



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0128773
(43) 공개일자 2023년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01) C12P 7/6409 (2022.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)

C12N 15/70 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0026074

(22) 출원일자 2022년02월28일

심사청구일자 2022년02월28일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

건국대학교 산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)

(72) 발명자

박진병

서울특별시 영등포구 여의동로3길 10, 401동 902호 (여의도동, 여의도자이)

윤정혜

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교

오덕근

경기도 과천시 별양로 85, 406동 1002호

(74) 대리인

김순웅

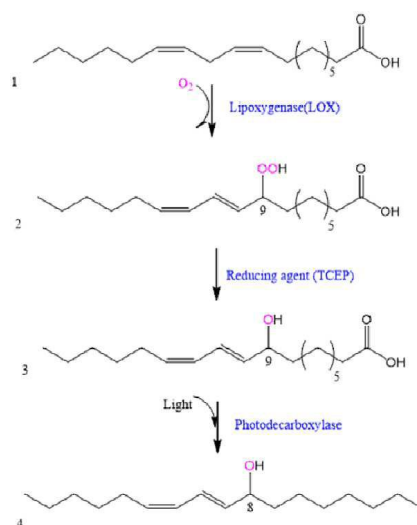
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 엔히그로미사 유래 리폭시게나아제 기반 재조합 미생물 및 이를 이용한 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 엔히그로미사 유래 리폭시게나아제 기반 재조합 미생물 및 이를 이용한 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 엔히그로미사 유래 리폭시게나아제 기반 재조합 미생물을 전세포 생축매로 이용할 경우 불포화 지방산으로부터 히드록시 지방산을 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한 maltose binding protein(MBP)과 퓨전을 통해 상기 효소 변이체를 만들었을 때 수용성 발현이 향상되었음을 확인하였고, 퓨전 된 효소를 이용하여 구축된 전세포 생축매를 통해 고농도의 리놀레산 전환을 확인하였다. 또한 엔히그로미사 유래 리폭시게나아제 및 클로렐라 유래 탈탄산 효소를 공동 발현하는 재조합 미생물을 전세포 생축매로 이용할 경우 불포화 지방산으로부터 이차 지방알콜을 생산할 수 있음을 확인하였다. 이와 같이 본 발명에서 구축된 재조합 미생물은 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜 생산 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0069 (2013.01)

C12P 7/6409 (2022.01)

C12Y 113/11031 (2013.01)

C12Y 113/11033 (2013.01)

C12Y 113/11034 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711146953
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	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제(lipoxygenase) 유전자를 포함하는, 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 리폭시게나아제 유전자는 엔히그로미사 살리나(*Enhygromyxa salina*) 유래인, 재조합 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 재조합 미생물은 서열번호 11의 염기서열로 표시되는 MBP(maltose binding protein)-코딩 서열을 더 포함하는, 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 리폭시게나아제는 페리플라즘 또는 세포질에 분비되는 것인, 재조합 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 재조합 미생물은 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 생산용인, 재조합 미생물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 재조합 미생물은 전세포 생물전환(whole-cell biotransformation)용인, 재조합 미생물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 미생물과 불포화 지방산을 반응시켜 히드로퍼옥시 지방산(hydroperoxy fatty acid)을 제조하는 단계;를 포함하는 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 생산방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

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

청구항 9

제7항에 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 10

제7항에 있어서,

상기 히드록시 지방산은 9-히드록시옥타데카다이에노익산(9-Hydroxyoctadecadienoic acid) 및 9-히드록시옥타데카트리에노익산(9-Hydroxyoctadecatrienoic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인, 히드록시 지방산 생산 방법.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 조성물.

청구항 12

서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 미생물에 도입하는 단계;를 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 재조합 미생물의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 엔히그로미사 유래 리폭시게나아제 기반 재조합 미생물 및 이를 이용한 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 리폭시게나아제는 장쇄 불포화 지방산의 산화를 촉매하는 산화효소로, 자연에 풍부하고 상대적으로 저렴한 재생 가능한 오일(renewable oil)을 기질로 사용할 수 있다. 재생 가능한 오일은 가장 중요한 생물 자원 중 하나이다. 재생 가능한 오일은 식물성 오일, 미세 조류 오일, 유지성 효모가 생산하는 오일 등이 있다. 재생 가능한 오일은 바이오디젤뿐만 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] 리폭시게나아제는 재생 가능한 오일을 이용하여 고부가 가치의 하이드로퍼옥시지방산, 하이드로옥시지방산을 친환경적으로 생산할 수 있다. 또한 탈탄산 반응을 촉매하는 효소와의 연속 반응을 통해 2차 알코올 또한 생성할 수 있다.

[0004] 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid)은 일반 지방산의 중심 사슬에 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 생리 활성 기능 및 기능성을 가질 수 있으며, 이로 인해 신농약, 신의약, 고기능성 레진 및 섬유 소재, 생분해성 플라스틱 소재, 윤활제, 화장품, 페인트 등 산업 전반에 광범위하게 응용될 수 있다.

[0005] 리폭시게나아제의 중요한 특징은 효소의 유래에 따라 기질이 산화되는 위치와 방향이 다르다는 것이다. 현재 대부분 미생물 유래의 리폭시게나아제는 리놀레산 13번 탄소를 산화시키며, 9번 탄소를 산화시키는 미생물 유래는 많이 발견되지 않았으며 이에 대한 연구가 시도되고 있다.

[0006] 히드록시 지방산 및 이차 지방 알콜의 여러 기능성이 알려져 있지만 자연계에 존재하는 히드록시 지방산 및 이차 지방 알콜은 식물체 내에 미량으로만 존재하는 것으로 알려져 있고, 화학적으로 생산하는 방법은 비용적, 환경적 문제가 유발되어 미생물을 이용하여 다양한 히드록시 지방산 및 이차 지방 알콜을 생산하려는 연구가 시도되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 미생물을 이용하여 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜을 제조하기 위하여, 엔히그로미사 유래 리폭시게나아제 기반 전세포 촉매 시스템을 구축함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

- [0008] 따라서 본 발명의 목적은, 서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제(lipoxygenase) 유전자를 포함하는, 재조합 미생물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은, 상기 재조합 미생물과 불포화 지방산을 반응시켜 히드رو퍼옥시 지방산(hydroperoxy fatty acid)을 제조하는 단계;를 포함하는 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 생산방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 재조합 미생물을 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 미생물에 도입하는 단계;를 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 재조합 미생물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제(lipoxygenase) 유전자를 포함하는, 재조합 미생물을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 상기 재조합 미생물과 불포화 지방산을 반응시켜 히드رو퍼옥시 지방산(hydroperoxy fatty acid)을 제조하는 단계;를 포함하는 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 생산방법을 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 상기 재조합 미생물을 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은 서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 미생물에 도입하는 단계;를 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 재조합 미생물의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 엔히그로미사 유래 리폭시게나아제 기반 재조합 미생물을 전세포 생축매로 이용할 경우 불포화 지방산으로부터 히드록시 지방산을 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한 maltose binding protein(MBP)과 퓨전을 통해 상기 효소 변이체를 만들었을 때 수용성 발현이 향상되었음을 확인하였고, 퓨전된 효소를 이용하여 구축된 전세포 생축매를 통해 고농도의 리놀렌산 전환을 확인하였다. 또한 엔히그로미사 유래 리폭시게나아제 및 클로렐라 유래 탈탄산 효소를 공동 발현하는 재조합 미생물을 전세포 생축매로 이용할 경우 불포화 지방산으로부터 이차 지방 알콜을 생산할 수 있음을 확인하였다. 이와 같이 본 발명에서 구축된 재조합 미생물은 히드록시 지방산 및 이차 지방알콜 생산 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 리놀렌산(1)으로부터 엔히그로미사 유래 리폭시게나아제의 이산소 반응과 환원 반응을 통해 9-히드رو퍼옥시옥타데카다이에노익산(2)을 거쳐 9-히드록시옥타데카다이에노익산(3)으로 전환한 경로이다. 이후 클로렐라 유래 탈탄산 효소 반응으로 8-히드록시헵타데센(4)을 생산한 생물전환 반응 경로를 나타낸 도이다.
- 도 2는 리놀렌산의 농도가 12 mM 일 때 본 발명에 따른 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-EsLOX)을 이용한 생물전환 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 알파 리놀렌산의 농도가 10 mM 일 때 본 발명에 따른 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-EsLOX)을 이용한 생물전환 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 SDS-PAGE를 통해 MBP 퓨전 효소의 대장균 내 수용성 발현 정도 및 배지로의 분비량을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 리놀렌산의 농도가 10 mM 일 때 본 발명에 따른 MBP 퓨전 효소 발현 재조합 대장균(*E. coli* pB4-EsLOX)을 이용한 생물전환 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 리놀렌산의 농도가 100 mM 일 때 본 발명에 따른 MBP 퓨전 효소 발현 재조합 대장균(*E. coli* pB4-EsLOX)을 이용한 생물전환 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 리놀렌산의 농도가 10 mM 일 때 본 발명에 따른 리폭시게나아제와 탈탄산 효소를 발현하는 재조합 대장

균(*E. coli* pACYC-EsLOX/pET28a-Cv-FAP)의 생물전환 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 실시예 4의 시료를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 정제 후 GC/MS로 순도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 NMR을 통해 실시예 4의 시료를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 포함하는, 재조합 미생물을 제공한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, “리폭시게나아제”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 평활근 수축 작용을 하는 류코트리엔을 합성하여 염증이나 면역의 병태 생리에 관여하고 있다.
- [0022] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자는 엔히그로미사 살리나(*Enhygromyxa salina*) 유래인 것이 바람직하다.
- [0023] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 미생물은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 포함한다.
- [0024] 본 발명의 구체예에서, 상기 재조합 미생물은 서열번호 11의 염기서열로 표시되는 MBP(maltose binding protein)-코딩 서열을 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0025] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제는 페리플라즘 또는 세포질에 분비되는 것이 바람직하다.
- [0026] 본 발명에 있어서, “페리플라즘(periplasm)”은 그람음성균의 내막과 외막 사이에 있는 공간으로, 단백질 농도가 매우 높아 겔과 같은 점성을 나타낸다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 미생물은 서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 포함하고, 리폭시게나아제는 페리플라즘으로 분비되는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 미생물은 히드록시 지방산 생산용인 것이 바람직하다.
- [0029] 본 발명에 있어서, “히드록시 지방산(hydroxy fatty acid)”은 일반 지방산의 중심 사슬에 1개 이상의 하이드록실기를 갖고 있는 형태로, 대응되는 지방산 또는 알콜보다 물에 더욱 잘 녹는다. 히드록시 지방산은 수산기의 위치에 따라 α -, β -, γ -, δ -히드록시 지방산으로 구분된다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 히드록시 지방산은 9-히드록시옥타데카다이에노익산(9-Hydroxyoctadecadienoic acid), 9-히드록시옥타데카트리에노익산(9-Hydroxyoctadecatrienoic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 구체예에서, 상기 재조합 미생물은 전세포 생물전환(whole-cell biotransformation) 용인 것이 바람직하다.
- [0032] 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.
- [0033] 본 발명에 있어서, “전세포 생물전환(whole-cell biotransformation)”은 효소를 발현하는 형질전환체 자체(즉, 전세포)를 이용하여 초기 물질을 목적하는 물질로 전환시키는 과정을 의미한다.
- [0034] 본 발명에 일 구체예에 있어서, 상기 재조합 미생물은 박테리아, 효모, 곰팡이로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있고, 바람직하게는 에스케리치아(*Escherichia*) 속 미생물일 수 있고, 더욱 바람직하게는 대장

균(*Escherichia coli*)일 수 있다.

