

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0134717 (43) 공개일자 2012년12월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/48 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0053838 (22) 출원일자 2011년06월03일 심사청구일자 2011년06월03일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 김영완 서울특별시 송파구 백제고분로22길 19-27, 301호 (삼전동) 김민수 충청남도 천안시 동남구 충절로 42, 신부 104-1407 (신부동, 경남아너스빌아파트) (74) 대리인 특허법인충현

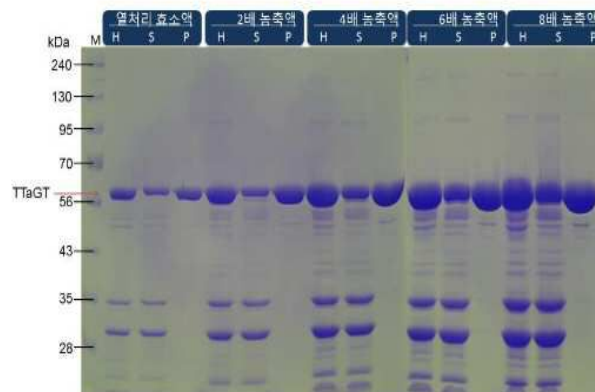
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈와 아밀로오스의 복합체 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈(4-alpha-glucanotransferase, EC 2.4.1.5)와 아밀로오스 복합체 형성에 관한 것으로 더욱 상세하게는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈가 가지는 아밀로오스에 대한 선택적 친화력을 바탕으로 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 포함하는 조효소액에 불용성 아밀로오스를 첨가하여 알파-글루카노트랜스퍼레이즈와 아밀로오스가 결합된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체를 제조하고, 비배당체, 배당체 및 올리고당을 당수용체로 하는 당전이산물의 제조 및 전분의 구조변형에 상기 복합체를 촉매제로 활용하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도6



특허청구의 범위

청구항 1

4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 포함하는 조효소 혼합물을 불용성 아밀로오스 또는 불용성 전분 또는 이들의 화학적 또는 효소적 변형물과 혼합하는 단계를 포함하는 조효소 혼합물로부터 순수한 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈만을 선택적으로 분리하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈는 서열번호 1, 및 서열번호 2로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 조효소 혼합물로부터 순수한 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈만을 선택적으로 분리하는 방법.

청구항 3

당 수용체 없이 불용성 당 공여체와 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈 효소액을 혼합하는 단계를 포함하는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈와 불용성 당공여체 복합체 제조 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 불용성 당공여체는 불용성 아밀로오스 또는 불용성 전분 또는 이들의 화학적 또는 효소적 변형물인 것을 특징으로 하는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-불용성 당공여체 복합체의 제조방법.

청구항 5

제 3항 또는 제4항의 제조방법에 의하여 제조된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체를 포함하는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-불용성 당공여체 복합체.

청구항 6

제 5항의 복합체를 이용하여 추가적인 당공여체 기질의 첨가 없이 비배당체, 배당체, 또는 말토올리고당에 추가적인 말토올리고당을 전이시키는 것을 특징으로 하는 당전이 산물의 제조 방법.

청구항 7

도 2에 기재된 개열 지도를 갖는 플라스미드에 대하여 정방향 프라이머(서열번호 9) 및 역방향 프라이머(서열번호 10)를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하여 앞부분의 PCR 산물을 획득하고, 동일 플라스미드에 대해 정방향 프라이머(서열번호 11) 및 역방향 프라이머(서열번호 8)를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하여 앞부분의 PCR 산물을 획득하는 단계를 포함하는 코돈최적화된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 제조하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 코돈최적화된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 코딩하는 유전자는 서열번호 12 또는 서열번호 13에 기재된 염기 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 코돈최적화된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 제조하는 방법.

청구항 9

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 네 번째 프로린을 암호화하는 코돈을 CCC에서 다른 프로린을 암호화하는 코돈으로 치환하는 코돈 최적화를 포함하고,

- a) 추가적으로 열한 번째 루이신을 CTC에서 다른 루이신을 암호화하는 코돈으로 치환,
- b) 열세 번째 프로린을 암호화하는 코돈을 CCC에서 다른 프로린을 암호화하는 코돈으로 치환,
- c) 열여섯 번째 루이신을 CTC에서 다른 루이신을 암호화하는 코돈으로 치환,
- d) 열일곱 및 열아홉 번째 프로린을 암호화하는 코돈을 CCC에서 다른 프로린을 암호화하는 코돈으로 치환된 군으

로부터 선택된 한 개 이상 최적화된 코돈을 포함하는 것을 특징으로 코돈최적화된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 코딩하는 유전자.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 코돈최적화된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 코딩하는 유전자는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 네 번째 프로린을 암호화하는 코돈을 CCC에서 CCG 코돈으로 치환하는 코돈 최적화를 포함하고,

a)추가적으로 열한 번째 루이신을 CTC에서 CTG 코돈으로 치환,

b)열세 번째 프로린을 암호화하는 코돈을 CCC에서 CCG 코돈으로 치환,

c)열여섯 번째 루이신을 CTC에서 CTG 코돈으로 치환,

d)열일곱 및 열아홉 번째 프로린을 암호화하는 코돈을 CCC에서 CCG 코돈으로 치환된 군으로부터 선택된 한 개 이상 최적화된 코돈을 포함하는 것을 특징으로 코돈최적화된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 코딩하는 유전자.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈(4-alpha-glucanotransferase, EC 2.4.1.5)와 아밀로오스 복합체 형성에 관한 것으로 더욱 상세하게는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈가 가지는 아밀로오스에 대한 선택적 친화력을 바탕으로 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 포함하는 조효소액에 불용성 아밀로오스를 첨가하여 알파-글루카노트랜스퍼레이즈와 아밀로오스가 결합된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체를 제조하고, 비배당체, 배당체 및 올리고당을 당수용체로 하는 당전이산물의 제조 및 전분의 구조변형에 상기 복합체를 촉매제로 활용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로 D-enzyme이라고도 알려진 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈는 미생물과 식물체 내에서 말토올리고당의 대사에 관여하는 효소로서 효소가 가지는 당전이 활성을 이용하여 짧은 두 분자의 말토올리고당을 긴 말토올리고당으로 전환하는 disproportionation 반응을 촉매하며, phosphorylase에 의한 말토올리고당의 분해를 원활하게 하는 기능을 수행한다(Lin and Preiss. 1988. Plant Physiol.86, 260).

[0003] 본 발명의 실시 양태에서 생산되는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈는 전분에 작용하여 전분의 구조 변형 및 배당체의 당쇄 변형 등에 사용되는 등 상업상 이용성이 높은 효소로서 전분을 당공여체(sugar donor)로 사용하여 소수성 배당체에 당쇄를 추가 부여하는 당전이 반응에 사용되어 수용성이 증가된 당전이 산물을 합성하거나, 아밀로오스를 기질로 사용하여 포도당의 중합도가 20이상인 환형아밀로스 (cycloamylose)를 생산하여 고분자물질과 환형아밀로스 간의 complex 형성을 통한 수용화 등에 사용되었다. 최근에는 아밀로펙틴을 클러스터 단위로 가수분해하는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈의 특이적 가수분해 활성과 당전이 활성의 복합 작용을 통해 가지의 길이가 변화된 아밀로펙틴 클러스터 형태의 전분 신소재를 제조하여 온도변화에 따라 가역적인 겔화(gelation) 성질을 가지는 전분신소재의 식품 적용 연구가 활발히 진행되고 있다.(Li et al. 2005. J. Agric. Food Chem. 53:6516-6524; Park et al. 2000. Biochim. Biophys. Acta. 1478:165-185; Choi et al. 2009. Regul Toxicol Pharmacol. 55:281-290).

[0004] 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈는 일반적으로 상기 효소를 보유한 미생물 또는 식물체에서 직접 얻을 수 있으며, 보다 일반적으로는 상기 효소를 암호화하는 유전자를 클로닝하고 대장균 또는 transgenic plant 등을 이용한 재조합 기술에 의해서 생산될 수 있다. 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈의 특이적 가수분해 또는 당전이 활성을 이용하여 생산된 신규 고부가 탄수화물 소재를 의약 및 식품용으로 사용하기 위해서는 촉매제로 사용되는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈의 정제가 요구된다.

[0005] 효소의 정제방법으로는 일반적으로 컬럼 크로마토그래피법을 이용한다. 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography), 소수성 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography), 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등의 다양한 크로마토그래피법을 연속적으로 사용하여 순수한 효소를 얻을

수 있다. 내열성 효소의 경우 열처리 공정을 통해서 내열성이 약한 기타 효소는 제거하고 대상효소(target enzyme)만을 회수하여 효소의 순도를 높일 수 있다. 최근에는 유전자조작을 통해 대상효소의 N-말단 또는 C-말단에 특정 크로마토그래피 수지(resin)과 특이적인 결합을 할 수 있는 아미노산 서열을 융합시켜 재조합 융합단백질(fusion protein)을 생산한 후, 융합단백질이 보유한 펩타이드와 resin의 선택적 결합력을 바탕으로 기타 단백질을 제거하고 대상효소만을 순수하게 정제하는 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)법이 다수 개발되어 상용화되어 있다. 친화성 크로마토그래피의 대표적인 예는 6개의 연속된 histidine 잔기(6xhistidine tag)를 대상효소에 유전자조작을 통해 융합시킨 융합단백질을 니켈과 같은 이가 금속양이온이 고정화된 resin을 이용하여 단일단계로 순수정제하는 방법이 있다(Wilchek and Bayer, 1999. Biomol. Eng. 16: 1-4.).

[0006] 일반적인 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 순수한 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 얻기 위해서는 여러 단계의 크로마토그래피 공정을 거쳐야 하는 번거로움이 있으며, 이로 인해 효소의 회수율이 낮고 시간과 비용면에서 산업적으로 이용하는데 한계가 있다. 재조합기술을 통해 확보된 내열성 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈의 경우 고온에서 열처리 공정을 통해 내열성이 낮은 숙주세균 또는 세포의 단백질은 열변성을 통해 제거하고 상기 내열성 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈만을 회수할 수 있으나, 얻어진 효소의 정제도가 충분하지 못한 단점이 있다.

[0007] 유전자 조작을 통해 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈에 부여된 펩타이드 (예를 들어 6xhistidine tag 또는 말토오스 결합단백질 등)를 이용하는 친화성 크로마토그래피의 경우 상기 효소에 아미노산 서열의 추가로 인해 식품용 효소로의 허가에 어려움이 있으며, 특히 6xhistidine tag 융합단백질의 경우 크로마토그래피과정에서 고정화된 니켈이온의 유출 및 융합단백질과의 결합 가능성 때문에 식품용 효소 정제공정에 이용될 수 없다.

