



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109072268 B

(45) 授权公告日 2022. 05. 17

(21) 申请号 201780007218.1

(22) 申请日 2017.01.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109072268 A

(43) 申请公布日 2018.12.21

(30) 优先权数据
10-2016-0006589 2016.01.19 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.07.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2017/000561 2017.01.17

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/126862 KO 2017.07.27

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔市城北区安岩路145 (邮递区
号:02841)

(72) 发明人 金京宪 崔仁杰 金晶铉 尹银珠

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理
有限公司 11205
专利代理师 彭雪瑞 臧建明

(51) Int.Cl.
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)

(56) 对比文件
KR 10-2015-0043040 A, 2015.04.22
Hee Taek Kim et al.. "The complete
enzymatic saccharification of agarose and
its application to simultaneous
saccharification and fermentation of
agarose for ethanol production".
《Bioresource Technology》. 2011, 第107卷第
301页摘要, 第302页图1和右栏第2.1节, 第303页
左栏第2.4节, 第304页右栏第1段.

审查员 赵二双

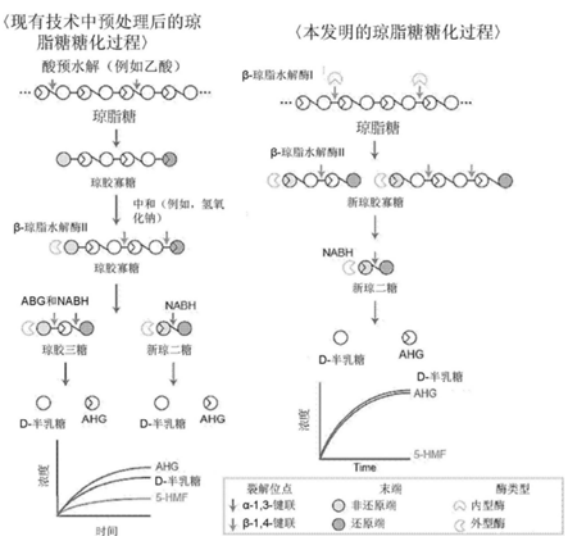
权利要求书1页 说明书11页
序列表8页 附图7页

(54) 发明名称

用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的组合物及方法。更具体来说,在本发明中,包括耐热琼脂水解酶的组合物可用于通过有效地分解琼脂糖或琼脂来以高产率制备半乳糖和3,6-脱水-L-半乳糖,而无需化学预处理、中和过程或琼胶三糖水解酶处理过程。



1. 一种用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的方法,其特征在于,包括:

使琼脂糖或琼脂相继与耐热琼脂水解酶、外型琼脂水解酶以及 α -新琼二糖水解酶进行反应,其中在未预处理琼脂糖或琼脂的情况下执行所述反应,

其中所述耐热琼脂水解酶与琼脂糖或琼脂的所述反应在40℃到60℃的温度范围内、在0转/分钟到300转/分钟的条件以及pH 5到9下进行30分钟到7天,

其中所述耐热琼脂水解酶由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示,所述外型琼脂水解酶由SEQ ID NO:3的氨基酸序列表示,且所述 α -新琼二糖水解酶由SEQ ID NO:4的氨基酸序列表示。

2. 根据权利要求1所述的用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的方法,其中通过所述外型琼脂水解酶以及所述 α -新琼二糖水解酶的所述反应在20℃到40℃的温度范围内以及在0转/分钟到200转/分钟的条件下进行30分钟到7天。

用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的组合物及方法。

背景技术

[0002] 主要多糖构成的红藻是琼脂糖,即一种聚合物,其中3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖通过 α -1,3键和 β -1,4键交联。琼脂糖具有以下特征:在普通温度下于水中具有低溶解度,且在高温下溶解于水中,而在冷却下来时变为硬胶。由于这些特征,因此存在的问题在于单糖通过仅利用酶促糖化分解琼脂糖来获得。

[0003] 在先前研究中,单糖3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖在通过使用作为弱酸的乙酸(3%)来化学液化琼脂糖以便分解琼脂糖的预处理之后,通过利用外型(exo-type) β -琼脂水解酶和 α -新琼二糖水解酶(α -neoagarobiase hydrolase;NABH)糖化琼脂糖来制备(HT Kim)等人,生物资源技术(Bioresour.Technol.) (2012) 107:301-306,HT金等人,生物资源技术(2013) 136:582-587)。从而,先前研究成功提高从琼脂糖获得的单糖的产率。

[0004] 另外,最近,已研发通过使用外型 β -琼脂水解酶、NABH以及琼脂降解 β -半乳糖苷酶(agarolytic β -galactosidase)(CH李(CH Lee)等人,环境微生物学应用(Appl.Environ.Microbiol.) (2014) 80:5965-5973)而非弱酸来糖化琼脂糖而获得单糖的方法,所述琼脂降解 β -半乳糖苷酶是通过使用Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)来分解琼胶三糖连同琼脂基质的酶,所述琼胶三糖是在高温下预处理之后作为副产物残余的丙糖,所述Tris-HCl缓冲液是低浓度的中性缓冲液(CH李等人,生物化学进程(Process Biochem.) (2015) 50:1629-1633)。过程的益处在于不使用昂贵化学催化剂乙酸,且优点在于可通过使中和过程降到最少来显著减少盐的形成。

[0005] 然而,使用酸或缓冲液的预处理方法的问题在于形成盐或产生5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural;5-HMF)。另外,因为在高温(在缓冲液预处理时170℃)下进行预处理,所以需要使用微波设备或高温反应器,这可在大批量生产时的规模扩展和装置的高成本方面成为一大限制。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的是提供能够通过包含耐热琼脂水解酶的酶促混合液以高产量制备还原糖而无需高温下溶解于水中的琼脂糖或琼脂的水解反应中的化学预处理的新颖耐热琼脂水解酶,以及用于制备单糖的包含耐热琼脂水解酶的酶促混合液的用途。

[0008] 技术解决方案

[0009] 为了实现目标,本发明提供用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的组合物,所述组合物包括:耐热琼脂水解酶,包含氨基酸序列SEQ ID NO:1;外型琼脂水解酶;以及 α -新琼二糖水解酶。

[0010] 本发明还提供用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的方法,所述方法包括使作

为基质的琼脂糖或琼脂与用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的前述组合物反应。

[0011] 有利效应

[0012] 本发明具有通过在不存在化学预处理、中和、琼胶三糖水解酶处理的情况下使用耐热琼脂水解酶来有效地分解琼脂糖或琼脂的简单方法,且可在无任何副产物的情况下以高产率制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖。

附图说明

[0013] 图1是在1%琼脂糖冷却下来时确认的琼脂糖的溶胶-凝胶相变分析结果。

[0014] 图2是SDS-PAGE结果,其中过度表达和纯化Aga16B,线M指示蛋白质序列梯,线1指示粗蛋白质,线2指示循环His-Trap柱和离开His-Trap柱的样本,线3指示在具有EQ缓冲液的柱中流动的样本,且线4、线5以及线6指示纯化的Aga16B。

[0015] 图3a是测量Aga16B的最佳pH的结果,且图3b是测量Aga16B的最佳反应温度的结果。

[0016] 图4是关于Aga16B在各种温度下的稳定性的实验结果。

[0017] 图5是说明根据初始速率的Aga16B蛋白加样量的效应的结果。

[0018] 图6a是Aga16B反应产物的TLC分析结果,且图6b是Aga16B反应产物的HPLC分析结果。

[0019] 图7a说明Aga16B反应产物的MALDI-TOF/TOF MS确认结果,图7b说明Aga16B反应产物的DP4的串联MS分析结果,且图7c说明Aga16B反应产物的DP6的串联MS分析结果。

[0020] 图8是观测由Aga16B液化的琼脂糖的程度的结果。

[0021] 图9a是说明通过Aga16B、Aga50D以及NABH的琼脂糖的酶促糖化的TLC分析结果,加工步骤编号1是5%琼脂糖基质,加工步骤编号2是在琼脂糖与Aga16B反应之后的反应产物,加工步骤编号3是相对于Aga16B反应产物的Aga15D反应产物,且加工步骤编号4是相对于Aga15D反应产物的NABH反应产物。

[0022] 图9b是说明通过Aga16B、Aga50D以及NABH的琼脂糖的酶促糖化的HPLC分析结果。

[0023] 图10是说明根据现有技术和本发明的通过Aga16B、Aga50D以及NABH的琼脂糖的糖化过程的示意图。

具体实施方式

[0024] 在下文中,将详细描述本发明的配置。

[0025] 本发明涉及用于产生半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的组合物,包括:包含SEQ ID NO:1氨基酸序列的耐热琼脂水解酶;外型琼脂水解酶;以及 α -新琼二糖水解酶。

[0026] 另外,本发明提供用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的方法,方法包括使作为基质的琼脂糖或琼脂与用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的前述组合物反应。

[0027] 本发明人已研发一种处理方法,所述处理方法用于通过将耐热琼脂水解酶Aga16B应用到省略化学处理过程的过程来以高产率制备3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖且允许三种酶(Aga16B、Aga50D以及NABH)相继与琼脂糖基质反应以仅通过酶促糖化分解琼脂糖,以便改良现有技术中已知的使用乙酸的预处理方法和使用Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)的热水预处理方法,且此外,解决在中和过程期间伴随这些预处理方法的产生盐的问题和在处理

过程期间在高温下3,6-脱水-L-半乳糖过度分解为5-HMF且因此糖化产率降低的问题。

[0028] 因此,根据本发明的半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖可通过以下来制备:使耐热琼脂水解酶与琼脂糖或琼脂反应,且随后使由此获得的反应产物与外型琼脂水解酶和 α -新琼二糖水解酶反应。

[0029] 根据本发明的用于通过使用耐热内型琼脂水解酶、外型琼脂水解酶以及 α -新琼二糖水解酶从琼脂糖或琼脂制备3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖而无需弱酸或缓冲液预处理过程的方法具有以下益处(参看图10)。1) 因为不使用昂贵乙酸,所以存在减小成本的效应。另外,因为最终分解产物中的3,6-脱水-L-半乳糖是还可用作化妆品功能材料,所以不使用引起不适气味的乙酸的事实是最大优势中的一个。2) 未形成在中和过程中产生的如乙酸钠的盐。3) 由于未产生如5-HMF的过度分解产物,所以可提高制备单糖的产率。4) 由于现存化学处理过程需要如微波的设备,而酶促过程在低温下进行,所以不需要高温调整设备,以使得在规模扩展上有益。5) 当使用三种类型的酶类时,琼胶三糖并不作为分解产物产生,以使得不需要使用琼胶三糖水解酶。

