



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월09일
 (11) 등록번호 10-1535526
 (24) 등록일자 2015년07월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/55 (2006.01)
 C12N 15/62 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0073914
 (22) 출원일자 2013년06월26일
 심사청구일자 2013년06월26일
 (65) 공개번호 10-2014-0001161
 (43) 공개일자 2014년01월06일
 (30) 우선권주장 1020120068808 2012년06월26일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌 WO2012027374 A2*
 KR1020080042823 A*
 KR1020070009269 A
 US20120107881 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (72) 발명자 손정훈
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 성봉현
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인 손민

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 이미욱

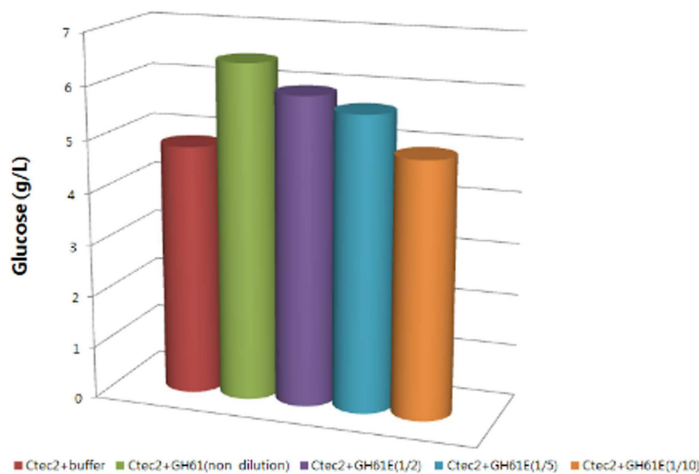
(54) 발명의 명칭 **야생형보다 분비능이 증가된 GH61 융합 단백질**

(57) 요약

본 발명은 배당체 가수분해효소 61(glycoside hydrolase 61; GH61) 및 서열번호 3, 4 또는 5로 표시표시 폴리펩티드가 연결된, GH61 야생형보다 분비능이 증가된 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 형질전환체, 상기 형질전환체로부터 GH61의 대량생산방법 및 바이오 에탄올의 생산방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 난발현성 GH61을 이의 분비능을 증가시킬 수 있는 특이적인 폴리펩티드와 융합 단백질의 형태로 발현시키면, 야생형과 비교하여 GH61의 분비능을 증가시킬 수 있다. 따라서, 상기 GH61은 대량생산이 가능하므로, 이를 종래의 섬유분해효소를 이용한 바이오매스 당화공정에 사용하여 섬유분해효소의 활성을 증가시켜 고가의 효소 사용량을 감소시킴으로써, 바이오 에탄올의 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

배정훈

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

강송화

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

서문지훈

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이초룡

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 308010-05-4-HD110
 부처명 농림수산식품부(농림부)
 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
 연구사업명 농림기술개발사업
 연구과제명 바이오매스 당화효소 저가생산기술 개발
 기여율 20/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2011.06.25 ~ 2012.06.24

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 310006-05-2-SB010
 부처명 농림수산식품부(농림부)
 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
 연구사업명 농림기술개발사업
 연구과제명 비목재자원을 활용한 바이오신소재 개발:고온성효모(KM) 세포공장 플랫폼 구축 및 그린바이오 신소재 생산기술 개발
 기여율 20/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20113010090030-11-1-000
 부처명 지식경제부
 연구관리전문기관 한국에너지기술평가원
 연구사업명 에너지기술개발사업
 연구과제명 고지방산 저급 팜 슬러지오일(PSO) 기반 바이오디젤 생산용 다기능성 촉매 개발
 기여율 20/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0028383
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단(대전)
 연구사업명 원천기술개발사업(글로벌프론티어)
 연구과제명 차세대 바이오매스 기반 바이오에너지 생산 효모 균주 및 공정개발
 기여율 40/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2011.08.22 ~ 2012.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

배당체 가수분해효소 61(glycoside hydrolase 61; GH61) 및 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 폴리펩티드가 연결된, GH61 야생형보다 분비능이 증가된 융합 단백질로서,

테르모아스쿠스 아우란티아쿠스 유래의 배당체 가수분해효소 61에는 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩티드가, 티에라비아 테레스트리스 유래의 배당체 가수분해효소 61에는 서열번호 4 또는 5로 표시되는 폴리펩티드가 연결된 것인 융합 단백질.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 6

제5항의 발현벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 인간을 제외한 형질전환체.

청구항 7

제6항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및

상기 형질전환체의 배양물 또는 배양상등액으로부터 GH61을 회수하는 단계를 포함하는, GH61의 대량생산방법.

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술분야

본 발명은 배당체 가수분해효소 61(glycoside hydrolase 61; GH61) 및 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 폴리펩티드가 연결된, GH61 야생형보다 분비능이 증가된 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 형질전환체, 상기 형질전환체로부터 GH61의 대량생산방법 및 바이오 에탄올의 생산방법을 제공하는

[0001]

것이다.

배경 기술

- [0002] 최근 들어 유가상승과 지구온난화 문제로 인해, 저렴하면서도 재생 가능한 바이오매스로부터 바이오에너지를 경제적으로 생산하기 위한 기술 개발을 위해 전 세계가 각축을 벌이고 있다. 섬유소 바이오매스는 지구상 가장 풍부한 재생가능 자원으로 기존 석유기반으로 생산되던 다양한 에너지 및 원료 플랫폼화합물을 생산할 수 있는 원료이다(Hoffert *et al.*, Science, 2002, 298: 981). 이러한 섬유소 바이오매스를 이용하여 바이오에너지, 그 중에서도 바이오에탄올을 얻는 과정은 현재의 과학기술로도 가능하지만, 공정에 소요되는 비용이 커 원유가격이 지나치게 상승하거나 원유가 완전고갈되기 전에는 경제성이 떨어지는 문제가 있다 (Zaldivar *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 56: 17). 섬유소 바이오매스로부터 바이오에탄올을 얻기 위해서는 바이오매스를 분해(당화)하고 분해된 당(sugar)을 발효하여 바이오에탄올을 얻게 된다. 자연계에 존재하는 미생물을 활용하여 고효율로 바이오매스의 동시 당화/ 발효를 수행할 수 없다. 때문에 현재의 바이오에탄올 생산공정은 바이오매스의 분해 및 발효 2단계로 나누어 진행하므로 비효율적이다(Lynd *et al.*, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2002, 66: 506).
- [0003] 특히 섬유소 바이오매스는 매우 단단한 구조로서 자연적으로 분해하는 과정이 매우 느리기 때문에 인위적으로 분해속도를 빨리 하기 위해서는 고비용의 전처리과정과 고가의 섬유분해효소 처리과정을 반드시 필요로 한다 (Lynd *et al.*, Biotechnol. Prog., 1999, 15: 777; Himmel *et al.*, Science, 2007, 315: 804). 따라서 섬유소 바이오매스를 이용한 바이오 에너지 및 플랫폼 화합물 생산의 경제성을 확보하기 위해서는 섬유소 바이오매스를 효율적으로 분해할 수 있는 섬유소 분해효소(셀룰라제)의 저가 생산 및 분해효소의 활성 증가 기술이 필요하며, 특히 이러한 효소 생산 재조합 균주를 바이오 에너지 생산기술에 직접 활용할 수 있는 통합공정(Consolidated bioprocess) 기술 개발이 요구된다(Hahn-Hagerdal *et al.*, Trends Biotechnol., 2006, 24: 549; Lynd *et al.*, Nat. Biotechnol., 2008, 26: 169).
- [0004] 섬유소 바이오매스의 셀룰로오스를 분해하기 위해서는 엔도셀룰라제(endo-1,4-β-D-glucanase), 엑소셀룰라제(exo-1,4-β-D-glucanase 또는 cellobiohydrolase) 및 베타-글루코시다제(β-glucosidase 또는 cellobiase)가 필수적으로 필요하다(Kubicek *et al.*, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 1992, 45: 1). 이러한 효소들은 자연적으로 식물체를 부식시키는 미생물, 특히 곰팡이에서 발견되며 상업적으로 생산되는 섬유소분해효소 복합체는 곰팡이 트리코더마 리자이(Trichoderma reesei) 유래의 효소복합체를 노보자임스(Novozymes)사, 다니스코(Danisco)사에서 시판하고 있다.
- [0005] 현재 전 세계적으로 바이오에너지 생산용 바이오매스 분해효소는 상기한 2개의 다국적 기업에서 독점적으로 생산 판매하고 있으나 상당히 고가이며 바이오매스에 따라 최적화된 상태가 아니므로 경우에 따라서 과잉의 효소를 사용해야 하는 문제점이 있다(Merino and Cherry, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2007, 108: 95; Kabel *et al.*, Bioeng. Biotechnol., 2006, 93: 56).
- [0006] 따라서 이러한 효소를 대량으로 경제적으로 생산하거나, 효소의 활성을 증가 시키는 요소 및 반응 조건을 개발하게 되면 효소의 사용량을 줄일 수 있는 장점이 있다. 종래의 바이오 에탄올 발효에 사용되는 효모는 에탄올 발효능은 매우 우수하나 섬유소 바이오매스의 분해능이 전혀 없어, 섬유소 바이오매스를 원료로 바이오에너지 생산시 고가의 섬유분해효소의 사용이 불가피한 문제점이 있다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 이러한 문제점을 해결하기 위해 적은 양의 섬유분해효소로도 바이오매스의 셀룰로오스를 분해하여 에너지를 생산할 수 있도록 상기 섬유분해효소의 활성을 증가시키는 단백질인 GH61을 대량생산할 수 있는 방법을 찾기 위해 예의 연구노력하였다. 그 결과, 상기 난발현성 GH61과 융합 단백질을 형성하여 상기 GH61의 분비능을 향상시킬 수 있는 특이적인 폴리펩티드를 발굴하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 배당체 가수분해효소 61(glycoside hydrolase 61; GH61) 및 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 폴리펩티드가 연결된, GH61 야생형보다 분비능이 증가된 융합 단백질을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 형질전환체의 배양물 또는 배양상등액으로부터 GH61을 회수하는 단계를 포함하는, GH61의 대량생산방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체, 상기 형질전환체의 배양물 또는 배양상등액으로부터 분리된 GH61 단백질, 또는 상기 배양상등액 자체와 섬유분해효소(cellulase)의 혼합물을 섬유분해효소의 기질에 처리하는 단계를 포함하는 바이오 에탄올의 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 배당체 가수분해효소 61(glycoside hydrolase 61; GH61) 및 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 폴리펩티드가 연결된, GH61 야생형보다 분비능이 증가된 융합 단백질을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 섬유질을 가수분해하여 섬유소 바이오매스로부터 연료인 바이오에탄올을 생산할 수 있는 섬유분해효소의 활성을 증진시킬 수 있는 배당체 가수분해효소 61을 대량으로 생산하는 방법에 관한 것이다. 상기 배당체 가수분해효소 61은 자연상태에서 발현이 어려운 난발현성 단백질임을 고려하여 본 발명자들은 상기 배당체 가수분해효소와 융합 단백질의 형태로 발현시킬 때, 특이적으로 배당체 가수분해효소 61의 분비능을 증가시킬 수 있는 맞춤형 폴리펩티드 서열을 최초로 동정하였다.
- [0016] "배당체 가수분해효소(glycoside hydrolase)"는 "글리코시다아제(glycosidase)" 또는 "글리코실 가수분해효소(glycosyl hydrolase)"라고도 불리는 효소로서, 배당결합(glycosidic linkage)을 가수분해하여 작은 당(sugar)을 생산한다. 이는 둘 또는 그 이상의 탄수화물(carbohydrate) 사이의 배당결합 또는 탄수화물과 비-탄수화물 모이어티 사이의 배당결합을 가수분해할 수 있으며, 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스 등의 바이오매스의 분해를 포함하는 자연계에서 널리 알려진 효소이다. 본 발명의 "배당체 가수분해효소 61(glycoside hydrolase 61; GH61)"은 상기 배당체 가수분해효소의 일종이다. 상기 배당체 가수분해효소 61 패밀리에 속하는 효소의 알려진 활성은 엔도글루카나아제(endoglucanase)라고도 불리는 섬유분해효소(셀룰레이즈; cellulase)의 활성을 증진시키는 것이다.
- [0017] 상기 배당체 가수분해효소 61은 단독으로는 낮은 가수분해활성을 나타내지만, 섬유분해효소와 함께 사용하여 섬유분해효소의 활성을 증진시킬 수 있다. 그러나, 상기 배당체 가수분해효소 61은 스스로 분비능이 낮은 난발현성 단백질이다. 따라서, 상기 배당체 가수분해효소 61의 분비를 촉진시킬 수 있는 특이적인 서열의 폴리펩티드와 융합 단백질의 형태로 생산하는 것이 바람직하다.
- [0018] 상기 배당체 가수분해효소 61의 분비를 촉진시킬 수 있는 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 폴리펩티드는 본 발명의 목적 단백질인 난발현성의 GH61 단백질의 발현을 증진시키기 위하여 적합한 맞춤형 폴리펩티드이며, 바람직하게, 배당체 가수분해효소 61과 직접적으로 또는 링커에 의해 연결될 수 있다.
- [0019] 상기 배당체 가수분해효소 61은 바람직하게 테르모아스쿠스 아우란티아쿠스(*Thermoascus aurantiacus*) 유래의 GH61(이하 GH61A로 표기) 또는 티에라비아 테레스트리스(*Thielavia terrestris*) 유래의 GH61(이하 GH61E로 표기)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 테르모아스쿠스 아우란티아쿠스(*Thermoascus aurantiacus*) 유래의 GH61은 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드로부터 코딩된 단백질, 및 티에라비아 테레스트리스(*Thielavia terrestris*) 유래의 GH61은 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드로부터 코딩된 단백질인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 테르모아스쿠스 아우란티아쿠스 유래의 GH61A, 예컨대 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드로부터 코딩된 단백질은 분비능을 증진시키기 위한 폴리펩티드로서 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드와 융합시키는 것이 바람직하다.

