(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0120493
(43) 공개일자 2012년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7017813
(22) 출원일자(국제) 2010년11월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년07월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/057525
(87) 국제공개번호 WO 2011/071682
국제공개일자 2011년06월16일
(30) 우선권주장
61/285,312 2009년12월10일 미국(US)

(71) 출원인
게노마티카 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 워터리지 써클 10520
(72) 발명자
버르가드 안소니 피.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 써클 10520
버크 마크 제이.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 써클 10520
파카야 프리티
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 써클 10520
(74) 대리인
유미특허법인

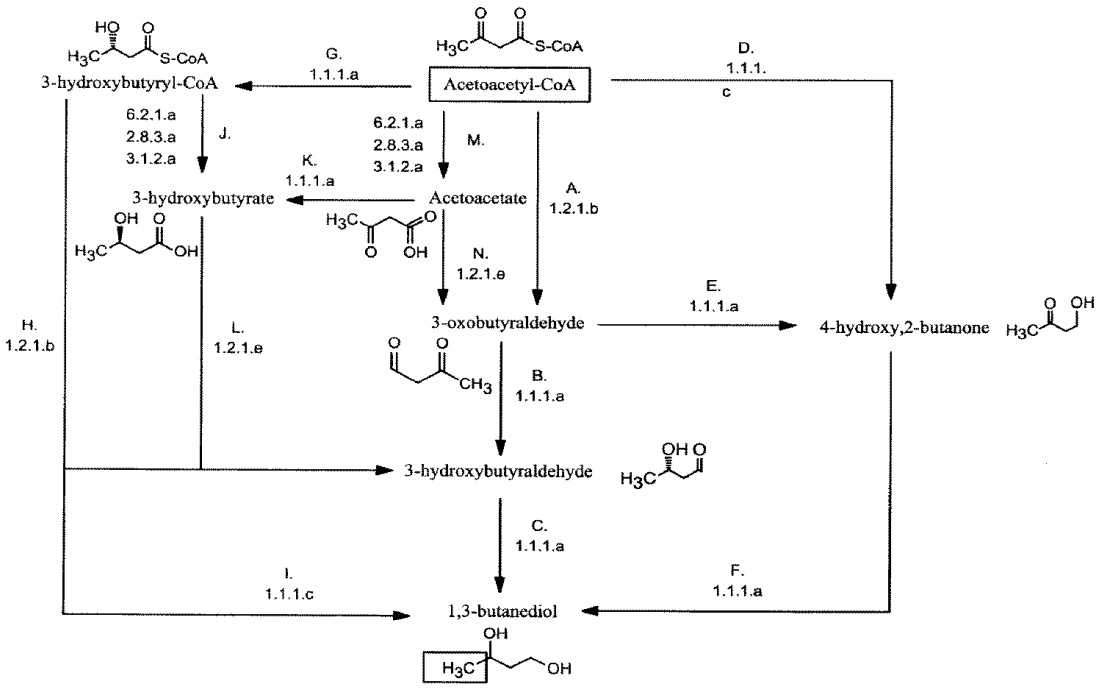
전체 청구항 수 : 총 79 항

(54) 발명의 명칭 **합성 가스 또는 기타 가스상 탄소원 및 메탄올을 1,3-부탄디올로 변환하는 방법 및 변환용 유기체**

(57) 요 약

1,3-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-BDO 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 1,3-부탄디올 (1,3-BDO) 경로를 포함하는 비천연 미생물 유기체에 관한 것이다. 상기 비천연 미생물 유기체를 1,3-BOD를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함하는 1,3-BDO 생산 방법에 관한 것이다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

1,3-부탄디올 (1,3-BDO) 경로를 포함하는 미생물 유기체를 포함하는 비천연 미생물 유기체로서,

상기 1,3-BDO 경로는 1,3-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-BDO 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하며,

상기 1,3-BDO 경로는, 포르메이트 데하이드로게나제, 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 페레독신 (Orf7), 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 하이드로게나제 (Hyd), 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신타제, 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신타제, 또는 아세토아세테이트 리덕타제를 포함하며,

상기 1,3-BDO 경로 효소는 아래 세트들로부터 선택되는 효소 세트인 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체:

A: 1) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 2) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 3) 포르메이트 데하이드로게나제, 4) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 5) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 6) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 7) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 8) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 9) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 10) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 11) 페레독신 (Orf7), 12) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 13) 하이드로게나제 (Hyd), 14) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 15) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 및 16) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

B: 1) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 2) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 3) 포르메이트 데하이드로게나제, 4) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 5) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 6) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 7) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 8) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 9) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 10) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 11) 페레독신 (Orf7), 12) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 13) 하이드로게나제 (Hyd), 14) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 15) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 16) 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 및 17) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

C: 1) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성); 2) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 3) 포르메이트 데하이드로게나제, 4) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 5) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 6) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 7) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 8) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 9) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 10) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 11) 페레독신 (Orf7), 12) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 13) 하이드로게나제 (Hyd), 14) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 및 15) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원);

D: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타

제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 15) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 및 16) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

E: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 15) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 및 16) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

F: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 및 15) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

G: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 15) 아세토아세테이트 리덕타제, 16) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 및 17) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

H: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 15) 아세토아세테이트 리덕타제, 16) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 및 17) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제; 및

I: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 15) 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 16) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 및 17) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 2종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 3종을 포함하는 것을

특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 4종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 5종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 6종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 7종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 8종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 9종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 10종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 11종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 12종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 13종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 14종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 15종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 16종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 17종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산(heterologous nucleic acid)인 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지 중에 존재하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는, 1) CO, 2) CO_2 및 H_2, 3) CO, CO_2, 및 H_2, 4) CO 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 5) CO, CO_2, 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 및 6) 하나 이상의 탄수화물로부터 선택되는 탄소 공급원료를 이용하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 21

제1항의 비천연 미생물 유기체를, 1,3-BDO를 생산하기 위한 조건에서 충분한 기간 동안 배양하는 단계를 포함하는, 1,3-BDO 생산 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 2종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 3종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 4종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 26

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 5종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 27

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 6종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 28

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 7종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 29

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 8종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 30

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 9종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 31

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 10종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 32

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 11종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 33

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 12종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 34

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 13종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 35

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 14종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 36

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 15종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 37

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 16종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 38

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 17종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 39

제21항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산인 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 40

제21항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 1) CO, 2) CO_2 및 H_2, 3) CO, CO_2, 및 H_2, 4) CO 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 5) CO, CO_2, 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 및 6) 하나 이상의 탄수화물로부터 선택되는 탄소 공급원료를 이용하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 41

1,3-부탄디올 (1,3-BDO) 경로를 포함하는 미생물 유기체를 포함하는 비천연 미생물 유기체로서,

상기 1,3-BDO 경로는 1,3-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-BDO 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하며,

상기 1,3-BDO 경로는, 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 코리노이드 단백질 (MtaC), 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 페레독신 (Orf7), 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 하이드로게나제 (Hyd), 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신타제, 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신타제, 또는 아세토아세테이트 리덕타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 1,3-BDO 경로 효소는 아래 세트들로부터 선택되는 효소 세트인 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체:

A: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 13) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 및 14) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

B: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 13) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 및 14) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

C: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 13) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 및 14) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

D: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 및 13) 3-하이드

록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성);

E: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 및 13) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

F: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 13) 아세토아세테이트 리덕타제, 14) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 및 15) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

G: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 13) 아세토아세테이트 리덕타제, 14) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 및 15) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

H: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 13) 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 14) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 및 15) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

I: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 13) 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 14) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 및 15) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제.

청구항 43

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 2종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 44

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 3종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 45

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 4종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 46

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 5종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 47

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 6종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 48

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 7종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 49

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 8종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 50

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 9종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 51

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 10종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 52

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 11종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 53

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 12종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 54

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 13종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 55

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 14종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 56

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 15종을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 57

제41항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산인 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 58

제41항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지 중에 존재하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 59

제41항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 1) 메탄올과 CO, 2) 메탄올, CO_2 및 H_2, 3) 메탄올, CO, CO_2, 및 H_2, 4) 메탄올과, CO 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 5) 메탄올과, CO, CO_2, 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 6) 하나 이상의 탄수화물, 7) 메탄올과 하나 이상의 탄수화물, 및 8) 메탄올로부터 선택되는 탄소 공급원료를 이용하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 60

제41항 또는 제42항의 비천연 미생물 유기체를 1,3-BDO를 생산하기 위한 조건에서 충분한 기간 동안 배양하는 단계를 포함하는 1,3-BDO 생산 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지 중에 존재하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 62

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 2종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 63

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 3종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 64

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 4종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 65

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 5종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 66

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 6종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 67

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 7종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 68

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 8종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 69

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 9종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 70

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 10종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 71

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 11종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 72

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 12종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 73

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 13종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 74

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 14종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 75

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 15종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 76

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 16종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 77

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 17종을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 78

제60항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산인 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법.

청구항 79

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 1) 메탄올과 CO, 2) 메탄올, CO_2 및 H_2, 3) 메탄올, CO, CO_2, 및 H_2, 4) 메탄올과, CO 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 5) 메탄올과, CO, CO_2, 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 6) 하나 이상의 탄수화물, 7) 메탄올과 하나 이상의 탄수화물, 및 8) 메탄올로부터 선택되는 탄소 공급원료를 이용하는 것을 특징으로 하는 1,3-BOD 생산 방법 .

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2009년 12월 10일자 미국 가출원 61/285,312에 대해 우선권을 주장하며, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0002] 본 발명은 일반적으로 생합성 공정에 관한 것으로, 보다 상세하게는 범용 화학물질의 제조시 탄수화물, 메탄올, 합성 가스 및 기타 가스상 탄소원을 이용할 수 있는 유기체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 1,3-부탄디올 (1,3-BDO)은 전통적으로 아세틸렌으로부터 수화 반응을 통해 제조되는 4 탄소 디올이다. 제조한 아세트알데하이드를 3-하이드록시부티르알데하이드로 변환시킨 후, 환원하여 1,3-BDO가 제조된다. 최근 몇년간, 아세트알데하이드의 원료로서 아세틸렌이 더 저렴한 에틸렌으로 대체되고 있다. 1,3-BDO는 식품 향미제용 유기용매로 통상 사용된다. 또한, 이것은 폴리우레탄과 폴리에스테르 수지에 대한 공-단량체로서 사용되며, 저혈당 제제로서 널리 사용되고 있다. 선택적으로 활성형 1,3-BDO는 생물학적 활성 화합물과 액정의 합성에 이용할 수 있는 출발 물질이다. 1,3-부탄디올의 다른 용도는, 탈수 반응을 통해 합성 고무(예, 타이어), 라텍스 및 수지 제조에 사용되는 화합물인 1,3-부타디엔을 제공하는 것이다 (Ichikawa et al., *J. Molecular Catalysis A-Chemical,* 231:181-189 (2005); Ichikawa et al., *J. Molecular Catalysis A-Chemical,* 256:106-112 (2006)).

[0004] 합성 가스(syngas)는 석탄, 석탄 오일, 천연 가스, 바이오매스 또는 폐유기물과 같은 임의의 유기 공급 원료의 기체화를 통해 수득할 수 있는, 주로 H_2와 CO로 이루어진 혼합물이다. 여러가지 기체화 공정들이 개발되어 있는데, 대부분은 산소 제한으로 완전 연소가 이루어지지 않는 고온(500 - 1500℃)에서의 유기 물질의 부분 산화를 통해, 합성 가스를 0.5:1-3:1 H_2/CO 혼합물로서 제조하는 원리에 입각하여 설계되어 있다. 때로는 증기를 가하여, 수소 함량을 높이며, 전형적으로 수성 가스 전환 반응(water gas shift reaction)을 통해 이산화탄소의 생산을 증가시킨다. 합성 가스 성분인 CO 및 H_2로부터 촉매 작용을 통해 산업적으로 가장 많이 생산되는 것은 메탄올이다.

[0005] 오늘날, 석탄은 합성 가스의 산업적 생산에 사용되는 주된 물질로서, 전통적으로 난방과 동력용으로, 그리고 메탄올과 액체 탄화수소의 피셔-트로프슈 합성의 공급 원료로서 사용된다. 많은 거대 화학 및 에너지 회사들은 석탄 가스화 공정을 대규모로 운영하고 있으며, 산업적으로 이러한 기술을 이용한 경험을 가지고 있다.

[0006] 아울러, 현재 사실상 전세계 도처에서 바이오매스, 폐기물, 폴리머 등의 과잉의 기타 물질들로부터 합성 가스를 비용 효율적으로 생산하는 기술이 존재하고 있다. 합성 가스는 바이오매스를 비롯하여 대부분의 유기 물질로부터 생산할 수 있기 때문에, 합성 가스 사용의 편리한 점은 유연성이다. 다른 이점은 합성 가스가 저렴하다는 것이다. 또한, 클로스트리듐 spp.(*Clostridium* spp.)와 같은 유기체에서와 같이, 합성 가스를 효율적으로 이용하는 경로가 공지되어 있다.

[0007] 합성 가스를 활용하는 유기체를 이용할 수 있음에도 불구하고, 대게 공지된 유기체들은 특정화가 미비한 편이고, 상업적인 개발에 그다지 적합하지 않다. 예컨대, 클로스트리듐 및 관련 박테리아는 부탄올과 같은 일부 고농도 산물에 민감한 절대 혐기성 생물이며, 따라서 역가(titer)와 상품화 가능성에 한계가 있다. 또한, 클로스트리디아는 여러가지 산물들을 생산하는데, 이는 원하는 산물을 수득함에 있어 분리하기 어려운 제약이 된다. 마지막으로, 클로스트리디아 유전자를 조작하기 위한 손쉬운 유전자 도구의 개발은 초기 단계에 머물러 있어, 원하는 산물의 수율 또는 생산 특성들을 향상시키도록 유전 공학 기술을 쉽게 적용하기 어렵다.

[0008] 화합물 생산에 있어 환경적 영향을 최소화하면서 저렴하고 쉽게 이용가능한 원료의 유연성을 높이는 것은 지속가능한 화학 산업의 2가지 목표이다. 원료의 유연성은 화합물 제조에 1차 공급원으로서 매우 다양한 물질들을 도입하여 이를 이용할 수 있는 방법의 도입에 달려있다. 아세틸렌 또는 에틸렌의 석유계 원료에 대한 의존성은 재생가능한 원료를 이용한 1,3-부탄디올 및 부타디엔의 제조 공정 개발에 동기가 된다.

[0009] 따라서, 1,3-부탄디올을 생산하기 위해 탄수화물, 메탄올, 합성 가스 또는 기타 가스상 탄소원을 이용하는 미생물 및 상기 미생물의 이용 방법을 개발할 필요가 있다. 본 발명은 이러한 필요성을 만족시키며, 관련된 이점들을 아울러 제공한다.

발명의 내용

[0010] 일부 측면에서, 본원에 기술된 구현예는, 1,3-부탄디올(1,3-BDO)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-BDO 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 1,3-BDO 경로를 가진 비-천연성 미생물 유기체에 관한 것이다. 상기 1,3-BDO 경로는 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 코리노이드(코리노이드) 단백질 (MtaC), 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 메틸테트라하이드로폴

레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 페레독신 (Orf7), 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 하이드로게나제 (Hyd), 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신타제, 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신타제, 또는 아세토아세테이트 리덕타제를 포함한다.

[0011] 일부 측면에서, 본 발명의 구현예는, 1,3-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-BDO 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 1,3-BDO 경로를 가진 비천연성 미생물 유기체에 관한 것이다. 상기 1,3-BDO 경로는, 포르메이트 데하이드로게나제, 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 페레독신 (Orf7), 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 하이드로게나제 (Hyd), 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신타제, 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신타제, 또는 아세토아세테이트 리덕타제를 포함한다.

[0012] 일부 측면에서, 본 발명의 구현예는, 1,3-BDO를 생산하기 위한 조건 및 충분한 기간 동안 전술한 비천연성 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 1,3-BDO 생산 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 아세테이트 및 에탄올에 대한 Wood-Ljungdahl 경로 및 생산 경로를 도시한 도표이다. 합성 가스에서 증식할 수 있는 유기체의 특징적인 변환 효소는, 1) CO 데하이드로게나제, 2) 하이드로게나제, 3) 에너지 소모성 하이드로게나제 (ECH), 및 4) 2중 기능성 CO 데하이드로게나제/아세틸-CoA 신타제이다.

도 2는 CO, CO_2, 및/또는 H_2 등의 가스를, 에탄올 또는 아세테이트와 같은 세포 매스 및 생성물로 이후 전환될 수 있는, 아세틸-CoA로 변환하는, 전체 Wood-Ljungdahl 경로를 나타낸 것이다. 약어: 10FTHF: 10-포르밀테트라하이드로폴레이트, 5MTHF: 5-메틸테트라하이드로폴레이트, ACTP: 아세틸 포스페이트, CFeSp: 코리노이드 철 황 단백질, FOR: 포르메이트, MeOH: 메탄올, METHF: 메틸테트라하이드로폴레이트, MLTHF: 메테네일테트라하이드로폴레이트, THF: 테트라하이드로폴레이트.

도 3은 아세토아세틸-CoA에서 1,3-부탄디올로의 변환 경로를 도시한 것이다. 효소적 단계는 다음과 같다: A) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), B) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), C) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, D) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), E) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), F) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, G) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), H) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), I) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), J) 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, K) 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, L) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, M) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제 N) 아세토아세테이트 리덕타제.

도 4는 글루코스 등의 탄수화물, CO, CO_2, 및/또는 H_2 등의 가스 및 메탄올을 아세틸-CoA로, 이를 다시 1,3-부탄디올로 변환시키는 생합성 대사 경로를 나타낸 것이다. 생산 숙주내에서 조작되는 특이적인 효소적 변환은 번호를 매기고, 도에 표기한다. 약어: 10FTHF: 10-포르밀테트라하이드로폴레이트, 5MTHF: 5-메틸테트라하이드로

폴레이트, ACTP: 아세틸 포스페이트, CFeSp: 코리노이드 철 황 단백질, FOR: 포르메이트, MeOH: 메탄올, METHF: 메틸테트라하이드로폴레이트, MLTHF: 메테네일테트라하이드로폴레이트, THF: 테트라하이드로폴레이트.

도 5는 글루코스 등의 탄수화물, CO, CO_2, 및/또는 H_2 등의 가스 및 메탄올을 아세틸-CoA로, 이를 다시 1,3-부탄디올로 변환시키는 생합성 대사 경로를 나타낸 것이다. 생산 숙주내에서 조작되는 특이적인 효소적 변환은 번호를 매기고, 도에 표기한다. 약어: 10FTHF: 10-포르밀테트라하이드로폴레이트, 5MTHF: 5-메틸테트라하이드로폴레이트, ACTP: 아세틸 포스페이트, CFeSp: 코리노이드 철 황 단백질, FOR: 포르메이트, MeOH: 메탄올, METHF: 메틸테트라하이드로폴레이트, MLTHF: 메테네일테트라하이드로폴레이트, THF: 테트라하이드로폴레이트.

도 6은 10 ㎍ ACS90 (레인 1), ACS91 (레인2), Mta98/99 (레인 3 및 4) 세포 추출물, 크기 표준 물질 (레인 5)과, 대조군 무어렐라 써모아세티카(*Moorella thermoacetica*) CODH (Moth_1202/1203) 또는 Mtr (Moth_1197) 단백질 (50, 150, 250, 350, 450, 500, 750, 900, 및 1000 ng)의 웨스턴 블롯 결과이다.

도 7은 메틸 비올로겐 분석에 사용된 큐벳을 도시한 것이다. 블랭크는 우측이고, 좌측은 환원된 메틸 비올로겐이 든 큐벳이다. 주의, 큐벳 각각에는 위에 마개와 진공 그리스(vacuum grease)를 사용하여 반응을 혐기 조건으로 유지시킨다.

도 8은 첨가된 CH_3-THF에서 정제된 무어렐라 써모아세티카 코리노이드 단백질로의 CH_3 이동을 분석한 ACS90 세포 추출물의 스펙트로그램이다.

도 9는 좌에서 우측 방향으로, N_2 및 CO 조건에서 36시간 동안 37℃에서, 재조합 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) MG1655, 빈 벡터, ACS90 및 ACS91을 혐기 배양한 것이다.

도 10은 Wood-Ljungdahl 경로 효소를 1,3-부탄디올 생합성 경로와 조합 사용함으로써, 글루코스로부터 1,3-부탄디올을 수율 1.09 mol/mol로 생산할 수 있는, 예시적인 플럭스 분포(flux distribution)를 도시한 것이다.

도 11은 기질로서 메탄올을 공동 이용할 수 있는 효소들을 사용함으로써, 글루코스로부터 1,3-부탄디올을 수율 1.2 mol/mol로 생산할 수 있는, 예시적인 플럭스 분포를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 탄수화물, 메탄올, 합성 가스 및/또는 기타 가스상 탄소원을 이용하여 1,3-부탄디올을 생산할 수 있는 미생물의 개발 및 이용에 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 합성 가스를 이용하는 다양한 미생물 제품, 합성 가스를 이용하여 1,3-부탄디올을 생산할 수 재조합 유기체의 제조, 및 이의 수율, 역가 및 생산성의 최적화에 관한 것이다. 증식과 화합물의 생산시 합성 가스를 기질로서 효율적으로 이용할 수 있는, 상업적인 규모로의 확장에 적합한, 재조합 유기체, 예컨대 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 기타 유기체들의 개발은, 비용 측면에서 효과적인 재생가능한 화합물 및 연료의 제조 공정을 제공한다. 유기체를 신속하고 적정한 비용으로 최적화하고 테스트할 수 있다.

[0015] 공급원료로서의 합성 가스의 가능성은, 관심 화합물 및 연료로 효과적으로 비용 효율적으로 변환시킬 수 있는 능력에 기인한다. 주요 2가지 합성 가스 변환 기술은 피셔-트로프슈 공정과 발효 공정이다. 피셔 트로프슈(F-T) 기술은 2차 세계대전 이후에 개발되었고, 메탄올 또는 혼성 탄화수소를 연료로서 효율적으로 생산할 수 있는 무기계 및 금속계 촉매를 사용한다. F-T 공정의 문제점은 다음과 같다: 1) 생성물에 대한 선택성 결여, 그 결과 원하는 생성물을 분리하기 어려움; 2) 독에 대한 촉매 민감성; 3) 필수적인 고온 및 압력으로 인한 고에너지 비용; 및 4) 상업적으로 경쟁력있는 가격으로 활용가능한 제품 범위의 한계.

[0016] 발효 공정의 경우, 합성 가스는 물질을 에탄올, 아세테이트 및 수소와 같은 산물로 변환시킬 수 있는 다수의 혐기성 미생물의 탄소원 및 에너지원으로서 사용되는 것으로 확인되었다. 합성 가스를 발효를 통해 변환하는 방법의 주된 이점은, 단일 산물 생산에 있어 유기체의 선택성, 합성 가스 불순물에 대한 높은 허용성, 낮은 조작 온도 및 압력, 및 합성 가스로부터의 대규모 포트폴리오 제품군의 제조 가능성이다. 발효 공정의 주된 단점은, 합성 가스를 변환시키는 것으로 공지된 유기체가 에탄올 및 아세테이트와 같이 매우 한정적인 범위의 화합물만 생산하는 경향을 가지고 있으며, 다른 화학제에 대해서는 효율적인 생산체가 아니며, 유전자 조작을 위해 확립된 유기체 툴이 미비하며, 유기체가 고농도의 최종 산물에 민감하다는 점이다.

[0017] 본 발명은 합성 가스 또는 기타 가스상 탄소원으로부터 1,3-부탄디올을 생산하는데 효율적인 미생물의 제조에 관한 것이다. 본 발명의 유기체 및 방법은, 전통적인 석유계 제품과, 글루코스, 슈크로스 또는 리그노셀루로직 당으로부터 직접 유래된 제품들에 비해 매우 유리한 비용 측면에서 1,3-부탄디올을 생산할 수 있다. 일 구현예

에서, 본 발명은, 도 4 및 5에 나타낸 바와 같이, 모 유기체에는 합성 가스를 이용하는 선천적인 능력이 결여된, 합성 가스 또는 기타 가스상 탄소원을 이용하여 1,3-부탄디올을 생산할 수 있는 비천연 미생물을 제공한다. 이러한 미생물에서는 하나 이상의 단백질 또는 효소가 미생물에서 발현되며, 이로써 합성 가스 또는 기타 가스상 탄소원을 이용하여 원하는 산물을 생산하는 경로가 부여된다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 모 유기체가 합성 가스 또는 기타 가스상 탄소원을 이용하여 원하는 제품을 생산하는 능력을 가지고 있는 경우에는, 예컨대 1,3-부탄디올 생산에 효율을 증가시킬 수 있는 하나 이상의 외인성 단백질 또는 효소를 발현시킴으로써, 유전자 변형된, 비천연 미생물을 제공한다. 따라서, 본 발명은 합성 가스를 이용할 수 있는 새로운 대사 경로를 가진 미생물 뿐만 아니라 합성 가스 또는 기타 가스상 탄소원을 이용하여 1,3-부탄디올을 생산하는 효율이 개선된 미생물의 제조에 관한 것이다.

[0018] 본 발명은, 추가적으로, MtaABC-타입의 메틸트랜스퍼라제 시스템과 연계하여, Wood-Ljungdahl 경로의 카르보닐-분지(branch)와 관련된 반응을 촉매하는 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는, 비천연 미생물을 제공한다. 이러한 유기체는, 합성 가스로부터 유래될 수 있는 비교적 비싸지 않은 유기 공급 원료인 메탄올과 CO, CO_2, 및/또는 H_2를 포함하는 기체를, 아세틸-CoA, 세포 매스 및 산물로 변환할 수 있다. 또한, 본 발명은, 외부에서 공급받거나 내부에서 생성되는, 메탄올 또는 이산화탄소에 존재하는 탄소를 고정하기 위한 효율적인 기전을 제공함으로써, 당연히 기대되는 바 이상으로, 탄수화물 공급 원료에 대한 1,3-부탄디올의 수율 증가, 즉 약 1 mol 1,3-부탄디올/mol(글루코스)을 달성할 수 있는 경로를 제공한다.

[0019] 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)는 최상의 유전자 도구 세트를 갖춘 산업적으로 많이 사용되는 유기체이다. CO_2, Co, 및/또는 H_2를, 모든 세포 매스 성분들과 다수의 유용 산물들이 파생될 수 있는 주요 대사산물인, 아세틸-CoA로 변환시키는 역량을, 에스케리키아 콜라이 등의 외래 숙주내로 조작하는 것은, Wood-Ljungdahl 경로의 다양한 단백질을 코딩하는 외인성 유전자를 발현시켜, 달성할 수 있다. 이러한 경로는 무어렐라 써모아세티카(*Moorella thermoacetica*) (기존에는 클로스트리듐 써모아세티컴(*Clostridium thermoaceticum*)이라고 불리었음)와 같은 초산 생성(acetogenic) 유기체에서 활발하게 작동하는 경로로, 1942년에 분리된 이래로 Wood-Ljungdahl 경로를 해명하기 위한 모델 유기체가 되었다 (Fontaine et al., *J Bacteriol.* 43:701-715 (1942)). Wood-Ljungdahl 경로는 2가지 분지로 구성된다: 우측, 즉, CO_2를 메틸테트라하이드로폴레이트 (Me-THF)로 변환시킬 수 있는 분지인 메틸와, 좌측, 즉, 메틸-THF, CO 및 코엔자임-A를 아세틸-CoA로 변환시킬 수 있는 분지인 카르보닐(도 1 및 2 참조). 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명은 1,3-부탄디올 생산을 위한 유전자 외에도, Wood-Ljungdahl 경로의 2가지 지류를 촉매하는 유전자들을 발현하는 비천연 유기체를 제공한다. 이러한 유기체는, CO, CO_2, 및/또는 H_2를 포함하는 가스를 아세틸-CoA, 1,3-부탄디올, 세포 매스 및 산물로 변환시킬 수 있다. 또한, 이러한 유기체는 화학량론적 최적 수율로 탄수화물로부터 1,3-부탄디올을 생산할 수 있다. 예를 들어, Wood-Ljungdahl 효소는, 아세틸-CoA를 1,3-부탄디올로 변환시키는 임의의 경로들과 조합하여, Wood-Ljungdahl 경로 효소의 부재시 달성가능한 글루코스 1 mol 당 1,3-부탄디올 1 mol과 비해, 글루코스 11 mol 당 1,3-부탄디올을 12 mol로 생산하는 수단을 제공한다.

[0020] 본 발명은, 부가적으로, 1,3-부탄디올 생산을 위한 유전자 외에도, MtaABC-타입의 메틸트랜스퍼라제 시스템과 연계하여, Wood-Ljungdahl 경로의 카르보닐-분지를 촉매하는 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는 비천연 미생물을 제공한다. 이 유기체는, 합성 가스로부터 유래될 수 있는 비교적 비싸지 않은 유기 공급 원료인 메탄올과 CO, CO_2, 및/또는 H_2를 포함하는 기체를, 아세틸-CoA, 1,3-부탄디올, 세포 매스 및 산물로 변환할 수 있다. 가스상 물질 외에도, 유기체는 메탄올만 이용할 수 있거나 또는 글루코스과 같은 탄수화물 원료와 조합하여 1,3-부탄디올을 고수율로 생산할 수 있다.

[0021] 합성가스(syngas) 또는 발생로 가스(producer gas)라고도 하는 합성 가스는, 석탄과, 농업 수확물 및 부산물을 비롯한 바이오물질 등의 탄소질 물질의 가스화 공정에서 나오는 주요 산물이다. 합성 가스는 주로 H_2와 CO로 이루어진 혼합물이며, 비제한적인 예로서, 석탄, 석탄 오일, 천연 가스, 바이오매스 및 폐유기물 등의 모든 유기 원료의 가스화로부터 수득할 수 있다. 가스화는 일반적으로 연료 대 산소 비율이 높은 조건에서 이루어진다. 합성 가스는 대체적으로 H_2와 CO를 포함하지만, 또한 CO_2와 기타 가스도 소량 포함될 수 있다. 따라서, 합성 가스는 CO 및 부가적으로 CO_2와 같은 가스상 탄소의 저렴한 공급원이다.

[0022] 본원에 기술된 바와 같이, 가스상 탄소원, 예컨대 CO 및/또는 CO_2를 포함하는 합성 가스는, 본 발명의 비천연 미생물에 의해 이용되어, 1,3-부탄디올로 제조된다. 본원에서는 합성 가스로 통상적으로 예시하였지만, 본 발

명의 비천연 미생물은 CO 및/또는 CO_2를 포함하는 가스상 탄소원을 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 탄소원으로서 CO 및/또는 CO_2를 이용할 수 있는 비천연 미생물에 관한 것이다.

[0023] Wood-Ljungdahl 경로는 CO 및 H_2를 아세틸-CoA 및 아세테이트와 같은 기타 산물로 변환되는 과정을 촉매한다. 또한, CO와 합성 가스를 이용할 수 있는 유기체는, 통상적으로, Wood-Ljungdahl 경로에 포함되는 동일한 기본 효소 및 변환 세트를 통해 CO_2 및 CO_2/H_2 혼합물을 이용할 수 있는 역량을 가지고 있다. 동일한 유기체들이 CO를 이용할 수 있으며 동일한 경로를 사용하는 것으로 밝혀지기 전까지, 오랜동안 미생물이 이산화탄소를 H_2-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:

[0024] $2\ CO_2 + 4\ H_2 + n\ ADP + n\ Pi \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O + n\ ATP$

[0025] 이때, Wood-Ljungdah 경로를 가지고 있는 비천연 미생물은 CO_2 및 H_2 혼합물을 이용할 수 있을 뿐만 아니라 아세틸-CoA와 1,3-부탄디올과 같은 다른 원하는 산물을 생산할 수 있다.

[0026] Wood-Ljungdahl 경로는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 2가지의 분지로 분류될 수 있는 23가지의 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: 페레독신 옥시도리덕타제, 포르메이트 데하이드로게나제, 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로데하이트라타제(dehydratase), 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제 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), 페레독신, 아세틸-CoA 신타제, 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 및 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (예, CooC). 아세틸-CoA 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-Ljungdah 경로의 한 분지 또는 전체 경로를 포함하도록, 하나 이상의 코딩 핵산을 본 발명의 미생물에 도입하여, 합성 가스의 활용 능력을 부여할 것이다.

[0027] 즉, 본 발명의 비천연 미생물은 CO 및/또는 CO_2를 제공하는 합성 가스 또는 기타 가스상 탄소원을 이용하여 1,3-부탄디올을 생산할 수 있다. CO_2의 경우, 추가적인 공급원으로는, 비제한적으로, 메탄이 CO_2로 변환되는 암모니아 및 수소 플랜트에서 부산물로서 생성되는 CO_2; 목재 및 화석 연료의 연소; 맥주, 위스키 및 기타 알코올 음료의 양조시 당 발효에 따른 부산물 또는 기타 발효 공정에 따른 부산물로서 CO_2의 생성; 석회, CaO 제조시 석회석 $CaCO_3$의 열적 분해; 소듐 포스페이트 제조시 부산물로서 CO_2의 생성; 및 석회석 또는 돌로마이트에 산성수가 작용하여 생성되는, 천연 이산화탄소 스프링스로부터의 직접 생성을 포함한다.

[0028] 초산 생성균, 예컨대 무어렐라 써모아세티카, 클로스트리듐 융달리이(*C. ljungdahlii*) 및 클로스트리듐 카복시디보란스(*C. carboxidivorans*)는 6탄당 내지 카본 모노옥사이드에 이르는 다양한 탄소원에서 증식할 수 있다. 6탄당, 예컨대 글루코스는 먼저 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) 당분해 반응을 통해 피루베이트로 대사된 다음, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제 (PFOR)를 통해 아세틸-CoA로 변환된다. 아세틸-CoA를 사용하여 바이오매스 전구체를 구축하거나, 또는 아세테이트 키나제 및 포스포트랜스아세틸라제를 통해 에너지를 생산하는 아세테이트로 변환할 수 있다. 글루코스에서 아세테이트, 에너지 및 환원 당량으로 변환되는 전 반응은 다음과 같다:

[0029] $C_6H_{12}O_6 + 4\ ADP + 4\ Pi \rightarrow 2\ CH_3COOH + 2\ CO_2 + 4\ ATP + 8\ [H]$

[0030] 초산 생성균은 글루코스에서 아세테이트로의 변환시 더 많은 에너지를 배출출하며, 동시에 방출된 이산화탄소를 Wood-Ljungdahl 경로를 통해 아세테이트로 다시 변환시켜 레독스 균형을 유지한다:

[0031] $2\ CO_2 + 8\ [H] + n\ ADP + n\ Pi \rightarrow CH_3COOH + n\ ATP$

[0032] 상기 식에서 계수 n은, 수소가 필수 환원 당량을 공급하도록 존재하는 한, 다수의 초산 생성균이 Wood-Ljungdahl 경로를 통해 이산화탄소의 존재 하에 증식할 수 있으므로, 상기 변환이 에너지를 발생시키는 공정임을 시사한다.

[0033] $2\ CO_2 + 4\ H_2 + n\ ADP + n\ Pi \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O + n\ ATP$

[0034] 도 1에 예시된 Wood-Ljungdahl 경로는 각각 Na^+- 또는 H^+-의존적인 ATP 신타제를 통해 ATP를 발생시킬 수 있는 Na^+ 또는 H^+ 이온 농도 구배 형성과 연합된다. Muller V. Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69:6345-6353 (2003). 공지된 전환(transformation)을 통해, 초산 생성균 역시 단독 탄소 에너지원으로서 일산화탄소를 이용하는 능력을 가지고 있다. 구체적으로, 일산화탄소를 산화시켜 환원 당량과 이산화탄소를 발생시키거나, 또는 직접 아세틸-CoA로 동화시킨 후 바이오매스 또는 아세테이트 중 하나로 변환할 수 있다.

[0035] $4\ CO + 2\ H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2\ CO_2$

[0036] 그러나, 환원 당량 요건을 만족시킬 만큼 충분한 수소가 존재하는 경우에는, 고수율로 아세테이트을 수득할 수 있다.

[0037] $2\ CO + 2\ H_2 \rightarrow CH_3COOH$

[0038] 도 1에 따라, 아세틸-CoA를 경유하여 아세테이트를 생산하는 경우 하나의 ATP 분자가 만들어지지만, 아세틸-CoA로부터 에탄올을 생산하는 경우에는 그렇지 않으며, 환원 당량 2개 요구된다. 따라서, 합성 가스로부터 에탄올을 생산하는 과정은 아세테이트가 생산되지 않는 조건에서 세포를 증식시키는데 충분한 에너지를 만들지 못할 것으로 볼 수 있다. 그러나, 어떤 조건에서는, 클로스트리듐 융달리이는 대개 합성 가스로부터 에탄올을 생산하는데(Klasson et al., Fuel 72:1673-1678(1993)), 이는 경로들의 어떤 조합이 실제로 세포 증식을 뒤받침하는 충분한 에너지를 생산한다는 의미이다.

