



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098598
(43) 공개일자 2008년11월11일

(51) Int. Cl.

C12N 9/10 (2006.01) C12N 9/38 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7018907

(22) 출원일자 2008년07월31일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년07월31일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2007/000178

국제출원일자 2007년01월23일

(87) 국제공개번호 WO 2007/088324

국제공개일자 2007년08월09일

(30) 우선권주장

0601901.2 2006년01월31일 영국(GB)

(71) 출원인

클라사도 인크.

파나마 파나마 0816-01560 아파르타도 칼레 엘비라 멘테즈 피소 2 에디피시오 인터세코

(72) 발명자

쥘르치스 게오르지오스

영국 알지2 7알알 버크셔 리딩 킬른 뷰 로드 1

고올라스 아타나시오스 케이.

영국 알지6 6에이피 버크셔 리딩 더 유니버시티 오브 리딩 스쿨오브 푸드 바이오사이언시스 푸드 마이크로비알 사이언시스 유닛

고올라스 테오도로스

영국 알지6 6에이피 버크셔 리딩 더 유니버시티 오브 리딩 스쿨오브 푸드 바이오사이언시스 푸드 마이크로비알 사이언시스 유닛

(74) 대리인

유미특허법인

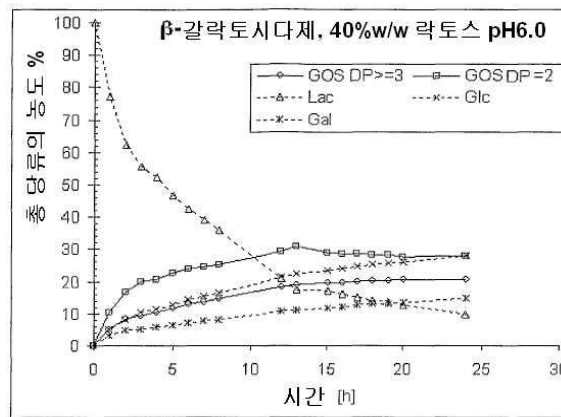
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 알파-갈락토스 전이 효소 활성을 가진 갈락토시다제

(57) 요약

본 발명은 비피도박테리움 비피덤으로부터 분리된 갈락토스 전이 활성을 가진 β-갈락토시다제에 관한 것이다. 상기 β-갈락토시다제는 락토스를 β-연결되어 있으며 예상치 못하게 알파-연결된 이당류 알파1-6 갈락토바이오스를 생성하는 올리고당 혼합물로, 전환시킬 수 있다. 상기 혼합물은 장에서 비피도박테리아의 증식을 촉진시켜 장 건강을 향상시키고 병원성 균총의 증식을 억제하기 위해 수많은 식품 또는 동물 사료에 혼합할 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

- a) 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열의 단백질을 코딩하거나,
- b) 엄격한 조건하에서 상기 a) 서열에 혼성화하거나, 또는
- c) 상기 a) 또는 b) 서열의 변성체인, DNA 서열.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 1로 기재된 서열이거나 또는 그 단편인 것을 특징으로 하는 DNA 서열.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 서열이 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그 단편에서 60% 미만, 바람직하기로는 45% 미만, 더 바람직하기로는 25% 미만이 변화된 뉴클레오타이드의 치환, 부가 또는 결손을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 서열.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 서열이 보존적인 아미노산 치환을 초래하는 뉴클레오타이드 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 서열.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한항의 DNA 서열에 의해 코딩되는 효소.

청구항 6

서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하는 효소.

청구항 7

서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 β -갈락토시다제.

청구항 8

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한항의 DNA 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 벡터는 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 10

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한항의 DNA 서열을 포함하는 숙주 세포.

청구항 11

제 8항 또는 제 9항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 12

제 10항 또는 제 11항에 있어서, 상기 세포는 박테리아 세포, 효모 세포 또는 진균 세포인 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 세포는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 락토코커스(*Lactococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 에스케리차(*Escherichia*), 바실러스(*Bacillus*) 및 아스페질러스(*Aspergillus*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 세포는 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*), 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 서큘란스(*Bacillus circulans*) 및 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 15

올리고당 혼합물 제조에 있어서의, 제 5항 내지 제 7항 중 어느 한항에 따른 효소 또는 제 10항 내지 제 14항 중 어느 한항에 따른 세포의 용도.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 혼합물은 2당류 Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3) Gal, Gal (β 1-6) Gal 및 Gal (α 1-6) Gal을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 17

제 15항 또는 제 16항에 있어서, 상기 혼합물은 3당류인 Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, 4당류인 Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc 및 5당류인 Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc를 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 18

액상유, 건조 분말 우유, 유아 우유, 유아 조제식(baby formula), 아이스크림, 요거트, 치즈, 발효 유제품과 같은 유제품, 과일 주스와 같은 음료, 유아 식품, 시리얼, 빵, 비스킷, 제과류, 케이크, 식품보조제, 식이보충제, 프로바이오틱 식료품, 프리바이오틱 식료품, 동물 사료, 가축 사료 및 약제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제품의 구성성분이 되는 올리고당 혼합물의 제조에 있어서의, 제 5항 내지 제 7항 중 어느 한항에 따른 효소 또는 제 10항 내지 제 14항 중 어느 한항에 따른 세포의 용도.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 혼합물은 2당류 Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3) Gal, Gal (β 1-6) Gal 및 Gal (α 1-6) Gal, 3당류 Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, 4당류 Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc 및 5당류 Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc를 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 20

액상유, 건조 분말 우유, 유아 우유, 유아 조제식(baby formula), 아이스크림, 요거트, 치즈, 발효 유제품과 같은 유제품, 과일 주스와 같은 음료, 유아 식품, 시리얼, 빵, 비스킷, 제과류, 케이크, 식품보조제, 식이보충제, 프로바이오틱 식료품, 프리바이오틱 식료품, 동물 사료, 가축 사료 및 약제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제품의 제조에 있어서의, 제 10항 내지 제 14항 중 어느 한항에 따른 숙주 세포의 용도.

청구항 21

제 5항 내지 제 7항 중 어느 한항에 따른 효소의 발현을 허용하는 조건하에서 제 10항 내지 제 14항 중 어느 한항에 따른 숙주 세포를 적정 배양 배지에서 배양하는 단계 및 배양물로부터 제조되는 효소를 회수하는 단계를 포함하는, 상기 효소의 생산 방법.

청구항 22

올리고당 혼합물의 제조 방법으로서,

상기 올리고당 혼합물은 2당류 Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3) Gal, Gal (β 1-6) Gal 및 Gal (α 1-6) Gal, 3당류 Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, 4당류 Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc 및 5당류 Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc를 포함하며,

상기 방법은 제 5항 내지 제 7항 중 어느 한항에 따른 효소, 또는 제 10항 내지 제 14항 중 어느 한항에 따른

숙주 세포를, 락토스 함유 물질과 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 올리고당 혼합물의 제조 방법.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은, 락토스를, β -연결되어 있으며 예상치 못하게 알파-연결된 2당류 알파1-6 갈락토바이오스를 생성하는 올리고당 혼합물로, 전환시킬 수 있는 갈락토스 전이 활성을 가진 β -갈락토시다제에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 최근 발견된 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*) 균주로부터 분리된 β -갈락토시다제에 관한 것이다.
- <2> 본 발명은 특히 분리된 β -갈락토시다제 효소를 코딩하는 DNA 서열, 상기한 DNA 서열에 의해 코딩되는 효소, 및 상기 DNA 서열을 포함하는 숙주 세포 또는 상기 DNA 서열이 도입된 재조합 벡터에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 올리고당을 생산하기 위한, DNA 서열에 의해 코딩되는 효소, DNA 서열을 포함하는 숙주 또는 재조합 벡터의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- <3> 비피도박테리아는 원래, 상부 장관에 존재하는 숙주와 미생물에 의해 우선적으로 단당류 및 2당류가 소비됨에 따라 상기 단당류 및 2당류가 부족한 환경으로 되는 하부 장관에서 군집한다. 비피도박테리아는 하부 장관에서 생존하기 위해, 다양한 탄수화물을 이용할 수 있는 다양한 종류의 엑소- 및 엔도-글리코시다제를 표면에 결합된 형태 및/또는 세포의 형태로 생산한다.
- <4> 비피도박테리아의 일부 효소들은 하이드릴라제 활성 이외에도 트랜스퍼라제 활성을 보인다. 이러한 글리코시다제의 당 전이 활성은 다양한 올리고당의 효소적 합성에 널리 이용되며, 비피도박테리아 증식 촉매 인자로 작용하는 것으로 입증되었다.
- <5> 비피도박테리아 속 균들은 락토스의 박테리아 대사에 관여하는 β -갈락토시다제 효소를 생산하는 것으로 알려져 있다. Moller, P.L. et al in *Appl. & Environ. Microbiol.*, (2001), 62, (5), 2276-2283에는 비피도박테리움 비피덤 균주로부터 3종의 β -갈락토시다제 유전자의 분리 및 특성화가 기재되어 있다. 이들은, 3종의 β -갈락토시다제 모두가 갈락토스 전이에 의해 β -연결된 갈락토올리고당의 생성을 촉매할 수 있다는 것을 확인하였다.
- <6> Dumortier et al in *Carbohydrate Research*, 201, (1990), 115-123에는 비피도박테리움 비피덤 DSM 20456을 이용한 락토스 가수분해에서 당 전이 반응에 의한 β -연결된 올리고당의 생성에 대해 기술되어 있다. 생성된 올리고당 혼합물의 구조 분석에서, 연결은 β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 6) 및 β -(1 \rightarrow 4)-D-갈락토실 연결인 것으로 확인되었다. Dumortier는 비피도박테리움 비피덤에 의해 생산된 화합물이 대장내 박테리아 유착에 관여하는 것으로 제시하였다.
- <7> 락토스를, 갈라바이오스(galabiose)(Gal(α 1-6) - Gal)를 포함하는 2당류를 예상치 못할 정도로 최대 35%까지 포함하는 신규한 갈락토올리고당 혼합물로 전환시키는, 갈락토시다제 효소를 생산하는 비피도박테리움 비피덤 균주가 발견되었다. 상기 2당류는 장벽에 독소, 예컨대 시가 독소(Shiga toxin) 및 *E. coli* 등의 병원체 부착을 방지할 수 있는 항-부착제인 것으로 공지되어 있다(Paton, J.C. & Paton, A. W. (1998), *Clin. Microbiol. Revs.*, 11, 450-479; Carlsson, K.A. (1989), *Ann. Reviews Biochem.*, 58, 309-350).
- <8> 이러한 비피도박테리움 비피덤 균주는 2003년 3월 31일에 영국 에버딘에 위치한 국립 산업 및 해양 박테리아 수집국(National Collection of Industrial & Marine Bacteria)에 기탁번호 NCIMB 41171로 기탁되었다. 또한, 영국 특허 2 412 380에 기술되어 있다.
- <9> 이러한 비피도박테리움 비피덤 균주는 뜻밖에도 α -갈락토스 전이 효소 활성을 보이는, 수종의 β -갈락토시다제를 생산하는 것으로 현재 확인되고 있다. 이 효소는 β -연결되어 있는 다수의 상이한 올리고당 뿐만 아니라 알파-연결된 2당류 갈라바이오스를 만든다.