[0008] 따라서 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 의약품 및 식품용 효소로서 활용하기 위해서는 전통적인 컬럼 크로마토그래피에 비해 간단하고 효율적이며, 추가적인 펩타이드와의 융합을 전제로 하는 기존의 친화성 크로마토그래피에 비해 안전성이 담보된 새로운 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈 정제 기술 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 포함하는 조효소액으로부터 간단하고 효율적인 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈 정제공정을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 추가적인 당공여체의 첨가 없이 소당류 또는 배당체의 당쇄를 가공할 수 있는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체를 이용하여 원하는 당전이산물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 포함하는 조효소 혼합물을 불용성 아밀로오스 또는 불용성 전분 또는 이들의 화학적 또는 효소적 변형물과 혼합하는 단계를 포함하는 조효소 혼합물로부터 순수한 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈만을 선택적으로 분리하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈는 서열번호 1 또는 서열번호 2인 것이 바람직하나 이들 서열에 하나 이상의 치환, 결손, 전좌, 역위를 통하여 얻어진 돌연변이체 중에서 본 발명의 목적하고자 하는 효소 활성을 가지는 모든 돌연변이체도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0014] 본 발명의 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈는 하기의 활성을 가지는 것을 특징으로 한다;

[0015] 1) 말토올리고당 또는 전분을 당공여체로 사용하고 비배당체, 배당체, 또는 말토올리고당 등의 당수용체에 추가적인 말토올리고당을 전이시키는 활성;

[0016] 2) 말토올리고당 또는 전분을 당공여체로 사용하고 전분의 가지에 추가적인 말토올리고당을 전이시키는 활성; 및

- [0017] 3) 아밀로오스 또는 이를 포함하는 전분을 기질로 사용하여 사이클로아밀로오스를 제조하는 활성.
- [0018] 또 본 발명은 당 수용체 없이 불용성 당 공여체와 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈 만을 혼합하는 단계를 포함하는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈와 불용성 당공여체 복합체 제조 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 불용성 당공여체는 불용성 아밀로오스 또는 불용성 전분 또는 이들의 화학적 또는 효소적 변형물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 제조방법에 의하여 제조된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-불용성 당공여체 복합체를 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 복합체를 이용하여 비배당체, 배당체, 또는 말토올리고당에 추가적인 말토올리고당을 전이시키는 것을 특징으로 하는 당 전이산물의 제조 방법을 제공한다.
- [0022] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0023] 본 발명은 친화성 크로마토그래피를 위한 추가적인 펩타이드서열 제공을 위한 유전자 조작 없이 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈와 아밀로오스의 선택적 결합을 이용하여 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 간편하게 분리하여 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 명세서에 기재된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈 유전자는 서열 번호 3 또는 4에 따른 핵산서열을 갖는 DNA 절편 또는 그 일부에 대하여 서열 동일성, 특히 약 70%, 바람직하게는 약 80%, 특히 약 90%, 특히 약 95%, 가장 바람직하게는 약 98% 이상의 서열동일성을 갖는 유전자를 지칭한다. 이러한 유전자는 천연 산출 또는 합성 돌연변이, 특히 특정위치 변이 또는 무작위 변이를 통해 얻어진 유전자를 포함한다. 또한 목적하는 유전자 분절의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드는 문헌에서 기술되어 있는 공지된 기법에 의해 합성할 수 있다(문헌[Carruthers et al, Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol. 47: 411-418(1982)] 및 문헌[Adams et al., J. Am. Chem. Soc. 105: 661(1983)] 참고). 그 다음, 상보적인 가닥을 합성하고 적당한 조건하에서 가닥을 함께 어닐링하거나 적당한 프라이머 서열과 함께 DNA 폴리머레이즈를 사용하여 상보적인 가닥을 첨가함으로써 이중 가닥 DNA 분절을 수득할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈는 상기 효소를 보유한 미생물, 식물, 동물에서 분리하거나, 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈 유전자를 함유한 재조합 대장균 또는 바실러스균에서 얻는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다. 본 발명의 바람직한 예에서는 *Thermus thermophilus*에서 유래한 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈와 *Thermus scotoducus*에서 유래한 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈 유전자를 함유한 재조합 대장균과 재조합 바실러스균을 사용하였다.
- [0026] 사용된 숙주 세포에 따라, 이러한 세포에 적절한 표준기법을 이용하여 형질전환이 실시된다. 적합한 기법은 염화칼슘을 비롯한 칼슘 처리, 폴리에틸렌 글리콜또는 전기천공을 포함한다.
- [0027] 단백질의 순도 또는 균질성은 당 분야에 공지되어 있는 다수의 방법, 예를 들어 단백질 샘플을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동시키고, 착색시킴으로써 가시화함으로써 밝힐 수 있다. 특정 목적을 위해서는 높은 해상도가 필요하고 정제를 위해서는 HPLC 또는 유사한 수단이 사용된다.
- [0028] 본 발명의 수행은 재조합 핵산의 구축 및 형질감염된 박테리아 세포내의 유전자 발현을 포함한다. 이러한 목적을 달성시킬 수 있는 분자의 클로닝 기법은 당 분야에 공지되어 있다. 다수의 클로닝, 및 재조합 핵산, 예를 들어 발현 벡터의 구축을 위해 적당한 시험관내 증폭 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 다수의 클로닝 시험을 통해 당 분야의 직접적인 숙련자들을 지도하기에 충분한 이러한 기법 및 기구의 예는 버거(Berger) 및 김멜(Kimmel)의 문헌[Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA(버거)] 및 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley Sons, Inc., (1994 Supplement)(Ausubel)]에서 발견할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 본 발명의 원하는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체를 제조하는 방법은 배양 후 원하는 폴리펩타이드 생성물을 배양액 또는 균체 내에서 생산하는 단계를 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0030] 본 발명의 아밀로오스를 이용하여 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 회수하는 방법은 친화성 크로마토 그래피를 이용하기 위해 유전공학을 통해 추가적인 펩타이드 서열과 대상 효소의 융합없이 높은 수율로 고순도의 4-알파-

글루카노트랜스퍼레이즈의 정제에 유용하다. 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈는 박테리아 숙주 세포와 동종일 수 있거나, 바람직하게는 숙주 세포와 이종이다. 예컨대, 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈의 유전자를 클로닝하여 다양한 발현 벡터를 사용하여 효모, 진균, 포유동물 및 식물을 숙주 세균으로 이용하여 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 발현시킬 수 있다. 청구된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈의 효소적 활성을 갖는다.

[0031] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0032] 본 발명자는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈가 아밀로오스, 아밀로펙틴 또는 말토올리고당을 당공여체 (sugar donor)로 사용하여 이들이 가지는 알파-1,4-결합을 잘라내어 얻어진 알파-글루칸을 다른 말토올리고당(당수용체, sugar acceptor)의 비환원성 말단의 포도당 4-OH기에 전이하면서 alpha-1,4-결합을 합성하는 활성을 가지지만, 반응액 내 적절한 당수용체가 존재하지 않으면 당공여체로 사용된 기질의 분해가 이루어지지 않는다. 따라서 당수용체 없이 불용성 당공여체 기질과 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈만을 혼합하면 효소가 기질인 아밀로오스에 결합하지만 분해는 이루어지지 않고, 효소-기질 복합체 형태로 반응액 내에 잔존할 것으로 예상되었다. 이러한 점에 착안하여 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈와 불용성 아밀로오스간의 선택적 결합에 의해 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체가 형성됨을 확인하였으며, 복합체 형성을 통해 조효소액 또는 부분정제된 조효소액으로부터 순수한 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈만을 선택적으로 회수할 수 있으며, 복합체를 이용하여 다양한 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈의 반응을 촉매할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 효과

[0033] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 포함하는 조효소액으로부터 상기 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈와 아밀로오스간의 친화성을 기반으로 하는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈 정제공정을 제공한다. 또한 본 발명에서 제공하는 정제공정을 통해 얻어지는 정제된 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 상기 효소의 당공여체인 아밀로오스와 복합체 형태로 회수하여 추가적인 당공여체의 첨가 없이 소당류 또는 배당체의 당쇄를 가공할 수 있는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체를 제공한다. 상기 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체를 이용하여 원하는 당전이산물을 제조 및 상기 복합체를 이용하여 변성전분을 제조하는 등에 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 pTKTTaGT 벡터 개열지도이다.

도 2는 pTKTTaGT-P4CCG 벡터 개열지도이며 코돈최적화된 Pro4의 코돈을 나타낸다.

도 3은 pTKTTaGT-6M 벡터 개열지도이며 코돈최적화된 6개의 아미노산에 대한 코돈을 나타낸다.

도 4는 야생형 및 코돈최적화된 재조합 TTaGT의 조효소액 내 발현양 비교를 위한 SDS-PAGE 결과사진으로 WT, wild type TTaGT의 조효소액, TTaGT; P4CCG, Pro4에 대한 코돈최적화된 TTaGT-P4CCG의 조효소액; 6M, 총 6개의 아미노산에 대한 코돈최적화된 TTaGT-6M의 조효소액을 나타낸다.

도 5는 TTaGT-6M 조효소액, 복합체 형성 후 회수된 상등액, 복합체 내 TTaGT의 SDS-PAGE 결과사진으로 C, TTaGT6M 조효소액; S, 15 mg 아밀로오스와 결합 후 회수된 상등액 내 잔존 TTaGT6M; P, 15 mg 아밀로오스와 결합된 TTaGT-6M을 각각 나타낸다.

도 6은 TTaGT 조효소액을 열처리 후 TTaGT 조효소액, 열처리 후 2배, 4배, 6배, 및 8배 농축한 농축 조효소액을 이용하여 복합체 형성 효율을 분석한 SDS-PAGE 결과사진으로 H, 열처리된 TTaGT-6M 효소액; S, 15 mg 아밀로오스와 결합 후 상등액 내 TTaGT-6M; P, 15 mg 아밀로오스와 결합된 TTaGT-6M을 각각 나타낸다.

도 7은 pUBRTA-TTaGT6M의 벡터의 개열지도를 나타낸다.

도 8은 TTaGT-아밀로오스 복합체를 이용한 당전이 반응을 나타낸 그림으로, STD, 글루코오스, 말토오스, 말토트리오스; C, 순수 정제된 TTaGT 효소액을 사용하고 0.1% 아밀로오스와 0.2% 말토오스를 기질로 사용한 당전이 반응산물; R, TTaGT-아밀로오스 복합체를 사용하고 0.2% 말토오스만을 기질로 사용한 당전이 반응산물을

나타낸다.