[0039] $2\ CO_2 + 6\ H_2 \rightarrow CH_3CH_2OH + 3\ H_2O$

[0040] $6\ CO + 3\ H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + 4\ CO_2$

[0041] $2\ CO + 4\ H_2 \rightarrow CH_3CH_2OH + H_2O$

[0042] 로도스피릴럼 루브럼과 같은 수소 생성균(Hydrogenic bacteria)도 물과 일산화탄소를 수소로 변환시켜 에너지를 만들 수 있다(도 1) (Simpma et al., *Critical Reviews in Biotechnology*, 26.1:41-65 (2006)). 주된 기전은 에너지 변환성 하이드로게나제(ECH) 및 CO 데하이드로게나제의 합동 작용이다. CO 데하이드로게나제는 CO로부터 전자를 공급하며, 이를 이용하여 ECH에 의해 프로톤을 H_2로 환원시키며, ECH의 작용은 에너지를 발생시키는 프로톤 전이와 커플링된다. 최종적인 결과로 수성 가스 전환 반응(water gas shift reaction)을 통해 에너지가 생성된다.

[0043] 1,3-부탄디올을 합성 가스를 통해 생합성하는 본원에 기술된 공정은 재생가능한 원료를 이용하며, 에너지 밀도를 낮추고, 온실 가스 방출을 줄이는, 지속가능한 생산 작업을 포함한다. 아울러, 바이오물질계 1,3-부탄디올의 탈수는 이러한 가연성 및 반응성 화합물의 이동이 필요하지 않는 소규모 최종 사용 시설에서 부타디엔을 생산하는 재생가능한 경로이다.

[0044] 본원에서, 용어 "비-천연"은 본 발명의 미생물 유기체 또는 미생물에 대해 사용되는 경우, 상기 미생물 유기체가 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 1,3-부탄디올 생합성 경로의 효소 또는 단백질을 포함한다.

[0045] 대사 변형은 이의 본래의 상태로부터 변형된 생화학적 반응을 지칭한다. 따라서, 비천연 미생물은 대사 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 단편을 코딩하는 핵산에 유전자 변형을 가질 수 있다. 대사 변형의 예는 본원에 기술

되어 있다.

[0046] 본원에서, 용어 "분리된"은 미생물 유기체에 대해 사용되는 경우, 이는 언급된 미생물 유기체가 자연 상태에서 발견될 때의 성분들 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 일부 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 비천연인 배지에서 배양된 미생물을 포함한다.

[0047] 본원에서, 용어 "미생물(microbial)", "미생물 유기체" 또는 "미생물(microorganism)"은 고세균, 박테리아 또는 진핵생물류의 도메인에 포함되는 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 뿐만 아니라 효모 및 진균과 같은 진핵 미생물을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 이 용어는 생화학적 생산을 위해 배양할 수 있는 임의의 종의 세포 배양물을 포함한다.

[0048] 본원에서, 용어 "CoA" 또는 "코엔자임 A"는, 활성 효소 시스템을 만들기 위해 다수 효소(주효소(apoenzyme))의 활성에 필요한 조인자 또는 보결기(효소의 비단백질 영역)를 의미한다. 코엔자임 A는 특정 축합 효소에 작용하며, 아세틸 또는 기타 아실기의 전달 작용을 하며, 지방산 합성 및 산화, 피루베이트 산화 및 기타 아세틸화에 관여한다.

[0049] 본원에서, 용어 "실질적으로 혐기성"은 배양 또는 증식 조건에 대해 사용되는 경우, 산소의 양이 액체 배지내 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.

[0050] 본원에서 "외인성"은 언급된 분자 또는 활성이 숙주 미생물 유기체로 도입되는 것을 의미하기 위한 것이다. 분자는, 예컨대, 플라스미드와 같은 숙주 염색체 또는 비-염색체성 유전 물질내로의 삽입에 의해서와 같이, 코딩 핵산을 숙주 유전 물질에 도입함으로써, 도입할 수 있다. 따라서, 이 용어는, 코딩 핵산의 발현에 대해 사용되는 바와 같이, 발현가능한 형태로 코딩 핵산을 미생물 유기체에 도입하는 것을 의미한다. 생합성 활성에 대해 사용되는 경우, 이 용어는 숙주 참조 유기체에 도입되는 활성에 대해서도 사용된다. 소스는, 예컨대 숙주 미생물 유기체로 도입된 후 언급된 활성을 발현하는 동종의 또는 이종의 코딩 핵산일 수 있다. 따라서, 용어 "내인성"은 숙주에 존재하는 언급된 분자 또는 활성에 대해 사용된다. 마찬가지로, 이 용어는, 코딩 핵산의 발현에 대해 사용되는 경우, 미생물 유기체 안에 포함된 코딩 핵산의 발현에 대해 사용된다. 용어 "이종"은 언급된 종 이외의 소스로부터 유래된 분자 또는 활성을 지칭하며, "동종"은 숙주 미생물 유기체로부터 유래된 분자 또는 활성을 지칭한다. 즉, 본 발명의 코딩 핵산의 외인성 발현시 이종 또는 동종의 코딩 핵산 중 어느 하나 또는 둘다를 이용할 수 있다.

[0051] 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, 폴리시스트론 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 불리된 플라스미드 형태로 도입될 수 있으며, 숙주 염색체에서 단일 부위 또는 복수의 부위에 통합될 수 있으며, 여전히 2개의 외인성 핵산으로 간주되는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 유사하게, 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 수의 외인성 핵산 또는 생합성 활성들은 숙주 유기체로 도입되는 개개 핵산의 수를 지칭하는 것이 아니라, 코딩 핵산의 수 또는 생합성 활성의 수를 지칭한다.

[0052] 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 유전한 변형은 무한정을 비롯하여 50 세대 보다 길게 지속될 것이다.

[0053] 당해 기술 분야의 당업자라면, 본원에 예시된 대사적 변이를 포함한 유전자 변형은, 에스케리키아 콜라이와 같은 적정 숙주 유기체와 이의 해당 대사 반응 또는 원하는 대사 경로에 관여하는 유전자 등의 바람직한 유전 물질에 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 에스케리키아 콜라이의 대사 변이는 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 치환을 포함한다.

[0054] 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.

[0055] 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 제2 종에서는 별개의 유전자로 분리되어 있는 경우, 이들 3개의 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, 마이코플라스마 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.

[0056] 이와는 반대로, 파라로그는 예를 들어 복제와 이후 진화적 분화 관계에 있는 상동체이며, 유사하거나 공통되지만, 동일한 것은 아닌 기능을 가지는 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 서열 유사성을 보이는 동일한 종으로부터 유래된 단백질이므로, 이들은 상동적이거나 또는 공통 조상으로부터 함께 진화된 관계임을 시사한다. 파라로그 패밀리 그룹으로는 HipA 상동체, 루시페라제 유전자, 펩티다제 등이 있다.

[0057] 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 유사성은, 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.

[0058] 따라서, 1,3-부탄디올 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, 파라

로그 및/또는 비-오르소로그 유전자 치환이 유사하거나 또는 실질적으로 유사한 대사 반응을 촉매하는 효소를 코딩하는 참조된 미생물에 존재하는 한, 이들 진화적으로 관련성 있는 유전자들을 사용할 수 있다.

[0059] 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 갭의 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 매개변수들은, 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 최적화할 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 데이터베이스 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. 데이터세트의 크기를 제시하는 이러한 매칭 유의 수준을 결정하기 위한 추가적인 통계학적 분석을 수행하여, 이들 서열들의 관련성을 결정할 수 있다.

[0060] 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; 갭 오픈(gap open): 11; 갭 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; 갭 오픈: 5; 갭 연장: 2; x_드롭오프: 50; 예상: 10.0; 워드크기: 11; 필터: 오프. 당해 기술 분야의 당업자는, 상기 매개변수들에 대해 예를 들어 상기 비교의 엄격성을 높이거나 낮추고, 2종 이상 서열의 관계를 정하기 위한 변형을 가할 수 있음을 알 것이다.

[0061] 일부 구현예에서, 본 발명은, 1,3-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-BDO 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 1,3-부탄디올 (1,3-BDO) 경로를 구비한 비천연 미생물 유기체를 제공한다. 상기 1,3-BDO 경로는, 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 코리노이드 단백질 (MtaC), 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 페레독신 (Orf7), 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 하이드로게나제 (Hyd), 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신타제, 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신타제, 또는 아세토아세테이트 리덕타제를 포함한다.

[0062] 일부 구현예에서, 1,3-BDO 경로 효소는 하기 군으로부터 선택되는 효소 세트이다:

[0063] A: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 13) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 및 14) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

[0064] B: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제

(AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 13) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 및 14) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0065] C: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 13) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 및 14) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0066] D: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 및 13) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성);

[0067] E: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 및 14) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

[0068] F: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 13) 아세토아세테이트 리덕타제, 14) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 및 15) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0069] G: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 13) 아세토아세테이트 리덕타제, 14) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 및 15) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

[0070] H: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 13) 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 14) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 및 15) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0071] I: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타

제, 13) 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 14) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 및 15) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제.

[0072] 비천연 미생물 유기체는, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 2개의 외인성 핵산, 일부 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 3개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 4개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 5개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 6개의 외인성 핵산 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 7개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 8개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 9개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 10개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 11개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 12개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 13개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 14개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 15개의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 임의의 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산일 수 있으며, 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에서 배양되도록 구축될 수 있다. 이러한 미생물 유기체는 하기 성분들로부터 선택되는 탄소 공급원료를 이용할 수 있다: 1) 메탄올 및 CO, 2) 메탄올, CO_2, 및 H_2, 3) 메탄올, CO, CO_2, 및 H_2, 4) 메탄올과, CO 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 5) 메탄올과, CO, CO_2 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 6) 하나 이상의 탄수화물, 7) 메탄올과 하나 이상의 탄수화물, 및 8) 메탄올. 탄수화물의 예로는 글루코스, 슈크로스, 자일로스, 아라비노스 및 글리세롤이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0073] 일부 구현예에서, 본 발명은, 1,3-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-BDO 경로 효소 또는 단백질을 발현하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 1,3-부탄디올(1,3-BDO) 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하는, 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 1,3-BDO 경로는, 포르메이트 데하이드로게나제, 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 페레독신 (Orf7), 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 하이드로게나제 (Hyd), 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신타제, 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신타제, 또는 아세토아세테이트 리덕타제를 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, 1,3-BDO 경로 효소는 하기로부터 선택되는 효소 세트이다:

[0075] A: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 15) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 및 16) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

[0076] B: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 15) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 및 16) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0077] C: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 15) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 및 16) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0078] D: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 및 15) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

[0079] E: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 및 15) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성);

[0080] F: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 15) 아세토아세테이트 리덕타제, 16) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 및 17) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0081] G: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 15) 아세토아세테이트 리덕타제, 16) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 및 17) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

[0082] H: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 15) 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 16) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 및 17) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0083] I: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-

황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 15) 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 16) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 및 17) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제.

[0084] 비천연 미생물 유기체는 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 2개의 외인성 핵산, 일부 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 3개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 4개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 5개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 6개의 외인성 핵산 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 7개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 8개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 9개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 10개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 11개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 12개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 13개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 14개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 15개의 외인성 핵산, 각각 1,3-BDO 경로 효소를 코딩하는 16개의 외인성 핵산, 다른 구현예에서, 17개의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 임의의 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산일 수 있으며, 상기 비천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에서 배양되도록 구축될 수 있다. 이러한 미생물 유기체는 하기 성분들로부터 선택되는 탄소 공급원료를 이용할 수 있다: 1) CO, 2) CO_2, 및 H_2, 3) CO, CO_2, 및 H_2, 4) CO 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 5) CO, CO_2 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 6) 하나 이상의 탄수화물. 탄수화물의 예로는 글루코스, 슈크로스, 자일로스, 아라비노스 및 글리세롤이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0085] 추가적인 구현예에서, 본 발명은, 1,3-부탄디올 경로를 구비한 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 비천연 미생물 유기체는 이산화탄소 → FOR, FOR → 10FTHF, 10FTHF → METHF, METHF → MLTHF, MLTHF → 5MTHF, 메탄올 → CH_3-MtaC, CH_3-MtaC → 5MTHF, 5MTHF → CFeSp-CH_3, CFeSp-CH_3 → 아세틸-CoA, 아세틸-CoA → 아세토아세틸-CoA, 아세토아세틸-CoA → 3-하이드록시부트릴-CoA, 3-하이드록시부트릴-CoA → 3-하이드록시부티르알데하이드, 3-하이드록시부트리알데하이드 → 1,3-BDO, 3-하이드록시부트릴-CoA → 1,3-BDO, 아세토아세틸-CoA → 4-하이드록시-2 부타논, 아세토아세틸-CoA → 3-옥소부트리알데하이드, 3-옥소부트리알데하이드 → 4-하이드록시-2-부타논, 4-하이드록시-2-부타논 → 1,3-BDO, 3-옥소부티르알데하이드 → 3-하이드록시부티르알데하이드, 아세토아세틸-CoA → 아세토아세테이트, 아세토아세테이트 → 3-옥소부티르알데하이드, 아세토아세테이트 → 3-하이드록시부티레이트, 3-하이드록시부티릴-CoA → 3-하이드록시부티레이트, 및 3-하이드록시부티레이트 → 3-하이드록시부티르알데하이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 기질을 산물로 변환시키는, 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함한다. 당해 기술 분야의 당업자는, 예에 불과하며, 바람직한 산물을 생산하는데 적합한 본원에 기술된 임의의 기질-산물 쌍 및 어떤 적합한 활성이 기질을 산물로 변환시키는데 이용가능한지를, 본원에 기술된 내용을 토대로 당해 기술 분야의 당업자가 쉽게 정할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명은, 효소 또는 단백질이 도 4 및 5에 도시된 바와 같이 기질을 1,3-부탄디올 경로의 산물로 변환시키는 경우, 상기 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비천연 미생물 유기체를 제공한다.

[0086] 일반적으로 1,3-부탄디올 경로를 가지고 있는 미생물 유기체로서 본원에 기술되어 있지만, 본 발명은 1,3-부탄디올 경로의 중간 산물을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부탄디올 경로 효소나 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는, 비천연 미생물을 부가적으로 제공한다. 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 1,3-부탄디올 경로는 도 4 및 5에 예시된다. 따라서, 1,3-부탄디올을 생산하는 1,3-부탄디올 경로를 갖춘 미생물 유기체 외에도, 본 발명은, 1,3-부탄디올 경로 중간 산물, 예컨대, 아세틸-CoA, 아세토아세틸-CoA, 아세토아세테이트, 3-하이드록시부트릴-CoA, 3-하이드록시부티레이트, 3-옥소부티르알데하이드, 4-하이드록시-2-부타논 및 3-하이드록시부트리알데하이드을 생산하는, 1,3-부탄디올 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비천연 미생물 유기체를 추가로 제공한다.

[0087] 실시예에 기술되어 있으며 도에 예시된 바와 같이, 본원에 기술된 경로들 중 임의의 경로를 이용하여, 바람직한 임의의 경로 중간산물 또는 산물을 생산하는 비천연 미생물 유기체를 제조할 수 있는 것으로 이해된다. 본원에 개시된 바와 같이, 중간산물을 생산하는 미생물 유기체는 하류 경로 효소를 발현하는 다른 미생물 유기체와 조

합하여 사용하여, 원하는 산물을 생산할 수 있다. 그러나, 1,3-부탄디올 경로 중간산물을 생산하는 비천연 유기체를 이용하여, 바람직한 산물로서 중산산물을 생산할 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 본 발명의 비천연 유기체를 이용하여, 예컨대, 아세토아세테이트, 3-하이드록시부티레이트, 3-옥소부티르알데하이드, 3-하이드록시부티르알데하이드 또는 4-하이드록시-2-부타논을 생산할 수 있다. 즉, 이들 중간간물들 중 임의의 산물은 도 4 및 5에 나타낸 경로를 이용하여 개별 유기체에서 생산할 수 있다.

[0088] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 비천연 유기체는 도 4에 도시된 3가지 역량을 가진다: 1) 메탄올과 THF로부터 5-메틸-테트라하이드로폴레이트 (Me-THF)를 생산할 수 있는, 기능성 메틸트랜스퍼라제 시스템, 2) CO, 코엔자임 A, 및 Me-THF의 메틸기를 조합하여 아세틸-CoA를 생산할 수 있는 능력, 및 3) 아세틸-CoA로부터 1,3-부탄디올을 합성하는 능력. 후자는 당분해에 의해 탄수화물로부터 피루베이트를 생산함으로써 촉진시킬 수 있다. 당분해는 살아있는 모든 유기체의 세포질에서 발견되는 혐기성 대사 경로이다. 이 공정은 글루코스 1 분자를 1개의 피루베이트로 변환시키며, 이때 ATP 분자 총 2개가 만들어진다:

[0089] 글루코스 + $2NAD^+$ + $2P_i$ + 2ADP → 2피루베이트 + 2NADH + 2ATP + $2H^+$ + $2H_2O$

[0090] 이러한 비천연 유기체는 외인성 CO 및/또는 CO_2 및 메탄올로부터 탄소를 "고정"하여 아세틸-CoA, 세포 매스 및 산물을 합성할 수 있다. 메탄올 및 합성 가스로부터 아세틸-CoA를 만드는 경로 실행은, Wood-Ljungdahl의 전체 경로를 이용하는 경우와 비교하여, 에너지 측면에서 유리할 수 있음에 유념한다. 예컨대, 합성 가스를 아세테이트로 직접 변환하는 과정은 에너지 측면에서 중성의 공정이다(도 1 및 2 참조). 구체적으로, 포르밀-THF 신타제에 의해 포르밀-THF를 생산하는 동안 ATP 분자 1개가 사용되고, 아세테이트 키나제를 통해 아세테이트를 생산하는 동안에 ATP 분자 1개가 생긴다. 본원에 개시된 경로는, 메틸 분지 산물, 메틸-THF 상의 메틸기가 이산화탄소가 아닌 메탄올로부터 입수되게 함으로써, ATP 소모를 방지한다. 이는, 아세테이트 생산이 세포 증식과 유지를 뒷받침하게 도울 수 있는 파지티브 ATP 수율(positive ATP yield)을 갖게 한다. 또한 보충대사(anapleurosis) 능력이 있는 이러한 능력을 가지고 있는 조작된 숙주 유기체 (예, 에스케리키아 콜라이)는 질산염과 같은 적합한 외부 전자 어셉터의 존재 하에 메탄올 및 합성 가스를 이용하여 생산되는 아세틸-CoA 상에서 증식할 수 있다. 상기 전자 어셉터를 이용하여 숙시네이트 데하이드로게나제에 의해 생성되는 환원된 퀴논으로부터 전자를 수용한다. 외부 전자 어셉터의 부가의 다른 이점은, 세포 증식, 유지 및 산물 형성을 위한 추가적인 에너지를 아세틸-CoA의 호흡으로부터 생산한다는 것이다. 일부 구현예에서, 다른 비천연 미생물 유기체는, 외부 전자 어셉터 부재시 바이오매스 전구체의 합성을 촉진시키기 위해, 균주내로, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제 (PFOR) 효소 또는 피루베이트를 아세틸-CoA로 또는 역방향으로의 변환을 촉진시키는 기타 효소를 포함한다. 이러한 비천연 유기체의 다른 특징은, 수소 분자로부터 환원 당량을 추출하는 능력이다. 이는, 에탄올, 부탄올, 이소부탄올, 이소프로판올, 1,4-부탄디올, 1,3-부탄디올, 숙신산, 푸마르산, 말산, 4-하이드록시부티르산, 3-하이드록시프로피온산, 락트산, 아디프산, 메타크릴산 및 아크릴산 등의 산물을 고수율로 환원시킬 수 있다.

[0091] 본원에 기술된 유기체는, 1) 메탄올 및 CO, 2) 메탄올, CO_2, 및 H_2, 3) 메탄올, CO, CO_2, 및 H_2, 4) 메탄올과, CO 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 5) 메탄올과, CO, CO_2 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 6) 하나 이상의 탄수화물, 7) 메탄올과 하나 이상의 탄수화물, 및 8) 메탄올로부터, 아세틸-CoA, 세포 매스 및 표적화된 화합물, 보다 구체적으로 1,3-BDO를 생산할 수 있다. 탄수화물의 예로는 글루코스, 슈크로스, 자일로스, 아라비노스 및 글리세롤이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0092] 이들 경로를 유기체내로 성공적으로 조작하는 과정은, 적정 효소 세트를 동정하는 단계, 해당 유전자를 생산 숙주로 클로닝하는 단계, 상기 유전자의 안정성 및 발현을 최적화하는 단계, 발효 조건을 최적화하는 단계, 및 발현 후 산물 생성을 분석하는 단계를 포함한다. 합성 가스 및 메탄올을 아세틸-CoA로, 다시 1,3-부탄디올로 변환시키는데 사용되는 경로의 각 단계를 촉매하는 복수의 효소는 아래에 기술한다. 합성 가스 및 메탄올을 이용하도록 생산 숙주를 조작하기 위해, 이들 경로를 구성하는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 DNA 서열(들)을 미생물에서 발현시킬 수 있다.

[0093] 도 4에 나타낸 바와 같이, 외래 숙주에서 수정된 Wood-Ljungdahl 경로의 발현은, 메탄올에 의해 제공되는 탄소와 수소, 및 CO 및/또는 CO_2에 의해 제공되는 탄소를 이용하기 위해 메틸트랜스퍼라제 세트를 도입하는 단계를 포함한다. MtaA, MtaB, 및 MtaC로 지칭되는 3종의 메틸트랜스퍼라제 단백질 복합체는 바람직한 메탄올 메틸트랜스퍼라제 활성을 수행한다 (Sauer et al., *Eur. J. Biochem.* 243.3:670-677 (1997); Naidu and Ragsdale, *J. Bacteriol.* 183.11:3276-3281 (2001); Tallant and Krzycki, *J. Biol. Chem.* 276.6:4485-4493 (2001);

Tallant and Krzycki, *J. Bacteriol.* 179.22:6902-6911 (1997); Tallant and Krzycki, *J. Bacteriol.* 178.5:1295-1301 (1996); Ragsdale, S.W., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39.3:165-195 (2004).

[0094] MtaB는 메틸기를 메탄올에서 MtaC, 코리노이드 단백질로 이동되는 과정을 촉매하는 아연 단백질이다. MtaB 및 MtaC를 코딩하는 유전자의 예들은 메타노사르시나 바케리(*Methanosarcina Barkeri*) (Maeder et al., *J. Bacteriol.* 188.22:7922-7931 (2006)) 및 메타노사르시나 아세티보란스(*Methanosarcina acetivorans*) (Galagan et al., *Genome Res.* 12/4:532-542 (2002)) 등의 메탄생성 고세균(methanogenic archaea) 뿐만 아니라 초산생성균, 무어렐라 써모아세티카 (Das et al., *Proteins* 67.1:167-176 (2007))에서 확인할 수 있다. 일반적으로, MtaB 및 MtaC 유전자는 이들 작용들이 밀접하게 상호 의존적이기 때문에 염색체에 서로 인접하여 존재한다. 메타노사르시나 바케리, 메타노사르시나 아세티보란스, 및 메타노사르시나 써모아세티컴에서 유전자를 코딩하는 다양한 MtaB 및 MtaC 단백질 서열들은 아래 유전자은행 등재번호로 식별할 수 있다:

표 1

[0095]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
MtaB1	YP_304299	73668284	메타노사르시나 바케리
MtaC1	YP_304298	73668283	메타노사르시나 바케리
MtaB2	YP_307082	73671067	메타노사르시나 바케리
MtaC2	YP_307081	73671066	메타노사르시나 바케리
MtaB3	YP_304612	73668597	메타노사르시나 바케리
MtaC3	YP_304611	73668596	메타노사르시나 바케리
MtaB1	NP_615421	20089346	메타노사르시나 아세티보란스
MtaB1	NP_615422	20089347	메타노사르시나 아세티보란스
MtaB2	NP_619254	20093179	메타노사르시나 아세티보란스
MtaC2	NP_619253	20093178	메타노사르시나 아세티보란스
MtaB3	NP_616549	20090474	메타노사르시나 아세티보란스
MtaC3	NP_616550	20090475	메타노사르시나 아세티보란스
MtaB	YP_430066	83590057	무어렐라 써모아세티카
MtaC	YP_430065	83590056	무어렐라 써모아세티카

[0096] 메타노사르시나 바케리의 MtaB1 및 MtaC1 유전자, YP_304299 및 YP_304298이 에스케리키아 콜라이에서 클로닝되어 서열분석되었다 (Sauer et al., *Eur. J. Biochem.* 243.3:670-677 (1997)). 또한, 메탄올-코발라민 메틸트랜스퍼라제 복합체의 결정 구조도 이용가능하다 (Hagemeier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103.50:18917-18922 (2006)). 메타노사르시나 바케리에서 MtaB 유전자, YP_307082 및 YP_304612가 YP_304299에 대한 서열 상동성에 의해 동정되었다. 일반적으로, MtaB 코딩 유전자는 트리메틸아민, 디메틸아민, 모노메틸아민 또는 디메틸설파이드 등의 대체 기질에 작용하는 메틸트랜스퍼라제에 대해 유사성을 거의 또는 전혀 나타내지 않기 때문에, 상동성 검색은 메탄올 메틸트랜스퍼라제를 동정하는 효과적인 수단이다. MtaB 유전자에 대한 근접성 및 이의 YP_304298에 대한 상동성을 토대로, MtaC 유전자들, YP_307081 및 YP_304611이 동정되었다. 메타노사르시나 아세티보란스로부터 MtaB 및 MtaC 유전자 3세트가, 유전자 측면에서, 생리적으로 및 생화학적으로 특정화되었다 (Pritchett and Metcalf, *Mol. Microbiol.* 56.5:1183-1194 (2005)). 상기 세트들 중 2개가 결여된 돌연변이 균주는 메탄올에서 증식할 수 있었지만, MtaB 및 MtaC 유전자 3세트 모두 결여된 균주는 메탄올에서 증식하지 못하였다. 이는, 유전자의 각 세트가 메탄올 이용에 역할을 한다는 것을 시사한다. 무어렐라 써모아세티카 MtaB 유전자는, 메탄형성 MtaB 유전자에 대한 상동성과, 결정화가 달성된 (Zhou et al., *Acta Crystallogr.Sect.F Struct. Biol Cryst. Commun.* 61 Pt. 5:537-540 (2005)) 메탄올-유도성 코리노이드 단백질, MtaC와의 염색체 인접성을 토대로 동정되었고, 추가적으로 노던 혼성화 및 웨스턴 블롯팅에 의해 특정화되었다(Das et al. Proteins 67.1:167-76 (2007)).

[0097] MtaA는, 메틸기를 MtaC에서 메탄 생성균의 경우 코엔자임 M으로, 초산 생성균의 경우 메틴테트라하이드로폴레이트로 전달하는 과정을 촉매하는, 아연 단백질이다. 또한, MtaA는 메틸 도너로서 메틸코발라민을 이용할 수 있

다. MtaA를 코딩하는 유전자의 예들은 메타노사르시나 바케리 (Maeder et al., *J. Bacteriol.* 188.22 7922-7931 (2006)) 및 메타노사르시나 아세티보란스 (Galagan et al., *Genome Res.* 12.4:532-542 (2002)) 등의 메탄 생성 고세균, 뿐만 아니라, 초산 생성균, 무어렐라 써모아세티카 (Das et al., Proteins 67.1:167-176 (2007))에서 확인할 수 있다. 일반적으로, CH_3-MtaC로부터의 메틸기의 전달을 촉매하는 MtaA 단백질은, 이것이 다른 코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제와 유사성은 공유하지만 염색체에서 MtaB 및 MtaC 유전자과 인접하게 배향되지 않기 때문에, 생물정보를 동정하기 어렵다. 그럼에도 불구하고, 다수의 MtaA 코딩 유전자들이 특정화되었다. 메타노사르시나 바케리 및 메타노사르시나 아세티보란스에서 이들 유전자의 단백질 서열은 아래 유전자은행 등재 번호로 확인할 수 있다:

표 2

[0098]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
MtaA	YP_304602	73668587	메타노사르시나 바케리
MtaA1	NP_619241	20093166	메타노사르시나 아세티보란스
MtaA2	NP_616548	20090473	메타노사르시나 아세티보란스

[0099] 메타노사르시나 바케리로부터 MtaA 유전자, YP_304602가 클로닝 및 서열분석되었고, 이를 에스케리키아 콜라이에서 기능적으로 과다 발현시켰다 (Harms and Thauer, *Eur. J. Biochem.* 135.3:653-659 (1996). 메타노사르시나 아세티보란스의 경우, MtaA1은 메탄올에서의 증식에 이용되며, MtaA2 돌연변이에서 메탄올로부터의 메탄 생산은 감소되지만 MtaA2는 없어도 되었다 (Bose et al. *J. Bacteriol.* 190.11:4017-4026 (2008)). 아울러, 아직 특정화되지 않았지만 코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 활성을 촉매할 수 있는, 추가적인 MtaA 상동체들 다수가 메타노사르시나 바케리 및 메타노사르시나 아세티보란스에도 존재한다.

[0100] 무어렐라 써모아세티카에서, 추정의 MtaA 코딩 유전자가, 특정화된 메탄 생성 MtaA 유전자와의 서열 유사성을 통해 동정되었다. 구체적으로, 무어렐라 써모아세티카의 유전자 3종은 메타노사르시나 바케리의 YP_304602에 대해 높은 상동성을 나타낸다 (서열 동일성 > 30%). CH_3-MtaC에서 코엔자임 M으로 메틸기의 이동을 본래 촉매하는 메탄 생성 MtaA 단백질과는 다르게, 무어렐라 써모아세티카 MtaA는, 메탄 생성균 및 초산 생성균 각각에서의 메틸테트라하이드로폴레이트 및 코엔자임 M의 유사한 역할을 고려하여, 메틸기를 메틸테트라하이드로폴레이트로 이동시킬 수 있을 것이다. 무어렐라 써모아세티카 유래의 추정의 MtaA 코딩 유전자의 단백질 서열은 아래 유전자은행 등재 번호로 확인할 수 있다:

표 3

[0101]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
MtaA	YP_430937	83590928	무어렐라 써모아세티카
MtaA	YP_431175	83591166	무어렐라 써모아세티카
MtaA	YP_430935	83590926	무어렐라 써모아세티카

[0102] ACS/CODH는 Wood-Ljungdahl 경로의 카르보닐 분지의 주요 효소이다. 이 효소는 이산화탄소에서 카본 모노옥사이드로의 가역적인 환원과, 또한 메틸화된 코리노이드-철-황 단백질에 의한 메틸기, 카본 모노옥사이드, 코엔자임 A로부터 아세틸-CoA의 합성을 촉매한다. 코리노이드-철-황 단백질은 메틸트랜스퍼라제를 통해 메틸테트라하이드로폴레이트에 의해 메틸화된다. 외래 숙주에서의 ACS/CODH의 발현은, 하나 이상의 아래 단백질의 도입을 포함한다: 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드, 단백질 메틸트랜스퍼라제 (*AcsE*), 코리노이드 철-황 단백질 (*AcsD*), 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (*AcsF*), 페레독신 (*Orf7*), 아세틸-CoA 신타제 (*AcsB* and *AcsC*), 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (*CooC*).

[0103] 카본-모노옥사이드 데하이드로게나제/아세틸-CoA 신타제의 활성을 위해 사용되는 유전자는, 연장된 오페론일 수 있는 천연 게놈(native genome)의 정해진 부위에 존재한다 (Ragsdale, S.W., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39.3:165-195 (2004); Morton et al., *J. Biol. Chem.* 266.35:23824-23828 (1991); Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86.1:32-36 (1989)). 초산 생성균인 무어렐라 써모아세티카의 상기 오페론내 각 유전자들은 이미 클로닝되었고, 에스케리키아 콜라이에서 활성형으로 발현되었다 (Morton et al., 상기 참조 (1991); Roberts et al., 상기 참조 (1989); Lu et al., *J. Biol. Chem.* 268.8:5605-5614 91993)). 이들 유

전자의 단백질 서열은 아래 유전자은행 등재 번호로 확인할 수 있다:

표 4

[0104]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
AcsE	YP_430054	83590045	무어렐라 써모아세티카
AcsD	YP_430055	83590046	무어렐라 써모아세티카
AcsF	YP_430056	83590047	무어렐라 써모아세티카
Orf7	YP_430057	83590048	무어렐라 써모아세티카
AcsC	YP_430058	83590049	무어렐라 써모아세티카
AcsB	YP_430059	83590050	무어렐라 써모아세티카
AcsA	YP_430060	83590051	무어렐라 써모아세티카
CooC	YP_430061	83590052	무어렐라 써모아세티카

[0105] 수소 생산(hydrogenogenic) 박테리아인 카르복시도써머스 하이드로게노포만스(*Carboxydothermus hydrogenoformans*)는 아세틸-CoA 신타제를 이용하여 증식 기질로서 카본 모노옥사이드를 이용할 수 있다 (Wu et al. *PLos Genet*. 1.5:e65 (2005)). 균주 Z-2901의 경우, 아세틸-CoA 신타제 효소 복합체에는, 프래임쉬프트 돌연변이로 인해 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제가 결여되어 있지만 (Wu et al. *PLos Genet*. 1.5:e65 (2005)), 균주 DSM 6008에서 상기 단백질이 프래임쉬프트되지 않은 기능성 전장 버전으로 정제되었다 (Svetlitchnyi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101.2:446-451 (2004)). 균주 Z-2901의 상기 카르복시도써머스 하이드로게노포만스 유전자의 단백질 서열은 아래 유전자은행 등재 번호로 확인할 수 있다:

표 5

[0106]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
AcsE	YP_360065	78044202	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
AcsD	YP_360064	78042962	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
AcsF	YP_360063	78044060	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
Orf7	YP_360062	78044449	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
AcsC	YP_360061	78043584	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
AcsB	YP_360060	78042742	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CooC	YP_360059	78044249	카르복시도써머스 하이드로게노포만스

[0107] 메탄 생성 고세균인 메타노사르시나 아세티보란스(*Methanosarcina acetivorans*)는 카본 모노옥사이드에서 증식할 수 있으며, 아세틸-CoA 신타제/카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 활성을 나타내며, 아세테이트와 포르메이트를 둘다 생산한다 (Lessner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103.47:17921-17926 (2006)). 이 유기체는 ACS/CODH 활성을 코딩하는 2개의 유전자 세트를 포함한다 (Rother and Metcalf, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101.48:16929-16934 (2004)). 상기 메타노사르시나 아세티보란스의 2개의 유전자 세트의 단백질 서열은 아래 유전자은행 등재 번호로 확인할 수 있다:

표 6

[0108]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
AcsC	NP_618736	20092661	메타노사르시나 아세티보란스
AcsD	NP_618735	20092660	메타노사르시나 아세티보란스
AcsF, CooC	NP_618734	20092659	메타노사르시나 아세티보란스
AcsB	NP_618733	20092658	메타노사르시나 아세티보란스
AcsEps	NP_618732	20092657	메타노사르시나 아세티보란스
AcsA	NP_618731	20092656	메타노사르시나 아세티보란스
AcsC	NP_615961	20089886	메타노사르시나 아세티보란스
AcsD	NP_615962	20089887	메타노사르시나 아세티보란스
AcsF, CooC	NP_615963	20089888	메타노사르시나 아세티보란스
AcsB	NP_615964	20089889	메타노사르시나 아세티보란스
AcsEps	NP_615965	20089890	메타노사르시나 아세티보란스
AcsA	NP_615966	20089891	메타노사르시나 아세티보란스

[0109] AcsC, AcsD, AcsB, AcsE, 및 AcsA 단백질들은 통상적으로 메탄 생성 CODH/ACS의 감마, 델타, 베타, 엡실론 및 알파 서브유닛들로서 언급된다. 엡실론 코딩 유전자에 대한 상동체는 무어렐라 써모아세티카와 같은 초산 생산균 또는 카르복시도써머스 하이드로게노포만스와 같은 수소 생산 세균에 존재하지 않는다. 메타노사르시나 아세티보란스에 2개의 활성형 CODH/ACS 오페론이 존재한다는 가설은, CODH/ACS 발현을 유도하기 위해 다양한 자극을 가할 수 있는 카복시도트로픽(carboxidotrophic) 또는 아세티클라스틱(aceticlastic) 증식 또는 차별적인 유전자 조절에 유리한 촉매 특징들(즉, K_m, V_{max}, k_{cat})이 수반된다 (Rother et al., *Arch. Microbiol.* 188.5:463-472 (2007)).