- [0021] 티에라비아 테레스트리스 유래의 GH61E, 예컨대 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드로부터 코딩된 단백질은 분비능을 증진시키기 위한 폴리펩티드로서 서열번호 4 또는 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드와 융합시키는 것이 바람직하다.
- [0022] 한편, 본 발명에 따른 융합 단백질에서 배당체 가수분해효소 61은 배당체 가수분해 활성이 증진되도록 변이된 배당체 가수분해효소 61의 변이체, 그 단편 또는 그 유사체를 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 배당체 가수분해 활성이 증진되도록 변이된 배당체 가수분해효소 61의 변이체는 둘 또는 그 이상의 탄수화물 사이 또는 탄수화물과 비-탄수화물 모이어티 사이의 배당결합을 가수분해하여 작은 당(sugar)을 생산하는 배당체 가수분해효소 고유의 활성이 증대되도록, 배당체 가수분해효소의 아미노산 서열이 변이된 배당체 가수분해효소를 의미한다.
- [0024] 상기 활성이 증진되도록 변이된 GH61의 변이체는 GH61을 코딩하는 서열번호 1 또는 2의 폴리뉴클레오티드로부터 특정위치에서 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드가 치환, 결실 또는 삽입된 폴리뉴클레오티드에 의해 발현되는 단백질로 상기 서열번호 1 또는 2의 폴리뉴클레오티드에 의해 발현되는 GH61의 아미노산 서열의 특정위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 결실 또는 삽입된 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 활성이 증진되도록 변이된 GH61 또는 GH61을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 활성이 증진되도록 변이된 GH61 또는 GH61을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 활성이 증진되도록 변이된 GH61의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨은 당업자에게 자명하다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산이 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0026] 상기 폴리펩티드에 관한 용어, "그 단편"은 목적 단백질인 GH61과 융합되었을 때, GH61의 분비를 증가시킬 수 있는 충분한 기능을 가지는 단편으로서 상기 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 아미노산 서열의 어떤 부분이라도 포함하는 펩티드를 말한다.
- [0027] 상기 폴리펩티드에 관한 용어, "그 유사체"는 GH61과 융합되었을 때, GH61의 분비를 증가시킬 수 있는 충분한 기능을 가지는 폴리펩티드로서, 상기 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 아미노산 서열과 최소한 70%의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 구성하는 폴리펩티드를 말한다. 구체적으로, 유사체는 상기 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 아미노산과 최소한 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 유사체는 상기 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 아미노산 서열의 부가, 결실, 치환 또는 조합을 포함한다. 부가 또는 치환은 인위적인 것을 포함한다.
- [0028] 바람직하게, 치환은 보존적 아미노산 치환일 수 있다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기로 대체되는 것을 말한다. 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기들은 당업계에 잘 알려져 있으며, 기본적인 측쇄(예컨대, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예컨대, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄(예컨대, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예컨대, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지 측쇄(예컨대, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향성 측쇄(예컨대, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함한다.
- [0029] 상기 서열 상동성의 계산은, 비교 대상이 되는 부위가 최적으로 정렬된 두 서열을 비교하고, 두 서열에서 상동성 있는 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 위치를 결정하여 대응되는 위치의 수를 구하고, 대응되는 위치의 수를 비교 대상 부위의 총 갯수로 나누고(즉, 윈도우 사이즈), 결과에 100을 곱하여 서열 상동성의 백분율을 구함으로써 계산할 수 있다. 하나의 양태로서, 100 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이에서의 4 개의 틈(gap)이 최대 정렬로 도입될 수 있을 때, 퍼센트 상동성은 비교 대상 서열의 상동성 있는 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 정렬한 두 서열보다 작은 서열에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 백분율로 계산된다(Dayhoff, in Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, p. 124, National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C., 1972). 상동성은 당업계에 알려진 컴퓨터 상동성 프로그램으로 결정된다. 프로그램의 예로는 Smith 와 Waterman 의 알고리즘을 사용한 초기값 설정을 이용하는 겹 프로그램이 있다(Adv. Appl. Math.,

1981, 2: 482-489).

