



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102405282 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 12

(21) 申请号 201080014617. 9

C12P 19/12 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 03. 24

审查员 谢德

(30) 优先权数据

10-2009-0026300 2009. 03. 27 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 09. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2010/001816 2010. 03. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/110599 KO 2010. 09. 30

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔特别市

(72) 发明人 崔仁杰 金京宪 李世荣

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

11243

代理人 钟晶 於毓桢

(51) Int. Cl.

C12N 9/14 (2006. 01)

C12N 15/55 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页

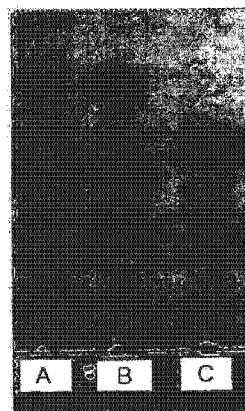
序列表13页 附图10页

(54) 发明名称

新的 α -新琼脂二糖水解酶及使用其获得单糖类的方法

(57) 摘要

本发明涉及新的 α -新琼脂二糖水解酶 (α -neoagarobiose hydrolase) 及使用其获得单糖类的方法。



1. 一种制造半乳糖或 3,6-脱水-L-半乳糖(AHG)的方法,包括用选自序列号 1、2 和 4 所公开的序列构成的组中的至少一种 α -新琼脂二糖水解酶分解 α -新琼脂二糖,并从所述分解物中提取半乳糖或 AHG。

2. α -新琼脂二糖水解酶用于由 α -新琼脂二糖制造半乳糖或 3,6-脱水-L-半乳糖(AHG)的应用,所述 α -新琼脂二糖水解酶是选自序列号 1、2 和 4 所公开的序列构成的组中的至少一种。

新的 α -新琼脂二糖水解酶及使用其获得单糖类的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及新的 α -新琼脂二糖水解酶 (α -neoagarobiose hydrolase) 及使用其获得单糖类的方法。

背景技术

[0002] 近年来,由于排放至大气中的二氧化碳量的增加所引起的地球变暖及在不久的将来可能发生的石油的枯竭和价格上升,因此迫切要求新的二氧化碳减少型替代能源的开发。多种替代能源中,使用可以再生且为丰富的地球资源之一的生物质来生产的生物能源作为满足前述要求的主要的再生能源,目前备受关注。特别地,已经考虑将生物乙醇作为目前需求大大增加的运输用燃料的代替方案,在以美国为代表的发达国家中已经用法律对生物乙醇的使用赋予了义务。目前,用于生产生物乙醇的原料物质局限于来自玉米或其他粮食资源的糖质、淀粉等(第1代生物燃料),与人类的粮食资源竞争,从而存在引发国际粮食价格上升这样的问题。作为可以克服这种缺点的对策,不与粮食资源竞争的新的陆地木质系生物质(第2代生物燃料)、海洋海藻类生物质(第3代生物燃料)作为下一代生物能源的原料也备受关注,有效利用生物质来生产生物能源的技术目前正在活跃研究中。

[0003] 海藻类生物质与木质系生物质相比,微生物可以利用的多糖类的含量多,且由于不含木质素,因此具有前处理较简单、每年可以收获多次等多个优点。特别是韩国三面被海包围,海藻类的生物资源化容易,海藻类的年产量在2006年为13754吨,与中国、日本、北朝鲜一起属于世界的海藻类生产国,但现状是:在其有效利用率方面,除了食用资源以外,是低迷的(渔业生产统计,2006,统计厅社会统计局农渔业生产统计科)。最近,由海藻类生产生物能源的研究在日本和韩国等进行了活跃的讨论。日本的水产业振兴财团以“Ocean Sunrise Project(海洋日出项目)”为主题,制定了在日本的专属经济水域和海洋带的未使用海域4.47百万 km^2 中大量养殖海藻类以生产50亿升的燃料用乙醇的计划(Aizawa M et al., Seaweed bioethanol production in Japan-The Ocean Sunrise Project(海藻生物乙醇生产在日本-海洋日出项目), OCEANS Conference, Sep. 29-Oct. 04, 2007, Vancouver, Canada)。另外,韩国在2009年1月最终发表的作为政府的17个新生推进事业领域之一的新再生能源领域中包括海洋生物燃料,对海藻类的兴趣进一步提高。根据2009年的农林水产食品部的涉及海洋生物物质的确保和有效利用技术的开发的研究规划发表,在四边71km的正四边形的海域中养殖海藻类来生产生物乙醇时,一年可以生产37.74亿升,这是相当于2030年韩国的汽油预期消耗量的31.4%的量。

[0004] 目前已知的海藻类中,特别是使用红藻类生物质(例如, *Gelidium amansii*)作为原料物质的研究目前正在活跃进行。红藻类的干重总体的70%以上为多糖类,能够转换为微生物可以利用的发酵性糖。特别地,来自红藻类生物质的多糖类的主要成分为琼脂(agar),含有干重总体的60%左右,被认为作为用于生产生物能源的主要原料。琼脂多糖体是以半乳糖(D-galactose)和3,6-脱水半乳糖(3,6-anhydro-L-galactose;以下简称“AHG”)为单体单元,将它们分别通过 α -1,3键(α -1,3-linkage)或 β -1,4键

(β -1,4-linkage) 连结而成的聚合物 (Duckworth, M. and W. Yaphe (1971) Carbohydrate Research (《碳水化合物研究》) 16, 435-445) (参照图 1)。

[0005] 已知将琼脂多糖体用作碳源的微生物的情况下, 使用 β 琼脂糖酶 (β -agarase) 或 α 琼脂糖酶 (α -agarase) 将琼脂多糖体切成小尺寸的低聚糖后, 最终在 β 琼脂糖酶的情况下分解成 α -新琼脂二糖 (α -neoagarobiose, α -1,3-D-半乳糖基-3,6-脱氢-L-半乳糖 (α -1,3-D-galactosyl-3,6-anhydro-L-galactose)), 在 α 琼脂糖酶的情况下分解成 β -琼脂二糖 (β -agarobiose, β -1,4-脱氢-L-半乳糖基-D-半乳糖 (β -1,4-anhydro-L-galactosyl-D-galactose))。已知作为 β 琼脂糖酶的分解产物的新琼脂二糖的情况下, 为了微生物进行代谢, 需要转换为半乳糖, 因此需要切断 α -1,3 键的酶 (α -新琼脂二糖水解酶) (Ekborg, N. A. et al (2005) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1545-1549; Ekborg, N. A. et al., (2006) Appl. Environ. Microbiol. (《应用与环境微生物学》) 72, 3396-3405)。但是, 迄今为止, 切断 S. degradas 中的新琼脂二糖的 α -1,3 键的酶尚未发现 (Ekborg, N. A. et al. (2006) Appl. Environ. Microbiol. (《应用与环境微生物学》) 72, 3396-3405)。

[0006] 据报道, 在微生物中由琼脂糖生产低聚琼脂糖的 β 琼脂糖酶可以通过许多微生物进行生产, 例如假单胞菌 (Pseudomonas) 属菌株 (Ha, J. C. et al. (1997) Biotechnol. Appl. Biochem. (《生物技术与应用生化学》) 26:1-6)、交替单胞菌 (Alteromonas) 属菌株 (Potin, P., et al. (1993) Eur. J. Biochem. (《欧洲生物化学期刊》) 214:599-607)、噬琼胶菌 (Agarivorans) 属菌株 (Ohta, Y. et al. (2005) Biotechnol. Appl. Biochem. (《生物技术与应用生化学》) 41:183-191)、交替假单胞菌 (Pseudoalteromonas) 属菌株 (Belas, R. (1989) J. Bacteriol. (《细菌学杂志》) 171:602-605)、微颤菌 (Microsilla) 属菌株 (Zhong, Z. et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. (《应用与环境微生物学》) 67:5771-5779) 和弧菌 (Vibrio) 属菌株 (Aoki, T. et al. (1990) Eur. J. Biochem. (《欧洲生物化学期刊》) 187:461-465) 等。

[0007] 将来自红藻类的琼脂多糖体用作生产生物能源的原料时, 必须经过多个阶段的前处理过程而转换为微生物可以实际利用的发酵性糖。琼脂多糖体向发酵性单糖类的转换可以大致通过化学前处理和生物学前处理 2 种工序来实现。首先是利用酸水解等的化学方法, 是较简单的工序, 但存在如下缺点: 将由多糖类构成的生物质在高温下进行化学前处理, 会大量生成糠醛 (furfural)、HMF (羟甲基糠醛, hydroxymethylfurfural) 等毒性副产物, 得到随机切断而得到的单糖类和低聚物的混合物 (Pickering et al., 1993, Journal of Applied Phycology (《应用藻类学杂志》) 5:85-91; Armis'en, 1995)。与此相对, 使用琼脂糖酶这样的酶的生物学前处理和糖化方法具有可以在常温下通过环境友好的方法来得到作为发酵性糖的半乳糖的优点, 但存在如下缺点: 目前商业上可买到的酶局限于 β 琼脂糖酶, 琼脂糖酶的产物也将通常的微生物难以使用的二糖类 (新琼脂二糖、琼脂二糖) 作为最终产物。

[0008] 作为 β 琼脂糖酶反应的结果而生成的新琼脂二糖的情况下, 为了用于生产生物能源, 必须转换为作为发酵性单糖类的半乳糖, 此时需要 α -新琼脂二糖水解酶。因此, 在用来将红藻类生物质用作生物乙醇这样的生物能源的生产原料的有效的生物质生物学的 (酶的) 前处理和糖化工序的最终阶段, α -新琼脂二糖水解酶是不可缺少的。另外, 作为新琼脂二糖的水解产物而与半乳糖一起获得的 AHG, 即使在商业上也没有销售, 是只

能购入 D 型的 AHG 的状况,而且价格卖得很高(2009 年,200 磅(英国)/100mg, Dextra Laboratories)。因此,可以使用本酶,由琼脂糖大量生产作为高价的宝贵性单糖类的 AHG。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 为解决上述问题,根据上述必要性而想出本发明,其目的在于提供一种在向用于生物能源的生产等的作为发酵性单糖类的半乳糖的转换中所必须的酶。

[0011] 本发明的其他目的在于提供一种使用新琼脂二糖作为基质,转换成作为单糖类糖的半乳糖和 AHG 的方法。

[0012] 技术的解决方法

[0013] 为了达成前述目的,本发明提供选自序列号 1~序列号 11 构成的组中的 α -新琼脂二糖水解酶(α -neoagarobiose hydrolase;以下称为“ α -NABH”)。

[0014] 本发明的优选实施例中,就前述具有 α -新琼脂二糖水解活性的酶而言,不仅包含序列号 1~序列号 11 所公开的氨基酸序列,而且作为前述酶的 1 个以上进行了取代、缺失、易位、添加等的突变蛋白质而具有 α -新琼脂二糖水解活性的蛋白质也包含在本发明的酶的权利要求范围中,优选包含与序列号 1~序列号 11 所公开的氨基酸序列的序列一致性为 80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上和 99%以上的氨基酸序列。

[0015] 本发明中,多肽相对于其他序列具有特定比率(例如,80%、85%、90%、95%或 99%)的序列一致性是指,使前述 2 个序列比对时,比较前述序列时前述比率的氨基酸残基相同。前述比对以及百分率相同性或一致性可以使用本技术领域公知的任意的适当软件程序,例如文献 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(《最新分子生物学实验方法汇编》)(F. M. Ausubel 等(eds)1987 Supplement 30 section 7.7.18)中所记载的软件程序来决定。作为优选的程序,有 GCG Pileup 程序、FASTA(Pearson 等,1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA(《美国科学院院刊》)85:2444-2448)、和 BLAST (BLAST Manual(BLAST 手册), Altschul 等, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, MD 和 Altschul 等,1997 NAR 25:3389-3402)。其他优选的比对程序是 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA),优选使用基本媒介变量的程序。可以使用的其他的序列软件程序是可以在 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group(遗传学计算机小组),University of Wisconsin(威斯康辛大学),Madison, WI)中利用的 TFASTA Data Searching Program。

[0016] 本发明的一个实施例中,前述酶优选从交替单胞菌 *saccharophagus degradans* 等获得,但并不限于此。

[0017] 本发明的交替单胞菌 *saccharophagus degradans* 通常可以购入(*saccharophagus degradans* ATCC 43961),但可以通过不受此限定的多种方法获得。

[0018] 另外,本发明提供一种编码前述本发明的酶的基因。

[0019] 在本发明的一个实施例中,前述基因优选是在序列号 12 中记载的基因,但并不限于此。

[0020] 另外,在本发明的一个实施例中,前述基因优选从交替单胞菌 *saccharophagus*

degradans 获得,但并不限于于此。

[0021] 另外,本发明提供一种制造本发明的酶的方法,包括培养交替单胞菌 *saccharophagus degradans*、从培养液中提取本发明的酶。

[0022] 另外,本发明提供一种制造半乳糖和脱水半乳糖的方法,包括用本发明的酶分解 α -新琼脂二糖,从前述分解物中提取半乳糖和脱水半乳糖。

[0023] 另外,本发明提供一种 α -新琼脂二糖水解酶,其包含含有在选自图 8 所示的模序 (motif) 1 ~ 50 (共 50 个模序) 所构成的组中的模序中的 1、2、3、4、5、6、7、14、16、17、20、34、40 的 13 个模序,更加优选提供必须包含图 8 所示的 50 个模序中的模序 7 和 34 的 α -新琼脂二糖水解酶。

