(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0006103
(43) 공개일자 2019년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 5/02 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 5/026 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7001071(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년05월04일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-7037394
원출원일자(국제) 2011년05월04일
심사청구일자 2018년01월26일
(85) 번역문제출일자 2019년01월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/035105
(87) 국제공개번호 WO 2011/140171
국제공개일자 2011년11월10일
(30) 우선권주장
61/331,812 2010년05월05일 미국(US)

(71) 출원인
게노마티카 인코포레이티드
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 넥서스 센터 드라이브 4757
(72) 발명자
버크 마크 제이.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 써클 10520
버르가드 안소니 피.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 써클 10520
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

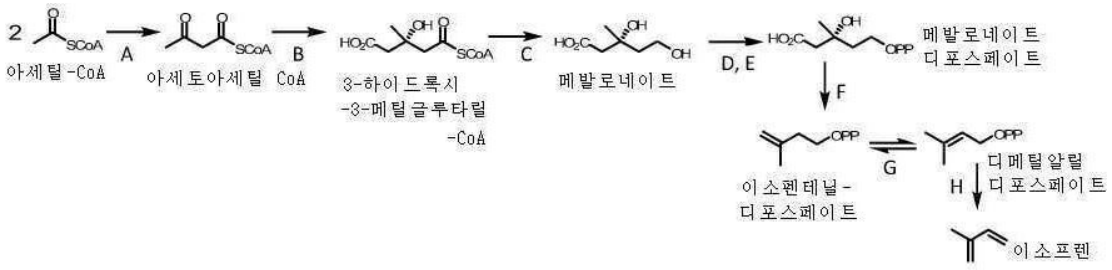
전체 청구항 수 : 총 59 항

(54) 발명의 명칭 **부타디엔을 생합성하기 위한 미생물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 부타디엔 경로를 구비한 비천연 미생물 유기체를 제공한다. 본 발명은 또한 부타디엔을 생산하기 위한 상기 유기체의 이용 방법을 제공한다.

대 표 도



(72) 발명자

순 준

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 써클 10520

오스터후트 로빈 이.

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 써클 10520

파르크야 프리티

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 써클 10520

명 세 서

청구범위

청구항 1

부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하는 비천연 미생물 유기체로서,

상기 부타디엔 경로는 부타디엔 신타제(butadiene synthase), 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제(acetyl-CoA:acetyl-CoA acyltransferase), 아세토아세틸-CoA 리덕타제(acetoacetyl-CoA reductase), 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제(3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase), 크로토닐-CoA 리덕타제(crotonyl-CoA reductase)(알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제(crotonaldehyde reductase)(알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제(crotyl alcohol kinase), 2-부테닐-4-포스페이트 키나제(2-butenyl-4-phosphate kinase), 크로토닐-CoA 하이드롤라제(crotonyl-CoA hydrolase), 신테타제(synthetase), 또는 트랜스퍼라제(transferase), 크로토네이트 리덕타제(crotonate reductase), 크로토닐-CoA 리덕타제(crotonyl-CoA reductase)(알코올 형성), 글루타코닐-CoA 데카르복실라제(glutaconyl-CoA decarboxylase), 글루타릴-CoA 데하이드로게나제(glutaryl-CoA dehydrogenase), 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제(3-aminobutyryl-CoA deaminase), 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제(4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase) 또는 크로틸 알코올 디포스포키나제(crotyl alcohol diphosphokinase)를 포함하는, 비천연 미생물 유기체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 부타디엔 경로 효소를 각각 코딩하는 2개의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 부타디엔 경로 효소를 각각 코딩하는 3개의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 부타디엔 경로 효소를 각각 코딩하는 4개의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 글루타코닐-CoA 데카르복실라제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타

디엔 신타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 글루타릴-CoA 데하이드로게나제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 26

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 27

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 28

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 29

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 30

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 31

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 32

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 33

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 34

제1항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 35

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

청구항 36

제1항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체가 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 37

부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하는 비천연 미생물 유기체로서,

상기 부타디엔 경로는 부타디엔 신타제(butadiene synthase), 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제(erythrose-4-phosphate reductase), 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제(erythritol-4-phospate

cytidylyltransferase), 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제(4-(cytidine 5'-diphospho)-erythritol kinase), 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제(erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase), 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제(1-hydroxy-2-butenyl 4-diphosphate synthase), 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제(1-hydroxy-2-butenyl 4-diphosphate reductase), 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제(butenyl 4-diphosphate isomerase), 에리트로스-4-포스페이트 키나제(erythrose-4-phosphate kinase), 에리트로스 리덕타제(erythrose reductase) 또는 에리트리톨 키나제(erythritol kinase)를 포함하는, 비천연 미생물 유기체.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 부타디엔 경로 효소를 각각 코딩하는 2개의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 39

제37항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 부타디엔 경로 효소를 각각 코딩하는 3개의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 40

제37항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 부타디엔 경로 효소를 각각 코딩하는 4개의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 41

제37항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제, 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 42

제37항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제, 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 43

제37항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부타디엔 신타제, 에리트로스-4-포스페이트 키나제, 에리트로스 리덕타제 및 에리트리톨 키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 44

제37항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 에리트로스-4-포스페이트 키나제, 에리트로스 리덕타제 및 에리트리톨 키나제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 45

제37항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산이 이종 핵산인 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 46

제37항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체가 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는

비천연 미생물 유기체.

청구항 47

부타디엔을 생산하기 위해 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하는, 비천연 미생물 유기체로서,

상기 부타디엔 경로는 부타디엔 신타제, 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성), 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (케톤 환원), 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (알데하이드 환원), 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타제 또는 3-옥소-글루타릴-CoA 리덕타제 (CoA 환원 및 알코올 형성)를 포함하는, 비천연 미생물 유기체.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 부타디엔 경로 효소를 각각 코딩하는 2개의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 49

제47항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 부타디엔 경로 효소를 각각 코딩하는 3개의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 50

제47항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 부타디엔 경로 효소를 각각 코딩하는 4개의 외인성 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 51

제47항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성), 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 52

제47항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (알데하이드 환원) 및 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 53

제47항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성) 및 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (케톤 환원)를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 54

제47항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3,5-디하이드록시펜타노에이

트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타제 및 3-옥소-글루타릴-CoA 리덕타제 (CoA 환원 및 알코올 형성)를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 55

제47항에 있어서, 상기 부타디엔 경로는 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성), 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제 및 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 56

제47항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산이 이종 핵산인 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 57

제47항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체가 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 비천연 미생물 유기체.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한항에 따른 비천연 미생물 유기체를 부타디엔을 생산하기 위한 조건과 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함하는 부타디엔의 생산 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 비천연 미생물 유기체가 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는 것을 특징으로 하는 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 생합성 공정, 보다 상세하게는 부타디엔 생합성 능력을 구비한 유기체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 연간 250억 파운드 이상의 부타디엔 (1,3-부타디엔, BD)이 생산되고 있으며, 합성 고무 및 ABS 수지 등의 폴리머와 헥사메틸렌디아민 및 1,4-부탄디올 등의 화합물의 제조에 활용되고 있다. 부타디엔은 전형적으로 나프타와 같은 석유 공급원료, 액화된 석유 가스, 에탄 또는 천연 가스를 에틸렌 및 기타 올레핀으로 변환하는 증기 분해 반응(steam cracking)에서 부산물로서 생성된다. 대체 공급원료 및/또는 재생가능한 공급원료로부터 부타디엔을 제조하는 역량은 보다 지속가능한 화학적 생산 공정을 탐색하는데 크게 유용할 것이다.

[0003] 부타디엔을 재생가능한 방식으로 생산할 수 있는 가능성있는 한가지 방법은, 당 또는 기타 공급원료를 발효하여 1,4-부타디올 또는 1,3-부타디올 등의 디올계 화합물을 생산한 다음, 이를 분리 및 정제한 후, 금속계 촉매를 사용하는 2차 단계에서 탈수 반응을 수행하여 부타디엔을 제조하는 공정을 포함한다. 재생가능한 공급원료로부터 부타디엔을 직접 발효에 의해 생산하는 방법은 탈수 단계가 필요없을 것이며, 부타디엔 가스 (bp -4.4℃)가 발효기에서 계속적으로 방출되어 이를 용이하게 응축하여 수집할 수 있을 것이다. 발효 생산 공정의 개발로 화석으로부터 부타디엔을 제조할 필요가 없어지며, 석유화학적으로 유래되는 부타디엔에 비해 비용, 에너지 및 유해 폐기물과 배기물을 상당히 절감할 수 있게 될 것이다.

[0004] 당밀, 사탕수수 쥬스 및 농업 폐기물과 목재 폐기물을 비롯한 바이오메스 소스 유래의 당과 같은 저렴한 재생가능한 공급원료 뿐만 아니라 합성가스와 이산화탄소와 같은 C1 공급원료로부터 부타디엔을 효율적으로 생산하기 위한 미생물 유기체와 방법들이 본원에 기술되어 있으며, 관련된 이점을 가진다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 포함하는 비천연성 미생물 유기체를 제공한다. 본 발명은, 또한, 본원에 기술된 부타디엔 경로를 포함하는 비천연성 미생물 유기체를 부타디엔을 생산하기 위한 조건 하에 충분한 시간 동안 배양함으로써, 상기한 미생물 유기체를 이용한 부타디엔의 생산 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0006] 도 1은 천연적인 이소프레노이드 및 테르펜 생산 경로를 나타낸 것이다. 지정된 기질을 산물로 변환시키기 위한 효소로는, A. 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, B. 하이드록시메틸글루타릴-CoA 신타제, C. 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), D. 메발로네이트 키나제, E. 포스포메발로네이트 키나제, F. 디포스포메발로네이트 데카르복실라제, G. 이소펜테닐-디포스페이트 이소머라제, H. 이소프렌 신타제를 포함한다.

도 2는 아세틸-CoA, 글루타코닐-CoA, 글루타릴-CoA, 3-아미노부티릴-CoA 또는 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 크로틸 알코올을 경유하여 부타디엔을 생산하기 위한 예시적인 경로를 도시한다. 지정된 기질을 산물로 변환시키기 위한 효소로는, A. 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, B. 아세토아세틸-CoA 리덕타제, C. 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, D. 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), E. 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), F. 크로틸 알코올 키나제, G. 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, H. 부타디엔 신타제, I. 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 트랜스퍼라제, J. 크로토네이트 리덕타제, K. 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성), L. 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, M., 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, N. 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, O. 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, P. 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함한다.

도 3은 에리트로스-4-포스페이트로부터 부타디엔을 생산하기 위한 예시적인 경로를 도시한다. 지정된 기질을 산물로 변환시키기 위한 효소로는, A. 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제, B. 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, C. 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, D. 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, E. 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, F. 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, G. 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, H. 부타디엔 신타제 I. 에리트로스-4-포스페이트 키나제, J. 에리트로스 리덕타제, K. 에리트리톨 키나제를 포함한다.

도 4는 말로닐-CoA + 아세틸-CoA로부터 부타디엔을 생산하기 위한 예시적인 경로를 도시한다. 지정된 기질을 산물로 변환시키기 위한 효소로는, A. 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, B. 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성), C. 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), D. 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제, E. 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, F. 3H5PP 키나제, G. 3H5PDP 데카르복실라제, H. 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, I. 부타디엔 신타제, J. 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), K. 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), L. 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (케톤 환원), M. 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (알데하이드 환원), N. 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타제, O. 3-옥소-글루타릴-CoA 리덕타제 (CoA 환원 및 알코올 형성)를 포함한다. 화합물 약자는 다음과 같다: 3H5PP = 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트, 및 3H5PDP = 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0007] 본 발명은 부타디엔 생합성 능력을 지닌 세포 및 유기체의 설계와 생산에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 도입함으로써 부타디엔을 생산할 수 있는 미생물 유기체를 설계하는 것에 관한 것이다.

[0008] 일 구현예에서, 본 발명은 부타디엔을 생합성하기 위한 대사적 설계를 확인하는 에스케리치아 콜라이(*E. coli*) 대사의 인 실리코(*in silico*) 화학량론적 모델을 이용한다. 본원에 기술된 결과들은, 대사 경로가 에스케리치아 콜라이 및 기타 세포 또는 유기체에서 부타디엔의 생합성이 달성되도록 설계 및 재조합적으로 조작될 수 있음을 보여준다. 예컨대, 인 실리코 설계에서, 생합성에 의한 부타디엔 생산은, 설계된 대사관련 유전자형을 가지는 균주를 구축함으로써, 검증할 수 있다. 또한, 대사적으로 조작된 세포 또는 유기체는, 이론적 최대 성장을 달성하는 조건 등의, 부타디엔 생합성을 더욱 증대시키기 위한 적응 진화(adaptive evolution)를 거칠 수 있다.

[0009] 특정 구현예에서, 설계된 균주의 부타디엔 생합성 특징들은 균주를 유전학적으로 안정하게 만들며, 계속적인 응용 생물학적 제조에 특히 유용하다. 에스케리치아 콜라이 또는 다른 숙주 유기체에 여러가지 비-천연 또는 이종적인 반응 능력을 병합하여, 아세틸-CoA, 글루타코닐-CoA, 글루타릴-CoA, 3-아미노부티릴-CoA, 4-하이드록시부티릴-CoA, 에리트로스-4-포스페이트 또는 말로닐-CoA + 아세틸-CoA로부터 부타디엔을 생산하는 대사 경로를 구축하는, 각각의 균주 설계 전략들이 확인되었다. 미생물에서 이들 기질 또는 대사 중간체 각각으로부터 부타디엔을 생합성하는 인 실리코 대사 설계가 확인되었다.

[0010] 플랫폼의 계산 요소(computational component)를 통해 동정된 균주들은 예상되는 대사적 변이들 중 임의의 변이를 유전학적으로 조작함으로써 실제 생산에 투입시킬 수 있으며, 부타디엔 또는 기타 중간체 및/또는 하위 산물의 생합성 생산을 유도할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 이들 화합물들을 생합성하는 균주는, 추가적으로 산물의 생합성을 증대시키기 위해 적응 진화를 추가로 수행할 수 있다. 또한, 적응 진화를 거친 후 산물의 생합성 수율 수준은 시스템의 계산 요소를 통해 예측할 수 있다.

[0011] 글리콜로부터의 부타디엔을 생산하는 이론적인 최대 수율은 1.09 mol/mol (0.33 g/g)이다:

[0012] $$11\ C_6H_{12}O_6 = 12\ C_4H_6 + 18\ CO_2 + 30\ H_2O$$

[0013] 도 2 및 4에 나타낸 경로에서는, 이용되는 글루코스 1 몰 당 부타디엔 1.0 몰의 수율이 달성된다. 세포가 환원성 (또는 역) TCA 사이클 또는 Wood-Ljungdahl 경로 등의 경로를 통해 CO_2를 고정할 수 있다면, 산물의 수율은 이론적 최대치가 된다. 또한, 도 3에 도시된 경로를 가지도록 조작된 유기체는 부타디엔의 거의 이론적 최대치에 도달할 수 있다.

[0014] 본원에서, 용어 "비천연(non-naturally occurring)"은, 본 발명의 미생물 유기체 또는 미생물에 대해 사용되는 경우, 언급된 종의 야생형 균주를 비롯하여, 언급된 종의 천연 균주에서는 통상적으로 발견되지 않는 하나 이상의 유전자 변형을 포함한다는 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 부타디엔 생합성 경로의 효소 또는 단백질을 포함한다.

[0015] 대사 변형은 이의 본래의 상태에서 변형된 생화학적 반응을 지칭한다. 따라서, 비천연 미생물은 대사 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 단편을 코딩하는 핵산에 대한 유전자 변형을 포함할 수 있다. 대사 변형의 예는 본원에 기술되어 있다.

[0016] 본원에서, 용어 "부타디엔"은 분자식 C_4H_6의 분자량이 54.09 g/mol (도 2-4) (IUPAC 명칭 부타-1,3-디엔)인 물질로서, 1,3-부타디엔, 비에틸렌, 에리트렌, 디비닐, 비닐에틸렌과 도처에서 호환적으로 사용된다. 부타디엔은 무색, 비부식성이며, 약한 방향성 또는 가솔린과 비슷한 냄새가 난다. 부타디엔은 발열점이 낮아 폭발성의 가연성 물질이다.

[0017] 본원에서, 용어 "분리된"은 미생물 유기체에 대해 사용되는 경우, 이는 언급된 미생물 유기체가 자연 상태에서 발견될 때의 성분들 중 하나 이상이 실질적으로 결여된 유기체를 의미한다. 이 용어는 자연 환경에서 발견될 때의 성분들 일부 또는 전체가 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 또한, 이 용어는 미생물 유기체가 비천연 환경에서 발견될 때의 성분들이 부분적으로 또는 전체가 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 즉, 분리된 미생물 유기체는 유기체가 자연에서 발견되거나 또는 비천연 환경에서 증식, 보관 또는 유지될 때의 기타 성분들로부터 일부 또는 완전히 분리된다. 분리된 미생물 유기체의 구체적인 예로는 부분적으로 순수한 미생물, 실질적으로 순수한 미생물 및 비천연성 배지에서 배양된 미생물을 포함한다.

[0018] 본원에서, 용어 "미생물(microbial)", "미생물 유기체" 또는 "미생물(microorganism)"은 고세균, 박테리아 또는 진핵생물류에 속하는 미시 세포로서 존재하는 모든 유기체를 의미한다. 즉, 이 용어는 미시적인 크기의 원핵 또는 진핵 세포 또는 유기체를 포괄하며, 모든 종의 박테리아, 고세균류 및 유박테리아(eubacteria) 뿐만 아니라 효모 및 진균과 같은 진핵 미생물을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 이 용어는 생화학적으로 생산하기 위해 배양할 수 있는 임의 종의 세포 배양물을 포함한다.

[0019] 본원에서, 용어 "CoA" 또는 "코엔자임 A"는, 활성 효소 시스템을 만들기 위해 다수 효소(주효소(apoenzyme))의 활성에 필요한 유기 조인자 또는 보결기(효소의 비단백질 영역)를 의미한다. 코엔자임 A는 특정 축합 효소에

작용하며, 아세틸 또는 기타 아실기를 전달시키는 작용을 하며, 지방산 합성 및 산화, 피루베이트 산화 및 기타 아세틸화에 관여한다.

[0020] 본원에서, 용어 "실질적으로 혐기성"은 배양 또는 생장 조건에 대해 사용되는 경우, 산소의 양이 액체 매질내 용해 산소 포화도의 약 10% 미만임을 의미한다. 또한, 이 용어는 약 1% 미만의 산소 분위기로 유지되는 액체 또는 고체 배지가 들어있는 밀폐된 챔버를 포괄하는 의미이다.

[0021] 본원에서 "외인성"은 언급된 분자 또는 활성이 숙주 미생물 유기체에 도입되는 것을 의미한다. 분자는, 예컨대, 플라스미드와 같은 숙주 염색체 또는 비-염색체성 유전 물질내로의 삽입에 의해서와 같이, 코딩 핵산을 숙주 유전 물질에 도입함으로써, 도입될 수 있다. 따라서, 이 용어는, 코딩 핵산의 발현에 대해 사용되는 바와 같이, 발현가능한 형태로 코딩 핵산을 미생물 유기체에 도입하는 것을 의미한다. 생합성 활성에 대해 사용되는 경우, 이 용어는 숙주 참조 유기체에 도입되는 활성에 대해서 사용된다. 그 소스는, 예컨대 숙주 미생물 유기체로 도입되어 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 유기체내에 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.

[0022] 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 분리된 플라스미드 형태로 도입될 수 있으며, 숙주 염색체에서 단일 부위 또는 복수의 부위에 통합될 수 있으며, 여전히 2개의 외인성 핵산으로 간주되는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 3개 이상의 외인성 핵산을, 숙주 유기체에 임의의 바람직한 조합으로, 예컨대 단일 플라스미드로, 각각의 개별 플라스미드로 도입할 수 있으며, 숙주 염색체에서 단일 위치 또는 복수 위치로 삽입할 수 있으며, 여전히 2 이상의 외인성 핵산, 예컨대 3개의 외인성 핵산으로 간주되는 것으로 이해된다. 따라서, 언급되는 외인성 핵산 또는 생합성 활성의 수는 숙주 유기체로 도입되는 개개 핵산의 수를 지칭하는 것이 아니라, 코딩 핵산의 수 또는 생합성 활성의 수를 지칭한다.

[0023] 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 안정적인 유전자 변형을 포함할 수 있는데, 이는 상기한 변형을 유지하면서 5 세대 이상 배양할 수 있는 미생물을 지칭한다. 일반적으로, 안정적인 유전자 변형은 10 세대 이상 유지되는 변형을 포함하며, 특히 안정적인 변형은 약 25 세대 이상 유지될 것이며, 보다 구체적으로는 안정적인 유전자 변형은 무한정을 비롯하여 50 세대 이상 유지될 것이다.

[0024] 당해 기술 분야의 당업자라면, 본원에 예시된 대사적 변이를 포함하여 유전자 변형이, 에스케리치아 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 에스케리치아 콜라이의 대사 변형은 언급된 종이 아닌 다른 종 유래의 동일 또는 유사 코딩 핵산을 병합함으로써, 다른 종에도 쉽게 적용할 수 있다. 이러한 유전자 변형으로는, 예컨대 일반적으로 종 상동체의 유전자 변형이 있으며, 구체적으로 오르소로그(ortholog), 파라로그(paralog) 또는 비-오르소로그형 유전자 치환(non-orthologous gene displacement)을 포함한다.

[0025] 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 경우, 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 경

우에도, 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.

[0026] 오르소로그는, 예를 들어, 진화를 통해 구조적으로 또는 전체 활성 측면에서 분화된 유전자, 또는 이로 코딩되는 유전자 산물을 포함한다. 예를 들어, 어떤 종이 2가지 기능을 나타내는 유전자 산물을 코딩하고 있으며 이 기능들이 제2의 종에서는 별개의 유전자로 분리되어 있는 경우, 이들 3종의 유전자와 이의 대응 산물들은 오르소로그로 간주된다. 생화학적 산물의 제조시, 당해 기술 분야의 당업자들은, 비천연 미생물을 구축하기 위해, 도입 또는 파괴할 대사 활성을 가지고 있는 오르소로그형 유전자를 선택해야 함을 알 것이다. 분리가능한 활성을 나타내는 오르소로그의 예는, 개개 활성이 2종 이상의 종들에서 또는 하나의 종에서 개별 유전자 산물로 분리되어 있는 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.

