



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0018581
(43) 공개일자 2019년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/26 (2006.01) C12N 9/44 (2006.01)
C12P 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/2414 (2013.01)
C12N 9/2457 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0102987
(22) 출원일자 2017년08월14일
심사청구일자 2017년08월14일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박천석
경기도 남양주시 와부읍 덕소로116번길 49 106동 1303호 (현대홈타운아파트)
정동현
경기도 수원시 영통구 덕영대로1681번길 13 203호 (영통동)
안유경
경기도 용인시 기흥구 용구대로2518번길 15 신촌마을 포스홈타운 204동 1702호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 12 항

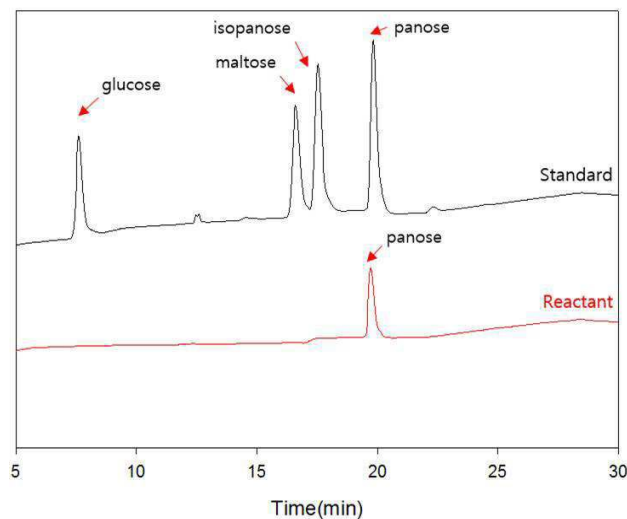
(54) 발명의 명칭 루미노코커스 브로미 유래 풀루란 분해 효소 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*) 유래 풀루란(pullulan) 분해 효소 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제(α -amylase) 단백질을 포함하는 판노스(panose) 제조용 조성물, 상기 조성물을 이용한 판노스의 제조방법 및 풀루란을 판노스로 분해하는 활성을 가진 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제에 관한 것이다.

본 발명의 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제는 풀루란으로부터 다른 부산물 없이 판노스만을 생성하므로, 판노스 제조에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12P 19/00 (2013.01)

C12Y 302/01001 (2013.01)

C12Y 302/01041 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*) 유래 α -아밀라아제(α -amylase) 단백질을 포함하는, 판노스(panose) 제조용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질은 풀루라나아제(pullulanase) 활성을 가지는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 판노스 제조용 조성물은 상기 단백질을 생산하는 미생물; 상기 미생물의 배양액; 상기 미생물 또는 상기 배양액의 파쇄물; 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*) 유래 α -아밀라아제(α -amylase) 단백질을 풀루란(pullulan)과 반응시키는 단계를 포함하는, 판노스(panose)의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 반응은 pH 4.5 내지 7.5에서 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 반응은 30 내지 50℃에서 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 반응은 1 내지 5시간 동안 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 9

풀루란(pullulan)을 판노스(panose)로 분해하는 활성을 가진, 루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*) 유래 α -아밀라아제(α -amylase).

청구항 10

제9항의 유래 α -아밀라아제(α -amylase)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 12

제11항의 발현 벡터를 포함하는, 인간을 제외한 형질전환체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*) 유래 풀루란(pullulan) 분해 효소 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제(α -amylase) 단백질을 포함하는 판노스(panose) 제조용 조성물, 상기 단백질을 이용한 판노스의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 판노스(panose)는 세 개의 글루코스 잔기로 구성된 삼당류의 탄수화물로서, 다양한 용도로 사용될 수 있다. 그 예로, 살모넬라나 대장균과 같은 유해균의 대사를 저해시키고, 장내 유익균인 비피도박테리아(*Bifidobacterium*) 및 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 미생물의 성장을 증진시키는 프리바이오틱스(prebiotics)로서 사용될 수 있다. 또한, 탄수화물이지만 스트렙토코커스 뮤턴스(*Streptococcus mutans*)와 같은 구강 내 세균에 의해 대사되지 않아 충치 예방에도 사용될 수 있음이 보고된 바 있다(Microbiol Immunol. 1988;32(1):25-31.). 이러한 약학적 기능 외에도, 식품학적 기능으로서 감미료로 사용될 수 있으며, 식품의 색 변화를 방지하는 기능이 있어, 식품 및 음료 산업에서 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

[0003] 한편, 효소를 이용한 판노스의 생산 방법으로는, 아우레오바시디움(*Aureobasidium*) 또는 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속 유래의 글루코실트랜스퍼레이스(glucosyltransferase, EC 2.4)를 이용해 말토스(maltose)를 기질로써 당을 전이시켜 생합성하는 방법; 텍스트란수크레이스(dextranase, EC 2.4.1.5)를 이용해 말토스와 수크로스(sucrose)를 기질로 판노스와 프럭토스(fructose)를 생성물로 얻어내는 방법; 또는 네오펠룰라네이스(Neopullulanase, EC 3.2.1.135)를 이용한 풀루란(pullulan)으로부터 판노스를 생산하는 방법; 및 오레오바시디움(*Aureobasidium*) 속 미생물을 이용하여 판노스를 생산하는 방법(일본 공개특허공보 제1996-023989호) 등이 개발된 바 있다. 그러나, 공지된 상기의 방법들은 이소말토스(isomaltose), 프럭토스, 글루코스(glucose), 말토스 등의 부산물이 판노스와 함께 생산되는 단점이 있었다.

[0004] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 부산물 없이 판노스를 생산하는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*) 유래 α -아밀라아제는 풀루란을 분해하여 다른 부산물 없이 판노스만을 고순도로 생성함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 하나의 목적은 루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*) 유래 α -아밀라아제(α -amylase) 단백질을 포함하는, 판노스(panose) 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 하나의 목적은 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 풀루란(pullulan)과 반응시키는 단계를 포함하는, 판노스의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 풀루란을 판노스로 분해하는 활성을 가진, 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 하나의 양태는 루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*) 유래 α -아밀라아제(α -amylase) 단백질을 포함하는, 판노스(panose) 제조용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명에서는, 루미노코커스 브로미 유래의 α -아밀라아제 단백질은 풀루란(pullulan)을 분해하는 풀루라나아제(pullulanase) 활성을 통해 다른 부산물 없이 판노스만을 고순도로 생성함을 확인하였다.

