



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0010087
(43) 공개일자 2019년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/08 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 8/66 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01) *C12N 9/96* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/0065 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0092335

(22) 출원일자 2017년07월21일

심사청구일자 2017년07월21일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

한성욱

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호 (잠실동, 리센츠아파트)

신상규

경기도 의정부시 동일로 400, 103동 807호 (장암동, 장암우성아파트)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 12 항

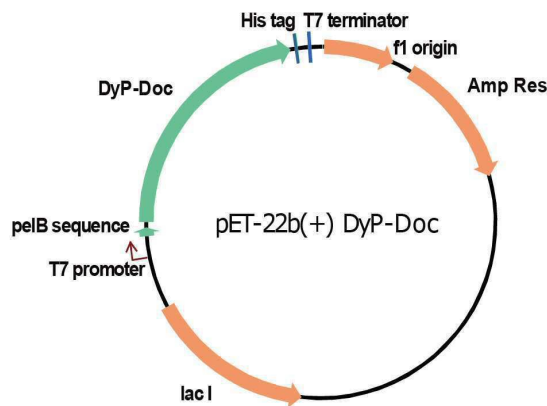
(54) 발명의 명칭 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제의 효소복합체 및 그 미백 용도

(57) 요약

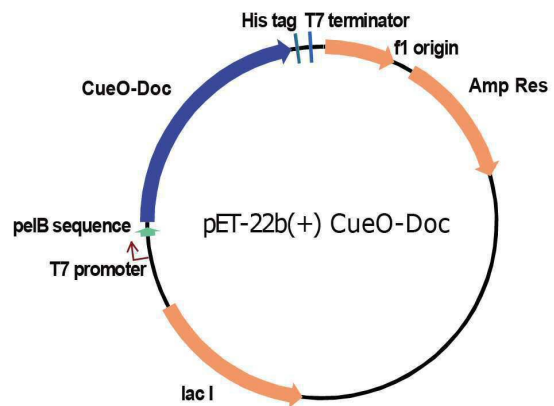
본 발명은 탈염료 퍼옥시다아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메라 탈염료 퍼옥시다아제; 락케이즈와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메라 락케이즈; 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합되어 있는 효소 복합체 및 이를 이용한 멜라닌의 분해방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1

A



B



(52) CPC특허분류

A61K 8/66 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
C12N 9/244 (2013.01)
C12N 9/96 (2013.01)
C12Y 111/01019 (2013.01)
C12Y 302/01006 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016943078

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_핵심연구

연구과제명 친환경 고분자 기질을 이용하는 코리네박테리움의 지방족 및 함황 아미노산 생합성 경로
 연구 및 유용물질 합성

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

탈염료 퍼옥시다아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제; 락케이즈와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 락케이즈; 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합되어 있는 효소 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 탈염료 퍼옥시다아제는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 효소 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 락케이즈는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 효소 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 엔도- β -1,4-글루카나아제-B는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 효소 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 효소 복합체.

청구항 6

탈염료 퍼옥시다아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제를 코딩하는 유전자 및 락케이즈와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 락케이즈를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 재조합 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 탈염료 퍼옥시다아제는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 락케이즈는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 엔도- β -1,4-글루카나아제-B는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 제1항의 효소 복합체의 제조방법:

- (a) 제6항의 재조합 미생물을 배양하여, 키메릭 탈염료 피옥시다아제 및 키메릭 락케이즈를 생성시키는 단계; 및
- (b) 상기 생성된 키메릭 탈염료 피옥시다아제 및 키메릭 락케이즈를 수득한 다음, 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A와 결합시켜 효소 복합체를 제조하는 단계.

청구항 11

제1항의 효소 복합체를 이용하여 멜라닌을 분해하는 방법.

청구항 12

제1항의 효소 복합체를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 락케이즈 및 탈염료 피옥시다아제의 효소복합체 및 이의 미백용도에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 탈염료 피옥시다아제와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 탈염료 피옥시다아제; 락케이즈와 엔도- β -1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 락케이즈; 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합되어있는 효소 복합체 및 이를 이용한 멜라닌의 분해방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 일반적으로 사람의 피부색은 피부 내에 존재하는 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈과 같은 색소에 의하여 좌우되며, 이 중에서 멜라닌 색소의 영향이 가장 크다고 알려져 있다. 멜라닌은 피부에 고루 분포하는 페놀류의 생물고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 이 색소는 피부 표피의 기저층에 존재하는 색소형성세포(melanocyte) 내의 소기관인 멜라노솜(melanosome)에서 합성되며, 색소형성세포의 수지상 돌기를 통하여 주위의 각질형성세포(keratinocyte)로 이동한다. 멜라닌은 멜라닌의 색깔, 용해도, 황(sulfur)의 함유량에 의해 구분되어지며, 크게 갈색-검은색의 유멜라닌(eumelanin)과 노란색-적갈색의 피오멜라닌(pheomelanin)의 두 종류로 구별되어진다(신화장품학, 권경옥외 6인, 동화기술, (1997) 39-41; 피부과학, 조기여외 6인, 성화, (2001) 86-92; Ed. Krol, S. and Liebler, D.C. (1998) Chem. Res. Toxicol., 11: 1434-1440; Ortonne, J-P. (2002) British Journal of Dermatology, 146: 7-10; Ed. Krol, S. and Liebler, D.C. (1998) Chem. Res. Toxicol., 11: 1434-1440; 이충환 및 고영희, (1996) 한국미생물생명공학회, 9: 32-35; Riley, P.A. (1997) Int. J. Biochem. Cell Biol., 29: 1235-1239).
- [0003] 이 중에서 유멜라닌은 흑갈색으로 비교적 큰 타원형 구조로 쉽게 탈색되는 성질을 가지고 있다. 또한, 유멜라닌은 검은 갈색 내지 검은색을 띠며, 유기용매 또는 염기에도 잘 녹지 않고, 황은 1% 미만으로 거의 없고 질소를 6 내지 9% 정도 함유하고 있다(Ed. Krol, S. and Liebler, D.C. (1998) Chem. Res. Toxicol., 11: 1434-1440). 파오멜라닌은 태양빛을 만나면 강력한 발암물질로 변하게 되며, 과다한 멜라닌은 피부의 색소침착을 야기한다.
- [0004] 멜라닌의 생합성은 주로 티로시나제(tyrosinase)의 작용에 의해 이루어지는 것으로 보고되어 있다. 이 경로에서는 피부 표피(epidermes)의 제일 안쪽 기저층(basal layer)에 존재하는 색소형성세포에서 출발 물질인 티로신

(tyrosine)을 산화하여 도파(DOPA)로, 그 이후 단계에 티로시나제의 촉매로 더욱 산화되어 도파퀴논(dopaquinone), 도파크롬(dopachrome)의 과정을 거쳐 멜라닌으로 합성된다. 구체적으로, 도파크롬은 자연적으로 디카르복실이되어 디히록시인돌(5,6-dihydroxyindole; DHI)이 되며 빠르게 산화되어 인돌-5,6-퀴논(indole-5,6-quinone)이 된다. 그러나, 특정한 금속이온과 효소가 있는 경우, 카르복실 중간체인 5,6-디히록시인돌-2-카르복실산(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, DHICA)이 만들어지며 DHICA 옥시다제의 작용을 받아 인돌-5,6-퀴논-2-카르복실산(indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid)으로 산화된 후 유멜라닌이 생성된다. 그러나, 도파크롬이 시스테인이나 글루타치온과 같은 티올화합물을 만나게 되면 시스테인도파(cysteinyl dopa)가 만들어지고 결국에는 페오멜라닌이 만들어진다. 이러한 과정에 관여하는 효소는 티로시나제, TRP-1(tyrosinase-related protein-1), TRP-2(tyrosinase-related protein-2) 등이 알려져 있다.

