



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0056179
(43) 공개일자 2019년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/729 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A23L 33/135 (2016.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61K 35/745 (2014.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/729 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0153350

(22) 출원일자 2017년11월16일

심사청구일자 2017년11월16일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김경현

서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 18동 805호

진용수

미국 일리노이주 61822 샴페인 샌드힐 레인 3005

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

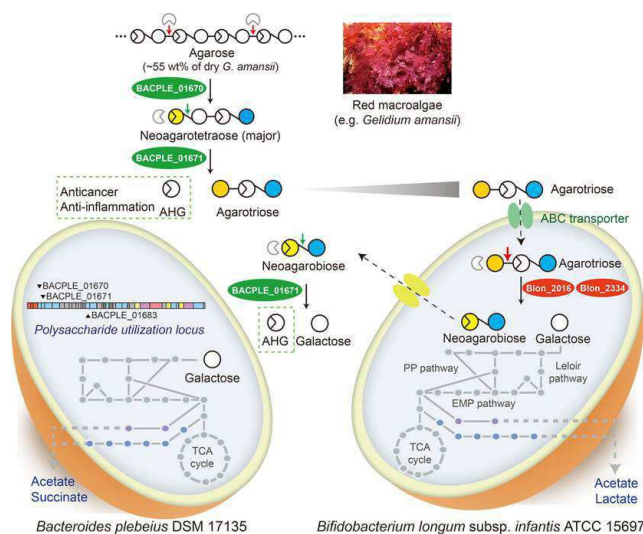
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 해조류 유래 아가로트리오스의 제조방법 및 프리바이오틱로서의 용도

(57) 요약

본 발명은 해조류 유래 아가로트리오스의 제조방법 및 프리바이오틱로서의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명은 프로바이오틱 미생물에 의해 선택적으로 대사되는 프리바이오틱로서의 아가로트리오스의 특성을 규명하여 식품 및 의약 분야에서 항암 또는 항염증 소재로 사용하고, 전처리 없이 홍조류 유래의 다당체의 효소적 가수분해 후 손실을 최소화한 효율적인 정제를 통해 고수율의 아가로트리오스를 얻을 수 있다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)

A61K 35/74 (2013.01)

A61K 35/745 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/3204 (2013.01)

A23V 2250/202 (2013.01)

(72) 발명자

윤은주

서울특별시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호(시흥동, 현대빌라)

김동현

부산광역시 사하구 감천로105번길 40 (감천동 감천아파트) 2동 305호

유소라

경기도 남양주시 홍유릉로 156(이패동, 용마아파트)

조경문

경기도 성남시 분당구 장미로 55(야탑동 장미마을) 동부아파트 107동 1101호

박나정

서울특별시 강동구 동남로79길 26(고덕동 고덕아이파크) 105동 901호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017005628

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원

연구과제명 식의약 소재용 퓨코스의 생물공학적 생산 플랫폼 구축

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

아가, 아가로스, 네오아가로헥사오스 및 아가로트리오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질;
박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) 균주; 및
비피도박테리움속(*Bifidobacterium*) 균주를 포함하는 의약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,
박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) 균주는 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 균주를 포함하는, 의약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,
비피도박테리움속(*Bifidobacterium*) 균주는 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697, 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 17930, 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15702, 비피도박테리움 비피디움(*B. bifidum*) DSM 20082 및 비피도박테리움 카쉬와노헨세(*B. kashiwanohense*) DSM 21854로 이루어진 군에서 선택되는, 의약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,
의약 조성물은 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 균주 유래의 SEQ ID NO: 1의 베타-아가레이즈(beta-agarase) 및 SEQ ID NO: 2의 네오-아가로바이오스 가수분해효소(neo-agarobiose hydrolase)와 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주 유래의 SEQ ID NO: 3 또는 4의 베타-갈락토시데이즈(beta-galactosidase)에 의해 기질을 3,6-안하이드-L-갈락토오스로 분해하는 특징이 있는, 의약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,
의약 조성물은 암 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물인, 의약 조성물.

청구항 6

아가, 아가로스, 네오아가로헥사오스 및 아가로트리오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질;
박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) 균주; 및

비피도박테리움속(*Bifidobacterium*) 균주를 포함하는 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) 균주는 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 균주를 포함하는, 식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

비피도박테리움속(*Bifidobacterium*) 균주는 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697, 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 17930, 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15702, 비피도박테리움 비피디움(*B. bifidum*) DSM 20082 및 비피도박테리움 카쉬와노헨세(*B. kashiwanohense*) DSM 21854로 이루어진 군에서 선택되는, 식품 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

식품 조성물은 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 균주 유래의 SEQ ID NO: 1의 베타-아가레이즈(beta-agarase) 및 SEQ ID NO: 2의 네오-아가로바이오스 가수분해효소(neo-agarobiose hydrolase)와 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주 유래의 SEQ ID NO: 3 또는 4의 베타-갈락토시데이즈(beta-galactosidase)에 의해 기질을 3,6-안하이드-L-갈락토오스로 분해하는 특징이 있는, 식품 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

식품 조성물은 암 또는 염증 질환의 예방 또는 개선용 조성물인, 식품 조성물.

청구항 11

아가, 아가로스 또는 네오아가로헥사오스 중 어느 하나의 기질을 SEQ ID NO: 1 또는 5의 베타-아가레이즈와 반응시킨 후 얻은 반응 산물을 SEQ ID NO: 2 또는 6의 네오-아가로바이오스 가수분해효소와 반응시키는 단계; 및 상기의 반응물에서 아가로트리오스를 크기배제컬럼으로 정제하는 단계를 포함하는 아가로트리오스의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

SEQ ID NO: 1의 베타-아가레이즈는 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 균주에서 유래하며, 기질로 아가, 아가로스 또는 네오아가로헥사오스를 사용하여 네오아가로테트라오스 및 네오아가로바이오스로 분해하는 효소인, 아가로트리오스의 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

기질과 베타-아가레이즈의 반응은 30 내지 60℃의 온도 조건에서 0 내지 200 rpm으로 5분 내지 12시간 동안 수행하는 것인, 아가로트리오스의 제조방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

SEQ ID NO: 2의 네오-아가로바이오스 가수분해효소는 박테로이드 플레비우스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 균주에서 유래하며, 기질로 네오아가로테트라오스 또는 네오아가로바이오스를 사용하여 아가로트리오스, 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해하는 효소인, 아가로트리오스의 제조방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

기질과 베타-아가레이즈의 반응 산물과 네오-아가로바이오스 가수분해효소의 반응은 25 내지 45℃의 온도 조건에서 0 내지 200 rpm으로 30분 내지 12시간 동안 수행하는 것인, 아가로트리오스의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해조류 유래 아가로트리오스의 제조방법 및 프리바이오틱로서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 프리바이오틱스(Prebiotics)는 장내 유익균에 의해 선택적으로 발효되어 장내 균총을 개선하고 인간의 건강에 유익한 물질을 지칭한다. 최근에는 인간의 질병과 장내 균총과의 상관관계에 대한 연구들이 보고되면서 장내 균총은 제2의 인간게놈으로 인식되어 이 분야의 연구가 급속도로 발전하고 있다. 특히 장내 유익 균총 분포의 증가에 따라 비만, 당뇨 및 면역기능이 개선된다는 연구결과들이 발표되어 장내 균총 연구가 더욱 주목을 받고 있다.

[0004] 홍조류 주요 구성 다당체인 아가로스의 가수분해산물의 프리바이오틱 효과는 그간 동물실험들을 통해 예측되었다. High fat diet를 통해 비만을 유도한 쥐에 아가로올리고당 혼합물을 경구 투여한 결과 장내 유익균인 비피도박테리아의 분포도가 높아지는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 장내 저분자 지방산의 합성을 촉진시키고 면역 및 항염증 기능성 관련 유전자의 발현을 유도하였다. 또한, 아가로를 두 종류의 엔도타입 베타-아가레이즈 효소 반응을 통해 생산한 네오아가로올리고당 혼합물의 경우, 비피도박테리아와 락토바실러스가 네오아가로올리고당 혼합물 탄소원 조건에서 성장하는 것을 확인하였다. 그러나 이 실험에서 대조군인 네오아가로올리고당 혼합물이 없는 조건에 대한 비피도박테리아와 락토바실러스의 성장 시험은 하지 않았으므로 배지 내 다른 탄소원에 의한 생장인지 네오아가로올리고당 대사에 의한 생장인지를 정확히 알 수 없다는 문제가 있다. 또한, 네오아가로올리고당 혼합물을 쥐 모델에 투여했을 때 비피도박테리아와 락토바실러스의 분포도가 올라가는 것을 확인하였다.

[0005] 앞서 기술한 바와 같이 현재까지 홍조류 유래 올리고당의 프리바이오틱 기능성 연구는 정제된 표준물질이 아닌 혼합물을 사용했기 때문에 실제 프리바이오틱 활성을 가지면서 장내 균총에 변화를 주는 유효한 지표 성분이 무엇인지를 전혀 알려진 바가 없었다. 뿐만 아니라 아가로스 유래 올리고당들이 장내 유효한 프리바이오틱 미생물에 의해 어떻게 대사되는지도 알려지지 않았다.

[0006] 한편, 홍조류를 구성하는 주요한 다당체는 아가로스이며, 아가로는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(이하 '3,6-AHG'라 함)와 D-갈락토오스(이하 'D-Gal'이라 함)가 알파-1,3-결합과 베타-1,4-결합이 교차적으로 번갈아 가며

연결되어 있는 중합체이다. 이전 연구에서는 항충치, 항염증, 미백 그리고 보습 기능이 있는 AHG의 생산을 위한 공정을 수립하였다. 아가로스 또는 아가 기질에 약산인 아세트산 또는 낮은 농도의 중성버퍼 Tris-HCl 버퍼(pH 7.4)를 사용하여 기질의 전처리를 통해 아가로올리고당(agarooligosaccharides)을 얻고, 이를 엑소-타입 베타-아가레이즈(exo-type β -agarase II) 효소반응을 통해 네오아가로바이오스(neoagarobiose)를 생산하였다. 이때 아가로트리오스(agarotriose)가 부산물로 함께 생성이 된다는 단점이 있으며 이를 단당류인 AHG와 갈락토오스로 분해하기 위해서는 아가로올리티크 베타-갈락토시데이즈(agarolytic β -galactosidase, ABG)라는 추가적인 효소 도입이 필요하였다. 하지만 이전 연구의 AHG 생산을 위한 부산물로 간주되었던 올리고당인 Gal-AHG-Gal 형태의 아가로트리오스는 현재 그 자체로 신체 내 장기능의 유익균을 증진시키며 프리바이오틱 효과가 있다고 여러 문헌을 통하여 알려져 있으나, 정제된 순수한 아가로트리오스를 얻는 상세한 공정 기술이 국내에 알려져 있지 않다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Bindels et al. (2015) Nat Rev Gastroenterol Hepatol 12(5):303-310
- (비특허문헌 0002) Hu et al. (2006) Anaerobe 12(5-6):260-266
- (비특허문헌 0003) Higashimura et al. (2016) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 310(6):G367-375
- (비특허문헌 0004) Miaomiao Li et. al. PLOS ONE, vol.9(3), e91106(2014.03)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 장내 유효한 프로바이오틱 미생물에 의한 아가로트리오스의 대사를 규명함으로써 의약 또는 식품 소재로 사용하는 용도를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 효소적 가수분해 및 정제를 통해 아가로트리오스의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아가, 아가로스, 네오아가로헥사오스 및 아가로트리오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질; 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) 균주; 및 비피도박테리움속(*Bifidobacterium*) 균주를 포함하는 의약 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한 유효량의 상기 의약 조성물을 개체에 투여하여 암 또는 염증 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 아가, 아가로스, 네오아가로헥사오스 및 아가로트리오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질; 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) 균주; 및 비피도박테리움속(*Bifidobacterium*) 균주를 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 아가, 아가로스 또는 네오아가로헥사오스 중 어느 하나의 기질을 SEQ ID NO: 1 또는 5의 베타-아가레이즈와 반응시킨 후 얻은 반응 산물을 SEQ ID NO: 2 또는 6의 네오-아가로바이오스 가수분해효소와 반응시키는 단계; 및 상기의 반응물에서 아가로트리오스를 크기배체컬럼으로 정제하는 단계를 포함하는 아가로트리오스의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명은 박테로이드, 비피도박테리움과 같은 프로바이오틱 미생물에 의해 선택적으로 대사되는 프리바이오틱 스로서의 아가로트리오스의 특성을 규명함으로써, 의약 및 식품 분야에서 항암 또는 항염증 소재로 사용할 수

있는 효과가 있다.

