



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0133922
(43) 공개일자 2016년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/75 (2006.01)
C12N 15/77 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)
C12N 15/75 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0067110

(22) 출원일자 2015년05월14일

심사청구일자 2015년05월14일

(71) 출원인

대한제당 주식회사

인천광역시 중구 월미로 116 (북성동1가)

(72) 발명자

경명옥

인천광역시 중구 홍예문로 64-1, 202호 (전동, 자
유파크빌)

조성은

인천광역시 부평구 수변로15번길 26, 108동 501호
(부개동, 베스트빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 14 항

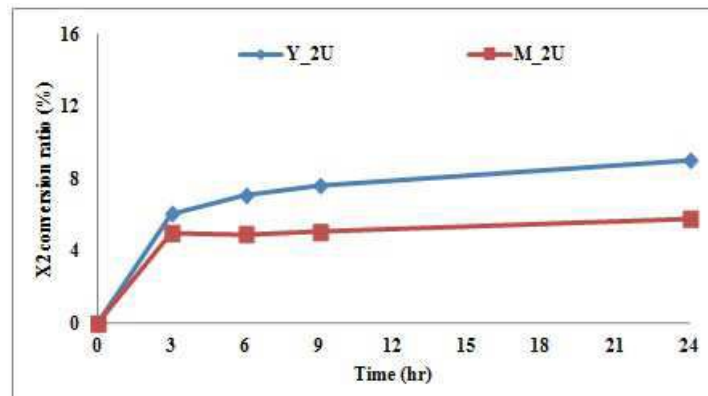
(54) 발명의 명칭 자일로비오스 생산을 위한 β -자일로시다아제 발현 시스템

(57) 요약

본 발명은 자일로비오스 생산을 위한 β -자일로시다아제 발현 시스템을 제공한다.

본 발명에 따른 β -자일로시다아제 발현 시스템은 자일로스로부터 자일로비오스로의 생 전환율이 높은 β -자일로시다아제를 제공하며, 짧은 시간 동안에 높은 수율로 자일로비오스의 대량 생산이 가능하게 한다. 이에 따라, 신규 설당 보완제의 대량 확보가 가능하며, 기능성 당 산업뿐만 아니라 이를 이용한 건강식품 소재, 의약품, 화장품용 소재 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 15/77 (2013.01)

C12N 15/81 (2013.01)

C12N 9/2402 (2013.01)

C12Y 302/01037 (2013.01)

(72) 발명자

이경선

인천광역시 남구 낙섬동로 9, 11동 1506호 (용현동, 금호아파트)

서승우

서울특별시 동대문구 장한로 33길 15, 302호 (장안동)

정상원

서울특별시 영등포구 양평로17길 36, 1동 7104호 (양평동4가, 성원아파트)

최근범

충청북도 청주시 흥덕구 청향로23번길 28, 203호 (비하동)

김근필

서울특별시 강남구 개포로 516, 602동 404호 (개포동, 주공아파트)

박근희

강원도 강릉시 주문진읍 울릉1길 2-3호

윤상욱

대구광역시 동구 효동로 23-16, 302호 (효목동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313024-03-2-HD020

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농심수산물기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 설탕보완재 xylobiose 생합성 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 대한제당 (주)

연구기간 2013.11.20 ~ 2016.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 β -자일로시다아제를 포함하는 자일로비오스 생산용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 β -자일로시다아제는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것인 자일로비오스 생산용 조성물.

청구항 3

자일로를 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 β -자일로시다아제 또는 β -자일로시다아제를 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 자일로비오스 생산 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 β -자일로시다아제는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것인 자일로비오스 생산 방법.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 반응 온도는 40 내지 60 °C이고, 반응 pH는 5.0 내지 8.0인 자일로비오스 생산 방법.

청구항 6

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 자일로스 농도는 400 g/L 내지 1000 g/L인 자일로비오스 생산 방법.

청구항 7

서열번호 2의 β -자일로시다아제 염기 서열, GPD 프로모터 염기 서열, His-tag 염기 서열, 및 delta 염기 서열을 포함하는 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 GPD 프로모터 염기 서열은 서열번호 3의 염기서열로 이루어지며, His-tag 염기 서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어지며, delta 염기서열은 서열번호 5의 염기 서열로 이루어지는 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트.

청구항 9

제7항에 있어서, 서열번호 6의 2-micron 염기 서열, 서열번호 7의 암피실린 저항성 유전자 염기 서열, 서열번호 8의 CYC1 터미네이터 염기 서열 및 서열번호 9의 TRP 염기 서열을 더 포함하는 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트를 포함하는 β -자일로시다아제 생산용 형질전환 균주.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 균주는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 중 선택된 어느 하나인 β

-자일로시다아제 생산용 형질전환 균주.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 형질전환 균주는 기탁번호 KCTC 18382P의 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) pTSY01-XynB인 β -자일로시다아제 형질전환 균주.

청구항 13

(a) 제10항에 따른 β -자일로시다아제 생산용 형질전환 균주를 배지 총 중량에 대하여 0.5 내지 2 중량 %의 효모 추출물(yeast extract), 1 내지 3 중량 %의 펩톤(peptone) 및 1 내지 4 중량 %의 글루코스를 포함하는 YPD 배지에 접종하는 단계;

(b) 반응 온도 25 내지 35 °C 및 반응 pH 7.5 내지 8.5로 배양하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 배양액으로부터 β -자일로시다아제를 분리하는 단계를 포함하는 β -자일로시다아제의 제조 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 β -자일로시다아제 생산용 형질전환 균주는 기탁번호 KCTC 18382P의 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) pTSY01-XynB인 β -자일로시다아제의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자일로스를 자일로비오스로 전환하는 β -자일로시다아제를 포함하는 자일로비오스 생산용 조성물, 이를 제조하기 위한 발현 컨스트럭트 및 재조합 균주, 자일로스로부터 자일로비오스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자일로-올리고사카라이드(Xylo-oligosaccharide, XOS)는 올리고당의 일종으로 자일로스(xylose)가 β -(1,4)-linkage에 의해 결합된 형태이며, 이는 인체의 소화효소에 의해 분해되지 않아 대장까지 흡수되지 않고 도달한다. 자일로-올리고사카라이드(Xylo-oligosaccharide, XOS)는 장내 유익미생물인 Bifidobacteria에 의해 분해되어 선택적으로 Bifidobacteria의 증식을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 항암 활성, 정균 활성 등의 건강 기능을 나타내는 것이 알려져 있다. 또한, 우수한 보습 효과를 가짐으로써, 이를 화장품에 적용하려는 시도가 이루어지고 있다.

[0003] 이러한 자일로-올리고사카라이드의 상업적 생산을 위해서는 목재, 면실각, 옥수수심 등에 물리화학적 전처리 과정을 거친 후 엔도-자일라나제(endo-xylanase)와 β -자일로시다아제에 의한 자일란의 분해를 거쳐야한다. 그런데, 자일로-올리고사카라이드 생산 과정 중 전처리 과정은 많은 양의 화학물질 사용을 필요로 하기 때문에, 공정에서 폐수 등의 다량의 오염물질이 발생하는 문제점이 존재한다.

[0004] 한편, 시판되는 자일로-올리고사카라이드 제품들은 일반적으로 혼합물 형태의 자일로-올리고사카라이드로 제공된다. 즉, 자일로-올리고사카라이드에서 자일로비오스만을 분리, 정제하는데는 어려운 점이 많기 때문에, 시판되는 물질로써 고순도의 자일로비오스 제품은 없다.

[0005] 그런데, 자일로-올리고사카라이드의 중합도가 높은 경우에는 착색 경향이 낮아지고 Bifidobacteria 등에 의한 자화성이 좋지 못하기 때문에, 자일로비오스(xylobiose)와 같은 중합도가 낮은 물질을 선택적으로 생산할 필요성이 있다.

[0006] 또한, 보존 중에서의 미생물 증식을 방지하기 위해서나, 식품의 본래의 조성을 손상시키지 않기 위해서나, 수송 비용을 저감시키기 위하여, 가능한 고농도의 시럽이 바람직하다. 또한, 분말화한 자일로올리고사카라이드를 제조할 때에 분무 건조시키려면 농축시킨 액체를 사용하는 것이 바람직하다.

[0007] 하지만, 현재까지 알려진 방법으로 순도가 높은 자일로비오스를 생산하기 어려우며, 이에 따라 자일란에 효소처리를 통해 고순도 자일로비오스(xylobiose) 시럽을 생산하려는 다양한 시도가 있었으나, 아직까지 관련 성과

가 이루어진 것이 없다.

[0008] 이러한 배경 하에, 자일로-올리고사카라이드가 가지는 모든 생리 활성의 주요인으로 알려진 자일로비오스(xylobiose)를 고순도로 얻기 위한 연구개발이 필요하며, 특히 고부가가치 신규 기능성 감미소재인 자일로비오스(xylobiose) 생산을 위한 효과적인 자일로비오스 생산 공정에 대한 연구 개발이 이루어져야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 자일로를 자일로비오스로 전환하는 활성을 가지는 신규 β -자일로시다아제를 포함하는 자일로비오스 생산용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 신규 β -자일로시다아제를 제조하는 방법 또는 신규 β -자일로시다아제를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 자일로스로부터 자일로비오스를 제조하는 방법 또는 자일로스로부터 자일로비오스를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 건강기능성 당류인 자일로비오스(xylobiose)의 효과적인 생산을 위하여, 상업적으로 이용이 가능한 β -자일로시다아제 발현 시스템 및 자일로비오스 생산 방법 기술을 개발하고자 예의 노력한 결과 신규 β -자일로시다아제를 이용하여 자일로를 자일로비오스로 대량 전환하는데 성공하여 본 발명을 완성하였다.

[0013] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 β -자일로시다아제를 포함하는 자일로비오스 생산용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에 따른 자일로비오스 생산용 조성물은 자일로를 자일로비오스로 전환시킬 수 있는 신규 β -자일로시다아제에 관한 것으로, 자일로의 자일로비오스로의 전환에 대한 최대 활성을 가지고, 짧은 시간 동안에 높은 수율로 자일로비오스의 대량 생산이 가능하다. 상기 β -자일로시다아제는 바실러스 퍼밀러스(*Bacillus pumilus*) 유전체 DNA에 존재하는 DNA 중 특정 DNA를 중합효소반응에 의해 증폭시키고, 증폭된 특정 DNA를 발현 컨스트럭트에 삽입하여 재조합 발현 컨스트럭트를 제조한 후, 상기 재조합 발현 컨스트럭트로 숙주 균주를 형질 전환시켜 재조합 균주를 제조한 후, 상기 재조합 균주를 배양하여 발현시키는 방법으로 얻어질 수 있다. 보다 바람직하게는 서열번호 12의 바실러스 퍼밀러스(*Bacillus pumilus*) IPO xynB 유전자를 합성하고, 이로부터 서열번호 2의 β -자일로시다아제 염기서열을 얻어, 이를 발현 컨스트럭트에 삽입하여 재조합 발현 컨스트럭트를 제조한 후, 상기 재조합 발현 컨스트럭트로 숙주 균주를 형질전환시켜 재조합 균주를 제조한 후, 상기 재조합 균주를 배양하여 발현시키는 방법으로 얻어질 수 있다.