- [0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자; 및 서열번호 4의 유전자로 표시되는 탈탄산 효소 유전자;를 포함하는, 재조합 미생물을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 구체예에서, 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자는 동시에 또는 이시에 미생물에 도입한 것일 수 있고, 전술한 본 발명의 양태의 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 미생물에 탈탄산 효소 유전자를 도입한 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 구체예에서, 상기 탈탄산 효소는 클로렐라 베리어빌리스(*Chlorella variabilis*) 유래인 것이 바람직하다.
- [0039] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 미생물은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 포함하고, 리폭시게나아제는 세포질로 분비되는 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 미생물은 히드록시 지방산(hydroxy fatty acid) 또는 이차 지방알콜 생산용인 것이 바람직하다. 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 미생물은 리폭시게나아제를 이용하여 불포화 지방산을 히드록시 지방산으로 생물전환할 수 있으며, 탈탄산 효소를 이용하여 히드록시 지방산을 이차 지방알콜로 생물전환할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 구체예에서, 이차 지방알콜은 리놀레산 유래 지방알콜 8-히드록시-9,11-헵타데센(8-hydroxy-9,11-heptadecene), 감마-리놀렌산 유래 지방알콜 8-히드록시-5,9,11-헵타데카트리엔(8-hydroxy-5,9,11-heptadecatriene), 알파-리놀렌산 유래 지방알콜 8-히드록시-9,11,14-헵타데카트리엔(8-hydroxy-9,11,14-heptadecatriene)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 재조합 미생물과 불포화 지방산을 반응시켜 히드로퍼옥시 지방산을 제조하는 단계;를 포함하는 히드록시 지방산 생산방법을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 재조합 미생물과 불포화 지방산을 반응시켜 히드로퍼옥시 지방산을 제조하는 단계;를 포함하는 히드록시 지방산 또는 이차 지방 알콜 생산방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 구체예에서, 상기 방법은 히드로퍼옥시 지방산을 환원시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 방법이 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소를 이용하여 이차 지방 알콜을 생산하는 경우 파장 400 내지 500 nm인 빛을 조사하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이는 탈탄산 효소의 광 의존성 탈탄산 반응을 유도하기 위한 것이다. 더 바람직하게는 광 의존성 탈탄산 반응을 위해 파장 450 nm의 빛을 조사할 수 있다.
- [0046] 본 명세서에서 용어, "불포화 지방산(unsaturated fatty acids)"은 한 분자 속에 탄소-탄소의 불포화결합과 카르복시기를 가지는 사슬 모양 화합물로 탄소 간 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.
- [0047] 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.
- [0048] 본 발명의 구체예에서, 상기 히드록시 지방산은 9-히드록시옥타데카다이에노익산(9-Hydroxyoctadecadienoic acid) 및 9-히드록시옥타데카트리에노익산(9-Hydroxyoctadecatrienoic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 구체예에서, 배지 및 기타 배양조건은 통상의 미생물 배양에 사용되는 배지이면 어느 것이나 사용할

수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 제조합 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양한다.

[0050] 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, 텍스트린, 글리코젠, 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.

[0051] 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 소포체를 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 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.

[0052] 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.

[0053] 본 발명에 따른 방법은 배양 단계에서 생산된 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜을 추가로 정제 또는 회수하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 제조합 미생물 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.

[0055] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 제조합 미생물을 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 포함하는 제조합 미생물을 포함하는, 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜 생산용 조성물을 제공한다.

[0056] 본 발명에 따른 제조합 미생물은 전세포 생촉매로 활용이 가능한바, 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜 생산용 조성물로 활용될 수 있다.

[0057] 본 발명의 구체예에서, 상기 조성물은 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜 생산을 유도(즉, 전세포 생물전환 유도) 하거나, 제조합 미생물의 배양하기 위한 공지의 유효성분을 더 포함할 수 있다.

[0059] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자를 미생물에 도입하는 단계;를 포함하는, 히드록시 지방산 생산용 제조합 미생물의 제조 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 서열번호 1 내지 3에서 선택된 1종 이상의 염기서열로 표시되는 리폭시게나아제 유전자 및 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 탈탄산 효소 유전자를 미생물에 도입하는 단계;를 포함하는, 히드록시 지방산 또는 이차 지방알콜 생산용 제조합 미생물의 제조 방법을 제공한다.

[0060] 본 발명에서 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자를 숙주 유전자에 도입하는 방법으로는 특별히 한정하지는 않으나, 벡터에 상기 유전자를 삽입하여 전기 충격 (electrophoresis) 및 열 충격 방법(heat shock transformation method) 등을 사용해 제조합 미생물 내에 도입함으로써, 제조합 균주에서 함께 발현될 수 있도록 하는 것이 바람직하다.

[0061] 본 발명의 구체예에서, 상기 리폭시게나아제 유전자 및 탈탄산 효소 유전자는 미생물에 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 미생물에 도입될 수 있으며, 두 유전자를 각각 포함하는 2개의 벡터 형태로 미생물에 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0063] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0065] 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.
- [0067] **실시예 1. *Enhygromyxa salina* 유래 리폭시게나아제(EsLOX) 효소의 반응 특성**
- [0068] **1-1. 효소 준비**
- [0069] 엔히그로미사 살리나(*Enhygromyxa salina*)의 genomic DNA를 기초로 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 수행하여 리폭시게나아제 유전자를 증폭시켰다. 상기 벡터 pET21a-EsLOX에 삽입하기 위한 리폭시게나아제 유전자는 프라이머 5'-CGGCGATGGCCATGCATCACCATCATCACCAC-3'(서열번호 5) 및 3'-GCTCGTGGTTATAGACTTTCGAACGCCGGCG-5'(서열번호 6)로 증폭하였고, 상기 벡터 pACYC-EsLOX에 삽입하기 위한 리폭시게나아제 유전자는 5'-GGAGATATACCATGGATGAAATACCTGCTGCC-3'(서열번호 7) 및 5'-CGGCCGAAGCTTTTCAGATGTTGATG-3'(서열번호 8)로 증폭하였다. PCR을 통해 얻은 리폭시게나아제 유전자 서열은 각각 서열번호 1(pET) 및 2(pACYC)로 표시된다.
- [0070] 증폭된 엔히그로미사 살리나(*Enhygromyxa salina*) 리폭시게나아제 DNA 절편은 PCR 정제 키트(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 벡터 pET21a(+)는 Nco I 및 HindIII 제한효소를 이용하여 잘랐으며, 벡터 pACYC는 Nco I 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 pET21a(+), pACYC 및 pB4에 각각 삽입하여, 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 벡터 pET21a-EsLOX 및 pACYC-EsLOX를 제작하였다.
- [0071] 상기의 방법으로 제작된 발현 벡터 ppET21a-EsLOX 및 pACYC-EsLOX를 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.
- [0073] 이후 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-EsLOX)에서 리폭시게나아제 유전자를 발현하기 위해 재조합 대장균을 37 °C 및 테리픽 배지에서 배양하였고 OD 0.2에서 IPTG를 배지에 첨가하여 유전자 발현을 유발한 후 16 °C에서 22시간 동안 배양하였다.
- [0074] 상기 배양액을 13,000 xg로 4 °C에서 30분 동안 원심분리 후 인산 완충 생리식염수(Phosphate-buffered saline)로 두 번 세척하였고, 50 mM 제일인산나트륨(NaH₂PO₄), 300 mM 염화나트륨, 10 mM 이미다졸(imidazole), 0.1 mM 단백 분해 효소 저해제(phenylmethylsulfonyl fluoride), 400U 라이소자임(lysozyme)를 첨가한 후 상기 세포 용액을 파쇄기(sonicator)로 파쇄하였다. 상기 세포 파쇄물은 13,000 xg로 4 °C에서 10분 동안 원심분리한 후 pellet은 제거하여 세포 상등액만을 분리하였다. 이를 Ni-NTA agarose resin(Qiagen)이 packing된 resin에 흘려주었다. Resin에 결합한 protein을 wash buffer(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20/30mM imidazole)로 세척하고, elution buffer(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM imidazole)로 elution 하여 엔하이그로미사 리폭시게나아제를 정제하였으며, 이후 30 kDa Amicon을 사용하여 농축된 단백질 용액을 얻어 상기 정제된 엔하이그로미사 리폭시게나아제를 포함하는 샘플을 제조하였다.
- [0076] **1-2. 다양한 장쇄 불포화 지방산에 대한 효소 활성**
- [0077] 이후 상기 효소 샘플을 분광광도계(UV-vis spectrophotometer, 234nm)를 이용하여 상기 효소의 활성을 측정하였다. 보다 상세하게는 리놀레산 이산화 반응이 진행됨에 따라 생성물인 공액 디엔(conjugated diene) 흡광도 증가율을 분광광도계를 이용하여 측정하였고, 반응 시간은 180초까지 10초 씩 측정하였다. 50 mM EPPS(pH 8.5) 버퍼에서 불포화 지방산인 리놀레산, 알파 리놀렌산, 감마 리놀렌산, 아라키돈산에 대한 효소의 활성을 측정하였다.

[0078] 리놀레산을 기질로 234 nm에서 활성을 측정한 결과, $K_M(\text{mM})$ 값은 0.09, $k_{\text{cat}}/K_M(\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1})$ 값은 1.51로 측정되었다. 알파 리놀렌산을 기질로 234 nm에서 활성을 측정한 결과, $K_M(\text{mM})$ 값은 0.12, $k_{\text{cat}}/K_M(\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1})$ 값은 0.56 으로 측정되었다. 감마 리놀렌산을 기질로 234 nm에서 활성을 측정한 결과, $K_M(\text{mM})$ 값은 0.13, $k_{\text{cat}}/K_M(\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1})$ 값은 0.61로 측정되었다. 아라키돈산을 기질로 234 nm에서 활성을 측정한 결과, $K_M(\text{mM})$ 값은 0.08, $k_{\text{cat}}/K_M(\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1})$ 값은 0.29로 측정되었다.

[0079] 상기 결과는 엔히그로미사 살리나 유래의 리폭시게나아제가 다양한 불포화 지방산에 대해서 이산화 반응 활성을 갖고, 특히 리놀레산에 대한 활성이 높음을 의미한다. 이를 통해 다양한 불포화지방산으로부터 9-히드록시 지방산 또는 9-히드رو퍼옥시지방산을 생산할 수 있음을 의미한다.

[0080] 본 실시예에서 확인한 다양한 불포화 지방산을 이용한 효소 활성 측정 결과는 표 1에 나타내었다.

