



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0123742  
(43) 공개일자 2012년11월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 1/21* (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)  
*C12P 7/40* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7019820
- (22) 출원일자(국제) 2011년01월21일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년07월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/022046
- (87) 국제공개번호 WO 2011/094131  
국제공개일자 2011년08월04일
- (30) 우선권주장  
61/299,794 2010년01월29일 미국(US)

- (71) 출원인  
개노마티카 인코포레이티드  
미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 워터리지 써클 10520
- (72) 발명자  
오스터후트 로빈 이.  
미국 92121 캘리포니아 샌디에고 워터릿지 써클 10520
- (74) 대리인  
유미특허법인

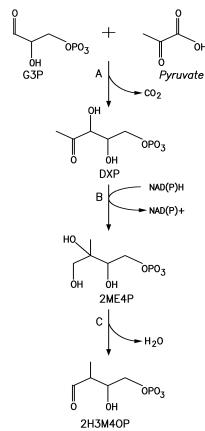
전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 발명의 명칭 P-톨루에이트 및 테레프탈레이트 생합성 미생물 및 생합성 방법

### (57) 요 약

본 발명은 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로, p-톨루에이트 경로, 및/또는 테레프탈레이트 경로를 포함하는 비천연 미생물 유기체를 제공한다. 본 발명은 추가적으로 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로, p-톨루에이트 경로 또는 테레프탈레이트 경로를 생산하기 위한 상기한 유기체의 이용 방법을 제공한다.

**대 표 도** - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

(2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 가진 미생물 유기체를 포함하는 비천연 미생물 유기체로서,

상기 유기체는 2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하며,

상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드레이타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제와 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소를 각각 코딩하는 3종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 3종의 외인성 핵산은 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드레이타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 및 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 코딩하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산인 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성의 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

### 청구항 8

(2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기 위한 조건하에 그것을 생산하기에 충분한 시간 동안 제1항의 비천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생산 방법.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성의 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생산 방법.

### 청구항 10

제8항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소를 각각 코

딩하는 3종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생산 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 3종의 외인성 핵산은 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 테하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 및 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소마라제를 코딩하는 것을 특징으로 하는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생산 방법.

#### 청구항 12

제8항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종의 핵산인 것을 특징으로 하는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생산 방법.

#### 청구항 13

p-톨루에이트 경로를 가진 미생물 유기체를 포함하는 비천연 미생물 유기체로서,

상기 유기체는 p-톨루에이트 경로를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 p-톨루에이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하며,

상기 p-톨루에이트 경로는 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 테하이드라타제; 시키메이트 테하이드로케나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제; 코리스메이트 신타제; 또는 코리스메이트 리아제(lyase)를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로를 각각 코딩하는 2종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 15

제13항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로를 각각 코딩하는 3종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 16

제13항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로를 각각 코딩하는 4종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 17

제13항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로를 각각 코딩하는 5종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 18

제13항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로를 각각 코딩하는 6종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 19

제13항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로를 각각 코딩하는 7종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 20

제13항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로를 각각 코딩하는 8종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 8종의 외인성 핵산은 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 데하이드로게나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제; 코리스메이트 신타제; 및 코리스메이트 리아제를 코딩하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 22**

제13항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제와 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 25**

제13항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산인 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 26**

제13항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성의 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 27**

p-톨루에이트를 생산하기 위한 조건하에 그것을 생산하기에 충분한 시간 동안 제13항에 따른 비천연 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 p-톨루에이트의 생산 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성의 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 p-톨루에이트의 생산 방법.

**청구항 29**

제27항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로 효소를 각각 코딩하는 8종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 p-톨루에이트의 생산 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 8종의 외인성 핵산은 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 데하이드로게나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제; 코리스메이트 신타제; 및 코리스메이트 리아제를 코딩하는 것을 특징으로 하는 p-톨루에이트의 생산 방법.

**청구항 31**

제27항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 p-톨루에이트의 생산 방법.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 p-톨루에이트의 생산 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 및 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 p-톨루에이트의 생산 방법.

**청구항 34**

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산인 것을 특징으로 하는 p-톨루에이트의 생산 방법.

**청구항 35**

테레프탈레이트 경로를 가진 미생물 유기체를 포함하는 비천연 미생물 유기체로서,

상기 유기체는 테레프탈레이트를 생산하기 위한 충분한 양으로 발현되는 테레프탈레이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하며;

상기 테레프탈레이트 경로는 p-톨루에이트 메틸-모노옥시게나제 리덕타제; 4-카르복시벤질알코올 데하이드로게나제; 또는 4-카르복시벤질알데하이드 데하이드로게나제를 포함하며;

상기 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로를 더 포함하며, 상기 p-톨루에이트 경로는 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 데하이드로게나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제; 코리스메이트 신타제; 또는 코리스메이트 리아제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 테레프탈레이트 경로 효소를 각각 코딩하는 2종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 37**

제35항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 테레프탈레이트 경로 효소를 각각 코딩하는 3종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 상기 3종의 외인성 핵산은 p-톨루에이트 메틸-모노옥시게나제 리덕타제; 4-카르복시벤질알코올 데하이드로게나제; 및 4-카르복시벤질알데하이드 데하이드로게나제를 코딩하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 39**

제35항에 있어서, 상기 p-톨루에이트 경로는 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 데하이드로게나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제; 코리스메이트 신타제; 및 코리스메이트 리아제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 40**

제35항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제와 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 43

제35항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산인 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 44

제35항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 협기성의 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

#### 청구항 45

테레프탈레이트를 생산하기 위한 조건하에 그것을 생산하기에 충분한 시간 동안 제35항에 따른 비천연 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 테레프탈레이트의 생산 방법.

#### 청구항 46

제45항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 협기성의 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 테레프탈레이트의 생산 방법.

#### 청구항 47

제45항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 테레프탈레이트 경로 효소를 각각 코딩하는 3종의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 테레프탈레이트의 생산 방법.

#### 청구항 48

제47항에 있어서, 상기 3종의 외인성 핵산은 p-톨루에이트 메틸-모노옥시게나제 리덕타제; 4-카르복시벤질알코올 데하이드로게나제; 또는 4-카르복시벤질알데하이드 데하이드로게나제를 코딩하는 것을 특징으로 하는 테레프탈레이트의 생산 방법.

#### 청구항 49

제45항에 있어서, 상기 p-톨루에이트 경로는 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 데하이드로게나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제; 코리스메이트 신타제; 및 코리스메이트 리아제를 포함하는 것을 특징으로 하는 테레프탈레이트의 생산 방법.

#### 청구항 50

제45항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 테레프탈레이트의 생산 방법.

#### 청구항 51

제50항에 있어서, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 테레프탈레이트의 생산 방법.

#### 청구항 52

제51항에 있어서, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 테하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제와 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 테레프탈레이트의 생산 방법.

### 청구항 53

제45항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산인 것을 특징으로 하는 테레프탈레이트의 생산 방법.

## 명세서

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 일반적으로 생합성 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 능력이 있는 유기체에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002]

테레프탈레이트 (또한, 테레프탈산 및 PTA라 함)는, 의류, 수지, 플라스틱 병 및 심지어 가금류 사료 첨가제를 생산하기 위해 사용되는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)의 바로 직전 전구체이다. 거의 모든 PTA는 미드 센추리 공정(Mid Century Process)으로도 알려진 공정에서 공기 중 산화에 의해 파라-자일렌으로부터 제조된다. 이러한 산화는 코발트염 및/또는 망간염으로 구성된 촉매를 이용하여 아세트산 용매 중에서 고온에서 이루어진다. 파라-자일렌은 석유화학 원료로부터 유래되며, 나프타의 매우 엄격한 촉매적 개질 반응에 의해 형성된다. 또한, 자일렌은 나프타 증기 분해(steam cracker)시 열분해 가솔린 증기로부터, 그리고 톨루엔 불균등화 반응에 의해 획득된다.

[0003]

재생가능한 PTA를 제조하기 위한 비용 효율적인 방법은 아직까지 개발되지 않았다. PTA, 톨루엔 및 기타 방향족 전구체들은 일부 박테리아에 의해 자연적으로 분해된다. 그러나, 이러한 분해 경로에는 전형적으로 분해 방향으로 비가역적으로 작용하는 모노옥시케나제가 관여한다. 그래서, PTA의 생합성 경로는 지금까지 공지된 효소들의 성질들에 의해 크게 제한된다.

[0004]

PTA에 대한 유망한 전구체는 p-톨루에이트이며, 이것은 p-메틸벤조에이트로도 알려져 있다. P-톨루에이트는 p-자일렌을 PTA로 산화시키는 일부 산업 공정에서의 중간 생성물이다. 또한, 이 화합물은 폴리머 안정제, 살충제, 감광성 화합물, 동물 사료 첨가제 및 기타 유기 화합물의 중간 생성물이다. p-톨루에이트는 수용액에서 매우 낮은 용해성으로 인해, 생리 온도에서 고체이며, 융점은 275°C이다. 당 공급원으로부터 이 화합물을 합성하기 위한 미생물 촉매는 지금까지 개시되지 않았다.

[0005]

따라서, p-톨루에이트 또는 테레프탈레이트와 같은 화합물을 상업적인 대규모로 효율적으로 제조하기 위한 대안적인 방법이 요구되고 있다. 본 발명은 이러한 요구를 충족시키며, 또한 관련 이점을 제공한다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0006]

본 발명은 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로, p-톨루에이트 경로, 및/또는 테레프탈레이트 경로를 가진 비천연 미생물 유기체를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 유기체를 이용한 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로, p-톨루에이트 경로 또는 테레프탈레이트 경로의 구축 방법을 제공한다.

#### 도면의 간단한 설명

[0007]

도 1은 글리세르알데하이드-3-포스페이트와 피루베이트로부터 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2H3M4OP)를 제조하는 예시적인 경로를 도식적으로 나타낸 것이다. G3P는 글리세르알데하이드-3-포스페이트이고, DXP는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트이고, 2ME4P는 C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트이다. 효소는, (A) DXP 신타제; (B) DXP 리덕토이소머라제; 및 (C) 2ME4P 테하이드라타제이다.

도 2는 p-톨루에이트에 대한 예시적인 대안적 시키메이트(Shikimate) 경로를 도식적으로 나타낸 것이다. 효소는, (A) 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; (B) 3-데하이드로퀴네이트 신타제; (C) 3-데하이드로

퀴네이트 데하이드라타제; (D) 시키메이트 데하이드로게나제; (E) 시키메이트 키나제; (F) 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스파라제; (G) 코리스메이트(chorismate) 신타제; 및 (H) 코리스메이트 리아제(lyase)이다. 화합물은, (1) (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트; (2) 2,4-디하이드록시-5-메틸-6-[포스포노옥시]메틸]옥산-2-카르복실레이트; (3) 1,3-디하이드록시-4-메틸-5-옥소사이클로헥산-1-카르복실레이트; (4) 5-하이드록시-4-메틸-3-옥소사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; (5) 3,5-디하이드록시-4-메틸사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; (6) 5-하이드록시-4-메틸-3-(포스포노옥시)사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; (7) 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸-3-(포스포노옥시)사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; (8) 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸사이클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트; 및 (9) p-톨루에이트이다.

도 3은 p-톨루에이트로부터 테레프탈산 (PTA)으로의 변환 경로를 예시한 것이다. 반응 A, B 및 C는 p-톨루에이트 메틸-모노옥시게나제 리덕타제, 4-카르복시벤질알코올 데하이드로게나제 및 4-카르복시벤질알데하이드 데하이드로게나제 각각에 의해 촉매된다. 도시된 화합물은, (1) p-톨루익산; (2) 4-카르복시벤질알코올; (3) 4-카르복시벤즈알데하이드; 및 (4) 테레프탈산이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0008]

본 발명은 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트에 대한 생합성 생산력을 가진 세포 및 유기체의 설계 및 생산에 관한 것이다. 본원에 기술된 결과는, 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*) 및 기타 세포 또는 유기체에서, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생합성을 달성하도록 대사 경로를 설계하고 재조합 방식으로 조작할 수 있다는 것을 보여준다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트의 생합성에 의한 생산은 설계된 대사 유전자형을 가진 균주를 구축함으로써, 검증할 수 있다. 또한, 이들 대사적으로 조작된 세포 또는 유기체는, 예를 들어 이론적인 최대 생장에 도달하는 조건 하에서, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성을 더욱 증대시키도록 적응 진화(adaptive evolution)을 거치게 될 수 있다.

[0009]

에스케리치아 콜라이의 시키메이트 생합성 경로는 에리트로스-4-포스페이트를, 4-하이드록시벤조에이트를 비롯하여 다수의 필수 대사산물의 생합성으로 이어지는 주요 중간 생성물인, 코리스메이트로 변환한다. 4-하이드록시벤조에이트는 테레프탈산의 공업적 전구체인 p-톨루에이트와 구조적으로 유사하다. 본원에 기술된 바와 같이, 다른 기질로서 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트(2H3M4OP)를 받아들여, 이를 p-톨루에이트로 변환하기 위해, 시키메이트 경로 효소들이 이용된다. 아울러, 이소프레노이드 생합성을 위한 비-메발로네이트 경로의 효소들을 이용하여 2H3M4OP 전구체를 합성하기 위한 경로도 이용된다.

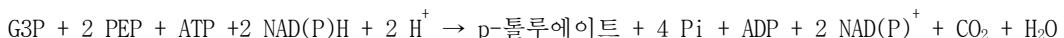
[0010]

본 발명은 탄수화물 원료로부터 재생가능한 p-톨루에이트 또는 테레프탈레이트(PTA)를 생산하기 위한 미생물 조작 전략을 기술한다. 먼저, 3단계 효소 반응에 의해, 글리세르알데하이드-3-포스페이트(G3P) 및 피루베이트를 2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트(2H3M4OP)로 변환한다 (참조: 실시예 I 및 도 1). 그런 후, 2H3M4OP 중간 생성물을 시키메이트 경로 효소에 의해 p-톨루에이트로 변환한다 (참조: 실시예 II 및 도 2). 또한, P-톨루에이트를 미생물에 의해 PTA로 변환한다 (참조: 실시예 III 및 도 3).

[0011]

G3P를 p-톨루에이트로 변환하는데에는, 아래 반응식에서와 같이, ATP 1개, 환원 당량(NAD(P)H) 2개 및 포스포에놀피루베이트 2분자가 필요하다.

[0012]



[0013]

글루코스로부터 G3P를 합성하기 위해서는 추가적인 ATP가 필요하다. 글루코스로부터 에너지에 필요한 탄소를 취하는 p-톨루에이트의 이론적 최대 수율은 0.67 mol/mol (0.51 g/g)이다. p-톨루에이트 합성시 분자 당 ATP 2 개가 소모된다는 가정 하에, 글루코스로부터의 p-톨루에이트 예상 수율은 0.62 mol/mol (0.46 g/g) p-톨루에이트이다.

[0014]

실시예 III에 기술된 바와 같이, p-톨루에이트가 PTA로 재변환되는 경우, 글루코스로부터의 PTA 예상 수율은 0.64 mol/mol (0.58 g/g)이다. 이 경우, p-톨루에이트에서 PTA로의 산화시 총 반응에 따라 부가적인 순 환원 당량(net reducing equivalent)이 생긴다:

[0015]



- [0016] 제안된 경로의 각 단계들을 촉매하는 후보 효소들은 아래 내용에서 설명된다.
- [0017] 본원에서, 용어 "비천연(non-naturally occurring)"은, 본 발명의 미생물 유기체 또는 미생물에 대해 사용되는 경우, 언급된 종의 야생형 균주를 비롯하여, 언급된 종의 천연 균주에서는 통상적으로 발견되지 않는 하나 이상의 유전자 변형을 가진다는 의미이다. 유전자 변형은, 예를 들어, 대사 폴리펩타이드를 코딩하는 발현 가능한 핵산의 도입, 다른 핵산의 부가, 핵산의 결손 및/또는 미생물 유기체의 유전 물질의 기타 기능적 파괴를 포함한다. 이러한 변형은, 예컨대, 언급된 종에 대해 이종, 동종, 또는 이종 및 동종의 폴리펩타이드에 대한 코딩 영역 및 이의 기능성 단편을 포함한다. 다른 변형으로는, 예컨대 상기 변형이 유전자 또는 오페론의 발현을 변형시키는 비-코딩 조절 영역을 포함한다. 예시적인 대사 폴리펩타이드는 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로의 효소 또는 단백질을 포함한다.
- [0018] 대사 변형은 이의 본래의 상태로부터 변형된 생화학적 반응을 지칭한다. 따라서, 비천연 미생물을 대사 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 단편을 코딩하는 핵산에 유전자 변형을 가질 수 있다. 대사 변형의 예는 본원에 기술되어 있다.
- [0019] 본원에서, 용어 "분리된"은 미생물 유기체에 대해 사용되는 경우, 이는 언급된 미생물 유기체가 자연 상태에서 발견될 때의 성분들 중 하나 이상이 실질적으로 결여된 유기체를 의미한다. 이 용어는 자연 환경에서 발견될 때의 성분들 일부 또는 전체가 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 또한, 이 용어는 미생물 유기체가 비천연 환경에서 발견될 때의 성분들이 부분적으로 또는 전체가 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 즉, 분리된 미생물 유기체는 유기체가 자연에서 발견되거나 또는 비천연 환경에서 증식, 보관 또는 유지될 때의 기타 성분들로부터 일부 또는 완전히 분리된다. 분리된 미생물 유기체의 구체적인 예로는 부분적으로 순수한 미생물, 실질적으로 순수한 미생물 및 비천연성 배지에서 배양된 미생물을 포함한다.
- [0020] 본원에서, 용어 "미생물(microbial)", "미생물 유기체" 또는 "미생물(microorganism)"은 고세균, 박테리아 또는 진핵생물류에 속하는 미시 세포로서 존재하는 모든 유기체를 의미한다. 즉, 이 용어는 미시적인 크기를 갖는 원핵 또는 진핵 세포 또는 유기체를 포괄하며, 모든 종의 박테리아, 고세균류 및 유박테리아(eubacteria) 뿐만 아니라 효모 및 진균과 같은 진핵 미생물을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 이 용어는 생화학적 생산을 위해 배양할 수 있는 임의 종의 세포 배양물을 포함한다.
- [0021] 본원에서, 용어 "CoA" 또는 "코엔자임 A"는, 활성 효소 시스템을 만들기 위해 다수 효소(주효소(apoenzyme))의 활성에 필요한 유기 조인자 또는 보결기(효소의 비단백질 영역)를 의미한다. 코엔자임 A는 특정 축합 효소에 작용하며, 아세틸 또는 기타 아실기를 전달시키는 작용을 하며, 지방산 합성 및 산화, 피루베이트 산화 및 기타 아세틸화에 관여한다.
- [0022] 본원에서, 용어 "(2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트"는 본원에서 2H3M4OP로 약칭되며, 도 1에 나타낸 화학식을 가진다. 이를 화합물 역시 3-하이드록시-2-메틸 부타닐-4-포스페이트로 기술할 수 있다.
- [0023] 본원에서, 분자식  $C_8H_7O_2^-$ 의 용어 "p-톨루에이트" (참조: 도 2, 화합물 9)(IUPAC 명칭 4-메틸벤조에이트)는 p-톨루익산의 이온화된 형태이며, p-톨루에이트과 p-톨루익산은, 명세서 전체에서 상호 호환적으로, 이의 모든 염 형태를 포함하여, 임의의 중성 또는 이온화된 형태로서의 화합물을 지칭하는 것으로 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 당업자라면 특정 형태가 pH에 따라 결정된다는 것을 알 것이다.
- [0024] 본원에서, 분자식  $C_8H_4O_4^{2-}$ 의 용어 "테레프탈레이트" (참조: 도 3, 화합물 4)(IUPAC 명칭 테레프탈레이트)는 테레프탈산의 이온화된 형태이며, 또한 p-프탈산 또는 PTA로 언급되며, 테레프탈레이트와 테레프탈산은 명세서 전체에서 상호 호환적으로, 이의 모든 염 형태를 포함하여, 임의의 중성 또는 이온화된 형태로서의 화합물을 지칭하는 것으로 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 당업자라면 특정 형태가 pH에 따라 결정된다는 것을 알 것이다.
- [0025] 본원에서, 용어 "실질적으로 협기성"은 배양 또는 생장 조건에 대해 사용되는 경우, 산소의 양이 액체 매질내 용해 산소 포화도의 약 10% 미만인 것을 의미한다. 또한, 이 용어는 약 1% 미만의 산소 분위기로 유지되는 액체 또는 고체 배지가 든 밀폐된 챔버를 포괄하는 의미이다.
- [0026] 본원에서 "외인성"은 언급된 분자 또는 활성이 숙주 미생물 유기체로 도입되는 것을 의미한다. 분자는, 예컨대, 플라스미드와 같은 숙주 염색체 또는 비-염색체성 유전 물질내로의 삽입에 의해서와 같이, 코딩 핵산을 숙주 유전 물질에 도입함으로써, 도입될 수 있다. 따라서, 이 용어는, 코딩 핵산의 발현에 대해 사용되는 바와 같이, 발현 가능한 형태로 코딩 핵산을 미생물 유기체에 도입하는 것을 의미한다. 생합성 활성에 대해 사용되는

경우, 이 용어는 숙주 참조 유기체에 도입되는 활성에 대해서 사용된다. 그 소스는, 예컨대 숙주 미생물 유기체로 도입된 후 언급된 활성을 발현하는 동종의 또는 이종의 코딩 핵산일 수 있다. 따라서, 용어 "내인성"은 숙주에 존재하는 언급된 문자 또는 활성에 대해 사용된다. 마찬가지로, 이 용어는, 코딩 핵산의 발현에 대해 사용되는 경우, 미생물 유기체내에 포함된 코딩 핵산의 발현에 대해 사용된다. 용어 "이종"은 언급된 종 이외의 소스로부터 유래된 문자 또는 활성을 지칭하며, "동종"은 숙주 미생물 유기체로부터 유래된 문자 또는 활성을 지칭한다. 즉, 본 발명의 코딩 핵산의 외인성 발현시 이종 또는 동종의 코딩 핵산 중 어느 하나 또는 둘다를 이용할 수 있다.

