(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0119213
(43) 공개일자 2020년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/40 (2006.01) *C12P 7/22* (2006.01)
C12P 7/44 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/40 (2013.01)
C12P 7/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0043023
(22) 출원일자 2020년04월08일
심사청구일자 2020년04월08일
(30) 우선권주장
1020190040992 2019년04월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
김경헌
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호(서초동, 삼풍아파트)
김재균
서울특별시 성북구 인촌로 22길 47
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

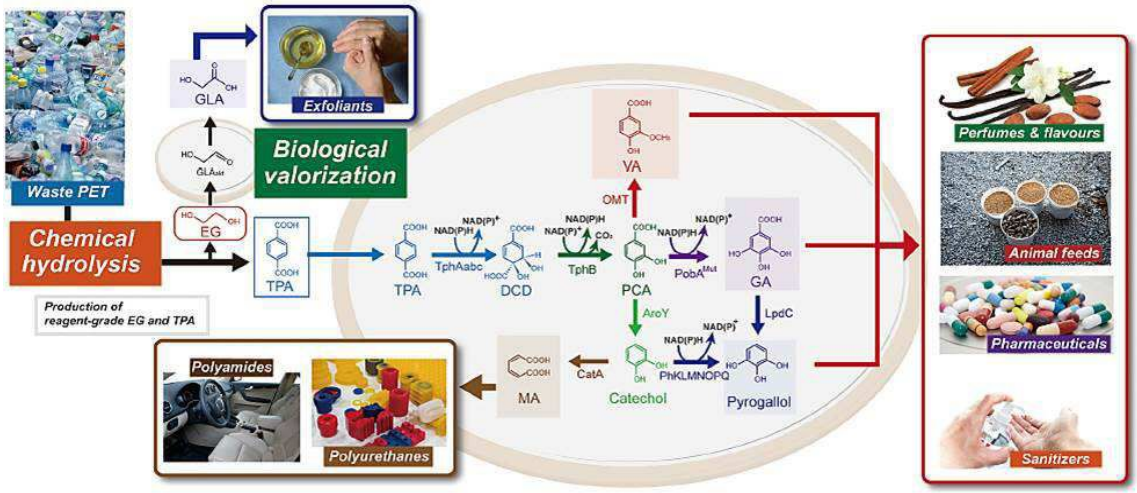
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명은 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 화학적 가수분해에서 얻은 단량체 테레프탈산으로부터 고부가가치의 방향족 화합물 및 방향족 유래 화합물로 전환되고, 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 다른 단량체인 에틸렌 글리콜은 화장료 소재인 글리콜산으로 전환될 수 있음을 입증하여 폐기되는 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 고부가가치 화합물로 재활용하는 것을 특징으로 한다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12P 7/44 (2013.01)
C12Y 103/01053 (2013.01)
C12Y 113/11001 (2013.01)
C12Y 114/12015 (2013.01)
C12Y 114/13007 (2013.01)
C12Y 401/01059 (2013.01)

(72) 발명자
주정찬
서울특별시 마포구 독막로20나길 22, 102동 1301호(상수동, 래미안 밤섬리베뉴Ⅰ)
김희택
대전광역시 유성구 죽동로 39, 203동 701호(죽동, 죽동칸타빌아파트)
박시재
경기도 고양시 일산서구 하이파크3로 62, 501동 1002호 (덕이동, 하이파크시티일산아이파크5단지)
차현길
울산광역시 울주군 범서읍 대리2길 48, 1604호(구영지구 푸르지오1단지)
송봉근
대전광역시 유성구 가정로 43, 103동 1203호(신성동, 한울아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017R1A2B2005628
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (이공)중견연구자지원
연구과제명 식의약 소재용 퓨코스의 생물공학적 생산 플랫폼
기 여 율 1/3
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017M1A2A2087634
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응기술개발사업
연구과제명 리그닌 해중합 단량체를 활용한 플랫폼화합물의 생물전환 원천기술 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 한국화학연구원
연구기간 2019.01.20 ~ 2020.01.19
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2019M1A2A2030931
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응기술개발사업
연구과제명 리그닌 해중합 단량체 이용 균주 개발을 위한 단백질 발현 시스템 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2019.01.20 ~ 2020.01.19

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴리에틸렌 테레프탈레이트의 가수분해를 통해 테레프탈산 및 에틸렌 글리콜을 생산하는 단계; 및

생체촉매 하에서 테레프탈산의 생물변환을 통해 프로토카테추산(protocatechuic acid)을 중간체로 하여 갈산, 피로갈롤, 카테콜, 뮤콘산 및 바닐산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 생산하거나,

에틸렌 글리콜의 발효를 통해 글리콜산을 생산하는 단계를 포함하는 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

폴리에틸렌 테레프탈레이트의 가수분해는 마이크로파를 인가하여 수행되는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 테레프탈산의 프로토카테추산으로의 생물변환은

테레프탈산 1,2-디옥시게네이즈 및 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트 디히드로게네이즈를 발현하는 미생물을 생체촉매로 사용하여 수행되는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 테레프탈산의 갈산으로의 생물변환은

테레프탈산 1,2-디옥시게네이즈, 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트 디히드로게네이즈 및 p-히드록시벤조에이트 히드록실레이즈를 발현하는 미생물을 생체촉매로 사용하거나, 또는

테레프탈산 1,2-디옥시게네이즈 및 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트 디히드로게네이즈를 발현하는 미생물; 및 p-히드록시벤조에이트 히드록실레이즈를 발현하는 미생물의 조합을 생체촉매로 사용하여 수행되는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 테레프탈산의 피로갈롤로의 생물변환은

테레프탈산 1,2-디옥시게네이즈, 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트 디히드로게네이즈, p-히드록시벤조에이트 히드록실레이즈 및 갈산 디카르복실레이즈를 발현하는 미생물을 생체촉매로 사용하거나, 또는

테레프탈산 1,2-디옥시게네이즈, 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트 디히드로게네이즈 및 프로토카테추산 디카르복실레이즈를 발현하는 미생물; 및 페놀 히드록실레이즈를 발현하는 미생물의 조합을 생체촉매로 사용하여 수행되는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 테레프탈산의 뮤콘산으로의 생물변환은

테레프탈산 1,2-디옥시게네이즈, 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트 디히드로게네이즈, 프로토카테추산 디카르복실레이즈 및 카테콜 1,2-디옥시게네이즈를 발현하는 미생물을 생체촉매로 사용하여 수행되는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 테레프탈산의 바닐산으로의 생물변환은

테레프탈산 1,2-디옥시게네이즈 및 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트 디히드로게네이즈를 발현하는 미생물; 및 인간 유래의 O-메틸트랜스퍼레이즈를 발현하는 미생물의 조합을 생체촉매로 사용하여 글리세롤 및 메티오닌 함유 배지에서 수행되는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

에틸렌 글리콜의 발효는 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109, 클로스트리디움 글리콜리쿰(*Clostridium glycolicum*) 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 에틸렌 글리콜 발효 미생물을 사용하여 수행되는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET)는 테레프탈산(terephthalic acid, TPA) 및 에틸렌 글리콜(ethylene glycol, EG)의 폴리에스테르이다. 우수한 물리적 특성으로 인해 PET는 합성 섬유 및 포장재료에 널리 사용되었다. 2015년 연간 전 세계 PET 생산량은 3,300만 톤에 달하여 PET가 전세계에서 가장 일반적으로 생산되는 폴리에스테르가 되었다. PET는 자연적으로 완전히 분해되지 않기 때문에 육상 생태계에서 미세 플라스틱의 보급 및 바다에서 폐 플라스틱 축적과 같은 심각한 환경 문제를 일으킨다. 그러나, PET와 유사한 물리적 특성 및 경제성을 갖는 생분해성 플라스틱은 아직 이용 가능하지 않다. 가까운 시일 내에 PET 생산량을 감축할 것 같지 않아 PET 재활용을 더 엄격하게 해야 자연에서 방출되는 폐기물 PET를 줄일 수 있다.

[0003] 다양한 플라스틱 중에서 PET와 폴리에틸렌(PE)은 물리적으로 재활용되는 유일한 플라스틱이며, 폐 플라스틱으로부터 재활용 플라스틱을 생산한다. 기계적인 PET 재활용은 수십 년 동안 수행되었지만, 이 전통적인 재활용률은 미국에서 약 21%보다 낮다. 이 낮은 비율은 주로 순수 PET($ 1.1-1.3/kg PET)에 비해 재활용 PET(예를 들어, $ 1.3-1.5/kg PET)의 품질이 낮고 비용이 높기 때문인 것으로 보인다. 예를 들어, 다운사이클링으로서 기능하는 기계적 재활용의 높은 비용 및 낮은 경제적 타당성을 개선하기 위해, 기계적으로 재활용된 PET를 리그닌과 혼합하여 탄소섬유를 제조하는 기계적으로 재활용된 PET의 대안적 응용이 연구되고 있다.

[0004] 기계적 재활용을 통한 PET의 다운사이클링 문제를 극복하기 위해 PET를 단량체로 탈중합시키고 단량체를 PET로 재중합하는 화학적 재활용이 개발되었다. PET의 탈중합, 화학적 재활용에 의한 PET의 생산 역시 경제적 장점이 없다. 따라서, 단량체를 PET보다 고부가가치의 제품으로 전환함으로써 업사이클링을 통해 PET 재활용의 경제성을 개선할 필요가 있다.

[0005] 최근 PET의 화학적 개질 및 유리섬유를 이용한 강화를 통해 폐 PET를 고부가가치의 플라스틱으로 화학적 업사이클링하는 방법이 개발되고 있다. 폴리히드록시 알카노에이트(PHA)와 같은 다른 플라스틱 단량체로 생물학적으로 전환된다. 그러나, PHA에 대한 이 생물변환 공정의 경제적 지속 가능성은 여전히 의문의 여지가 있다.

[0006] 따라서, 본 발명은 폐 PET 재활용의 경제성을 개선하고 효과적인 PET 업사이클링 전략을 개발하기 위해 처음으로 PET 단량체의 생물학적 가치화를 검증하였다. 생물학적 PET 가치화를 위해, PET를 화학적 가수분해에 의해 탈중합시키고, TPA 및 EG 단량체는 다양한 대사적으로 조작된 전체-세포 미생물 촉매를 사용하여 다양한 고부가가치의 화합물로 전환하였다. 특히, TPA 분해 경로를 미생물에 도입함으로써, TPA는 의약품, 화장품, 살균제, 동물 사료, 바이오 플라스틱 단량체 등을 제조하는 데 사용되는 고부가가치의 방향족 또는 방향족-유래 화합물, 즉 프로토카테추산(PCA), 갈산(GA), 피로갈롤, 카테콜, 뮤콘산(MA) 및 바닐산(VA)으로 전환된다. 구체적으로, TPA를 전환하는데 필요한 반응을 촉매하는 주요 효소 및 EG를 글리콜산(GLA)으로 발효하는 미생물을 동정하고,

PET 가치화의 주요 성분으로서 그들의 잠재력을 조사하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Ji, L. Appl. Mech. Mater. 2013, 312, pp.406-410

(비특허문헌 0002) Lwanga, E. H. et al. Environ. Pollut. 2017, 220, pp.523-531

(비특허문헌 0003) Awaja, F. et al. Eur. Polym. J. 2005, 41 (7), pp.1453-1477

(비특허문헌 0004) Beaucamp, A. et al. Green Chem. 2019, 21, pp.5063-5072

(비특허문헌 0005) Kenny, S. T. et al. Environ. Sci. Technol. 2008, 42 (20), pp.7696-7701

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 폐 PET로부터 고부가가치의 화합물을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 가수분해를 통해 테레프탈산 및 에틸렌 글리콜을 생산하는 단계; 및

[0010] 생체촉매 하에서 테레프탈산의 생물변환을 통해 프로토카테추산(protocatechuic acid)을 중간체로 하여 갈산, 피로갈롤, 카테콜, 뮤콘산 및 바닐산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 생산하거나,

[0011] 에틸렌 글리콜의 발효를 통해 글리콜산을 생산하는 단계를 포함하는 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 PET의 가수분해 산물인 TPA의 히드록시화, 탈카르복실화, 산화 고리 절단 및 메틸화의 단일 또는 조합 반응을 사용하여 중간체인 PCA를 통해 GA, 피로갈롤, 카테콜, MA 및 VA와 같은 PET 값보다 다양한 고부가가치 화합물로 전환시킬 수 있다.

[0013] 또한, PET의 다른 단량체인 EG를 발효하는 미생물을 통해 GLA로 전환시킴으로써 PET 폐기물 재활용의 가능성을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a-g는 PET의 화학적 가수분해에 의한 PET의 TPA 및 EG로의 탈중합 및 PET 가수분해물에서 각각 PCA 및 GLA로의 TPA 및 EG의 생물변환을 나타낸 것이다: (a) PET의 화학적 가수분해에 의한 EG 및 TPA의 생산 및 PET 가수분해물로부터 EG 및 TPA의 분리. (b) 대장균(*E. coli*) 균주 PCA-1에 의한 TPA의 PCA로의 생물변환. (c) 균주 PCA-1에 의해 PET 가수분해물 중의 TPA로부터 PCA의 생산. (d) 균주 PCA-1에 의해 생산된 PCA의 GC/MS 스펙트럼. (e) 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109에 의한 PET 가수분해물 중의 EG로부터 GLA의 생산. (f) EG의 GLA로의 전체-세포 전환의 시간 경과. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다. (g) 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109에서 생산한 GLA의 GC/MS 스펙트럼.

도 2a-e는 PET에서 EG 및 TPA의 생산, 분리 및 식별을 나타낸 것이다: (a) PET의 화학적 가수분해 및 NaOH 및 HCl을 사용하여 PET 가수분해물로부터 TPA 및 EG의 분리에 의한 EG 및 TPA의 생산 경로. (b) PET 가수분해물로부터의 TPA의 ^{1}H NMR 및 (c) ^{13}C NMR 스펙트럼; 시약 등급 TPA가 기준으로 사용된다. (d) PET 가수분해물로부터의 EG의 ^{1}H NMR 및 (e) ^{13}C NMR 스펙트럼; 시약 등급 EG가 기준으로 사용된다.

도 3은 PET 업사이클링을 위한 폐 PET 바이오리파이너리에 대한 전체 계획을 나타낸 것이다.

도 4a-f는 (a) PCA, (b) GA, (c) 피로갈롤, (d) MA, (e) VA, (f) GLA의 정통의 표준 GC/MS 스펙트럼을 나타낸다.

도 5a-c는 TPA의 GA로의 생물변환을 나타낸 것이다: (a) TPA에서 GA로의 전환을 위한 생합성 경로 및 전체-세포 촉매. (b) GA-1, GA-2a 및 GA-2b 시스템에서 TPA의 최고 GA 수율 비교. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다. (c) GA-2b 시스템에 의해 TPA로부터 생성된 GA의 GC/MS 스펙트럼.

도 6a-d는 전체-세포 촉매를 사용한 TPA의 GA로의 생물변환을 나타낸 것이다: (a) 코니칼 튜브에 3.4 mM PCA를 함유하는 TG-2 버퍼에서 PCA의 GA로의 전체-세포 전환에 대한 PobA를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 HBH-1 및 $PobA^{Mut}$을 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 HBH-2 균주의 비교. (b) 코니칼 튜브에 2.8 mM TPA를 함유하는 TG-2 버퍼에서 OD_{600} = 30에서 TphAabc, TphB 및 $PobA^{Mut}$을 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 GA-1로 구성된 GA-1 시스템에 의한 TPA의 GA로의 전환. (c) 3.1 mM TPA를 함유하는 TG-2 버퍼 함유 배플 플라스크에서 OD_{600} = 20에서 TphAabc 및 TphB를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 PCA-1 및 OD_{600} = 20에서 $PobA^{Mut}$를 발현하는 균주 HBH-2를 함유하는 GA-2a 시스템에 의해 TPA를 GA로의 전환. (d) TG-2에서 균주 PCA-1 및 HBH-2의 세포 밀도를 각각 OD_{600} = 10 및 30으로 조정함으로써 GA-2a 시스템으로부터 변형된 GA-2b 시스템에 의한 2.9 mM TPA를 함유하는 버퍼에서 TPA의 GA로의 전환. 모든 전환은 30 ℃ 및 250 rpm에서 수행된다. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다.

도 7a-b는 PobA의 활성 부위에 대한 PCA 결합의 도킹 시뮬레이션을 나타낸 것이다: (a) 야생형 PobA. (b) Y385F/T294A 이중 돌연변이체, $PobA^{Mut}$. PobA의 FAD-결합 구조(PDB 코드 6DLL)가 도킹 시뮬레이션에 사용되었으며 $PobA^{Mut}$의 구조는 MODELLER 소프트웨어를 사용하여 구성되었다. AutoDockFR 소프트웨어를 사용하여 분자 도킹 시뮬레이션을 수행한다.

도 8a-d는 TPA의 피로갈롤로의 생물변환을 나타낸 것이다: (a) 각각의 PG-1a 및 PG-1b 시스템에 의한 TPA의 피로갈롤로의 전환을 위한 생합성 경로 및 전체-세포 촉매. (b) PG-2a 및 PG-2b에 의한 TPA의 피로갈롤로의 전환을 위한 생합성 경로 및 전체-세포 촉매. (c) 균주 PG-1a 및 PG-1b 그리고 시스템 CTL-1, PG-2a 및 PG-2b의 TPA로부터 최고 수율의 피로갈롤 비교. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다. (d) 균주 PG-1a에 의해 TPA로부터 생성된 피로갈롤의 GC/MS 스펙트럼.

도 9a-e는 미생물 촉매를 사용하여 피로갈롤로의 TPA의 생물변환을 나타낸 것이다: (a) OD_{600} = 30에서 TphAabc, TphB, $PobA^{Mut}$ 및 LpdC를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 PG-1a로 구성된 PG-1a 시스템에 의한 TPA의 피로갈롤로의 전환. (b) PG-1b에 의한 TPA의 피로갈롤로의 전환 OD_{600} = 30에서 TphAabc, TphB, $PobA^{Mut}$, LpdC 및 PhKLMNOPQ를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 PG-1b로 이루어진 시스템. (c) 30 ℃ 및 250 rpm에서 코니칼 튜브에서 OD_{600} = 30에서 TphAabc, TphB 및 AroY를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 CTL-1에 의한 TPA의 카테콜로의 전환. (d) OD_{600} = 10에서 TphAabc 및 TphB를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 PCA-1 및 OD_{600} = 30에서 AroY 및 PhKLMNOPQ를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 PDC-CH-1로 구성된 PG-2a 시스템에 의한 TPA의 피로갈롤로의 전환. (e) OD_{600} = 10에서 TphAabc, TphB 및 AroY를 발현하는 균주 CTL-1 및 OD_{600} = 30에서 PhKLMNOPQ를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 CH-1을 포함하는 PG-2b 시스템에 의한 TPA의 피로갈롤로의 전환. 시스템 CTL-1, PG-1a 및 PG-1b에 대해 3.0 mM TPA를 함유하고 30 ℃ 및 250rpm에서 배플 플라스크에서 PG-1 및 PG-2 균주에 대해 3.5 mM TPA를 함유하는 TG-2 버퍼에서 수행하였다. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다.

도 10a-b는 GA에 대한 GA 디카르복실레이즈 LpdC의 무차별성을 나타낸 것이다: (a) LpdC를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 GDC-1에 의한 PCA의 카테콜 전환. (b) LpdC를 발현하는 균주 GDC-1에 의한 GA의 카테콜 전환. 30 ℃ 및 250rpm에서 배플 플라스크에 3.0 mM PCA 또는 3.0 mM GA를 함유하는 TG-2 버퍼에서 두 전환을 모두 수행한다. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다.

도 11a-c는 피로갈롤과 카테콜 합성에 사용되는 효소를 나타낸 것이다: (a) 대장균(*E. coli*) 균주 CH-1에서 발현된 카테콜 히드록실레이즈 PhKLMNOPQ 및 카테콜로부터 피로갈롤의 생성. (b) 대장균(*E. coli*) 균주 PDC-1에서 발현된 PCA 디카르복실레이즈 AroY 및 PCA로부터 카테콜의 생성. (c) 대장균(*E. coli*) 균주 PDC-CH-1에서 공동 발현된 PCA 디카르복실레이즈 AroY 및 카테콜 히드록실레이즈 PhKLMNOPQ 및 PCA로부터의 피로갈롤의 생성. 모든

전환은 30 ℃ 및 250 rpm에서 배플 플라스크의 TG-2 버퍼에서 수행된다. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다.

도 12a-b는 카테콜의 고리 절단에 의한 TPA의 MA로의 생물변환을 나타낸 것이다: (a) CatA를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 CDO-1에 의한 카테콜의 고리 절단. (b) TphAabc, TphB, AroY 및 CatA를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 MA-1로 구성된 MA-1 시스템에 의한 TPA의 MA로의 전환. 모든 전환은 코니칼 튜브에서 OD_{600} = 30 및 30 ℃ 및 250 rpm에서 TG-2 버퍼에서 수행된다. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다.

도 13a-c는 TPA의 MA로의 생물변환을 나타낸 것이다: (a) TphAabc, TphB, AroY 및 CatA를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 MA-1에 의한 TPA의 MA로의 전환을 위한 생합성 경로 및 전체-세포 촉매. (b) 30℃ 및 250rpm에서 코니칼 튜브에 TPA를 함유하는 TG-2 버퍼에서 수득된 TPA로부터의 MA의 최고 수율. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다. (c) 대장균(*E. coli*) MA-1 균주에 의해 TPA로부터 생성된 MA의 GC/MS 스펙트럼.

도 14a-c는 3개의 진핵생물 공급원으로부터 OMT의 단백질 발현 및 PCA의 VA로의 전체-세포 전환을 나타낸 것이다: (a) 대장균(*E. coli*) BL21 (DE3)에서 과발현된 OMT의 SDS-PAGE. (b) OD_{600} = 20에서 HsOMT를 발현하는 대장균(*E. coli*) OMT-1a에 의한 전체-세포 전환. (c) OD_{600} = 20에서 SlOMT를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 OMT-1b에 의한 전체-세포 전환. 전환은 30℃ 및 250rpm에서 코니칼 튜브에 3.2 mM PCA, 10g/L 효모 추출물 및 20g/L 펩톤을 함유하는 0.1 M 인산 나트륨(pH 7.0) 버퍼에서 수행된다. 데이터는 중복 실험의 평균±표준편차로 제시된다. 도면에서, *Hs*OMT, *H. sapiens*의 OMT; *Sl*OMT, *S. lycopersicum*의 OMT; *Ms*OMT, *M. sativa*의 OMT; pET28a, 빈 벡터; T, 총 단백질; S, 가용성 분획; I, 불용성 분획; M, 마커.

도 15a-d는 TPA의 VA로의 생물변환을 나타낸 것이다: (a) VA-1 시스템에서, OD_{600} = 30에서 TphAabc, TphB 및 HsOMT를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 VA-1을 30℃ 및 250rpm에서 코니칼 튜브의 TG-1/YP 버퍼에서 사용한다. (b) VA-2a 시스템에서, OD_{600} = 10에서 TphAabc 및 TphB를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 PCA-1 및 OD_{600} = 30에서 대장균(*E. coli*) 균주 OMT-2^{His}는 30 ℃ 및 250 rpm에서 코니칼 튜브의 TG-2/YPM 버퍼에 동시에 첨가된다. (c) VA-2b 시스템에서, VA-2a 시스템은 코니칼 튜브 대신 배플 플라스크를 사용하여 변형된다. (d) VA-2c 시스템에서, VA-2b 시스템의 균주 PCA-1 및 OMT-2^{His}에 대한 OD_{600} 값은 각각 OD_{600} = 20 및 OD_{600} = 20으로 변경된다. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다.

도 16a-d는 TPA를 VA로 전환하는 다양한 전체-세포 전환 시스템에 의한 글리세롤 및 메티오닌 소비를 나타낸 것이다: (a) 24시간 후 시스템 VA-1, VA-2a, VA-2b 및 VA-2c에 의한 글리세롤 소비의 비교. (b) 24시간 후 시스템 VA-1, VA-2a, VA-2b 및 VA-2c에 의한 메티오닌 소비의 비교. (c) VA-2b 시스템에 의한 글리세롤 소비의 시간 경과. (d) VA-2b 시스템에 의한 메티오닌 소비의 시간 경과. 글리세롤 및 메티오닌을 각각 HPLC 및 GC/MS로 분석한다. 데이터는 2반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다.

도 17a-b는 PCA의 VA로의 생물변환에 대한 HsOMT 단백질 공학의 효과를 나타낸 것이다: (a) TG-1/YP 버퍼에서 HsOMT를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 OMT-2. (b) HsOMT^{His}를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 OMT-2^{His}는 TG-1/YP 버퍼에 존재한다. TG-1/YP 버퍼는 100 g/L 글리세롤, 10 g/L 효모 추출물 및 20 g/L 펩톤을 함유하는 50 mM Tris-HCl 버퍼를 나타낸다. 전체-세포 전환은 30 ℃ 및 250 rpm에서 50 mL 코니칼 튜브에서 OD_{600} = 30에서 수행된다. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다.

도 18a-b는 메티오닌 보충이 PCA의 VA로의 생물변환에 미치는 영향을 나타낸 것이다: (a) 20 g/L 글리세롤을 함유하는 TG-2/YP 버퍼 중의 대장균(*E. coli*) 균주 OMT-2^{His}. (b) 20 g/L 글리세롤 및 2.5 mM 메티오닌을 함유하는 TG-2/YPM 버퍼 중의 스트레인 OMT-2^{His}. TG-2/YP 버퍼는 20 g/L 글리세롤, 10 g/L 효모 추출물 및 20 g/L 펩톤을 함유하는 50 mM Tris-HCl 버퍼를 나타낸다. 2.5 mM 메티오닌을 보충함으로써 TG-2/YPM 버퍼를 TG-2/YP 버퍼로부터 변형시킨다. 30 ℃ 및 250 rpm에서 50 mL 코니칼 튜브에서 OD_{600} = 30으로 전환을 수행한다. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다.

도 19a-c는 TPA의 VA로의 생물변환을 나타낸 것이다: (a) TPA의 VA로의 전환을 위한 생합성 경로 및 전체-세포 촉매. (b) TPA로부터의 최고 수율의 VA 비교. 데이터는 VA-2a 시스템에 대한 2반복 실험 및 시스템 VA-1, VA-2b 및 VA-2c에 대한 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다. (c) VA-2b 시스템에 의해 TPA로부터 생성된 VA의

GC/MS 스펙트럼.

