



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0146856

(43) 공개일자 2014년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/00 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0069697

(22) 출원일자 2013년06월18일

심사청구일자 2013년06월18일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

한성옥

서울특별시 성북구 길음로 119, 209동 1503호 (길음동, 길음뉴타운(대우푸르지오아파트))

현정은

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교

김영인

충청북도 청주시 흥덕구 서현중로 48, 104동 1102호 (가경동, 가경선광로즈웰아파트)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 7 항

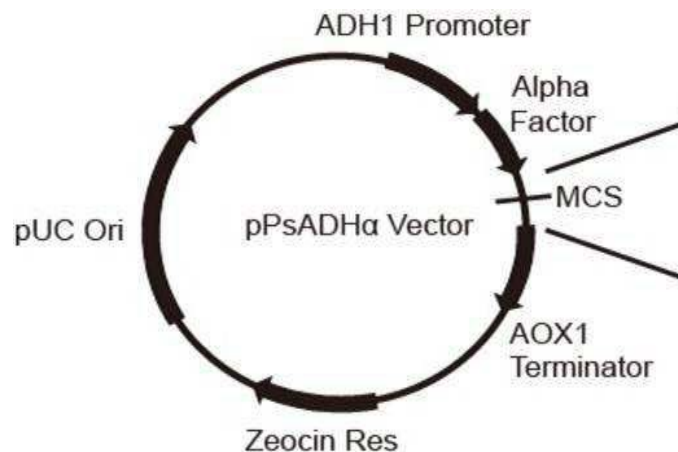
(54) 발명의 명칭 클로스트리디움 속 미생물 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈-비 및 소형 셀룰로오스 결합단백질-에이를 이용한 섬유소 분해효소 복합체의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 클로스트리디움 속 미생물 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈-비 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이를 이용한 섬유소 분해효소 복합체의 제조방법에 관한 것으로, 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(chimeric Endo- β -1,4-glucanase E; cCelE) 생성능을 가지는 재조합 효모, 자일란네이즈-비(xylanase B;

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



XynB) 생성능을 가지는 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(mini cellulose binding protein A; miniCbpA) 생성능을 가지는 재조합 효모를 배양하여 (i) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, (ii) 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 (iii) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체를 제조하는 방법 및 이를 이용한 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 방법으로 제조된 (i) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, (ii) 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 (iii) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체는 셀룰로오스 및 자일로오스 분해능이 우수하여, 양조, 제빵, 알코올 생산, 사료 생산 및 생균제 개발 등에 유용하게 사용될 수 있고 특히 섬유소의 분해와 분해산물로부터 알코올을 생산하는 동시당화발효 융합공정(SSF, simultaneous saccharification and fermentation 혹은 consolidated bioprocessing)에 사용할 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20113010090040-12-2-200
부처명	한국에너지기술평가원
연구관리전문기관	연구지원부
연구사업명	신재생에너지기술개발사업
연구과제명	[협동]효소가수분해에 의한 초본계 바이오에탄올 생산 및 부산물 활용기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 섬유소 분해효소 복합체의 제조방법:

(a) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(chimeric endo- β -1,4-glucanase E; cCelE)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모, 자일란네이즈-비(xylanase B; XynB)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모 및 소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이(mini cellulose binding protein A; miniCbpA)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모를 배양하는 단계;

(b) 각각의 재조합 효모에서 생성된 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈 비 및 소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이가 결합하여 (i) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, (ii) 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 (iii) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체를 형성시키는 단계; 및

(d) 상기 형성된 섬유소 분해효소 복합체를 회수하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 재조합 벡터는 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 pPsADH α -cCelE, 자일란네이즈-비를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 pPsADH α -XynB 및 소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 pPsADH α -mCbpA인 것을 특징으로 하는 섬유소 분해효소 복합체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 자일란네이즈 비를 코딩하는 유전자 및 소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이를 코딩하는 유전자는 클로스트리디움 셀룰로보란스(*clostridium cellulovorans*) 유래인 것을 특징으로 하는 섬유소 분해효소 복합체의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(cCelE)를 코딩하는 유전자는 클로스트리디움 서머셀럼(*clostridium thermocellum*)의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이를 코딩하는 유전자와 클로스트리디움 셀룰로보란스(*clostridium cellulovorans*)의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비(EngB)의 도커린(dokerin) 부위를 코딩하는 유전자가 결합된 것을 특징으로 하는 섬유소 분해효소 복합체의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 효모는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)인 것을 특징으로 하는 섬유소 분해효소 복합체의 제조방법.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 바이오매스의 동시당화 발효에 의한 에탄올의 제조방법:

(a) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(chimeric endo- β -1,4-glucanase E; cCelE)를 코딩하는 유전자 함유

유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모, 자일란네이즈-비(xylanase B; XynB)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(mini cellulose binding protein A; miniCbpA)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모를 배양하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 배양된 재조합 효모에 바이오매스를 첨가하고 추가로 배양하여 에탄올을 생성시키는 단계; 및

(c) 생성된 에탄올을 회수하는 단계;

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 바이오매스는 거대억새(*Miscanthus giganteus*)인 것을 특징으로 하는 에탄올의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 클로스트리디움 속 미생물 유래의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈-비 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이를 이용한 섬유소 분해효소 복합체의 제조방법에 관한 것으로, 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(chimeric Endo- β -1,4-glucanase E; cCelE) 생성능을 가지는 재조합 효모, 자일란네이즈-비(xylanase B; XynB) 생성능을 가지는 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(mini cellulose binding protein A; miniCbpA) 생성능을 가지는 재조합 효모를 배양하여 (i) 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, (ii) 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 (iii) 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체를 제조하는 방법 및 이를 이용한 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

최근 원유가격의 급등과 에너지 고갈에 대한 우려가 심각해지면서 대체 에너지 생산에 관한 관심이 증폭되고 있다. 대체 에너지 중 수송용 연료의 경우 가장 활발하게 대두되고 있는 소재가 바로 바이오 에탄올이다. 이는 자동차의 최종 기술 목표인 전기자동차 또는 수소자동차의 개발단계까지 현재의 아직도 개발초기 단계여서 이의 완료까지 이를 대체할 수 있는 절충형의 대체에너지가 필요하다. 현재 바이오에탄올은 휘발유와 혼합하여 사용할 수 있어 바이오 디젤과 더불어 대표적인 재생자원 에너지이며 바이오 에탄올 연소 시 발생하는 이산화탄소는 교토의정서에서 규정한 온실가스 계산에서 예외 적용을 받아 온실가스 감축효과가 있다. 또한 보급에 별도의 인프라 (주유소 등) 구축이 필요한 다른 청정연료와는 달리 기존 인프라에서 보급이 가능해 조기 상용화가 용이하다.

[0003]

현재 바이오 에탄올은 주로 사탕수수 및 옥수수로 대표되는 당질계 바이오매스, 목재와 같은 셀룰로오스계 바이오매스, 그리고 폐목자원, 잉여농산물 및 초본계 작물과 같은 리그노 셀룰로오스계 바이오매스로부터 생산될 수 있다. 전분질계의 사탕수수 및 옥수수는 현재 대표적인 바이오에탄올 생산의 재료로 실제 브라질의 경우 풍부한 사탕수수 재배지를 근간으로 하여 이를 활용하여 에탄올의 연료상업화에 성공하여 2004년에 이르러 전체 차량 연료 소비량의 약 30%를 바이오 에탄올로 대체하는 데 성공하였다. 미국의 경우 풍부한 옥수수를 활용한 바이오 에탄올 생산의 상당한 상업화 기술을 축적하여 2017년까지 전체 수송용 에너지 수요의 20%를 바이오에탄올로 대체할 예정이다.

