

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2012-0085364 2012년08월01일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	<i>C12N 9/02</i> (2006.01) <i>C12N 15/53</i> (2006.01) <i>C12P 7/40</i> (2006.01)	(71) 출원인	고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호	10-2011-0006631	(72) 발명자	최인걸
(22) 출원일자	2011년01월24일		서울특별시 동작구 남부순환로263길 34 (사당동)
심사청구일자	2011년01월24일		김경현
			경기 성남시 분당구 삼평동 봇들마을 907동 1704호
			(뒷면에 계속)
		(74) 대리인	특허법인다나

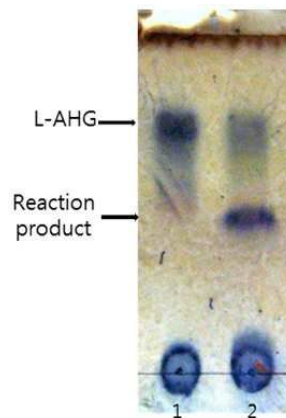
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 작용하는 신규한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제와 이 효소를 이용한 3,6-안하이드로 갈락토닉산의 생산

(57) 요약

본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 작용하는 신규한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제와 이 효소를 이용한 3,6-안하이드로 갈락토닉산의 생산에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

윤은주

서울특별시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호 (시흥
동, 현대빌라)

이세영

경기도 의왕시 호성로 48-7, 엘지아파트 103동
1502호 (오전동)

특허청구의 범위

청구항 1

보조 인자로 NADP를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 1번 탄소의 알데하이드기를 카르복실기로 산화하여 3,6-안하이드로갈락토닉산 (3,6-anhydrogalactonic acid)을 생성하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 효소는 서열번호 1 내지 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 가지는 단백질로부터 선택된 것을 특징으로 하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 유전자.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 유전자는 각각 서열번호 5 내지 8에 기재된 염기서열을 가지는 유전자로부터 선택된 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 5

제 3항 또는 제 4항의 유전자를 포함하는 재조합백터.

청구항 6

제 6항에 있어서, 상기 재조합백터는 도 17에 기재된 개열지도를 가지는 재조합백터.

청구항 7

제3항 또는 제4항의 유전자, 또는 제5항 또는 제7항의 백터 중 어느 하나를 발현 가능한 방법으로 포함하는 형질 전환체.

청구항 8

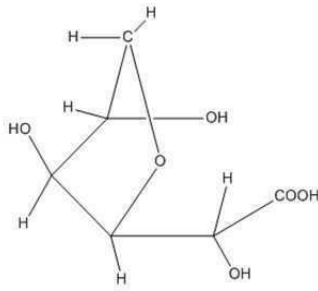
제 1항 또는 제2항의 효소를 생산하는 사카로파거스 테그라단스 또는 제 7항의 형질전환체를 배양하고 발현된 생산물을 수집하는 단계를 포함하는 제1항 또는 제2항의 효소를 제조하는 방법.

청구항 9

- (i) (a) 제1항 또는 제2항의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제;
- (b)상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 생산하는 미생물; 또는
- (c) 상기 미생물의 생성물을 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 반응시키는 단계; 및
- (ii) 상기 (i)단계에서 생산된 3,6-안하이드로갈락토닉산을 수집하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로갈락토닉산 제조 방법.

청구항 10

하기 화학식 1의 화합물.



3,6 anhydrogalactonic acid

[화학식 1]

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 작용하는 신규한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제와 이 효소를 이용한 3,6-안하이드로 갈락토닉산의 생산에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재 주요 에너지자원 중 하나로 사용되고 있는 원유의 고갈 및 가격상승과 이러한 화석연료의 과다한 사용으로 인한 대기 중으로 배출되는 이산화탄소의 증가로 야기된 지구온난화 등의 환경문제로 인해 전세계적으로 새로운 이산화탄소 저감형 대체 에너지원의 개발이 시급히 요구되고 있다. 따라서 재생가능하고 풍부한 자원 중 하나인 식물성 바이오매스를 원료로 이용하는 바이오에너지가 주요 대체에너지로 각광받고 있다. 다른 대체에너지들과 다르게 수송용 연료로써 사용이 가능한 바이오에탄올은 현재 많은 수요를 보이고 있으며 미국, 브라질을 비롯한 여러나라에서 사용을 법률로서 의무화 및 권장하고 있다.

[0003] 현재 바이오에탄올을 생산하기 위해 사용되고 있는 제 1세대 바이오매스는 식량자원에서 유래된 당질계 및 전분 질계 바이오매스로써, 전 인류의 식량자원과 경쟁함으로써 곡물가격의 상승을 유발하는 큰 문제점을 가지고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위한 대안으로 목질계 바이오매스인 제 2세대 바이오매스로부터의 에너지생산 연구가 본격적으로 진행되고 있다. 그러나 목질계 바이오매스는 난분해성물질인 리그닌을 많이 포함하고 있어 발효가 가능한 단당류로의 전환에 큰 문제를 나타내고 있다. 제 3세대 바이오매스인 해조류는 식량자원과 경쟁하지 않아도 될 뿐만 아니라, 리그닌이 없거나 함유량이 낮기 때문에 발효성당으로 전환을 비교적 간단하게 수행할 수 있는 등 여러가지 장점을 가지고 있다. 따라서 해조류는 차세대 바이오에너지 원료로서 주목받고 있으며, 이를 이용한 바이오에너지 생산기술들이 활발하게 연구되고 있다. 특히 대한민국의 경우, 삼면이 바다로 이루어져 있기 때문에 해양자원이 풍부하며 해조류를 생물자원화하기가 용이하다. 또한 해조류의 연간 생산량은 2006년을 기준으로 13,754톤으로 중국, 일본, 북한과 더불어 세계적인 해조류 생산국가에 속하고 있다. 하지만 해조류의 활용면에서는 저조한 실정이다(어업생산통계, 2006, 통계청 사회통계국 농어업생산통계과).

[0004] 현재 잘 알려진 해조류들 중에서 특히 홍조류(예, *Gelidium amansii*)를 원료물질로 사용하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이러한 홍조류는 전체 건중량의 70% 이상이 다당류로서 미생물이 이용 가능한 발효성당으로의 전환이 가능하다. 홍조류 바이오매스에서 유래된 다당류의 주요 성분은 아가로 전체 건중량의 60%정도를 함유하고 있어 바이오에너지생산을 위한 주요 원료로 고려되고 있다.

[0005] 아가는 단당류인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose, 이하 L-AHG)와 D-갈락토오스(D-galactose, 이하 D-Gal)가 알파-1,3 글리코사이드 결합(알파-1,3-glycosidic bond)과 베타-1,4 글리코사이드 결합(베타-1,4-glycosidic bond)으로 교차되어 나타나는 선형의 다당류로 홍조류의 세포벽을 구성하는 주요물질

이다. 아가는 아가로펙틴과 아가로오스로 이루어져있고, 이중 아가로펙틴은 아가로오스와 기본구성은 동일하나 부분적으로 황산기, 피루빅산(pyruvic acid)이나 글루쿠로닉산(glucuronic acid)등의 치환기를 보유하고 있다 (Carbohydrate Research (1971) 16:435-445).

[0006] 현재까지 아가를 분해할 수 있는 능력을 보유한 여러 종류의 미생물들이 동정되었고, 이중 사카로파거스 테그라 단스 (*Saccharophagus degradans* 2-40, 이하 *S. degradans*)는 미국의 체사피크만(Chesapeake Bay, Virginia, USA)에서 최초로 발견된 막대모양의 호기성 해양미생물로 전체 유전체서열이 보고되어 있다. *S. degradans*는 아가를 포함하여 최소 10개이상의 복합 다당류들을 분해하는 능력을 보유하고 있으며, 아가를 대사과정에 이용하기 위해 아가분해대사 시스템을 가지고 있다. 이러한 아가분해대사시스템에 이용되는 효소들은 GH16, GH50, GH86 그리고 GH117의 네 그룹으로 분류된다. 이중 GH117을 제외한 나머지 그룹은 베타-아가레이즈로 추정되어 있고, GH50그룹에 속하는 Aga50D효소는 최종 산물로 이당류인 네오아가로바이오스(Neoagarobiose, 이하 NA2)를 생산하는 것으로 보고되어 있다(Appl Microbiol Biotechnol 86: 227-234, 2010). 그리고 GH117그룹에 속하는 네오아가로바이오스 가수분해효소 (Neoagarobiose hydrolysis enzyme, 이하 NABH)는 이당류인 NA2의 α-1,3-결합을 절단하는 것으로 보고 되었다(특허 출원번호: 10-2009-0026300). 아가를 대사하는 미생물들은 아가레이즈들을 이용하여 아가를 발효성당인 D-Gal과 비발효성당인 L-AHG의 형태로 전환할 수 있다. 해조류를 사용하여 바이오에너지를 생산하기 위해서는 발효성당으로 전환하는 전처리과정이 필수적이지만, 대사과정 중에 생성된 단당류인 L-AHG의 경우 일반적인 미생물에서는 발효성당으로 사용할 수 없어 바이오에너지 생산의 효율이 크게 저하되는 실정이다. 또한 여러 종류의 미생물에서 D-Gal의 대사경로는 잘 알려져 있지만, 아가를 탄소원으로 사용하는 미생물에서의 L-AHG 대사과정에 대한 연구는 전혀 보고되어 있지 않다. 따라서 L-AHG를 이용하여 바이오에너지를 생산하기 위해서는 아가를 탄소원으로 사용하는 미생물들의 L-AHG 대사과정에 대한 연구를 통해 정확한 대사경로의 규명이 필요하다.

[0007]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 효소를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 효소를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 3,6-안하이드로갈락토닉산(3,6-anhydrogalactonic acid)를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 보조 인자로 NADP를 이용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 1번 탄소의 알데하이드기를 카복실기로 산화하여 3,6-안하이드로갈락토닉산(3,6-anhydrogalactonic acid)을 생성하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 제공한다.

[0012] 본 발명의 바람직한 효소는 서열번호:1 내지 서열번호 4로 구성된 군으로부터 선택된 단백질의 아미노산 서열에 대해 80% 이상, 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 및 더 바람직하게는 95% 이상(예를 들어, 98% 이상)의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 단백질의 상동성 검색은 단백질의 아미노산 서열의 데이터베이스(예컨대, SWISS-PROT 및 PIR), DNA서열의 데이터베이스(예컨대, DDBJ, EMBL 및 Gene-Bank), 또는 DNA서열로부터 추론한 아미노산 서열의 데이터베이스에 대해 예컨대 인터넷을 통해 BLAST 및 FASTA와 같은 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다.

[0013] 본 발명은 서열번호:1 내지 서열번호 4 중의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 단백질의 상동체를 추가적으로 포함한다.

