(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0027742
(43) 공개일자 2010년03월11일

(51) Int. Cl.
A23B 7/10 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0086772
(22) 출원일자 2008년09월03일
심사청구일자 2008년09월03일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
윤한대
경남 진주시 칠암동 284-2
조계만
경남 함양군 안의면 이전리 144
조지중
경상남도 사천시 벌리동 주공아파트 204동 703호
(74) 대리인
이덕록

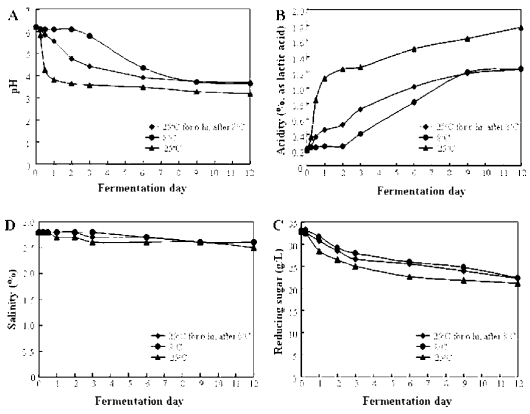
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 유기인제 살충제 분해효소

(57) 요 약

본 발명은 김치 발효 동안 유기인제 살충제에 대해 분해력을 갖는 젖산균으로부터 클로닝된 유기인제 살충제 분해효소인 *oph*A(서열번호 1), *oph*B(서열번호 2), *oph*C(서열번호 3), *oph*D(서열번호 4), 및 *oph*E(서열번호 5)에 관한 것으로, 상기 유기인제 살충제 분해효소는 유기인제 살충제의 에스테르 결합을 분해시켜 식품으로부터 유기인제 살충제를 제거하는데 아주 효과적으로 사용할 수 있는 아주 뛰어난 효과가 있어, 식품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

열무를 절단하는 단계;

상기 열무를 소금물로 25 내지 35℃에서 3 내지 5시간 동안 절이는 단계;

상기 절여진 열무를 세척한 후, 염분농도를 2 내지 4%로 조절하는 단계;

밀가루를 70 내지 90배수의 물과 혼합하고, 90 내지 110℃에서 3 내지 8분 간 가열하여 밀가루 용액을 제조하는 단계;

상기 열무 100 중량부에 대해 밀가루 용액을 7000 내지 10000 중량부를 혼합하는 단계;

마늘 150 내지 250 중량부, 부추 80 내지 150 중량부, 붉은 고추 80 내지 150 중량부, 양파 80 내지 150 중량부, 설탕 80 내지 150 중량부, 생강 30 내지 80 중량부 및 배 30 내지 80 중량부를 첨가하는 단계;

상기 혼합물을 23 내지 28℃에서 5 내지 8 시간 1차 발효하는 단계 및

5 내지 10℃에서 10 내지 15일 동안 2차 발효하는 단계

로 이루어진 열무 물김치 발효 방법.

청구항 2

서열번호 1(*oph*A)를 갖는 유기인제 살충제의 에스테르 결합을 분해하는 유기인제 살충제 분해효소.

청구항 3

서열번호 2(*ophB*)를 갖는 유기인제 살충제의 에스테르 결합을 분해하는 유기인제 살충제 분해효소.

청구항 4

서열번호 3(*ophC*)를 갖는 유기인제 살충제의 에스테르 결합을 분해하는 유기인제 살충제 분해효소.

청구항 5

서열번호 4(*ophD*)를 갖는 유기인제 살충제의 에스테르 결합을 분해하는 유기인제 살충제 분해효소.

청구항 6

서열번호 5(*ophE*)를 갖는 유기인제 살충제의 에스테르 결합을 분해하는 유기인제 살충제 분해효소.

청구항 7

*oph*A(서열번호 1), *oph*B(서열번호 2), *oph*C(서열번호 3), *oph*D(서열번호 4), 및 *oph*E(서열번호 5)로 구성된 군으로부터 선택되는 유기인제 살충제 분해효소 1 종 또는 2종 이상의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 유기인제 살충제 오염 토양 정화제.

청구항 8

*oph*A(서열번호 1), *oph*B(서열번호 2), *oph*C(서열번호 3), *oph*D(서열번호 4), 및 *oph*E(서열번호 5)로 구성된 군으로부터 선택되는 유기인제 살충제 분해효소 1 종 또는 2종 이상의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 유기인제 살충제 오염 식품용 세제.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유기인제 살충제 분해효소에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 김치 발효 동안 유기인제 살충제에 대

해 분해력을 갖는 젖산균으로부터 클로닝된 유기인제 살충제 분해효소인 *oph*A(서열번호 1), *oph*B(서열번호 2), *oph*C(서열번호 3), *oph*D(서열번호 4), 및 *oph*E(서열번호 5)에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 살충제는 작물에 발생하는 병충해 및 잡초를 방제하여 생산물의 품질 향상과 보존을 위해 사용되는 필수제품으로서 농산물의 안정적인 생산과 수량 증대에 크게 공헌하고 있다. 대부분의 살충제는 유기합성 화학물질이므로 유익성 못지않게 정도의 차이는 있으나 독성등의 유해성도 아울러 지니고 있다.

[0003] 다양한 살충제들 중 유기인계(organophosphorous; OPs) 화합물이 가장 넓게 사용되고 있으며, 현재 사용하고 있는 농약 중 가장 많은 종류를 차지하고 있다. 이들은 세계 식량생산 증가에 이바지하고 있고, 세계적인 살충제 판매량의 34%로 추정되는 양을 책임지고 있다. 그러나 유기인계 화합물 중독은 연간 200,000명의 죽음과 약 3백만명의 중독에 대한 세계적인 건강문제를 일으킨다.

[0004] 유기인계 화합물 중에서 클로리피리포스(chlorpyrifos; CP)는 목화, 벼농사, 목장과 채소작물의 잎충 방제를 위해 1960년대 까지 상업적으로 사용되었다. 농업에서 CP의 광범위한 사용은 식품에서 CP의 잔류로 인한 급성 또는 만성 식이 노출의 원인을 야기될 수 있는 잠재적인 인간건강 위험에 대한 공공의 관심을 증가시켰다. 한국정부는 생산되는 과일과 채소의 CP 최대잔류허용량을 0.1~2.0 mg/kg으로 정하고 있다. 따라서 인간소비를 위해 정해진 발효식품에서의 CP와 TCP 함량을 최소화하거나 감시하는 것이 필요하다.

[0005] 종래 상기 CP를 분해시키는 방법으로 자외선을 조사하여 Cl^-, SO_4^{2-} 등으로 분해시키는 방법이 연구된 바 있으며, 기능화된 영가 이온(Zerovalent Iron)에 의한 CP를 분해시키려는 연구 또한 수행된 바 있다.

[0006] 한편, 김치는 우리나라의 전통발효식품으로서 우리의 밥상에서는 빼 놓을 수 없는 필수적인 부식이다. 현재 국내 김치 총수요는 연간 15만 톤 정도이고 이 중 상품김치 수요는 계속 증가하여 2007년에는 전체 수요의 60% 이상인 약 100만 톤으로 추정되고 있다. 한국인에 의해 하루에 섭취되는 김치는 섭취하는 전체 음식의 약 10%를 차지하는 양인 일인당 약 120g정도이다. 김치의 주재료인 배추와 무의 재배에 사용된 유기인제 살충제의 잔류농약은 앞서 기술한 것처럼 동물 및 인간에게 잠재적인 독성을 가지고 있다.

[0007] 유기인제 살충제(organophosphorous insecticide)의 대다수는 인산의 에스테르 결합을 하고 있어 카르복실에스테르 가수분해효소(carboxylesterase)와 삼인산 에스테르 가수분해효소(triphosphatesterase)에 의해 가수분해되고 저독화 된다. 이 효소는 극도로 다양한 기질을 분해할 수 있으며, 신경독성 물질과 유기인제 농약의 가수분해를 촉매 한다. 이전 연구에서, CP와 다른 유기인제 살충제는 김치의 발효 동안 분해되었다는 사실이 보고된 바 있다. 그러나 김치에 발효에 관련하는 젖산균에서는 유기인제 살충제를 분해 젖산균은 보고된 적이 없다.

[0008] 본 발명자들은 상기와 같은 점들을 감안하여 김치 발효에 관련된 젖산균에 의해 유기인제 살충제인 CP의 분해와 관련하여 예의 연구를 거듭한 결과 최적의 김치 발효 조건하에서 김치 발효에 관련된 젖산균을 확인하고 이들의 아미노산 서열을 밝힘으로써 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 김치발효 중 유기인제 살충제 분해력 및 분해 젖산균 확인을 위하여 최적의 열무 물김치 발효 조건을 확립하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 김치발효 중 CP를 포함한 9종의 유기인제 살충제 분해 빠른 확인을 위하여 다중중합효소연쇄반응(multiplex PCR, m-PCR)를 설계하고 분해 젖산균을 확인하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 유기인제 살충제를 효과적으로 분해시킬 수 있는 유기인제 살충제 분해효소를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0012] 본 발명의 상기와 같은 목적은 김치 발효 동안 유기인제 살충제에 대해 분해력을 갖는 젖산균 류코노스톡 메센테리오데스 KCTC 3530(WCP907) 및 락토바실러스 브레비스 KACC 10553(WCP902), 락토바실러스 프란타륨 KCTC

3104(WCP931), 락토바실러스 사케이 KCTC 3603(WCP904)를 분리하고, 이들로부터 5종의 유기인제 살충제 분해효소를 클로닝하고, 이들의 염기서열을 확인한 후, 이들이 유기인제 살충제를 효과적으로 분해시킬 수 있음을 확인함으로써 달성되었다.

[0013] 본 발명은 김치발효 중 유기인제 살충제 분해력 및 분해 젖산균 확인을 위한 열무 물김치의 최적 발효 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 상기와 같은 열무 물김치 발효 조건을 확립하기 위한 방법은, 열무를 절단하는 단계, 상기 열무를 소금물로 25 내지 35℃에서 3 내지 5시간 동안 절이는 단계, 상기 절여진 열무를 세척한 후, 염분농도를 2 내지 4%로 조절하는 단계, 밀가루를 70 내지 90배수의 물과 혼합하고, 90 내지 110℃에서 3 내지 8분 간 가열하여 밀가루 용액을 제조하는 단계, 상기 열무 100 중량부에 대해 밀가루 용액을 7000 내지 10000 중량부를 혼합하는 단계, 마늘 150 내지 250 중량부, 부추 80 내지 150 중량부, 붉은 고추 80 내지 150 중량부, 양파 80 내지 150 중량부, 설탕 80 내지 150 중량부, 생강 30 내지 80 중량부 및 배 30 내지 80 중량부를 첨가하는 단계, 23 내지 28℃에서 5 내지 8 시간 1차 발효하는 단계 및 5 내지 10℃에서 10 내지 15일 동안 2차 발효하는 단계로 이루어진다.

[0015] 본 발명에서는 상기와 같은 방법으로 제조된 열무 물김치를 25℃에서 6시간 발효한 후 8℃에서 12일간 발효한 것(모델 A), 8℃에서 12일간 발효 한 것(모델 B), 25℃에서 12 일 동안 발효 것(모델 C)의 pH와 산도의 변화를 측정하여 열무 물김치 발효의 최적 조건을 규명하였다.

[0016] 도 2에 도시한 바와 같이, 열무 물김치 발효동안 총 젖산균수의 변화를 나타낸 결과이다. 모델 A의 경우, 총 젖산균은 발효 2일째까지(13.4 log cfu/mL) 증가하다가 그 이후 감소하였고 8℃(모델 B) 발효 동안 발효 3일째 최대 균수(10.9 log cfu/mL)을 나타낸 후 감소하였다. 25℃(모델 C)의 경우 발효 1일째 12.6 log cfu/mL을 나타낸 후 감소하였다. 이 결과로부터 열무 물김치 발효의 최적은 모델 A임을 확인할 수가 있었다.

[0017] 또한 본 발명은 *oph*A(서열번호 1), *oph*B(서열번호 2), *oph*C(서열번호 3), *oph*D(서열번호 4), 및 *oph*E(서열번호 5)인 유기인제 살충제 분해효소를 제공한다.

[0018] 본 발명에 따른 열무 물김치에 9종의 유기인제 살충제 카투사포스(Cadusafos, CS, *S,S*-di-sec-butyl *O*-ethylphosphorodithioate), 크로리피리포스(chlorpyrifos, CP, *O,O*-diethyl-*O*-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate), 코우마포스(coumaphos, CM, *O*-3-chloro-4-methyl-2-oxo-2*H*-1-benzopyran-7-yl*O,O*-diethyphosphorothioate), 디아지논(diazinon, DZ, *O*-3-chloro-4-methyl-2-oxo-2*H*-1-chromen-7-yl*O,O*-diethylphosphorothioate), 다포나테(dyfonate, DF, *O*-ethyl*S*-phenylethylphosphonodithioate), 에쏘프로포스(ethoprophos, EP, *O*-ethyl*S,S*-dipropylphosphorodithioate), 펜나미포스(Fenamiphos, FA, *RS*-ethyl4-methylthio-*m*-tolylisopropylphosphoramidate), 메칠파라치온(methylparathion, MPT, *O,O*-dimethyl*O*-4-nitrophenylphosphorothioate), 파라치온(parathion, PT, *O,O*-diethyl*O*-4-nitrophenylphosphorothioate), 3,5,6-트리클로-2-피리디놀(3,5,6-trichloro-2-pyridinol, TCP) 및 디에칠티포스포릭산(diethylthiphosphoric acid, DETP)를 접종한 결과 도 3 내지 5에 도시한 바와 같이, CP는 발효 3일 동안 빠른 분해를 보였고(약 5 mg/L) 9일 이후에는 완전히 분해되었다. CP의 분해율은 발효 초기 3일 동안(83.3%) 급격히 증가한 후 그 이후 서서히 증가하였다.

[0019] 발효기간 중 200 mg/L의 CP를 첨가하였을 때 1일째는 179 mg/L, 9일째는 49 mg/L 이었다. 약 64%(68 mg/L)는 6일에 78%(44 mg/L)는 12일 만에 분해되었다. CP의 분해는 TLC와 HPLC를 통해 발효가 진행됨에 따라 분해가 이루어짐을 확인할 수가 있었고, CP의 분해산물로 알려진 TCP는 두 가지 방법으로도 검출할 수 없었다.

[0020] 열무 물김치 발효기간 중 CP외에 상기 8종의 다른 유기인제 살충제의 분해정도도 확인하였다. 농약의 분석 또한 이루어 졌다. 발효기간 중 CS, CP, CM, DZ, EP, FA, MPT, PT의 농도는 3일째에 3, 41, 5, 13, 0, 7, 14, 38, 42%로 감소하였고 최종일(12일째)에는 37, 80, 48, 74, 22, 45, 51, 79, 82%로 감소하였다.

[0021] 발효기간 중 CS, CP, CM, DZ, EP, FA, MPT, PT(100 mg/L)를 첨가한 시료의 초기 pH는 6.18 이었으며 25℃에서 6시간 배양했을 때 3.69 였으며 8℃에서 12일 배양 했을 때 3.65 이였으며 산도는 초기 0.21%에서 각각 1.25%와 1.23%로 나타났다.

[0022] 이어서 본 발명에 따른 열무 물김치 발효 중 특이 젖산균 종의 변화를 m-PCR을 통해 관찰하였다. 그 결과 무 물김치의 발효 시작 시, 발효초기에는 7종의 젖산균 즉, 류코노스톡 칼노슘(*Leuconostoc carnosum*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 락토바실러스 프란타륨(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*), 페디오코쿠스 펜토사세우스

(*Pediococcus pentosaceus*), 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)가 검출되었다.

[0023] 최고 숙성기인 3일째는 류코노스톡 칼노슘, 류코노스톡 메센테로이데스, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 펜토슈스(*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 프란타륨, 락토바실러스 사케이, 바이셀라 콘푸사, 바이셀라 코리엔시스(*Weissella koreensis*)의 8종이 검출되었고, 락토바실러스 프란타륨, 락토바실러스 사케이, 바이셀라 콘푸사, 바이셀라 코리엔시스는 산패기(12일째)에서 발견 되었다. CP가 첨가된 시료에서는 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 사케이, 류코노스톡 메센테로이데스, 락토바실러스 프란타륨, 바이셀라 콘푸사, 바이셀라 코리엔시스가 최적발효기(3일째)에서 나타나고 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 프란타륨, 락토바실러스 사케이, 바이셀라 코리엔시스가 산패기(12일째)에서 나타났다.

