



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0114009
(43) 공개일자 2013년10월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/53 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0037763
(22) 출원일자 2013년04월05일
심사청구일자 2013년04월05일
- (30) 우선권주장
1020120036372 2012년04월06일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
- (72) 발명자
박진병
서울특별시 영등포구 여의도동 여의도자이아파트 101동 2403호
송지원
서울특별시 영등포구 여의도동 미성아파트 C동 306호
전은영
전라북도 익산시 부송동 부영5차아파트 505동 801호
- (74) 대리인
손민

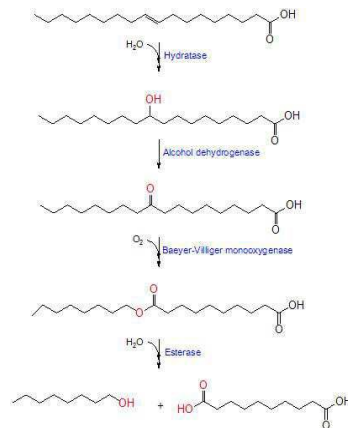
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올을 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)를 발현시키도록 형질전환된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 장쇄 지방산으로부터 6 내지 14개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산과 2 내지 14개의 탄소수를 가지는 카르복실산 또는 노말 알코올을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 BVMO를 발현시킬 수 있는 형질전환체는 효소반응에 의하여, 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 장쇄 지방산을 분해하여 6 내지 14개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산과 2 내지 14개의 탄소수를 가지는 카르복실산 또는 알코올을 대량으로 생성할 수 있으므로, 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올의 보다 안전하고 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 BVMO는 슈도모나스 플로레스센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 베로니(*Pseudomonas veronii*), 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) 또는 슈도모나스속 균주 HI-70(*Pseudomonas* sp. strain HI-70)으로부터 유래된 것인 형질전환체.

청구항 3

제1항에 있어서,

수화효소(hydratase) 또는 리폭시지나제(lipoxygenase)를 코딩하는 유전자, 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 유전자, 에스터 가수분해효소(esterase)를 코딩하는 유전자 또는 이들의 조합이 추가로 도입된 것인 형질전환체.

청구항 4

제3항에 있어서,

수화효소를 코딩하는 유전자, 알코올 탈수소효소를 코딩하는 유전자, BVMO를 코딩하는 유전자 및 에스터 가수분해효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산과 카르복실산 또는 알코올을 생성하는 것인 형질전환체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 장쇄 지방산으로 올레산(C18)을 사용하는 경우, 중쇄 디카르복실산으로서 세바식산(α, ω -decanedioic acid, C10) 및 알코올로서 옥탄올(C8)이 생성되는 것인 형질전환체.

청구항 6

제3항에 있어서,

수화효소를 코딩하는 유전자, 서로 다른 두 종류의 알코올 탈수소효소를 코딩하는 유전자, BVMO를 코딩하는 유전자 및 에스터 가수분해효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산과 카르복실산 또는 알코올을 생성하는 것인 형질전환체.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 알코올 탈수소 효소는 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래의 알코올 탈수소효소 및 슈도모

나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 알코올 탈수소효소인 것인 형질전환체.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 장쇄 지방산으로 올레산(C18)을 사용하는 경우, 중쇄 디카르복실산으로서 아젤레산(C9) 및 카르복실산으로서 nonanoic acid를 생성하는 것인 형질전환체.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 장쇄 지방산으로 리시놀레산(C18)을 사용하는 경우, 중쇄 디카르복실산으로서 α, ω -undec-2-enedioic acid 및 카르복실산으로서 heptanoic acid를 생성하는 것인 형질전환체.

청구항 10

(a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 형질전환체를 장쇄 지방산을 포함하는 배지에서 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및,

(b) 상기 배양물로부터 중쇄 디카르복실산과 카르복실산 또는 알코올을 회수하는 단계를 포함하는, 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산과 카르복실산 또는 알코올을 생산하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 배양은 배지에 포함된 탄소원이 소비된 후에 장쇄 지방산을 배지에 추가하여 수행하는 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 장쇄 지방산은 최종농도 0.1 내지 100g/L가 되도록 배지에 추가하는 것인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 장쇄 지방산은 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 지방산인 것인 방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 장쇄 지방산은 올레산, 리시놀레산, 12-히드록시스테아린산, 리놀레인산, 팔미톨레인산 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 중쇄 디카르복실산은 6 내지 14개의 탄소수를 가지는 디카르복실산인 것인 방법.

청구항 16

제10항에 있어서,

상기 중쇄 디카르복실산은 세바식산, 아젤레산, α, ω -undec-2-enedioic acid, α, ω -tridec-2-enedioic acid 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 17

제10항에 있어서,

상기 카르복실산 또는 알코올은 2 내지 14개의 탄소수를 가지는 카르복실산 또는 노말 알코올인 것인 방법.

청구항 18

제10항에 있어서,

상기 카르복실산 또는 알코올은 heptanoic acid, nonanoic acid, 노말 옥탄올 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 19

BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)를 이용하여 키토 지방산으로부터 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산 유도체를 생성하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올을 생산하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)를 발현시키도록 형질전환된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 장쇄 지방산으로부터 6 내지 14개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산과 2 내지 14개의 탄소수를 가지는 카르복실산 또는 노말 알코올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 디카르복실산은 지방산의 말단에 카르복실기를 1개 더 가지고 있는 2염기산의 일종으로 $(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH})$ 폴리아미드, 폴리에스터 등의 플라스틱 제조 시 모노머로 사용되고 있으며 유화제, 동결방지제, 페인트, 코팅제 생산에도 사용되고 있다. 또한 항균활성 등 다양한 생리활성이 있어 화장품, 식품, 생활용품 생산에도 광범위하게 이용되고 있다. 예를 들어 10개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산인 세바식산 $((\text{HOOC})(\text{CH}_2)_8(\text{COOH}))$ 은 연간 50,000MT 이상이 생산되어 플라스틱, 양초, 화장품, 유화제, 동결방지제, 부식방지제 생산에 사용되고 있다. 9개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산인 아젤레산 $((\text{HOOC})(\text{CH}_2)_7(\text{COOH}))$ 은 연간 20,000MT 이상이 생산되어 플라스틱, 화장품, 유화제, 동결방지제, 부식방지제 생산에 사용되고 있다. 또한 항균활성을 가지고 있어 여드름 치료제나 화장품, 생활용품 제조에도 이용되고 있다.

