



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0025790
(43) 공개일자 2017년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/81 (2006.01) C12N 9/92 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/81 (2013.01)
C12N 9/92 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0122746
(22) 출원일자 2015년08월31일
심사청구일자 2015년08월31일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
구자룡
충청남도 보령시 용천읍 외성1길 19
김세경
인천광역시 남동구 만수로75번길 85, 6-1005 (만수동, 신동아아파트)
윤현식
인천광역시 남구 인하로 100 인하대학교
(74) 대리인
김순웅

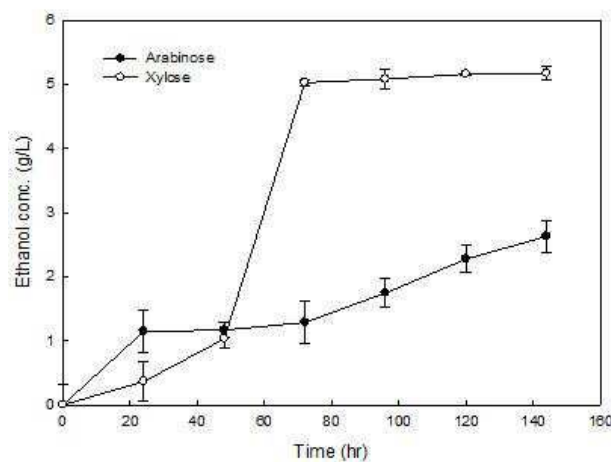
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **오탄당을 이용할 수 있는 재조합 미생물 및 이를 이용한 바이오에탄올의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 오탄당을 이용하여 에탄올을 생산할 수 있는 재조합 미생물 및 이를 이용한 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 재조합 미생물은 통상 탄소원으로 이용할 수 없는 오탄당을 탄소원으로 하여 바이오에탄올을 생산할 수 있으므로 다양한 바이오리파이너리 및 바이오에너지의 분야에 적용 가능한 원천 기술로서 산업 원료 수입 절감에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12P 7/06 (2013.01)

C12Y 503/01005 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A2044388

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 혼합당으로부터 지방산 에틸 에스터 생산

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)를 코딩하는 유전자가 도입된, 오타당 이용 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물은 효모인 것을 특징으로 하는, 오타당 이용 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)를 코딩하는 유전자는 *iolI* 유전자인 것을 특징으로 하는, 오타당 이용 미생물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 *iolI* 유전자는 *Lactobacillus rhamnosus* GG 유래인 것을 특징으로 하는, 오타당 이용 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 미생물은 오타당을 이용하여 바이오에탄올을 생산하는 것을 특징으로 하는, 오타당 이용 미생물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 오타당은 자일로오스(xylose), 아라비노오스(arabinose), 리보오스(ribose) 및 리불로오스(ribulose)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 오타당 이용 미생물.

청구항 7

효모에 *iolI* 유전자를 도입하는 단계를 포함하는, 오타당 이용 효모의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 균주인 것을 특징으로 하는, 오타당 이용 효모의 제조방법.

청구항 9

제1항의 오타당 이용 미생물을 오타당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 바이오에탄올의 생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 오타당은 자일로오스(xylose), 아라비노오스(arabinose), 리보오스(ribose) 및 리불로오스(ribulose)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 바이오에탄올의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오타당을 이용하여 에탄올을 생산할 수 있는 재조합 미생물 및 이를 이용한 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 유지되는 화석연료 기반 산업의 대안으로 바이오리파이너리가 제시되고 있다. 미국 에너지 정보국의 조사 결과, 한국은 OECD 국가들 중에서 멕시코(2.1%)에 이어 두 번째로 높은 CO₂ 배출 연평균 증가율(1.7%)이 예측되었다(2005~2030년 OECD 연평균 증가율 0.5%). 화석연료 고갈, 유가 상승, 기온상승과 기후변화 등이 국가안전보장과 국가성장전략 차원의 정책을 유도하고 있어, 신재생 에너지 사업과 같은 환경친화적 전략이 요구된다.