발명의 상세한 설명

- <10> 본 발명은 서열번호 2로 제시된 아미노산 서열의 단백질을 코딩하는 DNA 서열 또는 엄격한 조건하에서 상기 단백질을 코딩하는 상기 DNA 서열에 혼성화하는 DNA 서열을 제공한다. 상기 DNA 서열은 서열번호 1로 제공되며,

또는 그 단편이나 변성체(degenerative)를 포함할 수도 있다.

- <11> "변성체"란 표현은 서열번호 1과 50% 이상 상동한, 바람직하기로는 50 - 98% 상동한, 가장 바람직하기로는 75 - 95% 상동한 DNA 서열을 의미하는 것으로 해석된다.
- <12> 이러한 DNA 서열은, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 60% 미만이, 바람직하기로는 45% 미만이, 더 바람직하기로는 25% 미만이 변화되는, 뉴클레오타이드의 치환, 부가 또는 결손을 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 치환은 보존적인 아미노산 치환을 만들 수 있다.
- <13> 본 발명의 다른 측면은 전술한 바와 같은 DNA 서열에 의해 코딩되는 효소를 제공한다. 상기 효소는 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함할 수 있다.
- <14> 본 발명의 또다른 측면은 전술한 DNA 서열을 포함하는 재조합 벡터, 바람직하기로는 발현 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 박테리아, 효소 또는 진균 세포 등의 숙주 세포에 통합될 수 있다. 다른 예로, 상기 DNA 서열은 상기 숙주 세포에 통합될 수도 있다. 적합한 숙주 세포는 비피도박테리움, 락토코커스, 락토바실러스, 바실러스, 예컨대 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 서큘란스(*Bacillus circulans*), 에스케리차(*Escherichia*) 및 아스퍼질러스 예컨대 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 중에서 선택될 수 있다.
- <15> 락토스를 기질로 이용하여, 전술한 바와 같이 DNA 서열에 의해 코딩되는 효소는 Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3) Gal, Gal (β 1-6) Gal 및 Gal (α 1-6) Gal을 포함하는 2당류 혼합물을 형성한다. 또한, 올리고당의 혼합물에는 3당류인 Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, 4당류인 Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc 및 5당류인 Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc도 존재한다.
- <16> 전술한 바와 같이, 효소 또는 숙주 세포를 이용하여, 장 건강을 향상시키기 위한 제품의 일부분을 형성할 수 있는 Gal (α 1-6) Gal(갈라바이오스) 등의 2당류 혼합물을 만들 수 있다. 상기한 제품은 유제품(예, 액상유, 전지분유, 탈지분유, 지방 대체 분유(fat filled milk powder), 유청과 같은 분유, 유아 우유, 유아 조제식(baby formula), 아이스크림, 요거트, 치즈, 발효 유제품), 과일 주스와 같은 음료, 유아 식품, 시리얼, 빵, 비스킷, 제과류, 케이크, 식품보조제, 식이보충제, 프로바이오틱 식료품, 프리바이오틱 식료품, 동물 사료, 가축 사료 또는 실질적인 임의의 기타 식품 또는 음료로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- <17> 다른 예로서, 그렇게 제조된 올리고당은 병원체나 병원체에 의해 생산된 독소의 장벽 부착을 방지하기 위한 약제, 예컨대 정제 또는 캡슐 형태의 제조에 이용할 수 있다. 약제는 예컨대 종종 정상적인 건강한 장내 균총(gut flora)을 변화시키거나 심지어 파괴하는 항생제 치료 과정 다음에 환자에게 투여할 수 있다.
- <18> 본 발명의 또다른 측면은 전술한 숙주 세포를 전술한 효소의 발현을 허용하는 조건하에서 적정 배양 배지에서 배양하는 단계 및 배양물로부터 생산되는 효소를 회수하는 단계를 포함하는, 상기 효소의 생산 방법을 제공한다.
- <19> 또한, 본 발명은 전술한 효소 또는 전술한 숙주 세포를 올리고당 혼합물의 생성을 유도하는 조건하에서 락토스 함유 기질과 접촉시키는 단계를 포함하는, 2당류 Gal (α 1-6) Gal(갈라바이오스) 등의 올리고당 혼합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- <20> 적합한 락토스 함유 기질은 상업적으로 이용가능한 락토스, 전유(whole milk), 반-탈지유(semi-skimmed milk), 탈지유, 유장, 지방 대체유(fat-filled milk) 및 유청으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 이들 유제품은 소, 버팔로, 양 또는 염소로부터 유래될 수 있다. 지방 대체유는 유지방을 제거하기 위해 탈지된 후, 식물성 유지나 오일 첨가에 의해 대체된 전유로 정의된다.
- <21> 계놈 DNA를 Lawson et al. (1989) Ferns Microbiol Letters, 65, (1-2), 41-45의 방법을 이용하여 비피도박테리움 비피덤 균주(NCIMB 41171)로부터 분리하였다. 이 DNA를 제한 효소로 자르고, 가장 큰 15 kbp 단편을 동일한 제한 효소로 절단한 pSP72 벡터에 연결하였다. PstI, EcoRI, BamHI, KpnI, SmaI 또는 HindIII로 절단한 비피도박테리움 비피덤 염색체 DNA로 구성된 삽입물을 포함하는 벡터를 *E. coli* 세포에 형질전환하였다. p-니트로페닐, X- β -Gal(5-브로모-4-클로로-3-인돌릴- β -D-갈락토사이드) 및 이소프로필- β -D-티오갈락토사이드(IPTG)가 함유된 LB(Luria Bertani) 아가 플레이트 상에서 β -갈락토시다제 활성을 가진 클론을 선별하였다. BamHI 염색체 DNA와의 라이게이션 혼합물에서 7개의 β -갈락토시다제 양성 클론이 동정되었고, 이중에 하나는 pB1으로 동정되었다.
- <22> DNA 삽입 단편인 B1의 DNA 서열분석을 생거(Russel P., 2002 iGenetics, Pearson Education, Inc., San Francisco, 187-189)의 다이테옥시 체인 종결 방법으로, BigDye Terminator V.3.0 사이클 시퀀싱 키트(Applied

Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. B1의 DNA 서열은 도 1(서열번호 1)에 나타나 있다.

<23> 오픈 리딩 프레임(ORF)은 NCBI(National Center of Biotechnology Information)의 ORF 파인더를 이용하여 위치를 확인하였다. 도 1의 뉴클레오타이드 서열은 모두 6개의 가능한 리딩 프레임으로 번역되며, 추정된 β -갈락토시다제를 코딩하는 1052개의 아미노산으로 이루어진 하나의 오픈 리딩 프레임이 동정되었다. 번역 결과는 도 2(서열번호 2)에 나타나 있다.

실시예

<28> 본 발명은 하기 실시예를 들어 추가적으로 설명된다.

<29> 실시예 1

<30> 재료 및 방법

<31> 본 실험 전체에서 사용된 모든 화합물과 배지 조제물은 Sigma(Dorset, UK), Invitrogen(Paisley, UK), Oxoid(Basingstoke, UK), Qiagen(West Sussex, UK) 및 Promega(Southampton, UK)에서 구입하였다.

<32> 박테리아 균주

<33> 비피도박테리움 비피덤 균주(NCIMB 41171)는 마이크로뱅크 튜브내 냉동 비드상에서 -70°C 에서 유지하였다. 나중 실험을 위해, 균주는 Wilkinson Chalgren(WC) 아가(Oxoid, UK) 및 TPY 배지(trypticase phytone yeast extract medium)에서 소생시키고, 37°C 에서 48시간 동안 혐기적으로(CO_2 및 N_2 조성은 각각 80% 및 20%) 배양하였다. 콜로니 모양과 오염원의 부재는 그람 염색으로 테스트하였다.

<34> *E. coli* 균주

<35> *E. coli* 균주인 DH5a를 본 실험에 사용하였고, 이들은 일반적으로 LB(Luria Bertani) 아가나 브로스(Sambrook J. and Russell, W.D., (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York)에서, 37°C 로 호기적으로 배양하였으며, 때에 따라 항생제($100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 암피실린 및/또는 $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 클로람페니콜)와 $40\ \mu\text{l}$ 의 2% X- α -Gal을 보충하였고, $7\ \mu\text{l}$ 의 20% IPTG(이소프로필- β -D-티오갈락토사이드)를 미리 만들어진 90 mm 아가 플레이트 표면에 도포하였다.

<36> *E. coli* DH5a 균주(Invitrogen, Paisley, UK)(유전자형: $\text{F}^{\phi}80\text{lacZ}\Delta\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169 recA1 endA1 hsdR17}(\text{r}_k^-, \text{m}_k^-)\text{phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1}\lambda^{-}$)는 α -갈락토시다제 양성 균주이며, 그외 모든 유전자 조작에 사용하였다.