[0003] 세바식산은 자연계에 거의 존재하지 않기 때문에, 대체로 천연물로부터 수득할 수 있는 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 하이드록시 지방산인 리시놀레인산을 화학적으로 분해하여 제조하고 있다 (미국특허 제5,952,517호,

미국특허 제5,420,316호). 그러나, 하이드록시 지방산을 화학적으로 분해하기 위해서는 200-300℃ 이상의 고온에서 강산화제가 사용되고 또한 중금속 이온 촉매, 유기용매 등의 독성물질을 사용하여 제조과정이 위험할 뿐만 아니라, 제조된 후에 환경오염물질을 다량으로 배출하는 등의 문제점이 있다. 아젤레산은 올레산의 오존산화분해반응 (ozonolysis)을 통해 생산되고 있다(미국특허 제5,420,316호). 이 기술로 아젤레산을 생산할 때 강산화제인 오존이 다량 사용되고 있고 여러 가지 부산물이 생성되어 중금속 촉매를 이용하는 분리정제공정이 필요하다 (Eur. J. Lipid Sci. Technol., 113:83-91, 2011). 따라서 복잡한 분리정제 공정, 환경오염, 에너지 과다 사용 등 여러 가지 문제를 가지고 있어 이를 개선하려는 연구의 필요성이 높아지고 있다.

[0004] 따라서 보다 안전하면서도 경제적으로 6 내지 14개의 탄소수를 갖는 중쇄 디카르복실산을 제조하는 방법을 개발하려는 연구가 계속되고 있으나, 아직까지는 별다른 성과가 보고되지 않고 있는 실정이다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 BVMO가 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 장쇄 지방산으로부터 유래된 키토 지방산을 에스터 가수분해효소에 의해 절단될 수 있는 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산 유도체의 형태로 전환시킬 수 있음을 새로이 규명하여, 상기 BVMO 유전자가 도입된 형질전환 미생물을 이용할 경우 상기 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올을 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)를 발현할 수 있는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 BVMO 유전자가 도입된 형질전환체를 제공한다.

[0009] 본 발명의 용어 "Baeyer-Villiger monooxygenase(BVMO)"란, 케톤을 산화시켜서 락톤이나 에스터화합물을 생성하는 Baeyer-Villiger 산화반응을 포함하는 다양한 산화반응을 촉매할 수 있는 효소인 monooxygenase의 일종을 의미한다. 본 발명의 목적상, 형질전환체에서 발현되어 키토 지방산으로부터 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산 유도체(예로 10-키토스테아르산으로부터 10-옥틸옥시-10-옥소데카노산)를 생산하는 반응을 촉매하는 효소활성을 나타내는 한, 상기 BVMO는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 슈도모나스속 균주(*Pseudomonas* sp.), 로도코커스속 균주(*Rhodococcus* sp.), 브레비박테리움속 균주(*Brevibacterium* sp.), 코마노나스속 균주(*Comamonas* sp.), 아시네토박터속 균주(*Acinetobacter* sp.), 아트로박터속 균주(*Arthrobacter* sp.), 브라키모나스속 균주(*Brachymonas* sp.) 등의 미생물로부터 유래된 BVMO 등 일 수 있고, 보다 바람직하게는 슈도모나스 플로레스센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 베로니(*Pseudomonas veronii*), 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) 또는 슈도모나스속 균주 HI-70(*Pseudomonas* sp. strain HI-70)으로부터 유래된 BVMO일 수 있으며, 가장 바람직하게는 슈도모나스 푸티다로부터 유래된 BVMO가 될 수 있다. 상기 BVMO를 코딩하는 유전자의 염기서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있는데, 그 예로서, GenBank Accession No. CAFK01000010으로 표시되는 유전자, BVMO 유전자를 발현하도록 제작된 발현벡터 pJOE-KT2440BVMO(Biotechnol. Lett., 29:1393-1398, 2007) 등으로부터 취득할 수 있는 유전자 등이 될 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열 등이 될 수 있다.

[0010] 아울러, 상기 BVMO는 키토 지방산으로부터 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산 유도체를 생산하는 반응을 촉매

하는 활성을 나타내는 BVMO를 형질전환체에서 발현시킬 수 있는 한, BVMO를 구성하는 아미노산 서열의 하나 이상의 위치에서의 1개 또는 다수개(단백질의 아미노산 잔기의 입체 구조에 있어서의 위치나 종류에 따라서 상이하지만, 구체적으로는 2 내지 20개, 바람직하게는 2 내지 10개, 보다 바람직하게는 2 내지 5개)의 아미노산이 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위된 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 상기 BVMO의 활성을 유지 또는 강화시킬 수 있는 한, 상기 BVMO의 아미노산 서열에 대하여, 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 특히 바람직하게는 97% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 미생물의 종 또는 군주에 따라 상기 폴리펩티드가 갖는 활성을 나타내는 효소의 아미노산 서열에 차이가 있을 수 있기 때문에 특별히 이에 제한되지는 않으며, 상기 아미노산의 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위 등에는 상기 BVMO의 활성을 함유하는 미생물의 개체 또는 종의 차이에 근거하는 경우 등의 천연적으로 생기는 돌연변이 서열 또는 인위적인 변이 서열까지도 포함할 수 있다.

[0011] 본 발명의 용어 "상동성"이란, 서로 다른 두 아미노산 서열 또는 염기서열 사이의 동일성을 의미하는데, 점수(score), 동일성(identity), 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 BLAST 2.0를 이용하는, 당업자에게 잘 알려진 방법으로 결정될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0012] 본 발명의 용어 "형질전환체"란, 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 벡터를 이용하여 숙주의 내부로 도입된 후, 상기 목적 단백질을 발현시키도록 변이된 세포 또는 미생물을 의미한다. 이때, 상기 숙주세포에 도입되는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 한, 어떠한 형태라도 무방하다.

[0013] 본 발명에서 제공하는 상기 형질전환체는 공지된 BVMO를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 도입된 발현벡터 또는 공지된 발현벡터 pJOE-KT2440BVMO(Biotechnol. Lett., 29:1393-1398, 2007) 등을 숙주세포에 도입하여 제작할 수 있다. 이때, 사용될 수 있는 숙주세포로는 본 발명의 BVMO를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 도입되어 BVMO를 발현시킬 수 있는 숙주세포라면 특별히 제한되지는 않으나, 바람직하게는 생물전환공정에 적용하기에 적합한 배양가능한 단세포성 원핵생물 또는 진핵생물의 세포를 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 대장균, 효모 등을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 대장균 BL21(DE3) 세포를 사용할 수 있다.