[0027] 이와는 반대로, 파라로그는 예를 들어 복제와 이후 진화적 분화 관계에 있는 상동체이며, 유사하거나 공통되지만, 기능이 동일하진 않은 것이다. 파라로그는, 예컨대, 동일 종 또는 다른 종으로부터 기원하거나 유래될 수 있다. 예를 들어, 마이크로솜 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 I)와 가용성 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 II)는, 이들이 별개의 반응을 촉매하고, 동일 종에서 다른 기능을 가지고 있는, 공통 조상으로부터 함께 진화된 2개 별개의 효소이기 때문에, 파라로그로 간주될 수 있다. 파라로그는 서로 유의한 서열 유사성을 보이는 동일한 종으로부터 유래된 단백질들이므로, 이들은 상동적이거나 또는 공통 조상으로부터 함께 진화된 관계임을 시사한다. 파라로그 패밀리 그룹으로는 HipA 상동체, 루시퍼라제 유전자, 펩티다제 등이 있다.

[0028] 비-오르소로그 유전자 치환(nonorthologous gene displacement)은 다른 종에서 언급된 유전자의 기능을 치환할 수 있는 어떤 종 유래의 비-오르소로그 유전자이다. 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 관련성이 낮지만 기능적으로는 유사한 유전자 및 이의 유전자 산물도 그럼에도 불구하고 여전히 본 발명에서 사용되는 용어의 의미에 포함될 것이다. 기능 유사성에는, 예를 들어 치환하고자 하는 기능을 코딩하는 유전자에 대해, 비-오르소로그 유전자 산물의 활성부 또는 결합부에서의 어느 정도 이상의 구조 유사성이 요구된다. 따라서, 비-오르소로그 유전자는 예를 들어 파라로그 또는 비관련 유전자를 포함한다.

[0029] 따라서, 부타디엔 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 이의 함유 또는 불활성화가 포함될 수 있음을 인지할 것이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 또한, 파라로그 및/또는 비-오르소로그 유전자 치환이, 유사하거나 또는 실질적으로 유사한 대사 반응을 촉매하는 효소를 코딩하는 참조된 미생물에 존재하는 한, 진화적으로 관련성 있는 유전자들을 사용할 수 있다.

[0030] 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 데이터

베이스 검색시 우연히 발생할 수 있는 수준과 기본적으로 동일한 동일성(약 5%)을 가질 수 있다. 5% 내지 24%의 서열이, 비교 서열들과 관련성 있다고 판단할 만큼 충분한 상동성을 보이거나 그렇지 않을 수 있다. 데이터세트의 크기를 제시하는 이러한 매칭 유의 수준을 결정하기 위한 추가적인 통계학적 분석을 수행하여, 이들 서열들의 관련성을 결정할 수 있다.

[0031] BLAST 알고리즘을 이용하여 2종 이상의 서열의 관계를 측정하기 위한 매개변수의 예는, 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.

[0032] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 부타디엔을 생산하기 위해 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 비롯한, 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 부타디엔 경로는 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 또는 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함한다 (도 2). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-C, K, F, G, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-C, K, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-C, I, J, E, F, G, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-C, I, J, E, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-E, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부

타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, D-H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, K, F, G, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, K, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, I, J, E, F, G, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, I, J, E, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 글루타코닐-CoA 데카르복실라제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, C, D, E, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, D-H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, K, F, G, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, K, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, I, J, E, F, G, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, I, J, E, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제

(알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 글루타릴-CoA 데하이드로게나제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, C, D, E, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, D-H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, K, F, G, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, K, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, I, J, E, F, G, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, I, J, E, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, C, D, E, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 O, D-H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 O, K, F, G, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 O, K, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 O, I, J, E, F, G, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2,

단계 O, I, J, E, P, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, C, D, E, P, H).

[0033] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 부타디엔을 생산하기 위해 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 비롯한, 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 부타디엔 경로는 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제, 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 에리트로스-4-포스페이트 키나제, 에리트로스 리덕타제 또는 에리트리톨 키나제를 포함한다 (도 3). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제, 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 3, 단계 A-F, 및 H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제, 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 3, 단계 A-H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부타디엔 신타제, 에리트로스-4-포스페이트 키나제, 에리트로스 리덕타제 및 에리트리톨 키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 3, 단계 I, J, K, B-F, H). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 에리트로스-4-포스페이트 키나제, 에리트로스 리덕타제 및 에리트리톨 키나제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 3, 단계 I, J, K, B-H).

[0034] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 부타디엔을 생산하기 위해 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 비롯한, 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 부타디엔 경로는 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성), 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (케톤 환원), 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (알데하이드 환원), 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타제 또는 3-옥소-글루타릴-CoA 리덕타제 (CoA 환원 및 알코올 형성)를 포함한다 (도 4). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성), 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드

록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 4, 단계 A-I). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (알데하이드 환원) 및 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 4, 단계 A, K, M, N, E, F, G, H, I). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성) 및 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (케톤 환원)를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 4, 단계 A, K, L, D, E, F, G, H, I). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타제 및 3-옥소-글루타릴-CoA 리덕타제 (CoA 환원 및 알코올 형성)를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 4, 단계 A, O, N, E, F, G, H, I). 일 측면에서, 상기 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체로서, 상기 부타디엔 경로가 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성), 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제 및 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 것인, 미생물 유기체를 포함한다 (도 4, 단계 A, B, J, E, F, G, H, I).

[0035] 부가적인 구현예에서, 본 발명은 부타디엔 경로를 구비한 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기서 상기 비천연 미생물 유기체는 아세틸-CoA → 아세토아세틸-CoA, 아세토아세틸-CoA → 3-하이드록시부티릴-CoA, 3-하이드록시부티릴-CoA → 크로토닐-CoA, 크로토닐-CoA → 크로톤알데하이드, 크로톤알데하이드 → 크로틸 알코올, 크로틸 알코올 → 2-베테닐-포스페이트, 2-베테닐-포스페이트 → 2-부테닐-4-디포스페이트, 2-부테닐-4-디포스페이트 → 부타디엔, 에리트로스-4-포스페이트 → 에리트리톨-4-포스페이트, 에리트리톨-4-포스페이트 → 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 → 2-포스포-4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨, 2-포스포-4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 → 에리트리톨-2,4-사이클로디포스페이트, 에리트리톨-2,4-사이클로디포스페이트 → 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 → 부테닐 4-디포스페이트, 부테닐 4-디포스페이트 → 2-부테닐 4-디포스페이트, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 → 2-부테닐 4-디포스페이트, 2-부테닐 4-디포스페이트 → 부타디엔, 말로닐-CoA 및 아세틸-CoA → 3-옥소글루타릴-CoA, 3-옥소글루타릴-CoA → 3-하이드록시글루타릴-CoA → 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트, 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 → 3,5-디하이드록시 펜타노에이트, 3,5-디하이드록시 펜타노에이트 → 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 → 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 → 부테닐 4-비포스페이트, 글루타코닐-CoA → 크로토닐-CoA, 글루타릴-CoA → 크로토닐-CoA, 3-아미노부티릴-CoA → 크로토닐-CoA, 4-하이드록시부티릴-CoA → 크로토닐-CoA, 크로토닐-CoA → 크로토네이트, 크로토네이트 → 크로톤알데하이드, 크로토닐-CoA → 크로틸 알코올, 크로틸 알코올 → 2-부테닐-4-디포스페이트, 에리트로스-4-포스페이트 → 에리트로스, 에리트로스 → 에리트리톨, 에리트리톨 → 에리트리톨-4-포스페이트, 3-옥소글루타릴-CoA → 3,5-디옥소펜타노에이트, 3,5-디옥소펜타노에이트 → 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트, 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 → 3,5-디하이드록시펜타노에이트, 3-옥소글루타릴-CoA → 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트, 3,5-디옥소펜타노에이트 → 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 및 3-하이드록시글루타릴-CoA →

3,5-디하이드록시펜타노에이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 기질 → 산물로 변환시키는, 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함한다. 당해 기술 분야의 당업자는, 이는 예에 불과하며, 바람직한 산물을 생산하는데 적합하며 적정 활성을 기질을 산물로 변환하는데 이용가능한, 본원에 기술된 기질-산물의 임의 쌍을, 본원에 기술된 내용을 기초로 당해 기술 분야의 당업자라면 쉽게 결정할 수 있을 것으로 이해될 것이다. 즉, 본 발명은, 효소 또는 단백질이 도 2-4에 나타낸 바와 같이, 기질을 부타디엔 경로의 산물을 변환시키는, 상기 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비천연 미생물 유기체를 제공한다.

[0036] 본원에 일반적으로 부타디엔 경로를 포함하는 미생물 유기체로서 기술되지만, 본 발명은, 부가적으로, 부타디엔 경로의 중간 산물을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는, 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 비천연 미생물 유기체를 제공하는 것으로 이해된다. 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 부타디엔 경로는 도 2-4에 예시된다. 따라서, 부타디엔을 생산하는 부타디엔 경로를 포함하는 미생물 유기체와 더불어, 본 발명은 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 미생물 유기체는 부타디엔 경로의 중간 산물, 예컨대, 아세토아세틸-CoA, 3-하이드록시부티릴-CoA, 크로토닐-CoA, 크로톤알데하이드, 크로틸 알코올, 2-베테닐-포스페이트, 2-부테닐-4-디포스페이트, 에리트리톨-4-포스페이트, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨, 2-포스포-4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨, 에리트리톨-2,4-사이클로디포스페이트, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트, 부테닐 4-디포스페이트, 2-부테닐 4-디포스페이트, 3-옥소글루타릴-CoA, 3-하이드록시글루타릴-CoA, 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트, 3,5-디하이드록시 펜타노에이트, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시펜타노에이트, 크로토네이트, 에리트로스, 에리트리톨, 3,5-디옥소펜타노에이트 또는 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트를 생산한다.

[0037] 실시예에 기술되고, 도 2-4의 경로 등의 도에서 예시된 바와 같이, 본원에 기술된 임의의 경로를 활용하여, 원하는 임의의 경로 중간 산물 또는 산물을 생산하는 비천연 미생물 유기체를 제조할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 중간 산물을 생산하는 상기한 미생물 유기체는 원하는 산물을 생산하기 위해 하류 경로 효소를 발현하는 다른 미생물 유기체와 조합하여 사용할 수 있다. 그러나, 부타디엔 경로 중간 산물을 생산하는 비천연 미생물 유기체를 이용하여, 원하는 산물로서 상기 중간 산물을 생산할 수 있는 것으로 이해된다.

[0038] 본 발명은, 대사 반응, 반응체 또는 그 산물에 대한 일반적인 참조로, 또는 언급된 대사 반응, 반응체 또는 산물과 연관된 효소, 촉매하는 효소, 또는 연관된 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 또는 유전자에 대한 구체적인 참조로 기술된다. 본원에 명확하게 언급되어 있지 않은 한, 당해 기술 분야의 당업자는 반응에 대한 언급이 반응체 및 반응의 산물에 대한 언급으로 구성됨을 이해할 것이다. 마찬가지로, 본원에서 명확하게 언급되지 않은 한, 반응체 또는 산물에 대한 언급은 또한 반응을 지칭하며, 이들 대사적 구성 요소들 중 임의의 것에 대한 언급 역시 언급된 반응, 반응체 또는 산물을 촉매하는 효소 또는 관여하는 단백질을 코딩하는 유전자 또는 유전자들을 지칭한다. 이와 같이, 잘 알려진 대사적 생화학, 효소학 및 게놈학 분야에서 본다면, 유전자 또는 코딩 핵산에 대한 본원의 언급은 대응되는 코딩된 효소와 이를 촉매하는 반응 또는 반응과 관련된 단백질 뿐만 아니라 반응의 반응체 및 산물에 대한 언급을 포함한다.

[0039] 본원에 기술된 바와 같이, 중간체 글리세레이트; 3,5-디옥소펜타노에이트, 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트, 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트, 3-옥소글루타릴-CoA 및 3-하이드록시글루타릴-CoA, 뿐만 아니라 기타 중간체, 즉 카르복시산은, 완전히 양성자화된 형태, 부분 양성자화된 형태 및 완전히 탈양성자화된 형태 등의 다양한 이온화된 형태로 생길 수 있다. 이에, 접미사 "-에이트" 또는 산 형태는 호환적으로 사용되며, 이온화된 형태는 화합물이 발견되는 pH에 따라 결정되는 것으로 알려져 있어, 유리 산 형태와 특히 임의의 탈양성자화된 형태 둘다를 나타낼 수 있다. 카르복실레이트 산물 또는 중간체는 O-카르복실레이트 및 S-카르복실레이트 에스테르와 같은 카르복실레이트 산물의 에스테르 형태 또는 경로 중간체를 포함하는 것으로 이해된다. O-카르복실레이트 및 S-카르복실레이트는, C1 - C6의 분지쇄 또는 직쇄 카르복실레이트인 저급 알킬을 포함할 수 있다. 이러한 O-카르복실레이트 또는 S-카르복실레이트의 일부로는, 비제한적으로, 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, i-프로필, sec-부틸 및 tert-부틸, 펜틸, 헥실 O- 또는 S-카르복실레이트를 포함하며, 이들 모두 추가로 불포화될 수 있으며, 예로, 프로페닐, 부테닐, 펜틸 및 헥세닐 O- 또는 S-카르복실레이트를 포함한다. O-카르복실레이트는 생합성 경로의 산물일 수 있다. 생합성 경로를 통해 입수되는 O-카르복실레이트로는, 비제한적인 예로, 메틸 크로타네이트; 메틸-3,5-디옥소펜타노에이트; 메틸-5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트; 메틸-3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트; 3-옥소글루타릴-CoA, 메틸 에스테르; 3-하이드록시글루타릴-CoA, 메틸 에스테르; 에틸 크로타네이트; 에틸-3,5-디옥소펜타노에이트; 에틸-5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트; 에틸-3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트; 3-옥소글루타릴-CoA, 에틸 에스테르; 3-하이드록시글루타릴-CoA, 에틸 에스테르; n-프로필

크로타네이트; n-프로필-3,5-디옥소펜타노에이트; n-프로필-5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트; n-프로필-3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트; 3-옥소글루타릴-CoA, n-프로필 에스테르; 및 3-하이드록시글루타릴-CoA, n-프로필 에스테르를 포함할 수 있다. 그외 생합성에 의해 입수가능한 O-카르복실레이트로는, C7-C22인 중쇄 - 장쇄기, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실, 라우릴, 트리데실, 미리스틸, 펜타데실, 세틸, 팔미톨릴, 헵타데실, 스테아릴, 노나데실, 아라키딜, 헤네이코실 및 베헤닐 알코올과 같은 지방 알코올로부터 유래된 O-카르복실레이트 에스테르를 포함할 수 있으며, 이들 중 임의의 것은 선택적으로 분지화되거나 및/또는 불포화를 포함할 수 있다. O-카르복실레이트 에스테르는, 또한, 유리 카르복시산 산물의 에스테르화 또는 O- 또는 S-카르복실레이트의 트랜스에스테르화 등의, 생화학적 과정 또는 화학적 과정을 통해 입수할 수 있다. S-카르복실레이트는 CoA S-에스테르, 시스테이닐 S-에스테르, 알킬티오에스테르 및 다양한 아릴 및 헤테로아릴 티오에스테르로 예시된다.

[0040] 본 발명의 비천연 미생물 유기체는, 하나 이상의 부타디엔 생합성 경로에 참여하는 하나 이상의 효소 또는 단백질을 코딩하는 발현가능한 핵산을 도입함으로써, 제조할 수 있다. 생합성용으로 선택된 숙주 미생물 유기체에 따라, 특정 부타디엔 생합성 경로의 일부 또는 전부를 위한 핵산들을 발현시킬 수 있다. 예를 들어, 선택한 숙주에 원하는 생합성 경로에 대한 하나 이상의 효소 또는 단백질이 결핍된 경우, 결핍된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대한 발현가능한 핵산을 이후 외인성 발현을 위해 숙주에 도입한다. 다른 예로서, 선택한 숙주가 일부 경로 유전자들을 내인성 발현하지만 다른 유전자들은 결핍된 경우, 부타디엔 생합성을 달성하기 위해서는 결핍된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대한 코딩 핵산이 필요하다. 따라서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 원하는 생합성 경로를 획득하기 위해 외인성 효소 또는 단백질 활성을 도입함으로써 제조하거나, 또는 원하는 생합성 경로는, 하나 이상의 내인성 효소 또는 단백질과 함께, 부타디엔과 같은 원하는 산물을 생산하는, 하나 이상의 외인성 효소 또는 단백질 활성을 도입함으로써, 획득할 수 있다.

[0041] 숙주 미생물 유기체는, 예컨대 박테리아, 효모, 진균 또는 발효 공정이 적용가능한 기타 다양한 미생물들 중 임의의 미생물로부터 선택할 수 있으며, 비천연 미생물 유기체는 이들로부터 제조될 수 있다. 예시적인 박테리아로는, 에스케리치아 콜라이, 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 안에어로비오스피릴룸 숙시니시프로두센스(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 액티노바실러스 숙시노게네스(*Actinobacillus succinogenes*), 만하이미아 숙시니시프로두센스(*Mannheimia succiniciproducens*), 리조븀 에틀리(*Rhizobium etli*), 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*), 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*), 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*), 스트렙토마이세스 코엘리콜러(*Streptomyces coelicolor*), 클로스트리듐 아세토부틸리컴(*Clostridium acetobutylicum*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) 및 슈도모나스 푸티타(*Pseudomonas putida*)로부터 선택되는 종을 포함한다. 효모 또는 진균의 예로는, 사카로마이세스 세레비지애, 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*) 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*), 피키아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 리조푸스 아리주스(*Rhizopus arrhizus*), 리조부스 오리제(*Rhizobus oryzae*), 야오이와 리폴리티카(*Yarrowia li폴리tica*) 등으로부터 선택되는 종을 포함한다. 에스케리치아 콜라이는 유전자 조작에 적합한 잘 특정화된 미생물이기 때문에, 특히 유용한 숙주 미생물이다. 그외 특히 유용한 숙주 유기체는 사카로마이세스 세레비지애와 같은 효모이다. 임의의 적합한 미생물 숙주 유기체를 사용하여, 원하는 산물을 생산하도록 대사성 및/또는 유전자 변형을 도입할 수 있다는 것으로 이해된다.

[0042] 선택된 숙주 미생물 유기체의 부타디엔 생합성 경로의 구성 요소들에 따라, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는, 하나 이상의 외인성으로 발현되는 부타디엔 경로를 코딩하는 핵산, 최대로는 하나 이상의 부타디엔 생합성 경로를 코딩하는 모든 핵산을 포함할 것이다. 예컨대, 부타디엔 생합성은, 대응되는 코딩 핵산의 외인성 발현을 통해 경로 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에서 확립할 수 있다. 부타디엔 경로의 효소 또는 단백질들이 모두 결핍된 숙주인 경우, 상기 경로의 모든 효소 또는 단백질의 외인성 발현을 포함할 수 있지만, 경로의 모든 효소 또는 단백질은 숙주가 하나 이상의 경로 효소 또는 단백질을 포함하더라도 발현시킬 수 있는 것으로 이해된다. 예컨대, 부타디엔을 생산하는 경로의 모든 효소 또는 단백질, 예를 들면, 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제의, 외인성 발현도 포함될 수 있다 (도 2, 단계 A-H).

[0043] 본원에 제공되는 교시 및 지침 하에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 발현가능한 형태로 도입되는 코딩 핵산의

수가, 적어도, 선택된 숙주 미생물 유기체의 부타디엔 경로 결함성에 대응됨을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는, 본원에 기술된 부타디엔 생합성 경로를 구성하는 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10종, 최대 모든 핵산을 구비할 수 있다. 일부 구현예에서, 또한, 비천연 미생물 유기체는 부타디엔 생합성을 촉진시키거나 최적화하는, 또는 숙주 미생물 유기체에 다른 유용한 기능을 부여하는, 다른 유전적 변형을 포함할 수도 있다. 이러한 다른 기능성으로, 예컨대, 부타디엔 경로의 하나 이상의 전구체, 예컨대아세틸-CoA, 글루타코닐-CoA, 글루타릴-CoA, 3-아미노부티릴-CoA, 4-하이드록시부티릴-CoA, 에리트로스-4-포스페이트 또는 말로닐-CoA의 합성 증대를 포함할 수 있다.

[0044] 일반적으로, 숙주 미생물 유기체는, 부타디엔 경로의 전구체를, 자연적으로 생산되는 분자로서 또는 숙주 미생물 유기체에 의해 자연적으로 생산되는 전구체의 생산 증가 또는 원하는 전구체의 데 노보 생산을 제공하는 조작된 산물로서 생산하도록, 선택된다. 예를 들어, 아세틸-CoA, 글루타코닐-CoA, 글루타릴-CoA, 3-아미노부티릴-CoA, 4-하이드록시부티릴-CoA, 에리트로스-4-포스페이트 또는 말로닐-CoA는 에스케리치아 콜라이와 같은 숙주 유기체에서 천연적으로 생산된다. 숙주 유기체는, 본원에 기술된 바와 같이, 전구체의 생산을 증가시키도록 조작될 수 있다. 또한, 원하는 전구체를 생산하도록 조작된 미생물 유기체를 숙주 유기체로 사용할 수 있으며, 또한 부타디엔 경로의 효소 또는 단백질을 발현하도록 추가로 조작될 수 있다.

[0045] 일부 구현예에서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 합성하기 위한 효소적 역량을 포함하는 숙주로부터 제조된다. 이러한 구체적인 구현예에서, 이 유기체는, 예컨대 부타디엔을 생산하는 방향으로 부타디엔 경로 반응을 진행시키도록, 부타디엔 경로 산물의 합성 또는 축적을 높이는데 사용가능할 수 있다. 합성 또는 축적의 증가는, 예컨대, 전술한 부타디엔 경로의 효소 또는 단백질들 중 하나 이상을 코딩하는 핵산의 과다발현에 의해 달성될 수 있다. 부타디엔 경로의 효소 또는 효소들 및/또는 단백질 또는 단백질들의 과다 발현은, 예컨대 내인성 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 또는 이종의 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 이루어질 수 있다. 따라서, 천연 유기체는, 부타디엔 생합성 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10종, 즉 최대 모든 수의 핵산의 과다 발현을 통해, 예컨대 부타디엔을 생산하는 비천연 미생물 유기체로, 쉽게 제조할 수 있다. 또한, 비천연 유기체는, 부타디엔 생합성 경로에서 효소의 활성을 증가시키게 되는, 내인성 유전자의 돌연변이 유발에 의해, 제조할 수 있다.

[0046] 특히 유용한 구현예에서, 상기 코딩 핵산의 외인성 발현을 이용한다. 외인성 발현은 숙주 및 용도에 맞게, 사용자에 의해 조절되는 바람직한 발현 수준을 달성하도록 발현 및/또는 조절 인자를 맞춤식으로 조절하는 능력을 부여한다. 그러나, 또한, 내인성 발현은, 다른 구현예에서, 유도성 프로모터나 다른 조절 인자에 연결되었을 때, 부정적인 조절 작동자의 제거 또는 유전자의 프로모터 도입 등과 같이, 이용할 수 있다. 따라서, 천연적인 유도성 프로모터를 가진 내인성 유전자는, 적정 유도제를 제공함으로써, 상향-조절시킬 수 있거나, 또는 내인성 유전자의 조절 부위를 유도성 조절 인자가 병합되도록 조작하여, 원하는 시기에 내인성 유전자의 발현 증가를 조절할 수 있다. 마찬가지로, 유도성 프로모터를 비천연 미생물 유기체에 도입되는 외인성 유전자에 대한 조절 요소로서 포함시킬 수 있다.

