(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0127043
(43) 공개일자 2022년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12P 7/64 (2022.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/0069 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0031571
(22) 출원일자 2021년03월10일
심사청구일자 2021년03월10일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박진병
서울특별시 영등포구 여의동로3길 10, 401동 902호 (여의도동, 여의도자이)
차희정
경상남도 김해시 삼계로 223, 301동 1201호(삼계동, 화정마을3단지부영아파트)
이정후
서울특별시 강서구 등촌로 163, 202동 1704호(등촌동, 등촌아이파크아파트)
(74) 대리인
김순웅

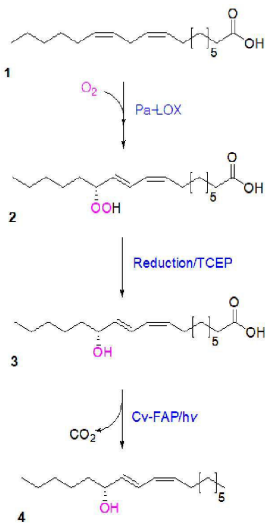
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **슈도모나스 유래 리폭시게나아제 기반 재조합 대장균 및 이를 이용한 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 슈도모나스 유래 리폭시게나아제를 발현하는 재조합 대장균; 및 슈도모나스 유래 리폭시게나아제 및 클로렐라 유래 탈탄산 효소를 공동발현하는 재조합 대장균;에 관한 것이다. 본 발명에 따른 슈도모나스 유래 리폭시게나아제 기반 재조합 대장균을 전세포 생촉매로 이용할 경우 불포화 지방산으로부터 히드록시 지방산을 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한 슈도모나스 유래 리폭시게나아제 및 클로렐라 유래 탈탄산 효소를 공동발현하는 재조합 대장균을 전세포 생촉매로 이용할 경우 불포화 지방산으로부터 이차 지방 알콜을 생산할 수 있음을 확인하였다. 이와 같이 본 발명에서 구축된 재조합 대장균은 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜 생산 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12P 7/6409 (2022.01)
C12Y 113/11 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711115448
과제번호	2020R1A2B5B03002376
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	지방산 유래 고부가 소재 생합성을 위한 산화효소 활성 향상 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제(lipoxygenase) 유전자를 포함하는, 재조합 대장균.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 리폭시게나아제 유전자는 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래인, 재조합 대장균.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 리폭시게나아제는 페리플라즘 또는 세포질에 분비되는 것인, 재조합 대장균.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 재조합 대장균은 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 생산용인, 재조합 대장균.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 재조합 대장균은 전세포 생물전환(whole-cell biotransformation)용인, 재조합 대장균.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 재조합 대장균과 불포화 지방산을 반응시켜 히드로퍼옥시 지방산(hydroperoxy fatty acid)을 제조하는 단계;를 포함하는 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 생산방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 방법은 히드로퍼옥시 지방산을 환원시키는 단계를 더 포함하는, 히드록시 지방산 생산방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 불포화 지방산은 리놀레산(linoleic acid), 알파-리놀렌산(α-linolenic acid), 감마-리놀렌산(γ-linolenic acid), 아라키돈산(arachidonic acid), 올레산(oleic acid) 및 팔미톨레산(palmitoleic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인, 히드록시 지방산 생산방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 히드록시 지방산은 13-히드록시옥타데카다이에노익산(13-Hydroxyoctadecadienoic acid), 13-히드록시옥타데카트리에노익산(13-Hydroxyoctadecatrienoic acid) 및 15-히드록시에이코사테트라에노익산(15-hydroxyeicosatetraenoic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인, 히드록시 지방산 생산방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 재조합 대장균을 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 조성물.

청구항 11

서열번호 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 대장균에 도입하는 단계;를 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 재조합 대장균의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 슈도모나스 유래 리폭시게나아제를 발현하는 재조합 대장균; 및 슈도모나스 유래 리폭시게나아제 및 클로렐라 유래 탈탄산 효소를 공동발현하는 재조합 대장균;에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 재생 가능한 오일(renewable oil)은 가장 중요한 생물 자원 중 하나이다. 재생 가능한 오일은 식물성 오일, 미세 조류 오일, 유지성 효모가 생산하는 오일 등이 있다. 재생 가능한 오일은 바이오 디젤뿐만 아니라 화학 산업용 올레오케미컬(oleochemical) 생산에도 널리 사용된다. 올레오케미컬은 지방산, 지방산 메틸 에스테르, 아민 및 알콜을 포함하며, 계면 활성제, 윤활제, 코팅제와 같은 다양한 화학제품의 제조에 활용된다.

[0003] 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid)은 일반 지방산의 중심사슬에 1개 이상의 하이드록실기를 갖고, 이차 지방 알콜은 일반 지방 사슬에 1개 이상의 하이드록실기를 갖고 있는 형태로, 자연계에서는 주로 식물체에서 극미량으로 발견된다. 히드록시 지방산 및 이차 지방 알콜은 지방 사슬에 붙어 있는 하이드록실기에 의해 높은 점성이나 반응성 등 특이한 성질을 보여준다. 히드록시 지방산 및 이차 지방 알콜은 히드록시기로 인해 특이한 성질을 갖고 이로 인해 이들은 다양한 생리활성기능 및 기능성을 가질 수 있으며, 이로 인해 신농약, 신의약, 고기능성 레진 및 섬유소재, 생분해성 플라스틱 소재, 윤활제, 화장품, 페인트 등 산업 전반에 광범위하게 응용될 수 있다(Biotechnology Advances(2013) 31:1473-1485, Nature Communications(2020) 11:2258).

[0004] 히드록시 지방산 및 이차 지방 알콜의 여러 기능성이 알려져 있지만 자연계에 존재하는 히드록시 지방산 및 이차 지방 알콜은 식물체 내에 미량으로만 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 미생물을 이용하여 히드록시 지방산 및 이차 지방 알콜을 생산하려는 연구가 시도되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 미생물을 이용하여 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜을 제조하기 위하여, 슈도모나스 유래 리폭시게나아제 기반 전세포 촉매 시스템을 구축함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 따라서 본 발명의 목적은, 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제(lipoxygenase) 유전자를 포함하는, 재조합 대장균을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은, 상기 재조합 대장균과 불포화 지방산을 반응시켜 히드로퍼옥시 지방산(hydroperoxy fatty acid)을 제조하는 단계;를 포함하는 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 생산방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 재조합 대장균을 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 대장균에 도입하는 단계;를 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 재조합 대장균의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제(lipoxygenase) 유전자를 포함하는, 재조합 대장균을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 대장균과 불포화 지방산을 반응시켜 히드로퍼옥시 지방산(hydroperoxy fatty acid)을 제조하는 단계;를 포함하는 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 생산방법을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 재조합 대장균을 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 대장균에 도입하는 단계;를 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 재조합 대장균의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 슈도모나스 유래 리폭시게나아제 기반 재조합 대장균을 전세포 생촉매로 이용할 경우 불포화 지방산으로부터 히드록시 지방산을 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한 슈도모나스 유래 리폭시게나아제 및 클로렐라 유래 탈탄산 효소를 공동발현하는 재조합 대장균을 전세포 생촉매로 이용할 경우 불포화 지방산으로부터 이차 지방 알콜을 생산할 수 있음을 확인하였다. 이와 같이 본 발명에서 구축된 재조합 대장균은 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜 생산 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 리놀레산(1)으로부터 슈도모나스 유래 리폭시게나아제의 이산소반응과 환원 반응을 통해 13-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산(2)을 거쳐 13-히드록시옥타데카다이에노익산(3)으로 전환한 경로이다. 이후 클로렐라 유래 탈탄산 효소 반응으로 6-히드록시헵타데센(4)을 생산한 생물전환 반응 경로를 나타낸 도이다.

도 2는 리놀레산의 농도가 10 mM일 때 본 발명에 따른 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)을 이용한 생물전환 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 리놀레산의 농도가 100 mM일 때 본 발명에 따른 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)을 이용한 생물전환 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 리놀레산의 농도가 200 mM일 때 본 발명에 따른 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)을 이용한 생물전환 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 리놀렌산의 농도가 10 mM일 때 본 발명에 따른 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)을 이용한 생물전환 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 아라키돈산의 농도가 10 mM일 때 본 발명에 따른 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)을 이용한 생물전환 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 리놀레산의 농도가 12 mM일 때 본 발명에 따른 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-Pa-LOX/pET28a-Cv-FAP)의 생물전환 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제(lipoxygenase) 유전자를 포함하는, 재조합 대장균을 제공한다.

