



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106414728 B

(45)授权公告日 2020.02.07

(21)申请号 201480056714.2

(22)申请日 2014.10.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106414728 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(30)优先权数据
10-2013-0121990 2013.10.14 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.04.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2014/009470 2014.10.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/056923 KO 2015.04.23

(73)专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔

(72)发明人 金京宪 崔仁杰 李赞炯 金希泽
尹银珠

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

代理人 黎艳 刘培培

(51)Int.Cl.
C12N 9/24(2006.01)
C12P 19/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 1460716 A,2003.12.10,
CN 102405282 A,2012.04.04,
CN 1460717 A,2003.12.10,
无.NCBI Reference Sequence: WP_014232195.1.《Genbank》.2013,1页.
Hee Taek Kim等.High temperature and low acid pretreatment and agarase treatment of agarose for the production of sugar and ethanol from red seaweed biomass.《Bioresource Technology》.2013,第136卷

审查员 冯娟

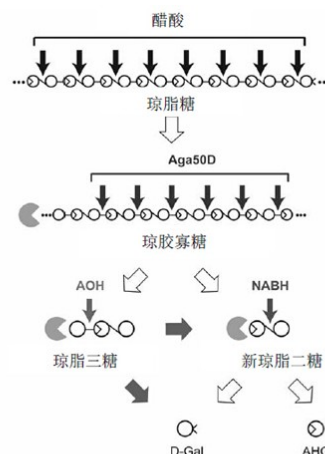
权利要求书1页 说明书9页
序列表14页 附图9页

(54)发明名称

琼胶寡糖水解酶及通过使用该琼胶寡糖水解酶从琼脂糖中生成3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的方法

(57)摘要

本发明涉及琼胶寡糖水解酶及一种通过使用该琼胶寡糖水解酶从琼脂糖中生成3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的方法。更具体地,通过使用对琼脂三糖具有水解活性的 β -琼胶寡糖水解酶,提高来自琼脂糖中的3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的产率,即糖化率。



↓ β 键被 AOH 断裂 ↓ β 键被 Aga50D 断裂 ↓ β 键被 NABH 断裂
AHG 3,6-脱水-L-半乳糖 D-Gal D-半乳糖 α -(1,3)键 β -(1,4)键

1. 一种用于琼脂糖糖化的组合物,该组合物包含:
琼胶酶;
对琼脂三糖具有水解活性且以氨基酸序列SEQ ID NO:1表示的 β -琼胶寡糖水解酶;和
 α -琼脂二糖水解酶。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述琼胶酶用氨基酸序列SEQ ID NO:3表示。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述 β -琼胶寡糖水解酶能将琼脂三糖水解成D-半乳糖和新琼脂二糖。
4. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述 β -琼胶寡糖水解酶源自弧菌EJY3。
5. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述 α -琼脂二糖水解酶用氨基酸序列SEQ ID NO:4表示。
6. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,通过使经预处理的琼脂糖与所述琼胶酶、所述 β -琼胶寡糖水解酶和 α -琼脂二糖水解酶的酶混合物反应,或者通过使所述琼胶酶、所述 β -琼胶寡糖水解酶和 α -琼脂二糖水解酶相继与所述经预处理的琼脂糖反应,所述用于琼脂糖糖化的组合物能从琼脂糖中生成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖。
7. 一种糖化琼脂糖的方法,该方法是通过使基底与选自权利要求1~6中任一项所述的组合物反应来进行的,其中,所述基底选自琼脂糖、琼脂三糖和新琼脂二糖。
8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述反应在20-40℃的温度范围和0-200rpm的条件下连续进行30分钟至7天。
9. 一种用于生成半乳糖的组合物,其包含:
 β -琼胶寡糖水解酶,且所述 β -琼胶寡糖水解酶对琼脂三糖、琼脂戊糖或琼脂庚糖具有水解活性并由氨基酸序列SEQ ID NO:1表示;和
基底,所述基底选自琼脂三糖、琼脂戊糖或琼脂庚糖。
10. 根据权利要求9所述的组合物,其特征在于,所述 β -琼胶寡糖水解酶源自弧菌EJY3。
11. 一种用于生成半乳糖的方法,该方法是通过使基底与权利要求9或10所述的 β -琼胶寡糖水解酶反应来进行的,其中,所述基底选自琼脂三糖、琼脂戊糖和琼脂庚糖。
12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述反应在20-40℃的温度范围和5-9.6的pH范围内进行。

琼胶寡糖水解酶及通过使用该琼胶寡糖水解酶从琼脂糖中生成3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种对琼胶寡糖具有水解活性的新型 β -琼胶寡糖水解酶, 且还涉及一种通过使用 β -琼胶寡糖水解酶从琼脂糖中生成3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的方法。

背景技术

[0002] 相比于最近在诸多领域中使用的植物生物量, 藻类具有含量较低的难以利用的成分, 如所使用的木质素。因此, 藻类的优点在于, 它们可以更为容易地转化成作为用来生成生物能源和生化物的基底的单糖。此外, 通过不去使用食物资源, 藻类则不存在使用食物资源来生成能源的问题。基于这些原因, 在生成包括有可替代能源的生化物质上, 藻类作为重要生物量而备受关注。

[0003] 在藻类中, 尤其, 红藻(如, 石花菜(*Gelidium amansii*))不仅是生成这种生物能源和生化物质的原材料, 据报道, 它还含有琼胶寡糖(agarooligosaccharides), 而被用作成分的琼胶寡糖显示出优异的生理活性, 如抗氧化、抗炎、抗癌、抗过敏、美白和保湿性, 从而在制药和化妆品领域中红藻被有效使用(U.S. Patent No. 76622291 by Tomono *et al.* (2009); U.S. Patent No. 691143282 by Enoki *et al.* (2005))。

[0004] 红藻包含作为主要组成的琼脂糖, 琼脂糖为以新琼脂二糖(neoagarobiose)(即, 通过 α -1,3-键相结合的3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖)作为基本单元的聚合物, 其中作为基本单元的新琼脂二糖与其他单元通过 β -1,4-键相连。本发明的发明人以实验为依据证明了3,6-脱水-L-半乳糖的生理功能起源于包含有新琼脂二糖的琼胶寡糖(Yun *et al.* (2013) *Appl Microbiol Biotechnol.* 97 (7):2961-70)的这一事实。此外, 据报道, 关于3,6-脱水-L-半乳糖的生成, 有一种通过温和的化学预处理和酶糖化制备3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖的过程, 来替代产率极低且具有水解过度的可能性高的化学处理方法(Jol *et al.* (1999) *Anal Biochem.* 268, 213-222; Kim *et al.* (2010) *Bull Korean Soc.* 31 (2) 511-514)。

[0005] 待经过化学预处理后, 琼脂糖被外切型Aga50D酶解聚成作为主要反应产物的新琼脂二糖和琼脂三糖(agarotriose)(D-半乳糖- β -1,4键-3,6-脱水-L-半乳糖- α -1,3键-D-半乳糖)。然后, 新琼脂二糖被作为 α -琼脂二糖水解酶的SdNABH最终水解成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖(韩国专利号10-1293668)。期间, 在温和条件下的化学预处理对提高所述Aga50D酶的反应性来说是不可或缺的。然而, 通过使用经化学预处理的基底, 所生成的琼脂三糖最终无法被分解成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖, 反而作为反应剩余物被残留下来。

[0006] 如果所残留的琼脂三糖最终可以被分解成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖时, 能够预期的是, 3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖的产量将得到更大的提高。由于内切型和外切型 β -琼胶酶无法水解如琼脂三糖的基底, 也尝试过另一种通过利用 β -半乳糖苷酶将琼脂三糖分解成D-半乳糖和新琼脂二糖的方法, 然而可商购的 β -半乳糖苷酶并没有展示出对琼脂寡糖的水解活性。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明在于,提供一种通过使用新型酶提高琼脂糖糖化的效率的方法,且所述新型酶对琼脂寡糖具有水解活性。

[0009] 本发明还在于,提供一种通过使用新型酶生成半乳糖的方法,且所述新型酶对琼脂寡糖具有水解活性。

[0010] 技术方案

[0011] 为了实现上述目的,本发明提供一种用于琼脂糖糖化的组合物,该组合物包含:琼胶酶;对琼脂三糖具有水解活性且以氨基酸序列SEQ ID NO:1表示的 β -琼胶寡糖水解酶;和 α -琼脂二糖水解酶。

[0012] 本发明还提供一种通过使基底与本发明的用于琼脂糖糖化的组合物进行反应来糖化琼脂糖的方法,其中所述基底选自琼脂糖、琼脂三糖和新琼脂二糖。

[0013] 本发明还提供一种用于生成半乳糖的组合物,该组合物包含 β -琼胶寡糖水解酶,且所述 β -琼胶寡糖水解酶对琼脂三糖、琼脂戊糖(agaropentaose)或琼脂庚糖(agaroheptaose)具有水解活性并被表示为氨基酸序列SEQ ID NO:1。

[0014] 此外,本发明提供一种通过使基底与本发明的 β -琼胶寡糖水解酶反应来生成半乳糖的方法,其中所述基底选自琼脂三糖、琼脂戊糖和琼脂庚糖。

[0015] 有益效果

[0016] 通过利用能将琼脂三糖水解成半乳糖和新琼脂二糖上表现出活性的 β -琼胶寡糖水解酶,本发明有效地提高了来自琼脂糖的3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖的产量,也就是说,有效地改善了糖化产量。

附图说明

[0017] 图1为用于各种酶(PA:经预处理的琼脂糖;PAS:相对于所述经预处理的琼脂糖的Aga50D和SdNABH的反应产物;PASV:相对于所述经预处理的琼脂糖的Aga50D、SdNABH与附加弧菌EJY3初始提取物时的反应产物)的反应产物的TLC照片。

[0018] 图2以柱形图总结并展示了通过DNS试验对图1的PAS和PASV的还原当量。

[0019] 图3为本发明的经提纯的 β -琼胶寡糖水解酶的SDS-PAGE照片。

[0020] 图4展示了本发明的 β -琼胶寡糖水解酶的最佳温度的pH结果。图4A展示了所述 β -琼胶寡糖水解酶相对于琼脂三糖基底的最佳pH,而图4B展示了所述 β -琼胶寡糖水解酶相对于琼脂三糖基底的最佳温度(M:蛋白标记;第1道:通过HisTrap HP柱经过第一次提纯的 β -琼胶寡糖水解酶;第2道:通过HisTrap Q FF柱经过第二次提纯的 β -琼胶寡糖水解酶)。

