(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0128875
(43) 공개일자 2014년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/42 (2006.01) *C12N 15/56* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0050018
(22) 출원일자 2014년04월25일
심사청구일자 2014년04월25일
(30) 우선권주장
1020130046423 2013년04월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경헌
서울특별시 서초구 서초중앙로 200 18동 805호 (서초4동, 삼풍아파트)
최인걸
서울특별시 동작구 사당1동 419-92 501호
이희진
서울특별시 성북구 보문동1가 60-20번지
(74) 대리인
특허법인다나

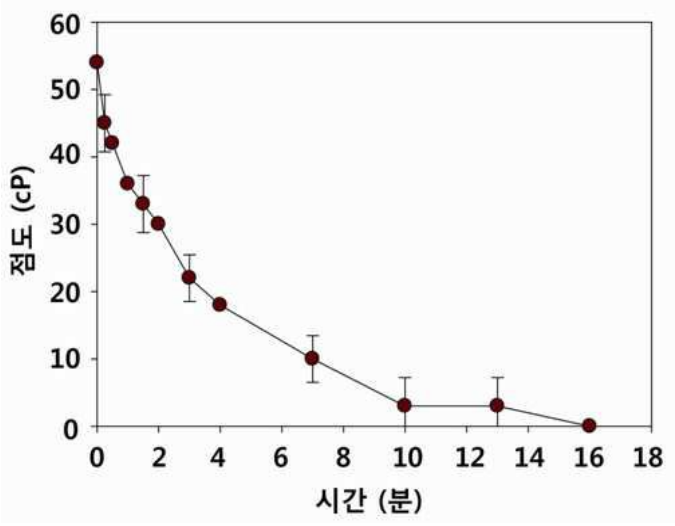
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **신규 재조합 셀룰레이즈 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 하헬라 제주엔시스(*Hahella chejuensis*) 유래의 재조합 셀룰레이즈 및 그의 용도를 제공한다. 본 발명에 따른 재조합 셀룰레이즈는 고온에서 안정성이 높고, 중성의 pH에서 최적화 활성을 나타내어 공정상 활용도가 높다. 또한, 본 발명에 따른 셀룰레이즈는 엔도글루카네이즈 활성뿐만 아니라 엑소글루카네이즈 활성을 나타내기 때문에 셀룰로오스 분해시 단당 생산이 가능하여 발효공정에 필요한 추가적 처리를 요하지 않아 비용을 절감할 수 있다. 이러한 효소 활성은 바이오 연료의 생산을 위한 발효나 열처리 조건에 유리하기 때문에 산업적 이익을 도모할 수 있다.

대 표 도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20110031353
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	(원천)글로벌프론티어
연구과제명	화학 및 단백질촉매 융합시스템을 통한 생물친화형 목질계 바이오매스의 탈구조화 기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.08.22 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

하헬라 제주엔시스 유래의 셀룰레이즈(*Hc*Cel5H)으로부터 신호서열 및 두 개의 CBM6 도메인이 제거된 재조합 셀룰레이즈.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 재조합 셀룰레이즈.

청구항 3

제1항에 있어서,

엔도글루카네이즈 및 엑소글루카네이즈의 활성을 동시에 갖는 재조합 셀룰레이즈.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 재조합 셀룰레이즈는 셀로트리오스 이상의 올리고당을 분해할 수 있는 것인 재조합 셀룰레이즈.

청구항 5

제1항의 셀룰레이즈를 코딩하는 유전자.

청구항 6

제5항에 있어서,

서열번호 2에 기재된 핵산서열을 갖는 유전자.

청구항 7

제1항의 셀룰레이즈를 발현하는 재조합 벡터.

청구항 8

제7항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 9

제8항의 형질전환체의 배양물로부터 재조합 셀룰레이즈를 분리정제하는 단계를 포함하는 셀룰레이즈의 제조방법.

청구항 10

제1항의 셀룰레이즈를 셀룰로오스와 반응시키는 단계를 포함하는 셀룰로오스 분해 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

반응은 pH 5.5 내지 6.5, 45 내지 55℃에서 수행되는 셀룰로오스 분해 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 하헬라 제주엔시스(*Hahella chejuensis*) 유래의 재조합 셀룰레이즈 및 그의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 한정된 원유 자원으로 인한 유가의 불안정성과 지구 온난화라는 과제를 해결하기 위해 전 세계는 지금 새로운 대체 에너지의 개발에 주력하고 있다. 이에 따라 재생가능한 식물자원으로부터 생산할 수 있는 바이오 에탄올을 비롯한 바이오연료가 크게 각광을 받고 있다.

[0003] 재생가능한 식물자원인 바이오매스는 주로 리그노셀룰로오스(lignocellulose)의 형태로 구성되어 있다. 여기서 리그노셀룰로오스는 탄수화물인 셀룰로오스(cellulose)와 헤미셀룰로오스(hemicellulose), 리그닌(lignin)을 주로 함유한다. 이 중 셀룰로오스를 셀룰레이즈로 가수분해하면 미생물에 의해 발효가 잘 되는 글루코오스와 같은 당을 얻을 수 있으며 이는 향후 발효공정을 통해 바이오연료로 전환할 수 있다.

[0004] 하지만, 리그노셀룰로오스는 설탕이나 전분으로만 구성된 당질계나 전분질계와 달리 헤미셀룰로오스 및 리그닌이 셀룰로오스를 둘러싸고 있기 때문에 당화가 어렵다. 일반적으로 셀룰레이즈를 통한 효소적 당화율도 이론적 글루코오스 수율의 20% 정도 밖에 되지 않는다. 이러한 점 때문에 반드시 물리화학적 전처리를 거쳐야 하고 전처리된 리그노셀룰로오스도 많은 양의 셀룰레이즈를 필요로 한다. 따라서 경제적인 당화를 위해서는 분해에 필요한 셀룰레이즈의 활성을 높이는 것이 중요하다. 특히나 전처리 공정의 경우 높은 온도에서 행해지므로 고온에서도 안정성을 갖는 셀룰레이즈의 확보가 매우 중요하다.

[0005] 대한민국 등록특허 제 10-1218341호, 제 10-1137020호, 제 10-0423670호 등에서는 활성을 높인 셀룰레이즈에 대해 언급하고 있긴 하지만, 고온의 조건에서 활성이 높고 자체 반응성(processivity)이 우수한 셀룰레이즈는 아직까지 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 고온에서도 활성이 높고 자체 반응성(processivity)이 우수한 재조합 셀룰레이즈를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 셀룰레이즈를 이용하여 셀룰로오스를 분해하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신호서열 및 두 개의 CBM6도메인이 제거된 하헬라 제주엔시스(*Hahella chejuensis*) 유래의 재조합 셀룰레이즈를 제공한다.

[0009] 본 발명의 재조합 셀룰레이즈는 분리정제를 용이하게 하기 위한 서열을 말단에 포함할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 본 발명의 재조합 셀룰레이즈는 신호서열 및 두 개의 CBM6도메인이 제거된 하헬라 제주

엔시스의 셀룰레이즈의 말단에 추가로 히스티딘 태그를 포함할 수 있다.

