



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.
C12N 9/14 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0039463
(43) 공개일자 2007년04월12일

(21) 출원번호 10-2006-0097390
(22) 출원일자 2006년10월02일
심사청구일자 2006년10월02일

(30) 우선권주장 1020050094580 2005년10월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인 한국해양연구원
경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자 김상진
경기도 안산시 사2동 요진아파트 213동 102호
강성균
경기도 안양시 동안구 평촌동 72-1번지 대우아파트 112동 506호
황영옥
경기도 안산시 사2동 선경아파트 104동 202호
우정희
경기도 안산시 단원구 고잔1동 514번지
조장천
서울특별시 구로구 구로본동 구로 중앙하이츠 105동 901호
강지현
경기도 안산시 사동 1384-4 301호
권개경
경기도 안산시 일동 579-3

(74) 대리인 유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 및 이를 이용한광학순도 에폭사이드의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 해양 미생물 유래의 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질 및 다양한 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학 활성을 갖는 상기 가수분해효소를 사용하여 높은 광학순도를 갖는 에폭사이드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 광학선택적 가수분해효소 단백질은 약학산업에서 약리활성이 있는 광학순도 에폭사이드를 고효율로 생합성하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1b

특허청구의 범위

청구항 1.

에리스로박터 리토랄리스(*Erythrobacter litoralis*) 균주로부터 분리 및 정제되고, 하기 1) 내지 3)의 특징을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소(enantioselective epoxide hydrolase) 단백질:

- 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량 30 내지 45kDa,
- 2) 최적 pH 6.5 내지 8.0, 및
- 3) 최적 온도 40 내지 60℃.

청구항 2.

제 2 항에 있어서, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 13인 아미노산 서열, SEQ ID NO: 15인 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 17인 아미노산 서열을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, 상기 SEQ ID NO: 13인 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 14인 염기서열에 의해 코딩되며, SEQ ID NO: 15를 갖는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 16인 염기서열에 의해 코딩되며, 또는 SEQ ID NO: 17을 갖는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 18인 염기서열에 의해 코딩되는 것인 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질.

청구항 4.

스핑고픽시스 알라스켄시스(*Sphingophyxis alaskensis*) 균주로부터 분리 및 정제되고, 하기 1) 내지 3)의 특징을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질:

- 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량 45 내지 50kDa,
- 2) 최적 pH 7.0 내지 8.0, 및
- 3) 최적 온도 30 내지 40℃.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 28인 아미노산 서열을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 29인 염기서열에 의해 코딩되는 것인 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질.

청구항 7.

노보스핑고비움 아로마티시보란스(*Novosphingobium aromaticivorans*) 균주로부터 분리 및 정제되고, 하기 1) 내지 3)의 특징을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질:

- 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량 40 내지 45kDa,
- 2) 최적 pH 7.0 내지 8.0, 및
- 3) 최적 온도 30 내지 40℃.

청구항 8.

제 7 항에 있어서, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 30인 아미노산 서열을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 31인 염기서열에 의해 코딩되는 것인 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질.

청구항 10.

로도박테리얼스속 균주 HTCC2654(*Rhodobacteriales bacterium*) 균주로부터 분리 및 정제되고, 하기 1) 내지 3)의 특징을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질:

- 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량 35 내지 40kDa,
- 2) 최적 pH 7.0 내지 8.0, 및
- 3) 최적 온도 30 내지 40℃.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 32인 아미노산 서열을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 33인 염기서열에 의해 코딩되는 것인 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질.

청구항 13.

제 1항 내지 12항 중 어느 한 항에 따른 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질을 이용하여 다양한 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학활성을 갖는 광학순도 에폭사이드 제조방법.

청구항 14.

제 13항에 있어서, 상기 에폭사이드 기질은 α -메틸스티렌 옥사이드(methylstyrene oxide), 스티렌 옥사이드(styrene oxide), 글리시딜 페닐 에테르(glycidyl phenyl ether, GPE), 에피클로로하이드린(epichlorohydrin), 에피플루오로하이드린(epifluorohydrin), 1,2-에폭시부탄(1,2-epoxybutane) 및 1,2-에폭시헥산(1,2-epoxyhexane)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 광학순도 에폭사이드 제조방법.

청구항 15.

제 13항에 있어서, 상기 가수분해효소는 SEQ ID NO: 13인 아미노산 서열, SEQ ID NO: 15인 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 17인 아미노산 서열을 가지며, pH 6.5 내지 8.0 및 온도 40 내지 60°C에서 상기 가수분해반응을 수행하는 것인, 광학순도 에폭사이드 제조방법.

청구항 16.

제 13항에 있어서, 상기 가수분해효소는 SEQ ID NO: 28인 아미노산 서열, SEQ ID NO: 30인 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 32인 아미노산 서열을 가지며, pH 7.0 내지 8.0 및 온도 30 내지 40°C에서 상기 가수분해반응을 수행하는 것인, 광학순도 에폭사이드 제조방법.

명세서**발명의 상세한 설명****발명의 목적****발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

본 발명은 다양한 에폭사이드 기질에 대해 광학선택적 가수분해효소 및 상기 효소를 이용하여 다양한 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학활성을 갖는 광학순도 에폭사이드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

의약품을 포함한 많은 생리활성물질들은 여러 종류의 거울상 이성질체(enantiomer)가 존재하며, 이들 중 특정 이성질체만이 올바른 활성을 보여주고 다른 이성질체는 경우에 따라 심각한 부작용을 유발하는 경우가 많다. 이와 같이, 안정성 및 생리활성의 측면에서 단일 거울상 이성질체의 생산이 중요시되고 있어, 최근 순수한 광학활성물질 합성에 대해 많은 연구가 진행되고 있다.

광학활성물질 합성에 사용될 수 있는 대표적인 합성 중간체로는 광학순도 에폭사이드(enantiopure epoxide) 및 인접 디올(vicinal diol) 등이 알려져 있으며(Grogan, et al., FEMS Microbiol. Lett., 141:239-243, 1996 및 Arahira, et al., Eur. J. Biochem., 267:2649-2657, 2000), 반응성이 우수하고 다양한 반응을 유도할 수 있기 때문에, 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용되고 있다.

특히, 광학순도 에폭사이드는 여러 종류의 키랄화학축매 및 생축매를 이용하여 제조할 수 있는데, 특히 라세믹 에폭사이드(racemic epoxide) 기질의 각 이성질체에 대한 에폭사이드 가수분해효소의 선택적 분해능 차이를 이용하여 단일 광학 이성질체만을 제조하는 광학선택적 동력학적 가수분해 기술은 관심의 대상이 되고 있다. 이 방법은 저가의 생축매를 사용하여 저가의 라세믹 기질로부터 고부가가치의 광학순도 에폭사이드를 제조할 수 있기 때문에 상업화될 가능성이 높은 기술이다. 에폭사이드 가수분해효소는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 (R) 또는 (S)-이성질체 중 한 가지 이성질체만을 광학선택적으로 디올로 가수분해하여 제거시키고 나머지 이성질체만을 남겨 광학적으로 순수한 에폭사이드를 제조할 수 있는 효소이다. 또한, (R) 또는 (S)-이성질체에 대한 에폭사이드 가수분해효소의 광학선택성은 미생물의 종류 및 기질 구조에 따라 결정된다.

에폭사이드 가수분해효소(epoxide hydrolyse, EHase; EC 3.3.2.3)는 박테리아, 효모, 곰팡이, 곤충, 식물 및 포유동물 등에서 분리된 유비쿼터스 효소로 알려져 있다(Weijers, et al., J. Mol. Catal. B Enzym., 6:199-214, 1999 및 Archelas, &

Furstoss, Curr. Opin. Chem. Biol., 5:112-119, 2001). 상기 효소는 반응속도 광학분할(kinetic resolution)에 의해 광학순도 에폭사이드 생산에 이용될 수 있기 때문에, 여러 개의 에폭사이드 가수분해효소들이 개발되어 왔다(Tokunaga, et al., Science, 277:936-938, 1997).

그러나, 의약품 산업에 있어서 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소는 그 수가 매우 제한되어 있기 때문에, 광학순도 에폭사이드를 생산할 수 있는 새로운 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소가 절실히 요구되어지고 있다.

대부분의 에폭사이드 가수분해효소는 프로테아제, 리파아제, 에스테라제, 디할로게나제 및 페록시다제(Nardini, & Dijkstra, Curr. Opin. Struct. Biol., 9:732-737, 1999)를 포함하는 α/β 가수분해효소 군에 포함된다(Rick, et al., J. Am. Chem. Soc., 121:7417-7418, 1999). α/β 도메인은 중앙, 평행 또는 α 나선형에 의해 둘러싸인 혼성 β 시트로 이루어져 있다. 이러한 효소의 촉매 친핵성(catalytic nucleophile)은 공유결합된 중간체의 극 전자친화성(polarized electrophile) 기질을 공격하고, 이어 가수분해시키는 특징적인 2단계 과정을 수행한다(Yamada, et al., J. Biol. Chem., 275:23082-23088, 2000). 보존된 촉매성 3개의 α/β 가수분해효소는 친핵성 잔기(Asp 또는 Ser), 아세트산 잔기(Asp 또는 Glu) 및 보존된 히스티딘 잔기로 이루어진 효소들로 포개져 있다. 상기 친핵성은 아미노산-서열 모티프, Sm-X-Nu-Sm(Sm= small residues, X= any residues 및 Nu= nucleophile)에 적합하다. 또 하나의 보존된 아미노산 서열은 효소의 음이온 공(oxyanion hole)을 포함하고 있는 HGXP 모티프이다(Ollis, et al., Protein Eng., 5:197-211, 1992).

그러나, 에폭사이드 가수분해효소들 중 보존되는 중요서열은 상기 효소의 중요부위에 있는 2개 또는 3개의 아미노산에만 제한되어 있기 때문에, 상동성 분석에 의한 스크리닝을 어렵게 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 다양한 해양으로부터 에리스로박터 종, 스펅고피식스 종, 노보스핑고비움 종 및 로도박테리엘즈 종을 스크리닝하여 선별한 후, 이 균주의 게놈 DNA 서열상에 존재하는 ORF 서열을 비교분석하여 후보 유전자를 선정한 다음, 상기 유전자를 발현시켜 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학활성을 갖는 광학선택적 가수분해효소 단백질을 분리 및 정제함으로써 본 발명을 완성하였다.

본 발명의 목적은 높은 광학순도로 에폭사이드를 제조할 수 있는, 해양 미생물유래의 광학선택적 에폭사이드 가수분해 효소 단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질을 이용하여 다양한 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학활성을 갖는 광학순도 에폭사이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 다양한 해양으로부터 수득한 퇴적물로부터 다양한 에폭사이드 기질에 대해 광학선택적 가수분해 효소 활성을 갖는 에리스로박터속 균주, 스펅고피식스속 균주, 노보스핑고비움속 균주 및 로도박테리엘스속 균주, 및 이를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 에리스로박터 리토랄리스(*Erythrobacter litoralis*) 균주로부터 분리 및 정제되고, 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량 30 내지 45kDa; 2) pH 6.5 내지 8.0 및 3) 온도 40 내지 60°C에서 최적 활성을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소(entantioselective epoxide hydrolase) 단백질을 제공한다.

바람직하게는, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 13인 아미노산 서열, SEQ ID NO: 15인 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 17인 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 단백질은 상기 SEQ ID NO: 13인 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 14인 염기서열에 의해 코딩되며, SEQ ID NO: 15를 갖는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 16인 염기서열에 의해 코딩되며, 또는 SEQ ID NO: 17을 갖는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 18인 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

또한, 본 발명은 스펅고픽시스 알라스켄시스(*Sphingophyxis alaskensis*) 균주로부터 분리 및 정제되고, 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량 45 내지 50kDa; 2) pH 7.0 내지 8.0 및 3) 온도 30 내지 40°C에서 최적 활성을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질을 제공한다. 바람직하게는, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 28인 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는, SEQ ID NO: 29인 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

또한, 본 발명은 노보스핑고비움 아로마티시보란스(*Novosphingobium aromaticivorans*) 균주로부터 분리 및 정제되고, 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량 40 내지 45kDa; 2) pH 7.0 내지 8.0 및 3) 온도 30 내지 40°C에서 최적 활성을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질을 제공한다. 바람직하게는, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 30인 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는, SEQ ID NO: 31인 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

또한, 본 발명은 로도박테리얼스속 균주(*Rhodobacterales bacterium*) 균주로부터 분리 및 정제되고, 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량 35 내지 40kDa; 2) pH 7.0 내지 8.0 및 3) 온도 30 내지 40°C에서 최적 활성을 갖는 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질을 제공한다. 바람직하게는, 상기 단백질은 SEQ ID NO: 32인 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는, SEQ ID NO: 32인 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

아울러, 본 발명은 상기 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질을 이용하여 다양한 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학활성을 갖는 광학순도 에폭사이드 제조방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 에리스로박터 리토랄리스(*Erythrobacter litoralis*) 균주, 스팅고픽시스 알라스켄시스(*Sphingopyxis alaskensis*) 균주, 노보스핑고비움 아로마티시보란스(*Novosphingobium aromaticivorans*) 균주 및 로도박테리얼스속 균주(*Rhodobacterales bacterium*) 균주로부터 분리 및 정제된 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질을 제공한다.

우선, 본 발명에서는 다양한 해양으로부터 에리스로박터 종(*Erythrobacter* sp.), 스팅고픽시스 종(*Sphingopyxis* sp.), 노보스핑고비움 종(*Novosphingobium* sp.) 및 로도박테리얼스 종(*Rhodobacterium* sp.) 균주를 스크리닝하여 선별한 후, 이 균주의 게놈 DNA 서열상에 존재하는 ORF 서열을 비교분석하여 후보 유전자를 선정한 다음, 상기 유전자를 발현시켜 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학활성을 갖는 광학선택적 가수분해효소 단백질을 분리 및 정제하였다. 구체적으로, 다양한 해양으로부터 수득한 미생물을 대상으로 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학선택적 가수분해효소 활성을 갖는 에리스로박터 종, 스팅고픽시스 종, 노보스핑고비움 종 및 로도박테리얼스 속 균주를 하기 1) 내지 4) 단계로 구성된 스크리닝 방법을 이용하여 선별하였다:

- 1) 다양한 해양으로부터 대상 시료를 준비하는 단계;
- 2) 상기 대상 시료를 영양 풍부 배지에 배양하여 양성 균주를 선별하는 단계;
- 3) 상기에서 선별된 균주의 게놈 DNA 서열상에 존재하는 ORF 서열을 분석한 후, 종래에 알려진 에폭사이드 가수분해효소 아미노산 서열과 비교분석하여 후보 유전자를 선정하는 단계 및
- 4) 상기에서 선정된 후보 유전자를 발현벡터에 클로닝하여 다양한 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학선택적 가수분해 활성을 나타내는지 확인하는 단계.

상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1의 대상 시료는 특별히 제한되는 것은 아니나, 강원도 후진, 경남 울릉도 및 독도, 부산 태종대, 경기 시화 하천 및 일본 가고시마 현과 같은 다양한 해양환경으로부터 수득한 해양 퇴적물(marine sediment), 해면동물(sponge) 및 조류(algae)를 포함하는 것이 바람직하다. 이때, 상기 대상 시료 중 해양 퇴적물 등은 수득한 후 바로 사용하여 균주를 분리할 수 있으나, 퇴적물을 (반죽한 후) 선택 영양(풍부) 배지에 농후배양 후(시켜) 균주를 분리할 수 있다.

상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 2의 영양 풍부 배지는 특별히 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 1 중량%의 스티렌 옥사이드(SO) 또는 알칸 혼합물(nC8, C10, nC12, nC13, nC14, nC15, nC16, C17, nC18, 및 사이클로헥산, (Sigma사, MO, USA)을 1리터의 해수인 미네랄 염 배지(mineral salt medium, MM2)에 혼합하여 제조하는 것이 바람직하다.