[0018] 본 발명에 있어서, “리폭시게나아제(lipoxygenase)”는 불포화지방산에 산소를 첨가하여 과산화물을 생성하는 효소를 의미한다. 리폭시게나아제는 미생물이나 동물조직에도 존재하고 있다. 동물에서는 아라키돈산에 산소 첨가하는 위치의 차이에 따라 5, 12 및 15-리폭시게나아제가 있으며, 혈소판이나 백혈구 등의 골수유래세포, 상피세포, 신경세포 등에 함유된다. 5-리폭시게나아제는 아라키돈산으로부터 5-히드로퍼옥시산을 경유하여 백혈구 유주(遊走)나 평활근수축작용을 하는 류코트리엔을 합성하여 염증이나 면역의 병태생리에 관여하고 있다.

[0019] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자는 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래인 것이 바람직하다.

[0020] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제는 페리플라즘 또는 세포질에 분비되는 것이 바람직하다.

[0021] 본 발명에 있어서, “페리플라즘(periplasm)”은 그람음성균의 내막과 외막 사이에 있는 공간으로, 단백질 농도가 매우 높아 겔과 같은 점성을 나타낸다.

[0022] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 포함하고, 리폭시게나아제는 페리플라즘으로 분비되는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 히드록시 지방산(hydroxy

fatty acid) 생산용인 것이 바람직하다.

[0024] 본 발명에 있어서, “히드록시 지방산(hydroxy fatty acid)”은 일반 지방산의 중심사슬에 1개 이상의 하이드록실기를 갖고 있는 형태로, 대응되는 지방산 또는 알콜보다 물에 더욱 잘 녹는다. 히드록시 지방산은 수산기의 위치에 따라 α-, β-, ɣ-, δ-히드록시 지방산으로 구분된다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 히드록시 지방산은 13-히드록시옥타데카다이에노익산(13-Hydroxyoctadecadienoic acid), 13-히드록시옥타데카트리에노익산(13-Hydroxyoctadecatrienoic acid) 및 15-히드록시에이코사테트라에노익산(15-hydroxyeicosatetraenoic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 구체예에서, 상기 재조합 대장균은 전세포 생물전환(whole-cell biotransformation)용인 것이 바람직하다.

[0027] 본 발명에 있어서, “생물전환(biotransformation)”은 생물의 생리적 기능을 이용해 첨가된 물질을 화학적으로 변형된 형태로 전환시키는 과정을 의미한다. 상기 생물전환은 효소 또는 상기 효소를 발현하는 미생물을 이용할 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, “전세포 생물전환(whole-cell biotransformation)”은 효소를 발현하는 형질전환체 자체(즉, 전세포)를 이용하여 초기 물질을 목적하는 물질로 전환시키는 과정을 의미한다.

[0029] 본 발명에 따른 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 도 1과 같은 생물전환 경로를 포함한다. 보다 상세하게는, 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 리놀레산(1)으로부터 슈도모나스 유래 리폭시게나아제의 이산소반응과 환원 반응을 통해 13-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산(2)을 거쳐 13-히드록시옥타데카다이에노익산(3)으로 전환하는 생물전환 경로를 포함한다.

[0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제(lipoxygenase) 유전자; 및 서열번호 3의 유전자로 표시되는 탈탄산 효소 유전자;를 포함하는, 재조합 대장균을 제공한다.

[0032] 본 발명의 구체예에서, 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자는 동시에 또는 이시에 대장균에 도입한 것일 수 있고, 전술한 본 발명의 양태의 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 대장균에 탈탄산 효소 유전자를 도입한 것일 수 있다.

[0033] 본 발명의 구체예에서, 상기 탈탄산 효소는 클로렐라 베리어빌리스(*Chlorella variabilis*) 유래인 것이 바람직하다.

[0034] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 포함하고, 리폭시게나아제는 세포질로 분비되는 것일 수 있다.

[0035] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 또는 이차 지방알콜(secondary fatty alcohol) 생산용인 것이 바람직하다. 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 리폭시게나아제를 이용하여 불포화 지방산을 히드록시 지방산으로 생물전환할 수 있으며, 탈탄산 효소를 이용하여 히드록시 지방산을 이차 지방알콜로 생물전환할 수 있다.

[0036] 본 발명의 구체예에서, 이차 지방알콜은 리놀레산 유래 지방알콜 6-히드록시-7,9-헵타데센(6-hydroxy-7,9-heptadecene), 감마-리놀렌산 유래 지방알콜 6-히드록시-7,9,12-헵타데카트리엔(6-hydroxy-7,9,12-heptadecatriene), 알파-리놀렌산 유래 지방알콜 6-히드록시-3,7,9-헵타데카트리엔(6-hydroxy-3,7,9-heptadecatriene) 및 올레산 유래 지방알콜인 9-히드록시-8-헵타데센(9-hydroxy-8-heptadecene)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 도 1과 같은 생물전환 경로를 포함한다. 보다 상세하게는, 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 리놀레산(1)으로부터 슈도모나스 유래 리폭시게나아제의 이산소반응과 환원 반응을 통해 13-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산(2)을 거쳐 13-히드록시옥타데카다이에노익산(3)으로 전환하고, 이후 클로렐라 유래 탈탄산 효소 반응으로 6-히드록시헵타데센(4)을 생산하는 생물전환 경로를 포함한다.

[0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 대장균과 불포화 지방산을 반응시켜 히드로퍼옥시 지방산(hydroperoxy fatty acid)을 제조하는 단계;를 포함하는 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 생산방법을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 대장균과 불포화 지방산을 반응시켜 히드로퍼옥시 지방산을 제조하는 단계;를 포함하는 히드록시 지방산 또는 이차 지방 알콜 생산방법을 제공한다.

[0040] 본 발명의 구체예에서, 상기 방법은 히드로퍼옥시 지방산을 환원시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 방법이 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소를 이용하여 이차 지방 알콜을 생산하는 경우 파장 400 내지 500 ㎚인 빛을 조사하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이는 탈탄산 효소의 광의존성 탈탄산 반응을 유도하기 위한 것이다. 더 바람직하게는 광 의존성 탈탄산 반응을 위해 파장 450 ㎚의 빛을 조사할 수 있다.

[0042] 본 명세서에서 용어, "불포화 지방산(Unsaturated fatty acids)"은 한 분자 속에 탄소-탄소의 불포화결합과 카르복시기를 가지는 사슬 모양 화합물로 탄소간 이중결합이 존재하는 지방산을 말한다. 이중결합을 1개 갖는 것을 모노엔산(monoenoic acid)이라고 하며 천연에는 디엔산, 트리엔산, 테트라엔산, 펜타엔산, 헥사엔산이 존재한다. 디엔산 이상을 총칭하여 폴리엔산이라고 하며, 어유에 많은 테트라엔산 이상의 산을 과불포화지방산이라고 한다. 이중결합의 위치는 카르복시기로부터 몇 번째의 탄소에 붙어 있느냐로 나타내지만, 천연에 존재하는 지방산은 일정한 배치를 나타낸다.

[0043] 본 발명의 구체예에서, 상기 불포화 지방산은 리놀레산(linoleic acid), 알파-리놀렌산(α-linolenic acid), 감마-리놀렌산(γ-linolenic acid), 아라키돈산(arachidonic acid), 올레산(oleic acid) 및 팔미톨레산(palmitoleic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명의 구체예에서, 상기 히드록시 지방산은 13-히드록시옥타데카다이에노익산(13-Hydroxyoctadecadienoic acid), 13-히드록시옥타데카트리에노익산(13-Hydroxyoctadecatrienoic acid) 및 15-히드록시에이코사테트라에노익산(15-hydroxyeicosatetraenoic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 구체예에서, 배지 및 기타 배양조건은 통상의 대장균의 배양에 사용되는 배지이면 어느 것이나 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 재조합 대장균을 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양한다.

[0046] 상기 배지는 탄소원으로서 당류 또는 당알코올을 포함할 수 있으며, 보다 상세하게는 포도당, 만니톨, 수크로오스, 아라비노스, 갈락토오스, 글리세롤, 자일로오스, 만노오스, 프락토오스, 락토오스, 말토오스, 수크로오스, 알긴산, 셀룰로오스, 덱스트린, 글리코겐, 히알루론산, 렌티난, 자이모산, 키토산, 글루칸, 리그닌 및 펙틴으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 포도당, 만니톨, 알긴산, 수크로오스, 아라비노스, 갈락토오스 및 글리세롤로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 배지 또는 전구체는 배양물에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.

[0047] 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.

[0048] 배양물의 온도는 보통 27℃ 내지 37℃, 바람직하게는 30℃ 내지 35℃로 설정할 수 있다. 배양 기간은 원하는 유용 물질의 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 100 시간 동안 배양할 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 방법은 배양 단계에서 생산된 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜을 추가로 정제 또는 회수하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 재조합 대장균 또는 배양물로부터 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜을 회수하는 방법은 당업계에 알려진 방법, 예컨대 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당업자는 공지된

여러 정제 공정 중 필요에 따라 선택하여 활용할 수 있다.