[0024] 蛋白质模序如果可以用规则表示的模式表示,则通常模式的表达方式用正则表达式表示;

[0025] <http://www.expasy.ch/prosite/prosuser.html>;例如:

[0026] PA[AC]-x-V-x(4)-{ED}。

[0027] 本模式解析如下:[Ala or Cys]-any-Val-any-any-any-any-{any but Glu or Asp}

[0028] PA < A-x-[ST](2)-x(0,1)-V。

[0029] 该模式必须在序列的 N-末端 (“<”),解析如下:

[0030] Ala-any-[Ser or Thr]-[Ser or Thr]-(any or none)-Val;Sigrist C. J. A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. Brief Bioinform. (《生物信息简报》) 3:265-274 (2002); Sigrist C. J. A., De Castro E., Langendijk-Genevaux P. S., Le Saux V., Bairoch A., Hulo N. ProRule: a new database containing functional and structural information on PROSITE profiles. Bioinformatics (《生物信息学》). 2005 Nov 1; 21(21):4060-6. Epub 2005 Aug 9; Timothy L. Bailey, Nadya Williams, Chris Misleh, and Wilfred W. Li, MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs, Nucleic Acids Research (《核酸研究》), Vol. 34, pp. W369-W373, 2006)。

[0031] 本发明中,与细胞、核酸、蛋白质或载体关联而使用时,用语“重组”是指前述细胞、核酸、蛋白质或载体由于异种核酸或蛋白质的导入或者原来的核酸或蛋白质的变更而变形、或者前述细胞来自这样变形后的细胞。即,例如,重组细胞表达在前述细胞原来的(非重组)形态内未表达的基因、或者表达由于不同而在表达时异常地表达、或者完全未表达的原来的基因。

[0032] 用语“蛋白质”和“多肽”在本发明中可以互换使用。本发明中对于氨基酸残基,使用通常的 1 个字或 3 个字的编码。

[0033] 本发明中,“基因”不仅指本发明的酶的编码区域之前或之后的区域,也指包含各自的编码片段间的插入序列的、与生产多肽有关的 DNA 片段。

[0034] 本发明中,用语“核酸”包括单链或双链的 DNA、RNA 及它们的化学变异体。用语“核酸”和“多核苷酸”在本发明中可以能够互换地使用。由于遗传密码简并,因此为了编码特定氨基酸,可以使用 1 个以上的密码子,本发明包括编码特定的氨基酸序列的多核苷酸。

本发明中，“载体”是指为了在 1 个以上细胞类型内导入核酸而设计的多核苷酸序列。就载体而言，有克隆载体、表达载体、穿梭载体、质粒、噬菌体粒子、盒子 (cassette) 等。

[0035] 本发明中使用的“表达载体”是指具有可工作地与可以使目标 DNA 在适当的宿主内表达的适当的控制序列连系的 DNA 序列的 DNA 结构物。这种控制序列可以包含引起转录的启动子、调节转录的任意的操纵子 (operator) 序列、编码 mRNA 上的适当的核糖体结合部位的序列、增强子以及调节转录和翻译终止的序列。

[0036] 本发明中，“启动子”是涉及为了开始基因的转录而使 RNA 聚合酶结合的调节序列。前述启动子可以是诱导性启动子或构成型 (constitutive) 启动子。

[0037] 本发明中的用语“来自”包括用语“源自”、“可得到”或“可以从... 得到”、以及“可从... 离析出”，在本发明中使用时，它是指被前述核苷酸序列编码的多肽由原本存在前述核苷酸、或者插入有前述核苷酸序列的细胞产生。

[0038] 用语“培养”是指在适当的条件下，使微生物细胞群体在液体或固体培养基中生长。在优选的实施例中，培养是指（典型地在容器或反应器内）将含有琼脂糖的基质生物转换为最终生成物。发酵是指通过使用微生物将有机物质以酶方式和厌氧方式进行分解而产生更单纯的有机化合物。发酵在厌氧条件下发生，但由于发酵还可以在氧的存在下发生，因此不用将前述用语仅限于严格的厌氧条件。

[0039] 本发明中使用的用语“回收”、“离析”和“分离”是指从自发结合的 1 个以上的成分中除去的化合物、蛋白质、细胞、核酸或氨基酸。

[0040] 与本发明中使用的细胞关联使用的用语“转化”、“稳定的转化”和“基因导入 (transgenic)”是指具有作为细胞通过数代维持的附加体质粒的、或整合到其基因组内的非原来（例如，异种）的核酸序列。

[0041] 本发明中使用的用语“表达”是指基于基因的核酸序列而生产多肽的方法。前述方法包括转录和翻译。

[0042] 将核酸序列插入细胞内的用语“导入”是指“转染 (transfection)”、或者“转化”或“转导 (transduction)”，包括言及涉及核酸序列整合到真核或原核细胞内，此时，前述核酸序列被整合到细胞的基因组（例如，染色体、质粒、色素体或线粒体 DNA）内，转换成自主复制子、或者暂时表达。

[0043] 以下，关于本发明进行说明。

[0044] 1. 含有红藻类的海洋生物质的前处理工序过程中，由 α -新琼脂二糖生成作为发酵性糖的半乳糖的酶处理工序

[0045] 为了从琼脂多糖体生成发酵性糖，作为分解为单糖类的前处理过程，可以利用大致化学方法和酶方法 2 种方法。首先，化学方法由于随机地分解复合多糖类，因此不仅非常难以选择性地生产所希望的发酵性单糖类，而且还有时生成阻碍所生成的糖的发酵的副产物。另外，在碱处理或酸处理的情况下，排放相当数量的污染物质，为了净化这些污染物质要花费高额费用，作为微生物可以利用的发酵性糖的生产方法是不适合的。作为酶方法，可以使用微生物生成的琼脂糖酶来使琼脂多糖体分解。作为可以用于这种方法的酶，可举出 α 琼脂糖酶或 β 琼脂糖酶。作为分解琼脂多糖体的酶， α 琼脂糖酶将琼脂多糖体中存在的 α -1,3 和 β -1,4 键中的 α 键水解，从而最终生成 β -琼脂二糖二糖体， β 琼脂糖酶切断 β 键而生成 α -新琼脂二糖二糖体。在这种酶的前处理的过程中使用 β 琼脂糖酶的情

况下,最终产物是 α -新琼脂二糖,这是通常的微生物无法使用的非发酵性糖。为了将其最终转换为作为发酵性糖的半乳糖的前处理工序, α -新琼脂二糖水解酶是不可缺少的。

[0046] 2. 由作为琼脂多糖体的酶分解产物的 α -新琼脂二糖生产半乳糖或 AHG

[0047] 目前,由新琼脂二糖的水解得到的 3,6-脱水-L-半乳糖 (3,6-Anhydro-L-galactose) 即使在商业上也没有销售,是只能购入 D 型的 AHG 的状况,而且价格卖得很高 (2009 年,200 磅 (英国)/100mg, DextraLaboratories)。因此,可以使用本酶、由琼脂糖大量生产高价的 AHG。

[0048] 本发明的发明人等确认了海洋细菌 *saccharophagus degradans* 中的 α -新琼脂二糖水解酶的活性,并首次确认了该基因。另外,转化到大肠杆菌来大量生产蛋白质,从而确认了 α -新琼脂二糖水解酶的活性。使用新的 α -新琼脂二糖水解酶基因的酶活性来适用于含有琼脂多糖体的海洋生物质的前处理工序中,并用于由前处理工序所得的 α -新琼脂二糖获得包含半乳糖的发酵性糖。

[0049] 近年来,发现可以使用琼脂多糖体作为碳源来进行生长的作为海洋细菌的 *saccharophagus degradans*,且其染色体的序列已确定。

[0050] 为了发掘 α -新琼脂二糖水解酶的基因,首先确认交替单胞菌 *saccharophagus degradans* 中的 α -新琼脂二糖水解酶的活性。其次,通过染色体序列信息的分析,预测将交替单胞菌 *saccharophagus degradans* 的基因中属于糖基水解酶家族 32 的基因 (蛋白质数据库 Uniprot database ID:Q21HB2) 作为 α -新琼脂二糖水解酶。实际上,为了确认蛋白质是否具有 α -新琼脂二糖水解酶的活性,在表达用载体中进行复制,在大肠杆菌中进行过表达,并分离精制蛋白质后,最终确认酶的活性。

[0051] 发明效果

[0052] 本发明中,报道了新的 α -新琼脂二糖水解酶的碱基序列和蛋白质序列。特别地,如上所述,近年来,在使用海藻类生物质的生物能源的生产中生物质向发酵性糖的酶转化工序中,为了由琼脂多糖体生产脱水半乳糖和半乳糖,必须使用 α -新琼脂二糖水解酶,因此会起到可以期待生物质前处理的成本削减和产量提高效果这样的效果。另外,在生产生物燃料的酵母或细菌等中导入 α -NABH 基因,从而还可以期待由琼脂 (agar) 或新琼脂二糖直接生产生物燃料。进一步地,在由海洋生物质生产作为高附加价值的单糖类的半乳糖和 AHG 的工序中也使用 α -新琼脂二糖水解酶,也可以进行有用物质的生产。

附图说明

[0053] 图 1 为表示琼脂多糖体的结构的图。

[0054] 图 2 为表示由 *S. degradans* 2-40 得到的细胞内酶得到的反应生成物的薄膜色谱 (Thin layer chromatography) 的照片。条带 A:半乳糖的标样;条带 B:与细胞内酶一起培养 0.25% (w/v) 琼脂糖而得的培养液;条带 C:与细胞内酶一起培养 0.3% (w/v) 石花菜 (红藻类) 而得的培养液。酶反应在 30°C、20mM Tris-HCl (pH6.8) 中进行 12 小时。

[0055] 图 3 表示本发明所发掘的基因的碱基序列和蛋白质序列。

[0056] 图 4 表示在大肠杆菌中表达并进行了精制的琼脂糖酶;12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳;A:分子尺寸标识物、B: α -新琼脂二糖水解酶 (α -neoagarobiose hydrolase)。

[0057] 图 5 表示 α -新琼脂二糖水解酶 (α -neoagarobiose hydrolase) 和 β 琼脂糖酶

引起的琼脂糖水解的产物的薄膜色谱照片。在 30℃、20mM Tris-HCl (pH6.8) 中进行酶反应, 其基质浓度为 0.25 (w/v)。(a) 半乳糖 (b-c) 反应混合物。A: 半乳糖标准物质; B: α -新琼脂二糖水解酶反应产物 (反应 2 小时); C: 新琼脂二糖。

[0058] 图 6 表示 α -新琼脂二糖水解酶和 β 琼脂糖酶引起的琼脂糖水解的产物通过液相色谱-质谱分析 (Mass Spectrometry) 来确认反应产物。使用质量分析仪的反应产物的质量分析结果 (阴离子化而形成甲酸盐 (HCOO^- , 分子量: 45)), 如图 6 所示, 确认到半乳糖的质量为 225.1 (180+45), 脱水半乳糖为 207.1 (162+45)。因此, 确认到水解酶的产物是半乳糖和脱水半乳糖。即, 依靠来自基础科学支援中心首尔分所的质量分析所得的结果是图 6 所示的质量分析图谱, 解析其结果, 结果确认了酶的水解产物。

[0059] 图 7 表示含有 α -新琼脂二糖水解酶的同源 (homolog) 蛋白质的模序 (motif) 分析结果。

[0060] 图 8 表示 α -新琼脂二糖水解酶的特异的模序。

[0061] 图 9 和图 10 表示包含所有由图 8 确认的 α -新琼脂二糖水解酶的特异的模序的蛋白质的序列。

[0062] 图 11 表示使用由图 9 和图 10 所得的 10 个序列和 α -新琼脂二糖水解酶的氨基酸序列的多重序列比对。

[0063] 图 12 表示在大肠杆菌中表达并进行了精制的来自大西洋假交替单胞菌的琼脂糖酶; 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 条带 A: 分子尺寸标识物; 条带 B: α -新琼脂二糖水解酶。

[0064] 图 13 表示在大肠杆菌中表达并进行了精制的天蓝色链霉菌; 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 条带 A: α -新琼脂二糖水解酶; 条带 B: 分子尺寸标识物。

[0065] 图 14 是 α -新琼脂二糖水解酶 (α -neoagarobiose hydrolase) 和 β 琼脂糖酶引起的琼脂糖水解的产物的薄膜色谱照片。使酶反应在 30℃、20mM Tris-HCl (pH6.8) 中进行 2 小时, 其基质浓度为 0.25 (w/v)。(A) 半乳糖 (B-D) 反应混合物。条带 A: 半乳糖标准物质; 条带 B: 来自交替单胞菌 *saccharophagus degradans* (*saccharophagus degradans* 2-40) 的 α -新琼脂二糖水解酶反应产物; 条带 C: 来自大西洋假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas atlantica* T6c) 的 α -新琼脂二糖水解酶反应产物; 条带 D: 来自天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor* A3) 的 α -新琼脂二糖水解酶反应产物。