[0021] 图5证明了本发明的 β -琼胶寡糖水解酶对琼脂三糖基底的酶活性。图5A为随着所述 β -琼胶寡糖水解酶与琼脂三糖基底之间的各反应时间所显示的所述基底和产物的变化的HPLC结果,而图5B为随着所述 β -琼胶寡糖水解酶和 α -琼脂二糖水解酶与琼脂三糖基底之间的各反应时间所显示的所述基底和产物的变化的HPLC结果。

[0022] 图6展示了本发明的 β -琼胶寡糖水解酶相对于琼脂三糖、琼脂戊糖和琼脂庚糖基底的酶活性。图6A通过利用TLC展示了所述 β -琼胶寡糖水解酶相对于每种基底的反应产物,而图6B通过利用TLC展示了所述 β -琼胶寡糖水解酶和 α -琼脂二糖水解酶相对于每种基底的

反应产物。

[0023] 图7展示了本发明的 β -琼胶寡糖水解酶相对于各种基底(使用葡萄糖和半乳糖作为基底)的酶活性。

[0024] 图8展示了源自大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶相对于各种基底(使用葡萄糖和半乳糖作为基底)的酶活性。图8A展示了分别相对于乳糖、乳糖-N-新四糖、乳果糖、4- β -半乳糖和 α -1,3- β -1,4-半乳二糖的酶的反应的结果,而图8B展示了分别相对于琼脂三糖、琼脂戊糖和琼脂庚糖的酶的反应的结果。

[0025] 图9为通过使用本发明的 β -琼胶寡糖水解酶(β -A0H)所展示的琼脂糖糖化过程的示意图。

具体实施方式

[0026] 下面,将具体说明本发明的构成。

[0027] 本发明涉及一种用于琼脂糖糖化的组合物,该组合物包含:琼胶酶;对琼脂三糖具有水解活性且以氨基酸序列SEQ ID NO:1表示的 β -琼胶寡糖水解酶;和 α -琼脂二糖水解酶。

[0028] 本发明的用于琼脂糖糖化的组合物的特征在于,通过在琼脂糖糖化中利用能够水解琼脂三糖的 β -琼胶寡糖水解酶来有效地分解那些过去在常规领域中不能水解而残留下来的琼脂三糖,其中 β -琼胶寡糖水解酶能使作为琼脂寡糖的产物的琼脂三糖水解成新琼脂二糖和D-半乳糖,从而显著地改善来自琼脂糖的3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖的产率(即,琼脂糖糖化的效率)。

[0029] 根据本发明的一个实施例,通过DNS方法所确认的还原当量的结果表明,当仅预处理琼脂糖时糖化率为约20%,而当采用常规酶处理(即,用琼胶酶与新琼脂二糖水解酶进行的处理)时所述比率会增加到50%。反之,在所述酶处理期间,当另外再处理 β -琼胶寡糖水解酶来水解琼脂三糖时,所述糖化率为70%。

[0030] 所述 β -琼胶寡糖水解酶并未展示由已报道的 β -半乳糖苷酶所显示的活性。反之,通过作用于琼脂三糖及各种如琼脂戊糖和琼脂庚糖的琼脂寡糖(n)的未还原端,所述 β -琼胶寡糖水解酶可将琼脂寡糖水解成D-半乳糖和新琼脂二糖(n-1)。

[0031] 所述 β -琼胶寡糖水解酶可以源自弧菌EJY3(*Vibrio* sp. EJY3),但不限于此。

[0032] 所述 β -琼胶寡糖水解酶不仅包括以SEQ ID NO: 1表示的氨基酸序列,还包括蛋白质,该蛋白质作为所述酶经过取代、缺失、转位、添加等中的一种或多种的变异蛋白并在本发明的酶的对琼脂三糖具有水解活性,而且,所述 β -琼胶寡糖水解酶优选地包括与SEQ ID NO: 1所公开的所述氨基酸序列具有80%或以上、85%或以上、90%或以上、93%或以上、94%或以上、95%或以上、96%或以上、97%或以上、98%或以上、以及99%或以上的序列相同性的氨基酸序列(也被指为'A0H')。

[0033] 在本发明中,一种多肽相对于其他序列具有特定百分比(如,80%、90%、95%或99%)的序列相同性,这表示,当比对并比较所述两种序列时,所述两种序列中占上述比例的氨基酸残基彼此相同。所述比对和百分比同源性(或相同性)可通过使用本领域熟知的软件程序,如在文献(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel *et al.* (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18))中公开的软件程序来确定。优选程序包括GCG Pileup程序、FASTA(Pearson *et al.* 1988 Proc. Natl Acad. Sci USA 85:2444-

2448)和BLAST(BLAST Manual, Altschul *et al.*, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, and Altschul *et al.* 1997 NAR25: 3389-3402)。其他优选的比对程序为ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, PA),此程序使用默认参数。其他可利用的序列软件程序为TFASTA数据检索程序,此程序可在Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)中使用。

[0034] 在本发明中,“蛋白质”与“多肽”在本文中可互换使用。此时,氨基酸残基使用常规的单字母代码或三字母代码。

[0035] 在本发明中,当涉及到细胞、核酸、蛋白质或载体时,术语“重组”表示,通过引入异源核酸或蛋白质或者通过天然核酸或蛋白质的改变进行的修饰来对所述细胞、核酸、蛋白质或载体进行修饰,又或者,所述术语可以指源自所修饰细胞的细胞。换言之,例如,重组细胞会表达该细胞的固有形式中未被发现的基因,又或者,它会表达经过异常表达或根本未被表达的原始基因。

[0036] 在本发明中,“核酸”包括单链或双链DNA、RNA及它们的变形体。“核酸”和“多核苷酸”可以在本文中互换使用。由于遗传密码被兼并(degeneracy),一种或多种遗传密码子可被用来编码特定的氨基酸,且本发明包括能编码特定氨基酸序列的多核苷酸。

[0037] 用于将核酸序列插入于细胞的术语,“导入”,是指“转染”、“转化”或“转导”,还包括一种将所述核酸序列融进真核或原核细胞内的说法。此时,所述核酸序列被融进所述细胞的基因组(如,染色体、质粒、质体和线粒体DNA)内,而被转化成自主复制子或者被瞬时表达。

[0038] 所述 β -琼胶寡糖水解酶不仅在酶的编码区中上游或下游段内进行转录或翻译,且所述 β -琼胶寡糖水解酶还通过与单个编码片段之间包含有间插序列的多肽的形成有关的DNA片段,即编码基因,进行转录或翻译。例如,所述转录或翻译可以通过序列SEQ ID NO: 2来实现,但并不限于此。

[0039] 所述 β -琼胶寡糖水解酶可从弧菌EJY3培养基的上清液中分离并提纯,且通过利用重组基因工程技术,可利用弧菌EJY3以外的菌株、人工化学合成方法来生成并分离所述 β -琼胶寡糖水解酶。

[0040] 当利用重组技术时,为了使通常的重组蛋白易于表达,会使用一些因子,如对抗生素抗性基因及可用于亲和柱层析的报告蛋白或多肽等,且这种技术在本发明所属技术领域的技术人员可容易实施的范畴内。此外,例如,经转化的大肠杆菌(*E. coli*)的培养基上清液可代替本发明的 β -琼胶寡糖水解酶而被使用。

[0041] 通过使用HisTrap HP柱和HisTrap FF柱,可提纯所述 β -琼胶寡糖水解酶。根据一个实施例,SDS-PAGE分析结果表明,所提纯的 β -琼胶寡糖水解酶的分子量可以为约90 kDa。

[0042] 所述 β -琼胶寡糖水解酶为一种属于GH家族2的酶,当与GH家族2内的其他 β 半乳糖苷酶做活性比较时,已被报道的常用的 β -半乳糖苷酶没有显示出能使琼胶三糖水解成D-半乳糖和新琼脂二糖的酶活性。然而,只有本发明的源自弧菌EJY3的 β -琼胶寡糖水解酶才显示出琼胶三糖水解活性。

[0043] 所述 β -琼胶寡糖水解酶可以在约30-40℃的温度范围和约5-9.6的pH范围内对琼胶三糖显示最佳水解活性。

[0044] 此外,用于本发明的琼脂糖糖化的组合物包含琼胶酶,琼胶酶能将琼脂寡糖水解成琼胶三糖和作为二糖的新琼脂二糖。

[0045] 作为所述琼胶酶,可以使用一种能使琼脂糖中的D-半乳糖与3,6-脱水-L-半乳糖之间的 β -1,4-糖苷键断裂的酶(被指作“ga50D”)。

[0046] 所述琼胶酶不仅包括以SEQ ID NO: 3表示的氨基酸序列,还包括蛋白质,该蛋白质作为所述酶经过取代、缺失、转位、添加等中的一种或多种的变异蛋白并在本发明的酶的范围具有琼胶寡糖水解活性,而且,所述琼胶酶优选地包括与SEQ ID NO:3所表示的所述氨基酸序列具有80%或以上、85%或以上、90%或以上、93%或以上、94%或以上、95%或以上、96%或以上、97%或以上、98%或以上、以及99%或以上的序列相同性的氨基酸序列。

[0047] 所述酶可源自*Saccharophagus degradans* 2-40^T,但不限于此。

[0048] 所述琼胶酶可以从*Saccharophagus degradans* 2-40^T的培养基上清液中分离并提纯,且通过利用重组基因工程技术,可利用*Saccharophagus degradans* 2-40^T以外的菌株、人工化学合成方法来生成并分离所述琼胶酶。

[0049] 当利用重组技术时,可以使用食用菌株如经转发的酵母的培养基上清液,来代替所述琼胶酶。

[0050] 此外,本发明的用于琼脂糖糖化的组合物包含 α -琼脂二糖水解酶(被指为“sdNABH”), α -琼脂二糖水解酶可以将新琼脂二糖水解成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖。

[0051] 所述 α -琼脂二糖水解酶不仅包括以SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列,还包括蛋白质,该蛋白质作为所述酶经过取代、缺失、转位、添加等中的一种或多种的变异蛋白并在本发明的酶的范围具有新琼脂二糖水解活性,而且,所述 α -琼脂二糖水解酶优选地包括与SEQ ID NO:4所表示的所述氨基酸序列具有80%或以上、85%或以上、90%或以上、93%或以上、94%或以上、95%或以上、96%或以上、97%或以上、98%或以上、以及99%或以上的序列相同性的氨基酸序列。