[0051] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 대장균을 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 대장균을 포함하는, 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜 생산용 조성물을 제공한다.

[0052] 본 발명에 따른 재조합 대장균은 전세포 생촉매로 활용이 가능한바, 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜 생산용 조성물로 활용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 구체예에서, 상기 조성물은 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜 생산을 유도(즉, 전세포 생물전환 유도)하거나, 재조합 대장균의 배양하기 위한 공지의 유효성분을 더 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 대장균에 도입하는 단계;를 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 재조합 대장균의 제조방법을 제공한다. 또한 본 발명은 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자 및 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 탈탄산 효소 유전자를 대장균에 도입하는 단계;를 포함하는, 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜 생산용 재조합 대장균의 제조방법을 제공한다.

[0056] 본 발명에서 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 숙주 유전자에 도입하는 방법으로는 특별히 한정하지는 않으나, 벡터에 상기 유전자를 삽입하여 전기충격(electrophoresis) 및 열 충격 방법(heat shock transformation method) 등을 사용해 재조합 미생물 내에 도입함으로써, 재조합 균주에서 함께 발현될 수 있도록 하는 것이 바람직하다.

[0057] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자는 대장균에 동시에 또는 이시에 도입될 수 있으며, 순차적으로 도입될 수 있다. 또한 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자는 두 유전자를 모두 포함하는 1개의 벡터 형태로 대장균에 도입될 수 있으며, 두 유전자를 각각 포함하는 2개의 벡터 형태로 대장균에 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0063] **실시예 1. 재조합 대장균을 이용한 리놀레산으로부터 13-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산 제조**

[0064] **1-1. 재조합 플라스미드 및 대장균 기반 전세포 촉매 구축**

[0065] 본 발명의 이산소 반응을 촉매하는 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 벡터 pET22b-Pa-LOX(페리플라즘으로 분비되는 리폭시게나아제) 및 pACYC-Pa-LOX(세포질에 분비되는 리폭시게나아제)를 제작하였다. 벡터 pET-22b(+)는 페리플라즘으로 분비하게 하는 N-말단의 PelB 신호 서열 및 정제를 위한 his 태그를 포함하고 있으며, 벡터 pACYC는 N-말단의 his 태그를 포함하고 있다.

[0066] 구체적으로, 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 genomic DNA를 기초로 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 수행하여 리폭시게나아제 유전자를 증폭시켰다. 상기 벡터 pET22b-Pa-LOX에 삽입하기 위한 리폭시게나아제 유전자는 프라이머 5'-CGGCGATGGCCATGCATCACCATCATCACCAC-3'(서열번호 4) 및 3'-GCTCGTGGTTATAGACTTTCGAACGCCGGCG-5'(서열번호 5)로 증폭하였고, 상기 벡터 pACYC-Pa-LOX에 삽입하기 위한 리폭시게나아제 유전자는 5'-GCCAGGATCCGAATTCGAATGACTCGATATTCTTTTCAC-3'(서열번호 6) 및 3'-CTCGTGGTTATAGACTTTCGAACGCCGGCGTA-5'(서열번호 7)로 증폭하였다. PCR을 통해 얻은 벡터 pET22b-Pa-LOX 및

pACYC-Pa-LOX에 삽입하기 위한 리폭시게나아제 유전자 서열은 각각 서열번호 1 및 2로 표시된다.

[0067] 증폭된 슈도모나스 에루지노사(*P. aeruginosa*) 리폭시게나아제 DNA 절편은 PCR 정제 키트(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 벡터 pET22b(+)는 NcoⅠ 및 HindⅢ 제한효소를 이용하여 잘랐으며, 벡터 pACYC는 EcoRⅠ 및 HindⅢ 제한효소를 이용하여 벡터를 잘랐다. 정제된 PCR 산물을 인-퓨전 클로닝 키트(In-Fusionⓡ HD Cloning Kit)(Takara, Tokyo, Japan)를 사용하여 제한효소로 절단된 벡터 pET-22b(+) 및 pACYC에 각각 삽입하여, 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 벡터 pET22b-Pa-LOX 및 pACYC-Pa-LOX를 제작하였다.

[0068] 상기의 방법으로 제작된 발현 벡터 pET22b-Pa-LOX 및 pACYC-Pa-LOX를 각각 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켰다. 재조합 대장균은 각 100 μg/mL의 암피실린(Ampicillin) 및 30 μg/mL 클로람페니콜(Chloramphenicol)을 포함하는 LB 배지에서 자라게 하였다.

[0069] 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 도 1과 같은 생물전환 경로를 포함한다. 구체적으로, 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 리놀레산(1)으로부터 슈도모나스 유래 리폭시게나아제의 이산소 반응과 환원 반응을 통해 13-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산(2)을 거쳐 13-히드록시옥타데카다이에노익산(3)으로 전환하는 생물전환 경로를 포함한다.

[0071] **1-2. 리놀레산 농도에 따른 생물전환**

[0072] 상기 실시예 1-1에서 제작된 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX) 기반 전세포 생촉매를 이용한 리놀레산 이산소화 반응을 위해서, 리폭시게나아제 유전자를 발현하는 재조합 대장균을 37 ℃ 및 테리픽 배지에서 배양하였다. IPTG로 유전자 발현을 유발한 후 16 ℃에서 22시간 동안 배양 후 3.6 g/L의 대장균 건조 세포로 50 mM 포타슘 포스페이트 버퍼에서 생물전환 반응을 진행하였다. 생물전환은 진탕배양기(shaking incubator)안에 플라스크에서 200 rpm 및 30 ℃의 조건으로 수행하였다. 구체적으로, 다양한 농도의 리놀레산(10, 100, 200 mM)을 배양액에 첨가하여, 히드로퍼옥시 지방산(13-hydroperoxyoctadecadienoic acid(13-HpODE)(2))을 생산하였다. 그 후, 히드로퍼옥시 지방산을 환원시키기 위해, 환원제(TCEP)를 기질 농도(25, 200, 200 mM)의 2배 이상의 농도로 반응액에 첨가한 후 30분간 반응시켰다.

[0073] 전체 세포 활성의 단위인 유닛(U)은 30 ℃에서 1.0g 의 건조 세포를 사용하여 1분 동안 생성되는 히드로퍼옥시 지방산의 μmol로서 정의하였다. 리놀레산 농도에 따른 생물전환 결과는 각각 도 2 내지 4에 나타내었다.

[0074] 도 2에 나타낸 바와 같이, 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)은 리놀레산 10 mM인 경우 히드록시 지방산(13-hydroxyoctadecadienoic acid(13-HODE)(3))을 생산하는 것을 확인하였다. 보다 상세하게는, 리놀레산 10 mM의 농도로 반응시켰을 때 10분 만에 히드로퍼옥시 지방산인 13-HpODE(2)로 97% 이상 전환된 것을 확인하였다. 또한 히드로퍼옥시 지방산을 환원시킨 결과, 히드로퍼옥시 지방산에서 히드록시 지방산(13-HODE)(3)으로 전환되는 것을 확인하였고, 최초 반응물인 리놀레산으로부터 99% 이상 전환되는 것을 확인하였다.

[0075] 도 3 및 4에 나타낸 바와 같이, 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)은 리놀레산 농도가 각각 100 및 200 mM인 경우에도 히드록시 지방산(13-HODE)을 생산하는 것을 확인하였다. 보다 상세하게는, 100 mM의 리놀레산으로 생물전환을 시작하였을 때 2시간 만에 81 mM의 13-HpODE로 전환되었으며, 200 mM의 환원제(TCEP)를 첨가한 후 30분 만에 85 mM의 13-HODE를 얻었다(도 3). 또한 200 mM의 리놀레산으로 생물전환을 시작하였을 때 3시간 만에 161 mM의 13-HpODE로 전환되었으며, 환원제를 처리한 후 30분 째에 161 mM의 13-HODE로 환원되는 것을 확인하였다(도 4). 즉, 고농도의 리놀레산을 이용하였을 때도 최초 반응물인 리놀레산으로부터 81% 이상 전환되는 것을 확인하였다.이 때 환원제를 처리하지 않아도 약 4 mM의 히드로퍼옥시 지방산이 히드록시 지방산으로 생물전환 세포 내에서 자체적으로 환원되는 것으로 확인되었다.

[0076] 재조합 대장균을 이용한 생물전환 반응의 초기 이산소화 반응의 속도는 고농도의 리놀레산에서도 약 800 μmol/g dry cells/min(800 U/g dry cells)이상으로 나타났다.

[0077] 상기 결과는 슈도모나스 에루지노사 유래의 리폭시게나아제를 도입한 재조합 대장균 기반 전세포 촉매가 고농도의 리놀레산에 대해서도 이산소화 반응이 800 U/ g dry cells의 속도로 잘 진행되고, 이를 통해 리놀레산으로부터 13-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산 또는 13-히드록시옥타데카다이에노익산을 고농도로 생산할 수 있음을 의미한다.

