



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0063841  
(43) 공개일자 2013년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C12N 9/88* (2006.01) *C12N 15/60* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01) *C12P 19/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0130425

(22) 출원일자 2011년12월07일  
심사청구일자 2011년12월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,  
부경대학교)

(72) 발명자

김경현

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호  
(서초동, 삼풍아파트)

우희철

부산광역시 남구 용소로 45, 화학공학과 (대연동,  
부경대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 신규한 올리고알긴산 분해효소 및 이를 이용한 알긴산 유래 단당의 효소적 생산방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 올리고알긴산 분해효소 및 이를 이용한 알긴산 유래 단당의 효소적 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)에서 분리한 알긴산 또는 올리고알긴산 분해능이 있는 신규한 올리고알긴산 분해효소(oligoalginate lyase)를 이용하여 알긴산으로부터 불포화 단당을 효과적으로 생산할 수 있다.

대표도 - 도2

```

Alu30251-736 1 MRPSAPAI SRGLTDEPRFSLTIGVEPSEEADPTENPPRFSLWDIDGAGYVLRISTDPGFDEKTLVFQLANWFFPFI
Al-001-761 1 -----MKKLEQDSADMTIRYFP--SDTLTENPFRFLWELDSQARYAVRVVSQAG---KETVFGDIQNNFRFP66
Alu30251-736 1 -----MLSVNTIKNTLLAAVLVSVPA-----AQVSGNGHNLIVT36
Alu30251-736 82 DEALPDGHYHWYALWQKSAATANSNWSTVRSFISEALPKTFLPGRSARHAAQTSHPRLWLNSEQLSAFADAYAKDPNH82
Al-001-761 67 DVTLTGSGYTWSYALWDAAGKVDSDWSSPRSFLPADAPVGMHKERYAECDMTHPRLWLSQSEATALGKSVATDPDH47
Alu30251-736 37 EQDYAR--IAASWESIDAFAGQLNADKTLNLDAMAEGVVFPMP--DAGGGTYTNEQKNEKRIARAGLLVQVGGQ---389
Al-001-761 37 -----
Alu30251-736 143 CGWAEFYEKSVFVWLERPVMPFQPPFNNTVATLWQNLQCEVITYAIR-HLAIAGRVLGDOLLDAKRKWLVAWAAD242
Al-001-761 140 CKWANKMAKSVTPFWNEIRIIEPDPFPNAPFAPLALH--QCEVITYAIR-HLAIAGRVLGDAAANTARAKELVAWAAD237
Alu30251-736 110 -KYLTEAKDILLAYAKMYPISLGEHPRKEQSPGLFWQSLNEAVWLVTYISQDYDAIDGLAAEEKQIESGVFLPMKFLS189
Al-001-761 110 -----
Alu30251-736 243 TKGATSRKAYNAGFRVVVALAWGVDWLVDHLSDEERTVRSVLLERTREVADHVIAHARIHVFPYDSAVLSAVLTP322
Al-001-761 228 VRGP-TCRDYNGAAFRIAAALAWGVDWLHDELSIERANVRESLTVRTREVANHVINRAKIHIFPYDSAVLSVSLVLP307
Alu30251-736 190 VESPEFTRKIHNGTWAAVVGMTQVVGNDLVEISLMGLDTGKAGFMQLDELSPDGYTTEGPPYRYALMPFIWFA270
Al-001-761 190 -----
Alu30251-736 323 ACIALQGESDEAGELWD--YTFEFLATLSPWAGTDGGWAEFWMFGMAYLIEAANLIRSYIGDYLRQRPFFONTGRFP481
Al-001-761 308 CSIIVLGEFPEADKWLQ--YSIDFYDAIFPPHGGVDGWAEFWMFGMAYFTEANLVLVTFYHLYRPFPOSTGWFP386
Alu30251-736 271 KAJETNEPERKIFEYRNILLKAVYTTIDLSYADYFFPINDALVDKGIDTVELVHALAIVYSITGNTLLDIAQEGQR15300
Al-001-761 271 -----
Alu30251-736 402 LYTAKPOTRRANFGDGLGDLFGKLGYNNROTAGVTGNGHYQWYDHIKADATSTEMNRYGNDLNFDDLVYKHDFP482
Al-001-761 387 LYTAKPOTRRACFGDGLGDLFCLKVGYNLROFAGVTGNNFYQWYFEVCRNDPSTEMNRYGNDLNFDDVQYLHDFP467
Alu30251-736 351 LTGDGLKYAKAVGEGITOPNYRSLILGQADGQDQALSIHRLGEGHNMALVAKNTSGQMG-HGHEDKLWNLTYDNGNEI430
Al-001-761 351 -----
Alu30251-736 483 QVEAVSPADLPALAVFDDIGWATIQDMEPDRHLOQVFK--SSPYGSLSSHGQDNFVLTANGEDLAIQSG-----VA557
Al-001-761 468 HIEAKAPSDITVKYFGDVWVALQHMMPDQHIQFLTK--ASDFGSISSHGQDGAFLLYGYGEDLAIQSG-----IG542
Alu30251-736 431 YTDGGAARLVVEAKYGGNLSANTWAGQTIAGNTLVNEDSHFQGVDTADLHPEVLSFSSGEDQLSSAKANA5031
Al-001-761 431 -----
Alu30251-736 558 LLSQHLNWRROTISKNAVLIGKGGQFAEKD--ALKRAAGRIVSVVEQFQVHRIVGATAYQVAVNPLVQKVLRETHV436
Al-001-761 543 LSTMKREWRILTISKNAVLIGKGGQSSSNK--AECLKAGDHLVEGTNRNAPHSIDPTDAYKADVPLTRYERDHPV401
Alu30251-736 512 VEFVRSMLLVNVPSELHPFVYVDLVNSADKASTDLPLFYNGQIDFSEFKVKNKNVMKMLKRRNGVQHLWNTAPVGDAS92
Al-001-761 512 -----
Alu30251-736 637 NDSYFYVIDE--VECEPQELQWLCHTLGAPOTGRSSFRYNGKAGFYGOFYVSSGOTQISAVEGFPDID--PKEFEGDL713
Al-001-761 622 HDRFFYIVDD--VELEGDSVQWLMHTFKPCLEQSVFRYHGDRAGLNGEFVCSGSPVSIENTYSTANID--QREVEGLP698
Alu30251-736 593 SEKATWILDORFVSYAFVSTPSKKQNVLIAGELGANDPRNLRKQDQVLIIRZEKAKAQSFSVLEPHGKYGDSLETTSGAY673
Al-001-761 593 -----
Alu30251-736 714 IHHVYCATVPAARHRLVTLVPYSLKEPKRIFSFIDGGFSTDIVFSOVODERFKLSLPKGF 716
Al-001-761 699 PQSLTAVSGAARNTVLLTPALSAFLRVFHNDDGFSNLYFGQDNEMMTILPEPF 701
Alu30251-736 674 NVKSVKHSVSENGKDVVYVDLKGDSNVVVALSYNANSEGVHKNVAGAEAEWGFSSVSVVRK 736
Al-001-761 674 -----