도 20a-c는 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109에 의한 EG의 GLA로의 생물변환을 나타낸 것이다: (a) EG로부터의 GLA의 생합성 경로. (b) 28.6 mM 및 (c) 67.6 mM에서 초기 EG에서 EG의 GLA로의 전체-세포 전환의 시간 과정. (b) 및 (c)의 경우, 40g/L 소르비톨, 10g/L 효모 추출물, 2.5g/L $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/L KH_2PO_4 및 2.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$을 함유하는 코니칼 튜브에서 30℃ 및 250rpm에서 OD_{600} = 30에서 전체-세포 전환을 수행한다. 데이터는 3반복 실험의 평균±표준편차로 제시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0016] 본 발명은 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 가수분해를 통해 테레프탈산 및 에틸렌 글리콜을 생산하는 단계; 및

[0017] 생체촉매 하에서 테레프탈산의 생물변환을 통해 프로토카테추산(protocatechuic acid)을 중간체로 하여 갈산, 피로갈롤, 카테콜, 뮤콘산 및 바닐산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 생산하거나,

[0018] 에틸렌 글리콜의 발효를 통해 글리콜산을 생산하는 단계를 포함하는 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법에 관한 것이다.

[0019] 본 발명의 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법은 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 화학적 가수분해를 통해 단량체인 테레프탈산 및 에틸렌 글리콜을 생산하고, PET 가수분해물인 TPA의 생물변환을 통해 GA, 피로갈롤, 카테콜, MA 및 VA과 같은 다양한 고부가가치의 방향족 또는 방향족 유래 화합물을 생산하고, 에틸렌 글리콜의 발효를 통해 글리콜산을 생산하는 것을 특징으로 한다.

[0020] PET의 화학적 가수분해는 170 내지 230 ℃에서 15 내지 50분 동안 마이크로파의 인가를 통해 수행될 수 있다. PET의 가수분해 산물은 여과를 통해 TPA 고형분 및 EG 함유 용액으로 분리하여 수득할 수 있다.

[0021] TPA의 생물변환은 프로토카테추산(protocatechuic acid, PCA)을 주요 중간체뿐만 아니라 첫 번째 산물로 선택한다. PCA는 GA, 피로갈롤, 카테콜, MA 및 VA과 같은 다양한 고부가가치의 방향족 또는 방향족 유래 화합물을 생성하기 위한 전구체 화합물일 수 있다.

[0022] TPA를 PCA로 전환할 수 있는 효율적인 생체촉매로, TPA 1,2-디옥시게네이즈 및 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트(DCD) 디히드로게네이즈를 사용하며, TPA 1,2-디옥시게네이즈는 TPA를 DCD로 전환하고, DCD 디히드로게네이즈는 DCD를 PCA로 전환한다 TPA 1,2-디옥시게네이즈 및 DCD 디히드로게네이즈는 코마노나스 에스피(*Comamonas sp.*) E6 유래일 수 있으며, 코딩 유전자 명칭은 각각 TphAabc 및 TphB이다. 상기 효소들은 NADH 및 NADPH를 보조인자로 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, PET 가수분해물인 TPA로부터 PCA를 얻기 위해 TphAabc 및 TphB를 발현하는 미생물을 생체촉매로 사용할 수 있다.

[0023] 다음으로, TPA의 GA로의 생물변환은 PCA의 메타 위치에서 히드록시화를 통해 GA로 전환시켜 구현될 수 있다. 상기 히드록시화는 p-히드록시벤조에이트 히드록실레이즈를 통해 수행될 수 있다. 상기 p-히드록시벤조에이트 히드록실레이즈는 슈도모나스 푸티다(*P. putida*) KT2440 유래일 수 있으며, 코딩 유전자 명칭은 PobA이다. 또한, GA 생산 수율을 높이기 위해 본 발명의 일 구체예에서는 PobA 돌연변이체, 즉, $PobA^{Mut}$(T294A/Y385F)를 구축하여 $PobA^{Mut}$를 발현하는 미생물을 생체촉매로 사용할 수 있다. 바람직하게는, TPA로부터 GA를 생성하기 위해 TphAabc, TphB 및 $PobA^{Mut}$를 발현하는 미생물, 또는 TphAabc 및 TphB를 발현하는 미생물과 $PobA^{Mut}$를 발현하는 미생물의 조합을 생체촉매로 사용할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에 따르면, TPA로부터 GA의 생산수율을 개선하기 위해, TphAabc, TphB 및 $PobA^{Mut}$를 발현하는 미생물(균주 GA-1)의 OD_{600} 값이 30일 때 TPA와 반응시키거나, TphAabc 및 TphB를 발현하는 미생물(균주 PCA-1)과 $PobA^{Mut}$를 발현하는 미생물(균주 HBH-2)의 OD_{600} 값이 각각 10 및 30일 때 TPA와 반응시켜 PCA 축적 없이 GA의 생산수율을 개선할 수 있다.

[0025] 다음으로, 갈산(GA)을 통한 TPA의 피로갈롤로의 생물변환은 PCA 히드록시화에 의해 합성된 GA의 탈카르복실화(제1경로) 및 PCA 탈카르복실화에 의해 합성될 수 있는 카테콜의 히드록시화(제2경로)를 통해 두 가지 경로에 의해 구현될 수 있다.

[0026] 제1경로의 경우, PCA 히드록시화에 의해 합성된 GA의 탈카르복실화를 위한 GA 디카르복실레이즈(코딩 유전자 명칭, LpdC)를 포함하여 TphAabc, TphB, $PobA^{Mut}$를 발현하는 미생물을 생체촉매로 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, TphAabc, TphB, $PobA^{Mut}$ 및 LpdC를 발현하는 미생물(균주 PG-1a)를 TPA와 반응시켜 피로갈롤을 생산할 수 있다.

[0027] 제2경로의 경우, PCA 디카르복실레이즈(코딩 유전자 명칭, AroY) 및 카테콜의 히드록시화를 위한 페놀 히드록실레이즈(코딩 유전자 명칭, PhKLMNOPQ)를 생체촉매로 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, TphAabc, TphB 및 AroY를 발현하는 미생물(균주 CTL-1) 및 PhKLMNOPQ를 발현하는 미생물(균주 CH-1)의 조합을 통해 이들의 OD_{600} 값이 각각 10 및 30일 때 TPA와 반응시켜 카테콜의 축적을 최소화하면서 피로갈롤을 생산할 수 있다.

[0028] 다음으로, TPA로부터 뮤콘산(MA)으로의 생물변환은 PCA를 통해 TPA로부터 합성된 카테콜의 고리 절단에 의해 MA로 전환될 수 있다. 카테콜의 고리 절단은 슈도모나스 푸티다(*P. putida*) KT2440에서 유래한 카테콜 1,2-디옥시게네이즈(코딩 유전자 명칭, CatA)를 이용하여 구현될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, TphAabc, TphB, AroY 및 CatA를 발현하는 미생물(균주 MA-1)을 TPA와 반응시켜 뮤콘산을 생산할 수 있다.

[0029] 다음으로, TPA의 바닐산(VA)으로의 생물변환은 PCA가 O-메틸트랜스퍼레이즈(OMT)에 의해 VA로 전환됨으로써 구현될 수 있다. OMT에 의해 촉매화된 O-메틸화 반응에서 ATP 및 메티오닌으로부터 아데노실 및 메틸기가 공급되므로, S-아데노실 메티오닌(SAM)이 공동-기질로 사용될 수 있다.

[0030] 상기 O-메틸트랜스퍼레이즈는 진핵생물에서 유래한 것을 사용할 수 있다. 예컨대, 인간의 HsOMT, 솔라넘 리코퍼시쿰(*Solanum lycopersicum*)의 SlOMT 및 메디카고 사티바(*Medicago sativa*)의 MsOMT 등을 사용할 수 있다. VA의 생산수율을 높이기 위해 바람직하게는 인간의 HsOMT가 좋다. 또한, HsOMT의 단백질 용해도를 높이기 위해 HsOMT의 N-말단에 헥사머 히스티딘을 갖도록 변형시킬 수 있다.

[0031] 또한, VA 생산수율을 개선하기 위해 TPA와 생체촉매의 반응 시 에어레이션을 증가시킬 수 있다. 에어레이션 증가는 글리세롤 및 메티오닌 소비 증가와 관련이 있다. 즉, 글리세롤이 효율적으로 대사되어 ATP를 생성하고, 따라서 S-아데노실기를 공급함으로써 메티오닌으로부터 SAM 합성을 가속화시키기 때문에 에어레이션은 PCA로부터 VA 생산을 증가시키는 데 중요하다.

[0032] 본 발명의 일 구체예에 따르면, PCA를 통해 TPA로부터 VA를 생산하기 위해, TphAabc 및 TphB를 발현하는 미생물(균주 PCA-1) 및 $HsOMT^{His}$를 발현하는 미생물(균주 $OMT\text{-}2^{His}$)의 OD_{600} 값을 각각 10 및 30일 때 ATP 생성을 증가시키기 위해 에어레이션을 증가시키면서 글리세롤 및 메티오닌 하에서 TPA와 반응시켜 바닐산의 생산수율을 개선할 수 있다.

[0033] 본 발명의 방법은 PET의 가수분해산물인 EG로부터 발효를 통해 글리콜산을 생산할 수 있다. 상기 발효는 EG 발효 미생물, 예컨대, 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109, 클로스트리디움 글리콜리쿰(*Clostridium glycolicum*), 또는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 등을 사용하여 수행할 수 있다.

[0034] 본 발명의 생물변환은 다양한 반응 버퍼 시스템에서 수행될 수 있다. 예컨대, 10 % (w/v) 글리세롤을 함유하는 TG-1 버퍼, 50 mM 트리스 버퍼 (pH 7.0); 2 % (w/v) 글리세롤을 함유하는 TG-2 버퍼, 50 mM 트리스 버퍼 (pH 7.0); TG-1/YP 버퍼, 10 % (w/v) 글리세롤, 10 g/L 효모 추출물 및 20 g/L 펩톤을 함유하는 50 mM 트리스 버퍼 (pH 7.0); TG-2/YP 버퍼, 2 % (w/v) 글리세롤, 10 g/L 효모 추출물 및 20 g/L 펩톤을 함유하는 50 mM Tris 버퍼 (pH 7.0); TG-1/YPM 버퍼, 2.5 mM L-메티오닌 (Sigma-Aldrich)이 보충된 TG-1/YP 버퍼; 및 2.5 mM L-메티오닌이 보충된 TG-2/YPM 버퍼, TG-2/YP 버퍼 등을 사용할 수 있다.

[0035] 본 명세서에서, 용어 "생체촉매"는 테레프탈산의 생물변환에 관여하는 효소를 지칭하는 것으로, 상기 효소를 발현하는 미생물과 혼용하여 사용된다. 상기 효소는 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 형태로 숙주세포에 도입되어 발현될 수 있다.

[0036] 상기 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 인 비보(*in vivo*) 또는 인 비트로(*in vitro*)에서 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물(construct)을 말한다. 본 명세서에 있어서, 용어 "플라스미드", "벡터" 또는 "발현 벡터"는 상호 교환적으로 사용된다.

[0037] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제

한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0038] 상기 "작동가능하게 연결된"은 적절한 핵산 분자가 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 것을 의미한다.

[0039] 본 명세서에서, 용어 "핵산 분자"는 cDNA, genomic DNA, 합성 DNA 또는 RNA, PNAS 또는 LNA 기원의 임의의 단일 또는 이중 나선 핵산 분자, 또는 이들의 혼합물을 의미한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터에 상술한 유전자를 삽입함으로써 제조될 수 있다. 상기 대장균 균주 발현용 벡터는 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.

[0041] 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주세포는 테레프탈산의 생물변환에 관여하는 효소를 발현할 수 있다. 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화칼슘($CaCl_2$) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0042] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.

[0043] 숙주세포로는 대장균(*Escherichiacoli*), 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus* subtilis), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵생물이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스퍼질러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichiapastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurosporacrassa*))등의 진핵생물이 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다.

[0044] 형질전환체의 (대량) 배양을 위해, 다양한 배양 방법이 적용될 수 있는데, 예컨대 재조합 미생물로부터 발현 또는 과발현된 유전자 산물의 대규모 제조는 회분(batch) 또는 연속 배양 방법에 의해 달성될 수 있다. 회분 및 유가식(fed-batch) 배양 방법은 통상적인 것으로서 당분야에 공지되어 있다. 연속 배양 공정을 위한 영양분 및 성장 인자의 조절 방법, 뿐만 아니라 생성물 형성율을 최대로 하기 위한 기법은 미생물 산업 분야에 공지되어 있다. 또한, 배양배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있으며, 당분야에 공지된 바에 따라 조성 구성할 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0046] <실시예 1> 폴리(에틸렌 테레프탈레이트) 단량체의 생물변환

[0047] (1) PET의 화학적 가수분해

[0048] 과립형 PET 칩(Sigma-Aldrich)을 화학적 가수분해 실험에 사용하였다. PET 가수분해 반응 혼합물은 13 mL의 탈이온수에 1 g의 과립 PET를 함유하고 마이크로웨이브 반응기(Monowave 300, Anton Paar, 오스트리아 Graz)에 넣었다. PET 가수분해는 170, 200 및 230 ℃ 및 15, 20, 25, 30, 40 및 50 분의 다양한 온도 및 지속 시간에서 마이크로웨이브 조사 하에서 수행되었다. PET의 가수분해로부터의 TPA 수율은 TPA 수율(이론적 최대 TPA의 % = 생성된 TPA (g)/소비된 PET(g) × 100에서 생성된 이론적 최대 TPA)로 계산되었다. PET로부터 생성될 이론적 최대 TPA 질량은 PET 질량에 PET의 TPA 수율 계수 0.864를 곱하여 계산하였다. PET의 높은 중합도로 인해, 가수분해에 의한 절단된 에스테르 결합의 총 수는 TPA 및 EG 단량체의 총 수와 동일한 것으로 가정하였다. 따라서, PET로부터의 TPA의 수율 계수는 TPA : EG : H_2O의 몰비로부터 1 : 1 : 2로 계산되었다. TPA 수율 계수는 166.13

/ (166.13 + 62.06 - 2 × 18.01) = 0.864이며, 여기서 166.13, 62.06 및 18.01은 각각 TPA, EG 및 H_2O의 MW이다.

[0049] (2) PET 가수분해물로부터 단량체의 분리

[0050] PET의 화학적 가수분해 후, 가수분해물 중의 TPA 고형분을 여과에 의해 EG를 함유하는 용액으로부터 분리하였다. 잔류물 중의 TPA 고형분을 1 M NaOH에 용해시키고 Na-TPA로 전환시켰다. Na-TPA 용액에 2M HCl을 첨가한 후, 형성된 TPA 고형분을 여과하고 진공 오븐에서 80 ℃에서 건조시켰다. EG를 포함하는 용액을 증발 농축하고 증류하여 정제된 EG를 얻었다. PET 가수분해물로부터 정제된 TPA 및 EG는 ^{1}H NMR 및 ^{13}C NMR을 갖는 핵자기공명 분광법(NMR; Bruker 400 MHz, Billerica, MA)에 의해 분석되고 진품 TPA(Alfa Aesar, Haverhill, MA) 및 EG(Junsei Chemical, 일본 도쿄) 표준물질과 비교되었다.

[0051] (3) 박테리아 균주 및 플라스미드

[0052] 대장균(*E. coli*) DH5α를 플라스미드 구축 및 유지를 위한 숙주 균주로 사용하였다. 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)을 O-메틸 트랜스퍼레이즈(OMT) 효소 스크리닝을 위한 숙주 균주로 사용하였다. 대장균 XL1-Blue(Stratagene, San Diego, CA) 및 대장균(*E. coli*) MG1655(DE3)를 전체-세포 전환을 위한 숙주 균주로 사용하였다. 재조합 대장균(*E. coli*) 균주는 10 g/L 트립톤, 5 g/L NaCl 및 5 g/L 효모 추출물을 함유한 LB 또는 LB 한천 플레이트(2.0 % w/v)에서 성장시켰다. 적절한 항생제(50 μg/mL 암피실린, 40 μg/mL 카나마이신 또는 34 μg/mL 클로람페니콜)를 준비하여 배지에 보충하였다. 플라스미드 pKM212, pKE112 및 pKA312는 전술한 바와 같이 구성되었다. 본 실험에 사용된 모든 플라스미드 및 박테리아 균주는 표 1에 열거되어있다. 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydan*) KCCM 40109(서울, 한국미생물센터)는 EG에서 GLA로의 생물변환을 위한 전체-세포 바이오 촉매로 사용되었다.

[0053] (4) 플라스미드 구축

[0054] 표준 절차에 따라 DNA 클로닝을 수행하였다. pobA 및 catA 유전자를 제외한 모든 유전자를 IDT 또는 GeneArt에 의해 합성하였고, 이는 PCR에 의해 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT2440으로부터 추출되었다. C1000 써모 사이클러(Bio-Rad, 캘리포니아 주 허큘리스)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 제한효소 부위를 변경하는 데 사용되는 프라이머 및 유전자는 표 2 및 표 3에 각각 나열하였다.

[0055] 플라스미드 pKE112TphAabc 및 pKM212TphB(PCA 합성 모듈)의 구축을 위해, 플라스미드 pKE112 및 pKM212를 각각 제한효소 KpnI/HindIII 및 EcorI/KpnI를 사용하여 소화시켰다. 상응하는 TphAabc 및 TphB 유전자를 각각 KpnI/HindIII 및 EcorI/KpnI를 사용하여 분해하고 플라스미드 pKE112 및 pKM212에 라이게이션시켰다.

[0056] 유전자 S1OOMT, HsOMT, MsOMT 및 $HsOMT^{His}$의 발현을 위한 pET28a-기반 플라스미드의 구축을 위해, pET28a를 NdeI/XhoI로 분해하고, 이에 상응하는 유전자를 라이게이션시켰다. KpnI/BamHI를 사용하여 HsOMT 및 $HsOMT^{His}$를 플라스미드 pKE112TphB로 연결함으로써 TPA를 PCA로 직접 전환시키는 데 사용된 플라스미드를 구축하였다. PobA 및 $PobA^{Mut}$의 PCA 히드록시화 능력을 조사하기 위해, 이들 유전자를 각각 플라스미드 pET28aPobA 및 pET28a$PobA^{Mut}$의 구축을 위해 NdeI/XhoI를 사용하여 플라스미드 pET28a에 라이게이션시켰다. TPA를 GA로 직접 전환시키기 위해, SbfI/HindIII를 사용하여 플라스미드 pKE112TphB 로의 $pobA^{Mut}$의 라이게이션을 수행하였다. TPA를 PG로 직접 전환시키기 위해, lpdC 유전자를 BamHI/SbfI를 사용하여 플라스미드 pKE112TphBPobA^{Mut}에 도입하였다. 카테콜 히드록시화 모듈, pKA312PhKLMNOPQ의 구축을 위해, phKLMNOPQ 유전자 단편을 각각 EcorI/KpnI, KpnI/BamHI, BamHI/SbfI 및 SbfI/HindII를 사용하여 플라스미드 pKA312, pKA312PhKLM, pKA312PhKLMNOP 및 pKA312PhKLMNOPQ에 라이게이션되었다.

[0057] 카테콜 합성을 위한 플라스미드는 KpnI/BamHI를 사용하여 pKE112TphB 내로 AroY의 연결에 의해 구축되었다. 효소 LpdC 및 AroY의 바람직한 기질의 평가와 관련된 실험을 위해, 상응하는 플라스미드 pET28aLpdC 및 pET28aAroY는 NdeI/XhoI 부위를 사용하여 pET28a에 상응하는 효소를 라이게이션함으로써 생성되었다. MA 합성을 위한 플라스미드 구축을 위해, catA를 KpnI/BamHI 부위를 사용하여 플라스미드 pKE112 및 pKE112TphBAroY에 도입하였다.

[0058] (5) 전체-세포 생물변환

[0059] 조작된 대장균(*E. coli*) 균주를 사용한 전체-세포 전환을 다음과 같이 수행하였다. 씨드 배양물을 적절한 항생제를 사용하여 5 mL LB 배지에서 밤새 제조하였다. 이어서, 씨드 배양물을 사용하여 2.8L 플라스크에 1 L LB 배지를 접종하고 37 ℃ 및 220 rpm에서 인큐베이션하였다. 세포 밀도가 600 nm에서 0.4의 광학밀도에 도달하면(OD_{600}), 0.1 mM 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 배양물에 첨가하였다. 이어서, 인큐베이션 온도를 16시간 동안 16 ℃로 조정하여 도입 된 유전자의 가용성 발현을 촉진시켰다. 조작된 대장균(*E. coli*) 균주를 10 ℃에서 5분 동안 4300 × g에서 원심분리하여 수확하였다. 수확된 세포를 세척하고 2 %(w/v) 글리세롤을 함유하는 50 mM Tris 버퍼(pH 7.0)으로 재현탁시켰다.

[0060] 전체-세포 전환을 위해, 미생물 세포 펠릿을 적절한 농도의 기질과 함께 4 mL 또는 20 mL의 반응 버퍼에 재현탁시키고 250 rpm 및 30 ℃에서 배양하였다. 본 실험에서 생물변환에 사용된 반응 버퍼의 조성은 다음과 같다: 10 % (w/v) 글리세롤을 함유하는 TG-1 버퍼, 50 mM 트리스 버퍼 (pH 7.0); 2 % (w/v) 글리세롤을 함유하는 TG-2 버퍼, 50 mM 트리스 버퍼 (pH 7.0); TG-1/YP 버퍼, 10 % (w/v) 글리세롤, 10 g/L 효모 추출물 및 20 g/L 펩톤을 함유하는 50 mM 트리스 버퍼(pH 7.0); TG-2/YP 버퍼, 2 % (w/v) 글리세롤, 10 g/L 효모 추출물 및 20 g/L 펩톤을 함유하는 50 mM Tris 버퍼 (pH 7.0); TG-1/YPM 버퍼, 2.5 mM L-메티오닌 (Sigma-Aldrich)이 보충된 TG-1/YP 버퍼; 및 2.5 mM L-메티오닌이 보충된 TG-2/YPM 버퍼, TG-2/YP 버퍼. 달리 나타내지 않는 한 모든 실험을 3반복 수행하였다. VA-2a 시스템을 사용한 전체-세포 전환은 2반복으로 수행되었다. TPA, PCA, GA, 피로갈롤, 카테콜, MA 및 VA 표준물질은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

[0061] 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109에 의한 전체-세포 생물변환은 다음과 같이 수행되었다. 밤새 씨드 배양을 50 mL 코니칼 튜브에서 5 mL의 배지에서 제조하였다. 배지는 80 g/L 소르비톨, 20 g/L 효모 추출물, 5 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 2 g/L KH_2PO_4 및 5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$를 함유하였다. 씨드 배양물을 사용하여 2.8 L 플라스크에 1 L 배지를 접종하고 30 ℃ 및 220 rpm에서 배양하였다. 세포를 10 ℃에서 6500 × g에서 8분 동안 원심분리하여 수집하고 세척하고 포스페이트 버퍼(pH 7.0)에 재현탁시켰다. 전체-세포 생물변환 혼합물은 적절한 농도의 전체-세포 촉매를 4 mL 또는 20 mL 버퍼에 재현탁시켜 제조하고 30 ℃ 및 250 rpm에서 12시간 동안 배양하였다. 생물변환 버퍼는 40 g/L 소르비톨, 10 g/L 효모 추출물, 2.5 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/L KH_2PO_4 및 2.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$로 구성되었다. 생물변환 버퍼에는 상이한 농도로 11.3, 28.6 및 67.6 mM의 EG가 보충되었다.

[0062] (6) SDS-PAGE 분석

[0063] 대장균(*E. coli*) BL21 (DE3) 세포에서 진핵생물 OMT 효소 S1OMT, HsOMT 및 MsOMT의 발현을 SDS-PAGE를 사용하여 확인하였다. 각각의 플라스미드를 보유하는 재조합 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 세포를 37 ℃ 및 220rpm에서 500mL 플라스크에서 100mL LB 배지에서 배양하였다. 0.4의 OD_{600}에 도달했을 때 배양 물에 0.1 mM IPTG를 보충하고 16 ℃ 및 180 rpm에서 16시간 동안 배양하였다. 세포 펠렛을 4 ℃에서 6,500 × g, 10분 동안 원심분리하여 수집하고, 16 ㎕의 100 mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 7.0)로 세척하였다.

[0064] 분취액을 세포 현탁액으로부터 제조하고 SDS-PAGE에 대한 총 단백질 샘플로서 사용하였다. 재조합 대장균(*E. coli*)의 세포 용해물을 초음파 처리(Branson 450, Marshall Scientific, Hampton, NH)로 수득하였다. 불용성 및 가용성 단백질을 각각 함유하는 고체 및 액체 분획을 4 ℃에서 16,000 × g에서 20분 동안 원심분리하여 분리하였다. 분리된 고체 분획을 16 mL의 100 mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 7.0)에 재현탁시켰다. 분취된 세포 현탁액과 액체 및 고체 분획을 5×SDS 버퍼(Biosesang, Seongnam, Korea)과 혼합하고 100 ℃에서 10분 동안 끓였다. 단백질 샘플을 예비-염색된 SDS 표준 마커(Bio-Rad)로 12 %(w/v) SDS-PAGE로 분리하였다.

[0065] (7) 분석 방법

[0066] OD_{600}은 분광 광도계(xMarkTM, Bio-Rad)를 사용하여 측정되었다. TPA 및 TPA로부터 전환된 산물을 1.0 mL/분의 유속으로 칼럼 온도를 30 ℃에서 유지하면서 OptimaPak C18 컬럼(RS tech, Daejeon, Korea)이 장착된 HPLC(Agilent 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 사용하여 분석하였다.

[0067] 이동상은 탈이온수에서 0.1 %(v/v) 트리플루오로아세트산(Sigma-Aldrich) 중 10 %(v/v) 아세토니트릴로 구성되었다. 주입량은 5 ㎕이었고 254 nm에서 UV 검출을 수행하였다. EG, GLA 및 글리세롤의 농도는 65 ℃에서 굴절률(RI) 검출기 및 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad)이 장착된 HPLC(Agilent 1100)에 의해 0.5 mL/분의 유속에서 이동상 0.01 N H_2SO_4로 측정되었다.