<37> 비피도박테리움 비피덤으로부터 게놈 DNA 추출

<38> 게놈 DNA는 100 ml의 WC 혐기성 브로스로부터 수거한 세포 펠렛으로부터 염색체 DNA를 준비하는, 하기 방법을 이용하여 비피도박테리움 비피덤 균주(NCIMB 41171)로부터 분리하였다. 세포를 10 ml의 TES 완충액(10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH8)에 재현탁한 다음, $200\ \mu\text{l}$ 의 라이소자임/무타노라이신(lysozyme/mutanolysin) 혼합물(4:1, 라이소자임 10 mg/ml; 무타노라이신 1 mg/ml)을 30분간 37°C 에서 처리하였다. 이후, 세포에 $200\ \mu\text{l}$ 의 프로테나제 K(20 mg/ml) 및 $200\ \mu\text{l}$ 의 RNase(10 mg/ml)을 처리하고, 혼합한 다음, 1시간 동안 65°C 에서 배양하였다. 최종적으로, 세포에 2 ml의 10% SDS를 첨가하여 65°C 에서 15분간 배양하였다. 여기에 페놀/클로로포름 12 ml을 첨가하고, 인터페이스(interphase)로부터 수상을 쉽게 분리할 수 있을 때까지 추출을 반복 실시하였다. 게놈 DNA를 이소프로판올로 침전시키고, 10 mM Tris-HCl - 1 mM EDTA(pH8)에 재현탁하였다. 이후, 게놈 DNA를 제한 효소로 절단하여, 동일한 효소로 자른 pSP72에 연결한 다음, 알카리 포스포타제를 처리하였다. 비피도박테리움 비피덤 게놈 DNA의 절단은 EcoRI, PstI, BamHI, SmaI 또는 KpnI을 이용하여 수행하였다. 연결 혼합물을 이용하여 *E. coli* DH5a를 형질전환하였고, β -갈락토시다제 양성 콜로니를 X-Gal-함유 플레이트에서 블루 콜로니로 동정하였다.

<39> 벡터 DNA 제조

<40> 본 실험에서 클로닝 및 발현에 사용한 벡터는 pSP72(Promega, UK)(Krieg, P.A. and Melton, D.A.(1987). In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. Methods on Enzymology. 155: 397-415)였다.

<41> 이 벡터는 pSP72에 코딩되어 있지 않은 β -갈락토시다제의 알파-단편의 상보적인 활성이 결핍되어 있어, 선택하

였다. 이 박터는, β-갈락토시다제의 처음 146개의 아미노산에 대한 코딩 정보와 조절 서열을 포함하는 *E. coli* DNA의 짧은 단편을 가지고 있지 않아, 이 β-갈락토시다제의 카복시 말단 부분을 발현하는 *E. coli* 균주 (즉, DH5a)와 조합하여 활성의 β-갈락토시다제(알파-상보)를 제공한다.

<42> 이 박터는 제조사의 설명서에 따라 DNA 대비 10배에 해당하는 효소(효소 단위: μgr DNA는 플라스미드 DNA μgr 당 효소 10 단위이거나, 또는 플라스미드 DNA 0.5 pmol 당 효소 10 단위임)를 이용하여 PstI, BamHI, HindIII, SmaI, KpnI 및 EcoRI으로 절단하였다. 효소는 열에 의해 불활성화(65 °C에서 20분)한 다음, 제한효소 절단 패턴을 수평적인 젤 전기영동 분석에 의해 분석하였다. 젤에 하나의 단편이 존재하는 것은 박터의 완전한 절단과 박터가 제한효소로 한번 절단되었음을 시사한다.

<43> 박터의 충분한 절단은 또한 컴피턴트 *E. coli* DH5a에 미연결 분자의 형질전환에 의해 테스트하였다. 암피실린 (100μgr/ml)이 첨가된 LB 아가 플레이트상에 형성된 콜로니의 수는 절단되지 않은 분자의 표시이며, 이후의 실험에서의 예상되는 백그라운드를 나타낸다.

<44> 제조사의 설명서에 따라 소의 장내 알칼라인 포스파타제 CIAP(Promega, Southampton, UK)를 이용하여 박터를 추가적으로 탈인산화하였다. 처리 효율은 (박테리오파지 T4 DNA 라이게아제를 제조사의 설명서에 따라 사용한) 박터의 자가-연결(self-ligation) 및 후속적인 DH5a 세포로의 형질전환에 의해 테스트하였다. 형성된 콜로니 수는 재고리화된 분자(클로닝되지 않은 박터)의 갯수를 나타내며, 여기에서 CIAP 박터 처리하지 않은 경우에 형성된 콜로니를 제하면, 탈인산화되지 않은 박터의 갯수가 된다.

<45> 계놈 DNA 라이브러리 구축

<46> 계놈 DNA는 원핵생물 DNA내에서 빈번하게 이루어지는 6개의 뉴클레오타이드 서열을 인지하는 6종의 제한 효소로 부분 절단하였다. EcoRI, BamHI, PstI, KpnI, SmaI 및 HindIII는 각각 5'G/AATTC'3, 5'G/GATCC'3, 5'CTGCA/G'3, 5'GGTAC/C3', 5'CCC/GGG3', 및 5'A/AGCTT3'을 특이적으로 인지하는 타입 II 제한 엔도뉴클레아제며, 이들 서열내에 4개의 뉴클레오타이드로 이루어진, EcoRI, BamHI 및 HindIII의 경우에는 각각 AATT, GATC 및 AGCT의 5' 돌출부(overhang)가, 그리고 PstI 및 kpnI의 경우에는 각각 ACGT 및 GTAC의 3' 돌출부가, 그리고 SmaI은 블런트 엔드(blunt end) 형성되는 이중가닥 절단을 수행한다.

<47> 이들 효소 모두 활성이었으며, 이가 마그네슘 이온이 존재하는 경우에만 DNA를 절단할 수 있었다. 이들 이온은 단지 필수 보조인자였다.

<48> DNA의 제한효소 절단

<49> 계놈 DNA 샘플의 모든 제한효소 절단은 2시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하여 실시하였고, 최종적으로 65 °C에서 20분 동안 열에 의해 불활성화하였다. 이후, 반응물을 실온으로 냉각시키고, 적량의 로딩 완충액을 첨가하고, 밀폐된 유리 모세관을 이용하여 부드럽게 혼합하였다. 이 용액은 0.8% 아가로스 젤의 웰에 주입하고(14-16 시간 동안 4-5 volt의 전력 공급), 1 kbp DNA 표준물질(Promega, UK)(Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002))을 이용하여 절단된 DNA 크기를 추정하였다.

<50> 제한효소로 절단한 후 생성된 단편의 정제

<51> 반응 혼합물 및 아가로스 젤에서의 단편 정제는 Qiagen 사의 QIAEX 젤 추출 키트(West Sussex, UK)를 이용하여 수행하였다. 프로토콜은 제조사의 매뉴얼에 상세히 기술되어 있다.

<52> DNA 연결 및 형질전환

<53> QIAEX 젤 추출 키트를 이용하여 DNA 단편을 분리한 다음, 이를 CIAP-처리한 pSP72 박터에 연결하였다. 연결을 위해, 표 1에 나타낸 바와 같이 적량의 DNA를 멸균한 0.5 ml 미세원심분리관에 넣었다.

<54> 시험관 DNA

<55> A 박터(15 fmoles [~ 29.7 ng])

<56> B 박터(15 fmoles ~29.7ng DNA)

<57> + 삽입체(외래물 15 fmoles ~ 69.3ng)

<58> C pUC 대조군(0.056 fmoles [-100 pg])

<59> 연결 반응에서 플라스미드 DNA 박터 : 삽입 DNA 단편의 몰비는 ~ 1: 1이어야 한다. 최종 DNA 농도는 ~ 10 ng/

μ이어야 한다.

<60> 표 1: 연결 혼합물. A 관은 형질전환 후 형질전환체 총 수에서 제해야 될 자가-연결된 벡터 DNA 수이다. B 관은 벡터와 DNA 단편의 연결을 나타낸 것이고, C 관은 형질전환 효율을 계산하기 위한 대조군이다.

<61> 각각의 연결 전에, DNA 단편들은 45 °C에서 5분간 가온하여, 단편을 제조하는 동안에 다시 어닐링되는 코헤시브 (cohesive) 말단을 용융하였다. 모든 연결 반응에서 벡터: 삽입 DNA의 몰 비를 1:1로 정하고, 반응 어셈블리를 Promega의 지침에 따라 수행하였다.

<62> A 관과 B 관에, 1.0 μl의 10x 연결 완충액과 0.5 Weiss 단위의 T4 DNA 라이게이즈(Promega, UK)를 넣고, 분자생물학에 적합한 등급의 물을 사용하여 연결 반응 부피를 10 μl로 조정하였다. C 관에, 10x 연결 완충액 1.0 μl을 넣고, 분자생물학에 적합한 등급의 물을 사용하여 연결 반응 부피를 10 μl로 조정하였다.

<63> DNA 단편은 물과 함께 시험관에 넣은 다음 5분간 45 °C로 가온하여, 제조하는 동안에 다시 어닐링되는 코헤시브 (cohesive) 말단을 용융하였다. DNA는 0 °C로 냉각한 다음 나머지 연결 반응시약을 첨가하고, 반응 혼합물을 16 °C에서 철야 인큐베이션하였다(Sambrook and Russell, 2001).

<64> (형질전환 효율을 감소시키는 연결 혼합물을 제거하기 위한) 에탄올 침전 및 연결된 단편의 정제를 수행한 다음, 형질전환을 Hanahan 지시에 따라 수행하였다. 연결된 DNA ~50 ng의 5 μl 용액을 컴피턴트 *E. coli* DH5a 세포 100 μl에 첨가하였다. 열 처리 및 암피실린 내성 유전자의 발현을 수행한 후, 세포를 암피실린(100 μg r/ml), X-α-Gal(40 μl의 2% X-α-Gal) 및 IPTG(7 μl의 20% IPTG)가 함유된 LB 플레이트 표면에 도말하였다.

<65> 각 연결 반응물에서의 형질전환체의 수를 측정하였다. C 관에서 일반적으로 수득되는 형질전환체 갯수는 $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cfu/μg이었지만, A 관의 경우에는 500 - 600 cfu/μg이었다. A 관에서의 형질전환체 갯수는 벡터 DNA의 처리 효율을 나타낸다. B 관의 형질전환체 수는 $2 - 4 \times 10^4$ cfu/μg이었다.