[0110] 추가적인 CODH 코딩 유전자들은 무어렐라 써모아세티카 및 카르복시도써머스 하이드로게노포만스 둘다에서 ACS/CODH 오페론 이외의 부분에 위치한다. 이들 효소는 카본 모노옥사이드에서 이산화탄소로의 변환으로부터 전자 (또는 환원 당량)를 추출하기 위한 수단을 제공한다. 환원 당량은 그 후 산화된 페레독신, NADP+, 물 또는 과산화수소 등의 어셉터로 전달되어, 환원된 페레독신, NADPH, H_2, 또는 물을 각각 형성한다. 어떤 경우들에서는, 하이드로게나제 코딩 유전자들은 CODH에 인접하여 위치한다. 코딩된 CODH/하이드로게나제 단백질들은, 로도스피릴럼 루브럼(*Rhodospirillum rubrum*)에서, CO에서 CO_2 및 H_2로의 변환으로부터 프로톤 농도 구배의 형태로 에너지가 발생되는 부위인 것으로 확인된 막-결합형 효소 복합체를 형성한다 (Fox et al., *J. Bacteriol.* 178.21:6200-6208 (1996)). 카르복시도써머스 하이드로게노포만스의 CODH-I과 이의 인접한 유전자들은 로도스피릴럼 루브럼 CODH/하이드로게나제 유전자 클러스터와의 유사성을 근거로 비슷한 기능적인 역할을 촉매하는 것으로 제시되었다 (Wu et al., *PLoS Genet.* 1.5:e65 (2005)). 또한, 카르복시도써머스 하이드로게노포만스 CODH-I은 전극과 연결시 강력한 CO 산화 및 CO_2 환원 활성을 발휘하는 것으로 입증되었다 (Parkin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 129.34:10328-10329 (2007)). 카르복시도써머스 하이드로게노포만스 CODH-II와 이의 이웃한 단백질인 CooF를 코딩하는 유전자들이 클로닝 및 서열분석되었다 (Gonzalez and Robb, *FEMS Microb. Lett.* 191.2:243-247 (2000)). 수득되는 복합체는, CODH-II의 세포질 분획들이 동화 작용으로 보이는 NADPH의 형성을 촉매하는 것으로 입증되었지만, 막 결합형이었다 (Svetlitchnyi et al., *J. Bacteriol.* 183.17:5134-5144 (2001)). 또한, CODH-II의 결정 구조도 이용가능하다 (Dobbek et al., *Science* 293.5533:1281-1285 (2001)). 예시적인 CODH 및 하이드로게나제 유전자의 단백질 서열은 아래 유전자은행 등재 번호로 확인할 수 있다:

표 7

[0111]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
CODH (추정)	YP_430813	83590804	무어렐라 써모아세티카
CODH-I (CooS-I)	YP_360644	78043418	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CooF	YP_360645	78044791	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
HypA	YP_360646	78044340	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CooH	YP_360647	78043871	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CooU	YP_360648	78044023	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CooX	YP_360649	78043124	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CooL	YP_360650	78043938	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CooK	YP_360651	78044700	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CooM	YP_360652	78043942	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CooM	AAC45116	1515466	로도스피릴럼 루브럼
CooK	AAC45117	1515467	로도스피릴럼 루브럼
CooL	AAC45118	1515468	로도스피릴럼 루브럼
CooX	AAC45119	1515469	로도스피릴럼 루브럼
CooU	AAC45120	1515470	로도스피릴럼 루브럼
CooH	AAC45121	1498746	로도스피릴럼 루브럼
CooF	AAC45122	1498747	로도스피릴럼 루브럼
CODH (CooS)	AAC45123	1498748	로도스피릴럼 루브럼
CooC	AAC45124	1498749	로도스피릴럼 루브럼
CooT	AAC45125	1498750	로도스피릴럼 루브럼
CooJ	AAC45126	1498751	로도스피릴럼 루브럼

CODH-II (CooS-II)	YP_358957	78044574	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CooF	YP_358958	78045112	카르복시도써머스 하이드로게노포만스

[0112] MTR 및ACS/CODH 활성을 가진 숙주 유기체에, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제 (PFOR)에 의해 피루베이트를 합성할 수 있게 함으로써, 외부 전자 어셉터 부재하에서 합성 가스와 메탄올에서 혐기성 증식을 가능하게 할 수 있다. 이 효소는 피루베이트에서 아세틸-CoA로의 가역적인 변환을 허용한다. 데설포비크릭 아프리카누스 (*Desulfovibrio africanus*)로부터 PFOR이 클로닝되었고, 에스케리키아 콜라이에서 발현시켜 산소의 존재하에 수일간 안정적인 활성형 재조합 효소를 제조하였다 (Pieulle et al., , *J. Bacteriol.* 179.18:5684-5692 (1997)). 산소 안정성은 PFOR에서는 상대적으로 드문 일이지만, 상기 데설포비크릭 아프리카누스 효소의 폴리펩타이드 체인을 잔기 60개로 연장시킴으로써, 부여할 수 있다. 또한, 무어렐라 써모아세티카 PFOR도 잘 특정화되었으며 (Menon and Ragsdale *Biochemistry* 36.28:8484-8494 (1997)), 독립영양 생육시에 피루베이트를 합성하는 방향으로 높은 활성을 발휘하는 것으로 확인되었다 (Furdui and Ragsdale, *J. Biol. Chem.* 275.37:28494-28499 (2000)). 아울러, 에스케리키아 콜라이도, 무어렐라 써모아세티카 PFOR과 51% 동일한 단백질을 코딩하는 특정화되지 않은 오픈 리딩 프래임 *ydbK*을 가지고 있다. 에스케리키아 콜라이에서의 피루베이트 옥시도리덕타제 활성의 증거들이 개시되었다 (Blaschkowski et al., *Eur. J. Biochem.* 123.3:563-569 (1982)). 이들 예시적인 PFOR 효소의 단백질 서열들은 아래 유전자은행 등재 번호로 확인할 수 있다. 수종의 추가적인 PFOR 효소들이 리뷰들에서 언급되었다 (Ragsdale, S.W., *Chem. Rev.* 103.6:2333-2346 (2003)):

표 8

[0113]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Por	CAA70873.1	1770208	데설포비크릭 아프리카누스
Por	YP_428946.1	83588937	무어렐라 써모아세티카
YdbK	NP_415896.1	16129339	에스케리키아 콜라이

[0114] 피루베이트에서 아세틸-CoA로의 변환은 몇가지 기타 효소 또는 이들의 조합에 의해 촉매될 수 있다. 예컨대, 피루베이트 데하이드로게나제는 NAD 분자를 NADH로 동시에 환원시키면서 피루베이트를 아세틸-CoA로 변환시킬 수 있다. 이것은 피루베이트의 아실화 산화적 탈카르복시화를 발생시키는 일련의 부분 반응들을 촉매하는, 멀티-효소 복합체이다. 이 효소는 3개의 서브유닛으로 구성된다: 피루베이트 탈카르복시화 효소 (E1), 디하이드로리포아미드 아실트랜스퍼라제 (E2) 및 디하이드로리포아미드 데하이드로게나제 (E3). 이 효소는 본래 에스케리키아 콜라이 및 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) 등의 수종의 유기체에 존재하고 있다. 에스케리키아 콜라이의 효소의 경우, E1 성분내 특정 잔기들이 기질 특이성을 담당한다 (Bisswanger, H., *J. Biol. Chem.* 256:815-82 (1981); Bremer, J., *Eur. J. Biochem.* 8:535-540 (1969); Gong et al., *J. Biol. Chem.* 275:13645-13653 (2000)). 효소를 조작하는 시도를 통해, 혐기 조건에서 에스케리키아 콜라이의 PDOH 효소 활성이 개선되었다 (Kim et al., *J. Bacteriol.* 190:3851-3858 (2008); Kim et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1766-1771 (2007); Zhou et al., *Biotechnol. Lett.* 30:335-342 (2008)). 에스케리키아 콜라이의 PDH와는 대조적으로, 바실러스 섭틸리스(*B. subtilis*)의 복합체는 혐기 조건에서 활성형이며 생육에 필수적이다 (Nakano et al., *J. Bacteriol.* 179:6749-6755 (1997)). 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*)의 PDH는 글리세롤에서의 생장에서 특정화된 것으로, 이 역시 혐기 조건에서 활성형이다 (Menzel et al., *J. Biotechnol.* 56:135-142 (1997)). 보바인 신장으로부터 유래된 효소 복합체에 대한 결정 구조 (Zhou et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:14802-14807 (2001))와 아조토박터 비넬란디(*Azotobacter vinelandii*) 유래의 E2 촉매 도메인도 이용가능하게 되었다 (Mattevi et al., *Science* 255:1544-1550 (1992)). 상기한 변환을 촉매할 수 있는 또다른 효소는 피루베이트 포르메이트 리아제이다. 이 효소는 피루베이트 + CoA → 아세틸-CoA 및 포르메이트로의 변환을 촉매한다. 피루베이트 포르메이트 리아제는 혐기성 레독스 균형 조절에 일조하기 위해 사용되는, 원핵 유기체에서 일반적인 효소이다. 효소의 예는 *pflB*로 코딩되는 에스케리키아 콜라이 (Knappe and Sawers, *FEMS.Microbiol Rev.* 6:383-398 (1990)), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) (Melchiorsen et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 58:338-344 (2002)), 및 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) (Takahashi-Abbe et al., *Oral.Microbiol Immunol.* 18:293-297 (2003))에서 확인할 수 있다. 에스케리키아 콜라이는, 피루베이트 또는 2-옥소부타노에이트를 각각 아세틸-CoA 또는 프로피오닐-CoA로 변환시키는 과정을 촉매하는, *tdcE*로 코딩되는, 다른 피루베이트 포르메이트 리아제를 가지고 있다 (Hesslinger et al., *Mol.*

Microbiol 27:477-492 (1998)). 에스케리키아 콜라이 유래의 *pflB* 및 *tdcE* 둘다, *pflA*로 코딩되는 피루페이트 포르메이트 리아제 활성화 효소를 필요로 한다. 아울러, 에스케리키아 콜라이에서 *yfiD*에 의해 코딩되는 짧은 단백질은 산소-절단된 피루베이트 포르메이트 리아제와 조합하여 활성을 복원시킬 수 있다 (Vey et al., *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:16137-16141 (2008)). 에스케리키아 콜라이 유래의 *pflA*와 *pflB*는 WO/2008/080124에 기술된 바와 같이 부탄올 생산을 위해 세포질 아세틸-CoA를 증가시키기 위한 수단으로서 사카로마이세스 세레비지애에서 발현시켰다. *pfl* 및 *act*로 각각 코딩되는, 다른 피루베이트 포르메이트 리아제 및 활성화 효소 후보체들도 클로스트리듐 파스테리아늄(*Clostridium pasteurianum*)에서 발현한 바 있다 (Weidner et al., *J Bacteriol.* 178:2440-2444 (1996)).

[0115] 아울러, 피루베이트를 아세틸-CoA로 변환시키기 위해 여러 효소를 조합하여 사용할 수 있다. 예컨대, 사카로마이세스 세레비지애에서, 먼저 피루베이트를 탈카르복시화하여 아세트알데하이드를 만들고, 이를 아세트알데하이드 데하이드로게나제에 의해 아세테이트로 산화시킨 후, 이를 아세틸-CoA 신타제에 의해 활성화시켜 아세틸-CoA를 제조함으로써, 세포질에서 아세틸-CoA를 수득한다. 아세틸-CoA 신타제는 에스케리키아 콜라이 (Kumari et al., *J. Bacteriol.* 177:2878-2886 (1995)), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*) (Starai et al., *Microbiology* 151:3793-3801 (2005); Starai et al., *J. Biol. Chem.* 280:26200-26205 (2005)), 및 무어렐라 써모아세티카 (전술됨) 등의 몇가지 다른 유기체들에 존재하는 천연 효소이다. 다른 예로, 아세테이트는 아세테이트 키나제 및 포스포트랜스아세틸라제에 의해 변환되어 아세틸-CoA가 될 수 있다. 먼저, 아세테이트 키나제가 아세테이트를 아세틸-포스페이트로 변환시키며, 이때 ATP 분자가 사용된다. 그 후, 아세틸-포스페이트와 CoA는, 포스포트랜스아세틸라제에 의해 하나의 포스페이트를 방출시키면서 아세틸-CoA로 변환된다. 아세테이트 키나제와 포스포트랜스아세틸라제는 수종의 클로스트리디아(*Clostridia*) 및 케타노사르시나 써모필리아(*Methanosarcina thermophila*)에서 잘 연구된 효소이다.

[0116] 피루베이트를 아세틸-CoA로 변환하는 또 다른 방법은 피루베이트 옥시다제에 의한 방법이다. 피루베이트 옥시다제는 피루베이트를 아세테이트로 전자 어셉터로서 유비퀴온(ubiquione)을 이용하여 변환시킨다. 에스케리키아 콜라이의 경우, 이러한 활성은 *poxB*에 의해 코딩되어 있다. PoxB는 사카로마이세스 세레비지애 및 자이모모나스 모빌리스(자이모모나스 모빌리스)의 피루베이트 탈카르복시화 효소와 유사성을 가지고 있다. 이 효소는 티아민 피로포스페이트 조인자 (Koland and Gennis, *Biochemistry* 21:4438-4442 (1982)); O'Brien et al., *Biochemistry* 16:3105-3109 (1977); O'Brien and Gennis, *J. Biol. Chem.* 255:3302-3307 (1980))와, 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 (FAD) 조인자를 취한다. 다음으로, 종래 공지된 바와 같이, 아세틸-CoA 신타제 또는 아세테이트 키나제 + 포스포트랜스아세틸라제 중 어느 하나에 의해, 아세테이트를 아세틸-CoA로 변환시킬 수 있다. 또한, 이들 효소들 중 일부는 아세틸-CoA로부터 피루베이트로의 가역적인 반응도 촉매할 수 있다.

[0117] CO 및 MeOH를 아세틸-CoA 또는 아세테이트로 레독스 중성 변환(redox neutral conversion)시키는 과정과는 다르게, 가스상 기질들로부터, 가능한 최대 수율로, 에탄올, 부탄올, 이소부탄올, 이소프로판올, 1,4-부탄디올, 1,3-부탄디올, 숙신산, 푸마르산, 말산, 4-하이드록시부티르산, 3-하이드록시프로피온산, 락트산, 아디프산, 메타크릴산 및 아크릴산 등의 보다 고도로 환원된 산물을 생산하는 방법은, CO 및 H_2로부터 추가적인 환원 당량의 추출에 의해 좌우된다 (예, 도 4에서 에탄올 형성 참조). 구체적으로, 환원 당량은 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제에 의한 CO 및 물의 CO_2로의 변환을 통해, 또는 페레독신, 플라보독신, FAD^+, NAD^+, 또는 $NADP^+$ 등의 어셉터로 H_2의 전자를 전달시키는 수소-이용성 하이드로게나제의 활성으로부터 수득된다.

[0118] 에스케리키아 콜라이 및 기타 장내 박테리아에는 천연적인 최대 4종의 하이드로게나제를 코딩하는 복수의 유전자들이 있다 (Sawers, G., *Antonie van Leeuwenhoek* 66.1:57-88 1994); Sawers et al., *J. Bacteriol.* 168.1:398-404 (1986); Sawers and Boxer, *Eur. J. Biochem.* 156.2:265-275 (1986); Sawers et al., *J. Bacteriol.* 164.3:1324-1331 (1985)). 효소 활성들의 다중성(multiplicity)을 감안하면, 에스케리키아 콜라이 또는 다른 숙주 유기체는 유입되는 수소 분자를 분할하여 대응되는 어셉터를 환원시키는데 충분한 하이드로게나제 활성을 제공할 수 있다. 그 중, 에스케리키아 콜라이의 내인성 수소-리아제 효소는 어셉터로서 페레독신을 이용하는 막 결합형 효소 복합체인 하이드로게나제 3와, 또한 페레독신 어셉터를 사용하는 하이드로게나제 4이다. 하이드로게나제 3와 4는 각각 *hyc* 및 *hyf* 유전자 클러스터들에 의해 코딩된다. 또한, 에스케리키아 콜라이에서의 하이드로게나제 활성은 하이드로게나제 복합체의 어셈블리에 관여하는 단백질의 *hyp* 유전자 발현에 의존한다 (Rangarajan et al. *J. Bacteriol.* 190.4:1447-1458 (2008); Jacobi et al., *Arch. Microbiol.* 158.6:444-451 (1992)). 무어렐라 써모아세티카의 하이드로게나제는, 충분한 내인성 하이드로게나제 활성이 결여된 생산 숙주에 적합한 후보 효소이다. 무어렐라 써모아세티카는 단독 탄소원으로서 이산화탄소를 이용하여

생육할 수 있는데, 이는 환원 당량을 H_2에서 추출하여, Wood-Ljungdahl 경로를 통해 아세틸-CoA를 합성할 수 있다는 것을 의미한다 (Drake, H. L., *J. Bacteriol.* 150.2:702-709 (1982); Kellum and Drake, *J. Bacteriol.* 160.1:466-469 (1984); Drake and Daniel *Res. Microbial.* 155.10:869-883 (2004)) (도 2). 무어렐라 써모아세티카에는 에스케리키아 콜라이의 몇가지 *hyp*, *hyc*, 및 *hyf* 유전자에 대한 상동체를 가지고 있다. 이 유전자에 의해 코딩되는 단백질 서열은 아래 유전자은행 등재 번호로 확인할 수 있다. 또한, 하이드로게나제 기능성을 코딩하는 수종의 유전자 클러스터들이 무어렐라 써모아세티카에 존재하며, 이의 단백질 서열은 아래에 열거한다:

표 9

[0119]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HypA	NP_417206	16130633	에스케리키아 콜라이
HypB	NP_417207	16130634	에스케리키아 콜라이
HypC	NP_417208	16130635	에스케리키아 콜라이
HypD	NP_417209	16130636	에스케리키아 콜라이
HypE	NP_417210	226524740	에스케리키아 콜라이
HypF	NP_417192	16130619	에스케리키아 콜라이

[0120] 에스케리키아 콜라이 *hyp* 유전자와 상동적인, 무어렐라 써모아세티카의 유전자 단백질은 아래에 열거한다:

표 10

[0121]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Moth_2175	YP_431007	83590998	무어렐라 써모아세티카
Moth_2176	YP_431008	83590999	무어렐라 써모아세티카
Moth_2177	YP_431009	83591000	무어렐라 써모아세티카
Moth_2178	YP_431010	83591001	무어렐라 써모아세티카
Moth_2179	YP_431011	83591002	무어렐라 써모아세티카
Moth_2180	YP_431012	83591003	무어렐라 써모아세티카
Moth_2181	YP_431013	83591004	무어렐라 써모아세티카

[0122] 하이드로게나제 3 단백질은 다음과 같다:

표 11

[0123]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HycA	NP_417205	16130632	에스케리키아 콜라이
HycB	NP_417204	16130631	에스케리키아 콜라이
HycC	NP_417203	16130630	에스케리키아 콜라이
HycD	NP_417202	16130629	에스케리키아 콜라이
HycE	NP_417201	16130628	에스케리키아 콜라이
HycF	NP_417200	16130627	에스케리키아 콜라이
HycG	NP_417199	16130626	에스케리키아 콜라이
HycH	NP_417198	16130625	에스케리키아 콜라이
HycI	NP_417197	16130624	에스케리키아 콜라이

[0124] 하이드로게나제 4 단백질은 다음과 같다:

표 12

[0125]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HyfA	NP_416976	90111444	에스케리키아 콜라이
HyfB	NP_416977	16130407	에스케리키아 콜라이
HyfC	NP_416978	90111445	에스케리키아 콜라이
HyfD	NP_416979	16130409	에스케리키아 콜라이

HyfE	NP_416980	16130410	에스케리키아 콜라이
HyfF	NP_416981	16130411	에스케리키아 콜라이
HyfG	NP_416982	16130412	에스케리키아 콜라이
HyfH	NP_416983	16130413	에스케리키아 콜라이
HyfI	NP_416984	16130414	에스케리키아 콜라이
HyfJ	NP_416985	90111446	에스케리키아 콜라이
HyfR	NP_416986	90111447	에스케리키아 콜라이

[0126] 에스케리키아 콜라이 *hyc* 및/또는 H*yf* 유전자와 상동적인, 무어렐라 써모아세티카의 유전자 단백질은 아래에 열거한다:

표 13

[0127]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Moth_2182	YP_431014	83591005	무어렐라 써모아세티카
Moth_2183	YP_431015	83591006	무어렐라 써모아세티카
Moth_2184	YP_431016	83591007	무어렐라 써모아세티카
Moth_2185	YP_431017	83591008	무어렐라 써모아세티카
Moth_2186	YP_431018	83591009	무어렐라 써모아세티카
Moth_2187	YP_431019	83591010	무어렐라 써모아세티카
Moth_2188	YP_431020	83591011	무어렐라 써모아세티카
Moth_2189	YP_431021	83591012	무어렐라 써모아세티카
Moth_2190	YP_431022	83591013	무어렐라 써모아세티카
Moth_2191	YP_431023	83591014	무어렐라 써모아세티카
Moth_2192	YP_431024	83591015	무어렐라 써모아세티카

[0128] 무어렐라 써모아세티카에서 추가적인 하이드로게나제-코딩 유전자 클로스터는 다음과 같다:

표 14

[0129]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Moth_0439	YP_429313	83589304	무어렐라 써모아세티카
Moth_0440	YP_429314	83589305	무어렐라 써모아세티카
Moth_0441	YP_429315	83589306	무어렐라 써모아세티카
Moth_0442	YP_429316	83589307	무어렐라 써모아세티카
Moth_0809	YP_429670	83589661	무어렐라 써모아세티카
Moth_0810	YP_429671	83589662	무어렐라 써모아세티카
Moth_0811	YP_429672	148283119	무어렐라 써모아세티카
Moth_0814	YP_429674	83589665	무어렐라 써모아세티카
Moth_0815	YP_429675	83589666	무어렐라 써모아세티카
Moth_0816	YP_429676	83589667	무어렐라 써모아세티카
Moth_1193	YP_430050	83590041	무어렐라 써모아세티카
Moth_1194	YP_430051	83590042	무어렐라 써모아세티카
Moth_1195	YP_430052	83590043	무어렐라 써모아세티카
Moth_1196	YP_430053	83590044	무어렐라 써모아세티카
Moth_1717	YP_430562	83590553	무어렐라 써모아세티카
Moth_1718	YP_430563	83590554	무어렐라 써모아세티카
Moth_1719	YP_430564	83590555	무어렐라 써모아세티카
Moth_1883	YP_430726	83590717	무어렐라 써모아세티카
Moth_1884	YP_430727	83590718	무어렐라 써모아세티카
Moth_1885	YP_430728	83590719	무어렐라 써모아세티카
Moth_1886	YP_430729	83590720	무어렐라 써모아세티카

Moth_1887	YP_430730	83590721	무어렐라 써모아세티카
Moth_1888	YP_430731	83590722	무어렐라 써모아세티카
Moth_1452	YP_430305	83590296	무어렐라 써모아세티카
Moth_1453	YP_430306	83590297	무어렐라 써모아세티카
Moth_1454	YP_430307	83590298	무어렐라 써모아세티카

[0130] 1,3-부탄디올의 생산은, 도 4 및 5에 도시된 다양한 대안적인 경로를 통해 재조합 에스케리키아 콜라이에서 달성할 수 있다. 전체 경로에서, 먼저 아세틸-CoA 분자 2개가 아세토아세틸-CoA 1분자로 티올라제에 의해 변환된다.

[0131] 아세토아세틸-CoA 티올라제는 아세틸-CoA 분자 2개를 아세토아세틸-CoA 및 CoA 각각 1분자로 변환시킨다. 아세토아세틸-CoA 티올라제 효소의 예로는, 에스케리키아 콜라이의 *atoB* (Martin et al., *Nat. Biotechnol.* 21.7:796-802 (2003)), 클로스트리듐 아세토부틸리컴(*Clostridium acetobutylicum*)의 *thlA* 및 *thlB* (Hanai et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 73.24:7814-7818 (2007); Winzer et al. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2.4:531-541 (2000)), 및 사카로마이세스 세레비지애의 *ERG10* (Hiser et al., *J. Biol. Chem.* 269.50:31383-31389 (1994))로부터 제조되는 유전자 산물들이다. 이들 단백질 및 유전자에 대한 정보는 아래 정보를 이용하여 확인할 수 있다:

표 15

[0132]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
AtoB	NP_416728	16130161	에스케리키아 콜라이
Thl A	NP_349476.1	15896127	클로스트리듐 아세토부틸리컴
Thl B	NP_149242.1	15004782	클로스트리듐 아세토부틸리컴
ERG10	NP_015297	6325229	사카로마이세스 세레비지애

[0133] 아세토아세틸-CoA로부터의 경로는, 아세토아세틸-CoA 리덕타제에 의한 3-하이드록시부티릴-CoA로의 환원을 수반한다 (케톤 환원). 그런 후, 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제라고 하는 CoA-의존형 알데하이드 리덕타제에 의해 3-하이드록시부티르알데하이드로 변환시킬 수 있다. 마지막으로, 3-하이드록시부티르알데하이드는 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제에 의해 환원되어 1,3-BDO를 생산할 수 있다. 다른 예로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 알코올-형성형 CoA-의존형 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제에 의해 1,3-BDO로 바로 환원시킬 수도 있다. 상기 경로의 각 단계에 사용되는 유전자들은 아래에서 설명한다.

[0134] 아세토아세틸-CoA에서 3-하이드록시부티릴-CoA로의 환원을 촉매하는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원)는, 수종의 클로스트리디아에서 아세틸-CoA를 부티레이트로 발효하는 공정에 참여하며, 상세한 연구가 이루어져 있다 (Jones and Woods, *Microbiol. Rev.* 50.4:484-524 (1986)). *hbd*에 의해 코딩되는 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 효소가 클로닝되었으며, 에스케리키아 콜라이에서 기능적으로 발현되었다 (Youngleson et al., *J. Bacteriol.* 171.12:6800-6807 (1989)). 또한, *fadB* 및 *fadJ*로 코딩되는, 에스케리키아 콜라이에서의 2개의 지방산 산화 복합체들의 서브유닛들은, 3-하이드록시아실-CoA 데하이드로게나제로 작용한다 (Binstock and Schulz, *Methods Enzymol.* 71 Pt. C: 403-411 (1981)). 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로 환원시키는 것으로 확인된 그외 유전자들로는, 주글로에아 라미게라(*Zoogloea ramigera*)의 *phbB* (Ploux et al., *Eur. J. Biochem.* 171.1:177-182 (1988))와 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)의 *phaB*가 있다 (Alber et al., *Mol. Microbiol.* 61.2:297-309 (2006)). 앞의 유전자는 NADPH 의존적이며, 그 뉴클레오티드 서열이 결정되었고 (Peoples and Sinskey, *Mol. Microbiol.* 3.3:349-357 (1989)), 에스케리키아 콜라이에서 유전자를 발현시킨 바 있다. 이 유전자에 대한 기질 특이성 연구를 통해, 기질로서 아세토아세틸-CoA 외에도 3-옥소프로피오닐-CoA를 받아들일 수 있다는 결론이 내려진 바 있다 (Ploux et al., *Eur. J. Biochem.* 171.1:177-182 (1988)). 다른 유전자로는, 클로스트리디듐 클루이베리(*Clostridium kluyveri*)의 *Hbd1* (C-말단 도메인)과 *Hbd2* (N-말단 도메인) (Hillmer and Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 3334:12-23 (1974)), 및 보스 타우루스(*Bos taurus*)의 *HSD17B10* (Wakil et al., *J. Biol. Chem.* 207.2:631-638 (1954))가 있다. 이들 유전자와 단백질에 대한 정보는 아래에 열거한다:

표 16

[0135]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
fadB	P21177.2	119811	에스케리키아 콜라이
fadJ	P77399.1	3334437	에스케리키아 콜라이
Hbd2	EDK34807.1	146348271	클로스트리듐 클루이베리
Hbd1	EDK32512.1	146345976	클로스트리듐 클루이베리
hbd	P52041.2		클로스트리듐 아세토부틸리컴
HSD17B10	O02691.3	3183024	보스 타우루스
phbB	P23238.1	130017	주글로에아 라미게라
phaB	YP_353825.1	77464321	로도박터 스페로이데스

[0136] 아래에 나타낸 바와 같이, 기타 클로스트리디아 종들과 메탈로스페라 세둘라(*Metallosphaera sedula*)에서도 다수의 유사 효소들이 확인되었다 (Berg et al., *Science* 318.5857:1782-1786 (2007)):

표 17

[0137]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Hbd	NP_349314.1	NP_349314.1	클로스트리듐 아세토부틸리컴
Hbd	AAM14586.1	AAM14586.1	클로스트리듐 베이에링키
Msed_1423	YP_001191505	YP_001191505	메탈로스페라 세둘라
Msed_0399	YP_001190500	YP_001190500	메탈로스페라 세둘라
Msed_0389	YP_001190490	YP_001190490	메탈로스페라 세둘라
Msed_1993	YP_001192057	YP_001192057	메탈로스페라 세둘라

[0138] 수종의 아실-CoA 데하이드로게나제는 아실-CoA를 대응되는 알데하이드로 환원시킬 수 있으며, 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성) 활성을 촉매하는데 사용할 수 있다. 이러한 효소를 코딩하는 유전자의 예로는, 지방 아실-CoA 리덕타제를 코딩하는 액시네토박터 칼코아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*) *acr1* (Reiser and Somerville, *J. Bacteriol.* 179.9:2969-2975 (1997)), 액시네토박터 *sp. M-1* 지방 아실-CoA 리덕타제 (Ishige et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 68.3:192-195 (2002)), 및 클로스트리듐 클로이베리의 *sucD* 유전자에 의해 코딩되는 CoA- 및 NADP-의존적인 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제 (Sohling and Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178.3:871-880 (1996); Sohling and Gottschalk *J. Bacteriol.* 178.3:871-880 (1996))를 포함한다. P. 깅기발리스(*P. gingivalis*)의 *SucD*는 또 다른 숙시네이트 세미알하이드 데하이드로게나제 (Takahashi et al., *J. Bacteriol.* 182.17:4704-4710 (2000))이다. *bphG*에 의해 코딩되는 슈도모나스 sp.의 효소 아실화 아세트알데하이드 데하이드로게나제는 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 이소부티르알데하이드 및 포름알데하이드를 산화 및 아실화하는 입증된 또 다른 효소이다 (Powlowski et al., *J. Bacteriol.* 175.2:377-385 (1993)). 루코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*)의 *adhE*에 의해 코딩되는 효소는, 아세틸-CoA를 에탄올로 환원시킬 뿐만 아니라, 분지쇄 화합물 이소부티르알데하이드를 이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 입증되었다 (Kazahaya et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43-55 (1972); Koo et al., *Biotechnol. Lett.* 27.7:505-510 (2005)). 부티르알데하이드 데하이드로게나제는 유사한 반응, 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*) 등의 용매생산 (solventogenic) 유기체에서 부티릴-CoA를 부티르알데하이드로 변환하는 과정을 촉매한다 (Kosaka et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71.1:58-68 (2007)). 이들 유전자와 단백질에 대한 정보는 아래에 열거한다:

표 18

[0139]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
acr1	YP_047869.1	50086359	액시네토박터 칼코아세티쿠스
acr1	AAC45217	1684886	액시네토박터 베일리
acr1	BAB85476.1	18857901	액시네토박터 sp. 균주 M-1
sucD	P38947.1	172046062	클로스트리듐 클루이베리

sucD	NP_904963.1	34540484	포르피로모나스 긴기발리스
bphG	BAA03892.1	425213	슈도모나스 *sp*
adhE	AAV66076.1	55818563	루코노스톡 메센테로이데스
bld	AAP42563.1	31075383	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴

[0140] 아실-CoA를 대응되는 알데하이드로 변환하는 다른 효소 타입은, 말로닐-CoA를 말로닉 세미알데하이드로 변환시키는 말로닐-CoA 리덕타제이다. 말로닐-CoA 리덕타제는 호열호산성(thermoacidophilic) 고세균(archaeal) 박테리아에서 3-하이드록시프로피오네이트 사이클을 통한 독립영양성 탄소 고정에 주요 효소이다 (Berg et al., *Science* 318.5857:1782-1786 (2007); Thauer, R.K., *Science* 318.5857:1732-1733). 이 효소는 조인자로서 NADPH를 이용하며, 메탈로스페라(*Metallosphaera*) 및 설폴로부스(*Sulfolobus*) spp에서 특정화되었다 (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188.24: 8551-8559 (2006); Hugler et al. 2404-10). 이 효소는 메탈로스페라 세둘라의 *Msed_0709*에 코딩되어 있다 (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188.24: 8551-8559 (2006); Berg et al., *Science* 318.5857:1782-1786 (2007)). 설폴로부스 토코다이(*Sulfolobus tokodaii*) 유래의 말로닐-CoA를 코딩하는 유전자가 클로닝되었고, 에스케리키아 콜라이에서 이종 발현되었다 (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188.24: 8551-8559 (2006); Alber et al., *Mol. Microbiol.* 61.2:297-309 (2006). 또한, 이 효소는 메틸 말로닐-CoA에서 대응되는 알데하이드로의 변환을 촉매하는 것으로 확인되었다. 이 효소의 알데하이드 데하이드로게나제 기능성은 클로로플렉수스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)로부터 유래된 2중 기능의 데하이드로게나제와 비슷하지만, 서열 유사성은 거의 없다. 말로닐-CoA 리덕타제 효소 후보체들 둘다, 아스파르틸-4-포스페이트에서 아스파르테이트 세미알데하이드로의 환원과 동시적인 탈인산화를 촉매하는 효소인, 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제와 서열 유사성을 가진다. 설폴로부스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*) 및 설폴로부스 액시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*) 등의 다른 유기체들에서도 단백질과의 서열 상동성에 의해 다른 유전자들을 발견할 수 있으며, 아래에 열거한다. CoA-아실화 알데하이드 데하이드로게나제에 대한 또 다른 유전자는 클로스트리듐 바이에링키(*Clostridium beijerinckii*) 유래의 *ald* 유전자이다 (Toth et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 65.11:4973-4980 (1999)). 이 효소는 아세틸-CoA 및 부티릴-CoA를 대응되는 알데하이드로 환원시키는 것으로 보고되었다. 이 유전자는 살모넬라 티피무리움과 에스케리키아 콜라이의 아세트알데하이드 데하이드로게나제를 코딩하는 *eutE*와 매우 비슷하다 (Toth et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 65.11:4973-4980 (1999)). 관련 유전자와 단백질에 대한 정보는 요약하여 아래에 열거한다:

표 19

[0141]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	메탈로스페라 세둘라
mcr	NP_378167.1	15922498	설폴로부스 토코다이
asd-2	NP_343563.1	15898958	설폴로부스 솔파타리쿠스
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	설폴로부스 액시도칼다리우스
Ald	AAT66436	9473535	클로스트리듐 바이에링키
eutE	AAA80209	687645	살모넬라 티피무리움
eutE	P77445	2498347	에스케리키아 콜라이

[0142] 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제 활성을 나타내는 효소 (EC 1.1.1.61)는, 랄스토니아 유트로파(*Ralstonia eutropha*) (Bravo et al., *J. Forensic Sci.* 49.2:379-387 (2004)), 클로스트리듐 클루이베리(Wolff and Kenealy, *Protein Expr. Purif.* 6.2:206-212 (1995)) 및 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) (Breitkreuz et al., *J. Biol. Chem.* 278.42: 41552-41556 (2003))에서 특정화되었다. 또다른 유전자는 지오바실러스 써모글루코시다시우스(*Geobacillus thermoglucosidasius*)의 알코올 데하이드로게나제 *adhI*이다 (Jeon et al., *J. Biotechnol.* 135.2:127-133 (2008)). 유전자 및 단백질 정보는 요약하여 아래에 열거한다:

표 20

[0143]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
4hbd	YP_726053.1	113867564	랄스토니아 유트로파 H16
4hbd	L21902.1	146348486	클로스트리듐 클루이베리 DSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	아라비돕시스 탈리아나
adhI	AAR91477.1	40795502	지오바실러스 써모글루코시다시우스 M10EXG

[0144] 효소의 다른 예는, 3-하이드록시이소부티레이트에서 메틸말로네이트 세미알데하이드로의 가역적인 산화를 촉매하는 3-하이드록시이소부티레이트 데하이드로게나제이다. 이 효소는 발린, 루신 및 이소루신의 분해에 관여하며, 박테리아, 진핵생물 및 포유류에서 동정되었다. 써무스 써모필러스(*Thermus thermophilus*) HB8의 *P84067*에 의해 코딩되는 효소가 구조적으로 특정되었다 (Lokanath et al., *J. Mol. Biol.* 352.4:905-917 (2005)). 동위원소로 표지된 기질을 이용하여 인간 3-하이드록시이소부티레이트 데하이드로게나제의 가역성이 입증되었다 (Manning and Pollitt, *Biochem. J.*231.2:481-484 (1985)). 이 효소를 코딩하는 추가적인 유전자는 호모 사피엔스(Hawes et al. *Methods Enzymol.* 324:218-228 (2000))와 오릭톨라구스 쿠니쿨러스(*Oryctolagus cuniculus*) (Hawes et al. *Methods Enzymol.* 324:218-228 (2000); Chowdhury et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60.12:2043-2047 (1996))의 *3hidh*, 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 *mmsb* 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 *dhat*이다 (Aberhart and Hsu, *J. Chem. Soc. (Perkin 1)* 6:1404-1406; Chowdhury et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60.12:2043-2047 (1996)); Chowdhury et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67.2:438-441 (2003)). 이들 유전자 및 단백질과 관련된 정보는 아래에 열거한다:

표 21

[0145]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
P84067	P84067	75345323	써무스 써모필러스
mmsb	P28811.1	127211	슈도모나스 에어루지노사
dhat	Q59477.1	2842618	슈도모나스 푸티다
3hidh	P31937.2	12643395	호모 사피엔스
3hidh	P32185.1	416872	오릭톨라구스 쿠니쿨러스

[0146] 알데하이드에서 알코올로의 변환을 촉매하며, 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제에 대한 후보 효소로 사용할 수 있는 효소(즉, 알코올 데하이드로게나제 또는 등가의 알데하이드 리덕타제)를 코딩하는 유전자의 다른 예는, C2-C14에 대한 중쇄 알코올 데하이드로게나제를 코딩하는 *alrA* (Tani et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 66.12:5231-5335 (2000)), 사카로마이세스 세레비지애의 ADH2 (Atsumi et al., *Nature* 451.7174:86-89 (2008)), C3 보다 긴 분자를 선호하는 에스케리키아 콜라이의 *yqhD* (Sulzenbacher et al., *J. Mol. Biol.* 342.2:489-502 (2004)), 및 부티르알데하이드를 부탄올로 변환시키는 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *bdh* I와 *bdh* II를 포함한다 (Walter et al., *J. Bacteriol.* 174.22:7149;7158 (1992)). *yqhD*의 유전자 산물은 조인자로서 NADPH를 이용하여, 아세트알데하이드, 말론디알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드 및 아크롤레인의 환원을 촉매한다 (Perez et al., *J. Biol. Chem.* 283.12:7346-7353 (2008)). 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*)의 ADH1이 포름알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인 등의 다수의 알데하이드 화합물에 대해 활성을 가지는 것으로 입증되었다 (Kinoshita et al., *Appl. Microbiol. Biotchenol.* 22:249-254 (1985)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 단백질 서열은, 이용가능한 경우 하기 유전자은행 등재 번호를 이용하여 확인할 수 있다:

표 22

[0147]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
alrA	BAB12273.1	9967138	액시네토박터 sp. 균주 M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	사카로마이세스 세레비지애
yqhD	NP_417484.1	16130909	에스케리키아 콜라이
bdh I	NP_349892.1	15896543	클로스트리듐 아세토부틸리컴

bdh II	NP_349891.1	15896542	클로스트리듐 아세토부틸리컴
adhA	YP_162971.1	56552132	자이모모나스 모빌리스

[0148] 알코올-형성하는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제는 아실-CoA를 알코올로 변환하는 예시적인 2단계 옥시도리덕타제에 의해 촉매될 수 있다. 이러한 것으로는 아세틸-CoA와 같은 기질을 에탄올로 (예, 에스케리키아 콜라이의 *adhE* (Kessler et al., *FEBS Lett*. 281.1-2:59-63 (1991)), 부티릴-CoA를 부탄올로 (예, 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *adhE2* (Fontaine et al., *J. Bacteriol*. 184.3:821-830 (2002))로 변환시키는 효소들을 포함한다. 루코노스톡 메센테로이데스의 *adhE*에 의해 코딩되는 효소는, 아세틸-CoA를 에탄올로 환원시킬 뿐만 아니라, 분지쇄 화합물인 이소부티르알데하이드를 이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 확인되었다 (Kazahaya et al., *J. Gen. App. Microbiol*. 18:43-55 (1972); Koo et al., *Biotechnol. Lett*. 27.7:505-510 (2005)). 이들 유전자와 단백질에 대한 정보는 아래에 열거한다:

표 23

[0149]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
adhE	NP_415757.1	16129202	에스케리키아 콜라이
adhE2	AAK09379.1	12958626	클로스트리듐 아세토부틸리컴
adhE	AAV66076.1	55818563	루코노스톡 메센테로이데스

[0150] 다른 예시적인 효소는 말로닐-CoA를 3-HP로 변환시킬 수 있다. 이러한 활성을 가진 NADPH 의존적인 효소는, 3-하이드록시프로피오네이트 사이클에 참여하는 클로로플렉수스 아우란티아쿠스에서 특정화되었다 (Hugler et al., *J. Bacteriol*. 184.9:2404-2410 (2002); Strauss and Fuchs, *Eur. J. Biochem*. 215.3:633-643 (1993)). 300 kDa 분자량의 이 효소는 기질에 대해 고특이적이며, 다른 공지된 옥시도리덕타제와의 서열 유사성이 거의 없다 (Hugler et al., *J. Bacteriol*. 184.9:2404-2410 (2002)). 다른 유기체에서는 이러한 특정 반응을 촉매하는 효소는 알려져 있지 않지만, 다른 유기체가 비슷한 경로를 구비할 수 있다는 생물정보학적 증거들은 있는 실정이다 (Klatt et al., *Environ. Microbiol*. 9.8:2067-2078 (2007)). 로제이플렉서스 카스텐홀지 (*Roseiflexus castenholzii*), 에리트로박터(*Erythrobacter*) *sp. NAP1* 및 마린 감마 프로테오박테리움(marine gamma proteobacterium) HTCC2080 등의 다른 유기체에서의 후보 효소들도 서열 유사성에 의해 추론할 수 있다. 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 24

[0151]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
mcr	AAS20429.1	42561982	클로로플렉수스 아우란티아쿠스
Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	로제이플렉서스 카스텐홀지
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	에리트로박터 *sp. NAP1*
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	마린 감마 프로테오박테리움 HTCC2080

[0152] 장쇄 아실-CoA 분자는 알코올-형성 지방 아실-CoA 리덕타제를 코딩하는 호호바 (*Simmondsia chinensis*) *FAR* 등의 효소에 의해 환원될 수 있다. 에스케리키아 콜라이에서 과다 발현시키면 FAR 활성이 나타나며, 지방 알코올이 축적된다 (Metz et al., *Plant Physiol*. 122.3: 635-644 (2000)). *FAR* 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 25

[0153]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
FAR	AAD38039.1	5020215	시몬시아 치넨시스

[0154] 아세토아세틸-CoA을 1,3-부탄디올로 변환시키는 2번째 다른 경로는 CoA-의존형 알데하이드 형성 아세토아세틸-CoA 리덕타제를 통해 아세토아세틸-CoA에서 3-옥소부티르알데하이드로의 환원을 경유하여 진행된다. 그런 후, 3-옥소부티르알데하이드는 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제에 의해 3-하이드록시부티르알데하이드로 환원되고 (케톤 환원), 마지막으로, 이 중간산물은 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제에 의해 1,3-부탄디올로 환원

된다. 이들 단계의 각각에 사용되는 효소를 코딩하는 유전자 및 효소는 아래에 열거한다.