[0010] 본 발명의 한 구체예에서는, 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하헬라 제주엔시스(*Hahella chejuensis*) 유래의 재조합 셀룰레이즈를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 상기 재조합 셀룰레이즈를 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0012] 일 구체예에 따르면, 상기 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 재조합 셀룰레이즈를 발현하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 상기 형질전환체의 배양물로부터 재조합 셀룰레이즈를 분리정제하는 단계를 포함하는 셀룰레이즈의 제조방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한 상기 재조합 셀룰레이즈를 포함하는 셀룰로오스 분해용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한 상기 재조합 셀룰레이즈를 셀룰로오스와 반응시키는 단계를 포함하는 셀룰로오스 분해 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 셀룰레이즈는 고온에서 안정성이 높고, 중성의 pH에서 최적화 활성을 나타내어 공정상 활용도가 높다. 또한, 본 발명에 따른 셀룰레이즈는 엔도글루카네이즈 활성뿐만 아니라 엑소글루카네이즈 활성을 나타내기 때문에 셀룰로오스 분해시 단당 생산이 가능하여 발효공정에 필요한 추가적 처리를 요하지 않아 비용을 절감할 수 있다. 이러한 효소 활성은 바이오 연료의 생산을 위한 발효나 열처리 조건에 유리하기 때문에 산업적 이익을 도모할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 original *Hc*Cel5H으로부터 두 개의 CBM6 도메인을 제거한 재조합 *Hc*Cel5H(Truncated *Hc*Cel5H)의 구조에 대한 모식도이다.

도 2는 original *Hc*Cel5H와 재조합 *Hc*Cel5H의 SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 사진이다.

도 3은 수용성 셀룰로오스 CMC와 불용성 셀룰로오스 Avicel에 대한 original *Hc*Cel5H와 재조합 *Hc*Cel5H의 활성을 비교한 결과를 보여준다.

도 4는 pH에 따른 재조합 *Hc*Cel5H의 CMCase 활성을 보여준다.

도 5는 온도에 따른 재조합 *Hc*Cel5H의 CMCase 활성을 보여준다.

도 6은 온도에 따른 재조합 *Hc*Cel5H의 Avicelase 활성을 보여준다.

도 7은 재조합 *Hc*Cel5H의 온도 안정성을 보여주는 실험 결과이다.

도 8은 Avicel을 기질로 한 재조합 *Hc*Cel5H의 시간별 반응 산물을 (a) DNS와 (b) TLC로 각각 분석한 결과를 보여준다.

도 9는 올리고머를 기질로 한 재조합 *Hc*Cel5H의 반응산물을 TLC로 분석한 결과이다.

도 10은 재조합 *Hc*Cel5H의 활성이 CMC 용액의 점도에 끼치는 영향에 관한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 하헬라 제주엔시스(*Hahella chejuensis*) 유래의 재조합 셀룰레이즈를 제공한다.

[0021] 본 발명의 재조합 셀룰레이즈는 하헬라 제주엔시스 유래의 셀룰레이즈(*Hc*Cel5H)으로부터 신호서열 및 두 개의 CBM6도메인이 제거된 재조합 셀룰레이즈이다.

[0022] 본 발명의 재조합 셀룰레이즈는 분리정제를 용이하게 하기 위한 서열을 말단에 포함할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 본 발명의 재조합 셀룰레이즈는 신호서열 및 두 개의 CBM6도메인이 제거된 하헬라 제주

엔시스의 셀룰레이즈의 말단에 추가로 히스티딘 태그를 포함할 수 있다.

[0023] 한 구체예에서, 상기 셀룰레이즈는 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 돌연변이체도 본 발명의 효소에 포함될 수 있다.

[0024] 일 구체예에 따르면, 상기 셀룰레이즈의 분자량은 SDS-PAGE 분석 결과 대략 34kDa일 수 있다.

[0025] 본 발명의 재조합 셀룰레이즈의 오리진(origin)으로 사용된 하헬라 제주엔시스의 셀룰레이즈에 해당하는 Q2SFD8 (Gene ID: 3842516)은 본래 엔도글루카네이즈(endoglucanase)로 구분되어 있었다. 이 단백질은 크게 세 개의 도메인으로 이루어져 있는데 셀룰레이즈 구간과 2개의 Cellulose binding module(CBM) family 6이다. 본 발명에 따른 재조합 셀룰레이즈는 신호서열 및 상기CBM6 도메인을 모두 제거한 형태로서, 친화 크로마토그래피를 통해 분리정제하여 실험한 결과, 본래의 하헬라 제주엔시스의 셀룰레이즈과 비교할 때 기질별로 활성의 차이가 없거나 도리어 나아진 것을 확인하였다.

[0026] 한편, 상기 재조합 셀룰레이즈에 대해 pH별 온도별 활성테스트를 수용성 셀룰로오스인 CMC (Carboxy methyl cellulose)를 사용하여 진행한 결과, 대략 pH 6, 온도 50도에서 최적의 활성을 보임을 확인하였다. 또한, 온도별로 일정시간 노출시킨 후 그 활성구조가 침전되지 않았는지를 실험한 결과 높은 온도인 (60도)에서도 단백질이 침전되지 않음을 확인할 수 있었다.

[0027] 또한, 불용성 셀룰로오스인 Avcel에 대한 반응을 진행하여 생성된 반응산물을 분석한 결과 단당인 글루코스와 이당인 셀로비오스로만 분해되는 것을 TLC와 HPLC로 확인할 수 있었다. 이 결과는 본 발명에 따른 재조합 셀룰레이즈가 엔도글루카네이즈 및 엑소글루카네이즈로서의 활성을 동시에 가짐을 의미한다. 이러한 특성으로 인해 본 발명의 재조합 셀룰레이즈는 셀로트리오스, 셀로테트라오스, 셀로펜타오스, 셀로헥사오스와 같은, 셀로트리오스 이상의 올리고당을 분해할 수 있다.

[0028] 본 발명의 재조합 셀룰레이즈는 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 재조합 셀룰레이즈를 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0030] 상기 유전자는 서열번호 2의 핵산서열을 가질 수 있으며, 유전자 코드의 디제너러시(degeneracy)를 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 셀룰레이즈를 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, 박테리오파아지 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, pET21 벡터에 상기 셀룰레이즈를 코딩하는 핵산을 삽입함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서는 대장균 발현용 벡터로 pET21를 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 pET21 벡터를 사용하여 본 발명의 셀룰레이즈 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($CaPO_4$) 침전, 염화 칼슘($CaCl_2$) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 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 스타필로코쿠스(*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, 식물 세포 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, 셀룰레이즈를 발현하는 재조합 벡터 pET21 를 대장균 균주 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환체를 제조할 수 있다.

[0040] 본 발명은 또한 상기 형질전환체의 배양물로부터 상기 재조합 셀룰레이즈를 분리정제하는 단계를 포함하는 셀룰레이즈의 제조방법에 관한 것이다.

[0041] 상기 재조합 셀룰레이즈는 통상의 배양방법에 따라 형질전환체를 배양하여 정제하는 것이 좋다. 상기 셀룰레이즈는 재조합 벡터에 도입되는 인서트 즉, 코딩 유전자의 염기서열에 따라 셀룰로오스 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 재조합 셀룰레이즈를 포함하는 셀룰로오스 분해용 조성물에 관한 것이다.