[0011] 본 발명의 용어, "루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*)"는 루미노코커스 속에 속하는, 혐기성 및 그람 양성 세균을 의미한다. 그러나, 루미노코커스 브로미 유래의 α -아밀라아제가 풀루란을 분해하여 판노스를 생산할 수 있음에 대해서는 공지된 바 없으며, 본 발명은 상기 루미노코커스 브로미 유래의 α -아밀라아제가 풀루란을 분해하여 부산물의 생산 없이 판노스만을 생산할 수 있음을 확인한 것에 그 특징이 있다.

- [0012] 본 발명의 용어, "판노스(panose)"는 화학식 $C_{18}H_{32}O_{16}$ 으로서, 세 개의 글루코스 잔기로 구성된 삼당류의 탄수화물을 의미한다. 글루코스 3분자가 α -1, 4 및 α -1, 6 글루코시드 결합을 통해 결합되어 있다. 판노스는 다양한 용도로 사용될 수 있는데, 그 예로 프리바이오틱스, 식품 첨가물, 또는 충치 예방 용도 등으로 사용되고 있다.
- [0013] 본 발명의 용어, " α -아밀라아제(α -amylase)"는 아밀라아제의 일종으로, 일반적으로는 아밀로스, 아밀로펙틴을 안쪽에서 가수분해하는 엔도형의 효소를 의미하며, 주로 텍스트린을 생성한다. 생성당의 환원잔기가 α -피라노오스형이기 때문에 α -아밀라아제로 명명된다. 본 발명에서, α -아밀라아제는 루미노코커스 브로미 유래이며, α -글루코시다아제(α -glucosidase) 활성을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 상기 루미노코커스 브로미 유래의 α -아밀라아제는 'Amy 5'와 혼용되어 명명될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 목적상, 상기 α -아밀라아제는 풀루라나아제(pullulanase) 활성, 구체적으로 풀루란을 판노스로 분해하는 활성을 가지는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 용어, "풀루라나아제(pullulanase)"는 풀루란 분해 효소 활성을 가지는 단백질로서, 풀루란의 α -1,4; 또는 α -1,6 글리코시드 결합을 특이적으로 가수분해하여 말토트리오스를 생성하는 효소를 의미한다. 구체적인 예로, 타입 I 풀루라나아제(pullulanase; pullulan 6-glucanohydrolase), 타입 II 풀루라나아제 등이 알려져 있다.
- [0017] 본 발명의 용어, "풀루란(pullulan)"은 α -1,4-; 또는 α -1,6-글루칸(glucan)으로도 알려진 말토트리오스(maltotriose) 단위로 구성된 다당 중합체를 의미한다. 말토트리오스 3개의 글루코스(glucose) 단위는 α -1,4 글리코시드 결합(glycosidic bond)으로 연결되어 있으며, 연속적인 말토트리오스 단위는 α -1,6 글리코시드 결합으로 연결되어 있다. 풀루란은 흑효모(*Aureobasidium pullulans* (DE BARY) ARN.)로부터 생산한 다당류를 분리 및 정제하여 얻어지는 물질로서, 일반적으로 식품의 물성, 촉감 또는 감미도를 향상시키기 위한 식품첨가물로서 사용되고 있다.
- [0018] 본 발명에서, 상기 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 이용되는 서열은 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, "실질적인 동일성"은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(aligned)하고, 당 업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [0020] 상기 "상동성"은 두 개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 모이티 사이의 동일성의 퍼센트를 말한다. 하나의 모이티로부터 다른 하나의 모이티까지의 서열 간 상동성은 알려진 당해 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 상동성은 서열정보를 정렬하고 용이하게 입수 가능한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 두 개의 폴리뉴클레오타이드 분자 또는 두 개의 폴리펩타이드 분자 간의 서열 정보를 직접 정렬하여 결정될 수 있다. 상기 컴퓨터 프로그램은 BLAST(NCBI), CLC Main Workbench(CLC bio), MegAlignTM(DNASTAR Inc) 등일 수 있으나, 상동성을 결정할 수 있는 프로그램이라면 제한 없이 이용할 수 있다.
- [0021] 따라서, 본 발명에 따른 서열번호 1로 표시되는 서열과 높은 상동성을 갖는 서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상, 더더욱 구체적으로 95% 이상의 높은 상동성을 갖는 서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [0022] 본 발명의 판노스 제조용 조성물은 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 생산하는 미생물; 상기 미생물의 배양액; 상기 미생물 또는 상기 배양액의 파쇄물; 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 단백질을 생산하는 미생물은 본 발명의 α -아밀라아제를 내재적으로 생산하거나, 풀루란을 판노스로 분해하는 활성이 내재적 활성에 비해 강화되도록 변형된 미생물을 의미한다.
- [0024] 상기 "배양액"은 상기 미생물의 생육을 위하여 사용하는 영양물질로서, 상기 α -아밀라아제 단백질을 포함하는 한 이에 제한되지 않지만, 상기 단백질을 생산하는 미생물, 상기 미생물을 포함하는 배양액(culture medium) 또는 상기 미생물을 포함하는 배양 여액(cultural filtrate)을 모두 포함한다.
- [0025] 상기 배양액은 당 업계에 알려진 배양액을 사용할 수 있으며, 루미노코커스 브로미를 배양할 수 있다면 특별히 이에 제한되지 않으나, C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, B, 및 Mo 등의 무기 영양소; 탄수화물, 식물생장 조절물질, 비타민 등의 유기 영양소; 미오-이노시톨, 글라이신, L-글루타민 등의 아미노산류; 글루코

스, 프럭토스, 만노스, 리보오스, 자일로스, 수크로스, 멜리비오스, 셀로비오스, 락토오스, 아밀로스, 탄수화물, 라피노스, 소르비톨, 만니톨, 글리세롤 등의 탄소원이 첨가되거나, 또는 첨가되지 않은 것을 사용할 수 있다.