[0155] 아세토아세틸-CoA에서 3-옥소부티르알데하이드로의 변환을 촉매하는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성)에 대한 예시적인 후보 효소는 전술한 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성)에 대해 기술된 것과 동일하다. 케톤을 하이드록시 관능기를 변환시키며, 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원) 활성을 촉매하는데 사용할 수 있는 수종의 알코올 데하이드로게나제 예들이 있다. 에스케리키아 콜라이로부터 유래된 이러한 2종의 효소는 말레이트 데하이드로게나제 (*mdh*) 및 락테이트 데하이드로게나제 (*ldhA*)에 의해 코딩된다. 또한, 랄스토니아 유트로파 유래의 락테이트 데하이드로게나제는 락테이트, 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소글루타레이트 등의 다양한 체인 길이의 기질에 대해 고활성을 나타내는 것으로 확인되었다 (Steinbuchel and Schlegel, *Eur. J. Biochem.* 130.2:329-334 (1983)). 또한, 옥소 관능기를 하이드록시기로 변환하는 과정을, 인간 및 랫의 태반에서 발견되는 것으로 보고된 효소인 2-케토 1,3-부탄디올 리덕타제로 촉매할 수 있다 (Suda et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 176.2:610-620 (1976); Suda et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342.2:586-591 (1977)). 이들 효소들 모두 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제로서 이용될 수 있다. 이 단계를 위한 추가적인 효소는 클로닝 및 특정화된 인간 심장 유래의 미토콘드리아 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 (*bdh*)이다 (Marks et al., *J. Biol. Chem.* 267.22:15459-15463 (1992)). 이 효소는 3-하이드록시산에 작용하는 데하이드로게나제이다. 클로스트리듐 바이에링키 (Ismaiel et al., *J. Bacteriol.* 175.16:5097-5105 (1993)) 및 써모안에어로박터 브록키이(Lamed and Zeikus, *Biochem. J.* 195.1:183-190 (1981); Peretz and Burstein, *Biochemistry* 28.16:6549-6555 (1989))에서 확인된 바와 같이, 아세톤을 이소프로판올로 변환시키는 다른 알코올 데하이드로게나제의 예도 있다. 메틸 에틸 케톤 (MEK) 리덕타제, 또는 다른 예로, 2-부탄올 데하이드로게나제는 MEK의 환원을 촉매하여 2-부탄올을 형성한다. 효소의 예들은, 로도코커스 루버(*Rhodococcus ruber*) (Kosjek et al., *Biotechnol. Bioeng.* 86.1:55-62 (2004)) 및 피로코커스 푸리오서스(*Pyrococcus furiosus*) (van der Oost et al., *Eur. J. Biochem.* 268.10:3062-3068 (2001))에서 확인할 수 있다. 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 26

[0156]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
mdh	AAC76268.1	1789632	에스케리키아 콜라이
ldhA	NP_415898.1	16129341	에스케리키아 콜라이
ldh	YP_725182.1	113866693	랄스토니아 유트로파
bdh	AAA58352.1	177198	호모 사피엔스
adh	AAA23199.2	60592974	클로스트리듐 바이에링키
adh	P14941.1	113443	써모안에어로박터 브록키이
sadh	CAD36475	21615553	로도코커스 루버
adhA	3288810	*AAC25556*	피로코커스 푸리오서스

[0157] 다른 경로는, CoA-의존형, 알코올 형성 아세토아세틸-CoA 리덕타제에 의해 아세토아세틸-CoA를 4-하이드록시-2-부타논로 환원시키는 과정을 경유하여 이루어진다. 그런 후, 이 중간산물은 4-하이드록시부타논 리덕타제에 의해 1,3-부탄디올로 환원된다. 또한, 4-하이드록시부타논은 알데하이드 환원 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제에 의해 3-옥소부티르알데하이드로부터도 생성될 수 있다. 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성)는 알코올-형성의 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제에서와 같이 동일한 효소를 이용할 수 있다.

[0158] 4-하이드록시부타논 리덕타제 활성은 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제에 대해 기술된 것과 동일한 유전자로부터 수득할 수 있다. 추가적으로, Matsuyama et al., 미국 특허 5,413,922에 기술된 바와 같이, 특히 바실러스 속, 브레비박테리움 속, 칸디다 속 및 클렙시엘라 속에 속하는 균주 등의, 다수의 유기체들은 4-하이드록시-2-부타논에서 1,3-부탄디올로의 환원을 촉매할 수 있다.

[0159] 알데하이드에서 알코올로의 변환을 촉매하는 효소(즉, 알코올 데하이드로게나제 또는 등가의 알데하이드 리덕타제)를 코딩하는 유전자의 예로는, C2-C14에 대한 중쇄 알코올 데하이드로게나제를 코딩하는 *alrA* (Tani et al., *App. Environ. Microbiol.* 66.12:5231-5235 (2000)), 사카로마이세스 세레비지애의 ADH2 (Atsumi et al., *Nature* 451.7174:86-89 (2008)), C3 보다 긴 분자를 선호하는, 에스케리키아 콜라이의 *yqh* (Sulzenbacher et al., *J. Mol. Biol.* 342.2:489-502 (2004)), 및 부티르알데하이드를 부탄올로 변환시키는, 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *bdh* I과 *bdh* II (Walter et al., *J. Bacteriol.* 174.22:7149-7158 (1992))를 포함한다. *yqhD*의

유전자 산물은 조인자로서 NADPH를 사용하여 아세트알데하이드, 말론디알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인의 환원을 촉매한다 (Perez et al., *J. Biol. Chem.* 283.12:7346-7353 (2008)). 이들 유전자 모두 3-옥소부티르알데하이드를 4-하이드록시부타논으로 변환시키는 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원) 활성을 제공할 수 있다. 자이모모나스 모빌리스의 ADH1은 포름알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인 등의 다수의 알데하이드에 대해 활성을 나타내는 것으로 입증되었다 (Kinoshita et al., *App. Microbiol. Biotechnol.* 22:249-254 (1985)).

[0160] 이용가능한 경우, 이들 예를 든 유전자 산물들 각각에 대한 단백질 서열들은 아래 유전자은행 등재 번호를 이용하여 확인할 수 있다:

표 27

[0161]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
alrA	BAB12273.1	9967138	액시네토박터 sp. 균주 M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	사카로마이세스 세레비지애
yqhD	NP_417484.1	16130909	에스케리키아 콜라이
bdh I	NP_349892.1	15896543	클로스트리듐 아세토부틸리컴
bdh II	NP_349891.1	15896542	클로스트리듐 아세토부틸리컴
adhA	YP_162971.1	56552132	자이모모나스 모빌리스

[0162] 아세토아세틸-CoA에서 아세토아세테이트로의 변환은, CoA-에스테르 결합에 저장된 에너지를 보존시키는 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제에 의해 수행될 수 있다. 이러한 변환을 촉매할 수 있는 트랜스퍼라제 효소의 몇가지 예들은 아래에 기술된다. 이들 효소는 본래 바람직한 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 활성을 나타내거나, 또는 높은 효율로 기질로서 아세테토아세틸-CoA를 받아들이도록 직접 진화(directed evolution)를 통해 조작시킬 수 있다. 자연적이거나 또는 직접 진화를 통한 것 중 어느 한 형태의 상기한 효소는, 또한, 트랜스퍼라제 기전을 통한 3-하이드록시부티릴-CoA에서 3-하이드록시부티레이트로의 변환을 촉매하는데 적합할 수 있다.

[0163] 아세토아세틸-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제는 본래 아세토아세틸-CoA 및 아세테이트를 아세토아세테이트 및 아세틸-CoA로 변환시킨다. 또한, 이 효소는 기질로서 3-하이드록시부티릴-CoA를 받아들일 수 있거나, 또는 그렇게 되도록 조작될 수 있다. 이 효소의 예로는, 에스케리키아 콜라이의 *atoAD* (Hanai et al., *Appl Environ Microbiol* 73:7814-7818 (2007)), 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *ctfAB* (Jojima et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1219-1224 (2008)), 및 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴의 *ctfAB* (Kosaka et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007))가 있다. 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 28

[0164]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
AtoA	P76459.1	2492994	에스케리키아 콜라이
AtoD	P76458.1	2492990	에스케리키아 콜라이
CtfA	NP_149326.1	15004866	클로스트리듐 아세토부틸리컴
CtfB	NP_149327.1	15004867	클로스트리듐 아세토부틸리컴
CtfA	AAP42564.1	31075384	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴
CtfB	AAP42565.1	31075385	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴

[0165] 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제는 본래 숙시네이트를 숙시닐-CoA로 변환하며, 동시에 3-케토아실-CoA를 3-케토산으로 변환한다. 숙시닐-CoA:3:케토산-CoA 트랜스퍼라제의 예들은 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*) (Corthesy-Theulaz et al., *J.Biol.Chem.* 272:25659-25667 (1997)), 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) (Stols et al., Protein.Expr.*Purif.* 53:396-403 (2007)), 및 호모 사피엔스 (Fukao et al., *Genomics* 68:144-151 (2000); Tanaka et al., *Mol.Hum.Reprod.* 8:16-23 (2002))에 존재한다. 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 29

[0166]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	헬리코박터 필로리
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	헬리코박터 필로리
ScoA	NP_391778	16080950	바실러스 섭틸리스
ScoB	NP_391777	16080949	바실러스 섭틸리스
OXCT1	NP_000427	4557817	호모 사피엔스
OXCT2	NP_071403	11545841	호모 사피엔스

[0167] 추가적으로 적합한 아세토아세틸-CoA 및 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제는, 클로스트리듐 클루이베리의 *cat1*, *cat2*, 및 *cat3*의 유전자 산물에 의해 코딩된다. 이들 효소는 각각 숙시닐-CoA, 4-하이드록시부티릴-CoA, 및 부티릴-CoA 아세틸트랜스퍼라제 활성을 나타내는 것으로 입증되었다 (Seedorf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:2128-2133 (2008); Sohling and Gottschalk, *J Bacteriol* 178:871-880 (1996)). 또한, 트리코모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*) (van Grinsven et al., *J. Biol. Chem.* 283:1411-1418 (2008)) 및 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*) (Riviere et al., *J. Biol. Chem.* 279:45337-45346 (2004))에도 유사한 CoA 트랜스퍼라제 활성이 존재한다. 원하는 변환을 수행할 수 있는 또 다른 트랜스퍼라제는 부티릴-CoA:아세토아세테이트 CoA-트랜스퍼라제이다. 효소의 예는, 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*) (Barker et al., *J. Bacteriol.* 152(1):201-7 (1982)), 클로스트리듐 SB4 (Barker et al., *J. Biol. Chem.* 253(4):1219-25 (1978)), 및 클로스트리듐 아세토부틸리컴 (Wiesenborn et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 55(2):323-9 (1989))에서 찾아 볼 수 있다. 부티릴-CoA:아세토아세테이트 CoA-트랜스퍼라제에 대한 구체적인 유전자 서열들은 기술되지 않았지만, 유전자 FN0272와 FN0273에는 부티레이트-아세토아세테이트 CoA-트랜스퍼라제로 주석이 첨부되어 있다 (Kapatral et al., *J. Bact.* 184(7) 2005-2018 (2002)). FN1857 및 FN1856 등의 푸조박테리움 뉴클레아툼에서의 상동체들은 원하는 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 활성을 나타낼 수 있다. FN1857 및 FN1856은 라이신 발효에 참여하는 다수의 기타 유전자들과 인접하여 존재하므로, 따라서, 아세토아세테이트:부티레이트 CoA 트랜스퍼라제를 코딩할 가능성이 매우 높다 (Kreimeyer, et al., *J. Biol. Chem.* 282 (10) 7191-7197 (2007)). 포르피르모나스 깅기발리스(*Porphyrmonas gingivalis*) 및 써모안에어로박터 텡콩엔시스(*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 유래의 추가적인 유전자들/유전자 산물들을 유사한 방식으로 동정할 수 있다 (Kreimeyer, et al., *J. Biol. Chem.* 282 (10) 7191-7197 (2007)). 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 30

[0168]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Cat1	P38946.1	729048	클로스트리듐 클루이베리
Cat2	P38942.2	1705614	클로스트리듐 클루이베리
Cat3	EDK35586.1	146349050	클로스트리듐 클루이베리
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	트리코모나스 바기날리스 *G3*
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	트리파노소마 브루세이
FN0272	NP_603179.1	19703617	푸조박테리움 뉴클레아툼
FN0273	NP_603180.1	19703618	푸조박테리움 뉴클레아툼
FN1857	NP_602657.1	19705162	푸조박테리움 뉴클레아툼
FN1856	NP_602656.1	19705161	푸조박테리움 뉴클레아툼
PG1066	NP_905281.1	34540802	포르피르모나스 깅기발리스 *W83*
PG1075	NP_905290.1	34540811	포르피르모나스 깅기발리스 *W83*
TTE0720	NP_622378.1	20807207	써모안에어로박터 텡콩엔시스 *MB4*
TTE0721	NP_622379.1	20807208	써모안에어로박터 텡콩엔시스 *MB4*

[0169] 아세토아세틸-CoA는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제에 의해 아세토아세테이트로 가수분해될 수 있다. 마찬가지로, 3-하이드록시부티릴-CoA는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제에 의해 3-하이드록시부티에이트로 가수분해될 수 있다. 다수의 CoA 하이드롤라제들(EC 3.1.2.1)은 기질 특이성이 넓으며, 자연적으로 또는 효소 조작된

이후에 이러한 변환에 적합한 효소이다. 서열들은 아직 보고되지 않았지만, 수종의 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제들이 랫 간의 세포질과 미토콘드리아에서 동정되었다 (Aragon and Lowenstein, *J. Biol. Chem.* 258(8):4725-4733 (1983)). 추가적으로, 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*)의 뇌 효소 (Robinson et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:959-965 (1976))는 부티릴-CoA, 헥사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응할 수 있다. 랫 간 유래의 *acot12* 효소는 C2 - C6 아실-CoA 분자를 가수분해하는 것으로 확인되엇다 (Suematsu et al., *Eur. J. Biochem.* 268:2700-2709 (2001)). 이의 서열은 아직 보고되지 않았지만, 완두콩 잎의 미토콘드리아에서 유래된 효소는 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 팔미토일-CoA, 올레오일-CoA, 숙시닐-CoA, 및 크로토닐-CoA에 대해 활성을 나타내었다 (Zeiher and Randall, *Plant.Physiol.* 94:20-27 (1990)). 아울러, 액시드아미노코커스 퍼멘탄스(*Acidaminococcus fermentans*)의 글루타코네이트 CoA-트랜스퍼라제는, 부위 특이적인 돌연변이를 유발하여, 글루타릴-CoA, 아세틸-CoA 및 3-부테노일-CoA에 대해 활성을 가진 아실-CoA 하이드롤라제로 형질전환되었다 (Mack and Buckel, *FEBS Lett.* 405:209-212 (1997)). 이는, 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제 및 아세토아세틸-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제를 코딩하는 효소도 그 기능을 변화시키기 위한 특정 돌연변이가 가미된 하이드롤라제로 사용할 수 있음을 의미한다. 사카로마이세스 세레비지애 유래의 아세틸-CoA 하이드롤라제, *ACH1*은 또 다른 하이드롤라제 후보 효소이다 (Buu et al., *J.Biol.Chem.* 278:17203-17209 (2003)). 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 31

[0170]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Acot12	NP_570103.1	18543355	라투스 노르베기쿠스
GctA	CAA57199	559392	액시드아미노코커스 퍼멘탄스
GctB	CAA57200	559393	액시드아미노코커스 퍼멘탄스
ACH1	NP_009538	6319456	사카로마이세스 세레비지애

[0171] 다른 하이드롤라제 효소로는, 글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 서베릴-CoA, 세바실-CoA, 및 도데칸디올-CoA에 대해 활성을 나타내는 인간 디카르복시산 티오에스테라제인 *acot8*(Westin et al., *J. Biol. Chem.* 280:38125-38132 (2005))와, 3-하이드록시부티릴-CoA (Tseng et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 75(10):3137-3145 (2009))를 비롯하여 매우 광범위한 CoA 티오에스테르 화합물을 가수분해시킬 수 있는, 가장 비슷한 에스케리키아 콜라이의 상동체인 *tesB*를 포함한다(Naggert et al., *J. Biol. Chem.* 266:11044-11050 (1991)). 유사한 효소들은 또한 랫의 간에서도 특정화되었다 (Deana, *Biochem. Int.* 26:767-773 (1992)). 그외 에스케리키아 콜라이의 티오에스테르 하이드롤라제는 *tesA* (Bonner and Bloch, *J. Biol. Chem.* 247:3123-3133 (1972)), *ybgC* (Kuznetsova et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 29:263-279 (2005); Zhuang et al., *FEBS Lett.* 516:161-163 (2002)), *paaI* (Song et al., *J. Biol. Chem.* 281:11028-11038 (2006)), 및 *ybdB* (Leduc et al., *J. Bacteriol.* 189:7112-7126 (2007))의 유전자 산물들이다. 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 32

[0172]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Acot8	CAA15502	3191970	호모 사피엔스
TesB	NP_414986	16128437	에스케리키아 콜라이
Acot8	NP_570112	51036669	라투스 노르베기쿠스
TesA	NP_415027	16128478	에스케리키아 콜라이
YbgC	NP_415264	16128711	에스케리키아 콜라이
PaaI	NP_415914	16129357	에스케리키아 콜라이
YbdB	NP_415129	16128580	에스케리키아 콜라이

[0173] 추가적인 하이드롤라제 효소로는, 발린 분해시 3-하이드록시이소부티릴-CoA의 3-하이드록시이소부티레이트로의 변환을 효과적으로 촉매하는 것으로 언급된 3-하이드록시이소부티릴-CoA 하이드롤라제가 있다 (Shimomura et al., *J. Biol. Chem.* 269:14248-14253 (1994)). 이 효소를 코딩하는 유전자로는, 라투스 노르베기쿠스 (Shimomura et al., 상기 참조 (1994); Shimomura et al., *Methods Enzymol.* 324:229-240 (2000))와 호모 사피엔스 (Shimomura et al., 상기 참조 (1994)의 *hibch*가 있다. 서열 상동성에 따른 후보 유전자로는, 사카로마

이세스 세레비지애의 *hibch*와 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 *BC_2292*가 있다. BC_2292는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제 활성이 입증되었고, 에스케리키아 콜라이로 형질전환시 3-하이드록시부티레이트 합성 경로의 일부로 작용하는 것으로 확인되었다 (Lee et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79:633-641 (2008)). 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 33

[0174]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Hibch	Q5XIE6.2	146324906	라투스 노르베기쿠스
Hibch	Q6NVY1.2	146324905	호모 사피엔스
Hibch	P28817.2	2506374	사카로마이세스 세레비지애
BC_2292	AP09256	29895975	바실러스 세레우스 ATCC 14579

[0175] 아세토아세틸-CoA 또는 3-하이드록시부티릴-CoA로부터 CoA 모이어티를 이동시키는 다른 방법은, 포스페이트-전이성 아실트랜스퍼라제와 같은 효소를, 아세토아세틸-CoA 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신타젤 활성을 부여하는 키나제로 구성된 한쌍으로 적용하는 방법이다. 본원에서, 포스포트랜스아실라제 및 키나제 효소의 조합을 "신타제"라고 한다. 이 활성은, ATP를 동시에 생성하면서 분자의 CoA-에스테르를 순(net) 가수분해할 수 있다. 예컨대, 클로스트리듐 아세토부틸리컴 유래의 부티레이트 키나제 (*buk*)/포스포트랜스부티릴라제 (*ptb*) 시스템을 적용하여, 3-하이드록시부티레이트 합성 경로의 일부로서 기능하는 경우 3-하이드록시부티릴-CoA로부터 CoA 기를 제거하는데 성공하였다 (Tseng et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 75(10):3137-3145 (2009)). 구체적으로, 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *ptb* 유전자는 아실-CoA를 아실-포스페이트로 변환시킬 수 있는 효소를 코딩한다 (Walter et al. *Gene* 134(1): p. 107-11 (1993)); Huang et al. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2(1): p. 33-38 (2000). 추가적인 *ptb* 유전자들은, 부티레이트-생산 박테리아 L2-50 (Louis et al. *J.Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004)) 및 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*)(Vazquez et al. *Curr.Microbiol* 42:345-349 (2001))에서도 발견할 수 있다. 포스페이트-전이성 아실트랜스퍼라제의 다른 예로는, *pta*로 코딩된 포스포트랜스아세틸라제를 포함한다. 에스케리키아 콜라이의 *pta* 유전자는 아세틸-CoA에서 아세틸-포스페이트로, 또는 반대로 변환시킬 수 있는 효소를 코딩한다 (Suzuki, T. *Biochim.Biophys.Acta* 191:559-569 (1969)). 또한, 이 효소는 공정에서 아세틸-CoA 대신 프로피오닐-CoA를 이용하여 프로피오네이트를 형성할 수 있다 (Hesslinger et al. *Mol.Microbiol* 27:477-492 (1998)). 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 34

[0176]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Pta	NP_416800.1	16130232	에스케리키아 콜라이
Ptb	NP_349676	15896327	클로스트리듐 아세토부틸리컴
Ptb	AAR19757.1	38425288	부티레이트-생산 박테리아 L2-50
Ptb	CAC07932.1	10046659	바실러스 메가테리움

[0177] 키나제의 예로는, *ackA*로 코딩된 에스케리키아 콜라이의 아세테이트 키나제 (Skarstedt and Silverstein *J.Biol.Chem.* 251:6775-6783 (1976)), *buk1* 및 *buk2*로 코딩된 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 부티레이트 키나제 ((Walter et al. *Gene* 134(1):107-111 (1993); Huang et al. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2(1):33-38 (2000)), 및 *proB*로 코딩된 에스케리키아 콜라이의 감마-글루타밀 키나제 (Smith et al. *J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984))가 있다. 이들 효소들은 아세테이트, 부티레이트, 및 글루타메이트를 각각 인산화한다. 에스케리키아 콜라이의 *ackA* 유전자 산물 역시 프로피오네이트를 인산화한다 (Hesslinger et al. *Mol.Microbiol* 27:477-492 (1998)). 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 35

[0178]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
AckA	NP_416799.1	16130231	에스케리키아 콜라이

Buk1	NP_349675	15896326	클로스트리듐 아세토부틸리컴
Buk2	Q97II1	20137415	클로스트리듐 아세토부틸리컴
ProB	NP_414777.1	16128228	에스케리키아 콜라이

[0179] 아세토아세틸-CoA 또는 3-하이드록시부티릴-CoA의 가수분해는, 다른 예로, 단일 효소나, 또는 아세토아세틸-CoA 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신타제 활성을 나타내는 효소 복합체에 의해 이루어질 수 있다. 이러한 활성은 이들 분자들 중 하나로부터 CoA-에스테르를 순 가수분해시킬 수 있으며, 일부 경우들에서는 ATP를 동시에 발생시킨다. 예컨대, 사카로마이세스 세레비지애의 *LSC1* 및 *LSC2* 유전자와, 에스케리키아 콜라이의 *sucC* 및 *sucD* 유전자의 산물들은 천연적으로 숙시닐-CoA 신타제 복합체를 형성하여, ATP 1개를 소비하면서 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA의 형성을 촉매하며, 이 반응은 생체내에서 가역적이다 (Gruys et al., 미국 특허 5,958,745, 1999년 9월 28일 출원됨). 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 36

[0180]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
SucC	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
SucD	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이
LSC1	NP_014785	6324716	사카로마이세스 세레비지애
LSC2	NP_011760	6321683	사카로마이세스 세레비지애

[0181] CoA-리가제의 다른 예로는, 서열은 아직 특정되지 않은 랫의 디카르복실레이트-CoA 리가제 (Vamecq et al., *Biochemical J.* 230:683-693 (1985)), 페니실리움 크리소게눔(Penicillium chrysogenum) 유래의 특정화가 잘 이루어진 페닐아세테이트-CoA 리가제 2종 중 하나 (Lamas-Maceiras et al., *Biochem. J.* 395:147-155 (2005); Wang et al., *Biochem Biophy Res Commun* 360(2):453-458 (2007)), 슈도모나스 푸티다의 페닐아세테이트-CoA 리가제 (Martinez-Blanco et al., *J. Biol. Chem.* 265:7084-7090 (1990)), 및 바실리스 섭틸리스의 6-카르복시헥사노에이트-CoA 리가제 (Boweret al., *J. Bacteriol.* 178(14):4122-4130 (1996))가 있다. 그외 후보 효소로는 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)(Hasegawa et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1779:414-419 (2008)) 및 호모 사피엔스 (Ohgami et al., *Biochem. Pharmacol.* 65:989-994 (2003))의 아세토아세틸-CoA 신타제가 있으며, 이 효소는 천연적으로 ATP 의존적인 방식으로 아세토아세테이트에서 아세토아세틸-CoA로의 변환을 촉매한다. 4-하이드록시부티릴-CoA 신타제 활성은 메탈로스페라 세둘라에서 입증되었다 (Berg et al., *Science* 318:1782-1786 (2007)). 이러한 기능은 Msed_1422 유전자로 지정되었다. 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 37

[0182]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Ph1	CAJ15517.1	77019264	페니실리움 크리소게눔
Ph1B	ABS19624.1	152002983	페니실리움 크리소게눔
PaaF	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸티다
BioW	NP_390902.2	50812281	바실러스 섭틸리스
AACS	NP_084486.1	21313520	무스 무스쿨루스
AACS	NP_076417.2	31982927	호모 사피엔스
Msed_1422	YP_001191504	146304188	메탈로스페라 세둘라

[0183] ADP-형성의 아세틸-CoA 신타제 (ACD, EC 6.2.1.13)는 ATP를 동시에 만들면서 아실-CoA 에스테르를 대응되는 산으로 변환시키는 다른 효소이다. 기질 특이성이 넓은 수개의 효소들이 문헌에 언급되어 있다. AF1211에 의해 코딩되는 아르케오글로부스 풀지두스(*Archaeoglobus fulgidus*)의 ACD I은 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 이소부티리에이트, 이소발레레이트, 숙시네이트, 푸마레이트, 페닐아세테이트, 인돌아세테이트 등의 직쇄 및 분지쇄의 다양한 기질에 대해 작용하는 것으로 입증되었다 (Musfeldt et al., *J. Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 할로아르쿨라 마리스모르투이(*Haloarcula marismortui*) 유래 효소 (숙시닐-CoA 신타제)는 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지쇄 산 (이소발레레이트 및

이소부티레이트)를 기질로서 허용하며, 정방향 및 역방향으로 작용하는 것으로 확인되었다 (Brasen et al., *Arch. Microbiol.* 182:277-287 (2004)). 고호열성 크레나르케이온(hyperthermophilic crenarchaeon)인 피로바쿨럼 에어로필럼(*Pyrobaculum aerophilum*)의 PAE3250으로 코딩되는 ACD는 모두 특정화된 매우 다양한 ACD 기질 범위를 가지며, 아세틸-CoA, 이소부티릴-CoA (선호 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응한다 (Brasen et al., 상기 참조 (2004)). 아르케오글로부스 풀지두스, 할로아르쿨라 마리스모르투이 및 피로바쿨럼 에어로필럼 유래의 효소들 모두 클로닝되었고, 기능적으로 발현시켰으며, 에스케리키아 콜라이에서 특정화되었다 (Musfeldt et al., 상기 참조; Brasen et al., 상기 참조 (2004)). 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 38

[0184]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
AF1211	NP_070039.1	11498810	아르케오글로부스 풀지두스 *DSM 4304*
scs	YP_135572.1	55377722	할로아르쿨라 마리스모르투이 *ATCC 43049*
PAE3250	NP_560604.1	18313937	피로바쿨럼 에어로필럼 *str. IM2*

[0185] 3-하이드록시부티레이트에서 3-하이드록시부티르알데하이드로의 변환은 3-하이드록시부티레이트 리덕타제에 의해 이루어질 수 있다. 마찬가지로, 아세토아세테이트에서 아세토아세트알데하이드로의 변환은 아세토아세테이트 리덕타제에 의해 이루어 수 있다. 이러한 변환에 적합한 효소는 아릴-알데하이드 데하이드로게나제, 또는 등가의, 노카르디아 아이오웬시스(*Nocardia iowensis*) 유래의 카르복시산 리덕타제이다. 카르복시산 리덕타제는 마그네슘, ATP 및 NADPH 의존적인 카르복시산의 대응되는 알데하이드로의 환원을 촉매한다 (Venkitasubramanian et al., *J. Biol. Chem.* 282:478-485 (2007)). *car*에 의해 코딩되는 이 효소는 클로닝되었고 에스케리키아 콜라이에서 기능적으로 발현시킨 바 있다 (Venkitasubramanian et al., *J. Biol. Chem.* 282:478-485 (2007)). *npt* 유전자 산물의 발현은 전사 후 변형을 통해 효소의 활성을 개선시켰다. *npt* 유전자는 불활성 아포-효소(apo-enzyme)를 홀로-효소(holo-enzyme)로 변환시키는 특이적인 포스포안테테인(phosphopantetheine) 트랜스퍼라제 (PPTase)를 코딩한다. 이 효소의 선천적인 기질은 바닐산이고, 효소는 광범위한 방향족 및 지방족 기질 허용성을 나타낸다 (Venkitasubramanian et al., in *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industires*, ed. R.N. Patel, Chapter 15, pp. 425-440, CRC Press LLC, Boca Raton, FL. (2006)). 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 39

[0186]

단백질	GI 번호	유전자은행 ID	유기체
Car	40796035	AAR91681.1	노카르디아 아이오웬시스 (sp. NRRL 5646)
Npt	114848891	ABI83656.1	노카르디아 아이오웬시스 (sp. NRRL 5646)

[0187] 추가적인 *car* 및 *npt* 유전자를 서열 상동성을 토대로 동정할 수 있다.