[0005] 기존의 피부 미백용 조성물은 일반적으로 티로시나제 저해제를 포함하여 멜라닌 생성을 억제하는 기작으로 미백 효과를 나타내었으나, 이러한 조성물들은 멜라닌 생성에 관여하는 효소가 티로시나제 이외에 여러 가지 더 존재하므로 완벽한 억제가 어려우며, 이미 생성된 멜라닌에 의한 흑화는 치유하기 어려운 문제점이 있었다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 멜라닌을 산화시켜 분해하는 피부 미백용 조성물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 멜라닌 탈색효과를 가지는 것으로 알려진 락케이즈와 탈염료 퍼옥시다아제를 미니셀룰로즈의 조합을 통하여 복합체를 형성시키는 경우, 각각의 효소를 단독으로 사용할 때 보다 더 높은 멜라닌 분해 활성을 나타내는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 멜라닌을 효율적으로 분해하는 효과를 가지는 효소복합체를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 효소복합체를 이용하여 멜라닌을 분해하는 방법을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 효소 복합체를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 탈염료 퍼옥시다아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제; 락케이즈와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 락케이즈; 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합되어 있는 효소 복합체를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 탈염료 퍼옥시다아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제를 코딩하는 유전자 및 락케이즈와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 락케이즈를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여, 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제 및 키메릭 락케이즈를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제 및 키메릭 락케이즈를 수득한 다음, 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A와 결합시켜 효소 복합체를 제조하는 단계를 포함하는 상기 효소 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 효소복합체를 이용하여 멜라닌을 분해하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 효소 복합체를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 효소 복합체를 사용하면, 자외선 노출에 의하여 생성되는 피부의 멜라닌을 효율적으로 분해할 수 있으며, 본 발명의 효소 복합체는 식물유래 효소의 복합체이기 때문에 피부에 안전하면서도 경제적이므로, 피부 미백용 화장품 및 의약품 등에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 재조합 탈염료 퍼옥시다아제 유전자가 삽입된 재조합 벡터의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 2는 전기영동을 통한 His-tag 부착 단백질의 정제 및 전기영동을 통한 단백질 발현을 확인한 결과를 나타낸

것이다(A:BL21/cCueO (64 kDa); B:BL21/cDyP (55 kDa); C:BL21/mCbpA (58 kDa)).

도 3은 락케이즈와 탈염료 퍼옥시다아제의 미니셀룰로솜의 셀룰로스 결합 특성을 이용한 효소복합체 결합을 확인한 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제의 멜라닌 분해 결과를 통한 효소 활성 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명에서는 식물유래의 멜라닌 분해활성을 가지는 효소인 락케이즈(Laccase)를 코딩하는 유전자와 바실러스 서브틸리스 속 (*Bacillus subtilis*) 균주로부터 유래한 탈염료 퍼옥시다아제의 유전자를 대장균 (*Escherichia coli*)에 도입하여 발현시키고, 미니셀룰로솜을 통하여 상기 락케이즈(Laccase)와 탈염료 퍼옥시다아제를 효소복합체 형태로 제조하였으며, 상기 효소 복합체는 락케이즈와 탈염료 퍼옥시다아제를 각각 단독으로 사용하였을 때보다, 현저히 높은 멜라닌 분해활성을 가진다는 것을 확인하였다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 탈염료 퍼옥시다아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제; 락케이즈와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 락케이즈; 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합되어 있는 효소 복합체에 관한 것이다.
- [0019] 락케이즈 (Laccase)는 주로 특정 나무나 곰팡이에서 발견되는 효소로서, 주로 리그닌과 같은 페놀계 화합물을 산화작용을 통해 분해하고, 이 과정에서 용존산소를 과산화수소로 전환하게 된다.
- [0020] 락케이즈는 폴리페놀옥시다제(polyphenol oxidases)의 한 종류로 산소분자에 의하여 페놀 화합물(phenolic compounds)의 산화를 촉매하는 산화환원효소(oxidoreductase)이고, 분자량은 대략 70~90 kDa이다(Johannes, C. (2000) Applied and Environmental Microbiology, 66: 524-528). 락케이즈는 산소가 물로 변환되면서 나오는 전자에 의해 방향족 화합물을 산화시키며, 방향족 화합물의 산화를 촉진시키는 능력으로 산업적인 효소로 주목을 받고 있다. 락케이즈의 산업상 용도는 펄프의 리그닌분해(pulp delignification), 목질 섬유의 변형(wood fiber modification), 염료 또는 얼룩의 표백(dye or stain bleaching), 화합물 또는 약의 합성, 오염된 물이나 토양의 자정 등이 알려져 있다(Majcherczyk, A. (1999) Appl. Microbiol. Biotechnol., 51:267-276).
- [0021] 락케이즈(0.5 내지 0.8 V)는 자신의 E0보다 더 높은 E0를 가지고 있는 기질을 산화시킬 수 있는데, 산화-환원 전위(redox potential)가 매우 낮고 분자량(70 내지 90 KDa)이 크기 때문에 기질로 단지 페놀류 단편(phenolic fragments)만 산화시킬 수 있다. 비페놀류(non-phenolic) 부분도 산화하기 위해서는 중간에서 작은 분자량인 물질이 매개체 역할을 해야 하는데, 락케이즈의 산화력을 촉진시키는 전자전달체가 이러한 역할을 한다. 전자전달체라는 중간 매개체에 의해서, 많은 무기/유기 화합물을 산화시키는 것이 가능하다(Bourbonnais, R. et al. (1998) Biochimica et Biophysica Acta, 1379: 381-390; Kawai, S. (2002) Enzyme and Microbial Technology, 30: 482-489; Li, K. (1999) Applied and Environmental Microbiology, 65: 2654-2660; Johannes, C. (2000) Applied and Environmental Microbiology, 66: 524-528; Majcherczyk, A. (1999) Appl. Microbiol. Biotechnol., 51: 267-276).
- [0022] 또한, 탈염료 퍼옥시다아제 (Dye-decolorizing Peroxidase)는 나무나 곰팡이에서 발견되는 페놀화합물 분해효소로서, 과산화수소를 이용하여 물로 전환하며, 이 과정에서 산화분해 작용을 나타나게 된다.
- [0023] 락케이즈를 통한 과산화수소 발생 및 탈염료 퍼옥시다아제의 서로 상호보완적인 관계에 있는 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제의 미니셀룰로솜의 조합을 통해 각각 사용할 때 보다 더 높은 멜라닌 분해 활성을 나타낸다.
- [0024] 본 발명에서는 생물학적으로 멜라닌을 분해하는 효소복합체 기술을 개발함으로써, 환경 및 경제적으로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 예상되며, 기존 화학제품 및 락케이즈나 탈염료 퍼옥시다아제를 단독 사용하였을 때 필수적인 산화제의 첨가 없이, 두 효소의 상호관계만을 통해 산화에 필요한 전자의 순환을 완성하였다. 를 미니셀룰로솜과 같은 골격단백질을 통해 하나로 묶어 각각의 역할에 필요한 기질순환을 완성하고 더 효율적인 멜라닌 분해를 완성하였다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 락케이즈는 클로스트리디움 (*Clostridium*) 유래, 곰팡이 유래, 바실러스 속 유래의 것을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 탈염료 퍼옥시다아제는 바실러스 속 유래, 슈도모나스 속 유래, 자이모모나스 모빌리스 유래의 것을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 탈염료 퍼옥시다아제는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수