- [0030] 상기 유사체의 예로는 결실 돌연변이(예컨대, 단방향 결실), 기능적 서열의 부가(예컨대, 당화 부위, 제한효소 부위), 및 상기 GH61의 분비능을 증가시키는 맞춤형 폴리펩티드의 프로 서열 또는 프리 서열 결실 또는 부가(예컨대, 스와핑)가 있다. 당업자는 당업계에 잘 알려진 돌연변이 유발 기술, 예컨대 상기 문헌에 개시된 방법을 사용하여 상기 GH61의 분비능을 증가시키는 맞춤형 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 핵산의 유사체를 만들 수 있고, 목적 단백질 GH61과 융합되었을 때 GH61의 분비를 유도할 수 있는 충분한 기능을 가지는 유사체를 확인할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 용어, "목적 단백질 GH61과 융합되었을 때 GH61의 분비를 유도할 수 있는 충분한 기능을 가지는"이란, GH61과 융합되었을 때 GH61의 분비를 유도할 수 있는 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 아미노산 서열의 폴리펩티드 기능의 50% 이상을 가지는 폴리펩티드의 유사체 또는 단편을 말한다. 또한, 융합된 GH61의 분비 유도 능력의 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 또는 95%를 가지는 유사체 또는 단편일 수 있다. GH61 분비 유도 능력은 당업계에 알려진 또는 상기의 기술들에 의해 결정될 수 있다.
- [0032] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0033] 본 발명에서 용어, "폴리뉴클레오티드"란, 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA(deoxyribonucleic acid) 또는 RNA(ribonucleic acid) 가닥을 의미한다. 본 발명에서는 상기 배당체 가수분해효소 61(glycoside hydrolase 61; GH61) 및 서열번호 3, 4 또는 5로 표시되는 폴리펩티드가 연결된 GH61 야생형보다 분비능이 증가된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.
- [0034] 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 융합 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 GH61 및 이의 분비능을 증가시키는 폴리펩티드가 연결된 융합 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0035] 상기 본 발명의 목적 단백질인 GH61은 자체로서는 발현이 용이하지 않은 난발현성 단백질이다. 따라서, 본 발명에 따른 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 GH61의 분비능을 증가시키기 위한 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 전술한 바와 같이, 상기 배당체 가수분해효소 61의 분비능을 증가시키는 폴리펩티드는 서열번호 3 내지 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 바람직하게, 이들 폴리펩티드는 각각 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8로 표시되는 폴리뉴클레오티드로부터 코딩되는 것일 수 있다.
- [0036] 상기 GH61의 분비능을 증가시키기 위한 폴리펩티드는 발현율이 낮은 단백질을 코딩하는 유전자와 융합되어 발현율이 낮은 단백질의 분비생산을 유도하는 것으로, 박테리아(예를 들어, 에스케리치아(*Escherichia*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 및 바실러스(*Bacillus*) 종 등), 곰팡이(예를 들어, 효모, 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 페니실리엄(*Penicillium*), 라이조퍼스(*Rhizopus*), 트리코더마(*Trichoderma*) 종 등), 식물(예를 들어, 애기장대, 옥수수, 담배, 감자 등) 및 동물(예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이 및 원숭이 등)을 포함하는 모든 원핵 또는 진핵생물의 DNA로부터 선별될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 구체적 실시예에서는 본 발명의 GH61의 효율적 분비 생산을 위한 재조합 벡터의 융합 파트너를 검색하고자, 자체시그널, MF α (mating factor alpha) 또는 이 외의 일련의 폴리펩티드를 융합파트너로 이용하여, GH61의 활성을 분석하였다(도 1). 그 결과, GH61A(서열번호 1)에 대해서는 ST5가, GH61E(서열번호 2)에 대해서는 ST8과 ST20이 분비능을 증가시키기 위한 최적의 융합 파트너임을 확인하였다(도 2 및 도 3).
- [0038] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 발현벡터를 제공한다.
- [0039] 본 발명의 벡터는 선별된 숙주세포에서 기능적인 모든 벡터를 포함한다. 본 발명에서 용어, "벡터"란 연결되어

있는 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 말한다. 벡터의 하나의 유형인 "플라스미드"는 그 안에 추가적으로 DNA 조각을 연결시킬 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 말한다. 벡터의 또다른 유형인 바이러스 벡터는 추가적인 DNA를 바이러스 계놈 안에 연결시킬 수 있다. 어떤 벡터는 숙주세포 내로 도입되었을 때 자가복제가 가능하다(예컨대, 복제원점을 가지는 박테리아 벡터 및 포유동물 에피솜 벡터). 어떤 벡터들은 숙주 세포 내로 도입되었을 때 숙주세포 계놈 안으로 삽입되어(예컨대, 포유동물 비-에피솜 벡터) 숙주 계놈과 함께 복제된다.

[0040] 본 발명에서 용어, "발현벡터"는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에 있어서 발현 벡터는 플라스미드 형태이다.

[0041] 본 발명에서 "플라스미드" 와 "벡터"는 플라스미드를 뜻하는 용어로서 서로 바꾸어 쓸 수 있는 용어이고, 벡터 형태로 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 바이러스 벡터(예컨대, 복제결핍 레트로바이러스, 아데노 바이러스 및 아데노바이러스의존바이러스)와 같이 동일한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터들도 포함한다.

[0042] 본 발명에서 용어, "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적인 기능을 수행하도록 하는 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산서열이 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 사용하여 용이하게 수행될 수 있다.

[0043] 적합한 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 서열을 포함할 수 있다. 개시코돈 및 종결코돈은 유전자 작제물이 투여되었을 때, 개체에서 반드시 작용을 나타내어야 하며 코딩서열과 인프레임(in-frame)에 있어야 한다. 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0044] 또한, 바람직한 발현 벡터는 형질전환된 숙주세포를 선별하는데 필요한 적절한 마커를 포함할 수 있다. 숙주의 형질전환은 당업계에 널리 알려진 다양한 기술 및 Sambrook 의 문헌에 기술되어 있는 기술 중 하나를 사용하여 이루어질 수 있다. 복제원점은 외래의 기원을 포함하는 벡터의 구성에 의해 제공될 수 있고, 또한 숙주세포 염색체 복제 메커니즘에 의해 제공될 수도 있는데, 벡터가 숙주 세포 염색체 내로 통합되면 후자는 충족된다. 한편, 바이러스 복제 원점을 함유하는 벡터를 사용하는 것 대신에, 당업자는 선별 마커 및 목적 단백질 DNA 로 공동 형질전환시키는 방법에 의하여 포유동물을 형질전환시킬 수도 있다.

[0045] 나아가, 본 발명의 벡터에서는 목적 단백질의 정제 효율을 높이기 위하여 친화성 태그(affinity tag)를 포함하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 친화성 태그는 GST, MBP, NusA, 티오레독신(thioredoxin), 유비퀴틴, FLAG, BAP, 6HIS, STREP, CBP, CBD, 및 S-태그로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 아울러, 본 발명에 따른 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 목적 단백질인 GH61 과 이의 분비능을 증가시키기 위한 폴리펩티드의 분리를 위하여 특정 효소가 인식하는 부위인 링커 DNA를 삽입할 수 있다. 이 경우, 목적 단백질의 효율적인 분리 및/또는 정제가 일어날 수 있다. 상기 효소는 프로테아제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일례로서, 상기 링커 DNA는 프로테아제 인식 서열을 코딩하여 분비능을 증가시키기 위하여 도입된 맞춤형 폴리펩티드와 목적 단백질 간의 접합 부위에서 절단을 일으킨다. 예컨대, 링커 DNA는 효모 kex2p 또는 Kex2p-유사 프로테아제 인식 서열(예컨대, Lys-Arg, Arg-Arg, 또는 Leu-Asp-Lys-Arg를 포함하는 아미노산 서열), 포유동물 푸린 인식 서열(Arg-X-X-Arg를 포함하는 아미노산 서열), Factor-Xa 인식 서열(Ile-Glu-Gly-Arg를 포함하는 아미노산 서열), 엔테로키나제-인식 서열(Asp-Asp-Lys를 포함하는 아미노산 서열), 서브틸리신 인식 서열(Ala-Ala-His-Tyr를 포함하는 아미노산 서열), 담배식각바이러스 인식 서열(Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly를 포함하는 아미노산 서열), 유비퀴틴 가수분해효소 인식 서열(Arg-Gly-Gly를 포함하는 아미노산 서열) 또는 트롬빈 인식 서열(Arg-Gly-Pro-Arg를 포함하는 아미노산 서열)을 코딩할 수 있다.

[0047] 다른 예로서, 링커 DNA는 GST, MBP, NusA, 티오레독신(thioredoxin), 유비퀴틴, FLAG, BAP, 6HIS, STREP, CBP, CBD, 또는 S-태그와 같은 친화성 태그(affinity tag)를 코딩할 수 있다.

[0048] 또 다른 예로서, 링커 DNA는 Sfi I 와 같은 제한효소 인식 부위를 코딩할 수 있다. 또 다른 예로서, 링커 DNA는 제한 효소 인식 부위 및 프로테아제 인식 서열(예컨대, kex2p-유사 프로테아제- 또는 kex-2p-인식 서열)을 코딩할 수 있다.

[0049] 상기 발현벡터는 숙주세포에 따라, 사용가능한 발현벡터의 종류가 결정될 수 있는데, 효모를 숙주로서 사용하는 경우는, 발현벡터로서, 예를 들면 YEp13, YCp50, pRS계, pYEX계 벡터등이 이용가능하다. 상기 발현벡터는 숙주

세포내로 도입되어 본 발명에서 기술되는 핵산서열에 의해 코딩된 용합 단백질 또는 펩타이드 등의 단백질 또는 펩타이드를 생산할 수 있다. 바람직하게는, 벡터는 숙주 생물체에 의해 인지되는 프로모터를 함유할 수 있다. 본 발명의 프로모터 서열은 원핵 또는 진핵 또는 바이러스 기원일 수 있다. 원핵 유래의 서열의 예로는 박테리오파지 람다(The bacteriophage Lambda, Hershey, A. D., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1973; Lambda II, Hendrix, R. W., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1980)의 PR 및 PL 프로모터; E. coli의 trp, recA, heat shock 및 lacZ 프로모터, 및 SV40 초기 프로모터 (Benoist et al, Nature, 290:304-310, 1981)를 포함한다. 효모에 적절한 프로모터는 GAPDH, PGK, ADH, PHO5, GAL1 및 GAL10를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 그 외에 프로모터는 마우스종양바이러스 (Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV), 인간면역결핍바이러스의 긴 말단 반복(long terminal repeat, LTR), 말로니 바이러스 (maloney virus), 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터(cytomegalovirus immediate early promoter), 엡스타인바 바이러스(Epstein Barr virus), 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus), 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 및 인간 메탈로티오네인을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 벡터는 추가적인 조절 서열을 포함할 수 있다. 적절한 조절 서열의 예는 파지 MS-2의 레플리카아제 유전자의 샤인-달가노 서열 및 박테리오파지 람다의 cII의 샤인-달가노 서열이 대표적이다. 구체적으로 본 발명의 바람직한 실시 양태에서, 상기 프로모터는 GAL프로모터, AOD프로모터 일 수 있다.