[0014] 여기서, '상동체'라 함은 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된, 서열번호:1 내지 서열번호 4 중의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 단백질로서, 서열번호:1 내지 서열번호 4 중의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동등한 단백질을 말한다. 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게

나제 상동체는 서열번호:1 내지 서열번호 4 중의 하나의 아미노산 서열 내에 예를 들어, 100 아미노산 잔기 이하, 전형적으로는 50 잔기 이하, 바람직하게는 30 잔기 이하, 보다 바람직하게는 15 잔기 이하, 더욱 바람직하게는 10 잔기 이하, 및 가장 바람직하게는 5 잔기 이하의 돌연변이를 포함할 수 있다. 일반적으로, 단백질의 기능을 보유하기 위해서는 단백질의 아미노산이 원래의 아미노산과 유사한 성질을 갖는 아미노산으로 치환된다. 그러한 아미노산 치환은 '보존적 치환(conservative substitution)'이라 부른다. 예를 들어, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe 및 Trp는 전부 비극성(non-polar) 아미노산의 군으로 분류되고, 유사한 특성을 갖는다. 비-하전된(non-charged) 아미노산은 Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn 및 Gln을 포함한다. 산성 아미노산은 Asp 및 Glu를 포함한다. 염기성 아미노산은 Lys, Arg 및 His을 포함한다.

[0015] 여기서, '서열번호:1 내지 서열번호 4 중의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동등한'이라 함은 단백질이 상기 본 발명의 효소적 특성을 갖는 것을 의미한다. 당업자는 사이트-유도 변이(site-directed mutagenesis) 등을 이용하여(Nucleic Acid Res., 10, 6487 (1982); Method in Enzymol., 100, 448 (1983); 'Molecular Cloning 2 nd Edition', Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); 및 'PCR A Practical Approach', IRL Press, 200(1991)) 서열번호:2의 폴리뉴클레오티드로 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가를 적절히 도입함으로써 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제의 상동체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 얻을 수 있다. 서열번호:1 내지 서열번호 4 중의 하나의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제의 상동체는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제의 상동체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 숙주내로 도입하고 발현시켜 얻을 수 있다.

[0016] 또한, 여기서, '3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제의 상동체'라 함은 서열번호:1 내지 서열번호 4 중의 하나의 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 및 더 바람직하게는 70% 이상의 상동성을 갖는 단백질을 말한다. BLAST 및 FASTA와 같은 프로그램을 이용하여 여러가지 아미노산 서열 데이터베이스 및 DNA 데이터베이스에 대해 단백질 상동성 검색을 행할 수 있다. 이용가능한 데이터베이스로는 SWISS-PROT 및 PIR과 같은 단백질의 아미노산 서열 데이터베이스; DDBJ, EMBL 및 Gene-Bank와 같은 DNA서열 데이터베이스; 및 DNA서열로부터 추론한 아미노산 서열의 데이터베이스를 포함한다. 모든 상기 데이터베이스는 인터넷을 통해 이용할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 효소는 사카로파거스 테그라단스에 의해 유래된 것이 바람직하나 상기 효소를 발현하는 모든 형질전환체 등을 포함하고, 이에 한정되지 아니한다.

[0018] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 유전자를 제공한다.

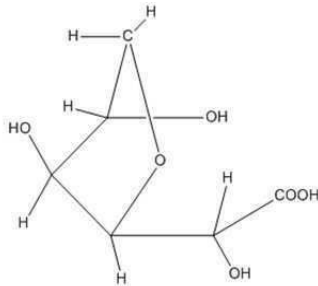
[0019] 본 발명의 유전자는 상기 본 발명의 효소의 물리 화학적 활성을 갖고, 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가된 서열번호:1 내지 서열번호 4 중의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 당업자는 사이트-유도 변이(site-directed mutagenesis) 등을 이용하여 서열번호:2의 폴리뉴클레오티드로 결실, 치환, 삽입, 및/또는 부가를 적절히 도입함으로써(Nucleic Acid Res., 10, 6487 (1982); Methods in Enzymol., 100, 448 (1983); 'Molecular Cloning 2 nd Edition', Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); 'PCR A Practical Approach', IRL Press, 200 (1991)), 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 상동체를 얻을 수 있다.

[0020] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 상동체는 서열번호:5 내지 서열번호 8 중 하나의 뉴클레오티드를 포함하고 상기 본 발명의 물리화학적 특성을 갖는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 엄격한 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드도 포함한다. '엄격한 조건하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드'라 함은, 예컨대 설명서에 기술된 조건하(0.5x SSC를 포함하는 일차 세척 완충액으로 42℃에서 세척)에서 ECL 직접 핵산 표지화 및 검출 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여, 서열번호:5 내지 서열번호 8 중 하나의 서열로부터 임의적으로 선택된 적어도 20, 바람직하게는 적어도 30의 연속적 잔기(예를 들어, 40, 60, 또는 100 연속 잔기)의 서열을 포함하는 하나 이상의 프루브 DNAs에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 말한다.

[0021] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. '분리된 뉴클레오티드'라 함은 천연적으로 발생하는 폴리뉴클레오티드에 비해 상이한 형태로 존재하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 예를 들어, 다른 생물체의 게놈에 통합된 벡터 및 폴리뉴클레오티드는 상기 분리된 폴리뉴클레오티드에 포함된다. 또한, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 cDNA, PCR 산물, 또는 제한 단편으로서 얻어진 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 부분으로서 사용되는 폴리뉴클레오티드는 '분리된 폴리뉴클레오티드'에 또한 포함된다.

- [0022] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 하기 방법에 의해 분리할 수 있다: 서열번호:2의 뉴클레오티드 서열에 기초한 PCR 프라이머를 설계하고, 주형(template)으로서 환원효소-생산 균주 유래의 염색체 DNA나 cDNA 라이브러리를 이용한 PCR을 수행하여 본 발명의 DNA를 얻는다.
- [0023] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 프루브로서 얻어진 DNA단편을 이용하여, 콜로니 혼성화, 플라크 혼성화 등으로, (a) 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제 생산 균주에서 유래된 염색체 DNA의 제한효소 단편을 파지나 플라스미드에 도입하고 상기 파지나 벡터로 대장균 세포를 형질전환하여 얻어진 라이브러리, 또는 (b) cDNA라이브러리에 대한 스크리닝을 수행함으로써 제조할 수 있다.
- [0024] 택일적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR로 얻어진 DNA단편의 뉴클레오티드 서열을 분석; 알려진 DNA서열의 외부에 가닥(strand)을 신장하기 위해 분석된 서열에 기초한 PCR 프라이머의 설계; 적절한 제한효소로 환원효소-
- [0025] 생성 균주의 염색체 DNA의 소화 및 주형으로서 상기 DNA를 이용하는 자가환화 반응(self-cyclizing reaction)에 의한 역-PCR을 수행함으로써 얻어질 수 있다(Genetics, 120, 621-623 (1988)). 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는
- [0026] RACE방법으로 얻어질 수 있다(Rapid Amplification of cDNA End, 'PCR Jikken Manual (Manual for PCR experiments)', 25-33, HBJ Publishing Bureau).
- [0027] 상기 방법으로 클로닝된 게놈 DNA 및 cDNA에 더하여, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 합성된 DNAs를 포함한다.
- [0028] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 유전자를 포함하는 재조합벡터를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 재조합벡터는 도 17에 기재된 개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0030] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 유전자, 또는 상기 본 발명의 벡터 중 어느 하나를 발현 가능한 방법으로 포함하는 형질전환체를 제공한다.
- [0031] 형질전환체의 제조 및 숙주에 적합한 재조합 벡터의 제조과정은 분자 생물학, 생체 공학, 및 유전 공학의 분야에서 통상 사용되는 기술을 이용함으로써 수행될 수 있다(예로서, Sambrook et al., 'Molecular Cloning', Cold Spring Harbor Laboratories 참조). 미생물내에서 전자 공여체가 NADP인 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 유전자를 발현시키기 위해서는, 미생물내에서 안정하고 유전정보를 전사 및 번역되도록 하는 플라스미드 벡터나 파지벡터에 DNA를 도입할 필요가 있다.
- [0032] 그러기 위하여, 전사 및 번역을 조절하는 단위, 프로모터는 본 발명의 DNA의 5'말단의 상부에 위치하고, 바람직하게는 터미네이터가 DNA의 3' 말단의 하부에 위치한다. 상기 프로모터와 터미네이터는 숙주로서 사용되는 미생물 내에서 기능적이어야 한다. 상기 각종 미생물용으로 사용가능한 벡터, 프로모터, 및 터미네이터는 'Biseibutugaku Kisokoza 8, Idenshikogaku (Fundamental Course in Microbiology (8): Genetic Engineering), Kyoritsu Shuppan', 효모에 대해 구체적으로는 'Adv. Biochem. Eng., 43, 75-102 (1990)' 및 'Yeast, 8, 423-488 (1992)'에 상세히 기술되어 있다.
- [0033] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 효소를 생산하는 사카로파거스 데그라단스 또는 상기 본 발명의 형질전환체를 배양하고 발현된 생산물을 수집하는 단계를 포함하는 상기 본 발명의 효소를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 효소의 제조는 예를 들어 다음과 같은 제조방법에 의하여 제조된다.
- [0035] 먼저 상기 본 발명의 미생물 또는 형질전환체를 배지에서 배양한다. 그 다음 충분히 성장한 상기 미생물 세포를 수거하고, 환원제(예로서, 2-머캅토에탄올) 및 프로테아제 저해제(예로서, 페닐메탄술포닐 플루오라이드)를 갖춘 완충액 내에서 세포를 용해(lysis)시켜 무세포추출물을 제조한다. 단백질 용해도에 기초한 분획법(유기용매를 이용한 침전; 황산암모늄에 의한 염석(salting out)); 양이온 교환 크로마토그래피; 음이온 교환 크로마토그래피; 겔 여과; 소수성 크로마토그래피; 및 착화제, 색소, 항체 등을 이용한 친화성 크로마토그래피의 적절한 조합에 의해 상기 무-세포 추출물로부터 원하는 효소를 정제할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 효소는 페닐-세파로스를 이용한 소수성 크로마토그래피, 모노Q 를 이용한 음이온 교환 크로마토그래피, 부틸-세파로스를 이용한 소수성 크로마토그래피, 및 히드록시아파타이트를 이용한 흡착 크로마토그래피를 이용하는 일련의 과정에 의해 전기영동상 하나의 밴드로 정제될 수 있다.

- [0036] 또한 본 발명은 (i) (a) 상기 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제;
- [0037] (b)상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 생산하는 미생물; 또는
- [0038] (c) 상기 미생물의 생성물을 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 반응시키는 단계; 및
- [0039] (ii) 상기 (i)단계에서 생산된 3,6-안하이드로갈락토닉산을 수집하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로갈락토닉산 제조 방법을 제공한다.
- [0040] 또한 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물을 제공한다.



3,6 anhydrogalactonic acid

- [0041]
- [0042] [화학식 1]

[0043] 이하 본 발명을 설명한다.

[0044] 본 발명은 아가를 유일한 탄소원으로 사용하는 *S. degradans* 에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(이하, 'L-AHG'라 함)를 기질로 하는 효소단백질의 동정을 시도하였다. 동정된 효소는 L-AHG가 NADP의 도움으로 1번 탄소의 알데하이드기를 카르복실기로 산화하여 3,6-안하이드로갈락토닉산(3,6-anhydrogalactonic acid)으로 만드는 L-AHG 데히드로게나제(이하 AHGD)로 확인되었다.