표 40

[0188]

단백질	유전자은행 ID	GI Number	유기체
fadD9	YP_978699.1	121638475	마이코박테리움 보비스 BCG
BCG_2812c	YP_978898.1	121638674	마이코박테리움 보비스 BCG
nfa20150	YP_118225.1	54023983	노카디아 파시니카 IFM 10152
nfa40540	YP_120266.1	54026024	노카디아 파시니카 IFM 10152
SGR_6790	YP_001828302.1	182440583	스트렙토마이세스 그리세우스 subsp. *griseus* NBRC 13350
SGR_665	YP_001822177.1	182434458	스트렙토마이세스 그리세우스 subsp. *griseus* NBRC 13350
MSMEG_2956	YP_887275.1	118473501	마이코박테리움 스메그마티스 *MC2 155*
MSMEG_5739	YP_889972.1	118469671	마이코박테리움 스메그마티스 *MC2 155*
MSMEG_2648	YP_886985.1	118471293	마이코박테리움 스메그마티스 *MC2 155*

MAP1040c	NP_959974.1	41407138	마이코박테리움 아비움 *subsp. paratuberculosis K-10*
MAP2899c	NP_961833.1	41408997	마이코박테리움 아비움 *subsp. paratuberculosis K-10*
MMAR_2117	YP_001850422.1	183982131	마이코박테리움 마리넘 *M*
MMAR_2936	YP_001851230.1	183982939	마이코박테리움 마리넘 *M*
MMAR_1916	YP_001850220.1	183981929	마이코박테리움 마리넘 *M*
TpauDRAFT_33060	ZP_04027864.1	227980601	쓰카무렐라 파우로메타볼라 *DSM 20162*
TpauDRAFT_20920	ZP_04026660.1	227979396	쓰카무렐라 파우로메타볼라 *DSM 20162*
CPCC7001_1320	ZP_05045132.1	254431429	시아노비움 *PCC7001*
DDBDRAFT_0187729	XP_636931.1	66806417	딕티오스텔리움 디스코이뎀 *AX4*

[0189] 스트렙토마이세스 그리세우스에서 발견되는 추가적인 후보 효소는 *griC*와 *griD* 유전자에 의해 코딩된다. *griC* 또는 *griD* 중 어느 하나가 결손되면 3-아미노-4-하이드록시벤조산 대사의 션트 산물(shunt product)인 세포외 3-아세틸아미노-4-하이드록시벤조산이 축적되기 때문에, 이 효소는 3-아미노-4-하이드록시벤조산을 3-아미노-4-하이드록시벤즈알데하이드로 변환시키는 것으로 생각된다 (Suzuki, et al., *J. Antibiot.* 60(6):380-387 (2007)). *griC* 및 *griD*를 노카르디아 아이오웬시스 *npt*과 서열이 비슷한 효소인 SGR_665와 공동-발현시키는 것이 유익할 수 있다. 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 41

[0190]

단백질	GI 번호	유전자은행 ID	유기체
griC	182438036	YP_001825755.1	스트렙토마이세스 그리세우스 subsp. *griseus* NBRC 13350
griD	182438037	YP_001825756.1	스트렙토마이세스 그리세우스 subsp. *griseus* NBRC 13350

[0191] 알파-아미노아디페이트 리덕타제(AAR, EC 1.2.1.31)와 비슷한 특징을 가진 효소는 일부 진균 종들에서 라이신 생합성 경로에 참여한다. 이 효소는 선천적으로 알파-아미노아디페이트를 알파-아미노아디페이트 세미알데하이드로 환원시킨다. 먼저 카르복시기는 ATP-의존적인 아데닐레이트 형성을 통해 활성화된 다음, NAD(P)H에 의해 환원되어 알데하이드 및 AMP로 제조된다. CAR와 같이, 이 효소는 마그네슘을 이용하며, PPTase에 의한 활성화를 필요로 한다. AAR의 후보 효소 및 이의 대응되는 PPTase는 사카로마이세스 세레비지애 (Morris et al., *Gene* 98:141-145 (1991)), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) (Guo et al., *Mol. Genet. Genomics* 269:271-279 (2003)), 및 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (Ford et al., *Curr. Genet.* 28:131-137 (1995))에서 발견되었다. 시조사카로마이세스 폼베의 AAR은 에스케리키아 콜라에서의 발현시 현저한 활성을 나타내었다 (Guo et al., *Yeast* 21:1279-1288 (2004)). 페니실리움 크리소게눔의 AAR은 대안 기질로서 S-카르복시메틸-L-시스테인을 이용하지만, 아디페이트, L-글루타메이트 또는 디아미노피멜레이트와는 반응하지 않는다 (Hijarrubia et al., *J. Biol. Chem.* 278:8250-8256 (2003)). 페니실리움 크리소게눔 PPTase를 코딩하는 유전자는 지금까지 동정되지 않았다. 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 42

[0192]

단백질	GI 번호	유전자은행 ID	유기체
LYS2	171867	AAA34747.1	사카로마이세스 세레비지애
LYS5	1708896	P50113.1	사카로마이세스 세레비지애
LYS2	2853226	AAC02241.1	칸디다 알비칸스
LYS5	28136195	AAO26020.1	칸디다 알비칸스
Lys1p	13124791	P40976.3	시조사카로마이세스 폼베
Lys7p	1723561	Q10474.1	시조사카로마이세스 폼베
Lys2	3282044	CAA74300.1	페니실리움 크리소게눔

[0193] CAR 또는 CAR-유사 효소들 중 임의의 효소는 본질적으로 3-하이드록시부티레이트 또는 아세토아세테이트 리덕타제 활성을 나타내거나 그렇게 되도록 조작될 수 있다.

[0194] 필수적인 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제는 아세토아세테이트를 환원시켜 3-하이드록시부티레이트를 형성하는 과정을 촉매한다. 효소의 예는, 로도코커스 루버 (Kosjek et al., *Biotechnol Bioeng.* 86:55-62 (2004))와 피로코커스 푸리오서스 (van der et al., *Eur.J.Biochem.* 268:3062-3068 (2001))에서 확인된다. 이러한 변형을 수행할 수 있는 추가적인 2차 알코올 데하이드로게나제 효소로는, 클로스트리듐 바이에링키의 *adh* (Hanai et al., *Appl Environ Microbiol* 73:7814-7818 (2007); Jojima et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1219-1224 (2008))와 써모안에어로박터 브록키이의 *adh* (Hanai et al., *Appl Environ Microbiol* 73:7814-7818 (2007); Peretz et al., *Anaerobe* 3:259-270 (1997))가 있다. 리조비움 (시노르히조비움) 멜리로티 (*Rhizobium (Sinorhizobium) Meliloti*)의 *bdhA* 유전자를 에스케리키아 콜라이에 클로닝하였을 때, 탄소원으로서 3-하이드록시부티레이트를 이용하는 능력이 부여되었다 (Aneja and Charles, *J. Bacteriol.* 181(3):849-857 (1999)). 다른 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제는 슈도모나스 프레기(*Pseudomonas fragi*) (Ito et al., *J. Mol. Biol.* 355(4) 722-733 (2006)) 및 랄스토니아 픽케티이(*Ralstonia pickettii*)에서 확인할 수 있다 (Takanashi et al., *Antonie van Leeuwenoek*, 95(3):249-262 (2009)). 이들 유전자와 단백질에 대한 관련 정보는 아래에 열거한다:

표 43

[0195]

단백질	유전자은행 ID	GI Number	유기체
Sadh	CAD36475	21615553	로도코커스 루버
AdhA	AAC25556	3288810	피로코커스 푸리오서스
Adh	P14941.1	113443	써모안에어로보박터 브록키이
Adh	AAA23199.2	60592974	클로스트리듐 바이에링키
BdhA	NP_437676.1	16264884	리조비움 (시노르히조비움) 멜리로티
PRK13394	BAD86668.1	57506672	슈도모나스 프레기
Bdh1	BAE72684.1	84570594	랄스토니아 픽케티이
Bdh2	BAE72685.1	84570596	랄스토니아 픽케티이
Bdh3	BAF91602.1	158937170	랄스토니아 픽케티이

[0196] 에스케리키아 콜라이와 같은 외래 숙주로, CO_2, CO, 및/또는 H_2를, 모든 세포 매스 성분과 다수의 유용한 산물이 유래될 수 있는 중요 대사산물인 아세틸-CoA로 변환시키는 능력을 조작하는 것은, Wood-Ljungdahl 경로의 다양한 단백질을 코딩하는 외인성 유전자를 발현시켜, 달성할 수 있다. 이 경로는, 1942년에 분리된 이래로 Wood-Ljungdahl 경로를 해명하기 위한 유기체 모델이었던 무어렐라 써모아세티카 (종래, 클로스트리듐 써모아세티컴) 등의 초산 생성 유기체에서 매우 활발하다 (Fontaine et al., *J. Bacteriol.* 43.6:701-715 (1942)). Wood-Ljungdahl 경로는 2가지의 분지로 구성된다: CO_2를 메틸테트라하이드로폴레이트 (Me-THF)로 변환시킬 수 있는 동측 (또는 메틸) 분지와, 메틸-THF, CO, 및 코엔자임-A를 아세틸-CoA로 변환시킬 수 있는 서측(또는 카르보닐) 분지 (도 5). 본원에서, Wood-Ljungdahl 경로의 메틸 분지와 카르보닐 분지를 촉매하는 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는 비천연 미생물을 개시한다. 이러한 유기체는 CO, CO_2, 및/또는 H_2를 아세틸-CoA, 세포 매스 및 산물로 변환시킬 수 있다.

[0197] 일부 구현예에서, 도 5에 나타낸 경로를 이용하는 비천연 유기체는 3가지 능력을 나타낸다: 1) THF 및 CO_2를 5-메틸-테트라하이드로폴레이트로 변환시킬 수 있는 Wood-Ljungdahl 경로의 기능성 메틸 분지, 2) CO, 코엔자임 A, 및 Me-THF의 메틸기를 조합하여 아세틸-CoA를 만드는 능력, 및 3) 아세틸-CoA로부터 1,3-부탄디올을 합성하는 능력.

[0198] 이러한 비천연 유기체는 외인성 CO 및/또는 외인성 또는 내인성으로 생산된 CO_2로부터 탄소를 '고정'하여 아세틸-CoA, 세포 매스 및 산물을 합성할 수 있다. 보충대사를 수행하는 능력을 선천적으로 가진, 상기한 능력을 구비하게 조작된 숙주 유기체(예, 에스케리키아 콜라이)는 질산염과 같이 적정 외부 전자 어셉터의 존재 하에 합성 가스로부터 제조된 아세틸-CoA 에서 생육할 수 있다. 이 외부 전자 어셉터는 숙시네이트 데하이드로게나제를 통해 형성된 환원된 퀴논으로부터 전자를 수용하는데 필요하다. 외부 전자 어셉터의 부가에 따른 다른 이점은, 세포 증식, 유지 및 산물 형성을 위한 부가적인 에너지를 아세틸-CoA 호흡을 통해 만들 수 있다는 점이다. 다른 방법은, 피루베이트를 아세틸-CoA로 변환시키는 효소 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제 (PFOR) 효소를 균주내로 조작하여, 외부 전자 어셉터 없이도 바이오매스 전구체들을 합성할 수 있게 하는 것이다. 상기

조작된 유기체의 다른 특징은, 수소 분자로부터 환원 당량을 추출하는 능력이다. 이는 에탄올, 부탄올, 이소부탄올, 이소프로판올, 1,4-부탄디올, 1,3-부탄디올, 숙신산, 푸마르산, 말산, 4-하이드록시부티르산, 3-하이드록시프로피온산, 락트산, 아디프산, 메타크릴산, 및 아크릴산 등의 산물의 고수율적 환원을 가능하게 한다.

[0199] 비천연 유기체는 아세틸-CoA, 세포 매스 및 표적 화합물, 보다 구체적으로는 1,3-부탄디올을, 1) CO, 2) CO_2, 및 H_2, 3) CO, CO_2, 및 H_2, 4) CO 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 5) CO, CO_2 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 6) 하나 이상의 탄수화물로부터 생산할 수 있다. 탄수화물의 예로는 글루코스, 슈크로스, 자일로스, 아라비노스 및 글리세롤이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0200] CO, CO_2, 및/또는 H_2를 아세틸-CoA로 변환시키는데 사용되는 효소는 도 5에 나타나 있다. CO, CO_2, 및/또는 H_2를 이용하는 생산 숙주를 조작하기 위해, 이들 효소를 코딩하는 하나 이상의 외래 DNA 서열(들)을 미생물에서 발현시킬 수 있다. 이제 도 5를 참조하여, 아래에서 CO, CO_2, 및/또는 H_2를 이용하도록 병합시킬 수 있는 효소들을 설명한다.

[0201] 포르메이트 데하이드로게나제는 무어렐라 써모아세티카에서 CO_2를 포르메이트로 병합하는 과정을 촉매하는 2개의 서브유닛으로 구성된 셀레노시스테인-함유 단백질이다 (Andreesen and Ljungdahl, *J. Bacteriol.* 116.2:867-873 (1973); Li et al., *J. Bacteriol.* 92.2:405-412 (1966); Yamamoto et al..*J. Biol. Chem.* 258.3:1826-1832 (1983)). 위치 Moth_2312 및 Moth_2313는 실제 포르메이트 데하이드로게나제의 알파 서브유닛을 코딩하는 하나의 유전자이고, 베타 서브유닛은 Moth_2314에 코딩되어 있다 (Pierce et al. *Environ. Microbiol.* 10:2550-2573 (2008)). 이산화탄소 환원 경향을 가진 포르메이트 데하이드로게나제 활성을 코딩하는 다른 유전자 세트는 신트로포박터 푸마록시단스(*Syntrophobacter fumaroxidans*)의 경우 Sfum_2703 - Sfum_2706에 코딩되어 있다 (Reda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105.31:10654-10658 (2008); de Bok et al., *Eur. J. Biochem.* 270. 11: 2476-2485 (2003)). 무어렐라 써모아세티카의 경우와 마찬가지로, Sfum_2705 및 Sfum_2706은 실제 하나의 유전자이다. 동일한 기능을 수행하는 것으로 추정되는 유사한 유전자 세트는 카르복시도써머스 하이드로게노포만스의 경우 CHY_0731, CHY_0732, 및 CHY_0733에 코딩되어 있다 (Wu et al., *PLoS Genet.*1.5:e65 (2005)). 관련 유전자 및 단백질 정보는 아래 나타낸 정보로부터 입수할 수 있다:

표 44

[0202]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Moth_2312	YP_431142	148283121	무어렐라 써모아세티카
Moth_2313	YP_431143		무어렐라 써모아세티카
Moth_2314	YP_431144	83591135	무어렐라 써모아세티카
Sfum_2703	YP_846816.1	116750129	신트로포박터 푸마록시단스
Sfum_2704	YP_846817.1	116750130	신트로포박터 푸마록시단스
Sfum_2705	YP_846818.1	116750131	신트로포박터 푸마록시단스
Sfum_2706	YP_846819.1	116750132	신트로포박터 푸마록시단스
CHY_0731	YP_359585.1	78044572	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CHY_0732	YP_359586.1	78044500	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
CHY_0733	YP_359587.1	78044647	카르복시도써머스 하이드로게노포만스

[0203] 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제는 ATP 1개를 사용하면서 포르메이트를 테트라하이드로폴레이트로 연결시킨다. 이 반응은 무어렐라 써모아세티카에서는 Moth_0109의 유전자 산물에 의해(O'brien et al., *Experientia Suppl.*26:249-262 (1976); Lovell et al., *Arch. Microbiol.* 149.4:280-285 (1988); Lovell et al., *Biochemistry* 29.24:5687-5694 (1990)), 클로스트리듐 액시두리시(*Clostridium acidurici*)에서는 *FHS*에 의해 (Whitehead and Rabinowitz, *J. Bacteriol.* 167.1:205-209 (1986); Whitehead and Rabinowitz, *J. Bacteriol.* 170.7:3255-3261 (1988)), 및 카르복시도써머스 하이드로게노포만스에서는 CHY_2385에 의해(Wu et al., *PLoS Genet.*1.5:e65 (2005)) 촉매된다. 관련 유전자 및 단백질 정보는 아래 나타낸 정보로부터 입수할 수 있다:

표 45

[0204]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Moth_0109	YP_428991.1	83588982	무어렐라 써모아세티카

CHY_2385	YP_361182.1	78045024	카르복시도써머스 하이드로게노포만스
FHS	P13419.1	120562	클로스트리듐 액시두리시

[0205] 무어렐라 써모아세티카, 에스케리키아 콜라이, 및 카르복시도써머스 하이드로게노포만스에서, 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제와 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제는 각각 Moth_1516, *folD*, 및 CHY_1878의 2중 기능성 유전자 산물에 의해 이루어진다 (Pierce et al. *Environ. Microbiol.* 10:2550-2573 (2008); (Wu et al., *PLoS Genet*.1.5:e65 (2005); D'Ari and Rabinowitz, *J. Biol. Chem.* 266.35:23953-23958 (1991)). 관련 유전자 및 단백질 정보는 아래 나타낸 정보로부터 입수할 수 있다:

표 46

[0206]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Moth_1516	YP_430368.1	83590359	무어렐라 써모아세티카
folD	NP_415062.1	16128513	에스케리키아 콜라이
CHY_1878	YP_360698.1	78044829	카르복시도써머스 하이드로게노포만스

[0207] 무어렐라 써모아세티카, 에스케리키아 콜라이, 및 카르복시도써머스 하이드로게노포만스에서, 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제와 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제는 각각 Moth_1516, *folD*, 및 CHY_1878의 2중 기능성 유전자 산물에 의해 이루어진다 (Pierce et al. *Environ. Microbiol.* 10:2550-2573 (2008); (Wu et al., *PLoS Genet*.1.5:e65 (2005); D'Ari and Rabinowitz, *J. Biol. Chem.* 266.35:23953-23958 (1991)). 관련 유전자 및 단백질 정보는 아래 나타낸 정보로부터 입수할 수 있다:

표 47

[0208]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Moth_1516	YP_430368.1	83590359	무어렐라 써모아세티카
folD	NP_415062.1	16128513	에스케리키아 콜라이
CHY_1878	YP_360698.1	78044829	카르복시도써머스 하이드로게노포만스

[0209] Wood-Ljungdahl 경로의 메틸 분지에서 최종 단계는 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제에 의해 촉매된다. 무어렐라 써모아세티카에서 이 효소는 산소에 민감하며, 철-황 클러스터를 함유한다 (Clark and Ljungdahl, *J. Biol. Chem.* 259.17:10845-10849 (1984)). 이 효소는, 에스케리키아 콜라이에서는 *metF*에 의해 (Sheppard et al., *J. Bacteriol.* 181.3:718-725 (1999)), 그리고 카르복시도써머스 하이드로게노포만스에서는 CHY_1233에 의해 (Wu et al., *PLoS Genet*.1.5:e65 (2005)) 코딩된다. 무어렐라 써모아세티카의 상기 유전자 및 이의 카르복시도써머스 하이드로게노포만스에서의 카운터파트는 CODH/ACS 유전자 클러스터 근처에 위치되어 있으며, 추정의 하이드로게나제 및 헤테로디설파이드 리덕타제 유전자들과는 떨어져 위치되어 있다.

표 48

[0210]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Moth_1191	YP_430048.1	83590039	무어렐라 써모아세티카
metF	NP_418376.1	16131779	에스케리키아 콜라이
CHY_1233	YP_360071.1	78044792	카르복시도써머스 하이드로게노포만스

[0211] 에스케리키아 콜라이는 선천적으로 필요한 변환들 중 일부를 수행하는 능력을 가지고 있지만(즉, 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제), 초산 생성균 유래의 메틸 분지 효소들이 비초산 생성균 유래의 것 보다 특이 활성이 상당히 높을 (50 - 100X) 수 있다 (Morton et al., *Genetics and molecular biology of anaerobic bacteria*, Ed. M. Sebald, New York: Springer Verlag (1992) pages 389-406). 포르메이트 데하이드로게나제는 혐기 조건에 대해 특화된 것일 수 있다 (Ljungdahl and Andreesen, *FEBS Lett.* 54.2:279-282 (1975)) (1975). 따라서, 이들 각각에 대한 다양한 비-천연 버전들을 메탄올 및 CO_2, CO, 및/또는 H_2를 이용할 수 있는 에스케리키아 콜라이 균주에서 발현시킬 수 있다. 구체적으로, 이들 유전자를 클로닝하고, 세트로서 이들을 발현하도록

설계된 발현 벡터에 조합할 수 있다. 우선, 카피수가 높거나 보통 수준인 벡터를 선택할 수 있다(ColE1 또는 P15A 레플리콘을 사용함). 프로모터의 예로는 람다 pL 또는 이의 IPTG-유도성 버전, pL-lacO 등의 강력한 구조적 프로모터(constitutive promoter)를 들 수 있다 (Lutz and Bujard, *Nucleic Acids Res.* 25.6:1203-1210 (1997)). 인공 오페론을 제작하기 위해, 유전자 세프의 상류에 5' 말단 프로모터를 배치하고, 각 유전자에 컨센서스 rbs 인자를 삽입한다. 유전자들의 순서는 가능한 선천적인 순서를 기초로 한다. 궁극적으로, 유전자들은 에스케리키아 콜라이 염색체로 삽입된다. (Ljungdahl and Andreesen, *Methods Enzymol.* 53:360-372 (1978); Yamamoto et al.. *J. Biol. Chem.* 258.3:1826-1832 (1983); Lovell et al., *Arch. Microbiol.* 149.4:280-285 (1988); de Mata and Rabinowitz, *J. Biol. Chem.* 255.6:2569-2577 (1980); D'Ari and Rabinowitz , *J. Biol. Chem.* 266.35:23953-23958 (1991); Clark and Ljungdahl, 259.17:10845-10849 (1984); Clark and Ljungdahl, *Methods Enzymol.* 122:392-399 (1986))에 기재된 효소 분석을 수행한다.

[0212] Wood-Ljungdahl 경로의 카르보닐 분지와 메틸 분지 둘다를 발현하는 에스케리키아 콜라이 균주를 구축한 다음, CO, CO_2, 및/또는 H_2를 이용하여 아세틸-CoA, 세포 매스, 1,3-부탄디올을 생산하는 능력을 분석한다. 먼저 외부에서 글루코스를 제공하는 엄격한 혐기 조건에서 배양된 세포를 사용한다. 글루코스 또는 기타 탄수화물을 아세틸-CoA로 대사하면 하나의 잠재적인 이산화탄소원이 공급되며, 이것은 Wood-Ljungdahl 경로를 통해 고정될 수 있다. 글루코스 외에 또는 추가적으로, 발효 브로스에 질산염을 첨가하여 전자 어셉터 및 증식 개시제로서 제공할 수 있다. 궁극적으로 아세틸-CoA로 대사되는 지방산에서 에스케리키아 콜라이가 질산염 존재 하에 혐기적으로 증식되는 것이 확인되었다 (Campbell et al., *Mol. Microbiol.* 47.3:793-805 (2003)). 또한, 산소의 세포내 수준이 조작된 효소의 임의의 저해 역치 이하로 유지되는 한 산소를 제공할 수 있다. 이러한 실험에 적합한 조성물의 '합성에 의한 합성 가스'도 채용할 수 있다. ^{13}C-표지된 CO 및/또는 CO_2를 세포에 제공하고, 분석용 질량분광측정을 수행하여, 표지된 탄소의 아세테이트, 1,3-부탄디올, 및 세포 매스 (예, 단백질을 구성하는 아미노산)로의 병합을 측정한다.

[0213] 합성 가스 발효에 있어 공정의 고려 요소는 높은 바이오매스 농도와 양호한 가스-액체 매스 전이이다 (Bredwell et al., *Biotechnol. Prog.* 15.5:834-844 (1999)). 수중 CO 용해성은 산소 보다 다소 낮다. 계속적으로 산소를 살포하면서 이루어지는 발효는, 질량 분광측정과 주기적인 액체 샘플링 및 GC와 HPLC에 의한 분석에 의해 일관된 오프-가스 분석(off-gas analysis)으로 통제된 발효기내에서 수행할 수 있다. 액체 상은 배치 방식으로 이루어질 수 있다. 발효 산물, 예컨대 알코올, 유기산 및 잔류 글루코스는 잔류 메탄올과 더불어, Aminex®

시리지의 HPLC 컬럼(예, HPX-87 series) (BioRad, Hercules CA)을 이용하고, 글루코스 및 알코올에 대한 굴절률 검출기와 유기산에 대한 UV 검출기를 사용하여, HPLC (Shimadzu, Columbia MD)로 정량 분석한다. 증식율은 스펙트로포토미터(600 nm)를 이용하여 광학 밀도를 측정함으로써 정한다. 이 시스템에서 사용되는 모든 관은 혐기성 조건을 유지하기 위해 유리 또는 금속이다. 가스 살포는 버블의 크기를 줄이고 매스 전달을 향상시키기 위해 유리 프릿으로 수행할 수 있다. 다양한 살포 속도를 약 0.1 내지 1 vvm(분 당 증기량)의 범위에서 테스트한다. 가스 흡수율에 대한 정확한 측정값을 구하기 위해, 가스 흐름을 일시적으로 정지시키는 주기적인 챌런지를 수행하고, 가스상의 조성을 시간에 따른 함수로써 모니터링한다.

[0214] 전체 타겟 생산성을 구하기 위해, 세포 보존 또는 리사이클 방법을 사용할 수 있다. 미생물 농도를 높이기 위한 한가지 방법은 사이드스트림(sidestream)과 접하는 흐름 막을 통해 세포를 재활용하는 방법이다. 또한, 반복적인 배치 배양도 기존의 모렐라에서 아세테이트를 생산하기 위해 기존에 언급된 방법과 같이 사용할 수 있다 (Sakai et al., *J. Biosci. Bioeng.* 99.3:252-258 (2005)). 또한 다른 다양한 방법들도 이용할 수 있다 (Bredwell et al., *Biotechnol. Prog.* 15.5:834-844 (1999); Datar et al., *Biotechnol. Bioeng.*86.5:587-594 (2004)). 매스 이동을 향상시키기 위해 1.5 atm의 과압 조건에서 추가적인 최적화를 테스트할 수 있다 (Najafpour and Younesi, *Enzyme and Microbial Technology* 38:223-228 (2006)).

[0215] 공급원으로서 순수한 H_2/CO를 이용하여 만족할만한 성능이 달성되면, 통상적인 합성 가스에 존재할 것으로 생각되는 저해제가 함유된 합성 가스 혼합물을 만들 수 있다. 예컨대, 전형적인 불순물 프로파일은 4.5% CH_4, 0.1% C_2H_2, 0.35% C_2H_6, 1.4% C_2H_4, 및 150 ppm 산화 질소이다 (Datar et al., *Biotechnol. Bioeng.*86.5:587-594 (2004)). 벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, p-자일렌, o-자일렌 및 나프탈렌 등의 화합물로 대표되는 타르를 ppm 수준으로 첨가하여, 생산에 대한 임의의 영향력을 테스트한다. 예를 들어, 40 ppm NO는 클로스트리듐 카복시디보란스(*C. carboxidivorans*)에 저해 효과가 있는 것으로 확인되었다 (Ahmed and Lewis, *Biotechnol. Bioeng.* 97.5:1080-1086 (2007)). 배양물은 발효기로 이동시키기 전에 쉐이크-플라스크 배양물에서 테스트할 수 잇다.

또한, 이러한 잠재적인 저해성 화합물을 다양한 수준에서 테스트하여 이들에 세포 증식에 미치는 효과를 정량한다. 이러한 기질을 이용하여, 연구 및 생산 규모를 확대하는데 활용되는, 합성 가스 순도에 대한 상세 내용들을 발전시킨다. 임의의 특정 성분이, 규모 확장을 위해, 사용되는 합성 가스로부터 줄이거나 또는 제거하기 어려운 것으로 확인된다면, 후천적인 진화 공정을 이용하여 세포가 하나 이상의 불순물을 허용하도록 적응시킨다.

[0216] 본 발명은 본원에서 대사 반응, 반응제 또는 이의 산물에 대한 일반적인 내용을 참조하거나, 또는 언급한 대사 반응, 반응제 또는 산물과 관련있거나 촉매하는 효소, 또는 관련 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 또는 유전자를 구체적으로 참조하여 설명된다. 본원에서 다른 것으로 명시되지 않은 한, 당해 기술 분야의 당업자는, 반응에 대한 내용이 또한 반응제 및 반응의 산물에 대한 내용을 구성함을 이해할 것이다. 마찬가지로, 본원에서 달리 명시되지 않은 한, 반응제 또는 산물에 대한 내용은 반응을 참조하고, 임의의 대사적 구성 성분에 대한 내용 역시 언급된 반응을 촉매하는 효소 또는 참여하는 단백질을 코딩하는 유전자 또는 유전자들을 참조한다. 이처럼, 널리 공지되어 있는 대사 생화학, 효소학 및 게놈학 분야를 감안하여, 유전자 또는 코딩 핵산에 대한 본원의 내용은, 대응되는 코딩된 효소와 이것이 촉매하는 반응 또는 반응과 관련된 단백질 뿐만 아니라 반응제 및 반응 산물에 대한 내용을 구성한다.

[0217] 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 하나 이상의 1,3-부탄디올 생합성 경로에 참여하는 효소 또는 단백질 중 하나 이상을 코딩하는 발현가능한 핵산을 도입함으로써 제조할 수 있다. 생합성용으로 선택되는 숙주 미생물 유기체에 따라, 특정 1,3-부탄디올 생합성 경로의 일부 또는 전체 핵산을 발현시킬 수 있다. 예컨대, 선택된 숙주가 바람직한 생합성 경로에 있어 하나 이상의 효소나 단백질이 결핍된 경우, 상기 결핍된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대한 발현가능한 핵산을 이후 외인성 발현을 위해 상기 숙주에 도입한다. 다른 예로, 선택된 숙주가 일부 경로 유전자의 내인성 발현을 나타내지만 그외 유전자는 없다면, 1,3-부탄디올 생합성을 달성하기 위해서는 상기 결핍된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대한 코딩 핵산들이 필요하다. 따라서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 외인성 효소 또는 단백질 활성을 도입하여 원하는 생합성 경로를 입수함으로써 제조하거나, 또는 원하는 생합성 경로는 하나 이상의 내인성 효소 또는 단백질과 더불어 1,3-부탄디올 등의 원하는 산물을 생산하는 하나 이상의 외인성 효소 또는 단백질 활성을 도입함으로써, 획득할 수 있다.

[0218] 숙주 미생물 유기체는 예컨대 박테리아, 효모, 진균, 조류, 시아노박테리아 또는 그외 발효 공정에 이용가능한 다양한 미생물들 중 임의의 미생물로부터 선택하여, 비천연 미생물 유기체로 제조할 수 있다. 박테리아의 예로는, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 안에이로바이오스피릴룸 숙시니시프로두센스(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 액티노바실러스 숙시노게네스(*Actinobacillus succinogenes*), 만하이미아 숙시니시프로두센스(*Mannheimia succiniciproducens*), 리조비움 에틀리(*Rhizobium etli*), 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*), 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*), 자이모모나스 모빌리스, 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 스트렙토마이세스 코엘리콜러(*Streptomyces coelicolor*), 클로스트리듐 아세토부틸리컴(*Clostridium acetobutylicum*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 중에서 선택되는 종을 포함한다. 효모 또는 진균의 예로는, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로마이세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 리조푸스 아리주스(*Rhizopus arrhizus*), 리조부스 오리제(*Rhizobus oryzae*) 등으로부터 선택되는 종을 포함한다. 시아노박테리아의 예로는, 아카리오클로리스 마리나(*Acaryochloris marina*) MBIC11017, 아나바에나(*Anabaena*) sp. PCC 7120, 아나바에나 바리어빌리스(*Anabaena variabilis*) ATCC 29413, 아그메넬럼 쿼드루플리카툼(*Agmenellum quadruplicatum*), 클로로비움 테피둠(*Chlorobium tepidum*) TLS, 시아노테세(*Cyanothece*) sp. ATCC 51142, 글로에오박터 비올라세우스(*Gloeobacter violaceus*) PCC 7421, 마이크로시스티스 에어루지노사(*Microcystis aeruginosa*) NIES-843, 노스톡 푼크티포르메(*Nostoc punctiforme*) ATCC 29133, 프로클로로코커스 마리누스(*Prochlorococcus marinus*) MED4, 프로클로로코커스 마리누스 MIT9313, 프로클로로코커스 마리누스 SS120, 프로클로로코커스 마리누스 str. AS9601, 프로클로로코커스 마리누스 str. MIT 9211, 프로클로로코커스 마리누스 str. MIT 9215, 프로클로로코커스 마리누스 str. MIT 9301, 프로클로로코커스 마리누스 str. MIT 9303, 프로클로로코커스 마리누스 str. MIT 9312, 프로클로로코커스 마리누스 str. MIT 9515, 프로클로로코커스 마리누스 str. NATL1A, 프로클로로코커스 마리누스 str. NATL2A, 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rhodopseudomonas palustris*) CGA009, 시네코코커스(*Synechococcus*) 일론가투스 PCC 6301, 시네코코커스 일론가투스 PCC 7942, 시네코코커스 sp. CC9311, 시네코코커스 sp. CC9605, 시네코코커스 sp. CC9902, 시네코코커스 sp. JA-2-3B'a(2-13), 시네코코커스 sp. JA-3-

3Ab, 시네코코커스 sp. PCC 7002, 시네코코커스 sp. RCC307, 시네코코커스 sp. WH 7803, 시네코코커스 sp. WH8102, 시네코시스티스(*Synechocystis*) sp. PCC 6803, 써모시네코코커스 일론가투스 BP-1, 트리코데스미움 에리트라이움(*Trichodesmium erythraeum*) IMS101이 있다. 조류의 예로는, 보트리오코커스 브라우니이(*Botryococcus braunii*), 클라미도모나스 라인하르디이(*Chlamydomonas reinhardii*), 클로렐라(*Chlorella*) sp., 크립테코디니움 코니이(*Crypthecodinium cohnii*), 실린드로테카(*Cylindrotheca*) sp., 두날리엘라 프리몰렉타(*Dunaliella primolecta*), 이소크리시스(*Isochrysis*) sp., 모날란투스 살리나(*Monallanthus salina*), 난노클로리스(*Nannochloris*) sp., 난노클로로프시스(*Nannochloropsis*) sp., 네오클로리스 올레오아분단스(*Neochloris oleoabundans*), 니츠시아(*Nitzschia*) sp., 페오닥틸럼 트리코르누텀(*Phaeodactylum tricornutum*), 시조키트리움(*Schizochytrium*) sp., 테트라셀미스 수에이카(*Tetraselmis sueica*)를 포함한다. 에스케리키아 콜라이는 유전자 조작에 적합한 가장 잘 특정화된 미생물 유기체이므로, 가장 유용한 숙주 유기체이다. 그외 특히 유용한 숙주 유기체는, 사카로마이세스 세레비지애와 같은 효모이다. 임의의 적합한 미생물 숙주 유기체를 이용하여 대사 및/또는 유전자 변형을 도입함으로써 원하는 산물을 생산하는 것으로 이해된다.

[0219] 선택된 숙주 미생물 유기체의 1,3-부탄디올 생합성 경로 구성 성분에 따라, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 하나 이상의 외인성으로 발현되는 1,3-BOD 경로를 코딩하는 핵산을 포함하며, 최대한으로는 하나 이상의 1,3-부탄디올 생합성 경로에 대한 모든 코딩 핵산을 포함할 것이다. 예를 들어, 1,3-부탄디올 생합성은 해당되는 코딩 핵산의 외인성 발현을 통해 경로 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에서 확립시킬 수 있다. 1,3-부탄디올 경로의 효소 또는 단백질이 모두 결핍된 숙주인 경우, 경로의 모든 효소 또는 단백질의 외인성 발현을 포함시킬 수 있지만, 경로의 모든 효소 또는 단백질들은 숙주가 하나 이상의 경로 효소나 단백질을 함유하는 경우에도 발현시킬 수 있는 것으로 이해된다. 예컨대, 1,3-부탄디올 생산 경로의 모든 효소 또는 단백질의 외인성 발현에는, 도 4에 나타낸 바와 같이, 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 13) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 14) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, 15) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 16) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 17) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 18) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 19) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 20) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 21) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 22) 아세토아세테이트 리덕타제, 23) 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 24) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 및 25) 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 등이 포함될 수 있다.

[0220] 다른 예로, 도 5에 나타낸 바와 같이, 1,3-부탄디올 생상 경로의 모든 효소 또는 단백질의 외인성 발현에는, 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 15) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 16) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, 17) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 18) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 19) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 20) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 21) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 22) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 23) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 24) 아세토아세테이트 리덕타제, 25) 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 26) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 및 27) 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 등이 포함될 수 있다.

[0221] 본원에 제공된 교시 및 지침을 참조하여, 당해 기술 분야의 당업자는, 발현가능한 형태로 도입하기 위한 코딩 핵산의 수가 적어도 상기 선택된 숙주 미생물 유기체의 1,3-부탄디올 경로의 결여(deficiency)와 일치함을 알 것이다. 즉, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 본 발명에 개시되고 도 4 및 5에 나타낸 1,3-부탄디올 생합성 경로를 구성하는 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개, 즉 모든 핵산을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 비천연 미생물 유기체는 1,3-부탄디올 생합성을

촉진 또는 최적화하거나, 또는 상기 숙주 미생물 유기체에 다른 유용한 기능을 부여하는, 그외 유전자 변형을 포함할 수 있다. 그러한 그외 기능성으로는, 예컨대, 1,3-부탄디올 전구체, 예컨대 아세틸-CoA, 아세토아세틸-CoA, 아세토아세테이트, 3-하이드록시부티릴-CoA, 3-하이드록시부티레이트, 4-하이드록시-2-부타논, 3-옥소부트리알데하이드 또는 3-하이드록시부트리알데하이드 중 하나 이상의 합성의 강화를 포함할 수 있다.

[0222] 일반적으로, 숙주 미생물 유기체는 상기 유기체가 1,3-부탄디올 경로의 전구체를, 자연적으로 생산되는 분자로, 또는 목적하는 전구체의 데 노보(de novo) 생산을 제공하거나 또는 상기 숙주 미생물 유기체에 의해 천연적으로 생산되는 전구체의 생산 증가를 제공하는 조작된 생성물로서, 생산하도록 선택된다. 예를 들어, 아세틸-CoA는 에스케리키아 콜라이와 같은 숙주 유기체에서 자연적으로 생산한다. 숙주 유기체를, 본 발명에 개시된 바와 같이, 전구체의 생산이 증가되도록 조작할 수 있다. 또한, 목적 전구체를 생산하도록 조작된 미생물 유기체를 숙주 유기체로 사용하고, 1,3-부탄디올 경로의 효소 또는 단백질을 발현하도록 추가로 조작할 수 있다.

[0223] 일부 구현예에서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 1,3-부탄디올을 합성하는 효소적 능력을 함유하는 숙주로부터 제조된다. 이에 대한 구체적인 구현예로, 예를 들어 1,3-부탄디올 경로 반응이 1,3-부탄디올을 생산하도록 추진되게 하기 위해, 1,3-부탄디올 경로의 산물의 합성 또는 축적을 증가시키는 것이 유용할 수 있다. 합성 또는 축적의 증가는, 예를 들어 전술한 1,3-부탄디올 경로 효소 또는 단백질 중 하나 이상을 코딩하는 핵산을 과다발현시킴으로써 달성할 수 있다. 상기 1,3-부탄디올 경로의 효소 또는 효소들 및/또는 단백질 또는 단백질들의 과발현은, 예를 들어 내인성 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해서, 또는 이종 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해 이루어질 수 있다. 따라서, 천연 유기체를, 본 발명의 비천연 미생물 유기체가 되도록, 예컨대 본 명세서와 도 4 및 5에 나타낸, 1,3-부탄디올 생합성 경로를 구성하는 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 즉 최대 전체 핵산을 과발현시킴으로써, 1,3-부탄디올을 생산하도록, 쉽게 만들 수 있다. 또한, 비천연 유기체는, 1,3-부탄디올 생합성 경로의 효소의 활성을 높이는 결과를 발생시키는 내인성 유전자의 돌연변이 유발에 의해서도, 제조할 수 있다.