상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 3의 균주는 *Erythrobacter litoralis*, *Erythrobacter* sp. 2216.25.25, *Erythrobacter aquimaris* SW-110, *Erythrobacter gaetabuli*, *Alterierythrobacter epoxidivorans*, *Erythrobacter luteolus* SW-109, *Erythrobacter* sp. MBIC3031 및 *Erythrobacter longus*로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 이때, 상기 균주는 보다 상세하게 *Erythrobacter litoralis* HTCC2594, *Erythrobacter* sp. AKS329, *Erythrobacter* sp. *aquimaris* JCS325, *Erythrobacter gaetbuli* JCS340 JCS325, *Erythrobacter* sp. JCS340, *Erythrobacter* sp. JCS350, *Erythrobacter* sp. JCS358, *Alterierythrobacter* sp. JCS350, *Erythrobacter aquimaris* sp. JCS360, *Erythrobacter aquimaris* sp.

JCS364, *Erythrobacter luteolus* sp. JCS368, *Erythrobacter* sp. HJ239, *Erythrobacter longus* sp. DokDo 15로 이루어진 에리스로박터 속 균주로부터 선택될 수 있으나(표 2 참조), 이에 제한되는 것은 아니며, *Erythrobacter litoralis* DMS8509 및 *Erythrobacter geatbuli* KCTC12227 균주를 포함할 수 있다(표 2 참조).

또한, 단계 3의 ORF 서열분석은 Ensoltek의 ProteinFinder(www.ensoltek.com) 및 BLAST 프로그램을 이용하여 분석할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 기존에 알려진 에폭사이드 가수분해효소의 아미노산 서열과 상기에서 선택된 후보 에폭사이드 가수분해효소의 아미노산 서열 분석은 CLUSTAL W 프로그램(Thompson, et al., Nucleic. Acids. 22:4673-4680, 1994)을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

또한, 단계 3의 후보 유전자로는 에리스로박터 *litoralis* HTCC2594 균주에서는 SEQ ID NO: 13으로 기재되는 EEH1 유전자, SEQ ID NO: 16으로 기재되는 EEH2 유전자 및 SEQ ID NO: 18로 기재되는 EEH3 유전자를, 스펅고피식스 알라스켄시스 균주에서는 SEQ ID NO: 29로 기재되는 sEEH 유전자를, 노보스펑고비움 아로마티시보란스 균주에서는 SEQ ID NO: 31로 기재되는 nEEH 유전자를, 로도박터레일스속 균주 HTCC2654 균주에서는 SEQ ID NO: 33으로 기재되는 rEEH 유전자를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 다양한 에폭사이드 기질을 가수분해할 수 있는 ORF 부위 전체 또는 일부 서열을 포함할 수 있다.

상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 4의 발현벡터로는 통상의 알려진 벡터를 사용할 수 있으며, 예를들어, pET-24a(+) 벡터를 사용할 수 있다.

또한, 단계 4의 가수분해 활성은 반응 혼합물로부터 추출된 에폭사이드 추출물 및 비-추출된 디올(diol)의 분광학적 양을 자외선 분광기로 측정하는 디올 분석법 및 가스 크로마토그래피(GC)를 이용한 방법으로 측정할 수 있다.

상기와 같은 스크리닝 방법으로 다양한 해양으로부터 4개의 후보 균주를 선별한 후, 각각의 균주로부터 다양한 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학선택적 가수분해 활성을 갖는 에폭사이드 가수분해효소 단백질을 분리 및 정제하였다. 에폭사이드 가수분해 효소 단백질의 분리 및 정제는 통상의 단백질 효소 분리 및 정제기술을 적용하여 수행할 수 있다. 예를 들면, 에폭사이드 가수분해효소의 발현을 위해 LB medium에 Kanamycin (50 ug/ml)이 첨가된 medium에서 seed culture 한 후 동일한 main medium에 1% 접종하여 3시간 배양 후 IPTG를 최종 1mM의 농도로 첨가하여 발현하였다. 발현후, 순수 분리의 용이를 위해 His-Tag이라는 oligopeptide를 접합시켰고, His tag 분리는 Talon resin (Clontech, Co.)를 이용하여 분리하였다.

또한, 상기에서 분리 및 정제된 에폭사이드 가수분해효소 단백질을 코딩하는 유전자를 동정하기 위하여, 상기 균주의 게놈 DNA 서열상에 있는 ORF 서열을 분석한 결과, 에리스로박터 *litoralis* HTCC2594 균주에서는 1.122bp(EEH1, SEQ ID NO: 14), 870bp(EEH2, SEQ ID NO: 16) 및 888bp(EEH3, SEQ ID NO: 18)로 이루어진 세 개의 유전자를 분리하였다.

스펑고피식스 알라스켄시스에서는 sEEH 유전자(SEQ ID NO: 29)를, 노보스펑고비움 아로마티시보란스에서는 nEEH 유전자(SEQ ID NO: 31)를 그리고 로도박터레일스속 균주 HTCC2654에서는 rEEH 유전자(SEQ ID NO: 33)를 각각 분리할 수 있었다. 또한, 상기 유전자를 각각 pET-24a(+) 발현벡터에 클로닝 한 후 BL21-CodonPlus (DE3)-RP (Novagen) 균주에 각각 도입하여 SDS-PAGE로 전기영동시킨 결과, 에리스로박터 *litoralis* HTCC2594 균주로부터는 41kDa(rEEH1, SEQ ID NO: 13), 33.4kDa(rEEH2, SEQ ID NO: 15) 및 34.5 kDa(rEEH3, SEQ ID NO: 17), 스펅고피식스 알라스켄시스로부터는 49kDa(sEEH, SEQ ID NO: 28), 노보스펑고비움 아로마티시보란스부터는 43kDa(nEEH, SEQ ID NO: 30) 및 로도박터레일스속 균주 HTCC2654로부터는 36kDa(rEEH, SEQ ID NO: 32)의 분자량을 가진 에폭사이드 가수분해효소를 분리할 수 있었다(도 9).

한편, 본 발명의 광학선택적 가수분해 활성을 갖는 가수분해효소 단백질은 상기 *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 균주로부터 분리 및 정제되고, 하기 1) 내지 3)의 특징을 갖는 것이 바람직하다:

- 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량이 30 내지 45kDa;
- 2) 최적 pH는 6.5 내지 8.0 및
- 3) 최적 온도는 40 내지 60℃.

이때, 상기 균주로부터 분리된 rEEH1, rEEH2 및 rEEH3 가수분해효소의 분자량은 각각 41kDa(SEQ ID NO: 13), 33.4kDa(SEQ ID NO: 15) 및 34.5kDa(SEQ ID NO: 17)인 것이 바람직하며(도 6A 및 6B 참조), 최적 pH는 각각 6.5(rEEH1), 7.5(rEEH2) 및 8.0(rEEH3)인 것이 바람직하며(도 7A 참조), 최적 온도는 50°C(rEEH1), 55°C(rEEH2) 및 45°C(rEEH3)인 것이 바람직하다(도 7B 참조).

또한, 본 발명의 광학선택적 가수분해 활성을 갖는 가수분해효소 단백질은 상기 스펅고픽시스 알라스켄시스 균주로부터 분리 및 정제되고, 하기 1) 내지 3)의 특징을 갖는 것이 바람직하다:

- 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량이 45 내지 50kDa;
- 2) 최적 pH는 7 내지 8.0 및
- 3) 최적 온도는 30 내지 40°C.

이때, 상기 균주로부터 분리된 sEEH 가수분해효소의 분자량은 49kDa(SEQ ID NO: 28)인 것이 바람직하고(도 9 참조), 최적 pH는 각각 약 7인 것이 바람직하며, 최적 온도는 30-40°C인 것이 바람직하다.

또한, 본 발명의 광학선택적 가수분해 활성을 갖는 가수분해효소 단백질은 상기 노보스핑크비움 아로마티시보란스 균주로부터 분리 및 정제되고, 하기 1) 내지 3)의 특징을 갖는 것이 바람직하다:

- 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량은 40 내지 45kDa;
- 2) 최적 pH는 7 내지 8.0 및
- 3) 최적 온도는 30 내지 40°C.

이때, 상기 균주로부터 분리된 nEEH 가수분해효소의 분자량은 43kDa(SEQ ID NO: 30)인 것이 바람직하고(도 9 참조), 최적 pH는 각각 7.0-8.0인 것이 바람직하며, 최적 온도는 30-40°C인 것이 바람직하다.

또한, 본 발명의 광학선택적 가수분해 활성을 갖는 가수분해효소 단백질은 상기 로도박터레일스속 균주 HTCC2654 균주로부터 분리 및 정제되고, 하기 1) 내지 3)의 특징을 갖는 것이 바람직하다:

- 1) SDS-PAGE로 측정시 분자량 35 내지 40kDa;
- 2) 최적 pH 7 내지 8.0 및
- 3) 최적 온도 30 내지 40°C.

이때, 상기 균주로부터 분리된 rEEH 가수분해효소의 분자량은 36kDa(SEQ ID NO: 32)인 것이 바람직하고(도 9 참조), 최적 pH는 각각 7-8인 것이 바람직하며, 최적 온도는 30-40°C인 것이 바람직하다.

아울러, 본 발명은 상기 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 단백질을 이용하여 다양한 에폭사이드 기질에 대해 높은 광학활성을 갖는 광학순도 에폭사이드 제조방법을 제공한다.

본 발명의 구체적인 일례로서, 2-100 mM racemic styrene oxide를 EEH1, EEH2, EEH3, sEEH, nEEH, rEEH 정제된 단백질이나, recombinant plasmid가 함유된 E.coli 혹은 wild type strain을 이용하여 각각의 단백질의 상기 표기된 최적 조건에서 반응시킨 후(GC분석에 의해 확인), 일정한 시간후에 나온 에폭사이드를 사용하는 방법이 있다.

본 발명에 따른 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소의 기질인 에폭사이드는 특별히 제한되는 것은 아니나, 스티렌옥사이드(styrene oxide, SO), 글리시딜 페닐 에테르(glycidyl phenyl ether, GPE), 에피클로로하이드린(epichlorohydrin, ECH), 에피플루오로하이드린(epifluorohydrin, EF), 1,2-에폭시부탄(1,2-epoxybutane, EB) 및 1,2-에폭시헥산(1,2-epoxyhexane, EX)으로 이루어진 균으로부터 선택되는 것일 수 있다.

또한, 상기 가수분해효소는 SEQ ID NO: 13인 아미노산 서열, SEQ ID NO: 15인 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 17인 아미노산 서열을 가지며, pH 6.5 내지 8.0 및 온도 40 내지 60°C에서 상기 가수분해반응을 수행하는 것이 바람직하다.

또한, 상기 가수분해효소는 SEQ ID NO: 28인 아미노산 서열, SEQ ID NO: 30인 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 32인 아미노산 서열을 가지며, pH 7.0 내지 8.0 및 온도 30 내지 40°C에서 상기 가수분해반응을 수행하는 것이 바람직하다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

광학선택적 에폭사이드 가수분해효소(enantioselective EHase)-생산용 균주의 스크리닝(screening)

<1-1> 재료 및 시약

본 발명에 사용된 에폭사이드(epoxide)는 도 1a에 기재하였다. 이때, 라세믹스티렌옥사이드(racemic styrene oxide)는 Fluka사에서, pure (R)-/(S)-스티렌옥사이드 및 나머지 라세믹스티렌옥사이드는 Aldrich사에서 각각 구입하였다. 키랄덱스 감마-사이클로덱스트린 트리플루오로아세틸(chiral dex gamma-cyclodextrin trifluoroacetyl, G-TA) 모세관 GC 컬럼은 Astec사(Whippany, NJ)에서, 균주 배양에 사용된 다른 배지 조성물들은 Merk사 및 Difco사에서 구입하였다.

<1-2> 대상 시료 준비

해양 퇴적물(marine sediment), 해면동물(sponge) 및 조류(algae)는 후진(depth, ~20m; 37° 51' N, 129° 45' E), 울릉도(depth, ~758.7m; 38° 00' N, 131° 27' E), 태종대(depth, ~20m; 35° 14' N, 129° 45' E), 시화(Yellow Sea, Korea) 및 가고시마현(depth, 100~200 m; 31° 09' N, 130° 48' E)으로부터 수득하였다. 이때, 상기 퇴적물은 집게(grab), 주상채니기(core sampler) 및 스쿠버 다이빙과 같은 방법으로 수득한 후 본 발명의 대상 시료로 사용하였다. 구체적으로, 상기 대상 시료 중 0.3g의 차가운 퇴적물을 반죽한 후 영양 풍부 배양액에 배양하여 균주를 분리하였다. 또한, 본 발명에 사용된 모든 시료는 법적 관련기관의 동의하에 수득하였다.

<1-3> 균주 분리

영양 풍부 배지는 1%의 스티렌옥사이드(SO) 또는 알칸 혼합물(nC8, C10, nC12, nC13, nC14, nC15, nC16, C17, nC18, 및 사이클로헥산, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 1리터의 해수인 미네랄 염 배지(MM2)에 혼합하여 제조하였다(Ferrara-Guerrero, et al., Handbook of methods in microbial ecology. Lewis Publishers, Florida, p9-19, 1993). 25°C에서 7일간 배양하여 클론들을 분리하였다. 또한, 연속적인 접종 및 25°C의 ZoBell 아가(agar)에 접종하여 상기에서 분리된 클론들로부터 균주를 분리하여 본 발명에 이용하였다.

<1-4> 균주 배양

E. litoralis HTCC2594 균주는 0.5% 펩톤, 0.1% 효모 추출물 및 75% 해수(pH 7.5)로 구성된 30°C의 ZoBell 2216E 배지에서 1일간 배양하였다. 스펅고피시스 알라스켄시스(*Sphingopyxis alaskensis*) 및 노보스핑크비움 마로마티시보란스(*Novosphingobium aromaticivorans*) 균주는 0.5% 펩톤, 0.3% 효모 추출물로 구성된 30°C의 중성 배지에서 배양하였고, 로도박테리일스속 균주(*Rhodobacteriales bacterium*) HTCC2654 균주는 25°C의 marine 배지 2216(Difco)에서 배양하였다. 또한, 상기 균주는 20% 글리세롤이 함유된 ZoBell 2216E 액체 배지에 현탁시킨 후 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다. DH5a 및 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 박테리아 세포(Stratagene, LaJolla, CA)는 각각 플라스미드 증식 및 유전자 발현용 균주로서 사용하였고, 적합한 항생제가 첨가된 37°C Luria-Bertani(LB) 배지에서 배양하였다.

<1-5> 에폭사이드 가수분해효소 생산용 균주의 동정

상기와 같은 방법으로, 본 실시예에서는 해양에서 수득한 시료로부터 총 181종의 균주를 분리할 수 있었고, 이 중 31종이 스티렌옥사이드 기질에 대해 가수분해할 수 있음을 분광학적 분석으로 확인하였다(표 1). 또한, 상기 균주의 광학선택적 가수분해효소 활성을 가스 크로마토그래피로 측정된 결과, (R)-에폭사이드 중 하나인 스티렌옥사이드를 선택적으로 가수분해할 수 있는 최종 1종인 JCS 358 균주를 선별할 수 있었다(표 1 및 도 1b).

[표 1]

광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 생산용 해양 미생물 균주의 스크리닝 및 분리된 균주의 16S rRNA 유전자 서열 분석

Sampling site	Strains	The phylogenetic grouping of the strains (number/%)	Screening	
			Diol assay	GC analysis
Hujin	64	(-pro ^a : 4 (6.25%) (-pro ^b : 47 (73.4%) G.P.: 4 (6.25%) CFB ^d : 9 (14.1%)	18	0
Uleungdo	9	(-pro: 3 (33.3%) G.P.: 6 (66.7%)	3	0
Dokdo	9	(-pro: 3 (33.3%) (-pro: 2 (22.2%) G.P.: 3 (33.3%) CFB: 1 (11.1%)	2	0
Taejongdae	18	(-pro: 8 (44.4%) (-pro: 6 (33.3%) G.P.: 2 (11.1%) CFB: 2 (11.1%)	8	0
Sihwa	15	(-pro: 3 (20%) (-pro: 8 (53.3%) G.P.: 2 (13.3%) CFB: 2 (13.3%)	0	0
Kagoshima, Japan	66	(-pro: 26 (39.4%) (-pro: 13 (19.7%) G.P.: 21 (31.8%) CFB: 6 (9.1%)	-	1
Total	181	(-pro: 44 (24.4%) (-pro: 79 (43.6%) G.P.: 38 (21.0%) CFB: 20 (11.0%)	31	1

a α-pro: α-프로테오박테리아; b γ-pro: γ-트로테오박테리아; c G.P: 그람-양성균 및 d CFB: 사이토파가-플라보박테리아-박테로이드(Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides)

<1-6> JCS 358 균주의 16S rRNA 서열 분석

한편, 본 실시예에서는 상기 균주의 게놈 DNA 서열상에 있는 16S rRNA 유전자의 서열을 분석하여 그 특징을 조사하였다. 구체적으로, 상기 균주의 게놈 DNA를 주형으로 SEQ ID NO: 2(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', 27F)로 기재되는 정방향 프라이머 및 SEQ ID NO: 3(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 1518R)으로 기재되는 역방향 프라이머를 이용한 PCR 방법(Weisburg, et al., J. Bacteriol., 173:697-703, 1991)으로 SEQ ID NO: 1로 기재되는 JCS 358 균주의 16S rRNA 서열을 증폭하였고, BigDye terminator kit(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용한 자동화 서열분석기로 상기 염기서열을 분석하였다.

