罚分,将所述两个序列进行比对,2)识别精确匹配的数量,其中精确匹配是比对程序已于比对过程中在两个受比对序列中的给定位置上识别出相同的氨基酸或核苷酸的情况,以及3)将精确匹配的数量除以参考序列的长度。

[0102] 在一个实施方案中,查询序列和参考序列之间的序列同一性程度通过如下步骤确定:1)通过任何合适的比对程序,使用默认计分矩阵和默认空位罚分,将所述两个序列进行比对,2)识别精确匹配的数量,其中精确匹配是比对程序已于比对过程中在两个受比对序列中的给定位置上识别出相同的氨基酸或核苷酸的情况,以及3)将精确匹配的数量除以所述两个序列中最长者的长度。

[0103] 在一个实施方案中,查询序列和参考序列之间的序列同一性程度通过如下步骤确定:1)通过任何合适的比对程序,使用默认计分矩阵和默认空位罚分,将所述两个序列进行比对,2)识别精确匹配的数量,其中精确匹配是比对程序已于比对过程中在两个受比对序列中的给定位置上识别出相同的氨基酸或核苷酸的情况,以及3)将精确匹配的数量除以“比对长度”,其中比对长度是整个比对的长度,包括所述序列的空位和突出部分。

[0104] 序列同一性比较可通过眼观来进行,或更通常地,借助于容易获得的序列比较程序来进行。这些可商购获得的计算机程序使用复杂的比较算法来比对最佳反映可能会导致两个或更多个序列之间的差异的演化事件的两个或更多个序列。因此,这些算法用对相同或类似氨基酸对齐加分并对空位插入、空位延伸和非相似氨基酸对齐罚分的评分体系进行运算。比较算法的评分体系包括:

[0105] i)每次插入空位时分配罚分(空位罚分),

[0106] ii)每次现有的空位延伸额外的位置时分配罚分(延伸罚分),

[0107] iii)相同氨基酸对齐时分配高分,以及

[0108] iv)非相同氨基酸对齐时分配可变分数。

[0109] 大多数比对程序允许修改空位罚分。然而,当用这种软件进行序列比较时优选使用默认值。

[0110] 根据计分矩阵(也称为置换矩阵)分配非相同氨基酸对齐时的分数。此类置换矩阵中提供的分数反映这样的事实:演化过程中一个氨基酸被另一个置换的可能性不同,并且置换的可能性取决于用于置换的氨基酸的物理/化学性质。例如,极性氨基酸受到另一个极性氨基酸置换的可能性比受到疏水氨基酸置换的可能性高。因此,计分矩阵将为相同氨基酸分配最高的分数,为非相同但相似的氨基酸分配较低的分数,并为非相同、非相似的氨基酸分配甚为更低的分数。最频繁使用的计分矩阵为PAM矩阵(Dayhoff等人(1978), Jones等人(1992)), BLOSUM矩阵(Henikoff和Henikoff(1992))和Gonnet矩阵(Gonnet等人(1992))。

[0111] 用于进行这种比对的合适的计算机程序包括但不限于Vector NTI(Invitrogen Corp.)以及ClustalV、ClustalW和ClustalW2程序(Higgins DG和Sharp PM(1988), Higgins等人(1992), Thompson等人(1994), Larkin等人(2007))。在www.expasy.org的ExpASY Proteomics上提供了精选的不同比对工具。可以进行序列比对的软件的另一个示例是BLAST(Basic Local Alignment Search Tool),其由当前可见于<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>的National Center for Biotechnology Information网页提供,并且最先描述于Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.215;403-410。

[0112] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述比对程序执行全局比对程序,该全局比对程序优化了在序列的全长上的比对。在另一个优选的实施方案中,所述全局比对程序基于Needleman-Wunsch算法(Needleman, Saul B.;和Wunsch, Christian D.(1970), "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins", Journal of Molecular Biology 48(3):443-53)。使用Needleman-Wunsch算法执行全局比对的当前程序的示例为EMBOSS Needle和EMBOSS Stretcher程序,它们均可从<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>获得。

[0113] EMBOSS Needle程序使用Needleman-Wunsch比对算法查找两个序列沿着它们的整个长度的最佳比对(包括空位),从而执行最佳全局序列比对。

[0114] EMBOSS Stretcher程序使用改进的Needleman-Wunsch算法,其实现了较大的序列的全局比对。

[0115] 在一个实施方案中,通过全局比对程序比对序列,并且通过识别由程序识别出的精确匹配数量除以“比对长度”而计算得到序列同一性,其中该比对长度是整个比对的长度,其包括序列的空位和突出部分。

[0116] 在另一个实施方案中,全局比对程序使用Needleman-Wunsch算法,并且通过识别由程序识别出的精确匹配数量除以“比对长度”而计算得到序列同一性,其中比对长度是整个比对的长度,其包括所述序列的空位和突出部分。

[0117] 在另一个实施方案中,全局比对程序选自EMBOSS Needle和EMBOSS Stretcher,并且序列同一性通过识别由程序识别出的精确匹配数量除以“比对长度”而计算得到,其中比

对长度是整个比对的长度,包括所述序列的空位和突出部分。

[0118] 一旦软件产生比对后,就可以计算相似性%和序列同一性%。该软件通常进行这种计算作为序列比较的一部分,并产生数值结果。

[0119] 在一个实施方案中,优选的是使用ClustalW软件进行序列比对。优选地,用ClustalW和以下参数进行逐对比对:

[0120]

置换矩阵:	Gonnet 250
空位开放罚分:	20
空位延伸罚分:	0.2
空位终止罚分:	无

[0121] 例如,ClustalW2由European Bioinformatics Institute列于EMBL-EBI网页www.ebi.ac.uk选项卡tools-sequence analysis-ClustalW2下,供互联网使用。目前,ClustalW2工具的准确地址为www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2。

[0122] 在另一个实施方案中,优选使用Vector NTI(Invitrogen)中的程序Align X来执行序列比对。在一个实施方案中,Exp10可以采用下列默认设置使用:

[0123] 空位开放罚分:10

[0124] 空位延伸罚分:0.05

[0125] 空位分离罚分范围:8

[0126] 在另一个实施方案中,一个氨基酸序列与或对另一个氨基酸序列的比对通过使用得分矩阵:blosum62mt2和VectorNTI逐对比对设定来测定

[0127]	设置	K-元组	1
		最佳对角线数	5
		窗口大小	5
		空位罚分	3
		空位开放罚分	10
		空位延伸罚分	0.1

[0128] 在一个实施方案中,一个氨基酸序列与或对另一个氨基酸序列的百分比一致性通过以3字长并以BLOSUM 62作为置换矩阵使用Blast来确定

[0129] 根据本发明的方法描述

[0130] 本文描述的是处理包含低聚半乳糖的乳基基质以获得具有稳定低聚半乳糖含量的乳制品的方法,其中所述乳基基质包含具有转半乳糖基化活性的活性 β -半乳糖苷酶,诸如源自双歧杆菌属的活性 β -半乳糖苷酶,该方法包括热处理所述乳基基质以获得基本上不具有残余的 β -半乳糖苷酶多肽活性的步骤,诸如低于0.0213LAU/ml、诸如低于0.0192LAU/ml、诸如低于0.017LAU/ml、诸如低于0.0149LAU/ml、诸如低于0.0149LAU/ml、诸如低于0.0107LAU/ml、诸如低于0.0085LAU/ml、诸如低于0.0064LAU/ml、诸如低于0.0043LAU/ml,或者更优选的低于0.00213LAU/ml的活性(如方法2中描述所测定)。

[0131] 本文描述的是处理包含低聚半乳糖的乳基基质的方法,其中所述乳基基质包含具有转半乳糖基化活性的活性 β -半乳糖苷酶,诸如源自双歧杆菌属的活性 β -半乳糖苷酶,该方法包括在90°C至130°C范围内的温度(T)下热处理所述乳基基质至少x秒的时间段的步骤,以获得经热处理的乳制品,

[0132] 其中x通过 $x=153,377,215,802.625e^{-0.20378144T}$ 与温度T相关联;

[0133] 其中在至少14天的时间段内低聚半乳糖的含量变化在0.4%(w/v)以内。

[0134] 又如图9中所示的方程是通过在乳基质中测定BIF_917 β -半乳糖苷酶的失活动力学来获得的。如以下实施例1所描述的,首先将BIF_917 β -半乳糖苷酶在4℃下与乳基质温育20小时而生成GOS。随后,在95℃或121℃下在不同的时间将乳基质均质化并进行巴氏灭菌。在1天、1周和2周陈旧的乳基质里分析该乳基质中的GOS含量。通过在95%置信区间使用单侧t分布检验进行统计分析评估经过两周的总GOS含量的降解。可通过LAU活性测定法(如方法2中所描述)测定BIF_917 β -半乳糖苷酶的失活。

[0135] 热处理

[0136] 温度和滞留时间的组合可根据特定的乳基质而变化。通常可使用适用于乳制品热处理的任意设备。在本试验中,使用由Service Teknisk(Randers,Denmark)设计的自组装小型UHT设备。在巴氏灭菌后,不同的巴氏灭菌设备在乳品的热建立和冷却方面不同。

[0137] 在一个方面,如本文描述将所述乳基质热处理至少1300秒的时间段,更优选的是至少800秒,最优选的是至少600秒。

[0138] 在另一个方面,在90-120℃的温度下所述时间段为最多y,其中 $y=(300秒+X秒)$,其中: $x=153,377,215,802.625e^{-0.20378144T}$ 。

[0139] 在另一个方面,在121-130℃的温度下所述时间段为最多y1,其中 $y1=(10秒+X秒)$,其中: $x=153,377,215,802.625e^{-0.20378144T}$ 。

[0140] 在一个方面,所述时间段为最多1800秒,诸如最多1300秒。

[0141] 在一个方面,所述时间段在至少0.01秒至最多1300秒的范围内,诸如在至少0.1秒至最多1300秒的范围内,诸如在至少1秒至最多1300秒的范围内。

[0142] 在一个方面,所述乳基质在至少80℃的温度下热处理,更优选的是在至少85℃的温度下,更优选的是在至少90℃的温度下,最优选的是在至少95℃的温度下。

[0143] 在一个方面,所述温度是在80℃-150℃范围内的温度,诸如在85℃-150℃范围内的温度,诸如在90℃-130℃范围内的温度,诸如在85℃-119℃范围内,诸如在90℃-119℃范围内的温度,诸如在90℃-100℃范围内。

[0144] 在一个方面,在期望较低温度的情况下,例如当乳基质用于酸奶时,所述温度是在80℃-119℃范围内的温度,诸如在90℃-119℃范围内的温度,诸如在90℃-100℃范围内的温度。

[0145] 在一个方面,该方法包括在85℃的温度下持续至少4605秒,或者90℃下持续至少1662秒或者95℃下持续至少600秒,或者100℃下持续至少217秒热处理乳基质(诸如酸奶)的步骤,以获得具有稳定低聚半乳糖含量的经热处理的乳制品。

[0146] 在如本文描述的热处理过程中所使用的压力取决于待处理的乳基质,然而当在最高至95℃的温度下热处理时,这通常在无反应的情况下完成,而当如本文描述的热处理在介于121℃和142℃之间,诸如介于121℃和130℃之间时,通常施用介于2至4巴的反压。

[0147] 最后,热处理后获得的产品可通过用于处理乳制品的已知方法来灭菌。例如,该产品可通过,例如Ultra High Temperature(UHT)处理来进行巴氏灭菌。任选地,终产品可在无菌冷灌装系统中进行包装。

[0148] 包含低聚半乳糖的乳基质

[0149] 包含低聚半乳糖的乳基基质,其中所述乳基基质包含具有转半乳糖基化活性的活性 β -半乳糖苷酶,诸如源自双歧杆菌属的活性 β -半乳糖苷酶,其可通过使用 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶)进行所述乳基基质的原位酶处理步骤从而获得所述包含低聚半乳糖的乳基基质。

[0150] 在一个方面,酶反应在 1°C 至低于 70°C 之间的温度下进行,诸如在 4°C 至低于 70°C 之间,或者诸如在 1°C 至 65°C 之间,或者诸如在 4°C 至 65°C 之间,优选地,在 40°C 至 60°C 之间进行酶促转半乳糖基化反应。在一个方面,将所述酶促转半乳糖基化反应进行30分钟至24小时,诸如30分钟至20小时。优选地,将酶反应进行30分钟至90分钟。在一个方面,反应在 40°C 至 60°C 下进行,诸如在 50°C 下进行30分钟至65分钟,诸如45分钟。

[0151] 在一个方面,为了确保具有转半乳糖基化活性的活性 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的活性 β -半乳糖苷酶)的失活完全,如方法2针对LAU活性所描述,应无残余活性被检测出。

[0152] 可用的乳基基质包括但不限于包含乳糖的任意乳品或类乳制品的溶液/悬浮液,诸如全乳或者低脂乳、脱脂乳、酪乳、复原乳粉、炼乳、干乳的溶液、UHT乳、乳清、无蛋白乳清、酸乳清或奶油。

[0153] 优选地,所述乳基基质为牛乳、山羊乳或绵羊乳。更优选地,所述乳物质为牛乳。用于本发明的乳品在用本发明的方法处理前可经调整。例如,可将乳物质转化成脱脂乳、低脂乳、乳清蛋白、乳清、乳铁蛋白或乳糖。因此,术语“乳基基质”可包括脱脂乳、低脂乳、乳清蛋白、乳清、乳铁蛋白和乳糖。在一个方面,用于本发明方法的乳基基质可为高度浓缩的。在本发明的一个实施方案中,用于该方法的乳物质包含 14% (w/w)固体含量。在本发明的另一个实施方案中,用于该方法的乳物质包含 40% (w/w)固体含量。在一个方面,用于本发明方法的乳基基质包含约 13% 至 60% (w/w),优选地 14% 至 40% (w/w)的固体含量。在一个方面,乳基基质可通过干燥方法加工成为乳蛋白或者乳粉末,并且在本发明方法中作为乳物质使用之前溶于水。例如,蛋白质、牛乳或者乳粉末可溶于水中。

[0154] 优选地,乳基基质是乳品或者脱脂乳粉末的水溶液。乳基基质可比生制乳更浓缩。

[0155] 在一个实施方案中,乳基基质具有至少 0.2 ,优选地至少 0.3 ,至少 0.4 ,至少 0.5 ,至少 0.6 或者更优选地至少 0.7 的蛋白与乳糖的比率。在一个方面,乳基基质是获自任意哺乳动物的乳分泌物。

[0156] 在一个方面,乳基基质是获自奶牛、绵羊、山羊、野牛或者骆驼的乳分泌物。

[0157] 在一个方面,乳基基质包含至少 1% (w/v),更优选的至少 2% (w/v),最优选的至少 4% (w/v)的量的乳糖。在另一个方面,乳基基质包含至少 1% (w/v),更优选的至少 2% (w/v),最优选的至少 4% (w/v)以及最多 15% (w/v)的量的乳糖。如方法3所描述,可通过HPLC来测量乳糖的量。

[0158] 任选地,本发明的方法中可使用另外的酶来水解乳基基质,其同时用 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶)进行了处理或顺序进行了处理,从而使得乳制品可具有另外的功能。例如可使用蛋白酶来将乳品物质中的蛋白质转化成氨基酸以促进乳蛋白的吸收并且限制过敏反应。任选地,可使用双酶水解法,其包括使用 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶)将乳基基质中的乳糖转化为低聚半乳糖,以及用蛋白酶将蛋白质转化为氨基酸,以获得具有高含量的低聚半乳糖和减少的过敏源性酪蛋白。

[0159] 用将乳糖转化为单糖或者GOS的酶对乳基基质进行处理具有若干优点。首先,该产品可由患有乳糖不耐受的人群使用,不然其将表现出症状诸如胀气和腹泻。其次,用乳糖酶处理的乳制品应比未经处理的相似产品具有更高的甜度,这是由于与乳糖相比葡萄糖和半乳糖的更高感受性甜度造成的。在期望终产品的高甜度的情况下,这一效果尤其受诸如酸奶和冰淇淋应用的关注,并且这实现了在所消费产品中碳水化合物的净减少。第三,在乳糖分子由于乳糖的相对低溶解度而发生结晶的情况下,在冰淇淋生产中通常出现名为沙质的现象。当乳糖转变成单糖或者GOS时,该冰淇淋的口感比未经处理的产品更具改善。通过以乳清粉替代脱脂奶粉可消除由于乳糖结晶而造成的沙感的存在并且可降低原料成本。酶处理的主要效应是增加的甜度。

[0160] 在一个方面,如本文所公开的转半乳糖基化多肽可与其它酶一起使用,诸如蛋白酶(诸如凝乳酶或者高血压蛋白原酶)、脂酶(诸如磷脂酶)、淀粉酶、转移酶和乳糖酶。在一个方面,如本文公开的转半乳糖基化多肽可与乳糖酶一起使用。当期望减少用本文公开的转半乳糖基化多肽处理(尤其是在低乳糖水平下)后的残余乳糖时,这可尤其有用。本发明的上下文中的乳糖酶是任意的糖苷水解酶,其具有将乳糖二糖水解为半乳糖和葡萄糖单体组分的能力。乳糖酶群体包括但不限于归为亚类EC3.2.1.108的酶。归为其它亚类的酶,诸如例如,EC 3.2.1.23,也可是本发明的上下文中的乳糖酶。本发明的上下文中的乳糖酶可具有除乳糖水解活性外的其它活性,诸如例如转半乳糖基化活性。在本发明的上下文中,乳糖酶的乳糖水解活性可称为其乳糖酶活性或者其 β -半乳糖苷酶活性。具有用于本发明方法的乳糖酶活性的酶可以是动物、植物或微生物来源。优选的酶获自微生物源,尤其是来自丝状真菌或酵母,或者来自细菌。该酶可源自,例如,伞菌属(*Agaricus*)的菌株,例如双孢蘑菇(*A. bisporus*);*Ascovaginospora*;曲霉属(*Aspergillus*),例如,黑曲霉(*A. niger*)、泡盛曲霉(*A. awamori*)、*A. foetidus*、*A. japonicus*、米曲霉(*A. oryzae*);假丝酵母属(*Candida*);毛壳菌属(*Chaetomium*);*Chaetotomastia*;网柄菌属(*Dictyostelium*),例如盘基网柄菌(*D. discoideum*);克鲁维酵母属(*Kluveromyces*),例如脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)、乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*);毛霉属(*Mucor*),例如爪哇毛霉(*M. javanicus*)、高大毛霉(*M. mucedo*)、细孢毛霉(*M. subtilissimus*);脉孢菌属(*Neurospora*),例如粗糙脉孢菌(*N. crassa*);根毛霉属(*Rhizomucor*),例如微小根毛霉(*R. pusillus*);根霉属(*Rhizopus*),例如少根根霉(*R. arrhizus*)、日本根霉(*R. japonicus*)、匍枝根霉(*R. stolonifer*);核盘菌属(*Sclerotinia*),例如大豆核盘菌(*S. libertiana*);圆酵母属(*Torula*);球拟酵母属(*Torulopsis*);毛癣菌属(*Trichophyton*),例如红色毛癣菌(*T. rubrum*);维氏核盘菌(*Whetzelinia*),例如*W. sclerotiorum*;芽孢杆菌属(*Bacillus*),例如凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、*B. novalis*、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*);双歧杆菌,例如长双歧杆菌(*B. longum*)、两歧双歧杆菌、动物双歧杆菌(*B. animalis*);金黄杆菌属(*Chryseobacterium*);柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*),例如弗氏柠檬酸杆菌(*C. freundii*);梭菌属(*Clostridium*),例如产气荚膜梭菌(*C. perfringens*);色二孢菌属(*Diplodia*),例如棉色二孢菌(*D. gossypina*);肠杆菌属(*Enterobacter*),例如产气肠杆菌(*E. aerogenes*)、阴沟肠杆菌(*E. cloacae*);爱德华氏菌属(*Edwardsiella*),迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*);欧文氏

菌属(*Erwinia*),例如草生欧文氏菌(*E.herbicola*);埃希氏菌属(*Escherichia*),例如大肠杆菌(*E.coli*);克雷伯氏菌属(*Klebsiella*),例如肺炎克雷伯氏菌(*K.pneumoniae*);*Miriococcum*; *Myrothesium*;毛霉属;脉孢菌属(*Neurospora*),例如粗糙脉孢菌(*N.crassa*);变形杆菌属(*Proteus*),例如普通变形杆菌(*P.vulgaris*);普罗威登斯菌属(*Providencia*),例如斯氏普罗威登斯菌(*P.stuartii*);密孔菌属(*Pycnopus*),例如朱红密孔菌(*Pycnopus cinnabarinus*)、血红密孔菌(*Pycnopus sanguineus*);瘤胃球菌属(*Ruminococcus*),例如汉森瘤胃球菌(*R.hansenii*);沙门氏菌属(*Salmonella*),例如鼠伤寒沙门氏菌(*S.typhimurium*);沙雷氏菌(*Serratia*),例如液化沙雷氏菌(*S.liquefasciens*)、粘质沙雷氏菌(*S.marcescens*);志贺氏菌属(*Shigella*),例如福氏志贺菌(*S.flexneri*);链霉菌属(*Streptomyces*),例如抗生素链霉菌(*S.antibioticus*)、栗色球链霉菌(*S.castaneoglobisporus*)、紫红链霉菌(*S.violeceoruber*);栓菌属(*Trametes*);木霉菌属(*Trichoderma*),例如里氏木霉(*T.reesei*)、绿色木霉(*T.viride*);耶尔森菌属(*Yersinia*),例如小肠结肠炎耶尔森菌(*Y.enterocolitica*)。在一个实施方案中,该乳糖酶是微生物(如克鲁维酵母属和芽孢杆菌属)的细胞内组分。克鲁维酵母属(尤其是脆壁克鲁维酵母和乳酸克鲁维酵母)以及其它真菌属(诸如源自假丝酵母属、圆酵母属和球拟酵母属的真菌)是真菌乳糖酶的常见来源,而对于细菌乳糖酶而言凝结芽孢杆菌和环状芽孢杆菌是众所周知的来源。源自这些生物体的若干市售乳糖酶制备物是可用的,诸如Lactozym.RTM.(可购自Novozymes,Denmark)、HA-Lactase(可购自Chr.Hansen,Denmark)以及Maxilact.RTM.(可购自DSM,the Netherlands),全部来自乳酸克鲁维酵母。全部这些乳糖酶为所谓的中性乳糖酶,其具有介于pH 6和pH 8之间的最适pH。当此类乳糖酶用于,例如低乳糖酸奶的生产时,酶处理应在发酵前的单独步骤中完成或者必须使用相当高的酶剂量,因为它们的活性随发酵过程中pH减少而下降。另外,这些乳糖酶并不适用于在高温下实施的乳品中乳糖的水解,为了保持低微生物量并且从而确保高乳品质量,高温在某些情况下是有利的。

[0161] 在一个实施方案中,该酶是来源于细菌的乳糖酶,例如来自双歧杆菌科,诸如来自双歧杆菌属,诸如描述于WO 2009/071539中的乳糖酶。

[0162] 在一个方面,所使用的 β -半乳糖苷酶,诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶,在反应15分钟后具有高于60%,诸如高于70%,诸如高于75%的相对转半乳糖基化活性。在一个方面,反应30分钟后相对转半乳糖基化活性高于3。在另一个方面,反应30分钟后相对转半乳糖基化活性高于6。在另一个方面,反应30分钟后相对转半乳糖基化活性高于12。

[0163] 在一个方面,提供了一种方法,其中用 β -半乳糖苷酶多肽(诸如如本文所述的源自双歧杆菌属的所述 β -半乳糖苷酶)进行的处理发生在对于酶活性而言最适的温度下。

[0164] 在一个方面,用至少0.0213 LAU量,最优选的至少1.065 LAU量的所述 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的所述 β -半乳糖苷酶),对乳基基质进行酶处理,以获得所述低聚半乳糖。

[0165] 在一个方面,通过以0.0213 LAU至4.26 LAU的量,更优选的0.213 LAU至2.13 LAU的量,最优选的1.065 LAU至2.13 LAU的量添加酶,用所述 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的所述 β -半乳糖苷酶)对乳基基质进行酶处理,以获得所述低聚半乳糖。

[0166] 在另一个方面,以0.01-1000ppm的浓度将 β -半乳糖苷酶多肽(例如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽)添加到乳基基质中。在另一个方面,以0.1-100ppm的浓度将 β -半乳

糖苷酶多肽(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽)添加到乳基基质中。在另一个方面,以1-10ppm的浓度将 β -半乳糖苷酶多肽(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽)添加到乳基基质中。

[0167] 在一个方面,酶处理产生了包含低聚半乳糖的乳基基质,所述低聚半乳糖的量为0.1%至10%(w/v),更优选的0.5%至8%(w/v),最优选的1%至4%(w/v)。

[0168] 在一个方面,通过将 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶)以溶液或者以喷雾干燥的粉末添加来实施酶处理。

[0169] 在一个方面,该方法还包括用微生物对乳基基质进行发酵。

[0170] 在一个方面,还以水解性 β -半乳糖苷酶对包含乳糖的乳基基质进行处理。

[0171] β -半乳糖苷酶多肽,诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽,可以如下文描述的配方形式添加。

[0172] 用于配制本文所公开的 β -半乳糖苷酶多肽(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽)的配方和方法。

[0173] 用于本文公开的方法中的 β -半乳糖苷酶多肽(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽)可根据本领域已知的方法制备,并且可以是液体或者干燥组合物的形式。例如,该多肽组合物可为颗粒或者微粒的形式。包含在组合物中的多肽可根据本领域已知的方法进行稳定化。在一个方面,本文公开了用于生产乳制品的方法,其通过以 β -半乳糖苷酶处理包含乳糖的乳基基质,诸如源自双歧杆菌属的如本文描述的 β -半乳糖苷酶多肽。

[0174] 在一个方面,还用水解性 β -半乳糖苷酶处理包含乳糖的底物。

[0175] 可以以酶制剂的形式使用 β -半乳糖苷酶多肽,诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽。酶制剂,诸如以乳制品成分的形式,可以为溶液的形式或者作为固体,这取决于用途和/或应用模式和/或施用模式。固体形式可作为干化酶粉末或者作为颗粒化酶。

[0176] 干燥酶制剂的示例包括喷雾干燥产品、混合颗粒产品、层叠产品诸如流化床颗粒、挤出或制粒颗粒产品、冻干产品。 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽)可为组合物的形式,该组合物包含基于组合物中多肽的总量至少5%w/w的如本文公开的一种或多种多肽,诸如例如10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%,该多肽与SEQ ID NO:22具有至少70%的序列同一性,例如诸如,72%、74%、74%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%的序列同一性。这可通过使用下列本领域的技术人员已知的技术进行评估。对待评估的样品进行SDS-PAGE并且使用适用于蛋白定量的染料而可视化,诸如例如Bio-Rad Criterion系统。随后使用合适的光密度扫描仪(诸如例如Bio-Rad Criterion系统)扫描凝胶,并确保生成的图片在动态范围内。对与源自SEQ ID NO:8的任意变体/片段相对应的带进行定量,并且计算该多肽的百分比,如:所关注的多肽的百分比=所关注的多肽/(表现出转半乳糖基化活性的全部多肽的和)*100。在组合物中源自SEQ ID NO:8的多肽变体/片段的总数可通过本领域的技术人员已知的方法,使用多克隆抗体进行的western印迹法对源自SEQ ID NO:8的片段进行检测而测定。

[0177] 在一个方面,根据本发明使用的组合物包含源自双歧杆菌属的一种或多种 β -半乳糖苷酶多肽,其选自由SEQ ID NO:1、2、3、4和5组成的多肽。在另一个方面,该组合物包含一种或多种多肽,其选自由SEQ ID NO:1、2和3组成的多肽。在另一个方面,该组合物包含源自双歧杆菌属的一种或多种 β -半乳糖苷酶多肽,其选自由SEQ ID NO:1和2组成的多肽。在一

个方面,本发明提供了酶复合制备物的用途,该制备物包含源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶酶复合物、酶载体以及任选地稳定剂和/或防腐剂。在本发明的另一个方面,使用的酶载体选自甘油或者水。在另一个方面,制备物/组合物包含稳定剂。在一个方面,稳定剂选自无机盐类、多元醇类、糖类和它们的组合。在一个方面,稳定剂是无机盐,诸如氯化钾。在另一个方面,多元醇是甘油、丙二醇或山梨醇。在另一个方面,糖是小分子碳水化合物,具体而言是若干有甜味的小分子碳水化合物中的任一种,诸如葡萄糖、半乳糖、果糖和蔗糖。在另一个方面,制备物包含防腐剂。在一个方面,防腐剂是对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸盐、山梨酸盐或者其它食品批准的防腐剂或者它们的混合物。

[0178] 乳制品

[0179] 在本文中,一些实施方案中的乳制品是如本文描述的乳基基质,其已根据本发明进行了热处理。

[0180] 在一个方面,提供了包含GOS的乳制品,其通过根据本发明的方法由 β -半乳糖苷酶多肽(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽)原位形成。

[0181] 在一个方面,在所述热处理的乳制品中,低聚半乳糖的含量稳定至少14天、至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少8周、至少10周、至少12周或至少24周。这可通过所描述的LAU活性测定的方法来测量(参见方法2)。

[0182] 在乳制品中“稳定的”低聚半乳糖含量是指,低聚半乳糖含量在所述的乳制品中的变化在0.25%(w/v)以内,更优选的在0.2%(w/v)以内,更优选的在0.1%(w/v)以内,最优选的在0.05%(w/v)以内,例如,如通过本领域技术人员所熟知的用于测量低聚半乳糖含量的任意方法在至少14天的时间段(诸如至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少8周、至少10周、至少12周或者至少24周的时间段)所测量,例如通过HPLC进行(例如,如方法3中所描述)。

[0183] 在一个方面,在所述乳制品中的低聚半乳糖的量在0.5%至10%(w/v)以内,优选的1%至8%(w/v)以内,更优选的1.5%至6%(w/v)以内,最优选的2%至5%(w/v)以内,例如,如通过HPLC所测量。

[0184] 在一个方面,在根据本发明的处理后,乳制品包含最多0.5%残余 β -半乳糖苷酶多肽活性,诸如最多0.01%残余 β -半乳糖苷酶多肽活性,优选的0.001%残余 β -半乳糖苷酶多肽活性。

[0185] 如本文描述的乳制品可为,例如,脱脂乳、低脂乳、全乳、奶油、UHT乳、具有延长的储存寿命的乳、发酵型乳制品、奶酪、酸奶、黄油、乳品抹酱、酪乳、酸化乳饮、酸奶油、乳清饮料、冰淇淋、浓缩乳、牛奶焦糖或者风味乳饮。乳制品可通过本领域已知的任意方法制造。

[0186] 在一个方面,乳制品是饮用乳,诸如巧克力或风味乳、甜乳、浓缩乳、乳清或者发酵型乳制品。在一个方面,乳制品是发酵型乳制品。

[0187] 在一个方面,乳制品是发酵型乳制品,其选自酸奶、酪乳、Riazhenka、奶酪、法式鲜奶油、奶渣和清爽干酪。

[0188] 在一个方面,乳制品是酸奶,诸如凝固型、搅拌型或者饮用型酸奶。

[0189] 乳制品还可包含非乳成分,例如植物成分,诸如例如植物油、植物蛋白和/或植物碳水化合物。乳制品还可包含其它添加剂,诸如例如,酶、风味剂、微生物培养物诸如益生菌培养物、盐、甜味剂、糖、酸、水果、果汁或者本领域已知作为乳制品组分或添加剂的任何其

它成分。

[0190] 在本发明的一个实施方案中,一种或多种乳成分和/或乳级分占该乳制品的至少50%(重量/重量),诸如至少70%,例如至少80%,优选地至少90%。在本发明的一个实施方案中,已用如本文所定义的具有转半乳糖基化活性的酶进行处理的一种或多种乳基质占该乳制品的至少50%(重量/重量),诸如至少70%,例如至少80%,优选地至少90%。在本发明的一个实施方案中,该乳制品是并非以添加预制低聚半乳糖来加以富集的乳制品。

[0191] 在本发明的一个实施方案中,多肽处理的乳基质在作为乳制品成分而使用前未经干燥。在本发明的一个实施方案中,乳制品是冰淇淋。在本文的上下文中,冰淇淋可为任意类型的冰淇淋,诸如全脂冰淇淋、低脂冰淇淋或者基于酸奶或其它发酵型乳制品的冰淇淋。冰淇淋可通过本领域已知的任意方法制造。在本发明的一个实施方案中,乳制品是乳或浓缩乳。

[0192] 在本发明的一个实施方案中,乳制品是UHT乳。在本发明上下文中的UHT乳是已实施旨在杀灭全部微生物的灭菌过程的乳。UHT(超高温)处理可以是,例如,在130℃下热处理30秒,或者在145℃下热处理一至三秒,诸如在145℃下一至二秒。在本发明的一个优选实施方案中,乳制品是ESL乳。在本文的上下文中的ESL乳是由于微过滤和/或热处理而具有延长储存寿命的乳,并且在2-5℃的存储货架上,其能够保持新鲜至少15天,优选地至少20天。

[0193] 在本发明的另一个优选的实施方案中,乳制品是发酵型乳制品,例如,酸奶。用于多数发酵型乳制品的微生物通常在巴氏灭菌后添加,其选自通常称为乳酸菌的细菌。如本文所用,术语“乳酸菌”是指革兰氏阳性菌、微嗜氧或者厌氧细菌,其将糖类发酵伴随酸的生成,该酸包括乳酸(作为主要产生的酸)、乙酸和丙酸。工业上最有用的乳酸菌见于“乳杆菌目”,其包括乳球菌属(*Lactococcus* spp.)、链球菌属(*Streptococcus* spp.)、乳杆菌属(*Lactobacillus* spp.)、明串珠菌属(*Leuconostoc* spp.)、假明串珠菌属(*Pseudoleuconostoc* spp.)、片球菌属(*Pediococcus* spp.)、短杆菌属(*Brevibacterium* spp.)、肠球菌属(*Enterococcus* spp.)和丙酸杆菌属(*Propionibacterium* spp.)。另外,属于厌氧细菌群组的产乳酸细菌双歧杆菌属(即双歧杆菌属)通常包括在乳酸菌群组中,其在很多情况下单独或者与乳酸菌组合以用于食品培养。

[0194] 乳酸菌通常以冰冻或者冻干培养物来供应给乳品工业以用于大批量起始物增殖或者作为所谓的“直投式”(DVS)培养物,其旨在用于直接接种到发酵罐或者桶来进行发酵型乳制品的生产。此类培养物一般指“起始培养物”或者“起始物”。

[0195] 乳酸菌的常用起始培养物菌株一般分为具有在约30℃的最适生长温度的嗜常温生物和具有在约40℃至约45℃范围的最适生长温度的嗜热生物。属于嗜常温群组的典型的生物包括乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)、肠膜明串珠菌乳脂亚种(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*)、肠膜假明串珠菌乳脂亚种(*Pseudoleuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、乳酸乳球菌乳酸亚种双乙酰生物变种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*)、干酪乳杆菌乳脂亚种(*Lactobacillus casei* subsp. *casei*)和副干酪乳杆菌副干酪亚种(*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*)。嗜热乳酸菌种包括,例如嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、德氏乳杆菌乳酸亚

种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)和嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)。

[0196] 属于双歧杆菌属的厌氧菌,包括两歧双歧杆菌、动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)和长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*),通常也用做乳品起始培养物并且通常包括在乳酸菌的群组中。另外地,丙酸杆菌的菌种也用作乳品起始培养物,尤其在奶酪的制造中。另外地,属于短杆菌属的生物也通常用作食品起始培养物。微生物起始培养物的另一群组为真菌培养物,包括酵母培养物和丝状真菌的培养物,其特别用于某些类型的奶酪和饮料的制造。真菌的示例包括洛克福青霉(*Penicillium roqueforti*)、白青霉(*Penicillium candidum*)、白地霉(*Geotrichum candidum*)、开菲尔圆酵母(*Torula kefir*)、开菲尔酵母(*Saccharomyces kefir*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。在本发明的一个实施方案中,用于乳基基质发酵的微生物是干酪乳杆菌,或者嗜热链球菌与德氏乳杆菌保加利亚亚种的混合物。

[0197] 用于本发明方法的发酵工艺是众所周知的并且本领域的技术人员应了解如何选择合适的加工条件,诸如温度、氧气、微生物的量和特征、添加剂诸如例如碳水化合物、风味剂、矿物质、酶和加工时间。显而易见,选择发酵条件以便支持本发明的实施。

[0198] 由于发酵,乳基基质的pH将变低。本发明的发酵型乳制品的pH可以是,例如,在3.5-6的范围内,诸如在3.5-5的范围内,优选地在3.8-4.8的范围内。

[0199] 在一个方面,本文描述的方法可用于制备奶酪制品以及用于制备奶酪制品的方法中。奶酪制品可选自,例如奶油干酪、茅屋干酪(*cottage cheese*)以及精制干酪。通过加入多肽该奶酪可包含明显提高水平的低聚半乳糖和降低水平的乳糖。在一个方面,在最终奶酪制品中的乳糖水平可减少至少约25%,优选地至少约50%并且更优选地至少约75%。多肽可用于将奶酪制品中的乳糖减少到低于约1克每份,其为大多数乳糖不耐受个体可耐受的量。

[0200] 本文提供的奶酪制品是营养改善型奶酪制品,其具有提高的可溶性纤维含量、降低的卡路里含量、出色的感官特性、改善的质地以及口味。此外,本文描述的多肽可减少该奶酪制品的血糖指数,因为GOS比乳糖或者其水解产物更慢地吸收。最后,多肽可降低奶酪制品的生产成本,尤其是奶油奶酪制品,这是因为GOS出乎意料地向奶油奶酪制品提供了改善的质地,从而实现了稳定剂的减少使用,或者通过实现了不经脱水收缩的提提高的水分含量。

[0201] 在另一个方面,提供了组合物,其包含如本文描述的多肽和碳水化合物底物。在另一个方面,碳水化合物底物为二糖。在另一个方面,该二糖是,例如,乳果糖、海藻糖、鼠李糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖或者纤维二糖。在另一个方面,碳水化合物底物为乳糖。制备组合物使得产生低聚糖。如本文描述的多肽可以是产品的部分,所述产品选自酸奶、奶酪、发酵型乳制品、膳食补充剂和可食用型益生菌产品。在一个方面,提供了组合物,其包含如本文描述的多肽和稳定剂。稳定剂的示例为,例如,多元醇(诸如例如甘油或者丙二醇)、糖或者糖醇、乳酸、硼酸或者硼酸衍生物(例如,芳族硼酸酯)。