[0224] 특히 유용한 구현예에 있어서, 상기 코딩 핵산의 외인성 발현을 이용한다. 외인성 발현은 상기 발현 및/또는 조절 인자들을 숙주 및 용도에 맞게 조절하여, 유저에 의해 통제되는 바람직한 발현 수준이 달성되게 할 수 있다. 그러나, 내인성 발현은, 또한, 다른 구현예로서, 예컨대 유도 프로모터 또는 다른 조절 인자와 연결되었을 때, 부정적인 조절성 작동인자를 제거하거나 상기 유전자의 프로모터에 대해 유도를 부여하여, 이용할 수도 있다. 따라서, 천연 유도 프로모터를 갖춘 내인성 유전자는 적정 유도제를 제공하여 상향 조절되게 하거나, 또는 내인성 유전자의 조절 영역에 유도성 조절 인자가 병합되게 조작하여, 적정 시기에 내인성 유전자를 증가된 수준으로 발현되게 조절할 수 있다. 마찬가지로, 유도 프로모터를 비천연 미생물 유기체에 도입되는 외래 유전자에 대한 조절 요소로서 포함시킬 수 있다.

[0225] 본 발명의 방법에서, 하나 이상의 외인성 핵산들 중 임의의 핵산은, 미생물 유기체에 도입되어, 본 발명의 비천연 미생물 유기체를 제조하는 것으로 이해된다. 핵산은, 예컨대 상기 미생물 유기체에 1,3-부탄디올 생합성 경로를 부여하기 위해 도입될 수 있다. 다른 예로, 코딩 핵산을 도입하여, 1,3-부탄디올 생합성력을 부여하기 위한 필수 반응들 중 일부를 촉매하는 생합성력을 가진 중간체 미생물 유기체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 1,3-부탄디올 생합성 경로를 지닌 비천연 미생물 유기체는, 바람직한 효소 또는 단백질을 코딩하는 적어도 2종의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 따라서, 생합성 경로의 2이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합을 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함시킬 수 있는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 생합성 경로의 3 이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합을 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함시킬 수 있는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 본원에 개시된 생합성 경로의 4 이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합은, 바람직한 생합성 경로의 상기한 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 바람직한 산물을 생산하는 한, 원하는 대로 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함시킬 수 있다. 이처럼, 본원에 기술된 생합성 경로의 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16개의 효소 및/또는 단백질의 임의 조합을, 상기 바람직한 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 바람직한 산물의 생산을 수행하는 한, 원하는대로 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함시킬 수 있다.

[0226] 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함되는, 본원에 기술된 생합성 경로를 구성하는 17가지의 외인성 효소 또는 단백질의 조합의 예는 다음과 같다:

[0227] A: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타

제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 15) 아세토아세테이트 리덕타제, 16) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 17) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0228] B: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 15) 아세토아세테이트 리덕타제, 16) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 17) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

[0229] C: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 15) 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 16) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 17) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0230] D: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 15) 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 16) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 17) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제.

[0231] 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함되는, 본원에 기술된 생합성 경로를 구성하는 16가지의 외인성 효소 또는 단백질의 조합의 예는, 상기 A-D에 기술된 17가지의 효소들 중 16개의 임의 조합을 포함하거나, 또는 하기를 포함한다:

[0232] E: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성),15) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 및 16) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제.

[0233] F: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 15) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 및 16) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제.

[0234] G: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-

황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 15) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 및 16) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제.

[0235] 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함되는, 본원에 기술된 생합성 경로를 구성하는 15가지의 외인성 효소 또는 단백질의 조합의 예는, 상기 A-G에 기술된 효소들 중 15개의 임의 조합을 포함하거나, 또는 하기를 포함한다:

[0236] H: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 및 15) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제.

[0237] I: 1) 포르메이트 데하이드로게나제, 2) 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 3) 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤라제, 4) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 5) 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 6) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 7) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 8) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 9) 페레독신 (Orf7), 10) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 11) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 12) 하이드로게나제 (Hyd), 13) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 14) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 및 15) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성).

[0238] J: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 13) 아세토아세테이트 리덕타제, 14) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 15) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0239] K: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 13) 아세토아세테이트 리덕타제, 14) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 15) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제;

[0240] L: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 13) 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 14) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 15) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제;

[0241] M: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신타제, 13) 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 14) 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 15) 3-하이드록시부

티르알데하이드 리덕타제.

[0242] 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함되는, 본원에 기술된 생합성 경로를 구성하는 14가지의 외인성 효소 또는 단백질의 조합의 예는, 상기 A-M에 기술된 효소들 중 14개의 임의 조합을 포함하거나, 또는 하기를 포함한다:

[0243] N: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성)13) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 및 14) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제.

[0244] O: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 13) 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 및 14) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제.

[0245] P: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 13) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 및 14) 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제.

[0246] 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함되는, 본원에 기술된 생합성 경로를 구성하는 13가지의 외인성 효소 또는 단백질의 조합의 예는, 상기 A-P에 기술된 효소들 중 13개의 임의 조합을 포함하거나, 또는 하기를 포함한다:

[0247] Q: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 및 13) 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성),

[0248] R: 1) 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 2) 코리노이드 단백질 (MtaC), 3) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 4) 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 5) 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 6) 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 7) 페레독신 (Orf7), 8) 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 9) 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 10) 하이드로게나제, 11) 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 12) 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 및 13) 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제.

[0249] 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함되는, 본원에 기술된 생합성 경로를 구성하는 12가지의 외인성 효소 또는 단백질의 조합의 예는, 상기 A-R에 기술된 효소들 중 12개의 임의 조합을 포함한다. 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함되는, 본원에 기술된 생합성 경로를 구성하는 11가지의 외인성 효소 또는 단백질의 조합의 예는, 상기 A-R에 기술된 효소들 중 10개의 임의 조합을 포함한다. 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함되는, 본원에 기술된 생합성 경로를 구성하는 9가지의 외인성 효소 또는 단백질의 조합의 예는, 상기 A-R에 기술된 효소들 중 8개의 임의 조합을 포함한다. 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함되는, 본원에 기술된 생합성 경로를 구성하는 7가지의 외인성 효소 또는 단백질의 조합의 예는, 상기 A-R에 기술된 효소들 중 6개의 임의 조합을 포함하며, 이러한 방식으로 계속 진행되어 상기 A-R에 기술된 효소들 중 2개의 임의 조합을 포함한다.

[0250] 본원에 기술된 바와 같이, 1,3-부탄디올의 생합성과 더불어, 본 발명의 비천연 미생물 유기체 및 방법들은, 또한, 이들 서로를, 그리고 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 다른 미생물 유기체 및 방법들과의 다양한 조합으로

이용하여, 다른 경로에 의해 생합성 생산을 달성할 수도 있다. 예를 들어, 1,3-부탄디올 생산체를 사용하지 않고 다르게 1,3-부탄디올을 생산하는 대안적인 방법은, 1,3-부탄디올 경로의 중간 산물을 1,3-부탄디올로 변환시킬 수 있는 다른 미생물 유기체의 부가를 통해 이루어진다. 이러한 생산체는, 예컨대 1,3-부탄디올 경로의 중간산물을 생산하는 미생물 유기체의 발효를 포함한다. 이후, 1,3-부탄디올 경로의 중간산물은 1,3-부탄디올 경로의 중간산물을 1,3-부탄디올로 변환하는 제2 미생물 유기체에 대한 기질로서 사용할 수 있다. 상기 1,3-부탄디올 경로의 중간산물은 상기 제2 유기체의 다른 배양물에 직접 첨가하거나, 또는 상기 1,3-부탄디올 경로의 중간간물 생산체의 오리지날 배양물에 첨가하고, 이들 미생물 유기체를 예컨대 세포 분리에 의해 제거한 다음, 발효 브로스에 제2 유기체를 첨가하여, 중간산물의 정제 단계없이 최종 산물을 생산할 수 있다.

[0251] 다른 구현예에서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체 및 방법은, 예컨대 1,3-부탄디올의 생합성을 달성하기 위해 매우 다양한 서브경로들을 조합할 수 있다. 이러한 구현예에서, 본 발명의 바람직한 산물에 대한 생합성 경로를 여러가지 미생물 유기체에 할당하고, 상기 여러가지 미생물 유기체를 공동-배양함으로써, 최종 산물을 생산할 수 있다. 이러한 생합성 계획의 경우, 하나의 미생물 유기체의 생산물은, 최종 산물이 합성될 때까지, 제2 미생물 유기체의 기질이 된다. 예컨대, 1,3-부탄디올의 생합성은 한가지 경로 중간산물을 다른 경로의 중간산물 또는 최종 산물로 변환하기 위한 생합성 경로를 포함하는 미생물 유기체를 구축함으로써, 달성할 수 있다. 다른 예로, 1,3-부탄디올은 또한, 동일한 바셀에서 2종의 유기체를 이용한 공동-배양 또는 공동-발효를 통해 미생물 유기체들로부터 생합성에 의해 생산할 수 있으며, 이때, 제1 미생물 유기체는 1,3-부탄디올 중산산물을 생산하고, 제2 미생물 유기체는 상기 중간산물을 1,3-부탄디올로 전환한다.

[0252] 본원에 제공된 교시 및 지침을 고려하여, 당해 기술 분야의 당업자는, 1,3-부탄디올을 생산하기 위해, 기타 미생물 유기체, 서브경로를 갖춘 기타 비천연 미생물 유기체들의 공동-배양, 및 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 그외 화학적 및/또는 생화학적 공정들의 조합과 더불어, 본 발명의 비천연 미생물 유기체 및 방법에 대한 매우 다양한 조합 및 치환(permutation)이 존재함을 알 것이다.

[0253] 1,3-부탄디올 경로 효소 또는 효소에 대한 코딩 핵산의 소스는, 예컨대 상기 코딩된 유전자 산물이 언급된 반응을 촉매할 수 있는 임의의 종들을 포함할 수 있다. 이러한 종으로는, 비제한적인 예로서 고세균 및 유박테리아 등의 박테리아, 및 효모, 식물, 조류, 곤충 동물 및 인간을 포함한 포유류 등의 진핵 생물을 비롯하여, 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체 둘다를 포함한다. 이러한 소스의 종의 예로는, 예컨대 에스케리키아 콜라이 뿐만 아니라 본원에 기술되거나 해당 유전자에 대한 소스 유기체로서 이용가능한 다른 예시적인 종들을 포함한다. 그러나, 395 종의 미생물 게놈 및 다양한 효모, 진균, 식물, 및 포유동물 게놈들을 포함하여, 현재 550종 이상(이들 중 절반 이상은 NCBI와 같은 공개 데이터베이스 상에서 입수가능함)에 대해 입수할 수 있는 전체 게놈 서열을 이용하여, 공지된 유전자들의 상동체, 오르소로그, 파라로그 및 비-오르소로그 유전자 치환을 비롯하여, 관련 종 또는 무관련 종들에서 하나 이상의 유전자에 대한 필수적인 1,3-부탄디올 생합성 활성을 코딩하는 유전자의 동정, 및 유기체들 간의 유전자 변이의 교환은 통상적이며 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 즉, 에스케리키아 콜라이 등의 특정 유기체에 대하여 본원에 기술된 1,3-부탄디올의 생합성을 가능하게 하는 대사 변이는, 원핵생물 및 진핵생물 유기체 등의 다른 미생물에도 쉽게 적용할 수 있다. 본 발명에 제공된 교시 및 지침을 감안하면, 당해 기술 분야의 당업자는 한가지 유기체에서 예시된 대사 변이를 다른 유기체에도 동등하게 적용할 수 있다는 것을 알 것이다.

[0254] 일부 예에서, 예컨대 대안적인 1,3-부탄디올 생합성 경로가 무관련 종들에 존재하는 경우, 1,3-부탄디올 생합성은, 예를 들어 유사하지만, 동일하진 않은 대사 반응을 촉매하여 언급된 반응을 치환하는, 무관련 종 유래의 파라로그 또는 파라로그들을 외인성 발현시킴으로써 숙주 종 상에 부여하여, 언급된 반응을 대체할 수 있다. 대사 네트워크들 간의 어떤 차이가 상이한 유기체들 간에 존재하기 때문에, 당해 기술 분야의 당업자라면 상이한 유기체들 간의 실제 유전자 사용성이 다를 수 있음을 알 것이다. 그러나, 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 기술 분야의 당업자라면, 본 발명의 교시 및 방법을 본원에 예시된 것들과 동족의(cognate) 대사 변이를 이용하는 모든 미생물 유기체들에 적용하여, 1,3-부탄디올을 합성하는 대상 종들에서 미생물 유기체를 구축할 수 있음을 인지할 것이다.

[0255] 비천연 1,3-부탄디올-생산 숙주의 발현 수준을 구축하는 방법과 테스트하는 방법은, 예컨대 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 재조합 방법 및 검출 방법에 의해 수행할 수 있다. 이러한 방법들은, 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)에서 확인할 수 있다.

[0256] 1,3-부탄디올 생산을 위한 경로에 참여하는 외인성 핵산 서열은, 비제한적인 예로서, 접합, 전기천공, 화학적 형질전환, 형질전이, 형질감염 및 초음파 형질전환 등의, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 기술을 이용하여 숙주 세포에 안정적으로 또는 일시적으로 도입할 수 있다. 에스케리키아 콜라이 또는 다른 원핵생물 세포에서의 외인성 발현을 위해, 유전자에서 일부 핵산 서열 또는 진핵생물 핵산의 cDNA는 N-말단 미토콘드리아 또는 기타 타겟 신호와 같은 표적 신호를 코딩할 수 있으며, 상기 신호는 필요에 따라 원핵생물의 숙주 세포에 형질전환하기 전에 제거할 수 있다. 예를 들어, 미토콘드리아 리더 서열을 제거하면 에스케리키아 콜라이에서의 발현이 증가되었다 (Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005)). 효모 또는 다른 진핵생물 세포에서의 외인성 발현을 위해, 유전자를 리더 서열을 부가하지 않고 시토졸에서 발현시키거나, 또는 숙주 세포에 적합한 미토콘드리아 표적 또는 분비 신호 등의 적정 타겟 서열을 부가함으로써, 미토콘드리아나 다른 세포 소기관으로 표적화하거나 분비되게 표적화할 수 있다. 따라서, 표적 서열을 제거 또는 포함시키기 위한 핵산 서열에 대한 적정 변형을 외인성 핵산 서열에 병합시켜, 바람직한 특성들을 부여할 수 있는 것으로 이해된다. 아울러, 유전자에 대해 당해 기술 분야에 널리 공지된 기법으로 코돈 최적화를 수행하여 상기 단백질의 최적화된 발현을 달성할 수 있다.

[0257] 숙주 유기체에서 기능하는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된, 본원에 예시된 하나 이상의 1,3-부탄디올 생합성 경로를 코딩하는 핵산을 포함하도록, 발현 벡터 또는 벡터들을 구축할 수 있다. 본 발명의 미생물 숙주 유기체에 사용하기 위해 적용가능한 발현 벡터로, 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, 상보성 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 블럿 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭, 또는 유전자 산물의 발현에 대한 면역블럿팅, 또는 도입된 핵산 서열 또는 이의 상응하는 유전자 산물의 발현을 테스트하기 위한 기타 적합한 분석 방법을 포함한다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 외인성 핵산을 바람직한 산물을 생산하는데 충분한 양으로 발현시킴을 알 것이며, 발현 수준을 당해 기술 분야에 널리 공지되고 본원에 개시된 방법을 이용하여 충분한 발현이 이루어지도록 최적화할 수 있음을 또한 알 것이다.

[0258] 일부 구현예에서, 본 발명은, 1,3-부탄디올을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 1,3-부탄디올을 생산하기 위해 충분한 양으로 발현되는, 1,3-부탄디올 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 1,3-부탄디올 경로를 갖춘 비천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 1,3-부탄디올 생산 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 1,3-BDO 경로는 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (MtaB), 코리노이드 단백질 (MtaC), 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (MtaA), 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 페레독신 (Orf7), 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 하이드로게나제 (Hyd), 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신타제, 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신타제, 또는 아세토아세테이트 리덕타제를 포함한다.

[0259] 다른 구현예에서, 본 발명은, 1,3-BDO를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 1,3-BDO를 생산하기 위해 충분한 양으로 발현되는, 1,3-BDO 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 1,3-BDO 경로를 갖춘 비천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 1,3-BDO 생산 방법을 제공한다. 상기 1,3-BDO 경로는, 포르메이트 데하이드로게나제, 포르밀테트라하이드로폴레이트 신타제, 메테닐테트라하이드로폴

레이트 사이클로하이드롤라제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제 (AcsE), 코리노이드 철-황 단백질 (AcsD), 니켈-단백질 어셈블리 단백질 (AcsF & CooC), 페레독신 (Orf7), 아세틸-CoA 신타제 (AcsB & AcsC), 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 (AcsA), 하이드로게나제 (Hyd), 아세토아세틸-CoA 티올라제 (AtoB), 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알데하이드 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존형, 알코올 형성), 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신타제, 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신타제, 또는 아세토아세테이트 리덕타제를 포함한다.

[0260] 일부 구현예에서, 비천연 미생물 유기체의 배양은 1,3-BDO를 생산하기 위한 조건과 충분한 시간 동안의 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양은 실질적으로 혐기성인 배양 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 미생물 유기체의 하나 이상의 외인성 핵산은 이종 핵산이다. 전술한 바와 같이, 상기 배양되는 비천연 미생물 유기체는 1,3-BDO 경로를 코딩하는 핵산 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개, 즉 최대 모든 핵산들을 비롯하여, 1,3-BDO 경로에서의 임의 수의 외인성 핵산을 가질 수 있다. 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 1) 메탄올 및 CO, 2) 메탄올, CO_2, 및 H_2, 3) 메탄올, CO, CO_2, 및 H_2, 4) 메탄올과, CO 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 5) 메탄올과, CO, CO_2 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 6) 하나 이상의 탄수화물, 7) 메탄올과 하나 이상의 탄수화물, 및 8) 메탄올로부터 선택되는 탄소 공급원료, 또는 일부 구현예에서, 1) CO, 2) CO_2 및 H_2, 3) CO, CO_2 및 H_2, 4) CO 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 5) CO, CO_2 및 H_2를 포함하는 합성 가스, 6) 하나 이상의 탄수화물로부터 선택되는 탄소 공급원료를 이용할 수 있다.

[0261] 1,3-부탄디올의 생산을 테스트하기 위한 적정 정제 및/또는 분석은 널리 공지된 방법으로 수행할 수 있다. 테스트할 조작된 각 균주에 대해 3세트 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) 및 LC-MS(액체 크로마토그래피-질량 분광학) 등의 방법으로 또는 당해 기술 분야에 널리 공지된 통상적인 과정을 이용하는 그외 적정 분석 방법으로 분석할 수 있다. 발효 브로스에서 산물의 방출도 배양 상층액을 이용하여 테스트할 수 있다. 부산물 및 잔류 글루코스는, 예컨대 글루코스 및 알콜의 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.

[0262] 1,3-부탄디올은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 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, 증류, 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.

[0263] 본원에 기술된 임의의 비천연 미생물 유기체를 배양하여, 본 발명의 생합성 산물을 생산 및/또는 분리할 수 있다. 예컨대, 1,3-부탄디올 생산체를 1,3-부탄디올의 생합성 생산을 위해 배양할 수 있다.

[0264] 1,3-부탄디올을 생산하기 위해, 재조합 균주를 탄소원과 기타 필수 영양원이 첨가된 배지에서 배양한다. 전체 공정의 비용을 줄이기 위해 발효기에서 혐기성 조건을 유지하는 것이 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 출원번호 11/891,602에 기술되어 있다. 발효는 본원에 개시된 바와 같이 배치, 피드-배치 또는 연속적인 방식으로 수행할 수 있다.

[0265] 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.

[0266] 즉, 본원에 제공된 교시 및 지침을 감안하면, 당해 기술 분야의 당업자는, 합성 가스, 메탄올 또는 CO, CO_2, 수소 등의 조합과 같은 탄소원에서 배양시 본 발명의 생합성된 화합물을 분비하는, 비천연 미생물 유기체를 생산할 수 있다는 것을 알 것이다. 상기 화합물은, 예컨대 1,3-부탄디올 및 1,3-부탄디올 경로의 중간 대사산물들 중 임의의 화합물을 포함한다. 필요한 모든 것은, 1,3-부탄디올 생합성 경로의 일부 또는 전체의 포괄을 포함하여, 원하는 화합물 또는 중간산물의 생합성을 달성하도록, 필요한 한가지 이상의 효소 또는 단백질의 활성을 조작하는 것이다.

[0267] 본 발명의 비천연 미생물 유기체는, 본원에 예시된 바와 같이 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법들을 이용하여, 1,3-부탄디올을 생산하기에 충분한 양으로 1,3-부탄디올 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산을 외인성으로 발현하도록, 구축된다. 본 발명의 미생물 유기체는 1,3-부탄디올을 생산하는데 충분한 조건 하에어 배양하는 것으로 이해된다. 본원에 제공된 교시 및 지침에 따라, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 1,3-부탄디올 생합성을 달성하여 세포내 농도 약 0.1-200 mM 이상을 형성할 수 있다. 일반적으로, 1,3-부탄디올의 세포내 농도는 약 3-150 mM, 특히 약 5-125 mM, 보다 구체적으로 약 8-100 mM, 예컨대 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM 또는 그 이상이다. 본 발명의 비천연 미생물 유기체로부터, 이들 예시된 범위에 속하는 세포내 농도 및 그 보다 높은 세포내 농도도 달성할 수 있다.

[0268] 일부 구현예에서, 배양 조건은 혐기적 또는 실질적으로 혐기적 생육 또는 유지 조건을 포함한다. 혐기 조건의 예는 종래에 개시되어 있으며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 발효 공정의 예시적인 혐기 조건은 본원에 기술외어 있으며, 예컨대 2007년 8월 10일자 미국 공개번호 2009/0047719에 기술되어 있다. 비천연 미생물 유기체에 이러한 조건들 중 임의 조건 뿐만 아니라 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 그외 혐기 조건을 이용할 수 있다. 이러한 혐기 조건하에서, 1,3-부탄디올 생산체는 1,3-부탄디올을 세포내 농도 5-10 mM 또는 그 이상으로 뿐만 아니라 본원에 데시된 기타 모든 농도로 합성할 수 있다. 전술한 내용은 세포내 농도에 대해 언급되지만, 1,3-부탄디올을 생산하는 미생물 유기체는 1,3-부탄디올을 세포내에서 생산하여 배양 배지로 산물을 분비할 수 있는 것으로 이해된다.

[0269] 1,3-부탄디올의 생합성을 달성하기 위한 배양 조건은, 본원에 기술된 배양 및 발효 조건 외에도, 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.

[0270] 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 혐기 또는 실질적으로 혐기적 배양 조건에서 달성할 수 있다.

[0271] 본원에 기술된 바와 같이, 1,3-부탄디올의 생합성을 달성하기 위한 배양 조건의 일 예는 혐기성 배양 또는 발효 조건을 포함한다. 일부 구현예들에서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 혐기 또는 실질적인 혐기 조건에서 유지, 배양 또는 발효시킬 수 있다. 간략하게는, 혐기 조건은 산소가 없는 환경을 지칭한다. 실질적인 혐기 조건은, 예를 들어, 배지내 용해된 산소 농도가 0 내지 10%의 포화율로 존재하는, 배양, 배치 발효 또는 연속 발효를 포함한다. 실질적인 혐기 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_2/CO_2 혼합물 또는 그외 적정 산소 이외의 기체 또는 기체들을 살포함으로써 유지할 수 있다.

[0272] 본원에 기술된 배양 조건은 1,3-부탄디올을 생산하기 위해 규모를 확대시켜 연속 배양할 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. 1,3-부탄디올을 상업적인 양으로 생합성 생산하기에는 발효 공정이 특히 유용하다. 일반적으로, 그리고 비-연속식 배양 공정을 이용하는 경우와 같이, 1,3-부탄디올의 연속 및/또는 거의 연속적인 생산은, 본 발명의 비천연 1,3-부탄디올 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 7개월까지의 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 산물을 충분한 양으로 생산하기에 충분한 기간인 것으로 이해된다.

[0273] 발효 공정은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 간략하게, 1,3-부탄디올을 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.

[0274] 상당량의 1,3-부탄디올을 연속 생산하기 위해 본 발명의 1,3-부탄디올 생산체를 이용한 전술한 발효 공정들 뿐만 아니라, 또한, 1,3-부탄디올 생산체는 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 공정에 투입할 수 있다.

[0275] 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 1,3-부탄디올을 보다 효율적으로 생산하는 방향으로 대사를 이동시키는 세포 생육에 대한 효과들을 신뢰성있게 예견할 수 있다.

[0276] 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 게놈에서 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.

[0277] 간략하게 설명하면, OptKnock는 본원에서 세포 대사를 모델링하기 위한 계산 방법 및 시스템을 지칭하는 용어이다. OptKnock 프로그램은 특정 제한(particular constraint)을 플럭스 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 플럭스 밸런스 모델로부터 나오는 플럭스 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.

[0278] 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 플럭스와 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.

[0279] 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 예견할 수 있는 정확도가 향상된다.

[0280] 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.

[0281] 전술한 방법들은 파괴할 한가지 이상의 대사 반응 세트를 제공할 것이다. 상기 세트 또는 대사 변이의 각 반응의 소거시, 원하는 산물을 유기체가 생장하는 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 데이타베이스를 이용한 반응들의 상관 관계를 통해 달성되는 자동화된 과정이다.

[0282] 일단 동정한 후, 원하는 산물의 생산을 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.

[0283] 추가적인 반응 세트가 파괴되거나 또는 생육과 커플링된 원하는 산물의 생합성 등의 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 지칭되는 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.

[0284] 타겟 생화학 산물의 생산을 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.

[0285] 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 방법은 선택압 하에서 유기체의 자기 최적화 능력을 활용한다. OptKnock 프래임워크는 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)).

[0286] 에스케리키아 콜라이 대사의 인 실리코 화학량론 모델을 채택하여, 기존에 예시되고, 예를 들어 미국 특허 공개공보 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 프래임워크를 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 컷으로 지칭되는 최적화 기법을 실행할 수 있다. 이는, 전술한 바와 같이, 각 반복에서 정수 컷으로 지칭되는 추가적인 제한을 추가하면서 OptKonck 문제를 반복적으로 해결하는 과정을 수반한다.

[0287] 본원에 기술된 바와 같이, 1,3-부탄디올 경로의 원하는 활성을 코딩하는 핵산을 숙주 유기체에 도입할 수 있다. 일부 경우에, 1,3-부탄디올 경로 효소 또는 단백질의 활성을 1,3-부탄디올 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.

[0288] 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 클래스들에서의 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 등의, 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 (kcat); 단백질 수율 및 전체 경로 플럭스를 높이기 위한, 발현 수준; 호기 조건에서 공기 민감성 효소의 작동을 위한, 산소 안정성; 및 산소가 존재하지 않는 조건에서 호기성 효소의 작동을 위한, 혐기 활성이 있다.

[0289] 특정 효소의 원하는 특징을 표적하기 위한 유전자의 돌연변이 유발 및 다양화를 위한, 다수의 예시적인 방법들

이 개발되었다. 이러한 방법들은 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 이러한 방법들 중 임의 방법을 이용하여 1,3-부탄디올 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, 에러-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 뉴클레아제로 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 w및 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.

[0290] 추가적인 방법으로는, 선형화된 플라스미드 DNA를 사용하여 미스매치 복원에 의해 복원되는 헤테로두플렉스를 형성하는, 헤테로두플렉스 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 DNA(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 "유니버셜" 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, 뉴클레오디트 교환 및 절개 기법(Nucleotide Exchange and Excision Technology) NexT (Muller et al., *Nucleic Acids Res.* 33:e117 (2005))이 있다.

[0291] 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.

[0292] 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 이용하여다른 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.

[0293] 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.

[0294] 본 발명의 다양한 구현예들의 작용에 실질적으로 영향을 미치지 않는 변형들은 본원에 기술된 본 발명의 정의에 포함되는 것으로 이해된다. 따라서, 아래 실시예들은 예시하기 위한 의도일 뿐 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0295] **실시예 I**

[0296] **탄소 공급원으로서 메탄올, CO 및/또는 CO_2를 이용한 1,3-BDO의 생산**

[0297] 본 실시예에서는 탄소원으로서 메탄올, CO, 및/또는 CO_2로부터 1,3-BDO를 생산하는 비천연 유기체를 구축하는 방법을 설명한다.

[0298] 클로닝 및 발현 과정의 제1 단계는, 에스케리키아 콜라이에서 메탄올로부터 Me-THF를 생산하는데 필요한 최소 유전자 세트(예, *MtaA*, *MtaB*, 및 *MtaC*)를 발현시키는 것이다. 이러한 메틸트랜스퍼라제 활성은 조인자로서 코엔자임 B_{12} (코발라민)을 필요로 한다. 무어렐라 써모아세티카에서, 메틸트랜스퍼라제 케스케이드 단백질은 메탄올의 메틸기를 아세틸-CoA 신타제 경로로의 병합을 매개한다. 최근 연구(Das et al., Proteins 67.1:167-176 (2007))를 통해, MtaABC는 Moth_1208-09 및 Moth_2346에 의해 코딩되는 것으로 확인되었다. 이들 유전자는 프루프-리딩 PCR(proof-reading PCR)을 통해 클로닝하고, pZE22-S와 같은 고 카피수 벡터에서 억제성 PA1-lacO1 프로모터의 통제 하에 발현시키기 위해 함께 연결한다 (Lutz and Bujard, *Nucleic Acids Res.* 25.6:1203-1210 (1997)). 클로닝된 유전자들은 PCR 및/또는 제한효소 맵핑으로 검증하여, 구축과 3-유전자 세트의 발현 벡터로의 삽입을 확인한다. 추정 클론의 DNA 서열분석을 수행하여, 각 유전자의 예상 서열을 검증한다. 검증 후, 최종 구조체를 에스케리키아 콜라이 K-12 (MG1655) 세포에서 IPTG 유도체를 최종 농도 0.05 - 1 mM로 첨가하여 발현시킨다. 클로닝한 유전자의 발현은 전체 세포 추출물을 SDS-PAGE를 이용하여 모니터링한다. 가용성 대 펠렛(잠재적으로 봉입체 기원임) 단백질의 수준을 최적화하기 위해, 이러한 수준에 대한 프로모터의 타이트레이션 효과를 조사할 수 있다. 수용가능한 발현이 달성되지 않으면, 카피수가 낮거나 높은 벡터나 또는 프로모터 강도에 대한 변이체를 테스트한다.

[0299] 무어렐라 써모아세티카의 MtaABC 단백질 발현이 에스케리키아 콜라이에서 메탄올로부터 테트라하이드로폴레이트

(THF)로의 메틸기의 전달력을 부여하는지를 확인하기 위해, 재조합 균주에 다양한 농도로 메탄올을 공급한다. 메틸트랜스퍼라제 시스템의 활성은 무어렐라 써모아세티카 (Naidu and Ragsdale, *J. Bacteriol*. 183.11:3276-3281 (2001)) 또는 메타노사르시나 바케리 메탄올 메틸트랜스퍼라제 (Sauer et al., *Eur. J. Biochem*. 243.3:670-677 (1997); Tallant et al., *J. Biol. Chem*. 276.6:4485-4493 (2001); Tallant and Krzycki, *J. Bacteriol*. 179.22:6902-6911 (1997); Tallant and Krzycki, *J. Bacteriol*. 178.5:1295-1301 (1996))의 경우, 메틸원으로서 바닐레이트에 대해 기술된 바와 같이 혐기적으로 분석한다. 양성 대조군으로, 무어렐라 써모아세티카 세포도 병행하여 배양하고, 혐기적으로 분석하여 내인성 메틸트랜스퍼라제 활성을 검증한다. 외부에서 첨가된 코엔자임 B_{12}에 대한 의존성의 입증은 에스케리키아 콜라이에서의 메탄올:코리노이드 메틸트랜스퍼라제 활성을 검증한다.

[0300] 일단 메틸트랜스퍼라제 발현이 달성되면, 발현을 최적화하는 방향으로 추가적인 작업을 수행한다. 발현 벡터에서의 프로모터의 타이트레이션(titration)은 다양한 발현 수준에서 테스트하여 실시할 수 있다. 그런 후, 그 결과는 단일 카피에 필요한 발현에 대한 가이드로서 사용하거나, 또는 이들 유전자의 단일 카피가 충분한 발현을 가능하게 하는지의 여부를 결정할 수 있다. 그럴 경우, 메틸트랜스퍼라제 유전자들은 단일한 합성 오페론으로서 염색체에 통합시킨다. 이는 RecET-기반의 '재조합'을 이용하는 타겟화된 통합을 수반한다 (Angrand et al., *Nucleic Acids Res*. 27.17:e16 (1999); Muyrers et al., *Nucleic Acids Res*. 27.6:1555-1557 (1999); Zhang et al., *Nat. Genet*. 20.2:123-128 (1998)). RecET-기반의 카세트 통합 및 FLP 또는 Cre에 의한 FRT 및 loxP-결합된 선별 마커의 제거와 관련된 잠재적인 문제는 각 통합 부위에서의 재조합 흉터(recombination scar)가 형성된다는 것이다. 이로 인한 문제점들은 다수의 방법들로 최소화할 수 있지만, 게놈 흉터를 남기지 않는 다른 방법들도 이용가능하다. 표준적인 대안책은 바실러스 *sacB* 유전자에 의해 가능한 것과 같이 카운터-선별과 커플링된 통합성 '자살' 플라스미드를 이용하여 원하는 유전자를 도입하는 것이며 (Link et al., *J. Bacteriol*. 179.20:6228-6237 (1997)); 이러한 방법에서는, 에스케리키아 콜라이 염색체에서 임의 위치에서의 마커 부재(markerless) 및 흉터 부재성 삽입을 달성할 수 있다. 최종 목표는 유도성 프로모터 하에 단일 카피(염색체로 통합됨)로 메탄올:코리노이드 메틸트랜스퍼라제 활성을 발현하는 에스케리키아 콜라이 K-12 균주이다.

[0301] 표준 PCR 방법을 이용하여, 전체 ACS/CODH 오페론을 pZA33-S (P15A계) 또는 pZS13-S (pSC101계)와 같은 카피수가 낮거나 보통인 벡터내로 결집시킬 수 있다. 메틸트랜스퍼라제 유전자에 대해 기술된 바와 같이, 클로닝된 유전자의 구조 및 서열을 검증한다. 발현은, 필수 금속 (Ni, Zn, Fe) 및 코엔자임 B_{12}가 제공된 엄격한 혐기 조건 하에서 배양한 전체 세포 라이세이트의 단백질 젤 전기영동을 통해 모니터링하다. 필수적으로, 에스케리키아 콜라이에서 유효한 것으로 공지된 부위들로부터 선택된 컨센서스 리보좀 결합부의 도입 및 임의의 명확한 종결인자의 동정 및 제거를 통해, 에스케리키아 콜라이에서 발현시키도록 유전자 클로스터를 변형한다 (Barrick et al., *Nucleic Acids Res*. 22.7:1287-1295 (1994); Ringquist et al. *Mol. Microbiol*. 6.9:1219-1229). 그러나, 각 유전자 클로스터를 클로닝하고 이의 천연 구조 및 발현과 동일한 방식으로 발현시킨다. 이는 대부분 서로 상호작용하는 다양한 유전자 산물들 간의 바람직한 화학량론을 확보하는데 도움이 된다. 혐기 조건에서 CODH/ACS 유전자 클러스터가 만족할만한 수준으로 발현되면, CO 및/또는 CO_2를 세포성 탄소로 고정하는 이들 유전자를 발현하는 세포의 능력을 분석한다. 처음 조건은 탄소원 및 에너지원으로서 외인성 글루코스가 제공된 엄격 혐기 조건에서 배양된 세포를 기질-수준의 인산화를 통해 이용하거나 또는 전자 어셉터로서 질산염을 이용한 혐기 호흡에 사용한다. 추가적으로, 배지에 외부로부터 제공되는 CH_3-THF를 첨가할 수 있다.

[0302] 또한 메탄올-메틸트랜스퍼라제 시스템을 발현하는 세포에서, ACS/CODH 유전자를 클로닝하고 발현시킨다. 이는, ACS/CODH를 발현하는 호환성 플라스미드를 MTR-발현 세포에 도입함으로써 달성할 수 있다. 장기간의 안정성을 부여하기 위해, ACS/CODH 및 MTR 유전자는 염색체에 통합시킬 수 있다. 메탄올을 이용하여 Me-THF를 생산할 수 있으며 활성형 ACS/CODH 유전자를 발현할 수 있는 에스케리키아 콜라이 균주를 제조한 다음, 이를 아세틸-CoA, 아세테이트 및 세포 매스로 병합하기 위해 메탄올과 합성 가스를 활용하는 능력에 대해 분석한다. 초기 조건에서는 탄소 및 에너지원으로서 외인성 글루코스가 제공된 엄격한 혐기 조건으로 배양된 세포를 이용한다. 다른 예로, 또는 글루코스 외에도, 질산염을 발효 브로스에 첨가하여 전자 어셉터 및 증식의 개시제로서 사용할 수 있다. 궁극적으로 아세틸-CoA로 대사되는 지방산에서의 에스케리키아 콜라이의 혐기적 배양은 질산염의 존재하에서 확인되었다 (Campbell et al., *Mol. Microbiol*. 47.3:793-805 (2003)). 또한, 조작된 효소의 임의의 저해 역치 미만으로 세포내 산소 수준이 유지되는 한, 산소를 제공할 수 있다. ^{13}C-표지된 메탄올, ^{13}C-표지된 바이카보네이트 또는 ^{13}C-표지된 CO를 세포에 제공하고, 분석용 질량 스펙트로메트리를 적용하여 표지된 탄소의

아세테이트 및 세포 매스(예, 단백질성 아미노산)로의 병합을 측정한다.

