



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월14일
(11) 등록번호 10-2312807
(24) 등록일자 2021년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/26 (2006.01) C07K 14/195 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/2414 (2013.01)
C07K 14/195 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0078070
(22) 출원일자 2020년06월25일
심사청구일자 2020년06월25일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160133996 A
KR1020080084519 A
KR1020020037056 A

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박천석
경기도 남양주시 와부읍 덕소로116번길 49 106동 1303호 (현대홈타운아파트)
정동현
경상북도 상주시 북릉냉림길 37 207호(냉림동, 부민강변타운)
김예진
서울특별시 용산구 효창원로 17 111동 204호 (산천동, 리버힐삼성아파트)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 5 항

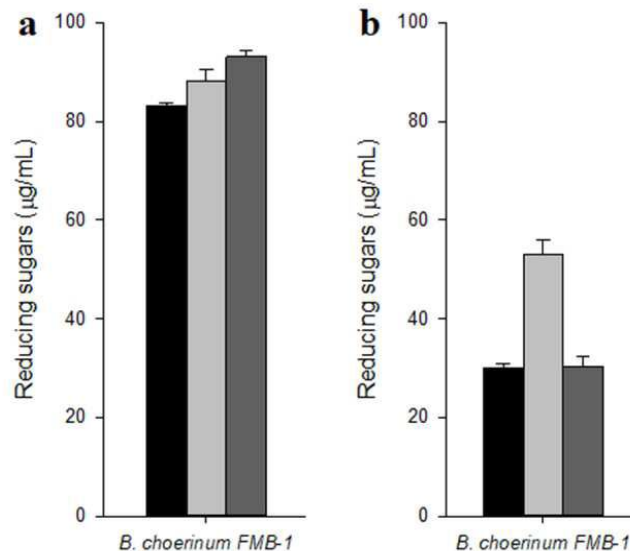
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 비피도박테리움 속의 저항전분 분해 활성을 가지는 아밀라아제들 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 비피도박테리움 코리넘(*Bifidobacterium choerinum*)의 저항전분 분해 활성을 가지는 아밀라아제들 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 저항전분 분해용 조성물은 저항전분 분해 활성을 갖는 α-아밀라아제를 포함하는 바, 다양한 산업 분야에서 저항전분 분해 용도로 제공될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Y 302/01001 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112444
과제번호	20200254
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단(통합)
연구사업명	이공분야기초연구/중견연구자지원사업
연구과제명	사람 장내에 존재하는 복합탄수화물 분해 미생물의 연구를 통한 기능성 프로바이오틱균의 탐색(4/5)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.01 ~ 2020.02.28
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 포함하는, 저항전분 분해용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 저항전분은 고아밀로오스 옥수수 전분(high amylose corn starch)인 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제는 비피도박테리움 코리넘(*Bifidobacterium choerinum*) 유래인 것인, 조성물.

청구항 4

서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 포함하는, 저항전분 분해 활성을 갖는 제조합 미생물.

청구항 5

서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 포함하는, 저항전분 분해 활성을 갖는 제조합 미생물 또는 이를 배양한 배지 중 어느 하나 이상을 저항전분을 함유하는 시료에 첨가하는 것을 포함하는, 저항전분을 분해하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비피도박테리움 코리넘(*Bifidobacterium choerinum*)의 저항전분 분해 활성을 가지는 아밀라아제들 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 저항전분(resistance starch, RS)은 소화 효소에 내성이 있는 전분의 일종으로, 섭취 후 소장에서 포도당으로 분해되지 않아 혈당을 낮추고 인슐린 감수성을 개선하는 등 인체 건강에 유익한 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또한, 완전한 형태로 대장에 도달한 RS는 장내 미생물에 의해 발효되고 장내 미생물과 숙주 건강 사이의 주요 신호 분자인 단쇄지방산(short chain fatty acids, SCFAs)으로 변형된다(Bird A, et al. (2010) Resistant starch, large bowel fermentation and a broader perspective of prebiotics and probiotics. Beneficial microbes 1(4):423-431). SCFAs는 6 개 미만의 탄소를 갖는 작은 지방산으로 아세트산, 프로피온산 및 부티르산이 포함된다. SCFAs는 대장 세포의 주요 에너지원으로 알려져 있으며 위장관 장애, 심혈관 질환 및 암의 위험 감소와 같이 인간 건강에서 다양한 생리적 역할을 한다. 최근 RS가 대장에서 SCFA의 공급원으로서의 역할을 함에 따라, RS의 프리바이오틱 사용에 대한 관심이 증가되었다. 이에 따라, 장내 RS를 활용하는 장 미생물총 및 RS 대사에 초점을 맞춘 추가 연구가 요구되고 있다.

[0004] 한편, 비피도박테리움은 인간의 장내 공생 박테리아로 프로바이오틱스(probiotics, 생균제)로써 알려져 있다.

다수의 연구를 통해 비피도박테리움의 전분 분해에 있어서 유리함이 알려져 있지만, 비피도박테리움 유래의 전분 분해 효소에 대한 연구는 거의 없으며, 특히, 비피도박테리움 유래의 RS 분해 효소는 보고된 바 없다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 비피도박테리움 코리넘(*Bifidobacterium choerinum*) 유래의 RS 분해 효소를 규명하고 이의 RS 분해 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 포함하는, 저항전분 분해용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 포함하는, 저항전분 분해 활성을 갖는 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 포함하는, 저항전분 분해 활성을 갖는 재조합 미생물 또는 이를 배양한 배지 중 어느 하나 이상을 저항전분을 함유하는 시료에 첨가하는 것을 포함하는, 저항전분을 분해하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0013] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 포함하는, 저항전분 분해용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서, 용어 " α -아밀라아제"는 녹말이나 글리코젠 등의 글루코오스 사슬을 안쪽에서부터 규칙성 없이 절단하는 효소로, 글루코오스의 α -1, 4-결합에만 작용한다. α -아밀라아제는 맥아·곰팡이·세균 등을 비롯하여 침이나 이자액에도 존재한다.

[0016] 본 발명의 목적상, 상기 α -아밀라아제는 저항전분을 분해하는 활성을 가지는 효소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명에서, 용어 "저항전분(resistance starch, RS)"은 소화 효소에 내성이 있는 전분의 일종으로, 섭취 후 소장에서 포도당으로 분해되지 않아 혈당을 낮추고 인슐린 감수성을 개선하는 등 인체 건강에 유익한 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또한, 완전한 형태로 대장에 도달한 저항전분은 장내 미생물에 의해 대장 세포의 주요 에너지원이며 위장관 장애, 심혈관 질환 및 암의 위험 감소와 같이 인간 건강에서 다양한 생리적 역할을 하는 것으로 알려진 단쇄지방산(short chain fatty acids, SCFAs)으로 변형된다. 상기 저항전분의 예로는 고아밀로오스 옥수수 전분(high amylose corn starch, HACS) 및 감자 전분(potato starch) 등의 과립형 전분, 호화 후 노화되어 결정화된 전분(retrograded starch) 또는 화학적으로 변성된 전분(chemically modified starch) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명의 목적상, 상기 저항전분은 고아밀로오스 옥수수 전분일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명은 비피도박테리움 코리넘(*Bifidobacterium choerinum*)으로부터 저항전분 분해 활성이 있는 단백질을 최초로 규명하고 이의 활성을 확인한 것에 의의가 있다.

[0023] 본 발명에서 상기 서열번호 1 내지 3은 저항전분을 분해하는 α -아밀라아제 활성을 갖는 아미노산 서열을 의미한다. 상기 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 단백질은 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드 또는 단백질, 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드 또는 단백질과 혼용하여 사용될 수 있다.

[0024] 상기 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열은 비피도박테리움 코리넘(*Bifidobacterium choerinum*) 유래의 유전자에 의해 코딩되는 저항전분을 분해하는 α -아밀라아제 활성을 갖는 단백질의 아미노산 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 상기 아미노산과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 서열번호 1 내지

3의 아미노산 서열은 공지의 데이터 베이스인 미국국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)에서 얻을 수 있다. 또한, 본 발명에서의 저항전분을 분해하는 α -아밀라아제 활성을 갖는 단백질은 비록 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이라고 정의하였으나, 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열 앞뒤로의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 서로 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면 본 발명의 저항전분을 분해하는 α -아밀라아제 활성을 갖는 단백질에 해당됨은 당업자에게 자명하다. 구체적인 예를 들어, 본 발명의 저항전분을 분해하는 α -아밀라아제 활성을 갖는 단백질은 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열 또는 이와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열로 구성되는 단백질일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 단백질도 본 발명의 변이 대상이 되는 단백질의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0025] 즉, 본 발명에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 단백질도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'는, 이와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'에 속할 수 있음은 자명하다.

[0027] 본 발명에서 상기 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속으로부터 유래하는 것일 수 있고, 구체적으로 비피도박테리움 코리넘(*Bifidobacterium choerinum*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 서열일 수 있고, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 서열번호 5의 염기서열을 포함하는 서열일 수 있으며, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열은 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 4 내지 6의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4 내지 6의 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 4 내지 6의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드와 혼용하여 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.

[0031] 구체적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리펩티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 저항전분을 분해하는 α -아밀라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다.

[0032] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 저항전분을 분해하는 α -아밀라아제 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60 °C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60 °C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68 °C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

[0033] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 발명은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수

있다.

- [0034] 구체적으로, 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55 °C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60 °C, 63 °C 또는 65 °C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [0035] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York).
- [0037] 본 발명에서, 용어 '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0038] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.
- [0039] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [0040] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스(또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티(또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.
- [0041] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., 상동)으로 결정될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예에서, *B. choerinum* FMB-1은 고아밀로오스 옥수수 전분 과립을 분해함으로써 생성된 당을 환원시킴으로써 성장함을 확인하였다(도 1), *B. choerinum* FMB-1 접종 후 24 시간까지 *B. choerinum* FMB-1의 로그 단계가 계속되었다. 로그 단계 동안, *B. choerinum* FMB-1에 의해 생성되는 환원당은 6 시간에 23.5 µg/mL의 농도로 생성된 후 24 시간 후에 점진적으로 감소되었다. 반면, *B. choerinum* FMB-1과 동속 균주인 *B. adoliscensis* DSM 20083은 HACs 과립 배지에서 성장하지 않는 것을 확인하였다.
- [0044] 상기 결과로부터, 전분 분해 활성이 있다고 알려진 비피도박테리움 중에서 동속 균주라도 저항전분 분해, 특히

고아밀로오스 옥수수 전분 과립 분해 활성을 나타내지 않는 균주가 존재함을 확인하였으며, 이는 HACS 과립 분해 활성이 *B. choerinum* FMB-1 특이적 효과임을 시사하였다.

- [0045] 또한, *B. choerinum* FMB-1는 필수적으로 저항전분 분해 효소[RS(resistant starch)-degrading enzymes, RSD]를 가질 것으로 예상된 바, 본 발명의 다른 구현예에서 RS 분해 비피도박테리움인 *B. choerinum* FMB-1 및 저항전분을 분해하지 않는 비-RS 분해 비피도박테리움인 *B. adoelscentis* DSM 20083의 계놈에서 아밀로 분해(amyolytic) 효소를 코딩하는 유전자를 비교하였다.
- [0046] 그 결과, 비-RS 분해 비피도박테리움인 *B. adoelscentis* DSM 20083의 계놈에서는 확인되지 않는, 가상 단백질로 지정된 3 개의 예상 RSDs(FMB-RSD1: WP_099720817.1(서열번호 1), FMB-RSD2: WP_099720815.1(서열번호 2), FMB-RSD3: WP_099720816.1(서열번호 3))가 *B. choerinum* FMB-1의 계놈에서 확인되었으며(표 1), 상기 결과는 RS 분해 균주인 *B. choerinum* FMB-1에서만 발견되는 3 개의 예상 RSDs가 RS 과립의 분해를 담당함을 시사하였다.
- [0047] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 3 개의 예상 RSDs가 α -아밀라아제임을 확인하였고, 이들의 HACS 과립 가수 분해 특성을 확인한 결과 FMB-RSD1/2/3는 고아밀로오스 옥수수 전분 과립에 대해 활성을 나타내었다(표 4). 특히, FMB-RSD1/2/3과 동일하게 비-RS 분해 비피도박테리움인 *B. adoelscentis* DSM 20083의 계놈에서는 확인되지 않는, 가상 단백질로 지정된 또 하나의 예상 RSDs(FMB-RSD4)는 가용성 전분에서는 활성을 나타내나 고아밀로오스 옥수수 전분 과립에 대해서는 활성을 나타내지 않았다.
- [0048] 상기 결과로부터, 동종동속 균주 유래 아밀라아제라도 HACS 과립 분해 활성을 나타내지 않는 아밀라아제가 존재함을 확인하였으며, 이는 HACS 과립 분해 활성이 FMB-RSD1/2/3 특이적 효과임을 시사하였다.
- [0050] 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제, 즉, FMB-RSD1/2/3은 pH 4 내지 9 및 30 °C 내지 55 °C 범위의 온도에서 활성을 나타낼 수 있으며, pH 5 내지 6 및 45 °C 내지 50 °C 범위의 온도에서 최적 활성을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 또한, 상기 FMB-RSD1/2/3은 가용성 전분, 아밀로오스, γ -시클로 텍스트린(cyclodextrins, CD), 말토트리오스(maltotriose, G3) 또는 말토펜타오스(maltopentaose, G5)에 상호 작용하여 각각 G1, G2/G2, G3/G1, G2, G3의 반응 생성물을 생성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 본 발명의 다른 하나의 양태는 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 포함하는, 저항전분 분해 활성을 갖는 재조합 미생물을 제공한다.
- [0054] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0056] 본 발명에서, 용어 "저항전분 분해 활성을 갖는 재조합 미생물"은 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기질이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 저항전분 분해 활성을 위하여 유전자가 도입되거나, 유전적 변이가 일어나거나, 특정 단백질의 활성이 강화 또는 약화된 미생물일 수 있다.
- [0057] 상기 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 코딩하는 유전자는 당업계에 알려진 통상적인 방법에 의하여 미생물 내에 도입되어, 미생물 내에서 저항전분을 분해하는 α -아밀라아제가 발현될 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 용어, 단백질이 "발현되도록/되는"은 목적 단백질이 미생물 내에 도입되거나, 미생물 내에서 발현되도록 변형된 상태를 의미한다. 본 발명의 목적상 "목적 단백질"은 전술한 저항전분을 분해하는 α -아밀라아제일 수 있다.
- [0059] 본 발명의 용어 "단백질의 도입"은 특정 단백질 활성이 없는 미생물에 단백질의 활성이 도입되는 것을 의미한다. 이는 특정 단백질 활성이 없는 미생물에서의 단백질의 활성 강화로도 표현할 수 있다.
- [0060] 상기 단백질의 도입은, 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 단백질을 암호화하는 외래 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드를 숙주세포 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한 없이 사용될 수 있다. 또한 도입된 상기 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화하여 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 상기 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하

여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질이 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.

[0061]

상기 도입된 단백질의 활성 강화는,

[0062]

1) 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가,

[0063]

2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형,

[0064]

3) 상기 단백질의 활성이 강화되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 또는

[0065]

4) 이의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0067]

상기 1) 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터에 본원의 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 숙주세포 내에 도입됨으로써 수행될 수 있거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터에 상기 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 숙주세포 내에 도입됨으로써 상기 숙주세포의 염색체 내 상기 폴리뉴클레오티드의 카피수를 증가시키는 방법으로 수행될 수 있다.

[0068]

다음으로, 2) 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현조절 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 가지는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현조절 서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.

[0069]

상기 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 이중 프로모터가 연결될 수 있는데, 상기 강력한 프로모터의 예로는 lysCP1 프로모터(국제 공개특허 제 2009-096689호), sp11 프로모터, sp17 프로모터, sp113 프로모터(대한민국 등록특허 제10-1783170호) EF-Tu 프로모터, groEL 프로모터, CJ7 프로모터(대한민국 등록특허 제10-0620092호 및 국제 공개특허 제 2006-065095호), aceA 혹은 aceB 프로모터 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0070]

아울러, 3) 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.

[0071]

마지막으로, 상기 방법들의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법은, 상기 도입된 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가, 이의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형, 염색체에 삽입된 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 및 상기 단백질의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드의 변형 중 하나 이상의 방법을 함께 적용하여 수행될 수 있다.