[0052] 所述酶可源自*Saccharophagus degradans* 2-40^T,但不限于此。

[0053] 所述 α -琼脂二糖水解酶可以从*Saccharophagus degradans* 2-40^T的培养基上清液中分离并提纯,且通过利用重组基因工程技术,可利用*Saccharophagus degradans* 2-40^T以外的菌株、人工化学合成方法来生成并分离所述 α -琼脂二糖水解酶。

[0054] 当利用重组技术时,可代替使用食用菌株如经转化的酵母的培养基上清液。

[0055] 本发明的用于琼脂糖糖化的组合物,可通过使经预处理的琼脂糖与所述琼胶酶、所述 β -琼胶寡糖水解酶和 α -琼脂二糖水解酶的酶混合物反应,或者通过使所述琼胶酶、所述 β -琼胶寡糖水解酶和 α -琼脂二糖水解酶相继与所述经预处理的琼脂糖反应,而从琼脂糖中生成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖。

[0056] 本发明还涉及一种通过使基底与本发明的用于琼脂糖糖化的组合物来糖化琼脂糖的方法,其中所述基底选自琼脂糖、琼脂三糖和新琼脂二糖。

[0057] 本发明的用于糖化琼脂糖的方法的特征在于,使琼胶酶(即,外切型 β -琼脂糖酶)、 β -琼胶寡糖水解酶和 α -琼脂二糖水解酶与经预处理的琼脂糖反应而生成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖。

[0058] 所述经处理的琼脂糖是指一种经弱酸处理时会生成琼脂寡糖的琼脂糖。

[0059] 所述弱酸可以为乙酸、甲酸、琥珀酸、柠檬酸、苹果酸、马来酸、草酸等中的一种或

多种。

[0060] 考虑到生产成本及经所述弱酸进行中和后的盐分离,所述弱酸优选使用0.5-60 % (w/v) 的浓度范围。更具体地,所述弱酸可使用20-40 % (w/v) 法人浓度范围。

[0061] 所述琼脂糖与所述弱酸的反应可在40-150℃的温度范围和100 -200 rpm的条件下持续进行30分钟至6小时。当满足所述范围时,可以最大程度减少当利用所述弱酸时琼脂糖的过量水解产物。

[0062] 所得反应产物为琼脂寡糖,是通过清洗和干燥去处所残留的弱酸和过量水解产物来获得的。

[0063] 所述清洗溶剂可以为具有1-6个碳原子的低级醇,但不限于此。

[0064] 为了对所得琼脂寡糖进行酶水解,会使用外切型琼胶酶、β-琼胶寡糖水解酶和α-琼脂二糖水解酶。

[0065] 所述琼胶酶能将琼脂寡糖水解成琼脂三糖和新琼脂二糖,所述β-琼胶寡糖水解酶能将琼脂三糖水解成D-半乳糖和新琼脂二糖,且所述α-琼脂二糖水解酶能将新琼脂二糖水解成D-半乳糖和3,6-脱水-L-半乳糖。

[0066] 因此,过去在琼脂寡糖的常规酶水解中残留下来所述琼脂三糖会被所述β-琼胶寡糖水解酶水解,从而提高了D-半乳糖和3,6-脱水-L-半乳糖的产率。

[0067] 通过使所述经预处理的琼脂糖与所述琼胶酶、所述β-琼胶寡糖水解酶和α-琼脂二糖水解酶的酶混合物反应,或者通过使所述琼胶酶、所述β-琼胶寡糖水解酶和α-琼脂二糖水解酶相继与所述经预处理的琼脂糖反应,可以生成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖。

[0068] 琼脂寡糖与所述酶混合物之间的反应、或琼脂寡糖与所述酶之间的连续反应可在20-40℃的温度范围和0-200 rpm的条件下连续进行30分钟至7天。更具体地,这些反应可在25-35℃的温度范围和100-150 rpm的条件下连续进行1-4天。

[0069] 当所述琼脂寡糖为粉状时,可将它溶解于通常的缓冲液中而进行使用,但不限于此。

[0070] 本发明还涉及一种用于生成半乳糖的组合物,该组合物包含对琼脂三糖、琼脂戊糖或琼脂庚糖具有水解活性且以氨基酸序列SEQ ID NO:1表示的β-琼胶寡糖水解酶。

[0071] 此外,本发明提供一种通过使基底与本发明的β-琼胶寡糖水解酶进行反应而生成半乳糖的方法,其中所述基底选自琼脂三糖、琼脂戊糖和琼脂庚糖。

[0072] 所述β-琼胶寡糖水解酶可以源自弧菌EJY3,但不限于此。

[0073] 由于所述β-琼胶寡糖水解酶能从琼脂三糖、琼脂戊糖或琼脂庚糖中生成D-半乳糖和新琼脂二糖,所述β-琼胶寡糖水解酶可以用来生成D-半乳糖。

[0074] 所述酶反应可在约20-40℃的温度范围和约5-9.6的pH范围内进行。

[0075] 下面,通过参考示例性实施例,将具体描述本发明。然而,以下示例性实施例只意在举例说明本发明,并不会限制本发明的范围。

实施例

[0076] <实施例1> 从弧菌EJY3的初始酶提取物中β-琼胶寡糖水解酶的酶活性的确定

[0077] 为了确认弧菌EJY3对所述琼脂三糖的水解具有酶活性,获得初始提取物并对所述活性进行评估。

[0078] 为了获得所述初始提取物,使弧菌EJY3在含有海盐的培养基内生长到中期指数阶段,然后离心分离40 mL的培养基,通过使用超声器使细胞破裂,从而获得初始提取物。通过使用作为所述基底的琼脂糖,利用TLC来观察(TLC溶剂的组成:容量比为3:1:1的正丁醇:乙醇:水)通过 β 琼胶酶的分解产物。

[0079] 基于3,6-脱水-L-半乳糖、半乳糖、新琼脂二糖的标准,在图1中展示了用于各种酶的反应产物的TLC结果。PA表示通过与3%醋酸在130℃下反应30分钟来进行预处理的琼脂糖,PAS为从所述经预处理的琼脂糖与外切型 β 琼胶酶(Aga50D)及 α -琼脂二糖水解酶(SdNABH)进行反应而获得的产物,且PASV为将弧菌EJY3初始提取物(或初始酶)加入到所述PAS中而获得的产物。

[0080] 如图1中所示,将弧菌EJY3初始酶被附加加入到所述反应中时,观察到琼脂三糖有减少。由此可确定,所述弧菌EJY3初始酶含有能水解琼脂三糖的酶。

[0081] 此外,使琼脂三糖完全水解,且通过还原糖定量方法(DNS法:50 μ l DNS试剂与稀释25倍的100 μ l酶反应产物混合,在95℃下处理5分钟,然后在540 nm测量吸光度),测量还原当量。

[0082] 如图2中所示,确认了3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的产率有增加。当只进行预处理时糖化率为约20%,然而当进行酶的预处理时该糖化率增加到50%。对此,通过用弧菌EJY3初始酶进行附加处理,致使糖化率变为70%,认为这是因为琼脂三糖最终被水解而引起的。

[0083] <实施例2> 在弧菌EJY3的酶候选物中对 β -琼胶寡糖水解酶的研究

[0084] 在有关弧菌EJY3的报告中所涉及的酶中,克隆那些在报告中对琼胶酶和 β -半乳糖苷酶具有活性的8种酶,以生成重组菌株,然后评估每种初始酶对琼脂三糖的活性。其中,发现只有一种酶(VEJY3_09170)对琼脂三糖具有水解活性。通过在UniProt(<http://www.uniprot.org>)中确认并基于由本发明的发明人第一次揭示的弧菌EJY3全基因组序列数据,鉴定结果表明,VEJY3_09170为一种基于碱基序列被分类为 β -半乳糖苷酶的酶,且VEJY3_09170属于具有诸多其他 β -半乳糖苷酶的GH家族2。然后,将大肠杆菌Rosetta(DE3)用作所述重组菌株的宿主,且将pET-21a用作载体。将接种于具有50 μ g/mL的氨苄西林浓度的固体培养基上并通过转化而获得的菌落再次接种在含有50 μ g/mL氨苄西林的LB(卢里亚肉汤)中,然后在37℃和220 rpm下孵化12小时(两个20ml的容量)。然后,分别在两个3 L锥形瓶中进行孵化,这两个3 L锥形瓶各含有1 L的LB肉汤,在相同条件下进行3小时(OD=0.8)震荡培养,用冰冷却1小时,而后加入0.1 mM IPTG,以在16℃和120rpm的条件下诱导表达12小时。所述培养基通过离心分离(6000 rpm, 4℃, 15分钟)回收细胞,而后所收回的细胞被悬浮在20 mM的Tris缓冲液(Tris-HCl, 1 M NaCl pH 8)中并利用超声器使之破裂,然后所述悬浮液通过离心分离从上清液中分离出 β -琼胶寡糖水解酶,再利用HisTrap HP柱和HisTrap Q FF柱(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)进行提纯,而后通过8 % SDS-PAGE进行观察。

[0085] 图3为经提纯的 β -琼胶寡糖水解酶的SDS-PAGE照片。M表示蛋白标记,第1道表示通过HisTrap HP柱被第一次提纯的 β -琼胶寡糖水解酶,且第2道表示HisTrap Q FF柱被第二次提纯的 β -琼胶寡糖水解酶。

[0086] 如图3中所示,在相当于约90 kDa相的位置处发现了所述 β -琼胶寡糖水解酶。

[0087] <实施例3> β -琼胶寡糖水解酶的最佳反应条件的确认

[0088] 对 β -琼胶寡糖水解酶的仅由温度和pH组成的最佳条件进行确认。作为所述基底使用琼脂三糖(Aglyco, 中国北京),且在10、20、30、35、40、45和50℃的温度及pH 4、5、6、7、8、9和10下确定结果。

[0089] 图4展示了本发明的 β -琼胶寡糖水解酶的最佳温度及pH结果。图4A展示了相对于琼脂三糖基底的 β -琼胶寡糖水解酶的最佳pH,而图4B展示了相对于琼脂三糖基底的 β -琼胶寡糖水解酶的最佳温度。