[0303] 메탄올 메틸트랜스퍼라제 시스템을 조작하기 위한 대안 방법 또는 보안 방법은, 메틸기를 ACS/CODH에 공급하기 위해 Wood-Ljungdahl 경로의 메틸 분지(branch)를 조작하는 단계를 포함한다. 에스케리키아 콜라이는 필수 활성들 중 일부를 수행할 수 있는 효소를 코딩하는 유전자(*fdh*, *metF*, *folD*)를 가지고 있어, 초산 생성균 유래의 메틸 분지 효소들은 비-초산 생성균 유래의 효소 보다 특이 활성이 상당히 높을 (50 - 100X) 수 있는 것으로 확인되었다 (Morton et al., *Genetics and molecular biology of anaerobic bacteria* Springer Verlag, New York). 무어렐라 써모아세티카 버전은 포르메이트 데하이드로게나제 (*fdhA*, Moth_2312 - Moth_2313 alpha, Moth_2314 beta), 포르밀-테트라하이드로폴레이트 (THF) 신타제 (Moth_0109), 메테닐-THF 사이클로하이드롤라제/메틸렌-THF 데하이드로게나제 (*folD*, Moth_1516), 메틸렌-THF 리덕타제 (*metF*, Moth_1191), 및 메틸트랜스퍼라제 (*acsE*, Moth_1197)를 포함한다. CODH/ACS 클러스터의 일부로서 클로닝할 메틸트랜스퍼라제 (*acsE*, Moth_1197)를 제외하고, 이들 유전자들을 클로닝하여, 이들을 세트로서 발현하도록 설계된 발현 벡터내로 조합한다. 메틸 분지 유전자의 클로닝과 발현은 전술한 바와 수행한다. 먼저, 카피 수가 높거나 또는 보통인 벡터를 선택한다 (ColE1 또는 P15A 레플리콘을 이용함). 또한, 이들 유전자를 에스케리키아 콜라이 염색체에 통합시킬 수 있다.

[0304] 무어렐라 써모아세티카, 데설포비크릭 아프리카누스, 및 에스케리키아 콜라이 유래의 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제 유전자들을 클로닝하여, ACS/CODH 활성을 나타내는 균주에서 발현시킬 수 있다. 조건, 프로모터 등은 상기에 기술되어 있다. PFOR 유전자의 큰 크기와 대응되는 효소의 산소 민감성을 감안하면, 테스트는 낮거나 또는 단일-카피 플라스미드 벡터 또는 단일-카피 염색체 통합을 이용하여 수행할 수 있다. 문헌에 기술된 활성 분석법을 이용하여 활성을 확인할 수 있다 (Furdui and Ragsdale, *J. Biol. Chem*. 275.37:28494-28499 (2000)). 아울러, 외부 전자 어셉터의 부재시 가스상 탄소원 및 메탄올에서의 증식 확인은, 생체내 PFOR 활성에 대한 추가적인 증거로 제공될 것이다.

[0305] 숙주 유기체의 내인성 수소를 이용하는 하이드로게나제 활성은, 수소의 존재 또는 부재하에 전술한 바와 같이 세포를 배양함으로써 테스트할 수 있다. 발효 중에 보다 환원된 산물의 형성 쪽으로의 급격한 변화가 관찰된다면(예, 아세테이트 대비 에탄올 증가), 이는, 내인성 하이드로게나제 활성이 충분히 활성형임을 의미한다. 이 경우, 이종의 하이드로게나제는 클로닝 및 발현시키지 않는다. 천연 효소는 충분한 활성을 가지지 않거나 또는 필요한 어셉터를 환원시키지 않는다면, 각각의 하이드로게나제 복합체를 코딩하는 유전자들을 클로닝하여 ACS/CODH 활성을 나타내는 균주에서 발현시킬 수 있다. 조건, 프로모터 등은 상기에 기술되어 있다.

[0306] 1,3-부탄디올 합성에 필요한 비천연 유전자를 종래에 기술된 바와 같이 발현 플라스미드에 클로닝한다. 숙주 균주는 또한 메탄올 메틸트랜스퍼라제 활성, CODH/ACS 활성을 발현하며, 경우에 따라 PFOR 및 하이드로게나제 활성도 발현한다. 이런 점에서, 이들 (CODH/ACS, 등) 유전자를 게놈에 통합하여 구성적으로 사용하거나 또는 유도제를 사용할 수 있는 프로모터로부터 발현시킬 수 있다(즉, PA1-lac01은 *lacI*을 포함하는 세포에서 유도성이지만, 그렇지 않은 경우 구성적임). 1,3-BDO의 발현 및 수율이 최적화되면, 중립 위치에 이들 유전자의 단일 카피를 통합시킴으로써, 기본 균주를 추가로 변형시킬 수 있다. 효소들의 상대적으로 한정된 수를 감안하면(최소 3개, 많으면 4개), 필수 유전자를 코딩하는 인공 오페론을 구축할 수 있다. 이 오페론을 통합형 프로모터를 이용하여 도입할 수 있으며, 바실러스 *sacB* 유전자에 의해 가능한 방법 등의 카운터-선별 방법과 커플링시킨다 (Link et al., *J. Bacteriol*. 179.20:6228-6237 (1997)). 이러한 방식으로, 에스케리키아 콜라이 염색체의 임의 위치에서 마커 및 흉터가 없게 삽입체를 넣을 수 있다. 최적화는 유전자 순서 변형 뿐만 아니라 리보좀 결합부 및 프로모터의 변형을 포함한다.

[0307] 임의의 천연 유전자, 예컨대 1,3-부탄디올의 생산에 필요한 클로스트리듐 아세토부틸리컴 아세틸-코엔자임 A [CoA] 아세틸트랜스퍼라제에 대한 대안으로서 사용할 수 있는, 에스케리키아 콜라이의 천연 *atoB* (b2224)를 과다 발현시키기 위해, RecET-기반의 방법을 적용하여 더 강력한 상류 프로모터를 통합시킨다. *atoB*의 경우, 이 유전자는 오페론 제일 뒷쪽에 위치되며, 하류 옆 유전자 (*yfaP*)는 둘다 비필수이며 반대 방향으로 위치된다. 따라서, 극성(polarity)은 문제가 되지 않아야 한다. FRT 또는 loxP의 옆에 위치되는 스펙티노마이신 내성 또는 클로람페니콜 내성 등의 선별 마커를 포함하는 카세트를 이용하여 강력한 구성적 프로모터 (예, pL)의 도입을 선별한다. 적합한 클론을 수득하고 qRT-PCR를 이용하여 검증한 후, Cre 발현을 이용하여 FRT- 또는 loxP-결합된 마커의 제거에 대해 선별한다.

[0308] **실시예 II**

[0309] **무어렐라 써모아세티카 ACS/CODH 코딩 유전자의 클로닝 및 발현**

[0310] 본 실시예는, CODH, ACS, 메틸트랜스퍼라제, 및 코리노이드 철-황 단백질에 대해 사용되는 등의 무어렐라 써모아세티카 ACS/CODH 오페론 유전자를 발현하는, 에스케리키아 콜라이 플라스미드의 제조에 대해 기술한다. 본 실시예는, 또한, 관찰가능한 CO 산화 활성, 메틸트랜스퍼라제 활성 및 코리노이드 철-황 단백질 활성을 발생시키는 에스케리키아 콜라이에서의 이들의 발현을 기술한다. 마지막으로, 본 실시예는, 에스케리키아 콜라이가 높은 CO 농도를 허용하며, 무어렐라 써모아세티카 유래의 CO-이용성 유전자 산물이 발현되는 경우에는 심지어 CO를 소비할 수 있음을 설명한다.

[0311] 발현 벡터는 Lutz 및 Bujard (Lutz and Bujard, *Nucleic Acids Res.* 25.6:1203-1210 (1997))에서 기술된 세트로부터 선택하였고, 이것은 다양한 카피 번호 범위를 포괄하는 상용의 레플리콘을 사용한다. 부가적으로, 각각은 prA1-lacoI을 포함하며; 이 T7 초기 유전자 프로모터는 IPTG에 의해 유도되며, IPTG의 존재 하에 전사를 매우 높을 수준으로 유도할 수 있으며, 그외 조건에서는 억제할 수 있다. ACS/CODH-코딩 오페론을 Moth_1204 (*CooC*) - Moth_1197로부터 클로닝하였고, Moth_1203 - Moth_1197만 포함하는 2차 버전도 구축하였다. 이러한 단편들 (10 - 11 kbp) 둘다는 DNA 서열 분석에 의해 검증하였다. 이들을 보통 내지 고 카피수의 p15A계 및 ColE1계 벡터에 구축하였다.

[0312] 재조합 단백질의 최종 농도를 평가하기 위해, CO 산화, ACS, 메틸트랜스퍼라제 및 코리노이드 Fe-S 분석에 사용한 동일 세포 추출물에 대해 SDS-PAGE 수행 후 웨스컨 블롯 분석을 수행하였다. 사용한 항혈청은 정제된 무어렐라 써모아세티카 ACS/CODH 및 Mtr 단백질에 대한 다클론 혈청이며, 알칼리 포스파타제-결합된 염소-항-토끼 2차 항체를 이용하여 가시화하였다. 웨스턴 블롯은 도 6에 나타낸다. ACS90 및 ACS91에서의 CODH의 양은 대조군 레인과 비교하여 50 ng으로 확인되었다.

[0313] 카본 모노옥사이드 산화 분석 (Seravalli et al., *Biochemistry* 43.13:3944-3955 (2004))을 이용하여, 무어렐라 써모아세티카 유래의 CODH-코딩 유전자의 기능적인 발현이 이루어졌는지의 여부를 테스트하였다. 빈 벡터 또는 "Acs90" 또는 "Acs91"을 발현하는 벡터 중 어느 하나를 포함하는 에스케리키아 콜라이 MG1655의 배양물을, IPTG를 최종 농도 0.2 mM로 첨가하여 프로모터에 유도 자극을 가하는 중간 내지 고 밀도에 도달할 때까지, (시아노코발라민, 제1철 및 환원제가 첨가된) 테릭픽 브로스에서 혐기 조건 하에 배양하였다. 37℃에서 3.5시간 동안 배양한 후, 세포를 회수하여 스핀 다운한 후, 라이소자임과 경도의 디터전트를 사용하여 용혈시켰다. 무어렐라 써모아세티카의 CODH 비활성(specific activity)에 대한 벤치마킹할 수 있는 값은, 55℃에서 500U 또는 25℃에서 ~60U이다. 이 분석에서는 CO의 존재 하에 메틸 비올로겐의 환원을 이용하였다. 이는 뚜껑이 달린 혐기성의 유리 큐벳에서 578 nm에서 측정한다. CODH에 의한 CO 산화에 양성인 반응물은 진한 보라색으로 색이 변한다(도 7). 세포성 단백질 약 0.5%는 웨스턴 블롯팅을 통해 CODH인 것으로 확인되었고, 즉, 표 1의 데이타는 순수한 무어렐라 써모아세티카 CODH의 활성 500 U/mg 보다 약 50X 낮았다. 그렇지만, 이 실험은 재조합 에스케리키아 콜라이에서의 CO 산화 활성을 명백하게 입증해주며, 음성 대조군의 경우에는 훨씬 낮았다. 음성 대조군에서 확인된 작은 CO 산화 수준(CH_3 비올로겐 환원)은, 에스케리키아 콜라이가 CH_3 비올로겐을 환원시키는 능력에 한계가 있을 수 있음을 의미한다.

[0314] **표 1.** 조 추출물의 CO 산화 활성

표 49

[0315]

ACS90	7.7 mg/ml	ACS91	11.8 mg/ml	
Mta98	9.8 mg/ml	Mta99	11.2 mg/ml	
추출물	**부피**	**OD/**	**U/ml**	**U/mg**
ACS90	10 ㎕	0.073	.0376	0.049
ACS91	10 ㎕	0.096	0.494	0.042
Mta99	10 ㎕	0.0031	0.016	0.0014
ACS90	10 ㎕	0.099	0.051	0.066
Mta99	25 ㎕	0.012	0.025	0.0022
ACS91	25 ㎕	0.215	0.443	0.037
Mta98	25 ㎕	0.019	0.039	0.004
ACS91	10 ㎕	0.129	0.66	0.056
평균				
ACS90	0.057 U/mg			

ACS91	0.045 U/mg			
Mta99	0.0018 U/mg			

[0316] 본 분석은, ACS/CODH, 메틸트랜스퍼라제, 및 CFeSP를 이용하여, 메틸-테트라하이드로폴레이트, CO, 및 CoA로부터 아세틸-CoA를 합성하는 시험관내 반응이다 (Raybuck et al., *Biochemistry* 27.20:7698-7702 (1988)). 사용된 효소들 각각을 부가 또는 제거함으로써, 하나 이상의 정제된 효소 또는 세포 추출물을 활성 테스트하는 것에서부터, 다양한 조건 또는 기질 또는 효소의 제한된 양에서의 반응의 동역학을 결정하는 것까지, 매우 다양한 실험들에 이용할 수 있다. 다양한 시점에 취한 반응 샘플을 1 M HCl로 퀀칭시켜, 아세틸-CoA 최종 산물로부터 아세테이트를 분리시킨다. Dowex 컬럼으로 정제한 후, 크로마토그래피, 질량 분광측정기에 의해 또는 방사능을 측정함으로써 아세테이트를 분석할 수 있다. 반응에 사용되는 특정 기질에 의해 실제 방법을 정할 수 있다.

[0317] 이 분석은 에스케리키아 콜라이에서 발현되는 ACS/CODH 오페론이 Fe-S 코리노이드 단백질 활성을 발현하는지를 확인하기 위해 수행하였다. 따라서, 표지된 기질로서 ^{14}C-표지된 메틸-THF를 사용하여, 분리된 아세테이트 샘플로의 방사능 물질의 병합에 의해 아세테이트 합성을 측정하였다. 6가지의 다른 조건들을 시험하였다:

[0318] 1. 정제된 ACS/CODH, MeTr, 및 CFeSP, 양성 대조군임

[0319] 2. 정제된 ACS/CODH와 ACS90 세포 추출물

[0320] 3. 정제된 ACS/CODH와 ACS91 세포 추출물

[0321] 4. 정제된 ACS/CODH, MeTr와 ACS90 세포 추출물

[0322] 5. 정제된 ACS/CODH, MeTr와 ACS91 세포 추출물

[0323] 6. 정제된 ACS/CODH, MeTr와 가능한 다량의 ACS91 세포 추출 (MES 완충액 제외).

[0324] 반응은 CO로 충진된 분석 바이얼에서 혐기 챔버안에서 조합하였다. 전체 반응 부피는 바이얼 체적 보다는 낮았고, 시약은 CO 충진 전에 넣었으며, 기밀의 해밀톤 시린지를 사용하였고, 시약을 혐기에서 유지하였다. 반응물 (총 ~60 ㎕)은 세포 추출물(#1 제외), CoA, Ti(III) 사이트레이트, MES(#6 제외), 정제된 ACS/CODH, 14C-메틸-테트라하이드로폴레이트, 메틸-비올로겐 및 페레독신으로 구성된다. 추가적으로, 정제된 MeTr을 #1, #4-6에 첨가하였고, 정제된 CFeSP를 #1에 첨가하였다.

[0325] 반응은 55℃ 모래조내 혐기 챔버 안에서 수행하였다. 첨가되는 마지막 시약은 ^{14}C-메틸-테트라하이드로폴레이트이며, 이것이 반응을 개시한다(t = 0s). 초기 샘플을 즉시 취하고, 30분, 1시간 및 2시간에 샘플을 취하였다. 6가지의 조건을 동시에 진행하였기 때문에(본 실험은 주로 질적 분석이었으므로), 이러한 시간대는 정확한 것은 아니다. 샘플 15 mL을 신틸레이션 바이얼내 1 M HCl 15 mL에 첨가하였다. 반응 혼합물을 카운팅한 후, ACS90 추출물내 코리노이드 Fe-S 단백질은 양성 대조군의 약 1/5에 해당되는 전체 활성을 가진 활성을 나타내었다.

[0326] ACS/CODH 오페론은 아세틸-CoA의 합성의 일부분(즉, 메틸 및 카르보닐을 함께 연결하는 단계)으로서 CH_3를 메틸-테트라하이드로폴레이트에서 ACS 복합체로 전달하는 과정을 촉매하는 필수 메틸트랜스퍼라제 활성을 코딩한다. 무어렐라 써모아세티카의 오페론의 경우, Mtr-코딩 유전자는 Moth_1197이고, 이것은 주요 CODH 및 ACS 서브유닛들 다음에 온다. 따라서, Mtr 활성은 보다 근접한 유전자들이 발현될 수 있다는 간접 증거가 될 것이다.

[0327] Mtr 활성은 스펙트로스코피로 분석하였다. 구체적으로, Co(III)와 함께 메틸화된 CFeSP는 ~450 nm에서 작은 흡광 피크를 나타내지만, Co(I)과 함께 비-메틸화된 CFeSP는 ~390 nm에서 큰 피크를 나타낸다. 이 스펙트럼은 코발트 및 철-황 클러스터 발색단으로 인한 것이다. 아울러, CFeSP는 자발적으로 Co(II)로 산화되어, ~470 nm에서 넓은 흡광 피크를 나타낼 수 있음에 유념하여야 한다 (Seravalli et al., *Biochemistry* 38.18:5728-5735 (1999)). ACS90를 포함하는 에스케리키아 콜라이 세포로부터 수득한 결과는 도 8을 참조한다.

[0328] 에스케리키아 콜라이가 CO가 포화량으로 존재하는 조건에서 혐기 증식할 수 있는지를 보기 위해, 테리픽 브로스 배지 (+ $NiCl_2$, Fe(II)NH_4SO_4, 및 시아노코발라민) 50 ml이 든 혐기 조건의 120 ml 혈청 보틀을 준비하였다. 이 보틀의 내용물의 절반은 질소 가스로 30분간 평형화하고, 나머지 절반에는 CO로 30분간 평형화하였다. 대조군으로 빈 벡터 (pZA33)를 사용하였고, ACS90와 ACS91 둘다를 N_2 및 CO 조건 2가지에서 테스트하였다. 모두 37℃에서 교반하면서(250 rpm) 36시간 배양하였다. 36시간 종료시, 플라스크들 모두에서 고도의 증식이 확인되었다 (도 9). 관찰되는 벌크 증식은 밤새 이루어졌고, 약한 수준(낮지만 가시적으로 확인되는 수준)의 긴 지체기를

거쳤다. 접종원의 부피는 에스케리키아 콜라이 스톡으로부터 취한 ~0.5 ml이었다.

[0329] 그 결과는 표 2에 나타내었다. 균주를 CO의 존재하에 또는 그렇지 않은 조건에서 배양하던지 간에 비슷한 수준으로 증식에 도달하였다(가시적으로 검사함). 또한, 음성 대조군은 최종 CO 농도는 930 μM이었고, ACS/CODH 오페론을 발현하는 균주의 경우에는 688 및 728 μM이었다. 명확하게, 이러한 측정의 오차로 인해 표준 편차의 값은 크게 나타났다. 그렇지만, 본 테스트로 2가지 잠정적인 결론을 내릴 수 있다: 1) 에스케리키아 콜라이는 혐기 조건에서 CO 노출을 허용할 수 있음, 및 2) ACS/CODH 오페론을 발현하는 에스케리키아 콜라이 세포는 CO 일부를 대사할 수도 있음. 두번째 경우는 첫번째 보다는 확실성이 유의하게 낮다.

[0330] **표 2.** 카본 모노옥사이드 농도, 36시간

표 50

[0331]

균주 및 증식 조건	최종 CO 농도 (μM) 930
ACS90-CO	638
	494
	734
	883
평균	687
SD	164
ACS91-CO	728
	812
	760
	611
평균	728
SD	85

[0332] **실시예 III**

[0333] **Wood-Ljungdahl 경로 효소를 이용한 당에 대한 1,3-부탄디올의 수율 증강**

[0334] 본 실시예에서는, Wood-Ljungdahl 경로의 카르보닐-분지를 촉매하는 효소를 코딩하는 유전자는 발현하는 천연 미생물을 개시한다. Wood-Ljungdahl 경로 효소들은 포르메이트, CO 및/또는 CO_2 형태의 탄소를 아세틸-CoA로 동화하며, 이것은 이후 1,3-부탄디올과 같은 유용 화합산물로 변환될 수 있다. 또한, Wood-Ljungdahl 경로는 글루코스 등의 다른 기질에서의 증식시 2차 탄소 동화 경로로도 사용될 수 있다. 구체적으로, 글루코스 1몰을 아세틸-CoA 2몰로 변환시키는 과정은, 환원 당량과 이산화탄소를 만들어낸다. WL 경로 효소는 상기 환원 당량을 이용하여, 이산화탄소 및/또는 포르메이트를 추가적인 아세틸-CoA로 변환시킬 수 있으며, 상기 아세틸-CoA는 이후 1,3-부탄디올 형성에 사용될 수 있다.

[0335] 1,3-부탄디올은 도 4 및 5에 도시되고 본 명세서에서 상기에서 설명된 몇가지 다른 경로를 통해 아세틸-CoA로부터 합성할 수 있다. 이러한 경로들 중 임의 경로를 통해 글루코스로부터 달성가능한 1,3-부탄디올의 최대 수율은 Wood-Ljungdahl 경로 효소가 없는 조건에서는 예컨대 1 mol/mol (0.5 g/g)이다. Wood-Ljungdahl 경로를 통한 추가적인 이산화탄소 동화는, 이론적인 화학량론적 최대치 1.09 mol/mol (0.545 g/g)로 수율을 더욱 개선시킨다. 이론적 최대치를 달성하기 위해 예상되는 플럭스 분포는 도 10에 도시한다.

[0336] 아울러, 메탄올을 글루코스 등의 탄수화물과 함께 공급하여, 1,3-부탄디올 수율을 높일 수 있다. 예컨대, 글루코스와 메탄올을 1.0:0.4 비율로 적용하면, 1 mol 1,3-부탄디올/mol 글루코스 (0.5 g/g) - 1.2 mol 1,3-부탄디올/mol 글루코스로 높일 수 있다. 이러한 수율 증가를 달성하기 위한 예측되는 플럭스 분포는 도 11에 도시한다.

[0337] **실시예 IV**

[0338] **유기체내로의 코발라민 합성의 조작**

[0339] Wood-Ljungdahl 경로의 주요 효소인 ACS/CODH는 작동에 코발라민(비타민 B_{12})을 필요로 한다. B_{12}는 일부 유기

체에서는 *de novo* 합성되지만, 다른 것들에는 외부적으로 공급을 받아야 한다. 또한 사카로마이세스 세레비지애와 같은 또다른 유기체들은 B_{12}를 효율적으로 흡수하는 능력이 결여되어 있다. 본 실시예는 유기체로 *de novo* B_{12} 합성 능력을 조작하는 것이다.

[0340] B_{12} 생합성 경로는 살모넬라 티피무리움 LT2 (Roth et al., *J. Bacteriol.* 175:3303-3316), 락토바실러스 레우테리(*Lactobacillus reuteri*) CRL1098 (Harms and Thauer, *Eur. J. Biochem.* 235:653-659 (1996)) 및 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*) (Brey et al., *J. Bacteriol.* 167:623-630 (1986)) 등의 수종의 유기체들에서 특정화되었다. 박테리아에서의 B_{12} 생합성 경로에는 20-30종의 유전자 클로스터가 하나 이상의 오페론으로 참여한다. 2가지 코발라민 생합성 경로가 확인되었다: 후기-삽입(late-insertion)(호기성에서만) 및 초기-삽입(혐기) (Scott, A.I., *J. Org. Chem.* 68:2529-2539 (2003)). 비타민 B_{12}의 생합성 최종 산물은 5'-데옥시아데노실코발라민 (코엔자임 B_{12})과 메틸코발라민 (MeCbl)이다. 비타민 B_{12}은 산업계에서 일반적으로 제조되는 형태인 시아노코발라민(CNCbl)으로 한정된다. 본 실시예에서는 B_{12}를 모두 3가지 유사 분자들로 참조한다.

[0341] 혐기적인 코발라민 생합성 경로는 살모넬라 티피무리움 LT2에서 잘 특정화되어 있다 (Roth et al., *J. Bacteriol.* 175:3303-3316)). 경로 유전자들은 *cob* 오페론이라고 하는 큰 오페론에 집합되어있다. *cob* 오페론 유래의 하기 20개의 유전자가 포함된 플라스미드 (pAR8827)를 에스케리키아 콜라이에 형질전환시켜, 코발라민의 데 노보 합성력을 부여하였다 (Raux et al., *J. Bacteriol.* 178:753-767 (1996)). 코비릭산 전구체의 수율을 보다 향상시키기 위해, 공지된 조절 인자인 *cbiA*는 제거하고, RBS를 변형시켰다. 이들 유전자와 이의 유전자은행에서의 식별명 및 GI 번호는 아래에 열거한다.

표 51

[0342]

cysG	NP_462380.1	16766765	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiK	NP_460970.1	16765355	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiL	NP_460969.1	16765354	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiH	NP_460972.1	16765357	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiF	NP_460974.1	16765359	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiG	NP_460973.1	16765358	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiD	NP_460977.1	16765362	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiJ	NP_460971.1	16765356	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiE	NP_460976.1	16765361	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiT	NP_460975.1	16765360	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiC	NP_460978.1	16765363	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiA	NP_460980.1	16765365	살모넬라 티피무리움 *LT2*
fldA	NP_459679.1	16764064	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cobA	P31570.1	399274	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiP	AAA27268.1	154436	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cbiB	Q05600.1	543942	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cobU	NP_460963.1	16765348	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cobT	NP_460961.1	16765346	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cobS	AAA27270.1	154438	살모넬라 티피무리움 *LT2*
cobC	NP_459635.1	16764020	살모넬라 티피무리움 *LT2*

[0343] B_{12}를 데 노보 합성할 수 없는 일부 유기체들은 경로의 일부 단계를 촉매할 수 있다. *E coli*는 예컨대 코린(corrin) 고리 구조를 합성할 순 없지만, 경로에서 몇가지 반응을 촉매하는 단백질들을 코딩한다 (Raux et al. *J. Bacteriol.* 178:753-767 (1996)). *cysG* 유전자는 유로포르피리노겐 III을 프리코린-2로 변환시키는 다중작용성 효소인 기능성 CysG를 코딩한다 (Hugler et al., *J. Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002); Ishige et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192-1195 (2002)). *cobTSU*에 의해 코딩되는 단백질은 코빈아미드를 코발라민으로 변환시키며, 5'-데옥시아데노실기를 도입한다 (Raux et al., 상기 참조 (1996)).

표 52

[0344]

cobT	NP_416495.1	16129932	에스케리키아 콜라이 K12 sp. MG1655
cobS	NP_416496.1	16129933	에스케리키아 콜라이 K12 sp. MG1655
cobU	NP_416497.1	16129934	에스케리키아 콜라이 K12 sp. MG1655
cysG	NP_417827.1	16131246	에스케리키아 콜라이 K12 sp. MG1655

[0345] 사카로마이세스 세레비지애는 B_{12}를 데 노보 합성할 수 없으며, 비타민을 검출가능한 수준으로 흡수할 수 없다. 그러나, 사카로마이세스 세레비지애 게놈은 2가지 단백질 Met1p 및 Met8p를 코딩하는데, 이 단백질들이 몇가지 B_{12} 경로 반응을 촉매한다. Met1p는 살모넬라 티피무리움의 우로포르피리노겐 III 트랜스메틸라제 CysG와 유사하며, 우로포르피리노겐 III으로부터 B_{12}를 생합성하는 첫번째 단계를 촉매한다 (Raux et al., *Biochem. J.* 338(pt. 3):701-708 (1999)). Met8p 단백질은 우로포르피리노겐 III 트랜스메틸라제 활성과 코발토켈라타제 활성을 가진 2중 기능성 단백질이며, 바실러스 메가테리움의 CysG와 유사하다 (Raux et al., 상기 참조 (1999)).

표 53

[0346]

Met1p	NP_012995.1	6322922	사카로마이세스 세레비지애
Met8p	NP_009772.1	6319690	사카로마이세스 세레비지애

[0347] 이들 유전자들 전체 또는 임의의 유전자를 코발라민 합성의 하나 이상의 구성 성분이 결핍된 유기체에 도입하여, 코발라민 합성을 실시하거나 또는 효율을 높일 수 있다.

[0348] **실시예 V**

[0349] **유기체내에서의 코발라민 흡수력 강화 조작**

[0350] 본 실시예는 숙주 유기체내에서의 B_{12} 흡수력을 조작하는 과정을 개시한다. B_{12}를 흡수하는데에는 특정 수송 시스템(transport system)이 필요하다 (Sennett et al., *Annu. Rev. Biochem.* 50:1053-1086 (1981)). 에스케리키아 콜라이의 B_{12} 수송 시스템은 광범위하게 연구되었다. 외막을 통한 고친화성 수송 과정은 칼슘 의존적이며, 66 kDa의 외막 포린, BtuB에 의해 매개된다 (Heller et al., *J. Bacteriol.* 161:896-903 (1985)). BtuB는 TonB 에너지 전이 시스템 (TonB-ExbB-ExbD)과 상호작용하여, 에너지-의존적인 전위를 촉진시키고, 주변 세포질 결합 단백질 BtuF에 결합한다 (WO/2007/141208; Atsumi et al., *Nature* 451:86-89 (2008)). 내막을 통한 수송은 BtuF, BtuD (ATP 결합성 구성 성분) 및 BtuC (퍼메아제)로 구성된 ABC 타입의 흡수 시스템에 의해 촉진된다 (Binstock et al., *Meth. Enzymol.* 71(pt. C):403-411 (1981)). BtuCDF 복합체의 결정 구조를 이용할 수 있다 (Atsumi et al., 상기 참조 (2008); Binstock et al., 상기 참조 (1981)). 다른 단백질 BtuE는 *btuCED* 오페론에서 공동 발현되지만, 이 단백질은 B_{12} 수송에 필요하지 않으며, 기능은 알려져 있지 않다 (Rioux et al., *Mol. Gen. Genet.* 217:301-308 (1989)). *btuCED* 오페론은 구성적으로 발현된다. B_{12} 수송과 관련된 유전자들의 유전자은행 식별명과 GI 번호는 아래에 열거한다.

표 54

[0351]

btuB	NP_418401.1	16131804	에스케리키아 콜라이 *K12 sp. MG1655*
btuC	NP_416226.1	16129667	에스케리키아 콜라이 *K12 sp. MG1655*
btuD	NP_416224.1	16129665	에스케리키아 콜라이 *K12 sp. MG1655*
btuF	NP_414700.1	16128151	에스케리키아 콜라이 *K12 sp. MG1655*
tonB	NP_415768.1	16129213	에스케리키아 콜라이 *K12 sp. MG1655*
exbB	NP_417479.1	16130904	에스케리키아 콜라이 *K12 sp. MG1655*
exbD	NP_417478.1	16130903	에스케리키아 콜라이 *K12 sp. MG1655*

[0352] 유기체의 B_{12} 흡수력은, 필수 수송 단백질을 코딩하는 유전자를 과다발현시키고, 네거티브 조절 대조군을 감소 또는 제거함으로써, 더욱 향상시킬 수 있다. *btuBCDF* 유전자의 과다발현은 B12의 막 결합을 증가시키고, 세포

로의 흡수력을 높이게 된다. 다른 방법은 조절 컨트롤을 제거하는 것이다. *btuB* mRNA 번역은 5' UTR에서 B_{12}에 의해 직접 억제된다 (Nahvi et al., *Chem. Biol.* 9:1043 (2002)). 이러한 상호작용은 mRNA 폴딩을 유도하여, 번역 개시부로의 리보좀 접근을 차단시킬 수 있다. B_{12} 결합부를 돌연변이화하거나 제거하면, 저해는 없어지고, B_{12} 흡수 효율은 개선된다 (미국 특허 6,432,686, Bulthuis et al.). 이러한 전략들을 이용하여 1,3-POD 생산 미생물에서 B_{12} 흡수력을 개선시키는데 성공하였다 (WO/1999/058686, 미국 특허 6,432,686, Bulthuis et al.). 최근 특허 출원 (WO/2008/152016)에서는 *C.* 글루타미컴 btuR2와 같은 네거티브 조절 단백질의 제거에 의한 B_{12}의 효율 향상이 개시되었다.

[0353] 살모넬라 티피무리움은 B_{12}에 대한 고친화성 수송자와 저친화성 수송자 둘다를 가지고 있다. 고친화성 수송자는 *btuB*에 의해 코딩된다 (Rioux et al., *J. Bacteriol.* 171:2986-2993 (1989)). 에스케리키아 콜라이에서와 같이, 주변세포질막을 통한 수송은 지금까지 특정화되지 않았지만, ABC 수송 시스템을 통해 이루어지는 것으로 예상된다. B_{12} 결합 단백질은 *btuD*와 *btuE*로 코딩되며, *btuC*는 퍼미아제(permease)를 코딩하는 것으로 보인다.

표 55

[0354]

btuB	AAA27031.1	153891	살모넬라 티피무리움 LT2
btuC	NP_460306.1	16764691	살모넬라 티피무리움 LT2
btuD	NP_460308.1	16764693	살모넬라 티피무리움 LT2
btuE	AAL20266.1	16419860	살모넬라 티피무리움 LT2

[0355] 이들 유전자들 모두 또는 임의 유전자를 코발라민 흡수와 관련된 하나 이상의 구성 성분이 결여된 유기체로 도입하여, 효율적인 코발라민 흡수를 수행하거나 증가시킬 수 있다.

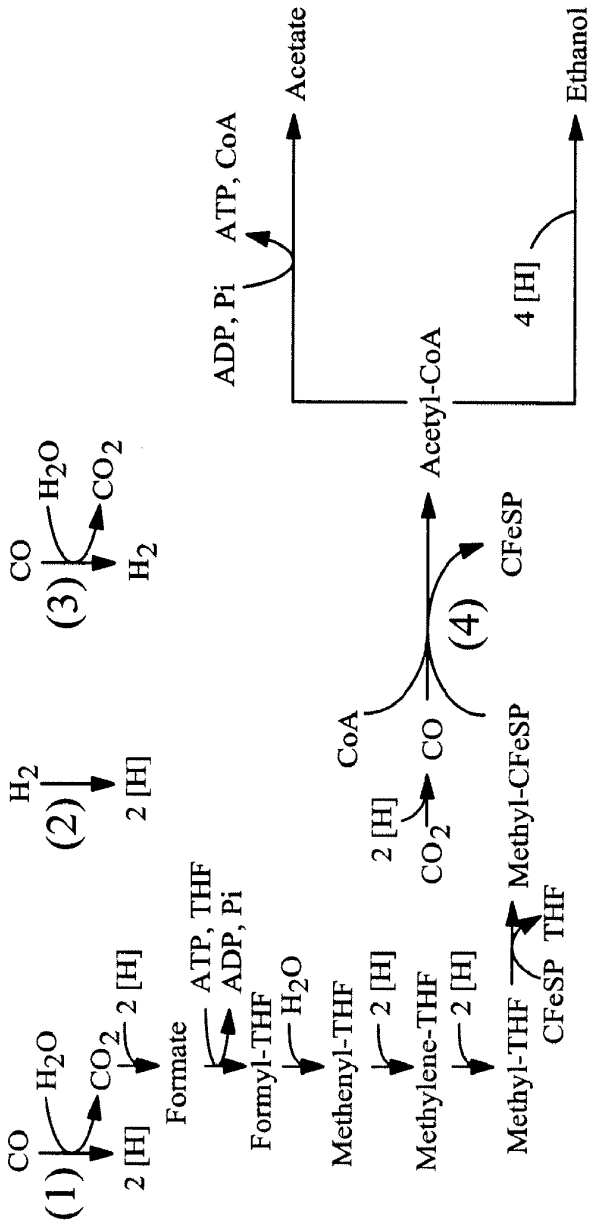
[0356] **배양 배지내에서 B_{12}를 정량하는 방법**. 배양 배지내 B_{12}의 양을 정량하기 위해, 세포가 제거된 샘플을 HPLC로 분석하였다. 코발라민 정량화는, 278 nm 및 361 nm에서의 피크 면적율을 표준 물질과 비교하고, 피크 면적을 코발라민의 표준 곡선에 적용하여, 달성한다.

