



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0124149
(43) 공개일자 2017년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01) C12P 19/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0053414
(22) 출원일자 2016년04월29일
심사청구일자 2016년04월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경현
서울특별시 서초구 서초중앙로 200 18동 805호 (서초동,삼풍아파트)
왕대모
서울특별시 성북구 안암로 145 CJ식품안전관 209호 (안암동5가,고려대학교안암캠퍼스)
김도형
경기도 용인시 수지구 대지로 139 107동 1401호 (죽전동,동부아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

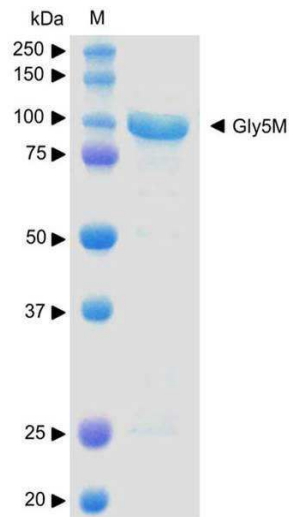
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 베타-글루칸으로부터 올리고당 또는 글루코스를 생산하는 신규한 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈

(57) 요약

본 발명은 베타-글루칸으로부터 올리고당 또는 글루코스를 생산하는 신규한 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 베타-글루칸에 대해 베타-1,3-엔도글루카네이즈 뿐만 아니라 베타-1,6-엔도글루카네이즈 활성을 보이면서, 라미나리올리고당에 대해 트랜스글리코실레이즈 활성을 보이는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈를 통해 다양한 중합도의 올리고당 또는 글루코스를 고수율로 생산하는 효과를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/2405 (2013.01)

C12P 19/20 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0031359

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌프론티어

연구과제명 인간올리고당 Fucosyllactose 생산을 위한 미생물 전환공정

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈(β -1,3-1,6-endoglucanase)를 포함하고,

상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스툴란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 사카로파거스 테그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 것인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 얻은 것인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

유전자는 SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열로 표시되는 것인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

라미나리올리고당은 중합도(degrees of polymerizations) 2 내지 6의 라미나리올리고당 중 어느 하나인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈에 의해 생산되는 올리고당은 라미나리올리고당 또는 젠티올리고당 중 어느 하나를 포함하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

라미나리올리고당은 중합도 2 내지 17의 라미나리올리고당 중 어느 하나인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

라미나리올리고당은 중합도 2 내지 6의 라미나리올리고당 중 어느 하나를 포함하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

젠티오올리고당은 중합도 2 내지 8의 젠티오올리고당 중 어느 하나인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

젠티오올리고당은 젠티오바이오스를 포함하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.

청구항 11

SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈(β -1,3-1,6-endoglucanase)와, 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스툴란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 반응시키는 것을 포함하는 올리고당 또는 글루코스의 생산방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

라미나리올리고당은 중합도 2 내지 6의 라미나리올리고당 중 어느 하나인, 올리고당 또는 글루코스의 생산방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

반응은 20 내지 45℃의 온도 범위에서, pH 5 내지 10에서, 5분 내지 1일 동안 수행되는, 올리고당 또는 글루코스의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 베타-글루칸으로부터 올리고당 또는 글루코스를 생산하는 신규한 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 현재 세계적으로 석유자원의 고갈에 따른 유가의 상승과 기후변화협약을 통한 환경규제가 강화됨에 따라 기존의 석유 및 석탄 등의 화석연료를 대체할 수 있는 친환경적 에너지 자원의 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 다양한 다당류로 이루어진 갈조류는 목질계, 초본계 바이오매스에 비해 빠른 속도로 성장하며 경지면적당 높은 생산성을 보이는 장점을 가지고 있다. 또한, 리그닌 함량이 적어 바이오에너지 및 화학물질의 생산을 위한 원료물질로의 전환이 수월하며 광합성 작용으로 공기 중의 이산화탄소를 흡수하므로 친환경, 경제적 바이오에너지 및 화학물질의 생산을 위한 자원으로 각광받고 있다.
- [0004] 갈조류는 알긴산, 후코이단, 만니톨, 라미나린 등으로 구성되어 있으며 그 중 라미나린은 종에 따른 차이가 있으나 라미나리아 하이퍼보린(*Laminaria hyperborean*), 사카리나 라티시마(*Saccharina latissimi*) 건조중량의 약 32%, 푸쿠스 베시쿨로수스(*Fucus vesiculosus*)의 전체 탄수화물 중 약 85%를 차지하는 등 갈조류 유래 다당류 중 매우 많은 구성비를 차지하고 있다. 라미나린은 β -1,3-글리코시드 결합이 주 골격이며 부분적으로 β -1,6-글리코시드 결합으로 이루어져 있다. 라미나린을 효과적으로 당화하기 위해서는 글리코시드 결합을 절단하는 글리코시드 하이드롤레이즈(glycoside hydrolases(GHs))가 필요한데, 그 중 β -1,3-글루카네이즈의 경우 그 효소적 특성에 따라 2개의 그룹으로 나뉘게 된다. β -1,3-엔도글루카네이즈는 내부의 β -1,3 글리코시드 결합을 절단함으로써 다양한 올리고당을 생산하며 β -1,3-엑소글루카네이즈는 비-환원 말단으로부터 글루코스를 생산하는 것으로 알려져 있다. 이러한 효소적 반응을 통해 생산된 최종산물인 글루코스는 에탄올 등 바이오 연료의 생산에 적합한 원료로 사용가능하며, 또한 본 효소반응을 통해 생산되는 라미나리올리고당 역시 유용한 생리활성 물질로써의 사용이 가능하다.
- [0005] 베타-1,3-엔도글루카네이즈와 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-1483182호에는 베타-1,3-엔도글루카네이즈가 라미나린을 분해하여 글루코스와 라미나린바이오스를 생산한다고 기재하고 있으나, 상기 효소의 푸스툴란에 대한 반응성은 언급하고 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1483182호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 베타-글루칸으로부터 올리고당 또는 글루코스를 생산할 수 있는 신규한 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈(β -1,3-1,6-endoglucanase)를 포함하고, 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스툴란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈(β -1,3-1,6-endoglucanase)와, 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스툴란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 반응시키는 것을 포함하는 올리고당 또는 글루코스의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명은 베타-글루칸에 대해 베타-1,3-엔도글루카네이즈 뿐만 아니라 베타-1,6-엔도글루카네이즈 활성을 보이면서, 라미나리올리고당에 대해 트랜스글리코실레이즈 활성을 보이는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈를 제공하는 효과가 있다.
- [0014] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 라미나린, 푸스톨란, 라미나리올리고당을 기질로 사용할 수 있어 다양한 중합도의 올리고당 또는 글루코스를 고수율로 생산하는 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 발현을 확인한 젤 사진도이다.
- 도 2는 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 최적 활성 pH 확인 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 최적 활성 온도 확인 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 열 안정성 확인 결과이다.
- 도 5는 기질, 라미나린의 가수분해에 대한 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 Lineweaver-Burk plot를 나타낸 것이다.
- 도 6은 기질, 라미나린에 따른 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈 반응 산물의 TLC(A) 및 HPLC(B) 분석 결과이다.
- 도 7은 기질, 푸스톨란에 따른 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈 반응 산물의 TLC(A) 및 HPLC(B) 분석 결과이다.
- 도 8은 기질, 라미나린(A) 및 푸스톨란(B)에 따른 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈 반응 산물의 MALDI-TOF/TOF MS 분석 결과이다.
- 도 9는 기질, 라미나리올리고당에 대한 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈 반응 산물의 TLC 분석 결과이다.
- 도 10은 기질, 라미나리올리고당에 대한 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈 반응 산물의 MALDI-TOF/TOF MS 분석 결과이다.
- 도 11은 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 계통수를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명자들은 베타-글리코시데이즈 활성을 가질 것으로 추정되는 GH5 패밀리에 속한 Gly5M 단백질의 베타-글루칸 분해 활성을 확인하였다. 그 결과, Gly5M 단백질은 포도당이 베타-1,3-결합의 주 골격과 및 베타-1,6-결합으로 결합된 다당류인 라미나린을 기질로 사용하여 라미나린의 β -1,3-글리코시드 결합을 절단함으로써 라미나리올리고당과 글루코스를 생산하고, 포도당이 베타-1,6-결합으로 연결된 다당류인 푸스톨란 기질의 β -1,6-글리코시드 결합을 절단함으로써 젠티오올리고당과 글루코스를 생산하였다. 또한, 라미나리올리고당을 기질로 사용할 경우 트랜스글리코실레이즈 활성을 나타내어 기질인 라미나리올리고당보다 높은 DP 값을 가지는 올리고당을 생산함을 확인하였다. 이러한 Gly5M 단백질의 다양한 효소적 특성은 GH5 패밀리에 속하는 다른 효소들이 가지고 있지 않은 β -1,3-엔도글루카네이즈 활성을 보임으로써 이전까지 알려지지 않은 GH5 패밀리 효소들에 대한 새로운 정보를 제공하였다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈(β -1,3-1,6-endoglucanase)를 포함하고, 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스톨란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈와, 기질로,