[0014] 본 발명의 형질전환체는 배지에 포함된 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 장쇄 지방산을 분해하여 6 내지 14개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카복실산과 함께 2 내지 14개의 탄소수를 가지는 카복실산 또는 노말 알코올을 생산하는데 사용될 수 있으며, 이를 위하여, 상기 BVMO를 코딩하는 유전자 이외에 수화효소(hydratase)나 리폭시지나제(lipoxygenase)를 코딩하는 유전자, 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 유전자, 에스터 가수분해효소(esterase)를 코딩하는 유전자 등이 추가로 도입될 수도 있다.

[0015] 본 발명의 용어 "수화효소(hydratase)"란, 탄소이중결합에 물을 가하여 하이드록시 화합물을 가역적으로 생성하는 효소를 의미하는데, 역반응에 의하여 하이드록시 화합물로부터 물을 제거할 수도 있으므로 "탈수효소(dehydratase)"라고 할 수도 있다. 상기 수화효소는 바람직하게는 스테노트로포모나스 말토펴리아(*Stenotrophomonas maltophilia*), 리시니바실러스 후시포르미스(*Lysinibacillus fusiformis*), 마크로코쿠스 카제올리티쿠스(*Macrococcus caseolyticus*), 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) 등의 군주로부터 유래된 것을 사용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 목적상 상기 수화효소는 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 장쇄 지방산에 하이드록시기를 가하여 하이드록시 지방산을 생성하려는 목적으로 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명의 용어 "리폭시지나제(lipoxygenase)란, 불포화지방산에 분자상 산소를 첨가하는 산소첨가효소로서, 불포화지방산의 cis,cis-1,4-펜타디엔 구조를 인식하여 메틸렌의 수소원자를 입체특이적으로 추출하여 반대측(antarafacial)에서 산소를 첨가하여 히드로퍼옥시드를 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 리폭시지나제는 상술한 수화효소와 마찬가지로 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 장쇄 지방산에 하이드록시기를 가하여 하이드록시 지방산을 생성하려는 목적으로 사용될 수 있다.

[0017] 본 발명의 용어 "알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase)"란, 알코올에서 수소를 제거하여 알데하이드 또는

케톤을 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다. 상기 알코올 탈수소효소는 바람직하게는 마이크로코커스 루테우스, 슈도모나스 속 균주로부터 유래된 것을 사용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 목적상 상기 알코올 탈수소효소는 상기 수화효소 또는 리폭시지나제에 의하여 생성된 하이드록시지방산으로부터 수소를 제거하여 키토 지방산을 생성하거나, 에스터 가수분해효소에 의해 생산된 오메가-하이드록시 지방산을 오메가-옥소지방산 (ω -oxofatty acid) 또는 알파,오메가-디카르복실산을 생산하려는 목적으로 사용될 수 있다.

[0018] 본 발명의 용어 "에스터 가수분해효소(esterase)"란, 에스터 화합물의 에스터 결합을 가수분해하는 효소를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 에스터 가수분해효소는 BVMO에 의해 생성된 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산 유도체를 중쇄 디카르복실산과 알코올로 분해하려는 목적으로 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 스테노트로포모나스 말토틸리아(*Stenotrophomonas maltophilia*) 유래의 올레산 수화효소 유전자, 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래의 알코올 탈수소효소 유전자를 포함하는 발현벡터(pACYC/올레산 수화효소/알코올 탈수소효소 발현벡터)를 대장균 BL21(DE3) 균주에 도입하여 수화효소 및 알코올 탈수소효소를 발현하는 형질전환체를 제작하고, 상기 형질전환체에 슈도모나스 푸티다 유래의 BVMO 유전자를 포함하는 발현벡터를 도입하여 수화효소, 알코올 탈수소효소 및 BVMO를 발현하는 형질전환체를 제작하였으며, 상기 형질전환체에 올레산을 가하여 반응시키고, 다시 에스터 가수분해효소와 반응시켜서, 세바식산과 옥탄올을 생성하였다(실시예 1). 또한, 상기 형질전환체를 올레산과 반응시켜서 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산을 생성하고, 슈도모나스 플로레센스 유래의 에스터 가수분해효소 유전자와 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소 유전자를 포함하는 발현벡터(pCOLAduet-1/에스터 가수분해효소/알코올 탈수소효소 발현벡터)를 발현시키는 또 다른 형질전환체를 상기 생성된 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산과 반응시켜서 아젤레산과 nonanoic acid를 생성하였다(실시예 2). 끝으로, 상기 pACYC/올레산 수화효소/알코올 탈수소효소 발현벡터와 BVMO 유전자 발현벡터 및 pCOLAduet-1/에스터 가수분해효소/알코올 탈수소효소 발현벡터를 도입한 형질전환체를 제작하고, 이를 리시놀레산과 반응시켜서 α, ω -undec-2-enedioic acid와 heptanoic acid를 생성하였다(실시예 3)

[0020] 상술한 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 이용하여 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산 및 카르복실산 또는 알코올을 생산하는 방법을 제공한다.

[0021] 구체적으로, 본 발명의 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산 및 카르복실산 또는 알코올을 생산하는 방법은 (a) BVMO를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체와 장쇄 지방산을 반응시켜서 반응물을 수득하는 단계; 및, (b) 상기 반응물로부터 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올을 회수하는 단계를 포함한다.

[0022] 이때, 상기 장쇄 지방산은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 장쇄 지방산이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 올레산, 리시놀레산, 12-하이드록시스테아린산, 리놀레인산, 팔미톨레인산 등이 될 수 있으며; 상기 중쇄 디카르복실산은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 6 내지 14개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 8 내지 12개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 세바식산, 아젤레산, α, ω -undec-2-enedioic acid, α, ω -tridec-2-enedioic acid 등이 될 수 있고; 상기 카르복실산과 알코올은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 2 내지 14개의 탄소수를 가지는 카르복실산과 노말 알코올이 될 수 있으며, 보다 바람직하게는 6 내지 10개의 탄소수를 가지는 카르복실산과 노말 알코올이 될 수 있고, 가장 바람직하게는 nonanoic acid, heptanoic acid, 노말 옥탄올 등이 될 수 있다.

