



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0141401

(43) 공개일자 2015년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

C12P 23/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0070076

(22) 출원일자 2014년06월10일

심사청구일자 2014년06월10일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김진우

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 108동 1005호
(평거동, 들말대경아파트)

최옥희

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 108동 1005호
(들말대경아파트)

이용상

경상남도 창원시 마산합포구 자산북3길 23, 903호
(자산동, 영승아파트)

(74) 대리인

한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식

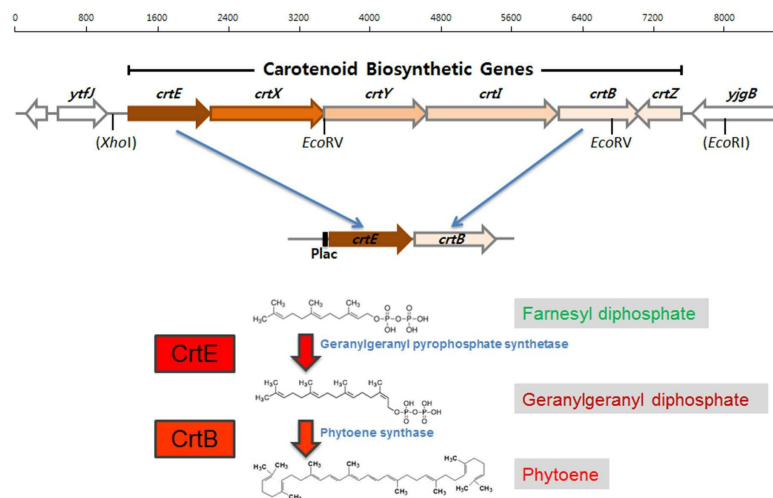
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **파이토엔의 고효율 생산 방법**

(57) 요약

본 발명은 카로테노이드 생합성을 위해 유전자 발현율이 높은 프로모터를 사용하여 종래의 생산 방법 보다 고효율로 카로테노이드를 생산할 수 있는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008144

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 벼이삭 세균의 병원 유전체 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

프로모터에 작동가능하게 연결된 파이토엔 생합성 유전자를 포함하는 파이토엔 생산용 유전자 컨스트럭트에 있어서, 상기 파이토엔 생합성 유전자는 상기 판토에아 아나나티스 PA13 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 합성효소(CrtE)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 파이토엔 합성효소(CrtB)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되고, 상기 폴리뉴클레오티드들 사이에는 리보솜 결합부위가 존재하나 제한효소 인식부위는 존재하지 않는, 파이토엔 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프로모터는 lac 프로모터, tac 프로모터, P_{BAD} 프로모터 또는 trc 프로모터인, 파이토엔 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CrtE를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1로 기재되는 핵산서열을 갖는, 파이토엔 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CrtB를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 기재되는 핵산서열을 갖는, 파이토엔 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 유전자 컨스트럭트는 서열번호 9로 기재되는 핵산서열을 갖는, 파이토엔 생산용 유전자 컨스트럭트.

청구항 6

제5항의 유전자 컨스트럭트로 파이토엔 미생산 숙주세포를 형질전환시켜 제조된, 파이토엔 생성 비인간 형질전환체.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 파이토엔 미생산 숙주세포는 그람양성 또는 그람음성 세균인, 파이토엔 생성 비인간 형질전환체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 그람음성 세균은 대장균 또는 슈도모나스인 파이토엔 생성 비인간 형질전환체.

청구항 9

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항의 비인간 형질전환체를 배양하는 배양단계; 배양된 상기 비인간 형질전환체로부터 파이토엔을 회수하는 파이토엔 회수단계를 포함하는, 파이토엔의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 화합물의 생산 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 파이토엔의 고효율 생산 방법 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 카로테노이드(Carotenoid)는 항산화 활성을 가지고 있는 C-40 이소프레노이드 화합물(isoprenoid compounds)로서, 자연계에 널리 분포되어 있는 한 군의 색소의 총칭을 말한다. β -카로틴(β -carotene; 당근의 주황색 색소), 라이코펜(lycopene; 토마토의 적색 색소) 및 푸코잔틴(fucoanthin; 해조류의 황갈색 또는 갈색 색소)을 비롯한 현재까지 알려진 카로테노이드는 6백여 종에 이르며, 이들은 각각 다른 형태로 존재한다. 파이토엔(phytoene)도 무색의 카로테노이드의 일종으로 피부 미백에 효과적인 성분으로 알려져 있는데 식이 파이토엔은 인간에 피부에 축적되어 여러 가지 메카니즘에 의해 피부를 보호 할 수 있다. 예를 들어 자외선 흡수제, 산화 방지제 및 소염제 등으로 사용되어 자외선을 차단해주고 피부보호 효과가 탁월한 것으로 알려져 있다.