具体实施方式

[0066] 以下, 通过非限定的实施例来进一步详细说明本发明。但下述实施例以说明本发明的目的而记载, 本发明的范围不受下述实施例限制。

[0067] 实施例 1: 来自 *saccharophagus degradans* 粗提取液的 α -新琼脂二糖水解酶的酶活性的确认

[0068] 为了确认 *saccharophagus degradans* 是否具有通过 α -新琼脂二糖水解生成作为单糖类的半乳糖和 AHG 的酶活性, 按以下方法得到粗提取液并确认活性。使 *saccharophagus degradans* 在含有海水盐的培养基中培养直至对数增殖期的中期后, 对 40ml 的培养液进行离心分离, 然后利用超声波将细胞粉碎, 得到粗提取液后, 将利用 β 琼脂糖酶分解琼脂多糖体而得到的琼脂糖作为基质, 通过 TLC 观察反应分解产物。A 条带是半

乳糖标准物、B条带是使0.25% (w/v) 的琼脂糖与 saccharophagus degradan 的细胞内助酶液反应而成的产物、C条带是使0.3% (w/v) 作为红藻类的干燥的琼脂粉与 saccharophagus degradan 的细胞内助酶液反应后,通过 TLC 分析产物的结果。通过与 saccharophagus degradan 的细胞内助酶液反应,从琼脂糖和琼脂获得的均是作为单糖类的 AHG 和半乳糖,而且确认到生成两种糖类。因此得知, saccharophagus degradan 具有在细胞内通过 α -新琼脂二糖水解而生成作为单糖类的半乳糖和 AHG 的酶。

[0069] 本发明中发掘的基因的碱基序列和蛋白质的氨基酸序列如图 3 所示。

[0070] 实施例 2: α -新琼脂二糖水解酶的生化活性和特征调查

[0071] 经精制的 α -新琼脂二糖水解酶的活性如下所述进行确认。首先,用 β 琼脂糖酶处理琼脂多糖体而生成作为酶处理的最终产物的新琼脂二糖后,将其作为基质,通过 TLC 确认 α -新琼脂二糖水解酶的反应产物(图 5 的 TLC 结果)。确认到用 α -新琼脂二糖水解酶在 TLC 溶剂条件(正丁醇:乙醇:水=3:2:2)下处理过的基质被分解为推断是半乳糖和脱水半乳糖的物质。在 TLC 上确认到半乳糖 Rf 值约为 0.46、 α -新琼脂二糖的 Rf 值约为 0.58。

[0072] 为了测定通过 α -新琼脂二糖水解酶生成的产物的分子量,通过液相色谱-质谱分析仪(liquid chromatography-mass spectrometry)确认了分子量。由 LC-MS 分析结果显示脱水半乳糖(AHG)的分子量为 162、半乳糖分子量为 180。207.1m/z 是甲酸(formic acid)与脱水半乳糖结合的状态的分子量,可知脱水半乳糖被检测出,179.1m/z 和 225.1m/z 是半乳糖以及与半乳糖结合的甲酸的分子量,可以确认半乳糖被检测出。因此,如 LC-MS 所示,可以确认作为新琼脂二糖水解酶的反应产物的 2 种单糖类、即半乳糖和脱水半乳糖为反应产物(参照图 6)。

[0073] 实施例 3: α -新琼脂二糖水解酶的特异的肽模序序列

[0074] 通常,蛋白质模序是指在具有相同的分子功能的蛋白质中以一种模式表达的短的肽序列。这种蛋白质模序被大致进化地、正常地保存在蛋白质的全体序列中,并以模式化的氨基酸序列表示,所述模式化的氨基酸序列以包含活性部位的、代表分子功能的区域表示(Sigrist C. J. A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. Brief Bioinform(《生物信息简报》). 3:265-274(2002); Sigrist C. J. A., De Castro E., Langendijk-Genevaux P. S., LeSaux V., Bairoch A., Hulo N. ProRule: a new database containing functional and structural information on PROSITE profiles. Bioinformatics(《生物信息学》). 2005Nov 1; 21(21):4060-6. Epub 2005Aug 9; Timothy L. Bailey, Nadya Williams, Chris Misleh, and Wilfred W. Li, MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs, Nucleic Acids Research(《核酸研究》), Vol. 34, pp. W369-W373, 2006)。

[0075] 为了确认可以规定 α -新琼脂二糖水解酶的蛋白质模序的序列,首先,使用 α -新琼脂二糖水解酶的氨基酸序列作为模板,使用 NCBI 碱基局部对准检索工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)来检索公共数据库,收集具有统计显著性(E-value < 0.001)的 60 个(包含 α -新琼脂二糖水解酶的)蛋白质的氨基酸序列。使用这些序列,使用作为蛋白质模序检索程序的 MEME(http://meme.sdsc.edu/meme4_1/intro.html;

使用参数:mode = zero or one occurrence&nsites = 50,mwin = 8,除此以外的条件使用 default parameters;Timothy L.Bailey,Nadya Williams,Chris Misleh,and Wilfred W. Li, MEME:discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs, Nucleic Acids Research, Vol. 34, pp.W369-W373,2006) 来检索针对 α -新琼脂二糖水解酶的特异的模序。其结果如图 7 所示,确认到 saccharophagus degradan 的 α -新琼脂二糖水解酶具有在从具有相同性的蛋白质的分析所得的共 50 个模序中的 13 个特异的模序(1、2、3、4、5、6、7、14、16、17、20、34、40)。因此,可以确认该 13 个特异的模序是代表 α -新琼脂二糖水解酶的活性的模序。其中模序 7 和 34 是一定出现在代表 α -新琼脂二糖水解酶的活性的蛋白质中的必须的 2 个模序,分别示于图 8 和图 9(通常,蛋白质模序使用正则表达式(regular expression)来表示,因此附图上也以相同的方式来表现;Sigrist C. J. A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. PROSITE:a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. Brief Bioinform(《生物信息简报》). 3:265-274(2002))。因此可以说,包含 13 个特异模序中的一部分、其中一定含有模序 7 和 34 的蛋白质具有 α -新琼脂二糖水解活性(参照图 8)。确认了:在与 α -新琼脂二糖水解酶显示出序列相同性的蛋白质中,含有这 13 个特异模序的一部分且一定含有模序 7 和 34 的蛋白质是 10 个(参照图 9 和 10)。

[0076] 前述含有在 α -新琼脂二糖水解酶中发现的 13 个特异模序的一部分且一定含有模序 7 和 34 的蛋白质在现有公共数据库上发现了 10 个。这些起源分别是大西洋假交替单胞菌(Pseudoalteromonas atlantica T6c),微颤菌(Microscilla sp.PRE1),拟杆菌(Bacteroides plebeius DSM17135),革兰菌(Gramella forsetii)(菌株 KT0803),黄杆菌(Flavobacteriales bacterium HTCC2170),类芽孢杆菌(Paenibacillus sp.oral taxon 786str.D14),瘤胃球菌(Rum inococcus sp.5139BFAA),天蓝色链霉菌(Streptomyces coelicolor A3)。各自的氨基酸序列示于图 10。

[0077] 图 11 所示的序列是如上所述地在与 α -新琼脂二糖水解酶具有序列相同性的蛋白质中,选择含有 13 个特异模序的一部分且一定含有模序 7 和 34 的 10 个蛋白质进行多重比对而成的序列,这些 10 个蛋白质的序列示于图 9 和图 10。

[0078] 实施例 4: α -新琼脂二糖水解酶基因的蛋白质序列的相同性的确认

[0079] 通过检索来自 saccharophagus degradan 的水解酶的蛋白质序列的相同性来确认预计具有类似功能的候选基因。虽然候选基因的具体功能未知,但根据作为碳水化合物关联的酶/蛋白质数据库的 CAZy(<http://www.cazy.org>),可以确认它们均属于糖苷水解酶(glycoside hydrolase family 32, GH32)。属于 GH32 家族的蛋白质所具有的已知功能是:转化酶(invertase)(EC 3.2.1.26);内切菊粉酶(endo-inulinase)(EC 3.2.1.7); β -2,6-果聚糖 6-左聚糖生物水解酶(β -2,6-fructan 6-levanbiohydrolase)(EC 3.2.1.64);内切左聚糖酶(endo-levanase)(EC 3.2.1.65);外切菊粉酶(exo-inulinase)(EC 3.2.1.80);果聚糖 β -(2,1)-果糖苷酶/1-外水解酶(fructan β -(2,1)-fructosidase/1-exohydrolase)(EC 3.2.1.153);果聚糖 β -(2,6)-果糖苷酶/6-外水解酶(frctan β -(2,6)-fructosidase/6-exohydrolase)(EC 3.2.1.154);蔗糖:蔗糖 1-果糖基转移酶(sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase)(EC 2.4.1.99);果聚糖:果聚糖 1-果糖基转移酶(fructan:fructan

1-fructosyltransferase) (EC2. 4. 1. 100) ; 蔗糖 : 果聚糖 6- 果糖基转移酶 (sucrose : fructan 6-fructosyltransferase) (EC 2. 4. 1. 10) ; 果聚糖 : 果聚糖 6G- 果糖基转移酶 (fructan : fructan 6G-fructosyltransferase) (EC2. 4. 1. 243) ; 左聚糖果糖基转移酶 (levan fructosyltransferase) (EC 2. 4. 1. -)。因此, 属于 GH32 家族的一部分蛋白质具有与 α -新琼脂二糖水解酶相同的分子功能, 这在本发明开始已报道。

[0080] 从来自 *saccharophagus degradans* (*saccharophagus degradans* 2-40) 的 α -新琼脂二糖水解酶 (以下称为 α -NABH) 的氨基酸序列的相同性的检索 (BLAST 检索 - 参照附件) 获得的序列中, 如果通过 BLAST 的 E-value 罗列具有 50% 以上的相同性的蛋白质序列, 则如下所示 (以下使用 Uniprot 数据库序号, 括弧内是来源微生物和 % 相同性)。

[0081] 1. Q15UF2 (大西洋假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas atlantica*) (菌株 T6c/BAA-1087), 70%),

[0082] 2. Q93PB3 (微颤菌 (*Microscilla* sp. PRE 1.), 59%),

[0083] 3. B4CY74 (拟杆菌 (*Bacteroides plebeius* DSM17135.), 60%),

[0084] 4. A0M245 (革兰菌 (*Gramella forsetii*) (菌株 KT0803)., 56%),

[0085] 5. A4AR39 (黄杆菌 (*Flavobacteriales bacterium* HTCC2170.), 57%),

[0086] 6. C6J3P3 (类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* sp. oral taxon 786str. D14.), 58%),

[0087] 7. C6JDD4 (瘤胃球菌 (*Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA.), 58%),

[0088] 8. C6J313 (类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* sp. oral taxon 786str. D14.), 57%),

[0089] 9. Q15XP8 (大西洋假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas atlantica*) (菌株 T6c/BAA-1087), 55%),

[0090] 10. Q9RKF6 (天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*), 56%)

[0091] 实施例 5 : 大肠杆菌中的表达和大小的确认

[0092] 分别复制前述获得的具有 50% 相同性以上的序列相同性的蛋白质中具有最高序列相同性的来自大西洋假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas atlantica* T6c) 的蛋白质 (Q15UF2) 和最低的来自天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor* A3) 的蛋白质 (Q9RKF6), 确认是否具有 α -NABH 活性。首先, 将使它们密码化的基因的碱基序列分别插入作为大肠杆菌表达载体的 pET21a (Novagen, 美国) 中 (以下, 将含有来自大西洋假交替单胞菌的 α -NABH 基因的表达载体称为 "pPsAGAJ"、将含有来自天蓝色链霉菌的 α -NABH 基因的表达载体称为 pScAGAJ)。为了确认重组 α -NABH 在大肠杆菌中成功表达, 使 pPsAGAJ 和 pScAGAJ 转化为作为表达用大肠杆菌的 *E. coli* BL21 (DE3) 后, 涂抹在含有 50mg/L 浓度的安匹西林抗生素的固体培养基上。将通过前述转化所得的菌落接种在添加有 50mg/L 浓度的安匹西林抗生素的 Luria-Bertani (LB) 培养基上后, 在 37°C 振荡培养一天, 确保菌体。之后, 为了确认表达, 将转化体接种在添加有 50mg/L 浓度的安匹西林抗生素的 Luria-Bertani (LB) 培养基上后, 在 37°C 振荡培养直至 OD600 = 0.5 ~ 1.0, 以 0.5mM/L 的浓度添加 IPTG, 在 180rpm 下诱导表达 4 小时。培养液经离心分离 (12000rpm、4°C、10 分钟) 回收菌体, 回收的菌体在 20mM 的 Tris 缓冲液 (Tris-HCl, pH 7.4) 中进行悬浮, 利用超声波粉碎机进行粉碎后, 通过 12% 的 SDS-PAGE 来确认大小。将确认了大小的已粉碎的悬浮液进行 15 分钟离心分离, 使用上清液作为助酶液。

[0093] 实施例 6 : α -新琼脂二糖水解酶的生化活性的确认

[0094] 经精制的 α -NABH 的活性如下所述进行确认。首先,用 β 琼脂糖酶处理琼脂多糖体,生成作为酶处理的最终产物的新琼脂二糖后,将其作为基质,通过 TLC 确认 α -NABH 的反应产物。通过 TLC 的确认是在硅胶 60TLC 平板上滴下 1 μ l 反应液,并在 TLC 溶剂条件(正丁醇:乙醇:水=3:2:2)下展开。展开的 TLC 平板用作为处理溶液的硫酸(乙醇中有 10% (v/v) 硫酸)处理 1 次后,进行干燥,经 1 次处理的平板再用作为 2 次处理溶液的间苯二酚(乙醇中有 0.2% (w/v) 间苯二酚)处理。这样处理的 TLC 平板干燥后,进行加热。