[0027] 2 이상의 외인성 핵산이 미생물 유기체에 포함되는 경우, 2 이상의 외인성 핵산은 전술한 바와 같이 언급된 코딩 핵산 또는 생합성 활성을 지칭하는 것으로 이해된다. 또한, 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 2 이상의 외인성 핵산은 숙주 미생물 유기체에 별개의 핵산 분자로, 폴리시스템론 핵산 분자로 또는 이의 조합으로 도입될 수 있으며, 여전히 2 이상의 외인성 핵산으로서 간주될 수 있는 것으로 또한 이해된다. 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 미생물 유기체는 원하는 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 2 이상의 외인성 핵산을 발현하도록 조작될 수 있다. 원하는 활성을 코딩하는 2개의 외인성 핵산이 숙주 미생물 유기체로 도입되는 경우, 상기 2개의 외인성 핵산은 단일 핵산으로서, 예컨대 단일 플라스미드 형태로 또는 분리된 플라스미드 형태로 도입될 수 있으며, 숙주 염색체에서 단일 부위 또는 복수의 부위에 통합될 수 있으며, 여전히 2개의 외인성 핵산으로 간주되는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 3개 이상의 외인성 핵산을, 숙주 유기체에 임의의 바람직한 조합으로, 예컨대 단일 플라스미드로, 각각의 개별 플라스미드로 도입할 수 있으며, 숙주 염색체에서 단일 위치 또는 복수 위치로 삽입할 수 있으며, 여전히 2 이상의 외인성 핵산, 예컨대 3개의 외인성 핵산으로 간주되는 것으로 이해된다. 따라서, 언급되는 외인성 핵산 또는 생합성 활성의 수는 숙주 유기체로 도입되는 개개 핵산의 수를 지칭하는 것이 아니라, 코딩 핵산의 수 또는 생합성 활성의 수를 지칭한다.

[0028] 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 안정적인 유전자 변형을 포함할 수 있는데, 이는 상기한 변형을 유지하면서 5 세대를 초과하여 배양할 수 있는 미생물을 지칭한다. 일반적으로, 안정적인 유전자 변형은 10 세대 보다 길게 지속되는 변형을 포함하며, 특히 안정적인 변형은 약 25 세대 보다 길게 지속될 것이며, 보다 구체적으로는 안정적인 유전자 변형은 무한정을 비롯하여 50 세대 보다 길게 지속될 것이다.

[0029] 당해 기술 분야의 당업자라면, 본원에 예시된 대사적 변이를 포함하여 유전자 변형은, 에스케리치아 콜라이와 같은 적정 숙주 유기체와 이의 해당 대사 반응 또는 원하는 대사 경로에 관여하는 유전자 등의 바람직한 유전물질에 대해 적합한 소스 유기체와 관련하여 기술됨을 알 것이다. 그러나, 매우 다양한 유기체의 전체 게놈 서열 분석과 게놈학 분야의 높은 기술 수준을 감안하면, 당해 기술 분야의 당업자는 본원에 기술된 내용 및 설명을 다른 유기체들 모두에도 적용할 수 있음을 쉽게 알 것이다. 예를 들어, 본원에 예시된 에스케리치아 콜라이의 대사 변형은 언급된 종이 아닌 다른 종 유래의 동일 또는 유사 코딩 핵산을 병합시킴으로써 다른 종에도 쉽게 적용할 수 있다. 이러한 유전자 변형으로는, 예컨대 일반적으로 종 상동체의 유전자 변형이 있으며, 구체적으로 오르소로그(ortholog), 파라로그(paralog) 또는 비-오르소로그형 유전자 치환(non-orthologous gene displacement)을 포함한다.

[0030] 오르소로그는 수직 직계(vertical descent) 관계이며, 상이한 유기체들에서 실질적으로 동일하거나 상동한 기능을 담당하는 유전자 또는 유전자들이다. 예를 들어, 마우스 에폭사이드 하이드롤라제와 인간 에폭사이드 하이드롤라제는 에폭사이드의 가수분해라는 생물학적 기능상 오르소로그로 간주할 수 있다. 유전자들은, 예컨대 유전자들이 상동적이거나 또는 공통 조상으로부터 진화적으로 관련있는 것으로 표현되기에 충분한 서열 유사성을 공유하는 경우에, 수직 직계 관계이다. 또한, 유전자는, 3차 구조를 공유하지만, 1차 서열 유사성이 확인불가한 수준으로 공통 조상으로부터 진화된 것임을 의미하는 충분한 수준의 서열 유사성을 반드시 가지고 있지 않은 경우에도, 오르소로그로 간주할 수 있다. 오르소로그인 유전자들은 아미노산 서열 유사성이 약 25% 내지 100%인 단백질을 코딩할 수 있다. 25% 미만의 아미노산 유사성을 공유하는 단백질을 코딩하는 유전자들 역시, 이들의 3차원 구조에 유사성이 있다면 수직 직계에 의해 생겨난 것으로 간주할 수 있다. 조직 플라스미노겐 활성자 및 엘라스타제 등의 세린 프로테아제 패밀리 효소의 구성원들은 공통 조상의 수직 직계에서 생겨난 것으로 간주된다.

[0031] 오르소로그는, 예를 들어 진화를 통해 구조적으로 또는 전체 활성 측면에서 분화된 유전자 또는 이로 코딩된 유전자 산물을 포함한다. 예를 들어, 어떤 종이 2가지 기능을 나타내는 유전자 산물을 코딩하고 있으며 이 기능들이 2번째 종에서는 별개의 유전자로 분리되어 있는 경우, 이들 3종의 유전자와 이의 대응 산물들은 오르소로그로 간주된다. 생화학적 산물의 제조시, 당해 기술 분야의 당업자들은, 비천연 미생물을 구축하기 위해, 도입 또는 파괴할 대사 활성을 가지고 있는 오르소로그형 유전자를 선택해야 함을 알 것이다. 분리가능한 활성들을

나타내는 오르소로그의 예는, 개개 활성이 2종 이상의 종 또는 단일 종에서 개별 유전자 산물로 분리되는 경우이다. 구체적인 예는, 세린 프로테아제의 2가지 활성인 엘라스타제 단백질 분해 활성과 플라스미노겐 단백질 분해 활성이, 플라스미노겐 활성자 및 엘라스타제로서 개별 분자로 분리되는 경우이다. 두 번째 예는, 마이코 플라스마 5'-3' 엑소뉴클레아제와 드로소필라 DNA 폴리머라제 III 활성이 분리되는 경우이다. 상기 첫 번째 종 유래의 DNA 폴리머라제는, 2번째 종 유래의 엑소뉴클레아제 또는 폴리머라제 중 어느 하나 또는 이들 둘다에 대해 오르소로그인 것으로 간주할 수 있으며, 그 역도 성립된다.

[0032] 이와는 반대로, 파라로그는 예를 들어 복제와 이후 진화적 분화 관계에 있는 상동체이며, 유사하거나 공통되지만, 기능이 동일하지 않은 것이다. 파라로그는, 예컨대, 동일 종 또는 다른 종으로부터 기원하거나 유래될 수 있다. 예를 들어, 마이크로솜 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 I)와 가용성 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 II)는, 이들이 별개의 반응을 촉매하고, 동일 종에서 다른 기능을 가지고 있는, 공통 조상으로부터 함께 진화된 2개 별개의 효소이기 때문에, 파라로그로 간주될 수 있다. 파라로그는 유의한 서로 서열 유사성을 보이는 동일한 종으로부터 유래된 단백질들이므로, 이들은 상동적이거나 또는 공통 조상으로부터 함께 진화된 관계임을 시사한다. 파라로그 패밀리 그룹으로는 HipA 상동체, 투시파라제 유전자, 웨티다제 등이 있다.

[0033] 비-오르소로그 유전자 치환(nonorthologous gene displacement)은 한 종의 비-오르소로그 유전자가 다른 종에서 언급된 유전자의 기능을 치환할 수 있는 것이다. 치환은, 예를 들어 다른 종들에서 언급된 기능과 비교하여, 기원 종에서 실질적으로 동일하거나 유사한 작용을 수행할 수 있음을 포함한다. 일반적으로, 비-오르소로그 유전자 치환은 언급된 기능을 코딩하는 공지된 유전자와 구조적으로 관련있는 것으로 구분할 수 있지만, 구조적으로는 관련성은 낮지만 기능적으로 유사한 유전자 및 이의 유전자 산물은 그럼에도 불구하고 여전히 본 발명에서 사용되는 용어의 의미에 포함될 것이다. 기능 유사성에는, 예를 들어 치환하고자 하는 기능을 코딩하는 유전자에 대해, 비-오르소로그 유전자 산물의 활성부 또는 결합부에 어느 정도 이상의 구조 유사성이 요구된다. 따라서, 비-오르소로그 유전자는 예를 들어 파라로그 또는 비관련 유전자를 포함한다.

[0034] 따라서, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 능력을 갖춘 본 발명의 비천연 미생물 유기체를 동정하고 구축함에 있어, 당해 기술 분야의 당업자들은, 본 발명에 제공된 교시 및 지침을 특정 종들에 적용하여, 대사 변형 확인에 오르소로그의 동정 및 포함 또는 불활성화가 포함될 수 있음을 인지할 것이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 또한, 파라로그 및/또는 비-오르소로그 유전자 치환이 유사하거나 또는 실질적으로 유사한 대사 반응을 촉매하는 효소를 코딩하는 참조된 미생물에 존재하는 한, 진화적으로 관련성 있는 유전자들을 사용할 수 있다.

[0035] 오르소로그, 파라로그 및 비-오르소로그 유전자 치환은 당해 기술 분야의 당업자에게 널리 공지된 방법으로 결정할 수 있다. 예를 들어, 2개의 폴리펩타이드에 대해 핵산 또는 아미노산 서열을 검사하여, 상기 비교되는 서열들 간의 서열 동일성과 유사성을 확인한다. 이러한 유사성을 토대로, 당해 기술 분야의 당업자는 상기 유사성이 상기 단백질들이 공통 조상으로부터 진화된 관계임을 의미할 만큼 충분히 높은지를 결정할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자들에게 널리 공지된 알고리즘, 예컨대 Align, BLAST, Clustal W 등으로 원(raw) 서열의 유사성 또는 동일성을 비교 및 확인하며, 또한, 웨이트 또는 스코어를 할당할 수 있는 서열내 캡의 존재나 유의 수준을 정할 수 있다. 이러한 알고리즘들은 또한 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 뉴클레오타이드 서열 유사성 또는 동일성 결정에 마찬가지로 적용가능하다. 관계(relatedness)를 정할 만큼 충분한 유사성에 대한 매개 변수들은, 널리 공지된 통계학적 유사성 계산법, 또는 랜덤 폴리펩타이드내에서 유사한 매칭을 발견할 확률, 그리고 확인된 매칭의 유의 수준을 근거로 산정된다. 2개 이상 서열들의 컴퓨터 비교는, 또한, 필요한 경우, 당해 기술 분야의 당업자에 의해 가시적으로 측정화할 수 있다. 관련 유전자 산물 또는 단백질은 높은 유사성, 예를 들어 25% 내지 100%의 서열 동일성을 가지는 것으로 볼 수 있다. 비관련 단백질은, 충분한 크기의 데이터 베이스 검색시 우연히 발생할 수 있는 수준과 기본적으로 동일한 동일성(약 5%)을 가질 수 있다. 5% 내지 24%의 서열이, 비교 서열들과 관련성 있다고 판단할 만큼 충분한 상동성을 보이거나 그렇지 않을 수 있다. 데이터 세트의 크기를 제시하는 이러한 매칭 유의 수준을 결정하기 위한 추가적인 통계학적 분석을 수행하여, 이를 서열들의 관련성을 결정할 수 있다.

[0036] BLAST 알고리즘을 이용하여 2종 이상의 서열의 관계를 측정하기 위한 매개변수의 예로는, 다음과 같을 수 있다. 간략하게는, 아미노산 서열 정렬은 BLASTP 버전 2.0.8(1999년 1월 5일) 및 하기의 매개변수들을 사용하여 수행할 수 있다: 매트릭스: 0 BLOSUM62; 캡 오픈(gap open): 11; 캡 연장(gap extension): 1; x\_드롭오프: 50; 예상: 10.0; 워드크기: 3; 필터: 온(on). 핵산 서열 정렬은 BLASTN 버전 2.0.6(1998년 9월 16일) 및 하기의 매개변수들을 사용하여 수행할 수 있다: 매치: 1; 미스매치: -2; 캡 오픈: 5; 캡 연장: 2; x\_드롭오프: 50; 예상:

10.0; 워드크기: 11; 필터: 오프. 당해 기술 분야의 당업자는, 상기 매개변수들에 대해 예를 들어 상기 비교의 염격성을 높이거나 낮추고, 2종 이상 서열의 관계를 정하기 위한 변형을 가할 수 있음을 알 것이다.

[0037] 본 발명은, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하는, 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제 (참조: 실시예 I 및 도 1, 단계 C)를 포함한다. (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 구비한 비천연 미생물 유기체는, 추가적으로 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제 (참조: 실시예 I 및 도 1, 단계 A 및 B)를 포함한다. 따라서, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 및 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함한다.

[0038] 또한, 본 발명은, p-톨루에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 p-톨루에이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 p-톨루에이트 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하는 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 p-톨루에이트 경로는 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 데하이드로게나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제; 코리스메이트 신타제; 또는 코리스메이트 리아제를 포함한다 (참조: 실시예 II 및 도 2, 단계 A-H). p-톨루에이트 경로를 구비한 비천연 미생물 유기체는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 (도 1)를 더 포함할 수 있다. (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는, 예컨대, 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함할 수 있다 (도 1).

[0039] 본 발명은, 테레프탈레이트를 생산하기 위한 충분한 양으로 발현되는 테레프탈레이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, p-톨루에이트 메틸-모노옥시게나제 리덕타제; 4-카르복시벤질알코올 데하이드로게나제; 또는 4-카르복시벤질알데하이드 데하이드로게나제 (참조: 실시예 III 및 도 3)를 포함하는 테레프탈레이트 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하는, 비천연 미생물 유기체를 추가로 제공한다. 이러한 테레프탈레이트 경로를 포함하는 유기체는, 선택적으로 p-톨루에이트 경로를 포함할 수 있으며, 상기 p-톨루에이트 경로는 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 데하이드로게나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제; 코리스메이트 신타제; 또는 코리스메이트 리아제를 포함한다 (참조: 실시예 II 및 III 및 도 2 및 3). 이러한 테레프탈레이트 경로와 a p-톨루에이트 경로를 가진 비천연 미생물 유기체는, 또한, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 (참조: 실시예 I 및 도 1)를 포함한다. (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는, 예컨대, 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제 (참조: 실시예 I 및 도 1)를 포함할 수 있다.

[0040] 다른 구현예에서, 본 발명은, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 구비한 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 이 비천연 미생물 유기체는 기질을 산물로 변환시키는 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함한다. 예를 들어, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로에서, 기질 및 산물은, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 및 피루베이트 → 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트; 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 → C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트; 및 C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 → (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 (참조: 실시예 I 및 도 1)로 이루어진 군으로부터 선택할 수 있다. 다른 구현예, p-톨루에이트 경로는, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 → 2,4-디하이드록시-5-메틸-6-[포스포노옥시]메틸]옥산-2-카르복실레이트; 2,4-디하이드록시-5-메틸-6-[포스포노옥시]메틸]옥산-2-카르복실레이트 → 1,3-디하이드록시-4-메틸-5-옥소사이클로헥산-1-카르복실레이트; 1,3-디하이드록시-4-메틸-5-옥소사이클로헥산-1-카르복실레이트 → 5-하이드록시-4-메틸-3-옥소사이클로헥스-1-엔-1-카르복시산; 5-하이드록시-4-메틸-3-옥소사이클로헥스-1-엔-1-카르복시산 → 3,5-디하이드록시-4-메틸사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; 3,5-디하이드록시-4-메틸사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트 → 5-하이드록시-4-메틸-3-(포스포노옥시)사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; 5-하이드록시-4-메틸-3-(포스포노옥시)사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트 → 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸-3-(포스포노옥시)사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸-3-(포스포노옥시)사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트;

로헥스-1-엔-1-카르복실레이트 → 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸사이클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트; 및 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸사이클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트 → p-톨루에이트 (참조: 실시예 II 및 도 2)로부터 선택되는 기질 및 산물을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 테레프탈레이트 경로는 p-톨루에이트 → 4-카르복시벤질알코올; 4-카르복시벤질알코올 → 4-카르복시벤즈알데하이드; 및 4-카르복시벤즈알데하이드 → 테레프탈산으로부터 선택되는 기질과 산물을 포함할 수 있다 (참조: 실시예 III 및 도 3). 당해 기술 분야의 당업자는, 바람직한 산물을 생산하는데 적합하며 적정 활성을 기질을 산물로 변환하는데 이용가능한, 본원에 기술된 기질-산물의 임의 쌍을, 본원에 기술된 내용을 기초로 당해 기술 분야의 당업자라면 쉽게 결정할 수 있을 것으로 이해될 것이다. 즉, 본 발명은, 효소 또는 단백질이 도 1-3에 나타낸 바와 같이, 기질과, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 산물을 변환시키는, 상기 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비천연 미생물 유기체를 제공한다.