[0018]

또한, 본 발명은 전처리 없이 홍조류 유래의 다당체의 효소적 가수분해 후 손실을 최소화한 효율적인 정제를 통해 고수율의 아가로트리오스를 얻을 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 아가로스로부터 효소반응을 통해 다양한 중합도의 올리고당, 네오아가로바이오스 및 AHG를 생산하기 위한 모식도를 도시한 것이다.

도 2는 사카로파커스 데그라단스(*S. degradans*) 2-40^T 유래의 엔도 타입 베타-아가레이즈인 Aga16B, 엑소타입 베타-아가레이즈인 Aga50D, 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소인 SdNABH의 재조합 단백질의 정제 결과(A), 효소 반응을 통해 아가로스로부터 다양한 중합도의 올리고당, 네오아가로바이오스 및 3,6-AHG 생산 결과(B), 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 유래 엔도타입 베타-아가레이즈 효소인 BpGH16A(BACPLE_01670) 및 네오아가로바이오스 가수분해 효소인 BpGH117(BACPLE_01671)의 아가로스와의 효소 반응 산물의 크기-배제 크로마토그래피를 통한 당 정제 결과(C)를 도시한 것이다.

도 3은 장내 미생물인 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 유래의 엔도타입 베타-아가레이즈 효소인 BpGH16A(BACPLE_01670), BpGH50(BACPLE_01683) 및 네오아가로바이오스 가수분해효소인 BpGH117(BACPLE_01671) 각각의 재조합 효소를 대장균에서 발현시킨 후 정제한 결과(A) 및 효소 반응 시험 결과(B)를 나타낸 것이다.

도 4는 아가로스 기질로부터 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 유래의 엔도타입 베타-아가레이즈 효소인 BpGH16A(BACPLE_01670) 및 네오아가로바이오스 가수분해효소인 BpGH117(BACPLE_01671)의 효소 반응을 통한 아가로트리오스 및 AHG의 생산 결과를 도시한 것이다.

도 5는 바이오스크린 C를 이용하여 각각의 정제한 당들을 탄소원으로 하고, 프로바이오틱 미생물인 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주를 배양한 결과를 도시한 것이다(A: AHG, B: NeoDP2, C: AgaDP3, D: NeoDP4, E: AgaDP5, F: NeoDP6, G: Glucose, H: Galactose, I: 2FL).

도 6은 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주의 아가로트리오스 발효 프로파일의 분석 결과를 도시한 것이다(A: AgaDP3, NeoDP2 및 갈락토오스를 기질로 한 결과, B: 세포밀도, 아세트이트 및 락테이트를 기질로 한 결과).

도 7은 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주의 조효소액을 이용하여 아가로트리오스(A) 및 네오아가로바이오스(B) 분해능 실험 결과를 도시한 것이다.

도 8은 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주의 네 종류의 베타-갈락토시데이즈 코딩 유전자(Blon_2016, Blon_2123, Blon_2334 및 Blon_2416)를 클로닝하고 대장균에서 재조합 단백질을 생산 및 정제한 후 효소 반응을 실시한 결과를 도시한 것이다(A: 젤 사진도, B: TLC 결과, C: 아가로트리오스 기질에 대한 각 효소들의 β -갈락토시데이즈 특이 활성).

도 9는 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)에 속하는 다른 균주인 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 17930, 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15702 균주들의 아가로트리오스 발효능 실험 결과를 도시한 것이다(A: 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 17930, B: 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15702).

도 10은 비피도박테리움 비피디움(*B. bifidum*) DSM 20082 및 비피도박테리움 카쉬와노헨세(*B. kashiwanohense*) DSM 21854 균주들의 아가로트리오스 발효능 실험 결과를 도시한 것이다(A: 비피도박테리움 비피디움(*B. bifidum*) DSM 20082, B: 비피도박테리움 카쉬와노헨세(*B. kashiwanohense*) DSM 21854).

도 11은 인공위액에 대한 아가로트리오스의 안정성 시험 결과를 도시한 것이다(A: TLC 결과를 그래프로 나타냄, B: HPLC 결과).

도 12는 장내 미생물인 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 및 비피도박테리움 롱검 인판

티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697에 의한 아가로스 의 대사 경로를 도시한 것이다.

도 13은 아가로스로부터의 아가르트리오스 생산 및 분리 공정 모식도를 나타낸 것이다(A: 산처리와 효소 당화를 통한 아가르트리오스 생산 공정, B: 효소 당화를 통한 AHG, D-Gal, 아가르트리오스 생산 및 정제공정).

도 14는 아가로스로부터 두 단계 효소반응을 통한 아가르트리오스 생산 및 크기배제컬럼을 이용한 아가르트리오스 정제 결과를 도시한 것이다(A: TLC 결과, B: HPLC 결과).

도 15는 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 유래의 엔도타입 베타-아가레이즈 효소인 BpGH16A(BACPLE_01670)의 효소 반응을 통해 아가로스로부터 생산되는 네오아가로테트라오스와 네오아가로바이오스의 비율을 보여주는 HPLC 정량분석결과이다.

도 16은 크기배제컬럼을 이용한 분획별 분리도 차이를 분석한 TLC 결과를 도시한 것이다.

도 17은 HPLC KS-802 당 컬럼을 이용한 아가르트리오스의 수율과 순도 측정 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명자들은 홍조류를 구성하는 주요 다당체인 아가로스로부터 엔도타입 베타-아가레이즈 및 네오아가로바이오스 가수분해효소 반응을 통해 아가르트리오스를 생산하고 크기배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 기법을 사용하여 효소 반응 산물 중 아가르트리오스만을 순수 분리 정제한 후 프로바이오틱 비피도박테리아의 의한 발효능을 시험함으로써 아가르트리오스의 프리바이오틱 효과를 증명하였다. 또한, 비피도박테리아에 의한 아가르트리오스 발효를 통해 생성된 네오아가로바이오스는 장내 미생물인 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*)의 네오아가로바이오스 가수분해효소에 의해 갈락토오스와 3,6-AHG로 분해될 수 있으며, AHG는 대장암 예방 및 항염증 효과가 있는 생리활성 물질이므로 아가르트리오스는 프리바이오틱 활성뿐 아니라 장내 미생물에 의한 대사를 통해 항암 및 항염증과 같은 생리활성을 기대할 수 있음을 확인하였다.
- [0022] 따라서, 본 발명은 아가, 아가로스, 네오아가로헥사오스 및 아가르트리오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질; 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) 균주; 및 비피도박테리움속(*Bifidobacterium*) 균주를 포함하는 의약 조성물을 제공한다.
- [0023] 상기 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) 균주는 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 균주를 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 비피도박테리움속(*Bifidobacterium*) 균주는 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 17930, 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15702, 비피도박테리움 비피디움(*B. bifidum*) DSM 20082 또는 비피도박테리움 카쉬와노헨세(*B. kashiwanohense*) DSM 21854 등을 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 의약 조성물은 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) 균주 및 비피도박테리움속(*Bifidobacterium*) 균주에 의해 기질이 최종적으로 3,6-AHG로 분해되는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 보다 구체적으로, 3,6-AHG는 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 균주 유래의 SEQ ID NO: 1의 베타-아가레이즈(beta-agarase) 및 SEQ ID NO: 2의 네오-아가로바이오스 가수분해효소(neo-agarobiose hydrolase)와 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주 유래의 SEQ ID NO: 3 또는 4의 베타-갈락토시데이즈(beta-galactosidase)에 의해 기질로부터 분해될 수 있다.
- [0027] 상기 베타-아가레이즈는 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135에서 유래한 것으로, 기질로 아가, 아가로스 또는 네오아가로헥사오스를 사용하여 네오아가로테트라오스 및 네오아가로바이오스로 분해하는 효소이며, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0028] 상기 베타-아가레이즈는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가, 아가로스 또는 네오아가로헥사오스의 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.
- [0029] 상기 베타-아가레이즈는 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 배양물의 상등액으로부터 분

리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 재조합 기술을 이용하는 경우, 대장균에 형질전환시켜 형질전환된 대장균의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 일 구체예에 따르면, 베타-아가레이즈를 코딩하는 유전자의 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다.

[0030] 상기 네오-아가로바이오스 가수분해효소는 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135에서 유래한 것으로, 기질로 네오아가로테트라오스 또는 네오아가로바이오스를 사용하여 아가로트리오스, 갈락토오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해하는 효소이며, SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0031] 상기 네오-아가로바이오스 가수분해효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가, 아가로스 또는 네오아가로헥사오스의 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 2에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 상기 네오-아가로바이오스 가수분해효소는 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 재조합 기술을 이용하는 경우, 대장균에 형질전환시켜 형질전환된 대장균의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 일 구체예에 따르면, 네오-아가로바이오스 가수분해효소를 코딩하는 유전자의 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다.

[0033] 상기 베타-갈락토시데이즈는 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697에서 유래한 것으로, 아가로트리오스를 네오아가로바이오스 및 갈락토스로 분해하는 효소이며, Blon_2016, Blon_2334 유전자로부터 생산되는 단백질이며, SEQ ID NO: 3 또는 4의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0034] 상기 베타-갈락토시데이즈는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가로트리오스의 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 3 또는 4에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.