[0090] 如图4中所示,琼脂三糖的相对活性达到50%的温度范围为约30-40℃,且所述pH的范围在5-9.6。在35℃和pH7上达到最佳酶活性。

[0091] <实施例4> 所述最佳条件下的 β -琼胶寡糖水解酶的生化活性的确定

[0092] 在所述实施例3中被确认为最佳条件的35℃和pH7的条件下,对相对于琼脂三糖、琼脂戊糖和琼脂庚糖的 β -琼胶寡糖水解酶活性进行测试。

[0093] 通过HPLC(KS-802柱)和TLC(TLC溶剂条件:正丁醇:乙醇:水=3:1:1)分析,当观察随着所述 β -琼胶寡糖水解酶与所述琼脂三糖基底之间的反应时间发生在所述基底和产物中的变化时,可见所述 β -琼胶寡糖水解酶通过水解能使一个分子的琼脂寡糖分解成一个分子的新琼脂寡糖和一个分子的D-半乳糖(图5A)。

[0094] 此外,通过HPLC,当分析随着所述 β -琼胶寡糖水解酶与所述琼脂三糖基底之间的反应时间发生在所述基底和产物中的变化时,可见通过组合使用 β -琼胶寡糖水解酶和 α -琼脂二糖水解酶,最终会从琼脂寡糖中生成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖(图5B)。

[0095] 图6展示了本发明的 β -琼胶寡糖水解酶相对于琼脂三糖、琼脂戊糖和琼脂庚糖基底的活性的TLC结果。如图6A中所示, β -琼胶寡糖通过水解酶水解琼脂三糖、琼脂戊糖和琼脂庚糖而生成D-半乳糖,然而,当组合使用 β -琼胶寡糖水解酶和 α -琼脂二糖水解酶时,所观察到的最终产物为3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖(图6B)。

[0096] <实施例5> β -琼胶寡糖水解酶和源自大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶的活性对比

[0097] 当与其他属于GH家族2中的 β -半乳糖苷酶作活性比较时,发现源自弧菌EJY3的所述 β -琼胶寡糖水解酶为一种属于GH家族2的酶,但显示出有别于先前有被报道的 β -半乳糖苷酶的新活性。测试源自大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶的活性(Sigma-Aldrich, 3050 spruce street, USA)相对于每个基底的活性,然后测试 β -琼胶寡糖水解酶相对于上述相同的基底的活性。

[0098] 图7展示了 β -琼胶寡糖水解酶相对于各种基底的活性的结果。针对乳糖、乳糖-N-新四糖、乳果糖、4- β -半乳糖和 α -1,3- β -1,4-半乳二糖分别进行酶反应性测试,结果表明,相对于任何的所述基底均没有反应性。

[0099] 图8展示了源自大肠杆菌的 β 半乳糖苷酶水解酶相对于各种基底的活性的结果。针对于乳糖、乳糖-N-新四糖、乳果糖、4- β -半乳糖和 α -1,3- β -1,4-半乳二糖分别进行酶反应性的测试,从而确认 β -半乳糖苷酶的已知活性(图8A)。此外,分别测试相对于琼脂三糖、琼脂戊糖和琼脂庚糖的酶反应性,且其结果确认了所述源自大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶无法水解琼脂寡糖(图8B)。

[0100] 上述结果能够证明,通过使用 β 半乳糖苷酶水解酶,本发明可以提高琼脂糖糖化的产率和效率,且图9展示了所述糖化过程的示意图。

[0101] 工业应用性

[0102] 本发明的3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖可用作食品、化妆品和药物领域中的有益材料。

序列表

<110> 高丽大学校产学协力团

<120> 琼胶寡糖水解酶及通过使用该琼胶寡糖水解酶从琼脂糖中生成 3,6-脱水-L-半乳糖和半乳糖的方法

<130> G16U13C0181P/CN

<150> KR 10-2013-0121990

<151> 2013-10-14

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 806

<212> PRT

<213> 弧菌 EJY3

[0001]

<400> 1

Met His Asn Ser Pro Arg Ser Thr Thr Leu Phe Asn Asp Asn Trp Leu
1 5 10 15

Phe Gln Leu Ala Lys Asp Lys Pro Asn Thr Lys Gln Trp Ser Thr Val
20 25 30

Thr Leu Pro His Asp Trp Ser Val Ala Ser Ala Phe Ser Pro Gln Tyr
35 40 45

Asp Gly Ala Thr Gly Tyr Leu Pro Gly Gly Ile Gly Trp Tyr Lys Lys
50 55 60

Gln Phe Lys Asn Pro Leu Asn Lys His Tyr Ser Arg Cys Ile Leu Val
65 70 75 80

Phe Asp Gly Ile Tyr Asn Asn Ala Thr Ile Asn Ile Asn Gly Tyr Asp

85	90	95
Ile His Phe Gln Ala Tyr Gly Tyr Ala Pro Phe Asn Ile Glu Ile Thr		
100	105	110
Asp Tyr Leu Lys Ser Asp Asn Val Ile Thr Ile His Val Asp Arg Arg		
115	120	125
Arg Tyr Ile Asp Ser Arg Trp Tyr Thr Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp		
130	135	140
Ile Glu Met Val Leu Thr Lys Asp Val Phe Val Pro Ile Trp Glu Asn		
145	150	155
		160
His Ile Lys Ala Ser Val Ser Ser Asn Gln Ile Gly His Ile His Gln		
165	170	175
[0002]		
Gln Leu Met Ile Glu Ala Lys Thr Lys Thr His Tyr Leu Thr Ile Val		
180	185	190
Ser Arg Leu Leu Glu Pro Asn Ser Asp Asn Cys Val Ala Thr Ala Arg		
195	200	205
Thr His Arg Ser Val Asn Asn Arg Glu Val Cys Asp Leu Glu Leu Thr		
210	215	220
Cys Asp Gln Leu Ser Leu Trp Ser Pro Asp Ser Pro Ile Leu Tyr Lys		
225	230	235
		240
Leu Glu Thr Gln Ile Tyr Glu Asn Gly Cys Val Ile Asp Lys Val Ser		
245	250	255
Glu Asn Ile Gly Phe Arg Ser Ile Glu Phe Ser Pro Glu Gln Gly Phe		

260	265	270	
Phe Leu Asn Gly Met Pro Thr Lys Val Arg Gly Val Cys Leu His His			
275	280	285	
Asp Gly Gly Leu Val Gly Ala Ala Val Pro Asp Glu Ile Trp Ile Arg			
290	295	300	
Arg Leu Ser Lys Leu Lys Gln Cys Gly Val Asn Ala Ile Arg Ile Ala			
305	310	315	320
His Asn Pro Ala Ser Lys Arg Leu Leu His Leu Cys Asp Thr Met Gly			
325	330	335	
Phe Leu Val Gln Asp Glu Phe Phe Asp Glu Trp Asp Tyr Pro Lys Asp			
340	345	350	
[0003]			
Lys Arg Leu Asn Met Gly Asn Gln His Asp Asp Phe Phe Ser Gln Cys			
355	360	365	
Tyr Thr Glu His Phe Gln Thr Arg Ala Lys Thr Asp Leu Cys Asn Thr			
370	375	380	
Leu Lys Cys His Ile Asn His Pro Ser Ile Phe Met Trp Ser Ile Gly			
385	390	395	400
Asn Glu Ile Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Asn Val Glu Ala Thr Gly Phe			
405	410	415	
Phe Asp Ala Ser Trp Asp Gly Asn Tyr Phe Trp Ser Leu Pro Pro Asn			
420	425	430	
Ser Pro Asp Glu Ile Lys Asp Lys Leu Lys Asn Leu Pro Gln His Thr			

435	440	445	
Tyr Asp Ile Gly Lys Thr Ala Asn Lys Leu Ala Arg Trp Val Lys Ala			
450	455	460	
Ile Asp Gln Thr Arg Pro Ile Thr Ala Asn Cys Ile Leu Pro Ser Ser			
465	470	475	480
Ser Tyr His Ser Gly Tyr Ala Asp Ala Leu Asp Val Ile Gly Phe Ser			
	485	490	495
Tyr Arg Arg Val Val Tyr Asp Tyr Gly His Glu Ile Arg Pro Asn Leu			
	500	505	510
Pro Ile Ile Gly Asn Glu Asn Leu Pro Gln Trp His Glu Trp Lys Ala			
	515	520	525
[0004]			
Val Leu Glu Arg Asn His Val Ser Gly Leu Phe Leu Trp Thr Gly Ile			
530	535	540	
Asn Tyr Met Gly Glu Ser His Gly Lys Trp Pro Val Arg Thr Thr Asp			
545	550	555	560
Ser Gly Leu Leu Asp Thr Ala Gly Phe Glu Lys Pro Ser Tyr Ala Leu			
	565	570	575
Phe Lys Ser Leu Trp Thr Asp Glu Pro Tyr Val Lys Val Phe Thr Gln			
	580	585	590
Arg Ala Asp Leu Thr Gln Leu Lys Phe Asp Glu Gln Thr Phe Val Ala			
595	600	605	
Phe Glu His Asp Glu Asn Ala Trp Gln Lys Lys Leu Trp Val Trp Asp			

610	615	620	
Glu Arg Asn Ser His Trp Asn Tyr Glu Asn Glu Gln Trp Val Thr Ile			
625	630	635	640
Glu Ala Tyr Ser Asn Cys Pro Gln Val Gln Leu Tyr Leu Asn Asp Glu			
645	650		655
Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Glu Lys Gln Ile Asp Arg Val Phe Arg			
660	665		670
Trp Ala Leu Pro Tyr Arg Ala Gly Lys Ile Ser Leu Val Gly Leu Lys			
675	680		685
Asn Asp Val Glu Val Thr Arg Asp Glu Ile Val Thr Ser Gly Val Pro			
690	695		700
[0005]			
Arg Lys Ile Ser Ile Val Asp Glu Thr His Glu Gly Ser Ser Ser Tyr			
705	710	715	720
Arg Gln Leu Ile Val Gln Met Leu Asp Lys Asp Asn His Pro Val Ser			
725	730		735
His Glu Glu Ala Leu Leu Glu Phe Arg Val Arg Gly Cys Glu Trp Ile			
740	745		750
Gly Ala Asp Asn Gly Ser Ile Ser Ser Ile Asn Ala Tyr Asn Ser Pro			
755	760		765
Thr Ile Ala Thr Arg His Gly Arg Val Leu Ala Val Val Lys Ser Ser			
770	775		780
Gln Gly Gln Ser Gly Asp Ile Glu Ile Tyr Ser Asn Ser Gly Val Lys			