[0041] 본원에 일반적으로 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 포함하는 미생물 유기체로서 기술되지만, 본 발명은, 부가적으로, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 중간 산물을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 비천연 미생물 유기체를 제공하는 것으로 이해된다. 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 도 1로 예시된다 (참조: 실시예 I). 따라서, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 포함하는 미생물 유기체와 더불어, 본 발명은 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 미생물 유기체는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 중간 산물, 예컨대, 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 또는 C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트를 생산한다. 마찬가지로, 또한, 본 발명은, p-톨루에이트를 생산하는 p-톨루에이트 경로를 구비한 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때, 상기 비천연 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로 중간 산물, 예컨대, 2,4-디하이드록시-5-메틸-6-[(포스포노옥시)메틸]옥산-2-카르복실레이트, 1,3-디하이드록시-4-메틸-5-옥소사이클로헥산-1-카르복실레이트, 5-하이드록시-4-메틸-3-옥소사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 3,5-디하이드록시-4-메틸사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5-하이드록시-4-메틸-3-(포스포노옥시)사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸-3-(포스포노옥시)사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 또는 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸사이클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트를 생산한다. 아울러, 본 발명은 부가적으로 테레프탈레이트 경로 효소를 포함하는 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 미생물 유기체는 테레프탈레이트 경로의 중간 산물, 예컨대, 4-카르복시벤질알코올 또는 4-카르복시벤즈알데하이드를 생산한다.

[0042] 실시예에 기술되고, 도 1-3의 경로 등의 도에서 예시된 바와 같이, 본원에 기술된 임의의 경로를 활용하여, 원하는 임의의 경로 중간 산물 또는 산물을 생산하는 비천연 미생물 유기체를 제조할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 중간 산물을 생산하는 상기한 미생물 유기체는 원하는 산물을 생산하기 위해 하류 경로 효소를 발현하는 다른 미생물 유기체와 조합하여 사용할 수 있다. 그러나, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 중간 산물을 생산하는 비천연 미생물 유기체를 이용하여, 원하는 산물로서 상기 중간 산물을 생산할 수 있는 것으로 이해된다.

[0043] 본 발명은, 대사 반응, 반응체 또는 그 산물에 대한 일반적인 참조로, 또는 언급된 대사 반응, 반응체 또는 산물과 연관된 효소, 촉매하는 효소, 또는 연관된 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 또는 유전자에 대한 구체적인 참조로 기술된다. 본원에 명확하게 언급되어 있지 않은 한, 당해 기술 분야의 당업자는 반응에 대한 언급이 반응체 및 반응의 산물에 대한 언급으로 구성됨을 이해할 것이다. 마찬가지로, 본원에서 명확하게 언급되지 않은 한, 반응체 또는 산물에 대한 언급은 또한 반응을 지칭하며, 이를 대사적 구성 요소들 중 임의의 것에 대한 언급 역시 언급된 반응, 반응체 또는 산물을 촉매하는 효소 또는 관여하는 단백질을 코딩하는 유전자 또는 유전자들을 지칭한다. 이와 같이, 대사적 생화학, 효소학 및 게놈학의 잘 알려진 분야에서 본다면, 유전자 또는 코딩 핵산에 대한 본원의 언급이 반응을 촉매하는 효소 또는 관여 단백질을 코딩하는 대응체 뿐만 아니라 반응의 반응체 및 산물에 대한 언급을 구성한다.

[0044] 본 발명의 비천연 미생물 유기체는, 하나 이상의 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로에 참여하는 하나 이상의 효소 또는 단백질을 코딩하는 발현가능한 핵산

을 도입함으로써, 제조할 수 있다. 생합성을 위해 선택된 숙주 미생물 유기체에 따라, 구체적인 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로의 일부 또는 전부에 대한 핵산들을 발현시킬 수 있다. 예를 들어, 선택한 숙주가 원하는 생합성 경로에 대한 하나 이상의 효소 또는 단백질이 결여된 경우, 결여된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대한 발현가능한 핵산을 이후 외인성 발현을 위해 숙주에 도입한다. 다른 예로, 선택한 숙주가 일부 경로 유전자들을 내인성 발현하지만 다른 유전자들은 결여된 경우, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 생합성을 달성하기 위해 결여된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대한 코딩 핵산이 요구된다. 따라서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 원하는 생합성 경로를 획득하기 위해 외인성 효소 또는 단백질 활성을 도입함으로써 제조하거나, 또는 원하는 생합성 경로는, 하나 이상의 내인성 효소 또는 단백질과 함께, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트와 같은 원하는 산물을 생산하는, 하나 이상의 외인성 효소 또는 단백질 활성을 도입함으로써, 획득할 수 있다.

[0045] 숙주 미생물 유기체는, 예컨대 박테리아, 효모, 진균 및 발효 공정을 적용가능한 다른 양한 미생물로부터 선택할 수 있으며, 비천연 미생물 유기체는 이들로부터 제조될 수 있다. 예시적인 박테리아로는 에스케리치아 콜라이, 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 안에어로비오스피릴룸 숙시니시프로두센스(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 액티노바실러스 숙시노게네스(*Actinobacillus succinogenes*), 만하이미아 숙시니시프로두센스(*Mannheimia succiniciproducens*), 리조븀 에틀리(*Rhizobium etli*), 바실러스 섭틸리스, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*), 자이모모나스 모빌리스, 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*), 스트렙토마이세스 코엘리콜러, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) 및 슈도모나스 푸티타(*Pseudomonas putida*)로부터 선택되는 종을 포함한다. 효모 또는 진균의 예로는, 사카로마이세스 세레비지애, 시조사카로마이세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 아스페질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*) 아스페질러스 나이거(*Aspergillus niger*), 피키아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 리조푸스 아리주스(*Rhizopus arrhizus*), 리조부스 오리제(*Rhizobus oryzae*) 등으로부터 선택되는 종을 포함한다. 에스케리치아 콜라이는 유전자 조작에 적합한 잘 특정화된 미생물이기 때문에, 특히 유용한 숙주 미생물이다. 그외 특히 유용한 숙주 유기체는 사카로마이세스 세레비지애와 같은 효모이다. 임의의 적합한 미생물 숙주 유기체를 사용하여, 원하는 산물을 생산하도록 대사성 및/또는 유전자 변형을 도입할 수 있다는 것으로 이해된다.

[0046] 선택된 숙주 미생물 유기체의 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로의 구성 요소들에 따라, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는, 하나 이상의 외인성으로 발현되는 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 코딩하는 핵산, 최대로는 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로를 코딩하는 모든 핵산을 포함할 것이다. 예컨대, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성은, 대응되는 코딩 핵산의 외인성 발현을 통해 경로 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에서 확립할 수 있다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 효소 또는 단백질들이 모두 결핍된 숙주인 경우, 상기 경로의 모든 효소 또는 단백질의 외인성 발현을 포함할 수 있지만, 경로의 모든 효소 또는 단백질은 숙주가 하나 이상의 경로 효소 또는 단백질을 포함하더라도 발현시킬 수 있는 것으로 이해된다. 예컨대, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생산을 위한 경로의 모든 효소 또는 단백질의 외인성 발현도 포함될 수 있다. 예컨대, p-톨루에이트 경로의 모든 효소, 예컨대 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 데하이드로게나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스페라제; 코리스메이트 신타제; 및 코리스메이트 리아제가 포함될 수 있다. 아울러, 테레프탈레이트 경로의 모든 효소, 예컨대 p-톨루에이트 메틸-모노옥시게나제 리덕타제; 4-카르복시벤질알코올 데하이드로게나제; 및 4-카르복시벤질알데하이드 데하이드로게나제가 포함될 수 있다. 나아가, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 모든 효소, 예컨대 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 및 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제가 포함될 수 있다.

[0047] 본원에 제공되는 교시 및 지침 하에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 발현가능한 형태로 도입되는 코딩 핵산의 수는, 적어도, 선택된 숙주 미생물 유기체의 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 결합성에 대응됨을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는, 특

정 경로에 따라, 본원에 기술된 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로를 구성하는 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8종, 즉 최대 모든 핵산을 구비할 수 있다. 일부 구현예에서, 또한, 비천연 미생물 유기체는 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성을 촉진시키거나 최적화하는, 또는 숙주 미생물 유기체에 다른 유용한 기능을 부여하는, 다른 유전적 변형을 포함할 수도 있다. 이러한 다른 기능성으로, 예컨대, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 하나 이상의 전구체, 예컨대 글리세르알데하이드-3-포스페이트, 피루베이트, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 또는 p-톨루에이트의 합성 중대를 포함할 수 있다. 나아가, 본원에 기술된 바와 같이, 상기 경로 등의 복수 경로들이 하나의 유기체에 포함되어, 바람직하게 p-톨루에이트 (도 2), 테레프탈레이트 (도 3) 및 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 (도 1)를 생산할 수 있다.

[0048]

일반적으로, 숙주 미생물 유기체는, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 경로의 전구체를, 자연적으로 생산되는 분자로서 또는 숙주 미생물 유기체에 의해 자연적으로 생산되는 전구체의 생산 증가 또는 원하는 전구체의 데 노보 생산을 제공하는 조작된 산물로서 생산하도록, 선택된다. 예를 들어, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 및 포스포에놀피루베이트는 에스케리치아 콜라이와 같은 숙주 유기체에서 천연적으로 생산된다. 숙주 유기체는, 본원에 기술된 바와 같이, 전구체의 생산을 증가시키도록 조작될 수 있다. 또한, 원하는 전구체를 생산하도록 조작된 미생물 유기체를 숙주 유기체로 사용할 수 있으며, 또한 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 효소 또는 단백질을 발현하도록 추가로 조작될 수 있다.

[0049]

일부 구현예에서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 합성하기 위한 효소적 역량을 포함하는 숙주로부터 제조된다. 이러한 구체적인 구현예에서, 이 유기체는, 예컨대 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하는 방향으로 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 반응을 진행시키기 위해, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 산물의 합성 또는 축적을 높이도록 사용가능할 수 있다. 합성 또는 축적 증가는, 예컨대, 전술한 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소 또는 단백질들 중 하나 이상을 코딩하는 핵산의 과다발현에 의해 달성될 수 있다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 효소 또는 효소들 및/또는 단백질 또는 단백질들의 과다 발현은, 예컨대 내인성 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 또는 이종의 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 이루어질 수 있다. 따라서, 천연 유기체는, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는, 1, 2, 3, 4, 5 등, 최대 모든 수의 핵산의 과다 발현을 통해, 예컨대 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하는 비천연 미생물 유기체로, 쉽게 제조할 수 있다. 또한, 비천연 유기체는, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로의 효소의 활성을 증가시키게 되는, 내인성 유전자의 돌연변이 유발에 의해, 제조할 수 있다.

[0050]

특히 유용한 구현예에서, 상기 코딩 핵산의 외인성 발현을 이용한다. 외인성 발현은 숙주에 발현 및/또는 조절 인자를 맞춤식으로 조절하는 능력을 부여하며, 사용자에 의해 조절되는 바람직한 발현 수준을 달성하는 적용성을 부여한다. 그러나, 또한, 내인성 발현은, 다른 구현예에서, 유도성 프로모터나 다른 조절 인자에 연결되었을 때, 부정적인 조절 작동자의 제거 또는 유전자의 프로모터 도입에 의해서와 같이, 이용될 수 있다. 따라서, 천연적인 유도성 프로모터를 가진 내인성 유전자는, 적정 유도제를 제공함으로써, 상향-조절시킬 수 있으며, 또는 내인성 유전자의 조절 부위를 유도성 조절 인자를 도입함으로써 조작하여, 바람직한 시기에 내인성 유전자의 발현 증가를 조절할 수 있다. 마찬가지로, 유도성 프로모터를 비천연 미생물 유기체에 도입되는 외인성 유전자에 대한 조절 요소로서 포함시킬 수 있다.

[0051]

본 발명의 방법에서, 하나 이상의 외인성 핵산들 중 임의의 핵산을 미생물 유기체에 도입하여 본 발명의 비천연 미생물 유기체를 생산할 수 있는 것으로 이해된다. 핵산을, 미생물 유기체에 예컨대 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로를 부여하도록 도입시킬 수 있다. 다른 예로, 코딩 핵산을 도입하여, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 능력을 부여하기 위해 필요한 반응들 중 일부를 촉매하기 위한 생합성 능력을 가진 중간 미생물 유기체를 제조할 수 있다. 예컨대, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로를 구비한 비천연 미생물 유기체는, 바람직한 효소 또는 단백질을 코딩하는 2 이상

의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로에서, 발현되는 효소의 조합은, 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제와 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제, 또는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제와 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제의 조합일 수 있다. p-톨루에이트 경로의 경우, 발현되는 효소의 조합은 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제와 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 키나제와 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제; 시키메이트 키나제와 시키메이트 데하이드로게나제의 조합 등일 수 있다. 마찬가지로, 테레프탈레이트 경로에서, 발현되는 효소의 조합은 p-톨루에이트 메틸-모노옥시게나제 리덕타제와 4-카르복시벤질알코올 데하이드로게나제; 또는 4-카르복시벤질알코올 데하이드로게나제와 4-카르복시벤질알데하이드 데하이드로게나제 등일 수 있다. 따라서, 생합성 경로의 2 이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합이 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함될 수 있는 것으로 이해된다. 유사하게, 생합성 경로의 3 이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합이, 원하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 원하는 산물의 생산으로 귀결되는 한, 예컨대, 필요에 따라, 3-데하이드로퀴네이트 신타제, 시키메이트 데하이드로게나제 및 시키메이트 키나제; 시키메이트 키나제, 코리스메이트 신타제 및 코리스메이트 리아제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제, 코리스메이트 신타제 및 코리스메이트 리아제 등이, 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함될 수 있는 것으로 이해된다. 유사하게, 본원에 기술된 경로에 따라, 생합성 경로의 4, 5, 6, 7 또는 그 이상의 수의 효소 또는 단백질의 임의 조합이, 원하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 원하는 산물의 생산으로 귀결되는 한, 필요에 따라 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함될 수 있다.

[0052] 본원에 기술된 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생합성 외에도, 본 발명의 비천연 미생물 유기체 및 방법은, 또한, 서로 그리고 다른 경로에 의해 산물 생합성을 달성하기 위해 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 다른 미생물 유기체 및 방법과 다양한 조합으로 이용할 수 있다. 예를 들어, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기 위한 다른 방법은, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 이용하는 것 이외의 방법은 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 중간 산물을 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트로 변환 할 수 있는 다른 미생물 유기체의 부가를 통한 것이다. 이러한 방법으로는, 예컨대 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 중간 산물을 생산하는 미생물 유기체의 발효를 포함한다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 중간 산물은 이후 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 중간 산물을 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트로 변환시키는 2번째 미생물에 대한 기질로서 사용할 수 있다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 중간 산물을, 제2 유기체의 다른 배양물에 첨가할 수 있거나, 또는 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 중간 산물 생산체의 오리지날 배양물을 예컨대 세포 분리에 의해 이들 미생물 유기체를 고갈시킨 다음, 발효 브로스에 제2 유기체를 첨가하여, 중간 정제 단계 없이 최종 산물을 생산할 수 있다.

[0053] 다른 구현예에서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체 및 방법은, 예컨대, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생합성을 달성하기 위해, 매우 다양한 서브경로로 조합될 수 있다. 이들 구현예에서, 본 발명의 바람직한 산물의 생합성 경로를 여러 미생물 유기체들로 분산시키고, 이 여러 미생물 유기체를 공-배양하여 최종 산물을 생산할 수 있다. 이러한 생합성 공정에서, 한가지 미생물 유기체의 산물은 최종 산물이 합성될 때 까지 2번째 유기체의 기질이다. 예컨대, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생합성은, 하나의 경로의 중간 산물을 다른 경로의 중간 산물 또는 산물로의 변환을 위한 생합성 경로를 구비한 미생물 유기체를 구축함으로써 달성할 수 있다. 다른 예로, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트는, 또한, 동일 용기에서 2가지 유기체, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 중간 간물을 생산하는 1번째 미생물 유기체와 상기 중간 산물을 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트로 변환하는 2번째 미생물 유기체를 이용하여 공-배양 또는 공-발효시킴으로써, 미생물 유기체로부터 생합성 방법으로 생산할 수 있다.

[0054] 본원에 제시된 교시 및 지침으로, 당해 기술 분야의 당업자라면, 다른 미생물 유기체와, 서브경로를 가진 다른 비천연 미생물 유기체의 공-배양과, 및 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기 위한 당해 기술 분야에 잘 공지된 다른 화학 공정 및/또는 생화학 공정의 조합과 더불어, 본 발명의 비천연 미생물 유기체 및 방법에 대한 매우 다양한 조합 및

변경이 존재함을 이해할 것이다.

[0055] p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소 또는 단백질에 대한 코딩 핵산의 소스는, 예컨대, 상기 코딩된 유전자 산물이 언급된 반응을 촉매할 수 있는 임의의 종을 포함할 수 있다. 이러한 종으로는, 비제한적으로, 고세균 및 유박테리아를 비롯한 박테리아, 및 효모, 식물, 곤충, 동물 및 인간을 포함한 포유류를 비롯한 진핵생물 등의 원핵 생물 및 진핵 생물 둘다를 포함하나, 이로 한정되지 않는다. 이러한 소스의 예시적인 종으로는, 예컨대, 에스케리치아 콜라이, 미코박테리움 투베르클로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*), 아그로박테리움 투메팩시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 바실러스 섭틸리스 (*Bacillus subtilis*), 시네코시스티스(*Synechocystis*) 종, 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*), 클렙시엘라 옥시토카, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 락토바콜루스 콜리노이데스(*Lactobacillus collinoides*), 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*), 클로스트리듐 파스테우라눔(*Clostridium pasteuranum*), 시트로박터 프레운디이(*Citrobacter freundii*), 클로스트리듐 부티리쿰(*Clostridium butyricum*), 로세부리아 이눌리니 보란스(*Roseburia inulinivorans*), 설풀로부스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*), 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*), 시노리조븀 프레디이(*Sinorhizobium fredii*), 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 에르위니아 크리산테미(*Erwinia chrysanthemi*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 두날리엘라 살리나 (*Dunaliella salina*), 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*), 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 아스퍼질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 뉴모시스티스 카리니이 (*Pneumocystis carinii*), 스트렙토마이세스 코엘리콜리(*Streptomyces coelicolor*), 베크홀데리아 (*Burkholderia*), 알칼리게네스(*Alcaligenes*), 슈도모나스, 신고모나스 및 코마모나스 속 유래의 종들, 예컨대, 코마모나스 테스토스테로니(*Comamonas testosteroni*), 뿐만 아니라 본원에 기술되거나 또는 대응되는 유전자에 대한 소스 유기체로서 이용가능한 예시적인 다른 종들을 포함한다. 그러나, 395종의 미생물 계놈 및 다양한 효모, 진균, 식물 및 포유류 계놈을 포함하여, 현재 550종 이상에 대한 이용가능한 완전한 계놈 서열을 이용하여 (NCBI 등의 공공 데이터베이스에 이용가능한 것의 절반 이상), 공지 유전자의 예컨대 상동체, 오르소로그, 파라로그 및 비-오르소로그 유전자 치환, 및 유기체들 간의 유전자 변형의 교환을 포함하여, 관련 또는 비관련 종들에서의 하나 이상의 유전자에 대한 필수적인 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 활성을 코딩하는 유전자의 동정은 일상적이며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 즉, 에스케리치아 콜라이 등의 특정 유기체에 대해, 본원에 기술된 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생합성을 허용하는 대사적 변이는, 원핵 및 진핵 유기체를 막론하고 다른 미생물들에도 쉽게 적용할 수 있다. 본원에 제시된 교시 및 지침 하에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 한 가지 유기체에서 예시된 대사적 변이는 다른 유기체에도 동등하게 적용될 수 있는 것으로 알 것이다.

[0056] p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 생합성 경로의 대안 경로가 무관한 종에 존재하는 경우 등의 일부 경우에, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성은, 예컨대 동일하지 않지만 유사한 언급된 반응을 대체하는 대사 반응을 촉매하는 무관한 종 유래의 파라로그 또는 파라로그들의 외인성 발현에 의해, 숙주 종에 제공될 수 있다. 여러가지 유기체들 간에 대사 네트워크에 대한 일정한 차이가 존재하기 때문에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 상이한 유기체들간의 실제 유전자 용법은 상이할 수 있다. 그러나, 본원에 제시된 교시 및 지침 하에, 당해 기수 분야의 당업자라면, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 합성할 대상 종에서 미생물 유기체를 구축하기 위해, 본 발명의 내용과 방법들을 본원에 예시된 사항에 대한 동족의 대사 변이를 이용하여 모든 미생물 유기체에 적용할 수 있음을 이해할 것이다.