<66> 형질전환체의 수

<67> PstI 염색체 DNA와의 연결 혼합물에서, 약 2500개의 스크리닝된 형질전환체 중에서 13개의 β-갈락토시다제 양성 클론이 나타났으며, BamHI 처리 염색체 DNA에서는 약 7개의 양성 클론(~1500 scr. 형질전환체)이, EcoRI 처리 염색체 DNA에서는 약 3개의 양성 클론이(~1300 scr. 형질전환체), KpnI의 경우 7개의 양성 클론이(~2000 scr. 형질전환체), SmaI의 경우 3개의 양성 클론이(~16000 scr. 형질전환체), 그리고 HindIII의 경우 2개의 양성 클론이(~1200 scr. 형질전환체) 나타났다.

<68> 양성 클론의 절단

<69> 여러가지 β-갈락토시다제 유전자를 동정하기 위해, 양성 클론으로부터 분리한 플라스미드를 하기 표와 같이 절단하였다.

<70>

	샘플	효소
1차 절단	pB1, pB2, pB3, pB4, pB5, pB6, pB7	<i>Bam</i> HI
2차 절단	pP1, pP2, pP3, pP4, pP5, pP6, pP7, pP8, pP9, pP10, pP11	<i>Pst</i> I
3차 절단	pP12, pP13, pP14	<i>Pst</i> I
4차 절단	pE1, pE2, pE3	<i>Eco</i> RI
5차 절단	pP1, pP12, pB1, pP2, pE1, pE2, pE3.....	<i>Pst</i> I 및 <i>Eco</i> RI
6차 절단	pS1, pS2, pS3	<i>Sma</i> I
7차 절단	pP1, pP12, pB1, pP2, pS1, pS2, pS3	<i>Pst</i> I 및 <i>Sma</i> I
8차 절단	pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	<i>Kpn</i> I
9차 절단	pP1, pP12, pB1, pP2, pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	<i>Pst</i> I 및 <i>Kpn</i> I

첫번째 글자(p)는 플라스미드와 삽입 유전자를 나타내고, 두번째 글자(P,B,E,S,K)는 게놈 DNA로부터 각 클론을 분리하는데 사용된 제한효소를 나타낸다.

<71> 절단 후 수득되는 단편의 겔 전기영동 분석은, 플라스미드 pB1, pP1, pP2 및 pP11 각각이 상이한 β-갈락토시다제를 코딩하는 삽입체를 가지고 있는 것으로 확인되었다. pB1을 포함하는 클론을 이후의 분석에 사용하였다.

<72> DNA 서열분석

<73> DNA 서열 분석은 생거의 다이데옥시 체인 종결 방법으로, BigDye Terminator V.3.0 사이클 시퀀싱 키트

(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였고, 모세관 전기영동이 통합된 형광을 이용한 DNA 분석 시스템인 ABI Prism 3100으로 분석하였다.

<74> 삽입된 DNA 단편의 5'- 및 3'- 말단은 벡터에 특이적인 프라이머를 이용하여 서열분석하였다. 삽입체는 또한 Genome Priming System(GPS-1)(New England Biolabs, Uk)를 이용하여 더욱 서열분석하였다. GPS-1은 DNA 타겟에 무작위로 트랜스포존을 삽입하기 위해 TnsABC 트랜스포사제를 이용하는 TN7 트랜스포존 기반의 시험관내 시스템이다. 제조사의 설명서에 따라 공여체 : 타겟 DNA의 중량비를 1:4로 이용하였다. 타겟 플라스미드에 트랜스프라이머를 삽입한 후 서열분석하기 위한 분리된 플라스미드의 수는 25개였다. 이 수치는 제조사의 설명서에 따라 계산하였고, 유효 범위(fold depth of coverage)는 5로 추측되었다.

<75> 플라스미드 pB1에서, 사용된 벡터의 다중 클로닝 부위의 하류 973bp 위치에 ~1699bp 트랜스포존-삽입체의 삽입은 β-갈락토시다제 활성을 완전히 제거하였으며, 이는 개시 코돈이 벡터 MCS(다중 클로닝 부위)와 트랜스포존 부위 사이에 위치되어 있음을 의미한다. 그러나, MCS의 하류 841bp 위치에 삽입은 활성의 β-갈락토시다제의 생성으로 이어졌는데, 이는 개시 코돈이 MCS의 하류 841bp 내지 973bp 사이에 존재함을 의미한다. 효소 활성은 MCS의 하류 3565bp 위치에 삽입체가 삽입되었을 때 완전히 없어졌으며, 이는 개시 코돈이 이 위치의 하류에 있음을 의미한다. 또한, 1239bp, 1549bp, 1683bp, 1832bp, 2108bp, 2189bp, 2270bp, 2340bp, 2414bp, 2574bp, 2648bp, 2734bp, 2807bp 및 3410bp 위치에 삽입도 효소적 활성을 완전히 제거하였다.

<76> 서열분석 반응 혼합물에는 약 400-600ng의 플라스미드 DNA, 3.2pmol의 프라이머 용액 및 4μl의 BigDye 종결 용액이 포함되어 있었다.

<77> 오픈 리딩 프레임 식별

<78> B1의 오픈 리딩 프레임(ORF)은 NCBI의 ORF 파인더를 이용하여 위치를 확인하였다. 박테리아의 유전자 코드를 이용하였고, 프레임 길이는 100 bp인 것으로 확인하였다. 뉴클레오타이드 서열은 모두 6개의 가능성 있는 리딩 프레임으로 번역되며, 추정의 β-갈락토시다제를 코딩하는 1052개의 아미노산으로 이루어진 하나의 오픈 리딩 프레임이 동정되었다(도 2에 번역 결과를 나타냄).

<79> 실시예 2

<80> 비피도박테리움 비피덤 NCIMB 41171로부터 분리된 β-갈락토시다제 클론 효소를 이용한, E. coli 숙주(DH5a)에 서의 합성

<81> 별도로 언급하지 않는 한, 하기 기술된 합성은, 세포 투과성을 증가시키고 세포질 막을 파괴함으로써 세포를 비-생존성이 되게 하기 위해 (10,000 g로 원심분리하여 회수한), E. coli 바이오메스를 2000 ppm의 툴루엔으로 처리한 후, E. coli DH5a 숙주 세포 전체를 이용하여 수행하였다. E. coli 바이오메스는 실시예 1의 "E. coli 균주"에 기재된 바와 같이 준비하였다.

<82> 클로닝한 효소를 이용한 합성

<83> β-갈락토시다제를 이용한 합성은 기질 농도가 40% (w/w) 초기 벨리바이오스 농도인 조건에서 수행하였다. 합성 용액은 pH 6.0의 0.1 M 인산 완충액(또는 pH 6.2의 0.1M 사이트레이트 완충액 또는 pH 6.8의 포타슘 포스페이트 완충액)으로 준비하였다. 합성은 150 rpm의 교반 수조에서 40 °C로 수행하였다. 특이적인 효소에 대한 최적 pH는 다양한 pH에서 (o-니트로페닐-β-D-갈락토피라노사이드를 기질로 이용하여) 특이적 효소 준비물의 활성 측정치를 기초로 선정하였다.

<84> β-갈락토시다제 합성을 위해, 5 ml의 E. coli DH5a 세포 현탁물(활성 2.2 U/ml)을 원심분리(10,000 g)하여, 세포 바이오메스를 모으고, 상층액은 버렸다. 합성을 수행하기 위해, 상기 바이오메스는 10 g의 40%(w/w) 벨리바이오스 기질 용액로 재현탁하였다.

<85> 합성 중에 혼합물에 존재하는 다양한 당의 농도를 도 3에 나타낸다. 비피도박테리움 비피덤 NCIMB 41171로부터 클로닝한 β-갈락토시다제에 의해 합성한 갈락토올리고당 혼합물의 펄스형 전류계 검출이 연계된 고성능 음이온 교환 크로마토그래피(HPAEC-PAD) 크로마토그램은 도 4에 나타낸다. 최적 합성 시간대의 갈락토올리고당 혼합물의 당 농도를 표 1에 나타낸다.

<86> 표 1. 최대 올리고당 농도가 관찰되는 시간대에 40 %(w/w) 초기 벨리바이오스 농도에서의 β-갈락토올리고당 합성의 탄수화물 조성.

<87>

합성 초기 기질	GOS DP≥3	GOS DP=2	Lac	Glc	Gal
%(w/w)	농도(총 당에 대한 %)				
40	20.45	27.64	12.73	25.90	13.28

<88>

Lac: 락토스, Glc: 글루코스, Gal: 갈락토스, DP: 중합도

도면의 간단한 설명

<24>

도 1은 본 발명의 비피도박테리움 비피덤 β-갈락토시다제의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 1)을 나타낸 것이다.

<25>

도 2는 도 1의 뉴클레오타이드 서열에 대응하는 아미노산 서열(서열번호 2)을 나타낸 것이다.

<26>

도 3은 β-갈락토시다제와 기질로서 0.1M 인산 완충액(pH 6.0) 중의 40%(w/w) 락토스를 이용한 갈락토올리고당 합성 반응 동안의 시간 경과에 따른 반응을 나타낸 그래프이다.

<27>

도 4는 기질로서 0.1M 인산 완충액(pH 6.0) 중의 40%(w/w) 락토스를 이용하여 비피도박테리움 비피덤 NCIMB 41171 유래의 β-갈락토시다제에 의해 합성된 갈락토올리고당 혼합물의 고성능 음이온 교환 크로마토그램을 나타낸다(Glc = 글루코스, Gal = 갈락토스, Lac = 락토스, 알파(1-6) 갈락토바이오스, DP = 중합도).