[0035] 상기 베타-갈락토시데이즈는 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 재조합 기술을 이용하는 경우, 대장균에 형질전환시켜 형질전환된 대장균의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 일 구체예에 따르면, 베타-아가레이즈를 코딩하는 유전자의 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0037] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc. Natl Acad. Sci USA* 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, *Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH)*, Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프

로그랩은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

- [0038] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.
- [0039] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.
- [0040] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈 (예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.
- [0041] 본 발명의 의약 조성물은 아가, 아가로스, 네오아가로헥사오스, 또는 아가로트리오스를 항염증, 항암 활성이 있는 3,6-AHG로 대사하므로 암 또는 염증 질환의 예방 또는 치료에 사용할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명의 의약 조성물을 개체에 투여하여 암 또는 염증 질환의 발병을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0043] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 의약 조성물을 개체에 투여하여 암 또는 염증 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0044] 본 발명에 있어서, '유효량'이라 함은 항암 효과를 나타내거나, 염증을 억제할 수 있는 화합물의 양을 의미한다.
- [0045] 상기 암은, 대장암, 자궁경부암, 유방암, 위암, 간암 등을 들 수 있다.
- [0046] 본 발명에 있어서, '항염증 효과' 또는 '항염증 활성'이라 함은 염증을 억제하는 것을 말하며, 상기 염증은 어떤 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 조직 변질, 순환 장애와 삼출, 조직 증식의 세 가지를 병발하는 복잡한 병변을 말한다. 보다 구체적으로 염증은 선천성 면역의 일부이며 다른 동물에서처럼 인간의 선천성 면역은 병원체에 특이적으로 존재하는 세포 표면의 패턴을 인식한다. 식세포는 그런 표면을 가진 세포를 비자기로 인식하고 병원체를 공격한다. 만일 병원균이 신체의 물리적 장벽을 깨고 들어온다면 염증반응이 일어난다. 염증반응은 상처부위에 침입한 미생물들에 대한 적대 환경을 만드는 비특이적인 방어작용이다. 염증반응에서, 상처가 나거나 외부 감염체가 체내로 들어왔을 때, 초기단계 면역반응을 맡고 있는 백혈구들이 몰려들어 사이토카인을 발현한다. 따라서 세포 내 사이토카인의 발현양이 염증반응 활성화의 지표가 된다.
- [0047] 본 발명의 의약 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0048] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 또한, 본 발명의 의약 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0050] 한 양태로서, 본 발명의 의약 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.
- [0051] 상기 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성

현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

- [0052] 본 발명의 의약 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴(Amylopectin), 셀룰로오스(Cellulose) 또는 젤라틴(Gelatin) 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트(Dicalcium phosphate) 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕괴제; 스테아르산 마그네슘(Magnesium stearate), 스테아르산 칼슘(Calcium stearate), 스테아릴 푸마르산 나트륨(Sodium stearyl fumarate) 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스(Polyethylene glycol wax) 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다.
- [0053] 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.
- [0054] 상기 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 구강용 스프레이제, 구강용 세정제, 치약제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.
- [0055] 본 발명의 의약 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0056] 또한, 보다 구체적으로 본 발명의 의약 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 의약 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 또한, 본 발명의 의약 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명의 의약 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 의약 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 상기 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 본 발명의 의약 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 다른 시기에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 의약 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명의 의약 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 의약 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 의약 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.
- [0060] 상기 비경구 투여하는 방법으로는, 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 의약 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이들에 제한되지 아니한다.
- [0061] 본 발명의 의약 조성물은 바람직하게는 경구 투여되거나 주사 투여될 수 있다.
- [0062] 본 발명은 또한 유효량의 상기 의약 조성물을 개체에 투여하여 암 또는 염증 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0063] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"는 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유 동물을 비롯한 모든 동물을 의미한다.
- [0064] 본 발명의 암 또는 염증 질환의 치료 방법에서, 상기 의약 조성물의 투여량, 투여 경로, 투여 방식 등에 관한 설명은, 의약 조성물과 관련하여 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0066] 본 발명은 또한 아가, 아가로스, 네오아가로헥사오스 및 아가로트리오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질; 박테로이드 플레비우스(*Bacteroides plebeius*) 균주; 및 비피도박테리움속(*Bifidobacterium*) 균주를 포

합하는 식품 조성물을 제공한다.

- [0067] 상기 식품 조성물은 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품 제형으로 제조될 수 있다.
- [0068] 상기 식품 제형은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 암 또는 염증 질환의 예방 또는 개선을 기대할 수 있어 매우 유용하다.
- [0069] 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 낙농제품, 통상적인 의미에서의 건강식품 등을 포함할 수 있다.
- [0071] 본 발명은 또한 아가, 아가로스 또는 네오아가로헥사오스 중 어느 하나의 기질을 SEQ ID NO: 1 또는 5의 베타-아가레이즈와 반응시킨 후 얻은 반응 산물을 SEQ ID NO: 2 또는 6의 네오-아가로바이오스 가수분해효소와 반응시키는 단계; 및 상기의 반응물에서 아가로트리오스를 크기배제컬럼으로 정제하는 단계를 포함하는 아가로트리오스의 제조방법을 제공한다.
- [0072] 약산 전처리 후 효소적 가수분해를 수행하는 종래의 공정(도 13A)이 전처리 후 중화 과정에서 다량의 염을 생성하고, 낮은 농도의 중성 버퍼를 사용하는 경우 고온(170℃)에서 전처리 반응을 해야 하므로 고온고압 반응기가 요구되며, 3,6-AHG의 생산 수율 개선에 초점이 맞추어져 있어 아가로트리오스의 생산 수율은 상당히 낮고 특히, 전처리에 사용하는 아세트산은 불쾌취를 유발하기 때문에 아가로트리오스를 프리바이오틱 소재로 이용할 경우 문제가 될 수 있다. 따라서, 본 발명의 아가로트리오스의 제조방법은 상술한 문제점들을 다음과 같은 방법으로 해결한다.
- [0073] 첫째, 아가로트리오스 생산 시 아가로트리오스의 전구체인 네오아가로테트라오스를 주로 생산하는 베타-아가레이즈를 적용하여 전처리 공정을 생략하며 마일드한 조건에서 두 단계의 효소반응(즉, 엔도타입 베타-아가레이즈, 네오아가로바이오스 가수분해효소)을 통해 높은 수율의 아가로트리오스, 3,6-AHG 및 D-Gal을 획득한다.
- [0074] 둘째, 아가로트리오스 정제 시 크기배제크로마토그래피 기법을 사용하여 중합도 차이를 이용한 크기배제컬럼(Size exclusion Bio-P2 Gel column)을 통해 단당과 삼당체를 분리하여 고순도의 아가로트리오스를 얻는다(도 13B). 이 정제 공정은 인체에 유해한 유기용매를 사용하지 않고 물을 이동상으로 사용하며, 정제과정 중에 손실되는 아가로트리오스 양이 거의 없으므로 정제된 고수율의 아가로트리오스를 획득할 수 있다는 장점이 있다.
- [0075] 상기 베타-아가레이즈는 아가, 아가로스 또는 네오아가로헥사오스 중 어느 하나의 기질을 네오아가로올리고당인 네오아가로바이오스와 네오아가로테트라오스로 분해하며, 상술한 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 균주 유래의 SEQ ID NO: 1의 베타-아가레이즈를 사용하거나, 아가 또는 아가로스를 기질로 사용하여 네오아가로테트라오스 및 네오아가로헥사오스로 분해하는 SEQ ID NO: 5의 내열성 한천분해효소를 사용할 수 있다.
- [0076] 상기 내열성 한천분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0077] 상기 내열성 한천분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagusdegradans*)2-40^T 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 재조합 기술을 이용하는 경우, 대장균에 형질전환시켜 형질전환된 대장균의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0078] 상기 한천, 아가로스 또는 네오아가로헥사오스 중 어느 하나의 기질과 베타-아가레이즈의 반응은 30 내지 60℃의 온도 조건에서 0 내지 200 rpm으로 5분 내지 12 시간 동안 수행할 수 있다.
- [0079] 상기 네오아가로바이오스 가수분해효소는 네오아가로바이오스와 네오아가로테트라오스를 3,6-AHG, D-Gal 및 아가로트리오스로 분해하며, 상술한 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 유래의 SEQ ID NO: 2의 네오-아가로바이오스 가수분해효소를 사용하거나, 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 SEQ ID NO: 6의 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 사용할 수 있다.

- [0080] 상기 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 알파-네오아가로바이오스 가수분해 효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [0081] 상기 베타-아가레이즈의 반응 산물과 네오-아가로바이오스 가수분해효소의 반응은 25 내지 45℃의 온도 조건에서 0 내지 200 rpm으로 30분 내지 12시간 동안 수행할 수 있다.
- [0082] 상기 네오아가로바이오스 가수분해효소에 의해 생산된 단당, 3,6-AHG 및 D-Gal과 삼당체인, 아가로트리오스를 얻은 후 크기배제컬럼을 사용하여 고순도, 고수율의 정제된 아가로트리오스를 얻을 수 있다.
- [0083] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0085] <실시예 1> 베타-아가레이즈에 의한 아가로스의 분해 실험
- [0086] 홍조류를 구성하는 주요 탄수화물인 아가로스로부터 아가로트리오스를 포함한 다양한 중합도의 아가 유래 올리고당을 생산하기 위하여 효소반응을 실시하였다. 먼저 1%(w/v) 농도의 아가로스를 기질로 사용하여 사카로파거스 데그라단스(*S. degradans*) 2-40^T 유래 엔도-타입 아가레이즈인 Aga16B 효소반응을 실시하였다. 이때 Aga16B의 효소반응은 50℃, 200 rpm에서 2시간 동안 진행하였다.
- [0087] 효소반응 결과, 네오아가로테트라오스(DP4)와 네오아가로헥사오스(DP6)가 생산되었다(도 2B).
- [0088] 이 반응 산물을 기질로 다음 단계 효소인 사카로파거스 데그라단스(*S. degradans*) 2-40^T 유래 네오아가로바이오스 가수분해효소(*SdNABH*)의 효소 반응을 통해 아가로트리오스(DP3), 아가로펜타오스(DP5), 및 3,6-AHG를 생산하였다. *SdNABH* 효소반응은 30℃, 200 rpm에서 2시간 동안 진행하였다.
- [0089] 또한, Aga16B 반응 산물을 기질로 사용하여 사카로파거스 데그라단스(*S. degradans*) 2-40^T 유래 엑소-타입 아가레이즈인 Aga50D 효소반응을 통해 이당체인 네오아가로바이오스(DP2)를 생산하였다. Aga50D 효소반응은 30℃, 200 rpm에서 2시간 동안 진행하였다.
- [0090] 다음으로, 장내 미생물인 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 유래 엔도타입 베타-아가레이즈 효소인 BpGH16A(BACPLE_01670)의 효소반응 조건은 다음과 같다: 효소 로딩 양 8 mg BpGH16A/g 아가로스, 버퍼 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 반응 온도 40℃에서 2시간동안 진행하였다.
- [0091] 네오아가로바이오스 가수분해 효소인 BpGH117(BACPLE_01671)의 효소반응 조건은 다음과 같다: 효소 로딩양 4 mg BpGH117/ g 네오아가로바이오스, 버퍼 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 반응 온도 40℃에서 2시간 동안 진행하였다.
- [0092] 도 2C에 나타난 바와 같이, 장내 미생물인 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 유래 아가분해 관련 효소 반응 조합을 통해 아가로스로부터 아가로트리오스와 3,6-AHG를 생산할 수 있었다. TLC(Thin layer chromatography)를 통해 반응산물을 분석한 결과 아가로스 기질은(레인 1) BpGH16A(BACPLE_01670) 효소반응을 통해 네오아가로테트라오스(DP4)가 주요산물로 생성되었다(레인 2). 그 후 BpGH117(BACPLE_01671) 효소반응을 통해 아가로트리오스와 3,6-AHG가 생성되었다(레인 2). 두 효소를 동시에 반응시켰을 때에도 순차적으로 반응시켰을 때와 마찬가지로 아가로트리오스와 3,6-AHG가 주로 생성되었다(레인 3).
- [0094] <실시예 2> 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 유래의 엔도타입 베타-아가레이즈 효소인 BpGH16A(BACPLE_01670), BpGH50(BACPLE_01683) 및 네오아가로바이오스 가수분해 효소인 BpGH117(BACPLE_01671)의 재조합 및 효소 반응 실험
- [0095] 도 3에 나타난 바와 같이, 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 유래의 GH50 family 효소인 BpGH50 (BACPLE_01683)의 경우 베타-아가레이즈 활성이 나타나지 않았다.