[0024] 이어서 CP 첨가 유무에 따른 열무 물김치 발효 중 주요 젖산균을 비교하였다. 그 결과 류코노스톡 메센테로이데스 및 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 프란타륨, 락토바실러스 사케이는 CP를 분해할 수 있을 것으로 추정되었다.

[0025] 상기에서 검출한 10종의 젖산균을 이용하여 CP의 분해능을 측정하였다. 그 결과 류코노스톡 메센테리오데스 KCTC 3530(WCP907) 및 락토바실러스 브레비스 KACC 10553(WCP902), 락토바실러스 프란타륨 KCTC 3104(WCP931), 락토바실러스 사케이 KCTC 3603(WCP904) 균주는 TCP와 CP 모두를 분해할 수 있었다.

[0026] 상기 4 종의 젖산균의 액체 배지에서의 생육가능여부와 유기인제 살충제 분해능을 조사하였다. 그 결과 DF를 제외한 모든 유기인계 화합물에 4종(WCP907, WCP902, WCP931, WCP904)의 배양된 균을 첨가 시 인산 에스터 결합이 가수분해되어 분해가 이루어짐을 확인 할 수 있었다.

[0027] 상기 4종(WCP907, WCP902, WCP931, WCP904)의 젖산균주로부터 5 종의 유기인제 살충제 분해유전자를 클로닝하였다. 이들 5종의 유기인제 살충제 분해 유전자에 대한 에스테라아제 활성을 확인한 결과 5종 모두 에스테라아제 활성을 나타내었다. 이들을 각각 *oph*A, *oph*B, *oph*C, *oph*D, 및 *oph*E와 같이 명명한 후 염기서열을 분석하여, 서열번호 1(*oph*A), 서열번호 2(*oph*B), 서열번호 3(*oph*C), 서열번호 4(*oph*D) 및 서열번호 5(*oph*E)로 나타내었다.

[0028] 상기와 같은 본 발명의 유기인제 살충제 분해효소인 *oph*A(서열번호 1), *oph*B(서열번호 2), *oph*C(서열번호 3), *oph*D(서열번호 4), 및 *oph*E(서열번호 5)는 9종의 유기인제 살충제를 분해시킬 수 있다. DF를 제외한 8종의 유기인제 살충제(CS 및 CP, CM, DZ, EP, FM, MPT, PT) 살충제들은 각각 OphA, OphB, OphC, OphD, 그리고 OphE효소들이 포스포에스테르 결합(phosphoester bond) 때 가수분해했다. 특히 CP 및 CM, DZ, MPT, PT에 대한 분해력이 뛰어남을 확인할 수 가 있었다.

[0029] 또한 본 발명은 *oph*A(서열번호 1), *oph*B(서열번호 2), *oph*C(서열번호 3), *oph*D(서열번호 4), 및 *oph*E(서열번호 5)로 구성된 군으로부터 선택되는 유기인제 살충제 분해효소 1 종 또는 2종 이상의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 유기인제 살충제 오염 토양 정화제를 제공한다.

[0030] 또한 본 발명은 *oph*A(서열번호 1), *oph*B(서열번호 2), *oph*C(서열번호 3), *oph*D(서열번호 4), 및 *oph*E(서열번호 5)로 구성된 군으로부터 선택되는 유기인제 살충제 분해효소 1 종 또는 2종 이상의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 유기인제 살충제 오염 식품용 세제를 제공한다.

효 과

[0031] 본 발명에 따른 열무 물김치의 최적발효 조건은 유해물질 분해력 측정 모델로 아주 유용하게 이용할 수가 있으며, 본 발명에서 설계된 m-PCR은 김치발효 중 신속하고 정확하게 젖산균을 확인하는데 유용하게 이용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 유기인제 살충제 분해효소인 *oph*A(서열번호 1), *oph*B(서열번호 2), *oph*C(서열번호 3), *oph*D(서열번호 4), 및 *oph*E(서열번호 5)는 유기인제 살충제의 에스테르 결합을 분해시켜 식품으로부터 유기인제 살충제를 제거에 아주 효과적으로 사용할 수 있는 아주 뛰어난 효과가 있어, 식품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] **실시예 1: 열무 물김치 제조**

[0034] 본 실시예에서는 김치발효 중 유기인제 살충제 분해력 및 분해 젖산균 확인을 위하여 최적의 열무 물김치 발효 조건을 확립하기 위하여 열무 물김치를 제조하였다. 열무 물김치 제조를 위해 열무, 양파, 마늘, 붉은 고추, 부추, 생강 같은 6가지 채소들은 진주지역에 있는 경남농업기술원로부터 얻었고, 배, 설탕, 소금, 밀가루는 슈퍼마켓에서 구입하였다.

[0035] 우선, 열무 1,000 g을 손질한 후 가로 7cm 길이로 자르고, 10% 소금물로 30도에서 4시간 동안 절였다. 이것을 두 개의 다른 바구니에서 두 번 세척한 후 1시간 동안 물기를 없앤 후 염도를 측정한 후 절인 열무의 염분농도를 3%로 조절하였다. 세척한 부추와 붉은 고추를 각각 가로로 7cm와 3mm 길이로 절단하고, 마늘, 생강, 배는 껍질을 벗기고 세척한 후 분쇄하였다. 탈피된 양파를 2 등분하고, 5mm 두께로 얇게 썰었다. 50 g의 밀가루를 수돗물 4,000 mL에 혼합하고 100℃에서 5분간 가열한 후 3%로 맞춰 소금에 절인 열무 시료 50 g에 첨가하였다. 준비된 마늘 100 g, 부추, 붉은 고추, 마늘, 양파, 설탕 50 g, 생강, 배 25 g 역시 첨가하였다.

[0036] 열무 물김치시료를 각각 1,000 mL씩 1,800 mL 발효조에 담고 밀봉한 후 초기에 25℃에서 6시간 발효한 후 8℃에서 12일간 발효한 것(모델 A), 8℃에서 12일간 발효 한 것(모델 B), 25℃에서 12 일 동안 발효하였다(모델 C).

[0037] **실험예 1: 열무 물김치 발효의 최적 조건 규명**

[0038] 상기 실시예 1에서 준비된 열무 물김치를 25℃에서 6시간 발효한 후 8℃에서 12일간 발효한 것(모델 A), 8℃에서 12일간 발효 한 것(모델 B), 25℃에서 12 일 동안 발효(모델 C) 기간 중 열무 물김치 각각의 시료를 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12일에 100 mL씩 수집하여 pH와 산도의 변화를 측정하였다.

[0039] 열무 물김치 발효 중 pH의 변화는 pH 측정기(MP220, pH meter, UK)를 사용하였고 산도는 pH 8.2까지 중화하는데 소요되는 0.1N NaOH용액 소비량을 측정한 후 젖산으로 환산하여 측정하였고 아래의 계산 방식으로 환산한 후 젖산에 대한 백분율(%)로 표기하였다.

[0040] 산도(%, 젖산)

[0041] = 0.009 × 0.1N NaOH의 량(mL) × F × 100/시료량(mL)

[0042] F : factor of 0.1N NaOH

[0043] 염도는 염도계(Atago Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였으며 환원당은 밀러(Miller, 1959)의 디니트로-살익시레이트(Dinitro-salicylate, DNS) 방법으로 측정하였다.

[0044] 상기와 같은 측정결과, pH가 감소함에 따라 산도는 증가하였다. 발효 초기 pH는 6.20 있었으나 발효 종점기 각각 3.69(모델 A) 및 3.64(모델 B), 3.18(모델 C) 있었다. 산도는 초기 0.20% 있었으나 발효가 진행됨에 따라 증가하여 각각 1.24%(모델 A), 1.22%(모델 B), 1.74%(모델 C)였다.

[0045] 한편 염도와 환원당의 함량은 발효가 진행됨에 따라 감소하였다. 염도의 경우 발효 초기 2.8%에서 각각 2.7%(모델 A와 B) 및 2.6%(모델 C)로 감소하였다. 환원당의 경우 33.07 g/l에서 각각 22.48 g/l(모델 A) 및 22.37 g/l(모델 B), 22.12 g/l(모델 C)로 감소하였다(도 1 참조).

[0046] 한편, 열무 물김치 발효 중 총 젖산균수는 분쇄한 각각의 열무 물김치 시료 1 mL을 살균된 0.85% NaCl이 함유된 물 9 mL에 연속희석(101-1012)을 한 후락토바실루스 MRS 한천배지(Lactobacilli MRS agar, MRSA, Difco) 도말하고 28℃에서 48시간동안 배양하였다.

[0047] 상기 락토바실루스 MRS 한천배지에서 자란 젖산균 중 임의적으로 96 클론을 선택하여 새 락토바실루스 MRS 한천배지에 옮겨 마스터 플레이트(master plate)를 만들고 이로부터 게놈 DNA를 분리하고 이를 주행으로 하여 m-PCR를 행하여 10종의 젖산균을 확인하였다. 각각의 젖산균 종에 대한 생균수 계산은 아래의 계산에 따라 측정하였다.

[0048] 특이 젖산균 생균수(log cfu/mL)

[0049] = (확인된 특이 젖산균 클론수/분리 96 클론수) × 100

[0050] = (특이 젖산균 백분율%/100) × MRS 한천배지 상의 총 젖산균수

[0051] 도 2에 도시한 바와 같이, 열무 물김치 발효동안 총 젖산균수의 변화를 나타낸 결과이다. 모델 A의 경우, 총 젖산균은 발효 2일째까지(13.4 log cfu/mL) 증가하다가 그 이후 감소하였고 8℃씨(모델 B) 발효 동안 발효 3일째 최대 균수(10.9 log cfu/mL)을 나타낸 후 감소하였다. 25℃(모델 C)의 경우 발효 1일째 12.6 log cfu/mL을 나

타낸 후 감소하였다. 이 결과로부터 열무 물김치 발효의 최적은 모델 A임을 확인할 수가 있었다.

[0052] **실시예 2: 열무 물김치 발효 동안 클로피리포스(chlorpyrifos, CP)의 분해**

[0053] 본 실시예에서 사용된 9종의 유기인제 살충제는 카투사포스(Cadusafos, CS, *S,S*-di-sec-butyl *O*-ethylphosphorodithioate), 크로리피리포스(chlorpyrifos, CP, *O,O*-diethyl-*O*-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate), 코우마포스(coumaphos, CM, *O*-3-chloro-4-methyl-2-oxo-2*H*-1-benzopyran-7-yl*O,O*-diethyphosphorothioate), 디아지논(diazinon, DZ, *O*-3-chloro-4-methyl-2-oxo-2*H*-1-chromen-7-yl*O,O*-diethylphosphorothioate), 다포나테(dyfonate, DF, *O*-ethyl*S*-phenylethylphosphonodithioate), 에쏘프로포스(ethoprophos, EP, *O*-ethyl*S,S*-dipropylphosphorodithioate), 펜나미포스(Fenamiphos, FA, *RS*-ethyl4-methylthio-*m*-tolylisopropylphosphoramidate), 메칠파라치온(methylparathion, MPT, *O,O*-dimethyl*O*-4-nitrophenylphosphorothioate), 파라치온(parathion, PT, *O,O*-diethyl*O*-4-nitrophenylphosphorothioate), 3,5,6-트리클로-2-피리디놀(3,5,6-trichloro-2-pyridinol, TCP), 디에칠티포스포릭산(diethylthiphosphoric acid, DETP)는 ChemService(West Chester, PA, USA)와 Sigma Chemical Co. (St. Louris, MO, USA)로부터 구입하였고, HPLC-grade Water, 메탄올(methanol), 아세토니티릴(acetonitrile), 갈릭 아세트틱산(glacial acetic acid)는 Fisher Scientific(Fairlawn, NJ, USA)로부터 구입하였다.

[0054] CP를 30 mg/L되게 열무 물김치와 1/25 MRS 배지에 접종 후 최적의 발효조건에서 발효되는 동안 CP의 농도변화를 박층크로마토그래피(Tin layer chromatograph, TLC)와 고압액체크로마토그래피(High press liquid chromatograph, HPLC)로 관찰하였다.

[0055] 배양물 5 mL을 모은 후 원심분리 하였다. 상등액 4 mL은 에틸아세테이트 (8 mL × 3)로 추출하였고, 유기층은 Na_2SO_4를 이용하여 물을 건조하고 진공하에서 농축하였다. CP의 분해정도를 확인하기 위하여, 추출된 시료는 TLC 플레이트(pre-coated silica gel aluminum plate, 0.25mm, Merck, Germany)에 로딩하고 클오로포름(chloroform)과 헥산(hexane) = 4:4(v/v)의 용매조건에서 전개하였다. CP의 분해산물인 TCP 확인을 위하여, 에틸아세테이트와 이소프로판올, NH4OH = 5:3:2(v/v)의 용매조건에서 전개하였다. 최종적으로, CP와 TCP는 UV 램프의 단파장(254nm)에서 확인하였다.

[0056] 한편, 상등액 1 mL는 HPLC용 시료의 준비를 위해 메탄올 1 mL와 혼합한 후 HPLC 분석을 위해 0.45 ㎛ Minipore PVDF filter(Schleicher & Schuell, GmbH, Dassel, Germany)를 통해 여과하였다. 분석 시료량은 10 μL 이며. 9종의 OPs와 TCP의 분석은 C18 column(250×4.6mm, 5㎛, Phenomenx, CA, USA)를 사용하였고 HPLC 기기는 HPLC, Perkin-Elmer 200 series(Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA)를 이용하여 분석하였다. HPLC 용매조건은 0.5% 아세틱산(acetic acid)와 메탄올(methanol) = 1:4,(v/v) 비율로 온도 30도에서 분당 1 mL씩 흘리면서 분석하였다. 9종의 OPs와 TCP는 Perkin-Elmer UV 200 series의 UV detector(Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA)의 214nm에서 측정하였다.

[0057] 9 종의 OPs와 TCP에 대한 보정곡선은 100% methanol에서 용해시킨 시료의 연속희석으로부터 만들어졌다. 직선구간과 선형회귀방정식은 순차적으로 10, 25, 50, 70, 100㎍/mL에서 획득하였다. 표준용액으로부터 발생한 Mean area(n=3)는 보정방정식을 확립하기 위해 농도에 대하여 그래프로 계산되었다.

[0058] 상기와 같은 실험결과, CP는 발효 3일 동안 빠른 분해를 보였고(약 5 mg/L) 9일 이후에는 완전히 분해되었다. CP의 분해율은 발효 초기 3일 동안(83.3%) 급격히 증가한 후 그 이후 서서히 증가하였다(도 3A 참조).

[0059] 발효기간 중 200 mg/L의 CP를 첨가하였을 때 1일째는 179 mg/L, 9일째는 49 mg/L 이었다. 약 64%(68 mg/L)는 6일에 78%(44 mg/L)는 12일 만에 분해되었다(도 3B 참조).

[0060] CP의 분해는 TLC와 HPLC를 통해 발효가 진행됨에 따라 분해가 이루어짐을 확인할 수가 있었고, CP의 분해산물로 알려진 TCP는 두 가지 방법으로도 검출할 수 없었다(도 4 참조).

[0061] 열무 물김치 발효기간 중 CP외에 상기 8종의 다른 유기인제 살충제의 분해정도도 확인하였다. 농약의 분석 또한 이루어 졌다. 발효기간 중 CS, CP, CM, DZ, EP, FA, MPT, PT의 농도는 3일째에 3, 41, 5, 13, 0, 7, 14, 38, 42%로 감소하였고 최종일(12일째)에는 37, 80, 48, 74, 22, 45, 51, 79, 82%로 감소하였다(도 5 참조).

[0062] 발효기간 중 CS, CP, CM, DZ, EP, FA, MPT, PT(100 mg/L)를 첨가한 시료의 초기 pH는 6.18 이었으며 25℃에서 6시간 배양했을 때 3.69 였으며 8℃에서 12일 배양 했을 때 3.65 이였으며 산도는 초기 0.21%에서 각각 1.25%와 1.23%로 나타났다.