```

(72) 발명자

**김희택**

서울특별시 마포구 성미산로5길 50-7, 202호 (성산동, 조광아트빌)

**최인걸**

서울특별시 동작구 남부순환로263길 34 (사당동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20111001212-00

부처명 농림부

연구사업명 연구용역

연구과제명 해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 기반구축 연구

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.10.06 ~ 2011.08.05

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 유래의 올리고알긴산 분해효소(oligoalginate lyase).

### 청구항 2

제1항에 있어서,  
알긴산, 불포화 올리고알긴산 또는 포화 올리고알긴산 분해능을 갖는 올리고알긴산 분해효소.

### 청구항 3

제1항의 올리고알긴산 분해효소를 코딩하는 유전자.

### 청구항 4

제3항에 있어서,  
서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함하는 유전자.

### 청구항 5

제1항의 올리고알긴산 분해효소를 발현하는 재조합 벡터.

### 청구항 6

제5항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

### 청구항 7

제6항의 형질전환체의 배양물로부터 올리고알긴산 분해효소를 분리정제하는 단계를 포함하는 올리고알긴산 분해효소의 제조방법.

### 청구항 8

제1항의 올리고알긴산 분해효소를 포함하는 불포화 단당 생산용 조성물.

### 청구항 9

제8항에 있어서,  
불포화 단당은 4-디옥시-L-에리스로-5-헥소세울로우즈 우론산(4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid, DEH)을 포함하는 불포화 단당 생산용 조성물.

## 청구항 10

제8항에 있어서,

기질로 알긴산, 불포화 올리고알긴산 또는 포화 올리고알긴산 중 어느 하나를 사용하는 불포화 단당 생산용 조성물.

## 청구항 11

제1항의 올리고알긴산 분해효소를 알긴산, 불포화 올리고알긴산 또는 포화 올리고알긴산 중 적어도 하나와 반응시키는 단계를 포함하는 불포화 단당 생산 방법.

## 청구항 12

제11항에 있어서,

반응은 pH 4 내지 8, 20 내지 60℃에서 실시하는 불포화 단당 생산 방법.

## 명세서

### 기술분야

- [0001] 본 발명은 사카로파거스 테그라단스(*Saccharophagus degradans*)에서 분리한 알긴산 또는 올리고알긴산 분해능이 있는 신규한 올리고알긴산 분해효소(oligoalginate lyase)를 이용하여 알긴산으로부터 불포화 단당을 생산하는 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

- [0002] 최근 해조류의 구성성분이 여러 가지 생리활성을 갖는다는 보고와 대체 에너지 바이오매스로서 식량경쟁을 초래하지 않기 때문에 그 중요성이 증가하고 많은 관심을 갖고 있다. 실질적으로 우리나라와 일본과 같이 바다의 접근성이 용이한 나라에서는 최근 몇 년 사이에 이와 같은 바이오매스를 통해 대체에너지를 생산하려는 시도를 하고 있다. 이와 같은 해조류 유래 바이오매스를 이용한 자원은 효율적 사용의 극대화를 이룰 수 있고 비단 바이오 에탄올의 생산뿐만 아니라 생산과정 중에 목적을 달리하면 여러 가지 대체 식량으로서의 사용이 가능하기 때문에 앞으로 이용 잠재성은 크다고 할 수 있다.
- [0003] 갈조류의 주성분인 알긴산(alginate)는 만루론산(M, mannuronic acid)와 글루론산(G, guluronic acid)로 구성되어 있는데 구성되는 방법에 따라 poly M chain, poly G chain과 hetero GM chain으로 구성된다. 알긴산을 분해하는 미생물로는 스펅고모나스 에스피(*Sphingomonas* sp.) A1, 아가리보란스 에스피(*Agarivorans* sp.) JAM-A1m, 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1, 코리네박테리움 에스피(*Corynebacterium* sp.) ALY-1 및 사카로파거스 테그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40 등이 알려져 있다.
- [0004] 알긴산을 분해하는 방법은 크게 물리화학적 방법과 생물학적 방법으로 나뉘는데, 물리화학적인 방법은 염산과 황산과 같은 산과 열처리를 통해 알긴산을 분해하는 방법이다. 이와 같은 물리화학적인 방법을 통해서도 비교적 쉽게 알긴산을 분해할 수 있지만, 반응 조절이 어려워 선택적인 중합도를 갖는 올리고알긴산 및 단당(DEH)을 만들기가 어렵고 과분해에 의해 퍼퍼릴(furfural), HMF(하이드록시메틸퍼퍼릴) 등의 독성이 있는 알데히드가 다량 생성된다. 더욱이 생리활성을 갖는 구조인 불포화 올리고알긴산(unsaturate oligoalginate) 및 불포화 단당(Unsaturated monomeric sugar; DEH)이 아닌 포화 올리고알긴산(saturate oligoalginate) 및 포화 단당(saturated monomeric sugar; 만루론산(mannuronic acid), 글루론산(guluronic acid))의 생성만이 이루어지기 때문에 신규물질 또는 바이오연료로의 전환 시 이용하기 부적합하다. 또한, 물리화학적인 방법은 부수적으로 중화과정이 수행되어야 하는데 이때 환경오염물질의 배출로 인해 환경친화적인 방법으로는 적합하지가 않다.
- [0005] 반면에, 대표적으로 효소를 이용하는 생물학적 전환공정의 경우는 사용되는 효소에 따라 알긴산을 특이적으로

분해하여 원하는 중합도의 올리고알긴산의 생산을 가능하게 하고, 또한 생리활성 기능이 탁월한 구조인 불포화 올리고알긴산(unsaturated oligoalginate) 및 불포화 단당(saturated monomeric sugar; DEH)이 생성되어 기능성 소재로서의 이용이 가능하다. 또한, 생물학적인 촉매인 효소에 의해 반응이 진행되기 때문에 반응 후에도 독성물질의 배출이 생성되지 않아 환경친화적인 공정이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제2009-0092613호, 2009.09.01  
(특허문헌 0002) 2. 대한민국 공개특허 제2010-0087959호, 2010.08.06

