

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0049356 (43) 공개일자 2016년05월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>C12N 1/21</i> (2006.01) <i>C12N 11/16</i> (2006.01) <i>C12N 15/31</i> (2006.01) <i>C12N 15/56</i> (2006.01) <i>C12N 15/77</i> (2006.01) <i>C12R 1/15</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0146364 (22) 출원일자 2014년10월27일 심사청구일자 2014년10월27일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 한성욱 서울특별시 성북구 길음로 119, 209동 1503호 (길음동, 길음뉴타운(대우푸르지오아파트)) 김수정 서울특별시 중구 다산로18길 28, 101호 (신당동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 12 항

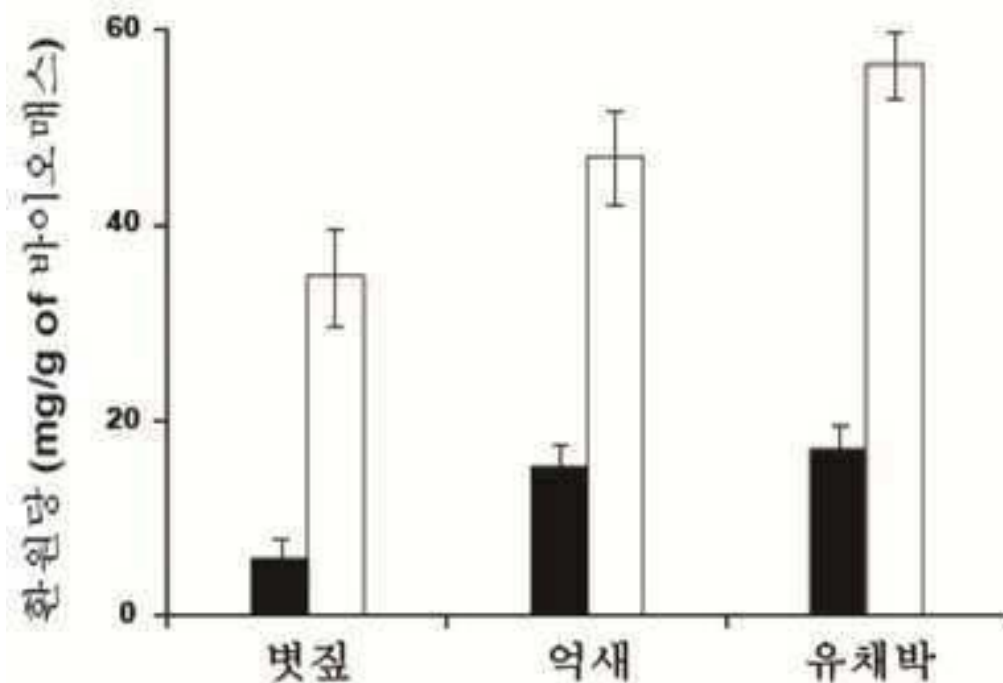
(54) 발명의 명칭 **셀룰로오스 분해효소 복합체가 세포표면에 고정화된 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 및 이를 통한 당화 방법**

(57) 요약

본 발명은 셀룰로오스 분해효소 복합체가 세포표면에 고정화된 재조합 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용한 바이오매스의 분해방법에 관한 것으로 더욱 자세하게는 (i) CelE(엔도-베타-1,4-글루칸아제-이)의 활성부위와 EngB(endo-베타1,4-glucanase B)의 도커린 부위가 연결된 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-

(뒷면에 계속)

대표도 - 도6



CelE)를 코딩하는 유전자; (ii) 코리네박테리움 유래 막고정단백질(Msc) 유전자; 및 (iii) 셀룰로솜 기본골격 소단위 소형 셀룰로오스 결합 단백질 에이 (miniCbpA) 유전자를 포함하는 유전자 구조체, 유전자 구조체와 베타글루코시다제 유전자와 EngB(endo-베타1,4-glucanase B)의 도커린 부위가 연결된 키메라 베타글루코시다제 유전자가 도입되어 있는 재조합 코리네박테리움 속 미생물 및 상기 미생물을 이용한 바이오매스의 분해방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 표면에 셀룰로오스 분해효소 복합체가 고정화된 재조합 코리네박테리움속 미생물은 셀룰로오스 분해효소의 열 안정성이 증가되고, 고정화되지 않은 셀룰라아제 복합체보다 바이오매스 분해 효율이 증가되어 발효산물 생산에 유용하다.

(72) 발명자

현정은

서울특별시 성북구 인촌로13길 18-21, 1층 (안암동2가)

전상덕

서울특별시 강동구 올림픽로71길 23-7, 203호 (천호동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A2005630

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 바이오매스 당화능을 가진 *Corynebacterium glutamicum*의 당대사에 관여하는 전사 조절자에 대한 유전체 및 단백질체 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

(i) CelE(엔도-베타-1,4-글루칸아제-이)의 활성부위와 EngB(endo-베타1,4-glucanase B)의 도커린 부위가 연결된 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-CelE)를 코딩하는 유전자;

(ii) 코리네박테리움 유래 막고정단백질(Msc) 유전자; 및

(iii) 셀룰로솜 기본골격 소단위 소형 셀룰로오즈 결합 단백질 에이 (miniCbpA) 유전자;

를 포함하는 유전자 구조체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-CelE)는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자 구조체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 막고정단백질 (Msc)은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자 구조체.

청구항 4

상기 셀룰로솜 기본골격 소단위 소형 셀룰로오즈 결합 단백질 에이 (miniCbpA)는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자 구조체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 유전자 구조체를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 코리네박테리움 발현용인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 7

제1항의 유전자 구조체와 베타글루코시다제 유전자와 EngB(endo-베타1,4-glucanase B)의 도커린 부위가 연결된 키메릭 베타글루코시다제 유전자가 도입되어 있는 재조합 코리네박테리움 속 미생물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 키메릭 베타글루코시다제는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 코리네박테리움 속 미생물.

청구항 9

제7항에 있어서, 제1항의 유전자 구조체를 포함하는 재조합백터와 베타글루코시다제 유전자와 EngB(endo-베타 1,4-glucanase B)의 도커린 부위가 연결된 키메라 베타글루코시다제 유전자를 포함하는 재조합 백터가 도입되어 있는 재조합 코리네박테리움 속 미생물.

청구항 10

제7항에 있어서, 코리네박테리움 글루타미코인 것을 특징으로 하는 재조합 코리네박테리움속 미생물.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항의 재조합 코리네박테리움 속 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-CelE)와 키메라 베타글루코시다제가 막고정단백질(Msc)에 결합된 셀룰로오스 분해효소 복합체를 재조합 코리네박테리움 속 미생물 표면에 고정화하는 방법.

청구항 12

제11항의 방법으로 그 표면에 셀룰로오스 분해효소 복합체가 고정화된 재조합 코리네박테리움속 미생물을 이용하여 셀룰로오스 함유 바이오매스를 처리하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 분해방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 셀룰로오스 분해효소 복합체가 세포표면에 고정화된 재조합 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용한 당화방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 (i) CelE(엔도-베타-1,4-글루칸아제-이)의 활성부위와 EngB(endo-베타1,4-glucanase B)의 도커린 부위가 연결된 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-CelE)를 코딩하는 유전자; (ii) 코리네박테리움 유래 막고정단백질(Msc) 유전자; 및 (iii) 셀룰로솜 기본골격 소단위 소형 셀룰로오스 결합 단백질 에이 (miniCbpA) 유전자를 포함하는 유전자 구조체, 유전자 구조체와 베타글루코시다제 유전자와 EngB(endo-베타1,4-glucanase B)의 도커린 부위가 연결된 키메라 베타글루코시다제 유전자가 도입되어 있는 재조합 코리네박테리움 속 미생물 및 상기 미생물을 이용한 바이오매스의 분해방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

자연에서 가장 풍부한 바이오 매스로 셀룰로오스를 들 수 있다. 이를 분해하는 효소는 섬유상 곰팡이나 여러 세균에서 생산되는데, 그 중 혐기성 균주인 클로스트리디아 계열 (Clostridia. sp.)에서 코헤신과 도커린이라는 도메인을 이용한 효소 복합체를 생산한다 (Jeong Eun Hyeon et al., Biotechnol Adv. (2013) 31:936-944). 효소 복합체는 골격 단백질(scaffolding protein)에 코헤신 도메인을 여러 개 가지고 있어서 도커린 도메인을 가진 효소들과 결합하여 이루어지고, 골격 단백질 (scaffolding protein)에 탄수화물 결합 부분(carbohydrate binding module; CBM)을 가지고 있어서 복합체를 형성하는 효소들의 효율을 늘려주는 특징을 가지고 있다. 효소 복합체를 형성할 수 있는 도커린을 가진 효소를 키메라 효소라고 부르는데, 특정 코헤신과 결합이 가능한 도커린 도메인을 재조합한 효소를 이용하여 여러 종류의 효소를 임의대로 붙일 수 있어서, 목적에 맞게 임의대로 효소를 선택하여 그 복합체를 형성할 수 있다. 이렇게 형성된 효소 복합체는 순차적으로 다당류를 먼저 작은 단위의 다당류로 분해하고 분해된 작은 단위의 다당류를 다음 효소가 바로 분해하여 더 작은 이당류 혹은 단당류로 분해할 수 있는 구성을 가지게 된다.