도 9는 동결건조한 TTAGT-아밀로오스 복합체의 당전이 반응을 나타낸 그림으로, STD, 글루코오스(G1), 말토오스(G2), 말토트리오스(G3), 말토테트라오스(G4), 말토펜타오스(G5), 말토펜사오스(G6), 말토펜타오스(G7); C, 조효소액을 사용한 당전이 반응산물; R1, TTAGT-아밀로오스 복합체를 사용한 당전이 반응산물; R2, 동결건조된 TTAGT-아밀로오스 복합체를 사용한 당전이 반응산물을 각각 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0036] 실시예 1: E. coli 형질전환

[0037] 형질전환을 위하여, 5 ml LB 액체 배지에 숙주 세포인 E. coli MC1016(New England Biolab(NEB), USA)를 접종하여 37℃에서 12시간 배양하고, 배양액 1.0 ml을 새로운 LB 액체 배지 50 ml에 접종하여 600 nm에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 배양하였다.

[0038] 상기 흡광도를 확인한 배양액 1.5 ml를 4℃에서 7000 x g의 조건으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 뒤, 0.75 ml의 형질전환용액I(50 mM CaCl₂)으로 현탁하고 얼음 속에서 30분간 방치하였다. 이후 4℃에서 6000 x g의 조건으로 2분간 원심분리하여 균체를 회수하고, 회수된 균체를 0.15 ml의 형질전환용액II(100 mM CaCl₂)로 현탁하여 얼음 속에서 30분간 방치하였다. 형질전환할 DNA 시료를 상기 형질전환용 E. coli MC1061 0.2 ml과 혼합하고, 1시간 방치한 후 42℃에서 2분간 열 충격을 주었다. 상기 열 충격을 준 혼합액에 0.8 ml의 LB 액체 배지를 혼합한 후, 37℃에서 1시간 배양시켰다. 상기 1시간 동안 배양한 배양액을 암피실린(최종농도 20 µg/ml)을 함유한 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다.

[0039] 실시예 2: Thermus thermophilus 4-alpha-glucanotransferase(TTAGT) 발현

[0040] 2-1. 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통한 TTAGT의 증폭

[0041] TTAGT 유전자를 가지는 TTHA1261 유전자를 증폭하기 위하여 NdeI 제한효소 자리를 가지는 정방향 프라이머 TTHA1261-Nd-fw primer(서열번호 5)와 NotI 제한효소 자리를 가지는 역방향 프라이머 TTHA1261-Nt-rv primer(서열번호 6)를 각각 제작 하였으며, 상기 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

	서열	서열번호
정방향 프라이머 TTHA1261-Nd-fw	5-GGGTATAATGGGCATATGGAGCTTCCCCGC-3	5
역방향 프라이머 TTHA1261-Nt-rv	5-CCCGGTCTGTGCGGCCGCGAGCCGTTCGTGGC-3	6

[0043] 상기 NdeI과 NotI제한효소 자리를 가지는 aGT 유전자를 증폭하기 위하여 TTHA1261에 대해 상기 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하여 PCR 산물을 획득하였으며, 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 1.5 kb임을 확인하였다. 상기 PCR의 조건은 하기 표 2에 기재된 바와 같다.

표 2

단계	온도	반응시간
First denaturation	94	5 min
Cycle (30 cycles)	Denaturation	1 min
	Annealing	2 min
	Extension	1 min
Final extension	72	7 min

[0045] 2-2. TtaGT 유전자의 클로닝

[0046] 상기 TtaGT 유전자를 포함하는 PCR 산물과 pTKNd6xHT119 벡터를 동일 제한효소 NdeI과 NotI으로 각각 절단한 뒤 라이게이션 하고, 라이게이션 혼합물을 상기 실시예 1에 따라 E. coli에 형질전환하여 가나마이신(최종농도 20 $\mu\text{g/ml}$)을 함유한 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 재조합 E. coli를 가나마이신(최종농도 20 $\mu\text{g/ml}$)을 함유한 [1% (w/v) Bacto tryptone, 0.5% (w/v) Bacto yeast extract, 0.5% (w/v) NaCl]에 접종하고 37℃에서 15시간 배양하고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 플라스미드 분리 키트를 이용하여 회수된 균체로 재조합 플라스미드를 얻고, NdeI과 NotI으로 절단하고 아가로스 겔 전기영동을 통해 TtaGT 유전자에 해당하는 1.5 kb의 유전자 절편을 포함하는 재조합 플라스미드를 확인하였다. 상기 TtaGT 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 pTKTtaGT로 명명하였다. 상기 재조합 벡터 pTKTtaGT의 벡터 개열지도를 도 1에 나타내었다.

[0047] 2-3. TtaGT 유전자 내 1개 코돈 최적화

[0048] 발현율을 높이기 위해 상기 TtaGT 네 번째 Proline 잔기(Pro4)를 암호화하는 코돈 CCC를 E. coli와 B. subtilis에서 최적화된 CCG로 최적화하였다. 이를 위하여 정방향 프라이머 TTGT-P4CCG-F primer(5'-AAGGGGAAACCATATGATGGAGCTTCCGCGCGCT-3, 서열번호 7)와 역방향프라이머 T7 terminator primer(5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3, 서열번호 8)를 각각 제작하였으며, 상기 프라이머는 하기 표 3와 같다.

표 3

	서열	서열번호
정방향 프라이머 TTGT-P4CCG-F	5-AAGGGGAAACCATATGATGGAGCTTCCGCGCGCT-3	7
역방향 프라이머 T7 terminator	5-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3	8

[0050] 상기 2-2에서 얻어진 재조합 플라스미드 pTKTtaGT에 대하여 상기 정방향 프라이머(서열번호 7) 및 역방향 프라이머(서열번호 8)를 이용하여 증합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하여 PCR 산물을 획득하였으며, 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 1.5 kb임을 확인하였다. 상기 PCR의 조건은 상기 표 2에 기재된 바와 같다.

[0051] 확보된 상기 PCR산물을 상기 실시예 2-2와 동일하게 라이게이션 하고 E. coli 형질전환하여 Pro4를 암호화하는 코돈이 최적화된 TtaGT 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pTKTtaGT-P4CCG를 제조하였다. 상기 재조합 벡터 pTKTtaGT-P4CCG의 벡터 개열지도를 도 2에 나타내었다.

[0052] 2-4. TtaGT 유전자 내 6개 선택코돈 최적화

[0053] 상기 TtaGT의 Pro4, Leu11, Pro13, Leu16, Pro17, 및 Pro19을 암호화하는 코돈이 최적화된 TtaGT 유전자를 제조하기 위하여 상기 아미노산 잔기의 코돈이 E. coli와 B. subtilis에 대하여 최적화된 선택된 6개의 코돈중 나머지 5개의 코돈 최적화는 앞부분과 뒷부분을 나누어 PCR을 한 산물을 합쳐서 완성하는 방법을 사용하였고 앞부분의 PCR을 위해 정방향 프라이머 ATGseq primer(서열번호 9)와 역방향 프라이머 TTGT-mut6-R primer (서열번호 10)를 각각 제작하였고, 뒷부분의 PCR을 위해 정방향 프라이머 TTGT-mut6-F primer(서열번호 8)와 역방향 프라이머 T7 terminator primer(서열번호 11)를 각각 제작하였으며, 프라이머 서열은 하기 표 4와 같다.

표 4

	서열	서열번호
정방향 프라이머 ATGseq	5-ATCGACTTTGTAGGGT-3	9
역방향 프라이머 TTGT-mut6-R	3-CCAGACGAAGACGTGGGCTGCTCGGAGGCCCCGGGC-5	10
정방향 프라이머 TTGT-mut6-F	5-CCGACGAGCCTGCCGGGCCGTACGGCGTCGGC-3	11

[0055] 상기 2-3에서 얻어진 플라스미드 pTKTTaGT-P4CCG에 대해 상기 정방향 프라이머 ATGSseq(서열번호 9) 및 역방향 프라이머 TTGT-mut6-R(서열번호 10)를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하여 앞부분의 PCR 산물을 획득하였으며, 동일 플라스미드에 대해 상기 정방향 프라이머 TTGT-mut6-F(서열번호 11) 및 역방향 프라이머 T7 terminator(서열번호 8)를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하여 앞부분의 PCR 산물을 획득하였다. 상기 PCR 산물이 가지는 서로 상보적인 서열을 이용하여 두 산물을 다시 PCR을 통해 합친 후 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 1.5 kb임을 확인하였다. 상기 PCR의 조건은 상기 표 2에 기재된 바와 같다.

[0056] 확보된 상기 PCR산물을 상기 실시예 2-2를 통해 라이게이션 하여 6개의 선택 코돈이 모두 최적화된 pTKTTaGT-6M를 제조하였다. 상기 재조합 벡터 pTKTTaGT-6M의 벡터 개열지도를 도 3에 나타내었다.

[0057] 2-5. 재조합 E. coli에서 TTaGT의 생산

[0058] 상기 실시예 2-2, 2-3 및 2-4을 통해 얻어진 재조합 벡터 pTKTTaGT, pTKTTaGT-P4CCG, 및 pTKTTaGT-6M을 상기 실시예 1에 따라서 E. coli에 형질전환하고 형질전환체들 (E. coli MC1061/pTKTTaGT, E. coli MC1061/pTKTTaGT-P4CCG, E. coli MC1061/pTKTTaGT-6M)을 가나마이신(최종농도 20 µg/ml)을 함유하는 LB 배지 100 mL에 접종하고 37°C에서 15시간 배양하였다.

[0059] 배양액을 4°C에서 7,000 x g의 조건으로 15분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 상기 회수된 균체를 10 mL의 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)으로 현탁한 후, 상기 현탁한 균체를 초음파 분쇄하였다. 상기 초음파 분쇄를 수행한 배양액을 10,000 x g의 조건으로 20분간 원심분리하여 상등액을 취하여 각 형질전환체로부터 TTaGT 조효소액을 제조하였다.