### 비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) 1. Hwan Hee Park et al. Mar Biotechnol., "Cloning and characterization of a novel oligoalginate lyase from a newly isolated bacterium *Sphingomonas* sp. MJ-3", 2011.08.10

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 알긴산으로부터 불포화 단당을 생산할 수 있는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 유래의 새로운 올리고알긴산 분해효소를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 알긴산 또는 올리고알긴산을 분해할 수 있는 상기 올리고알긴산 분해효소를 이용하여 불포화 단당을 효과적으로 생산하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 유래의 올리고알긴산 분해효소(oligoalginate lyase)를 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한 상기 올리고알긴산 분해효소를 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0012] 일 구체예에 따르면, 상기 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0013] 본 발명은 또한 상기 올리고알긴산 분해효소를 발현하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 상기 형질전환체의 배양물로부터 올리고알긴산 분해효소를 분리정제하는 단계를 포함하는 올리고알긴산 분해효소의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 상기 올리고알긴산 분해효소를 포함하는 불포화 단당 생산용 조성물을 제공한다.

- [0017] 본 발명은 또한 상기 올리고알긴산 분해효소를 알긴산, 불포화 올리고알긴산 또는 포화 올리고알긴산 중 적어도 하나와 반응시키는 단계를 포함하는 불포화 단당 생산 방법을 제공한다.
- [0018] 일 구체예에 따르면, 상기 반응은 pH 4 내지 8, 20 내지 60℃에서 실시할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0019] 본 발명의 올리고알긴산 분해효소는 알긴산을 완전 당화시켜 불포화 단당을 생성할 수 있다. 또한 알긴산 외에도 여러 가지의 중합도를 갖는 불포화 또는 포화 올리고알긴산을 분해할 수 있다. 따라서, 다른 엔도 타입과의 조합 처리를 통해 시너지 효과를 낼 수 있다. 또한 물리화학적 처리를 통해 생성되는 포화 알긴산과도 반응하기 때문에 물리화학적 및 생물학적 조합처리를 통해 높은 수율의 불포화 단당을 생산할 수 있다. 따라서, 향후 이를 이용하여 새로운 신규 소재 개발 및 바이오 연료 생산을 위한 중요한 단초를 제공할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명의 재조합 Alg17C의 SDS-PAGE를 나타낸 것으로, M은 단백질 마커; 레인 1은 alg17C를 포함하는 재조합 대장균에 의하여 생성된 조 효소; 레인 2는 His-tag 친화 크로마토그래피에 의하여 정제된 Alg17C를 각각 나타낸다.

도 2는 PL-15 올리고알긴산 분해효소인 본 발명의 올리고알긴산 분해효소(Alg17C), *A. tumefaciens* 유래의 Atu3025 및 *Sphingomonas* sp. strain A1 유래의 A1-IV 의 아미노산 서열 배열을 나타낸 것으로, 밑줄은 SignalP server 3.0.에서 예측된 시그널 서열 가능성을 나타내며, 별표 및 점은 Atu3025 및 A1-IV 간의 같거나 유사한 아미노산을 의미한다.

도 3은 본 발명의 Alg17C의 활성에 대한 온도(a) 및 pH(b) 효과를 나타낸 것으로, (a)에서 효소반응은 20에서 60℃의 온도 범위에서 30분 동안 pH 6에서 20 mM Tris-HCl 완충용액에서 수행한 것이고, (b)에서 효소 반응은 다음과 같은 완충용액 시스템에서 수행한 것으로, pH 4-5에 대해서는, 50 mM 시트레이트 완충용액, pH 6-8에 대해서는, 20 mM Tris-HCl 완충용액에서 30분간 50℃에서 수행한 것이다.

도 4는 본 발명의 Alg17C에 의하여 (a) 알긴산, (b) Alg7D에 의해서 분해된 2에서 5의 중합도를 갖는 올리고알긴산과 (c) poly M과 poly G와 반응하여 생성되는 산물의 TLC 결과를 나타낸 것으로, 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.0)에서 50℃에서 수행한 것이고, (c)에서 레인 1은 poly M, 레인 2는 poly M과 Alg17C를 18시간 반응시킨 산물, 레인 3은 poly G, 레인 4는 poly G와 Alg17C를 18시간 동안 반응시킨 산물, Man은 모노머 당 표준물질로 사용된 만노스를 나타낸다.

도 5는 Alg17C에 의하여 알긴산으로부터 온 반응 산물의 LC/Q-TOF tandem 질량 분석 결과를 나타낸 것으로, 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 6.0)에서 40℃에서 수행되었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0022] 알긴산을 효소적으로 완전히 당화하기 위해서는 최소 두 종류의 다른 특성을 갖는 효소가 필요하다. 최초 알긴산과 반응을 하여 결합 자리를 무작위로 분해를 하여 올리고알긴산(oligoalginate)을 생산하는 효소(endo-type alginate lyase)와 이와 같은 효소에 의해 분해되어 나오는 올리고알긴산을 기질 끝부분의 결합자리에 작용하여 불포화 단당(unsaturated monomeric sugar; DEH)를 생산하는 효소(exo-type alginate lyase; oligoalginate lyase)가 필요하다. 두 종류의 효소 중 올리고알긴산 분해효소는 최종 효소적 당화를 완성하기 위해 필수적인 효소이다. 본 발명은 상기 두 종류의 효소 중 알긴산을 최종 당화시켜 불포화 단당(unsaturated monomeric sugar; DEH)를 생산하는 올리고알긴산 분해효소로서 전체 당화공정에서 핵심적인 효소를 제공한다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 유래의 올리고알긴산 분해효소(oligoalginate lyase)에 관한 것이다.
- [0024] 상기 올리고알긴산 분해효소는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있으며, 해당 아미노산 서열에 하나 이상의 치환, 결손, 역위, 전좌 등의 돌연변이를 통하여 본 발명의 목적하고자 하는 활성을 가지는 모든 돌

연변이체도 본 발명의 효소에 포함될 수 있다.