[0003] 최근 카로테노이드 생합성에 관여하는 효소들을 코딩하는 유전자들에 대해 많은 연구가 진행되었고 여러 생산 방법이 도입이 되었으나 종래의 생산 방법은 수율이 저조하여 산업적으로 이용하는데 제한적이다. 대한민국 등록특허 제0813284호는 감귤의 파이토엔 생합성 효소(phytoene synthase, PSY) 유전자를 이용하여 카로테노이드를 생성하는 형질전환 유채(*Brassica napus*) 식물체를 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 그러나, 종래에 파이토엔만을 유전자 재조합을 이용하여 대장균 등 미생물을 통해 생산하는 방법은 존재하지 않았다. 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 파이토엔 생합성을 위해 유전자 발현율이 높은 프로모터를 사용하여 종래의 생산 방법 보다 고효율로 파이토엔을 생산할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, 프로모터에 작동가능하게 연결된 파이토엔 생합성 유전자를 포함하는 파이토엔 생산용 유전자 컨스트럭트에 있어서, 상기 파이토엔 생합성 유전자는 상기 판토에아 아나나티스 PA13 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 합성효소(CrtE)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 파이토엔 합성효소(CrtB)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되고, 상기 폴리뉴클레오티드들 사이에는 리보솜 결합부위가 존재하나 제한효소 인식부위는 존재하지 않는, 파이토엔 생산용 유전자 컨스트럭트가 제공된다.

[0006] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 유전자 컨스트럭트로 파이토엔 미생물 숙주세포를 형질전환시켜 제조된 파이토엔 생성 비인간 형질전환체가 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 비인간 형질전환체를 배양하는 배양단계; 배양된 상기 비인간 형질전환체로부터 파이토엔을 회수하는 파이토엔 회수단계를 포함하는 파이토엔의 생산방법이 제공된다.

발명의 효과

[0008] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 파이토엔 생합성에 있어서 유전자 발현율이 높은 프로모터를 사용하여 생산 수율을 극대화하는 효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 *Pantoea ananatis* PA13 균주의 파이토엔 생합성 유전자 재조합과 생합성 경로 모델을 나타내는 개요도이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에서 사용된 클로닝 벡터 pBBR1MCS-5의 벡터맵(A)과 상기 pBBR1MCS-5 벡터에 파이토엔 생합성 유전자를 클로닝한 재조합 플라스미드 벡터 pYS71 벡터맵(B)을 나타낸 그림이다.

도 3은 벡터 pYS71에 형질전환된 *crtE* 및 *crtB*의 유전자 지도와 RT-PCR 결과결과를 나타낸 겔 사진이다.

도 4는 HPLC 분석을 수행하여 파이토엔의 생산을 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

용어의 정의:

이하, 본 문서에서 사용되는 용어를 정의한다.

본 문서에서 사용되는 "파이토엔(Phytoene)"은 파이토엔은 카로테노이드의 생합성에서 40개의 탄소로 구성된 중간물질이다. 파이토엔의 합성은 식물의 카로테노이드 합성에서 첫 개입단계이다. 파이토엔은 파이토엔 합성효소의 작용에 의해 제라닐제라닐 피로포스페이트(GGPP)의 두 개의 분자로부터 생산된다. 상기 두 개의 GGPP 분자는 이인산염 제거로 인해 함께 농축되고 양성자는 파이토엔의 형성을 위해서 이동한다.

발명의 상세한 설명:

본 발명의 일 관점에 따르면, 프로모터에 작동가능하게 연결된 파이토엔 생합성 유전자를 포함하는 파이토엔 생산용 유전자 컨스트럭트에 있어서, 상기 파이토엔생합성 유전자는 상기 판토에아 아나나티스 PA13 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 합성효소(CrtE)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 파이토엔 합성효소(CrtB)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되고, 상기 폴리뉴클레오티드들 사이에는 리보솜 결합부위가 존재하나 제한효소 인식부위는 존재하지 않는, 파이토엔 생산용 유전자 컨스트럭트가 제공된다.

상기 유전자 컨스트럭트에 있어서, 상기 프로모터는 lac 프로모터, tac 그로모터, P_{BAD} 프로모터, 또는 trc 프로모터일 수 있다.

상기 유전자 컨스트럭트에 있어서, 상기 CrtE를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1로 기재되는 핵산서열을 가질 수 있고, 상기 CrtB를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 기재되는 핵산서열을 가질 수 있다.