[0063] **실험예 2: 열무 물김치 발효 중 젖산균의 검출**

[0064] 열무 물김치 발효 중 특이 젖산균 종의 변화는 m-PCR를 이용하여 관찰하였다. 각 시료는 96개 colony씩 분석하였다. m-PCR은 thermalcycler(PC802, Astec, Japan)을 이용하여 수행하였다. PCR 반응 혼합물(50 ㎕)은 Super-therm DNA 중합효소(5.0 unit, JMR, Side Cup, Kent, UK) 1 ㎕, primer(20 pmol) 각각 2 ㎕, 2.5 mM MgCl2를 함유한 PCR 반응 완충액(buffer) 5 ㎕, 2.5 mM dNTP 5 ㎕, 주형 DNA 5 ㎕ 그리고 증류수 30 ㎕를 포함한다. m-PCR은 95℃에서 5분 동안 예열 단계를 거친 후 35 사이클 동안 수행하였다. 각 cycle은 94℃에서 3분간 변성, 60℃에서 1분 동안 풀림, 72℃에서 2분간 신장 단계으로 구성된다. 마지막 사이클은 72℃에서 10분간 신장 단계를 수행하였다. 동일한 PCR 조건으로 단일(single) PCR 분석을 수행하였다. PCR 산물은 전기영동법으로 분석하였다. PCR 산물 10 ㎕를 2.5% 아가로즈 겔(agarose gel)에 주입한 후 1× TAE 완충액에서 80 볼트(volt)로 6시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 겔은 1 ㎍/mL 에티듐 브로마이드(EtBr, ethidium bromide) 용액으로 30분간 염색한 후 Gel Documentation System(Model GelDoc 1000, Bio-Red, USA)의 CCD-카메라에서 관찰하였다. PCR 산물의 분자크기는 100 bp DNA ladder(Bioneer Inc., Seoul, Korea)의 표준 마이크를 통하여 확인하였다(표 1).

[0065] <표 1>

[0066] 10종의 젖산균 프라이머 유전자 서열 및 PCR 산물의 생성 길이

프라이머 이름	프라이머 유전자 서열 (5' → 3')	목표 젖산균 종/ 유전자 (Accession 번호)	PCR 산물 (bp)	수집원
LcaF	GAT TGT TGC TGC AGG TAT CGA GAA G	*Le. carnosum* / DNA-depent RNA polymerase (X95811)	506	KCTC 3525
LcaR	TCC AAC GTA TCT GTG ACA GAC AAT AGC			
LmeF	GAG CCG TTA TTC AAG CAC CAA TC	*Le. mesenteroides* / Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase (AY804189)	358	KCTC 3530
LmeR	CCT GCG CCT TGA TAG TTT AAC AAG			
LbrF	AAA GCC AGG TAC TGT TAA GGG TGC	*Lb. brevis* / Surface layer protein (AY040846)	482	KACC 10553
LbrR	AAC CAT CAG CCT TAG TGT CAG CG			
LplF	AAG GCC GTA GTC AGT CGT CTA TGG	*Lb. plantarum* / Cadmium-manganese transport ATPase (AF136521)	313	KCTC 3104
LplR	TCA ACCA CAC GAA TAT CAG CCG G			
LpeF	TCC GGT TTA CGC GGA ACA TTT	*Lb. pentosus* / Recombinase A (AJ621666)	398	KCCM 398
LpeR	CCT TGA TTT GTT CAG CAC GAC G			
LsaF	TTA AAG GCA TTA GCT GAA GGC TGT	*Lb. sakei* / Putative lipase-esterase (YP_395501)	274	KCTC 3603
LsaR	CGC CAT GGT GGC CAC GAT			
LlaF	TTG CAT GGA ATG AGC GGA AAC	*Lc. lactics* / Tributyrin esterase (AF157484)	248	KCCM 40104
LlaR	TAT CCT CCC ATT GAT AAA CCA GCG			
PpeF	CTT TGT GCC CGG TGG ATC CT	*Pe. pentosaceus* / Esterase-lipase (ZP_00323987)	330	KCTC 3507
PpeR	AAA GGC TGC AAT GTA GTT GAT GCT A			
WcoF	AAG CGT ATC TTG AAC CAA GCT GG	*We. confusa* / D-alanine: D-alanine ligase (U08910)	208	KCTC 3499
WcoR	GCA AAG CGT CCT TAA CAC CAG C			
WkoF	TCT GCC GAA GCT TGA CCG G	*We. koreensis* / Maltose phosphorylase (this study)	154	W602
WkoR	GCC GAA TTA AGT AGT GTA AAG TCA AAT G			

[0067]

[0068] 그 결과, 열무 물김치의 발효 시작 시, 발효초기에는 7종의 젖산균 즉, 류코노스톡 칼노슘(*Leuconostoc carnosum*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 락토바실러스 프란타륨(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*), 페디오코쿠스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)가 검출되었다.

[0069] 최고 숙성기인 3일째는 류코노스톡 칼노슘, 류코노스톡 메센테로이데스, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus*

brevis), 락토바실러스 펜토슈스(*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 프란타룸, 락토바실러스 사케이, 바이셀라 콘푸사, 바이셀라 코리엔시스(*Weissella koreensis*)의 8종이 검출되었고, 락토바실러스 프란타룸, 락토바실러스 사케이, 바이셀라 콘푸사, 바이셀라 코리엔시스는 산패기(12일째)에서 발견 되었다.

[0070] CP가 첨가된 시료에서는 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 사케이, 류코노스톡 메센테로이데스, 락토바실러스 프란타룸, 바이셀라 콘푸사, 바이셀라 코리엔시스가 최적발효기(3일째)에서 나타나고 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 프란타룸, 락토바실러스 사케이, 바이셀라 코리엔시스가 산패기(12일째)에서 나타났다(도 6 참조).

[0071] **실험예 3 : CP의 첨가 유무에 따른 열무 물김치 발효 중 주요 젖산균의 비교**

[0072] 발효 초기(0일) pH는 6.20에서 CP를 첨가한 것은 12일째에 3.69로 CP를 첨가하지 않은 것은 3.65로 낮아졌으며, 산도는 둘 다 0.20%에서 1.24%로 증가하였다. CP를 첨가하지 않은 열무 물김치에서는 2일째 총 LAB가 13.4 log cfu/mL로 가장 높았으나 CP가 첨가된 열무 물김치에서는 0일째 4.4 log cfu/mL에서 3일째 13.2 log cfu/mL로 증가하였다가 이후 꾸준히 감소하였다(표 2 참조).

[0073] <표 2>

[0074] 열무 물김치 발효 중 CP 200 mg/L의 첨가 유무에 따른 주요 젖산균의 변화 양상

젖산균 종수/총 젖산균수 /pH/산도[f]		발효단계/일 (% / log cfu ml^{-1})				
		초기/0	미숙기/1	적숙기/3	후숙기/6	산패기/12
WOCP[b]	*Le. carnosum*	2.1/0.09	2.1/0.26	2.1/0.28	0 / 0	0 / 0
	Le. mesenteroides	4.2/0.18	12.6/1.55	9.4/1.23	8.3 / 1.06	0 / 0
	Lb. bervis	0/0	0/0	1.0/0.13	0 / 0	0 / 0
	Lb. pentosus	0/0	0/0	2.1/0.28	3.1 / .40	0 / 0
	Lb.plantarum	3.1/0.14	5.2/0.64	8.3/1.09	5.2 / 0.67	12.6 / 1.58
	Lb. sakei	6.3/0.27	10.4/1.28	16.7/2.19	19.8 / 2.53	29.0 / 3.63
	Lc. lactic	9.4/0.41	6.3/0.77	0/0	2.1 / 0.27	0 / 0
	Pe. pentosaceus	2.1/0.09	1.0/0.12	0/0	0 / 0	0 / 0
	We. confusa	55.2/2.43	39.5/4.86	11.4/1.44	8.3 / 1.06	10.4 / 1.30
	We. koreensis	0/0	4.2/0.52	22.9/3.0	28.1 / 3.60	42.8 / 5.35
	총 젖산균수 (log cfu/ml)	4.4	12.3	13.1	12.8	12.5
	pH/산도(%, 젖산)	6.2/0.20	5.56/0.46	4.42/0.72	3.91 / 1.01	3.69 / 1.24
WCP[c]	*Le. carnosum*	2.1/0.09	1.0/0.10	0/0	0 / 0	0 / 0
	Le. mesenteroides	4.2/0.18	18.7/1.94	6.3/0.83	2.1 / 0.28	0 / 0
	Lb. bervis	0/0	2.1/0.22	2.1/0.28	4.2 / 0.55	7.3 / 0.90
	Lb. pentosus	0/0	0/0	0/0	0 / 0	0 / 0
	Lb. plantarum	3.1/0.14	7.3/0.76	17.8/2.35	19.6 / 2.57	10.4 / 1.29
	Lb. sakei	6.3/0.27	32.6/3.39	61.0/8.05	70.7 / 9.26	83.4/10.34
	Lc. lactic	9.4/0.41	5.2/0.54	0/0	0 / 0	0 / 0
	Pe. pentosaceus	2.1/0.09	0/0	0/0	0 / 0	0 / 0
	We. confusa	55.2/2.43	24.7/2.57	11.8/1.56	6.3 / 0.83	0 / 0
	We. koreensis	0/0	0/0	1.0/0.13	2.1 / 0.28	2.1 / 0.26
	총 젖산균수 (log cfu/ml)	4.4	10.4	13.2	13.1	12.4
	pH/산도(%, 젖산)	6.2/0.20	5.97/0.38	4.62/0.65	4.14 / 0.99	3.65 / 1.24

[a] A *Yeulmu-mulkimchi* fermentation at 25℃ early for 6 hr and after 8℃ for day 12.
[b] WOCP, *Yeulmu-mulkimchi* fermented without CP.
[c] WCP, *Yeulmu-mulkimchi* fermented with 200 mg l^{-1} of CP.
[d] spercific LAB viable cells (log cfu/ml) = detection of specific LAB colonies/isolated 96 colonies × 100 = specific LAB%/100 × total LAB viable cells.
[e] One ml of each blended *kimchi* was serially diluted. Dilutions were plated onto MRSA, and after these incubated at 28℃ for 48 hr. Total LAB viable cells were performed by triplicate.
[f] Twenty ml of *kimchi* filtrate (*kimchi* juice) was titrated with 0.1N NaOH at pH 8.2±0.2 for acidity

[0075]

[0076] 표 2에 나타낸 바와 같이, 특이 젖산균 종의 CP의 유무에 따른 영향을 나타내었다.

[0077] 바이셀라 콘푸사가 발효 초기에 우점종 있었다. CP 무첨가 열무 물김치에서는 각각의 단계에 따라 우점 젖산균이 다양하게 나타났다. 바이셀라 콘푸사가 시작단계와 미숙기에서 55.2%(2.43 log cfu/mL)로 우점 이었으며, 적숙기와 후숙기에서는 바이셀라 코리엔시스가 각각 22.9%(3.0 log cfu/mL) 및 28.1%(3.6 log cfu/mL)로 우점이었고 산패 단계에서도 바이셀라 코리엔시스가 42.8%(5.35 log cfu/mL)로 우점이었다.

[0078] CP 첨가 열무 물김치에서는 각각의 단계에 따라 역시 우점 젖산균이 다양하게 나타났다. 바이셀라 콘푸사가 시작단계에서 55.2%(2.43 log cfu/mL)로 우점이었고, 미숙기에서는 락토바실러스 사케이가 32.6%(3.39 log cfu/mL)로 우점이었고, 적숙기에도 락토바실러스 사케이 61.0%(8.05 log cfu/mL)로 우점이었고 후숙기 역시 락토바실러스 사케이가 70.7%(9.26 log cfu/mL)로 우점이었고 산패기에서도 락토바실러스 사케이가 83.4%(10.34 log cfu/mL)로 우점이었다. 류코노스톡 메센테로이데스는 미숙기에서 CP가 첨가된 열무 물김치에서 많이 존재하였다. 역시 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 프란타륨은 적숙기와 후숙기에서 CP가 첨가한 시료에서 높은 수준으로 존재하였다.

[0079] 결과적으로 류코노스톡 메센테로이데스 및 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 프란타륨, 락토바실러스 사케이는 CP를 분해할 수 있을 것으로 추정되었다.

[0080] **실시예 3: 10 종의 공시 젖산균을 이용한 CP 분해능 측정**

[0081] 공시 젖산균주 10종에 대해서 CP 분해능을 먼저 측정하였다. CP 100 mg/L를 포함한 1/25 MRS 액체배지에서 공시균주 10종을 접종하여 9일간 배양한 후 TLC와 HPLC로 분석한 결과 류코노스톡 메센테리오데스 KCTC 3530(WCP907) 및 락토바실러스 브레비스 KACC 10553(WCP902), 락토바실러스 프란타륨 KCTC 3104(WCP931), 락토바실러스 사케이 KCTC 3603(WCP904) 균주는 TCP와 CP 모두를 분해할 수 있었다(표 3).

[0082] <표 3>

[0083] TLC와 HPLC를 이용한 10 종의 공시 젖산균을 이용한 CP 분해능 측정

젖산균종	TLC		HPLC		분리균주
	TCP	CP	TCP	CP	
Le. carnosum KCTC 3525	--[b]	--	--	--	
Le. mesenteroides KCTC 3530	+	+	+	+	WCP907
Lb. brevis KACC 10553	+	+	+	+	WCP902
Lb. plantarum KCTC 3104	+	+	+	+	WCP931
Lb. pentosus KCCM 35472	--	+/-	--	+/-	
Lb. sakei KCTC 3603	+	+	+	+	WCP904
Lc. lactis KCCM 40104	--	+	--	+/-	
Pe. pentosaceus KCTC 3507	--	--	--	--	
We. cenfusa KCTC 3499	--	--	--	--	
We. kerenesis W602 (this study)	--	--	--	--	

[a] Each strain is incubated on 1/25 MRS comtaining 100 mg/L of CP at 9 day.
[b] Symbols: --, no degradation; +/-, weak degradation; +, degradation.

[0084]

[0085] **실험예 4 : 4 종의 김치분리 젖산균의 액체배지에서 유기인제 살충제 분해능**

[0086] 상기 실시예 3에서 CP를 분해 젖산균 WCP907 및 WCP902, WCP931, WCP904의 CP가 포함된 배지에서 생육가능여부

와, CP 분해능을 실험하였다.

[0087] 도 7에서는 4종의 균이 1일째까지는 잘 자라고 2일째는 감소했다가, 6일째까지 다시 증가하였고 CP는 6 일 뒤 매우 낮은 농도로 검출되었다. 첫 3일 동안은 이 4종의 젖산균이 CP를 급격히 분해하여 100 mg/L의 초기농도가 3 일 뒤 약 32-39 mg/L까지 감소하였다. 그 후 CP의 농도는 천천히 감소하였다. 한편 TCP는 어떤 시료에서도 검출되지 할 수 없었다. 이 4종의 젖산균들은 또 다른 유기인제 살충제의 분해능을 시험하였다. CP, CM ,DZ, MPT, PT는 DEPT잔기를 가지고 있고, CS, DF, EP, FA는 DEPT잔기를 가지지 않았다. 여기서 DF를 제외한 모든 유기인계 화합물에 4종(WCP907, WCP902, WCP931, WCP904)의 배양된 균을 첨가 시 인산 에스터 결합이 가수분해되어 분해가 이루어짐을 확인 할 수 있었다(표 4).

[0088] <표 4>

[0089] 4 종의 젖산균(WCP907 및 WCP902, WCP931, WCP904) 100 mg/L 9 종의 유기인제 살충제가 함유된 1/25 MRS 액체 배지 상에서 분해 정도a

유기인제 살충제[b]	농도 (mg/l)			
	균주			
	Lme WCP907[c]	*Lbr* WCP902[d]	*Lpl* WCP931[e]	*Lsa* WCP904[f]
Cadusafos (CS)	82	90	84	83
Chlorpyrifos (CP)	20	24	20	16
Coumaphos (CA)	75	74	64	78
Diazinon (DZ)	28	56	41	22
Dyfonate (DF)	95	69	96	98
Ethoprophos (EP)	87	89	93	86
Fenamiphos (FA)	67	63	54	59
Methylparathion (MPT)	21	33	18	21
Parathion (PT)	18	35	20	14

[a] The strain WCP907, WCP902, WCP931, and WCP904 growth on 1/25 MRS at day 9 contained in the different OPs
[b] Values indicate the mean's of three replications (n=3).
[c] *Leuconostoc mesenteroides* WCP907.
[d] *Lactobacilus brevis* WCP902.
[e] *Lactobacilus plantarum* WCP931.
[f] *Lactobacilus sakei* WCP904.