[0047] 본 발명의 방법에서, 하나 이상의 외인성 핵산들 중 임의의 핵산을 미생물 유기체에 도입하여 본 발명의 비천연 미생물 유기체를 제조할 수 있는 것으로 이해된다. 핵산을, 미생물 유기체에, 예컨대 부타디엔 생합성 경로를 부여하도록 도입시킬 수 있다. 다른 예로서, 코딩 핵산을 도입하여, 부타디엔 생합성 능력을 부여하는데 필요한 반응들 중 일부를 촉매하는 생합성 능력을 가진 중간 미생물 유기체를 제조할 수 있다. 예컨대, 부타디엔 생합성 경로를 구비한 비천연 미생물 유기체는, 바람직한 효소 또는 단백질을 코딩하는 2 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 크로틸 알코올 키나제와 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제와 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제와 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제와 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 크로토닐-CoA 하이드롤라제와 크로틸 알코올 디포스포키나제, 또는 다른 예로서 에리트로스 리덕타제와 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 3-옥소-글루타릴-CoA 리덕타제 (CoA 환원 및 알코올 형성)와 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제의 조합 등을 포함할 수 있다. 따라서, 생합성 경로의 2 이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합이 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함될 수 있는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 생합성 경로의 3개 이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합이, 원하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 원하는 산물의 생산으로 귀결되는 한, 예컨대, 필요에 따라, 크로틸 알코올 키나제 + 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 + 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제 + 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제 + 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 + 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제 + 부타디엔 신타

제, 또는 다른 예로서 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제 + 크로틸 알코올 키나제 + 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 글루타코닐-CoA 데카르복실라제 + 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) + 크로틸 알코올 디포스포키나제, 또는 다른 예로서 에리트로스-4-포스페이트 키나제 + 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제 + 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 또는 다른 예로서 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (알데하이드 환원) + 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 + 부타디엔 신타제 등의 조합이, 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함될 수 있는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 임의의 4개로 구성된 조합, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성) + 크로틸 알코올 키나제 + 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 + 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제 + 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제 + 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 + 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제 + 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 키나제 + 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 + 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제 + 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제 + 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제 + 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제 + 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) + 크로틸 알코올 디포스포키나제 + 부타디엔 신타제, 또는 다른 예로서 에리트로스 리덕타제 + 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제 + 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제 + 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 또는 다른 예로서 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제 + 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성) + 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 + 부타디엔 신타제, 또는 본원에 기술된 생합성 경로의 더 많은 수의 효소 또는 단백질들이, 원하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 원하는 산물의 생산으로 귀결되는 한, 필요에 따라, 본 발명의 비천연 미생물 유기체에 포함될 수 있다.

[0048] 본원에 기술된 부타디엔의 생합성 외에도, 본 발명의 비천연 미생물 유기체 및 방법은, 또한, 다른 경로에 의해 산물의 생합성을 달성하기 위해, 서로간의 다양한 조합으로, 그리고 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 다른 미생물 유기체 및 방법들과의 다양한 조합으로 이용할 수 있다. 예를 들어, 부타디엔 생산체를 이용하는 것 이외의 부타디엔을 생산하는 다른 방법은, 부타디엔 경로 중간 산물을 부타디엔로 변환시킬 수 있는 다른 미생물 유기체를 추가하는 것이다. 이러한 방법으로는, 예컨대 부타디엔 경로 중간 산물을 생산하는 미생물 유기체의 발효를 포함한다. 부타디엔 경로의 중간 산물은 그런 후 부타디엔 경로의 중간 산물을 부타디엔로 변환하는 2번째 미생물에 대한 기질로서 사용할 수 있다. 부타디엔 경로의 중간 산물은, 제2 유기체의 다른 배양물에 직접 첨가할 수 있거나, 또는 부타디엔 경로 중간 산물 생산체의 오리지날 배양물을 예컨대 세포 분리에 의해 이들 미생물 유기체를 고갈시킨 다음, 발효 브로스에 제2 유기체를 첨가하여, 중간 정제 단계 없이 최종 산물을 생산할 수 있다.

[0049] 다른 구현예에서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체 및 방법은, 예컨대, 부타디엔의 생합성을 달성하기 위해, 매우 다양한 서브경로로 조합될 수 있다. 이들 구현예에서, 본 발명의 바람직한 산물의 생합성 경로를 여러가지 미생물 유기체들로 분산시키고, 이 여러가지 미생물 유기체를 공-배양하여 최종 산물을 생산할 수 있다. 이러한 생합성 공정에서, 한가지 미생물 유기체의 산물은 최종 산물이 합성될 때 까지 2번째 유기체의 기질이다. 예컨대, 부타디엔의 생합성은, 하나의 경로의 중간 산물을 다른 경로의 중간 산물 또는 산물로의 변환시키기 위한 생합성 경로를 구비한 미생물 유기체를 구축함으로써 달성할 수 있다. 다른 예로서, 부타디엔은, 또한, 동일 용기에서 2가지 유기체, 부타디엔 중간 산물을 생산하는 1번째 미생물 유기체와 상기 중간 산물을 부타디엔로 변환시키는 2번째 미생물 유기체를 이용하여 공-배양 또는 공-발효시킴으로써, 미생물 유기체로부터 생합성 방법으로 생산할 수 있다.

[0050] 본원에 제시된 교시 및 지침을 감안하여, 당해 기술 분야의 당업자라면, 다른 미생물 유기체, 서브경로를 구비한 다른 비천연 미생물 유기체들의 공-배양, 및 부타디엔을 생산하기 위한 당해 기술 분야에 잘 공지된 다른 화학 공정 및/또는 생화학 공정의 조합과 더불어, 본 발명의 비천연 미생물 유기체 및 방법에 대해, 매우 다양한 조합 및 변경이 존재함을 이해할 것이다.

[0051] 부타디엔 경로 효소 또는 단백질의 코딩 핵산의 소스는, 예컨대, 상기 코딩된 유전자 산물이 언급된 반응을 촉매할 수 있는 임의의 종을 포함할 수 있다. 이러한 종으로는, 비제한적으로, 고세균 및 유박테리아를 비롯한 박테리아, 및 효모, 식물, 곤충, 동물 및 인간을 포함한 포유류를 비롯한 진핵생물 등의, 원핵 생물 및 진핵 생물 둘다를 포함하나, 이로 한정되지 않는다. 이러한 소스의 예시적인 종으로는, 예컨대, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 액시드아미노코커스 퍼멘탄스(*Acid아미노coccus fermentans*), 액시네토박터 베일리이(*Acinetobacter baylyi*), 액시네토박터 칼코아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*), 액시네토박터 sp. *ADP1*, 액시네토박터 *sp. Strain M-1*, 아퀴펙스 에어올리쿠스(*Aquifex aeolicus*), 아라비돕시스 탈리아나

(*Arabidopsis thaliana*), 아라비돕시스 탈리아나 콜(*Arabidopsis thaliana col*), 아르카에오글로부스 풀기두스(*Archaeoglobus fulgidus*) *DSM 4304*, 아조아르쿠스(*Azoarcus*) *sp. CIB*, 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 보스 타우루스(*Bos Taurus*), 브루셀라 멜리텐시스(*Brucella melitensis*), 버크홀데리아 앰비파리아(*Burkholderia ambifaria*) *AMMD*, 버크홀데리아 피마툼(*Burkholderia phymatum*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 마그놀리애(*Candida magnoliae*), 클로로플렉수스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*), 시트로박터 융가이(*Citrobacter younge*) *ATCC 29220*, 클로스트리듐 아세토부틸리컴(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리듐 아미노부티리컴(*클로스트리듐 아미노부티리컴*), 클로스트리듐 베이예린키(*Clostridium beijerinckii*), 클로스트리듐 베이예린키 *NCIMB 8052*, 클로스트리듐 베이예린키 *NRRL B593*, 클로스트리듐 보툴리눔 0 str. Eklund(*Clostridium botulinum C str. Eklund*, 클로스트리듐 클루이베리(*Clostridium kluyveri*), 클로스트리듐 클루이베리 *DSM 555*, 클로스트리듐 노비이(*Clostridium novyi*) *NT*, 클로스트리듐 프로피오니컴(*Clostridium propionicum*), 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*), 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) *ATCC 13032*, 쿠프리아비두스 타이와넨시스(*Cupriavidus taiwanensis*), 시아노비움(*Cyanobium*) *PCC7001*, 딕티오스텔리움 디스코이데움(*Dictyostelium discoideum*) *AX4*, 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 에리트로박터 sp.(*Erythrobacter sp.*) *NAP1*, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) *K12*, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) *str. K-12 substr. MG1655*, 유박테리움 렉탈(*Eubacterium rectale*) *ATCC 3365*, 퓨조박테리움 누클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 퓨조박테리움 뉴클레아툼 subsp. 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*) *ATCC 25586*, 지오바실러스 서모글루코시다시우스(*Geobacillus thermoglucosidasius*), 헤마토코커스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*), 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 할로아르쿨라 마리스모라투이(*Haloarcula marismortui*) *ATCC 43049*, 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), 호모 사피엔스(*Homo sapiens*), 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 루코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 마린 감마 프로테오박테리움(*marine gamma proteobacterium*) *HTCC2080*, 메탈로스페라 세둘라(*Metallosphaera sedula*), 메타노칼도코커스 야나스키이(*Methanocaldococcus jannaschii*), 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*), 미코박테리움 아비움 subsp. 파라투베르쿨로시스 k-10(*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis K-10*), 미코박테리움 보비스 BCG(*Mycobacterium bovis BCG*), 미코박테리움 마리눔 M(*Mycobacterium marinum M*), 미코박테리움 스메그마티스 MC2 155(*Mycobacterium smegmatis MC2 155*), 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 미코플라스마 뉴모니애 *M129*(*Mycoplasma pneumoniae M129*), 노카르디아 파르시니카 IFM 10152(*Nocardia farcinica IFM 10152*), 노카르디아 아이오웬시스(*Nocardia iowensis*) *(sp. NRRL 5646)*, 오릭톨라구스 쿠니쿨루스(*Oryctolagus cuniculus*), 파라코커스 데니트리피칸스(*Paracoccus denitrificans)*, 페니실리움 크리소게눔(*Penicillium chrysogenum*), 포풀루스 알바(*Populus alba*), 포풀루스 트레물라 x 포풀루스 알바(*Populus tremula x Populus alba*), 포르피로모나스 깅기발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 포르피로모나스 깅기발리스 W83(*Porphyromonas gingivalis W83*), 슈도모나스 에우루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 에우루지노사 *PAO1*, 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 플루오레센스 *Pf-5*(*Pseudomonas fluorescens Pf-5*), 슈도모나스 낙크무시이 (B13)(*Pseudomonas knackmussii (B13)*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 푸티다 E23(*Pseudomonas putida E23*), 슈도모나스 푸티다 KT2440(*Pseudomonas putida KT2440*), 슈도모나스 sp(*Pseudomonas sp*), 퓨레라리아 몬타나(*Pueraria Montana*), 피로바쿨룸 에어로필룸 str. IM2(*Pyrobaculum aerophilum str. IM2*), 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*), 랄스토니아 유트로파(*Ralstonia eutropha*), 랄스토니아 유트로파 H16(*Ralstonia eutropha H16*), 랄스토니아 메탈리두란스(*Ralstonia metallidurans*), 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*), 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter spaeroides*), 로도코커스 루버(*Rhodococcus rubber*), 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rhodopseudomonas palustris*), 로세부리아 인테스티날리스 L1-82(*Roseburia intestinalis L1-82*), 로세부리아 이눌리니보란스 DSM 16841(*Roseburia inulinivorans DSM 16841*), 로세부리아 sp. A2-183(*Roseburia sp. A2-183*), 로세이플렉수스 카스텐홀지이(*Roseiflexus castenholzii*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로폴리스포라 리트라에(*Saccharo폴리spora rythraea NRRL 2338*), 살모넬라 엔테리카 subsp. 아리조나 세로바(*Salmonella enterica subsp. arizonae serovar*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 시조사카로마이세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*), 심몬드시아 치넨시스(*Simmondsia chinensis*), 시노리조지움 멜리로티(*Sinorhizobium meliloti*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토마이세스 코엘리콜러(*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 그리세우스 subsp. 그리세우스(*Streptomyces griseus subsp. griseus*) *BRC 13350*, 스트렙토마이세스 sp. ACT-

1(*Streptomyces sp. ACT-1*), 설폴로부스 액시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*), 설폴로부스 시바타에(*Sulfolobus shibatae*), 설폴로부스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*), 설폴로부스 토코다이(*Sulfolobus tokodaii*), 시네코시스티스 sp. strain PCC6803(*Synechocystis sp. strain PCC6803*), 신트로푸스 시디트로피큐스(*Syntrophus ciditrophicus*), 서모안에어로박터 브록키이 HTD4(*Thermoanaerobacter brockii HTD4*), 서모안에어로박터 탱콩엔시스 MB4(*Thermoanaerobacter tengcongensis MB4*), 서모시네코코커스 일론게이트(*Thermosynechococcus elongates*), 서모토가 마리팀 MSB8(*Thermotoga maritime MSB8*), 서무스 서모필러스(*Thermus thermophilus*), 서무스 헤모필러스 HB8(*Thermus, hermophilus HB8*), 트리코모나스 바기날리스 G3(*Trichomonas vaginalis G3*), 트리코스포로노이데스 메가킬리엔시스(*Trichosporonoides megachiliensis*), 트립아노소모 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 스카무렐라 파우로메타볼라 DSM 20162(*Tsukamurella paurometabola DSM 20162*), 예르시니아 인터메디아 ATCC 29909(*Yersinia intermedia ATCC 29909*), 주글로이에 라미게라(*Zoogloea ramigera*), 지고사카로마이세스 로룩시이(*Zygosaccharomyces rouxii*), 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*), 뿐만 아니라 본원에 기술된 기타 예시적인 종들을 포함하며, 해당 유전자에 대한 소스 유기체로서 이용가능한다. 그러나, 395종의 미생물 게놈 및 다양한 효모, 진균, 식물 및 포유류 게놈을 포함하여, 현재 550종 이상에 대한 이용가능한 완전한 게놈 서열을 이용하여(NCBI 등의 공공 데이타베이스에 이용가능한 것의 절반 이상), 예컨대 공지 유전자의 상동체, 오르소로그, 파라로그 및 비-오르소로그 유전자 치환, 및 유기체들 간의 유전자 변형의 교환을 비롯하여, 관련 또는 비관련 종들에서의 하나 이상의 유전자에 대한 필수적인 부타디엔 생합성 활성을 코딩하는 유전자의 동정은, 일상적이며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 즉, 에스케리치아 콜라이 등의 특정 유기체에 대해, 본원에 기술된 부타디엔의 생합성이 가능한 대사적 변이는, 원핵 및 진핵 유기체를 막론하고 다른 미생물들에도 쉽게 적용할 수 있다. 본원에 제시된 교시 및 지침을 감안하여, 당해 기술 분야의 당업자라면, 한가지 유기체에서 예시된 대사적 변이는 다른 유기체에도 동등하게 적용될 수 있는 것음을 알 것이다.

[0052] 비관련 종들에 대안적인 부타디엔 생합성 경로가 존재하는 경우 등의 일부 경우들에서, 부타디엔 생합성은, 예컨대 언급된 반응을 대체하기 위해 유사하지만 동일하진 않은 대사 반응을 촉매하는 비관련 종들로부터 파라로그 또는 파라로그들을 외인적으로 발현시킴으로써, 숙주 종에 부여할 수 있다. 여러가지 유기체들 간에 대사 네트워크에 대한 일정한 차이가 존재하기 때문에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 상이한 유기체들간의 실제 유전자 용법은 상이할 수 있음을 이해할 것이다. 그러나, 본원에 제시된 교시 및 지침 하에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 부타디엔을 합성할 대상 종에서 미생물 유기체를 구축하기 위해, 본 발명의 내용과 방법들을 본원에 예시된 내용에 동족의 대사 변이를 이용하여 모든 미생물 유기체에 적용할 수 있음을 이해할 것이다.

[0053] 비천연성 부타디엔 생산 숙주의 구축 방법 및 발현 수준을 테스트하는 방법은, 예컨대 당해 기술 분야에 공지된 재조합 및 검출 방법에 의해 수행할 수 있다. 이러한 방법은, 예컨대, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); 및 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)에 언급된 내용에서 볼 수 있다.

[0054] 부타디엔의 생산 경로에 참여하는 외인성 핵산 서열은, 비제한적인 예로서, 접합, 전기충격, 화학적 형질전환, 형질전이, 형질감염 및 초음파 형질전환 등의 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 기법을 이용하여 숙주 세포로 안정적으로 또는 일시적으로 도입할 수 있다. 에스케리치아 콜라이 또는 다른 원핵 생물 세포에서의 외인성 발현을 위해, 진핵 생물의 핵산의 유전자 또는 cDNA내 일부 핵산 서열은 N-말단 미토콘드리아 신호 또는 다른 타겟팅 신호와 같은 타겟팅 신호를 코딩할 수 있으며, 상기 신호는 필요에 따라 원핵 생물 숙주 세포에 형질전환시키기 전에 제거될 수 있다. 예컨대, 미토콘드리아 리더 서열을 제거하면, 에스케리치아 콜라이에서의 발현 증가로 이어진다 (Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005)). 효모 또는 다른 진핵 생물 세포에서의 외인성 발현을 위해, 유전자를 리더 서열을 첨가하지 않고, 세포질에서 발현시키거나, 또는 숙주 세포에 적합한 미토콘드리아 표적 또는 분비 신호 등의 적합한 표적 신호를 부가함으로써, 미토콘드리아 또는 다른 기관으로 타겟팅하거나 또는 분비되도록 타겟화할 수 있다. 즉, 타겟팅 서열을 제거하거나 포함시키기 위한 핵산 서열에서의 적절한 변형이 바람직한 특성을 부여하기 위해 외인성 핵산 서열에 통합시킬 수 있는 것으로 이해된다. 아울러, 유전자는 단백질의 발현 최적화를 달성하기 위해, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 기법으로 코돈 최적화를 수행할 수 있다.

[0055] 발현 벡터 또는 벡터들은, 숙주 유기체에서 기능하는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본원에 예시된 바와 같은 하나 이상의 부타디엔 생합성 경로를 코딩하는 핵산을 포함하도록 구축할 수 있다. 본 발명의 미생물 숙주 유기체에서 이용하기 위한 적용가능한 발현 벡터는, 예컨대, 플라스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 에피

솜 및 숙주 염색체내로의 안정적인 삽입을 위해 작동가능한 벡터 및 선택 서열 또는 마커를 포함하는 인공 염색체를 포함한다. 또한, 발현 벡터는 하나 이상의 선택성 마커 유전자와 적합한 발현 조절 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항생제 또는 독소에 대한 내성, 보완적인 영양요구성 결핍, 또는 배양 배지에 없는 주요 영양원의 공급을 제공하는, 선택성 마커 유전자도 포함시킬 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, 이들 두가지 핵산을 예를 들어 하나의 발현 벡터 또는 분리된 발현 벡터에 삽입시킬 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 핵산이 바람직한 산물을 생산하는데 충분한 양으로 발현됨을 알 것이며, 발현 수준을 당해 기술 분야에 널리 공지되고 본원에 개시된 방법을 이용하여 충분한 발현이 이루어지도록 최적화할 수 있음을 또한 알 것이다.

[0056] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 부타디엔을 생산하기 위해 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 비롯하여, 비천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는 부타디엔 생산 방법으로서, 상기 부타디엔 경로가 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 또는 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 것인, 부타디엔 생산 방법을 제공한다 (도 2). 일 측면에서, 상기 방법은, 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-H). 일 측면에서, 상기 방법은, 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-C, K, F, G, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-C, K, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-C, I, J, E, F, G, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-C, I, J, E, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 A-E, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, D-H). 일 측면에서, 상기 방법은, 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, K, F, G, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 글루타코닐-CoA 데카르복실

라제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, K, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, I, J, E, F, G, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 글루타코닐-CoA 데카르복실라제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, I, J, E, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 글루타코닐-CoA 데카르복실라제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 L, C, D, E, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, D-H). 일 측면에서, 상기 방법은, 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, K, F, G, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, K, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 부타디엔 신타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, I, J, E, F, G, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 글루타릴-CoA 데하이드로게나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, I, J, E, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 글루타릴-CoA 데하이드로게나제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 M, C, D, E, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, D-H). 일 측면에서, 상기 방법은, 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, K, F, G, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, K, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, I, J, E, F, G, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, I, J, E, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 N, C, D, E, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 O, D-H). 일 측면에서, 상기 방법은, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제 및 크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 O, K, F, G, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 리덕

타제 (알코올 형성) 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 O, K, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 크로틸 알코올 키나제, 2-부테닐-4-포스페이트 키나제, 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 또는 트랜스퍼라제 및 크로토네이트 리덕타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 O, I, J, E, F, G, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제 또는 트랜스퍼라제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 O, I, J, E, P, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성), 부타디엔 신타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 및 크로틸 알코올 디포스포키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 2, 단계 O, C, D, E, P, H).

[0057] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 부타디엔을 생산하기 위해 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 비롯하여, 비천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는 부타디엔 생산 방법으로서, 상기 부타디엔 경로가 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제, 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 에리트로스-4-포스페이트 키나제, 에리트로스 리덕타제 또는 에리트리톨 키나제를 포함하는 것인 부타디엔 생산 방법을 제공한다 (도 3). 일 측면에서, 상기 방법은, 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제, 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 3, 단계 A-F, 및 H). 일 측면에서, 상기 방법은, 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제, 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 3, 단계 A-H). 일 측면에서, 상기 방법은, 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부타디엔 신타제, 에리트로스-4-포스페이트 키나제, 에리트로스 리덕타제 및 에리트리톨 키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 3, 단계 I, J, K, B-F, H). 일 측면에서, 상기 방법은, 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제, 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 에리트로스-4-포스페이트 키나제, 에리트로스 리덕타제 및 에리트리톨 키나제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 3, 단계 I, J, K, B-H).