유전자 *crtE* 및 *crtB*는 특히 파이토엔을 생산하는 미생물 또는 식물 내에 존재하기 때문에 그러한 생물체의 게놈 DNA를 주형으로 하고 해당 유전자별로 그 유전자의 양 말단에 상보적인 염기서열을 갖는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행함으로써 획득할 수 있다. 물론, 각 유전자별로 공지된 서열을 기반으로 하여 DNA 합성기 등을 이용하여 화학적으로 합성할 수도 있다.

상기 파이토엔 생합성 유전자 컨스트럭트는 서열번호 9로 기재되는 핵산서열을 가질 수 있다.

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 유전자 컨스트럭트로 파이토엔 미생물 숙주세포를 형질전환시켜 제조된 파이토엔 생성 비인간 형질전환체가 제공된다.

상기 파이토엔 미생물 숙주세포는 그람양성 또는 그람음성 세균일 수 있고, 상기 그람음성 세균은 대장균 또는 슈도모나스일 수 있다.

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 비인간 형질전환체를 배양하는 배양단계; 배양된 상기 비인간 형질전환체로부터 파이토엔을 회수하는 파이토엔 회수단계를 포함하는 파이토엔의 생산방법이 제공된다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

일반적 방법

Pantoea ananatis PA13 균주의 파이토엔 생합성 유전자

본 발명의 파이토엔 생합성에 관여하는 효소들을 코딩하는 유전자는 제라닐제라닐 피로포스페이트 합성효소(CrtE)를 암호화하는 유전자(*crtE*, 서열번호 1) 및 파이토엔 합성효소(CrtB)를 암호화하는 유전자(*crtB*, 서열번호 2)로, 상기 CrtE는 파네실 디포스페이트(Farnesyl diphosphate)를 제라닐제라닐 피로포스페이트

(Geranylgeranyl diphosphate)로 전환하는데 관여하는 효소이며, CrtB는 상기 제라닐제라닐 디포스페이트를 파이토엔(phytoene)으로 전환하는데 관여하는 효소이다. CrtE와 CrtB는 상기 파네실 디포스페이트를 기질로 하여 각각 제라닐제라닐 파이로포스페이트와 파이토엔과 같은 카로테노이드를 형성하기 때문에 파이토엔을 생합성하기 위해서는 본 발명의 *crtE*와 *crtB* 유전자를 반드시 포함하여야 한다. 상기 유전자는 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) PA13 균주로부터 유래된 것이다(도 1). 파이토엔을 합성하는데 관여하는 효소들을 코딩하는 유전자들은 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

유전자	효소명	유전자 서열 (GenBank 등록번호-유전자번호)
<i>crtE</i>	판토에아 아나나티스(<i>Pantoea ananatis</i>) PA13 유래의 제라닐제라닐 파이로포스페이트 합성효소(geranylgeranyl pyrophosphate synthetase)	서열번호 1 (CP003086.1-PAGR_p225)
<i>crtB</i>	<i>Pantoea ananatis</i> PA13 유래의 파이토엔 합성효소(phytoene synthase)	서열번호 2 (CP003086.1-PAGR_p230)

실시예 1: 형질전환 벡터 제작

본 발명자들은 카로테노이드 성분인 파이토엔(phytoene) 생합성에 관여하는 효소들을 코딩하는 유전자와 대장균을 이용하여 파이토엔 생산을 위한 형질전환 벡터를 제작하였다.

구체적으로, DNA 증폭을 위해 909-bp 크기의 *crtE* 유전자를 *Pantoea ananatis* PA13균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여 프라이머 CAR1, CAR2 및 Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase(New England Biolabs)를 사용하여 PCR 증폭하였다. 프라이머 CAR1에는 제한효소 *XhoI* 인식부위와 *lac* 프로모터를 순서대로 두었으며 동일한 방법으로 930-bp 크기의 *crtB* 유전자를 프라이머 CAR3와 CAR4를 사용하여 PCR 증폭하였다. 특히, 프라이머 CAR2와 CAR3에는 27 bp의 서로 상보적 상동성을 갖는 염기서열을 두어 상보적 상동성 부위를 가지면서 중첩되도록 제작하였다. PCR 증폭된 *crtE* 및 *crtB* 유전자는 전기영동 후 아가로스 겔로부터 분리 정제하였고 두 번째 PCR 증폭을 위해 사용하였는데, 이때, 프라이머와 주형 DNA를 따로 첨가하지 않고 PCR 증폭된 *crtE* 및 *crtB* 유전자 PCR 생산물을 사용하여 두 번째 PCR을 시행하였다.