[0095] 前述实施例 4 ~ 6 的结果如下所述。

[0096] 来自使用作为表达用菌株的 *E. coli* BL21(DE3) 进行了转化的大西洋假交替单胞菌和天蓝色链霉菌的 α -NABH 的表达和大小的确认是通过 12% 的 SDS-PAGE 进行确认的。来自大西洋假交替单胞菌和天蓝色链霉菌的 α -NABH 的预期分子量分别为 40.7kDa 和 41.1kDa 左右,确认与预期分子量相同(图 12、图 13)。

[0097] 另外,为了确认分解产物,使用作为标准物质的 D-半乳糖来确认预期分解产物。确认到:作为用 α -NABH 处理过的二糖类的新琼脂二糖被分解为推断是已确认具有与 D-半乳糖相同的 Rf 值的半乳糖和脱水半乳糖的物质(图 14)。

[0001]

<110> 高丽大学校产学协力团
 <120> 新的 α -新琼脂二糖水解酶及使用其获得单糖类的方法
 <150> KR1020090026300
 <151> 2009-03-27
 <160> 12
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> 大西洋假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas atlantica* T6c)
 <400> 1
 Met Thr Gln Ala Lys Gln Lys Gln Ser Leu Ala Thr Lys Arg Ala Ile
 1 5 10 15
 Glu Arg Gly Tyr Asp Ser Lys Asn Ala Asp Trp Met Ile Glu Phe Glu
 20 25 30
 Thr Ser Pro Leu Lys Gly Asp Phe Ala Phe Glu Glu Gly Val Ile Arg
 35 40 45
 Arg Asp Pro Thr Ser Val Ile Ser Val Asp Asp Val Tyr His Cys Trp
 50 55 60
 Tyr Thr Lys Gly Thr Gly Glu Thr Val Gly Phe Gly Ser Thr Asn Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Lys Val Phe Pro Trp Asp Leu Thr Glu Val Trp His Ala Thr
 85 90 95
 Ser Arg Asp Gly Glu Thr Trp His Glu Gln Gly Pro Ala Ile Thr Arg
 100 105 110
 Gly Thr Pro Gly Ala Phe Asp Asp Arg Ala Val Phe Thr Pro Glu Val
 115 120 125
 Leu Ala His Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val Gln Tyr
 130 135 140
 Pro Tyr Thr Asn Arg Gln Ile Glu Gln Ile Ala Ile Ala His Ala Asp
 145 150 155 160
 Ser Pro Phe Gly Pro Trp Ile Lys Ser Thr Ala Pro Ile Leu Ser Pro
 165 170 175
 Ser Met Asp Gly Glu Trp Arg Gly Asp Glu Asp Asn Arg Phe His Val
 180 185 190
 His Ser Lys Gly Ser Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro Cys Leu
 195 200 205
 Leu Val Phe Asn Gly Lys Phe His Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu Thr Met
 210 215 220
 Gly Glu Glu Met Asn Phe Gly Gly Arg Glu Ile Lys His Gly Val Ala
 225 230 235 240
 Ile Ala Asp Asp Ile Leu Gly Pro Tyr His Lys Ser Glu Tyr Asn Pro
 245 250 255
 Ile Ser Asn Ser Gly His Glu Val Val Val Trp Asn Tyr Gln Gly Gly
 260 265 270
 Val Ala Ser Leu Leu Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr Ile Gln
 275 280 285
 Phe Ala Pro Asp Gly Ile Asn Phe Asp Ile Lys Ala His Ile Lys Gly
 290 295 300
 Ala Pro Glu Ala Val Gly Leu Tyr Arg Pro Ser Asn Ile Glu Asp Thr
 305 310 315 320

[0002]

```

Ser Pro Pro Gly Leu His Trp Gly Leu Cys His Lys Tyr Asp Ser Ser
          325          330          335

Trp Asn Trp Asn Tyr Ile Cys Arg Tyr Arg Leu Lys Lys Gln Val Leu
          340          345          350

Asp Ala Gly Thr Phe Gln Asn Ser Asn
          355          360

<210>      2
<211>      370
<212>      PRT
<213>      天蓝色链霉菌(Streptomyces coelicolor A3)

<400>      2
Met Thr Met Pro Ala Glu Ser Ala Ala Thr Val Arg Gly Arg Arg Tyr
  1          5          10          15

Pro Ala Asp Pro Glu Trp Phe Cys Asp Phe Arg Thr Phe Pro Val Gln
          20          25          30

Gly Leu Gly Pro Glu Val Gly Val His Arg Arg Asp Pro Ser Ser Val
          35          40          45

Leu Thr Val Asp Gly Arg Tyr His Val Trp Tyr Thr Arg Ser Thr Gly
  50          55          60

Glu Thr Asp Gly Phe Gly Thr Gly Asp Pro Met Ala Lys Val Phe Pro
  65          70          75          80

Trp Asp Trp Ser Glu Ile Trp His Ala Thr Ser Asp Asp Gly Ala Thr
          85          90          95

Trp Val Glu Gln Gly Arg Ala Leu Gly Arg Gly Glu Pro Gly Ser Tyr
          100          105          110

Asp Asp Arg Ser Val Phe Thr Pro Glu Val Leu Glu His Gln Gly Trp
          115          120          125

Phe Tyr Leu Val Tyr Gln Val Ile Arg Ser Pro Tyr Ala Leu Arg Ser
          130          135          140

Phe Glu Ser Ile Ala Met Ala Lys Ala Pro Ser Pro Asp Gly Pro Trp
          145          150          155          160

Val Arg Ser Pro Gln Pro Ile Leu Arg Pro Gln Ala Asp Gly Glu Trp
          165          170          175

Ala Gly Glu Glu Asp Asn Arg Leu Ser Val Val Ser Gln Gly Ser Phe
          180          185          190

Asp Ser His Lys Val His Asp Pro Ile Leu Val Pro Phe Gln Gly Arg
          195          200          205

Phe Phe Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu Gln Met Gly Glu Gly Phe Ser Ala
          210          215          220

Gly Gly Arg Thr Thr Arg Trp Gly Leu Ala Ile Ala Asp Asp Ile Glu
          225          230          235          240

Gly Pro Tyr His Arg Cys Pro Ala Asn Pro Val Thr Asn Ser Gly His
          245          250          255

Glu Thr Cys Val Trp Arg Tyr Gly Asp Gly Ile Ala Ala Met Leu Thr
          260          265          270

Thr Asp Gly Pro Glu Arg Asn Thr Ile Gln Phe Ala Pro Asp Gly Ile
          275          280          285

Asn Phe Glu Ile Met Ala His Ile Ala Asn Pro Pro Val Ala Thr Gly
          290          295          300

Pro Leu Arg Leu Pro Asp His Ala Val Ala Pro Leu Asp Gly Val Arg
          305          310          315          320

```

[0003]

Trp Gly Leu Cys His Asp Val Thr Ala Ser Trp His Tyr Ile Gln Gly
 325 330 335
 Phe Ala Ala Asp Glu Arg Gln Lys Met Phe Tyr Thr Arg Gly Leu Ser
 340 345 350
 Pro Glu Thr Ala Glu Ser Ala Glu Ala Asp Ala Leu Pro Ala Pro His
 355 360 365
 Glu Lys
 370
 <210> 3
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> 革兰菌(Gramella forsetii) (strain KT0803)
 <400> 3
 Met Ile Lys Lys Thr Lys Ala Leu Ile Val Ile Gly Leu Met Ala Thr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Ser Cys Asn Asn Thr Ser Glu Lys Ile Ser Ala Glu Lys Thr
 20 25 30
 Glu Asp Lys Pro Glu Ile Ser Gln Val Asp Ile Asp Arg Leu Gly Ile
 35 40 45
 Thr Asn Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ala Ser Val Arg Ala Leu Asp Trp
 50 55 60
 Pro Asp Val Gly Asn Glu Trp Phe Ile Glu Phe Ser Glu Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Leu Lys Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val Val Arg Arg Asp Pro
 85 90 95
 Ser Ala Leu Leu Lys His Asp Gly Lys Tyr Tyr Val Trp Tyr Thr Lys
 100 105 110
 Ser Val Gly Pro Thr Gln Gly Phe Gly Gly Asp Ile Glu Asn Asp Lys
 115 120 125
 Val Phe Pro Trp Asp Arg Cys Asp Ile Trp Tyr Ala Thr Ser Glu Asp
 130 135 140
 Gly Trp Thr Trp Glu Glu Gln Gly Ile Ala Val Ala Arg Gly Glu Lys
 145 150 155 160
 Gly Glu Tyr Asp Asp Arg Ser Val Phe Thr Val Glu Ile Met Glu Asp
 165 170 175
 Lys Gly Lys Tyr Tyr Leu Ser Tyr Gln Thr Ile Gln Ser Pro Tyr Asn
 180 185 190
 Val Arg Thr Lys Asn Gln Val Gly Leu Ala Trp Ala Asp Ser Pro Asn
 195 200 205
 Gly Pro Trp Thr Lys Ser Lys Asp Pro Ile Leu Ser Pro Ala Asp Asn
 210 215 220
 Gly Ile Trp Lys Gly Glu Glu Gln Asn Arg Phe Ala Val Glu Lys Lys
 225 230 235 240
 Gly Asp Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro Cys Ile Ile Pro Tyr
 245 250 255
 Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu Gln Met Gly Glu Glu
 260 265 270
 Ile Thr Phe Gly Gly Arg Gln Ile Arg His Gly Val Ala Ile Ala Asp
 275 280 285
 Asn Pro Lys Gly Pro Tyr Val Lys Ser Ala Tyr Asn Pro Ile Ser Asn
 290 295 300

[0004]

Ser Gly His Glu Ile Cys Val Trp Lys His Asn Gly Gly Ile Ala Ser
 305 310 315 320
 Leu Ile Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr Ile Gln Trp Ala Pro
 325 330 335
 Asp Gly Val Asn Phe Gly Ile Lys Ser Val Ile Lys Gly Ala Pro His
 340 345 350
 Ala Ile Gly Leu Asn Arg Glu Leu Asn Thr Asp Glu Ser Glu Glu Pro
 355 360 365
 Gly Ala Ile Leu Gly Trp Gly Leu Ser His Ile Tyr Asn Asn Ser Asp
 370 375 380
 Tyr Gln Ser Ile Met Arg Phe Ser Ser Lys Arg Arg Thr Ser His Val
 385 390 395 400
 Ala Lys Gly Glu Lys Ala Glu
 405

 <210> 4
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> 交替单胞菌(Saccharophagus degradans)

 <400> 4
 Met Ser Asp Ser Lys Val Asn Lys Lys Leu Ser Lys Ala Ser Leu Arg
 1 5 10 15
 Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Asp Glu Lys Gly Pro Glu Trp Leu Phe Glu
 20 25 30
 Phe Asp Ile Thr Pro Leu Lys Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val
 35 40 45
 Ile Arg Arg Asp Pro Ser Ala Val Leu Lys Val Asp Asp Glu Tyr His
 50 55 60
 Val Trp Tyr Thr Lys Gly Glu Gly Glu Thr Val Gly Phe Gly Ser Asp
 65 70 75 80
 Asn Pro Glu Asp Lys Val Phe Pro Trp Asp Lys Thr Glu Val Trp His
 85 90 95
 Ala Thr Ser Lys Asp Lys Ile Thr Trp Lys Glu Ile Gly Pro Ala Ile
 100 105 110
 Gln Arg Gly Ala Ala Gly Ala Tyr Asp Asp Arg Ala Val Phe Thr Pro
 115 120 125
 Glu Val Leu Arg His Asn Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val
 130 135 140
 Lys Ala Pro Tyr Leu Asn Arg Ser Leu Glu His Ile Ala Ile Ala Tyr
 145 150 155 160
 Ser Asp Ser Pro Phe Gly Pro Trp Thr Lys Ser Asp Ala Pro Ile Leu
 165 170 175
 Ser Pro Glu Asn Asp Gly Val Trp Asp Thr Asp Glu Asp Asn Arg Phe
 180 185 190
 Leu Val Lys Glu Lys Gly Ser Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro
 195 200 205
 Cys Leu Met Phe Phe Asn Asn Arg Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu
 210 215 220
 Thr Met Gly Glu Ser Met Asn Met Gly Gly Arg Glu Ile Lys His Gly
 225 230 235 240
 Val Ala Ile Ala Asp Ser Pro Leu Gly Pro Tyr Thr Lys Ser Glu Tyr
 245 250 255

[0005]

Asn Pro Ile Thr Asn Ser Gly His Glu Val Ala Val Trp Pro Tyr Lys
 260 265 270
 Gly Gly Met Ala Thr Met Leu Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr
 275 280 285
 Cys Gln Trp Ala Glu Asp Gly Ile Asn Phe Asp Ile Met Ser His Ile
 290 295 300
 Lys Gly Ala Pro Glu Ala Val Gly Phe Phe Arg Pro Glu Ser Asp Ser
 305 310 315 320
 Asp Asp Pro Ile Ser Gly Ile Glu Trp Gly Leu Ser His Lys Tyr Asp
 325 330 335
 Ala Ser Trp Asn Trp Asn Tyr Leu Cys Phe Phe Lys Thr Arg Arg Gln
 340 345 350
 Val Leu Asp Ala Gly Ser Tyr Gln Gln Thr Gly Asp Ser Gly Ala Val
 355 360 365