[0058] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 부타디엔을 생산하기 위해 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 비롯하여, 비천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는 부타디엔 생산 방법으로서, 상기 부타디엔 경로가 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성), 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (케톤 환원), 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (알데하이드 환원), 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타제 또는 3-옥소-글루타릴-CoA 리덕타제 (CoA 환원 및 알코올 형성)를 포함하는 것인 부타디엔 생산 방법을 제공한다 (도 4). 일 측면에서, 상기 방법은, 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성), 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 및 부타디엔 신타제를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 4, 단계 A-I). 일 측면에서,

상기 방법은, 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (알데하이드 환원) 및 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 4, 단계 A, K, M, N, E, F, G, H, I). 일 측면에서, 상기 방법은, 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성) 및 3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (케톤 환원)를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 4, 단계 A, K, L, D, E, F, G, H, I). 일 측면에서, 상기 방법은, 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제, 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타제 및 3-옥소-글루타릴-CoA 리덕타제 (CoA 환원 및 알코올 형성)를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 4, 단계 A, O, N, E, F, G, H, I). 일 측면에서, 상기 방법은, 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제, 3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성), 3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 키나제, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트 데카르복실라제, 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제, 부타디엔 신타제 및 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함하는 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함한다 (도 4, 단계 A, B, J, E, F, G, H, I).

[0059] 부타디엔의 생산을 테스트하기 위한 적합한 정제 및/또는 분석은 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 테스트할 조작된 각 균주에 대해 3세트 배양물 등의 적정 레플리케이트로 증식시킬 수 있다. 예를 들어, 조작된 생산 숙주에서의 산물 및 부산물의 생성을 모니터링할 수 있다. 최종 산물 및 중간산물, 및 기타 유기 화합물은 HPLC(고성능 액체 크로마토그래피), GC-MS(기체 크로마토그래피-질량 분광학) 및 LC-MS(액체 크로마토그래피-질량 분광학) 또는 당해 기술 분야에 널리 공지된 통상적인 절차를 이용하는 그외 적정 분석 방법으로 분석할 수 있다. 발효 브로스에서 산물의 분비는, 또한, 배양 상층액을 이용하여 테스트할 수 있다. 부산물 및 잔류 글루코스는, 예컨대 글루코스 및 알코올의 경우 굴절률 검출기, 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. 또한, 외인성 DNA 서열로부터 각 효소 또는 단백질의 활성은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 분석할 수 있다. 전형적인 분석 방법에 대해서는, Manual on Hydrocarbon Analysis (ASTM Manula Series, A.W. Drews, ed., 6th edition, 1998, American Society for Testing and Materials, Baltimore, Maryland를 참조한다.

[0060] 부타디엔은 당해 기술 분야에 잘 알려진 다양한 방법을 이용하여 배양물내 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.

[0061] 본원에 기술된 임의의 비천연 미생물 유기체는 배양하여, 본 발명의 생합성 산물을 생산 및/또는 분리할 수 있다. 예컨대, 부타디엔 생산체를 부타디엔의 생합성 생산을 위해 배양할 수 있다.

[0062] 부타디엔을 생산하기 위해, 재조합 균주는 탄소원과 기타 필수 영양원이 첨가된 배지에서 배양한다. 전체 공정의 비용을 줄이기 위해, 발효기를 혐기성 조건으로 유지하는 것이 때로는 바람직하며, 매우 바람직할 수 있다. 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 조건 또는 실질적으로 혐기 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 공개공보 2009/0047719에 기술되어 있다. 발효는 본원에 개시된 바와 같이 배치, 피드-배치 또는 연속적인 방식으로 수행할 수 있다.

[0063] 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.

[0064] 배양 배지는, 예컨대 비천연 미생물에 탄소원을 공급할 수 있는 임의의 탄수화물원을 포함할 수 있다. 이러한 탄수화물원으로는, 예컨대 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스, 프럭토스, 슈크로스 및 스타치와 같은 당을 포함한다. 기타 탄수화물원으로는, 예컨대 재생가능한 공급 원료 및 바이오매스를 포함한다. 본 발명의 방법에 공급 원료로서 이용될 수 있는 타입의 바이오매스의 예로는, 셀룰로직 바이오매스, 헤미셀룰로직 바이오매스 및 리그닌 공급원료 또는 공급원료의 일부를 포함한다. 이러한 바이오매스 공급원료로는, 예컨대 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스, 프럭토스 및 스타치와 같이 탄소원으로서 이용가능한 탄수화물 기질을 포함한다. 본원에 제시된 교시 및 지침을 고려하여, 당해 기술 분야의 당업자라면, 상기에 예시된 것 이외의 재생가능한 공급원료 및 바이오매스가 또한 부타디엔을 생산하기 위한 발명의 미생물 유기체 배양에 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0065] 상기 예시된 바와 같은 재생가능한 공급원료 외에도, 본 발명의 부타디엔 미생물 유기체는 또한 탄소원으로서 합성가스(syngas)에서도 생장하도록 변형될 수 있다. 이러한 구체적인 구현예에서, 합성 가스 또는 기타 가스상 탄소원을 이용하는 대사 경로를 제공하기 위해, 하나 이상의 단백질 또는 효소를 부타디엔 생산 유기체에서 발현시킨다.

[0066] 합성 가스(syngas) 또는 발생로 가스(producer gas)라고도 하는 합성 가스(synthesis gas)는, 석탄의 기체화와, 농업 작물 및 잔류물 등의 바이오매스 물질과 같은 탄소질 물질의 주요 산물이다. 합성 가스는 주로 H_2 및 CO로 구성된 혼합물이며, 비제한적인 예로, 석탄, 석탄 오일, 천연 가스, 바이오매스 및 폐기 유기 물질 등의 임의의 유기 공급원의 기체화로부터 수득할 수 있다. 기체화는 일반적으로 높은 연료 대 산소 비율 하에 수행된다. 주로 H_2 및 CO이지만, 합성 가스는 CO_2 및 다른 기체를 소량으로 포함할 수 있다. 따라서, 합성 가스는 CO, 추가적으로 CO_2 등의 가스상 탄소에 대한 비용 효율적인 소스로 제공된다.

[0067] Wood-Ljungdahl 경로는 CO와 H_2의 아세틸-CoA와 아세테이트 등의 기타 산물로의 변환을 촉매한다. 또한, CO 및 합성가스를 이용할 수 있는 유기체는, 일반적으로, Wood-Ljungdahl 경로에 포함된 효소 및 변환(transformation)의 동일한 기본적인 세트를 통해, CO_2 및 CO_2/H_2 혼합물을 이용하는 능력을 가진다. 또한, 동일 유기체에 의해 CO가 이용될 수 있으며 동일한 경로가 관여된다는 것이 밝혀지기 전까지, 오랜동안 미생물이 이산화탄소를 H_2-의존적인 방식으로 아세테이트로 변환시키는 것으로 인지되었다. 수소가 필수적인 환원 당량(reducing equivalent)의 공급원으로서 제공되는 한, 다수의 초산 생성균들을 이산화탄소의 존재 하에 증식시킬 수 있으며 아세테이트와 같은 화합물을 생산한다는 것이 확인되었다 (예, Drake, *Acetogenesis*, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994)). 이를 아래 등식으로 정리할 수 있다:

[0068] $$2\ CO_2 + 4\ H_2 + n\ ADP + n\ Pi \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O + n\ ATP$$

[0069] 이때, Wood-Ljungdah 경로를 가지고 있는 비천연 미생물은 CO_2 및 H_2 혼합물을 이용할 수 있을 뿐만 아니라, 아세틸-CoA와 기타 원하는 산물을 만들 수 있다.

[0070] Wood-Ljungdahl 경로는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 2가지의 분지로 분리될 수 있는 12가지의 반응으로 구성되어 있다: (1) 메틸 분지와 (2) 카르보닐 분지. 메틸 분지는 합성 가스를 메틸-테트라하이드로폴레이트(메틸-THF)로 변환시키고, 카르보닐 분지는 메틸-THF를 아세틸-CoA로 변환시킨다. 메틸 분지에서의 반응들은 다음과 같은 효소 또는 단백질에 의해 순차적으로 촉매된다: 페레독신 옥시도리덕타제, 포르메이트 데하이드로게나제, 포르밀테트라하이드로폴레이트 신테타제, 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로데하이트라타제(cyclode하이드라타제), 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). 부타디엔 경로를 구현하기 위해 충분한 수의 코딩 핵산을 도입하는 것에 대한 본원에 제공된 내용 및 지침에 따라, 당해 기술 분야의 당업자는, 숙주 유기체에 존재하지 않는 Wood-Ljungdahl 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산을 적어도 도입하는 측면에 대해, 동일한 조작 설계를 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 변형된 유기체에 Wood-Ljungdah의 전체 경로가 포함되도록, 하나 이상의 코딩 핵산을 본

발명의 미생물에 도입함으로써, 합성 가스의 이용 능력이 부여될 것이다.

[0071] 또한, 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 활성 및/또는 하이드로게나제 활성과 커플링된 환원성(역) 트리카르복시산 사이클은, CO, CO_2 및/또는 H_2를 아세틸-CoA과 아세테이트와 같은 기타 산물로 변환시키기 위해 사용될 수 있다. 환원성 TCA 경로를 통해 탄소를 고정할 수 있는 유기체는 하나 이상의 다음과 같은 효소를 이용할 수 있다: ATP 사이트레이트-리아제, 사이트레이트 리아제, 아코니타제(aconitase), 이소시트레이트 데하이드로게나제, 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마레이트 리덕타제, 푸마라제(fumarase), 말레이트 데하이드로게나제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 카본 모노옥시드 데하이드로게나제, 및 하이드로게나제. 구체적으로, 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 및 하이드로게나제에 의해 CO 및/또는 H_2로부터 추출된 환원 당량을 이용하여, 환원성 TCA 사이클을 통해 CO_2를 아세틸-CoA 또는 아세테이트에 고정한다. 아세테이트는 아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세테이트 키나제/포스포트랜스아세틸라제, 및 아세틸-CoA 신테타제와 같은 효소에 의해 아세틸-CoA로 변환시킬 수 있다. 아세틸-CoA는, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제 및 당신생 효소에 의해 p-톨루에이트, 테레프탈레이트, 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 전구체, 글리세르알데하이드-3-포스페이트, 포스포에놀피루베이트, 및 피루베이트로 변환될 수 있다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 구현을 위한 충분한 수의 코딩 핵산의 도입에 대해, 본원에 제시된 교시 및 지침에 따라, 당해 기술 분야의 당업자라면, 숙주 유기체에 존재하지 않는 환원성 TCA 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산을 적어도 도입하는 것에 대하여 동일한 조작 설계를 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 변형된 유기체가 환원성 TCA 전체 경로를 포함하도록, 하나 이상의 코딩 핵산을 본 발명의 미생물에 도입함으로써, 합성 가스의 이용 능력이 부여될 것이다.

[0072] 즉, 본원에 제시된 교시 및 지침을 감안하여, 당해 기술 분야의 당업자라면, 탄수화물과 같은 탄소원에서 생육시켰을 때, 본 발명의 생합성된 화합물을 분비하는 비천연 미생물 유기체를 생산할 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 화합물로는, 예컨대, 부타디엔과 부타디엔 경로에서의 임의의 중간 대사산물을 포함한다. 모든 필요한 것은, 예컨대 부타디엔 생합성 경로의 일부 또는 전체 포함 등의, 바람직한 화합물 또는 중간 산물의 생합성을 달성하도록 필수 효소 또는 단백질 활성 중 한가지 이상을 조작하는 것이다. 이에, 본 발명은, 탄수화물 또는 기타 탄소원에서 생장시켰을 때 부타디엔을 생산 및/또는 분비하며, 탄수화물 또는 기타 탄소원에서 생장시켰을 때 부타디엔 경로에 확인되는 임의의 중간 대사산물을 생산 및/또는 분비하는, 비천연 미생물 유기체를 제공한다. 부타디엔을 생산하는 본 발명의 미생물 유기체는 중산 산물들, 예를 들어, 아세토아세틸-CoA, 3-하이드록시부티릴-CoA, 크로토닐-CoA, 크로톤알데하이드, 크로틸 알코올, 2-베테닐-포스페이트, 2-부테닐-4-디포스페이트, 에리트리톨-4-포스페이트, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨, 2-포스포-4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨, 에리트리톨-2,4-사이클로디포스페이트, 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트, 부테닐 4-디포스페이트, 2-부테닐 4-디포스페이트, 3-옥소글루타릴-CoA, 3-하이드록시글루타릴-CoA, 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트, 3,5-디하이드록시 펜타노에이트, 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트, 3-하이드록시-5-[하이드록시(포스포노옥시)포스포릴]옥시 펜타노에이트, 크로토네이트, 에리트로스, 에리트리톨, 3,5-디옥소펜타노에이트 또는 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트로부터 합성을 개시할 수 있다.

[0073] 본 발명의 비천연 미생물 유기체는, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 부타디엔의 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산이 외인성으로 발현되도록, 본원에 예시된 당해 기술 분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 구축한다. 본 발명의 미생물 유기체는 부타디엔을 생산하기에 충분한 조건 하에서 배양되는 것으로 이해된다. 본원에 제시된 교시 및 지침에 따라, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 부타디엔의 생합성을 달성하여, 세포내 농도 약 0.001-2000 mM 이상을 형성시킬 수 있다. 일반적으로, 부타디엔의 세포내 농도는 약 3-1500 mM, 특히 약 5-1250 mM, 보다 구체적으로 약 8-1000 mM이며, 예로, 약 10 mM, 약 100 mM, 200 mM, 500 mM, 800 mM 또는 그 이상을 포함한다. 이들 예시적인 범위 사이, 그리고 그 이상의 세포내 농도는 또한 본 발명의 비천연 미생물 유기체로부터 달성할 수 있다.

[0074] 일부 구현예에서, 배양 조건은 혐기적 또는 실질적으로 혐기적 배양 또는 유지 조건을 포함한다. 예시적인 혐기 조건은 종래에 개시되어 있으며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 발효 공정에 대한 예시적인 혐기 조건은 본원에 기술되어 있으며, 예컨대 2007년 8월 10일자 미국 공개공보 2009/0047719에 기술되어 있다. 이러한 조건들 중 임의의 조건을 비천연 미생물 유기체로 이용할 수 있으며, 뿐만 아니라 당해 기술 분야에 잘 알려진 다른 혐기 조건을 이용할 수 있다. 부타디엔의 생산체들은, 상기한 혐기 또는 실질적인 혐기 조건 하에서, 부타디엔을 세포내 농도 5-10 mM 이상으로, 뿐만 아니라 본원에 예시된 다른 모든 농도들로 합성할 수 있다. 전술한 내용이 세포내 농도를 언급하더라도, 부타디엔을 생산하는 미생물 유기체가 부타디엔을 세포내에서 생산할

수 있으며, 및/또는 배양 배지로 산물을 분비할 수 있는 것으로 이해된다.

[0075] 본원에 기술된 배양 및 발효 조건 외에도, 부타디엔의 생합성을 달성하기 위한 생육 조건은, 배양 조건에 내삼투압제(osmoprotectant)의 추가를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 비천연 미생물 유기체는 내삼투압제가 존재하는 조건에서 유지, 증식 및 발효될 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 엑토인이 있다. 일 측면에서, 상기 내삼투압제는 글리신 베타인이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 본원에 기술된 미생물 유기체를 삼투 스트레스로부터 보호하기에 적합한 내삼투압제의 양과 타입이 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.

[0076] 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 달성될 수 있다.

[0077] 본원에 기술된 바와 같이, 부타디엔의 생합성을 달성하기 위한 배양 조건의 일 예는 혐기성 배양 또는 발효 조건을 포함한다. 특정 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 안에서 액체 배지 내에서 또는 고체 한천 배지 상에서의 세포의 증식 또는 휴지를 포함한다. 상기 산소 비율은, 예컨대 상기 배양물에 N_2/CO_2 혼합물 또는 그외 적절한 산소 이외의 기체 또는 기체들을 살포함으로써 유지시킬 수 있다.

[0078] 본원에 기술된 배양 조건은 부타디엔을 생산하기 위한 규모 확대 및 연속 배양일 수 있다. 배양 공정의 예는, 피드-배치 발효(fed-batch 발효) 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. 부타디엔을 상업적인 양으로 생합성에 의해 생산하는데에는 발효 공정이 특히 유용하다. 일반적으로, 그리고 비-연속식 배양 공정을 이용하는 경우와 같이, 부타디엔의 연속 및/또는 거의 연속적인 생산은, 본 발명의 부타디엔의 비천연 생산 유기체를 지수기(exponential phase)로의 증식을 유지 및/또는 거의 유지시키기 위한 충분한 영양분 및 배지에서 배양하는 단계를 포함할 것이다. 이러한 조건에서의 연속 배양은, 예컨대 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 이상의 기간동안의 배양을 포함할 수 있다. 추가적으로, 연속 배양은 1주일, 2주일, 3주일, 4주일 또는 5주일 이상에서 최대 수 개월까지의 장기간을 포함할 수 있다. 다른 예로서, 본 발명의 유기체는 특정 용도에 적합하다면, 수시간 배양할 수 있다. 상기 연속 및/또는 거의 연속 배양 조건은 이러한 예시적인 기간에 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.

[0079] 발효 공정은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 간략하게, 부타디엔을 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.

[0080] 상당량의 부타디엔을 연속 생산하기 위해, 본 발명의 부타디엔 생산체를 이용한 전술한 발효 공정 외에도, 부타디엔 생산체는, 또한, 예컨대, 산물을 다른 화합물로 변환시키는 화학적 합성 공정에 동시에 투입하거나, 또는 산물을 발효 배양물로부터 분리한 다음 순차적으로 이를 필요에 따라 산물을 다른 화합물로 변환시키는 화학적 또는 효소적 변환 공정을 진행할 수 있다.

[0081] 보다 우수한 생산체를 제조하기 위해, 대사 모델 연구를 이용하여 생장 조건을 최적화할 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 2002/0168654 및 US 2004/0009466, 미국 특허 7,127,379). 모델 분석을 통해 부타디엔을 보다 효율적으로 생산하는 방향으로 대사를 이동시키는 세포 생육에 대한 효과들을 신뢰성있게 예견할 수 있다.

[0082] 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)). OptKnock는 표적 산물을 과생산하는 유전적으로 안정한 미생물을 만드는, 유전자 결손 또는 파괴 전략을 제시하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 프로그램이다. 구체적으로, 상기 프래임워크에서 원하는 생화학물질이 세포 생육의 필수 부산물이 되도록 강제하는 유전자 조작을 제안하기 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.

[0083] 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 프래임워크와 관련있다. 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 구축할 수 있으며, 구해지는 혼성-정수 선형 프로그래밍 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.

[0084] 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 결정하기 위해 사용될 수 있는 전산 시스템이다. 이러한 방식은, 상기 해결 영역이 포함된 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.

[0085] 이러한 계산법은, 생물 시스템들이 유연하고 다수의 다른 방식으로도 동일한 결과에 도달할 수 있기 때문에, 생물학적 현실에 부합된다. 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.

[0086] 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 예시된 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.

[0087] 전술한 방법들은 파괴할 한가지 이상의 대사 반응 세트를 제공할 것이다. 상기 세트 또는 대사 변이에서 각 반응의 제거시, 원하는 산물은 유기체의 증식기 동안에 필수 산물로서 생산될 수 있다. 반응들은 공지되어 있으

므로, bilevel OptKnock 문제에 대한 해법은, 또한, 반응 세트의 각 반응을 촉매하는 하나 이상의 효소를 코딩하는 관련 유전자 또는 유전자들을 제공해 줄 것이다. 반응 세트와, 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.

[0088] 일단 동정되면, 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 수행된다. 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.

[0089] 추가적인 반응 세트의 파괴 또는 생육과 커플링된 원하는 산물의 생합성 등의 생합성을 달성할 수 있는 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 반복시 정수 컷으로 지칭되는 추가적인 제한을 통합하여, 반복적으로 해결함으로써, 진행된다. 정수 컷 제한은, 상기 해결 과정이, 산물 생합성과 생육을 필수적으로 조합시킨 임의의 이전 반복에서 동정된 반응의 실제 동일한 세트가 선택되지 않게 방지한다. 예컨대, 앞서 동정된 생육과 결합된 대사 변이에서 파괴시킬 반응들 1, 2 및 3가지가 확인된다면, 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 정수 컷 방법을, 또한, 예컨대, SimPheny® 등의 당해 기술 분야에 널리 공지된 그외 계산 프래임워크와 함께 적용할 수 있다.

[0090] 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 계산법으로 OptKnock 및 SimPheny® 중에서 선택되는 인 실리코(*in silico*) 방법으로 확인되는 대사 변이를 동정 및 구현할 수 있다. 대사 변이 세트는, 예컨대 하나 이상의 생합성 경로 효소들의 부가 및/또는 유전자 결손에 의한 파괴 등의 한가지 이상의 대사 반응의 기능적 파괴를 포함할 수 있다.

[0091] 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 커플링시키는 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)).

[0092] 에스케리치아 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 구현할 수 있다. 이는, 전술한 바와 같이, 각 반복에서 정수 컷으로 지칭되는 추가적인 제한을 추가하면서 OptKonck 문제를 반복적으로 해결하는 과정을 수반한다.

[0093] 본원에 기술된 바와 같이, 부타디엔 경로의 원하는 활성을 코딩하는 핵산을 숙주 유기체에 도입할 수 있다. 일부 경우에, 부타디엔 경로 효소 또는 단백질의 활성을 부타디엔 생산을 증가시키도록 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 예컨대, 단백질 또는 효소의 활성을 증가시키는 공지된 돌연변이는 코딩 핵산 분자에 도입시킬 수 있

다. 아울러, 효소 또는 단백질의 활성을 높이거나 및/또는 저해 활성을 낮추기 위해, 예컨대 네거티브 조절자의 활성을 낮추기 위해, 최적화 방법을 적용할 수 있다.

[0094] 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 위한, 선택성/특이성; 확실한 고온 처리를 위한 온도 안정성; 높거나 낮은 pH 조건에서의 생물학적 처리를 위한 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 의한 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 효소 작동을 위한, 산소 안정성; 및 산소가 존재하지 않는 조건에서 호기성 효소의 작동을 위한, 혐기 활성을 포함한다.

[0095] 특정 효소의 원하는 특징을 표적하기 위한 유전자의 돌연변이 유발 및 다양화를 위해 개발된 예시적인 방법들을 하기에 보다 상세하게 기술한다. 이러한 방법들은 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 이러한 방법들 중 임의 방법을 이용하여 부타디엔 경로 효소 또는 단백질의 활성을 변형 및/또는 최적화할 수 있다.

[0096] EpPCR (Pritchard et al., *J Theor.Biol.* 234:497-509 (2005))은 PCR 반응에 Mn^{2+} 이온을 첨가하여 DNA 중합효소의 피델리티(fidelity)를 낮춤으로써, dNTP 농도를 편향시킴으로써, 또는 다른 조건에 변화를 가함으로써, 랜덤 포인트 돌연변이를 도입한다. 대상 타겟 유전자로의 돌연변이 유발을 제한하는 5단계 클로닝 공정은, 1) 대상 유전자의 에러 유발성 PCR 증폭; 2) 제한 효소 절단; 3) 원하는 DNA 단편의 정제; 4) 벡터로의 삽입; 5) 적정 숙주의 유전자 변이체로의 형질전환 및 성능 개선에 대한 라이브러리 검색을 포함한다. 이러한 방법은 하나의 유전자에 동시에 복수의 돌연변이를 만들 수 있어, 바람직한 활성을 가진 다수의 잠재적인 변이체를 스크리닝하는데 유용하다. EpPCR을 통해 다수의 돌연변이를 제작할 수 있어, 고성능 스크리닝 분석 또는 선별 방법, 예컨대 로봇 공학을 이용한 방법을 활용하여 바람직한 특징을 가진 변이체를 동정할 수 있다.