[0068] GC/MS 분석을 사용하여 TPA의 PCA, GA, 피로갈롤, 카테콜, MA 및 VA로의 전환 및 EG의 GLA로의 전환을 확인하고

L-메티오닌을 정량화하였다. GC/MS 분석은 추가 10 m 통합 가드 컬럼이 있는 RTX-5Sil MS 모세관 컬럼(30 m × 0.25 mm, 0.25 ㎛ 필름 두께; Restek, Bellefonte, PA)이 장착된 Agilent 7890A GC/5975C MSD(Agilent Technologies)를 사용하여 수행하였다. 1 ㎕의 샘플을 250 ℃의 입구 온도로 스플릿리스 모드로 주입하였다. 초기 오븐 온도를 1분 동안 50 ℃에서 유지한 다음 20 ℃/분의 속도로 320 ℃로 증가시키고 25분 동안 유지시켰다. 캐리어 가스로서 헬륨을 1mL/분의 유속으로 사용하였고, 질량 스펙트럼은 50 내지 700m/z로 스캐닝하여 기록하였다. 이송 라인 및 이온 소스의 온도는 각각 280 및 230 ℃로 설정되었다.

[0069] (8) 컴퓨터 도킹 시뮬레이션

[0070] 슈도모나스 푸티다(*P. putida*) KT2440에서 유래한 단백질 구조 PobA의 컴퓨터 모델링을 Discovery Studio 소프트웨어(BIOVIA, San Diego, CA)를 사용하여 수행하였다. PobA의 FAD-결합 구조(PDB 코드 6DLL)는 컴퓨터 도킹 시뮬레이션에 사용되었다. 야생형 PobA 구조는 활성 부위에 4-HBA를 갖지 않아 야생형 PobA의 결정 구조는 4-HBA 및 FAD의 복잡한 형태를 나타내지 않을 수 있음을 나타낸다. 도킹 시뮬레이션을 위해, 슈도모나스 푸티다(*P. putida*) KT2440 PobA의 활성 부위에서 FAD의 결합 형태는 4-HBA 및 FAD(PDB 코드 1PBE 및 1BGN)와 복합된 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescence*) PobA의 활성 부위와 비교하여 MODELER를 사용하여 모델링되었다. $PobA^{Mut}$(T294A/Y385F)의 구조는 MODELER에 의해 구성되었다. 기질 PCA의 가요성 도킹은 AutodockFR, 3을 사용하여 수행되었고 9개의 잔기(Y386, Y201, T294, L210, S212, R220, W185, Y222 및 I43)를 가요성 잔기로 선택하였다. 모든 파라미터는 도킹 시뮬레이션에 대한 기본값으로 설정되었고, 결과 결합 모드는 PyMOL 소프트웨어(PyMOL Molecular Graphics System, ver. 1.4.1; Schrodinger, New York, NY)를 사용하여 분석되었다.

표 1

[0071] 본 발명에 사용된 균주, 전략 및 플라스미드

균주, 전략 또는 플라스미드	관련 특성	참조
균주		
E. coli XL1-Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [FA1*proAB lacI*^{q}*ZΔM15* Tn*10* (Tet^{R})]	Stratagene
E. coli MG1655(DE3)	K-12 F^{-} λ^{-} *ilvG*$^{-}$ *rfb-50 rph*$^{-1}$ (DE3)	한국생명공학연구원
G. oxydans KCCM 40109	에틸렌 글리콜로부터 글리콜산 생산	KCCM
PCA 합성을 위한 재조합 균주		
PCA-1 (TPA→PCA)	pKM212TphAabc 및 pKE112TphB 함유 *E. coli* XL1-Blue	본 발명
GA 합성을 위한 재조합 균주		
HBH-1 (PCA→GA)	pET28aPobA 함유 *E. coli* MG1655(DE3)	본 발명
HBH-29 (PCA→GA)	pET28a$PobA^{Mut}$ 함유 *E. coli* MG1655(DE3)	본 발명
GA-1 (TPA→GA)	pKM212TphAabc 및 pKE112TphB$PobA^{Mut}$ 함유 *E. coli* XL1-Blue	본 발명
피로갈롤 합성을 위한 재조합 균주		
GDC-1 (GA→피로갈롤)	pET28aLpdC 함유 *E. coli* MG1655(DE3)	본 발명
CH-1 (카테콜→ 피로갈롤)	pKA312PhKLMNOPQ 함유 *E. coli* MG1655(DE3)	본 발명
PDC-CH-1 (PCA→피로갈롤)	pET28aAroY 및 pKA312PhKLMNOPQ 함유 *E. coli* MG1655(DE3)	본 발명
PG-1(TPA→ 피로갈롤)	pKM212TphAabc 및 pKE112TphBLpdCPobA^{Mut} 함유 *E. coli* XL1-Blue	본 발명
PG-2 (TPA→ 피로갈롤)	pKM212TphAabc, pKE112TphBLpdCPobA^{Mut} 및 pKA312PhKLMNOPQ 함유 *E. coli* XL1-Blue	본 발명
카테콜 합성을 위한 재조합 균주		
PDC-1 (PCA→카테콜)	pET28aAroY 함유 *E. coli* MG1655(DE3)	본 발명
CTL-1 (TPA→ 카테콜)	pKM212TphAabc 및 pKE112TphBaroY 함유 *E. coli* XL1-Blue	본 발명
뮤콘산 합성을 위한 재조합 균주		
CDO-1 (카테콜→MA)	pKE112CatA 함유 *E. coli* XL1-Blue	본 발명
MA-1 (TPA→MA)	pKM212TphAabc 및 pKE112TphBAroYCatA 함유 *E. coli* XL1-Blue	본 발명

바닐산 합성을 위한 재조합 균주		
OMT-1a (PCA→VA)	pET28a*Hs*OMT 함유 *E. coli* BL21(DE3)	본 발명
OMT-1b (PCA→VA)	pET28a*Sl*OMT 함유 *E. coli* BL21(DE3)	본 발명
OMT-2 (PCA→VA)	pET28a*Hs*OMT 함유 *E. coli* MG1655(DE3)	본 발명
OMT-2^{His} (PCA→VA)	pET28a*Hs*OMT^{His} 함유 *E. coli* MG1655(DE3)	본 발명
VA-1 (TPA→VA)	pKM212TphAabc 및 pKE112TphB*Hs*OMT 함유 *E. coli* XL1-Blue	본 발명
전체-세포 전환 시스템		
GA-1 시스템	증가된 에어레이션 하에서 단일 촉매인 균주 GA-1(균주 GA-1의 OD_{600} = 30)	본 발명
GA-2a 시스템	증가된 에어레이션 하에서 균주 PCA-1 및 HBH-2의 동시 첨가(균주 PCA-1의 OD_{600} = 20, 균주 HBH-2의 OD_{600} = 20)	본 발명
GA-2b 시스템	증가된 에어레이션 하에서 균주 PCA-1 및 HBH-2의 동시 첨가(균주 PCA-1의 OD_{600} =10, 균주 HBH-2의 OD_{600} = 30)	본 발명
PG-1a 시스템	증가된 에어레이션 하에서 단일 촉매인 균주 PG-1a(균주 PG-1a의 OD_{600} = 30)	본 발명
PG-1b 시스템	증가된 에어레이션 하에서 단일 촉매인 균주 PG-1b(균주 PG-1b의 OD_{600} = 30)	본 발명
PG-2a 시스템	증가된 에어레이션 하에서 균주 PCA-1 및 PDC-CH-1의 동시 첨가(균주 PCA-1의 OD_{600} = 10, 균주 PDC-CH-1의 OD_{600} = 30)	본 발명
PG-2b 시스템	증가된 에어레이션 하에서 균주 CTL-1 및 CH-1의 동시 첨가(균주 CTL-1의 OD_{600} = 10, 균주 CH-1의 OD_{600} = 30)	본 발명
MA-1 시스템	단일 촉매인 균주 MA-1(균주 MA-1의 OD_{600} = 30)	본 발명
VA-1 시스템	단일 촉매인 균주 VA-1(균주 VA-1의 OD_{600} = 30)	본 발명
VA-2a 시스템	균주 PCA-1 및 OMT-2^{His}의 동시 첨가(균주 PCA-1의 OD_{600} = 10, 균주 OMT-2^{His}의 OD_{600} = 30)	본 발명
VA-2b 시스템	증가된 에어레이션 하에서 균주 PCA-1 및 OMT-2^{His}의 동시 첨가(균주 PCA-1의 OD_{600} = 10, 균주 OMT-2^{His}의 OD_{600} = 30)	본 발명
VA-2c 시스템	증가된 에어레이션 하에서 균주 PCA-1 및 OMT-2^{His}의 동시 첨가(균주 PCA-1의 OD_{600} = 20, 균주 OMT-2^{His}의 OD_{600} = 20)	본 발명
플라스미드		
pKM212TphAabc	pKM212; P_{tac} 프로모터, *Comamonas* sp. strain E6 *tphAIIabc* 유전자, Km^R	본 발명
pKE112TphB	pKE112; P_{tac} 프로모터, *Comamonas* sp. strain E6 *tphB* 유전자, Amp^R	본 발명
pET28a*Hs*OMT	pET28a; T7 프로모터, *H. sapiens OMT* 유전자, Km^R	본 발명
pET28a*Sl*OMT	pET28a; T7 프로모터, *S. lycopersicum OMT* 유전자, Km^R	본 발명
pET28a*Ms*OMT	pET28a; T7 프로모터, *M. sativa OMT* 유전자, Km^R	본 발명
pET28a*Hs*OMT^{His}	pET28a; T7 프로모터, *H. sapiens* OMT^{His} 유전자, Km^R	본 발명

pKE112TphB*Hs*OMT	pKE112; P_{tac} 프로모터, *H. sapiens*의 *OMT* 유전자가 pKE112TphB에 삽입됨, Amp^R	본 발명
pKE112TphBPobA^{Mut}	pKE112; P_{tac} 프로모터, *P. putida* KT2440의 *pobA*^{Mut} 유전자가 pKE112TphB에 삽입됨, Amp^R	본 발명
pET28aPobA	pET28a; T7 프로모터, *P. putida* KT2440 *pobA* 유전자, Km^R	본 발명
pET28aPobA^{Mut}	pET28a; T7 프로모터, *P. putida* KT2440 *pobA*^{Mut} 유전자, Km^R	본 발명
pET28aAroY	pET28a; T7 프로모터, *E. cloacae aroY* 유전자, Km^R	본 발명
pET28aLpdC	pET28a; T7 프로모터, *L. plantarum lpdC* 유전자, Km^R	본 발명
pKE112TphBaroY	pKE112; P_{tac} 프로모터, *E. cloacae*의 *aroY* 유전자가 pKE112TphB에 삽입됨, Amp^R	본 발명
pKE112TphBAroYCatA	pKE112; P_{tac} 프로모터, *P. putida* KT2440의 *catA* 유전자가 pKE112TphBAroY에 삽입됨, Amp^R	본 발명
pKE112TphBPobA^{Mut}LpdC	pKE112; P_{tac} 프로모터, *L. plantarum*의 *lpdC* 유전자가 pKE112TphBPobA^{Mut}에 삽입됨, Amp^R	본 발명
pKA312PhKLMNOPQ	pKE112; P_{tac} 프로모터, *P. stutzeri* OX1의 *PhKLMNOPQ* 유전자, Cm^R	본 발명
pKE112CatA	pKE112; P_{tac} 프로모터, *P. putida* KT2440의 catA 유전자, Amp^R	본 발명

표 2

[0072] 본 발명에 사용된 프라이머

프라이머 명칭	서열(5'-3')	서열번호	유전자의 유래
pKM212-TphAabc-F/R	IDT에서 유전자 합성		*Comamonas* sp. strain E6
pKE112-TphB-F/R	IDT에서 유전자 합성		*Comamonas* sp. strain E6
pET28a-*Hs*OMT	IDT에서 유전자 합성		*H. sapiens*
pET28a-*Sl*OMT	IDT에서 유전자 합성		*S. lycopersicum*
pET28a-*Ms*OMT	IDT에서 유전자 합성		*M. sativa*
pKE112-*Hs*OMT-F	*GGTACC*TTTCACACAGGAAACAGACCATGGGCGATACCAAAGAACAG	20	pET28a-*Hs*OMT
pKE112-*Hs*OMT-R	*GGATCC* TTAAGTTACGGACCTGCTTCG	21	
pKE112-*Hs*OMT^{His}-F	*GGTACC* TTTCACACAGGAAACAGACCATGCATCACCATCACCATCATGGCGATACCAAAGAACAGCG	22	pET28a-*Hs*OMT
pKE112-*Hs*OMT^{His}-R	*Hs*OMT-R와 동일 (*GGATCC* TTAAGTTACGGACCTGCTTCG)	23	
pET28a-*Hs*OMT^{His}-F	CATATG CATCACCATCACCATCATGGCGATACCAAAGAACAGCG	24	pET28a-*Hs*OMT
pET28a-*Hs*OMT^{His}-R	CTCGAG TTAAGTTACGGACCTGCTTCG	25	

pET28a-PobA-F	CATATG AAAACTCAGGTTGCAATTATTG	26	*P. putida* KT2440
pET28a-PobA-R	CTCGAG TCAGGCAACTTCCTCGAACG	27	
pKE112-PobA-F	CCTGCAGG TTTCACACAGGAAACAGACC ATGAAAACTCAGGTTGCAATTATTG	28	*P. putida* KT2440
pKE112-PobA-R	AAGCTT TCAGGCAACTTCCTCGAACG	29	
pKE112-PobA^{Mut}-F/R	IDT에서 유전자 합성		Mutant of *P. putida* KT2440 *pobA* gene
pET28a-PobA^{Mut}-F	pET28a-PobA-F와 동일	26	pKE112-PobA^{Mut}-F/R
pET28a-PobA^{Mut}-R	pET28a-PobA-R과 동일	27	
pKE112-LpdC-F/R	Gene Art에서 유전자 합성		*P. putida* KT2440
pET28a-LpdC-F	CATATG GCAGAACAACCATGGGATT	30	pKE112-LpdC-F/R
pET28a-LpdC-R	CTCGAG TTACTTCAAATACTTCTCCCAGTC	31	
pKE112-AroY-F/R	Gene Art에서 유전자 합성		*L. plantarum* WCFS1
pET28a-AroY-F	CATATG CAGAACCCGATCAACGAC	32	pKE112-AroY-F/R
pET28a-AroY-R	CTCGAG TTACTTCTTGTCGCTGAACAGC	33	
pKA312-PhKLMOPQ-F/R	Gene Art에서 유전자 합성		*P. stutzeri* OX1
pKE112-CatA-F	GGTACCTTTCACACAGGAAACAGACC ATGACCGTGAAAATTTCCCACAC	34	*P. putida* KT2440
pKE112-CatA-R	GGATCC TCAGCCCTCCTGCAACGC	35	

표 3

[0073] 본 발명에 사용된 유전자의 핵산 서열

유전자	UniProtKB 등록번호	서열(5'-3')	서열번호
tphAa	Q3C1D2	ATGAACCACCAGATCCATATCCACGACTCCGATATCGCGTTCCCCTGCGCGCCCGGG CAATCCGTACTGGATGCAGCTCTGCAGGCCGGCATCGAGCTGCCCTATTCCTGCCGC AAAGGTAGCTGTGGCAACTGTGCGAGTACGCTGCTCGACGGAAATATTGCCTCCTTC AATGGCATGGCCGTGCGAAACGAACTCTGCGCCTCGGAACAAGTGCTGCTGTGCGGC TGCACTGCAGCCAGCGATATACGTATCCACCCGAGCTCCTTTCGCCGTCTCGACCCG GAAGCCCGAAAACGTTTTACGGCCAAGGTGTACAGCAATACACTGGCGGCACCCGAT GTCTCGCTGCTGCGCCTGCGCCTGCCTGTGGGCAAGCGCGCCAAATTTGAAGCCGGC CAATACCTGCTGATTCACCTCGACGACGGGGAAAGCCGCAGCTACTCTATGGCCAAT CCACCCCATGAGAGCGATGGCATCACATTGCATGTCAGGCATGTACCTGGTGGTCGC TTCAGCACTATCGTTCAGCAGTTGAAGTCTGGTGACACATTGGATATCGAACTGCCA TTCGGCAGCATCGCACTGAAGCCTGATGACGCAAGGCCCCTGATTTGCGTTGCGGGT GGCACGGGATTTGCGCCCATTAAATCCGTTCTTGATGACTTAGCCAAACGCAAGGTT CAGCGCGACATCACGCTGATCTGGGGGGCTCGCAACCCCTCGGGCCTGTATCTTCCT AGCGCCATCGACAAGTGGCGCAAAGTCTGGCCACAGTTTCGCTACATTGCAGCCATC ACCGACCTAGGCGATATGCCTGCGGATGCTCACGCAGGTCGGGTGGATGACGCGCTA CGCACTCACTTTGGCAACCTGCACGATCATGTGGTGCACTGCTGTGGCTCACCAGCT CTGGTTCAATCAGTGCGCACAGCCGCTTCCGATATGGGCCTGCTTGCACAGGACTTC CACGCGGATGTTTTTGCGACAGGCCCGACTGGTCACCACTAG	1

tphAb	Q3C1D5	ATGCAAGAATCCATCATCCAGTGGCATGGGGCCACTAATACGCGCGTGCCTTTTGGT ATCTATACCGACACAGCCAATGCTGATCAGGAACAGCAGCGCATCTATCGCGGCGAG GTCTGGAACTACTTGTGCCTGGAATCTGAAATTCCCGGGGCCGGTGATTTCCGCACT ACCTTTGCCGGTGAAACACCGATAGTTGTCGTACGGGATGCCGACCAGGAAATCTAC GCCTTCGAGAACCGCTGCGCGCATCGCGGCGCTCTCATCGCTCTGGAGAAATCGGGC CGTACGGATAGTTTCCAGTGCGTCTATCACGCCTGGAGCTACAACCGACAGGGAGAT CTGACCGGCGTTGCCTTCGAGAAAGGTGTCAAGGGCCAGGGTGGCATGCCGGCCTCA TTCTGCAAAGAAGAGCATGGCCCGCGCAAGCTCCGCGTGGCTGTCTTTTGCGGTTTG GTCTTTGGCAGTTTTTCCGAGGACGTGCCCAGCATTGAGGATTACCTTGGCCCTGAG ATTTGCGAGCGCATAGAGCGCGTGCTGCACAAGCCCGTAGAAGTCATCGGTCGCTTC ACGCAAAAGCTGCCTAACAACTGGAAGCTCTACTTCGAGAACGTGAAGGACAGCTAT CACGCCAGCCTCCTGCATATGTTCTTCACCACCTTCGAGCTGAATCGCCTCTCACAA AAAGGCGGTGTCATCGTCGACGAGTCGGGTGGCCACCATGTGAGCTATTCCATGATC GATCGCGGCGCCAAAGACGACTCGTACAAGGACCAGGCCATCCGCTCCGACAACGAG CGTTACCGGCTCAAAGATCCTAGCCTTCTAGAGGGCTTTGAGGAGTTCGAGGACGGC GTGACCCTGCAGATCCTTTCTGTGTTCCCTGGCTTTGTGCTGCAGCAGATTCAGAAC AGCATCGCCGTGCGTCAGTTGCTGCCCAAGAGCATCTCCAGCTCGGAACTCAACTGG ACCTATCTTGGCTATGCAGATGACAGTGCCGAGCAACGCAAGGTCAGACTCAAACAG GCCAACCTTATCGGCCCGGCCGGATTCATTTCCATGGAAGACGGAGCTGTCGGTGGA TTCGTGCAGCGTGGCATCGCAGGCGCTGCCAACCTTGATGCAGTCATCGAGATGGGC GGAGACCACGAAGGCTCTAGCGAGGGCCGCGCCACGGAAACCTCGGTACGCGGCTTT TGGAAGGCCTACCGCAAGCATATGGGACAGGAGATGCAAGCATGA	2
tphAc	Q3C1D4	ATGATCAATGAAATTCAAATCGCGGCCTTCAATGCCGCCTACGCGAAGACCATAGAC AGTGATGCAATGGAGCAATGGCCAACCTTTTTCACCAAGGATTGCCACTATTGCGTC ACCAATGTCGACAACCATGATGAGGGACTTGCTGCCGGCATTGTCTGGGCGGATTCG CAGGACATGCTCACCGACCGAATTTCTGCGCTGCGCGAAGCCAATATCTACGAGCGC CACCGCTATCGCCATATCCTGGGTCTGCCTTCGATCCAGTCAGGCGATGCAACACAG GCCAGCGCTTCCACTCCGTTCATGGTGCTGCGCATCATGCATACAGGGGAAACAGAG GTCTTTGCCAGCGGTGAGTACCTCGACAAATTCACCACGATCGATGGCAAGTTACGT CTGCAAGAACGCATCGCGGTTTGCGACAGCACGGTGACGGACACGCTGATGGCATTG CCGCTATGA	3
tphB	Q3C1D3	ATGACAATAGTGCACCGTAGATTGGCTTTGGCCATCGGCGATCCCCACGGTATTGGC CCAGAAATCGCACTGAAAGCTCTCCAGCAGCTGTCTGTCACCGAAAGGTCTCTTATC AAGGTCTATGGACCTTGGAGCGCTCTCGAGCAAGCCGCACGGGTTTGCGAAATGGAG CCGCTTCTTCAAGACATCGTTCACGAGGAAGCCGGCACACTTACACAACCAGTTCAA TGGGGAGAAATCACCCCGCAGGCTGGTCTATCTACGGTGCAATCCGCAACAGCGGCT ATCCGAGCGTGCGAAAACGGCGAAGTCGATGCCGTCATTGCCTGCCCTCACCATGAA ACGGCCATTCACCGCGCAGGCATAGCGTTCAGCGGCTACCCATCTTTGCTCGCCAAT GTTCTTGGCATGAACGAAGACCAGGTATTCCTGATGCTGGTGGGGGCTGGCCTGCGC ATAGTGCATGTCACTTTGCATGAAAGCGTGCGCAGCGCATTGGAGCGGCTCTCTCCT CAGTTGGTGGTCAACGCGGCGCAGGCTGCCGTGCAGACATGCACCTTACTCGGAGTG CCTAAACCAAAAGTCGCTGTATTCGGGATCAACCCTCATGCATCTGAAGGACAGTTG TTCGGCCTGGAGGACTCCCAGATCACCGTTCCCGCTGTCGAGACACTGCGCAAGCGC GGCCTAGCAGTAGACGGCCCCATGGGAGCTGACATGGTTCTGGCACAGCGCAAGCAC GACCTGTATGTAGCCATGCTGCACGATCAGGGCCATATCCCCATCAAGCTGCTGGCA CCTAACGGAGCCAGCGCACTATCTATCGGTGGCAGGGTGGTGCTTTCCAGCGTGGGC CATGGCAGCGCCATGGACATTGCCGGCCGTGGCGTGGCTGACGCCACGGCCCTCCTA CGCACAATAGCCCTACTCGGAGCCCAACCGGTCTGA	4
S1OMT	K4CX40	ATGGGATCGACAGCAAATATCCAGTTAGCAACACAATCGGAAGACGAAGAGCGTAAT TGCACGTACGCCATGCAACTACTCTCATCGTCAGTGCTTCCCTTCGTTTTGCACTCA ACTATCCAATTGGATGTTTTTGACATACTCGCAAAAGATAAAGCCGCCACTAAACTA TCTGCTTTAGAAATTGTGTCTCACATGCCTAACTGTAAGAACCCTGATGCCGCTACC ATGCTAGACCGGATGCTTTATGTCCTAGCTAGTTATTCTTTACTCGATTGCTCGGTT GTTGAAGAGGGAAATGGGGTGACCGAAAGGCGCTATGGTCTGTCACGAGTGGGGAAA TTTTTTGTACGTGATGAAGATGGTGCATCCATGGGACCATTGTTGGCTTTGCTTCAA GATAAAGTATTCATTAACAGCTGGTTTGAACTAAAAGATGCAGTACTTGAAGGTGGA GTTCCATTTGACAGGGTGCATGGTGTACATGCATTTGAATATCCAAAATTGGACCCA AAGTTCAATGATGTTTTCAACCAGGCAATGATAAACCACACAACTGTTGTCATGAAA AGAATACTTGAAAATTACAAAGGTTTTGAGAATCTCAAAACTTTGGTTGATGTTGGA GGTGGTCTTGGTGTTAATCTCAAGATGATTACATCTAAATACCCCACAATTAAGGGC ACTAATTTTGATTTGCCTCATGTTGTTCAACATGCACCTTCCTATCCTGGGGTGGAT CATGTTGGGGGAGATATGTTTGAAAGTGTTCCACAAGGAGATGCTATTTTTATGAAG TGGATTCTTCATGACTGGAGTGATGGTCACTGCCTCAAATTGCTGAAGAACTGTCAT AAGGCTCTACCGGACAACGGAAAGGTGATTGTTGTGGAGGCCAATCTACCAGTGAAA CCTGATACTGATACCACAGTGGTTGGAGTTTCACAATGTGATTTGATCATGATGGCT CAGAATCCCGGAGGTAAAGAGCGTTCTGAACAGGAGTTTCGGGCATTGGCAAGTGAA GCTGGATTCAAAGGTGTTAACCTAATATGTTGTGTCTGTAATTTTTGGGTCATGGAA TTTTACAAGTAG	5

