



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- a) 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 DNA 서열,
- b) 엄격한 조건하에 (a)의 서열과 혼성화하는 DNA 서열, 또는
- c) (a) 또는 (b)의 서열과 동의성이 있는 (degenerative) DNA 서열.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 서열 1의 서열인 DNA 서열 또는 이의 단편.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 서열 1의 위치 212 내지 214의 ATG로 출발하여 위치 5468 내지 5470의 TGA에서 종결하는 서열을 포함하는 DNA 서열 또는 이의 임의의 단편.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 서열 1의 위치 212 내지 214의 ATG로 출발하여 위치 3731 내지 3734의 ATCT에서 종결하는 서열을 포함하는 DNA 서열 또는 이의 임의의 단편.

### 청구항 5

제3항에 있어서, 서열 1의 위치 308 내지 310의 GTC로 출발하여 위치 5468 내지 5470의 TGA에서 종결하는 서열을 포함하는 DNA 서열 또는 이의 임의의 단편.

### 청구항 6

제3항에 있어서, 서열 1의 위치 308 내지 310의 GTC로 출발하여 위치 3731 내지 3734의 ATCT에서 종결하는 서열을 포함하는 DNA 서열 또는 이의 임의의 단편.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 2에 따른 아미노산 서열의 60% 미만, 바람직하게는 45% 미만, 더욱 바람직하게는 25% 미만이 변화되는 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 DNA 서열 또는 이의 단편.

### 청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보존적 아미노산 치환되는 뉴클레오티드 치환을 포함하는 DNA 서열.

### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 DNA 서열에 의해 코딩되는 효소.

### 청구항 10

서열 2에 따른 아미노산 서열 또는 이의 단편을 포함하는 효소.

### 청구항 11

서열 2에 정의된 바와 같은 서열을 갖는  $\beta$ -갈락토시다제.

### 청구항 12

제10항에 있어서, 서열 2에 정의된 바와 같은 Met(1) 내지 Gly(1752)의 서열 또는 이의 단편을 갖는 효소.

### 청구항 13

제12항에 따른 성숙한  $\beta$ -갈락토시다제.

**청구항 14**

제10항에 있어서, 서열 2에 정의된 바와 같은 Met(1) 내지 Ile(1174)의 서열 또는 이의 단편을 갖는 효소.

**청구항 15**

제14항에 따른 트랜스갈락토실화 효소.

**청구항 16**

제14항에 있어서, 서열 2에 정의된 바와 같은 Ala(33) 내지 Ile(1174)의 서열 또는 이의 단편을 갖는 효소.

**청구항 17**

제16항에 따른 성숙한 트랜스갈락토실화 효소.

**청구항 18**

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 37°C에서 100 g/L 락토스 용액 중에서 β-갈락토시다제 활성에 대한 트랜스갈락토실화 활성의 비가 1 : 1 이상임,
  - b) 37°C에서 100 g/L 락토스 용액을 사용한 배치 (batch) 반응에서 25% 이상의 갈락토-올리고당류 생산을 촉매함,
  - c) 37°C에서 100 g/L 락토스 용액을 사용한 배치 반응에서 갈락토-올리고당류 생산을 촉매하며 갈락토-올리고당류의 농도가 최고인 반응 시간에 유리 형태로 존재하는 락토스로부터 15% 미만의 갈락토스 생산을 촉매함
- 의 특징 중 하나 이상을 보유하는 트랜스갈락토실화 효소.

**청구항 19**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 DNA 서열을 포함하는 재조합 벡터.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 발현 벡터인 벡터.

**청구항 21**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 DNA 서열을 포함하는 숙주 세포.

**청구항 22**

제19항 또는 제20항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 23**

제21항 또는 제22항에 있어서, 박테리아 세포, 효모 세포 또는 진균 세포인 세포.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 비피도박테륨 (*Bifidobacterium*), 락토코쿠스 (*Lactococcus*), 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 스트렙토코쿠스 (*Streptococcus*), 류코노스톡 (*Leuconostoc*), 에셰리히아 (*Escherichia*), 바실러스 (*Bacillus*), 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*), 칸디다 (*Candida*), 토롤라 (*Torula*), 토롤롭시스 (*Torulopsis*) 및 아스페르길루스 (*Aspergillus*)로 구성된 군에서 선택된 세포.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 비피도박테륨 브레브 (*Bifidobacterium breve*), 비피도박테륨 롱검 (*Bifidobacterium longum*), 비피도박테륨 인판티스 (*Bifidobacterium infantis*), 비피도박테륨 비피둠 (*Bifidobacterium*

*bifidum*) 및 락토코쿠스 락티스 (*Lactococcus lactis*)로 구성된 군에서 선택된 세포.

**청구항 26**

요구르트, 치즈, 발효시킨 우유 제품, 식이보조제 및 건강보조 (probiotic) 식품으로 구성된 군에서 선택된 제품의 생산을 위한, 제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 세포의 용도.

**청구항 27**

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 세포를 포함하는 유제품.

**청구항 28**

갈락토-올리고당류 생산을 위한, 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항의 트랜스갈락토실화 효소 또는 제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 세포의 용도.

**청구항 29**

요구르트, 치즈, 발효시킨 유제품, 식이보조제 및 건강보조 식품으로 구성된 군에서 선택된 제품의 일부인 갈락토-올리고당류 생산을 위한, 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항의 트랜스갈락토실화 효소 또는 제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 세포의 용도.

**청구항 30**

비피도박테륨의 성장을 향상시키는 갈락토-올리고당류 생산을 위한, 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항의 트랜스갈락토실화 효소 또는 제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 세포의 용도.

**청구항 31**

혼합 배양 발효물 중 비피도박테륨의 성장을 향상시키는 갈락토-올리고당류 생산을 위한, 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항의 트랜스갈락토실화 효소 또는 제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 세포의 용도.

**청구항 32**

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 세포를 적합한 배양 배지 중에서 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항의 트랜스갈락토실화 효소의 발현을 허용하는 조건하에 배양하는 단계 및 생성된 효소를 배양물로부터 회수하는 단계를 포함하는, 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항의 트랜스갈락토실화 효소의 생산 방법.

**청구항 33**

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항의 효소 또는 제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 세포를 락토스 용액과 접촉시키는 단계를 포함하는, 갈락토-올리고당류의 생산 방법.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

<1> 본 발명은 발효시킨 유제품의 개선에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 트랜스갈락토실화 활성을 보유하는 β-갈락토시다제에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 비피도박테륨 비피둠 (*Bifidobacterium bifidum*)에서 단리한 β-갈락토시다제로서 상기 단백질의 C-말단 종결부가 결실되어 트랜스갈락토실화 활성이 히드롤라제 활성보다 더 높은 말단절단형 (truncated) 효소로 생성된 β-갈락토시다제에 관한 것이다. 트랜스갈락토실라제 활성은 기질로서 락토스를 사용하는 경우, 갈락토-올리고당류를 생산한다. 갈락토-올리고당류는 낙농업에서 수많은 용도로 사용할 수 있는 건강 촉진 비피도박테륨의 성장을 향상시킨다.

**배경기술**

<2> 비피도박테륨 속은 유제품 산업에서 다양한 유제품 발효에 가장 널리 이용되는 유형의 박테리아 배양물 중 하나이다. 또한, 비피도박테륨을 함유하는 제품의 섭취는 건강을 촉진하는 효과가 있다. 이러한 효과는 장내 내용

물의 pH 감소에 의해서만이 아니라, 항생제 복용 등으로 인해 장내 플로라 (flora)가 파괴된 개인에서 장내 플로라를 복구할 수 있는 비피도박테륨의 능력에 의해서도 달성된다. 또한, 비피도박테륨은 잠재적으로 해로운 장내 미생물들을 배출시키는 (outcompeting) 능력도 보유한다.

- <3> 갈락토-올리고당류는 비피도박테륨의 성장을 향상시킨다고 공지되어 있다. 이러한 효과는 갈락토-올리고당류를 탄소 공급원으로 활용하는 비피도박테륨의 독특한 능력을 통해 달성되는 것으로 보인다. 또한, 식이보조제로서의 갈락토-올리고당류는 수많은 장기간의 질환을 보호하는 효과를 갖는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 갈락토-올리고당류의 복용은 래트에서의 직장결장암 진행에 대한 고도의 보호 효과를 나타내는 것으로 밝혀진 바 있다 [Wijnands, et al., 1999]. 그러므로, 식이보조제 및 유제품을 개선하는 산업에 사용하기 위해서, 갈락토-올리고당류를 생산하는 저렴하고 효율적인 방법의 개발에 많은 관심이 있다.
- <4> 효소 β-갈락토시다제 (EC 3.2.1.23)는 통상적으로 락토스를 단당류인 D-글루코스 및 D-갈락토스로 가수분해한다. β-갈락토시다제의 정상적인 효소 반응에서, 상기 효소는 락토스를 가수분해하고 갈락토스 단당류를 갈락토스-효소 복합체 중에서 일시적으로 결합하였다가 상기 갈락토스를 물의 히드록실기에 전달함으로써, D-갈락토스 및 D-글루코스를 유리시킨다. 그러나, 락토스가 고농도인 경우, 일부의 β-갈락토시다제는 트랜스갈락토실화라고 지칭되는 과정을 통해 갈락토스를 D-갈락토스 또는 D-글루코스의 히드록실기에 전달하여 갈락토-올리고당류를 생산할 수 있다.
- <5> 트랜스갈락토실화할 수 있는 효소는 박테리아 및 효모 등을 비롯한 광범위한 범위의 미생물로부터 단리되어 왔다. 갈락토-올리고당류가 건강 촉진 비피도박테륨의 성장을 향상시킨다는 관찰이 비피도박테륨 및 이의 β-갈락토시다제 효소에 대한 연구를 자극시켰다. 비피도박테륨 브레브 (*Bifidobacterium breve*)의 β-갈락토시다제 유전자 및 비피도박테륨 롱검 (*Bifidobacterium longum*)의 β-갈락토시다제 유전자 2가지의 DNA 서열이 진뱅크 (수탁 번호: 각각 E5040 및 AJ242596)에 기탁되어 있다. 문헌 [Dumortier et al. (1994)]에는 비피도박테륨 비피둠 DSM 20215이 3종의 β-갈락토시다제를 함유하고, 이들 효소 중 하나가 트랜스-갈락토실화 성질을 보유한다고 보고되어 있다. 그러나, 이러한 활성을 보유하는 상기 효소를 확인하거나, 상기 효소의 임의의 서열 또는 비피도박테륨 비피둠 DSM 20215로부터의 상응하는 유전자가 공개된 적은 없었다.
- <6> β-갈락토시다제를 사용하여 갈락토-올리고당류를 생산하는 방법이 여러 문헌에 보고되어 있다. 예를 들어, 대장균의 β-갈락토시다제는 락토스가 고농도 (0.5 M 락토스 또는 대략 20% 락토스)인 경우에 올리고당류를 생산하는 것으로 나타났다 [Huber et al. 1976]. 각종 호열성 미생물이 고온 및 고농도의 락토스 조건에서 올리고당류를 생산하는 것으로 나타난 바 있는데, 예를 들어 스테리그마토마이세스 엘비에 (*Sterigmatomyces elviae*)는 60°C에서 20% 락토스로부터 39% 올리고당류를 생산할 수 있으며 [Onishi & Tanaka, 1995], 사카로폴리스포라 렉티비르굴라 (*Saccharopolyspora rectivirgula*)는 70°C에서 1.75 M 락토스 중에서 41% 올리고당류를 합성할 수 있다 [Nako et al., 1994].
- <7> 그러나, 상기에서 기재한 효소들은 모두 유의한 트랜스갈락토실라제 활성을 발휘하기 위해서는 고온 또는 고농도의 락토스가 필요하거나, 또는 이들 두가지가 모두 필요하다는 결점이 있다. 그러므로, 산업에 사용하기 위한 갈락토-올리고당류를 생산하는 더욱 저렴하고 더욱 효율적인 방법의 개발이 요구된다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

**<8> 발명의 요약**

<9> 본 발명은 비피도박테륨 비피둠의 신규 β-갈락토시다제를 기재한다. 놀랍게도, 상기 효소의 말단절단형 버전은 높은 트랜스갈락토실화 활성을 보유하는 것으로 나타났다. 상기 말단절단형 효소 또는 제조합 말단절단형 효소를 발현하는 숙주 세포를 락토스와 함께 적절한 조건하에서 인큐베이션시키는 경우, 갈락토-올리고당류가 고효율로 생산된다. 유제품 또는 기타의 식품 중 갈락토-올리고당류의 존재는 상기 제품 중 및(또는) 상기 제품을 복용한 소비자의 장내 플로라 중의 건강 촉진 비피도박테륨의 성장을 향상시킨다는 장점이 있다.