[0097] 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))은, 완전한 환형 플라스미드를 주형으로 사용하고, 마지막 뉴클레오티드 2개에 엑소뉴클레아제 내성 티오포스페이트 결합을 구비한 랜덤 6mer를 이용하여 플라스미드를 증폭시킨 다음, 세포로 형질전환시키고, 세포내에서 플라스미드는 탠덤 리피트로 다시 환형화되는 것을 제외하고는, epPCR과는 동일한 다수의 요소들을 가지고 있다. Mn^{2+} 농도를 조정하여 돌연변이 비율을 어느 정도 바꿀 수 있다. 이 기법은 간단한 에러-유발성 한단계 방법을 이용하여, 3-4개의 돌연변이/kbp의 풀 카피 플라스미드를 제조한다. 제한 효소에 의한 절단이나 특이적인 프라이머는 필요하지 않는다. 부가적으로, 이 방법은 전형적으로 상업적으로 이용가능한 키트로 이용할 수 있다.

[0098] DNA 또는 패밀리 셔플링 (Stemmer, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747-10751 (1994)); 및 Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994))은, 전형적으로 Dnase I 또는 Endo V와 같은 뉴클레아제로 2개 이상의 변이체 유전자를 절단하여, DNA 중합효소의 존재 중에서 어닐링 및 연장 사이클에 의해 재조립되는 랜덤 단편 풀을 제조함으로써, 키메라 유전자 라이브러리를 구축하는 과정을 포함한다. 단편들은 서로 촉발하여, 하나의 카피가 다른 카피를 촉발시키는 경우 (주형 스위치) 재조립이 이루어진다. 이러한 방법은 >1 kbp DNA 서열을 이용할 수 있다. 단편 재조립에 의해 만들어지는 돌연변이 재조합 외에도, 이 방법은 에러-유발 PCR와 비슷한 비율로 연장 과정에 점 돌연변이를 도입한다. 이 방법을 이용하여, 유해하고, 랜덤이며, 중성인 돌연변이를 제거할 수 있다.

[0099] 스테거드 연장(Staggered Extension) (StEP) (Zhao et al., *Nat.* Biotechnol. 16:258-261 (1998))은, 주형을

프라이밍한 후 변성과 매우 짧은 시간 동안(약 5초)의 어닐링/연장으로 이루어진 2단계 PCR 사이클을 반복하는 과정을 수반한다. 자라나는 단편들은 여러가지 주형에 어닐링하여, 더욱 연장시키고, 전장 서열이 제조될 때까지 반복한다. 주형 스위칭은 대부분 제조되는 단편들이 복수의 모 서열을 가진다는 의미이다. 피델러티가 낮은 중합효소들의 조합 (Taq 및 Mutazyme)은 반대되는 돌연변이 스펙트럼으로 인해 에러-유발 편향성을 낮춘다.

[0100] 랜덤 프라이밍 재조합 (Random Priming Recombination, RPR)은, 랜덤 서열 프라이머를 사용하여 주형의 여러가지 세그먼트에 대해 상보적인 다수의 짧은 DNA 단편을 제조한다 (Shao et al., *Nucleic Acids Res* 26:681-683 (1998)). epPCR을 통한 베이스의 잘못된 병합과 잘못된 프라이밍으로 점 돌연변이가 만들어진다. 짧은 DNA 단편들은 상동성을 기반으로 다른 것을 촉발시키며, 재조합하여, 반복적인 써모사이클링에 의해 전장으로 재조립된다. 이 단계 전에 주형이 제거되면 낮은 수준의 모체형 재조합체가 만들어진다. 이 방법은 대부분의 다른 방법들과 같이 개별 특징을 진화시키기 위해 여러번 반복 수행할 수 있다. 이러한 기술은 서열의 편향성을 회피하며, 유전자 길이와는 독립적이며, 적용시 모 DNA가 거의 필요하지 않는다.

[0101] 헤테로두플렉스 재조합(Heteroduplex Recombination)은, 선형화된 플라스미드 DNA를 사용하여 미스매치 복원에 의해 복원되는 헤테로두플렉스를 형성한다 (Volkov et al, *Nucleic Acids Res.* 27:e18 (1999); 및 Volkov et al., *Methods Enzymol.* 328:456-463 (2000)). 미스매치 복원 단계는 어느 수준 이상의 돌연변이를 유발한다. 헤테로두플렉스는 선형 호모두플렉스 보다 훨씬 효율적으로 형질전환된다. 이 방법은 큰 유전자와 전체 오페론에 적합하다.

[0102] RACHITT (Random Chimeragenesis on Transient Templates) (Coco et al., *Nat. Biotechnol.* 19:354-359 (2001))는 Dnase I 단편화와 단일 가닥 DNA(ssDNA)의 크기 분획화를 이용한다. 상동적인 단편들은 중합효소 부재시 상보적인 ssDNA 스캐폴드와 혼성화한다. 임의의 중복되는 혼성화되지 않은 단편의 말단을 엑소뉴클레아제로 잘라낸다. 단편들 간의 갭을 메우고, 연결하여, 증폭을 방지하기 위해 U를 포함하는 스캐폴드에 혼성화되는 전장의 다양한 가닥들로 구성된 풀을 제조한다. 그런 후, 스캐폴드를 파괴하고, PCR 증폭을 통해 다양한 가닥에 상보적인 새로운 가닥으로 치환한다. 이 방법은 한쪽 모체로부터 유래되는 하나의 가닥 (스캐폴드)을 사용하나 프라이밍 단편은 다른 유전자로부터 유래되며; 이에 반하여 모체 스캐폴드가 선별된다. 따라서, 모체 단편과의 리어닐링은 발생되지 않는다. 중복성 단편은 엑소뉴클레아제로 트리밍한다. 그렇지 않다면, 개념상 DNA 셔플링 및 StEP와 유사하다. 따라서, 자매(sibling)가 없고, 거의 무활성이며, 언셔플링된 모체(unshuffled parental)가 없어야 한다. 이 기법은, 모 유전자가 거의 또는 전형 생성되지 않으며, 표준 DNA 셔플링에 비해 크로스오버가 더 많이 발생한다 점에서 이점을 가진다.

[0103] RETT (Recombined Extension on Truncated templates)는 주형의 풀로서 사용되는 단방향성 ssDNA 단편의 존재 중에서 프라이머로부터 한쪽 방향으로 자라는 가닥들의 주형 스위칭을 수반한다 (Lee et al., *J. Molec. Catalysis* 26:119-129 (2003)). DNA 엔도뉴클레아제는 사용하지 않는다. 단방향성 ssDNA는 랜덤 프라이머를 이용하여 DNA 중합효소에 의해 또는 엑소뉴클레아제를 이용하여 연속 제거에 의해 제조된다. 단방향성 ssDNA는 주형일 뿐이며, 프라이머가 아니다. 랜덤 프라이밍과 엑소뉴클레아제는 DNA 셔플링/RACHITT의 효소적 절단에서 그러한 서열 편향성을 도입하지 않는다. RETT는 연장이 매우 짧은 대신 정상적인 PCR 조건을 이용하기 때문에 StEP 보다 최적화하기 용이할 수 있다. 재조합은 PCR 단계의 요소로서, 즉, 직접적인 셔플링 없이 이루어진다. 이러한 방법은 또한 중단이 없기 때문에 StEP 보다 더 무작위적일 수 있다.

[0104] DOGS (Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling)에서는, 축중(degenerate) 프라이머를 사용하여 분자들 간의 재조합을 제어하며 (Bergquist and Gibbs, *Methods Mol.Biol* 352:191-204 (2007); Bergquist et al., *Biomol. Eng* 22:63-72 (2005); Gibbs et al., 유전자 271:13-20 (2001)), 이를 이용하여 모 유전자를 재생하는 DNA 셔플링과 같은 다른 방법들의 경향을 제어할 수 있다. 이 방법은 선별된 유전자 세그먼트의 랜덤 돌연변이 유발 (epPCR)과 조합할 수 있다. 이는 모 서열의 재형성(reformation)을 차단하기 위한 좋은 방법일 수 있다. 제조된 세그먼트의 투입 농도를 조정함으로써, 바람직한 벡본으로 편향시킬 수 있다. 이 방법은 제한 효소 절단 없이도 무관련 모체로부터 DNA 셔플링을 허용하며, 랜덤 돌연변이 유발 방법의 한가지 선택이 될 수 있다.

[0105] ITCHY(Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzyme)는 대상 유전자 또는 유전자 단편에서 1 bp가 결손된 조합 라이브러리(combinatorial library)를 만든다 (Ostermeier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3562-3567 (1999); 및 Ostermeier et al., *Nat. Biotechnol.* 17:1205-1209 (1999)). 2종의 유전자들의 조각에서 반대 방향으로 절단을 도입한다. 이를 연결하고, 융합체를 클로닝한다. 이 기법에서는 2종의 모 유전자들 간에 상동성이 필요한 것은 아니다. ITCHY를 DNA 셔플링과 조합하는 경우, 이러한 시스템을 SCRATCHY라고 칭한다 (하기 참조). 이들 2가지 방법의 주된 이점은 모 유전자들 간에 상동성이 필요없다는 것이며; 예

로, *E. coli*와 인간 유전자 간의 기능적 융합체가 ITCHY에 의해 제조되었다. ITCHY 라이브리 제조시, 모든 가능한 크로스오버들이 포착된다.

[0106] THIO-ITCHY(Thio-Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzyme)는 포스포티오에이트 dNTA를 이용하여 절단체(truncation)를 제조하는 것을 제외하고는 ITCHY와 유사하다 (Lutz et al., *Nucleic Acids Res* 29:E16 (2001)). ITCHY와 동류인 THIO-ITCHY는 최적화하기 용이하여, 우수한 재현성 및 조절 가능성을 제공할 수 있다.

[0107] SCRATCHY는 재조합 유전자에 대한 ITCHY와 DNA 셔플링 방법 2가지를 조합한 것이다 (Lutz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11248-11253 (2001)). SCRATCHY는 ITCHY와 DNA 셔플링의 최고 특징을 조합한다. 첫째로, ITCHY를 이용하여 DNA-상동성-의존적인 양상으로 유전자 단편들 간의 포괄적인 융합체 단편을 구축한다. 이러한 인위적인 패밀리를 DNA-셔플링 공정으로 수행하여, 크로스오버의 수를 증가시킨다. 최적화에는 컴퓨터를 이용한 예측을 사용할 수 있다. SCRATCHY는 서열 동일성이 80% 미만일 경우 DNA 셔플링 보다 더 효과적이다.

[0108] RNDM (Random Drift Mutagenesis)에서는, epPCR로 제작한 후, 유용한 활성을 보유한 것을 스크리닝/선별한다 (Bergquist et al., *Biomol. Eng.* 22:63-72 (2005)). 그런 후, 이를 DOGS로 수행하여, 복수의 활성 돌연변이들 또는 활성의 돌연변이와 일부 다른 적합한 모체들 간에 융합체와 재조합체를 제조한다. 중성인 돌연변이를 분리하는 것을 높이기 위해 고안되었다: 목적은 유지된 촉매 활성에서 활성이 오리지날 유전자 보다 높은지 낮은지를 스크리닝하기 위함이다. 스크리닝으로 백그라운드에 비해 높은 활성을 검출할 수 있을 경우, 고성능 분석으로 사용가능하다. RNDM은 다양성 구축에 DOGS에 프런트 엔드로서 사용되고 있다. 기법은 셔플링 전에 또는 다른 후속적인 공정 전에 활성에 필요한 요건을 부가하며; 중성 드리프트(neutral drift) 라이브러리는 소규모의 라이브러리에 비해 활성을 높이고/신속하게 개선시키는 것으로 확인된다. epPCR을 이용하는 것으로 공개되어 있지만, 다른 대규모 돌연변이 유발 방법에도 적용할 수 있다.

[0109] SeSaM (Sequence Saturation Mutagenesis)은, 1) 포스포티오에이트 뉴클레오티드의 랜덤 병합 및 절단을 이용하여 랜덤 길이의 단편들의 풀을 제조하고, 이러한 풀을 주형으로 사용하여 2) 이노신 등의 "유니버셜" 염기들의 존재 하에 연장시키고, 3) 이노신-함유 상보체의 복제로 랜덤 염기 병합이 이루어지고, 결과적으로 돌연변이가 유발되는, 랜덤 돌연변이 유발 방법이다 (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)). 이러한 기법을 이용하여, 2-3일 이내에 대규모의 돌연변이 라이브러리를 간단한 방법으로 제작할 수 있다. 이 기법은 DNA 중합효소의 돌연변이 편향성과 비교하여 방향성이 없다. 이러한 방법의 차이로 인해 이러한 기법이 epPCR을 보완한다 (또는 대체한다).

[0110] 합성 셔플링(Synthetic Shuffling)에서는, "타겟에서 모든 유전자 다양성"을 코딩하고 셔플링된 후대(shuffled progeny)에 대해 매우 다양한 다양성을 허용할 수 있도록 중첩되는 올리고뉴클레오티드를 설계한다 (Ness et al., *Nat. Biotechnol.* 20:1251-1255 (2002)). 이 기법에서는, 셔플링할 단편을 설계할 수 있다. 이는 후대에서 이루어질 다양성 증가에 일조한다. 매우 관련성이 높은 서열에서 관찰되는 비율에 가까운 비율로 훨씬 관련성이 먼 서열들을 재조합하기 위한 서열/코돈 편향성을 설계할 수 있다. 부가적으로, 이 기법은 물리적으로 주형 유전자를 보유할 필요가 없다.

[0111] 뉴클레오티드 교환 및 절개 기법(Nucleotide Exchange and Excision Technology) NexT은, dUTP 병합, 우라실 DNA 글리코실라제 처리 후 피페리딘 처리, 및 엔드포인트 DNA 단편화 수행으로 이루어진 조합을 이용한다 (Muller et al., *Nucleic Acids Res.* 33:e117 (2005)). 유전자는 프로프리딩(proofreading) 중합효소를 이용하여 내부 PCR 프라이머를 연장시켜 재조립된다. 셔플링 크기는 dUPT::dTTP 비율을 변화시켜 직접 조절가능하다. 이는 우라실의 병합과 절단을 위한 단순한 방법을 이용하는 엔드포인트 반응이다. 8-옥소-구아닌과 같은 다른 뉴클레오티드 유사체를 이 방법으로 사용할 수 있다. 부가적으로, 이 기법은 매우 짧은 단편 (86bp)에서도 잘 작동하며, 에러 발생율이 낮다. 본 기법에 사용되는 DNA의 화학적 절단으로 매우 적은 수의 셔플링되지 않은 클론들이 제조된다.

[0112] 서열 상동성-독립적인 단백질 재조합(SHIPREC)에서는, 링커를 사용하여 2개의 관련성이 멀거나 관련성이 없는 유전자들이 융합되게 촉진시킨다. 뉴클레아제 처리를 이용하여, 2종의 유전자들 간에 다양한 키메라를 제조함으로써 단일-교차 하이브리드 라이브러리를 제조한다. 이들 융합체는 단일-크로스오버 하이브리드로 구성된 라이브러리를 구축한다 (Sieber et al., *Nat. Biotechnol.* 19:456-460 (2001)). 이는 제한된 유형의 셔플링을 만들어내며, 돌연변이 유발을 위해서는 개별 공정이 요구된다. 또한, 상동성이 필요하지 않기 때문에, 이러한 기법은 2개의 관련성이 없는 유전자들 각각의 다양한 분획들을 이용하여 키메라 라이브러리를 구축할 수 있다.

SHIPREC는 포유류 CP450의 N-말단부에 융합된 박테리아 CP450의 헴-결합 도메인으로 테스트하였으며; 이로써 용해성이 높은 효소에서 포유류 활성이 발휘되었다.

[0113] 유전자 부위 포화 돌연변이 유발(Gene Site Saturation Mutagenesis, GSSM™)에서, 출발 물질은 삽입체를 포함하는 슈퍼코일형의 dsDNA 플라스미드와 원하는 돌연변이 부위에 대해 축중인 2개의 프라이머를 포함한다 (Kretz et al., *Methods Enzymol.* 388:3-11 (2004)). 대상 돌연변이를 함유한 프라이머는 DNA 반대 가닥에 있는 동일한 서열에 어닐링한다. 돌연변이는 전형적으로 프라이머의 중간에, 각 말단에서 올바른 뉴클레오티드 서열 약 20개가 떨어진 측면에 위치된다. 프라이머의 서열은 NNN 또는 NNK (코딩) 및 MNN (비코딩) (N = 모두 4, K = G, T, M = A, C)이다. 연장 후, DpnI을 사용하여 dam-메틸화된 DNA를 잘라 야생형 주형을 제거한다. 이 기법은 정해진 위치 (즉, 코돈)에서 모든 가능한 아미노산 치환을 조사한다. 이 기법은 한 부위에 넌센스 코돈이 아닌 모든 가능한 치환이 구축되게 하며, 대부분 가능한 대립유전자들을 거의-동일 내지 동일하게 제공한다. 이러한 기법은 타겟 효소의 구조, 기전 또는 도메인에 대한 기존 지식이 필요없다. 이후 셔플링 또는 유전자 재조립한 후, 이 기법으로 단일 부위 상향-돌연변이들의 모든 가능한 조합을 포함하는 다양한 재조합 라이브러리를 제작한다. 이러한 조합 기법의 유용성은 50개 이상의 여러가지 효소들의 성공적인 진화로 입증되었고, 또한 해당 효소에서 2가지 이상의 특성들로 입증되었다.

[0114] 조합 카세트 돌연변이 유발(Combinatorial Cassette Mutagenesis, CCM)은 제한된 영역을 다수의 가능한 아미노산 서열 변이로 치환시키는 짧은 올리고뉴클레오티드 카세트를 사용한다 (Reidhaar-Olson et al. *Methods Enzymol.* 208:564-586 (1991); 및 Reidhaar-Olson et al. *Science* 241:53-57 (1988)). 2 또는 3곳에서의 동시적인 치환이 이 기법으로 가능하다. 부가적으로, 본 방법은 제한된 범위의 부위에서 대규모의 다수의 가능한 서열 변화를 테스트한다. 이 기법은 람다 억제자 DNA-결합 도메인의 정보 내용을 연구하는데 사용되고 있다.

[0115] 조합형 다중 카세트 돌연변이 유발(Combinatorial Multiple Cassette Mutagenesis, CMCM)은 기본적으로 CCM과 비슷하지만, 1) 높은 돌연변이 유발율로 epPCR을 이용하여 2) 핫 스팟과 핫 영역을 동정한 다음 3) CMCM으로 연장하여 단백질 서열 스페이스의 한정된 영역을 포괄(cover)하는, 큰 규모의 프로그램의 일부분으로서 사용된다 (Reetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591 (2001)). CCM에서와 같이, 본 방법은 타겟 영역에서 사실상 모든 가능한 변이들을 테스트할 수 있다. 랜덤 돌연변이와 셔플링된 유전자를 구축하기 위한 방법들과 함께 사용하는 경우, 다양한 셔플링된 단백질을 제작하는 탁월한 수단이 된다. 이러한 방식은 효소의 거울상이성질체 선택성을 51배 높이는데 성공하였다.

[0116] 돌연변이 유발 균주 기법(Mutator Strains technique)의 경우, 조건부 *ts* 돌연변이 유발 플라스미드는 선택 과정 중에 랜덤 및 천연 돌연변이 빈도를 20에서 4000 X로 증가시키며, 선택 과정이 필요없을 때에는 유해한 돌연변이가 축적되는 것을 차단할 수 있다 (Selifonova et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3645-3649 (2001)). 이 기법은 DNA 중합효소 III의 돌연변이 서브유닛을 코딩하는 플라스미드-유래의 *mutD5* 유전자를 이용한다. 이 서브유닛은 내인성 DNA 중합효소 III에 결합하며, 플라스미드를 보유한 임의의 균주에서 중합효소 III의 교정력을 약화시킨다. 광범위한 스펙트럼의 염기 치환과 프레임쉬프트 돌연변이가 이루어진다. 효율적으로 사용하기 위해서는, 돌연변이 유발 플라스미드는 바람직한 표현형이 달성되면 제거되어야 하며; 이는 복제 오리진의 온도 민감성 (ts)을 통해 달성되며, 이는 플라스미드를 41℃에서 큐어링(curing)한다. 돌연변이 유발 균주는 꽤 오래 연구되었음에 유념하여야 한다 (참조: Low et al., *J. Mol. Biol.* 260:359-3680 (1996)). 이러한 기법에서, 자발적인 돌연변이율은 매우 높게 관찰된다. 조건부 특성은 바람직하지 않은 백그라운드 돌연변이를 최소화한다. 이 기법은 돌연변이 유발율을 높이며, 매우 신속하게 바람직한 표현형을 달성하기 위해 후천적인 진화와 결부시킬 수 있다.

[0117] LTM (Look-Through Mutagenesis)은 선택된 아미노산의 조합 돌연변이(combinatorial mutation)를 분석 및 최적화하는 다향성 돌연변이를 유발하는 방법이다 (Rajpal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8466-8471 (2005)). 모든 가능한 아미노산 변화로 각 부위를 포화시키기 보다는, 아미노산 R-기 화합물 범위를 포괄하도록 9개로 이루어진 세트를 선별한다. 부위 당 보다 변화가 적을 수록 복수의 부위에 이러한 타입의 돌연변이 유발이 일어나게 할 수 있다. 낮은 나노몰에서 피코몰의 항체에 대한 결합 친화성 > 800배 증가가 이러한 방법을 통해 달성되었다. 이는 랜덤 조합의 수를 최소화할 수 있는 합리적인 방식이며, 스크리닝할 클론의 수를 크게 낮춤으로써 개선된 형질을 발굴하는 능력을 개선시킬 수 있다. 이는 결합 친화성을 증가시키거나 및/또는 해리를 감소시키기 위해, 항체 조작에 특이적으로 적용되고 있다. 이 기법은 스크리닝 또는 선별과 조합할 수 있다.