[0060] 실시예 3: 코돈 최적화에 따른 TTaGT 효소 생산량 비교

[0061] 상기 실시예 2-5에서 얻어진 조효소액을 적절하게 희석하고, 0.05% (w/v) maltose와 0.05% (w/v) 아밀로스가 함유된 기질용액 900 µl와 희석된 조효소액 100 µl를 섞고 70°C에서 10분간 반응시킨 후, 10분간 중탕가열하여 반응을 정지시켰다. 상기 반응액 100 µl에 0.02% I₂, 0.2% KI를 물에 녹여 제조한 아이오다인 용액 1 mL을 첨가하고 스펙트로포토미터 (UV-160A, Shimadzu, Japan)을 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하여 분해된 amylose의 함량을 계산하였다. 1 유닛의 4-알파-글루카노트렌스퍼레이즈 활성은 분당 1µg/mL의 아밀로스를 분해하는 효소량으로 결정하였다. TTaGT의 효소활성 측정결과는 하기 표 5와 같다.

표 5

[0062] 형질전환체	부피 (ml)	활성 (U/ml)	총활성 (U)	단백질 (mg/ml)	총단백질 (mg)	비효소활성 (U/mg)
E. coli /pTKTTaGT	10	0.49	4.9	2.65	26.5	0.18
E. coli /pTKTTaGT-P4CCG	10	46	460	2.94	29.4	15.65
E. coli /pTKTTaGT-6M	10	48	480	3.05	30.5	15.74

[0063] 상기 결과로부터 코돈최적화된 TTaGT 유전자로부터 발현된 TTaGT의 양이 최적화 이전에 비해 약 100배 증가하였음을 알 수 있다.

[0064] 상기 실시예 2-5에서 얻어진 조효소액을 Acrylamide/Bis(33.5%,0.5%) 1.4 ml, 1M Tris-HCl(pH 9.1) 2.28 ml, D.W 2.08 ml, 10% SDS 0.06 ml, 3% APS 0.15 ml, TEMED 0.03 ml로 SDS-PAGE gel을 만들어 전기영동을 실시하였다. 상기 SDS-PAGE로 분석한 결과는 도 4에 나타내었다. SDS-PAGE 분석결과에서도 상기 효소활성 측정에서와 같이 TTaGT에 해당하는 단백질의 발현양이 코돈 최적화후 크게 증가하였음을 알 수 있다.

[0065] 실시예 4: TTaGT-아밀로오스 복합체

[0066] 4-1. TTaGT-아밀로오스 복합체의 제조

[0067] 상기 실시예 2-5에서 제조된 조효소액 중 E. coli MC1061/pTKTTaGT-6M로부터 얻어진 조효소액을 이용하여 하기 실시예를 수행하였다. 상기 조효소액 0.1 mL (** Unit)를 15 mg 아밀로오스를 함유한 0.4 mL의 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)과 섞은 후, 4℃에서 매 15분마다 잘 섞어주면서 2시간 반응하였다. 반응이 완료되면 10,000 x g의 조건으로 5분간 원심분리하고, 상등액을 제거하여 TTaGT-아밀로오스 복합체를 제조하였다.

[0068] 4-2. 아밀로오스에 결합된 TTaGT의 효소활성 측정

[0069] 상기 실시예 6-1에서 얻어진 상등액을 일정비율 희석하여 상기 실시예 5에 따라서 TTaGT의 효소활성을 측정하였다. 측정된 효소활성 및 단백질을 조효소액의 효소활성 및 단백질양에서 각각 감하여 복합체 내 효소활성과 단백질을 결정하였다. 조효소액과 복합체 내 효소활성 및 단백질양에 따른 정제표를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

Sample	부피 (ml)	활성 (U/ml)	총활성 (U)	단백질양 (mg/ml)	총단백질양 (mg)	비효소활성 (U/mg)	수율 (%)	정제도
조효소액	0.5	10.838	5.42	0.72	0.36	15.064	100	1
상등액*	0.5	3.816	1.908	0.632	0.316	6.031	-	-
복합체**	-	-	3.51	-	0.04	81.05	64.8	5.3

[0071] * 상등액 : 복합체 형성 후, 원심분리를 통해 얻어진 상등액 (복합체를 이루지 못한 효소액)

[0072] ** 복합체 : 조효소액의 총활성과 총단백질양에서 상등액의 총효소활성과 총단백질양을 각각 뺀 총효소활성 또는 총단백질양

[0073] 상기 표 6에 따라 TTaGT가 아밀로오스에 결합하여 상등액 내 되는 것을 확인 하였고, 계산된 복합체 내 TTaGT의 비효소활성이 81.05 U/mg으로 조효소액의 비효소활성에 비해 5배 가량 증가하였으며, 총 효소활성을 비교한 결과 64%의 수율로 TTaGT가 아밀로오스에 결합한 복합체 형태로 회수되었음을 확인하였다.

[0074] 상기 실험을 통해 얻어진 조효소액, 상등액, 및 복합체 내 TTaGT를 상기 실시예 3에서와 같이 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였고, 상기 SDS-PAGE 사진을 도 5에 나타내었다. 상기 도 5 결과로부터 TTaGT가 매우 선택적으로 아밀로오스와 결합하여 복합체 내에 존재함을 확인할 수 있다.

[0075] 실시예 5: 열처리된 TTaGT를 이용한 복합체 제조

[0076] 5-1. TTaGT 조효소액의 열처리 및 농축

[0077] 아밀로오스에 결합하는 TTaGT의 양을 늘리기 위해 반응액 내 TTaGT의 효소양을 늘리기 위해 효소액을 농축하였다. 농축하기 전에 먼저 조효소액을 열처리한 후, 4℃, 10,000 x g의 조건으로 20분간 원심분리하여 열변성된 E. coli의 단백질을 제거하였다. 상기 얻어진 열처리 효소액을 상기 실시예 3에 따라 TTaGT의 효소양을 측정하여 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

시료	부피 (ml)	활성 (U/ml)	총활성 (U)	단백질양 (mg/ml)	총단백질양 (mg)	비효소활성 (U/mg)	수율 (%)	정제도
조효소액	6.2	11.366	70.469	1.171	7.26	9.706	100	1
60, 20분	6.2	11.674	72.379	0.295	1.829	39.573	102.7	4.1
70, 10분	6.2	12.966	80.389	0.226	1.401	57.372	114.1	5.9
70, 20분	6.2	14.104	87.445	0.216	1.339	65.296	124.1	6.7

[0079] 상기 표 6에 따라 열처리를 통해 내열성 TTaGT의 부분 정제가 이루어짐을 확인하였으며, 하기 실험은 pH 7.0, 온도는 70℃, 열처리시간은 20분의 조건에서 열처리되어 얻어진 TTaGT 시료를 사용하였다.

[0080] 5-2. 열처리 TTaGT를 이용한 복합체 제조

[0081] 상기 얻어진 열처리 TTaGT 효소액을 Ultrafiltration을 통해 농축하였다. 상기 농축된 효소액을 실시예 6에 따라 15 mg의 아밀로오스와 결합시킨 뒤, 상등액과 복합체를 원심분리를 통해 분리하고, 상기 실시예 3와 같이 열처리 효소액과 상등액의 효소 활성 및 단백질을 측정하고, 이들의 차를 통해 복합체 내 TTaGT의 활성과 단백질량을 결정하였다. 결과를 하기 표8에 나타내었다.

표 8

시료		부피 (ml)	활성 (U/ml)	총활성 (U)	단백질량 (mg/ml)	총단백질량 (mg)	비효소활성 (U/mg)	수율 (%)	정제도
열처리 효소액	효소액	0.5	28.854	14.427	0.425	0.212	67.867	100	1
	상등액*	0.5	14.11	7.221	0.271	0.135	53.173	-	-
	복합체**	-	-	7.2	-	0.077	93.858	49.9	1.38
2배 농축 액	효소액	0.5	53.709	26.854	0.785	0.392	68.372	100	1
	상등액	0.5	26.393	13.196	0.505	0.252	52.246	-	-
	복합체	-	-	13.658	-	0.14	97.42	50.8	1.42
4배 농축 액	효소액	0.5	106.29	53.145	1.516	0.758	70.11	100	1
	상등액	0.5	53.053	26.526	0.928	0.464	57.11	-	-
	복합체	-	-	26.619	-	0.294	90.683	50.1	1.3
6배 농축 액	효소액	0.5	157.59	78.795	2.31	1.15	68.2	100	1
	상등액	0.5	81.338	40.669	1.403	0.701	57.964	-	-
	복합체	-	-	29.126	-	0.45	84.047	48.3	1.23
8배 농축 액	효소액	0.5	198.6	99.3	3	1.5	66.03	100	1
	상등액	0.5	101.3	50.65	1.857	0.928	54.526	-	-
	복합체	-	-	48.65	-	0.572	84.64	48.9	1.28

[0083] * 상등액 : 복합체 형성 후, 원심분리를 통해 얻어진 상등액 (복합체를 이루지 못한 효소액)

[0084] ** 복합체 : 조효소액의 총활성과 총단백질량에서 상등액의 총효소활성과 총단백질량을 각각 뺀 총효소활성 또는 총단백질량

[0085] 상기 표 8에 따라 열처리와 농축과정을 거친 TTaGT 효소액으로부터 아밀로오스와의 복합체 형성을 통해 비효소 활성이 증가하는 것을 알 수 있다. 또한 수율은 45-50%를 유지하였으며, 아밀로오스와 반응하는 효소액 내 TTaGT의 양이 늘어날수록 아밀로오스에 결합하는 TTaGT의 효소량이 계속 증가함을 확인할 수 있다.

[0086] 상기 실험을 통해 얻어진 조효소액, 상등액, 및 복합체 내 TTaGT를 상기 실시예 3에서와 같이 SDS-PAGE 전기 영동을 실시하였고, 상기 SDS-PAGE 사진을 도 6에 나타내었다. 상기 도 6 결과로부터 열처리 후 TTaGT 효소액 내 존재하던 E. coli단백질은 상등액에 거의 그대로 남아있으며, TTaGT만이 매우 선택적으로 아밀로오스와 결합하여 복합체 내에 존재함을 확인할 수 있다.