그 결과, 상기 JCS 358 균주는 에리스로박터 종 중 하나인 에리스로박터 개트불리(E.gaetbuli)와 약 98%의 염기서열 상동성을 보였다(표 2). 특히, 에리스로박터 종은 해수, 퇴적물 및 갯벌과 같은 다양한 해양에서 서식하는 호기성 중속영양생물인 α-프로테오박테리아로 알려져 있기 때문에, 본 실시예에서는 에폭사이드 기질에 대한 광학선택적 가수분해 활성이 에리스로박터 종에서 일반적으로 발생하는지 조사하기 위하여, KORDI 수탁기관 또는 세포배양기관(Anzai, et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50:1563-1589, 2000; Denner, et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52:1655-1661, 2002; Shiba & Simidu, Int. J. Syst. Bacteriol., 32:211-217, 1982; Yoon, et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53:1169-1174, 2003 및 Yurkov, et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 44:427-434, 1994)으로부터 수득한 다양한 해양에서 분리된 9개의 추가적인 에리스로박터 종에 대해 가수분해 활성을 측정하였다.

그 결과, 표 2에서와 같이 10개 종 중 7개의 종(AKS 329, JCS 325, JCS 340, JCS 350, JCS 358, JCS 360 및 JCS 364)에서 스티렌옥사이드 기질에 대해 높은 광학선택성 ee값을 가지며 가수분해효소 활성을 나타내었다. 한편, 7개의 에리스

로박터 종에 있어서, 대부분은 (R)-스티렌옥사이드 기질에 대해 반응속도 선호도를 보였다. 이는, 에리스로박터 종이 에폭사이드 기질을 분해할 수 있을 뿐 아니라 에폭사이드와 연관된 새로운 효소를 찾는데 매우 중요한 인자가 될 수 있음을 의미한다.

[표 2]

다양한 에폭사이드 기질에 대한 에리스로박터 종의 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 활성

Strain name	Best-matched neighbor	Similarity (%)	ee ^a (%) / abs. conf. ^b			
			SO	GPE	EX	EB
AKS 329	<i>Erythrobacter</i> sp. 2216.25.25	99	96.4/S	99/R	47.5/S	19.6/R
JCS 325	<i>Erythrobacter aquamaris</i> SW-110	99	99/S	8.15/RA D ^c	64.8/S	37.2/R
JCS 340	<i>Erythrobacter gaetbuli</i>	99	80.9/S	62.2/RA D	81.3/S	23.8/R
JCS 350	<i>Alierythrobacter epoxidivorans</i>	97	80.6/S	99/R AD	99/S	11.5/R
JCS 358	<i>Erythrobacter gaetbuli</i>	98	99/S	81.7/R	72.5/S	5.5/R
JCS 360	<i>Erythrobacter aquamaris</i> SW-110	99	99/S	99/R AD	28.0/S AD	20.6/R
JCS 364	<i>Erythrobacter aquamaris</i> SW-110	99	99/S	99/R AD	37.4/S AD	34.6/R
JCS 368	<i>Erythrobacter luteolus</i> SW-109	99	2.8/S X ^d	5.5/S	26.0/S	14.2/R
HJ 239	<i>Erythrobacter</i> sp. MBIC 3031	99	0.09/S X	X	2.7/S X	ND ^e
DokDo 15	<i>Erythrobacter longus</i>	99	5.0/S X	12.4/R	13.3/S	7.98/R

a ee(%): 최대광학 순도.

b abs. Conf.: 배양 후 남아있는 에폭사이드를 나타내는 절대적인 형태.

c AD: 가수분해된 (S)- 및 (R)-광학순도.

d X: 검출되지 않은 에폭사이드가수분해효소.

e ND: 미결정.

<1-7> 다양한 에폭사이드 기질에 대한 에리스로박터 종의 가수분해 활성 측정

반응 혼합물로부터 추출된 에폭사이드 추출물 및 비-추출된 디올(diol)의 분광학적 양을 자외선 분광기를 이용하여 측정하였다(Bhatnagar et al., J. Biochem. Biophys. Methods., 50:1-13, 2001). 우선, 분리된 균주를 30ml의 ZoBell 배지에서 25°C, 24시간 동안 진탕 배양한 후, 상등액을 4°C, 4300g에서 20분간 원심분리하여 제거하였다. 전체 세포는 10 mM의 인산완충용액(pH 6.8)으로 2번 세척한 후, 디메틸포름아미드(dimethylformamid, DMF)가 함유된 4 mM의 스티렌옥사이드와 10mM의 인산염(pH 6.8) 용액에 현탁시킨 0.04g의 전체 세포를 혼합하여 30°C에서 15분간 반응시켰다. 상기 반응액에 40ul의 NaIO₄ 농축액(DMF에 200 mM의 NaIO₄를 함유)을 첨가한 후 2분간 vortexing함으로써 반응액내 생성된 diol과의 산화반응을 실시하였다. 반응액과 현탁되어 있는 세포는 16,500g에서 90초 동안 원심분리하여 제거하였고, 반응 상등액을 취한 후 분광기를 이용하여 290nm에서 흡광도를 측정하여 정량화하였다.

또한, 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 활성은 가스 크로마토그래피(GC)를 이용하여 측정하였다. 즉, 자외선 분광기로 측정된 에폭사이드 가수분해효소 활성이 있는 0.2g의 전체 세포를 1ml의 100mM Tris-HCl(pH 8.0)이 함유된 10ml의 바이알에 함유된 2mM의 스티렌옥사이드와 혼합하여 30°C에서 15시간 동안 반응시켰다. 상기 반응 혼합물을 2ml의 헥산

으로 추출한 후, 이 추출물을 GC 시스템인 키랄텍스 감마-사이클로렉스트린 트리플루오로아세틸 컬럼(0.25 mm ID, 30 m length; Astec, Adv., Tech., USA; van Loo et al., 2004)을 장착한 FID 검출기(Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA)로 측정하였다. 라세믹스티렌옥사이드에 대한 GC 분석에 있어서, 오븐, 주입기 및 검출기의 온도는 각각 90°C, 220°C 및 230°C이다. 또한, 도 1a에 기재된 다른 에폭사이드 기질에 대한 가수분해도 상기와 유사한 방법으로 측정하였다.

상기와 같은 방법으로, 도 1a의 다양한 에폭사이드 기질에 대해 상기 10개 종의 가수분해효소 활성을 측정한 결과, 표 2에서와 같이 스티렌옥사이드 기질에 대한 광학선택적 가수분해효소 활성 외에, 상기 7개의 에리스로박터 종은 다양한 ee값을 가지면서 (S)-GPE를 선택적으로 가수분해할 수 있었다. 한편, 스티렌옥사이드 및 GPE와는 달리, 1,2-에폭시헥산(EX) 및 1,2-에폭시부탄(EB)의 (R)- 및 (S)-에폭사이드는 대부분의 종에 의해 동일하게 가수분해됨을 확인할 수 있었다(표 2).

구체적으로, 반응 혼합물로부터 추출된 에폭사이드 추출물 및 비-추출된 디올(diol)의 분광학적 양을 자외선 분광기를 이용하여 측정하였다(Bhatnagar et al., J. Biochem. Biophys. Methods., 50:1-13, 2001). 우선, 분리된 균주를 30ml의 ZoBell 배지에서 25°C, 24시간 동안 진탕 배양한 후, 상등액을 4°C, 4300g에서 20분간 원심분리하여 제거하였다. 전체 세포는 10 mM의 인산완충용액(pH 6.8)으로 2번 세척한 후, 디메틸포름아미드(dimethylformamid, DMF)가 함유된 4 mM의 스티렌옥사이드와 10mM의 인산염(pH 6.8) 용액에 현탁시킨 0.04g의 전체 세포를 혼합하여 30°C에서 15분간 반응시켰다. 상기 반응액에 40ul의 NaIO₄ 농축액(DMF에 200 mM의 NaIO₄를 함유)을 첨가한 후 2분간 vortexing함으로써 반응액내 생성된 diol과의 산화반응을 실시하였다. 반응액과 현탁되어 있는 세포는 16,500g에서 90초 동안 원심분리하여 제거하였고, 반응 상등액을 취한 후 분광기를 이용하여 290nm에서 흡광도를 측정하여 정량화하였다.

또한, 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소 활성은 가스 크로마토그래피(GC)를 이용하여 측정하였다. 즉, 자외선 분광기로 측정된 에폭사이드 가수분해효소 활성이 있는 0.2g의 전체 세포를 1ml의 100mM Tris-HCl(pH 8.0)이 함유된 10ml의 바이알에 함유된 2mM의 스티렌옥사이드와 혼합하여 30°C에서 15시간 동안 반응시켰다. 상기 반응 혼합물을 2ml의 헥산으로 추출한 후, 이 추출물을 GC 시스템인 키랄텍스 감마-사이클로렉스트린 트리플루오로아세틸 컬럼(0.25 mm ID, 30 m length; Astec, Adv., Tech., USA; van Loo et al., 2004)을 장착한 FID 검출기(Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA)로 측정하였다. 라세믹스티렌옥사이드에 대한 GC 분석에 있어서, 오븐, 주입기 및 검출기의 온도는 각각 90°C, 220°C 및 230°C이다. 또한, 도 1a에 기재된 다른 에폭사이드 기질에 대한 가수분해도 상기와 유사한 방법으로 측정하였다.

이처럼, 도 1a의 다양한 에폭사이드 기질에 대해 상기 10개 종의 가수분해효소 활성을 측정한 결과, 표 2에서와 같이 스티렌옥사이드 기질에 대한 광학선택적 가수분해효소 활성 외에, 상기 7개의 에리스로박터 종은 다양한 ee값을 가지면서 (S)-GPE를 선택적으로 가수분해할 수 있었다. 한편, 스티렌옥사이드 및 GPE와는 달리, 1,2-에폭시헥산(EX) 및 1,2-에폭시부탄(EB)의 (R)- 및 (S)-에폭사이드는 대부분의 종에 의해 동일하게 가수분해됨을 확인할 수 있었다(표 2).

<1-8> 에리스로박터 종 JCS 358 균주에 의한 라세믹 스티렌옥사이드의 반응속도 광학분할(kinetic resolution)

2 mM 라세믹스티렌옥사이드의 반응속도 광학분할은 30°C의 배치모드(batch mode)에 있는 에리스로박터 종 JCS 358 균주를 이용하여 수행하였다. 라세믹 스티렌옥사이드의 초기 농도는 2 mM이며, 0.2g의 전체 세포를 이용하였다. 24시간 배양 후, 상기 반응 혼합물을 주기적으로 제거하였고, 남은 에폭사이드는 헥산으로 추출한 후 GC로 분석하였다.

그 결과, 도 2에서와 같이 JCS 358 균주에 의한 라세믹 스티렌옥사이드의 반응속도 광학분할이 수행됨을 관찰하였다. 즉, (R)-스티렌옥사이드 기질에 대한 가수분해 비율은 (S)-스티렌옥사이드 기질에 대한 가수분해 비율에 비해 반응속도가 빨랐으며, 16시간 후 (S)-스티렌옥사이드의 광학순도가 0에서 99%까지 증가함을 관찰할 수 있었다. 이때, (S)-스티렌옥사이드에 대한 광학순도의 최종 산출량은 약 10%였다(이론적 산출량은 약 50%). 그러나, 2 mM 스티렌옥사이드 기질에 대한 상기 균주의 반응속도 광학분할에 16시간이 소요된다는 것은 에리스로박터 JCS 358 균주에서 생산된 에폭사이드 가수분해효소의 내재적 효율성이 라세믹 스티렌옥사이드의 효율적인 반응속도 광학분할에 불충분하다는 것을 의미한다.

<실시예 2>

에리스로박터 *litoralis* HTCC2594 균주로부터 에폭사이드 가수분해효소 유전자의 동정 및 계통발생학적 분석

<2-1> 에리스로박터 *litoralis* HTCC2594 균의 ORF 서열 분석

에리스로박터 *litoralis* HTCC2594 균주로부터 에폭사이드 가수분해효소의 유전자를 동정하기 위하여, Moore foundation(www.moore.org)으로 분석한 상기 균주의 게놈 DNA 서열상에 있는 개방해독틀(ORF)에 상응하는 서열(Sm-X-Nu-X-Sm-Sm 모티프 및 H-G-X-P)을 Ensoltek의 ProteinFinder(www.ensoltek.com) 및 BLAST 프로그램을 이용하여 분석하였다. 또한, 후보 에폭사이드 가수분해효소의 아미노산 서열과 기존에 알려진 에폭사이드 가수분해효소 아미노산 서열을 CLUSTAL W 프로그램(Thompson, et al., Nucleic. Acids. 22:4673-4680, 1994)으로 분석하였다.

한편, 상기 후보 균주에 있어서 본질적인 에폭사이드 가수분해효소 활성-부위가 존재하는지 통상적인 방법으로 측정하였다. 이를 위해, 링-개방 타이로신, HGXP 및 Sm-X-Nu-X-Sm-Sm(Sm= small residues, X= any residues 및 Nu= nucleophile) 모티프가 포함된 서열이 선택되었고, 기존에 알려진 에폭사이드 가수분해효소 서열과 비교분석하였다.

상기 분석결과를 도 3a 내지 도 3c에 나타냈다. 즉, 도3a 내지 도 3c는 분리 및 정제된 EEH1 아미노산 서열과 종래에 알려진 아미노산 서열을 비교분석한 것으로서, 비교분석된 단백질 번호는 하기와 같다:

EPH1(*Rhodotorula glutinis*), AAF64646;

Ephx1(*Rattus norvegicus*), P07687;

EPHX1(*Homo sapiens*), AAH08291;

Eph1 (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), AAF18956;

hyl1 (*Aspergillus niger*), CAB59813;

EEH1 (*Erythrobacter litoralis* HTCC2594).

도 4a 및 4b는 본 발명에서 분리 및 정제된 EEH2 및 EEH3 아미노산 서열과 종래에 알려진 아미노산 서열을 비교분석한 것으로서, 비교분석된 단백질 번호는 하기와 같다:

Homo sapiens(EPHX2, Human sEH), AAH11628;

Rattus norvegicus(Ephx2, Rat sEH), CAA46211;

Solanum tuberosum(pEHSt, potato sEH), AAA81890;

Glycine max(sEHGm, soybean sEH), CAA55293;

Bradyrhizobium japonicum(ephA), BAC46379;

Erythrobacter litoralis HTCC2594(EEH2);

Erythrobacter litoralis HTCC2594(EEH3).

상기와 같이 에리스로박터 *litoralis* HTCC2594 균주의 ORF 서열을 분석한 결과, 1.122bp(*eeh1*, SEQ ID NO: 14), 870bp(*eeh2*, SEQ ID NO: 16) 및 888bp(*eeh3*, SEQ ID NO: 18)로 이루어진 세 개의 유전자를 선별할 수 있었다. 또한, 대부분의 에폭사이드 가수분해효소는 공유된 Sm-X-Nu-X-Sm-Sm 모티프, 촉매성 3가 원소 및 음이온 공을 가지고 있었다(도 3a-c 및 도 4a-b). 구체적으로, EEH1 유전자는 사람의 미립자 에폭사이드 가수분해효소와 약 35%의 상동성을 보였고, GGD173WGS 모티프, 촉매성 3가 원소(Asp173, Glu324 및 His351) 및 음이온 공 HGXP(HGW99P)을 가지고 있었다(도 3a 내지 3c). 반면, EEH2 및 EEH3 유전자는 Sm-X-Nu-X-Sm-Sm 모티프(*eeh2*에 대해서는 VHD107YGV 및 *eeh3*에 대해서는 AHD106WGA), 촉매성 3가 원소(*eeh2*에 대해서는 Asp107, Glu250 및 His269; *eeh3*에 대해서는 Asp106, Glu251 및 His270) 및 에폭사이드 가수분해효소(Arahira et al., 2000; Kaneko et al., 2002; Knehr et al., 1993; Stapleton et al., 1994 및 Strausberg et al., 2002; 도 4)에 보존된 음이온 공 HGXP(*eeh2*에 대해서는 HGY42P 및 *eeh3*에 대해서는 HGF38P)를 가진 용해성 에폭사이드 가수분해효소와 상동성을 보였다(도 4a 및 4b).