- [0025] 일 구체예에 따르면, 상기 올리고알긴산 분해효소의 분자량은 SDS-PAGE 분석 결과 대략 79.1kDa일 수 있다.
- [0026] 상기 올리고알긴산 분해효소는 알긴산 및 올리고알긴산 분해능을 가지고 있어 알긴산을 분해하여 올리고알긴산을 제조하거나, 올리고알긴산을 분해하여 불포화 단당을 제조할 수 있는 이중 특징을 가질 수 있다.
- [0027] 상기 올리고알긴산 분해효소는 알긴산을 완전 당화시켜 불포화 단당(unsaturated monomeric sugar; DEH)을 생성할 수 있다. 알긴산 분해는 베타-제거에 의하여 엔도 타입으로 분해하여 중합도(degree of polymerization, DP) 1의 불포화 단당(unsaturated monomeric sugar; DEH)으로 전환할 수 있다. 또한 알긴산만을 기질로 하지 않고 여러 가지의 중합도를 갖는 불포화 올리고알긴산(unsaturated oligoalginate)과 포화 올리고알긴산(saturated oligoalginate; poly M, poly G)을 분해할 수 있다. 이와 같은 성질은 다른 엔도 타입과의 조합 처리를 통해 시너지 효과를 낼 수 있다. 또한 물리화학적 처리를 통해 생성되는 포화 알긴산(saturated alginate)과도 반응하기 때문에 물리화학적 및 생물학적 조합처리를 통해 높은 수율의 불포화 단당(unsaturated monomeric sugar; DEH)을 생산할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 올리고알긴산 분해효소는 펩타이드를 합성하는 당해 분야의 공지된 방법에 의하여 제조할 수 있다. 예를 들어 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템 또는 펩타이드 합성기 등을 통하여 시험관내에서 합성하는 방법에 의하여 제조할 수 있다.
- [0029] 본 발명은 또한 상기 올리고알긴산 분해효소를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.
- [0030] 상기 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가질 수 있으며, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하고 상기와 같은 돌연변이체 단백질을 고려할 때 서열번호 2의 염기서열과 80% 이상의 상동성, 구체적으로 85% 이상의 상동성을 가지는 유전자 역시 본 발명의 보호범위에 포함될 수 있다.
- [0031] 본 발명은 또한 상기 올리고알긴산 분해효소를 발현하는 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [0033] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [0034] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터, pET21a에 상기 올리고알긴산 분해효소를 코딩하는 핵산을 삽입함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서는 대장균 발현용 벡터로 pET21a를 사용하였지만 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균주 발현용 벡터가 제한없이 사용될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서는 대장균 균주 발현용 벡터인 pET21a 벡터를 사용하여 본 발명의 올리고알긴산 분해효소 코딩 유전자(서열번호 2)를 포함하는 DNA 절편을 삽입하여 재조합 벡터를 제조할 수 있다.
- [0035] 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다.
- [0036] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘( $\text{CaPO}_4$ ) 침전, 염화 칼슘( $\text{CaCl}_2$ ) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [0037] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.

- [0038] 숙주세포로는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*))등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.
- [0039] 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 올리고알긴산 분해효소를 발현하는 재조합 벡터 pET21a 를 대장균 균주 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환체를 제조할 수 있다.
- [0040] 본 발명은 또한 상기 형질전환체의 배양물로부터 올리고알긴산 분해효소를 분리정제하는 단계를 포함하는 올리고알긴산 분해효소의 제조방법에 관한 것이다.
- [0041] 상기 올리고알긴산 분해효소는 통상의 배양방법에 따라 형질전환체를 배양하여 정제하는 것이 좋다. 상기 올리고알긴산 분해효소는 재조합 벡터에 도입되는 인서트 즉, 코딩 유전자의 염기서열에 따라 알긴산 또는 올리고알긴산 분해능에 영향을 주지 않을 정도로 아미노산 서열의 일부에 얼마든지 변형이 있을 수 있다. 상기 변형은 결실, 삽입 또는 치환에 의한 변형을 의미한다.
- [0042] 본 발명은 또한 상기 올리고알긴산 분해효소를 포함하는 불포화 단당 생산용 조성물에 관한 것이다.
- [0043] 상기 불포화 단당은 4-디옥시-L-에리트로-5-헥소세올로우즈 우론산(4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid, DEH)을 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 불포화 단당은 중합도 1일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0045] 상기 올리고알긴산 분해효소는 알긴산 또는 올리고알긴산을 액소 형태로 절단하여 불포화 단당을 생산할 수 있어 기질로 알긴산, 불포화 올리고알긴산 또는 포화 올리고알긴산 중 적어도 하나를 사용할 수 있다.
- [0046] 상기 올리고알긴산 분해효소가 여러 가지의 중합도를 갖는 불포화 올리고알긴산과 포화 올리고알긴산(poly M, poly G 등)을 분해할 수 있으므로, 다른 엔도 타입과의 조합 처리를 통해 시너지 효과를 낼 수 있다. 또한 물리화학적 처리를 통해 생성되는 포화 알긴산과도 반응하기 때문에 물리화학적 및 생물학적 조합처리를 통해 높은 수율의 불포화 단당(unsaturated monomeric sugar; DEH)을 생산할 수 있다.
- [0047] 본 발명은 또한 상기 올리고알긴산 분해효소를 알긴산, 불포화 올리고알긴산 또는 포화 올리고알긴산 중 적어도 하나와 반응시키는 단계를 포함하는 불포화 단당 생산 방법에 관한 것이다.
- [0048] 상기 반응은 pH 4 내지 8, 20 내지 60℃에서 실시할 수 있으며, 보다 구체적으로, pH 5 내지 6, 30 내지 50℃에서 실시할 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0050] <실시예 1> 올리고알긴산 분해효소의 분리정제
- [0051] 폴리사카라이드 분해효소-17(polysaccharide lyase-17) 계열에 속하는 추정적인 알긴산 분해효소(alginate lyase)인 Alg17C에 대한 유전자를 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40로부터 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) BL21(DE3)으로 클로닝하였다. 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0052] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40(ATCC 43961)는 23 g/L의 인스턴트 해수염, 50 mM Tris-HCl, 2 g/L의 글루코오스, 2 g/L의 효모 추출물 및 1 g/L의 암모늄 클로라이드를 함유하는 최소배지에서

30° C 에서 12시간 동안 배양하였다. 클로닝 및 단백질 발현 숙주로 각각 에스케리치아 이콜라이(*Escherichia coli*) DH5 α 및 BL21 (DE3)을 사용하였다.