[0030] 耐热琼脂水解酶是内型(endo-type)琼脂水解酶,且在琼脂糖的酶促液化中水中的溶胶状琼脂糖可比凝胶状的琼脂糖更易于接近酶,因此由于将耐热内型 β -琼脂水解酶Aga16B评估为琼脂糖液化酶,所以Aga16B在超出1% (w/v) 琼脂糖于水中的溶胶-凝胶转变温度(约35°C)至多50°C时维持高热稳定性,且更具体地说,在约55°C下呈现最佳活性,且在室温到60°C时呈现琼脂糖或琼脂的分解活性,因此Aga16B表征为适合于相对较高温度下的琼脂糖的酶促液化。因此,Aga16B表征为能够在琼脂糖或琼脂保持液态的温度、即约35°C或高于35°C的范围内呈现活性。

[0031] 确认的是,耐热琼脂水解酶使用琼脂糖或琼脂作为基质,且酶反应产物是分别具有4和6的聚合度(Degree of polymerization;DP)的新琼四糖和新琼六糖。

[0032] 当相继处理均为外型琼脂水解酶的外型琼脂水解酶和 α -新琼二糖水解酶时,耐热琼脂水解酶可呈现与通过现有技术中的化学预处理所获得的糖化产率相比改良的糖化产率。根据特定示范性实施例,糖化产率与获得现有缓冲液预处理相比提高了约1.6倍(理论最大值(theoretical maximum)的72.5%)。

[0033] 耐热琼脂水解酶不仅可通过在酶的编码区之前和之后的区域而且还可通过DNA区段来转录和转译,所述DNA区段与包含个别编码区段、即编码基因之间的中间序列的多肽的产生相关。举例来说,耐热琼脂水解酶可从SEQ ID NO:2中所阐述的序列转录和转译,但不特别限于此。另外,作为具有酶的一或多种替代、缺失、易位、添加等的变异蛋白的具有水解成新琼四糖或新琼六糖的活性的蛋白质也包含在本发明的酶的权利范围中,并且优选地,包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与阐述于SEQ ID NO:1中的氨基酸序列具有80%或高于80%、85%或高于85%、90%或高于90%、93%或高于93%、94%或高于94%、95%或高于95%、96%或高于96%、97%或高于97%、98%或高于98%以及99%或高于99%的序列一致性。

[0034] 耐热琼脂水解酶可来源于变形菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T,但不特别限于此。

[0035] 耐热琼脂水解酶可与变形菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T培养基的上清液分离和纯化,且可通过使用基因工程重组技术由除变形菌(*Saccharophagus degradans*) 2-

40^T外的菌株或人工化学合成方法以及类似方法制备和分离。当使用重组技术时,耐热琼脂水解酶可通过替换通过转化大肠杆菌来转化大肠杆菌培养基的上清液或上清液流体来使用,但方法不特别限于此。根据特定示范性实施例,耐热琼脂水解酶可从由包含阐述于SEQ ID NO:2中的碱基序列的重组载体转化的大肠杆菌或其培养基获得。

[0036] 耐热琼脂水解酶以及琼脂糖或琼脂可通过在pH 5到9下、0转/分钟到300转/分钟的条件下、40℃到60℃的温度范围内反应30分钟到7天来制备新琼四糖或新琼六糖。

[0037] 外型琼脂水解酶是将琼胶寡糖(agarooligosaccharide)分解成新琼二糖和琼胶三糖(D-半乳糖-β-1,4键联-3,6-脱水-L-半乳糖-α-1,3键联-D-半乳糖)的酶和裂解琼脂糖中的D-半乳糖与3,6-脱水-L-半乳糖之间的β-1,4-糖苷键的酶(在下文中,也称为‘Aga50D’)。

[0038] 对于外型琼脂水解酶,不仅阐述于SEQ ID NO:3中的氨基酸序列而且蛋白质也包含在本发明的酶的权利范围中,所述蛋白作为具有酶的一或多种替代、缺失、易位、添加等的变异蛋白具有琼胶寡糖水解活性,且优选地,外型琼脂糖可包含阐述于SEQ ID NO:3中的氨基酸序列和与序列具有以下序列一致性的氨基酸序列:80%或高于80%、85%或高于85%、90%或高于90%、93%或高于93%、94%或高于94%、95%或高于95%、96%或高于96%、97%或高于97%、98%或高于98%以及99%或高于99%。

[0039] 外型琼脂水解酶可来源于变形菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T,但不特别限于此。

[0040] 外型琼脂水解酶可与变形菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T培养基的上清液分离和纯化,且可通过使用基因工程重组技术通过除变形菌2-40^T外的菌株或人工化学合成方法以及类似方法来制备和分离。

[0041] 当使用重组技术时,为了有助于典型重组蛋白表达,例如,有可能使用如耐抗生素基因和报告基因蛋白或肽的因素,所述报告基因蛋白或肽可用于亲和柱层析,且技术对应于本发明涉及的领域的技术人员可易于执行的范围。举例来说,外型琼脂水解酶可用作通过转化例如酵母菌的可食用菌株所转化的酵母菌培养基的上清液的替换。对于更特定的制备技术,可参考韩国专利申请案公开号2010-0040438(2010年4月20日)。

[0042] 琼胶寡糖与外型琼脂水解酶的反应可在20℃到40℃的温度范围内进行30分钟到7天。更确切地说,反应可在25℃到35℃的温度范围内进行1天到4天。

[0043] 对于可将新琼二糖分解成3,6-脱水-L-半乳糖和D-半乳糖的α-新琼二糖水解酶(也称为‘SdNABH’),不仅阐述于SEQ ID NO:4中的氨基酸序列而且蛋白质也包含在本发明的酶的权利范围中,所述蛋白质作为具有酶的一或多种替代、缺失、易位、添加等的变异蛋白具有新琼二糖水解活性,且优选地,α-新琼二糖水解酶包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与阐述于SEQ ID NO:4中的氨基酸序列具有80%或高于80%、85%或高于85%、90%或高于90%、93%或高于93%、94%或高于94%、95%或高于95%、96%或高于96%、97%或高于97%、98%或高于98%以及99%或高于99%的序列一致性。

[0044] α-新琼二糖水解酶可来源于变形菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T,但不特别限于此。

[0045] α-新琼二糖水解酶可与变形菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T培养基的上清液或上清液流体分离和纯化,且可通过使用基因工程重组技术通过除变形菌

(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T外的菌株或人工化学合成方法以及类似方法来制备和分离。对于更特定的制备技术,可参考韩国专利申请案公开号2013-0085017(2013年7月26日)。

[0046] 新琼二糖与 α -新琼二糖水解酶的反应可在20℃到40℃的温度范围内进行30分钟到7天。更确切地说,反应可在25℃到35℃的温度范围内进行1天到4天。

[0047] 对于新琼二糖的分解产物,呈大致95%高纯度的3,6-脱水-L-半乳糖可通过相继进行硅胶层析和生物凝胶P2层析来分离和纯化,所述硅胶层析是吸附层析,所述生物凝胶P2层析是凝胶渗透层析。

[0048] 在本发明书中,“蛋白质”和“多肽”可互换地使用。

[0049] 在本发明中,多肽与另一序列具有特定比率(例如,80%、85%、90%、95%或99%)的序列一致性是指,当两个序列对准时,所述比率的氨基酸残基在比较序列时彼此相同。对准和百分比同源性或一致性可通过使用本领域中公开已知的任何适合的软件程序中所描述的那些程序来确定,例如,文献[现代分子生物学实验指南(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)(F.M.奥斯贝(F.M.Ausubel)等人,(编)1987副刊30章节7.7.18)]。优选程序的实例包含:GCG Pileup程序、FASTA(皮尔逊(Pearson)等人,1988美国科学院院刊(Proc.Natl Acad.Sci USA) 85:2444-2448)以及BLAST(BLAST手册(BLAST Manual),阿尔丘尔(Altschul)等人,国立生物技术信息中心、国立医学图书馆(Natl.Cent.Biotechnol.Inf.,Natl Lib.Med.)(NCBI NLM NIH),贝塞斯达(Bethesda)、MD以及阿尔丘尔等人,1997NAR25:3389-3402)。另一优选对准程序是ALIGN Plus(科学与教育软件(Scientific and Educational Software),宾夕法尼亚州(PA)),且优选地,使用默认参数。另一可获得的序列软件程序是在序列软件包版本6.0(Sequence Software Package Version 6.0)(遗传学计算机组(Genetics Computer Group),威斯康星大学,麦迪逊(Madison),威斯康星州(WI))中可获得的TFASTA数据搜索程序。

[0050] 在本发明中,当与细胞、核酸、蛋白质或载体结合使用时,术语“重组”指示细胞、核酸、蛋白质或载体已通过引入异源核酸或蛋白或改变初始核酸或蛋白质来修改,或指示细胞来源于由此所修改的细胞。也就是说,例如,重组细胞表达未在初始(非重组)形式的细胞内发现的基因,或否则,重组细胞表达非正常地表达或在表达期根本未表达的初始基因。

[0051] 在本发明书中,“核酸”包涵单链或双链DNA和RNA及其化学变体。“核酸”和“多核苷酸”在本申请案中可互换地使用。因为基因密码简并,所以可使用一或多种密码子,以便对特定氨基酸进行编码,且本发明包涵编码特定氨基酸序列的多核苷酸。

[0052] 核酸序列插入到细胞中的术语“引入”是指“转染(transfection)”或“转化”或“转导(transduction)”,且包含将核酸序列整合到真核细胞或原核细胞中的参考,且在这种情况下,核酸序列整合到细胞的基因组(例如,染色体、质粒、质体或线粒体DNA)中,且由此转换成自主复制子或瞬时表达。

具体实施方式

[0053] 在下文中,将通过根据本发明的实例更详细地描述本发明,但本发明的范围不限于下文所建议的实例。

[0054] <实例1>通过冷却来测量琼脂糖的溶胶-凝胶相变

[0055] 为了观测在高温下溶解于水中的呈溶液状态的琼脂糖在降低温度时变成凝胶状

态的温度间隔,通过使用特定旋光度(specific optical rotation)同时在冷却时的1% (w/v) 琼脂糖溶解于20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)中之后将琼脂糖从80℃冷却到10℃来测量琼脂糖的溶胶-凝胶相变。