[0202] 在一个方面,提供了如本文公开的转半乳糖基化多肽或者如本文公开的细胞的用途,其用于生产低聚半乳糖。在一个方面,提供了如本文公开的转半乳糖基化多肽或者如本

文公开的细胞的用途,其用于生产低聚半乳糖以作为产品部分,该产品选自酸奶、奶酪、发酵型乳制品、膳食补充剂和可食用型益生菌产品。在一个方面,产品是酸奶,奶酪或者发酵型乳制品。在一个方面,提供了如本文公开的转半乳糖基化多肽或者如本文公开的细胞的用途,其用于生产低聚半乳糖来增强双歧杆菌属的生长。在一个方面,提供了如本文公开的转半乳糖基化多肽或者如本文公开的细胞的用途,其用于生产低聚半乳糖来增强双歧杆菌在混合培养物发酵中的生长。

[0203] 在一个方面,提供了用于生产如本文公开的转半乳糖基化多肽的方法,该方法包括在适当的培养基中在允许所述多肽表达的条件下培养如本文公开的细胞,以及从培养物中回收所得多肽。提供了用于生产低聚半乳糖的方法,该方法包括将如本文公开的多肽或者如本文公开的细胞与包含乳糖的乳基溶液进行接触。

[0204] 低聚半乳糖的添加可提高单独双歧杆菌属或者混合培养物中的双歧杆菌属的生长。

[0205] 源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽

[0206] 具有转半乳糖基化活性的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶的示例如下:

[0207] 在一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是源自两歧双歧杆菌的 β -半乳糖苷酶。

[0208] 在另一个方面,源自两歧双歧杆菌的 β -半乳糖苷酶是源自两歧双歧杆菌DSM20215的 β -半乳糖苷酶。

[0209] 在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0210] 在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0211] 在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0212] 在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的多肽中的任一种。

[0213] 在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的多肽中的任一种的截短片段,并且具有850个氨基酸残基的最小长度。

[0214] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,在等于或高于3%w/w的初始乳糖浓度的浓度下,其具有至少0.5、至少1、至少2、至少2.5、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11或者至少12的转半乳糖基化活性: β -半乳糖苷酶活性的比率。

[0215] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其中糖苷水解酶催化核心具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0216] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含Glyco_hydro2N(PF02837)、Glyco_hydro(PF00703)和/或Glyco_hydro2C(PF02836)结构域。

[0217] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含细菌Ig样结构域(组4)(PF07532)。

[0218] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是具有转半乳糖基化活

性的多肽,其选自:

[0219] a.包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多980个氨基酸残基组成,

[0220] b.包含与SEQ ID NO:2具有至少97%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多975个氨基酸残基组成,

[0221] c.包含与SEQ ID NO:3具有至少96.5%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多1300个氨基酸残基组成,

[0222] d.由多核苷酸编码的多肽,在至少低严格的条件下该多核苷酸与i)编码SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽的SEQ ID NO:9、10、11、12或13中包含的核酸序列或者ii)i)的互补链进行杂交,

[0223] e.由多核苷酸编码的多肽,该多核苷酸包含与编码SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽的核苷酸序列或者编码成熟多肽的SEQ ID NO:9、10、11、12或13中包含的核苷酸序列具有至少70%的同一性的核苷酸序列,以及

[0224] f.包含SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的一种或多种氨基酸残基的缺失、插入和/或保守置换的多肽。

[0225] 在另一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是具有转半乳糖基化活性的多肽,其选自:

[0226] a.包含与SEQ ID NO:3具有至少96.5%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多1300个氨基酸残基组成,

[0227] b.包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多980个氨基酸残基组成,

[0228] c.由多核苷酸编码的多肽,在至少低严格的条件下该多核苷酸与i)编码SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽的SEQ ID NO:9、10、11、12或13中包含的核酸序列或者ii)i)的互补链进行杂交,

[0229] d.由多核苷酸编码的多肽,该多核苷酸包含与编码SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽的核苷酸序列或者编码成熟多肽的SEQ ID NO:9、10、11、12或13中包含的核苷酸序列具有至少70%的同一性的核苷酸序列,以及

[0230] e.包含SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的一种或多种氨基酸残基的缺失、插入和/或保守置换的多肽。

[0231] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其中氨基酸序列与SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的成熟氨基酸序列具有至少68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0232] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其与SEQ ID NO:1的成熟氨基酸序列具有90%的序列同一性。

[0233] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其与SEQ ID NO:2的成熟氨基酸序列具有90%的序列同一性。

[0234] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其与SEQ ID NO:3的成熟氨基酸序列具有96.5%的序列同一性。

[0235] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其与SEQ ID NO:4的成熟氨基酸序列具有96.5%的序列同一性。

[0236] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其与SEQ ID NO:5的成熟氨基酸序列具有96.5%的序列同一性。

[0237] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的氨基酸序列或者由它们组成。

[0238] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其源自两歧双歧杆菌。

[0239] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其具有6.5-7.5的最适pH。

[0240] 对碳水化合物具有活性的多肽可通过使用基于它们的底物特异性进行分类的IUBMB系统或者基于CaZy分配而归类为当前125种糖苷水解酶家族中的一种。在CaZy数据库中,分配是基于序列和结构信息两者,其与底物和产物的立体化学知识进行了结合。

[0241] 本文公开了多肽,当其为来自编码所述多肽的核酸序列的合适芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)宿主的表达产物时,其是表现出转半乳糖基化活性的所述核酸序列的唯一多肽表达产物。这可通过使用下列本领域的技术人员已知的技术进行评估。对待评估的样品进行SDS-PAGE并且使用适用于蛋白定量的染料而可视化,诸如例如Bio-Rad Criterion系统。随后使用合适的光密度扫描仪(诸如例如Bio-Rad Criterion系统)扫描凝胶,并且确保所得的图片在动态范围内。对与源自SEQ ID NO:8的任意变体/片段相对应的带进行定量,并且计算该多肽的百分比,如:所考虑的多肽的百分比=考虑的多肽/(表现出转半乳糖基化活性的全部多肽的和)*100。

[0242] 在组合物中源自SEQ ID NO:8的多肽变体/片段的总数可通过本领域的技术人员已知的方法,使用多克隆抗体进行的western印迹法对源自SEQ ID NO:8的片段进行检测而测定。

[0243] 本文公开的多肽包含在酶中所包含的至少两个独立的功能结构域。首先,多肽应包含糖苷水解酶催化核心,如下所述。该催化核心应属于与糖苷水解酶家族相关的GH-A族。GH-A族的特征在于通过保持机制裂解糖苷键并且具有基于TIM桶折叠的催化结构域(Wierenga,2001,FEBS Letters,492(3),p 193-8)。催化结构域包含两个谷氨酸残基,其充当质子供体和亲核体,其来自于桶结构域的链4和7(Jenkins,1995,FEBS Letters,362(3),p 281-5)。TIM桶的整体结构是由8个 β 链和8个 α 螺旋组成的(β/α)8组折叠。在一个方面,本文公开的糖苷水解酶催化核心属于糖苷水解酶家族GH-2和GH-35之一,其全都是属于GH-A族的TIM桶酶。在另一个方面,糖苷水解酶催化核心属于家族GH-2或者GH-35。在另一个方面,糖苷水解酶催化核心属于家族GH-2。共同的特性是这些酶是所谓的保留酶,使得底物的立体化学在产物中是保守的(Henrissat,1997,Curr Opin Struct Biol,7(5),637-44)。

[0244] 在一个方面,本文公开的多肽对于具有 $\beta(1\rightarrow4)$ 构型的碳水化合物键具有活性。这有效地将该酶归入 β -半乳糖苷酶的IUBMB EC 3.2.1.23类中。该活性可通过但不限于利用合成底物来测定,诸如对-硝基苯氧基- β -D-吡喃半乳糖苷(PNPG)、邻-硝基苯氧基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)或者带有显色糖苷配基的 β -D-吡喃半乳糖苷(XGal)。测定酶是否属于 β -半乳糖苷酶EC3.2.1.23类的另选方法是与底物诸如乳糖进行温育,并且通过诸如酶活测

定、HPLC、TLC的方法或者其它本领域技术人员已知的方法来测量葡萄糖的释放。

[0245] 为了预测多肽的功能实体,可采用若干可用的公共储存库,诸如例如Pfam (Nucl.Acids Res.(2010)38(suppl 1):D211-D222.doi:10.1093/nar/gkp985)和Interpro (Nucl.Acids Res.(2009)37(suppl 1):D211-D215.doi:10.1093/nar/gkn785)。应当明确,当进行此类分析时该分析应在可获自公共存储数据库的多肽的全长序列上进行。

[0246] 在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含选自以下的一种或多种Pfam结构域:Glyco_hydro2N(PF02837)、Glyco_hydro(PF00703)、Glyco_hydro 2C (PF02836)和细菌Ig样结构域(组4)(PF07532)。在另一个方面,提供了多肽,其包含Pfam结构域Glyco_hydro2N(PF02837)、Glyco_hydro(PF00703)、Glyco_hydro 2C(PF02836)和细菌Ig样结构域(组4)(PF07532)。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含Glyco_hydro2N(PF02837)、Glyco_hydro(PF00703)和Glyco_hydro 2C(PF02836)结构域,其构成该多肽的催化结构域。

[0247] 在另一个方面, β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶)具有至少1、至少2.5、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11或者至少12的转半乳糖基化活性: β -半乳糖苷酶活性的比率,如在100ppm浓度,37°C和5w/w%乳糖的乳基测定法中15分钟、30分钟或者180分钟,诸如180分钟反应后所测量。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶源自两歧双歧杆菌。

[0248] 在一个方面,本文公开的 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶)具有转半乳糖基化活性,使得超过20%、超过30%、超过40%、至多达50%的初始乳糖被转半乳糖基化,如在100ppm浓度,37°C和5w/w%乳糖的乳基测定法中15分钟、30分钟或者180分钟,诸如180分钟反应后所测量。在另一个方面,本文公开的 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶)具有 β -半乳糖苷酶活性,使得低于80%、低于70%、低于60%、低于50%、低于40%、低于30%、低于20%的乳糖已水解,如在100ppm浓度,37°C和5w/w%乳糖的乳基测定法中15分钟、30分钟或者180分钟,诸如180分钟反应后所测量。在一个方面, β -半乳糖苷酶活性和/或转半乳糖基化活性在100ppm浓度下测量对应为2.13LAU,如方法2中所明确指出。

[0249] 在另一个方面,本文公开的 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶)具有如下特征中的一种或多种:

[0250] a)至少1、至少2.5、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11或者至少12的转半乳糖基化活性: β -半乳糖苷酶活性的比率,如在100ppm浓度,37°C和5w/w%乳糖的乳基测定法中15分钟、30分钟或者180分钟,诸如180分钟反应后所测量,和/或

[0251] b)具有转半乳糖基化活性使得超过20%、超过30%、超过40%以及至多50%的初始乳糖被转半乳糖基化,如在100ppm浓度,37°C和5w/w%乳糖的乳基测定法中15分钟、30分钟或者180分钟,例如180分钟反应后所测量。在一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含与SEQ ID NO:3具有至少96.5%序列同一性的氨基酸序列,其中所述多肽由最多1300个氨基酸残基组成。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,例如,其中所述序列同一性为至少95%,诸如例如至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或者至少100%的序列同一性,

并且其中所述多肽由最多980个氨基酸残基组成。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含与SEQ ID NO:1具有至少90%的序列同一性的氨基酸序列,其中所述多肽由最多980个氨基酸残基组成。在另一个方面,多肽,其中所述多肽与SEQ ID NO:1具有至少90%的序列同一性,诸如,其中所述多肽与SEQ ID NO:1具有至少90%,诸如例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或者至少99%的序列同一性。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其与SEQ ID NO:2具有至少96.5%的序列同一性,诸如,其中所述多肽与SEQ ID NO:2具有至少97%,诸如例如至少98%或者至少99%的序列同一性。在一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶由最多975个氨基酸残基组成,诸如例如,最多970个氨基酸残基,诸如最多950个氨基酸残基,诸如最多940个氨基酸残基,最多930个氨基酸残基,最多920个氨基酸残基,最多910个氨基酸残基,最多900个氨基酸残基,最多895个氨基酸残基或者最多890个氨基酸残基。在一个方面,特定的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽由887或者965个氨基酸残基组成。在一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含与SEQ ID NO:2具有至少97%的序列同一性的氨基酸序列,诸如其中所述序列同一性为至少98%,诸如例如至少99%或者至少100%的序列同一性,其中所述多肽由最多975个氨基酸残基组成,诸如例如,最多970或者至少965个氨基酸残基组成。在一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含与SEQ ID NO:2具有至少97%的序列同一性的氨基酸序列,其中所述多肽由最多975个氨基酸残基组成。

[0252] 在另一个优选的方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含SEQ ID NO:1、2、3、4或者5。在另一个优选的方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其由SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的氨基酸序列组成,特别是由SEQ ID NO:1或者2的氨基酸序列组成的多肽。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含与SEQ ID NO:3具有至少96.5%的序列同一性的氨基酸序列,诸如其中所述序列同一性为至少97%,诸如例如至少98%、至少99%或者至少100%的序列同一性,其中所述多肽由最多1300个氨基酸残基组成。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其中所述多肽与SEQ ID NO:5具有至少98.5%,诸如至少99%或者至少99.5%的序列同一性。在一个方面,此类多肽由最多1290个氨基酸残基组成,诸如例如,最多1280,最多1270,最多1260,最多1250,最多1240,最多1230,最多1220或者最多1215个氨基酸残基。在一个优选的方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其由1211个氨基酸残基组成。

[0253] 在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其中所述多肽与SEQ ID NO:4具有至少96%,诸如至少97%,诸如例如至少98%或者至少99%的序列同一性。在一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其由最多1210个氨基酸残基组成,诸如例如,最多1200,最多1190,最多1180,至多1170,最多1160,最多1150或者最多1145个氨基酸残基,诸如1142个氨基酸残基。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其中所述多肽与SEQ ID NO:3具有至少96.5%,诸如至少97%,诸如例如至少98%或者至少99%的序列同一性。在一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其由最多1130个氨基酸残基组成,诸如例如,最多1120,最多1110,最多1100,最多1090,最多1080,最多1070,最多1060,最多1050,最多1055或者最多1040个氨基酸残基。在一个优选的方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其由1038个氨基酸残基组成。

[0254] 在另一个方面,本文公开的 β -半乳糖苷酶多肽(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽)具有高于100%,诸如高于150%、175%或者200%的转半乳糖基化活性比率。在一个方面,在15分钟反应、30分钟反应、60分钟反应、90分钟反应、120分钟反应或者180分钟反应后测量该活性。因此在一方面,例如,在添加酶后15分钟,诸如添加酶后30分钟,诸如添加酶后60分钟,诸如添加酶后90分钟,诸如添加酶后120分钟或者诸如添加酶后180分钟测量相对转半乳糖基化活性。

[0255] 蛋白质通常由一种或多种功能域组成,通常称为结构域。不同结构域以变化的组合在不同蛋白质中的存在产生了天然存在的蛋白质多样性库。描述结构域的一种方法是通过Pfam数据库的帮助,其是蛋白结构域家族的大集合,如“The Pfam protein families database”:R.D.Finn,J.Mistry,J.Tate,P.Coggill,A.Heger,J.E.Pollington,O.L.Gavin,P.Guneseharan,G.Ceric,K.Forslund,L.Holm,E.L.Sonnhammer,S.R.Eddy,A.Bateman Nucleic Acids Research(2010)Database Issue 38:D211-222中所描述。各个家族通过多序列比对和隐马尔可夫模型(HMM)来表示。在另一个方面,本发明人已发现本文提供的多肽包含Pfam结构域Glyco_hydro2N(PF02837)、Glyco_hydro(PF00703)、Glyco_hydro_2C(PF02836)、和细菌Ig样结构域(组4)(PF07532)中的一种或多种。在一个方面,本文提供的多肽包含Glyco_hydro2N(PF02837)、Glyco_hydro(PF00703)、Glyco_hydro_2C(PF02836)和细菌Ig样结构域(组4)(PF07532)。

[0256] 在一个方面, β -半乳糖苷酶多肽(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽)在pH 4-9的范围,诸如5-8,诸如5.5-7.5,诸如6.5-7.5具有有用的转半乳糖基化活性。

[0257] 本发明涵盖了源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽的用途,其与本文所定义的氨基酸序列或与具有本文所定义的具体性质的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽具有一定程度的序列同一性或序列同源性。具体地,本发明涵盖了与下文定义的SEQ ID NO:1、2、3、4或者5中的任意一种具有一定程度的序列同一性的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶肽或者其同源物。

[0258] 在一方面,与SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽相比,该同源氨基酸序列和/或核苷酸序列应提供和/或编码保留功能性转半乳糖基化活性和/或增强转半乳糖基化活性的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽。

[0259] 在本文中,所采用的同源序列包括与主题序列可以是至少66%、70%、75%、78%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。通常,同源物应包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等等。尽管同源性也可以根据相似性(即具有类似的化学性质/功能的氨基酸残基)来考虑,但在本发明的上下文中优选根据序列同一性来表示同源性。

[0260] 因此,本发明还涵盖了如本文所定义的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶蛋白质或者多肽的任意氨基酸序列(尤其是下文所定义的SEQ ID No:1、2、3、4或者5)的变体、同源物和衍生物的用途。

[0261] 该序列,尤其是下文所定义的SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶的变体、同源物和衍生物,还可以具有氨基酸残基的缺失、插入或置换,其产生沉默改变并导致功能上的等效物质。可以基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性进行有意的氨基酸置换,只要该物质的二级结合活性得以保留即可。

例如,带负电的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;并且具有类似亲水性值的带有无电荷的极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。本发明还涵盖了可能出现的保守置换(在本文中,置换和替换都用来指现有氨基酸残基与替代残基的交换),即对等置换(like-for-like substitution),诸如碱性对碱性,酸性对酸性,极性对极性等。非保守置换也可能出现,即从一类残基到另一类残基,或者涉及非天然氨基酸的纳入,诸如鸟氨酸(下文称为Z)、二氨基丁酸鸟氨酸(下文称为B)、正亮氨酸鸟氨酸(下文称为O)、吡啶丙氨酸、噻吩丙氨酸、萘丙氨酸和苯甘氨酸。

[0262] 可以进行的保守置换,例如,在以下群组内进行:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、脂族氨基酸(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺、天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸)、芳族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)、羟基氨基酸(丝氨酸、苏氨酸)、大型氨基酸(苯丙氨酸和色氨酸)和小型氨基酸(甘氨酸、丙氨酸)。

[0263] 在一个方面,用于本发明的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽序列为纯化形式。

[0264] 在一个方面,用于本发明的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽或者蛋白质为分离的形式。

[0265] 在一个方面,通过重组技术生产本发明的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽。

[0266] 源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶的变体多肽包括与SEQ ID NO:1或者2具有一定百分比例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或者99%序列同一性的多肽。

[0267] 源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶的变体多肽包括与SEQ ID NO:3、4或者5具有一定百分比例如,至少96%、97%、98%或者99%序列同一性的多肽。

[0268] 在一个方面,本文公开的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽包含氨基酸序列,其与编码转半乳糖酶的核苷酸序列所编码的成熟多肽的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或者99%的序列同一性,该转半乳糖酶包含在本文所示如SEQ ID NO:22的两歧双歧杆菌DSM20215中。与就SEQ ID NO:1、2、3、4或者5所讨论的序列同一性和功能性相关的全部注意事项和限制变通地应用于这些多肽和核苷酸的序列同一性和功能性。

[0269] 在一个方面,该主题氨基酸序列为SEQ ID NO:1、2、3、4或者5,并且该主题核苷酸序列优选地为SEQ ID NO:9、10、11、12或者13。

[0270] 在一个方面,多肽是从SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽的氨基和/或羧基末端缺失了一个或多个(若干)氨基酸的片段;其中该片段具有转半乳糖基化活性。在一个方面,片段包含至少500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或者1000个氨基酸残基。

[0271] 在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽变体的长度为500至1300个氨基酸残基。在另一个方面,多肽变体的长度为600至1300个氨基酸。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽变体的长度为700至1300个氨基酸。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽变体的长度为800至1300个氨基酸。在另一个方面,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽变体的长度为800至1300个氨基酸。

[0272] SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽变体

[0273] 在一个方面,提供了SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶变体,其具有在相对于SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的一个或多个位置上的产生改变属性(例如,改善的转半乳糖基化作用)的置换。在本文件中为了方便起见,此类源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶的变体多肽也称为“变体多肽”、“多肽变体”或“变体”。在一个方面,与SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽相比,如本文定义的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶的多肽具有改善的转半乳糖基化活性。在另一个方面,与SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽相比,如本文定义的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽具有改善的反应速率。

[0274] 在一个方面,如本文定义的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽和变体表现出酶活性。在一个方面,如本文描述的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽和变体多肽包含转半乳糖基化活性。

[0275] 在一个方面,进行反应30分钟后(例如高于3%w/w初始乳糖浓度的浓度),转半乳糖基化活性: β -半乳糖苷酶活性的比率为至少0.5,诸如至少1,诸如至少1.5或者诸如至少2。

[0276] 在一个方面,进行反应30分钟后(诸如高于3%w/w初始乳糖浓度的浓度),转半乳糖基化活性: β -半乳糖苷酶活性的比率为至少2.5,诸如至少3,诸如至少4,诸如至少5,诸如至少6,诸如至少7,诸如至少8,诸如至少9,诸如至少10,诸如至少11或者诸如至少12。

[0277] 在一个方面,如本文定义的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽和变体是可衍生自微生物来源的,尤其是来自丝状真菌或酵母或者来自细菌。该酶可以,例如,衍生自下列的菌株:乳杆菌;落叶松蕈(*Agaricus*),例如双孢蘑菇(*A. bisporus*);*Ascovaginospora*;曲霉属(*Aspergillus*),例如,黑曲霉(*A. niger*)、泡盛曲霉(*A. awamori*)、*A. foetidus*、*A. japonicus*、米曲霉(*A. oryzae*);假丝酵母属(*Candida*);毛壳菌属(*Chaetomium*);*Chaetotomastia*;网柄菌属(*Dictyostelium*),例如盘基网柄菌(*D. discoideum*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*),例如脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)、乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*);毛霉属(*Mucor*),例如爪哇毛霉(*M. javanicus*)、高大毛霉(*M. mucedo*)、细胞毛霉(*M. subtilissimus*);脉孢菌属(*Neurospora*),例如粗糙脉孢菌(*N. crassa*);根毛霉属(*Rhizomucor*),例如微小根毛霉(*R. pusillus*);根霉(*Rhizopus*),例如少根根霉(*R. arrhizus*)、日本根霉(*R. japonicus*)、匍茎根霉菌(*R. stolonifer*);菌核菌属(*Sclerotinia*),例如*S. libertiana*;圆酵母属(*Torula*);球拟酵母属(*Torulopsis*);毛癣菌属(*Trichophyton*),例如红色毛癣菌(*T. rubrum*);维氏核盘菌(*Whetzelinia*),例如*W. sclerotiorum*;芽孢杆菌属(*Bacillus*),例如凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、*B. novalis*、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*);双歧杆菌(*Bifidobacterium*),例如长双歧杆菌(*B. longum*)、两歧双歧杆菌(*B. bifidum*)、动物双歧杆菌(*B. animalis*);金黄杆菌属(*Chryseobacterium*);柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*),例如弗氏柠檬酸杆菌(*C. freundii*);梭菌属(*Clostridium*),例如产气荚膜梭菌(*C. perfringens*);色二孢属(*Diplodia*),例如棉色二孢菌(*D. gossypina*);肠杆菌属(*Enterobacter*),例如产气肠杆菌(*E. aerogenes*)、阴沟肠杆菌(*E. cloacae*);爱德华氏菌属(*Edwardsiella*),迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*);欧文氏菌

属(*Erwinia*),例如草生欧文氏菌(*E.herbicola*);埃希氏菌属(*Escherichia*),例如大肠杆菌(*E.coli*);克雷伯氏菌属(*Klebsiella*),例如肺炎克雷伯氏菌(*K.pneumoniae*);*Miriococcum*; *Myrothesium*; 毛霉属(*Mucor*);脉孢菌属(*Neurospora*),例如粗糙脉孢菌(*N.crassa*);变形杆菌属(*Proteus*),例如普通变形杆菌(*P.vulgaris*);普罗威登斯菌属(*Providencia*),例如*P.stuartii*;密孔菌属(*Pycnoporus*),例如血红密孔菌(*Pycnoporus cinnabarinus*)、朱红密孔菌(*Pycnoporus sanguineus*);瘤胃球菌属(*Ruminococcus*),例如汉森瘤胃球菌(*R.hansenii*);沙门氏菌属(*Salmonella*),例如鼠伤寒沙门氏菌(*S.typhimurium*);沙雷氏菌,例如液化沙雷氏菌(*S.liquefasciens*)、粘质沙雷氏菌(*S.marcescens*);志贺氏菌属(*Shigella*),例如福氏志贺菌(*S.flexneri*);链霉菌属(*Streptomyces*),例如抗生素链霉菌(*S.antibioticus*)、栗色球链霉菌(*S.castaneoglobisporus*)、紫红链霉菌(*S.violeceoruber*);栓菌属(*Trametes*);木霉属(*Trichoderma*),例如里氏木霉(*T.reesei*),绿色木霉(*T.viride*);耶尔森氏菌属(*Yersinia*),例如小肠结肠炎耶尔森菌(*Y.enterocolitica*)。

[0278] 提供了分离的和/或纯化的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽,其包含如本文定义的多肽或者变体多肽。在一个实施方案中,源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶变体多肽是多肽(SEQ ID NO:1、2、3、4或者5)的成熟形式。在一个方面,变体包括C末端结构域。

[0279] 在一个方面,如本文定义的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶变体多肽包括变体,其中相对SEQ ID NO:1、2、3、4或者5而言具有介于1和约25个氨基酸残基之间的添加或缺失。在一个方面,如本文定义的变体多肽包括变体,其中相对SEQ ID NO:1、2、3、4或者5而言有具有介于1和约25个氨基酸残基之间的置换、添加或缺失。在一个方面,该变体具有SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的氨基酸序列,其中介于1和约25个之间的任意数量的氨基酸被置换。在另一个方面,该变体具有SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的氨基酸序列,其中介于3和12个之间的任意数量的氨基酸被置换。在另一个方面,该变体具有SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的氨基酸序列,其中介于5和9个之间的任意数量的氨基酸被置换。

[0280] 在一个方面,SEQ ID NO:1、2、3、4或者5中的至少2个,在另一个方面至少3个,并且又在另一个方面至少五个氨基酸被置换。

[0281] 在一个方面,本文公开的多肽具有1、2、3、4或者5的序列。

[0282] 在一个方面,本文公开的多肽具有SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的序列,其中在N末端10个,诸如9个,诸如8个,诸如7个,诸如6个,诸如5个,诸如4个,诸如3个,诸如2个,诸如1个氨基酸被置换和/或缺失。

[0283] 酶和其酶变体的特征在于它们的核酸和一级多肽序列、三维结构模型和/或它们的比活。如本文定义的多肽或者多肽变体的另外的特征还包括,例如,稳定性、pH范围、氧化稳定性和热稳定性。可使用本领域技术人员已知的标准测定法评估表达水平和酶活性。在另一个方面,相对于SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽而言,变体展现了改善的性能特征,诸如在高温下,例如65-85 $^{\circ}$ C,改善的稳定性。

[0284] 提供了如本文定义的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽变体,其包括与SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽具有至少约66%、68%、70%、72%、74%、78%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的同一性的氨基酸序列。

[0285] 核苷酸

[0286] 在一个方面,本发明涉及源自双歧杆菌属的分离的具有如上所述的转半乳糖基化活性的 β -半乳糖苷酶多肽,其由多核苷酸所编码,所述多核苷酸在非常低严格的条件下,优选地低严格的条件下,更优选地中严格的条件下,更优选地中高严格的条件下,甚至更优选地高严格的条件下并且最优选地非常高严格的条件下,与i)包含在编码SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的成熟多肽的SEQ ID NO:9、10、11、12或13中的核酸序列;ii)i)的cDNA序列或者iii)i)或ii)的互补链进行杂交,(J.Sambrook,E.F.Fritsch和T.Maniatis,1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*,第2版,Cold Spring Harbor,New York)。SEQ ID NO:9、10、11、12或13的亚序列包含至少100个连续的核苷酸或者优选地至少200个连续的核苷酸。此外,该亚序列可编码具有乳糖酶活性的多肽片段。

[0287] SEQ ID NO:9、10、11、12或13或者其亚序列的核苷酸序列,以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5或者它们的片段的氨基酸序列,根据本领域众所周知的方法其可用于设计核酸探针来识别以及克隆DNA编码的具有转半乳糖基酶活性的来自不同属或者菌种的菌株的多肽。具体情况下,此类探针可用于与所关注的属或者菌种的基因组或者cDNA进行杂交(遵循标准Southern印迹过程)以便识别和分离其中对应的基因。此类探针大大短于全序列,但是长度应为至少14个核苷酸,优选地至少25个,更有选地至少35个并且最优选地至少70个核苷酸。然而,优选的是核酸探针的长度为至少100个核苷酸。例如,核酸探针的长度可为至少200个核苷酸,优选地至少300个核苷酸,更优选地至少400个核苷酸或者最优选地至少500个核苷酸。可使用甚至更长的探针,例如,长度为至少600个核苷酸,优选地至少700个核苷酸,更优选地至少800个核苷酸或者最优选地至少900个核苷酸的核酸探针。DNA和RNA探针均可使用。通常该探针经标记以检测对应的基因(例如,带有 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 、生物素或者抗生物素蛋白)。本发明涵盖了此类探针。

[0288] 因此,通过此类其它生物体制备的基因组DNA文库可针对与上述探针进行杂交并且编码具有乳糖活性的多肽的DNA进行筛选。来自此类其它生物体的基因组或者其它DNA可通过琼脂糖或者聚丙烯酰胺凝胶电泳或者其它分离技术进行分离。来自文库的DNA或者分离的DNA可经转移并且固定到硝化纤维或者其它合适的载体材料上。为了鉴定与SEQ ID NO:9、10、11、12或13或者其亚序列同源的克隆或者DNA,将该载体材料用于Southern印迹。

[0289] 出于本发明的目的,杂交显示了核苷酸序列在非常低到非常高严格的条件下与标记的核酸探针进行杂交,该探针对应SEQ ID NO:9、10、11、12或13中所示的核苷酸序列、其互补链或者其亚序列。在这些条件下与核酸探针杂交的分子可使用X-ray底片进行检测。

[0290] 在另一个优选的方面,该核酸探针是SEQ ID NO:9、10、11、12或者13的成熟多肽编码区。

[0291] 对长度为至少100个核苷酸的长探针而言,非常低到非常高严格的条件定义为:在 42°C 下在 $5\times\text{SSPE}$ 、 0.3% SDS、 200g/ml 剪切及变性的大马哈鱼精子DNA条件下的预杂交和杂交,并且25%的甲酰胺用于非常低和低严格性,35%的甲酰胺用于中和中高严格性,或者50%的甲酰胺用于高和非常高严格性,遵循标准Southern印迹过程在最优情况下进行12至24小时。

[0292] 对长度为至少100个核苷酸的长探针而言,最后使用 $2\times\text{SSC}$ 、 0.2% SDS来洗涤载体材料3次,每次15分钟,优选地至少在 45°C (非常低严格性),更优选地至少在 50°C (低严格性),更优选地至少在 55°C (中严格性),更优选地至少在 60°C (中高严格性),甚至更优选地至

至少在65℃(高严格性),以及最优选地至少在70℃(非常高严格性)。

[0293] 在具体的实施方案中,使用0.2×SSC、0.2%SDS进行洗涤,优选地至少在45℃(非常低严格性),更优选地至少在50℃(低严格性),更优选地至少在55℃(中严格性),更优选地至少在60℃(中高严格性),甚至更优选地至少在65℃(高严格性),以及最优选地至少在70℃(非常高严格性)。在另一具体的实施方案中,使用0.1×SSC、0.2%SDS进行洗涤,优选地至少在45℃(非常低严格性),更优选地至少在50℃(低严格性),更优选地至少在55℃(中严格性),更优选地至少在60℃(中高严格性),甚至更优选地至少在65℃(高严格性),以及最优选地至少在70℃(非常高严格性)。

[0294] 对长度为约15个核苷酸至约70个核苷酸的短探针而言,严格条件定义为:遵循标准Southern印迹过程,在比使用根据Bolton和McCarthy(1962,Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390)的计算方法所计算的 T_m 低约5℃至约10℃下,在0.9M NaCl、0.09M Tris-HCl pH 7.6、6mM EDTA、0.5%NP-40、1X Denhardt溶液、1mM焦磷酸钠、1mM磷酸二氢钠、0.1mM ATP和0.2mg酵母RNA/ml中进行预杂交、杂交以及杂交后洗涤。

[0295] 对长度为约15个核苷酸至约70个核苷酸的短探针而言,以6×SSC加上0.1%SDS洗涤一次载体材料15分钟,并使用6×SSC在比所计算的 T_m 低5℃至10℃下洗涤两次,每次15分钟。

[0296] 在含盐杂交条件下,对于成功的杂交而言,有效 T_m 控制了探针与滤纸结合的DNA之间的所需的一致性程度。有效 T_m 可使用下列公式来测定,从而测定在多种严格性条件下进行杂交所需要的两个DNA的一致性程度。

[0297] 有效 $T_m = 81.5 + 16.6(\log M[Na^+]) + 0.41(\%G+C) - 0.72(\%甲酰胺)$

[0298] (参见www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc731/dna/dna6.htm)

[0299] SEQ ID NO:10的G+C的含量是42%并且SEQ ID NO:11的G+C的含量是44%。对于中严格性而言,甲酰胺是35%并且对于5×SSPE的 Na^+ 浓度是0.75M。

[0300] 另一个相关的关联是两个DNA的1%的错配使 T_m 降低了1.4℃。为了测定在42℃下中严格条件下两个DNA杂交所需要的一致性程度,使用下列公式:

[0301] $\%同源性 = 100 - [(有效T_m - 杂交温度) / 1.4]$

[0302] (参见www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc731/dna/dna6.htm)

[0303] 变体核酸包括多核苷酸,其与编码SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的核酸具有一定百分比的序列同一性,例如,60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或者99%。在一个方面,提供了能够编码如本文所公开的多肽的核酸。在另一个方面,本文公开的核酸具有与SEQ ID NO:9、10、11、12或者13至少60%相同的核酸序列,诸如至少65%,诸如至少70%,诸如至少75%,诸如至少80%,诸如至少85%,诸如至少90%,诸如至少95%,诸如至少99%。

[0304] 在一个方面,提供了包含如本文所描述的核酸的质粒。

[0305] 在一个方面,提供了包含如本文所描述的核酸或者能够表达如本文所描述的多肽的表达载体。

[0306] 提供了与编码任意如本文所定义的多肽变体的核酸相互补的核酸。另外,提供了能够与互补序列杂交的核酸。在另一个实施方案中,用于本文所描述的方法和组合物的序列是合成序列。其包括但不限于,由在宿主生物体(例如酵母)中用于表达的最优密码子所

组成的序列。

[0307] 根据本领域中已知的过程,本文提供的多肽变体可是合成地产生,或者通过在宿主细胞中重组表达而产生。在一个方面,本文公开的多肽是重组多肽。如本文定义的表达的多肽变体任选地在之前是分离的。

[0308] 在另一个实施方案中,如本文定义的多肽变体是表达后纯化的。在以下专利中描述了多肽变体的基因修饰和重组生产的方法,例如,美国专利7,371,552;7,166,453;6,890,572;和6,667,065;以及美国公布的专利申请2007/0141693;2007/0072270;2007/0020731;2007/0020727;2006/0073583;2006/0019347;2006/0018997;2006/0008890;2006/0008888;和2005/0137111。这些公开的相关内容在此以引用的方式并入,包括编码多肽的多核苷酸序列、引物、载体、选择方法、宿主细胞、表达的多肽变体的纯化和重组以及如本文定义的多肽变体的表征,包括用于酶测定法的可用的缓冲液、pH范围、Ca²⁺浓度、底物浓度和酶浓度。

[0309] 提供了核酸序列,其编码SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的蛋白质或者与编码SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的蛋白质的核酸具有至少约66%、68%、70%、72%、74%、78%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或者100%的序列同一性的核酸序列。在一个实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:9、10、11、12或者13的核酸具有至少约60%、66%、68%、70%、72%、74%、78%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0310] 载体

[0311] 在一个方面,本发明涉及包含多核苷酸的载体。在一个方面,细菌细胞包含该载体。在一些实施方案中,将包含编码变体的核酸的DNA构建体在表达载体中转移到宿主细胞内,该表达载体包含可操作地连接到编码序列的调控序列。该载体可以是能够整合进入真菌宿主细胞基因组并且当引入宿主细胞时进行复制的任意载体。The FGSC Catalogue of Strains, University of Missouri列出了合适的载体。合适的表达和/或整合载体的另外的示例在Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); Bennett等人, More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, San Diego (1991), 396-428页; 和美国专利5,874,276中提供。示例性载体包括pFB6、pBR322、pUC18、pUC100和pENTR/D、pDONTM201、pDONRTM221、pENTRTM、pGEM[®]3Z和pGEM[®]4Z。用于细菌细胞的示例包括允许在大肠杆菌中复制的pBR322和pUC19,以及例如,允许在芽孢杆菌中复制的pE194或pUB110。

[0312] 在一些实施方案中,编码变体的核酸可操作地连接到合适的启动子上,其允许在宿主细胞中的转录。该启动子可源自编码蛋白质的基因,其与宿主细胞同源或者异源。启动子的合适的非限制性示例包括cbh1、cbh2、eg11和eg12启动子。在一个实施方案中,启动子对宿主细胞而言是天然的启动子。例如,当嗜糖假单胞菌(*P. saccharophila*)是宿主时,启动子是天然的嗜糖假单胞菌启动子。诱导型启动子是在环境或发育调控下激活的启动子。在另一个实施方案中,启动子是对宿主细胞异源的启动子。