[0004]

기존에 사용되어 온 옥수수 등을 중심으로 한 당질계 바이오매스의 경우 2008년 초 곡물가격의 급등으로 인한 애그플레이션의 영향으로 원료수급 및 가격경쟁력의 측면에서 부정적인 평가를 받게 되어 최근 가장 많이 활용되고 있는 것이 목질계 또는 리그노 셀룰로오스계 바이오매스이다. 이들은 기존의 당질계와는 달리 원료수급이나 윤리적인 문제에 제한이 없어 이러한 재료를 사용하여 바이오에탄올을 생산하려는 여러 연구가 시도되고 있다. 그러나 이러한 원료들의 주요성분은 대부분이 셀룰로오스로 구성되어 있는데 이를 직접 에탄올 발효에 활용하기 위해서는 이들의 충분한 당화가 필요하다. 그러나 당화 공정을 거처도 대부분이 분해되지 않은 올리고머 또는 폴리머 형태로 남아있는 경우가 많다.

- [0005] 클로스트리디움 써모셀럼 (*Clostridium thermocellum*)은 혐기성, 호열성이며 셀룰로오스를 가수분해하고 에탄올을 생산하는 세균으로서, 다양한 섬유소 분해 효소(cellulase)를 생산하고 또한 효소복합체인 셀룰로솜(cellulosome)을 만들어내는 것으로 알려져 있다. 또한 매우 높은 온도에서 자랄 수 있는 박테리아의 특성과 결합되어 미생물은 셀룰로오스계 바이오매스 자원들로부터 산업적으로 수소와 에탄올을 생산하는 공정들을 개발하기 위한 대상 물질로서 뛰어난 장점들을 지니고 있다. 또한, 결정형 섬유소의 효과적인 분해에는 적어도 세가지의 섬유소 분해효소, 즉, 엔도글루칸아제(endoglucanase), 엑소글루칸아제(exoglucanase)(또는 셀로비오하이드롤라제 cellobiohydrolase) 및 베타-글루코시다제(β -glucosidase)가 동시에 필요하며, 이들의 상승작용으로 섬유소 분해능이 많이 증가한다고 보고되었다(Murashima, K. *et al.*, *J Bacteriol*, 184(18):5088, 2002; B Schwarz, *Microbiol Biotechnol.*, 56:634, 2001; Shoham, Y. *et al.*, *Trends Microbiol.*, 7(7):275, 1999).
- [0006] 한편, 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*clostridium cellulovorans*)는 혐기중온성 세균으로서, 다양한 섬유소 분해 효소(cellulase)를 생산하고 또한 효소복합체인 셀룰로솜(cellulosome)을 만들어내는 것으로 알려져 있다. 이들 혐기성 세균에서 셀룰로솜 조합체(dellulosomal complex)의 기본적인 구조는 하나의 cellulose binding module(CBM)을 가지고 있는 기본 골격 소단위체(primary scaffolding subunit)가 주축이 되어 catalytic module을 가진 셀룰라아제 혹은 헤미셀룰라아제의 효소 소단위체(enzyme Subunits)들이 합쳐져서 이루어진다. 이 구조를 이루기 위해 기본 골격 소단위체에 있는 9개의 코히즌 모듈(cohesin module)이 강력하게 각각의 효소 소단위체에 있는 도커린 모듈(dockerin module)에 단백질 간의 상호작용(Protein-Protein interaction)에 의해 결합하게 된다.
- [0007] 이에 본 발명자들은 섬유소 분해능이 우수한 효소를 생산하기 위해 예의 노력한 결과, 클로스트리디움 속 균주로부터 유래한 엔도글루칸아제, 자일란네이즈 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이로 구성된 섬유소 분해효소 복합체가 효과적으로 바이오에탄올을 생성하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 클로스트리디움 속 미생물 유래의 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈 비 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이가 결합하여 형성된 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체의 제조방법 및 생성된 섬유소 분해효소 복합체를 이용한 바이오에탄올 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (a) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(chimeric endo- β -1,4-glucanase E; cCelE)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모, 자일란네이즈 비(xylanase B; XynB)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(mini cellulose binding protein A; miniCbpA)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모를 배양하는 단계; (b) 각각의 재조합 효모에서 생성된 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈 비 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이가 결합하여 (i) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, (ii) 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 (iii) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체를 형성시키는 단계; 및 (d) 상기 형성된 섬유소 분해효소 복합체를 회수하는 단계를 포함하는 섬유소 분해효소 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한, (a) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(cCelE)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모, 자일란네이즈 비(xylanase B)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(mini cellulose binding protein A; miniCbpA)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모를 배양하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 재조합 효모에 바이오매스를 첨가하고 추가로 배양하여 에탄올을 생성시키는 단계; 및 (c) 생성된 에탄올을 회수하는 단계를 포

합하는 바이오매스의 동시당화 발효에 의한 에탄올의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011]

본 발명의 방법으로 제조된 (i) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, (ii) 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 (iii) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체는 셀룰로오스 및 자일로오스 분해능이 우수하여, 양조, 제빵, 알코올 생산, 사료 생산 및 생균제 개발 등에 유용하게 사용될 수 있고 특히 섬유소의 분해와 분해산물로부터 알코올을 생산하는 동시당화발효 융합공정(SSF, simultaneous saccharification and fermentation 혹은 consolidated bioprocessing)에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012]

도 1은 pPsADHa 벡터의 모식도이다

도 2는 본 발명에서 제시된 키메릭 엔도-글루칸아제-이(chimeric endo- β -1,4-glucanase E; cCelE)를 코딩하는 유전자, 자일란네이즈-비(xylanase B)를 코딩하는 유전자, 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(mini cellulose binding protein A; miniCbpA)를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pPsADHa의 모식도이다.

도 3은 본 발명에서 제시된 자일란네이즈-비(A)와 키메릭 엔도-글루칸아제-이(B) 유전자를 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에 재조합시킨 후 배양 농축하여, 효소분비 정도를 확인한 Halo 실험 데이터이다.

도 4는 본 발명에서 제시된 재조합 벡터 pPsADHa/cCelE, pPsADHa/XynB, pPsADHa/mCbpA가 삽입된 효모 효소 분비를 확인하기 위하여, 콜로니와 배양 농축액의 Native-PAGE를 통한 Zymogram에서의 효소활성을 확인한 데이터이다.

도 5는 본 발명에서 형성된 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체를 확인한 데이터이다.

도 6은 본 발명에서 발현한 섬유소 분해효소 복합체의 활성을 측정한 그래프이다.

도 7은 본 발명에서 발현한 섬유소 분해효소 복합체를 이용하여 바이오매스인 거대억새(*Miscanthus sinensis*)에서 에탄올 생성을 확인한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0014]

본 발명은 일 관점에서, (a) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(chimeric endo- β -1,4-glucanase E; cCelE)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모, 자일란네이즈-비(xylanase B; XynB)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(mini cellulose binding protein A; miniCbpA)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모를 배양하는 단계; (b) 각각의 재조합 효모에서 생성된 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈 비 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이가 결합하여 (i) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, (ii) 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 (iii) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체를 형성시키는 단계; 및 (d) 상기 형성된 섬유소 분해효소 복합체를 회수하는 단계.를 포함하는 섬유소 분해효소 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0015]

본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 재조합 벡터는 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 pPsADHa-cCelE, 자일란네이즈-비를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 pPsADHa-XynB 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 pPsADHa-mCbpA인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016]

본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 자일란네이즈 비(xylanase B; XynB)를 코딩하는 유전자 및 소형 셀룰로오스

결합단백질 에이(mini cellulose binding protein A; miniCbpA)를 코딩하는 유전자는 클로스트리디움 셀룰로보란스(*clostridium cellulovorans*) 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(cCelE)를 코딩하는 유전자는 클로스트리디움 서머셀럼(*clostridium thermocellum*)의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(CelE)를 코딩하는 유전자와 클로스트리디움 셀룰로보란스(*clostridium cellulovorans*)의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비(endo- β -1,4-glucanase B; EngB)의 도커린(dokerin) 부위를 코딩하는 유전자가 결합된 것을 특징으로 할 수 있다.