[0073]

본 발명의 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 도입할 수 있도록, 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 목적 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 계통과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계통 그 자체에 통합될 수 있다. 일례로 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 폴리뉴클레오티드를 변이된 폴리뉴클레오티드로 교체시킬 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0074]

본 발명의 벡터는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pET, pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

- [0075] 본 발명의 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오타이드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이라면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0076] 또한, 본 발명의 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [0077] 본 발명의 벡터를 형질전환시키는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 본 발명의 목적상, 상기 저항전분 분해 활성을 갖는 재조합 미생물은 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물보다 저항전분 분해능이 향상된 미생물일 수 있다. 상기 '비변형 미생물'은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 천연형 미생물 자체이거나, 야생형 미생물 자체이거나, 또는 저항전분 분해 경로에 관여하는 유전자의 발현량이 조절되기 전의 미생물일 수 있으며, 또는, 내재적으로 존재하지 않는 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가 도입되기 전의 미생물일 수 있다.
- [0081] 본 발명에 있어서, 상기 미생물은 공지된 미생물을 제한 없이 포함할 수 있으며, 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가 도입되어 이로부터 α -아밀라아제를 발현하고, 이에 따라 저항전분 분해 활성을 나타낼 수 있다면 특별히 제한되지 않는다.
- [0083] 본 발명의 또 하나의 양태는 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 포함하는, 저항전분 분해 활성을 갖는 재조합 미생물 또는 이를 배양한 배지 중 어느 하나 이상을 저항전분을 함유하는 시료에 첨가하는 것을 포함하는, 저항전분을 분해하는 방법을 제공한다.
- [0084] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0086] 본 발명에서, 용어 "배양"은 상기 재조합 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 발명의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0087] 본 발명에서 용어, "배지"는 상기 미생물을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 발명의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 발명의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.
- [0088] 본 발명에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있

으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0089] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0090] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기 화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0091] 또한, 상기 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0092] 배지의 온도는 20 °C 내지 45 °C, 구체적으로는 25 °C 내지 40 °C일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 배양 기간은 원하는 균주양이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 10 시간 내지 160 시간, 보다 구체적으로는 6 시간 내지 24 시간일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0094] 본 발명의 일 구현예에서, 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 발현하는 *B. choerinum* FMB-1는 HACS 과립을 단독 탄소원으로 포함하는 배지에서 HACS 과립을 분해함으로써 생성된 당을 환원시켜 성장하였다(도 1). 이에 따라, 서열번호 1 내지 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 α -아밀라아제를 포함하는 재조합 미생물 또는 이를 배양한 배지는 저항전분 분해 활성을 갖는 α -아밀라아제를 발현하거나 또는 상기 재조합 미생물로부터 유래된 저항전분 분해 활성을 갖는 α -아밀라아제를 포함하므로 저항전분 분해 활성을 나타낼 수 있는 바, 상기 재조합 미생물 또는 이를 배양한 배지는 시료 내 저항전분을 분해할 수 있을 것으로 사료된다.

발명의 효과

[0096] 본 발명에 따른 저항전분 분해용 조성물은 저항전분 분해 활성을 갖는 α -아밀라아제를 포함하는 바, 다양한 산업 분야에서 저항전분 분해 용도로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0098] 도 1은 비젤라틴화 고아밀로오스 옥수수 전분 과립으로 비피도 박테리아를 배양하는 동안의 세포 성장 및 환원당 생산량을 나타낸 도이다. 청색 선은 세포 성장; 적색 선은 환원당의 광학 밀도이다.

도 2는 예상 저항전분 분해 효소와 반응 후 HACS 과립의 주사 전자 현미경 이미지이다. a) 효소없이, b) FMB-RSD1, c) FMB-RSD2, d) FMB-RSD3.

도 3은 예상 저항전분 분해 효소에 의해 생성된 환원당을 나타낸 도이다. 검은 색, 밝은 회색 및 어두운 회색은 각각 RSD1, RSD2 및 RSD3이다. 도 3a는 수용성 전분을 반응한 것, 도 3b는 고아밀로오스 옥수수 전분 과립을 반응한 것이다.

도 4는 정제된 예상 저항전분 분해 효소를 확인한 도이다. 도 5는 비피도박테리움 유래 예상 저항전분 분해 효소 [RS(resistant starch)-degrading enzymes, RSD]의 다중 도메인 구조를 나타낸 도이다. RSD : 예상 저항전분 분해 효소; SP : 신호 펩티드; CBM : 탄수화물 결합 도메인; BID : 박테리아 Ig-유사 도메인; SLH, S-층 상동성 도메인. 숫자는 아미노산의 시작 및 중지 위치이다.

도 6은 a) 7 개의 GH 13 특성 보존 영역(CSR)과 b) RSD의 CSR의 진화 나무의 다중 정렬을 나타낸 도이다. RSD: 예상 저항전분 분해 효소. 적색, 녹색 및 청색 역삼각형은 각각 촉매 트라이어드(Asp, Glu 및 Asp), 보존된 히스티딘 잔기 및 불변 잔기인 아르기닌 잔기이다.

도 7은 예상 저항전분 분해 효소에서 a) CBM25 또는 b) CBM26의 다중 정렬을 나타낸 도이다. Bh_{amy}: 바실러스 할로듀란스 C-125로부터의 말토 헥사오스-형성 아밀라제. CBM25 및 CBM26 모듈에서 탄수화물 결합에 중요한 잔기는 황색(적층 상호 작용) 및 적색(수소 결합 형성 잔류물)으로 표시되었다.

도 8은 예상 저항전분 분해 효소에서의 CBM25 및 CBM26의 진화 나무를 나타낸 도이다. . RSD : 예상 저항전분 분해 효소.

도 9는 저항전분 분해 α-아밀라아제의 최적 pH 분석 결과이다. a) FMB-RSD1, b) FMB-RSD2, c) FMB-RSD3.

도 10은 저항전분 분해 α-아밀라아제의 최적 온도 분석 결과이다.

도 11은 저항전분 분해 α-아밀라제의 다양한 α-글루코시드 결합된 기질과의 반응 결과를 나타낸 도이다. a) 효소없는 반응, b) FMB-RSD1과의 반응, c) FMB-RSD2과의 반응, d) FMB-RSD3과의 반응, M : G1 내지 G7 표준, 1 : 가용성 전분, 2 : 아밀로오스, 3 : 풀루란, 4 : α-시클로 텍스트린, 5 : β-시클로 텍스트린, 6 : γ-시클로 텍스트린, 7 : G2-β-시클로 텍스트린, 8 : G3, 9 : G5.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0099] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.
- [0101] **실시예 1. 고아밀로스 옥수수 전분(high amylose corn starch, HACS) 과립에서의 비피도박테리움 코리넘(*Bifidobacterium choerinum*) FMB-1 배양**
- [0102] *B. choerinum* FMB-1은 한국산 소(Hanwoo; *Bos taurus coreanae*)의 반추액에서 분리되었다. 저항전분(resistance starch, RS)인 HACS에서 *B. choerinum* FMB-1가 성장하는지 확인하기 위해, 시드 브로스(seed broth) 2 mL를 멸균된 0.5%의 젤라틴화되지 않은 HACS[70%(w/w) 아밀로스(amylose) 및 30%(w/w) 아밀로펙틴(amylopectin)]의 과립을 포함하는 CM 배지(Chopped meat broth, MBcell, 한국) 20 mL에 접종하였다. 샘플을 천천히 혼합하면서 혐기성 조건에서 37 °C로 배양하고 배양액을 매 6 시간마다 수득하였다. 대조군으로 동종 균주인 *B. adoescentis* DSM 20083를 이용하였다.
- [0103] *B. choerinum* FMB-1 및 *B. adoescentis* DSM 20083의 세포 성장 및 환원당은 각각 광학 밀도 측정법 및 DNS(Dinitrosalicylic acid) 방법을 이용하여 iMark 마이크로 플레이트 리더(BioRad, Hercules, CA, USA)로 600nm 및 550nm에서 측정되었다.
- [0104] 구체적으로, DNS 방법은 50 mM 시트르산 나트륨 완충액(pH 5)에 최종 농도 0.5 %의 가용성 전분을 포함하는 기질 용액을 35 °C에서 5 분 동안 사전 배양한 후, 10 μL의 각 균주 배양액을 90 μL의 기질 용액에 첨가하여 반응을 개시하고 10 분 동안 반응시켜 수행하였다.
- [0105] 그 결과, *B. choerinum* FMB-1은 HACS 과립을 단독 탄소원으로 사용하여 성장하였으나, *B. adoescentis* DSM 20083는 성장하지 않는 것을 확인하였다(도 1). 구체적으로, 접종 후 24 시간까지 *B. choerinum* FMB-1의 로그 단계가 계속되었다. 로그 단계 동안, 환원당은 *B. choerinum* FMB-1에 의해 6 시간에 23.5 μg/mL의 농도로 생성된 후 24 시간 후에 점진적으로 감소되었다.
- [0106] 상기 결과로부터, 전분 분해 활성이 있다고 알려진 비피도박테리움 종에 속하는 균주라도 RS 분해, 특히 HACS 과립 분해 활성을 나타내지 않는 균주가 존재함을 확인하였으며, 이는 HACS 과립 분해 활성이 *B. choerinum* FMB-1 특이적 효과임을 시사하였다.
- [0107] 이러한 결과를 바탕으로 *B. choerinum* FMB-1은 HACS 과립을 분해함으로써 생성된 당을 환원시킴으로써 성장함을 확인하였으며, 이에 따라 *B. choerinum* FMB-1은 필수적으로 저항전분 분해 효소[RS(resistant starch)-degrading enzymes, RSD]를 가질 것으로 예상되었다.
- [0108] 이에, 이하의 실시예에서 저항전분(resistant starch, RS)를 분해하는 RS 분해 비피도박테리움인 *B. choerinum* FMB-1 및 RS를 분해하지 않는 비-RS 분해 비피도박테리움인 *B. adoescentis* DSM 20083의 계능에서 아밀로 분해(amyolytic) 효소를 코딩하는 유전자를 비교하였다.
- [0110] **실시예 2. RS 분해 비피도박테리움 유래 아밀로 분해 효소의 비교 유전자 분석**
- [0111] 비피도박테리움에서 단백질 주석의 분석은 NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline을 사용하였다. 비교

유전자 분석 NCBI-BLAST+ 2.9.0을 사용하여 단백질 대 단백질의 비교 연구를 수행하였으며, 상기 단백질은 GenBank(GCA) 및 RefSeq(GCF)의 데이터베이스를 모두 사용하여 비교되었다.

[0112] 그 결과, *B. choerinum* FMB-1의 게놈에서 α -글루칸 기질에 활성을 나타내는 글리코겐 포스포릴라제(glycogen phosphorylase), 4- α -글루카노트랜스퍼라제(4- α -glucanotransferase), 글리코겐 탈분지효소(glycogen debranching enzyme), α -아밀라제(α -amylase), α -1, 4-글루칸 분지효소(α -1, 4-glucan branching enzyme), 글리코시다제(glycosidase), 풀루라나제(pullulanase), α -1, 4-글루칸-말토오스-1-포스페이트 말토실 트랜스퍼라제(α -1, 4-glucan-maltose-1-phosphate maltosyltransferase) 및 α -글루코시다제(α -glucosidase)와 같은 아밀로 분해 효소를 암호화하는 유전자가 발견되었다.

[0113] 또한, 다른 단백질 주석 엔진(RAST 및 interproscan)을 사용하여 분석한 결과 PGAP(Prokaryotic Genome Annotation Pipeline)에서 가상 단백질로 지정된, 글리코사이드 가수분해 효소 계열 13(glycoside hydrolase family 13, GH 13) α -아밀라아제(α -amylase)의 촉매 도메인을 갖는 여분의 전분 결합 도메인을 포함하는, 4 개의 예상 RSDs(WP_099720817.1, WP_099720815.1, WP_099720816.1 및 WP_099720923.1)가 추가로 확인되었다.

[0114] 최종적으로, RS로부터 방출된 RS 과립 및 당류의 분해에 직접 또는 간접적으로 참여하는 효소로 총 19 개의 효소가 가정되었으며 이는 하기 표 1에서 나타난 단백질 대 단백질 정렬(protein to protein alignment) 결과와 같다.

표 1

[0116]

NO.	<i>B. choerinum</i> FMB-1 Cover/identity (protein_ID)	<i>B. adolscensis</i> DSM 20083 Cover/identity (protein_ID)
1	Glycogen/starch/alpha-glucan phosphorylase (WP_024540347.1)	Glycogen/starch/ α -glucan family phosphorylase 99% / 79.63% (WP_011742583.1)
2	4- α -Glucanotransferase (WP_024540981.1)	4- α -Glucanotransferase 99% / 67.64% (WP_041777242.1)
3	-	Probable glycogen operon protein GlgX (BAF39092.1)
4	-	α -Amylase (WP_050731445.1)
5	1,4- α -Glucan branching protein (WP_099721766.1)	1,4- α -Glucan branching enzyme 98% / 80.57% (WP_011743089.1)
6	Glycogen debranching enzyme GlgX (WP_024541280.1)	Glycogen debranching enzyme GlgX 98% / 83.98% (WP_003809530.1)
7	-	Putative α -amylase/Glycosidase (BAF39488.1)
8	Type I pullulanase (WP_099721362.1)	Type I pullulanase 92% / 60.20% (WP_011743123.1)
9	-	α -Amylase (WP_011743335.1)
10	Hypothetical protein (WP_099720817.1)	-
11	Hypothetical protein (WP_099720815.1)	-
12	Hypothetical protein (WP_099720816.1)	-
13	α -1,4-Glucan-maltose-1-phosphate maltosyltransferase (WP_099720854.1)	α -1,4-Glucan-maltose-1-phosphate maltosyltransferase 94% / 52.61% (WP_011743724.1)
14	Type I pullulanase (WP_099720922.1)	Pullulanase precursor 69% / 59.29% (BAF40340.1)
15	α -Amylase (WP_099720923.1)	-
16	4- α -Glucanotransferase (WP_099721692.1)	4- α -Glucanotransferase 99% / 66.34% (WP_011743858.1)

17	α -Amylase (WP_099720926.1)	α -Amylase 99% / 66.78% (WP_003811282.1)
18	α -Glucosidase (WP_099720933.1)	α -Glucosidase 99% / 74.88% (WP_011743867.1)
19	-	α -Glucosidase (WP_011743891.1)

[0118] 상기 표 1에서 비-RS-분해 균주인 *B. adoelscentis* DSM 20083의 경우, 4 개의 예상 RSDs(WP_099720817.1, WP_099720815.1, WP_099720816.1 및 WP_099720923.1)는 가지고 있지 않았으나, 나머지 10 개 효소는 모두 확인되었다. RS 분해 균주인 *B. choerinum* FMB-1의 경우, *B. adoelscentis* DSM 20083에서 확인되는 5 개의 예상 RSDs(BAF39092.1, WP_050731445.1, BAF39488.1, WP_011743335.1 및 WP_011743891.1)는 가지고 있지 않았으나, 나머지 10개 효소는 모두 확인되었다. *B. adoelscentis* DSM 20083는 비-RS-분해 균주이므로, 상기 5 개의 단백질은 RS 분해와 관련된 효소로 간주되지 않았다.

[0119] 상기 결과는 RS 분해 균주인 *B. choerinum* FMB-1에서만 발견되는 4 개의 예상 RSDs가 RS 과립의 분해를 담당함을 시사하였다. 상기 4개의 예상 RSDs는 각각 FMB-RSD1/2/3/4 또는 F-RSD1/2/3/4(각각 WP_099720817.1, WP_099720815.1, WP_099720816.1 및 WP_099720923.1에 상응)로 명명하였다.

[0120] 한편, 상기 표 1에서 볼 수 있듯이 4 개의 예상 RSDs를 제외한 10 개 효소의 대부분은 92 % 이상의 쿼리 커버(query covers) 및 동일성을 나타내었으며, 이를 통해 이들 효소가 일반적인 비피도박테리움 종에서 기능적으로 유사성을 가짐을 알 수 있다.

[0121] 본 실시예에서 비교 분석에 사용된 전체 계통은 CP018044.1(*B. choerinum* FMB-1), AP009256.1(*B. choerinum* DSM20083)이며, 해당 서열은 NCBI 계통 데이터베이스 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)에서 확인할 수 있다. 상기 표 1에 개시된 19개 효소에 대한 유전자 정보는 하기 표 2와 같으며, 상기 표 1의 커버/아이덴티티(Cover/identity)는 하기 표 2의 유전자와 상동성을 비교하여 표시한 수치이다.

표 2

[0123]

NO.	Gene ID	Protein ID	Start	Stop	Length	Strand	Function
1	BAD_RS00160	WP_011742583.1	38,284	40,740	2,457	+	Glycogen/starch/ α -glucan family phosphorylase
2	BAD_RS01655	WP_041777242.1	406,336	408,498	2,163	+	4- α -Glucanotransferase
3	BAD_0311	BAF39092.1	409,824	411,839	2,016	-	Probable glycogen operon protein GlgX
4	BAD_RS02400	WP_050731445.1	566,152	567,909	1,758	+	α -Amylase
5	BAD_RS03550	WP_011743089.1	832,976	835,231	2,256	-	α -1, 4-Glucan branching enzyme
6	BAD_RS03635	WP_003809530.1	853,178	855,301	2,124	+	Glycogen debranching enzyme GlgX
7	BAD_0707	BAF39488.1	887,201	888,472	1,272	+	Putative α -amylase/Glycosidase
8	BAD_RS03775	WP_011743123.1	889,023	894,302	5,280	+	Type I pullulanase
9	BAD_RS05185	WP_011743335.1	1,208,286	1,210,061	1,776	+	α -Amylase
10	BAD_RS07575	WP_011743724.1	1,810,911	1,813,169	2,259	+	α -1, 4-Glucan-maltose-1-phosphate maltosyltransferase
11	BAD_1559	BAF40340.1	1,969,760	1,971,457	1,698	-	Pullulanase precursor
12	BAD_RS08190	WP_011743858.1	1,971,927	1,974,095	2,169	+	4- α -Glucanotransferase
13	BAD_RS08195	WP_003811282.1	1,974,258	1,976,006	1,749	-	α -Amylase
14	BAD_RS08270	WP_011743867.1	1,992,747	1,994,567	1,821	-	α -Glucosidase
15	BAD_RS08415	WP_011743891.1	2,034,772	2,037,297	2,526	-	α -Glucosidase

[0125] **실시예 3. RS 분해 비피도박테리움 유래 예상 RSDs의 발현 및 정제**

[0126] 실시예 2에서 확인된 4개의 예상 RSDs인 FMB-RSD1/2/3/4(WP_099720817.1, WP_099720815.1, WP_099720816.1 및 WP_099720923.1)을 발현 및 정제하기 위해, *B. choerinum* FMB-1의 게놈 DNA를 제조사의 지시에 따라 QIAamp DNA 미니 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였다. 4 개의 예상 RSDs를 각각 코딩하는 4 개의 유전자를 프라이머 세트를 사용하여 PCR로 증폭시켰다. 여기에서 사용된 프라이머는 하기 표 3과 같다.