[0313] 在一些实施方案中,编码序列可操作地连接到编码信号序列的DNA序列上。在另一个方面,代表性信号肽是SEQ ID NO:27。代表性信号肽是SEQ ID NO:9,其是枯草芽孢杆菌aprE前体蛋白的天然信号序列。在其它实施方案中,编码信号序列的DNA由编码来自其它细胞外枯草芽孢杆菌前体蛋白的信号序列的核苷酸序列所替代。在一个实施方案中,编码信

号序列的多核苷酸位于紧邻上游处,并且与编码多肽的多核苷酸合读码框。该信号序列可选自与宿主细胞相同的物种。

[0314] 在另外的实施方案中,包含DNA构建体或待引入真菌宿主细胞的载体的信号序列和启动子序列源自相同来源。在一些实施方案中,表达载体还包括终止序列。在一个实施方案中,终止序列和启动子序列源自相同来源。在另一个实施方案中,终止序列是与宿主细胞同源的。

[0315] 在一些实施方案中,表达载体包括选择性标记。合适的选择性标记的示例包括赋予对抗微生物剂(例如潮霉素或腐草霉素)的抗性的标记。营养选择性标记也是适合的,并且其包括amdS、argB和pyr4。在一个实施方案中,选择性标记是amdS基因,其编码乙酰胺酶;它允许转化的细胞在作为氮源的乙酰胺中生长。构巢曲菌(*A.nidulans*)amdS基因作为选择性标记的用途描述于Kelley等人,EMBO J.4:475-479(1985)和Penttila等人,Gene 61:155-164(1987)中。

[0316] 包含带有编码变体的多核苷酸的DNA构建体的合适表达载体可以是任意载体,其在给定的宿主生物中能够自主复制或者整合到宿主的DNA中。在一些实施方案中,表达载体是质粒。在一些实施方案中,设想了用于获得基因表达的两类表达载体。第一类表达载体包含DNA序列,其中的启动子、编码区和终止子全部来自待表达的基因。在一些实施方案中,通过缺失不期望的DNA序列而将待表达的结构域留在其自身转录和翻译调控序列的控制下来获得基因截短物。表达载体的第二类是预装配的并且包含所需的高水平转录和选择性标记的序列。在一些实施方案中,将基因的编码区或其部分插入这一通用表达载体,使得其处于表达构建体启动子和终止子序列的转录控制下。在一些实施方案中,将基因或其部分插入到强cbh1启动子的下游。

[0317] 表达宿主/宿主细胞

[0318] 在另一个方面,提供了宿主细胞,其包含如本文所述的质粒或如本文所述的表达载体,优选地以其进行转化。

[0319] 在另一个方面,提供了能够表达如本文所述的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽的细胞。

[0320] 在一个方面,如本文描述的宿主细胞或者如本文描述的细胞是细菌、真菌或酵母细胞。在另一个方面,该宿主细胞选自瘤胃球菌属、双歧杆菌属、乳球菌属、乳杆菌属、链球菌属、明串珠菌属、埃希氏杆菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属、酵母属、克鲁维酵母属、假丝酵母属、圆酵母属、球拟酵母属和曲霉属。在另一个方面,该宿主细胞选自汉氏瘤胃球菌(*Ruminococcus hansenii*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、两歧双歧杆菌和乳酸乳球菌。在另一个实施方案中,合适的宿主细胞包括革兰氏阳性菌,其选自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌(*B.lentus*)、短芽孢杆菌(*B.brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌(*B.alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌(*B.amyloliquefaciens*)、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌(*B.lautus*)、苏云金芽孢杆菌、变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)或者鼠灰链霉菌(*S.murinus*);或者革兰氏阴性菌,其中所述革兰氏阴性菌是大肠杆菌或者假单胞菌属菌种。在一个方面,宿主细胞是枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌。在一个实施方案中,宿主细胞是枯草芽孢杆菌,并且将表达的蛋白质工程化从

而包含枯草芽孢杆菌信号序列,如下文进一步详述所示出。

[0321] 在一些实施方案中,宿主细胞经基因工程化以表达如本文所定义的多肽变体,其具有与SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的多肽至少约66%、68%、70%、72%、74%、78%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码如本文所定义的多肽变体的多核苷酸应具有编码SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的蛋白质的核酸序列或者与编码SEQ ID NO:1、2、3、4或者5的蛋白质的核酸具有至少约66%、68%、70%、72%、74%、78%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或者100%的序列同一性的核酸序列。在一个实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:9、10、11、12或者13的核酸具有至少约60%、66%、68%、70%、72%、74%、78%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0322] 制备多肽的方法

[0323] 在另一个方面,表达如本文所述的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶多肽的方法包括获得如本文所述的宿主细胞或细胞以及从该细胞或宿主细胞中表达多肽,以及任选地纯化多肽。表达特征意指当在特定的宿主细胞中生产该变体时,变体的改变的表达水平。表达一般与可从发酵液中回收的活性变体的量相关,其通过在给定的时间量下使用本领域已知的标准技术进行。表达还可与在宿主细胞内产生或者由宿主细胞分泌的变体的量或者速率相关。表达还可与编码变体多肽的mRNA的翻译速率相关。

[0324] 宿主细胞的转化、表达和培养

[0325] DNA构建体或载体向宿主细胞中的引入包括诸如以下的技术:转化;电穿孔;细胞核显微注射;转导;转染,例如,脂质转染介导或DEAE-葡聚糖介导的转染;与磷酸钙DNA沉淀进行温育;用DNA包被的微粒子弹进行高速轰击;以及原生质体融合。通用转化技术在本领域中是已知的。参见例如,Ausubel等人(1987)的上文引用,第九章;Sambrook等人(2001)的上文引用;和Campbell等人,Curr.Genet.16:53-56(1989)。描述了异源蛋白质在木霉属中的表达,例如,美国专利6,022,725;美国专利6,268,328;Harkki等人,Enzyme Microb.Technol.13:227-233(1991);Harkki等人,BioTechnol.7:596-603(1989);EP 244,234;和EP 215,594中。在一个实施方案中,用载体系统构建遗传稳定转化体,从而将编码变体的核酸稳定整合进宿主细胞染色体中。然后通过已知的技术纯化转化体。

[0326] 在一个非限制性示例中,包括amdS标记的稳定转化体与非稳定转化体的区别在于其在包含乙酰胺的固体培养基上的更快生长速率以及光滑而非粗糙轮廓的圆形菌落的形成。另外,在一些情况下,通过非选择性固体培养基(例如,不含乙酰胺的培养基)上生长转化体,从该培养基中收获孢子,以及测定随后在包含乙酰胺的选择性培养基上发芽并且生长的这些孢子的百分比来进行稳定性的进一步测试。在本领域中已知的其它方法可用于选择转化体。

[0327] 活性鉴定

[0328] 为了评估源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶变体在宿主细胞中的表达,测定法可测量所表达的蛋白质,对应的mRNA或者 β -半乳糖苷酶的活性。例如,合适的测定法包括Northern和Southern印迹、RT-PCR(逆转录聚合酶链反应)和原位杂交,其使用适当标记的杂交探针。合适的测定法还包括测量样品中的活性。对变体活性的合适测定法包括但不限于,基于ONPG的测定法,或者测定反应混合物中的葡萄糖,诸如例如本文的方法和实施例中

描述的。

[0329] 纯化本文公开的多肽的方法

[0330] 一般来讲,在细胞培养物中产生的源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶变体多肽经分泌进入培养基中,并且可通过,例如从细胞培养基中除去不需要的组分而进行纯化或分离。在一些情况下,变体可从细胞裂解液中回收。在这种情况下,使用由本领域的技术人员常规采用的技术将该酶从产生其的细胞中进行纯化。示例包括但不限于,亲和层析法、离子交换层析法(包括高分辨率离子交换)、疏水相互作用层析法、两相分离法、乙醇沉淀法、反相HPLC法、硅胶柱层析法或者阳离子交换树脂层析法(诸如DEAE)、层析聚焦法、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀法和凝胶过滤法(例如,使用Sephadex G-75)。根据预期用途,本文公开的多肽可为,例如,冷冻干燥的或者制备于溶液中。在一个方面,本文公开的多肽是冷冻干燥的形式。在另一个方面,本文公开的多肽是在溶液中。

[0331] 本发明可通过本发明的下列进一步具体实施方案来描述:

[0332] 实施方案1:一种处理包含低聚半乳糖的乳基基质以获得具有稳定低聚半乳糖含量的乳制品的方法,其中所述乳基基质包含具有转半乳糖基化活性的活性 β -半乳糖苷酶,诸如源自双歧杆菌属的活性 β -半乳糖苷酶,该方法包括热处理所述乳基基质以获得基本上无残余的 β -半乳糖苷酶多肽活性的步骤,诸如,低于0.0213LAU/ml、诸如低于0.0192LAU/ml、诸如低于0.017LAU/ml、诸如低于0.0149LAU/ml、诸如低于0.0149LAU/ml、诸如低于0.0107LAU/ml、诸如低于0.0085LAU/ml、诸如低于0.0064LAU/ml、诸如低于0.0043LAU/ml,或者更优选的诸如低于0.00213LAU/ml的活性(如方法2中描述所测定)。

[0333] 实施方案2:一种处理包含低聚半乳糖的乳基基质的方法,其中所述乳基基质包含具有转半乳糖基化活性的活性 β -半乳糖苷酶,诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶,该方法包括在90°C-130°C范围内的温度(T)下热处理所述乳基基质至少x秒的时间段的步骤,以获得经热处理的乳制品,

[0334] 其中x通过 $x=153,377,215,802.625e^{-0.20378144T}$ 与温度T相关联;

[0335] 其中在至少14天的时间段内低聚半乳糖的含量变化在0.4%(w/v)以内。

[0336] 实施方案3:一种处理包含低聚半乳糖的乳基基质的方法,其中所述乳基基质包含具有转半乳糖基化活性的 β -半乳糖苷酶,该方法包括在90°C-130°C范围内的温度(T)下热处理所述乳基基质至少x秒的时间段的步骤,以获得经热处理的乳制品,

[0337] 其中x通过 $x=153,377,215,802.625e^{-0.20378144T}$ 与温度T相关联;

[0338] 其中在至少14天的时间段内低聚半乳糖的含量变化在0.4%(w/v)以内。

[0339] 实施方案4:一种热处理包含低聚半乳糖的乳基基质的方法,其中所述乳基基质包含具有转半乳糖基化活性的活性 β -半乳糖苷酶,诸如源自双歧杆菌属的活性 β -半乳糖苷酶,该方法包括在70°C-150°C范围内,诸如在90°C-130°C范围内的温度(T)下,热处理所述乳基基质至少x秒的时间段的步骤,以获得具有稳定低聚半乳糖含量的经热处理的乳制品,

[0340] 其中x通过 $x=153,377,215,802.625e^{-0.20378144T}$ 与温度T相关联。

[0341] 实施方案5:根据实施方案1所述的方法,该方法包括在70°C-150°C范围内,诸如在90°C-130°C范围内的温度(T)下,热处理所述乳基基质至少x秒的时间段的步骤,

[0342] 其中x通过 $x=153,377,215,802.625e^{-0.20378144T}$ 与温度T相关联。

[0343] 实施方案6:根据实施方案1-5中任一项所述的方法,其中所述方法在所述热处理

步骤之前还包括用所述 β -半乳糖苷酶(诸如源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶)对所述乳基基质进行原位酶处理的步骤,以获得所述包含低聚半乳糖的乳基基质。

[0344] 实施方案7:根据实施方案1-6中任一项所述的方法,其中所述乳基基质在至少80°C的温度下,更优选的是在至少85°C的温度下,更优选的是在至少90°C的温度下,最优选的是在至少95°C的温度下热处理。

[0345] 实施方案8:根据实施方案1-7中任一项所述的方法,其中所述温度是在80°C-150°C范围内的温度,诸如在85°C-150°C范围内的温度。

[0346] 实施方案9:根据实施方案1-8中任一项所述的方法,其中所述温度是在80°C-120°C范围内的温度,诸如在90°C-100°C范围内的温度。

[0347] 实施方案10:根据实施方案1-9中任一项所述的方法,其中所述温度是在85°C-119°C范围内的温度,诸如在90°C-100°C范围内的温度。

[0348] 实施方案11:根据实施方案1-10中任一项所述的方法,其中所述乳基基质经热处理至少1800秒的时间段,诸如至少1300秒,诸如至少800秒,诸如至少600秒。

[0349] 实施方案12:根据实施方案1-11中任一项所述的方法,其中所述时间段为最多1300秒。

[0350] 实施方案13:根据实施方案1-12中任一项所述的方法,其中所述时间段在至少0.01秒至最多1300秒的范围内,诸如在至少0.1秒至最多1300秒的范围内,诸如至少1秒至最多1300秒的范围内。

[0351] 实施方案14:根据实施方案1-13中任一项所述的方法,其中在所述经热处理的乳制品中,低聚半乳糖的含量稳定至少14天、至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少8周、至少10周、至少12周或至少24周。

[0352] 实施方案15:根据实施方案1-14中任一项所述的方法,其中在至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少8周、至少10周、至少12周或至少24周的时间段内,低聚半乳糖的含量变化在0.4%(w/v)以内。

[0353] 实施方案16:根据实施方案1-15中任一项所述的方法,其中所述乳制品基本上不具有残余的 β -半乳糖苷酶多肽活性,诸如,低于0.0213LAU/ml、诸如低于0.0192LAU/ml、诸如低于0.017LAU/ml、诸如低于0.0149LAU/ml、诸如低于0.0149LAU/ml、诸如低于0.0107LAU/ml、诸如低于0.0085LAU/ml、诸如低于0.0064LAU/ml、诸如低于0.0043LAU/ml,或者更优选的诸如低于0.00213LAU/ml。

[0354] 实施方案17:根据实施方案1-16中任一项所述的方法,其中在所述乳制品中的低聚半乳糖的量在0.5%至10%(w/v)以内,更优选的1%至8%(w/v)以内,更优选的1.5%至6%(w/v)以内,最优选的2%至5%(w/v)以内。

[0355] 实施方案18:根据实施方案1-17中任一项所述的方法,其中所述 β -半乳糖苷酶具有高于100%的转半乳糖基化活性比率,诸如高于150%、175%或者200%。

[0356] 实施方案19:根据实施方案1-18中任一项所述的方法,其中所述 β -半乳糖苷酶是源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶。

[0357] 实施方案20:根据实施方案1-19中任一项所述的方法,其中经过至少14天的测量,低聚半乳糖含量的变化在0.25%(w/v)以内,更优选的在0.2%(w/v)以内,更优选的在0.1%(w/v)以内,最优选的在0.05%(w/v)以内。

[0358] 实施方案21:根据实施方案1-20中任一项所述的方法,其中含量的变化在至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少8周、至少10周、至少12周或至少24周以内。

[0359] 实施方案22:根据实施方案1-21中任一项所述的方法,其中所述乳基质包含至少1%(w/v)量的乳糖,更优选的至少2%(w/v),最优选的至少4%(w/v)并且最多15%(w/v)的量。

[0360] 实施方案23:根据实施方案1-22中任一项所述的方法,其中使用至少0.0213LAU的量,最优选的至少1.065LAU的量的所述源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶对所述乳基质进行酶处理,以获得所述低聚半乳糖。

[0361] 实施方案24:根据实施方案1-23中任一项所述的方法,其中所述乳基质在酶处理以后包含0.1%至10%(w/v)的量,更优选的0.5%至8%(w/v)的量,最优选的1%至4%(w/v)的量的低聚半乳糖。

[0362] 实施方案25:根据实施方案1-24中任一项所述的方法,其中源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是源自两歧双歧杆菌的 β -半乳糖苷酶。

[0363] 实施方案26:根据实施方案1-25中任一项所述的方法,其中源自两歧双歧杆菌的 β -半乳糖苷酶是源自两歧双歧杆菌DSM20215的 β -半乳糖苷酶。

[0364] 实施方案27:根据实施方案1-26中任一项所述的方法,其中源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0365] 实施方案28:根据实施方案1-27中任一项所述的方法,其中源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0366] 实施方案29:根据实施方案1-28中任一项所述的方法,其中源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,其包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的任意多肽。

[0367] 实施方案30:根据实施方案1-29中任一项所述的方法,其中源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的任意多肽的截短片段,并且具有850个氨基酸残基的最小长度。

[0368] 实施方案31:根据实施方案1-30中任一项所述的方法,其中源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶包含多肽,其选自:

[0369] a.包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多980个氨基酸残基组成,

[0370] b.包含与SEQ ID NO:2具有至少97%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多975个氨基酸残基组成,

[0371] c.包含与SEQ ID NO:3具有至少96.5%序列同一性的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽由最多1300个氨基酸残基组成。

[0372] 实施方案32:根据实施方案1-31中任一项所述的方法,其中源自双歧杆菌属的 β -半乳糖苷酶是多肽,在等于或高于3%w/w的初始乳糖浓度的浓度下,其具有至少0.5、至少1、至少2、至少2.5、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11或者至少12的转半乳糖基化活性: β -半乳糖苷酶活性比率。

[0373] 实施方案33:根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中乳基质是获自任意哺乳动物的乳分泌物。

[0374] 实施方案34:根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中乳基基质是获自奶牛、绵羊、山羊、野牛或者骆驼的乳分泌物。

[0375] 实施方案35:根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中乳基基质的蛋白与乳糖比率为至少0.2,优选地至少0.3,至少0.4,至少0.5,至少0.6或者更优选地至少0.7。

[0376] 实施方案36:根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中乳制品是饮用乳、甜乳、浓缩乳、乳清或者发酵型乳制品。

[0377] 实施方案37:根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中乳制品是发酵型乳制品。

[0378] 实施方案38:根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中乳制品是发酵型乳制品,其选自酸奶、酪乳、Riazhenka、奶酪、法式鲜奶油、奶渣、清爽干酪、乳酸菌(Acidophilus)乳品、Leben、Ayran、Kefir和Sauermilch。

[0379] 实施方案39:根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中酸奶是凝固型、搅拌型或者饮用型酸奶。

[0380] 实施方案40:一种通过根据实施方案1-39中任一项所述的方法获得的乳制品。

[0381] 实施方案41:一种通过根据实施方案1-39中任一项所述的方法处理的乳基基质。

实施例

[0382] 用于制备多肽的材料和方法

[0383] 方法1a

[0384] 多肽的制备

[0385] 合成基因可购自GeneART(Regensburg, Germany)SEQ ID No.8,其设计来编码两歧双歧杆菌全长(1752个残基)基因,该基因带有针对枯草芽孢杆菌中表达而优化的密码子。

[0386] 该两歧双歧杆菌截短突变体使用带有反向引物的聚合酶链反应进行构建,其实现了对合成基因的选定区域的特异性扩增。

[0387] 正向引物GGGGTAACTAGTGGAAGATGCAACAAGAAG(SpeI带下划线)(SEQ ID NO:15)。

[0388] 反向引物

[0389]

截短突变体	引物序列
BIF_917 (SEQ ID NO: 9)	GCGCTTAATTAATTATGTTTTTTCTGTGCTTGTTTC SEQ ID NO: 16
BIF_995 (SEQ ID NO: 10)	GCGCTTAATTAATTACAGTGCGCCAATTCATCAATCA SEQ ID NO: 17
BIF_1068 (SEQ ID NO: 11)	GCGCTTAATTAATTATTGAACTCTAATTGTCGCTG SEQ ID NO: 18
BIF_1241 (SEQ ID NO: 12)	GCGCTTAATTAATTATGTCGCTGTTTTCAGTTCAAT SEQ ID NO: 19
BIF_1326 (SEQ ID NO: 13)	GCGCTTAATTAATTAATAATTCTTGTCTGTGCCCA SEQ ID NO: 20
BIF_1478 (SEQ ID NO: 14)	GCGCTTAATTAATTATCTCAGTCTAATTCGCTTGCGC SEQ ID NO: 21

[0390] 使用唯一的限制性位点SpeI和PacI将合成基因克隆进入pBNspe枯草芽孢杆菌表达载体中(图4),并且将分离的质粒转化到合适的芽孢杆菌属宿主中。将转化体在含有10 μ g/mL新霉素为选择的LB平板上重划线。

[0391] 在包含10 μ g/mL新霉素的LB培养基中建立预培养物,并且在37 $^{\circ}$ C下180rpm振荡培养7小时。使用500 μ L的这一预培养物来接种含10 μ g/mL新霉素的50mL Grant's改良培养基,并使其在33 $^{\circ}$ C下180rpm振荡生长68小时。

[0392] 通过将终浓度1mg/ml的溶菌酶(Sigma-Aldrich)和10U/ml的核酸酶(Merck)直接加入到培养基中并且在33 $^{\circ}$ C下180RPM温育1小时来裂解细胞。在10,000 \times g下离心20分钟来清理裂解物并且随后进行无菌过滤。

[0393] 根据以下说明来制备Grant's改良培养基:

[0394] 第I部分(高压灭菌)

[0395] 大豆脲 10g

[0396] 调至 500mL/升

[0397] 第II部分

1M K₂HPO₄ 3mL

葡萄糖 75g

[0398] 脲 3.6g

Grant's 10 \times MOPS 100mL

调至 400mL/升

[0399] 制备第I部分(2w/w%大豆脲)并且在121 $^{\circ}$ C下高压灭菌25分钟。

[0400] 制备第II部分并且与第I部分混合,并且用HCl/NaOH将pH调节到pH 7.3。

[0401] 将体积调至满体积并且通过0.22- μ m PES过滤器进行消毒。

[0402] 根据下列说明制备10 \times MOPS缓冲液:

	83.72g	Tricine
	7.17g	KOH 片
[0403]	12g	NaCl
	29.22g	0.276M K ₂ SO ₄
	10mL	0.528M MgCl ₂
	10mL	Grant's 微量营养素 100×

[0404] 用水调至约900mL并且溶解。用KOH调节pH至7.4,填满至1L并且通过0.2 μ m PES过滤器对溶液进行无菌过滤。

[0405] 根据下列说明制备100 \times 微量营养素:

	柠檬酸钠.2H ₂ O	1.47g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.47g
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.4g
[0406]	MnSO ₄ .H ₂ O	0.1g
	ZnSO ₄ .H ₂ O	0.1g
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0.05g
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.1g
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.1g

[0407] 溶解并且用水将体积调至1L。

[0408] 通过0.2 μ m PES过滤器进行消毒。

[0409] 在4 $^{\circ}$ C下避光储存。

[0410] 方法2a

[0411] 纯化和酶制备物

[0412] 使用带有10kDa MW截留的VivaSpin超滤设备(Vivaspin 20, Sartorius, Lot# 12VS2004)对过滤的酶分离物进行浓缩,并且将该浓缩物上样至PD10脱盐柱(GE healthcare, Lot#6284601)并用20mM Tris-HCl pH 8.6进行洗脱。在Äkta FPLC系统(GE Healthcare)上进行手动层析。将包含约20mg蛋白质的4mL脱盐样品上样至2mL HyperQ柱(HyperCelTM, Q sorbent),其用20mM Tris-HCl pH 8.6以1ml/min的流速进行平衡。用30CV(柱体积)洗涤缓冲液充分洗涤该柱,并且用100CV的长梯度将所结合的 β -半乳糖苷酶洗脱到20mM Tris-HCl pH 8.6 250mM NaCl中。以使用20mM Tris-HCl pH 8.6 500mM NaCl进行的一步洗脱来除去柱上的剩余杂质。通过SDS-page来分析穿流液和洗脱液中蛋白质的 β -半乳糖苷酶活性。

[0413] 根据制造商的方案,用10孔的1.0mm Invitrogen NuPage[®] Novex 4-12%Bis-Tris凝胶(目录号NP0321box)、See-Blue[®] Plus2预染标准品(目录号LC5925)和NuPAGE[®] MES SDS运行缓冲液(目录号NP0002)来运行SDS-page凝胶。用Simply Blue Safestain (Invitrogen, 目录号LC6060)对凝胶进行染色(图5)。

[0414] 方法3a

[0415] 测量 β -半乳糖苷酶活性

[0416] 使用可商购获得的底物2-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)(Sigma N1127)来测量酶活性。

[0417] ONPG带有或不带有受体

- [0418] 100 mM KPO4pH6.0
[0419] 12,3 mM ONPG
[0420] 补充了受体的ONPG
[0421] 100 mM KPO4pH6.0
[0422] 20 mM纤维二糖
[0423] 12,3 mM ONPG

[0424] 终止溶液

[0425] 10%Na₂CO₃

[0426] 将纯化酶的10μl系列稀释物加入到微量滴定板的孔内,其包含90μl带有或不带有受体的ONPG缓冲液。混合样品并且在37℃下温育10分钟,随即将100μl终止液加入到各个孔中来终止反应。在Molecular Device SpectraMax酶标仪中在420nm下记录吸光度值,其通过Softmax软件包控制。

[0427] 转半乳糖基化活性的比率如下计算转半乳糖基化活性的比率 = $(\text{Abs}_{420}^{\text{纤维二糖}} / \text{Abs}_{420}^{\text{纤维二糖}}) * 100\%$,对吸光度为介于0.5和1.0之间的稀释液而言(图6)。

[0428] 方法4a

[0429] LAU活性的测定

[0430] 原理:

[0431] 这一测定法的原理是,在37℃下乳糖酶将2-o-硝基氧基-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)水解为2-o-硝基酚(ONP)和半乳糖。用碳酸钠终止反应,在分光光度计或者色度计中在420nm下测量释放的ONP。

[0432] 试剂:

[0433] MES缓冲液pH 6.4(100mM MES pH 6.4,10mM CaCl₂):将19,52g MES水合物(Mw:195.2g/mol,Sigma-aldrich#M8250-250G)和1.470g CaCl₂二水合物(Mw:147.01g/mol,Sigma-aldrich)溶解于1000ml ddH₂O中,用10M NaOH将pH调节至6.4。通过0.2μm过滤器过滤溶液,并且在4℃储存至多1个月。

[0434] ONPG底物pH 6.4(12.28mM ONPG,100mM MES pH 6.4,10mM CaCl₂):将0.370g 2-o-硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG,Mw:301.55g/mol,Sigma-aldrich#N1127)溶解于100ml MES缓冲液pH 6.4中,并且在4℃暗处储存至多7天。

[0435] 终止试剂(10%Na₂CO₃):溶解20.0g Na₂CO₃于200ml ddH₂O中,通过0.2μm过滤器过滤溶液,并且在室温下储存至多1个月。

[0436] 过程:

[0437] 在MES缓冲液pH 6.4中制备酶样品的系列稀释物,并且将10μl各个样品稀释液转移到微量滴定板(96孔规格)的孔内,其包含90μl pH 6.4的ONPG底物。使用Thermomixer(Comfort Thermomixer,Eppendorf)混合样品并且在37℃下温育5分钟,并且随即将100μl终止试剂加入到各个孔来终止反应。使用MES缓冲液pH 6.4取代酶样品来构建空白。在酶标仪(ELISA reader,SpectraMax platereader,Molecular Device)上测量在420nm下相对于该空白的吸光度增加。

[0438] 酶活性的计算:

[0439] 测定MES缓冲液pH 6.4中2-o-硝基酚(Sigma-aldrich#33444-25G)的摩尔消光系

数($0.5998 \times 10^{-3} \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)。将一个单位(U)的乳糖酶活性(LAU)定义为对应于每分钟 $1 \mu\text{mol}$ 的ONPG的水解的活性。使用具有 $200 \mu\text{L}$ 总反应体积(0.52cm 的光路)的微量滴定板,每mL酶样品的乳糖酶活性可使用下列公式计算:

$$[0440] \quad \text{LAU/ml} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{分钟} \cdot \text{mL}} \right) = \frac{\text{Abs}_{420} \times 200 \mu\text{L} \times \text{稀释因子}}{0.5998 \cdot 10^{-3} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times 0.52 \text{cm} \times 5 \text{分钟} \times 0.01 \text{mL}}$$

[0441] BIF_917比活的计算在此以SEQ ID NO:1来示出:

[0442] BIF_917浓度的测定:

[0443] 使用Criterion无染色SDS-page系统(BioRad)测定定量的目标酶(BIF_917)和截短产品。以Serva Tris-甘氨酸/SDS缓冲液(BioRad cat.#42529)使用任意kD无染色预制凝胶4-20%Tris-HCl,18孔(Comb#345-0418)。使用以下参数运行凝胶:200V,120mA,25W,50分钟。使用BSA(1.43mg/ml)(Sigma-Aldrich,cat.#500-0007)作为蛋白质标准品,并且以Image Lab软件(BioRad)使用Criterion Stain Free Imager(BioRad)来以色氨酸含量相关性带密度进行定量。

[0444] 通过两组独立发酵(如方法1中描述)的粗发酵物(超滤浓缩物)并使用5组不同稀释度(见表1a)来测定BIF_917的LAU比活。

[0445] BIF_917的比活据发现为 21.3LAU/mg 或者 0.0213LAU/ppm 。

[0446] 表1a:BIF_917比活的测定

[0447]

样品 ID	酶	发酵	稀释因子	活性	蛋白质 (BIF_917)浓度	蛋白质 (BIF_917)浓度	比活	比活
				LAU/ml	mg/ml	ppm	LAU/mg	LAU/ppm

[0448]

1	BIF_917	a	5	26.9	1.23	1232	21.9	0.0219
2	BIF_917	a	10	53.9	2.44	2437	22.1	0.0221
3	BIF_917	a	10	75.4	3.56	3556	21.2	0.0212
4	BIF_917	a	20	163.9	7.78	7778	21.1	0.0211
5	BIF_917	a	30	233.6	11.06	11065	21.1	0.0211
6	BIF_917	b	5	30.26825	1.34	1342	22.6	0.0226
7	BIF_917	b	10	55.91536	2.61	2607	21.4	0.0214
8	BIF_917	b	10	76.96056	3.70	3697	20.8	0.0208
9	BIF_917	b	20	156.986	7.75	7755	20.2	0.0202
10	BIF_917	b	30	236.9734	11.45	11452	20.7	0.0207
						Arg	21.3	0.0213
						Std	0.70097 6	0.000701

[0449] 实施例1a[0450] 测定BIF截短变体的β-半乳糖苷酶活性

[0451] 8种不同的截短变体:如所描述使用方法1a构建BIF_917、BIF_995、BIF_1068、BIF_1172、BIF_1241、BIF1326、BIF_1400和BIF_1478,并且如方法2a中所述进行纯化(见图6)。

[0452] 使用如上描述的方法3a测定在纤维二糖存在或者不存在下,全部截短变体的β-半乳糖苷酶活性。

[0453] 结果

[0454] 通过针对各个变体所测量的β-半乳糖苷酶活性来计算转半乳糖基化活性比率($(\text{Abs}_{420}^{\text{纤维二糖}}/\text{Abs}_{420}^{\text{纤维二糖}})*100$)并且示于图6中。具有1241个残基(包括其信号肽)或更小长度的变体表现出高于100%的转半乳糖基化活性比率,说明这些变体主要进行转半乳糖基化。具有多于1241个残基长度的变体表现出低于100%的转半乳糖基化活性比率,说明这些变体主要是水解性的。BIF_917和BIF_995具有约250%的最高转半乳糖基化活性比率。

[0455] 实施例2a[0456] 酸奶基质中GOS的生成

[0457] 在酸奶应用模拟中测试BIF酶在GOS制备中的评估。在96孔MTP板中使用酸奶混合物进行100μl体积的批量实验,该混合物由98,60%(w/v)新鲜的巴氏灭菌的低脂乳(Mini-mælk, Arla Foods, Denmark)和1.4%(w/v)Nutrilac YQ-5075乳清成分(Arla)组成。为了完全水解Nutrilac YQ-5075,将混合物搅拌20小时,然后加入20mM磷酸钠pH 6.5来确保6.5的pH。这一乳基不加处理地使用,并且乳糖浓度测定为5.5%(w/v),对应于该溶液中

的5.3%(w/v)。下列关联在本实施例中是有效的:1%(w/v)乳糖=0.9587%(w/w)乳糖。将90 μ l乳基与10 μ l纯化的酶混合,用胶带密封并且在43 $^{\circ}$ C下温育3小时。以100 μ l 10%Na₂CO₃终止反应。样品储存在-20 $^{\circ}$ C。

[0458] HPLC方法

[0459] 通过HPLC实施对低聚半乳糖(GOS)、乳糖、葡萄糖以及半乳糖的定量。在Dionex ICS 3000上进行样品分析。IC参数如下:流动相:150mM NaOH,流速:等度,0,25ml/min,柱:Carbopac PA1,柱温:室温,进样体积:10 μ L,检测器:PAD,积分:手动,样品制备:Milli-Q水中100倍稀释(0,1ml样品+9,9ml水),并且通过0.45 μ m注射式过滤器进行过滤,定量:占标准品峰面积的峰面积百分比。使用GOS浆液(Vivinal GOS,Friesland Campina)作为GOS定量的标准。在本实施例中,术语“GOS”定义为具有3或者以上聚合度(DP)的低聚半乳糖。

[0460] 结果

[0461] 在乳基中由BIF_917、BIF_995和BIF_1326所生成的定量的GOS的量在表7中示出。可见,与BIF_1326生成的低于0.1%(w/v)的GOS产物相比,更短的变体BIF_917和BIF_995具有显著(通过在95%置信区间的单侧t分布检验来测定)更高的约1.2%(w/v)的GOS产物。

[0462] 实施例3a

[0463] 截短变体的降解模式

[0464] 包括BIF1230与BIF1325间区域的文库订购于GeneART(Regensburg,Germany)(见表2a)。如方法1a中所描述来制备截短变体。对所得的多肽进行SDS_PAGE分析,并且用Simply Blue Safestain(Invitrogen,Cat#LC6060)进行可视化(图8)。

[0465] 结果

[0466] 出人意料地,大多数变体在最终的培养液中受到蛋白酶解修饰,在发酵终止时出现了不同量的目标带。该变体产生了具有不同密度的三条不同带,其使用质谱进行验证。变体具有C末端截短,BIF_917对应于SEQ ID NO:1的末端,BIF995对应于SEQ ID NO:2的末端,并且BIF1068对应于SEQ ID NO:3的末端。

[0467] 切自凝胶的蛋白带(在图8中以箭头标记)使用三种不同酶进行消化,作为用于质谱分析的准备。胰蛋白酶在精氨酸(R)和赖氨酸(K)残基的羧基侧特异性地水解肽键,脯氨酸(P)在羧基侧的情况除外。 α -糜蛋白酶特异性地在酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和亮氨酸(L)的羧基侧水解肽键,脯氨酸(P)在羧基侧的情况除外。Glu-C优选地在碳酸氢铵缓冲液pH 8中对谷酰基的羧基侧进行裂解,如果水解在磷酸盐缓冲液pH 8中进行则也对天冬氨酰基(D)的羧基侧进行裂解。

[0468] 为了检测C末端而制备了所关注的蛋白以用于分析,其使用我们用于蛋白表征的基本方法(A2963),其具有在消化缓冲液中使用40%¹⁸O-水的一个改动。理论上蛋白水解裂解应将¹⁸O-水和¹⁶O-水均掺入所得的多肽中,因此其应表现为双峰。蛋白质C末端却应仅表现为具有¹⁶O-水的单肽,这是因为其并未裂解,而仅仅是该蛋白质留下的“最后的肽”。以此方式,使用MS/MS分析标测了C末端。

[0469] 表2a:

[0470] 变体

[0471]

名称	SEQ ID NO: 6 的片段	孔	
BIF_1230	1	1201	A01
BIF_1231	1	1202	B01
BIF_1232	1	1203	C01
BIF_1233	1	1204	
BIF_1234	1	1205	
BIF_1235	1	1206	D01
BIF_1236	1	1207	
BIF_1237	1	1208	E01
BIF_1238	1	1209	F01
BIF_1239	1	1210	G01
BIF_1240	1	1211	A02
BIF_1241	1	1212	B02

[0472]

BIF_1242	1	1213	C02
BIF_1243	1	1214	
BIF_1244	1	1215	E02
BIF_1245	1	1216	F02
BIF_1246	1	1217	G02
BIF_1247	1	1218	H02
BIF_1248	1	1219	A03
BIF_1249	1	1220	B03
BIF_1250	1	1221	C03
BIF_1251	1	1222	D03
BIF_1252	1	1223	E03
BIF_1253	1	1224	
BIF_1254	1	1225	F03
BIF_1255	1	1226	G03
BIF_1256	1	1227	H03
BIF_1257	1	1228	A04
BIF_1258	1	1229	B04
BIF_1259	1	1230	C04
BIF_1260	1	1231	D04
BIF_1261	1	1232	
BIF_1262	1	1233	E04
BIF_1263	1	1234	F04
BIF_1264	1	1235	G04
BIF_1265	1	1236	H04
BIF_1266	1	1237	A05
BIF_1267	1	1238	B05
BIF_1268	1	1239	C05
BIF_1269	1	1240	D05
BIF_1270	1	1241	E05
BIF_1271	1	1242	F05
BIF_1272	1	1243	G05
BIF_1273	1	1244	H05
BIF_1274	1	1245	A06
BIF_1275	1	1246	B06
BIF_1276	1	1247	C06
BIF_1277	1	1248	D06
BIF_1278	1	1249	E06
BIF_1279	1	1250	
BIF_1280	1	1251	F06
BIF_1281	1	1252	G06
BIF_1282	1	1253	H06
BIF_1283	1	1254	A07
BIF_1284	1	1255	
BIF_1285	1	1256	
BIF_1286	1	1257	
BIF_1287	1	1258	B07
BIF_1288	1	1259	

[0473]	BIF_1289	1	1260	C07
	BIF_1290	1	1261	D07
	BIF_1291	1	1262	
	BIF_1292	1	1263	E07
	BIF_1293	1	1264	
	BIF_1294	1	1265	
	BIF_1295	1	1266	F07
	BIF_1296	1	1267	G07
	BIF_1297	1	1268	
	BIF_1298	1	1269	H07
	BIF_1299	1	1270	A08
	BIF_1300	1	1271	B08
	BIF_1301	1	1272	C08
	BIF_1302	1	1273	D08
	BIF_1303	1	1274	E08
	BIF_1304	1	1275	F08
	BIF_1305	1	1276	G08
	BIF_1306	1	1277	H08
	BIF_1307	1	1278	A09
	BIF_1308	1	1279	B09
	BIF_1309	1	1280	
	BIF_1310	1	1281	
	BIF_1311	1	1282	
	BIF_1312	1	1283	C09
	BIF_1313	1	1284	
	BIF_1314	1	1285	
	BIF_1315	1	1286	D09
	BIF_1316	1	1287	E09
	BIF_1317	1	1288	F09
	BIF_1318	1	1289	G09
	BIF_1319	1	1290	H09
	BIF_1320	1	1291	A10
	BIF_1321	1	1292	B10
	BIF_1322	1	1293	C10
	BIF_1323	1	1294	D10
	BIF_1324	1	1295	E10
	BIF_1325	1	1296	F10