**과제 해결수단**

<10> 본 발명의 제1 측면은 비피도박테륨 비피둠으로부터 단리하여 특성화한 신규 β-갈락토시다제인 OLGA5 (서열 1 및 서열 2)에 관한 것이다. 비피도박테륨 비피둠으로부터의 염색체 DNA를 PstI로 소화시킨 삽입물을 함유하는 플라스미드로 대장균 세포를 형질전환시켰다. 발색성 β-갈락토시다제 기질을 함유하는 플레이트상에서 β-갈

락토시다제 활성을 보유한 클론을 선별했다. 양성 콜로니 중 하나는 대략 20 kb의 인서트인 pOLGA5 (서열 1)가 있는 플라스미드를 함유했다. DNA 서열결정을 통해 OLGA5 β-갈락토시다제의 추정되는 아미노산 서열 (서열 2)이 현재 공지된 β-갈락토시다제 길이의 대략 2배이며, 공지된 β-갈락토시다제와의 서열 상동성 정도가 놀라울 만큼 낮다는 것을 밝혀냈다. 대장균 내 재조합 OLGA5의 발현을 통해 상기 효소가 락토스 가수분해 활성 뿐 아니라 트랜스갈락토실화 활성까지 보유한다는 것을 밝혀냈다. OLGA5 효소의 C-말단부는 공지된 β-갈락토시다제와 상동성이 없었다. 이어서, OLGA5의 다양한 C-말단 결실 돌연변이체를 제작하고, 생성된 효소의 가수분해 활성 및 트랜스갈락토실화 활성에 대해 조사했다.

<11> 본 발명의 제2 측면은 OLGA5의 결실 돌연변이체, 예를 들어 OLGA347에 관한 것이다. 여러 C-말단 결실 돌연변이체 중에서, 578개 아미노산의 C-말단이 결실된 OLGA347이 비교적 저농도의 락토스와 인큐베이션시키는 경우일지라도 생산되는 올리고당류의 수준은 가장 두드러지게 증가된 것으로 밝혀졌다. 명백하게, 상기 효소는 실제로 모든 갈락토스 분자를 갈락토스 또는 글루코스에 전달한다. 그러므로, OLGA5의 C-말단 종결부의 결실은 상기 효소를 가수분해성 OLGA5 β-갈락토시다제에서 트랜스갈락토실화 OLGA347-트랜스갈락토시다제로 전환시킨다. 천연 OLGA5 효소를 포함하는 다른 트랜스갈락토실화 β-갈락토시다제와는 달리, 상기 말단절단형 β-갈락토시다제 OLGA347은 시험된 모든 락토스 농도에서 갈락토스를 수용자 당 분자에 높은 빈도로 전달한다.

**효과**

<12> 본 발명은 비피도박테륨 비피둠의 신규 β-갈락토시다제를 기재한다. 놀랍게도, 상기 효소의 말단절단형 버전은 높은 트랜스갈락토실화 활성을 보유하는 것으로 나타났다. 상기 말단절단형 효소 또는 재조합 말단절단형 효소를 발현하는 숙주 세포를 락토스와 함께 적절한 조건하에서 인큐베이션시키는 경우, 갈락토-올리고당류가 고효율로 생산된다. 유제품 또는 기타의 식품 중 갈락토-올리고당류의 존재는 상기 제품 중 및(또는) 상기 제품을 복용한 소비자의 장내 플로라 중의 건강 촉진 비피도박테륨의 성장을 향상시킨다는 장점이 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

<13> 본 발명의 제1 측면은 비피도박테륨 비피둠으로부터 단리하여 특성화한 신규 β-갈락토시다제인 OLGA5 (서열 1 및 서열 2)에 관한 것이다. 비피도박테륨 비피둠으로부터의 염색체 DNA를 PstI로 소화시킨 삼입물을 함유하는 플라스미드로 대장균 세포를 형질전환시켰다. 발색성 β-갈락토시다제 기질을 함유하는 플레이트상에서 β-갈락토시다제 활성을 보유한 클론을 선별했다. 양성 콜로니 중 하나는 대략 20 kb의 인서트인 pOLGA5 (서열 1)가 있는 플라스미드를 함유했다. DNA 서열결정을 통해 OLGA5 β-갈락토시다제의 추정되는 아미노산 서열 (서열 2)이 현재 공지된 β-갈락토시다제 길이의 대략 2배이며, 공지된 β-갈락토시다제와의 서열 상동성 정도가 놀라울 만큼 낮다는 것을 밝혀냈다. 대장균 내 재조합 OLGA5의 발현을 통해 상기 효소가 락토스 가수분해 활성 뿐 아니라 트랜스갈락토실화 활성까지 보유한다는 것을 밝혀냈다. OLGA5 효소의 C-말단부는 공지된 β-갈락토시다제와 상동성이 없었다. 이어서, OLGA5의 다양한 C-말단 결실 돌연변이체를 제작하고, 생성된 효소의 가수분해 활성 및 트랜스갈락토실화 활성에 대해 조사했다.

<14> 본 발명의 제2 측면은 OLGA5의 결실 돌연변이체, 예를 들어 OLGA347에 관한 것이다. 여러 C-말단 결실 돌연변이체 중에서, 578개 아미노산의 C-말단이 결실된 OLGA347이 비교적 저농도의 락토스와 인큐베이션시키는 경우일지라도 생산되는 올리고당류의 수준은 가장 두드러지게 증가된 것으로 밝혀졌다. 명백하게, 상기 효소는 실제로 모든 갈락토스 분자를 갈락토스 또는 글루코스에 전달한다. 그러므로, OLGA5의 C-말단 종결부의 결실은 상기 효소를 가수분해성 OLGA5 β-갈락토시다제에서 트랜스갈락토실화 OLGA347-트랜스갈락토시다제로 전환시킨다. 천연 OLGA5 효소를 포함하는 다른 트랜스갈락토실화 β-갈락토시다제와는 달리, 상기 말단절단형 β-갈락토시다제 OLGA347은 시험된 모든 락토스 농도에서 갈락토스를 수용자 당 분자에 높은 빈도로 전달한다.

<15> 한 실시양태에서, OLGA5, OLGA342, OLGA345, OLGA347, OLGA344 또는 임의의 다른 OLGA5 변이체를 코딩하는 인서트를 보유하는 발현 벡터를 사용한다. 이러한 발현 벡터를 사용하여 비피도박테륨, 락토코쿠스 (*Lactococcus*), 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 스트렙토코쿠스 (*Streptococcus*), 류코노스톡 (*Leuconostoc*), 에셰리히아 (*Escherichia*), 바실러스 (*Bacillus*), 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*), 칸디다 (*Candida*), 토룰라 (*Torula*), 토룰롭시스 (*Torulopsis*) 및 아스페르길루스 (*Aspergillus*)를 포함하는 군에서 선택된 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있다. 비피도박테륨 속의 세포는 비피도박테륨 브레브, 비피도박테륨 룡검, 비피도박테륨 인판티스 (*Bifidobacterium infantis*), 비피도박테륨 비피둠 및 락토코쿠스 락티스 (*Lactococcus lactis*)로 구성된 군에서 선택한다. 이어서, 상기 세포를 적합한 배양 배지 중에서 OLGA5 또는 OLGA347 변이체 등의 발현을 허용하는 조건하에 배양한

후에, 생성된 효소를 배양물로부터 회수한다.

- <16> 본 발명의 다른 실시양태에서, OLGA5 변이체는 상기 언급한 숙주 세포 중 임의의 하나를 형질전환시킬 수 있는 발현 벡터의 일부이다. 이어서, 상기 세포를 적합한 배양 배지 중에서 OLGA5 변이체의 발현을 허용하는 조건하에 배양한 후에, 생성된 효소를 배양물로부터 회수한다. OLGA5 변이체는 임의의 무작위 돌연변이 또는 통상적인 분자 생물학 기술을 통해 제작한 임의의 돌연변이를 함유할 수 있다. 돌연변이되거나 야생형인 OLGA5 DNA 분자의 임의의 단편을 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 상기 단편은 PCR (중합효소 연쇄 반응) 및(또는) 상기 서열에 존재하는 임의의 제한 부위를 이용하여 제작할 수 있다. OLGA5 변이체의 제작 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 그러므로, 변이체 획득 방법은 본 발명에 중요하지 않다. 본원에 개시된 변이체는 상기 서열 중에 존재하는 제한 부위를 이용하여 서브클로닝함으로써 획득된다.
- <17> 본 발명의 다른 측면은 요구르트, 치즈, 발효시킨 유제품, 식이보조제 및 건강보조 (probiotic) 식품으로 구성된 군에서 선택된 제품의 생산을 위한, 상기 언급한 세포 유형 중 1종 이상의 용도에 관한 것이다. 이러한 측면에서, 비피도박테륨의 성장 향상이라는 기술적 효과를 이용하여 산업적 제품의 품질을 개선시킨다. 갈락토-올리고당류의 첨가는 건강 촉진 비피도박테륨의 성장을 향상시킨다. 그러므로, OLGA347에 의해 생산된 갈락토-올리고당류는 올리고당류 생산을 위해 천연 β-갈락토시다제를 사용하는 경우에 비해 훨씬 저렴하고 획득 방법이 쉽다.
- <18> 본 발명의 다른 측면은 올리고당류의 생산을 위한, OLGA5, OLGA342, OLGA345, OLGA347, OLGA344 또는 임의의 다른 OLGA5 변이체의 용도 또는 상기 언급한 세포 유형 중 1종 이상의 용도에 관한 것이다. 올리고당류로는 프룩토올리고당류, 갈락토-올리고당류, 이소말토-올리고당류, 말토-올리고당류, 락토-수크로스 및 크실로-올리고당류 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- <19> 본 발명의 한 실시양태에서, 이당류 기질, 예를 들어 락툴로스, 트레할로스, 람노스, 말토스, 수크로스, 락토스 또는 셀로비오스를 포함하는 배지 중에서 OLGA5 변이체를 발현하는 세포를 인큐베이션시켜 올리고당류를 생산한다. 인큐베이션은 올리고당류가 생산되는 조건하에 수행한다. 상기 세포는 요구르트, 치즈, 발효시킨 우유 제품, 식이보조제 및 건강보조 식품으로 구성된 군에서 선택된 제품의 일부일 수 있다. 별법으로, 올리고당류를 회수한 후에 이를 제조 전 또는 제조 후의 관심 제품에 첨가할 수 있다. 올리고당류의 첨가는 비피도박테륨 단독의 성장을 향상시키거나, 또는 혼합 배양물 중의 비피도박테륨의 성장을 향상시킨다.
- <20> 다른 실시양태에서, 이당류 기질, 예를 들어 락툴로스, 트레할로스, 람노스, 말토스, 수크로스, 락토스 또는 셀로비오스를 포함하는 배지 중에서 OLGA5 변이체를 인큐베이션시켜 올리고당류를 생산한다. 인큐베이션은 올리고당류가 생산되는 조건하에 수행한다. OLGA5 변이체 및 락토스를 포함하는 배지는 요구르트, 치즈, 발효시킨 우유 제품, 식이보조제 및 건강보조 식품으로 구성된 군에서 선택된 제품의 일부일 수 있다. 별법으로, 올리고당류를 회수한 후에 이를 제조 전 또는 제조 후의 관심 제품에 첨가할 수 있다. 올리고당류의 첨가는 비피도박테륨 단독의 성장을 향상시키거나, 또는 혼합 배양물 중의 비피도박테륨의 성장을 향상시킨다.
- <21> **정의**
- <22> "β-갈락토시다제 또는 이의 단편": β-갈락토시다제는 락토스를 단당류인 D-글루코스와 D-갈락토스로 가수분해할 수 있는 효소로서 정의된다. β-갈락토시다제의 단편은 상기 단백질의 5 내지 98%, 바람직하게는 40 내지 95% 및 가장 바람직하게는 55 내지 75%를 포함하며, 상기 결실은 C-말단 종결부가 결실된 것이 바람직하다.
- <23> "숙주 세포"는 잔균, 효모 및 원핵생물로 구성된 군에서 선택된다. 상기 미생물은 더욱 바람직하게는 원핵생물이고, 가장 바람직하게는 비피도박테륨 속 또는 대장균 종의 박테리아이다.
- <24> "올리고당류"란, 3개 이상의 당 분자로 구성된 올리고당류를 의미한다. 올리고당류의 예로는 갈락토-올리고당류 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 올리고당류의 당 잔기 사이의 연결 방식은 1-4 및 1-6 결합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- <25> β-갈락토시다제와 락토스의 인큐베이션은 0.5 내지 60% 락토스, 바람직하게는 2 내지 30% 락토스 및 가장 바람직하게는 2 내지 15% 락토스의 존재하에서 수행한다.
- <26> β-갈락토시다제와 락토스를 인큐베이션시키는 조건은 5 내지 75℃, 바람직하게는 15 내지 45℃, 가장 바람직하게는 37℃의 온도에서 인큐베이션을 수행하는 것으로 정의된다. 인큐베이션에 필요한 시간은 1 내지 50시간, 바람직하게는 5 내지 40시간, 가장 바람직하게는 15 내지 25시간이다.