발명의 효과

[0045] 본 발명을 통해서 알 수 있는 바와 같이, *S. degradans* 뿐만 아니라 아가를 사용하여 대사하는 여러종류의 미생물에서 세포내의 L-AHG 대사경로 확인을 가능하게 하고, L-AHG의 대사를 통해 해조류로부터의 바이오에너지 획득 수율을 높이는 데 기여할 것으로 예상된다. 뿐만 아니라 AHGD에 의해 L-AHG로부터 생성되는 신규물질인 3,6-안하이드로 갈락토닉산(3,6-anhydrogalactonic acid)의 제조도 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 활성분획 단백질과 분획별 활성의 반응 비교를 나타낸 그림.
- 도 2는 활성분획 효소의 10% SDS-PAGE 분석 결과로, Lane 1 분자크기 마커, Lane 2 crude extract, Lane 3 Loading sample, Lane 4 Washing sample (10mM Imidazole), Lane 5~16 fraction No. 14~25를 나타냄.
- 도 3은 SdeAHGD와 Pat1AHGD 유전자의 염기서열 및 단백질 서열을 나타낸 그림.
- 도 4는 *sdeAHGD*와 *pat1AHGD*의 PCR 산물을 나타낸 그림으로, M, 1kb 마커; 1, pB2 벡터; 2, *pat1AHGD*; 3, *sdeAHGD*를 나타냄.
- 도 5는 SdeAHGD와 Pat1AHGD 단백질의 10% SDS-PAGE 결과를 나타낸 그림으로, 1, 분자크기 마커; 2, 발현 전 SdeAHGD; 3, 발현 후 SdeAHGD; 4, 발현 전 Pat1AHGD; 5, 발현 후 Pat1AHGD를 나타냄.
- 도 6은 L-AHG에 대한 SdeAHG와 Pat1AHG의 효소활성을 나타낸 그림,
- 도 7은 효소활성의 반응산물을 나타낸 그림으로, 1, L-AHG; 2, 반응산물을 나타냄.
- 도 8은 SdeAHGD와 Pat1AHGD 활성에 대한 pH효과를 나타낸 그림으로, A, SdeAHGD; B, Pat1AHGD를 나타냄.
- 도 9는 SdeAHGD와 Pat1AHGD 활성에 대한 온도효과를 나타낸 그림으로, A, SdeAHGD; B, Pat1AHGD를 나타냄.

도 10은 SdeAHGD와 Pat1AHGD의 반응속도론적 분석을 나타낸 그림.

도 11은 GC/MS에서의 전체이온 크로마토그램으로, (a) 효소활성 전 반응산물, (b) 효소활성 후 반응산물, (c) 분별결정 후 효소활성의 반응산물을 나타냄.

도 12는 분별결정 전과 후의 반응산물에 대한 TLC(Thin layer chromatography)로, 1, 분별결정전 반응산물; 2, 분별결정후 반응산물을 나타냄.

도 13은 정제된 반응산물의 NMR 스펙트럼으로, 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄ acid를 내부 표준물질로 사용.

도 14는 정제된 반응산물의 2D ¹H-¹³C HSQC 스펙트럼을 나타냄.

도 15는 정제된 반응산물의 ¹H-¹³C HMBC 스펙트럼을 나타냄.

도 16은 3,6-anhydrogalatonic acid의 화학적 구조를 나타냄.

도 17은 본 발명의 발현벡터의 개열지도를 나타낸 그림.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0048] 실시예 1: *S. degradans* 조추출액으로부터 L-AHG를 기질로 하는 효소의 활성분획을 얻는 방법

[0049] *Saccharophagus degradans* 2-40 (이하 sde)의 단일콜로니를 0.2%의 아가가 포함된 10ml의 최소배지(2.3% sea salt, 0.1% yeast extract and 0.05% NH₄Cl in DW)를 사용하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후, 같은 배지 1L에 배양된 균 10ml을 넣고 30℃에서 24시간 동안 추가 배양하였다. 배양된 균체는 4000rpm으로 30분간 원심분리하여 회수하고, 초음파 파쇄기(Sonifier 450, Branson, USA)를 사용하여 조추출액(crude cell extract)으로 만들었다. 조추출액은 4℃에서 15000rpm으로 1시간동안 원심분리하여 상등액(조효소액)과 침전물(세포조각)로 나눈 뒤, 상등액은 HiTrap Q 컬럼(GE healthcare, USA)을 사용하여 음이온 교환 크로마토그래피방법으로 분획하였다. 얻어진 분획들은 최종적으로 디솔팅(Desalting) 컬럼(GE healthcare, USA)을 사용하여 20mM Tris-HCl, pH 8.0의 완충용액으로 만들었다. 각 분획은 10% SDS-PAGE방법을 사용하여 단백질의 크기 및 조성을 확인하였고, 아래와 같은 방법으로 L-AHG 기질로 하는 효소의 활성검증을 통해 활성분획을 획득하였다(도 2).

[0050] 실시예 2: 분획에 포함된 L-AHG 기질로 하는 효소 활성측정방법

[0051] 조추출액으로부터 분획된 시료로부터 L-AHG를 기질로 하는 효소의 활성은 다음과 같이 측정하였다. 먼저 10ul의 분획시료를 5mM의 여러 조효소(NAD, NADP, ATP...)와 5mM의 기질(L-AHG)이 포함된 200ul의 반응용액(20mM Tris-HCl, pH 8.0)에 넣어 25℃에서 30분동안 반응시켰다. 최종 반응액은 microplate spectrophotometer(Bio-Tek Instruments, Inc.)를 사용하여 End-point UV-methods에 따라 339nm파장에서 변환된 NAD(P)H를 최종 농도를 측정하거나(도 1), 반응산물의 생성여부를 TLC를 통해 확인하였다.

[0052] 실시예 3: 활성 단백질의 동정

[0053] 활성을 나타내는 분획들을 SDS-PAGE로 전개한후 Image J 프로그램으로 활성분획에 포함된 단백질들의 크기를 비교 확인하였다. 그 결과 활성이 증가되는 구간에서 같은 증가를 보이는 단백질의 크기는 약 52kDa으로 확인하였다. National Center for Biotechnology Information(NCBI) site(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 유사한 크기를 갖고, NAD(P)를 사용하는 dehydrogenase를 Sde의 유전체서열에서 검색한 결과 EMBL ID ABD81905(이하 L-AHG dehydrogenase, AHGD)로 예측되었고, 그와 서열상동성을 갖는 단백질들의 서열도 확인하였다. Sde와 *Pseudoalteromonas atlantica* T6c(이하 Pat1)유래 AHGD는 아래와 같이 클로닝하여 최종적으로 활성을 검증하였다.

[0054] .

[0055] 실시예 4: AHGD의 클로닝

[0056] 사카로파ergus 테그라단스와 슈도알테로모나스 아틀란티카 유전체 서열로부터 얻어진 AHGD의 뉴클레오티드 서열 (유럽분자생물학연구소 (EMBL) 염기서열데이터베이스 식별번호: 각각 CP000282, 1446 nt와 CP000388, 1464 nt)에 대한 정보를 기반으로 다음과 같은 올리고뉴클레오티드를 제작하였다.

[0057] 1. Sde;

[0058] primer 1: 5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGAAAATTCATAACATGAAAAATTTTATCAACG-3' (49mer), (서열번호 9)

[0059] primer 2: 5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCTATCATTCAGCAAAATACACTGTCTTC-3' (47mer). (서열번호 10)

[0060] 2. Pat1;

[0061] primer 1: 5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGACTGTTCAGATTTACACTTTAAAAACAA-3' (47mer), (서열번호 11)

[0062] primer 2: 5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCTACTAAGCCTCATTGATATAAACGGTT-3' (47mer). (서열번호 12)

[0063] 대상 유전자들은 Sde와 Pat1 유전체 DNA를 사용하여 중합효소연쇄반응을 통해 증폭되었다(이하 S. degradans: sdeAHGD, P. atlantica: pat1AHGD)(도 4). 증폭된 sdeAHGD와 pat1AHGD DNA 조각들은 아미노 말단에 6개의 히스티딘 잔기가 부가된 변형된 pET21a (이하 pB2) 벡터에 클로닝한 다음 발현용 대장균인 E. coli BL21 (DE3)에 형질전환하여 발현시켰다.

[0064] 실시예 5: AHGD 발현 및 정제

[0065] 형질전환된 대장균에서 SdeAHGD와 Pat1AHGD의 발현을 확인하기 위해, 재조합 sdeAHGD와 pat1AHGD 유전자를 각각 포함한 형질전환된 대장균 BL21 (DE3)를 50mg/L의 앰피실린 항생제가 포함된 루리아-버타니(LB)배지에 형질전환체를 접종한 후, 37℃에서 OD₆₀₀=0.5~1.0까지 진탕배양하였다. 그 후에 0.5mM/L의 농도로 IPTG를 첨가하여 180rpm으로 16℃에서 24시간 동안 발현을 유도하였다. 배양액은 4000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였고, 회수한 균체는 초음파 파쇄기를 사용하여 조추출액으로 만든 후, 4℃에서 15000rpm으로 60분 동안 원심분리하여 조효소액과 침전물로 분리하였다. 조효소액은 0.45μm 여과지(Sartorius stedim biotech, Germany)를 사용하여 여과한 후, Histaq 컬럼 (GE healthcare, USA)을 사용하여 친화력 크로마토그래피 방법으로 정제하고, 다시 Hitraq Q 컬럼을 사용하여 이온교환 크로마토그래피 방법으로 정제를 하였다. 용출시킨 활성 분획물은 탈염(desalting) 컬럼을 사용하여 20mM Tris-HCl, pH 8.0의 완충용액으로 만들었다. 발현된 SdeAHGD와 Pat1AHGD는 10% SDS-PAGE 분석을 통해 확인하였다(도 5).

[0066] 실시예 6: AHGD 활성 확인

[0067] 정제한 단백질 활성은 다음과 같은 조건에서 분석하였다. 먼저 5mM의 조효소(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP)와 5mM의 기질(L-AHG)이 포함된 200ul의 반응용액(20mM Tris-HCl, pH 8.0)에 SdeAHGD와 Pat1AHGD 효소(최종농도 : 0.1mg/ml)를 각각 넣은 후 25℃에서 1에서 190분 동안 반응시켰다. 반응액은 microplate spectrophotometer(Bio-Tek Instruments, Inc.)를 사용하여 End-point UV-methods에 따라 339nm 파장에서 시간별로 변환된 NADPH의 최종 농도를 측정하였다(도 6). 그리고 AHGD 효소활성에 의한 반응산물은 Thin layer chromatography (TLC) 방법을 사용하여 확인하였다. TLC를 통한 확인은 Silica gel 60 TLC 평판에 반응액을 1ul 점적하고, TLC용매조건(n-Butanol:EtOH:물= 3:2:2)에서 전개하였다. 전개한 TLC 평판은 1차 처리 용액인 황산(10%(v/v) H₂SO₄ in Ethanol)으로 처리한 후 건조하고, 1차 처리된 평판은 다시 2차 처리 용액인 나프토레조시놀(0.2%(w/v) naphthoresorcinol in ethanol)로 처리 후 가열 처리하였다(도 7).