	785	790	795	800
	Ala Ser Phe Ser Leu Leu			
	805			
	<210> 2			
	<211> 2421			
	<212> DNA			
	<213> Vibrio sp. EJY3			
	<400> 2			
	atgcacaatt caccgagaag taccacatta ttaacgaca actggctttt tcagttggca			60
	aaagataaac cgaataccaa acaatggctg acggttacgc ttccccacga ttggagtga			120
	gcttcggcct tttctccaca gtatgatga gccacgggtt acctacctgg gggaaattgt			180
	tggtacaaaa agcagtttaa aaatcctcta aataaacact attcgcgctg tatactcgtt			240
[0006]	tttgacggga ttacaacaa tgcaaccatt aatatcaatg gctatgatat acatttccaa			300
	gcgtatggtt atgcgccatt caatatagaa attactgatt acttgaaatc agacaatga			360
	attactatcc atgtcgatag acgcaggtat atcgacagta ggtggtatac aggttcaggt			420
	atttaccgtg atatagaaat ggttctaact aaggatgtgt ttgttcctat ttgggaaaat			480
	catataaaag ctccgtag ctcaaaccag attggccata tccaccagca actgatgatt			540
	gaagcaaaaa cgaaaacgca ttacttgaca attgtaagtc gtttgctcga gcccaattcc			600
	gataattgcg tagctacagc tcgaacgcat cggtcagtga acaatcgaga agtatgtgat			660
	ttagaactaa cgtgtgatca actgagcctt tggagcccag attaccaat tctttataag			720
	ttggaaactc aaatctacga aaatggctgc gtcattgata aggtatctga aaacattggt			780
	tttcgtagca tagagttttc gccagaacag gggtttttcc tcaatgggat gccaaactaaa			840
	gtccgtgggg tctgccttca tcatgatggc ggactcgtt gcgctgccgt acctgatgaa			900
	atatggatac gtcggtgttc aaagctcaaa caatgtggtg taaatgcaat aagaatcgca			960

	cacaaccag cctccaagcg tctattgcac ctctgtgaca cgatgggatt tctgggtcag	1020
	gatgagtttt ttgacgagtg ggattatcct aaagataaac gccttaacat gggcaaccaa	1080
	cacgatgact tttcagcca atgttacacc gagcacttc aaacccgagc aaaaaccgat	1140
	ctttgtaata cgttgaaatg ccatattaac catccatcaa tattcatgtg gagtattggc	1200
	aacgaaattg agtggaccta cccacgcaac gtcgaagcaa cgggcttttt tgatgcaagt	1260
	tgggatggga attatttctg gagcttacca cctaactctc ccgatgaaat aaaagataaa	1320
	ctcaaaaatt tgccacagca cacttatgat attgggaaaa ctgcaacaa gcttgctcgt	1380
	tgggtaaaag ctatgatca aactcgaccg attactgcca actgtatcct tccatcatcc	1440
	agctaccatt caggttacgc cgacgcgctc gatgtaattg gatttagtta tcgacgtgtt	1500
	gtatatgatt atgggcatga aatcagacct aacctgccga taatcggtaa tgaaaattta	1560
	cctcaatggc atgaatggaa agcagtgctt gaacgcaacc atgtatccgg attgtttctt	1620
[0007]	tggactggaa tcaattatat gggagaatct catggtaaatt ggcctgtaag aaccactgac	1680
	agcggcctgc tagacaccgc tgggtttgaa aaaccaagtt atgcgctttt taaatcgctg	1740
	tggacagacg aaccttatgt caaagtattt actcaacgag cagacttaac acaactgaag	1800
	tttgacgagc aaacttttgt tgcctttgaa catgatgaaa atgcttgga aaaaaatta	1860
	tgggtctggg acgaaagaaa ctgcactgg aattatgaaa atgagcaatg ggtcactatc	1920
	gaagcctata gcaactgtcc gcaggtacaa ctctacctca acgatgagtt ggttgaacc	1980
	caacagttag aaaagcaaat cgacagagtc tttcgttggg ccttaccata tagagcagga	2040
	aagatctctc tgggtggttt aaagaacgac gtagaggtaa ctagagatga aattgtcacg	2100
	tctggagtgc cgaggaagat ctcgattgta gatgaaaccc atgaaggttc aagctcatac	2160
	cggcaactta tagtccagat gcttgataaa gacaaccatc cagtgagtca tgaagaagca	2220
	ttgttagagt ttcgtgttcg cggttgtaaa tggattggag ccgataatgg cagtatatct	2280

tctatcaacg catataatag cccaacgatt gctacacgtc atggcagagt tttagcagtt 2340

gtaaaatcat cgcagggtca aagtggatgat atcgaaattt actcaaattc aggagtgaag 2400

gcctcttttt cactacttta a 2421

<210> 3

<211> 747

<212> PRT

<213> Saccharophagus degradans 2-40

<400> 3

Met Leu Phe Asp Phe Glu Asn Asp Gln Val Pro Ser Asn Ile His Phe

1 5 10 15

Leu Asn Ala Arg Ala Ser Ile Glu Thr Tyr Thr Gly Ile Asn Gly Glu

20 25 30

[0008]

Pro Ser Lys Gly Leu Lys Leu Ala Met Gln Ser Lys Gln His Ser Tyr

35 40 45

Thr Gly Leu Ala Ile Val Pro Glu Gln Pro Trp Asp Trp Ser Glu Phe

50 55 60

Thr Ser Ala Ser Leu Tyr Phe Asp Ile Val Ser Val Gly Asp His Ser

65 70 75 80

Thr Gln Phe Tyr Leu Asp Val Thr Asp Gln Asn Gly Ala Val Phe Thr

85 90 95

Arg Ser Ile Asp Ile Pro Val Gly Lys Met Gln Ser Tyr Tyr Ala Lys

100 105 110

Leu Ser Gly His Asp Leu Glu Val Pro Asp Ser Gly Asp Val Asn Asp

115	120	125	
Leu Asn Leu Ala Ser Gly Leu Arg Ser Asn Pro Pro Thr Trp Thr Ser			
130	135	140	
Asp Asp Arg Gln Phe Val Trp Met Trp Gly Val Lys Asn Leu Asp Leu			
145	150	155	160
Ser Gly Ile Ala Lys Ile Ser Leu Ser Val Gln Ser Ala Met His Asp			
165	170	175	
Lys Thr Val Ile Ile Asp Asn Ile Arg Ile Gln Pro Asn Pro Pro Gln			
180	185	190	
Asp Glu Asn Phe Leu Val Gly Leu Val Asp Glu Phe Gly Gln Asn Ala			
195	200	205	
[0009]			
Lys Val Asp Tyr Lys Gly Lys Ile His Ser Leu Glu Glu Leu His Ala			
210	215	220	
Ala Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Leu Asp Gly Lys Pro Met Pro Ser			
225	230	235	240
Arg Ser Lys Phe Gly Gly Trp Leu Ala Gly Pro Lys Leu Lys Ala Thr			
245	250	255	
Gly Tyr Phe Arg Thr Glu Lys Ile Asn Gly Lys Trp Met Leu Val Asp			
260	265	270	
Pro Glu Gly Tyr Pro Tyr Phe Ala Thr Gly Leu Asp Ile Ile Arg Leu			
275	280	285	
Ser Asn Ser Ser Thr Met Thr Gly Tyr Asp Tyr Asp Gln Ala Thr Val			

290	295	300	
Ala Gln Arg Ser Ala Asp Asp Val Thr Pro Glu Asp Ser Lys Gly Leu			
305	310	315	320
Met Ala Val Ser Glu Lys Ser Phe Ala Thr Arg His Leu Ala Ser Pro			
	325	330	335
Thr Arg Ala Ala Met Phe Asn Trp Leu Pro Asp Tyr Asp His Pro Leu			
	340	345	350
Ala Asn His Tyr Asn Tyr Arg Arg Ser Ala His Ser Gly Pro Leu Lys			
	355	360	365
Arg Gly Glu Ala Tyr Ser Phe Tyr Ser Ala Asn Leu Glu Arg Lys Tyr			
	370	375	380
[0010]			
Gly Glu Thr Tyr Pro Gly Ser Tyr Leu Asp Lys Trp Arg Glu Val Thr			
385	390	395	400
Val Asp Arg Met Leu Asn Trp Gly Phe Thr Ser Leu Gly Asn Trp Thr			
	405	410	415
Asp Pro Ala Tyr Tyr Asp Asn Asn Arg Ile Pro Phe Phe Ala Asn Gly			
	420	425	430
Trp Val Ile Gly Asp Phe Lys Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Phe Trp			
	435	440	445
Gly Ala Met Pro Asp Val Phe Asp Pro Glu Phe Lys Val Arg Ala Met			
	450	455	460
Glu Thr Ala Arg Val Val Ser Glu Glu Ile Lys Asn Ser Pro Trp Cys			

465	470	475	480
Val Gly Val Phe Ile Asp Asn Glu Lys Ser Phe Gly Arg Pro Asp Ser			
	485	490	495
Asp Lys Ala Gln Tyr Gly Ile Pro Ile His Thr Leu Gly Arg Pro Ser			
	500	505	510
Glu Gly Val Pro Thr Arg Gln Ala Phe Ser Lys Leu Leu Lys Ala Lys			
	515	520	525
Tyr Lys Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ala Trp Gly Leu Lys Leu Ser			
	530	535	540
Ser Trp Ala Glu Phe Asp Leu Gly Val Asp Val Lys Ala Leu Pro Val			
545	550	555	560
[0011]			
Thr Asp Thr Leu Arg Ala Asp Tyr Ser Met Leu Leu Ser Ala Tyr Ala			
	565	570	575
Asp Gln Tyr Phe Lys Val Val His Gly Ala Val Glu His Tyr Met Pro			
	580	585	590
Asn His Leu Tyr Leu Gly Ala Arg Phe Pro Asp Trp Gly Met Pro Met			
	595	600	605
Glu Val Val Lys Ala Ala Ala Lys Tyr Ala Asp Val Val Ser Tyr Asn			
610	615	620	
Ser Tyr Lys Glu Gly Leu Pro Lys Gln Lys Trp Ala Phe Leu Ala Glu			
625	630	635	640
Leu Asp Lys Pro Ser Ile Ile Gly Glu Phe His Ile Gly Ala Met Asp			