<210> 5
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> 大西洋假交替单胞菌(Pseudoalteromonas atlantica)

<400> 5
 Met Lys Tyr Trp Leu Ile Gly Ala Leu Ser Leu Ser Leu Thr Ala Cys
 1 5 10 15
 Asn Asn Thr Thr Met Glu Ser Glu Thr Arg Ala Ala Ser Thr Ser Val
 20 25 30
 Ser Ala Pro Asn Lys Ala Tyr Ser Gln Ala Asp Tyr Ala Tyr Leu Ala
 35 40 45
 Ile Ser Gln Pro Asp Thr Met Ser Ala Ala Ser Lys Arg Ala Leu Ala
 50 55 60
 Arg Asn Tyr His Lys Asn Glu Gln Trp Phe Gly Glu Phe Arg His Glu
 65 70 75 80
 Thr Leu Phe Gly Asp Phe Ala Phe Asp Pro Asn Val Ser Arg Arg Asp
 85 90 95
 Pro Ser Lys Val Leu Lys Val Asp Asn Val Phe Tyr Thr Trp Tyr Thr
 100 105 110
 Arg Thr Thr Gly Glu Ala Val Gly Phe Gly Thr Gly Asp Pro Asn Ala
 115 120 125
 Lys Val Phe Pro Trp Asp Gln Ala Glu Ile Trp Tyr Ala Thr Ser Lys
 130 135 140
 Asp Gly Tyr His Trp Gln Glu Lys Gly Arg Ala Leu Gly Thr Gly Asp
 145 150 155 160
 Val Gly Gln Phe Asp Asp Arg Ser Val Phe Thr Pro Glu Val Leu Ala
 165 170 175
 His Gln Gly Met Phe Tyr Leu Val Tyr Gln Ala Ile Lys Ala Pro Tyr
 180 185 190
 Leu Asn Arg Thr Lys Asn Thr Val Ala Met Ala Tyr Ser Ser Ser Pro
 195 200 205
 Asp Gly Pro Trp Arg Lys Leu Asp Ala Pro Ile Leu Thr Ala Ser Asp
 210 215 220
 Thr Gly Glu Trp Ala Gly Thr Gln Asp Asn Arg Phe Leu Val Lys Ser
 225 230 235 240

[0006]

Gln Gly Asp Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro Thr Leu Leu Phe
 245 250 255
 Tyr Arg Asp Lys Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu Arg Met Gly Glu
 260 265 270
 Arg Lys Thr Ala Gly Gly Arg Glu Ile Arg Trp Gly Val Ala Ile Ala
 275 280 285
 Asp Asn Pro Gln Gly Pro Tyr Ile Lys Ser Ala Phe Asn Pro Ile Thr
 290 295 300
 His Ser Gly His Glu Leu Cys Val Trp Gln Tyr Gln Asp Gly Ile Ala
 305 310 315 320
 Ile Val Ser Ser His Asp Gly Pro Glu Lys Gln Thr Ile Gln Tyr Ala
 325 330 335
 Pro Asp Gly Ile Asn Phe Glu Val Met Ser Tyr Leu Pro Ser Val Pro
 340 345 350
 Ser Ala Ile Gly Leu Val Glu Ser Leu Asp Lys Asn Ala Tyr Pro Thr
 355 360 365
 Ala Gly Leu Glu Trp Gly Leu Tyr His Glu Tyr Val Ile Pro Pro Gly
 370 375 380
 Lys Thr Trp Met Ser Gly Ile Asn His Ile Lys Arg Phe Ser Phe Asn
 385 390 395 400
 Ala Pro Asn Arg Val Ser Met Gln Gly Asp Ser Ile Gly Asn Thr Pro
 405 410 415
 Gln Asn Asn Ser Gly Glu Phe Ile Asn Lys Gln Ser Asp His
 420 425 430

 <210> 6
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> 类芽孢杆菌(Paenibacillus sp.)

 <400> 6
 Met Gly Met Lys Lys Glu Ser Ala Ala Thr Ile Arg Ala Lys Gln Tyr
 1 5 10 15
 Thr Lys Asn Ala Asp Trp Phe Cys Glu Phe Lys Tyr Glu Pro Val Glu
 20 25 30
 Gly Leu Gly Tyr Glu Glu Gly Ile His Arg Arg Asp Pro Ser Ser Val
 35 40 45
 Ile Lys Val Gly Asp Leu Tyr Tyr Val Trp Tyr Thr Lys Ser Val Gly
 50 55 60
 Glu Ala Val Gly Phe Asn Thr Gly Asp Pro Asp Ser Lys Val Phe Pro
 65 70 75 80
 Trp Asp Gln Ser Asp Val Trp Tyr Ala Thr Ser Pro Asp Gly Thr Thr
 85 90 95
 Trp Thr Glu Arg Gly Met Ala Val Gly Arg Gly Pro Lys Gly Ser Tyr
 100 105 110
 Asp Asp Arg Ser Val Phe Thr Pro Glu Ile Leu His His Asp Gly Lys
 115 120 125
 Phe Tyr Leu Val Tyr Gln Val Ile Glu Gly Gln Tyr Leu Leu Arg Lys
 130 135 140
 Tyr Glu Asn Ile Ala Met Ala Val Ala Glu Ser Pro Glu Gly Pro Trp
 145 150 155 160
 Arg Lys Leu Asp Ala Pro Ile Leu Arg Pro Ala Met Asn Gly Glu Trp
 165 170 175

[0007]

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

<210> 7
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> 瘤胃球菌(Ruminococcus sp.)

<400> 7
 Met Lys Leu Ser Ser Ala Ser Lys Arg Ala Ile Glu Arg Asn Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gln Ser Cys Glu Trp Phe Cys Asp Phe Lys Glu Ser Gly Ile Glu Gly
 20 25 30
 Ile Gly Tyr Glu Lys Gly Ile His Arg Arg Asp Pro Ser Ser Val Ile
 35 40 45
 Lys Val Gly Asp Asp Tyr Phe Val Trp Tyr Ser Arg Ser Val Gly Pro
 50 55 60
 His Lys Gly Phe His Thr Gly Asp Glu Glu Ala Lys Val Phe Pro Trp
 65 70 75 80
 Asp Tyr Cys Asp Ile Trp Tyr Ala Val Ser Lys Asp Gly Tyr Arg Trp
 85 90 95
 Glu Glu Lys Gly Pro Ala Val Val Arg Gly Glu Arg Gly Ala Tyr Asp
 100 105 110
 Asp Arg Ser Val Phe Thr Pro Glu Ile Leu Glu Tyr Glu Gly Lys Tyr
 115 120 125
 Tyr Leu Val Tyr Gln Val Val Gln His Pro Tyr Val Asn Arg Ser Phe
 130 135 140
 Glu Ser Ile Ala Ile Ala Val Ala Asp Ser Pro His Gly Pro Phe Thr
 145 150 155 160
 Lys Ser Lys Glu Pro Ile Leu Thr Pro Thr Lys Asp Gly Ile Trp Glu

[0008]

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

Glu

<210> 8
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> 类芽孢杆菌 (Paenibacillus sp.)

<400> 8
 Met Arg Lys Glu Ser Ala Ala Thr Lys Arg Ala Lys Gln Tyr Thr Lys
 1 5 10 15
 Asn Ser Asp Trp Phe Cys Glu Phe Arg Ile Ser Pro Val Gln Gly Leu
 20 25 30
 Gly Tyr Glu Glu Gly Val His Arg Arg Asp Pro Ser Ser Val Ile Lys
 35 40 45
 Val Asn Asp Leu Tyr Tyr Val Trp Tyr Thr Lys Thr Glu Gly Glu Ala
 50 55 60
 Ala Gly Phe Gln Thr Gly Asp Pro Asp Ala Lys Val Phe Pro Trp Asp
 65 70 75 80
 Leu Ser Glu Val Trp Tyr Ala Thr Ser Pro Asp Gly Val Asn Trp Thr
 85 90 95
 Glu Arg Gly Arg Ala Ile Gly Arg Gly Pro Lys Gly Ser Tyr Asp Asp
 100 105 110
 Arg Ser Val Phe Thr Pro Glu Ile Leu His His Glu Asp Lys Phe Tyr
 115 120 125
 Leu Val Tyr Gln Val Val Gln Ser Pro Tyr Thr Leu Arg Thr Leu Glu
 130 135 140
 Asn Ile Ala Met Ala Val Ala Glu Ser Pro Glu Gly Pro Trp Arg Lys
 145 150 155 160
 Leu Asp Glu Pro Ile Leu Arg Pro Ser Asn Asn Gly Glu Trp Phe Gly

[0009]

165										170										175									
Asp	Asp	Asp	Asn	Arg	Leu	Thr	Val	Lys	His	Lys	Gly	Asp	Phe	Asp	Ser														
			180					185					190																
Leu	Lys	Val	His	Asp	Pro	Thr	Leu	Phe	Phe	Tyr	Asn	Asn	Gln	Phe	Trp														
		195					200					205																	
Leu	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Glu	Gln	Met	Gly	Glu	Glu	Met	Asn	Phe	Gly	Gly														
		210				215					220																		
Arg	Thr	Thr	Lys	Trp	Gly	Val	Ala	Ile	Ala	Asp	His	Pro	Glu	Gly	Pro														
					230					235					240														
Tyr	Val	Lys	Ser	Glu	Tyr	Asn	Pro	Ile	Thr	Asn	Ser	Gly	His	Glu	Thr														
				245					250					255															
Cys	Leu	Trp	Gln	Tyr	Arg	Gly	Gly	Met	Ala	Ala	Leu	Leu	Thr	Thr	Asp														
			260					265					270																
Gly	Pro	Glu	Lys	Asn	Thr	Ile	Gln	Tyr	Ala	Pro	Asp	Gly	Ile	Asn	Phe														
		275					280					285																	
Glu	Ile	Glu	Ala	Val	Ile	Lys	Asn	Pro	Pro	Glu	Ala	Pro	Gly	Pro	Tyr														
		290				295					300																		
Arg	Thr	Pro	Asp	Ala	Asp	Arg	Ser	Pro	Leu	Glu	Gly	Leu	Arg	Trp	Gly														
		305			310					315					320														
Leu	Cys	His	Asn	Val	His	Ser	Lys	Trp	Asn	Tyr	Ile	Gln	Met	Tyr	Thr														
				325					330					335															
Val	Asp	Glu	Ser	Phe	Lys	His	Tyr	Tyr	Met	Asn	Lys	Ile	Asn	Pro	Glu														
			340					345					350																
Glu	Leu	Trp	Leu	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Arg	Asn	Gln																		
		355					360																						
<210>		9																											
<211>		382																											
<212>		PRT																											
<213>		黄杆菌(Flavobacteriales bacterium)																											
<400>		9																											
Met	Lys	Lys	Glu	Lys	Glu	Val	Val	Glu	Lys	Lys	Ser	Phe	Glu	Ile	Ser														
	1			5					10					15															
Asn	Glu	Gln	Leu	Asp	Asn	Leu	Gly	Ile	Thr	Asn	Arg	Asp	Ser	Leu	Ser														
			20					25					30																
Ser	Ala	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Trp	Pro	Asn	Ile	Gly	Asn	Glu	Trp														
		35					40					45																	
Phe	Ile	Glu	Phe	Ser	Ala	Leu	Lys	Pro	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Ala	Tyr														
	50					55					60																		
Glu	Glu	Gly	Val	Val	Arg	Arg	Asp	Pro	Ser	Ala	Leu	Ile	Phe	Glu	Asn														
	65				70					75				80															
Gly	Lys	Tyr	Tyr	Val	Trp	Tyr	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	Ser	Gln	Gly														
			85					90					95																
Phe	Gly	Gly	Asp	Ile	Glu	Asn	Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Trp	Asp	Arg	Cys														
			100					105					110																
Asp	Ile	Trp	Tyr	Ala	Thr	Ser	Val	Asp	Gly	Trp	Thr	Trp	Lys	Glu	Glu														
		115					120					125																	
Gly	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Gly	Val	Asn	Gly	Glu	Phe	Asp	Asp	Arg	Ser														
		130				135					140																		
Val	Phe	Thr	Val	Glu	Ile	Met	Lys	Tyr	Glu	Asn	Met	Tyr	Tyr	Leu	Cys														
	145				150					155				160															
Tyr	Gln	Thr	Val	Gln	Ser	Pro	Tyr	Thr	Val	Arg	Val	Lys	Asn	Gln	Val														

[0010]

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

<210> 10
 <211> 402
 <212> PRT
 <213> 拟杆菌(Bacteroides plebeius)