도면

도면1a

1 ggatccgggtg aacgcgccga gcgcgggtgta cgtgctgcgc tcgtgcgagt cggaggagat
 61 cgcggggatc atgccccagt aggagatgtc gcgcagcggag tagatcacgt cgagcaggat
 121 gaacacgatg acgaacagga ccatgaacac gccgggtgtc acatccacga ggccgaacag
 181 gccgggtgaac accatgatca gcaggatgcc aggcacgatg ccgccaatga actgccacgg
 241 gcggaaccgg ccccagcggg tgttcgtgtt gtccacgagg ttgccgagca gcgggtcgag
 301 aaagatctcc gcgatcggga tgaccaccac gagtccgggtg atcaccgcga tgaggcgttt
 361 ggcaagcgtc ttgtccacgt cgatgaacag gcgggtggtc acgaacgtga tgaagaacgt
 421 gtcattgtg tttagaacg cggcctggcc caggitaccg aatgcgatg cgatcttctg
 481 acccgtgttc cgcgtgggct gcggccttcc ggtcgttcc gtgtgtgtg tggtagatcc
 541 gtcattgggtg tggtagcctc ctgagacct gtaaaagaatc cgtgcgcgtg aaccgctccg
 601 atcccgaaaa gcgtgagat agaacttct tgaaaaagta gaaaactata ccgcgtgtcg
 661 caaatcatgc caacttctg caaccggcac tccgtgtgga tgagtaaggt tgaagcctg
 721 ctgtatgtgc ttgaatctta agaaatccac gtattctgca tgttcaggc cttgtgccgc
 781 gaaatgctgg aaagaatttg cgcaatcaag taacaatatt taccctgtt gtacaaggaa
 841 cccgattcaa cgaggttccc tcaactcggc ggcaacgacg cgacccaatc cgatgcgaaa
 901 gcgaggacat catgaacaca accgacgac agcgggaagaa cggcgatccg atcgtctccc
 961 cgtccatacc gacgacggca tggctcggc acccgcgcgt gtacgcggtt caccggctcg
 1021 acgcccattc cgatcatcg tgctgtgtct gctcccagt cgacggcgg agcacgaatc
 1081 tcaggcagag ccttgacggc gaatggcggg tccgcgtcga gacggcggc acggggcctt
 1141 tcccgatgg gacgagcgc gggccggact ggatcagcga cgtgtcgcct ctgttcgcc
 1201 gcggcggtt cgacgattc tcttctcac gctgcaggt gcctcgcac ctggagactg
 1261 cggggctgct tgccccag tacgtgaac tgcatgacc atgggacgga catgaggacc
 1321 cgaaggcccc ggccatcccc gagcatggc atgtggcgt ctaccggcg gagttcgacg
 1381 cggatggcga agtcgccag gccgtgcgc aagggcgcc ggtgacgtt acctccagg
 1441 gcgcggccac agccatctac gtgtggctca acggctcgt cgttggctac gccgagact
 1501 ctttcaccc cagcagttc gacgtgacg acgcatcaa ggtggacggc aacgtgctgg
 1561 cggctgtct ctacgagtat tcgagcgcga gctggttga ggaacaggac ttctggcgtc
 1621 tgcacggcct gttccgctc gtogaactca acgagggcc cggcccccac atcgcgacc
 1681 tccatgccga cggcactgg gatctgccca catcaagggg ttcgctctc ctggatgtc
 1741 tgatgacgg tgccgcgaac gccgcgacgg tcgactcgc actgtgggac aagaacggca
 1801 ccatctgtc gcacaccgcc acgaaagcgg acggaacgct gcacgccgag gccgagatc
 1861 atgacggcg gccatggagc gccgaacgcc ccgacctgta cgagctatcc gtcaccctgc
 1921 tcgacggga cggcaaggtc ctggagaccg ctcgactcg catcggcttc cggcatgtgg
 1981 ccatcgagga cggcatctc aagctcaac gcaagcgcct cgtgttccgt ggcgtcaacc
 2041 gccacgagt cgactgccg gcggccggg ccataccga agaggacatg ctgtgggaca
 2101 tccgcttcat gaagcggc aacatcaac cgtgctgcac ctcgactat ccgaaccagt
 2161 cgcgctggtg cagctgtgc gacgaatac gcatctacct gatcagcag accaatctg
 2221 agaccatgg cagctggaac agccccggc acatccccgt gggaacctcc gtccccggtg
 2281 acgacgagc ctggctggc gcgtgcatc accggctgga cagcatgatc ctgcgcgacc
 2341 gcaacctcc cagcgtgct gtctgtcgc tgggcaacga atctacgcg ggcgaagtc
 2401 tcaaggccat gagcgcgac gcgcaccggc ttgatccggg tcgtcccgtc cactacgaag
 2461 gtgtcaactg gaacctgcc tacgacggga tcagcgacti cgaagccgt atgtaccca
 2521 agccggccga gatccaagac tggctcgaac acggcgacga acggggcgag gcgagcaag
 2581 cgttcgtcag ctgtgagtac atgcatgcca tgggcaactc gtgcggcggt ctgagcagt

도면1b

2641 tcatogacct cgaacggtag gagcgtact ccggcgggft catctgggat tacatcgacc
 2701 aggggctcgt ccagcgtctg cccgacggga gcgaacgcct cagcgtcggc ggagaatggg
 2761 gcgacctcc aaccgactac gaattcgtgg gcaacggcat cgtgttcgcc gaccgcacgc
 2821 ccagcccaa ggcgaggag gtcaagcagc tgtatcgcc ggtcaagctc gccccgacg
 2881 ggcacggcgt gaccatcgag aaccgcaacc tgttcgccgg caccgacggc tacgtgttcg
 2941 ccgacggct cctcgaagac gggcatgaga tctggcatgc cactaccgt ttcgacgtgg
 3001 ccgaggaga taccacaac catgacatcg ccttccgga catcgacgcg gacggggata
 3061 cgcgcaagt cacctacgag gtcgactcct tctcgcgca agccaccga tgggcccgg
 3121 ccgctacga gctcgcgtc ggccaactca ccggcacgct caacccgaa caggacatca
 3181 ccgagaccag ccatgacgac gacggcccgc caactcgac gctcagccga tggaacggcg
 3241 gcatccgccg cgacgacgag gaaattctc tgtcacgac tcagggaggc atcgtctct
 3301 ggaagcgcga cgaccgggaa atggctatc gtcgccccga actcgtcacg ttcggccat
 3361 tgaccgaaa cgatcggtt aaccattccg gtttcgaccg tgcgcatgg ttcgcccg
 3421 gccgatacg catcgtaac gaaacgaaa tccatgaaag cgatgacggt ctcgtagcg
 3481 aataccagta cgaactgcc gatccgaacc acacgccgt gtcgctact tacatgtca
 3541 actccgatat gcgtatgca ctgaccgtc aataccccgg gaacgccact gacatggcca
 3601 gctcggcgc gttcgtatc gaatgggagc tccccggcga atacgatcgt ctgcgctact
 3661 acggccccgg ccccgaggag acctaccgc accgtaagca gggcggcaag ctccggcatc
 3721 gggacgccac cgcgaaggcg agcatggcg cgtatctcat ggtgcaggaa accggcagcc
 3781 acgaggact cgcgtgctc gaagccaccg acatccaagg ccacggattg cgcgtcacc
 3841 aacggcgcga ccgtcactc acggccagcc tctgcctcg gaacacctac acgatcgagg
 3901 cccgcccgc cgacgaggac ctgcccaaac cgcgcccaaa ctacctgccc ctgctcggg
 3961 cccgatggg cgtcgtgga gacgactct ggggagcccc cgtccacacg gcctaccagc
 4021 tccccggcg cagcccgtc acctcgacg tgacctcga actcatctga ccggcaacgg
 4081 cggcggcat gcaccacat gccggcccgc gcccgccta cgacgcggcg atcgaggcca
 4141 cggcgctgc ggccggcgc ggcaccggcg aggaggcgt cagcgcgcc gggcacggcg
 4201 tcacggcac caccgccag gctcctcgc tcatacaca cccgatggac gtgatctgc
 4261 gcaacatccg caccgtgccc gagaagatgg caaccgccc gacatcctc ggctgccacc
 4321 tcgaaggccc gttcctcgc ctcaagtgc agggcgcgca cgattcgaac tgcctcaag
 4381 acccgatgc cgaactcatg gaccgcatgc tcgacgctc gggcgcgac ctcgcccgc
 4441 gcaagctcgg gtgcatccg cagatcaca tctgacccc accgactgga ccgccaaca
 4501 cgtctggtc gccggcccgc aggtggagta aactcctc agcaaatcg acgcccgtc
 4561 cggcgtctc gagacgact ctacgcctg aggaacgaag cttgcgcgcg gcaccagttc
 4621 ggtcgtcagc aggatgtgac gacgacccc ccgctcatg tcaacccat cgatcagggt
 4681 ggagaacgcc atcgggcca actcccttg atcgatcga tacgaactca gcggcggcga
 4741 cgtgtaccgg gcgatcgact ggtgttcac actaccacg gccaactcgt cgggaacctc
 4801 cggcgcagc cgttcaacg cctgcaacgc cccaccgca agcagctcgg cggccacgat
 4861 caaacatcg gcatgctgc cggcctcag atggtcagcc accaactgct ccgagagacg
 4921 atagccgtc tccacgtgga acgtcccga cgaatacacc aatccgtccg tttcaatc
 4981 cagatgcgc gccactgac ggaacgacag ctcgcaatg tctcgggat agtcatgcat
 5041 gccatgatg ctgccacgc cgcgagaaa cgcgatatga ctgcggcccg ccgcatcat
 5101 cgcgtccaag gctccagca tctctcga cagatcggga cacacggagt cgaacaggcg
 5161 cggcggcga ttctgtcga tgcacagcc atcggggagc accatagca gggctcgcag
 5221 gtccgcttc ggaacaccg tggctcccac ggtgatgaa ccatcaaac cgttgcgcg
 5281 ttccgtcaac tctgtatgg acaactgag ctggtccaat tccaacgact ccgacgctc
 5341 cgaagaacc tccgagat cggcgaagta cgcgtctc aattctccc cggacggagg
 5401 cgcaccaac acccgatcg cgggacggaa cacgttcga taccatct cctcgcacac