[0043] 본 발명에 따른 재조합 셀룰레이즈는 셀룰로오스를 엔도뿐만 아니라 엑소 형태로 절단할 수 있기 때문에 단당의 형성이 가능하다. 따라서, 기존의 엔도글루카네이즈를 사용할 경우 단당 형성을 위해 추가적 분해효소의 사용이 요구되었던 것과 달리 추가적 공정을 요하지 않기 때문에 시간과 비용을 절감할 수 있다.

[0044] 본 발명은 또한 상기 재조합 셀룰레이즈를 셀룰로오스와 반응시키는 단계를 포함하는 셀룰로오스 분해 방법에 관한 것이다.

[0045] 상기 반응은 pH 5 내지 7, 20 내지 70℃, 예컨대 30 내지 60℃에서 실시할 수 있으며, 보다 구체적으로, pH 5.5 내지 6.5, 45 내지 55℃에서 실시할 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0046] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0047] **<실시예 1> 본 발명에 따른 재조합 셀룰레이즈의 분리정제**

[0048] 하헬라 제주엔시스(*Hahella chejuensis*)의 셀룰레이즈로서 엔도글루카네이즈로 구분되어 있는 Q2SFD8 (Gene ID: 3842516)를 코딩하는 염기서열(Hch03914) 중에서 CBM6도메인을 제거하여 Truncated HcCe15H(본 발명에 따른 재조합 셀룰레이즈)를 만들었다(도 1).

[0049] 본 발명에 따른 재조합 셀룰레이즈의 생산 과정을 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0050] 하헬라 제주엔시스(*Hahella chejuensis*) KCTC 2396은 연세대학교 김지현 교수로부터 (당시에는 생명공학연구원 소속 박사) genomic DNA를 제공받았다. 이를 template로 사용하여 클로닝에 사용하였다. 클로닝 및 단백질 발현 숙주로 에스케리치아 이콜라이(*Escherichia coli*) BL21 (DE3)을 사용하였다.

[0051] Q2SFD8은 위에서 언급한대로 크게 세 개의 도메인으로 이루어져 있는데 본 실험을 위하여 CBM6도메인을 제거한 것과 전체 염기서열를 온전하게 갖는 두 가지 형태의 단백질을 제작하기 위하여 프라이머를 디자인하였다. 염기서열 앞부분은 공유하기 때문에 같은 프라이머 (F)를 사용하였고 뒷 부분에는 Histrap으로 분리정제를 가능하게 하기 위한 Histidine (6X) 연속서열을 붙였다. 프라이머의 정보는 다음과 같다. CBM6를 제거한 단백질은 (F+R1), 전체서열을 갖는 단백질은 (F+R2)로 클로닝에 사용하였다. 제한효소로는 BamHI (GGATCC)과 NotI

(GCGGCCGC)을 앞뒤로 사용하였다.

[0052] Primer F: CCGGATCCATGCACGCTGTGCCGCCGTTATCG (서열번호 3)

[0053] Primer R1: GGGCGGCCGCTCAGTGATGATGGTGATGGTGAGGAATGGGGTCGGAGCTTTGGATAATG (서열번호 4)

[0054] Primer R2: GGGCGGCCGCTCAGTGATGATGGTGATGGTGTTTTTGTCCTTTAGTGATCTTGAACCAGTTCAGG (서열번호 5)

[0055] 위와 같이 제작한 프라이머와 앞서서 제공받은 템플레이트를 이용하여 PCR 산물을 얻었고 이 단편과 벡터인 pET21a를 각각 BamHI+NotI으로 digestion하였다. 이를 gel elution하여 단편을 확보한 후, T4 ligase로 접합하여 플라스미드 형태인 pET-HchCore, pET-HchFull로 각각 클로닝하였다.

[0056] 상기 플라스미드를 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균을 Luria-Bertani broth 2L 에 배양하여 37° C 200 rpm에서 Optical density 600 nm에서 0.8이 될 때까지 키운 후 16° C로 옮겨 cooling 하였다. 이 후0.5mM IPTG로 발현을 유도하였다. 이후 16시간을 더 배양한 후 회수하여 세포만 얻은 후, 20 mM Tris-Cl (pH 8.0) buffer에 총 부피 40ml이 되도록 섞어주었다. 여기에 프로테아제 저해제인 1mM PMSF를 첨가한 후 Sonic generator를 사용하여 10분간 세포를 파쇄 하였다. 이를 다시 원심분리 (16,000 rpm 60 min)하여 상층액만 걸러낸 후 0.45 nm PVDF로 필터링한 후 이를 Histrap (GE healthcare, USA) 5ml에 로딩 하였다. 이후 10mM 이미다졸이 녹여진 20mM Tris-Cl (pH 8.0) 버퍼로 워싱하여 불필요한 단백질을 제거하였고 위와 동일한 조성에 100mM 이미다졸이 첨가된 버퍼를 가하여 생산된 단백질을 추출하였다. 이를 10% SDS-PAGE상에서 180V, 60min으로 전개한 후 깨끗한 순도의 단백질 구간만 수합하여 Vivaspin 10,000 (Satorious, USA)을 사용하여 농축 및 버퍼교환을 해주었다. 이 후 다시 SDS-PAGE에 로딩하여 본 발명에 따른 재조합 셀룰레이즈를 얻을 수 있었다. Truncated form(재조합 *Hc*Cel5H)이 아닌 전체 서열의 셀룰레이즈(original *Hc*Cel5H) 또한 동일한 공정으로 분리생산하였다(도 2). 도 2는 original *Hc*Cel5H와 재조합 *Hc*Cel5H의 SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 사진이다(Lane L: protein marker; 1: truncated *Hc*Cel5H; 2: original *Hc*Cel5H). 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 재조합 *Hc*Cel5H는 약 34 kDa 의 분자량을 가지고 있음을 확인할 수 있다.

[0057] **<실험예 1> original *Hc*Cel5H와 재조합 *Hc*Cel5H의 기질에 따른 활성 비교**

[0058] original *Hc*Cel5H와 재조합 *Hc*Cel5H의 활성을 비교하기 위해 기질로는 수용성 셀룰로오스 CMC는 1%, 불용성 셀룰로오스 Avicel은 10% 사용하였고 총 부피 200 ml에서 50도에서 반응하였다. 기질별 반응 시간은 각각 20분, 24시간을 처리하였다. 넣어준 Truncated HcCel5H와 Original HcCel5H는 0.1mmol per g cellulose이다. 반응을 종료할 때는 95도에서 5분간 끓여 효소의 활성을 중지하였고 DNS 방법으로 정량하였다.