<27> "식품"은 음식물, 음료수, 정제 및 분말 등의 섭취에 의도되는 제품을 포함한다.

**실시예**

<28> **실시예 1: 비피도박테륨 비피둠으로부터 트랜스갈락토실화 β-갈락토시다제의 단리 및 특성화**

<29> 비피도박테륨 비피둠 DSM 20215로부터의 염색체 DNA를 PstI로 소화시키고, 이를 표준 방법을 사용하여 pKS 플라스미드 (스트라타젠 (Stratagene) 제품)에 라이게이션시켰다. 상기 라이게이션 혼합물로 LacZ 및 β-갈락토시다제가 결핍된 대장균 균주 MT102를 형질전환시켰다. 발색성 β-갈락토시다제 기질인 X-gal을 함유하는 플레이트 상에서 β-갈락토시다제를 생산하는 클론을 청색 콜로니로서 확인하였다.

<30> 청색 콜로니 중 하나는 대략 20 kb의 인서트인 pOLGA5가 있는 플라스미드를 함유했다. 상기 인서트를 추가로 서브클로닝하고 부분적으로 서열결정하였으며, 추정되는 β-갈락토시다제 (OLGA5 β-갈락토시다제)를 코딩하는 오픈 리딩 프레임에 확인하였다 (도 1). BLAST 검색을 통해, OLGA5 β-갈락토시다제는 스트렙토마이세스 코엘리콜러 (*Streptomyces coelicolor*) β-갈락토시다제 (AL133171) 및 써모애어로박터 에탄올리쿠스 (*Thermoanaerobacter ethanolicus*) (Y08557)와 가장 높은 상동성을 나타내어, 각각 38% 및 30% 동일성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 도 3은 OLGA5 및 관련된 아미노산 서열의 "동일성 트리 (tree)"를 나타낸다.

<31> OLGA5 β-갈락토시다제 아미노산 서열에 관한 상세한 분석을 통해, 상기 효소가 이의 N-말단에 추정되는 신호 서열을 함유하고 오픈 리딩 프레임이 현재 공지된 임의의 β-갈락토시다제 크기의 대략 2배인 185 kDa의 폴리펩티드를 코딩한다는 것이 밝혀졌다. 대장균에서 생성된 재조합 OLGA5 효소를 정제하여 N-말단 아미노산을 서열 결정한 결과, 대장균에서 발현되는 동안 신호 서열이 절단된다는 것을 확인하였다. SDS-PAGE를 통해, OLGA5 폴리펩티드의 분자량을 확인하였다.

<32> pOLGA5를 함유하는 재조합 대장균 MT102의 세포 추출물을 제조하여 트랜스갈락토실화 활성에 대해 분석하였다. 도 4는 OLGA5가 락토스 가수분해 활성 뿐 아니라 트랜스갈락토실화 활성까지 보유한다는 것을 나타낸다.

<33> **실시예 2: 높은 트랜스갈락토실라제 활성을 보유한 말단절단형 OLGA5 β-갈락토시다제의 제조**

<34> OLGA5 중 다른 β-갈락토시다제와 상동성이 있는 영역은 상기 단백질의 N-말단 종결부에 위치한다. C-말단 절단은 임의의 공지된 β-갈락토시다제와 상동성이 없는 것으로 나타났다. 그러나, C-말단부에서 시알리다제-유사 갈락토스-결합 도메인이 관찰되었다. 말단절단형 결실 돌연변이체를 제조하여 OLGA5 β-갈락토시다제의 이러한 C-말단부의 역할을 조사하였다. 생성된 재조합 β-갈락토시다제의 가수분해 활성 및 트랜스갈락토실화 활성을 분석했다. 도 5는 OLGA5 효소의 거의 1/3을 절단하여도 여전히 가수분해 활성을 보유할 수 있음을 나타낸다.

<35> 트랜스갈락토실화 활성의 분석시에, 플라스미드 pOLGA5, pOLGA342 및 pOLGA345를 함유하는 대장균으로부터의 추출물을 사용하여 유사한 결과를 얻었다. 그러나, pOLGA347을 보유하는 세포 추출물에서는, 생산된 올리고당류의 수준은 증가되었으나 갈락토스는 전혀 생산되지 않은 것으로 나타났다. 도 5에 나타난 바와 같이, 말단절단형 OLGA347 β-갈락토시다제를 함유하는 추출물은 락토스를 가수분해하지는 않았으나, 상기 효소는 갈락토스 물의 히드록실기에 전달하는 대신 실제로 모든 갈락토스 분자를 갈락토스 또는 글루코스 (또는 글리세롤; TLC상에서 글루코스보다 다소 느리게 이동하는 스팟은 NMR에 의해 갈락토-글리세롤임이 밝혀졌음 - 데이터는 나타나지 않음)에 전달했다. 결론적으로, OLGA347은 진정한 "트랜스갈락토실라제"이다.

<36> **실시예 3: OLGA347의 트랜스갈락토실화 활성의 특성화**

<37> 다음의 두가지 방법을 사용하여 OLGA347 β-갈락토시다제의 트랜스갈락토실화 활성을 정량하였다: 방사성 표지된 락토스를 함유하는 반응 혼합물의 TLC 분석 및 표지되지 않은 락토스를 효소적 전환시킨 후의 HPLC 분석.

<38> 글루코스의 C-1 위치에 <sup>14</sup>C 표지를 함유하는 락토스를 사용하여 방사성 실험을 수행했다. 표지는 상기 이당류의 글루코스 부분에 존재했기 때문에, 글루코스를 함유하는 반응 생성물만이 검출되었다. 도 7은 15% 락토스 및 다양한 양의 OLGA347 효소를 사용한 트랜스갈락토실화 실험의 결과를 나타낸다. TLC를 통해 반응 혼합물을 분리한 후, 상기 플레이트를 스캐닝하여 방사성 스팟을 포스포화상기에서 정량했다. 낮은 효소 농도 (추출물 0 내지 0.2 μl 사이)에서 글루코스 및 올리고당류 수준은 거의 동일했으며, 이는 트랜스갈락토실화 반응에서 모든 글루코스 분자가 기질로서 활용되었음을 지시했다. 가수분해되어 "유리"된 글루코스는 효소가 고농도인 경우에만 나타났다.



<39> 표지되지 않은 락토스를 사용한 실험에서, 상이한 기질 및 효소 농도를 시험하였다. 도 8은 OLGA347 효소의 농도를 변화시키면서 수행한 효소 반응에서 기질로서 10%, 20% 및 40% 락토스를 사용한 실험을 나타낸다. 반응 혼합물을 HPLC로 분석하고, 락토스, 글루코스, 갈락토스 및 갈락토-올리고당류의 농도를 계산했다. 도 8은 효소 농도가 증가함에 따라 락토스 농도가 감소하고 글루코스 농도가 증가하지만, 실제로는 "유리" 갈락토스는 생산되지 않았음을 보여주며, 이는 락토스 중의 거의 모든 갈락토스 분자가 다른 당으로 전달되었음을 지시한다. 저농도의 효소를 사용한 반응에서 측정된 탄수화물의 농도 계산은 글루코스와 갈락토스의 비율이 대략 0.1임을 지시하는데, 이는 모든 락토스 분자가 유리 갈락토스 및 글루코스로 가수분해되며, 트랜스갈락토실화에는 9개의 락토스 분자가 사용된다는 것을 암시한다. 도 8에 나타난 바와 같이, 트랜스갈락토실화 반응은 10% 내지 40% 락토스 범위의 락토스 농도와는 무관하다. 10%, 20% 또는 40% 락토스를 기질로서 사용한 트랜스갈락토실화 반응에서 생산된 갈락토-올리고당류의 최대 수율은 각각 39%, 44% 및 37%였다 (첨가된 락토스 1 mg 당 생산된 올리고당류 (mg)).

<40> **참고문헌**

Dumortier, V., Brassart, C., and Bouquelet, S. (1994) Purification and properties of a  $\beta$ -D-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* exhibiting a transgalactosylation reaction. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19**, 341-354.

Huber, R.E., Kurz, G., and Wallenfels, K. (1976) A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of  $\beta$ -galactosidase (*E. coli*) on lactose. *Biochemistry*, **15**, 1994-

Nakao, M., Harada, M., Kodama, Y., Nakayama, T., Shibano, Y., and Amachi, T. (1994) Purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 657-663.

Onishi, N and Tanaka, T. (1995) Purification and properties of a novel thermostable galactooligosaccharide-producing  $\beta$ -galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4026-4030.

Wijnands, M. V., Appel M. J., Höllanders, V. M., and Woutersen, R. A. (1999) A comparison of the effects of dietary cellulose and fermentable galacto-oligosaccharide in a rat model of colorectal carcinogenesis: fermentable fibre confers greater protection than non-fermentable fibre in both high and low fat backgrounds. *Carcinogenesis*. **20**, 651-656.

<41>

**도면의 간단한 설명**

<42> 도 1: OLGA5 서열. 비피도박테룸 비피둠의 OLGA5  $\beta$ -갈락토시다제의 DNA 및 단백질 서열. 신호 서열은 굵은체로 나타내었고, OLGA347에서 결실된 OLGA5 유전자의 일부는 이탤릭체로 나타내었다. 결실 생성에 사용된 BglII 부위는 밝게 표시했다.

<43> 도 2:  $\beta$ -갈락토시다제 활성 부위 영역들의 비교. 대장균의 촉매적 Glu461 잔기의 주변 영역들의 정렬 (밝게 표시한 부분). 상기 서열은 이들의 데이터베이스 수탁 번호를 통해 확인하였다. 6-포스포- $\beta$ -갈락토시다제 서열은 (P)로 표시했다.

<44> 도 3: 도 1에서의 정렬을 계통별로 연결 (neighbour joining)한 분석으로서, 술폴로부스 (*Sulfolobus*) 서열은

외(外)집단으로 사용했다. 부트스트랩 분석 (n = 100) 결과는 80 초과의 수치로 관련있음을 나타낸다.