표 3

[0128]

Strain	RSD_accession	Primers	
		Forward	Revers
<i>B. choerinum</i> FMB-1	RSD1_WP_099720817.1	gcgagcgcggcgaatg(서열번호 8)	gttcctgtaccgcctcaacaaactcatc(서열번호 9)
	RSD2_WP_099720815.1	ccgctgcgcgacagcta(서열번호 10)	tcggccgcgacgagtttgttg(서열번호 11)
	RSD3_WP_099720816.1	gccgatcatgtgggccc(서열번호 12)	gatgagtttgttgaggcggtacaggaacg(서열번호 13)
	RSD4_WP_099720923.1	atgaccaactcaatgaacacacctg(서열번호 14)	ctgcaggacggcgaagga(서열번호 15)

[0130] PCR은 KOD 폴리머라제(Toyobo, Tokyo, Japan)를 이용하여 하기 조건으로 수행하였다: 95 °C에서 5 분 동안 초기 변성; 95 °C에서 30 초, 60 °C에서 30 초, 72 °C에서 1 분/kb의 25 사이클; 이어서 72 °C에서 7 분 동안 최종 연장 단계. 각각의 증폭된 유전자 단편은 제조사의 지시에 따라 주입 클로닝 키트(infusion cloning kit, Takara)를 사용하여 pET-21a 벡터(Novagen, Darmstadt, Germany)와 융합시켰다. 4 개의 예상 RSDs를 코딩하는 유전자를 각각 포함하는 각 벡터(pET-RSD)는 대장균 DH5 α(*Escherichia coli* DH5 α., Takara, Shiga, Japan)로 형질전환되었고, 이어서 발현을 위해 대장균 BL21 코돈 플러스 (DE3)-RP(*E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RP, Stratagene, La Jolla, CA, USA)로 형질전환되었다.

[0131] 4 개의 pET-RSD를 각각 보유하는 각 대장균 BL21 코돈 플러스 (DE3)-RP를 암피실린(ampicillin) 100 µg/mL 및 클로람페니콜(chloramphenicol) 34 µg/mL이 포함된 LB(Luria-Bertani) 배지(Difco Laboratories Inc., USA) 250 mL로 37 °C에서 배양하였다. 600 nm에서 광학 밀도가 0.5에 도달하면, 0.5 mM IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 세포 배양물에 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 세포를 20 °C에서 18 시간 동안 연속 배양한 후, 성장된 세포를 20 분 동안 4,000 xg에서 원심 분리를 통해 수확하였다. 세포를 20 mL의 용해 완충액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl 및 10 mM 이미다졸(imidazole), pH 7.5)에 재현탁시키고 4 °C에서 초음파 처리기(Sonifier 450, Branson, USA)를 사용하여 파괴시켰다. 파괴된 세포를 12,000 xg에서 20 분 동안 원심 분리를 통해 제거하고, 조효소(crude enzymes)를 Ni-NTA(nickel-nitrilotriacetic acid) 친화성 컬럼(Qiagen, Valencia, CA, USA)에 통과시켰다. 비표적 단백질을 세척 완충액(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl 및 20mM 이미다졸, pH 7.5)으로 세척하고, 제조한 RSD를 용리 완충액(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl 및 250mM 이미다졸, pH 7.5)에서 용리하였다. 정제된 효소를 한외 여과(50,000 MW 컷오프 막; Amicon, USA)를 사용하여 50 mM 아세트산 나트륨(sodium acetate, pH 5)에서 농축시켰다.

[0132] 최종 정제된 단백질을 10 %(w/v) 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔을 이용한 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 통해 분석하였다. 단백질 농도는 비킨코닉산 단백질 분석 키트(bicinchoninic acid protein assay kit, Thermo Fisher Scientific, MA, USA, USA)를 사용하여 측정하였고, 소 혈청 알부민을 표준으로 사용하였다.

[0134] **실시예 4. RS 분해 비피도박테리움 유래 예상 RSDs의 HACS 과립 가수 분해 특성 및 환원당 분석**

[0135] **4-1. HACS 과립 가수 분해 특성 분석**

[0136] FMB-RSD1/2/3/4의 HACS 과립 가수 분해 특성을 확인하기 위해, 실시예 3에서 정제된 FMB-RSD1/2/3/4 각 2 µg 을 50 mM 시트르산 나트륨 완충액(pH 5) 1,000 µL에 용해한 20 mg의 가용성 전분(soluble starch, SS)과 40 °C에서 10 분 동안 또는 20 mg의 HACS 과립과 40 °C에서 24 시간 동안 반응시키고 이들의 활성 정도를 측정하였다. 반응이 완료된 HACS 과립은 추가적으로 그 구조를 주사 전자 현미경(scanning electron microscopy)으로

확인하였다.

[0137] 그 결과, 하기 표 4와 같이, 가용성 전분에서 FMB-RSD1/2/3/4는 각각 2.58/7.32/3.50/0.94 $\mu\text{mole/h} \cdot \text{mg}$ 으로 특정 활성을 각각 나타내었다. HACS 과립에서 FMB-RSD1/2/3는 각각 0.13/0.40/0.18 $\mu\text{mole/h} \cdot \text{mg}$ 으로 특정 활성을 나타낸 반면, FMB-RSD4는 HACS 과립에 대한 활성을 나타내지 않았다. FMB-RSD1/2/3 중에서도 FMB-RSD2는 HACS 과립에서 0.40 $\mu\text{mole/h} \cdot \text{mg}$ 로 가장 높은 활성을 나타냈다.

표 4

Strains	RSDs	Activity levels to starch ($\mu\text{mole/h} \cdot \text{mg}$)	
		Soluble	High amylose corn
<i>B. choerinum</i> FMB-1	RSD 1 (WP_099720817.1)	2.58 $\pm$ 0.28	0.13 $\pm$ 0.03
	RSD 2 (WP_099720815.1)	7.32 $\pm$ 0.44	0.40 $\pm$ 0.12
	RSD 3(WP_099720816.1)	3.50 $\pm$ 0.12	0.18 $\pm$ 0.04
	RSD 4 (WP_099720923.1)	0.94 $\pm$ 0.17	*N.D

[0140] *Not detected

[0142] 또한, 주사 전자 현미경으로 HACS 과립을 관찰한 결과, 포화점까지 반응시켰을 때 각각의 HACS 과립의 구조는 다공성 구조로 바뀌고 특히 FMB-RSD2와 반응한 HACS 과립의 구조는 상당히 파괴됨을 확인하였다(도 2).

[0144] 4-2. 환원당 분석

[0145] 실시예 3에서 정제된 FMB-RSDs 중 HACS 과립에 대한 활성을 나타내지 않는 FMB-RSD4를 제외한 FMB-RSD1/2/3의 활성을 실시예 1의 DNS(Dinitrosalicylic acid) 방법을 사용하여 당의 환원 정도에 따라 측정하였다. FMB-RSDs의 한 단위(unit)는 말토스(maltose) 표준을 사용한 분석 조건 하에서 분당 1 μmol 의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의되었다.

[0146] 그 결과, FMB-RSD1/2/3와 반응한 가용성 전분으로부터 80 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 환원당이 생성되었다(도 3a). FMB-RSD2와 반응한 HACS 과립으로부터는 53 $\mu\text{g/mL}$ 의 환원당이 생성된 반면, FMB-RSD1/3은 각각 29/30 $\mu\text{g/mL}$ 의 환원당을 생성하였다(도 3b). 따라서, FMB-RSD2는 FMB-RSD1/3보다 HACS 과립에 대해 더 강한 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0147] 이들 결과로부터 *B. choerinum* FMB-1에 존재하는 예상 RSDs 중 FMB-RSD1/2/3가 RS 분해 활성이 있으며, 특히 이 중에서 FMB-RSD2로 명명된 효소가 HACS 과립에 대한 가장 강력한 효소이며 HACS 과립에서 말토 올리고당을 생성하는 핵심 효소임을 확인하였다.

[0149] 한편, 실시예 3에서 정제된 FMB-RSD1/2/3의 분자량(MW) 및 등전점(pI)을 ExPASy-ProtParam을 이용하여 이론적으로 산출한 결과, FMB-RSD1/2/3의 성숙 단백질은 각각 142/128/165 kDa의 분자량 및 각각 5.48/5.25/5.32의 이론적 pI 값을 나타내었다. 또한 실시예 3의 SDS-PAGE 분석 결과 이론적 사이즈와 일치하였다(도 4).

[0151] 실시예 5. 비피도박테리움 유래 예상 RSDs의 in silico 분석

[0152] in silico 분석을 위해, *B. choerinum* FMB-1 유래 4개의 예상 RSDs의 보존된 도메인을 NCBI-CD 검색으로 확인하였다. 각 유전자의 신호 펩티드(Sec- 및 Tat- 분비)의 예측은 CBS-SignalP 및 CBS-TatP를 사용하여 수행되었다. 다중 서열 정렬은 EBI-Clustal Omega를 사용하여 수행하였으며, 보존된 영역은 정량 모드(<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>)가 있는 GeneDoc 소프트웨어를 사용하여 시각적으로 수정되었다.

[0153] 그 결과, FMB-RSD1/2/3/4의 전장 코딩 서열(coding sequences, CDS)은 4,203/3,762/4,842/1,608 bp(각각 WP_099720817.1, WP_099720815.1, WP_099720816.1 및 WP_099720923.1)로 구성되어 있으며, CDS의 G+C 함량 값이 각각 61.8/61.6/61.2/65.7 %임을 확인하였다. 또한, FMB-RSD1/2/3/4의 코딩 유전자는 각각 1,400/1,253/1,613/535 개의 아미노산으로 번역될 수 있음을 알 수 있었다.

[0154] 4 개의 예상 RSDs에서 도메인을 분석한 결과, 신호 펩티드, 촉매 도메인, 탄수화물 결합 도메인(carbohydrate

binding domains, CBMs) 및 기타 도메인으로 세포벽 앵커링 도메인(cell wall-anchoring domain)[구체적으로, 박테리아 이뮤노글로불린-유사 도메인(Bacterial immunoglobulin-like domain, BID) 및 추가적인 S-층 상동 도메인(S-layer homology domain, SLH)]으로 추측되는 도메인이 있음이 밝혀졌다(도 5).

[0155] 그러나, FMB-RSD4의 경우 GH 13 α -아밀라아제의 촉매 도메인만을 가졌고, 실시예 4에서 확인된 바와 같이 재조합 FMB-RSD4는 전형적인 α -글루코시다제 활성을 나타낼 뿐 HACS 과립을 분해하지 않으므로(표 4), FMB-RSD4는 더 이상 분석되지 않았다.

[0156] FMB-RSD4를 제외한 3 개의 RSDs(FMB-RSD1/2/3) 모두, 촉매 도메인은 전형적인 α -아밀라아제 슈퍼 패밀리로(β/α) 8 배럴(barrel) 도메인 형태의 A 영역 및 추가 B 및 C 영역을 포함하였다. 7 개의 보존된 영역(conserved region, CR)이 확인되었으며, 일반적으로 α -아밀라아제에 보존되는 촉매의 잔기가 각각 CR II, CR IV 및 CR III(2 개의 아스파르트산 및 1 개의 글루탐산)에 존재하였다(도 6a). 전이 상태의 안정화와 관련된 2 개의 보존된 히스티딘 잔기는 CR I 및 CR IV에 존재하였다. GH 13의 불변 잔기인 아르기닌 잔기는 위치 i(CR II)의 촉매 친핵체(catalytic nucleophile) Asp에 대하여 위치 i-2에서 보존되었다.

[0157] 이러한 결과를 바탕으로 FMB-RSD1/2/3이 GH 13 패밀리에 속하는 α -아밀라아제임이 확인되었다. 구체적으로, FMB-RSD1/2/3은 GH 13 α -아밀라아제의 분류에 따라(Janecek et al. 2014), GH 13_28 서브 패밀리에 속하는 것으로 분류되었다(도 6b).

[0158] 또한, FMB-RSD1/2/3은 모두 하나 이상의 CBM25 및 CBM 26으로 구성되어 있음을 확인하였다(도 5).

[0159] 더하여, 비피도박테리움의 CBM25 및 CBM26은 바실러스 할로듀란스(*Bacillus halodurans*) C-125 유래 말토헥사오스-형성 아밀라제(maltohexaose-forming amylase)에서 과립 전분에 결합하는 CBM25 및 CBM26과 비교한 결과, FMB_RSD1의 CBM26a의 Gln⁷⁰을 제외한 중요한 잔기는 비피도박테리움 CBM25 및 CBM26에 존재하므로(도 7), 이들 CBM은 과립 전분에 결합할 것으로 예상하였다.

[0160] CAZY 데이터베이스에서 특성화된 CBM25 및 CBM26을 포함하는 진화 나무는 패밀리 CBM25와 CBM26이 나뉘어져 있고 동일한 CBM 패밀리의 경우 비피도박테리움 유래 RSD의 CBM이 서로 가깝다는 것을 나타냈다(도 8).

[0161] 한편, FMB_RSD3에서 NCBI-CD 검색에 의해 발견되지 않은 신규한 CBM 패밀리 74가 발견되었다. CBM74는 박테리아에서 널리 발생하고 전분 과립에 대한 결합력에 영향을 미치는 새로운 CBM이다. 따라서, FMB_RSDs에서 발견된 CBM(25, 26 및 74)은 비피도박테리움 중에서 보존된 CBM인 것으로 확인되었다. 전분 과립에 작용하는 α -아밀로 분해 효소는 일반적으로 보조 모듈로서 CBM을 포함하는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과를 통해 FMB-RSD1/2/3가 RS-분해 α -아밀라아제임을 재확인하였다.

[0163] 실시예 6. 비피도박테리움 유래 다른 α -아밀라아제와의 HACS 과립 가수 분해 특성 비교

[0164] FMB-RSD1/2/3의 HACS 과립 가수 분해 특성을 확인하기 위해, *B. choerinum* FMB-1 유래의 아밀라아제 활성을 가지는 다른 단백질(WP_099720923.1 및 WP_099720926.1)에 대해 실시예 4-1과 동일한 방법으로 HACS 과립 가수 분해 특성을 비교 분석하였다.

[0165] 그 결과, 하기 표 5와 같이, 가용성 전분에서 FMB-RSD1/2/3/4를 비롯하여 WP_099720923.1 및 WP_099720926.1는 각각 2.58/7.32/3.50/0.94/0.94/0.84 $\mu\text{mole/h} \cdot \text{mg}$ 으로 특정 활성을 각각 나타내었다. 그러나, HACS 과립에서는 FMB-RSD1/2/3에서 특정 활성이 나타난 반면, FMB-RSD4 및 다른 α -아밀라아제로 명명되었던 WP_099720926.1는 HACS 과립에 대한 활성을 나타내지 않았다.

표 5

Strains	RSDs	Activity levels to starch ($\mu\text{mole/h} \cdot \text{mg}$)	
		Soluble	High amylose corn

<i>B. choerinum</i> FMB-1	RSD 1 (WP_099720817.1)	2.58 ± 0.28	0.13 ± 0.03
	RSD 2 (WP_099720815.1)	7.32 ± 0.44	0.40 ± 0.12
	RSD 3 (WP_099720816.1)	3.50 ± 0.12	0.18 ± 0.04
	RSD 4(WP_099720923.1)	0.94 ± 0.17	* N.D
	WP_099720926.1	0.84 ± 0.13	* N.D

* Not detected

상기 결과로부터, 동종동속 균주 유래 아밀라아제일지라도 HACS 과립 분해 활성을 나타내지 않는 아밀라아제가 존재함을 확인하였으며, 이는 HACS 과립 분해 활성이 FMB-RSD1/2/3 특이적 효과임을 시사하였다.

실시예 7. 비피도박테리움 유래 α -아밀라아제의 최적 반응 조건 분석

7-1. 최적 pH 분석

FMB-RSD1/2/3의 최적 pH를 확인하기 위해, 실시예 3에서 정제된 FMB-RSD1/2/3(0.2 단위) 10 μ L과 50 mM 아세트산 나트륨(pH 4-5), 50 mM 시트르산 나트륨(sodium citrate)(pH 5-6), 50 mM 인산 나트륨(sodium phosphate)(pH 6-8) 또는 50 mM Tris-Cl(pH 7-9) 완충액에 용해된 최종 농도 0.5 %의 가용성 전분, 아밀로펙틴, 풀루란(pullulan), 아밀로스, 최종 농도 1 mM의 시클로 텍스트린(cyclodextrins, CD)인 α -CD, β -CD, γ -CD, G2- β -CD, 최종 농도 1 mM의 말토 텍스트린(maltodextrins)인 말토티리오스(maltotriose, G3) 또는 말토펜타오스(maltopentaose, G5) 90 μ L와 45 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 반응시키고 반응물을 박막 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 통해 분석하여 효소의 활성 패턴을 확인하였다.