- [0026] 상기 "과쇄물"은 공지된 모든 방법에 의해 상기 미생물, 그의 배양물 등을 과쇄한 결과물을 의미한다.
- [0027] 상기 미생물은 풀루라나아제 활성을 가지는 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 포함하고 있으므로, 상기 미생물의 배양액, 또는 상기 미생물 또는 상기 배양액의 과쇄물도 상기 α -아밀라아제 단백질을 포함하고 풀루라나아제 활성을 가지는 것은 자명하다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제와 풀루란을 반응시킨 결과, 이의 반응 산물에는 글루코스, 말토스, 이소말토스 등의 부산물이 존재하지 않고, 판노스만이 존재함을 확인하였다(도 6).
- [0029] 이는, 상기 루미노코커스 브로미 유래의 α -아밀라아제를 포함하는 본 발명의 조성물은 판노스의 제조에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0030] 다른 하나의 양태는 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 풀루란과 반응시키는 단계를 포함하는, 판노스의 제조방법을 제공한다.
- [0031] 이때, 상기 "루미노코커스 브로미", " α -아밀라아제", "풀루란" 및 "판노스"의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0032] 본 발명에서, 상기 반응은 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질이 풀루라나아제 활성을 가지는 조건에서 수행될 수 있다.
- [0033] 구체적으로, 상기 반응은 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질이 풀루라나아제 활성을 가지는 한 이에 제한되지 않으나, pH 조건으로는 pH 4.5 내지 7.5, 더욱 구체적으로 pH 5 내지 7에서 수행될 수 있으며, 이때 pH 5는 아세트산 나트륨(sodium acetate); 및 pH 6 내지 7은 인산 나트륨(sodium phosphate) 버퍼를 사용하여 조정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 또한, 온도 조건으로는 30 내지 50℃, 더욱 구체적으로 35 내지 45℃에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 또한, 시간 조건으로는 1 내지 5시간, 더욱 구체적으로 3시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제의 활성은 pH가 아세트산 나트륨 또는 인산 나트륨 버퍼에 의해 5 내지 7로 조정된 조건에서 최대가 되며, 또한 35℃에서 높은 활성이 장시간 지속됨을 확인하였다(도 2 내지 4). 또한, 상기 α -아밀라아제와 풀루란을 pH 7의 인산 나트륨 버퍼에서 35℃에서 3시간 동안 반응시킨 결과, 이의 반응 산물에는 글루코스, 말토스, 이소말토스 등의 부산물이 존재하지 않고, 판노스만이 존재함을 확인하였다(도 6).
- [0037] 이는, 상기 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제와 풀루란을 반응시키는 단계를 포함하는, 본 발명의 제조방법은 판노스의 제조에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0038] 또 다른 하나의 목적은 풀루란을 판노스로 분해하는 활성을 가진, 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제를 제공한다.
- [0039] 이때, 상기 "풀루란", "판노스", "루미노코커스 브로미" 및 " α -아밀라아제"의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0040] 구체적으로, 상기 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 또한 풀루란 분해 활성, 즉 풀루라나아제(pullulanase) 활성을 가지는 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 α -아밀라아제는 풀루란을 분해하여 다른 부산물 없이 판노스만을 생성하므로, 판노스 제조용 조성물 및 제조방법 등에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 다른 하나의 양태는 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.
- [0043] 이때, 상기 "풀루란", "판노스", "루미노코커스 브로미" 및 " α -아밀라아제"의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0044] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 코딩하는 것일 수 있다. 구체

적으로, 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 상기 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있어 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열이면 제한없이 포함될 수 있으나, 구체적으로 서열번호 2의 염기서열에 의해 코딩된 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 적당한 숙주 세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 폴리뉴클레오티드 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 폴리뉴클레오티드 작제물을 말한다. 상기 제조된 제조합 벡터를 숙주 세포에 형질전환(transformation) 또는 형질감염(transfection) 시킴으로써, 목적하는 단백질을 수득할 수 있게 된다.

[0046] 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 아그로박테리움 매개 형질전환에 사용할 수 있는 Ti-플라스미드를 포함한다. 파아지 DNA의 구체적인 예로는 λ -파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λ gt10, λ gt11 및 λ ZAP)가 있다. 또한, 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus) 또는 백신시아 바이러스(vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스, 배콜로바이러스(baculovirus)와 같은 곤충 바이러스, 이중 가닥 식물 바이러스(예, CaMV), 단일가닥 바이러스 또는 게미니 바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터가 또한 사용될 수 있다.

[0047] 아울러 본 발명의 벡터로서, 핵산 발현 활성화 단백질(예를 들어, B42)이 연결된 융합 플라스미드(fusion plasmid, 예를 들어, pJG4-5)가 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 회수되는 목적 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 플라스미드 벡터는 필요에 따라 다른 서열을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 융합 플라스미드에는 GST, GFP, His-tag, Myc-tag 등을 태그(tag)로 포함할 수 있으나, 상기 예들에 의해 본 발명의 융합 플라스미드가 한정되는 것은 아니다.

[0048] 또한, 상기 융합 단백질의 제조에 있어, 크로마토그래피 공정을 포함할 수 있으며, 상기 융합 단백질은 특히 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 헥사히스티딘이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼(Novagen, USA)을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 회수할 수 있다.

[0049] 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 벡터로 삽입하기 위해, 정제된 DNA를 적당한 제한효소로 절단하여 적당한 벡터 DNA의 제한 부위 또는 클로닝 부위에 삽입하는 방법이 사용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 벡터에 작동 가능하게 연결되어 있을 수 있다. 본 발명의 벡터는 프로모터 및 본 발명의 핵산 외에 인핸서(enhancer)와 같은 시스 요소(cis element), 스플라이싱 시그널(splicing signal), 폴리 A 추가 시그널(poly A addition signal), 선택 마커(selection marker), 라이보솜 결합 서열(ribosome binding sequence, SD sequence) 등을 추가로 포함할 수 있다. 선택 마커의 예로, 클로람페니콜 저항 핵산, 암피실린 저항 핵산, 디하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase), 네오마이신 저항 핵산 등이 사용될 수 있으나, 상기 예들에 의해 작동 가능하도록 연결되는 추가적 구성요소가 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명에서, "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.