[0003] 바이오리파이너리는 바이오매스로부터 재생가능한 연료, 전력 및 화합물을 생산하기 위한 바이오매스 전환 공정과 장치를 아우르는 표현이다. 이를 위한 바이오매스의 원료물질은 전분질계 자원과 목질계 자원, 당질계 자원 등이 있다. 이중 목질계 자원인 바이오매스는 막대한 자원량과 함께 저장성 및 대체성이 용이한 장점이 있는 반면 목질계 자원의 주요성분은 리그노셀룰로오스(lignocellulose)를 물리화학적 방법이나 특정효소에 의하여 사용 가능한 오타당을 생산하는 분해과정을 거쳐야 하는 단점이 있다. 자연계에서 자일로오스(xylose), 아라비노오스(arabinose) 등의 오타당을 이용하는 박테리아나 효모는 많이 알려지지 않았으며, 최근 *Pichia stipites* 등의 XR(Xylose Reductase), XDH(Xylulose Dehydrogenase)에 대한 연구가 이루어지고 있을 뿐이다. 최근에는 홍조류를 바이오매스로 이용한 바이오 에너지 생성에 관한 연구도 활발히 진행되고 있으나 해조류의 주성분인 갈락탄(galactan), 즉 갈락토오스(galactose)의 중합체를 기질로 이용할 수 있는 균주는 거의 없다. 따라서 바이오매스로부터 바이오리파이너리 기술을 이용하여 유용한 화학원료물질을 생산하고 바이오매스 선택의 다양성을 위해 자일로오스, 아라비노오스 등의 대사에 관련된 효소와 그 메커니즘을 이해하고 효소반응이 효율적으로 이루어지도록 하는 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이에 본 발명자들은 오타당을 이용할 수 있는 균주 개발에 대한 연구를 수행한 결과, 단일 유전자 도입을 통해 오타당을 이용할 수 있는 균주를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0005] 본 발명의 목적은 자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)를 코딩하는 유전자가 도입된 오타당 이용 미생물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또다른 목적은 효모에 *iolI* 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 오타당 이용 효모의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또다른 목적은 상기 오타당 이용 미생물을 오타당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 바이오에탄올의 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)를 코딩하는 유전자가 도입된 오탄당 이용 미생물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 효모에 *iolI* 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 오탄당 이용 효모의 제조방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 오탄당 이용 미생물을 오탄당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 바이오에탄올의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따른 재조합 미생물은 통상 탄소원으로 이용할 수 없는 오탄당을 탄소원으로 하여 바이오에탄올을 생산할 수 있으므로 다양한 바이오리파이너리 및 바이오에너지의 분야에 적용 가능한 원천 기술로서 산업 원료 수입 절감에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 자일로오스 및 아라비노오스를 포함하는 배지에서 재조합 효모의 성장을 OD 측정을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 재조합 효모에 의해 이용되는 아라비노오스 및 자일로오스의 양을 나타낸 도이다.
- 도 3은 재조합 효모에 의해 생산되는 바이오에탄올의 양을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0014] 본 발명은 자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)를 코딩하는 유전자가 도입된 오탄당 이용 미생물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 미생물은 육안으로 확인할 수 없는 0.1mm 이하의 크기인 미세한 생물로서 통상 오탄당을 탄소원으로 이용할 수 없는 미생물을 제한없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)일 수 있다. 효모는 다른 미생물에 비해 세포분리가 쉽고 인체 안정성이 보장되는 장점이 있다.
- [0016] 본 발명에서 "자일로오스 아이소머레이즈(xylose isomerase)"는 자일로오스(알도오스)와 자일룰로오스(케토오스) 사이의 이성질화 반응을 촉매하는 효소를 의미한다. 본 발명의 일실시예에서 *Lactobacillus rhamnosus* GG(*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 균주)에서 분리한 자일로오스 아이소머레이즈 유전자인 *iolI*(Xylose isomerase domain-containing protein 2-keto-myo-inositol isomerase) 유전자를 사용하였으며, 바람직하게는 서열목록 1의 염기서열로 나타낼 수 있으며, 서열목록 2의 아미노산 서열로 전사된다. 본 발명의 유산균 유래 *iolI* 유전자를 미생물에 도입하면 통상적으로 XR(Xylose Reductase) 및 XDH(Xylose Dehydrogenase)를 통해야 하는 에탄올 생산 과정을 자일로오스 아이소머레이즈만으로 가능하게 한다는 장점이 있다. 특히, 본 발명의 *Lactobacillus rhamnosus* GG 균주 유래의 *iolI* 유전자를 도입하는 경우 다른 유산균의 자일로오스 아이소머레이즈보다 바이오에탄올 생산 효과가 뛰어나다.
- [0017] 본 발명에서 오탄당(pentose)은 탄소원자 5개를 가진 단당류의 총칭으로서, 리보오스(ribose), 아라비노오스(arabinose), 자일로오스(xylose), 리불로오스(ribulose) 등이 있다. 천연으로 동식물계에 널리 분포하는 것은 D-리보오스, D,L-아라비노오스, D-자일로오스 등이다. 통상적으로 오탄당은 육탄당과 달리 효모에 의해 발효되지 않는 특징이 있다. 본 발명에서 오탄당은 자일로오스(xylose), 아라비노오스(arabinose), 리보오스(ribose) 및 리불로오스(ribulose)로 이루어진 군에서 선택된 1종을 포함하고, 본 발명의 일실시예에서는 재조합 효모의 탄소원으로서 자일로오스, 아라비노오스 또는 이의 혼합물을 사용하였으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명에서 용어 "오탄당 이용"은 재조합 미생물이 오탄당을 탄소원으로 소비하여 대사 산물을 생산하는 것을 의미한다.
- [0019] 본 발명에 따른 재조합 효모는 오탄당을 탄소원으로 하여 에탄올을 생산할 수 있으므로 바이오에너지 및 바이오리파이너리 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