라미나린(laminarin), 푸스톨란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 반응시키는 것을 포함하는 올리고당 또는 글루코스의 생산방법을 제공한다.

- [0020] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 베타-글루칸에 대해 베타-1,3-엔도글루카네이즈 뿐만 아니라 베타-1,6-엔도글루카네이즈 활성을 보이면서, 라미나리올리고당에 대해 트랜스글리코실레이즈 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 약 20 내지 약 45℃까지 열 안정성을 유지하고, 라미나린, 라미나리올리고당 또는 푸스톨란에 대해 최적 분해 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다. 더 구체적으로, 약 30 내지 40℃에서 최적 활성을 나타낼 수 있다.
- [0022] 또한, 완충 용액 내 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 최적 pH는 완충용액의 종류에 따라 달라질 수는 있으나 약 pH 4 내지 10일 수 있고, 더 구체적으로 약 pH 4 내지 9, 가장 구체적으로 약 pH 6일 수 있다.
- [0023] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 라미나린, 푸스톨란 및 라미나리올리고당 등을 기질로 사용할 수 있다.
- [0024] 상기 기질로 사용하는 라미나리올리고당은 더 구체적으로, 중합도(degrees of polymerizations, DP) 2 내지 6의 라미나리올리고당 중 어느 하나일 수 있다. 예컨대, 라미나리바이오스(DP2), 라미나리트리오스(DP3), 라미나리테트라오스(DP4), 라미나리펜타오스(DP5), 또는 라미나리헥사오스(DP6)일 수 있다. 상기 중합도 2 내지 6의 라미나리올리고당을 기질로 사용하는 경우, 트랜스글리코실레이즈 활성을 통해 기질의 DP 값보다 높은 DP 값을 보이는 피크의 라미나리올리고당이 분해 산물로 획득될 수 있다.
- [0025] 또한, 상기 효소의 반응 산물은 라미나리올리고당, 젠티오올리고당, 또는 글루코스일 수 있다.
- [0026] 상기 라미나리올리고당은 중합도 2 내지 17의 라미나리올리고당 중 어느 하나일 수 있다. 더 구체적으로, 중합도 2 내지 6의 라미나리바이오스, 라미나리트리오스, 라미나리테트라오스, 라미나리펜타오스 또는 라미나리헥사오스가 다량 생성될 수 있다.
- [0027] 상기 젠티오올리고당은 중합도 2 내지 8의 젠티오올리고당 중 어느 하나일 수 있다. 더 구체적으로, 중합도 2의 젠티오바이오스가 다량 생성될 수 있다.
- [0028] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 사카로파거스 데그라단스 (*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0029] 또한, 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, SEQ ID NO: 2에 기재된 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 올리고당 또는 글루코스의 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.
- [0030] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^T 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적인 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)2-40^T 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [0031] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 킬림 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다. 예컨대, 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈를 코딩하는 유전자, 즉, SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다. 상기 숙주세포로 대장균을 사용하나, 이에 제한하는 것은 아니다.
- [0032] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈와 기질의 반응은 20 내지 45℃의 온도 범위에서, pH 5 내지 10에서, 5분 내지 1일 동안 수행될 수 있다. 보다 구체적으로, 기질로 라미나린 또는 푸스톨란을 사용하는 경우, 38 내지 42℃의 온도 범위에서, pH 5 내지 7에서, 5분 내지 5시간 동안 수행될 수 있다. 기질로 라미나리올리고당을 사용

하는 경우, 38 내지 42℃의 온도 범위에서, pH 5 내지 7에서, 1시간 내지 5시간 동안 수행될 수 있다.

[0033] 상기 효소의 분해산물은 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피 및 젤 투과 크로마토그래피인 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 대략 95%의 고순도의 올리고당 또는 글루코스를 분리 정제할 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0035] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc. Natl Acad. Sci USA* 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

[0036] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.

[0037] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.

[0038] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈(예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.