[0052] 상기 형질전환으로 본 발명의 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 또는 상기 발현 벡터의 일부를 숙주 세포 내에 도입할 수 있는데, 여기서 상기 발현 벡터의 일부란, 숙주 세포 내에 상기 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질의 활성을 부여할 수 있도록 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 부분을 포함하는 발현 벡터의 부분을 의미한다. 예컨대, 아그로박테리아 매개 형질전환법에서 숙주 세포 내로 전달되는 Ti 플라스미드의 T-DNA를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 CaCl_2 침전법, CaCl_2 방법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질

융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다. 본 발명의 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명에서 형질전환체 제조에 사용될 수 있는 숙주 세포의 종류는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)같은 바실러스(*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 세균; 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모; 동물세포, 식물세포 및 곤충 세포가 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 대장균 균주의 구체적인 예로는 CL41(DE3), BL21 또는 HB101이, 바실러스 서브틸리스 균주의 구체적인 예로는 WB700 또는 LKS87이 있다.

[0055] 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 형질전환세포 또는 생물체의 형태일 수 있다.

[0056] 상기의 방법으로 형질전환된 본 발명의 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 폴루란을 판노스로 분해하는 폴루라나아제 활성을 가진다.

[0057] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 서열번호 2의 염기서열로 암호화되는 루미노코커스 브로미 균주 유래의 α -아밀라아제 유전자를 대장균에 형질전환시켰으며, 상기 형질전환 대장균을 이용하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제 재조합 단백질을 발현시키고 이를 정제하였다(실시예 1). 상기 단백질을 폴루란과 반응시킨 결과, 이의 반응 산물에는 글루코스, 말토스, 이소말토스 등의 부산물이 존재하지 않고, 판노스만이 존재함을 확인하였다(도 6).

[0058] 이는, 상기 루미노코커스 브로미 균주 유래의 α -아밀라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체는 판노스의 제조에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.

발명의 효과

[0059] 본 발명의 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제는 폴루란으로부터 다른 부산물 없이 판노스만을 생성하므로, 판노스 제조에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*) 유래의 α -아밀라아제(이하 'Amy 5'로 명명)를 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 통해 정제한 결과를 보여주는 SDS-PAGE 이미지이다. 이때, Inclusion body는 봉입체, Crude는 균체의 조단백질, Crude Passing through는 크로마토그래피를 통해 여과된 균체의 조단백질, Elute는 크로마토그래피 레진으로부터 용출된 단백질을 의미한다.

도 2는 pH에 따른 Amy 5의 활성을 보여주는 그래프이다.

도 3은 온도에 따른 Amy 5의 활성을 보여주는 그래프이다.

도 4는 Amy 5의 열 안정성을 보여주는 그래프이다.

도 5는 Amy 5의 기질에 따른 효소 반응 및 이에 따른 생성물을 분석한 결과를 보여주는 TLC의 크로마토그램이다. G1-7 standard는 1 내지 7개의 글루코스(glucose)가 중합된 말토올리고당 기준(각각 글루코스(G1), 말토스(G2), 말토트리오스(G3), 말토테트라오스(G4), 말토펜타오스(G5), 말토흡사오스(G6) 및 말토펜타오스(G7)); α -CD, β -CD 및 γ -CD는 각각 α -사이클로덱스트린, β -사이클로덱스트린 및 γ -사이클로덱스트린; 및 G3- β -CD는 G3- β -사이클로덱스트린을 의미한다.

도 6은 Amy 5와 폴루란의 반응 산물(reactant)을 분석한 HPAEC의 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예

에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

실시예 1. 폴루란 분해 효소 제조

실시예 1-1. α -아밀라아제(α -amylase) 유전자 클로닝(cloning) 방법

폴루란 분해 효소를 제조하기 위하여, 루미노코커스 브로미(*Ruminococcus bromii*) 유래의 α -아밀라아제(α -amylase) 유전자를 이용하였다.

구체적으로, 하기 표 1에 기재한 바와 같이, 루미노코커스 브로미 ATCC 27255 균주의 염색체 DNA에 대하여 각각의 정방향 및 역방향 프라이머를 제작하였다. 상기 프라이머 및 KOD 중합효소 등을 이용하여, 하기 표 2에 기재한 조건으로 상기 염색체 DNA에 대한 PCR을 실시함으로써 1,572 bp의 PCR 산물을 획득하였다. 이때, 획득한 상기 PCR 산물의 염기 서열, 즉 루미노코커스 브로미 유래의 α -아밀라아제의 염기 서열은 서열번호 2로 명명하였다.

표 1

프라이머	방향	염기 서열
F_NheI_rb_amy5	정방향	5'-gct agc TCA AAA TCA GAT TCA TCC GAC GGA AA-3' (서열번호 3)
R_XhoI_rb_amy5	역방향	5'-ctc gag TTC AGC AGA CTT AAT GAT TAC CGT TGA-3' (서열번호 4)

표 2

변성 (denaturation)	초기변성 (initial denaturation)	95℃/5분	
증폭 (amplification)	변성(denaturation)	95℃/30초	30회
	결합(annealing)	60℃/30초	
	확장(extension)	72℃/2분	
최종 확장 (final extension)	최종확장(final extension)	72℃/5분	

수득한 상기 PCR 산물(유전자 조각)을 *Taq* 중합효소를 이용해 A-tailing을 수행한 뒤, T-벡터(T-vector)와 16℃에서 3시간 동안 연결(ligation)하였다. 각각의 연결 혼합물들은 대장균(*E. coli*) DH10B 균주에 형질전환하였고, 블루-화이트 스크리닝(blue/white screening)을 이용하여 유전자 조각이 삽입된 구성체(construct)를 얻어내었다.