[0003]

이들 효소의 효율을 늘리는 또 다른 방법으로 고정화를 들 수 있는데, 고정화에는 나노 단위의 물질에 붙이거나 세포 표면의 막단백질을 이용하여 막단백질의 말단에 효소를 부착하여 세포표면에 효소를 부착하는 방법이

있다. 간편한 방법으로 지속적인 고정화 효과를 보기위해서 생물의 세포 표면에 직접 고정화를 시키게 되면, 효소의 반응을 통해 나온 생산물을 균주가 바로 이용할 수 있게 만드는 장점을 가지게 된다. 이것을 다른 말로 통합된 응용 생물학적 제법 (콘솔리데이티드 바이오 프로세싱, consolidated bio-processing)이라고 한다 (Jinying Yang et al., J Basic Microbiol. (2013) 53: 381-389).

[0004] 고정화에 사용될 수 있는, 발효과정에서 산업적으로 이용가능한 산물을 생산하는 균주로는 아미노산이나 비타민을 생산하는 코리네박테리움 글루타미쿰, 알콜을 생산하는 효모 등을 들 수 있다(Stefan Wieschalka et al., Microb Biotechnol. 6:87-102, 2013; Jia-Qing Zhu et al., Bioresour Technol.,169:9-18, 2014). 이 중 당화 효소를 가지지 않고, 산업균주로서 이용되고 있는 대표적인 균주가 코리네박테리움 글루타미쿰이라 할 수 있다. 코리네박테리움 글루타미쿰은 발효과정중 생산된 이차 생산물을 세포 밖으로 내보내기 위해 세포 표면에 여러 개의 막단백질을 가지고 있는데, 이들을 이용하여 외부 효소를 세포 표면에 고정화시키는 것이 가능하다.

[0005] 셀룰로오스 분해 효소의 복합체를 당화과정에 사용하게 되면, 기질의 중간 중간에 임의로 파고들어 결합을 끊는 endo의 특징과 이렇게 끊어져서 나온 이탄당을 일탄당으로 만들어 주는 beta-glucosidase의 특징에 의해 일탄당인 glucose의 양을 늘려서 균주가 직접 사용가능한 당화물을 많이 확보할 수 있게 된다. 스스로 당화를 할 수 없는 코리네박테리움 글루타미쿰에 당화효율이 뛰어난 효소복합체를 발현시킨다면, 효율적인 당화가 가능할 것이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 코리네박테리움 글루타미쿰에서 생산되는 막 고정단백질과, 셀룰로오스 분해효소 복합체를 함께 발현시키는 경우, 막 고정 단백질에 의하여, 셀룰로오스 분해효소 복합체가 세포 표면에 고정화되어, 당화효율이 뛰어난 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제조할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 셀룰로오스 분해 효소 복합체와 이를 고정화하는 막단백질의 유전정보를 포함하는 유전자 구조체 및 상기 유전자 구조체를 함유하는 재조합 벡터를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합벡터를 포함하는 재조합 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 코리네박테리움 속 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-CelE)와 키메릭 베타글루코시다제가 막고정단백질(Msc)에 결합된 셀룰로오스 분해효소 복합체를 재조합 코리네박테리움속 미생물 표면에 고정화하는 방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 표면에 셀룰로오스 분해효소 복합체가 고정화된 재조합 코리네박테리움속 미생물을 셀룰로오스 함유 바이오매스에서 배양하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 분해방법을 제공하는데 있다.

[0012]

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (i) CelE(엔도-베타-1,4-글루칸아제-이)의 활성부위와 EngB(endo-베타 1,4-glucanase B)의 도커된 부위가 연결된 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-CelE)를 코딩하는 유전자; (ii) 코리네박테리움 유래 막고정단백질(Msc) 유전자; 및 (iii) 셀룰로솜 기본골격 소단위 소형 셀룰로오스 결합 단백질 에이 (miniCbpA) 유전자; 를 포함하는 유전자 구조체 및 상기 유전자 구조체를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 유전자 구조체와 베타글루코시다제 유전자와 EngB(endo-베타1,4-glucanase B)의 도커된 부위가 연결된 키메릭 베타글루코시다제 유전자가 도입되어 있는 재조합 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 재조합 코리네박테리움 속 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 키메릭 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-CelE)와 키메릭 베타글루코시다제가 막고정단백질(Msc)에 결합된 셀룰로오스 분해효소 복합체를 재조합 코리네박테리움속 미생물 표면에 고정화하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 표면에 셀룰로오스 분해효소 복합체가 고정화된 재조합 코리네박테리움속 미생물을 셀룰

로오스 함유 바이오매스에서 배양하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 분해방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 표면에 셀룰로오스 분해효소 복합체가 고정화된 제조합 코리네박테리움속 미생물은 셀룰로오스 분해효소의 열 안정성이 증가되고, 고정화되지 않은 셀룰라아제 복합체보다 바이오매스 분해 효율이 증가되어 발효산물 생산에 유용하다.

[0018]

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 클로스트리디움 써모셀림의 엔도글루칸아제 E (CelE)와 베타글루코시다제 A (BglA)를 클로스트리디움 셀룰로보란스의 셀룰로오스 바인딩 프로테인 A (cellulose binding protein A, CbpA)의 코헤신과 이와 결합하는 도커린 도메인을 이용한 복합체 형성 및 고정화를 위한 막고정단백질(Msc)을 코딩하는 유전자를 pMT1s 벡터와 pKmobSacB Transposon 벡터에 삽입시킨 모식도이다. A는 pMT1s-cCelE-Msc-mCbpA 벡터의 모식도이며, B는 pKmobSacB Transposon-cBglA 벡터의 모식도이다.

도 2는 본 발명에 따른 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-CelE)와 키메라 베타글루코시다제가 막고정단백질(Msc)에 결합된 셀룰로오스 분해효소 복합체가 세포표면에 고정된 제조합 코리네박테리움 글루타미쿰을 이용한 바이오매스의 분해과정을 나타낸 모식도이다.

도 3은 셀룰라아제 복합체의 코리네박테리움 글루타미쿰 세포 표면에서의 발현을 확인하기 위하여 원심분리를 통한 세포 fraction과 그 상청액사이의 효소 활성을 비교한 그래프이다. A는 고정화된 두 효소 중 엔도글루칸아제의 활성을 확인한 것이고, B는 고정화된 두 효소 중 베타글루코시다제의 활성을 확인한 것이다.

도 4는 각 효소에 형광항체를 붙여서 세포 외부에서 발광하는지 면역 형광 표지법을 이용한 셀룰로오스 분해 효소 복합체를 발현하지 않는 wild-type과 비교하는 현미경관찰을 한 것이다. 녹색은 FITC의 발광을 나타내고, 빨간색은 Texas Red의 발광을 나타낸 것으로, 녹색은 His-Tag를 말단에 가지고 있는 miniCbpA가 세포표면에 부착된 것을 나타내며, 빨간색은 FLAG-Tag를 말단에 가지고 있는 cBglA가 세포표면에 부착된 것을 나타내는 것이다. 두 색이 한 세포에 동시에 나타나는 것은 상반전 (phase contrast)을 통해 같은 위치에 세포가 존재하는 것을 나타내었다.

도 5는 코리네박테리움 글루타미쿰의 세포 표면에 고정화된 셀룰라아제 복합체와 고정화되지 않고, 세포 외부에 발현된 셀룰라아제 복합체의 열안정성을 비교한 그래프이다. A는 엔도글루칸아제 활성의 열 안정성을 비교한 것이고, B는 베타글루코시다제 활성의 열 안정성을 비교한 것이다. 흰색의 세모는 고정화된 다기능 효소 복합체의 결과이고, 검은색의 네모는 고정화되지 않은 다기능 효소 복합체의 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 코리네박테리움 글루타미쿰의 세포 표면에 고정화된 셀룰라아제 복합체와 고정화되지 않고, 세포 외부에 발현된 셀룰로오스 분해 효소 복합체의 바이오매스 분해를 통해 얻은 환원당의 양을 바이오매스 그램 (gram)당으로 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0021] 본 발명의 용어 "엔도글루칸아제(endoglucanase)"는 셀룰로오스에서 β -1,4-D-글리코시딕 결합을 가수분해하여 이탄당 이상의 포도당 폴리머 (cellobiose, cellotriose 등)의 생성을 촉매하는 효소를 의미하며, 효소 엔도-베타-1,4-글루칸아제(endo- β -1,4-glucanase, EC 3.2.1.4, endoglucanase)를 포함하는 의미이다.

[0022] 본 발명의 용어 "베타글루코시다제 (β -glucosidase, EC 3.2.1.21)"는 이탄당인 셀로바이오스의 β -1,4-D-글리코시딕 결합을 가수분해하여 포도당 (glucose, 글루코오스)의 생성을 촉매하는 효소를 의미한다.

[0023] 발명의 용어 "셀룰로오스 바인딩 프로테인 A (cellulose binding protein A)"는 클로스트리디움 셀룰로보란스

(*Clostridium cellulovorans*)에서 유래한 단백질로 셀룰로솜을 형성하는 단백질의 요소로써 골격을 이루는 단백질(scaffolding protein)을 의미한다. 상기의 셀룰로오스 바인딩 프로테인은 셀룰로오스를 인식하여 강력하게 결합하는 특징을 지닌 탄수화물 결합 부분(carbohydrate binding module)을 가지고 있어서 상기의 단백질에 결합하는 효소가 탄수화물 혹은 셀룰로오스에 접근이 용이하게 해준다. 상기의 셀룰로오스 바인딩 프로테인에는 코헤신 도메인이 있는데, 이는 셀룰로솜 생산 균주의 효소가 가지고 있는 도커린 도메인과 특정한 결합을 이루고 있어서 코헤신의 갯수에 따라 결합하는 효소의 수가 결정된다.