[0056] 如图1中所示,可确认的是,琼脂糖在小于35℃的温度下胶凝化。

[0057] <实例2>克隆和表达Aga16B

[0058] 在来自海洋细菌变形菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40的内型 β -琼脂水解酶aga16B基因(Sde_1175;UniProt寄存编号Q21LJ2)通过克隆到pET21a质粒中来引入到大肠杆菌中之后,过度表达Aga16B酶纯化且用于酶反应。

[0059] 出于此目的,基因组DNA通过使用商业DNA试剂盒(柏业,韩国)来纯化,且Aga16B通过PCR来扩增。在这种情况下,引物是Aga16B-N,5-AAA GGATCC ATGGCAGATTGGGACGGAATT-3 (Tm:59.4) (SEQ ID NO:5);以及Aga16B-C,5-AAAGCGGCCGC GTTGCTAAGCGTGAAGTTATCTA-3 (Tm:59.3) (SEQ ID NO:6)。

[0060] PCR产物是去除定位于Aga16B的N端处的氨基酸19-20处的信号序列的产物。BamHI和NotI用作限制酶,且定位于N末端和C末端的5区和3区处。PCR产物和pET21a分别用BamHI和NotI切割,且使用T4 DNA连接酶连接在一起。且随后,所得载体转化入BL21大肠杆菌。

[0061] 为了从每一基因产生重组蛋白,将所转化大肠杆菌接种到含有50微克/毫升安比西林的介质中,且在37℃下生长。当所转化大肠杆菌生长直到指数生长期中期(mid-exponential phase)为止时,在添加0.1毫摩尔异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)之后在16℃下诱发蛋白质表达16小时。其后,通过以8,000转/分钟在4℃下离心20分钟来收集细胞,且随后再悬浮于溶胞缓冲液(20毫摩尔磷酸钠和500毫摩尔氯化钠,pH 7.4)中,且使用超声发生器破碎细胞。细胞以16,000转/分钟在4℃下离心1小时。在通过使用His-Trap柱(通用电气医疗集团(GE Healthcare))来纯化和通过使用阿米康(Amicon)超过滤膜来浓缩蛋白质之后,通过SDS-PAGE来识别Aga16B蛋白。Aga16B的浓度使用BCA蛋白分析试剂盒来测量。

[0062] 如图2中所示,识别对应于Aga16B的大小为63.7千道尔顿的条带。

[0063] <实例3>测量Aga16B的活性、最佳pH以及温度

[0064] 通过在121℃下将1% (w/v) 琼脂糖溶解于高压釜中的3毫升的20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)中10分钟来制备基质,且随后将0.0625微摩尔Aga16B蛋白添加到其中,且在45℃下以200转/分钟使所得混合物反应30分钟。

[0065] 另外,监测Aga16B的最佳反应温度和pH。对于最佳温度实验,通过将1% (w/v) 琼脂糖放到20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)中且在121℃下溶解琼脂糖10分钟来制备基质,在将基质从70℃冷却到30℃时,纯化实例2中过度表达的Aga16B,且放入基质中,以使琼脂糖的浓度呈4毫克/克,且以200转/分钟使所得混合物反应。

[0066] 对于最佳pH实验,制备琼脂糖以便在每一缓冲液中通过使用20毫摩尔磷酸钠缓冲剂(pH 5到7)、20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.5到9)以及20毫摩尔硼酸盐缓冲液(pH 9.5到11)来使浓度为1% (w/v),且随后通过在121℃下于高压釜中溶解琼脂糖10分钟来制备基质,将与最佳温度实验中相同的量的蛋白量添加到其中,且在45℃下以200转/分钟使所得混合物反应30分钟。

[0067] 对于所有三个实验而言,在蛋白质反应之后在95℃下灭活蛋白质1分钟之后,通过

以16,000转/分钟离心10分钟来产生上清液,上清液以1:1的比率与二硝基水杨酸(DNS)试剂混合,在95℃下使所得混合物反应5分钟,且随后通过使用微板读数仪测量540纳米下的吸收率来测量反应产物的还原糖。在这种情况下,半乳糖用作标准材料。

[0068] 如图3a中所示,Aga16B的最佳pH是7.5,但类似于温度,在pH 5.5到pH 8.5的广泛范围内呈现高活性。另外,如图3b中,已经表明酶在40℃或高于40℃的温度下具有活性,其中琼脂糖以溶胶(液体)状态存在,且直到60℃为止酶的活性显示为高的。另外,酶的最佳温度显示为55℃,且高酶促活性显示为保持在40℃到60℃的广泛范围内。

[0069] <实例4>Aga16B的热稳定性实验

[0070] 为了进行Aga16B的热稳定性实验,通过引入20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)和1% (w/v) 琼脂糖基质且随后使用高压釜在121℃下溶解10分钟来制备基质,且随后在40℃、45℃、50℃、55℃、60℃以及65℃下预培养Aga16B蛋白,将Aga16B添加到其中,以使琼脂糖的浓度呈4毫克/克,且随后通过DNS反应通过在0分钟、10分钟、20分钟、30分钟、60分钟、90分钟以及120分钟时执行取样同时在45℃下且以200转/分钟使所得混合物反应来测量反应产物的还原糖。

[0071] 如图4中所示,可确认的是,Aga16B在40℃、45℃以及50℃下稳定,且在55℃或高于55℃下酶促活性与初始水平相比在30分钟内减小了小于20%,且因此,稳定性降低。

[0072] <实例5>测量适合Aga16B蛋白加样量

[0073] 由于需要确定酶的加样量以便将Aga16B蛋白应用到过程,所以进行测量适合的加样量的实验。

[0074] 在1% (w/v) 琼脂糖基质、pH 7.0以及45℃的酶反应条件下测量适合的Aga16B加样量,且通过改变Aga16B加样量来比较初始反应速率。

[0075] 如图5中所示,通过Aga16B所获得的初始速率增加直到Aga16B的酶加样增加到42U/g琼脂糖。即使Aga16B的加样量增加到高于42U/g琼脂糖的Aga16B加样量,酶反应的初始速率也几乎保持恒定。本实验的结果是,42U/g琼脂糖下的Aga16B加样与8毫克Aga16B/克琼脂糖的相同。

[0076] <实例6>金属离子对Aga16B酶促活性的影响

[0077] 金属离子对Aga16B酶促活性的影响通过选择0.1% (w/v) 琼脂糖作为基质和各种金属离子中的一种来测试。

[0078] 如表1中所显示,大部分离子并不影响Aga16B的酶促活性,但CuCl₂和FeCl₂将Aga16B的酶促活性分别显著降低到最大活性的76.6%和82.6%。

[0079] [表1]

[0080] 金属离子对Aga16B相对活性的影响

	金属盐	相对活性%
[0081]	对照组 ^a	100.0 ± 0.3
	CuCl ₂	76.6 ± 0.6
	MgCl ₂	99.1 ± 0.1
	MnCl ₂	93.4 ± 0.5
	CaCl ₂	96.5 ± 0.2
	FeCl ₂	82.6 ± 0.7
	NH ₄ Cl	97.9 ± 0.1
	KCl	96.8 ± 0.3
	NaCl	93.0 ± 0.3

[0082] ^a当金属离子不存在时酶促活性设定为100%。实验值表达为从三次重复实验获得的平均值±标准偏差。

[0083] <实例7>Aga16B的动力参数

[0084] 为了测量Aga16B的动力参数,在pH 7.0和45℃下于3毫升全部反应混合物体积中进行酶反应,所述反应混合物体积包含每琼脂糖浓度(0.5%到2% (w/v)) 0.04毫克/毫升纯化的Aga16B。反应时间对于0.5%和1% (w/v) 琼脂糖而言为6分钟,且对于1.5%和2% (w/v) 琼脂糖而言为10分钟。 $V_{\max}$ 和 K_m 根据利-伯二氏绘图(Lineweaver-Burk plot)计算。且随后,Aga16B的这些动力常量与属于GH16的其它β-琼脂水解酶的动力常量相比较,所述其它β-琼脂水解酶也即是,源自如天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)、延长微泡菌(*Microbulbifer elongatus*) JAMB-A7以及白色噬琼胶菌(*Agarivorans albus*) YKE-34的海洋细菌的β-琼脂水解酶。

[0085] 如表2中所显示,Aga16B相对于琼脂糖的 K_m 值是7.7毫克/毫升,这分别比AgaB34的 K_m 值高38.5倍且比DagA的 K_m 值高3.5倍。Aga16B的 $V_{\max}$ 值是18.3U/mg蛋白质,这比AgaB34的 $V_{\max}$ 值低2.7倍。在与属于GH16的其它β-琼脂水解酶相比较时,Aga16B显示 K_{cat} 的最低值(也就是说,20s⁻¹)。因此,Aga16B的催化效率(即, K_{cat}/K_m)与GH16的其它β-琼脂水解酶的催化效率相比相对低。

[0086] [表2]

[0087] 比较Aga16B与属于GH16的已知琼脂水解酶的动力参数

[0088]

琼脂水解酶	生物体	基质	产物	$V_{\max}$ (U/mg 蛋白质)	K_m (mg/mL)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ /mg/mL)	参考
Aga16B	变形菌 (S. degradans) 2-40 ^T	琼脂糖	DP4, DP6	18.3	7.7	2.0×10^1	2.6×10^1	本发明
AgaB34	白色噬琼胶菌 (Agarivorans albus) YKW-34	琼脂糖	DP4	50.0	0.2	4.1×10^1	2.1×10^2	付 (Fu) 等人, 微生物学与生物技术杂志 (J Microbiol Biotechnol) 19(3):257-264, 2009
DagA	天蓝色链霉菌 (Streptomyces coelicolor)	琼脂糖	DP4, DP6	39.0	2.2	9.5×10^3	4.3×10^3	特木槿 U (Temuujin U) 等人, 应用微生物学与生物技术, 92(4):749-759, 2011
AgaA7	延长微孢菌 (Microbulbifer elongatus) JAMB-A7	琼脂	DP4	N.A.	3.0	2.9×10^6	9.6×10^5	太田 (Ohta) 等人, 应用微生物学与生物技术, 64(4):505-514, 2004
N.A.: 不可用								