각 구성체들에 *Nhe* I/*Xho* I의 제한효소를 처리한 후, 겔 추출법(gel extraction)을 통해 단일 조각들을 수득하였고, 다양한 길이의 상기 조각을 아가로스(agarose) 전기영동을 통해 분리한 후, 동일한 제한효소로 처리한 pET21a 발현 벡터(6×His tag 포함)와 함께 연결하여 재조합 발현 벡터인 pET-*rb_amy5*를 제조하였다. 이때, 상기 pET-*rb_amy5* 벡터는 *rb_amy5* 유전자를 포함하며, 상기 유전자의 3' 말단에 8개의 부가적인 아미노산 잔기(Leu-Glu-His×6)를 포함하고 있음을 확인하였다.

실시예 1-2. α -아밀라아제 유전자를 포함하는 형질전환체의 제조 방법

상기 실시예 1-1을 통해 제조한 pET-Rb_amy5 벡터를 대장균(*E. coli*) BL21 (DE3) codon plus 균주에 형질전환하여 최종적으로 α -아밀라아제 유전자를 발현하는 형질전환체를 제작하였다. 제작한 상기 형질전환체를 100 μ g/ml의 암피실린(ampicillin)이 포함된 액체 LB 배지에 접종하여 600nm의 OD 값이 0.5에 도달할 때까지 배양한 후, 단백질의 발현 유도를 위하여 0.5 mM의 IPTG를 첨가하였다. 생산된 6×His-tag가 결합된 재조합 단백질을 정제하기 위해, 상기 배양액을 4℃에서 4,000 rpm의 조건으로 30분 동안 원심분리를 수행하여 형질전환체의 균체를 회수하였다.

실시예 1-3. α -아밀라아제 단백질의 정제 방법

상기 실시예 1-2를 통해 회수한 균체를 용해 버퍼(50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.0)에 현탁한 후, 초음파 분쇄하였다. 분쇄액을 4℃에서 12,000 rpm의 조건으로 20분간 원심분리하여 조단백질

(crude protein)을 얻어내었다. 상기 조단백질을 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)에 주입하여 아밀라아제 재조합 단백질을 정제하였다. 이후, 도 1에 나타난 바와 같이, SDS-PAGE를 통해 상기 재조합 단백질이 발현 및 정제되었음을 확인하였다. 이때, 수득한 상기 재조합 단백질의 아미노산 서열, 즉 루미노코커스 브로미 유래의 α -아밀라아제의 아미노산 서열은 서열번호 1로 명명하였다.

[0074] 실시예 2. 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제의 특성 분석

[0075] 실시예 2-1. pH에 따른 효소 활성 분석

[0076] 상기 실시예 1을 통해 발현 및 정제한 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제(이하, 'Amy 5'로 명명)의 효소 특성을 확인하고자 하였다.

[0077] 먼저, 10 μ l의 Amy 5 및 1 mM의 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, CD)이 포함된 100 μ l의 50 mM 인산나트륨(sodium phosphate, pH 7) 용액을 45°C에서 10분간 반응시켰고, DNS(dinitrosalicylic acid) 용액을 첨가하여 5분 동안 가열한 뒤, 식혀주었다. 이후, 상기 반응을 통해 생성된 포도당과 분해된 중합체의 환원성 말단에 의해 발색된 반응액은 분광광도계(DU730, Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA)를 이용하여 550 nm 흡광도에서 측정하였다. 측정된 흡광도는 말토스(maltose) 표준 곡선과 비교하여 1분당 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 유닛(unit)으로 설정하였다.

[0078] 이후, 상기 Amy 5의 최적 pH를 확인하기 위하여, 2 unit의 Amy 5를 각각 50 mM의 pH 4 내지 5의 아세트산 나트륨(sodium acetate) 버퍼, pH 5 내지 6의 시트르산 나트륨(sodium citrate) 버퍼, pH 6 내지 8의 인산 나트륨(sodium phosphate) 버퍼, pH 7 내지 9의 트리스-HCl(tris-HCl) 버퍼, 또는 pH 9 내지 10의 글라이신-NaOH(Glycine-NaOH) 버퍼에 용해된 0.5% 용해성 전분(soluble starch)과 45°C에서 5분간 반응시킴으로써, Amy 5의 상대적인 효소 활성을 비교하였다.

[0079] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, pH 5의 아세트산 나트륨을 버퍼로 사용하는 경우, Amy 5의 상대적인 활성이 약 100%로서 최대가 됨을 확인하였다. 또한, pH 6 또는 7의 인산 나트륨 버퍼에서도 각각 80% 또는 60% 이상의 높은 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0080] 상기 결과를 통해, 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제를 이용한 효소 반응에는 pH 5의 아세트산 나트륨, 또는 pH 6 또는 7의 인산 나트륨 버퍼를 사용하는 것이 상기 효소의 활성을 최대로 이끌어낼 수 있음을 확인하였다.

[0081] 실시예 2-2. 온도에 따른 효소 활성 분석

[0082] 상기 Amy 5의 최적 온도를 확인하기 위하여, 2 unit의 Amy 5를 50 mM의 pH 7의 인산 나트륨 버퍼에 용해된 0.5% 용해성 전분과 30 내지 55°C에서 10분간 반응시켜, Amy 5의 상대적인 효소 활성을 비교하였다.

[0083] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 45°C에서 Amy 5의 상대적인 활성이 약 100%로서 최대가 됨을 확인하였다. 또한, 35 내지 40°C에서도 90% 이상의 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0084] 상기 결과를 통해, 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제를 이용한 효소 반응에는 35 내지 45°C의 온도 조건을 사용하는 것이 상기 효소의 활성을 최대로 이끌어낼 수 있음을 확인하였다.

[0085] 실시예 2-3. 효소의 열 안정성 분석

[0086] 상기 Amy 5의 열 안정성을 확인하기 위하여, 2 unit의 Amy 5를 50 mM의 pH 7의 인산 나트륨 버퍼에 용해된 0.5% 용해성 전분과 35, 40 또는 45°C에서 10분간 반응시켜, Amy 5의 상대적인 효소 활성을 비교하였다.