도면1c

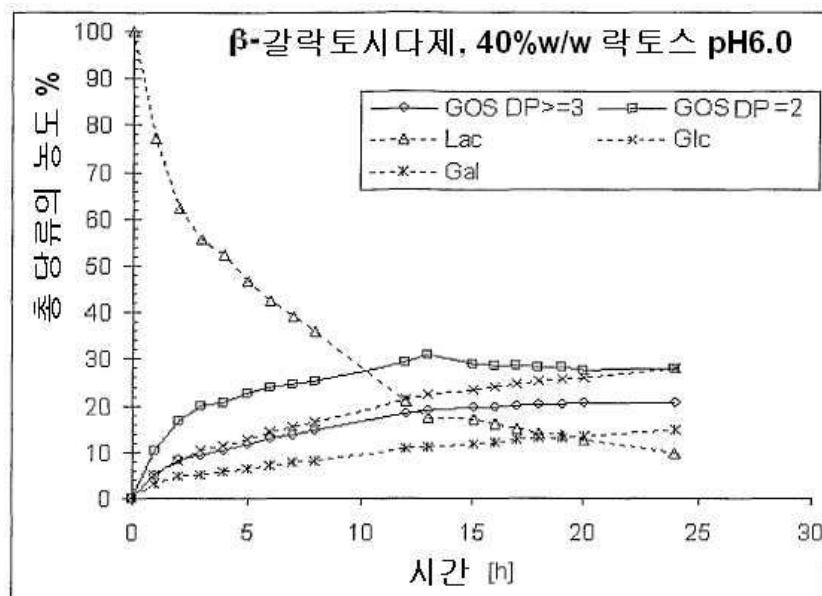
5461 gcgcaacaca cgccgacgcg tctcctcctt gatggagaac gacgggtcgt tcaacaagcg
 5521 tgacaccgtg ctctgcgaca ccccgccccg tcccgcgact tcctfgagcg tggccatgac
 5581 atcctccccg caaactttag taaagggttt tactacagca taaccgggga aggcgggggtt
 5641 agcggcattg gcggcgtgga agttaccca tgactggtag actgcacatg tcccgcaat
 5701 aggggcaatg catagggggg tggcgggcat gtgcagcaac attcccgtca ccttacgatt
 5761 cttatagcgt gtcaggtaaa agaattatga ttctcaatcc accttccggc cgcgctgca
 5821 gactcaaatg gccatgatgc atagcgacaa tctctcgac tatggataaa cccaatccgt
 5881 gatgagggtga tgcagatccc acatgcgtat ttatcctatt atcctcccct ctgttaaaag
 5941 gtgacaggaa atcatctatc ctctatcgg aaagatccat gccggattg gatattgcta
 6001 tcgcaatgca ggactcgcct togtattgcc tgotgtggc taagttatc catacatgfg
 6061 gttgagccgc acgattatgc tgaatggcat tctgaataag gtttgaatc atctgtctaa
 6121 ttagcagacc atcggctagg atatatgcat tctccagatt ggtatgtact tgaactctat
 6181 ctccgataag ttccatattt tctgaagaa cattgcgaat gatctcagct acattaactc
 6241 ggctaagatc agctcgggtt aattgctgaa ctctcgacaa ttcgagcaga tgattgacga
 6301 ttcaacccc agcatgattt gaagccaaag ccttttcgac gaaaggctcg caacgctcat
 6361 cgaanaagctg gttgtgcagc ggaatctcca atgcggccga agtggccgca agtggatttt
 6421 ttaactcatg tgacgcctgc gcgataaatt ccttttccc actgattgag ctgttgagat
 6481 cctttaacat gaggttgat gcggatgcaa tagtgtacgc ctcgtcgttt tcatatggaa
 6541 taacgatagg ttgccttcc aatccagcgt cggacgcgat aatctgagag gccacactat
 6601 tgattctcg ttgtgccta gtggcgataa tccaagtat tctccagat aatatgccga
 6661 aaacaatgat gggggctatg ctaccgcca atacagatc ccgggatttt atgtctcct
 6721 gttcatagt tagcgttaaa gcaccttac cggagtcata cccggcagaa acgtaactct
 6781 taccggagtc aggaggaatg gcttgcgaat tcaactatg ttgtcatcg gcatctctg
 6841 cctgagtaaa agattattt acggtcactg ttccagttg ccggttcacg acataatg
 6901 tcatggcggg caccactccg gtaagcatga agaacacgat gacgatcgtg gtgaccaatc
 6961 ttctcttctg agaccactga aacggtaaac gcagttcgg atggctggaa tggctccat
 7021 tcgacgaagg atattcaggc ttttcatga tatcgatat cctgtccgg gaacggttc
 7081 aatgaaatca gtgattccga tttcgtgcg aatcgcatag attgtgtct tgacgattcc
 7141 tctcgtatga gcgtgatcat cctgccaaat ctcacgatat agacatccg cactaatcac
 7201 cgcacctgc gcctcaatca gcgtcctcaa tacggcaagt tctcgttcc caaactttag
 7261 ttctgcaccg cgaaccgtga t

도면2

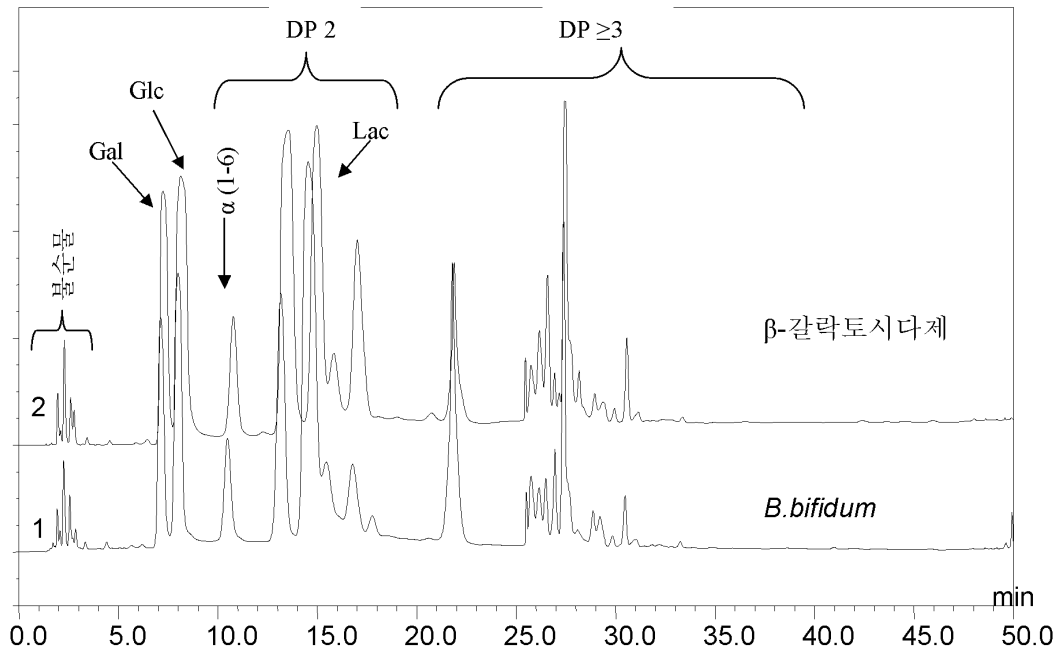
```

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
1 MNTTDDQKNGDPIVSPSIPPTAWLADPRVYAVHRLDAHSDHACWSRSPVDGESTNLRQSLDGEWVRVRETAPTGRFPDGTSDGPDWISDVSPLPAAPGF
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
101 DDSSFSRQVQVPSHLETAGLLAPQYVNVQYPWDGHEDPKAPAIPEHGHVAVYRREFDADGEVAQAVREGRPVTLTFQGAATAIYVWLNQSVVYAEDESFTP
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
201 SEFDVTDAIKVDGNLAVVVCYESSASWLEDQDFWRLHGLFRSVELNARPAHIADLHADADWDLATSRGSLSLDVLIDGAANAATVDFALWDKNGTIVW
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
301 HTATKADGTLHAEAEIDDAAPWSAERPDLIELSVTLLDADGKVLLETARTRIGFRHVAIEDGILKLNKRLVFRGVNRHEFDCRRGRAITTEEDMLWDIRFM
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
401 KRHNINAVRTSHYPNQRWYELCDEYGIYLIDETNLETHGSWNSPGDIPVGTSPVGDDEAWLGACIDRLDSMILDRNHPVSLVNSLGNESYAGEVLKAM
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
501 SAHAHRLDPGRPVHYEGVNNHAYDGISDFESRMYAKPAEIQDWLEHGDERGEASKPFVSCBYMHAMGNSCGGLSEFIDLERYERYSGGFVWYIDQGLV
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
601 QRLPDGSRERLSVGGWGDPRPTDYEFVNGNIVFADRTPSKAQEVKQLYSPVKLAPDGHGVTIENRNLFAGTDGYVFAARLLEDGHEIWHADYRFDVAAGD
710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
701 TQHHDIAPFDIDADGDTREVITYEVDLLAEATAWAPAGYELAFGLTGTNLNPEQDITETSHDDDGRAIRTLRSRWNAGIRRDEEILLSTRQGGIVSWKRD
810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
801 DRENVIRRELVTFRPLTDNDRGNHSGFDRAAWFAAGRYAIVTETKIHESDDGLVAEYQYELADPNHTPVSVTYHVNSDMRMQLTVEYPGNATDMASLPA
910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
901 FGIEWELPGEYDRLRYGPGPEETYDRKQGGKLGIWDATAKASMAPYLMVQETGSHEDEVWLEATDIQGHGLRVTRQGRHFTASLLPWNTYIEAARR
1010 1020 1030 1040 1050
1001 HEDLPKPRHNYLRLAAQMGVGGDDSWGAPVHTAYQLPAGRPLTLDVNLLELI
    
```

도면3



도면4



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> LINDSAY, Clare L
- <120> Product and Process
- <130> 13906WO:GH
- <150> GB 0601901.2
- <151> 2006-01-31
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 7281
- <212> DNA
- <213> Bifidobacterium bifidum
- <220>
- <221> gene
- <222> (1)..(7281)