[0015] 상기 재조합 균주의 숙주 균주는 식품학적으로 안전한 균주인 것이 바람직하다. 상기 식품학적으로 안전한 균주는 일반적으로 안전한 것으로 인정되는 GRAS(generally accepted as safe)급 균주를 의미하며, 예를 들어 사카로마이세스속 균주(*Saccharomyces* sp.), 바실러스속 균주(*Bacillus* sp.), 코리네박테리움속 균주(*Corynebacterium* sp.) 등에서 선택될 수 있다. 상기 균주들은 사료, 의약품 및 식품 등의 분야에서 다양한 용도를 갖는 화학물질을 생산하는 산업용 미생물이다. 이러한 균주들은 유전자 조작 및 대량 배양에 용이하거나, 다양한 공정 조건에서 높은 안정성을 가지는 균주이다. 또한, 이러한 균주들은 다른 세균에 비하여 상대적으로 단단한 세포막 구조를 보유하고 있기 때문에 높은 당 농도 등에 의한 삼투압의 영향 하에서도 균체가 안정적인 상태로 존재하는 생물학적 특성을 보인다. 상기 GRAS(generally accepted as safe)급 균주의 구체적인 예로는 사카로마이세스 세레비자에(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 등이 있으며, 바람직하게 사카로마이세스 세레비자에(*Saccharomyces cerevisiae*)이다.

[0016] 본 발명에 따른 β -자일로시다아제는 바람직하게는 분자량이 55 내지 60 kDa이고 최적 활성 온도가 40~60℃, 바람직하게 45 내지 55 ℃의 범위이고, 최적 활성 pH가 5.0~8.0, 바람직하게 6.0 내지 7.0의 범위이다. 본 발명에 따른 β -자일로시다아제는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지나, 본 발명에 따른 β -자일로시다아제의 균등 범위는 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따른 β -자일로시다아제의 균등 범위는 자일로를 자일로비오스로 전환하는 활성이 유지되는 한, 서열번호 1의 아미노산 중 일부가 치환, 삽입 및/또는 결실된 것일

수 있다.

- [0017] 상기 아미노산의 치환은 바람직하게는 단백질의 특성이 바뀌지 않는 보존적 아미노산 치환(conservative amino acid replacement)에 의해 이루어지는 것이 바람직하다. 또한, 상기 아미노산의 변형은 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등에 의해 이루어질 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 β -자일로시다아제의 균등 범위는 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 자일로스의 자일로비오스로의 전환에 대한 활성이 증가한 단백질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 β -자일로시다아제의 균등 범위는 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명은 또한, 자일로를 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 β -자일로시다아제 또는 β -자일로시다아제를 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 자일로비오스 생산 방법을 제공한다.
- [0019] 상기 β -자일로시다아제를 포함하는 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 β -자일로시다아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환되거나 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 β -자일로시다아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 컨스트럭트에 의해 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물 또는 상기 재조합 균주의 파쇄물을 포함한다. 이때, 상기 β -자일로시다아제 또는 β -자일로시다아제를 포함하는 조성물의 반응 온도는 40 내지 60 $^{\circ}\text{C}$, 바람직하게 45 내지 55 $^{\circ}\text{C}$ 이고, 반응 pH는 5.0 내지 8.0, 바람직하게 6.0 내지 7.0일 수 있으며, 반응을 위한 자일로스 농도는 400 g/L 내지 1000 g/L, 바람직하게 500 내지 800 g/L일 수 있으나, 농도는 특별히 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 β -자일로시다아제 염기 서열, GPD 프로모터 염기 서열, His-tag 염기 서열 및 delta 염기 서열을 포함하는 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트를 제공한다. 본 발명의 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트는 형질전환체에서 신규 β -자일로시다아제를 고효율로 발현할 수 있어 저비용으로 대량의 β -자일로시다아제를 생산할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따른 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트는 GPD promoter를 통해 강력하게 β -자일로시다아제가 발현되며, transposon 기능을 가진 delta 서열을 포함하여 세포 내의 지속적인 발현이 가능하며, His-tag 서열을 포함하여 분리 정제가 용이하다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 발현 컨스트럭트는 세포 내에서 단백질 발현을 위한 최소의 엘리먼트(element)만을 포함하는 핵산분자를 의미한다. 바람직하게는 본 발명의 발현 컨스트럭트는 상기 언급된 구성요소들을 최소의 필수 구성요소로 포함한다.
- [0023] 본 발명의 발현 컨스트럭트는 재조합 벡터일 수 있다. 바람직하게, 당업계에 알려진 벡터 재조합 방법에 따라 GPD 프로모터 염기 서열을 His-tag 염기 서열이 첨가된 서열번호 2의 β -자일로시다아제 염기 서열 상류에 연결하고, delta 염기 서열을 포함하는 재조합 벡터일 수 있다. 여기서, 상기 GPD 프로모터 염기 서열은 서열번호 3의 염기서열을 포함할 수 있으며, His-tag 염기 서열은 서열번호 4의 염기서열을 포함할 수 있으며, delta 염기서열은 서열번호 5의 염기 서열을 포함할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명에 따른 발현 컨스트럭트는 서열번호 6의 2-micron 염기 서열, 서열번호 7의 암피실린 저항성 유전자 염기 서열, 서열번호 8의 CYC.1 터미네이터 염기 서열 및 서열번호 9의 TRP 염기 서열 중 어느 하나 이상을 더 포함하는 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트이다.
- [0025] 상기 언급된 염기서열들은 기능적으로 동등한 성질을 가지는 이상, 상기 각각의 염기 서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95%이상, 또는 99% 이상의 상동성을 가지는 염기서열을 본 발명의 범주에 포함하는 것이다.
- [0026] 예컨대, 본원 발명에 따른 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트는 2-micron, 암피실린 저항성 유전자, GPD 프로모터, His-Tag, CYC.1 터미네이터, Delta 및 TRP1 서열을 가지는 발현벡터에 서열번호 2의 β -자일로시다아제 염기 서열이 삽입된 것으로, 도 1에 기재된 재조합 발현 벡터 구조를 가진다. 재조합 벡터의 모식도는 도 1에 나타내었다. 상기 β -자일로시다아제 삽입을 위한 컨스트럭트는 서열번호 10의 염기서열을 가질 수 있다. 또한, 일실시예에 따르면, β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트는 서열번호 11의 염기서열을 가진다.
- [0027] 본 발명은 또한, β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트를 포함하는 β -자일로시다아제 생산용 형질전환 균주를 제공한다. 상기 재조합 균주의 숙주 균주는 식품학적으로 안전한 균주인 것이 바람직하다. 식품학적으로 안전한 균주는 일반적으로 안전한 것으로 인정되는 GRAS(generally accepted as safe)급 균주를 의미하며, 예를 들어 사카로마이세스속 균주(*Saccharomyces* sp.), 바실러스속 균주(*Bacillus* sp.), 코리네박테리움속 균주

(*Corynebacterium* sp.) 등에서 선택될 수 있다. 구체적인 예로는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 등이 있으며, 바람직하게 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)이다. 가장 바람직하게 본 발명에 따른 β -자일로시다아제 생산용 형질전환 균주는 기탁번호 KCTC 18382P로 2015년 4월 29일 자에 한국생명공학 연구원 미생물자원센터에 기탁된 형질전환 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) pTSY01-XynB이다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트를 균주에 형질전환하는 방법은 당업계에서 공지된 형질전환하는 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들어, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리 법, 유전자 밤바드먼트, 초산-리튬 DMSO법 등을 포함한다.

[0029] 본 발명은 또한, (a) β -자일로시다아제 생산용 형질전환 균주를 배지 총 중량에 대하여 0.5 내지 2 중량 %의 효모 추출물(yeast extract), 1 내지 3 중량 %의 펩톤(peptone) 및 1 내지 4 중량 %의 글루코스를 포함하는 YPD 배지에 접종하는 단계;

[0030] (b) 반응 온도 25 내지 35 °C 및 반응 pH 7.5 내지 8.5로 배양하는 단계; 및

[0031] (c) 상기 (b) 단계의 배양액으로부터 β -자일로시다아제를 분리하는 단계를 포함하는 β -자일로시다아제의 제조 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명에 따른 β -자일로시다아제의 제조방법은 (a) β -자일로시다아제 생산용 형질전환 균주를 배지 총 중량에 대하여 0.5 내지 2 중량 %의 효모 추출물(yeast extract), 1 내지 3 중량 %의 펩톤(peptone) 및 1 내지 4 중량 %의 글루코스를 포함하는 YPD 배지에 접종하는 단계를 포함한다. 본 발명에 있어서, YPD 배지는 상기 함량 범위의 효모 추출물, 펩톤 및 글루코스를 포함하여 배양시에 균주의 빠른 성장 및 β -자일로시다아제 생산에 효과를 보인다. 본 발명에 따른 형질전환 균주는 바람직하게 형질전환 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 보다 바람직하게 기탁번호 KCTC 18382P의 형질전환 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) pTSY01-XynB이다.

[0033] 본 발명에 따른 β -자일로시다아제의 제조방법은 (b) 반응 온도 25 내지 35 °C, 바람직하게 28 내지 32 °C 및 반응 pH 7.5 내지 8.5, 바람직하게 pH 7.8 내지 8.2로 배양하는 단계를 포함한다. 본 발명에 있어서, 상기 배양은 100 rpm 내지 400 rpm의 조건하에서 수행하는 것이 바람직하며, 상기 온도 및 pH 조건 하에서 빠른 성장 및 β -자일로시다아제 생산에 효과를 보인다.

[0034] 본 발명에 따른 β -자일로시다아제의 제조방법은 (c) 상기 (b) 단계의 배양액으로부터 β -자일로시다아제를 분리하는 단계를 포함하는 β -자일로시다아제의 제조방법을 제공한다. 상기 β -자일로시다아제를 분리하는 단계는 동결-해동 반복, 초음파 처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리 또는 정제가 가능하다. 예를 들어, 균주에 의해 발현된 단백질의 분리 또는 정제방법으로는 전기영동, 원심분리, 겔 여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역흡착 친화력 크로마토그래피, 역상 HPLC, 겔 침투 HPLC), 등전성 포커스 및 이의 다양한 변화 또는 복합 방법을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 한편, 본 발명에서 형질전환 균주의 파쇄물로부터 β -자일로시다아제를 분리하는 것은 바람직하게는 펩티드 태그를 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의해 수행될 수 있다. 상기 펩티드 태그로는 HA 태그, FLAG 태그, His 태그, BCCP (biotin carboxyl carrier protein), c-myc 태그, V5 태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제 (GST) 또는 MBP(maltose binding protein) 등과 같이 공지된 다양한 태그를 사용할 수 있으며, 이중 His 태그인 것이 바람직하다. His-태깅된 단백질은 Ni-NTA(니켈-니트릴로트리아세트산) 수지의 칼럼 상에 특이적으로 트랩핑되어 분리가능하다. 또한, 상기 분리된 β -자일로시다아제는 사용을 위하여 투석 후 농축시키는 단계가 더 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 따른 β -자일로시다아제 발현 시스템은 자일로스로부터 자일로비오스의 생전환율이 높은 β -자일로시다아제를 제공하며, 짧은 시간 동안에 높은 수율로 자일로비오스의 대량 생산이 가능하게 한다. 이에 따라, 신규 설탕 보완제의 대량 확보가 가능하며, 기능성 당 산업뿐만 아니라 이를 이용한 건강식품 소재, 의약품, 화장품용 소재 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 β -자일로시다아제 발현 컨스트럭트의 일모식도를 나타낸다.