TLC를 수행하기 위해, 다양한 기질에 대해 반응시킨 각 반응물을 혼합한 반응 혼합물(1 mL)을 TLC 실리카 겔 60 F254 TLC 플레이트(Merck; Darmstadt, Germany)에 로딩하고 용매 시스템[이소프로판올 : 에틸 아세테이트 : 물 (3 : 1 : 1, v/v/v)]으로 전개시켰다. 이후, 플레이트를 후드에서 건조시키고 메탄올 중 0.3 %(w/v) N-(1-나프틸)-에틸렌디아민(N-(1-naphthyl)-ethylene diamine) 및 5 %(v/v) H₂SO₄에서 빠르게 전개시켰다. 플레이트를 건조시키고 110 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 오븐에 두어 반응 지점을 가시화하였다.

상대적인 활성은 실시예 1의 DNS 방법을 사용하여 방출된 환원당과 비교하였다.

그 결과, FMB-RSD1/2/3의 α -아밀라아제 활성은 pH 5 내지 6의 시트르산 나트륨 완충액에서 가장 우수하였다(도 9).

7-2. 최적 온도 분석

FMB-RSD1/2/3의 최적 온도를 확인하기 위해, 30 $^{\circ}$ C 내지 55 $^{\circ}$ C 범위의 온도에서 50 mM 시트르산 나트륨 완충액(pH 5)을 사용하여 실시예 6-1과 동일한 방법으로 반응시켰다.

상대적인 활성은 실시예 1의 DNS 방법을 사용하여 방출된 환원당과 비교하였다.

그 결과, FMB-RSD1/2/3의 α -아밀라아제 활성은 FMB-RSD1/3의 경우 45 $^{\circ}$ C, FMB-RSD2의 경우 50 $^{\circ}$ C에서 가장 우수하였다(도 10).

7-3. 최적 기질 분석

FMB-RSD1/2/3의 최적 기질을 확인하기 위해, 실시예 7-1과 동일한 방법으로 다양한 기질(가용성 전분, 아밀로스, 풀루란, α -CD, β -CD, γ -CD, G2- β -CD, G3 및 G5)에 대해 상기 도출한 최적의 pH 및 온도에서 FMB-RSD1/2/3 활성 패턴을 확인하였다.

그 결과, 도 11과 같이 FMB-RSD1/2/3은 가용성 전분, 아밀로스, γ -CD, G3 및 G5에 상호 작용하여 각각 G1, G2/G2, G3/G1, G2, G3의 반응 생성물을 생성하였다. 구체적으로, G3는 FMB-RSD2/3에서는 우수한 기질이 아니었으나, FMB-RSD1과 쉽게 반응했다. 또한 γ -CD는 FMB-RSD1/3에 의해 G1, G2 및 G3으로 완전히 가수분해되었으나,

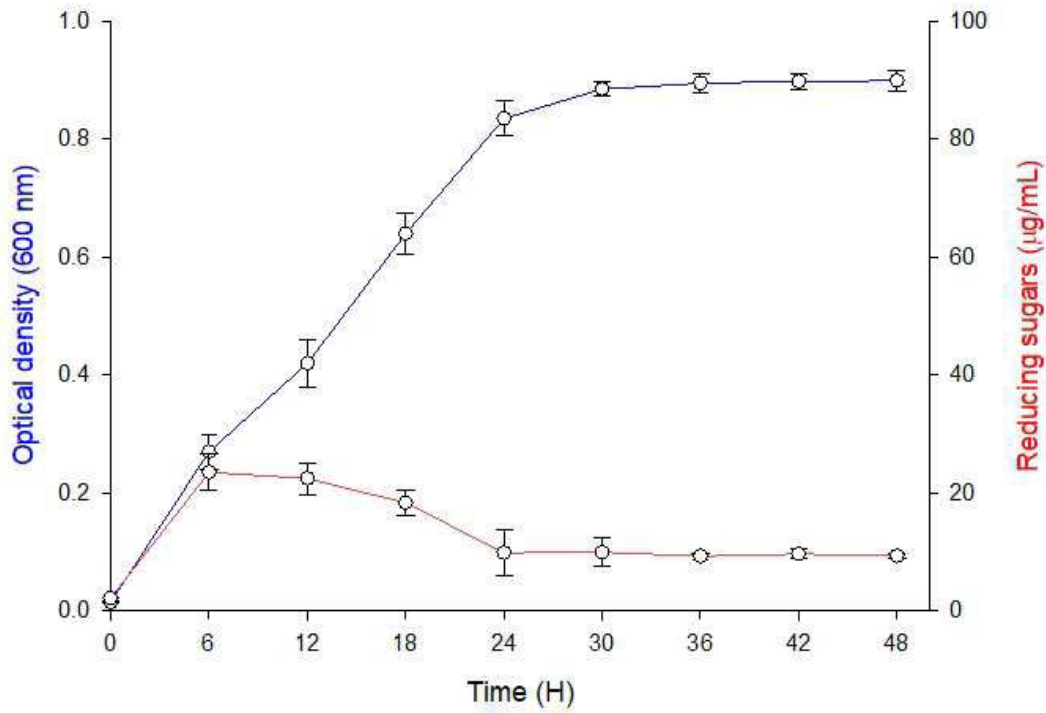
FMB-RSD2에 의해서는 가수분해 되지 않았다.

[0188]

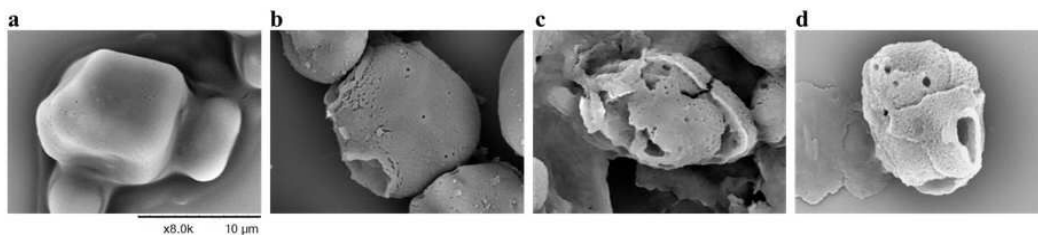
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

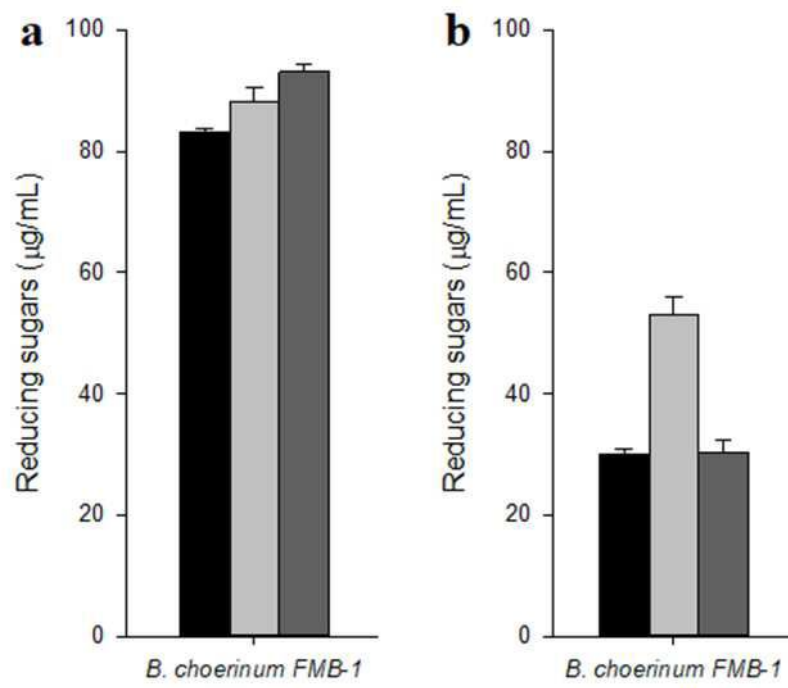
도면1



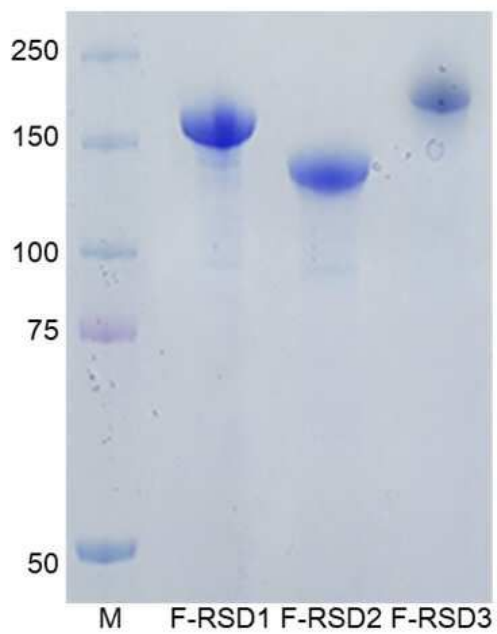
도면2



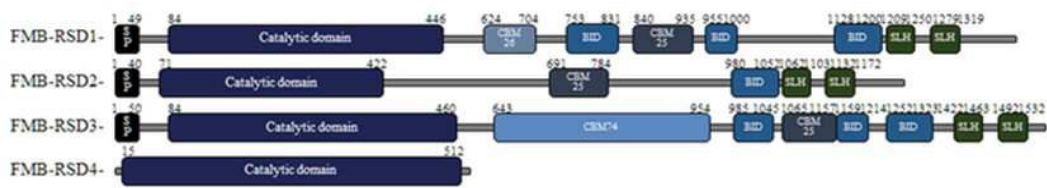
도면3



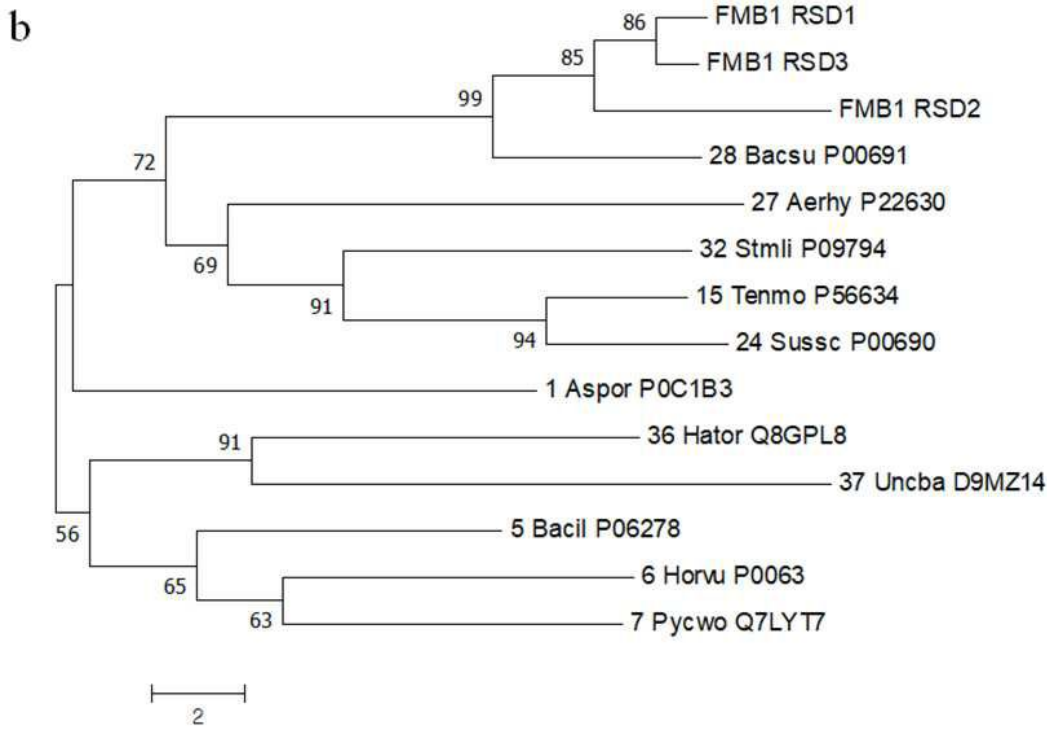
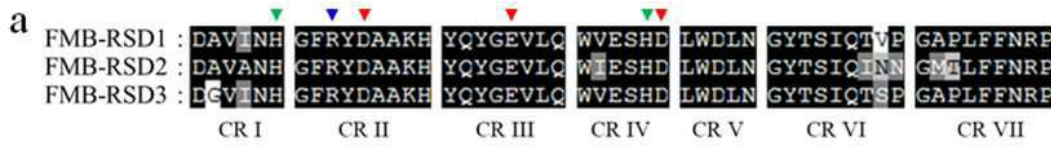
도면4



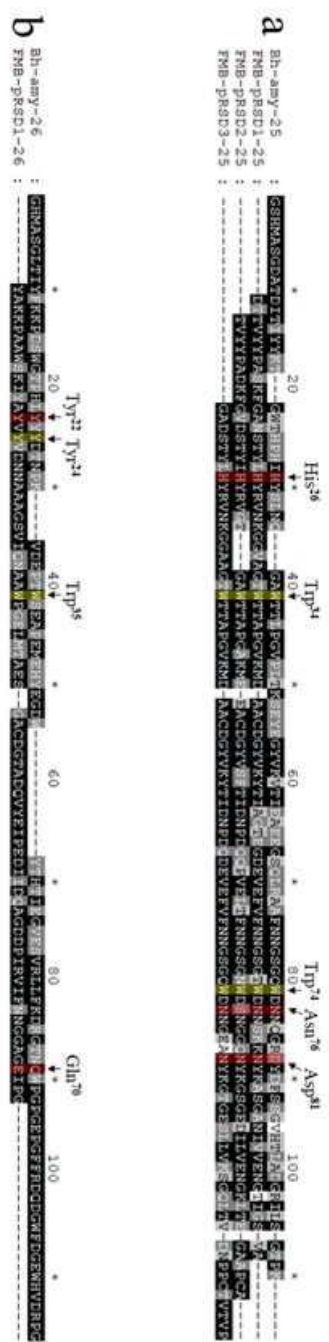
도면5



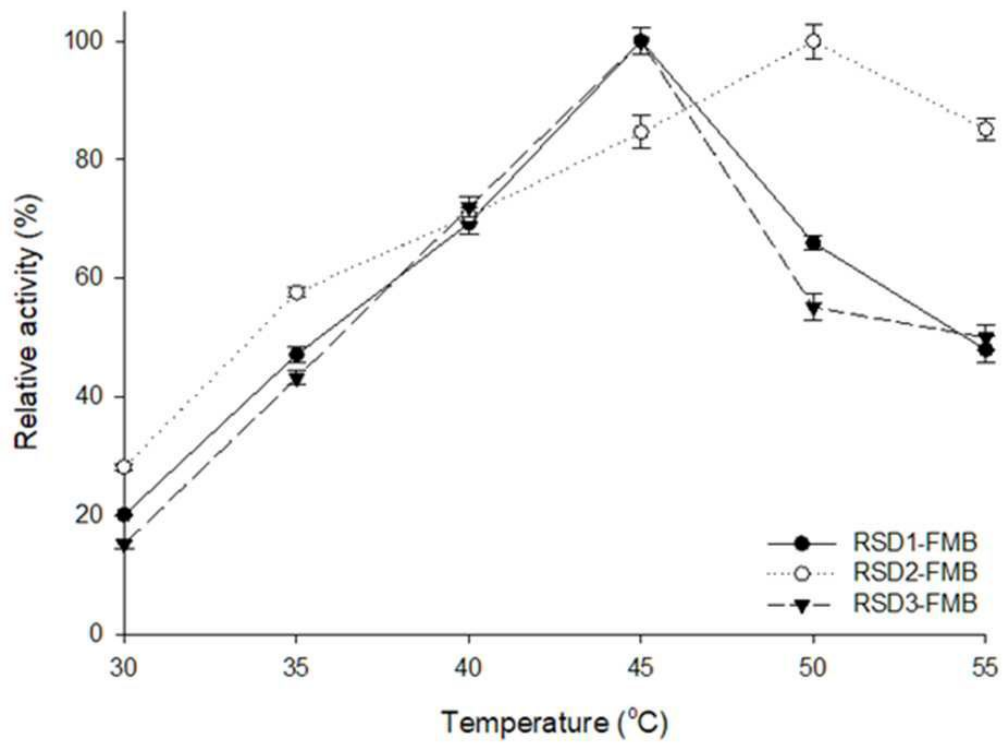
도면6



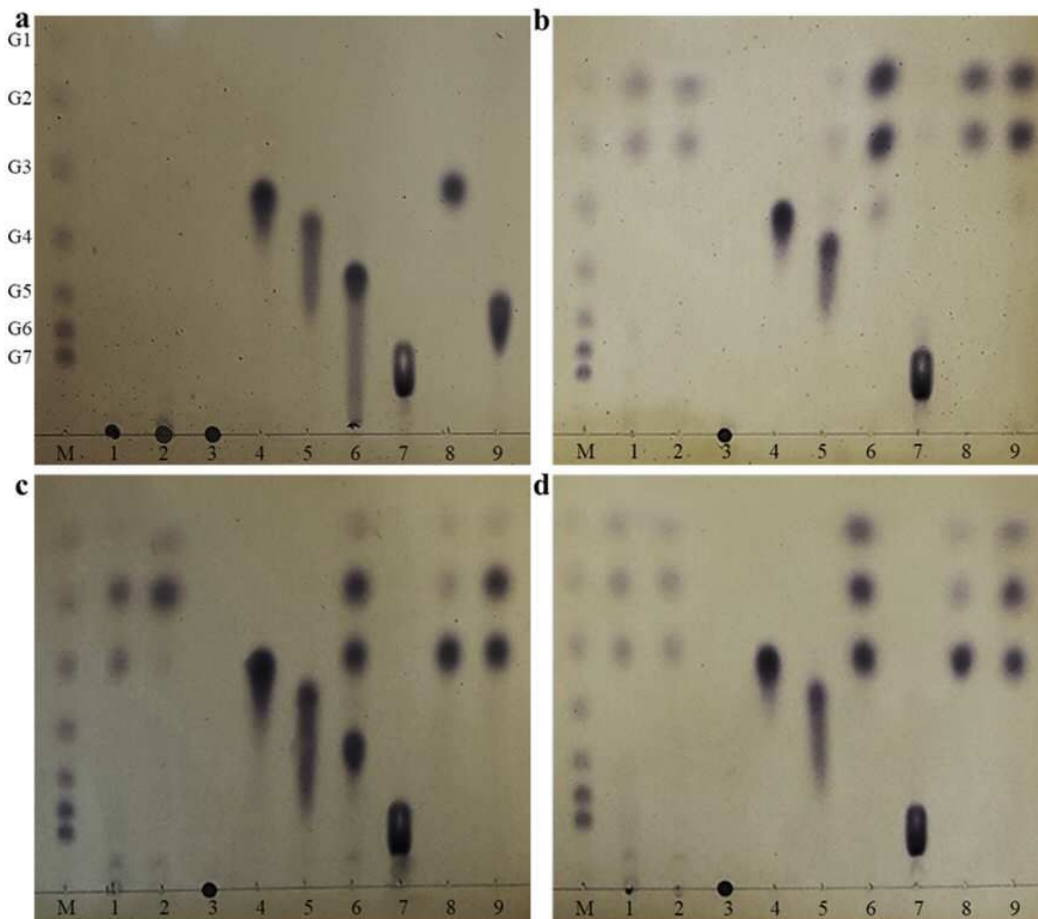
도면7



도면10



도면11



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> Amylases having resistance to starch decomposition activity in
 Bifidobacterium and uses thereof
 <130> KPA200804-KR
 <160> 16
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 1400
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> FBM-RSD1
 <400> 1