[0059] 도 3은 수용성 셀룰로오스 Carboxymethyl cellulose (CMC)와 불용성 셀룰로오스 Avicel에 대한 original *Hc*Cel5H와 재조합 *Hc*Cel5H의 활성을 비교한 결과를 보여준다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이 Cellulose binding domain family 6가 제거되었음에도 오히려 활성은 더 나아진 것을 볼 수 있다. 특히, 불용성 셀룰로오스인 Avicel에서의 활성을 볼 때, 우리가 디자인한 형태의 셀룰레이즈의 활성이 원래의 것과 비슷하거나 더 좋은 것을 볼 수 있다. 이는 도메인을 잘라낸 형태의 분자량이 원래의 절반 가량이라는 것을 생각해보면 투입질량 대비 활성은 적어도 2배가 개선되었음을 알 수 있다.

[0060] **<실험예 2> pH에 따른 재조합 *Hc*Cel5H의 CMCase의 활성**

[0061] 상기 실시예 1에서 제조된 재조합 *Hc*Cel5H의 최적 pH를 결정하기 위하여, 1% CMC를 기질로 하였고 전체 반응양은 200 μl, 반응시간은 20분, 반응온도는 50° C에서 측정하여 pH에 따른 재조합 *Hc*Cel5H의 CMCase의 활성을 측정하였다. pH 3~6은 소듐 시트레이트(sodium citrate) 버퍼를 pH 7~8은 Tris-Cl 버퍼를 pH 9는 글리세롤-NaOH 버퍼를 각각 사용하였다. 반응을 종료할 때는 95도에서 5분간 끓여 효소의 활성을 중지하였고 DNS 방법으로 정량하였다.

[0062] 도 4는 pH에 따른 재조합 *Hc*Cel5H의 CMCase 활성을 보여준다. 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이 pH 6에서 가장 높은 활성을 나타내고 있으며 pH 5와 7에서도 괜찮은 활성을 보인다. 이를 통해 이 효소의 가장 좋은 반응 pH가 6임을 확인할 수 있다.

[0063] <실험예 3> 온도에 따른 재조합 *Hc*Cel5H의 CMCase의 활성

[0064] 상기 실험예 1에서 제조된 재조합 *Hc*Cel5H의 최적 온도를 결정하기 위하여, 수용성기질인1% CMC를 기질로 하였고 전체 반응양은 200 μl, 반응시간은 20분, pH 6, 0.1M 소듐 시트레이트 버퍼에서 측정하였다. 반응을 종료할 때는 95도에서 5분간 끓여 효소의 활성을 중지하였고 DNS 방법으로 정량하였다.

[0065] 도 5는 온도에 따른 재조합 *Hc*Cel5H의 CMCase 활성을 보여준다. 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 전반적으로 굉장히 넓은 범위에서 활성을 보임을 알 수 있다. 특히 20도에서 70도까지 거의 흡사한 활성을 보임으로 인하여 이 효소의 효용범주가 굉장히 넓은 것을 확인할 수 있으며 또한, 고온에서도 반응성이 떨어지지 않음을 (60도 이상) 확인할 수 있다.

[0066] <실험예 4> 온도에 따른 재조합 *Hc*Cel5H의 Avicelase의 활성

[0067] 상기 실험예 3와 달리 불용성 셀룰로오스를 사용하여 온도별 활성을 측정하였다. 불용성 기질인10% Avicel을 기질로 하였고 전체 반응양은 200 μl, 반응시간은 12 시간, pH 6, 0.1M 소듐 시트레이트 버퍼에서 측정하였다. 반응을 종료할 때는 95도에서 5분간 끓여 효소의 활성을 중지하였고 DNS 방법으로 정량하였다.

[0068] 도 6은 온도에 따른 재조합 *Hc*Cel5H의 Avicelase 활성을 보여준다. 도 5에 비해 반응시간이 길기 때문에, 도 6에서는 50도에서 가장 높은 활성을 보였다. 특히나 이 효소의 유래가 되는 하헬라 제주엔시스가 해양미생물임에도 50도라는 높은 온도에서 가장 높은 활성을 보인다. 이는 기질에 대한 특이적 반응형태로 해석할 수도 있고, 반응시간이 증가함으로 인한 효소 활성의 유지적 측면에서 접근하여 볼 수 있다. 그럼에도 불구하고 60도에서도 나쁘지 않은 활성을 보이는 것으로 보아 고온에 대한 저항성이 있음을 확인할 수 있다.

[0069] <실험예 5> 재조합 *Hc*Cel5H의 온도 안정성 실험

[0070] Bradford 분석법으로 단백질의 양을 1, 14시간 지난 후 온도별로 측정하였다. pH 6, 0.1M sodium citrate 버퍼를 사용하였다. 단백질의 안정성을 측정하기 위해 처음 넣어줄 당시의 단백질을 Bradford assay로 측정한 후, 일정 시간이 지난 온도별 샘플을 수거하여 16,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 이를 상등액만 수거하여 Bradford assay로 단백질의 양을 측정하였다. 처음에 넣어준 단백질이 얼마나 보존되었는지를 나중에 측정한 값을 빼주어 알 수가 있다. Bradford assay는 Biorad 제품의 Bio-Rad Protein assay Dye reagent concentrate를 40 ul, 희석한 단백질을 160 ul로 섞어주어 5분간 30도에서 반응한 후 microassay reader기에서 595nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 도출하였다. Standard 물질로는 10 mg의 BSA (Bovine serum albumin)을 사용하였다. 즉, 스탠다드 물질로 얻은 정량곡선에 단백질 샘플이 반응한 흡광도 값을 계산하여 실제 단백질의 농도의 차이를 계산할 수 있다.

[0071] 도 7은 재조합 *Hc*Cel5H의 온도 안정성을 보여주는 실험 결과이다. 도 7에서는 앞서서 수행한 도5, 도6에 대한 해석을 뒷받침해주는 형태를 보였다. 우선, 각각의 온도에서 1시간을 반응하였을 때, 60도까지는 안정성에 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 70도에서는 절반으로 줄기는 했지만 도5의 결과를 볼 때 고온에서의 활성이 더 좋은 바탕이 있음을 확인할 수 있다. 14시간을 반응한 결과를 보면 60도가 큰 폭으로 안정성이 떨어졌지만 50도까지는 일정하게 내열성을 유지하고 있음을 볼 수 있고 그의 결과로 도6의 최적활성 온도가 50도가 됨을 뒷받침하고 있다. 또한, 30도와 60도를 비교하였을 때 활성형태의 단백질 대비 활성은 60도가 더 좋음을 보이는 것으로 나타나며 이는 고온에서 활성이 높음을 다시금 입증하는 결과가 된다.

[0072] <실험예 6> Avicel을 기질로 한 재조합 *Hc*Cel5H의 반응 산물 분석

[0073] 재조합 *Hc*Cel5H에 의해 생산되는 반응 산물의 종류를 확인하고자, 10% Avicel을 기질로 사용하여 전체 반응양 200 μl, 50° C, pH 6, 0.1M 소듐 시트레이트 버퍼 조건에서 반응하였다. 이를 시간별로 샘플링하여 (a) DNS 와 (b) Thin Liquid Chromatography (TLC) 로 각각 분석하였다.

[0074] DNS 분석법은 상기의 실시예와 동일한 방법으로 수행하였다. TLC 분석에서는 부탄올:아세트산:물을 각각 2:1:1로 섞은 것을 전개용액으로 사용하였고, TLC 판은 silica로 덮인 것을 사용하였다. 전개 후 10%황산이 함유된

에탄올을 부어주고 건조한 후, 다시 발색시약을 부어주고 건조하였다. 이후 열을 가하여 확인하였다.