- [0020] 또한, 본 발명은 효모에 *iolI* 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 오타당 이용 효모의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명에서 상기 효모는 당업자에게 공지된 효모 균주를 제한 없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 균주일 수 있다.
- [0022] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 오타당 이용 효모의 제조방법은 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 균주에서 *iolI* 유전자를 분리하는 단계, 이를 증폭시켜 벡터에 클로닝하는 단계, 재조합 벡터를 숙주 세포에 형질전환시키는 단계, 플라스미드 DNA를 효모에 형질전환시키는 단계를 포함한다. 상기 벡터는 효모에 형질전환시킬 수 있는 당업계에 공지된 벡터를 제한 없이 포함하나, 바람직하게는 YCplac33 벡터일 수 있다. 상기 숙주 세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포인 *E. coli*, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움, 세라티마 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있고, 진핵 세포 또한 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 벡터의 숙주 세포 내로의 도입은 당업계에 널리 알려진 삽입 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, CaCl_2 방법, 전기천공법, 리튬 아세테이트 방법, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 바람직하게는 CaCl_2 방법, 리튬 아세테이트 방법, 전기천공법을 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 재조합 효모는 오타당을 발효시켜 바이오에탄올을 생산할 수 있는 특징이 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 오타당 이용 미생물을 오타당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 바이오에탄올의 생산방법을 제공한다.
- [0025] 상기 오타당은 자일로오스(xylose), 아라비노오스(arabinose), 리보오스(ribose) 및 리불로오스(ribulose)로 이루어진 군에서 선택된 1종을 포함한다.
- [0026] 본 발명에 따른 바이오에탄올의 생산방법에 의하면 90시간 이내로 20g/L의 자일로오스를 탄소원으로 하여 0.258g/g의 높은 수율로 바이오에탄올을 생산할 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0028] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] **실시예 1 - 재조합 미생물의 제조**
- [0030] 오타당을 이용하여 바이오에탄올을 생산할 수 있는 재조합 미생물을 제조하기 위하여 하기와 같이 수행하였다. *Lactobacillus rhamnosus* GG 균주(*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 균주)에서 자일로오스 아이소머레이즈인 *iolI* 유전자(Xylose isomerase domain-containing protein 2-keto-myo-inositol isomerase)를 분리하였고 이를 PCR 기법으로 증폭한 후, PCR 생성물을 PCR purification 키트를 이용하여 정제하였다. 정제한 *iolI* 유전자를 YCplac33 벡터에 삽입하여 형질전환용 재조합 벡터를 제조하였다. 이후 CaCl_2 방법을 이용하여 *E. coli* XL1-blue에 상기 재조합 벡터를 형질전환시켰다. 형질전환시킨 *E. coli*에서 plasmid miniprep 키트를 이용하여 플라스미드 DNA를 정제하였다.
- [0031] EUROSCARF(EUROpean *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis)에서 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 균주를 입수하였다. 상기 정제된 플라스미드 DNA를 리튬 아세테이트 방법 및 전기천공법(Bio-rad, CA, US)을 병행하여 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 균주에 형질전환시켜 재조합 효모를 제조하였으며 이후 실시예에 사용하였다.

[0032] 실시예 2 - 재조합 미생물의 오타당 이용 확인

[0033] 상기 실시예 1에서 제조한 재조합 효모가 오타당을 이용하는 능력이 있는지 확인하기 위하여 재조합 효모와 함께 배양될 경우 오타당의 농도 변화를 측정하였다.