도 2는 온도 조건에 따른 β -자일로시다아제 발현 최적화 조건 확인 결과를 나타낸다.

도 3은 pH 조건에 따른 β -자일로시다아제 발현 최적화 조건 확인 결과를 나타낸다.

도 4는 탄소원 조건에 따른 β -자일로시다아제 발현 최적화 조건 확인 결과를 나타낸다.

도 5는 자일로스 600 g/L 및 β -자일로시다아제 1 U 처리시 자일로비오스 생합성 전환율 결과를 나타낸다.

도 6은 자일로스 600 g/L 및 β -자일로시다아제 2 U 처리시 자일로비오스 생합성 전환율 결과를 나타낸다.

도 7은 자일로스 700 g/L 및 β -자일로시다아제 1 U 처리시 자일로비오스 생합성 전환율 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0038] <실시예 1> β -자일로시다아제 (*XynB*) 발현 벡터 클로닝 및 발현 시스템 제작

[0039] 서열번호 12의 *Bacillus pumilus* IPO xynB의 DNA (2,201 bp)를 합성한 후, 제한효소 자리가 첨가된 primer를 제작하여 PCR을 통해 β -자일로시다아제 DNA를 제조하였다.

[0040] 발아 효모에서 강력하게 발현되는 GPD promoter를 포함하는 벡터(pTSY01)에 β -자일로시다아제를 삽입하기 위하여 합성된 double-stranded β -자일로시다아제 DNA를 template로 하여 다음의 서열을 가진 primer set로 PCR을 수행하였다. 상기 GPD promoter를 포함하는 벡터는 서열번호 13의 염기 서열을 가진다.

	서열정보
KK510 (<i>Bam</i> HI)	5'-ATATGGATCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCAGCAGCGGCC ATTTGAAGATTACTAATCCAGTGCT-3' (서열번호 14)
KK511 (<i>Xho</i> I)	5'-ATATCTCGAGTTATTCAGTTGTTTCTTCGTAT-3' (서열번호 15)

[0041]

[0042] 상기, PCR기법으로 amplification한 *XynB*를 pTSY01 내 삽입하기 위하여 *Bam*HI, *Xho*I으로 double enzyme cutting을 수행하였다. 벡터에 삽입되는 β -자일로시다아제 서열은 서열번호 2의 염기 서열을 가진다. 또한, pTSY01 벡터 역시 같은 제한효소로 cutting을 수행하였다. Cutting한 *XynB*와 pTSY01를 gel elution을 통해 정제한 뒤, T4 ligase를 이용하여 ligation을 수행하였다. Ligation한 DNA 샘플을 *E.coli*에 transformation한 뒤, ampicillin-resistant colony를 선별하고, 다음의 primer set을 이용한 DNA sequencing을 통해 *XynB*의 염기서열에 대한 서열 분석을 정확히 수행하였다.

	서열정보
KK518	5'-AGCCCCGCATCTTTATTACA-3' (서열번호 16)
KK519	5'-CTCTTTTCCGCCTACCACAT-3' (서열번호 17)

[0043]

[0044] 또한, GPD promoter를 통해 강력하게 발현되는 *XynB*의 발아효모 세포 내의 지속적인 발현을 위해 transposon 기능을 가진 delta sequence를 삽입하기 위하여 발아효모의 gDNA를 template으로 하여 다음의 서열을 가진 primer set으로 PCR을 수행하였다.

	서열정보
KK563(<i>Ngo</i> MIV)	5'-ATATGCCGGCTGTTGGAATAGAAATCAACTATCAT-3' (서열번호 18)
KK564 (<i>Ngo</i> MIV)	5'-ATATGCCGGCTGAGAATTGGGTGAATGTTGAGATA-3' (서열번호 19)

[0045]

[0046] PCR기법으로 amplification한 delta sequence를 pTSY01-*XynB* 내 삽입을 위하여 *Ngo*MIV로 enzyme cutting을 수행하였다. 동시에, pTSY01-*XynB* 역시 같은 제한효소로 cutting을 진행하였다. Cutting한 delta sequence와 pTSY01-*XynB*를 gel elution을 통해 정제한 뒤, T4 ligase를 이용하여 ligation을 진행하였다. Ligation한 DNA 샘플을 *E.coli*에 transformation한 뒤, ampicillin-resistant colony를 선별하고, 다음의 primer set을 이용한 DNA sequencing을 통해 delta의 삽입여부를 확인하고 β-자일로시다아제 (*XynB*) 발현 벡터를 완성하였다. β-자일로시다아제 발현 벡터의 모식도는 도 1에 나타내었으며, 서열번호 11의 염기서열을 가진다.

	서열정보
KK484	5'-ATATAGATCTTGAGAATGGGTGAATGTTGAGATA-3' (서열번호 20)
KK485	5'-ATATCATATGTGTTGGAATAGAAATCAACTATCAT-3' (서열번호 21)

[0047]

[0048] <실시예 2> β-자일로시다아제 생산 *Saccharomyces cerevisiae* 재조합 균주 제조

[0049] 상기 제조된 β-자일로시다아제 (*XynB*) 발현 벡터는 하기 방법에 의해 *Saccharomyces cerevisiae* SK1 균주에 형질전환되었다.

[0050] 30 °C 조건, 밤샘으로 YPG 플레이트에서 *Saccharomyces cerevisiae* SK1 균주를 배양하고, 5 ml YPD배지에 콜로니를 접종한 후 30 °C에서 밤샘으로 배양하였다. 1: 50으로 10 ml YPD배지에 희석하고 4시간 동안 30 °C에서 배양한 다음, 세포를 수거하여 3,000 rpm으로 5분간 원심분리를 수행하였다. 세포 펠렛은 1 ml 증류수에 현탁되고 3,000 rpm으로 5분간 원심분리를 수행하였다. 세포 펠렛은 10 mM LiAc 1 ml에 현탁되고 다시 3,000 rpm으로 5분간 원심분리를 수행하였다. 배지는 제거되고 세포에 50% PEG 480 ul, 100mM LiAc 72ul, 2mg/ml single-stranded salmon sperm DNA 50ul 및 transforming plasmid DNA 1.0ug이 첨가되었다. 그 후 30분 동안 42 °C에서 Heat shock 처리하고 0.7 ml 증류수가 첨가되었다. 세포는 5분간 3,000 rpm으로 원심분리되어 수거되었다. 배지는 제거되고 1 ml YPD에 세포 펠렛은 현탁된 후 추가의 1 ml YPD를 포함하는 유리 배양 튜브에 옮겨졌다. 4 시간 동안 30 °C에서 더 배양한 후 세포는 수거되었다. 세포는 300 ul 증류수에서 현탁된 후 selective plate에서 30 °C 조건으로 3 내지 4일간 배양되었다.

[0051] 제조된 균주는 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 수탁번호 KCTC18382P으로 2015년 4월 29일자에 자에 기탁되었다.

[0052] <실시예 3> *S.cerevisiae* 재조합 균주의 β-자일로시다아제 발현 최적화 배양 조건 확립

[0053] 상기 *S.cerevisiae* 재조합 균주의 β-자일로시다아제 발현 최적화 배양 조건 확립을 위하여 온도, pH, 탄소원 조건을 달리하면서 배양을 수행하였다.

[0054] β-자일로시다아제 활성 검정은 다음 방법을 통해 수행되었다.

[0055] 1 mM p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside 200 uL와 β-자일로시다아제 200 uL를 넣고, 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 400mM sodium bicarbonate 400 uL를 넣어 반응을 종료하였다. p-nitrophenol을 표준물질로 사용하여 405 nm에서 흡광도 측정을 통해 효소의 활성을 측정하고, 1 Unit은 1 분에 p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside로부터 1 uM의 p-nitrophenol을 생성하는데 필요한 β-자일로시다아제의 양으로 정의하였다.

[0056] YPD 배지 (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % glucose)에서 온도, pH, 탄소원 조건에 따른 β-자일로시다아제 발현 변화 결과를 도 2 내지 도 4에 나타내었다.

[0057] 도 2는 온도 조건에 따른 β-자일로시다아제 발현 최적화 조건 확인 결과를 나타내며, 약 30 °C 정도에서 가장 높은 발현 효율을 보이는 것이 확인되었다.

[0058] 도 3은 pH 조건에 따른 β-자일로시다아제 발현 최적화 조건 확인 결과를 나타내며, 약 pH 8 정도에서 가장 높은 발현 효율을 보이는 것이 확인되었다.

[0059] 도 4는 탄소원 조건에 따른 β-자일로시다아제 발현 최적화 조건 확인 결과를 나타내며, 배양 4 시간 시점에 기본 배지에 1 % 탄소를 첨가하여 발현 결과를 확인한 것이다. 그 결과, 글루코스 사용시 가장 높은 발현 효율을 보이는 것이 확인되었다.

[0060] 상기 결과로부터, YPD 배지 (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % glucose)에 4 % 접종 후 30 °C, 200 rpm, pH 8로 22 시간 동안의 본 배양 조건을 확립하였다.

[0061] <실시예 4> *S.cerevisiae* 재조합 균주로부터 β-자일로시다아제 정제

[0062] 상기 *S.cerevisiae* 재조합 균주로부터 자일로비오스 생산을 위한 β-자일로시다아제를 정제하였다.

[0063] 상기 실시예 3의 본 배양 조건에서 배양된 세포를 회수하여 50 mM Tri-HCl buffer (pH 7)를 넣고 cell을 균질화하였다. 초음파 세포파쇄기를 이용하여 세포벽을 파쇄하고 cell extract를 얻었다. 다음으로, Ni-NTA column을 이용하여 효소를 정제하고, 정제한 효소는 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7)를 사용하여 투석한 후 농축함으로써 β-자일로시다아제를 얻었다.

[0064] <실시예 5> β-자일로시다아제의 자일로비오스 생합성 반응

[0065] 상기 실시예 4에서 제조된 β-자일로시다아제를 상업적으로 판매하는 Megazyme의 효소인 xynB(E-BXSEBP)와 대비하여 자일로비오스 생합성 효율을 확인하였다.

[0066] 비교를 위해 각각 반응액의 최종 농도가 1 U 또는 2 U이 되도록 첨가하고, Xylose 농도는 각각 600 g/L, 700 g/L으로 하고, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7), 온도 50℃에서 반응을 시키며 배양 3, 6, 9, 24 시간에 샘플링을 수행하였다. 샘플링한 시료는 반응한 후 99℃, 10 분 동안 효소를 불활성화 시킨 후 생성된 자일로비오스의 농도를 Sugar-Pak I Column (Waters, USA)을 이용하여 HPLC로 정량 분석하였다.