그 결과, 수득된 PCR 반응산물의 크기는 1833 bp로, splicing overlap extension(SOE) 절편에 해당한다(Kim *et al.*, *PLOS ONE* 8(2): e56682, 2013). 이후 SOE 절편은 전기영동 후 아가로스 겔로부터 순수 정제한 다음 pGEM-T Easy(Promega) 벡터에 클로닝하였다. 제한효소 *XhoI*과 *SacI*(pGEM-T Easy의 MCS부분에 존재)을 이용하여 절단 후, DNA 정제하였고 동일한 제한효소로 절단된 클로닝 벡터 pBBR1MCS-5에 삽입함으로써 재조합 플라스미드 벡터를 제조하였으며, 이를 pYS71으로 명명하였다. 상기 재조합 플라스미드 벡터 pYS71을 대장균 DH5 α 에 형질 전환하였으며 클로닝된 벡터로부터 *lac* 프로모터 부분을 포함하여 유전자 배열순서는 *crtE*, *crtB* 순이다(도 2). 대장균 균주로는 SURE, XL1-Blue, Top10, BL21(DE3), DH5 α 및 DH10B 등이 이용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 유전자 클로닝에 사용된 프라이머 서열을 하기 표 2에 표시하였다.

표 2

유전자	프라이머	핵산서열	서열 번호
<i>crtE</i>	CAR1	5'-GGCCTCGAGCTGAAACAGGAAACAGCTATGACGGTCTGCGCAAAA??3'	3
	CAR2	5'-ATCAGATCCTCCAGCATCAAACCTGCTTTAACTGACGGCAGCGAGTTT??3'	4
<i>crtB</i>	CAR3	5'-AGCAGGTTTGATGCTGGAGGATCTGATATGAATAATCCGTCGTTACTC??3'	5
	CAR4	5'-GTAGTCGCTCTTTAACGATGAGTCGTCATTCAGAGCGGGCGCTGCCAGAG??3'	6

※상기 표 2에 나타난 밑줄은 상보적 상동성을 갖는 27 bp의 overlap되는 부위이고 굵은 글씨체는 *XhoI* 제한효소 인식부위를 나타낸다.

실시예 2: RT-PCR(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

본 발명의 일 실시예에 따른 파이토엔 생합성 유전자를 클로닝한 재조합 플라스미드의 *crtE-crtB* 유전자의 하나의 오페론(operon) 구성여부와 올바른 전사(transcription) 과정을 확인하기 위해 RT-PCR 검정을 실시하였다.

[0035] 구체적으로, 플라스미드 pYS71로 형질전환된 대장균으로부터 mRNA를 순수 분리하였고 mRNA를 주형으로 하여 *crtE-crtB*에 상응하는 cDNA(complementary DNA) RT1을 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다. PCR 증폭을 위한 주형으로는, 재조합 플라스미드 pYS71, 전체 RNA 및 cDNA (RT1)을 각각 사용하였고 257-bp 크기의 PCR1 증폭 산물을 프라이머 PCR1-F와 PCR4-R을 사용하여 PCR 증폭을 시행하였다.

[0036] 그 결과, PCR 증폭산물 PCR1은 재조합 플라스미드 pYS71과 cDNA(RT1)를 주형으로 하였을 때만 증폭산물이 생성되었지만, 전체 RNA를 주형으로 사용한 PCR 증폭 반응에서는 생성되지 않았다. 따라서, 파이토엔을 생합성하기 위해 재조합한 재조합 플라스미드 pYS71의 2개 유전자 *crtE-crtB*는 하나의 오페론으로 존재하며, 하나의 mRNA로 전사가 이루어짐을 알 수 있었다(도 3). 상기 RT-PCR에 사용된 프라이머 서열을 하기 표 3에 표시하였다.

표 3

유전자	프라이머	핵산서열	서열번호
PCR1(257 bp)	PCR1-F	5'-ATCTTCATCTTGCCAGTGAG??3'	7
	PCR4-R	5'-AATAACATCGTCACAATGGC??3'	8

[0038] 실시예 3: 대장균 배양 및 파이토엔 생산

[0039] 본 발명에서 파이토엔의 생산을 위해 대장균(*Escherichia coli*) strain DH5α(제조사: Stratagene)를 사용하였으며, 제조된 재조합 플라스미드 벡터 pYS71과 클로닝용 벡터 pBBR1MCS-5를 각각 DH5α에 전기천공법을 이용하여 형질전환시킨 다음 37℃의 온도 조건에서 배양하였다. 전기천공법에는 Biorad사의 Gene pulser를 사용하였다. 형질전환된 대장균 strain DH5α 1 ml를 LB 50 ml 배지에 접종하고, 젠타마이신(gentamycin) 25 µg/ml을 첨가하여 37℃에서 24시간 동안 250 rpm으로 진탕하면서 배양하였다. 파이토엔의 분리를 위해 배양한 세포를 4℃, 10,000 rpm에서 원심분리하였고, 에탄올(ethanol) 3 ml로 반복적으로 추출하였다. 추출된 용액을 원심 분리한 후 상등액을 필터링(0.45 µm pore size GHP membrane)하여 분석에 이용하였다. 파이토엔 생합성 유전자 컨스트럭트를 하기 표 4에 표시하였다.