<2-2> 계통발생학적 분석(phylogenetic analysis)

에폭사이드 가수분해효소의 계통발생학적 분석을 위하여, SwissProt 또는 EMBL 단백질 데이터베이스로부터 입수한 기준에 알려진 에폭사이드 가수분해효소 서열을 본 발명의 *eeh1*, *eeh2* 및 *eeh3* 서열과 비교분석하였다. 계통발생학적 거리는 Clustal W 프로그램을 이용하여 측정하였고, 계통발생학적 트리는 Molecular Evolutionary Genetics Analysis 3.1 소프트웨어(The Biodesign Institute, Tempe, AZ; Kumar et al., 2004)를 이용하여 작성하였다. 얻어진 결과를 도 5에 나타냈다. 도 5는 에폭사이드 가수분해효소의 계통발생학적 분석을 도식화한 것으로서, 비교분석된 아미노산 서열은 하기와 같다:

Rhodotorula glutinis (AAF64649);

Rattus norvegicus (P07687);

Homo sapiens (AAH08291);

Xanthophyllomyces dendrorhous (AAF18956);

Aspergillus niger (CAB59813);

Homo sapiens (AAH11628);

Rattus norvegicus (CCA46211);

Solanum tuberosum (AAA81890);

Glycine max (CAA55293);

Agrobacterium radiobacter sEEH(O31243);

Corynebacterium sp. sEEH(O52866);

Haloalkane dehalogenase (P22643).

도 5에서와 나타낸 바와 같이, 로도토룰라 글루티니스(EPH1; Visser et al., 2000), 래티스 노르베지쿠스(Ephx1, Rat mEH; Falany et al., 1987), 호모 사피엔스(EPHX1, Human mEH; Strausberg et al., 2002), 잔토피로마이세스 덴드로로우스(Eph1; Visser et al., 1999), 아스펠길루스 니거(hyl1; Arand et al., 1999), 호모 사피엔스(EPHX2, Human sEH; Strausberg et al., 2002), 래티스 노르베지쿠스(Ephx2, Rat sEH; Knehr et al., 1993), 솔라눔 투베로섬(pEHSt, potato; sEH; Stapleton et al., 1994), 글리신 맥스 max (sEHGm, soybean sEH; Arahira et al., 2000), 애그로박트리움 라디오박터 sEH(Rink et al., 1997), 코리네박테리움 중 sEH(Misawa et al., 1998) 및 할로아켄 디할로게네이즈(Janssen et al., 1989)로부터 기준에 알려진 에폭사이드 가수분해효소를 갖고 있는 3개의 ORF를 neighbor-joining 방법을 근간으로 계통발생학적 분석을 수행하였다.

그 결과, *eeh1*은 미립자 에폭사이드 가수분해효소를 가진 균에 속하는 반면, *eeh2* 및 *eeh3*는 용해성 에폭사이드 가수분해효소와 연관되어 있음을 관찰할 수 있었다(도 5). 따라서, 본 발명의 에리스로박터 *litoralis* HTCC2594 균주의 ORF는 에폭사이드 기질에 대해 가수분해 활성을 가진 에폭사이드 가수분해효소임을 알 수 있다.

<2-3> *eeh* 유전자 클로닝

에리스로박터 *litoralis* HTCC2594 균주의 ORF 서열을 내에 있는 *eeh* 유전자를 클로닝하기 위하여, 우선, 하기와 같은 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR 방법으로 상기 균주의 게놈 DNA로부터 증폭시켰다. 이때, 제한효소인 NdeI과 XhoI/NotI를 각각 프라이머 양끝에 붙였으며, *eeh1*, *eeh2* 및 *eeh3* 유전자의 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 하기 표 3에 나타낸 것과 같다.

[표 3]

에리스로박터 *litoralis* HTCC2594 균주의 ORF 서열 내에 있는 eeh 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머 서열

명칭	서열	SEQ ID NO:
eeh1F (정방향)	5'-CGACCCGGCATATGAGCGAGATCAGGCCCTTCGTTCT-3'	4
eeh1R (역방향)	5'-CTCCACATCTCGAGTCGCATGAGTGAAAAACAGGCGCG-3'	5
eeh2F (정방향)	5'-CGACCCGGCATATGGCCGGACCAAGCCTGGGCGAATGG-3'	6
eeh2R (역방향)	5'-CTCCACATCTCGAGGCGTGCAGCCAATCCAGCGTCACGC-3'	7
eeh3F (정방향)	5'-CGACCCGGCATATGCCCGATCCTGCGAGCGGGATT-3'	8
eeh3R (역방향)	5'-CTCCACATGCGGCCGCGGATGCCGGAGCGGGCTTAGG-3'	9
eeh1RX (역방향)	5'-CTCCACATCTCGAGCTATCGCATGAGTGAAAAACAGGC-3'	10
eeh2RX (역방향)	5'-CTCCACATCTCGAGTTAGCGTGCAGCCAATCCAGCGTCACGC-3'	11
eeh3RX (역방향)	5'-CTCCACATGCGGCCGCTCAGGATGCCGGAGCGGGCTTAG-3'	12

상기 표 3에서, 상기 정방향 및 역방향 프라이머의 밑줄친 부분은 각각 NdeI 및 XhoI/NotI 부위를 가리키며, 히스티딘-태그가 없는 EEH1, EEH2 및 EEH3 유전자의 발현을 위하여, 상기 표 3에 기재한 eeh1RX, eeh2RX 및 eeh3RX 역방향 프라이머를 제작하였다. PCR 반응 후, NdeI 및 XhoI/NotI 제한효소 부위를 가진 증폭된 단편을 NdeI/XhoI 또는 NdeI/NotI 부위를 가진 pET-24a (+) 벡터에 연결한 후, 이 재조합 발현벡터를 DH5a에 형질전환시켰고, 상기 재조합 발현벡터의 발현을 BL21-CodonPlus (DE3)-RP (Novagen) 균주에 도입하여 발현 유무를 확인하였다.

<2-4> eeh 유전자 발현

상기 실시예 <2-3>에서 제조한 eeh 유전자 발현벡터가 실질적으로 세포에서 발현되는지 확인하기 위하여, 상기 형질전환체를 37°C에서 배양한 후 600nm에서 O.D값이 0.4 내지 0.6이 됐을 때 1 mM의 IPTG를 첨가하여 발현을 유도하였다. 3시간 배양한 후, 상기 세포를 5,000g에서 20분간 원심분리하여 수득하였고, 수득한 세포를 용액[50 mM phosphate (pH 7.0), 0.5 M KCl 및 10% glycerol]에 현탁시켜 분쇄기로 균질화하였다. 세포 분쇄물은 His·Bind Purification Kit (Novagen)을 이용하여 15,000g에서 30분간 원심분리시켜 제거하였다.

용해성 단편은 결합용액[500 mM NaCl, 20 mM phosphate (pH 7.0), 5 mM 이미다졸]으로 평형상태를 유지한 Ni-nitrilotriacetic(Ni-NTA) 컬럼에 적재하였다. 세척용액[500 mM NaCl, 20 mM phosphate (pH 7.0), 60 mM 이미다졸]으로 세척한 후, 결합된 효소를 용출용액[500 mM NaCl, 20 mM phosphate (pH 7.0), 1 M 이미다졸]으로 용출하였고, 50 mM 인산화용액(pH 7.0)으로 투석하였다. 단백질 정제는 Laemmli(1970)에 기재된 방법으로 SDS-PAGE를 실시하여 분리하였다. 단백질 농도는 표준 단백질인 BSA와 함께 Bio-Rad 단백질 분석 키트를 이용한 Bradford 방법으로 측정하였다(Bradford, 1976).

그 결과, 분리된 재조합 효소의 분자량이 각각 41kDa(rEEH1, SEQ ID NO: 13), 33.4kDa(rEEH2, SEQ ID NO: 15) 및 34.5 kDa(rEEH3, SEQ ID NO: 17)임을 확인할 수 있었다(도 6a 및 6b).

<2-5> 에폭사이드 가수분해효소 활성화에 대한 pH 및 온도의 효능

에폭사이드 가수분해효소 활성화에 대한 pH 효능은 50 mM의 아세트산 나트륨-아세트산 용액(pH 4.0 및 pH 6.0), 50 mM의 MES 용액(pH 6.0 - 7.0), 50 mM의 인산화용액(pH 7.0 - 9.0) 및 50 mM의 글라이신용액(pH 9.0 및 pH 10.0)을 이용하여 측정하였고, 최적 반응온도는 pH 7.5, 10°C 내지 70°C 범위에서 에폭사이드 가수분해효소 활성을 측정하였다.

에폭사이드 가수분해효소(rEEH1, rEEH2 및 rEEH3)의 활성화에 대한 pH의 효능을 pH 4.0 내지 10.0에서 다양하게 측정된 결과, 스티렌옥사이드 기질에 대한 rEEH1, rEEH2 및 rEEH3의 최적 활성은 pH 6.5, pH 7.5 및 pH 8.0에서 각각 나타났다(도 7a). 즉, 에폭사이드 가수분해효소는 대부분 중성 pH에서는 안정적이나, pH 6.0 이하에서는 불안정함을 알 수 있다.

또한, 에폭사이드 가수분해효소(rEEH1, rEEH2 및 rEEH3)의 활성에 대한 온도의 효능을 10 내지 70℃ 범위에서 분석한 결과, 스티렌옥사이드 기질에 대한 rEEH1, rEEH2 및 rEEH3의 가수분해 효율은 50℃, 55℃ 및 45℃에서 각각 최대치를 나타냈다(도 7b). 즉, 온도에 따른 에폭사이드 가수분해효소의 활성은 10 내지 50℃에서는 증가하다가, 최적온도 이상에서는 현저하게 감소됨을 알 수 있다(도 7b).

<실시예 3>

스펩고픽시스 알라스켄시스(*Sphingopyxis alaskensis*), 노보스펩고비움 아로마티시보란스(*Novosphingobium aromaticivorans*) 및 로도박테리얼스속 균주(Rhodobacterales) HTCC2654 균주로부터 에폭사이드 가수분해효소 유전자 클로닝 및 발현 측정

상기 <실시예 2>와 같은 방법으로, 스펩고픽시스 알라스켄시스, 노보스펩고비움 아로마티시보란스 및 로도박테리얼스속 균주 HTCC2654 균주의 ORF 서열을 분석한 후, 하기와 표 4에 기재된 정방향 및 역방향 프라이머를 이용한 PCR 방법으로 상기 균주로부터 에폭사이드 가수분해효소 활성을 가진 유전자를 각각 클로닝하였다:

[표 4]

스펩고픽시스 알라스켄시스, 노보스펩고비움 아로마티시보란스 및 로도박테리얼스속 균주 HTCC2654 균주의 ORF 서열로부터 에폭사이드 가수분해효소 유전자를 클로닝하기 위한 프라이머 서열

명칭	서열	SEQ ID NO:
SPF1 (정방향)	5'-CGACCCGGCATATGTCCCCGCCAAATCAATTTGCG -3'	19
SPRH1 (역방향)	5'-CTCCACATGCGGCCGCTTCTTCTCGCGCAAGGGG -3'	20
NVF1 (정방향)	5'-CGACCCGGCATATGAATGTTGCGCCTTTGTTGTGC -3'	21
NVRH1 (역방향)	5'-CTCCACATGCGGCCGCGCACATCAGGAAAACGCGG -3'	22
RBF2 (정방향)	5'-CGACCCGGCATATGAACGACAAGACCTTTATCGAGACGAACGGC -3'	23
RBRH2 (역방향)	5'-CTCCACATCTCGAGTTACAAGGCTGAAAAGAACAACACTCGCAAATC -3'	24
SPRNH1(역방향)	5'-CTCCACATGCGGCCGCTCACTTCTTCTCGCGCAAGGG -3	25
NVRNH1(역방향)	5'-CTCCACATGCGGCCGCTAGCACATCAGGAAAACGCG -3'	26
BRNH2(역방향)	5'-CTCCACATCTCGAGTCAAAGCGTGGCGAGCCAGTCGATGA -3'	27

상기 표 4에서, 밑줄친 부분은 각각 정방향 프라이머에서는 NdeI 부위를, 역방향 프라이머에서는 XhoI/NotI 부위를 가리킨다. 또한, 히스티딘-태그가 없는 sEEH, nEEH 및 rEEH 유전자의 발현을 위해, 상기 표 4에 기재된, SPRNH1(SEQ ID NO: 25), NVRNH1(SEQ ID NO: 26), 및 RBRNH2 (SEQ ID NO: 27)의 역방향 프라이머를 제작하였다.

그 결과, 스펩고픽시스 알라스켄시스로부터는 *seeh* 유전자(SEQ ID NO: 29), 노보스펩고비움 아로마티시보란스로부터는 *neeh* 유전자(SEQ ID NO: 31) 및 로도박테리얼스속 균주 HTCC2654로부터는 *reeh* 유전자(SEQ ID NO: 33)를 각각 분리할 수 있었다.

또한, 상기 유전자를 pET-24a (+) 발현벡터에 클로닝 한 후 BL21-CodonPlus (DE3)-RP(Novagen) 균주에 각각 도입하여 SDS-PAGE로 전기영동시킨 결과, 49kDa(sEEH, SEQ ID NO: 28), 43kDa(nEEH, SEQ ID NO: 30) 및 36kDa(rEEH, SEQ ID NO: 32)의 분자량을 가진 에폭사이드 가수분해효소를 관찰할 수 있었다(도 9). 또한, sEEH, nEEH 및 rEEH의 최적 활성은 중성 pH 및 친온성(30-40℃)에서 나타났다.

<실시예 4>

반응속도 매개변수(kinetic parameter) 결정 및 기질 선택성

rEEH1, rEEH2, rEEH3, sEEH, nEEH 및 rEEH의 반응속도 매개변수는 기질로 (R)- 또는 (S)-스티렌옥사이드를 이용하여 각각 GC로 분석하였다. 구체적으로, 100ul의 분리된 에폭사이드 가수분해효소를 1ml의 100mM 칼륨인산화용액(pH 8.0)이 함유된 10ml의 바이알내에 존재하는 다양한 농도의 (R)- 또는 (S)-스티렌옥사이드와 혼합하였고, 30℃의 200rpm에서 흔들어 배양하였다. 상기 반응물은 2ml의 헥산으로 추출하였고, 스티렌옥사이드에 대한 최대 광학순도[ee; ee= 100

X (S-R)/(S+ R)]는 키랄렉스 감마-사이클로텍스트린 트리플루오로아세틸(G-TA) 모세관 GC 컬럼을 이용하여 분석하였다. 분석결과를 표 5 및 도 8에 나타냈다. 도 8은 라세믹 스티렌옥사이드 기질에 대한 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소(rEEH1, rEEH2 및 rEEH3)의 가수분해 활성을 가스 크로마토그래피로 분석하여 도식화한 것이다:

직선(solid line): 스티렌옥사이드,

굵은 직선(Bold solid line): rEEH1이 첨가된 스티렌옥사이드,

긴 띄줄(long dashed line): rEEH2이 첨가된 스티렌옥사이드,

점선(dotted line): rEEH3이 첨가된 라세틱 스티렌옥사이드.