[0024] 발명의 용어 "메카노센서티브 채널(mechanosensitive channel)"은 코리네박테리움 글루타미쿰 세포질의 막 부분을 관통하여 고정되어 있는 단백질로 이온 차지(ion charge)에 민감하게 반응하여 여러 개의 도메인이 뭉쳐서 중간에 구멍을 만들어 주는 특징을 지니고 있으며, C-말단 부분이 세포 외부로 뻗어있어서 외부로 발현된 단백질과 연결되어 결합된 형태를 형성하는 것이 가능하다.

[0025] 본 발명의 용어 "콘솔리테이티드 바이오 프로세싱(consolidated bio-processing)"은 하나의 균주에서 자연발생적인 당화과정과 발효과정이 바로바로 이어질 수 있도록 재조합한 균주를 말한다.

[0026] 코리네박테리움 글루타미쿰은 발효산업에서 널리 이용되는 균주이지만, 세포표면이나 외부로 분비하는 당화효소를 가지지 않아, 셀룰로오스를 대량함유하고 있는 바이오매스를 이용한 발효에는 그 적용이 제한되고 있었다.

[0027] 코리네박테리움 글루타미쿰은 발효과정중 생산된 이차 생산물을 세포 밖으로 내보내기 위해 세포 표면에 여러 개의 막단백질을 가지고 있는데, 이들을 이용하여 외래 효소를 세포 표면에 고정화시키는 것이 가능하다(Chikako Yamashita et al., *Biosci Biotechnol Biochem.* (2013) 77(5): 1008-1013). 본 발명에서는 N-말단은 세포막에 고정되어 있고, C-말단은 세포막 외부에 노출되어 외부로 빠져나온 막고정단백질을 이용하면 셀룰로오스 분해능을 가지는 외부효소를 코리네박테리움 글루타미쿰의 세포표면에 고정시키기에 적절할 것으로 판단하였다.

[0028] 따라서, 일관점에서, 본 발명은 (i) CelE(엔도-베타-1,4-글루칸아제-이)의 활성부위와 EngB(endo-베타1,4-glucanase B)의 도커린 부위가 연결된 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이(chimera-CelE)를 코딩하는 유전자; (ii) 코리네박테리움 유래 막고정단백질(Msc) 유전자; 및 (iii) 셀룰로솜 기본골격 소단위 소형 셀룰로오스 결합 단백질 에이(miniCbpA) 유전자; 를 포함하는 유전자 구조체 및 상기 유전자 구조체를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에서, 막고정단백질(Msc) 유전자는 메카노센서티브 채널(mechanosensitive channel)을 형성하는 단백질을 코딩하는 유전자로, 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 Msc (NCgl1221, NCBI reference sequence no. NC_003450.3), 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 유래의 yggB(NCBI reference sequence; YP_225559.1; NC_006958.1), 대장균과 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 MscL (mechanosensitive channel large conductance), 대장균 유래의 MscM (mechanosensitive channel large conductance), 대장균과 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 MscS (mechanosensitive channel small conductance)을 사용할 수 있으며, 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 cytochrome c oxidase subunit(ctaE, ctaD, NCgl2112 등), Cytochrome c biogenesis protein(ccsA, NCgl0425 등), ABC type sugar transporter (cg1100, cg2939, NCgl0925, cg1753, MsiK, cg0834, PtsS 등), Methionine transport (MetN 등), peptide transport (Cg2181 등), glutamate transport (ItsA, GluABCD 등), succinate transport, lysine transport 등, amino acids transport 등을 코딩하는 유전자를 사용할 수도 있다.

[0030] 바람직하게는 메카노센서티브 채널(mechanosensitive channel)을 형성하는 단백질을 코딩하는 유전자로, 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 Msc (NCgl1221, NCBI reference sequence no. NC_003450.3)를 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 2 아미노산 서열로 표시되는 막고정단백질을 코딩하는 유전자를 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명의 도커린과 코헤신의 결합에는 셀룰로솜(cellulosome)을 생산하는 균주의 타입 I 도커린과 코헤신이라면 제한없이 사용할 수 있으나, 종간 특이성을 가지므로, 같은 종의 균주에서 유래된 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0032] 도커린과 코헤신의 조합은 클로스트리듐 셀룰로보란스(*Clostridium cellulovorans*) 유래의 도커린 타입I인 EngH, EngK, ExgS, EngL, ManA, EngM 및 EngN 과 클로스트리듐 셀룰로보란스 유래의 cbpA의 코헤신 타입 I을 사용할 수 있다.

[0033] 또한, 클로스트리듐 셀룰로라이티쿰(*Clostridium cellulolyticum*) 유래의 Cel48F, Cel9C, Cel9G, Cel9E,

Cel9H, Cel9J, Man5K, Cel9M, Cel5N의 도커린 타입I과 클로스트리듐 셀룰로라이티쿰 유래의 CipC의 코헤신 타입 I(1~9)인 을 사용할 수 있다.

- [0034] 또한, 클로스트리듐 조수이(*Clostridium josui*) 유래의 인 Cel48A, Cel8A, Cel9E, Cel9F, Cel9G, Cel9H, 및 Man5A의 도커린 타입 I과 클로스트리듐 조수이 유래의 CipA의 코헤신 타입 I을 사용할 수 있다.
- [0035] 클로스트리듐 써모셀룸(*Clostridium thermocellum*) 유래의 CelS, CelK, CelD, CelN, CelF, CelO, CelB 및 CelG의 도커린 타입 I과 클로스트리듐 써모셀룸 유래의 CipA의 코헤신 타입 I을 사용할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이는 Cazy number EC 3.2.1.4로 나타낼 수 있는 모든 endoglucanase 또는 베타-1,4-D glucanase를 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들면, *Thermobifida fusca* 유래의 Cel9A, *C. cellulovorans* 유래의 EngD, *C. thermocellum* 유래의 Cel9I, *Trichoderma reesei* 유래의 EGI 등에 도커린을 퓨전시켜 사용할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-CelE)는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 셀룰로솜 기본골격 소단위 소형 셀룰로오스 결합 단백질 에이 (miniCbpA)는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 벡터는 코리네박테리움 발현용인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 유전자 구조체와 베타 글루코시다아제 유전자와 EngB(endo-베타1,4-glucanase B)의 도커린 부위가 연결된 키메라 베타글루코시다아제 유전자가 도입되어 있는 재조합 코리네박테리움 속 미생물에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에서, 상기 베타글루코시다아제는 ; Cazy number EC 3.2.1.21로 표현되는 모든 가진 모든 베타-glucosidase 또는 베타-D glucosidase, cellobiase를 사용할 수 있으며, 예를 들면, *Saccharomycopsis fibuligera* 유래의 Bgl1, *Aspergillus oryzae* 유래의 BglA 등 외부로 발현이 가능한 베타-glucosidase 모두를 도커린 부위와 융합시켜 키메라 형태로 사용할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 키메라 베타글루코시다아제는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 코리네박테리움 속 미생물은 상기 유전자 구조체를 포함하는 재조합벡터와 베타글루코시다아제 유전자와 EngB(endo-베타1,4-glucanase B)의 도커린 부위가 연결된 키메라 베타글루코시다아제 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 도입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 코리네박테리움 글루타미쿰인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 재조합벡터는, 그 자신이 숙주 속에서 자율복제 가능한 동시에, 프로모터, 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 유전자 또는 셀룰로솜 기본골격소단위 소형 셀룰로오스 결합 단백질 에이 유전자를 함유하는 DNA 및 전사종결서열 등의 발현에 필요한 구성을 가진 것이 바람직하다. 본 발명에 사용된 발현벡터로서는 대장균-코리네박테리움 글루타미쿰 셔틀 발현 벡터(*E.coli*-*C. glutamicum* shuttle expression vector)인 pMT1-s를 사용하였으나 상기의 요건을 만족하는 발현 벡터이면 어느 것이나 사용가능하다.
- [0045] 프로모터는, 숙주속에서 발현할 수 있는 것이면 어느 것이나 사용가능하고, 예를 들면, trp프로모터, trc프로모터, tac프로모터, lac프로모터, PL프로모터, PR프로모터, T7프로모터, T3프로모터 등의 대장균이나 파지 등에 유래하는 프로모터를 사용할 수 있다. 세균의 재조합 DNA의 도입방법으로서, 상기한 염화칼슘법이나 일렉트로포레이션법 등이 이용가능하다.
- [0046] 또한, 재조합벡터에는, 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 또는, 균체 밖으로의 분비를 목적으로 한 시그널을 코딩하는 유전자 등을 가진 것도 가능하다.
- [0047] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 재조합 코리네박테리움 속 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimera-CelE)와 키메라 베타글루코시다아제가 막고정단백질(Msc)에 결합된 셀룰로오스 분해효소 복합체를 재조합 코리네박테리움속 미생물 표면에 고정화하는 방법에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명에서는 다기능 셀룰로오스 분해 효소 복합체를 당화능이 없는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)에서 발현 및 균주의 세포 표면에 부착함으로써 효소 복합체의 열 안정성과 당화

효율을 극대화하는 것으로, 코리네박테리움 글루타미쿰의 세포 표면에 고정화된 셀룰로오스 분해 효소 복합체는 60-80℃에서 고정화되지 않은 셀룰로오스 분해 효소 복합체보다 열안정성을 나타내고, 바이오매스의 당화 효율에서도 3.1-6.0 배의 상승효과를 나타내었다.