[0057] 비천연의 p-톨루에이트-, 테레프탈레이트- 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생산 숙주의 구축 방법 및 발현 수준을 테스트하는 방법은 예컨대 당해 기술 분야에 공지된 재조합 및 검출 방법에 의해 수행할 수 있다. 이러한 방법은, 예컨대, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); 및 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)에 언급된 내용에서 볼 수 있다.

[0058] p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생산 경로에 참여하는 외인성 핵산 서열은, 비제한적인 예로서, 접합, 전기충격, 화학적 형질전환, 형질전이, 형질감염 및 초음파 형질전환 등의 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 기법을 이용하여 숙주 세포로 안정적으로 또는 일시적으로 도입 할 수 있다. 에스케리치아 콜라이 또는 다른 원핵 생물 세포에서의 외인성 발현을 위해, 진핵 생물의 핵산의

유전자 또는 cDNA내 일부 핵산 서열은 N-말단 미토콘드리아 신호 또는 다른 타겟 신호와 같은 타겟 신호를 코딩 할 수 있으며, 상기 신호는 필요에 따라 원핵 생물 숙주 세포에 형질전환시키기 전에 제거할 수 있다. 예컨대, 미토콘드리아 리더 서열을 제거하면 에스케리치아 콜라이에서의 발현 증가로 이어진다 (Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005)). 효모 또는 다른 진핵 생물 세포에서의 외인성 발현을 위해, 유전자를 리더 서열 부가 없이 세포질에서 발현시키거나, 또는 숙주 세포에 적합한 미토콘드리아 표적 또는 분비 신호 등의 적합한 표적 신호를 부가함으로써, 미토콘드리아 또는 다른 기관으로 또는 분비되도록 타겟화될 수 있다. 즉, 타겟팅 서열을 제거하거나 포함하기 위한 핵산 서열에 대한 적절한 변형은 바람직한 특성 부여를 위해 외인성 핵산 서열에 통합될 수 있는 것으로 이해된다. 아울러, 유전자는 단백질의 최적화된 발현을 달성하기 위해, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 기법으로 코돈 최적화를 수행할 수 있다.

[0059]

발현 벡터 또는 벡터들은, 숙주 유기체에 기능하는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본원에 예시된 바와 같이 하나 이상의 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로를 코딩하는 핵산을 포함하도록 구축할 수 있다. 본 발명의 미생물 숙주 유기체에서 이용하기 위해 적용가능한 발현 벡터는, 예컨대, 플라스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜 및 숙주 염색체내로의 안정적인 삽입을 위해 작동가능한 벡터 및 선택 서열 또는 마커를 포함하는 인공 염색체를 포함한다. 또한, 상기 발현 벡터는 하나 이상의 선택성 마커 유전자와 적합한 발현 조절 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어 항생제 또는 독소에 대한 내성, 보완적인 영양요구성 결핍, 또는 배양 배지에 없는 주요 영양원의 공급을 제공하는, 선택성 마커 유전자도 포함할 수 있다. 발현 조절 서열은 당해 기술 분야에 널리 공지된 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 전사 인핸서, 전사 종결자 등을 포함할 수 있다. 2 이상의 외인성 코딩 핵산을 공동으로 발현시켜야 하는 경우, 두가지 핵산을 예를 들어 하나의 발현 벡터 또는 개별 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 하나의 벡터에서 발현시키는 경우, 코딩 핵산을 하나의 공통 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결시키거나 또는 하나의 유도성 프로모터 및 하나의 구성적 프로모터와 같은 여러가지 발현 조절 서열에 연결시킬 수 있다. 대사 또는 합성 경로에 관여하는 외인성 핵산 서열의 형질전환은 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법으로 검증할 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어 핵산 분석, 예를 들어 mRNA의 노던 블랏 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭, 또는 유전자 산물의 발현에 대한 면역블랏팅, 또는 도입된 핵산 서열 또는 이의 상응하는 유전자 산물의 발현을 테스트하기 위한 기타 적합한 분석 방법을 포함한다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 외인성 핵산이 바람직한 산물을 생산하는데 충분한 양으로 발현됨을 알 것이며, 발현 수준을 당해 기술 분야에 널리 공지되고 본원에 개시된 방법을 이용하여 충분한 발현이 이루어지도록 최적화할 수 있음을 또한 알 것이다.

[0060]

또한, 본 발명은, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 갖춘 비천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생산 방법을 제공한다. 이러한 미생물 유기체는, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는, 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제를 포함하는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 경로 (참조: 실시예 I 및 도 1, 단계 C)의 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 가질 수 있다. (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는, 선택적으로, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 및/또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 더 포함할 수 있다 (참조: 실시예 I 및 도 1, 단계 A 및 B).

[0061]

다른 구현예, 본 발명은, p-톨루에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, p-톨루에이트 경로를 갖춘 비천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, p-톨루에이트 생산 방법을 제공한다. 상기 p-톨루에이트 경로는 p-톨루에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는, 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 데하이드로게나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스페라제; 코리스메이트 신타제; 및/또는 코리스메이트 리아제를 포함하는 p-톨루에이트 경로 (참조: 실시예 II 및 도 2, 단계 A-H)의 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 포함할 수 있다. 다른 구현예, 본 발명의 방법은 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 (참조: 실시예 I 및 도 1)를 더 포함하는 비천연 미생물 유기체를 이용할 수 있다. 이러한 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 신타제 및/또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 포함할 수 있다 (참조: 실시예 I 및 도 1).

[0062]

본 발명은 또한 테레프탈레이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 테레프탈레이트 경로를 갖춘 비천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 테레프탈레이트 생산 방법을 제공한다. 상기 테레프탈레이트

경로는 테레프탈레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는, p-톨루에이트 메틸-모노옥시제나제 리덕타제; 4-카르복시벤질알코올 데하이드로제나제; 및/또는 4-카르복시벤질알데하이드 데하이드로제나제를 포함하는 테레프탈레이트 경로의 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 포함할 수 있다. 이러한 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로를 더 포함할 수 있으며, 이때 p-톨루에이트 경로는 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 신타제; 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제; 시키메이트 데하이드로제나제; 시키메이트 키나제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스페라제; 코리스메이트 신타제; 및/또는 코리스메이트 리아제로 구성된다 (참조: 실시예 2 및 3 및 도 2 및 3). 다른 구현예, 비천연 미생물 유기체는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 (참조: 실시예 I 및 도 1)를 더 포함할 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명은 미생물 유기체가 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 및 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 포함하는, 비천연 미생물 유기체 및 이의 사용 방법을 제공한다.

[0063] p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생산을 테스트하기 위한 적정 정제 및/또는 분석을 잘 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 테스트할 조작된 각 균주에 대해 3 세트 배양물과 같은 적합한 레플리케이트로 증식시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 조작된 생산 숙주에서의 산물 및 부산물의 생성을 모니터링할 수 있다. 최종 산물 및 중간산물, 및 기타 유기 화합물을 HPLC(고성능 액체 크로마토그래피), GC-MS(기체 크로마토그래피-질량 분광학), LC-MS(액체 크로마토그래피-질량 분광학) 및 UV-가시 분광학 또는 당해 기술 분야에 널리 공지된 통상적인 과정을 이용하는 그외 적정 분석 방법으로 분석할 수 있다. 발효 브로스에서 산물의 분비도 배양 상층액을 이용하여 테스트할 수 있다. 부산물 및 잔류 글루코스는, 예컨대 글루코스 및 알코올의 경우 굴절률 검출기, 및 유기산의 경우, UV 검출기(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 90:775-779 (2005))를 이용하여 HPLC로, 또는 당해 기술 분야에 널리 공지된 그외 적합한 분석 및 검출 방법으로 정량할 수 있다. 상기 외인성 DNA 서열 유래의 각 효소 또는 단백질 활성도 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 분석할 수 있다. 예를 들어, p-톨루에이트 메틸-모노옥시제나제 활성은 정제 효소를 NADH, FeSO<sub>4</sub> 및 p-톨루에이트 기질과 수조내에서 인큐베이션하고, 단백질의 침강에 의해 반응을 정지시키고, 상층액에서 HPLC에 의해 산물을 분석함으로써, 평가할 수 있다 (Locher et al., J. Bacteriol. 173:3741-3748 (1991)).

[0064] p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트는, 당해 기술 분야에 잘 알려진 다양한 방법을 이용하여 배양물에서 다른 성분들로부터 분리할 수 있다. 이러한 분리 방법으로는, 예컨대 추출 방법 뿐만 아니라, 연속적인 액체-액체 추출, 투석증발(pervaporation), 막 여과, 막 분리, 역삼투압, 전기투석, 중류, 결정화, 원심분리, 추출 여과(extractive filtration), 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 및 한외여과를 비롯한 방법들을 포함한다. 상기 방법들 모두 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0065] 본원에 기술된 임의의 비천연 미생물 유기체를 배양하여, 본 발명의 생합성 산물을 생산 및/또는 분리할 수 있다. 예컨대, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 생산체를 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생합성 생산을 위해 배양할 수 있다.

[0066] p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기 위해, 재조합 균주를 탄소원과 기타 필수 영양원이 첨가된 배지에서 배양한다. 전체 공정의 비용을 줄이기 위해 발효기에서 혐기성 조건을 유지하는 것이 때로는 매우 바람직할 것이다. 이러한 조건은, 예컨대 배지에 질소를 일차 분사한 다음 격막(septum)과 크림프-캡으로 플라스크를 밀봉함으로써 달성할 수 있다. 혐기 조건에서는 증식이 관찰되지 않는 균주의 경우, 제한된 호기를 위해 격막에 작은 구멍을 뚫어 미세호기 조건을 적용할 수 있다. 혐기 조건의 예들은 종래에 개시되어 있으며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 호기 조건 및 혐기 조건의 예들은 2007년 8월 10일자 미국 공개 공보 2009/0047719에 기술되어 있다. 발효는 본원에 개시된 바와 같이 배치, 피드-배치 또는 연속적인 방식으로 수행할 수 있다.

[0067] 적절한 경우, 배지의 pH는, 배양 배지를 원하는 pH로 유지하기 위해 필요에 따라 NaOH 또는 기타 염기, 또는 산을 첨가함으로써, 바람직한 pH, 특히 pH 약 7과 같은 중성 pH로 유지시킬 수 있다. 증식율은 분광광도계(600 nm)를 이용하여 광학 밀도를 측정함으로써 결정할 수 있으며, 글루코스 흡수율(uptake rate)은 시간에 따른 탄소원 고갈을 모니터링함으로써 결정할 수 있다.

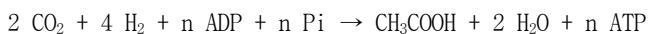
[0068] 배양 배지는, 예컨대 비천연 미생물에 탄소원을 공급할 수 있는 임의의 탄수화물 소스를 포함할 수 있다. 이러한 소스로는, 예컨대 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스, 프럭토스, 슈크로스 및 스타치와 같

은 당을 포함한다. 탄수화물의 다른 소스로는, 예컨대 재생가능한 공급 원료 및 바이오매스를 포함한다. 본 발명의 방법에 공급 원료로서 이용할 수 있는 바이오매스의 예시적인 타입으로는, 셀룰로직 바이오매스, 헤미셀룰로직 바이오매스 및 리그닌 공급원료 또는 공급원료의 일부를 포함한다. 이러한 바이오매스 공급원료로는, 예컨대 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스, 프리토스 및 스타치와 같은 탄소원으로서 이용가능한 탄수화물 기질을 포함한다. 본원에 제시된 교시 및 지침 하에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 상기에 예시된 것 이외의 재생가능한 공급원료 및 바이오매스는 또한 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생산을 위한 본 발명의 미생물 유기체를 배양하는데 사용할 수 있다.

[0069] 상기 예시된 물질과 같이 재생가능한 공급원료 외에도, 본 발명의 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 미생물 유기체 역시 탄소원으로서 합성가스 상에서 생장하도록 변형될 수 있다. 이러한 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 단백질 또는 효소는, 합성 가스 또는 다른 가스상 탄소원의 이용하기 위한 대사 경로를 제공하기 위해, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하는 유기체에서 발현시킨다.

[0070] 합성 가스(syngas) 또는 발생로 가스(producer gas)라고도 하는 합성 가스(synthesis gas)는 석탄의 기체화 및 농업 작물 및 잔류물을 포함하여, 바이오매스 물질과 같은 탄소질 물질의 주요 산물이다. 합성 가스는 주로 H<sub>2</sub> 및 CO로 구성된 혼합물이며, 비제한적인 예로, 석탄, 석탄 오일, 천연 가스, 바이오매스 및 폐기물 유기 물질 등의 임의의 유기 공급원의 기체화로부터 수득할 수 있다. 기체화는 일반적으로 높은 연료 대 산소 비율 하에 수행된다. 주로 H<sub>2</sub> 및 CO이지만, 합성 가스는 CO<sub>2</sub> 및 다른 기체를 더 소량으로 포함할 수 있다. 따라서, 합성 가스는 CO 및 추가적으로 CO<sub>2</sub> 등의 가스상 탄소의 비용 효율적인 소스를 제공한다.

[0071] Wood-Ljungdahl 경로는 CO와 H<sub>2</sub>의 아세틸-CoA 및 아세테이트와 같은 다른 산물로의 변환을 촉매한다. 또한, CO 및 합성가스를 이용할 수 있는 유기체는, 또한, 일반적으로, Wood-Ljungdahl 경로에 포함된 효소 및 변환(transformation)의 동일한 기본 세트를 통해 CO<sub>2</sub> 및 CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 혼합물을 이용하는 능력을 가진다. 동일 유기체에 의해 CO를 이용할 수 있으며 동일한 경로가 참여한다는 것이 밝혀지기 전까지, 오랜동안 미생물이 이산화탄소를 H<sub>2</sub>-의존적인 방식으로 아세테이트로 변환시키는 것으로 알고 있었다. 수소가 필수적인 환원 당량(reducing equivalent)의 공급원으로서 존재하는 한, 다수의 초산 생성균들이 이산화탄소의 존재 하에 증식할 수 있으며 아세테이트와 같은 화합물을 생산하는 것으로 확인되었다(예, Drake, *Acetogenesis*, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994)). 이를 아래 등식으로 정리할 수 있다:



[0073] 이때, Wood-Ljungdahl 경로를 가지고 있는 비천연 미생물은 CO<sub>2</sub> 및 H<sub>2</sub> 혼합물을 이용할 수 있을 뿐만 아니라 아세틸-CoA와 다른 원하는 산물을 생산할 수 있다.

[0074] Wood-Ljungdahl 경로는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 2가지의 분지로 분류될 수 있는 12가지의 반응으로 구성되어 있다: (1) 메틸 분지와 (2) 카르보닐 분지. 메틸 분지는 합성 가스를 메틸-테트라하이드로폴레이트(메틸-THF)로 변환시키고, 카르보닐 분지는 메틸-THF를 아세틸-CoA로 변환시킨다. 메틸 분지에서의 반응들은 다음과 같은 효소 또는 단백질에 의해 순차적으로 촉매된다: 폐례독신 옥시도리덕타제, 포르메이트 데하이드로제나제, 포르밀테트라하이드로폴레이트 신테타제, 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로데하이트라타제(dehydratase), 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로제나제 및 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제. 카르보닐 분지에서의 반응들은 다음과 같은 효소 또는 단백질에 의해 순차적으로 촉매된다: 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제(예, AcsE), 코리노이드 철-황 단백질, 니켈-단백질 어셈블리 단백질(예, AcsF), 폐례독신, 아세틸-CoA 신타제, 카본 모노옥사이드 데하이드로제나제 및 니켈-단백질 어셈블리 단백질(예, CooC). p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 경로 형성을 위한 충분한 수의 코딩 핵산을 도입하는 것에 대한 본원에 제공된 내용 및 지침을 따라, 당해 기술 분야의 당업자는, 숙주 유기체에 존재하지 않는 Wood-Ljungdahl 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산을 적어도 도입하는 측면에 대해, 동일한 조작 디자인을 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 변형된 유기체가 Wood-Ljungdah의 전체 경로를 포함하도록, 하나 이상의 코딩 핵산을 본 발명의 미생물에 도입하여, 합성 가스의 활용 능력을 부여할 것이다.

[0075] 또한, 카본 모노옥사이드 데하이드로제나제 활성 및/또는 하이드로제나제 활성과 커플링된 환원적 트리카르복시

산 사이클은, CO, CO<sub>2</sub> 및/또는 H<sub>2</sub>에서 아세틸-CoA 및 아세테이트와 같은 다른 산물로의 변환을 허용할 수 있다. 환원적 TCA 경로를 통해 탄소를 고정할 수 있는 유기체는 하나 이상의 다음과 같은 효소를 이용할 수 있다: ATP 사이트레이트-리아제, 사이트레이트 리아제, 아코니타제(aconitase), 이소시트레이트 데하이드로게나제, 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마레이트 리덕타제, 푸마라제(fumarase), 말레이트 데하이드로게나제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 카본 모노옥시드 데하이드로게나제, 및 하이드로게나제. 구체적으로, 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 및 하이드로게나제에 의한 CO 및/또는 H<sub>2</sub>에서 추출된 환원 당량을 이용하여, 환원적 TCA 사이클을 통해 CO<sub>2</sub>를 아세틸-CoA 또는 아세테이트로 고정한다. 아세테이트는 아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세테이트 키나제/포스포트랜스아세틸라제, 및 아세틸-CoA 신테타제와 같은 효소에 의해 아세틸-CoA로 변환시킬 수 있다. 아세틸-CoA는, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제 및 글루코스 신생 합성 효소에 의해, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 전구체들, 글리세르알데하이드-3-포스페이트, 포스포에놀피루베이트, 및 피루베이트로 변환시킬 수 있다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 만들기 위해 충분한 수의 코딩 핵산을 도입하기 위한 본원에 제시된 교시 및 지침에 따라, 당해 기술 분야의 당업자라면, 숙주 유기체에 존재하지 않는 환원적 TCA 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산을 적어도 도입하는 것에 관해서 유사한 조작 설계를 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 변형된 유기체가 환원적 TCA 전체 경로를 포함하도록, 하나 이상의 코딩 핵산을 본 발명의 미생물에 도입하여, 합성 가스의 활용 능력을 부여할 것이다.

[0076]

즉, 본원에 제시된 교시 및 지침 하에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 탄수화물과 같은 탄소원에서 생육시 본 발명의 생합성된 화합물을 분비하는 비천연 미생물 유기체를 생산할 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 화합물로는 예컨대 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로에서의 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 및 임의의 중간 대사산물을 포함한다. 모든 필요한 것은, 예컨대 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생합성 경로의 일부 또는 일부를 비롯하여, 바람직한 화합물 또는 중간 산물의 생합성을 달성하기 위해 필요한 효소 또는 단백질 활성의 한가지 이상을 조작하는 것이다. 이에, 본 발명은, 탄수화물 및 다른 탄소원에서 생육시 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산 및/또는 분비하며, 탄수화물 또는 다른 탄소원에서 생육시 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로에 나타난 임의의 중간 대사산물을 생산 및/또는 분비하는, 천연 미생물 유기체를 제공한다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하는 본 발명의 미생물 유기체는 중간 산물로부터 합성을 개시할 수 있다. 예를 들어, (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 중간 산물은 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 또는 C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트일 수 있다 (참조: 실시예 I 및 도 1). p-톨루에이트 경로의 중간 산물은 예컨대, 2,4-디하이드록시-5-메틸-6-[포스포노옥시]메틸]옥산-2-카르복실레이트, 1,3-디하이드록시-4-메틸-5-옥소사이클로헥산-1-카르복실레이트, 5-하이드록시-4-메틸-3-옥소사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 3,5-디하이드록시-4-메틸사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5-하이드록시-4-메틸-3-(포스포노옥시)사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸-3-(포스포노옥시)사이클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 또는 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸사이클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트일 수 있다 (참조: 실시예 II 및 도 2). 테레프탈레이트의 중간 산물은 예컨대, 4-카르복시벤질알코올 또는 4-카르복시벤즈알데하이드일 수 있다 (참조: 실시예 III 및 도 3).