<400> 1
 ggatccgggtg aacgcgccga ggcggtgta cgtgctgcgc tcgtgcgagt cggaggagat 60
 cgcggggatc atgccccagt aggagatgtc ggcagcgag tagatcacgt cgagcaggat 120
 gaacacgatg acgaacagga ccatgaacac gccggtgttc acatccacga ggccgaacag 180
 gccggtgaac accatgatca gcaggatgcc aggcacgatg ccgccaatga actgccacgg 240
 gcggaaccgg cccagcggg tgttcgtgtt gtccacgagg ttgccgagca ggggtcgag 300
 aaagatctcc gcgatgcgga tgaccaccac ggtccgggtg atcaccgcga tgaggcgttt 360
 ggcaagcgtc ttgtccactg cgatgaacag cgcggtggtc acgaacgtga tgaagaacgt 420
 gctcattgtg ttgtagaacg cggcctggcc caggttaccg aatgcgatg cgatcttctg 480
 acccgtgttc cgcgtgggct gcggccttcc ggtcgtttcc gtgtgttggtg tggatggatcc 540
 gctcatggtg tggatggctc cttgcgacct gtaaagaatc cgtgcgcgtg aaccgctccg 600
 atcccgaaa gcgtgagtat agaactttct tgaaaaagta gaaaactata ccgctgtcgc 660
 caaatcatgc caacgttctg caaccggcac tccgtgtgga tgagtaaggt ttgaagcctg 720
 cttgatgtgc ttgaatctta agaaatccac gtattctgca tgttcaggc cttgtgccgc 780
 gaaatgctgg aaagaatttg cgcaatcaag taacaatatt tacccttgtt gtacaaggaa 840
 cccgattcaa cgaggttccc tcactgcggc ggcaacgacg cgacgcaatc cgatgcgaaa 900
 gcgaggacat catgaacaca accgacgatc agcgggaagaa cggcgatccg atcgtctccc 960
 cgtccatacc gacgacggca tggctcgccg acccgcgcgt gtacgcggtt caccgctcgc 1020
 acgcccattc cgatcatcgc tgctgggtctc gctccccagt cgacggcgag agcacgaatc 1080

tcaggcagag ccttgacggc gaatggcggg tccgcgtcga gacggcgccg acgggcccgtt 1140
 tccccgatgg gacgagcgac gggcccggact ggatcagcga cgtgtcgcct ctgttcgccc 1200
 cggccggatt cgacgattcg tcgttctcac gcgtgcaggt gccctcgcat ctggagactg 1260
 cggggctgct tgcccccgag tacgtgaacg tgcagtacc c atgggacgga catgaggacc 1320
 cgaaggcccc ggccatcccc gagcatggcc atgtggcggc ctaccggcgc gatttcgacg 1380
 cggatggcga agtcgcccag gccgtgcgcg aagggcggcc ggtgacgctt acctccagg 1440
 gcgcggccac agccatctac gtgtggctca acggctcgtt cgttggctac gccgaggact 1500
 cttcacgcc cagcgagttc gacgtgacgg acgcgatcaa ggtggacggc aacgtgctgg 1560
 cggctgtctg ctacgagtat tcgagcgcga gctggttggg ggatcaggac ttctggcgtc 1620
 tgcacggcct gttccgctcc gtgcaactca acgcgaggcc cgcccccac atcgccgacc 1680
 tccatgccga cgccgactgg gatctcgcca catcaagggg ttcgctctcg ctggatgtgc 1740
 tgatcgacgg tgccgcgaac gcccgacggg tcgacttcgc actgtgggac aagaacggca 1800
 ccatcgtctg gcacaccgcc acgaaagcgg acggaacgct gcacgccgag gccgagatcg 1860
 atgacgcggc gccatggagc gccgaacgcc ccgacctgta cgagctatcc gtcaccctgc 1920
 tcgacgcgga cggcaaggtc ctggagaccg ctgcactcg catcggttc cggcatgtgg 1980
 ccatcgagga cggcatcctc aagctcaacg gcaagcgcct cgtgttccgt ggcgtcaacc 2040
 gccacgagtt cgactgccgg cgcggccggg ccatcaccga agaggacatg ctgtgggaca 2100
 tccgttcat gaagcggccac aacatcaacg cgtgctgcac ctgcactat ccgaaccagt 2160
 cgcgctggta cgagctgtgc gacgaatacg gcatctacct gatcgacgag accaatctgg 2220
 agacccatgg cagctggaac agccccggcg acatccccgt gggaacctcc gtccccggtg 2280

acgacgagge ctggctgggc gcgtgcatcg accggctgga cagcatgac ctgcgcgacc 2340

gcaaccatcc cagcgtgctc gtctggtcgc tgggcaacga atcctacgcg ggcgaagtcc 2400

tcaaggccat gagcgcgcac gcgcaccggc ttgatccggg tcgtcccgtc cactacaag 2460

gtgtcaactg gaaccatgcc tacgacggga tcagcgactt cgaaagccgt atgtaccca 2520

agccggccga gatccaagac tggctcgaac acggcgacga acggggcgag gcgagcaagc 2580

cgttcgtcag ctgtgagtac atgcatgcca tgggcaactc gtgcggcggc ctgagcgagt 2640

tcatcgacct cgaacggtac gagcgtact cggcggggtt catctgggat tacatcgacc 2700

aggggctcgt ccagcgtctg cccgacggga gcgaacgcct cagcgtcggc ggagaatggg 2760

gcgaccgtcc aaccgactac gaattcgtgg gcaacggcat cgtgttcgcc gaccgcacgc 2820

ccagcccaa ggcgcaggag gtcaagcagc tgtattcgcc ggtcaagtc gcccccagc 2880

ggcacggcgt gaccatcgag aaccgcaacc tgttcgccgg caccgacgc tacgtgttcg 2940

ccgcacggct cctcgaagac gggcatgaga tctggcatgc cgactaccgt ttcgacgtgg 3000

ccgcaggaga taccaaac catgacatcg ccttcccga catcgacgcg gacggggata 3060

cgcggaagt cacctacgag gtcgatctc tgctcgccga agccaccga tggcgccgg 3120

ccggctacga gtcgcgttc ggccaactca ccggcacgt caaccgaa caggacatca 3180

ccgagaccag ccatgacgac gacggccgc caactcgac gtcagccga tggaacgcc 3240

gcatccgcc cgacgacgag gaaattctc tgctacgcac tcaggaggc atcgtctct 3300

ggaagcgcga cgaccgggaa atggfcatcc gtcgccccga actcgtcac ttccgccat 3360

tgaccgaaa cgatcgcggc aaccattccg gtttcgaccg tgccgatgg ttcgcccgcg 3420

gccgatacgc catcgtaacg gaaacgaaaa tccatgaaag cgatgacggt ctcgtagcgg 3480

aataccagta cgaacttgcc gatccgaacc acacgcccgt gtccgtcact taccatgtca 3540

actccgatat gcgatgcaa ctgaccgtcg aataccccgg gaacgccact gacatggcca 3600

gtctgcccgc gticggatc gaatgggagc tgcccggcga atacgatcgt ctgcgtact 3660

acggccccgg ccccaggag acctaccgcg accgtaagca gggcggcaag ctcgcatct 3720

gggacccac cgcaaggcg agcatggcg cgtatctcat ggtgcaggaa accggcagcc 3780

acgaggacgt ccctggctc gaagccaccg acatccaagg ccacgattg cgcgtcacce 3840

aacgcggcga ccgtcactc acggccagcc tgctgccctg gaacacctac acgatcgagg 3900

ccgcgcgccg ccacaggac ctgccc aaac cgcgccaa ctacctgcg ctgctcgcg 3960

cccagatggg cgtcggtgga gacgactct ggggagcccc cgtccacacg gcctaccagc 4020

tgcccgccgg caggccgctc accctcgacg tgaacctga actcatctga ccggaacgg 4080

gcgccggcat gcaccacat gccccgccg gccccgcta cgacggcg atcgaggcca 4140

cgggcctgc ggcgcggac ggcaccggcg aggaggcgtt cgagcgcgc gcccacgcg 4200

tccacggcac caccgccag gtctctcgc tcatcaciaa cccgatggac gtgatctgcc 4260

gcaacatccg caccgtgcg gagaagatgg caaccgccc cgacatctc ggctgccacc 4320

tcgaaggccc gttctcgc ctcaagtga agggcgcgca cgattcgaac tgctcaaag 4380

acccgatgcc cgaactcatg gaccgatgc tcgacgctc gggcggcgc ctgcccgcg 4440

gcaagctcgg gtgcatccg cagatcacia tctcgacccc accgactgga ccgccaaca 4500

cgtctggtgc gccggccgc aggtggagta aactcttcc agcaaatcg acgcccgtgc 4560

cgccgtctc gagacgacgt cttacgcctg aggaacgaag cttgcgcgcg gcaccagttc 4620

ggtcgtcagc aggatgtgac gacgcacccg ccgctcatgc tteaaccat cgatecagggt 4680
 ggagaacgcc atgcgggcca actccctttg atcgatcgca tacgaactca gcggcggcga 4740
 cgtgtaccgg gcgatcgact ggttgttcac actcaccacg gccaaactcgt cgggaacctc 4800
 cacgcgcagt gcgttcaacg cctgcaacgc ccccaccgca agcacgtcgg cggccacgat 4860
 caaacatcg ggcgatgctg cggcctcagc atggtcagcc accaactgct ccgcgagacg 4920
 atagccgttc tccacggiga acgtgccgga cgaatacacc aatccgtccg tttccaatcc 4980
 cagatgcgcg gcccaactgac ggaacgacag ctgcggaatg tcctcgggat agtcatgcat 5040
 gcccatgatg ctgcccacgc cgccgagaaa cgcgatatga ctgcggcccg ccgcgatcat 5100
 cgcgtccaag gcgtccagca tcgtctgca cagatcggga cacacggagt cgaacaggcg 5160
 cggcgcggga ttcgtgtcga tgcacacgcc atgcgggagc accatatgca gggctcgag 5220
 gtccgcttcg gaaacaccg tggctcccac ggtgatgaac ccatcaaact ccgttgcgcg 5280
 ttccgtcaac tcgtgtatgg acaacgtgag ctggtccaat tccaacgact ccgcacgctc 5340
 cgcaagaacc ttcgcagat cggcgaagta cgcgtcctgc aattcctccc cggacggagg 5400
 cgcaccaac accgcgatcg cgggacggaa cacgttgca taccatct cctcgcacac 5460
 gcgcaacaca cgccgacgcg tctctcctt gatggagaac gacgggtcgt tcaacaagcg 5520
 tgacaccgtg ctctcgaca ccccggcccg tcccgact tccttgagcg tggccatgac 5580
 atctccccg caaactttag taaagggttt tactacagca taaccggga aggcggggtt 5640
 agcggcattg gcggcgtgga agtttaccba tgactgtag actgcacatg tcccggcaat 5700
 aggggcaatg catagggggg tggcgggcat gtgcagcaac attccgtca cttacgatt 5760