[0087] 실시예 6: 재조합 B. subtilis에서 발현된 TTaGT를 이용한 복합체 제조

[0088] 6-1. TTaGT-6M 유전자의 B. subtilis로의 형질전환

[0089] B. subtilis와 E. coli에서 동시 사용가능한 셔플벡터인 pUBRT29에 B. subtilis 알파-아밀레이즈 프로모터인 AmyR2 프로모터를 가지는 pUBRTA 벡터 (대한민국 특허 10-2010-0017071 출원번호)를 NdeI과 NotI로 절단하여 벡터를 제조하고, 상기 pUBRTA 벡터와 상기 실시예 2-#에서 얻어진 TTaGT-6M 유전자를 동일한 제한효소로 절단한 뒤, 상기 두 유전자 절편을 라이게이션 시킨 후, 상기 실시예 1에서와 같이 E. coli에 형질전환 하였다. 암피실린 저항성 형질전환체를 1차로 선발하였다. 1차 선발된 형질전환체를 암피실린을 함유한 3 mL LB 배지에 접종하고 12시간 배양하였다. 배양액을 원심분리 (7,000 x g, 10분)하여 균체를 회수한 후, QUAGEN 플라스미드 분리 kit를 이용하여 배양된 균체로부터 플라스미드를 분리한 후, 상기과 동일한 제한 효소 NdeI과 NotI을 이용, 절단하여 약 1.5kb의 크기의 TTaGT 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다. 상기 라이게이션을 통하여 하여 pUBRTA-TTaGT6M을 제조하였으며, 상기 재조합 벡터는 pUBRT29 벡터가 함유하는 AmyR2 프로모터에 의해 코돈 최적화된 TTaGT-6M 유전자의 발현이 이루어진다. 상기 재조합 벡터 pUBRTA-TTaGT6M의 벡터의 개열지도를 도 7에

나타내었다.

[0090] 상기 pUBRTA-TTaGT6M 플라스미드를 *B. subtilis*에 형질전환하기 위해서 하기의 방법으로 형질전환용 *B. subtilis*를 제조하였다. *B. subtilis* ISW1214(Takara. Co. 일본)를 5 ml의 LB배지에 접종하여 37에서 12시간 배양하고, 배양액 1.0 ml을 새로운 SP I 배지 (0.5% glucose, 0.02% casamino acid, 0.05% yeast extract, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 1.4% K₂HPO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.1% Na-citrate, 0.02% MgSO₄, pH7.5) 50 ml에 접종하여 600 nm에서 흡광도를 측정하면서 균체의 성장이 대수기에 접어들 때까지 교반하며 배양하였다. 상기 배양액 1mL을 5mL의 SP II 배지(0.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂를 포함하는 SP I 배지)에 접종하고 다시 37℃에서 90분간 교반하며 배양하였다. 상기 배양액 1mL을 4℃에서 7000 x g의 조건으로 5분간 원심분리한 후, 0.8 ml의 상등액을 제거하고, 균체를 남은 0.2 ml에 현탁하여 형질전환용 *B. subtilis*를 제조하였다. 상기 형질전환용 *B. subtilis* 50 μ l와 상기 실시예 6-1에서 얻은 pUBRTA-TTaGT-6M 플라스미드를 상기 혼합하고, 37℃에서 30분간 교반 배양하였다. 상기 혼합액에 0.8 ml의 LB 액체 배지를 혼합한 후, 37℃에서 1시간 배양시켰다. 상기 1시간 동안 배양한 배양액을 가나마이신(최종농도 20 μ g/ml)을 함유한 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다.

[0091] 6-2. 재조합 *B. subtilis*를 이용한 TTaGT의 생산 및 복합체 형성

[0092] 실시예 6-1에 따라서 얻어진 *B. subtilis* 형질전환체 (*B. subtilis*/pUBRTA-TTaGT-6M)을 가나마이신(최종농도 20 μ g/ml)을 함유하는 LB 배지 100 mL에 접종하고 37℃에서 30시간 배양하였다.

[0093] 상기 배양액을 상기 실시예 2-5에 따라 조효소액을 제조하고, 상기 조효소액을 이용하여 상기 실시예 4-1과 같이 복합체를 형성하였다. 10,000 x g의 조건으로 20분간 원심분리를 통해서 상등액과 복합체를 분리한 후, 상기 실시예 5에 따라서 조효소액과 상등액의 효소활성 및 단백질량을 계산하고, 그 차이로부터 복합체 내 TTaGT의 효소활성 및 단백질 양을 결정하였다. 조효소액과 복합체 내 효소활성 및 단백질량에 따른 정제표를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

Sample	부피 (ml)	활성 (U/ml)	총활성 (U)	단백질량 (mg/ml)	총단백질량 (mg)	비효소활성 (U/mg)	수율 (%)	정제도
조효소액	0.5	21.45	10.72	1.72	0.86	12.47	100	1
상등액*	0.5	10.07	5.035	1.626	0.813	6.19	-	-
복합체**	-	-	5.69	-	0.047	121	52.3	9.7

[0095] * 상등액 : 복합체 형성 후, 원심분리를 통해 얻어진 상등액 (복합체를 이루지 못한 효소액)

[0096] ** 복합체 : 조효소액의 총활성과 총단백질량에서 상등액의 총효소활성과 총단백질량을 각각 뺀 총효소활성 또는 총단백질량

[0097] 상기 표 9에 따라 TTaGT가 아밀로오스에 결합하여 상등액 내 비효소활성이 감소되는 것을 확인하였고, 계산된 복합체 내 TTaGT의 비효소활성이 121 U/mg으로 조효소액의 비효소활성에 비해 10배 가량 증가하였으며, 총 효소활성을 비교한 결과 52%의 수율로 TTaGT가 아밀로오스에 결합한 복합체 형태로 회수되었음을 확인하였다.

[0098] 실시예 7: *Thermus scotoductus* 4- α -glucanotransferase (TSaGT)-아밀로오스 복합체 제조

[0099] 상기 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈-아밀로오스 복합체 형성이 가능한 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈를 알아보기 위하여 TTaGT와 아미노산 서열 상동성이 85%인 *Thermus scotoductus* 4- α -glucanotransferase (TSaGT)를 이용한 복합체 형성 실험을 실시하였다. 상기 TSaGT 유전자를 포함하는 p6xHTSaGT 벡터 (Seo et al. 2007. J. Food Sci. 72:C331-C336)를 상기 실시예 1에 따라 *E. coli*에 형질전환하고, 암피실린(최종농도 100 μ g/ml)을 함유한 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 형질전환체를 암피실린(최종농도 100 μ g/ml)을 함유한 3 mL LB 배지에 접종하고 12시간 배양하였다. 배양액을 원심분리 (7,000 x g, 10분)하여 균체를 회수한 후, QUAGEN 플라스미드 분리 kit를 이용하여 배양된 균체로부터 플라스미드를 분리한 후, 상기과 동일한 제한 효소 NdeI과 NotI을 이용, 절단하여 약 1.5kb의 크기의 TTaGT 유전자가 포함되어 있음

을 확인하였다.

[0100] 상기 E. coli 형질전환체(E. coli/p6xHTSaGT)를 암피신린(최종농도 100 $\mu\text{g/ml}$)을 함유한 LB 배지에서 15시간 배양한 후, 배양액을 상기 실시예 2-5에 따라 조효소액을 제조하였다. 상기 조효소액을 상기 실시예 4-1에 따라 TSaGT-아밀로오스 복합체와 상등액을 분리하였다. 상기 얻어진 상등액의 효소활성과 단백질을 상기 조효소액의 효소활성 및 단백질량과 비교하여 복합체내 TSaGT의 효소활성과 단백질을 결정하였다. 이를 하기 표 10에 실었다.

표 10

Sample	부피 (ml)	활성 (U/ml)	총활성 (U)	단백질량 (mg/ml)	총단백질량 (mg)	비효소활성 (U/mg)	수율 (%)	정제도
조효소액	0.5	48	24	3.05	1.525	15.737	100	1
상등액*	0.5	24.98	12.49	2.813	1.406	8.88	-	-
복합체**	-	-	11.51	-	0.118	97.24	47.95	6.17

[0102] * 상등액 : 복합체 형성 후, 원심분리를 통해 얻어진 상등액 (복합체를 이루지 못한 효소액)

[0103] ** 복합체 : 조효소액의 총활성과 총단백질량에서 상등액의 총효소활성과 총단백질량을 각각 뺀 총효소활성 또는 총단백질량

[0104] 상기 표 10에 따라 TSaGT가 아밀로오스에 결합하여 상등액 내 비효소활성이 감소되는 것을 확인 하였고, 계산된 복합체 내 TSaGT의 비효소활성이 97.24 U/mg으로 조효소액의 비효소활성에 비해 6배 가량 증가하였으며, 총 효소활성을 비교한 결과 48%의 수율로 TSaGT가 아밀로오스에 결합한 복합체 형태로 회수되었음을 확인하였다. 상기 실시예로부터 TTaGT와 아미노산 상동성이 85%이상인 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈는 상기 복합체를 형성할 수 있음을 알 수 있다.

[0105] 실시예 8: TTaGT-아밀로오스 복합체를 이용한 당전이 반응

[0106] 상기 실시예 5-2에서 얻어진 복합체를 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)을 1 ml 넣어 잘 섞어준 뒤 원심분리 (10,000 x g, 3분) 하여 상등액을 건어내는 방법으로 3회 세척하였다. 상기 복합체를 사용하여 7.5 mg 의 말토오스와 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0) 1.5 ml를 넣고 70℃에서 12시간 복합체의 당전이 반응을 실시하고, 반응산물을 박막크로마토그래피(Thin-layer chromatography, TLC)를 이용하여 분석하였다. 대조구로 TTaGT 효소용액을 이용하여 당공여체로 0.1% 수용성전분(soluble starch)과 0.2% 말토오스를 당수용체로하는 반응을 수행하였다. 반응산물 1 μl 를 TLC 판(머크 사)에 올린 후, 열풍건조하고, 용매(용매조건)으로 전개하였다. 열풍건조를 통해 용매를 제거한 후 발색시약(조성)에 담근 후 100에서 5분 간 가열하여 시료를 발색시켰다. 분석결과는 도 8 에 나타내었다.

[0107] 상기 도 8을 통하여 TTaGT-아밀로오스 복합체를 이용한 반응에서 추가적인 당공여체의 첨가없이 TTaGT가 복합체 내의 아밀로오스를 당공여체로 하여 당수용체인 말토오스의 사슬길이를 연장시킴을 확인하였다. 동일한 효소활성의 TTaGT용액을 이용한 반응산물과의 비교에서도 산물의 양과 조성이 크게 다르지 않음을 확인하였다. 따라서 상기 제조공정을 통해 얻어진 TTaGT-아밀로오스 복합체는 용액 상태의 TTaGT와 동일한 효소활성을 나타냄을 확인하였으며, 정제를 위해 사용된 아밀로오스가 당전이 반응에서 당공여체로 작용함에 따라 추가적인 당공여체의 첨가 없이 당전이산물을 합성할 수 있음을 알 수 있다.