[0077]

본 발명의 비천연 미생물 유기체는, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기에 충분한 양으로 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산을 외인성으로 발현하도록, 본원에 예시된 당해 기술 분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 구축한다. 본 발명의 미생물 유기체는 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기에 충분한 조건 하에서 배양하는 것으로 이해된다. 본원에 제시된 교시 및 지침에 따라, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 세포내 농도 약 0.1-200 mM 이상으로 형성되는 생합성을 달성할 수 있다. 일반적으로, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 세포내 농도는 약 3-150 mM, 특히 약 5-125 mM, 보다 구체적으로 약 8-100 mM이며, 예로, 약 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM 또는 그 이상을 포함한다. 이를 예시적인 범위 각각의 범위 및 상기 수준의 세포내 농도 역시 본 발명의 비천연 미생물 유기체로부터 달성할 수 있다.

[0078]

일부 구현예에서, 배양 조건은 협기적 또는 실질적으로 협기적 배양 또는 유기 조건을 포함한다. 예시적인 협기 조건은 종래에 개시되어 있으며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 발효 공정에 대한 예시적인 협기 조건은 본원에 기술되어 있으며, 예컨대 2007년 8월 10일자 미국 공개공보 2009/0047719에 기술되어 있다. 이러한 조건들 중 임의의 조건을 비천연 미생물 유기체로 이용할 수 있으며, 뿐만 아니라 당해 기술 분야에 잘 알려진 다른 협기 조건을 이용할 수 있다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생산체들은, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 세포내 농도 5-10 mM 뿐만 아니라 실질적으로 협기 조건 하에 예시된 다른 농도로 합성할 수 있다. 전술한 내용이 세포내 농도를 언급하고 있더라도, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하는 미생물 유기체들은 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 세포내에서 생산할 수 있으며, 및/또는 배양 배지로 산물을 분비할 수 있는 것으로 이해된다.

[0079]

본원에 기술된 배양 및 발효 조건 외에도, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생합성을 달성하기 위한 생육 조건은, 배양 조건에 내삼투압제(osmoprotectant)의 추가를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 내삼투압제가 존재하는 조건에서 유지, 증식 및 발효할 수 있다. 간략하게는, 내삼투압제는 삼투 물질(osmolyte)로서 작용하며 본원에 기술된 미생물 유기체를 삼투 스트레스로부터 생존하도록 보조하는 화합물을 지칭한다. 내삼투압제로는, 베타인, 아미노산 및 당 트레할로스를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 이러한 것에 대한 비제한적인 예로는 글리신 베타인, 프랄린 베타인, 디메틸테틴, 디메틸설포니오프로피오네이트, 3-디메틸설포니오-2-메틸프로피오네이트, 피페콜산, 디메틸설포니오아세테이트, 콜린, L-카르니틴 및 엑토인이다. 일 측면에서, 상기 내삼투압제는 글리신 베타인이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 본원에 기술된 미생물 유기체를 삼투 스트레스로부터 보호하기에 적합한 내삼투압제의 양과 타입이 상기 사용되는 미생물 유기체에 따라 결정된다는 것을 알 것이다. 배양 조건에서의 내삼투압제의 양은, 예컨대 약 0.1 mM 이하, 약 0.5 mM 이하, 약 1.0 mM 이하, 약 1.5 mM 이하, 약 2.0 mM 이하, 약 2.5 mM 이하, 약 3.0 mM 이하, 약 5.0 mM 이하, 약 7.0 mM 이하, 약 10 mM 이하, 약 50 mM 이하, 약 100 mM 이하, 또는 약 500 mM 이하일 수 있다.

[0080]

배양 조건은, 예컨대 액체 배양 과정 뿐만 아니라 발효 및 그외 대규모 배양 과정을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명의 생합성 산물에 대해 특히 유용한 수율은 협기 또는 실질적으로 협기적 배양 조건에서 달성할 수 있다.

[0081]

본원에 기술된 바와 같이, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 생합성을 달성하기 위한 배양 조건의 일 예는 협기성 배양 또는 발효 조건을 포함한다. 일부 구현예들에서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 협기 또는 실질적인 협기 조건에서 유지, 배양 또는 발효시킬 수 있다. 간략하게는, 협기 조건은 산소가 없는 환경을 지칭한다. 실질적인 협기 조건은, 예를 들어, 배지내 용해된 산소 농도가 0 내지 10%의 포화율로 존재하는, 배양, 배치 발효 또는 연속 발효를 포함한다. 실질적인 협기 조건은 또한 산소 1% 미만의 분위기로 유지되는 밀폐된 챔버 안에서의 액체 배지내에서 또는 고체 한천 배지 상에서의 세포의 증식 또는 휴지를 포함한다. 상기 산소 비율은, 예컨대 상기 배양물에 N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 혼합물 또는 그외 적정 산소 이외의 기체 또는 기체들을 살포함으로써 유지할 수 있다.

[0082]

본원에 기술된 배양 조건은 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트를 생산하기 위한 규모 확대 및 연속 배양일 수 있다. 배양 공정의 예는, 피드-배치 발효(fed-batch fermentation) 및 배치 분리(batch separation); 피드-배치 발효 및 연속 분리, 또는 연속 발효 및 연속 분리를 들 수 있다. 이러한 공정들 모두 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 상업적인 양으로 생합성 생산하기에는 발효 공정이 특히 유용하다. 일반적으로, 그리고 비-연속 배양 공정을 이용하는 경우와 같이, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 연속 및/또는 거의 연속적인 생산은, 본 발명의 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트의 비천연 생산 유기체를 지수기(exponential phase)로의 증식을 유지 및/또는 거의 유지시키기 위해 충분한 영양분 및 배지에서 배양하는 단계를 포함할 것이다. 이러한 조건에서의 연속 배양은, 예컨대 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 이상의 기간동안의 배양을 포함할 수 있다. 추가적으로, 연속 배양은 1주일, 2주일, 3주일, 4주일 또는 5주일 이상에서 최대 수 개월까지의 장기간을 포함할 수 있다. 다른 예로, 본 발명의 유기체는 특정 용도에 적합하다면 수시간 배양할 수 있다. 상기 연속 및/또는 거의 연속 배양 조건은 이러한 예시된 기간 조건에 포함된 모든 시간 간격을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 아울러, 본 발명의 미생물 유기체의 배양 시간은 원하는 목적을 위해 산

물을 충분한 양으로 생산하기에 충분한 기간인 것으로 이해된다.

[0083] 발효 공정은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 간략하게, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생합성 생산하기 위한 발효는, 예컨대 피드-배치 발효 및 배치 분리; 피드-배치 발효 및 연속 분리, 또는 연속 발효 및 연속 분리로 실시할 수 있다. 배치 및 연속 발효 공정의 예는 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다.

[0084] 상당량의 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 연속 생산하기 위해, 본 발명의 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생산체를 이용한 전술한 발효 공정 외에도, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생산체는, 또한 예컨대 산물을 다른 화합물로 변환하는 화학적 합성 공정에 동시에 투입하거나, 또는 산물을 발효 배양물로부터 분리한 다음 이를 필요에 따라 산물을 다른 화합물로 변환하는 화학적 변환 공정을 진행할 수 있다.

[0085] 보다 우수한 생산체를 만들기 위해, 배양 조건을 최적화하기 위해 대사 모델 연구를 이용할 수 있다. 모델 연구를 통해 또한 경로의 이용성을 추가적으로 최적화하는 유전자 낫아웃을 설계할 수 있다(예, 미국 특허 공개번호 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654와 US 2004/0009466, 및 미국 특허 7,127,379). 모델 분석을 통해 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 보다 효율적으로 생산하는 방향으로 대사를 이동시키는 세포 생육에 대한 효과들을 신뢰성있게 예견할 수 있다.

[0086] 원하는 산물의 생합성에 유익한 대사 변이를 동정 및 설계하기 위한 한가지 컴퓨터 작업 방식은 OptKnock 전산 프래임워크이다(Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)). OptKnock은 표적 산물을 과생산하는 유전적으로 안정한 미생물을 만드는, 유전자 결손 또는 파괴 전략을 제시하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 프로그램이다. 구체적으로, 상기 프래임워크에서는 원하는 생화학물질이 세포 생육의 필수 부산물이 되도록 강제하는 유전자 조작을 제시하기 위해, 미생물의 전체 대사 및/또는 생화학적 네트워크를 조사한다. 전략적으로 배치시킨 유전자 결손 또는 그외 기능성 유전자의 파괴를 통해, 생화학적 생산을 세포 생육과 커플링시킴으로써, 생물반응기에서의 장시간 경과 후 상기 조작된 균주에 부과되는 생육 선택압은 강제적인 생육과 커플링된 생화학적 생산의 결과로서 성능을 개선시킨다. 마지막으로, 유전자 결손의 구축시, OptKnock에서 선택된 유전자들은 계놈에서 완전히 제거되기 때문에, 설계된 균주는 야생형 형태로 되돌아갈 가능성이 거의 없다. 따라서, 상기 컴퓨터를 통한 계산 방법을 이용하여, 원하는 산물의 생합성을 도출하는 대안적인 경로를 동정하거나, 또는 원하는 산물의 생합성을 추가로 최적화하기 위해 비천연 미생물 유기체와 조합하여 사용할 수 있다.

[0087] 간략하게 설명하면, OptKnock는 본원에서 세포 대사를 모델링하기 위한 계산 방법 및 시스템을 지칭하는 용어이다. OptKnock 프로그램은 특정 제한(particular constraint)을 플러스 밸런스 분석(FBA) 모델과 통합시킨 방법 및 모델 프래임워크에 관한 것이다. 이러한 제한으로는, 예컨대 정성적인 동역학 정보(qualitative kinetic information), 정성적인 조절 정보, 및/또는 DNA 마이크로어레이 실험 데이터를 포함한다. 또한, OptKnock는 예를 들어 플러스 밸런스 모델로부터 나오는 플러스 바운더리를 엄격하게 하고 후속적으로 유전자 추가 또는 결손시의 대사 네트워크의 성능 한계를 탐지함으로써, 다양한 대사 문제들에 대한 해법을 도출한다. OptKnock 전산 프래임워크는 대사 네트워크의 성능 한계의 유효 쿼리를 허용하는 모델 포뮬레이션을 구출할 수 있으며, 수득되는 혼합-정수 선형 계획의 문제점을 해결하는 방법을 제공할 수 있다. 본원에서 OptKnock로 지칭되는 대사 모델링 및 시뮬레이션 방법들은 예를 들어 2002년 1월 10일자로 출원된 미국 공개공보 2002/016854, 2002년 1월 10일자로 출원된 국제 특허 제 PCT/US02/00660, 및 2007년 8월 10일자로 출원된 미국 공개공보 2009/0047719에 개시되어 있다.

[0088] 산물의 생합성 생산에 유리한 대사 변이를 동정 및 설계하기 위한 또 다른 계산법은, SimPheny®로 칭하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 시스템이다. 이 계산법 및 시스템은 예컨대 2002년 6월 14일자로 출원된 미국 공개공보 2003/0233218 및 2003년 6월 13일자로 출원된 국제 특허 출원 PCT/US03/18838에 개시되어 있다. SimPheny®는 인 실리코(*in silico*) 네트워크 모델을 만들고 생물 시스템의 화학 반응들을 통해 매스, 에너지 또는 전하의 흐름을 시뮬레이션하여 상기 시스템에서의 화학 반응의 임의의 및 모든 가능한 작용기를 포괄하는 해결 영역을 규정함으로써, 상기 생물 시스템에서 허용되는 다양한 활성들을 결정할 수 있는 전산 시스템이다. 이러한 접근법은 상기 해결 영역이 포함되는 반응들의 공지된 화학량론 뿐만 아니라 반응을 통한 최대 플러스와 조합된 반응 열역학적 한계 및 용량 한계 등의 한계로 규정되기 때문에, 제한 조건 기반의 모델링(constraints-based

modeling)으로 지칭된다. 이러한 제한에 의해 규정되는 영역을 조사하여, 상기 생물 시스템 또는 그것의 생화학적 성분들의 표현형적 역량 및 행태를 결정할 수 있다.

[0089] 이러한 계산법은 생물 시스템들이 유연하고 다수의 다른 방식으로도 동일한 결과에 도달할 수 있기 때문에 생물학적 현실과 일치된다. 생물 시스템은 모든 살아있는 시스템들이 직면해야 하는 기본적인 제약들에 의해 제한되는 진화 기전을 통해 설계된다. 따라서, 제한 조건 기반의 모델링 전략은 이러한 일반적인 현실을 포괄한다. 더욱이, 제한 조건의 엄격화를 통해 네트워크 모델에 추가적인 제한을 계속적으로 부과하는 능력은 상기 해결 영역의 크기를 줄이게 되고, 그래서 생리학적 성능 또는 표현형을 예측할 수 있는 정확도가 향상된다.

[0090] 본 발명의 교시 및 지침을 감안하여, 당해 기술 분야의 당업자는 숙주 미생물 유기체에서 원하는 화합물의 생합성을 설계 및 구현하기 위해 대사 모델링 및 시뮬레이션에 다양한 계산 프래임워크를 적용할 수 있을 것이다. 이러한 대사 모델링 및 시뮬레이션 방법은, 예를 들어 SimPheny® 및 OptKnock로 상기에 데시된 전산 시스템을 포함한다. 본 발명을 예시하기 위해, 모델링 및 시뮬레이션을 위한 OptKnock 계산 프래임워크 체계와 관련하여 일부 방법들을 본원에서 기술한다. 당해 기술 분야의 당업자들은, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 임의의 이러한 다른 대사 모델링 및 시뮬레이션 계산 프래임워크 및 방법에, OptKnock를 이용한 대사 변이의 동정, 설계 및 구현을 적용하는 방법을 알 것이다.

[0091] 전술한 방법들은 파괴할 한가지 이상의 대사 반응 세트를 제공할 것이다. 상기 세트 또는 대사 변이의 각 반응의 소거시, 원하는 산물을 유기체가 생성하는 동안에 필수 산물로서 생산할 수 있다. 상기 반응들은 공지되어 있으므로, bilevel OptKnock 문제에 대한 해법은, 또한 상기 반응 세트의 각 반응을 촉매하는 하나 이상의 효소를 코딩하는 관련 유전자 또는 유전자들을 제공해 줄 것이다. 반응 세트, 및 각 반응에 참여하는 효소를 코딩하는 해당 유전자를 동정하는 것은 일반적으로 효소와 코딩 유전자 간의 관련성이 포함된 반응 데이터베이스를 이용한 반응들의 상관 관계를 통해 달성되는 자동화된 과정이다.

[0092] 일단 동정한 후, 원하는 산물을 달성하기 위해 파괴시켜야 하는 반응 세트는, 세트에 포함된 각 대사 반응을 코딩하는 하나 이상의 유전자의 기능적 파괴에 의해, 타겟 세포 또는 유기체에서 수행한다. 상기 반응의 기능적 파괴를 달성하는데 특히 유용한 한가지 수단은, 각 코딩 유전자의 결손이다. 그러나, 일부 경우에, 예컨대 프로모터 또는 조절 인자에 대한 cis 결합 부위와 같은 조절 영역의 돌연변이, 결손 등의 기타 유전적 이상에 의해, 또는 다수 위치들 중 임의 위치에서의 코딩 서열의 절단(truncation)에 의해, 상기 반응을 파괴하는 것이 유익할 수 있다. 유전자 세트의 전체 결손까지는 아닌 그 미만의 수준의 결손을 발생시키는 상기한 이상은, 예컨대 산물의 커플링의 신속한 평가가 필요할 때 또는 유전자 복원이 이루어질 가능성이 거의 없을 경우에, 유용할 수 있다.

[0093] 추가적인 반응 세트가 파괴되거나 또는 생육과 커플링된 원하는 산물의 생합성이 달성되도록 대사 변이를 유도하는, 전술한 bilevel OptKnock 문제에 대한 추가적인 생산적인 해법을 동정하기 위해, 정수 컷(integer cut)으로 칭해지는 최적화 방법을 실행할 수 있다. 상기 방법은 상기 예시된 OptKnock 문제를 각 반복에서 정수 컷으로 지정되는 추가적인 제한을 통합하여 반복적으로 해결함으로써 진행된다. 정수 컷 제한은, 상기 해결 과정으로, 산물 생합성과 생육을 필수적으로 조합시킨 임의의 이전 반복에서 동정되는 정확하게 동일한 반응 세트가 선택되지 않게 방지한다. 예컨대, 앞서 동정된 생육과 결합된 대사 변이에서 파괴시킬 반응들 1, 2 및 3가지가 명시된다면, 하기 제한으로 동일 반응이 후속 해법에서 동시에 고려되지 않도록 한다. 정수 컷 방법은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 예컨대 Burgard et al., *Biotechnol. Prog.* 17:791-797 (2001)에서 찾아 볼 수 있다. 대사 모델링 및 시뮬레이션을 위해 OptKnock 계산 프래임워크와의 조합 사용에 대한 본원에 기술된 모든 방법들에서와 같이, 반복적인 계산 분석에서 쓸데없는 반복을 줄이는 컷 방법을, 또한, 예컨대, SimPheny® 등의 당해 기술 분야에 널리 공지된 그외 계산 프래임워크와 함께 적용할 수 있다.

[0094] 타겟 생화학 산물을 동정된 유전자 변이를 가지도록 조작된 세포 또는 유기체의 생육과 필연적으로 커플링시키는 방법을 비롯하여, 본원에 예시된 방법들로, 원하는 산물을 생합성으로 생산하는 세포 및 유기체를 구축할 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 계산법은 OptKnock 및 SimPheny® 중에서 선택되는 인 실리코(*in silico*) 방법으로 확인되는 대사 변이를 동정 및 구현할 수 있다. 대사 변이 세트로는, 예컨대 하나 이상의 생합성 경로 효소들의 부가 및/또는 유전자 결손에 의한 파괴 등의 한가지 이상의 대사 반응의 기능적 파괴를 포함할 수 있다.

[0095] 전술한 바와 같이, OptKnock 방법은 오랜 기간의 생육 선택을 거쳤을 때 미생물 돌연변이 네트워크가 계산적으로 예측되는 최대-증식 표현형을 나타내는 방향으로 진화할 수 있다는 전제에서 개발되었다. 즉, 이러한 방법

은 선택압 하에서 유기체의 자기 최적화 능력을 활용한다. OptKnock 프레임워크는 네트워크 화학량론에 근거하여 생화학적 생산과 세포 증식을 강제로 커플링하는 유전자 결손의 조합을 철저하게 조사할 수 있다. 최적 유전자/반응 낫아웃을 확인하는데에는, 형성되는 네트워크에 대한 최적 증식 해법이 대상 생화학적 산물을 과생산하도록, 활성 반응 세트를 선택하는 2단식 최적화 문제의 해법이 요구된다(Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)).

[0096] 에스케리치아 콜라이 대사의 인 실리코 화학량론 모델을 채택하여, 기존에 예시되고, 예를 들어 미국 특허 공개 공보 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466, 및 미국 특허 7,127,379에 기술된 바와 같이, 대사 경로의 필수 유전자들을 동정할 수 있다. 본 발명에 개시된 바와 같이, OptKnock의 수리적 프레임워크를 적용하여, 원하는 산물을 증식과 조합하여 생산가능하게 하는, 유전자 결손을 정확하게 파악할 수 있다. 나아가, 상기 이단식 OptKnock 문제 해법은 오직 하나의 결손 세트만을 제공한다. 모든 의미 있는 해법들, 즉 증식과 조합되어 생산되게 하는 낫아웃 세트들을 모두 열거하기 위해, 정수 쿵으로 지칭되는 최적화 기법을 실행할 수 있다. 이는, 전술한 바와 같이, 각 반복에서 정수 쿵으로 지칭되는 추가적인 제한을 추가하면서 OptKnock 문제를 반복적으로 해결하는 과정을 수반한다.