있고, 상기 락케이즈는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 엔도-β-1,4-글루카나아제-B는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 코히즌 모듈은 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA), *Clostridium thermocellum* 유래 소형 골격 단백질 (mCipA), *Clostridium cellulolyticum* 유래의 소형 골격 단백질 (mCipC) 것을 사용할 수 있으며, 상기 아가레이즈는 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 유래, 사카로파거스 (*Saccharophagus*) 유래, 알토로모나스 (*Aleromonas*), 유래의 것을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 다른 관점에서, 본 발명은 탈염료 퍼옥시다아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제를 코딩하는 유전자 및 락케이즈와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 락케이즈를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [0031] 또 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여, 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제 및 키메릭 락케이즈를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제 및 키메릭 락케이즈를 수득한 다음, 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A와 결합시켜 효소 복합체를 제조하는 단계를 포함하는 효소 복합체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명의 일 양태에서는, 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제의 효소를 함께 처리한 경우, 락케이즈와 탈염료 퍼옥시다아제를 각각 단일 효소로 처리한 경우보다 멜라닌 분해 효율이 다소 높게 측정되었으며, 본 발명의 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제 복합체를 처리한 경우, 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제의 효소를 함께 처리하였을 때보다, 멜라닌 분해 효율이 1.9배 더 증가되는 것을 확인하였다(도 4).
- [0033] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 탈염료 퍼옥시다아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제; 락케이즈와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 락케이즈; 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합되어 있는 효소 복합체를 이용하여 멜라닌을 분해하는 방법에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명의 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제 복합체는 멜라닌의 우수한 멜라닌 분해효율에 의하여, 피부에 이미 생성되어 침착된 멜라닌을 분해하여, 피부 미백을 위한 화장료나 의약품조성물로에 사용될 수 있다.
- [0035] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 탈염료 퍼옥시다아제와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 탈염료 퍼옥시다아제; 락케이즈와 엔도-β-1,4-글루카나아제-B의 도커린 모듈이 융합된 키메릭 락케이즈; 및 소형 셀룰로즈-결합 단백질 A가 결합되어 있는 효소 복합체를 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명에서 "벡터(Vector)"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [0037] 일반적으로 플라스미드 벡터는 염색체 외의 환형 이중가닥 DNA이고, 세포 내에 존재하며 다양한 기능을 한다. 항생물질에 내성을 가진 물질 및 박테리옌(Bacteriocin)을 생산하여 유사한 균주나 종들을 죽이는 저해 물질로 작용하고, 색소 생성, 화합물 분해, 질소 고정과 같은 생리학적 기능을 수행한다. 최고 약 10kb되는 길이의 외래 DNA 절편을 삽입하기 위해서 제한효소 부위를 가지고 있다.
- [0038] 벡터로 사용되는 플라스미드와 박테리옌의 중대한 단점인 상대적으로 작은 DNA 절편만 삽입할 수 있는 것은 플라스미드와 파지 DNA의 조작된 혼성체인 코스미드(Cosmid)를 사용하여 더 큰 DNA 절편을 클로닝 할 수 있다.
- [0039] 파지 입자 안으로 포장되어 들어가는 코스(cos) 부위가 있고, 세균 숙주에서 복제하는 플라스미드의 복제 시작점과 플라스미드를 선별할 수 있는 유전자를 가지고 있다. 박테리옌 벡터 같이 시험관 내에서 단백질 외피로 포장되지만, 포장된 DNA가 대장균 숙주세포를 감염한 후에, 그 DNA는 박테리옌 DNA보다는 플라스미드 형태로 복제하고, 용균되지 않는다. 크기는 2.5kb, 숙주세포를 감염하여 포장된 후에 cos 부위가 37kb에서 52kb까지 분리되면, 외래 DNA를 삽입체로 수용한다. 일반적으로 35kb에서 45kb가 코스미드 벡터(Cosmid vector)로 클로닝 될 수 있다.
- [0040] 또한 박테리옌의 벡터의 일반적인 형태인 파지의 경우는 염기쌍을 이룰 수 있는 12개 뉴클레오티드의 단일

가닥의 상보적인 말단으로 된 점착성 말단(cohesive termini) 혹은 cos를 가지는 50kb의 이중가닥으로 된 야생형 게놈에서 비롯된 것으로 용균성 경로에서 숙주세포는 새로운 바이러스가 복제되고, 자손 바이러스가 방출된 후에 용균된다. 이 형태의 DNA는 전체 52kb 크기에 3kb를 더하거나 그 게놈의 5% 만도 수용할 수 있으며, 외래 DNA를 위한 공간을 만드는 벡터는 비필수적인 DNA 조각이 제거된 형태이다.

- [0041] 본 발명과 관련된 벡터는 플라스미드 벡터(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79 및 pUC19 등), 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터(예: gt4B, -Charon, z1 및 M13 등), 바이러스 벡터 등을 포함한다.
- [0042] 바이러스 벡터는 레트로바이러스(Retrovirus), 예를 들어 인간면역결핍바이러스(Human immunodeficiency virus, HIV), 생쥐백혈병 바이러스(Murine leukemia virus, MLV), 백혈증 바이러스(Avian sarcoma and leukosis virus, ASLV), 비장괴사바이러스(Spleen necrosis virus, SNV), 라우스육종바이러스(Rous sarcoma virus, RSV), 마우스 유방암 바이러스(Mouse mammary tumor virus, MMTV) 등, 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노 관련 바이러스(Adeno-associated virus, AAV), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 등에서 유래한 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명에서 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 목적 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0044] 본 발명에서 "조절 요소"란 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 전사, 번역 또는 발현의 증진을 돕거나 이에 영향을 미치는 비해독화된 핵산 서열을 의미한다. 본 발명의 발현벡터는 조절 요소로 본 발명의 유전자 회로를 필수적으로 포함하고, 단백질 발현에 영향을 미칠 수 있는 발현 조절 서열, 예를 들어, 개시 코돈, 종결 코돈, 폴리 아데닐화 시그널, 인핸서(enhancer), 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열 등을 포함할 수 있다.
- [0045] 폴리 아데닐화 시그널은 전사체의 안정성을 증가시키거나 세포질 수송을 용이하게 한다. 인핸서 서열은 프로모터에서 다양한 부위에 위치하여 인핸서 서열이 없을 때의 프로모터에 의한 전사 활성화와 비교하여, 전사 활성을 증가시키는 핵산 핵산 서열이다. 신호서열에는 숙주가 에스케리키아(*Escherichia*) 속 균인 경우에는 PhoA 신호서열, OmpA 신호서열 등이, 숙주가 바실러스 속 균인 경우에는 -아밀라아제 신호서열, 서브틸리신(Subtilisin) 신호서열 등을, 숙주가 효모인 경우에는 MF(Mating factor) 신호서열, SUC2 신호서열 등을, 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 또한, 벡터는 복제 가능한 발현 벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제 개시점(replication origin)을 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 벡터는 선택 마커(selection marker)를 포함할 수 있다. 선택 마커는 벡터로 형질 전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택 가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 선택 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질 전환된 세포를 선별 가능하다. 선택 마커의 대표적인 예로써, 영양 요구 마커(auxotrophic marker)인 *ura4*, *leu1*, *his3* 등을 들 수 있으나 상기 예에 의해 본 발명에서 사용될 수 있는 마커의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명에서 "숙주세포"란 다른 미생물 또는 유전자를 기생시켜 영양을 공급하는 세포로, 벡터가 숙주세포에 형질전환됨으로써 숙주세포 내에서 다양한 유전적 또는 분자적 영향을 미치게 되는 세포를 의미한다. 숙주세포는 외부 DNA를 받아들일 수 있는 수용성(competence) 상태에서, 벡터와 같은 외부 DNA가 삽입될 수 있는데, 벡터가 숙주세포에 성공적으로 도입되면, 해당 벡터의 유전형질을 숙주세포에 제공하게 된다.
- [0049] 바람직하게 본 발명의 숙주 미생물은 그람 음성 균일 수 있으며, 상기 그람음성균은 살모넬라 속(*Salmonella* sp.), 아시네박터 속(*Acinetobacter* sp.), 에스케리아 속(*Escherichia* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) 또는 크렙시엘라 속(*Klebsiella* sp.) 균주 등을 포함하고, 예를 들면, 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*), 아시네박터 칼코아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*), 대장균(*E. coli*), 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 크렙시엘라 아에로제네스(*Klebsiella aerogenes*), 아시네박터 바우마니 또는 크렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)등을 포함하나, 상기 예에 의해 본 발명의 벡터가 형질전환될 수 있는 숙주세포가 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 숙주 세포에 벡터를 도입하는 방법은 형질전환 방법이 이용될 수 있다. "형질전환"이란 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도

입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다. 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 CaCl_2 침전법, CaCl_2 방법에 DMSO (dimethyl sulfoxide)라는 환원 물질을 사용함으로써 효율을 높인 하나한(Hanahan)방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아(Agrobacteria) 매개된 형질전환법, 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트(Dextran sulfate), 리포펙타민(lipopectamine) 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다. 본 발명의 플라스미드를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에 서는 통상적으로 사용되는 형질전환 방법이 제한없이 사용될 수 있다.