[0049] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법으로 그 표면에 셀룰로오스 분해효소 복합체가 고정화된 재조합 코리네박테리움속 미생물을 이용하여 셀룰로오스 함유 바이오매스를 처리하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 분해 방법에 관한 것이다.

[0050] 본 발명에서 상기 "처리"는 바이오매스와 본 발명의 재조합 코리네박테리움 속 미생물을 반응시키는 것을 포함한다.

[0051] 본 발명에서는 토양 마이크로박테리움인 코리네박테리움 글루타미쿰의 바이오매스 활용율을 늘리기 위하여 두 종류의 바이오매스 분해 효소가 동시에 반응할 수 있도록 복합체를 형성하였고, 이의 효율을 더욱 높이기 위하여 세포 표면에 부착함으로써 복합체에 포함되어 있는 CBM의 도움을 받아 다당류 물질이 세포 표면에 연달아 부착되어 있는 효소들에 가까이 다가갈 수 있도록 하여 당화 효율에 있어 상승효과를 낼 수 있도록 하였다(도 2).

[0052] 본 발명에서는 당화가 불가능하지만, 발효과정을 통해 아미노산이나 비타민의 생산이 가능한 코리네박테리움 글루타미쿰과 같은 균주에 당화효율이 늘어난 재조합 단백질을 형질전환하여 이형화 발현 (heterologous expression)시키면, 위와 같은 콘솔리테이트 바이오 프로세싱의 효과를 기대할 수 있다. 또한, 고정화과정은 효소들을 응집시켜서 안정성을 강화하는 효과를 낼 수 있게 되므로, 두 가지 효과를 하나의 방법으로 얻어낼 수 있게 된다.

[0053] 실시예

[0054] 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. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0055] **실시예 1: 엔도글루칸아제와 베타글루코시다제의 복합체 및 막고정단백질의 유전자 증폭**

[0056] 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 막고정단백질인 Msc (NCBI reference sequence no. NC_003450.3)의 유전자 염기서열을 기초로 하여 정방향 프라이머 (Msc f 5'-ATATGGATCCCATGCGTATTATCAAGCGC-3'; 서열번호 9)와 역방향 프라이머 (Msc r 5'-ATATGGTACCCACCGTAGTGGCA-3'; 서열번호 10)를 이용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 이용하여 유전자를 증폭시켰다. 상기의 프라이머들은 5' 부분에 제한효소의 서열을 포함하도록 설계되었으며, 각 제한효소는 밑줄로 표시하였다. 이렇게 증폭된 Msc는 BamHI과 KpnI으로 절단한 후 본 연구실에서 제작한 대장균-코리네박테리움 글루타미쿰 셔틀 발현 벡터 (E.coli-C. glutamicum shuttle expression vector) 인 pMT1-s에 라이게이션(ligation) 시켜 통상적인 형질전환방법에 의하여 DH5α에 형질전환하였고, sequencing을 통해 염기서열을 확인하였다.

[0057] 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로좀 기본골격소단위인 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이(miniCbpA) 유전자를 클로닝하기 위하여 miniCbpA의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 와 역방향 프라이머(mCbpA f 5'-CCCGGATCCGCGACGACATCATCAATGTC-3'(서열번호 11); mCbpA r 5'-CCCGGTACCTCATATAGGATCTCCAATATTTA3'(서열번호 12))를 이용하여PCR로 증폭한 뒤, BamHI과 KpnI으로 절단하여 pMT1s에 삽입한 뒤 6개의 히스티딘 꼬리 (His-tag)를 달기 위해 프라이머 (mCbpA-His f 5'-CCCGGTACCGCGACGACATCATCAATGTC-3'(서열번호 13); mCbpA-His r 5'-CCCGCGCGCGCTCAATGATGATGATGATGATGTAATAGGA-3' (서열번호 14))를 이용하여 PCR로 증폭 시킨 뒤, KpnI과 NotI으로 절단하여 pMT1s-Msc에 삽입 하여 pMT1s-Msc-mCbpA 유전자를 얻게 되었다. 프라이머의 밑줄 친 부분이 제한효소를 포함하는 부분이고, 굵은 글씨로 쓰여진 부분이 히스티딘 꼬리 부분이다.

[0058] 클로스트리디움 유래 씨모셀럼의 CelE (GenBank accession no. M22759.1)와 셀룰로보란스의 EngB (GenBank accession no. M75706.1)의 유전자 염기서열을 기초로 하여 CelE의 활성부분(catalytic domain, CD)과 EngB의 도커린 부분(dockerin, doc)을 프라이머 (CelE CD f 5'-ATATGGATCCGTCGGAACAAAGCTTTTG-3'(서열번호 15); CelE CD r 5'-TTTGTTAACATCACCGTACAAAATATTGCTGTC-3'(서열번호 16); EngBdoc f 5'-ATTTTGTACGGTGATGTTAACAAGATGGAAGG-3' (서열번호 17); EngBdoc r 5'-ATATGCGCGCGTCATAAAAGCATTTTTTAAG-

3' (서열번호 18))를 이용하여 PCR로 유전자를 증폭시켰다. 프라이머에는 상기 두 부분의 중간에 겹치는 부분 (프라이머에서 이텔릭체로 표기하였음)을 집어넣어 중첩 (overlap) PCR이 가능하도록 만들었고, 이렇게 대량 증폭된 상기 유전자를 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 통해 overlap PCR로 하나의 키메릭 엔도글루칸아제 (chimeric CelE, cCelE)를 얻었다. 대량으로 증폭한 cCelE를 BamHI과 NotI으로 절단한 후 본 연구실에서 제작한 대장균-코리네박테리움 글루타미쿰 셔틀 발현 벡터 (E.coli-C. glutamicum shuttle expression vector) 인 pMT1s에 라이게이션(ligation)시켜 통상적인 형질전환방법에 의하여 대장균 DH5α에 형질전환하였고, 염기서열을 sequencing을 통하여 확인하였다. 이렇게 얻어진 pMT1s-cCelE 유전자를 pMT1s-Msc-mCbpA 플라스미드에 끼워넣기 위하여 제한효소를 달리 넣은 프라이머 (cCelE f 5'-CTGCCATGGTGGTCAGGGATT-3'(서열번호 19); cCelE r 5'-GCCTCGAGTCAGATCTTATCGTC-3'(서열번호 20))를 합성하여 PCR을 통해 증폭시키고, NcoI과 XhoI으로 절단하여 삽입하였다. 이를 통해 pMT1s-cCelE-Msc-mCbpA 유전자를 얻었다. 상기 재조합 벡터 pMT1s-cCelE-Msc-mCbpA는 도 1(A)에 나타내었다.

[0059] 클로스트리디움 유래 씨모셀럼의 BglA (GenBank accession no.X60268.1)는 상기위 cCelE와 마찬가지로, EngB dockerin과 overlap PCR을 통해 키메릭 베타글루코시다제를 형성하였다. 이를 위해 프라이머 (cBglA P1 5'-GCGCGGTACCGCATGTGCAAGATAACTTTCCCTACGTGACGTACCAGCACA-3'(서열번호 21); cBglA P2 5'-CAGCGGATCCAAAACCGTTGTTTTGATTACTTCTTGTACCAG-3'(서열번호 22); cBglA P3 5'-CAACGGTTTTGGATCCGCTGGCTCCGCTGCTGGTTCTGGGAATTCGATGTTAACAAGATGGAAAGGTAATGCTATCGATT-3'(서열번호 23); cBglA P4 5'-ATATGCGGCCGCTCAGATCTTATCGTCGTCATCCT-3'(서열번호 24))을 이용하여 증폭하였고, KpnI과 NotI으로 절단하여 벡터 pKmobsacB Transposon에 삽입하였다. 상기 pKmobsacB Transposon-cBglA 재조합 벡터는 도면 1(B)에 도식하였다. P3 프라이머는 BglA와 EngB의 dockerin domain의 결합을 위해 linker부분을 일부 포함하고 있으며, 이는 서열번호 4의 449~460 부위이며, EngB dockerin부분은 서열번호 4의 461~513부위이다.

[0060] 실시예 2: 엔도글루칸아제와 베타글루코시다제의 복합체 및 막고정단백질의 유전자 클로닝

[0061] 실시예 1에서 형성된 pMT1s-cCelE-Msc-mCbpA 플라스미드와 pKmobsacB Transposon-cBglA 플라스미드를 순차적으로 코리네박테리움 글루타미쿰에 형질전환 하였다. 형질전환 방법으로 전기침공법 (electroporation)과 46℃에서의 가열 충격 (heat shock)법을 동시에 사용하였다. 각 재조합 벡터는 암피실린과 카나마이신의 각기 다른 선택적 마커를 가지고 있어서 이를 통해 형질 전환 여부를 확인할 수 있었다.

[0062] 실시예 3: 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체의 세포 fraction의 효소 활성 측정

[0063] 세포표면에 효소가 잘 부착되었는지 확인하기 위해 30℃에서 48시간 키운 코리네박테리움 글루타미쿰 형질 전환체와 wild-type 균주를 각 각 2,500 분당회전수 (revolutions per minute, rpm)를 10분간 원심분리하여 세포 추출액을 세포와 배양액으로 나눈 뒤 세포 고체 덩어리를 염산으로 적정한 pH8의 트리스 버퍼와 섞어서 상청액과 비교하였다.