[0108] 실시예 9: 동결건조를 통한 TTaGT-아밀로오스 복합체의 분말제조

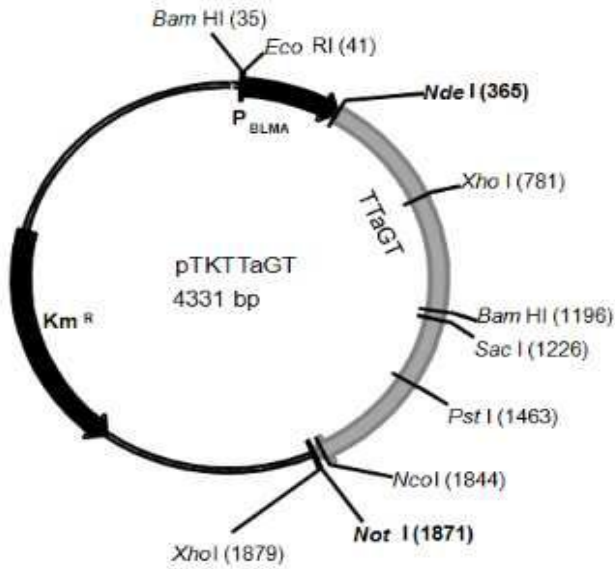
[0109] 상기 실시예 5-2에서 얻어진 복합체를 -70℃에서 동결한 후, 동결건조기(Bondiro, ilshin, 대한민국)를 이용하여 동결건조하였다. 건조 후, 분말화 과정을 거쳐 회수한 후, 15 mg의 동결건조 복합체, 15 mg의 비건조 복합체 (상기 실시예 5-2에서 얻어진 복합체) 및 열처리된 TTaGT 효소액을 이용하여 상기 실시예 8에 따라 당전이 반응을 수행한 후, TLC로 각각의 반응산물을 분석하였다. 분석결과는 도 9 에 나타내었다.

[0110] 상기 도 9에서 알 수 있듯이 복합체의 효소활성은 동결건조 후에도 동결건조 전과 동일한 활성을 유지됨을 확인

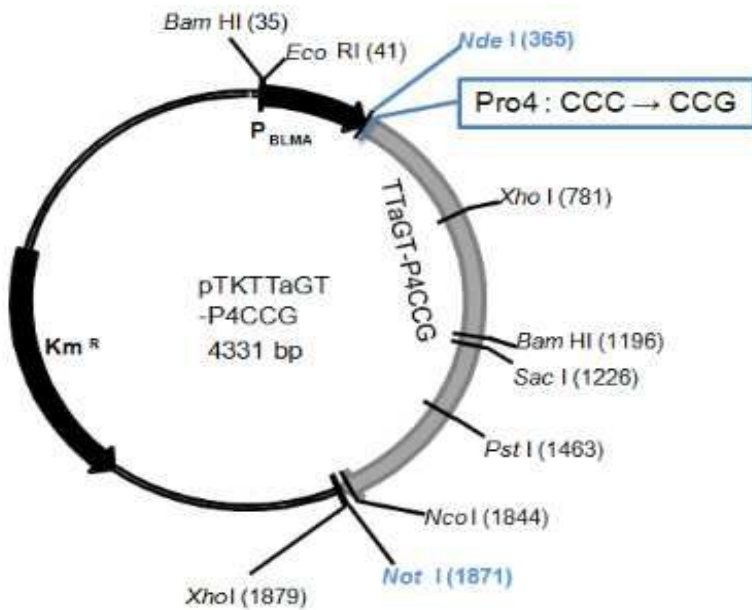
하였다. 본 실시예로부터 TTaGT-아밀로오스 복합체 내의 아밀로오스가 동결안정제로 작용하여 추가적인 안정제의 첨가 없이 상시 실시예와 같은 건조공정을 통해 TTaGT-아밀로오스 복합체의 분말화가 손쉽게 이를 수 있음을 확인하였다.

도면

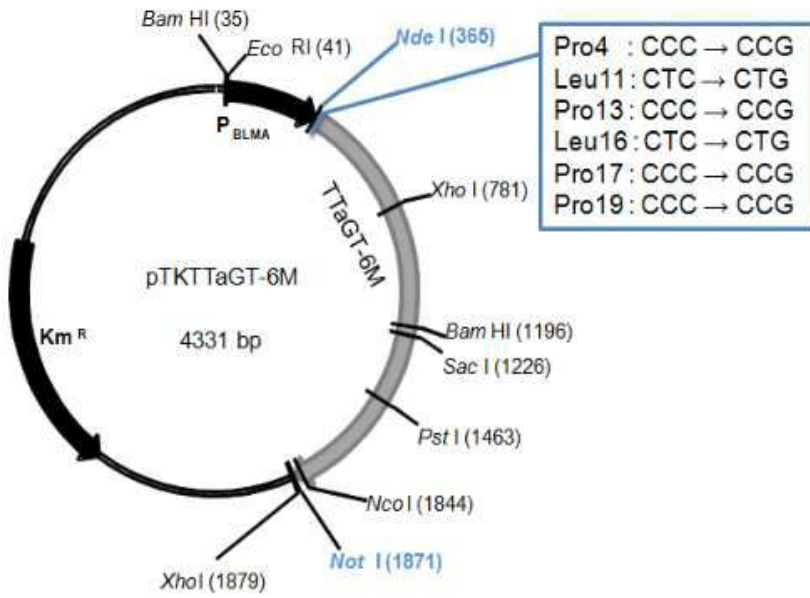
도면1



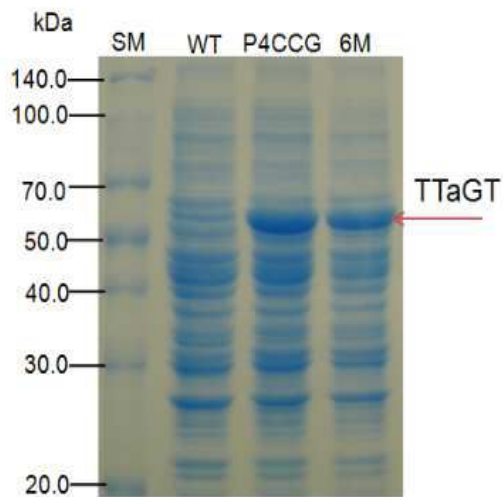
도면2



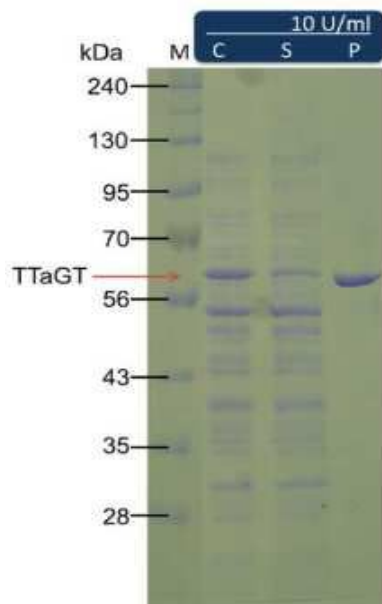
도면3



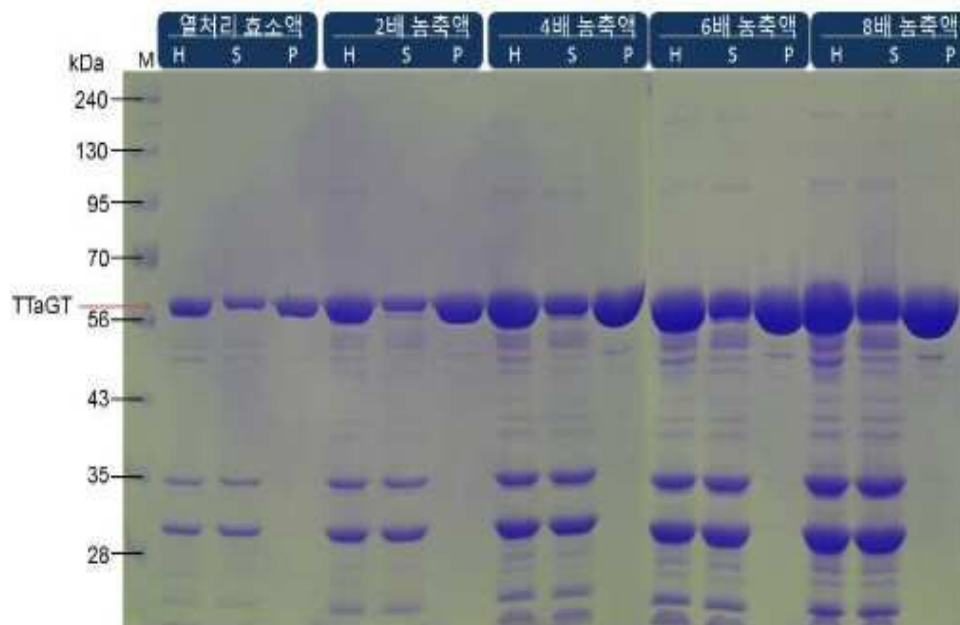
도면4



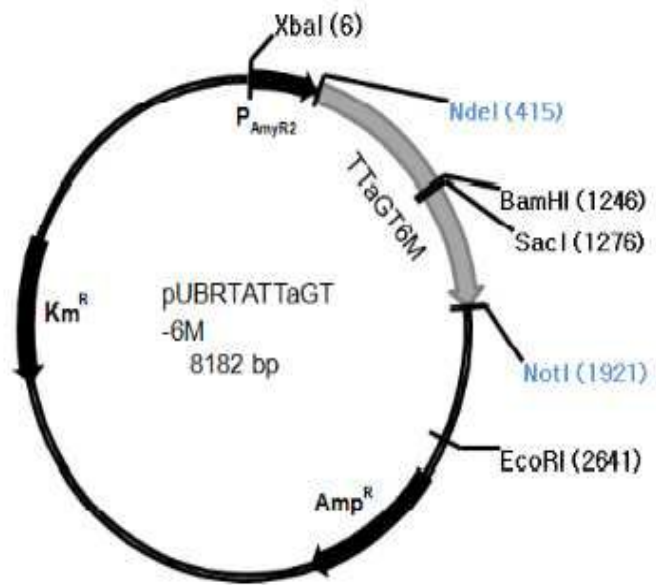
도면5



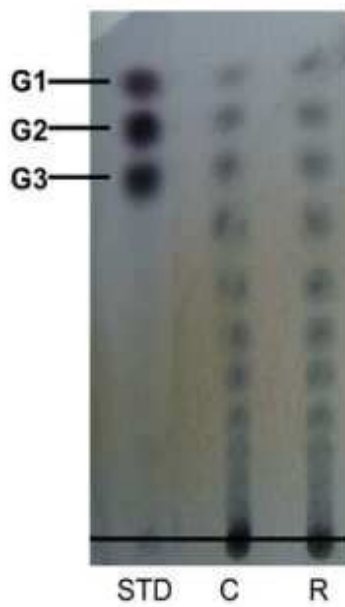
도면6



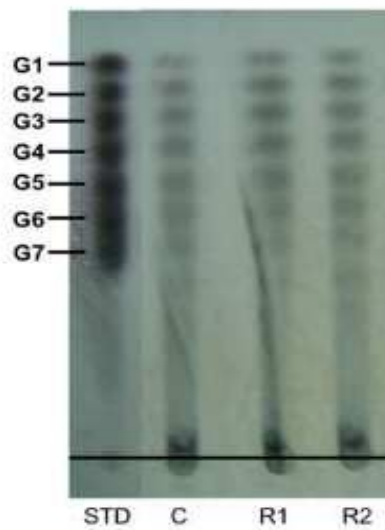
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 <120> 4- α -Glucanotransferase-amylose complex and the applications
 of the same
 <160> 13
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Thermus thermophilus
 <400> 1