[0053] 시판중인 DNA 분리 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 사카로파거스 테그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40(ATCC 43961)의 게놈 DNA를 얻었다. 표적 유전자 *alg17C*(GeneBank accession no. ABD82539)는 pfu DNA 중합효소(Fermentas, Glen Burnie, MD, USA)를 사용하여 증폭하였다. 사용된 프라이머는 5'-GCGGGATCCCAAGTTTCTGGCAATGGTCATC-3'(31-mer) 및 5'-GCGGCGGCCGCTTTACGTCGAACCACCACGC-3'(31-mer)이고, 이들은 5' 부위에 *Bam*HI 및 *Not*I 사이트를 가지고 있다. 이중 시스템에서 단백질 발현을 촉진하기 위해, *alg17C*의 시그널 서열은 제거하였다.

[0054] PCR 산물과 pET21a 벡터는 *Bam*HI and *Not*I 으로 이중 절단하고, 최종 DNA 단편을 라이게이션 하였다. *alg17C* 이 탑재된 플라스미드는 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환 시켰다. 세포는 50 µg/mL의 앰피실린이 함유된 Luria-Bertani (LB) broth (BD, Sparks, MD, USA)에서 37°C에서 600 nm에서의 흡광도가 0.5에 도달할 때까지 배양하였다.

[0055] IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, 0.1 mM)를 이용한 유도는 16°C에서 18시간 동안 수행하였다. 원심분리 하여 세포를 수집하고, 세포 펠렛은 -20°C에서 저장하였다.

[0056] 발현된 단백질을 소니케이터(Branson, Danbury, CT, USA)를 사용하여 세포를 파쇄하여 얻었다. 16,000 g 에서 4°C에서 1시간 동안 원심분리 하여 단백질의 용해성 분획을 얻었다. His-trap column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 상기 용해성 분획으로부터 표적 단백질을 얻었다. 분리된 단백질을 Amicon tube (Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 추가로 농축하고, 단백질의 농도는 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다. Alg17C의 분자량은 8%(w/v) 분리젤(resolving gel) 상에서 SDS-PAGE에 의해 측정하였다.

[0057] Alg17C의 효소 활성을 측정하기 위해, 효소 반응은 2 % 알기네이트(w/v)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 포함하는 100µl의 20 mM Tris-HCl buffer (pH 6.0)에서 50.6 nmol Alg17C를 사용하여 40°C에서 30분 동안 수행하였다. 반응 혼합물을 끓는 물에서 5분간 침지하여 반응을 종결하였다. 상대 효소 활성은 디니트로살리실산(dinitrosalicylic acid, DNS) 방법을 사용하여 측정하였고(Miller, GL, *Anal Chem* 31:426-428, 1959), D-글루코오스를 표준물질로 사용하였다.

[0058] 0.1 mM IPTG를 사용하여 37°C에서 유도된 경우, 대부분의 단백질이 봉입체(inclusion body)의 형태로 발현되었다. 그러나, 유도 온도를 16°C로 낮춘 경우, 재조합 단백질 대부분이 수용성 형태로 발현되었다.

[0059] Alg17C를 분리하기 위하여, 세포를 초음파로 분쇄하고 원심분리한 후 그 상등액을 정제를 위하여 His-trap 컬럼을 통과하였다. 정제된 Alg17C를 초미세여과로 농축하였다. 발현된 재조합 Alg17C의 분자량은 SDS-PAGE에 의하여 대략 79.1kDa으로 측정되었다(도 1).

[0060] *alg17C* 유전정보가 입력된 단백질의 아미노산의 수는 733 aa이고 81.6kDa의 분자량을 가지며, CAZy 데이터베이스에 PL-17에 속하는 알긴산 분해효소로 알려져 있다. 현재까지 알려진 두 가지 올리고알긴산 분해효소(oligoalignate lyase)는 PL-15에 속하며 스펡고모나스 에스피(*Spingomonas sp.*) strain A1의 A1-IV 효소(Hashimoto, W, Miyake *et al.* (2000) *J Bacteriol* 182:4572-4577)와 아가로벡테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 Atu3025 효소(Ochiai, A *et al.*(2010) *J Biol Chem* 285:24519-24528)가 알려져 있다.

[0061] 도 2에 나타난 바와 같이, A1-IV와 Atu3025간에는 50% 이상의 단백질과 유전자 상동성이 나타나지만, Alg17C와는 20% 미만의 상동성이 나타났다. 또한 기질 결합자리에서도 Atu3025은 Arg<sup>199</sup>, His<sup>311</sup>, Tyr<sup>365</sup>, Trp<sup>467</sup>와 His<sup>531</sup>(Ochiai, A *et al.*(2010) *J Biol Chem* 285:24519-24528)와 같은 아미노산을 갖는다고 알려져 있지만 Alg17C는 그와 같은 자리에 위치하는 아미노산이 달랐다.

[0062] <실험예 1> Alg17C의 최적 온도 및 pH 조사

[0063] 상기 실시예 1에서 제조된 Alg17C 활성에 대한 최적 온도를 결정하기 위하여, 그 반응 혼합물을 도 3a와 같이 20에서 60°C의 여러 온도 범위에서 배양하였다. 효소활성은 20에서 40°C의 온도 범위에서는 반응 온도가 증가함에 따라서 점차적으로 증가하여 40°C에서 최대 값에 도달하였다. 50 및 60°C의 반응온도에서 온도 증가는 40°C

에서 관찰한 것에 비교하여 효소 활성이 감소하였다. 따라서 40℃를 Alg17C의 최적 온도로 선택하였고, 이 온도를 모든 후속 실험에서 사용하였다.

[0064] 도 3b는 4-8의 범위의 pH에서 Alg17C의 상대적 활성을 나타낸다. Alg7B는 pH 6에서 최대 활성을 나타내었고 그 전후의 pH에서 급격하게 효소 활성이 낮아지는 것을 확인하였다.

[0065] <실험예 2> TLC 및 LC-MS를 사용한 효소의 반응 특성 및 산물의 분석

[0066] Alg17C의 반응 특성을 파악하기 위해 알긴산(sodium alginate), 엔도-타입 알긴산 분해효소인 Alg7D로 분해한 올리고알긴산과 poly M(polymanuronic acid)과 poly G(polygluconic acid)의 세가지 다른 종류에 해당하는 기질을 사용하였다.