[0097] 본원에 기술된 바와 같이, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로의 원하는 활성을 코딩하는 핵산을 숙주 유기체에 도입할 수 있다. 일부 경우에, p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 경로 효소 또는 단백질의 활성을 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 생산을 증가시키도록 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 예컨대, 단백질 또는 효소의 활성을 증가시키는 공지된 돌연변이는 코딩 핵산 분자에 도입시킬 수 있다. 아울러, 효소 또는 단백질의 활성을 높이거나 및/또는 저해 활성을 낮추기 위해, 예컨대 네거티브 조절자의 활성을 낮추기 위해, 최적화 방법을 적용할 수 있다.

[0098] 이러한 최적화 방법의 한가지가 방향성 진화(directed evolution)이다. 방향성 진화는, 효소의 특성을 개선 및/또는 변이시키기 위해, 특정 유전자로 표적화된 돌연변이를 도입하는 과정을 포함하는, 강력한 방법이다. 향상된 및/또는 변이된 효소는 다수의(예,  $>10^4$ ) 효소 변이체를 자동으로 스크리닝할 수 있는 민감성 고성능 스크리닝 분석을 개발 및 구현하여 동정할 수 있다. 돌연변이 유발 및 스크리닝의 반복 라운드를 전형적으로 수행하여 효소에 최적화된 특성을 부여할 수 있다. 돌연변이를 유발하기 위한 유전자의 영역들을 동정하는데 도움이 될 수 있는 수리적 알고리즘들도 또한 개발되었고, 제조 및 스크리닝할 필요가 있는 효소 변이체들의 수를 현저하게 줄일 수 있다. 다양한 변이체 라이브러리 제조에 유효한 다수의 방향성 진화 기법들이 개발되었고 (Hibbert et al., *Biomol. Eng.* 22:11-19 (2005); Huisman and Lalonde, In *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries* pgs. 717-742 (2007), Patel (ed.), CRC Press; Otten and Quax. *Biomol. Eng.* 22:1-9 (2005); 및 Sen et al., *Appl Biochem. Biotechnol.* 143:212-223 (2007)), 많은 효소 클래스들에서 매우 다양한 특성을 개선시키기 위해, 이러한 방법들이 성공적으로 적용되었다. 방향적 진화 기법에 의해 향상 및/또는 변이시킨 효소 특징들로는, 예컨대 비천연 기질의 변환을 위해, 선택성/특이성; 확실한 고온 처리를 위해 온도 안정성; 높거나 낮은 pH 조건에서의 생물학적 처리를 위해 pH 안정성; 기질 또는 산물 관용성, 이로써 높은 생산 역가를 달성할 수 있음; 비천연 기질들을 포괄하기 위한 광범위한 기질 결합성 등이, 결합성 ( $K_m$ ); 산물, 기질 또는 주요 중간산물에 의해 저해를 없애기 위한, 저해성 ( $K_i$ ); 원하는 플럭스를 달성하기 위해 효소적 반응 속도를 높이기 위한, 활성 ( $k_{cat}$ ); 단백질 수율 및 전체 경로 플럭스를 높이기 위한, 발현 수준; 초기 조건에서 공기 민감성 효소의 작동을 위한, 산소 안정성; 및 산소가 존재하지 않는 조건에서 호기성 효소의 작동을 위한, 혐기 활성이 있다.

[0099] 특정 효소의 원하는 특징을 표적하기 위한 유전자의 돌연변이 유발 및 다양화를 위한, 다수의 예시적인 방법들이 개발되었다. 이러한 방법들은 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 이러한 방법들 중 임의 방법을 이용하여 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 경로 효소 또는 단백질의 활성을 변형 및/또는 최적화시킬 수 있다. 이러한 방법으로는, 비제한적인 예로서, PCR 반응에서 DNA 중합효소의 필델리티를 낮춤으로써 랜덤 점 돌연변이를 도입하는 EpPCR (Pritchard et al., *J Theor. Biol.* 234:497-509 (2005)); 완전한 환형 플라스미드를 주형으로 사용하고 마지막 뉴클레오티드 2개에 엑소뉴클레아제 내성 포스페이트 결합을 구비한 랜덤 6 mer를 이용하여 플라스미드를 증폭시킨 다음 플라스미드를 탠덤 리피트에서 다시 환형화하는 세포로 형질전환시키는 것을 제외하고는, epPCR과는 비슷한, 애러-유발 롤링 서클 증폭(Error-prone Rolling Circle Amplification) (epRCA) (Fujii et al., *Nucleic Acids Res.* 32:e145 (2004); 및 Fujii et al., *Nat. Protoc.* 1:2493-2497 (2006)); 전형적으로 Dnase I 또는 Endo V 등의 뉴클레아

제로 2 이상의 변이체 유전자를 잘라, DNA 중합효소의 존재 하에 어닐링 및 연장 과정으로 이루어진 사이클로 재조립하는 랜덤 단편 풀을 제작함으로써 키메라 유전자 라이브러리를 제조하는, DNA 또는 패밀리 셔플링 (Family Shuffling) (Stemmer, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747-10751 (1994); 및 Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994)); 주형을 프라이밍한 후, 변성 및 매우 짧은 시간 동안(약 5초)의 어닐링/연장으로 2단계 PCR 사이클을 반복하는 과정을 수반하는, 스테거드 연장(Staggered Extension) (STEP) (Zhao et al., *Nat. Biotechnol.* 16:258-261 (1998)); 랜덤 서열 프라이머를 사용하여 주형의 여러 세그먼트에 상보적인 다수의 짧은 DNA 단편을 제조하는, 랜덤 프라이밍 재조합 (Random Priming Recombination, RPR) (Shao et al., *Nucleic Acids Res* 26:681-683 (1998))을 포함한다.

## [0100]

추가적인 방법으로는, 선형화된 플라스미드 DNA를 사용하여 미스매치 복원에 의해 복원되는 혜테로두플렉스를 형성하는, 혜테로두플렉스 재조합(Heteroduplex Recombination) (Volkov et al., *Nucleic Acids Res.* 27:e18 (1999); 및 Volkov et al., *Methods Enzymol.* 328:456-463 (2000)); Dnase I 잔편화 및 단일 가닥 ssDNA(ssDNA)의 크기 분획화를 이용하는, RACHITT (Random Chimeragenesis on Transient Templates) (Coco et al., *Nat. Biotechnol.* 19:354-359 (2001)); 주형의 풀로서 사용되는 단향성(unidirectional) ssDNA 단편들의 존재 하에 프라이머로부터 단향성으로 자라는 가닥의 주형 스위칭을 수반하는, RETT (Recombined Extension on Truncated templates) (Lee et al., *J. Molec. Catalysis* 26:119-129 (2003)); 축중(degenerate) 프라이머를 사용하여 분자들 간의 재조합을 조절하는 DOGS (Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling) (Bergquist and Gibbs, *Methods Mol. Biol.* 352:191-204 (2007); Bergquist et al., *Biomol. Eng.* 22:63-72 (2005); Gibbs et al., *Gene* 271:13-20 (2001)); 대상 유전자 또는 유전자 단편에서 1 bp가 결손된 조합 라이브러리(combinatorial library)를 만드는, ITCHY(Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes) (Ostermeier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3562-3567 (1999); 및 Ostermeier et al., *Nat. Biotechnol.* 17:1205-1209 (1999)); 포스포티오에이트 dNTA를 이용하여 절단체(truncation)를 제조하는 것을 제외하고는 ITCHY와 비슷한, THIO-ITCHY(Thio-Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzyme) (Lutz et al., *Nucleic Acids Res* 29:E16 (2001)); 재조합 유전자, ITCHY 및 DNA 셔플링 방법 2가지가 조합된 SCRATCHY (Lutz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11248-11253 (2001)); epPCR로 제작한 돌연변이를 유지되는 유용 활성을 스크리닝/선별하는, RNDM (Random Drift Mutagenesis) (Bergquist et al., *Biomol. Eng.* 22:63-72 (2005)); 포스포티오에이트 뉴클레오티드의 랜덤 병합 및 절단을 이용하여 랜덤 길이의 단편들의 풀을 제조하고, 이를 주형으로 사용하여 이노신 등의 "유니버설" 염기들의 존재 하에 연장시키고, 이노신-함유 상보체의 복제로 랜덤 염기 병합이 이루어지고, 결과적으로 돌연변이가 유발되는, 랜덤 돌연변이 유발 방법인, SeSaM (Sequence Saturation Mutagenesis) (Wong et al., *Biotechnol. J.* 3:74-82 (2008); Wong et al., *Nucleic Acids Res.* 32:e26 (2004); 및 Wong et al., *Anal. Biochem.* 341:187-189 (2005)); "타겟에서 모든 유전자 다양성"을 코딩하고 셔플링된 후대(shuffled progeny)에 대해 매우 다양한 다양성을 허용할 수 있도록 설계된 중첩 올리고뉴클레오티드를 사용하는, 합성 셔플링(Synthetic Shuffling) (Ness et al., *Nat. Biotechnol.* 20:1251-1255 (2002)); dUTP 병합 후 우라실 DNA 글리코실라제로 처리한 다음 피페리딘을 처리하여, 엔드포인트 DNA 발효를 수행하는 조합을 활용하는, 뉴클레오티드 교환 및 절개 기법(Nucleotide Exchange and Excision Technology) Next (Muller et al., *Nucleic Acids Res.* 33:e117 (2005))이 있다.

## [0101]

추가적인 방법으로는, 링커를 사용하여 2개의 관련성이 멀거나 관련성이 없는 유전자들 간의 융합을 촉진시키고, 2가지 유전자 간의 다양한 키메라를 제조하여 단일-교차 하이브리드 라이브러리를 형성하는, 서열 상동성-독립적인 단백질 재조합(SHIPREC) (Sieber et al., *Nat. Biotechnol.* 19:456-460 (2001)); 출발 물질이 삽입체를 포함하는 슈퍼코일형의 이중 가닥 DNA (dsDNA) 플라스미드와 원하는 돌연변이 부위에 대해 축중인 2개의 프라이머를 포함하는, 유전자 부위 포화 돌연변이 유발(Gene Site Saturation Mutagenesis, GSSM™) (Kretz et al., *Methods Enzymol.* 388:3-11 (2004)); 제한된 영역을 많은 수의 가능성 있는 아미노산 서열 변이로 치환하는 짧은 올리고뉴클레오티드 카세트를 사용하는, 조합 카세트 돌연변이 유발(Combinatorial Cassette Mutagenesis, CCM) (Reidhaar-Olson et al., *Methods Enzymol.* 208:564-586 (1991); 및 Reidhaar-Olson et al., *Science* 241:53-57 (1988)); 기본적으로 CCM과 비슷하며, 높은 돌연변이 유발율로 epPCR을 이용하여 핫 스팟과 핫 영역을 동정한 다음 CMCM으로 연장하여 단백질 서열 스페이스의 한정된 영역을 포괄(cover)하는, 조합성 다중 카세트 돌연변이 유발(Combinatorial Multiple Cassette Mutagenesis, CMCM) (Reetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591 (2001)); DNA 중합효소 III의 돌연변이 서브유닛을 코딩하는 *mutD5* 유전자를 이용하는 조건부 *ts* 돌연변이 유발 플라스미드를 사용하여, 선택하는 동안에 랜덤 및 천연 돌연변이 빈도를 20에서 4000 X로 증가시킬 수 있고, 선택이 필요하지 않을 때에 유해한 돌연변이의 축적을 차단할 수 있는, 돌연변이 유발 균주 기법(Mutator Strains technique) (Selifonova et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3645-3649

(2001)); Low et al., *J. Mol. Biol.* 260:359-3680 (1996))이 있다.

[0102] 추가적인 방법의 예로는, 선택된 아미노산의 조합 돌연변이(combinatorial mutation)를 분석 및 최적화하는 다향성 돌연변이 유발 방법인 LTM (Look-Through Mutagenesis) (Rajpal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8466-8471 (2005)); 한번에 여러 유전자에 적용할 수 있거나, 또는 단일 유전자의 대규모 키메라(복수의 돌연변이) 라이브러리를 제조할 수 있는 DNA 셔플링 방법인, 유전자 어셈블리 (Tunable GeneReassembly™ (TGR™) Technology supplied by Verenium Corporation), 특정 폴드를 가지고 있는 구조적으로 정의된 단백질 백본을 고정하며, 폴드와 전체 단백질 에너제틱스를 안정화시킬 수 있는 아미노산 치환에 대한 서열 스페이스를 검색하는 최적화 알고리즘이며, 일반적으로 공지된 3차원 구조를 가진 단백질에서 가장 효과적으로 작동하는, PDA (*in Silico* Protein Design Automation) (Hayes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15926-15931 (2002)); 및 구조/기능에 대한 지식을 이용하여 효소 개선이 가능한 부위를 선택하는 단계, Stratagene QuikChange (Stratagene; San Diego CA)와 같은 돌연변이 유발 방법을 이용하여 선택한 부위에서의 포화 돌연변이 유발 (saturation mutagenesis)을 수행하는 단계, 원하는 특징을 스크리닝/선별하는 단계, 및 개선된 클론(들)을 이용하여 다른 부위에 대해서도 다시 시작하여 원하는 활성이 달성될 때까지 계속 반복하는 단계를 포함하는, ISM (Iterative Saturation Mutagenesis) (Reetz et al., *Nat. Protoc.* 2:891-903 (2007); and Reetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45:7745-7751 (2006))이 있다.

[0103] 돌연변이 유발을 위한 임의의 전술한 방법들은 단독으로 또는 임의 조합하여 사용할 수 있다. 아울러, 방향성 진화 방법들 중 임의의 한가지 방법 또는 조합을 본원에 기술된 후천적인 진화 기법과 더불어 사용할 수 있다.

[0104] 본 발명의 다양한 구현예들의 작용에 실질적으로 영향을 미치지 않는 변형들은 본원에 기술된 본 발명의 정의내에 제공되는 것으로 이해된다. 따라서, 아래 실시예들은 예시하기 위한 의도일 뿐 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

#### 실시예 I

##### (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기 위한 경로의 예

[0107] 본 실시예는, 테레프탈산 (PTA) 전구체 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 (2H3M4OP)를 생산하기 위한 예시적인 경로를 설명한다.

[0108] p-톨루에이트 및 PTA 경로의 전구체는 2H3M4OP이다. 이 화합물은 도 1에 나타낸 3가지 효소적 단계에서 주요 대사산물 글리세르알데하이드-3-포스페이트 (G3P) 및 피루베이트로부터 파생될 수 있다. 첫번째 2 단계는 에스케리치아 콜라이와 이소프레노이드 생합성에 대한 메틸에리트리톨 포스페이트 (비-메발로네이트) 경로를 이용하는 다른 유기체들에 네거티브이다. 피루베이트 및 G3P를 먼저 축합하여, DXP 신타제 의해 1-데옥시-D-자일룰로스 5-포스페이트 (DXP)가 된다. 이후, DXP 리덕토이소머라제의 의해 환원 및 탄소 백본의 재배치를 촉매한다. 마지막으로, 새로운 디올 데하이드라타제가 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트를 p-톨루에이트 전구체 2H3M4OP로 변환시킨다.

[0109] **A. 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 (DXP) 신타제.** 피루베이트 및 G3P는 DXP 신타제 (EC 2.2.1.7) 의해 축합되어 DXP가 된다. 이 효소는 이소프레노이드 생합성의 비-메발로네이트 경로의 제1 단계를 촉매한다. 이 효소는 조인자로서 티아민 디포스페이트를 필요로 하며, 또한 순 레독스 교환은 없지만 환원된 FAD를 필요로 한다. 에스케리치아 콜라이 효소의 결정 구조를 이용가능하다 (Xiang et al., *J. Biol. Chem.* 282:2676-2682 (2007)(doi:M610235200, pii:10.1074/jbc.M610235200 doi)). 다른 효소들도 클로닝되었고, 미코박테리움 투베르쿨로시스(Bailey et al., *Glycobiology* 12:813-820 (2002) 및 아그로박테리움 투메팩시엔스 (Lee et al., *J. Biotechnol.* 128:555-566 (2007)(doi:S0168-1656(06)00966-7, pii:10.1016/j.jbiotec.2006.11.009, doi)에서 특정화되었다. 바실러스 섭틸리스 및 시네코시스티스 sp. PCC 6803 유래 DXP 신타제 효소는 에스케리치아 콜라이로 클로닝되었다 (Harker and Bramley, *FEBS Lett.* 448:115-119 (1999)(doi:S0014-5793(99)00360-9, pii).

#### 표 1

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>dxs</i>	AAC73523.1	1786622	에스케리치아 콜라이
<i>dxs</i>	P0A554.1	61222979	미코박테리움 투베르쿨로시스
<i>dxs11</i>	AAP56243.1	37903541	아그로박테리움 투메팩시엔스
<i>dxs</i>	P54523.1	1731052	바실러스 섭틸리스

s111945	BAA17089.1	1652165	시네코시스티스 sp. PCC 6803
---------	------------	---------	----------------------

[0111]

B. 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제 (EC 1.1.1.267). 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 (DXP)에서 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트로의 NAD(P)H-의존적인 환원 및 재배치는, 이소프레노이드 생합성의 비-메발로네이트 경로의 제2 단계에서, DXP 리덕토이소머라제 (DXR, EC 1.1.1.267)에 의해 촉매된다. NADPH-의존적인 에스케리치아 콜라이 효소는 dxr로 코딩된다(Takahashi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9879-9884 (1998)). 아라비돕시스 탈리아나 유래의 재조합 효소를 기능적으로 에스케리치아 콜라이에서 발현되었다 (Carretero-Paulet et al., *Plant Physiol.* 129:1581-1591 (2002)(doi:10.1104/pp.003798 (doi). 자이모모나스 모빌리스 및 미코박테리움 투베르쿨로시스 유래 DXR 효소가 특정화되었고, 결정 구조를 이용할 수 있다 (Grolle et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 191:131-137 (2000)(doi:S0378-1097(00)00382-7, pii); Henriksson et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62:807-813 (2006)(doi:S0907444906019196, pii;10.1107/S0907444906019196, doi). 가장 잘 특정화된 DXR 효소는 엄격하게 NADPH 의존적이나, 아라비돕시스 탈리아나 및 미코박테리움 투베르쿨로시스 유래의 효소들은 NADH와 낮은 수준으로 반응한다 (Argyrou and Blanchard, *Biochemistry* 43:4375-4384 (2004)(doi:10.1021/bi049974k, doi); Rohdich et al., *FEBS J.* 273:4446-4458 (2006)(doi:EJB5446, pii;10.1111/j.1742-4658.2006.05446.x, doi.).

표 2

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
dxr	AAC73284.1	1786369	에스케리치아 콜라이
dxr	AAF73140.1	8131928	아라비돕시스 탈리아나
dxr	CAB60758.1	6434139	자이모모나스 모빌리스
dxr	NP_217386.2	57117032	미코박테리움 투베르쿨로시스

[0112]

C. 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 데하이드라타제. 디올 데하이드라타제는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트를 p-톨루에이트 전구체로 변환하는데 필요하다 (Altmiller and Wagner, *Arch. Biochem. Biophys.* 138:160-170 (1970)). 이러한 변환은 실험을 통해 입증되지 않았지만, 몇 가지 효소들이 디하이드록시-산 데하이드라타제 (EC 4.2.1.9), 프로판디올 데하이드라타제 (EC 4.2.1.28), 글리세롤 데하이드라타제 (EC 4.2.1.30) 및 미오-이노토스(myo-inositolose) 데하이드라타제 (EC 4.2.1.44) 등의 유사한 변환들을 촉매한다.

[0114]

이차 디올 2,3-부탄디올을 2-부타논으로 변환할 수 있는 디올 데하이드라타제 또는 프로판디올 데하이드라타제 효소들은 (EC 4.2.1.28) 이러한 변환에 우수한 후보 효소들이다. 아데노실코발라민-의존적인 디올 데하이드라타제는 알파, 베타 및 감마 서브유닛을 포함하며, 이들 모두 효소 기능에 필수적이다. 후보 유전자의 예들은 클렙시엘라 뉴모니애 (Tobimatsu et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:1774-1777 (1998); Toraya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480 (1976)), 살모넬라 티피무리움 (Bobik et al., *J. Bacteriol.* 179:6633-6639 (1997)), 클렙시엘라 옥시토카 (Tobimatsu et al., *J. Biol. Chem.* 270:7142-7148 (1995)) 및 락토바실러스 콜리노이데스(*Lactobacillus collinoides*)(Sauvageot et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 209:69-74 (2002))에서 확인된다. 다른 유기체에서 디올 데하이드라타제 후보 유전자를 분리하기 위한 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다 (참조: , 예컨대, 미국 특허 5,686,276).