Met Glu Leu Pro Arg Ala Phe Gly Leu Leu Leu His Pro Thr Ser Leu

1 5 10 15

Pro Gly Pro Tyr Gly Val Gly Val Leu Gly Gln Glu Ala Arg Asp Phe

20 25 30

Leu Arg Phe Leu Lys Glu Ala Gly Gly Arg Tyr Trp Gln Val Leu Pro

35 40 45

Leu Gly Pro Thr Gly Tyr Gly Asp Ser Pro Tyr Gln Ser Phe Ser Ala

50 55 60

Phe Ala Gly Asn Pro Tyr Leu Ile Asp Leu Arg Pro Leu Ala Glu Arg

65 70 75 80

Gly Tyr Val Arg Leu Glu Asp Pro Gly Phe Pro Gln Gly Arg Val Asp
85 90 95
Tyr Gly Leu Leu Tyr Ala Trp Lys Trp Pro Ala Leu Lys Glu Ala Phe
100 105 110
Arg Gly Phe Lys Glu Lys Ala Ser Pro Glu Glu Arg Glu Ala Phe Ala
115 120 125
Ala Phe Arg Glu Arg Glu Ala Trp Trp Leu Glu Asp Tyr Ala Leu Phe
130 135 140
Met Ala Leu Lys Gly Ala His Gly Gly Leu Pro Trp Asn Arg Trp Pro
145 150 155 160
Leu Pro Leu Arg Lys Arg Glu Glu Lys Ala Leu Arg Glu Ala Lys Ser
165 170 175
Ala Leu Ala Glu Glu Val Ala Phe His Ala Phe Thr Gln Trp Leu Phe
180 185 190
Phe Arg Gln Trp Gly Ala Leu Lys Ala Glu Ala Glu Ala Leu Gly Ile
195 200 205
Arg Ile Ile Gly Asp Met Pro Ile Phe Val Ala Glu Asp Ser Ala Glu
210 215 220
Val Trp Ala His Pro Glu Trp Phe His Leu Asp Glu Glu Gly Arg Pro
225 230 235 240
Thr Val Val Ala Gly Val Pro Pro Asp Tyr Phe Ser Glu Thr Gly Gln
245 250 255
Arg Trp Gly Asn Pro Leu Tyr Arg Trp Asp Val Leu Glu Arg Glu Gly
260 265 270
Phe Ser Phe Trp Ile Arg Arg Leu Glu Lys Ala Leu Glu Leu Phe His
275 280 285
Leu Val Arg Ile Asp His Phe Arg Gly Phe Glu Ala Tyr Trp Glu Ile
290 295 300
Pro Ala Ser Cys Pro Thr Ala Val Glu Gly Arg Trp Val Lys Ala Pro
305 310 315 320
Gly Glu Lys Leu Phe Gln Lys Ile Gln Glu Val Phe Gly Glu Val Pro

325 330 335
Val Leu Ala Glu Asp Leu Gly Val Ile Thr Pro Glu Val Glu Ala Leu
340 345 350
Arg Asp Arg Phe Gly Leu Pro Gly Met Lys Val Leu Gln Phe Ala Phe
355 360 365
Asp Asp Gly Met Glu Asn Pro Phe Leu Pro His Asn Tyr Pro Ala His
370 375 380
Gly Arg Val Val Val Tyr Thr Gly Thr His Asp Asn Asp Thr Thr Leu

385 390 395 400
Gly Trp Tyr Arg Thr Ala Thr Pro His Glu Lys Ala Phe Met Ala Arg
405 410 415
Tyr Leu Ala Asp Trp Gly Ile Thr Phe Arg Glu Glu Glu Glu Val Pro
420 425 430
Trp Ala Leu Met His Leu Gly Met Lys Ser Val Ala Arg Leu Ala Val
435 440 445
Tyr Pro Val Gln Asp Val Leu Ala Leu Gly Ser Glu Ala Arg Met Asn
450 455 460

Tyr Pro Gly Arg Pro Ser Gly Asn Trp Ala Trp Arg Leu Leu Pro Gly
465 470 475 480
Glu Leu Ser Pro Glu His Gly Ala Arg Leu Arg Ala Met Ala Glu Ala
485 490 495
Thr Glu Arg Leu

500

<210> 2

<211> 500

<212> PRT

<213> Thermus scotoductus

<400> 2

Met Glu Leu Pro Arg Ala Tyr Gly Leu Leu Leu His Pro Thr Ser Leu
1 5 10 15
Pro Gly Pro Tyr Gly Val Gly Val Leu Gly Glu Glu Ala Phe Ala Phe

20

25

30

Leu Arg Phe Leu Gly Glu Ser Gly Ala Arg Tyr Trp Gln Val Leu Pro
 35 40 45
 Leu Gly Pro Thr Gly Tyr Gly Asp Ser Pro Tyr Gln Ser Phe Ser Ala
 50 55 60
 Phe Ala Gly Asn Pro Tyr Leu Ile Asp Leu Arg Leu Arg Arg Arg Arg
 65 70 75 80
 Gly Tyr Leu Arg Leu Glu Asp Pro Gly Phe Pro Glu Gly Arg Val Val
 85 90 95

 Tyr Gly Trp Leu Tyr Ala Trp Lys Trp Pro Ala Leu Arg Glu Ala Phe
 100 105 110
 Arg Gly Phe Gln Glu Arg Ala Ser Arg Glu Glu Lys Glu Ala Phe Gln
 115 120 125
 Pro Phe Gly Thr Arg Glu Arg Ser Trp Leu Asp Asp Tyr Thr Leu Phe
 130 135 140
 Met Ala Leu Lys Pro Thr His Gly Gly Leu Pro Trp Asn Arg Trp Pro
 145 150 155 160
 Met Pro Leu Arg Leu Arg Glu Glu Lys Ala Leu Arg Glu Ala Ser Leu

 165 170 175
 Ala Leu Ser Gln Glu Val Ala Phe His Ala Trp Thr Gln Trp Phe Phe
 180 185 190
 Phe Arg Gln Trp Gln Ala Leu Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Leu
 195 200 205
 Ser Leu Ile Gly Asp Met Pro Ile Phe Val Ala Glu Asp Ser Ala Glu
 210 215 220
 Val Trp Ala His Pro Glu Trp Phe His Leu Asp Glu Glu Gly Arg Pro
 225 230 235 240

 Thr Val Val Ala Gly Val Pro Pro Asp Tyr Phe Ser Glu Thr Gly Gln
 245 250 255
 Arg Trp Gly Asn Pro Leu Tyr Arg Trp Glu Val Leu Glu Arg Glu Gly
 260 265 270
 Phe Ser Phe Trp Ile Glu Arg Leu Arg Lys Ala Leu Glu Leu Phe His
 275 280 285

Leu Val Arg Ile Asp His Phe Arg Gly Phe Glu Ala Tyr Trp Glu Ile
 290 295 300
 Pro Ala Ser Cys Pro Thr Ala Val Glu Gly Arg Trp Val Lys Ala Pro
 305 310 315 320
 Gly Glu Lys Leu Phe Gln Lys Ile Gln Glu Thr Phe Gly Arg Val Pro
 325 330 335
 Ile Leu Ala Glu Asp Leu Gly Val Ile Thr Pro Glu Val Glu Ala Leu
 340 345 350
 Arg Asp Arg Phe Gly Leu Pro Gly Met Lys Val Leu Gln Phe Ala Phe
 355 360 365
 Asp Gly Gly Met Glu Asn Pro Phe Leu Pro His Asn Tyr Pro Ser His
 370 375 380
 Gly Arg Val Val Val Tyr Thr Gly Thr His Asp Asn Asp Thr Thr Leu
 385 390 395 400
 Gly Trp Tyr Arg Thr Ala Thr Pro His Glu Arg Ala Phe Leu Gly Arg
 405 410 415
 Tyr Leu Ala Glu Trp Gly Ile Gly Phe Gln Arg Glu Glu Glu Ile Pro
 420 425 430
 Trp Ala Leu Met His Leu Gly Met Lys Ser Val Ala Arg Leu Ala Val
 435 440 445
 Tyr Pro Val Gln Asp Val Leu Ala Leu Gly Ser Glu Ala Arg Met Asn
 450 455 460
 Tyr Pro Gly Arg Pro Ser Gly Asn Trp Ala Trp Arg Leu Arg Pro Gly
 465 470 475 480
 Gln Leu Leu Pro Glu His Gly Glu Arg Leu Arg Trp Met Ala Glu Ala
 485 490 495
 Thr Gly Arg Val
 500
 <210> 3
 <211> 1503
 <212> DNA
 <213> Thermus thermophilus