[0474] 实施例4a

[0475] 乳基和酸奶中原位酶促生成的GOS

[0476] 在本实施例中,术语“GOS”定义为具有3或者以上聚合度(DP)的低聚半乳糖。

[0477] 由BIF_917和BIF_995生产的GOS的评估是通过不同凝固型酸奶中的原位应用来检测的。将 β -半乳糖苷酶添加到乳基中,同时加入特定的酸奶培养物,使得转半乳糖基化反应连同酸奶发酵过程一起进行。

[0478] 初始酸奶(凝固型)批量实验由100mL乳基(酸奶混合物)构成。乳基由98.60%(w/v)新鲜的巴氏灭菌的常规(非有机)低脂乳(**Mini-mælk** 0.5%脂肪, Arla Foods Amba, Denmark)和1.4%(w/v)Nutrilac YQ-5075乳清成分(Arla Foods Ingredients, Denmark)组成,产生了5.5%(w/w)的乳糖浓度,其对应于5.3%(w/w)(1%(w/v)乳糖=0.9587%(w/w)溶液中的乳糖)。为了完全水化Nutrilac YQ-5075,将混合物置于4°C下弱搅拌20小时。在初始实验中,使用了冷冻干燥的YO-MIX 485LYO培养物,其由保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*)和嗜热链球菌(DuPont Nutrition Biosciences, Denmark)组成。将10g YO-MIX 485LYO加入到400mL UHT常规(非有机)乳(**Let-mælk** 1.5%脂肪, Arla Foods Amba, Denmark)中制成初始的稀释培养物。每升乳基加

入1.43mL稀释培养物。将100mL乳基分入250mL蓝盖瓶中,以最终酸奶混合物1%的组成加入变化浓度(10ppm、20ppm和40ppm,对应于如方法4a所描述的0.213、0.426和0.853LAU)的酶。在43℃下实施酸奶发酵并且在10小时后在冰上迅速冷却。通常以两组重复进行发酵,并且发酵后次日通过HPLC分析酸奶的糖/低聚糖组成(参见以下HPLC方法)。发酵的酸奶样品通常储存于4℃。

[0479] 初始酸奶实验的结果示于表3a中。可见,BIF_917或者BIF_995从10ppm到40ppm的增加剂量导致最终酸奶中增加的GOS含量和降低的DP2量(包括乳糖)。两种变体性能上的区别在HPLC测定的差异之内,并且其可总结为两种变体在研究的剂量内表现类似。

[0480] 表3a 用增加的剂量的BIF_917和BID995处理的发酵酸奶中DP2糖(主要为乳糖)和GOS(DP3+)的含量。全部结果为三次独立测量的平均值。

[0481]

	量 w/v %		量 w/v %	
	DP2 包括乳糖	标准偏差	GOS (DP3+)	标准偏差

[0482]

酸奶	BIF 917 10ppm	2.191	0.092	1.249	0.051
	BIF 917 20ppm	1.296	0.047	1.882	0.056
	BIF 917 40ppm	0.970	0.019	2.346	0.047
	BIF 995 10ppm	2.787	0.139	1.158	0.035
	BIF 995 20ppm	1.494	0.075	1.649	0.082
	BIF 995 40ppm	0.931	0.028	2.392	0.063
	H2O	4.219	0.127	0.000	0.000
乳基	5.500	0.156	0.000	0.000	

[0483] 凝固型酸奶由7.5%w/v(对应于7.1%w/w,根据1%w/v乳糖=在该溶液中的0.9423%w/w)的更高初始乳糖浓度制成,以研究它对在最终酸奶中达到的GOS浓度的影响。应用下列过程:

[0484] 1.混合全部粉末成分(列于表4a中)并且在4-5℃良好搅拌下将干燥的共混物加入到乳/水中,置于4℃下水化20小时。

[0485] 2.将乳基预热到65℃(P1)

[0486] 3.在65℃/200巴下对乳基进行均化

[0487] 4.将乳基于95℃下巴氏灭菌6分钟(P3)

[0488] 5.将乳基冷却到5℃(K2)

[0489] 表4a 凝固型酸奶成分表,%(w/w)

[0490]

成分, %(w/w)	
成分名称	
脱脂乳 (Skummet-mælk 0.1%脂肪, Arla Foods Amba, Denmark)	93.533
奶油 38%脂肪(Arla Foods Amba, Denmark)	1.067
Nutrillac YQ5075 (Arla Foods Ingredients, Denmark)	1.400
乳糖(Variolac [®] 992 BG100, Arla Foods Amba, Denmark)	3.000
酶/H2O	1.000
总计%	100

[0491] 遵循上述过程,将乳基加热到43°C(K1)。由保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌(DuPont Nutrition Biosciences,Denmark)组成的培养物Y0-MIX 495的稀释在发酵温度下完成。将250mL乳基分入500mL蓝盖瓶中,以最终酸奶混合物1%的组成加入变化浓度的酶。以每100升20 DCU(DuPont Culture Units)剂量来加入起始培养物Y0-Mix 495,其中一个DCU是1000亿个细胞,根据菌落形成单位而测量。对每个试验制备了三组样品。在43°C进行发酵至pH 4.6下并且随后通过迅速冷却到5°C进行终止。发酵后次日通过HPLC来分析酸奶的糖/低聚糖组成(参见以下HPLC方法)。发酵的酸奶样品通常储存于4°C。

[0492] 酸奶实验的结果示于表5a中。可见,与以5.5%(w/v)的初始乳糖所达到的GOS相比,更高的初始乳糖(7.5%w/v)提高了酸奶中生成的总GOS,如表3a中所示。2.954%的最终GOS浓度用50ppm剂量的受测BIF_917实现,而2.662%GOS用25ppm BIF_917实现。与之相比,来自乳酸克鲁维酵母(GODO-YNL2,GODO SHUSEI Co.,Ltd.,Japan)的传统水解性β-半乳糖苷酶以25ppm的剂量产生0.355%GOS。在空白酸奶中观察到2.127%的乳糖浓度的降低,在其中加入了相同量H2O以替换酶。

[0493] 表5a 用增加的剂量的BIF_917和乳酸克鲁维酵母属β-半乳糖苷酶处理的发酵的酸奶中DP2糖(主要为乳糖)和GOS(DP3+)的含量。

[0494]

		量 w/v %		量 w/v %	
		DP2 包括乳糖	标准偏差	DP3+ (GOS)	标准 偏差
酸奶	BIF_917_12,5ppm	3.295	0.224	1.525	0.197
	BIF_917_25ppm	2.090	0.045	2.662	0.003
	BIF_917_50ppm	1.395	0.090	2.954	0.202
	乳酸克鲁维酵母属 β- Gal 25ppm	0.425	0.040	0.355	0.006
	H2O	5.431	0.099	0.000	0.000
乳基	H2O	7.558	0.265	0.000	0.000

[0495] 为测试在酸奶发酵中酸化对BIF_917性能的影响,以三组不同的Y0混合培养物建立了研究,其全部由保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌(DuPont Nutrition Biosciences, Denmark)组成:Y0-MIX 495具有相对慢的发酵时间;Y0-MIX 495具有相对快的发酵时间并且Y0-MIX 601具有延长的停滞期以及强酸化发酵。全部发酵以相同量的BIF_917(25ppm)在

43℃进行。

[0496] 除了测试温度对BIF_917性能的影响外,还在43℃、45℃和47℃下以Y0-MIX 495和25ppm BIF_917进行发酵。

[0497] 应用以下过程来以7.5%(w/v)(对应7.1%w/w,根据1%w/v乳糖=在溶液中的0.9423%w/w)的初始乳糖浓度生产凝固型酸奶:

[0498] 1.混合全部粉末成分(列于表6a中)并且在4-5℃良好搅拌下将干燥的共混物加入到乳/水中,置于4℃下水化20小时。

[0499] 2.将乳基预热到65℃(P1)

[0500] 3.在65℃/200巴下对乳基进行均化

[0501] 4.将乳基于95℃下巴氏灭菌6分钟(P3)

[0502] 5.将乳基冷却到5℃(K2)

[0503] 6.将乳基加热到43℃(K1)。培养物Y0-MIX 495、485和601(DuPont Nutrition Biosciences,Denmark)的稀释在发酵温度下完成。

[0504] 7.将100mL乳基分入到250mL蓝盖瓶中,以最终酸奶混合物1%的组成加入变化浓度的酶。

[0505] 8.以每100升20DCU(DuPont Culture Units)剂量来加入起始培养物Y0-Mix 495、485或者601。对每个试验制备了三组样品。

[0506] 9.在43℃下进行发酵至pH 4.6(分别在43℃、45℃和47℃下进行温度研究),并且通过迅速冷却到5℃进行终止。

[0507] 10.发酵后次日通过HPLC分析酸奶的糖/低聚糖组分(参见以下HPLC方法)。发酵的酸奶样品通常储存于4℃。

[0508] 表6a 凝固型酸奶成分表,%(w/w)

[0509]

成分, %(w/w)	
成分名称	
脱脂乳 (Skummet-mælk 0.1%脂肪, Arla Foods Amba, Denmark)	93.533
奶油 38%脂肪(Arla Foods Amba, Denmark)	1.067
Nutrillac YQ5215 (Arla Foods Ingredients, Denmark)	1.400
乳糖(Variolac [®] 992 BG100, Arla Foods Amba, Denmark)	3.000
酶/H2O	1.000
总计%	100

[0510] 酸奶实验的结果示于表7a中。可见,具有不同酸化特征的不同的Y0混合发酵物对最终GOS收率无显著影响。产生了平均3.22%(w/v)GOS并且以Y0混合物485生产的酸奶中所见的最高GOS浓度(3.300%)处于定量的差异内。发酵温度从43℃到45℃以及47℃的变化并不显著地(使用在95%置信区间的单侧t分布检验)改变在任意酸奶中所产生的GOS的量:在43℃下为3,258%w/v,在45℃下为3,375%w/v并且在47℃下为3,236%w/v。因此,可得出结论,在所研究的条件下,BIF_917的作用对于使用各种培养物和温度条件的酸奶中GOS的原位生成是稳定的。

[0511] 表7a 用BIF_917处理的发酵型酸奶中DP2、DP3、DP4、DP5、DP6、葡萄糖和半乳糖的

含量。

[0512]

样品	酶剂量	发酵培养物	发酵温度	量 w/v%	量 w/v%	量 w/v%	量 w/v%	量 w/v%	量 w/v%	量 w/v%	量 w/v%	量 w/v%
				DP2 包括乳糖	葡萄糖	半乳糖	DP3 (GOS)	DP4 (GOS)	DP5 (GOS)	DP6 (GOS)	DP3+ (GOS)	
乳基				7.25 9	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.000
酸奶	BIF_917_25p pm	YM 495	43 °C	5.46 6	0.00 0	0.44 8	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.000
	BIF_917_25p pm	YM 495	43 °C	1.77 0	1.36 8	0.64 8	2.06 7	0.79 3	0.26 0	0.07 4	3.194	
	BIF_917_25p pm	YM 485	43 °C	1.86 0	1.25 9	0.60 9	2.06 5	0.83 0	0.30 2	0.10 3	3.300	
	BIF_917_25p pm	YM 601	43 °C	1.71 2	1.41 8	0.83 2	2.09 4	0.78 0	0.24 8	0.06 8	3.189	
	BIF_917_25p pm	YM 495	43 °C	1.76 1	1.34 4	0.64 2	2.08 6	0.81 3	0.27 5	0.08 4	3.258	
	BIF_917_25p pm	YM 495	45 °C	1.83 8	1.32 3	0.62 5	2.12 8	0.84 8	0.30 1	0.09 9	3.375	
	BIF_917_25p pm	YM 495	47 °C	1.73 9	1.40 6	0.72 2	2.10 6	0.79 9	0.25 7	0.07 4	3.236	
				STD								
乳基				0.25 2	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.000
酸奶	BIF_917_25p pm	YM 495	43 °C	0.22 5	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.00 0	0.000
	BIF_917_25p pm	YM 495	43 °C	0.07 5	0.06 7	0.03 9	0.08 0	0.03 1	0.01 0	0.00 2	0.123	
	BIF_917_25p	YM 485	43 °C	0.09	0.06	0.01	0.08	0.03	0.01	0.00	0.136	

[0513]

pm			0	3	5	4	3	2	8	
BIF_917_25p pm	YM 601	43 °C	0.01 3	0.01 4	0.01 7	0.01 8	0.01 0	0.00 6	0.00 2	0.037
BIF_917_25p pm	YM 495	43 °C	0.04 2	0.03 1	0.01 4	0.04 6	0.01 6	0.00 5	0.00 1	0.067
BIF_917_25p pm	YM 495	45 °C	0.07 1	0.05 0	0.01 3	0.06 1	0.02 8	0.01 2	0.00 7	0.108
BIF_917_25p pm	YM 495	47 °C	0.00 9	0.01 5	0.00 4	0.00 3	0.00 2	0.00 3	0.00 3	0.011

[0514] HPLC方法

[0515] 使用的所有化学试剂均为分析级。D-(+)-乳糖(最低99%,no.17814)、D-(+)-葡萄糖(最低99.5%,no G8270-100G,批号#036K0137)和D-(+)-galactose(最低99%,no G0750-25G,批号#031M0043V)购自Sigma(St.Louis,Mo,USA)。Vivinal GOS浆(货品号502675,批号#649566)购自Friesland Campina Domo(Amersfoort,The Netherlands),其包含占干物质(DM)57%的低聚半乳糖,占DM 21%的无水乳糖,占DM 20%的无水葡萄糖,以及占DM 0.8%的无水半乳糖。

[0516] 样品制备

[0517] 全部标准物:在双蒸水(ddH₂O)中制备乳糖、葡萄糖、半乳糖和GOS并且通过0.45μm注射器式过滤器进行过滤。制备了浓度范围从10ppm到200000ppm的各个标准物的组。

[0518] 为了评估酸奶/乳基质中上文糖组的定量,将上述标准物作为内参掺入乳和酸奶样品中。包含活性β-半乳糖苷酶的全部乳和酸奶样品通过加热样品到95℃10分钟进行灭活。全部乳样品在96孔MTP板中(Corning,NY,USA)制备并且最低稀释20倍,并且在分析前通过0.20μm 96孔板过滤器进行过滤(Corning过滤器平板,PVDF亲水膜,NY,USA)。将包含多于50000ppm(5%w/v)乳糖的样品加热到30℃以确保适当的增溶。在使用Ultra turrax TP18/10对样品进行几分钟均化之前(Janke&Kunkel Ika-labor technik,Bie&Berntsen,Denmark),全部酸奶样品经称重并且在ddH₂O中稀释10倍。在分析之前通过热处理对β-半乳糖苷酶进行灭活,并且将样品进一步在96孔MTP板中进行稀释并且通过0.20μm 96孔板过滤器进行过滤(Corning过滤器平板,PVDF亲水膜,NY,USA)。全部样品在以胶带密封的96孔MTP板中进行分析。

[0519] 仪器使用

[0520] 通过HPLC实施低聚半乳糖(GOS)、乳糖、葡萄糖以及半乳糖的定量。在Dionex Ultimate 3000HPLC系统上(Thermo Fisher Scientific)进行样品的分析,其配备有DGP-3600SD Dual-Gradient分析级液体输送泵、WPS-3000TSL恒温自动进样器、TCC-3000SD恒温柱温箱和RI-101折光率检测器(Shodex, JM Science)。使用Chromeleon色谱数据系统软件(Version 6.80,DU10A Build 2826,171948)进行数据采集和分析。

[0521] 色谱条件

[0522] 在70℃下使用Ag⁺4%交联的RSO低聚糖柱(Phenomenex,The Netherlands)通过HPLC分析样品,其配备有分析保护柱(Carbo-Ag⁺neutral,AJ0-4491,Phenomenex,The Netherlands)。用双蒸水(通过再生0.45μm纤维素膜进行过滤并且用氦气吹扫)以0.3ml/min的流速洗脱柱。

[0523] 分析的全程保持0.3ml/min的恒流,其具有37分钟的总运行时间并且注射体积设为10μL。样品在恒温自动进样器室中保持在30℃以确保乳糖的溶液化。通过折光率检测器监测洗脱液,并且通过相对于给定的标准峰面积的峰面积进行定量。将在Vivinal GOS浆(Friesland Food Domo,The Netherlands)中具有三或者更高程度(DP3+)的峰作为标准用于GOS定量,遵循产品中GOS含量的制造商声明。

[0524] 用于下列方法的材料和方法

[0525] 方法1

[0526] 源自两歧双歧杆菌的β-半乳糖苷酶的制备

[0527] β -半乳糖苷酶BIF_917(SEQ ID No.1)的制备在适当的芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)宿主中进行制备,BIF_917在aprE启动子的控制下通过复制性质粒表达,如PCT申请PCT/EP2013/061819中所描述。

[0528] 简而言之,在包含10 μ g/mL新霉素的LB培养基中建立预培养物,并且在37 $^{\circ}$ C下180rpm振荡培养7小时。使用500 μ L的这一预培养物来接种50mL含10 μ g/mL新霉素的Grant's改良培养基,并使其在33 $^{\circ}$ C下180rpm振荡生长68小时。

[0529] 将终浓度为1mg/ml的溶菌酶(Sigma-Aldrich)和10U/ml核酸酶(Merck)直接加入到培养基中并且在33 $^{\circ}$ C下180RPM温育1小时来裂解细胞。在10,000 \times g下离心20分钟来清理裂解物并且随即进行无菌过滤。

[0530] 根据下列说明制备Grant's改良培养基:

[0531] 第I部分(高压灭菌)

[0532] 大豆脲 10g

[0533] 调至 500mL每升

[0534] 第II部分

1M K₂HPO₄ 3mL

葡萄糖 75g

[0535] 脲 3.6g

Grant's 10 \times MOPS 100mL

调至 400mL 每升

[0536] 制备第I部分(2w/w%大豆脲)并且在121 $^{\circ}$ C下高压灭菌25分钟。

[0537] 制备第II部分并且与第I部分混合,并且用HCl/NaOH将pH调节到pH7.3。

[0538] 将体积调至满体积并且通过0.22- μ m PES过滤器进行消毒。

[0539] 根据下列说明制备10 \times MOPS缓冲液:

83.72g Tricine

7.17g KOH 片

[0540] 12 g NaCl

29.22g 0.276M K₂SO₄

10mL 0.528M MgCl₂

10mL Grant's 微量营养物 100 \times

[0541] 用水调至约900mL并且溶解。用KOH调节pH至7.4,装至1L并且通过0.2 μ m PES过滤器对溶液进行无菌过滤。

[0542] 根据下列说明制备100 \times 微量营养素:

[0543]

柠檬酸钠.2H ₂ O	1.47g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.47g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.4g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.1g
ZnSO ₄ .H ₂ O	0.1g
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.05g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.1g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.1g

[0544] 溶解并且用水将容积调至1L。

[0545] 通过0.2um PES过滤器进行消毒。

[0546] 在4℃下避光储存。

[0547] 方法2

[0548] LAU活性的测定

[0549] 原理:

[0550] 该测定法的原理是,在37℃下乳糖酶将2-o-硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)水解为2-o-硝基酚(ONP)和半乳糖。用碳酸钠终止反应,在分光光度计或者色度计中在420nm下测量释放的ONP。

[0551] 试剂:

[0552] MES缓冲液pH 6.4(100mM MES pH 6.4,10mM CaCl₂):将19,52g MES水合物(Mw:195.2g/mol,Sigma-aldrich#M8250-250G)和1.470g CaCl₂二水合物(Mw:147.01g/mol,Sigma-aldrich)溶解于1000ml ddH₂O中,用10M NaOH将pH调节至6.4。通过0.2μm过滤器过滤溶液,并且在4℃储存至多1个月。

[0553] ONPG底物pH 6.4(12.28mM ONPG,100mM MES pH 6.4,10mM CaCl₂):将0.370g 2-o-硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG,Mw:301.55g/mol,Sigma-aldrich#N1127)溶解于100ml MES缓冲液pH 6.4中,并且在4℃暗处储存至多7天。

[0554] 终止试剂(10%Na₂CO₃):溶解20.0g Na₂CO₃于200ml ddH₂O中,通过0.2μm过滤器过滤溶液,并且在室温下储存至多1个月。

[0555] 过程:

[0556] 在MES缓冲液pH 6.4中制备酶样品的系列稀释物,并且将10μL的各个样品稀释液转移至微滴定板(96孔规格)的孔内,其包含90μl ONPG底物pH 6.4。使用Thermomixer (Comfort Thermomixer,Eppendorf)混合样品并且在37℃下温育5分钟,并且随即将100μl终止试剂加入到各个孔来终止反应。使用MES缓冲液pH 6.4取代酶样品来构建空白。在酶标仪(ELISA reader,SpectraMax platereader,Molecular Device)上针对该空白测量在420nm处吸光度的增加。

[0557] 酶活性的计算:

[0558] 测量MES缓冲液pH 6.4中2-o-硝基酚(Sigma-aldrich#33444-25G)的摩尔消光系数($0.5998 \times 10^{-3} \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)。将一个单位(U)的乳糖酶活性(LAU)定义为对应于37℃下每分钟1μmol的ONPG的水解的活性。使用具有200μL总反应体积(0.52cm的光路)的微量滴定板,每mL酶样品的乳糖酶活性可使用下列公式计算:

$$[0559] \quad \text{LAU/ml} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{分钟} \cdot \text{mL}} \right) = \frac{\text{Abs}_{420} \times 200\mu\text{L} \times \text{稀释因子}}{0.5998 \cdot 10^{-3} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times 0.52\text{cm} \times 5\text{分钟} \times 0.01\text{mL}}$$

[0560] 全部活性为三次独立测定的平均值。

[0561] BIF_917比活的计算在此以SEQ ID NO:1示出:

[0562] BIF_917浓度的测定:

[0563] 使用Criterion无染色SDS-page系统(BioRad)测定定量的目标酶(BIF_917)和截短产品。以Serva Tris-甘氨酸/SDS缓冲液使用任意kD无染色预制凝胶4-20%Tris-HCl,18孔(Comb#345-0418)(BioRad cat.#42529)。使用以下参数运行凝胶:200V,120mA,25W,50分

钟。BSA(1,43mg/ml)(Sigma-Aldrich,cat.#500-0007)用作蛋白质的标准品,并且以Image Lab软件(BioRad)使用Criterion Stain Free Imager(BioRad)来以色氨酸含量相关性带密度进行定量。

[0564] 通过两组独立发酵(如方法1中描述)的粗发酵物(超滤浓缩物)并使用5组不同稀释度(见表1)来测定BIF_917的LAU比活。

[0565] BIF_917的比活测定为21.3LAU/mg或者0.0213LAU/ppm。

[0566] 表1: BIF_917比活的测定

[0567]

样品 ID	酶	发酵	稀释因子	活性 LAU/ml	蛋白质 (BIF_917) 浓度 mg/ml	蛋白质 (BIF_917) 浓度 ppm	比活 LAU/mg	比活 LAU/ppm
1	BIF_917	a	5	26.9	1.23	1232	21.9	0.0219
2	BIF_917	a	10	53.9	2.44	2437	22.1	0.0221
3	BIF_917	a	10	75.4	3.56	3556	21.2	0.0212
4	BIF_917	a	20	163.9	7.78	7778	21.1	0.0211
5	BIF_917	a	30	233.6	11.06	11065	21.1	0.0211
6	BIF_917	b	5	30.26825	1.34	1342	22.6	0.0226
7	BIF_917	b	10	55.91536	2.61	2607	21.4	0.0214

[0568]

8	BIF_917	b	10	76.96056	3.70	3697	20.8	0.0208
9	BIF_917	b	20	156.986	7.75	7755	20.2	0.0202
10	BIF_917	b	30	236.9734	11.45	11452	20.7	0.0207
						Avr.	21.3	0.0213
						Std	0.700976	0.000701

[0569] 方法3

[0570] 通过HPLC对低聚半乳糖定量

[0571] 样品制备

[0572] 全部标准物:在双蒸水(ddH₂O)中制备乳糖、葡萄糖、半乳糖和GOS并且通过0.45μm注射器式过滤器进行过滤。制备了浓度范围从10到200,000ppm的各个标准物的组。

[0573] 为了评估酸奶/乳基质中上文糖组的定量,将上述标准物作为内参掺入乳和酸奶样品中。包含活性β-半乳糖苷酶的全部乳和酸奶样品通过加热样品到95℃10分钟进行灭活。全部乳样品在96孔MTP板中(Corning, NY, USA)制备并且最低稀释20倍,并且在分析前通过0.20μm 96孔板过滤器进行过滤(Corning过滤器平板, PVDF亲水膜, NY, USA)。将包含多于50,000ppm(5% w/v)乳糖的样品加热到30℃以确保适当的增溶。在使用Ultra turrax TP18/10对样品进行均化几分钟之前,全部酸奶样品经称重并且在ddH₂O中稀释10倍(Janke&Kunkel Ika-labortechnik, Bie&Berntsen, Denmark)。β通过热处理对β-半乳糖苷酶进行灭活,并且在分析之前还将样品在96孔MTP板中进行稀释并且通过0.20μm 96孔板过滤器进行过滤(Corning filter plate, PVDF hydrophile membrane, NY, USA)。全部样品在以胶带密封的96孔MTP板中进行分析。

[0574] 仪器使用

[0575] 通过HPLC实施对低聚半乳糖(GOS)、乳糖、葡萄糖以及半乳糖的定量。在Dionex Ultimate 3000HPLC系统上(Thermo Fisher Scientific)进行样品的分析,其配备有DGP-3600SD Dual-Gradient分析级液体输送泵、WPS-3000TSL恒温自动进样器、TCC-3000SD恒温柱温箱和RI-101折光率检测器(Shodex, JM Science)。使用Chromeleon色谱数据系统软件(Version 6.80, DU10A Build 2826, 171948)进行数据采集和分析。

[0576] 色谱条件

[0577] 在70℃下使用Ag⁺4%交联的RSO低聚糖柱(Phenomenex, The Netherlands)通过HPLC分析样品,其配备有分析保护柱(Carbo-Ag⁺neutral, AJ0-4491, Phenomenex, The Netherlands)。用双蒸水(通过再生0.45μm纤维素膜进行过滤并且用氦气吹扫)以0.3ml/min的流速洗脱柱。

[0578] 分析的全程保持0.3ml/min的恒流,其具有37分钟的总运行时间并且注射体积设为10μL。样品在恒温自动进样器室中保持在30℃以确保全部组分的溶液化。通过使用折光率检测器(RI-101, Shodex, JM Science)监控洗脱液,通过相对于给定的标准峰面积的峰面积进行定量。将在Vivinal GOS浆(Friesland Food Domo, The Netherlands)中具有三或者更高程度(DP3+)的峰作为标准用于全部低聚半乳糖(DP3+)的定量,遵循产品中GOS含量的制造商声明。全部DP3+低聚半乳糖组分的相同应答的假设通过质量平衡来确认。

[0579] 实施例1

[0580] 乳中原位生成的低聚半乳糖的稳定性。

[0581] 在2周的时间段内,将原位β-半乳糖苷酶生成的GOS的稳定性与向乳基中加入制造和纯化的GOS进行了比较。在本实施例中,将BIF_917β-半乳糖苷酶(如上述方法1所描述的进行制备)添加到乳基以产生低聚半乳糖,随后该乳基不进行巴氏灭菌,并且因此无β-半乳糖苷酶的灭活。

[0582] 材料和方法:

[0583] 在4-5℃下,在金属容器(Service Teknik, Randers, Denmark)中将用于乳基的全部成分(脱脂乳、奶油、乳清蛋白和乳糖)进行混合(IKA-Werke, Staufen, Germany),工作体积为5L,并且在4℃下水化至少20小时(Service Teknik, 表2)。

[0584] 表2:

[0585] 用于生产巴氏灭菌的乳基的成分和量

[0586]

成分	量[g]
脱脂乳 (Skummet-mælk 0.1%脂肪, Arla Foods Amba, Denmark)	233.47
奶油 38%脂肪(Arla Foods Amba, Denmark)	2.03
Nutrilac YQ5215 (Arla Foods Ingredients, Denmark)	3.50
乳糖(Variolac [®] 992 BG100, Arla Foods Amba, Denmark)	7.50
YO-MIX 495 LYO (DuPont, France)	1.00
β-半乳糖苷酶或者 H ₂ O	2.50

[0587] 随即,在自组装的小型UHT设备(Service Teknik, Randers, Denmark)中将混合的成分预热到65℃并均化(65℃/200巴),并且然后加热到80℃。将均化的乳在95℃下巴氏灭菌6分钟并且随后冷却到5℃。收集精确的250mL巴氏灭菌乳用于GOS的原位生成。将巴氏灭菌乳加热到45℃并且加入2.5g(1%(w/v))β-半乳糖苷酶以引发GOS生产(对应于2.13LAU/

ml)。用水(2.5g;1%(w/v))替代β-半乳糖苷酶用于参考样品的生产,或者对于纯化的GOS的情况,使用了Vivinal GOS浆(Friesland Food Domo,The Netherlands)。反应持续3小时,之后该乳立即冷却到4℃并且存储直至分析。

[0588] 结果

[0589] GOS储存稳定性的结果示于表3中。可见在4℃(无酶)储存期间,在巴氏灭菌的乳基中未形成低聚半乳糖(GOS)并且在2周的储存时间段上所施用的纯化的GOS(参考)在乳基中稳定。因此,如所预期,在储存期间,在乳基系统中不存在明显GOS产生或降解。

[0590] 然而,在乳基中通过β-半乳糖苷酶原位生成的低聚半乳糖(GOS)的量从储存第一天所测量的3.679%(w/v)降低到2周(14天)后所测量的0.438%(w/v),在GOS浓度上总共降低88.1%。储存期间GOS的降低必须是由于活性β-半乳糖苷酶,此前显示了促进所形成的低聚半乳糖的水解(Park等人,Appl.Microbiol Biotechnol.2010,85,1279-1286)(Splechtna等人,J.Agric.Food Chem.2006,54,4999-5006)。

[0591] 表3. 测量在4℃下储存2周的在乳基中的GOS含量(如方法3中所描述的测定DP3+低聚半乳糖)。GOS是由BIF_917原位生成或者加入到乳基中(纯化的GOS参考)

[0592]

酶剂量	储存时间	量 w/v% GOS DP3+	标准偏差	变化* % (w/v) GOS DP3+
无	1天	0	0	0.000
无	3天	0	0	0.000
无	1周	0	0	0.000
无	2周	0	0	0.000
B-gal 所产生的 GOS	1天	3.679	0.037	0.000

[0593]

B-gal 所产生的 GOS	1周	1.334	0.039	-2.345
B-gal 所产生的 GOS	2周	0.438	0.035	-3.241
GOS 参考(纯化的)	1天	1.956	0.080	0.000
GOS 参考(纯化的)	1周	1.971	0.052	0.015
GOS 参考(纯化的)	2周	1.933	0.031	-0.023

[0594] * GOS DP3+浓度的变化是相对于第1天来计算的。

[0595] 实施例2

[0596] 在乳基巴氏灭菌前的批量加热步骤中β-半乳糖苷酶所生成的低聚半乳糖的稳定性。

[0597] 在本实施例中,在4℃下在2周的时间段内评估β-半乳糖苷酶原位生成的GOS的稳定性。使用延长滞留时间,在95℃巴氏灭菌之前,50℃下,将如上述方法1所描述而制备的BIF_917β-半乳糖苷酶于加入批量加热容器中的乳基中45分钟。

[0598] 材料和方法:

[0599] 在4℃-5℃下,将全部成分(脱脂乳、奶油、乳清蛋白和乳糖)在金属容器中与β-半乳糖苷酶BIF_917(对应于2.13LAU/ml)进行混合(IKA-Werke,Staufen,Germany)(Service

Teknik, Randers, Denmark), 工作体积为20L, 并且在4℃下水化至少24小时(Service Teknik, 表4)。

[0600] 表4:

[0601] 生产凝固型酸奶所采用的成分和量

[0602]

成分	量[g]
脱脂乳 (Skummet-mælk 0.1%脂肪, Arla Foods Amba, Denmark)	18958.0
奶油 38%脂肪(Arla Foods Amba, Denmark)	162
Nutrilac YQ5215 (Arla Foods Ingredients, Denmark)	280
乳糖(Variolac [®] 992 BG100, Arla Foods Amba, Denmark)	600
YO-MIX 495 LYO (DuPont, France)	80.8*
β-半乳糖苷酶或者 H ₂ O	200

[0603] *溶解于先前的巴氏灭菌的乳中

[0604] GOS经原位生成后, 将乳基称重进入到6×2500g桶内, 并且在自组装的小型UHT设备(Service Teknik, Randers, Denmark)中进行巴氏灭菌。简而言之, 将乳加热到65℃, 在200巴下进行均化, 并且随后加热到80℃, 在95℃下巴氏灭菌10分钟或者12分钟。随后, 将该乳冷却到30℃并且最终到5℃。精确收集1000mL巴氏灭菌的包含GOS的乳并且储存直至分析(5℃)。

[0605] 结果

[0606] 从表5的结果可见, 当乳基在95℃下10分钟或者12分钟进行巴氏灭菌时, 由BIF_917所产生的酸奶中低聚半乳糖(GOS)含量在2周的时间段内稳定。与第1天(巴氏灭菌10分钟)所见的3.452%(w/v)相比, 存储2周后所见的GOS的浓度为3.491%(w/v), 并且与第1天(巴氏灭菌12分钟)所见的3.451%(w/v)相比, 其为3.487%(w/v)。这一变化在测量的所观察到的标准偏差以内。

[0607] 表5. 测量在4℃下储存2周的乳基中的GOS含量(如方法3中所描述而测定的DP3+低聚半乳糖)。GOS是由β-半乳糖苷酶BIF_917原位生成。

[0608]

酶剂量	巴氏灭菌 温度 ℃	巴氏灭 菌时间 分钟	储存时间	量	标准偏差	变化*
				w/v% GOS DP3+		% (w/v) GOS DP3+
无	95	5	1天	0	0	0.000
无	95	5	3天	0	0	0.000
无	95	5	1周	0	0	0.000
无	95	5	2周	0	0	0.000
2.13 LAU	95	10	1天	3.452	0.0015	0.000
2.13 LAU	95	10	1周	3.440	0.057	-0.012
2.13 LAU	95	10	2周	3.491	0.057	0.039
2.13 LAU	95	12	1天	3.451	0.023	0.000
2.13 LAU	95	12	1周	3.480	0.160	0.029
2.13 LAU	95	12	2周	3.487	0.043	0.036

[0609] * GOS DP3+浓度的变化是相对于第1天来计算的。

[0610] 实施例3

[0611] 通过高于95℃的延时巴氏灭菌温度对BIF_917β-半乳糖苷酶的灭活。

[0612] 在本实施例中,在4℃下在2周的时间段内评估β-半乳糖苷酶原位生成的GOS的稳定性。将如方法1中所描述而制备的BIF_917β-半乳糖苷酶于在105℃和110℃下进行巴氏灭菌之前加入乳基中。

[0613] 材料和方法:

[0614] 在4℃-5℃下,将全部成分(脱脂乳、奶油、乳清蛋白和乳糖)在金属容器中与β-半乳糖苷酶BIF_917(对应于2.13LAU/ml)进行混合(IKA-Werke,Staufen,Germany)(Service Teknik,Randers,Denmark),工作体积为20L,并且在4℃下水化至少24小时(Service Teknik,表6)。

[0615] 表6:

[0616] 用于生产凝固型酸奶的成分和量

[0617]

成分	量[g]
脱脂乳 (Skummet-mælk 0.1%脂肪, Arla Foods Amba, Denmark)	18958.0
奶油 38%脂肪(Arla Foods Amba, Denmark)	162
Nutrilac YQ5215 (Arla Foods Ingredients, Denmark)	280
乳糖(Variolac [®] 992 BG100, Arla Foods Amba, Denmark)	600
YO-MIX 495 LYO (DuPont, France)	80.8*
β-半乳糖苷酶或者 H ₂ O	200

[0618] *溶解于先前的巴氏灭菌的乳中

[0619] GOS经原位生成后,将乳基称重进入到6×2500g桶内,并且在自组装的小型UHT设备(Service Teknik,Randers,Denmark)中进行巴氏灭菌。简而言之,将乳加热到65℃,在200巴下进行均化,并且随后加热到80℃,在105℃下8分钟或者110℃下6分钟进行巴氏灭

菌。随后,将该乳冷却到30℃并且最终到5℃。精确收集1000mL的巴氏灭菌的包含GOS的乳并且储存直到分析(5℃)。

[0620] 结果

[0621] 从表7的结果可见,当乳基在105℃或者110℃下分别巴氏灭菌6分钟或者8分钟的情况下,酸奶中由BIF_917所产生的低聚半乳糖(GOS)含量在2周的时间段内稳定。与在第1天(在105℃下巴氏灭菌8分钟)所见的3.329%(w/v)相比,存储2周后所见的GOS的浓度为3.514%(w/v),并且与在第1天(在110℃下巴氏灭菌6分钟)所见的3.436%(w/v)相比其为3.556%(w/v)。这一变化在测量的所观察到的标准偏差以内。

[0622] 表7. 测量在4℃下储存2周的乳基中的GOS含量(如方法3中所描述而测定的DP3+低聚半乳糖)。GOS是由β-半乳糖苷酶BIF_917原位生成。

[0623]