HsOMT	P21964	ATGGGCGATACCAAAGAACAGCGTATTCTGAATCATGTTCTGCAGCATGCCGAACCG GGTAATGCACAGAGCGTTCTGGAAGCAATTGATACCTATTGTGAACAGAAAGAATGG GCCATGAATGTGGGTGATAAAAAAGGCAAAATTGTGGATGCCGTGATCCAAGAACAT CAGCCGAGCGTGCTGCTGGAACTGGGTGCATATTGTGGTTATAGCGCAGTTCGTATG GCACGTCTGCTGAGTCCGGGTGCACGTCTGATTACCATTGAAATTAACCCGGATTGT GCAGCAATTACCCAGCGTATGGTTGATTTTGCCGGTGTTAAAGATAAAGTTACCCTG GTTGTTGGTGCAAGCCAGGATATTATTCCGCAGCTGAAAAAAAAATATGACGTGGAT ACCCTGGATATGGTGTTTCTGGATCATTGGAAAGATCGTTATCTGCCGGATACCCTG CTGCTGGAAGAATGTGGTCTGCTGCGTAAAGGCACCGTTCTGCTGGCAGATAATGTT ATTTGTCCTGGTGCACCGGATTTTCTGGCACATGTTCGTGGTAGCAGCTGTTTTGAA TGTACCCATTATCAGTCCTTTCTGGAATATCGTGAAGTTGTTGATGGTCTGGAAAAA GCCATCTATAAAGGTCCGGGTAGCGAAGCAGGTCCGTAACTTAA	6
MsOMT	P28002	ATGGGTTCAACAGGTGAAACTCAAATAACACCAACCCACATATCAGATGAAGAAGCA AACCTCTTCGCCATGCAACTAGCAAGTGCTTCAGTTCTTCCCATGATTTTGAAATCA GCTCTTGAACTTGATCTCTTAGAAATCATTGCTAAAGCTGGACCTGGTGCTCAAATT TCACCTATTGAAATTGCTTCTCAGCTACCAACAACTAACCCTGATGCACCAGTTATG TTGGACCGAATGTTGCGTCTCTTGGCTTGTTACATAATCCTCACATGTTCAGTTCGT ACTCAACAAGATGGAAAGGTTCAGAGACTTTATGGTTTGGCTACTGTTGCTAAGTAT TTGGTTAAGAATGAAGATGGTGTATCCATTTCTGCTCTTAATCTCATGAATCAGGAT AAAGTGCTCATGGAAAGCTGGTATCACCTAAAAGATGCAGTCCTTGATGGGGGCATT CCATTCAACAAGGCTTATGGAATGACAGCCTTTGAATACCATGGAACAGATCCAAGG TTTAACAAGGTTTTCAACAAGGGGATGTCTGATCACTCTACCATCACAATGAAGAAA ATTCTTGAGACCTACACAGGTTTTGAAGGCCTTAAATCTCTTGTTGATGTAGGTGGT GGTACTGGAGCTGTAATTAACACGATTGTCTCAAAATATCCCACTATAAAGGGTATA AATTTTGATTTACCCCATGTCATTGAAGATGCTCCATCTTATCCAGGAGTTGAGCAT GTTGGTGGAGACATGTTTGTCAGTATTCCAAAGGCTGATGCTGTTTTTATGAAGTGG ATTTGTCATGACTGGAGTGATGAGCACTGCTTGAAATTTTTGAAGAACTGCTATGAG GCACTGCCAGACAATGGAAAAGTGATTGTGGCAGAATGCATACTTCCAGTGGCTCCA GATTCAAGCCTGGCCACAAAAGGTGTGGTTCACATTGATGTGATCATGTTGGCTCAT AATCCTGGTGGGAAAGAGAGAACACAAAAAGAGTTTGAGGATCTTGCCAAAGGTGCT GGATTCCAAGGTTTCAAAGTCCATTGTAATGCTTTCAACACATACATCATGGAGTTT CTTAAGAAGGTTTAA	7
pobA	Q88H28	ATGAAAACTCAGGTTGCAATTATTGGTGCAGGTCCGTCTGGCCTGCTGCTGGGCCAG CTGCTGCACAAGGCCGGTATCGATAACATCATCGTCGAACGCCAGACTGCCGAGTAC GTACTAGGCCGCATCCGCGCCGGGGTGCTAGAGCAAGGCACGGTCGACCTGCTGCGC GAGGCTGGCGTGGCCGAGCGCATGGACCGTGAAGGCCTGGTGCACGAGGGGGTTGAA CTGCTGGTTGGCGGGCGCCGCCAGCGTCTGGATCTCAAAGCCCTGACCGGCGGCAAG ACGGTGATGGTCTACGGCCAGACCGAAGTCACCCGTGACCTGATGCAGGCCCGCGAA GCCAGTGGTGCGCCGATCATTTATTCAGCCGCCAACGTTCAGCCGCATGAATTGAAA GGCGAGAAGCCCTACCTGACGTTCGAAAAGGATGGCCGGGTGCAGCGGATTGACTGC GACTATATCGCCGGCTGCGACGGCTTCCACGGTATCTCGCGGCAGAGCATCCCGGAG GGCGTGCTGAAACAGTATGAGCGGGTTTACCCGTTTGGCTGGCTGGGCCTGCTGTCG GACACACCGCCAGTCAATCACGAGTTGATCTACGCCCACCATGAGCGCGGTTTCGCG TTGTGTAGCCAACGCTCGCAAACACGCAGCCGCTACTATCTGCAGGTGCCTTTGCAG GATCGGGTCGAGGAGTGGTCTGACGAGCGTTTCTGGGACGAACTGAAAGCCCGTCTG CCCGCCGAGGTGGCGGCGGACCTGGTCACAGGCCCCGCGTTGGAAAAAAGTATTGCG CCGCTGCGTAGCCTGGTGGTCGAACCCATGCAGTATGGTCACCTGTTCCTGGTGGGG GACGCGGCGCACATCGTCCCCCCTACGGGTGCCAAAGGCCTTAACCTGGCGGCCTCC GACGTCAACTACCTGTACCGCATTCTGGTCAAGGTGTACCACGAAGGGCGCGTCGAC CTGCTTGCGCAATACTCGCCGCTGGCACTGCGCCGCGTGTGGAAGGGCGAGCGCTTC AGCTGGTTCATGACCCAACTGCTGCATGACTTCGGTAGCCACAAGGACGCCTGGGAC CAGAAGATGCAGGAAGCTGACCGCGAGTACTTCCTGACCTCGCCGGCGGGCCTGGTG AACATTGCCGAGAACTATGTGGGGCTGCCGTTCGAGGAAGTTGCCTGA	8

pobA^{Mut}		ATGAAAACTCAGGTTGCAATTATTGGTGCAGGTCCGTCTGGCCTGCTGCTGGGCCAG CTGCTGCACAAGGCCGGTATCGATAACATCATCGTCGAACGCCAGACTGCCGAGTAC GTACTAGGCCGCATCCGCGCCGGGGTGCTAGAGCAAGGCACGGTCGACCTGCTGCGC GAGGCTGGCGTGGCCGAGCGCATGGACCGTGAAGGCCTGGTGCACGAGGGGGTTGAA CTGCTGGTTGGCGGGCGCCGCCAGCGTCTGGATCTCAAAGCCCTGACCGGCGGCAAG ACGGTGATGGTCTACGGCCAGACCGAAGTCACCCGTGACCTGATGCAGGCCCGCGAA GCCAGTGGTGCGCCGATCATTTATTCAGCCGCCAACGTTCAGCCGCATGAATTGAAA GGCGAGAAGCCCTACCTGACGTTCGAAAAGGATGGCCGGGTGCAGCGGATTGACTGC GACTATATCGCCGGCTGCGACGGCTTCCACGGTATCTCGCGGCAGAGCATCCCGGAG GGCGTGCTGAAACAGTATGAGCGGGTTTACCCGTTTGGCTGGCTGGGCCTGCTGTCG GACACACCGCCAGTCAATCACGAGTTGATCTACGCCCACCATGAGCGCGGTTTCGCG TTGTGTAGCCAACGCTCGCAAACACGCAGCCGCTACTACCTGCAAGTGCCTTTGCAG GATCGGGTCGAGGAGTGGTCTGACGAGCGTTTCTGGGACGAACTGAAAGCCCGTCTG CCCGCCGAGGTGGCGGCGGACCTGGTCACAGGCCCCGCGTTGGAAAAAAGTATTGCG CCGCTGCGTAGCCTGGTGGTCGAACCCATGCAGTATGGTCACCTGTTCCTGGTGGGG GACGCGGCGCACATCGTCCCCCCTGCGGGTGCCAAAGGCCTTAACCTGGCGGCCTCC GACGTCAACTACCTGTACCGCATTCTGGTCAAGGTGTACCACGAAGGGCGCGTCGAC CTGCTTGCGCAATACTCGCCGCTGGCACTGCGCCGCGTGTGGAAGGGCGAGCGCTTC AGCTGGTTCATGACCCAACTGCTGCATGACTTCGGTAGCCACAAGGACGCCTGGGAC CAGAAGATGCAGGAAGCTGACCGCGAGTACTTCCTGACCTCGCCGGCGGGCCTGGTG AACATTGCCGAGAACTTTGTGGGGCTGCCGTTCGAGGAAGTTGCCTGA	9
aroY	B2DCZ6	ATGCAGAACCCGATCAACGACCTGCGCTCCGCGATCGCGCTGCTGCAACGCCATCCG GGTCACTACATCGAAACCGACCACCCGGTCGACCCGAACGCCGAACTGGCCGGTGTG TACCGCCACATCGGTGCGGGTGGCACCGTGAAACGTCCGACCCGCACCGGTCCAGCC ATGATGTTCAACAGCGTGAAGGGCTACCCAGGCAGCCGCATCCTGGTGGGCATGCAC GCCAGCCGTGAACGTGCCGCCCTGCTGCTGGGCTGCGTGCCAAGCAAACTGGCGCAG CACGTGGGCCAGGCCGTGAAGAACCCGGTGGCCCCAGTGGTGGTGCCAGCCAGCCAA GCCCCATGCCAAGAACAGGTGTTCTACGCCGACGACCCGGACTTCGACCTGCGCAAG CTGCTGCCAGCCCCAACCAACACCCCGATCGATGCCGGTCCGTTCTTCTGCCTGGGC CTGGTGCTGGCGAGCGACCCGGAAGATACCAGCCTGACCGACGTGACCATCCACCGC CTGTGCGTGCAAGAGCGCGACGAGCTGAGCATGTTCCTGGCCGCCGGTCGCCACATC GAGGTGTTCCGCAAGAAGGCCGAAGCCGCCGGTAAGCCGCTGCCGGTGACCATCAAC ATGGGCCTGGACCCAGCCATCTACATCGGTGCCTGCTTCGAAGCGCCAACCACCCCG TTCGGCTACAACGAGCTGGGTGTGGCCGGTGCCCTGCGTCAGCAACCGGTGGAACTG GTGCAGGGCGTGGCCGTGAAAGAGAAGGCGATCGCGCGTGCCGAGATCATCATCGAG GGCGAACTGCTGCCAGGCGTGCGCGTGCGCGAAGATCAGCACACCAACACCGGTCAC GCCATGCCGGAATTCCCAGGCTACTGCGGTGAGGCCAACCCGAGCCTGCCGGTGATC AAGGTGAAGGCCGTGACCATGCGCAACCACGCCATCCTGCAGACCCTGGTGGGTCCG GGTGAGGAACACACCACCCTGGCGGGTCTGCCGACCGAAGCCAGCATCCGCAACGCC GTGGAAGAGGCGATCCCAGGCTTCCTGCAGAACGTGTACGCCCACACCGCCGGTGGC GGTAAGTTCCTGGGCATCCTGCAGGTCAAGAAGCGCCAGCCGAGCGACGAAGGCCGT CAGGGCCAAGCCGCCCTGATCGCCCTGGCCACCTACAGCGAGCTGAAGAACATCATC CTGGTGGACGAGGACGTGGACATCTTCGACAGCGACGACATCCTGTGGGCCATGACC ACCCGCATGCAGGGCGACGTGAGCATCACCACCCTGCCAGGCATCCGTGGCCATCAG CTGGACCCGAGCCAGAGCCCAGACTACAGCACCAGCATCCGTGGCAACGGCATCAGC TGCAAGACCATCTTCGACTGCACCGTGCCGTGGGCCCTGAAAGCCCGTTTCGAGCGT GCCCCATTCATGGAAGTGGACCCGACCCCGTGGGCCCCAGAGCTGTTCAGCGACAAG AAGTAA	10

lpdC	F9US27	ATGGCAGAACAACCATGGGATTTGCGTCGCGTGCTTGATGAGATCAAGGATGATCCA AAGAACTATCATGAAACTGACGTCGAAGTTGATCCAAATGCGGAACTTTCTGGTGTT TATCGGTATATCGGTGCTGGTGGGACCGTTCAACGGCCAACGCAAGAGGGTCCAGCA ATGATGTTTAACAACGTTAAGGGGTTTCCTGATACGCGGGTCTTGACTGGATTGATG GCGAGTCGCCGGCGCGTTGGTAAGATGTTCCACCACGATTATCAGACGTTAGGGCAA TACTTGAACGAAGCAGTCTCTAATCCAGTGGCGCCAGAAACGGTTGCTGAAGCGGAT GCGCCAGCTCACGATGTCGTTTATAAAGCGACGGATGAAGGCTTTGATATTCGTAAG TTAGTGGCAGCACCAACGAATACGCCCCAAGATGCTGGACCATATATTACGGTCGGT GTGGTGTTTGGCTCAAGCATGGACAAGTCTAAGAGTGATGTGACGATTCACCGAATG GTCCTTGAAGATAAGGATAAGTTAGGGATTTATATCATGCCTGGCGGTCGGCACATT GGTGCGTTTGCGGAAGAGTATGAGAAAGCTAACAAGCCAATGCCAATTACAATTAAT ATTGGTTTAGATCCAGCCATTACGATTGGTGCAACTTTCGAACCACCGACCACGCCA TTCGGTTATAACGAATTAGGTGTTGCTGGTGCGATTCGGAACCAAGCTGTTCAATTA GTTGACGGGGTGACCGTCGATGAAAAGGCGATTGCGCGTTCTGAATATACGCTTGAG GGGTACATTATGCCTAACGAACGTATTCAGGAAGATATCAATACGCATACGGGCAAG GCGATGCCTGAATTTCCGGGTTATGATGGTGACGCCAACCCAGCTTTACAAGTGATT AAGGTGACGGCGGTGACTCATCGGAAGAATGCCATCATGCAAAGCGTGATTGGACCA TCCGAAGAACATGTCAGCATGGCGGGCATTCCAACTGAAGCTAGTATCTTACAATTG GTTAACCGTGCCATTCCTGGTAAAGTGACGAATGTTTATAATCCGCCGGCTGGTGGT GGTAAGTTGATGACCATCATGCAGATTCACAAGGATAATGAAGCGGATGAAGGCATT CAACGGCAAGCTGCCTTGCTTGCGTTCTCAGCCTTTAAGGAATTGAAGACTGTTATC CTGGTTGATGAAGATGTTGATATTTTTGATATGAATGATGTGATTTGGACGATGAAT ACCCGTTTCCAAGCCGATCAGGACTTGATGGTCTTATCAGGCATGCGGAATCATCCG TTGGACCCATCGGAACGCCCACAATATGATCCAAAGTCGATTCGTTTCCGTGGGATG AGTTCTAAACTAGTGATTGATGGCACCGTACCATTCGATATGAAGGACCAATTTGAA CGGGCCCAATTCATGAAAGTGGCTGACTGGGAGAAGTATTTGAAGTAA	11
phK	A0A0S2UP50	ATGACAACTCAACCGGAAACCAAATCCTTTGAAGAGCTGACCCGATACATCCGAGTG CGCAGTGAGCCGGGCGACAAGTTCGTGGAATTCGACTTCGCCATTGCTTACCCCGAG CTCTTCGTTGAGCTCGTGCTGCCTCACGAGGCCTTCGAGATTTTCTGCAAACATAAC AAAGTCGTCCACATGGACTCCAACATAATCCGCAAAATTGACGAAGACATGGTCAAG TGGCGGTTCGGAGAGCATGGCAAGCGCTACTGA	12
phL	Q84AQ4	ATGAGTATTGAAATCAAGACCAATTCGGTGGAACCTATCCGCCATACTTATGGCCAC ATCGCCCGTCGCTTCGGTGATAAGCCGGCTACCCGTTATCAGGAGGCCAGCTACGAC ATTGAGGCAAAGACCAATTTCCATTACCGGCCCCAGTGGGATTCCGAGCACACCCTG AACGATCCCACGCGTACCGCCATCCGCATGGAAGACTGGTGCGCCGTTTCCGATCCC CGCCAGTTTTACTATGGCGCCTATGTCGGCAACCGGGCCAAGATGCAGGAGTCGGCC GAGACCAGCTTTGGCTTCTGCGAAAAGCGTAATCTGCTGACCCGCCTTTCCGAAGAA ACCCAGAAGCAATTGTTGCGGCTGCTGGTGCCCCTGCGTCATGTCGAGCTTGGCGCC AACATGAACAACGCCAAGATCGCCGGTGATGCCACCGCCACGACCGTCTCCCAGATG CACATCTACACTGGGATGGATCGCTTGGGCATTGGCCAGTACCTGTCCCGTATTGCA TTGATGATTGATGGCAGCACCGGTGCCGCTCTGGATGAGTCCAAGGCCTACTGGATG GATGACGAAATGTGGCAACCCATGCGCAAGCTGGTCGAAGACACGCTTGTGGTCGAT GATTGGTTTGAGCTGACTCTGGTTCAGAACATTCTTATCGACGGAATGATGTACCCG CTGGTCTACGACAAGATGGACCAGTGGTTCGAAAGCCAGGGTGCTGAAGATGTGTCC ATGCTCACGGAGTTCATGCGTGACTGGTACAAGGAATCCCTACGCTGGACTAATGCC ATGATGAAAGCCGTGGCCGGTGAAAGTGAGACTAACCGTGAGTTGCTTCAAAAATGG ATCGATCACTGGGAACCGCAGGCCTACGAAGCCCTGAAACCTCTGGCCGAAGCCTCC GTTGGCATCGACGGGCTGAATGAAGCCCGGGCGGAACTCTCTGCCCGCCTGAAGAAA TTCGAACTGCAGAGCCGGGGAGTCTCAGCATGA	13
phM	Q84AQ3	ATGAGCCAGCTTGTATTTATTGTATTCCAGGACAACGACGACTCCCGCTACCTCGCG GAAGCCGTTATGGAAGATAACCCCGACGCCGAAATGCAGCACCAGCCGGCCATGATC CGGATCCAGGCGGAAAAACGTCTGGTGATCAACCGCGAAACCATGGAAGAAAAGCTG GGGCGAGACTGGGATGTTCAGGAAATGCTCATAAATGTTATCAGCATCGCCGGCAAC GTCGATGAAGACGATGATCACTTCATTCTTGAATGGAATTAA	14

phN	Q84AQ2	ATGGTTAGTAAAAACAAAAAGCTTAACCTTAAAGACAAGTATCAATACCTGACCCGG GATATGGCCTGGGAACCGACCTATCAGGACAAGAAAGATATTTTTCCGGAGGAGGAT TTTGAGGGTATCAAGATCACCGACTGGTCCCAGTGGGAAGATCCGTTCCGCCTGACC ATGGATGCCTACTGGAAATACCAGGCGGAAAAAGAGAAGAAGCTGTACGCCATTTTC GATGCATTTGCCCAGAACAACGGCCACCAGAACATTTCAGACGCCCGTTATGTGAAC GCGCTAAAACTGTTCATCAGTGGTATATCTCCGCTTGAACATGCGGCGTTCCAGGGT TATTCCAAGGTCGGTCGCCAGTTTAGCGGCGCCGGGGCGCGGGTTGCCTGCCAGATG CAGGCAATTGACGAGCTGCGTCATTCCCAGACCCAGCAACACGCGATGAGCCACTAC AACAAGCACTTCAACGGTCTGCACGATGGCCCGCACATGCACGATCGGGTGTGGTAC CTGTCGGTGCCGAAATCGTTCTTTGATGATGCACGCTCGGCTGGTCCGTTCGAGTTC CTGACGGCCATCTCATTCTCGTTCGAGTATGTGCTCACCAACCTGTTGTTCGTACCG TTCATGTCGGGCGCTGCCTATAACGGCGACATGGCGACAGTCACCTTCGGTTTCTCC GCCCAGTCTGACGAAGCCCGTCATATGACCCTGGGCCTTGAGGTGATCAAGTTCATC CTCGAGCAGCACGAAGATAACGTGCCCATCGTTCAGCGCTGGATCGACAAGTGGTTC TGGCGCGGATTTCGCCTGCTTAGCCTGGTCAGCATGATGATGGACTACATGCTGCCA AACAAGGTCATGTCCTGGTCCGAGGCATGGGAAGTCTATTACGAGCAGAACGGCGGT GCTCTGTTCAAGGACCTGGAGCGATACGGCATCCGCCCGCCCAAATACCAGGACGTG GCTAACGATGCCAAACATCACCTGAGCCACCAGCTTTGGACCACTTTCTACCAGTAC TGCCAGGCCACCAACTTCCATACTTGGATTCCGGAGAAGGAAGAGATGGACTGGATG TCCGAGAAGTATCCGGACACTTTCGACAAGTACTACCGTCCGCGTTACGAGTACCTG GCGAAAGAGGCTGCCGCTGGCCGTCGCTTCTACAACAACACCCTGCCGCAGCTGTGC CAAGTGTGTCAGATCCCGACCATTTTCACCGAGAAAGATGCCCCAACCATGCTCAGC CATCGGCAGATAGAACATGAGGGCGAACGCTATCACTTCTGCTCTGACGGCTGCTGC GACATCTTCAAACACGAGCCGGAGAAGTACATACAGGCCTGGCTGCCGGTGCACCAG ATCTACCAGGGCAACTGTGAAGGCGGGGATCTCGAGACCGTGGTGCAGAAGTATTAC CACATCAATATCGGAGAGGACAATTTCGACTACGTTGGATCGCCCGACCAGAAACAC TGGCTGTCGATCAAGGGCCGGAAGCCTGCAGACAAGAACCAGGACGCCGCCTGA	15
phO	Q84AQ1	ATGAGTGTAAACGCACTTTACGACTACAAGTTTGAACCTAAAGACAAGGTCGAGAAC TTCCACGGCATGCAGCTGCTGTATGTCTACTGGCCCGATCACCTGCTGTTCTGCGCG CCCTTCGCGCTGCTGGTGCAGCCGGGTATGACCTTCAGTGCCCTGGTGGACGAGATT CTCAAGCCGGCTACCGCCGCGCACCCGGACTCTGCCAAGGCGGACTTCCTGAATGCC GAGTGGTTGCTGAACGATGAACCGTTCACACCCAAGGCTGACGCCAGCCTGAAAGAG CAGGGTATTGATCACAAGAGCATGCTGACGGTGACCACGCCGGGCCTGAAGGGCATG GCGAACGCCGGTTACTGA	16
phP	Q84AQ0	ATGAGTTACACCGTCACTATTGAGCCGATCGGCGAGCAGATTGAGGTAGAGGATGGC CAGACTATCCTCGCCGCCGCCCTGCGCCAGGGTGTCTGGCTGCCCTTTGCCTGCGGC CACGGCACCTGTGCTACCTGTAAGGTTCAGGTGCTTGAAGGTGATGTCGAGATCGGA AACGCCTCGCCCTTTGCGCTGATGGATATCGAACGTGACGAGGGCAAGGTTCTGGCC TGCTGCGCCACGGTTGAGAGCGACGTCACCATTGAGGTGGACATCGATGTGGATCCG GATTTTGAGGGCTACCCGGTGGAGGACTATGCCGCCATAGCGACCGATATCGTCGAA CTCTCTCCGACCATCAAGGGCATTCACCTGAAACTGGACCGGCCGATGACATTCCAG GCCGGCCAGTACATCAATATCGAACTGCCGGGTGTTGAAGGCGCGAGGGCCTTCTCC CTGGCCAACCCGCCCAGCAAAGCAGACGAAGTGGAGCTGCATGTGCGCCTCGTTGAG GGCGGTGCTGCCACCACCTACATCCACGAACAACTGAAAACGGGTGATGCGCTGAAC CTTTCAGGCCCTTACGGCCAGTTCTTCGTGCGTAGTTCCCAACCCGGCGATCTGATT TTCATCGCCGGCGGATCCGGATTGTCCAGTCCCCAGTCGATGATCCTTGATCTGCTT GAGCAGAACGATGAGCGCAAGATCGTTCTGTTCCAGGGTGCCCGAAACCTGGCAGAG CTTTACAACCGGGAGCTGTTTGAGGCTCTGGATCGCGACCACGACAATTTCACCTAC GTACCGGCGCTTAGCCAAGCCGACGAAGACCCTGACTGGAAGGGCTTCCGAGGCTAT GTCCATGAGGCGGCCAACGCCCATTTCGATGGCCGGTTTGCCGGTAACAAGGCATAC CTGTGCGGCCCGCCTCCAATGATCGATGCGGCTATCACGGCATTGATGCAGGGGCGG CTGTTCGAGCGTGACATCTTCATGGAGAAATTCCTGACAGCGGCGGACGGAGCTGAA GACACCCAGCGTTCGGCCCTGTTCAAGAAGATATAG	17
phQ	A0A0S2UPA7	ATGGGCATGGGTTTCCTAGTGTTCAACCGCACAACGGGAGGTCACTTTACCTGCCAG GAGGGCCAGAGTGTGCTCAAGGCCATGGAGCAGAGGGGCCTGAAGTGTGTCCCCGTG GGCTGCCGGGGTGGTGGTTGCGGATTTTGTAAGATCCGGGTTCTGGAAGGGTATTTC GAGTGCGGCAAGATGAGCAAGCGGCACGCCCCGCCTGAAGCCGTTGAAAAAGGGGAA GTTCTGGCCTGCCGGATCTACCCACTGACTGATCTGATCATTGAGTGTCCGCCGCAA CCGGCGGCGGACTTTGCGAGCTAG	18

catA	Q88GK8	ATGACCGTGAAAATTTCCCACACTGCCGACATTCAAGCCTTCTTCAACCGGGTAGCT GGCCTGGACCATGCCGAAGGAAACCCGCGCTTCAAGCAGATCATTCTGCGCGTGCTG CAAGACACCGCCCGCCTGATCGAAGACCTGGAGATTACCGAGGACGAGTTCTGGCAC GCCGTCGACTACCTCAACCGCCTGGGCGGCCGTAACGAGGCAGGCCTGCTGGCTGCT GGCCTGGGTATCGAGCACTTCCTCGACCTGCTGCAGGATGCCAAGGATGCCGAAGCC GGCCTTGGCGGCGGCACCCCGCGCACCATCGAAGGCCCGTTGTACGTTGCCGGGGCG CCGCTGGCCCAGGGCGAAGCGCGCATGGACGACGGCACTGACCCAGGCGTGGTGATG TTCCTTCAGGGCCAGGTGTTCGATGCCGACGGCAAGCCGTTGGCCGGTGCCACCGTC GACCTGTGGCACGCCAATACCCAGGGCACCTATTCGTACTTCGATTCGACCCAGTCC GAGTTCAACCTGCGTCGGCGTATCATCACCGATGCCGAGGGCCGCTACCGCGCGCGC TCGATCGTGCCGTCCGGGTATGGCTGCGACCCGCAGGGCCCAACCCAGGAATGCCTG GACCTGCTCGGCCGCCACGGCCAGCGCCCGGCGCACGTGCACTTCTTCATCTCGGCA CCGGGGCACCGCCACCTGACCACGCAGATCAACTTTGCTGGCGACAAGTACCTGTGG GACGACTTTGCCTATGCCACCCGCGACGGGCTGATCGGCGAACTGCGTTTTGTCGAG GATGCGGCGGCGGCGCGCGACCGCGGTGTGCAAGGCGAGCGCTTTGCCGAGCTGTCA TTCGACTTCCGCTTGCAGGGTGCCAAGTCGCCTGACGCCGAGGCGCGAAGCCATCGG CCGCGGGCGTTGCAGGAGGGCTGA	19

[0074] <실험예 1> PET의 TPA 및 EG으로의 탈중합

[0075] PET를 단량체, EG 및 TPA로 탈중합하기 위해, 13 mL의 물에 1 g의 PET를 반응시켜 15-50분의 다양한 반응 시간 동안 마이크로웨이브를 사용하여 170, 200 및 230 ℃에서 PET의 탈중합 반응을 수행하였다(도 1a). 초기 가수분해 동안, PET의 TPA 및 EG로의 랜덤 사슬 절단으로 인해 TPA의 양은 천천히 증가하였다(도 1a). 이후에는, 반응 산물인 TPA에 의해 유도된 자가촉매에 의해 PET 탈중합이 급격히 증가하였다. 이중 TPA의 최고 수율은 230 ℃에서 50분 후에 얻었다(도 1a). 최고 수율은 반응 동안 소비된 PET로부터 계산된 이론적 최대 TPA 수율의 99.9 %인 것으로 측정되었고, 여기서 초기 투입 PET의 24.1 %(w/w)는 반응에 의해 230 ℃에서 50분 후에 소비되었다. 이러한 결과는 TPA가 과분해없이 PET 가수분해로부터 단량체 형태로 높게 수득될 수 있음을 나타낸다.