	645	650	655
His Gly Ser Tyr His Pro Gly Leu Ile His Ala Ala Ser Gln Ala Asp			
	660	665	670
Arg Gly Glu Met Tyr Lys Asp Tyr Met Gln Ser Val Ile Asp Asn Pro			
	675	680	685
Tyr Phe Val Gly Ala His Trp Phe Gln Tyr Met Asp Ser Pro Leu Thr			
	690	695	700
Gly Arg Ala Tyr Asp Gly Glu Asn Tyr Asn Val Gly Phe Val Asp Val			
705	710	715	720
Thr Asp Thr Pro Tyr Gln Glu Met Val Asp Ala Ala Lys Glu Val Asn			
	725	730	735
[0012]			
Ala Lys Ile Tyr Thr Glu Arg Leu Gly Ser Lys			
	740	745	
<210>	4		
<211>	368		
<212>	PRT		
<213>	Saccharophagus degradans 2-40		
<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	
[0013]	Glu Val Leu Arg His Asn Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val	
	130 135 140	
	Lys Ala Pro Tyr Leu Asn Arg Ser Leu Glu His Ile Ala Ile Ala Tyr	
	145 150 155 160	
	Ser Asp Ser Pro Phe Gly Pro Trp Thr Lys Ser Asp Ala Pro Ile Leu	
	165 170 175	
	Ser Pro Glu Asn Asp Gly Val Trp Asp Thr Asp Glu Asp Asn Arg Phe	
	180 185 190	
	Leu Val Lys Glu Lys Gly Ser Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro	
	195 200 205	
	Cys Leu Met Phe Phe Asn Asn Arg Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu	
	210 215 220	

Thr Met Gly Glu Ser Met Asn Met Gly Gly Arg Glu Ile Lys His Gly
225 230 235 240

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

Asn Pro Ile Thr Asn Ser Gly His Glu Val Ala Val Trp Pro Tyr Lys
260 265 270

Gly Gly Met Ala Thr Met Leu Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr
275 280 285