- <45> 도 4: OLGA5 트랜스갈락토실라제 활성. 플라스미드에 OLGA5 유전자를 보유하는 대장균 세포의 전체 세포 용균물을 0.4 M 락토스와 37°C에서 20시간 동안 인큐베이션했다. 총 반응 부피 50  $\mu$ l는 전체 세포 용균물을 지시된 양만큼 함유했다. 반응 샘플을 실리카겔 TLC 플레이트상에서 분석했다. 상기 플레이트에 오르시놀 (Orcinol) 시약을 분무하여 당을 가시화했다.
- <46> 도 5: OLGA5  $\beta$ -갈락토시다제의 C-말단 결실. 1752개 아미노산의 오픈 리딩 프레임은 OLGA5  $\beta$ -갈락토시다제를 코딩하며, 출발하는 32개 아미노산이 신호 펩티드 (백색 박스)를 나타내는 것으로 여겨진다. OLGA5의 결실 돌연변이체는 지시된 제한 부위를 사용하여 제작하였다. 밤새 성장시킨 박테리아 배양물로부터 제조한 용균물을 사용하여  $\beta$ -갈락토시다제 활성을 측정하고, 상대적인 결과를 각 구조물의 오른쪽에 나타냈다. 사용한 제한 효소 부호: BglIII (B), EcoRI (E), EcoRV (V), HindIII (H), KpnI (K), NruI (N), PstI (P).
- <47> 도 6: 트랜스갈락토실라제 활성의 TLC 분석. 시험한 2가지 결실 돌연변이체인 OLGA347 및 OLGA345의 전체 세포 용균물을 지시된 양으로 사용하여 총 부피 50  $\mu$ l로 0.4 M 락토스와 반응시켰다. 반응물을 37°C에서 20시간 동안 인큐베이션했다. 샘플을 실리카겔 TLC 플레이트상에서 분석했다. 상기 플레이트에 오르시놀 시약을 분무하여 당을 가시화했다.
- <48> 도 7: OLGA347에 의해 생산된 올리고당류. OLGA347 전체 세포 용균물을 지시된 양으로 사용하여 총 부피 50  $\mu$ l로 15% 락토스와 37°C에서 21시간 동안 인큐베이션했다. 글루코스 C-1 위치에  $^{14}$ C로 표지한 방사성 락토스를 사용했다. 샘플들을 TLC 플레이트상에서 분리하고 포스포화상기 (phosphoimager)를 사용하여 정량하였다. A: 락토스, 글루코스 및 갈락토-올리고당류 (GOS) 스팟으로부터의  $^{14}$ C 신호 측정에 사용한 화상; B: 백그라운드 (background) (빈 라인)를 감하여 측정된  $^{14}$ C-신호.
- <49> 도 8: OLGA347 효소 반응 생성물의 HPLC 측정. OLGA347 전체 세포 용균물을 지시된 양으로 사용하여 10%, 20% 및 40% 락토스와의 반응을 수행했다. 총 부피를 200  $\mu$ l로 사용하였고, 반응물을 37°C에서 20시간 동안 인큐베이션했다. 희석한 샘플을 HPLC 분석하였고, 표준 곡선을 사용하여 관찰된 피크 영역을 농도 (mg/mL)로 전환시켰다. A: OLGA347이 10% 락토스와 반응한 후에 수득된 당 (mg/mL); B: OLGA347이 20% 락토스와 반응한 후에 수득된 당 (mg/mL); C: OLGA347이 40% 락토스와 반응한 후에 수득된 당 (mg/mL); D: 상기 10% 반응 결과의 플롯. 갈락토-올리고당류의 생산량을 글루코스 또는 갈락토스로서 회수되지 않은 락토스의 양으로서 계산했다 ("GOS").

도면

도면1a

1 ATGCGTTGCGTTGCGATTTCCTCCGGCCCTGTATGGGGATACAGGATGGCGATGGCGACAGCCGCTTTTGTGTTAATGGC  
81 ATTTACATGAAATACAGGTAAATGAGATATCATTTCTCATGATCACCCTGTGGATATCGCATTTGGTGGCTATACACTAACAG  
161 CAACAGAGCGGGCGGGCAGGCGCTCGTGGATTCAATGAAGAAGGAACGTTTATGGCAGTTCCGAGACTTGGTGGCCGCAT  
M A V R R L G G R I  
241 CGTGGCTTTCGCGCCACAGTGGCTTGTCAATACCGTTAGGGTTGTTAACAATTCAGCGTGGGCGCTCCAGGACGCCA  
V A F A A T V A L S I P L G L L T N S A W A V E D A  
321 CCCGATCCGACTCCACCACCGAGATGAGCTCCACGCCGGAGGTGGTCTACTCCAGCGCCCTGGATTCCAGCAGAATCGC  
T R S D S T T Q M S S T P E V V Y S S A V D S K Q N R  
401 ACCTCGGATTTCCAGCCCACTGGAAGTTCATGCTGTCCGATTCGCGAGGCGGAGGATCCGGCGTTCGACGATTCGGC  
T S D F D A N W K F M L S D S V Q A Q D F A F D D S A  
481 CTGGCAGCAGGTCGACCTGCCGATGACTACAGCATCACGCAGAAGTATTCGAGAGCAACGAGCCGAAAGCGCATACC  
W Q Q V D L P H D Y S I T Q K Y S Q S N E A E S A Y  
561 TTCGCGCCGCGCACGGCTGGTACCSCAAGTCTTCACCATCGACCGGGACCTCGCGCGCAAGCGCATCGCCATCAACTTC  
L F G G T G W Y R K S F T I D R D L A G K R I A I N F  
641 GACGGCTGTACATGAACGCCACCGTCTGGTTCAACGGCGTCAAGCTCGGCACCCATCCGTACGGCTACGCCCTCTC  
D G V Y M N A T V W F N G V K L G T H P Y G Y S P F S  
721 CTTCGACCTGACCGGCAAGCTCGGTGGGAGAACCCATCGTCTCAAGTCEAGAACAGGCTCCCTCCAGCC  
F D L T G N A K F G G E N T I V V K V E N R L P S S  
801 GCTGTACTCCGGCTCCGGCATCTACCGGACGCTCACCTCACCGTCCAGCAGCGCTGCACCTCGGCATACCGCGTGC  
R W Y S G S G I Y R D V T L T V T D G V H V G N N G V  
881 GCCATCAAGACCCCGACCTCGCCACCCAAAACGGCGGACGATGACGATGAACCTCACCCAAAGTCCGCCAACGACAC  
A I K T P S L A T Q N G G D V T M N L T T K V A N D T  
961 CGAGGCGCGCGCAACATCACCTCAAGCAGACCGTGTCCCGAAGGGAGGCAAGACCGAGCCGCGCATCGCCACGTC  
E A A A N I T L K Q T V F P K G G K T D A A I G T V A  
1041 CCACCGCATCAAGTCCATCCGCGCGCGTCCAGCGCGGACCTCCACGATCACCGCGCTCGCCCAAGCTGTGG  
T T A S K S I A A G A S A D V T S T I T A A S P K L S  
1121 AGCATCAGAACCCGACCTGTACCGTCCGCGCGGACGATGCTCAAGCGCGCAAGGCTCGTCCGACTTCCGACACCGA  
S I K N F N L Y T V R T E V L N G G K V L D T Y D T E  
1201 AFATGGCTTCCGCTGGACCGGCTTCGATGCGACCGGTTTCTCGCTCAACGGCGAGAAAGTCAAGCTCAAGGGCGCT  
Y G F R W T G F D A T S G F S L N G E K V K L K G V  
1281 CAATCGATCCTGACCCAGGATCCGCTCGCGCGGCTCGCAGCGCGCGGATCGAGCGCCAGGTCGAGATTCTCCAGAG  
S M H H D Q G S L G A V A N R R A I E R G C C C A G G T C G A G A T T C C C A G A G  
1361 ATGGCGTCAACTCCATCCGACCCAGCACAACCCCGCAGCCAGGCGCTGATTGACGCTCTGACAGAGAGGGCGTCT  
M G V N S I R T T H N P A A K A L I D V C N E K G V L  
1441 CGTGGTCCGAGAGGCTTCGACATGTGGACCGGTCGAGAACCGCAACACCGAGGATTACGGCAAGTGGTTCGGCCAGG  
V V E E V F D M W N R S K N G N T E D Y G K W F G Q  
1521 CCATCGCCGCTGACACCGCGTCTTGGTGGCGACAAGGACGAGACCTGGGCGAGTTCGACCTGACGACCATCAC  
A I A G D N A V L G G D K D E T W A K F D L T S T I N  
1601 CGTGCAGGAACGCCCGTCCGTCATCATGTGGTGGCTCGGCAACGAGATGATGGAAGGCATCAGCGGACCGCTCCGG  
R D R N A P S V I M W S L G N E M M E G I S G S V S G  
1681 CTTCGCGCTACCTCCGCAAGCTGGTCCGATGGACGAAGCGCGGACAGCACCGCCGATGACCTACGGCGACACACA  
F P A T S A K L V A W T K A A D S T R P M T Y G D N  
1761 AGATCAAGGCCAACTGGAACGAGTGAACACCATGGGCGAACCTGACCGCAACCGCGCGGCTGGTCCGGCACCACTAC  
K I K A N W N E S N T M G D N L T A N G G V V G T N Y  
1841 TCCGACGGCGAAGTACGACAGATCCGACGACCCACCCCTCATGGGCATCTATGGTTCGAGACGGCTCCGCCAT  
S D G A N Y D K I R T T H P S W A I Y G S E T A S A I  
1921 CAACGCGAGGCACTTCAACCCGACCCCGCGCGCCAGTCAAGCGACAGCAGCTGACCGCTATGACAAITCCG  
N S R G I Y N R T T G G A Q S S D K Q L T S Y D N S  
2001 CAGTGGCTGGGCGCGCTCCGCGCTCCGCTGGTACGACCTGGTCCAGCGGATTCGTCGCGCGCACATACGCTGG  
A V G W G A V A S S A W Y D V V Q R D F V A G T Y V W  
2081 ACCGCTTCGACTACCTCGCGAACCACCCCGTGGAAACGGCACCGGCTCCGGCGCGTGGCTCCTTGGCTTCGCGA  
T G F D Y L G E P T P W N G T G S G A V G S L A V A E  
2161 AGAATCGTACTTCGGCATCTGACACCCGAGGCTTCCCGAAGACACCTATTACTTCTATCAGACCGAGTGAACGAG  
E L V L R H R R H R R L P E D T Y Y F Y Q S Q W N D  
2241 ACGTGCACGCTGCACATCCCTCCCGCATGGAACGAGAACCTCGTCCGCAAGGCTCCGGCAACAGCTCCGCGCTC  
D V H T L H I L P A W N E N V V A K G S G N N V P V V

도면1b

2321 GTCTACACCGACGGCCCAAGGTCAAGCTGTACTTCACACCGAAGGGCAGTACCGAAAAGCGACTGATCGGAGAGAAATC  
V Y T D A A K V K L Y E T P K E S T E K R L I G E K S

2401 CTTCACCAAGAAGACCACCGGGCCGATACACCTATCAGGCTCAGAGGGCTCCGACAAAGGACTCCACCGGCCACAGA  
F T K K T T A A G Y T Y Q V Y E G S D K D S T A H K

2481 ACATGTACCTGACCTGGAACTCGCGTGGGGCCAGGGCCACATCTCCGCGGAGCATACGACGAGAACCAACAGGCTGATC  
N M Y L T W H V P W A E G T I S A E A Y D E N N R L I

2561 CCGAGGGGTCCACCGAGGGCAACCGCTCGGTGACACACCGGCAAGGCGCGGAGCTTAAAGCCGATGCGCCAGCCAA  
P E G S T E G N A S V T T T G K A A K L K A D A D R K

2641 GACGATCACCGGGACCGCAAGGACCTGTCTACATCGAGGTCGACGTCGACGACGCCAACGGCCATATCTCCCGGATG  
T I T A D G K D L S Y I E V D V T D A N G H I V P D

2721 CCGCAACCGGCTCACCTTCAGCTCAAGGGCGCCGCAACTGGTCGGGCTCGCAACCGGACGTCGCGGATCAGCAG  
A A N R V T F D V K G A G K L V G V D N G S S P D H D

2801 TCCTATCAGCCGACACCGCAAGGCGTTCAGCGCAAGTGTCTCGCATCGTCCAGTCCACCAAGGAGCGGGCGAGT  
S Y Q A D N R K A F S G K V L A I V Q S T K E A G E I

2881 CACGTCACCGCCAAAGCCGAGCTCTGCAATCATCCACAGTGAAGATCGCCACCGCCGCTCCCGGACCCAGCAGC  
T V T A K A D G L Q S S T V K I A T T A J P C G G T C

2961 AGAGACCGGTCGCGAGCTTCTACTCTCGGCAACTACTACGTCAGAACCGGCAACAGCCGATTCGCGGATGATGTC  
E K T V R S F Y I S R N Y Y V K T G N K P I L P S D V