- [0097] <실시예 3> 아가로스 기질로부터 박테로이드 플레비우스(*Bacteroides plebeius*) DSM 17135 유래의 엔도타입 베타-아가레이즈 효소인 BpGH16A(BACPLE_01670) 및 네오아가로바이오스 가수분해효소인 BpGH117(BACPLE_01671)의 효소 반응을 통한 아가로트리오스 및 AHG의 생산 실험
- [0098] 각각의 정제된 재조합 효소인 Aga16B, Aga50D, SdNABH 반응을 통해 생산한 다양한 중합도의 올리고당, 네오아가로바이오스 및 3,6-AHG를 크기배제컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 이때, 크기-배제 컬럼 크로마토그래피를 위한 컬럼 레진은 sephadex G-10을 사용하였다.
- [0099] 도 4에 나타난 바와 같이, 엔도타입 베타-아가레이즈 효소인 BpGH16A(BACPLE_01670) 및 네오아가로바이오스 가수분해 효소인 BpGH117(BACPLE_01671) 반응을 통해 아가로스로부터 아가로트리오스와 3,6-AHG가 생산되었다.
- [0101] <실시예 4> 바이오스크린 C를 이용하여 각각의 정제된 당들을 탄소원으로 하고, 프로바이오틱 미생물인 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주의 배양 실험
- [0102] 아가 유래 당들의 프리바이오틱 효과를 검증하기 위하여 아가로트리오스를 포함한 각각의 정제된 당을 단일 탄소원으로 사용하여 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주의 세포생장을 모니터링하였다. 이때 배지 조성은 BactoPeptone 10 g/L, 효모 추출물 5 g/L, K₂HPO₄ 무수물 2 g/L, Na 아세테이트 무수물 5 g/L, NH₄ 시트레이트 트리베이직 2 g/L, Mg 설페이트 헵타하이드레이트 0.2 g/L, Mn 설페이트 0.05 g/L, 트윈 80(polysorbate 80) 1 mL/L, 시스테인 0.5 g/L 및 각각의 정제된 당 5 g/L을 사용하였으며 37℃에서 배양하였다.
- [0103] 도 5에 나타난 바와 같이, 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주는 정제된 다양한 당들 중에서도 아가로트리오스만을 선택적으로 발효하는 것을 확인하였다.
- [0105] <실시예 5> 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주의 아가로트리오스 발효 프로파일의 분석
- [0106] 발효 산물을 모니터링하기 위해 테스트 튜브 조건에서 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주를 배양하였다.
- [0107] 도 6에 나타난 바와 같이, 아가로트리오스 5 g/L 농도 탄소원 조건에서 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697는 아가로트리오스를 갈락토오스와 네오아가로바이오스로 분해했으며 갈락토오스는 세포 내에서 발효되어 아세트산을 생산하였다. 네오아가로바이오스의 경우 세포 내에서 더 이상 분해되지 않고 세포 밖으로 분비되어 축적되었다.
- [0109] <실시예 6> 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주의 조효소액을 이용한 아가로트리오스 및 네오아가로바이오스 분해능 실험
- [0110] 아가로트리오스의 대사경로를 확인하기 위해 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주의 조효소액을 실험하였다. 이를 위해, 아가로트리오스 조건에서 배양한 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697의 배양액을 원심분리(14,000 rpm, 5 분, 4℃)를 통해 세포와 배지를 분리하였다. 세포 밖 조효소는 상등액의 암모늄 설페이트 침전법으로 얻었다. 또한, 세포 내 조효소를 포함한 무세포 추출물은 세포를 20 mM Tris-HCl 버퍼로 재현탁한 후 소니케이션하여 세포를 파쇄하고 파쇄액을 원심분리하여 상등액 조효소를 얻었다. 조효소 실험 시 2 mg/mL 농도의 조효소와 2 mg/mL의 아가로트리오스를 기질로 사용하여 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0)에서 30℃ 및 200 rpm 효소 반응 조건에서 2시간 동안 반응시켰다.
- [0111] 도 7에 나타난 바와 같이, 아가로트리오스를 갈락토오스와 네오아가로바이오스로 분해하는 베타-갈락토시데이즈 반응은 세포 내 조효소를 포함한 무세포 추출물에서 일어나는 것을 확인하였다. 또한, 네오아가로바이오스에 대해서는 조효소의 활성이 나타나지 않음을 확인하였다.
- [0113] <실시예 7> 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주의 네 중

류의 베타-갈락토시데이즈 코딩 유전자(Blon_2016, Blon_2123, Blon_2334 및 Blon_2416)의 재조합 단백질 생산 및 효소 반응 실험

[0114] 어떤 효소 유전자가 아가로트리오스를 분해하는 활성을 지니는지를 확인하기 위하여 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주가 가지고 있는 4가지의 베타-갈락토시데이즈를 모두 클로닝 한 후에 대장균에서 과발현시키고, 각각의 효소 단백질을 정제하여 효소 활성을 시험하였다.

[0115] 도 8에 나타난 바와 같이, 두 개의 효소 유전자 Blon_2016과 Blon_2334의 단백질이 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0117] <실시에 8> 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)에 속하는 다른 균주들의 아가로트리오스 발효능 실험

[0118] 아가로트리오스가 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697 균주 외에 다른 프로바이오틱 미생물에 대해서도 프리바이오틱 효과가 있는지를 확인하기 위해 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 17930, 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15702, 비피도박테리움 비피디움(*B. bifidum*) DSM 20082 및 비피도박테리움 카쉬와노헨세(*B. kashiwanohense*) DSM 21854를 아가로트리오스 단일 탄소원 조건에서 배양하였다.

[0119] 도 9 및 10에 나타난 바와 같이, 4종의 프로바이오틱 미생물들 모두 아가로트리오스를 대사하고 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697와 마찬가지로 아가로트리오스를 갈락토오스와 네오아가로바이오스로 분해한 후 갈락토오스를 발효하여 아세트산을 생산하였다.

[0121] <실시에 9> 인공위액에 대한 아가로트리오스의 안정성 시험

[0122] 아가로트리오스가 장까지 분해되지 않고 도달할 수 있는지를 테스트해보기 위하여 인공위액에서 시간 별로 반응시킨 후 TLC와 HPLC로 분해되는지를 확인하였다.

[0123] 도 11에 나타난 바와 같이, 37℃에서 3시간 반응 후 아가로트리오스는 80% 이상 남아있는 것을 확인하였다.

[0124] 상기 결과로부터, 아가로트리오스는 해조류 유래 신규 프리바이오틱으로서 프로바이오틱스에 의해 선택적으로 발효가 되는 물질임을 최초로 확인하였다. 아가로트리오스는 해양 유래 사카로파거스 데그라단스(*S. degradans*) 2-40^T 또는 장내 미생물 유래 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*)가 지니고 있는 아가분해효소 및 NABH 효소 작용에 의해 생성될 수 있다(도 12). 아가로트리오스는 프로바이오틱스인 비피도박터가 가지고 있는 ABC 트랜스포터 관련 유전자에 의해 세포 내로 이동하고 세포 내의 베타-갈락토시데이즈에 의해 갈락토오스와 네오아가로바이오스로 분해되며 갈락토오스는 아세트산 발효에 이용된다. 뿐만 아니라 네오아가로바이오스는 장내 미생물인 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*)가 지니고 있는 네오아가로바이오스 가수분해 효소에 의해 장 내에서 갈락토오스와 3,6-AHG로 분해될 수 있다. AHG는 대장암 예방 효과 및 항염증 기능성이 있는 생리활성물질로 알려져 있어, 아가로트리오스는 프리바이오틱 활성뿐 아니라 장내 미생물인 비피도박터 및 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*)에 의한 대사를 통해 생성된 AHG로 인해 대장암 예방 및 항염증 생리활성을 나타낼 수 있다(도 12).

[0126] <실시에 10> BACPLE_01670 및 NABH 재조합 효소 생산

[0127] 박테로이드 플레비어스(*Bacteroides plebeius*) 유래 베타-아가레이즈 가수분해 효소 BACPLE_01670 유전자를 pET21a 벡터를 사용하여 이 콜라이(*E. coli*) BL21(DE3)에 도입하였다. 유전자가 도입된 재조합 대장균을 전배양(pre-culture)하기 위해 50 mL-코니칼 튜브에 엠펜실린(ampicillin) 100 µg/mL가 있는 10 mL의 LB broth에서 37℃, 9시간 배양하였다. 그 후 전 배양액 10 mL을 같은 배지 조성의 본 배양액 1 L에 접종한 후, 광학밀도분광기(Optical density spectroscope)를 이용하여 광학밀도 값이 미드익스포넨셜 단계(OD 0.4~0.6)까지 자라면 0.1 mM 이소프로필-베타-D-썬오갈락토파이라노사이드(IPTG)를 넣고 16℃에서 16시간 동안 유도시켜 세포내 단백질을 발현 시켰다. 그 후 세포 배양액을 500 mL-튜브에 옮겨 4℃에서 30분간 10,000 rpm에서 원심분리를 한 뒤 세포를 수득하였다. 단백질의 변성을 방지하기 위하여 트리스 버퍼(20 mM Tris-HCl, pH 7.0) 30 mL에 모은

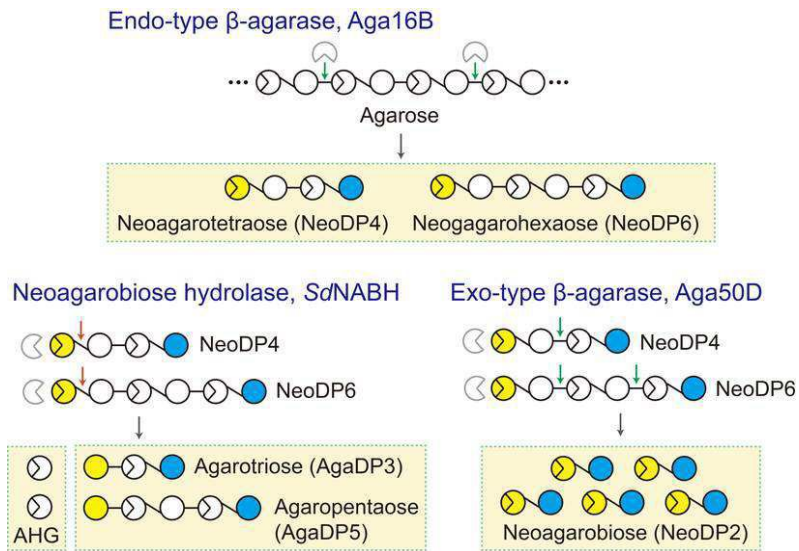
세포를 다시 풀어주고 초음파기(sonicator)를 이용하여 세포를 파쇄(cell lysis) 하였다. 이후 4℃에서 1시간 동안 16,000 rpm에서 원심분리하였다. 히스트랩 컬럼(5ml GE health care)을 사용하여 단백질을 정제한 뒤, SDS-PAGE gel을 사용하여 정제된 각각의 단백질의 크기를 확인하였다. Desalting 컬럼을 사용하여 단백질 정제에 사용하였던 염(Imidazole)을 제거하였다. 염이 제거된 재조합 단백질은 BCA 분석방법으로 농도를 정량하였다.