[0064] 엔도글루칸아제 효소 활성분석은 1.0%의 카복시메틸셀룰로오스 (Carboxymethyl cellulose, CMC)와 60℃에서 30분간 반응시킴으로써 측정하였다. 효소활성은 디나이트로살리실릭산 (dinitrosalicylic acid, DNS)를 첨가하여 5분간 가열함으로써 종료하였다. 환원당(reducing sugar)의 양은 밀러의 방법(G. L. Miller, Anal. Chem. (1959) 31:426-428)을 이용하여 540nm에서 측정한 흡광도를 이용하여 계산하였고, 1U은 1분 동안 효소에 의해 환원된 1μM의 포도당 (glucose)을 생산하는데 필요한 효소의 농도로 정의하였고, 도 3(A)에 도식화 하였다.

[0065] 베타글루코시다제 효소 활성분석은 5 mM 파라 나이트로프로필 글루코피라노시드 (pNPG)와 60℃에서 30분간 반응시킴으로써 측정하였다. 효소활성은 이전 논문(B. Kaur et al., Bioresour. Technol. (2014) 156: 100-107)의 방법에 따라 0.5M 중탄산 나트륨 (Na2CO3)을 첨가하여 종료하였다. 확인은 생산된 파라 나이트로 페놀 (pNP)의 양을 405nm에서 측정한 흡광도를 이용하여 계산하였고, 1U은 1분 동안 효소에 의해 환원된 1μM의 pNP를 생산하는데 필요한 효소의 농도로 정의하였고 도 3(B)에 나타내었다.

[0066] 이를 통한 비교에서 코리네박테리움 글루타미쿰 wild-type에서 거의 활성이 나타나지 않은 반면에, 형질전환체의 세포 덩어리 부분에서 세포 건조 질량 g당 151.1 U의 엔도글루칸아제 활성이 나타났고, 세포 건조 질량 g당 35.9 U의 베타글루코시다제 활성이 나타난 것으로 보아 효소들이 세포 표면에 잘 부착되어 있음을 확인하였다.

[0067] 실시예 4: 콘포칼 (confocal) 현미경을 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체의 세포 표면에 부착된 효소의 형광 표지 관찰

[0068] 코리네박테리움 글루타미쿰의 세포 표면에 엔도글루칸아제와 베타글루코시다제 복합체가 하나의 세포에 함께 부착되어 있는지를 시각적으로 확인하기 위하여 벡터 내에 히스티딘 꼬리와 OctA 펩타이드를 함께 발현시키고, 특정 단백질에 형광 표지를 붙여 항원-항체 반응을 이용한 발광을 현미경을 통해 관찰이 가능하도록 만들었다. 히스티딘 꼬리를 mCbpA의 C-말단에 붙이고, 이에 반응하는 1차 항체로 토끼 혈청에서 뽑은 이뮤노글로불린 G (immunoglobulin G, IgG)와 2차 항체로 1차 항체에 반응하고 텍사스 레드 (Texas Red)형광 염색약이 붙어있는 쥐의 혈청을 이용하여 발광이 가능하게 만들었다. OctA 펩타이드는 cBglA의 C-말단에 붙여서 상기의 펩타이드에 반응하는 1차 항체로 쥐 혈청에서 뽑은 IgG1과 2차 항체로 1차 항체에 반응하고 fluorescein isothiocyanate (FITC) 녹색 형광 염색약이 붙어있는 토끼의 혈청을 이용하여 발광이 가능하게 만들었다. 이를 코리네박테리움 글루타미쿰의 wild-type과 비교하여, 두 효소가 하나의 세포 표면에 함께 발현해 있음을 형광 현미경 (본 실시예에서는 confocal laser-scanning microscope LSM 5 Exciter (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany)를 사용하였다.) 상에서 두 가지 색깔로 구분하여 확인할 수 있으며, 하나의 세포에서 발현하는지를 상 대조 (phase contrast)그림에서 확인할 수 있다.

[0069] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 빨간색과 녹색의 형광 염색이 형질전환체의 하나의 세포 표면에 동시에 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 반면, wild-type은 상 대조 그림에서 세포가 분명하게 보이지만, 형광 염색은 전혀 되지 않은 것으로, 형광 염색약이 세포 표면에 임의로 붙어서 발광하는 것이 아님을 확인해 주었다. 이를 통해, 효소 복합체가 성공적으로 세포 표면에 부착된 것을 확인할 수 있다.

[0070] 실시예 5: 코리네박테리움 글루타미쿰 세포표면에 고정화된 효소 복합체의 열 안정성 측정

[0071] 열 안정성을 조사하기 위하여, 효소복합체를 세포표면에 부착시킨 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체의 세포 추출액과 Msc를 가지지 않는 pMT1s-cCelE-mCbpA를 형질전환한 코리네 박테리움 글루타미쿰 형질전환체의 세포 배양액 상청액을 40-70℃의 여러 온도에서 30분간 노출시킨 후 얼음에서 10분간 열을 식힌 뒤에 기질인 1.0% CMC와 5mM pNPG를 각 각 첨가하여 60 ℃에서 반응시킴으로써 효소활성을 측정하였다. 엔도글루칸아제의 열안정성은 도 5(A)에 나타내었으며, 베타글루코시다제는 도 5(B)에 최고 활성을 100%로하여 그 비교 활성을 나타내었다.

[0072] 열 안정성 시험 결과, 60℃이후에서 효소 복합체를 고정화시킨 형질전환체에서 그렇지 않은 형질전환체보다 유의적으로 높게 나타났다. 열 안정성 시험 결과, 40℃에서부터 효소 복합체를 고정화시킨 형질전환체에서 그렇지 않은 형질전환체보다 상승효과가 있음이 나타났다.

[0073] 실시예 6: 코리네박테리움 글루타미쿰 세포표면에 고정화된 효소 복합체의 바이오매스 당화 효율 측정

[0074] 바이오매스를 직접적으로 당화하는 효율의 상승효과를 확인하기 위하여 30℃에서 48시간 발현하여 세포표면에 부착한 효소 복합체의 형질전환체와 세포 표면에 부착하지 않은 효소 복합체의 형질전환체를 각 대표 섬유소 분해 효소활성인 엔도글루칸아제를 기준으로 동일한 2U를 계산하여 0.5g의 바이오매스와 반응시켰다. 바이오매스는 강염기 물질과 열로 전 처리한 것으로 이를 통해 셀룰로오스를 더 많이 효소에 노출시켜 당화 효율을 늘릴 수 있도록 도와 줄 수 있다. 본 실시예에서는 상기와 같이 전 처리한 볏짚, 억새 그리고 유채박을 바이오매스로 사용하였으며, 효소를 포함하는 형질전환체 (세포 표면에 부착한 효소 복합체의 경우)혹은 그 상청액 (세포 표면에 부착하지 않은 효소 복합체의 경우)과 효소의 최고 활성온도인 60℃에서 72시간 동안 오랜 시간 반응하여 그 차이를 확실히 구분 할 수 있도록 하였다.

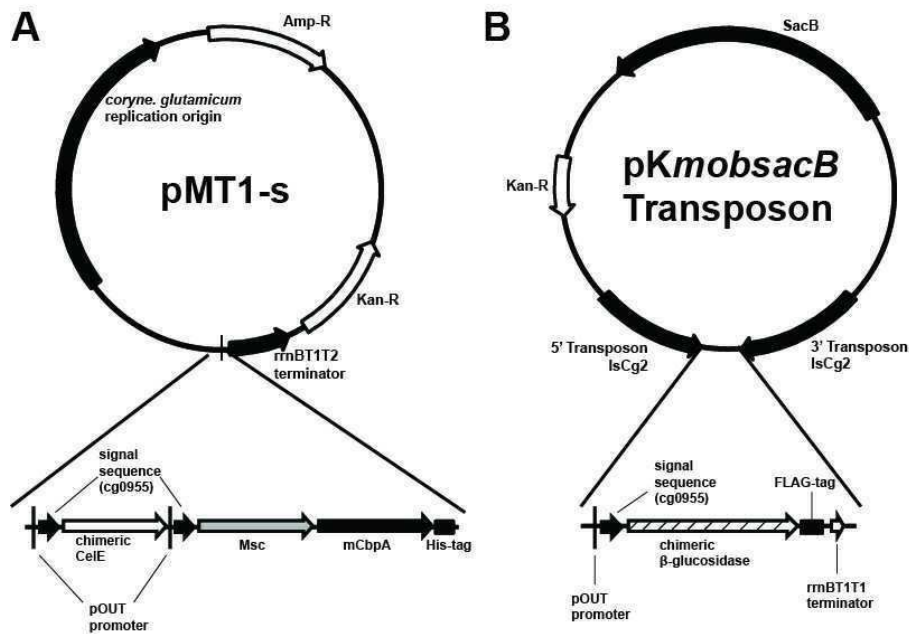
[0075] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 효소 복합체를 세포 표면에 부착하지 않은 경우보다 효소 복합체를 세포 표면에 부착한 경우 3.1에서 6.0배 가량 높은 당화 효율을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 세포 표면에 부착하는 것이 당화 효율을 늘리는데, 명확한 기능을 한 것으로 보인다.