[0050] 본 발명의 발현벡터는 GH61 야생형보다 분비능이 증가된 GH61 및 이의 분비능을 증가시키는 폴리펩티드가 연결된 용합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 특히, GH61 및 이의 분비능을 증가시키는 폴리펩티드가 연결된 용합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환하는 경우, 상기 GH61의 분비능을 증가시키는 폴리펩티드에 의하여 GH61을 고효율로 생산할 수 있다.

[0051] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0052] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 DNA를 숙주세포로 도입시켜 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다.

[0053] 본 발명에서 형질전환 방법은 본 발명의 발현벡터를 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포 융합, 인산칼슘 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 텍스트란-매개된 형질감염(DEAE dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기천공법(electroporation), 스펙로플라스트법, 아세트산리튬법 등의 공지 방법으로 숙주세포에 도입하여 형질전환시킬 수 있다.

[0054] 효모에의 재조합체 DNA의 도입방법으로서, 예를 들면 전기천공법(Method Enzymol., 194, 182-187(1990)), 스펙로플라스트법(Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 84, 1929-1933(1978)), 아세트산리튬법(J. Bacteriol., 153, 163-168(1983)) 등이 이용될 수 있다.

[0055] 아울러, 상기 발현벡터에는, 목적 유전자의 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현 억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 균체막으로의 분비를 목적으로 한 시그널을 코딩하는 유전자, 난발현성 단백질에 적합한 맞춤형 융합인자 등을 추가로 포함할 수도 있다.

[0056] 본 발명에 따른 형질전환에 사용되는 숙주 세포는 당업계에 널리 알려져 있는 숙주세포는 어떤 것이나 사용할 수 있으나, 본 발명의 GH61 또는 변이된 GH61을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 도입효율이 우수하고, 상기 도입된 폴리뉴클레오타이드의 발현효율이 높은 숙주를 사용할 수 있는데, 예를 들어 박테리아, 곰팡이(예컨대, 효모), 식물 또는 동물(예컨대, 포유동물 또는 곤충) 세포를 포함한다.

[0057] 바람직하게, 상기 숙주세포는 에탄올 발효능을 가지는 세포일 수 있으며, 보다 바람직하게 상기 에탄올 발효능을 가지는 세포는 자이모모나스, 효모, 바실러스 일 수 있다.

[0058] 상기 효모는 특별히 이에 제한되지 않으나, 캔디다(Candida), 디베리오마이세스(Debaryomyces), 한세놀라(Hansenula), 클루비베로마이세스(Kluyveromyces), 피키아(Pichia), 스킨조사카로마이세스(Schizosaccharomyces), 야로이아(Yarrowia), 사카로마이세스(Saccharomyces), 사카로마이콥시스(Saccharomycopsis), 슈완니오마이세스(Schwanniomyces), 아르술라(Arxula) 종을 포함하고, 보다 바람직하게는

칸디다 유틸리스(*Candida utilis*), 칸디다 보이디니(*Candida boidinii*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 피키아스티피티스(*Pichia stipitis*), 스킴조카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이콥시스 피브리케라(*Saccharomycopsis fiburigera*), 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 야로이야 리포폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 슈완니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*), 아르술라 아데니니모란스(*Arxula adenivorans*) 등을 사용하며, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에를 사용할 수 있다.

[0059] 본 발명의 구체적 실시예에서, 본 발명의 형질전환체에 의해 발현된 GH61 효소활성을 확인하기 위하여 효소 복합체 및 이의 기질과 반응시킨 후 글루코스 생성량 분석한 결과, 효소 복합체에 본 발명에 따른 GH61을 첨가한 경우, 그렇지 않은 효소 복합체보다 높은 효소활성을 나타내어 보다 많은 글루코스를 생산함을 확인하였다(도 7 및 도 9).

[0060] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 형질전환체의 배양물 또는 배양상등액으로부터 GH61을 회수하는 단계를 포함하는, GH61의 대량생산방법을 제공한다.

[0061] 본 발명의 형질전환체를 배양하기 위한 배지 및 배양조건은 숙주세포에 따라적절히 선택하여 이용할 수 있다. 영양배지는 숙주세포의 생육에 필요한 탄소원, 무기질소원 또는 유기질소원을 포함하는 것이 바람직하다. 탄소원으로는 글루코스, 텍스트란, 가용성 전분, 수크로스 및 메탄올 등이 사용될 수 있다. 무기질소원 또는 유기질소원으로는 암모늄염류, 질산염류, 아미노산, 콘스틸리퀴(corn steep liquer), 펩톤, 카제인, 소추출물, 대두백 및 감자추출물 등이 사용될 수 있다. 필요에 따라 다른 영양소, 예를 들어 염화나트륨, 염화칼슘, 인산이수소나트륨, 염화마그네슘과 같은 무기염, 비타민류 또는 향생물질(테트라사이클린, 네오마이신, 암피실린 및 카나마이신) 등을 추가로 포함할 수 있다. 배양시에는 세포의 생육과 단백질의 대량생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건을 적절히 조절할 수 있다.

[0062] 배양방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치(batch)식, 유가배치식(fed-batch), 연속배양, 반응기(reactor) 형식 등 통상의 미생물 배양에 사용되는 어떠한 방법도 사용할 수 있다.

[0063] 상기 GH61을 회수하는 단계는 통상적인 생화학 분리기술에 의하거나 단백질의 한 부분 또는 다른 부분에 대한 항체를 사용하는 면역친화적인 방법으로 엔도글루카나제를 분리, 정제할 수 있다. 또 다른 방법은 단백질 서열에 태그(tag)를 가하여, 항체 또는 이러한 태그에 대하여 적절히 높은 친화력을 갖는 기타 물질을 이용하는 친화방법에 의해 정제할 수도 있다. 통상적인 생화학 분리기술로는 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피법 등이 있고, 통상적으로 이들을 조합하여 사용하여 고순도로 목적 단백질을 분리할 수 있다.

[0064] 본 발명에서는 상기 배양물로부터 수득한 배양균체 또는 배양상등액을 균체파쇄, 추출, 친화성 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 겔여과 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 단백질 침전, 투석 등 공지된 정제방법을 단독으로 또는 적절히 조합하여 수행하였다. 회수된 목적 단백질의 확인은 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯 등의 공지된 통상의 방법을 이용하여 수행하였다.

[0065] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체, 상기 형질전환체의 배양물 또는 배양상등액으로부터 분리된 GH61 단백질, 또는 상기 배양상등액 자체와 섬유분해효소(cellulase)의 혼합물을 섬유분해효소의 기질에 처리하는 단계를 포함하는 바이오 에탄올의 생산방법을 제공한다.

[0066] 구체적으로, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하고, 이의 배양물 또는 배양상등액으로부터 분리된 GH61 단백질 또는 상기 배양상등액 자체와 섬유분해효소(cellulase)의 혼합물을 사용하여 바이오매스를 당화시키는 단계를 포함하는 바이오 에탄올의 생산방법을 제공한다.

[0067] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 섬유분해효소(cellulase)와 섬유분해효소의 기질을 포함하는 배양액에서 배양하는 단계를 포함하는 바이오 에탄올의 생산방법을 제공한다.

[0068] 구체적으로, 본 발명의 바이오 에탄올 생산방법은 (i) 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환시킨 형질전환체를 수득하는 단계; (ii) 상기 형질전환체를 배양하고, 이의 배양물 또는 배양상등액으로부터 GH61 단백질

을 분리하는 단계; (iii) 상기 분리된 GH61 또는 배양상등액과 섬유분해효소의 혼합물을 사용하여 바이오매스를 당화시키는 단계; 및 (iv) 당화반응 혼합물로부터 바이오 에탄올을 회수하는 단계를 포함한다

[0069] 또는 (i) 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환시킨 형질전환체를 수득하는 단계; (ii) 상기 형질전환체를 섬유분해효소와 섬유분해효소의 기질을 포함하는 배양액에서 배양하는 단계; 및 (iii) 상기 배양액으로부터 바이오 에탄올을 회수하는 단계를 포함한다.

[0070] 본 발명의 용어, "섬유분해효소(cellulase)"는 균류(fungi), 박테리아(bacteria) 및 원생동물(protozoans) 등에 의해 주로 생산되는 효소로서, 셀룰로오스의 가수분해를 촉진시킬 수 있다. 이는 달리 엔도글루카나제(endoglucanase)로도 불리며, endo-1,4-베타-글루카나제, 카르복시메틸 셀룰라아제 등의 다양한 이름을 갖는다. 커피콩의 건조과정에서 섬유소의 가수분해에 사용되는 등의 상업적 음식물공정에 사용될 수 있으며, 섬유산업, 펄프 및 제지산업에 다양한 목적으로 사용될 수 있다.

[0071] 상기 섬유분해효소의 기질은 섬유분해효소에 의해 분해될 수 있는 것이면 특별히 이에 제한되지 않으나, 셀룰로오스(cellulose), 리케닌(lichenin) 또는 곡물의 베타-D-글루칸(β -D-glucan) 등일 수 있다.