- [0128] 다음으로, 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T 유래 알파-네오아가로바이오스 가수분해 효소 NABH 유전자를 pET21a 벡터를 사용하여 이 콜라이(*E. coli*) BL21(DE3)에 도입하고 상기와 같이 재조합 단백질을 제조하였다.
- [0130] <실시예 11> BACPLE_01670 및 NABH의 효소반응
- [0131] BACPLE_01670 효소 반응 시 기질은 1%(w/v) 농도의 아가로스를 사용하였으며 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0)에서 50℃, 100 rpm 조건에서 10시간 동안 반응을 실시하였다.
- [0132] BACPLE_01670 효소 반응 산물인 네오아가로테트라오스, 네오아가로바이오스를 기질로 하여 NABH 효소 반응을 실시하였으며 37℃, 100 rpm 조건에서 10시간 동안 효소 반응을 실시하였다.
- [0133] 각 단계별 효소 반응 후 반응 산물은 TLC를 통해 분석하였다. TLC 분석 조건은 고정상인 실리카 겔 플레이트에 1 μ l의 효소 반응산물을 로딩하고, 이동상 용매로는 n-부탄올: 에탄올: 물, 3:1:1 (v/v/v)로 하여 1시간 동안 전개시킨 뒤 에탄올 중의 10% 황산과 에탄올 중의 0.2%의 1,3-디하이드록시나프탈렌을 사용하여 발색시켰다.
- [0134] 도 14A에 나타난 바와 같이, 엔도타입의 베타-아가레이즈인 BACPLE_01670의 효소 반응을 통해 아가로스는 네오아가로올리고당으로 분해되었으며, 이때 주요 산물은 중합도(degree of polymerization, DP) DP2와 DP4에 해당하는 네오아가로바이오스와 네오아가로테트라오스였다. 그 후 알파-아가레이즈인 네오아가로바이오스 가수분해 효소(NABH)의 효소 반응을 통해 DP4로부터 삼당체인 아가로트리오스와 3,6-AHG가 생성되었으며, DP2로부터 D-갈락토오스와 3,6-AHG가 생성되었다.
- [0136] <실시예 12> BACPLE_01670 효소반응 산물 HPLC 분석
- [0137] BACPLE_01670 효소 반응 시 생성되는 물질은 네오아가로테트라오스(DP4)와 네오아가로바이오스(DP2)이다(도 14B). 이 중 아가로트리오스를 만드는 전구체는 네오아가로테트라오스로 DP4의 산물이 많을수록 더 많은 아가로트리오스를 얻을 수 있다. BACPLE_01670으로부터 DP4의 생성 비율을 알아보기 위해, HPLC KS-802 크기배제컬럼을 사용하여 계산하였다.
- [0138] 도 15에 나타난 바와 같이, BACPLE_01670의 반응 산물은 1 g의 아가로오스로부터 0.795 g의 네오아가로테트라오스(0.795 g neoagarotetraose/g agarose)와 0.205 g의 네오아가로 바이오스(0.205 g neoagarobiose/g agarose)의 결과를 얻었다.
- [0140] <실시예 13> 크기-배제 컬럼(Bio Gel-P2 column)을 이용한 DP3(아가로트리오스) 및 DP1(3,6-AHG, D-Gal) 분리
- [0141] 실시예 10과 11로부터 획득한 최종 반응 산물은 3,6-AHG와 D-Gal, 아가로트리오스며, 이 중에서 3,6-AHG와 D-Gal을 아가로트리오스로부터 분리하기 위하여 당분리 컬럼을 사용하였다. 기계는 AKTA prime(GE healthcare)을 사용하였다. 당분리를 이행하는데 사용된 이동상은 3차 증류수(Distilled water), flow는 0.3 mL/min으로 10분 동안 컬럼 안정화를 한 뒤, 2 mL의 반응산물을 주입한 뒤 컬럼을 통하여 나오는 용액을 2 mL-에펜도르프 튜브에 1 mL씩 받고 TLC를 통해 분석하였다. TLC 분석 조건은 상기 실시예 11과 같다.
- [0142] 도 16에 나타난 바와 같이, 분획별로 모은 샘플을 TLC로 분석한 결과 DP3(아가로트리오스)와 DP1(3,6-AHG, D-Gal)이 분리된 것을 확인할 수 있었다.
- [0144] <실시예 14> 아가로오스로부터 효소당화, 크기배제컬럼을 통하여 분리된 아가로트리오스의 수율 및 순도의 HPLC 정량 분석

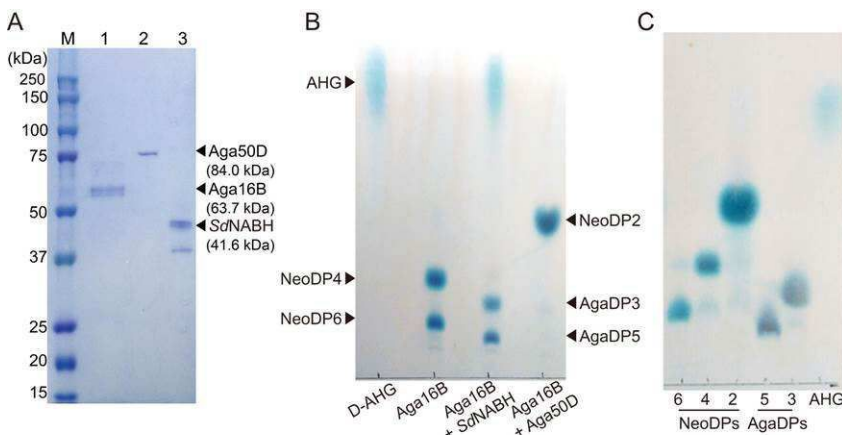
- [0145] 실시예 13에서 당분리 컬럼을 통하여 얻은 아가로트리오스를 TLC로 확인한 후 순도가 높은 아가로트리오스의 분획을 모았다. 55번부터 61번의 분획을 15 mL-코니칼 튜브에 모아 교반하여 잘 섞이도록 하였다. 이후 7 mL 중 일부를 샘플링하여 HPLC KS-802 컬럼을 통해 수율과 순도를 분석하였다.
- [0146] 도 17에 나타난 바와 같이, 1 g의 아가로스로부터 0.4 g의 아가로트리오스를 얻었고(0.4 g NAB/g agarose) 샘플 중 약 90.2%가 아가로트리오스라는 것을 확인하였다.