[0075] 도 8은 Avicel을 기질로 한 재조합 *Hc*Cel5H의 시간별 반응 산물을 (a) DNS와 (b) TLC로 각각 분석한 결과를 보여준다. 도 8a에서 볼 수 있는 바와 같이 반응이 진행됨에 따라 점차 반응산물이 포화되고 있음을 알 수 있다. 그런데 각각의 구간을 8b로 확인해볼 때, 글루코스, 셀로비오스, 셀로트리오스의 패턴이 변화되고 있음을 확인할 수 있다. 처음에는 셀로비오스와 셀로트리오스 위주로 반응산물이 형성되다가 시간이 지날수록 셀로비오스는 큰 변화가 없고 셀로트리오스가 분해되어 형성된 글루코스의 생성이 크게 증가함을 확인할 수 있다.

[0076] **<실험예 7> 올리고당을 기질로 한 재조합 *Hc*Cel5H의 반응 산물 분석**

[0077] 재조합 *Hc*Cel5H가 분해할 수 있는 올리고당의 종류를 확인하고자, 1% 올리고당을 기질로 사용하여 전체 반응양 20 μl, 50°C, pH 6, 0.1M 소듐 시트레이트 버퍼 조건에서 20분간 반응하였다. 이를 Thin Liquid Chromatography (TLC) 로 각각 분석하였다. 분석방법은 실험예 6과 동일하다.

[0078] 도8에서 확인하였던 셀룰레이즈의 높은 반응성 (processivity)을 본 실험예에서도 확인하였다. 도 9의 경우 *Hc*Cel5H가 분해하는 형태를 보다 구체적으로 파악하기 위하여 셀로비오스(G2), 셀로트리오스(G3), 셀로테트라오스(G4), 셀로펜타오스(G5), 셀로헥사오스(G6)를 기질로 사용하여 반응하였다. 도 9의 결과를 보면, 셀로비오스를 분해하지는 못하였기에 베타글루코시데이즈는 아니다. 그리고 산물이 주로 셀로비오스 (G2)이며 셀로트리오스 (G3)가 점차 글루코오스 (G1)으로 분해하는 패턴을 통해 엑소셀룰레이즈의 특성을 나타내고 있다. 원래 지속적인 반응성 (processive)를 갖는 엑소셀룰레이즈는 CMC와 같은 기질에 분해를 잘 못하는 것이 일반적인데, 이 효소는, 이미 도 1과 2 등에서 CMC에 대한 엔도셀룰레이즈로서의 높은 활성을 보인바 있다. 결국 이 효소는 결국 엔도와 엑소의 기능을 모두 갖는 processive 셀룰레이즈로 분류할 수 있다. 이러한 형태의 효소는 박테리아에서는 매우 드문 형태이며 그 활성이 높은 것에 발명의 의의가 있다. 또한 고온에서도 활성을 갖는 것은 산업적 당화공정에서도 그 쓰임이 크다고 하겠다.

[0079] **<실험예 8> 수용성 셀룰로오스인 Carboxyl methyl cellulose (CMC), 불용성 셀룰로오스인 Avicel에 대한 효소 속도론 적용(Kinetic study)**

[0080] 미카엘레스-멘튼 속도식의 실험에 의한 속도상수를 결정하는 것이 일반적인 효소의 속도상수를 구하는 방식이기에 차용하였다. 표 1 에서는 실험을 통하여 생성된 반응속도 상수 Km과 최대반응속도 Vmax, 촉매상수 Kcat을 계산하여 표기하였다. 표 1은 재조합 셀룰레이즈가 실제적으로 기질에 대하여 보이는 반응양상을 보다 정확하게 수치화하여 객관화 할 수 있는 자료이다. 실험방법은 다음과 같다. 초기반응속도를 고려하여 CMC에 대해서는 1~4% (w/v) 의 다양한 기질농도를 사용하였고 여기에 동일한 재조합 셀룰레이즈 0.1 nmol 씩을 넣어주었고 반응시간은 5분을 사용하였다. Avicel에 대해서는 0.8~4% (w/v) 의 다양한 기질농도를 사용하였고 재조합 셀룰레이즈를 0.5 nmol씩을 넣어주었고 반응시간은 2시간을 사용하였다. 반응액은 200 μl의 50 mM 소듐시트레이트 (pH 6.0)를 사용하였고 50깂에서 반응하였다. 이렇게 나온 결과를 이중역수 취하여 도표 (Lineweaver Bulk plot)에 대입하여 K_m, K_{cat}, V_{max}를 각각 구하였다.

[0081] 반응속도 상수 (Km) 가 낮은 기질인 CMC에서 분해가 빠르게 진행한 것은 엔도글루카네이즈의 특성이 강하게 작용한 것을 나타낸다. 하지만 일반적인 셀룰레이즈와 달리 Avicel에서도 비교적 높은 활성을 보이는 것을 보임으로서 엑소글루카네이즈의 특성을 더불어 갖는 결과를 보였다. 기질에 따라 분해능이 크게 차이나는 것은 효소의 고유 특성이기 보다는 기질의 특성상 수용성 기질의 효소 접근성이 훨씬 뛰어나기 때문이다.

[0082] [표 1]

기질	효소	Km (mg·ml^{-1})	V_{max} (mg·ml^{-1}·min^{-1})	K_{cat} (min^{-1})
CMC	*Hc*Cel5H	21.34	1.67 x 10^{-1}	9.76 x 10^{-1}
Avicel		171.77	4.94 x 10^{-3}	2.89 x 10^{-3}

[0083]

[0084] <실험예 9> 높은 반응성(Processivity)을 갖는 특성의 확인

[0085] 0.2 nmol의 재조합셀룰레이즈, *Hc*Cel5H를 기질인 10 mg의 필터페이퍼 (filter paper, Watman No 1.)에 처리하였다. 이 때 반응액은 200 μl의 50 mM소듐 시트레이트 버퍼 (pH 6.0) 였고 50℃, 2시간동안 반응하였다. 수용성 당을 측정하기 위해 상등액을 취하여 DNS 법으로 당을 측정하였고 불용성 당을 측정하기 위하여 남은 필터페이퍼를 6회 씻어낸 후 여기에 BCA 분석법을 사용하여 불용성 당을 측정하였다. 각각 측정된 당의 값에서 수용성 당을 불용성 당으로 나누어 주면 재조합 셀룰레이즈의 고유의 반응성을 측정할 수 있다. 이를 통해 반응성이 높은 셀룰레이즈는 기질을 연속으로 분해하므로 수용성 당의 함량이 일반 셀룰레이즈보다 월등히 높은데 표 2의 결과처럼 본 효소도 5.78이라는 높은 값을 나타냈다. (일반적인 셀룰레이즈는 2~3을 나타낸다.)