[0018] 본 발명에서 클로스트리디움 속 균주의 도커린 모듈이란 클로스트리디움 속의 셀룰로즈-결합 단백질의 일부분인 코히즌 모듈과의 상호작용으로 셀룰로솜을 형성하는 셀룰레이즈(cellulosomal cellulase) 단백질이 가지는 모듈을 의미한다.

[0019] 본 발명에서 소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이A는(mCbpA)는 셀룰로솜 기본골격 소단위체를 만드는 셀룰로오스에 결합하는 단백질을 의미하며, 본 발명에서 사용한 소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이A는 mCbpA란 클로스트리디움 속의 셀룰로즈-결합 단백질의 하나인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(CbpA) 중에서 하나의 셀룰로즈 결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)을 가지는 소형 셀룰로즈-결합 단백질을 의미한다.

[0020] 본 발명에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0021] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 Sambrook, *et. al.*, *supra*의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation) [Neumann, *et. al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982] 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.

[0022] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더(leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0023] 본 발명에서 효모를 숙주로서 사용하는 경우는, 발현벡터로서, 예를 들면 YEp13, YCp50, pRS계, pYEX계 벡터 등이 이용가능하다. 프로모터로서는, 예를 들면 GAL프로모터, AOD프로모터 등을 사용할 수 있다. 효모에의 재조합체 DNA의 도입방법으로는, 예를 들면 일렉트로포레이션법(*Method Enzymol.*, 194:182, 1990), 스페로플라스트법(*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:1929, 1978), 아세트산리튬법(*J. Bacteriol.*, 153:163, 1983) 등이 이용가능하다.

[0024] 본 발명의 재조합 벡터는 그 자신이 숙주세포 속에서 자율복제 가능한 동시에, 프로모터, 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈 비 또는 소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이를 코딩하는 유전자를 함유하는 DNA

및 전사종결서열 등의 발형에 필요한 구성을 가진 것임이 바람직하다. 본 발명에서는 pPsADH α 벡터를 사용하였으나, 상기의 요건을 만족하는 벡터이면 어느 것이나 사용가능하다.

[0025] 본 발명에 따른 상기 재조합 효모는 통상의 방법에 따라 상기 유전자를 효모의 염색체(chromosome) 상에 삽입시키거나, 상기 재조합 벡터를 효모의 플라스미드(plasmid) 상에 도입시킴으로써 제조할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 물리적인 방법으로서, microinjection(세포에 DNA를 직접 넣는 것), liposome, directed DNA uptake, receptor-mediated DNA transfer 또는 Ca^{++} 을 이용한 DNA 운반 방법 등이 있으며, 최근에는 바이러스(virus)를 이용한 유전자 운반 방법이 많이 사용되고 있다. 일례로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터를 이용하는 방법 등이 있으며, 특히, 레트로바이러스는 유전자 전달 효율이 높고 gross deletion이나 숙주 DNA와 재정렬(rearrangement : 숙주 DNA 중 자기 DNA와 유사한 부위를 바꾸는 것으로 숙주 DNA 기능의 변화를 초래함)에 의한 결함 없이 넓은 범위의 세포들에서 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 사용하였으나, 이에 한정되는 것은 아니며, *Agrobacterium* 속, *Aspergillus* 속, *Acetobacter* 속, *Aminobacter* 속, *Agromonas* 속, *Acidiphilium* 속, *Bulleromyces* 속, *Bullera* 속, *Brevundimonas* 속, *Cryptococcus* 속, *Chionosphaera* 속, *Candida* 속, *Cerinosterus* 속, *Escherichia* 속, *Exisophiala* 속, *Exobasidium* 속, *Fellomyces* 속, *Filobasidium* 속, *Geotrichum* 속, *Graphiola* 속, *Gluconobacter* 속, *Kockovaella* 속, *Curtzmanomyces* 속, *Lalaria* 속, *Leucospoidium* 속, *Legionella* 속, *Psedozyma* 속, *Paracoccus* 속, *Petromyc* 속, *Rhodotorula* 속, *Rhodospiridium* 속, *Rhizomonas* 속, *Rhodobium* 속, *Rhodoplanes* 속, *Rhodopseudomonas* 속, *Rhodobacter* 속, *Sporobolomyces* 속, *Spridobolus* 속, *Saitoella* 속, *Schizosaccharomyces* 속, *Sphingomonas* 속, *Sporotrichum* 속, *Symptodiomyopsis* 속, *Sterigmatosporidium* 속, *Tapharina* 속, *Tremella* 속, *Trichosporon* 속, *Tilletiaria* 속, *Tilletia* 속, *Tolyposporium* 속, *Tilletiposis* 속, *Ustilago* 속, *Udenlomyce* 속, *Xanthophilomyces* 속, *Xanthobacter* 속, *Paecilomyces* 속, *Acremonium* 속, *Hyhomonus* 속, *Rhizobium* 속 등을 예시할 수 다.

[0028] 본 발명은 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이를 코딩하는 유전자, 자일란네이즈-B를 코딩하는 유전자 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이를 코딩하는 유전자는 하나의 효모에 형질전환시키거나 또는 각각 효모에 형질전환시킬 수 있으며, 본 발명에서는 각각에 효모에 형질전환시킨 것을 특징으로 하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0029] 본 발명에서는 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 생성능을 가지는 재조합 효모, 자일란네이즈-B 생성능을 가지는 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 생성능을 가지는 재조합 효모를 제작하였으며, 상기 재조합 효모에서 형성된 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈-B 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 효모에서 세포외로 분비되어 보다 높은 셀룰로오스 분해능을 가지는 셀룰로솜 형성을 위해 발현된 상기 단백질의 어셈블리를 통한 (i) 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCeIE-mCbpA) 복합체, (ii) 자일란네이즈 B-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 (iii) 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 B-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCeIE-XynB-mCbpA) 복합체를 형성하도록 하였다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에서, (i) 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (cCeIE) 유전자가 도입되어 있는 pPsADH α /cCeIE 재조합 벡터, (ii) 자일란네이즈-B (xylanase B) 유전자가 도입되어 있는 pPsADH α /XynB 재조합 벡터 및 (iii) 셀룰로오스 분해효소 골격단백질 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 (mini cellulose binding protein A; miniCbpA) 유전자가 도입되어 있는 pPsADH α /mCbpA 재조합 벡터를 제조하였으며(도 2), 효소활성대(halo)를 확인하기 위해 YPD한천배지와 YPD자일란을 효소반응의 기질로 사용하여 실험을 수행한 확인한 결과, 본 발명의 재조합된 자일란네이즈 B(도 3A) 및 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(도 3B)의 섬유소 분해효소 활성이 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0031] 또한, 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 생성능을 가지는 재조합 효모, 자일란네이즈-B 생성능을 가지는 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 생성능을 가지는 재조합 효모의 배양액으로의 효소 분비를 확인하기 위해 실험을 수행한 결과, 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈-B, 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 단백질 사이즈와 동일한 위치에서 효소활성을 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 생성된 단백질이 어셈블리를 통해 (i) 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCeIE-mCbpA) 복합체(도 4 line 4) 및 (ii) 자일란네이즈 B-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체(도 4 line 5)를

이루는 것을 확인할 수 있었다.

[0032] 본 발명의 방법으로 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체가 형성되었는지 확인하기 위하여, 복합체를 형성시킨 후, 미결합 단백질을 제거하고 복합체의 결합을 변형시켜 Native-PAGE로 확인한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA)의 복합체가 형성된 것을 확인할 수 있었다 (도 5 non denature). 복합체 결합을 변형시켜 Native-PAGE로 확인한 경우에도, cCelE와 XynB 및 mCbpA를 1:1:1의 비율로 혼합한 시료에서 실제 cCelE, XynB 및 mCbpA를 모두 확인할 수 있었다 (도 5, denature).