표 3

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
pddA	BAA08099.1	868006	클렙시엘라 옥시토카
pddB	BAA08100.1	868007	클렙시엘라 옥시토카
pddC	BAA08101.1	868008	클렙시엘라 옥시토카
pduC	AAB84102.1	2587029	살모넬라 티피무리움
pduD	AAB84103.1	2587030	살모넬라 티피무리움
pduE	AAB84104.1	2587031	살모넬라 티피무리움
pduC	CAC82541.1	18857678	락토바콜루스 콜리노이데스
pduD	CAC82542.1	18857679	락토바콜루스 콜리노이데스

<i>pduE</i>	CAD01091.1	18857680	락토바콜루스 콜리노이데스
<i>pddA</i>	AAC98384.1	4063702	클렙시엘라 뉴모니애
<i>pddB</i>	AAC98385.1	4063703	클렙시엘라 뉴모니애
<i>pddC</i>	AAC98386.1	4063704	클렙시엘라 뉴모니애

[0116] 글리세롤 데하이드라타제 패밀리 (EC 4.2.1.30)에서의 효소를 이용하여 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트를 탈수시킬 수 있다. 예시적인 후보 유전자는 클렙시엘라 뉴모니애의 *gldABC* 및 *dhaB123* (WO 2008/137403) (Toraya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480 (1976)), 클로스트리듐 파스테우라눔의 *dhaBCE* (Macis et al., *FEMS Microbiol Lett.* 164:21-28 (1998)), 및 시트로박터 프레운디이의 *dhaBCE* (Seyfried et al., *J. Bacteriol.* 178:5793-5796 (1996))에 의해 코딩된다. 클렙시엘라 뉴모니애 유래의, 활성이 80배 내지 336배 강화된 B12-의존적인 디올 데하이드라타제의 변이체들은 최근에 베타 유닛의 잔기 2개에 돌연변이 도입에 의해 조작되었다 (Qi et al., *J. Biotechnol.* 144:43-50 (2009)(doi:S0168-1656(09)00258-2, pii:10.1016/j.jbiotec.2009.06.015, doi)). 불활성화 카이네티스가 감소된 디올 데하이드라타제 효소가 에러 유발 PCR (WO 2004/056963)에 의해 DuPont 사에 의해 개발되었다.

표 4

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>gldA</i>	AAB96343.1	1778022	클렙시엘라 뉴모니애
<i>gldB</i>	AAB96344.1	1778023	클렙시엘라 뉴모니애
<i>gldC</i>	AAB96345.1	1778024	클렙시엘라 뉴모니애
<i>dhaB1</i>	ABR78884.1	150956854	클렙시엘라 뉴모니애
<i>dhaB2</i>	ABR78883.1	150956853	클렙시엘라 뉴모니애
<i>dhaB3</i>	ABR78882.1	150956852	클렙시엘라 뉴모니애
<i>dhaB</i>	AAC27922.1	3360389	클로스트리듐 파스테우라눔
<i>dhaC</i>	AAC27923.1	3360390	클로스트리듐 파스테우라눔
<i>dhaE</i>	AAC27924.1	3360391	클로스트리듐 파스테우라눔
<i>dhaB</i>	P45514.1	1169287	시트로박터 프레운디이
<i>dhaC</i>	AAB48851.1	1229154	시트로박터 프레운디이
<i>dhaE</i>	AAB48852.1	1229155	시트로박터 프레운디이

[0118] B12-의존적인 디올 데하이드라타제를 이용가능하다면, 대응되는 재활성화 인자의 이종 발현이 권고된다. B12-의존적인 디올 데하이드라타제는 기질 및 일부 하위 산물에 의한 막-기반의 자살 활성화를 수행한다. 불활성 코발라민과의 밀접한 조합에 의해 야기되는 불활성화는 ATP-의존적인 방식으로 디올 데하이드라타제 재활성화 인자에 의해 부분적으로 극복될 수 있다. B12 조인자의 재생에는 추가적인 ATP가 요구된다. 디올 데하이드라타제 재생 인자는 2-서브유닛 단백질들이다. 후보의 예는 클렙시엘라 옥시토카 (Mori et al., *J. Biol. Chem.* 272:32034-32041 (1997)), 살모넬라 티피무리움 (Bobik et al., *J. Bacteriol.* 179:6633-6639 (1997); Chen et al., *J. Bacteriol.* 176:5474-5482 (1994)), 락토바실러스 콜리노이데스(Sauvageot et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 209:69-74 (2002)), 및 클렙시엘라 뉴모니애(WO 2008/137403)에서 확인된다.

표 5

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>ddrA</i>	AAC15871.1	3115376	클렙시엘라 옥시토카
<i>ddrB</i>	AAC15872.1	3115377	클렙시엘라 옥시토카
<i>pduG</i>	AAL20947.1	16420573	살모넬라 티피무리움
<i>pduH</i>	AAL20948.1	16420574	살모넬라 티피무리움
<i>pduG</i>	YP_002236779	206579698	클렙시엘라 뉴모니애
<i>pduH</i>	YP_002236778	206579863	클렙시엘라 뉴모니애
<i>pduG</i>	CAD01092	29335724	락토바실러스 콜리노이데스
<i>pduH</i>	CAD01093	29335725	락토바실러스 콜리노이데스

[0120]

B12-의존적인 디올 데하이드라타제 효소는 조인자로서 S-아데노실메티오닌(SAM)을 이용하여, 염격한 협기 조건 하에서 기능하며, 특이적인 활성화 효소에 의한 활성화를 필요로 한다 (Frey et al., *Chem. Rev.* 103:2129-2148 (2003)). *dhaB1* 및 *dhaB2*에 의해 코딩되는 클로스트리듐 부티리쿰의 글리세롤 데하이드로게나제 및 대응되는 활성화 인자가 잘 특정화되었다 (O'Brien et al., *Biochemistry* 43:4635-4645 (2004); Raynaud et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:5010-5015 (2003)). 이 효소는 최근 에스케리치아 콜라이의 1,3-프로판디올 파다생산 균주에서 이용되었고, 산물을 매우 높은 역가를 생산시킬 수 있었다 (Tang et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1628-1634 (2009)(doi:AEM.02376-08, pii:10.1128/AEM.02376-08, doi)). 로세부리아 이눌리니보란스로부터 추가적인 B12-의존적인 디올 데하이드라타제 효소와 활성화 인자들이 2,3-부탄디올에서 2-부타논으로의 변환을 촉매하는 것으로 확인되었다 (미국 공개 공보 2009/09155870).

표 6

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>dhaB1</i>	AAM54728.1	27461255	클로스트리듐 부티리쿰
<i>dhaB2</i>	AAM54729.1	27461256	클로스트리듐 부티리쿰
<i>rdhtA</i>	ABC25539.1	83596382	로세부리아 이눌리니보란스
<i>rdhtB</i>	ABC25540.1	83596383	로세부리아 이눌리니보란스

[0121]

디하이드록시-산 데하이드라타제 (DHAD, EC 4.2.1.9)는, 분지쇄 아미노산 생합성에 참여하는 B12-독립적인 효소이다. 자연적인 법칙상, 이 효소는 2,3-디하이드록시-3-메틸발레레이트를 이소루신의 전구체인 2-케토-3-메틸-발레레이트로 변환한다. 발린 생합성에서, 이 효소는 2,3-디하이드록시-이소발레레이트에서 2-옥소이소발레레이트로의 탈수를 촉매한다. 설풀로부스 솔파타리쿠스 유래의 DHAD는 광범위한 기질 범위를 가지며, 에스케리치아 콜라이에서 발현되는 재조합 효소의 활성은 다양한 알돈산들에서 확인되었다 (Kim and Lee, *J. Biochem.* 139:591-596 (2006)(doi:139/3/591, pii:10.1093/jb/mvj057, doi)). 설풀로부스 솔파타리쿠스 효소는 다수의 디올 데하이드라타제 효소와 다르게 산소를 허용한다. *iIvD*로 코딩되는 에스케리치아 콜라이 효소는 산소에 민감하여 철-황 클러스터를 불활성화한다 (Flint et al., *J. Biol. Chem.* 268:14732-14742 (1993)). 유사한 효소들이 뉴로스포라 크라사 (Altmiller and Wagner, *Arch. Biochem. Biophys.* 138:160-170 (1970)) 및 살모넬라 티피무리움 (Armstrong et al., *Biochim. Biophys. Acta* 498:282-293 (1977))에서 특정화되었다.

표 7

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>iIvD</i>	NP_344419.1	15899814	설풀로부스 솔파타리쿠스
<i>iIvD</i>	AAT48208.1	48994964	에스케리치아 콜라이
<i>iIvD</i>	NP_462795.1	16767180	살모넬라 티피무리움
<i>iIvD</i>	XP_958280.1	85090149	뉴로스포라 크라사

[0124]

디올 데하이드라타제 미오-이노소세-2-데하이드라타제 (EC 4.2.1.44)는 다른 예시적인 후보 효소이다. 미오-이노소세는 인접한 알코올기를 함유하는 6원 고리이다. 미오-이노소세-2-데하이드라타제 기능성을 코딩하는 정제 효소가 미오-이노시톨을 분해 측면에서 클렙시엘라 에어로게네스(*Klebsiella aerogenes*)에서 연구되었으나 (Berman and Magasanik, *J. Biol. Chem.* 241:800-806 (1966)), 지금까지 유전자와 관련지어지지는 않았다. 시노리조븀 프레디의 미오-이노소세-2-데하이드라타제가 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이에서 기능적으로 발현시켰다 (Yoshida et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:2957-2964 (2006)(doi:JST.JSTAGE/bbb/60362, pii)). 바실러스 섭틸리스 유래의 *ioLE*에 의해 코딩되는 유사 효소들도 연구되었다 (Yoshida et al., *Microbiology* 150:571-580 (2004)).

표 8

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>ioLE</i>	P42416.1	1176989	바실러스 섭틸리스
<i>ioLE</i>	AAX24114.1	60549621	시노리조븀 프레디

## [0126] 실시예 II

[0127] 시키메이트 경로 효소에 의한 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트로부터 p-톨루에이트의 합성 경로의 예

[0128] 본 실시예는 시키메이트 경로 효소를 이용한 p-톨루에이트 합성에 대한 경로의 예를 기술한다.

[0129] p-톨루에이트의 화학 구조는 전자 전달 유비퀴논의 전구체인 p-하이드록시벤조에이트와 매우 비슷하다. 4-하이드록시벤조에이트는 박테리아, 식물 및 진균에서 발견되는 시키메이트 경로에서의 효소에 의해 주요 대사 전구체로부터 합성된다. 시키메이트 경로는 D-에리트로스-4-포스페이트 (E4P) 및 포스포에놀피루베이트 (PEP)를 코리스메이트로 변환하는 효소적 여러 단계로 구성된다. 경로 효소로는, 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 (DAHP) 신타제, 데하이드로퀴네이트 (DHQ) 신타제, DHQ 데하이드라타제, 시키메이트 데하이드로게나제, 시키메이트 키나제, 5-에놀피루빌시키메이트-3-포스페이트 (EPSP) 신타제 및 코리스메이트 신타제가 있다. 경로의 제 1 단계에서, D-에리트로스-4-포스페이트와 포스포에놀피루베이트는 DAHP 신타제에 의해 연결되어, 3-데옥시-D-아라비노-헵톨로소네이트-7-포스페이트를 형성하다. 그런 후, 이 화합물은 탈인산화, 탈수 및 환원되어, 시키메이트를 형성한다. 시키메이트는 3가지 효소의 작용에 의해 코리스메이트로 변환된다: 시키메이트 키나제, 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제 및 코리스메이트 신타제. 코리스메이트에서 4-하이드록시벤조에이트로의 후속적인 변환은 코리스메이트 리아제에 의해 촉매된다.

[0130] p-톨루에이트의 합성은 도 2에 나타낸 바와 유사한 방식으로 진행된다. 경로는, PEP 및 E4P의 3-하이드록시기 대신 메틸기를 가진 E4P와 유사한 화합물인 2H3M4OP로부터 기원한다. E4P의 하이드록시기는 시키메이트 경로 반응의 화학 공정에 직접 참여하지 않아, 메틸-치환된 2H3M4OP 전구체는 대안적 기질로서 반응하는 것으로 예상된다. 방향성 또는 후천적 진화를 이용하여 기질로서 2H3M4OP 및 하위 유도체에 대한 선호성을 개선시킬 수 있다. 이러한 방법들은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0131] 시키메이트 경로 효소를 통한 플러스 효율을 증가시키기 위한 균주 조작 전략들도 본원에 적용가능하다. 경로 전구체 PEP의 이용가능성은 글루코스 수송 시스템 변형에 의해 증가시킬 수 있다 (Yi et al., *Biotechnol. Prog.* 19:1450-1459 (2003)(doi:10.1021/bp0340584, doi). 4-하이드록시벤조에이트-파다 생산 시스템을, 3-데옥시-D-아라비노헵톨로소낙산-7-포스페이트 신타제의 피드백-불응성 이소자임의 파다 발현을 이용함으로써, 시키메이트 경로를 통한 플러스를 개선시키도록 조작하였다 (Barker and Frost, *Biotechnol. Bioeng.* 76:376-390 (2001)(doi:10.1002/bit.10160, pii). 부가적으로, 시키메이트 경로 효소 및 코리스메이트 리아제의 발현 수준을 강화하였다. 비슷한 경로를 p-톨루에이트 파다생산을 위한 균주에서 이용할 수 있다.

[0132] A. 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 신타제 (EC 2.5.1.54). D-에리트로스-4-포스페이트 및 포스포에놀피루베이트의 축합은 2-데하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 (DAHP) 신타제(EC 2.5.1.54)에 의해 촉매된다. 이 효소에 대한 이소자임 3종이 에스케리치아 콜라이 계놈 *aroG*, *aroF* 및 *aroH*에 코딩되어 있으며, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판 각각에 의한 피드백 저해에 관여한다. 최소 배지에서 배양한 야생형 세포에서, *aroG*, *aroF* 및 *aroH* 유전자 산물은 DAHP 신타제 활성에 각각 80%, 20% 및 1%로 기여한다 (Hudson and Davidson, *J. Mol. Biol.* 180:1023-1051 (1984)(doi:0022-2836(84)90269-9, pii). *AroG*의 2개의 잔기들이 페닐알라닌에 의한 저해를 완화시키는 것으로 확인되었다 (Kikuchi et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 63:761-762 (1997)). 티로신에 의한 *AroF*의 피드백 저해는 단일 염기-쌍 변화에 의해 없어졌다 (Weaver and Herrmann, *J. Bacteriol.* 172:6581-6584 (1990)). 티로신-불응성 AHP 신타제는 에스케리치아 콜라이의 4-하이드록시벤조에이트-파생균주에서 파다발현되었다 (Barker and Frost, *Biotechnol. Bioeng.* 76:376-390 (2001)(doi:10.1002/bit.10160, pii)). *aroG* 유전자 산물은 다양한 엘터네이트 4- 및 5-탄소쇄 기질을 수용하는 것으로 확인되었다 (Shefalyan et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120(43):11027-11032 (1998); Williamson et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15:2339-2342 (2005)(doi:S0960-894X(05)00273-8, pii;10.1016/j.bmc.2005.02.080, doi). 이 효소는 2번 위치에 알코올이 결여된 D-에리트로스-4-포스페이트와 유사한 기질인 (3S)-2-데옥시에리트로스-4-포스페이트와 효율적으로 반응한다 (Williamson et al., *supra* 2005). 또한, 헬리코박터 필로리 및 피로코커스 푸리오수스 유래 효소는 이 엘터네이트 기질을 받아들이며 (Schofield et al., *Biochemistry* 44:11950-11962 (2005)(doi:10.1021/bi050577z, doi; Webby et al., *Biochem. J.* 390:223-230 2005)(doi:BJ20050259, pii;10.1042/BJ20050259, doi), 에스케리치아 콜라이에서 발현시켰다. 야생형 에스케리치아 콜라이 *AroG* 효소와 아미노산 7개가 다른 DAHP 신타제의 진화된 변이체는  $K_{cat}/K_m$  이 60배 개선된 것으로 확인되었다 (Ran and

Frost, *J. Am. Chem. Soc.* 129:6130-6139 (2007)(doi:10.1021/ja067330p, doi).

표 9

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>aroG</i>	AAC73841.1	1786969	에스케리치아 콜라이
<i>aroF</i>	AAC75650.1	1788953	에스케리치아 콜라이
<i>aroH</i>	AAC74774.1	1787996	에스케리치아 콜라이
<i>aroF</i>	Q9ZMU5	81555637	헬리코박터 필로리
<i>PF1690</i>	NP_579419.1	18978062	피로코커스 푸리오수스

[0134] B. 3-데하이드로퀴네이트 신타제 (EC 4.2.3.4). 도 2에 나타낸 바와 같이 기질 (2)(2,4-디하이드록시-5-메틸-6-[(포스포노옥시)메틸]옥산-2-카르복실레이트의 기질 (3)(1,3-디하이드록시-4-메틸사일로헥스-1-엔-1-카르복실레이트)로의 탈인산화는 3-데하이드로퀴네이트 신타제에 의한 3-데옥시-아라비노-헵툴로네이트-7-포스페이트의 탈인산화와 유사하다. 이 효소는 에스케리치아 콜라이 (Mehdi et al., *Methods Enzymol.* 142:306-314 (1987), 바실러스 섭틸리스 (Hasan and Nester, *J. Biol. Chem.* 253:4999-5004 (1978)) 및 미코박테리움 투베르콜로시스 *H37Rv* (de Mendonca et al., *J. Bacteriol.* 189:6246-6252 (2007)(doi:JB.00425-07, pii:10.1128/JB.00425-07, doi)에서 특정화되었다. 에스케리치아 콜라이 효소는 L-티로신에 의해 저해된다 (Barker and Frost, *Biotechnol. Bioeng.* 76:376-390 2001)(doi:10.1002/bit.10160, pii).

표 10

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>aroB</i>	AAC76414.1	1789791	에스케리치아 콜라이
<i>aroB</i>	NP_390151.1	16079327	바실러스 섭틸리스
<i>aroB</i>	CAB06200.1	1781064	미코박테리움 투베르콜로시스

[0136] C. 3-데하이드로퀴네이트 테하이드라타제 (EC 4.2.1.10). 3-데하이드로퀴네이트 테하이드라타제, 또한 3-데하이드로퀴나제 (DHQase)로 칭해지는 효소는, 본래 도 2의 p-톨루에이트 경로의 단계 C와 유사한 3-데하이드로퀴네이트에서 3-데하이드로시키메이트로의 탈인산화를 촉매한다. DHQase 효소는 기전, 입체 화학 및 서열 상동성을 근간으로 2개의 클래스로 분류될 수 있다 (Gourley et al., *Nat. Struct. Biol.* 6:521-525. (1999)(doi:10.1038/9287, doi)). 일반적으로, 1형 효소는 생합성에 관여하지만, 2형 효소는 역(분해) 방향으로 작동한다. 에스케리치아 콜라이 (Kinghorn et al., 유전자 14:73-80. 1981)(doi:0378-1119(81)90149-9, pii), 살모넬라 티피 (Kinghorn et al., *supra* 1981; Servos et al., *J. Gen. Microbiol.* 137:147-152 (1991)) 및 바실러스 섭틸리스 (Warburg et al., *Gene* 32:57-66 1984)(doi:0378-1119(84)90032-5, pii) 유래 1형 효소들이 클로닝되었고, 특정화되었다. 예시적인 2형의 3-데하이드로퀴네이트 테하이드라타제 효소들은 미코박테리움 투베르콜로시스, 스트렙토마이세스 코엘리콜라 (Evans et al., *FEBS Lett.* 530:24-30 (2002)) 및 헬리코박터 필로리 (Lee et al., *Proteins* 51:616-7 (2003))에서 클로닝되었다.