[0023] 또한, 상기 반응은 기질로 사용되는 장쇄 지방산을 상기 형질전환체에서 생산되는 수화효소, 리폭시지나제, 알코올 탈수소효소, 에스터 가수분해효소 등의 다양한 효소로 반응시켜서 상기 장쇄 지방산을 절단 또는 분해를 촉매하는 효소반응을 의미하는데, 상기 형질전환체에서 생산되는 일련의 효소는 형질전환체의 내부에서 생산되고, 생산된 효소가 형질전환체의 외부로 분비될 수 있으므로, 상기 반응은 형질전환체의 내부에서 진행될 수도 있고, 외부에서 진행될 수도 있다. 예를 들어, 상기 형질전환체를 탄소원을 포함하는 배지에서 배양하면서, 배지에 포함된 탄소원이 소비된 후에 장쇄 지방산을 배지에 가하고, 상기 형질전환체로부터 생산된 상기 효소들에 의해 장쇄 지방산을 절단 또는 분해시켜서 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올을 생산하는 방식으로 수행

할 수도 있고; 상기 형질전환체를 장쇄 지방산을 포함하는 반응완충액에 넣고, 상기 효소들을 이용하여 장쇄 지방산을 절단 또는 분해시켜서 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올을 생산하는 방식으로 수행될 수도 있으며; 또는 상기 각 효소들을 형질전환체로부터 분리하고, 분리된 효소들을 각각 담체에 고정화시킨 후, 장쇄 지방산이 포함된 반응완충액을 가하여, 상기 고정화된 효소가 장쇄 지방산을 절단 또는 분해하여 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올을 생산하는 방식으로 수행될 수도 있다. 이때, 배지 또는 반응완충액에 포함되는 장쇄 지방산의 함량은 특별히 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 0.1 내지 100g/L의 최종농도가 되도록 가할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 발명에서 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈, 수크로즈, 락토스와 같은 당, 지방, 지방산, 글리세롤이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산과 같은 아미노산 및 펩톤, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27 내지 37, 바람직하게는 30 내지 35이다.

[0026] 아울러, 반응액으로부터 중쇄 디카르복실산과 알코올을 회수하는 단계는 투석, 원심분리, 여과, 용매추출, 크로마토그래피, 결정화 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 상기 반응액을 원심분리하여 형질전환체를 제거하고 얻어진 상등액을, 용매추출법에 적용하여 목적하는 중쇄 디카르복실산과 카르복실산 또는 알코올을 회수하는 방법을 사용할 수 있으나, 이외에도 상기 목적하는 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올의 특성에 맞추어 공지된 실험방법을 조합하여 상기 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올을 회수할 수 있는 방법이라면 특별히 제한되지 않고 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명의 방법에 따라, 수화효소를 코딩하는 유전자, 알코올 탈수소효소를 코딩하는 유전자, BVMO를 코딩하는 유전자 및 에스터 가수분해효소를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체는 배지에 존재하는 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 장쇄 지방산(올레산, 리놀레산, 12-히드록시스테아린산, 리놀레인산 등)으로부터 6 내지 14개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산(세바식산, 아젤레산, α, ω -undec-2-enedioic acid, α, ω -tridec-2-enedioic acid 등)과 2 내지 14개의 탄소수를 가지는 카르복실산(nonanoic acid, heptanoic acid 등)과 노말 알코올(노말 옥탄올 등)을 생성할 수 있다.

[0028] 예를 들어, 대장균에 알코올 탈수소효소를 코딩하는 유전자 및 BVMO를 코딩하는 유전자를 도입하여 제조된 형질전환체는 장쇄 지방산을 사슬내에 에스테르기가 도입된 장쇄 지방산으로 전환시킬 수 있으며, 이에 에스터 가수분해효소를 추가로 처리하거나 또는 상기 형질전환체가 에스터 가수분해효소를 추가로 포함할 경우, 상기 전환된 사슬내에 에스테르기가 도입된 장쇄지방산은 다양한 형태의 중쇄 디카르복실산과 카르복실산 또는 알코올로 전환될 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예로서, 수화효소, 알코올 탈수소효소, BVMO 및 에스터 가수분해효소를 발현시킬 수 있는 형질전환체는 올레산(C18)과 같은 장쇄 지방산으로부터 세바식산(C10)과 같은 중쇄 디카르복실산과 옥탄올과 같은 알코올을 생성할 수 있는데, 수화효소는 장쇄 지방산을 하이드록시지방산으로 전환시키고, 알코올 탈수소효소는 상기 전환된 하이드록시지방산으로부터 수소를 제거하여 키토 지방산을 생성하며, BVMO는 상기 생성된 키토 지방산을 산화시켜서 사슬내에 에스테르기가 도입된 장쇄 지방산을 생성하고, 에스터 가수분해효소는 상기 생성된 사슬내에 에스테르기가 도입된 장쇄 지방산의 에스터 결합을 가수분해하여 중쇄 디카르복실산과 알코올을 생성한다(도 1a).

[0030] 본 발명의 다른 실시예로서, 수화효소, 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소, BVMO, 에스터 가수

분해효소 및 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소를 발현시킬 수 있는 형질전환체는 올레산(C18)과 같은 장쇄 지방산으로부터 아젤레산(C9)과 같은 중쇄 디카르복실산과 nonanoic acid과 같은 카르복실산을 생성할 수 있는데, 수화효소는 장쇄 지방산을 하이드록시지방산으로 전환시키고, 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소는 상기 전환된 하이드록시지방산으로부터 수소를 제거하여 키토 지방산을 생성하며, BVMO는 상기 생성된 키토 지방산을 산화시켜서 사슬내에 에스터기가 도입된 장쇄 지방산을 생성하고, 에스터 가수분해효소는 상기 생성된 사슬내에 에스터기가 도입된 장쇄 지방산의 에스터 결합을 가수분해하여 오메가-하이드록시 지방산과 카르복실산을 생성하며, 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소는 상기 오메가 하이드록시 지방산으로부터 수소를 제거하여 중쇄 디카르복실산을 생성한다(도 1b).

[0031] 본 발명의 또 다른 실시예로서, 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소, BVMO, 에스터 가수분해효소 및 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소를 발현시킬 수 있는 형질전환체는 리시놀레산(C18)과 같은 장쇄 하이드록시 지방산으로부터 α, ω -undec-2-enedioic acid과 같은 중쇄 디카르복실산과 heptanoic acid과 같은 카르복실산을 생성할 수 있는데, 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소는 상기 장쇄 하이드록시지방산으로부터 수소를 제거하여 키토 지방산을 생성하고, BVMO는 상기 생성된 키토 지방산을 산화시켜서 사슬내에 에스터기가 도입된 장쇄 지방산을 생성하며, 에스터 가수분해효소는 상기 생성된 사슬내에 에스터기가 도입된 장쇄 지방산의 에스터 결합을 가수분해하여 오메가-하이드록시 지방산과 카르복실산을 생성하고, 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소는 상기 오메가 하이드록시 지방산으로부터 수소를 제거하여 중쇄 디카르복실산을 생성한다(도 1c).