[0076] PET 가수분해물을 여과에 의해 고체 및 액체 분획으로 분리하였다. 먼저, TPA를 수득하기 위해, TPA를 함유하는 고체 분획을 1 M NaOH에 용해시킨 후, Na-TPA를 실온에서 2 M HCl에 의해 TPA로서 침전시켰다. 침전된 TPA를 여과하고 80 ℃에서 진공 건조시켰다(도 2a). TPA 샘플의 동일성을 확인하기 위해, ^{1}H 및 ^{13}C NMR 분석을 수행하였다(도 2b, 2c). 두 스펙트럼의 화학적 이동은 시약 등급 TPA와 동일하다.

[0077] 화학적 가수분해에 의해 수득된 PET 가수분해물로부터 EG를 분리하기 위해, 액체 분획을 증류시키고, ^{1}H 및 ^{13}C NMR 분석을 사용하여 EG 샘플의 동일성을 확인하였다(도 2d, e). 이러한 화학적 이동은 시약 등급 EG와 동일하다.

[0078] <실험예 2> TPA의 PCA로의 생물변환

[0079] PET보다 고부가가치의 화합물을 생산하기 위한 공급 원료로서 폐 PET로부터 TPA의 적용가능성을 실험적으로 검증하기 위해, PCA를 주요 중간체뿐만 아니라 첫 번째 산물로 선택하였다. PCA는 GA, 피로갈롤, 카테콜, MA 및 VA과 같은 다양한 고부가가치의 방향족 또는 방향족 유래 화합물을 생성하기 위한 전구체 화합물일 수 있다(도 3). 따라서, TPA를 PCA로 전환할 수 있는 효율적인 생체촉매를 확립하는 것이 중요하다. 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트(DCD)를 통한 TPA의 PCA로의 생물변환은 코마노나스 에스피(*Comamonas sp.*) E6, 델프티아 쑤루하텐시스(*Delftia tsuruhatensis*) T7 및 로도코커스 에스피(*Rhodococcus sp.*) DK17와 같이 TPA를 유일한 탄소원으로 대사하는 여러 박테리아의 TPA 분해 경로에서 시험관 내에서만 밝혀져 있다. TPA 분해 경로는 2개의 효소, TPA 1,2-디옥시게네이즈 및 DCD 디히드로게네이즈로 구성되며, 여기서 TPA 1,2-디옥시게네이즈는 TPA를 DCD로 전환하고, DCD 디히드로게네이즈는 DCD를 PCA로 전환한다.

[0080] 본 실험에서, 코마노나스 에스피(*Comamonas sp.*) E6 유래의 TPA 1,2-디옥시게네이즈로서 TphAabc 및 DCD 디히드로게네이즈로서 TphB를 대장균(*E. coli*)에서 TPA로부터 PCA로의 생합성 경로에 사용하였다. 다른 미생물의 다른 상응하는 효소와 달리 이 두 효소는 NADH 및 NADPH 모두에 대한 이중 보조인자 이용 능력을 보유할 수 있다는 이점이 있다. 버퍼에 TPA를 용해시키기 위해, NaOH를 첨가하여 pH를 7로 조정한 다음, TPA를 0.5 g/L 이상의 농도로 용해시킬 수 있는 추가적인 전환 반응을 위해 50 g/L의 TPA 용액을 제조하였다. PET 가수분해물로부터의 TPA가 TG-1 버퍼에서 TphAabc 및 TphB를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 PCA-1과 배양될 때(도 1b), 3시간 후 81.4 %의 몰 수율로 2.8 mM PCA가 생성되었으며, 이는 시약 등급의 TPA에서 얻은 것이다(도 1c). PCA 생산은 GC/MS에 의해 확인되었다(도 1d 및 4a). TPA로부터 화합물의 생체 내 생산은 아직 보고되지 않았기 때문에, 이

실험은 TPA로부터 생체 내 PCA 생산의 첫 번째 실험 시연이다. PET 가수분해물로부터의 TPA는 방향족 또는 방향족-유래 화합물의 주요 전구체인 PCA를 생성하기 위한 공급 원료로서 사용될 수 있다. PCA는 리그닌 리파이너리에서 중요한 중간 화합물이기 때문에, PCA 자체는 다른 생물학적 전환에서 기질로서 가치가 있다.

[0081] <실험예 3> TPA의 GA로의 생물변환

[0082] GA는 현재 제약 산업에서 항균제인 트리메토프림 및 항산화제인 프로필갈레이트를 생산하는 데 사용된다. PCA의 메타 위치에서 히드록시화 활성을 갖는 PCA 히드록실레이즈가 확인되면 TPA는 PCA를 통해 GA로 전환될 수 있다(도 5a). 비록 야생형 p-히드록시벤조에이트 히드록실레이즈(슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 PobA)가 PCA(즉, 3,4-디히드록시벤조산)가 아니라 4-히드록시벤조산(4-HBA)을 히드록시화 시키지만, 구조-기반 조작된 PobA는 4-HBA 및 PCA 둘 다를 GA로 히드록시화 시켰다.

[0083] 본 실험에서는 대장균(*E. coli*)(Strain HBH-1)에서 슈도모나스 푸티다(*P. putida*) KT2440 유래의 PobA를 발현시켜 슈도모나스 푸티다(*P. putida*) KT2440 유래의 PobA가 PCA의 메타-위치를 히드록시화할 수 있는지 시험하였다. 결과적으로, 균주 HBH-1은 30 ℃ 및 250 rpm에서 TG-2 버퍼에서 12시간 후 40.1 %의 몰 수율로 PCA로부터 1.4 mM GA를 생성하였다(도 6a). PobA에 의한 히드록시화를 향상시키기 위해, 이전 접근법에 따른 구조-기반 효소 공학이 수행되었다. 분자 도킹 시뮬레이션에 따르면, Tyr201은 야생형 PobA의 활성 부위에서 Tyr386 및 PCA와 함께 두 개의 수소결합을 형성하였다(도 7a). 그러나, PCA는 모델링된 이중 돌연변이체 $PobA^{Mut}$(T294A/Y385F)의 활성 부위에서 Tyr201 및 Ala294와 2개의 수소결합을 형성하여, 기질과 FAD 보조인자 사이의 결합 거리가 더 짧아졌다(도 7b). 모델링 결과를 검증하기 위해, 이중 돌연변이체 $PobA^{Mut}$(T294A/Y385F)를 구축하고 대장균(*E. coli*) 균주 HBH-2로 발현시켰다. $PobA^{Mut}$을 발현하는 HBH-2 균주를 사용함으로써, 12시간 후 74.3 %의 몰 수율로 PCA로부터 2.5 mM GA를 생성하였고, 이는 야생형 PobA에 비해 83.7 % 증가하였다(도 6a).

[0084] TPA로부터 GA를 생성하기 위해, 먼저 TphAabc, TphB 및 $PobA^{Mut}$을 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 GA-1로 구성된 단일 촉매 GA-1 시스템을 시험하였다. GA-1 시스템은 TG-2 버퍼에서 12시간 후 TPA로부터 46.6 %의 몰 수율로 1.3 mM GA만을 생성하였지만, 1.1 mM PCA가 남아있었다(도 6b). 이는 단일 스트레인 시스템 GA-1에서 NAD(P)H를 사용하여 PCA에서 GA의 생합성으로 인한 산화 환원 불균형 때문일 수 있다. TPA로부터의 GA 수율을 개선하기 위해, 균주 PCA-1 및 HBH-2를 동시에 첨가하여 TPA 및 PCA로부터 PCA 및 GA의 합성을 각각 촉매하는 GA-2a 시스템을 구축하였다. 그러나, GA 합성 촉매는 15.9 %의 몰 수율로 3.1 mM TPA로부터 단지 0.5 mM GA를 생성하였다(도 6c). 2.1 mM의 중간체 PCA가 GA로 전환되지 않고 축적되었으므로, GA 합성 촉매에 의한 두 번째 반응은 GA-2a 시스템에서 속도조절반응인 것으로 밝혀졌다. 두 번째 전환 단계를 촉진하기 위해 PCA와 GA 합성 촉매 사이의 OD_{600} 값이 GA-2a 시스템에서는 각각 20이었으나, GA-2b 시스템에서는 각각 10과 30으로 변경되었다(도 6d). 결과적으로, TPA로부터 GA의 생산 및 몰 수율은 PCA를 축적하지 않고 24시간 후에 각각 2.7 mM GA 및 92.5 %로 증가하였다(도 5b 및 6d). GA-2b 시스템에 의한 GA 생산은 GC/MS에 의해 확인되었다(도 5c 및 4b).

[0085] <실험예 4> GA를 통한 TPA의 피로갈롤로의 생물변환

[0086] 피로갈롤은 PCA를 통해 TPA에서 생산할 수 있는 또 다른 고부가가치의 화합물이다. 피로갈롤은 현재 석유 산업에서 산화방지제로 사용된다. 피로갈롤은 PCA 히드록시화에 의해 합성된 GA의 탈카르복실화(도 8a) 및 PCA 탈카르복실화에 의해 합성될 수 있는 카테콜의 히드록시화를 통한 두 가지 경로에 의해 생합성될 수 있다(도 8b).

[0087] GA를 통한 피로갈롤의 생합성 경로를 개발하기 위해, 시험관내에서 GA 디카르복실레이즈인 것으로 밝혀진 LpdC를 GA 생합성 경로에서 GA 탈카르복실화 모듈로서 도입하였다. 결과적으로, TphAabc, TphB, $PobA^{Mut}$ 및 LpdC를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 PG-1a를 구축하였다(도 8a). PG-1a 균주는 6시간 후 30 ℃ 및 250 rpm에서 TG-2 버퍼 중 32.7 %의 몰 수율로 TPA로부터 1.1 mM 피로갈롤을 생성하였고(도 8c 및 9a), 피로갈롤 생성은 GC/MS에 의해 확인되었다(도 8d 및 4c). 그러나, 6시간 후에 상당한 양의 1.6 mM 카테콜이 또한 부산물로서 생성되었다; 이는 PCA에 대한 GA 디카르복실레이즈, LpdC의 무차별성에 기인한다. LpdC는 GA뿐만 아니라 PCA를 각각 피로갈롤 및 카테콜로 전환시켰다. 예를 들어, LpdC를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 GDC-1은 8시간 후에 3.0 mM PCA를 2.9 mM 카테콜로 전환시켰고, 18시간 후에 3.0 mM GA를 2.8 mM 피로갈롤로 전환시켰다(도 10a, 10b). 이러한 결과는 LpdC가 이전에 GA 탈카르복실레이즈로 보고되었기 때문에 LpdC가 PCA에 대한 무차별 활성을 가짐을 나타낸다. 따라서, PCA를 중간체로 하여 GA 생합성 경로를 사용할 때 카테콜 생성이 불가피하다.

[0088] LpdC 무차별성으로 인한 카테콜 축적을 완화하기 위해 축적된 카테콜을 피로갈롤로 전환해야 했다. 카테콜을 피

로갈롤로 전환시키는 카테콜 히드록실레이즈가 아직 보고되지 않았지만, 최근에 슈도모나스 슈테제리(*Pseudomonas stutzeri*) OX1로부터 페놀 히드록실레이즈를 코딩하는 PhKLMNOPQ 오페론 코딩이 카테콜을 피로갈롤로 전환시키는 데 있어서 무차별한 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. PhKLMNOPQ를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 CH-1은 24시간 후 67.1 %의 몰 수율로 카테콜로부터 2.6 mM 피로갈롤을 생산하였다(도 11a). PhKLMNOPQ의 카테콜 히드록시화 모듈을 대장균(*E. coli*) 균주 PG-1a에 첨가하여 대장균(*E. coli*) 균주 PG-1b를 구축하였다(도 8a). 그러나 PhKLMNOPQ의 카테콜 히드록시화 모듈을 보유한 PG-1b 시스템이 TPA로부터의 피로갈롤 생산에 적용되더라도, 카테콜 축적이 다소 증가하였고, 12시간 후 0.7 mM의 피로갈롤 생산은 6시간 후 PG-1a 시스템에 의한 1.1 mM보다 다소 낮았다(도 9b). PG-1a와 PG-1b 시스템 사이의 GA 축적과 피로갈롤로의 전환을 비교하면, PG-1b는 GA를 적게 축적하지만 PG-1a보다(도 9a) 적은 피로갈롤을 생성한다(도 9b). PG-1b에서, 카테콜 히드록시화 모듈은 카테콜을 전환시키지 않고 PG-1a보다 카테콜을 더 높게 축적하는 것(도 9b)에서 비활성적인 것으로 보였다(도 9a). 이들 결과는 2개의 상이한 히드록시화 반응을 수반하는 2개의 생합성 경로를 통한 피로갈롤 합성이 비효율적일 수 있음을 의미한다. 히드록시화 모듈 둘 다에 하나 이상의 NAD(P)H 분자가 필요하기 때문일 수 있다.

[0089] <실험예 5> 카테콜을 통한 TPA의 피로갈롤로의 생물변환

[0090] LpdC의 무차별성으로 인한 부산물인 카테콜의 형성없이 피로갈롤을 합성하기 위해, 카테콜을 통한 대안적인 피로갈롤 합성 경로를 채택하였다. TPA의 PCA로의 전환을 위한 PCA 합성 모듈(즉, PCA-1 시스템)에 기초하여, 피로갈롤 합성 경로는 PCA를 카테콜로 전환하기 위한 PCA 탈카르복실화 모듈과 카테콜 전환을 위한 카테콜 히드록시화 모듈을 단일 또는 이중 스트레인 시스템(즉, 각각 PG-2a 및 PG-2b 시스템)에서 PhKLMNOPQ에 의해 통합함으로써 구축되었다(도 8b). 여러 미생물에서 PCA 디카르복실레이즈로 확인된 AroY 효소를 PCA 탈카르복실화 모듈로 채택하였다. 먼저, AroY를 발현하는 대장균 균주 PDC-1에 의한 PCA의 카테콜로의 전환이 확인되었고, 여기서 PCA는 5시간 후 TG-2 버퍼에서 97.8 %의 몰 수율로 2.9 mM 카테콜로 전환되었다(도 11b). PhKLMNOPQ에 의한 피로갈롤로의 카테콜 전환을 위한 카테콜 히드록시화 모듈의 기능은 CH-1 균주를 사용하여 이미 확인하였다(도 11a). TPA의 PCA로의 전환을 위한 PCA 합성 모듈과 함께 카테콜, AroY를 생산하는 PCA 탈카르복실화 모듈의 능력을 추가로 평가하기 위해, TphAabc, TphB 및 AroY를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 CTL-1을 시험한 결과, 균주 CTL-1 4시간 후 PCA 축적없이 90.1 %의 몰 수율로 TPA로부터 2.7 mM 카테콜을 생성하였다(도 9c).

[0091] 다음으로, PG-2a 시스템에서, PCA 합성 균주 PCA-1과 AroY 및 PhKLMNOPQ를 발현하는 PCA-피로갈롤 전환 균주 PDC-CH-1을 동시에 3.1 mM TPA와 함께 인큐베이션 할 때, 단지 0.2 mM 피로갈롤이 생성되었으나, 2.4 mM 카테콜은 TG-2 버퍼에서 20시간 후에 비전환된 상태로 유지되었다(도 9d). PG-2a 시스템의 문제를 해결하기 위해 균주 PDC-CH-1의 기질로 3.2 mM PCA를 단독 시험한 경우, PCA는 20시간 후 카테콜로 완전히 전환된 것으로 보이지만, 카테콜로부터 약 39.0 %의 몰 수율로 1.2 mM 피로갈롤이 생성되었다(도 11c). PDC-CH-1 균주에 의한 카테콜로부터의 피로갈롤 수율은 24시간 후 PhKLMNOPQ만을 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 CH-1에 의해 생성된 2.6 mM 피로갈롤보다 1.7배 낮았다(도 11a, c). 이들 결과는 PhKLMNOPQ 단독의 발현이 카테콜의 피로갈롤로의 전환에 유리하다는 것을 나타낸다. 이는 AroY와 공동 발현된 경우 PhK, $Ph(LNO)_2$, PhP, PhQ 및 PhM 서브유닛으로 구성된 올바른 형태의 멀티 유닛 PhKLMNOPQ 생성에 대한 불확실성 때문일 수 있다. 따라서, 균주 PCA-1 및 PDC-CH-1로 구성된 PGA-2a 시스템은 AroY, TphAabc 및 TphB를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 CTL-1 및 PhKLMNOPQ 단독을 발현하는 대장균 균주 CH-1(도 9e)으로 구성된 PG-2b 시스템으로 대체되었다(도 8b). PG-2b 시스템(즉, 0.6 mM)에 의한 피로갈롤 생산은 PG-2a 시스템(즉, 0.2 mM)에 비해 3배 더 높았다; 이것은 PhKLMNOPQ의 단일 표현에 기인한 것 같다. 그러나, 상당한 양의 1.6 mM 카테콜은 전환되지 않은 채로 남아 있었다(도 9e).

[0092] <실험예 6> TPA의 MA로의 생물변환

[0093] PCA를 통해 TPA로부터 합성된 카테콜은 카테콜의 고리 절단에 의해 MA로 전환될 수 있다. MA는 현재 화학 산업에서 플라스틱 생산에 널리 사용되는 아디프산을 생산하는 데 사용된다. TPA로부터 MA 생합성 경로를 개발하기 위해, 슈도모나스 푸티다(*P. putida*) KT2440에서 유래한 카테콜 1,2-디옥시게네이즈인 CatA를 고리 절단 모듈로서 시험하였다. 4.5 mM 카테콜을 CatA를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 CDO-1과 함께 인큐베이션했을 때, MA로의 완전한 전환은 10분 후에 발생하였다(도 12a). 이 MA 합성 모듈을 TphAabc, TphB 및 AroY를 발현하는 균주 CTL-1의 카테콜 생합성 경로와 조합하여(도 9c), TPA로 시작하는 MA 생합성 경로를 갖는 대장균(*E. coli*) 균주 MA-1을 구축하였다(도 13a). MA-1 균주를 함유하는 MA-1 시스템은 중간체를 축적하지 않고 6시간 후 85.4 %의 몰 전환율로 3.2 mM TPA를 2.7 mM MA로 전환시켰다(도 12b 및 13b). TPA의 PCA로의 생합성 경로는 산화 환원 불균형을 나타내지 않았다(도 13a). GC/MS는 Ma가 균주 MA-1에 의해 생성되었음을 확인하였다(도 4d 및 13c).

[0094] <실험예 7> 단일 촉매 시스템을 이용한 TPA의 VA로의 생물변환

[0095] VA는 제약 산업에서 바닐린의 직접적인 전구체로 사용된다. PCA는 시험관 내 및 생체 내 O-메틸트랜스퍼레이즈(OMT)에 의해 VA로 전환되는 것으로 밝혀졌다. OMT에 의해 촉매화된 이 O-메틸화 반응에 메틸기를 공급하기 위해, S-아데노실 메티오닌(SAM)이 공동-기질로 사용되고, 아데노실 및 메틸기는 각각 ATP 및 메티오닌으로부터 공급된다. 현재 알려진 OMT는 진핵생물에서 유래한 것이다. 그러나, 본 발명에서, 다양한 소스로부터의 OMT의 발현을 대장균(*E. coli*) BL21 (DE3)에서 시험하여 VA 합성 모듈을 구축하였다. 본 발명에서 조사한 세 가지 OMT 중 인간의 HsOMT, 솔라넘 리코퍼시쿰(*Solanum lycopersicum*)의 SlOMT 및 메디카고 사티바(*Medicago sativa*)의 MsOMT 중 HsOMT와 *Sl*OMT 만 활성 형태로 표현되었다(도 14a). HsOMT 및 *Sl*OMT를 각각 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 OMT-1a 및 OMT-1b에 의한 전체-세포 전환을 비교하였다. 균주 OMT-1a에 의해, 3.2 mM PCA를 각각 0.94 및 0.54 mM 메티오닌을 함유하는 20 및 10 g/L 펩톤이 보충된 0.1 M 포스페이트 버퍼 중 29.4 %의 몰 수율로 1.0 mM VA로 전환시켰다(도 14b); 균주 OMT-1a에 의한 수율은 균주 OMT-1b에 의한 수율보다 1.4 배 높았다(도 14c). 따라서, 추가 실험에서 VA로의 PCA 전환을 위한 합성 모듈에 대해 HsOMT가 선택되었다.

[0096] PCA를 통해 TPA로부터 직접 VA를 생성하기 위해, TphAabc, TphB 및 HsOMT를 발현하는 대장균(*E. coli*) 균주 VA-1을 구축함으로써 HPAOM을 사용하여 TPA에서 PCA로의 생합성 경로를 PCA에서 VA 경로로 연결시켰다(도 19a). 3.3 mM TPA가 균주 VA-1과 함께 배양될 때, TPA는 완전히 소비되었다; 그러나, 0.02 mM VA만이 생성되었고, 2.3 mM PCA는 72시간 후에 TG-1/YP 버퍼에 축적되었다(도 15a). PCA의 VA로의 이러한 낮은 전환은 글리세롤(도 16a) 및 메티오닌(도 16b)의 열악한 소비에 의해 확인되었다. 이러한 낮은 전환 수율은 HsOMT의 낮은 가용성 발현에 기인할 수 있다(도 14a).

[0097] 균주 VA-1에 의한 VA로의 낮은 PCA 전환을 개선시키기 위해(도 15a), HsOMT의 단백질 용해도는 HsOMT의 N-말단에 헥사머 히스티딘의 부착에 의해 증가되었으며, 이는 단백질 용해도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 야생형 HsOMT를 발현하는 균주 OMT-2(도 17a)는 0.65 mM VA를 생산했지만, N-말단 헥사머 히스티딘을 갖는 $HsOMT^{His}$를 발현하는 균주 $OMT\text{-}2^{His}$는 야생형 HsOMT 균주보다 10.7 % 더 높은 VA 생성을 나타냈다(도 17a, 17b). 따라서 $HsOMT^{His}$가 추가 실험에 사용되었다.

[0098] PCA의 VA로의 낮은 전환율을 추가로 개선하기 위해, 변형 조건은 균주 $OMT\text{-}2^{His}$를 사용하여 최적화되었다. 특히, 내인성 SAM 재생은 비효율적일 수 있으므로, TG-2/YPM 버퍼에서 메티오닌을 보충함으로써 촉진되었다. 균주 $OMT\text{-}2^{His}$가 보충된 메티오닌이 결여된 TG-2/YP 버퍼에서 배양될 때, 48시간 후 2.9 mM PCA로부터 0.9 mM VA만이 생성되었다(도 18a). TG-2/YP 버퍼는 효모 추출물 및 펩톤으로부터 단지 0.8 mM 유리 메티오닌을 함유하기 때문에, 2.5 mM 메티오닌을 TG-2/YPM 버퍼에 첨가하여 메티오닌 몰 농도를 PCA의 농도와 균형을 맞추었다. 결과적으로, TG-2/YPM 버퍼에서 균주 $OMT\text{-}2^{His}$에 의한 2.9 mM PCA로부터의 VA의 몰 수율은 44.5%였으며, 이는 TG-2/YP 버퍼보다 40.0% 높았다(도 18b).