그 결과, (R)-스티렌옥사이드에 대한 rEEH1의 V_{maxR} 및 K_{mR} 는 각각 2.5 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 및 2.9 mM인 반면, (S)-스티렌옥사이드에 대한 rEEH1의 V_{maxS} 및 K_{mS} 는 각각 1.18 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 및 2.3mM임을 확인하였다(표 5 및 도 8). 이는, (R)-스티렌옥사이드가 (S)-스티렌옥사이드에 비해 보다 빠르게 가수분해됨을 의미한다. 즉, 이성질체(enantiomer)를 보다 빠르게 가수분해할 수 있다는 것은 rEEH1가 광학선택적이라는 것을 의미한다. 이와 달리, (S)-스티렌옥사이드에 대한 rEEH3의 V_{maxS} 및 K_{mS} 는 각각 0.43 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 및 3.71 mM인 반면, (R)-스티렌옥사이드에 대한 rEEH3의 V_{maxR} 및 K_{mR} 는 각각 0.29 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 및 2.61 mM임을 확인하였다(표 5 및 도 8). 이는, rEEH3가 (R)-스티렌옥사이드 보다는 (S)-스티렌옥사이드에 대해 보다 선택적으로 가수분해할 수 있음을 의미한다. 한편, (S)-스티렌옥사이드에 대한 rEEH2의 V_{maxS} 및 K_{mS} 는 각각 0.12 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 및 6.18 mM인 반면, (R)-스티렌옥사이드에 대해 rEEH2의 V_{maxR} 및 K_{mR} 는 각각 0.11 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 및 5.49 mM임을 확인하였다(표 5 및 도 8). 이는, rEEH2가 (S)-스티렌옥사이드와 (R)-스티렌옥사이드 모두에서 같은 비율로 가수분해시킨다는 것을 의미한다.

또한, rEEH1, rEEH2 및 rEEH3의 촉매 효율성(k_{cat}/K_m)에 있어서, rEEH1의 가수분해 활성은 rEEH2 및 rEEH3의 활성에 비해 대략 6 내지 55배 정도 우세함을 나타내었다(표 5). 이는, rEEH1이 전체 세포의 광학선택적 활성에 주도적으로 작용한다는 것을 의미한다.

[표 5]

(R)- 및 (S)-스티렌옥사이드 가수분해에 대한 rEEH1, rEEH2 및 rEEH3의 반응속도 매개변수

Enzyme	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat} / K_m
	<i>mM</i>	<i>$\mu\text{mol} / \text{min}$</i>	<i>s^{-1}</i>	<i>$s^{-1} \text{ mM}^{-1}$</i>
(S)- enantiomer				
rEEH1	2.3	1.1	24.5	10.6
rEEH2	6.1	0.1	1.7	0.2
rEEH3	3.7	0.4	6.5	1.7
(R)- enantiomer				
rEEH1	2.9	2.3	49.1	16.3
rEEH2	5.4	0.1	1.6	0.3
rEEH3	2.6	0.2	4.3	1.6

또한, 도 1의 다양한 에폭사이드 기질에 대한 rEEH1, rEEH2 및 rEEH3의 기질 선택성은 표 6와 같다. 즉, rEEH1는 C-1 부위에 있는 부피가 큰 링을 가진 단일치환된 에폭사이드에 대해 광학선택적으로 가수분해시키는 반면, 지방족 사슬을 가진 (R)- 및 (S)-단일치환된 에폭사이드 양쪽에서는 유사한 비율로 가수분해시킴을 알 수 있다. 반면, rEEH3는 C-1 부위 및 스티렌옥사이드에서 광학선택적으로 지방족 에폭사이드를 가수분해시켰으나, 광학선택적 다양성은 보이지 않았다.

[표 6]

다양한 에폭사이드 기질에 대한 rEEH1, rEEH2 및 rEEH3의 광학선택적 가수분해효소 활성

Enzyme	Hydrolysis rate (x 10 ⁻²) mg/ min											
	SO		GPE		EX		EB		ECH		EF	
	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)
rEEH1	9.00	28.0	20.0	11.0	8.00	7.00	15.0	15.0	N.D.	N.D.	15.0	4.00
rEEH2	0.06	0.05	0.07	0.06	0.07	0.07	0.08	0.08	0.23	0.23	N.D.	N.D.
rEEH3	0.14	0.10	0.10	0.10	0.09	0.17	0.11	0.08	0.28	0.26	N.D.	N.D.

* N.D: 미결정

또한, 반응속도 매개변수는 시그마 플롯 프로그램을 이용한 비-선형 회귀분석으로 예측하였으며, 도 1의 다양한 기질에 대해서도 rEEH1, rEEH2, rEEH3, nEEH, rEEH 및 sEEH의 반응속도 매개변수를 측정하였다. 그 결과, 표 7에서와 같이 rEEH는 (R)-광학순도 스티렌옥사이드를 선택적으로 가수분해시키는 반면, nEEH 및 sEEH는 광학선택성이 매우 낮음을 알 수 있다.

[표 7]

(R)- 및 (S)-스티렌옥사이드에 대한 각 균주로부터 분리된 효소의 반응속도 매개변수

Enzyme and enantiomer	Parameter value			
	Km (mM)	V max (umole/min/mg)	Kcat (S-1)	Kcat/Km (S-1 /mM)
(S)-enantiomer				
Spa	5.25 ± 0.3	12.1	10.08	1.92
Novob	4 ± 0.3	18.67	12.96	3.24
RHc	4.1 ± 0.3	11.26	6.7	1.63
(R)- enantiomer				
Spa	4 ± 0.3	8.9	7.42	1.86
Novob	6 ± 0.3	40.0	27.8	4.63
RHc	5.2 ± 0.3	54.08	32	6.16

상기 표에서, a, b, c : 스펅고픽시스 알라스켄시스, 노보스핑고비움 아로마티시보란스 및 로도박테리일스속 균주 HTCC2654 균주로부터 각각 분리된 효소.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 에리스로박터(*Erythrobacter*) 종, 스텡고피식스(*Sphingophyxis*) 종, 노보스핑고비움(*Novosphingobium*) 종 및 로도박테리얼스(*Rhodobacterales*) 속 균주로부터 분리 및 정제된 광학선택적 가수분해효소 활성을 가진 단백질은 약학산업에서 약리활성이 있는 광학순도 에폭사이드를 고효율로 생합성하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1a는 다양한 에폭사이드 기질의 종류를 나타낸 것이며, A: 스티렌옥사이드(SO), B: 글리시딜 페닐 에터르(GPE), C: 1,2-에폭시헥산(EX), D: 1,2-에폭시부탄(EB)이다.

도 1b는 라세믹 스티렌옥사이드 기질에 대한 에리스로박터 종 JCS358 균주의 가수분해 정도를 GC 컬럼으로 분석하여 도식화한 것이고, a: (S)-스티렌옥사이드이고, b: (R)-스티렌옥사이드이다.

도 2는 라세믹 스티렌옥사이드 기질에 대한 에리스로박터 종 JCS358 균의 반응속도 광학분할(kinetic resolution)을 나타낸 도면으로, ○: (R)-스티렌옥사이드 면적, ●: (S)-스티렌옥사이드 면적, □: 최대 광학순도(enantiomeric excess, %)이다.

도 3a 내지 도 3c는 본 발명에서 분리 및 정제된 EEH1 아미노산 서열과 종래에 알려진 아미노산 서열을 비교분석한 것이다.

도 4a 및 도 4b는 본 발명에서 분리 및 정제된 EEH2 및 EEH3 아미노산 서열과 종래에 알려진 아미노산 서열을 비교분석한 것이다.

도 5는 에폭사이드 가수분해효소의 계통발생학적 분석을 도식화한 것으로서, 비교분석된 아미노산 서열을 나타낸다.

도 6은 에리스로박터 리토랄리스(*litoralis*) HTCC2594 균주로부터 분리된 3개의 에폭사이드 가수분해효소를 SDS-PAGE로 나타낸 사진이고, A: 분리된 EEH1, B: 분리된 EEH2 및 EEH3이다.

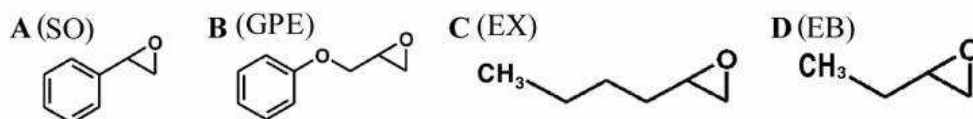
도 7a 및 도 7b는 분리된 rEEH1, rEEH2 및 rEEH3 가수분해효소의 활성에 대한 pH 및 온도의 효능을 나타낸 그래프이며, ●: EEH1, ○: EEH2, 및 ▼: EEH3이다.

도 8은 라세믹 스티렌옥사이드 기질에 대한 광학선택적 에폭사이드 가수분해효소(EEH1, EEH2 및 EEH3)의 가수분해 활성을 가스 크로마토그래피로 분석하여 도식화한 것이다.

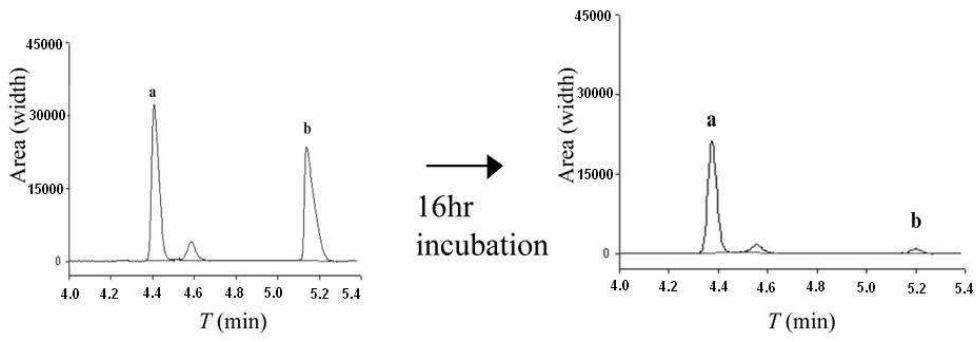
도 9는 노보스핑고비움 아로마티보란스(*N. aromativorans*)로부터 에폭사이드 가수분해효소를 SDS-PAGE로 분리한 사진이다.

도면

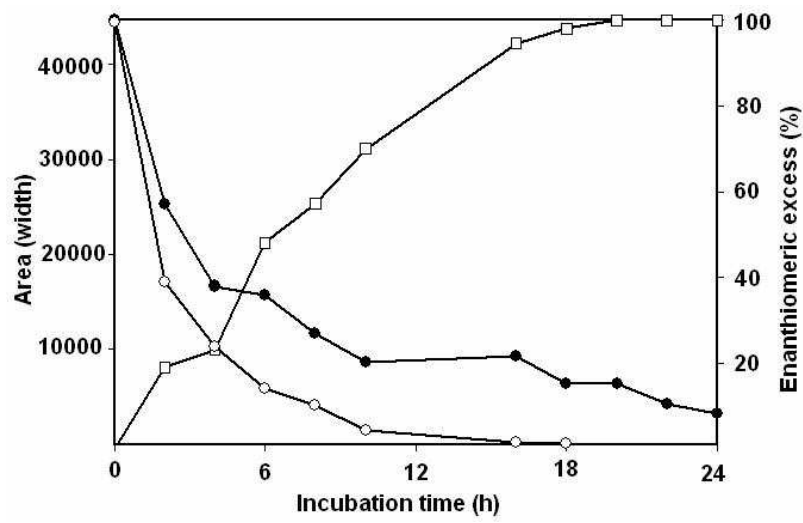
도면 1a



도면1b



도면2



부
표
3a

```

EEH1 -----MSEIRPFVLDVPKADL 16
EPH1 -----MAT--HTFAS--P-PTRFTVIDIPQSEL 22
hyl1 -----MSAPFAKFPSSASISPNPFTVSIPEQJL 28
Eph1 -----MTS-----AN-----IPTPFQVSEFAQQDV 19
EPHX1 MWLEILLTSVLGFAYWFISRDKKEETLPLEDGWMGPGTRSAAREDDDSIRPFKVEITSEEEI 60
Ephx1 MWLELVASLLGFVIYWFVSRDKKEETLPLEDGWMGPGSKPSAKEDESIIRPFKVEITSEEEI 60
      * . . . . .

DRLHR--KLDLTRWPEKEPEVDDWS-----QGTPL-AALQDLAA--YWRDGYDWRAGEAK 65
DELHS--RLDKTRWPATEIVPEDGTDPTAFGLGAGPTLPMLKELAKGWREFFDWKKAQDH 80
DDLKT LVRLSKIAPPTYESLQADG-----RFGITS-EWLTTRMRE--KWLSEFFDWRPFEAR 80
DRMMA--KIRDTRLPTAPIVPGAS----WDYGIDL-DWLTELHK--YWANIEWSWEETEKR 70
HD LHQ--RIDKFRFTPPLEDSCFH-----YGFNS-NYLKKVIS--YWRNEFDWKKQVEI 109
KD LHQ--RIDRFRASPPLEGRFH-----YGFNS-NYMKKVVS--YWRNEFDWKKQVEI 109
. . . . . * . . . . .

LNAIGQFITEIDGLDIHF LHVR----SKCDDALP LILTHGWP GSVREFFDVIPLLITEPQ- 120
LNTFEHYMVEIEDLS IHF LHHR----STRPNAVPLILCHGWPGHFGFELNVIPLELITEPSD 136
LNSFPQFTEIEGLTIHFAALF----SEREDAVPIALLHGWP GSFVEFYPI LQLFREYET 136
INKYPHFRVDIEEIS LHF VHIK----SKQPDALP LILSHGWP SFLFEFWEVIDELVDPTK 126
LNRYPHFKTKIEGLDIHF IHVKPPQLPAGHTPKPLMVHGWP GSFYEFYKI IPLLTDPKN 169
LNQYPHFKTKIEGLDIHF IHVKPPQLPSGRTPKPLMVHGWP GSFYEFYKI IPLLTDPKS 169
:* . . . . . * . . . . .

```

부 록 3B

EEH1	----	DGMFHVVAPS	LPFGFSGKPRNTG-WGVDKIATAWATLMQRLGYTE-WVAQGGDW	174
EPH1	---	PSAQAFHVVAPSM	PGYAWSLPPPSSK-WNNPDTARVFDKLMTGLGYEK-YMAQGGDW	191
hyl1	---	PETLPEHLVVPS	LPGYTFSSGPPDLKDFLMDNARVVDQLMKDLGFGSGYIIQGGDI	193
Eph1	---	AGQPAFHVWIPSM	PGYTFSSGPQKKG-WTVVDTARVYNSLMVNVLVGYKTYTCGAGDW	182
EPHX1	HGLSDEHVFEVICPS	IPGYGFSEASSKKG-FNSVATARIFYKLMRLRGLGFQE-FYIQGGDW		227
Ephx1	HGLSDEHVFEVICPS	IPGYGYSEASSKKG-LNSVATARIFYKLMTRRLGFFQK-FYIQGGDW		227
		*.:.: **:*:*:	* * * * *	
EEH1	GS	AVTTAIGAQAPEGCKG	IHVNMPIGRPGDDMANP-----GPDE-----	214
EPH1	GS	IARCLGSLHKDHCKA	VHLNFLPVFPVPMWLINPHT-----LAWAPRFLV-----	240
hyl1	GS	FVGRLLG-VGFDACKA	VHLNLCAMRAPPEGPSIES-----LSAAE-----	234
Eph1	GS	WITAQIILHDYSEFA	VVAHFTMIKASVPIINPIYSLPI-----LIGKIPFVPKGVARWLQ	238
EPHX1	GSLICTNMAQLVPS	HVKGLHLNMALVLSNFSTLTL	LLGQRFGRFLGITERDV-----	279
Ephx1	GSLICTNMAQMV	PNHVKGLHLNMAFISRSFY	TMTPLLGRFGRFLGYTEKDI-----	279
	* *			
EEH1	----	LKALKALFFY-QDWD	SGYSKQQRPTIGYSLVDSPVGLAGWIFEKMFFTD	266
EPH1	----	PEKQARMKRG	LAYLEKGSAYYVMQQLTPRTPAYGLTDSPVGLLAWIGEKFPTIQ	296
hyl1	----	KEGIARMEK---	FMTDGLAYAMEHSTRPSTIGHVLSSSPIALLAWIGEKYLQWVD	286
Eph1	SLVY	TEAEINGLERTDKF	WKEGLGYQKIQGSKPMTLGAALFDSPVGILSWIGEKYHGMSD	298
EPHX1	----	ELLYPVKEKVFYS	LMRESGYMHIQCTKPDTVGSALNDSPVGLAAYILEKFSTWTN	334
Ephx1	----	ELLYPYKEKVFYS	IMRESGYLHIQATKPDTVGCALNDSPVGLAAYILEKFSTWTK	334
		* * * * *	* * * * *	