[0079] 본 실시예에서 확인한 리놀레산 10, 100, 200 mM을 이용한 재조합 대장균 기반 전세포 촉매 생물전환 결과; 및 올레산 71 mM을 이용한 기존의 슈도모나스 기반 전세포 촉매 생물전환 결과(비교예 1);를 비교하였다. 비교 결과는 표 1에 나타내었다.

표 1

[0080]

	기질 농도 (mM)	초기 생물전환 속도(U/g dry cells)[1]	전환율(%)[2]	생성물 농도(mM)
실시예 1-2	10	500	99	10
	100	710	85	85
	200	890	85	169
비교예[3]	71[3]	12[3]	38	27

[0081] [1] 초기 생물전환 속도인 유닛(U)은 초기 생물전환 반응 30분 째에 30 ℃에서 1.0g 의 건조 세포를 사용하여 1분 동안 생성되는 히드로퍼옥시 지방산의 μmol로 정의하였다.

[0082] [2] 전환율은 첨가한 기질농도 대비 생성된 산물 농도를 기반으로 계산하였으며, 도 2, 3, 4 의 생물전환 결과를 참고하였다.

[0083] [3] 비교예는 슈도모나스 sp. 42A2를 기반으로한 전세포 생물전환 반응이다. 기질은 올레산 71 mM을 이용하였으며 생물전환 결과 생성물로 10-히드로퍼옥시-8-옥타데세노익산과 10-히드록시-8-옥타데세노익산이 생성된다.

[0085] 표 1에 나타낸 바와 같이, 재조합 대장균 기반 전세포 촉매 생물전환은 올레산을 기질로 한 슈도모나스 전세포 생촉매 생물전환 결과보다 초기 속도가 최대 74배 이상 빠르고, 전환율 또한 38 %에서 최소 85 %까지 2배 이상 높은 것을 확인하였다.

[0086] 따라서 기존의 슈도모나스 전세포 생촉매 생물전환 시스템보다 상기 실시예 1-1에서 구축한 재조합 대장균 기반 전세포 촉매 생물전환 시스템이 더 우수한 활성을 가졌음을 뒷받침한다.

[0088] **1-3. 리놀렌산 생물전환**

[0089] 상기 실시예 1-1에서 제조된 대장균 기반 전세포 촉매가 다른 불포화 지방산에도 적용될 수 있는지 알아보기 위하여, 리놀렌산(즉,(9Z,12Z)-9,12-octadecadienoic acid)에 대해서도 리폭시게나아제의 이산소화반응을 확인하였다. 리놀렌산의 화학구조는 리놀레산과 비교하여 탄소 골격의 이중결합 수가 1개 더 많은 것을 제외하고 리놀레산과 동일하다. 따라서 리폭시게나아제에 의해 리놀레산과 동일한 위치인 13번 탄소 골격에 산소가 도입되어 13-히드로퍼옥시옥타데카트리에노익산(13-hydroperoxyoctadecatrienoic acid)으로 전환된다.

[0090] 구체적으로, 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)의 배양 및 리폭시게나아제의 발현은 실시예 1-2에 기술한 것과 동일한 방법으로 수행하였으며, 리놀렌산 10 mM을 첨가하여 생물전환 반응을 진행하였다. 리놀렌산을 이용한 생물전환 결과는 도 5에 나타내었다.

[0091] 도 5에 나타낸 바와 같이, 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)을 이용하여 리놀렌산 10 mM을 생물전환하였을 때 1시간째에 리놀렌산은 모두 감소되고, 생성물인 13-히드로퍼옥시옥타데카트리에노익산으로 95% 이상 전환된 것을 확인하였다.

[0092] 상기 결과는 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)은 리놀레산뿐만 아니라 다른 불포화 지방산인 리놀렌산에 대해서도 재조합 대장균 기반 전세포 촉매의 생물전환 반응으로 이산소화 반응이 적용될 수 있음을 의미한다.

[0094] **1-4. 아라키돈산 생물전환**

[0095] 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX) 기반 리폭시게나아제를 도입한 전세포 촉매 반응의 적용 범위를 넓히기

위하여, 또 다른 불포화 지방산의 한 종류인 아라키돈산(즉,(5Z,8Z,11Z,14Z)-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid)을 이용하여 이산소화 반응을 확인하였다. 상기 아라키돈산의 화학구조는 탄소 골격 20개, 이중결합 4개를 가진 구조로 리놀레산에 비해 탄소 골격 2개와 이중 결합 수가 2개 더 많은 구조를 가지고 있다. 이에, 리폭시게나아제에 의해 산소가 도입되는 위치가 리놀레산이 13번 탄소 골격에 산소가 도입되는 것과 달리 아라키돈산의 경우 15번 탄소 골격에 산소가 도입되어 15-히드로퍼옥시에이코사테트라에노익산(15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid)으로 전환된다.

[0096] 구체적으로, 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)의 배양 및 리폭시게나아제의 발현은 실시예 1-2에서 기술한 것과 동일한 방법으로 수행하였으며, 아라키돈산 10 mM을 첨가하여 생물전환 반응을 진행하였다. 생물전환 결과는 도 6에 나타내었다.

[0097] 도 6에 나타낸 바와 같이, 재조합 대장균(*E. coli* pET22b-Pa-LOX)은 반응 1시간째에 아라키돈산은 모두 감소하고, 생성물인 15-히드로퍼옥시에이코사테트라에노익산으로 95% 이상 전환된 것을 확인하였다. 아라키돈산의 생물전환 속도는 리놀레산의 생물전환 속도보다 낮았는데, 이는 불포화 지방산의 화학구조적 차이에 따른 속도 차이라고 예상된다.

[0098] 상기 결과는 리놀레산뿐만 아니라 탄소 골격 수와 이중결합 수가 다른 불포화 지방산 종류인 아라키돈산에 대해서도 재조합 대장균 기반 전세포 촉매의 생물전환 반응으로 이산소화 반응이 적용될 수 있음을 의미한다.

[0100] **실시예 2. 재조합 대장균을 이용한 리놀레산으로부터 6*S*-hydroxy-(7*E*,9*Z*)-heptadecene(6-HHD) 제조**

[0101] **2-1. 재조합 플라스미드 및 대장균 기반 전세포 촉매 구축**

[0102] 본 발명에서 리놀레산으로부터 신규물질인 이차 지방 알콜인 6-HHD를 제조하기 위해, 슈도모나스 에루지노사 유래 리폭시게나아제 유전자; 및 광 의존성 탈탄산 반응을 촉매하는 클로렐라 베리어빌리스(*Chlorella variabilis*) 유래 탈탄산효소 유전자;를 공동 도입한 재조합 대장균을 구축하였다.

[0103] 구체적으로, 광탈탄산반응을 촉매하는 탈탄산효소인 Cv-FAP 유전자(서열번호 3)를 pET28a 벡터에 도입한 벡터 pET28a-Cv-FAP를 구축하였다. 대장균 BL21(DE3)에 상기 실시예 1-1에서 구축된 벡터 pACYC-Pa-LOX; 및 벡터 pET28a-Cv-FAP;을 형질전환시켰다. 구축된 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-Pa-LOX/pET28a-Cv-FAP)은 50 μg/mL의 카나마이신(Kanamycine)과 30 μg/mL 클로람페니콜(Chloramphenicol)을 포함하는 LB 배지에서 자라게 하였다.

[0104] 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 도 1과 같은 생물전환 경로를 포함한다. 구체적으로, 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 리놀레산(1)으로부터 슈도모나스 유래 리폭시게나아제의 이산소반응과 환원 반응을 통해 13-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산(2)을 거쳐 13-히드록시옥타데카다이에노익산(3)으로 전환하고, 이후 클로렐라 유래 탈탄산 효소 반응으로 6-히드록시헵타데센(4)을 생산하는 생물전환 경로를 포함한다.

[0106] **2-2. 리놀레산으로부터 6-HHD 제조**

[0107] 상기 실시예 2-1에서 구축된 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-Pa-LOX/pET28a-Cv-FAP) 기반 전세포 생촉매를 이용한 리놀레산으로부터 6-HDD 제조를 위하였다. 구체적으로, 구축된 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-Pa-LOX/pET28a-Cv-FAP)을 37℃ 및 테리픽 배지에 배양하였다. IPTG로 유전자 발현을 유도한 후 16 ℃에서 22시간 배양하였다. 그 후 14.4 g/L의 대장균 건조 세포로 50 mM 포타슘 포스페이트 버퍼에서 리놀레산 12 mM을 이용하여 히드로퍼옥시 지방산을 생산하였다. 그 후, 히드로퍼옥시 지방산을 환원시키기 위해, 환원제(TCEP)를 기질의 2배 이상의 농도(25 mM)로 반응액에 첨가한 후 30분간 반응시켰다. 그 후, 광 의존성 탈탄산 반응을 위해 450 nm 파장대의 푸른 LED 조명 하에서 전세포 촉매 반응을 진행하였다. 상기 생물전환 반응은 진탕배양기(shaking incubator)안에 플라스크에서 200 rpm 및 30℃ 조건에서 진행하였으며, 탈탄산 반응은 히팅맨틀에서 37 ℃로 진행하였다. 생물전환 결과는 도 7에 나타내었다.