[0039] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0041] <실시예 1> 클로닝 기법을 통한 *gly5m* 유전자의 확보

[0042] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T(ATCC 43961)는 23 g/L의 인스턴트 해수염, 50 mM Tris-HCl, 2 g/L의 글루코스, 2 g/L의 효모 추출물 및 0.5 g/L의 암모늄 클로라이드를 함유하는 최소배지에서 30℃에서 12시간 동안 배양하였다.

[0043] 시판중인 DNA 분리 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T(ATCC 43961)의 게놈 DNA를 얻었다. 표적 유전자 *gly5m*(GeneBank ID. ABD82251.1)는 Solg 2×Taq PCR smart mix 2(SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 증폭하였다. 사용된 프라이머는 5'-GCGGGATCCATGAGAGAAAACTACTGCGCG-3'(정방향) 및 5'-GCGCTCGAGGTGGTGGTGGTGGTGGTCAACTGCTCAACACTCCA-3'(역방향)이고 이들은 5' 부위에 *Bam*HI 및 *Xho*I 제한효소 사이트를 가지고 있다. 또한 HisTrap 컬럼의 친화도를 높이기 위해 히스티딘을 코딩하고 있는 유전자의 염기서열에 추가하였다. PCR 산물과 pET28a+ 벡터는 *Bam*HI 및 *Xho*I 으로 이중 절단하고, 최종 DNA 단편을 라이게이션 하였다. *gly5m*이 탑재된 플라스미드는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5a에 형질전환 하였다.

[0045] <실시예 2> Gly5M의 과발현 및 정제

[0046] 실시예 1을 통해 확보한 유전자의 과발현을 위해 단백질 발현용 숙주인 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) B121(DE3)에 형질전환 하였다. 세포는 50 mg/L의 카나마이신(kanamycin)이 첨가된 Luria-Bertani(LB) broth(BD, Sparks, MD, USA)를 사용하여 37℃에서 600 nm에서의 흡광도가 0.6에 도달할 때까지 배양하였다. 0.1 mM IPTG를 사용하여 단백질의 발현을 유도하였으며 유도 온도는 16℃로 설정하여 수용성 형태로 재조합 단백질을 발현하였다. 발현시킨 Gly5M 단백질을 분리하기 위하여, 세포를 초음파로 분쇄하고 원심분리 후 그 상등액을 HisTrap column(GE Healthcare, Piscataway, USA)을 이용해 정제하였다. 정제된 단백질을 Amicon Ultra Centrifugal filter(millipore, Billerica, MA, USA)로 농축하고, bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)로 단백질 농도를 측정하였다.

[0047] 발현된 Gly5M의 분자량은 SDS-PAGE에 의해 대략 95kDa으로 측정되었다(도 1).

[0049] <실시예 3> Gly5M의 기질특이성 및 양이온 효과 확인

[0050] Gly5M 단백질의 기질 특이성을 확인하기 위해 1%의 푸스톨란, 라미나린, 커들란(Wako, Osaka, Japan), 카복시메틸셀룰로즈(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 자일란(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 등과 같은 다양한 글루칸을 포함하는 20 mM Tris-HCl(pH6.0)에서 10.5 μ M의 Gly5M 단백질과 함께 40℃에서 30분간 반응시켰다. 생산된 환원당은 DNS 방법을 이용해 측정하였다.

[0051] 표 1에 나타난 바와 같이, Gly5M 단백질은 라미나린에서 가장 높은 활성을 보였으며 푸스톨란을 기질로 사용하였을 경우 라미나린을 단독 기질로 사용하였을 경우와 비교하여 약 55.6%의 상대활성을 보였다. Gly5M 단백질은 다른 β -글루카네이즈와는 달리 커들란을 가수분해하지 않는 것으로 확인되었으며, 이는 라미나린과 비교해 커들란에 매우 활성을 보이는 β -1,3-글루카네이즈의 특징과 매우 유사하다. 또한, Gly5M 단백질은 아비셀, 보리의 β -글루칸, CM-셀룰로스, 자일란과 같은 β -1,4-글리코시드 결합에는 반응하지 않는 것으로 확인되었다.

[0052] Gly5M 단백질의 양이온효과 확인한 결과, 표 2와 같이, Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} 과 같은 양이온에 의해 반응성이 저해되는 것을 확인하였다.

표 1

[0053]

기질	글리코시드 결합	상대 효소 활성(%)
라미나린	β -1,3 및 β -1,6 (글루코스)	100.0
푸스톨란	β -1,6 (글루코스)	55.6
커들란	β -1,3 (글루코스)	ND
β -글루칸 (보리)	β -1,3 및 β -1,4 (글루코스)	ND
자일란	β -1,4 (자일로스)	ND
아비셀	β -1,4 (글루코스)	ND
카르복시메틸 셀룰로스	β -1,4 (글루코스)	ND
ND는 검출되지 않았다는 의미임		

표 2

[0054]

양이온	상대 활성(%)
대조군	100.2 $\pm$ 0.9
K^{+}	99.1 $\pm$ 1.4
Na^{+}	100.3 $\pm$ 1.4
Mg^{2+}	63.1 $\pm$ 1.2
Ca^{2+}	103.4 $\pm$ 2.9
Mn^{2+}	101.7 $\pm$ 0.8
Ni^{2+}	22.5 $\pm$ 1.2
Cu^{2+}	25.3 $\pm$ 0.2

Fe ²⁺	20.7 ± 1.1
Co ²⁺	56.8 ± 0.7
양이온이 없는 상태의 활성을 100%로 정함 실험 데이터는 3반복 실험치의 평균±표준편차임	

[0056] <실시예 4> Gly5M 단백질의 최적 pH 및 활성 온도 확인

[0057] Gly5M 단백질의 활성에 대한 최적 pH를 조사하기 위해 2% 라미나린을 포함하는 20 mM glycine-HCl(pH 2.0-4.0), 20 mM 소듐 아세테이트(pH 4.0-6.0), 20 mM Tris-HCl(pH 6.0-9.0), 20 mM glycine-NaOH(pH 9.0-10.0)과 Gly5M 단백질을 반응하였다.

[0058] 도 2는 2.0-10.0 범위의 pH에서 Gly5M의 상대적 활성을 나타낸다. Gly5M은 pH 6.0일 때 최대 활성을 나타내었고 그 전후의 pH에서 급격하게 효소활성이 떨어지는 것을 확인하였다.

[0059] Gly5M 단백질의 활성에 대한 최적 온도를 조사하기 위해 2% 라미나린을 포함하는 20 mM Tris-HCl과 Gly5M을 반응시켰다.

[0060] 도 3은 20-70℃ 범위의 온도에서 Gly5M의 상대적 활성을 나타낸 것이다. 효소 활성은 20℃에서 40℃ 범위에서는 온도가 증가함에 따라 점차적으로 증가하여 40℃에서 최대 값에 도달하였다. 40℃의 반응온도에서의 활성은 40℃에서 관찰한 것과 비교하여 효소 활성이 급격히 감소하였다.