[0034] 먼저, 배양 시작시의 OD를 0.5로 하고 30℃에서 200rpm의 조건으로 전배양하였다. 전배양은 호기 상태에서 YPD 배지를 이용해 수행하였으며, 초기 정제 단계까지 배양한 후 증류수로 세척했다. 재조합 효모를 YPX 배지에 접종하였고 1 mM의 IPTG로 유전자 발현을 유도하였다. 이후의 배양은 혐기 상태로 수행하였다. 전배양 및 이후의 배양을 140시간동안 수행하였으며, 20시간마다 배지 내의 자일로오스 및 아라비노오스의 농도와 OD를 측정하여 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0035] 도 1에 나타난 바와 같이 재조합 효모는 유전자 도입 이후에도 오타당을 포함하는 배지에서 잘 성장하였음을 확인하였다. 또한 도 2에 나타난 바와 같이 자일로오스 및 아라비노오스의 농도가 시간에 따라 감소함을 확인하였으며, 이는 재조합 미생물이 에탄올 생산에 자일로오스 및 아라비노오스를 탄소원으로 이용함을 의미한다. 특히 자일로오스의 경우 88시간만에 20g/L의 자일로오스가 모두 소비됨을 확인하였다. 따라서 효모에 도입된 *iolI* 유전자가 효모 시스템에서 작동가능하며 한 종류의 유전자의 도입으로 자일로오스 및 아라비노오스 모두를 이용할 수 있음을 확인하였다.

[0036] 실시예 3 - 생산된 바이오에탄올의 확인

[0037] 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 배양하며 20시간마다 생산되는 바이오에탄올의 양을 측정하였고, 자일로오스 및 아라비노오스로부터 전환된 에탄올의 농도를 도 3에 나타내었다.

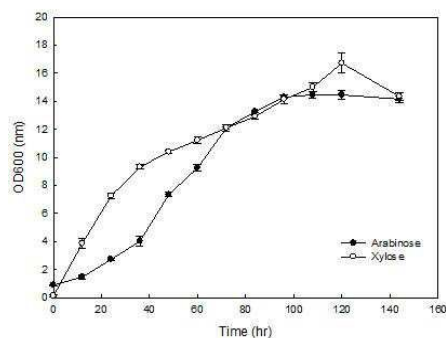
[0038] 도 3에 나타난 바와 같이, 자일로오스 및 아라비노오스 모두로부터 에탄올이 생산됨을 확인하였고 특히 자일로오스의 경우 재조합 미생물이 20g/L의 자일로오스를 전부 이용하여 5.16g/L의 에탄올을 생산하였으므로 수율이 0.258g/g임을 확인하였다.

[0039] 따라서, 상기 실시예 2에서 이용된 것으로 확인한 자일로오스 및 아라비노오스가 에탄올로 전환되었으며, 오타당을 이용하여 에탄올을 생산하지 못하는 효모에 *iolI* 유전자를 도입하여 오타당을 이용한 바이오에탄올의 생산이 가능한 효과를 나타낸다.

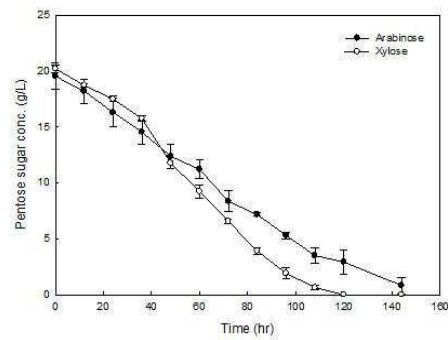
[0040] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

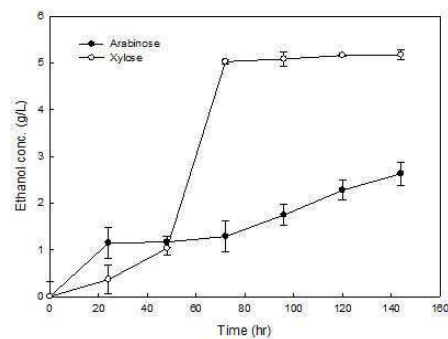
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110>	INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE	
<120>	Recombinant microorganism using pentose and method for producing bioethanol using the same	
<130>	1-166P	
<160>	2	
<170>	Kopatent In 2.0	
<210>	1	
<211>	888	
<212>	DNA	
<213>	Lactobacillus rhamnosus GG	
<400>	1	
	atggggatag aactgacaca aatggctttg aatcgaaaaa ttgctcagaa gcggccactg	60
	gaaaactttt ttcaattagc cgaagctgct ggcatcctac aagtcgagtt acgcaatgat	120
	atgaccactt ctgatggctc agagactgtc attgatggca tgcaggttgc agaatttcag	180