발명의 효과

[0072] 본 발명의 난발현성 GH61을 이의 분비능을 증가시킬 수 있는 맞춤형 폴리펩티드와 융합 단백질의 형태로 발현시키면, 야생형과 비교하여 GH61의 분비능을 증가시킬 수 있다. 따라서, 상기 GH61은 대량생산이 가능하므로, 이를 종래의 섬유분해효소를 이용한 바이오매스 당화공정에 사용하여 섬유분해효소의 활성을 증가시켜 고가의 효소 사용량을 감소시킴으로써, 바이오 에탄올의 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 SDS-PAGE 전기영동을 이용하여 24종의 TFP 벡터를 이용한 (A) GH61A 및 (B) GH61E의 고분비생산 균주를 선별하는 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 효모 Y2805균주에 GH61A 또는 GH61E가 도입된 형질전환체들의 배양상등액을 분석한 SDS-PAGE 전기영동 결과 및 이를 바탕으로 한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 도이다. 이로부터 고분비 활성 최종균주를 선별하였다.

도 3은 Kex2 신호 펩티드분해효소(signal peptidase)를 과발현하는 효모 균주를 이용하여 성숙한(mature) GH61A 및 GH61E의 생산을 확인한 배양상등액의 SDS-PAGE 전기영동 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 SDS-PAGE 전기영동 및 배양액의 흡광도 측정을 이용하여 재조합 GH61 생산 균주의 유가식 발효배양에서 배양시간에 따른 분비 단백질을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 FPLC를 이용한 재조합 균주(Y2805/ST5-1 GH61A)에서 분비된 GH61A의 정제 및 상기 정제된 GH61 단백질을 Endo-H로 처리하여 SDS-PAGE와 웨스턴 블롯팅으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 FPLC를 이용한 재조합 균주(Y2805/ST8-1 GH61A)에서 분비된 GH61A의 정제 및 상기 정제된 GH61 단백질을 Endo-H로 처리하여 SDS-PAGE와 웨스턴 블롯팅으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 GH61E가 첨가된 KRIBB 섬유분해효소 칵테일(KRIBB cellulase cocktail; KCC)의 활성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 다양한 농도의 시판 효소 복합체 Ctec2에 GH61을 첨가한 후, 활성의 증가를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 시판 효소 복합체 Ctec2에 GH61E를 다양한 농도로 첨가한 후, 바이오매스 당화 활성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0075]

실시예 1. GH61 고분비 발현 효모 구축

[0076]

섬유소 바이오매스의 셀룰로오스를 분해하는 효소 복합체들의 활성 개선을 위해 섬유분해효소 향상인자 (cellulase enhancing factor)로 알려진 배당체 가수분해효소 61(glycoside hydrolase 61; GH61) 유전자를 사용하였다. GH61은 매우 낮은 엔도-1,4-β-D-글루카나제(endo-1,4-β-D-glucanase) 활성을 가지는, 많은 배당체 가수분해효소 중 하나의 패밀리로 알려져 있다. GH61 패밀리 중 테르모아스쿠스 아우란티아쿠스(*Thermoascus aurantiacus*) 유래의 GH61A(Genbank Accession ABW56451)와 티에라비아 테레스트리스(*Thielavia terrestris*) 유래의 GH61E (Genbank Accession ACE10234) 유전자를 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*; *S. cerevisiae*)에 코돈 최적화(codon optimization)하고 각 유전자의 C-말단에 His-태그를 결합시켜 합성하였다(바이오니아, 대전).

[0077]

실시예 2. GH61에 대한 최적의 분비능이 향상된 융합 단백질 생산 균주의 선별

[0078]

상기 실시예 1에서 합성한 배당체 가수분해효소 61 유전자 GH61을 효모 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 발현시키기 위하여, pGEM T-GH61을 주형으로, 목적 단백질의 단백질 분비발현을 도와주는 24종의 분비능을 증가시키는 후보 폴리펩티드(ST1 내지 ST24)를 함유한 선형의 벡터에 클로닝하였다. 이후, 상기 벡터를 효모 균주 Y2805(Mat a pep4::HIS3 prb1 can1 his3-200 ura3-52)에 도입하여 세포 내 재조합을 통하여 형질전환체가 형성되도록 하였다. 세포 내 재조합을 통해 형성된 형질전환체는 우라실(uraci1)이 없는 선택배지(0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.77% 우라실이 결핍된 영양보충물, 2% 포도당)에서 성장하므로 이를 통해 형질전환체를 선별하였다. YPDG(1% 효모추출물, 2% 펩톤, 1% 포도당, 1% 갈락토오스)에서 40시간 동안 배양시킨 후 상등액 0.6 ml을 취하여 0.4 ml의 아세톤으로 침전시켜 SDS-PAGE로 분석하였다(도 1). 도 1은 효모 Y2805균주에 GH61과 ST1 내지 24가 연결된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 도입시켜 제조한 24개 형질전환체들의 배양상등액을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 각각의 벡터를 함유한 균체의 배양상등액에서 서로 다른 크기의 단백질에 대한 강한 밴드들이 관찰되었다.

[0079]

선별된 각각의 분비능을 증가시키는 폴리펩티드에 의한 단백질의 발현을 비교하여 최종 균주를 선택하기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다(도 2). 각각의 발현벡터를 포함하는 효모 균주를 YPDG에 배양한 뒤 배양상등액을 취하여 SDS-PAGE와 Western blotting으로 분석하였다. GH61A와 GH61E는 각각 1개의 N-당화 자리(N-Glycosylation site)를 가지고 있으므로, 엔도글루코시다제-H(endoglucosidase-H; Endo-H)를 처리하여 처리 전과 후를 비교하였다. 웨스턴 블롯팅 분석 결과, 모든 균주에서 Endo-H 처리 후 GH61A와 GH61E의 밴드를 확인할 수 있었다.

[0080]

효모에서 상기 일련의 분비능을 증가시키는 후보 폴리펩티드로부터 최적의 폴리펩티드를 선별하는 기술의 경우 생체 내(in vivo)에서 Kex2에 의해 진행되므로 보다 많은 활성 GH61 단백질을 얻기 위하여 Kex2가 과발현된 Y2805K 균주에 재조합 GH61을 형질전환 하였다. 형질전환된 세포를 YPDG 배지에서 배양하였고 배양상등액을 Endo-H로 처리한 후 SDS-PAGE와 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다(도 3). SDS-PAGE와 웨스턴 블롯팅 분석 결과, 일반적으로 효모에서 단백질 분비발현에 사용되는 신호 펩타이드(signal peptide)인 MFα(mating factor alpha, ST6)와의 융합 단백질에 비해 높은 활성을 나타내는 ST5와 GH61A 및 ST8 또는 ST20과 GH61E의 융합 단백질을 발현하도록 형질전환시킨 Y2805K를 GH61 고분비 균주로 선별하였다.

[0081]

실시예 3. 분비능을 증가시키는 폴리펩티드와의 융합 단백질 이용한 GH61 고분비 생산 정제

[0082]

GH61을 대량생산하기 위하여, 상기 실시예 2에서 선별된 재조합 균주를 5L 발효조를 이용하여 유가식 배양하였다. 본 배양에 들어가기 전에 50 ml의 최소 액체 배지(0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.5% 카사미노산, 2% 포도당)에 1단계 초기배양을 수행하고 다시 200 ml의 YPD 액체배지(1% 효모추출물, 2% 펩톤, 2% 포도당)에서 배양하여 활성화시킨 후, 본 배양액(6% 효모추출물, 3% 펩톤, 2% 포도당)에 접종하여 30℃에서 48시간 동안 배양하였다. 발효 중에 포도당에 의해서 섬유분해효소(cellulase)가 충분히 발현 생산될 수 있도록 12시간 이후부터는 연속적으로 추가 배지(5% 효모추출물, 30% 포도당)를 첨가해주었다. 배양시간 별로 채취한 배지 10 μl를 SDS-PAGE 분석하여 각각의 GH61 분비량을 확인하였다(도 4).

[0083]

분비된 단백질을 분리하기 위해서 GE사의 HisTrap FF 컬럼에 배양상등액을 흡착시킨 후 250 mM 이미다졸(imidazole; pH7.5)로 단백질을 용출시켰다. 상기 컬럼을 통해 정제된 GH61 단백질을 Endo-H로 처리한 후 SDS-

PAGE와 웨스턴 블롯팅을 수행하여 Endo-H 처리 전과 후를 비교하였다(도 5, 도 6).

[0084] **실시예 4. 부가효소 GH61 단백질의 활성 증진 효과 확인**

[0085] GH61의 효과를 확인하기 위하여 기존 효소 각테일에 첨가하여 활성증진 여부를 관찰하였다. 섬유분해효소 활성은 여과지(filter paper)에 대한 분해능을 이용하여 글루코스(glucose) 생성을 비교함으로써 수치로 표현하였다. 2 ml E-tube에 1 ml의 50 mM 시트르산 나트륨 완충용액(sodium citrate buffer; pH 4.8)을 분주하고 활성을 측정하고자 하는 효소를 500 µl 첨가하였다. 1×6 cm²의 여과지(Watman No.1)를 기질로 사용하여 50 °C 항온수조에서 1 내지 10시간 동안 효소반응을 수행하였다. 또, 효소 자체가 가지고 있는 당 정량을 위해 여과지를 첨가하지 않은 동일한 시료를 동일한 조건에서 반응시켰다. 상기 반응액의 상등액을 이용하여 DNS 환원당 측정법을 통하여 생성된 환원당을 정량하였다. 본 발명의 실시예에서 사용된 GH61 발효 농축 정제 효소는 섬유분해효소 대비 20% (v/v)로 첨가하였고 GH61을 첨가하지 않은 실험군은 50 mM 시트르산 나트륨 완충용액을 넣어주었다.