[0061] Gly5M의 열 안정성을 확인하기 위해, 40℃ 이상의 온도에서 1시간 반응한 40℃에서 반응한 경우와 비교해보았을 때 상대활성이 급격히 줄어듦을 확인하였다(도 4). 따라서 30℃를 Gly5M의 최적 반응 온도로 결정하였고 이 온도를 모든 후속 실험에 사용하였다.

[0063] <실시예 5> Gly5M의 효소 반응속도 확인

[0064] Gly5M 단백질의 라미나린에 대한 효소 반응속도를 확인하기 위하여 0.45-9.1%의 다양한 농도의 라미나린을 포함하는 20mM Tris-HCl 완충용액과 단백질을 pH 6.0, 40℃에서 반응시켰다.

[0065] 그 결과, Lineweaver-Burk plot(도 5)으로부터 K_m , V_{max} , K_{cat} 값은 각각 10.4 g/L, 10.6 U/mg, 16.8 s⁻¹ 로 확인되었다.

[0067] <실시예 6> TLC, HPLC를 사용한 Gly5M 단백질의 효소 반응 특성 확인

[0068] 반응 시간에 따른 Gly5M 단백질의 효소 반응 특성은 Thin Layer Chromatography(TLC) 및 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)를 사용하여 분석하였다.

[0069] TLC 분석을 위한 반응산물은 *n*-부탄올:아세트산:물(3:2:2 부피비) 혼합용매 시스템을 사용하여 silica gel 60 plate(Merck)에 전개하였으며 시각화를 위해 10% (v/v) 황산 처리 후 130℃에서 5분간 열처리하였다.

[0070] HPLC 분석은 gel permeation and ligand exchange column(KS-802; Shodex)을 장착한 Agilent 1100 HPLC(Agilent)를 사용해 분석하였으며 refractive index detector(Agilent)를 통해 탐지하였다. HPLC 분석을 위한 용매로는 멸균수를 사용하였으며 flow rate은 0.5 mL/min, 컬럼 온도는 80℃로 설정하였다. 분석을 위한 표준물질로는 라미나리바이오스(DP2), 라미나리트리오스(DP3), 라미나리테트라오스(DP4), 라미나리펜타오스(DP5), 라미나리헥사오스(DP6)(Megazyme)를 사용하였다.

[0071] Gly5M 단백질과 라미나린을 반응한 반응산물의 TLC 분석결과(도 6A), 반응시작 5분 이후부터 다양한 DP 값을 보이는 올리고당이 생성되는 것을 확인할 수 있으며, 시간이 지남에 따라 DP2에서 DP5에 해당하는 낮은 DP값의 올리고당과 글루코스가 다량 생성됨을 확인하였다.

[0072] 동일한 반응 산물을 HPLC를 통해 분석한 결과(도 6B), 반응시간이 지남에 따라 DP5 보다 낮은 DP 값을 보이는 피크가 증가하는 것을 확인하였다. 이 결과는 Gly5M 단백질이 라미나린을 구성하는 β-1,3-글리코시드 결합을

무작위적으로 절단함을 의미한다.

[0073] Gly5M 단백질과 푸스톨란을 반응시킨 경우, 반응이 진행됨에 따라 초기에는 다양한 DP값을 보이는 올리고당이 생성되나 최종적으로는 다량의 젠티오바이오스(DP2)와 글루코스를 생성하는 것을 확인하였다(도 7A 및 7B).

[0075] <실시예 7> MALDI-TOF/TOF MS를 사용한 Gly5M 단백질의 효소 반응 특성 확인

[0076] Gly5M 단백질의 추가적인 효소 반응 특성 확인을 위해 라미나린, 푸스톨란, 라미나리올리고당을 기질로 2시간동안 반응하여 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Tandem Time Of Flight Mass Spectrometry(MALDI-TOF/TOF MS) 분석을 실시하였다. 분석을 위한 시료는 0.01M NaCl 0.3 μ l, 50% (v/v) 아세트니트릴에 녹인 50 g/L 2,5-디하이드록시벤조산 0.5 μ l와 혼합하여 스테인리스 스틸 타겟 플레이트에 점적하였다. 점적한 시료는 결정 생성을 위해 신속히 건조 후 ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF MS system(Bruker Daltonics)을 사용하여 분석하였다. 가공하지 않은 MS 데이터는 FlexAnalysis software(version 3.3; Bruker Daltonics)를 통해 가공하였다.

[0077] 라미나린을 기질로 하여 반응시킨 경우, Gly5M 단백질에 의해 대부분 글루코스로 전환되었으며 그 외 생산된 DP2부터 DP17에 이르는 다양한 올리고당 중 DP4, DP5가 주로 생산됨을 확인하였다(도 8A).

[0078] 푸스톨란을 기질로 사용한 경우, 역시 대부분이 글루코스로 전환됨을 확인하였고 그 외 DP2에서 DP8에 이르는 다양한 올리고당이 생산됨을 확인하였다(도 8B).

[0079] 라미나리올리고당(DP2-6)을 기질로 사용한 경우, 특이적으로 기질의 DP 값보다 높은 DP 값을 보이는 피크가 확인되었으며 이를 통해 Gly5M 단백질이 라미나리올리고당(DP2-6)과 반응할 경우 트랜스글리코실레이즈 활성을 보임이 확인되었다(도 9 및 도 10).

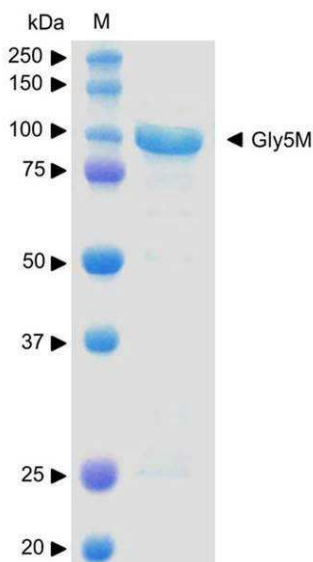
[0081] <실시예 8> Gly5M 단백질의 계통분류학적 분석

[0082] Gly5M 단백질의 계통분류학적 분석을 위해 이전까지 알려진 미생물 유래 β -1,3-엔도글루카네이즈의 유전자 정보를 CAZy database(<http://www.cazy.org>)로부터 획득하여 계통수를 그려보았다.