acgttaaagc aaaaatacga cctgcagatt ttaacgatta atgcgattca gcaattcaat 240
aatccagcca aattaacaa aaatcgcat cttttgacca aactggcgga attgtcggcg 300
caaattggca atcaggcgat tatctttgta ccggaagtta acgcacagga caagcgaacc 360
gagcaacagc gacttgatga tgccgttagc agtttacagg tgtttgggga cattctgtct 420
gcttatcatt tgacgggatt cattgaaccg ttgggcttta gggccagcac aatgcggtat 480
ccgtggacag cgtcggacgc cattaattta tctggccgga ccgagtttaa gctgacgatt 540
gatacgtttc atttcttctt ggcacatcia acagccgaac aattcaaagc aggtgttgat 600

attaaccgcg ttggattaat tcatctgtcg ggaattgagc cgatccacgc attgcgagaa 660
gttgtggatg aagatcgcat tctgattacc gagcgggata tcatgcaaaa cattgagcag 720
gttcatttgt ttgaggcaat gggttatcgg ggccattatt catttgagcc attttcaagc 780
cggttggcag ccgaaaccaa ccagcaactt actcagcaga tattagcaag tattgaacgg 840
ttgaatcagc caactgcagt gtttagtacg gaggtgacgc aaccatga 888

<210> 2

<211> 295

<212> PRT

<213> Lactobacillus rhamnosus GG

<400> 2

Met Gly Ile Glu Leu Thr Gln Met Ala Leu Asn Arg Lys Ile Ala Gln

1	5	10	15
Lys	Arg	Pro	Leu
Glu	Asn	Phe	Phe
Gln	Leu	Ala	Glu
Ala	Ala	Gly	Ile
20	25	30	
His	Gln	Val	Glu
Leu	Arg	Asn	Asp
Met	Thr	Thr	Ser
Asp	Gly	Ser	Glu
35	40	45	
Thr	Val	Ile	Asp
Gly	Met	Gln	Val
Ala	Glu	Phe	Gln
Thr	Leu	Lys	Gln
50	55	60	
Lys	Tyr	Asp	Leu
Gln	Ile	Leu	Thr
Ile	Asn	Ala	Ile
Gln	Gln	Phe	Asn
65	70	75	80

Asn	Pro	Ala	Lys	Leu	Asn	Lys	Asn	Arg	Asp	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Ala
85	90	95													
Glu	Leu	Ser	Ala	Gln	Ile	Gly	Asn	Gln	Ala	Ile	Ile	Phe	Val	Pro	Glu
100	105	110													
Val	Asn	Ala	Gln	Asp	Lys	Arg	Thr	Glu	Gln	Gln	Arg	Leu	Asp	Asp	Ala

115 120 125
 Val Ser Ser Leu Gln Val Phe Gly Asp Ile Leu Ser Ala Tyr His Leu
 130 135 140
 Thr Gly Phe Ile Glu Pro Leu Gly Phe Arg Ala Ser Thr Met Arg Tyr

 145 150 155 160
 Pro Trp Thr Ala Leu Asp Ala Ile Asn Leu Ser Gly Arg Thr Glu Phe
 165 170 175
 Lys Leu Thr Ile Asp Thr Phe His Phe Phe Leu Ala His Leu Thr Ala
 180 185 190
 Glu Gln Phe Lys Ala Gly Val Asp Ile Asn Arg Val Gly Leu Ile His
 195 200 205
 Leu Ser Gly Ile Glu Pro Ile His Ala Leu Arg Glu Val Val Asp Glu
 210 215 220

 Asp Arg Ile Leu Ile Thr Glu Arg Asp Ile Met Gln Asn Ile Glu Gln
 225 230 235 240
 Val His Leu Phe Glu Ala Met Gly Tyr Arg Gly His Tyr Ser Phe Glu
 245 250 255
 Pro Phe Ser Ser Arg Leu Ala Ala Glu Thr Asn Gln Gln Leu Thr Gln
 260 265 270
 Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Arg Leu Asn Gln Pro Thr Ala Val Phe
 275 280 285
 Ser Thr Glu Val Thr Gln Pro

 290 295