[0014] 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

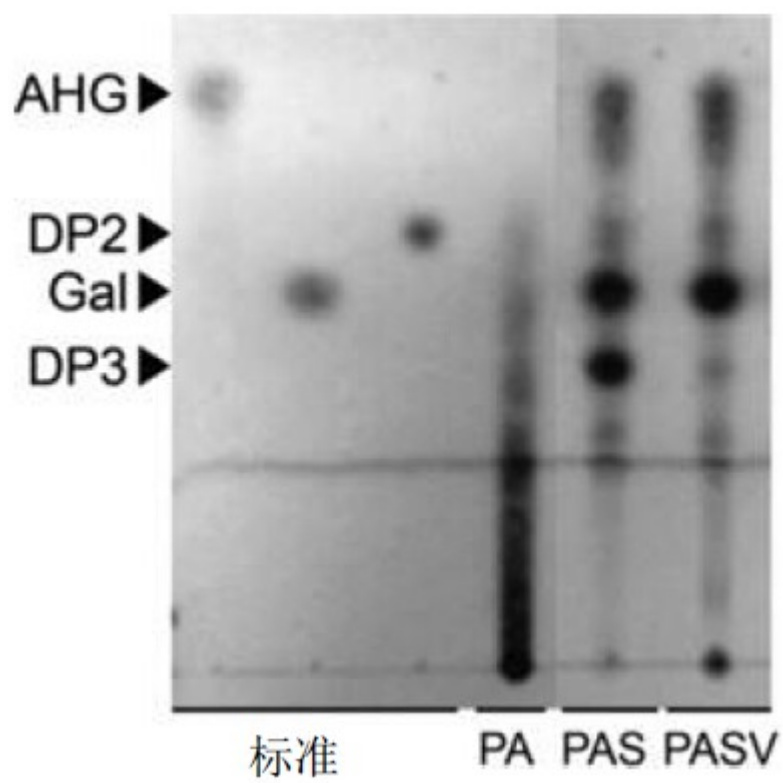


图1

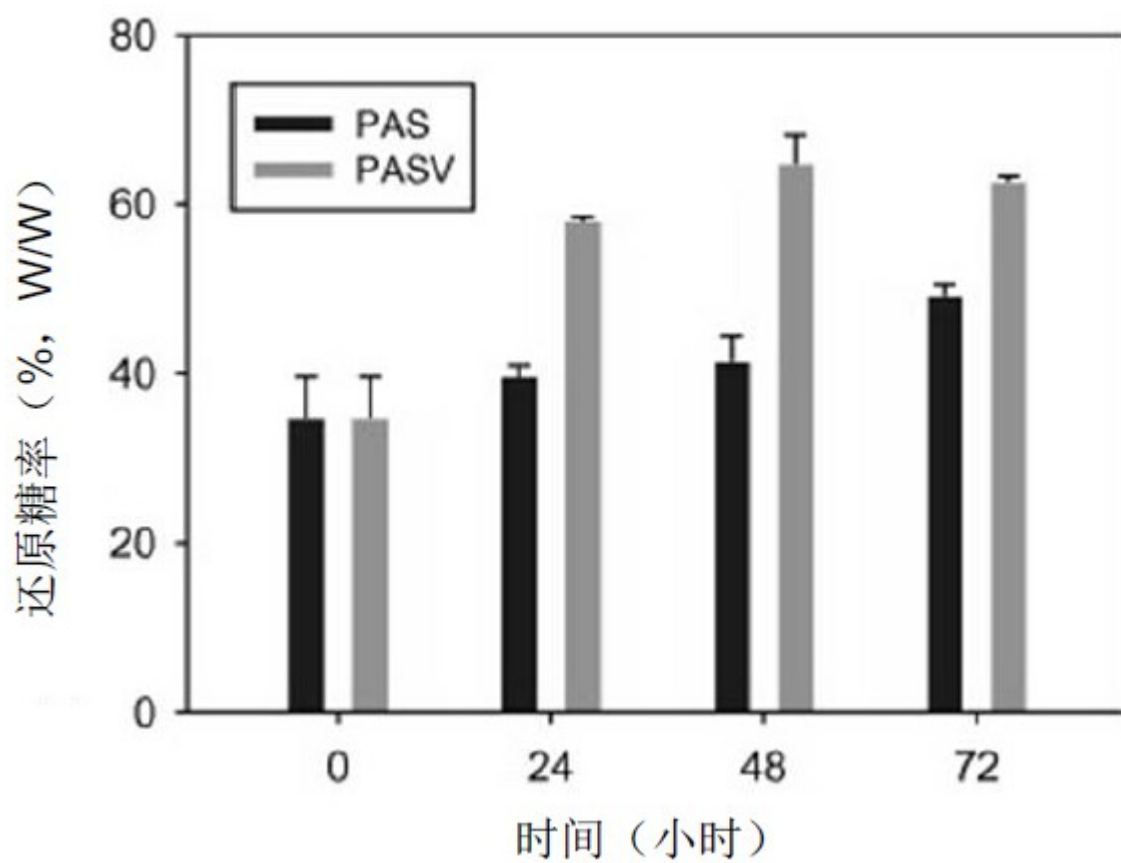


图2

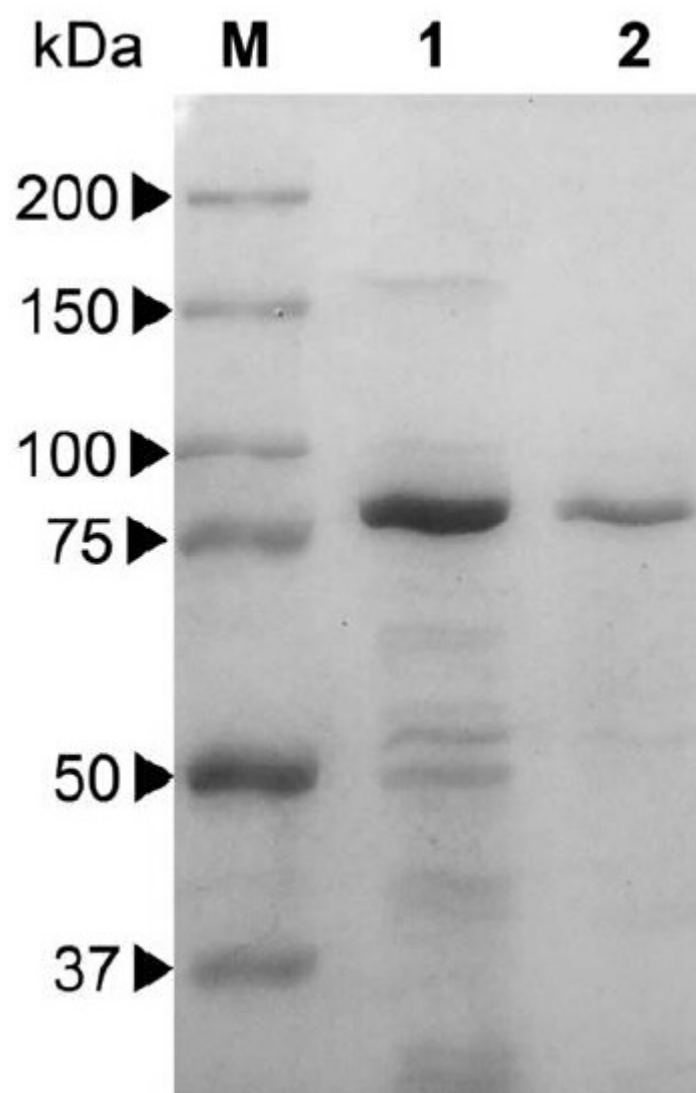


图3

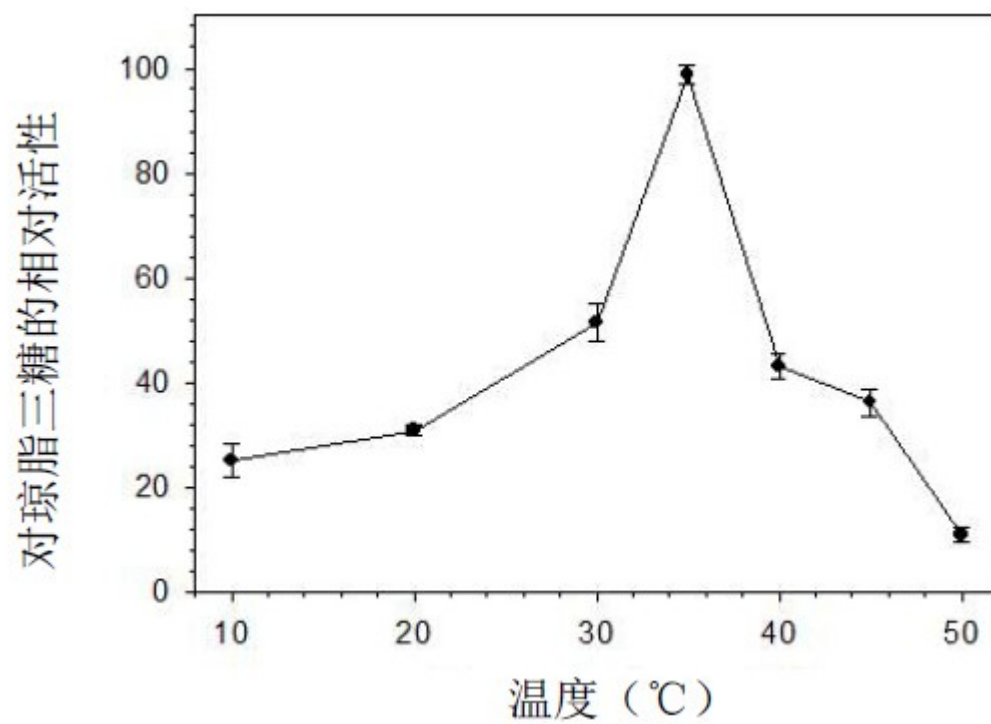


图4a

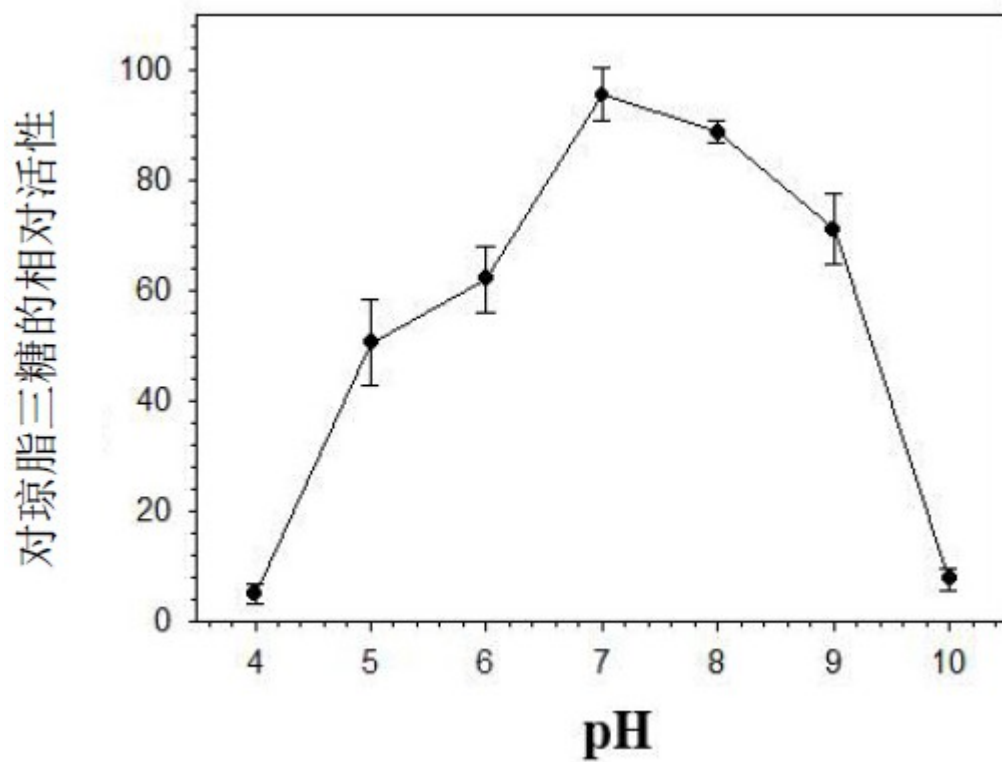


图4b

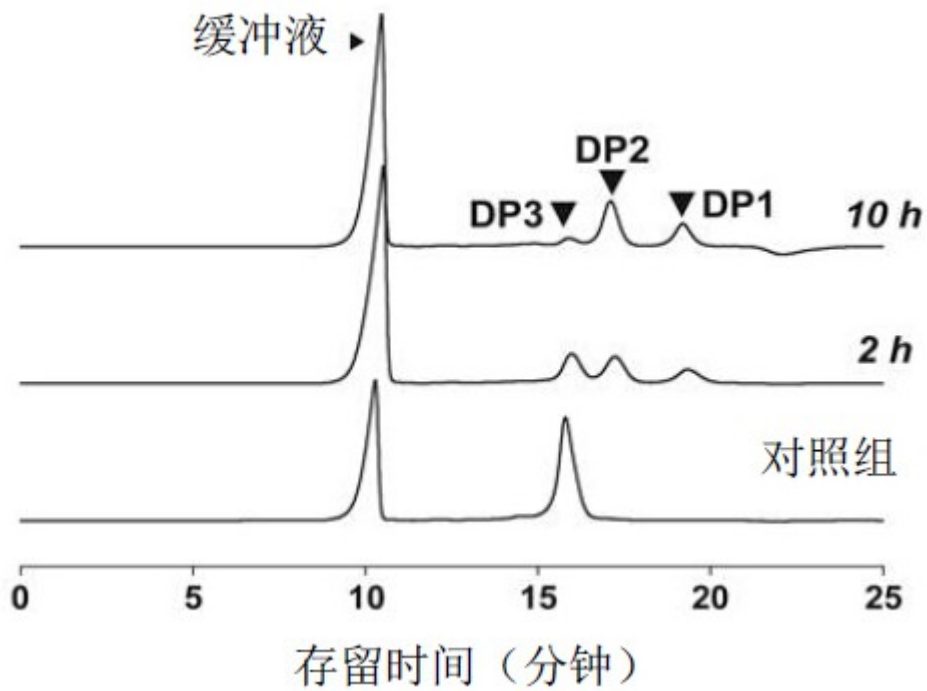