[0068] 실시예 7: 효소활성에 미치는 pH의 영향

[0069] AHGD 효소의 최적 pH를 확인하기 위해, pH값은 pH 3~11범위에서 효소의 활성을 측정하였다. 각각의 pH에 대한 완충용액은 pH 3~5.5는 20mM Citric acid 완충용액을 pH 5.5~7.0은 20mM sodium phosphate 완충용액을 pH 7.0~9.0은 20mM Tris-HCl 완충용액을 마지막으로 pH 9.0~11.0은 20mM borate 완충용액을 사용하였다. 2mM의 기질(L-AHG)과 1.5mM의 조효소(NADP)가 포함된 각각의 완충용액에 최종 효소단백질 농도를 0.1mg/ml로 하여 25℃

에서 15분 동안 반응하였다. 효소의 반응을 멈추기 위해 효소를 95℃에서 5분간 처리하고, 12000rpm으로 5분간 원심분리 후, End-point UV-methods에 따라 339nm파장에서 변환된 NADPH를 측정하였다. 확인 결과, SdeAHGD의 활성은 20mM Tris-HCl, pH 9.0 완충용액에서 가장 높았고, PatIAHGD의 활성은 20mM borate, pH 9.0에서 가장 높았다(도 8).

[0070] 실시예 8: 효소활성에 미치는 온도의 효과

[0071] AHGD 효소의 최적 온도를 확인하기 위해, AHGD의 활성은 4, 16, 25, 37, 50, 70, 90℃ 범위에서 각각의 활성을 측정하였다. SdeAHGD는 20mM Borate, pH 9.0 완충용액에서 PatIAHGD는 20mM Tris-HCl, pH9.0 완충용액에서 측정하였고, 2mM의 기질(L-AHG)과 1.5mM의 조효소(NADP)가 포함된 각각의 완충용액에 최종 효소단백질 농도를 0.1mg/ml로 하여 각각 정해진 온도에서 15분 동안 반응하였다. 효소의 반응을 멈추기 위해 효소를 95℃에서 5분간 처리하고 12000rpm으로 5분간 원심분리 후, End-point UV-methods에 따라 339nm파장에서 변환된 NADPH를 측정하였다. 그 결과 SdeAHGD는 25℃에서 가장 좋은 활성을 나타내었고, PatIAHGD는 37℃에서 가장 좋은 활성을 나타내었다(도 9).

[0072] 실시예 9: 효소의 반응속도론적 분석

[0073] SdeAHGD와 PatIAHGD는 반응속도론적 분석을 위해 최종단백질 농도를 0.1mg/ml로 고정하고, 기질(L-AHG, 21mg/ml)을 SdeAHGD의 경우 1.8, 2.0, 2.2, 2.5, 2.8ul를 PatIAHGD의 경우 1.5, 1.8, 2.0, 2.2, 2.5ul를 각각 포함되어있고 1.5mM의 조효소(NADP)가 포함된 완충용액(SdeAHGD: 20mM Borate, pH 9.0, PatIAHGD: 20mM Tris-HCl, pH 9.0)을 사용하였다. SdeAHGD의 효소반응은 25℃에서 15분동안 반응시키고 PatIAHGD는 25℃에서 10분 동안 반응시켰다. 효소반응을 멈추기 위해 95℃에서 5분간 처리하고, 12000rpm으로 5분동안 원심분리하여 획득한 상등액은 End-point UV-methods에 따라 339nm파장에서 변환된 NADPH를 측정하였다. 그 결과, SdeAHGD와 PatIAHGD의 K_m 값은 각각 1.2202와 2.8529로 확인되었고, K_{cat} 값은 각각 15.0376과 51.5464로 확인되었다(도 10).

[0074] 실시예 10: 반응 산물의 정제 및 확인

[0075] 건조시킨 혼합물들은 용매추출법을 이용하여 각각의 극성도 차에 따라 추출하고 최종적으로 반응 산물만을 정제한다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다. 건조된 반응물은 극성 용매인 메탄올에 현탁 한 후에 원심분리를 통해 용매에 녹은 상등액 부분만을 취하여 다시 건조를 시킨다. 극성도 차이에 의해 L-AHG와 반응산물은 메탄올에 녹지만 NADP와 Tris-HCl는 상대적으로 잘 녹지 않는다. 다시 건조시킨 반응물은 L-AHG와 반응 산물을 분리하기 위하여 메탄올보다 극성도가 낮은 용매인 부탄올에 재현탁 시킨다. 이 때 L-AHG가 녹아있는 상등액 부분은 제거하고 침전물부분을 다시 건조 시킨다. 높은 순도의 반응 산물을 얻기 위해 다음의 과정을 3회 반복한다. 그 후 건조시킨 반응산물은 3차 증류수에 녹인 후 GC/MS(도 11)와 TLC로 순도를 확인하였다(도 12).

[0076] 실시예 11: 활성 산물의 NMR 분석

[0077] 정제한 반응산물을 동정하기 위하여 NMR 분석을 실시하였다. 건조시킨 반응산물을 D_2O 에 녹이고 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid를 기준으로 1H chemical shift를 결정하였으며 2D 1H - ^{13}C HSQC (heteronuclear single quantum coherence), 이차원(2D) 1H - ^{13}C HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) spectra를 통해 반응 산물을 구조를 분석하였다. 1H chemical shift를 분석한 결과는 다음과 같다.

[0078] 1H chemical shift의 결과는 도 13에 나타내었다. 효소반응에서 기질로 사용한 L-AHG의 1번 탄소의 알데하이드기의 수소결합이 반응 산물에서는 나타나지 않았으며 이를 통해 1번 탄소의 기능기에서 변화가 일어났음을 알 수 있다.

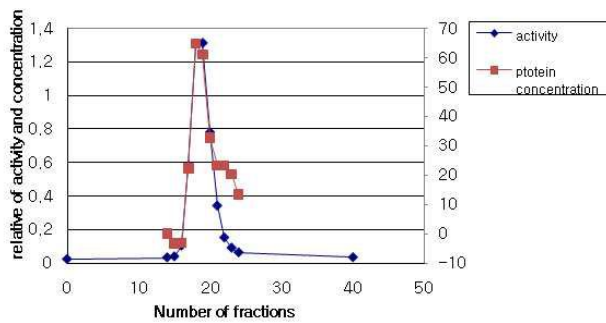
[0079] 구체적인 구조적 변화 및 동정을 위해 2D NMR 분석을 실시하였다. 도 14는 2D 1H - ^{13}C HSQC를 통해 수소-탄소 쌍

을 나타낸 결과를 보여주고 있는데, 6개의 수소-탄소 쌍을 있음을 나타내고 있다. 이는 L-AHG에서는 나타났던 1번 수소-탄소 쌍이 사라진 것을 알 수 있다. 또한 2D ^1H - ^{13}C HMBC 분석을 통해 3번 탄소와 6번 수소, 그리고 6' 수소 결합이 나타났는데 이를 통해 3번과 6번 탄소 사이의 안하이드로 고리는 그대로 유지가 된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 2번 수소는 181.5 ppm의 카보닐 탄소와 연관이 있는데 1번 탄소가 카르복실기로 산화반응이 일어났다. 이는 도 14의 결과에서 나타난 1번 수소결합이 사라진 것과 일치한다. 2D ^1H - ^{13}C HMBC 분석 결과는 도 15에서 나타내었다.

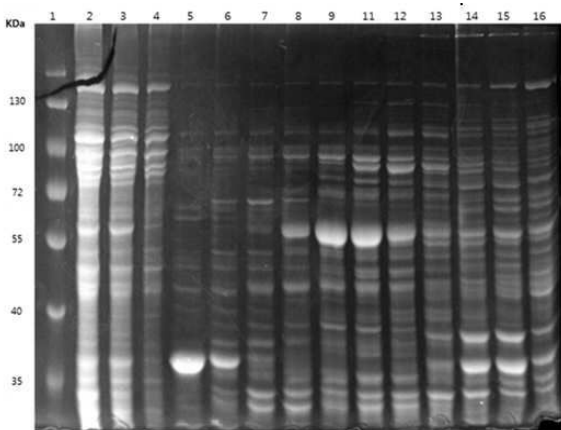
[0080] 따라서 L-AHG를 기질로 사용하고 NADP를 조효소로 효소반응을 했을 때 NADP가 NADPH로 환원이 되면서 기질은 산화 반응이 일어났다. 이 산화물은 L-AHG의 1번 탄소의 알데하이드기가 카르복실기로 산화된 구조라는 것을 NMR을 통해 분석하였으며 동정한 산화물의 구조는 도 16에 나타내었다. 이 산화물은 가장 일반적인 화합물의 명명법에 따라 3,6-안하이드로 갈락토닉산로 명명하였다.

도면

도면1



도면2



도면3a

```

-----
atgaaaaatcataaatgaaaaattttatcaacggcggaatatatagcttcacaagctgat > 60
M K I H N M K N F I N G E Y I A S Q A D
ggcgctattgatgtgctaaagcccaagcaccggtaaaaaggtaggcgatattccgcgagga > 120
G A I D V L S P S T G K K V G D I P A G
Tgtgtagaggatgcccagttggcgctggatacagccaacgcagctcaaaagctgtgggca > 180
C V E D A Q L A L D T A N A A Q K L W A
Aaaaaaacgaacagagagcgcgcaaaaatattgcgtgtattcgctgogaatattcggtgcg > 240
K K T N R E R A K I L R V F A A N I R A
ggcgcgatgatattagccaagctgttagtgagcgagcagggtaaattactttctgttgcg > 300
A A D D L A K L L V S E Q G K L L S V A
Caaatggaagtagaagccacagcaacgtttatagaatacgcgtgtgataacgcgttact > 360
Q M E V E A T A T F I E Y A C D N A L T
Atagagggcgatattttacottccgataaccccaacgaaaaatatatccacaaagtg > 420
I E G D I L P S D N P N E K I Y I H K V
Ccaagcggtgtggttgtggcaattacogcttgggaattttccgttagcaactggcgggcaga > 480
P R G V V V A I T A W N F P L A L A G R
Aaaataggccagcacttgttacaggcaatgctatcggttgaagccaaccaagaacg > 540
K I G P A L V T G N A I V V K P T Q E T
Ccaacttgcaacattggcggttaggcgagctagctaattgctgcgggtattccgcgcgggta > 600
P L A T L A L G E L A N A A G I P A G V
Ctcaatattgtaaacggcggtggcagtggtgttgggcagcacctgtgcgaagcccaata > 660
L N I V N G R G S V V G Q H L C E S P I
Accogcttaataaaccatgacggcgagcacccctgctgggcagcgatatttacgcaccagt > 720
T R L I T M T G S T P A G Q R I Y R T S
ggcgatcatttaacgccagtaattgctagaactggcggtgaaggcaccatttatcgtaatg > 780
A D H L T P V M L E L G G K A P F I V M
gaagatgccaaacttagaaaagcgagtagaggcgcatctactacgcgttatgccaattgc > 840
E D A N L E S A V E A A F T T R Y A N C
gggcaagtggtacctgtgcgagcgccctgtatgtacagcaatctatttaccccgctttt > 900
G Q V C T C A E R L Y V H E S I Y P A F
Atggataagctacttgagaagggtgaaagcaataaaaagtgggcgacccaatggctgcgat > 960
M D K L L E K V K A I K V G D P M A A D
Accgatatgggtccaaggttaatacaagcgaaatagaaaatatgtatgcgctgggttaag > 1020
T D M G P K V N Q S E I E N I D A L V K
Aagggtattgagcaaggcgcaaccttgctgcatggcggtgaagcgcgcatgtgcctggc > 1080
K G I E Q G A T L L H G G K R A H V P G
Tttgaagggtggcaactgggtatgaaccacactgctaggtgatgtgcagcaaagtaattt > 1140
F E G G N W Y E P T L L G D V Q Q S N I
Cttgtgcacgaagaaacgtttgggcctattttacotgtagttaaaattaacagtattgag > 1200
L V H E E T F G P I L P V V K I N S I E
Caggctatagagtacaccaacgcagctgagtatggcctttcaacgtatttgtttacgcaa > 1260
Q A I E Y T N D S E Y G L S T Y L F T Q
Aaccttaaatatattcatcaatatattgcccagggttagggccggtgaggtgtatgttaac > 1320
N L K Y I H Q Y I A E V E A G E V Y V N
ggcggtattgggtgagcagcaccgaaggcttcacaacgggttggaagctaagcgggcgaggc > 1380
R G I G E Q H Q G F H N G W K L S G A G
ggtagaagatgggtcggttaacggttttagagcagtaacttagagaagaagacagtgatatttgct > 1440
G E D G R Y G L E Q Y L E K K T V Y F A
Gaatga > 1446