				量 w/v% GOS DP3+	标准偏差	变化* % (w/v) GOS DP3+
酶剂量	巴氏灭菌 温度	巴氏灭 菌时间	储存时间			
	℃	分钟				
无	95	5	1天	0	0	0.000
无	95	5	3天	0	0	0.000
无	95	5	1周	0	0	0.000
无	95	5	2周	0	0	0.000
无	95	5	4周	0	0	0.000
无	95	5	6周	0	0	0.000
2.13 LAU	105	8	1天	3.329	0.217	0.000
2.13 LAU	105	8	1周	3.461	0.096	0.132
2.13 LAU	105	8	2周	3.514	0.005	0.185
2.13 LAU	110	6	1天	3.436	0.077	0.000
2.13 LAU	110	6	1周	3.549	0.005	0.113
2.13 LAU	110	6	2周	3.556	0.034	0.120

[0624] * GOS DP3+浓度的变化是相对于第1天来计算的。

[0625] 实施例4

[0626] 使用直管式高温巴氏灭菌法对BIF_917β-半乳糖苷酶的灭活。

[0627] 在本实施例中,在乳基中随时间推移而测量了由β-半乳糖苷酶BIF_917原位生成的GOS的稳定性,该乳基已在121℃和142℃下使用直接高温巴氏灭菌进行了处理。

[0628] 材料和方法:

[0629] 在4℃-5℃下,在金属容器中将全部成分(脱脂乳、奶油、乳清蛋白和乳糖)与β-半乳糖苷酶BIF_917进行混合(IKA-Werke,Staufen,Germany)(Service Teknik,Randers,Denmark),工作体积为20L,并且在4℃下水化至少24小时(Service Teknik,表8)。

[0630] 表8:

[0631] 生产凝固型酸奶所采用的成分和量

[0632]

成分	量[g]
脱脂乳 (Skummet-mælk 0.1%脂肪, Arla Foods Amba, Denmark)	18958.0
奶油 38%脂肪(Arla Foods Amba, Denmark)	162
Nutrilac YQ5215 (Arla Foods Ingredients, Denmark)	280
乳糖(Variolac [®] 992 BG100, Arla Foods Amba, Denmark)	600
YO-MIX 495 LYO (DuPont, France)	80.8*
β -半乳糖苷酶或者 H ₂ O	200

[0633] *溶解于先前的巴氏灭菌的乳中

[0634] GOS经原位生成后,将乳基称重进入到6×2500g桶内,并且在自组装的小型UHT设备(Service Teknik,Randers,Denmark)中进行巴氏灭菌。简而言之,将乳加热到55℃持续16分钟,在200巴下进行均化,并且随后加热到80℃,在121℃或142℃下巴氏灭菌3秒钟或者15秒钟。随后,将该乳冷却到30℃并且最终到5℃。精确收集500mL的巴氏灭菌的包含GOS的乳并且储存直至分析(5℃)。

[0635] 结果

[0636] 包含GOS的样品通过三种不同方式的高温巴氏灭菌法进行巴氏灭菌:1)121℃下3秒钟,2)121℃下15秒钟以及3)142℃下3秒钟。从表9的结果可知,乳基中的低聚半乳糖(GOS)含量在2周的时间段内稳定。与第2周相比,在第1天所测量的GOS浓度中所观察的变化在测量的标准偏差内。然而,在142℃下管式巴氏灭菌法的乳基中检测到严重的Maillard反应(如褐变和异味的存在),可能是由于高温、提高浓度的还原糖和乳蛋白的组合所导致。

[0637] 表9. 在2周存储期间(4℃)的乳基中所测量的GOS含量(DP3+,如方法3中描述而测定)。由 β -半乳糖苷酶BIF 917原位生成的GOS。

[0638]

量 w/v%	标准偏差	变化* % (w/v)
-----------	------	----------------

酶剂量	巴氏灭菌 温度 ℃	巴氏灭 菌时间 秒	储存时间	GOS DP3+		
2.13 LAU	121	3	1天	3.530	0.129	0.000
2.13 LAU	121	3	1周	3.583	0.024	0.053
[0639] 2.13 LAU	121	3	2周	3.510	0.009	-0.020
2.13 LAU	121	15	1天	3.440	0.053	0.000
2.13 LAU	121	15	1周	3.549	0.140	0.109
2.13 LAU	121	15	2周	3.480	0.018	0.040
2.13 LAU	142	3	1天	3.415	0.072	0.000
2.13 LAU	142	3	1周	3.411	0.063	-0.004
2.13 LAU	142	3	2周	3.390	0.020	-0.025

[0640] * GOS DP3+浓度的变化是相对于第1天来计算的。

[0641] 实施例5[0642] BIF_917 β -半乳糖苷酶在磷酸盐缓冲液、乳或者无乳糖乳中的热稳定性。

[0643] 在本实施例中通过对通过巴氏灭菌法灭活BIF_917(如方法1中所述制备)的能力进行

了研究。在三种不同溶液：磷酸盐缓冲液、乳或者无乳糖乳中分别在60℃、72℃和95℃下进行实验室规模的巴氏灭菌实验。

[0644] 材料和方法：

[0645] 将三种不同的溶液预热到给定的巴氏灭菌温度：1)20mM磷酸钠缓冲液pH 7.0、2)乳基(与用于实施例1的乳基相同，见表2中的成分表)以及3)无乳糖乳(Laktose-fri, **Mini-mælk** 0.5%脂肪, Arla Foods Amba, Denmark)。

[0646] 使用Eppendorf comfort恒温混匀仪(Eppendorf AG, Germany)在实验室规模巴氏灭菌测定法中测定LAU活性的相对损耗(参见方法2)。将样品1:10稀释到给定的溶液中并且转移到薄玻璃皿内，并且在60℃、72℃或者95℃下置于恒温混匀仪中，在其中测量时间和温度。随时间(0至600秒)而取样，并且在测定残余LAU活性之前保持在冰上。在96孔ELISA板中手动地或者在Biomek 3000(Beckman Coulter)上进行稀释和混合。为了在用于本实验的条件下计算残余酶的活性，LAU活性的测定在酶的温育之前和之后进行。将不含β-半乳糖苷酶的乳或者缓冲液用作空白。数据以时间函数的相对活性损失来给出。

[0647] 结果：

[0648] 示出了结果，在图1中为乳基、图2中为磷酸钠缓冲液以及在图3中为无乳糖乳。可见，与所使用的乳基和无乳糖乳相比(包含更少量的乳糖和脂肪)，在缓冲液中的BIF_917更迅速地灭活。值得注意的是，在缓冲液中为了确保完全灭活，使用72℃和600分钟或者在95℃下仅多于20秒即可灭活BIF_917，而在受测的两种乳基质中需要在95℃下多于300秒。比较使用乳基和无乳糖乳的巴氏灭菌特征，似乎灭活乳基中的BIF_917需要更高的巴氏灭菌(更高的温度或更长的时间)。在95℃下巴氏灭菌5分钟和6分钟后，我们发现分别有2%和1.4%的残余LAU活性留在乳基中。更长的巴氏灭菌，例如，在95℃下10分钟和12分钟，产生了不可检测的LAU活性(表10)。

[0649] 表10. 在95℃下巴氏灭菌的强化乳基(乳糖和乳清蛋白)中BIF_917的残余LAU活性。

[0650]

酶剂量	在95℃下的巴氏灭菌时间	残余活性%
2.13LAU/mL	4分钟	5.2
2.13LAU/mL	5分钟	2.0
2.13LAU/mL	6分钟	1.1
2.13LAU/mL	10分钟	0.0
2.13LAU/mL	12分钟	0.0

[0651] 序列表

[0652] >SEQ ID NO:1(BIF_917)

[0653]

vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqrtsdfdanwkwfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqs
neaesaylpggtgwrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentiv
vkvenrlpssrwysgsgiyrdvtltvtgdvghvngngaiktptlatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf
pkggktdaaigtvttasksiaagasadvsttitaaspklwsiknplytvrtevlnggkvldtydteygrwtgfd
tsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveilqkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfd

mwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlbgdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpat
 saklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnl tanggvvgtnysdganydkirtthpswaiygsetasain
 srgiynrttggagssdkqltsydnsavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgswwps
 pknsyfgivdtagfpkdtyfyqsqwddvhtlhilpawnenvvakgsgnnpvvytdaakvklyftpkgstekrl
 igeksftkkttaagytyqvyegsddkdstahknmyltnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasvtttgaak
 lkadadrkti tadgkdl syievdvt danghivpdaanrvtdvkgagklvgv dngssp dhsyqadnrkafsgkvla
 ivqstkeageitvtakadglqsstvkia ttavpgtstekt

[0654] >SEQ ID NO:2(BIF_995)

[0655]

vedatrdssttqmsstpevyssavdskqrtsdfdanwkmfmsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqs
 neaesaylpggtgwrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentiv
 vkvenrlpssrwysgsgiyrdvtltvtdgvhvgngvaiktplatqnggdvtmnl ttkvandteaaanitlkqtvf
 pkggktdaaigtvttasksiaagasadvststitaaspklwsiknplytvrtevlnggkvl dtydteygfrwtgfd
 tsgfslngekvklkgvsmhhdqsglgavanrraierqveilqkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfd
 mwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlbgdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpat
 saklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnl tanggvvgtnysdganydkirtthpswaiygsetasain
 srgiynrttggagssdkqltsydnsavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgswwps
 pknsyfgivdtagfpkdtyfyqsqwddvhtlhilpawnenvvakgsgnnpvvytdaakvklyftpkgstekrl
 igeksftkkttaagytyqvyegsddkdstahknmyltnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasvtttgaak
 lkadadrkti tadgkdl syievdvt danghivpdaanrvtdvkgagklvgv dngssp dhsyqadnrkafsgkvla
 ivqstkeageitvtakadglqsstvkia ttavpgtstektvrsfyysrnyyvtgnkpi lpsdvevrysdgtsdrqn
 vtwdavsddqiakagsfsvagt vagqkisvrvtmideigal

[0656] >SEQ ID NO:3(BIF_1068)

[0657]

Vedatrdssttqmsstpevyssavdskqrtsdfdanwkmfmsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqs
 neaesaylpggtgwrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentiv
 vkvenrlpssrwysgsgiyrdvtltvtdgvhvgngvaiktplatqnggdvtmnl ttkvandteaaanitlkqtvf
 pkggktdaaigtvttasksiaagasadvststitaaspklwsiknplytvrtevlnggkvl dtydteygfrwtgfd
 tsgfslngekvklkgvsmhhdqsglgavanrraierqveilqkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfd
 mwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlbgdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpat
 saklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnl tanggvvgtnysdganydkirtthpswaiygsetasain
 srgiynrttggagssdkqltsydnsavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgswwps
 pknsyfgivdtagfpkdtyfyqsqwddvhtlhilpawnenvvakgsgnnpvvytdaakvklyftpkgstekrl
 igeksftkkttaagytyqvyegsddkdstahknmyltnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasvtttgaak
 lkadadrkti tadgkdl syievdvt danghivpdaanrvtdvkgagklvgv dngssp dhsyqadnrkafsgkvla
 ivqstkeageitvtakadglqsstvkia ttavpgtstektvrsfyysrnyyvtgnkpi lpsdvevrysdgtsdrqn
 vtwdavsddqiakagsfsvagt vagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgrpavlpdgtvtsanfahv
 wtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtatirvq

[0658] >SEQ ID NO:4(BIF_1172)

[0659]

vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqrtsdfdanwkwfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqs
 neaesaylpggtgwyrsftidrldagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentiv
 vkvenrlpssrwyssgiyrdvtltvtgdvghvngngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf
 pkggktdaaigtvttasksiaagasadvststitaaspklwsiknplytvrtevlnggkvldtydeygrwtgfd
 tsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveilqkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfd
 mwnrskngntedygkwfqqaiagdnavlbgdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpat
 saklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnl tanggvvgtnysdganydkirtthpswaiygetasain
 srgiyrnttggagssdkqltsydnasvngwvassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgeptwngtgsgavgsups
 pknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnddvhlhlpawnenvvakgsgnnpvvytdaakvlyftpkgstekrl
 igeksftkkktaagytyqvyegsdkdstahknmyltnvpwaehtisaeydennrlipegstegnasvtttgaak
 lkadadrktitadgkdl syievdvt danghivpdaanrvtfdvkgagklvgvngsspdhdsyqadnrkafsgkvla
 ivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavpgtstektrvsfyysrnyyvtgnkpi lpsdvevrysdgtsdrqn
 vtwdavsdqiakagsfsvagt vagqkivrvtmideigallnysastpvgtpavlpgrpavlpdgtvtsanfah
 wtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtatirvqrsqvtigssvsngalrltqnipadkqsdtdaikdgsttv
 dantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqivmyffrdsnavrfdagtkkiqi

[0660] >SEQ ID NO:5(BIF_1241)

[0661]

vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqrtsdfdanwkwfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqs
 neaesaylpggtgwyrsftidrldagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentiv
 vkvenrlpssrwyssgiyrdvtltvtgdvghvngngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf
 pkggktdaaigtvttasksiaagasadvststitaaspklwsiknplytvrtevlnggkvldtydeygrwtgfd
 tsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveilqkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfd
 mwnrskngntedygkwfqqaiagdnavlbgdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpat
 saklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnl tanggvvgtnysdganydkirtthpswaiygetasain
 srgiyrnttggagssdkqltsydnasvngwvassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgeptwngtgsgavgsups
 pknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnddvhlhlpawnenvvakgsgnnpvvytdaakvlyftpkgstekrl
 igeksftkkktaagytyqvyegsdkdstahknmyltnvpwaehtisaeydennrlipegstegnasvtttgaak
 lkadadrktitadgkdl syievdvt danghivpdaanrvtfdvkgagklvgvngsspdhdsyqadnrkafsgkvla
 ivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavpgtstektrvsfyysrnyyvtgnkpi lpsdvevrysdgtsdrqn
 vtwdavsdqiakagsfsvagt vagqkivrvtmideigallnysastpvgtpavlpgrpavlpdgtvtsanfah
 wtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtatirvqrsqvtigssvsngalrltqnipadkqsdtdaikdgsttv
 dantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqivmyffrdsnavrfdagtkkiqisadgknwtdlaat
 etiaaqessdrvkytydfapvgatfvkvtvtnadtttsgvvcagl teielktat

[0662] >SEQ ID NO:6(BIF_1326)

[0663]

vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqrtsdfdanwkwfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqs
 neaesaylpggtgwyrsftidrldagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentiv
 vkvenrlpssrwyssgiyrdvtltvtgdvghvngngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf

pkggktdaaigtvttasksiaagasadvststiaaspklwsiknplytvrtevlnggkvldtydteygrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveilqkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlbgdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnl tanggvvgtynsdganydkirtthpswaiygsetasain srgiynrttggaaqssdkqltsydnasavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgsbpspknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnddvhlhilpawnenvvakgsgnnpvvytdaakvkllyftpkgstekrli geksftkkttaagytyqvyegsdkdstahknmyl twnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasvtttgaaklkadadrkti tadgkdl syievdvtdanghi vpdaanrvtfdvkgagklvgvdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavpgtstektvrsfyysrnyvktgnkpi lpsdvevrysdgtsdrqnv twdavsddqiakagsfsvagt vagqkisrvvtmideigallnysastpvgt pavlpgsrpavlpdgtvtsanfahv wtkpadtvyn tagtvkvpgtatvfgkefkvtatirvqrsqvtigssvsngalrltqnipadkqsdltldaikdgsttv dantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqivmyffrdsnavrfpdagktkiqisadgknwtdlaat etiaaqessdrvkytydfapvgatfvkvtvtnadtttspgvvcaglteielktatskfvntsaalssltnvngtkv sdsvlaagsyntpaiiadvkaegegnasvtvlpahdnvirvitesedhvtrktftinlgteqef

[0664] >SEQ ID NO:7两岐双岐杆菌糖苷水解酶催化核心

[0665]

qnrt sdfdanw kfm lsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesaylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsgiyrdvtltvtdgvhvgngvaiktpslatqnggdvtmnl ttkvandteaaaniltkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadvststiaaspklwsiknplytvrtevlnggkvldtydteygrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveilqkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlbgdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnl tanggvvgtynsdganydkirtthpswaiygsetasain srgiynrttggaaqssdkqltsydnasavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgsbpspknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnddvhlhilpawnenvvakgsgnnpvvytdaakvkllyftpkgstekrli geksftkkttaagytyqvyegsdkdstahknmyl twnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasvtttgaaklkadadrkti tadgkdl syievdvtdanghi vpdaanrvtfdvkgagklvgvdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavpgtstektvrsfyysrnyvktgnkpi lpsdvevrysdgtsdrqnv twdavsddqiakagsfsvagt vagqkisrvvtmideigallnysastpvgt pavlpgsrpavlpdgtvtsanfahv wtkpadtvyn tagtvkvpgtatvfgkefkvtatirvqrsqvtigssvsngalrltqnipadkqsdltldaikdgsttv dantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqivmyffrdsnavrfpdagktkiqisadgknwtdlaat etiaaqessdrvkytydfapvgatfvkvtvtnadtttspgvvcaglteielktatskfvntsaalssltnvngtkv sdsvlaagsyntpaiiadvkaegegnasvtvlpahdnvirvitesedhvtrktftinlgteqef

[0666] >SEQ ID NO:8编码全长的核苷酸序列

[0667]

gcagttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaaatgtcatcaacaccggaagtgtttattcatcagcggtcgtagcaaaacaaaatcgcacaagcgattttgatgccaactggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagcatggcaacaagttgatctgccgatgattatagcatcacacagaaatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatalcttccgggaggcacagcctggatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgctataatgaaatgcaacagcttggtttaatggcgttaaacggcacacatccgtatggctattcaccgtttcatttgatctgacaggcaatgcaaaatggcggagaaaacacaattgtcgtcaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggattcaggcagcggcattatagagatgttacactgacagttacagatggcgttcatgttgcaataatggcgctgcaattaaacaccgtcactggcaacacaaaaatggcggagatgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagttttccgaaaggcggaaaaacggatgcagcaattggcagcagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatagcagatgttacaagcacaattacagcagcaagcccgaactgtggctcaatataaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaaagttctggatacataatgatacagaataatggctttcgtggacaggccttgatgcaacatcaggcttttactgaaatggcgaaaaagtcgaaatgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttgccgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcctgcaaaaaatggcgctcaatagcattcgcaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaggcgttctggttgtcgaagaagctttt

gatatgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcgataa
tgcagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgatagaatg
caccgtcagttattatgtggctactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggca
acatcagcaaaactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaa
agcgaactggaacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagtgttggcacaattattcag
atggcgcaaacatgataaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaacagcatcagcgatt
aatagccgtggcattttataatagaacaacaggcggagcacaatcatcgataaacagctgacaagctatgataattc
agcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggatgatgttgttcagagagattttgtcgcaggcacaatg
tttggacaggatttgattatctgggcaaccgcacaccgtggaatggcacaggctcaggcgcagttggctcatggccg
tcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattatttttatcagagcca
gtggaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaata
atgttccggttgtcgtttatacagatgcagcgaagtgaaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaaga
ctgatcggcgaaaaatcatttacaacaaaaaacacagcggcaggctatacatatacaagctcagaaggcagcgataa
agattcaacagcgcataaaaaacatgtatctgacatggaaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgt
atgatgaaaaataatcgccctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcacatcagttacaacaacaggcaaacgcga
aaactgaaagcagatgcggatcgcaaaaacattacagcggatggcaaagatctgtcataatggaagtcgatgtcac
agatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaaatagatcacatttgatgttaaaggcgcaggcaaacgtggttg
gcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatacaagcggataaccgcaaagcattttcaggcaaaagtcctg
gcaattgttcagtcacaacaaaagaagcaggcgaatttacagttacagcaaaagcagatggcctgcaatcaagcacagt
taaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtcgcagcttttat tacagccgcaactatt
atgtcaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgtattcagatggaacaagcgatagacaa
aacgttacatgggatgcagtttcagatgatcaaatgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcagg
caaaaaatttagcgttcgctcacaatgattgatgaaatggcgacactgctgaattattcagcaagcacaccggttg
gcacaccggcagttcttccgggatcaagaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaaattttgcagtc
cattggacaaaaccggcagatacagtcataatacagcaggcacagtcaaagtaccgggaacagcaaacagtttttg
caaagaatttaagtcacagcgacaattagagttcaaagaagccaagttacaattggctcatcagtttcaggaaatg
cactgagactgacacaaaatattccggcgataaaacaatcagatacactggatgcatgataaagatggctcaacaaca
gttgatgcaaaatcagggcggaggcgcaaaatccgtcagcattggacaaattgggcatattcaaaagcaggccataaac
agcggaaattacatttgaaatgacgacagaacaacaactgggcccagatcgtcatgtattttttcgcgatagcaatg
cagttagatttccggatgctggcaaaaacaaaaattcagatcagcgcagatggcaaaaattggacagatctggcgca
acagaaacaattgcagcgcgaagaatcaagcgatagagtcaaaccgtatacatatgattttgcaccggttggcgcaac
atgtgttaaagtgacagtcacaaacgcagatacaacaacaccgtcaggcgttgtttgcgcaggcctgacagaaattg
aactgaaaacagcgcacaagcaaatgtgtcacaatacatcagcagcactgtcactcacttacagtcaatggcacaacaa
gtttcagattcagttctggcagcaggctcataaacacaccggcaattatcgcagatgttaaagcgggaaggcgaagg
caatgcaagcgttacagtccttccggcacatgataatgttatcgcgtcattacagaaagcgaagatcatgtcacac
gcaaacatttacaatcaacctgggacagaaacaagaattccggctgattcagatgaaagagattatccggcgca
gatatgacagtcacagttggctcagaacaaacatcaggcacagcaacagaaggaccgaaaaaatttcagtcgatgg
caacacatcaacatattggcatagcaattggacaccgacaacagttaatgatctgtggatcgcgtttgaaactgcaaa
aaccgacaaaactggatgcaactgagatacttccgcgtccggcaggctcaaaaaatggcagcgtcagcaataataaa

gttcagggtgtcagatgatggaacaaactggacagatgcaggctcaggcacatggacaacggattatggctggaact
 ggcggaatataatcaaccgggtcacaacaaacatgtagactgaaagcggttcatacatatgcagatagcggcaacg
 ataaatattatgagcgcgaagcgaatttagactgagaaaagcggtcgatacaacggatatttcaggcgcacagttaca
 gttccggcaaaactgacagttgatagagttgatgcagatcatccggcaacatttgcaacaaaagatgtcacagttac
 actgggagatgcaaacactgagatatggcgttgattatctgctggattatgcaggcaatacagcagttggcaaagcaa
 cagtgacagtttagaggcattgataaataattcaggcacagtcgcgaaaacatttacaattgaaactgaaaaatgcaccg
 gcaccggaaccgacactgacatcagtttagcgtcaaaaacaaaccgagcaaacactgacatatggtgtcggagatgcatt
 tgatccggcaggcctggttctgcaacatgatagacaagcagatagacctccgcaaccgctggttggcgaacaagcgg
 atgaacgcggactgacatgcggcacaagatgcgatagagttgaacaactgcgcaacatgaaaatagagaagcgcatt
 agaacaggcctggatcatctggaatttgttggcgcagcagatggcgcagttggagaacaagcaacatttaaagtcca
 tgtccatgcagatcaggagatggcagacatgatgatgcagatgaacgcgatatgatccgcagttccggctcgatc
 atgcagttggcgaactggcaagagcagcatgccatcatgttattggcctgagagtcgatacacatagacttaaagca
 agcggctttcaaatccggctgatgatatggcagaaaatcgatcgattacaggctttcatcgttttgaaacgcatgt
 c

[0668] >SEQ ID NO:9编码BIF_917的核苷酸序列

[0669]

gttgaagatgcaacaagaagcagatagcacaacacaaaatgtcatcaacaccggaagtgtttattcatcagcggctga
 tagcaaacaaaatcgcaacaagcagttttgatgcgaactggaaatattatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatc
 cggcatttgatgattcagcatggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaaatagccaaagc
 aatgaagcagaatcagcatatcttccgggaggcacaggctggtagaaaaagctttacaattgatagagatctggc
 aggcaaacgcattgcgattaatattgatggcgtctatatgaatgcaacagtcctggttaattggcgttaaactgggca
 cacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaatggcggagaaaacacaattgtc
 gtcaaagtggaaaatagactgccgtcatcaagatggattcaggcagcggcatttatagagatgttacactgacagtt
 tacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgctcactggcaacacaaaatggcggagatg
 tcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagttttt
 ccgaaaggcggaaaaacggatgcagcaatggcacagttacaacagcatcaaaaatcaattgcagcaggcgcattcagc
 agatgttacaagcacaattacagcagcaagcccgaacctgtggtcaattaaaacccgaacctgtatacagttagaa
 cagaagttctgaaacggaggcaagttctggatacatatgatacagaatatggctttcgtcggacaggctttgatgca
 acatcaggcttttcaactgaaatggcgaaaaagtcacaactgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttgg
 cgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaaatctgcaaaaaatggggtcaatagcattcgcacaa
 cacataatccggcagcaaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttctggttctgaagaagcttttgat
 atgtggaaccgcagcaaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcgataatgc
 agttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacaacaattaaccgcgatagaaatgcac
 cgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggcaaca
 tcagcaaaactggttgcattggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaataaagc
 gaactggaacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaatatttcagatg
 gcgcaaacatgataaaaatcgtacaacacatccgtcatgggcaatattatggctcagaacagcatcagcgattaat
 agccgtggcattttataatagaacaacaggcggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagc
 agttggctggggagcagttgcatcatcagcatggatgatgttgcagagagattttctcgcaggcacaatgtttt

ggacaggatttgattatctgggcgaaccgacaccgtggaatggcacaggctcaggegcagttggctcatggccgtca
 ccgaaaaatagctatcttggcatcgttgatacagcaggccttccgaaagatacatattatcttccagagccagtg
 gaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaatgaaaagttggcggcaggctcaggcaataatg
 ttccggttgctgtttatacagatgcagcgaagtgaaactgtatcttaccgaaaggctcaacagaaaaaagactg
 atcggcgaaaaatcatttacaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagcttatgaaggcagcgataaaga
 ttcaacagcgcataaaaaacatgtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgtatg
 atgaaaaataatcgctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcacagttacaacaacaggcaaacagcaaaa
 ctgaaagcagatgcggatcgcaaaaacaattacagcggatggcaaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacaga
 tgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcacatttgatgttaaaggcgcaggcaaacgtggtggcg
 ttgataatggctcatcaccggatcatgattcatalcaagcggataaccgcaaaagcattttcaggcaaacgtcctggca
 attgttcagtcacaaaaagaagcaggcgaattacagttacagcaaaagcagatggcctgcaatcaagcacagttaa
 aattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaca

[0670] >SEQ ID NO:10编码BIF_995的核苷酸序列

[0671]

ggtgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaaatgcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggctga
 tagcaaacaaaatcgcaaacgcatcttgatgcgaactggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatc
 cggcatttgatgattcagcatggcaacaagttgatctgccgatgattatagcattcacagaaaatagcctaaagc
 aatgaagcagaatcagcatatcttccgggaggcacaggctggtagaaaaagctttacaattgatagagatctggc
 aggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatgaaatgcaacagctctggtttaatggcgttaaactgggca
 cacatccgtatggctattcaccgtttcatttgatctgacaggcaatgcaaaatttggcggagaaaacacaattgtc
 gtcaaagttagaaaatagactgcccgtcatcaagatggatctcaggcagcggcatttatagagatgtttactgacagt
 tacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaaatggcggagatg
 tcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcaaatgatacagaagcagcagcgaacattactgaaacagacagttttt
 ccgaaaggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcattcagc
 agatgtttacaagcacaattacagcagcaagcccgaaacgttggtcaattaaaacccgaacctgtatacagttagaa
 cagaagttctgaacggaggcaaaagttctggatacatatgatacagaatatggcttctcgtggacaggctttgatgca
 acatcaggcttttactgaaatggcgaaaaaagtcacaactgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttgg
 cgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaaacttgcaaaaaatggggtcgaatagcatttcgcaaaa
 cacataatccggcagcaaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttctggttgcgaagaagcttttgat
 atgtggaaccgcagcaaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcgataatgc
 agttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacaacaattaaccgcgatagaaatgcac
 cgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggcttccggcaaca
 tcagcaaaactggttgcattggcaaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatattggcgataacaaaattaaagc
 gaactggaacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaataattcagatg
 gcgcaaacatgataaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaacagcatcagcgattaat
 agccgtggcatttataatagaacaacaggcggagcacaatcattcagataaacagctgacaagctatgataattcagc
 agttggctggggagcagttgcatcatcagcatggatgatgttggcagagagattttgtcgcaggcacaatgttt
 ggacaggatttgattatctgggcgaaccgacaccgtggaatggcacaggctcaggegcagttggctcatggccgtca
 ccgaaaaatagctatcttggcatcgttgatacagcaggccttccgaaagatacatattatcttccagagccagtg

gaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaaatgaaaaagtgttgcaaaaggctcaggcaataatg
 ttccggttgctgtttatacagatgcagcgaagtgaaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaagactg
 atcggcgaaaaatcatttacaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaaga
 ttcaacagcgcataaaaaacatgtatctgacatggaaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgtatg
 atgaaaaataatcgctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaagcagcaaaa
 ctgaaagcagatgcggatcgcaaaaacaattacagcggatggcaaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacaga
 tgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcacatttgatgttaaaggcgcaggcaaacgtgttgccg
 ttgataatggctcatcaccggatcatgattcatalcaagcggataaccgcaaagcattttcaggcaaagtcctggca
 attgttcagtcacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgcaatcaagcacagttaa
 aattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtcgcagctttttattacagccgcaactattatg
 tcaaacagggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgctattcagatggaacaagcga tagacaaaac
 gttacatgggatgcagtttcagatgatcaaatgcaaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggcca
 aaaaattagcgttcgcgtcacaatgattgatgaaattggcgcactg

[0672] >SEQ ID NO:11编码BIF_1068的核苷酸序列

[0673]

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaaatgtcatcaacaccggaagtgtttattcatcagcggtcga
 tagcaaacaaaatcgcaacaagcattttgatgcgaactggaaatttatgtctgtagatagcgttcaagcacaagatc
 cggcatttgatgattcagcatggcaacaagttgatctgccgatgattatagcatcacacagaaatagccaaagc
 aatgaagcagaatcagcatatcttccgggaggcacaggctggtagaaaaagctttacaattgatagagatctggc
 aggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatgaatgcaacagctctggtttaatggcgttaaacgggca
 cacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaaattggcggagaaaacacaattgtc
 gtcaaaagttgaaaaatagactgccgtcatcaagatggatcaggcagcggcatttatagagatgtttacactgacagt
 tacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggagatg
 tcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagttttt
 ccgaaaggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaaatcaattgcagcaggcgcattcagc
 agatgtttacaagcacaattacagcagcaagcccgaaactgttggtcaattaaaacccgaaacctgtatacagttagaa
 cagaagttctgaaacggaggcaagttctggatacatalgatacagaatatggctttcgctggacaggcttttgatgca
 acatcaggcttttctactgaaatggcgaaaaaagtcaaaactgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttgg
 cgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcctgcaaaaaatgggcgtcaatagcatttcgcacaa
 cacataatccggcagcaaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttcgtgttgcgaagaagcttttgat
 atgttgaaccgcagcaaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcagataatgc
 agttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgatagaaatgcac
 cgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggcaaca
 tcagcaaaaactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatagggcagatacaaaaataaagc
 gaactggaacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagtgttggcacaatatttcagatg
 gcgcaaacatagataaaaatcgtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaacagcatcagcgattaat
 agccgtggcatttataatagaacaacaggcggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagc
 agttggctggggagcagttgcatcatcagcatggatgatgttctcagagagattttgtcgcaggcacaatgtttt
 ggacaggatttgattatctgggcgaaccgacaccgtggaaatggcacaggctcaggcgcagttggctcatggccgtca

ccgaaaaatagctatTTTTGGCATCGTTGATACAGCAGGCTTCCGAAAGATACATATTATTTTTATCAGAGCCAGTG
 gaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaaTgaaaatgttTGTGCAAAAGGCTCAGGCAATAATG
 tTCCGGTTGTCTTTATACAGATGCAGCGAAAGTGAACTGTATTTACACCGAAAGGCTCAACAGAAAAAGACTG
 atcggcgaaaaatcatttacaAAAAAACAACAGCGGCAGGCTATACATATCAAGTCTATGAAGGCAGCGATAAAGA
 ttcaacagcgcataAAAAACATGTATCTGACATGGAAATGTTCCGTGGGCAGAAGGCACAATTCAGCGGAAGCGTATG
 atgaaaaataatcgctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaagcagcaaaa
 ctgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcggatggcaaaagatctgtcataattgaagtcgatgtcacaga
 tgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcacatttgatgttaaaggcgcaggcaaaactggttggcg
 ttgataatggctcatcaccgatcatgattcataatcaagcggataaccgcaaagcattttcaggcaaaagtcctggca
 attgttcagtcacaaaagaagcaggcgaattacagttacagcaaaagcagatggcctgcaatcaagcacagttaa
 aattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtcgcagcttttattacagccgcaactattatg
 tcaaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagtctgctattcagatggaacaagcga tagacaaaac
 gttacatgggatgcagtttcagatgatcaaatTgcaaaagcaggetcaTTTTcagttgcaggcacagttgcaggcca
 aaaaattagcgttcgcgtcacaatgattgatgaaatTggcgcactgctgaattattcagcaagcacaccggttggca
 caccggcagttcttccgggatcaagaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaatTTTgcagtcctat
 TggacaaaaccggcagatacagtcTataatacagcaggcacagtcAAAGTaccgggaacagcaaacagTTTTTggcaa
 agaatttaaagtcacagcgcacaatttagagttcaa

[0674] >SEQ ID NO:12编码BIF_1172的核苷酸序列

[0675]

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaaTgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggtcga
 tagcaaacaaaatcgcaacaagcattttgatgcgaactggaaatTtatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatc
 cggcattttgatgattcagcatggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatagccaaagc
 aatgaagcagaatcagcatalcttccgggaggcacaggctggTatagaaaaagctttacaattgatagagatctggc
 aggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatgaatgcaacagtcTggtttaaTggcgttaaactgggca
 cacatccgtatggctattcaccgttttcatTTgatctgcacaggcaatgcaaaatTggcggagaaaacacaattgtc
 gtcaaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggTattcaggcagcggcatttatagagatgtttacttgacagt
 tacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggagatg
 tcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattactgaaacagacagttttt
 ccgaaaggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatacagc
 agatgttacaagcacaattacagcagcaagcccgaaactgtTgttcaattaaaaccgaaacctgtatacagtttagaa
 cagaagttctgaacggaggcaaaagttctggatacatalgatacagaataggtcttctgctggacaggctttgatgca
 acatcaggcttttctactgaatggcgaaaaagTcaaacTgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttgg
 cgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcctgcaaaaaatggcgtcaatagcattcgcacaa
 cacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttctggttTgtcgaagaagcttttgat
 atgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcagataatgc
 agttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaaatTgactttacatcaacaattaaccgcgatagaaatgcac
 cgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggcttccggcaaca
 tcagcaaaactggttgcattggcaaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaatTaaagc
 gaactggaacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaatTattcagatg

gcgcaactatgataaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaacagcatcagcgattaat
agccgtggcatttataatagaacaacaggcggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagc
agttggctggggagcagttgcatcatcagcatgggatgatgttggtcagagagatTTTgtcgcaggcacatatgttt
ggacaggatttgattatctgggccaaccgacaccgtggaaatggcacaggctcagcgcagttggctcatggccgtca
ccgaaaaatagctatTTTggcatcgttgatacagcaggcTTTccgaaagatacatattatTTTtatcagagccagtg
gaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaaatgaaaatgtttgttgcaaaaggctcaggcaataatg
ttccggttgctgTTTatacagatgcagcgaagtgaaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaagactg
atcggcgaaaaatcatttacaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagcttatgaaggcagcgataaaga
ttcaacagcgcataaaaaacatgtatctgacatggaaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgatg
atgaaaaataatcgctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcacagttacaacaacaggcaaacgagcaaaa
ctgaaagcagatgcggatcgcaaaaacaattacagcggatggcaaaagatctgtcataattgaagtcgatgtcacaga
tgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaaatagagtacatttgatgttaaaggcgcaggcaaacgtgttgggc
ttgataatggctcatcaccggatcatgattcataatcaagcggataaccgaaagcattttcaggcaaacgcttgga
attgttcagtcacaaaagaagcaggcgaatttacagttacagcaaacagatggcctgcaatcaagcacagttaa
aattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtcaccgagctTTTattacagccgcaactattatg
tcaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagtccgctattcagatggaacaagcgaatagacaaaac
gttacatgggatgcagtttcagatgatcaaatgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggcca
aaaaattagcgttcgcgtcacaatgattgatgaaaatggcgcactgctgaattattcagcaagcacaccggttgga
caccggcagttcttccgggatcaagaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaatTTTgcagtcct
tggaacaaaccggcagatacagtcataatacagcaggcacagtcaaagtaccgggaacagcaaacagtttttgga
agaatttaaagtcacagcagacaattagagttcaagaagccaagttacaattggctcatcagtttcaggaaatgcac
tgagactgacacaaaaatattccggcagataaacaatcagatacactggatgcgattaaagatggctcaacaacagtt
gatgcaaatacaggcggaggcgcaaatccgtcagcatggacaaatTgggcatattcaaaagcaggccataacacagc
ggaaattacatttgaatatgagcagacaacaacaactgggcccagatcgtcatgtatTTTTTtcgcatagcaatgcag
ttagatttccggatgctggcaaaaacaaaaattcagatc