[0086] [표 2]

효소	반응성 정도	% 수용성 당	% 불용성 당
*Hc*Cel5H	5.78 ± 0.78	85.16	14.84

[0087]

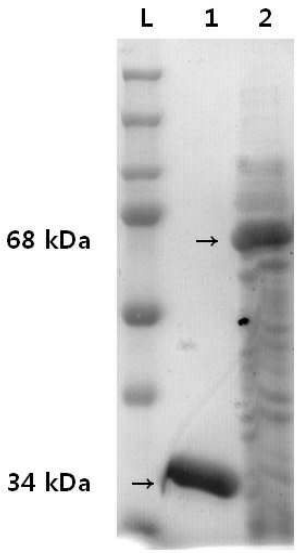
[0088] <실험예 10> 점도기를 이용한 재조합 HcCel5H의 활성 확인

[0089] 점도기를 이용하여 재조합 HcCel5H의 활성을 추가로 확인하였다. 점도계는 DV-II+ Pro Extra (Brookfield, Middleboro, MA, USA)를 사용하였고 시간당 감소하는 점도값 (Cp)를 기기의 수치를 확인하여 측정하였다. 25 ml의 0.1M 소듐 시트레이트 버퍼 (pH 6.0)에 3% (w/v) 이 되게CMC를 녹여서 액상용액 (solution) 을 만들었다. 상온에서 이 액상용액에 0.1 nmol의 재조합 HcCel5H를 넣고, 액상용액 30 ml를 점도계에 채운 후 점도계를 회전시켜 점도가 변화하는 것을 관찰하였다. 이를 통해 20분만에 점도가 0으로 감소함을 도 10에서 보였다. 이는, 전형적인 엔도글루카네이즈의 특성으로 앞서 도 8, 9에서 보여준 엑소글루카네이즈의 특성을 지닌 재조합 HcCel5H가 명백한 엔도글루카네이즈의 특성을 함께 가짐을 다시금 확인한 것이다. 이를 통해, 단순한 엔도-, 엑소 글루카네이즈가 아니라 이 둘 특성을 모두 겸비한 높은 반응성의 셀룰레이즈임을 확정하였다.