[0089] <实例8>Aga16B的酶反应产物的产物分析

[0090] 为了监测Aga16B的酶反应产物,进行TLC和HPLC分析。对于TLC,将1微升酶反应产物加样到硅胶培养板上,在其中正丁醇、乙醇以及水以3:1:1 (v/v/v) 的体积比混合的流动相中溶离,且随后通过使用10%硫酸和0.2%1,3-二羟基萘(1,3-dihydroxynaphthalene)来产生颜色变化。对于HPLC分析,在80℃的柱温条件下和0.5毫升/分钟的流动速率下通过使用KS-802柱(昭和)来分析在0分钟、2分钟、10分钟以及30分钟的反应时间所获得的反应产物样本。

[0091] 如图6a中所示,可确认的是,由于TLC,在2分钟的反应时间之后形成反应产物,且如在图6b中,可确认的是,通过HPLC分析,反应产物分别是DP4和DP6的新琼四糖(neoagarotetraose)和新琼六糖(neoagarohexaose)。并且,检测到DP8为副产物。

[0092] 为了用Aga16B识别酶反应产物的准确质量,执行MALDI-TOF/TOF MS分析。MALDI-TOF/TOF MS是ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF MS系统(布鲁克道尔顿(Bruker Daltonics),不莱梅(Bremen),德国)。通过在分析之前通过使用多孔石墨化碳滤筒进行固相萃取来纯化Aga16B的反应产物来移除盐和缓冲液(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific),圣何塞(San Jose),加利福尼亚州(CA),美国(USA))。纯化反应产物再溶解于

水中,1微升反应产物点样在不锈钢目标培养板上,且随后点样0.5微升的0.1毫克/毫升2,5-二羟基苯甲酸(溶解于0.3微升的0.01摩尔NaCl和50%乙腈中)。通过在真空下对点进行干燥来形成均质晶体。针对总共2400次激光发射以阳性模式在500到3000的m/z范围内获得MALDI-TOF质谱。为了获得MS/MS数据,将前体离子加速到7.5千伏且在TOF/TOF模式中在时间离子选择器中选择用于碎片离子分析。经由前体离子的碰撞致解离(collision-induced dissociation;CID)由1千电子伏特碰撞能量产生的碎片离子通过LIFT细胞中的19千电子伏特来进一步加速,且在使其穿过离子反射器之后分析其质量。在 5.9×10^{-6} 毫巴的压力下氙气用作碰撞气体。使用flexAnalysis软件(版本3.3,布鲁克道尔顿,不莱梅,德国)来处理原始MS数据和MS/MS数据。

[0093] 如图7a中所示,Aga16B和琼脂糖的主要反应产物的准确质量分别测量为653.2和959.3,其分别对应于新琼四糖(DP4)和新琼六糖(DP6)。同时,质量为1,265.4的新琼八糖(DP8)也检测为副产物。

[0094] 另外,由于执行主要反应产物的化学结构的分析的串联MS(tandem MS),如图7b和图7c中所示,确认新琼四糖和新琼六糖。确切地说,由新琼四糖和新琼六糖的前体离子产生的子离子(daughter ion)证明这些反应产物由通过交替糖苷键键合的AHG和半乳糖构成。

[0095] <实例9>确认由Aga16B分解的琼脂糖的液化的实验

[0096] 为了通过Aga16B监测反应产物的液化程度,测量琼脂糖基质、Aga16B反应产物以及20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)的吸收率。

[0097] 出于此目的,通过使用造成酶反应的产物和使用光谱光度计在600纳米下测量吸收率,所述酶反应使用其中1% (w/v) 琼脂糖溶解于20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)中的基质和Aga16B蛋白,且液化程度通过透明度确认。在这种情况下,在121℃下高压处理其中1% (w/v) 琼脂糖溶解于20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)中的基质10分钟,且随后在室温下冷却,且通过使Aga16B蛋白与基质彼此反应来获得的产物是上清液,所述上清液通过在45℃下使其中在121℃下高压处理溶解于20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)中的1%琼脂糖10分钟的基质与蛋白反应30分钟来获得,且随后在95℃或高于95℃下使蛋白在沸水中灭活,且以16,000转/分钟执行离心10分钟。

[0098] 如图8中所示,1%琼脂糖胶凝化,变为不透光,且在600纳米下得到高吸收率,且Aga16B反应产物显示与20毫摩尔Tris-HCl的吸收率相同水平的吸收率。通过这种方式,确认Aga16B通过以酶的方式液化琼脂糖来获得。

[0099] <实例10>使用Aga16B、Aga50D以及NABH制备3,6-脱水-L-半乳糖

[0100] 为了通过将Aga16B应用到酶促过程来制备单糖,通过使用Aga16B、Aga50D以及NABH酶来制备D-半乳糖和3,6-脱水-L-半乳糖。

[0101] 出于此目的,当在200毫升的20毫摩尔Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)中制备5%琼脂糖且在120℃下使用高压釜溶解10分钟之后,将19.7毫克Aga16B添加到其中,以便分解琼脂糖,在55℃下以200转/分钟使所得混合物反应12小时,且产生DP4和DP6作为反应产物。

[0102] 为了分解这些反应产物,在25℃和200转/分钟下使这些反应产物与外型二糖产生的酶Aga50D(20毫克)反应,且产生新琼二糖作为反应产物。

[0103] 在这个反应之后,使SdNABH(10毫克)反应,以便产生D-半乳糖和3,6-脱水-L-半乳糖。

[0104] 分别如韩国专利申请案公开号2010-0040438 (2010年4月20日) 和韩国专利申请案公开号2013-0085017 (2013年7月26日) 中所描述来制备Aga50D和SdNABH并使用。

[0105] 通过HPLC分析确认每一反应产物的图案(图9b)。

[0106] <实例11>通过GC-MS分析来定量分析3,6-脱水-L-半乳糖

[0107] 通过GC/MS来分析通过实例10制备的SdNABH的反应产物并定量。出于此目的,执行GC/MS分析的衍生过程。用Speed-Vac干燥20微升反应产物,且随后将呈4% (w/v) 浓度的10微升0-甲基羟胺盐酸盐吡啶 (0-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine) 溶液添加到其中,在30℃下使所得混合物反应90分钟,将45微升N-甲基-N-(三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺 (N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) 添加到其中,且通过在37℃下使所得混合物反应30分钟来制备分析样本。对于GC/MS分析的工具条件,通过使用DB5-MS毛细管柱,使柱温度保持在100℃下3.5分钟,且在温度升高到160℃之后,使温度保持20分钟。在温度升高到200℃之后,使温度保持15分钟,且最后,在温度升高到280℃之后,使温度保持5分钟。在加样0.5微升样本之后,在5分流比下分析样本。

[0108] 如表3中所示,由于基于GC/MS定量结果来测量单糖产率,获得0.81克/克琼脂糖的产率,这是对应于理论上可获得的最大产量的72.5%的值。

[0109] [表3]

[0110] 通过酶促糖化制备的3,6-脱水-L-半乳糖的制备产率

[0111]	琼脂糖糖化方法	使用乙酸预处理以及 Aga50D、ABG 以及 NABH 的酶促糖化方法(CH 李等人, (2015) 生物化学进程, 50:1629-1633)	使用 Tris-HCl 缓冲液预处理以及 Aga50D、ABG 以及 NABH 的酶促糖化方法 (CH 李等人, (2015) 生物化学进程, 50:1629-1633)	使用 Aga16B、Aga50D 以及 NABH 的酶促糖化方法
	糖化产率(理论最大值的%)	50.5	44.9	72.5

[0112] 工业实用性

[0113] 本发明可应用于通过红藻制备单糖的领域。

[0001]	<110>	高丽大学校产学协力团
[0002]	<120>	用于制备半乳糖或3,6-脱水-L-半乳糖的组合物及方法
[0003]	<130>	X16U13C0298
[0004]	<150>	KR 10-2016-0006589
[0005]	<151>	2016-01-19
[0006]	<160>	6
[0007]	<170>	KoPatentIn 3.0
[0008]	<210>	1
[0009]	<211>	598
[0010]	<212>	PRT
[0011]	<213>	未知
[0012]	<220>	
[0013]	<223>	变形菌 2-40 (Saccharophagus degradans 2-40)
[0014]	<400>	1
[0015]	Met Lys Thr Thr Lys Cys Ala Leu Ala Ala Leu Phe Phe Ser Thr Pro	
[0016]	1 5 10 15	
[0017]	Leu Met Ala Ala Asp Trp Asp Gly Ile Pro Val Pro Ala Asp Pro Gly	
[0018]	20 25 30	
[0019]	Asn Gly Asn Thr Trp Glu Leu Gln Ser Leu Ser Asp Asp Phe Asn Tyr	
[0020]	35 40 45	
[0021]	Ala Ala Pro Ala Asn Gly Lys Ser Thr Thr Phe Tyr Ser Arg Trp Ser	
[0022]	50 55 60	
[0023]	Glu Gly Phe Ile Asn Ala Trp Leu Gly Pro Gly Gln Thr Glu Phe Tyr	
[0024]	65 70 75 80	
[0025]	Gly Pro Asn Ala Ser Val Glu Gly Gly His Leu Ile Ile Lys Ala Thr	
[0026]	85 90 95	
[0027]	Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gln Ile Tyr Thr Gly Ala Ile His Ser Asn	
[0028]	100 105 110	
[0029]	Glu Ser Phe Thr Tyr Pro Leu Tyr Leu Glu Ala Arg Thr Lys Ile Thr	
[0030]	115 120 125	
[0031]	Asn Leu Thr Leu Ala Asn Ala Phe Trp Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr	
[0032]	130 135 140	
[0033]	Glu Glu Ile Asp Val Leu Glu Ser Tyr Gly Ser Asp Arg Ala Thr Glu	
[0034]	145 150 155 160	
[0035]	Thr Trp Phe Asp Glu Arg Leu His Leu Ser His His Val Phe Ile Arg	
[0036]	165 170 175	
[0037]	Gln Pro Phe Gln Asp Tyr Gln Pro Lys Asp Ala Gly Ser Trp Tyr Pro	
[0038]	180 185 190	
[0039]	Asn Pro Asp Gly Gly Thr Trp Arg Asp Gln Phe Phe Arg Ile Gly Val	
[0040]	195 200 205	
[0041]	Tyr Trp Ile Asp Pro Trp Thr Leu Glu Tyr Tyr Val Asn Gly Glu Leu	