[0676] >SEQ ID NO:13编码BIF_1241的核苷酸序列

[0677]

gttgaagatgcaacaagaagcagatagcacaacacaaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggtcga
tagcaaacaaaatcgcaacagcagttttgatgccaactggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatc
cggcatttgatgattcagcatggcaacaagttgactgccgcatgattatagcatcacacagaaatagccaaagc
aatgaagcagaatcagcatatcttccgggaggcacaggctggtagaaaaagcTTTacaattgatagagatctggc
aggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatgaaatgcaacagtcctggtttaattggcgttaaactgggca
cacatccgtatggctattcaccgTTTTcatttgatctgacaggcaatgcaaaatTggcggagaaaacacaattgtc
gtcaaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggatcagcagcggcatttatagagatgttacactgacagt
tacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggagatg
tcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagttttt
ccgaaaggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcattcaaaatcaattgcagcaggcgcattcagc
agatgttacaagcacaattacagcagcaagcccgaactgtggctcaattaaaacccgaacctgtatacagttagaa
cagaagttctgaacggaggcaagttctggatacatgatagcaaatatggcttccgctggacaggcTTTgatgca

acatcaggcttttactgaatggcgaaaaagtcaaactgaaaggcgtagcatgcatcatgatcaaggctcacttgg
 cgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcctgcaaaaaatgggcgctcaatagcattcgcacaa
 cacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttctggttgtcgaagaagtccttgat
 atgtggaaccgcagcaaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcgataatgc
 agttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgatagaaatgcac
 cgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggcaaca
 tcagcaaaactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagc
 gaactggaacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcgagttgttggcacaattattcagatg
 gcgcaactatgataaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaaacagcatcagcgattaat
 agccgtggcatttataatagaacaacaggcgagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagc
 agttggctggggagcagttgcatcatcagcatggatgatgttggctcagagagattttgtcgcaggcacaatgttt
 ggacaggatttgattatctgggcaaccgacaccgtggaatggcacaggctcaggcgagttggctcatggccgtca
 ccgaaaaatagctatctggcatcgttgatacagcagcttccgaaagatacattatcttccatcagagccagtg
 gaatgatgatgttcatacactgcatattctccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaataatg
 ttccggttgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaactgtatcttacaccgaaaggctcaacagaaaaagactg
 atcggcgaaaaatcatttacaacacacacagcggcagcctatacattcaagctcattgaaggcagcgataaaga
 ttcaacagcgcataaaaaacatgtatctgacatggaaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaaagcgtatg
 atgaaaaaatcgcctgattccggaaggcagcagaaaggcaacgcattcacaacaacaggcaaacgagcaaaaa
 ctgaaagcagatgcggatcgcaaaaacaattacagcggatggcaaaagatctgtcattatgaagtgcattgacaga
 tgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcacatttgatgttaaaggcgcaggcaaacgggtggcg
 ttgataatggctcatcaccgatcatgattcattcaagcggataaccgcaaacgatttcaggcaaacgcttggca
 attgttcagtcacaacaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaacagatggcctgcaatcaagcagcttaa
 aattgcaacaacagcagttccgggaacaagcagcaaaaaacagtcaccgagcttttattacagccgcaactattatg
 tcaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagtccgctattcagatggaacaagcgaatagacaaac
 gttacatgggatgcagtttcagatgatcaaatgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggcca
 aaaaattagcgttcgcgtcacaatgattgatgaaatggcgactgctgaattattcagcaagcacaccggttggca
 caccggcagttcttccgggatcaagaccggcagctctgccggatggcacagtcacatcagcaaatcttgcagttccat
 tggacaaaaccggcagatacagctctataatcagcaggcacagtcacagttaccgggaacagcaaacagtttttggcaa
 agaatttaaagtcacagcagcaattagagttcaaaagaagccaagttacaattggctcatcagtttcaggaaatgcac
 tgagactgacacaaaatattccggcagataaaacaatcagatacactggatgcatgaaatggctcaacaacagtt
 gatgcaaaatcagcggaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaagcaggccataacacagc
 ggaaattacatttgaaatgagcagacaacaacaatgggccagatcgtcatgtatcttctcgcgatagcaatgcag
 tttagatttccggatgctggcaaaaacaaaattcagatcagcgcagatggcaaaaattggacagatctggcagcaaca
 gaaacaattgcagcgaagaatcaagcgaatagagtcacaaaccgtatataatgatcttgcaccggttggcgcaacatt
 tgttaaagtgacagtcacaaacgcagatacaacaacaccgtcaggcgttgttgcgcaggcctgacagaaattgaac
 tgaaaacagcgaca

[0678] >SEQ ID NO:14编码BIF_1326的核苷酸序列

[0679]

gttgaagatgcaacaagaagcgaatgacacaacacaaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcattcagcggctcga

tagcaaacaaaatcgcacaaagcgatTTTgatgCGAACTGGAAATTTATGCTGTCAGATAGCGTTCAAGCACAAAGATC
 CGGCATTTGATGATTCAGCATGGCAACAAGTTGATCTGCCGATGATTATAGCATCACACAGAAATATAGCCAAAGC
 AATGAAGCAGAATCAGCATATCTTCCGGGAGGCACAGGCTGGTATAGAAAAGCTTTACAATTGATAGAGATCTGGC
 AGGCAAACGCATTGCGATTAATTTTGGTGGCTCTATATGAATGCAACAGTCTGGTTTAATGGCGTTAAACTGGGCA
 CACATCCGTATGGCTATTCACCGTTTTCAATTTGATCTGACAGGCAATGCAAAATTTGGCGGAGAAAACACAATTTGTC
 GTCAAAGTTGAAAATAGACTGCCGTCATCAAGATGGTATTCAGGCAGCGGCATTTATAGAGATGTTACTGACAGT
 TACAGATGGCGTTCATGTTGGCAATAATGGCGCTGCAATTTAAACACCGTCACTGGCAACACAAAATGGCGGAGATG
 TCACAATGAACCTGACAACAAAAGTCGCGAATGATACAGAAGCAGCAGCGAACATTACTGAAACAGACAGTTTTT
 CCGAAAGGCGGAAAAACGGATGCAGCAATTTGGCACAGTTACAACAGCATCAAAATCAATTGCAGCAGGCGCATCAGC
 AGATGTTACAAGCACAAATTACAGCAGCAAGCCCCGAAACTGTGGTCAATTTAAAACCCGAACCTGTATACAGTTAGAA
 CAGAAGTTCTGAACGGAGGCAAGTTCTGGATACATATGATACAGAATATGGCTTTCGCTGGACAGGCTTTGATGCA
 ACATCAGGCTTTTCACTGAATGGCGAAAAAGTCAAACGAAAGGCGTTAGCATGCATCATGATCAAGGCTCACTTGG
 CGCAGTTGCAAAATAGACGCGCAATTGAAAGACAAGTCGAAAATCTGCAAAAAATGGGCGTCAATAGCATTTCGCACAA
 CACATAATCCGGCAGCAAAAGCACTGATTGATGCTGCAATGAAAAAGGCGTCTGGTTGTCGAAGAAGTCTTTGAT
 ATGTGGAACCGCAGCAAAAAATGGCAACACGGAAGATTAAGCAAAATGGTTGGCCAAGCAATTGCAGGCGATAATGC
 AGTCTGGGAGGCGATAAAGATGAAACATGGGCGAAAATTTGATCTTACATCAACAATTAACCGCGATAGAAATGCAC
 CGTCAGTTATTTATGTGGTCACTGGGCAATGAAATGATGGAAGGCATTTCAAGGCTCAGTTTCAGGCTTCCGGCAACA
 TCAGCAAAACTGGTTGCATGGACAAAAGCAGCAGATTCAACAAGACCGATGACATATGGCGATAACAAAATTAAGC
 GAACGGAACGAATCAAATACAATGGGCGATAATCTGACAGCAAAATGGCGGAGTTGTTGGCACAAATTAATCAGATG
 GCGCAAACATGATAAAATTCGTACAACACATCCGTCATGGGCAATTTATGGCTCAGAAACAGCATCAGCGATTAAT
 AGCCGTGGCATTATAATAGAACAACAGGCGGAGCACAAATCATCAGATAAACAGCTGACAAGCTATGATAATTCAGC
 AGTTGGCTGGGGAGCAGTTGCATCATCAGCATGGTATGATGTTGTTCAAGAGATTTTGTGTCAGGCACATATGTTT
 GGACAGGATTTGATTATCTGGGCGAACCGACACCGTTGAAATGGCACAGGCTCAGGCGCAGTTGGCTCATGGCCGTCA
 CCGAAAAATAGCTATTTTGGCATCGTTGATACAGCAGGCTTCCGAAAGATACATATTTATTTATCAGAGCCAGTG
 GAATGATGATGTTCACTGATATCTTCCGGCATGGAATGAAAATGTTGTTGCAAAAGGCTCAGGCAATAATG
 TCCGGTTGTCGTTTATACAGATGCAGCGAAAGTGAACGTATTTTACACCGAAAGGCTCAACAGAAAAAGACTG
 ATCGGCGAAAAATCAATTTACAAAAAAAACAACAGCGGCAGGCTATACATATCAAGTCTATGAAGGCAGCGATAAAGA
 TTCAACAGCGCATAAAAACATGTATCTGACATGGAAATGTTCCGTGGGCAGAAGGCACAATTTCAAGCGGAAGCGTATG
 ATGAAAATAATCGCCTGATTCGGGAAGGCAGCACAGAAGGCAACGCAATCAGTTACAACAACAGGCAAGCAGCAAAA
 CTGAAAGCAGATGCGGATCGCAAAACAATTACAGCGGATGGCAAAGATCTGTCATATATTGAAGTCGATGTCACAGA
 TGCAAAATGGCCATATTGTTCCGGATGCAGCAAAATAGAGTCAATTTGATGTTAAAGGCGCAGGCAAACTGGTTGGCG
 TTGATAATGGCTCATCACCGGATCATGATTCATATCAAGCGGATAACCGCAAAGCATTTTCAGGCAAAGTCTCTGGCA
 ATTTGTTCACTCAACAAAAGAAGCAGGCGAAATTAAGTTACAGTACAGCAAAAGCAGATGGCCTGCAATCAAGCACAGTTAA
 AATTGCAACAACAGCAGTTCCGGGAACAAGCACAGAAAAAACAGTCCGCGACTTTTATTACAGCCGCAACTATTTATG
 TCAAAACAGGCAACAAACCGATCTGCCGTCAGATGTTGAAGTTCGCTATTCAGATGGAACAAGCGATAGACAAAAC
 GTTACATGGGATGCAGTTTCAGATGATCAAAATGCAAAAGCAGGCTCAATTTCAAGTTGCAAGGCAGATTGCAAGGCA
 AAAAAATAGCGTTCGCGTCACAATGATTGATGAAAATGGCGCACTGCTGAATTAATCAGCAAGCACACCGGTTGGCA
 CACCGGCAAGTTCTTCCGGGATCAAGACCGGCAAGTCTGCCGATGGCACAGTCAATCAGCAAAATTTGCAAGTCCAT
 TGGACAAAACCGGCAAGATACAGTCTATAATACAGCAGGCAAGTCAAAGTACCAGGCAACAGCAACAGTTTTTGGCAA

agaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaaagaagccaagttacaattggctcatcagtttcaggaaatgcac
 tgagactgacacaaaatattccggcagataaacaatcagatacactggatgcgattaaagatggctcaacaacagtt
 gatgcaaatacaggcggaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaagcaggccataacacagc
 gaaattacatttgaatatgcgacagaacaacaactgggcccagatcgatcatgtatTTTTTTCGcatagcaatgcag
 tttagatttccggatgctggcaaaacaaaattcagatcagcgcagatggcaaaaattggacagatctggcagcaaca
 gaaacaattgcagcgcagaatcaagcgaatagagtcaaaccgtatacatatgattttgcaccggttggcgcaacatt
 tgttaaagtgcagtcacaaacgcagatacaacaacaccgtcaggcgttggttgcgaggcctgacagaaattgaac
 tgaacacagcgcagaagcaaatTTgtcacaatacatcagcagcactgtcatcacttacagtcaatggcacaacagtt
 tcagattcagttctggcagcaggctcataaacacaccggcaattatcgcagatgttaaagcggaaggcgaaggcaa
 tgcaagegttacagtccttccggccatgataatgTTatcgcgtcattacagaaagcgaagatcatgtcacacgca
 aacatttacaatcaacctgggcacagaacaagaattt

[0680] >SEQ ID NO:15用于生成BIF变体的正向引物

[0681] GGGTAACTAGTGAAGATGCAACAAGAAG

[0682] >SEQ ID NO:16用于BIF_917的反向引物

[0683] GCGCTTAATTAATTATGTTTTTCTGTGCTTGTTT

[0684] >SEQ ID NO:17用于BIF_995的反向引物

[0685] GCGCTTAATTAATTACAGTGCGCCAATTTTCATCAATCA

[0686] >SEQ ID NO:18用于BIF_1068的反向引物

[0687] GCGCTTAATTAATTATTGAACCTAATTGTGCTG

[0688] >SEQ ID NO:19用于BIF_1241的反向引物

[0689] GCGCTTAATTAATTATGTGCTGTTTTTCAGTTCAAT

[0690] >SEQ ID NO:20用于BIF_1326的反向引物

[0691] GCGCTTAATTAATTAATAATTCTTGTTCTGTGCCCA

[0692] >SEQ ID NO:21用于BIF_1478的反向引物

[0693] GCGCTTAATTAATTATCTCAGTCTAATTTTCGCTTGCGC

[0694] >SEQ ID NO:22两歧双歧杆菌BIF_1750

[0695]

vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqrtsdfdanwkmfmsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqs
 neaesaylpggtgwrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentiv
 vkvenrlpssrwygsgiyrdvtlvtvdgvhvgngvaiktpslatqnggdvtmnltkvandteaaanitlkqtvf
 pkggktdaaigtvttasksiaagasadvstitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggkvltdydeygrwtgfd
 tsgfslngckvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveilqkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfd
 mwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlbgdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpat
 saklvawtkaadstrpmtgdnkikanwnesntmgdnl tanggvvgtmysdganydkirtthpswaiygsetasain
 srgiyrnttgaqssdkqltsydnsavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgsyps
 pknsyfgivdtagfpkdyfyysqwnddvhtlhlipawnenvakgsgnnpvvytdaakvklyftpkgstekrl
 igeksftkkttaagytyqvyegsdkdstahknmyltnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasvtttgaak
 lkadadrkti tadgkdl syievdvt danghi vpdaanrvtdfvkgagklvgvdngssp dhsyqadnrkafsgkvl
 ivqstkeageitvtakadglqsstvkiattavpgtstektvrsfyysrnyyvktnkpi lpsdvevrysdgtsdrqn

vtwdavsddqiakagsfsvagtvagqkivrvvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfah
wtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefktatirvqrsqvtigssvsgnalrltqnipadkqsdtdaikdgsttv
dantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqivmyffrdsnavrfpdagktkiqisadgknwtdlaa
etiaaqessdrvkytydfapvgatfvkvtvtnadtttspgvcaglteielktatskfvntsaalsslvtngtkv
sdsvlaagsyntpaiiadvkaegegnasvtvlpahdnvirvitesedhvtrktftinlgteqefpadsderdypaad
mtvtvgseqtsgtategpkkfavdgntstywhsnwtpptvndlwiafelqkptkldalrylprpagskngsvteykv
qvsddgtnwtdagsgtwttdygwklaefnqpvttkhvrkavhtyadsgndkfmsaseirlrkavdttdisgatv
pakltvdrvdadhpatfatkdvtvlgdatlrygvdyllidyagntavgkatvtvrgidkysgtvaktftielknapa
peptltsvsvtkpskltyvvgdafdpaglvqhadrqadrppqplvgeqadergltcgtrcdrveqlrkhenreahr
tgldhlefvgaadgavgeqatfkvhvhadqgdgrhddaderdidphvpvdhavgelaraachhviglrvdthrlkas
gfqipaddmaeidritgfhrrferhvg

[0696] >SEQ ID NO:23来自两歧双歧杆菌DSM20215的细胞外乳糖酶的信号序列

[0697] Vrskklwisllfalaliftmafgstssaqa

序列表

<110> 杜邦营养生物科学有限公司(DuPont Nutrition Biosciences AB)
 <120> 用于制备具有稳定低聚半乳糖含量的乳制品的方法
 <130> 19728FCT00
 <160> 23
 <170> BISSAF 1.0
 <210> 1
 <211> 887
 <212> PK1
 <213> 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)
 <220>
 <221> SOURCE
 <222> L. 887
 <223> /met. 型-蛋白质
 <224> /生物体="两歧双歧杆菌"
 <400> 1
 Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
 1 5 10 15
 Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
 20 25 30
 Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
 35 40 45
 Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
 50 55 60
 Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
 85 90 95
 Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
 100 105 110
 Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
 115 120 125
 Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
 130 135 140
 Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
 145 150 155 160
 Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
 165 170 175
 Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
 180 185 190
 Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met
 195 200 205
 Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile
 210 215 220
 Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
 225 230 235 240
 Ile Gly Thr Val Thr Trp Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser
 245 250 255 260
 Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
 260 265 270
 Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
 275 280 285
 Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr
 290 295 300
 Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
 305 310 315 320
 Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val
 325 330 335
 Ala Asn Arg Arg Ala Ile Gln Arg Gln Val Gln Ile Leu Gln Lys Met
 340 345 350
 Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu
 355 360 365
 Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe
 370 375 380
 Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys
 385 390 395 400
 Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp
 405 410 415
 Lys Asp Gln Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg
 420 425 430
 Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met
 435 440 445
 Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala
 450 455 460
 Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr
 465 470 475 480
 Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met
 485 490 495
 Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser
 500 505 510
 Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala
 515 520 525
 Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr
 530 535 540
 Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser
 545 550 555 560
 Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp
 565 570 575
 Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr
 580 585 590
 Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser
 595 600 605
 Gly Ala Val Gly Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile
 610 615 620
 Val Asp Thr Ala Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser
 625 630 635 640
 Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn
 645 650 655
 Glu Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val
 660 665 670
 Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser
 675 680 685

[0001]

Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr
690 695 700
Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Glu Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser
705 710 715 720
Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Top Ala Glu
725 730 735
Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro
740 745 750
Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala
755 760 765
Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly
770 775 780
Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His
785 790 795 800
Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala
805 810 815
Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser
820 825 830
Tyr Glu Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile
835 840 845
Val Glu Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala
850 855 860
Asp Gly Leu Glu Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro
865 870 875 880
Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr
885

<210> 2
<211> 965
<212> PRT
<213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..965
<223> /mol.型="蛋白质"
/生物体="两歧双歧杆菌"

[0002]

<400> 2
Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Glu Met Ser Ser Thr
1 5 10 15
Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Glu Asn Arg Thr
20 25 30
Ser Asp Phe Asp Ala Ser Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Glu
35 40 45
Ala Glu Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Glu Glu Val Asp Leu
50 55 60
Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Glu Lys Tyr Ser Glu Ser Asn Glu Ala
65 70 75 80
Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
85 90 95
Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
100 105 110
Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
115 120 125
Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
130 135 140
Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
145 150 155
Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
160 165 170 175
Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
180 185 190
Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Glu Asn Gly Gly Asp Val Thr Met
195 200 205
Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile
210 215 220
Thr Leu Lys Glu Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
225 230 235 240
Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser
245 250 255
Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
260 265 270
Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
275 280 285
Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Top Thr
290 295 300
Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
305 310 315 320
Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Glu Gly Ser Leu Gly Ala Val
325 330 335
Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Glu Val Glu Ile Leu Glu Lys Met
340 345 350
Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu
355 360 365
Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe
370 375 380
Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys
385 390 395 400
Trp Phe Gly Glu Ala Ile Ala Gly Asp Asn Asa Val Leu Gly Gly Asp
405 410 415
Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg
420 425 430
Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met
435 440 445
Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala
450 455 460
Lys Leu Val Ala Trp Trp Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr
465 470 475 480
Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met
485 490 495
Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser
500 505 510
Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala
515 520 525
Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr
530 535 540
Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Glu Ser Ser Asp Lys Glu Leu Thr Ser
545 550 555 560
Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp

565 570 575
Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr
580 585 590
Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser
595 600 605
Gly Ala Val Gly Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile
610 615 620
Val Asp Thr Ala Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Phe Tyr Gln Ser
625 630 635 640
Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Leu Leu Pro Ala Trp Asn
645 650 655
Glu Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val
660 665 670
Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser
675 680 685
Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr
690 695 700
Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser
705 710 715 720
Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu
725 730 735
Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro
740 745 750
Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala
755 760 765
Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly
770 775 780
Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His
785 790 795 800
Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala
805 810 815
Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser
820 825 830
Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile
835 840 845
Val Gln Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala
850 855 860
Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro
865 870 875 880
Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn
885 890 895
Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu
900 905 910
Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp
915 920 925
Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala
930 935 940
Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp
945 950 955 960
Glu Ile Gly Ala Leu
965

[0003]

<210> 3
<211> 1038
<212> PRT
<213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)
<220>
<221> SOURCE
<222> 1..1038
<223> /mol. 型-“蛋白质”
/生物体-“两歧双歧杆菌”
<400> 3
Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
1 5 10 15
Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
20 25 30
Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
35 40 45
Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
50 55 60
Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
65 70 75 80
Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
85 90 95
Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
100 105 110
Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
115 120 125
Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
130 135 140
Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
145 150 155 160
Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
165 170 175
Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
180 185 190
Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met
195 200 205
Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile
210 215 220
Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
225 230 235 240
Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Leu Ala Ala Gly Ala Ser
245 250 255
Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
260 265 270
Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
275 280 285
Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr
290 295 300
Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
305 310 315 320
Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val
325 330 335
Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met
340 345 350
Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu
355 360 365

Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe
 370 375 380
 Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys
 385 390 395 400
 Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp
 405 410 415
 Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg
 420 425 430
 Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met
 435 440 445
 Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala
 450 455 460
 Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr
 465 470 475 480
 Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met
 485 490 495
 Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser
 500 505 510
 Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala
 515 520 525
 Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr
 530 535 540
 Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser
 545 550 555 560
 Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp
 565 570 575
 Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr
 580 585 590
 Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser
 595 600 605
 Gly Ala Val Gly Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile
 610 615 620
 Val Asp Thr Ala Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser
 625 630 635 640
 Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn
 645 650 655
 Glu Ser Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val
 660 665 670
 Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser
 675 680 685
 Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr
 690 695 700
 Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser
 705 710 715 720
 Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu
 725 730 735
 Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro
 740 745 750
 Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Tyr Gly Lys Ala
 755 760 765
 Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly
 770 775 780
 Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His
 785 790 795 800
 Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala
 805 810 815
 Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser
 820 825 830
 Tyr Glu Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile
 835 840 845
 Val Glu Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala
 850 855 860
 Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro
 865 870 875 880
 Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn
 885 890 895
 Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu
 900 905 910
 Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Glu Asn Val Thr Trp Asp
 915 920 925
 Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala
 930 935 940
 Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp
 945 950 955 960
 Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr
 965 970 975
 Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr
 980 985 990
 Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asn Thr
 995 1000 1005
 Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val
 1010 1015 1020
 Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln
 1025 1030 1035

[0004]

<210> 4
 <211> 1142
 <212> FFT
 <213> 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)
 <220>
 <221> SOURCE
 <222> J. 1142
 <223> /mol 型="蛋白质"
 /生物体="两歧双歧杆菌"
 <400> 4
 Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
 1 5 10 15
 Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
 20 25 30
 Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
 35 40 45
 Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
 50 55 60
 Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
 85 90 95
 Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp

[0005]

100 105 110
 Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
 115 120 125
 Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
 130 135 140
 Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
 145 150 155 160
 Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
 165 170 175
 Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
 180 185 190
 Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Glu Asn Gly Gly Asp Val Thr Met
 195 200 205
 Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile
 210 215 220
 Thr Leu Lys Glu Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
 225 230 235 240
 Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Leu Ala Ala Gly Ala Ser
 245 250 255
 Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
 260 265 270
 Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
 275 280 285
 Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr
 290 295 300
 Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
 305 310 315 320
 Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Glu Gly Ser Leu Gly Ala Val
 325 330 335
 Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Glu Val Glu Ile Leu Glu Lys Met
 340 345 350
 Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu
 355 360 365
 Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe
 370 375 380
 Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys
 385 390 395 400
 Trp Phe Gly Glu Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp
 405 410 415
 Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg
 420 425 430
 Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met
 435 440 445
 Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala
 450 455 460
 Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr
 465 470 475 480
 Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met
 485 490 495
 Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser
 500 505 510
 Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala
 515 520 525
 Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr
 530 535 540
 Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Glu Ser Ser Asp Lys Glu Leu Thr Ser
 545 550 555 560
 Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp
 565 570 575
 Tyr Asp Val Val Glu Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr
 580 585 590
 Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser
 595 600 605
 Gly Ala Val Gly Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile
 610 615 620
 Val Asp Thr Ala Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Glu Ser
 625 630 635 640
 Glu Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn
 645 650 655
 Glu Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val
 660 665 670
 Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser
 675 680 685
 Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr
 690 695 700
 Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Glu Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser
 705 710 715 720
 Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu
 725 730 735
 Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro
 740 745 750
 Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala
 755 760 765
 Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly
 770 775 780
 Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His
 785 790 795 800
 Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala
 805 810 815
 Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser
 820 825 830
 Tyr Glu Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile
 835 840 845
 Val Glu Ser Thr Lys Gly Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala
 850 855 860
 Asp Gly Leu Glu Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro
 865 870 875 880
 Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn
 885 890 895
 Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu
 900 905 910
 Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Glu Asn Val Thr Trp Asp
 915 920 925
 Ala Val Ser Asp Asp Glu Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala
 930 935 940
 Gly Thr Val Ala Gly Glu Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp
 945 950 955 960
 Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr
 965 970 975

Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr
 980 985 990
 Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr
 995 1000 1005
 Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val
 1010 1015 1020
 Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Leu Arg Val Gln Arg Ser
 1025 1030 1035 1040
 Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Thr
 1045 1050 1055
 Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala Ile Lys
 1060 1065 1070
 Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro
 1075 1080 1085
 Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala
 1090 1095 1100
 Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val
 1105 1110 1115 1120
 Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly
 1125 1130 1135
 Lys Thr Lys Ile Gln Ile
 1140

<210> 5
 <211> 1211
 <212> PRT
 <213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..1211
 <223> /mol.型="蛋白质"
 /生物体="两歧双歧杆菌"

<400> 5
 Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
 1 5 10 15
 Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
 20 25 30
 Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
 35 40 45
 Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
 50 55 60
 Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
 85 90 95
 Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
 100 105 110
 Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
 115 120 125
 Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
 130 135 140
 Ala Lys Phe Gly Gly Gln Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
 145 150 155 160
 Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
 165 170 175
 Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
 180 185 190
 Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met
 195 200 205
 Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Gln Ala Ala Ala Asn Ile
 210 215 220
 Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
 225 230 235 240
 Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser
 245 250 255
 Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
 260 265 270
 Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
 275 280 285
 Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr
 290 295 300
 Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
 305 310 315 320
 Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val
 325 330 335
 Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met
 340 345 350
 Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu
 355 360 365
 Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe
 370 375 380
 Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys
 385 390 395 400
 Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp
 405 410 415
 Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg
 420 425 430
 Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met
 435 440 445
 Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala
 450 455 460
 Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr
 465 470 475 480
 Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met
 485 490 495
 Nly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser
 500 505 510
 Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala
 515 520 525
 Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr
 530 535 540
 Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser
 545 550 555
 Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp
 565 570 575
 Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr
 580 585 590
 Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser

[0006]

595 600 605
 Gly Ala Val Gly Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile
 610 615 620
 Val Asp Thr Ala Gly His Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Glu Ser
 625 630 635 640
 Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn
 645 650 655
 Phe Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val
 660 665 670
 Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser
 675 680 685
 Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr
 690 695 700
 Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser
 705 710 715 720
 Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu
 725 730 735
 Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro
 740 745 750
 Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala
 755 760 765
 Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly
 770 775 780
 Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His
 785 790 795 800
 Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala
 805 810 815
 Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser
 820 825 830
 Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile
 835 840 845
 Val Gln Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala
 850 855 860
 Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro
 865 870 875 880
 Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn
 885 890 895
 Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu
 900 905 910
 Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp
 915 920 925
 Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala
 930 935 940
 Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp
 945 950 955 960
 Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr
 965 970 975
 Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr
 980 985 990
 Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asn Thr
 995 1000 1005
 Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val
 1010 1015 1020
 Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln Arg Ser
 1025 1030 1035 1040
 Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Thr
 1045 1050 1055
 Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala Ile Lys
 1060 1065 1070
 Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro
 1075 1080 1085
 Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala
 1090 1095 1100
 Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val
 1105 1110 1115 1120
 Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly
 1125 1130 1135
 Lys Thr Lys Ile Gln Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu
 1140 1145 1150
 Ala Ala Thr Glu Thr Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys
 1155 1160 1165
 Pro Tyr Thr Tyr Asp Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val
 1170 1175 1180
 Thr Val Thr Asn Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala
 1185 1190 1195 1200
 Gly Leu Thr Glu Ile Glu Leu Lys Thr Ala Thr
 1205 1210

[0007]

<210> 6
 <211> 1296
 <212> PRT
 <213> 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)
 <220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..1296
 <223> mol 型-蛋白质
 /生物体-两歧双歧杆菌
 <400> 6
 Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
 1 5 10 15
 Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
 20 25 30
 Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
 35 40 45
 Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Glu Gln Val Asp Leu
 50 55 60
 Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
 85 90 95
 Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
 100 105 110
 Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
 115 120 125
 Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
 130 135 140
 Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
 145 150 155 160

Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
 165 170 175
 Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
 180 185 190
 Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met
 195 200 205
 Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile
 210 215 220
 Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
 225 230 235 240
 Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser
 245 250 255
 Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
 260 265 270
 Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
 275 280 285
 Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr
 290 295 300
 Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
 305 310 315 320
 Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val
 325 330 335
 Ala Asn Arg Arg Ala Ile Gln Arg Gln Val Gln Ile Leu Gln Lys Met
 340 345 350
 Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu
 355 360 365
 Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe
 370 375 380
 Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys
 385 390 395 400
 Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp
 405 410 415
 Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg
 420 425 430
 Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met
 435 440 445
 Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala
 450 455 460
 Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr
 465 470 475 480
 Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met
 485 490 495
 Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser
 500 505 510
 Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala
 515 520 525
 Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr
 530 535 540
 Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Cln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser
 545 550 555 560
 Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp
 565 570 575
 Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr
 580 585 590
 Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Gln Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser
 595 600 605
 Gly Ala Val Gly Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile
 610 615 620
 Val Asp Thr Ala Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser
 625 630 635 640
 Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn
 645 650 655
 Glu Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val
 660 665 670
 Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser
 675 680 685
 Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr
 690 695 700
 Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser
 705 710 715 720
 Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu
 725 730 735
 Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro
 740 745 750
 Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala
 755 760 765
 Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly
 770 775 780
 Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His
 785 790 795 800
 Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala
 805 810 815
 Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser
 820 825 830
 Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile
 835 840 845
 Val Glu Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala
 850 855 860
 Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro
 865 870 875 880
 Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn
 885 890 895
 Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu
 900 905 910
 Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp
 915 920 925
 Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala
 930 935 940
 Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp
 945 950 955 960
 Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr
 965 970 975
 Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Phe Asp Gly Thr
 980 985 990
 Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr
 995 1000 1005
 Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val
 1010 1015 1020
 Phe Gly Lys Gln Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln Arg Ser

[0008]

1025 1030 1035 1040
 Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Thr
 1045 1050 1055
 Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala Ile Lys
 1060 1065 1070
 Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro
 1075 1080 1085
 Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala
 1090 1095 1100
 Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Leu Gly Gln Ile Val
 1105 1110 1115 1120
 Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly
 1125 1130 1135
 Lys Thr Lys Ile Gln Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu
 1140 1145 1150
 Ala Ala Thr Glu Thr Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys
 1155 1160 1165
 Pro Tyr Thr Tyr Asp Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val
 1170 1175 1180
 Thr Val Thr Asn Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala
 1185 1190 1195 1200
 Gly Leu Thr Glu Ile Glu Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr
 1205 1210 1215
 Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys Val
 1220 1225 1230
 Ser Asp Ser Val Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala Ile Ile
 1235 1240 1245
 Ala Asp Val Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Val Leu
 1250 1255 1260
 Pro Ala His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu Ser Glu Asp His
 1265 1270 1275 1280
 Val Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly Thr Glu Gln Glu Phe
 1285 1290 1295

<210> 7
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..453
 <223> /mol 糖“蛋白质”
 /note“糖苷水解酶催化核心”
 /生物体“两歧双歧杆菌”

[0009]

<400> 7
 Gln Asn Arg Thr Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Gln Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Glu
 20 25 30
 Gln Val Asp Leu Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Glu Lys Tyr Ser Gln
 35 40 45
 Ser Asn Glu Ala Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr
 50 55 60
 Arg Lys Ser Phe Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala
 65 70 75 80
 Ile Asn Phe Asp Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly
 85 90 95
 Val Lys Leu Gly Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp
 100 105 110
 Leu Thr Gly Asn Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys
 115 120 125
 Val Glu Asn Arg Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile
 130 135 140
 Tyr Arg Asp Val Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn
 145 150 155 160
 Asn Gly Val Ala Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly
 165 170 175
 Asp Val Thr Met Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala
 180 185 190
 Ala Ala Asn Ile Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys
 195 200 205
 Thr Asp Ala Ala Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala
 210 215 220
 Ala Gly Ala Ser Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro
 225 230 235 240
 Lys Leu Trp Ser Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu
 245 250 255
 Val Leu Asn Gly Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly
 260 265 270
 Phe Arg Trp Thr Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly
 275 280 285
 Glu Lys Val Lys Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser
 290 295 300
 Leu Gly Ala Val Ala Ser Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile
 305 310 315 320
 Leu Gln Lys Met Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala
 325 330 335
 Ala Lys Ala Leu Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val
 340 345 350
 Glu Glu Val Phe Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu
 355 360 365
 Asp Tyr Gly Lys Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val
 370 375 380
 Leu Gly Gly Asp Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser
 385 390 395 400
 Thr Ile Asn Arg Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser
 405 410 415
 Gly Asn Glu Met Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro
 420 425 430
 Ala Thr Ser Ala Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr
 435 440 445
 Arg Pro Met Thr Tyr
 450

<310> 8
 <311> 5160
 <312> DNA
 <313> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

```

<220>
<221> source
<222> J. 5160
<223> /mol_型="DNA"
/生物体="两歧双歧杆菌"

<400> 8
gcaattgaa atgcaaacg aagcagatg acacacaaa tgcataaac accggaagt 60
gtttattca cagcggtag tagcaaacaa aatcgcaca gggatttga tgcgaactgg 120
aaaattatg tgcagatag gtttaagca caagatcgg catitgata ttcagcattg 180
caacaagttg atctgcgca tgaatagc atcacacaga aatagacca aagcaatgaa 240
ggagaatcag catatcttc gsgagcaca gctgtgata gaaaaagctt tacaattgat 300
agagatctg cagcaaacg catctcgatt aatttgatg gcctctatg gaatgcaca 360
gtctgattta atgcccgtt aetggscaca catctgatg gctatccac gttttcatt 420
gtctgacag gcaatgcaa atttgacgga gaaaacaaa ttgtctcaa agtfgaaaat 480
agactggcgt catcaagat gatttcagc agcggcatt atagagatg tacactgaca 540
gttacagatg ggttcaatg tgcacaat tgcagcaga ttcaaacacc gtcactggca 600
atcacaaaat gggagatgt cacatgaac ctgacacaaa aagtcggaaa tgatacagaa 660
ggcagcagca acattacac gaacagaca gttttccga aagcggaaa accgatgca 720
gcaatggca cagllacaa agcatcaaaa tcaatlcag cagcgcata acagatgat 780
naaacacaa ttacagcag aagccgaaa ctgtgttca ttaaacacc gaacctgat 840
acagttagaa cagaagtct gaacggagg aagctctg atacatata tacagaatat 900
ggctttcgt ggcagcgtt tgaagcaaa tcaagcttt cacitgaatg cgaanaagt 960
aaactgaaa gctttagat gcatcagat caagctcac ttggcagat tgcanaatg 1020
cagcaattg aagacaaat gcaaatctg caaaaatg gcctcaatg cattccaca 1080
acacataat cggcagcaaa agcatgatt gatctcga atgaaaagg cgtttctggt 1140
gtcgaagaat tctttgatg ttggaaccg agcaaaaat gcaaccgga agatlatag 1200
aaatggttt gccaaagat tgcagcagat aatgcattg tggagagca taaagatgaa 1260
aataggggg aatttgatc tacatcaaa attaaccgc atagaaatg accctcagt 1320
atlatggtt cactgggca tgaatgatg gaggcattt cagctcagt ttccagctt 1380
cggcaaacat cagcaaaaat ggttcatgg acaaaagca cagattcaac aagaccgag 1440
atlatggtt atacaaaat taagcgaac tggaaagat aaatcaaat gggcgaatg 1500
ctaacagca ataccgagt ttttgcaca aatllacag atggcgaat ctatgataa 1560
atcgtcaaa cacatccctg atggcaatt tatgtctag aacacagatc agcattaat 1620
agcctggca ttataatag aacaaagc ggagcaaat catcagata acagotgaca 1680
agctatgata atcagcagt tggctggga gcaatgcat catcagatg gtatgatgt 1740
gtcagagaa atttgtcgc agccacatg gtttggcag galitgata tctggcgaa 1800
cggacacct ggaatggac agctcagcc gcaatgctt catggcctg accgaaaaat 1860
agctatttt gcaatctga tacagcagg tttccgaag atacatata tttttatcg 1920
agcagttga atgtgatgt tcatcacatg catactctt cggcatgaaa tgaanaatg 1980
gttgcaaa gctcagcaaa taatgtccg gttgcttt atacagatg agcgaagtg 2040
aaactgatt ttacacgaa agctcaaca gaaaaagac tgatcggca aaaatcatt 2100
aaacaaaana caacagcggc agctcaaca talcagctt atgaaagca cgttaaatg 2160
ttcaacagc ctaaaaaat gtatctgaca tggaaatgt cgtggcaga agccacatt 2220
ttagcggag atgatgaga aaanaatc ctagctccg aagcagrar agaaagcaac 2280
gctcaatla caaacacag caaaagatg aac gaaa caatgcaaa tcaaaaata 2340
atlacagca atgcaanaa tctgtcatb atgaaatg atgtcacaga tgcanaatg 2400
catattggt cggatcgagc aatagatgc acatctgat ttaaaagc agcacaatg 2460
atggcgttg aatggctc atcacaggat catgatcat atcaagcga taaccgaaa 2520
gcaatllag caaagctc gccaatggt cagtcacaa aagaagcag cgaatitaca 2580
gttacagca aagcagatg cctgcaata agcacagta aaatgcaac aacagcatt 2640
cgggcaaca gcaagaaaa acagctccg agctttatt acagcccaa ctatgatg 2700
aaaaagca acaaacgat tctgcctca gatgtgaag ttcttattc agatggaaa 2760
agcagatagc aaaaagctt atgggagca gtttcagat atcaaatg caaagcagg 2820
tcaatllag ttgagcagc agttgcagg caaaaatfa gcttctgct caaatgat 2880
gatgaattg ggcactgt gattatca cgaagcacc cgttggcc accggcagt 2940
cttccggat caagaccgc agctcggcg gatggcag tccatcagc aatitttca 3000
ctcatttga caaacagc agatagatc tataatcag cagcagatg caaatcag 3060
gaaacagca cactttllg caaagaatt taagcagc cgaatata agttcaaaa 3120
agcraagtta caatggctc atcagttca ggaatgccc tgagactgac acaanaat 3180
tagcagata acaatcaga tacactgat gcaataag atgctcaac aacagttag 3240
gcaatcaga cggagcgc aatctctca gcatggcaa atggcaca tcaaaaaga 3300
ggcaataca cagcgaat tacattgaa ttggcagc acaacaact gggcagatc 3360
gtcattgat tttttcaga tagcaagca gttgatctt cggatctgg caaaacaaa 3420
atcagatca ggcagatg caaaaatgg acagatctg cagcaacga acaattgca 3480
ggcagaaat caagcagat agtcaaacg tataatatt atttgcacc ggttggcga 3540
acatttgtta aagtcagat cacaaacga gatacaaaa caccgtcag cgtttgttg 3600
gcaatctga cagaatllg acgaaaca gcaacagca aatlltca aatitacat 3660
gagcactgt catcactac agtcaagg acanaatgt cagatctgt tctggcaga 3720
ggctcatata acacaccgc aattatgca gatgttaag cgaagcga agcgaatgca 3780
agcattacag tctctcggc acatgaaat gttatcgc traitacga aagcgaatg 3840
catctcacx caaaaact tacatcaac ctggcagc acaaaatit tccgctgat 3900
ctagatgaaa gagattatc ggcagcag atgacagca cagttgctc agcaaaa 3960
ttagcagag caacagaag accgaaaaa ttggcagtc atggcaaac atcaaatat 4020
ttagcagca atggaccc gacacagtt aatgatctt ggtctcgtt tgaactgaa 4080
naaccgaca aactggatc actgagatc ctctcctc cggcagctc aaaaatggc 4140
agcttcaag aatataaag tcaagttca gatgatgaa caaactgac agatcagc 4200
ttagcagca gcaaacgga ttatggctg aacggcgc aatitacat accgctca 4260
acaaaacat tttagactga agcgttcat acatctcag atagcgcga cgtataat 4320
atagcagca cgaatattg actgaaaaa ccgcagata caacggat tttagggca 4380
atagllaca tctggcaaa acgacagtt gataatllg atgcaata tctggcaaa 4440
ttggcaaaa aagatctac agttacatg ggagatcga cactgagata tggcgttat 4500
tatctgttg aatagcag caatcagca gttggcaag caacagtag agttagagg 4560
atgataaat atcagcagc agtctgaaa acatcaaa ttgaatgaa aatgcaag 4620
ggcagcaac gcaactgac atcagtagc gtcaaaa aacagcga acagatata 4680
gttctggag atcatttga tccggcagg ctagctctg aacatgatg acaagcag 4740
agacctccg aaccgtggt tggcaaaa cgggatgac gggactgac atggcga 4800
agatggata agttgaaa actgcaaaa catgaaata gaaagcga tagaacagg 4860
ctgattcat tgaattttg ttggcagca gatggcag ttggagaaca agcaaat 4920
aaagtccat tcatctcga tcaagagat ggcagcatg atgatcaga tgaaccgat 4980
atgatccg atctcctgt cgaatcga gttggcaag tggcaagag acatgca 5040
catgttttg gctgagat caatcaaat agcaataag caagcctct tcaatctg 5100
gctatgata tggcagaat cagatcatt acagcttt atcttttga accgatg 5160