[0051] 또한, 상기 방법으로 형질전환된 숙주세포는 필요에 따라 당업계에서 통상적으로 사용되는 배양 방법을 통하여 배양될 수 있으며, 사용될 수 있는 배지 및 배양기간은 필요에 따라 당업자에 의해 임의적으로 선택될 수 있다.

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0053] **실시예 1: 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자, 락케이즈 유전자의 증폭**

[0054] 효소 복합체 형성을 위한 락케이즈 유전자와 섬유소 분해효소 유전자는 하기와 같이, 대한민국 공개특허 10-2015-0028564에 개시된 내용을 참조하여 제작하였다.

[0055] 락케이즈 효소 복합체 형성을 위한 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 클로닝하기 위하여 클로스트리디움 셀룰로보란스(Clostridium cellulovorans)의 게놈 DNA로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린(dockerin) 부분의 염기서열(서열번호 5)을 참고로 하여 정방향 프라이머의 5'에는 대장균으로부터 유래한 락케이즈 CueO 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향 프라이머의 5'에는 제한효소 Not I 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여, 217bp 크기의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자가 포함되어 있는 PCR 산물을 수득하였다.

[0056] 대장균으로부터 유래한 락케이즈 CueO 유전자(서열번호 6)를 클로닝하기 위하여 정방향 프라이머의 5'에는 제한효소 NcoI, 역방향프라이머(reverse primer)의 5'에는 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고, 1563bp의 대장균으로부터 유래한 락케이즈 CueO 유전자가 포함되어 있는 PCR 산물을 수득하였다.

[0057] 그리고, 클로스트리디움 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체(primary scaffolding subunit)인 셀룰로오스-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A) 중 셀룰로오스 결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 코히즌1 모듈(Cohesin1 module, Coh1) 및 코히즌2 모듈(Cohesin2 module, Coh2)의 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로오스-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A, MiniCbpA) 유전자를 클로닝하기 위해 서열번호 7의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머의 5'에는 제한효소 BamHI, 역방향 프라이머(reverse primer)에는 제한효소 XhoI 인식서열이 각각 삽입된 프라이머를 합성하여, PCR을 수행하고, 1659bp의 클로스트리디움 셀룰로보란스의 셀룰로오스-결합 단백질-에이 유전자의 일부인 mCbpA 유전자가 포함되어 있는 PCR 산물을 수득하였다.

[0058] **실시예 2: 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 락케이즈 유전자의 연결 및 클로닝**

[0059] 락케이즈 유전자와 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 연결은 대한민국 공개특허 10-2015-0028564에 개시된 내용을 참조하여 수행하였다.

[0060] 실시예 1에서 얻은 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 CueO 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에 서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit(입수처:GeneAll)를 사용하여 회수하였다. 그 후, 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 락케이즈 유전자의 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 이전에 확보한 두 DNA 절편을 프라이머 없이 Annealing Time을 25min으로 늘려 DNA Polymerase 반응을 10 Cycle 수행하였다. 정방향 프라이머의 5'에는 제한효소 NcoI, 역방향 프라이머의 5'에는 제한효소 Not I 인식서열(서열번호 12)이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 오버랩된 PCR 결과물을 주형으로 하여 합성된 DNA 절편과 합성한 양 말단의 두 프라이머를 이용하여, dNTP를 기질로 하여 DNA Polymerase의 효소 활성을 반응을 94도, 52도, 72도에서 35 Cycle 반응을 하였다.

PCR 반응을 수행한 결과, 1770bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 대장균으로부터 유래한 키메릭 락케이즈 cCue0 유전자가 포함되어 있는 PCR 산물을 수득하였다. 그 후, 키메릭 락케이즈 cCue0 유전자는 절단한 후 대장균 발현 벡터(E. coli expression vector)인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 Nco I 과 Not I 으로 E. coli BL21에 형질전환한 후, 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다.

[0061] 상기 분리된 플라스미드 DNA를 pET22(+)-cCue0라 명명하였고, 상기 대장균 형질전환체를 BL21/cCue0라 명명하였으며, 이를 한국미생물보존센터에 기탁번호 KCCM11409P로 기탁하였다.

[0062] 또한, 소형 셀룰로오스-결합 단백질 유전자 또한 절단 후 대장균 발현 벡터인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 E. coli BL21에 형질전환을 하여 형질전환체를 얻었다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였으며, 상기 분리된 플라스미드 DNA를 pET22(+)-mCbpA라 명명하고, 상기 대장균 형질전환체를 BL21/mCbpA라 명명하였다.

[0063] 실시예 3: 멜라닌 분해효소의 도커린 도메인 융합을 위한 탈염료 퍼옥시다아제 연결 유전자 증폭

[0064] 탈염료 퍼옥시다아제의 복합체 형성을 위한 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 클로닝하기 위하여 클로스트리디움 셀룰로보란스 (*Clostridium cellulovorans*)의 게놈DNA로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비(Endo-β-1,4-Glucanase-B) 유전자의 도커린 부분의 염기서열(서열번호 5)을 참고로 하여 정방향 프라이머의 5'에는 바실러스 서브틸리스로부터 유래한 DyP 유전자(서열번호 8)를 참고하여 Bioneer사의 Cloning Kit를 이용하여 정방향 프라이머(서열번호 9)의 5'에는 pET22b(+) 벡터의 앞쪽으로 18 bp만큼의 인식서열이, 역방향 프라이머(서열번호 10)의 5'에는 벡터의 뒤쪽으로 18 bp만큼의 인식서열이 삽입 되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며, 그 결과 159bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인하였다.

[0065] 한편, 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 탈염료 퍼옥시다아제 유전자를 연결하기 위해 회수한 DNA절편을 이용하여 Overlap PCR 반응을 수행하였다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(서열번호 11)의 5'에는 pET22b(+) 벡터의 앞쪽 결합부위 18 bp만큼, 역방향 프라이머(서열번호 12)의 5'에는 pET22b(+) 벡터의 뒤쪽 결합부위 18 bp의 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. PCR반응을 수행하여 그 결과, 1410 bp의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 재조합 탈염료 퍼옥시다아제의 유전자를 증폭하였다.

[0066] 본 실시예에서 사용한 프라이머 서열

[0067] 서열번호 9: gaattaattcgatcctc TAGATATGAACGTAAATTTTGGCATGG

[0068] 서열번호 10: tgttaacatc TGATTCCAGCAAACGCTG

[0069] 서열번호 11: gctggaatca GATGTTAACAAGATGGAAGG

[0070] 서열번호 12: gctcgaattcgatccga ATTCTATAGGATCTCCAATATTTATTGTAAC

[0071] 실시예 4: 멜라닌 분해효소의 도커린 도메인 융합을 위한 및 탈염료 퍼옥시다아제 클로닝

[0072] 실시예 3에서 수득한 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 탈염료 퍼옥시다아제 유전자 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고, 아가로스 겔 상의 DNA절편은 Gel extraction Kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.