[0090]

[0091] **실시예 4: 4 종의 CP 분해 젖산균으로부터 유기인제 살충제 분해유전자 클로닝과 염기서열 분석**

[0092] 상기 4종(WCP907, WCP902, WCP931, WCP904)의 젖산균주를 3 mL의 영양액체배지(MRSB)에 접종한 후 30℃에서 36 시간 배양한 후 4℃, 14,000 × g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버린 후 모인 균체는 G-spinTM Genomic DNA extraction kit(iNtRON Biotechnology, Suwon, Korea)에 기술되어있는 방법으로 게놈(genome) DNA를 분리한 후 PCR의 주형으로 사용하였다.

[0093] 각각 균주의 특정 프라이머를 이용하여 유기인제 살충제 분해유전자를 PCR로 증폭하였다(표 4). PCR 산물은 각각 약 1.2-1.6 kb의 단일 증폭 산물을 생성하였다. PCR 반응은 94℃에서 변성(denaturation) 1분, 52℃에서 풀림(anneling) 30초, 72℃에서 신장(extension) 2분 10초 동안 35회를 수행하였다. 이렇게 하여 얻어진 PCR 단편들을 MEGA-spinTM Agarose Gel Extraction kit(iNtRON Biotechnology, Suwon, Korea)를 각 키트에 포함된 방법에 따라 겔에서 DNA를 분리하였다. 분리된 PCR 단편들과 pGEM-T Easy Vector(Promega, Md., WI, USA)를 1:3의 비율로 섞은 후 T4 DNA 리가아제를 이용하여 16℃에서 2시간 동안 반응시켜서 라이게이션한 후 형질전환 하였다.

[0094] 대장균(*E. coli*) DH5α의 형질전환은 Cohen 등의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. CaCl2로 처리한 반응세포

(competent cell)에 라이게이션된 DNA를 10 ㎕ 넣고 얼음에 30분 동안 둔 후 이를 42℃에서 90초간 처리한 다음 얼음에 2분 동안 방치하여 형질전환시켰고, 이를 LB 액체배지 500 ㎕를 넣고 37℃에서 90분간 진탕 배양하였다. 이것을 원심분리하여 상등액은 버리고 남은 균체를 LB 액체배지 100 ㎕로 현탁하여 선택배지에 도말한 후 37℃에서 16시간 배양하였다.

[0095] 형질전환체의 선택배지는 LB배지에 항생제 암피실린(ampicilin, 50 ㎕/㎖)과 이소프로필-베타-D 치오갈락토시데이스(isopropyl-β-D thiogalactoside, IPTG) 1 mM, 5-브로모-4-크롤오-3-인도일-베타-5-갈락토시데이스(bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside, X-gal) 0.12 mM의 농도로 첨가한 평판배지(LAXI agar plate)에서 흰색의 클론을 선발하여 다시 새로운 LAXI agar plate에 picking하여 16시간 배양 후에 클론 1.5 ㎖ e-tube에 약간 옮긴 후 페놀:클오로포름(phenol : CH3Cl)을 1:1 섞은 후 상등액 14 ㎕와 로딩 다이(loading dye) 30 ㎕를 넣은 후 강하게 혼합한 후 13,000 rpm에서 원심분리한 후 전기 영동하여 형질전환체의 유무를 1차적으로 확인하였다.

[0096] 이렇게 선발된 클론들을 LB배지에 항생제 암피실린 (50ul/mL)만이 들어 있는 배지에서 순수분리 한 후 LB+ampicilin (50 ㎕/㎖) 3 ㎖의 액체배지에 접종하여 37℃에서 12 시간 배양하여 DNA-spinTM Plasmid DNA Purification kit(iNtRON Biotechnology, Suwon, Korea)의 방법에 따라 플라스미드(plasmid) DNA를 분리하였다. 분리된 플라스미드 DNA를 *EcoR*I 제한효소로 37℃에서 1시간 동안 절단한 후 72℃에서 10 분간 처리하여 효소반응을 정지시키고 0.7% 아가로저 겔(agarose gel)에서 전기영동하여 pGEMⓡ-T easy vector와 16S rDNA를 확인하였다. pGEMⓡ-T easy vector에 서브클로닝(subcloning)한 것을 주행으로 사용하여 염기서열을 결정하였다.

[0097] 유전자 염기서열 결정은 PRISM Ready Reaction Dye terminator/primer cycle sequencing kit(Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CN, USA)를 사용한 dideoxychain termination 방법으로 하였다. 시료는 자동 DNA 염기서열분석기(ABI prism 310, Perkin-Elmer)로 분석하였다. DNA와 아미노산의 상동성 조사는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 블라스트(BLAST) 네트워크 서비스와 DNAMAN 분석 시스템(Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)을 이용하여 조사하였다.

[0098] **실험예 5 : 유기인제 살충제 분해 유전자(*chi*18B)의 염기서열 특징**

[0099] 상기 실시 예4에서 클로닝 된 5종의 유기인제 살충제 분해 유전자를 다시 pBluescript Ⅱ SK+ 벡터에 클로닝한 후 에스테라아제(esterase) 활성을 확인한 결과 5종 모두 에스테라아제 활성을 나타내었다. 약 1.2에서 1.6 kb의 유기인제 살충제 분해 유전자를 가지고 있는 양성 서브클론들은 pSCY100에서 pSCY500이라고 명명하였다. pSCY100에서 pSCY500에 들어 있는 약 1.2에서 1.6 kb의 양 가닥은 완전한 선형배열로 되어있었고, 거기에서 930, 723, 831, 825 그리고 894 bp 인 개방 해독 판독틀(open reading frame, ORF)들이 각각 *oph*A(서열번호 1), *oph*B(서열번호 2), *oph*C(서열번호 3), *oph*D(서열번호 4), 및 *oph*E(서열번호 5)와 같이 명명하였다.

[0100] *oph*A, *oph*B, *oph*C, *oph*D, 그리고 *oph*E ORF는 1,260 및 861, 1,235, 1,135, 1,210의 자리에서 모두 ATG 개시코돈을 가지고 있었고 종결코돈은 ochre 종결코돈 (TAA) 혹은 opal 종결코돈(TGA)을 가지는 경우도 있었다. 각각 약 35 및 27, 30, 31, 33 kDa 의 예측된 단백질 분자 크기와 함께 309, 240, 276, 274, 그리고 297개 아미노산이 단백질로 암호화 되었다. 아미노산 염기서열과 함께 프로그램 PSORT의 분석은 비 잠재적 염기서열로 나타났다. OphA 및 OphB, OphC, OphD, OphE 단백질의 계산된 등전점(pI)는 각각 9.04 및 4.84, 6.33, 5.18, 8.79 있었다(도 8 참조).

[0101] **실험예 6 : 유기인제 살충제 분해 유전자 산물들의 상동성 및 특징**

[0102] 본 발명의 유기인제 살충제 분해효소 인 OphA(Lme-WCP907) 및 OphB(Lbr-WCP902), OphC(Lpl-WCP931), OplD(Lsa-WCP904), OphE(Lme-WCP907)사이의 아미노산 염기서열 유사성의 수준은 7.7 에서 57.9% 있었다. 각각의 아미노산 잔기 128 및 82, 116, 116, 116는 세린(serine)을 활성부위(active site)를 가지고 있었고 GXSXG 모티프 또한 발견되었다. 본 발명의 유전자와 기존의 lipase/esterase 그룹의 아미노산서열과 비교하여 계통발생학적 파이로제네틱 트리(phylogenetic tree)를 살펴본 결과, OphA 및 OphB, OphC, OphD, OphE 단백질들은 그룹 Ⅰ 및 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ 어느 그룹에도 속하지 않을 것을 보아 본 발명의 유기인제 살충제 분해 유전자는 새로운 형태의 신종 esterase 그룹임을 알 수 가 있었다(도 9).

[0103] OphA 및 OphB, OphC, OphD, OphE의 유기인제 살충제 분해효소를 대량발현한 후 정제하여 단백질 전기영동 한 결과 각각 35 및 27, 30, 31, 33 kDa임을 확인할 수가 있었다(도 10).

[0104] 9종의 유기인제 살충제는 본 발명의 유기인제 살충제 분해효소에 의해 분해되었다. DF를 제외한 8종의 유기인제

살충제(CS 및 CP, CM, DZ, EP, FM, MPT, PT) 살충제들은 각각 OphA, OphB, OphC, OphD, 그리고 OphE효소들이 phosphoester bond 때 가수분해했다. 특히 CP 및 CM, DZ, MPT, PT에 대한 분해력이 뛰어남을 확인할 수 가 있었다(도 11).

도면의 간단한 설명

[0105] 도 1은 열무 물김치의 발효 동안 pH 및 산도, 염도, 환원당의 변화를 나타낸 그래프이다.

[0106] 도 2는 열무 물김치의 발효 동안 총 젖산균수의 변화를 나타낸 그래프이다.

[0107] 도 3은 열무 물김치의 발효기간 중 크로리피리포스(chlorpyrifos, CP)의 농도 및 분해률을 나타낸 그래프이다.

[0108] 도 4는 TLC와 HPLC를 이용하여 열무 물김치의 발효기간 중 크로리피리포스(chlorpyrifos, CP)의 변화양상을 나타낸 그래프이다.

[0109] 도 5는 열무 물김치의 발효기간 중 9종의 유기인제 살충제를 접종한 후 발효기간 동안 분해률을 나타낸 그래프이다.

[0110] 도 6은 크로리피리포스(chlorpyrifos, CP)를 접종한 열무 물김치와 접종하지 않은 열무 물김치 발효기간 동안 다중중합효소연쇄반응을 이용하여 젖산균을 검출하고 전기 영동하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[0111] 도 7은 액체 배지에 크로리피리포스(chlorpyrifos, CP)를 접종한 후 배양되는 동안 균주 WCP907 및 WCP902, WCP931, 및 WCP904의 균 성장정도와 CP 함량의 변화를 나타낸 그래프이다.

[0112] 도 8은 균주 WCP907 및 WCP902, WCP931, 및 WCP904로부터 획득한 재조합 *oph*A 및 *oph*B, *oph*C, *oph*D, *oph*E 유전자들의 물리적 지도를 나타낸 도이다.

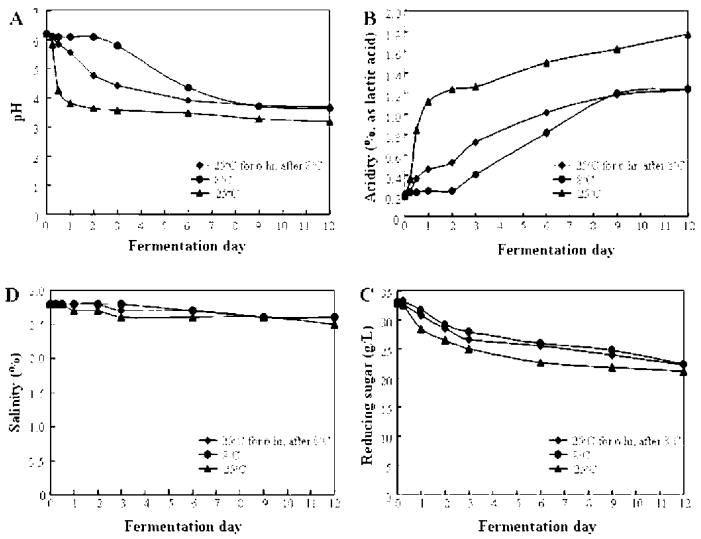
[0113] 도 9는 지방분해효소들의 그룹 I 및 II, III, IV와 크로리피리포스(chlorpyrifos, CP) 분해 젖산균으로부터 얻어진 살충제 분해효소(에스테라제)인 OphA 및 OphB, OphC, OphD, OphE와 계통발생학적 파로제네틱 트리(Phylogenetic tree)를 나타낸 도이다.

[0114] 도 10은 살충제 분해효소(에스테라제)인 OphA 및 OphB, OphC, OphD, OphE의 단백질 전기영동을 통한 단백질 분자량을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

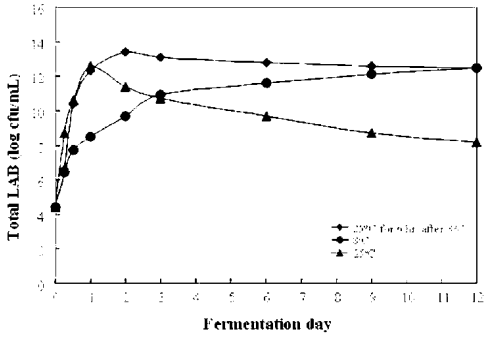
[0115] 도 11은 9종의 유기인제 살충제에 대한 살충제 분해효소(에스테라제)인 OphA 및 OphB, OphC, OphD, OphE의 살충제 분해력을 나타낸 그래프이다.

도면

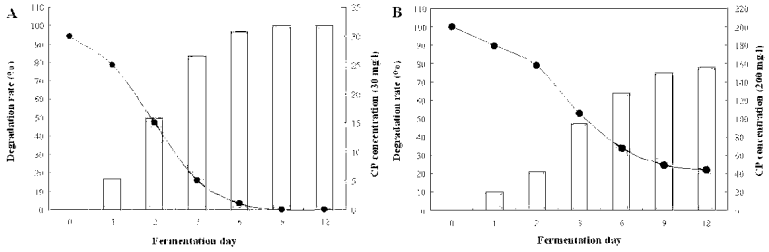
도면1



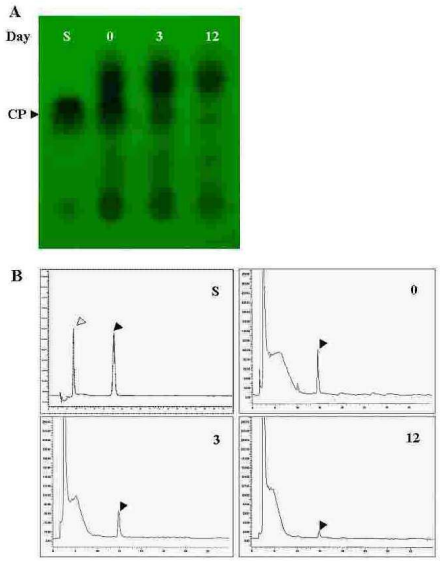
도면2


Total LAB (log cfu/mL)
Fermentation day

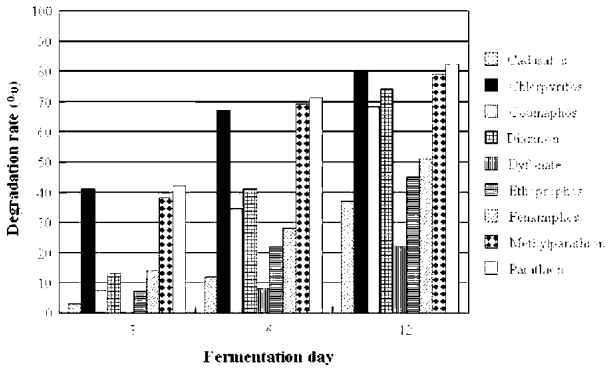
도면3


A
B
Degradation rate (%)
Fermentation day

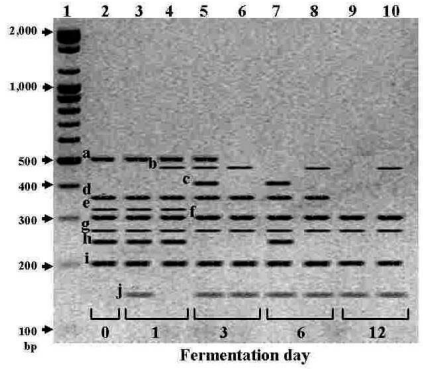
도면4


A
Day
S
0
3
12
CP
B
S
0
3
12

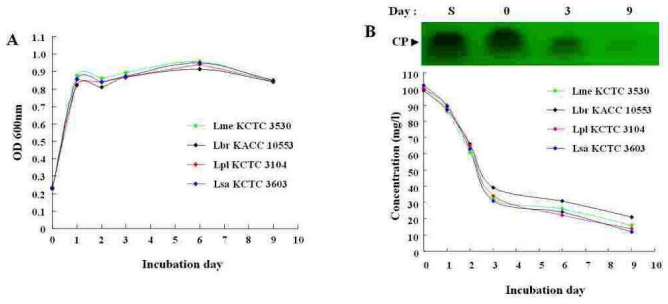
도면5


Degradation rate (%)
Fermentation day

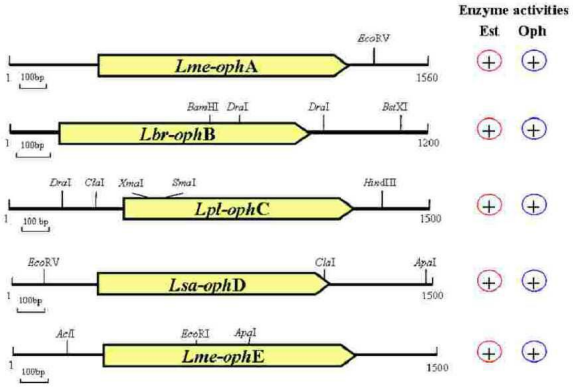
도면6


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2,000
1,000
500
400
300
200
100
bp
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
0 1 3 6 12
Fermentation day