```

[0010]

```

<210> 9
<211> 2661
<212> DNA
<213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

<220>
<221> source
<222> J. 3661
<223> /mol_型="DNA"
/生物体="两歧双歧杆菌"

<400> 9
atllacagat caacaaagc gcatagcaca acacaaatg catcaaacg gaaatllg 60
tatctctcag cgtctgatg caacaaaat cgcacaagg attttgatg gaactggaa 120

```

```

tttatggctgt cagatagcgt tcaagcaca gaccggccat ttgatgatic agcaaggcaa 180
caagttagat tcccgcatga tcatagcatic acacagaaat atacccaag caatgaagca 240
gaatcagcat atcttorggg aggcacagc ttgatataga aaagctttac aattgataga 300
gatttggcag gcaaacgcat tgcgallaat lllltaggca klalalaga tgcacagctc 360
lqllltaalg gclllaaact ggcacacat tccatagcrl attcagctt licaallgat 420
elgatagcca atgcaaaa tt tggcgagaa aacacaatfg tcttcaagtt tgaataataga 480
cttccgctat caagatggt ltcaggcagc ggcatttata gagatgttac actggacagtt 540
aragatggag ttratttgg caaiaaifgg gtcgcaaita aacacagctc actggcaaca 600
caaaatggag gngatgtcar aacgaarctg acacaaaag tccgcaatga tacagaagca 660
gcagcgaaca ttacactgaa acagacagtt ttccgcaag gggcaaaaac ggatgagca 720
attggccagc ttacaaragc acaaaaatca attggagcag ggcctcagc agatgttaca 780
agcacaa tta cagcagvaag cccgaacttg ttgtcaaita aaacccgaa cctgtataca 840
gttagaacag aagttctgaa cggaggcaaa gtcttgata catatgatcc agaaatagc 900
tttccgttga taggctt tgcacaatca gctctttcac tgaatggca aaaagcaaa 960
ctgaaagcgc tttagatgca tcatgatcaa gctcacttg gctcagttgc aaalagagc 1020
gcaattgaaa gacaagtcca aactctgaaa aaatggggc tcaatagcat tccgcaaca 1080
caataatccg cagcaaaaagc acgattgat gctcgaatg aaacagcgt tcttggctgc 1140
gaagaagctc ttgaitgttg gaaccgagc aaaaatgcca acacggaga ttatgcaaa 1200
tggtttggcc aagcaattgc agcgataaaf gcaattctgg cagcgataa agatgaaaa 1260
tggcgaact ttgaleltac acaacaatt aaccggata gaaatgacc gtcagttat 1320
atgtgtccat tggcnaifg aaatgtgaa tggcatttcag gctcagttc aggccttcg 1380
gcacatcag caaacigtgt tgcaggaa aaagcagcag attcccaag accgatgca 1440
tatggcgata aceaaaifga agcgaactgg aacgaatcaa atcaaatggc cgaatactg 1500
acagcaaatg ccagatgtgt tggcacaat tattcagatg ggcacaaact tgaataaatt 1560
gttacacacac atctctcatg agcaatttat ggcctcagaaa cagcctcagc gattaatagc 1620
cttggcattt ataatagaac aacagcgga gcaaatcat cagataaaca gttgacaagc 1680
lallglaall cactagllgg cgggggca gttgcacat tgcctaggia tgaigtgtt 1740
cagaagall lllgttaggg cacaatgll ttgataagat ttgatllct gggcaacgc 1800
acacclaga atggcagag cccagcgpa ttggctcat ggcctcacc gaaaaatagc 1860
tattttgcca ttgttgatc agcagcttt ccgaagaata catattatct ttatcagagc 1920
cagttgaaif atgalttca tacactgmat atttllccgg catggaaiga aaatgtgtt 1980
caaaaagcct cagcnaataa tctccggtt gctgttata cagatgacc gaaagcaaa 2040
ctgtatttia caccgaaagc ccaacaaga aaaaagctga tggcgaaaa atcaatcaca 2100
aaaaaaccaa cagcggcagg ccatacatat caagcttatg aagcgagca taagattca 2160
acagcgata aaaaactgta tccgacatgg aatgttccgt ggcagaaag cacaatcca 2220
tccgaagcct atgaitgaaa taatcctctg attccggaag ccagcagaca aggcacgca 2280
tcagttacca caacagcga agcagcaaaa ctgaaagag atgcagctc caaaaactt 2340
acagcgatg gcaagatct gcaatatt gaagctgat tccagctgc aaatggcact 2400
atgttccgg atgcagcaaa tagagtaea ttgatgta aagcgcagg caaacggtt 2460
ggcttgata atggctcctc aacgatcat gattcatalc aagcgataa ccgcaagca 2520
tttccagca agtctctggc aaatgttag tcaacaana agcagcgca aattacagtt 2580
acagcaaaag cagatggct gcaatcagc acagttaaa ttgcacac accagctccg 2640
agcaaaagc cagaaaaaa a

```

```

<210> 10
<211> 2895
<212> DNA
<213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

<220>
<221> source
<222> J. 2895
<223> /hm "Bifidobacterium bifidum"
/生物体="两歧双歧杆菌"

```

[0011]

```

<400> 10
gttgaagatg caacaagaag cgaatgcaca acacaaatgt catcaacac ggaagctgtt 60
tattcatcag cgttctgtag caaacaaaat ccgcaacagc attttgagc gaacggaaa 120
tttatgctgt cagatagcgt tcaagcaca gaccggccat ttgatgatic agcaaggcaa 180
caagttagat tcccgcatga tcatagcatic acacagaaat atacccaag caatgaagca 240
gaatcagcat atcttorggg aggcacagc ttgatataga aaagctttac aattgataga 300
gatttggcag gcaaacgcat tgcgallaat lllltaggca klalalaga tgcacagctc 360
lqllltaalg gclllaaact ggcacacat tccatagcrl attcagctt licaallgat 420
elgatagcca atgcaaaa tt tggcgagaa aacacaatfg tcttcaagtt tgaataataga 480
cttccgctat caagatggt ltcaggcagc ggcatttata gagatgttac actggacagtt 540
aragatggag ttratttgg caaiaaifgg gtcgcaaita aacacagctc actggcaaca 600
caaaatggag gngatgtcar aacgaarctg acacaaaag tccgcaatga tacagaagca 660
gcagcgaaca ttacactgaa acagacagtt ttccgcaag gggcaaaaac ggatgagca 720
attggccagc ttacaaragc acaaaaatca attggagcag ggcctcagc agatgttaca 780
agcacaa tta cagcagvaag cccgaacttg ttgtcaaita aaacccgaa cctgtataca 840
gttagaacag aagttctgaa cggaggcaaa gtcttgata catatgatcc agaaatagc 900
tttccgttga taggctt tgcacaatca gctctttcac tgaatggca aaaagcaaa 960
ctgaaagcgc tttagatgca tcatgatcaa gctcacttg gctcagttgc aaalagagc 1020
gcaattgaaa gacaagtcca aactctgaaa aaatggggc tcaatagcat tccgcaaca 1080
caataatccg cagcaaaaagc acgattgat gctcgaatg aaacagcgt tcttggctgc 1140
gaagaagctc ttgaitgttg gaaccgagc aaaaatgcca acacggaga ttatgcaaa 1200
tggtttggcc aagcaattgc agcgataaaf gcaattctgg cagcgataa agatgaaaa 1260
tggcgaact ttgaleltac acaacaatt aaccggata gaaatgacc gtcagttat 1320
atgtgtccat tggcnaifg aaatgtgaa tggcatttcag gctcagttc aggccttcg 1380
gcacatcag caaacigtgt tgcaggaa aaagcagcag attcccaag accgatgca 1440
tatggcgata aceaaaifga agcgaactgg aacgaatcaa atcaaatggc cgaatactg 1500
acagcaaatg ccagatgtgt tggcacaat tattcagatg ggcacaaact tgaataaatt 1560
gttacacacac atctctcatg agcaatttat ggcctcagaaa cagcctcagc gattaatagc 1620
cttggcattt ataatagaac aacagcgga gcaaatcat cagataaaca gttgacaagc 1680
lallglaall cactagllgg cgggggca gttgcacat tgcctaggia tgaigtgtt 1740
cagaagall lllgttaggg cacaatgll ttgataagat ttgatllct gggcaacgc 1800
acacclaga atggcagag cccagcgpa ttggctcat ggcctcacc gaaaaatagc 1860
tattttgcca ttgttgatc agcagcttt ccgaagaata catattatct ttatcagagc 1920
cagttgaaif atgalttca tacactgmat atttllccgg catggaaiga aaatgtgtt 1980
caaaaagcct cagcnaataa tctccggtt gctgttata cagatgacc gaaagcaaa 2040
ctgtatttia caccgaaagc ccaacaaga aaaaagctga tggcgaaaa atcaatcaca 2100
aaaaaaccaa cagcggcagg ccatacatat caagcttatg aagcgagca taagattca 2160
acagcgata aaaaactgta tccgacatgg aatgttccgt ggcagaaag cacaatcca 2220
tccgaagcct atgaitgaaa taatcctctg attccggaag ccagcagaca aggcacgca 2280
tcagttacca caacagcga agcagcaaaa ctgaaagag atgcagctc caaaaactt 2340
acagcgatg gcaagatct gcaatatt gaagctgat tccagctgc aaatggcact 2400
atgttccgg atgcagcaaa tagagtaea ttgatgta aagcgcagg caaacggtt 2460
ggcttgata atggctcctc aacgatcat gattcatalc aagcgataa ccgcaagca 2520
tttccagca agtctctggc aaatgttag tcaacaana agcagcgca aattacagtt 2580
acagcaaaag cagatggct gcaatcagc acagttaaa ttgcacac accagctccg 2640
agcaaaagc cagaaaaaa agcgcagc tttattacca gercgacta ttatgcaaa 2700
acagcacaac accgatctc ggcctcagc attgaagtc cctattcaga tggcaaacg 2760
gattagcaaa actgtacatg ggaatcagtt ttagatgac aaattgcaaa agcagctca 2820
tttccagca agtctctggc aaatgttag tcaacaana agcagcgca aattacagtt 2880
agcaaaagc cagatggct gcaatcagc acagttaaa ttgcacac accagctccg 2940
gaaatggcc cactg

```

```

<410> 11
<411> 3114
<412> DNA

```

<213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

<220>

<221> source

<222> L. 3114

<223> /mol. 型="DNA"

/生物体="两歧双歧杆菌"

<400> 11

gttgaagtg	caacaagaag	cgatagccca	acacaanaat	catcaacacc	ggaagtgttt	60
laticatcag	cagctgatalag	caaacaaaat	tgracaagtg	atllilgagtc	gaactlgaau	120
ttatagctgt	cagatagcgt	tcaagcaca	gaaccgcaat	ttgatgatte	agcatggcaa	180
caagttgato	tgcgcgatga	ttatagcaco	acacagaana	atagccaaga	caaagaaga	240
gaattagcst	atcttcgggg	agggcaggg	tggatagaa	aaagctttac	aatgataga	300
gacttggcag	gcaaacgcat	tgcattfaat	ttgatggcg	tctatagaa	tgcacacgtr	360
tggtttaag	gggttaaac	gggcacacat	ccgatggct	attcaagctt	ttcatttgat	420
ctggacagca	atgcaaaaat	tggcggagaa	aacacaatig	tcttcaagtt	tgaaaaataga	480
ctgcctcat	caagatagta	ttcagggcgc	ggcatttata	ggatgtttac	acgacagtt	540
acaatggc	ttcatgttgg	caataatggc	gtgcgaatta	aaacaccgtc	acggcaaca	600
caaaatggc	gagatgtcac	aatgaaccig	acaaraaag	tccgcaatga	tacagaagca	660
gcgcgcaaa	ttacacigaa	acagccagll	ttccgaaag	gggaaaana	ggaagcagca	720
attggcrag	ttacaaagc	atcaaaatca	atggcaag	ggccatcagc	agaatttara	780
agcacaafta	cagcagcaag	cccgaaccig	tggcaatta	aaaaccggaa	ccggtataca	840
tttgaagcag	aagctctgaa	cggagggcaaa	gtcttgata	catatgatcc	agaatattgc	900
tttgcctgga	cagcctttag	tgcacatca	ggcctttcac	tgaatggcga	aaaagtcaaa	960
ctgaagggc	ttagcatgca	tcatgatcaa	ggcctactig	ggccagttgc	aaaagagcc	1020
gcatttgaat	gacaangtca	aatctctgaa	aaaatggcg	tcaatagcat	tccgcaaca	1080
caaaatccg	cagcaaaaagc	actgatgat	gtcgaatig	aaaagggctt	tcggttgtc	1140
gaaagaactt	ttatattgty	gaaccgcagc	aaaatggca	acacggcaag	ttagcgaana	1200
tggtttggc	aagcaatggc	agggcgaat	ggatgttag	ggggcaata	agaagaana	1260
tggcgaat	ttgatcttac	atcaacaatt	aaccggata	gaatgcacc	gtcatttatt	1320
atgtgtrac	tggcraatga	aatgatgaa	ggcattttag	gctcaatttc	agctttctgc	1380
gcaaatcag	caaaaatggc	tgcattggca	aaagcagag	attcaacaa	accgatgaa	1440
tatggcgaat	acaanaatga	agcgaactgg	aacgaatca	atcaaatggc	cgaatctctg	1500
acagcaaatg	gggagttgt	tggcacaat	taacagatg	ggcgaacta	tgaataaatt	1560
cgtacacacc	atcctctag	ggcaatttat	ggcacaana	cagcatcagc	gactaatagc	1620
ctggcatttt	ataatagaac	aaccggcga	gcacaatcat	cagataaaca	gcgacaagc	1680
tatgataatt	cagcagttgg	ctggggagca	gtgcaatc	cagcatggtta	tgaattgttt	1740
caagagatt	ttgcgcagc	ccacatagtt	tggcagcag	ttgattatct	ggcgcaacc	1800
acccctggca	aiggccagc	ctcaggcgca	gtggcaatg	ggccttacc	gaaaatagc	1860
tattttgga	tctgtalac	agcagcttt	ccgaagata	catattatt	ttacagagc	1920
cagtggcaat	atgatgttca	tacactgcat	atctctccg	catggaatga	aaaattgttt	1980
gcacaagll	cagcaatgaa	ttlctcagll	gtgtlltata	cagatcagc	gaaagtcaaa	2040
ctgtatttta	caccgaaaag	ctcaacagaa	aaaagactga	tccggcaaaa	atcatttaca	2100

<210> 12

<211> 2426

<212> DNA

<213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

<220>

<221> source

<222> L. 3426

<223> /mol. 型="DNA"

/生物体="两歧双歧杆菌"

<400> 12

gttgaagtg	caacaagaag	cgatagccca	acacaanaat	catcaacacc	ggaagtgttt	60
tattctctag	cagctgatalag	caaacaaaat	tgracaagtg	atllilgagtc	gaactlgaau	120
ttatagctgt	cagatagcgt	tcaagcaca	gaaccgcaat	ttgatgatte	agcatggcaa	180
caagttgato	tgcgcgatga	ttatagcaco	acacagaana	atagccaaga	caaagaaga	240
gaattagcst	atcttcgggg	agggcaggg	tggatagaa	aaagctttac	aatgataga	300
gacttggcag	gcaaacgcat	tgcattfaat	ttgatggcg	tctatagaa	tgcacacgtr	360
tggtttaag	gggttaaac	gggcacacat	ccgatggct	attcaagctt	ttcatttgat	420
ctggacagca	atgcaaaaat	tggcggagaa	aacacaatig	tcttcaagtt	tgaaaaataga	480
ctgcctcat	caagatagta	ttcagggcgc	ggcatttata	ggatgtttac	acgacagtt	540
acaatggc	ttcatgttgg	caataatggc	gtgcgaatta	aaacaccgtc	acggcaaca	600
caaaatggc	gagatgtcac	aatgaaccig	acaaraaag	tccgcaatga	tacagaagca	660
gcgcgcaaa	ttacacigaa	acagccagll	ttccgaaag	gggaaaana	ggaagcagca	720
attggcrag	ttacaaagc	atcaaaatca	atggcaag	ggccatcagc	agaatttara	780
agcacaafta	cagcagcaag	cccgaaccig	tggcaatta	aaaaccggaa	ccggtataca	840
tttgaagcag	aagctctgaa	cggagggcaaa	gtcttgata	catatgatcc	agaatattgc	900
tttgcctgga	cagcctttag	tgcacatca	ggcctttcac	tgaatggcga	aaaagtcaaa	960
ctgaagggc	ttagcatgca	tcatgatcaa	ggcctactig	ggccagttgc	aaaagagcc	1020
gcatttgaat	gacaangtca	aatctctgaa	aaaatggcg	tcaatagcat	tccgcaaca	1080
caaaatccg	cagcaaaaagc	actgatgat	gtcgaatig	aaaagggctt	tcggttgtc	1140
gaaagaactt	ttgatattgy	gaaccgcagc	aaaatggca	acacggcaag	ttagcgaana	1200
tggtttggc	aagcaatggc	agggcgaat	ggatgttag	ggggcaata	agaagaana	1260
tggcgaat	ttgatcttac	atcaacaatt	aaccggata	gaatgcacc	gtcatttatt	1320
atgtgtrac	tggcraatga	aatgatgaa	ggcattttag	gctcaatttc	agctttctgc	1380
gcaaatcag	caaaaatggc	tgcattggca	aaagcagag	attcaacaa	accgatgaa	1440
tatggcgaat	acaanaatga	agcgaactgg	aacgaatca	atcaaatggc	cgaatctctg	1500
acagcaaatg	gggagttgt	tggcacaat	taacagatg	ggcgaacta	tgaataaatt	1560
cgtacacacc	atcctctag	ggcaatttat	ggcacaana	cagcatcagc	gactaatagc	1620
ctggcatttt	ataatagaac	aaccggcga	gcacaatcat	cagataaaca	gcgacaagc	1680
tatgataatt	cagcagttgg	ctggggagca	gtgcaatc	cagcatggtta	tgaattgttt	1740
caagagatt	ttgcgcagc	ccacatagtt	tggcagcag	ttgattatct	ggcgcaacc	1800
acccctggca	aiggccagc	ctcaggcgca	gtggcaatg	ggccttacc	gaaaatagc	1860
tattttgga	tctgtalac	agcagcttt	ccgaagata	catattatt	ttacagagc	1920
cagtggcaat	atgatgttca	tacactgcat	atctctccg	catggaatga	aaaattgttt	1980
gcacaagll	cagcaatgaa	ttlctcagll	gtgtlltata	cagatcagc	gaaagtcaaa	2040
ctgtatttta	caccgaaaag	ctcaacagaa	aaaagactga	tccggcaaaa	atcatttaca	2100

[0012]

```

aaacaaacaa cagcggcagg ctatatacat caagctatag aaggcagcga taagaattca 2160
acagcgcata aacaculgtt tctgacatgg aaagttccgt ggccagcagg caaatlttea 2220
gcggaagcgt atgctgnaaa atctcggaag ccagcagaca ggcacacaga agcacaacga 2280
tcagttacaa caacaggcaaa agcagcaaaa ctgaaagcag atctggatcg caaaacaatt 2340
acagcaxatg gcaaacatct gtcataatct gaagtcgata tccagatcgc aatagcccat 2400
atagttccgg atgcagcaaa tagagtcaca gctgagttta aagccagcgg caaacctggt 2460
ggcattgata atggctcttc accggatcct gattcatatc aagccgala a ctgcaaacga 2520
tllttacaga atgctcttgc aatlyllcag tcaaaaagag aagccagcga adlttaacgt 2580
acagcaaaag cagatggcct gcaatcaage acagttaaaa ttgcaacaa agcagttccg 2640
ggacaagaac cagaaaaaac agtctccage ctctattaaa gcccgaacta ttatgtcaaa 2700
acagcacaaa accgalltct gctctcagat ctgaagttcc gctattcaga ttgaaacagg 2760
gatagacaaa acgtttratt ggatcagatt ccagatgatc aatltgcaaa agrcagctca 2820
tlttcagttg cagccacagt tgcaggcaaa aaaaattagc ttccgctcac aatgattgat 2880
gaaattggcg cactgttga a ttattcaga agcacaccgg ttggcacacc ggcagttctt 2940
ccggatcaaa gaccggcagt ccgcccggat ggcacagtca caccagcaaa ttttcagctc 3000
cattggcaaa aaccggcaga tacagcttat aaacagcag ccacagctcaa agtaccggga 3060
acagcaaacg tttttggcaa agaattttaa ggcacagcga caattagagt tcaaaagagc 3120
caagttacaa ttggctcttc agtttcagaa aa-gcaatga gactgacaaa aatatctccg 3180
cagataaac aatcagatcc actggatgg at-aaagatg gctcaacaa agttgatgca 3240
aatacagcgg gaggcctaaa tccgtcaga cggcaaaat ggccatattc aaaagcagc 3300
cataacacag cggaaattac attgaaatc ggcacagaa acaaacctgg ccagatcttc 3360
atgatttttt ttcggatag caatgcagtt agatttccgg atgtgtggca acaaaaatt 3420
cagatc

```

<210> 13
 <211> 3633
 <212> DNA
 <213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

<220>
 <221> source
 <222> J. 3633
 <223> /mol. 型="DNA"
 /生物体="两歧双歧杆菌"

```

<400> 13
gttgaagatg caacagaag cgaatgcaca acacaaatgt caticaaccc ggaagttggt 60
tatctatcag cgtctgattg caaac-aaat cgcacacagg atllttgatg gaactggaaa 120
tltatgctgt cagatagcgt tcaagcacia ga-ccggcatt ttgatgctc agcatggcaa 180
caagttgatc tgcgccttga ttatagc-ate acacaga-aa- atagc-aaag caatgaaga 240
gaatcagca- atcttccggg agcagcaggg cggatagaaa aaagt-ctta- aattgataga 300
gatctaggca gcaaaagc-ct tgcgattaa ct-gatgggg ttatattgaa tgcacagctc 360
tggtttaatg gcgtt-aa-ct- gggcaca-ct- cctgatggt- atctaccgt- ttcatttgat 420
ttgacagcga atgcaaa-ct- ttgggggaaa aacaaa-ct- tgc-aa-agt- tga-aaa-taga 480
ctgctgattc- caagatggta ttacggcagc ggcatttala gaaatgttac actgacagtt 540
acagatggcg ttcattgttg caataatggc g-ccgaa-ct- aaaa-cc-ct- actggca-aa- 600
caaatggcgg gaaatgtcac aatgaactcg acaaaa-aa- tccgaa-tga- taccagagca 660
cagcagca-ct- ttacc-ctga- acagcag-ct- ct-ccgaa-agg- gggcaaaa- agat-gaaga 720
atggc-ctcag- ttacc-ccagc- atcaaaa-ct- at-ctg-ccag- ggc-ctcagc- agatgttaca 780
agcacaa-ct- cagcagc-agg- cccgaa-ct- g-cc-aa-ct- aaaa-cc-cc-aa- cc-ctg-ctaca 840
atctcaaac- aa-ct-ct-ctca- cccagc-aaa- g-ct-ct-gata- catat-gtac- agaat-tggc- 900
tltcttgg- cagc-ct-ct-ct- tgc-aa-ct-ct- ggc-ct-ct-ct- tgaat-cc-cc- aaaa-ct-aa- 1020
ctgaaagc-ct- ttac-ct-ct-ct- ttatgat-ct- ggc-ct-ct-ct- ggc-ct-ct-ct- aatagac-ct- 1080
caatltgaaa gca-aa-ct-ct- aa-ct-ct-ct- aa-ct-ct-ct- ct-ct-ct-ct- ct-ct-ct-ct- ttac-ct-aa- 1140
caatltcagg cagc-aa-ct-ct- ac-ct-ct-ct- ct-ct-ct-ct- ct-ct-ct-ct- aaaa-ct-ct- ct-ct-ct-ct- 1200
gaagcag-ct- ttgat-ct-ct- gaa-cc-cc-agg- cca-ct-ct-ct- gaa-ct-ct-ct- agat-ga-aa- 1260
tggttggcc- aag-ct-ct-ct- ag-cc-gata-ct- gca-ct-ct-ct- gaa-ct-ct-ct- agat-ga-aa- 1320
tggg-ct-ct-ct- ttgat-ct-ct- atca-aa-ct- aa-ct-ct-ct- gca-ct-ct-ct- gca-ct-ct-ct- gca-ct-ct-ct- 1380
atgtgct-ct- ttgat-ct-ct- aa-aa-ct-ct- aa-aa-ct-ct- aa-aa-ct-ct- aa-aa-ct-ct- aa-aa-ct-ct- 1440
caca-ct-ct-ct- ca-aa-ct-ct-ct- ag-cc-aa-ct-ct- ag-cc-aa-ct-ct- ag-cc-aa-ct-ct- ag-cc-aa-ct-ct- 1500
tat-gc-ct-ct-ct- aa-aa-ct-ct-ct- ag-cc-aa-ct-ct- ag-cc-aa-ct-ct- ag-cc-aa-ct-ct- ag-cc-aa-ct-ct- 1560
acagcaaa-ct- g-cc-aa-ct-ct- ttg-ct-ct-ct- ggc-ct-ct-ct- ggc-ct-ct-ct- ggc-ct-ct-ct- ggc-ct-ct-ct- 1620
ctctacac-ct- at-ct-ct-ct-ct- ggc-aa-ct-ct- ggc-ct-ct-ct- ggc-ct-ct-ct- ggc-ct-ct-ct- ggc-ct-ct-ct- 1680
ctagc-ct-ct-ct- at-aa-ct-ct-ct- aa-aa-ct-ct-ct- aa-aa-ct-ct-ct- aa-aa-ct-ct-ct- aa-aa-ct-ct-ct- 1740
tat-gat-ct-ct- cag-ct-ct-ct- ct-gg-ct-ct-ct- g-ct-ct-ct-ct- g-ct-ct-ct-ct- g-ct-ct-ct-ct- g-ct-ct-ct-ct- 1800
tagcagatt- ttgtccagc- ctca-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- 1860
acac-ct-ct-ct- at-gc-ct-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- 1920
tat-ttggca- ttgtgtct- ag-aa-ct-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- 1980
tagtgagc- atgattgt- ttac-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- ct-gc-ct-ct- 2040
gc-aa-ct-ct-ct- ca-cc-ct-ct-ct- tt-ct-ct-ct- at-gt-ct-ct- at-gt-ct-ct- at-gt-ct-ct- at-gt-ct-ct- 2100
ctgatttt- ca-cc-ct-ct-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- 2160
aa-aa-ct-ct-ct- ca-aa-ct-ct-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- 2220
acag-ct-ct-ct- aa-aa-ct-ct-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- 2280
gc-aa-ct-ct-ct- at-aa-ct-ct-ct- aa-aa-ct-ct- aa-aa-ct-ct- aa-aa-ct-ct- aa-aa-ct-ct- aa-aa-ct-ct- 2340
cagttaca- ca-cc-ct-ct-ct- ag-cc-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- 2400
acag-ct-ct-ct- gca-aa-ct-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- 2460
at-gt-ct-ct-ct- ttg-ct-ct-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- ct-ga-aa-ct- 2520
ggcattgata atggctcttc accggatcct gattcatatc aagccgala a ctgcaaacga 2580
tllttacaga atgctcttgc aatlyllcag tcaaaaagag aagccagcga adlttaacgt 2640
acagcaaaag cagatggcct gcaatcaage acagttaaaa ttgcaacaa agcagttccg 2700
ggacaagaac cagaaaaaac agtctccage ctctattaaa gcccgaacta ttatgtcaaa 2760
acagcacaaa accgalltct gctctcagat ctgaagttcc gctattcaga ttgaaacagg 2820
gatagacaaa acgtttratt ggatcagatt ccagatgatc aatltgcaaa agrcagctca 2880
tlttcagttg cagccacagt tgcaggcaaa aaaaattagc ttccgctcac aatgattgat 2940
gaaattggcg cactgttga a ttattcaga agcacaccgg ttggcacacc ggcagttctt 2940
ccggatcaaa gaccggcagt ccgcccggat ggcacagtca caccagcaaa ttttcagctc 3000
cattggcaaa aaccggcaga tacagcttat aaacagcag ccacagctcaa agtaccggga 3060
acagcaaacg tttttggcaa agaattttaa ggcacagcga caattagagt tcaaaagagc 3120
caagttacaa ttggctcttc agtttcagaa aa-gcaatga gactgacaaa aatatctccg 3180
cagataaac aatcagatcc actggatgg at-aaagatg gctcaacaa agttgatgca 3240
aatacagcgg gaggcctaaa tccgtcaga cggcaaaat ggccatattc aaaagcagc 3300
cataacacag cggaaattac attgaaatc ggcacagaa acaaacctgg ccagatcttc 3360
atgatttttt ttcggatag caatgcagtt agatttccgg atgtgtggca acaaaaatt 3420
cagatc

```

<210> 14
 <211> 3888
 <212> DNA
 <213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

<220>
 <221> source
 <222> J. 3888
 <223> /mol. 型="DNA"
 /生物体="两歧双歧杆菌"

```

<400> 14
gttgaagatg caacagaag cgaatgcaca acacaaatgt caticaaccc ggaagttggt 60

```

[0013]

```

tatttcatcag cggctcgtatg caaacaaaaa tgcacaagcg atttttgatc gaacttgaad 120
tttatgctgt cagatagcgt tcaagcaca caa ccggcgtat ttgatgatto agcattgcca 180
caagttgact lctcgaatga tialagcalt acacayaaal alagccaaag caatgagca 240
gaatcagcat atcttccggg aggcacagcc cggatagaa aaagctttac aattgataga 300
gactcggcag gcaaacgcat tgcattaa tttgatggcg tctatatgaa tgcacacagc 360
tggtttaagt gcttttaact gggacacat cctgatggcg attcaccggt tctatftgat 420
ctgacagca atgcaaaatb tggggagaa acacaaatg tngtcaagt tgaanaatga 480
ctcgtctcat caagatggta ttcaggcage ggcatttata gatatgtac actgacagtt 540
atcgatggg ttcatgttgg caaiaatggc gtcgcaatta aaacaccgfc acggcaaca 600
caaaatggcg gagatgtcac aatgaacctg acaacaaaa tggcagatga tacagaagca 660
gtagcgaaca ttacactgaa acagacagtt tcccgaaag gggcaaaaac ggatgcagca 720
attgycacag ttacacagct atcaaaaica atcgcagag ggcctcagc agatgtaca 780
agcaacaata cagcagcaag cccgaacctg tggcaatta aaaaccgaa cctgtataca 840
gttagaacag aagttctgaa cggaggcaaa ggcctttgata catatgatc agaataggc 900
tttccttggc cagcctttga tgcacaalca ggcctttcac tgaatggca aaaagtcaaa 960
ctgaaaagcg tttagcatga tcatgatcaa ggcctactg ggcagttgc aaatagacc 1020
gcaattgaaa gacacagtga aatcttgraa aaaaatggcg tcaatagcat tggcacaaca 1080
caataactcg cagcaaaagc actgattgat gtcgcaatg aaaaagcgt tctggttgc 1140
gtagaogtct ttgtatgtg gaccggcgc aaaaatggca acaggaaga ttatggcaaa 1200
tggtttggcc aagcaattgc agcgataat ggcattctgg gaggcatala agatgaaaca 1260
tggcgcaact ttgactttac atcaacaat aaccggcata gaaatgcacc gtcagttatt 1320
atgtgtctac tggcacaatga aatgatgaa ggcattctac gctcagtttc agcctttccg 1380
gcaacatcac caaaatgcat tccatggasa aaagcagcag attcaacaag accgatgaca 1440
tatggcgata acadaattaa agcgaattgc aatcaatcaa atcaaatggc tcatatctg 1500
taccacaatg cctcgaatgk tggcacaat taatgaaatc taatgaaatc tgaataatc 1560
ctlacaaac atctctatg agcaatllal ggcacagaa ggcacacagc galtaaagc 1620
cctggcattt ataatagaa acagggcga gcaaatcat cagataaaca gctgacaagc 1680
tatgataatt cagcagttgg ctggggagca gtcgcaatc cagcatgata tgaigtgttt 1740
ragaaagatt ttgtcragg cacataagtt tggaaagat ttgattatct gggcaaacg 1800
aractgtaga atggcragg ctcaggcaga gtcgctatc ggccttacc gaaaatfagc 1860
tattttggca tctttgatgc agcagcttt cggaaagata caatatttt ttatcagagc 1920
cagttgaaat atgatgtca tacactgcat atcttccgg caatgaaatg aaatgtgttt 1980
gcaaaaagct cagcacaataa tgttccggtt ggcctttata cagatgcagc gaaagtgaat 2040
ctgtatttta caccgaaag ctacacagaa aaaaagcaga tggcgaaa atcatttaca 2100
aaaaaacaaa cagcggcagg ctatcacat caagtctatg aaggcagoga faaagattca 2160
acagcgcata aaaaatgta tctgacatgg aaagttctg ggcagaaag cacaatttca 2220
ggcgaaagct atgatgaaa taatcgcctg atcccgaaag gtagcacaga aggcaacgca 2280
tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa cggaaagcag atggcagtc caaaacaatt 2340
acagcgatg gcaacagatc gicatatatt gaagtcagtt tccagatgc aatggccat 2400
atgttccgg atgcagcaaa tagatleaca ttgatgata aaggcgagc caaactggtt 2460
ggctttgata atgtctcatc accgataat gattatata aagcgataa ccgcaaaagca 2520
tttttagca aatccttggc aatgittcag caacaanaa aagcagcoga aatctacgtt 2580
acagcaaaag cagatggcct gcaatcaag acagttaaaa ttgcacaac agcagttccg 2640
ggcaacagca cagaataaac agtcggcagc ctctattaca ggcgcaacta ttatgtcaaa 2700
acagcaaca caaccatct cccctcaat gctgaagtc gctattcaga tggcaacaac 2760
katagcaaaa acattcaatg gatacagtt tcaatgato aatattcaaa agcagctcca 2820
ttttcagttg cagcacaagt tgcagcaca aaaaatagct ttccgctac aatgatgat 2880
gaatttggc cactgttga ttattcagca agcaatccg ttggcaaac agcagttctt 2940
ttggatgaaa gacatcagc ctctcagat ggcctagttc tcttagcaaa ttttagctg 3000
catctgacaa aaccggcaga tacagttat aaacagcag gcaactgaa agtaccggga 3060
acagcaacag tttttggcaa gaaattlaa gtcacagca caatttagt tcaaaagac 3120
raatttaca ttgcttact agttttagga aa gcaatga gattgacaa aatatttccg 3180
gcagataaac aatcagatc actggaatgc ataaagatg gctcaacaac agttgatgca 3240
aatcagcgg gaaagcctaaa tccgtcaga tggcaaaat ggcctatttc aaaaagcagc 3300
caataacacag cgaaaattac attgaaat ggcagaaac acaactggc ccagatctc 3360
atgtattttt ttccgcatg caatgcagtt agatttccg atctgtgcaa acaaaaaatt 3420
cagattcagc cagatggca aatltgaca gatctggcag caacagaaac aattgcagc 3480
caaaatcaaa gcatagatc caaacgcat acatagatt ttgcaccgt tggcgcaaca 3540
tttgttaag ttacagtcac aaacagat acacaacaac agttagcgt tgtttgca 3600
ggcctgacag aatttgaact gaaacagcc acagcaaat ttgtacaaa tactbcaga 3660
gcaatgtcat caattcagat aatggcaca aaagtltcag attcagttc agcagcagc 3720
tcataataca caccgcaat tatgcagat gtaaaagc aaggcagag caatgcaagc 3780
gttacagctc ttccgcaca tgaataatg atctcctca ttacagaag cgaagatcat 3840
gttacagca aacatttcc aatcaactg ggcacagac aagaattt 3888