[0073] 그 후 BamHI 제한효소를 통해 선형화한 pET22b(+) 벡터와 앞서 PCR을 통해 증폭한 DNA절편을 Infusion Kit (Takara)를 이용하여 50℃ 중탕에서 15 분간 라이게이션 하였고 동시에 E.coli BL21에 형질전환시켰다. 상기 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하고, 상기 분리된 재조합 플라스미드를 pET22b(+)-Dyp-Doc이라 명명하였고, 도면 1에 도시하였으며, 상기 대장균 형질전환체를 BL21/cDyP라 명명하였다.

[0074] 실시예 5: 대장균 형질전환체의 재조합 락케이즈 및 재조합 탈염료 퍼옥시다아제 단백질 발현

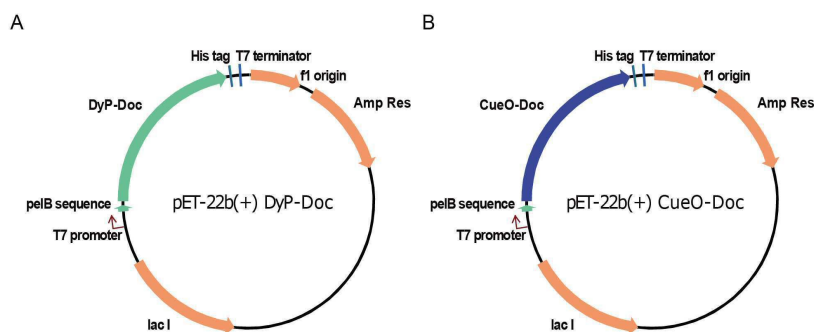
[0075] 실시예 4 에서 확보한 형질전환체의 효소 단백질 발현을 확인하기 위하여, His-Tag을 이용한 정제 및 SDS-PAGE를 수행하였다.

[0076] 실시예 2에서 제작한 BL21/cCue0, BL21/mCbpA 및 실시예 4d에서 제작한 BL21/cDyP 재조합 균주의 단백질 발현을 유도하는 조건을 조성하여 LB 배지에 접종하여 24시간 동안 37℃에서 배양하고, 500 μM IPTG와 암피실린을 함유한 LB 액상배지에서 12시간 동안 배양한 뒤 원심 분리하여 세포를 확보하였다.

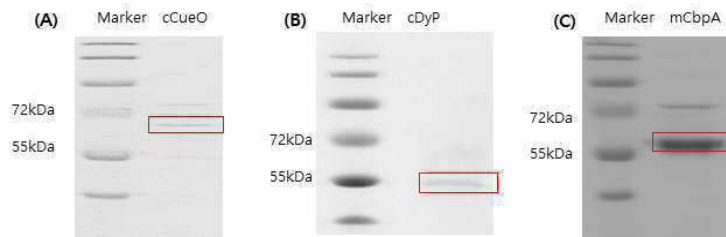
- [0077] 이후 세포를 초음파를 이용하여 파쇄하고 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여 단백질의 C-terminal에 연결되어 있는 His-tag을 이용하여 정제하였다. 이후 12% SDS-PAGE 전기영동을 수행하였고, 쿠마시블루를 통해 염색한 결과가 예상한 단백질 사이즈와 동일한 위치에서 나타남을 확인할 수 있었다(도 2).
- [0078] 도 2에 나타난 바와 같이, BL21/cCue0는 64kDa 크기의 재조합 단백질(A)을 생산하였으며, BL21/cDyP는 55kDa 크기의 재조합 단백질(B)을 생산하였고, BL21/mCbpA는 58 kDa의 재조합 단백질(C)을 생산하였다.
- [0079] **실시예 6: 재조합 락케이즈와 재조합 탈염료 퍼옥시다아제의 단백질을 어셈블리 시킨 복합체 확인**
- [0080] 실시예 5에서 확보한 형질전환체의 효소 단백질 복합체 형성을 확인하기 위하여 셀룰로스 결합모듈과 셀룰로스 사이의 상호작용을 이용하여 효소복합체의 형성을 관찰하였다.
- [0081] 실시예 3에서 확보한 3종의 효소복합체 형성을 관찰하기 위해 미니셀룰로솜이 포함하고 있는 셀룰로스-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로스 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제를 위해 셀룰로스 (Sigmacell Type 50, SIGMA)를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 1 M 소듐 클로라이드 (sodium chloride) 20 mM 트리스 버퍼 (pH 8.0)로 세 번 행구어낸 후 50 mM 트리스 버퍼(pH 12.5)로 용리하였다. 이의 SDS-PAGE는 12% poly-acrylamide gel을 사용하여 효소 단백질을 전기영동 하였다.
- [0082] CBM 정제결과를 도 3에 나타내었으며, CBM이 없는 락케이즈와 도커린은 세척 과정에서 모두 떨어져 나갔지만, CBM이 있는 소형 셀룰로스결합 단백질A와 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제가 효소복합체를 형성한 경우에는 세척과정에서 떨어져 나가지 않고, 그대로 용출과정까지 남아있게 된다. 이후 용출과정을 통하여 효소복합체를 분리해내었으며 이를 His-Tag정제한 단백질들과 크기비교를 하여 목적단백질이 맞는 것을 확인하였다.
- [0083] **실시예 7: 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제의 조합 및 활성 분석**
- [0084] 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제의 조합으로 인한 활성을 확인하기 위해 멜라닌을 기질로 하는 멜라닌 분해활성 분석을 수행하였다. 효소 활성 분석 방법은 0.5 M NaOH에 용매에 녹인 멜라닌(시그마 알드리치, 미국) 200 μ g/L을 기질로 하고, 50 mM Sodium Acetate (pH 5.0)를 반응버퍼로 하여 30℃에서 2시간 반응시킨 후 중합된 헤모조인의 양을 흡광기를 이용해 540nm 파장으로 측정하여 분석하였다.
- [0085] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제의 효소를 함께 처리한 경우, 락케이즈와 탈염료 퍼옥시다아제를 각각 단일 효소로 처리한 경우보다 멜라닌 분해 효율이 다소 높게 측정되었으며, 본 발명의 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제 복합체를 처리한 경우, 락케이즈 및 탈염료 퍼옥시다아제의 효소를 함께 처리하였을 대보다, 멜라닌 분해 효율이 1.9배 더 증가되는 것을 확인하였다.
- [0086] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

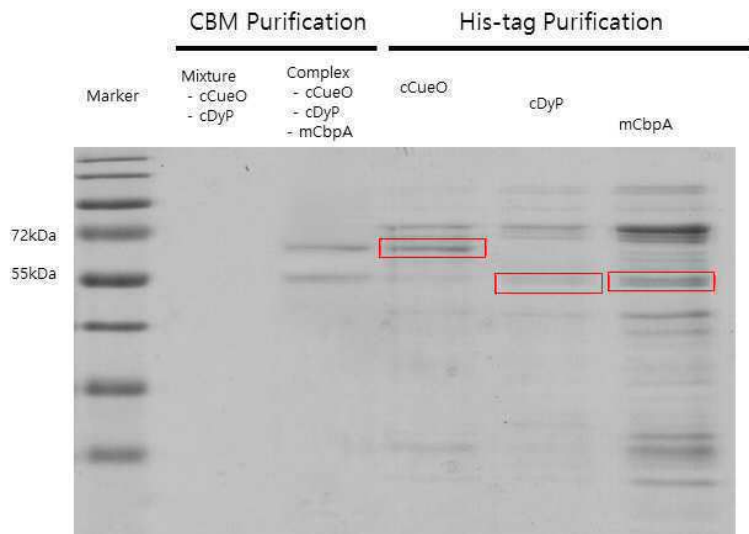
도면1



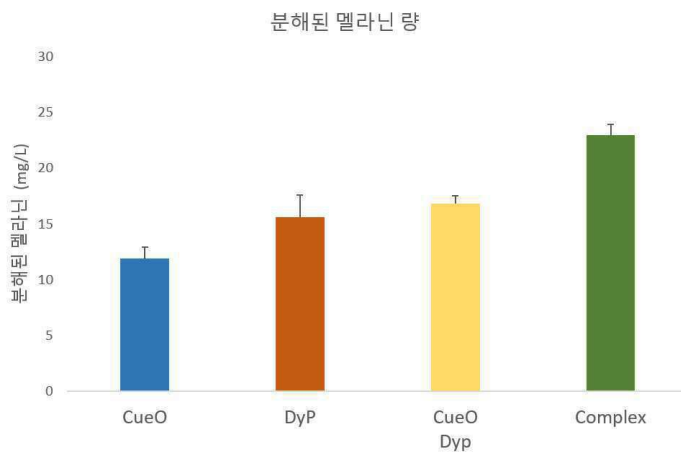
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Korea University Research & Business Foundation
- <120> Enzyme Complex of Laccase and Dye-decolorizing Peroxidase and Use for Skin Whitening Thereof
- <130> P17-B113
- <160> 12