[0042]	210	215	220
[0043]	Val Arg Thr Val Ser Gly Pro Glu Met Ile Asp Pro Tyr Gly Tyr Thr		
[0044]	225	230	235
[0045]	Asn Gly Thr Gly Leu Ser Lys Pro Met Gln Val Ile Phe Asp Ala Glu		
[0046]		245	250
[0047]	His Gln Pro Trp Arg Asp Glu Gln Gly Thr Ala Pro Pro Thr Asp Ala		
[0048]		260	265
[0049]	Glu Leu Ala Asp Ser Ser Arg Asn Gln Phe Leu Ile Asp Trp Val Arg		
[0050]		275	280
[0051]	Phe Tyr Lys Pro Val Ala Ser Asn Asn Gly Gly Gly Asp Pro Gly Asn		
[0052]	290	295	300
[0053]	Gly Gly Thr Pro Gly Asn Gly Gly Ser Gly Asp Thr Val Val Val Glu		
[0054]	305	310	315
[0055]	Met Ala Asn Phe Ser Ala Thr Gly Lys Glu Gly Ser Ala Val Ala Gly		
[0056]		325	330
[0057]	Asp Thr Phe Thr Gly Phe Asn Pro Ser Gly Ala Asn Asn Ile Asn Tyr		
[0058]		340	345
[0059]	Asn Thr Leu Gly Asp Trp Ala Asp Tyr Thr Val Asn Phe Pro Ala Ala		
[0060]		355	360
[0061]	Gly Asn Tyr Thr Val Asn Leu Ile Ala Ala Ser Pro Val Thr Ser Gly		
[0062]	370	375	380
[0063]	Leu Gly Ala Asp Ile Leu Val Asp Ser Ser Tyr Ala Gly Thr Ile Pro		
[0064]	385	390	395
[0065]	Val Ser Ser Thr Gly Ala Trp Glu Ile Tyr Asn Thr Phe Ser Leu Pro		
[0066]		405	410
[0067]	Ser Ser Ile Tyr Ile Ala Ser Ala Gly Asn His Thr Ile Arg Val Gln		
[0068]		420	425
[0069]	Ser Ser Gly Gly Ser Ala Trp Gln Trp Asn Gly Asp Glu Leu Arg Phe		
[0070]		435	440
[0071]	Thr Gln Thr Asp Ala Asp Thr Gly Thr Asn Pro Pro Ser Thr Ala Ser		
[0072]	450	455	460
[0073]	Ile Ala Val Glu Ala Glu Asn Phe Asn Ala Val Gly Gly Thr Phe Ser		
[0074]	465	470	475
[0075]	Asp Gly Gln Ala Gln Pro Val Ser Val Tyr Thr Val Asn Gly Asn Thr		
[0076]		485	490
[0077]	Ala Ile Asn Tyr Val Asn Gln Gly Asp Tyr Ala Asp Tyr Thr Ile Ala		
[0078]		500	505
[0079]	Val Ala Gln Ala Gly Asn Tyr Thr Ile Ser Tyr Gln Ala Gly Ser Gly		
[0080]		515	520
[0081]	Val Thr Gly Gly Ser Ile Glu Phe Leu Val Asn Glu Asn Gly Ser Trp		
[0082]		530	535
[0083]	Ala Ser Lys Thr Val Thr Ala Val Pro Asn Gln Gly Trp Asp Asn Phe		

[0084]	545	550	555	560
[0085]	Gln Pro Leu Asn Gly Gly Ser Val Tyr Leu Ser Ala Gly Thr His Gln			
[0086]		565	570	575
[0087]	Val Arg Leu His Gly Ala Gly Ser Asn Asn Trp Gln Trp Asn Leu Asp			
[0088]		580	585	590
[0089]	Lys Phe Thr Leu Ser Asn			
[0090]	595			
[0091]	<210> 2			
[0092]	<211> 1797			
[0093]	<212> DNA			
[0094]	<213> 未知			
[0095]	<220>			
[0096]	<223> 变形菌 2-40 (Saccharophagus degradans 2-40)			
[0097]	<400> 2			
[0098]	atgaaaacca ccaaatgcgc cctagctgcg ctctttctca gtaccctct tatggctgca	60		
[0099]	gattgggacg gaattcctgt cccagcggac ccagggaatg gcaacacctg ggagctacag	120		
[0100]	tccctttctg acgatttcaa ctatgcggcc ccagctaacg gcaaaagcac caccttctat	180		
[0101]	agccgctgga gcgaaggctt tatcaatgct tggctcggcc cggggcaaac cgagttttac	240		
[0102]	ggccccaatg cttcggtaga aggcggccac cttattatta aggccactcg caagccaggt	300		
[0103]	actactcaaa ttactactgg agcaattcac tccaatgaaa gttttaccta cccattgtat	360		
[0104]	ttggaagcgc gcacaaaaat tacaacctc accctcgcca acgcattttg gctactaagc	420		
[0105]	tcagattcca ccgaagagat tgatgtgctg gagtcttacg gcagcgaccg tgcaacagaa	480		
[0106]	acgtggtttg acgaacgcct acacttaagc catcacgttt ttatccgcca gccatttcaa	540		
[0107]	gactaccaac cgaaagatgc aggcagctgg taccceaacc ccgatggcgg cacttggcgc	600		
[0108]	gaccaatttt tccgtatagg tgtttattgg atagacccat ggacactgga gtattacgtg	660		
[0109]	aatggcgaat tagtgcgcac tgtaagcggc ccagaaatga ttgaccgta cggttacacc	720		
[0110]	aacggcacag gcctaagtaa acccatgcaa gttattttcg atgcagagca tcagccttgg	780		
[0111]	cgcgacgaac aaggtactgc cccaccacc gacgcagagc tagccgactc gagtcgcaat	840		
[0112]	caattcttaa ttgactgggt gcgattctac aaaccctgg caagcaacaa tggtaggcgc	900		
[0113]	gaccaggca atggcgccac cccaggtaat ggtggcagtg gcgatactgt agtggtagaa	960		
[0114]	atggccaact tctctgccac aggtaaagaa ggctctgcag ttgcaggcga cactttcaca	1020		
[0115]	ggcttcaacc ccagcggcgc gaacaacatc aactacaaca ccttagggga ttgggcagac	1080		
[0116]	tacacggtga acttccccgc tgccggtaat tacaccgtaa acctaattgc agcctcgccg	1140		
[0117]	gttacatctg ggctgggtgc agatattttg gtagacagca gttacgcagg caccatacct	1200		
[0118]	gttagcagca ccggagcttg ggagatatac aacaccttta gcttgcccag ctcgatttat	1260		
[0119]	atcgcaagcg caggcaatca tactattcgc gtacaaagct ccggcggtag cgcttggcag	1320		
[0120]	tggaacggcg acgaacttcg ctttacccaa acggatgcgg atacaggcac caatccacc	1380		
[0121]	agtacagcca gcatagcggg tgaagccgaa aactttaacg cggtagggcg caccttttagc	1440		
[0122]	gatggtcaag ctcaacctgt tagcgtttac accgttaacg gcaacactgc cattaactac	1500		
[0123]	gtaaaccaag gcgattatgc cgactacacc attgctgttg cccaagcggg taactacacc	1560		
[0124]	attagctatc aagctggcag tggcgtaaca ggtggttagca tagagttttt ggtaacgaa	1620		
[0125]	aacggaagct gggccagtaa aaccgttacc gccgtaccaa accaagggtg ggataacttc	1680		

[0126] caacccttaa acggaggcag cgtttaccta agcgcaggca cccaccaagt tcgtttacac 1740
 [0127] ggcgctggca gcaacaactg gcagtggaac ctagataagt tcacgcttag caactaa 1797
 [0128] <210> 3
 [0129] <211> 747
 [0130] <212> PRT
 [0131] <213> 未知
 [0132] <220>
 [0133] <223> 变形菌 2-40(Saccharophagus degradans 2-40)
 [0134] <400> 3
 [0135] Met Leu Phe Asp Phe Glu Asn Asp Gln Val Pro Ser Asn Ile His Phe
 [0136] 1 5 10 15
 [0137] Leu Asn Ala Arg Ala Ser Ile Glu Thr Tyr Thr Gly Ile Asn Gly Glu
 [0138] 20 25 30
 [0139] Pro Ser Lys Gly Leu Lys Leu Ala Met Gln Ser Lys Gln His Ser Tyr
 [0140] 35 40 45
 [0141] Thr Gly Leu Ala Ile Val Pro Glu Gln Pro Trp Asp Trp Ser Glu Phe
 [0142] 50 55 60
 [0143] Thr Ser Ala Ser Leu Tyr Phe Asp Ile Val Ser Val Gly Asp His Ser
 [0144] 65 70 75 80
 [0145] Thr Gln Phe Tyr Leu Asp Val Thr Asp Gln Asn Gly Ala Val Phe Thr
 [0146] 85 90 95
 [0147] Arg Ser Ile Asp Ile Pro Val Gly Lys Met Gln Ser Tyr Tyr Ala Lys
 [0148] 100 105 110
 [0149] Leu Ser Gly His Asp Leu Glu Val Pro Asp Ser Gly Asp Val Asn Asp
 [0150] 115 120 125
 [0151] Leu Asn Leu Ala Ser Gly Leu Arg Ser Asn Pro Pro Thr Trp Thr Ser
 [0152] 130 135 140
 [0153] Asp Asp Arg Gln Phe Val Trp Met Trp Gly Val Lys Asn Leu Asp Leu
 [0154] 145 150 155 160
 [0155] Ser Gly Ile Ala Lys Ile Ser Leu Ser Val Gln Ser Ala Met His Asp
 [0156] 165 170 175
 [0157] Lys Thr Val Ile Ile Asp Asn Ile Arg Ile Gln Pro Asn Pro Pro Gln
 [0158] 180 185 190
 [0159] Asp Glu Asn Phe Leu Val Gly Leu Val Asp Glu Phe Gly Gln Asn Ala
 [0160] 195 200 205
 [0161] Lys Val Asp Tyr Lys Gly Lys Ile His Ser Leu Glu Glu Leu His Ala
 [0162] 210 215 220
 [0163] Ala Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Leu Asp Gly Lys Pro Met Pro Ser
 [0164] 225 230 235 240
 [0165] Arg Ser Lys Phe Gly Gly Trp Leu Ala Gly Pro Lys Leu Lys Ala Thr
 [0166] 245 250 255
 [0167] Gly Tyr Phe Arg Thr Glu Lys Ile Asn Gly Lys Trp Met Leu Val Asp