[0357] 본 명세서 전체에 다양한 공개문헌들을 괄호 안에 기재하였다. 이들 공개문헌의 전체 내용은, 본원이 속하는 기술 분야의 상황을 보다 충분하게 기술하기 위해, 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

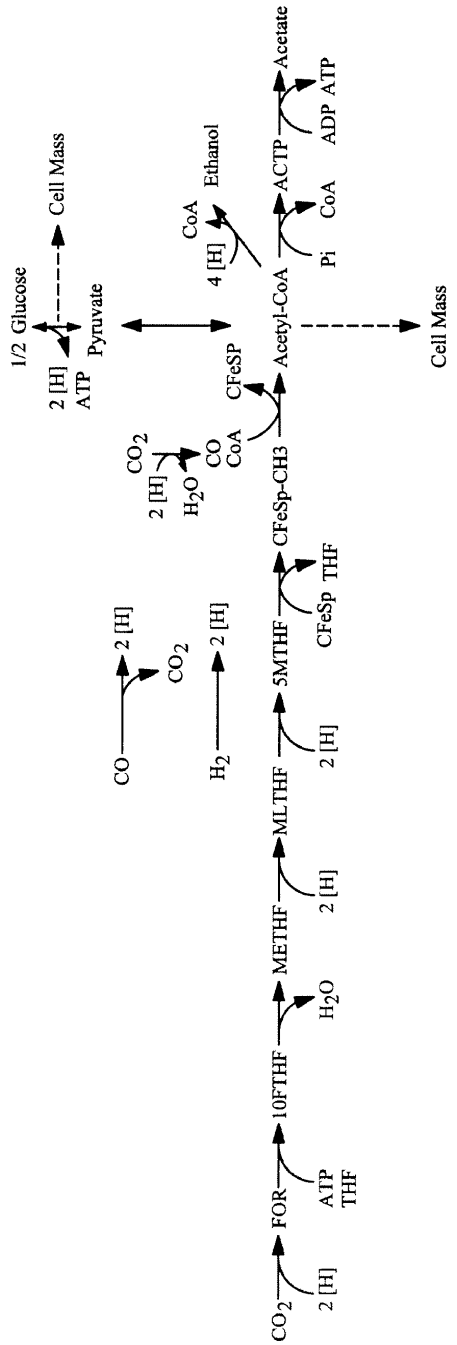
[0358] 본 발명은 기술된 구현예들을 들어 기술되어 있지만, 당해 기술 분야의 당업자라면, 전술한 구체적인 실시예들과 연구들은 본 발명을 예시하는 것에 불과하다는 것을 쉽게 알 것이다. 본 발명의 사상으로부터 이탈되지 않으면서 다양한 변형을 가할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 오직 아래 첨부된 청구범위로만 한정된다.

도면

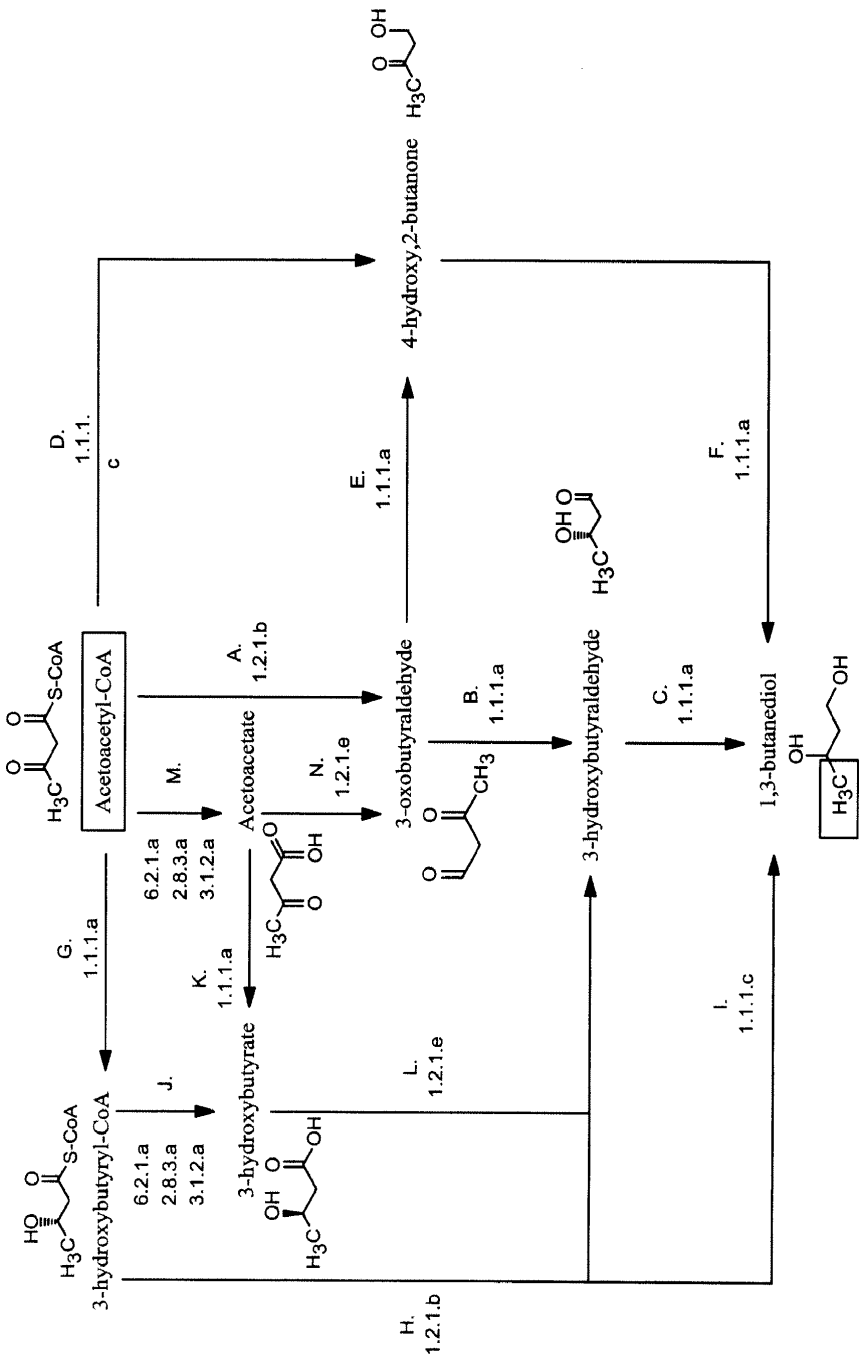
도면1


CO
(1)
H2O
CO2
2 [H]
Formate
ATP, THF
ADP, Pi
Formyl-THF
H2O
Methenyl-THF
2 [H]
Methylene-THF
2 [H]
Methyl-THF
CFeSP
THF
H2
(2)
2 [H]
CO
(3)
H2O
CO2
H2
CoA
2 [H]
CO2
CO
(4)
Methyl-CFeSP
CFeSP
Acetyl-CoA
ADP, Pi
ATP, CoA
Acetate
4 [H]
Ethanol

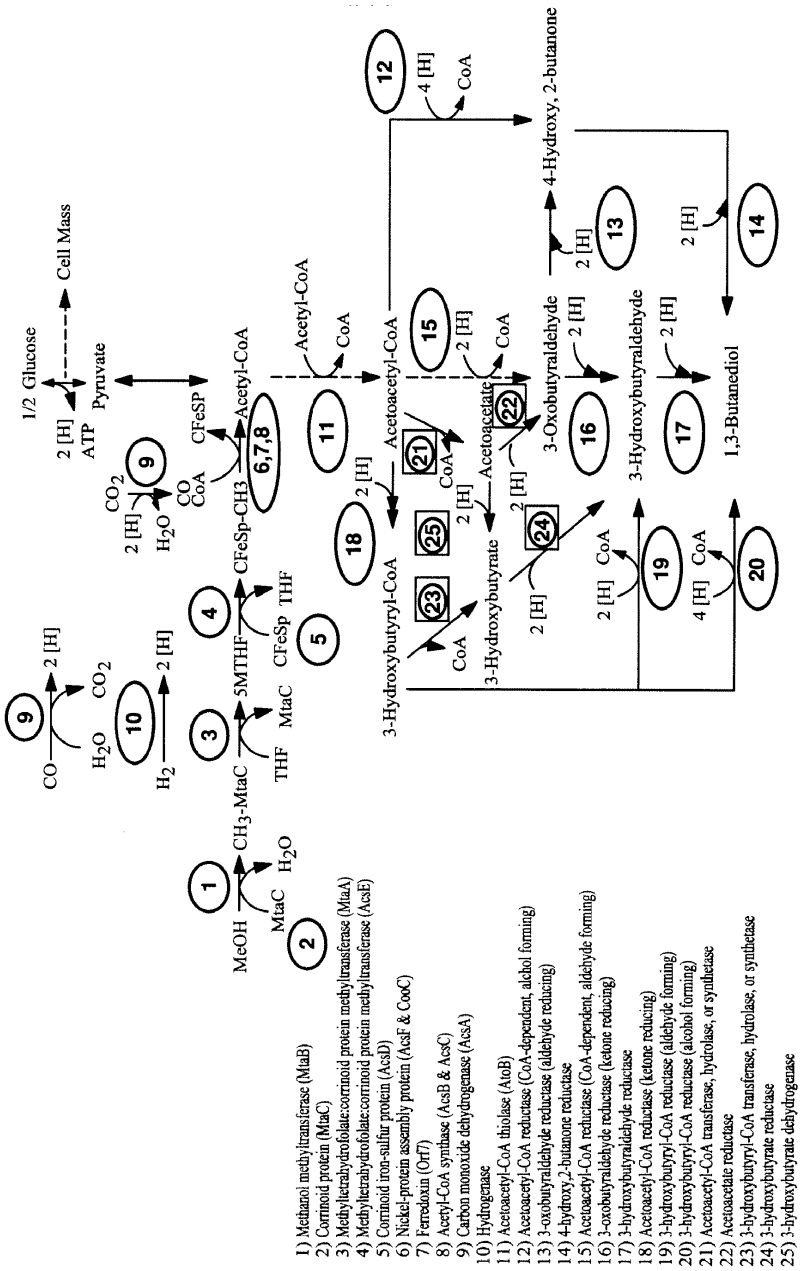
도면2


1/2 Glucose
2 [H]
ATP
Pyruvate
Cell Mass
CO
2 [H]
CO2
H2
2 [H]
CO2
2 [H]
H2O
CO
CoA
CFeSP
CoA
4 [H]
Ethanol
Acetyl-CoA
Cell Mass
ACTP
Pi
CoA
ADP ATP
Acetate
CFeSp-CH3
5MTHF
CFeSp
THF
MLTHF
2 [H]
METHF
2 [H]
10FTHF
H2O
FOR
ATP
THF
CO2
2 [H]

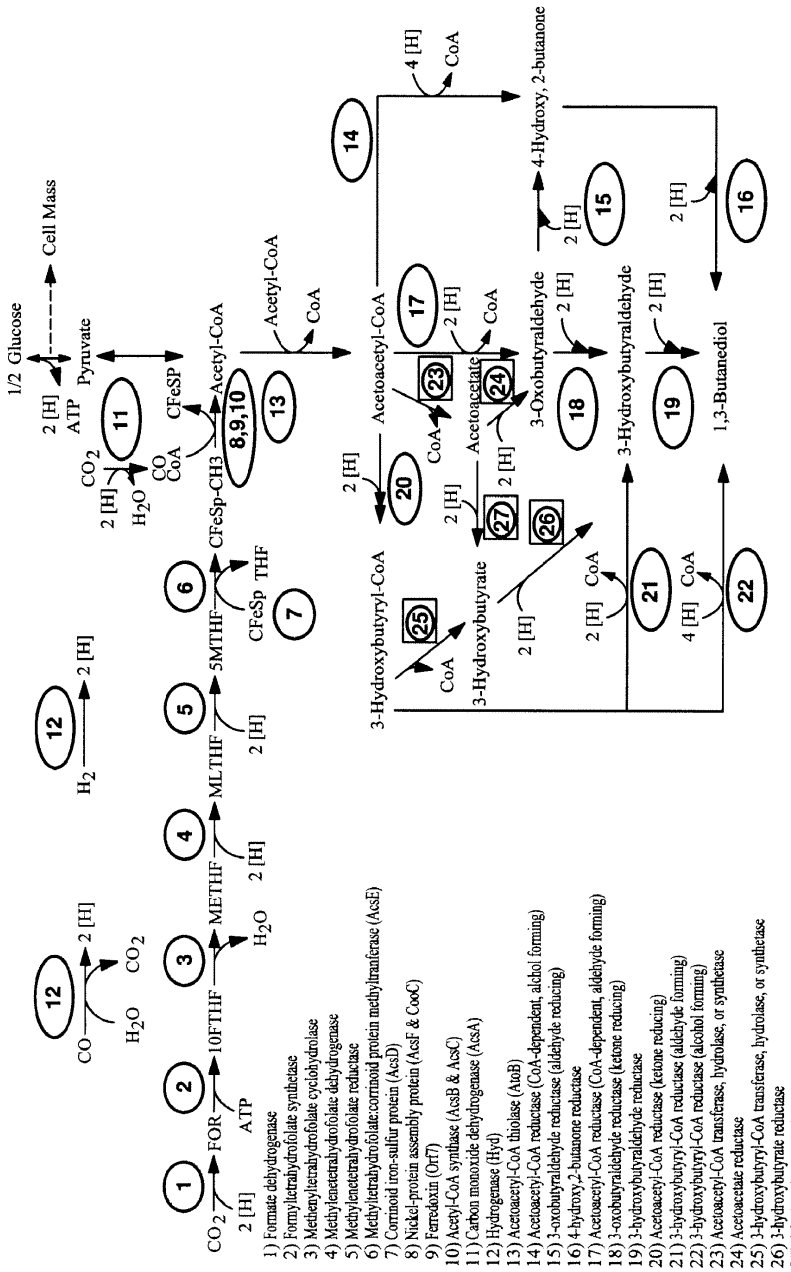
도면3


Acetoacetyl-CoA
3-hydroxybutyryl-CoA
Acetoacetate
3-hydroxybutyrate
3-oxobutyraldehyde
3-hydroxybutyraldehyde
4-hydroxy,2-butanone
1,3-butanediol
A. 1.2.1.b
B. 1.1.1.a
C. 1.1.1.a
D. 1.1.1. c
E. 1.1.1.a
F. 1.1.1.a
G. 1.1.1.a
H. 1.2.1.b
I. 1.1.1.c
J. 6.2.1.a 2.8.3.a 3.1.2.a
K. 1.1.1.a
L. 1.2.1.e
M. 6.2.1.a 2.8.3.a 3.1.2.a
N. 1.2.1.e

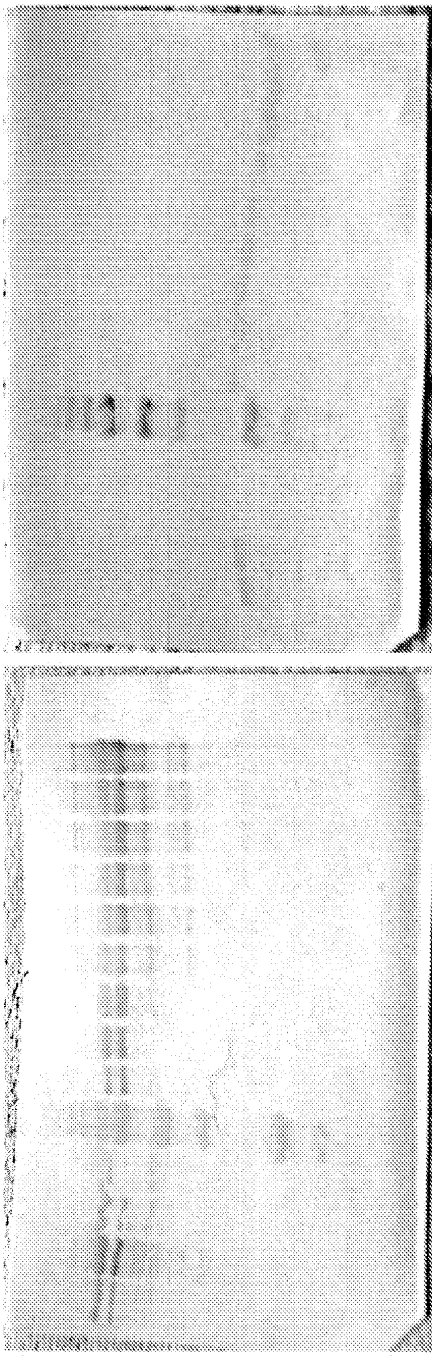
도면4


1/2 Glucose
Cell Mass
2 [H]
ATP
Pyruvate
CO
CO2
H2O
H2
MeOH
CH3-MtaC
MtaC
H2O
5MTHF
THF
MtaC
CFeSp
THF
CFeSp-CH3
CFeSP
Acetyl-CoA
CoA
3-Hydroxybutyryl-CoA
Acetoacetyl-CoA
4 [H]
3-Hydroxybutyrate
Acetoacetate
3-Oxobutyraldehyde
4-Hydroxy, 2-butanone
3-Hydroxybutyraldehyde
1,3-Butanediol
1) Methanol methyltransferase (MtaB)
2) Corrinoid protein (MtaC)
3) Methyltetrahydrofolate:corrinoid protein methyltransferase (MtaA)
4) Methyltetrahydrofolate:corrinoid protein methyltransferase (AcsE)
5) Corrinoid iron-sulfur protein (AcsD)
6) Nickel-protein assembly protein (AcsF & CooC)
7) Ferredoxin (Orf7)
8) Acetyl-CoA synthase (AcsB & AcsC)
9) Carbon monoxide dehydrogenase (AcsA)
10) Hydrogenase
11) Acetoacetyl-CoA thiolase (AtoB)
12) Acetoacetyl-CoA reductase (CoA-dependent, alchol forming)
13) 3-oxobutyraldehyde reductase (aldehyde reducing)
14) 4-hydroxy,2-butanone reductase
15) Acetoacetyl-CoA reductase (CoA-dependent, aldehyde forming)
16) 3-oxobutyraldehyde reductase (ketone reducing)
17) 3-hydroxybutyraldehyde reductase
18) Acetoacetyl-CoA reductase (ketone reducing)
19) 3-hydroxybutyryl-CoA reductase (aldehyde forming)
20) 3-hydroxybutyryl-CoA reductase (alcohol forming)
21) Acetoacetyl-CoA transferase, hydrolase, or synthetase
22) Acetoacetate reductase
23) 3-hydroxybutyryl-CoA transferase, hydrolase, or synthetase
24) 3-hydroxybutyrate reductase
25) 3-hydroxybutyrate dehydrogenase

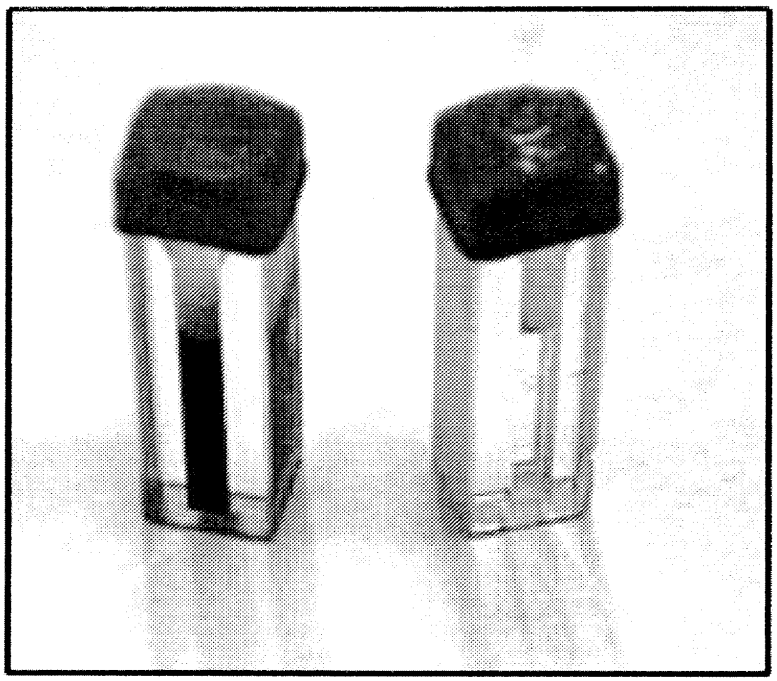
도면5


1/2 Glucose
Cell Mass
2 [H]
ATP
Pyruvate
CO2
2 [H]
H2O
CO
CoA
CFeSP
Acetyl-CoA
Acetyl-CoA
CoA
CO2
FOR
ATP
10FTHF
METHF
MLTHF
5MTHF
CFeSp-CH3
CFeSp THF
H2O
2 [H]
H2
3-Hydroxybutyryl-CoA
Acetoacetyl-CoA
4 [H]
CoA
3-Hydroxybutyrate
Acetoacetate
3-Oxobutyraldehyde
4-Hydroxy, 2-butanone
3-Hydroxybutyraldehyde
1,3-Butanediol
1) Formate dehydrogenase
2) Formyltetrahydrofolate synthetase
3) Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
4) Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
5) Methylenetetrahydrofolate reductase
6) Methyltetrahydrofolate:corrinoid protein methyltransferase (AcsE)
7) Corrinoid iron-sulfur protein (AcsD)
8) Nickel-protein assembly protein (AcsF & CooC)
9) Ferredoxin (Orf7)
10) Acetyl-CoA synthase (AcsB & AcsC)
11) Carbon monoxide dehydrogenase (AcsA)
12) Hydrogenase (Hyd)
13) Acetoacetyl-CoA thiolase (AtoB)
14) Acetoacetyl-CoA reductase (CoA-dependent, alchol forming)
15) 3-oxobutyraldehyde reductase (aldehyde reducing)
16) 4-hydroxy,2-butanone reductase
17) Acetoacetyl-CoA reductase (CoA-dependent, aldehyde forming)
18) 3-oxobutyraldehyde reductase (ketone reducing)
19) 3-hydroxybutyraldehyde reductase
20) Acetoacetyl-CoA reductase (ketone reducing)
21) 3-hydroxybutyryl-CoA reductase (aldehyde forming)
22) 3-hydroxybutyryl-CoA reductase (alcohol forming)
23) Acetoacetyl-CoA transferase, hydrolase, or synthetase
24) Acetoacetate reductase
25) 3-hydroxybutyryl-CoA transferase, hydrolase, or synthetase
26) 3-hydroxybutyrate reductase
27) 3-hydroxybutyrate dehydrogenase

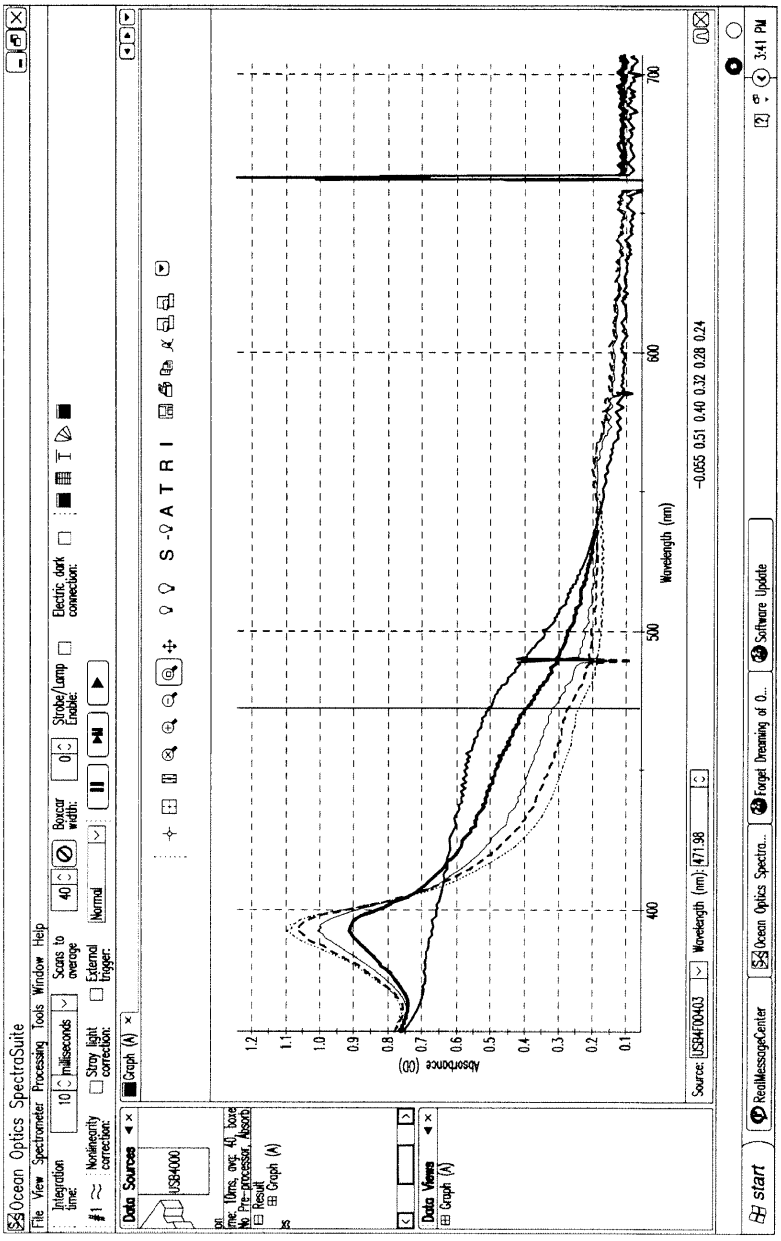
도면6



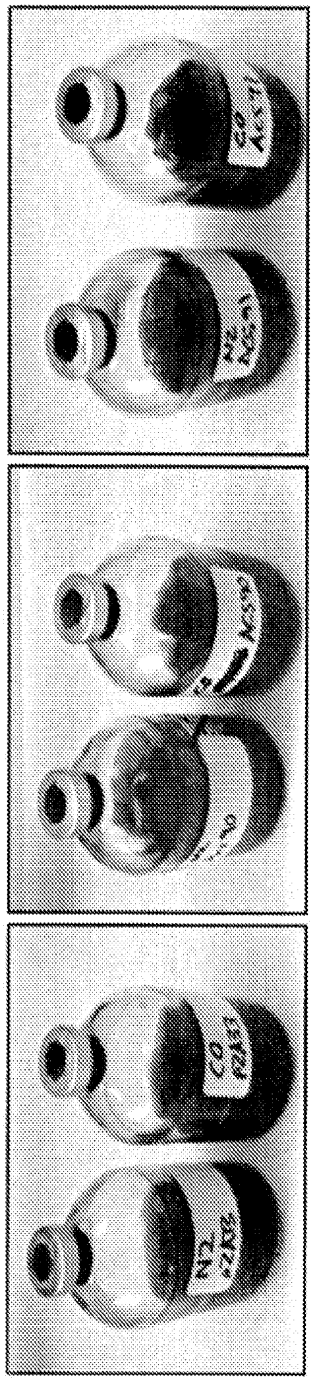
도면7



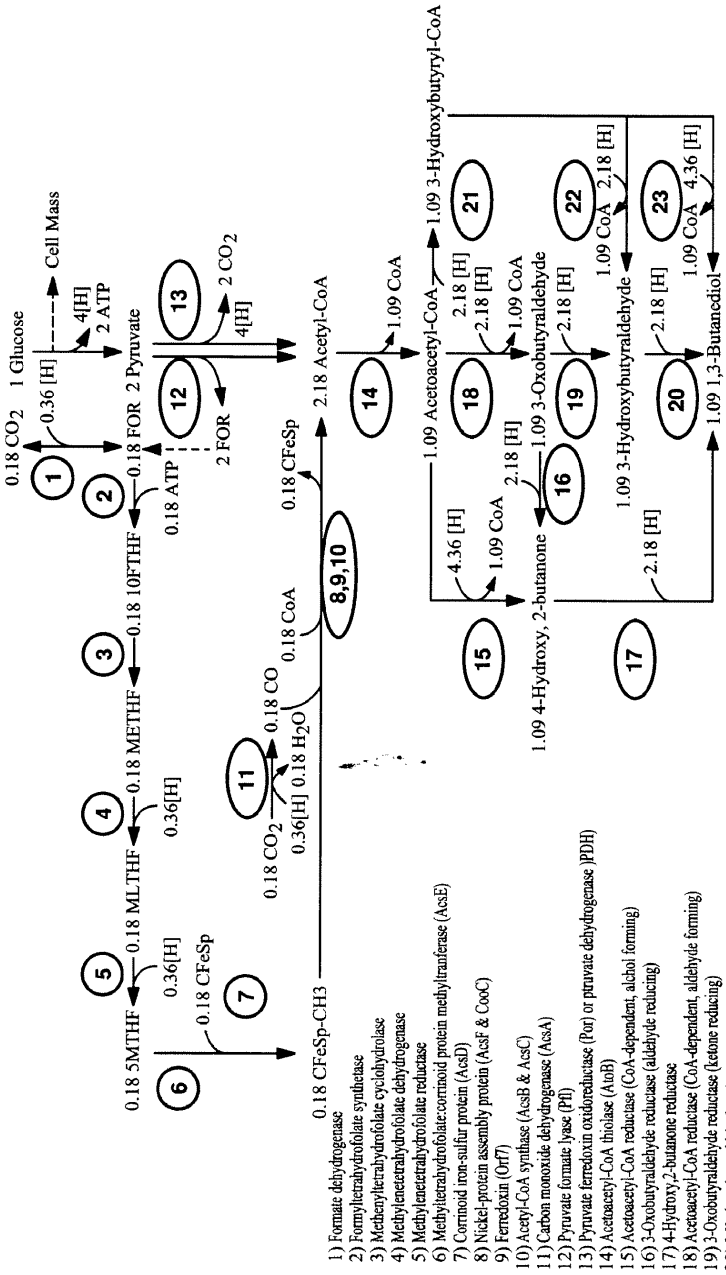
도면8


Ocean Optics SpectraSuite
File View Spectrometer Processing Tools Window Help
Integration time:
milliseconds
Scans to average
Boxcar width:
Strobe/Lamp Enable:
Electric dark connection:
Nonlinearity correction:
Stray light correction:
External Trigger:
Normal
Graph (A)
Data Sources
USB4000
Data Views
Graph (A)
Absorbance (OD)
Wavelength (nm)
Source: USB4F00403
Wavelength (nm): 471.98
RealMessageCenter
Ocean Optics Spectra...
Forget Dreaming of O...
Software Update
start
3:41 PM

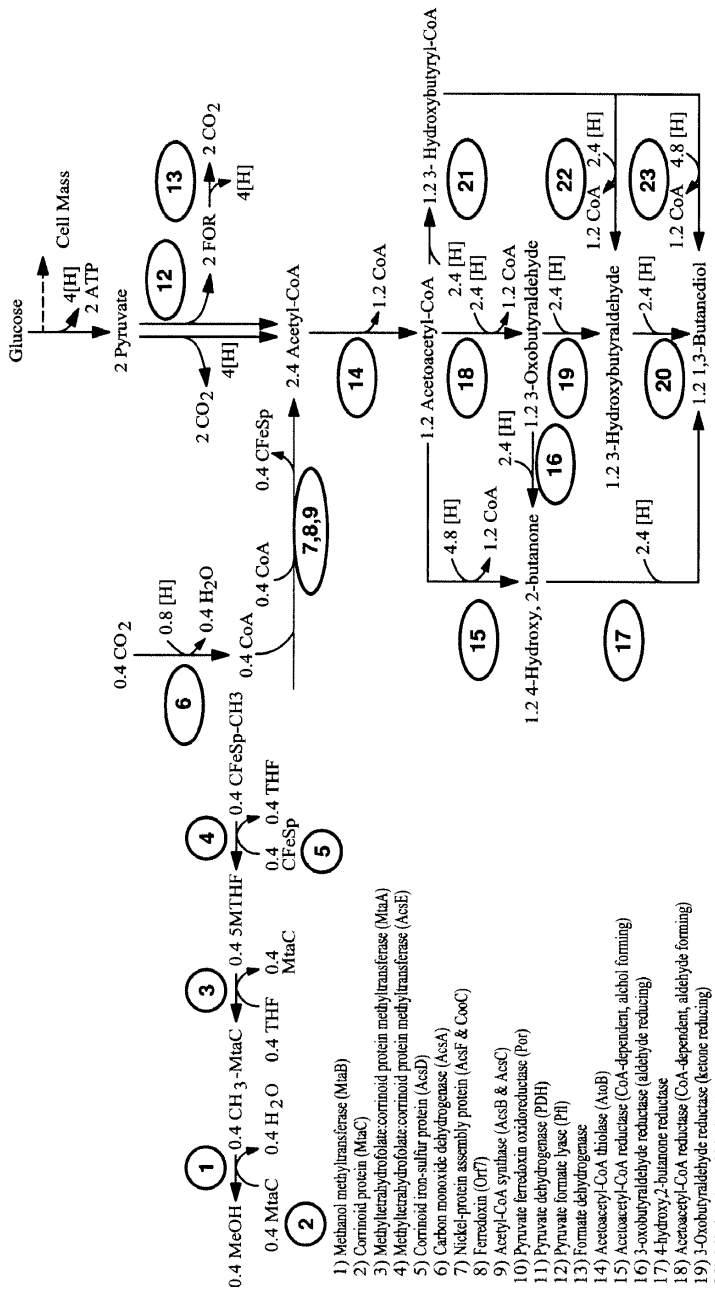
도면9



도면10


0.18 CO_2
1 Glucose
Cell Mass
0.36 [H]
4[H]
2 ATP
2 Pyruvate
0.18 FOR
0.18 10FTHF
0.18 METHF
0.18 MLTHF
0.18 5MTHF
0.36[H]
0.18 CFeSp
0.18 ATP
2 FOR
2 CO_2
4[H]
0.18 CO
0.18 H_2O
0.18 CoA
0.18 CFeSp
2.18 Acetyl-CoA
1.09 CoA
1.09 Acetoacetyl-CoA
1.09 3-Hydroxybutyryl-CoA
4.36 [H]
2.18 [H]
1.09 4-Hydroxy, 2-butanone
1.09 3-Oxobutyraldehyde
1.09 3-Hydroxybutyraldehyde
1.09 1,3-Butanediol
1.09 CoA 2,18 [H]
1.09 CoA 4.36 [H]
0.18 CFeSp-CH3
8,9,10
1) Formate dehydrogenase
2) Formyltetrahydrofolate synthetase
3) Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
4) Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
5) Methylenetetrahydrofolate reductase
6) Methyltetrahydrofolate:corrinoid protein methyltransferase (AcsE)
7) Corrinoid iron-sulfur protein (AcsD)
8) Nickel-protein assembly protein (AcsF & CooC)
9) Ferredoxin (OrfF)
10) Acetyl-CoA synthase (AcsB & AcsC)
11) Carbon monoxide dehydrogenase (AcsA)
12) Pyruvate formate lyase (Pfl)
13) Pyruvate ferredoxin oxidoreductase (Por) or pruvate dehydrogenase (PDH)
14) Acetoacetyl-CoA thiolase (AtoB)
15) Acetoacetyl-CoA reductase (CoA-dependent, alchol forming)
16) 3-Oxobutyraldehyde reductase (aldehyde reducing)
17) 4-Hydroxy,2-butanone reductase
18) Acetoacetyl-CoA reductase (CoA-dependent, aldehyde forming)
19) 3-Oxobutyraldehyde reductase (ketone reducing)
20) 3-Hydroxybutyraldehyde reductase
21) Acetoacetyl-CoA reductase (ketone reducing)
22) 3-Hydroxybutyryl-CoA reductase (aldehyde forming)
23) 3-Hydroxybutyryl-CoA reductase (alcohol forming)

도면11


Glucose
Cell Mass
4[H]
2 ATP
2 Pyruvate
2 FOR
2 CO_2
4[H]
2 CO_2
4[H]
2.4 Acetyl-CoA
0.4 CFeSp
0.4 CoA
0.4 CO_2
0.8 [H]
0.4 H_2O
0.4 CFeSp-CH3
0.4 THF
0.4 5MTHF
0.4 MtaC
0.4 CH_3-MtaC
0.4 THF
0.4 H_2O
0.4 MeOH
0.4 MtaC
0.4 CFeSp
1.2 CoA
1.2 Acetoacetyl-CoA
1.2 3- Hydroxybutyryl-CoA
4.8 [H]
1.2 CoA
2.4 [H]
2.4 [H]
1.2 CoA
1.2 4-Hydroxy, 2-butanone
1.2 3-Oxobutyraldehyde
2.4 [H]
1.2 3-Hydroxybutyraldehyde
1.2 CoA
2.4 [H]
1.2 CoA
4.8 [H]
2.4 [H]
1.2 1,3-Butanediol
1) Methanol methyltransferase (MtaB)
2) Corrinoid protein (MtaC)
3) Methyltetrahydrofolate:corrinoid protein methyltransferase (MtaA)
4) Methyltetrahydrofolate:corrinoid protein methyltransferase (AcsE)
5) Corrinoid iron-sulfur protein (AcsD)
6) Carbon monoxide dehydrogenase (AcsA)
7) Nickel-protein assembly protein (AcsF & CooC)
8) Ferredoxin (Orf7)
9) Acetyl-CoA synthase (AcsB & AcsC)
10) Pyruvate ferredoxin oxidoreductase (Por)
11) Pyruvate dehydrogenase (PDH)
12) Pyruvate formate lyase (Pfl)
13) Formate dehydrogenase
14) Acetoacetyl-CoA thiolase (AtoB)
15) Acetoacetyl-CoA reductase (CoA-dependent, alchol forming)
16) 3-oxobutyraldehyde reductase (aldehyde reducing)
17) 4-hydroxy,2-butanone reductase
18) Acetoacetyl-CoA reductase (CoA-dependent, aldehyde forming)
19) 3-Oxobutyraldehyde reductase (ketone reducing)
20) 3-Hydroxybutyraldehyde reductase
21) Acetoacetyl-CoA reductase (ketone reducing)
22) 3-Hydroxybutyryl-CoA reductase (aldehyde forming)
23) 3-Hydroxybutyryl-CoA reductase (alcohol forming)