```

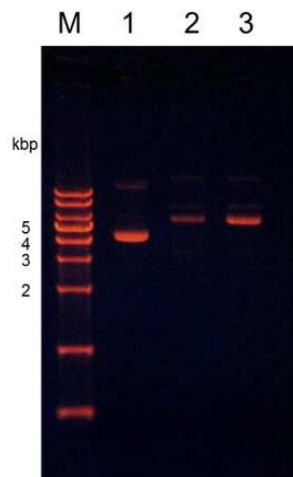
도면3b

```

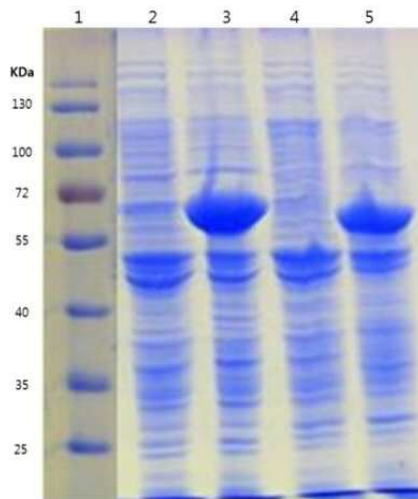
Atgactgttcaagatttacactttaaaacaagggttaatttcattggaggccaatatgtg > 60
M T V Q D L H F K N K V N F I G G Q Y V
Cccctaaacgaatccgatacaattgacatacttagcccgtaactggcaaagtcataggc > 120
P S N E S D T I D I L S P S T G K V I G
Gaaataccggcaggttgtaaagcggatgctgaaaatgccctagaggtaggctcaggccgcg > 180
E I P A G C K A D A E N A L E V A Q A A
Caaaaagcatgggctaataaaccgctcgtacacgccagaatatgctgcgtaccttcgct > 240
Q K A W A K L T A R T R Q N M L R T F A
Aacaaaaatcgttgagaataaacacattcttggccctatgctcgtcgtcgtgagcaaggcaaa > 300
N K I R E N K H I L A P M L V A E Q G K
Ttgttatcagtagccgaaatggaagtggacgtaacgcgtacgtttatcgactacggatgt > 360
L L S V A E M E V D V T A T F I D Y G C
gacaatgccctgaccatagaaggcgacattttgccttcagataatcaggacgaaaaaata > 420
D N A L T I E G D I L P S D N Q D E K I
tacattcagtgcgaaaaatggccctggtgtgtgggcattaccgcctggaatttcocctctg > 480
Y I H K V P R G V V V G I T A W N F P L
gcattacagcgtcgaaaaatggccctggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt > 540
A L A G R K I G P A L I T G N T M V L K
cctaccaagaagcgcgttgcaacgactgagcttggcgctattgccaaagaagcaggc > 600
P T Q E T P L A T T E L G R I A K E A G
cttcccgatggcgttataaacgtcataaattggctacgtggctctgtggctgggcaaacctta > 660
L P D G V L N V I N G T G S V V G Q T L
tgtgaaagcccatcactaaaatgatcaccatgacaggctccactgtcgcgggtaaacaa > 720
C E S P I T K M I T M T G S T V A G K Q
atttataaaaccagcgcagagtatatgacccctgtcatgcttgagttagggtggtaaagcg > 780
I Y K T S A E Y M T P V M L E L G G K A
ccgatggtcgtcatggatgatgccgatcttgataaggcggcagaagatgcactgtggggg > 840
P M V V M D D A D L D K A A E D A L W G
cgttttgcacactcgggacaggtatgcacttggttagaacgcttatatgttcatgcaagt > 900
R F A N C G Q V C T C V E R L Y V H A S
gtttacgatgagtttatggctaaattctacctttagtgaagggttgaaagtcggggat > 960
V Y D E F M A K F L P L V K G L K V G D
cccatggatgcagactcacaaaaggccctaaagtgaaccagcgtgaaattgataaatatc > 1020
P M D A D S Q M G P K C N Q R E I D N I
gaccacatagtgcatgaagccatcaagcaagggtgcaacggttgccactggcggttaagacg > 1080
D H I V H E A I K Q G A T V A T G G K T
gcaacagttgaaggcttcgaaggcggctgttggtatgagccacggcttttagtggatgtt > 1140
A T V E G F E G G C W Y E P T V L V D V
aaacaagacaatatagttggtgcacgaagaaaccttcggcccccattctacctatcgttaaa > 1200
K Q D N I V V H E E T F G P I L P I V K
gtcagtagtatggaacaagctatcgagttttgtaacgacagcatctatggttttaagcgct > 1260
V S S M E Q A I E F C N D S I Y G L S A
tacgtacacaccccaagctttgccaattattaatcaagctatcagtgatttagaagtcggt > 1320
Y V H T Q S F A N I N Q A I S D L E V G
gaagtgatatcaaccgcggaatgggtgagcagcatcagggttcacacaacggctggaaa > 1380
E V Y I N R G M G E Q H Q G F H N G W K
caagcgggttttggcggtgaagacggttaagtttggcccttgagcaatacttggaaaagaaa > 1440
Q S G F G G E D G K F G L E Q Y L E K K
accgtttatatcaatgaggttag > 1464
T V Y I N E A *