표 1

실시예 1-2	기질	$K_M(\text{mM})$	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
	리놀레산	0.09	1.51
	알파-리놀렌산	0.12	0.56
	감마-리놀렌산	0.13	0.61
	아라키돈산	0.08	0.29

[0084] 실시예 2. 재조합 대장균을 이용한 리놀레산으로부터 9-히드رو퍼옥시옥타데카다이에노익산 제조

[0085] 2-1. 리놀레산 생물전환

[0086] 상기 실시예 1-1에서 제작된 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-EsLOX) 기반 전세포 생축매를 이용한 리놀레산 이산화 반응을 위해서, 리폭시게나아제 유전자를 발현하는 재조합 대장균을 37 °C 및 테리픽 배지에서 배양하였다. IPTG로 유전자 발현을 유발한 후 16 °C에서 22시간 동안 배양 후 3.6 g/L의 대장균 건조 세포로 50 mM EPPS 버퍼에서 생물전환 반응을 진행하였다. 생물전환은 진탕 배양기(shaking incubator)안에 플라스크에서 200 rpm 및 20 °C의 조건으로 수행하였다. 구체적으로, 다양한 농도의 리놀레산(12, 20 mM)을 배양액에 첨가하여, 히드رو퍼옥시 지방산(9-hydroperoxyoctadecadienoic acid(9-HpODE)(3))을 생산하였다. 그 후, 히드رو퍼옥시 지방산을 환원시키기 위해, 환원제(TCEP)를 기질 농도(12, 20 mM)의 2배 이상의 농도로 반응액에 첨가한 후 20분간 반응시켰다.

[0087] 전체 세포 활성의 단위인 유닛(U)은 20 °C에서 1.0g 의 건조 세포를 사용하여 1분 동안 생성되는 히드رو퍼옥시 지방산의 μmol 로서 정의하였다. 리놀레산 농도에 따른 생물전환 결과는 도 2에 나타내었다.

[0088] 도 2에 나타낸 바와 같이, 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-EsLOX)은 리놀레산 12 mM인 경우 히드록시 지방산(9-hydroxyoctadecadienoic acid(9-HODE)(3))을 생산하는 것을 확인하였다. 보다 상세하게는, 리놀레산 12 mM의 농도로 반응시켰을 때 30분 만에 히드رو퍼옥시 지방산인 9-HpODE(2)로 80% 이상 전환된 것을 확인하였다. 또한 히드رو퍼옥시 지방산을 환원시킨 결과, 히드رو퍼옥시 지방산에서 히드록시 지방산(9-HODE)(3)으로 전환되는 것을 확인하였고, 최초 반응물인 리놀레산으로부터 89% 이상 전환되는 것을 확인하였다

[0090] 2-2. 리놀렌산 생물전환

[0091] 상기 실시예 2-1에서 제조된 대장균 기반 전세포 축매가 다른 불포화 지방산에도 적용될 수 있는지 알아보기 위하여, 리놀렌산(즉, (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoic acid)에 대해서도 리폭시게나아제의 이산화반응을 확인하였다. 리놀렌산의 화학구조는 리놀레산과 비교하여 탄소 골격의 이중결합 수가 1개 더 많은 것을 제외하고 리놀

레산과 동일하다. 따라서 리폭시게나아제에 의해 리놀레산과 동일한 위치인 9번 탄소 골격에 산소가 도입되어 9-히드로퍼옥시옥타데카트리에노익산(9-hydroperoxyoctadecatrienoic acid)으로 전환된다.

[0092] 구체적으로, 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-EsLOX)의 배양 및 리폭시게나아제의 발현은 실시예 2-1에 기술한 것과 동일한 방법으로 수행하였으며, 리놀렌산 10 mM을 첨가하여 생물전환 반응을 진행하였다. 리놀렌산을 이용한 생물전환 결과는 도 3에 나타내었다.

[0093] 도 3에 나타난 바와 같이, 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-EsLOX)을 이용하여 리놀렌산 10 mM을 생물전환하였을 때 20분 만에 리놀렌산은 모두 감소되고, 생성물인 9-히드로퍼옥시옥타데카트리에노익산으로 90% 이상 전환된 것을 확인하였다.

[0094] 상기 결과는 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-EsLOX)은 리놀레산뿐만 아니라 다른 불포화 지방산인 리놀렌산에 대해서도 재조합 대장균 기반 전세포 촉매의 생물전환 반응으로 이산화 반응이 적용될 수 있음을 의미한다.

[0096] 실시예 3. 대장균에서 EsLOX의 수용성 발현 향상을 위한 MBP-EsLOX 퓨전 효소 구축

[0097] 3-1. 재조합 플라스미드 및 대장균 기반 전세포 촉매 구축

[0098] 본 발명의 이산화 반응을 촉매하는 리폭시게나아제 유전자를 MBP(maltose binding protein)-코딩 서열을 포함하는 pB4 대장균 발현 벡터에 서브 클로닝 하여 벡터 pB4-EsLOX를 제작하였다. 벡터 pB4는 정제를 위한 N-말단의 his 태그를 포함하고 있으며, MBP(maltose binding protein)-코딩 서열(서열번호 11)을 포함하고 있다.

[0099] 구체적으로, 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 수행하여 리폭시게나아제 유전자를 증폭시켰다. 상기 벡터 pB4-EsLOX에 삽입하기 위한 리폭시게나아제 유전자는 프라이머 5'-GCGGTGGTGGCGCATGTCCAACATCCCA-3'(서열번호 9) 및 5'-GCCCTCAGATGTTGATGCTCAGATGTTGAT-3'(서열번호 10)로 증폭하였다. PCR을 통해 얻은 벡터 pB4-EsLOX에 삽입하기 위한 리폭시게나아제 유전자 서열은 서열번호 3으로 표시된다.

[0100] 증폭된 엔히그로미사 살리나(*Enhygromyxa salina*) 리폭시게나아제 DNA 절편은 PCR 정제 키트(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 벡터 pB4는 Sma I 제한효소를 이용하여 벡터를 잘랐다. 정제된 PCR 산물을 인-퓨전 클로닝 키트(In-Fusion HD Cloning Kit)(Takara, Tokyo, Japan)를 사용하여 제한효소로 절단된 벡터 pB4에 각각 삽입하여, 리폭시게나아제 유전자를 포함하는 벡터 pB4-EsLOX를 제작하였다.

[0101] 상기의 방법으로 제작된 발현 벡터 pB4-EsLOX를 대장균 BL21(DE3)star에 형질전환시켰다. 재조합 대장균은 각 100 µg/mL의 암피실린(Ampicillin)을 포함하는 LB 배지에서 자라게 하였다. SDS-PAGE 및 젤 어날라이저(Gel analyzer) 프로그램을 통해 MBP 퓨전 효소의 대장균 내 수용성 발현 정도 및 배지로의 분비량을 확인하였으며, 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0102] 도 4에 나타난 바와 같이, 71kDa의 EsLOX가 44kDa의 MBP가 퓨전되어 115kDa의 크기로 생산된 것을 확인하였다. 또한 분비량 분석 결과, EsLOX의 수용성 단백질이 약 2배 이상 증가했음을 확인했다.

[0104] 3-2. 리놀레산 농도에 따른 생물전환

[0105] 상기 실시예 3-1에서 제작된 재조합 대장균(*E. coli* pB4-EsLOX) 기반 전세포 생촉매를 이용한 리놀레산 이산화 반응을 위해서, 리폭시게나아제 유전자를 발현하는 재조합 대장균을 37 °C 및 테리픽 배지에서 배양하였다. IPTG로 유전자 발현을 유발한 후 18 °C에서 22시간 동안 배양 후 3.6 g/L의 대장균 건조 세포로 50 mM EPPS 버퍼에서 생물전환 반응을 진행하였다. 생물전환은 진탕 배양기(shaking incubator)안에 플라스크에서 200 rpm 및 20 °C의 조건으로 수행하였다. 구체적으로, 리놀레산(10mM)을 배양액에 첨가하여, 히드로퍼옥시 지방산(9-hydroperoxyoctadecadienoic acid(9-HpODE)(3))을 생산하였다. 그 후, 히드로퍼옥시 지방산을 환원시키기 위해, 환원제(TCEP)를 기질 농도(10 mM)의 2배 이상의 농도로 반응액에 첨가한 후 20분간 반응시켰다.

[0106] 전체 세포 활성의 단위인 유닛(U)은 20 °C에서 1.0g의 건조 세포를 사용하여 1분 동안 생성되는 히드로퍼옥시 지방산의 µmol로서 정의하였다. 리놀레산 농도(10, 100 mM)에 따른 생물전환 결과는 도 5 및 6에 나타내었다.

[0107] 도 5에 나타난 바와 같이, 재조합 대장균(*E. coli* pB4-EsLOX)은 리놀레산 10mM인 경우 히드로시 지방산(9-hydroxyoctadecadienoic acid(9-HODE)(3))을 생산하는 것을 확인하였다. 보다 상세하게는, 리놀레산 10mM의 농도로 반응시켰을 때 10분 만에 히드로퍼옥시 지방산인 9-HpODE(2)로 90% 이상 전환된 것을 확인하였다. 또한 히

드로퍼옥시 지방산을 환원시킨 결과, 히드로퍼옥시 지방산에서 히드록시 지방산(9-HODE)(3)으로 전환되는 것을 확인하였고, 최초 반응물인 리놀레산으로부터 91% 이상 전환되는 것을 확인하였다.

[0108] 도 6에 나타난 바와 같이, 재조합 대장균(*E. coli* pB4-EsLOX)은 리놀레산 농도가 100mM인 경우에도 히드록시 지방산(9-HODE)(3)을 생산하는 것을 확인하였다. 보다 상세하게는, 100 mM의 리놀레산으로 생물전환을 시작하였을 때 2시간 만에 79mM의 9-HpODE(2)로 전환되었으며, 200mM의 환원제(TCEP)를 첨가한 후 20분 만에 80mM의 9-HODE(3)를 얻었다(도 6). 최초 반응물인 리놀레산으로부터 80% 이상 전환되는 것을 확인하였다. 이 때 환원제를 처리하지 않아도 약 1 mM의 히드로퍼옥시 지방산이 히드록시 지방산으로 생물전환 세포 내에서 자체적으로 환원되는 것으로 확인되었다.

[0109] 재조합 대장균을 이용한 생물전환 반응의 초기 이산화 반응의 속도는 고농도의 리놀레산에서 약 665 $\mu\text{mol/g dry cells/min}$ (170U/g dry cells) 이상으로 나타났다.

[0110] 상기 결과는 MBP(maltose binding protein)을 엔히그로미사 살리나 유래의 리폭시게나아제에 퓨전 하여 타겟 효소의 수용성 발현 향상을 유도했고, 이는 효소의 반응속도의 향상을 초래했다. 즉, 재조합 대장균 기반 전세포 촉매가 고농도의 리놀레산에 대해서 이산화 반응이 665U/ g dry cells의 속도로 잘 진행되고, 이를 통해 리놀레산으로부터 9-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산 또는 9-히드록시옥타데카다이에노익산을 고농도로 생산할 수 있음을 의미한다.

[0111] 본 실시예에서 확인한 리놀레산 10, 100 mM을 이용한 재조합 대장균 기반 전세포 촉매 생물전환 결과는 표 2에 나타내었다. 생성물 농도 특히 기질 100 mM일 때 생성물 농도는 EsLOX를 발현하는 재조합 대장균(*E. coli* pET21a-EsLOX) 촉매에 비해 4배 이상 높은 수준이었다.

표 2

	기질 농도(mM)	초기 생물전환 속도(U/g dry cells) ¹	전환율(%) ²	생성물 농도(mM)
실시예 3-2	10	275	90	9.8
	100	665	79	79

[0114] 1 초기 생물전환 속도인 유닛(U)은 초기 생물전환 반응 10분 내에 20 °C에서 1.0g의 건조 세포를 사용하여 1분 동안 생성되는 히드로퍼옥시 지방산의 μmol 로 정의하였다.