표 4

[0040] 파이토엔 생합성 유전자 컨스트럭트(서열번호 9)

```
CTCGAGCTGAAACAGGAAACAGCTATGACGGTCTGCGCAAAAAACACGTTTCATCTCACTCGCGATGCTGCGGAGCAGTTACTGGCTGATATT
GATCGACGCTTGATCAGTTATTGCCCGTGGAGGGAGAACGGGATGTTGTGGGTGCCGCGATGCGTGAAGGTGCGCTGGCACCGGAAAAACGT
ATTGCGCCCATGTTGCTGTGCTGACGCGCCGCGATCTGGGTGCGCTGTCAGCCATGACGGATTACTGGATTGGCCTGTGCGGTGGAATG
GTCCACGCGGCTTCGCTGATCCTTGACGATATGCCCTGCATGGACGATGCGAAGCTGCGGCGCGGACGCCCTACCATTCATTCTCATTACGGA
GAGCATGTGGCAATACTGGCGGCGGTTGCCCTTGCTGAGTAAAGCCTTTGGCGTAATTGCCGATGCGAGATGGCCTCACGCCGCTGGCAAAAAAT
CGGGCGGTTTCTGAAGTGTCAAACGCCATCGGCATGCAAGGATTGGTTTCAAGGACCTGTCTGAAGGGGATAAGCCGCGCAGC
GCTGAAGTATTTTGTGACGAATCACTTTAAACAGCAGCAGCTGTTTGTGCTCCATGCGATGGCCTCGATTGTTGCGAATGCCTCCAGC
GAAGCGCGTGATGCGCTGCATCGTTTCTACTTGATCTTGGTCAGGCATTTCAACTGCTGGACGATTGACCGATGGCATGCCGACACCGGT
AAAGATAGCAATCAGGACGCCGTAATCGACGCTGGTCAATCTGTTAGGCCGAGGGCGGTTGAAGAAGCTCTGAGACAACATCTTCATCTT
GCCAGTGAGCATCTCTCTGCGGCTGCCAACACGGGCACGCCACTCAACATTTTATTCAGGCCTGGTTTGACAAAAAACTCGTGCCGTCAGT
TAAAGCAGGTTTGTATGCTGGAGGATCTGATATGAATAATCCGTCGTTACTCAATCATGCGGTGCAACGATGGCAGTTGGCTCGAAAAAGTTTT
GCGACAGCCTCAAAGTTATTTGATGCAAAAAACCGGCGCAGCGTACTGATGCTCTACGCTGGTGCCGCCATTGTGACGATGTTATTGACGAT
CAGACGCTGGGCTTCCAGGCGCGGCGAGCCCTTACAAACGCCGAACAGTCTGATGCAACTTGAGATGAAACGCGCCAGGCCTATGCA
GGATGCGCAGATGCACGAACCGCGGTTTGGCGCTTTTCAAGGAGTGGCTATGGCCCATGATATCGCCCGGCTTACGCGTTTGATCATCTGGA
GGCTTCGCCATGGATGTACGCGAAGCGCAATACAGCAACTGGACGATACGCTGCGCTATTGCTATCACGTTGACGCGGTTGTCGGCTTGATG
ATGGCGCAATCATGGCGGTACGGGATAACGCCACGCTGGACCGCGCTGTGACCTGGGCTGGCATTTAGTTGACCAATATTGCTCGCGAT
ATTGTGGACGATGCACATCGGGCGGCTGTTATCTGCCGGCAAGCTGGCTGGAGCATGAAGGTCTGAACAAAGAGAATTATGCGGCACCTGAA
AACCGTCAGGCGCTGAGCCGATCGCCCGTCTGTTGGTGAGGAAGCAGAACCTTACTATTTGTCTGCCACAGCGGCTGGCTGGGTTGCC
CTGCGTTGCGGCTGGCAATCGCTACGGCGAAGCAGGTTTACCGGAAAATAGGTGTCAAAGTTGAACAGGCGGTCAGCAAGCCTGGGATCAG
CGGCAGTCAACGACCGCCGAAAAATTAACGCTGTGCTGGCCGCTCTGGTCAGGCCCTTACTTCCCGGATGCGGGCTCATCTCCCGC
CCTGCGCATCTTGGCAGCGCCGCTCTGA
```