<400>	10														
Met	Arg	Lys	Ile	Ile	Phe	Ala	Ala	Gly	Met	Met	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala
1				5					10					15	
Cys	Gly	Asn	Thr	Gly	Asn	Thr	Gln	Thr	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Thr	Gln
			20					25					30		
Asn	Tyr	Asp	Glu	Arg	Lys	Ala	Asp	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Lys	Gly	Asn
		35					40					45			
Lys	Leu	Ser	Ala	Ala	Met	Lys	Arg	Ala	Met	Lys	Trp	Glu	Asn	His	Asp
	50					55					60				
Asn	Lys	Trp	Phe	Phe	Glu	Tyr	Lys	Met	Glu	Pro	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu
65				70					75						80
Ala	Tyr	Glu	Glu	Gly	Val	Val	Arg	Arg	Asp	Pro	Ser	Ala	Met	Leu	Lys
			85					90					95		
Ile	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Val	Trp	Tyr	Ser	Lys	Ser	Tyr	Gly	Pro	Thr
			100					105					110		
Gln	Gly	Phe	Ala	Gly	Asp	Ile	Glu	Lys	Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Trp	Asp
		115					120					125			
Arg	Cys	Asp	Ile	Trp	Tyr	Ala	Thr	Ser	Lys	Asp	Gly	Leu	Thr	Trp	Lys
	130					135					140				

[0011]

Glu Gln Gly Ile Ala Val Lys Arg Gly Glu Lys Gly Ala Tyr Asp Asp
 145 150 155 160
 Arg Ser Val Phe Thr Pro Glu Val Met Glu Trp Lys Gly Lys Tyr Tyr
 165 170 175
 Leu Cys Tyr Gln Ala Val Lys Ser Pro Tyr Thr Val Arg Val Lys Asn
 180 185 190
 Thr Ile Gly Met Ala Cys Ala Asp Ser Pro Glu Gly Leu Trp Thr Lys
 195 200 205
 Thr Asp Lys Pro Val Leu Glu Pro Ser Asp Thr Gly Glu Trp Glu Gly
 210 215 220
 Asp Glu Asp Asn Arg Phe Lys Val Val Ser Lys Gly Asp Phe Asp Ser
 225 230 235 240
 His Lys Val His Asp Pro Cys Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Lys Phe Tyr
 245 250 255
 Met Tyr Tyr Lys Gly Glu Arg Met Gly Glu Glu Ile Thr Trp Gly Gly
 260 265 270
 Arg Glu Ile Lys His Gly Val Ala Ile Ala Glu Asn Pro Met Gly Pro
 275 280 285
 Tyr Val Lys Ser Glu Tyr Asn Pro Ile Ser Asn Ser Gly His Glu Val
 290 295 300
 Cys Val Trp Pro Tyr Lys Gly Gly Ile Ala Ser Leu Ile Thr Thr Asp
 305 310 315 320
 Gly Pro Glu Lys Asn Thr Leu Gln Trp Ser Pro Asp Gly Ile Asn Phe
 325 330 335
 Glu Ile Met Ser Val Val Lys Gly Ala Pro His Ala Ile Gly Leu Asn
 340 345 350
 Arg Ser Ala Asp Ala Glu Lys Glu Pro Thr Glu Ile Leu Arg Trp Gly
 355 360 365
 Leu Thr His Ile Tyr Asn Ser Ser Asp Tyr Gln Ser Ile Met Arg Phe
 370 375 380
 Ser Thr Trp Thr Leu Gln Thr His Thr Ala Lys Gly Glu Ser Lys Glu
 385 390 395 400
 Arg Lys

<210> 11
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> 微颤菌(Microscilla sp.)

<400> 11
 Met Lys Ile Met Asn Val Lys Tyr Ser Thr Ile Gly Ala Met Thr Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe Phe Ala Ser Cys Gln Thr Pro Cys Pro Glu Glu Gln Glu
 20 25 30
 Glu Asn Phe Glu Ile Thr Gln Asp Lys Ile Asp Tyr Leu Gly Ile Thr
 35 40 45
 Asn Pro Asp Lys Leu Ser Ala Ala Ser Lys Arg Ala Leu Gln Trp Pro
 50 55 60
 Asp Ile Gly Asn Glu Trp Tyr Gly Glu Phe Gln Val Tyr Asp Leu Lys
 65 70 75 80
 Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val Val Arg Arg Asp Pro Ser Ser
 85 90 95

[0012]

Ile Ile Lys His Asp Gly Lys Tyr Phe Val Trp Tyr Ser Lys Ser Thr
 100 105 110
 Gly Lys Thr Asp Gly Phe Ala Gly Asp Ile Glu Lys Asp Lys Val Phe
 115 120 125
 Pro Trp Asp Arg Cys Asp Ile Trp Phe Ala Thr Ser Glu Asp Gly Trp
 130 135 140
 Thr Trp Lys Glu Glu Gly Met Ala Val Gly Arg Gly Glu Lys Gly Thr
 145 150 155 160
 Tyr Asp Asp Arg Ser Val Phe Thr Thr Glu Val Met Glu His Asn Gly
 165 170 175
 Thr Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val Lys Ser Pro Tyr Asn Val Arg
 180 185 190
 Val Lys Asn Gln Val Gly Leu Ala Trp Ser Asp Ser Pro Tyr Gly Pro
 195 200 205
 Trp Thr Lys Ser Lys Glu Pro Ile Leu Ser Pro Ser Asp Asn Gly Ile
 210 215 220
 Trp Lys Gly Asp Glu Asp Asn Arg Phe Leu Val Glu Lys Lys Gly Asp
 225 230 235 240
 Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro Cys Ile Ile Pro Tyr Asn Gly
 245 250 255
 Lys Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu Gln Met Gly Glu Gln Ile Thr
 260 265 270
 Phe Gly Gly Arg Gln Ile Arg His Gly Val Ala Ile Ala Asp Asp Pro
 275 280 285
 Lys Gly Pro Tyr Val Lys Ser Pro Tyr Asn Pro Ile Ser Asn Ser Gly
 290 295 300
 His Glu Ile Cys Val Trp Lys His Glu Gly Gly Ile Ala Ser Leu Ile
 305 310 315 320
 Thr Thr Asp Gly Pro Glu Arg Asn Thr Ile Gln Trp Ala Pro Asp Gly
 325 330 335
 Ile Asn Phe Asp Ile Ile Ala Ala Ile Pro Gly Ala Pro His Ala Ile
 340 345 350
 Gly Leu Asn Arg Thr Leu Asn Asn Glu Asp Pro Phe Gly Ile Phe Gly
 355 360 365
 Trp Gly Leu Thr His Glu Tyr Val Thr Tyr Asp Trp Gln Tyr Ile Arg
 370 375 380
 Arg Phe Glu Gly Lys Arg Lys Thr Thr His Val Ala Arg Gly Glu Thr
 385 390 395 400
 Gly Ser Lys Lys Ser Ser Asp Glu
 405

<210> 12
 <211> 1107
 <212> DNA
 <213> 交替单胞菌(Saccharophagus degradans)

<400> 12
 atgagcgatt caaaagtaaa taaaaaattg agtaaagcta gcctgcgagc catagagcgc 60
 ggctacgatg aaaaggggcc tgaatggctg tttagatttg atattacccc actaaaaggc 120
 gacttagcct acgaagaagg cgtaattcgt cgagacccca gcgcagtatt aaaggtggac 180
 gatgaatatc acgttttgta caccaagggc gaagtgaaa cagtaggctt cggcagcgac 240

[0013]

aaccccgaag acaaagtctt cccatgggat aaaacagaag tttggcacgc cacctctaaa	300
gataagatta cttggaaaga aattggccct gccatacaac gcggcgacgc tggggcatat	360
gatgaccgtg cagtgttcac cccgaagtc ctgcgccata acggcaccta ctaccttcta	420
tatcaaacgg taaaagcgcc ctacttaaac cgatcgctag agcatatagc catcgcatac	480
agcgattccc cctttggccc atggacaaa tccgatgcgc caattttaag ccagaaaaat	540
gacggcgttt gggatacgga cgaagacaat cgatttttag taaaagagaa aggcagtttc	600
gatagccaca aagtacacga cccctgcta atgtttttta acaatcgttt ctacctgtat	660
tacaaaggcg agactatggg cgaagcatg aacatgggcg gcagagaaat aaaacacggt	720
gtagccattg ccgactcgcc acttgggccc tacaccaaaa gcgaatacaa ccctattacc	780
aatagtggcc atgaagttgc cgtatggccc tacaaagggt gaatggccac catgctaacc	840
accgacgggc cagaaaaaaaa cacctgccag tgggcagaag acggcattaa ctttgacatt	900
atgtcgcata taaaaggcgc accagaagca gtaggttttt ttagaccaga aagcgatagc	960
gacgacccta taagcggcat tgaatggggg ctaagccaca agtacgacgc cagctggaac	1020
tggaactatc tatgtttttt taaaacgcgt cgacaagttt tagatgcagg tagctatcag	1080
caaacaggcg attccggagc agtataa	1107

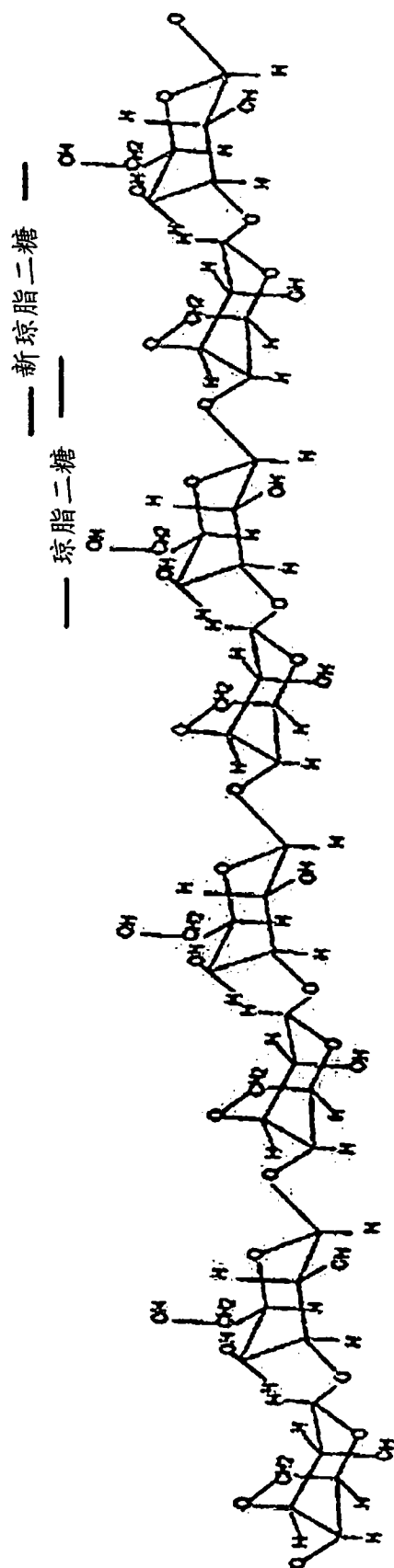


图 1

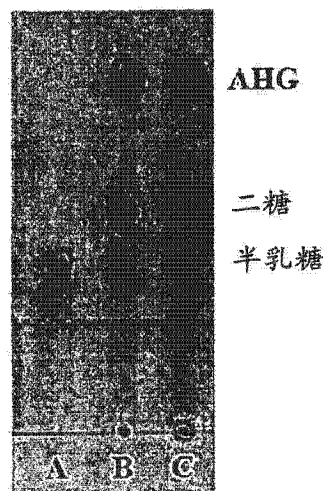


图 2

ATG AGC GAT TCA AAA GTA AAT AAA AAA TTG AGT AAA GCT AGC CTG CGA GGC ATA GAG CGC < 60
 M S D S K V N K K L S K A S L R A I E R
 GGC TAC GAT GAA AAG GGG CCT GAA TGG CTG TTT GAG TTT GAT ATT AOC CCA CTA AAA GGC < 120
 G Y D E K G P E W L F E F D I T P L K G
 GAC TTA GCC TAC GAA GAA GGC GTA ATT CGT CGA GAC COC AGC GCA GTA TTA AAG GTG GAC < 180
 D L A Y E E G V I R R D P S A V L K V D
 GAT GAA TAT CAC GTT TGG TAC ACC AAG GGC GAA GGT GAA ACA GTA GGC TTC GGC AGC GAC < 240
 D E Y H V W Y T K G E G E T V G F G S D
 AAC CCC GAA GAC AAA GTC TTC CCA TGG GAT AAA ACA GAA GTT TGG CAC GOC ACC TCT AAA < 300
 N P E D K V F P W D K T E V W H A T S K
 GAT AAG ATT ACT TGG AAA GAA ATT GGC OCT GOC ATA CAA CGC GGC GCA GCT GGG GCA TAT < 360
 D K I T W K E I G P A I Q R G A A G A Y
 GAT GAC CGT GCA GTG TTC ACC CCC GAA GTC CTG CGC CAT AAC GGC ACC TAC TAC CTT GTA < 420
 D D R A V F T P E V L R H N G T Y Y L V
 TAT CAA ACG GTA AAA GCG CCC TAG TTA AAG CGA TCG CTA GAG CAT ATA GOC ATC GCA TAC < 480
 Y Q T V K A P Y L N R S L E H I A I A Y
 AGC GAT TCC CCC TTT GGC CCA TGG ACC AAA TCC GAT GOG CCA ATT TTA AGC CCA GAA AAT < 540
 S D S P F G P W T K S D A P I L S P E N
 GAC GGC GTT TGG GAT ACG GAC GAA GAC AAT CGA TTT TTA GTA AAA GAG AAA GGC AGT TTC < 600
 D G V W D T D E D N R F L V K E K G S F
 GAT AGC CAC AAA GTA CAC GAC CCC TGC TTA ATG TTT TTT AAC AAT CGT TTC TAC CTG TAT < 660
 D S H K V H D P C L M F F N N R F Y L Y
 TAC AAA GGC GAG ACT ATG GGC GAA AGC ATG AAC ATG GGC GGC AGA GAA ATA AAA CAC GGT < 720
 Y K G E T M G E S M N H G G R E I K H G
 GTA GOC ATT GOC GAC TCG CCA CTT GGG CCC TAC ACC AAA AGC GAA TAC AAC CCT ATT ACC < 780
 V A I A D S P L G P Y T K S E Y N P I T
 AAT AGT GGC CAT GAA GTT GOC GTA TGG OCC TAC AAA GGT GGA ATG GOC ACC ATG CTA ACC < 840
 N S G H E V A V W P Y K G G M A T M L T
 ACC GAC GGC CCA GAA AAA AAC ACC TGC CAG TGG GCA GAA GAC GGC ATT AAC TTT GAC ATT < 900
 T D G P E K N T C Q W A E D G I N F D I
 ATG TCG CAT ATA AAA GGC GCA CCA GAA GCA GTA GGT TTT TTT AGA CCA GAA AGC GAT AGC < 960
 M S H I K G A P E A V G F F R P E S D S
 GAC GAC OCT ATA AGC GGC ATT GAA TGG GGG CTA AGC CAC AAG TAC GAC GOC AGC TGG AAC < 1020
 D D P I S G I E W G L S H K Y D A S W N
 TGG AAC TAT CTA TGC TTT TTT AAA ACG CGT CGA CAA GTT TTA GAT GCA GGT AGC TAT CAG < 1080
 W N Y L C F F K T R R Q V L D A G S Y Q
 CAA ACA GGC GAT TCC GGA GCA GTA TAA < 1107
 Q T G D S G A V *