[0067] 소듐 알기네이트로부터 부분 산 가수분해 후 소듐 만루론산, M-rich 분획인 poly M 및 소듐 글루론산, G-rich 분획인 poly G를 제조하였고, poly M 및 poly G는 pH 별로 분획하였다(Haug *et al. Acta Chem Scand* 20:183-190, 1966; Gacesa and Wusteman 1990 *Appl Environ Microbiol* 56:2265-2267). Thin layer chromatography (TLC)를 사용하여 반응 시간 대 별(0, 0.08, 0.5, 1, 4, 및 18 h)로 Alg17C를 이용한 분해 후 프로파일에서의 변화를 시험하였다. 반응 산물은 *n*-부탄올:아세트산:물(3:2:2 부피비)의 혼합 용매 시스템을 사용하여 전개시키고, 에탄올에 녹인 10%(v/v) 설펡산 용액을 사용하고 이어 TLC 플레이트를 130℃에서 1분간 열처리 하여 시각화하였다.

[0068] 알긴산과 Alg17C의 반응에서 얻은 산물의 분자량은 ACQUITY BEH C18 column (100×2.1 mm, 1.7  $\mu$ m; Waters)이 장착된 ACQUITY UPLCTM (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 UPLC/Q-TOF tandem MS(ultra performance liquid chromatography/quadruple time of flight tandem mass spectrometry)에서 측정하였다. 2개의 이동상은 용액 A(증류수에 녹인 0.1%(w/v) 포름산) 및 용액 B(아세트오니트릴에 녹인 0.1%(w/v) 포름산)을 포함하고 있다. 유속은 직선 구배로 0.3 mL/분으로 셋팅하고, 질량 스펙트럼은 -TOF Micro mass detector (Waters)를 이용하여 얻었다.

[0069] 도 4a에 나타난 바와 같이, Alg17C는 알긴산과 반응하여 오직 한 가지 스팟만을 생산하는 것을 볼 수 있으며 시간이 경과해도 스팟의 수의 변화가 관찰되지 않았다.

[0070] 도 4b에 나타난 바와 같이 Alg7D에 의해 생산된 중합도가 2에서 5에 해당되는 올리고알긴산이 모두 하나 스팟으로 변환되는 것을 알 수 있다.

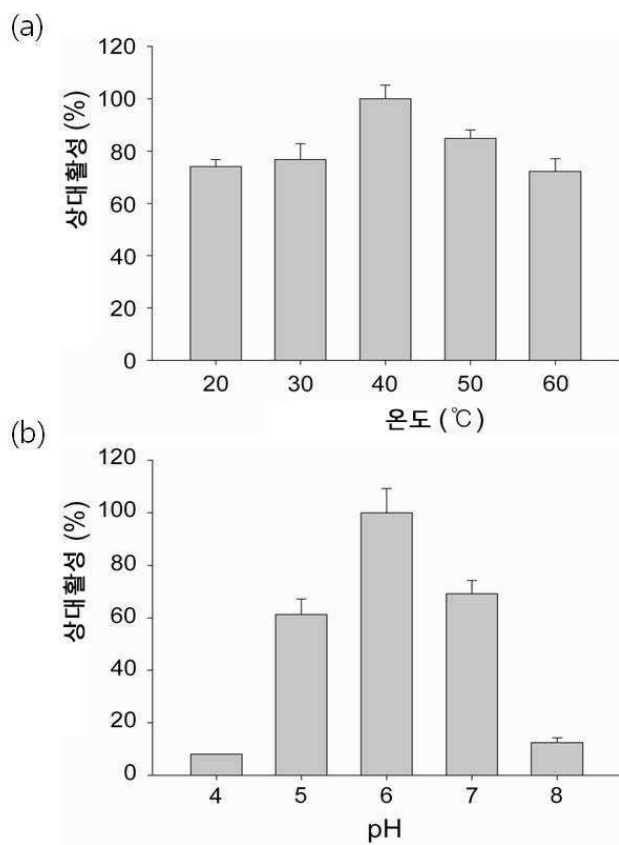
[0071] poly M과 poly G를 Alg17C와 반응하였을 때도 도 4c의 라인 2와 4와 같이 오직 하나의 스팟만을 나타나는 것을 확인하였다.

[0072] 이와 같은 박층 크로마토그래피 분석을 종합하면 Alg17C는 기질에 상관없이 오직 하나의 물질만을 생산하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이와 같이 생산된 물질의 정확한 분자량을 알기 위해, LC/MS를 이용하여 분석하였는데 175m/z[M - H]<sup>-</sup>의 피크가 검출되었다(도 5). 이 피크는 알긴산의 최종 당화물인 DEH의 분자량과 동일하며, 이를 통해 Alg17C의 최종 산물이 DEH임을 확인할 수 있었다.

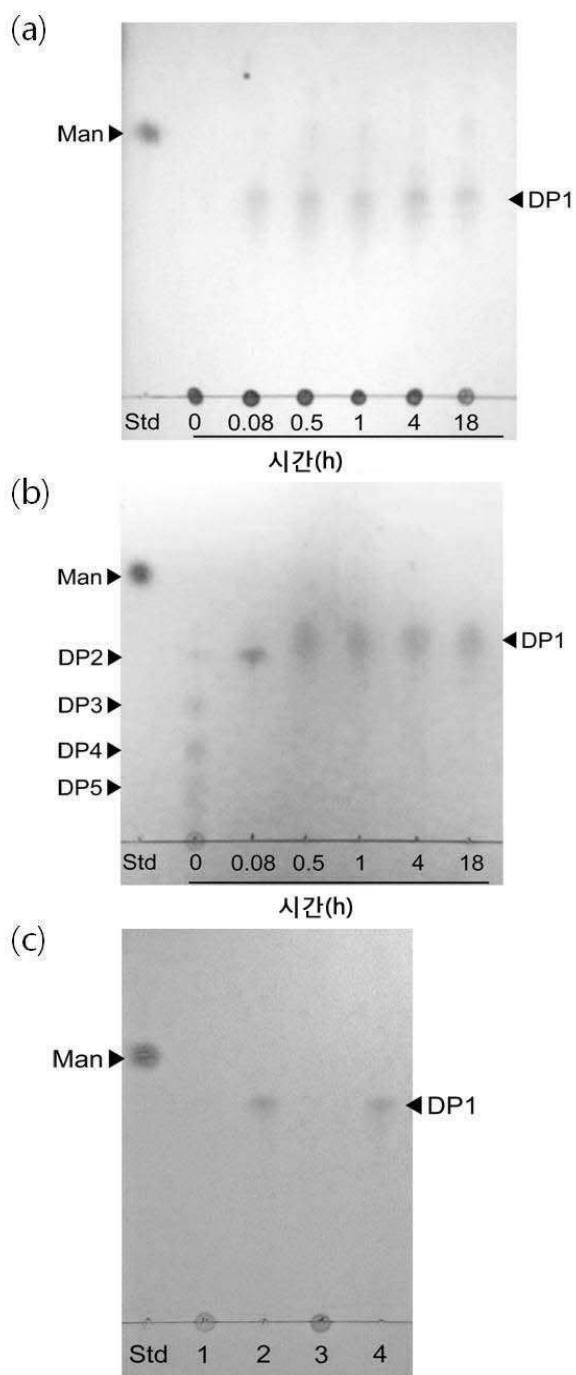
[0073] 요약하면, 본 발명은 PL-17에 속하는 Alg17C를 *S. degradans* 2-40으로부터 클로닝하여 유전자의 유도 동안에 배양 온도를 16℃로 이동하여 *E. coli* BL21(DE3)에서 활성화된 수용성 형태로 발현하였다. 재조합 Alg17C는 알긴산, 올리고알긴산과 포화 알긴산(poly M과 poly G)등 알긴산 유래 중합체 모두를 엑소 형태로 절단하여 불포화 단당을 생산할 수 있다는 것을 확인하였다. Alg17C가 기질에 대한 최적 반응 조건은 pH 6, 온도 40℃임을 확인하였다.