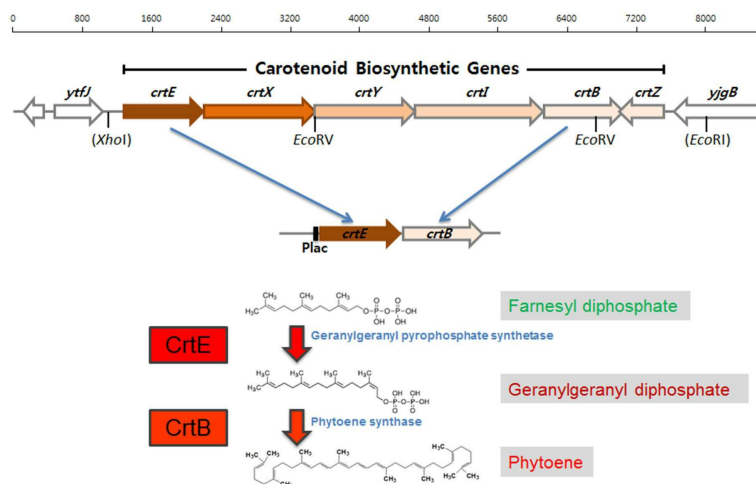
[0041] ※상기 표 4에 나타난 파이토엔 생합성 유전자 컨스트럭트에서 이탤릭체는 *XhoI* 제한효소 인식부위를 나타내고 밑줄은 각각 *lacZ* 프로모터의 리보솜 부착부위(*lacZ* RBS), *crtB*의 리보솜 부착부위로 예상되는 부위(*crtB* RBS)이며 굵은 글씨체는 각 유전자 *crtE* 및 *crtB*의 시작 코돈과 종료 코돈을 나타낸다.

[0042] 실시예 4: 파이토엔 분석

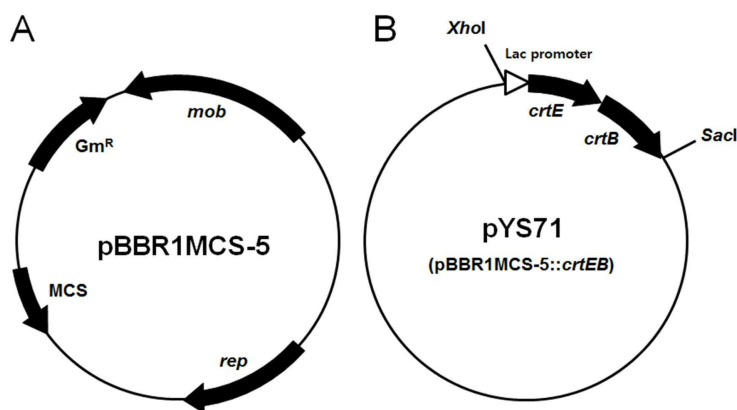
- [0043] 상기 실시예 3에서 분리한 파이토엔 샘플을 이용하여 HPLC 분석을 수행하였다.
- [0044] 구체적으로, 20 μ l의 준비된 샘플을 이용해 HPLC분석을 진행하였으며 A 용매 [60% 아세토나이트릴 (acetonitrile), 38 % 에틸아세테이트(ethyl acetate), 2 % 아세트산(acetic acid)]와 B 용매 100% 메탄올 (methanol)을 이동상으로 C18 Shim-pack GIS-DOS 컬럼(4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m; Shimadzu)을 고정상으로 하여 1.5 ml/min의 유속으로 분석하였다.
- [0045] 그 결과, 파이토엔은 Photodiode Array (PDA) Detector를 이용하여 280 nm에서 측정하였다(도 5).
- [0046] 상기 결과들을 종합해보면, 무색 카로테노이드의 일종인 파이토엔을 고효율로 생산하기 위해 카로테노이드 생합성에 관여하는 효소들을 코딩하는 유전자와 상기 유전자를 포함하는 형질전환용 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 대장균을 이용하여 종래의 생산방법보다 높은 효율로 파이토엔을 생산할 수 있으며, 상기 생산된 파이토엔은 여러 분야에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