cttatagcgt gtcaggtaaa agaattatga ttctcaatcc accttccggc cgcgcctgca 5820
 gactcaaatg gccatgatgc atagegacaa tctctcgac tatggataaa cccaatccgt 5880
 gatgaggtga tgcagatccc acatgcgtat ttatcctatt atcctcccct ctgttaaag 5940
 gtgacaggaa atcatctatc ctcgatcgg aaagatccat gccggtattg gatatgtcta 6000
 tcgcaatgca ggactcgctt tcgtattgcc tgcgttggc taagtttacc catacatgtg 6060
 gttgagccgc acgattatgc tgaatggcat tcgtaataag gtttgaatc atctgtctaa 6120
 ttagcagacc atcggctagg atatatgcat tctccagatt ggtatgtact tgaactctat 6180
 ctccgataag ttccatattt tctgaagaa cattgcgaat gatctcagct acattaactc 6240
 ggctaagatc agctcggttt aattgctgaa ctttcgacaa ttcgagcaga tgattgacga 6300
 tttaacccc agcatgattt gaagccaaag ccttttcgac gaaaggtctg caacgctcat 6360
 cgaaaagctg gttgtgcagc ggaatctcca atcgggccga agtggccgca agtggatttt 6420
 ttaactcatg tgacgcacg gcgataaatt ccttttcccg actgattgcg ctgttgagat 6480
 cctttaacat gaggttgtat gcggatgcaa tagtgtacgc ctcgtcgttt tcatatggaa 6540
 taacgatagg ttgcctttcc aatccagcgt cggacgcgat aatctgagag gccacactat 6600
 tgattcttcg ttgtgtccta gtggcgataa tccaagtat tctccagat aatatgccga 6660
 aaacaatgat gggggctatg cttaccgcca atatcagatc ccgggatttt atgtctcctt 6720
 gttccatagt tagcgttaaa gcacctttac cggagtcata cccggcagaa acgtaatcct 6780
 taccggagtc aggaggaatg gcttgcgaat tcaaaactatg ttgttcatcg gcattctctg 6840
 cctgagtaaa agatttattt acggtcactg tttccagttg ccggttcacg acataatag 6900
 tcatggcggg caccactccg gtaagcatga agaacacgat gacgatcgtg gtgaccaatc 6960

ttcttcttgt agaccactga aacggtaaac gcagtttcgg atggctggaa tggctcccat 7020
 tcgacgaagg atattcaggc ttttcatga tatgcgatat ccttgccgg gaacggttc 7080
 aatgaaatca gtgattccga ttttcgtgcg aatcgcatag attgtgtct tgacattcc 7140
 tctcgtatga gcgtgatcat cctgcaaat ctacgatat agacattccg cactaatcac 7200
 cgcacctgc gcctcaatca gcgtcctcaa tacggcaagt tctcgtttcc caactttag 7260
 ttctgcaccg cgaaccgtga t 7281

<210> 2
 <211> 1052
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(1052)

<400> 2

Met Asn Thr Thr Asp Asp Gln Arg Lys Asn Gly Asp Pro Ile Val Ser
 1 5 10 15

Pro Ser Ile Pro Thr Thr Ala Trp Leu Ala Asp Pro Arg Val Tyr Ala
 20 25 30

Val His Arg Leu Asp Ala His Ser Asp His Ala Cys Trp Ser Arg Ser
 35 40 45

Pro Val Asp Gly Glu Ser Thr Asn Leu Arg Gln Ser Leu Asp Gly Glu
 50 55 60

Trp Arg Val Arg Val Glu Thr Ala Pro Thr Gly Arg Phe Pro Asp Gly

260

265

270

Ser Leu Asp Val Leu Ile Asp Gly Ala Ala Asn Ala Ala Thr Val Asp
 275 280 285

Phe Ala Leu Trp Asp Lys Asn Gly Thr Ile Val Trp His Thr Ala Thr
 290 295 300

Lys Ala Asp Gly Thr Leu His Ala Glu Ala Glu Ile Asp Asp Ala Ala
 305 310 315 320

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

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

Phe Arg His Val Ala Ile Glu Asp Gly Ile Leu Lys Leu Asn Gly Lys
 355 360 365

Arg Leu Val Phe Arg Gly Val Asn Arg His Glu Phe Asp Cys Arg Arg
 370 375 380

Gly Arg Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Leu Trp Asp Ile Arg Phe Met
 385 390 395 400

Lys Arg His Asn Ile Asn Ala Val Arg Thr Ser His Tyr Pro Asn Gln
 405 410 415

Ser Arg Trp Tyr Glu Leu Cys Asp Glu Tyr Gly Ile Tyr Leu Ile Asp
 420 425 430

Glu Thr Asn Leu Glu Thr His Gly Ser Trp Asn Ser Pro Gly Asp Ile
 435 440 445

Pro Val Gly Thr Ser Val Pro Gly Asp Asp Glu Ala Trp Leu Gly Ala

450

455

460

Cys Ile Asp Arg Leu Asp Ser Met Ile Leu Arg Asp Arg Asn His Pro
465 470 475 480

Ser Val Leu Val Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Tyr Ala Gly Glu Val
485 490 495

Leu Lys Ala Met Ser Ala His Ala His Arg Leu Asp Pro Gly Arg Pro
500 505 510

Val His Tyr Glu Gly Val Asn Trp Asn His Ala Tyr Asp Gly Ile Ser
515 520 525

Asp Phe Glu Ser Arg Met Tyr Ala Lys Pro Ala Glu Ile Gln Asp Trp
530 535 540

Leu Glu His Gly Asp Glu Arg Gly Glu Ala Ser Lys Pro Phe Val Ser
545 550 555 560

Cys Glu Tyr Met His Ala Met Gly Asn Ser Cys Gly Gly Leu Ser Glu
565 570 575

Phe Ile Asp Leu Glu Arg Tyr Glu Arg Tyr Ser Gly Gly Phe Phe Trp
580 585 590

Asp Tyr Ile Gly Gln Gly Leu Val Gln Arg Leu Pro Asp Gly Ser Glu
595 600 605

Arg Leu Ser Val Gly Gly Glu Trp Gly Asp Arg Pro Thr Asp Tyr Glu
610 615 620

Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val Phe Ala Asp Arg Thr Pro Ser Pro Lys
625 630 635 640

Ala Gln Glu Val Lys Gln Leu Tyr Ser Pro Val Lys Leu Ala Pro Asp
645 650 655

Gly His Gly Val Thr Ile Glu Asn Arg Asn Leu Phe Ala Gly Thr Asp
 660 665 670

Gly Tyr Val Phe Ala Ala Arg Leu Leu Glu Asp Gly His Glu Ile Trp
 675 680 685

His Ala Asp Tyr Arg Phe Asp Val Ala Ala Gly Asp Thr Gln His His
 690 695 700

Asp Ile Ala Phe Pro Asp Ile Asp Ala Asp Gly Asp Thr Arg Glu Val
 705 710 715 720

Thr Tyr Glu Val Asp Leu Leu Leu Ala Glu Ala Thr Ala Trp Ala Pro
 725 730 735

Ala Gly Tyr Glu Leu Ala Phe Gly Gln Leu Thr Gly Thr Leu Asn Pro
 740 745 750

Glu Gln Asp Ile Thr Glu Thr Ser His Asp Asp Asp Gly Arg Ala Thr
 755 760 765

Arg Thr Leu Ser Arg Trp Asn Ala Gly Ile Arg Arg Asp Asp Glu Glu
 770 775 780

Ile Leu Leu Ser Arg Thr Gln Gly Gly Ile Val Ser Trp Lys Arg Asp
 785 790 795 800

Asp Arg Glu Met Val Ile Arg Arg Pro Glu Leu Val Thr Phe Arg Pro
 805 810 815

Leu Thr Asp Asn Asp Arg Gly Asn His Ser Gly Phe Asp Arg Ala Ala
 820 825 830

Trp Phe Ala Ala Gly Arg Tyr Ala Ile Val Thr Glu Thr Lys Ile His
 835 840 845

Glu Ser Asp Asp Gly Leu Val Ala Glu Tyr Gln Tyr Glu Leu Ala Asp
 850 855 860

Pro Asn His Thr Pro Val Ser Val Thr Tyr His Val Asn Ser Asp Met
 865 870 875 880

Arg Met Gln Leu Thr Val Glu Tyr Pro Gly Asn Ala Thr Asp Met Ala
 885 890 895

Ser Leu Pro Ala Phe Gly Ile Glu Trp Glu Leu Pro Gly Glu Tyr Asp
 900 905 910

Arg Leu Arg Tyr Tyr Gly Pro Gly Pro Glu Glu Thr Tyr Arg Asp Arg
 915 920 925

Lys Gln Gly Gly Lys Leu Gly Ile Trp Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser
 930 935 940

Met Ala Pro Tyr Leu Met Val Gln Glu Thr Gly Ser His Asx Asp Val
 945 950 955 960

Arg Trp Leu Glu Ala Thr Asp Ile Gln Gly His Gly Leu Arg Val Thr
 965 970 975

Gln Arg Gly Asp Arg His Phe Thr Ala Ser Leu Leu Pro Trp Asn Thr
 980 985 990

Tyr Thr Ile Glu Ala Ala Arg Arg His Glu Asp Leu Pro Lys Pro Arg
 995 1000 1005

His Asn Tyr Leu Arg Leu Leu Ala Ala Gln Met Gly Val Gly Gly
 1010 1015 1020

Asp Asp Ser Trp Gly Ala Pro Val His Thr Ala Tyr Gln Leu Pro
 1025 1030 1035

Ala Gly Arg Pro Leu Thr Leu Asp Val Asn Leu Glu Leu Ile
1040 1045 1050