[0076] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고

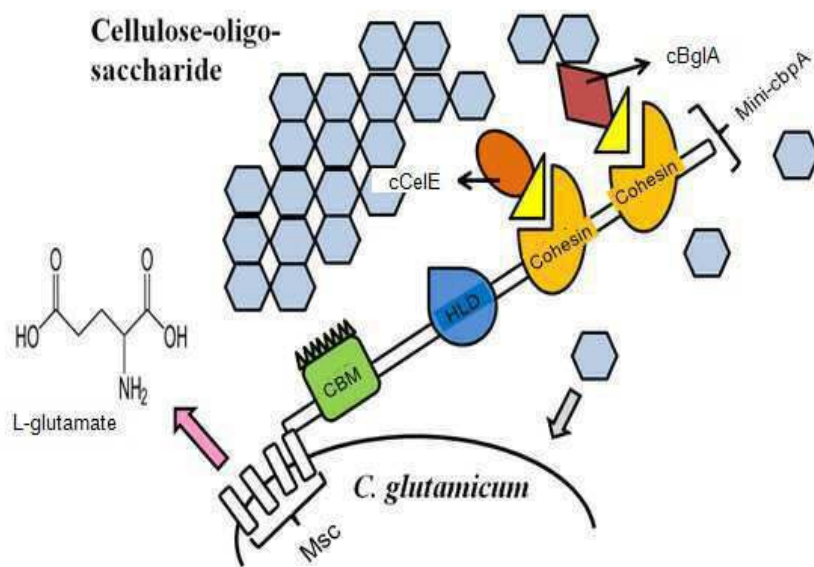
할 것이다.

도면

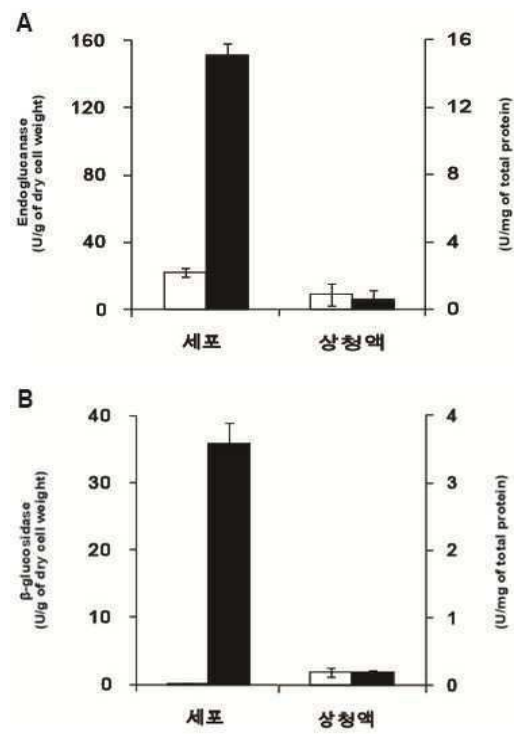
도면1



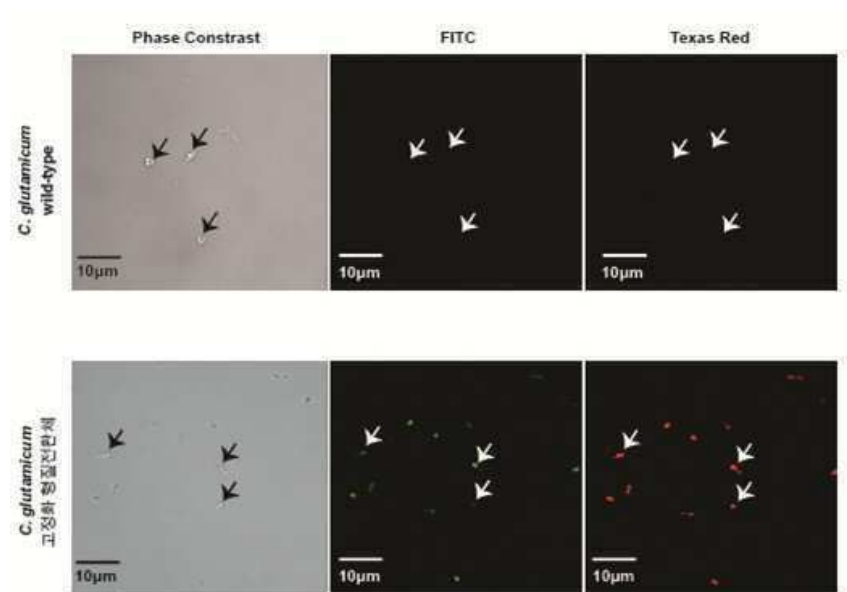
도면2



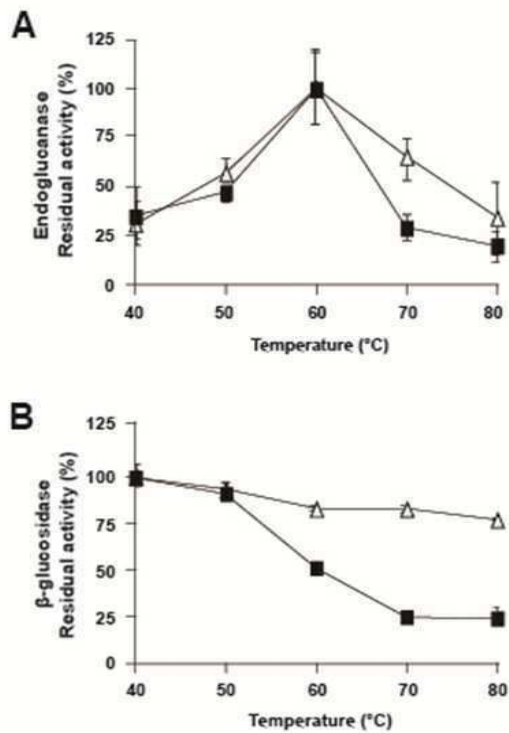
도면3



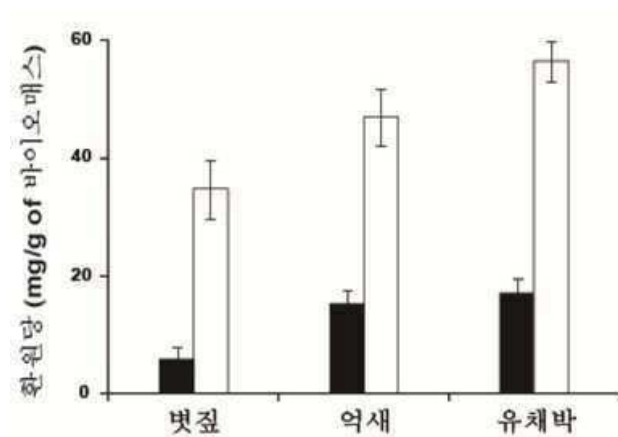
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
- <120> Recombinant *Corynebacterium glutamicum* immobilized
multi-functional cellulolytic enzyme complex and method for
saccharification with the same
- <130> P14-B281
- <160> 24
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> Clostridium sp.
 <400> 1
 Ser Gly Thr Lys Leu Leu Asp Ala Ser Gly Asn Glu Leu Val Met Arg
 1 5 10 15
 Gly Met Arg Asp Ile Ser Ala Ile Asp Leu Val Lys Glu Ile Lys Ile
 20 25 30
 Gly Trp Asn Leu Gly Asn Thr Leu Asp Ala Pro Thr Glu Thr Ala Trp
 35 40 45
 Gly Asn Pro Arg Thr Thr Lys Ala Met Ile Glu Lys Val Arg Glu Met
 50 55 60
 Gly Phe Asn Ala Val Arg Val Pro Val Thr Trp Asp Thr His Ile Gly
 65 70 75 80
 Pro Ala Pro Asp Tyr Lys Ile Asp Glu Ala Trp Leu Asn Arg Val Glu
 85 90 95
 Glu Val Val Asn Tyr Val Leu Asp Cys Gly Met Tyr Ala Ile Ile Asn
 100 105 110
 Leu His His Asp Asn Thr Trp Ile Ile Pro Thr Tyr Ala Asn Glu Gln
 115 120 125
 Arg Ser Lys Glu Lys Leu Val Lys Val Trp Glu Gln Ile Ala Thr Arg
 130 135 140
 Phe Lys Asp Tyr Asp Asp His Leu Leu Phe Glu Thr Met Asn Glu Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Val Gly Ser Pro Met Glu Trp Met Gly Gly Thr Tyr Glu Asn
 165 170 175
 Arg Asp Val Ile Asn Arg Phe Asn Leu Ala Val Val Asn Thr Ile Arg
 180 185 190
 Ala Ser Gly Gly Asn Asn Asp Lys Arg Phe Ile Leu Val Pro Thr Asn
 195 200 205
 Ala Ala Thr Gly Leu Asp Val Ala Leu Asn Asp Leu Val Ile Pro Asn

210 215 220
 Asn Asp Ser Arg Val Ile Val Ser Ile His Ala Tyr Ser Pro Tyr Phe

 225 230 235 240
 Phe Ala Met Asp Val Asn Gly Thr Ser Tyr Trp Gly Ser Asp Tyr Asp

 245 250 255
 Lys Ala Ser Leu Thr Ser Glu Leu Asp Ala Ile Tyr Asn Arg Phe Val

 260 265 270
 Lys Asn Gly Arg Ala Val Ile Ile Gly Glu Phe Gly Thr Ile Asp Lys

 275 280 285
 Asn Asn Leu Ser Ser Arg Val Ala His Ala Glu His Tyr Ala Arg Glu

 290 295 300

 Ala Val Ser Arg Gly Ile Ala Val Phe Trp Trp Asp Asn Gly Tyr Tyr
 305 310 315 320
 Asn Pro Gly Asp Ala Glu Thr Tyr Ala Leu Leu Asn Arg Lys Thr Leu