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 480

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dye-decolorizing Peroxidase

<400> 1

Met Ser Asp Glu Gln Lys Lys Pro Glu Gln Ile His Arg Arg Asp Ile

1 5 10 15

Leu Lys Trp Gly Ala Met Ala Gly Ala Ala Val Ala Ile Gly Ala Ser

20 25 30

Gly Leu Gly Gly Leu Ala Pro Leu Val Gln Thr Ala Ala Lys Pro Ser

35 40 45

Lys Lys Asp Glu Lys Glu Glu Glu Gln Ile Val Pro Phe Tyr Gly Lys

50 55 60

His Gln Ala Gly Ile Thr Thr Ala His Gln Thr Tyr Val Tyr Phe Ala

65 70 75 80

Ala Leu Asp Val Thr Ala Lys Asp Lys Ser Asp Ile Ile Thr Leu Phe

85 90 95

Arg Asn Trp Thr Ser Leu Thr Gln Met Leu Thr Ser Gly Lys Lys Met

100 105 110

Ser Ala Glu Gln Arg Asn Gln Tyr Leu Pro Pro Gln Asp Thr Gly Glu

115 120 125

Ser Ala Asp Leu Ser Pro Ser Asn Leu Thr Val Thr Phe Gly Phe Gly

130 135 140

Pro Gly Phe Phe Glu Lys Asp Gly Lys Asp Arg Phe Gly Leu Lys Ser

145 150 155 160

Lys Lys Pro Lys His Leu Ala Ala Leu Pro Ala Met Pro Asn Asp Asn

165 170 175

Leu Asp Glu Lys Gln Gly Gly Gly Asp Ile Cys Ile Gln Val Cys Ala

180 185 190

Asp Asp Glu Gln Val Ala Phe His Ala Leu Arg Asn Leu Leu Asn Gln

195	200	205	
Ala Val Gly Thr Cys Glu Val Arg Phe Val Asn Lys Gly Phe Leu Ser			
210	215	220	
Gly Gly Lys Asn Gly Glu Thr Pro Arg Asn Leu Phe Gly Phe Lys Asp			
225	230	235	240
Gly Thr Gly Asn Gln Ser Thr Lys Asp Asp Thr Leu Met Asn Ser Ile			
245	250	255	
Val Trp Ile Gln Ser Gly Glu Pro Asp Trp Met Thr Gly Gly Thr Tyr			
260	265	270	
Met Ala Phe Arg Lys Ile Lys Met Phe Leu Glu Val Trp Asp Arg Ser			
275	280	285	
Ser Leu Lys Asp Gln Glu Asp Thr Phe Gly Arg Arg Lys Ser Ser Gly			
290	295	300	
Ala Pro Phe Gly Gln Lys Lys Glu Thr Asp Pro Val Lys Leu Asn Gln			
305	310	315	320
Ile Pro Ser Asn Ser His Val Ser Leu Ala Lys Ser Thr Gly Lys Gln			
325	330	335	
Ile Leu Arg Arg Ala Phe Ser Tyr Thr Glu Gly Leu Asp Pro Lys Thr			
340	345	350	
Gly Tyr Met Ala Gly Leu Leu Phe Ile Ser Phe Gln Lys Asn Pro Asp			
355	360	365	
Asn Gln Phe Ile Pro Met Leu Lys Ala Leu Ser Ala Lys Asp Ala Leu			
370	375	380	
Asn Glu Tyr Thr Gln Thr Ile Gly Ser Ala Leu Tyr Ala Cys Pro Gly			
385	390	395	400
Gly Cys Lys Lys Gly Glu Tyr Ile Ala Gln Arg Leu Leu Glu Ser Gln			
405	410	415	
Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe Asp Val Asn Lys Asp			
420	425	430	
Gly Lys Val Asn Ala Ile Asp Tyr Ala Val Leu Lys Ser Ile Leu Leu			
435	440	445	