표 11

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>aroD</i>	AAC74763.1	1787984	에스케리치아 콜라이
<i>aroD</i>	P24670.2	17433709	살모넬라 티피
<i>aroC</i>	NP_390189.1	16079365	바실러스 섭틸리스
<i>aroD</i>	P0A4Z6.2	61219243	미코박테리움 투베르콜로시스
<i>aroQ</i>	P15474.3	8039781	스트렙토마이세스 코엘리콜라
<i>aroQ</i>	Q48255.2	2492957	헬리코박터 필로리

[0138] D. 시키메이트 테하이드로게나제 (EC 1.1.1.25). 시키메이트 테하이드로게나제는 도 2의 단계 D와 유사하게 3-데하이드로시키메이트에서 시키메이트로의 NAD(P)H 의존적인 환원을 촉매한다. 에스케리치아 콜라이 게놈은 여러가지 조인자 특이성을 가진 2가지의 시키메이트 테하이드로게나제 파라로그를 코딩한다. *aroE*에 의해 코딩

되는 효소는 NADPH 특이적인데 반해, *ydiB* 유전자 산물은 조인자로서 NADH(바람직함) 또는 NADPH를 이용할 수 있는 큐네이트/시카메이트 데하이드로제나제이다 (Michel et al., *J. Biol. Chem.* 278:19463-19472 (2003)(doi:10.1074/jbc.M300794200, doi:M300794200, pii)). 미코박테리움 투베르콜로시스 (Zhang et al., *J. Biochem. Mol. Biol.* 38:624-631 (2005)), 해모필루스 인플루엔자 (Ye et al., *J. Bacteriol.* 185:4144-4151 (2003)) 및 헬리코박터 필로리 (Han et al., *FEBS J.* 273:4682-4692 (2006)(doi:EJB5469, pii:10.1111/j.1742-4658.2006.05469.x, doi)) 유래 NADPH-의존적인 효소들이 에스케리치아 콜라이에서 기능적으로 발현되었다.

표 12

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>aroE</i>	AAC76306.1	1789675	에스케리치아 콜라이
<i>ydiB</i>	AAC74762.1	1787983	에스케리치아 콜라이
<i>aroE</i>	NP_217068.1	15609689	미코박테리움 투베르콜로시스
<i>aroE</i>	P43876.1	1168510	해모필루스 인플루엔자
<i>aroE</i>	AAW22052.1	56684731	헬리코박터 필로리

[0140] E. 시카메이트 키나제 (EC 2.7.1.71). 시카메이트 키나제는 도 2의 단계 E와 유사하게 시카메이트의 3-하이드록시기의 ATP-의존적인 인산화를 촉매한다 2가지 시카메이트 키나제 효소들이 에스케리치아 콜라이에 *aroK* (SK1) 및 *aroL* (SK2)에서 코딩되어 있다 (DeFeyter and Pittard, *J. Bacteriol.* 165:331-333 (1986); Lobner-Olesen and Marinus, *J. Bacteriol.* 174:525-529 (1992)). *aroL*로 코딩되는 SK2의 Km은 SK1 보다 100배 낮으며, 이는 이 효소가 방향적 생합성을 담당한다는 것을 의미한다 (DeFeyter et al., *supra* 1986). 미코박테리움 투베르콜로시스 (Gu et al., *J. Mol. Biol.* 319:779-789 (2002)(doi:10.1016/S0022-2836(02)00339-X, doi:S0022-2836(02)00339-X, pii); Oliveira et al., *Protein Expr. Purif.* 22:430-435 (2001)(doi:10.1006/prep.2001.1457, doi:S1046-5928(01)91457-3, pii), 헬리코박터 필로리 (Cheng et al., *J. Bacteriol.* 187:8156-8163 (2005)(doi:187/23/8156, pii:10.1128/JB.187.23.8156-8163.2005, doi) 및 에르위니아 크리산테미 (Krell et al., *Protein Sci.* 10:1137-1149 (2001)(doi:10.1110/ps.52501, doi) 유래 추가적인 시카메이트 키나제 효소들이 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되었다.

표 13

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>aroK</i>	YP_026215.2	90111581	에스케리치아 콜라이
<i>aroL</i>	NP_414922.1	16128373	에스케리치아 콜라이
<i>aroK</i>	CAB06199.1	1781063	미코박테리움 투베르콜로시스
<i>aroK</i>	NP_206956.1	15644786	헬리코박터 필로리
SK	CAA32883.1	42966	에르위니아 크리산테미

[0142] F. 3-포스포시카메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제 (EC 2.5.1.19). 3-포스포시카메이트-2-카르복시비닐트랜스퍼라제는 또한 5-에놀피루빌시카메이트-3-포스페이트 신타제 (EPSPS)라고도 불리우는 효소로, 포스포에놀 피루베이트의 에놀피루빌 모이어티를 시카메이트-3-포스페이트의 5-하이드록시로 전달하는 과정을 촉매한다. 이 효소는 에스케리치아 콜라이의 *aroA*에 코딩되어 있다 (Anderson et al., *Biochemistry* 27:1604-1610 (1988)). 미코박테리움 투베르콜로시스 (Oliveira et al., *Protein Expr. Purif.* 22:430-435 (2001)(doi:10.1006/prep.2001.1457, doi:S1046-5928(01)91457-3, pii), 두날리엘라 살리나 (Yi et al., *J. Microbiol.* 45:153-157 (2007)(doi:2519, pii) 및 스타필로코커스 아우래우스 (Priestman et al., *FEBS Lett.* 579:728-732 (2005)(doi:S0014-5793(05)00012-8, pii:10.1016/j.febslet.2004.12.057, doi) 유래 EPSPS 효소들이 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되었고, 기능적으로 발현되었다.

표 14

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>aroA</i>	AAC73994.1	1787137	에스케리치아 콜라이

<i>aroA</i>	AAA25356.1	149928	미코박테리움 투베르쿨로시스
<i>aroA</i>	AAA71897.1	152956	스타필로코커스 아우레우스
<i>aroA</i>	ABM68632.1	122937807	두날리엘라 살리나

[0144]

G. 코리스메이트 신타제 (EC 4.2.3.5). 코리스메이트 신타제는 5-에놀피루빌시키메이트-3-포스페이트의 코리스메이트로의 변환을 촉매하는 시키메이트 경로의 7번째 효소이다. 이 효소는 효소의 순 반응에 레독스 변화가 이루어지지 않지만 조인자로서 환원된 플라빈 모노뉴클레오티드(FMN)를 필요로 한다. 식물 및 박테리아에서 발견되는 효소와는 대조적으로, 진균에서의 코리스메이트 신타제 역시 NADPH를 소비하면서 FMN을 환원시킬 수 있다 (Macheroux et al., *Planta* 207:325-334 (1999)). 대표적인 한가지 기능의 효소는 에스케리치아 콜라이 (White et al., *Biochem. J.* 251:313-322 (1988)) 및 스트렙토코커스 뉴모니애 (Maclean and Ali, *Structure* 11:1499-1511 (2003)(doi:S0969212603002648, pii)의 *aroC*에 코딩되어 있다. 2가지 기능의 진균 효소들은 뉴로스포라 크라사 (Kitzing et al., *J. Biol. Chem.* 276:42658-42666 (2001)(doi:10.1074/jbc.M107249200, doi:M107249200, pii) 및 사카로마이세스 세레비지애 (Jones et al., *Mol. Microbiol.* 5:2143-2152 (1991))에서 클로닝되었다.

표 15

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>aroC</i>	NP_416832.1	16130264	에스케리치아 콜라이
<i>aroC</i>	ACH47980.1	197205483	스트렙토코커스 뉴모니애
<i>U25818.1:19..1317</i>	AAC49056.1	976375	뉴로스포라 크라사
<i>ARO2</i>	CAA42745.1	3387	사카로마이세스 세레비지애

[0145]

H. 코리스메이트 리아제 (EC 4.1.3.40). 코리스메이트 리아제는 유비퀴논 생합성의 첫번째 예정된 단계를 촉매한다: 코리스메이트로부터 피루베이트를 제거하여 4-하이드록시벤조에이트를 형성함. 효소 반응은 4-하이드록시벤조에이트 산물의 느린 방출에 의해 속도 제한되는데 (Gallagher et al., *Proteins* 44:304-311 (2001)(doi:10.1002/prot.1095, pii), 이는 4-하이드록시벤조에이트의 하위 막-결합된 효소로의 전달에 역할을 하는 것으로 생각된다. 에스케리치아 콜라이의 코리스메이트 리아제가 클로닝 및 특정화되었고, 이 효소는 결정화되었다 (Gallagher et al., *supra* 2001; Siebert et al., *FEBS Lett.* 307:347-350 (1992)(doi:0014-5793(92)80710-X, pii)). 구조 연구를 통해, 산물 저해에 기여하는 것으로서 G90 잔기가 암시되었다 (Smith et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 445:72-80 (2006)(doi:S0003-9861(05)00446-7, pii;10.1016/j.abb.2005.10.026, doi). 표면-활성 시스테인 잔기를 2개의 변현은 단백질 응집을 감소시켰다 (Holden et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1594:160-167 (2002)(doi:S0167483801003028, pii)). 미코박테리움 투베르쿨로시스 코리스메이트 리아제의 재조합 형태가 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이에서 특정화되었다 (Stadthagen et al., *J. Biol. Chem.* 280:40699-40706 2005)(doi:M508332200, pii;10.1074/jbc.M508332200, doi).

표 16

유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
<i>ubiC</i>	AAC77009.2	87082361	에스케리치아 콜라이
<i>Rv2949c</i>	NP_217465.1	15610086	미코박테리움 투베르쿨로시스

[0148]

B-F. 다기능성 AROM 단백질. 대부분의 박테리아에서, 시키메이트 경로의 효소들은 분리된 폴리펩타이드에 코딩되어 있다. 미생물 진핵 생물에서, 5가지의 효소 기능이 6가지 기능성의 슈퍼유전자에 의해 코딩된 다중 기능성 단백질에 의해 촉매된다 (Campbell et al., *Int. J. Parasitol.* 34:5-13 (2004)(doi:S0020751903003102, pii)). 다중 기능성 AROM 단백질 복합체는 두 가지의 B-F 반응들과 유사한 반응들을 촉매한다. AROM 단백질 복합체는 아스페질러스 니둘란스, 뉴로스포라 크라사, 사카로마이세스 세레비지애 및 뉴모시스티스 카리니이 등의 진균에서 특정화되었다 (Banerji et al., *J. Gen. Microbiol.* 139:2901-2914 (1993); Charles et al., *Nucleic Acids Res.* 14:2201-2213 (1986); Coggins et al., *Methods Enzymol.* 142:325-341 (1987); Duncan, K., *Biochem. J.* 246:375-386 (1987)). AROM의 몇가지 구성 요소들이 개별 폴리펩타이드로서 독립적으로 기능

하는 것으로 확인되었다. 예를 들어, 데하이드로퀴네이트 신타제 (DHQS)는 AROM의 아미노 말단 도메인을 형성 하며, 에스케리치아 콜라이에 클로닝시 독립적으로 기능할 수 있다 (Moore et al., *Biochem. J.* 301 ( Pt 1):297-304 (1994)). 아스퍼질러스 니둘란스 유래의 AROM의 몇가지 결정 구조들이 촉매 기전에 대한 통찰을 제공한다 (Carpenter et al., *Nature* 394:299-302 (1998)(doi:10.1038/28431, doi).

표 17

[0149]	유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
	<i>AROM</i>	P07547.3	238054389	아스퍼질러스 니둘란스
	<i>AROM</i>	P08566.1	114166	사카로마이세스 세레비지애
	<i>AROM</i>	P07547.3	238054389	아스퍼질러스 니둘란스
	<i>AROM</i>	Q12659.1	2492977	뉴모시스티스 카리니이

## [0150] 실시예 III

## p-톨루에이트에서 테레프탈산으로의 효소적 변환 경로의 예

본 실시예는 p-톨루에이트에서 테레프탈산 (PTA)으로의 변환을 위한 경로의 예를 기술한다.

p-톨루에이트는 도 3에 나타낸 효소적 단계 3단계로 메틸기의 산으로의 산화에 의해 PTA로 추가로 변환될 수 있다. 이 경로는 p-톨루에이트 메틸-모노옥시게나제 리덕타제, 4-카르복시벤질알코올 데하이드로게나제 및 4-카르복시벤질알데하이드 데하이드로게나제로 구성된다. 첫번째 단계에서, p-톨루에이트 메틸-모노옥시게나제는 O<sub>2</sub>의 존재하에 p-톨루에이트를 4-카르복시벤질알코올로 산화한다. 코마모나스 테스토스테로니 효소는 (*tsaB*M), 또는 기질로서 4-톨루엔과 반응하는 것으로, 정제 및 특정화되었다 (Locher et al., *J. Bacteriol.* 173:3741-3748 (1991)). 이후, 4-카르복시벤질알코올은 4-카르복시벤질알코올 데하이드로게나제 (*tsaC*)에 의해 알데하이드로 변환된다. 알데하이드에서 산으로의 변환은 4-카르복시벤즈알데하이드 데하이드로게나제 (*tsaD*)에 의해 촉매된다. 이 반응을 촉매하는 효소들은 탈소 및 에너지 단독 소스로서 p-톨루에이트를 이용하는 능력을 가진 유기체인 코마모나스 테스토스테로니 T-2에서 발견되었다 (Junker et al., *J. Bacteriol.* 179:919-927 (1997)). p-톨루에이트를 PTA로 변환하는 추가적인 유전자들이 서열 상동성에 의해 발견되었으며, 특히 벼크홀데리아, 알칼리게네스, 슈도모나스, 싱고모나스 및 코마모나스 속들의 프로테오박테리아에서 발견되었다 (미국 특허 6,187,569 및 미국 공개 공보 2003/0170836). 코마모나스 테스토스테로니 효소에 대한 유전자은행 식별체는 아래에 열거한다.

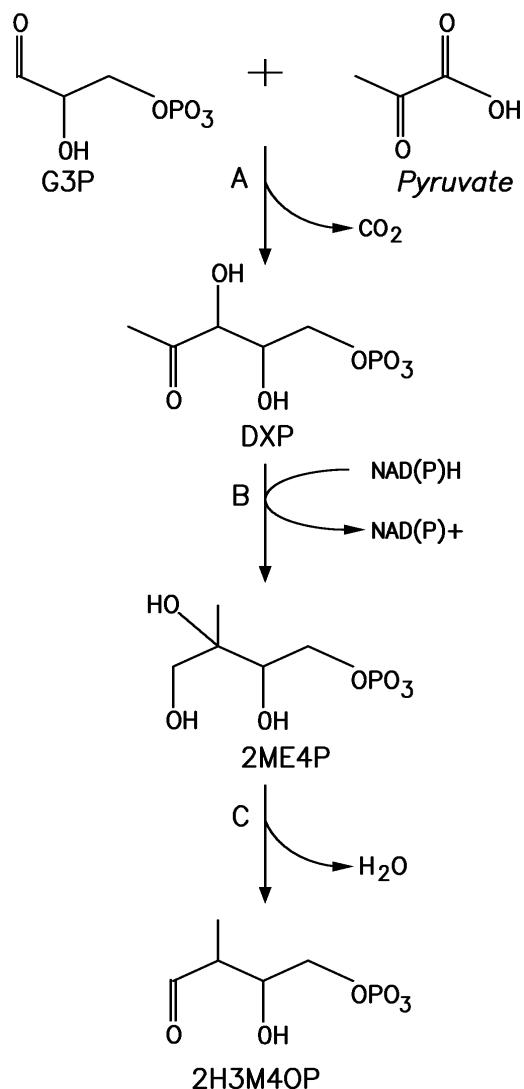
표 18

[0154]	유전자	유전자은행 등재 번호	GI 번호	유기체
	<i>tsaB</i>	AAC44805.1	1790868	코마모나스 테스토스테로니
	<i>tsaM</i>	AAC44804.1	1790867	코마모나스 테스토스테로니
	<i>tsaC</i>	AAC44807.1	1790870	코마모나스 테스토스테로니
	<i>tsaD</i>	AAC44808.1	1790871	코마모나스 테스토스테로니

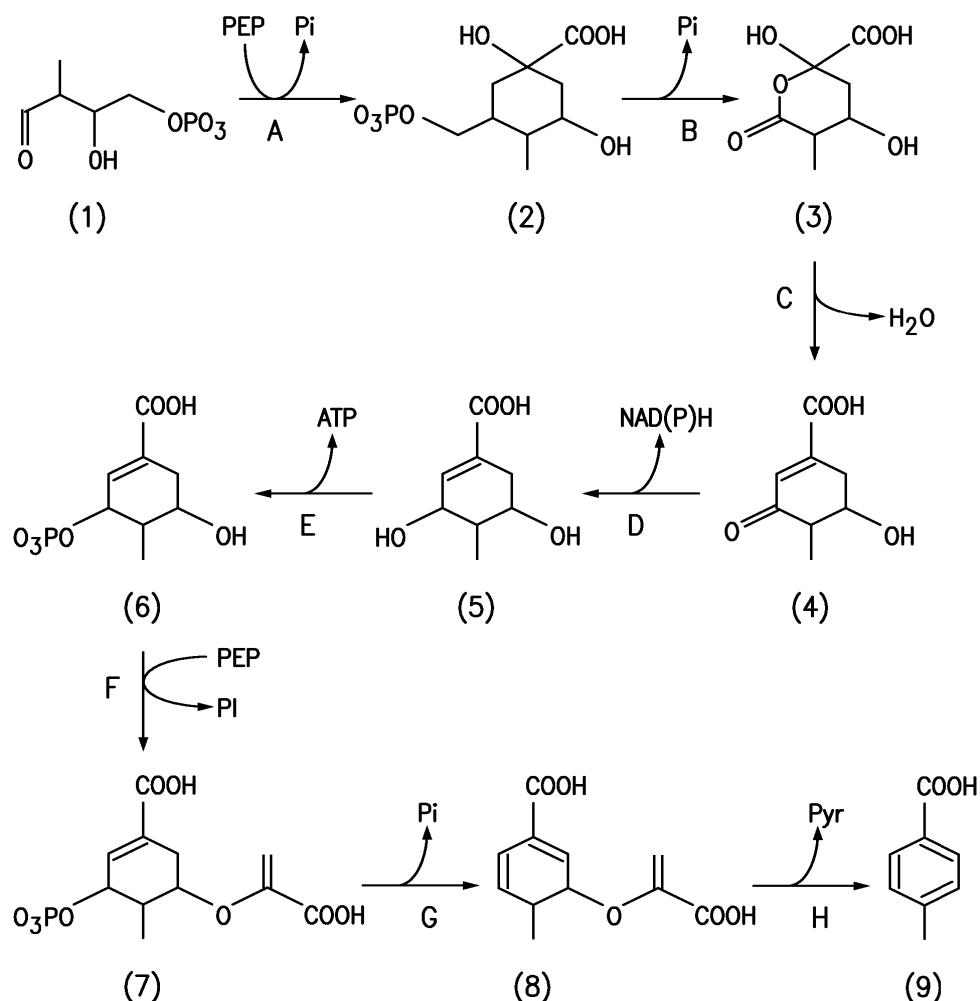
본 명세서 전체에 다양한 문헌들이 참조된다. 유전자은행 및 GI 번호 공개물을 비롯하여, 이들 공개 문헌의 내용은 그 전체가 본 발명이 속하는 기술 분야의 상황을 보다 충분히 설명하기 위해 본 명세서에 원용에 의해 포함된다. 본 발명은 전술한 실시예를 참조하여 언급되지만, 본 발명의 사상으로부터 이탈되지 않으면서 다양한 변형이 이루어질 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

도면

도면1



## 도면2



## 도면3