[0033] 본 발명의 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체의 효소활성을 특정하기 위하여 환원당 측정(reducing sugar assay)을 수행하였으며, 그 결과 세 가지 단백질이 결합된 경우 더 높은 활성을 가지는 것을 알 수 있었다 (도 6).

[0034] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(chimeric CelE)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모, 자일란네이즈-비(xylanase B)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(mini cellulose binding protein A; miniCbpA)를 코딩하는 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 효모를 배양하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 재조합 효모에 바이오매스를 첨가하고 추가로 배양하여 에탄올을 생성시키는 단계; 및 (c) 생성된 에탄올을 회수하는 단계를 포함하는 바이오매스의 동시당화 발효에 의한 에탄올의 제조방법에 관한 것이다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 바이오매스는 거대억새(*Miscanthus giganteus*)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 섬유소로 이루어진 바이오매스는 에탄올 생산을 위한 기질로 다양하게 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서, 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 생성능을 가지는 재조합 효모, 자일란네이즈-비 생성능을 가지는 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 생성능을 가지는 재조합 효모를 배양하여 섬유소 효소 복합체가 형성된 배지에 거대억새(*Miscanthus giganteus*)를 첨가하여 배양한 결과, 대조군인 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)와 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 생성능을 가지는 재조합 효모보다 *Pichia pastoris*-pPsADH α-cCelE, *Pichia pastoris*-pPsADH α-XynB, *Pichia pastoris*-pPsADH α-mini-CbpA 동시에 배양하였을 때, 에탄올 생산량이 증가한 것을 확인하였다 (도 7).

[0037] 본 발명의 방법으로 바이오매스에서 에탄올을 생산하였을 때, 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 생성능을 가지는 재조합 효모, 자일란네이즈-비 생성능을 가지는 재조합 효모 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 생성능을 가지는 재조합 효모를 동시에 배양하였을 경우, 재조합 효모에서 생산된 생성된 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈 비 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이이 결합하여 (i) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, (ii) 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 (iii) 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체가 형성되었기 때문이라고 볼 수 있다.

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0039] 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈 비 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 유전자의 증폭

[0040] 1-1 : pPsADHα 벡터 제작

[0041] 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이, 자일란네이즈 비 및 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 유전자를 클로닝할

pPsADHa백터를 하기의 방법으로 제조하였다.

[0042] 정방향 프라이머(forward primer; 서열번호 1)에 제한효소 HindIII 인식서열(AAGCTT)과 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)의 ADH2 프로모터 유전자(서열번호 2)의 N-terminal 부분이, 역방향프라이머(reverse primer; 서열번호 3)에 pPICZa백터 (INVITROGEN, cat. No. V195-20)에 있는 Alpha Factor 유전자(서열번호 4)의 N-terminal 부분 10bp 서열(GAAATCTCAT)과 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)의 ADH2 프로모터 유전자의 C-terminal 부분이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다 (바이오니아, 한국).

[0043] pPsADHa primer

[0044] [서열번호 1] 5'-gcgcaagcttGATCCGAGGGAAAAACCCGGGACTCAGTTTATCACGTACCGAG-3'

[0045] [서열번호 3] 5'-gaaatctcatGATAATTTGGATGGATCGCCAGCACTTATGCAATTGGGT-3'

[0046] 또한, 다른 한 쌍의 프라이머를 제조하기 위해, 정방향 프라이머(forward primer, 서열번호 5)에 피키아 파스토리스의 ADH2 Promoter 유전자의 C-terminal 부분 10bp 서열(CCAAATTATC)과 pPICZa백터에 있는 Alpha Factor 유전자의 N-terminal 부분이, 역방향프라이머(reverse primer; 서열번호 6)에 제한효소 EcoRI 인식서열(GAATTC)과 pPICZa백터에 있는 Alpha Factor 유전자의 C-terminal 부분이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다 (바이오니아, 한국).

[0047] pPsADHa primer

[0048] [서열번호 5] 5'-ccaaattatcATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGAGCA TCCTCCGCAT-3'

[0049] [서열번호 6] 5'-gcgcaattcAGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCGAGAGATACCCCTTCTTCTTT-3'

[0050] 이후 상기 합성된 두쌍의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며, 그 결과, 588bp의 피키아 파스토리스의 ADH2 Promoter 유전자와 267bp의 pPICZa백터에 있는 Alpha Factor 유전자가 포함된 PCR 밴드를 확인하였다. 두 PCR 단편은 Overlap PCR 기법(Higuchi R *et. al.*, *Nucleic Acids Res*, 16(15):7351, 1988)을 이용하여 865bp의 하나의 단편으로 증폭시킨 다음, 클로닝된 최종 DNA 단편은 HindIII (TAKARA, cat.No.1060A)와 EcoRI (TAKARA, cat.No.1040A) 제한효소를 처리한 다음, pPICZa백터에 삽입하여, 키메릭 pPsADHa 백터를 제작하였다 (도 1).

[0051] 1-2 : 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 유전자의 증폭

[0052] 섬유소 분해 효소 복합체 형성을 위한 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 클로닝하기 위하여 클로스트리디움 셀룰로보판스의 지노믹디엔에이로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열(서열번호 7)이 연결된 클로스트리디움 쉐모셀룸으로부터 유래한 엔도-글루칸아제 *cCelE* 유전자 (키메릭 엔도-글루칸아제 *cCelE*; 서열번호 8)가 삽입된 플라스미드 pADHa-c*CelE* 염기서열(한국 등록특허 제1120359호)을 참고로 하여 정방향 프라이머(forward primer)에는 키메릭 엔도-글루칸아제 *cCelE* 유전자의 C-terminal 부분과 제한효소 *KpnI*(GGTACC) 인식서열이, 역방향프라이머(reverse primer)에는 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 N-terminal 부분과 제한효소 *XbaI*((TCTAGA) 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다 (바이오니아, 한국).

[0053] c*CelE* primer

[0054] [서열번호 9] 5'-atatggtaccTCGGGAACAAGCTTTTG-3'

[0055] [서열번호 10] 5'-gctctagatcaatgatgatgatgatgatgTAAAAGCATTTTTTAAGAA-3'

[0056] 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며, 그 결과, 1317bp의 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아

제-이(cCeIE) 유전자(서열번호 11)가 포함된 PCR 밴드를 확인하였다. 클로닝된 DNA 단편은 *KpnI*(TAKARA, cat.No.1068A)와 *XbaI*(TAKARA, cat.No.1093A) 제한효소를 처리한 다음, 상기 실시예 1-1에서 제조한 도 1의 pPaADH α 벡터에 삽입하여, 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이를 코딩하는 유전자(cCeIE)를 포함하는 재조합 벡터(도 2C)를 제작하였으며, 상기 클로닝된 pPaADH α-cCeIE을 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)(Korean Colection for Type Culture, KCTC 7190)에 형질전환시켜, 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 생산능을 가지는 재조합 미생물을 제조하였다.

[0057] 1-3 : 자일란네이즈 비 유전자의 증폭

[0058] 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 유래한 자일란네이즈-비(XynB)를 코딩하는 유전자(서열번호 12)를 클로닝하기 위하여 정방향 프라이머(forward primer)에는 자일란네이즈-비(XynB)의 N-termianl 부분과 제한효소 *EcoRI*(GAATTC) 인식서열이, 역방향프라이머(reverse primer)에는 자일란네이즈-비(XynB)의 C-termianl 부분과 제한효소 *KpnI*(GGTACC) 인식서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였고(바이오니아, 한국), 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0059] XynB primer

[0060] [서열번호 13] 5'-gcgcggaattcGAAGATGCTCTATTAATAAGTAG-3'

[0061] [서열번호 14] 5'-gcggtacctcaatgatgatgatgatgatgGAACTAGTAATTTGTCCTA-3'

[0062] 그 결과, 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 유래한 자일란네이즈-비를 코딩하는 유전자가 포함되어 있는 1821bp 크기의 PCR 밴드를 확인할 수 있었다. 클로닝된 DNA 단편은 *EcoRI*(TAKARA, cat.No.1040A)와 *KpnI*(TAKARA, cat.No.1068A) 제한효소를 처리한 다음, 도 1의 pPaADH α 벡터에 삽입하여, 자일란네이즈-비(XynB)를 코딩하는 유전자(XynB)를 포함하는 재조합 벡터(도 2B)를 제작하였으며, 상기 클로닝된 pPaADH α-XynB를 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에 형질전환시켜, 자일란네이즈-비(XynB) 생산능을 가지는 재조합 미생물을 제조하였다.