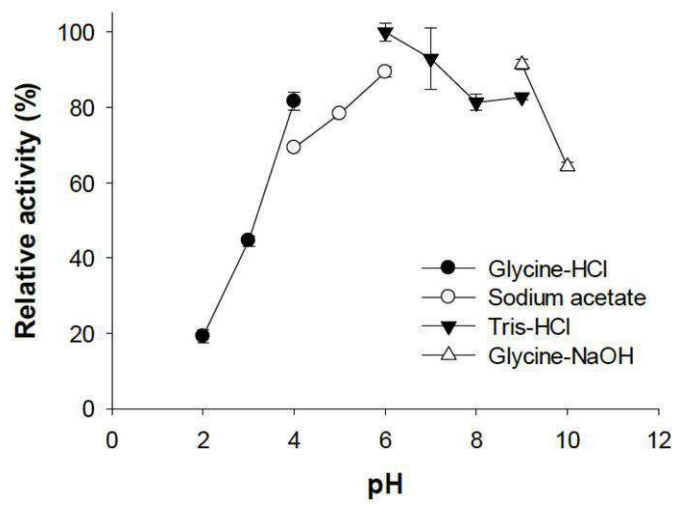
[0083] 도 11에 나타난 바와 같이, 이전에 알려진 다른 β -1,3-엔도글루카네이즈와 계통학적으로 확인한 차이를 확인할 수 있었다.