[0108] 도 7에 나타낸 바와 같이, 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-Pa-LOX/pET28a-Cv-FAP)은 6-HHD 생산의 첫 번째 단계에서 15분 만에 리놀레산이 13-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산(13-HpODE)으로 92% 이상 전환된 것을 확인하였다. 이후 환원제를 첨가하여 환원시킨 결과(두번째 단계), 13-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산(2)이 10.5 mM의 13-히드록시옥타데카다이에노익산(3)으로 전환되는 것을 확인하였다. 광 의존성 탈탄산 반응 결과, 리놀레

산 12 mM으로부터 이차 지방 알콜인 6-HHD(4)를 9.1 mM로 얻었다. 즉, 리놀레산으로부터 6-HHD를 생산하는데에 2시간 45분이 소요되었고, 전환율은 76%임을 확인하였다. 이 때 두 번째 반응 후 환원되지 않고 남아있던 13-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산으로부터 탈탄산 반응이 일어나 6-히드로퍼옥시헵타데센(6-HpHD)이 부산물로 생산된 것을 확인하였다.

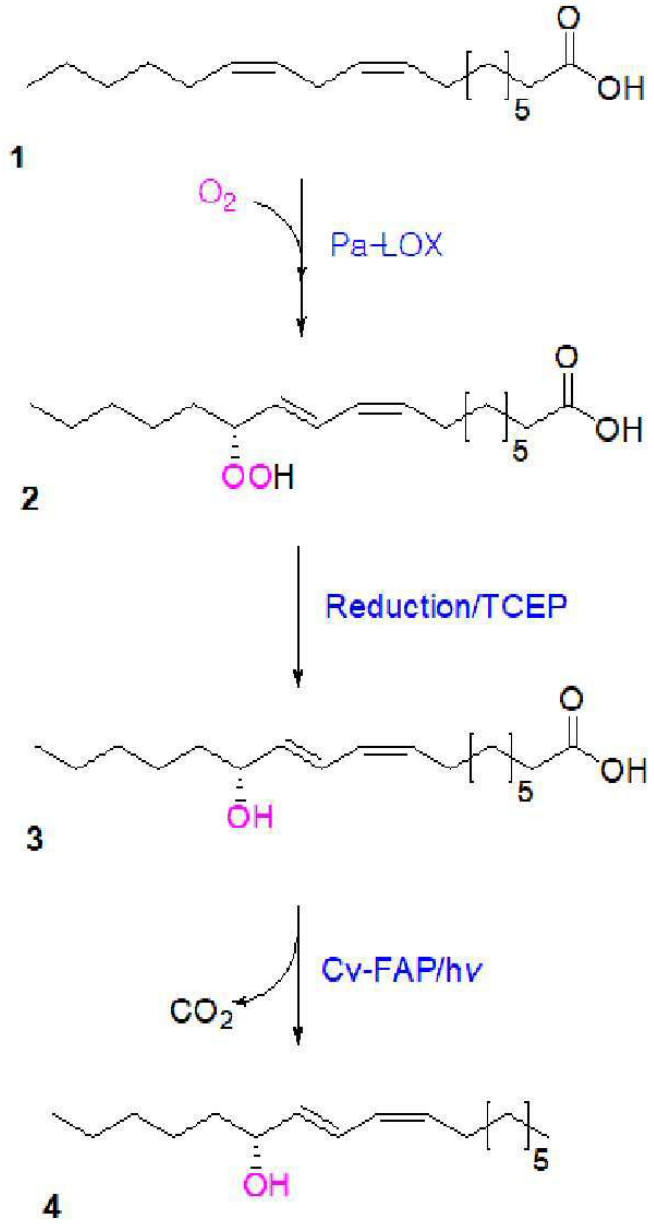
[0109] 따라서 상기 결과는 슈도모나스 에루지노사 유래 이산화 반응을 촉매하는 리폭시게나아제; 및 광 의존성 탈탄산 반응을 촉매하는 클로렐라 베리어빌리스 유래 탈탄산 효소;를 공동발현하는 대장균 기반 전세포 촉매는 리놀레산으로부터 이차 지방알콜인 6-히드록시헵타데센(6-HHD)을 생산할 수 있음을 의미한다.

[0111] 종합적으로 본 발명자들은 슈도모나스 에루지노사 유래 리폭시게나아제를 포함하는 재조합 대장균을 구축하고, 이를 전세포 생촉매로 이용할 경우 리놀레산 등의 불포화 지방산으로부터 히드록시 지방산을 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한 슈도모나스 에루지노사 유래 리폭시게나아제 및 클로렐라 베리어빌리스 유래 탈탄산 효소을 공동발현하는 재조합 균주를 구축하고, 이를 전세포 생촉매로 이용하여 리놀레산 등의 불포화 지방산으로부터 이차 지방 알콜을 생산할 수 있음을 확인하였다. 이는 본 발명에서 구축된 재조합 대장균은 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜 생산 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

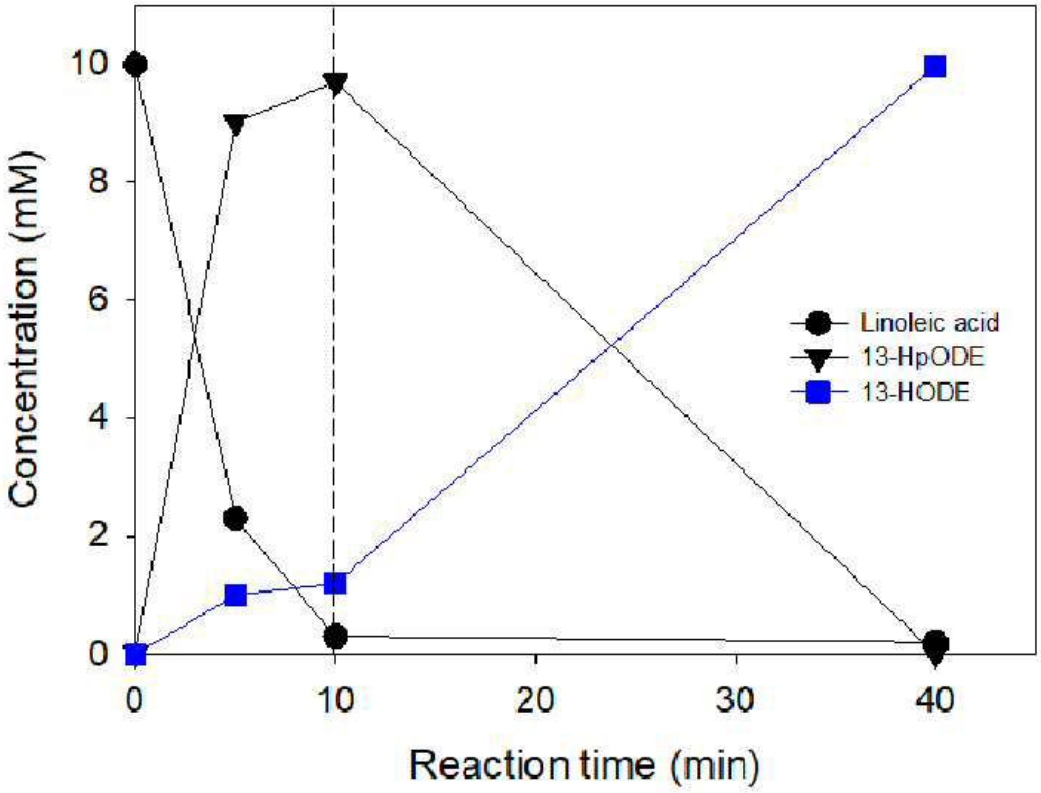
[0113] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