[0086] 상기 유가식 발효와 농축, 정제를 통하여 얻어진 GH61E를 섬유분해효소에 첨가하여 활성의 변화를 확인하였다. 섬유분해효소 활성을 나타내는 주효소로는 실험실에서 만들어진 섬유분해효소를 발현하는 효모들을 유가식 발효하고 농축하여 각테일화 한 KCC(KRIBB cellulase cocktail; KCC)를 사용하였다. 실험방법으로는 상기한 바와 같이 여과지를 이용한 섬유분해효소 활성 측정법을 이용하였으며 GH61E의 첨가량은 섬유분해효소의 20% (v/v)로 하였다. 상기한 방법으로 활성을 측정한 결과, GH61E를 첨가한 효소의 경우 약 2.7 g/L의 글루코스를 생산하였고 GH61E를 첨가하지 않은 효소의 경우 약 2.1 g/L의 글루코스를 생산하였다. 이로써, GH61E 첨가에 의해 효소의 활성이 약 29% 증가되었음을 확인할 수 있었다(도 7).

[0087] 또한 시판중인 효소 C-tec2에 GH61E를 첨가하여 활성 증가에 대한 효과를 확인하였다. Novozyme사에서 생산된 C-tec2를 1/10 내지 1/500로 희석시키고 GH61E의 농도는 고정하여 실험하였다. GH61E의 첨가량은 사용된 Ctec2 부피의 20%로 첨가하였으며 50°C의 항온수조에서 2시간 동안 여과지와 반응시킨 후 DNS 환원당 분석법을 통하여 생산된 글루코스를 정량하였다. 실험결과, 고농도의 C-tec2에서는 GH61E의 첨가에 의해 활성이 30% 가까이 증진되는 것이 확인되었다. 그러나 효소의 농도가 낮아짐에 따라 활성 증진 효과가 줄어드는 것이 관찰되어 섬유분해효소의 활성이 높은 조건에서 GH61E 효소는 더욱 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다(도 8).

[0088] GH61E 단백질 농도에 따른 활성 증진 효과를 분석하기 위하여 C-tec2의 농도는 일정하게 고정하고 GH61E를 1/1 내지 1/10로 희석하여 활성의 변화를 확인하였다. GH61E의 첨가량은 사용된 C-tec2 부피의 20%로 첨가하였으며 50°C의 항온수조에서 1시간 동안 여과지와 반응 후 DNS 환원당 분석법을 통하여 생산된 글루코스를 정량하였다. 실험결과, 첨가되는 GH61E 단백질의 희석률이 높을수록 효소의 분해능이 감소하는 것이 확인되었다. 이로써 활성증진 효과가 GH61E에 의한 것임을 확인하였다(도 9).

[0089] Y2805 Δ*gal180*에 도입된 3개의 형질전환체들(ST5-GH61A, ST8-GH61E, ST20-GH61E)에서 발현된 단백질을 KRIBB 섬유분해효소 각테일(KRIBB cellulase cocktail)과 Novozymes사에서 시판하는 Ctec2와 혼합하여 여과지를 이용한 섬유분해효소 활성 측정법을 통해 각각의 GH61 활성을 비교한 결과, Y2805 Δ*gal180*에 도입된 ST20GH61E 균주의 활성이 가장 높은 것을 확인하였다.

[0090] **실시예 5. 분자진화를 이용한 변이 라이브러리 제조**

[0091] 고효율 GH61 스크리닝을 위해 변이유도 중합효소연쇄반응(error-prone PCR)을 이용하여 변이주 라이브러리를 얻었다. YGaST20-GH61E를 주형으로 하여 GAL47(서열번호 9) 및 GT50R(서열번호 10) 프라이머를 사용하여 변이유도 효소연쇄중합반응(PCR random mutagenesis kit, Clontech)을 수행하였다.

[0092] GAL47: 5'-gcgccatccaaaaaaaagtaagaatttttgaaaattcaagaattc-3'(서열번호 9)

[0093] GT50R: 5'-gtcattatataatataatataatattgtcactccggttcaagtcgac-3'(서열번호 10)

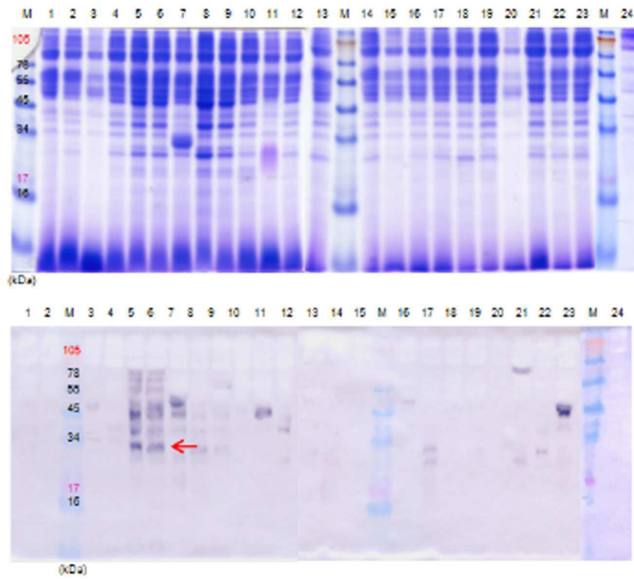
[0094] 제조업자의 프로토콜에 따라, 변이유도는 1 kb 당 2개의 변이를 유도하도록 하였으며, 구체적으로 94°C에서 30

초간 1회; 94℃ 30초간, 68℃ 3분간 25회; 68℃에서 1분간 1회의 반응조건으로 수행하였다. 아가로스젤 전기영동을 통해 회수된 절편은 YNB-CB-gal-A(0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.77% 우라실이 결핍된 영양보충물, 2% 셀로바이오스(cellobiose), 0.3% 갈락토즈(galactose), 1 µg/ml 안티마이신A) 평판배지에 YGa 벡터와 함께 세포 내 재조합을 통하여 사카로마이세스 세레비지에 Y2805Δ*gal11*(Mat a pep4::HIS3 gal1::Tc190, prb1 can1 his3-200 ura3-52)균주에 도입하였다.