[0087] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 35°C에서 Amy 5의 상대적인 활성은 120분까지 노출되어도 안정함을 확인하였고, 40°C에서는 20분 이후 활성이 감소하며, 45°C에서는 최초 노출 이후 활성이 급격히 감소함을 확인하였다.

[0088] 상기 결과를 통해, 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제를 이용한 효소 반응에는 35°C의 온도 조건을 사용하는 것이 상기 효소의 활성을 장시간 유지할 수 있음을 확인하였다.

[0089] 실시예 3. 루미노코커스 브로미 유래 α -아밀라아제를 이용한 판노스(panose)의 제조

[0090] 실시예 3-1. 효소 반응 및 생성물의 분석

[0091] Amy 5의 기질로서 0.5%의 아밀로스(amylose), 용해성 전분(soluble starch), 풀루란(pullulan), 또는 아밀로펙틴(amylopectin); 또는 10 mM의 α -CD(α -cyclodextrin), β -CD(β -cyclodextrin), γ -CD(γ -cyclodextrin),

G2-β-CD(G2-β-cyclodextrin)과 G3-β-CD(G3-β-cyclodextrin), G5-β-CD(G5-β-cyclodextrin)를 이용하였다. 상기 기질을 각각 포함하는 pH 7의 인산 나트륨 버퍼에 4 유닛의 Amy 5를 첨가하여 35℃에서 3시간 동안 반응시켰고, 반응 후 반응액을 끓는 물에서 5분간 가열하여 반응을 종결시켰다.

[0092] 이후, 각각의 반응 산물에 대하여 아이소프로필 알코올(isopropyl alcohol):에틸 아세테이트(ethyl acetate):물(water)을 3:1:1의 용매 조건에서 TLC(Thin-Layer Chromatography) 분석을 수행하였다. TLC는 Whatman K5F 플레이트를 사용하여 전개하여 건조시킨 다음 침액 용액(메탄올 950ml, 황산 50ml, 1-나프톨(1-naphtol) 3g)을 이용하여 발색시켰고, 110℃에서 건조하여 효소 반응 산물을 확인하였다.

[0093] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, 루미노코커스 브로미 유래 α-아밀라아제는 각 기질을 분해함을 확인하였고, 특히 풀루란을 기질로 사용하는 경우에 이를 분해하여 G4 내지 G5 기준 사이에 위치하는 판노스(panose)를 생성함을 확인하였다.

[0094] 실시예 3-2. Amy 5 및 풀루란 반응 산물의 분석

[0095] 상기 실시예 3-1을 통해 루미노코커스 브로미 유래 α-아밀라아제는 풀루란으로부터 판노스를 생성함을 확인하였고, 더욱 정확히 확인하기 위하여 상기 반응 산물을 HPAEC(High Performance Anion Exchange Chromatography)를 이용하여 분석하였다.

[0096] 구체적으로, 용매 A(50 mM NaOH)와 용매 B(50 mM NaOH, 100 mM NaOAc)를 이용하여 50분까지 용매 B가 40%에 도달하는 직선 구배(linear gradient)를 주어 CarboPAC PA-1 컬럼에 통과시켰고, 통합 펄스 전류 측정 검출기(integrated pulsed amperometric detector)를 이용하여 정성 분석하였다. 또한, 글루코스, 말토스, 이소판노스 또는 판노스 기준의 검출 결과와 상기 반응 산물의 검출 결과를 비교하였다.

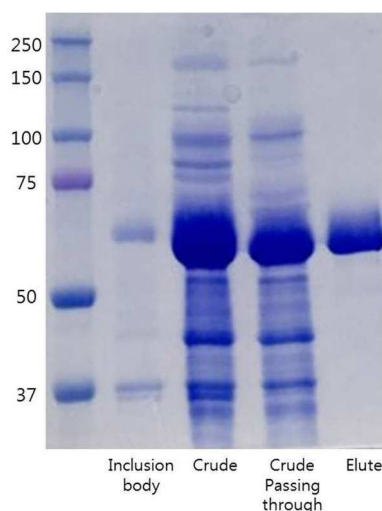
[0097] 그 결과, 도 6에서 볼 수 있듯이, 풀루란을 기질로 사용한 반응 산물에는 글루코스, 말토스, 이소말토스 등의 부산물이 존재하지 않고, 판노스만이 존재함을 확인하였다.

[0098] 상기 결과를 통해, 루미노코커스 브로미 유래 α-아밀라아제가 풀루란을 기질로 사용하는 경우에는 풀루란을 분해하여, 다른 부산물 없이 판노스만을 고순도로 생성함을 확인하였다.

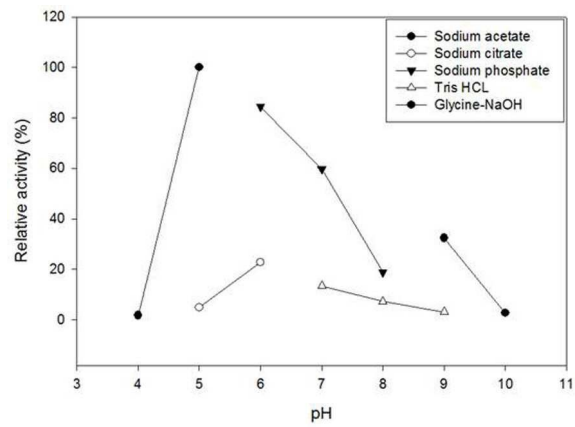
[0099] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