图 3

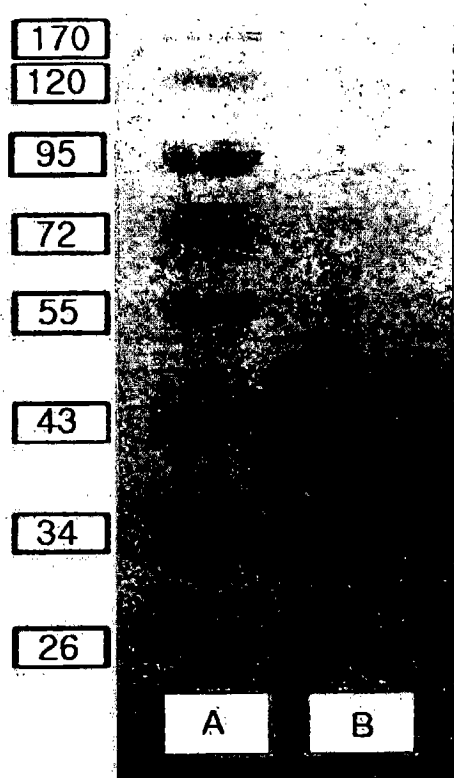


图 4



图 5

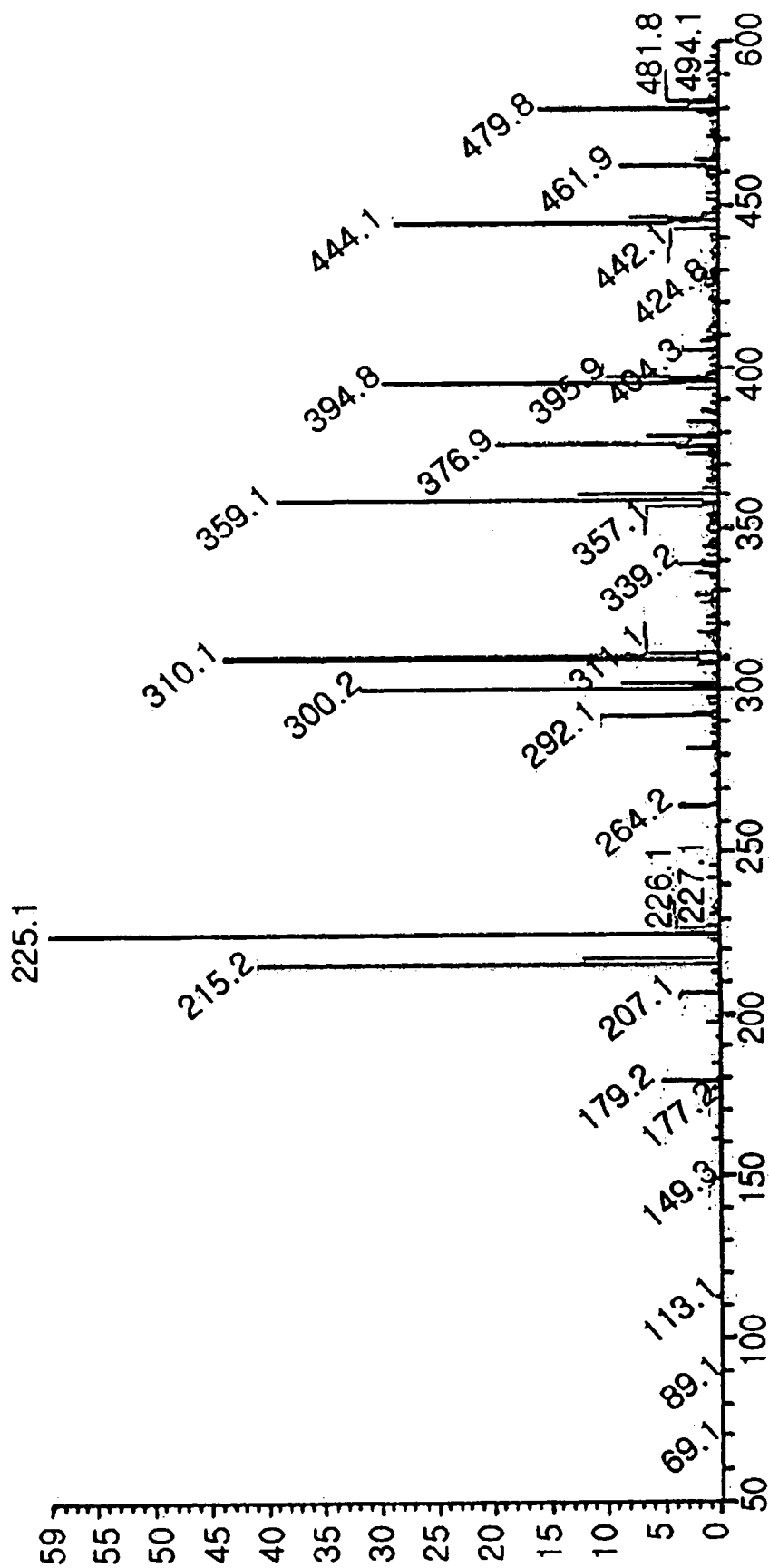


图 6

31

模序的正则表达

Motif 1	[IV]GVAV[AS]DSPxGP[WF][KET][KR]
Motif 2	[ATN]PE[IV][LY]EH[DN]GK[YF]Y[LM][YF][YF]
Motif 3	VGVA[TI][AS]D[SD][PI][LE]GPIYF]TKSxNP[IV]
Motif 4	NSGHE[TIV]C[VL][WF][PQ][YF]K[GD]G[IM]A[AS][L][I]TTDGPENKTIQ[YWF]A[PE]DG[IV]NF[ED][MK][AS][VH]IK[GN][AP]P[EH]A
Motif 5	[AY]TSKD[GL][VI][TN]WKE
Motif 6	VxRR[DE]P[SP]S[VI][IL]K[EV]D[GD]xYY[VM]WY[ST]
Motif 7	DNR[FL][LT][V][KV][SH][KQ]G[DS]FDS[HL]KVHDP[CIT][L][FL][FP][FY][NR][GN][KQR][FYW]LYYKGE[QRT]MGEEM[NT][FAM]GGR[ET][IT][KR]
Motif 14	GFG[TG][DG][DI][PE][DN][DA]KVPWDR[CS][DE][IV]W[YH]
Motif 16	[DEK][QAEK]P[IL][L][RS]P[GS][DN][DTN]G[EIS]WD[GD]
Motif 17	[IVL]GRGE[KP]G[SA][YF]DDR[SA]VF
Motif 20	G[L]P[YFN]R[NPST][ELP]DA[DES][DKR][ENS]P[LT][EA][GI][LI][RE]WGL[CS]H[DIKN][YV][NDH][SAN][SKQ][WD]
Motif 34	Q[TV]A[VI][QK][SA]PY[TLN][NVL]R[STV]
Motif 40	PLKGDLAYEEG

>tr|Q9RKF6|Q9RKF6_STRCO
HTMPAESAAITVGRRRVPADEWFCDFRIFPVQELGPEVGYHRRDPSSVLTVDGRVHYVYT
PSTGETDGFGTGDPNAKYFPWDSEIWHATSDOGATWVEQGRALGRGEGSYDDRSYFTIP
EVLHGGWFVLYVQVIRSPVALRSFESIMAKAPSPGPNVRSQPIILRPQADGEWAGEE
QARLSVWSQGSFDSHKYHDPILVPPQGRFLVYKGEQNGEGFSAQGRITRWGLAIADDIIE
GPVHRCPAINPTNSGHETCYWRVGGIAMLITDGPENTIQFAPDGINFEIMAHIANPP
VATGLRLPDHAYAPLDGWRWGLCHDVTASWHVILQGFADDERQKHFTYRGLSPETAESAE
ADALPAHPHEK
OS=Streptomyces coelicolor GN=SC03481 PE=4 SV=1
预测非典型型蛋白

>tr|Q15XP8|Q15XP8_PSEAS
HKVWILIGALSLSLTACNNTTNESETRAASTSVSPNKAYSQADYAYLAIISQPDINSAAASK
RALARNYHKNQEGFRHETLFGDFADPNVSRDPKYLKVDAVFTWYTRTTGEAVG
FGTGDPAKVFWDQAEIWWATSKGVHIDEGRALGTGVGQDORSVFTPEVLAHQH
FVLYVQAIAKAPLNRTKNTVAMAYSSSPGPNVRSQPIILASDTGEWAGTQNRFLYKS
QGFDSHKYHDPITLLFYRDKFYLKYKGERWIGERTAGGREIRWGYAIAADNPQSPYIKSAF
NPITHSHELQVQVQDGIATVSSHDPKQTIQYAPDGINFEIMVSYLPSVPSAIGLYES
LDKNAYPTAGLEWGLVHEVYIPPGKTWNSGINHIKPFSPNAPNRYSNQDOSIGNTPQNNNS
GEFINKQSDH
OS=Pseudoalteromonas atlantica (strain T6c / BAA-1087) GN=Pat1_0812 PE=3 SV=1
预测非典型型蛋白

>tr|D6J313|D6J313_9BAQL
MGNKESAAITRAKQYTKNADWFCDFKYPVEBLGYEEGIHRRDPSSYIKVQDLVYVWYT
KSYGEAVGENTGDPUSKYFPWDQVWYATSPDITWTERGHAVGRGPKGSYDDRSYFTIP
EITLHIDGKLYVQVIEGQYLLRYENIAMAYAESPEGPWRKLDAPILRPAMNGEWFQDD
QNLRTVKHKGFDSLKYHDPILFYNNQFQLYKGEQNGEENFGERTTKWGYAISDHP
GPYKSEVNPVINSGHETLLWHYREGMAALLTDGPEKNTIQYAPDGINFEIEAVIKNPP
EAAQFRITEDRSPLEGIHWGLCHNVHTKWHILKFRITVEDYKHYANKINPEVLWLGK
KAKQKQD
OS=Paenibacillus sp. oral taxon 786 str. D14 GN=POTG_02762 PE=4 SV=1
预测非典型型蛋白

>tr|D6JDD4|D6JDD4_9FIRM
MKLSSAKRAIERNVYQSENFCDKESGIEGIGYEGKIHRRDPSSYIKVGDYFVWYSR
SVGPKGHTGDEEAKYFPWDYCDIWWYKSGYRWEEKGPVYRGERGAYDDRSYFTPE
ILEVEGKYLWYVQVQHPYVNRSFESIAIAYADSPHGFITKSEPIITPKGIEWEED
NRFAYKKGSFDSHKYHDPILFAFGKLYVYKGEWGEELVNGRETWGYAIAADNLG
PYHRSEVNPVINSGHETCLWQVNGGI AAFRTDGVKNTIQFADGINFEIKSYIKQGP
ACGPYRLESNSNPLKMEWGLCHDVSQDYGFIKRFIDIERIKKQVYTNREWE
OS=Paenibacillus sp. oral taxon 786 str. D14 GN=POTG_02958 PE=4 SV=1
预测非典型型蛋白

>tr|D6J3P3|D6J3P3_9BAQL
MKESAAITRAKQYTKNSDWFCEFRISPVQGLGYEEGYPHRRDPSSYIKVNDLYVWYTKT
EGEAAGFTGDPDAKYFPDLSVWYATSPDYNWTERGRIAGRPKGSYDDRSYFTPEI
LHEDKLYVQVQSPYTLRTLENIAMAYAESPEGPWRKLDPEILRPSINGEWFQDDN
RLTVYKHKGFDSLKYHDPITLLFFVNGQFLLVYKGEQNGEENFGERTTKWGYAIAADHPGP
VYKSEVNPVINSGHETCLWQVREGMAALLTDGPEKNTIQYAPDGINFEIEAVIKNPP
PGVYRTPDADHSPLEGLHWGLCHNVHKSNNYIQVYTVDESFKHYWINKINPEELWLGKSP
KRNQ
OS=Flavobacteriales bacterium HTC22170 GN=FB2170_15408 PE=4 SV=1
预测非典型型蛋白