3041 GAGGTCCGCTACTCCGACGGCAGCTCGGACCGTCAGAACGTCACATGGGACGAGTCAGCGACGACCGATCGCCAGGC  
E V R Y S D G T S D R Q N V T W D A V D Q I K A A

3121 CGGTCGTTACGCGTGGCCGCGGTCGCGGCGCAAGATCTCCGTGCGCTGACGATGATCGACGAGATCGGTGCGC  
G S E S V A G T V A G Q K I S V R V T M I D E I G A

3201 TGCTCAACTATTGCGCCAGCACCGGTCGCGCACGGCCGCGTGTGCTGCTGGCTCGGCTCCGCGGTCGCGGCGGCG  
L L N Y S A S T P V G T P A V L P G S R P A V L P D G

3281 ACCGTGACGACCGAATCTCGCGCTCCACTGGACCAAGCCCGCCGACCCGCTGTACAACCGGCGCCACCGCTAAGT  
T V T S A N F A V H W T K P A D T V Y N T A G T V K V

3361 CCCGGCACCGCCAGCTTCTGGCAAGGATCAAGTCAACGCGGAGGATTCGCTGCGAGGTCGCGAGTCCACCATCG  
P G T A T V F G K E F K V T A T I R V Q R S Q T F I

3441 GCAGCAGCTCTCCGCAATGCGCTGCGCTGACTCAGAACATCCCGCCGACAGCAGTCCGACACGCTGGACCGCCATC  
G S S V S G N A L R L T Q N I P A D K Q S D T L D A I

3521 AAGGACCGGTCACGACCGCTCGAGCCAAATACCGGCGCGCGGCAACCCGTCAGCATGGACCTGCGGCTACTCGAA  
K D G S T T V D A N T G G G A N P S A W T N W A Y S K

3601 GGCCCGCCACAACCGCCGAGATCACCTTCGAGTACCGGACCGGACGAGCAGCTCGGCGAGATTGTCATGACTCTCTCC  
A G H N T A E I T F E Y A T E Q Q L G Q I V M Y F F

3681 GCAGCAGCAACCGGCTGAGGTTCCCGGACCGCGCAAGACAGATCCAGATCTCCGCGGACGGCAAGACTGAGCGAT  
R D S N A V R F P D A G K T K I Q I S A D G K N W T D

3761 CTGCTGCCACGAGACCATCCGCGCCAGGAGTGTGTCGCGAGTCAAGCGTACACCTATGACTTCGCTCCGCTGGG  
L A A T E T I A A Q E S S D R V K P Y T Y D F A P V G

3841 AGCCAGGTTCTCAAGGTCAGGTCACCAACCGCGACCCACAAACCCCGAGCGGTCGCTGCGCGGCTGACCGAGA  
A T F V K V T V T N A D T T T P S G V C A G L T E

3921 TCGAGCTGAAGACCGCCAGCAAGTTCGTCACGAACCGTCCGCGCGCTCTCGTCGCTGACAGTGAACCGCAGAGA  
I E L K T A T S K F V T N T S A A L S S L T V N G T K

4001 GTCTCCGACTCGCTCGCGCGCGCTCCTACACCGCCGATCATCGCGGACGTCAAAGCGAGGCGGAGGCGAA  
V S D S V L A A G S Y N T P A I I A D V K A E G E G H

4081 CGCCAGCGTCAACGCTGCTCCCGCGCACGACAACGTCGTCGCGTATCAGCGTCCGAGGACCCGTCACCGCAAG  
A S V T V L P A H D N V I R V I T E S E D H V T R K

4161 CCTTCACCTCAACTGCGACCGGACGGAATTCGCGGACCTCCGATGAACCGGACTACCGCGCCCGCATGACG  
T F T I N L G T E Q E F P A D S D E R D Y F A A D M T

4241 GTCAACGTTGGCAGCAACAGCTCCGCGCACCGGACCGGACCGGACCGGACCGGACCGGACCGGACCGGACCGG  
V T V G S E Q T S G T A T E G P K K F A V D G N T S C

4321 GTACTGCAATTCACCTGACGCGCCACCGCTGAAACGACCTGTGATCGCCTTCGAGCTCCAGAAACCCACCAAGCTCG  
Y W H S N W T P T T V N D L W I A F E L Q K P T K L

4401 ACGGCTCGGCTACCTCCGCGCGCCGCGGCAAGAACCGGCTCCGTCACCGAATACAGGTTCCAGTCCAGTCCAGT  
D A L R Y L P R P A G S K N G S T C G T E Y K V Q V S D D

4481 GGCACCAACTGGACCGGCGGCTCCGCAATGGACCCGATACCGGCTGGAAGCTCCGCGAGTCAACTCAGCGGCT  
G T N W T D A G S G T W T T D Y G W K L A E E N Q P V

도면1c

4561 GACCACCAAGCAGTCCGCGTCAAGGCGTCCACACCTATGCGGATTCGCGCAACGCAAGTTCATGTCGCGCTCCGAAA  
T F K H V R L K A V H T Y A D S G N D K F M S A S E

4641 TCCGCTGCGCAAGGCGTCCGACCCACCGACATCAGCGCGCGACCGTACCGGTCGCGCCGCAAGCTGACCGTCCGCG  
I R L R K A V D T T D I S G A T V T V P A K L T C D G R

4721 GTGGACGCGACCATCCGCGCACTTCGCGCACGAAGGACGTGACGTTGCGGCGACCGCAGCTGCGCTACGCGGT  
V D A D H P A T F A T K D V T V F L G D A T L R Y G V

4801 GGACTACCTGCTCAGTACCGGGCAACACCGCTCCGCAAGGCGGACCGTACCGTCCGCGGATCGACAGTACTCGG  
D Y L L D Y A G N T A V G K A T V T V R G I D K Y S

4881 GCACCGTCCGCAAGGCTTCACCTCGAAGTGAAGAACCGCCGCGCGGAAACCGACGCTGACCTCGTTCAGGCTCAAG  
G T V A K T F T I E L K N A P A P E P T L T S V I K

4961 ACCAAGCCTTCCAGCTGACCTATGCTGCGCGACCGCTTCGACCGGACGAGTGTGTCGACGACGACAGCAGG  
T K P S K L T Y V V G D A F D P A G L V L Q H D R Q A

5041 CGATCGCCCCCAGGCCACTTGTGGAGAACAGGCGGACGAAACCGGACTGACGTCCGGAACCGGATGCGATCGCGTTG  
D R P P Q P L V G E Q A D E R G L T C G G T R C D R V

5121 AACAGCTCGCAACACGAGAAATCGTGAAGCCCATCGTACGGGCTCGATCATCGGAATTCTGCTGCGCGGATGGA  
E Q L R K H E N R E A H R T G L D H L E F V G A A T C G

5201 CCGGTGCTGAACAGGCCACTTCAAGGTGCAATGCTATCCGATCAAGTGAACGCGCCGATGATGATCGGATCAAGC  
A V G E Q A T F K V H V H A D Q G D G R H D D A D A E R

5281 CGATATCGATCCACATGCTGTCGATCAGCGGTCGCTGAGCTTGGCGGGCTCGCTCCATCAGCTCATCGTCTGCG  
D T D P H V P V D H A V G E L A R A A C H H V I G L

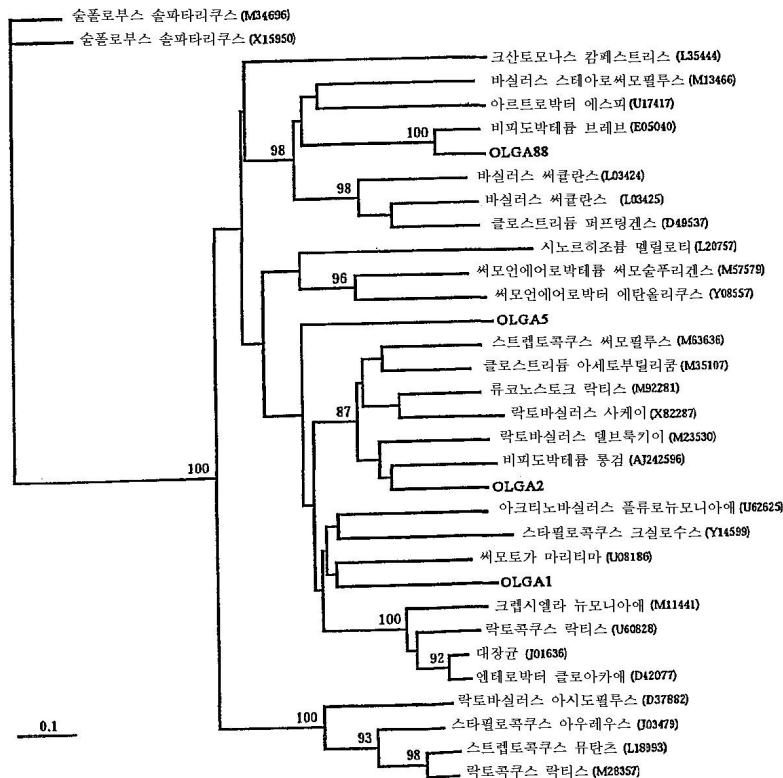
5361 GGTTCGACACCCATCGCTCAAGGATCCGCTTCAGATCCCGCGACGACATGGCCGAGATCGACAGTACTCGGCG  
R V D T H R L K A S G F Q I P A D D M A E I D R I T G