[0032] 상기 형질전환체에 의하여 생성된 6 내지 14개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산과 2 내지 14개의 탄소수를 가지는 카르복실산 또는 알코올은 상기 형질전환체에서 배지 또는 반응완충액으로 분비되므로, 상기 형질전환체를 고정화 담체에 고정시키거나, 상기 형질전환체를 유가식 또는 연속식으로 배양할 경우, 6 내지 14개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산과 2 내지 14개의 탄소수를 가지는 카르복실산 또는 알코올을 대량으로 생산할 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 올레산 수화효소 유전자, 알코올 탈수소효소 유전자 및 BVMO 유전자를 대장균 BL21(DE3) 균주에 도입하여 제작된 형질전환체를 올레산과 반응시킨 결과, 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산을 생성하고(도 2a), 상기 생성된 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산에 슈도모나스 플로레센스 유래의 에스터 가수분해효소를 투입하고 반응시켜서 세바식산을 생성하며, 부산물로서 옥탄올을 생산함을 알 수 있었고(도 2b), 상기 생성된 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산에 에스터 가수분해효소와 알코올 탈수소효소를 발현하는 형질전환체를 가하고 반응시켜서 아젤레산을 생성하며, 부산물로서 nonanoic acid를 생산함을 알 수 있었고(도 3b), 올레산 수화효소, 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소, BVMO 및 에스터 가수분해효소, 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소를 발현하는 형질전환체를 리시놀레산과 반응시킨 결과, α, ω -undec-2-enedioic acid를 생성하며, 부산물로서 heptanoic acid를 생산함을 알 수 있었다(도 4).

[0034] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 BVMO를 이용하여 키토 지방산으로부터 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산 유도체를 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 BVMO를 발현시킬 수 있는 형질전환체는 효소반응에 의하여, 16 내지 20개의 탄소수를 가지는 장쇄 지방산을 분해하여 6 내지 14개의 탄소수를 가지는 중쇄 디카르복실산과 2 내지 14개의 탄소수를 가지는 카르복실산 또는 알코올을 대량으로 생성할 수 있으므로, 중쇄 디카르복실산, 카르복실산 및 알코올의 보다 안전하고 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1a는 수화효소, 알코올 탈수소효소, BVMO 및 에스터 가수분해효소에 의해 장쇄 지방산(18개의 탄소수를 가지

는 올레산)으로부터 세바식산이 생성되는 반응을 순차적으로 나타내는 개략도이다.

도 1b는 수화효소, 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소, BVMO, 에스터 가수분해효소, 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소에 의해 장쇄 지방산(18개의 탄소수를 가지는 올레산)으로부터 아젤레산이 생성되는 반응을 순차적으로 나타내는 개략도이다.

도 1c는 수화효소, 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소, BVMO, 에스터 가수분해효소, 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소에 의해 장쇄 지방산(18개의 탄소수를 가지는 리시놀레산)으로부터 α, ω -undec-2-enedioic acid가 생성되는 반응을 순차적으로 나타내는 개략도이다.

도 2a는 올레산 수화효소, 알코올 탈수소효소 및 BVMO를 발현하는 형질전환체를 이용하여 생산된 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산의 시간의 경과에 따른 생산량의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 2b는 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산에 에스터 가수분해 효소를 처리하여 얻어진 반응산물을 GC/MS로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3a는 올레산 수화효소, 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소 및 BVMO를 발현하는 형질전환체를 이용하여 생산된 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산의 시간의 경과에 따른 생산량의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3b는 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산에 에스터 가수분해효소와 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소를 발현하는 형질전환체를 가하여 반응시켜서 얻어진 반응산물인 아젤레산의 시간의 경과에 따른 생산량의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 올레산 수화효소, 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소, BVMO 및 에스터 가수분해효소, 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소를 발현하는 형질전환체를 이용하여 리시놀레산으로부터 생산된 α, ω -undec-2-enedioic acid의 시간의 경과에 따른 생산량의 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1: 다단계 효소합성을 이용한 세바식산의 생산

[0039] 1) 유전자 클로닝

[0040] 올레산 수화효소와 알코올 탈수소효소 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제조하기 위하여, 스테노트로포모나스 말토필리아 유래의 올레산 수화효소 유전자와 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소 유전자를 클로닝하였다.

[0041] 먼저, 올레산 수화효소 유전자는 플라스미드 벡터 pET 28(+)/올레산 수화효소(J. Biotechnol., 158:17-23, 2012)를 주형으로 하고, 제한효소인 PvuI과 XhoI의 절단부위를 포함하도록 제작된 프라이머(서열번호 1 및 2)를 이용한 PCR을 수행하여 증폭하였다.

[0042] 정방향 프라이머: 5'-gctagcatgtattacagtaatggtaactatgaa-3'(서열번호 1)

[0043] 역방향 프라이머: 5'-ggctcgagctatattagtttacttttctttca-3'(서열번호 2)

[0044] 상기 증폭된 PCR 산물을 제한효소인 PvuI과 XhoI로 절단하고, 플라스미드 벡터 pACYC (Novagen사 제품)에 삽입하여 pACYC/올레산 수화효소 발현벡터를 제작하였다.

[0045] 또한, 알코올 탈수소효소는 마이크로코커스 루테우스로부터 유래한 알코올 탈수소효소의 DNA 염기서열(Genebank

Accession No.ZP_07049769)을 주형으로 하고, 제한효소인 EcoRI과 HindIII의 절단부위를 포함하도록 제작된 프라이머(서열번호 3 및 4)를 이용한 PCR을 수행하여 증폭하였다.

[0046] 정방향 프라이머: 5'-atcgaattcgtccgagttcaccggtttcga-3'(서열번호 3)

[0047] 역방향 프라이머: 5'-atatcaagcttcagccgagcgggtgtcct-3'(서열번호 4)

[0048] 상기 증폭된 PCR 산물을 제한효소인 EcoRI과 HindIII로 절단하고, 상기 제작된 pACYC/올레산 수화효소 발현벡터에 삽입하여, pACYC/올레산 수화효소/알코올 탈수소효소 발현벡터를 제작하였다.