```

[0014]

```

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source:
<222> 1..30
<223> /mol_型="DNA"
      /note="合成的DNA引物"
      /生物体="人工序列"
<400> 15
gggtaacta gtagagatg caacaagaag 30

<210> 16
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source:
<222> 1..35
<223> /mol_型="DNA"
      /note="合成的DNA引物"
      /生物体="人工序列"
<400> 16
ggcctaaatt aattatgttt tttctgtct gcttc 35

<210> 17
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source:
<222> 1..38
<223> /mol_型="DNA"
      /note="合成的PCR引物"
      /生物体="人工序列"
<400> 17
ggcctaaatt aattacagtg cgcacattc acaatca 38

<210> 18
<211> 35

```

```

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<222> 1..35
<223> /mol_型="DNA"
      /note="合成的PCR引物"
      /生物体="人工序列"
<400> 18
gcgcttaatt aattattgaa ctctaatigt cgtg          35

<210> 19
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<222> 1..36
<223> /mol_型="DNA"
      /note="合成的PCR引物"
      /生物体="人工序列"
<400> 19
gcgcttaatt aattatgtag ctgitttcag ttcatt          35

<210> 20
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<222> 1..35
<223> /mol_型="DNA"
      /note="合成的PCR引物"
      /生物体="人工序列"
<400> 20
gcgcttaatt aattaaaatt ctgtctctgt gccca          35

<210> 21
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<222> 1..38
<223> /mol_型="DNA"
      /note="合成的PCR引物"
      /生物体="人工序列"
<400> 21
gcgcttaatt aattattctc gctcaatttc gcttggct          38

[0015]
<210> 22
<211> 1720
<212> PRT
<213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..1720
<223> /mol_型="蛋白质"
      /生物体="两歧双歧杆菌"
<400> 22
Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
1      5      10      15
Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asp Arg Thr
20     25     30
Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
35     40     45
Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
50     55     60
Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
65     70     75     80
Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Lys Ser Phe
85     90     95
Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
100    105    110
Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
115    120    125
Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
130    135    140
Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
145    150    155    160
Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
165    170    175
Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
180    185    190
Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met
195    200    205
Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile
210    215    220
Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
225    230    235    240
Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser His Ala Ala Gly Ala Ser
245    250    255
Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
260    265    270
Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
275    280    285
Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr
290    295    300
Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
305    310    315    320
Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val
325    330    335
Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met
340    345    350

```

Gly Val Asp Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu
 355 360 365
 Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe
 370 375 380
 Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys
 385 390 395 400
 Trp Phe Gly Glu Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp
 405 410 415
 Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg
 420 425 430
 Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met
 435 440 445
 Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala
 450 455 460
 Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr
 465 470 475 480
 Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met
 485 490 495
 Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser
 500 505 510
 Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala
 515 520 525
 Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr
 530 535 540
 Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Glu Ser Ser Asp Lys Glu Leu Thr Ser
 545 550 555 560
 Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp
 565 570 575
 Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr
 580 585 590
 Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser
 595 600 605
 Gly Ala Val Gly Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile
 610 615 620
 Val Asp Thr Ala Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser
 625 630 635 640
 Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn
 645 650 655
 Glu Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val
 660 665 670
 Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser
 675 680 685
 Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr
 690 695 700
 Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser
 705 710 715 720
 Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu
 725 730 735
 Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro
 740 745 750
 Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala
 755 760 765
 Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly
 770 775 780
 Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His
 785 790 795 800
 Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala
 805 810 815
 Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser
 820 825 830
 Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile
 835 840 845
 Val Gln Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala
 850 855 860
 Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro
 865 870 875 880
 Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn
 885 890 895
 Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu
 900 905 910
 Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Glu Asn Val Thr Trp Asp
 915 920 925
 Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala
 930 935 940
 Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp
 945 950 955 960
 Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr
 965 970 975
 Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr
 980 985 990
 Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr
 995 1000 1005
 Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val
 1010 1015 1020
 Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Leu Arg Val Gln Arg Ser
 1025 1030 1035 1040
 Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Thr
 1045 1050 1055
 Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala Ile Lys
 1060 1065 1070
 Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro
 1075 1080 1085
 Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala
 1090 1095 1100
 Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val
 1105 1110 1115 1120
 Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly
 1125 1130 1135
 Lys Thr Lys Ile Gln Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu
 1140 1145 1150
 Ala Ala Thr Glu Thr Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys
 1155 1160 1165
 Pro Tyr Thr Tyr Asp Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val
 1170 1175 1180
 Thr Val Thr Asn Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala
 1185 1190 1195 1200
 Gly Leu Thr Glu Ile Glu Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr
 1205 1210 1215
 Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys Val

[0016]

[0017]

1220 1225 1230
 Ser Asp Ser Val Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala Ile Ile
 1235 1240 1245
 Ala Asp Val Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Val Leu
 1250 1255 1260
 Pro Ala His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu Ser Glu Asp His
 1265 1270 1275 1280
 Val Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly Thr Glu Gln Glu Phe
 1285 1290 1295
 Pro Ala Asp Ser Asp Glu Arg Asp Tyr Pro Ala Ala Asp Met Thr Val
 1300 1305 1310
 Thr Val Gly Ser Glu Gln Thr Ser Gly Thr Ala Thr Glu Gly Pro Lys
 1315 1320 1325
 Lys Phe Ala Val Asp Gly Asn Thr Ser Thr Tyr Trp His Ser Asn Trp
 1330 1335 1340
 Thr Pro Thr Thr Val Asn Asp Leu Trp Ile Ala Phe Glu Leu Gln Lys
 1345 1350 1355 1360
 Pro Thr Lys Leu Asp Ala Leu Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Gly Ser
 1365 1370 1375
 Lys Asn Gly Ser Val Thr Glu Tyr Lys Val Gln Val Ser Asp Asp Gly
 1380 1385 1390
 Thr Asn Trp Thr Asp Ala Gly Ser Gly Thr Trp Thr Thr Asp Tyr Gly
 1395 1400 1405
 Trp Lys Leu Ala Glu Phe Asn Glu Pro Val Thr Thr Lys His Val Arg
 1410 1415 1420
 Leu Lys Ala Val His Thr Tyr Ala Asp Ser Gly Asn Asp Lys Phe Met
 1425 1430 1435 1440
 Ser Ala Ser Glu Ile Arg Leu Arg Lys Ala Val Asp Thr Thr Asp Ile
 1445 1450 1455
 Ser Gly Ala Thr Val Thr Val Pro Ala Lys Leu Thr Val Asp Arg Val
 1460 1465 1470
 Asp Ala Asp His Pro Ala Thr Phe Ala Thr Lys Asp Val Thr Val Thr
 1475 1480 1485
 Leu Gly Asp Ala Thr Leu Arg Tyr Gly Val Asp Tyr Leu Leu Asp Tyr
 1490 1495 1500
 Ala Gly Asn Thr Ala Val Gly Lys Ala Thr Val Thr Val Arg Gly Ile
 1505 1510 1515 1520
 Asp Lys Tyr Ser Gly Thr Val Ala Lys Thr Phe Thr Ile Glu Leu Lys
 1525 1530 1535
 Asn Ala Pro Ala Pro Glu Pro Thr Leu Thr Ser Val Ser Val Lys Thr
 1540 1545 1550
 Lys Pro Ser Lys Leu Thr Tyr Val Val Gly Asp Ala Phe Asp Pro Ala
 1555 1560 1565
 Gly Leu Val Leu Gln His Asp Arg Gln Ala Asp Arg Pro Pro Gln Pro
 1570 1575 1580
 Leu Val Gly Glu Gln Ala Asp Glu Arg Gly Leu Thr Cys Gly Thr Arg
 1585 1590 1595 1600
 Cys Asp Arg Val Glu Gln Leu Arg Lys His Glu Asn Arg Glu Ala His
 1605 1610 1615
 Arg Thr Gly Leu Asp His Leu Glu Phe Val Gly Ala Ala Asp Gly Ala
 1620 1625 1630
 Val Gly Glu Gln Ala Thr Phe Lys Val His Val His Ala Asp Gln Gly
 1635 1640 1645
 Asp Gly Arg His Asp Asp Ala Asp Glu Arg Asp Ile Asp Pro His Val
 1650 1655 1660
 Pro Val Asp His Ala Val Gly Glu Leu Ala Arg Ala Ala Cys His His
 1665 1670 1675 1680
 Val Ile Gly Leu Arg Val Asp Thr His Arg Leu Lys Ala Ser Gly Phe
 1685 1690 1695
 Gln Ile Pro Ala Asp Asp Met Ala Glu Ile Asp Arg Ile Thr Gly Phe
 1700 1705 1710
 His Arg Phe Glu Arg His Val Gly
 1715 1720

<210> 23
 <211> 30
 <212> FRT
 <213> 两歧双歧杆菌 (Bifidobacterium bifidum)

 <220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..30
 <223> /mol_型="蛋白质"
 /note="来自两歧双歧杆菌DSM20215的细胞外乳糖酶的信号序列"
 /生物体="两歧双歧杆菌"

 <400> 23
 Val Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu
 5 10 15
 Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser Ser Ala Gln Ala
 20 25 30

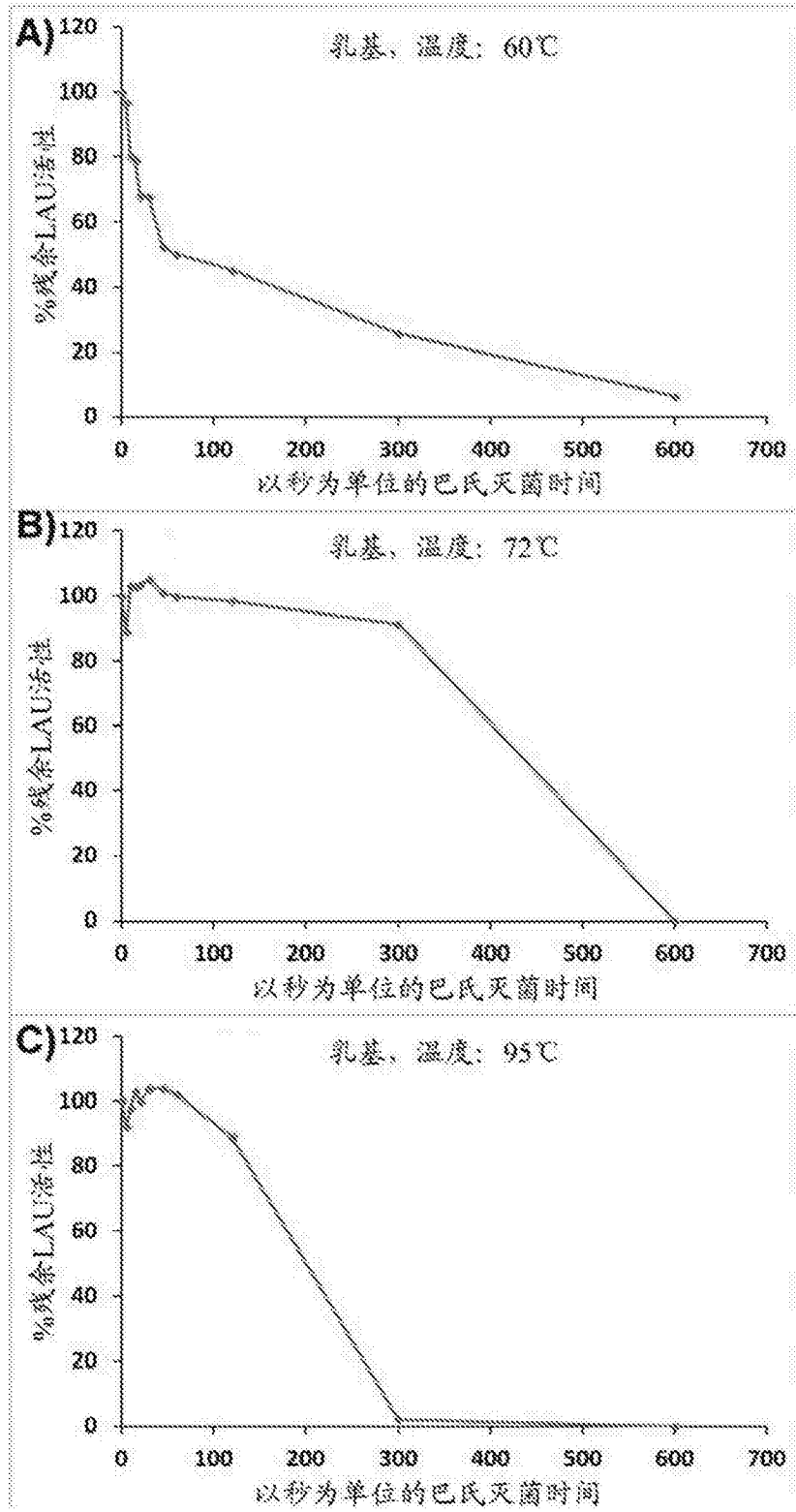


图1

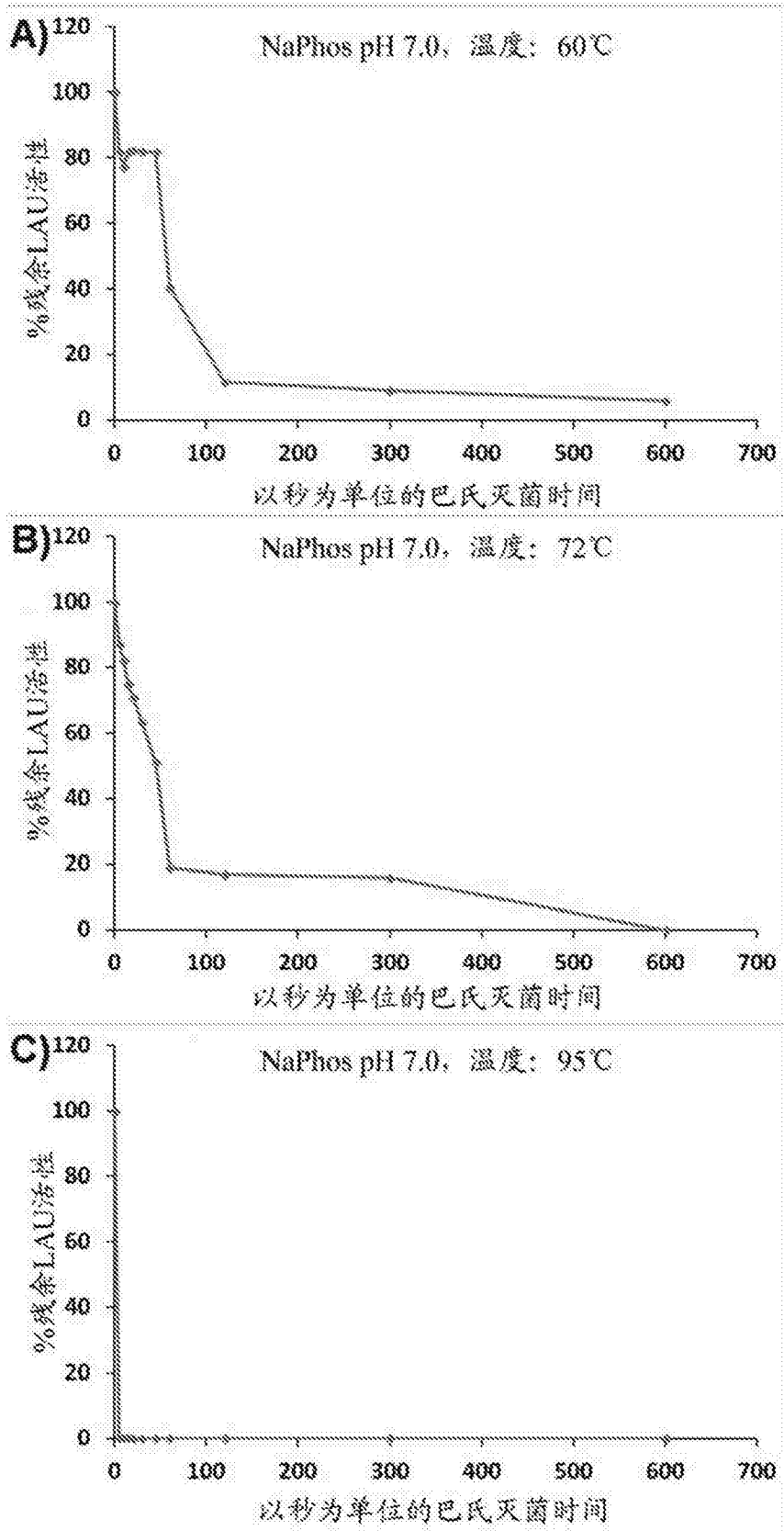


图2

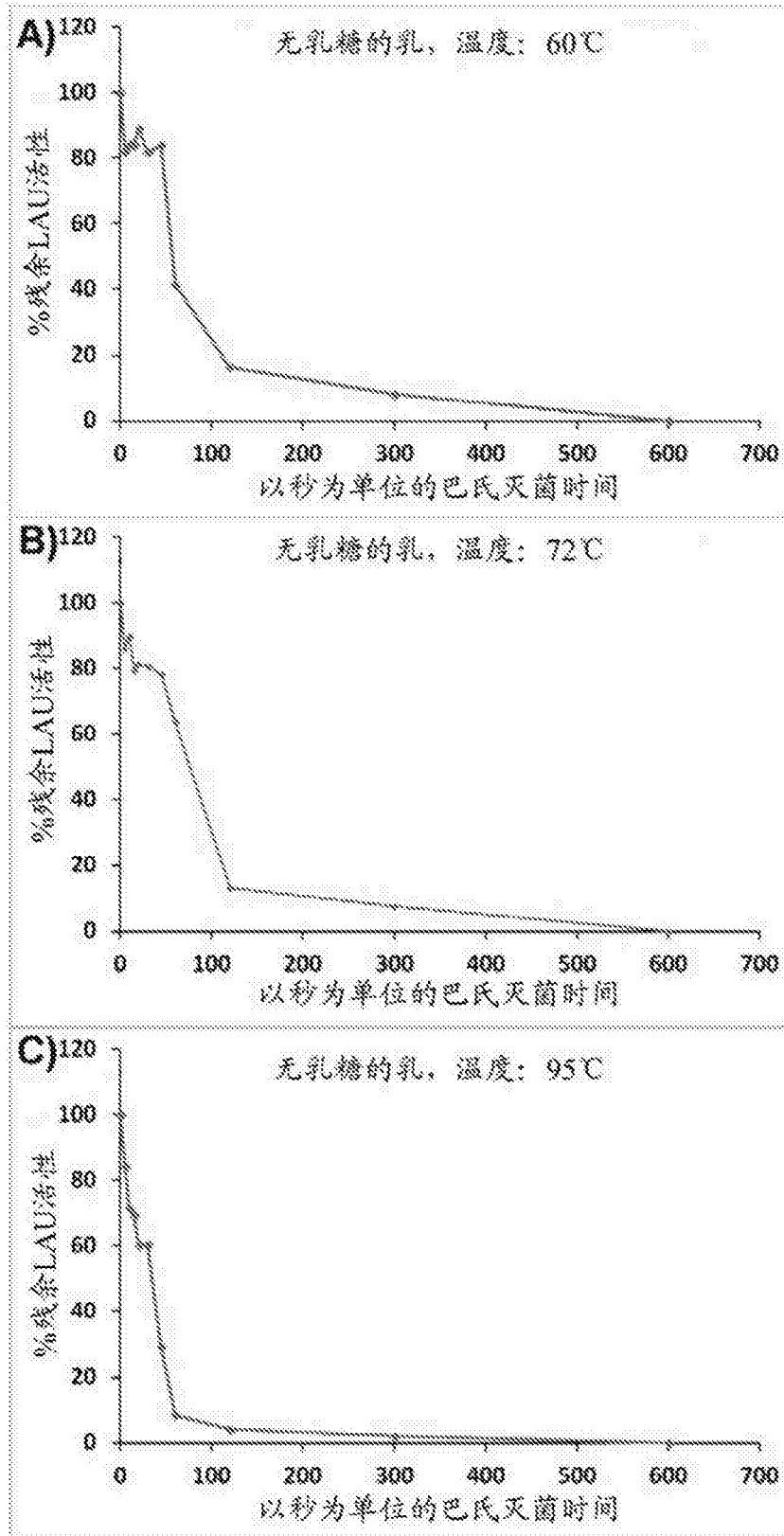


图3

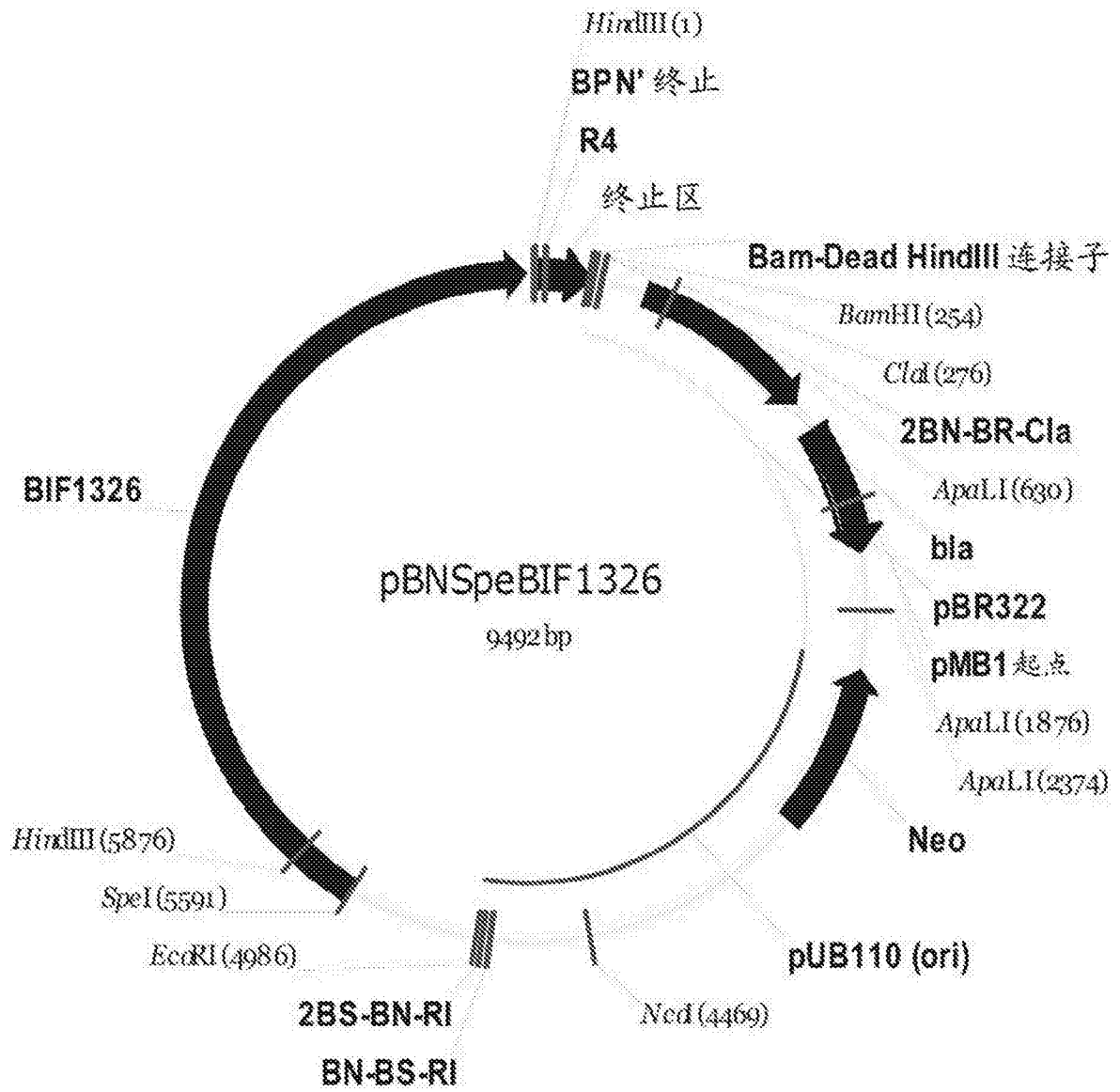


图4

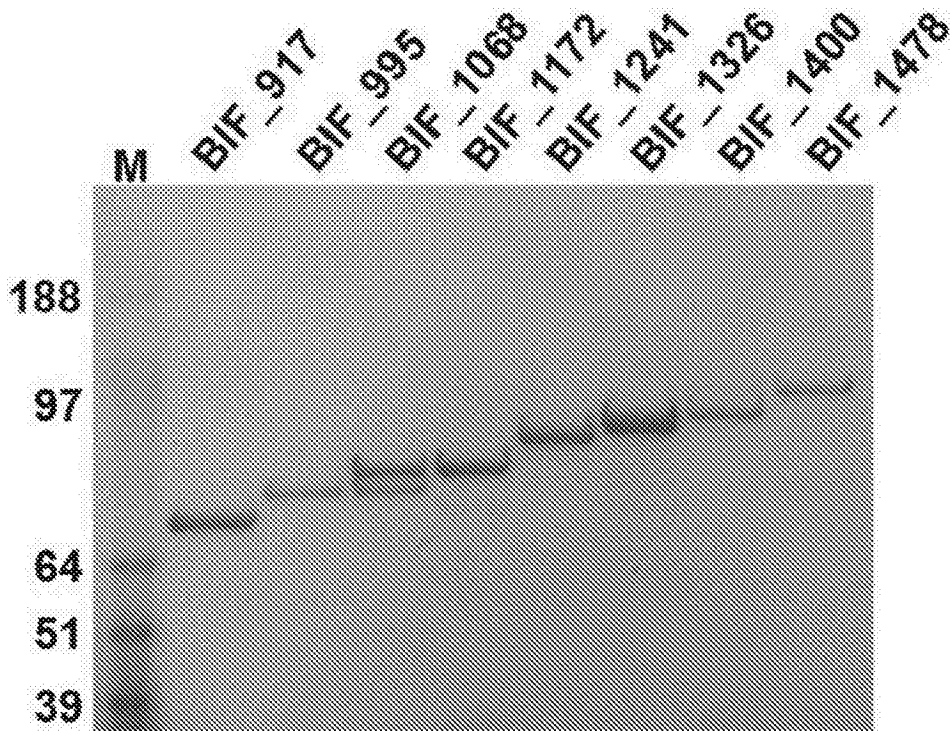


图5

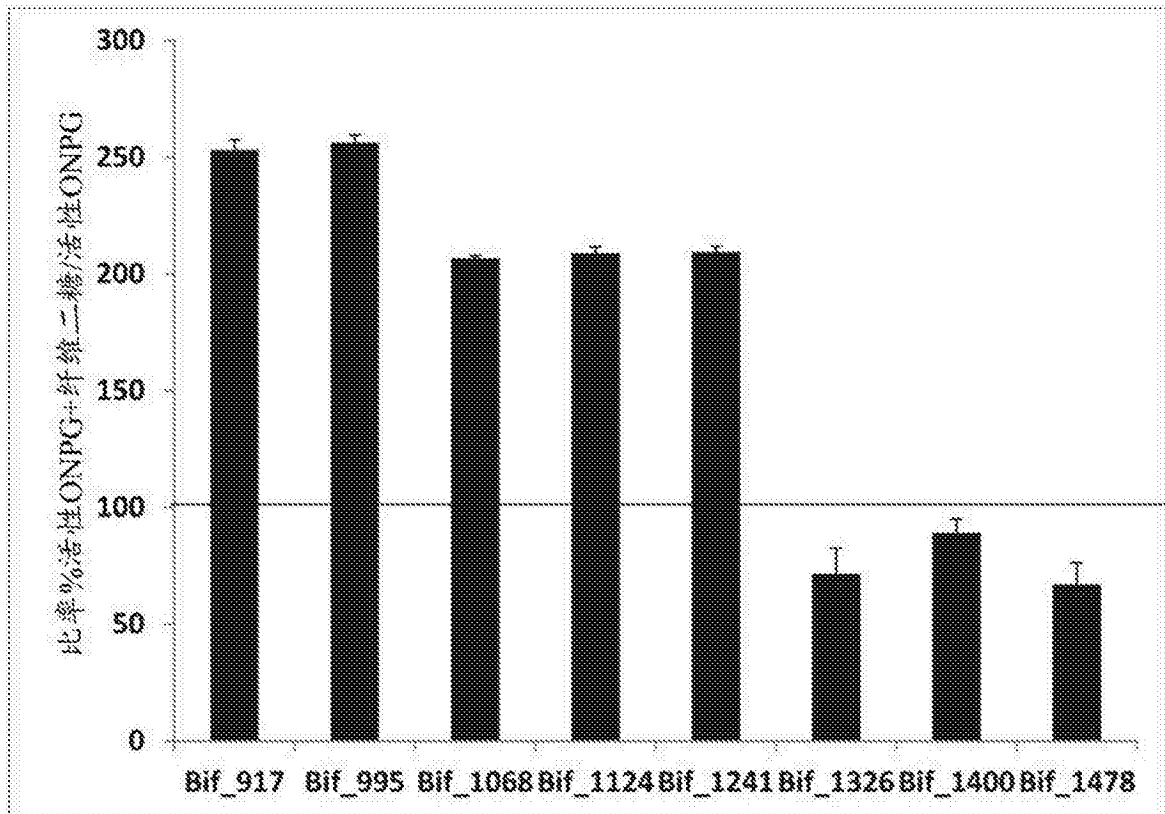


图6

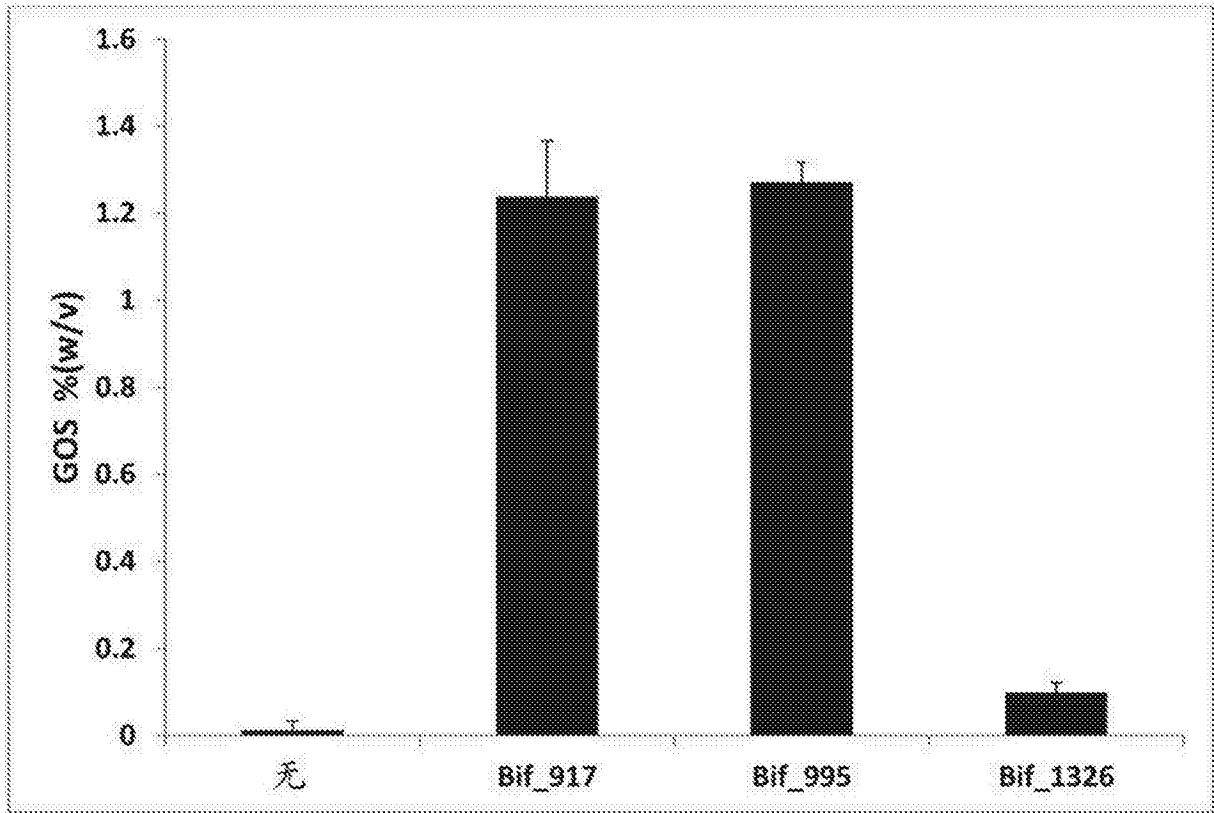


图7

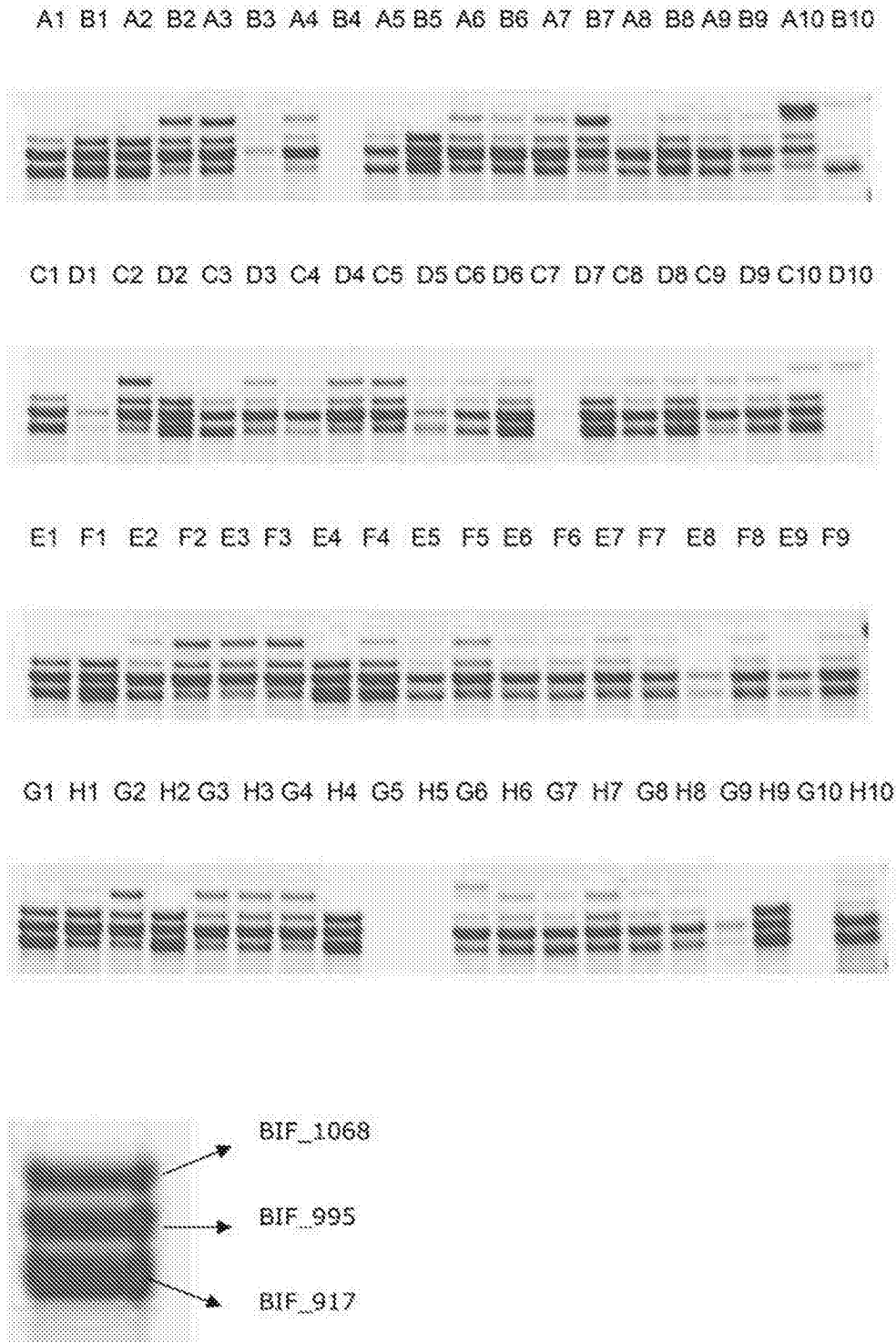
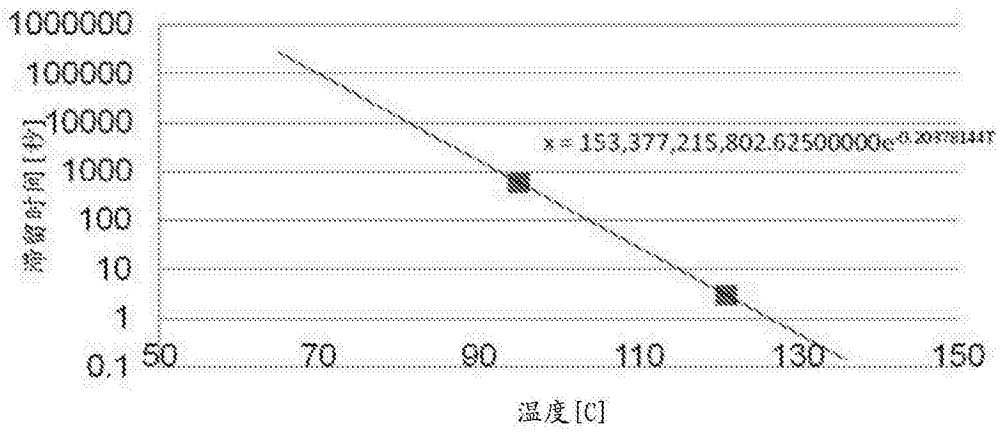


图8



摄氏度	时间 [秒]	时间 [分钟]
70	97876.86	1631.3
80	12754.65	212.6
90	1662.10	27.7
95	600.00	10.0
100	216.59	3.6
110	28.22	0.5
120	3.68	0.1
121	3.00	0.0
141	0.05	0.0

图9