```

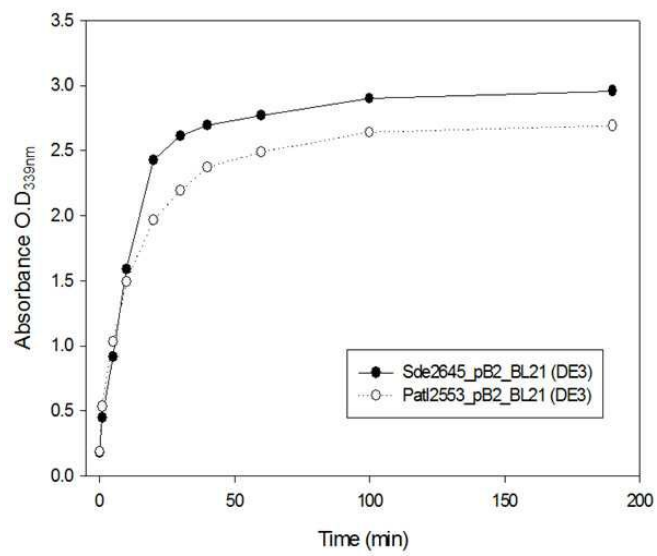
도면4



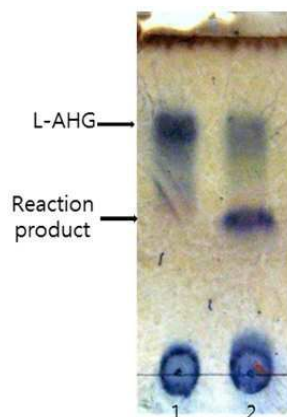
도면5



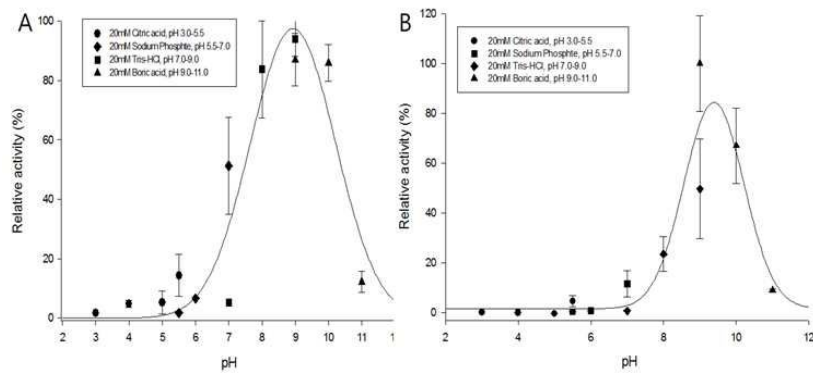
도면6



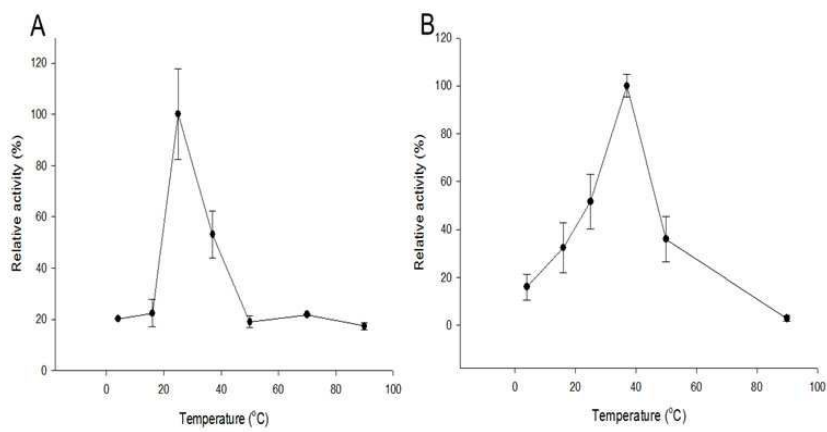
도면7



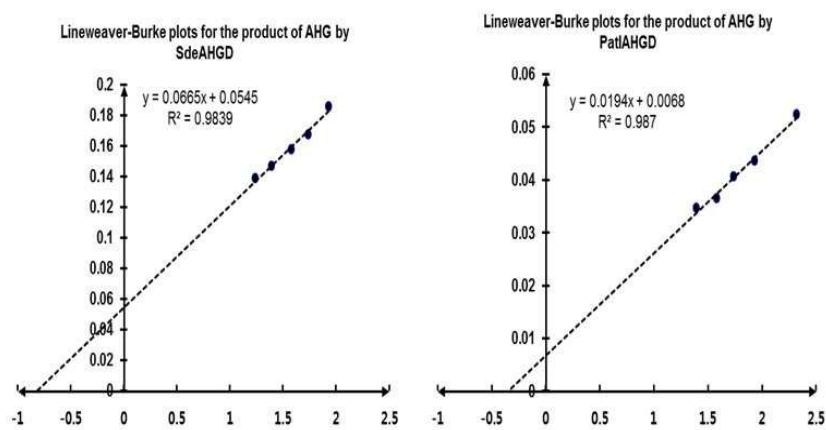
도면8



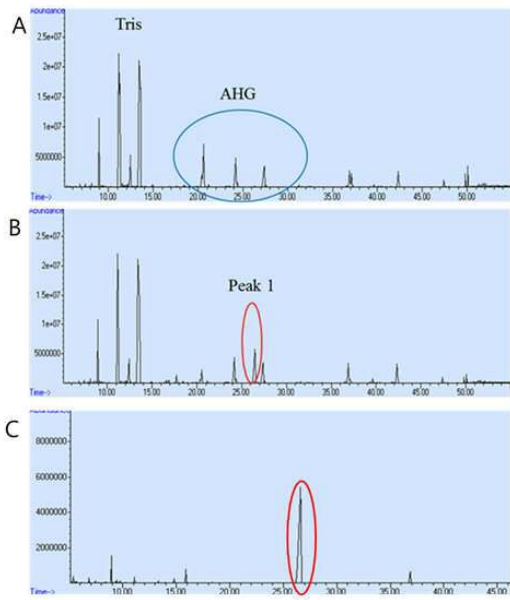
도면9



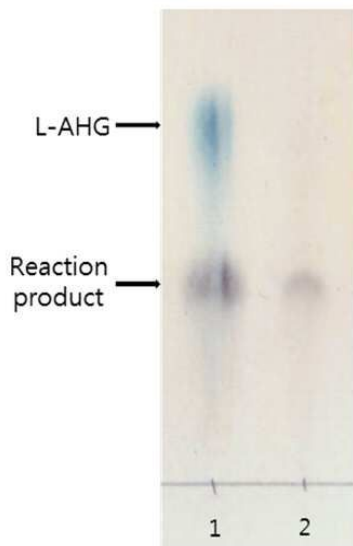
도면10



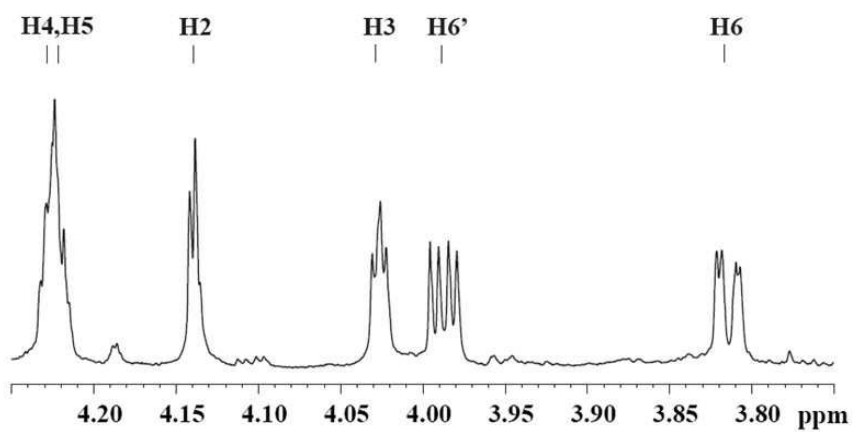
도면11



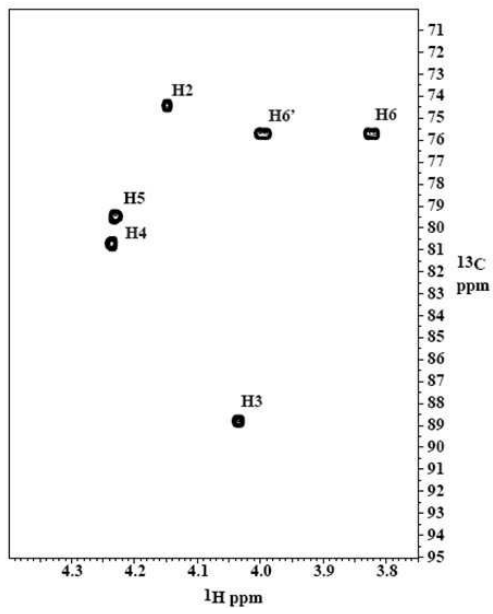
도면12



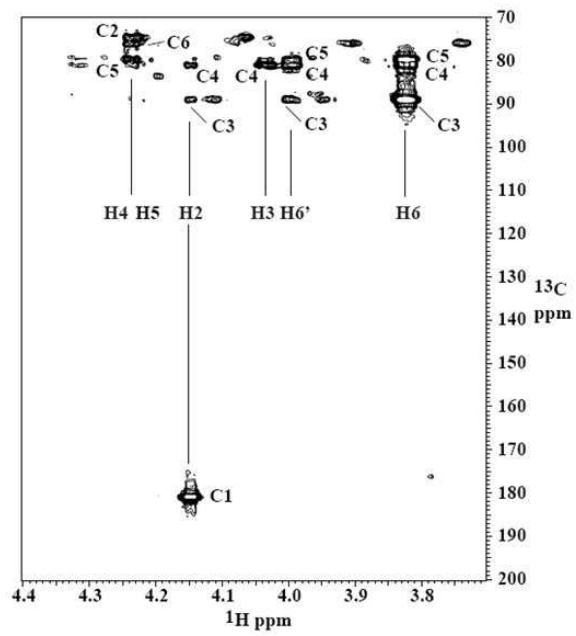
도면13



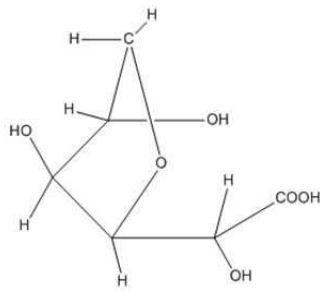
도면14



도면15

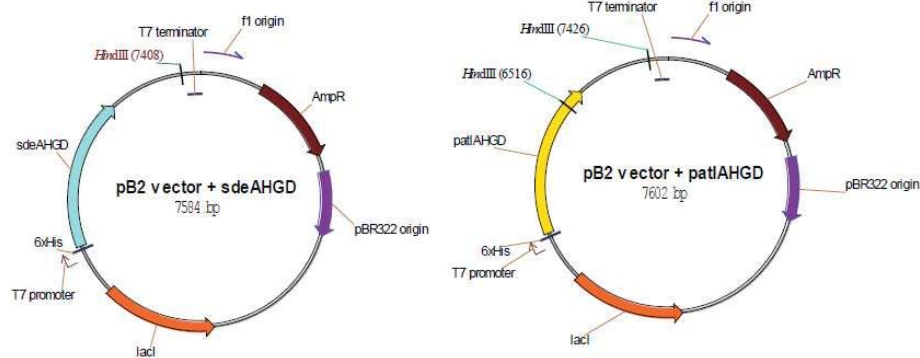
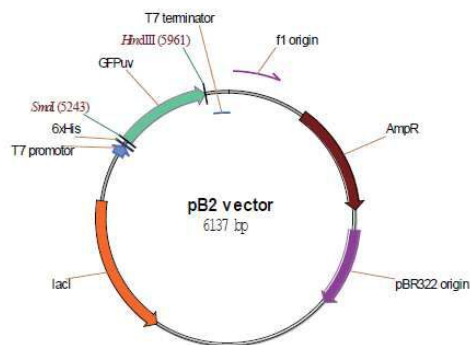


도면16



3,6 anhydrogalactonic acid

도면17



서열목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> A noble 3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase to convert
3,6-anhydro-L-galactose into 3,6-anhydrogalactonic acid
- <160> 12
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1

<211> 481

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SdeAHGD

<400> 1

Met Lys Ile His Asn Met Lys Asn Phe Ile Asn Gly Glu Tyr Ile Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Asp Thr Ala Asn Ala Ala Gln Lys Leu Trp Ala Lys Lys Thr Asn

50 55 60

Arg Glu Arg Ala Lys Ile Leu Arg Val Phe Ala Ala Asn Ile Arg Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Ser Val Ala Gln Met Glu Val Glu Ala Thr Ala Thr Phe Ile Glu

100 105 110

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

115 120 125

Asp Asn Pro Asn Glu Lys Ile Tyr Ile His Lys Val Pro Arg Gly Val

130 135 140

Val Val Ala Ile Thr Ala Trp Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ala Gly Arg

145 150 155 160

Lys Ile Gly Pro Ala Leu Val Thr Gly Asn Ala Ile Val Val Lys Pro

165 170 175

Thr Gln Glu Thr Pro Leu Ala Thr Leu Ala Leu Gly Glu Leu Ala Asn

180 185 190

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

195 200 205

Ser Val Val Gly Gln His Leu Cys Glu Ser Pro Ile Thr Arg Leu Ile

210 215 220
 Thr Met Thr Gly Ser Thr Pro Ala Gly Gln Arg Ile Tyr Arg Thr Ser
 225 230 235 240

 Ala Asp His Leu Thr Pro Val Met Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ala Pro
 245 250 255
 Phe Ile Val Met Glu Asp Ala Asn Leu Glu Ser Ala Val Glu Ala Ala
 260 265 270
 Phe Thr Thr Arg Tyr Ala Asn Cys Gly Gln Val Cys Thr Cys Ala Glu
 275 280 285
 Arg Leu Tyr Val His Glu Ser Ile Tyr Pro Ala Phe Met Asp Lys Leu
 290 295 300
 Leu Glu Lys Val Lys Ala Ile Lys Val Gly Asp Pro Met Ala Ala Asp

 305 310 315 320
 Thr Asp Met Gly Pro Lys Val Asn Gln Ser Glu Ile Glu Asn Ile Asp
 325 330 335
 Ala Leu Val Lys Lys Gly Ile Glu Gln Gly Ala Thr Leu Leu His Gly
 340 345 350
 Gly Lys Arg Ala His Val Pro Gly Phe Glu Gly Gly Asn Trp Tyr Glu
 355 360 365
 Pro Thr Leu Leu Gly Asp Val Gln Gln Ser Asn Ile Leu Val His Glu
 370 375 380