 325 330 335
 Ser Trp Tyr Tyr Pro Glu Ile Val Gln Ala Leu Met Arg Gly Ala Gly

 340 345 350
 Val Glu Pro Leu Val Ser Pro Thr Pro Thr Pro Thr Leu Met Pro Thr

 355 360 365
 Pro Ser Pro Thr Val Thr Ala Asn Ile Leu Tyr Gly Ser Gly Thr Lys

 370 375 380
 Leu Leu Asp Ala Ser Gly Asn Glu Leu Val Met Arg Gly Met Arg Asp
 385 390 395 400
 Ile Ser Ala Ile Asp Leu Val Lys Glu Ile Lys Ile Gly Trp Asn Leu

 405 410 415
 Gly Asn Thr Leu Asp Ala Pro Thr Glu Thr Asp Val Asn Lys Asp Gly

 420 425 430
 Lys Val Asn Ala Ile Asp Tyr Ala Val Leu Lys Ser Ile Leu Leu Gly

 435 440 445

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

 450 455 460

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

465 470 475

<210> 2

<211> 423

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

Met Arg Ile Ile Lys Arg Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr

1 5 10 15

Thr Lys Asn Gln Leu Ala Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln

20 25 30

Ile Val Ala Phe Phe Met Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ile Gly Leu Gly Ala Gln Ser Ile Val Ala Asp Phe Leu Ala Gly Phe

65 70 75 80

Phe Ile Leu Thr Glu Lys Gln Phe Gly Val Gly Asp Trp Val Arg Phe

85 90 95

Glu Gly Asn Gly Ile Val Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met

100 105 110

Arg Ala Thr Lys Ile Arg Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro

115 120 125

Asn Ser Thr Ala Lys Val Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Val Ile Ala Arg Ser Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln

165 170 175

Glu Lys Ile Ala Pro Glu Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala

180 185 190

Thr Glu Val Thr Pro Pro Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr

195 200 205
Met Arg Phe Leu Val Gln Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu
210 215 220
Arg Ala Ile Arg Thr Glu Ile Ile Ser Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly
225 230 235 240

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

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

Asn Trp Gln Asn Ser Ser Gly Trp Leu Ser Pro Ser Thr Ala Thr Ser
385 390 395 400
Thr Ala Val Thr Thr Ser Glu Thr Ser Ala Pro Val Ser Thr Gln Ser
405 410 415
Met Thr Val Pro Thr Thr Val
420

<210> 3
<211> 549
<212> PRT

<213> Clostridium cellulovorans

<400> 3

Ala Ala Thr Ser Ser Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser
20 25 30

Asp Ser Asp Leu Asn Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr
35 40 45

Ser Asp Gly Thr Gln Gly Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala
50 55 60

Leu Leu Gly Asn Ser Tyr Val Asp Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn
65 70 75 80

Phe Val Lys Glu Thr Ala Ser Pro Thr Ser Thr Tyr Asp Thr Tyr Val

85 90 95

Glu Phe Gly Phe Ala Ser Gly Arg Ala Thr Leu Lys Lys Gly Gln Phe
100 105 110

Ile Thr Ile Gln Gly Arg Ile Thr Lys Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Thr
115 120 125

Gln Thr Asn Asp Tyr Ser Phe Asp Ala Ser Ser Ser Thr Pro Val Val
130 135 140

Asn Pro Lys Val Thr Gly Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Val Leu Gly Thr
145 150 155 160

Ala Pro Gly Pro Asp Val Pro Ser Ser Ile Ile Asn Pro Thr Ser Ala
165 170 175

Thr Phe Asp Lys Asn Val Thr Lys Gln Ala Asp Val Lys Thr Thr Met
180 185 190

Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe Lys Thr Ile Thr Asp Ala Asn Gly Thr
195 200 205

Ala Leu Asn Ala Ser Thr Asp Tyr Ser Val Ser Gly Asn Asp Val Thr
210 215 220

Ile Ser Lys Ala Tyr Leu Ala Lys Gln Ser Val Gly Thr Thr Thr Leu

225 230 235 240
 Asn Phe Asn Phe Ser Ala Gly Asn Pro Gln Lys Leu Val Ile Thr Val
 245 250 255
 Val Asp Thr Pro Val Glu Ala Val Thr Ala Thr Ile Gly Lys Val Gln
 260 265 270
 Val Asn Ala Gly Glu Thr Val Ala Val Pro Val Asn Leu Thr Lys Val
 275 280 285
 Pro Ala Ala Gly Leu Ala Thr Ile Glu Leu Pro Leu Thr Phe Asp Ser
 290 295 300

 Ala Ser Leu Glu Val Val Ser Ile Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu Asn
 305 310 315 320
 Pro Ser Val Asn Phe Ser Ser Thr Val Ser Gly Ser Thr Ile Lys Leu
 325 330 335
 Leu Phe Leu Asp Asp Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Thr Lys Asp Gly
 340 345 350
 Val Phe Ala Thr Ile Thr Phe Lys Ala Lys Ala Ile Thr Gly Thr Thr
 355 360 365
 Ala Lys Val Thr Ser Val Lys Leu Ala Gly Thr Pro Val Val Gly Asp

 370 375 380
 Ala Gln Leu Gln Glu Lys Pro Cys Ala Val Asn Pro Gly Thr Val Thr
 385 390 395 400
 Ile Asn Pro Ile Asp Asn Arg Met Gln Ile Ser Val Gly Thr Ala Thr
 405 410 415
 Val Lys Ala Gly Glu Ile Ala Ala Val Pro Val Thr Leu Thr Ser Val
 420 425 430
 Pro Ser Thr Gly Ile Ala Thr Ala Glu Ala Gln Val Ser Phe Asp Ala
 435 440 445

 Thr Leu Leu Glu Val Ala Ser Val Thr Ala Gly Asp Ile Val Leu Asn
 450 455 460
 Pro Thr Val Asn Phe Ser Tyr Thr Val Asn Gly Asn Val Ile Lys Leu
 465 470 475 480
 Leu Phe Leu Asp Asp Thr Leu Gly Ser Gln Leu Ile Ser Lys Asp Gly

485 490 495
Val Phe Val Thr Ile Asn Phe Lys Ala Lys Ala Val Thr Ser Thr Val
500 505 510
Thr Thr Pro Val Thr Val Ser Gly Thr Pro Val Phe Ala Asp Gly Thr

515 520 525
Leu Ala Glu Val Gln Ser Lys Thr Ala Ala Gly Ser Val Thr Ile Asn
530 535 540
Ile Gly Asp Pro Ile

545

<210> 4

<211> 513

<212> PRT

<213> Clostridium sp.

<400> 4

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

Ser Ile Trp Asp Arg Phe Ser His Thr Pro Gly Asn Ile Ala Asp Gly
35 40 45
His Thr Gly Asp Val Ala Cys Asp His Tyr His Arg Tyr Glu Glu Asp
50 55 60

Ile Lys Ile Met Lys Glu Ile Gly Ile Lys Ser Tyr Arg Phe Ser Ile
65 70 75 80
Ser Trp Pro Arg Ile Phe Pro Glu Gly Thr Gly Lys Leu Asn Gln Lys
85 90 95

Gly Leu Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Thr Asn Leu Leu Leu Glu Asn Gly

100 105 110
Ile Met Pro Ala Ile Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Gln Lys Leu
115 120 125
Asn Asp Lys Gly Gly Trp Lys Asn Arg Asp Thr Thr Asp Tyr Phe Thr
130 135 140

Glu Tyr Ser Glu Val Ile Phe Lys Asn Leu Gly Asp Ile Val Pro Ile
 145 150 155 160
 Trp Phe Thr His Asn Glu Pro Gly Val Val Ser Leu Leu Gly His Phe
 165 170 175

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

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

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

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

 Asp Gly Lys Val Asn Ala Ile Asp Tyr Ala Val Leu Lys Ser Ile Leu
 465 470 475 480
 Leu Gly Thr Asn Thr Asn Val Asp Leu Ser Val Ser Asp Met Asn Lys
 485 490 495
 Asp Gly Lys Val Asn Ala Leu Asp Leu Ala Val Leu Lys Lys Met Leu
 500 505 510
 Leu

<210> 5
 <211> 1302
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> chimeric endoglucanase E (cCelE)