5441 TTCACCGCTTCGAGCGCCAGTCCGCTGACGTGATGGGCTTCCCGCTGCTGGTCCGCGCTCGCGA  
T H R F E R K V G Z

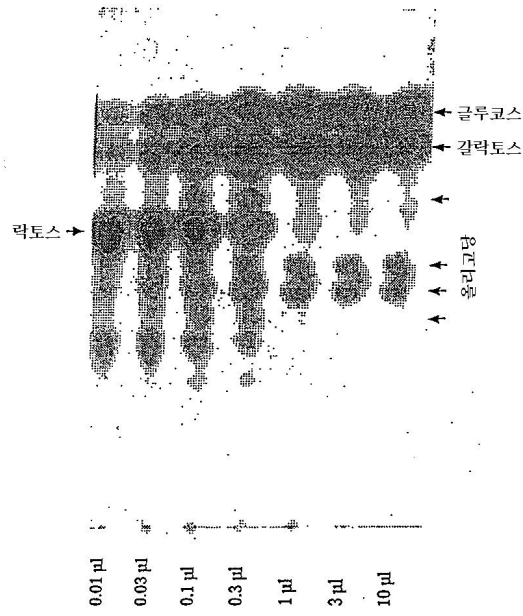
도면2

L35444	RFLAASQAY--LDALAKQVQPLLN-HNGGP-II-AVQVE-NEYGSYAD
M13466	HYCPNHPQL--ITHIKRLVRAIAERYKNHPALK-MWHVN-NEYACHVS
U17417	TISSSAWYYSVGGQYAAKMTALAEYKDHAPALA-LWHVD-NELGCHVS
E05040	HWRATSPVF--LDYALNLCRMAEHYKDNPYVW-SWHVS-NEYGCHNR
OLGA88	HWRPSPVF--REYALRLCRAMAEHYKDNPYVW-AWHVS-NEYGCHNR
L03424	NSCPNSPTY--RKYSKLIADKLAERYKDHAPAVL-VWHIS-NEYGGDCY
L03425	NHCYTPVY--REKVTAINTKLAERYSDHAPAVL-GWHIS-NEFGGDCH
D49537	NHCYTPVY--REKIAIIDRLAERYKDHAPALI-LWHIS-NEFEGQCY
L20757	RWGGME-TG--GNPERPHERSSATG--TTRLSY-IWGVINESQDSDH
M57579	QYIGNS-EW--KKVAEQNLREMITRDNNHPSII-LWGVINESQDDDA
Y08557	QHIGDE-NW--KNIAKENLKMILDRNHPCIF-MWGVINERLDDHD
OLGA5	AVLGGDKDE--TWAKFD-ITSTINRDRNAPSVI-MWSLG-NEMMEGSI
M63636	NI PASEPEW--LPACILDRANNMFQRDKNHASVI-IWSCG-NESYAGKD
M35107	NVPGSLPQW--QAAVIDRASSMVERDKNHPSVI-IWSCG-NESYAGED
M92281	NVPGDNPHW--PAAVIDRARSNYEWFKNHPSII-FWSLG-NESYAGED
X82287	NVPGSYDEW--EAAITLDRARTNFETFKNHVSIL-FWSLG-NESYAGSV
M23530	NVPGDDQHW--LGASLSRVKNMMARDKNHASIL-IWSLG-NESYAGTV
AJ242596	I VPGSKREW--EGACVDRVNSMMRRDYNHPSVI-IWSLG-NESYVGDV
OLGA2	SVPGDDEAW--LGACIDRLDSMILDRNHPHPSVI-VWSLG-NESYAGEV
U62625	CYFARDPLF--KKAILDRQQANVERDKNRTSII-IWSLG-NEAGYGAN
Y14599	NI IADDSKF--ETAI IERIEASIMPLKNYSIV-SWSLG-NESGFGKN
U08186	VTLANRWEW--EKAFHFDRI KRMVERDKNHPSII-FWSLG-NEAGDGVN
OLGA1	RPIADNPW--IAPTVDRAQRVSVERDKNHASII-FWSMG-NECAYGCT
M11441	NRLSDDPAW--LPAPFARVTRMVQRDRNHPHPSII-IWSLG-NESSGGGN
U60828	NRLTNDPTY--LPIMSERVTRMVMRDRNHPHPSII-IWSLG-NESSGYGSN
J01636	NRLTDDPRW--LPAMSERVTRMVQRDRNHPHPSVI-IWSLG-NESSGHGAN
D42077	SRLADDPW--LPAMSERVTRMVQRDRNHPHPSII-IWSLG-NESSGHGAN
D37882 (P)	EGLHEDGDELTHEKMDPVVEYADYCFKEPPEVK-YWITI-NEIRSVAV
J03479 (P)	EVLHKDGFNLNRCTIDYFVDYAEYCFKEPPEVK-YWTF-NEIGPIGD
L18993 (P)	EALHNSGDFLNRENI EHFVNYAEP CFKEPPEVN-YWTF-NEIGPIGD
M28357 (P)	EALHNSGDFLNRENI EHFIDYAAF CFEPPEVN-YWTF-NEIGPIGD
M34696	GDFTCPSSGLSTRIVYEFARFSAYIAWKFDLVDVEYSTM-NEPNVVG
X15950	GDFTGPTGWLNSRTVYEFARFSAYIAWKLDLASEYATM-NEPNVVG

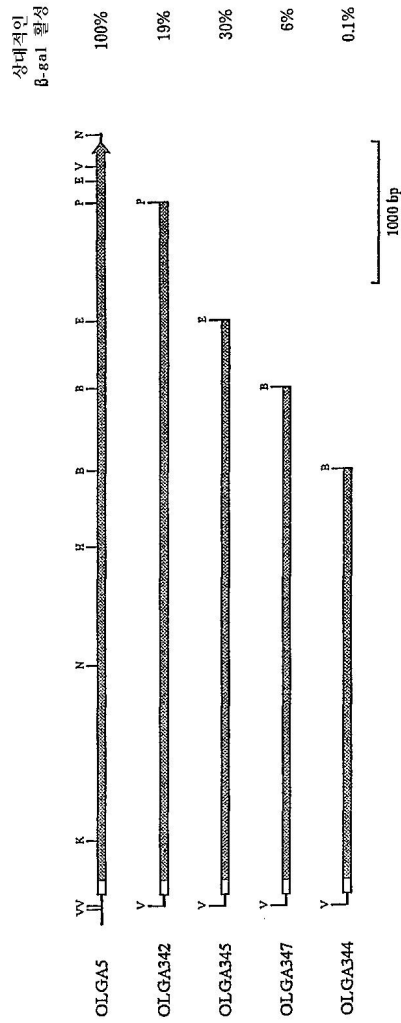
도면3



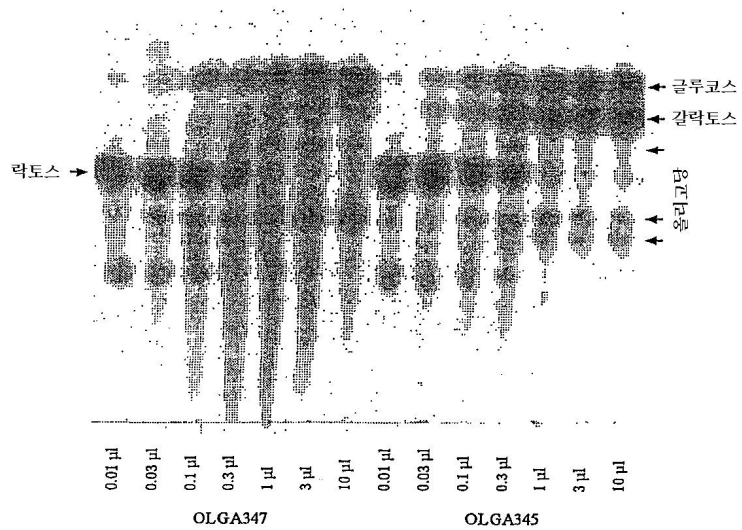
도면4



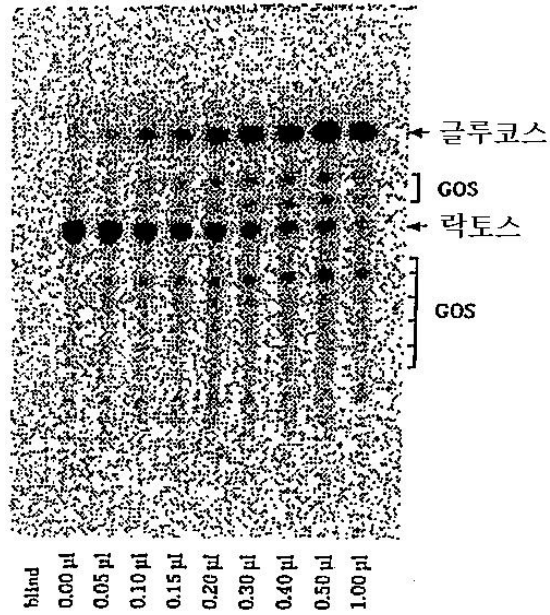
도면5



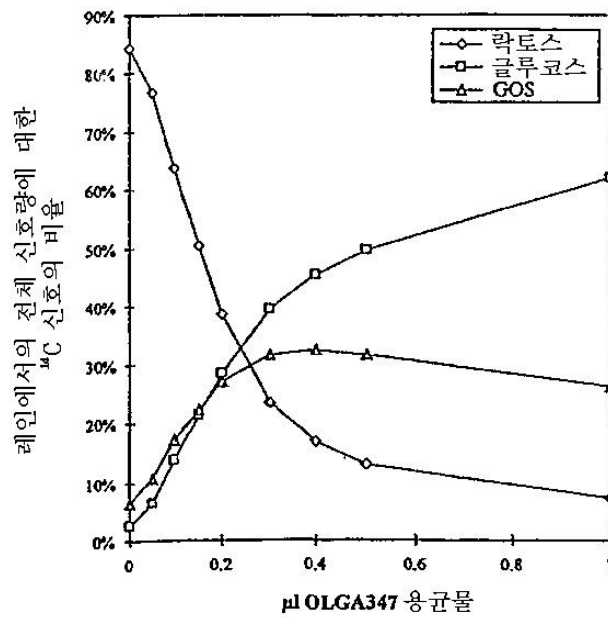
도면6



도면7a



도면7b





도면8a

10% 락토스와의 반응

	0 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l	0.8 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	3 $\mu$ l	6 $\mu$ l
락토스	112.38	105.87	101.35	92.52	75.56	51.82	34.04	30.08
글루코스	0	1.52	2.85	6.11	11.53	20.66	30.16	36.92
갈락토스	0	0.19	0.30	0.66	1.30	2.16	3.80	5.58

도면8b

20% 락토스와의 반응

	0 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l	0.8 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	3 $\mu$ l	6 $\mu$ l
락토스	235.65	217.58	205.30	177.70	137.27	93.78	66.24	61.69
글루코스	0	2.95	6.48	13.93	29.57	45.99	61.06	73.06
갈락토스	0	0.34	0.48	0.78	1.96	3.07	4.87	6.95

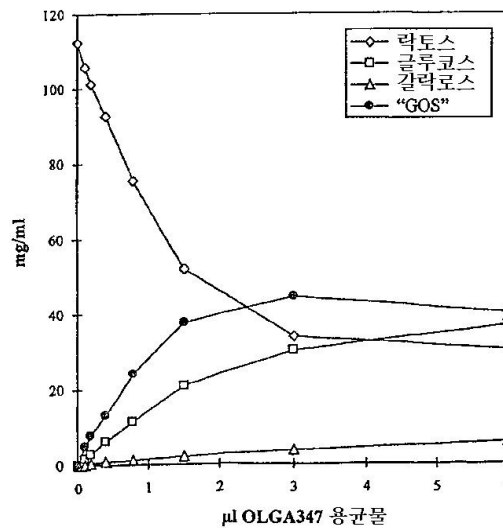
도면8c

40% 락토스와의 반응

	0 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l	0.8 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	3 $\mu$ l	6 $\mu$ l
락토스	426.47	395.16	370.29	308.07	224.08	174.88	136.73	121.29
글루코스	0	7.96	17.51	37.96	63.42	93.99	123.99	144.27
갈락토스	0	0.65	0.97	1.48	2.94	4.11	6.84	8.89

도면8d

10% 락토스와의 반응 플롯



서열목록

<110> ARLA FOODS AMBA

<120> Beta-Galactosidase Isolated from a Bifidobacterium

<130> PC025441

<150> US 60/207,154

<151> 2000-05-26

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 5509

<212> DNA

<213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> CDS

<222> (212)..(5467)

<400> 1

atgcgttgcg ttgcgatttt tccggccctg tafgggggat acaggattgg cgatggcgac 60

acgccgtttt tgtaatggc atttcatga aatacaggta atgagatc atctcatga 120

taccgtgtg gatatcgcat tgggtcgtat aactaacag caacagagcg gcgcggcagg 180

cgctcgtgga ttcaatgaag aaggaacgtt t atg gca gtt cgc aga 226  
Met Ala Val Arg Arg  
1 5

ctt ggt ggc cgc atc gtg gct ttc gcc gcc aca gtg gcc ttg tca ata 274  
Leu Gly Gly Arg Ile Val Ala Phe Ala Ala Thr Val Ala Leu Ser Ile  
10 15 20

ccg tta ggg ttg tta aca aat tca gcg tgg gcg gtc gag gac gcc acc 322  
Pro Leu Gly Leu Leu Thr Asn Ser Ala Trp Ala Val Glu Asp Ala Thr  
25 30 35

cga tcc gac tcc acc acg cag atg agc tcc acg ccg gag gtg gtc tac 370  
Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr Pro Glu Val Val Tyr  
40 45 50

tcc agc gcc gtg gat tcc aag cag aat cgc acc tcg gat ttc gac gcc 418  
Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr Ser Asp Phe Asp Ala

55	60	65	
aac tgg aag ttc atg ctg tcc gat tcc gtg cag gcg cag gat ccg gcg			466
Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln Ala Gln Asp Pro Ala			
70	75	80	85
ttc gac gat tcg gcc tgg cag cag gtc gac ctg ccg cat gac tac agc			514
Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu Pro His Asp Tyr Ser			
90	95	100	
atc acg cag aag tat tcg cag agc aac gag gcc gaa agc gca tac ctt			562
Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala Glu Ser Ala Tyr Leu			
105	110	115	
ccc ggc ggc acc ggc tgg tac cgc aag tcc ttc acc atc gac cgg gac			610
Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe Thr Ile Asp Arg Asp			
120	125	130	
ctc gcc ggc aag cgc atc gcc atc aac ttc gac ggc gtg tac atg aac			658
Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp Gly Val Tyr Met Asn			
135	140	145	
gcc acc gtc tgg ttc aac ggc gtc aag ctc ggc acc cat ccg tac ggc			706
Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly Thr His Pro Tyr Gly			
150	155	160	165
tac tcg ccg ttc tcc ttc gac ctg acc ggc aac gcc aag ttc ggt ggg			754
Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn Ala Lys Phe Gly Gly			
170	175	180	
gag aac acc atc gtc gtc aag gtc gag aac agg ctg ccg tcc agc cgc			802
Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg Leu Pro Ser Ser Arg			
185	190	195	
tgg tac tcc ggc tcc ggc atc tac cgc gac gtc acc ctc acc gtc acc			850
Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val Thr Leu Thr Val Thr			
200	205	210	
gac ggc gtg cac gtc ggc aat aac ggc gtg gcc atc aag acc ccg agc			898
Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala Ile Lys Thr Pro Ser			
215	220	225	
ctc gcc acc caa aac ggc ggc gac gtg acg atg aac ctc acc acc aag			946
Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met Asn Leu Thr Thr Lys			