Gly Thr Asn Thr Asn Val Asp Leu Ser Val Ser Asp Met Asn Lys Asp

450

455

460

Gly Lys Val Asn Ala Leu Asp Leu Ala Val Leu Lys Lys Met Leu Leu

465

470

475

480

<210> 2

<211> 569

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Laccase

<400> 2

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

1

5

10

15

Ser Ala Leu Pro Leu Trp Ser Arg Ala Val Phe Ala Ala Glu Arg Pro

20

25

30

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

35

40

45

Gln Leu Thr Ile Gly Ala Gly Gln Ser Thr Phe Gly Gly Lys Thr Ala

50

55

60

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

65

70

75

80

Gln Arg Gly Lys Ala Val Thr Val Asp Ile Tyr Asn Gln Leu Thr Glu

85

90

95

Glu Thr Thr Leu His Trp His Gly Leu Glu Val Pro Gly Glu Val Asp

100

105

110

Gly Gly Pro Gln Gly Ile Ile Pro Pro Gly Gly Lys Arg Ser Val Thr

115

120

125

Leu Asn Val Asp Gln Pro Ala Ala Thr Cys Trp Phe His Pro His Gln

130

135

140

His Gly Lys Thr Gly Arg Gln Val Ala Met Gly Leu Ala Gly Leu Val

145

150

155

160

Val Ile Glu Asp Asp Glu Ile Leu Lys Leu Met Leu Pro Lys Gln Trp

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

Met Asn Lys Pro Met Phe Ala Ala Ala Lys Gly Gln Tyr Glu Arg Trp
420 425 430

Val Ile Ser Gly Val Gly Asp Met Met Leu His Pro Phe His Ile His
435 440 445

Gly Thr Gln Phe Arg Ile Leu Ser Glu Asn Gly Lys Pro Pro Ala Ala
450 455 460

His Arg Ala Gly Trp Lys Asp Thr Val Lys Val Glu Gly Asn Val Ser
465 470 475 480

Glu Val Leu Val Lys Phe Asn His Asp Ala Pro Lys Glu His Ala Tyr
485 490 495

Met Ala His Cys His Leu Leu Glu His Glu Asp Thr Gly Met Met Leu
500 505 510

Gly Phe Thr Val Asp Val Asn Lys Asp Gly Lys Val Asn Ala Ile Asp
515 520 525

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

Leu Ser Val Ser Asp Met Asn Lys Asp Gly Lys Val Asn Ala Leu Asp
545 550 555 560

Leu Ala Val Leu Lys Lys Met Leu Leu
565

<210> 3

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> endo-1,4-glucanase-B

<400> 3

Met Asn Lys Arg Leu Ser Arg Gly Lys Ile Ser Leu Leu Ala Ser Val
1 5 10 15

Phe Val Thr Thr Thr Phe Met Gly Gly Val Asn Val Leu Ala Ser Thr
20 25 30

Ala Lys Thr Gly Ile Arg Asp Ile Thr Ser Gln Gln Val Val Lys Glu
35 40 45

Met Lys Val Gly Trp Asn Leu Gly Asn Thr Met Asp Ala Thr Gly Gly
50 55 60

Glu Thr Asn Trp Gly Asn Pro Leu Thr Thr His Ala Met Ile Asp Lys
65 70 75 80

Val Lys Ala Ala Gly Phe Asn Thr Leu Arg Leu Pro Ile Thr Trp Asp
85 90 95

Gly His Ile Gly Ala Ala Pro Asp Tyr Ala Ile Asp Ala Thr Trp Met
100 105 110

Asn Arg Val Glu Glu Ile Ala Asn Tyr Ala Phe Asp Asn Asn Met Tyr
115 120 125

Val Ile Ile Asn Leu His His Glu Asp Gly Trp Leu Lys Pro Tyr Tyr
130 135 140

Ala Asn Glu Ala Glu Val Lys Ala Lys Ile Thr Lys Val Trp Thr Gln
145 150 155 160

Ile Ala Asn Arg Phe Lys Asp Tyr Gly Asp Tyr Leu Ile Phe Glu Thr
165 170 175

Met Asn Glu Pro Arg Pro Val Gly Ala Ala Asp Glu Trp Ser Gly Gly
180 185 190

Ser Tyr Glu Asn Arg Asp Met Val Asn Arg Tyr Asn Leu Thr Ala Val
195 200 205

Asn Thr Ile Arg Ala Thr Gly Gly Asn Asn Ala Leu Arg His Ile Met
210 215 220

Val Pro Thr Leu Ala Ala Ala Ala Leu Ser Thr Thr Met Asn Asp Tyr
225 230 235 240

Ile Val Pro Asn Asn Asp Ser Arg Val Ile Val Ser Leu His Met Tyr
245 250 255

Ser Pro Tyr Phe Phe Ser Ala Asp Leu Thr Ser Gln Trp Thr Thr Ala
260 265 270

Thr Trp Gly Ser Asp Ala Asp Lys Ala Ala Leu Ser Ala Asp Phe Asp
275 280 285

Ala Val Tyr Asn Lys Phe Val Lys Asn Gly Arg Ala Val Val Ile Gly
290 295 300

Glu Met Gly Thr Ile Asn Lys Asn Asn Leu Asp Ser Arg Val Lys His

305 310 315 320

Ala Glu Tyr Tyr Ala Lys Glu Ala Thr Val Arg Gly Ile Thr Pro Ile

325 330 335

Trp Trp Asp Asn Gly Tyr Cys Val Ala Gly Lys Glu Gln Thr Phe Gly

340 345 350

Ile Phe Asn Arg Lys Asn Leu Thr Trp Cys Cys Pro Glu Val Met Gln

355 360 365

Ala Phe Ile Arg Gly Ala Gly Ala Thr Gln Thr Gln Thr Ser Tyr Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

Val Leu Lys Ser Ile Leu Leu Gly Thr Asn Thr Asn Val Asp Leu Ser

405 410 415

Val Ser Asp Met Asn Lys Asp Gly Lys Val Asn Ala Leu Asp Leu Ala

420 425 430

Val Leu Lys Lys Met Leu Leu Ser

435 440

<210> 4

<211> 550

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mini cellulose-binding protein A

<400> 4

Met Ala Ala Thr Ser Ser Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys

1 5 10 15

Ser Ala Gln Thr Asn Ser Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr

20 25 30

Ser Asp Ser Asp Leu Asn Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr

35 40 45

Thr Ser Asp Gly Thr Gln Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly

50 55 60
 Ala Leu Leu Gly Asn Ser Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala
 65 70 75 80
 Asn Phe Val Lys Glu Thr Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr
 85 90 95
 Val Glu Phe Gly Phe Ala Ser Gly Ala Ala Thr Leu Lys Lys Gly Gln
 100 105 110
 Phe Ile Thr Ile Gln Gly Arg Ile Thr Lys Ser Asp Trp Ser Asn Tyr
 115 120 125
 Thr Gln Thr Asn Asp Tyr Ser Phe Asp Ala Ser Ser Ser Thr Pro Val

 130 135 140
 Val Asn Pro Lys Val Thr Gly Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Val Leu Gly
 145 150 155 160
 Thr Ala Pro Gly Pro Asp Val Pro Ser Ser Ile Ile Asn Pro Thr Ser
 165 170 175
 Ala Thr Phe Asp Lys Asn Val Thr Lys Gln Ala Asp Val Lys Thr Thr
 180 185 190
 Met Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe Lys Thr Ile Thr Asp Ala Asn Gly
 195 200 205

 Thr Ala Leu Asn Ala Ser Thr Asp Tyr Ser Val Ser Gly Asn Asp Val
 210 215 220
 Thr Ile Ser Lys Ala Tyr Leu Ala Lys Gln Ser Val Gly Thr Thr Thr
 225 230 235 240
 Leu Asn Phe Asn Phe Ser Ala Gly Asn Pro Gln Lys Leu Val Ile Thr
 245 250 255
 Val Val Asp Thr Pro Val Glu Ala Val Thr Ala Thr Ile Gly Lys Val
 260 265 270
 Gln Val Asn Ala Gly Glu Thr Val Ala Val Pro Val Asn Leu Thr Lys

 275 280 285
 Val Pro Ala Ala Gly Leu Ala Thr Ile Glu Leu Pro Leu Thr Phe Asp
 290 295 300

Ser Ala Ser Leu Glu Val Val Ser Ile Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu
 305 310 315 320
 Asn Pro Ser Val Asn Phe Ser Ser Thr Val Ser Gly Ser Thr Ile Lys
 325 330 335
 Leu Leu Phe Leu Asp Asp Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Thr Lys Asp
 340 345 350

 Gly Val Phe Ala Thr Ile Thr Phe Lys Ala Lys Ala Ile Thr Gly Thr
 355 360 365
 Thr Ala Lys Val Thr Ser Val Lys Leu Ala Gly Thr Pro Val Val Gly
 370 375 380
 Asp Ala Gln Leu Gln Glu Lys Pro Cys Ala Val Asn Pro Gly Thr Val
 385 390 395 400
 Thr Ile Asn Pro Ile Asp Asn Arg Met Gln Ile Ser Val Gly Thr Ala
 405 410 415
 Thr Val Lys Ala Gly Glu Ile Ala Ala Val Pro Val Thr Leu Thr Ser

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

 Gly Val Phe Val Thr Ile Asn Phe Lys Ala Lys Ala Val Thr Ser Thr
 500 505 510
 Val Thr Thr Pro Val Thr Val Ser Gly Thr Pro Val Phe Ala Asp Gly
 515 520 525
 Thr Leu Ala Glu Val Gln Ser Lys Thr Ala Ala Gly Ser Val Thr Ile
 530 535 540
 Asn Ile Gly Asp Pro Ile
 545 550

<210> 5
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> dockerin of endo-beta-1,4-glucanase B

<400> 5
 gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgcctta atcaattctt 60
 ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta 120
 aatgccttgg atttagctgt tcttaaaaaa atgccttta 159

<210> 6
 <211> 1545
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> laccase Cue0 gene