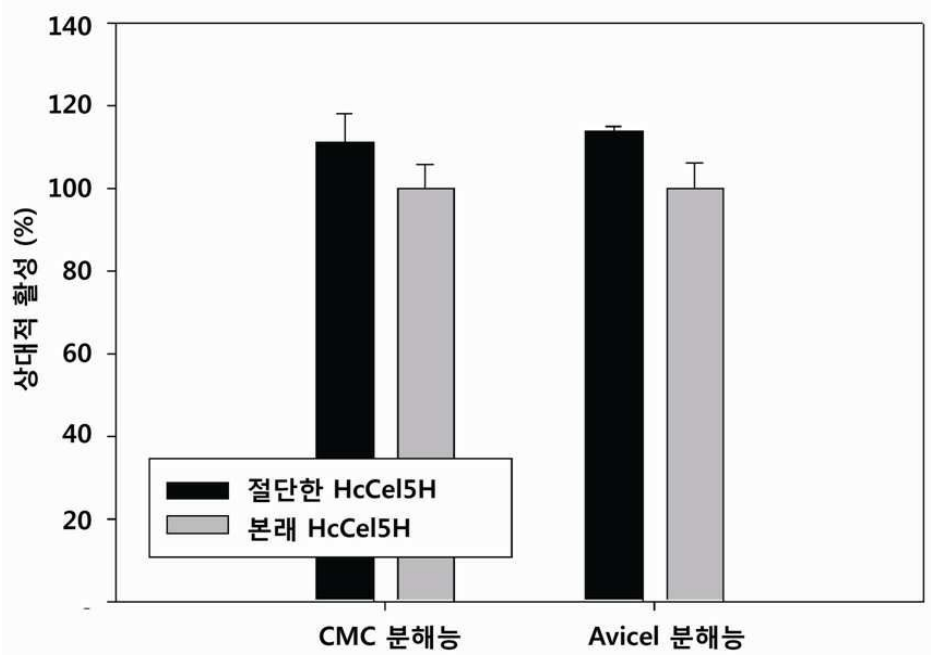
도면

도면1

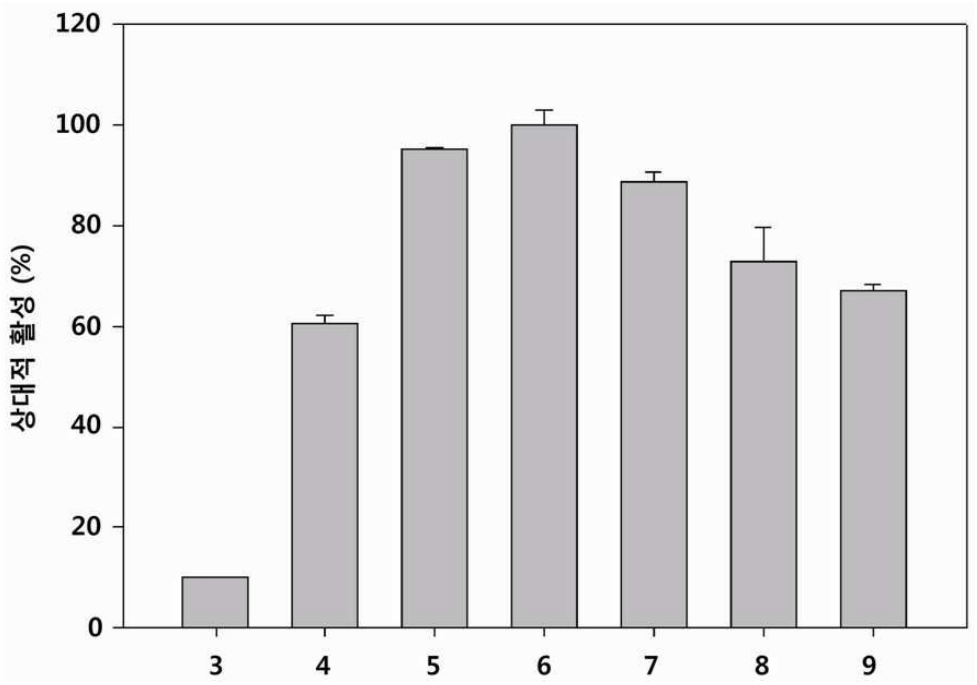
도면2


L
1
2
68 kDa
34 kDa

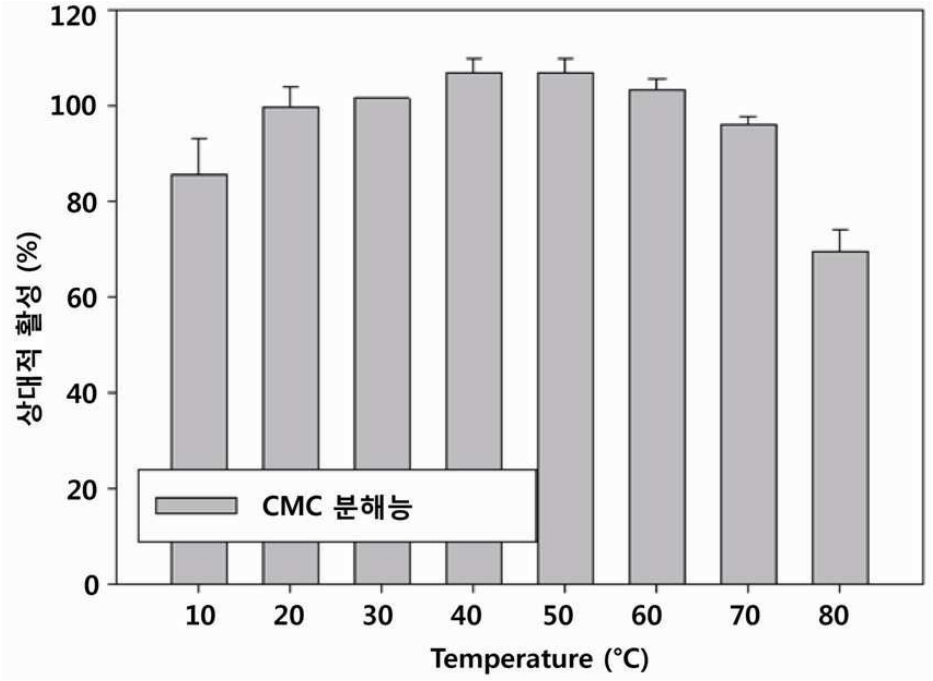
도면3


140
120
100
80
60
40
20
상대적 활성 (%)
절단한 HcCel5H
본래 HcCel5H
CMC 분해능
Avicel 분해능

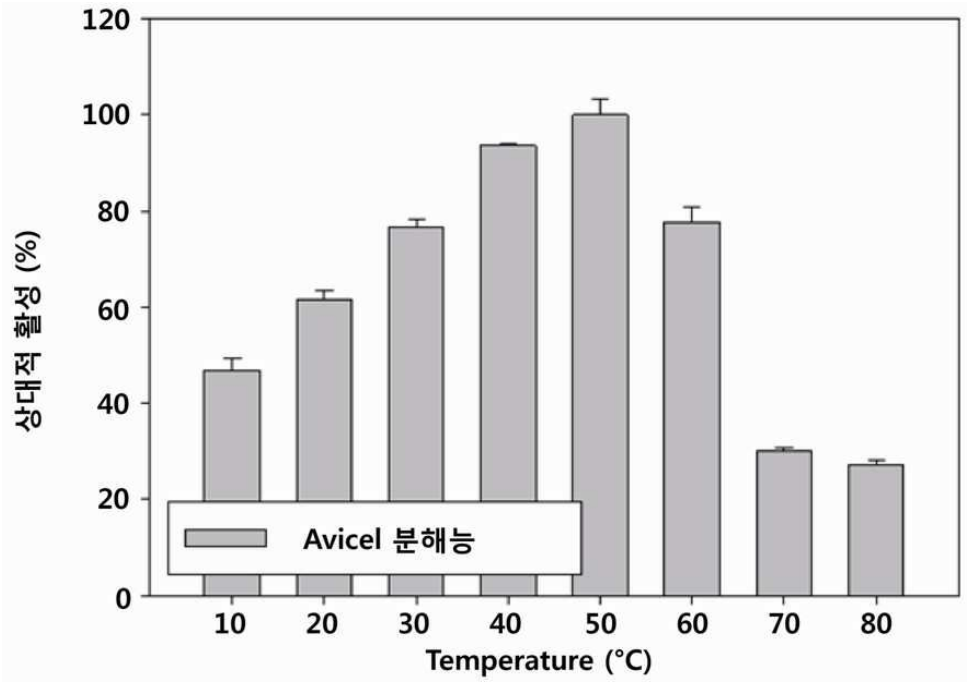
도면4


120
100
80
60
40
20
0
상대적 활성 (%)
3
4
5
6
7
8
9

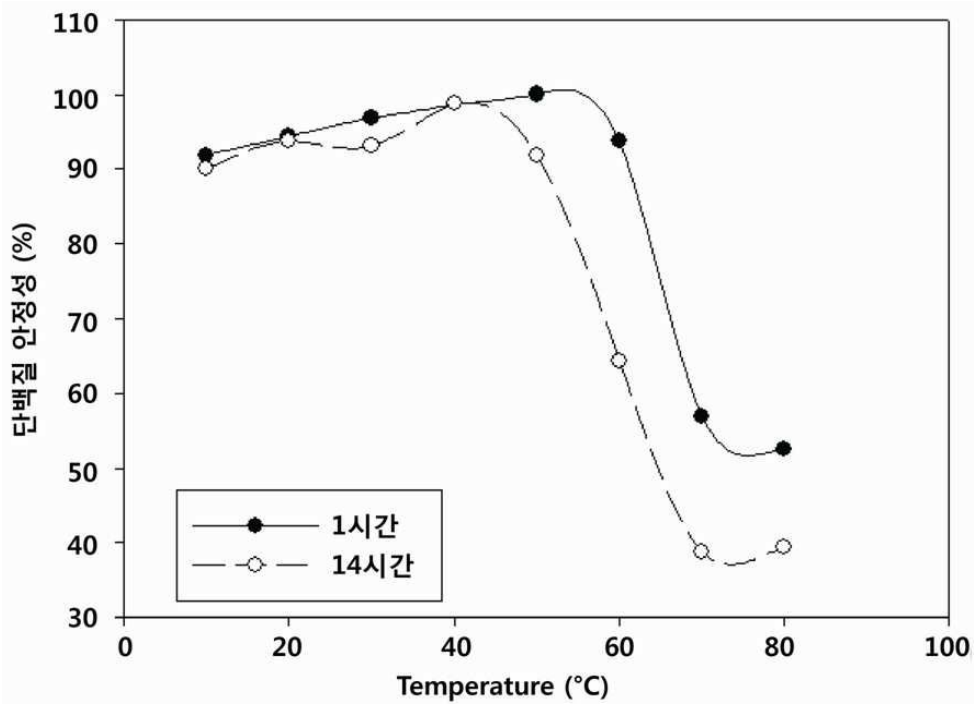
도면5


120
100
80
60
40
20
0
상대적 활성 (%)
CMC 분해능
10
20
30
40
50
60
70
80
Temperature (°C)

도면6

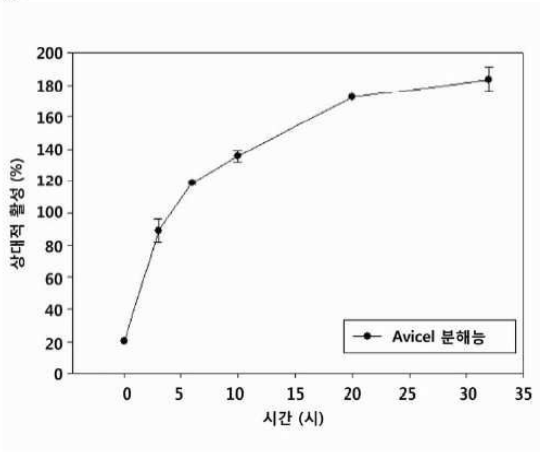

120
100
80
60
40
20
0
상대적 활성 (%)
Avicel 분해능
10
20
30
40
50
60
70
80
Temperature (°C)