[0063] 1-4 : 소형 셀룰로오즈 결합단백질 에이 유전자의 증폭

[0064] 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체(primary scaffolding subunit)인 셀룰로오즈 결합단백질 에이(Cellulose-binding protein A) 중 셀룰로즈 결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A) 유전자(서열번호 15)를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)에는 제한효소 *EcoRI*(GAATT) 인식서열이, 역방향 프라이머(Rreverse primer)에는 제한효소 *NotI*(GCGGCCGC) 인식서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다 (바이오니아, 한국).

[0065] mCbp primer

[0066] [서열번호 16] 5'-gcgcggaattcGCAGCGaCATCATCAAT-3'

[0067] [서열번호 17] 5'-gcgcgggcgcgtcaatgatgatgatgatgatgTATAGGATCTCCAATATT-3'

[0068] 그 결과 1647bp의 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로즈-결합 단백질-에이 유전자의 일부인 mCbpA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다. 클로닝된 DNA 단편은 *EcoRI*과 *NotI* 제한효소를 처리한 다음, 도 1의 pPaADH α 벡터에 삽입하여, 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A)를 코딩하는 유전자(mCbpA)를 포함하는 재조합 벡터(도 2A)를 제작하였으며, 상기 클로닝된 pPaADH α-mCbpA를 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에 형질전환시켜, 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A) 생산능을 가지는 재조합 미생물을 제조하였다.

실시예 2

제조합 효소 단백질의 활성 측정

2-1 : 효소활성대(halo) 측정

상기 실시예 1에서 제조한 3종류의 제조합 효모에서 효소 단백질의 발현정도를 확인하기 위하여, cCelE, XynB, mini-CbpA 효소 단백질의 효소활성대(halo)를 측정하였다.

효소활성대(halo)를 확인하기 위해 YPD한천배지와 YPD자일란을 효소반응의 기질로 사용하였다. 제조합 효모의 콜로니를 YPD 배지에 접종하여 24시간 동안 30℃에서 배양하고, YPD 액상 배지에서 5시간 동안 30℃에서 배양한 배양액을 농축하여 얻은 효소 단백질을 YPD 한천 배지와 YPD 자일란 배지에 올려 흡수시킨 후 50℃에서 24시간 반응시켰다. 0.25% 콩고레드(congo-red)로 5분간 염색 후 염화나트륨(NaCl)으로 여러 번 세척한 후 효소활성대(halo)를 확인하였다 (도 3).

그 결과, 야생형 효모(wild type *P. pastoris*)에 비해 제조합 효모의 효소활성대가 넓은 것을 확인하였으며, 제조합 자일란네이즈-비(도 3A)와 키메릭 엔도-글루칸아제-이(도 3B)가 정상적으로 발현되는 것을 확인하였다.

2-2 : 지모그램(Zymogram) 방법

효소 활성 및 효소의 복합체 형성 정도를 알아보기 위하여 지모그램(Zymogram) 방법을 수행하였다. 먼저, cCelE, XynB, mini-CbpA 효소 단백질이 배양액으로 분비되도록 제조합 효모를 30℃에서 5시간 동안 진탕배양하였으며, 그 후 배양액을 원심분리한 다음, 상등액을 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) cCelE, XynB, mini-CbpA 효소 단백질을 얻었다.

그 다음, Native-PAGE는 10% poly-acrylamide gel (Bio-Rad, cat. No. 161-0156)과 0.2% xylan (sigma aldrich, cat. No. X4252)과 CMC (carboxymethylcellulose) (sigma aldrich, cat. No. C4888)를 녹인 poly-acrylamide gel을 사용하여 상기에서 농축하여 분리한 효소 단백질을 전기영동하였으며, 기질이 첨가된 renature buffer(100mM Succinate, 10mM CaCl₂, 1mM dTT)(sigma aldrich, cat. No. D9779)에 2시간 동안 1시간 마다 renature buffer를 갈아준 후 50℃에서 3시간 반응시켰다. 반응이 끝난 겔을 0.25% 콩고레드(congo-red)로 5분간 염색 후 염화나트륨(NaCl)으로 여러 번 세척한 후 효소활성대(halo)를 확인하였다.

그 결과, 키메릭 엔도-글루칸아제-이(cCelE)와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(mini-CbpA)를 반응시킨 경우와 자일란네이즈-비(XynB)와 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(mini-CbpA)를 반응시킨 경우에, 각각 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체(도 4 line 4) 및 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체가 형성된 것을 확인하였으며(도 4 line 5), 형성된 복합체의 xylan과 CMC(carboxymethylcellulose)의 분해활성 효과도 확인할 수 있었다.

또한, 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체의 형성 여부를 확인하기 위하여, 복합체를 형성시킨 후, 미결합 단백질을 제거하고 복합체의 결합을 변형시켜 Native-PAGE로 확인한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA)의 복합체가 형성된 것을 확인할 수 있었다 (도 5 non denature). 복합체 결합을 변형시켜 Native-PAGE로 확인한 경우에도, cCelE와 XynB 및 mCbpA를 1:1:1의 비율로 혼합한 시료에서 실제 cCelE, XynB 및 mCbpA를 모두 확인할 수 있었다 (도 5, denature).

2-3 : 환원당 측정(reducing sugar assay)

키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-mCbpA) 복합체, 자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(XynB-mCbpA) 복합체 및 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이-자일란네이즈 비-소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(cCelE-XynB-mCbpA) 복합체의 효소활성을 특정하기 위하여 환원당 측정(reducing sugar assay)을 수행하였다.

[0081] 자일란(xylan)과 카르복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose; CMC)가 각각 2% 포함된 기질(substrate)에 각각의 반응 효소액을 1:1의 비율로 혼합하고 2시간 효소 반응을 진행시킨 후 반응액을 DNS 방법을 이용하여 분해된 환원당을 측정하였으며, 그 결과 세 가지 단백질이 결합된 경우 더 높은 활성을 가지는 것을 알 수 있었다 (도 6).

실시예 3

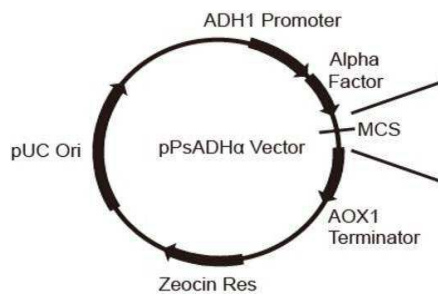
[0082] 제조합 효모를 이용한 바이오에탄올의 생산

[0083] *Pichia pastoris*-pPsADH α -cCelE, *Pichia pastoris*-pPsADH α -XynB, *Pichia pastoris*-pPsADH α -mini-CbpA를 YPD 배지에서 24시간 전배양 후, 48시간 진탕배양하고, 거대 억새(*Miscanthus sinensis*)(주)창해에탄올)가 기질로 첨가된 발효배지에서 추가로 배양하였다. 상기 발효배양액을 30℃, 100rpm에서 배양하며 일정한 시간별로 배양액을 채취하여 가스 크로마토그래피를 실시함으로 생산된 에탄올을 측정하였다. 상기 방법대로 실행결과 엔도글루칸아제와 자일란네이즈가 삽입된 *Pichia pastoris*-pPsADH α /cCelE, *Pichia pastoris*-pPsADH α /XynB, *Pichia pastoris*-pPsADH α /mini-CbpA에서의 에탄올 생산수율이 *Pichia pastoris*/pPsADH α 보다 높게 측정된 것을 확인할 수 있었다 (도 7).