[0115] 2 전환율은 첨가한 기질농도 대비 생성된 산물 농도를 기반으로 계산하였으며, 도 5,6의 생물전환 결과를 참고하였다.

[0117] 실시예 4. 재조합 대장균을 이용한 리놀레산으로부터 8S-hydroxy-(9E, 11Z)-heptadecadiene(8-HHD) 제조

[0118] 4-1. 재조합 플라스미드 및 대장균 기반 전세포 촉매 구축

[0119] 본 발명에서 리놀레산으로부터 신규물질인 이차 지방 알콜인 8-HHD를 제조하기 위해, 엔히그로미사 살리나 유래 리폭시게나아제 유전자; 및 광 의존성 탈탄산 반응을 촉매하는 클로렐라 베리어빌리스(*Chlorella variabilis*) 유래 탈탄산효소 유전자;를 공동 도입한 재조합 대장균을 구축하였다.

[0120] 구체적으로, 광탈 탄산 반응을 촉매하는 탈탄산효소인 Cv-FAP 유전자(서열번호 4)를 pET28a 벡터에 도입한 벡터 pET28a-Cv-FAP를 구축하였다. 대장균 BL21(DE3)에 상기 실시예 1-1에서 구축된 벡터 pACYC-EsLOX; 및 벡터 pET28a-Cv-FAP;을 형질전환시켰다. 구축된 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-EsLOX/pET28a-Cv-FAP)은 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 카나마이신(Kanamycin)과 30 $\mu\text{g/mL}$ 클로람페니콜(Chloramphenicol)을 포함하는 LB 배지에서 자라게 하였다.

[0122] 4-2. 리놀레산으로부터 8-HHD 제조

[0123] 상기 실시예 4-1에서 구축된 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-EsLOX/pET28a-CvFAP) 기반 전세포 생촉매를 이용한

리놀레산으로부터 8-HHD 제조를 위하여. 구체적으로, 구축된 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-EsLOX/pET28a-CvFAP)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 EPPs 버퍼에서 리놀레산 10 mM을 이용하여 히드로퍼옥시 지방산을 생산하였다. 그 후, 히드로퍼옥시 지방산을 환원시키기 위해, 환원제(TCEP)를 기질의 2배 이상의 농도(20 mM)로 반응액에 첨가한 후 20분간 반응시켰다. 그 후, 광 의존성 탈탄산 반응을 위해 450 nm 파장대의 푸른 LED 조명 하에서 전세포 촉매 반응을 진행하였다. 상기 생물전환 반응은 진탕 배양기(shaking incubator)안에 플라스크에서 200 rpm 및 30℃ 조건에서 진행하였으며, 탈탄산 반응은 히팅 맨틀에서 37℃로 진행하였다. 생물전환 결과는 도 7에 나타내었다.

[0124] 도 7에 나타낸 바와 같이, 재조합 대장균(*E. coli* pACYC-EsLOX/pET28a-CvFAP)은 8-HHD 생산의 첫 번째 단계에서 120분 만에 리놀레산이 9-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산(9-HpODE)(2)으로 80% 이상 전환된 것을 확인하였다. 이후 환원제를 첨가하여 환원시킨 결과(두 번째 단계), 9-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산(2)이 9mM의 9-히드록시옥타데카다이에노익산(3)으로 전환되는 것을 확인하였다. 광 의존성 탈탄산 반응 결과, 리놀레산 10 mM으로부터 이차 지방 알콜인 8-HHD(4)를 7.5mM로 얻었다. 즉, 리놀레산으로부터 8-HHD를 생산하는 데에 3시간 20분이 소요되었고, 전환율은 75% 임을 확인하였다.

[0126] 4-3. 반응산물 정제 및 NMR 분석

[0127] 상기 실시예 4-2 에서 제조한 시료의 성분을 확인하기 위하여 핵자기 공명 기기 분석을 하였다. 시료는 90% 이상의 고순도 추출을 위해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. NMR spectrum은 Bruker AVIII400 instrument를 이용하여 분석하였고, TMS(trimethylsilane)를 내부 표준(internal standard)으로 포함하는 CDC13와 DMSO에 녹여 측정하였다(1H at 400 MHz, 13C at 100 MHz)

[0128] 도 8은 실시예 4의 시료를 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피 정제 후 GC/MS로 순도를 분석한 결과이고, 도 9는 실시예 4의 시료 분석 시 얻어지는 NMR 데이터이다.

[0129] 도 8 및 9에 나타낸 바와 같이, 목적하는 8-히드록시헵타데센(8-HHD)이 합성됨을 알 수 있다. ¹H NMR 결과, ¹H NMR(500 MHz, DMSO-d₆) δ: 6.38-6.33(m, 1H), 5.93-5.89(m, 1H), 5.61-5.57(m, 1H), 5.34-5.29(m, 1H), 4.65-4.64(d, J = 4.58 Hz, 1H), 3.95-3.91(m, 1H), 2.11-2.06(m, 2H), 1.35-1.17(m, 18H), 0.83-0.80(m, 6H) 분석 되었다. 또한 ¹³C NMR 분석 결과, ¹³C NMR(125 MHz, DMSO-d₆) δ: 138.61(C7=C8-C9=C10), 131.40(C7=C8-C9=C10), 128.92(C7=C8-C9=C10), 124.28(C7=C8-C9=C10), 71.03(C-OH), 37.78, 31.87, 31.81, 29.65, 29.08, 27.59, 25.23, 22.68, 22.62, 14.48(CH₃)로 확인되어 생성물의 구조를 확인하였다.

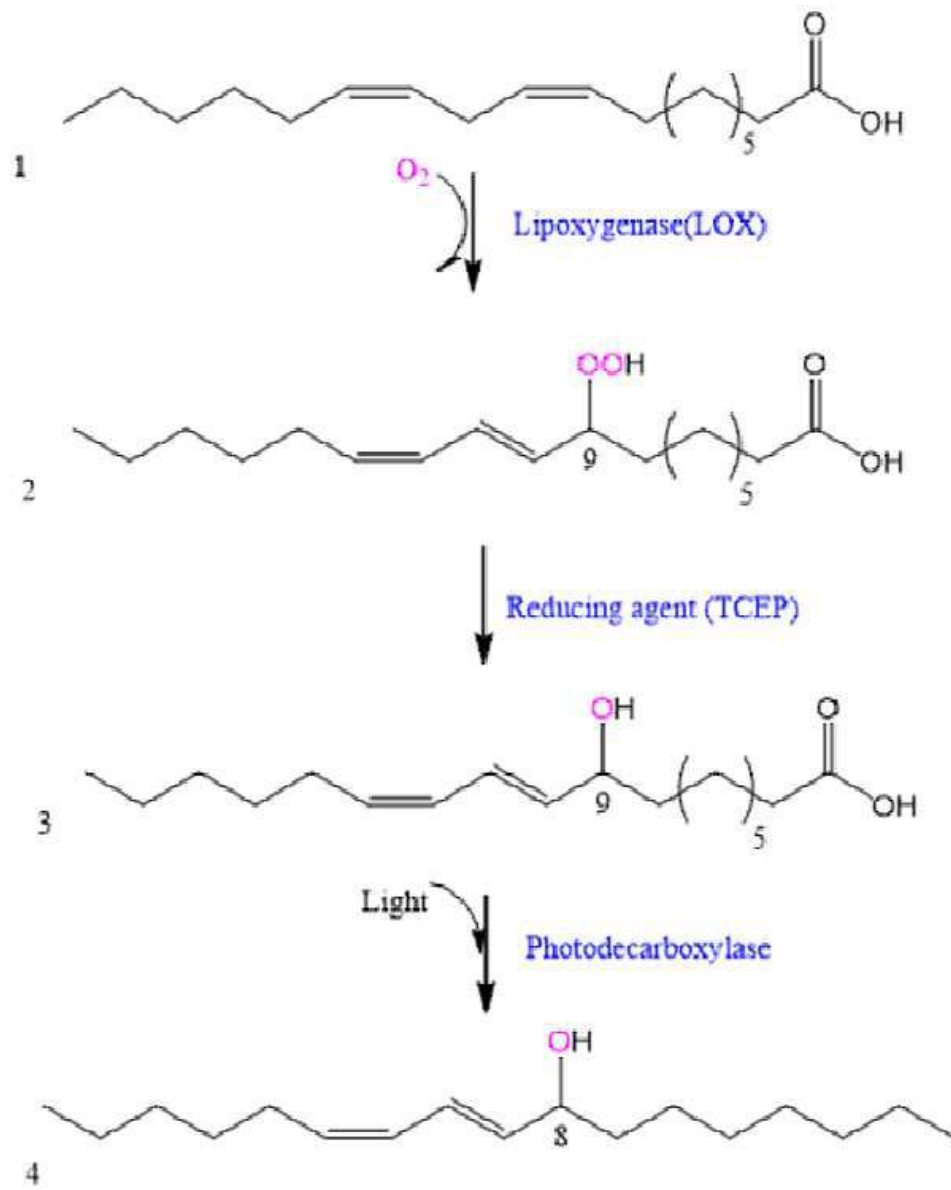
[0131] 따라서 상기 결과는 엔히그로미사 살리나 유래 이산화 반응을 촉매하는 리폭시게나아제 및 광 의존성 탈탄산 반응을 촉매하는 클로렐라 베리어빌리스 유래 탈탄산 효소를 공동발현하는 대장균 기반 전세포 촉매는 리놀레산으로부터 이차 지방알콜인 8-히드록시헵타데센(8-HHD)을 생산할 수 있음을 의미한다.

[0133] 종합적으로 본 발명자들은 엔히그로미사 살리나 유래 리폭시게나아제를 발굴 및 특성을 분석하고, 상기 효소를 포함하는 재조합 대장균을 구축하였다. 수용성 발현 향상을 위한 MBP-EsLOX 퓨전 효소를 구축하였고, 상기 효소를 대장균에 발현시켜 전세포 생촉매로 이용할 경우 리놀레산 등의 불포화 지방산으로부터 고농도의 히드록시 지방산을 빠른 속도로 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한 엔히그로미사 살리나 유래 리폭시게나아제 및 클로렐라 베리어빌리스 유래 탈탄산 효소를 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.