Met Ile Pro Leu Ser Glu Thr Glu Gln Gln Leu Gly Lys Ser Lys Arg
 1 5 10 15
 Ser Gly Arg His Gly Phe Val Ala Lys Thr Val Ala Ser Leu Ser Ala
 20 25 30
 Phe Ala Thr Leu Ala Gly Gly Met Ala Leu Gly Met Val Ala Ala Pro
 35 40 45
 Ala Ala Ser Ala Ala Asn Val Pro Thr Thr Ser Tyr Asp Arg Thr Leu
 50 55 60
 Gly Asn Ala Gln Phe Glu Ala Ala Arg Glu Ser Tyr Gly Leu Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Met Asp Tyr Gly Ala Ile Leu His Ala Trp Met Trp Ser Ala Asn
 85 90 95
 Thr Ile Lys Ala His Met Asp Glu Ile Ala Asp Ala Gly Tyr Thr Ser
 100 105 110
 Ile Gln Thr Val Pro Ile Ser Asn Ile Val Gly Pro Asn Arg Gly Gly
 115 120 125
 Val Phe Thr Glu Asn Trp Tyr Tyr Val Tyr Gln Pro Ser Gly Thr Gly
 130 135 140
 Ile Gly Asn Lys Val Ile Gly Thr Glu Gln Glu Ile Lys Asp Met Thr
 145 150 155 160

Ala Glu Ala His Lys His Gly Ile Arg Val Ile Ala Asp Ala Val Ile

165 170 175

Asn His Phe Thr Ala Asp Trp Asn Gly Ile Asn Ser Asp Trp Lys Asn

180 185 190

Ser Ser Leu Phe His Thr Arg Ser Glu Gly Gly Cys Gly Asp Asn Gly

195 200 205

Thr Ala Ile Asn Tyr Ser Asn Arg Trp Gln Val Thr His Cys His Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Met His Asp Tyr Leu Thr Arg Ala Val Ala Asp Gly Ile Asp Gly Phe

245 250 255

Arg Tyr Asp Ala Ala Lys His Ile Glu Leu Pro Asp Glu Phe Gln Thr

260 265 270

His Ser Pro Tyr Tyr Asp Thr Ile Leu Pro Asn Gly Ala Gln Tyr Gln

275 280 285

Tyr Gly Glu Val Leu Gln Gly Asp Pro Gly Leu Asn Ala Pro Ala Tyr

290 295 300

Pro Ala Leu Phe Asp Lys Tyr Ser Thr Asn Gly Gly Gly Asn Thr Ala

305 310 315 320

Ser Asn Tyr Gly Arg Glu Ile Arg Ser Ala Met Gln Asp Lys Asn Ile

325 330 335

Ser Ala Gly Arg Leu Asn Ser Leu Gln Gly Thr Gly Val Arg Asp Asn

340 345 350

Gln Leu Val Thr Trp Val Glu Ser His Asp Thr Tyr Ala Asn Thr Asn

355 360 365

Glu Tyr Ser Ser Gln Leu Ser Ala Trp Gln Ile Arg Met Gly Trp Gly

370 375 380

Ile Val Ala Ser Arg Ala Gly Gly Ala Pro Leu Phe Phe Asn Arg Pro

385 390 395 400

Gln Gly Ser Gly Gly Ser Asn Pro Arg Phe Ala Glu Val Ser Gln Leu

405 410 415
 Gly Asp Ala Gly Asp Asp Glu Trp Lys His Pro Glu Val Lys Trp Val
 420 425 430
 Asn Lys Phe Arg Asn Ala Met Glu Gly Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Asn
 435 440 445
 Cys Asn Gly Asn Asn Asn Cys Leu Met Ile Glu Arg Tyr Lys Thr Asp

 450 455 460
 Gly Asn Asn Asn Asn Asp Gly Met Thr Val Val Asn Met Asp Gly Asp
 465 470 475 480
 Lys Ser Leu Ala Gly Met Asp Thr Thr Leu Asp Asp Gly Glu Tyr Val
 485 490 495
 Asp Gln Val Tyr Gly Gly Lys Leu Thr Val Ser Gly Lys Lys Ile Thr
 500 505 510
 Ser Gly Asn Val Lys Ser Gly Lys Ile His Val Phe Tyr Asn Ala Ser
 515 520 525

 Asn Thr Pro Arg Ala Ser Leu Ala Ala Thr Gly Ala Lys Ser Phe Lys
 530 535 540
 Thr Asp Thr Thr Gln Val Thr Leu Thr Ala Arg Asn Val Asn Asn Ala
 545 550 555 560
 Arg Tyr Ser Thr Ser Glu Gly Asp Ser Gly Ser Phe Thr Asp Gly Gln
 565 570 575
 Lys Ile Thr Ile Gly Ala Lys Ser Ala Val Asn Thr Gln Ile Thr Val
 580 585 590
 Thr Leu Thr Gly Thr Asp Gln Asp Gly Asn Ala Val Lys Ala Glu Glu

 595 600 605
 Thr Phe Thr Lys Lys Asp Pro Asn Ala Val Val Ser Tyr Thr Ala Tyr
 610 615 620
 Ala Lys Lys Pro Ala Ala Trp Ser Lys Ile Tyr Ala Tyr Val Tyr Val
 625 630 635 640
 Asp Asn Asn Ala Ala Ala Gly Ser Val Ile Gln Asn Ala Ala Trp Pro
 645 650 655
 Gly Glu Leu Met Thr Ala Glu Ser Gly Ala Cys Asp Gly Thr Ala Asp

660	665	670
Gln Val Tyr Glu Ile Pro Glu Asp Ile Ile Asp Gln Ala Gly Asp Asp		
675	680	685
Pro Ile Arg Val Ile Phe Asn Asn Gly Gly Ala Gly Glu Ile Pro Gly		
690	695	700
Asn Lys Phe Pro Ala Asp Ser Ala Thr Thr Asp Pro Asp Asp His Val		
705	710	715
720		
Asp Ala Ala Gly Leu Leu Ile Asp Gly Ser Tyr Val Trp Asp Gly Asn		
725	730	735
Ile Thr Gly Gly Thr Trp Glu Glu Ala Ser Cys Leu Ala Val Thr Val		
740	745	750
Asp Ser Val Thr Ile Ser Pro Ala Gly Thr Ile Asp Leu Asp Leu Ala		
755	760	765
Thr Gly Ala Thr Ala Gln Leu Thr Ala Thr Val Ala Pro Ala Ala Ala		
770	775	780
Ser Gly Lys Pro Val Lys Trp Thr Ser Ser Asn Glu Lys Val Ala Ala		
785	790	795
800		
Val Lys Asn Gly Leu Val Gln Gly Leu Ser Lys Gly Thr Ala Thr Ile		
805	810	815
Thr Ala Ser Val Gly Gly Lys Ser Asp Thr Val Thr Val Asn Val Thr		
820	825	830
Gly Glu Ala Pro Val Val His Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Pro Ala Ser		
835	840	845
Lys Phe Gly Ala Asn Ser Thr Tyr Leu His Tyr Arg Val Asn Lys Gly		
850	855	860
Gly Val Ala Gly Thr Trp Thr Thr Ala Pro Gly Val Lys Met Asp Ala		
865	870	875
880		
Ala Cys Asp Gly Tyr Val Lys Tyr Thr Ile Ala Gly Thr Glu Gly Asp		
885	890	895
Glu Val Glu Phe Val Phe Asn Asn Gly Ser Gly Thr Trp Asp Asn Asn		
900	905	910

Ser Lys Lys Asn Tyr Lys Ala Ser Gly Ala Asn Ile Val Val Glu Asn
 915 920 925
 Gly Thr Ile Gly Ser Val Ala Pro Cys Val Thr Val Val Pro Val Thr
 930 935 940
 Ser Val Ser Ile Ser Gly Gly Asp Phe Glu Leu Lys Glu Gly Ala Ser
 945 950 955 960

 Lys Gln Leu Ser Ala Thr Val Ala Pro Ala Asn Ala Thr Asp Arg Ala
 965 970 975
 Val Ser Trp Lys Ser Ser Asn Thr Ser Val Ala Ala Val Asn Ala Ser
 980 985 990
 Gly Asn Val Thr Ala Val Ala Ala Gly Thr Ala Thr Ile Thr Ala Thr
 995 1000 1005
 Ala Gly Gly Lys Ser Ala Thr Val Thr Val Thr Val Thr Pro Glu Val
 1010 1015 1020
 Val Asp Ile Pro Val Gln Ser Val Ala Ile Ser Gly Thr Gly Val Ser

 1025 1030 1035 1040
 Gly Gly Lys Ala Thr Ile Ser Val Gly Ala Gly Leu Asn Leu Asn Ala
 1045 1050 1055
 Val Ile Thr Pro Ser Asn Ala Thr Asp Gln Asn Val Ser Trp Leu Ser
 1060 1065 1070
 Ser Asp Asp Ser Val Ala Thr Val Ser Ser Thr Gly Ala Val Arg Gly
 1075 1080 1085
 Ile Lys Ala Gly Met Ala Val Ile Met Ala Thr Val Gly Gly Lys Ser
 1090 1095 1100

 Ala Ser Val Ile Val Thr Val Gln Asp Ala Gly Pro Thr Leu Gln Ser
 1105 1110 1115 1120
 Ile Gln Ile Thr Gly Ser Gly Val Ser Gly Asn Lys Leu Thr Leu Ala
 1125 1130 1135
 Gln Asn Lys Thr Val Gln Leu Ser Val Lys Ala Thr Pro Ser Asn Ala
 1140 1145 1150
 Gln Ile Gly Ala Val Thr Trp Asp Ser Ser Asp Ser Ser Ile Ala Thr
 1155 1160 1165

Val Asp Gly Asn Gly Lys Val Thr Ala Lys Lys Glu Gly Met Val Val

1170 1175 1180
Ile Thr Ala Thr Ala Gly Gly Lys His Ser Ser Ile Val Leu Thr Val

1185 1190 1195 1200
Ser Lys Gly Ala Ser Thr Asp Arg Phe Ser Asp Val Pro Ala Gly Val

1205 1210 1215
Ala Phe His Asp Glu Ile Glu Trp Leu Ala Ala Gln Gly Ile Thr Asn

1220 1225 1230
Gly Tyr Ser Asp Gly Arg Phe Gly Tyr Gly Asp His Leu Ser Arg Gln

1235 1240 1245

Asp Met Ala Ile Phe Leu Tyr Arg Leu Ala Lys Val His Gly Val Ala

1250 1255 1260
Gly Ala Ala Ser Phe Thr Pro Ser Ala Ala Asp Tyr Gln Arg Phe Ser

1265 1270 1275 1280
Asp Val Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Ala Lys Glu Ile Leu Trp Leu Ala

1285 1290 1295
Arg Asn Gly Ile Ser Gln Gly Ser Asn Gly Arg Phe Lys Gly Asn Asp

1300 1305 1310
Lys Leu Thr Arg Gln Asp Met Ala Val Phe Leu Tyr Arg Tyr Ala Lys

1315 1320 1325
Leu Ala Gly Val Gln Gly Ala Ala Ser Phe Ala Pro Ser Ala Ala Asp

1330 1335 1340
Tyr Arg Arg Phe Ser Asp Val Lys Gln Gly Thr Phe Gly Ala Lys Glu

1345 1350 1355 1360
Ile Leu Trp Cys Ala Lys Val Gly Ile Thr Leu Gly Asn Ala Asn Gly

1365 1370 1375
Thr Phe Gly Tyr Gly Asp Lys Leu Thr Arg Ser Ala Met Ala Ala Phe

1380 1385 1390

Leu Tyr Arg Leu Asn Lys Leu Ile

1395 1400

<210> 2

<211> 1253

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> FBM-RSD2

<400> 2

Met Val Leu Thr Gly Arg Leu Ala Gly Ile Arg Lys Lys Thr Val Ala

1 5 10 15

Gly Leu Val Ala Ala Ala Thr Leu Leu Gly Gly Leu Ser Leu Gly Met

20 25 30

Ala Thr Thr Gln Thr Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Asp Ser Tyr Ala

35 40 45

Gln Thr Val Gly Asn Ala Ser Phe Glu Ala Ala Arg Asn Lys Tyr Gly

50 55 60

Leu Thr Lys Asn Met Arg Asp Gly Ala Thr Leu His Thr Phe Met Trp

65 70 75 80

Ser Phe Glu Thr Ile Lys Glu His Met Glu Glu Ile Ala Gln Ala Gly

85 90 95

Tyr Thr Ser Ile Gln Ile Asn Asn Val Ser Ala Val Lys Asp Asn Ser

100 105 110

Glu Leu Gly Lys Gly Asn Trp Tyr Leu Asn Trp Tyr Tyr Ile Tyr Gln

115 120 125

Pro Ile Asn Thr Thr Ile Gly Asn Tyr Ile Leu Gly Ser Glu Asp Glu

130 135 140

Phe Arg Gln Met Cys Asn Ile Ala His Gln Tyr Gly Val Arg Val Ile

145 150 155 160

Val Asp Ala Val Ala Asn His Phe Thr Ser Asp Trp Asp Val Ile Asp

165 170 175

Pro Ser Trp Gln Asn Glu Asp Tyr Phe His Pro Ala Arg Lys Ile Asn

180 185 190

Asp Tyr Asn Asp Arg Glu Asp Cys Thr Gln Gly Gln Leu Ser Gly Leu

195 200 205

Trp Asp Leu Asn Thr Gln Asn Ser Glu Val Ala Asn Arg Met Ala Glu

210 215 220
 Phe Tyr Lys Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Asp Gly Phe Arg Tyr Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Lys His Ile Glu Leu Thr Asn Glu Val Gly Ser Ser Gln Tyr
 245 250 255
 Trp Asn Thr Ile Leu Pro Asn Gly Ala Gln Tyr Gln Tyr Gly Glu Val

 260 265 270
 Leu Gln Asp Lys Asn Val Arg Glu Ala Asp Tyr Ala Asn Met Phe Gly
 275 280 285
 Ser Ser Ser Val Gly Gly Gly Gly Ile Thr Gly Ser Asn Tyr Gly Gln
 290 295 300
 Glu Met Arg Asn Ser Met Asn Asp Arg Ser Val Ala Ser Arg Phe Phe
 305 310 315 320
 Thr Asp Leu Arg Ser Gly Thr Ser Ala Asp Lys Thr Val Thr Trp Ile
 325 330 335

 Glu Ser His Asp Asn Tyr Cys Asp Arg Gln Ser Glu Lys Tyr Thr Ala
 340 345 350
 Asp Gln Val Arg Ala Ser Trp Ala Val Met Asn Ala Met Gly Gln Gly
 355 360 365
 Met Thr Leu Phe Phe Asn Arg Pro Tyr Ala Ser Gly Gly Gln Gln Glu
 370 375 380
 Trp Phe Ser Glu Lys Ser Lys Ile Gly Asp Val Gly Ala Asp Asp Trp
 385 390 395 400
 Lys His Pro Gly Val Val Ala Ser Asn His Phe Arg Asn Ala Met Val

 405 410 415
 Gly Thr Asp Met Asn Ile Thr Asn Cys Gly Gly Asp Asn Cys Ala Met
 420 425 430
 Val Glu Arg Tyr Lys Ser Asp Gly Asn Pro Ser Asn Asp Gly Val Leu
 435 440 445
 Val Ser Thr Thr Glu Arg Gly Gly Ala Asn Leu Ser Gly Leu Ser Thr
 450 455 460
 Lys Leu Asp Asn Gly Thr Tyr Lys Asp Glu Val Ser Gly Ser Thr Ile