도면7

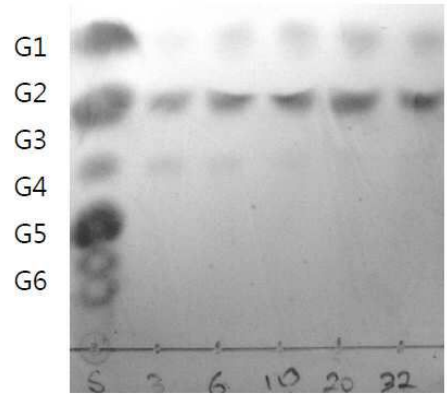

110
100
90
80
70
60
50
40
30
단백질 안정성 (%)
1시간
14시간
0
20
40
60
80
100
Temperature (°C)

도면8

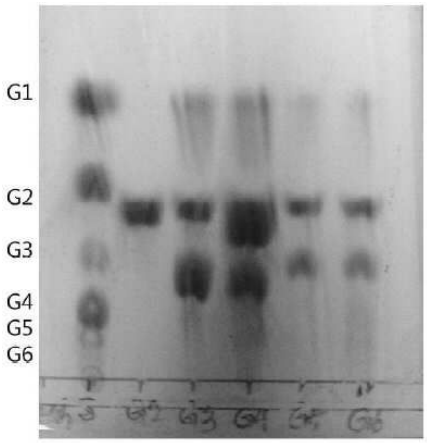
(a)


200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
상대적 활성 (%)
0
5
10
15
20
25
30
35
시간 (시)
Avicel 분해능

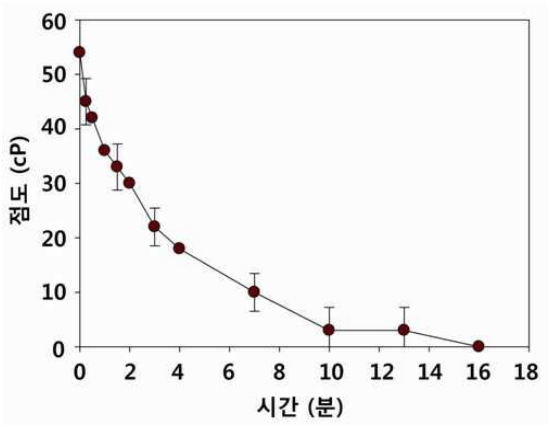
(b)


G1
G2
G3
G4
G5
G6

도면9


G1
G2
G3
G4
G5
G6

도면10



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Novel recombinant cellulase and use thereof

<130> X14U13C0033

<150> 10-2013-0046423

<151> 2013-04-26

<160> 5

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 307

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Truncated HcCel5H

<400> 1

Met His Ala Val Pro Pro Leu Ser Val Gln Gly Asn Lys Val Val Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Val Ser Leu Gly Gly Asn Ser Leu Phe Trp Ser Asn

20 25 30

Asn Gly Trp Gly Gly Glu Arg Phe Tyr Asn Ser Gly Ala Val Gly Ala

35 40 45

Ile Lys Asn Asp Trp Lys Ser Ser Ile Val Arg Ala Ala Met Gly Val

50 55 60

Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Leu Gln Asp Arg Glu Gly Asn Arg Asn Lys

65 70 75 80

Val Ile Ser Val Val Asp Ala Ala Ile Ala Asn Asp Met Tyr Val Ile

85 90 95

Ile Asp Trp His Ser His His Ala His Gln Tyr Lys Asn Glu Ala Ile

100 105 110

Glu Phe Phe Gln Asp Met Ala Arg Arg Tyr Gly Asp Lys Asn Asn Val

115 120 125

Ile Tyr Glu Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asp Val Ser Trp Ser Gly Val

130 135 140

Ile Lys Pro Tyr Ala Glu Ala Val Ile Asp Ala Ile Arg Gln Val Asp

145 150 155 160

Pro Asp Asn Leu Ile Ile Val Gly Thr Arg Gln Trp Ser Gln Glu Val

165 170 175

Glu Glu Ala Ser Trp Asp Pro Ile Arg Lys Asn Asn Ile Ala Tyr Thr

180 185 190

Leu His Phe Tyr Ala Gly Thr His Lys Gln Trp Leu Arg Asp Lys Ala

195 200 205

Gln Asn Ala Met Asn Asn Gly Ile Ala Leu Phe Val Thr Glu Trp Gly

210 215 220

Thr Val Asp Ala Ser Gly Asp Gly Ala Val Asn Glu Ser Glu Thr Trp

225 230 235 240

Ala Trp Val Asp Phe Met Arg Asn His Gly Ile Ser His Ala Asn Trp

245 250 255

Ala Leu Asn Asp Lys Ala Glu Gly Ala Ser Thr Phe Trp Pro Gly Ala

260 265 270

Ser Gly Thr Gly Gly Trp Asn Asp Gly Asn Leu Thr Pro Ser Gly Lys

275 280 285

Leu Val Lys Ser Ile Ile Gln Ser Ser Asp Pro Ile Pro His His His

290 295 300

His His His

305

<210> 2

<211> 924

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Truncated HcCel5H

<400> 2

atgcacgctg tgccgccgtt atcggtgcag ggcaataaag tcgtcagtgg cggtcagcaa 60

gtcagtctgg gaggcaacag cctgttttgg agcaacaacg gctggggagg ggagcgcttt 120

tataattccg gcgcggtagg ggccatcaaa aacgactgga agtccagcat tgtgcgggcc 180

gccatggggg tggatgaagg cggcggatat ttacaggacc gggaaggcaa ccgtaataaa 240

gtcatctccg tggtggacgc cgccatcgcc aatgatatgt acgtcatcat cgactggcac 300

tcccaccatg ctcatcagta caagaacgaa gccatcgagt ttttccagga catggcgcgc 360

cgctacggcg ataaaaacaa tgttatttac gaagtctata acgagccgct ggatgtgtcc 420

tggagcggcg ttatcaagcc ctacgccgag gcggtgattg acgctatccg ccaagttgat 480

ccagataacc tgatcattgt cgggactcgc caatggtcgc aggaagtgga ggaagcctcc 540

tgggacccta tccgcaagaa caatatcgcc tatacgctgc atttttacgc cggcacgcat 600

aagcagtggc tgcgcgacaa agcgcaaaac gccatgaaca acggcatcgc acttttcgtg 660

acggagtggg gaaccgtaga cgccagcggc gatggcgcgg ttaatgaaag tgaaacctgg 720

gcctgggtcg acttcatgcg caaccacggc atcagccacg ccaactgggc gctgaatgat 780

aaagccgaag gcgcctcaac gttctggcct ggggctagtg gaaccggtgg ttggaatgat 840

ggaaacctga cgccttccgg taaactggtg aaatccatta tccaaagctc cgaccccatt 900

cctcaccatc accatcatca ctga 924

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer F

<400> 3

ccggatccat gcacgctgtg ccgccgttat cg 32

<210> 4

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer R1

<400> 4

gggcggccgc tcagtgatga tggtgatggt gaggaatggg gtcggagctt tggataatg 59

<210> 5

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer R2

<400> 5

gggcggccgc tcagtgatga tggtgatggt gtttttgtcc tttagtgatc ttgaaccagt 60

tcagg 65