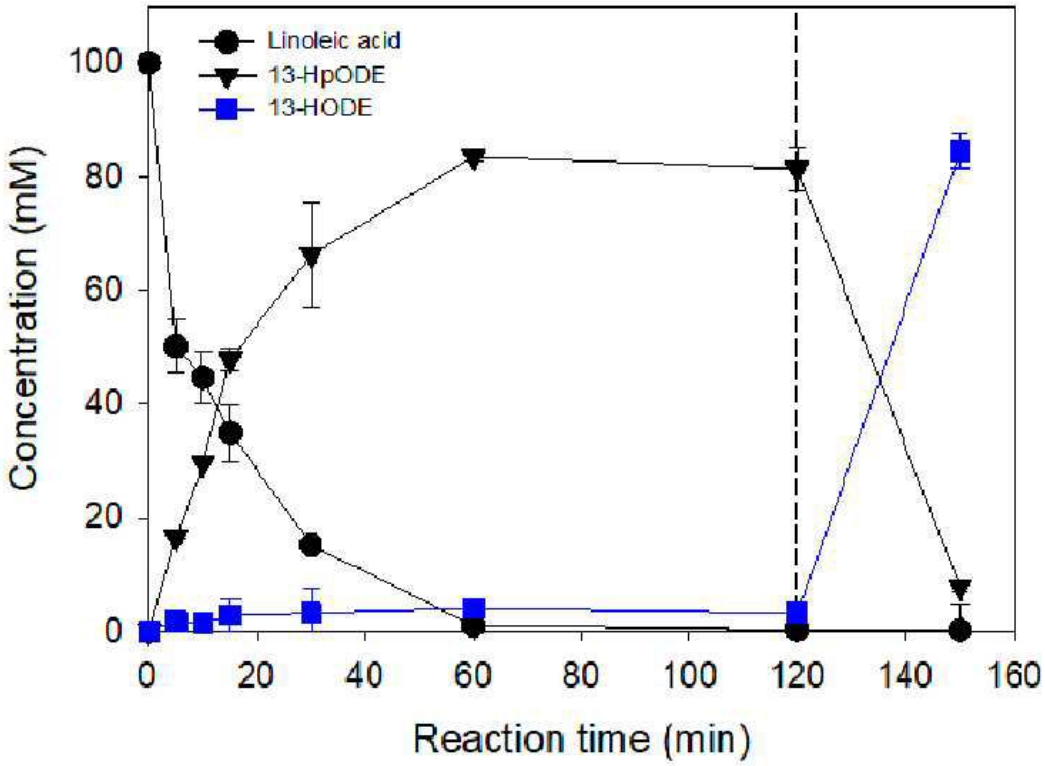
도면1



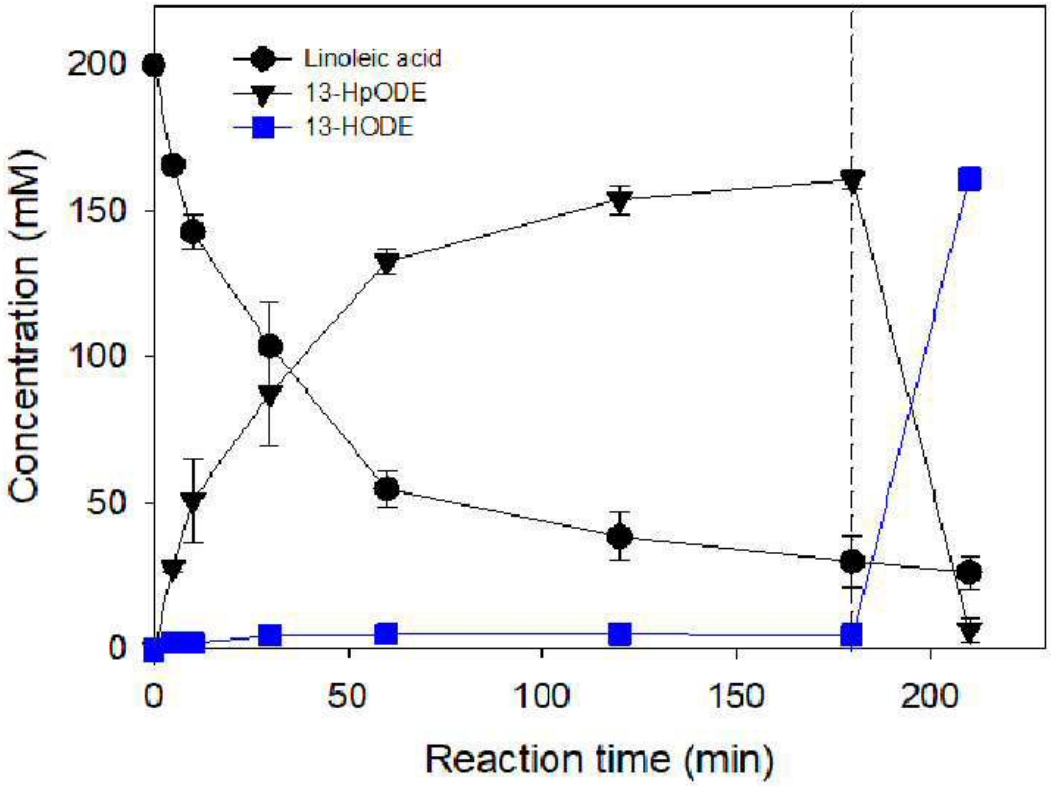
도면2


Concentration (mM)
Reaction time (min)
Linoleic acid
13-HpODE
13-HODE
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40

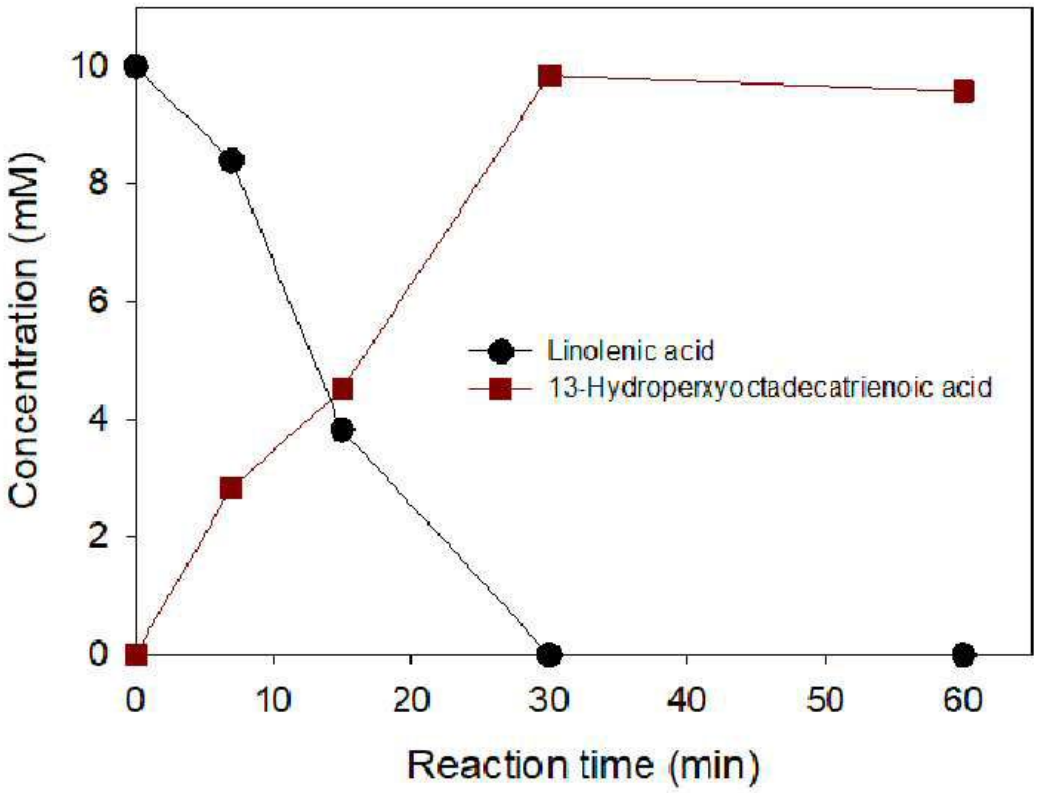
도면3


Linoleic acid
13-HpODE
13-HODE
Concentration (mM)
Reaction time (min)
0
20
40
60
80
100
120
140
160