[0067] 그 결과를 도 5 내지 도 7 및 표 1 내지 3에 나타내었다.

[0068] 도 5 및 표 1은 자일로스 600 g/L 및 β-자일로시다아제 1 U 처리시의 결과를 나타낸다.

[0069] [표 1] 자일로비오스 생합성 전환율 (Xylose 600 g/L, 효소 1U 처리)

Xylose 600 g/L, 효소 1U 처리					
Time (hr)	0	3	6	9	24
Y_1U (%)	0	4.4	5.4	6.8	8.1
M_1U (%)	0	4.0	4.6	5.7	6.3

[0070]

[0071] Xylose 600 g/L 조건에서 효소를 1U으로 처리하여 24 시간 동안 자일로비오스 생합성 전환율을 평가한 결과 pTSY01-XynB 발현 효소(Y_1U)는 8.1%의 전환율을 나타내었다. 반면, 시약으로 판매되는 상용 효소인 (M_1U)는 6.3%의 전환율만을 나타내, 본원 발명에 따른 β-자일로시다아제가 시약으로 판매되는 상용효소(M_1U) 대비 약 130% 높은 생합성 전환율을 보이는 것을 확인하였다.

[0072] 도 6 및 표 2는 자일로스 600 g/L 및 β-자일로시다아제 2 U 처리시의 결과를 나타낸다.

[0073] [표 2] 자일로비오스 생합성 전환율 (Xylose 600 g/L, 효소 2U 처리)

Xylose 600 g/L, 효소 2U 처리					
Time (hr)	0	3	6	9	24
Y_2U (%)	0	6.1	7.1	7.6	9.0
M_2U (%)	0	5.0	5.0	5.1	5.8

[0074]

[0075] Xylose 600 g/L 조건에서 효소를 2U으로 처리하여 24 시간 동안 자일로비오스 생합성 전환율을 평가한 결과 pTSY01-XynB 발현 효소(Y_2U)는 9.0%의 전환율을 나타내었다. 반면, 시약으로 판매되는 상용 효소인 (M_2U)는 5.8 %의 전환율만을 나타내 본원 발명에 따른 β-자일로시다아제가 시약으로 판매되는 상용효소(M_2U) 대비 약 156% 높은 생합성 전환율을 보이는 것을 확인하였다.

[0076] 도 7 및 표 3은 자일로스 700 g/L 및 β-자일로시다아제 1 U 처리시의 결과를 나타낸다.

[0077] [표 3] 자일로비오스 생합성 전환율 (Xylose 700 g/L, 효소 1 U 처리)

Xylose 700 g/L, 효소 1U 처리					
Time (hr)	0	3	6	9	24
Y_1U (%)	0	3.0	4.2	5.9	10.5
M_1U (%)	0	4.4	5.0	5.5	5.6

[0078]

[0079] Xylose 700 g/L 조건에서 효소를 1 U으로 처리하여 24 시간 동안 자일로비오스 생합성 전환율을 평가한 결과

pTSY01-XynB 발현 효소(Y_1U)는 10.5%의 전환율을 나타내었다. 반면, 시약으로 판매되는 상용 효소인 (M_1U)는 5.6 %의 전환율만을 나타내 본원 발명에 따른 β -자일로시다아제가 시약으로 판매되는 상용효소(M_1U) 대비 약 186% 높은 생합성 전환율을 보이는 것을 확인하였다.

[0080]

상기 결과로부터 본원 발명의 β -자일로시다아제가 타 효소와 대비하여 우수한 자일로비오스 생합성 전환율을 보이는 것을 확인하였다.

수탁번호

[0081]

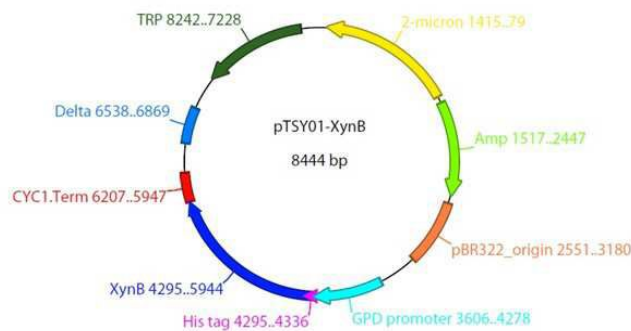
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18382P

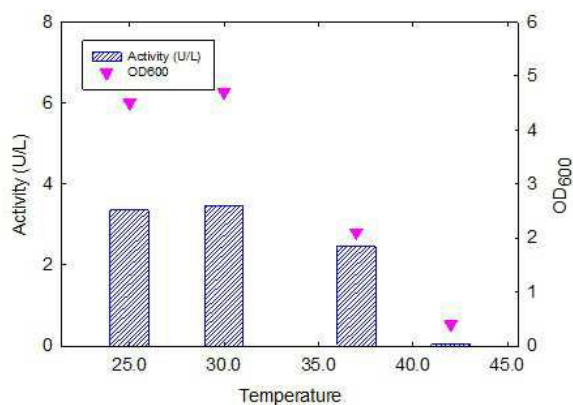
수탁일자 : 20150429

도면

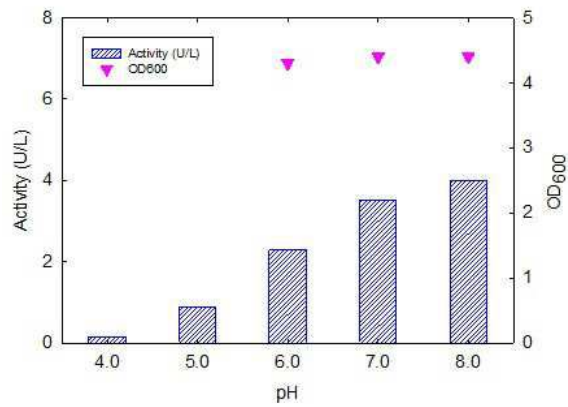
도면1



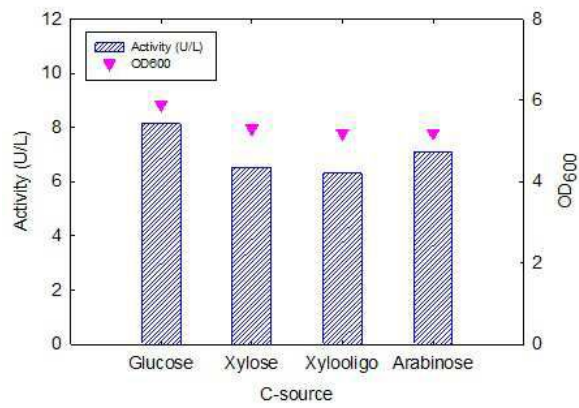
도면2



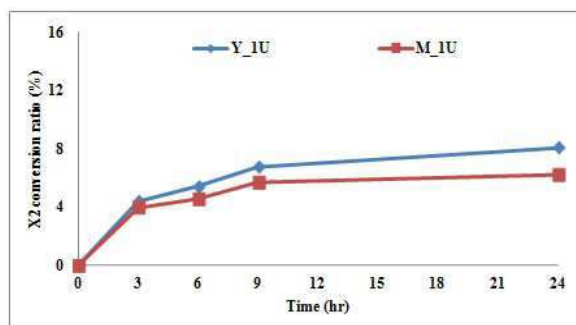
도면3



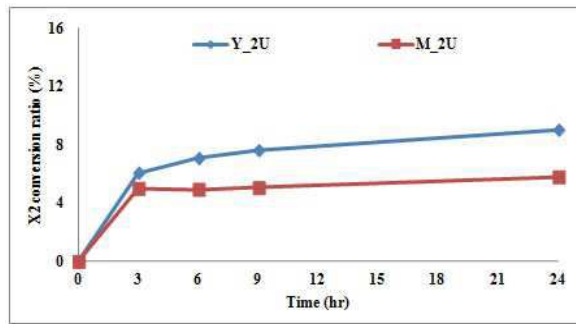
도면4



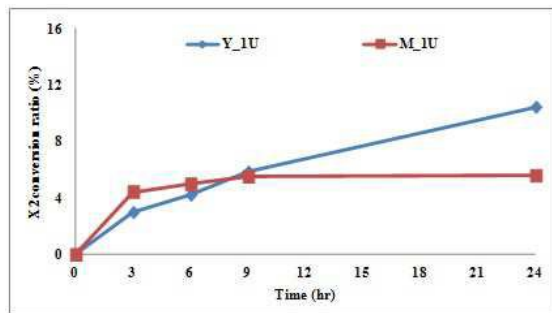
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> TS Corporation
- <120> Beta xylosidase expression system for producing xylobiose
- <130> P15-071-DHJ
- <160> 21
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 535
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> beta xylosidase
- <400> 1

Met Lys Ile Thr Asn Pro Val Leu Lys Gly Phe Asn Pro Asp Pro Ser

1 5 10 15

Ile Cys Arg Ala Gly Glu Asp Tyr Tyr Met Ala Val Ser Thr Phe Glu

20 25 30

Trp Phe Pro Gly Val Gln Ile Tyr His Ser Lys Asp Leu Ile His Trp

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

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

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

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

290 295 300
 Gly Gly Lys Glu Gly Leu Leu Glu Val Glu Ala Pro Ala Met Ser Val
 305 310 315 320

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

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

 Val Gln Arg Glu Thr Tyr Thr Tyr Ser Tyr Ser Phe Asp Gln Gln Glu
 465 470 475 480
 Trp Glu Lys Ile Asp Val Pro Leu Glu Ser Thr His Leu Ser Asp Asp
 485 490 495
 Phe Ile Arg Gly Gly Gly Phe Phe Thr Gly Ala Phe Val Gly Met Gln
 500 505 510
 Cys Gln Asp Thr Ser Gly Glu Arg Leu Pro Ala Asp Phe Lys Tyr Phe
 515 520 525
 Arg Tyr Glu Glu Thr Thr Glu