부편 4a

EHPX2	YVTVKPRVRLHFVELGSG--PAVCLCHGFPESWSWRYQIPALAQAGYRVLAMDMMKGYGE	298
Ephx2	YVTVKPGIRLHFVEMGSG--PAICLCHGFPESWFSWRYQIPALAQAGFRVLAIDMMKGYGD	296
PEHst	MVAVN-GLNMHIAELGQG--PTILFIHGFPPELWYSWRHQMVYLAERGYRAVAPDLRGYGD	64
SEHGm	TVEVN-GIKMHVAEKGE--PVVLFHGFPELWYSWRHQILSLSSLGYRAVAPDLRGYGD	89
epHA	TIKAN-GISLNVAEQKG--PMVLLCHGFPPEGWYSWRHQLEALAAAGYHAVAPDMRGYGK	64
EEH3	RVPAN-GLLEFEVAMAGEGD-HLALMLHGFPPELHFSWRHQMPLLAEMGYRVWAPNMRGYGE	69
EEH2	QHFAVDGLQIAFWTGGKPDARPLLLVHGYPYPTASWDWHRVWETLGSK-YHLVAPDMIGFGL	72
	. : : . * . : * * * * : : * : : * * * * : : * * * * : : * * * *	
EHPX2	SSAPPE--IEEYCMELCKEMVTFDLKLG--LSQA VFI GHD WGGMLLVWYMALFYPERVRA	354
Ephx2	SSSPPE--IEEYAMELLCEEMVTFLNKLG--IPQAVFI GHD WAGVLVWMMALFHPERVRA	352
PEHst	TTGAPINDPSKFSIFHLVGDVVALLLEAIAPNEDKVFVAHDWGALIAWHLLCLFRPDKVKA	124
SEHGm	TEAPPS--ISSYNCFHIVGDLVALIDSLG--VQQVFLVAHDWGAIIGWYLCMFRPDKVKA	145
epHA	SDRPEA--IDQYTI LHMVGDLVGLDAFE--VKDAVIVGHDWGATIAWHTARLRPDRFRA	120
EEH3	TTRPTE--VRDYALDHLTQDVAAALIDASG--ATKVTLIAHDWGAI IAWYFAILKLRPLER	125
EEH2	SDKPRS----GYSIHRQADMHVALLDHLG--IGAFDALVHDYGVSVGQELLARRAERSAA	126
	: . . : : : : * * * * : : * * * * : : * * * * : : * * * *	
EHPX2	VASLNTPFI PANPNMSPLESIKAMP-VFDYQLYFQEPGVABAELEQNLSRRTFKS LFRASD	413
Ephx2	VASLNTPLMPPNPEVSPMEVIRSIP-VFNYQLYFQEPGVABAELEKNMSRRTFKSFFRTSD	411
PEHst	LVNLSVHYHPRWNNMPIEGLKALYGEDYYICRFQVPGEIEAEFAPIGAKSVLKKMLT--	182
SEHGm	YVCLSVPLLRDPNIRTVDGMRALYGDYVVCRFQKPGEMEAQMAEVGTEYVLKNILT--	203
epHA	AAILSVPYRPR-SEARPTSVMPQTADAQFYQLYFQEPGVABAEFERD-PRATLGAMLYGG	178
EEH3	LVIMNVP---HPKVLQRELRRWEQIKKSWYVFFQLPWLPEKCRIGADSGKRIG-----	175
EEH2	QGLGQTVFLNGGIFPDQHRPRPIQKLGTSPLGLFLVGLL TNREKFGRSFSEVFG-----	179
 : : * * * * : : * * * * : : * * * * : : * * * *	

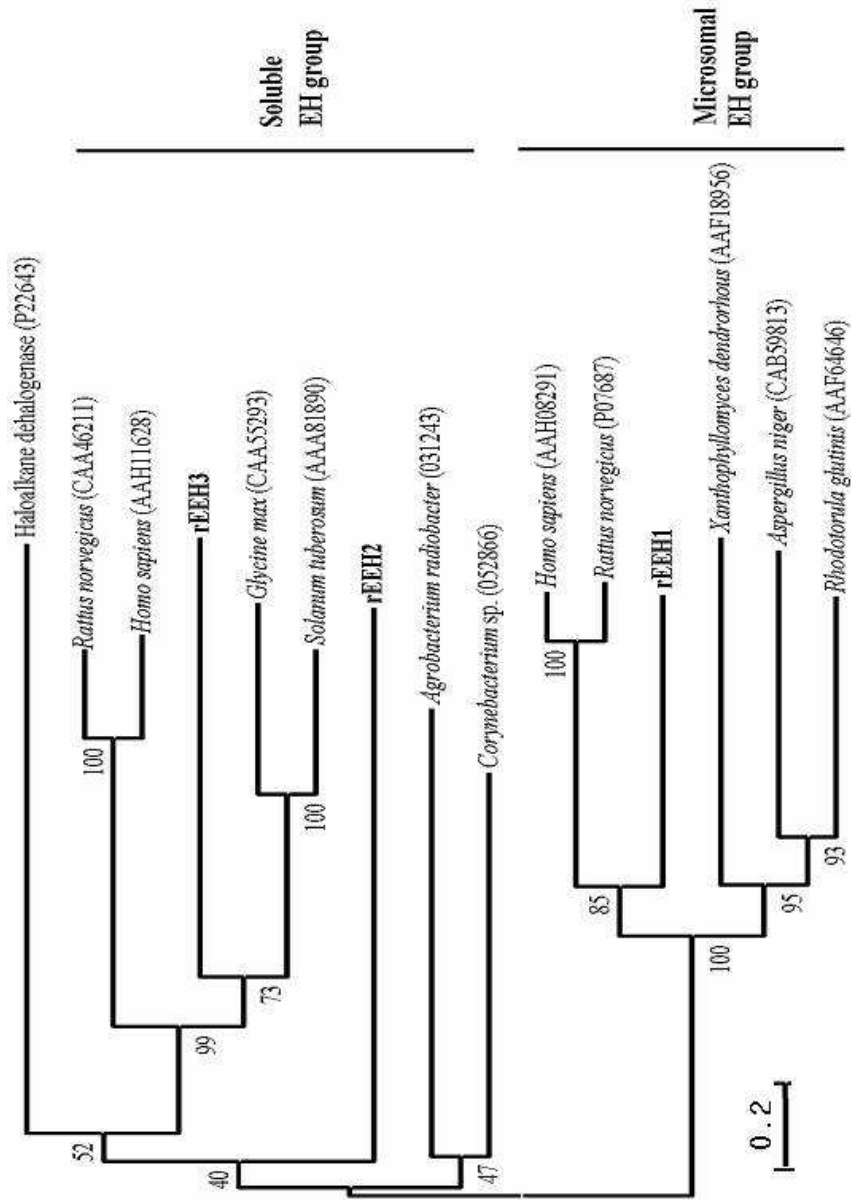
부면4b

Ephx2 DMGLLTVMKAT-----EMGGI LVGTPEDPKVSKI TTEEEIEEYIQQFKKSGFR 459
 pEHst YRDPAPFFYP-----KGKGLEAIAADAPIVLSTWLSSEELDYANKFEQTGFT 229
 sEHGm TRNPGPPILP-----KGR-FQFNPEMPTLPSWLTEEDLAYVSKFEKTGFT 249
 ephA SGEAAAIRASAEAGRTVGVMSRKDGLPKVQVPLPSWLSATDLDYSAEFFARSGFR 238
 EEH3 -----ELFAQTSCNPERFGPDVKAVYAAGAARPGAPR 207
 EEH2 -----PDTQPGAQELDEFWDLVSHNGGNRIM 205

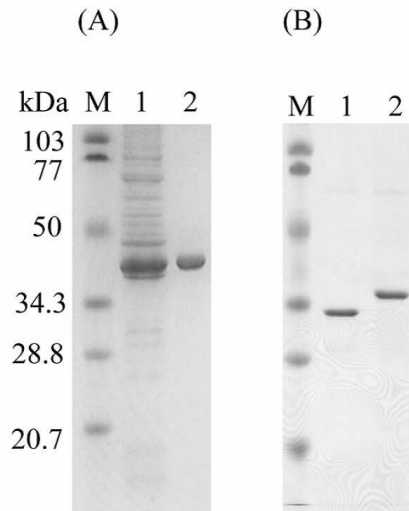
EHPX2 GPLNMYRNMERWKKWACKSLGRKILIPA LMVTAEKDFVLPQ-----MSQHMEDWIPHL 514
 Ephx2 GPLNMYRNTERWKKWACKALGRKILVPA LMVTAEKDIVLRPE-----MSKNMENWIPFL 513
 pEHst GALNYYRALSENSELTAPWTGAQVNVPTKFI VGEFDLAYHMRGAKEYIHNGGFKKYVPLL 289
 sEHGm GPLNYYRNFNLNWELTAPWTGGQIKVPVKYITGELDMVYNS LNLKEYIHGGGFKQDVPNL 309
 ephA GPLNYYRNIDRNWELMGAFEGVKVVVPS LF IAGDHDVIAFPGAAEHLAN--MKQFVPQL 296
 EEH3 AMVNYRRAAMRHRDTIDPGD-FRVDVPTLLVWGEEDVALNIR-----CTEGTEQWVVDI 260
 EEH2 HKLLHY IADRKEHAERWFDALRIAQGDIGLINGALDPPVSGRH-----AYEAWRERLPPDA 259
 : * : :

EHPX2 KRGHIED--CGHWTOQMDKPTQEVNQLIKWLDSDARNPPVVSKM 555
 Ephx2 KRGHIED--CGHWTOIEKPAEVNQLIKWLDKTEIQNPSVTSKI 554
 pEHst EEVVLEGAHFVNQERPHEIS KHI YDF IQKF----- 321
 sEHGm EQVIVQKGVAFHFNQEAEEIDNYI YDF INKF----- 341
 ephA REIKILPGCGHWTOQERPTQEVNAAI VEF LRS LPG----- 330
 EEH3 TVKRLPN-VSHWVQQDAPDEVNAILREWLPKPAPAS----- 295
 EEH2 RHHLIPT-VGHYPQVEDPPQTVSRVTLDWLAR----- 289
 : * : :

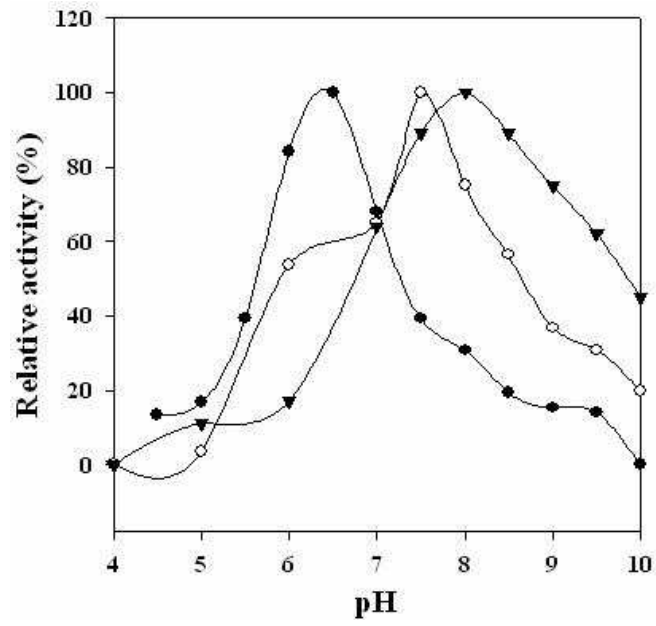
도면5



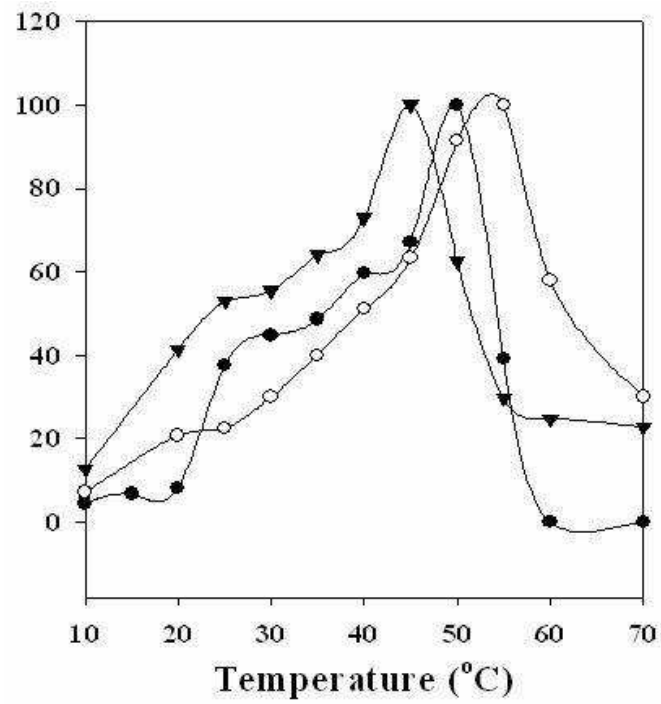
도면6



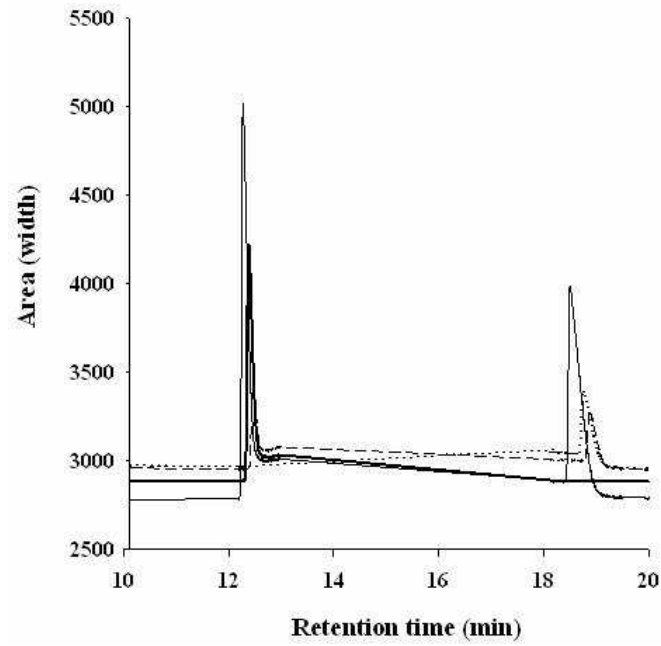
도면7a



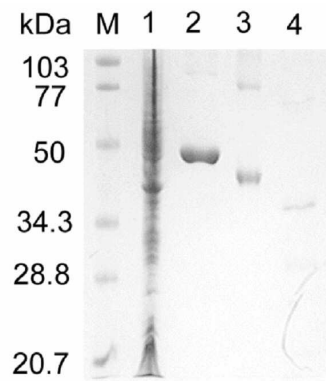
도면7b



도면8



도면9



서열목록

- <110> Korea Ocean Research & Development Institute
- <120> ENANTIOSELECTIVE EPOXIDE HYDLROLASE AND METHOD FOR PREPARING AN ENANTIOPURE EPOXIDE USING THE SAME
- <130> DPP20063436KR
- <160> 33
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 1450
- <212> DNA