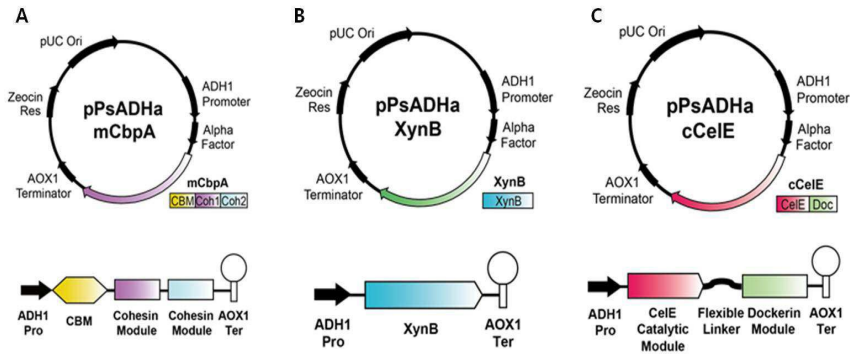
[0084] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

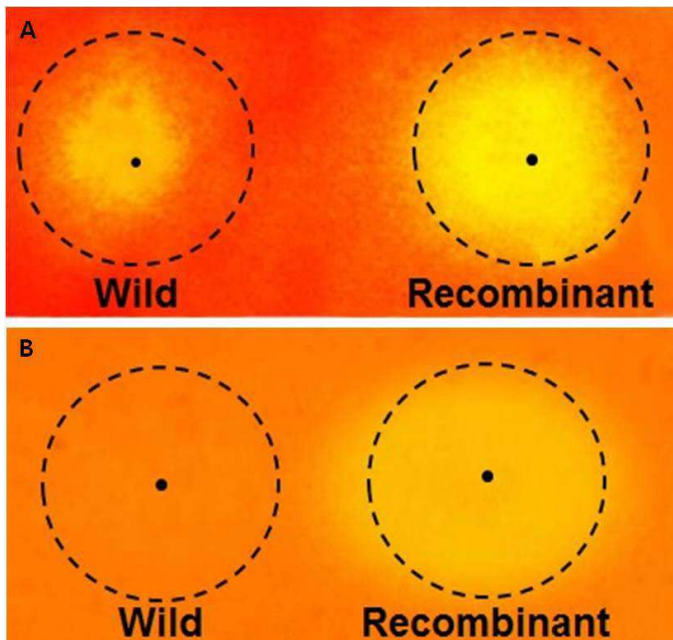
도면1



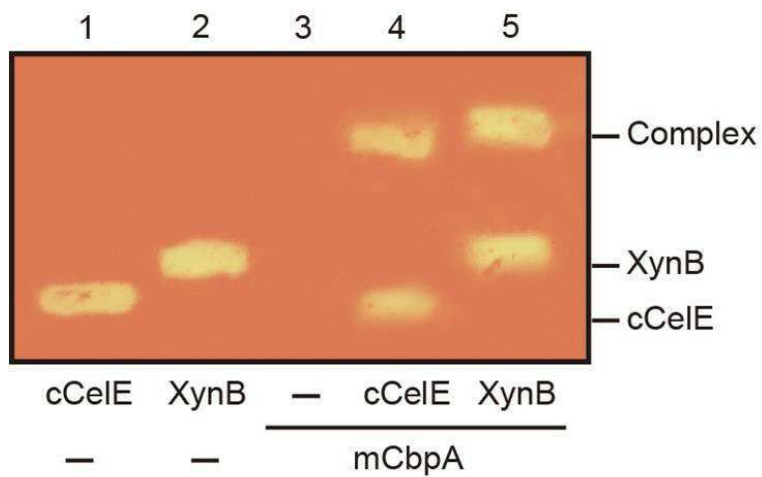
도면2



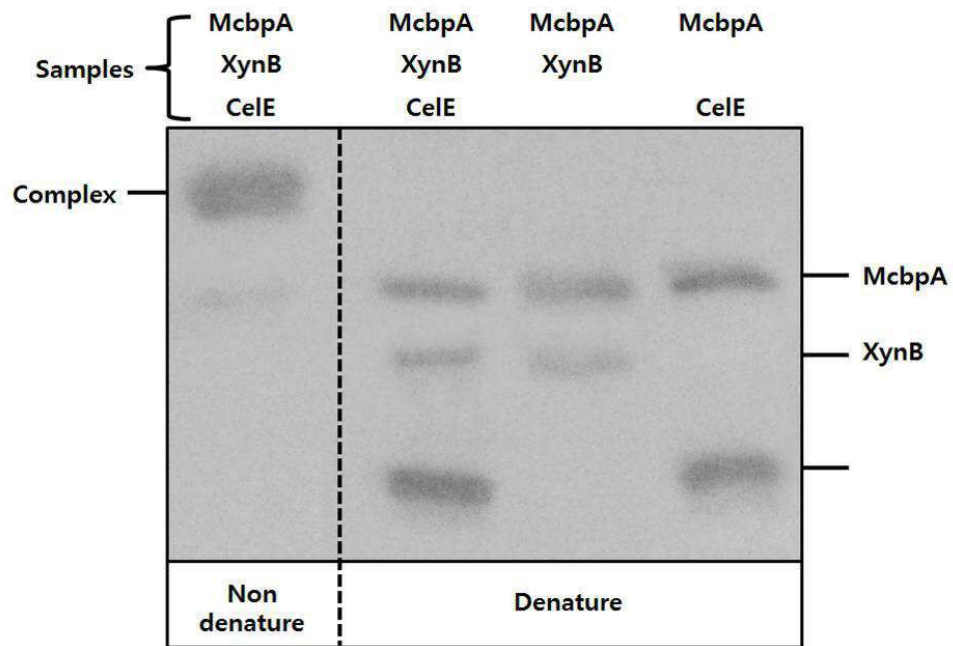
도면3



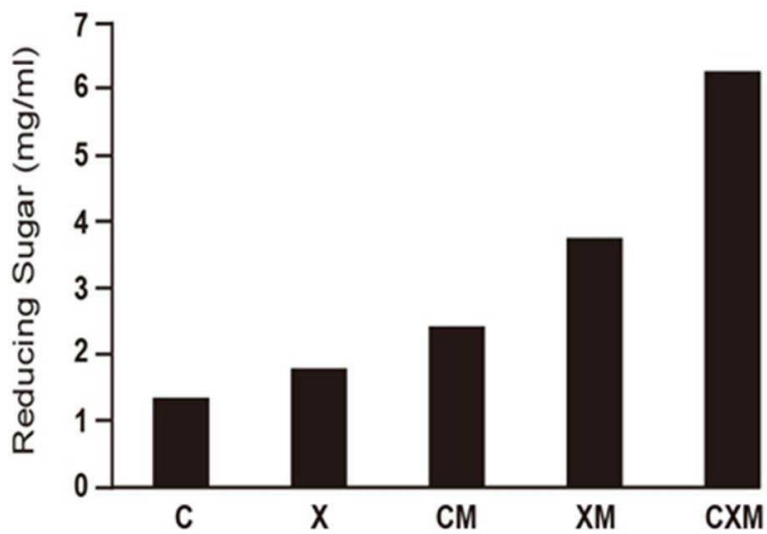
도면4



도면5

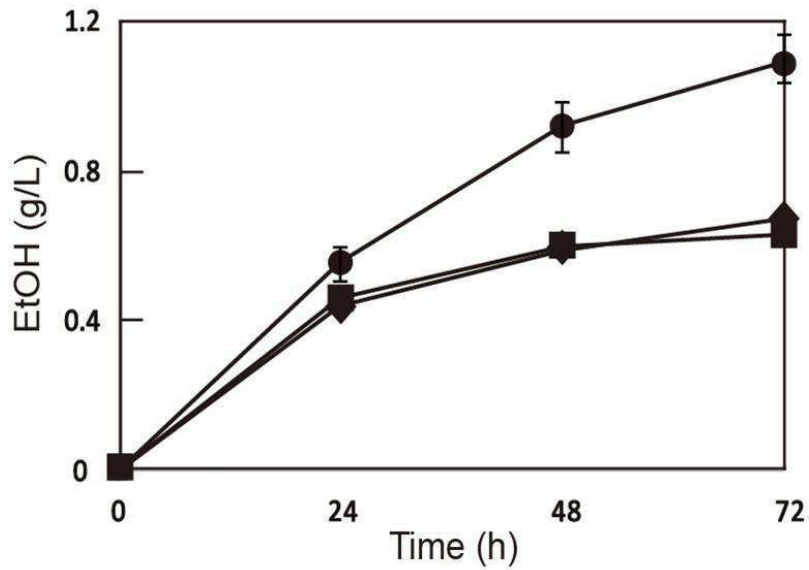


도면6



C : *P. pastoris*-pPsADH α -cCelE;
X : *P. pastoris*-pPsADH α -XynB;
CM : *P. pastoris*-pPsADH α -mCbpA and pPsADH α -cCelE;
XM : *P. pastoris*-pPsADH α -mCbpA and pPsADH α -XynB;
CXM : *P. pastoris*-pPsADH α -mCbpA pPsADH α -cCelE and pPsADH α -XynB

도면7



서열목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Method for Preparing Cellulose Complex Using Endo-b-1,4-glucanase
E, Xylanase B and Mini Cellulose Binding Protein A from
Clostridium sp.

<130> P12-B248

<160> 17

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pPsADHa forward primer

<400> 1

gcgcaagctt gatccgaggg aaaaaccgg ggactcagtt taccacgtac cgag

54

<210> 2

<211

> 588

<212> DNA

<213> Pichia pastoris ADH2 promoter

<400> 2

gatccgaggg aaaaaccggg gactcagttt atcacgtacc gagaaattct tcgtttcagc

60

atcatcacca tgttgtccaa ttacagcccg aagcacagtc taatgctgaa ttttgataga 120
gctcatcgtg aacagccaga ttcgaagaaa ggggggatga gatccgggtt catctgcaag 180
agacacagaa aataaaaaac atacgatccg ttcagctacc tggcgcttaa ccaggaaaat 240
cactgctgga gtggccagca tgtcacgagg tggcagaatc cgataatgtg tgattgctg 300
tagcatcggc gcaagtcgaa tttcgggtcat atccgtgtct ggatattatc cactatTTTT 360

taatTTTTca ggttggatgc gattgttccc ttacgtctg gacgatgcct gaagccccag 420
gtatatataa ggggctcgaa agtccttga ccagctggtt gatttgactt tgtttgttcc 480
tttctttctt tcacttactc atcactcaat tgcattcgca atttccatt aatacatatt 540
caacttgcct cacatattgc acccaattgc ataagtgtg cgatccat 588

<210> 3

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pPsADHa reverse primer

<400> 3

gaaatctcat gataatttgg atggatcgcc agcacttatg caattgggt 49

<210> 4

<211> 267

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pPICZa vector Alpha Factor gene

<400> 4

atgagatttc cttcaatttt tactgctgtt ttattcgag catcctccgc attagctgct 60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggtgaagc tgtcatcggt 120
tactcagatt tagaagggga tttcgtgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat 180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcatig ctgctaaaga agaagggtta 240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagct 267

<210> 5

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pPsADHa forward primer

<400>	5	
ccaaattatc atgagatttc cttcaatttt tactgctgtt ttattcgcag catcctccgc	60	
at	62	
<210>	6	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pPsADHa reverse primer	
<400>	6	
gcgcgaattc agcttcagcc tctcttttct cgagagatac cccttcttct tt	52	
<210>	7	
<211>	159	
<212>	DNA	
<213>	dockerin of endo-b-glucanase B	
<400>	7	
gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgcctta atcaattctt	60	
ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta	120	
aatgcttttg atttagctgt tcttaaaaa atgctttta	159	
<210>	8	
<211>	1140	
<212>	DNA	
<213>	endo-b-glucanase E	
<400>	8	
tcgggaacaa agcttttgga tgcaagcgga aacgagcttg taatgagggg catgcgtgat	60	
atttcagcaa tagatttggg taaagaaata aaaatcggat ggaatttggg aaatactttg	120	