465 470 475 480
 Thr Val Ser Gly Gly Lys Ile Thr Ser Gly Ser Val Glu Ala Asn Thr
 485 490 495
 Val Ala Ala Phe Tyr Asn Ala Lys Val Asp Thr Thr Pro Ile Ser Ser
 500 505 510
 Ala Glu Ala Met Pro Asn Lys Gly Ser Phe Glu Asp Thr Lys Asp Ile
 515 520 525
 Thr Leu Arg Ser Phe Asn Met Ala Asn Val Ser Tyr Ala Thr Ser Glu
 530 535 540
 Gly Ala Ser Gly Ser Phe Lys Asp Gly Asp Ile Ile Thr Ile Gly Ala

 545 550 555 560
 Ala Ser Ala Gly Gly Lys Asp Val Thr Val Thr Val Thr Gly Thr Gly
 565 570 575
 Asn Asn Gly Lys Ser Val Ser His Thr Tyr Thr Tyr His Lys Gly Ala
 580 585 590
 Gln Thr Pro Val Glu Ser Val Thr Ile Ser Gly Asp Gly Val Asn Asn
 595 600 605
 Gly Arg Leu Asn Met Asp Leu Asn Ser Thr Thr Ser Ala Gln Leu Thr
 610 615 620

 Ala Thr Val Thr Pro Ser Asp Ala Thr Val Arg Asn Val Ala Trp Ser
 625 630 635 640
 Ser Ser Asp Pro Ser Val Ala Thr Val Ser Ser Ser Gly Leu Val Arg
 645 650 655
 Gly Lys Lys Ala Gly Thr Thr Thr Ile Thr Ala Thr Ala Gly Gly Val
 660 665 670
 Ser Ala Ser Ile Thr Val Thr Val Thr Gly Glu Ile Val Thr Pro Gln
 675 680 685
 Gly Thr Thr Val Tyr Tyr Pro Ala Asp Lys Phe Gly Val Asp Ser Thr

 690 695 700
 Tyr Ile His Tyr Arg Val Gly Thr Gly Ala Trp Thr Thr Ala Pro Gly
 705 710 715 720

Ala Lys Met Glu Glu Ala Cys Asp Gly Tyr Val Ser Phe Thr Ile Asp
725 730 735

Asn Pro Asp Gln Gln Pro Val Glu Leu Thr Phe Asn Asn Gly Ser Gly
740 745 750

Asn Trp Asp Ser Asn Gly Gly Gln Asn Tyr Lys Gly Ser Gly Glu Asp
755 760 765

Ile Leu Val Glu Asn Gly Lys Leu Thr Glu Gly Ala Ala Pro Cys Ala
770 775 780

Val Ile Pro Val Val Pro Val Thr Ser Val Ala Ile Asn Ser Asn Asp
785 790 795 800

Phe Phe Ser Ile Gln Glu Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ala Ala Thr Val
805 810 815

Leu Pro Ala Asn Ala Thr Asn Pro Thr Val Thr Trp Thr Ser Ser Asp
820 825 830

Thr Ala Val Ala Thr Val Ser Ser Asp Gly Thr Val Arg Gly Val Lys
835 840 845

Ser Gly Ile Ala Lys Ile Thr Ala Thr Ala Asp Gly Lys Ser Ala Ser
850 855 860

Val Thr Val Thr Val Pro Gln Gly Gly Asp Pro Val Val Pro Val Glu
865 870 875 880

Ser Val Ser Val Ser Gly Ile Gly Val Ser Gly Gly Ala Thr Ser Ile
885 890 895

Asn Val Gly Ala Gly Leu Asn Leu Asn Ala Thr Val Leu Pro Ser Asn
900 905 910

Ala Thr Asp His Ala Val Ser Trp Ser Thr Ser Asp Ala Ser Val Ala
915 920 925

Thr Val Ser Ser Thr Gly Ala Val Arg Gly Val Lys Ala Gly Ile Ala
930 935 940

Thr Ile Thr Ala Thr Ala Gly Gly Lys Ser Ala Ser Val Gln Val Thr
945 950 955 960

Ile Lys Asp Asn Gly Ser Val Ile Leu Pro Glu Ser Ile Thr Ile Thr
965 970 975

Gly Asp Gly Ile Ser Gly Ala Glu Leu Ser Leu Val Gln Asn Lys Ser

980 985 990
Val Gln Leu Ser Val Lys Ala Asn Pro Ser Asn Ala Thr Leu Gly Ala
995 1000 1005
Val Ser Trp Ser Ser Ser Asp Thr Ala Val Ala Thr Ile Asp Gly Asn
1010 1015 1020
Gly Lys Leu Thr Ala Lys Ser Glu Gly Ile Thr Ala Val Thr Ala Thr
1025 1030 1035 1040
Ala Ser Gly Lys Ser Ala Ala Leu Leu Val Thr Val Ser Lys Asn Gly
1045 1050 1055

Gly Ser Ser Asp Arg Phe Ser Asp Val Pro Ala Gly Val Ala Phe His
1060 1065 1070
Asp Glu Ile Glu Trp Leu Ala Ala Gln Gly Ile Thr Asn Gly Tyr Ser
1075 1080 1085
Asp Gly Arg Phe Gly Tyr Gly Asp His Leu Ser Arg Gln Asp Met Ala
1090 1095 1100
Ile Phe Leu Tyr Arg Leu Ala Lys Val His Gly Val Ala Gly Ala Ala
1105 1110 1115 1120
Ser Phe Thr Pro Ser Asp Ala Asp Tyr Ala Arg Phe Ser Asp Val Asn

1125 1130 1135
Arg Gly Ser Tyr Gly Ala Lys Glu Ile Leu Trp Leu Ala Lys Asn Gly
1140 1145 1150
Ile Ser Gln Gly Ser Asn Gly Arg Phe Lys Gly Asn Asp Lys Leu Thr
1155 1160 1165
Arg Gln Asp Met Ala Val Phe Leu Tyr Arg Tyr Ala Lys Leu Ala Gly
1170 1175 1180
Val Ala Gly Ala Ala Ser Phe Ala Pro Ser Ala Ala Asp Tyr Arg Arg
1185 1190 1195 1200

Phe Ser Asp Val Lys Gln Gly Thr Phe Gly Ala Lys Glu Ile Leu Trp
1205 1210 1215
Cys Ala Asn Ala Gly Ile Thr Leu Gly Asn Ser Asp Ser Ser Phe Gly

1220 1225 1230
Tyr Gly Ser Lys Leu Thr Arg Ser Ala Met Ala Ala Phe Leu Tyr Arg

1235 1240 1245

Leu Asn Lys Leu Val

1250

<210> 3

<211> 1613

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> FBM-RSD3

<400> 3

Met Thr Pro Leu Ser Glu Lys His Gly Val Gly Pro Val Ser Asp Lys

1 5 10 15

Arg Pro Ser Gly Arg Arg Phe Ala Thr Lys Ala Ile Ala Gly Leu Ala

20 25 30

Ala Ala Ala Thr Leu Val Gly Gly Met Ala Leu Gly Thr Ser Thr Ala

35 40 45

Val Ala Ala Asp His Val Gly Pro Thr Thr Ser Tyr Asp Arg Thr Leu

50 55 60

Gly Asn Ala Thr Phe Glu Ala Ala Arg Lys Gln Tyr Gly Leu Ala Gln

65 70 75 80

Glu Met Ser Tyr Gly Ala Ile Leu His Ala Trp Met Trp Ser Phe Asn

85 90 95

Thr Ile Lys Gln Lys Met Pro Glu Ile Ala Ala Ala Gly Tyr Thr Ser

100 105 110

Ile Gln Thr Ser Pro Ile Ser Glu Ile Lys Gly Pro Val Asn Gly Met

115 120 125

Gln Phe Asp Glu Asn Trp Tyr Tyr Val Tyr Gln Pro Thr Gly Thr Lys

130 135 140

Ile Gly Asn Lys Val Val Gly Thr Glu Asp Glu Leu Lys Ala Met Thr

145 150 155 160

Ala Glu Ala His Lys Tyr Gly Ile Arg Val Ile Val Asp Gly Val Ile

165	170	175	
Asn His Phe Ser Ser Asp Trp Asn Ala Ile Asp Ser Asp Trp Arg Ser			
180	185	190	
Glu Gly Asn Phe His Gln Ala Trp Gly Ile Cys Asp Lys Gln Glu Ser			
195	200	205	
Thr Ser His Asn Gly Asp Arg Ile Asp Tyr Ser Asn Arg Trp Lys Val			
210	215	220	
Thr Gln Cys His Leu Leu Gly Leu Trp Asp Leu Asn Thr Gln Ser Gln			
225	230	235	240
Ser Val Ala Asp Arg Met His Asp Tyr Leu Ala Arg Ala Val Asp Asp			
245	250	255	
Gly Val Asp Gly Phe Arg Tyr Asp Ala Ala Lys His Ile Glu Leu Pro			
260	265	270	
Asp Glu Phe Asp Thr His Ser Pro Tyr Phe Asp Thr Ile Leu Ser Asn			
275	280	285	
Gly Ala Gln Tyr Gln Tyr Gly Glu Val Leu Gln Gly Asp Ser Gly Leu			
290	295	300	
Asn Ala Ala Ala Tyr Pro Ala Leu Phe Asp Lys Tyr Ser Ser Asn Gly			
305	310	315	320
Gly Gly Asn Thr Gly Ser Lys Tyr Gly Gly Ala Val Arg Ala Ala Ile			
325	330	335	
Asn Ser Gly Ser Met Asn Ala Gln Ser Leu Arg Asn Leu Gln Gly Asp			
340	345	350	
Gly Val Arg Asp Asn Gln Leu Val Thr Trp Val Glu Ser His Asp Asn			
355	360	365	
Tyr Ala Asn Lys Glu Val Asp Thr Glu Ile Gly Lys Val Gly Val Ser			
370	375	380	
Thr Arg Ile Ser Ala Asp Lys Ile Arg Lys Gly Trp Ala Ile Ile Ala			
385	390	395	400
Ser Arg Ala Gly Gly Ala Pro Leu Phe Phe Asn Arg Pro Val Gly Ser			
405	410	415	
Gly Gly Thr Asn Asn Asn Gln Phe Ser Glu Arg Thr Thr Leu Gly Met			

420 425 430
 Ala Gly Asp Asp Glu Trp Lys His Pro Glu Val Thr Trp Val Asn Lys
 435 440 445
 Phe Arg Asn Ala Met Glu Gly Ser Pro Glu Asn Met Gln Asn Cys Gln
 450 455 460
 Gly Asp Asn Ser Cys Leu Met Ile Glu Arg Gly Ile Asp Asp Gly Ser
 465 470 475 480
 Pro Asp Asn Asn Gly Val Val Val Val Asn Ser Gly Gly Asp Lys Asp
 485 490 495
 Leu Ser Gly Ile Ser Thr Thr Leu Asp Asp Gly Gln Tyr Lys Asp Gln

 500 505 510
 Val Asn Gly Gly Gln Ile Thr Val Ser Gly Gly Lys Ile Thr Ser Gly
 515 520 525
 Arg Ala Pro Gly Gly Lys Val Ala Val Phe Trp Asn Asn Lys Gly Gly
 530 535 540
 Thr Thr Ile Asp Ala Glu Thr Ile Ser Ala Ala Pro Ile Asn Thr Thr
 545 550 555 560
 Phe Thr Gly Ser Gly Ile Glu Val Thr Val Arg Ala Gln Asn Ala Thr
 565 570 575

 Asn Leu Lys Trp Ser Thr Ser Asp Gly Lys Ser Gly Thr Phe Val Ser
 580 585 590
 Gly Asp Lys Ile Thr Val Gly Ala Asn Ala Glu Val Gly Asp Val Ile
 595 600 605
 Thr Leu Thr Leu Thr Gly Lys Gly Thr Gly Ala Thr Gly Lys Asp Leu
 610 615 620
 Lys Val Glu Tyr Thr Tyr Glu Lys Val Glu Arg Ser Gln Gln Gln Leu
 625 630 635 640
 Ala Lys Tyr Tyr Ser Thr Asn Thr Ala Gly Gln Lys Lys Lys Lys Thr

 645 650 655
 Ile Ser Val Asp Gly Ser Ala Ser Asp Trp Asp Ser Ser Met Leu Ile
 660 665 670

Ala Gln Gly Thr Ala Asn Asp Asp Pro Arg Val Tyr Arg Pro Asn Ser
675 680 685

Met Tyr Glu Met Pro Ile Asp Leu Tyr Ala Leu Tyr Gly Thr Tyr Asp
690 695 700

Asp Asp Asn Leu Tyr Leu Met Trp Glu Met Thr Asn Val Gln Asp Val
705 710 715 720

Val Asp Pro Gly Asp Asn Phe Pro Leu Asn Arg Pro Val His Thr Glu
725 730 735

Lys Gly Pro Ala Ala Trp Ile Ala Leu Asp Thr Gly Arg Ser Asp Asn
740 745 750

Arg Val Gly Lys Asn Ala Asn Leu Gln Thr Gly Gly Thr Ile Trp Asp
755 760 765

Ser Arg Ile Ser Trp Glu Gln Asn Val Asn Asn Val Ile Gly Leu Ala
770 775 780

Leu Lys Lys Gly Glu Asn Gly Pro Trp Met Tyr Gly Gly Asp Glu Thr
785 790 795 800

Gly Leu Asn Ala Asn Ala Ile Tyr Gly Pro Gly Ala Ala Pro Ala Val
805 810 815

Gly Thr Gln Lys Thr Lys Met Gln Tyr Ala Ala Gly Thr Gly Leu Leu
820 825 830

Ser Asn Glu Val Trp Gly Leu Asp Asn Ala Trp Gly Ala Ser Asn Gly
835 840 845

Arg Val Pro Gly Asp Val Lys Asn Asp Asn Gly Asn Trp Val Asn Phe
850 855 860

Lys Ser Lys Gly His Asn Pro Gly Ala Gln Asp Ser Ile Cys Glu Leu
865 870 875 880

Ala Ile Pro Leu Glu Glu Leu Gly Ile Thr Ala Ala Asp Val Glu Lys
885 890 895

Thr Gly Val Gly Val Gln Ile Val Ala Thr Tyr Gly Leu Ser Gly Met
900 905 910

Asp Ser Leu Pro Tyr Asp Leu Ala Ala Asn Asp Asn Ala Asp Leu Pro
915 920 925

Asp Thr Gln Ser Gln Glu Asn Asn Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Asp Asp

930

935

940

Ser Tyr Ser Ala Pro Leu Ala Arg Ile Gly Ala Ala Gly Gly Val Ile

945

950

955

960

Glu Thr Ile Pro Val Glu Ser Val Thr Ile Asn Glu Gly Ser Ser Met

965

970

975

Ser Ile Asp Leu Gly Thr Ser Arg Thr Ala Lys Leu Ser Ala Thr Val

980

985

990

Ala Pro Ser Asn Ala Ser Ser Lys Lys Val Thr Trp Ser Ser Ser Asn

995

1000

1005

Glu Gln Ile Ala Thr Val Asp Ser Lys Gly Asn Val Lys Ala Asn Lys

1010

1015

1020

Ala Gly Thr Val Thr Ile Thr Ala Lys Ala Gly Asp Lys Thr Asp Thr

1025

1030

1035

1040

Ile Thr Ile Thr Val Thr Gly Glu Leu Ile Ile Pro Thr Thr Thr Thr

1045

1050

1055

Val Tyr Tyr Pro Thr Ser Ala Tyr Gly Ala Asp Ser Thr Tyr Leu His

1060

1065

1070

Tyr Arg Val Asn Lys Gly Gly Ala Ala Gly Thr Trp Thr Thr Ala Pro

1075

1080

1085

Gly Val Lys Met Asp Ala Ala Cys Asp Gly Tyr Val Lys Tyr Thr Ile

1090

1095

1100

Asp Asn Pro Asp Gln Asp Glu Val Glu Phe Val Phe Asn Asn Gly Ser

1105

1110

1115

1120

Gly Gln Trp Asp Asn Asn Gly Glu Ala Asn Tyr Lys Gly Thr Gly Glu

1125

1130

1135

Ser Leu Leu Val Lys Ser Gly Gln Leu Thr Val Asp Asn Pro Pro Cys

1140

1145

1150

Thr Val Thr Val Pro Val Thr Ser Val Ser Ile Ser Gly Gly Asp Phe

1155

1160

1165

Glu Leu Thr Thr Gly Ala Thr Arg Lys Leu Thr Ala Ser Val Ala Pro

1170 1175 1180
 Ala Asn Ala Thr Asp Arg Ala Val Ser Trp Lys Ser Ser Asn Thr Ser
 1185 1190 1195 1200
 Val Ala Thr Val Asp Ala Ser Gly Thr Val Lys Ala Val Ser Thr Gly
 1205 1210 1215
 Thr Ala Thr Ile Thr Ala Thr Ala Gly Gly Lys Ser Ala Ser Ile Lys

 1220 1225 1230
 Val Thr Val Ala Ser Asp Tyr Ile Ala Val Asn Ser Val Ala Ile Ser
 1235 1240 1245
 Gly Thr Gly Val Ser Ser Gly Lys Ala Thr Ile Asn Val Gly Ala Gly
 1250 1255 1260
 Leu Asn Leu Asn Ala Thr Val Leu Pro Asn Asn Ala Thr Asp Arg Thr
 1265 1270 1275 1280
 Val Thr Trp Ser Thr Ser Asn Ala Glu Val Ala Thr Val Ser Asn Gly
 1285 1290 1295