[0049] 2) 숙주세포의 배양

[0050] 대장균 *E. coli* BL21(DE3)은 플라스미드 유지를 위하여 10 g/ 글루코스 및 적절한 항생제가 함유된 리젠버그(Riesenberg) 배지에서 배양하였다. 이때, 리젠버그 배지는 4 g/ $N(NH_4)_2HPO_4$, 13.5 g/ KH_2PO_4 , 1.7 g/ citric acid, 1.4 g/ $MgSO_4$ 및 10 / trace metal solution(10 g/ $FeSO_4$, 2.25 g/ $ZnSO_4$, 1.0 g/ $CuSO_4$, 0.5 g/ $MnSO_4$, 0.23 g/ $Na_2B_4O_7$, 2.0 g/ $CaCl_2$ 및 0.1 g/ $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)가 함유되어 있으며, 마이크로코커스 루테우스는 LB 배지에서 배양하였다.

[0051] 3) 형질전환체를 이용한 세바식산의 생산

[0052] 먼저, 상기 실시예 1-1)의 스테노트로포모나스 말토피리아 유래의 올레산 수화효소 유전자와 마이크로코커스 루테우스 유래의 알코올 탈수소효소 유전자가 삽입된 pACYC/올레산 수화효소/알코올 탈수소효소 발현벡터를 상기 실시예 1-2)에서 배양된 대장균 BL21(DE3) 균주에 도입하여 1차 형질전환체를 제작하였다.

[0053] 다음으로, 상기 1차 형질전환체에 슈도모나스 플로레센스 유래의 BVMO 유전자를 발현하도록 제작된 발현벡터(Appl. Microbiol. Biotechnol. 73:10651072, 2007)를 도입하여, 올레산 수화효소, 알코올 탈수소효소 및 BVMO를 발현시킬 수 있는 2차 형질전환체를 제작하였다.

[0054] 이어, 상기 2차 형질전환체를 리젠버그 미네랄배지에서 30 및 200 rpm의 조건으로 배양하면서, 올레산 수화효소, 알코올 탈수소효소 및 BVMO를 발현시키고 1 mM의 올레산($C_{17}H_{33}COOH$)과 반응시킨 후, 에스터 가수분해효소와 다시 반응시킴으로써, 세바식산($HOOC(CH_2)_8COOH$)을 생산하였다(도 2a 및 2b). 도 2a는 상기 2차 형질전환체를 이용하여 생산된 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산의 시간의 경과에 따른 생산량의 변화를 나타낸 그라프로서, (●)는 올레산의 농도를 나타내고, (△)는 10-하이드록시스테아르산의 농도를 나타내며, (▽)는 10-키토스테아르산의 농도를 나타내고, (■)는 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산의 농도를 나타내고, (▲)는 세바식산의 농도를 나타낸다. 도 2b는 반응 종료 후, 상기 반응에서 얻어진 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산에 슈도모나스 플로레센스 유래의 에스터 가수분해효소를 처리하여 얻어진 반응산물을 GC/MS로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0055] 상기 도 2a 및 2b에서 보듯이, 올레산으로부터 생산된 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산이 대부분 세바식산으로 전환되고, 부산물로서 옥탄올이 생성됨을 알 수 있었다.

[0056] 실시예 2: 올레산으로부터 아젤레산의 생산

[0057] 1)유전자 클로닝

[0058] 에스터 가수분해효소와 알코올 탈수소효소 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제조하기 위하여, 슈도모나스

플로레센스 유래의 에스터 가수분해효소 유전자와 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소 유전자를 클로닝하였다.

[0059] 먼저, 에스터 가수분해효소 유전자는 플라스미드 벡터 pGASTON/에스터 가수분해효소(Agric Biol. Chem., 54:2039-2045, 1990)를 주형으로 하고, 제한효소인 NdeI과 XhoI의 절단부위를 포함하도록 제작된 프라이머(서열번호 1 및 2)를 이용한 PCR을 수행하여 증폭하였다.

[0060] 정방향 프라이머: 5'-gcgccatatgatgagcacatttgttgcaaaa-3'(서열번호 1)

[0061] 역방향 프라이머: 5'-ggcctcgagtcagtggtgatggtgatgatgactccgccgccacttt-3'

[0062] (서열번호 2)

[0063] 상기 증폭된 PCR 산물을 제한효소인 NdeI과 XhoI로 절단하고, 플라스미드 벡터 pCOLAduet-1(Novagen사 제품)에 삽입하여 pCOLAduet-1/에스터 가수분해효소 발현벡터를 제작하였다.

[0064] 또한, 알코올 탈수소효소는 슈도모나스 푸티다로부터 유래한 알코올 탈수소효소의 DNA 염기서열(J. Biotechnol. 262:17712-17718, 1987)을 주형으로 하고, 제한효소인 BamHI과 NotI의 절단부위를 포함하도록 제작된 프라이머(서열번호 3 및 4)를 이용한 PCR을 수행하여 증폭하였다.

[0065] 정방향 프라이머: 5'-gcgcggtatccgatgtacgactatataatcggt-3'(서열번호 3)

[0066] 역방향 프라이머: 5'-gcgcgcgggccgcttagtggtgatggtgatgatgcagacagctat-3'

[0067] (서열번호 4)

[0068] 상기 증폭된 PCR 산물을 제한효소인 BamI과 NotI로 절단하고, 상기 제작된 pCOLAduet-1/에스터 가수분해효소 발현벡터에 삽입하여, pCOLAduet-1/에스터 가수분해효소/알코올 탈수소효소 발현벡터를 제작하였다.

[0069] 2) 형질전환체를 이용한 아젤레산의 생산

[0070] 먼저, 실시예 1에서 제작된 pACYC/올레산 수화효소/알코올 탈수소효소 발현벡터와 슈도모나스 푸티다 유래의 BVMO 유전자 발현벡터(Biotechnol. Lett., 29:1393-1398, 2007)를 대장균 BL21(DE3) 균주에 도입하여 형질전환체 A를 제작하고, 상기 실시예 2-1)의 슈도모나스 플로레센스 유래의 에스터 가수분해효소와 슈도모나스 푸티다 유래의 알코올 탈수소효소 유전자가 삽입된 pCOLAduet-1/에스터 가수분해효소/알코올 탈수소효소 발현벡터를 대장균 BL21(DE3) 균주에 도입하여 형질전환체B를 제작하였다.