도면

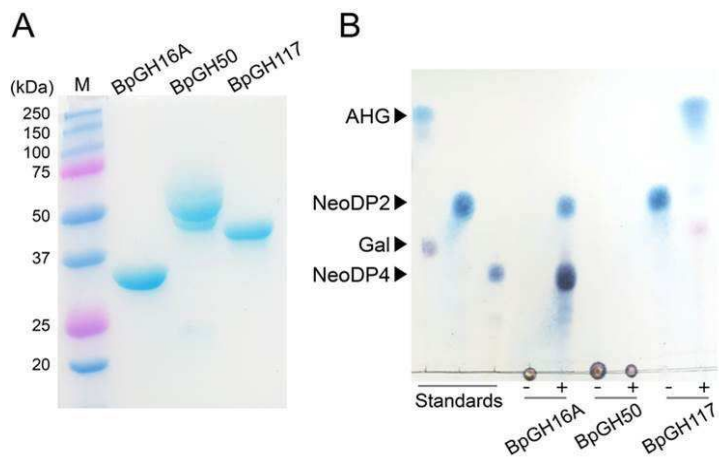
도면1



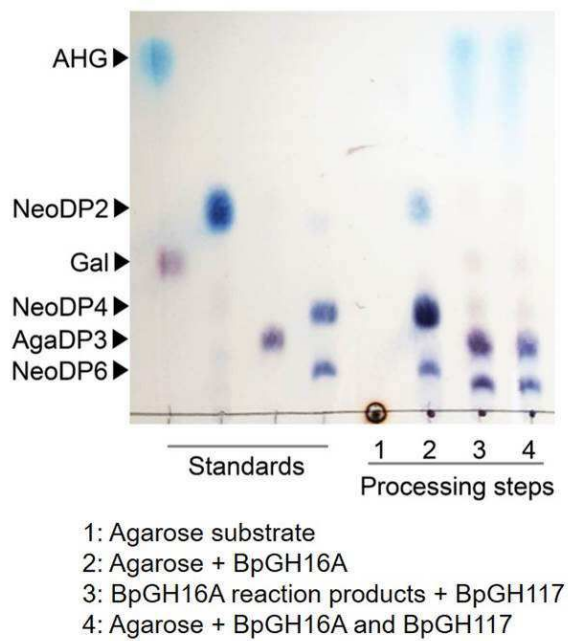
도면2



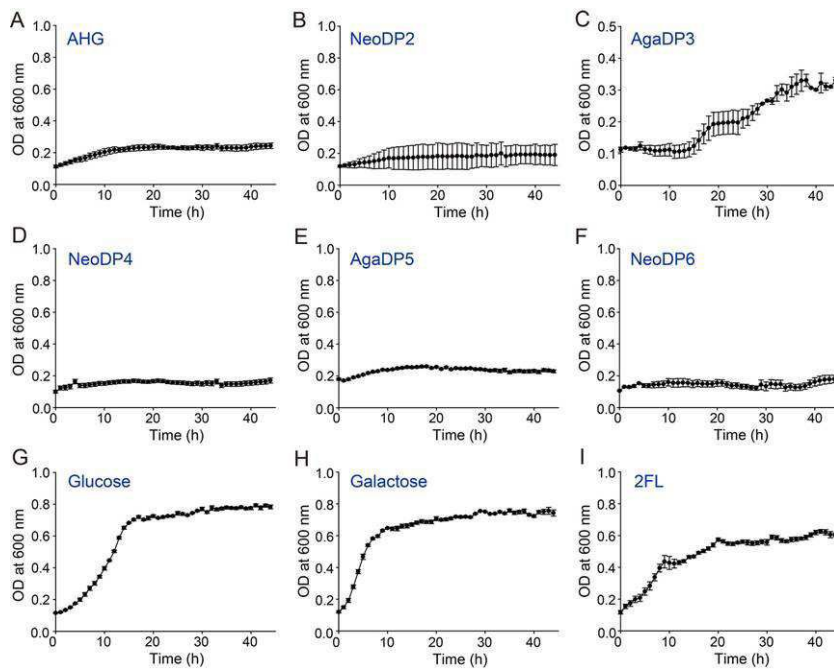
도면3



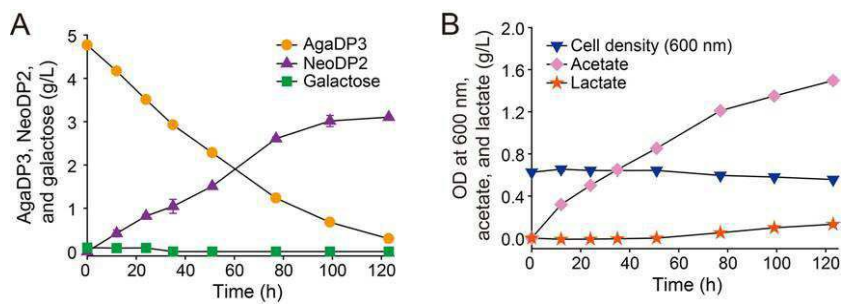
도면4



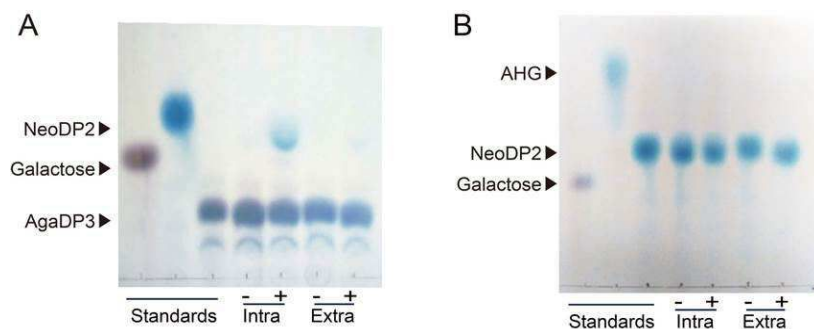
도면5



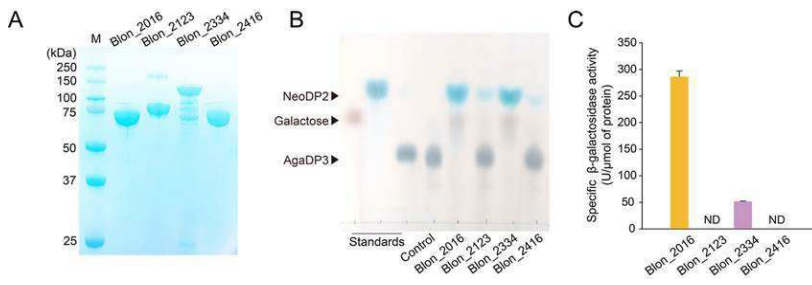
도면6



도면7

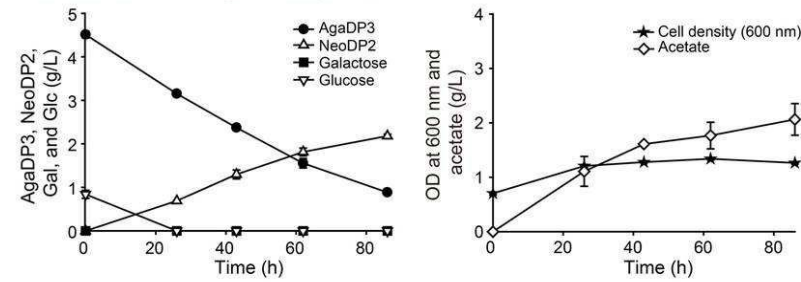


도면8

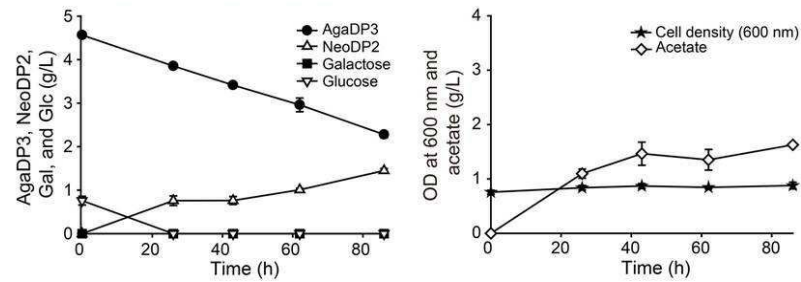


도면9

A. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 17930

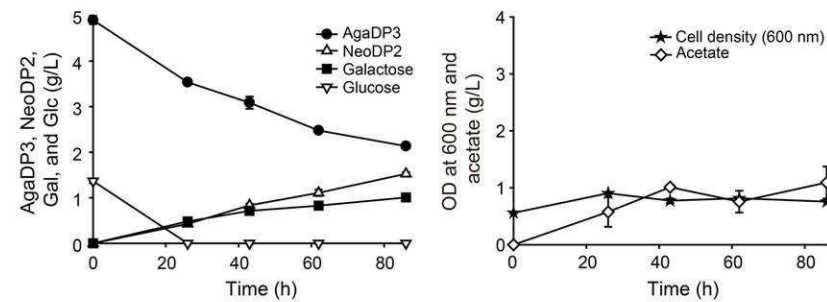


B. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15702

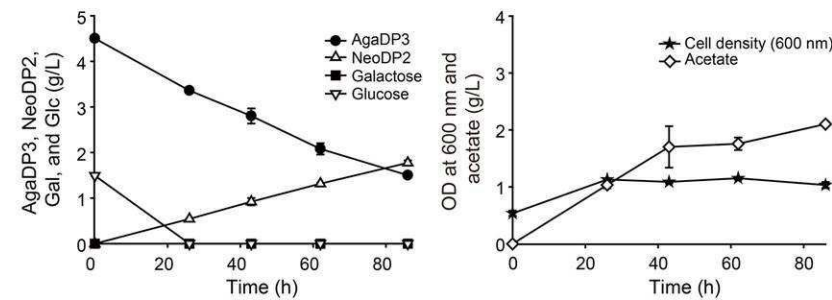


도면10

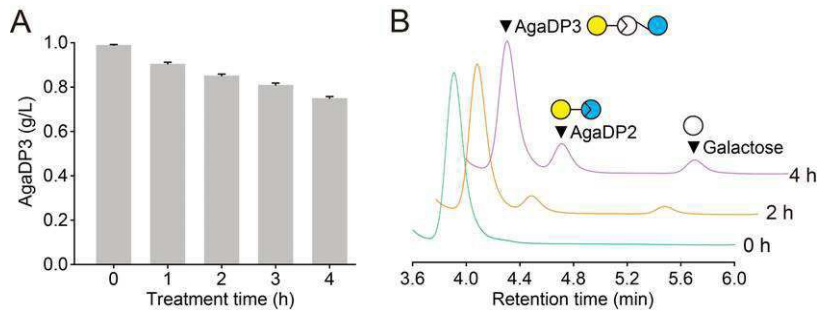
A. *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082



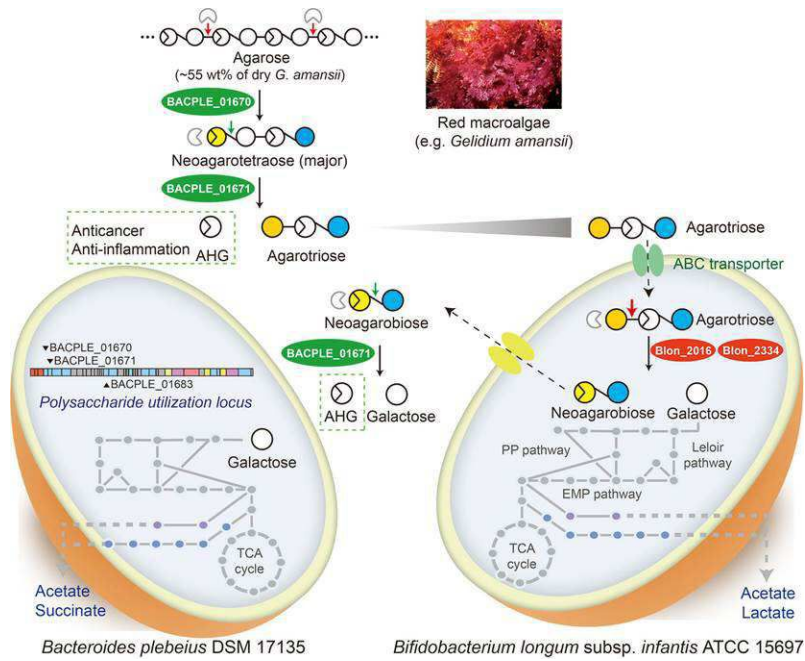
B. *Bifidobacterium kashiwanohense* DSM 21854



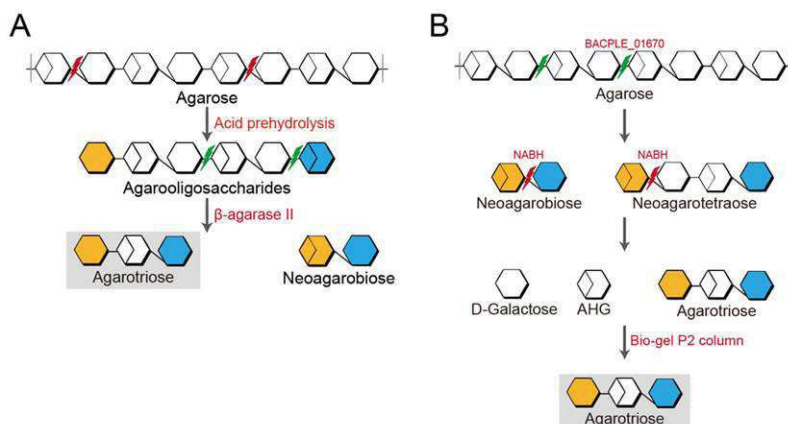
도면11



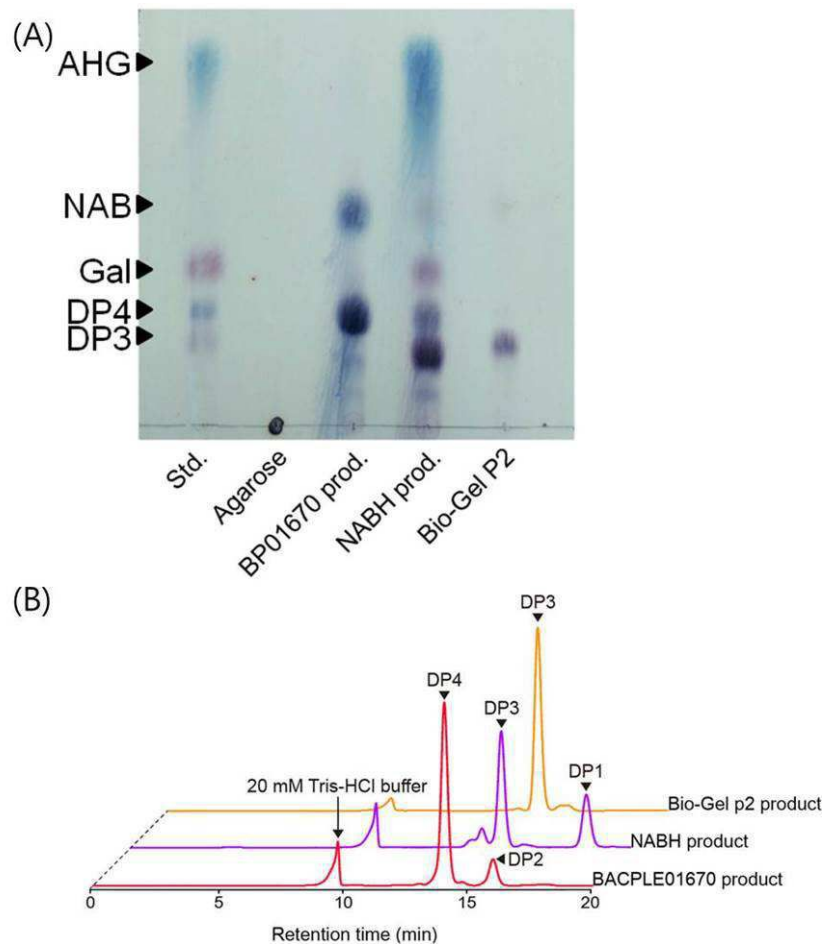
도면12



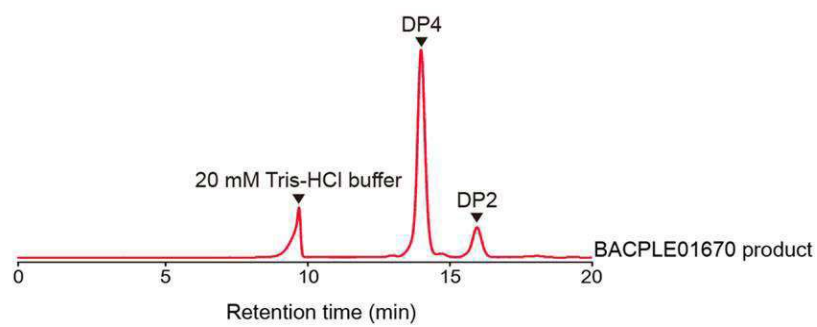
도면13



도면14

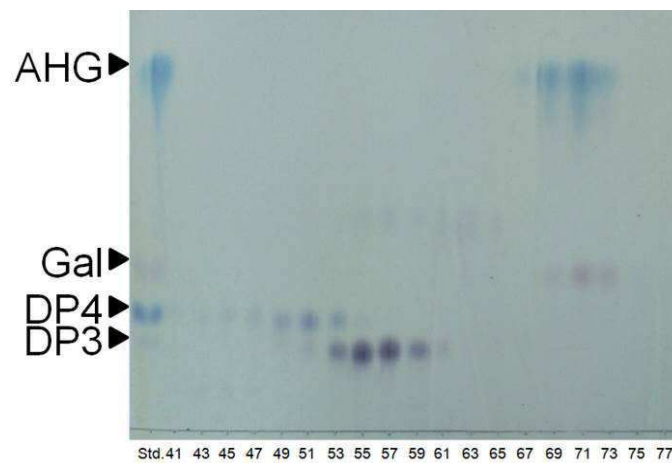


도면15



Oligosaccharides	Standard curve	Yield (% w/w)
Neogaroiose	$y = 271981x - 9413.2$	20.5
Neogaroetraose	$y = 389185x + 553.2$	79.5