230	235	240	245	
gtc gcc aac gac acc gag gcc gcg gcg aac atc acc ctc aag cag acc 994				
Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile Thr Leu Lys Gln Thr				
	250	255	260	
gtg ttc ccc aag gga ggc aag acc gac gcc gcc atc ggc acc gtc acc 1042				
Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala Ile Gly Thr Val Thr				
	265	270	275	
acc gca tcc aag tcc atc gcg gcc ggt gcc agc gcg gac gtg acc tcc 1090				
Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser Ala Asp Val Thr Ser				
	280	285	290	
acg atc acc gcc gct tcg ccc aag ctg tgg agc atc aag aac ccg aac 1138				
Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser Ile Lys Asn Pro Asn				
	295	300	305	
ctg tac acc gtg cgc acc gaa gtg ctc aac ggc ggc aag gtg ctc gac 1186				
Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly Gly Lys Val Leu Asp				
310	315	320	325	
act tac gac acc gaa tat ggc ttc cgc tgg acc ggc ttc gat gcg acc 1234				
Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr Gly Phe Asp Ala Thr				
	330	335	340	
agc ggt ttc tcg ctc aac ggc gag aaa gtc aag ctc aag ggc gtc tca 1282				
Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys Leu Lys Gly Val Ser				
	345	350	355	
atg cat cat gac cag gga tcg ctc ggc gcg gtc gcc aac cgc cgc gcc 1330				
Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val Ala Asn Arg Arg Ala				
	360	365	370	
atc gag cgc cag gtc gag att ctc cag aag atg ggc gtc aac tcg atc 1378				
Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met Gly Val Asn Ser Ile				
	375	380	385	
cgc acc acg cac aac ccc gca gcc aag gcg ctg att gac gtc tgc aac 1426				
Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu Ile Asp Val Cys Asn				
390	395	400	405	
gag aag ggc gtc ctc gtg gtc gaa gag gtc ttc gac atg tgg aac cgg 1474				
Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe Asp Met Trp Asn Arg				

410	415	420	
tcg aag aac ggc aac acc gag gat tac ggc aag tgg ttc ggc cag gcc			1522
Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys Trp Phe Gly Gln Ala			
425	430	435	
atc gcc ggt gac aac gcc gtc ctg ggt ggc gac aag gac gag acc tgg			1570
Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp Lys Asp Glu Thr Trp			
440	445	450	
gcc aag ttc gac ctg acc agc acc atc aac cgt gac agg aac gcc ccg			1618
Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg Asp Arg Asn Ala Pro			
455	460	465	
tcc gtc atc atg tgg tcg ctc ggc aac gag atg atg gaa ggc atc agc			1666
Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met Met Glu Gly Ile Ser			
470	475	480	485
ggc agc gtc tcg ggc ttc ccg gct acc tcc gcc aag ctg gtc gca tgg			1714
Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala Lys Leu Val Ala Trp			
490	495	500	
acg aag gcc gcg gac agc acc cgc ccg atg acc tac ggc gac aac aag			1762
Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr Tyr Gly Asp Asn Lys			
505	510	515	
atc aag gcc aac tgg aac gag tcg aac acc atg ggc gac aac ctg acc			1810
Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met Gly Asp Asn Leu Thr			
520	525	530	
gcc aac ggc ggc gtg gtc ggc acc aac tac tcc gac ggc gcg aac tac			1858
Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser Asp Gly Ala Asn Tyr			
535	540	545	
gac aag atc cgc acg acc cac ccc tca tgg gcc atc tat ggt tcc gag			1906
Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala Ile Tyr Gly Ser Glu			
550	555	560	565
acg gcg tcc gcc atc aac agc cga ggc atc tac aac cgc acc acc ggc			1954
Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr Asn Arg Thr Thr Gly			
570	575	580	
ggc gcc cag tca agc gac aag cag ctg acc agc tat gac aat tcc gca			2002
Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Asn Ser Ala			

585	590	595	
gtc ggc tgg ggc gcc gtc gcc agc tcc gcc tgg tac gac gtg gtc cag			2050
Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp Tyr Asp Val Val Gln			
600	605	610	
cgc gat ttc gtc gcc ggc aca tac gtg tgg acc ggc ttc gac tac ctc			2098
Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr Gly Phe Asp Tyr Leu			
615	620	625	
ggc gaa ccc acc ccg tgg aac ggc acc ggc tcc ggc gcc gtg ggc tcc			2146
Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser Gly Ala Val Gly Ser			
630	635	640	645
ttg gcc gtc gcc gaa gaa ctc gta ctt cgg cat cgt cga cac cgc agg			2194
Leu Ala Val Ala Glu Glu Leu Val Leu Arg His Arg Arg His Arg Arg			
650	655	660	
ctt ccc gaa gac acc tat tac ttc tat cag agc cag tgg aac gac gac			2242
Leu Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser Gln Trp Asn Asp Asp			
665	670	675	
gtg cac acg ctg cac atc ctc ccc gca tgg aac gag aac gtc gtc gcc			2290
Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn Glu Asn Val Val Ala			
680	685	690	
aag ggc tcc ggc aac aac gtg ccg gtc gtc gtc tac acc gac gcg gcc			2338
Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val Tyr Thr Asp Ala Ala			
695	700	705	
aag gtc aag ctg tac ttc aca ccg aag ggc agt acc gaa aag cga ctg			2386
Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser Thr Glu Lys Arg Leu			
710	715	720	725
atc gga gag aag tcc ttc acc aag aag acc acc gcg gcc gga tac acc			2434
Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr Ala Ala Gly Tyr Thr			
730	735	740	
tat cag gtc tac gag ggc tcc gac aag gac tcc acc gcc cac aag aac			2482
Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser Thr Ala His Lys Asn			
745	750	755	
atg tac ctg acc tgg aac gtg ccg tgg gcc gag ggc acc atc tcc gcc			2530
Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu Gly Thr Ile Ser Ala			

760	765	770	
gaa gca tac gac gag aac aac agg ctg atc ccc gag ggg tcc acc gag			2578
Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro Glu Gly Ser Thr Glu			
775	780	785	
ggc aac gcg tcg gtg acc acc acc ggc aag gcc gcg aag ctt aaa gcc			2626
Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala Ala Lys Leu Lys Ala			
790	795	800	805
gat gcc gac cgc aag acg atc acc gcg gac ggc aag gac ctg tcg tac			2674
Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly Lys Asp Leu Ser Tyr			
810	815	820	
atc gag gtc gac gtg acc gac gcc aac ggc cat atc gtc ccc gat gcc			2722
Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His Ile Val Pro Asp Ala			
825	830	835	
gcc aac cgc gtc acc ttc gac gtc aag ggc gcc ggc aaa ctg gtc ggc			2770
Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala Gly Lys Leu Val Gly			
840	845	850	
gtc gac aac ggc agc tcg ccg gat cac gac tcc tat cag gcc gac aac			2818
Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser Tyr Gln Ala Asp Asn			
855	860	865	
cgc aag gcg ttc agc ggc aag gtg ctc gcc atc gtc cag tcc acc aag			2866
Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile Val Gln Ser Thr Lys			
870	875	880	885
gag gcg ggc gag atc acc gtc acc gcc aag gcc gac ggt ctg caa tca			2914
Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala Asp Gly Leu Gln Ser			
890	895	900	
tcc aca gtg aag atc gcc acc acc gcc gtc ccc ggc acc agc acc gag			2962
Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro Gly Thr Ser Thr Glu			
905	910	915	
aag acg gtc cgc agc ttc tac tac tcg cgc aac tac tac gtc aag acc			3010
Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn Tyr Tyr Val Lys Thr			
920	925	930	
ggc aac aag ccg att ctg ccg agt gat gtc gag gtg cgc tac tcc gac			3058
Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu Val Arg Tyr Ser Asp			

935	940	945	
ggc acg tcg gac cgt cag aac gtc aca tgg gac gca gtc agc gac gac			3106
Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp Ala Val Ser Asp Asp			
950	955	960	965
cag atc gcc aag gcc ggt tcg ttc agc gtg gcc ggc acg gtc gcc ggg			3154
Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala Gly Thr Val Ala Gly			
	970	975	980
cag aag atc tcc gtg cgc gtg acg atg atc gac gag atc ggt gcg ctg			3202
Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp Glu Ile Gly Ala Leu			
	985	990	995
ctc aac tat tcg gcc agc aca ccg gtc ggc acg ccc gcc gtg ctg cct			3250
Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr Pro Ala Val Leu Pro			
	1000	1005	1010
ggc tcg cgt ccg gcc gtg ctg ccc gac ggc acc gtg acc agc gcg aac			3298
Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr Val Thr Ser Ala Asn			
	1015	1020	1025
ttc gcc gtc cac tgg acc aag ccc gcc gac acc gtg tac aac acg gcc			3346
Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr Val Tyr Asn Thr Ala			
1030	1035	1040	1045
ggc acc gtc aag gtc ccc ggc acc gcc acc gtc ttc ggc aag gag ttc			3394
Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val Phe Gly Lys Glu Phe			
	1050	1055	1060
aag gtc acc gcg acg att cgc gtg cag cgg tcg cag gtc acc atc ggc			3442
Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln Arg Ser Gln Val Thr Ile Gly			
	1065	1070	1075
agc agc gtc tcc ggc aat gcg ctg cgc ctg act cag aac atc ccc gcc			3490
Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Thr Gln Asn Ile Pro Ala			
	1080	1085	1090
gac aag cag tcc gac acg ctg gac gcc atc aag gac ggc tcc acg acc			3538
Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala Ile Lys Asp Gly Ser Thr Thr			
	1095	1100	1105
gtc gac gcc aat acc ggc ggc ggc gcg aac ccg tca gca tgg acc aac			3586
Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro Ser Ala Trp Thr Asn			



1110	1115	1120	1125	
tgg gcg tac tcg aag gcc ggc cac aac acc gcc gag atc acc ttc gag				3634
Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala Glu Ile Thr Phe Glu				
	1130	1135	1140	
tac gcg acc gag cag cag ctc ggc cag att gtc atg tac ttc ttc cgc				3682
Tyr Ala Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val Met Tyr Phe Phe Arg				
	1145	1150	1155	
gac agc aac gcg gtg agg ttc ccc gac gcc ggc aag acg aag atc cag				3730
Asp Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly Lys Thr Lys Ile Gln				
	1160	1165	1170	
atc tcc gcg gac ggc aag aac tgg acg gat ctc gct gcc acg gag acc				3778
Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu Ala Ala Thr Glu Thr				
	1175	1180	1185	
atc gcg gcc cag gag tcg tcc gac cga gtc aag ccg tac acc tat gac				3826
Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys Pro Tyr Thr Tyr Asp				
	1190	1195	1200	1205
ttc gct ccg gtg gga gcc acg ttc gtc aag gtc acg gtc acc aac gcc				3874
Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val Thr Val Thr Asn Ala				
	1210	1215	1220	
gac acc aca acc ccc agc ggc gtg gtc tgc gcc ggc ctg acc gag atc				3922
Asp Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala Gly Leu Thr Glu Ile				
	1225	1230	1235	
gag ctg aag acc gcg acc agc aag ttc gtc acg aac acg tcc gcc gcg				3970
Glu Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr Asn Thr Ser Ala Ala				
	1240	1245	1250	
ctc tcg tcg ctg aca gtg aac ggc acg aag gtc tcc gac tcc gtg ctc				4018
Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys Val Ser Asp Ser Val Leu				
	1255	1260	1265	
gcc gcc ggc tcc tac aac acg ccc gcg atc atc gcg gac gtc aaa gcc				4066
Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala Ile Ile Ala Asp Val Lys Ala				
	1270	1275	1280	1285
gag ggc gaa ggc aac gcc agc gtc acc gtg ctg ccc gcg cac gac aac				4114
Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Val Leu Pro Ala His Asp Asn				