>tr|A4AR39|A4AR39_9FLA0
MKKEWVEKKSFEISNEQLDNLGINTRDSLSASAKRALKPNIGNENFIEFSALKPLKGL
DLAYEEGVRRDPSALIIFENGKYVWVSKLSQSFGGDIENOKVFPWRDQIWWATSY
DGWTWKEGPAIVRGVNGEFDORSVFTVEIMKYENWYLYQVTVQSPYTVRYKQVGLAW
SOSPDPWITKSKQPIILSPADNGIWKGLDQNRFSVEKKGDFDSHKYHDPILIPYNGKLYLY
VYKGEQNGEETFGGRIRHGLAIENPQGPVIKSPVNPISNSGHEIDYWEYKGIASLIT
TDGPEKNTIQWANDGINFEIMAVIKGAPHAIGLNRYVNDGKNPTEYLWGLSHVYNSDY
QSIHRESSQLKTYHTAKGEKAK

```

>tr|ADM245|ADM245_GRAFK      分泌蛋白      OS=Gramella forsetii (strain KT0803) GN=GF0_1720 PE=4 SV=1
MIKKTALIVIGLHATLYSCNNTSEKISAEKTEOKPEISQVQIDRLGINTPDSLAAVSR
ALMDPDVGNWFTEFSELQPLKGLAYEEGVRRDPSALLKDGKQYVWVTKSYGPTQGF
GGDINDKVPWDRCDIWFATSEQGTWEEGGIAYAGEGGEVDDRSYFTVEIMEDKQKY
VLSYQTIQSPYVVRTKNQVGLAWADSPNGWTKSKDPIILSPAONGIKGEEQNRFAVEKK
GQDSHKYHDPCLIPYNGKYVLYVKGEGNGEEITFGGRQIIRHGVAIADNPKGPYKSAVN
PISNGHEICVKNNGGIASLITTDGPEKNTIQWAPDGVNFGIKSVIKGAPHAIGLNREL
NTDESEEPGAILGGLSHIYVNSDYQSIINRFSSKRRITSHVAKGEAE
>tr|B5CY74|B5CY74_98ACE      预测非典型蛋白      OS=Bacteroides plebeius DSM 17135 GN=BACPLE_01671 PE=4 SV=1
MRKIIFAAGHMSLLAACNTGNTQITAYDOOTQNYDERKADSLGIPKGNKLSAMKRAK#
ENHONKWFEEYKNEPLKGLAYEEGVRRDPSAMLKIGDTYVWVYSKYGPTQGFAGDIE
KOKVPWDRCDIWFATSKQGLTWKEGGIAYKRGEGAYDDRSYFTPEVNEWKGYVLYCQ
AYKSPYVRYKNTIGMACADSPGLWTKDKPYLEPSDTGEWEGEDNREFKYSKGDFDS
HKYHDPCLIPYNGKYVLYVKGEGNGEEITWGGREIKHGVAIENPMPGYKSEWNPISNS
GHEVCVWPKGGIASLITTDGPEKNTLQWSPDGINFEIMSVYKGAHAIGLNPSADAKE
PTEILRWGLTHIYNSDYQSIINRFSTWTLQTHIAKGESEK#
>tr|Q3PBB1|Q3PBB1_9SPHI      预测非典型蛋白      OS=Micrococcillus sp. PRE1 PE=4 SV=1
MKTHNYKYSTIIGMTALLFFASQITPCPEQEENFEITQDKIDVLGITNPKLSAASKRA
LQWPDIGNEWGEFQVYDLKGLAYEEGVRRDPSIILKDGKQYVWVSKSTGKTGDFAG
DIEKDKYFPWDRCDIWFATSEQGTWKEEGNAYGRGEGTYDDRSYFTTEVNEWGTYVL
VYQTYKSPYVRYKNTIGMACADSPGLWTKSKDPIILSPAONGIKGEEQNRFLVEKKGQ
FDSHKYHDPCLIPYNGKYVLYVKGEGNGEITFGGRQIIRHGVAIADNPKGPYKSPVNP
SNRHEICVWKEGGIASLITTDGPEKNTIQWAPDGINFEIMSVYKGAHAIGLNRLNN
EDPFGIFGWGLTHEYVYVYQVIRRFEGKTKTHVARGETGSKSSDE
>tr|Q15UF2|Q15UF2_P5A6      预测非典型蛋白      OS=Pseudoalteromonas atlantica (strain T6c / BAA-1087) GN=PatL_1968 PE=4 SV=1
MTQKQKQSLATKRAIERGYDSKNADNMIEFEISPLKGFDFEEGYIRPDPTSYISYDQV
VHCWYTKGTGETYGFGSTNPDQKYFPWDLTEVWHATSRDGETWHEGPAITRGTPGAADD
RAVFTPEVLAHNGKYVLYVQTYKSPYVRYKNTIQWAPDGINFEIMSVYKGAHAIGLNRLNN
EWRGDEONRPHWHSKGSFDSHKYHDPCLIPYNGKYVLYVKGEGNGEITWGGREIKHGVA
IADNPKGPYKSEWNPISNSGHEVYVWVYQGVASLLITTDGPEKNTIQWAPDGINFEIMSVYKGAHAIGLNRLNN
HIKGAPEAVGLVPPSNIEDTSPPLHWGLCHKYDSSNNWNYICRYLKKQYLDAGTQNS
N
>tr|Q21HB2|Q21HB2_SACD2      糖基水解酶家族      32, N terminal OS=Saccharophagus degradans (strain 2-40 / ATCC 43951 / DSM 17024) GN=Sde_2657 PE=4 SV=1
MSDSKYNKLSKSLPAIERGYDEKGEWLFEEFITPLKGLAYEEGVRRDPSAVLYQD
DEVHWYTKGETYGFGSTNPDQKYFPWDLTEVWHATSKOKITWKEIGPAIRGMAAGAY
DDRAVFTPEVLAHNGKYVLYVQTYKSPYVRYKNTIQWAPDGINFEIMSVYKGAHAIGLNRLNN
DQWDTDEONRFLVKEGSDSKYHDPCLIPYNGKYVLYVKGEGNGEITWGGREIKHGVA
VAIADNPKGPYKSEWNPISNSGHEVYVWVYQGVATMLITTDGPEKNTIQWAPDGINFEIMSVYKGAHAIGLNRLNN
KSHIKGAPEAVGFRPPESDSDPISGIEWGLSHKYDASNNWVLCFFKTRQYLDAGSYQ
QTGDSGAY

```

图 10

C6J313/C6J313_9BACL/1-367	1	-----MGMKKE	23
C6J3P3/C6J3P3_9BACL/1-364	1	-----MRKES	21
Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370	1	-----MTMPAES	22
C6JDD4/C6JDD4_9FIRM/1-353	1	-----MKLS	23
Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361	1	-----MTQAKQKQ	28
Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368	1	-----MSOSKVNKL	30
A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382	1	-----MKKEEYVE	49
ADM245/ADM245_GRAFK/1-407	1	-----MIKKTKAL	72
Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408	1	-----MKIMNYKST	71
B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402	1	-----MRKII	68
Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430	1	-----MKYWLICAL	73
C6J313/C6J313_9BACL/1-367	24	CEKYEP--VEGCV	94
C6J3P3/C6J3P3_9BACL/1-364	22	CEPISR--VQCLG	92
Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370	24	CDRTFR--VQCLG	94
C6JDD4/C6JDD4_9FIRM/1-353	23	CDKESC--IEGIG	93
Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361	29	CEETSP--LKGF	100
Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368	31	FEITIP--LKGD	102
A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382	50	IESALKP	122
ADM245/ADM245_GRAFK/1-407	73	IESALKP	145
Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408	72	CEQVVD--LKGD	143
B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402	69	FEYKMEP	140
Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430	74	FCGFRHET	146
C6J313/C6J313_9BACL/1-367	95	TITRER	167
C6J3P3/C6J3P3_9BACL/1-364	93	VMTERR	165
Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370	95	ATVQR	167
C6JDD4/C6JDD4_9FIRM/1-353	94	YRKEK	166
Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361	101	ETHEQ	173
Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368	103	ITKKEI	175
A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382	123	WIMKEP	195
ADM245/ADM245_GRAFK/1-407	146	WIMKEP	218
Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408	144	WIMKEP	216
B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402	141	LTKKEI	213
Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430	147	YHKEK	219
C6J313/C6J313_9BACL/1-367	168	REAMNE	240
C6J3P3/C6J3P3_9BACL/1-364	166	REAMNE	238
Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370	168	REAMNE	240
C6JDD4/C6JDD4_9FIRM/1-353	167	RTKDE	239
Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361	174	SSMD	246
Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368	176	SSMD	248
A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382	196	SSMD	268
ADM245/ADM245_GRAFK/1-407	219	SSMD	291
Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408	217	SSMD	289
B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402	214	SSMD	286
Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430	220	SSMD	292
C6J313/C6J313_9BACL/1-367	241	VVEK	311
C6J3P3/C6J3P3_9BACL/1-364	239	VVEK	309
Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370	241	VVEK	311
C6JDD4/C6JDD4_9FIRM/1-353	240	VVEK	310
Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361	247	VVEK	317
Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368	249	VVEK	319
A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382	269	VVEK	339
ADM245/ADM245_GRAFK/1-407	292	VVEK	364
Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408	290	VVEK	359
B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402	287	VVEK	357
Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430	293	VVEK	363
C6J313/C6J313_9BACL/1-367	312	DRS	367
C6J3P3/C6J3P3_9BACL/1-364	310	DRS	364
Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370	312	DRS	370
C6JDD4/C6JDD4_9FIRM/1-353	311	DSN	353
Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361	318	EDT	361
Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368	320	SDT	368
A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382	340	GKN	382
ADM245/ADM245_GRAFK/1-407	365	SEE	407
Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408	360	NED	408
B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402	358	EKE	402
Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430	364	NAY	430

图 11

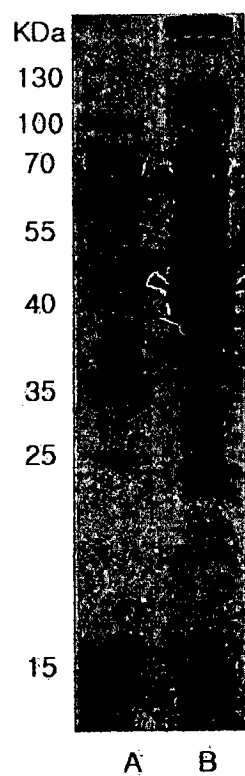


图 12

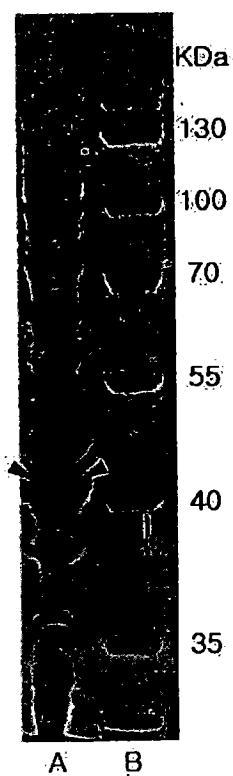


图 13

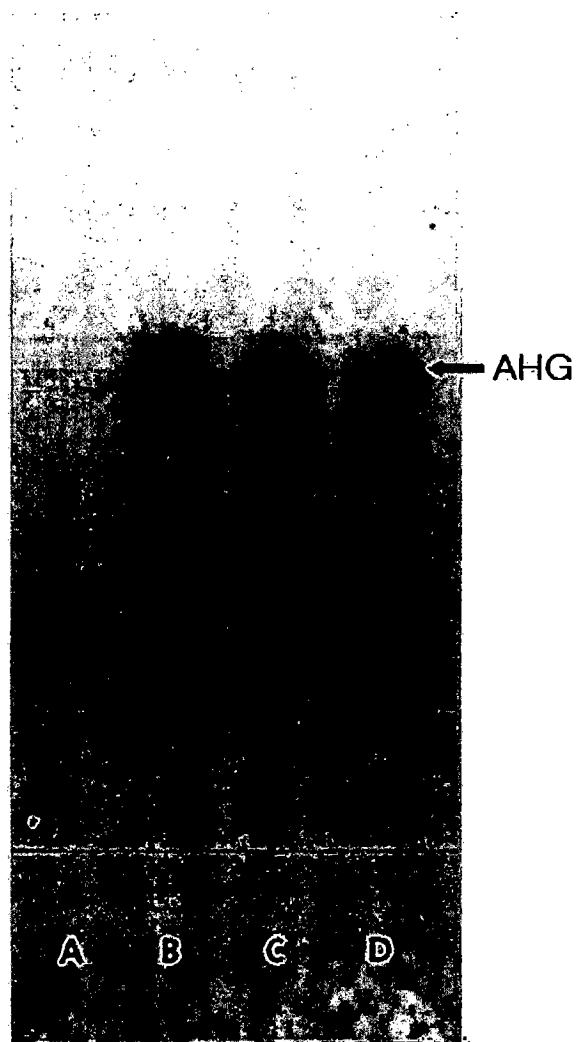


图 14