图5a

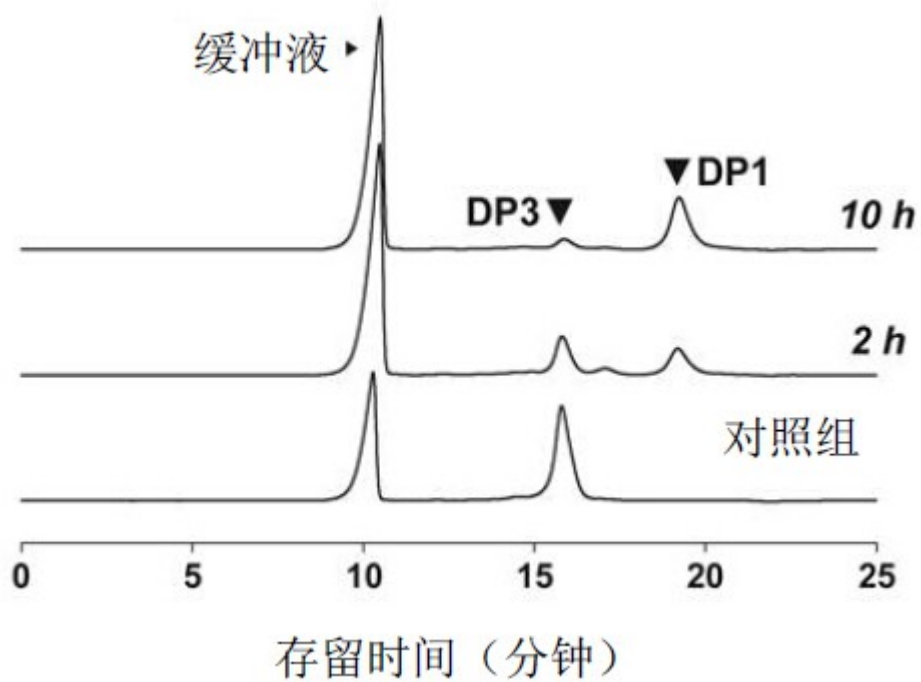


图5b

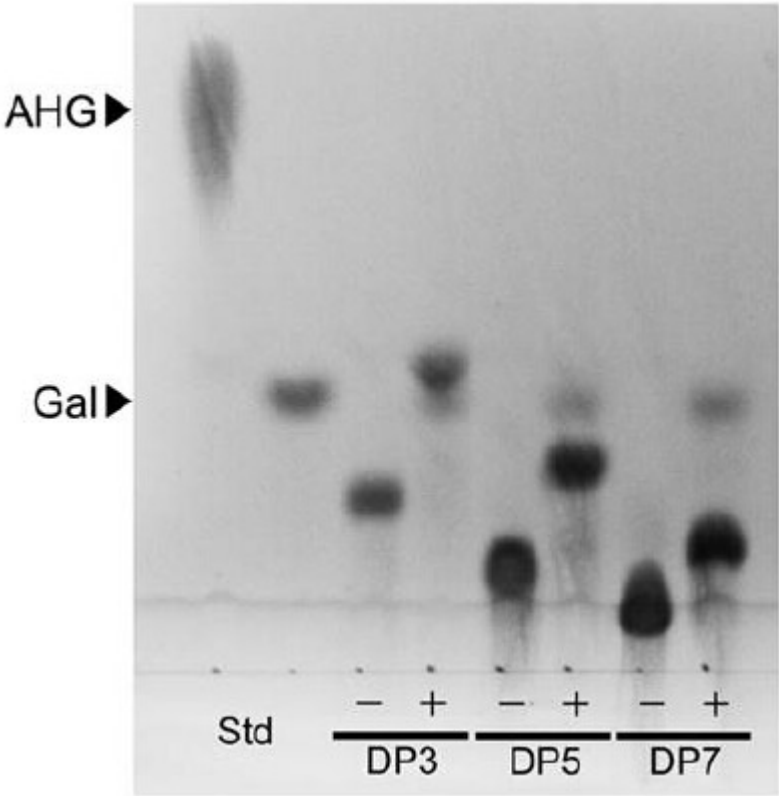


图6a

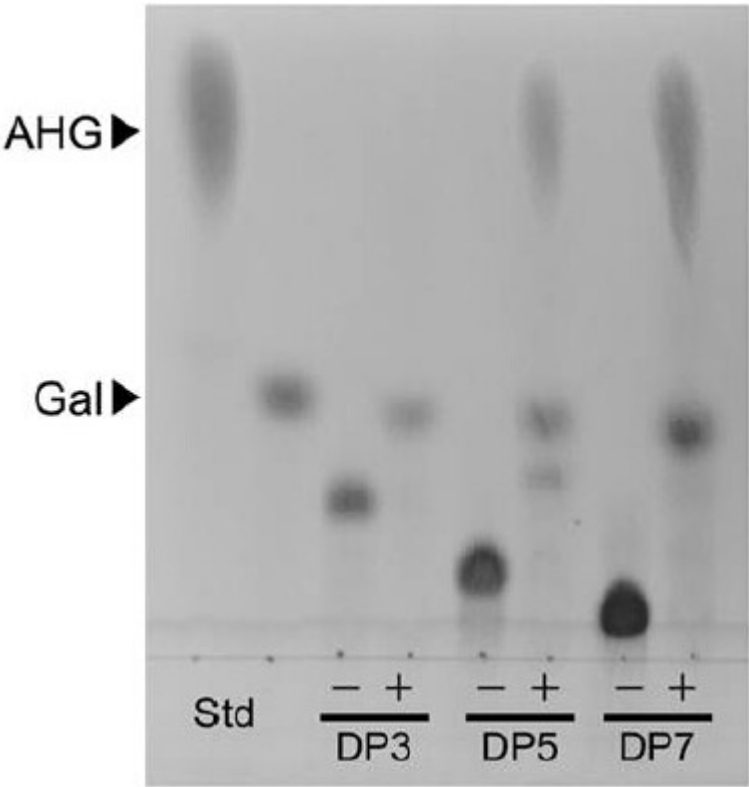


图6b

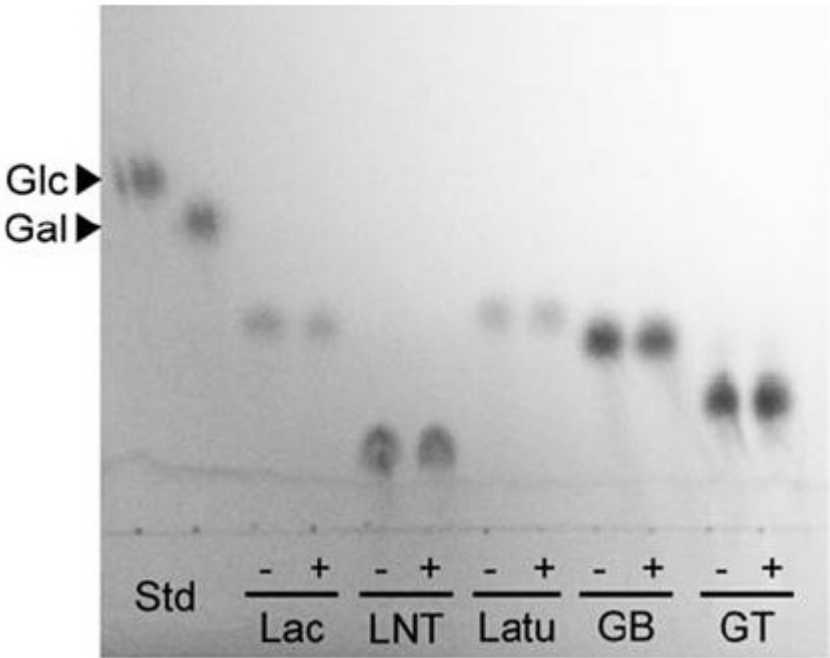


图7

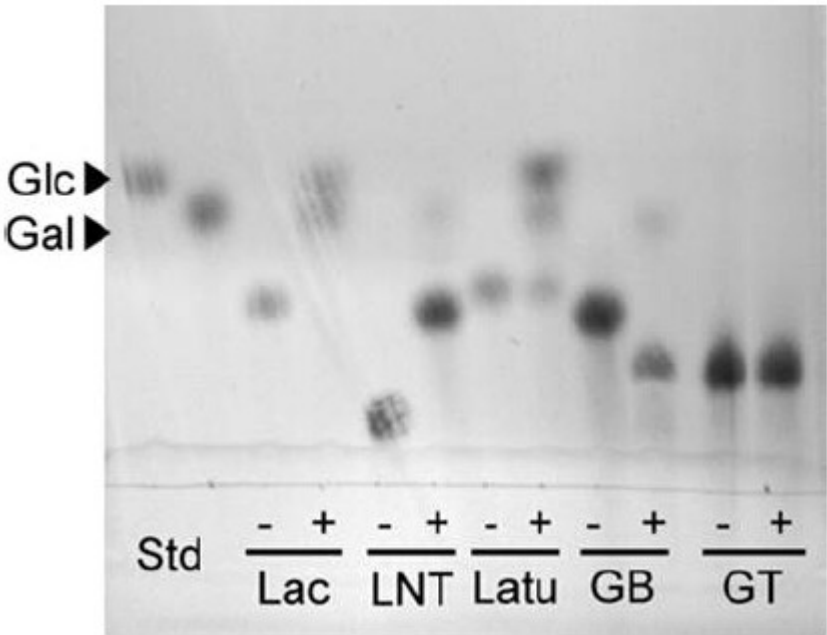


图8a

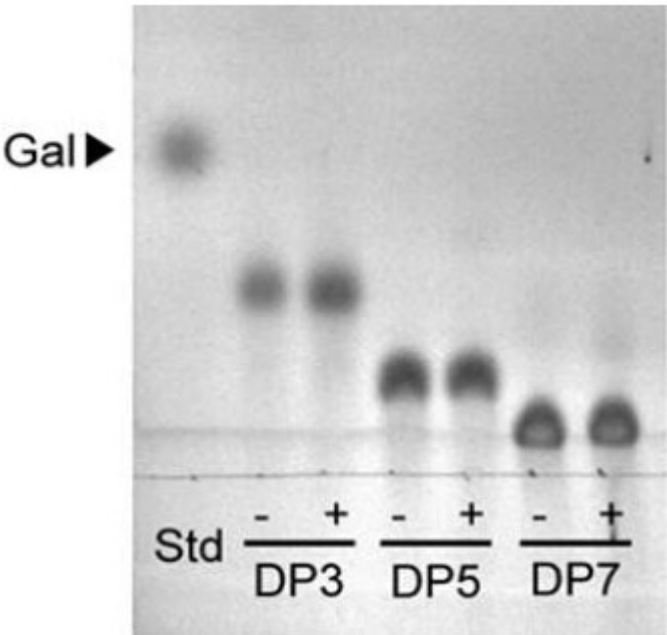


图8b

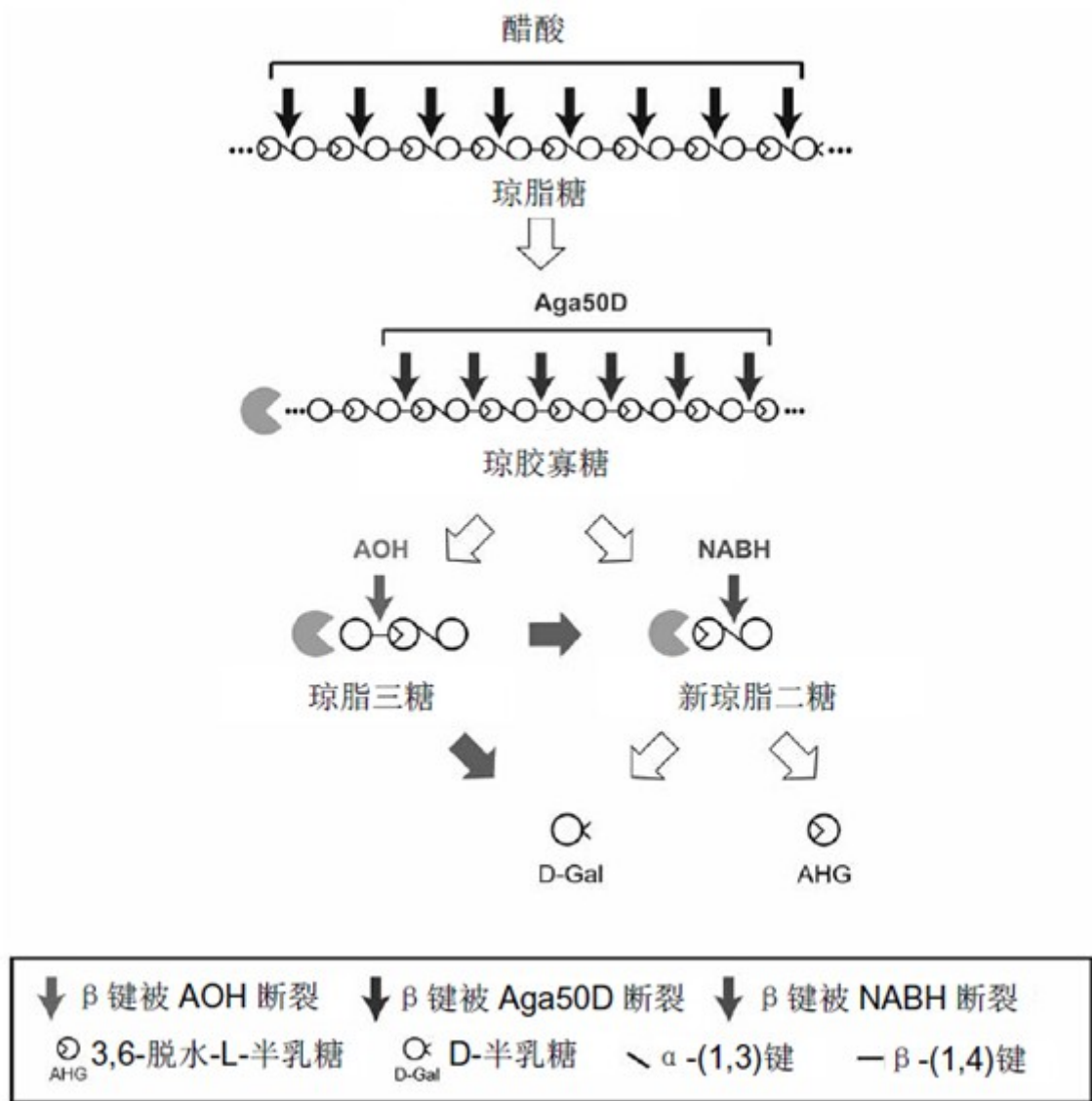


图9