 530 535

<210> 2

<211> 1608

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta xylosidase

<400> 2

ttgaagatta ctaatccagt gctcaaagga tttaaccctg acccaagtat ttgccgtgcg 60

ggagaggact attacatggc ggtttctaca ttggaatggt tccccggggt gcaaatttat 120

cactcgaagg atctcatcca ttggcggtc gccgcgcgtc ccttgcaaaa aacttctcaa 180

ctcgatatga aaggaaatcc tgattccggc ggggtatggg caccgtgttt aagttatgcg 240

gatggtcagt ttgggtcat ctattcagat attaaagtag tagatggtcc gtttaaggat 300

ggtcataatt atttggcac agctgatgca gtagatggtg agtggagcga tccggttcgg 360

ctcaatagtt ctgggttga tccttccttg ttccatgac caagcggaaa gaaatacgtg 420

ttgaatatgc tgtgggacca tcgagaaaaa catcactcct ttgcaggtat agccttgag 480

gaatatagtg tatctgaaaa aaaactggc ggtgagcgga aggtcatttt taaaggcacg 540

ccaatcaaac tcacagaagc cccgcacttt tattacatca atgatgtcta ttatttatta 600

acagctgaag ggggaacacg ttacgaacat gcagccacaa tcgcccgttc ctgcgtatt 660

gatgggccgt acgaggttca tcctgacaac ccaattttaa cggcttttca cgcgcctagc 720

catccactac aaaaatgcgg gcatgcttcc attgtacaaa cgcatacaaa tgaatggtat 780

ttggctcatc tgactggccg cccaattcat tcaagtaagg aatccatttt tcagcaaaga 840

ggctggtgcc ctttaggaag agagacagcc atacaaaagc ttgaatggaa agatggctgg 900

ccgtatgtgg taggcggaag agaggggctc ctagaggttg aagcgcctgc gatgagcgta 960

aaagagtctt ctccaacctc tcacatagtc gatgaattta aagattcatc gttaaataga 1020

catttccaaa cattaagaat cccatttacg gatcagattg gttcagtgac ggaaaatcct 1080

catcatttaa ggctgtatgg gcaggaatct ttaacgtcta aatttaccca agcgtttgtt 1140

gcgaggcgct ggcaaagctt ttattttgaa gcagagacag cggtttcctt ctttcgaaa 1200

aactttcagc aagcggcagg tcttgtgaat tattataata cggaatattg gactgcactt 1260

caggtgactt atgacgatgc gcttggccgt atccttgagt tatctgtgtg tgaaaacctg 1320

gccttttctc agccgcta at taaaaaatc atcatccag acgagattcc gtatgtgtat 1380

ttaaaagtga ccgttcagag agagacgtac acgtattctt attcttttga tcaacaagag 1440

tgggaaaaaa tagatgtacc gcttgaatcg acccatttgt cagatgattt tattcgagga 1500

ggggggttct ttacaggggc ttttgttga atgcagtgcc aagacacaag cggatgaacgt 1560

ctgcctgccg attttaagta ttttcgatac gaagaaacaa ctgaataa 1608

<210> 3

<211> 673

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GPD promoter

<400> 3

acaaaagctg gagctcagtt tatcattatc aatactcgcc atttcaaaga atacgtaaat 60

aattaatagt agtgattttc ctaactttat ttagtcaaaa aattagcctt ttaattctgc 120

tgtaacccgt acatgcccaa aatagggggc gggttacaca gaatatataa catcgtaggt 180

gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc actaaatata atggagcccg ctttttaagc 240

tggcatccag aaaaaaaaaag aatcccagca ccaaatatt gttttcttca ccaaccatca 300

gttcataggt ccattctctt agcgcaacta cagagaacag gggcacaaac aggcaaaaaa 360

cgggcacaaac ctcaatggag tgatgcaacc tgctggagt aaatgatgac acaaggcaat 420

tgaccacgc atgtatctat ctcatcttct tacaccttct attaccttct gctctctctg 480

atttgaaaa agctgaaaaa aaaggttgaa accagttccc tgaaattatt cccctacttg 540

actaataagt atataaagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaatct atttcttaa 600

cttcttaaat tctactttta tagttagtct tttttttagt tttaaaacac cagaacttag 660

tttcgacgga ttc 673

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> His tag

<400> 4

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc at 42

<210> 5

<211> 332

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Delta

<400> 5

gagaattggg tgaatgttga gataattgtt gggattccat ttttaataag gcaataatat 60

taggtatgta gaatgtacta gaagttctcc tcgaggattt aggaatccat aaaagggaat 120

ctgcaattct acacaattct ataaatatta ttatcatcat tttatatgtt aatattcatt 180

gatectatta cattatcaat ctttgcgttt cagcttccac taatttagat gactatttct 240

catcatttgc gtcattctct aacaccgtat atgataatat actagtaacg taaatactag 300

ttagtagatg atagttgatt tctattccaa ca 332

<210> 6

<211> 1337

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2-micron

<400> 6

caaaggaaat gatagcattg aaggatgaga ctaatccaat tgaggagtgg cagcatatag 60

aacagctaaa gggtagtgct gaaggaagca tacgataccc cgcatggaat gggataatat 120

cacaggaggt actagactac ctttcatcct acataaatag acgcataata gtacgcattt 180

aagcataaac acgcactatg ccgttcttct catgtatata tatatacagg caacacgcag 240

atataggatg gacgtgaaca gtgagctgta tgtgcgcagc tcgcgttgca ttttcggaag 300

cgctcgtttt cggaaacgct ttgaagtcc tattccgaag ttcctattct ctagaaagta 360

taggaacttc agagcgcttt tgaaaaccaa aagcgctctg aagacgcact ttcaaaaaac 420

caaaaacgca ccggactgta acgagctact aaaatatgtc gaataccgct tccacaaaca 480

ttgtcaaaa gtatctcttt gctatatatc tctgtgctat atccctatat aacctaccca 540

tccaccttcc gctccttgaa cttgcatctc aactcgacct ctacattttt tatgtttatc 600

tctagtatta ctcttttagac aaaaaaattg tagtaagaac tattcataga gtgaatcgaa 660

aacaatacga aaatgtaaac atttctata cgtagtatat agagacaaaa tagaagaaac 720

cgttcataat tttctgacca atgaagaatc atcaacgcta tcactttctg ttcacaaagt 780

atgcgcaatc cacatcggtg tagaatataa tcggggatgc ctttatcttg aaaaaatgca 840

cccgcagctt cgetagtaat cagtaaacgc gggaagtgga gtcaggcttt ttttatggaa 900

gagaaaaatg acaccaaagt agccttcttc taaccttaac ggacctacag tgcaaaaagt 960

tatcaagaga ctgcattata gagcgcaaaa aggagaaaaa aagtaatcta agatgctttg 1020

ttagaaaaat agcgctctcg ggatgcattt ttgtagaaca aaaaagaagt atagattctt 1080

tggttgtaaa atagcgctct cgcgttgcat ttctgttctg taaaaatgca gctcagattc 1140
 ttgttttgaa aaatttagcg tctcgcttg catttttgtt ttacaaaaat gaagcacaga 1200
 ttcttcgttg gtaaaatagc gctttcgctg tgcatttctg ttctgtaaaa atgcagctca 1260
 gattctttgt ttgaaaaatt agcgctctcg cgttgcatth ttgttctaca aaatgaagca 1320
 cagatgcttc gttcagg 1337

<210> 7

<211> 931

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ampicillin resistance gene (amp)

<400> 7

ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc 60
 ccttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaacgctg gtgaaagtaa 120
 aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg 180
 glaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag 240
 ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtt ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc 300
 gcatacacta ttctcagaat gacttgggtg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta 360

cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aacctagagt gataaactg 420
 cggccaactt acttctgaca acgatcgag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca 480
 acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac 540
 caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaactat 600
 taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg 660
 ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata 720
 aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta 780

agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa 840
 atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttgglaactg tcagaccaag 900
 ttactcata tatactttag attgatttaa a 931

<210> 8

<211> 261

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CYC1 Terminator

<400>	8	
cgagtcacgtg aattagttat gtcacgctta cattcacgcc ctccccccac atccgctcta	60	
accgaaaagg aaggagtttag acaacctgaa gtctaggtcc ctatttattt ttttatagtt	120	
atgttagtat taagaacgtt atttatattt caaatttttc ttttttttct gtacagacgc	180	
gtgtacgcat gtaacattat actgaaaacc ttgcttgaga aggttttggg acgctcgaag	240	
gctttaattt gggcgcggtta c	261	
<210>	9	
<211>	1015	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TRP	
<400>	9	
tctgtgcggt atttcacacc gcatagatcg gcaagtgcac aaacaatact taaataaata	60	
ctactcagta ataacctatt tcttagcatt ttgacgaaa tttgtattt tgttagagtc	120	
ttttacacca ttgtctcca caccctcgct tacatcaaca ccaataacgc catttaatct	180	
aagcgcatca ccaacatttt ctggcgctcag tccaccagct aacataaaat gtaagctttc	240	
ggggctctct tgccttccaa cccagtcaga aatcgagttc caatccaaaa gttcacctgt	300	
cccacgtgct tctgaatcaa acaagggaat aaacgaatga ggtttctgtg aagctgcact	360	
gagtagtatg ttgcagctct ttggaaatac gagtctttta ataactggca aaccgaggaa	420	
ctcttggtat tcttgccacg actcatctcc atgcagttgg acgatatcaa tgccgtaatc	480	
attgaccaga gccaaaacat cctccttagg ttgattacga aacacgcaa ccaagtattt	540	
cggagtgcct gaactatttt tatatgcttt tacaagactt gaaattttcc ttgcaataac	600	
cgggtcaatt gtctctttc tattgggcac acatataata cccagcaagt cagcatcgga	660	
atctagagca cattctgcgg cctctgtgct ctgcaagccg caaactttca ccaatggacc	720	
agaactacct gtgaaattaa taacagacat actccaagct gcctttgtgt gcttaatcac	780	
gtatactcac gtgtcaata gtcaccaatg cctccctct tggccctctc cttttctttt	840	
ttcgaccgaa ttaattctta atcgcaaaaa aaagaaaagc tccggatcaa gattgtacgt	900	
aaggtgacaa gctatttttc aataaagaat atcttcact actgcatctt ggcgtcataa	960	
ctgcaaagta cacatatatt acgatgctgt ctattaaatg cttcctatat tatat	1015	
<210>	10	
<211>	6836	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> expression construct

<400> 10

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatatt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt	60
cttagtatga tccaatatca aaggaaatga tagcattgaa ggatgagact aatccaattg	120
aggagtggca gcatatagaa cagctaaagg gtagtgctga aggaagcata cgataccccg	180
catggaatgg gataatatca caggaggtac tagactacct ttcacacctac ataaatagac	240
gcataaagt acgcatttaa gcataaacac gcactatgcc gttcttctca tgtatatata	300
tatacaggca acacgcagat ataggtgcga cgtgaacagt gagctgtatg tgcgcagctc	360
gcgttgcat ttcggaagcg ctcgttttcg gaaacgcttt gaagttccta ttcgaagtt	420
cctattctct agaaagtata ggaacttcag agcgtttttg aaaacaaaa gcgctctgaa	480
gacgcacttt caaaaaacca aaaacgcacc ggactgtaac gagctactaa aatattgcga	540
ataccgttc cacaacatt gctcaaaagt atctctttgc tatatatctc tgtgctatat	600
ccctatataa cctaccatc cacctttcgc tccttgaact tgcatctaaa ctgcacctct	660
acatttttta tgtttatctc tagtattact ctttagacaa aaaaattgta gtaagaacta	720
ttcatagagt gaatcgaaaa caatacgaaa atgtaaacad ttctatacg tagtatatag	780
agacaaaata gaagaaaccg ttcataattt tctgaccaat gaagaatcat caacgctatc	840
actttctgtt cacaagtat gcgcaatcca catcggtata gaataatac ggggatgcct	900
ttatcttgaa aaaatgcacc cgcagcttcg ctagtaatca gtaaacgcgg gaagtggagt	960
caggcttttt ttatggaaga gaaaatagac accaaagtag ctttcttcta acctaacgg	1020
acctacagt caaaaagtta tcaagagact gcattataga gcgcacaaag gagaaaaaaa	1080
gtaatctaag atgctttgtt agaaaaatag cgtctcggg atgcattttt gtagaacaaa	1140
aaagaagtat agattctttg ttggtaaaat agcgtctctg cgttgcattt ctgttctgta	1200
aaaatgcagc tcagattctt tgtttgaaaa attagcgctc tcgcgttgca tttttgtttt	1260
acaaaaatga agcacagatt cttcgtttgtt aaaatagcgc tttcgcgttg catttctgtt	1320
ctgtaaaaat gcagctcaga ttctttgttt gaaaaattag cgctctcgcg ttgcattttt	1380
gttctacaaa atgaagcaca gatgcttctg tcaggtggca ctttcgggg aaatgtgcgc	1440
ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaata tgtatccgct catgagacaa	1500
taacctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc	1560
cggtgcgcc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa	1620

acgctgggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa	1680
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg	1740
atgagcactt ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa	1800
gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc	1860
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	1920
atgagtata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	1980
acgcgttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag	2040
ctgaatgaag ccatacaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca	2100
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccgga acaattaata	2160
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc	2220
tggtttattg ctgataaac tggagccgt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca	2280
ctggggccag atggtaaccc ctccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtacggca	2340
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg	2400
taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa	2460
tttaaaagga tctaggtaga gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt	2520
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat	2580
cttttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaa aaccaccgt accagcggtg	2640
gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggttaactgg cttcagcaga	2700
gcgcagatac caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac	2760
tctgtagcac cgctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt	2820
ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag	2880
cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc	2940
gaactgagat acctacagc tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag	3000
gcggacaggt atccggtgag cggcaggggtc ggaacaggag agcgacagag ggagcttcca	3060
gggggaaacg cctggtaact ttatagtct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt	3120
cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc	3180
tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct tttgtcaca tgttctttcc tgcgttatcc	3240
cttgattctg tggataaccg tattaccgcc tttagtgag ctgataccgc tcgccgcagc	3300
cgaacgaccg agcgacgga gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa	3360
ccgctctcc ccgcggttg gccattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac	3420
tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt acctactca ttaggcaccc	3480

caggctttac acittatgct tccggctcct atgtttgttg gaattgtgag cggataacaa	3540
tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc gcgcaattaa ccctcactaa	3600
agggaaacaaa agctggagct cagtttatca ttatcaatac tcgccatttc aaagaatacg	3660
taaataatta atagtagtga ttttcctaac tttatttagt caaaaaatta gccttttaat	3720
tctgctgtaa cccgtacatg cccaaaatag ggggcgggtt acacagaata tataacatcg	3780
taggtgtctg ggtgaacagt ttattcctgg catccactaa atataatgga gcccgtttt	3840
taagctggca tcagaaaaa aaaagaatcc cagcaccaaa atattgtttt cttcaccaac	3900
catcagttca taggtccatt ctcttagcgc aactacagag aacaggggca caaacaggca	3960
aaaaacgggc acaacctcaa tggagtgatg caacctgcct ggagtaaag atgacacaag	4020
gcaattgacc cagcatgta tctatctcat tttcttacac cttctattac cttctgctct	4080
ctctgatttg gaaaaagctg aaaaaaaagg ttgaaaccag ttcctgaaa ttattccct	4140
acttgactaa taagtatata aagacggtag gtattgattg taattctgta aatctatttc	4200
ttaaacttct taaattctac ttttatagtt agtctttttt ttagttttta aacaccagaa	4260
cttagtttcg acggattcta gaactagtgg atccatgggc agcagccatc atcatcatca	4320
tcacagcagc ggccatctcg agtcatgtaa ttagttatgt cacgcttaca ttcacgccct	4380
ccccccacat ccgtctaac cgaaaaggaa ggagtttagac aacctgaagt ctaggtccct	4440
atttattttt ttatagttat gttagtatta agaacgttat ttatatttca aatttttctt	4500
ttttttctgt acagacgctg gtacgcatgt aacattatac tgaaaacctt gcttgagaag	4560
gttttgggac gctcgaaggc ttttaatttc ggccggfacc caattcgccc tatagtgagt	4620
cgtattacgc gcgtcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg	4680
ttaccaact taatgcctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag	4740
aggcccgac cgatgcctt tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgcgacg	4800
cgccctgtag cggcgcatca agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta	4860
catttgccag cgccttagcg cccgtctctt tcgctttctt ccttctctt ctcgccagct	4920
tcgccggctg agaattgggt gaatgttgag ataattgttg ggattccatt ttaataagg	4980
caataatatt aggtatgtag aatgtactag aagttctcct cgaggattta ggaatccata	5040
aaagggaatc tgcaattcta cacaattcta taaatattat tatcatcatt ttatatgtta	5100
atattcattg atcctattac attatcaatc cttgcgtttc agcttccact aatttagatg	5160
actatttctc atcatttgcg tcatcttcta acaccgtata tgataatata ctagtaacgt	5220
aaatactagt tagtagatga tagttgattt ctattccaac agccggcttt ccccgtaag	5280

ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca 5340

aaaaacttga ttagggatgat gggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc 5400

gccctttgac gttggagtcc acgtttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa 5460

cactcaacc tctctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct 5520

attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa 5580

cgtttacaat ttcttgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg 5640

catagatcgg caagtgcaca aacaatactt aaataaatac tactcagtaa taacctattt 5700

cttagcattt ttgacgaaat ttgctatttt gttagagtct tttacaccat ttgtctccac 5760

acctcgcctt acatcaacac caataacgcc atttaatcta agcgcatcac caacattttc 5820

tggcgtcagt ccaccagcta acataaaatg taagctttcg gggctctctt gccttccaac 5880

ccagtcagaa atcgagtcc aatccaaaag ttcacctgct ccacctgctt ctgaatcaaa 5940

caagggaata aacgaatgag gtttctgtga agctgcactg agtagtatgt tgcagctttt 6000

tggaaatacg agtcttttaa taactggcaa accgaggaac tcttggtatt ctgtccacga 6060

ctcatctcca tgcagttgga cgatatcaat gccgtaatca ttgaccagag ccaaaacatc 6120

ctccttaggt tgattacgaa acacgccaac caagtatttc ggagtgccctg aactattttt 6180

atatgctttt acaagacttg aaattttcct tgcaataacc gggccaattg ttctctttct 6240

attgggcaca catataatac ccagcaagtc agcatcggaa tctagagcac attctgcggc 6300

ctctgtgctc tgcaagccgc aaactttcac caatggacca gaactacctg tgaaattaat 6360

aacagacata ctccaagctg cttttgtgtg cttaatcacg tatactcacg tgctcaatag 6420

tcaccaatgc cctccctctt ggccctctcc ttttctttt tcgaccgaat taattcttaa 6480

tcggcaaaaa aagaaaagct ccggatcaag attgtacgta aggtgacaag ctatttttca 6540

ataaagaata tcttccacta ctgccatctg gcgtcataac tgcaaagtac acatatatta 6600

cgatgctgtc tattaaatgc ttctatatatt atatatatag taatgtcgtt tatgggtcac 6660

tctcagtaca atctgctctg atgccgata gttaagccag ccccgacacc cgccaacacc 6720

cgctgacgcg cctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac 6780

cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcga 6836

<210> 11

<211> 8444

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta xylosidase expression construct

<400> 11

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatatt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt	60
cttagtatga tccaatatca aaggaaatga tagcattgaa ggatgagact aatccaattg	120
aggagtggca gcatatagaa cagctaaagg gtagtgctga aggaagcata cgataccccg	180
catggaatgg gataatatca caggaggtac tagactacct ttcactctac ataaatagac	240
gcatataagt acgcatttaa gcataaacac gcactatgcc gttcttctca tgtatatata	300
tatacaggca acacgcagat ataggtgcga cgtgaacagt gagctgtatg tgcgcagctc	360
gcgttgcttt ttcggaagcg ctctgtttcg gaaacgcttt gaagttccta ttccgaagtt	420
cctattctct agaaagtata ggaacttcag agcgcttttg aaaacaaaa gcgctctgaa	480
gacgcacttt caaaaaacca aaaacgcacc ggactgtaac gagctactaa aatattgcga	540
ataccgcttc cacaaacatt gctcaaaagt atctctttgc tatatatctc tgtgctatat	600
ccctatataa cctaccctac cacccttcgc tccttgaact tgcatctaaa ctgcacctct	660
acatttttta tgtttatctc tagtattact cttagacaa aaaaattgta gtaagaacta	720
ttcatagagt gaatcgaaaa caatacgaaa atgtaaacat ttctatagc tagtatatag	780
agacaaaata gaagaaaccg ttcataattt tctgaccaat gaagaatcat caacgctatc	840
actttctgtt cacaaagtat gcgcaatcca catcggtata gaataatac ggggatgcct	900
ttatcttgaa aaaatgcacc cgcagcttcg ctagtaatca gtaaacgcgg gaagtggagt	960
caggcttttt ttatggaaga gaaaatagac accaaagtag ccttcttcta accttaacgg	1020
acctacagtg caaaaagtta tcaagagact gcattataga gcgcacaaag gagaaaaaaa	1080
glaatctaag atgctttgtt agaaaaatag cgctctcggg atgcattttt gtagaacaaa	1140
aaagaagtat agattctttg ttggtaaaa atgcgctctcg cggtgcattt ctgttctgta	1200
aaaatgcagc tcagattctt tgtttgaaaa attagcgctc tcgcgttgca tttttgtttt	1260
acaaaaatga agcacagatt ctctgttggg aaaatagcgc tttcgcgttg catttctgtt	1320
ctgtaaaaat gcagctcaga ttctttgttt gaaaaattag cgctctcgcg ttgcattttt	1380
gttctacaaa atgaagcaca gatgcttcgt tcaggtggca ctttcgggg aaatgtgcgc	1440
ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaata tgtatccgt catgagacaa	1500
taacctgat aaatgctta ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc	1560
cggtgtcgcc ttattccctt ttttcgggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa	1620
acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa	1680

ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg	1740
atgagcactt ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa	1800
gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc	1860
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	1920
atgagtata acactgcgcg caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	1980
accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag	2040
ctgaatgaag ccatacaaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca	2100
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag cttcccgga acaattaata	2160
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc	2220
tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca	2280
ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca	2340
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg	2400
taactgtcag accaagttaa ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa	2460
tttaaaagga tctagtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt	2520
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat	2580
cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgt accagcgggtg	2640
gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggttaactgg cttcagcaga	2700
gcgcagatac caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac	2760
tctgtagcac cgctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt	2820
ggcgataagt cgigtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag	2880
cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacac	2940
gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag	3000
gcggacaggt atccggtaag cggcaggggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca	3060
gggggaaacg cctggtatct ttatagtctt gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt	3120
cgatttttgt gatgctctgc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc	3180
tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct ttgtctcaca tgttctttcc tgcgttatcc	3240
cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttagatgag ctgataccgc tcgccgcagc	3300
cgaacaccg agcgacgca gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa	3360
ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac	3420

tggaagcgg gcagtgcgc caacgcaatt aatgtgagtt acctcactca ttaggcaccc	3480
caggctttac actttatgct tccggctcct atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa	3540
tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc gcgcaattaa ccctcactaa	3600
aggaacaaa agctggagct cagtttatca ttatcaatac tcgccatttc aaagaatacg	3660
taaataatta atagtagtga ttttcctaac tttatttagt caaaaaatta gccttttaac	3720
tctgctgtaa cccgtacatg cccaaaatag ggggcgggtt acacagaata tataacatcg	3780
taggtgtctg ggtgaacagt ttattcctgg catccactaa atataatgga gcccgctttt	3840
taagctggca tccagaaaaa aaaagaatcc cagcaccaaa atattgtttt cttcaccaac	3900
catcagttca taggtccatt ctcttagcgc aactacagag aacaggggca caaacaggca	3960
aaaaacgggc acaacctcaa tggagtgatg caacctgcct ggagtaaatg atgacacaag	4020
gcaattgacc cagcatgta tctatctcat tttcttacac cttctattac cttctgctct	4080
ctctgatttg gaaaaagctg aaaaaaagg ttgaaaccag ttccttgaaa ttattccctt	4140
acttgactaa taagtatata aagacggtag gtattgattg taattctgta aatctatttc	4200
ttaaacttct taaattctac ttttatagtt agtctttttt ttagttttta aacaccagaa	4260
cttagtttcg acggatttcta gaactagtgg atccatgggc agcagccatc atcatcatca	4320
tcacagcagc ggccatttga agattactaa tccagtgtc aaaggattta accctgaccc	4380
aagtatttgc cgtgcgggag aggactatta catggcgggt tctacatttg aatggttccc	4440
gggggtgcaa atttatcact cgaaggatct catccattgg cggctcgccg cgcgtccctt	4500
gcaaaaaact tctcaactcg atatgaaagg aaatcctgat tccggcgggg tatgggcacc	4560
gtgtttaagt tatgcggatg gtcagttttg gtcctctat tcagatatta aagtagtaga	4620
tggtcggtt aaggatggtc ataattattt ggtcacagct gatgcagtag atggtgagtg	4680
gagcgtaccg gttcggtcca atagtcttg gtttgatcct tcttgttcc atgatccaag	4740
cggaaagaaa tacgtgttga atatgctgtg ggaccatcga gaaaaacatc actcctttgc	4800
aggtatagcc ttgcaggaat atagtgtatc tgaaaaaaaaa ctggtcggtg agcgggaaggt	4860
catttttaaa ggcacgcca tcaaaactac agaagccccg catctttatt acatcaatga	4920
tgtctattat ttattaacag ctgaaggggg aacacgttac gaacatgcag ccacaatcgc	4980
ccgttcctcg cgtattgatg ggccgtacga ggttcactct gacaacccaa ttttaacggc	5040
ttttcacgcg cctagccatc cactacaaaa atcggggcat gcttcattg taaaaacgca	5100
tacaaatgaa tggatttttg ctcatctgac tggccgcca attcattcaa gtaaggaatc	5160
catttttcag caaagaggct ggtgcccttt aggaagagag acagccatac aaaagcttga	5220
atggaaagat ggctggccgt atgtggtagg cggaaaagag gggctcctag aggttgaagc	5280

gcctgcgatg agcgtaaaag agttctctcc aacctatcac atagtcgatg aatttaaaga	5340
ttcatcgta aatagacatt tccaaacatt aagaatccca tttacggatc agattggttc	5400
agtgacggaa aatcctcatc atttaaggct gtatgggcag gaatctttaa cgtctaaatt	5460
taccaagcg tttgttcga ggcgtggca aagcttttat tttgaagcag agacagcgg	5520
ttccttcttt ccgaaaaact ttcagcaagc ggcaggcttt gtgaattatt ataatacga	5580
aaattggact gcacttcagg tgacttatga cgatgcgctt ggccgtatcc ttgagttatc	5640
tgtgtgtgaa aacctggcct tttctcagcc gctaattaaa aaaatcatca tcccagacga	5700
gattccgtat gtgtatttaa aagtgaccgt tcagagagag acgtacacgt attcttattc	5760
ttttgatcaa caagagtggg aaaaaataga tgtaccgctt gaatcgacc atttgcaga	5820
tgattttatt cgaggagggg ggttctttac aggggctttt gttggaatgc agtgccaaga	5880
cacaagcggg gaacgtctgc ctgccgattt taagtatttt cgatacgaag aaacaactga	5940
ataactcgag tcatgtaatt agttatgtca cgcttacatt cagccctcc ccccatcc	6000
gctctaaccg aaaaggaagg agttagacaa cctgaagtct aggtccctat ttatttttt	6060
atagttatgt tagtattaag aacgttattt atatttcaaa ttttctttt tttctgtac	6120
agacgcgtgt acgcatgtaa cattatactg aaaaccttgc ttgagaaggt tttgggacgc	6180
tcgaaggctt taatttgcgg ccggtacca attcgcccta tagtgagtgc tattacgcgc	6240
gctcactggc cgtcgtttta caacgtctg actgggaaaa ccctggcggt acccaactta	6300
atcgcttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg	6360
atcgcccttc ccaacagtig cgcagcctga atggcgaatg gcgcgacgcg ccctgtagcg	6420
gcgcattaag cgcggcgggt gtgggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca ctgcccagcg	6480
ccctagcgcc cgtctcttcc gctttcttcc ctctcttct cgccacgttc gccggctgag	6540
aattgggtga atgttgagat aattgttggg attccatttt taataaggca ataatttag	6600
glatgtagaa tgiactagaa gttctcctcg aggatttagg aatccataaa agggaatctg	6660
caattctaca caattctata aatattatta tcatcathtt atatgttaat attcattgat	6720
cctattacat tatcaatcct tgcgtttcag ctccactaa tttagatgac ttttctcat	6780
catttgcgtc atcttctaac accgtatatg ataataact agtaacgtaa atactagtta	6840
gtagatgata gttgatttct attccaacag ccggttttcc ccgtcaagct ctaaatcggg	6900
ggctcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgacccaaa aaacttgatt	6960
agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt	7020
tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta	7080
tctcggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttgcgat ttcgcctat tggttaaaaa	7140

atgagctgat ttaacaaaaa ttaacgcga attttaacaa aatattaacg tttaacaattt	7200
cttgatgcgg tattttctcc ttacgcattc gtgcggtatt tcacaccgca tagatcgga	7260
agtgcacaaa caataactaa ataaatacta ctacagtaata acctatttct tagcattttt	7320
gacgaaattt gctattttgt tagagtcttt tacaccattt gtctccacac ctccgcttac	7380
atcaacacca ataacgcat ttaatctaag cgcacacca acattttctg gcgtcagtc	7440
accagctaac ataaaatgta agctttcggg gtctctctgc cttccaaccc agtcagaaat	7500
cgagttccaa tcaaaaagtt caccgtccc acctgcttct gaatcaaaca aggaataaa	7560
cgaatgaggt ttctgtgaag ctgcactgag tagtatgttg cagtcttttg gaaatacgag	7620
tcctttaata aciggcaaac cgaggaactc ttggtattct tgccacgact catctccatg	7680
cagttggacg atatcaatgc cgtaatcatt gaccagagcc aaaacatcct ccttaggttg	7740
attacgaaac acgccaacca agtatttcgg agtgcctgaa ctatttttat atgcttttac	7800
aagacttgaa attttccttg caataaccgg gtcaattgtt ctctttctat tgggcacaca	7860
tataatacc agcaagtcag catcggaatc tagagcacat tctgcggcct ctgtgctctg	7920
caagcgcga actttcacca atggaccaga actacctgtg aaattaataa cagacatact	7980
ccaagctgcc ttgtgtgct taatcacgta tactcacgtg ctcaatagtc accaatgccc	8040
tcctcttgg cctctcctt ttcttttttc gaccgaatta attcttaatc ggcaaaaaaa	8100
gaaaagctcc ggatcaagat tgtacgtaag gtgacaagct atttttcaat aaagaatac	8160
ttccactact gccatctggc gtacataactg caaagtacac atatattacg atgctgtcta	8220
ttaaatgctt cctatattat atatatagta atgtcgttta tggtgcaact tcagtacaat	8280
ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc ccgacaccg ccaacaccg ctgacgcgc	8340
ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag	8400
ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcga	8444
<210> 12	
<211> 2201	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bacillus pumilus IPO xynB	
<400> 12	
ctgcaggag tattacagca ggtgcttaca tgtgggcact cattcctgaa accgttgaat	60
atggcgaata taaaacaggg aaaagaatgg gtggactgat ttacgcagtg attggttct	120
tccttaaat tgggatggcc ttaggcggca tcgttccagg gcttgcctt gaccgatttg	180

gttatattgc aaatcaagtg caaacaccag aagctttact gggcatttta atcacgacaa	240
cgggtgattcc tgtatgctta ctcatcttag cgatgggtga tattaatttt tataacctag	300
atgaagaaaa acataaaaaa gtcatacgag agcttgagaa tagagacaag gtgtatatcg	360
atcatatgga cgattttaaa atgtagttct ctgaaagagg aggaagtcca attgaagatt	420
actaatccag tgcctcaaagg atttaacct gacccaagta tttgccgtgc gggagaggac	480
tattacatgg cggtttctac atttgaatgg ttcccggggg tgcaaattta tcaactcgaag	540
gatctcatcc attggcggtc cgccgcgcgt cccttgcaaa aaacttctca actcgatatg	600
aaaggaatc ctgattccgg cggggtatgg gcaccgtgtt taagttagtc ggatggtcag	660
ttttggctca tctattcaga tattaagta gtagatggtc cgtttaagga tggtcataat	720
tatttggcca cagctgatgc agtagatggt gagtggagcg atccggttcg gctcaatagt	780
tctgggtttg atccttcctt gttccatgat ccaagcggaa agaaatacgt gttgaatatg	840
ctgtgggacc atcgagaaaa acatcactcc ttgacagga tagccttgca ggaatatagt	900
glatctgaaa aaaaactggt cgggtgagcgg aaggtcattt ttaaaggcac gccaatcaaa	960
ctcacagaag ccccgcatct ttattacatc aatgatgtct attatttatt aacagctgaa	1020
gggggaacac gttacgaaca tgcagccaca atcgccgtt cctcgcgtat tgatgggccg	1080
tacgaggttc atcctgacaa cccaatttta acggttttc acgcgcctag ccatccacta	1140
caaaaatgcg ggcatgcttc cattgtacaa acgcatacaa atgaatggta tttggctcat	1200
ctgactggcc gcccaattca ttcaagtaag gaatccattt ttcagcaaag aggctgggtc	1260
cctttaggaa gagagacagc catacaaaag ctggaatgga aagatggctg gccgtatgtg	1320
gtaggcggaa aagaggggct cctagaggtt gaagcgctg cgatgagcgt aaaagagttc	1380
tctccaacct atcacatagt cgatgaattt aaagattcat cgttaaatag acatttccaa	1440
acattaagaa tcccatctac ggatcagatt ggttcagtga cggaaaatcc tcatcatcta	1500
aggctgtatg ggcaggaatc tttaacgtct aaatttacc aagcgtttgt tgcgaggcgc	1560
tggcaaagct tttattttga agcagagaca gcggtttcct tctttccgaa aaactttcag	1620
caagcggcag gtcttgtgaa ttattataat acggaaaatt ggactgcact tcaggtgact	1680
tatgacgatg cgcttggccg tatccttgag ttatctgtgt gtgaaaacct ggccttttct	1740
cagccgctaa ttaaaaaaat catcatccca gacgagattc cgtatgtgta tttaaaagt	1800
accgttcaga gagagacgta cacgtattct tattcttttg atcaacaaga gtgggaaaaa	1860
atagatgtac cgcttgaatc gaccatttg tcagatgatt ttattcgagg aggggggttc	1920