[0071] 상기 형질전환체A를 이용하여 올레산($C_{17}H_{33}COOH$)으로부터 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산을 생산하고, 상기 형질전환체B를 이용하여 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산으로부터 아젤레산($HOOC(CH_2)_7COOH$)을 생산하였다(도 3a 및 3b). 도 3a는 형질전환체A를 이용하여 생산된 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산의 시간의 경과에 따른 생산량의 변화를 나타낸 그래프로서, (●)는 올레산의 농도를 나타내고, (△)는 10-하이드록시스테아르산의 농도를 나타내며, (▽)는 10-키토스테아르산의 농도를 나타내고, (■)는 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산의 농도를 나타내고, (▲)는 오메가-하이드록시 노난산의 농도를 나타낸다. 도 3b는 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산에 형질전환체B를 가하여 반응시켜서 얻어진 반응산물인 아젤레산의 시간의 경과에 따른 생산량의 변화를 나타낸 그래프로서, (■)는 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산의 농도를 나타내고, (▲)는 오메가-하이드록시 노난산의 농도를 나타내며, (◇)는 9-옥소노난산의 농도를 나타내며, (◆)는 아젤레산의 농도를 나타낸다.

[0072] 상기 도 3a 및 3b에서 보듯이, 올레산으로부터 생산된 사슬내에 에스터기가 도입된 지방산이 대부분 아젤레산으로 전환되고, 부산물로서 nonanoic acid가 생성됨을 알 수 있었다.

[0073] 실시예 3: 리시놀레산으로부터 α, ω -undec-2-enedioic acid의 생산

[0074] 실시예 1에서 제작된 pACYC/올레산 수화효소/알코올 탈수소효소 발현백터와 슈도모나스 푸티다 유래의 BVMO 유전자 발현백터 및 실시예 2-1)에서 제작된 pCOLAduet-1/에스터 가수분해효소/알코올 탈수소효소 발현백터를 대장균 BL21(DE3) 균주에 도입하여 형질전환체를 제작하였다.

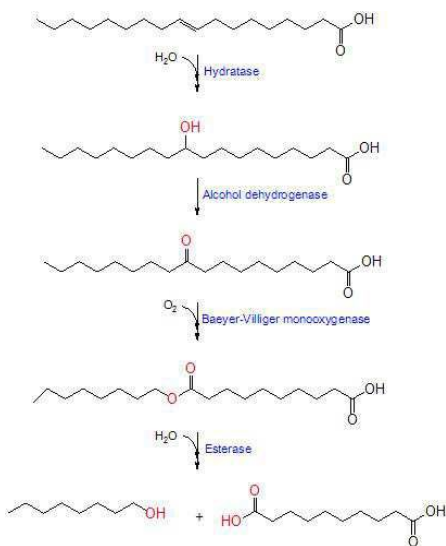
[0075] 상기 형질전환체를 이용하여 리시놀레산($C_{18}H_{34}O_2$)으로부터 α, ω -undec-2-enedioic acid를 생산하였다(도 4). 도 4는 상기 형질전환체를 이용하여 리시놀레산으로부터 생산된 α, ω -undec-2-enedioic acid의 시간의 경과에 따른 생산량의 변화를 나타낸 그래프로서, (Δ)는 리시놀레산의 농도를 나타내며, (∇)는 12-키토올레산의 농도를 나타내고, ($\blacksquare$)는 사슬내 에스테르기가 도입된 지방산의 농도를 나타내고, ($\blacktriangle$)는 ω -hydroxyundec-9-enoic acid의 농도를 나타내며, ($\diamond$)는 9-oxoundec-9-enoic acid의 농도를 나타내며, ($\blacklozenge$)는 α, ω -undec-2-enedioic acid의 농도를 나타낸다.

[0076] 상기 도 4에서 보듯이, 생물전환공정을 통하여 리시놀레산으로부터 α, ω -undec-2-enedioic acid를 생산할 수 있고, 부산물로서 heptanoic acid가 생성됨을 알 수 있었다.

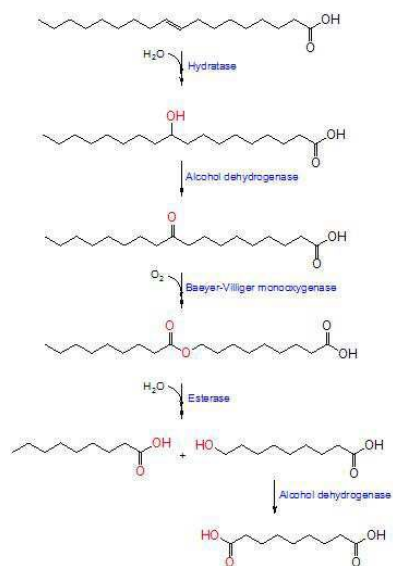
[0077] 한편, 상기 형질전환체를 이용하면 레스큐에롤린산으로부터 heptanoic acid와 α, ω -tridec-2-enedioic acid를 생산할 수 있었다.