도면16



도면17

아가로트리오스 (DP3)	
순도 (%)	수율 (% , w/w)
90.2	40.0

서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Method for producing agarotriose and prebiotics use thereof
- <130> P17U13C0706
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 316
- <212> PRT
- <213> Bacteroides plebeius DSM 17135
- <400> 1

Met Lys Arg Lys Leu Phe Thr Ile Cys Leu Ala Ser Leu Gln Phe Ala
 1 5 10 15
 Cys Ala Ala Glu Asn Leu Asn Asn Lys Ser Tyr Glu Trp Asp Ile Tyr
 20 25 30
 Pro Val Pro Ala Asn Ala Gly Asp Gly Met Val Trp Lys Leu His Pro
 35 40 45
 Gln Ser Asp Asp Phe Asn Tyr Ile Ala Asp Glu Lys Asp Lys Gly Lys
 50 55 60

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

305				310				315							
<210> 2															
<211> 402															
<212> PRT															
<213> Bacteroides plebeius DSM 17135															
<400> 2															
Met	Arg	Lys	Ile	Ile	Phe	Ala	Ala	Gly	Met	Met	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala
1				5					10					15	
Cys	Gly	Asn	Thr	Gly	Asn	Thr	Gln	Thr	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Thr	Gln
			20					25				30			
Asn	Tyr	Asp	Glu	Arg	Lys	Ala	Asp	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Lys	Gly	Asn
		35					40					45			
Lys	Leu	Ser	Ala	Ala	Met	Lys	Arg	Ala	Met	Lys	Trp	Glu	Asn	His	Asp
	50					55					60				
Asn	Lys	Trp	Phe	Phe	Glu	Tyr	Lys	Met	Glu	Pro	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu
65					70					75					80
Ala	Tyr	Glu	Glu	Gly	Val	Val	Arg	Arg	Asp	Pro	Ser	Ala	Met	Leu	Lys
				85					90					95	
Ile	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Val	Trp	Tyr	Ser	Lys	Ser	Tyr	Gly	Pro	Thr
			100					105					110		
Gln	Gly	Phe	Ala	Gly	Asp	Ile	Glu	Lys	Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Trp	Asp
		115					120					125			
Arg	Cys	Asp	Ile	Trp	Tyr	Ala	Thr	Ser	Lys	Asp	Gly	Leu	Thr	Trp	Lys
	130					135					140				
Glu	Gln	Gly	Ile	Ala	Val	Lys	Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Ala	Tyr	Asp	Asp
145				150					155					160	
Arg	Ser	Val	Phe	Thr	Pro	Glu	Val	Met	Glu	Trp	Lys	Gly	Lys	Tyr	Tyr
			165					170					175		
Leu	Cys	Tyr	Gln	Ala	Val	Lys	Ser	Pro	Tyr	Thr	Val	Arg	Val	Lys	Asn
			180					185					190		
Thr	Ile	Gly	Met	Ala	Cys	Ala	Asp	Ser	Pro	Glu	Gly	Leu	Trp	Thr	Lys

195 200 205
 Thr Asp Lys Pro Val Leu Glu Pro Ser Asp Thr Gly Glu Trp Glu Gly
 210 215 220
 Asp Glu Asp Asn Arg Phe Lys Val Val Ser Lys Gly Asp Phe Asp Ser
 225 230 235 240
 His Lys Val His Asp Pro Cys Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Lys Phe Tyr
 245 250 255
 Met Tyr Tyr Lys Gly Glu Arg Met Gly Glu Glu Ile Thr Trp Gly Gly
 260 265 270

 Arg Glu Ile Lys His Gly Val Ala Ile Ala Glu Asn Pro Met Gly Pro
 275 280 285
 Tyr Val Lys Ser Glu Tyr Asn Pro Ile Ser Asn Ser Gly His Glu Val
 290 295 300
 Cys Val Trp Pro Tyr Lys Gly Gly Ile Ala Ser Leu Ile Thr Thr Asp
 305 310 315 320
 Gly Pro Glu Lys Asn Thr Leu Gln Trp Ser Pro Asp Gly Ile Asn Phe
 325 330 335
 Glu Ile Met Ser Val Val Lys Gly Ala Pro His Ala Ile Gly Leu Asn

 340 345 350
 Arg Ser Ala Asp Ala Glu Lys Glu Pro Thr Glu Ile Leu Arg Trp Gly
 355 360 365
 Leu Thr His Ile Tyr Asn Ser Ser Asp Tyr Gln Ser Ile Met Arg Phe
 370 375 380
 Ser Thr Trp Thr Leu Gln Thr His Thr Ala Lys Gly Glu Ser Lys Glu
 385 390 395 400
 Arg Lys

<210> 3
 <211> 691
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697

 <400> 3

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

Gln Thr Thr Asn Phe Met Val Ser Ala Gly Cys Thr Val Leu Asp Tyr
260 265 270

Asp Lys Trp Gly His Asp Val Asp Phe Val Ser Asn Asp His Tyr Phe
275 280 285

Ser Pro Gly Glu Ala His Phe Asp Glu Met Ala Tyr Ala Ala Cys Leu
290 295 300

Thr Asp Gly Ile Ala Arg Lys Asn Pro Trp Phe Leu Met Glu His Ser
305 310 315 320

Thr Ser Ala Val Asn Trp Arg Pro Thr Asn Tyr Arg Leu Glu Pro Gly
325 330 335

Glu Leu Val Arg Asp Ser Leu Ala His Leu Ala Met Gly Ala Asp Ala
340 345 350

Ile Cys Tyr Phe Gln Trp Arg Gln Ser Lys Ala Gly Ala Glu Lys Trp
355 360 365

His Ser Ala Met Val Pro His Ala Gly Pro Asp Ser Gln Ile Phe Arg
370 375 380

Asp Val Cys Glu Leu Gly Ala Asp Leu Asn Lys Leu Ala Asp Glu Gly
385 390 395 400

Leu Leu Ser Thr Lys Leu Val Lys Ser Lys Val Ala Ile Val Phe Asp
405 410 415

Tyr Glu Ser Gln Trp Ala Thr Glu His Thr Ala Thr Pro Thr Gln Glu
420 425 430

Val Arg His Trp Thr Glu Pro Leu Asp Trp Phe Arg Ala Leu Ala Asp
435 440 445

Asn Gly Leu Thr Ala Asp Val Val Pro Val Arg Gly Pro Trp Asp Glu
450 455 460

Tyr Glu Ala Val Val Leu Pro Ser Leu Ala Ile Leu Ser Glu Gln Thr
465 470 475 480

Thr Arg Arg Val Arg Glu Tyr Val Ala Asn Gly Gly Lys Leu Phe Val
485 490 495

Thr Tyr Tyr Thr Gly Leu Val Asp Asp Arg Asp His Val Trp Leu Gly

500 505 510
 Gly Tyr Pro Gly Ser Ile Arg Asp Val Val Gly Val Arg Val Glu Glu
 515 520 525
 Phe Ala Pro Met Gly Thr Asp Ala Pro Gly Thr Met Asp His Leu Asp
 530 535 540
 Leu Asp Asn Gly Thr Val Ala His Asp Phe Ala Asp Val Ile Thr Ser
 545 550 555 560
 Val Ala Asp Thr Ala His Val Val Ala Ser Phe Lys Ala Asp Lys Trp
 565 570 575

 Thr Gly Phe Asp Gly Ala Pro Ala Ile Thr Val Asn Asp Phe Gly Asp
 580 585 590
 Gly Lys Ala Ala Tyr Val Gly Ala Arg Leu Gly Arg Glu Gly Leu Ala
 595 600 605
 Lys Ser Leu Pro Ala Leu Leu Glu Glu Leu Gly Ile Glu Thr Ser Ala
 610 615 620
 Glu Asp Asp Arg Gly Glu Val Leu Arg Val Glu Arg Ala Asp Glu Thr
 625 630 635 640
 Gly Glu Asn His Phe Val Phe Leu Phe Asn Arg Thr His Asp Val Ala

 645 650 655
 Val Val Asp Val Glu Gly Glu Pro Leu Val Ala Ser Leu Ala Gln Val
 660 665 670
 Asn Glu Ser Glu His Thr Ala Ala Ile Gln Pro Asn Gly Val Leu Val
 675 680 685
 Val Lys Leu
 690
 <210> 4
 <211> 1023
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697
 <400> 4
 Met Thr Asp Val Thr His Val Asp Arg Ala Ser Gln Ala Trp Leu Thr

1 5 10 15

Asp Pro Thr Val Phe Glu Val Asn Arg Thr Pro Ala His Ser Ser His
 20 25 30
 Lys Trp Tyr Ala Arg Asp Pro Gln Ser Gly Gln Trp Ser Asp Leu Lys
 35 40 45
 Gln Ser Leu Asp Gly Glu Trp Arg Val Glu Val Val Gln Ala Ala Asp
 50 55 60
 Ile Asn Leu Glu Glu Glu Pro Ala Thr Ala Glu Ser Phe Asp Asp Ser
 65 70 75 80

 Ser Phe Glu Arg Ile Gln Val Pro Gly His Leu Gln Thr Ala Gly Leu
 85 90 95
 Met Asn His Lys Tyr Val Asn Val Gln Tyr Pro Trp Asp Gly His Glu
 100 105 110
 Asn Pro Leu Glu Pro Asn Ile Pro Glu Asn Asn His Val Ala Leu Tyr
 115 120 125
 Arg Arg Lys Phe Thr Val Ser Ala Pro Val Ala Asn Ala Lys Gln Ala
 130 135 140
 Gly Gly Ser Val Ser Ile Val Phe His Gly Met Ala Thr Ala Ile Tyr

 145 150 155 160
 Val Trp Val Asn Gly Ala Phe Val Gly Tyr Gly Glu Asp Gly Phe Thr
 165 170 175
 Pro Asn Glu Phe Asp Ile Thr Gly Leu Leu His Asp Gly Glu Asn Val
 180 185 190
 Val Ala Val Ala Cys Tyr Glu Tyr Ser Ser Ala Ser Trp Leu Glu Asp
 195 200 205
 Gln Asp Phe Trp Arg Leu His Gly Leu Phe Arg Ser Val Glu Leu Ala
 210 215 220