[0099] <실험예 8> 이중 촉매 시스템을 이용한 TPA의 VA로의 생물변환

[0100] 단일 촉매 시스템에서 PCA는 VA로의 무시할만한 전환으로 인해 축적되었다. PCA에서 VA로의 전환을 강화하기 위해, 본 발명자들은 TphAabc 및 TphB를 발현하는 균주 PCA-1 및 $HsOMT^{His}$를 발현하는 균주 $OMT\text{-}2^{His}$(도 15b)가 각각 10 및 30의 상이한 OD_{600} 값에서 TPA를 함유하는 TG-2/YPM 버퍼에 동시에 첨가되는 이중 촉매 VA-2a 시스템을 개발하였다(도 19a). 결과적으로, VA-2a 시스템에 의해 3.4 mM TPA에서 생산된 VA는 48시간 후에 0.3 mM로 증가했지만(도 15a, 15b), TPA에서 전환된 PCA에서 VA의 몰 수율은 6.4 %로 유지되었다(도 19b). PCA의 VA로의 전환을 추가로 증가시키기 위해, O-메틸화에 필요한 아데노실기가 ATP로부터 이루어질 수 있기 때문에, $HsOMT^{His}$에 의해 촉매된 O-메틸화는 산소 공급을 증가시킴으로써 향상되었다. 에어레이션을 개선하여 ATP 생성을 증가시키기 위해 VA-2b 시스템은 VA-2a 시스템에 사용되는 코니칼 튜브 대신 배플 플라스크를 사용하였다(도 19a). 결과적으로, 48시간 후 VA-2b에 의해 생성된 VA는 41.6 %의 몰 수율로 1.4 mM VA로 증가하였고(도 15c), 이는 코니칼 튜브를 사용하여 VA-2a 시스템에 의해 생성된 것보다 4.7배 높았다(도 15c, 15b). 에어레이션 증가로 인한 이러한 향상된 VA 생성은 글리세롤 및 메티오닌 소비 증가와 관련이 있다(도 16a-d). 따라서, 글리세롤이 효율적으로 대사되어 ATP를 생성하고, 따라서 S-아데노실기를 공급함으로써 메티오닌으로부터 SAM 합성을 가속화시키기 때문에 에어레이션은 PCA로부터 VA 생산을 증가시키는 데 중요하다. VA-2b 시스템에 의한 VA 생산은 GC/MS에 의해 확인되었다(도 19c 및 4e). 이러한 결과는 ATP로부터의 메티오닌 및 아데노실기의 개선된 공급에 의한

SAM 재생이 OMT에 의한 PCA의 O-메틸화에 중요하다는 것을 의미한다.

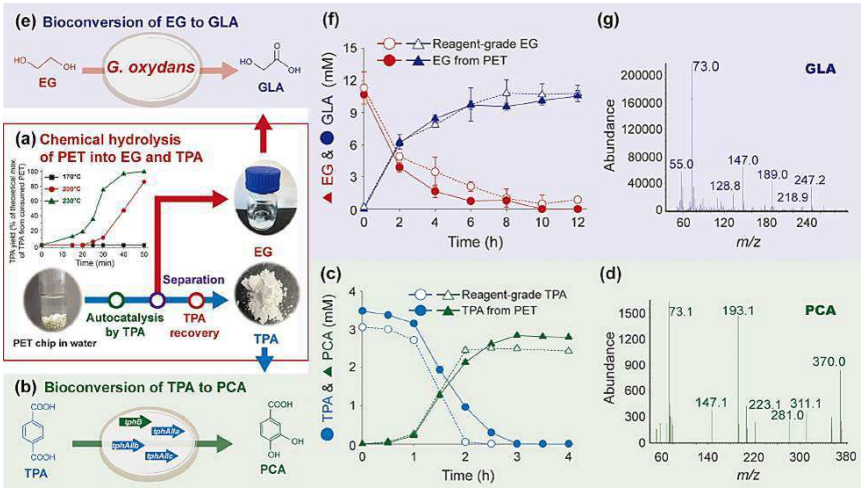
[0101] 그러나, VA-2b 시스템에서는 1.4 mM TPA가 전환되지 않은 상태로 유지되었다(도 15c). VA-2b 시스템에서 VA-2b 시스템에서 PCA-1 및 OMT-2^{His} 균주의 OD_{600} 값을 VA-2c 시스템에서 각각 10 및 30에서 20 및 20으로 조정하여 PCA로의 TPA 전환이 증가하여 이 문제를 해결하였다. 그러나, 48시간 후 VA 생산량은 0.4 mM VA로 감소한 반면 TPA는 완전히 소비되었다(도 15d). TPA에서 VA로의 전환을 증가시키기 위해, TPA에서 PCA로 및 PCA에서 VA로의 전환의 플럭스는 추가적인 최적화가 필요하다.

[0102] <실험예 9> EG의 GLA로의 생물변환

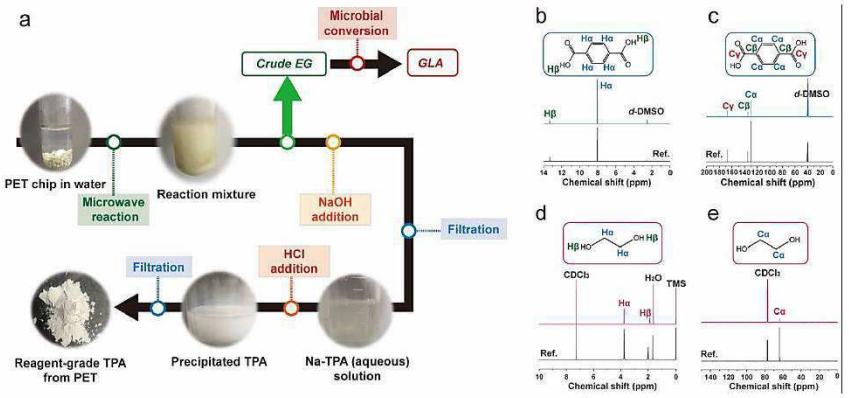
[0103] 폐 PET로부터의 공급 원료로서 EG의 적용 가능성을 실험적으로 검증하기 위해, PET 가수분해물로부터 얻어진 EG 샘플을 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109를 사용하여 시험하여 GLA를 생성하였다(도 1e 및 20). GLA는 화장품의 각질 제거제로 사용된다. 11.3, 28.6 및 67.6 mM EG의 시약 등급 샘플은 125.3일 후 95.3, 99.7 및 89.4%의 각 몰 수율로 GLA로 전환되었다(도 20b, 20c). PET 가수분해물로부터 10.7 mM EG의 샘플을 12시간 후에 98.6 %의 몰 수율로 GLA로 전환시켰다(도 1f). 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*)에 의한 GLA 생성은 GC/MS에 의해 확인되었다(도 1g 및 도 4f).

도면

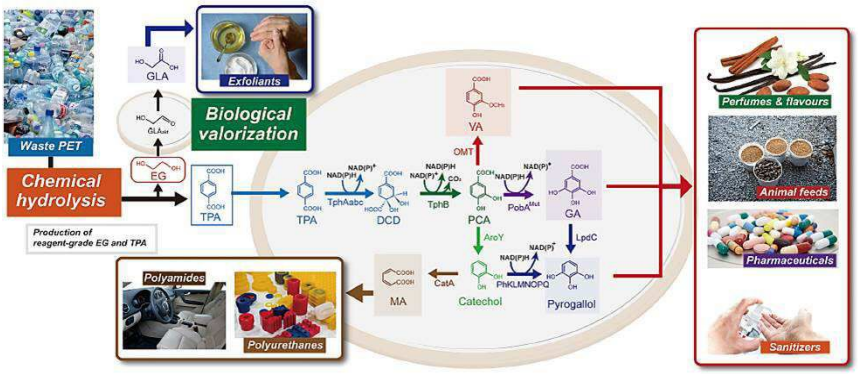
도면1



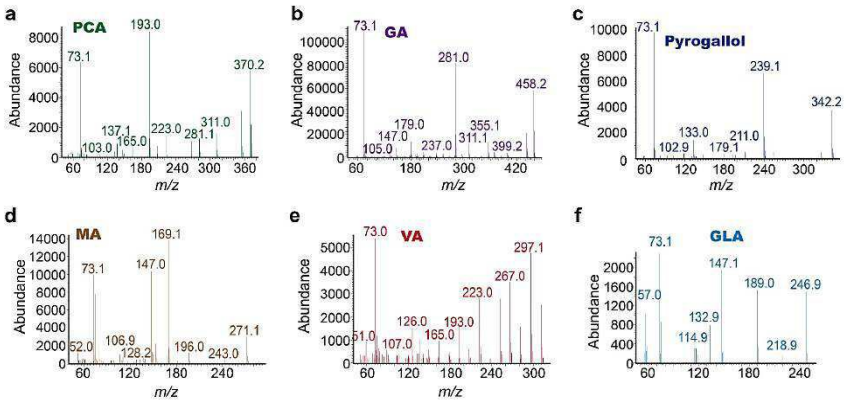
도면2



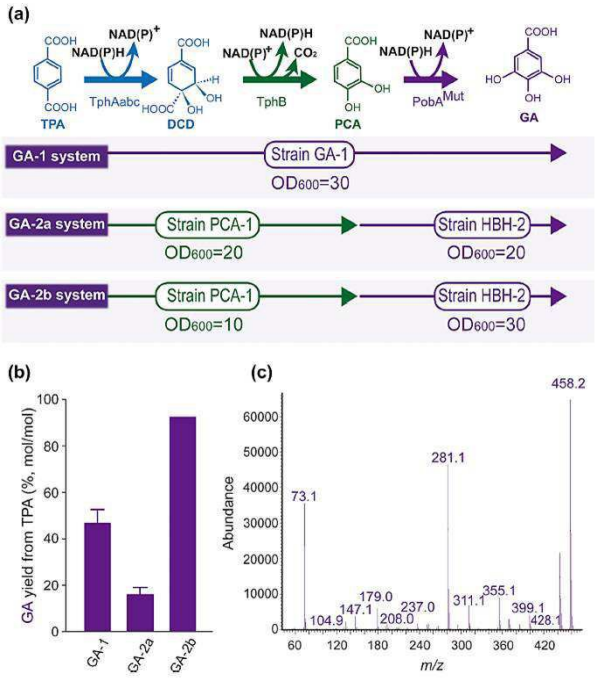
도면3


Waste PET
Chemical hydrolysis
Production of reagent-grade EG and TPA
GLA
EG
TPA
Exfoliants
Biological valorization
TphAabc
DCD
TphB
PCA
PobA^Mut
GA
VA
OMT
AroY
LpdC
Catechol
PhKLMNOPQ
Pyrogallol
CatA
MA
Polyamides
Polyurethanes
Perfumes & flavours
Animal feeds
Pharmaceuticals
Sanitizers

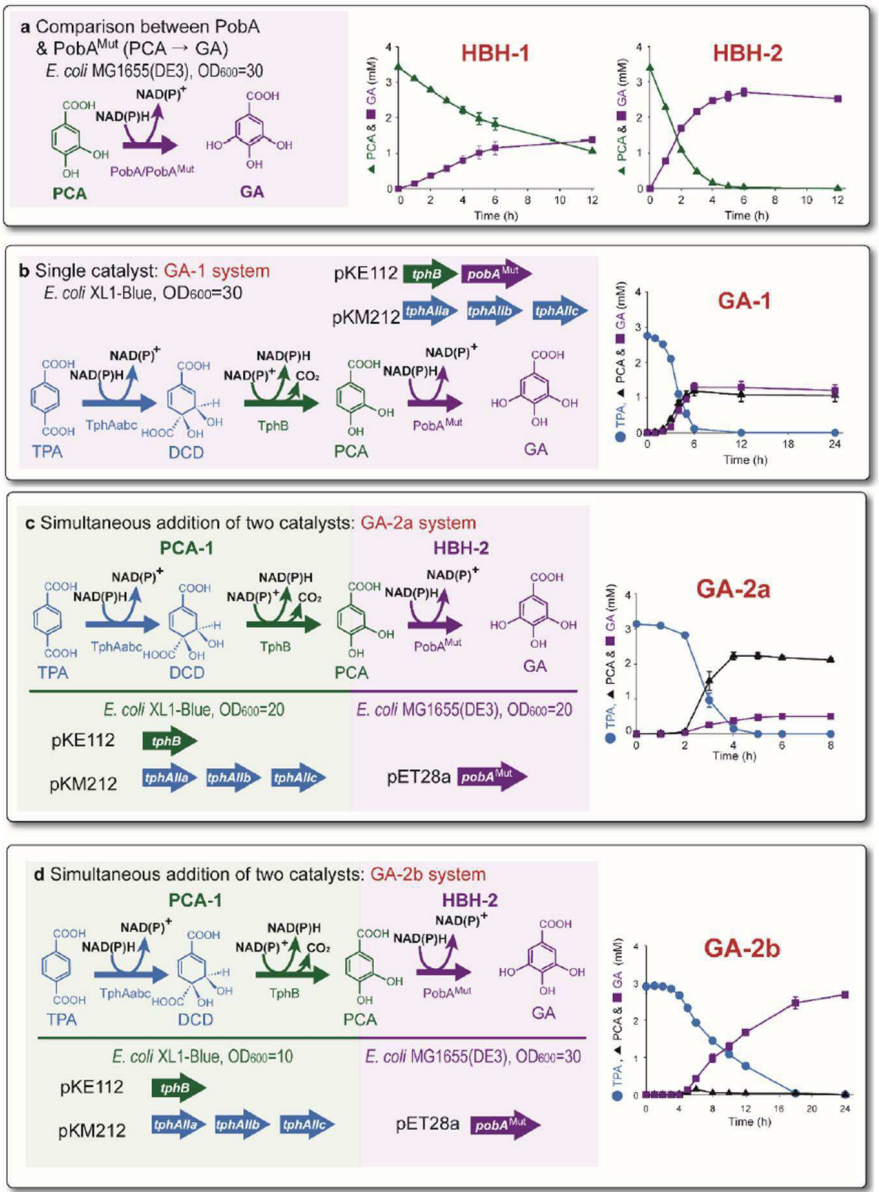
도면4


a
PCA
b
GA
c
Pyrogallol
d
MA
e
VA
f
GLA
Abundance
m/z

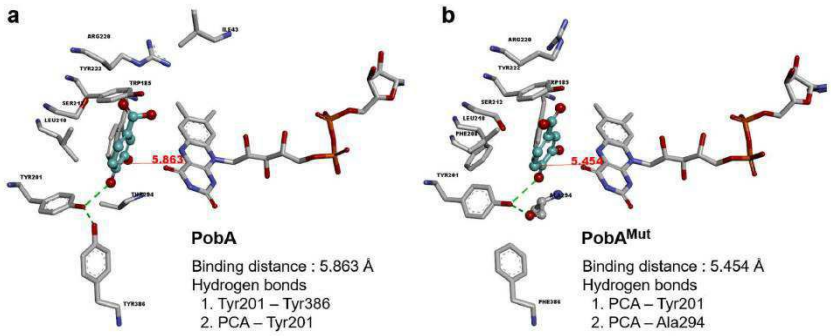
도면5


(a)
TPA
DCD
PCA
GA
TphAabc
TphB
PobA^Mut
GA-1 system
Strain GA-1
OD600=30
GA-2a system
Strain PCA-1
OD600=20
Strain HBH-2
OD600=20
GA-2b system
Strain PCA-1
OD600=10
Strain HBH-2
OD600=30
(b)
GA yield from TPA (%, mol/mol)
GA-1
GA-2a
GA-2b
(c)
Abundance
m/z

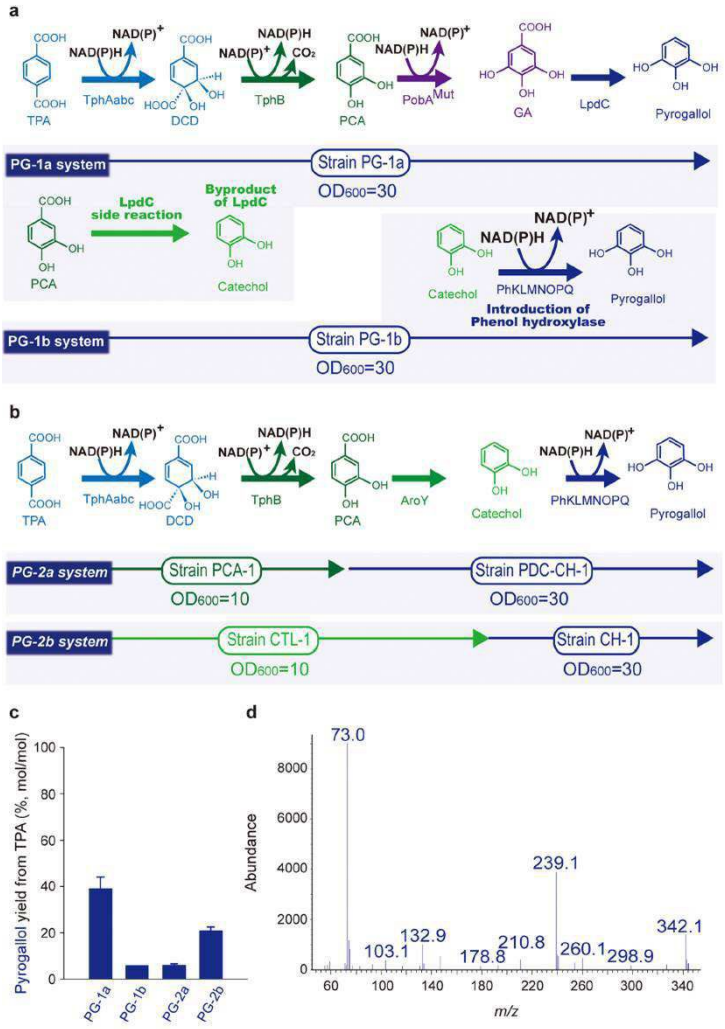
도면6


a Comparison between PobA & PobA^Mut (PCA → GA)
E. coli MG1655(DE3), OD600=30
NAD(P)+
NAD(P)H
PobA/PobA^Mut
PCA
GA
HBH-1
HBH-2
PCA & GA (mM)
Time (h)
b Single catalyst: GA-1 system
E. coli XL1-Blue, OD600=30
pKE112 tphB pobA^Mut
pKM212 tphAIIa tphAIIb tphAIIc
TphAabc
TphB
PobA^Mut
TPA
DCD
PCA
GA
GA-1
TPA, PCA & GA (mM)
c Simultaneous addition of two catalysts: GA-2a system
PCA-1
HBH-2
E. coli XL1-Blue, OD600=20
E. coli MG1655(DE3), OD600=20
pET28a pobA^Mut
GA-2a
d Simultaneous addition of two catalysts: GA-2b system
E. coli XL1-Blue, OD600=10
E. coli MG1655(DE3), OD600=30
GA-2b

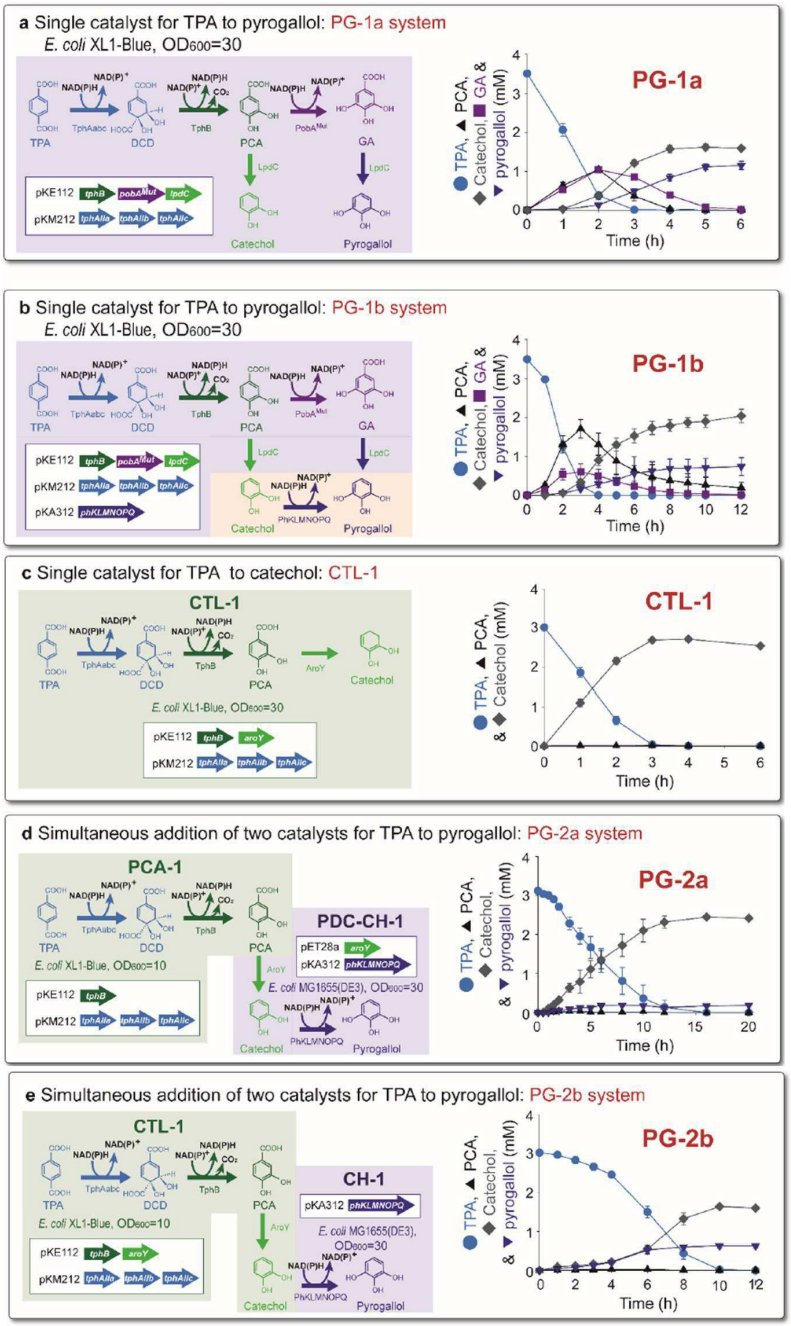
도면7


a
5.863
PobA
Binding distance : 5.863 Å
Hydrogen bonds
1. Tyr201 – Tyr386
2. PCA – Tyr201
b
5.454
PobA^Mut
Binding distance : 5.454 Å
Hydrogen bonds
1. PCA – Tyr201
2. PCA – Ala294

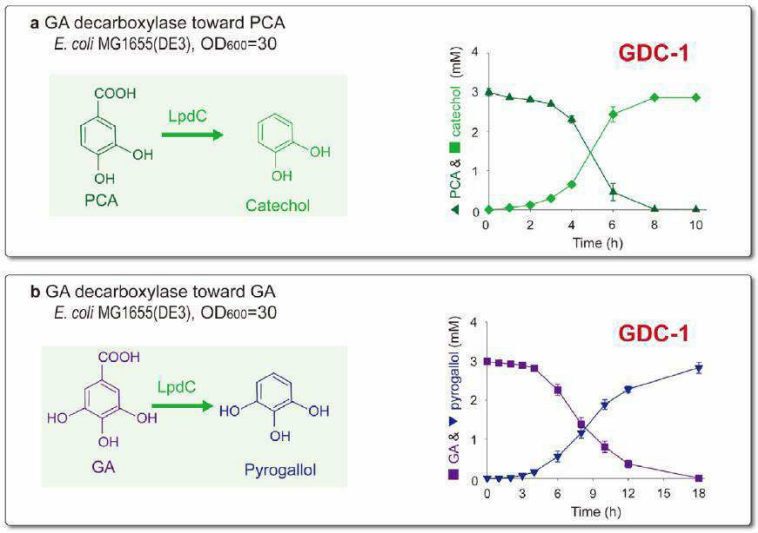
도면8


a
TPA
TphAabc
DCD
TphB
PCA
PobA Mut
GA
LpdC
Pyrogallol
PG-1a system
Strain PG-1a
OD600=30
LpdC side reaction
Byproduct of LpdC
Catechol
PhKLMNOPQ
Introduction of Phenol hydroxylase
PG-1b system
Strain PG-1b
OD600=30
b
AroY
PG-2a system
Strain PCA-1
OD600=10
Strain PDC-CH-1
OD600=30
PG-2b system
Strain CTL-1
OD600=10
Strain CH-1
OD600=30
c
Pyrogallol yield from TPA (%, mol/mol)
PG-1a
PG-1b
PG-2a
PG-2b
d
Abundance
m/z
73.0
239.1
342.1
132.9
103.1
210.8
178.8
260.1
298.9

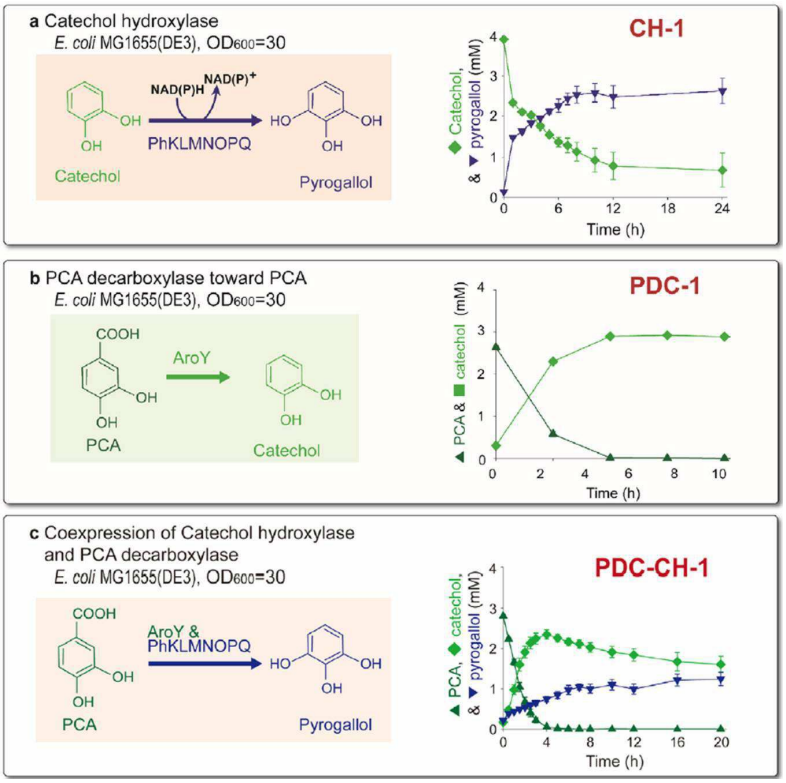
도면9


a Single catalyst for TPA to pyrogallol: PG-1a system
E. coli XL1-Blue, OD600=30
TPA
DCD
PCA
GA
Catechol
Pyrogallol
pKE112 tphB pobAMut lpdC
pKM212 tphAIa tphAIb tphAIc
PG-1a
TPA, ▲ PCA, ■ GA & ◆ Catechol, ▼ pyrogallol (mM)
Time (h)
b Single catalyst for TPA to pyrogallol: PG-1b system
E. coli XL1-Blue, OD600=30
pKA312 phKLMNOPQ
PG-1b
c Single catalyst for TPA to catechol: CTL-1
CTL-1
AroY
E. coli XL1-Blue, OD600=30
pKE112 tphB aroY
pKM212 tphAIa tphAIb tphAIc
TPA, ▲ PCA, & ◆ Catechol (mM)
d Simultaneous addition of two catalysts for TPA to pyrogallol: PG-2a system
PCA-1
E. coli XL1-Blue, OD600=10
PDC-CH-1
pET28a aroY
pKA312 phKLMNOPQ
E. coli MG1655(DE3), OD600=30
PG-2a
TPA, ▲ PCA, ■ Catechol, & ▼ pyrogallol (mM)
e Simultaneous addition of two catalysts for TPA to pyrogallol: PG-2b system
CH-1
PG-2b