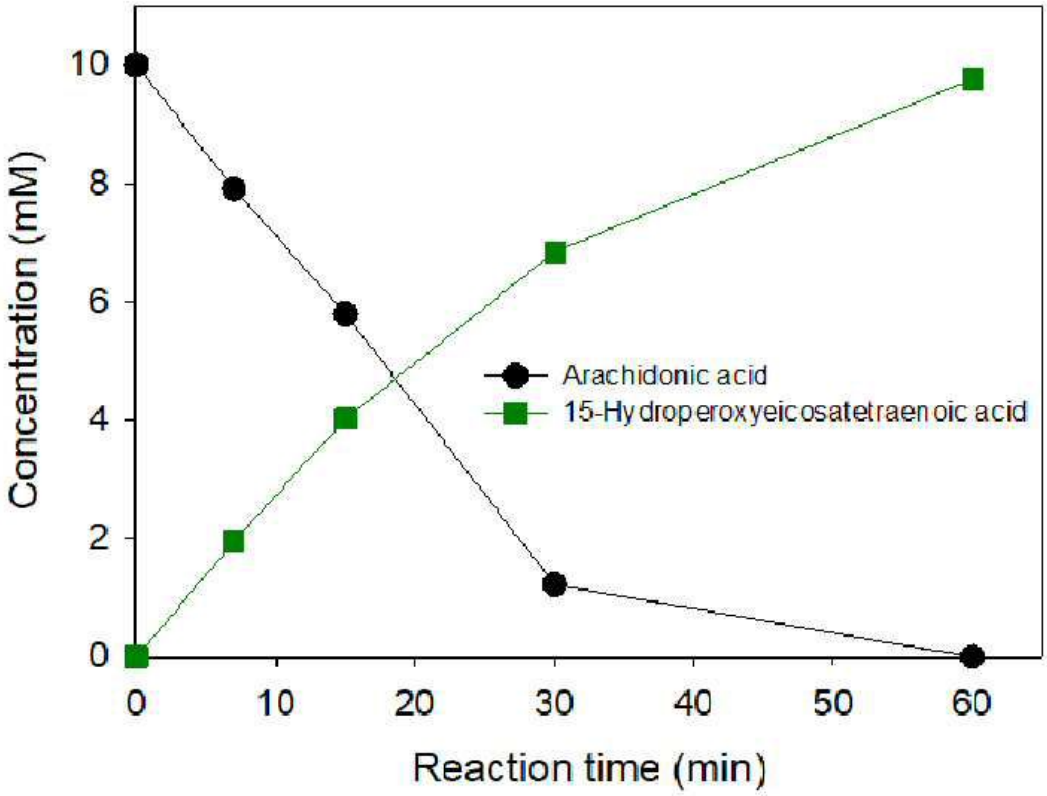
도면4


Linoleic acid
13-HpODE
13-HODE
Concentration (mM)
Reaction time (min)
0
50
100
150
200

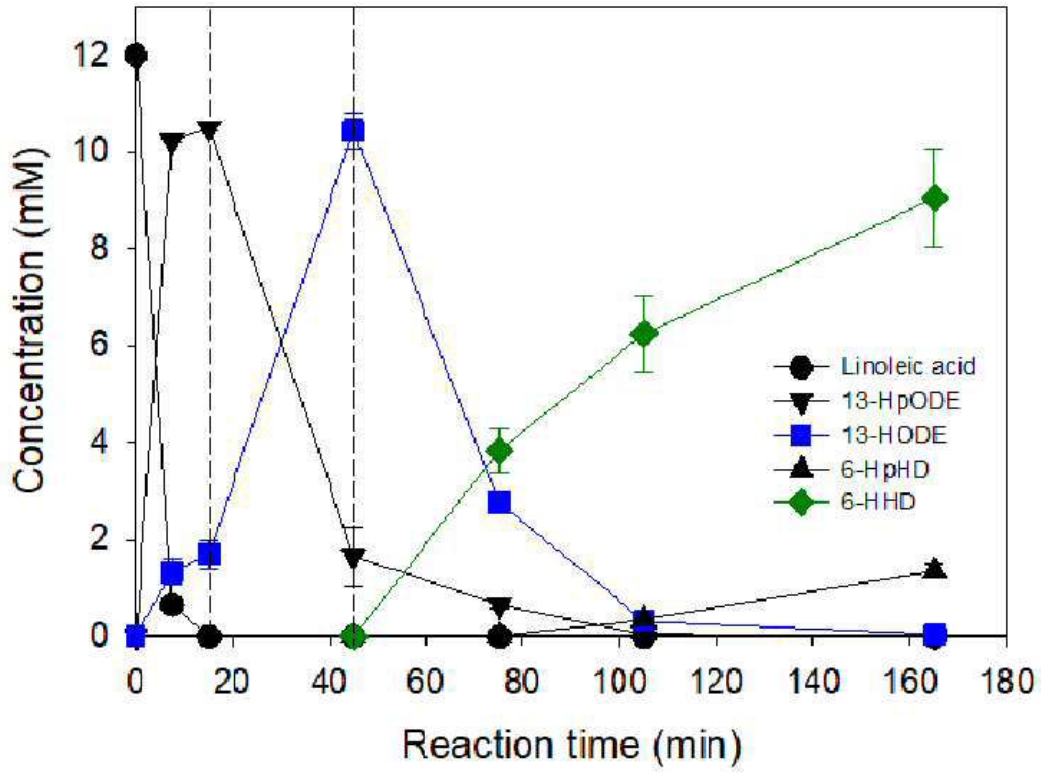
도면5


Concentration (mM)
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
40
50
60
Reaction time (min)
Linolenic acid
13-Hydroperxyoctadecatrienoic acid

도면6


Concentration (mM)
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
40
50
60
Reaction time (min)
Arachidonic acid
15-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid

도면7



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Pseudomonas-derived lipoxygenase-based recombinant Escherichia coli and hydroxy fatty acid and secondary fatty alcohol production method using the same