gatgctccta cagagactgc ctggggaaat ccaaggacaa ccaaggcaat gatagaaaag	180	
gtaagggaaa tgggctttta tgccgtcaga gtgcctgtta cctgggatac gcacatcgga	240	
cctgctccgg actataaaat tgacgaagca tggctgaaca gagttgagga agtggttaac	300	
tatgttcttg actgcggtat gtacgcgatc ataaatcttc accatgacaa tacatggatt	360	
atactacat atgccaatga gcaaaggagt aaagaaaaac ttgtaaaagt ttgggaacaa	420	
atagcaaccc gttttaaaga ttatgacgac catttgttgt ttgagacaat gaacgaaccg	480	
agagaagtag gttcacctat ggaatggatg ggcggaacgt atgaaaaccg agatgtgata	540	

aacagattta atttggcggg tgtaataacc atcagagcaa gcggcggaaa taacgataaa 600
 agattcatac tggttccgac caatgcggca accggcctgg atgttgcat t aaacgacctt 660
 gtcattccga acaatgacag cagagtcata gtatccatac atgcttattc accgtatttc 720
 tttgctatgg atgtcaacgg aacttcatat tggggaagtg actatgacaa ggcttctctt 780
 acaagtgaac ttgatgctat ttacaacaga tttgtgaaaa acggaagggc tgtaattatc 840
 ggagaattcg gaaccattga caagaacaac ctgtcttcaa ggggtggctca tgccgagcac 900
 tatgcaagag aagcagtttc aagaggaatt gctgttttct ggtgggataa cggctattac 960

aatccgggtg atgcagagac ttatgcattg ctgaacagaa aaactctctc atggtattat 1020
 cctgaaattg tccaggctct tatgagaggt gccggcgttg aacctttagt ttcaccgact 1080
 cctacaccta cattaatgcc gacccctcg cccacggtga cagcaaatat tttgtacggt 1140
 1140

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cCelE forward primer
 <400> 9
 atatggtacc tcggaacaa gcttttg 27

<210> 10
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cCelE reverse primer
 <400> 10
 gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgtctaa atcaattctt 60
 ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta 120
 aatgctttgg atttagctgt tcttaaaaaa atgctttta 159

<210> 11
 <211> 1298
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> chimeric CelE
 <400> 11

cggaacaaa gcttttggat gcaagcggaa acgagcttgt aatgaggggc atgcgtgata 60

tttcagcaat agatttgggt aaagaaataa aaatcggatg gaatttggga aatactttgg 120
atgctctac agagactgcc tggggaaatc caaggacaac caaggcaatg atagaaaagg 180
taagggaat gggctttaat gccgtcagag tgcctgttac ctgggatacg cacatcggac 240
ctgctccgga ctataaaatt gacgaagcat ggctgaacag agttgaggaa gtggtaaact 300
atgttcttga ctgcggtatg tacgcgatca taaatcttca ccatgacaat acatggatta 360
tacctacata tgccaatgag caaaggagta aagaaaaact tgtaaaagt ttgggaacaaa 420
tagcaaccg ttttaaagat tatgacgacc atttgttgt ttgagacaatg aacgaaccga 480

gagaagtagg ttcacctatg gaatggatgg gcggaacgta tgaaaaccga gatgtgataa 540
acagatttaa ttggcggtt gtttaatacca tcagagcaag cggcggaat aacgataaaa 600
gattcactact ggttccgacc aatgcggcaa ccggcctgga tgttgatta aacgaccttg 660
tcattccgaa caatgacagc agagtcatag tatccatata tgcttattca ccgtatttct 720
ttgctatgga tgtcaacgga acttcatatt ggggaagtga ctatgacaag gcttctctta 780
caagtgaact tgatgctatt tacaacagat ttgtgaaaaa cggaagggt gtaattatcg 840
gagaattcgg aaccattgac aagaacaacc tgtcttcaag ggtggctcat gccgagcact 900

atgcaagaga agcagtttca agaggaattg ctgttttctg gtgggataac ggctattaca 960
atccgggtga tgcagagact tatgcattgc tgaacagaaa aactctctca tggattatc 1020
ctgaaattgt ccaggtctct atgagagggt ccggcgttga acctttagtt tcaccgactc 1080
ctacacctac attaatgccg accccctcgc ccacggtgac agcaaatatt ttgtacggtg 1140
atgttaacaa agatggaaag gtaaatgcta tcgattatgc agtctttaa tcaattcttt 1200
taggtacaaa tactaacgtt gatttatcag tatcagacat gaataaggat ggtaaaagtaa 1260
atgctttgga tttagctgtt cttaaaaaaa tgctttta 1298