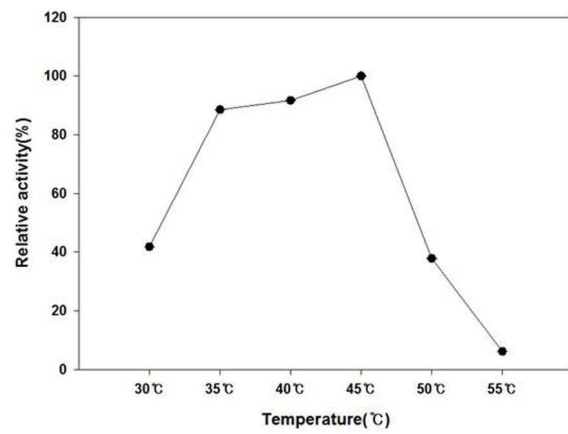
도면1



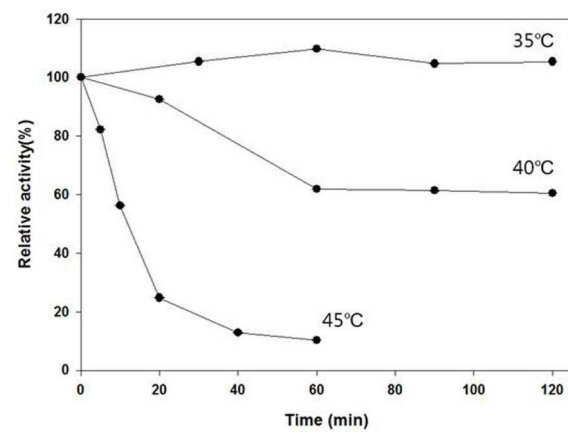
도면2



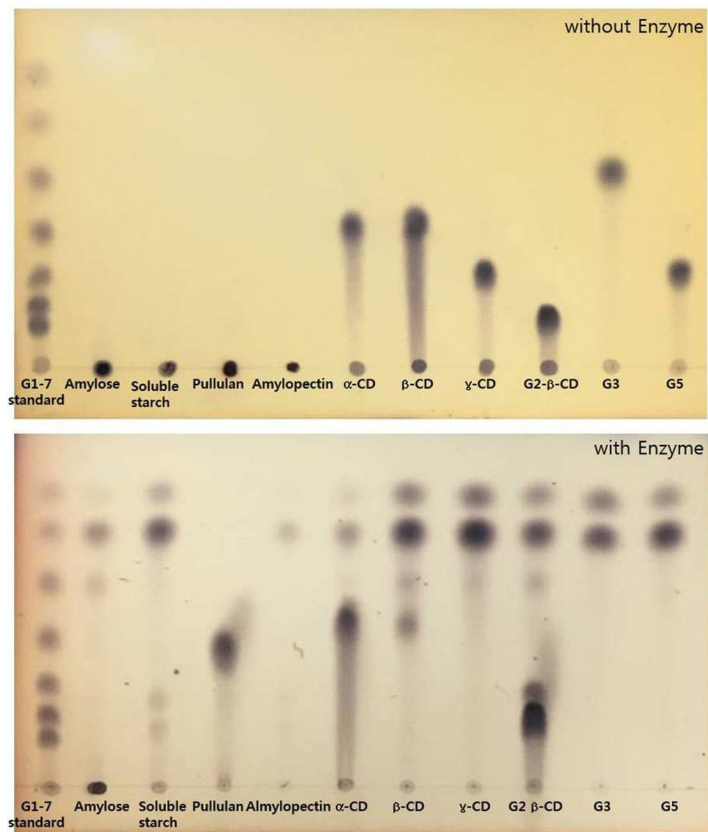
도면3



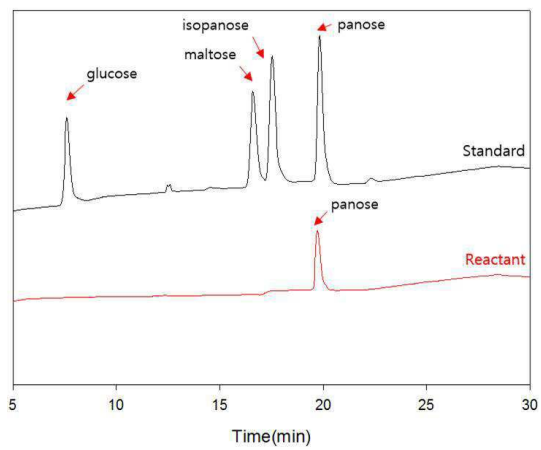
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Pullulan degrading enzyme from Ruminococcus bromii and use thereof
- <130> KPA170083-KR
- <160> 4