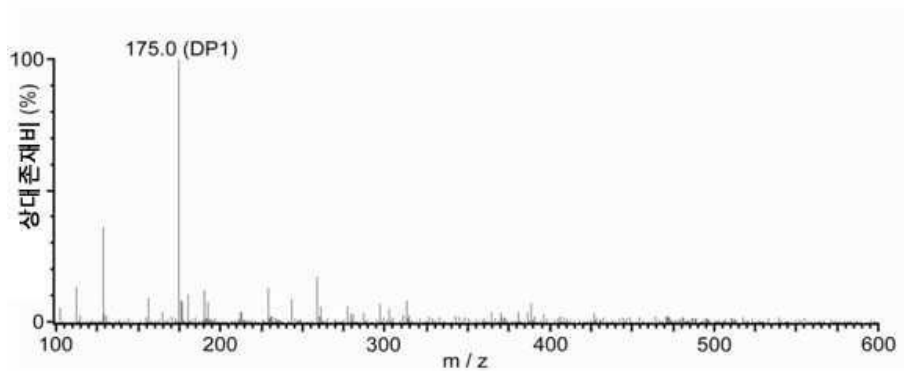
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
- <120> Novel oligoalginate lyase and enzymatic production method of unsaturated monomeric sugar from alginate
- <130> P111198
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 736
- <212> PRT
- <213> Alginate lyase from Saccharophagus degradans strain 2-40
- <400> 1

Met Leu Ser Val Asn Thr Ile Lys Asn Thr Leu Leu Ala Ala Val Leu  
1 5 10 15  
Val Ser Val Pro Ala Thr Ala Gln Val Ser Gly Asn Gly His Pro Asn  
20 25 30  
Leu Ile Val Thr Glu Gln Asp Val Ala Asn Ile Ala Ala Ser Trp Glu  
35 40 45  
Ser Tyr Asp Ala Tyr Ala Glu Gln Leu Asn Ala Asp Lys Thr Asn Leu  
50 55 60  
Asp Ala Phe Met Ala Glu Gly Val Val Val Pro Met Pro Lys Asp Ala  
65 70 75 80  
Gly Gly Gly Tyr Thr His Glu Gln His Lys Arg Asn Tyr Lys Ala Ile  
85 90 95

Arg Asn Ala Gly Phe Leu Tyr Gln Val Thr Gly Asp Glu Lys Tyr Leu  
 100 105 110  
 Thr Phe Ala Lys Asp Leu Leu Leu Ala Tyr Ala Lys Met Tyr Pro Ser  
 115 120 125  
 Leu Gly Glu His Pro Asn Arg Lys Glu Gln Ser Pro Gly Arg Leu Phe  
 130 135 140  
 Trp Gln Ser Leu Asn Glu Ala Val Trp Leu Val Tyr Ser Ile Gln Gly  
 145 150 155 160  
 Tyr Asp Ala Ile Ile Asp Gly Leu Ala Ala Glu Glu Lys Gln Glu Ile  
 165 170 175  
 Glu Ser Gly Val Phe Leu Pro Met Ala Lys Phe Leu Ser Val Glu Ser  
 180 185 190  
 Pro Glu Thr Phe Asn Lys Ile His Asn His Gly Thr Trp Ala Val Ala  
 195 200 205  
 Ala Val Gly Met Thr Gly Tyr Val Leu Gly Asn Asp Glu Leu Val Glu  
 210 215 220  
 Ile Ser Leu Met Gly Leu Asp Lys Thr Gly Lys Ala Gly Phe Met Lys  
 225 230 235 240  
 Gln Leu Asp Lys Leu Phe Ser Pro Asp Gly Tyr Tyr Thr Glu Gly Pro  
 245 250 255  
 Tyr Tyr Gln Arg Tyr Ala Leu Met Pro Phe Ile Trp Phe Ala Lys Ala  
 260 265 270  
 Ile Glu Thr Asn Glu Pro Glu Arg Lys Ile Phe Glu Tyr Arg Asn Asn  
 275 280 285  
 Ile Leu Leu Lys Ala Val Tyr Thr Thr Ile Asp Leu Ser Tyr Ala Gly  
 290 295 300  
 Tyr Phe Phe Pro Ile Asn Asp Ala Leu Lys Asp Lys Gly Ile Asp Thr  
 305 310 315 320  
 Val Glu Leu Val His Ala Leu Ala Ile Val Tyr Ser Ile Thr Gly Asp  
 325 330 335  
 Asn Thr Leu Leu Asp Ile Ala Gln Glu Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr  
 340 345 350

Gly Asp Gly Leu Lys Val Ala Lys Ala Val Gly Glu Gly Leu Thr Gln  
355 360 365

Pro Tyr Asn Tyr Arg Ser Ile Leu Leu Gly Asp Gly Ala Asp Gly Asp  
370 375 380

Gln Gly Ala Leu Ser Ile His Arg Leu Gly Glu Gly His Asn His Met  
385 390 395 400