 Glu Thr Phe Gly Pro Ile Leu Pro Val Val Lys Ile Asn Ser Ile Glu
 385 390 395 400
 Gln Ala Ile Glu Tyr Thr Asn Asp Ser Glu Tyr Gly Leu Ser Thr Tyr
 405 410 415
 Leu Phe Thr Gln Asn Leu Lys Tyr Ile His Gln Tyr Ile Ala Glu Val
 420 425 430
 Glu Ala Gly Glu Val Tyr Val Asn Arg Gly Ile Gly Glu Gln His Gln
 435 440 445
 Gly Phe His Asn Gly Trp Lys Leu Ser Gly Ala Gly Gly Glu Asp Gly

 450 455 460

Arg Tyr Gly Leu Glu Gln Tyr Leu Glu Lys Lys Thr Val Tyr Phe Ala
 465 470 475 480
 Glu

<210> 2

<211> 487

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pat1AHGD

<400> 2

Met Thr Val Gln Asp Leu His Phe Lys Asn Lys Val Asn Phe Ile Gly
 1 5 10 15
 Gly Gln Tyr Val Pro Ser Asn Glu Ser Asp Thr Ile Asp Ile Leu Ser
 20 25 30

Pro Ser Thr Gly Lys Val Ile Gly Glu Ile Pro Ala Gly Cys Lys Ala
 35 40 45
 Asp Ala Glu Asn Ala Leu Glu Val Ala Gln Ala Ala Gln Lys Ala Trp
 50 55 60
 Ala Lys Leu Thr Ala Arg Thr Arg Gln Asn Met Leu Arg Thr Phe Ala
 65 70 75 80
 Asn Lys Ile Arg Glu Asn Lys His Ile Leu Ala Pro Met Leu Val Ala
 85 90 95
 Glu Gln Gly Lys Leu Leu Ser Val Ala Glu Met Glu Val Asp Val Thr

100 105 110
 Ala Thr Phe Ile Asp Tyr Gly Cys Asp Asn Ala Leu Thr Ile Glu Gly
 115 120 125
 Asp Ile Leu Pro Ser Asp Asn Gln Asp Glu Lys Ile Tyr Ile His Lys
 130 135 140
 Val Pro Arg Gly Val Val Val Gly Ile Thr Ala Trp Asn Phe Pro Leu
 145 150 155 160
 Ala Leu Ala Gly Arg Lys Ile Gly Pro Ala Leu Ile Thr Gly Asn Thr
 165 170 175

Met Val Leu Lys Pro Thr Gln Glu Thr Pro Leu Ala Thr Thr Glu Leu
180 185 190

Gly Arg Ile Ala Lys Glu Ala Gly Leu Pro Asp Gly Val Leu Asn Val
195 200 205

Ile Asn Gly Thr Gly Ser Val Val Gly Gln Thr Leu Cys Glu Ser Pro
210 215 220

Ile Thr Lys Met Ile Thr Met Thr Gly Ser Thr Val Ala Gly Lys Gln
225 230 235 240

Ile Tyr Lys Thr Ser Ala Glu Tyr Met Thr Pro Val Met Leu Glu Leu
245 250 255

Gly Gly Lys Ala Pro Met Val Val Met Asp Asp Ala Asp Leu Asp Lys
260 265 270

Ala Ala Glu Asp Ala Leu Trp Gly Arg Phe Ala Asn Cys Gly Gln Val
275 280 285

Cys Thr Cys Val Glu Arg Leu Tyr Val His Ala Ser Val Tyr Asp Glu
290 295 300

Phe Met Ala Lys Phe Leu Pro Leu Val Lys Gly Leu Lys Val Gly Asp
305 310 315 320

Pro Met Asp Ala Asp Ser Gln Met Gly Pro Lys Cys Asn Gln Arg Glu
325 330 335

Ile Asp Asn Ile Asp His Ile Val His Glu Ala Ile Lys Gln Gly Ala
340 345 350

Thr Val Ala Thr Gly Gly Lys Thr Ala Thr Val Glu Gly Phe Glu Gly
355 360 365

Gly Cys Trp Tyr Glu Pro Thr Val Leu Val Asp Val Lys Gln Asp Asn
370 375 380

Ile Val Val His Glu Glu Thr Phe Gly Pro Ile Leu Pro Ile Val Lys
385 390 395 400

Val Ser Ser Met Glu Gln Ala Ile Glu Phe Cys Asn Asp Ser Ile Tyr
405 410 415

Gly Leu Ser Ala Tyr Val His Thr Gln Ser Phe Ala Asn Ile Asn Gln
420 425 430

Ala Ile Ser Asp Leu Glu Val Gly Glu Val Tyr Ile Asn Arg Gly Met
435 440 445

Gly Glu Gln His Gln Gly Phe His Asn Gly Trp Lys Gln Ser Gly Phe
450 455 460

Gly Gly Glu Asp Gly Lys Phe Gly Leu Glu Gln Tyr Leu Glu Lys Lys
465 470 475 480

Thr Val Tyr Ile Asn Glu Ala
485

<210> 3
<211> 486
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Q93p88
<400> 3

Met Ile Met Ser Thr Val Lys Asn Tyr Lys Leu Tyr Ile Asp Gly Glu
1 5 10 15

Trp Ile Asp Ala Thr Thr Gly Glu Ser Gln Glu Ile Leu Ser Pro Thr
20 25 30

Asp Glu Thr Val Val Gly Thr Val Gln Met Gly Val Glu Ala Asp Ala
35 40 45

Gln Ile Ala Leu Glu Ala Ala Glu Arg Ala Gln Lys Gln Trp Lys Lys
50 55 60

Val Pro Ala Arg Lys Arg Ala Asp Leu Leu Arg Thr Phe Ala Ala Glu
65 70 75 80

Ile Lys Ala Asn Lys Asn Gln Leu Ala Glu Leu Leu Val Arg Glu Gln
85 90 95

Gly Lys Leu Leu Ala Val Ala Lys Met Glu Val Glu Val Thr Ala Ser
100 105 110

Phe Ile Glu Tyr Ala Cys Asp Gly Ala Arg Ser Ile Glu Gly Asp Ile
115 120 125

Ile Pro Ser Asp Asn Pro Ala Glu His Ile Met Ile His Lys Ile Pro
130 135 140

Arg Gly Val Val Val Ala Ile Thr Ala Trp Asn Phe Pro Leu Ala Leu
 145 150 155 160
 Ala Gly Arg Lys Leu Gly Pro Ala Leu Val Ala Gly Asn Ser Val Val
 165 170 175

 Leu Lys Pro Thr Gln Glu Thr Pro Ile Ala Thr Leu Glu Leu Gly Asn
 180 185 190
 Ile Ala Asn Lys Val Gly Leu Pro Lys Gly Leu Ile Asn Ile Leu Thr
 195 200 205
 Gly Gln Gly Ser Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Ala Asn Pro Ile Thr
 210 215 220
 Lys Met Val Ser Met Thr Gly Ser Thr Pro Ala Gly Gln Gln Ile Phe
 225 230 235 240
 Arg Thr Ala Ala Glu Asn Leu Ile His Val Gln Leu Glu Leu Gly Gly

 245 250 255
 Lys Ala Pro Cys Ile Val Phe Asp Asp Ala Asp Leu Glu Gln Ala Val
 260 265 270
 Glu Gly Ala Phe His Ser Arg Phe Asp Asn Cys Gly Gln Val Cys Thr
 275 280 285
 Ser Asn Glu Arg Leu Tyr Val His Glu Ser Ile Tyr Asn Glu Phe Met
 290 295 300
 Glu Arg Phe Met Glu Lys Val Lys Gly Leu Lys Leu Gly Asn Pro Met
 305 310 315 320

 Asp Ala Ala Thr Thr Ile Gly Pro Lys Val Asn Ala Lys Glu Val Ala
 325 330 335
 His Met Glu His Leu Val Thr Lys Ser Val Glu Glu Gly Ala Thr Val
 340 345 350
 Ala Ile Gly Gly Lys Lys Pro Gln Gly Lys Ala Phe Glu Lys Gly His
 355 360 365
 Trp Phe Glu Pro Thr Ile Leu Thr Asp Val Lys Gln Asn Met Thr Ile
 370 375 380
 Val His Glu Glu Ser Phe Gly Pro Ile Leu Pro Val Ile Lys Phe Ser

385 390 395 400
 Glu Phe Asn Glu Val Ile Gly Tyr Ala Asn Asp Cys Glu Tyr Gly Leu
 405 410 415
 Ala Ala Met Val Phe Thr Asn Asp Met Asn Lys Ile Met Arg Leu Asn
 420 425 430
 Asp Glu Leu Glu Phe Gly Glu Ile Tyr Ile Asn Arg Gly His Gly Glu
 435 440 445
 Gln His Gln Gly Phe His Asn Gly Tyr Lys Leu Ser Gly Thr Gly Gly
 450 455 460

 Glu Asp Ser Lys Tyr Gly Phe Glu Gln Tyr Met Glu Lys Lys Thr Phe
 465 470 475 480
 Tyr Ile Lys Tyr Lys Ala
 485

 <210> 4
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> D5EN35
 <400> 4
 Met Ser Thr Asp Thr Ile Thr Ala Tyr Gln Met Tyr Ile His Gly Glu
 1 5 10 15
 Trp Val Asp Ala Thr Ser Gly Lys Ile Val Glu Val Glu Asn Pro Ser
 20 25 30

 Asn Glu Ala Val Ile Ala Thr Val Gln Asp Gly Asp Ala Ala Asp Ala
 35 40 45
 Glu Arg Ala Leu Gln Ser Ala Lys Gln Ala Gln Pro Ala Trp Ala Ala
 50 55 60
 Ile Pro Ala Val Glu Arg Gly Asn Val Leu Ile Lys Phe Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Ile Lys Ala Asn Arg Glu Arg Leu Ala Arg Leu Leu Ser Ile Glu Met
 85 90 95
 Gly Lys Thr Tyr Glu Leu Ala Leu Gly Glu Val Asp Val Ser Ala Asp