도면

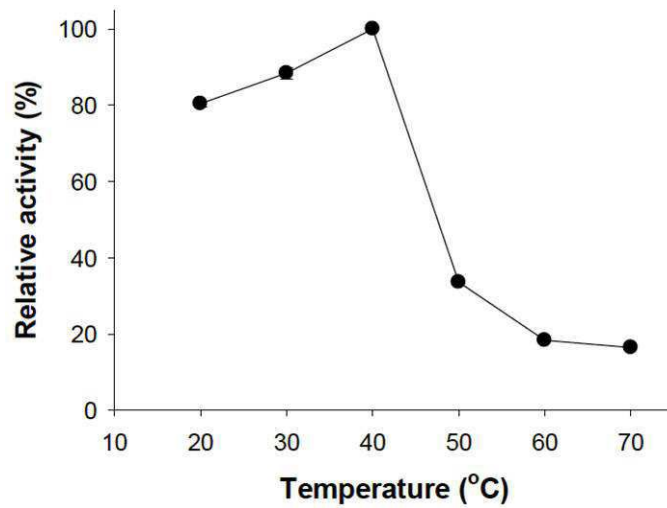
도면1



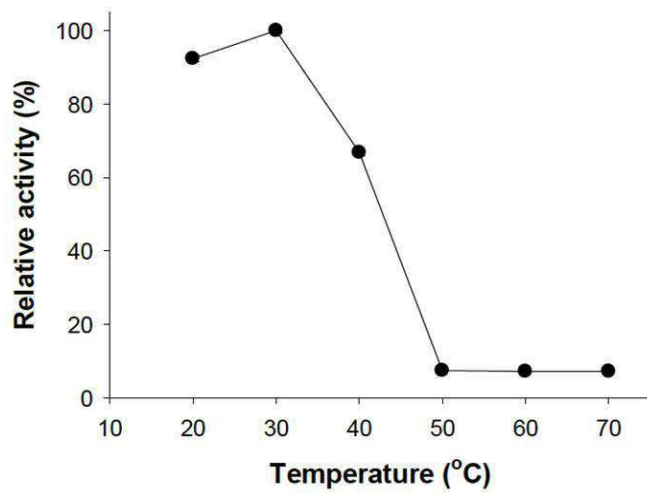
도면2



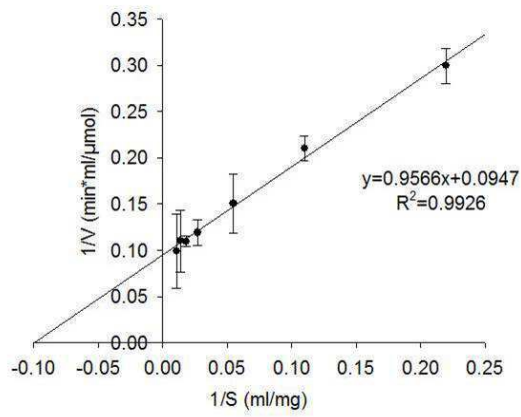
도면3



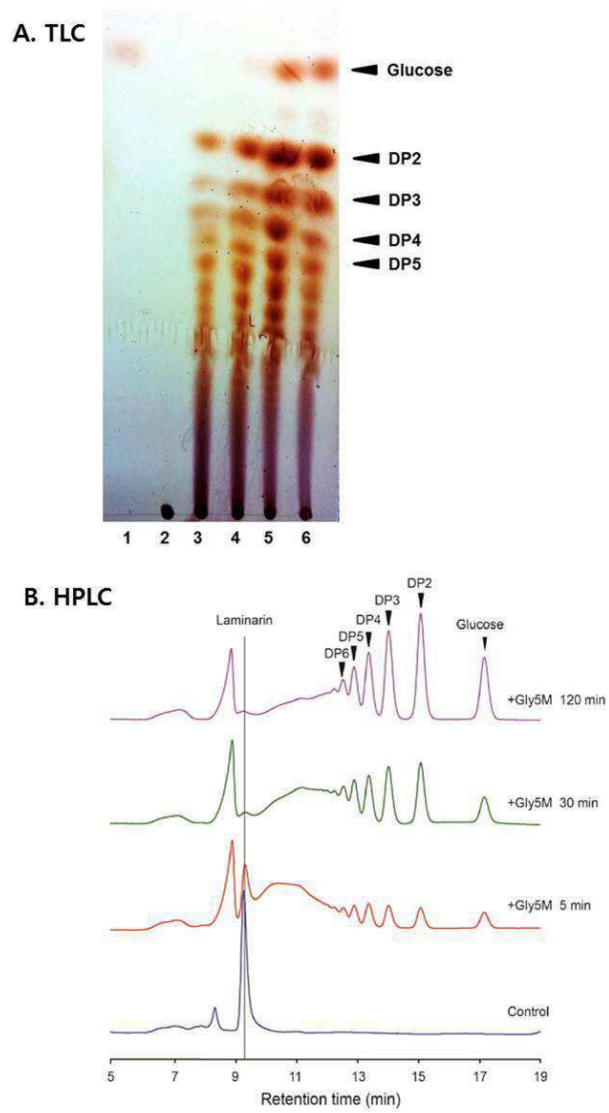
도면4



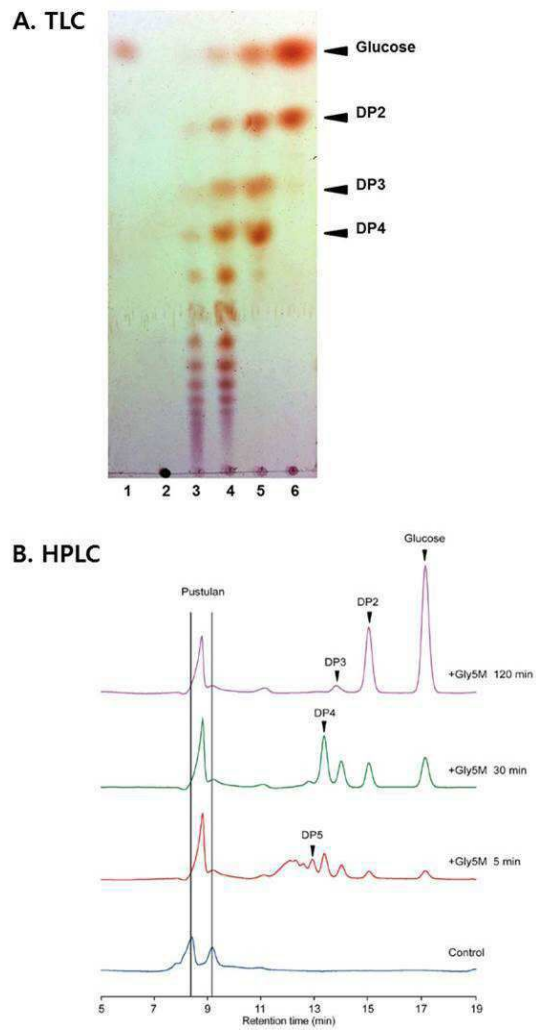
도면5



도면6

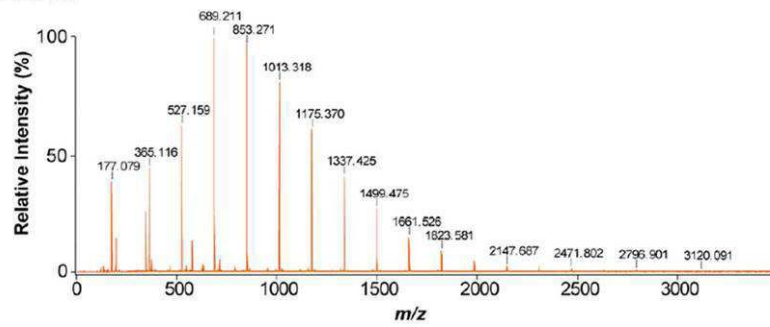


도면7

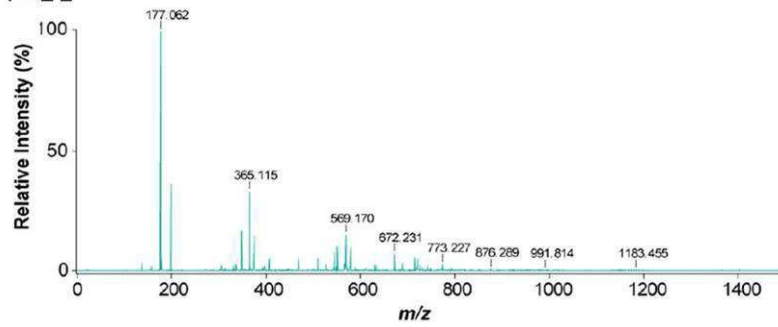


도면8

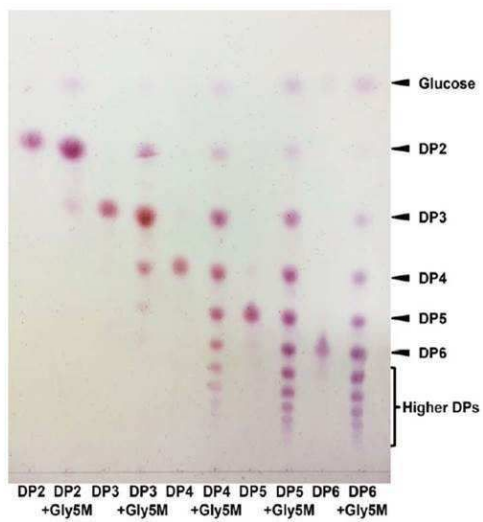
A. 라미나린



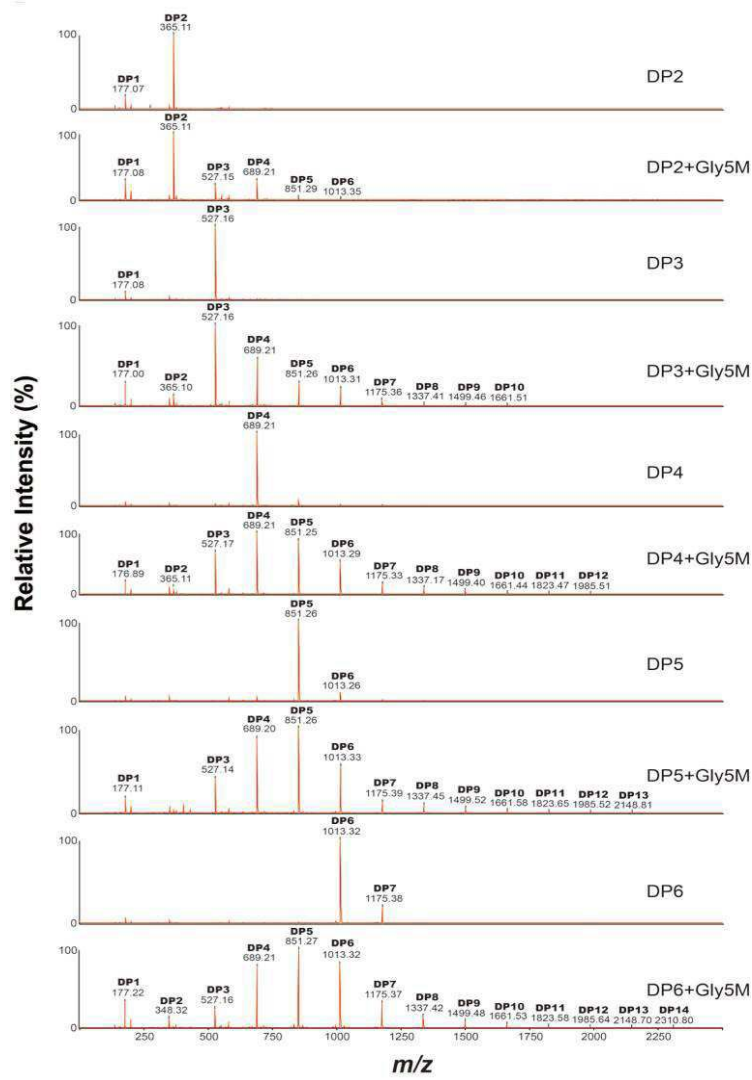
B. 푸스틀란



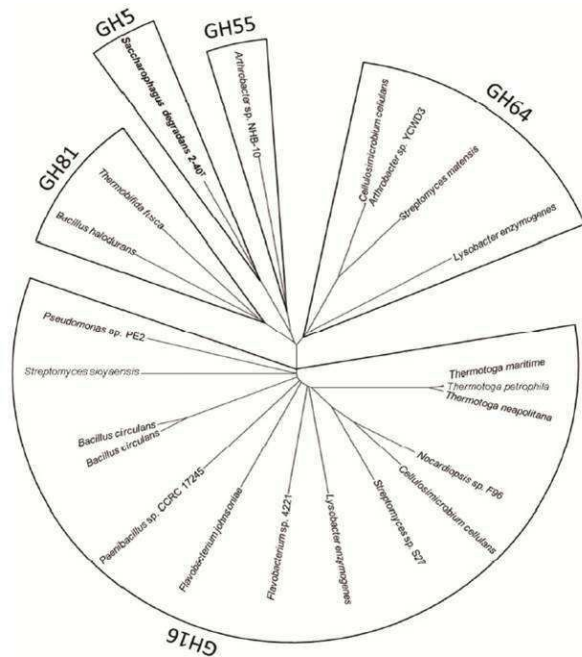
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
- <120> Novel beta-1,3-1,6-endoglucanase for producing oligosaccharides and glucose from beta-glucan
- <130> P16U13C0787
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 869
- <212> PRT
- <213> Saccharophagus degradans 2-40T
- <400> 1

Met Arg Glu Lys Leu Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ser Ala Lys Phe Phe

1 5 10 15

Gly Ala Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Phe Asn Leu Thr Ala Cys Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Ser Gly Thr Lys Pro Val Val Glu Glu Pro Gln Pro Glu

35 40 45

Pro Gln Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu

50 55 60

Pro Glu Pro Glu Pro Gln Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Asp Phe Ser
65 70 75 80
Ala Leu His Thr Asp Gly Thr Lys Trp Val Asn Ala Asn Gly Asp Gln
85 90 95
Val Leu Leu Lys Gly Val Asn Leu Gly Asn Trp Leu Leu Gln Glu Phe
100 105 110
Trp Met Met Glu Gln Gly Ser Glu Asp Val Asn Asp Gln Cys Ser Leu
115 120 125
Glu Ala Val Phe Asp Asp Arg Phe Gly Phe Ala Glu Arg Glu Arg Leu
130 135 140
Met Asp Leu Phe Arg Asp Asn Trp Ile Asn Asp Arg Asp Trp Asp Ile
145 150 155 160
Ile Ala Ser Phe Gly Met Asn Val Ile Arg Leu Pro Phe Ile Trp Asn
165 170 175
Leu Ile Glu Asp Glu Asn Asn Pro Met Thr Leu Arg Asp Asp Ala Trp
180 185 190
Gln Tyr Ile Asp Tyr Ala Ile Glu Gln Ala Glu Ala Arg Asp Met Tyr
195 200 205
Val Ile Leu Asp Leu His Gly Ala Val Gly Ala Gln Gly Trp Glu His