<400> 6
 caacgtcgtg atttcttaaa atattccgtc gcgctgggtg tggcttcggc tttgccgctg 60
 tggagccgcg cagtatttgc ggcagaacgc ccaacgttac cgatccctga tttgctcacg 120

accgatgccc gtaatcgcat tcagttaact attggcgcag gccagtccac ctttggcggg 180
 aaaactgcaa ctacctgggg ctataacggc aatctgctgg ggccggcggt gaaattacag 240
 cgcggcaaag cggtaacggt tgatatctac aaccaactga cggaagagac aacgttgcac 300
 tggcacgggc tggaagtacc gggatgaagtc gacggcggcc cgcagggaat tattccgcca 360
 ggtggcaagc gctcggtgac gttgaacgtt gatcaacctg ccgctacctg ctggttccat 420
 ccgcatcagc acggcaaac cgggcgacag gtggcgatgg ggctggctgg gctgggtggtg 480
 attgaagatg acgagatcct gaaattaatg ctgccaaaac agtgggggat cgatgatgtt 540

ccggtgatcg ttcaggataa gaaatttagc gccgacgggc agattgatta tcaactggat 600
 glgatgaccg ccgccgtggg ctggtttggc gatacgttgc tgaccaacgg tgcaatctac 660
 ccgcaacacg ctgccccgcg tggttggctg cgcttgcgtt tgctcaatgg ctgtaatgcc 720
 cgttcgctca atttcgccac cagcgacaat cgcccgtgt atgtgattgc cagcgacggt 780
 ggtctgctac ctgaaccagt gaaggtgagc gaactgccgg tgctgatggg cgagcgtttt 840
 gaagtctgg tggaggttaa cgataacaaa ccttttgacc tggtagcgt gccggtcagc 900
 cagatgggga tggcgattgc gccgtttgat aagcctcatc cggtaatgcg gattcagccg 960

attgctatta gtgcctccgg tgctttgcc aacacattaa gtagcctgcc tgcgttacct	1020
tcgctggaag ggctgacggt acgcaagctg caactctcta tggacccgat gctcgatatg	1080
atggggatgc agatgcta at ggagaaatat ggcgatcagg cgatggccgg gatggatcac	1140
agccagatga tgggccaat ggggcacggc aatatgaatc atatgaacca cggcgggaag	1200
ttcgatttcc accatgcca caaaatcaac ggtcaggcgt ttgatatgaa caagccgatg	1260
tttgcggcgg cgaaaggga atacgaacgt tgggttatct ctggcgtggg cgacatgatg	1320
ctgcatccgt tccatatcca cggcacgcag ttccgtatct tgtcagaaaa tggcaaacgg	1380
ccagcggctc atcgcgcggg ctggaaagat accgttaagg tagaaggtaa tgtcagcgaa	1440
gtgctggatga agtttaatca cgatgcaccg aaagaacatg cttatatggc gcactgccat	1500
ctgctggagc atgaagatac ggggatgatg ttagggttta cggta	1545
<210> 7	
<211> 1647	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> cellulose-binding protein A	
<400> 7	
gcagcgacat catcaatgtc agttgaattt tacaactcta acaaatcagc acaaacaaac	60
tcaattacac caataatcaa aattactaac acatctgaca gtgattttaa tttaaatgac	120
gtaaaagtta gatattatta cacaagtgat ggtacacaag gacaaacttt ctggtgtgac	180
catgctgggtg cattattagg aaatagctat gttgataaca ctagcaaagt gacagcaaac	240
ttcgttaaag aaacagcaag cccaacatca acctatgata catatgttga atttggattt	300
gcaagcggag cagctactct taaaaagga caatttataa ctattcaagg aagaataaca	360
aatcagact ggicaaacta cactcaaaca aatgactatt catttgatgc aagtagttca	420
acaccagttg taaatccaaa agttacagga tatatagggt gagctaaagt acttggtaca	480
gcaccaggtc cagatgtacc atcttcaata attaataccta cttctgcaac atttgataaa	540
aatgtaacta aacaagcaga tgttaaaact actatgactt taaatggtaa cacattttaa	600
acaattacag atgcaaaggg tacagctcta aatgcaagca ctgattatag tgtttctgga	660
aatgatgtaa caataagcaa agcttattta gcaaaacaat cagtaggaac aactacatta	720
aactttaact ttagtgcagg aaatcctcaa aaattagtaa ttacagtagt tgacacacca	780
gttgaagctg taacagctac aattggaaaa gtacaagtaa atgctggaga aacggtagca	840
gtaccagtta acttaacaaa agttccagca gctggtttag caacaattga attaccatta	900

acttttgatt ctgcatcatt agaagtagta tcaataactg ctggagatat cgtattaaat	960
ccatcagtaa acttctcttc tacagtaagt ggaagcacia taaaattatt attcttagat	1020
gatacattag gaagccaatt aatcactaag gatggagttt ttgcaacaat aacatttaaa	1080
gcaaaagcta taactggaac aactgcaaaa gtaacttcag ttaaattagc tggaacacca	1140
gtagtgggtg atgcgcaatt acaagaaaaa cttgtgcag ttaaccagg aacagtaact	1200
atcaatccaa tcgataatag aatgcaaatt tcagttggaa cagcaacagt aaaagctgga	1260
gaaatagcag cagtgccagt aacattaaca agtgttccat caactggaat agcaactgct	1320
gaagcacaag taagttttga tgcaacatta ttagaagtag catcagtaac tgctggagat	1380
atcgatttaa atccaacagt aaacttctct tatacagtaa acggaaatgt aataaaatta	1440
ttattcctag atgatacatt aggaagccaa ttaattagta aagatggagt ttttgtaaca	1500
ataaacttca aagcaaaagc tgtaacaagc acagtaacaa caccagttac agtatcagga	1560
acacctgtat ttgcagatgg tacattagca gaagtacaat ctaaaacagc agcaggtagc	1620
gttacaataa atattggaga tcctata	1647
<210> 8	
<211> 1410	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dye-decolorizing Peroxidase	
<400> 8	
atgagcgatg aacagaaaaa gccagaacaa attcacagac gggacatttt aaaatgggga	60
gcatggcg ggcagccgt tgcatcggt gccagcggtc tcggcggtct cgtccgctt	120
gttcagactg cggctaagcc atcgaaaaag gatgaaaaag aggaggagca gattgttccg	180
ttttacggaa agcatcaggc cggaatcaca actgccatc agacgtatgt ctattttgct	240
gcactggatg taacagcaaa agacaaaagc gacatcatta cgttatttag aaactggaca	300
agtctcacac agatgctgac gtctggcaag aaaatgtcag cggagcagag aaatcagtat	360
ctgccccgc aggatacagg tgagtctgct gatttatccc cttccaactt aacggtcaca	420
ttcggattcg ggcctggctt ttttgaaaaa gacggaaagg accgcttcgg actgaaaagc	480
aaaaaacga agcacctagc cgctcttcca gcgatgccca atgacaacct ggatgaaaag	540
caggaggcg gggacatctg cattcaagtg tgtgcagacg acgagcaagt ggcgtttcac	600
gcgctcgta acctgctaaa tcaagcggtc ggcacttgtg aggtccgttt tgtgaacaaa	660
ggctttttta gcggtggaaa aaatggtgaa acaccgcga acctcttcgg gtttaaat	720

ggaacaggca accagagcac gaaggatgac acgttgatga actcgatcgt gtggattcag	780
tctggtgagc ctgactggat gacgggcggc acctatatgg ctttccgaa aatcaaaatg	840
ttccttgagg tatgggaccg ctcttccctc aaggaccaag aggatacctt cggccgcaga	900
aaaagctcgg gggcgccctt tgggcagaaa aaggaaacag atcccgtgaa gctgaatcaa	960
attccgtcta attcacacgt cagtctagcg aaatctactg ggaaacaaat ttgccaaga	1020
gctttctctt acacagaagg acttgatccg aaaaccggct atatggatgc aggtctcctg	1080
tttatcagtt ttcaaaaaa tcccgacaat cagtttatcc cgatgctgaa ggctctttca	1140
gcaaaggatg cgttaaacga atatacaca acaatcggtt ctgctttata cgcagccca	1200
ggcggctgca aaaaaggaga atatattgcc cagcgtttgc tggaatcaga tgtaacaaa	1260
gatggaaagg taaatgctat cgattatgca gtgcttaaat caattctttt aggtacaaat	1320
actaacgttg atttatcagt atcagacatg aataaggatg gtaaagtaaa tgctttggat	1380
ttagctgttc ttaaaaaat gcttttataa	1410
<210> 9	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 9	
gaattaattc ggatcctcta gatatgaacg taaattttgg catgg	45
<210> 10	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 10	
tgtaacatc tgattccagc aaacgctg	28
<210> 11	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 11	

gctggaatca gatgtaaca aagatggaaa gg

32

<210> 12

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gctcgaattc ggatccgaat tctataggat ctccaatatt tattgtaac

49