1290	1295	1300	
gtg atc cgc gtg atc acc gag tcc gag gac cac gtc acg cgc aag acc			4162
Val Ile Arg Val Ile Thr Glu Ser Glu Asp His Val Thr Arg Lys Thr			
1305	1310	1315	
ttc acc atc aac ctg ggc acg gag cag gaa ttc ccc gca gac tcc gat			4210
Phe Thr Ile Asn Leu Gly Thr Glu Gln Glu Phe Pro Ala Asp Ser Asp			
1320	1325	1330	
gaa cgc gac tac ccg gcc gcc gac atg acg gtc acc gtg ggc agc gaa			4258
Glu Arg Asp Tyr Pro Ala Ala Asp Met Thr Val Thr Val Gly Ser Glu			
1335	1340	1345	
cag acg tcc ggc acc gcg acc gaa ggc ccg aag aaa ttc gcg gtc gac			4306
Gln Thr Ser Gly Thr Ala Thr Glu Gly Pro Lys Lys Phe Ala Val Asp			
1350	1355	1360	1365
ggc aac acc agc acg tac tgg cat tcc aac tgg acg ccc acc acc gtg			4354
Gly Asn Thr Ser Thr Tyr Trp His Ser Asn Trp Thr Pro Thr Thr Val			
1370	1375	1380	
aac gac ctg tgg atc gcc ttc gag ctc cag aaa ccc acc aag ctc gac			4402
Asn Asp Leu Trp Ile Ala Phe Glu Leu Gln Lys Pro Thr Lys Leu Asp			
1385	1390	1395	
gcg ctg cgc tac ctg ccg cgc ccc gcg ggc agc aag aac ggc tcc gtc			4450
Ala Leu Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Gly Ser Lys Asn Gly Ser Val			
1400	1405	1410	
acc gaa tac aag gtt cag gtc agc gat gac ggc acc aac tgg acc gac			4498
Thr Glu Tyr Lys Val Gln Val Ser Asp Asp Gly Thr Asn Trp Thr Asp			
1415	1420	1425	
gcg ggc tcc ggc aca tgg acc acc gat tac ggc tgg aag ctc gcc gag			4546
Ala Gly Ser Gly Thr Trp Thr Thr Asp Tyr Gly Trp Lys Leu Ala Glu			
1430	1435	1440	1445
ttc aat cag ccg gtg acc acc aag cac gtg cgg ctc aag gcc gtc cac			4594
Phe Asn Gln Pro Val Thr Thr Lys His Val Arg Leu Lys Ala Val His			
1450	1455	1460	
acc tat gcg gat tcc ggc aac gac aag ttc atg tcc gcc tcc gaa atc			4642
Thr Tyr Ala Asp Ser Gly Asn Asp Lys Phe Met Ser Ala Ser Glu Ile			

1465	1470	1475	
cgc ctg cgc aag gcc gtc gac acc acc gac atc agc ggc gcg acc gtg			4690
Arg Leu Arg Lys Ala Val Asp Thr Thr Asp Ile Ser Gly Ala Thr Val			
1480	1485	1490	
acc gtg ccc gcc aag ctg acc gtc gac cgg gtg gac gcc gac cat ccc			4738
Thr Val Pro Ala Lys Leu Thr Val Asp Arg Val Asp Ala Asp His Pro			
1495	1500	1505	
gcc acc ttc gcc acg aag gac gtg acg gtg acg ttg ggc gac gcc acg			4786
Ala Thr Phe Ala Thr Lys Asp Val Thr Val Thr Leu Gly Asp Ala Thr			
1510	1515	1520	1525
ctg cgc tac ggc gtg gac tac ctg ctc gac tac gcg ggc aac acc gcc			4834
Leu Arg Tyr Gly Val Asp Tyr Leu Leu Asp Tyr Ala Gly Asn Thr Ala			
1530	1535	1540	
gtc ggc aag gcc acg gtg acc gtg cgc ggc atc gac aag tac tcc ggc			4882
Val Gly Lys Ala Thr Val Thr Val Arg Gly Ile Asp Lys Tyr Ser Gly			
1545	1550	1555	
acc gtc gcc aag acg ttc acc atc gaa ctg aag aac gcc ccg gcg ccg			4930
Thr Val Ala Lys Thr Phe Thr Ile Glu Leu Lys Asn Ala Pro Ala Pro			
1560	1565	1570	
gaa ccg acg ctg acc tcg gtg agc gtc aag acc aag cct tcc aag ctg			4978
Glu Pro Thr Leu Thr Ser Val Ser Val Lys Thr Lys Pro Ser Lys Leu			
1575	1580	1585	
acc tat gtg gtc ggc gac gcg ttc gac ccg gca gga ctg gtg ctg cag			5026
Thr Tyr Val Val Gly Asp Ala Phe Asp Pro Ala Gly Leu Val Leu Gln			
1590	1595	1600	1605
cac gac aga cag gcc gat cgc ccc cca cag cca ctt gtt gga gaa cag			5074
His Asp Arg Gln Ala Asp Arg Pro Pro Gln Pro Leu Val Gly Glu Gln			
1610	1615	1620	
gcc gac gaa cgc gga ctg acg tgc gga acg cga tgc gat cgc gtt gaa			5122
Ala Asp Glu Arg Gly Leu Thr Cys Gly Thr Arg Cys Asp Arg Val Glu			
1625	1630	1635	
cag ctg cgc aaa cac gag aat cgt gaa gcc cat cgt acg ggc ctc gat			5170
Gln Leu Arg Lys His Glu Asn Arg Glu Ala His Arg Thr Gly Leu Asp			

1640                      1645                      1650

cat ctg gaa ttc gtg ggt gcc gcc gat gga gcg gtc ggt gaa cag gcc      5218  
His Leu Glu Phe Val Gly Ala Ala Asp Gly Ala Val Gly Glu Gln Ala  
1655                      1660                      1665

acc ttc aag gtg cat gtc cat gcc gat caa ggt gac ggc cgc cat gat      5266  
Thr Phe Lys Val His Val His Ala Asp Gln Gly Asp Gly Arg His Asp  
1670                      1675                      1680                      1685

gat gcc gat gaa cgc gat atc gat cca cat gtc cct gtc gat cac gcg      5314  
Asp Ala Asp Glu Arg Asp Ile Asp Pro His Val Pro Val Asp His Ala  
1690                      1695                      1700

gtc ggt gag ctt gcg cgg gct gcg tgc cat cac gtc atc ggt ctg cgg      5362  
Val Gly Glu Leu Ala Arg Ala Ala Cys His His Val Ile Gly Leu Arg  
1705                      1710                      1715

gtc gac acc cat cgc ctc aag gca tcc ggc ttc cag atc ccc gcc gac      5410  
Val Asp Thr His Arg Leu Lys Ala Ser Gly Phe Gln Ile Pro Ala Asp  
1720                      1725                      1730

gac atg gcc gag atc gac cgc atc acc ggc ttc cac cgc ttc gag cgc      5458  
Asp Met Ala Glu Ile Asp Arg Ile Thr Gly Phe His Arg Phe Glu Arg  
1735                      1740                      1745

cac gtc ggc              tga cgtgattggg cttccccgct gtctggtgcc ggctcgcga      5509  
His Val Gly  
1750

<210> 2  
<211> 1752  
<212> PRT  
<213> Bifidobacterium bifidum

<400> 2  
Met Ala Val Arg Arg Leu Gly Gly Arg Ile Val Ala Phe Ala Ala Thr  
1                      5                      10                      15  
  
Val Ala Leu Ser Ile Pro Leu Gly Leu Leu Thr Asn Ser Ala Trp Ala  
20                      25                      30  
  
Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr

35	40	45
Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr		
50	55	60
Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln		
65	70	75 80
Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu		
85	90	95
Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala		
100	105	110
Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe		
115	120	125
Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp		
130	135	140
Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly		
145	150	155 160
Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn		
165	170	175
Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg		
180	185	190
Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val		
195	200	205
Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala		
210	215	220
Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met		
225	230	235 240
Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile		
245	250	255
Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala		
260	265	270

Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser  
 275 280 285

Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser  
 290 295 300

Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr  
 325 330 335

Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys  
 340 345 350

Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val  
 355 360 365

Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met  
 370 375 380

Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu  
 385 390 395 400

Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe  
 405 410 415

Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys  
 420 425 430

Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp  
 435 440 445

Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg  
 450 455 460

Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met  
 465 470 475 480

Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala  
 485 490 495

Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr  
 500 505 510

Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met  
 515 520 525

Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser  
 530 535 540

Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala  
 545 550 555 560

Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr  
 565 570 575

Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser  
 580 585 590

Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp  
 595 600 605

Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr  
 610 615 620

Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser  
 625 630 635 640

Gly Ala Val Gly Ser Leu Ala Val Ala Glu Glu Leu Val Leu Arg His  
 645 650 655

Arg Arg His Arg Arg Leu Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser  
 660 665 670

Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn  
 675 680 685

Glu Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val  
 690 695 700

Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser  
 705 710 715 720

Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr  
 725 730 735

Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser





Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp  
 980 985 990

Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr  
 995 1000 1005

Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr  
 1010 1015 1020

Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr  
 1025 1030 1035 1040

Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val  
 1045 1050 1055

Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln Arg Ser  
 1060 1065 1070

Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Thr  
 1075 1080 1085

Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala Ile Lys  
 1090 1095 1100

Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro  
 1105 1110 1115 1120

Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala  
 1125 1130 1135

Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val  
 1140 1145 1150

Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly  
 1155 1160 1165

Lys Thr Lys Ile Gln Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu  
 1170 1175 1180

Ala Ala Thr Glu Thr Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys  
 1185 1190 1195 1200

Pro Tyr Thr Tyr Asp Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val  
 1205 1210 1215

Thr Val Thr Asn Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala  
 1220 1225 1230

Gly Leu Thr Glu Ile Glu Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr  
 1235 1240 1245

Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys Val  
 1250 1255 1260

Ser Asp Ser Val Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala Ile Ile  
 1265 1270 1275 1280

Ala Asp Val Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Val Leu  
 1285 1290 1295

Pro Ala His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu Ser Glu Asp His  
 1300 1305 1310

Val Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly Thr Glu Gln Glu Phe  
 1315 1320 1325

Pro Ala Asp Ser Asp Glu Arg Asp Tyr Pro Ala Ala Asp Met Thr Val  
 1330 1335 1340

Thr Val Gly Ser Glu Gln Thr Ser Gly Thr Ala Thr Glu Gly Pro Lys  
 1345 1350 1355 1360

Lys Phe Ala Val Asp Gly Asn Thr Ser Thr Tyr Trp His Ser Asn Trp  
 1365 1370 1375

Thr Pro Thr Thr Val Asn Asp Leu Trp Ile Ala Phe Glu Leu Gln Lys  
 1380 1385 1390

Pro Thr Lys Leu Asp Ala Leu Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Gly Ser  
 1395 1400 1405

Lys Asn Gly Ser Val Thr Glu Tyr Lys Val Gln Val Ser Asp Asp Gly  
 1410 1415 1420

Thr Asn Trp Thr Asp Ala Gly Ser Gly Thr Trp Thr Thr Asp Tyr Gly  
 1425 1430 1435 1440

Trp Lys Leu Ala Glu Phe Asn Gln Pro Val Thr Thr Lys His Val Arg



Asp Gly Arg His Asp Asp Ala Asp Glu Arg Asp Ile Asp Pro His Val  
1685 1690 1695

Pro Val Asp His Ala Val Gly Glu Leu Ala Arg Ala Ala Cys His His  
1700 1705 1710

Val Ile Gly Leu Arg Val Asp Thr His Arg Leu Lys Ala Ser Gly Phe  
1715 1720 1725

Gln Ile Pro Ala Asp Asp Met Ala Glu Ile Asp Arg Ile Thr Gly Phe  
1730 1735 1740

His Arg Phe Glu Arg His Val Gly  
1745 1750