Ala Leu Val Ala Lys Asn Thr Ser Gln Gly Met Gly His Gly His Phe  
405 410 415

Asp Lys Leu Asn Trp Leu Leu Tyr Asp Asn Gly Asn Glu Ile Val Thr  
420 425 430

Asp Tyr Gly Ala Ala Arg Tyr Leu Asn Val Glu Ala Lys Tyr Gly Gly  
435 440 445

His Tyr Leu Ala Glu Asn Asn Thr Trp Ala Lys Gln Thr Ile Ala His  
450 455 460

Asn Thr Leu Val Val Asn Glu Gln Ser His Phe Tyr Gly Asp Val Thr  
465 470 475 480

Thr Ala Asp Leu His His Pro Glu Val Leu Ser Phe Tyr Ser Gly Glu  
485 490 495

Asp Tyr Gln Leu Ser Ser Ala Lys Glu Ala Asn Ala Tyr Asp Gly Val  
500 505 510

Glu Phe Val Arg Ser Met Leu Leu Val Asn Val Pro Ser Leu Glu His  
515 520 525

Pro Ile Val Val Asp Val Leu Asn Val Ser Ala Asp Lys Ala Ser Thr  
530 535 540

Phe Asp Leu Pro Leu Tyr Phe Asn Gly Gln Ile Ile Asp Phe Ser Phe  
545 550 555 560

Lys Val Lys Asp Asn Lys Asn Val Met Lys Met Leu Gly Lys Arg Asn  
565 570 575

Gly Tyr Gln His Leu Trp Leu Arg Asn Thr Ala Pro Val Gly Asp Ala  
580 585 590

Ser Glu Arg Ala Thr Trp Ile Leu Asp Asp Arg Phe Tyr Ser Tyr Ala

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

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

<210> 2

<211

> 2211

<212> DNA

<213> Alginate lyase from Saccharophagus degradans strain 2-40

<400> 2

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atgttaagcg ttaatactat taaaaacacc ttgctggcag cagtgcctgt tctgtgcct   | 60  |
| gcaactgctc aagtttctgg caatgggtcat ccgaatctta ttgttacaga gcaagacgta | 120 |
| gcaaacatag ctgctagctg ggagtcttat gatgcatatg ccgagcaatt aaatgccgac  | 180 |
| aagaccaacc tcgacgcatt tatggctgaa ggtgttgttg tgcctatgcc taaagatgct  | 240 |
| ggcggcgggt ataccacga gcaacacaag cgcaactata aagctattcg caatgccggc   | 300 |
| tttttgtatc aggtaacggg tgacgaaaaa tatttaacgt tcgccaaaga cttgttgcta  | 360 |
| gcctacgcca aaatgtacce atcgctaggt gagcacccca atcgcaaaga gcagtcgcct  | 420 |
| ggtcgattgt ttggcgaag cctaaatgaa gctgtttggt tggtttatag catacaaggc   | 480 |
| tacgacgcca taatagacgg cctagccgca gaagaaaaac aagaaattga gtcgggtgtt  | 540 |
| tttctgccca tggctaaatt tctttctgta gagtcacctg aaacattcaa caagattcac  | 600 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| aatcacggta cgtgggccgt agccgcagta ggcatgactg gttacgtact tggcaacgat  | 660  |
| gagctcgttg aaatctcgtt aatgggttta gataaaaccg gtaaagcggg ttttatgaag  | 720  |
| cagttggata aactgttttc gccagatggc tattacacag aaggcccata ctaccaacgc  | 780  |
|                                                                    |      |
| tatgcactta tgccatttat ttggtttgcc aaagcgattg aaaccaatga gcctgagcga  | 840  |
| aaaatatttg aataaccgaa taatattttg ttgaaggcgg tgtataccac tatcgatctt  | 900  |
| agttatgcgg gttacttttt ccccatcaat gatgcgctta aagataaagg tattgatacc  | 960  |
| gtagagcttg tacatgcgtt ggcaattgtc tactcaatta ccggtgacaa tacattgtta  | 1020 |
| gatatcgcg aagaacaagg gcgcattagc ctaactgggt acggcctaaa agtggcaaag   | 1080 |
| gctgttggcg aaggtttaac ccagccatat aactatcgct ccattttatt gggtgatggc  | 1140 |
| gctgatggtg atcaagggtc tctgtctatt caccgtttgg gtgaagggtca taaccatatg | 1200 |
|                                                                    |      |
| gcgctgggtg cgaagaatac tagccaaggt atggggcatg gtcacttcga taagcttaat  | 1260 |
| tggtttttat acgataacgg caacgaaata gttaccgatt acggtgcggc gcgtaccta   | 1320 |
| aacgttgaag ctaaatacgg cggtcattat ttagctgaaa acaatacatg ggctaaacaa  | 1380 |
| actatcgcg acaacacttt ggttgtaaac gagcaaagcc atttttatgg cgacgttaca   | 1440 |
| acagccgatt tgcatacccc cgaagtgtct agcttttata gtggcgaaga ctatcagtta  | 1500 |
| agttctgcga aagaggctaa tgcctacgat ggcggtgagt ttgttcgctc catgctgctg  | 1560 |
| gtaaatgtgc cttcgctaga gcaccaatt gttgtagatg tgttgaatgt ttctgccgat   | 1620 |
|                                                                    |      |
| aaagcctcaa catttgattt gccattgtat tttaacggtc aaattatcga ttttagcttt  | 1680 |
| aaggtaaaag acaacaaaaa tgtgatgaaa atgctaggca agcgcaatgg ctaccaacac  | 1740 |
| ctgtggttgc gtaaacctgc accagtaggt gacgccagtg agcgcgctac ttggatactt  | 1800 |
| gatgatcgct tttattctta tgcgtttgtt acttctactc caagtaaaaa gcaaatgta   | 1860 |
| ttgattgctg agttgggagc aaacgaccct aactacaatt tgcgtcagca gcaggtatta  | 1920 |
| attcgtcgag tagaaaaagc gaagcaggca tcgtttgtta gcgtgttaga gccacacggt  | 1980 |
| aaatacgatg gttcgttgga gacgactagc ggtgcttact caaatgttaa atcagttaaa  | 2040 |
|                                                                    |      |
| cacgtaagcg aaaacggtaa agatgtggtt gtagttgatt tgaagatgg cagcaatgtt   | 2100 |
| gttgtcgctt tgcctacaa cgctaatagc gagcaagtac ataaagtaaa cgccggtgaa   | 2160 |
| gaagcgatag agtgggaagg cttctctagc gtgggtggtc gacgtaaata a           | 2211 |