210 215 220
His Ser Gly Cys Ala Glu Leu Asn Glu Tyr Trp Gly Ser Glu Ala Tyr
225 230 235 240
Gln Glu Arg Thr Arg Trp Leu Trp Gln Gln Val Ala Thr Arg Tyr Ala
245 250 255
Asp Arg Asp Ala Val Ala Ala Tyr Gly Val Leu Asn Glu Pro Trp Gly
260 265 270
Thr Thr Pro Glu Asn Leu Ala Val Glu Ala Ile Glu Leu Phe Asp Ala
275 280 285
Ile Arg Glu Val Asp Ala Asp Lys Ile Ile Ile Leu Pro Gly His His
290 295 300
Ser Gly Ile His Ala Tyr Pro Asn Pro Ala Thr Val Asn Gln Thr Asn

305 310 315 320
 Val Ala Tyr Glu Met His Phe Tyr Pro Gly Ile Phe Gly Trp Gly Glu
 325 330 335
 Ile Gly Tyr Asp Val Asn Arg Asp Trp Leu Thr Cys Gly Pro Thr Gly
 340 345 350
 Thr Ser Gly Val Cys Glu Trp Asp Ala Arg Leu Asp Ala Leu Asp Ser
 355 360 365
 Pro Phe Leu Ile Gly Glu Phe Gln Pro Trp Thr Gly Leu Gly Pro Glu
 370 375 380

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

 450 455 460
 Arg Glu Gly Glu Gln Thr Tyr Tyr Leu Val Ile Lys Phe Gly Ala Cys
 465 470 475 480
 Cys Glu Gly Asn Leu Asp Ala Thr Leu Asp Ser Ile Ser Ile Ile Asp
 485 490 495
 Asp Val Thr Gly Glu Glu Ile Ile Val Asn Gly Gly Phe Gly Ala Gly
 500 505 510
 Thr Gly Trp Thr Glu Trp Tyr Glu Ser Ala Met Pro Ile Ile Asp Tyr
 515 520 525

 Asn Tyr Thr Gly Ala Gly Val Pro Thr Gly Ser Asp Gly Ala Val Leu
 530 535 540
 Arg Met Ser Gly Ala Ala Ala Ile Asn Gly Gly Val Tyr Gln Ala Ile
 545 550 555 560
 Thr Leu Asp Ser Ser Lys Ser Tyr Ser Phe Ser Gly Val Phe Lys Asp

565 570 575
 Asn Gly Ser Ala Ser Ala Trp Ala Glu Ile Phe Leu Val Gln Ser Gln
 580 585 590
 Pro Val Asp Gly Ser Asp Val Leu Ala Glu Gly Pro Phe Ala Ala Val

 595 600 605
 Asp Phe Leu Thr Ala Pro Ile Glu Glu Ile Glu Asn Leu Phe Glu Ala
 610 615 620
 Phe Gly Thr Thr Pro Tyr Asp Ile His Glu Glu Met Arg Ala Ala Met
 625 630 635 640
 Thr Ala Glu Thr Ala Pro Thr Leu Phe Asp Leu Pro Gly Ala Pro Thr
 645 650 655
 Gly Val Met Leu Ala Glu Asp Ala Gly Ala Ala Thr Ile Ser Trp Thr
 660 665 670