[0118] 유전자 어셈블리는, 한번에 복수의 유전자에 적용할 수 있거나, 또는 단일 유전자의 대규모 키메라(복수의 돌연

변이) 라이브러리를 제조할 수 있는 DNA 셔플링 방법이다 (Tunable GeneReassembly™ (TGR™) Technology supplied by Verenium Corporation). 전형적으로, 이 기법에서는 바람직한 개선을 나타내는 대표적인 서열 스페이스를 검색하기 위해 울트라-고처리 스크리닝과 조합하여 사용한다. 이 기법으로 상동성과 무관하게 복수의 유전자를 재조합할 수 있다. 크로스오버의 실제 수와 위치는 생물정보 분석을 통해 설계된 단편을 이용하여 사전-결정할 수 있다. 이 기법은, 사실상 모 유전자의 재형성이 이루어지지 않으며 불활성 유전자의 비율이 낮은, 고도의 다양성을 발생시킨다. GSSM™과 조합시, 매우 다양한 돌연변이들을 대상으로 활성 개선을 테스트할 수 있다. 본 발명은 DNA 셔플링의 "혼성(blending) 및 "미세 조정(fine tuning)"을 허용하며, 예컨대 코돈 용법 (codon usage)을 최적화할 수 있다.

[0119] PDA (*in Silico* Protein Design Automation)는, 특정 폴드를 가지고 있는 구조적으로 정의된 단백질 백본을 고정하고, 폴드와 전체 단백질 에너제틱스를 안정화시킬 수 있는 아미노산 치환에 대해 서열 스페이스를 검색하는 최적화 알고리즘이다 (Hayes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15926-15931 (2002)). 이 기법에서는 단백질 아미노산 변형에 대한 구조적 허용성을 검색하기 위해 인 실리코 구조-기반의 엔트로피 예측을 이용한다. 통계 역학을 적용하여 각 위치에서 커플링 상호작용을 계산한다. 아미노산 치환에 대한 구조 허용은 커플링 측정치이다. 궁극적으로, 이 기법은 구조적 특징의 보전성을 유지하면서 단백질 특성을 바람직하게 변형시키도록 설계된다. 본 방법은 전산적으로 조사하며, 가능한 최대 수 (10^{50})의 서열 변이체들을 필터링할 수 있다. 테스트할 서열 변이체의 선택은 가장 우호적인 열역학을 기반으로 한 예측과 관련있다. 원칙적으로, 안정성 또는 안정성과 연계되는 특성들만 이러한 기법으로 효과적으로 해결할 수 있다. 이 방법은 특히 면역글로불린 조작에 일부 치료 단백질에 성공적으로 사용되고 있다. 인 실리코 예측은 다수의 잠재적인 변이체를 테스트하는 과정을 상당히 회피한다. 기존의 3차 구조를 기반으로 한 예측은 가정된 구조를 기반으로 한 예측 보다 성공할 가능성이 높다. 이 기법은 쉽게 예측할 수 있으며, 기하급수적인 수 증가로 인해 전적으로 실험 기법으로 불가능한 복수의 동시적인 돌연변이를 타겟화된 방식으로 스크리닝할 수 있다.

[0120] ISM (Iterative Saturation Mutagenesis)은, 1) 구조/기능에 대한 지식을 이용하여 효소 개선이 가능한 부위를 선택하는 단계, 2) Stratagene QuikChange (Stratagene; San Diego CA)와 같은 돌연변이 유발 방법을 이용하여 선택한 부위에서의 포화 돌연변이 유발(saturation mutagenesis)을 수행하는 단계, 3) 원하는 특징을 스크리닝/선별하는 단계, 및 4) 개선된 클론(들)을 이용하여 다른 부위에 대해서도 다시 시작하여 원하는 활성이 달성될 때까지 계속 반복하는 단계를 포함한다 (Reetz et al., *Nat. Protoc.* 2:891-903 (2007); 및 Reetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45:7745-7751 (2006)). 이는 입증된 방법이며, 스크리닝/선별을 위해 해당 위치에서 모든 가능한 치환이 이루어지게 한다.

[0121] 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.

[0122] 본 발명의 다양한 구현예들의 작용에 실질적으로 영향을 미치지 않는 변형들은 본원에 기술된 본 발명의 정의내에 제공되는 것으로 이해된다. 따라서, 아래 실시예들은 예시하기 위한 의도일 뿐 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0123] **실시예 I**

[0124] **부타디엔 생산 경로**

[0125] 본 실시예에서는 일반 대사산물을 4 탄소 디엔, 1,3-부타디엔으로 변환하는데 필수적인 효소를 구비한 조작된 비천연 미생물을 이용하여 부타디엔을 직접 생산하는 새로운 공정을 설명한다. 부타디엔을 직접 생산하기 위한 새로운 한가지 경로는, 알데하이드 및 알코올 데하이드로게나제와의 환원을 통해 공지된 부탄올 경로 대사산물 크로토닐-CoA를 크로틸 알코올로 환원시킨 다음, 키나제를 이용하여 인산화하여 크로틸 피로포스페이트를 수득한 후, 이소프렌시타제 또는 이의 변이체를 이용하여 부타디엔으로 변환하는 과정을 수반한다 (도 2 참조). 다른 경로 (도 3)는 이소프레노이드 생합성에 대해 잘 특정화된 DXP 경로의 변형 경로이다. 이 경로에서, 기질에는 2-메틸기가 없으며, 부타디엔 신타제를 통해 이소프렌이 아닌 부타디엔이 제조된다. 상기 부타디엔 신타제는 본원에 기술된 바와 같이 방향성 진화 등의 방법을 이용하여 이소프렌 신타제로부터 파생될 수 있다. 마지막으로, 도 4는 천연 메발로네이트 경로의 기질 3-하이드록시-3-메틸-글루타릴-CoA(도 1)에 대한 서로게이트로서 제공되는, 기질 3-하이드록시글루타릴-CoA가 관여하는 부타디엔 경로를 나타낸다. 도 2의 단계 A-P, 도 3의 단계 A-K 및 도 4의 단계 A-O에 대한 후보 효소들은 아래에 나타낸다.

[0126] **아세틸-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제 (도 2, 단계 A)**

[0127] 아세토아세틸-CoA 티올라제는 아세틸-CoA 2 분자를 각각 아세토아세틸-CoA와 CoA로 변환한다. 아세토아세틸-CoA 티올라제 효소의 예로는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)의 *atoB* (Martin et al., *Nat.Biotechnol* 21:796-802 (2003)), 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *thlA* 및 *thlB* (Hanai et al., *Appl Environ Microbiol* 73:7814-7818 (2007); Winzer et al., *J.Mol.Microbiol Biotechnol* 2:531-541 (2000)), 그리고 사카로마이세스 세레비지애의 *ERG10* (Hiser et al., *J. Biol. Chem.* 269:31383-31389 (1994))의 유전자 산물을 포함한다.

표 1

[0128]

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

[0129] **아세토아세틸-CoA 리덕타제 (도 2, 단계 B)**

[0130] 아세토아세틸-CoA에서 3-하이드록시부티릴-CoA로의 환원을 촉매하는 아세토아세틸-CoA 리덕타제는, 여러가지 클로스트리디아 종에서의 부티레이트로의 아세틸-CoA 발효 경로에 참여한다 (Jones et al., *Microbiol Rev.* 50:484-524 (1986)). 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *hbd*에 의해 코딩되는 효소가 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)에서 기능적으로 발현되었다 (Youngleson et al., *J Bacteriol.* 171:6800-6807 (1989)). 부가적으로, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) *fadB* 및 *fadJ*에 코딩된 2개의 지방산 산화 복합체의 서브유닛들은 3-하이드록시아실-CoA 데하이드로게나제로서 기능한다 (Binstock et al., *Methods Enzymol.* 71 Pt C:403-411 (1981)). 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로 환원시키는 것으로 확인된 또 다른 후보 유전자는, 주글로에이 라미게라의 *phbB* (Ploux et al., *Eur.J Biochem.* 174:177-182 (1988))와 로도박터 스페어로이데스의 *phaB* (Alber et al., *Mol.Microbiol* 61:297-309 (2006))이다. 전자 후보 유전자는 NADPH-의존적이며, 이의 뉴클레오티드 서열은 결정되었으며 (Peoples et al., *Mol.Microbiol* 3:349-357 (1989)), 유전자는 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨 바 있다. 유전자에 대한 기질 특이성 연구를 통해, 기질로서 아세토아세틸-CoA 대신 3-옥소프로피오닐-CoA를 수용할 수 있다는 결론이 내려졌다 (Ploux et al., 상기 참조, (1988)). 추가적인 후보 유전자로는 클로스트리듐 클루이베리의 *Hbd1* (C-말단 도메인)과 *Hbd2* (N-말단 도메인)(Hillmer and Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 3334:12-23 (1974))과 보스 타우루스의 *HSD17B10* (WAKIL et al., *J Biol.Chem.* 207:631-638 (1954))를 포함한다.

표 2

[0131]

단백질	Genbank ID	GI 번호	유기체
fadB	P21177.2	119811	에스케리치아 콜라이
fadJ	P77399.1	3334437	에스케리치아 콜라이
Hbd2	EDK34807.1	146348271	클로스트리듐 클루이베리
Hbd1	EDK32512.1	146345976	클로스트리듐 클루이베리
hbd	P52041.2	18266893	클로스트리듐 아세토부틸리컴
HSD17B10	002691.3	3183024	보스 타우루스
phbB	P23238.1	130017	주글로에이 라미게라
phaB	YP_353825.1	77464321	로도박터 스페어로이데스

[0132] 기타 클로스트리디아 속과 메탈로스페어라 세둘라(*Metallosphaera sedula*)에서 유사한 다수 효소들이 발견되었다 (Berg et al., *Science.* 318:1782-1786 (2007)).

표 3

[0133]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
hbd	NP_349314.1	NP_349314.1	클로스트리듐 아세토부틸리컴
hbd	AAM14586.1	AAM14586.1	클로스트리듐 베이예린스키이
Msed_1423	YP_001191505	YP_001191505	메탈로스페어라 세둘라

Msed_0399	YP_001190500	YP_001190500	메탈로스페어라 세둘라
Msed_0389	YP_001190490	YP_001190490	메탈로스페어라 세둘라
Msed_1993	YP_001192057	YP_001192057	메탈로스페어라 세둘라

[0134] **3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 (도 2, 단계 C)**

[0135] 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 (EC 4.2.1.55)는 크로토나제라고도 하며, 이는 가역적으로 3-하이드록시부티릴-CoA를 탈수하여 크로토닐-CoA를 만드는 에노일-CoA 하이드라타제이다. 크로토나제 효소는, 일부 유기체들, 특히 클로스티리디아졸에서 n-부탄올을 만드는데 필요하며, 또한 설폴로부스(*Sulfolobus*), 액시디아누스(*Acidianus*) 및 메탈로스페어라(*Metallosphaera*) 속의 호열호산성 고세균에서의 3-하이드록시프로피오네이트/4-하이드록시부티레이트 사이클의 한 단계를 포함한다. 크로토나제 효소를 코딩하는 유전자의 예들은 클로스트리듐 아세토부틸리컴 (Atsumi et al., *Metab Eng.* 10:305-311 (2008); Boynton et al., *J Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996)), 클로스트리듐 클루이베리 (Hillmer et al., *FEBS Lett.* 21:351-354 (1972)) 및 메탈로스페어라 세둘라 (Berg et al., *Science* 318:1782-1786 (2007a))에서 발견되었지만, 후자 유전자 서열은 아직 확인되지 않았다. 에노일-CoA 하이드라타제는 슈도모나스 푸티다의 *ech*에 의해 코딩되며, 크로토닐-CoA에서 3-하이드록시부티릴-CoA로의 변환을 촉매한다 (Roberts et al., *Arch Microbiol.* 117:99-108 (1978)). 추가적인 에노일-CoA 하이드라타제 후보 유전자로는 슈도모나스 푸티다의 *phaA*와 *phaB*, 그리고 슈도모나스 플루오레센스의 *paaA*와 *paaB*가 있다 (Olivera et al., *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998)). 마지막으로, 다수의 에스케리치아 콜라이 유전자들이 *maoC* (Park et al., *J Bacteriol.* 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et al., *Eur. J Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park et al., *Appl. Biochem. Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park et al., *Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004)) 및 *paaG* (Ismail et al., 상기 참조, (2003); Park and Lee, 상기 참조, (2004); Park and Yup, 상기 참조, (2004))를 포함하여 에노일-CoA 하이드라타제 기능성을 보이는 것으로 확인되었다. 이들 단백질을 하기에 나타낸다.

표 4

[0136]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
crt	NP_349318.1	15895969	클로스트리듐 아세토부틸리컴
crt1	YP_001393856.1	153953091	클로스트리듐 클루이베리
ech	NP_745498.1	26990073	슈도모나스 푸티다
paaA	NP_745427.1	26990002	슈도모나스 푸티다
paaB	NP_745426.1	26990001	슈도모나스 푸티다
phaA	ABF82233.1	106636093	슈도모나스 플루오레센스
phaB	ABF82234.1	106636094	슈도모나스 플루오레센스
maoC	NP_415905.1	16129348	에스케리치아 콜라이
paaF	NP_415911.1	16129354	에스케리치아 콜라이
paaG	NP_415912.1	16129355	에스케리치아 콜라이

[0137] **크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성) (도 2, 단계 D)**

[0138] 수종의 아실-CoA 데하이드로게나제들은 아실-CoA를 이의 대응되는 알데하이드로 환원할 수 있다. 즉, 이들은 본래 크로토닐-CoA를 크로톤알데하이드로 환원시키거나, 또는 그렇도록 조작될 수 있다. 이러한 효소를 코딩하는 유전자의 예로는, 지방 아실-CoA 리덕타제를 코딩하는 액시네토박터 칼코아세티쿠스의 *acr1* (Reiser et al., *J. Bacteriol.* 179:2969-2975 (1997)), 액시네토박터 *sp. M-1* 지방 아실-CoA 리덕타제 (Ishige et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192-1195 (2002)), 및 클로스트리듐 클루이베리에서 *sucD* 유전자에 의해 코딩되는 CoA- 및 NADP-의존적인 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제 (Sohling et al., *J Bacteriol.* 178:871-880 (1996); Sohling et al., *J. Bacteriol.* 178:871-80 (1996)))를 포함한다. 포르피로모나스 깅기발리스의 *SucD*는 다른 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제이다 (Takahashi et al., *J. Bacteriol.* 182:4704-4710 (2000)). 이들 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제들은 문헌에 개시된 바와 같이, 1,4-부탄디올을 생산하기 위한 경로의 일부로서 4-하이드록시부티릴-CoA를 4-하이드록시부타날로 변환하는 것으로 구체적으로 입증되었다 (Burk et al., WO/2008/115840: (2008)). 슈도모나스 sp의 *bphG*에 의해 코딩되는 아실화 아세트알데하이드 데하이드로게나제 효소는, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 이소부티르알데하이드 및 포름알데하이드를 산화 및 아실화하는 것으로 입증되었으므로, 또다른 효소이다 (Powlowski et

al., *J. Bacteriol.* 175:377-385 (1993)).

표 5

[0139]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
acr1	YP_047869.1	50086359	액시네토박터 칼코아세티쿠스
acr1	AAC45217	1684886	액시네토박터 베일리이
acr1	BAB85476.1	18857901	액시네토박터 sp. Strain M-1
sucD	P38947.1	172046062	클로스트리듐 클루이베리
sucD	NP_904963.1	34540484	포르피로모나스 긴기발리스
bphG	BAA03892.1	425213	슈도모나스 *sp*

[0140] 아실-CoA를 대응되는 알데하이드로 변환하는 다른 효소 타입은, 말로닐-CoA를 말론 세미알데하이드로 변환하는 말로닐-CoA 리덕타제이다. 말로닐-CoA 리덕타제는 호열호산성 고세균 박테리아에서 3-하이드록시프로피오네이트 사이클을 통한 자가영양성 탄소 고정에 주요 효소이다 (Berg et al., *Science* 318:1782-1786 (2007b); Thauer, 318:1732-1733 (2007)). 이 효소는 조인자로서 NADPH를 이용하며, 메탈로스페어라와 설폴로부스 spp에서 특정화되었다 (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); Hugler et al., *J. Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002)). 이 효소는 메탈로스페어라 세둘라의 *Msed_0709*에 코딩되어 있다 (Alber et al., 상기 참조, (2006); Berg et al., 상기 참조, (2007b)). 설폴로부스 토코다이로부터 말로닐-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자가 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이에서 이종적으로 발현되었다 (Alber et al., 상기 참조, (2006)). 이들 효소의 알데하이드 데하이드로게나제 기능성은 클로로플렉수스 아우란티아쿠스의 2중 기능의 데하이드로게나제와 유사하지만, 서열 유사성은 거의 없다. 이들 2가지 말로닐-CoA 리덕타제 후보 효소는, 환원과 동시적인 아스파르틸-4-포스페이트에서 아스파르테이트 세미알데하이드로의 탈인산화를 촉매하는 효소인, 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제와 서열 유사성이 높다. 부가적인 후보 유전자는, 설폴로부스 솔파타리쿠스와 설폴로부스 액시도칼다리우스 등의 다른 유기체들에서 단백질 서열 상동성에 의해 발견할 수 있다. CoA-아실화 알데하이드 데하이드로게나제의 또다른 후보 유전자는 클로스트리듐 베이예린키이의 *ald* 유전자이다 (Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999). 이 효소는 아세틸-CoA와 부티릴-CoA를 대응되는 알데하이드 화합물로 환원시키는 것으로 보고된 바 있다. 이 유전자는 살모넬라 티피무리움과 에스케리치아 콜라이의 아세트알데하이드 데하이드로게나제를 코딩하는 *eutE*와 매우 유사하다 (Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999). 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 6

[0141]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	메탈로스페어라 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	49473535	클로스트리듐 베이예린키이
eutE	AAA80209	687645	살모넬라 티피무리움
eutE	P77445	2498347	에스케리치아 콜라이

[0142] **크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성) (도 2, 단계 E)**

[0143] 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성) 활성을 나타내는 효소는 크로톤알데하이드로부터 크로틸 알코올을 만들 수 있다. 아래 효소들은 본래 이러한 활성을 가지고 있거나, 또는 이 활성을 나타내도록 조작할 수 있다. 알데하이드에서 알데하이드로의 변환을 촉매하는 효소 (즉, 알코올 데하이드로게나제 또는 등가로 알데하이드 리덕타제)를 코딩하는 유전자의 예로는, C2-C14에 대한 중쇄 알코올 데하이드로게나제를 코딩하는 *alrA* (Tani et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5231-5235 (2000)), 사카로마이세스 세레비지애의 ADH2 (Atsumi et al., *Nature* 451:86-89 (2008)), C(3) 보다 긴 분자를 선호하는 에스케리치아 콜라이의 *yqhD* (Sulzenbacher et al., *J. Mol. Biol.* 342:489-502 (2004)), 및 부티르알데하이드를 부탄올로 변환하는 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *bdh* I와 *bdh* II (Walter et al., *J. Bacteriol.* 174:7149-7158 (1992))를 포함한다. 자이모모나스 모

빌리스의 ADH1은 포름알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드 및 아크롤레인 등의 다수의 알데하이드에 대해 활성을 나타내는 것으로 입증된 바 있다 (Kinoshita, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:249-254 (1985)). 클로스트리듐 베이예린키이 NCIMB 8052의 Cbei_2181은 크로톤알데하이드를 크로틸 알코올로 변환시킬 수 있는 또 다른 유용한 알코올 데하이드로게나제를 코딩한다.

표 7

[0144]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
alrA	BAB12273.1	9967138	액시네토박터 sp. Strain M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	사카로마이세스 세레비지애
yqhD	NP_417484.1	16130909	에스케리치아 콜라이
bdh I	NP_349892.1	15896543	클로스트리듐 아세토부틸리컴
bdh II	NP_349891.1	15896542	클로스트리듐 아세토부틸리컴
adhA	YP_162971.1	56552132	자이모모나스 모빌리스
Cbei_2181	YP_001309304.1	150017050	클로스트리듐 베이예린키이 NCIMB 8052

[0145] 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 활성을 나타내는 효소 (EC 1.1.1.61) 역시 이 카테고리에 포함된다. 이러한 효소는 랄스토니아 유트로파 (Bravo et al., *J. Forensic Sci.* 49:379-387 (2004)), 클로스트리듐 클루이베리 (Wolff et al., *Protein Expr. Purif.* 6:206-212 (1995)) 및 아라비돕시스 탈리아나 (Breitkreuz et al., *J. Biol. Chem.* 278:41552-41556 (2003))에서 특정화되었다.

표 8

[0146]

단백질	GenBank 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

[0147] **크로틸 알코올 키나제 (도 2, 단계 F)**

[0148] 크로틸 알코올 키나제 효소는 포스페이트기를 크로틸 알코올의 하이드록시기로 전이하는 과정을 촉매한다. 아래 기술된 효소들은 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 포스페이트기를 알코올기로 전이하는 과정을 촉매하는 키나제는 EC 2.7.1 효소 클래스에 속한다. 아래 표에 EC 2.7.1 효소 클래스에서 몇가지 유용한 키나제 효소를 열거한다.