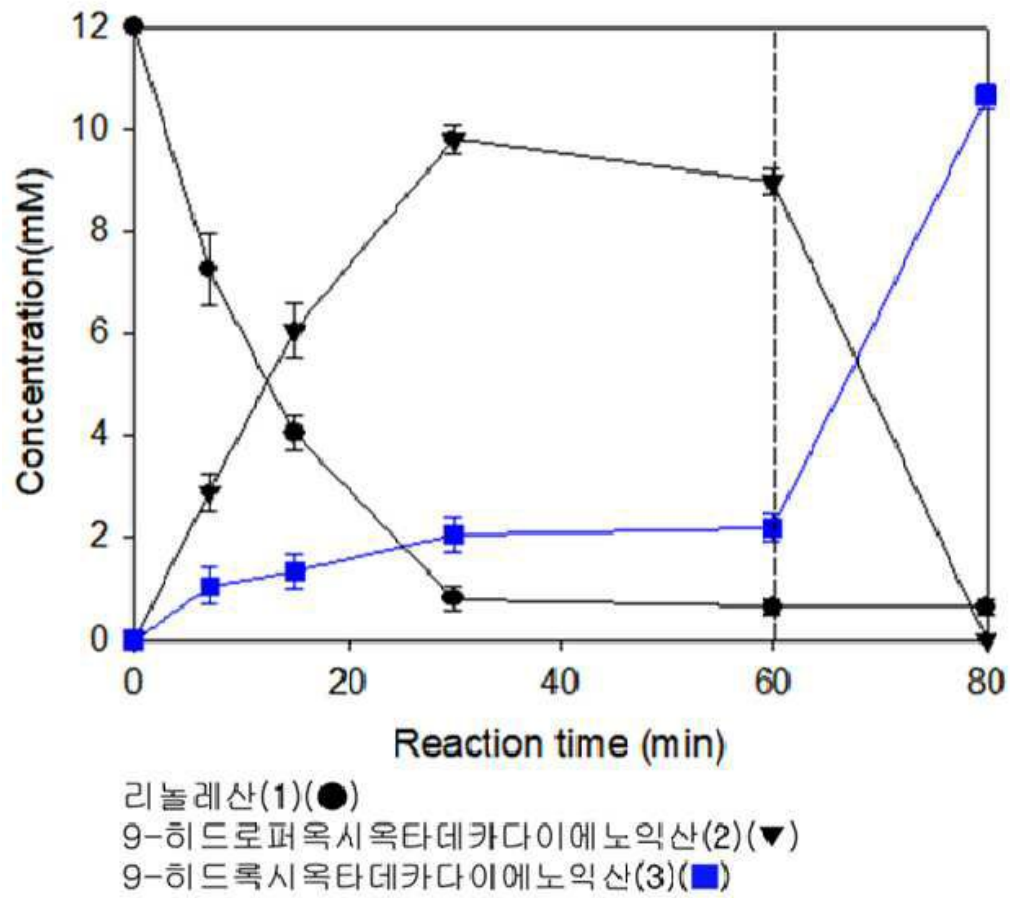
[0135] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

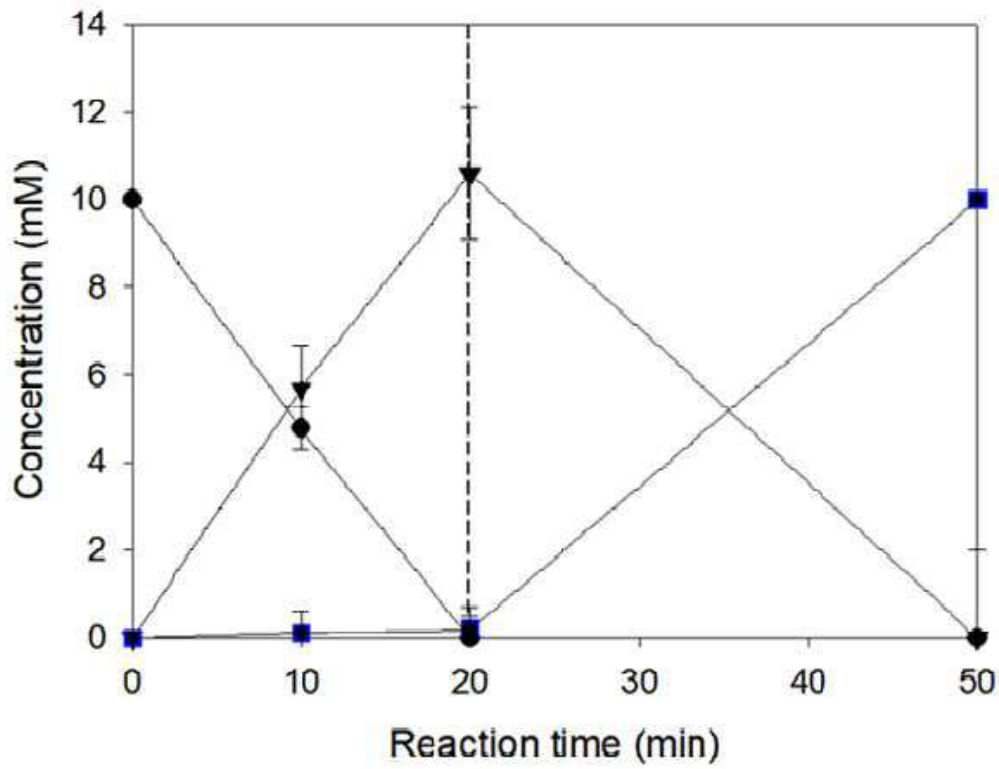
도면1



도면2



도면3

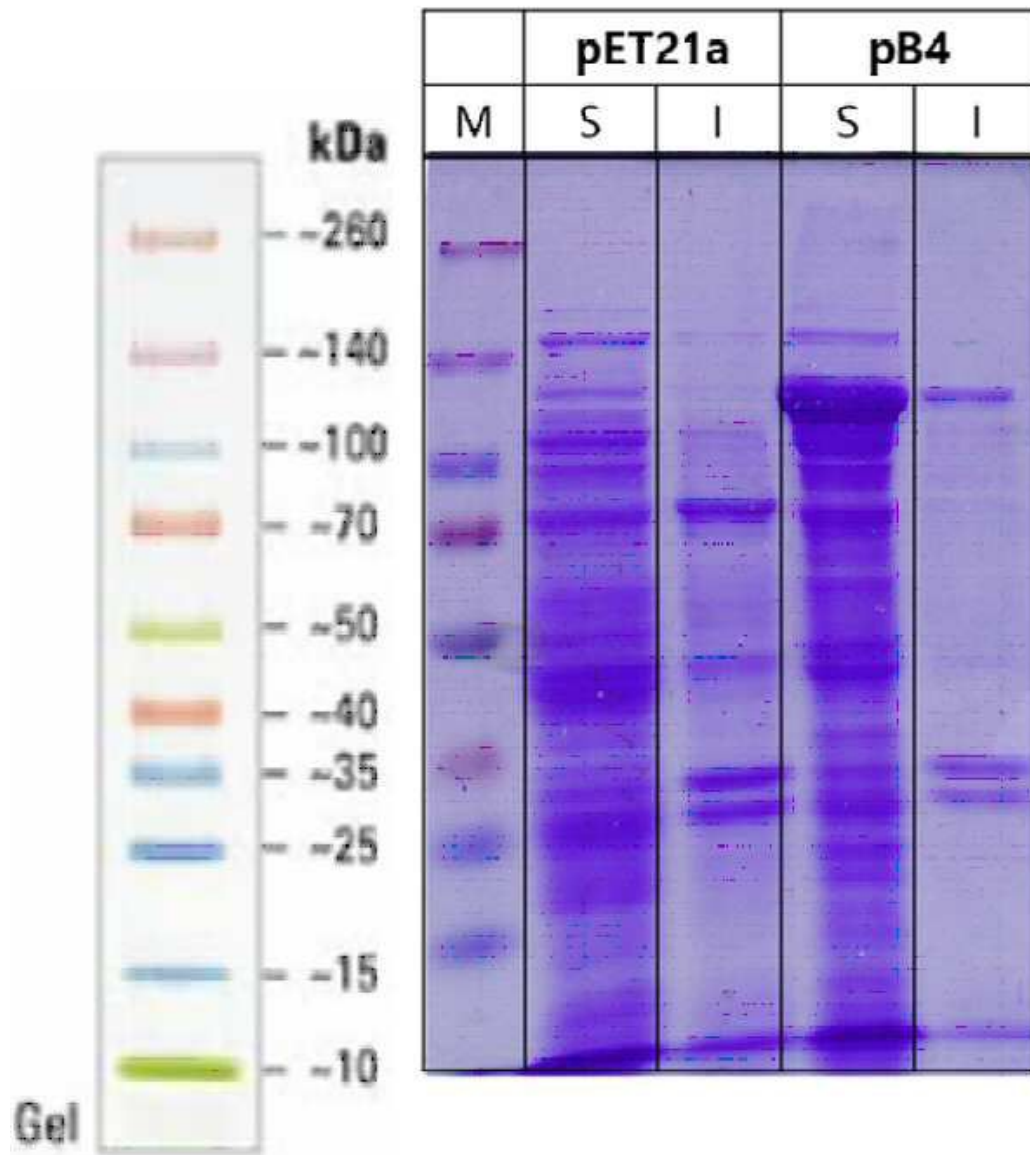


리놀렌산(●)

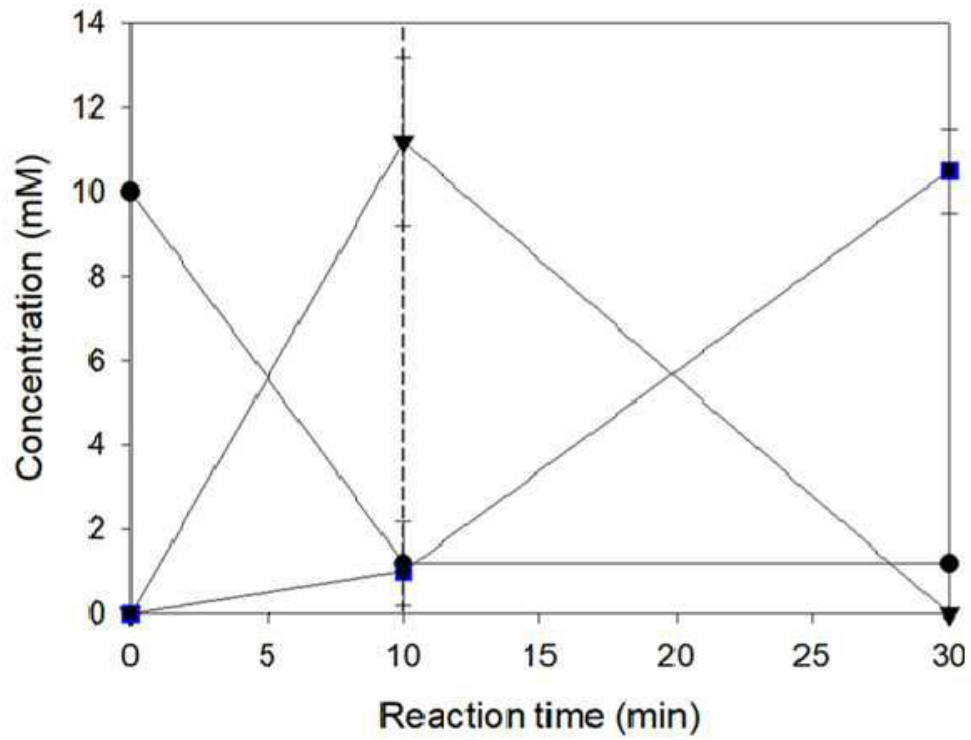
9-히드로퍼옥시옥타트리데세노익산(▼)

9-히드로옥시옥타트리데세노익산 (■)