 Ala Arg Pro His Val His Ile Glu Asn Thr Gln Ile Glu Ala Asp Trp
 225 230 235 240
 Asp Pro Glu Ala Gly Thr Ala Ser Leu Asp Ala Ala Leu Thr Val Leu
 245 250 255
 Asn Ala Thr Asp Ala Ala Thr Val Arg Ala Thr Leu Lys Asp Ala Asp
 260 265 270

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

Leu Ser Ser Gly Pro Leu Gln Gly Ile Glu Pro Trp Ser Ala Glu Ser

290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Gly Ser Lys Arg Glu Trp Glu Gly Ala Cys Val Asp Arg Val

435 440 445

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

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

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

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

Met Tyr Ser His Ala Asp Glu Ile Glu Lys Tyr Leu Lys Asp Asp Pro

515 520 525
 Lys Lys Pro Tyr Leu Ser Cys Glu Tyr Met His Ala Met Gly Asn Ser
 530 535 540
 Val Gly Asn Met Asp Glu Tyr Thr Ala Leu Glu Arg Tyr Pro Lys Tyr
 545 550 555 560
 Gln Gly Gly Phe Ile Trp Asp Phe Ile Asp Gln Ala Ile Tyr Ala Thr
 565 570 575
 Gln Pro Asp Gly Thr Arg Ser Leu Arg Tyr Gly Gly Asp Phe Gly Asp

 580 585 590
 Arg Pro Ser Asp Tyr Glu Phe Ser Gly Asp Gly Leu Leu Phe Ala Asp
 595 600 605
 Arg Lys Pro Ser Pro Lys Ala Gln Glu Val Lys Gln Leu Tyr Ser Asn
 610 615 620
 Val His Ile Asp Val Thr Lys Asp Ser Val Ser Val Lys Asn Asp Asn
 625 630 635 640
 Leu Phe Thr Ala Thr Gly Asp Tyr Val Phe Val Leu Ser Val Leu Ala
 645 650 655

 Asp Gly Lys Pro Val Trp Gln Ser Thr Arg Arg Phe Asp Val Pro Ala
 660 665 670
 Gly Glu Thr Arg Thr Phe Asp Val Ala Trp Pro Val Ala Ala Tyr Arg
 675 680 685
 Ala Asp Ala Arg Glu Leu Val Leu Gln Val Ser Gln Arg Leu Ala Lys
 690 695 700
 Ala Thr Asp Trp Ala Glu Ser Gly Tyr Glu Leu Ala Phe Gly Gln Ala
 705 710 715 720
 Val Val Pro Ala Asp Ala Thr Ala Thr Pro Asp Thr Lys Pro Ala Asp

 725 730 735
 Gly Thr Ile Thr Val Gly Arg Trp Asn Ala Gly Val Arg Gly Ala Gly
 740 745 750
 Arg Glu Val Leu Leu Ser Arg Thr Gln Gly Gly Met Val Ser Tyr Thr
 755 760 765
 Phe Ala Gly Asn Glu Phe Val Leu Arg Arg Pro Ala Ile Thr Thr Phe

770 775 780
 Arg Pro Leu Thr Asp Asn Asp Arg Gly Ala Gly His Gly Phe Glu Arg
 785 790 795 800

 Val Gln Trp Leu Gly Ala Gly Arg Tyr Ala Arg Cys Val Asp Asn Val
 805 810 815
 Leu Glu Gln Ile Asp Asp Ser Thr Leu Lys Gly Thr Tyr Thr Tyr Glu
 820 825 830
 Leu Ala Thr Ala Gln Arg Thr Lys Val Thr Val Ser Tyr Thr Ala His
 835 840 845
 Thr Asp Gly Arg Val Asn Leu His Val Glu Tyr Pro Gly Glu Gln Gly
 850 855 860
 Asp Leu Pro Thr Ile Pro Ala Phe Gly Ile Glu Trp Thr Leu Pro Val

 865 870 875 880
 Gln Tyr Thr Asn Leu Arg Phe Phe Gly Thr Gly Pro Glu Glu Thr Tyr
 885 890 895
 Leu Asp Arg Lys His Ala Lys Leu Gly Val Trp Asn Thr Asn Ala Phe
 900 905 910
 Ala Asp His Ala Pro Tyr Leu Met Pro Gln Glu Thr Gly Asn His Glu
 915 920 925
 Asp Val Arg Trp Ala Glu Ile Thr Asp Asp His Gly His Gly Met Arg
 930 935 940

 Val Ser Arg Ala Asp Gly Ala Ala Pro Phe Ala Val Ser Leu Leu Pro
 945 950 955 960
 Tyr Ser Ser Phe Met Leu Glu Glu Ala Gln His Gln Asp Glu Leu Pro
 965 970 975
 Lys Pro Lys His Met Phe Leu Arg Val Leu Ala Ala Gln Met Gly Val
 980 985 990
 Gly Gly Asp Asp Ser Trp Met Ser Pro Val His Pro Gln Tyr His Ile
 995 1000 1005
 Pro Ala Asp Lys Pro Ile Ser Leu Asp Val Asp Leu Glu Leu Ile

 1010 1015 1020

<210> 5
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> Saccharophagus degradans 2-40
 <400> 5
 Met Lys Thr Thr Lys Cys Ala Leu Ala Ala Leu Phe Phe Ser Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Met Ala Ala Asp Trp Asp Gly Ile Pro Val Pro Ala Asp Pro Gly
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Trp Glu Leu Gln Ser Leu Ser Asp Asp Phe Asn Tyr
 35 40 45
 Ala Ala Pro Ala Asn Gly Lys Ser Thr Thr Phe Tyr Ser Arg Trp Ser
 50 55 60
 Glu Gly Phe Ile Asn Ala Trp Leu Gly Pro Gly Gln Thr Glu Phe Tyr
 65 70 75 80
 Gly Pro Asn Ala Ser Val Glu Gly Gly His Leu Ile Ile Lys Ala Thr
 85 90 95
 Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gln Ile Tyr Thr Gly Ala Ile His Ser Asn
 100 105 110
 Glu Ser Phe Thr Tyr Pro Leu Tyr Leu Glu Ala Arg Thr Lys Ile Thr
 115 120 125
 Asn Leu Thr Leu Ala Asn Ala Phe Trp Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr
 130 135 140
 Glu Glu Ile Asp Val Leu Glu Ser Tyr Gly Ser Asp Arg Ala Thr Glu
 145 150 155 160
 Thr Trp Phe Asp Glu Arg Leu His Leu Ser His His Val Phe Ile Arg
 165 170 175
 Gln Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Lys Asp Ala Gly Ser Trp Tyr Pro
 180 185 190
 Asn Pro Asp Gly Gly Thr Trp Arg Asp Gln Phe Phe Arg Ile Gly Val
 195 200 205
 Tyr Trp Ile Asp Pro Trp Thr Leu Glu Tyr Tyr Val Asn Gly Glu Leu

210 215 220
 Val Arg Thr Val Ser Gly Pro Glu Met Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr
 225 230 235 240
 Asn Gly Thr Gly Leu Ser Lys Pro Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Glu
 245 250 255
 His Gln Pro Trp Arg Asp Glu Gln Gly Thr Ala Pro Pro Thr Asp Ala

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

 Asp Thr Phe Thr Gly Phe Asn Pro Ser Gly Ala Asn Asn Ile Asn Tyr
 340 345 350
 Asn Thr Leu Gly Asp Trp Ala Asp Tyr Thr Val Asn Phe Pro Ala Ala
 355 360 365
 Gly Asn Tyr Thr Val Asn Leu Ile Ala Ala Ser Pro Val Thr Ser Gly
 370 375 380
 Leu Gly Ala Asp Ile Leu Val Asp Ser Ser Tyr Ala Gly Thr Ile Pro
 385 390 395 400
 Val Ser Ser Thr Gly Ala Trp Glu Ile Tyr Asn Thr Phe Ser Leu Pro

 405 410 415
 Ser Ser Ile Tyr Ile Ala Ser Ala Gly Asn His Thr Ile Arg Val Gln
 420 425 430
 Ser Ser Gly Gly Ser Ala Trp Gln Trp Asn Gly Asp Glu Leu Arg Phe
 435 440 445
 Thr Gln Thr Asp Ala Asp Thr Gly Thr Asn Pro Pro Ser Thr Ala Ser
 450 455 460
 Ile Ala Val Glu Ala Glu Asn Phe Asn Ala Val Gly Gly Thr Phe Ser

465 470 475 480

Asp Gly Gln Ala Gln Pro Val Ser Val Tyr Thr Val Asn Gly Asn Thr

485 490 495

Ala Ile Asn Tyr Val Asn Gln Gly Asp Tyr Ala Asp Tyr Thr Ile Ala

500 505 510

Val Ala Gln Ala Gly Asn Tyr Thr Ile Ser Tyr Gln Ala Gly Ser Gly

515 520 525

Val Thr Gly Gly Ser Ile Glu Phe Leu Val Asn Glu Asn Gly Ser Trp

530 535 540

Ala Ser Lys Thr Val Thr Ala Val Pro Asn Gln Gly Trp Asp Asn Phe

545 550 555 560

Gln Pro Leu Asn Gly Gly Ser Val Tyr Leu Ser Ala Gly Thr His Gln

565 570 575

Val Arg Leu His Gly Ala Gly Ser Asn Asn Trp Gln Trp Asn Leu Asp

580 585 590

Lys Phe Thr Leu Ser Asn

595

<210> 6

<211> 368

<212> PRT

<213> Saccharophagus degradans 2-40

<400> 6

Met Ser Asp Ser Lys Val Asn Lys Lys Leu Ser Lys Ala Ser Leu Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Asp Ile Thr Pro Leu Lys Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val

35 40 45

Ile Arg Arg Asp Pro Ser Ala Val Leu Lys Val Asp Asp Glu Tyr His

50 55 60

Val Trp Tyr Thr Lys Gly Glu Gly Glu Thr Val Gly Phe Gly Ser Asp

65						70						75						80	
Asn	Pro	Glu	Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Trp	Asp	Lys	Thr	Glu	Val	Trp	His				
					85						90						95		
Ala	Thr	Ser	Lys	Asp	Lys	Ile	Thr	Trp	Lys	Glu	Ile	Gly	Pro	Ala	Ile				
					100						105						110		
Gln	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Tyr	Asp	Asp	Arg	Ala	Val	Phe	Thr	Pro				
					115						120						125		
Glu	Val	Leu	Arg	His	Asn	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Val	Tyr	Gln	Thr	Val				
					130						135						140		
Lys	Ala	Pro	Tyr	Leu	Asn	Arg	Ser	Leu	Glu	His	Ile	Ala	Ile	Ala	Tyr				
					145						150						155		
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		
Val	Ala	Ile	Ala	Asp	Ser	Pro	Leu	Gly	Pro	Tyr	Thr	Lys	Ser	Glu	Tyr				
					245						250						255		
Asn	Pro	Ile	Thr	Asn	Ser	Gly	His	Glu	Val	Ala	Val	Trp	Pro	Tyr	Lys				
					260						265						270		
Gly	Gly	Met	Ala	Thr	Met	Leu	Thr	Thr	Asp	Gly	Pro	Glu	Lys	Asn	Thr				
					275						280						285		
Cys	Gln	Trp	Ala	Glu	Asp	Gly	Ile	Asn	Phe	Asp	Ile	Met	Ser	His	Ile				
					290						295						300		
Lys	Gly	Ala	Pro	Glu	Ala	Val	Gly	Phe	Phe	Arg	Pro	Glu	Ser	Asp	Ser				
					305						310						315		
					320						325						330		

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	