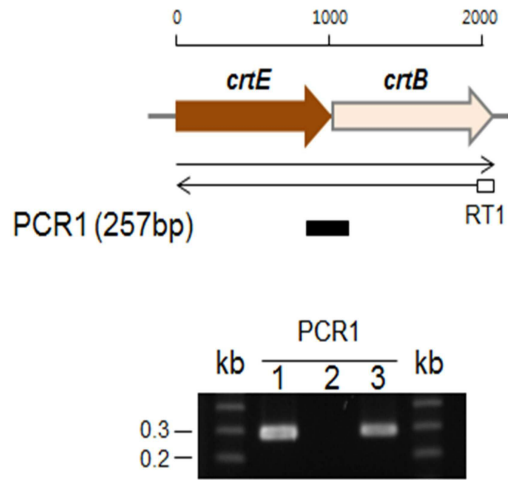
도면1



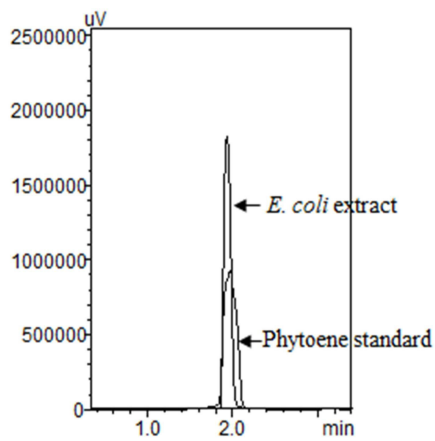
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> High efficient production method of phytoene
- <130> PD14-1250
- <160> 9
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 909
- <212> DNA
- <213> Pantoea ananatis PA13
- <400> 1

atgacgggtct ggcgaaaaaa acacgttcat ctcaactcgcg atgctgcgga gcagttactg
gctgatattg atcgacgcct tgatcagtta ttgcccggtgg agggagaacg ggatgttgtg