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

355 360 365
Trp Tyr Glu Pro Thr Ile Leu Thr Gly Cys Asp Asn Ser Met Asp Val

370 375 380
Met Arg Glu Glu Val Phe Gly Val Val Ser Pro Ile Met Lys Ile Ser

385 390 395 400
Ser Tyr Glu Glu Ala Leu Glu Leu Ala Asn Asp Ser Asp Tyr Gly Leu

405 410 415
Ala Ala Phe Leu Phe Thr Lys Asp Met Arg Leu Ile Gln Arg Ala Val

420 425 430
Leu Glu Leu Glu Phe Gly Glu Ile Tyr Val Asn Arg Pro Met Gly Glu

435 440 445
Gln Arg Gln Gly Phe His Asn Gly Tyr Lys Leu Ser Gly Thr Gly Gly

450 455 460

Glu Asp Gly Lys Tyr Gly Tyr Glu Asn Tyr Leu Glu Lys Lys Thr Met
465 470 475 480

Tyr Val Asn Phe Ser Glu

485

<210> 5

<211> 1443

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SdeAHGD

<400> 5

atgaaaattc ataacatgaa aaattttatc aacggcgaat atatagcttc acaagctgat 60

ggcgctattg atgtgctaag cccaagcacc ggtaaaaagg taggcgatat tcccgcagga 120

tgtgtagagg atgcgcagtt ggcgtggat acagccaacg cagctcaaaa gctgtgggca 180

aaaaaaacga acagagagcg cgaaaaata ttgcgtgtat tcgctgcgaa tattcgtgcg 240

gcggcggatg atttagccaa gctgttagtg agcgagcagg gtaaattact ttctgttgcg 300

caaatggaag tagaagccac agcaacgttt atagaatagc cgtgtgataa cgcgcttact 360

atagagggcg atattttacc ttccgataac cccaacgaaa aaatatatat ccacaaagtg 420

ccacgcggtg tggttgtggc aattaccgct tggaattttc cgtagcact ggcgggcaga 480

aaaataggcc cagcacttgt tacaggcaat gctatcgtgg ttaagccaac ccaagaaacg 540

ccacttgcaa cattggcggtt aggcgagctt gctaattgctg cgggtattcc cgccggcgta 600

ctcaatattg taaacggccg tggcagtgtt gttgggcagc acctgtgcga aagcccaata 660

accgcttaa taacatgac cggcagcacc cctgctgggc agcgtattta cgcaccagt 720

gccgatcatt taacgccagt aatgctagaa ctgggcggta aggcaccatt tatcgtaatg 780

gaagatgcc aactagaaag cgcagtagag gcggcattta ctacgcgtta tgccaattgc 840

gggcaagtgt gtacctgtgc cgagcgctg tatgtacacg aatctattta ccccgtttt 900

atggataagc tacttgagaa ggtgaaagca ataaaagtgg gcgaccaat ggctgccgat 960

accgatatgg gtcccaaggt taatcaaagc gaaatagaaa atattgatgc gctggttaag 1020

aagggtattg agcaaggcgc aaccttgctg catggcggta agcgcgcgca tgtgcctggc 1080

tttgaagggt gcaactggta tgaaccaca ctgctagggt atgtgcagca aagtaatatt 1140

cttgtgcacg aagaaacgtt tgggcctatt ttacctgtag ttaaaattaa cagtattgag 1200

caggctatag agtacaccaa cgacagttag tatggccttt caacgtattt gtttacgcaa 1260

aaccttaaat atattcatca atatattgcc gaggttgagg ccggtgaggt gtatgttaac 1320

cgcggtattg gtgagcagca ccaaggcttc cacaacgggt ggaagctaag cggcgcaggc 1380

ggtgaagatg gtcgttacgg tttagagcag tacttagaga agaagacagt gtattttgct 1440

gaa 1443

<210> 6

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pat1AHGD

<400> 6

atgactgttc aagatttaca ctttaaaac aagggttaatt tcattggagg gcaatatgtg 60

ccctctaacg aatccgatac aattgacata cttagcccggt caactggcaa agtcataggc 120

gaaataccgg caggttgtaa agcggatgct gaaaatgccc tagagggtggc tcaggccgcg 180

caaaaagcat gggctaaatt aaccgctcgt acacgccaga atatgctgcg taccttcgct 240

aacaaaattc gtgagaataa acacattctt gccctatgc tcgtcgtga gcaaggcaaa 300

ttgttatcag tagccgaaat ggaagtggac gtaaccgcta cgtttatcga ctacggatgt 360

gacaatgccc tgaccataga aggcgacatt ttgccttcag ataactagga cgaaaaaata 420

tacattcata aggtaccaag aggcgtgggt gtgggcattt ccgcctggaa ttccctctg 480

gcattagcag gtcgaaaaat tggcctgcg cttattaccg gtaataccat ggtgttaag 540

cctaccaag aaacgccgt tgcaacgact gagcttgggc gtattgcaa agaagcaggc 600
cttcccgatg gcgtattaaa cgtcataaat ggtactggct ctgtggtcgg gcaaactta 660
tgtgaaagcc ccactactaa aatgatcacc atgacaggct ccactgtcgc gggtaaacaa 720

attataaaa ccagcgcaga gtatatgacc cctgtcatgc ttgagttagg tggtaagcg 780
ccgatggtcg tcatggatga tgccgatctt gataaggcgg cagaagatgc actgtggggg 840
cgttttgcca actgcggaca ggtatgcaact tgtgtagaac gcttatatgt tcatgcaagt 900
gtttacgatg agtttatggc taaattctta cctttagtga aagggttgaa agtcggggat 960
cccatggatg cagactcaca aatgggcctt aagtgttaacc agcgtgaaat tgataatgc 1020
gaccacatag tgcatgaagc catcaagcaa ggtgcaacgg ttgccactgg cggtaagacg 1080
gcaacagttg aaggcttcga aggcggctgt tggatgagc ccaccgtttt agtggatgtt 1140

aaacaagaca atatagtggg gcacgaagaa accttcggcc ccattctacc tatcgttaaa 1200
gtcagtagta tggaacaagc tatcgagttt tgtaacgaca gcatctatgg ttaagcgcgt 1260
tacgtacaca ccaaagctt tgccaatatt aatcaagcta tcagtgattt agaagtcggt 1320
gaagtgtata tcaaccgcgg aatgggtgag cagcatcagg gcttcacaa cggctggaaa 1380
caaagcggtt ttggcggiga agacggtaag ttggccttg agcaatactt ggaaaagaaa 1440
accgtttata tcaatgagc t 1461

<210> 7

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Q93p88

<400> 7

atgattatgt caacagtaaa aaattataaa cttacatcg atggagagtg gatagacgct 60
accaccggtg aatcacagga aatccttagc ccaacggacg aaactgtcgt ggggacagta 120
cagatgggtg tagaggcaga tgcacaaatt gccttagaag ctgcggaaag ggcacagaaa 180
cagtggaaaa aaglacctgc aagaaaacgc gcggatttgc tccgcacttt tgcggctgaa 240
atcaaagcca ataagaatca acttgctgaa ttacttgtga gagagcaggg taagcttttg 300
gcagtagcca aaatggaagt ggaagtgaca gcgtcattca tagagtatgc gtgtgacggt 360

gccagaagca tcgaaggiga tatcattcct tcagacaacc ctgctgagca tattatgatc 420
cacaaaattc cccggggagt tgtagtggct attacagcgt ggaatttccc attggtcttt 480
gcgggaagaa agcttgacc tgctttggta gccggcaact cgggtgtatt aaagcctacg 540

caggaaacac cgatagctac gcttgaactt ggaaatatag ccaataaggt aggtttacct	600
aaaggcctaa tcaatattct aacaggtcag ggaggtgtgc tgggtaatgc cctggtagcc	660
aacccgatta ccaaaatggt gtctatgaca ggtagtactc ctgcaggtca gcagatcttc	720
cgtacggcag cagaaaacct tatccatgtt cagttggagc tgggtggaaa ggcacatgt	780
attgtatttg atgatgtga tctggagcag gctgtagagg gtgcttttca ttcaagattt	840
gataactgcg gccaggtatg tacgagcaat gagcgactgt atgtccacga gagcatctac	900
aatgaattca tggagcgtt tatggagaaa gtcaaagggt tgaaattagg aaaccccatg	960
gatgcagcga cgaccattgg tctaagggtg aatgccaagg aagtagcgca tatggaacat	1020
ctcgtgacaa aaagcgtgga ggaaggagct accgtggcta taggaggtaa aaagcctcag	1080
ggtaaggcat ttgaaaaagg tcaactggtt gagcctacta tcttaacgga tgtaaagcag	1140
aatatgacca tagttcatga ggagtcctttt ggtccattc ttcggtaat taagttcagt	1200
gagttcaatg aggtcattgg atatgccaat gattgtgaat acggtttggc tgctatggta	1260
tttactaacg acatgaataa gatcatgcga ttgaacgatg agctcgaatt tggagaaatc	1320
tatatcaata gaggccatgg cgaacaacat cagggtattcc ataattggcta caaattgagt	1380
gggacaggtg gagaagatag taagtatgga ttgagcagt atatggagaa aaaaaccttc	1440
tatatcaaat acaaagcc	1458
<210> 8	
<211> 1458	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> D5EN35	
<400> 8	
ctactcgctg aagttcacat acatggtttt ctctcgcaga tagttctcgt agccgtactt	60
gccgtcttcg ccgccgttac cactgagctt gtagccattg tggaagccct gacgttgttc	120
accattggg cggttgacgt agatctgcc gaattcgagt tccagcacgg cgcgtggat	180
gaggcgcata tccttggga agaggaaggc ggccagaccg tagtcgtgt cgttggcgag	240
ttcgagggt tcttcgtagc tggagatctt catgatcggg ctgacgacac cgaagacttc	300
ttcgcgcata acgtccatgc tgttgcgca accggtcaga atggtgggt cgtaccagt	360
gcccttttca tatgggcac ctccggacg ctgccgccg caaaccaagc ttgctccttg	420
ctcaattgcc ttgtcgacga tcttaccat ggctcgggt tcgtaggcgt tgacctagg	480
gccgatgtg gtggatggat cgagtggtac accaatggc agtttcttta cctcatcgt	540

gtacttggcc aggaactcgt cgtagtgcct ctcgtggata tagaaacgtt cggggcaggt 600
gcagacctgg ccgctgttca aatggcggga aaccactgca gccgaaactg ctttatcgac 660
atcgccgtct tccagtagga tgaagggagc cttaccgccg agttcgaggc gaacagcagt 720
gagattgtct gcgctgtcct tgaattttg ctgaccgtt ttggtgtac cagtcatggt 780
aaccagcttg gtgagcttat tcttcacaa ttccgagccc atggtggaac cgccgccggt 840
tacgatgttg agcacgccat ccggaatgcc agcttctttg gcaagcttgc cgagttcgag 900

tacggcgcat ggagtcaccg atggtggctt gacgaccatc gagttgcctg ccgtcaatgc 960
cgggccgac ttgcggcaag cgagggcgag cgggaaattc caagcagcga tgccaacagt 1020
cacgccatag ggaaccttgt ggatccaaat gtgttcgttg ggcaggtcgg aggaatagat 1080
gtcgccttcc gtgcgacggg cggattgcgc tgggaagtig atgaagtctg cagagacgtc 1140
gatttcccc agcgcaagtt cataggtctt gccatttca atgctcagta ggcgagcgag 1200
gcgttcacgg ttgtctttaa ttaagtcagc aaacttgatt agtacgttgc cgcgttcgac 1260
cgcaggaatg gctgcccatt cgggttgggc ttgcttggcg ctttgcaggg cacgttcagc 1320

atcggcagcg tcgccgtcct gtacggtagc gatgactgct tcattggatg ggttctcgac 1380
ttcaacgac ttgccggaag tggcgtcgac ccattcgccg tgaatataca ttggttaggc 1440
ggtaattgta tcagtgtc 1458

<210> 9

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

ggcgggtggtg gcggcatgaa aattcataac atgaaaaatt ttatcaacg 49

<210> 10

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gttcttctcc ttgcgcccc tatcattcag caaaatacac tgtcttc 47

<210> 11

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

ggcgggtggtg gcggcatgac tgttcaagat ttacacttta aaaacaa

47

<210> 12

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gtttcttctcc ttgcgcccc tactaagcct cattgatata aacggtt

47