<400> 3

atgatggagc ttccccgcgc ttctggctctg cttctccacc ccacgagcct ccccggcccc	60
tacggcgctcg gcgtcctggg ccaggaggcc cgggacttcc tccgtttcct caaggaggca	120
ggggggcggt acitggcaggt cctcccccttg gggccacgg gctatggcga ctccccctac	180
cagtccttca gcgccttcgc cggaaccacc tacctcatag acctgaggcc cctcgcggaa	240
aggggctacg tgcgcctgga ggaccccgcc ttcccccaag gccgggtgga ctacggcctc	300
ctctacgcct ggaagtggcc cgccctgaag gaggccttcc ggggcttcaa ggaaaaggcc	360
tccccggagg agcgggaggg cttcgccgcc ttccgggaga gggaggcctg gtggctcgag	420
gactacgccc tcttcatggc cctgaagggg gcgcacgggg ggcttccctg gaaccgtgg	480
ccccctcccc tgcggaagcg ggaagagaag gcccttaggg aggcgaaaag cgccttggcc	540
gaggaggtgg ctttccacgc cttcacccag tggctcttct tccgccagtg gggggccttg	600
aaggcggagg ccgaggcgtt gggcatccgg atcatcgggg acatgcccat cttcgtggcc	660
gaggactccg ccgaggtctg ggccaccacc gagtggtttc acctggacga ggaggccgc	720
cccacggtgg tggcgggggt gccccccgac tactttctcg agacgggcca gcgtggggc	780
aaccctctt accgctggga cgttttggag cgggaggggt tctccttctg gatccgccgt	840
ctggagaagg ccttgagct cttccacctg gtgcgcatag accacttccg cggtttttag	900
gcctactggg agatccccgc aagctgcccc acggcggtgg aggggcgctg ggtcaaggcc	960
ccgggggaga agctcttcca gaagatccag gaggtcttct gcgaggtccc cgtcctcgcc	1020
gaggacctgg gggatcacac ccccagggtg gaggccttgc gcgaccgtt cggccttccc	1080
gggatgaagg tcttgcagtt cgcctttgac gacgggatgg aaaaccctt cctccccac	1140
aactacctg cccacggccg ggtggtggtc tacaccggca cccacgaca cgacaccacc	1200
ctgggctggt accgcacggc caccctccac gagaaggcct tcatggcgcg gtacctggcg	1260
gactggggga tcaccttccg ggaagaggag gaggtgccct gggccctgat gcacctgggg	1320
atgaagtccg tggccccgct cgccgtctac ccggtgcagg acgtcctggc cctgggcagc	1380
gaggccccga tgaactacc gggaaggccc tcggggaact gggcctggcg gtcctcccg	1440
ggggagcttt ccccggagca cggggcgagg cttaggcca tggccgaggc cacggaacgg	1500
ctc	1503

<210> 4

<211> 1500

<212> DNA

<213> Thermus scotoductus

<400> 4

atggagcttc cgcgcgcta tggcctgctt ctgcaccca ccagccttcc cggacctat	60
ggggttggcg ttcttgggga ggaggtttt gccttcttcc gattcctggg ggagtctggg	120
gcccgtact ggcaggtttt gcccttaggg cccacaggat acggagactc ccctaccag	180
tccttcagcg cctttgccgg gaacccttac ctcatcgacc tccgcctaag gcggaggcgg	240
gggtacctcc gcctcgagga ccccggtttt cccgagggcc gggtgggtata cggctggctc	300
tacgcctgga aatggccggc gcttagggaa gccttcggg gtttcagga gcgggctagc	360
cgggaggaag aggagccctt tcagcctttt gggaccggg aaaggagctg gttggatgac	420
tacacctctt tcattggcctt gaagcccacc cacggaggcc ttcttggaa ccgctggccc	480
atgcccttac gcctgagggg ggaagaggct ttaagggaag catctttggc cctctccaa	540
gaggtggcct tcacgcctg gaccagtggt ttttcttcc ggcagtggca ggccttgagg	600
gaggcggcgg aggccttggg cctctccttg atcggcgaca tgcccatctt cgtggccgag	660
gactccgcgg aggtctgggc ccaccccgag tggttccacc tggatgagga gggaaggccc	720
acggtggtgg cgggggtgcc gccggattac ttttcggaaa cgggccagcg ctgggggaat	780
cccctgtacc gctgggaggt gctggaaagg gaggggttct cttcttgat agagcgctg	840
aggaaggcct tggagctttt ccacctggtg cgcacgacc acttcgggg ctttgaagcc	900
tactgggaga tccttgctc ctgcccacg gcagtggagg gacgtgggt gaaggccccg	960
ggggagaagc tctttcagaa gattcaggaa acctttggcc gggtgcccac cctggcggag	1020
gacctggggg tgatcacccc cgaggtggag gccctgaggg accggttttg ccttcgggg	1080
atgaaggctc tgcatctgc ctttgacggg gggtgggaaa accccttctt gcccacaac	1140
taccctccc acggccgggt ggtggtctac accggcacc acgacaacga caccacttg	1200
ggctggtacc gcaccgtac ccccacgag cgggctttcc ttgggcgcta cctggcggag	1260
tgggggattg ggttcagag ggaagaggag atccctggg ccctcatgca cctggggatg	1320
aagtcggtgg ccaggtggc cgtctacccc gtgcaggatg tgttggcgtt gggaagcgag	1380
gcccgatga actaccctgg gcgcccctcg ggcaactggg cttggcggt taggcccggc	1440
cagctcctgc ccgagcacgg ggaacggctt cgctggatgg ccgaggccac gggcagggtg	1500

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

gggtataatg ggcataatgga gcttccccgc 30

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

cccgggtctgt gcggccgcga gccgttccgt ggc 33

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

aagggggaaa ccatatgatg gagcttccgc gcgct 35

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gctagttatt gctcagcgg 19

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

atcgactttg tagggt 16

<210> 10

<211> 36

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
ccagacgaag acgtgggctg ctcggagggc ccgggc		36
<210>	11	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
ccgacgagcc tgccgggccc gtacggcgtc ggc		33
<210>	12	
<211>	1500	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mutant	
<400>	12	
atggagcttc cgcgcgttt cggctctgtt ctccaccca cgagcctccc cggcccctac		60
ggcgctcggcg tcttgggcca ggaggcccgg gacttctctc gcttctctca ggaggcaggg		120
ggcggttact ggaggttct ccccttgggc cccacgggct atggcgactc ccctaccag		180
tccttcagcg ctttcgccgg aaaccctac tcatagacc tgaggccct cgcgaaagg		240
ggctacgtgc gcttgagga ccccgcttc cccaaggcc gggtggacta cggcctctc		300
tacgcctgga agtggccgc cctgaaggag gccttcggg gcttcaagga aaaggcctcc		360
ccggaggagc gggaggcctt cgccgccttc cgggagaggg aggcctggtg gctcaggac		420
tacgccctct tcatggcctt gaagggggcg cacggggggc ttccttgaa ccggtggccc		480
cttccctgc ggaagcggga agagaaggcc cttagggagg cgaagcgc cttggccgag		540
gaggtggcct tcacgcctt caccagtgg ctcttcttc gccagtggg gcccttgaag		600
gcggaggccg aggcgttggg catccgatc atcggggaca tgccatctt cgtggccgag		660
gactccgcc aggtctggg ccccccgag tggtttcacc tggacagga gggccgccc		720
acgttggtgg cgggggtgcc cccgactac ttctcgaga cgggccagcg ctggggcaac		780
cccccttacc gctgggacgt tttggagcgg gaggggttct cttcttgat ccgccgtctg		840

gagaaggccc tggagctctt ccacctgggtg cgcatagacc acttccgcgg ctttgaggcc 900
tactgggaga tccccgaag ctgccccacg gcggtggagg ggcgctgggt caaggccccg 960
ggggagaagc tcttcagaa gatccaggag gtcttcggcg aggtccccgt cctcgccgag 1020
gacctggggg tcatcacccc cgaggtggag gccctgcgcg accgcttcgg ctttcccggg 1080
atgaaggtcc tgcagttcgc ctttgacgac gggtatggaaa accccttcct cccccacaac 1140
tacctgccc acggccgggt ggtggtctac accggcacc acgacaacga caccacctg 1200

ggctggtacc gcacggccac cccccacgag aaggccttca tggcgcggta cctggcggac 1260
tgggggatca ctttccggga agaggaggag gtccctggg ccctgatgca cctggggatg 1320
aagtccgtgg cccggtcgc cgtctaccg gtgcaggacg tcctggccct gggcagcgag 1380
gcccggatga actaccggg aaggccctcg gggaactggg cctggcggct cttcccgggg 1440
gagctttccc cggagcacgg ggcgaggctt agggccatgg ccgaggccac ggaacggctc 1500
1500

<210> 13
<211> 1500
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutant

<400> 13

atggagcttc cgcgcgttt cggctctgtt ctgcaccca cgagcctgcc gggcccgtac 60
ggcgtcggcg tcttgggcca ggaggcccgg gacttctcc gcttctcaa ggaggcaggg 120
ggcggtact ggcaggtcct ccccttgggc ccacgggct atggcgactc ccctaccag 180
tcttcagcg ctttcgcccg aaaccctac ctcatagacc tgaggccct cgcggaagg 240
ggctacgtgc gcctggagga ccccgcttc cccaaggcc gggtaggacta cggcctctc 300
tacgcctgga agtggccgc cctgaaggag gccttcggg gcttcaagga aaagcctcc 360

ccggaggagc gggaggcctt cgccgccttc cgggagaggg aggcctgggt gctcaggac 420
tacgccctct tcatggcctt gaagggggcg cacggggggc ttccttgaa ccggtggccc 480
cttccctgc ggaagcggga agagaaggcc cttagggagg cgaagagcgc ctggccgag 540
gaggtggcct tccacgcctt caccagtggt ctcttcttc gccagtggg ggccttgaag 600
gcggaggccg aggcgttggg catccgatc atcggggaca tgccatctt cgtggccgag 660
gactccgcc aggtctgggc ccaccccgag tggtttcacc tggacgagga gggccgccc 720
acggtggtgg cgggggtgcc ccccgactac ttctcgaga cgggccagcg ctggggcaac 780

ccccctttacc gctgggacgt tttggagcgg gaggggttct ctttctggat cgcctgtctg	840
gagaaggccc tggagctctt ccacctggtg cgcatagacc acttccgcgg ctttgaggcc	900
tactgggaga tccccgcaag ctgccccacg gcggtggagg ggcgtgggt caaggccccg	960
ggggagaagc tcttcagaa gatccaggag gtcttcggcg aggtccccgt cctgcgcgag	1020
gacctggggg tcatcacccc cgaggtggag gccctgcgcg accgcttcgg cttccccggg	1080
atgaaggtec tgcagttcgc ctttgacgac ggcatggaaa accccttct cccccacaac	1140
tacctgccc acggccgggt ggtggtctac accggcacc acgacaacga caccacctg	1200
ggctggtacc gcacggccac cccccacgag aaggccttca tggcgcggt cctggcggac	1260
tgggggatca cttccggga agaggaggag gtgccctggg ccctgatgca cctggggatg	1320
aagtccgtgg cccggctcgc cgtctaccg gtgcaggacg tcctggccct gggcagcgag	1380
gcccggatga actaccggg aaggccctcg gggaactggg cctggcggct cttccccggg	1440
gagctttccc cggagcacgg ggcgaggctt agggccatgg ccgaggccac ggaacggctc	1500
	1500