도면4

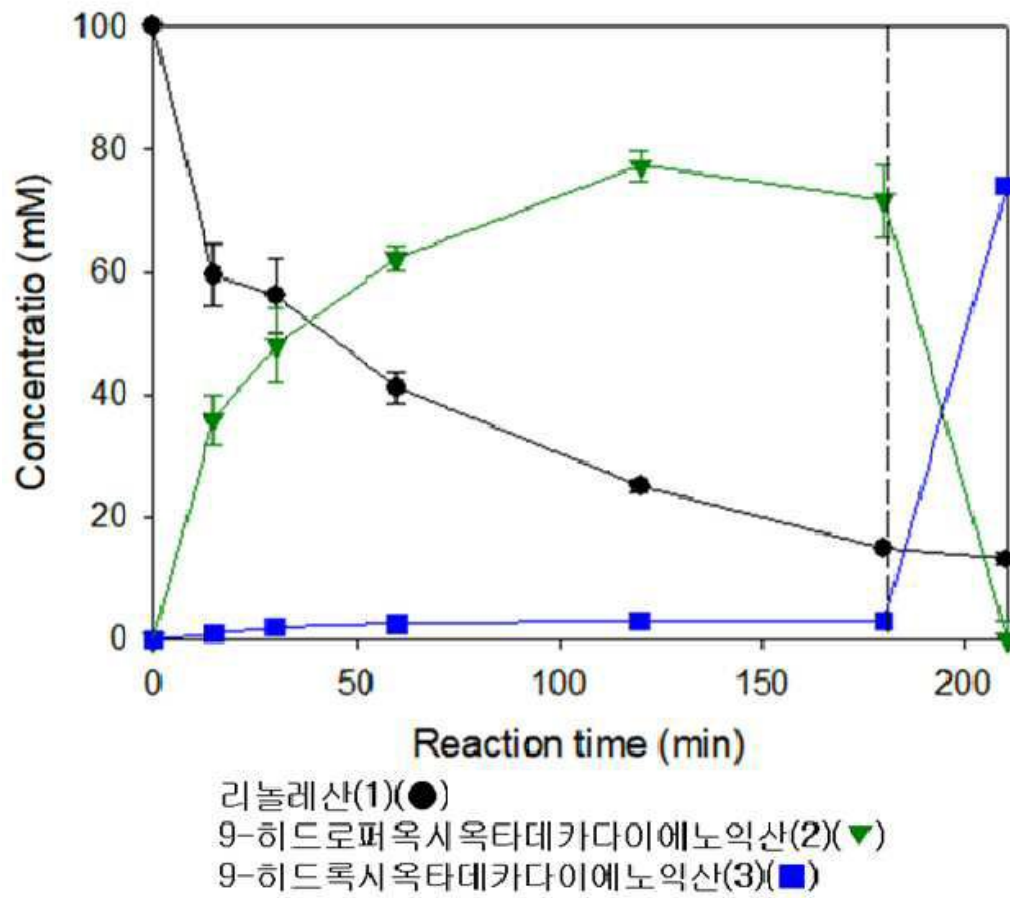


도면5

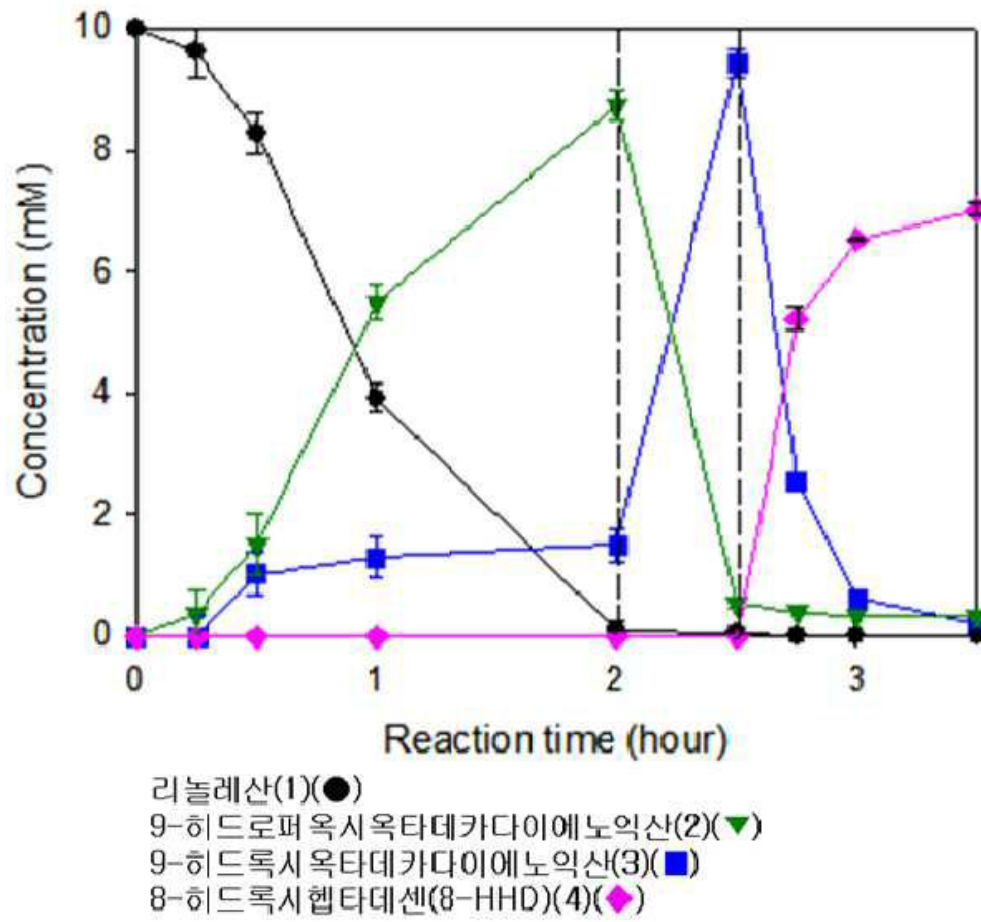


리놀레산(1)(●)
 9-히드로퍼옥시옥타데카다이에노익산(2)(▼)
 9-히드록시옥타데카다이에노익산(3)(■)

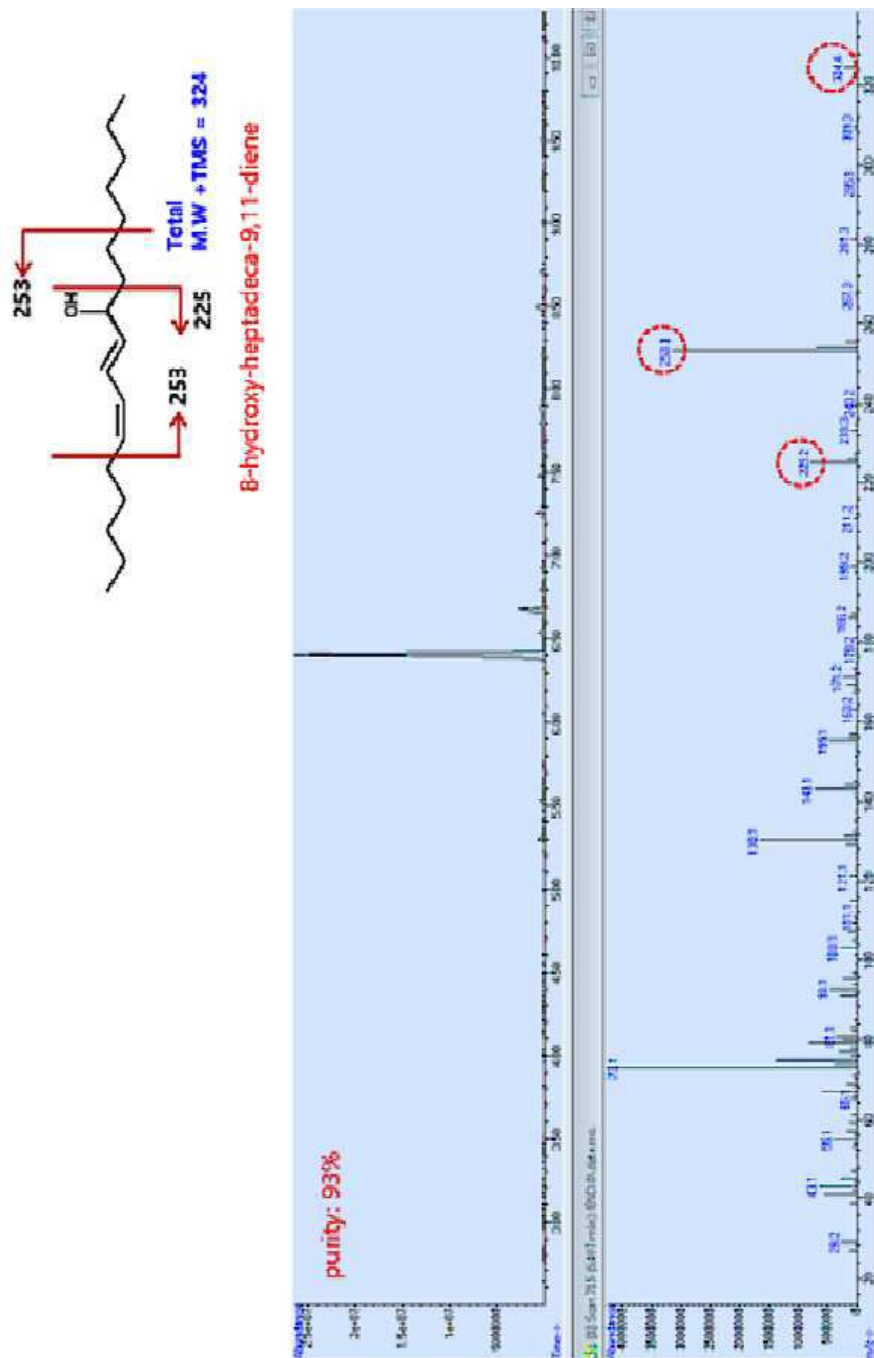
도면6



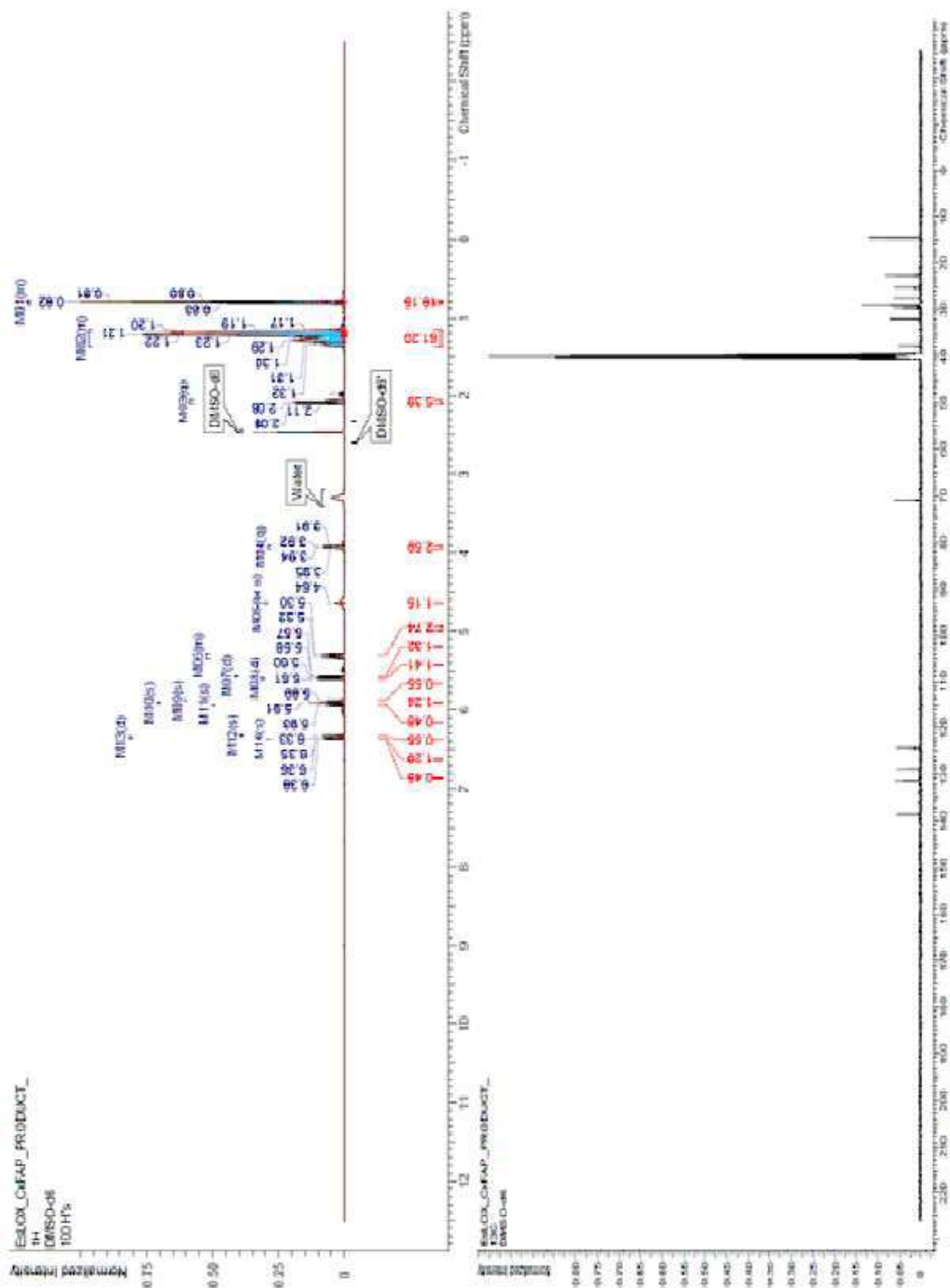
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록