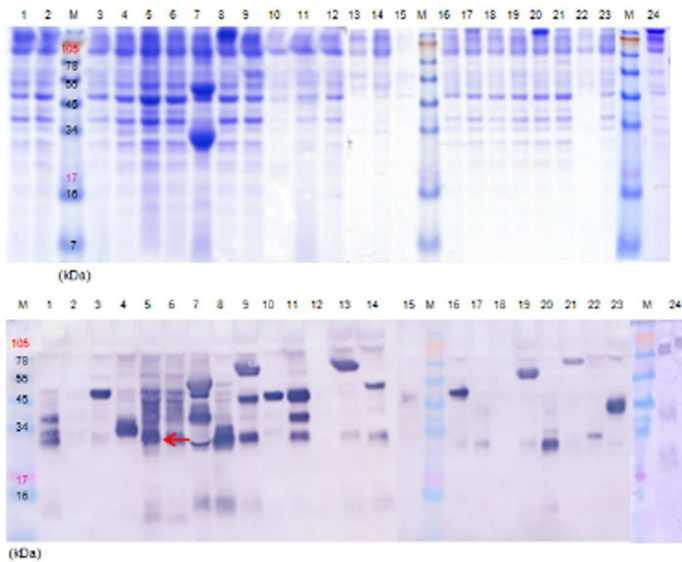
도면

도면1

(A) *GH61A*

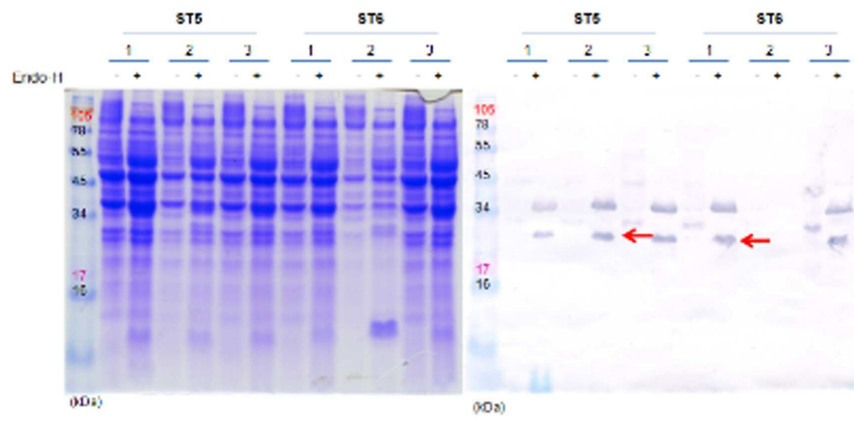


(B) *GH61E*

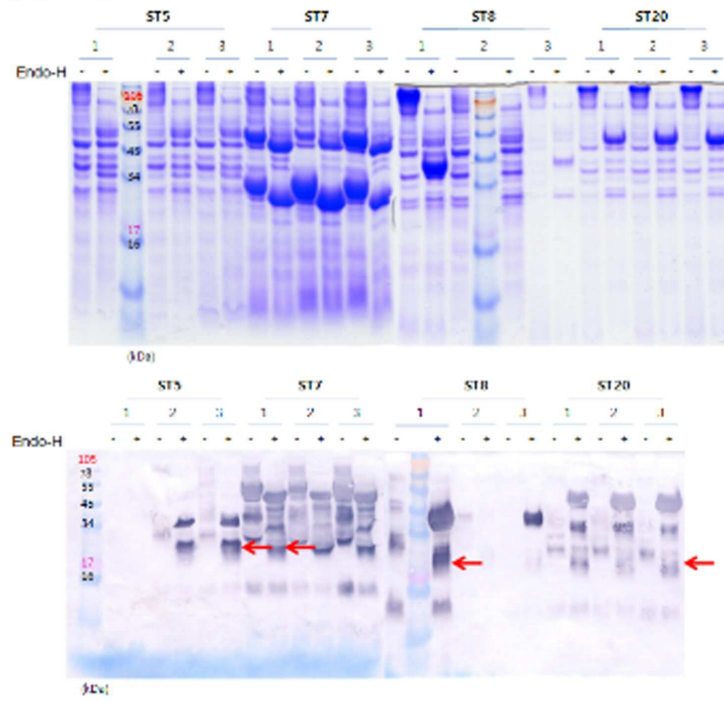


도면2

(A) *GH61A*

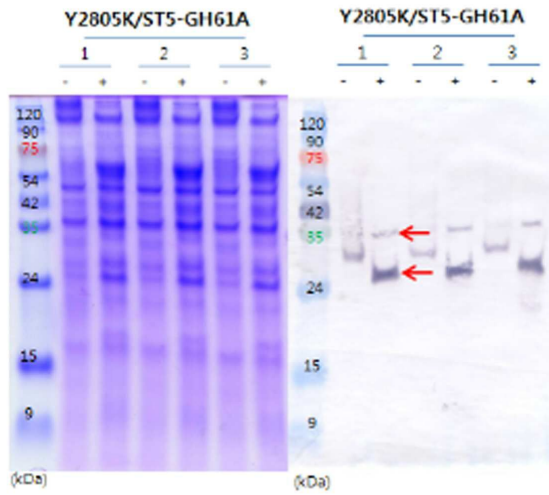


(B) *GH61E*

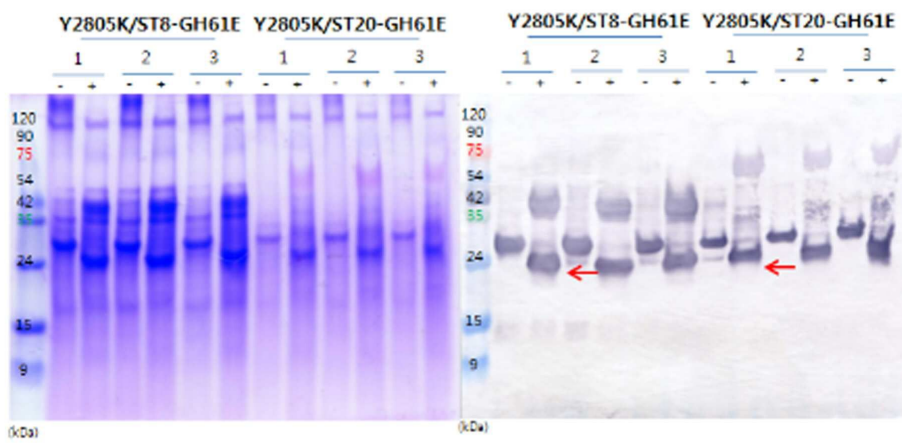


도면3

(A) Y2805K/GH61A

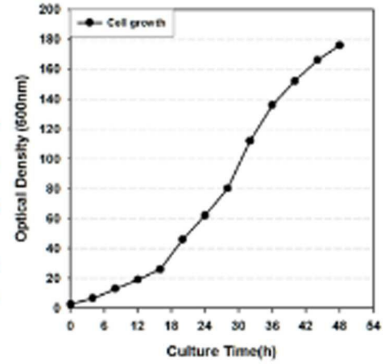
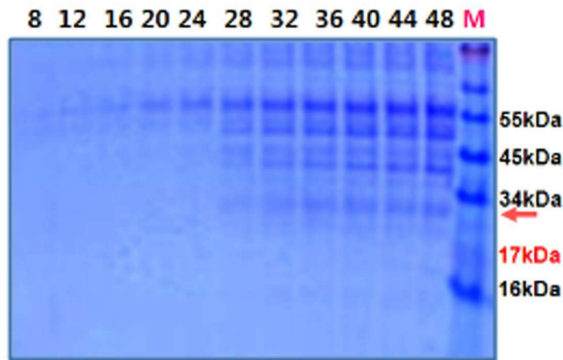


(B) Y2805K/GH61E

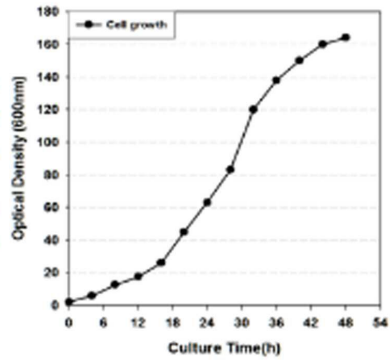
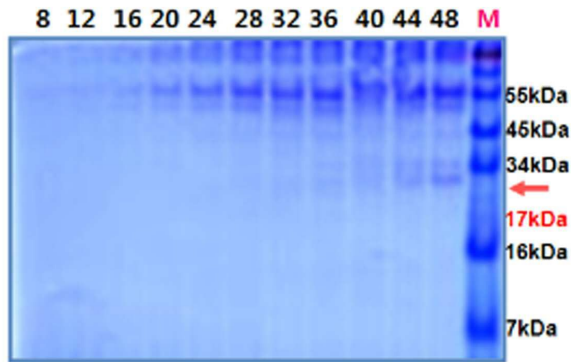