[0168]	260	265	270
[0169]	Pro Glu Gly Tyr Pro Tyr Phe Ala Thr Gly Leu Asp Ile Ile Arg Leu		
[0170]	275	280	285
[0171]	Ser Asn Ser Ser Thr Met Thr Gly Tyr Asp Tyr Asp Gln Ala Thr Val		
[0172]	290	295	300
[0173]	Ala Gln Arg Ser Ala Asp Asp Val Thr Pro Glu Asp Ser Lys Gly Leu		
[0174]	305	310	315
[0175]	Met Ala Val Ser Glu Lys Ser Phe Ala Thr Arg His Leu Ala Ser Pro		
[0176]	325	330	335
[0177]	Thr Arg Ala Ala Met Phe Asn Trp Leu Pro Asp Tyr Asp His Pro Leu		
[0178]	340	345	350
[0179]	Ala Asn His Tyr Asn Tyr Arg Arg Ser Ala His Ser Gly Pro Leu Lys		
[0180]	355	360	365
[0181]	Arg Gly Glu Ala Tyr Ser Phe Tyr Ser Ala Asn Leu Glu Arg Lys Tyr		
[0182]	370	375	380
[0183]	Gly Glu Thr Tyr Pro Gly Ser Tyr Leu Asp Lys Trp Arg Glu Val Thr		
[0184]	385	390	395
[0185]	Val Asp Arg Met Leu Asn Trp Gly Phe Thr Ser Leu Gly Asn Trp Thr		
[0186]	405	410	415
[0187]	Asp Pro Ala Tyr Tyr Asp Asn Asn Arg Ile Pro Phe Phe Ala Asn Gly		
[0188]	420	425	430
[0189]	Trp Val Ile Gly Asp Phe Lys Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Phe Trp		
[0190]	435	440	445
[0191]	Gly Ala Met Pro Asp Val Phe Asp Pro Glu Phe Lys Val Arg Ala Met		
[0192]	450	455	460
[0193]	Glu Thr Ala Arg Val Val Ser Glu Glu Ile Lys Asn Ser Pro Trp Cys		
[0194]	465	470	475
[0195]	Val Gly Val Phe Ile Asp Asn Glu Lys Ser Phe Gly Arg Pro Asp Ser		
[0196]	485	490	495
[0197]	Asp Lys Ala Gln Tyr Gly Ile Pro Ile His Thr Leu Gly Arg Pro Ser		
[0198]	500	505	510
[0199]	Glu Gly Val Pro Thr Arg Gln Ala Phe Ser Lys Leu Leu Lys Ala Lys		
[0200]	515	520	525
[0201]	Tyr Lys Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ala Trp Gly Leu Lys Leu Ser		
[0202]	530	535	540
[0203]	Ser Trp Ala Glu Phe Asp Leu Gly Val Asp Val Lys Ala Leu Pro Val		
[0204]	545	550	555
[0205]	Thr Asp Thr Leu Arg Ala Asp Tyr Ser Met Leu Leu Ser Ala Tyr Ala		
[0206]	565	570	575
[0207]	Asp Gln Tyr Phe Lys Val Val His Gly Ala Val Glu His Tyr Met Pro		
[0208]	580	585	590
[0209]	Asn His Leu Tyr Leu Gly Ala Arg Phe Pro Asp Trp Gly Met Pro Met		

[0210]	595	600	605
[0211]	Glu Val Val Lys Ala Ala Ala Lys Tyr Ala Asp Val Val Ser Tyr Asn		
[0212]	610	615	620
[0213]	Ser Tyr Lys Glu Gly Leu Pro Lys Gln Lys Trp Ala Phe Leu Ala Glu		
[0214]	625	630	635 640
[0215]	Leu Asp Lys Pro Ser Ile Ile Gly Glu Phe His Ile Gly Ala Met Asp		
[0216]	645	650	655
[0217]	His Gly Ser Tyr His Pro Gly Leu Ile His Ala Ala Ser Gln Ala Asp		
[0218]	660	665	670
[0219]	Arg Gly Glu Met Tyr Lys Asp Tyr Met Gln Ser Val Ile Asp Asn Pro		
[0220]	675	680	685
[0221]	Tyr Phe Val Gly Ala His Trp Phe Gln Tyr Met Asp Ser Pro Leu Thr		
[0222]	690	695	700
[0223]	Gly Arg Ala Tyr Asp Gly Glu Asn Tyr Asn Val Gly Phe Val Asp Val		
[0224]	705	710	715 720
[0225]	Thr Asp Thr Pro Tyr Gln Glu Met Val Asp Ala Ala Lys Glu Val Asn		
[0226]	725	730	735
[0227]	Ala Lys Ile Tyr Thr Glu Arg Leu Gly Ser Lys		
[0228]	740	745	
[0229]	<210> 4		
[0230]	<211> 368		
[0231]	<212> PRT		
[0232]	<213> 未知		
[0233]	<220>		
[0234]	<223> 变形菌 2-40 (Saccharophagus degradans 2-40)		
[0235]	<400> 4		
[0236]	Met Ser Asp Ser Lys Val Asn Lys Lys Leu Ser Lys Ala Ser Leu Arg		
[0237]	1 5 10 15		
[0238]	Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Asp Glu Lys Gly Pro Glu Trp Leu Phe Glu		
[0239]	20 25 30		
[0240]	Phe Asp Ile Thr Pro Leu Lys Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val		
[0241]	35 40 45		
[0242]	Ile Arg Arg Asp Pro Ser Ala Val Leu Lys Val Asp Asp Glu Tyr His		
[0243]	50 55 60		
[0244]	Val Trp Tyr Thr Lys Gly Glu Gly Glu Thr Val Gly Phe Gly Ser Asp		
[0245]	65 70 75 80		
[0246]	Asn Pro Glu Asp Lys Val Phe Pro Trp Asp Lys Thr Glu Val Trp His		
[0247]	85 90 95		
[0248]	Ala Thr Ser Lys Asp Lys Ile Thr Trp Lys Glu Ile Gly Pro Ala Ile		
[0249]	100 105 110		
[0250]	Gln Arg Gly Ala Ala Gly Ala Tyr Asp Asp Arg Ala Val Phe Thr Pro		
[0251]	115 120 125		

[0252]	Glu Val Leu Arg His Asn Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val
[0253]	130 135 140
[0254]	Lys Ala Pro Tyr Leu Asn Arg Ser Leu Glu His Ile Ala Ile Ala Tyr
[0255]	145 150 155 160
[0256]	Ser Asp Ser Pro Phe Gly Pro Trp Thr Lys Ser Asp Ala Pro Ile Leu
[0257]	165 170 175
[0258]	Ser Pro Glu Asn Asp Gly Val Trp Asp Thr Asp Glu Asp Asn Arg Phe
[0259]	180 185 190
[0260]	Leu Val Lys Glu Lys Gly Ser Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro
[0261]	195 200 205
[0262]	Cys Leu Met Phe Phe Asn Asn Arg Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu
[0263]	210 215 220
[0264]	Thr Met Gly Glu Ser Met Asn Met Gly Gly Arg Glu Ile Lys His Gly
[0265]	225 230 235 240
[0266]	Val Ala Ile Ala Asp Ser Pro Leu Gly Pro Tyr Thr Lys Ser Glu Tyr
[0267]	245 250 255
[0268]	Asn Pro Ile Thr Asn Ser Gly His Glu Val Ala Val Trp Pro Tyr Lys
[0269]	260 265 270
[0270]	Gly Gly Met Ala Thr Met Leu Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr
[0271]	275 280 285
[0272]	Cys Gln Trp Ala Glu Asp Gly Ile Asn Phe Asp Ile Met Ser His Ile
[0273]	290 295 300
[0274]	Lys Gly Ala Pro Glu Ala Val Gly Phe Phe Arg Pro Glu Ser Asp Ser
[0275]	305 310 315 320
[0276]	Asp Asp Pro Ile Ser Gly Ile Glu Trp Gly Leu Ser His Lys Tyr Asp
[0277]	325 330 335
[0278]	Ala Ser Trp Asn Trp Asn Tyr Leu Cys Phe Phe Lys Thr Arg Arg Gln
[0279]	340 345 350
[0280]	Val Leu Asp Ala Gly Ser Tyr Gln Gln Thr Gly Asp Ser Gly Ala Val
[0281]	355 360 365
[0282]	<210> 5
[0283]	<211> 30
[0284]	<212> DNA
[0285]	<213> 人工序列
[0286]	<220>
[0287]	<223> 顺向引物, Aga16B-N
[0288]	<400> 5
[0289]	aaaggatcca tggcagattg ggacggaatt 30
[0290]	<210> 6
[0291]	<211> 34
[0292]	<212> DNA
[0293]	<213> 人工序列

-
- [0294] <220>
[0295] <223> 反向引物, Aga16B-C
[0296] <400> 6
[0297] aaagcggccg cgttgctaag cgtgaactta tcta 34