<210> 12

<211> 1734

<212> DNA

<213> xylanase B

<400> 12

gaagatgctc tattaataag tagcaccttc gaaggaggta cagatggttg gtcaactatg 60
ggtacaacta ctatttcacc aagtacttta agccatagcg gtaacggaag cctctacgtt 120
tctgtagag ctgcttcatg ggctggacca tgcaatataa gaacagacgt attgaaagca 180
ggaaatacat ataaccttag ttcctatgta atgtacaatg atgctagtgc tgcagatact 240

caacctatta gcttcacgtt aaagtacaca gattctacaa ataaagcttt ctatgtacct	300
atcgcaactg taactgtaaa caaaggtgaa tggacaaaaa tcgaaaatac cgcttataaa	360
atcccagcag aagcaactag tgcaatgatt tattgggaaa ctacaggtac aatgattaac	420
tactatgtcg acgacgttac agcatatggt ccaagcacat ttaatcctaa tgtaactgca	480
gctacaccac ttaaaaacgt atttggaaaa tactttgata taggttgcg cgcgacacct	540
tctgaagtat ctttacaagt tgctaagat cttgtaaaaa ctactacaa caaccttact	600
ataggaaatg agcttaaac agattatgta ttagataaag ctgcttgcca agcatccgt	660
aacaatgtaa accctcaagt taaattagac agtgcacgta gtctttttaa atactgtgct	720
gagaacaata tagaagtaag aggccacgtt ttagtatggc atagtcaaac tccttcttgg	780
ttctttaaag aaaacttcag tgacactgga gctactgtat caaaagacgt catgaatcaa	840
cgtcttgaac actatataaa gaatcttttt gcagcaatta acgcagagtt ccctacatta	900
aagatttatg catgggacgt tgtaaatgaa tgttacctag atgggtggtaa tctacgtact	960
gcaggatttc ctgaaactgc tgggaaagaa gcatctgcat ggaatttagt ctatggtgat	1020
gactcataca tagacaatgc tttcacatat gcaagaaaat atgctccagc tgggtgtaag	1080
ttattctaca acgactttaa cgaatatata caatcaaaac gtaacgcaat ctacactatg	1140
gcaatgagat taaaatctaa aggtattatc gatggtatcg gtatgcaatc tcacctagat	1200
atgggctttc ctgatacaaa tacttataaa gcagcactaa ctaaattcgg ttcaactggc	1260
ttagaagttc aagttacaga acttgatata actacaagtg atacaagtgc tacaggacta	1320
gcaaatcaag ctactaaata tgcagctatt atgcaaagta ttttagatgc aaaaaagca	1380
ggtactgcta acattacaaa cgttgtattc tgggggtatta ctgatggaac aagctggcgt	1440
gcaacaagat taccattgct attcgatgga aactactatc caaaaccagc tttcgattca	1500
gttgttaaat tagttcctac aagcgactac tatactcctg gttatgcctt aggtgatgta	1560
aacaatgacg gtaaaatcaa tgctctagat cttgcattag tgaaaaaagg tctattaagt	1620
gaatttacag atccagctgc aaaagtagct gcagatgtaa acaaagatgg taatactaat	1680
gctatcgacc ttgcattatt aaagaaatat cttctaggac aaattactag ttcc	1734
<210> 13	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> XynB forward primer	
<400> 13	

gcgcgaattc gaagatgctc tattaataag tag	33
<210> 14	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> XynB reverse primer	
<400> 14	
gcggtacctc aatgatgatg atgatgatgg aaactagtaa tttgtccta	49
<210> 15	
<211> 1646	
<212> DNA	
<213> Mini-Cellulose-binding protein A	
<400> 15	
cagcgacatc atcaatgtca gttgaatttt acaactctaa caaatcagca caaacaact	60
caattacacc aataatcaaa attactaaca catctgacag tgatttaaat ttaaatgacg	120
taaaagttag atattattac acaagtgatg gtacacaagg acaaaccttc tgggtgacc	180
atgctggtgc attattagga aatagctatg ttgataacac tagcaaagtg acagcaact	240
tcgttaaaga aacagcaagc ccaacatcaa cctatgatac atatgttgaa tttggatttg	300
caagcggagc agctactctt aaaaaaggac aatttataac tattcaagga agaataacaa	360
aatcagactg gtcaactac actcaaaca atgactattc atttgatgca agtagttcaa	420
caccagttgt aaatccaaaa gttacaggat atataggtagg agctaaagta cttggtacag	480
caccaggctc agatgtacca tcttcaataa ttaatcctac ttcgcaaca tttgataaaa	540
atgtaactaa acaagcagat gttaaaacta ctatgacttt aaatggtaac acatttaaaa	600
caattacaga tgcaaacggt acagctctaa atgcaagcac tgattatagt gtttctggaa	660
atgatgtaac aataagcaaa gcttatttag caaaacaatc agtaggaaca actacattaa	720
actttaactt tagtgcagga aatcctcaaa aattagtaat tacagtagtt gacacaccag	780
ttgaagctgt aacagctaca attggaaaag tacaagtaaa tgctggagaa acggtagcag	840
taccagttaa cttacaaaaa gttccagcag ctggttttagc aacaattgaa ttaccattaa	900
cttttgattc tgcatcatta gaagtagtat caataactgc tggagatata gtattaaatc	960
catcagtaaa cttctcttct acagtaagtg gaagcacaat aaaattatta ttcttagatg	1020
atacattagg aagccaatta atcactaagg atggagtttt tgcaacaata acatttaaag	1080
caaaagctat aactggaaca actgcaaaag taacttcagt taaattagct ggaacaccag	1140

tagttggtga tgcgcaatta caagaaaaac cttgtgcagt taaccagga acagtaacta	1200
tcaatccaat cgataataga atgcaaattt cagttggaac agcaacagta aaagctggag	1260
aaatagcagc agtgccagta acattaacaa gtgttccatc aactggaata gcaactgctg	1320
aagcacaagt aagttttgat gcaacattat tagaagtagc atcagtaact gctggagata	1380
tcgtattaaa tccaacagta aacttctctt atacagtaaa cggaaatgta ataaaattat	1440
tattcctaga tgatacatta ggaagccaat taattagtaa agatggagtt tttgtaacaa	1500
taaacttcaa agcaaaagct gtaacaagca cagtaacaac accagttaca gtatcaggaa	1560
cacctgtatt tgcagatggt acattagcag aagtacaatc taaaacagca gcaggtagcg	1620
ttacaataaa tattggagat cctata	1646
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mCbp forward primer	
<400> 16	
gcgcgaattc gcagcgacat catcaat	27
<210> 17	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mCbp reverse primer	
<400> 17	
gcgcggccgc tcaatgatga tgatgatgat gtataggatc tccaatatt	49