<213> JCS358 16S rRNA sequence

<400> 1

tggtcagaa cgaacgctgg cggcatgcct acacatgcaa gtcgaacgaa cccttcgggg	60
ttagtggcgc acgggtgctg aacgcgtggg aacctgcctt taggttcgga ataactcaga	120
gaaatttgag ctaataccgg ataatgtctt cggaccaaaag atttatcgcc tttggatggg	180
cccgcgtagg attaggtagt tgggtgggta aaggcctacc aagccgacga tccttagctg	240
gtctgagagg atgatcagcc aactgaggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggc	300
agcagtgggg aatattggac aatgggagaa agcctgatcc agcaatgccg cgtgagtgat	360
gaaggcctta gggttgtaaa gctcttttac cagggatgat aatgacagta cctggagaat	420
aagctccggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg gagggagcta gcgttgctcg	480
gaattactgg gcgtaaagcg cgcgtagggc gctcatcaag tcaggggtga aatcccgggg	540
ctcaaccccc gaactgccct tgaaactggt aggctagaat cctggagagg cgagtggaat	600
tccgagtgta gaggtgaaat tcgtagatat tcggaagaac accagtggcg aaggcgactc	660
gctggacagg tattgacgct gaggtgagaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc	720
tggtagtcca cgccgtaaac gatgataact agctgtccgg gttcacagaa cttgggtggc	780
gcagctaacg cattaagtta tccgcctggg gagtacggtc gcaagattaa aactcaaagg	840
aattgacggg ggcctgcaca agcggtgagg catgtggttt aattcgaagc aacgcgcaga	900
acctaccag cctttgacat cctaggacgg tttctggaga cagactcctt cccttcgggg	960
acctagtgac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt	1020
cccgaacga gcgcaaccct cgtccttagt tgccatcatt tagttgggca ctttaaggaa	1080
actgccggtg ataagccgga ggaagggtgg gatgacgtca agtcctcatg gcccttacag	1140
gctgggctac acacgtgcta caatggcatc tacagtgagc agcgatcccg cgagggttag	1200
ctaactctca aaagatgtct cagttcggat tgttctctgc aactcgagag catgaaggcg	1260
gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcgggtgaata cgttcccagg ccttgtacac	1320
accgcccgtc acaccatggg agttggattc accogaaggc ggtgcgctaa ctttttagga	1380
ggcagccgac cacggtgggt tcagcgactg ggggtgaagtc gtaacaaggt agccgtaggg	1440
gaacctgcgg	1450

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Forward primer for 16S rRNA of JCS358 (27F)

 <400> 2
 agagtttgat catggctcag 20

 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Reverse primer for 16S rRNA of JCS358 (1518R)

 <400> 3
 aaggaggtga tccagccgca 20

 <210> 4
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Forward primer for EEH1 gene

 <400> 4
 cgacccggca tatgagcgag atcaggcct tcgttct 37

 <210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Reverse primer for EEH1 gene

 <400> 5
 ctccacatct cgagtcgcat gaggtaaaaa caggcgcg 38

<210> 6
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Forward primer for EEH2 gene

 <400> 6
 cgacccggca tatggccgga ccaagcctgg gcgaatgg 38

 <210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Reverse primer for EEH2 gene

 <400> 7
 ctccacatct cgaggcgtgc gagccaatcc agcgtcacgc 40

 <210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Forward primer for EEH3 gene

 <400> 8
 cgacccggca tatgcccgat cctgcgagcg ggatt 35

 <210> 9
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Reverse priemr for EEH3 gene

 <400> 9
 ctccacatgc ggccgcggat gccggagcgg gcttagg 37

<210> 10
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer for EEH1 without His-tag

<400> 10
 ctccacatct cgagctatcg catgagtgaa aaacaggc 38

<210> 11
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer for EEH2 without His-tag

<400> 11
 ctccacatct cgagtttagcg tgcgagccaa tccagcgtca cgc 43

<210> 12
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer for EEH3 without His-tag

<400> 12
 ctccacatgc ggcgctcag gatgccggag cgggcttag 39

<210> 13
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Amino acid sequence for rEEH1

<400> 13
 Met Ser Glu Ile Arg Pro Phe Val Leu Asp Val Pro Lys Ala Asp Leu
 1 5 10 15
 Asp Arg Leu His Arg Lys Leu Asp Asp Thr Arg Trp Pro Glu Lys Glu
 20 25 30

Pro Val Asp Asp Trp Ser Gln Gly Thr Pro Leu Ala Ala Leu Gln Asp
 35 40 45

Leu Ala Ala Tyr Trp Arg Asp Gly Tyr Asp Trp Arg Ala Gly Glu Ala
 50 55 60

Lys Leu Asn Ala Leu Gly Gln Phe Ile Thr Glu Ile Asp Gly Leu Asp
 65 70 75 80

Ile His Phe Leu His Val Arg Ser Lys Cys Asp Asp Ala Leu Pro Leu
 85 90 95

Ile Leu Thr His Gly Trp Pro Gly Ser Val Arg Glu Phe Phe Asp Val
 100 105 110

Ile Pro Leu Leu Thr Glu Pro Gln Asp Gly Met Ala Phe His Val Val
 115 120 125

Ala Pro Ser Leu Pro Gly Phe Gly Phe Ser Gly Lys Pro Arg Asn Thr
 130 135 140

Gly Trp Gly Val Asp Lys Ile Ala Thr Ala Trp Ala Thr Leu Met Gln
 145 150 155 160

Arg Leu Gly Tyr Thr Glu Trp Val Ala Gln Gly Gly Asp Trp Gly Ser
 165 170 175

Ala Val Thr Thr Ala Ile Gly Ala Gln Ala Pro Glu Gly Cys Lys Gly
 180 185 190

Ile His Val Asn Met Pro Ile Gly Arg Pro Gly Pro Asp Asp Met Ala
 195 200 205

Asn Pro Gly Pro Asp Glu Leu Lys Ala Leu Lys Ala Leu Lys Phe Tyr
 210 215 220

Gln Asp Trp Asp Ser Gly Tyr Ser Lys Gln Gln Ser Thr Arg Pro Gln
 225 230 235 240

Thr Ile Gly Tyr Ser Leu Val Asp Ser Pro Val Gly Leu Ala Gly Trp
 245 250 255

Ile Phe Glu Lys Met Phe Phe Trp Thr Asp Asn Gly Gly Ser Pro Phe
 260 265 270

Asp Thr Leu Ser Met Asp Ala Ile Leu Asp Asn Ile Met Leu Tyr Trp
 275 280 285

Leu Pro Glu Thr Gly Ala Ser Ala Ala Arg Leu Tyr Trp Glu Ser Phe
 290 295 300

Ala Arg Phe Gly Glu Gly Thr Val Ala Ile Pro Ala Gly Val Ser Ala

tttccgaaaag aaatcatccc cgcgccccgc aagtgggcgg agcgtcgcta cgccgacctc 1020
 gtctactgga atgaatgcga aaagggcgga cacttcgccc cgtgggagca gccggagctg 1080
 ttcgccgccg agttgcgcgc ctgtttttca ctcatgcgat ag 1122

<210> 15
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Amino acid sequence for rEEH2

<400> 15
 Met Ala Gly Pro Ser Leu Gly Glu Trp Lys Ala Lys Ala Gln His Phe
 1 5 10 15
 Ala Tyr Asp Gly Leu Gln Ile Ala Phe Trp Thr Gly Gly Lys Pro Asp
 20 25 30
 Ala Arg Pro Leu Leu Leu Val His Gly Tyr Pro Thr Ala Ser Trp Asp
 35 40 45
 Trp His Arg Val Trp Glu Thr Leu Gly Ser Lys Tyr His Leu Val Ala
 50 55 60
 Pro Asp Met Ile Gly Phe Gly Leu Ser Asp Lys Pro Arg Ser Gly Tyr
 65 70 75 80
 Ser Ile His Arg Gln Ala Asp Met His Val Ala Leu Leu Asp His Leu
 85 90 95
 Gly Ile Gly Ala Phe Asp Ala Leu Val His Asp Tyr Gly Val Ser Val
 100 105 110
 Gly Gln Glu Leu Leu Ala Arg Arg Ala Glu Arg Ser Ala Ala Gln Gly
 115 120 125
 Leu Gly Gln Thr Val Phe Leu Asn Gly Gly Ile Phe Pro Asp Gln His
 130 135 140
 Arg Pro Arg Pro Ile Gln Lys Leu Gly Thr Ser Pro Leu Gly Phe Leu
 145 150 155 160
 Val Gly Leu Leu Thr Asn Arg Glu Lys Phe Gly Arg Ser Phe Ser Glu
 165 170 175
 Val Phe Gly Pro Asp Thr Gln Pro Gly Ala Gln Glu Leu Asp Glu Phe
 180 185 190
 Trp Asp Leu Val Ser His Asn Gly Gly Asn Arg Ile Met His Lys Leu
 195 200 205
 Leu His Tyr Ile Ala Asp Arg Lys Glu His Ala Glu Arg Trp Phe Asp

210

215

220

Ala Leu Arg Ile Ala Gln Gly Asp Ile Gly Leu Ile Asn Gly Ala Leu
225 230 235 240

Asp Pro Val Ser Gly Arg His Ala Tyr Glu Ala Trp Arg Glu Arg Leu
245 250 255

Pro Asp Ala Arg His His Leu Ile Pro Thr Val Gly His Tyr Pro Gln
260 265 270

Val Glu Asp Pro Gln Thr Val Ser Arg Val Thr Leu Asp Trp Leu Ala
275 280 285

Arg

<210> 16
<211> 870
<212> DNA
<213> Nucleotide sequence for EEH2

<400> 16
atggccggac caagcctggg cgaatggaag gccaaaggcgc agcacttcgc ctacgacggg 60
ctgcaaatcg cttcttgac cggcggcaag ccggatgcac ggccgctgct gctggtgcac 120
ggctatccga cggcctcgtg ggactggcac cgggtctggg agacgctcgg cagcaaatac 180
catctcgttg cgccgacat gatcggcttc ggctctcgg acaagccgcg ctcgggctat 240
tcgatccatc gccaggccga catgcatgtg gcgctgctcg atcatctggg catcggcgcg 300
ttcgatgcgc tggcgcacga ttacggcgtt tccgttgggc aggaactgct cgcccgtcgg 360
gccgagagat cggcggcgca ggggctcggc caaacagtct tcctcaacgg cggtatcttt 420
cccgaccagc accgcccgcg ccgatccag aagctcggca cgtcgccgct cggcttcctc 480
gtcggcctgc ttaccaaccg tgagaaatc ggcaggagct tttccgaggt cttcggcccc 540
gacaccagc ccggcgcgca ggagctggac gaattctggg acctcgtcag ccacaacggc 600
ggcaaccgca tcatgcacaa gctgctgcac tatatcgccg accgcaaaga gcatgccgaa 660
agtggttcg acgcactcag gatcgcgcaa ggcgatatcg gcctcatcaa tggcgcgctc 720
gacctggtct ctggcccgca tgacctcgaa gcctggcgcg agcggctgcc cgacgcgcg 780
catcacctga tcccgaccgt gggccattat ccgcaggtgg aggaccgca gacggtgtcg 840
cgcgtgacgc tggattggct cgcacgctaa 870

<210> 17
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Amino acid sequence for rEEH3

 <400> 17
 Met Pro Asp Pro Ala Ser Gly Ile Ala Ile Asn Arg Val Pro Ala Asn
 1 5 10 15
 Gly Leu Glu Phe Glu Val Ala Met Ala Gly Glu Gly Asp His Leu Ala
 20 25 30
 Leu Met Leu His Gly Phe Pro Glu Leu His Phe Ser Trp Arg His Gln
 35 40 45
 Met Pro Leu Leu Ala Glu Met Gly Tyr Arg Val Trp Ala Pro Asn Met
 50 55 60
 Arg Gly Tyr Gly Glu Thr Thr Arg Pro Thr Glu Val Arg Asp Tyr Ala
 65 70 75 80
 Leu Asp His Leu Thr Gln Asp Val Ala Ala Leu Ile Asp Ala Ser Gly
 85 90 95
 Ala Thr Lys Val Thr Leu Ile Ala His Asp Trp Gly Ala Ile Ile Ala
 100 105 110
 Trp Tyr Phe Ala Ile Leu Lys Leu Arg Pro Leu Glu Arg Leu Val Ile
 115 120 125
 Met Asn Val Pro His Pro Lys Val Leu Gln Arg Glu Leu Arg Arg Trp
 130 135 140
 Glu Gln Ile Lys Lys Ser Trp Tyr Val Phe Phe Phe Gln Leu Pro Trp
 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Lys Arg Ile Gly Ala Asp Ser Gly Lys Arg Ile Gly Glu
 165 170 175
 Leu Phe Ala Gln Thr Ser Cys Asn Pro Glu Arg Phe Gly Pro Asp Val
 180 185 190
 Lys Ala Val Tyr Ala Ala Gly Ala Ala Arg Pro Gly Ala Pro Arg Ala
 195 200 205
 Met Val Asn Tyr Tyr Arg Ala Ala Met Arg His Arg Asp Thr Ile Asp
 210 215 220
 Pro Gly Asp Phe Arg Val Asp Val Pro Thr Leu Leu Val Trp Gly Glu
 225 230 235 240

Glu Asp Val Ala Leu Asn Ile Arg Cys Thr Glu Gly Thr Glu Gln Trp
 245 250 255

Val Pro Asp Ile Thr Val Lys Arg Leu Pro Asn Val Ser His Trp Val
 260 265 270

Gln Gln Asp Ala Pro Asp Glu Val Asn Ala Ile Leu Arg Glu Trp Leu
 275 280 285

Pro Lys Pro Ala Pro Ala Ser
 290 295

<210> 18

<211> 888

<212> DNA

<213> Nucleotide sequence for EEH3

<400> 18

atgcccgatc ctgcgagcgg gattgcgatc aatcgggtcc cgcaccaatgg cttggaattc 60
 gaagtgcgca tggcgggtga gggcgatcac ctgcgctca tgctgcacgg ctttcccgag 120
 ctgcatttca gctggcgtca ccaaatgccg ctattggcag aaatgggcta ccgcgctctgg 180
 gcgccaata tgcgcggtta tggcgagacg acgcgctcaa cggaagtgcg cgactatgcg 240
 ctcgatcacc tgacgcagga tgttgcggcg ctgatcgatg cgagcggggc gacaaaagtg 300
 acgctgatcg cgcgatgactg gggcgcgatc atcgcgtggt atttcgcat cctgaaactg 360
 cgaccgctcg agcggctggt gatcatgaat gtgccgcacc ccaaggttct tcagcgcgag 420
 ttgcggcggt gggagcagat caagaagagt tggatatgtg tcttctttca acttccgtgg 480
 ctgccggaaa agcgcacatcg tgccggacagc ggcaagcggga tcggcgagct attcgcgcag 540
 acgagctgca atccggagcg gttcggggccg gatgtgaagg cggcttatgc tgccggtgcc 600
 gcgaggcccg gcgcgcccg agcgatggtg aattattatc gcgcggcgat gcggcaccgc 660
 gacacgatcg atccgggcga tttccgcgctc gatgttccaa cgctattggt ttggggcgag 720
 gaggacgttg cgctcaatat ccgttgcacc gaaggcaccg agcaatgggt gcccgatata 780
 acggtcaaac gcctgcccga tgtctcgcac tgggtgcagc aagacgcgcc cgacgaagtg 840
 aacgcgatcc tgcgcgagtg gctgcctaag cccgctccgg catcctga 888

<210> 19

<211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Forward primer for *Sphingopyxis alaskensis* (SPF1)

 <400> 19
 cgaccggca tatgtcccc gccaaatcaa ttctgc 36

 <210> 20
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Reverse primer for *Sphingopyxis alaskensis* (SPRH1)

 <400> 20
 ctccacatgc ggccgccttc ttctcgcgca agggg 35

 <210> 21
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Forward primer for *Novosphingobium aromaticivorans* (NVF1)

 <400> 21
 cgaccggca tatgaatggtt ggcctttcgtt ttgtcg 36

 <210> 22
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Reverse primer for *Novosphingobium aromaticivorans* (NVRH1)

 <400> 22
 ctccacatgc ggccgcgcac atcagggaaa acgagg 36

 <210> 23

<211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Forward priemr for Rhodobacterales bacterium HTCC2654(RBF2)

 <400> 23
 cgaccggca tatgaacgac aagaccttta tcgagacgaa cggc 44

 <210> 24
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Forward primer for Rhodobacterales bacterium HTCC2654(RBRH2)

 <400> 24
 ctccacatct cgagttacaa ggctgaaaag aacactcgca aatc 44

 <210> 25
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Reverse primer for sEEH without His-tag (SPRNH1)

 <400> 25
 ctccacatgc ggccgctcac ttcttctcgc gcaaggg 37

 <210> 26
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Reverse primer for nEEH without His-tag (NVRNH1)

 <400> 26
 ctccacatgc ggccgcctag cacatcaggg aaaacgcg 38

 <210> 27

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse priemr for rEEH without His-tag(RBRNH2)

<400> 27
 ctccacatct cgagtcaaag cgtggcgagc cagtcgatga 40

<210> 28
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Amino acid sequence for sEEH

<400> 28
 Met Ser Pro Ala Lys Ser Ile Ser Leu Arg Arg Leu Leu Ser Thr Ala
 1 5 10 15