 Thr Val Arg Gly Ile Lys Ala Gly Asn Ala Val Ile Thr Ala Thr Ala
 1300 1305 1310
 Gly Asn Lys Ser Ala Ser Ile Ile Val Thr Val Gln Asn Asn Gly Ala
 1315 1320 1325
 Val Leu Gln Ser Ile Ser Ile Ser Gly Ser Gly Val Ser Gly Gly Lys
 1330 1335 1340
 Leu Thr Leu Ala Gln Asn Lys Ser Val Gln Leu Ser Val Lys Ala Asn
 1345 1350 1355 1360
 Pro Ser Asn Ala Thr Val Gly Ala Ala Tyr Trp Ser Ser Ser Asp Thr

 1365 1370 1375
 Ser Val Ala Thr Val Asp Gly Asn Gly Lys Val Thr Ala Lys Lys Glu
 1380 1385 1390
 Gly Val Thr Ala Ile Thr Val Thr Ala Ser Gly Lys Ser Ala Ala Ile
 1395 1400 1405
 Val Leu Thr Val Ser Lys Asn Gly Gly Ser Ser Asp Arg Phe Ser Asp
 1410 1415 1420
 Val Pro Ala Gly Val Ala Phe His Asp Glu Ile Glu Trp Leu Ala Ala

1425 1430 1435 1440

Gln Gly Ile Thr Asn Gly Tyr Ser Asp Gly Arg Phe Gly Tyr Gly Asp

1445 1450 1455

His Leu Ser Arg Gln Asp Met Ala Ile Phe Leu Tyr Arg Leu Ala Lys

1460 1465 1470

Val His Gly Val Ala Gly Ala Ala Ser Phe Thr Pro Ser Asp Ala Asp

1475 1480 1485

Tyr Ala Arg Phe Ser Asp Val Asn Arg Gly Ser Tyr Gly Ala Lys Glu

1490 1495 1500

Ile Leu Trp Leu Ala Lys Asn Gly Ile Ser Gln Gly Ser Asn Gly Arg

1505 1510 1515 1520

Phe Lys Gly Asn Asp Lys Leu Thr Arg Gln Asp Met Ala Val Phe Leu

1525 1530 1535

Tyr Arg Tyr Ala Lys Leu Ala Gly Val Gln Gly Ala Ala Ser Phe Ala

1540 1545 1550

Pro Ser Ala Ala Asp Tyr Arg Arg Phe Ser Asp Val Lys Gln Gly Thr

1555 1560 1565

Phe Gly Ala Lys Glu Ile Leu Trp Cys Ala Lys Val Gly Ile Thr Leu

1570 1575 1580

Gly Asn Ala Asn Gly Thr Phe Gly Tyr Gly Asp Lys Leu Thr Arg Ser

1585 1590 1595 1600

Ala Met Ala Ala Phe Leu Tyr Arg Leu Asn Lys Leu Ile

1605 1610

<210> 4

<211> 4203

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> FBM-RSD1

<400> 4

atgattcctc tgtctgaaac cgagcagcag ctcggaaga gcaagcgttc gggaaggcat 60

gggttcgtcg ccaagacggt tgccagcctc tcggcattcg cgacgcttgc cggcggcatg 120

gcgcttggca tggtcgccgc cccggcggcg agcgcggcga atgtgccgac gaccagctat	180
gatcgacgc ttggcaatgc gcagttcgag gccgctcgcg aatcgtatgg cctgtccaag	240
gaaatggact atggtgcgat tctgcatgca tggatgtggt cggccaacac gatcaaggcg	300
catatggatg agatcgccga cgccggctat acctcgatcc agaccgtgcc gatttccaac	360
atcgtcggtc cgaaccgcgg cggcgtcttc accgagaact ggtactacgt ctaccagcct	420
tccggcaccg gcatcggcaa caagtgatc ggcaccgagc aggaaatcaa ggacatgacc	480
gccgaagcgc acaagcacgg cattcgtgtc atcgccgacg ctgtcatcaa ccacttcacc	540
gcggattgga acggcatcaa ctccgactgg aagaactcca gcctgttcca caccggttcc	600
gaaggcggct gcggggacaa cggcaccgcc atcaactaca gcaaccgctg gcaggtcacg	660
cactgccatc tgctgagcct gtgggatctc aacaccgaga accaagaagt cggcaaccgc	720
atgcacgact atctgacccg cgctgtcgcg gacggcattg atggcttccg ctatgacgcc	780
gcgaagcata tcgagcttcc ggacgagttc cagacgcatt cgccgtatta tgacacgatt	840
ctgccgaatg gcgccagta tcagtacggt gaggtgtctc agggcgatcc cggcctgaac	900
gcaccggcat acccggcgct gttcgataag tattcgacca acggcggcgg caacacggct	960
tcgaactatg gccgtgagat ccgcagcgca atgcaggaca agaacatcag cgccggccgt	1020
ctgaacagcc tgcagggcac cggcgtccgc gacaaccagc tcgtcacctg ggtcgagtcc	1080
catgacacct atgcgaacac caacgaatac tctcgcagc tgtccgcatg gcagatccgc	1140
atgggctggg gcatcgtcgc atcccgtgcc ggcgccgcgc cgctgttctt caaccgtccg	1200
cagggttccg gcggctcga tccgcgtttc gctgaggtct ctcagctcgg tgacgcgggc	1260
gacgacgagt ggaagcatcc cgaggtcaag tgggtcaaca agttccgcaa cgcgatggaa	1320
ggcaacgccg aatactgcg caactgcaac ggcaacaaca actgcctgat gatcgagcgg	1380
tacaagaccg atggcaacaa caacaacgac ggcatgaccg tcgtgaacat ggatggcgac	1440
aagagcctcg ccggcatgga cagcagctc gatgacggcg aatacgtcga tcaggcttac	1500
ggtggcaagc tcaactgtctc cggcaagaag atcacgtccg gcaatgtgaa gagcggaag	1560
atccatgtgt tctataacgc ctggaacacg ccgcgagcct cgctcgccgc gaccggtgcg	1620
aagtccttca agaccgatac gacgcaggtg acgctgaccg cgcgcaatgt caacaacgcg	1680
cgctacagca cctccgaagg cgattccggc tcgttcaccg acggccagaa gatcacgac	1740
ggcgccaagt ccgccgtgaa cacgcagatc accgtcacgc tgaccggcac cgatcaggac	1800
ggcaacgccg tcaaggctga agagaccttc acgaagaagg acccgaacgc ggtcgtctcc	1860

tacacggctt acgcgaagaa gcctgctggca tggagcaaga tctacgccta tgtctatgtg	1920
gacaacaacg ccgcgccggg ttccgtcatc cagaacccg cttggccggg cgaactgatg	1980
accgccgaat ccggcgccgtg tgacggcacc gccgatcagg tctacgagat tccggaggac	2040
atcatcgatc aggcgggtga cgaccgatc cgcgtcatct tcaacaacgg tggcgccggc	2100
gaaatcccgg gcaacaagtt cccggccgac tcggcgacca ccgatccgga cgacatgtg	2160
gacgcgagg gcctgtcat cgacggctcc tacgtctggg atggcaatat cacgggtgtg	2220
acctgggaag aggtctctg cctcgccgtg accgtcgact cggtcacgat cagcccggcc	2280
ggcacgatcg accttgacct cgccaccggt gccaccgccc agctgaccgc cactgtggcc	2340
ccggccgagg cctccggcaa gccggtcaag tggacctgt cgaacgaaa ggtcgccgcc	2400
gtcaagaacg gcctcgtgca gggctctgtc aaggccaccg cgacgatcac cgcctccgtc	2460
ggtggcaagt cggacaccgt gaccgtcaac gttaccggtg aggcgcccgt tgtccatgac	2520
acgaccgtct actatccggc ctggaagttc ggcgcaatt ccacctatct gcactatct	2580
gtgaacaagg gtggtgtggc cggcacatgg acgaccgac cggcggtgaa gatggacgt	2640
gcctgcgacg gctacgtcaa gtacacgatc gcgggcaccg aaggcgacga ggtcgagttc	2700
gtgttcaaca acggctcggg cacttgggac aacaatagca agaagaacta caaggccagc	2760
ggcggaaca tcgtcgttga gaacggcacg attggttcgg tcgctccgtg tgtgacggtc	2820
gttccggtga cgtcgggtg gatttcgggt ggtgacttc agcttaagga aggtgcttcg	2880
aagcagctgt cggcgacggt ggctcctgac aacgcgacgg atcgtgcggt gtcgtggaag	2940
tcgtcgaata cttcggttgc ggcggtgaac gcttcgggca atgtgacggc cgtggctgcc	3000
ggcacggcga cgatcacggc gacggcgggt ggcaagtcgg ctaccgtgac cgtgacggtg	3060
actccggagg tcgtggacat cccggtgcag tcggtcgcga tctcgggcac gggcgtgtcg	3120
ggcggaagg cgacgatcag cgtcggcgcc ggctgaacc tcaacgccgt catcaccccg	3180
tcgaacgcca ctgatcagaa cgtatcgtgg ctctcctccg atgattcggg ggccacggtc	3240
tcctcgaccg gcgccgttcg tggcatcaag gccggcatgg ccgtcatcat ggcaaccgtc	3300
ggcggaagt cggttcctgt catcgtgacg gtgcaggatg caggcccgac gctgcagtcg	3360
attcagatca ccggttcggg tgtttcgggc aacaagctga cgcttgcgca gaacaaaacc	3420
gtgcagctgt cgggtgaaggc gacgccgtcg aacgcgcaga tcggtgccgt gacgtgggat	3480
tcctcggatt cctcgattgc gacggtcgat ggcaacggca aggtcacggc gaagaaggaa	3540
ggcatggtcg tcatcacggc aactgccggc ggcaagcatt cctcgattgt gctaacggtc	3600
tcgaagggtg cgtctactga tcggttctct gatgtgccgg ctggtgtggc gttccatgat	3660
gagattgagt ggctggcggc gcagggtatc acgaatgggt attcggatgg tcgtttcggg	3720

tatggatgac atctgagccg tcaggataatg gcgatcttcc tgtatcgtct ggccaaggtg	3780
catggtgtgg cgggtgccgc gtcgttcacg ccgtcggtcg cggattacca gcggttctct	3840
gatgtgaagc aggggtcgta tgggtccaag gagatcctgt ggctggctcg taatggcatt	3900
tcgcaggggt cgaatggccg gttcaagggt aatgacaagt tgacgcgtca ggataatggcg	3960
gtgttcctgt atcggtatgc gaagcttgcc ggtgtgcagg gtgcggcgtc gtttgcgccg	4020
tcggctgcgg attaccgtcg gttctctgat gtgaagcagg gtacgttttg tgccaaggag	4080
atcctgtggt gcgccaaggt ggggtattacg ctggcaatg cgaatggcac gttcggttat	4140
ggtgacaagc tgacgcgttc tgcgatggcc gcgttcctgt accgcctcaa caaactcatc	4200
tga	4203
<210> 5	
<211> 3762	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> FBM-RSD2	
<400> 5	
atggtattga cgggtcgctc tgcaggcatt cgtaaaaaga ccgtcgccgg actcgtcgcc	60
gcagcaacgc tgctcggcgg attgagcctc ggtatggcaa cgacgcagac cgcttcgcgc	120
gcgccgctgc gcgacagcta tgcgcagacg gtgggcaacg cctcctttga ggccgcgcgc	180
aacaagtacg gtcigacgaa gaacatgagg gacggcgcca cgctgcatac cttcattgtg	240
tcgttcgaga caatcaagga gcatatggag gagatcgccc aagccggcta cacctccatc	300
cagatcaaca acgtgtccgc cgtcaaggac aacagcgagc tcggcaaggg caactggtat	360
ctcaactggt attacatcta ccagccgatc aacacgacga ttggcaacta catcctcggc	420
tccgaggacg agttccggca gatgtgcaac atcgcgcatc agtacggcgt gcgtgtcatc	480
gtcgacgccg tcgcaaacca cttcacctcc gactgggacg tcatcgacce gtcgtggcag	540
aacgaagact acttccacce tgccaggaag atcaatgatt acaacgacgc cgaggactgc	600
acgcagggcc agctttcggg actctgggac ctcaacaccc agaactccga ggtagccaac	660
cgcatggcag agttctacaa gaaggtcgtc gccgacggag ccgacggctt ccgtacgat	720
gccgccaagc acatcgagct caccaacgag gtcggcagtt ccagttattg gaacacgatc	780
ctgccgaacg gcgcccagta ccagtacggc gaggtccttc aggacaagaa cgtgcgtgaa	840
gccgactacg ccaacatgtt cggctcatcc tccgtcggag ggggcggcat caccggctcg	900
aactacggtc aggagatgcg caactcgatg aacgaccgca gcgtcgctc gcgattcttc	960

acggatctgc gcagcggcac ctcccgccgac aagacgggtga catggatcga gtcgcacgac	1020
aactactgcg atcgtcagtc cgaaaagtac acccgccgacc aggtcgccgc ctctgtgggca	1080
gtgatgaacg cgatgggaca gggcatgact ttgttcttca accgtccgta tgcttccggc	1140
ggtaacacgg aatggttctc cgagaagtcg aagatcggcg acgtcgccgc cgatgactgg	1200
aagcatccgg gcgtcgtggc ctcgatcac ttccgcaatg ccatgggtgg cacggacatg	1260
aacatcacca attgcggcgg agacaactgc gcgatggtgg agcgttaca gtcggacggc	1320
aaccctcga acgacggcgt gctcgtctcc acgacggaac gcggcggcgc caacctctcc	1380
ggcctgagca cgaagctaga caacggcacc tataaggacg aggtctccgg ttcgacgac	1440
accgtctccg gtggcaagat tacgtccggc tccgtggaag ccaacaccgt ggccgcgttc	1500
tacaaccca aggtggacac gacgccgatt tcttcggccg aggcgatgcc gaacaagggc	1560
agcttcgagg atacgaagga catcacgtg cgtcgttca atatggcgaa cgtctctac	1620
gcgacctccg aaggcgctc gggctccttc aaggacggtg atatcatcac gatcgccgcg	1680
gcctctgccg gcggcaagga cgtgacggtc acagtaccg gcaccggcaa caacgtaag	1740
tcggtaagcc acacctacac ctatcacaag ggtgcacaga caccggtcga atcggtgacg	1800
atctccggcg acggcgtgaa caacggccgc ctgaacatgg atctgaactc gacgacgagt	1860
gcgcagctca cggcaaccgt tacgccgtcg gacgcgaccg tgcgcaatgt ggcattggagc	1920
tcctccgacc cgtctgtcgc gaccgtatcc tcgagcggtc tcgtgcgtgg caagaaggcg	1980
ggtacgacga cgatcacggc gacggcaggt ggcggttccg cgtcgatcac ggtgacggtg	2040
accggcgaga tcgtgacgcc gcagggcacg accgtctact atccggccga taagtccggc	2100
gtcgactcca cctacatcca ctaccgcgtc ggccaccggcg cgtggacgac cgcgcccggt	2160
gcgaagatgg aggaggcctg cgatggctac gtctccttca cgatcgaaa tcccaccag	2220
cagccggtcg agctgacgtt caacaacggc tcgggcaact gggacagcaa cggcggccag	2280
aattacaagg gcagcggcga ggacatctc gtcgagaacg gcaagctcac cgaaggcgcc	2340
gcgccgtgcg cggatcatcc ggctcgtccg gtgacctcg tcgccatcaa cagcaacgac	2400
ttcttctcga tcaggaagg cgcttcgaag aagcttgcgg cgaccgtgct gccggcgaac	2460
gcgacgaacc cgaccgtgac gtggacgtct tcggacaccg cggtcgcaac cgtctctcgc	2520
gacggcaccg tcccgggcgt taagtccggc atcgcaaga tcacggcgac ggccgacggc	2580
aagtcgcct cggtgaccgt caccgtgcc cagggcggcg atccggtggt tccggttgag	2640
tcggtgtcgg tgtcgggtat tgggtgtcgc ggtggtgcga cgtcgatcaa tgtcgtgct	2700
ggcctgaatc tcaatgcgac ggtgtgccg agcaatgcga cggatcatgc ggtgtcgtgg	2760
agcacatcgg acgcgtcgtt ggcgacggtg tcgtcgacgg gtgcggtgcg tggcgtcaag	2820

gccggtatcg cgacgatcac ggcgacggcc ggcggaagt cggcatcggt tcaggtagcg 2880
atcaaggata acggctctgt catactgccg gagtcgatta cgatcacagg cgacggtatt 2940
tccggtgccg aactgtcgct ggtgcagaac aagtcggtgc agctgtcggt gaaggcgaac 3000

ccgtcgaatg cgacgcttgg cgccgtatca tggtcgtcgt cggataccgc ggtggccacg 3060
attgatggca atggcaagct gacggcgaag tctgaaggca tcaccgccgt caccgccacc 3120
gcaagcggtg agtcggcggc tctgctgggt acggtgtcga agaattggtg ttcgtctgat 3180
cggttctctg atgtgccggc tgggtgtggc ttcctatgat agattgagt gctggcgcg 3240
cagggtatca cgaatgggta ttcggatggt cgtttcggtt atggtgatca tctgagccgt 3300
caggatatgg cgatcttct gtatcgtctg gcgaagggtc atggtgtggc gggtagccgc 3360
tcgttcacgc cgtcggatgc ggattatgcg cggttctctg atgtgaatcg tggttcgtat 3420

ggcgccaagg agatcctgtg gctggcgaag aacggcattt cgcagggttc gaatggccgg 3480
ttcaagggtg atgacaagtt gacgcgtcag gatatggcgg tgttctctga tcggtatgcg 3540
aagcttgccg gtgtggccgg tgcggcgtcg tttgcgccgt cggctgcgga ttaccgtcgg 3600
ttctctgatg tgaagcaggg tacgtttggt gccaaaggaga tctgtggtg cgcgaatgcg 3660
ggtattacgc tgggtaattc ggatagttcg ttcgggtatg gcagcaagct gacgcgttct 3720
gcgatggccg cgttctctga ccgcctcaac aaactcgtct ga 3762