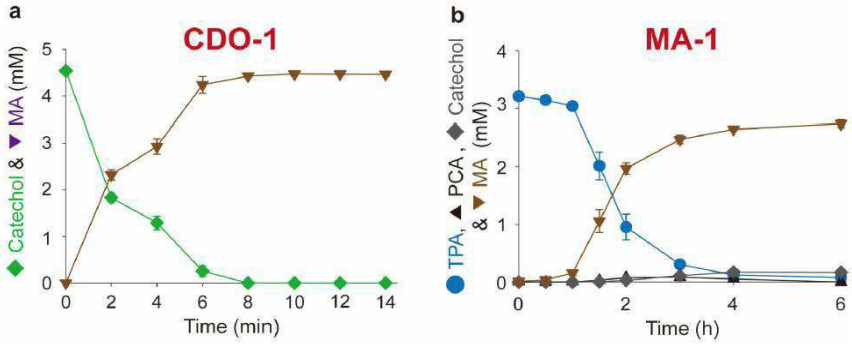
도면10


a GA decarboxylase toward PCA
E. coli MG1655(DE3), OD600=30
COOH
LpdC
OH
PCA
Catechol
GDC-1
PCA & catechol (mM)
Time (h)
b GA decarboxylase toward GA
E. coli MG1655(DE3), OD600=30
HO
GA
Pyrogallol
GDC-1
GA & pyrogallol (mM)
Time (h)

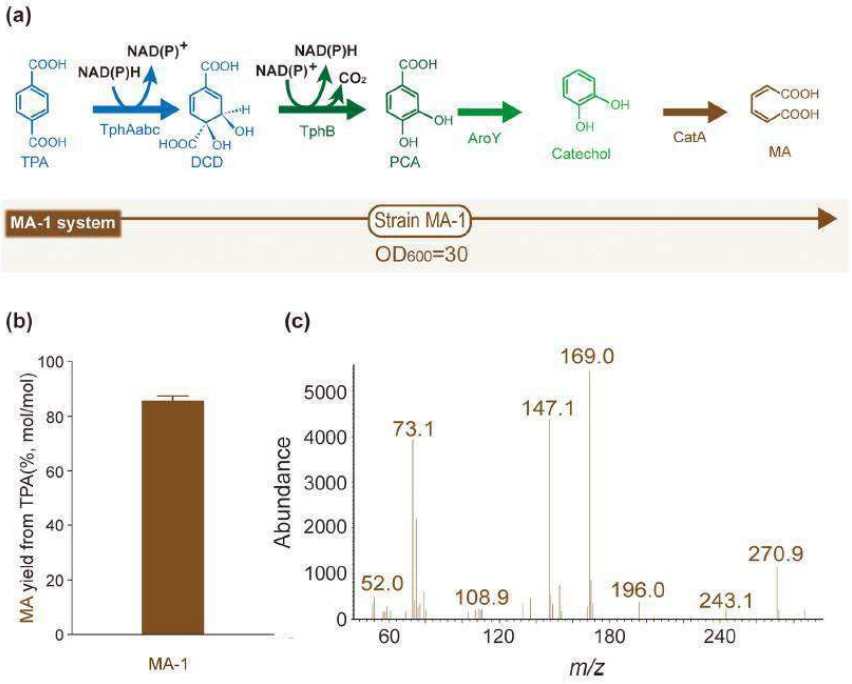
도면11


a Catechol hydroxylase
E. coli MG1655(DE3), OD600=30
NAD(P)H
NAD(P)+
PhKLMNOPQ
Catechol
Pyrogallol
CH-1
Catechol & pyrogallol (mM)
Time (h)
b PCA decarboxylase toward PCA
E. coli MG1655(DE3), OD600=30
AroY
PCA
Catechol
PDC-1
PCA & catechol (mM)
Time (h)
c Coexpression of Catechol hydroxylase and PCA decarboxylase
E. coli MG1655(DE3), OD600=30
AroY & PhKLMNOPQ
PCA
Pyrogallol
PDC-CH-1
PCA, catechol & pyrogallol (mM)
Time (h)

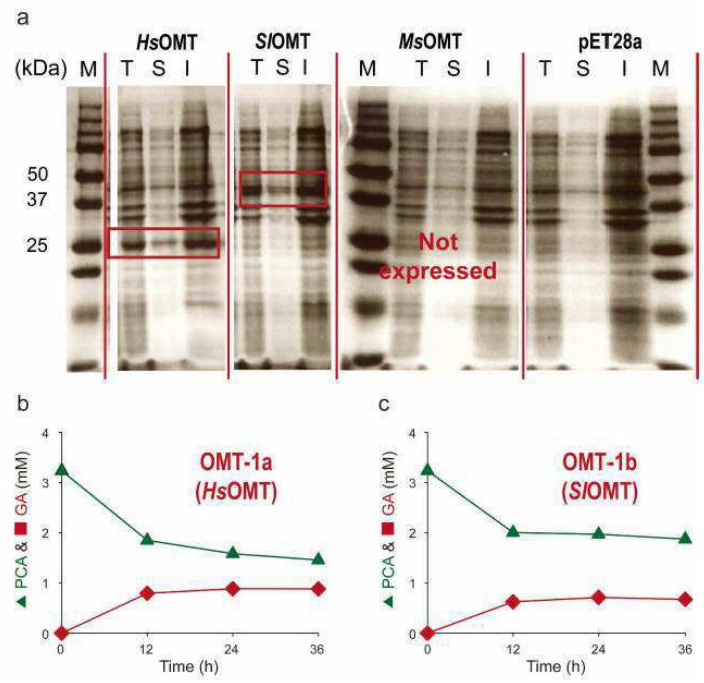
도면12


a
CDO-1
Catechol & ▼ MA (mM)
Time (min)
b
MA-1
TPA, ▲ PCA, ◆ Catechol & ▼ MA (mM)
Time (h)

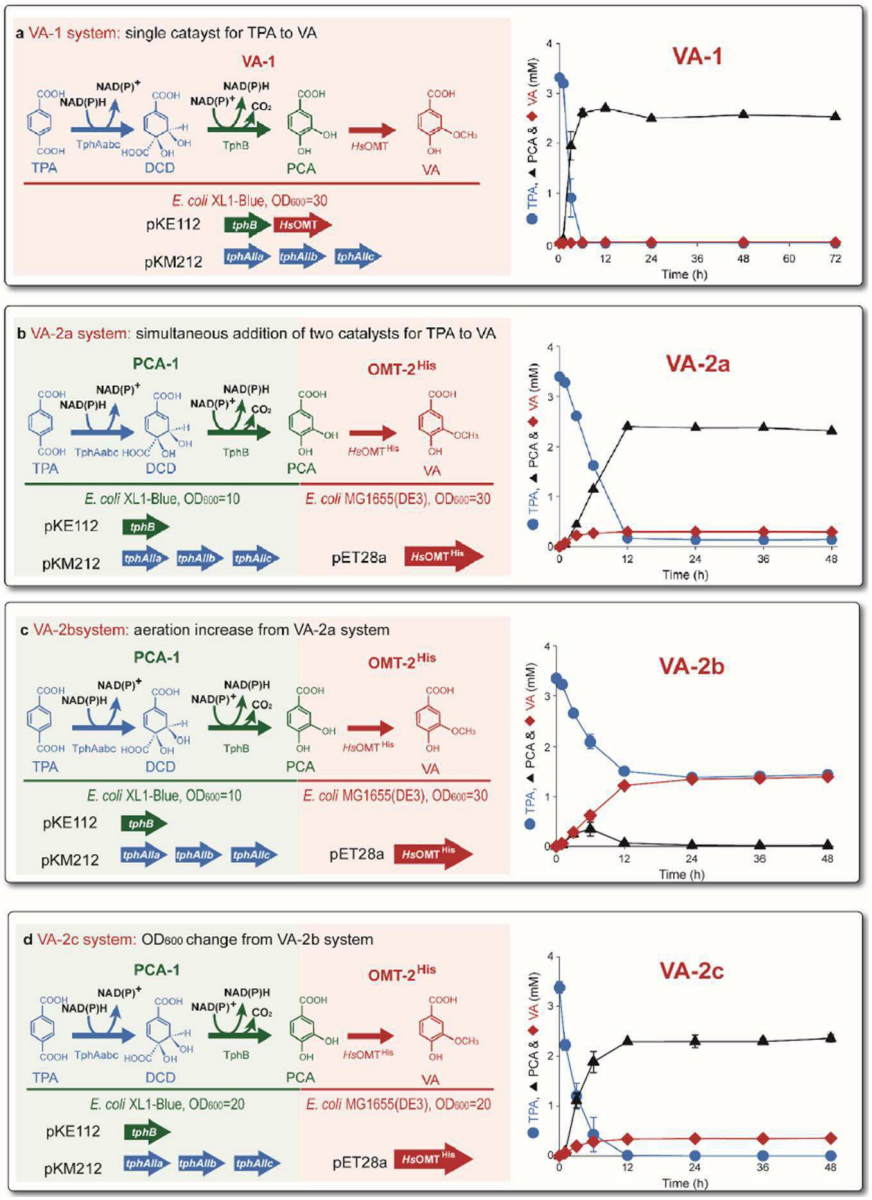
도면13


(a)
NAD(P)+
NAD(P)H
TphAabc
DCD
NAD(P)H
NAD(P)+
CO2
TphB
PCA
AroY
Catechol
CatA
MA
TPA
MA-1 system
Strain MA-1
OD600=30
(b)
MA yield from TPA(%, mol/mol)
MA-1
(c)
Abundance
m/z
169.0
147.1
73.1
270.9
52.0
108.9
196.0
243.1

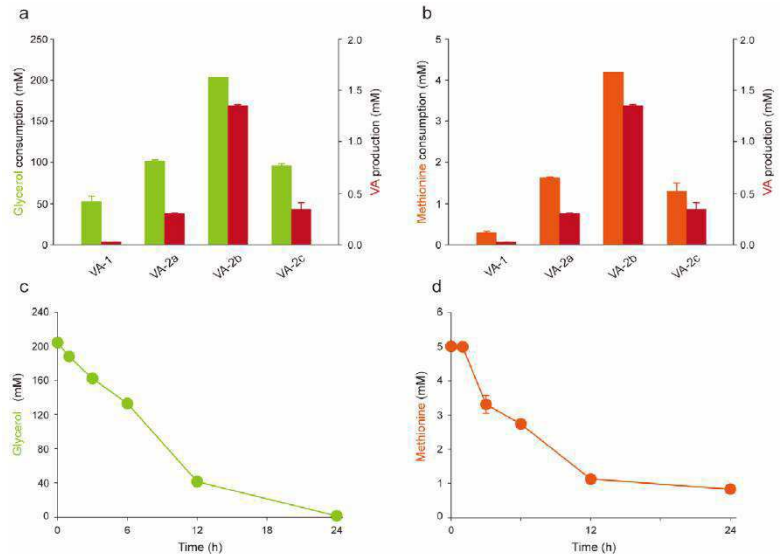
도면14


a
HsOMT
SlOMT
MsOMT
pET28a
(kDa) M T S I T S I M T S I T S I M
50
37
25
Not expressed
b
OMT-1a (HsOMT)
PCA & GA (mM)
Time (h)
c
OMT-1b (SlOMT)
PCA & GA (mM)
Time (h)

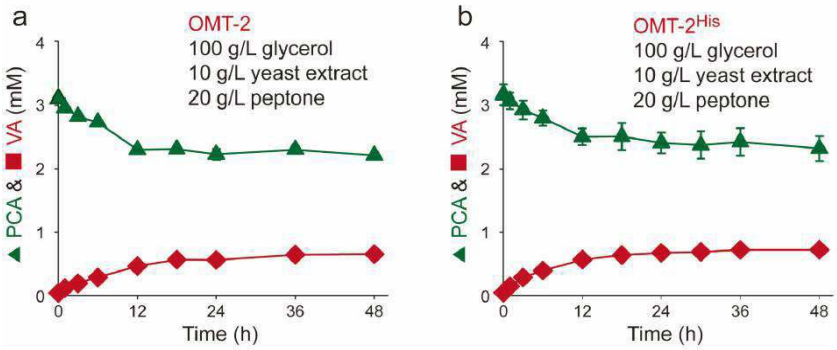
도면15


a VA-1 system: single catayst for TPA to VA
VA-1
TPA
DCD
PCA
VA
TphAabc
TphB
HsOMT
E. coli XL1-Blue, OD600=30
pKE112
tphB
HsOMT
pKM212
tphAIIa
tphAIIb
tphAIIc
VA-1
TPA, PCA & VA (mM)
Time (h)
b VA-2a system: simultaneous addition of two catalysts for TPA to VA
PCA-1
OMT-2His
HsOMTHis
E. coli XL1-Blue, OD600=10
E. coli MG1655(DE3), OD600=30
pET28a
VA-2a
c VA-2bsystem: aeration increase from VA-2a system
VA-2b
d VA-2c system: OD600 change from VA-2b system
E. coli XL1-Blue, OD600=20
E. coli MG1655(DE3), OD600=20
VA-2c

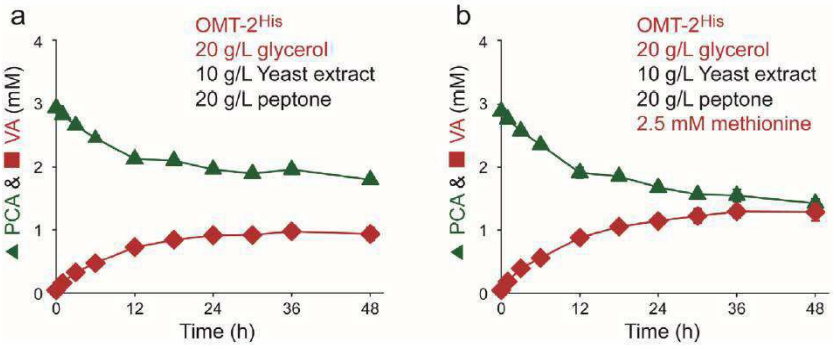
도면16



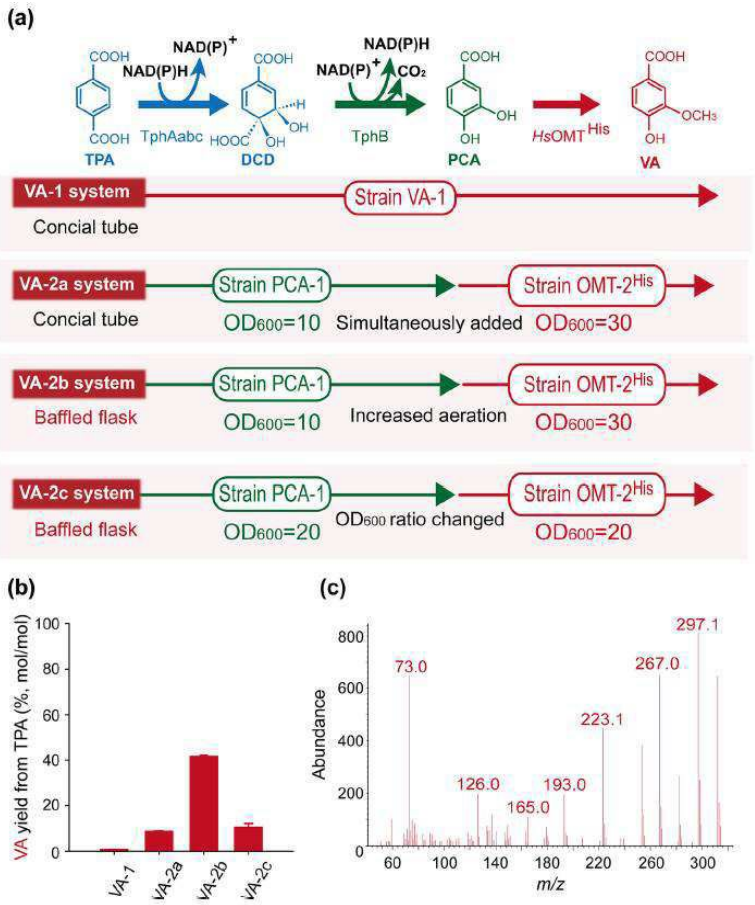
도면17



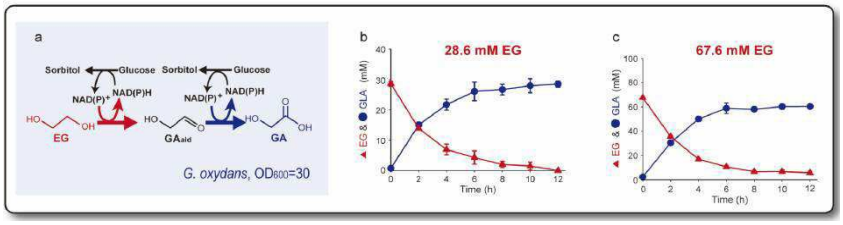
도면18



도면19



도면20



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY

EWHA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> Synthesis of high-value products from polyethylene terephthalate

<130> X19U13C0298

<150> KR 10-2019-0040992

<151> 2019-04-08

<160> 35

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1011

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tphAa

<400> 1

atgaaccacc agatccatat ccacgactcc gatatcgcgt tcccctgcgc gcccgggcaa 60

tccgtactgg atgcagctct gcaggccggc atcgagctgc cctattcctg ccgcaaaggt 120

agctgtggca actgtgcgag tacgctgctc gacggaaata ttgcctcctt caatggcatg 180

gccgtgcgaa acgaactctg cgcctcggaa caagtgctgc tgtgcggctg cactgcagcc 240

agcgatatac gtatccaccc gagctccttt cgccgtctcg acccggaagc ccgaaaacgt 300

tttacggcca aggtgtacag caatacactg gcggcacccg atgtctcgct gctgcgcctg 360

cgcctgcctg tgggcaagcg cgccaaattt gaagccggcc aatacctgct gattcacctc 420

gacgacgggg aaagccgcag ctactctatg gccaatccac cccatgagag cgatggcatc 480

acattgcatg tcaggcatgt acctggtggt cgcttcagca ctatcgttca gcagttgaag 540

tctggtgaca cattggatat cgaactgcca ttcggcagca tcgcactgaa gcctgatgac 600

gcaaggcccc tgatttgcgt tgcgggtggc acgggatttg cgcccattaa atccgttctt 660

gatgacttag ccaaacgcaa ggttcagcgc gacatcacgc tgatctgggg ggctcgcaac 720

ccctcgggcc tgtatcttcc tagcgccatc gacaagtggc gcaaagtctg gccacagttt 780

cgctacattg cagccatcac cgacctaggc gatatgcctg cggatgctca cgcaggtcgg 840

gtggatgacg cgctacgcac tcactttggc aacctgcacg atcatgtggt gcactgctgt 900

ggctcaccag ctctggttca atcagtgcgc acagccgctt ccgatatggg cctgcttgca 960

caggacttcc acgcggatgt ttttgcgaca ggcccgactg gtcaccacta g 1011

<210> 2

<211> 1242

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tphAb

<400> 2

atgcaagaat ccatcatcca gtggcatggg gccactaata cgcgcgtgcc ttttggtatc 60

tataccgaca cagccaatgc tgatcaggaa cagcagcgca tctatcgcgg cgaggtctgg 120

aactacttgt gcctggaatc tgaaattccc ggggccggtg atttccgcac tacctttgcc 180

ggtgaaacac cgatagttgt cgtacgggat gccgaccagg aaatctacgc cttcgagaac 240

cgctgcgcgc atcgcggcgc tctcatcgct ctggagaaat cgggccgtac ggatagtttc 300
cagtgcgtct atcacgcctg gagctacaac cgacagggag atctgaccgg cgttgccttc 360
gagaaaggtg tcaagggcca gggtggcatg ccggcctcat tctgcaaaga agagcatggc 420
ccgcgcaagc tccgcgtggc tgtcttttgc ggtttggtct ttggcagttt ttccgaggac 480
gtgcccagca ttgaggatta ccttggccct gagatttgcg agcgcataga gcgcgtgctg 540
cacaagcccg tagaagtcat cggtcgcttc acgcaaaagc tgcctaacaa ctggaagctc 600
tacttcgaga acgtgaagga cagctatcac gccagcctcc tgcatatgtt cttcaccacc 660

ttcgagctga atcgcctctc acaaaaaggc ggtgtcatcg tcgacgagtc gggtggccac 720
catgtgagct attccatgat cgatcgcggc gccaaagacg actcgtacaa ggaccaggcc 780
atccgctccg acaacgagcg ttaccggctc aaagatccta gccttctaga gggctttgag 840
gagttcgagg acggcgtgac cctgcagatc ctttctgtgt tccctggctt tgtgctgcag 900
cagattcaga acagcatcgc cgtgcgtcag ttgctgccca agagcatctc cagctcggaa 960
ctcaactgga cctatcttgg ctatgcagat gacagtgccg agcaacgcaa ggtcagactc 1020
aaacaggcca accttatcgg cccggccgga ttcatttcca tggaagacgg agctgtcggt 1080

ggattcgtgc agcgtggcat cgcaggcgct gccaaccttg atgcagtcat cgagatgggc 1140
ggagaccacg aaggctctag cgagggccgc gccacggaaa cctcggtacg cggcttttgg 1200
aaggcctacc gcaagcatat gggacaggag atgcaagcat ga 1242

<210> 3
<211> 465
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> tphAc
<400> 3

atgatcaatg aaattcaaat cgcggccttc aatgccgcct acgcgaagac catagacagt 60
gatgcaatgg agcaatggcc aacctttttc accaaggatt gccactattg cgtcaccaat 120
gtcgacaacc atgatgaggg acttgctgcc ggcattgtct gggcggattc gcaggacatg 180

ctcaccgacc gaatttctgc gctgcgcgaa gccaatatct acgagcgcca ccgctatcgc 240
catatcctgg gtctgccttc gatccagtca ggcgatgcaa cacaggccag cgcttccact 300
ccgttcatgg tgctgcgcat catgcataca ggggaaacag aggtctttgc cagcggtgag 360
tacctcgaca aattcaccac gatcgatggc aagttacgtc tgcaagaacg catcgcggtt 420