tttacagggg cttttgttgg aatgcagtgc caagacacaa gcggtgaacg tctgcctgcc 1980

gattttaagt attttcgata cgaagaaaca actgaataaa aaaagacaac actctaaagg 2040

ctgtctctct ttaacatgta ttccatcatg gtgaaggcgt gacatcacgc aaaaaagctt 2100

cagtgacaag agatgtcatc cctaaggctg gtgcgttttg tcctaattgat gaaggaagca 2160

gctccacccg tgagctgaat tgtgcatcca ttctagaatt c 2201

<210> 13

<211> 6504

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTSY01 expression construct

<400> 13

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatatt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagtatga tccaatatca aaggaaatga tagcattgaa ggatgagact aatccaattg 120

aggagtggca gcatatagaa cagctaaagg gtagtgctga aggaagcata cgataccccc 180

catggaatgg gataatatca caggaggtac tagactacct ttcacacctac ataaatagac 240

gcatataagt acgcatttaa gcataaacac gcactatgcc gttctttctca tgtatatata 300

tatacaggca acacgcagat atagggtcga cgtgaacagt gagctgtatg tgcgcagctc 360

gcgtttgcatt ttcggaagcg ctgcgttttcg gaaacgcttt gaagttccta ttccgaagtt 420

cctattctct agaaagtata ggaacttcag agcgcctttg aaaacaaaa gcgctctgaa 480

gacgcacttt caaaaaacca aaaacgcacc ggactgtaac gagctactaa aatattgcga 540

ataccgttc cacaacatt gctcaaaagt atctctttgc tataatatctc tgtgctatat 600

ccctatataa cctaccate cacttttcgc tccttgaact tgcactctaa ctcgacctct 660

acatttttta tgtttatctc tagtattact ctttagacaa aaaaattgta gtaagaacta 720

ttcatagagt gaatcgaaaa caatacgaaa atgtaaacad ttcctatacg tagtatatag 780

agacaaaata gaagaaaccg ttcataattt tctgaccaat gaagaatcat caacgtatc 840

actttctgtt cacaaglat gcgcaatcca catcggtata gaataaatc ggggatgcct 900

ttatcttgaa aaaaatgcacc cgcagcttcg ctagtaatca gtaaaccgga gaagtggagt 960

caggcttttt ttatggaaga gaaaatagac accaaagtag ccttcttcta accttaacgg 1020

acctacagt caaaaagtta tcaagagact gcattataga gcgcacaaag gagaaaaaaa 1080

gtaatctaag atgctttgtt agaaaaatag cgtctcggg atgcatTTTT gtagaacaaa 1140

aaagaagtat agattctttg ttggtaaaat agcgcctctc cggtgcattt ctgttctgta 1200

aaaatgcagc tcagattctt tgtttgaaaa attagcgctc tcgcgttgca tttttgttt	1260
acaaaaatga agcacagatt cttcggttgg aaatagcgc tttcggttg cttttctgtt	1320
ctgtaaaaat gcagctcaga ttctttgttt gaaaaattag cgctctcgcg ttgcattttt	1380
gttctacaaa atgaagcaca gatgcttcgt tcaggtggca ctttcgggg aaatgtgcgc	1440
ggaaccctta tttgtttatt ttcttaata cattcaaata tgtatccgt catgagacaa	1500
taacctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc	1560
cgtgtcgccc ttattccctt ttttcggca ttttccttc ctgtttttgc tcaccagaa	1620
acgttggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggt ttacatcgaa	1680
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg tttccaatg	1740
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa	1800
gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc	1860
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	1920
atgagtata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	1980
accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag	2040
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca	2100
acgttgcga aactattaac tggcgaacta ctactctag cttcccgga acaattaata	2160
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc	2220
tggtttattg ctgataaatc tggagccgt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca	2280
ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca	2340
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg	2400
taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa	2460
tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt	2520
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat	2580
cttttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgt accagcggtg	2640
gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggttaactgg cttcagcaga	2700
gcgcagatac caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac	2760
tctgtagcac cgctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt	2820
ggcgataagt cgigtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag	2880
cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacac	2940

gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag	3000
gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca	3060
gggggaaacg cctggtaict ttatagtect gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt	3120
cgatTTTTgt gatgctcgtc aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc	3180
TTTTtacgt tctggcctt ttgctggcct ttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc	3240
cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttagtgag ctgataccgc tcgccgcagc	3300
cgaacaccg agcgacgca gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa	3360
ccgctctcc ccgcgcgtg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac	3420
tggaaagcgg gcagtgagcg caacgaatt aatgtgagtt acccactca ttaggcaccc	3480
caggctttac actttatgt tccgctcct atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa	3540
ttcacacag gaaacagcta tgacctgat tacccaagc gcgcaattaa ccctactaa	3600
agggaacaaa agctggagct cagtttatca ttatcaatac tcgccatttc aaagaatacg	3660
taaataatta atagtagtga ttttctaac ttatttagt caaaaaatta gccttttaat	3720
tctgctgtaa cccgtacatg cccaaaatag ggggcgggtt acacagaata tataacatcg	3780
taggtgtctg ggtgaacagt ttattcctgg catccactaa atataatgga gcccgtttt	3840
taagctggca tccagaaaaa aaaagaatcc cagcaccaaa atattgtttt cttaccaac	3900
catcagttca taggtccatt ctcttagcgc aactacagag aacaggggca caaacaggca	3960
aaaaacgggc acaacctcaa tggagtgatg caacctgcct ggagtaaatg atgacacaag	4020
gcaattgacc cacgcatgta tctatctcat tttcttacac cttctattac cttctgctct	4080
ctctgatttg gaaaaagctg aaaaaaaagg ttgaaaccag ttcctgaaa ttattccct	4140
acttgactaa taagtatata aagacggtag gtattgattg taattctgta aatctatttc	4200
ttaaacttct taaattctac ttttatagtt agtctttttt ttagttttta aacaccagaa	4260
cttagtttcg acggattcta gaactagtgg atccatgggc agcagccatc atcatcatca	4320
tcacagcagc ggccatctcg agtcatgtaa ttagttatgt cacgcttaca ttcacgcct	4380
ccccccat ccgctctaac cgaaaaggaa ggagttagac aacctgaagt ctaggtcct	4440
atttatTTTT ttatagttat gttagtatta agaacgttat ttatatTTca aatttttctt	4500
TTTTtctgt acagacgct gtacgcatgt aacattatac tgaaaacctt gcttgagaag	4560
gttttgggac gctcgaaggc tttatttgc ggccgggtacc caattcgccc tatagtgagt	4620
cgatttacgc gcgtcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg	4680

ttaccaact taatgcctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag	4740
aggcccgac cgatgcctt tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgcgacg	4800
cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta	4860
cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttcctt ccttcctttt ctgccacgt	4920
tcgccggctg ccggctttcc ccgtaagct ctaaatcggg ggctcccttt aggggttccga	4980
tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatgg ttcacgtagt	5040
gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat	5100
agtggactct tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta tctcggctcta ttcttttgat	5160
ttataaggga ttttgccgat ttccgcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa	5220
tttaacgca attttaacaa aatattaacg tttaaatctt cctgatgcgg tattttctcc	5280
ttacgcact gtgcggtatt tcacaccgca tagatcggca agtcacaaaa caatacttaa	5340
ataaatacta ctcagtaata acctatctct tagcattttt gacgaaattt gctattttgt	5400
tagagtcttt tacaccattt gtctccacac ctccgcttac atcaacacca ataacgcat	5460
ttaatctaag cgcatcacca acattttctg gcgtcagtec accagctaac ataaaatgta	5520
agctttcggg gctctcttc cttccaacc agtcagaaat cgagttccaa tccaaaagtt	5580
cacctgtccc acctgcttct gaatcaaaca aggaataaaa cgaatgaggt ttctgtgaag	5640
ctgcactgag tagtatgttg cagtcttttg gaaatacgag tcttttaata actggcaaac	5700
cgaggaaact ttggtattct tgccacgact catctccatg cagttggacg atatcaatgc	5760
cgtaatcatt gaccagagcc aaaacatcct ccttaggttg attacgaaac acgccaacca	5820
agtatttcgg agtcctgaa ctatttttat atgcttttac aagacttgaa attttccttg	5880
caataaccgg gtcaattggt ctctttctat tgggcacaca tataataccc agcaagtcag	5940
catcggaatc tagagcacat tctgcggcct ctgtgctctg caagccgcaa actttcacca	6000
atggaccaga actacctgtg aaattaataa cagacatact ccaagctgcc tttgtgtgct	6060
taatcacgta tactcacgtg ctcaatagtc accaatgecc tccctcttgg cctctcctt	6120
ttcttttttc gaccgaatta attcttaatc ggcaaaaaaa gaaaagctcc ggatcaagat	6180
tgtacgtaag gtgacaagct atttttcaat aaagaatata ttccactact gccatctggc	6240
gtcataactg caaagtacac atatatagc atgctgtcta ttaaatgctt cctatattat	6300
atatatagta atgtcgttta tgggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt	6360
taagccagcc ccgacaccg ccaacaccg ctgacgcgc ctgacgggct tgtctgtctc	6420
cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt	6480
caccgtcatc accgaaacgc gcga	6504

<210> 14
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KK510(BamH1) primer
 <400> 14
 atatggatcc atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc atttgaagat 60
 tactaatcca gtgct 75

<210> 15
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KK511(Xho1) primer
 <400> 15
 atatctcgag ttattcagtt gtttcttcgt at 32

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KK518 primer
 <400> 16
 agccccgcat ctttattaca 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KK519 primer
 <400> 17

ctcttttccg cctaccacat 20

<210> 18
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> KK563(NgoMIV) primer

<400> 18

atatgccggc tgttgaata gaaatcaact atcat 35

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KK564(NgoMIV) primer

<400> 19

atatgccggc tgagaattgg gtgaatgttg agata 35

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KK484 primer

<400> 20

atatagatct tgagaattgg gtgaatgttg agata 35

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KK485 primer

<400> 21

atatcatatg tgttgaata gaaatcaact atcat 35