- | | |
|-------|--|
| <110> | Ewha University - Industry Collaboration Foundation
Konkuk University Industrial Cooperation Corp |
| <120> | Enhygromyxa-derived lipoxygenase-based recombinant microorganism
and hydroxy fatty acid and secondary fatty alcohol production
method using the same |
| <130> | 1.111 |
| <160> | 11 |

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1953

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Enhygromyxa salina-derived lipoyxygenase_pET21a

<400> 1

atgtccaaca tccaacgct ccctcaaaat gatccccgcc ccgagcaacg agcccagcag 60

ctcgacaagg cccgggagac ctacaaatac gcggatctgc tgcccccgct ggcttctgt 120

gaggggggtcc ccaagcccga cagccaagc gcggcgtggc tggtcaccgt tggcaaggtc 180

gcggccgcgg tcgattgaa tgcagtgcgc aaccgccggg cctggaagcg cggcgatcac 240

gacgaggagg acgcatcggt cgatgtgggc ggcaccagcg aagaagacca gaacgaggcc 300

ggtcacaaca gcttcttggc gcggctcgag aacttcgatg aagaggcggt ctggttcgcc 360

ccgggcgacg agcccagcgt gctcgacgag gtcaacgagc gcgtcgccgc gatcttgggg 420

gccaagccca accgtcacgt gccgccggcc caagccgacg acgatgaaa cggcgacgac 480

ggcgacggcg acgagagctt cggcgtgctc gacggcaacg tgtccaagga cggccccaac 540

ggccgcccgc agagcatgga cgactacgcc aacttgtttc ggcgcatcac gctgccgccg 600

atgccagca cctggaagaa cgactcggcg ttgcgcgcct accgcgtggc cgggccaac 660

gccagcatga tccagcgat caccgagctg ccgcacaact tcgcggtcac cgacgccac 720

tacaacaag caatgggcga ggggtgactcg ctcgacgcgg ccaaggccga aggtcggttg 780

ttcttgccg actggaagct gatcggtag accctggtca acaacaccta caaggcgcc 840

cagaagaccg tgtacgcgc gctggccctg ttgcgggtcc cgccgggagg tggctcgctg 900

gcgccgtgg cgatccaacc aggccagacc ccaagcccaa cgaacaagat ctacgcgacc 960

caggatggca acgactggct cgcgccaag agcgccgtgc aggtcgcgga gggcaactat 1020

cacgagctcg tcagccacct cggcctgacc catctgtgc tcgagccgat cgtgatggcg 1080

acctatgcc agtcgcgca acaccacccc atctacatgc tgcgatccc ccaacttcgag 1140

ggcacgctgt cgatcaaaa cagcggggcg accaacctga tcgcccggg tggggccgtt 1200

gacctgatct tcgtggcac gatcgagtcc gagcaccagc tggccctggc cgccctgaag 1260

cgccacgact tcatgcgctc gggcctgccc gacacgatcg agcagcgagg cgtcgcgat 1320

accagcgtgc tgaccgacta cccctatcgc gacgacggcc tgaagatctg ggccaacatc 1380

gagcgtggg tcacggccta cgtcaacaac tactacatca gcaggccaa cgtcacccaa 1440

gacacagagc tgcaggcgtg ggccggccgtg ctcagcaagc ccttcgccga ggccggcgtg 1500
 tctgggtttg gcccgatcga caccggggcc gcgctgatct tcgctgcac gaaggtcatc 1560
 ttacaggcca gcgccagca ctcggccgtc aacttcccgc agaaggatct gatgtcctac 1620
 gcgcccgca tcaccggcgc gggctggacc gctgcgccgc cctcacaagg cccgctgaag 1680
 gacttcagc cgcgcctcga gctgcgccgag ctgcaggccg agttcctgta ttgctgggc 1740

ggcgtccacc acaccaagct gggcttctac aactccaaca gtttcccgtc ccgggcctgg 1800
 ttcaaggatc ccaagatcac gcgcgagctg ctgcccgcgt tccagcggga cctcgcggcc 1860
 agcgaagagc tgatcgtcgc ggccaacgcc accgcacgt tcaagtacac gtacatgatc 1920
 ccgtccacca ttccgatgag catcaacatc tga 1953

<210> 2
 <211> 1953
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Enhygromyxa salina-derived lipoygenase_pACYC
 <400> 2

atgtccaaca tccaacgct ccctcaaat gatccccgcc ccgagcaacg agcccagcag 60

ctcgacaagg cccgggagac ctacaatac gcggatctgc tgccccgcgt ggccttctgt 120
 gaggggttc ccaagcccga caccgaagc gcggcgtggc tggtcaccgt tggcaaggctc 180
 gcggcccgcg tcgattgaa tgacgtgcc aaccgccggg cctggaagcg cggcgatcac 240
 gacgaggagg acgcatcgtt cgatgtgggc ggcaccagcg aagaagacca gaacagggcc 300
 ggtcacaaca gtttcttggc gcggtcagc aacttcgatg aagaggcggt ctcttgcgc 360
 ccgggcgacg agcccagcgt gctcgacgag gtcaacgagc gcgtcgccgc gatcttgggg 420
 gccaaagcca accgtcacgt gccgccggcc caagccgacg acgatgacaa cggcgacgac 480

ggcgacggcg acgagagctt cggcgtgctc gacggcaacg tgtccaagga cggccccaac 540
 ggccgcccgc agagcatgga cgactacgcc aacttgtttc ggcgcatcac gctgccgccc 600
 atcgccagca cctggaagaa cgactcggcg ttgcggcct accgcgtggc cgggccaac 660
 gccagcatga tccagcgat caccgagctg cccgacaact tcgcggtcac cgacggccac 720
 tacaacaag caatgggcga ggggtgactc ctcgacgagg ccaaggccga aggtcggttg 780
 ttcttgccg actggaagct gatcggtgag accctggtca acaacaccta caaggcgcc 840
 cagaagaccg tgtacgcgc gctggccctg ttgcgggtcc cgccgggcgg tggtcgtg 900

gcgcccggtg cgatccaacc aggcagacc ccaagcccaa cgaacaagat ctacgcgacc 960

caggatggca acgactggct cgcgccaag agcgccgtgc aggtcgcgga gggcaactat 1020
cacgagctcg tcagccacct cggcctgacc catctgtctg tcgagccgat cgtgatggcg 1080
acctatcgcc agctcgcgca acaccacccc atctacatgc tgctgatccc ccacttcgag 1140
ggcacgctgt cgatcaacaa cagcgcgggcg accaacctga tcgccccggg tggggccgtt 1200
gacctgatct tcgtggcac gatcgagtcc gagcaccagc tggccctggc cgccctgaag 1260
cgccacgact tcattgcgtc gggcctgccc gacacgatcg agcagcgcg cgctcgcgat 1320

accagcgtgc tgaccgacta cccctatcgc gacgacggcc tgaagatctg ggccaacatc 1380
gagcgtggg tcacggccta cgtcaacaac tactacatca gcgaggccaa cgtcacccaa 1440
gacacagagc tgcaggcgtg ggcggccgtg ctgagcaagc ccttcgccga gggcggcgtg 1500
tctgggtttg gcccgatcga caccggggc gcgctgatct tcgctgcac gaaggtcatc 1560
ttcacggcca gcgccgagca ctgcgccgtc aacttcccgc agaaggatct gatgtcctac 1620
gcgcccgca tcaccggcgc gggctggacc gctgcgccgc cctcacaagg cccgctgaag 1680
gacttcagc cgccgtcga gctcgccgag ctgcaggccg agttcctgta ttgctgggc 1740

ggcgtccacc acaccaagct gggcttctac aactccaaca gtttccgta cgggccttg 1800
ttcaaggatc ccaagatcac cgccgagctg ctgcccgcgt tccagcgga ctcgcggcc 1860
agcgaagagc tgatcgtcgc ggccaacgcc acccgcacgt tcaagtacac gtacatgatc 1920
ccgtccacca ttccgatgag catcaacatc tga 1953

<210> 3
<211> 3150
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Enhygromyxa salina-derived lipoyxygenase_pB4
<400> 3

atgggcagca gcaatcatca tcatcatcac ggtacaaaa tcgaagaagg taaactgta 60

atctggatta acggcgataa aggctataac ggtctcgtg aagtcggtaa gaaattcgag 120
aaagataccg gaattaaagt caccgttgag catccgata aactggaaga gaaattccca 180
caggttgccg caactggcga tggccctgac attatcttct gggcacacga ccgctttggt 240
ggctacgctc aatctggcct gttggctgaa atcaccccg acaaagcgtt ccaggacaag 300
ctgtatccgt ttacctggga tgccgtacgt tacaacggca agctgattgc ttaccgatc 360
gctgttgaag cgttatcgt gatttataac aaagatctgc tgccgaaccc gccaaaaacc 420
tggaagaga tccggcgct ggataaagaa ctgaaagcga aaggtgaag cgcgctgatg 480