표 9

[0149]

EC 번호	효소명	EC 번호	효소명	EC 번호	효소명
2.7.1.1	헥소키나제	2.7.1.48	우리딘 키나제	2.7.1.94	아실글리세롤 키나제
2.7.1.2	글루코키나제	2.7.1.49	하이드록시메틸피리미딘 키나제	2.7.1.95	카나마이신 키나제
2.7.1.3	케토헥소키나제	2.7.1.50	하이드록시에틸티아졸 키나제	2.7.1.100	S-메틸-5-티오리보스 키나제
2.7.1.4	프럭토키나제	2.7.1.51	L-푸쿨로키나제	2.7.1.101	타가토스 키나제
2.7.1.5	람눌로키나제	2.7.1.52	푸코키나제	2.7.1.102	하마멜로스 키나제
2.7.1.6	갈락토키나제	2.7.1.53	L-자일룰로키나제	2.7.1.103	비오마이신 키나제
2.7.1.7	만노키나제	2.7.1.54	D-아라비노키나제	2.7.1.105	6-포스포프럭토-2-키나제
2.7.1.8	글루코사민 키나제	2.7.1.55	알로스 키나제	2.7.1.106	글루코스-1,6-비스포스페이트 신타제
2.7.1.10	포스포글루코키나제	2.7.1.56	1-포스포프럭토키나제	2.7.1.107	디아실글리세롤 키나제
2.7.1.11	6-포스포프럭토키나제	2.7.1.58	2-데하이드로-3-데옥시갈락토노키나제	2.7.1.108	돌리콜 키나제
2.7.1.12	글루코노키나제	2.7.1.59	N-아세틸글루코사민 키나제	2.7.1.113	데옥시구아노신 키나제

2.7.1.13	데하이드로글루코노키나제	2.7.1.60	N-아실만노사민 키나제	2.7.1.114	AMP-티미딘 키나제
2.7.1.14	세도헵툴로키나제	2.7.1.61	아실-포스페이트-헥소스 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.118	ADP-티미딘 키나제
2.7.1.15	리보키나제	2.7.1.62	포스포르아미데이트-헥소스 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.119	히그로마이신-B 7"-O-키나제
2.7.1.16	리불로키나제	2.7.1.63	폴리포스페이트-글루코스 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.121	포스포에놀피루베이트-글리세론 포스포트랜스퍼라제
2.7.1.17	자일룰로키나제	2.7.1.64	이노시톨 3-키나제	2.7.1.122	자일리톨 키나제
2.7.1.18	포스포리보키나제	2.7.1.65	스실로-이노사민 4-키나제	2.7.1.127	이노시톨-트리스포스페이트 3-키나제
2.7.1.19	포스포리불로키나제	2.7.1.66	운데카프레놀 키나제	2.7.1.130	테트라아실디사카라이드 4'-키나제
2.7.1.20	아데노신 키나제	2.7.1.67	1-포스파티딜이노시톨 4-키나제	2.7.1.134	이노시톨-테트라키스포스페이트 1-키나제
2.7.1.21	티미딘 키나제	2.7.1.68	1-포스파티딜이노시톨-4-포스페이트 5-키나제	2.7.1.136	마크롤라이드 2'-키나제
2.7.1.22	리보실니코틴아미드 키나제	2.7.1.69	단백질-Np-포스포히스티딘-당 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.137	포스파티딜이노시톨 3-키나제
2.7.1.23	NAD+ 키나제	2.7.1.70	EC 2.7.1.37와 상동	2.7.1.138	세라마이드 키나제
2.7.1.24	데포스포-CoA 키나제	2.7.1.71	쉬키메이트 키나제	2.7.1.140	이노시톨-테트라키스포스페이트 5-키나제
2.7.1.25	아데닐릴-설페이트 키나제	2.7.1.72	스트렙토마이신 6-키나제	2.7.1.142	글리세롤-3-포스페이트-글루코스 포스포트랜스퍼라제
2.7.1.26	리보플라빈 키나제	2.7.1.73	이노신 키나제	2.7.1.143	디포스페이트-퓨린 뉴클레오사이드 키나제
2.7.1.27	에리트리톨 키나제	2.7.1.74	데옥시시티딘 키나제	2.7.1.144	타가토스-6-포스페이트 키나제
2.7.1.28	트리오키나제	2.7.1.76	데옥시아데노신 키나제	2.7.1.145	데옥시뉴클레오사이드 키나제
2.7.1.29	글리세론 키나제	2.7.1.77	뉴클레오사이드 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.146	ADP-의존형 포스포프럭토키나제
2.7.1.30	글리세롤 키나제	2.7.1.78	폴리뉴클레오티드 5'-하이드록실-키나제	2.7.1.147	ADP-의존형 글루코키나제
2.7.1.31	글리세레이트 키나제	2.7.1.79	디포스페이트-글리세롤 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.148	4-(시티딘 5'-디포스포)-2-C-메틸-D-에리트리톨 키나제
2.7.1.32	콜린 키나제	2.7.1.80	디포스페이트-세린 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.149	1-포스파티딜이노시톨-5-포스페이트 4-키나제
2.7.1.33	판토테네이트 키나제	2.7.1.81	하이드록시라이신 키나제	2.7.1.150	1-포스파티딜이노시톨-3-포스페이트 5-키나제
2.7.1.34	판테테인 키나제	2.7.1.82	에탄올아민 키나제	2.7.1.151	이노시톨-폴리포스페이트 멀티키나제
2.7.1.35	피리독살 키나제	2.7.1.83	슈도우리딘 키나제	2.7.1.153	포스파티딜이노시톨-4,5-비스s포스페이트 3-키나제
2.7.1.36	메발로네이트 키나제	2.7.1.84	알킬글리세론 키나제	2.7.1.154	포스파티딜이노시톨-4-포스페이트 3-키나제
2.7.1.39	호모세린 키나제	2.7.1.85	베타-글루코사이드 키나제	2.7.1.156	아데노실코빈아미드 키나제
2.7.1.40	피루베이트 키나제	2.7.1.86	NADH 키나제	2.7.1.157	N-아세틸갈락토사민 키나제
2.7.1.41	글루코스-1-포스페이트 포스포디스뮤타제	2.7.1.87	스트렙토마이신 3"-키나제	2.7.1.158	이노시톨-펜타키스포스페이트 2-키나제
2.7.1.42	리보플라빈 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.88	디하이드로스트레토마이신-6-포스페이트 3'a-키나제	2.7.1.159	이노시톨-1,3,4-트리스포스페이트 5/6-키나제

2.7.1.43	글루쿠로노키나제	2.7.1.89	티아민 키나제	2.7.1.160	2'-포스포트랜스퍼라제
2.7.1.44	갈락투로노키나제	2.7.1.90	디포스페이트-프럭토스-6-포스페이트 1-포스포트랜스퍼라제	2.7.1.161	CTP-의존형 리보플라빈 키나제
2.7.1.45	2-데하이드로-3-데옥시글루코노키나제	2.7.1.91	스핀가닌 키나제	2.7.1.162	N-아세틸헥소사민 1-키나제
2.7.1.46	L-아라비노키나제	2.7.1.92	5-데하이드로-2-데옥시글루코노키나제	2.7.1.163	히그로마이신 B 4-O-키나제
2.7.1.47	D-리불로키나제	2.7.1.93	알킬글리세롤 키나제	2.7.1.164	O-포스포세릴-tRNASec 키나제

[0150] 이 단계에서 우수한 후보 효소는 메틸 유사체, 메발로네이트, 3,5-디하이드록시펜타노에이트의 말단 하이드록실기를 인산화하는 메발로네이트 키나제 (EC 2.7.1.36)이다. 이 단계의 일부 후보 유전자는 사카로마이세스 세레비지애의 erg12, 메타노칼도코커스 야나스키의 *mvk*, 호모사피엔스의 *MVK*, 그리고 아라비돕시스 탈리아나 *col*의 *mvk*를 포함한다.

표 10

[0151]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
erg12	*CAA39359.1*	3684	사카로마이세스 세레비지애
mvk	Q58487.1	2497517	메타노칼도코커스 야나스키
mvk	AAH16140.1	16359371	호모 사피엔스
M/mvk	NP_851084.1	30690651	아라비돕시스 탈리아나

[0152] 글리세롤 키나제는 또한 글리세롤의 말단 하이드록실기를 인산화하여 글리세롤-3-포스페이트를 만들다. 이 반응은, 에스케리치아 콜라이, 사카로마이세스 세레비지애 및 서모토가 마리티마를 비롯하여 여러가지 종들에서 이루어진다. 에스케리치아 콜라이의 글리세롤 키나제는 대체 기질로서 디하이드록시아세톤과 글리세르알데하이드 등을 받아들이는 것으로 확인된 바 있다 (Hayashi et al., *J Biol.Chem.* 242:1030-1035 (1967)). 서모토가 마리티마는 2종의 글리세롤 키나제를 가진다 (Nelson et al., *Nature* 399:323-329 (1999)). 글리세롤 키나제는 기질 특이성이 넓은 것으로 알려져 있다. Crans과 Whiteside는 4종의 유기체(에스케리치아 콜라이, 사카로마이세스 세레비지애, 바실러스 스테아로서모필러스 및 칸디다 미코더마)에서 글리세롤 키나제를 연구하였다 (Crans et al., *J. Am. Chem. Soc.* 107:7008-7018 (2010); Nelson et al., 상기 참조, (1999)). 이들은 글리세롤의 66종의 유사체를 연구하였고, 이 효소가 하나의 말단 하이드록실기 대신 다양한 치환기를 허용할 수 있으며 메틸기로 C2의 수소 원자를 치환할 수 있다고 결론내렸다. 흥미롭게도, 4종의 유기체에서 유래한 효소들 모두 카이네틱 상수가 매우 비슷하였다. 후보 유전자는 다음과 같다:

표 11

[0153]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
glpK	*AP_003883.1*	89110103	에스케리치아 콜라이 K12
glpK1	NP_228760.1	15642775	서모토가 마리팀 MSB8
glpK2	NP_229230.1	15642775	서모토가 마리팀 MSB8
Gut1	NP_011831.1	82795252	사카로마이세스 세레비지애

[0154] 호모세린 키나제는, 3,5-디하이드록시펜타노에이트의 인산화를 유도할 수 있는 가능성 있는 다른 후보 효소이다. 이 효소는 또한 에스케리치아 콜라이, 스트렙토마이세스 sp, 및 사카로마이세스 세레비지애 등의 다수의 유기체들에 존재한다. 에스케리치아 콜라이의 호모세린 키나제는 L-2-아미노, 1,4-부탄디올, 아스파르테이트 세미알데하이드 및 2-아미노-5-하이드록시발레레이트 등의 다양한 기질에 대해 활성을 가지는 것으로 확인되었다 (Huo et al., *Biochemistry* 35:16180-16185 (1996); Huo et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 330:373-379 (1996)). 이 효소는 알파 위치의 카르복실시가 에스테르로 치환되거나 또는 하이드록시메틸기로 치환된 기질에 작용할 수 있다. 후보 유전자는 다음과 같다:

표 12

[0155]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
thrB	BAB96580.2	85674277	에스케리치아 콜라이 K12
SACT1DRAFT_4809	ZP_06280784.1	282871792	스트렙토마이세스 sp. ACT-1
Thr1	AAA35154.1	172978	사카로마이세스 세레비지애

[0156] **2-부테닐-4-포스페이트 키나제 (도 2, 단계 G)**

[0157] 2-부테닐-4-포스페이트 키나제 효소는 2-부테닐-4-포스페이트의 포스페이트기로 포스페이트기를 전이시키는 과정을 촉매한다. 아래 기술된 효소는 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 포스페이트기를 다른 포스페이트기로 전이시키는 과정을 촉매하는 키나제는 EC 2.7.4 효소 클래스에 속한다. 아래 표는 EC 2.7.4 효소 클래스에 속하는 수종의 유용한 키나제 효소를 열거한다.

표 13

[0158]

EC 번호	효소명
2.7.4.1	폴리포스페이트 키나제
2.7.4.2	포스포메발로네이트 키나제
2.7.4.3	아데닐레이트 키나제
2.7.4.4	뉴클레오사이드-포스페이트 키나제
2.7.4.6	뉴클레오사이드-디포스페이트 키나제
2.7.4.7	포스포메틸피리미딘 키나제
2.7.4.8	구아닐레이트 키나제
2.7.4.9	dTMP 키나제
2.7.4.10	뉴클레오사이드-트리포스페이트-아데닐레이트 키나제
2.7.4.11	(데옥시)아데닐레이트 키나제
2.7.4.12	T2-유도성 데옥시뉴클레오티드 키나제
2.7.4.13	(데옥시)뉴클레오사이드-포스페이트 키나제
2.7.4.14	시티딜레이트 키나제
2.7.4.15	티아민-디포스페이트 키나제
2.7.4.16	티아민-포스페이트 키나제
2.7.4.17	3-포스포글리세로일-포스페이트-폴리포스페이트 포스포트랜스퍼라제
2.7.4.18	파르네실-디포스페이트 키나제
2.7.4.19	5-메틸데옥시시티딘-5'-포스페이트 키나제
2.7.4.20	돌리킬-디포스페이트-폴리포스페이트 포스포트랜스퍼라제
2.7.4.21	이노시톨-헥사키스포스페이트 키나제
2.7.4.22	UMP 키나제
2.7.4.23	리보스 1,5-비스포스페이트 포스포키나제
2.7.4.24	디포스포이노시톨-펜타키스스페이트 키나제

[0159] 포스포메발로네이트 키나제 효소가 매우 흥미롭다. 포스포메발로네이트 키나제 (EC 2.7.4.2)는 2-부테닐-4-포스페이트 키나제로의 유사 변환을 촉매한다. 이 효소는 사카로마이세스 세레비지애의 *erg8* (Tsay et al., *Mol.Cell Biol.* 11:620-631 (1991))와 스트렙토코커스 뉴모니애, 스타필로코커스 아우레우스 및 엔테로코커스 패칼리스의 *mvaK2*에 의해 코딩된다 (Doun et al., Protein *Sci.* 14:1134-1139 (2005); Wilding et al., *J Bacteriol.* 182:4319-4327 (2000)). 스트렙토코커스 뉴모니애와 엔테로코커스 패칼리스에서 효소들이 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이에서 특정화되었다 (Pilloff et al., *J Biol. Chem.* 278:4510-4515 (2003); Doun et al., Protein *Sci.* 14:1134-1139 (2005)).

표 14

[0160]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
Erg8	AAA34596.1	171479	사카로마이세스 세레비지애
mvaK2	AAG02426.1	9937366	스타필로코커스 아우레우스
mvaK2	AAG02457.1	9937409	스트렙토코커스 뉴모니애

mvaK2	AAG02442.1	9937388	엔테로코커스 패칼리스

[0161] **부타디엔 신타제 (도 2, 단계 H)**

[0162] 부타디엔 신타제는 2-부테닐-4-디포스페이트에서 1,3-부타디엔으로의 변환을 촉매한다. 아래 기술된 효소는 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 이소프렌 신타제는 본래 디메틸알릴 디포스페이트의 이소프렌으로의 변환을 촉매하며, 또한 2-부테닐-4-디포스페이트로부터의 1,3-부타디엔의 합성을 촉매할 수 있다. 이소프렌 신타제는 포풀루스 알바 (Sasaki et al., FEBS Letters, 2005, 579 (11), 2514-2518), 푸라리아 몬타나(*Pueraria montana*) (Lindberg et al., Metabolic Eng, 2010, 12 (1), 70-79; Sharkey et al., Plant Physiol., 2005, 137 (2), 700-712), 및 포풀루스 트레뮬라 x 포풀루스 알바 (Miller et al., Planta, 2001, 213 (3), 483-487) 등의 몇가지 유기체들에서 발견할 수 있다. 추가적인 이소프렌 신타제 효소는 (Chotani et al., WO/2010/031079, Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene; Cervin et al., US Patent Application 20100003716, Isoprene Synthase Variants for Improved Microbial Production of Isoprene)에 기술되어 있다.

표 15

[0163]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
ispS	BAD98243.1	63108310	포풀루스 알바
ispS	AAQ84170.1	35187004	푸라리아 몬타나
ispS	CAC35696.1	13539551	포풀루스 트레뮬라 x 포풀루스 알바

[0164] **크로토닐-CoA 하이드롤라제, 신테타제, 트랜스퍼라제 (도 2, 단계 I)**

[0165] 크로토닐-CoA 하이드롤라제는 크로토닐-CoA에서 크로토네이트로의 변환을 촉매한다. 아래 기술된 효소는 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 3-하이드록시이소부티릴-CoA 하이드롤라제는 발린 분해 과정 중에 3-하이드록시이소부티릴-CoA에서 3-하이드록시이소부티레이트로의 변환을 효율적으로 촉매한다 (Shimomura et al., *J Biol Chem.* 269:14248-14253 (1994)). 이 효소를 코딩하는 유전자로는 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*) (Shimomura et al., *supra*; Shimomura et al., *Methods Enzymol.* 324:229-240 (2000)) 및 호모 사피엔스 (Shimomura et al., *supra*)의 *hibch*를 포함한다. 또한, 호모 사피엔스 효소는 기질로서 3-하이드록시부티릴-CoA와 3-하이드록시프로피오닐-CoA를 수용한다. 서열 상동성에 의한 후보 유전자로는 사카로마이세스 세레비지애의 *hibch*와 바실러스 세레우스의 BC_2292가 있다. 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 16

[0166]

단백질	GenBank 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

[0167] 수종의 진핵 생물 아세틸-CoA 하이드롤라제 (EC 3.1.2.1)는 기질 특이성이 넓으며, 따라서 적합한 후보 효소이다. 예컨대, 라투스 노르베기쿠스 뇌 유래 효소 (Robinson et al., Res. Commun. 71:959-965 (1976))는 부티릴-CoA, 헥사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응할 수 있다. 그 서열은 보고된 바 없지만, 완두콩 잎의 미토콘드리아 유래 효소는 기질 특이성이 넓으며, 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 팔미토일-CoA, 올레오일-CoA, 숙시닐-CoA 및 크로토닐-CoA에 대해 입증된 활성을 가진다 (Zeiher et al., Plant. Physiol. 94:20-27 (1990)). 사카로마이세스 세레비지애 유래 아세틸-CoA 하이드롤라제, ACH1은 다른 후보 하이드롤라제이다 (Buu et al., J. Biol. Chem. 278:17203-17209 (2003)). 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 17

[0168]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
acot12	NP_570103.1	18543355	라투스 노르베기쿠스
ACH1	NP_009538	6319456	사카로마이세스 세레비지애

[0169] 다른 후보 하이드롤라제는, 글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 서베릴-CoA, 세바실-CoA 및 도데칸디오일-CoA에 대해 활성을 나타내는 인간 디카르복시산 티오에스터라제 *acot8* (Westin et al., J Biol. Chem. 280:38125-38132 (2005))와 또한 광범위한 CoA 티오에스테르를 가수분해할 수 있는 가장 가까운 에스케리치아 콜라이 상동체 *tesB*이다 (Naggert et al., J Biol. Chem. 266:11044-11050 (1991)). 유사 효소는 랫 간에서도 특정화되었다 (Deana et al., Biochem. Int. 26:767-773 (1992)). 다른 잠재적인 에스케리치아 콜라이 티오에스테르 하이드롤라제로는 *tesA* (Bonner et al., Chem. 247:3123-3133 (1972)), *ybgC* (Kuznetsova et al., FEMS Microbiol Rev 29:263-279 (2005); 및 (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 산물을 포함한다. 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 18

[0170]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
tesB	NP_414986	16128437	에스케리치아 콜라이
acot8	CAA15502	3191970	호모 사피엔스
acot8	NP_570112	51036669	라투스 노르베기쿠스
tesA	NP_415027	16128478	에스케리치아 콜라이
ybgC	NP_415264	16128711	에스케리치아 콜라이
paaI	NP_415914	16129357	에스케리치아 콜라이
ybdB	NP_415129	16128580	에스케리치아 콜라이

[0171] 또 다른 후보 하이드롤라제는 액시드아미노코커스 퍼멘탄스 유래의 글루타코네이트 CoA-트랜스퍼라제이다. 이 효소는 글루타릴-CoA, 아세틸-CoA 및 3-부테노일-CoA에 대해 활성을 가진 아실-CoA 하이드롤라제로 부위-특이적인 돌연변이 유발에 의해 형질전환된 바 있다 (Mack et al., FEBS.Lett. 405:209-212 (1997)). 이는, 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제 및 아세토아세틸-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제를 코딩하는 효소가 또한 이 반응 단계의 후보체로서 사용될 수 있으며, 이의 기능에 변화를 가하기 위해 특정한 돌연변이가 필요할 것임을 시사한다.

표 19

[0172]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
gctA	CAA57199	559392	액시드아미노코커스 퍼멘탄스
gctB	CAA57200	559393	액시드아미노코커스 퍼멘탄스

[0173] 크로토닐-CoA 신테타제는 크로토닐-CoA에서 크로토네이트로의 변환을 촉매한다. 아래 기술된 효소는 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 한가지 후보 효소인 ADP-형성 아세틸-CoA 신테타제 (ACD, EC 6.2.1.13)는 ATP를 동시에 합성하면서 아실-CoA 에스테르를 이의 대응되는 산으로 변환시키는 과정을 커플링한다. 기질 특이성이 넓은 수종의 효소들이 문헌에 기술되어 있다. 아르케오글로부스 풀기두스 (*Archaeoglobus fulgidus*) 유래의 AF1211에 의해 코딩되는 ACD I은 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 이소부티리에이트, 이소발레레이트, 숙시네이트, 퓨마레이트, 페닐아세테이트, 인돌아세테이트 등의 다양한 직쇄 및 분지쇄 기질에 대해 작동하는 것으로 확인되었다 (Musfeldt et al., *J Bacteriol* 184:636-644 (2002)). 할로아르쿨라 마리스모르투이 (숙시닐-CoA 신테타제로 주석 첨부됨) 유래 효소는 프로피오네이트, 부티레이트 및 분지쇄 산 (이소발레레이트 및 이소부티레이트)를 기질로서 허용하며, 정방향 및 역방향으로 작동하는 것으로 입증되었다 (Brasen et al., *Arch Microbiol* 182:277-287 (2004)). 초호열성 크레나르케온(hyperthermophilic crenarchaeon) 피로바쿨럼 에어로필럼(*Pyrobaculum aerophilum*) 유

래의 PAE3250로 코딩되는 ACD가 모두 특정화된 ACD들 중에서 가장 기질 특이성이 넓으며, 아세틸-CoA, 이소부티릴-CoA (선호 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응한다 (Brasen et al., *supra*). 아르케오글로부스 풀기두스, 할로아르쿨라 마리스모르투이 및 피로바쿨럼 에어로필럼으로부터 효소들이 모두 클로닝되었고, 기능적으로 발현되었고, 에스케리치아 콜라이에서 특정화되었다 (Musfeldt et al., *supra*; Brasen et al., *supra*). 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 20

[0174]

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

[0175] 다른 후보 CoA 신테타제는 숙시닐-CoA 신테타제이다. 에스케리치아 콜라이의 *sucCD* 유전자는 ATP 하나를 동시에 소비하면서 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA를 만드는 과정을 본래 촉매하는 숙시닐-CoA 신테타제 복합체이며, 이 반응은 생체내에서 가역적이다 (Buck et al., *Biochem.* 24:6245-6252 (1985)). 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 21

[0176]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리치아 콜라이
sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리치아 콜라이

[0177] 다른 예로서, CoA-리가제는 아직 서열이 특정되지 않은 랫의 디카르복실레이트-CoA 리가제 (Vamecq et al., Biochemical Journal 230:683-693 (1985)), 페니실리움 크리소게눔 유래의 2종의 특정화된 페닐아세테이트-CoA 리가제들 (Lamas-Maceiras et al., Biochem. J. 395:147-155 (2005); Wang et al., Biochem Biophy Res Commun 360(2):453-458 (2007)), 슈도모나스 푸티다 유래의 페닐아세테이트-CoA 리가제(Martinez-Blanco et al., J. Biol. Chem. 265:7084-7090 (1990)), 및 바실러스 섭틸리스 유래의 6-카르복시헥산에이트-CoA 리가제 (Boweret al., J. Bacteriol. 178(14):4122-4130 (1996))를 포함한다. 추가적인 후보 효소는, 무스 무스쿨루스 (Hasegawa et al., Biochim Biophys Acta 1779:414-419 (2008))와 호모 사피엔스 (Ohgami et al., Biochem Pharmacol 65:989-994 (2003)) 유래의 아세토아세틸-CoA 신테타제이며, 이는 아세토아세테이트를 아세토아세틸-CoA로 ATP-의존적으로 변환시키는 과정을 본래 촉매한다. 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 22

[0178]

단백질	GenBank 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

[0179] 크로토닐-CoA 트랜스퍼라제는 크로토닐-CoA에서 크로토네이트로의 변환을 촉매한다. 아래 기술된 효소는 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 다수의 트랜스퍼라제들이 넓은 특이성을 가지며, 따라서, 특히 아세테이트, 숙시네이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 2-메틸아세토아세테이트, 3-케토헥사노에이트, 3-케토펜타노에이트, 발레레이트, 크로토네이트, 3-머캅토프로피오네이트, 프로피오네이트, 비닐아세테이트, 부티레이트와 같이 다양하게 CoA 억셉터들을 이용할 수 있다. 예를 들어, 로즈부리아 sp. A2-183 유래의 효소는 부티릴-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제 및 프로피오닐-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제 활성을 가지는 것으로 확인되었다 (Charrier et al., *Microbiology* 152, 179-185 (2006)). 가까운 상동체들은, 예

를 들어, 로즈부리아 인테스티날리스(*Roseburia intestinalis*) L1-82, 로즈부리아 이눌리니보란스(*Roseburia inulinivorans*) DSM 16841, 유박테리움 렉탈 ATCC 33656에서 발견할 수 있다. 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 활성을 가진 다른 효소는 클로스트리듐 프로피오니컴에서 발굴할 수 있다 (Selmer et al., *Eur J Biochem* 269, 372-380 (2002)). 이 효소는 아세테이트, (R)-락테이트, (S)-락테이트, 아크릴레이트 및 부티레이트를 CoA 억셉터로서 이용할 수 있다 (Selmer et al., *Eur J Biochem* 269, 372-380 (2002); Schweiger and Buckel, *FEBS Letters*, 171(1) 79-84 (1984)). 가까운 상동체는, 예를 들어 클로스트리듐 노비이 NT, 클로스트리듐 베이예린키이 NCIMB 8052, 및 클로스트리듐 보툴리눔 C str. Eklund에서 발견할 수 있다. *YgfH*는 에스케리치아 콜라이에서 프로피오닐 CoA:숙시네이트 CoA 트랜스퍼라제를 코딩한다 (Haller et al., *Biochemistry*, 39(16) 4622-4629). 가까운 상동체는, 예를 들어 시트로박터 용게이 ATCC 29220, 살모넬라 엔테리카 subsp. 아리조나 세로바르 및 예르시니아 인터메디아 ATCC 29909에서 확인할 수 있다. 이들 단백질은 하기에 나타낸다 .