<210> 6
<211> 4842
<212> DNA

<213> Unknown
<220><223> FBM-RSD3
<400> 6

atgacacctc tgctgaaaa gcacggagtc ggccccgtct cggacaagcg tccttcgggt 60
cgcaggttcg cgacgaaggc aatcgccggc ctgcgcggcg cggccacgct tgtcggcggc 120
atggcgttgg gaacctccac ggccgtggcg gccgatcatg tgggcccgcg gacgagctac 180
gaccgcacgc ttggcaacgc gaccttcgag gccgcgcgca agcagtagcg cctcgcccag 240
gagatgagct acggcgcaat cctgcatgca tggatgtggt cgttcaacac gatcaagcag 300
aagatgccgg agatcgccgc cgcgggttac acgtccatcc agacctcgcc gatcagttag 360

atcaaggggc cggtaacagg catgcagttc gatgagaact ggtattacgt ctaccagccg 420
accggcacga agatcggcaa caaggtcgtc ggcaactgagg acgagctcaa ggcatgacc 480
gccgaagcgc acaaatacgg catccgagta atcgtcgacg gcgtcatcaa ccatttcagc 540

tccgattgga acgccattga ttccgattgg cgttcggagg gcaacttcca ccaagcatgg	600
ggcatctgcg acaagcagga aagcaccagc cacaacggcg accgcatcga ttacagcaac	660
cgttggaagg tcacccagtg ccatctgctc ggcttgtggg atctgaacac ccagagccaa	720
agcgttgcgg accgaatgca tgattatctc gcccgcgccg tcgatgatgg tgtggacggc	780
ttccgctacg atcccgcaa gcacatcgag ctcccggatg agttcgatac gcattcgccg	840
tatttcgaca cgatcctgtc gaacggcgcg cagtaccagt acggtgaggt gctgcagggc	900
gattccggcc tgaacgccg gccgtatccg gccctcttcg acaagtattc gagcaatggc	960
ggcggcaaca ccggttcgaa gtacggtggc gccgtacgtg ccgcatcaa ctcggaagc	1020
atgaacgccc agtcgtcgtc caatctgcag ggtgacggcg tgcgtgacaa ccagctcgtc	1080
acctgggtcg aatcgcatga caactatgcg aacaaggaag tcgatacgga aatcgcaaa	1140
gtgggcgtct cgacgcgcat ttccggccgac aagatccgca agggatgggc gatcatcgcg	1200
tcccgcgccc gcggcgccc gctgttcttc aaccgtccgg tcggttccgg cggcacgaac	1260
aataaccagt tctccgagcg tacgacgtt ggcatggctg gcgatgacga gtggaagcat	1320
cccgaggtea cctgggtcaa caagttccgc aatgcgatgg agggctcgcc cgaatacatg	1380
cagaactgcc agggcgacaa ctctgacctg atgatcgagc gcggcatcga tgacggttcg	1440
ccggacaaca acggtgtcgt cgtgttcaac tccggtggag acaaggacct cagcggcatc	1500
tcgacgacgc tcgatgacgg ccagtacaag gatcaggtca acggcgcca gatcacgtc	1560
tccggcggca agatcacgtc cggccgcgt cgggtggca aggtcgcgtt gttctggaac	1620
aacaaggcg gcacgacgat cgatcccag acgatcagcg ccgcgccgat caacacgacc	1680
ttcacgggtt ctggcatcga agtcaccgtg cgcgcgcaga acgcgacgaa cctcaagtgg	1740
tcgacctcgc acggcaagtc cggcaccttc gtctccggcg acaagattac cgtcggcgcc	1800
aatgccgaag tcggcgatgt catcacgtg acgtcacccg gcaaggcac cgggtcgacc	1860
ggcaaggacc tcaaagtcga atacacctat gagaaggtcg aacgcagcca gcagcagtc	1920
gccaagtact attcgacgaa tacggccggc cagaagaaaa agaagacgat ttcggtcgat	1980
ggctccgcca gcgattggga cagctccatg ctcatcgcg aggtaccgc gaatgatgat	2040
ccccgcgtct accgtccgaa ttcgatgtat gagatgcca tcgatctgta tgccctctat	2100
ggcacctatg acgatgacaa tctctatctg atgtgggaga tgaccaacgt ccaggatgtc	2160
gttgatcccc gtgacaactt cccgtcaat cgtccggtcc ataccgaaaa ggacacctgcc	2220
gcgtggattg cgcttgacac cggacgtcc gataaccgcg tcggcaagaa cgccaatctg	2280
cagaccggcg gcacgatctg ggattcgcg atctcatggg agcagaatgt caacaatgtc	2340
atcgggcttg ccttgaagaa gggcgagaat ggtccctgga tgtacggcgg cgatgagacc	2400

ggctctgaacg cgaacgcgat ctatgggtccg ggcgcggctc cggctgtcgg tacgcagaag	2460
accaagatgc agtatgcggc tggaaaccggt ctgctcagca atgaggtctg gggctcttgac	2520
aatgcttggg gcgccagcaa tgggcgtgtg ccgggcgatg tgaagaacga caacggcaac	2580
tgggtcaact tcaagtccaa gggacacaac ccgggcgccc aggattcgat ctgcgagctg	2640
gccattccgc tcgaagagct tggcatcacg gcggccgacg tcgagaagac cggcgtcggc	2700
gtgcagattg tgcacaccta tggcctgtcg ggcatggact cgctgccgta cgacctcgcc	2760
gcgaacgaca acgccgatct cccggatacg cagtcgcagg agaacaactc ctacgagaag	2820
tccgatgacg actcgtactc cgctccgctc gctcgcatcg gcgccgccgg tgggtgtcatc	2880
gaaacgattc ctgtcgaatc ggtgacgatc aacgaaggct cctcgatgtc gatcgacctc	2940
ggcacctcgc gcacggcgaa gctgagcgcg accgtcgccc cgtcgaatgc ctcgagcaag	3000
aaggtcacgt ggagctcgtc caacgagcag atcgcgaccg tcgactcgaa gggcaacgtc	3060
aaggcgaaca aggccggcac tgtgacgatc acggccaaag ccggagacaa gaccgacacg	3120
atcacgatca ccgtgaccgg tgagctcatc attccgacga cgacaaccgt ctactatccg	3180
acgagcgcct acggcgcgga ctccacctac ctgcactacc gtgtgaacaa ggggtgtgctg	3240
gccggcacgt ggacgaccgc gcccggcgtg aagatggacg ctgcctgcga tggctacgtc	3300
aagtacacga tcgacaaccc cgatcaggac gaagtcgagt tcgtgttcaa caacggctcc	3360
ggtcagtggtg acaacaatgg cgaagccaac tacaaggga cggcgagtc gctgctcgtc	3420
aagagcggcc agctcacctg tgacaatcct ccgtgcacgg tgaccgttcc ggtgacttcg	3480
gtgtcgattt cgggtggcga ttctgagctg acaaccggcg cgacgcggaa gctcacggcg	3540
agcgtggctc ctgcgaacgc gacggatcgc gcggtgtcgt ggaagtcgtc gaacacttcg	3600
gtggcgacgg tggacgcgtc gggcacggtg aaagctgtct cgacgggcac cgcgacgatc	3660
acggcgacgg ccggtggcaa gtccgcctcg attaaggtga cggttgcttc cgattacatt	3720
gcggtcaatt cggtcgcaat ctcggtact ggcgtctcga gcgcaaggc gacgatcaac	3780
gttggcgtg gcctcaacct caacgcgacc gtgctgccga acaacgcgac ggaccgcacc	3840
gtcacgtgga gcacgtcgaa cgcgagggtg gccaccgtca gcaacggcac ggtgcgcggc	3900
atcaaggctg gcaacgcggt catcaccgt accgccggca acaagtcgc atcgattatc	3960
gtgacgttc agaacaacgg agcgttctg cagtcgatct caatctcggg cagcggcgtc	4020
tcgggcggca agctcacgt tgcgcagaac aagagcgtcc agctttccgt gaaggcgaac	4080
ccgtcgaacg cgacggtcgg tgcggcctac tggctgtcct ctgacacgtc ggtcgcgacg	4140

gtcgacggca acggcaaggt cacggcgaag aaggaaggcg ttacggcaat caccgtgacg 4200
gcctccggca agtccgccc gattgtgctg acggtgtcga agaattggtg ttcgtctgat 4260
cggttctctg atgtgccggc tgggtgtggcg ttccatgatg agattgagt gctggcggcg 4320
cagggatca cgaatgggta ttcggatggt cgtttcggtt atggatgatca tctgagccgt 4380
caggatatgg cgatcttcct gtatcgtctg gcgaagggtc atgggtgtgc ggggtgcccg 4440
tcgttcacgc cgtcggatgc ggattatgcg cggttctctg atgtgaatcg tggttcgtat 4500
ggcgccaagg agatcctgtg gctggcgaag aacggcattt cgcagggttc gaatggccgg 4560

ttcaagggta atgacaagtt gacgcgtcag gatatggcgg tgttcctgta tcggtatgcg 4620
aagcttgccg gtgtgcaggg tgcggcgtcg tttgcgccgt cggtctcgga ttaccgtcgg 4680
ttctctgatg tgaagcaggg tacgtttggt gccaaaggaga tcctgtggtg cgcgaagggtg 4740
ggtattacgc ttggcaatgc gaatggcacg ttcggttatg gtgacaagct gacgcgttcg 4800
gcgatggccg cgttcctgta ccgcctcaac aaactcatct ga 4842

<210> 7
<211> 1608
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> FBM-RSD4
<400> 7

atgaccaact caatgaacac acctgtttca tggtctgaac aggccgtctt ctacaggtg 60

taccgcgaga gcttcaacga ttcgaacaac gacggcatcg gcgacatccc gggcatcacc 120
gaacgcctcg actatatccg gtcattgggc tgcaacgcct tgttggtcaa cccctgcttc 180
gcctcgccgt tccgcgacgc cggatacgac gtcgccgatt acacgaaggt cgcggagcgc 240
tacggcacca acgatgacct catcgatctg ttcgcccgcg cgcactcccg gggcatgcac 300
gtcctgctcg atcttgtccc ggggcacacg agcgacgaac atccgtggtt catcgccagc 360
agtgaagaac ggcacaacct gtacaccgac cgtatatact ggaccgactc gtggatcacc 420
ggcggcgacg gcctgccgtt catcggcggc gtctatccac gcaacggcgc ggcgatcacg 480

aactttctcg cgttccagcc ggcgtcaac tacggcttcg cgcattccgac gaagccctgg 540
cagcagccgg cgtcggcgga cgcggcgctc gacacctgcg gcgcgatgct cgacgtcatg 600
cgcttctggc tgtcgcggcg agccgacggc ttcgcgctcg acatggccga cagcctcgtc 660
aagaacgacg acaacggcaa gccgtccacg atcgcgacct ggcggtacat gttcaagcag 720
atccgcgagg agttcccga cgcggccttc gtctccgaat ggggccgccc ggacgaggcc 780
ttcgacgccg gcttcgacat ggacttctat ctcgactggc gctgggatgg cgtgccgaac 840

ggctacaaca tgctgctgcg caacaccgac accccgatgc tgcacgacgg cgacaagagc 900

tatttcaacg cggacagtgg cgctggcatc cgcgctttcc tcaacgaata cgagccgcg 960

ctcgagcagg cgcgcaagcg cggcggctac ctcgacctca tcacctgcaa ccatgacacg 1020

gcgcgcgtcg cgcgcgcct gtcgcgcgag gagatccgcc tcgcttatgc gacgatgctg 1080

ctgatgccgg gcgccccgtt catctactac ggcgacgaga tcggcatgcg ctaccgcgac 1140

ctgcccacga aggagggcgg ctatacacgc accggcagcc gcacgccgat gcagtgggac 1200

cgttcggcga acgacggctt ctccggagcg agcgcgcgac cgctctatct gccgattgac 1260

gaatccgacg acgcgccgac cgtcgccgac cagatcaatg ccgacgactc gctgtggacg 1320

gccgtccatg acgtgctcgc attgcgcgcc gactcgccgg ccttcgcgcg cgacgccgac 1380

ttcaccgtgc tgctcgttc cgacgagcgc cgttccttcg tcttcaagcg cacgaaggac 1440

ggcgtcagcg ccgtcgtcgc cgtcaaccgc ggccgtgaga ccgaaacgat cgagctgccg 1500

gtcggcgaag gcagcgagcg gcgcaccgtg aactgtcct atggcgaccc gacgctcgac 1560

tacacgacgc tgacgtccc gccgcagtcc ttcgccgtcc tgcagtag 1608

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSD1_F

<400> 8

gcgagcgcgg cgaatg 16

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSD1_R

<400> 9

gttcctgtac cgcctcaaca aactcatc 28

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSD2_F

<400>	10	
ccgctgcgcg acagcta		17
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	RSD2_R	
<400>	11	
tcggccgcga cgagtttggt g		21
<210>	12	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	RSD3_F	
<400>	12	
gccgatcatg tgggcc		17
<210>	13	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	RSD3_R	
<400>	13	
gatgagtttg ttgaggcgt acaggaacg		29
<210>	14	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	RSD4_F	
<400>	14	
atgaccaact caatgaacac acctg		25
<210>	15	
<211>	18	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSD4_R

<400> 15

ctgcaggacg gcgaagga 18

<210> 16

<211> 1761

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> nucleotide sequence of WP_099720926.1

<400> 16

atgacctca acaacacca tgacactgg tggaaacaag ccgtcgtcta tcaggtctat 60

ccccgcagct tccgcgacgc gaacggcgac ggtctcggcg acatcgccgg cgtcaccgcg 120

cagatgggct atctcaagaa gctcggcgctc gacgccgtct ggctctcgcc gttctaccg 180

tccgaactcg ccgacggcgg atacgactgc atcgactacc gcaacgtcga tccgcgcctc 240

ggcacgctcg acgatttcga tgcgatgctc gaggccgccc atacggccgg actcaaggtg 300

atcgtcgaca tcgtcccgaa ccacacgtcg aacctgcacc cgtggttcca ggccgcctc 360

gccgcgcgc ccggctccgc ggagcgcgac cgtacatct tccgccacgg cgaaggcgag 420

cacggcgagc tgcgccgaa caactggcag tcgtgttcg gcggcccgcc ctgggagccg 480

gtcggcgcg gagaatggta tctccatctg ttcacgaagg agcagccgga cctcaactgg 540

aaggaccagg acgtgcacga cgatttcaag cgcacattgc gcttctggtc ggaccgcggc 600

gtcgacggct tccgcatcga cgtggcgcat ggcttgccga aggatctcga ttcccggccg 660

ctcaaggagc tcgagcgctg gagcgtcgcc ggcgaccagt cgcatgacgg caccatccg 720

ctgtgggacc gtcccaggt gcatgacatc taccgcgagt ggaatgccgt cttcaatgaa 780

tacgaccgc cgcgcttcgc cgtcggcgag gcctggatcg tgccggagca ccagcatctg 840

tacgcgtcga aggacgagct gggtcaggtc ttcaacttcg aattcgcgaa ggccgactgg 900

ttcgccgacg agttccgcac ggcatcgctc gaggggcttg cgagcgccga cgaggcgaag 960

tcgacgacga cgtgggtcat gagcaacat gatgtctgcc gccatgcgag ccgtacggc 1020

ctgccgagg tgcgcacgaa cggctacat gtccctcgca acgactggct gctgcgttcc 1080

ggcaccacct atcccgaaga ttgcgagctc ggcgacgca gggcgcgccg gccgatcctg 1140

atggagctgg gcctgccggg ttccgtctat gtgtatgaag gcgaggagct gggctctgcc 1200

gaggtcgcaa cgattccgtg ggaccatctt gaggatccgg tcgcttcaa caccgacat 1260

ggcgacgcgc agaagggctc gcacggctgc cgcgtgccgc tgccgtgggt cggcccgac 1320

cgctccgcgcc cggccgactg ggatccccgc ttcggcaccg gcgcgtcctt cggcttctcg	1380
tcggcgccgg ccgacggatc cgtccccgcc gacccgcatc tgccgcagcc gctgtggtat	1440
gccgattatg cggccgacgc cgaggacgcc gacgacacgt cgatgctcaa tctctaccgg	1500
cgcgcgctgc attggcgta ggaccatctg acgccgaccg gcgacctgc gctcgcgtgg	1560
ctcggcgacg acgtgctga cccgggcgaa tccgacgtga tcgcctatgc gcgtccggcc	1620
gtcgacggcg accgcttcgc ctgcatctgc aattcggcc cgtcgccggt cgagctgccg	1680
catggcgaca tcgtgctgcg ttcgacggcc ttcgacggct attcgctgcc ggtcgacgcg	1740
gccgtgtgga tgcgcatctg a	1761