도면4

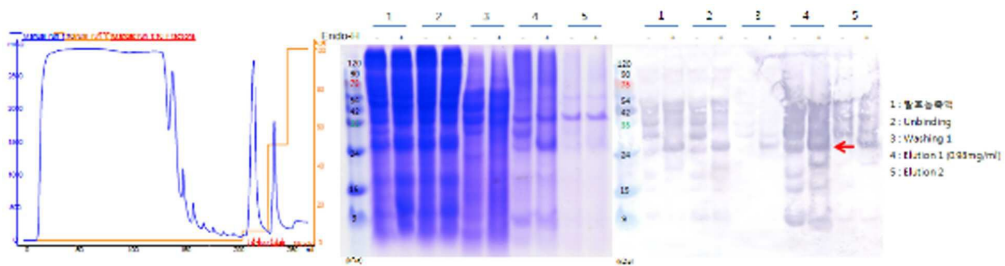
(A) Y2805K/ST5-1 *GH61A*



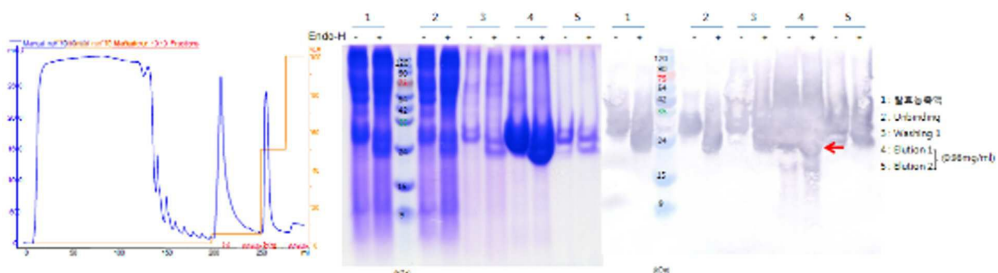
(B) Y2805K/ST20-1 *GH61E*



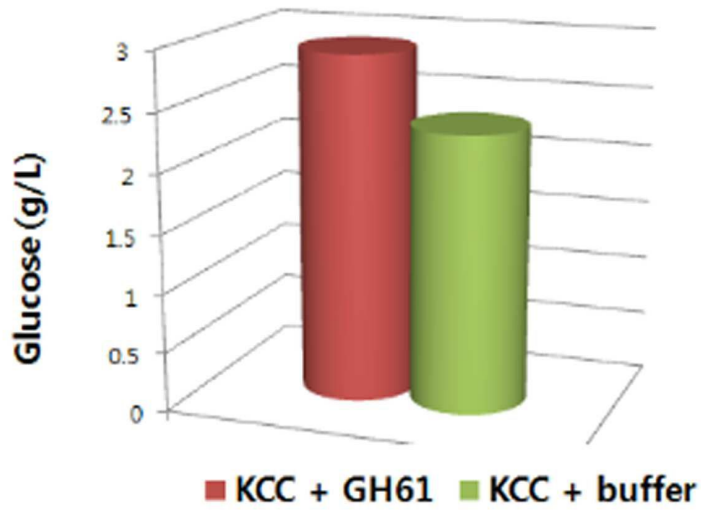
도면5



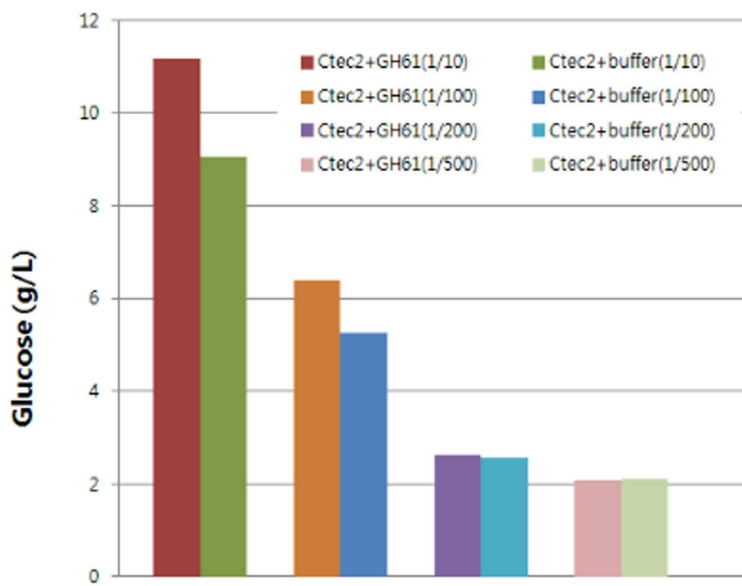
도면6



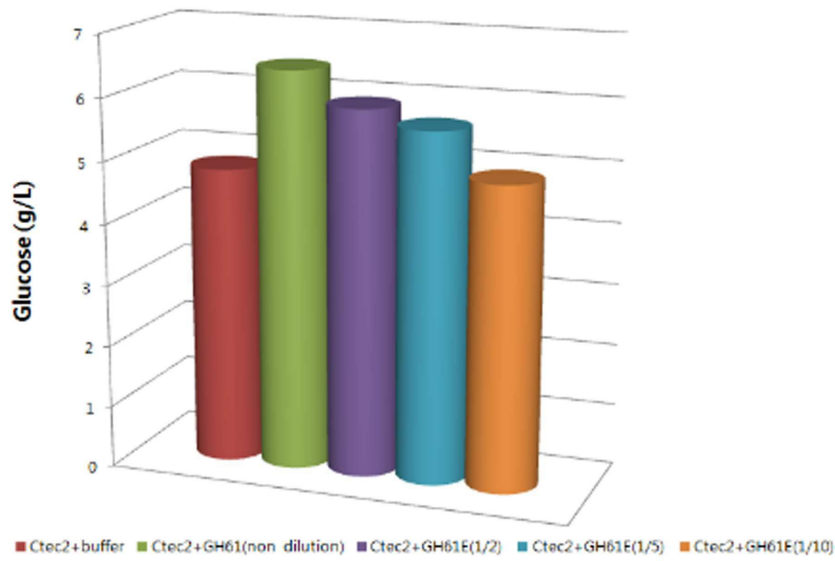
도면7



도면8



도면9



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Fusion proteins of GH61 with enhanced secretory capability
comparing to its wild-type
- <130> PA130618/KR
- <150> KR 10-2012-0068808
- <151> 2012-06-26
- <160> 10
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 753
- <212> DNA
- <213> Thermoascus aurantiacus
- <220><221> gene
- <222> (1)..(753)
- <223> GH61A(Genbank Accession ABW56451)
- <400> 1

atgtcctttt ccaaatacat tgcaacagcc ggtgttttgg cctcagcttc ttagtagca 60

ggatcatggtt tcgttcagaa tattgtgata gatggtaaaa agtattacgg cggttactta 120

gtgaatcaat atccatacat gagtaatccc ccagaggttaa tcgcgtggtc gactacggct 180

actgatcttg ggtttgttga tggactgga taccaaacc cagatattat ttgtcataga 240
 ggcgcaaagc ctggtgcatt aactgctcca gtttctccag gaggaactgt tgaactacaa 300
 tggaccccat ggccggactc tcaccatggc ccagtaataa actattttagc tccgtgcaat 360
 ggtgattgta gtacagtcca taaaacccaa ttagaatttt tcaagattgc tgaaagcggg 420
 ctcatcaatg atgataatcc tccaggtata tgggcttcag acaatctaata tgcagcgaac 480

aatagctgga ctgtcacat tccaactaca attgcccctg ggaattatgt ttaagacat 540
 gaaattattg ctttgcattc agctcagaat caagatggg cacaacta tccacaatgt 600
 attaatttac aagtcacagg aggtggttct gataatccag ctggaacttt gggaacagct 660
 ttgtaccagc acacagacc tggattctcg atcaacatat atcagaaact ttcaagttat 720
 ataatactg gtcctccatt gtatactggg taa 753

<210> 2

<211> 681

<212> DNA

<213> Thielavia terrestris

<220><221> gene

<222> (1)..(681)

<223> GH61E(Genbank Accession ACE10234)

<400> 2

atgctggcaa acggtgctat cgtcttttta gccgctgctt taggagtffc tggtcattac 60
 acatggccaa gagttaatga tggggcagat tggcaacaag tcagaaaggc cgataattgg 120
 caagacaatg gatatgtcgg tgatgtcact tcgccacaga tcagatgttt tcaagctacc 180
 ccgtccccag ctccatcagt attaaataca actgcagggt caaccgtgac ttattgggca 240
 aatccagacg tttatcacc cgggccggta caattttata tggccagagt tcctgatggc 300
 gaggatataa attcctggaa cggagacggg gcagtttggg ttaaggtata cgaagatcat 360

ccaacttttg gtgctcaatt aacatggcca tcaacaggaa aatcatcgtt tgcggttccc 420
 attcctcett gtatcaaate tggttattac ttactaaggg cagaacaat aggattacat 480
 gtggcccaga gcgtaggtag tgctcagttc tatatttctt gcgccagtt gagtgtcagc 540
 ggcggtgggt ctaccgaacc tcctaataaa gtggcattcc ctggtgctta tagtgcaact 600
 gaccagcga ttttgattaa tatatactac cctgttcca cgagttatca aaatccagga 660
 cctgcagtct tcagctgtta a 681

<210> 3

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST5 aa

<400> 3

Met Phe Asn Arg Phe Asn Lys Phe Gln Ala Ala Val Ala Leu Ala Leu

1 5 10 15

Leu Ser Arg Gly Ala Leu Gly Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp

20 25 30

Glu Thr Ala Leu Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg

<210> 4

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST8 aa

<400> 4

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

1 5 10 15

Val Ser Ala Ile Tyr Ser Asn Asn Thr Val Ser Thr Thr Thr Thr Leu

20 25 30

Ala Pro Ser Tyr Ser Leu Val Pro Gln Glu Thr Thr Ile Ser Tyr Ala

35 40 45

Asp Asp Leu Ala Ala Ser Ala Ser Ala Gly Leu Ala Leu Asp Lys Arg

50 55 60

<210> 5
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ST20 aa
 <400> 5

Met Gln Phe Ser Thr Val Ala Ser Ile Ala Ala Val Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Asn Val Thr Thr Ala Thr Val Ser Gln Glu Ser Thr
 20 25 30

Thr Leu Val Thr Ile Thr Ser Cys Glu Asp His Val Cys Ser Glu Thr
 35 40 45

Val Ser Pro Ala Leu Val Ser Thr Ala Thr Val Thr Val Asp Asp Val
 50 55 60

Ile Thr Gln Tyr Thr Thr Trp Cys Pro Leu Thr Thr Glu Ala Pro Lys
 65 70 75 80

Asn Gly Thr Ser Thr Ala Ala Pro Val Thr Ser Thr Glu Ala Pro Lys
 85 90 95

Asn Thr Thr Ser Ala Ala Pro Thr His Ser Val Thr Ser Tyr Thr Gly
 100 105 110

Ala Ala Ala Lys Ala Leu Pro Ala Ala Gly Ala Leu Leu Ala Ala Ser
 115 120 125

Ala Ser Ala Gly Leu Ala Leu Asp Lys Arg
 130 135

<210> 6
 <211> 297
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ST5
 <400> 6

ggatccatgt tcaatcgttt taacaaattc caagctgctg tcgctttggc cctactctct 60

cgcggcgctc tcggtgctcc agtcaacact acaacagaag atgaaacggc actaattccg 120

gctgaagctg tcacgggta cttagattta gaaggggatt tcgatgttgc tgttttgcca 180
 ttttccaaca gcacaaataa cgggttattg tttataaata ctactattgc cagcattgct 240
 gctaaagaag aaggggtggc cgctcggcc tctgctggcc tcgccttaga taaaaga 297

<210> 7
 <211> 198
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ST8
 <400> 7

ggatccatgc ttcaatccgt tgtcttttcc gctcttttaa ccttcgcaag ttctgtgtca 60
 gcgatttatt caaacaatac tgtttctaca actaccactt tagcggccag ctactccttg 120

gtgccccaaag agactacat atcgtagcc gacgacctgg ccgcctcggc ctctgctggc 180
 ctgccttag ataaaaga 198

<210> 8
 <211> 430
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ST20
 <400> 8

ggccattacg gccaaaatgc aattttctac tgtcgcttct atgcccgctg tcgccgctgt 60
 cgcttctgcc gctgctaacg ttaccactgc tactgtcagc caagaatcta ccactttggt 120
 caccatcact tcttgtgaag accacgtctg ttctgaaact gtctccccag ctttggtttc 180
 caccgctacc gtcaccgtcg atgacgttat cactcaatac accacctggt gccattgac 240

cactgaagcc ccaaagaacg gtacttctac tgetgtcca gttacctcta ctgaagctcc 300
 aaagaacacc acctctgtcg ctccaactca ctctgtcacc tcttacctg gtgetgctgc 360
 taaggctttg ccagctgctg gtgctttgct ggccgcctcg gcctctgctg gcctcgctt 420
 agataaaaaga 430

<210> 9
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAL47 primer
 <400> 9

gcgtccatcc aaaaaaaaaag taagaatttt tgaaaattca agaattc 47

<210

> 10

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GT50R primer

<400> 10

gtcattatta aatatatata tatatatatt gtcactccgt tcaagtcgac 50