<130> 1-101P

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 2040

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 1

atgcatcacc atcatcacca cagccaggat ccgaattcga atgactcgat attcttttca 60

cccttgaaat acctcggggc ggaacaacag cgatctatcg atgcctcgcg aagtttgctg 120

gacaacctga ttccgccgag tttgccgcaa tatgacaacc tggccggaaa gttggcgcgg 180

cgtgcggtat tgaccagcaa gaaactggta tatgtctgga ccgagaactt cggcaatgtc 240

aaaggcgtgc cgatggcccg ctcggtgccg ctgggcgagt tgccgaatgt cgactggctg 300

ttgaagaccg ccggggtgat cgtcgagctg atcgtcaatt tcgtcgcctc gttgccggcg 360

tcggccgcag cgcagttcga gcggatcgcc accgggctca gcggtgacct ggaggcggcg 420

cgccaggtcc acgaggcgtt gctggaggag gcgaagaacg atccggccgc ggccggcagc 480

ctgctgctgc gcttcacgga gttgcagacg cgggtgatcg ccatactgac gcgggtcggc 540

ctgctggtcg acgatattct caagagcgcc agcaacctgg ttacccagag ggggcagggc 600

gacggcctga atcgcttccg cgcggtgttc ggcaccctgc gcctgccgga ggtcgccgac 660

agcttccgtg acgacgaagc gttcgcctac tggcgggtgg ccgggcctaa tccgctgctg 720

atccgtcgcg tcgatgcgct gccggccaac tttccgctgg gcgaggagca gttccgccgg 780

gtgatgggcg ccgacgacag cttgctggag gccgccgcca gccgccgcct gtatctgctg 840

gactacgccg agctgggcaa gctggcgccg tcgggagcgg tggacaaact gctcaccggg 900

acgggcttcg cctatgcgcc gatcgccctg ttcgcccttg gcaaggatcg ggcgaggcta 960

ttgccggtgg ccatccagtg cggtcaggac cccgctaccc atccgatgtt cgtgcgtccc 1020

gccgagtcgg agagtgatct gtactggggt tggcagatgg ccaagacggt ggtccaggtc 1080

gccgaggaga actaccacga gatgttcgtc cacctggccc agacccacct ggtgagcgag 1140

gcgttctgcc tggccaccca gcgcaccctg gcgcccagcc atccgctgca cgtcctgctc 1200

gccccgcact tcgagggcac cctgttcatc aacgaggggg cggcgcggat cctgttgccc 1260

agcgcgggct tcatcgacgt gatgttcgcc gcgccgatcc aggacaccca ggccaccgcc 1320

ggcggcaatc ggctgggttt cgacttctac cgcggcatgt tgccggagag cctgaaggcg 1380

cggaacgtcg acgacccgct ggcgctaccg gactaccct atcgcgacga cggcctgctg 1440

gtatggaatg ccatccgcca gtgggcggcc gactacgtgg cggtgtacta cgccagcgac 1500

ggcgacgtca ccgctgacgt cgaactggcg gcctgggtcg gcgaagtgat cggcagcggc 1560

aaggtggccg ggttccgccc gatcaccggt cgcagccaac tggtcgaggt gctgaccatg 1620

gtgatcttca ctgcctccgc gcagcatgcg gcggtcaatt ttccccagcc ttcgatgatg 1680

acctacgcac cagccatctg tgccatgagc gcggcgccgg caccggactc gccaagcggc 1740

aagagcgagg ccgattggtt gaagatgatg ccgccgaccc tggtggcgct ggagaaggtg 1800

aacatctatc acctgctcgg ttcggtctac cacggtcgcc tgggcgacta ccggcagacc 1860

gggttcccct acgcgccggt gttttcggac aggcgggtga ccgccagcgg cggcccgctg 1920

gagcgcttcc aggcacgcct gaaggaggtc gaggcgacca ttcgcacgcg caaccaggcg 1980

cgccgcaggc cctacgagta cctgttgccg agccggatcc cggcgagcac caatatctga 2040

2040

<210> 2

<211> 2049

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 2

atgggcagca gccatcacca tcatcaccac agccaggatc cgaattcgaa tgactcgata 60

ttcttttcac ccttgaaata cctcggggcg gaacaacagc gatctatcga tgcctcgcga 120

agtttgctgg acaacctgat tccgccgagt ttgccgcaat atgacaacct ggccggaaag 180

ttggcgcggc gtgcggtatt gaccagcaag aaactggtat atgtctggac cgagaacttc 240

ggcaatgtca aaggcgtgcc gatggcccgc tcggtgccgc tgggcgagtt gccgaatgtc 300

gactggctgt tgaagaccgc cggggtgatc gtcgagctga tcgtcaattt cgtcgcctcg 360

ttgccggcgt cggccgcagc gcagttcgag cggatcgcca ccgggctcag cggtgacctg 420

gaggcggcgc gccaggtcca cgaggcgttg ctggaggagg cgaagaacga tccggccgcg 480

gccggcagcc tgctgctgcg cttcacggag ttgcagacgc gggtgatcgc catactgacg 540

cgggtcggcc tgctggtcga cgatattctc aagagcgcca gcaacctggt tacccagagg 600

gggcagggcg acggcctgaa tcgcttccgc gcggtgttcg gcaccctgcg cctgccggag 660

gtcgccgaca gcttccgtga cgacgaagcg ttcgcctact ggcgggtggc cgggcctaat 720

ccgctgctga tccgtcgcgt cgatgcgctg ccggccaact ttccgctggg cgaggagcag 780

ttccgccggg tgatgggcgc cgacgacagc ttgctggagg ccgccgccag ccgccgcctg 840

tatctgctgg actacgccga gctgggcaag ctggcgccgt cgggagcggt ggacaaactg 900

ctcaccggga cgggcttcgc ctatgcgccg atcgccctgt tcgcccttgg caaggatcgg 960

gcgaggctat tgccggtggc catccagtgc ggtcaggacc ccgctaccca tccgatgttc 1020

gtgcgtcccg ccgagtcgga gagtgatctg tactggggtt ggcagatggc caagacggtg 1080

gtccaggtcg ccgaggagaa ctaccacgag atgttcgtcc acctggccca gacccacctg 1140

gtgagcgagg cgttctgcct ggccacccag cgcaccctgg cgcccagcca tccgctgcac 1200

gtcctgctcg ccccgcactt cgagggcacc ctgttcatca acgaggggcc ggcgcggatc 1260

ctgttgccca gcgcgggctt catcgacgtg atgttcgccg cgccgatcca ggacacccag 1320

gccaccgccg gcggcaatcg gctgggtttc gacttctacc gcggcatgtt gccggagagc 1380

ctgaaggcgc ggaacgtcga cgacccgctg gcgctaccgg actaccccta tcgcgacgac 1440

ggcctgctgg tatggaatgc catccgccag tgggcggccg actacgtggc ggtgtactac 1500

gccagcgacg gcgacgtcac cgctgacgtc gaactggcgg cctgggtcgg cgaagtgatc 1560

ggcagcggca aggtggccgg gttccgcccg atcaccggtc gcagccaact ggtcgaggtg 1620

ctgaccatgg tgatcttcac tgcctccgcg cagcatgcgg cggtcaattt tccccagcct 1680

tcgatgatga cctacgcacc agccatctgt gccatgagcg cggcgccggc accggactcg 1740

ccaagcggca agagcgaggc cgattggttg aagatgatgc cgccgaccct ggtggcgctg 1800

gagaaggtga acatctatca cctgctcggt tcggtctacc acggtcgcct gggcgactac 1860

cggcagaccg ggttccccta cgcgccggtg ttttcggaca ggcgggtgac cgccagcggc 1920

ggcccgctgg agcgcttcca ggcacgcctg aaggaggtcg aggcgaccat tcgcacgcgc 1980

aaccaggcgc gccgcaggcc ctacgagtac ctgttgccga gccggatccc ggcgagcacc 2040

aatatctga 2049

<210> 3

<211> 2178

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Chlorella variabilis

<400> 3

atgaaatctt ctcaccatca ccatcaccat ggttcttcta tgagcgataa aattattcac 60

ctgactgacg acagttttga cacggatgta ctcaaagcgg acggggcgat cctcgtcgat 120

ttctgggcag agtggtgcgg tccgtgcaaa atgatcgccc cgattctgga tgaaatcgct 180

gacgaatatc agggcaaact gaccgttgca aaactgaaca tcgatcaaaa ccctggcact 240

gcgccgaaat atggcatccg tggtatcccg actctgctgc tgttcaaaaa cggtgaagtg 300

gcggcaacca aagtgggtgc actgtctaaa ggtcagttga aagagttcct cgacgctaac 360

ctggccggga tcgaggaaaa cctgtacttc caatccgcgt ctgccgttga agacatccgt 420

aaagtcctgt ccgattcttc gtctccggtg gcgggtcaga aatatgacta catcctggtt 480

ggcggtggca ccgcggcgtg cgtgctggca aaccgtctga gcgctgacgg ttccaaacgt 540

gtactggttc tggaagcagg cccggataac acctcccgcg acgttaagat tccggcggcg 600

atcacccgcc tgttccgctc cccgctggac tggaacctgt tctctgaact gcaggaacag 660

cttgcggaac gtcagatcta catggcgcgt ggccgtctgc tgggcggttc cagcgcgact 720

aacgccactc tgtaccaccg tggtgcggcg ggtgattacg acgcatgggg tgttgaaggc 780

tggtccagcg aagacgttct gtcttggttc gtccaggcgg aaaccaacgc ggacttcggt 840

ccgggcgctt atcatggcag cggcggcccg atgcgtgtgg aaaacccgcg ttacaccaac 900

aaacagctgc acactgcttt cttcaaggct gctgaagaag ttggtcttac cccgaactcc 960

gatttcaacg attggagcca tgaccacgcc ggttacggca cctttcaggt gatgcaggat 1020

aaaggcaccc gcgcggatat gtaccgtcag tatctgaaac ctgtgctggg tcgtcgcaac 1080

ctgcaggtac tgaccggcgc tgcagtgacc aaagtcaaca tcgaccaggc tgcgggcaaa 1140

gcgcaggctc tgggtgttga attctccacc gacggcccaa ccggcgaacg cctgtctgcg 1200

gaactggctc cgggtggtga ggtcatcatg tgcgcaggtg ctgttcacac cccgttcctg 1260

ctgaaacatt ccggcgttgg cccgtctgct gagctgaaag aattcggcat cccggttgtt 1320

agcaacctgg ctggtgttgg ccagaacctg caggatcagc cggcgtgcct gaccgcggct 1380

ccggttaaag aaaaatacga cggtattgcc atttctgatc acatctacaa cgaaaaaggc 1440

cagatccgta aacgtgcaat cgcatcctac ctgctgggtg gtcgtggcgg tctgacttcc 1500

accggttgcg atcgcggtgc cttcgttcgt accgcgggtc aggcgctgcc ggacctgcag 1560

gttcgcttcg ttccaggtat ggcgctggac ccggacggtg ttagcaccta cgttcgtttt 1620

gctaaattcc agagccaggg tctgaaatgg ccgagcggca tcaccatgca gctgatcgct 1680

tgccgtccgc agtctaccgg ctccgtcggt cttaaatccg ctgacccgtt tgcgccgccg 1740

aaactgtcac caggttacct gaccgacaaa gacggtgctg atctggctac cctgcgtaaa 1800

ggcatccatt gggcacgtga tgttgcgcgt agctctgctc tgtccgaata cctggatggt 1860

gagctgttcc caggtagcgg cgttgtttct gatgatcaga tcgatgaata tatccgtcgt 1920

tctatccact cgtccaacgc tatcactggc acctgtaaaa tgggtaacgc aggtgacagc 1980

agctctgtgg tagacaacca gctgcgtgtt cacggtgttg aaggcctgcg cgttgttgac 2040

gctagcgttg ttccgaaaat tccgggtggt cagaccggtg cgccggtagt tatgatcgct 2100

gaacgcgcag cagctctgct gacggggaaa gcaaccattg gtgcatctgc tgctgcaccg 2160

gcgaccgtag ctgcataa 2178

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET22b-Pa-LOX forward primer

<400> 4

cggcgatggc catgcatcac catcatcacc ac 32

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET22b-Pa-LOX reverse primer

<400> 5

gcggccgcaa gctttcagat attggtgctc g 31

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pACYC-Pa-LOX forward primer

<400> 6

gccaggatcc gaattcgaat gactcgatat tcttttcac 39

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pACYC-Pa-LOX reverse primer

<400> 7

atgcggccgc aagctttcag atattggtgc tc 32