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 524

<212> PRT

<213> Ruminococcus bromii

<400> 1

Ser Lys Ser Asp Ser Ser Asp Gly Asn Thr Ala Lys Val Ala Asp Pro

1 5 10 15

Ile Glu Gly Val Lys Ala Thr Ala Ser Thr Asp Lys Tyr Arg Asn Tyr

20 25 30

Tyr Glu Ile Phe Val Asn Ser Phe Cys Asp Ser Asn Gly Asp Glu Thr

35 40 45

Gly Asp Leu Gln Gly Ile Ile Ser Gln Leu Asp Tyr Leu Asn Asp Gly

50 55 60

Asp Pro Asn Ser Gly Asp Asp Leu Gly Val Asp Ala Ile Trp Leu Thr

65 70 75 80

Pro Ile Met Pro Ser Lys Ser Tyr His Lys Tyr Asp Val Glu Asp Tyr

85 90 95

Tyr Asn Ile Asp Pro Asp Phe Gly Thr Leu Asp Asp Phe Asp Lys Leu

100 105 110

Ile Glu Glu Cys His Lys Arg Gly Ile Asn Val Ile Leu Asp Leu Val

115 120 125

Leu Asn His Ala Ser Ser Lys Asn Pro Leu Phe Thr Lys Ala Val Glu

130 135 140

Glu Val Ala Asp Asn Lys Leu Asp Gly Asn Ala Glu Tyr Phe Glu Ile

145 150 155 160

His Lys Ala Ser Tyr Phe Asp Ser Asn Thr Gln Thr Ile Ser Leu Gly

165 170 175

Asn Gly Tyr Ala Cys Glu Ala Asn Phe Ser Gln Glu Met Pro Glu Trp

180 185 190

Asn Leu Asn Ser Lys Lys Thr Arg Glu Glu Phe Thr Lys Ile Ala Lys

195 200 205

Phe Trp Leu Asp Arg Gly Val Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Cys Lys
 210 215 220
 Tyr Phe Thr Asn Lys Glu Thr Asp Gly Thr Glu Phe Leu Lys Trp Phe
 225 230 235 240
 Tyr Asp Thr Cys Lys Gly Ile Lys Glu Asp Val Tyr Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Asn Trp Thr Asp Asp Ser Asp Ile Gln Glu Leu Tyr Lys Ser Gly Ile
 260 265 270
 Asp Ser Gln Phe Ala Phe Lys Phe Ser Thr Ser Thr Gly Thr Ile Ile
 275 280 285
 Ser Asn Ile Ile Ser Gln Gly Gly Met Ala Thr Ala Lys Lys Ile Met
 290 295 300
 Asn Tyr Asp Asn Lys Met Ala Glu Ser Asn Pro Asn Ala Ile Asn Ala
 305 310 315 320
 Met Phe Leu Ser Asn His Asp Gln Val Arg Ser Gly Asn Ala Leu Glu
 325 330 335
 Ser Gln Gly Leu Ser Ser Gln Lys Leu Ala Ala Ala Val Tyr Met Leu
 340 345 350
 Ala Pro Gly Asn Pro Phe Ile Tyr Tyr Gly Glu Glu Ile Gly Ile Lys
 355 360 365
 Ala Pro Asn Thr Thr Asn Asp Ala Ala Tyr Arg Thr Gln Met Val Phe
 370 375 380
 Asp Ser Glu Asn Leu Pro Asp Ile Tyr Val Asn Gly Ile Gly Asp Glu
 385 390 395 400
 Pro Asp Val Pro Thr Gly Gly Gly Val Lys Gln Gln Leu Ala Asp Lys
 405 410 415
 Asp Ser Leu Leu Asn Tyr Tyr Arg Arg Ile Ile Thr Ile Lys Asn Gln
 420 425 430
 Asn Pro Glu Ile Ala Arg Gly Arg Ile Val Gly Thr Gln Gly Phe Asp
 435 440 445
 Asp Lys Thr Val Gly Ala Tyr Tyr Val Glu Tyr Glu Asp Ser Lys Leu

450

455

460

Leu Ile Ile His Asn Phe Ser Lys Asn Asp Ala Lys Glu Leu Thr Ile

465 470 475 480

Thr Asp Asp Met Ile Lys Asn Ala Thr Leu Arg Ala Asp Leu Ile Pro

485 490 495

Glu Ser Ser Ser Lys His Thr Glu Leu Lys Asp Gly Lys Ile Ser Val

500 505 510

Pro Pro Gln Ser Thr Val Ile Ile Lys Ser Ala Glu

515 520

<210> 2

<211> 1575

<212> DNA

<213> Ruminococcus bromii

<400> 2

tcaaaatcag attcatccga cggaaatact gcaaaagttg ccgacccgat tgaaggcgtt 60

aaggcaactg catcaaccga taaatacaga aactactacg aaattttcgt aaactctttc 120

tgcgattcaa acggtgacga aacaggcgac cttcagggaa tcatttcaca gcttgactac 180

cttaatgacg gcgatccgaa ttcaggtgac gacctcgttg ttgacgcaat ctggcttact 240

ccgattatgc cgtcaaagtc atatcataag tatgatgttg aagattatta caatattgat 300

cccgacttcg gtacgctcga cgattttgac aagcttattg aagaatgtca caagcgtggc 360

ataaatgtaa ttcttgacct tgttttgaat cacgcattct caaaaaatcc gcttttcaca 420

aaggctgttg aagaggttgc cgataataag cttgacggca atgccgaata ttttgaaatt 480

cacaaggcct catattttga cagcaataca cagactatca gtcttggaac cggttatgcc 540

tgtgaggcga actttttcga ggagatgccc gaatggaatc tcaattctaa aaagacgaga 600

gaagaattta caaaaattgc gaaattctgg cttgaccgag gagttgacgg cttcagactt 660

gacgcttgca aatactttac aaataaggaa accgacggaa cagaatttct caagtggttc 720

tacgacacct gcaagggtat taaggaagat gtctatatgg ttggcgagaa ctggaccgat 780

gattccgata ttcaggagct ttacaaatcc ggcatcgaca gccagtttgc atttaagttt 840

tcaacctcaa caggcacaat tatcagcaac atcatttcgc agggcggtat ggctactgcc 900

aaaaaaatta tgaactacga taacaaaatg gcagagtcaa atcccaatgc tatcaatgca 960

atgttccttt caaaccacga tcaggttcgt agcggaacg cacttgaatc tcagggactt 1020

tctttctcaga aacttgccgc cgcagtttat atgcttgccg cgggtaatcc gttcatctat 1080
 tacggagagg aaatcgccat taaggctccg aataccacaa acgatgcggc atacagaaca 1140
 cagatggttt ttgacagtga gaaccttccc gatatttatg taaacggtat cggagatgag 1200

ccagatgtgc ctaccggcgg cgggtgtaaaa cagcagcttg ccgacaagga ttctctctc 1260
 aactactatc gtagaattat cacaatcaaa aatcagaacc ccgaaattgc aaggggcaga 1320
 attgtaggca cacagggtt tgatgataag acagtcggcg cttactatgt tgagtatgag 1380
 gattcaaagc tctcattat tcacaacttc agcaagaatg acgccaagga gcttacaatt 1440
 acagacgata tgattaagaa tgcaactctc cgtgcagacc ttatccccga gagcagttca 1500
 aagcataccg agcttaaga cggaaaaatc tctgtaccgc cacagtcaac ggtaatcatt 1560
 aagtctgctg aatga 1575

<210> 3
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F_NheI_rb_amy5 Forward primer

<400> 3
 gctagctcaa aatcagattc atccgacgga aa 32

<210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F_NheI_rb_amy5 Reverse primer

<400> 4
 ctcgagttca gcagacttaa tgattaccgt tga 33