 Ala Ser Gly Asp Ala Asn Val Thr Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Thr
 675 680 685
 Ile Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Leu Ala Glu Asn Val Thr Ala Thr
 690 695 700
 Thr Phe Val Asp Ser Thr Ile Asp Gly Glu Gln Thr Phe Tyr Tyr Thr
 705 710 715 720
 Val Thr Ala Val Thr Asp Thr Ala Glu Ser Tyr Arg Ser Gln Glu Val
 725 730 735
 Ala Thr Thr Phe Val Ala Val His Leu Pro Gly Lys Val Glu Ala Glu

 740 745 750
 Ala His Ser Asp Met Met Gly Leu Gln Thr Glu Asn Thr Thr Asp Thr
 755 760 765
 Gly Gly Gly Ile Asn Ile Gly Phe Ile Asp Ala Gly Asp Trp Phe Glu
 770 775 780
 Tyr Glu Val Thr Ile Asp Thr Ala Ala Thr Tyr Asn Ile His Tyr Arg
 785 790 795 800
 Leu Ala Ser Glu Pro Gly Ser Thr Gly Phe Thr Val Ser Ile Asn Asp
 805 810 815

Glu Val Leu Asn Thr Val Ala Val Pro Ala Thr Gly Gly Trp Gln Thr
820 825 830
Trp Gln Thr Glu Ser Thr Thr Ile Thr Leu Pro Ala Gly Glu His Thr
835 840 845
Leu Arg Phe Asp Ala Leu Gly Gly Gln Trp Asn Met Asn Trp Trp Ser
850 855 860
Val Glu Ala Val Asp

865

<210> 2

<211> 2610

<212> DNA

<213> Saccharophagus degradans 2-40T

<400> 2

atgagagaaa aactactgcg cgcactgtta acaagcgcca agttctttgg ggcgagctta 60

ctactgctta gcctatttaa ccttaccgcc tgtggcggag gctccagcgg cactaagccc 120

gtagtggaag agccacagcc agaaccgcag ccagaaccag aacctgaacc ggagccagaa 180

cctgaaccgg agccagaacc agaaccgcag ccagaaccag aaccagagcc cgacttctcg 240

gccctacata ccgatggcac taaatgggtt aacgccaatg gcgaccaagt gttgttaaaa 300

ggtgtgaacc tgggcaactg gctattgcaa gagttttgga tgatggagca aggctctgag 360

gatgtgaatg atcaatgctc cctcgaagct gtttttgacg accgctttgg ctttgcctgag 420

cgcgagcgtc ttatggatct gttccgcgat aattggataa acgatcgca ctgggacatt 480

atgcctcgt tcggtatgaa cgttattcgc ctgccgttta tttggaacct aatagaagac 540

gaaaacaacc ccatgacact gcgtgacgat gcgtggcagt acattgatta cgccattgag 600

caggccaag cccgcgacat gtatgtaatt ttagatttgc acggtgccgt aggggcacaa 660

gggtgggagc atcacagtgg ctgtgctgag cttaatgaat actggggtag cgaagcttac 720

caagagcgta cgcgctgggt gtggcagcaa gtggctacac gctatgccga ccgacgca 780

gtagcggctt acggcgtgct aaacgagccg tggggcacca caccagaaaa cctcgcagta 840

gaagccatcg aattattcga tgctattcgc gaagtggatg ccgacaaaat aattatttta 900

ccagggcacc actcaggtat tcacgcgtac cctaaccctg caactgtaaa ccaaaccaat 960

gttgcttacg aaatgcactt ttaccccggt atttttggtt ggggtgaaat aggctacgac 1020

gtaaaccgag acttggttaac ctgtggccca acgggcacca gcggcgtgtg cgaatgggat 1080

gcgcgcttag atgcattaga ttccccgttt ttaattggtg aatttcaacc gtggacaggc 1140

ctaggcccg aacttggtgc gcaaattaca cgtgccactt acgataccta cgcgagtttc	1200
gattgggcat ctacggcgtg gtcttataaaa attattacca gtggcggcgg tcaagtggt	1260
ggcacatggg gcatggtaac aaacgagcgc ggttttaggtt tattggccaa agccgatact	1320
tgggcctgtg ccggttggga tagcagcttt gccaacgcat gtggtgtaag tcgcaccggt	1380
tttaccccc atagagaagg cgagcaaacc tactatttag tgattaaatt cggcgctgt	1440
tgcaaggta acctcgatgc aacattagat agcatcagca ttatcgacga tgtaaccggc	1500
gaagaaataa ttgtgaatgg cggctttgtt gctggtagcg gttggaccga gtggtacgaa	1560
agtgcaatgc ccattatcga ttacaactac accggtgcag gtgtgcctac gggtagcgat	1620
ggcgcggtgt tacgcatgag tgggtctgca gccattaacg gcggcgtgta ccaagctata	1680
acgttagatt ccagcaaaag ctatagcttc tctggtgtat ttaaagataa cggcagtgca	1740
agtgcatggg cagaaatatt cttagtgcga agccagccgg ttgatggcag cgatgtatta	1800
gccgaaggcc catttgccgc ggtagatttt ttaaccgcac cgatagaaga aatagaaaat	1860
ctatttgaag ctttggcac taccctgtac gacattcacg aagaaatgcg tgcagccatg	1920
accgcgaaa cagcgccaac cttgtttgac ctgcccggcg cacctaccgg cgtaatgcta	1980
gccgaagatg caggcgcagc aacaataagi tggaccgcaa gcggcgatgc caacgtgact	2040
ggctacaatg ttatcgctc aacaatttct ggcaacagct atacctgtt agctgaaaat	2100
gtaacagcta ccaccttctt ggatagcacc atagatggcg agcaaaactt ctattacacc	2160
gtaacggctg taacagacac ggcagaaagc tatcgagcc aagaggtagc cactaccttt	2220
gtagccgtgc atttacctgg caaagtagaa gcagaagctc atagcgatat gatgggctta	2280
caaaccgaaa aactaccga taccggcggc ggtattaata ttggctttat agatgccggc	2340
gattggtttg aatacgaagt aacaatcgat accgcggcga cctataacat ccactaccgc	2400
ttagcgagtg agccgggcag cacaggcttt accgtatcta taaatgatga agtgctaaat	2460
accgttgccg taccgctac aggcggttgg caaacatggc aaaccgaaag tacaactatc	2520
accttaccg ccggcgaaca cacattgcgc ttgatgcat tgggtggcca gtggaatatg	2580
aattggtgga gtgtgaagc agttgactag	2610