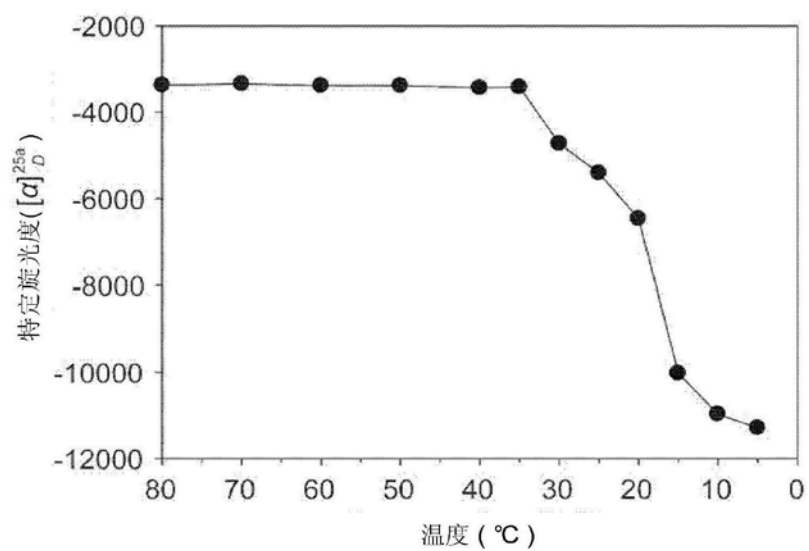


图1

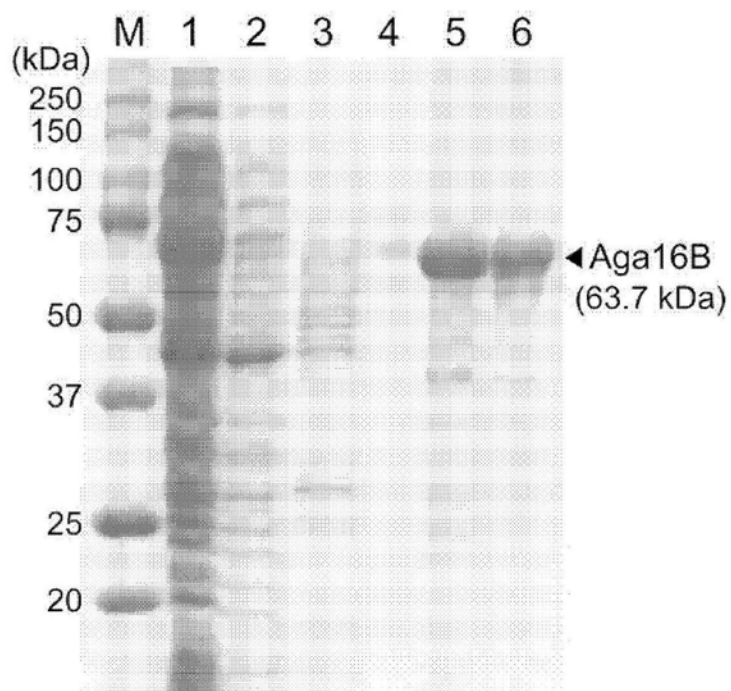


图2

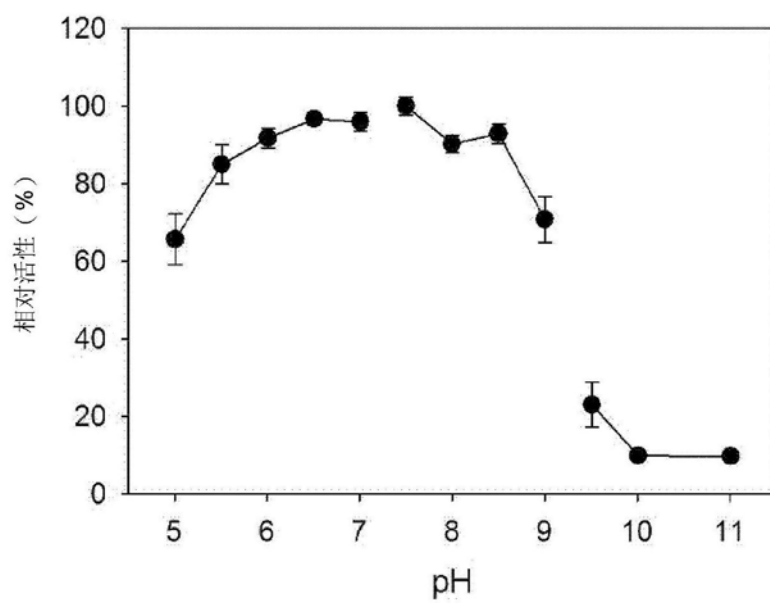


图3a

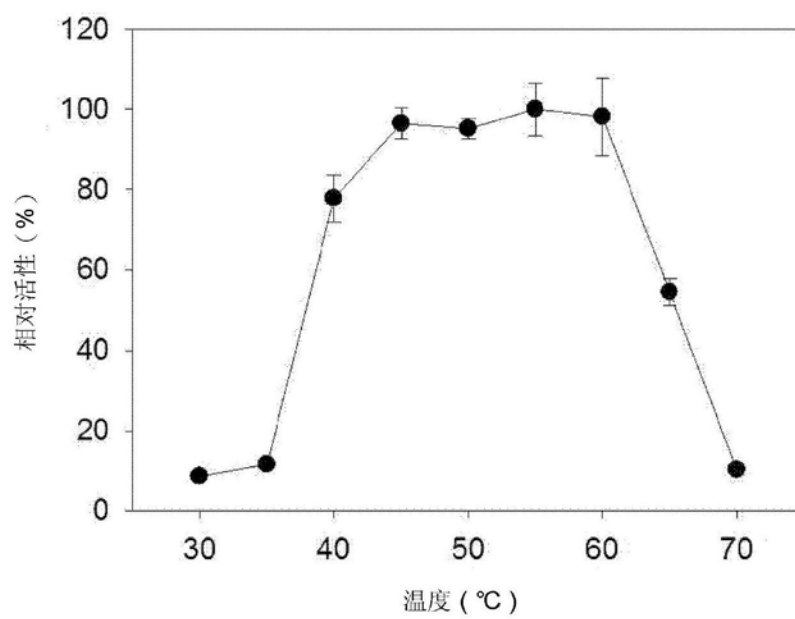


图3b

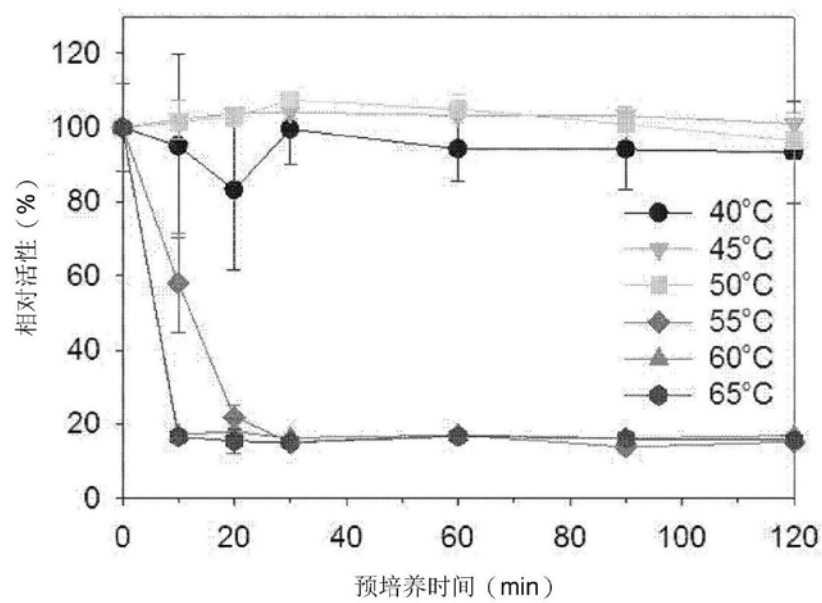


图4

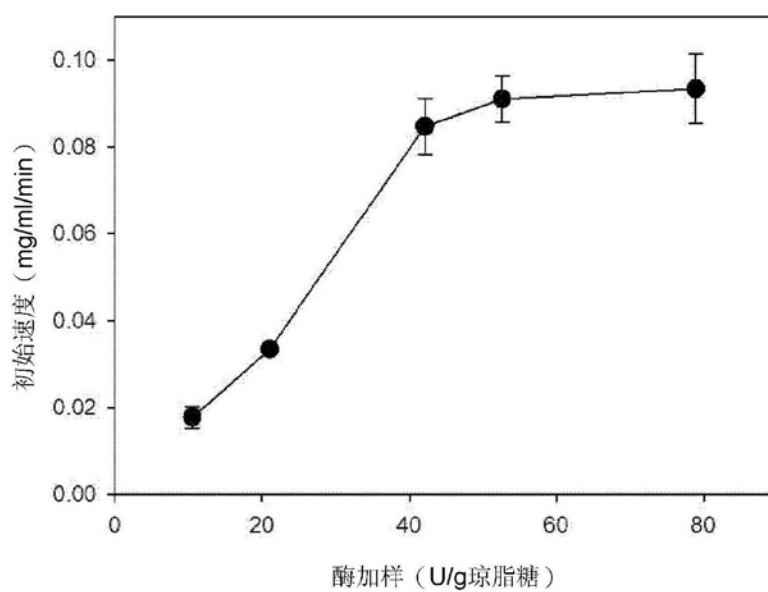


图5

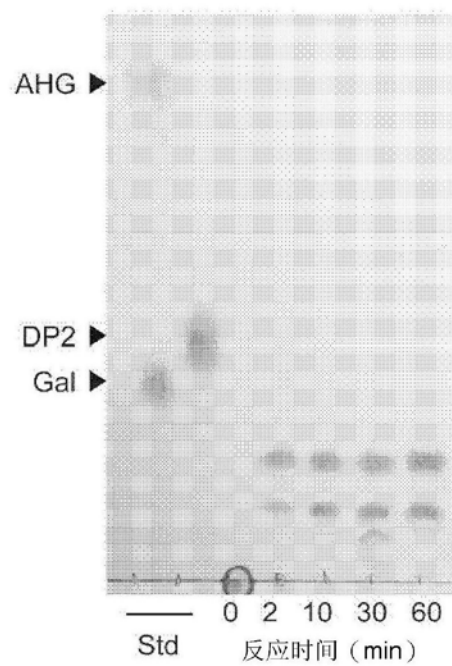


图6a

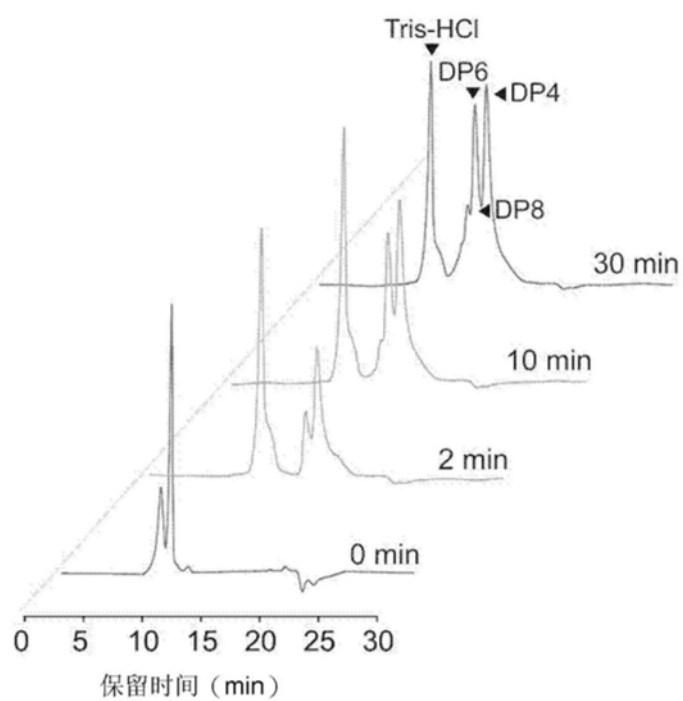