Ile Ser Val Ala Ala Leu Gly Met Thr Leu Gln Ser Ser Pro Ser Phe
 20 25 30

Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Thr Ala Ile Thr Val Ser Ala Ala Ala
 35 40 45

Ala Val Ala Ala Pro Gln Asp Glu Ser Ile Arg Pro Phe His Val Ser
 50 55 60

Ile Pro Glu Glu Ala Leu Thr Asp Leu Arg Arg Arg Leu Ala Glu Thr
 65 70 75 80

Arg Trp Pro Asp Arg Glu Lys Val Ser Asp Ala Ser Gln Gly Val Gln
 85 90 95

Leu Asp Arg Leu Glu Pro Leu Val Arg Tyr Trp Gly Thr Asp Tyr Asp
 100 105 110

Trp Arg Lys Gly Glu Ala Arg Leu Asn Ala Val Pro Gln Phe Ile Thr
 115 120 125

Thr Ile Asp Gly Leu Asp Ile Gln Phe Ile His Ile Arg Ser Lys His
 130 135 140

Lys Gly Ala Met Pro Leu Leu Met Thr His Gly Trp Pro Gly Ser Pro
 145 150 155 160

Phe Glu Leu Leu Lys Thr Val Gly Pro Leu Thr Asp Pro Thr Ala His
 165 170 175

Gly Gly Lys Ala Glu Asp Ala Phe Asp Leu Ile Met Pro Thr Tyr Pro

180	185	190													
Gly Tyr Gly Phe Ser Gly Lys Pro Asn Glu Ala Trp Asp Pro Ala Arg															
195	200	205													
Val Ala Arg Ala Trp Asp Val Leu Met Lys Arg Leu Gly Tyr Lys Asn															
210	215	220													
Tyr Val Ser Gln Gly Gly Asp Trp Gly Ala Ile Ile Ser Gln Val Leu															
225	230	235													
Ala Val Gln Ala Pro Glu Gly Leu Leu Gly Ile His Thr Asn Met Pro															
245	250	255													
Gly Thr Val Pro Pro Gly Val Leu Lys Leu Val Arg Ala Lys Gln Pro															
260	265	270													
Ala Pro Asp Ser Tyr Ser Pro Glu Glu Lys Ile Ala Tyr Ala Gly Leu															
275	280	285													
Glu Thr Phe Tyr Gly Lys Gly Phe Gly Tyr Ala Glu Met Met Asn Thr															
290	295	300													
Arg Pro Gln Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Ser Asp Ser Pro Val Gly Leu															
305	310	315													
Ala Ala Phe Leu Tyr Glu Lys Ile Ala Thr Trp Thr Asp Ser Gly Gly															
325	330	335													
Asn Pro Glu Ser Val Leu Thr Arg Asp Glu Ile Leu Asp Asn Ile Thr															
340	345	350													
Leu Tyr Trp Leu Thr Asn Thr Gly Thr Ser Ser Ser Arg Ser Tyr Trp															
355	360	365													
Asp Ala Ala Gln Gly Pro Gly Gly Pro Phe Asn Ala Ile Glu Ile Ser															
370	375	380													
Lys Val Pro Val Ala Val Thr Val Phe Pro Gly Glu Ile Tyr Arg Ala															
385	390	395													
Pro Arg Ser Trp Gly Glu Lys Ser Phe Lys Lys Leu Ile Tyr Trp Asn															
405	410	415													
Glu Val Asp Lys Gly Gly His Phe Ala Ala Trp Glu Gln Pro Glu Leu															
420	425	430													
Phe Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ala Phe Arg Pro Leu Arg Glu Lys Lys															
435	440	445													

<210> 29
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Nucleotide sequence for sEEH

<400> 29
 atgtcccccg ccaaatcaat ttcgctccgc cgcttctgtt ccaccgcat ttctgtcgcg 60
 gcgctcggca tgaccctcca gtccagcccg agcttcgcca gcagcgtgg cccgtccacc 120
 gctatcacgg tctcggccgc tgcggcggtc gccgcaccgc aagacgagtc catccgcccg 180
 tttcatgtga gcatccccga agaggcgtc acggatcttc gccgccgtct cgccgagacg 240
 cgctggcccg atcgcgaaaa ggtttcggac gcatcgcagg gtgtgcaact cgaccgtctc 300
 gaaccctcgc tccgttattg gggcactgac tatgactggc gcaagggcga agcccgcctc 360
 aacgccgtgc cgcagttcat caccaccatc gacgggtctc acatccagtt catccacatc 420
 cgctcgaagc ataaggggtgc gatgccgctg ctcatgacgc acggctggcc cggctcaccg 480
 ttcgagctgc tgaaaaccgt cggaccgctt accgatccga ccgcgcacgg cgggaaggcc 540
 gaagacgcct tcgacctgat catgccgacc tatccggggt atgggttttc cggcaagccg 600
 aacgaggcat gggatccggc ccgggtggcg cgcgcctggg atgtgctgat gaagcgtctc 660
 ggctacaaga attatgtgtc gcagggcggc gattggggcg cgatcatttc gcaggtgctg 720
 gccgtgcagg caccgaagg attgcttggc atccatacca atatgccggg caccgttccg 780
 ccgggcgttc tcaagctcgt ccgcgccaaag caaccggctc cggacagcta ttctcccga 840
 gagaagatcg cctacgccgg tctcagagacc ttctacggca agggcttcgg ctatgccga 900
 atgatgaaca cgcgcccgca gacgctcggc tacggcctgt cggactctcc ggtcgggctt 960
 gcagctttcc tctacgagaa gatcgcgacc tggacggata gcgggtggcaa tcccgaagc 1020
 gtgctgacgc gcgacgagat actcgacaac atcacccttt actggctgac caacaccgga 1080
 acctcgtcat cgcgcagcta ttgggatgcc ggcagggcc cgggcgggtcc gttcaacgcg 1140
 atcgagatca gcaaggtgcc ggtcgcggtg accgtcttcc ccggcgagat ctatcgcgcg 1200
 ccgcgcagct ggggcgaaaa gagcttcaag aagctcatct actggaacga ggtcgacaag 1260
 ggcggtcatt tcgccgcctg ggaacagccc gagctgttcg ctgccgagat ccgcgccgcc 1320
 ttccgcccct tgccgcgagaa gaagtga 1347

<210> 30
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Amino acid sequence for nEEH

 <400> 30
 Met Asn Val Ala Pro Phe Val Val Asp Ile Pro Arg Gly Glu Ile Glu
 1 5 10 15
 Asp Leu His Arg Arg Ile Asp Met Thr Arg Trp Pro Glu Lys Glu Thr
 20 25 30
 Val Asp Asp Trp Ser Gln Gly Thr Pro Leu Gly Ala Leu Gln Asp Phe
 35 40 45
 Val Ser Tyr Trp Arg Gly Gly Tyr Asp Trp Tyr Ala Cys Gln Arg Met
 50 55 60
 Leu Asn Asp Trp Gly Met Phe Glu Thr Glu Ile Asp Gly Val Ala Ile
 65 70 75 80
 Arg Phe Leu His Val Arg Ser Ala Gln Ala Asp Ala Arg Pro Leu Leu
 85 90 95
 Leu Thr His Gly Trp Pro Gly Ser Ile Leu Glu Phe Arg Arg Cys Ile
 100 105 110
 Ala Pro Leu Thr Arg Pro Glu Glu His Gly Gly Thr Ala Ala Asp Ala
 115 120 125
 Phe His Leu Val Ile Pro Cys Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Ser Gly Lys
 130 135 140
 Pro Thr Arg Lys Gly Trp Ser Val Gln Lys Ile Ala Gln Ala Trp Gly
 145 150 155 160
 Glu Leu Met Lys Arg Leu Gly Tyr Glu Ser Trp Leu Ala Gln Gly Gly
 165 170 175
 Asp Trp Gly Ser Ala Val Thr Thr Ala Ile Gly Ala Leu Lys Val Glu
 180 185 190
 Gly Cys Ala Gly Ile His Leu Asn Met Pro Ile Ala Arg Pro Leu Pro
 195 200 205
 Glu Asp Leu Ala Ala Pro Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Thr Ala
 210 215 220
 Leu Gln His Tyr Gln Asp Trp Asp Ser Gly Tyr Ser Lys Glu Gln Ala
 225 230 235 240

Thr Arg Pro Gln Thr Val Gly Tyr Gly Leu Val Asp Ser Pro Val Gly
 245 250 255

Leu Ala Gly Trp Ile Tyr Glu Lys Met Trp Ala Trp Thr Asp Asn Glu
 260 265 270

Gly Ala Pro Glu Asp Ala Leu Ser Arg Asp Asp Met Leu Asp Asn Ile
 275 280 285

Met Leu Tyr Trp Leu Thr Ala Ala Gly Ala Ser Ser Ala Arg Leu Tyr
 290 295 300

Trp Glu Ser Phe Ala Ser Phe Gly Pro Ser Gln Ile Asp Ile Pro Ala
 305 310 315 320

Ala Ala Ser Ala Phe Pro Lys Glu Ile Ile Pro Ala Pro Arg Lys Trp
 325 330 335

Phe Glu Arg Asn Cys Ser Lys Leu Val Tyr Trp Gly Glu Leu Glu Lys
 340 345 350

Gly Gly His Phe Ala Ala Trp Glu Gln Pro Glu Ala Phe Val Lys Glu
 355 360 365

Leu Arg Ala Ala Phe Ser Leu Met Cys
 370 375

<210> 31
 <211> 1134
 <212> DNA
 <213> Nucleotide sequence for nEEH

<400> 31
 atgaatggtg cgcttttctg tgtcgacata cctcgcggcg agatcgagga cctgcatcgt 60
 cgcacgcaca tgacacgctg gcccgagaaa gagacggctc acgactggtc gcagggcacg 120
 ccgcttgccg cgcttcagga tttcgtgagc tactggcgcg gcggctatga ctggtacgcg 180
 tgccagagga tgctgaacga ctggggcatg ttcgagaccg agatcgacgg agtggcgatc 240
 cgcttcctcc acgtgcgctc tgcgcaagca gatgcgcggc ccttgctgct gaccacggc 300
 tggccgggat cgattctcga gttccgcgcg tgcacgcgcg cgctgaccg cccagaggag 360
 catggtggta ctgccgccga cgcgttccat ctogtgatcc cttgcctgcc gggatacggc 420
 tttccggaa agcccacgcg caagggctgg agcgtgcaga agatcgcgca ggcctggggc 480
 gaactgatga agcggctggg ctacgaaagc tggcttgcac agggcgggga ctggggttcc 540

gccgttacca ctgccatcgg ggcgctgaag gtggagggct gcgcgggcat ccatctcaac 600
atgccgatcg cccggcccct gccggaggac ctggccgctc cgacgccgga ggagctaagg 660
gcgctgaccg cgctacagca ctatcaggat tgggattcgg ggtattccaa ggagcaggcg 720
acccggcccc agacggtagg ttacgggctg gtcgattcgc cggtcgggct ggctggctgg 780
atctacgaga agatgtgggc ctggaccgac aacgagggcg cgcccgagga cgcgctgagc 840
cgcgacgaca tgctcgacaa catcatgctg tactggctga cggcggcagg ggcatcgtcg 900
gcccggcttt attgggagag ttttgcgagc ttcgggccat cgcagatcga cattccggcc 960
gcggccagcg cttttccgaa ggagataatt cccgcgccgc gcaagtggtt cgagcgcaac 1020
tgttcgaagc tggctactg gggcgagctg gaaaagggcg gccactttgc cgcgtgggag 1080
cagcccgaag ccttcgtgaa ggaacttcgg gccgcgtttt cctgatgtg ctag 1134

<210> 32
<211> 320
<212> PRT
<213> Amino acid sequence for rEEH

<400> 32
Met Asn Asp Lys Thr Phe Ile Glu Thr Asn Gly Ile Arg Leu Ala Thr
1 5 10 15
Arg Ile Glu Gly Asp Gly Pro Leu Val Ile Leu Val His Gly Phe Pro
20 25 30
Glu Thr Ala Tyr Ser Trp Arg Lys Gln Ala Ser Pro Leu Val Glu Ala
35 40 45
Gly Tyr Arg Val Cys Ile Pro Asp Val Arg Gly Tyr Gly Asn Ser Asp
50 55 60
Ala Pro Glu Ala Val Ser Ala Tyr Ala Met Glu Val Met Thr Arg Asp
65 70 75 80
Phe Leu Gly Leu Ala Gln Ala Leu Ser Glu Val Pro Ala Val Ile Val
85 90 95
Gly His Asp Trp Gly Ala Pro Leu Ala Trp Asn Thr Ala Arg Leu Phe
100 105 110
Pro Glu Gln Phe Arg Ala Val Ala Gly Leu Ser Val Pro Tyr Ala Pro
115 120 125
Pro Gly Asp Val Ala Pro Ile Asp Leu Tyr His Lys Leu Phe Thr Asp

130		135		140
Lys Gly Arg Phe Phe Tyr Gln Val Tyr Phe Gln Asp Glu Gly Val Ala				
145		150		155
				160
Glu Ala Glu Leu Glu Ala Asp Val Glu Asp Ser Leu Ala Lys Phe Tyr				
		165		170
				175
Tyr Ala Trp Ser Gly Asp Cys Pro Pro Asn Gly Trp Pro Asn Asp Lys				
		180		185
				190
Ala His Gly Asp Pro Val Leu Lys Gly Leu Pro Arg Pro Asp Leu Pro				
		195		200
				205
Leu Pro Trp Leu Thr Gln Asp Asp Leu Asp Arg Tyr Ala Ala Asp Phe				
		210		215
				220
Arg Thr Ser Gly Phe Arg Gly Pro Leu Asn Arg Tyr Arg Asn Gln Arg				
		225		230
				235
				240
Glu Asp His Ala Phe Leu Lys Ala His Pro Ser Asn Pro Ile Ile Gln				
		245		250
				255
Gln Pro Ser Leu Phe Leu Tyr Gly Asp Arg Asp Pro Val Leu Thr Met				
		260		265
				270
Phe Arg Thr Pro Pro Glu Asp Leu Leu Pro Lys Thr Leu Ala Asp Leu				
		275		280
				285
Arg Gly Val His Arg Leu Pro Gly Val Gly His Trp Thr Gln Gln Glu				
		290		295
				300
Ala Pro Glu Ala Val Asn Lys Ala Leu Ile Asp Trp Leu Ala Thr Leu				
		305		310
				315
				320

<210> 33
 <211> 963
 <212> DNA
 <213> Nucleotide sequence for rEEH

<400> 33
 atgaacgaca agacctttat cgagacgaac ggcattcggc tggccacgcg catcgagggc 60
 gacggggccgc tcgtcatcct cgtccacggc tttcccgaga ccgcgtatag ctggcgcaag 120
 caggcgtcgc cgctggtgga agcgggctac cgcggtgtgta ttcccgatgt acgcggctac 180
 ggcaattcgg acgcgccgga ggccgtttcg gcctatgcga tggaggtcat gacgcgcgac 240
 tttctgggtc tcgcgaggc gttgtcggaa gtaccgcccg tcattgtcgg gcatgactgg 300

ggcgcgccct tggcatggaa caccgcgcgg ctcttccctg agcagtttcg cgccgtcgct	360
gggctttccg tggcctacgc accacctggc gacgtcgcgc cgatcgacct ttaccacaag	420
cttttcaccg acaagggccg cttcttctat caggtctatt ttcaggacga gggcgtggcc	480
gaagccgagt tggaggcgga tgtcgaagac agcctcgcca agttttacta cgcgtggtcc	540
ggcgactgcc cgccgaacgg atggcccaac gacaaggcgc acggcgaccc ggtgctcaag	600
ggcctgcccc ggcccgatct gccgctgccg tggctgacgc aagatgacct cgaccgctac	660
gccgcagatt tccgcacctc cgggtttcgt ggcccgtca accgataccg aaatcagcgg	720
gaggatcacg cgtttctcaa agcgcacccg tcgaaccgca tcatccagca gccgagcctg	780
ttcctttatg gcgaccgtga cccggtgctg accatgttcc gcaccccgcc cgaggatctt	840
ctgccaaga cgctggccga cctgcgcggc gtgcaccgcc tgcccgggtg cggccactgg	900
accagcagg aagcgcgccg agcggtaaac aaggcgctca tcgactggct cgccacgctt	960
tga	963