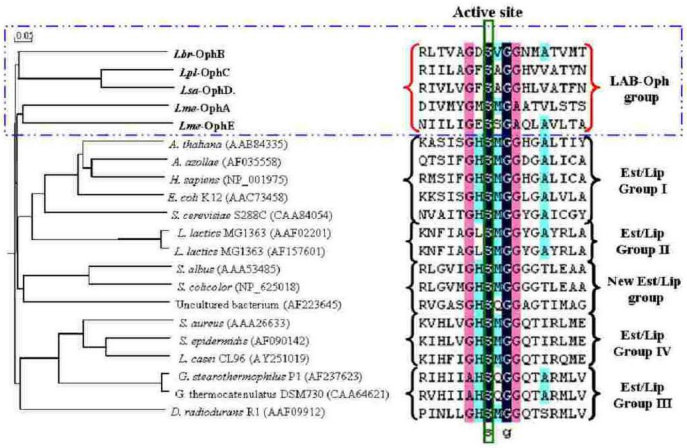
도면7


A
OD 600nm
Incubation day
Lme KCTC 3530
Lbr KACC 10553
Lpl KCTC 3104
Lsa KCTC 3603
B
Day : S 0 3 9
CP
Concentration (mg/l)
Incubation day

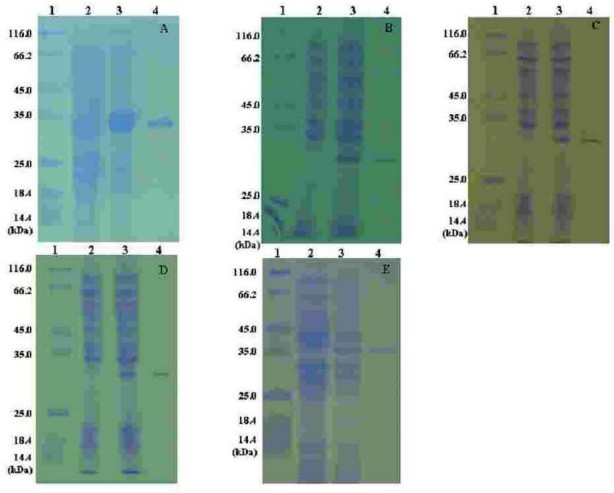
도면8


Enzyme activities
Est
Oph
Lme-ophA
Lbr-ophB
Lpl-ophC
Lsa-ophD
Lme-ophE
EcoRV
BamHI
DraI
BstXI
ClaI
XmaI
SmaI
HindIII
ApaI
AclI
EcoRI
100bp
1560
1200
1500

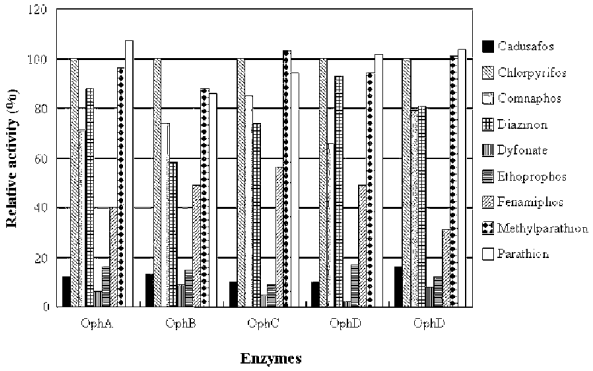
도면9


Active site
0.05
Lbr-OphB
Lpl-OphC
Lsa-OphD
Lme-OphA
Lme-OphE
A. thaliana (AAB84335)
A. azollae (AF035558)
H. sapiens (NP_001975)
E. coli K12 (AAC73458)
S. cerevisiae S288C (CAA84054)
L. lactics MG1363 (AAF02201)
L. lactics MG1363 (AF157601)
S. albus (AAA53485)
S. cohcolor (NP_625018)
Uncultured bacterium (AF223645)
S. aureus (AAA26633)
S. epidermidis (AF090142)
L. casei CL96 (AY251019)
G. stearothermophilus P1 (AF237623)
G. thermocatenulatus DSM730 (CAA64621)
D. radiodurans R1 (AAF09912)
LAB-Oph group
Est/Lip Group I
Est/Lip Group II
New Est/Lip group
Est/Lip Group IV
Est/Lip Group III

도면10


A
B
C
D
E
116.0
66.2
45.0
35.0
25.0
18.4
14.4
(kDa)

도면11



서 열 목 록

<110> Gyeongsang National University Industrial & Academic Collaboration Foundation
<120> Organophosphorous hydrolase

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 1870
<212> PRT
<213> ophA gene obtained from Leuconostoc mesenteroides WCP907

<400> 1

Gly Cys Thr Ala Ala Ala Thr Cys Ala Gly Cys Cys Ala Ala Cys Ala
1 5 10 15

Cys Cys Gly Thr Gly Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Gly Thr Cys
20 25 30

Thr Thr Gly Thr Gly Cys Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Thr Ala Ala
35 40 45

Thr Cys Gly Gly Cys Thr Ala Thr Cys Ala Thr Ala Thr Cys Ala Gly
50 55 60

Thr Ala Ala Ala Ala Thr Cys Ala Thr Thr Gly Ala Thr Thr Thr Gly
65 70 75 80

Cys Thr Thr Thr Gly Cys Gly Ala Thr Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala

85 90 95

Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Gly Ala Gly Thr Gly Ala Gly Thr Thr
100 105 110

Gly Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Thr Thr Ala Thr Ala Cys Cys
115 120 125

Ala Cys Cys Cys Gly Gly Gly Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Thr Thr
130 135 140

Thr Cys Thr Ala Ala Ala Thr Thr Cys Cys Ala Thr Thr Thr Thr Thr
145 150 155 160

Gly Thr Gly Ala Gly Thr Ala Gly Gly Thr Cys Ala Cys Gly Thr Thr
165 170 175

Ala Ala Thr Ala Thr Ala Cys Cys Thr Cys Gly Cys Thr Thr Thr Cys
180 185 190

Thr Thr Thr Ala Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala Thr Gly Ala Thr Ala
195 200 205

Cys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Thr Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Thr
210 215 220

Thr Cys Thr Ala Gly Gly Gly Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ala Thr Thr
225 230 235 240

Thr Ala Thr Thr Ala Ala Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Thr Thr Thr
245 250 255

Thr Ala Ala Thr Cys Ala Thr Ala Ala Thr Thr Thr Gly Thr Thr Thr
260 265 270

Gly Cys Thr Cys Cys Ala Thr Gly Ala Cys Cys Ala Ala Ala Ala Thr
275 280 285

Thr Ala Gly Cys Gly Thr Ala Cys Ala Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr
290 295 300

Gly Gly Ala Thr Thr Gly Ala Thr Thr Ala Thr Ala Ala Gly Gly Ala
305 310 315 320

```
Ala Ala Ala Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala
                325                 330                 335

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Thr Ala Thr Ala Ala Gly Thr Gly Gly Thr
            340                 345                 350

Thr Ala Ala Thr Thr Gly Gly Thr Met Lys Arg Lys Tyr Lys Trp Leu
        355                 360                 365

Ile Gly Thr Gly Thr Thr Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Ala Thr
    370                 375                 380

Thr Gly Cys Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Gly Thr Thr Ala
385                 390                 395                 400

Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr
                405                 410                 415

Thr Thr Thr Thr Thr Cys Ala Thr Gly Thr Thr Gly Cys Thr Cys Leu
            420                 425                 430

Val Phe Ile Ala Ile Leu Leu Leu Ser Ala Gly Met Tyr Phe Phe His
        435                 440                 445

Val Ala Gly Ala Gly Gly Thr Cys Cys Gly Cys Gly Ala Thr Gly Thr
    450                 455                 460

Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala Gly Cys Cys Ala
465                 470                 475                 480

Gly Ala Cys Ala Ala Ala Thr Thr Ala Cys Gly Thr Gly Cys Ala Ala
                485                 490                 495

Ala Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Glu Val
            500                 505                 510

Arg Asp Val Ala Ala Asp Lys Pro Asp Lys Leu Arg Ala Lys Thr Asn
        515                 520                 525

Ser Leu Thr Ala Thr Cys Ala Cys Thr Ala Cys Gly Ala Ala Cys Ala
    530                 535                 540

Thr Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Gly Thr
545                 550                 555                 560
```

Gly Ala Ala Ala Ala Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala
565 570 575

Cys Ala Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala Thr Cys Thr Tyr His
580 585 590

Tyr Glu His Asp Phe Leu Ser Arg Glu Lys Gln Thr Trp Thr Gln Lys
595 600 605

Thr Ser Gly Ala Thr Ala Ala Thr Thr Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr
610 615 620

Ala Ala Thr Thr Gly Cys Thr Thr Gly Gly Thr Ala Cys Gly Thr Ala
625 630 635 640

Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
645 650 655

Cys Ala Gly Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr Asp Asn
660 665 670

Leu Lys Leu Ile Ala Trp Tyr Val Pro Ala Glu Lys Lys Thr Gly Lys
675 680 685

Thr Ala Ala Thr Thr Cys Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala Cys Gly Gly
690 695 700

Cys Thr Gly Gly Cys Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Thr Ala Ala Ala
705 710 715 720

Ala Cys Gly Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Ala Thr
725 730 735

Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Gly Cys Thr Ala Thr Thr Cys Ile Leu
740 745 750

Ala His Gly Trp His Asn Asn Lys Thr Thr Met Ala Ile Tyr Gly Glu
755 760 765

Leu Phe Cys Ala Thr Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Gly Cys Thr Ala
770 775 780

Cys Ala Ala Cys Gly Thr Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Cys Cys Ala

785 790 795 800

Gly Ala Thr Ala Ala Thr Cys Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Cys Gly
805 810 815

Gly Thr Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr His Glu
820 825 830

Leu Gly Tyr Asn Val Leu Ile Pro Asp Asn Arg Ala His Gly Asp Ser
835 840 845

Gln Gly Gly Ala Ala Ala Thr Gly Ala Thr Thr Gly Gly Cys Thr Ala
850 855 860

Cys Gly Gly Thr Thr Gly Gly Thr Thr Ala Gly Ala Thr Cys Gly Gly
865 870 875 880

Cys Gly Ala Gly Ala Cys Thr Ala Thr Ala Thr Cys Gly Gly Thr Thr
885 890 895

Gly Gly Thr Thr Gly Ala Ala Thr Cys Ala Ala Ala Thr Thr Glu Met
900 905 910

Ile Gly Tyr Gly Trp Leu Asp Arg Arg Asp Tyr Ile Gly Trp Leu Asn
915 920 925

Gln Ile Thr Thr Ala Gly Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly
930 935 940

Thr Cys Ala Ala Ala Ala Ala Thr Cys Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr
945 950 955 960

Gly Thr Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Gly Gly Thr Ala Thr Gly Ala
965 970 975

Gly Cys Ala Thr Gly Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Leu Glu
980 985 990

Asn Asn Gly Gln Lys Ser Asp Ile Val Met Tyr Gly Met Ser Met Gly
995 1000 1005

Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Cys
1010 1015 1020

Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Thr
1025 1030 1035 1040

Thr Thr Ala Cys Cys Gly Ala Ala Thr Cys Ala Gly Gly Thr Gly Ala
1045 1050 1055

Ala Ala Gly Cys Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Gly Cys Thr Thr Val
1060 1065 1070

Leu Ser Thr Ser Gly Glu Asn Asp Leu Pro Asn Gln Val Lys Ala Ile
1075 1080 1085

Ile Ala Gly Ala Thr Thr Cys Gly Thr Cys Cys Thr Ala Cys Ala Cys
1090 1095 1100

Ala Ala Gly Thr Gly Thr Thr Ala Thr Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly
1105 1110 1115 1120

Ala Thr Thr Ala Ala Ala Cys Ala Thr Gly Ala Ala Gly Cys Ala Gly
1125 1130 1135

Gly Ala Gly Ala Thr Ala Thr Gly Thr Ala Thr Gly Gly Cys Asp Ser
1140 1145 1150

Ser Tyr Thr Ser Val Ile Glu Glu Ile Lys His Glu Ala Gly Asp Met
1155 1160 1165

Tyr Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Cys Cys
1170 1175 1180

Ala Cys Thr Thr Gly Thr Thr Ala Ala Thr Gly Thr Gly Gly Thr Thr
1185 1190 1195 1200

Thr Cys Gly Gly Gly Thr Ala Thr Cys Thr Cys Gly Ala Ala Gly Gly
1205 1210 1215

Thr Ala Cys Gly Gly Gly Cys Cys Gly Gly Ala Thr Ala Cys Leu Pro
1220 1225 1230

Trp Phe Pro Leu Val Asn Val Val Ser Gly Ile Ser Lys Val Arg Ala
1235 1240 1245

Gly Tyr Thr Cys Ala Thr Ala Thr Gly Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys
1250 1255 1260

Thr Ala Gly Thr Cys Cys Thr Thr Thr Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala
1265 1270 1275 1280

Gly Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala Cys Gly Cys
1285 1290 1295

Gly Gly Cys Cys Ala Ala Cys Cys Thr Thr Thr Thr Thr Cys Ser Tyr
1300 1305 1310

Glu Glu Ala Ser Pro Leu Arg Gln Val Glu Lys Asn Thr Arg Pro Thr
1315 1320 1325

Phe Phe Ala Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Cys
1330 1335 1340

Cys Gly Ala Cys Ala Cys Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala
1345 1350 1355 1360

Ala Cys Cys Ala Ala Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Ala Cys Cys
1365 1370 1375

Cys Gly Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Cys Thr Ile Gln
1380 1385 1390

Gly Gly Ala Asp Thr Phe Val Pro Thr Lys Met Val Tyr Pro Leu Tyr
1395 1400 1405

Asn Ala Thr Cys Thr Ala Gly Ala Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Ala
1410 1415 1420

Gly Cys Ala Gly Thr Thr Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr Ala Cys Cys
1425 1430 1435 1440

Ala Ala Gly Gly Gly Cys Thr Cys Ala Ala Ala Ala Cys Ala Thr Gly
1445 1450 1455

Thr Thr Cys Ala Ala Ala Gly Thr Thr Thr Thr Cys Ala Thr Ser Arg
1460 1465 1470

Gly Pro Lys Gln Leu Trp Ile Thr Lys Gly Ser Lys His Val Gln Ser
1475 1480 1485

Phe His Gly Ala Cys Thr Ala Cys Cys Cys Ala Gly Thr Cys Gly Cys

1490 1495 1500

Thr Thr Ala Thr Ala Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Ala Thr Ala
1505 1510 1515 1520

Ala Ala Ala Gly Cys Ala Thr Thr Thr Thr Thr Gly Gly Ala Ala Ala
1525 1530 1535

Ala Ala Thr Ala Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Thr Ala Ala Asp Tyr
1540 1545 1550