tgcgacagca cggtgacgga cacgctgatg gcattgccgc tatga 465

<210> 4

<211> 948

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tphB

<400> 4

atgacaatag tgcaccgtag attggctttg gccatcggcg atccccacgg tattggccca 60

gaaatcgcac tgaaagctct ccagcagctg tctgtcaccg aaaggtctct tatcaaggtc 120

tatggacctt ggagcgctct cgagcaagcc gcacgggttt gcgaaatgga gccgcttctt 180

caagacatcg ttcacgagga agccggcaca cttacacaac cagttcaatg gggagaaatc 240

accccgcagg ctggtctatc tacggtgcaa tccgcaacag cggctatccg agcgtgcgaa 300

aacggcgaag tcgatgccgt cattgcctgc cctcaccatg aaacggccat tcaccgcgca 360

ggcatagcgt tcagcggcta cccatctttg ctcgccaatg ttcttggcat gaacgaagac 420

caggtattcc tgatgctggt gggggctggc ctgcgcatag tgcatgtcac tttgcatgaa 480

agcgtgcgca gcgcattgga gcggctctct cctcagttgg tggtcaacgc ggcgcaggct 540

gccgtgcaga catgcacctt actcggagtg cctaaaccaa aagtcgctgt attcgggatc 600

aaccctcatg catctgaagg acagttgttc ggcctggagg actcccagat caccgttccc 660

gctgtcgaga cactgcgcaa gcgcggccta gcagtagacg gccccatggg agctgacatg 720

gttctggcac agcgcaagca cgacctgtat gtagccatgc tgcacgatca gggccatatc 780

cccatcaagc tgctggcacc taacggagcc agcgcactat ctatcggtgg cagggtggtg 840

ctttccagcg tgggccatgg cagcgccatg gacattgccg gccgtggcgt ggctgacgcc 900

acggccctcc tacgcacaat agccctactc ggagcccaac cggtctga 948

<210> 5

<211> 1095

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S1OMT

<400> 5

atgggatcga cagcaaatat ccagttagca acacaatcgg aagacgaaga gcgtaattgc 60

acgtacgcca tgcaactact ctcatcgtca gtgcttccct tcgttttgca ctcaactatc 120

caattggatg tttttgacat actcgcaaaa gataaagccg ccactaaact atctgcttta 180

gaaattgtgt ctcacatgcc taactgtaag aaccctgatg ccgctaccat gctagaccgg 240

atgctttatg tcctagctag ttattcttta ctcgattgct cggttgttga agagggaaat 300

ggggtgaccg aaaggcgcta tggtctgtca cgagtgggga aatttttgt acgtgatgaa 360

gatggtgcat ccatgggacc attgttggct ttgcttcaag ataaagtatt cattaacagc 420

tggtttgaac taaaagatgc agtacttgaa ggtggagttc catttgacag ggtgcatggt 480

gtacatgcat ttgaatatcc aaaattggac ccaaagttca atgatgtttt caaccaggca 540

atgataaacc acacaactgt tgtcatgaaa agaatacttg aaaattacaa aggttttgag 600

aatctcaaaa ctttggttga tgttggaggt ggtcttggtg ttaatctcaa gatgattaca 660

tctaaatacc ccacaattaa gggcactaat tttgatttgc ctcatgttgt tcaacatgca 720

ccttcctatc ctggggtgga tcatgttggg ggagatatgt ttgaaagtgt tccacaagga 780

gatgctattt ttatgaagtg gattcttcat gactggagtg atggtcactg cctcaaattg 840

ctgaagaact gtcataaggc tctaccggac aacggaaagg tgattgttgt ggaggccaat 900

ctaccagtga aacctgatac tgataccaca gtggttggag tttcacaatg tgatttgatc 960

atgatggctc agaatcccgg aggtaaagag cgttctgaac aggagtttcg ggcattggca 1020

agtgaagctg gattcaaagg tgttaaccta atatgttgtg tctgtaattt ttgggtcatg 1080

gaattttaca agtag 1095

<210> 6

<211> 671

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HsOMT

<400> 6

atgggcgata ccaaagaaca gcgtattctg aatcatgttc tgcagcatgc cgaaccgggt 60

aatgcacaga gcgttctgga agcaattgat acctattgtg aacagaaaga atgggccatg 120

aatgtgggtg ataaaaaagg caaaattgtg gatgccgtga tccaagaaca tcagccgagc 180

gtgctgctgg aactgggtgc atattgtggt tatagcgcag ttcgtatggc acgtctgctg 240

agtccgggtg cacgtctgat taccattgaa attaacccgg attgtgcagc aattacccag 300

cgtatggttg attttgccgg tgttaaagat aaagttaccc tggttgttgg tgcaagccag 360

gatattattc cgcagctgaa aaaaaaatat gacgtggata ccctggatat ggtgtttctg 420

gatcattgga aagatcgtta tctgccggat accctgctgc tggaagaatg tggtctgctg 480

cgtaaaggca ccgttctgct ggcagataat gttatttgtc ctggtgcacc ggattttctg 540

gcacatgttc gtggtagcag ctgttttgaa tgtacccatt atcagtcctt tctggaatat 600

cgtgaagttg ttgatggtct ggaaaaagcc atctataaag gtccgggtag cgaagcaggt 660

ccgtaactta a 671

<210> 7

<211> 1098

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MsOMT

<400> 7

atgggttcaa caggtgaaac tcaaataaca ccaacccaca tatcagatga agaagcaaac 60

ctcttcgcca tgcaactagc aagtgcttca gttcttccca tgattttgaa atcagctctt 120

gaacttgatc tcttagaaat cattgctaaa gctggacctg gtgctcaaat ttcacctatt 180

gaaattgctt ctcagctacc aacaactaac cctgatgcac cagttatgtt ggaccgaatg 240

ttgcgtctct tggcttgtta cataatcctc acatgttcag ttcgtactca acaagatgga 300

aaggttcaga gactttatgg tttggctact gttgctaagt atttggttaa gaatgaagat 360

ggtgtatcca tttctgctct taatctcatg aatcaggata aagtgctcat ggaaagctgg 420

tatcacctaa aagatgcagt ccttgatggg ggcattccat tcaacaaggc ttatggaatg 480

acagcctttg aataccatgg aacagatcca aggtttaaca aggttttcaa caaggggatg 540

tctgatcact ctaccatcac aatgaagaaa attcttgaga cctacacagg ttttgaaggc 600

cttaaatctc ttgttgatgt aggtggtggt actggagctg taattaacac gattgtctca 660

aaatatccca ctataaaggg tataaatttt gatttacccc atgtcattga agatgctcca 720

tcttatccag gagttgagca tgttggtgga gacatgtttg tcagtattcc aaaggctgat 780

gctgttttta tgaagtggat ttgtcatgac tggagtgatg agcactgctt gaaatttttg 840

aagaactgct atgaggcact gccagacaat ggaaaagtga ttgtggcaga atgcatactt 900

ccagtggctc cagattcaag cctggccaca aaaggtgtgg ttcacattga tgtgatcatg 960

ttggctcata atcctggtgg gaaagagaga acacaaaaag agtttgagga tcttgccaaa 1020

ggtgctggat tccaaggttt caaagtccat tgtaatgctt tcaacacata catcatggag 1080

tttcttaaga aggtttaa 1098

<210> 8

<211> 1188

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pobA

<400> 8

atgaaaactc aggttgcaat tattggtgca ggtccgtctg gcctgctgct gggccagctg 60

ctgcacaagg ccggtatcga taacatcatc gtcgaacgcc agactgccga gtacgtacta 120

ggccgcatcc gcgccggggt gctagagcaa ggcacggtcg acctgctgcg cgaggctggc 180

gtggccgagc gcatggaccg tgaaggcctg gtgcacgagg gggttgaact gctggttggc 240

gggcgccgcc agcgtctgga tctcaaagcc ctgaccggcg gcaagacggt gatggtctac 300

ggccagaccg aagtcacccg tgacctgatg caggcccgcg aagccagtgg tgcgccgatc 360

atttattcag ccgccaacgt tcagccgcat gaattgaaag gcgagaagcc ctacctgacg 420

ttcgaaaagg atggccgggt gcagcggatt gactgcgact atatcgccgg ctgcgacggc 480

ttccacggta tctcgcggca gagcatcccg gagggcgtgc tgaaacagta tgagcgggtt 540

tacccgtttg gctggctggg cctgctgtcg gacacaccgc cagtcaatca cgagttgatc 600

tacgcccacc atgagcgcgg tttcgcgttg tgtagccaac gctcgcaaac acgcagccgc 660

tactatctgc aggtgccttt gcaggatcgg gtcgaggagt ggtctgacga gcgtttctgg 720

gacgaactga aagcccgtct gcccgccgag gtggcggcgg acctggtcac aggccccgcg 780

ttggaaaaaa gtattgcgcc gctgcgtagc ctggtggtcg aacccatgca gtatggtcac 840

ctgttcctgg tgggggacgc ggcgcacatc gtccccccta cgggtgccaa aggccttaac 900

ctggcggcct ccgacgtcaa ctacctgtac cgcattctgg tcaaggtgta ccacgaaggg 960

cgcgtcgacc tgcttgcgca atactcgccg ctggcactgc gccgcgtgtg gaagggcgag 1020

cgcttcagct ggttcatgac ccaactgctg catgacttcg gtagccacaa ggacgcctgg 1080

gaccagaaga tgcaggaagc tgaccgcgag tacttcctga cctcgccggc gggcctggtg 1140

aacattgccg agaactatgt ggggctgccg ttcgaggaag ttgcctga 1188

<210> 9

<211> 1188

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pobAMut

<400> 9

atgaaaactc aggttgcaat tattggtgca ggtccgtctg gcctgctgct gggccagctg 60

ctgcacaagg ccggtatcga taacatcatc gtcgaacgcc agactgccga gtacgtacta 120

ggccgcatcc gcgccggggt gctagagcaa ggcacggtcg acctgctgcg cgaggctggc 180

gtggccgagc gcatggaccg tgaaggcctg gtgcacgagg gggttgaact gctggttggc 240

gggcgccgcc agcgtctgga tctcaaagcc ctgaccggcg gcaagacggt gatggtctac 300

ggccagaccg aagtcacccg tgacctgatg caggcccgcg aagccagtgg tgcgccgatc 360

atttattcag ccgccaacgt tcagccgcat gaattgaaag gcgagaagcc ctacctgacg 420

ttcgaaaagg atggccgggt gcagcggatt gactgcgact atatcgccgg ctgcgacggc 480

ttccacggta tctcgcggca gagcatcccg gagggcgtgc tgaaacagta tgagcgggtt 540

tacccgtttg gctggctggg cctgctgtcg gacacaccgc cagtcaatca cgagttgatc 600

tacgcccacc atgagcgcgg tttcgcgttg tgtagccaac gctcgcaaac acgcagccgc 660

tactacctgc aagtgccttt gcaggatcgg gtcgaggagt ggtctgacga gcgtttctgg 720

gacgaactga aagcccgtct gcccgccgag gtggcggcgg acctggtcac aggccccgcg 780

ttggaaaaaa gtattgcgcc gctgcgtagc ctggtggtcg aacccatgca gtatggtcac 840

ctgttcctgg tgggggacgc ggcgcacatc gtccccccctg cgggtgccaa aggccttaac 900

ctggcggcct ccgacgtcaa ctacctgtac cgcattctgg tcaaggtgta ccacgaaggg 960

cgcgtcgacc tgcttgcgca atactcgccg ctggcactgc gccgcgtgtg gaagggcgag 1020

cgcttcagct ggttcatgac ccaactgctg catgacttcg gtagccacaa ggacgcctgg 1080

gaccagaaga tgcaggaagc tgaccgcgag tacttcctga cctcgccggc gggcctggtg 1140

aacattgccg agaactttgt ggggctgccg ttcgaggaag ttgcctga 1188

<210> 10

<211> 1488

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aroY

<400> 10

atgcagaacc cgatcaacga cctgcgctcc gcgatcgcgc tgctgcaacg ccatccgggt 60

cactacatcg aaaccgacca cccggtcgac ccgaacgccg aactggccgg tgtgtaccgc 120

cacatcggtg cgggtggcac cgtgaaacgt ccgacccgca ccggtccagc catgatgttc 180

aacagcgtga agggctaccc aggcagccgc atcctggtgg gcatgcacgc cagccgtgaa 240

cgtgccgccc tgctgctggg ctgcgtgcca agcaaactgg cgcagcacgt gggccaggcc 300

gtgaagaacc cggtggcccc agtggtggtg ccagccagcc aagccccatg ccaagaacag 360

gtgttctacg ccgacgaccc ggacttcgac ctgcgcaagc tgctgccagc cccaaccaac 420

accccgatcg atgccggtcc gttcttctgc ctgggcctgg tgctggcgag cgacccggaa 480

gataccagcc tgaccgacgt gaccatccac cgcctgtgcg tgcaagagcg cgacgagctg 540

agcatgttcc tggccgccgg tcgccacatc gaggtgttcc gcaagaaggc cgaagccgcc 600

ggtaagccgc tgccggtgac catcaacatg ggcctggacc cagccatcta catcggtgcc 660

tgcttcgaag cgccaaccac cccgttcggc tacaacgagc tgggtgtggc cggtgccctg 720

cgtcagcaac cggtggaact ggtgcagggc gtggccgtga aagagaaggc gatcgcgcgt 780

gccgagatca tcatcgaggg cgaactgctg ccaggcgtgc gcgtgcgcga agatcagcac 840

accaacaccg gtcacgccat gccggaattc ccaggctact gcggtgaggc caacccgagc 900

ctgccggtga tcaaggtgaa ggccgtgacc atgcgcaacc acgccatcct gcagaccctg 960

gtgggtccgg gtgaggaaca caccaccctg gcgggtctgc cgaccgaagc cagcatccgc 1020

aacgccgtgg aagaggcgat cccaggcttc ctgcagaacg tgtacgccca caccgccggt 1080

ggcggtaagt tcctgggcat cctgcaggtc aagaagcgcc agccgagcga cgaaggccgt 1140

cagggccaag ccgccctgat cgccctggcc acctacagcg agctgaagaa catcatcctg 1200

gtggacgagg acgtggacat cttcgacagc gacgacatcc tgtgggccat gaccacccgc 1260

atgcagggcg acgtgagcat caccaccctg ccaggcatcc gtggccatca gctggacccg 1320

agccagagcc cagactacag caccagcatc cgtggcaacg gcatcagctg caagaccatc 1380

ttcgactgca ccgtgccgtg ggccctgaaa gcccgtttcg agcgtgcccc attcatggaa 1440

gtggacccga ccccgtgggc cccagagctg ttcagcgaca agaagtaa 1488

<210> 11

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lpdC

<400> 11

atggcagaac aaccatggga tttgcgtcgc gtgcttgatg agatcaagga tgatccaaag 60

aactatcatg aaactgacgt cgaagttgat ccaaatgcgg aactttctgg tgtttatcgg 120

tatatcggtg ctggtgggac cgttcaacgg ccaacgcaag agggtccagc aatgatgttt 180

aacaacgtta aggggtttcc tgatacgcgg gtcttgactg gattgatggc gagtcgccgg 240

cgcgttggta agatgttcca ccacgattat cagacgttag ggcaatactt gaacgaagca 300

gtctctaatc cagtggcgcc agaaacggtt gctgaagcgg atgcgccagc tcacgatgtc 360

gtttataaag cgacggatga aggctttgat attcgtaagt tagtggcagc accaacgaat 420

acgccccaag atgctggacc atatattacg gtcggtgtgg tgtttggctc aagcatggac 480

aagtctaaga gtgatgtgac gattcaccga atggtccttg aagataagga taagttaggg 540

atttatatca tgcctggcgg tcggcacatt ggtgcgtttg cggaagagta tgagaaagct 600

aacaagccaa tgccaattac aattaatatt ggtttagatc cagccattac gattggtgca 660

actttcgaac caccgaccac gccattcggt tataacgaat taggtgttgc tggtgcgatt 720

cggaaccaag ctgttcaatt agttgacggg gtgaccgtcg atgaaaaggc gattgcgcgt 780

tctgaatata cgcttgaggg gtacattatg cctaacgaac gtattcagga agatatcaat 840

acgcatacgg gcaaggcgat gcctgaattt ccgggttatg atggtgacgc caacccagct 900

ttacaagtga ttaaggtgac ggcggtgact catcggaaga atgccatcat gcaaagcgtg 960

attggaccat ccgaagaaca tgtcagcatg gcgggcattc caactgaagc tagtatctta 1020

caattggtta accgtgccat tcctggtaaa gtgacgaatg tttataatcc gccggctggt 1080

ggtggtaagt tgatgaccat catgcagatt cacaaggata atgaagcgga tgaaggcatt 1140

caacggcaag ctgccttgct tgcgttctca gcctttaagg aattgaagac tgttatcctg 1200

gttgatgaag atgttgatat ttttgatatg aatgatgtga tttggacgat gaatacccgt 1260

ttccaagccg atcaggactt gatggtctta tcaggcatgc ggaatcatcc gttggaccca 1320

tcggaacgcc cacaatatga tccaaagtcg attcgtttcc gtgggatgag ttctaaacta 1380

gtgattgatg gcaccgtacc attcgatatg aaggaccaat ttgaacgggc ccaattcatg 1440

aaagtggctg actgggagaa gtatttgaag taa 1473

<210> 12

<211> 261

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phK

<400> 12

atgacaactc aaccggaaac caaatccttt gaagagctga cccgatacat ccgagtgcgc 60

agtgagccgg gcgacaagtt cgtggaattc gacttcgcca ttgcttaccc cgagctcttc 120

gttgagctcg tgctgcctca cgaggccttc gagattttct gcaaacataa caaagtcgtc 180

cacatggact ccaacataat ccgcaaaatt gacgaagaca tggtcaagtg gcggttcgga 240

gagcatggca agcgctactg a 261

<210> 13

<211> 1002

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phL

<400> 13

atgagtattg aaatcaagac caattcggtg gaacctatcc gccatactta tggccacatc 60

gcccgtcgct tcggtgataa gccggctacc cgttatcagg aggccagcta cgacattgag 120

gcaaagacca atttccatta ccggccccag tgggattccg agcacaccct gaacgatccc 180

acgcgtaccg ccatccgcat ggaagactgg tgcgccgttt ccgatccccg ccagttttac 240

tatggcgcct atgtcggcaa ccgggccaag atgcaggagt cggccgagac cagctttggc 300

ttctgcgaaa agcgtaatct gctgacccgc ctttccgaag aaacccagaa gcaattgttg 360

cggctgctgg tgcccctgcg tcatgtcgag cttggcgcca acatgaacaa cgccaagatc 420

gccggtgatg ccaccgccac gaccgtctcc cagatgcaca tctacactgg gatggatcgc 480

ttgggcattg gccagtacct gtcccgtatt gcattgatga ttgatggcag caccggtgcc 540

gctctggatg agtccaaggc ctactggatg gatgacgaaa tgtggcaacc catgcgcaag 600

ctggtcgaag acacgcttgt ggtcgatgat tggtttgagc tgactctggt tcagaacatt 660

cttatcgacg gaatgatgta cccgctggtc tacgacaaga tggaccagtg gttcgaaagc 720

cagggtgctg aagatgtgtc catgctcacg gagttcatgc gtgactggta caaggaatcc 780

ctacgctgga ctaatgccat gatgaaagcc gtggccggtg aaagtgagac taaccgtgag 840

ttgcttcaaa aatggatcga tcactgggaa ccgcaggcct acgaagccct gaaacctctg 900

gccgaagcct ccgttggcat cgacgggctg aatgaagccc gggcggaact ctctgcccgc 960

ctgaagaaat tcgaactgca gagccgggga gtctcagcat ga 1002

<210> 14

<211> 270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phM

<400> 14

atgagccagc ttgtatttat tgtattccag gacaacgacg actcccgcta cctcgcggaa 60

gccgttatgg aagataaccc cgacgccgaa atgcagcacc agccggccat gatccggatc 120

caggcggaaa aacgtctggt gatcaaccgc gaaaccatgg aagaaaagct ggggcgagac 180

tgggatgttc aggaaatgct cataaatgtt atcagcatcg ccggcaacgt cgatgaagac 240

gatgatcact tcattcttga atggaattaa 270

<210> 15

<211> 1536

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phN

<400> 15

atggttagta aaaacaaaaa gcttaacctt aaagacaagt atcaatacct gacccgggat 60

atggcctggg aaccgaccta tcaggacaag aaagatattt ttccggagga ggattttgag 120

ggtatcaaga tcaccgactg gtcccagtgg gaagatccgt tccgcctgac catggatgcc 180

tactggaaat accaggcgga aaaagagaag aagctgtacg ccattttcga tgcatttgcc 240

cagaacaacg gccaccagaa catttcagac gcccgttatg tgaacgcgct aaaactgttc 300

atcagtggta tatctccgct tgaacatgcg gcgttccagg gttattccaa ggtcggtcgc 360

cagtttagcg gcgccggggc gcgggttgcc tgccagatgc aggcaattga cgagctgcgt 420

cattcccaga cccagcaaca cgcgatgagc cactacaaca agcacttcaa cggtctgcac 480

gatggcccgc acatgcacga tcgggtgtgg tacctgtcgg tgccgaaatc gttctttgat 540

gatgcacgct cggctggtcc gttcgagttc ctgacggcca tctcattctc gttcgagtat 600

gtgctcacca acctgttgtt cgtaccgttc atgtcgggcg ctgcctataa cggcgacatg 660

gcgacagtca ccttcggttt ctccgcccag tctgacgaag cccgtcatat gaccctgggc 720

cttgaggtga tcaagttcat cctcgagcag cacgaagata acgtgcccat cgttcagcgc 780

tggatcgaca agtggttctg gcgcggattt cgcctgctta gcctggtcag catgatgatg 840

gactacatgc tgccaaacaa ggtcatgtcc tggtccgagg catgggaagt ctattacgag 900

cagaacggcg gtgctctgtt caaggacctg gagcgatacg gcatccgccc gcccaaatac 960

caggacgtgg ctaacgatgc caaacatcac ctgagccacc agctttggac cactttctac 1020

cagtactgcc aggccaccaa cttccatact tggattccgg agaaggaaga gatggactgg 1080

atgtccgaga agtatccgga cactttcgac aagtactacc gtccgcgtta cgagtacctg 1140

gcgaaagagg ctgccgctgg ccgtcgcttc tacaacaaca ccctgccgca gctgtgccaa 1200

gtgtgtcaga tcccgaccat tttcaccgag aaagatgccc caaccatgct cagccatcgg 1260

cagatagaac atgagggcga acgctatcac ttctgctctg acggctgctg cgacatcttc 1320

aaacacgagc cggagaagta catacaggcc tggctgccgg tgcaccagat ctaccagggc 1380

aactgtgaag gcggggatct cgagaccgtg gtgcagaagt attaccacat caatatcgga 1440

gaggacaatt tcgactacgt tggatcgccc gaccagaaac actggctgtc gatcaagggc 1500

cggaagcctg cagacaagaa ccaggacgcc gcctga 1536

<210> 16

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phO

<400> 16

atgagtgtaa acgcacttta cgactacaag tttgaaccta aagacaaggt cgagaacttc 60

cacggcatgc agctgctgta tgtctactgg cccgatcacc tgctgttctg cgcgcccttc 120

gcgctgctgg tgcagccggg tatgaccttc agtgccctgg tggacgagat tctcaagccg 180

gctaccgccg cgcacccgga ctctgccaag gcggacttcc tgaatgccga gtggttgctg 240

aacgatgaac cgttcacacc caaggctgac gccagcctga aagagcaggg tattgatcac 300

aagagcatgc tgacggtgac cacgccgggc ctgaagggca tggcgaacgc cggttactga 360

360

<210> 17

<211> 1062

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phP

<400> 17

atgagttaca ccgtcactat tgagccgatc ggcgagcaga ttgaggtaga ggatggccag 60

actatcctcg ccgccgccct gcgccagggt gtctggctgc cctttgcctg cggccacggc 120

acctgtgcta cctgtaaggt tcaggtgctt gaaggtgatg tcgagatcgg aaacgcctcg 180

ccctttgcgc tgatggatat cgaacgtgac gagggcaagg ttctggcctg ctgcgccacg 240

gttgagagcg acgtcaccat tgaggtggac atcgatgtgg atccggattt tgagggctac 300

ccggtggagg actatgccgc catagcgacc gatatcgtcg aactctctcc gaccatcaag 360

ggcattcacc tgaaactgga ccggccgatg acattccagg ccggccagta catcaatatc 420

gaactgccgg gtgttgaagg cgcgagggcc ttctccctgg ccaacccgcc cagcaaagca 480

gacgaagtgg agctgcatgt gcgcctcgtt gagggcggtg ctgccaccac ctacatccac 540

gaacaactga aaacgggtga tgcgctgaac ctttcaggcc cttacggcca gttcttcgtg 600

cgtagttccc aacccggcga tctgattttc atcgccggcg gatccggatt gtccagtccc 660

cagtcgatga tccttgatct gcttgagcag aacgatgagc gcaagatcgt tctgttccag 720

ggtgcccgaa acctggcaga gctttacaac cgggagctgt ttgaggctct ggatcgcgac 780

cacgacaatt tcacctacgt accggcgctt agccaagccg acgaagaccc tgactggaag 840

ggcttccgag gctatgtcca tgaggcggcc aacgcccatt tcgatggccg gtttgccggt 900

aacaaggcat acctgtgcgg cccgcctcca atgatcgatg cggctatcac ggcattgatg 960

caggggcggc tgttcgagcg tgacatcttc atggagaaat tcctgacagc ggcggacgga 1020

gctgaagaca cccagcgttc ggccctgttc aagaagatat ag 1062

<210> 18

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phQ

<400> 18

atgggcatgg gtttcctagt gttcaaccgc acaacgggag gtcactttac ctgccaggag 60

ggccagagtg tgctcaaggc catggagcag aggggcctga agtgtgtccc cgtgggctgc 120

cggggtggtg gttgcggatt ttgtaagatc cgggttctgg aagggtattt cgagtgcggc 180

aagatgagca agcggcacgc cccgcctgaa gccgttgaaa aaggggaagt tctggcctgc 240

cggatctacc cactgactga tctgatcatt gagtgtccgc cgcaaccggc ggcggacttt 300

gcgagctag 309

<210> 19

<211> 936

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> catA

<400> 19

atgaccgtga aaatttccca cactgccgac attcaagcct tcttcaaccg ggtagctggc 60

ctggaccatg ccgaaggaaa cccgcgcttc aagcagatca ttctgcgcgt gctgcaagac 120

accgcccgcc tgatcgaaga cctggagatt accgaggacg agttctggca cgccgtcgac 180

tacctcaacc gcctgggcgg ccgtaacgag gcaggcctgc tggctgctgg cctgggtatc 240

gagcacttcc tcgacctgct gcaggatgcc aaggatgccg aagccggcct tggcggcggc 300

accccgcgca ccatcgaagg cccgttgtac gttgccgggg cgccgctggc ccagggcgaa 360

gcgcgcatgg acgacggcac tgacccaggc gtggtgatgt tccttcaggg ccaggtgttc 420

gatgccgacg gcaagccgtt ggccggtgcc accgtcgacc tgtggcacgc caatacccag 480

ggcacctatt cgtacttcga ttcgacccag tccgagttca acctgcgtcg gcgtatcatc 540

accgatgccg agggccgcta ccgcgcgcgc tcgatcgtgc cgtccgggta tggctgcgac 600

ccgcagggcc caacccagga atgcctggac ctgctcggcc gccacggcca gcgcccggcg 660

cacgtgcact tcttcatctc ggcaccgggg caccgccacc tgaccacgca gatcaacttt 720

gctggcgaca agtacctgtg ggacgacttt gcctatgcca cccgcgacgg gctgatcggc 780

gaactgcgtt ttgtcgagga tgcggcggcg gcgcgcgacc gcggtgtgca aggcgagcgc 840

tttgccgagc tgtcattcga cttccgcttg cagggtgcca agtcgcctga cgccgaggcg 900

cgaagccatc ggccgcgggc gttgcaggag ggctga 936

<210> 20

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pKE112-HsOMT-F(forward)

<400> 20

ggtacctttc acacaggaaa cagaccatgg gcgataccaa agaacag 47

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pKE112-HsOMT-R(reverse)

<400> 21

ggatccttaa gttacggacc tgcttcg 27

<210> 22

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pKE112-HsOMTHis-F(forward)

<400> 22

ggtacctttc acacaggaaa cagaccatgc atcaccatca ccatcatggc gataccaaag 60

aacagcg 67

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pKE112- HsOMTHis -R(reverse)

<400> 23

ggatccttaa gttacggacc tgcttcg 27

<210> 24

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28a- HsOMTHis -F(forward)

<400> 24

catatgcatc accatcacca tcatggcgat accaaagaac agcg 44

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28a- HsOMTHis -R(reverse)

<400> 25

ctcgagttaa gttacggacc tgcttcg 27

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28a-PobA-F(forward)

<400> 26

catatgaaaa ctcaggttgc aattattg 28

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28a-PobA-R(reverse)

<400> 27

ctcgagtcag gcaacttcct cgaacg 26

<210> 28

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pKE112-PobA-F(forward)

<400> 28

cctgcaggtt tcacacagga aacagaccat gaaaactcag gttgcaatta ttg 53

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pKE112-PobA-R(reverse)

<400> 29

aagctttcag gcaacttcct cgaacg 26

<210> 30

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28a-LpdC-F(forward)

<400> 30

catatggcag aacaaccatg ggatt 25

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28a-LpdC-R(reverse)

<400> 31

ctcgagttac ttcaaatact tctcccagtc 30

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28a-AroY-F(forward)

<400> 32

catatgcaga acccgatcaa cgac 24

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28a-AroY-R(reverse)

<400> 33

ctcgagttac ttcttgtcgc tgaacagc 28

<210> 34

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pKE112-CatA-F(forward)

<400

> 34

ggtacctttc acacaggaaa cagaccatga ccgtgaaaat ttcccacac 49

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pKE112-CatA-R(reverse)

<400> 35

ggatcctcag ccctcctgca acgc 24