图6b

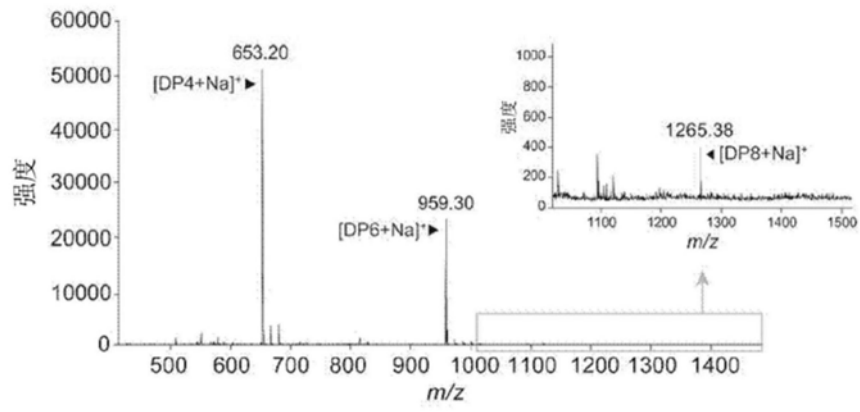


图7a

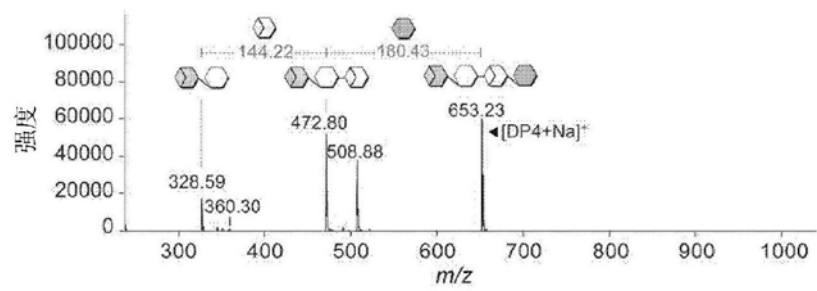


图7b

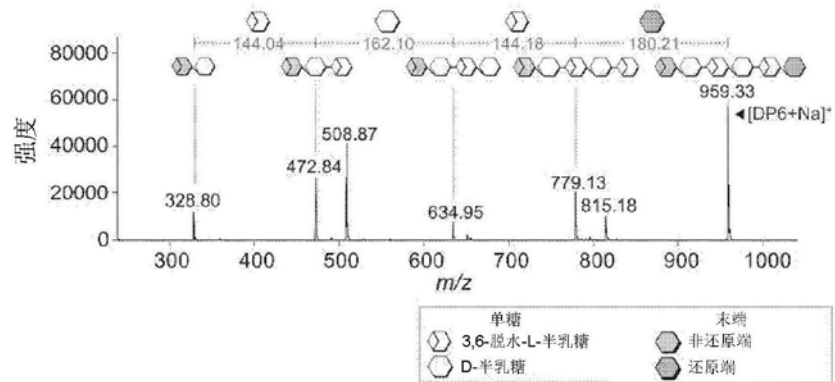


图7c

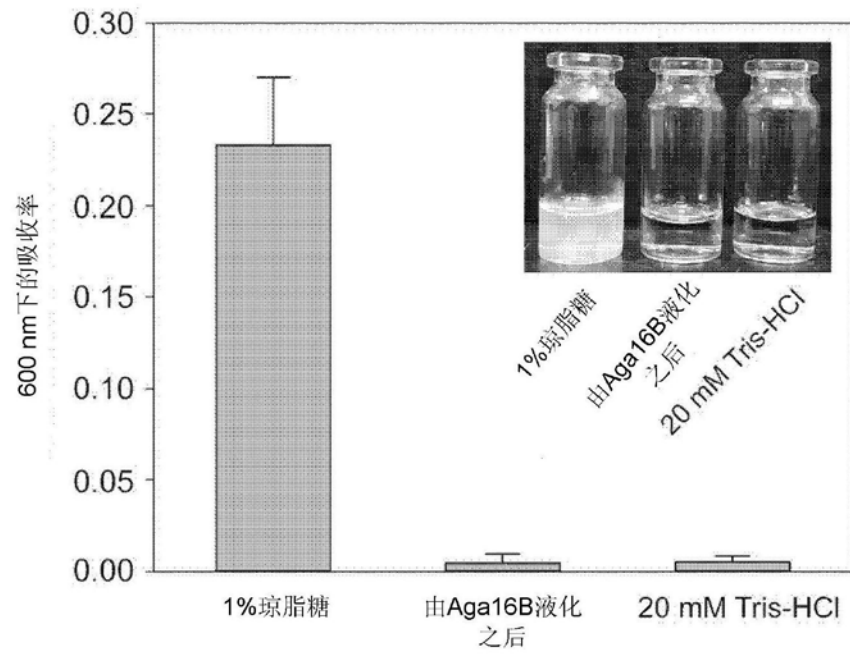


图8

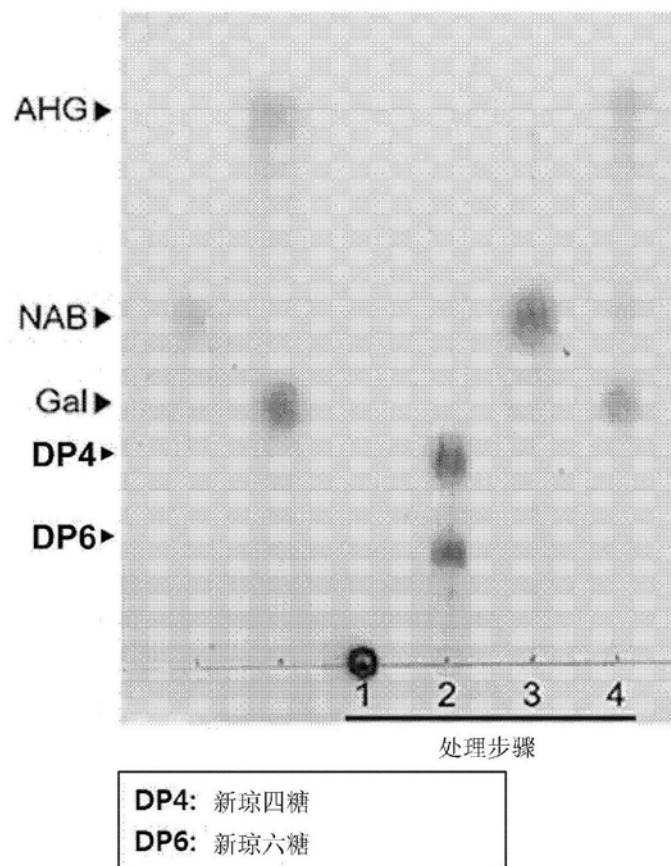


图9a

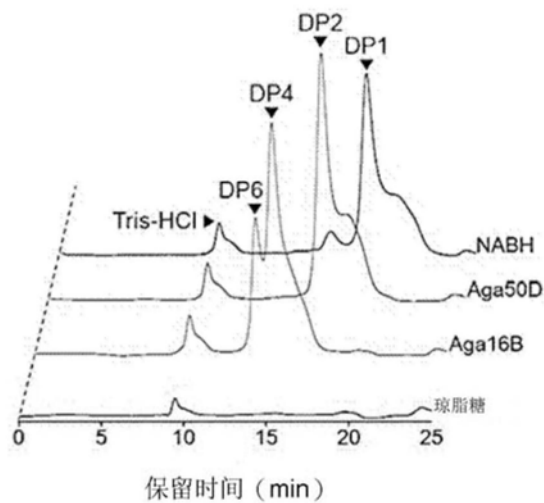


图9b

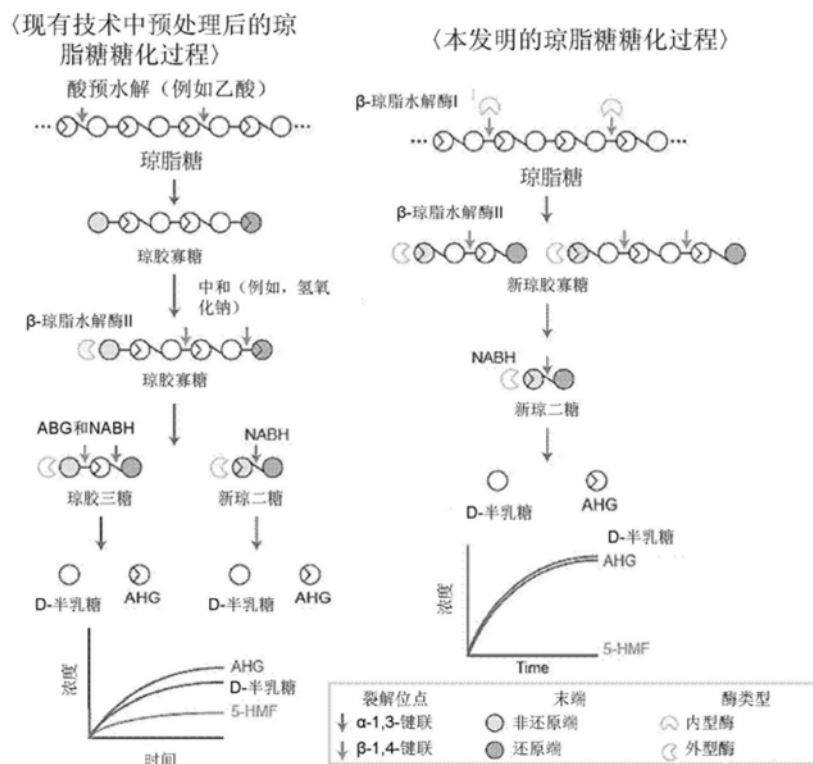


图10