Pro Val Ala Tyr Arg Ser Lys Ile Lys Ala Phe Leu Glu Lys Tyr Asp
1555 1560 1565

Lys *** Ala Ala Gly Gly Ala Thr Cys Ala Ala Cys Thr Cys Ala Thr
1570 1575 1580

Thr Ala Ala Thr Gly Ala Gly Thr Thr Gly Ala Thr Cys Cys Thr Thr
1585 1590 1595 1600

Thr Thr Thr Thr Gly Gly Ala Ala Cys Ala Ala Ala Gly Thr Thr Ala
1605 1610 1615

Ala Thr Ala Thr Cys Ala Gly Ala Ala Ala Cys Ala Cys Thr Ala Cys
1620 1625 1630

Gly Ala Ala Thr Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr Ala Ala
1635 1640 1645

Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala Gly Ala Thr Cys Thr Cys Ala Ala Thr
1650 1655 1660

Ala Thr Gly Ala Thr Ala Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Ala Thr Ala
1665 1670 1675 1680

Thr Thr Thr Ala Ala Ala Cys Cys Gly Cys Thr Ala Gly Cys Thr Thr
1685 1690 1695

Thr Ala Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys Gly Thr Cys Ala Ala Ala
1700 1705 1710

Cys Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys Ala Thr Ala Thr Cys Gly
1715 1720 1725

```
Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Ala Ala
   1730                1735                1740

Thr Ala Ala Thr Cys Thr Cys Ala Cys Thr Ala Gly Thr Thr Thr Gly
1745               1750                1755                1760

Thr Thr Gly Ala Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Thr Gly Ala
               1765                1770                1775

Thr Ala Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr
           1780                1785                1790

Ala Ala Thr Ala Ala Thr Cys Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly Cys Gly
       1795                1800                1805

Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Thr Cys Ala Thr Cys Ala Thr Gly Ala
   1810                1815                1820

Ala Thr Gly Thr Cys Thr Ala Thr Ala Gly Cys Gly Ala Thr Gly Ala
1825               1830                1835                1840

Thr Thr Ala Ala Thr Cys Cys Ala Gly Thr Thr Thr Cys Ala Ala Thr
               1845                1850                1855

Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala Thr Cys Ala Ala Gly Cys Gly
           1860                1865                1870
```

<210> 2
<211> 1441
<212> PRT
<213> ophB gene obtained from Lactobacillus brevis WCP902

<400> 2

```
Gly Thr Thr Ala Cys Thr Cys Cys Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Cys
  1               5                  10                  15

Cys Ala Gly Cys Gly Ala Cys Cys Gly Cys Thr Thr Ala Ala Ala Ala
             20                  25                  30

Thr Ala Cys Thr Cys Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys
         35                  40                  45

Ala Cys Cys Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Gly Thr Thr Ala Thr Gly
```

50 55 60

Cys Thr Gly Ala Cys Ala Ala Ala Thr Thr Thr Gly Thr Cys Cys Ala
65 70 75 80

Ala Ala Ala Ala Thr Thr Cys Gly Gly Ala Thr Thr Ala Ala Ala Thr
85 90 95

Thr Thr Gly Cys Ala Ala Thr Cys Thr Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala
100 105 110

Thr Thr Cys Gly Thr Cys Cys Cys Gly Cys Thr Gly Gly Cys Gly Ala
115 120 125

Thr Thr Ala Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Thr Gly Cys Cys Ala
130 135 140

Gly Thr Thr Ala Thr Cys Thr Thr Thr Thr Ala Thr Ala Thr Thr Cys
145 150 155 160

Ala Thr Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Gly Thr
165 170 175

Ala Thr Thr Thr Met Pro Val Ile Phe Tyr Ile His Gly Ala Gly Trp
180 185 190

Val Phe Gly Gly Gly Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala Ala Ala Ala Cys
195 200 205

Ala Cys Ala Thr Gly Ala Cys Ala Ala Gly Cys Thr Cys Gly Thr Gly
210 215 220

Cys Gly Gly Gly Ala Ala Cys Thr Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys
225 230 235 240

Gly Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Thr Cys Ala Gly Thr Cys Gly Ser
245 250 255

Ala Lys Thr His Asp Lys Leu Val Arg Glu Leu Ala Val Arg Thr His
260 265 270

Ser Val Gly Thr Thr Gly Thr Ala Thr Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala
275 280 285

```
Ala Thr Ala Cys Ala Cys Gly Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Cys
    290                 295                 300

Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala Ala Gly Thr Ala Thr Cys Cys Ala Ala
305                 310                 315                 320

Cys Gly Gly Cys Cys Ala Thr Thr Gly Ala Gly Cys Ala Ala Val Val
                325                 330                 335

Phe Pro Glu Tyr Thr Leu Ser Pro Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Ala Ile
            340                 345                 350

Glu Gln Ala Ala Thr Thr Ala Thr Gly Cys Gly Gly Thr Thr Thr Thr
        355                 360                 365

Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala
    370                 375                 380

Ala Thr Thr Gly Cys Thr Ala Ala Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Ala
385                 390                 395                 400

Ala Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Gly Thr Cys Gly Ala Thr Asn Tyr
                405                 410                 415

Ala Val Leu Gln Gln Leu Pro Glu Ile Ala Lys Asp Glu Asn Phe Asp
            420                 425                 430

Val Asp Cys Gly Gly Thr Thr Ala Ala Cys Gly Gly Thr Cys Gly Cys
        435                 440                 445

Cys Gly Gly Thr Gly Ala Cys Thr Cys Thr Gly Thr Thr Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Gly Gly Ala Ala Cys Ala Thr Gly Gly Cys Cys Ala Cys Gly Gly
465                 470                 475                 480

Thr Thr Ala Thr Gly Ala Cys Gly Thr Thr Gly Ala Thr Gly Arg Leu
                485                 490                 495

Thr Val Ala Gly Asp Ser Val Gly Gly Asn Met Ala Thr Val Met Thr
            500                 505                 510

Leu Met Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Ala Ala Cys Gly Cys Cys Ala
        515                 520                 525
```

Ala Gly Gly Cys Ala Thr Thr Ala Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Thr
530 535 540

Cys Ala Ala Cys Ala Ala Thr Thr Gly Thr Thr Ala Thr Ala Cys Thr
545 550 555 560

Ala Cys Cys Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys Gly Gly Ala Thr Thr Lys
565 570 575

Gln Arg Gln Gly Ile Lys Ile Asn Gln Gln Leu Leu Tyr Tyr Pro Val
580 585 590

Thr Asp Gly Cys Cys Ala Ala Cys Thr Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys
595 600 605

Gly Cys Cys Ala Thr Cys Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Ala
610 615 620

Thr Thr Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Ala Ala Cys Thr Ala Cys Thr
625 630 635 640

Ala Cys Thr Thr Ala Ala Cys Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala Asn
645 650 655

Phe Asp Thr Pro Ser Tyr Asn Gln Phe Ala Asp Asn Tyr Tyr Leu Thr
660 665 670

Lys Glu Gly Gly Gly Ala Thr Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Thr Thr
675 680 685

Cys Thr Gly Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Thr Ala Thr Ala Cys Ala
690 695 700

Ala Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Gly Cys Ala Ala Cys
705 710 715 720

Gly Gly Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Cys Gly Gly Met
725 730 735

Gln Trp Phe Trp Asp Gln Tyr Thr Thr Asp Pro Lys Gln Arg Ala Glu
740 745 750

Ile Thr Gly Cys Thr Thr Cys Ala Cys Cys Thr Thr Thr Gly Cys Gly

```
        755                 760                 765

Gly Gly Cys Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly
    770                 775                 780

Thr Thr Gly Ala Ala Ala Gly Ala Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Gly
785                 790                 795                 800

Cys Gly Gly Cys Thr Ala Thr Gly Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ser
                805                 810                 815

Pro Leu Arg Ala Ser Leu Asp Glu Leu Lys Asp Leu Pro Ala Ala Met
            820                 825                 830

Ile Leu Ala Ala Thr Gly Gly Cys Gly Ala Ala Gly Cys Ala Gly Ala
        835                 840                 845

Cys Gly Thr Gly Thr Thr Gly Cys Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala Ala
    850                 855                 860

Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Gly Thr Ala Cys Gly Cys Thr Ala
865                 870                 875                 880

Ala Cys Ala Ala Gly Cys Thr Ala Cys Gly Thr Gly Ala Ala Asn Gly
                885                 890                 895

Glu Ala Asp Val Leu Arg Asp Glu Gly Glu Ala Tyr Ala Asn Lys Leu
            900                 905                 910

Arg Glu Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Thr Cys Gly Cys Thr Gly Thr
        915                 920                 925

Cys Ala Cys Ala Cys Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Thr Thr Cys
    930                 935                 940

Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Cys Ala Thr Gly
945                 950                 955                 960

Ala Cys Thr Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala Gly
                965                 970                 975

Val Ala Val Thr Gln Val Gln Phe Gln Gly Met Ile His Asp Phe Val
            980                 985                 990
```

```
Met Val Ala Ala Cys Thr Cys Ala Thr Thr Gly Gly Ala Thr Gly Ala
        995                1000                1005

Cys Ala Cys Gly Cys Ala Cys Gly Cys Cys Ala Cys Thr Cys Gly Thr
   1010                1015                1020

Gly Cys Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr Thr Ala Thr
1025                1030                1035                1040

Cys Ala Ala Cys Thr Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Thr Asn Ser
               1045                1050                1055

Leu Asp Asp Thr His Ala Thr Arg Ala Ala Met Asp Leu Ser Thr Ser
           1060                1065                1070

Trp Val Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Gly Thr Ala Ala Cys Ala Ala
       1075                1080                1085

Thr Cys Ala Ala Thr Ala Ala Cys Ala Thr Cys Thr Thr Cys Gly Ala
   1090                1095                1100

Thr Ala Ala Gly Thr Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Thr Ala Ala Gly
1105                1110                1115                1120

Thr Gly Gly Cys Gly Ala Gly Ala Thr Ala Ala Thr Thr Thr Leu Gln
               1125                1130                1135

Arg Asn Asn Gln *** Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr
           1140                1145                1150

Cys Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Gly
       1155                1160                1165

Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Cys Cys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala
   1170                1175                1180

Ala Cys Ala Cys Gly Gly Ala Gly Thr Cys Thr Gly Thr Thr Ala Thr
1185                1190                1195                1200

Gly Cys Thr Ala Gly Ala Gly Ala Thr Ala Ala Thr Thr Ala Gly Gly
               1205                1210                1215

Ala Gly Gly Gly Thr Gly Ala Thr Ala Ala Cys Gly Thr Gly Ala Cys
           1220                1225                1230
```

Thr Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Cys Thr Cys
1235 1240 1245

Ala Ala Thr Gly Thr Gly Thr Thr Ala Cys Gly Cys Gly Cys Ala Gly
1250 1255 1260

Cys Gly Gly Thr Gly Gly Thr Ala Gly Cys Cys Gly Ala Thr Gly Cys
1265 1270 1275 1280

Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Gly Gly Thr Gly
1285 1290 1295

Gly Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Gly Gly Cys Gly Cys Gly Cys Gly
1300 1305 1310

Gly Gly Ala Cys Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Cys Thr Ala Ala Cys
1315 1320 1325

Cys Gly Gly Cys Ala Thr Gly Ala Cys Gly Gly Gly Cys Cys Ala Thr
1330 1335 1340

Gly Gly Thr Thr Cys Ala Thr Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Cys
1345 1350 1355 1360

Cys Gly Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Thr Gly Gly Thr Cys
1365 1370 1375

Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Cys Gly Thr Cys Gly Ala Thr Gly
1380 1385 1390

Ala Cys Gly Cys Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Thr Thr Thr Gly Gly
1395 1400 1405

Cys Ala Ala Ala Cys Ala Thr Cys Ala Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala
1410 1415 1420

Gly Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Ala Cys Gly Cys Cys Gly Ala Cys
1425 1430 1435 1440

Cys

<210> 3
<211> 1777
<212> PRT
<213> ophC gene obtained from Lactobacillus plantarum WCP931

<400> 3

```
Cys Thr Gly Gly Gly Thr Thr Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Thr Gly
  1               5                  10                  15

Thr Gly Cys Thr Cys Cys Ala Ala Thr Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala
             20                  25                  30

Cys Cys Cys Cys Gly Cys Gly Cys Cys Cys Cys Thr Thr Ala Ala Cys
         35                  40                  45

Gly Cys Thr Gly Thr Ala Ala Ala Cys Thr Ala Gly Gly Cys Cys Gly
     50                  55                  60

Thr Cys Thr Thr Thr Gly Gly Cys Thr Ala Gly Thr Thr Gly Thr Gly
 65                  70                  75                  80

Cys Gly Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr Thr Ala Cys Gly Ala Ala Cys
                 85                  90                  95

Ala Gly Cys Ala Thr Ala Gly Cys Gly Ala Cys Thr Gly Cys Thr Ala
            100                 105                 110

Thr Cys Ala Ala Ala Thr Thr Cys Thr Gly Thr Ala Ala Thr Thr Ala
        115                 120                 125

Ala Thr Thr Cys Gly Thr Cys Thr Thr Cys Ala Ala Thr Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Thr Cys Gly Cys Ala Thr Cys Thr Thr Ala Ala Cys Gly
145                 150                 155                 160

Cys Thr Gly Thr Ala Gly Thr Gly Thr Cys Cys Cys Gly Thr Gly Ala
                165                 170                 175

Gly Ala Ala Thr Gly Cys Gly Gly Thr Cys Cys Thr Thr Thr Ala Ala
            180                 185                 190

Ala Ala Cys Gly Thr Gly Ala Thr Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys Gly
        195                 200                 205
```

Cys Thr Gly Ala Ala Thr Gly Thr Thr Thr Gly Thr Thr Thr Cys Cys
210 215 220

Cys Cys Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Cys Cys Cys Cys Cys
225 230 235 240

Gly Cys Thr Cys Ala Thr Cys Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Thr Ala
245 250 255

Ala Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Thr Ala Gly Cys Ala Ala Ala
260 265 270

Thr Ala Ala Thr Ala Gly Thr Cys Ala Thr Thr Ala Gly Cys Gly Ala
275 280 285

Gly Thr Ala Ala Ala Cys Ala Ala Gly Cys Gly Ala Ala Thr Ala Ala
290 295 300

Ala Thr Ala Thr Cys Gly Ala Thr Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Cys
305 310 315 320

Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Gly Ala Cys Ala Ala
325 330 335

Gly Cys Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Thr Gly Ala Cys Cys Thr Ala
340 345 350

Cys Thr Ala Thr Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Gly Cys Gly Ala Ala
355 360 365

Ala Thr Cys Ala Ala Gly Thr Cys Gly Gly Thr Ala Ala Thr Ala Cys
370 375 380

Gly Gly Gly Ala Gly Thr Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala
385 390 395 400

Ala Cys Ala Thr Ala Thr Gly Cys Ala Ala Gly Thr Thr Gly Ala Ala
405 410 415

Cys Ala Gly Cys Met Gln Val Glu Gln Gly Cys Ala Cys Ala Thr Thr
420 425 430

Ala Ala Ala Thr Ala Cys Thr Gly Cys Gly Gly Cys Ala Cys Ala Cys

435 440 445

Cys Cys Ala Thr Thr Thr Cys Ala Gly Ala Thr Cys Ala Cys Gly Gly
450 455 460

Cys Gly Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Thr Ala Gly Ala Cys Cys Ala
465 470 475 480

Ala Ala Thr Thr Ala Arg Thr Leu Asn Thr Ala Ala His Pro Phe Gln
485 490 495

Ile Thr Ala Tyr Trp Leu Asp Gln Ile Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr
500 505 510

Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Ala Thr
515 520 525

Thr Ala Thr Cys Cys Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Ala Thr Thr Ala
530 535 540

Thr Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly
545 550 555 560

Cys Thr Thr Thr Ala Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Asp Tyr Pro Ile
565 570 575

Met Ile Ile Cys Pro Gly Gly Gly Phe Cys Thr Thr Ala Thr Cys Ala
580 585 590

Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Ala
595 600 605

Gly Cys Gly Cys Cys Ala Ala Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Cys Cys
610 615 620

Gly Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly Gly
625 630 635 640

Ala Ala Thr Gly Cys Thr Tyr His Ser Gly Arg Glu Glu Ala Pro Ile
645 650 655

Ala Thr Arg Met Met Ala Ala Gly Met Ala Thr Ala Cys Gly Gly Thr
660 665 670

Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Ala Ala Thr Thr Ala Cys Cys Ala Ala
675 680 685