ttcaacctgc aagaaccgta cttcacctgg ccgctgattg ctgctgacgg gggttatgcg	540
ttcaagtatg aaaacggcaa gtacgacatt aaagacgtgg gcgtggataa cgctggcgcg	600
aaagcgggtc tgaccttcct ggttgacctg attaaaaaca aacacatgaa tgcagacacc	660
gattactcca tcgcagaagc tgcctttaat aaaggcgaag cagcgatgac catcaacggc	720
ccgtgggcat ggtccaacat cgacaccagc aaagtgaatt atggtgtaac ggtactgccg	780
accttcaagg gtcaaccatc caaacggttc gttggcgtgc tgagcgagg tattaacgcc	840
gccagtccga acaaagagct ggcaaaagag ttcttcgaaa actatctgct gactgatgaa	900
ggtctggaag cggttaataa agacaaaccg ctgggtgccg tagcgctgaa gtcttacgag	960
gaagagttag cgaagatcc acgtattgcc gccacatgg aaaacgcca gaaagtgaa	1020
atcatgccga acatcccga gatgtccgt ttttggtatg ccgtgcgtac tgcggtgatc	1080
aacgcgcca gcggtcgtca gactgtcgat gaagccctga aagacgcga gactgtacc	1140
gattacgata tcccagcgac cgaaaacctt tacttccagg gcggcggtgg tggcgcatg	1200
tccaacatcc caacgtccc tcaaatgat ccccgccccg agcaacgagc ccagcagtc	1260
gacaaggccc gggagaccta caaatacgcg gatctgtgc ccccgctggc cttctgtgag	1320
ggggtcccca agcccgacac gccaaagcgc gcgtggctgg tcaccgttgg caaggtcgcg	1380
gccgcggtcg cattgaatgc agtcgccaac cgccgggcct ggaagcgcg cgatcacgac	1440
gaggaggacg catcgttcca tgtggcggc accagcgaag aagaccagaa cgaggccggt	1500
cacaacagct tcttggcgcg gctcgagaac ttcgatgaag aggcggtctc gttcgccccg	1560
ggcgacgagc ccagcgtgct cgacgaggtc aacgagcgcg tcgcccgat cttgggggcc	1620
aagcccaacc gtcacgtgcc gccggcccaa gccgacgacg atgacaacgg cgacgacggc	1680
gacggcgacg agagcttcgg cgtgctcgac ggcaacgtgt ccaaggacgg cccaacggc	1740
cgcccgcaga gcatggacga ctacccaac ttgtttcggc gcatcacgt gccgccgatc	1800
gccagcacct ggaagaacga ctcggcgttc gcggcctacc gcgtggccgg gcccaacgcc	1860
agcatgatcc agcggatcac cgagctgccc gacaacttcg cggtcaccga cgccectac	1920
aaacaagcaa tggcgaggg tgactcgctc gacgcggcca aggcgaagg tcggttggtc	1980
ctggccgact ggaagctgat cggtagagacc ctggtcaaca acacctaaa gggcgcccag	2040
aagaccgtgt acgcgccgt gccctgttc gcggtcccgc cggcggttg ctcgtggcg	2100
cccgtggcga tccaaccagg ccagaccca agcccaacga acaagatcta cggaaccag	2160
gatggcaacg actggctcgc ggccaagagc gccgtgcagg tcgcggaggg caactatcac	2220
gagctcgta gccacctcg cctgacccat ctgctgctcg agccgatcgt gatggcgacc	2280
tatcgccagc tcgcgaaca ccacccatc tacatgctgc tgatcccca cttcgagggc	2340

acgctgtcga tcaacaacag cgcgccgacc aacctgatcg ccccggtgg ggccgttgac	2400
ctgatcttcg ctggcacgat cgagtcgag caccagctgg ccctggccgc cctgaagcgc	2460
cacgacttca tgcgctcggg cctgcccgc acgatcgagc agcgccgctg cggcgatacc	2520
agcgtgctga ccgactaccc ctatcgcgac gacggcctga agatctgggc caacatcgag	2580
cgctgggtca cggcctacgt caacaactac tacatcagcg aggccaacgt cacccaagac	2640
acagagctgc aggcgtgggc ggccgtgctc agcaagccct tcgccgaggg cggcgtgtct	2700
gggtttggcc cgatcgacac ccgggccgcg ctgatcttcg cgtgcacgaa ggtcatcttc	2760
acggccagcg ccgagcactc ggccgtcaac ttcccgcaga aggatctgat gtcctacgag	2820
cccgcgatca ccggcgccgg ctggaccgct gcgccgccct cacaaggccc gctgaaggac	2880
ttccagccgc cgctcgagct cgccgagctg caggccgagt tcctgtattt gctgggcggc	2940
gtccaccaca ccaagctggg cttctacaac tccaacagct tccgtaccg ggcctgggtc	3000
aaggatccca agatcacgc cgagctgctg cccgcgttcc agcgggacct cgcggccagc	3060
gaagagctga tcgtcgccgc caacgccacc cgcacgttca agtacacgta catgatcccg	3120
tccaccattc cgatgagcat caacatctga	3150
<210> 4	
<211> 2178	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Chlorella variabilis-derived decarboxylase	
<400> 4	
atgaaatctt ctcacatca ccatcacat ggttcttcta tgagcgataa aattattcac	60
ctgactgacg acagttttga cacggatgta ctcaaagcgg acggggcgat cctcgtcgat	120
ttctgggcag agtgggtcgg tccgtgcaaa atgatcgccc cgattctgga tgaaatcgct	180
gacgaatatc agggcaaaact gaccgttgca aaactgaaca tcgatcaaaa ccctggcact	240
gcgccgaaat atggcatccg tggatatccg actctgctgc tgttcaaaaa cggatgaagt	300
gcggcaacca aagtgggtgc actgtctaaa ggtcagttga aagagttcct cgacgtaac	360
ctggccggga tcgaggaaaa cctgtacttc caatccgctg ctgccgttga agacatccgt	420
aaagtcctgt ccgattcttc gtctccggtg gcgggtcaga aatatgacta catcctggtt	480
ggcgggtggca ccgcggcgctg cgtgctggca aaccgtctga gcgctgacgg ttccaaacgt	540
gtactgggtc tggaagcagg cccggataac acctcccgcg acgttaagat tccggcggcg	600
atcacccgcc tgttccgctc cccgtggac tggaacctgt tctctgaact gcaggaaacag	660

cttgcggaac gtcagatcta catggcgcgt ggccgtctgc tgggcggttc cagcgcgact 720
aacgccactc tgiaccaccg tggctcggcg ggtgattacg acgcatgggg tgttgaaggc 780
tggtcacgag aagacgttct gtcttgggtc gtccaggcgg aaaccaacgc ggacttcggt 840
ccgggcgctt atcatggcag cggcggcccg atgcgtgtgg aaaaccgcg ttacaccaac 900
aaacagctgc aactgcttt cttcaaggct gctgaagaag ttggtcttac ccggaactcc 960

gatttcaacg attggagcca tgaccacgcc ggttacggca cctttcaggt gatgcaggat 1020
aaaggcaccg gcgcggatat gtaccgtcag tatctgaaac ctgtgctggg tcgtcgcaac 1080
ctgcaggtag tgaccggcgc tgcagtacc aaagtcaaca tcgaccaggc tgcgggcaaa 1140
gcgcaggctc tgggtgttga attctccacc gacggcccaa ccggcgaacg cctgtctgcg 1200
gaactggctc cgggtgttga ggtcatcatg tgcgcagggt ctgttcacac cccgttctg 1260
ctgaaacatt ccggcgttgg cccgtctgct gagctgaaag aattcggcat cccggttgtt 1320
agcaacctgg ctggtgttgg ccagaacctg caggatcagc cggcgtgcct gaccgcggct 1380

ccggttaaag aaaaatacga cggattgcc atttctgac acatctaca cgaaaaaggc 1440
cagatccgta aacgtgcaat cgcacacctc ctgctgggtg gtcgtggcgg tctgacttcc 1500
accggttgcg atcgcgggtc cttcgttctg accgcgggtc aggcgtgcc ggacctgcag 1560
gttcgcttcg ttccaggtag ggcgtggac ccggacgggt ttagcaccta cgttcgtttt 1620
gctaaattcc agagccaggg tctgaaatgg ccgagcggca tcaccatgca gctgatcgt 1680
tgccgtccgc agtctaccgg ctccgtcggg cttaaatccg ctgacccgtt tgcgcgcccg 1740
aaactgtcac caggttacct gaccgacaaa gacggtgctg atctggctac cctgcgtaaa 1800

ggcatccatt gggcacgtga tgttcgcgt agctctgctc tgtccgaata cctggatggt 1860
gagctgttcc caggtagcgg cgttgtttct gatgatcaga tcgatgaata tatccgtcgt 1920
tctatccact cgtccaacgc tatcactggc acctgtaaaa tgggtaacgc aggtgacagc 1980
agctctgttg tagacaacca gctgcgtgtt cacggtgttg aaggcctgcg cgttgttgac 2040
gctagcgttg ttccgaaat tccgggtggt cagaccggtg cgccggtagt tatgatcgt 2100
gaacgcgcag cagctctgct gacggggaag gcaaccattg gtgcatctgc tgctgcaccg 2160
gcgaccgtag ctgcataa 2178

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET21a-EsLOX forward primer

<400>	5	
cggc gatggc catgcatcac catcatcacc ac		32
<210>	6	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pET21a-EsLOX reverse primer	
<400>	6	
gctcgtgggtt atagactttc gaacgccggc g		31
<210>	7	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pACYC-EsLOX forward primer	
<400>	7	
ggagatatac catggatgaa atacctgctg cc		32
<210>	8	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pACYC-EsLOX reverse primer	
<400>	8	
cggccgcaag ctttcagatg ttgatg		26
<210>	9	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pB4-EsLOX forward primer	
<400>	9	
gcggtggtgg cggcatgtcc aacatcccaa		30
<210>	10	
<211>	30	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> pB4-EsLOX reverse primer

<400> 10

gccctcagat gttgatgctc agatgttgat 30

<210> 11

<211> 1098

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MBP(maltose binding protein)

<400> 11

aaaatcgaag aaggtaaact ggtaatctgg attaacggcg ataaaggcta taacggctctc 60

gctgaagtcg gtaagaaatt cgagaaagat accggaatta aagtcaccgt tgagcatccg 120

gataaactgg aagagaaatt cccacaggtt gcggcaactg gcgatggccc tgacattatc 180

ttctgggcac acgaccgctt tgggtggctac gctcaatctg gcctgttggc tgaaatcacc 240

ccggacaaag cgttccagga caagctgtat ccgtttacct gggatgccgt acgttacaac 300

ggcaagctga ttgcttacc gatcgtgtt gaagcgttat cgctgattta taacaaagat 360

ctgctgccga acccgccaaa aacctgggaa gagatcccg gcctggataa agaactgaaa 420

gcgaaaggta agagcgcgt gatgttcaac ctgcaagaac cgtacttcac ctggccgctg 480

attgctgctg acgggggtta tgcgttcaag tatgaaaacg gcaagtacga cattaaagac 540

gtgggcgtgg ataacgctgg cgcgaaagcg ggtctgacct tcctggttga cctgattaaa 600

aacaaacaca tgaatgcaga caccgattac tccatcgcag aagctgcctt taataaaggc 660

gaaacagcga tgaccatcaa cggcccgtgg gcatggtcca acatcgacac cagcaaagtg 720

aattatggtg taacggtact gccgacctt aagggtcaac catccaaacc gttcgttggc 780

gtgctgagcg caggtattaa cgccgccagt ccgaacaaag agctggcaaa agagttcctc 840

gaaaactatc tgctgactga tgaaggtctg gaagcggtta ataaagacaa accgctgggt 900

gccgtagcgc tgaagtctta cgaggaagag ttggcgaaag atccacgtat tgccgccacc 960

atggaaaacg cccgaaaagg tgaaatcatg ccgaacatcc cgcagatgtc cgctttcttg 1020

tatgccgtgc gtactgcggt gatcaacgcc gccagcggtc gtcagactgt cgatgaagcc 1080

ctgaaagacg cgcagact 1098