도면

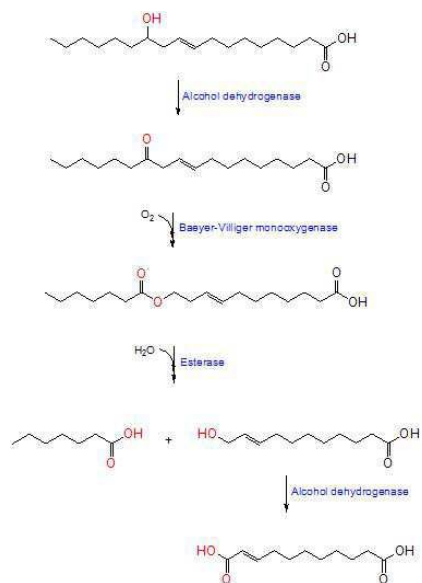
도면1a



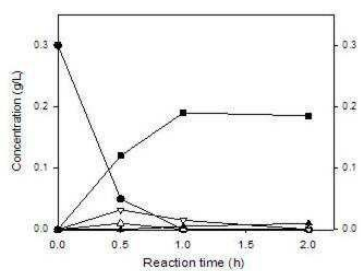
도면1b



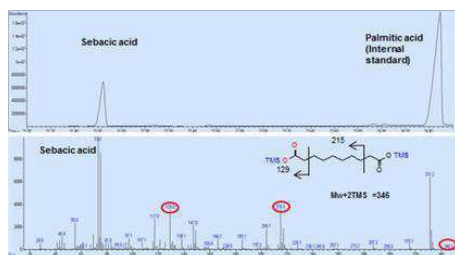
도면1c



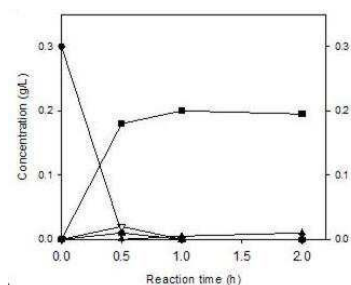
도면2a



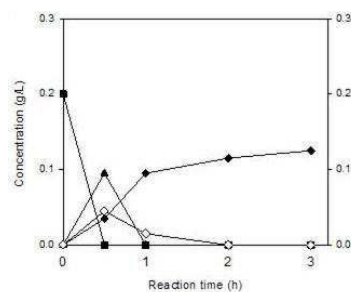
도면2b



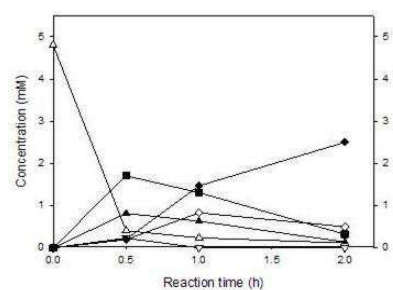
도면3a



도면3b



도면4



서열목록

- <110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation
- <120> Process for preparing medium chain dicarboxylic acids, carboxylic acids and alcohols from long chain fatty acids
- <130> PA130337/KR
- <150> KR 10-2012-0036372
- <151> 2012-04-06

<160> 5

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gctagcatgt attacagtaa tggtaactat gaa 33

<210> 2

<211

> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggctcgagct atattagttt actttctttc a 31

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

atcgaattcg tccgagttca cccgtttcga 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

atatcaagct tcagccgagc ggggtgtcct 30

<210> 5

<211> 546

<212> PRT

<213> Baeyer-Villiger monooxygenase

<400> 5

Met Thr Glu Ala Val Thr Lys Ser Asn Gly His Asn Gly Thr His Val

1 5 10 15

Thr Ala Lys Leu Asp Ala Val Val Val Gly Ala Gly Val Ala Gly Leu

20 25 30

Tyr Gln Leu Tyr Arg Leu Arg Glu Gln Gly Leu Thr Val Arg Ala Phe

35 40 45

Asp Ala Ala Ser Gly Val Gly Gly Thr Trp Tyr Trp Asn Arg Tyr Pro

50 55 60

Gly Ala Arg Phe Asp Ser Glu Ser Tyr Ile Tyr Gln Tyr Leu Phe Ser

65 70 75 80

Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Trp Ser Trp Ser Glu Arg Phe Pro Gly Gln

85 90 95

Pro Glu Ile Glu Arg Trp Leu Asn Tyr Val Ala Asp Arg Leu Asp Leu

100 105 110

Arg Lys Asp Ile Gln Phe Gly Thr Ala Ile Val Ser Ala His Phe Asp

115 120 125

Asp Ala Thr Gln Arg Trp Arg Val Thr Thr Asp Gln Gly Asp Gly Val

130 135 140

Asp Thr Gln Phe Ile Ile Thr Cys Cys Gly Met Leu Ser Ala Pro His

145 150 155 160

Val Ser Phe Pro Gly Gln Asp Thr Phe Gly Gly Gln Val Phe His Thr

165 170 175

Ala Arg Trp Pro Ala Gln Pro Val Asp Phe Ala Gly Lys Arg Val Gly

180 185 190

Ile Val Gly Asn Gly Ala Thr Gly Ile Gln Val Ile Gln Thr Ile Ala

195 200 205

Ser Glu Val Gly His Leu Lys Val Phe Met Arg Thr Pro Gln Tyr Ile

210 215 220

Ile Pro Met Lys Asn Pro Lys Tyr Gly Ala Ala Asp Ala Glu Ala Tyr

225 230 235 240

Lys Ser Lys Phe Lys His Phe Val Glu Arg Leu Pro His Thr Phe Thr
 245 250 255
 Gly Phe Glu Tyr Asp Phe Glu His Ala Trp Ala Ala Leu Thr Ala Glu
 260 265 270

 Lys Arg Arg Glu Val Leu Glu Asp Cys Trp Asn Asp Gly Ser Leu Lys
 275 280 285
 Leu Trp Ile Ser Ser Phe Ala Glu Leu Phe Phe Asp Asp Ala Val Asn
 290 295 300
 Gly Glu Ile Ser Glu Phe Val Arg Glu Lys Met Arg Glu Arg Leu Lys
 305 310 315 320
 Asp Pro Lys Leu Cys Asp Leu Leu Ile Pro Gln Asp Tyr Gly Phe Gly
 325 330 335
 Thr His Arg Val Pro Leu Glu Gln Asn Phe Leu Glu Ala Phe His Arg

 340 345 350
 Pro Asn Val Glu Ile Val Glu Val Lys Thr Asn Pro Ile Glu Cys Val
 355 360 365
 Thr Arg Glu Gly Ile Gln Leu Ala Asp Gly Thr Val His Glu Leu Asp
 370 375 380
 Ile Ile Ile Leu Ala Thr Gly Phe Asp Ala Gly Ser Gly Ala Leu Met
 385 390 395 400
 Arg Ile Asp Ile Arg Gly Arg Gly Gly Arg Ser Leu Lys Asp Glu Trp
 405 410 415

 Ser Arg Asp Ile Arg Thr Thr Met Gly Leu Gln Ile His Gly Tyr Pro
 420 425 430
 Asn Leu Phe Thr Thr Ala Val Pro Leu Ala Pro Ser Ala Ala Leu Cys
 435 440 445
 Asn Met Thr Thr Cys Leu Gln Gln Gln Val Glu Trp Ile Asp Asp Cys
 450 455 460
 Ile Arg Tyr Val Arg Ala Asn Ser Leu Ala Ala Val Glu Pro Thr Lys
 465 470 475 480
 Glu Thr Gln Asp Ala Trp Val Ala His His Asp Glu Ile Ala Asn Ala

485 490 495
 Thr Leu Ile Ala Lys Thr Asn Ser Trp Tyr Leu Gly Ser Asn Val Lys
 500 505 510
 Gly Lys Pro Arg Arg Val Leu Ser Tyr Cys Gly Gly Val Gly Ala Tyr
 515 520 525
 Arg Gln Lys Cys Asp Glu Val Ala Ala Ser Gly Tyr Gln Gly Phe Ala
 530 535 540
 Met Arg
 545