Thr Thr Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Thr Cys
690 695 700

Ala Gly Thr Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr Cys Cys Thr Thr Gly
705 710 715 720

Gly Gly Cys Gly Thr His Thr Val Val Leu Asn Tyr Gln Leu Ile Val
725 730 735

Gly Asp Gln Ser Val Tyr Pro Trp Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala
740 745 750

Ala Thr Thr Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala Thr Thr
755 760 765

Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Thr Thr Ala Cys Gly Ala Cys Cys Cys
770 775 780

Ala Gly Gly Cys Gly Thr Cys Cys Gly Cys Gly Cys Ala Cys Cys Ala
785 790 795 800

Thr Gly Thr Thr Gly Leu Gln Gln Leu Gly Ala Thr Ile Asp Trp Ile
805 810 815

Thr Thr Gln Ala Ser Ala His His Val Ala Thr Thr Gly Thr Cys Ala
820 825 830

Gly Cys Gly Gly Ala Thr Thr Ala Thr Thr Cys Thr Thr Gly Cys Cys
835 840 845

Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Cys Gly Gly Cys Thr Gly Gly Cys Gly
850 855 860

Gly Cys Cys Ala Cys Gly Thr Gly Gly Thr Thr Gly Cys Gly Ala Cys
865 870 875 880

Thr Thr Ala Thr Ala Asp Cys Gln Arg Ile Ile Leu Ala Gly Phe Ser
885 890 895

Ala Gly Gly His Val Val Ala Thr Tyr Ala Thr Gly Gly Thr Gly Thr
900 905 910

Thr Gly Cys Gly Ala Cys Cys Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Ala
915 920 925

Thr Thr Gly Cys Gly Cys Ala Cys Ala Cys Gly Gly Thr Ala Thr Cys
930 935 940

Ala Thr Thr Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Thr Thr Ala Thr Cys Ala
945 950 955 960

Ala Gly Gly Cys Cys Asn Gly Val Ala Thr Gln Pro Glu Leu Arg Thr
965 970 975

Arg Tyr His Leu Asp His Tyr Gln Gly Ala Gly Cys Ala Thr Gly Cys
980 985 990

Thr Gly Cys Cys Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Gly Gly Cys
995 1000 1005

Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala Thr Thr Gly Ala Thr Thr
1010 1015 1020

Thr Gly Ala Cys Ala Gly Cys Gly Gly Gly Gly Thr Thr Thr Cys Cys
1025 1030 1035 1040

Cys Ala Cys Gly Ala Gln His Ala Ala Ile Ile Leu Gly Tyr Pro Val
1045 1050 1055

Ile Asp Leu Thr Ala Gly Phe Pro Thr Cys Thr Thr Cys Gly Gly Cys
1060 1065 1070

Gly Gly Cys Gly Cys Gly Thr Ala Ala Thr Cys Ala Gly Ala Thr Thr
1075 1080 1085

Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Ala Thr Gly Cys Cys Cys Gly Gly Thr
1090 1095 1100

Thr Gly Thr Gly Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly
1105 1110 1115 1120

Cys Cys Thr Ala Gly Thr Ser Ala Ala Arg Asn Gln Ile Thr Thr Asp
1125 1130 1135

Ala Arg Leu Trp Ala Ala Gln Arg Leu Thr Cys Ala Cys Ala Cys Cys

1140 1145 1150

Ala Gly Cys Thr Ala Gly Thr Ala Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Thr
1155 1160 1165

Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Gly Gly
1170 1175 1180

Cys Gly Ala Cys Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Thr Cys Gly Gly Thr
1185 1190 1195 1200

Cys Cys Cys Gly Cys Val Thr Pro Ala Ser Lys Pro Ala Phe Val Trp
1205 1210 1215

Gln Thr Ala Thr Asp Glu Ser Val Pro Cys Ala Ala Thr Cys Ala Ala
1220 1225 1230

Thr Thr Cys Gly Thr Thr Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly Thr Gly
1235 1240 1245

Cys Ala Gly Gly Cys Cys Ala Thr Gly Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys
1250 1255 1260

Ala Thr Cys Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Cys
1265 1270 1275 1280

Gly Thr Ala Thr Cys Pro Ile Asn Ser Leu Lys Tyr Val Gln Ala Met
1285 1290 1295

Leu Gln His Gln Val Ala Thr Ala Tyr Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr
1300 1305 1310

Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gly Gly Gly Ala Thr Thr Cys Ala Thr
1315 1320 1325

Gly Gly Gly Thr Thr Ala Gly Cys Gly Thr Thr Ala Gly Cys Cys Ala
1330 1335 1340

Ala Thr Cys Ala Thr Gly Thr Gly Ala Cys Gly Cys Ala Ala Ala Ala
1345 1350 1355 1360

Ala Cys Cys Thr Gly His Leu Phe Gly Ser Gly Ile His Gly Leu Ala
1365 1370 1375

Leu Ala Asn His Val Thr Gln Lys Pro Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala
1380 1385 1390

Cys Ala Ala Gly Thr Ala Thr Thr Thr Gly Ala Ala Thr Gly Ala Cys
1395 1400 1405

Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Ala Thr Ala Thr Gly Gly Cys
1410 1415 1420

Cys Ala Cys Ala Ala Thr Thr Ala Gly Cys Ala Thr Thr Gly Cys Gly
1425 1430 1435 1440

Gly Thr Gly Gly Thr Gly Lys Asp Lys Tyr Leu Asn Asp Gln Ala Ala
1445 1450 1455

Ile Trp Pro Gln Leu Ala Leu Arg Trp Thr Ala Cys Ala Ala Gly Ala
1460 1465 1470

Ala Cys Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr Gly Thr Thr Ala Gly Cys Thr
1475 1480 1485

Gly Gly Thr Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr
1490 1495 1500

Ala Ala Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Cys Ala Gly
1505 1510 1515 1520

Thr Cys Gly Thr Gly Leu Gln Glu Gln Gly Leu Leu Ala Gly Asn Tyr
1525 1530 1535

*** Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Gly Ala Thr Cys Gly Cys Cys Cys
1540 1545 1550

Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Cys Gly Ala Thr
1555 1560 1565

Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Cys Cys Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr
1570 1575 1580

Thr Thr Thr Cys Thr Gly Cys Gly Gly Thr Ala Thr Ala Ala Thr Ala
1585 1590 1595 1600

Ala Thr Ala Cys Gly Ala Ala Thr Ala Ala Gly Cys Thr Thr Ala Thr
1605 1610 1615

Thr Ala Ala Gly Thr Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Cys Gly
1620 1625 1630

Ala Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala
1635 1640 1645

Ala Thr Cys Ala Ala Cys Ala Cys Thr Thr Gly Gly Thr Cys Ala Thr
1650 1655 1660

Thr Ala Thr Thr Thr Cys Cys Thr Thr Ala Gly Ala Thr Gly Cys Gly
1665 1670 1675 1680

Thr Thr Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr Cys Gly Thr Gly Ala Thr Thr
1685 1690 1695

Thr Ala Cys Gly Cys Gly Ala Ala Cys Ala Thr Cys Ala Ala Gly Cys
1700 1705 1710

Ala Gly Ala Ala Thr Thr Ala Cys Cys Cys Gly Thr Thr Cys Thr Gly
1715 1720 1725

Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Gly
1730 1735 1740

Gly Thr Gly Gly Thr Ala Cys Thr Thr Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala
1745 1750 1755 1760

Gly Thr Cys Gly Gly Thr Gly Ala Cys Ala Gly Gly Cys Ala Thr Thr
1765 1770 1775

Thr

<210> 4
<211> 1775
<212> PRT
<213> ophD gene obtained from Lactobacillus sakei WCP904

<400> 4
Gly Ala Cys Gly Gly Cys Ala Thr Ala Gly Cys Gly Cys Gly Cys Ala
1 5 10 15

```
Thr Cys Cys Ala Thr Thr Thr Gly Ala Ala Thr Thr Thr Gly Gly Thr
            20                  25                  30

Gly Ala Ala Ala Ala Cys Cys Gly Gly Thr Ala Thr Thr Ala Thr Gly
        35                  40                  45

Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Thr Ala Ala Gly
    50                  55                  60

Cys Thr Ala Thr Gly Thr Thr Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr
65                  70                  75                  80

Gly Cys Gly Cys Ala Ala Thr Cys Ala Ala Gly Cys Cys Ala Thr Ala
                85                  90                  95

Ala Ala Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Ala Thr Ala Ala Cys Cys Thr
            100                 105                 110

Gly Ala Thr Ala Thr Cys Ala Thr Thr Gly Cys Ala Thr Thr Thr Thr
        115                 120                 125

Thr Cys Cys Thr Cys Thr Ala Gly Cys Ala Ala Cys Thr Ala Thr Cys
    130                 135                 140

Ala Thr Ala Cys Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ala Ala Thr Cys Gly
145                 150                 155                 160

Gly Cys Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Gly Thr Cys Gly Thr Thr
                165                 170                 175

Thr Thr Thr Ala Ala Ala Ala Gly Cys Ala Cys Thr Cys Gly Thr Ala
            180                 185                 190

Thr Thr Gly Thr Thr Cys Ala Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala
        195                 200                 205

Ala Thr Ala Thr Ala Thr Thr Thr Cys Cys Cys Cys Gly Ala Thr Thr
    210                 215                 220

Gly Thr Ala Thr Thr Gly Ala Cys Ala Gly Gly Thr Gly Thr Thr Ala
225                 230                 235                 240

Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Ala
                245                 250                 255
```

Thr Ala Ala Ala Ala Gly Cys Ala Thr Cys Ala Ala Cys Thr Gly Ala
260 265 270

Ala Ala Gly Cys Gly Cys Thr Thr Cys Gly Cys Thr Thr Ala Thr Thr
275 280 285

Cys Ala Gly Ala Cys Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Thr Gly Thr
290 295 300

Cys Thr Ala Thr Cys Thr Ala Thr Gly Cys Ala Ala Ala Thr Thr Ala
305 310 315 320

Thr Gly Ala Ala Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys
325 330 335

Ala Ala Cys Gly Ala Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys
340 345 350

Thr Thr Thr Cys Ala Ala Gly Thr Met Gln Ile Met Asn Gln Thr Leu
355 360 365

Thr Thr Asn His Gln Asp Phe Gln Val Thr Ala Cys Ala Gly Cys Cys
370 375 380

Thr Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Ala Gly Ala Thr Thr Cys Cys Ala
385 390 395 400

Ala Thr Cys Ala Ala Gly Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ala Cys Ala Ala
405 410 415

Cys Ala Cys Thr Cys Gly Cys Cys Ala Thr Cys Ala Ala Cys Cys Gly
420 425 430

Gly Thr Cys Gly Thr Thr Ala Tyr Trp Leu Asp Ser Asn Gln Asp Phe
435 440 445

Asn Asn Thr Arg His Gln Pro Val Val Gly Ala Thr Thr Ala Thr Cys
450 455 460

Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr
465 470 475 480

Thr Cys Cys Gly Cys Thr Ala Cys Cys Ala Thr Thr Cys Ala Cys Ala

485 490 495

Gly Cys Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala
500 505 510

Ala Thr Thr Gly Cys Ile Ile Cys Pro Gly Gly Gly Phe Arg Tyr His
515 520 525

Ser Gln Arg Glu Thr Glu Pro Ile Ala Cys Thr Thr Ala Ala Ala Gly
530 535 540

Gly Cys Ala Thr Thr Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Gly Cys Thr
545 550 555 560

Gly Thr Cys Ala Cys Gly Cys Ala Gly Thr Thr Gly Thr Cys Thr Thr
565 570 575

Ala Cys Cys Thr Thr Ala Thr Cys Ala Ala Cys Thr Cys Ala Thr Cys
580 585 590

Gly Ala Ala Cys Cys Leu Lys Ala Leu Ala Glu Gly Cys His Ala Val
595 600 605

Val Leu Pro Tyr Gln Leu Ile Glu Pro Ala Gly Ala Cys Cys Ala Ala
610 615 620

Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Ala Thr Cys Cys Thr Ala Cys Ala Gly
625 630 635 640

Cys Gly Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr Cys Gly Cys
645 650 655

Thr Ala Ala Ala Ala Cys Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Thr Gly Gly
660 665 670

Ala Thr Thr Ala Cys Asp Gln Met Val Tyr Pro Thr Ala Leu Gln Gln
675 680 685

Leu Ala Lys Thr Ile Glu Trp Ile Thr Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala
690 695 700

Thr Cys Ala Gly Ala Thr Ala Cys Thr Cys Ala Ala Ala Ala Ala Gly
705 710 715 720

```
Thr Thr Gly Ala Thr Cys Cys Cys Gly Ala Ala Cys Gly Ala Ala Thr
                725                 730                 735

Cys Gly Thr Ala Cys Thr Cys Gly Thr Thr Gly Gly Thr Thr Thr Cys
            740                 745                 750

Thr Cys Ala Gly Cys Asp Gln Ser Asp Thr Gln Lys Val Asp Pro Glu
        755                 760                 765

Arg Ile Val Leu Val Gly Phe Ser Ala Thr Gly Gly Thr Gly Gly Gly
    770                 775                 780

Cys Ala Thr Cys Thr Ala Gly Thr Gly Gly Cys Thr Ala Cys Thr Thr
785                 790                 795                 800

Thr Thr Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala Thr Cys Gly Cys Thr Ala Cys
                805                 810                 815

Thr Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Ala Ala Cys
            820                 825                 830

Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly His Leu Val Ala Thr Phe Asn Gly Ile
        835                 840                 845

Ala Thr Asn Pro Glu Leu Asn Thr Gln Ala Thr Ala Thr Cys Ala Ala
    850                 855                 860

Cys Thr Cys Gly Ala Cys Ala Gly Thr Thr Ala Thr Cys Gly Thr Gly
865                 870                 875                 880

Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Cys Cys Gly Cys Ala Gly Thr
                885                 890                 895

Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ala Gly Cys Thr Ala Thr Cys Cys Thr
            900                 905                 910

Gly Thr Cys Ala Thr Tyr Gln Leu Asp Ser Tyr Arg Gly His His Ala
        915                 920                 925

Ala Val Ile Leu Ser Tyr Pro Val Ile Thr Gly Ala Thr Thr Thr Ala
    930                 935                 940

Gly Ala Cys Gly Cys Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Cys Cys Thr Ala
945                 950                 955                 960
```

Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala
965 970 975

Ala Gly Ala Gly Cys Gly Gly Ala Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys
980 985 990

Gly Ala Thr Cys Ala Asp Leu Asp Ala Gly Phe Pro Lys Glu Glu Ser
995 1000 1005

Glu Lys Glu Arg Ile Thr Thr Asp Gln Ala Cys Gly Thr Cys Thr Cys
1010 1015 1020

Thr Gly Gly Cys Ala Cys Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala
1025 1030 1035 1040

Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys Ala Ala Ala Ala Thr Gly Gly Gly Cys
1045 1050 1055

Cys Ala Ala Ala Cys Cys Gly Thr Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Ala
1060 1065 1070

Thr Gly Gly Cys Ala Arg Leu Trp His Ala Gln Asp Thr Leu Thr Lys
1075 1080 1085

Trp Ala Lys Pro Cys Phe Val Trp Gln Ala Ala Cys Gly Gly Cys Ala
1090 1095 1100

Ala Cys Thr Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Cys Gly Thr Ala Cys
1105 1110 1115 1120

Cys Ala Gly Cys Cys Ala Thr Cys Ala Ala Thr Thr Cys Ala Thr Thr
1125 1130 1135

Ala Cys Thr Gly Thr Ala Cys Gly Thr Cys Ala Cys Thr Gly Ala Ala
1140 1145 1150

Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Asp Glu Leu Val Pro Ala Ile Asn
1155 1160 1165