60

120

ggtgccgcga tgcgtgaagg tgcgtggca ccgggaaaac gtattcgccc catgttgctg 180

ttgctgaccg cccgcgatct gggttgcgct gtcagccatg acggattact ggatttggcc 240

tgtgcggtgg aaatggtcca cgcggttcg ctgaccttg acgatatgcc ctgcatggac 300

gatgcgaagc tgcggcgcgg acgccctacc attcattctc attacggaga gcatgtggca 360

atactggcgg cggttgcctt gctgagtaaa gcctttggcg taattgccga tgcagatggc 420

ctcacgccgc tggcaaaaaa tcgggcgggt tctgaactgt caaacgccat cggcatgcaa 480

ggatttggtc agggtcagtt caaggacctg tctgaagggg ataagccgcg cagcgtgaa 540

gctatittga tgacgaatca ctttaaaacc agcacgctgt tttgtgcctc catgcagatg 600

gccctgattg ttgcgaatgc ctccagcga ggcgctgatt gcctgcatcg tttttactt 660

gatcttggtc aggcatttca actgctggac gatttgaccg atggcatgac cgacaccggt 720

aaagatagca atcaggacgc cggtaaatcg acgctggta atctgttagg cccgagggcg 780

gttgaagaac gtctgagaca acatcttcat cttgccagt agcatctctc tgcggcctgc 840

caacacgggc acgccactca acatittatt caggcctggt ttgacaaaaa actcgtgcc 900

gtcagttaa 909

<210> 2

<211> 930

<212> DNA

<213> Pantoea ananatis PA13

<400> 2

atgaataatc cgtcgttact caatcatgcg gtcgaaacga tggcagttgg ctcgaaaagt 60

tttgcgacag cctcaaagtt attgatgca aaaacccggc gcagcgtact gatgctctac 120

gcctgggtgcc gccattgtga cgatgttatt gacgatcaga cgctgggctt ccaggcccgg 180

cagccagcct tacaacgcc cgaacaacgt ctgatgcaac ttgagatgaa aacgcgccag 240

gcctatgcag gatcgcatg gcacgaaccg gcgtttgcgg cttttcagga agtggctatg 300

gcccataata tcgccccggc ttacgcgttt gatcatctgg aaggcttcgc catggatgta 360

cgcaagcgc aatacagcca actggacgat acgtcgcgt attgctatca cgttgcaggc 420

gttgtcggct tgatgatggc gcaaatcatg ggcttacggg ataacgccac gctggaccgc 480

gcctgtgacc ttgggctggc atttcagttg accaatattg ctgcgatat tgtggacgat 540

gcacatgcgg gccgtgtta tctgccggca agctggctgg agcatgaagg tctgaacaaa 600

gagaattatg cggcacctga aaaccgtcag gcgtgagcc gtatcgcccg tcgtttggtg 660

caggaagcag aaccttacta tttgtctgcc acagggggcc tggctgggtt gccctgcgt 720

tcggcctggg caatcgctac ggcaagcag gttaccgga aaataggtgt caaagttgaa 780

caggccggtc agcaagcctg ggatcagcgg cagtcaacga ccacgcccgga aaaattaacg 840

ctgtctgtgg cgcctcttgg tcaggccctt acttcccgga tgcgggctca tcttcccgc 900

cctgcgcata tctggcagcg cccgctctag 930

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crtE CAR1

<400> 3

ggcctcgagc tgaacagga aacagctatg acggtctgcg caaaa 45

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crtE CAR2

<400> 4

atcagatcct ccagcatcaa acctgcttta actgacggca gcgagttt 48

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crtB CAR3

<400> 5

agcaggtttg atgctggagg atctgatatg aataatccgt cgttactc 48

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crtB CAR4

<400> 6

gtatcgctc tttaacgatg agtcgtcatt cagagcgggc gctgccagag 50

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR1 PCR1-F

<400> 7

atcttcatct tgccagtgag 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR1 PCR4-R

<400> 8

aataacatcg tcacaatggc 20

<210> 9

<211> 1890

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene construct for synthesizing phytoene

<400> 9

ctcgagctga aacaggaaac agctatgacg gtctgcgcaa aaaaacacgt tcctctcact 60

cgcgatgctg cggagcagtt actggctgat attgatcgac gccttgatca gttattgccc 120

gtggaggag aacgggatgt tgtgggtgcc gcgatgcgtg aaggtgcgct ggcaccggga 180

aaacgtattc gcccctgatt gctgttgctg accgcccgcg atctgggttg cgctgtcagc 240

catgacggat tactggattt ggctgtgctg gtggaatgg tccacgcggc ttcgctgac 300

cttgacgata tgcctgcat ggacgatcg aagctgcggc gcggacgccc taccattcat 360

tctcattacg gagagcatgt ggcaatactg gcggcgggtg ccttgctgag taaagccttt 420

ggcgtaattg ccgatgcaga tggcctcagc ccgctggcaa aaaatcgggc ggtttctgaa 480

ctgtcaaacg ccatcgccat gcaaggattg gttcagggtc agttcaagga cctgtctgaa 540

ggggataagc cgcgcagcgc tgaagctatt ttgatgacga atcactttaa aaccagcacg 600

ctgttttttg cctccatgca gatggcctcg attgttgca atgcctccag cgaagcgcgt 660

gattgcctgc atcgtttttc acttgatctt ggtcaggcat ttcaactgct ggacgatttg 720

accgatggca tgaccgacac cggtaaagat agcaatcagg acgccggtaa atcgacgctg 780

gtcaatctgt taggcccag ggcgggtgaa gaacgtctga gacaacatct tcatcttgcc	840
agtgagcatc tctctcgccg ctgccaacac gggcacgcca ctcaacattt tattcaggcc	900
tggtttgaca aaaaactcgc tgccgtcagt taaagcaggt ttgatgctgg aggatctgat	960
atgaataatc cgtcgttact caatcatgcg gtcgaaacga tggcagttgg ctcgaaaagt	1020
tttgcgacag cctcaaagtt atttgatgca aaaacccggc gcagcgctact gatgctctac	1080
gcctgggtgcc gccatttgtga cgatgttatt gacgatcaga cgctgggctt ccaggcccgg	1140
cagccagcct tacaacgcc cgaacaacgt ctgatgcaac ttgagatgaa aacgcgccag	1200
gcctatgcag gatcgcatg gcacgaaccg gcgtttgcgg cttttcagga agtggctatg	1260
gcccataata tcgccccggc ttacgcgttt gatcatctgg aaggcttcgc catggatgta	1320
cggaagcgc aatacagcca actggacgat acgtgctgct attgctatca cgttgaggc	1380
gttgtcggct tgatgatggc gcaaatcatg ggcgtacggg ataacgccac gctggaccgc	1440
gcctgtgacc ttgggctggc atttcagttg accaatattg ctgcgatat tgtggacgat	1500
gcacatgcgg gccgctgtta tctgccggca agctggctgg agcatgaagg tctgaacaaa	1560
gagaattatg cggcacctga aaaccgtcag gcgtgagcc gtatcgcccg tcgtttggtg	1620
caggaagcag aaccttacta ttgtctgcc acagcgggccc tggctgggtt gcccctgcgt	1680
tcggcctggg caatcgctac ggcaagcag gtttaccgga aaataggtgt caaagttgaa	1740
caggccggtc agcaagcctg ggatcagcgg cagtcaacga ccacgccga aaaattaacg	1800
ctgctgctgg ccgcctctgg tcaggccctt acttcccga tgcgggctca tcctcccgc	1860
cctgcgcac tctggcagcg cccgctctga	1890