<400> 5
 tcgggaacaa agcttttga tgcaagcgga aacgagcttg taatgagggg catgctgat 60
 atttcagcaa tagatttgg taaagaaata aaaatcggat ggaatttggg aaatactttg 120
 gatgctccta cagagactgc ctggggaaat ccaaggacaa ccaaggcaat gatagaaaag 180
 gtaagggaat tgggctttaa tgccgtcaga gtgcctgtta cctgggatac gcacatcgga 240
 cctgctccgg actataaaat tgacgaagca tggctgaaca gagttgagga agtggtaaac 300
 tatgttcttg actgcggtat gtacgcgatc ataaatcttc accatgacaa tacatggatt 360
 atacctacat atgccaatga gcaaaggagt aaagaaaaac ttgtaaaagt ttgggaacaa 420

 atagcaaccc gttttaaaga ttatgacgac catttgttgt ttgagacaat gaacgaaccg 480
 agagaagtag gttcacctat ggaatggatg ggcggaacgt atgaaaaccg agatgtgata 540

aacagattta atttggcggg tggttaatacc atcagagcaa gcggcggaaa taacgataaa 600
agattcatac tggttccgac caatgcggca accggcctgg atgttgcat aaacgacctt 660
gtcattccga acaatgacag cagagtcata gtatccatac atgcttattc accgtatttc 720
tttgctatgg atgtcaacgg aacttcataat tggggaagtg actatgacaa ggctttcttt 780
acaagtgaac ttgatgctat ttacaacaga tttgtgaaaa acggaagggc tgtaattatc 840

ggagaattcg gaaccattga caagaacaac ctgtcttcaa ggggtggctca tgccgagcac 900
tatgcaagag aagcagtttc aagaggaatt gctgttttct ggtgggataa cggctattac 960
aatccgggtg atgcagagac ttatgcattg ctgaacagaa aaactctctc atggtattat 1020
cctgaaattg tccaggctct tatgagaggt gccggcgttg aacctttagt ttcaccgact 1080
cctacaccta cattaatgcc gacccctcgc ccacgggtga cagcaaatat tttgtacggt 1140
gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgcctaa atcaattctt 1200
ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta 1260

aatgctttgg atttagctgt tcttaaaaaa atgcttttat ga 1302

<210> 6

<211> 1269

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Msc

<400> 6

atgcgtatta tcaagcgccg agtggagtct gcagccgatg cggacaccac taagaaccag 60
ctcgcgttcg ccggcgttgg cgtttatatc gcgcaaatg tggcgttttt catgcttgcc 120
gtctccgcga tgcaggcttt tggtttctct ctcgcgggcg ctgcgattcc ggcaaccatt 180
gcgtcagctg ccattggcct tgggtcgcag tcgattgttg cggacttctt ggccggattt 240
ttcatcctga cggaaaagca attcggcgtg ggtgactggg tgcgttttga gggcaacggc 300

atcgttgctg aaggcaccgt cattgagatc accatgcgcg cgacaaaaat tcgcacgatt 360
gcacaagaga ccgtgatcat ccccaactcc acggcgaaag tgtgcatcaa caattctaata 420
aactggctcg gtgcggttgt cgttattccg atccccatgt tgggttctga aaacatcaca 480
gatgtcatcg cgcgctctga agctgcgact cgtcgcgcac ttggccagga gaaaatcgca 540
ccggaaatcc tcggtgaact cgatgtgcac ccagccacgg aagtcacgcc gccaacggtg 600
gtcggcatgc cgtggatggt caccatgcgt ttctctgtgc aagtcaccgc cggcaatcaa 660
tggtcgtgctg aacgcgcat ccgcacagaa atcatcagcg aattctggga agaatacggc 720

agcgcaacca ctacatcggg aaccttcatt gattccttac acgttgagca tgaagagcca	780
aagacctcgc ttatcgacgc ctccccccag gctcttaagg aaccgaagcc ggaggctgcg	840
gcgacggttg catcgctagc tgcacctctt aacgacgatg cagacaatgc agacgcctcg	900
gtgatcaatg caggcaatcc agagaaggaa cttgattccg atgtgctgga acaagaactc	960
tccagcgaag aaccggaaga aacagcaaaa ccagatcact ctctccgagg cttcttccgc	1020
actgattact acccaaatcg gtggcagaag atcctgtcgt ttggcggacg tgtccgatg	1080
agcacgtccc tgttgttggg tgcgctgctc ttgctgtcac tatttaaggt catgactgtg	1140
gaaccaagtg agaattggca aaactccagt ggatggctgt caccaagcac tgccacctca	1200
actgcggtga ccacctcga aacttccgcg ccagtaagca cgccttcgat gacagtgccc	1260
actacggtg	1269
<210> 7	
<211> 1647	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mCbpA	
<400> 7	
gcagcgacat catcaatgtc agttgaattt tacaactcta acaaatcagc acaaacaaac	60
tcaattacac caataatcaa aattactaac acatctgaca gtgattttaa tttaaatgac	120
gtaaaagtta gatattatta cacaagtgat ggtacacaag gacaaacttt ctggtgtgac	180
catgctggtg cattattagg aaatagctat gttgataaca ctagcaaagt gacagcaaac	240
ttcgttaaag aaacagcaag cccaacatca acctatgata catatgttga atttgattt	300
gcaagcggac gagctactct taaaaagga caatttataa ctattcaagg aagaataaca	360
aatcagact ggicaaacta cactcaaaca aatgactatt catttgatgc aagtagttca	420
acaccagttg taaatccaaa agttacagga tatatagtg gagctaaagt acttggtaca	480
gcaccaggtc catagtacc atcttcaata attaataccta cttctgcaac atttgataaa	540
aatgtaacta aacaagcaga tgttaaaact actatgactt taaatggtaa cacatttaaa	600
acaattacag atgcaaacgg 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 aacattttaa 1080

gcaaaagcta taactggaac aactgcaaaa gtaacttcag ttaaattagc tggaacacca 1140

gtagttggtg atgcgcaatt acaagaaaaa ccttgtgcag ttaaccagg aacagtaact 1200

atcaatccaa tcgataatag aatgcaaatt tcagttggaa cagcaacagt aaaagctgga 1260

gaaatagcag cagtgccagt aacattaaca agtgttccat caactggaat agcaactgct 1320

gaagcacaag taagttttga tgcaacatta ttagaagtag catcagtaac tgctggagat 1380

atcgtattaa 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> 1542

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cBglA

<400> 8

atgtcaaaga taactttccc aaaagatttc atatggggtt ctgcaacagc agcatatcag 60

attgaagggtg catacaacga agacggcaaa ggtgaatcta tatgggaccg tttttccac 120

acgccaggaa atatagcaga cggacatacc ggcatgttg catgcgacca ctatcatcgt 180

tatgaagaag atatcaaaat aatgaagaa atcggtatta aatcatacag gttttccatc 240

tcatggccca gaatctttcc tgaaggaaca ggtaaattaa atcaaaaggg actggatttt 300

tacaaaaggc tcacaaatct gcttctggaa aacggaatta tgcctgcaat cactctttat 360

cactgggacc ttccccaaaa gcttcaggat aaaggcggat ggaaaaacg ggacaccacc 420

gattatttta cagaatactc tgaagtaata tttaaaaatc tcggagatat cgttccaata 480

tggtttactc acaatgaacc cgggtgtgtt tctttgtctg gccacttttt aggaattcat 540

gcccctggga taaaagacct ccgcacttca ttggaagtct cgcacaatct tctttgtcc 600

cacggcaagg ccgtgaaact gtttagagaa atgaatattg acgcccacaa tggaatagct 660

ctcaatttat cttaccatta tcccgcaccc gaaaaagctg aggatattga agcagcgga 720

ttgtcatttt ctctggcggg aagggtgtat ctggatcctg tgctaaaagg ccggtatcct 780

gaaaacgcat tgaacttta taaaaagaag ggtattgagc tttctttccc tgaagatgac 840
ctgaaactta tcagtcagcc aatagacttc atagcattca acaattattc ttcggaattt 900
ataaaatatg atccgtccag tgagtcaggt tttcacctg caaactccat attagaaaag 960

ttcgaaaaa cagatatggg ctggatcata taccctgaag gcttgtatga tctgcttatg 1020
ctccttgaca gggattatgg aaagccaaac attgttatca gcgaaaacgg agccgccttc 1080
aaagatgaaa taggtagcaa cggaagata gaagacacaa agagaatcca atatcttaaa 1140
gattatctga ccaggctca cagggaatt caggacgggt taaacttaaa agcatactac 1200
ttgtggtcgc ttttgacaa ctttgaatgg gcttacgggt acaacaagag attcggaatc 1260
gttcacgtaa atttgatag gttggaaaga aaaataaagg atagcggcta ctggtacaaa 1320
gaagtaatca aaaacaacgg ttttgatcc gctggctccg ctgctggttc tggggaattc 1380

gatgttaaca aagatggaaa ggtaaatgct atcgattatg cagtgcctta atcaattctt 1440
ttaggtacaa atactaacgt tgatttatca gtatcagaca tgaataagga tggtaaagta 1500
aatgctttgg atttagctgt tcttaaaaaa atgcttttat ga 1542

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

atatggatcc catgcgtatt atcaagcgc 29

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

atatggtacc caccgtagtg ggca 24

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11
cccggatccg cagcgacatc atcaatgtc 29

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 12
cccggatcct catataggat ctccaatatt ta 32

<210> 13
<211> 29
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 13
cccggatccg cagcgacatc atcaatgtc 29

<210> 14
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 14
cccgcggccg ctcaatgatg atgatgatga tgtaatagga 40

<210> 15
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 15
atatggatcc gtcggaaca aagcttttg 29

<210> 16
<211> 33
<212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	16	
	tttgттааса tcaccgtaca aaatattgct gtc	33
<210>	17	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	17	
	atттtgtacg gtgatgttaa caaagatgga aagg	34
<210>	18	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	18	
	atatgcggcc gtcataaaa gcattttttt aag	33
<210>	19	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	19	
	ctgccatggt ggtcagggat t	21
<210>	20	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	20	
	gcctcgagtc agatcttатс gtc	23
<210>	21	
<211>	51	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 gcgcggtacc gcatgtcaaa gataactttc cctacgtgac gtaccagcac a 51

<210> 22
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 cagcggatcc aaaaccgttg tttttgatta cttctttgta ccag 44

<210> 23
 <211> 83
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 caacggtttt ggatccgctg gctccgctgc tggttctggg gaattcgatg ttaacaaaga 60
 tggaaaggta aatgctatcg att 83

<210> 24
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 24
 atatgcggcc gctcagatct tatcgtcgtc atcct 35