Ser Leu Leu Tyr Val Thr Glu Leu Asn Thr Cys Gly Gly Cys Thr Ala
1170 1175 1180

Ala Ala Cys Ala Thr Cys Ala Cys Ala Ala Cys Thr Gly Ala Gly Thr

```
1185                1190                1195                1200

Ala Thr Cys Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Ala
                1205                1210                1215

Thr Gly Gly Thr Gly Thr Thr Cys Ala Cys Gly Gly Thr Thr Thr Gly
            1220                1225                1230

Gly Cys Ala Thr Thr Arg Leu Asn Ile Thr Thr Glu Tyr His Leu Phe
        1235                1240                1245

Ser Asp Gly Val His Gly Leu Ala Leu Gly Gly Cys Cys Ala Ala Thr
    1250                1255                1260

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Ala Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Thr Cys
1265                1270                1275                1280

Cys Cys Gly Gly Thr Ala Ala Ala Cys Cys Ala Cys Ala Ala Gly Ala
                1285                1290                1295

Cys Gly Thr Thr Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Cys Gly Gly Thr Thr
            1300                1305                1310

Gly Cys Cys Cys Ala Ala Asn Lys Val Thr Gln Arg Pro Gly Lys Pro
        1315                1320                1325

Gln Asp Val Asn Glu Pro Val Ala Gln Gly Thr Gly Gly Cys Thr Cys
    1330                1335                1340

Cys Cys Gly Cys Thr Thr Gly Cys Gly Cys Thr Ala Ala Cys Thr Thr
1345                1350                1355                1360

Gly Gly Cys Thr Cys Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Thr Cys Gly Ala
                1365                1370                1375

Thr Ala Thr Thr Gly Cys Thr Cys Ala Thr Cys Ala Thr Thr Ala Ala
            1380                1385                1390

Ala Ala Gly Thr Thr Trp Leu Pro Leu Ala Leu Thr Trp Leu Ala Glu
        1395                1400                1405

Ile Asp Ile Ala His His *** Thr Ala Ala Ala Cys Gly Ala Thr Cys
    1410                1415                1420
```

Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Gly
1425 1430 1435 1440

Ala Thr Ala Ala Ala Ala Thr Cys Cys Cys Gly Gly Cys Thr Cys Thr
1445 1450 1455

Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala
1460 1465 1470

Thr Thr Ala Ala Ala Cys Thr Thr Thr Ala Cys Thr Ala Ala Thr Cys
1475 1480 1485

Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr Ala Ala Gly Cys
1490 1495 1500

Cys Cys Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Cys Cys Thr Cys Thr Ala Ala
1505 1510 1515 1520

Ala Ala Thr Ala Gly Thr Gly Ala Cys Thr Ala Ala Thr Gly Thr Thr
1525 1530 1535

Ala Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Gly Cys Gly Ala Gly Gly Thr Cys
1540 1545 1550

Gly Ala Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Ala
1555 1560 1565

Ala Thr Cys Ala Thr Cys Ala Gly Thr Thr Thr Cys Ala Thr Thr Thr
1570 1575 1580

Thr Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Ala Gly Thr Cys Thr Cys Ala Thr
1585 1590 1595 1600

Cys Thr Gly Thr Cys Thr Ala Gly Cys Gly Cys Cys Ala Ala Cys Thr
1605 1610 1615

Gly Cys Thr Ala Cys Cys Thr Ala Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Gly
1620 1625 1630

Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Thr Cys Ala Gly Gly
1635 1640 1645

Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr Cys Ala
1650 1655 1660

```
Ala Cys Cys Thr Cys Thr Ala Gly Thr Gly Gly Thr Thr Cys Gly Thr
1665                1670                1675                1680

Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala Ala Gly
                1685                1690                1695

Thr Ala Cys Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys Gly Ala Cys Ala Gly Ala
            1700                1705                1710

Ala Cys Ala Ala Cys Gly Ala Ala Cys Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr
        1715                1720                1725

Ala Cys Gly Gly Thr Cys Gly Cys Cys Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ala
    1730                1735                1740

Cys Thr Ala Cys Gly Gly Gly Cys Cys Cys Cys Gly Thr Ala Gly Thr
1745                1750                1755                1760

Thr Thr Thr Cys Thr Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Cys
                1765                1770                1775
```

<210> 5
<211> 1798
<212> PRT
<213> ophE gene obtained from Leuconostoc mesenteroides WCP907

<400> 5

```
Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Gly
  1               5                  10                  15

Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly Thr Ala Gly Gly Gly Thr Thr Gly
             20                  25                  30

Ala Thr Ala Cys Thr Gly Cys Cys Gly Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr
         35                  40                  45

Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Gly Ala Gly Gly Gly Thr Gly Thr Gly
     50                  55                  60

Gly Ala Thr Gly Thr Thr Gly Gly Gly Ala Thr Ala Gly Gly Cys Thr
 65                  70                  75                  80
```

```
Thr Thr Thr Ala Cys Thr Thr Cys Cys Thr Gly Ala Thr Thr Gly Thr
                 85                  90                  95

Ala Cys Ala Cys Gly Gly Thr Gly Thr Thr Cys Thr Thr Cys Thr Ala
            100                 105                 110

Thr Thr Thr Cys Ala Ala Thr Ala Cys Cys Ala Ala Ala Ala Cys Gly
        115                 120                 125

Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Ala Thr Ala Gly Thr Ala Thr Thr
    130                 135                 140

Thr Cys Ala Cys Gly Thr Ala Gly Cys Thr Thr Gly Thr Thr Ala Thr
145                 150                 155                 160

Cys Thr Gly Thr Ala Ala Gly Thr Thr Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala
                165                 170                 175

Ala Thr Thr Thr Thr Gly Ala Ala Gly Cys Ala Thr Ala Cys Ala Ala
            180                 185                 190

Cys Gly Thr Thr Cys Thr Cys Cys Ala Ala Thr Thr Gly Thr Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Thr Thr Ala
    210                 215                 220

Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly
225                 230                 235                 240

Thr Ala Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ala Ala Ala Thr Thr Thr Gly Thr
                245                 250                 255

Ala Thr Cys Ala Gly Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr Ala
            260                 265                 270

Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gly Ala Cys Gly
        275                 280                 285

Gly Ala Thr Ala Cys Gly Thr Thr Ala Ala Thr Thr Gly Thr Thr Thr
    290                 295                 300

Thr Ala Thr Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Gly Thr Ala Thr Gly Thr
305                 310                 315                 320
```

Thr Ala Thr Thr Cys Ala Ala Ala Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ala Cys
325 330 335

Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly Thr Thr Cys Cys Ala
340 345 350

Gly Cys Ala Ala Ala Thr Ala Thr Met Leu Phe Lys Asp Lys Thr Tyr
355 360 365

Lys Tyr Val Pro Ala Asn Met Gly Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala
370 375 380

Thr Gly Cys Thr Ala Gly Gly Gly Thr Gly Thr Thr Thr Cys Ala Thr
385 390 395 400

Ala Ala Thr Cys Thr Thr Ala Gly Cys Thr Ala Thr Thr Cys Gly Gly
405 410 415

Thr Thr Gly Gly Ala Gly Ala Thr Cys Gly Thr Ala Ala Thr Cys Ala
420 425 430

Gly Cys Thr Pro Lys Asn Ala Arg Val Phe His Asn Leu Ser Tyr Ser
435 440 445

Val Gly Asp Arg Asn Gln Leu Thr Gly Ala Cys Cys Thr Thr Thr Ala
450 455 460

Thr Thr Thr Ala Cys Cys Thr Ala Ala Ala Gly Cys Gly Gly Gly Gly
465 470 475 480

Gly Ala Gly Ala Ala Thr Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Thr Thr Ala
485 490 495

Thr Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Ala Thr Ala Thr Ala Thr Gly Gly
500 505 510

Thr Gly Gly Asp Leu Tyr Leu Pro Lys Ala Gly Glu Asn Cys Pro Val
515 520 525

Ile Val Asp Ile Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Thr Ala Thr Gly Cys Thr
530 535 540

Thr Cys Gly Ala Gly Gly Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Thr Cys Cys

```
545                 550                 555                 560

Thr Cys Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Cys Thr Thr Ala Ala Thr Cys
                565                 570                 575

Cys Cys Ala Gly Thr Thr Thr Ala Cys Gly Gly Thr Thr Cys Thr Thr
            580                 585                 590

Gly Ala Ala Gly Met Leu Arg Gly Gln Lys Ser Ser Tyr Lys Leu Asn
        595                 600                 605

Pro Ser Leu Arg Phe Leu Asn Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr
    610                 615                 620

Thr Gly Cys Ala Gly Thr Ala Gly Thr Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala
625                 630                 635                 640

Gly Ala Thr Thr Ala Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Ala Ala Thr Cys
                645                 650                 655

Ala Gly Cys Thr Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys
            660                 665                 670

Thr Thr Thr Asp Gly Phe Ala Val Val Ser Pro Asp Tyr Ser Leu Asn
        675                 680                 685

Gln Leu Gly Glu Gln Thr Phe Cys Cys Cys Thr Gly Thr Cys Cys Ala
    690                 695                 700

Ala Ala Thr Cys Gly Cys Thr Gly Ala Gly Ala Thr Thr Cys Gly Thr
705                 710                 715                 720

Gly Cys Ala Gly Thr Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr
                725                 730                 735

Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Thr Cys Ala Ala Ala
            740                 745                 750

Gly Cys Ala Pro Val Gln Ile Ala Glu Ile Arg Ala Val Ile Asn Phe
        755                 760                 765

Leu Ile Lys Asn Ser Lys Gln Gly Thr Ala Thr Gly Gly Cys Cys Thr
    770                 775                 780
```

```
Thr Gly Ala Thr Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Cys Ala Thr Thr
785                 790                 795                 800

Ala Thr Ala Thr Thr Gly Ala Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ala Ala Thr
                805                 810                 815

Cys Thr Ala Gly Cys Gly Gly Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Thr Thr
            820                 825                 830

Ala Gly Cys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Asn Ile Ile Leu Ile Gly Glu
        835                 840                 845

Ser Ser Gly Ala Gln Leu Ala Thr Gly Thr Thr Thr Thr Ala Ala Cys
    850                 855                 860

Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala Thr Ala Thr Cys Thr
865                 870                 875                 880

Gly Ala Gly Cys Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Gly Thr Thr Gly Gly
                885                 890                 895

Gly Cys Ala Gly Ala Cys Thr Cys Ala Ala Ala Gly Ala Thr Gly Thr
            900                 905                 910

Ala Gly Cys Val Leu Thr Ala Ala Thr Ile Ser Glu His Leu Leu Leu
        915                 920                 925

Gly Arg Leu Lys Asp Val Ala Gly Gly Ala Ala Cys Ala Cys Ala Cys
    930                 935                 940

Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr
945                 950                 955                 960

Ala Gly Thr Thr Gly Cys Gly Thr Gly Ala Thr Thr Gly Gly Gly Ala
                965                 970                 975

Thr Gly Thr Ala Thr Gly Gly Gly Cys Cys Cys Thr Ala Cys Ala Ala
            980                 985                 990

Ala Gly Thr Glu His Thr Phe Phe Pro Lys Ile Ser Cys Val Ile Gly
        995                1000                1005

Met Tyr Gly Pro Tyr Lys Val Thr Gly Ala Cys Gly Ala Thr Thr Thr
   1010                1015                1020
```

Thr Thr Cys Thr Ala Ala Ala Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gly Cys Thr
1025 1030 1035 1040

Gly Cys Gly Cys Thr Cys Ala Ala Cys Ala Thr Ala Ala Ala Ala Cys
1045 1050 1055

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Ala Ala Ala Cys
1060 1065 1070

Thr Gly Gly Asp Asp Phe Ser Lys Gln Phe Ala Ala Leu Asn Ile Lys
1075 1080 1085

Pro Gln Phe Ser Glu Thr Gly Thr Gly Ala Gly Gly Cys Ala Cys Ala
1090 1095 1100

Gly Thr Cys Gly Thr Thr Thr Gly Ala Ala Gly Gly Ala Ala Thr Ala
1105 1110 1115 1120

Ala Thr Gly Thr Thr Ala Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala Ala Ala Cys
1125 1130 1135

Gly Gly Cys Cys Gly Gly Ala Cys Cys Ala Gly Ala Thr Gly Cys Cys
1140 1145 1150

Ala Ala Gly Glu Ala Gln Ser Phe Glu Gly Ile Met Leu Gly Thr Lys
1155 1160 1165

Arg Pro Asp Gln Met Pro Ser Cys Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Cys
1170 1175 1180

Ala Cys Ala Ala Gly Cys Gly Ala Ala Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala
1185 1190 1195 1200

Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Cys Ala Ala Ala Gly Ala
1205 1210 1215

Ala Thr Ala Thr Gly Cys Cys Gly Cys Cys Cys Thr Thr Gly Thr Thr
1220 1225 1230

Ala Thr Thr Lys Val Ala Gln Ala Asn Pro Ala Thr Tyr Phe Ser Lys
1235 1240 1245

Asn Met Pro Pro Leu Leu Leu Ala Thr Thr Thr Gly Cys Thr Gly Gly

1250 1255 1260

Ala Ala Cys Thr Ala Ala Gly Gly Ala Thr Gly Ala Cys Gly Thr Ala
1265 1270 1275 1280

Gly Thr Ala Cys Cys Thr Thr Ala Thr Thr Thr Ala Cys Ala Gly Ala
1285 1290 1295

Gly Thr Gly Thr Thr Thr Cys Ala Thr Thr Gly Gly Cys Thr Gly Ala
1300 1305 1310

Ala Ala Ala Phe Ala Gly Thr Lys Asp Asp Val Val Pro Tyr Leu Gln
1315 1320 1325

Ser Val Ser Leu Ala Glu Lys Gly Thr Ala Thr Thr Ala Thr Cys Ala
1330 1335 1340

Gly Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala Ala Gly Ala
1345 1350 1355 1360

Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Thr Gly Ala Thr Ala Cys Thr Ala Gly
1365 1370 1375

Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Cys Gly Thr Ala Thr Cys Ala
1380 1385 1390

Thr Gly Gly Tyr Tyr Gln Lys Val Gly Lys Arg Ala Glu Val Ile Leu
1395 1400 1405

Val Asp Asp Ala Tyr His Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Thr Gly Ala
1410 1415 1420

Thr Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Cys Gly Gly Ala Thr Gly Ala Thr
1425 1430 1435 1440

Ala Thr Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr
1445 1450 1455

Thr Gly Gly Cys Ala Thr Thr Thr Ala Thr Cys Ala Gly Ala Cys Ala
1460 1465 1470

Ala Ala Ala Pro Arg Asp Phe Asn Thr Asp Asp Ile His Ala Lys Lys
1475 1480 1485

```
Leu Ala Phe Ile Arg Gln Asn Thr Ala Cys Thr Ala Ala Cys Thr Ala
   1490                1495                1500

Ala Cys Ala Ala Thr Gly Cys Gly Thr Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala
1505                1510                1515                1520

Ala Ala Gly Cys Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Thr Ala Gly Ala Cys
               1525                1530                1535

Cys Cys Thr Gly Thr Gly Gly Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala
           1540                1545                1550

Ala Gly Thr Thr Asn *** Cys Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys
       1555                1560                1565

Thr Ala Thr Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Thr Ala Ala Thr Gly Thr
   1570                1575                1580

Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr
1585                1590                1595                1600

Cys Ala Thr Cys Gly Thr Ala Gly Thr Cys Ala Thr Cys Ala Gly Gly
               1605                1610                1615

Thr Gly Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly
           1620                1625                1630

Gly Ala Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr
       1635                1640                1645

Ala Ala Thr Gly Thr Gly Thr Cys Thr Gly Ala Cys Gly Thr Gly Gly
   1650                1655                1660

Thr Thr Cys Ala Thr Cys Ala Gly Gly Ala Ala Thr Cys Ala Ala Cys
1665                1670                1675                1680

Ala Cys Cys Cys Ala Ala Gly Cys Gly Ala Thr Ala Ala Thr Ala Thr
               1685                1690                1695

Ala Ala Ala Cys Thr Ala Ala Ala Ala Thr Thr Cys Cys Gly Gly Gly
           1700                1705                1710

Cys Ala Gly Ala Ala Cys Gly Gly Gly Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr
       1715                1720                1725
```

Cys Cys Thr Ala Ala Thr Ala Cys Cys Ala Cys Gly Ala Ala Ala Ala
1730 1735 1740

Thr Ala Ala Thr Thr Cys Gly Ala Ala Cys Thr Ala Ala Cys Gly Thr
1745 1750 1755 1760

Ala Gly Cys Ala Thr Cys Cys Cys Ala Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala
1765 1770 1775

Thr Ala Gly Thr Thr Ala Gly Cys Ala Ala Thr Thr Cys Cys Ala Cys
1780 1785 1790

Cys Ala Ala Gly Gly Ala
1795