표 23

[0180]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
Ach1	AAX19660.1	60396828	로즈부리아 sp. A2-183
ROSINTL182_07121	ZP_04743841.2	257413684	로즈부리아 인테스티날리스 L1-82
ROSEINA2194_03642	ZP_03755203.1	225377982	로즈부리아 이눌리니보란스 DSM 16841
EUBREC_3075	YP_002938937.1	238925420	유박테리움 렉탈 ATCC 33656
pct	CAB77207.1	7242549	클로스트리듐 프로피오니컴
NT01CX_2372	YP_878445.1	118444712	클로스트리듐 노비이 NT
Cbei_4543	YP_001311608.1	150019354	클로스트리듐 베이예린키이 NCIMB 8052
CBC_A0889	ZP_02621218.1	168186583	클로스트리듐 보툴리눔 C str. Eklund
ygfH	NP_417395.1	16130821	에스케리치아 콜라이 str. K-12 substr. MG1655
CIT292_04485	ZP_03838384.1	227334728	시트로박터 용게이 *ATCC 29220*
SARI_04582	YP_001573497.1	161506385	살모넬라 엔테리카 subsp. 아리조나 세로바르
yinte0001_14430	ZP_04635364.1	238791727	예르시니아 인터메디아 *ATCC 29909*

[0181] 추가적인 후보 효소는, 슈도모나스의 pcaI 및 pcaJ에 의해 코딩되는 2-유닛 효소로, 이는 3-옥소아디필-CoA/숙시네이트 트랜스퍼라제 활성을 가지는 것으로 확인되었다 (Kaschabek et al., supra). 상동성에 기반한 유사 효소는 액시네토박터 sp. ADP1 (Kowalchuk et al., Gene 146:23-30 (1994))와 스트렙토마이세스 코엘리콜러에 존재하였다. 다른 예시적인 숙시닐-CoA:3:옥소액시드-CoA 트랜스퍼라제는 헬리코박터 필로리 (Corthesy-Theulaz et al., *J. Biol. Chem.* 272:25659-25667 (1997)) 및 바실러스 섭틸리스 (Stols et Protein Expr. Purif. 53:396-403 (2007))에 존재한다. 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 24

[0182]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
pcaI	AAN69545.1	24985644	슈도모나스 푸티다
pcaJ	NP_746082.1	26990657	슈도모나스 푸티다
pcaI	YP_046368.1	50084858	액시네토박터 sp. ADP1
pcaJ	AAC37147.1	141776	액시네토박터 sp. ADP1
pcaI	NP_630776.1	21224997	스트렙토마이세스 코엘리콜러
pcaJ	NP_630775.1	21224996	스트렙토마이세스 코엘리콜러
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

[0183] CoA 억셉터로서 아세테이트를 이용할 수 있는 CoA 트랜스퍼라제는 에스케리치아 콜라이 atoA (alpha 서브유닛) 및 atoD (beta 서브유닛) 유전자에 의해 코딩되는 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제이다 (Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res Commun. 33:902-908 (1968); Korolev et al., Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.

58:2116-2121 (2002)). 또한, 이 효소는 이소부티레이트 (Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58:1435-1439 (1992)), 발레레이트 (Vanderwinkel et al., supra) 및 부타노에이트 (Vanderwinkel et al., supra) 등의 다양한 분지형 또는 선형의 아실-CoA 기질로부터 CoA 모이어티를 아세테이트로 전이시키는 것으로 알려져 있다. 유사 효소는 코리네박테리움 글루타미컴 ATCC 13032 (Duncan et al., Appl Environ Microbiol 68:5186-5190 (2002)), 클로스트리듐 아세토부틸리컴 (Cary et al., Appl Environ Microbiol 56:1576-1583 (1990)), 및 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴 (Kosaka et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 71:58-68 (2007))에 존재한다. 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 25

[0184]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
atoA	P76459.1	2492994	에스케리치아 콜라이 K12
atoD	P76458.1	2492990	에스케리치아 콜라이 K12
actA	YP_226809.1	62391407	코리네박테리움 글루타미컴 ATCC 13032
cg0592	YP_224801.1	62389399	코리네박테리움 글루타미컴 ATCC 13032
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

[0185] 또한, 상기 효소는 크로토닐-CoA에 대해 바람직한 활성을 나타낼 수 있다. 다른 예시적인 트랜스퍼라제 후보체들은, 숙시닐-CoA, 4-하이드록시부티릴-CoA, 및 부티릴-CoA 트랜스퍼라제 활성을 각각 나타내는 것으로 확인된, 클로스트리듐 클루이베리의 *cat1*, *cat2* 및 *cat3* 유전자 산물에 의해 촉매된다 (Seedorf et al., *supra*; Sohling et al., *Eur. J Biochem.* 212:121-127 (1993); Sohling et al., *J Bacteriol.* 178:871-880 (1996)). 유사한 CoA 트랜스퍼라제 활성은 트리코모나스 바기날리스 (van Grinsven et al., *J. Biol. Chem.* 283:1411-1418 (2008))와 트리파노소마 브루세이 (Riviere et al., *J. Biol. Chem.* 279:45337-45346 (2004))에도 존재한다. 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 26

[0186]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
cat1	P38946.1	729048	클로스트리듐 클루이베리
cat2	P38942.2	172046066	클로스트리듐 클루이베리
cat3	EDK35586.1	146349050	클로스트리듐 클루이베리
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	트리코모나스 바기날리스 G3
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	트리파노소마 브루세이

[0187] 혐기성 박테리아인 액시드아미노코커스 퍼멘탄스의 글루타코네이트-CoA-트랜스퍼라제 (EC 2.8.3.12) 효소는 2산 글루타코닐-CoA와 3-부테노일-CoA와 반응한다 (Mack et al., FEBS Lett. 405:209-212 (1997)). 이 효소를 코딩하는 유전자는 gctA와 gctB이다. 이 효소는 글루타릴-CoA, 2-하이드록시글루타릴-CoA, 아디필-CoA 및 아크릴릴-CoA 등의 다른 CoA 유도체에 대해 낮지만 검출가능한 수준의 활성을 나타낸다 (Buckel et al., Eur. J. Biochem. 118:315-321 (1981)). 이 효소는 클로닝되어 에스케리치아 콜라이에서 발현된 바 있다 (Mack et al., Eur. J. Biochem. 226:41-51 (1994)). 이들 단백질은 하기에 나타낸다.

표 27

[0188]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
gctA	CAA57199.1	559392	액시드아미노코커스 퍼멘탄스
gctB	CAA57200.1	559393	액시드아미노코커스 퍼멘탄스

[0189] **크로토네이트 리덕타제 (도 2, 단계 J)**

[0190] 크로토네이트 리덕타제 효소는 크로토네이트에서 크로톤알데하이드로의 변환을 촉매할 수 있다. 아래 기술된 효소는 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 카르복시산 리덕타제는 마그네슘, ATP 및 NADPH-의존적인 방식으로 카르복시산을 대응되는 알데하이드 화합물로 환원시키는 과정을 촉매한다 (Venkitasubramanian et al., *J. Biol. Chem.* 282:478-485 (2007)). *car*에 의해 코딩된 효소가 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이에서 기능적으로 발현된 바 있다 (Venkitasubramanian et al., *J. Biol. Chem.* 282:478-485 (2007)). *npt* 유전자 산물의 발현은 전사 후 수정을 통해 효소의 활성을 개선시켰다. *npt* 유전자는 주효소(apo-enzyme)를 활성형의 전효소(holo-enzyme)로 변환시키는 특이적인 포스포판테테인 트랜스퍼라제(PPTase)를 코딩한다. 이 효소의 천연 기질은 바닐산이며, 이 효소는 방향족 및 지방족 기질들에 대해 넓은 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)).

표 28

[0191]

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

[0192] 추가적인 *car* 및 *npt* 유전자들이 서열 상동성을 기반으로 동정되었다.

표 29

[0193]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
fadD9	YP_978699.1	121638475	미코박테리움 보비스 BCG
BCG_2812c	YP_978898.1	121638674	미코박테리움 보비스 BCG
nfa20150	YP_118225.1	54023983	노카르디아 파르시니카 IFM 10152
nfa40540	YP_120266.1	54026024	노카르디아 파르시니카 IFM 10152
SGR_6790	YP_001828302.1	182440583	스트렙토마이세스 그리세우스 subsp. 그리세우스 NBRC 13350
SGR_665	YP_001822177.1	182434458	스트렙토마이세스 그리세우스 subsp. 그리세우스 NBRC 13350
MSMEG_2956	YP_887275.1	118473501	미코박테리움 스메그마티스 MC2 155
MSMEG_5739	YP_889972.1	118469671	미코박테리움 스메그마티스 MC2 155
MSMEG_2648	YP_886985.1	118471293	미코박테리움 스메그마티스 MC2 155
MAP1040c	NP_959974.1	41407138	미코박테리움 아비움 subsp. 파라투버쿨로시스 K-10
MAP2899c	NP_961833.1	41408997	미코박테리움 아비움 subsp. 파라투버쿨로시스 K-10
MMAR_2117	YP_001850422.1	183982131	미코박테리움 마리넘 M
MMAR_2936	YP_001851230.1	183982939	미코박테리움 마리넘 M
MMAR_1916	YP_001850220.1	183981929	미코박테리움 마리넘 M
TpauDRAFT_33060	ZP_04027864.1	227980601	스카무렐라 파우로메타볼라 DSM 20162
TpauDRAFT_20920	ZP_04026660.1	227979396	스카무렐라 파우로메타볼라 DSM 20162
CPCC7001_1320	ZP_05045132.1	254431429	시아노비움 PCC7001
DDBDRAFT_0187729	XP_636931.1	66806417	딕티오스텔리움 디스코이데움 AX4

[0194] 스트렙토마이세스 그리세우스에서 발굴된 추가적인 후보 효소는 *griC* 및 *griD* 유전자에 코딩되어 있다. *griC* 또는 *griD* 중 한가지가 제거되면 3-아미노-4-하이드록시벤조산 대사의 션트 산물인 3-아세틸아미노-4-하이드록시벤조산이 세포외에 축적되므로, 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 아이웬시스 npt와 서열이 비슷한 효소인 SGR_665와 공동-발현시키는 것이 유익할 수 있다.

표 30

[0195]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
griC	YP_001825755.1	182438036	스트렙토마이세스 그리세우스 subsp. 그리세우스 NBRC 13350

Grid	YP_001825756.1	182438037	스트렙토마이세스 그리세우스 subsp. 그리세우스 NBRC 13350

[0196] 유사한 특징을 가진 효소, 알파-아미노아디페이트 리덕타제 (AAR, EC 1.2.1.31)는 일부 진균 종들에서 라이신 생합성 경로에 참여한다. 이 효소는 본래 알파-아미노아디페이트를 알파-아미노아디페이트 세미알데하이드로 환원시킨다. 카르복시기가 먼저 아데닐레이트의 ATP-의존적인 생성을 통해 활성화된 다음, NAD(P)H에 의해 환원되어 알데하이드와 AMP가 만들어진다. CAR와 마찬가지로, 이 효소는 마그네슘을 이용하며, PPTase에 의한 활성화가 필요하다. AAR에 대한 후보 효소와 이의 대응되는 PPTase는 사카로마이세스 세레비지애 (Morris et al., *Gene* 98:141-145 (1991)), 칸디다 알비칸스 (Guo et al., *Mol. Genet. Genomics* 269:271-279 (2003)), 및 쉬조사카로마이세스 폼베 (Ford et al., *Curr. Genet.* 28:131-137 (1995))에서 확인되었다. 쉬조사카로마이세스 폼베 유래의 AAR은 에스케리치아 콜라이에서 발현시켰을 때 유의한 활성을 발휘하였다 (Guo et al., *Yeast* 21:1279-1288 (2004)). 페니실리움 크리소게눔 유래의 AAR은 대체 기질로서 S-카르복시메틸-L-시스테인을 허용하지만, 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.

표 31

[0197]

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

[0198] **크로토닐-CoA 리덕타제 (알코올 형성) (도 2, 단계 K)**

[0199] 크로톤알데하이드 리덕타제 (알코올 형성) 효소는 크로토닐-CoA로부터 크로틸 알코올을 만드는데 필요한 2 단계 환원을 촉매한다. 예시적인 2 단계에서, 아실-CoA를 알코올로 변환하는 옥시도리덕타제는 아래에 기술한다. 상기 효소는 본래 크로토닐-CoA를 크로틸 알코올로 변환하거나 또는 그렇도록 조작될 수 있다. 이들 효소로는 아세틸-CoA와 같은 기질을 에탄올로 변환시키는 것 (예, 에스케리치아 콜라이의 *adhE* (Kessler et al., *FEBS.Lett.* 281:59-63 (1991)))과 부티릴-CoA를 부탄올로 변환시키는 것 (예, 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *adhE2* (Fontaine et al., *J. Bacteriol.* 184:821-830 (2002)))을 포함한다. 클로스트리듐 아세토부틸리컴 유래의 *adhE2*는 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 BDO를 생산하는 것으로 문헌에 구체적으로 기술되어 있다 (Burk et al., 상기 참조, (2008)). 루코노스톡 메센테로이데스(Leuconostoc mesenteroides) 유래의 *adhE*는, 아세틸-CoA를 에탄올로 환원시킬 뿐만 아니라, 분지쇄 화합물인 이소부티르알데하이드를 이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 확인된 바 있다 (Kazahaya et al., *J.Gen.Appl.Microbiol.* 18:43-55 (1972); Koo et al., *Biotechnol. Lett.* 27:505-510 (2005)).

표 32

[0200]

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

[0201] 다른 예시적인 효소는 말로닐-CoA를 3-HP로 변환할 수 있다. 이러한 활성을 가진 NADPH-의존적인 효소는, 3-하이드록시프로피오네이트 사이클에 참여하는 클로로플렉수스 아우란티아쿠스에서 특정화되었다 (Hugler et al., 상기 참조, (2002); Strauss et al., 215:633-643 (1993)). 이 효소는, 분자량 300 kDa으로, 기질 특이성이 높으며, 다른 공지된 옥시도리덕타제와의 서열 유사성이 낮다 (Hugler et al., 상기 참조, (2002)). 다른 유기

체에서는 이러한 특이적인 반응을 촉매하는 것으로 확인된 효소는 없지만, 다른 유기체가 유사한 경로를 가질 수 있다는 생물정보학적 증거는 있다 (Klatt et al., *Environ Microbiol.* 9:2067-2078 (2007)). 로즈이플렉수스 카스텐홀지이, 에리트로박터 *sp. NAP1* 및 마린 감마 프로테오박테리움 HTCC2080 등의 다른 유기체에서 후보 효소들을 서열 유사성으로 추론할 수 있다.

표 33

[0202]

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

[0203] **글루타코닐-CoA 데카르복실라제 (도 2, 단계 L)**

[0204] 글루타메이트 발효성 혐기 박테리아에서 특정화된 글루타코닐-CoA 데카르복실라제 효소는, 조인자로서 바이오틴을 이용하는 소듐 이온 전위성 데카르복실라제이며, 4개의 서브유닛들 (알파, 베타, 감마 및 델타)로 구성된다 (Boiangiu et al., *J Mol. Microbiol Biotechnol* 10:105-119 (2005); Buckel, *Biochim Biophys Acta.* 1505:15-27 (2001)). 이 효소는 푸조박테리움 뉴클레아툼 (Beatrix et al., *Arch Microbiol.* 154:362-369 (1990))과 액시드아미노코커스 퍼멘탄스 (Braune et al., *Mol.Microbiol* 31:473-487 (1999))에서 특정화되었다. 푸조박테리움 뉴클레아툼에 대한 유사체, 글루타코닐-CoA 데카르복실라제 알파, 베타 및 델타 서브유닛들은 신트로푸스 액시디트로피쿠스(*Syntrophus aciditrophicus*)에서 확인되었다. 에노일-CoA 데하이드로게나제로 주석이 달린 *syn_00480*은 다른 GCD로, 이는 비오틴-카르복실 캐리어(*syn_00479*)와 글루타코닐-CoA 데카르복실라제 알파 서브유닛 (*syn_00481*) 사이에 예상되는 오페론에 위치한다. 예시적인 유전자 산물의 단백질 서열은 하기 나타낸 유전자은행 등재 번호를 이용하여 확인할 수 있다.

표 34

[0205]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
gcdA	CAA49210	49182	액시드아미노코커스 퍼멘탄스
gcdC	AAC69172	3777506	액시드아미노코커스 퍼멘탄스
gcdD	AAC69171	3777505	액시드아미노코커스 퍼멘탄스
gcdB	AAC69173	3777507	액시드아미노코커스 퍼멘탄스
FN0200	AAL94406	19713641	푸조박테리움 뉴클레아툼
FN0201	AAL94407	19713642	푸조박테리움 뉴클레아툼
FN0204	AAL94410	19713645	푸조박테리움 뉴클레아툼
syn_00479	YP_462066	85859864	신트로푸스 액시디트로피쿠스
syn_00481	YP_462068	85859866	신트로푸스 액시디트로피쿠스
syn_01431	YP_460282	85858080	신트로푸스 액시디트로피쿠스
syn_00480	ABC77899	85722956	신트로푸스 액시디트로피쿠스

[0206] **글루타릴-CoA 데하이드로게나제 (도 2, 단계 M)**

[0207] 글루타릴-CoA 데하이드로게나제 (GCD, EC 1.3.99.7 및 EC 4.1.1.70)는 글루타릴-CoA의 크로토닐-CoA로의 산화성 탈카르복시화를 촉매하는 2중 기능의 효소이다 (도 3, 단계 3). 2중 기능성의 GCD 효소는 전자 억셉터로서 전자 전달 플라보단백질을 이용하는 호모테트라머이다 (Hartel et al., *Arch Microbiol.* 159:174-181 (1993)). 이 효소는 방향족 화합물에서 배양시 슈도모나스 균주 KB740와 K172의 세포 추출물에서 최초로 특정되었지만 (Hartel et al., 상기 참조, (1993)), 이들 유기체에서의 관련 유전자는 확인되지 않았다. 글루타릴-CoA 데하이드로게나제를 코딩하는 유전자 (*gcdH)*와 이의 동족 전사 조절자 (*gcdR)*가 아조아르쿠스 *sp. CIB*에서 동정되었다 (Blazquez et al., *Environ Microbiol.* 10:474-482 (2008)). *gcdH* 활성이 결핍된 아조아르쿠스 균주를 이용하여 슈도모나스 푸티다 유래의 이종 유전자 *gcdH*가 동정되었다 (Blazquez et al., 상기 참조, (2008)). 슈도모나스 푸티다에서 동족 전사 조절자는 동정되지 않았지만, 유전자좌 *PP_0157*은 아조아르쿠스 효소와 높은 서열 상동성 (> 69% 동일성)을 가진다. 추가적인 GCD 효소가 슈도모나스 플루오레센스와 파라코커스 데니트리피

칸스에서 발견되었다 (Husain et al., *J Bacteriol.* 163:709-715 (1985)). 인간 GCD에 대해 광범위하게 연구되었고, 에스케리치아 콜라이에서 과다 발현시킨 바 있으며 (Dwyer et al., *Biochemistry* 39:11488-11499 (2000)), 결정 구조가 파악되었고, 활성부에 보존된 글루타메이트 잔기가 참여하는 촉매 기전이 해명되었다 (Fu et al., *Biochemistry* 43:9674-9684 (2004)). 신트로푸스 액시디트로피쿠스의 GCD는 크로토네이트에서 생장하는 동안에 이산화탄소를 동화하는 방향으로 작동한다 (Mouttaki et al., *Appl Environ Microbiol.* 73:930-938 (2007))). 신트로푸스 액시디트로피쿠스에서 2종의 GCD 유전자들이 단백질 서열 상동성에 의해 *Azoarcus* GcdH: *syn_00480* (31%) 및 *syn_01146* (31%)인 것으로 동정되었다. 아조아르쿠스 GcdR 조절 단백질에 대해 유의한 상동성은 확인되지 않았다. 예시적인 유전자 산물에 대한 단백질 서열은 하기 나타낸 유전자은행 등재 번호를 이용하여 확인할 수 있다.

표 35

[0208]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
gcdH	ABM69268.1	123187384	아조아르쿠스 sp. CIB
gcdR	ABM69269.1	123187385	아조아르쿠스 sp. CIB
gcdH	AAN65791.1	24981507	슈도모나스 푸티다 KT2440
PP_0157 (*gcdR*)	AAN65790.1	24981506	슈도모나스 푸티다 KT2440
gcdH	YP_257269.1	70733629	슈도모나스 플루오레센스 Pf-5
gcvA (*gcdR*)	YP_257268.1	70733628	슈도모나스 플루오레센스 Pf-5
gcd	YP_918172.1	119387117	파라코커스 데니트리피칸스
gcdR	YP_918173.1	119387118	파라코커스 데니트리피칸스
gcd	AAH02579.1	12803505	호모 사피엔스
syn_00480	ABC77899	85722956	신트로푸스 액시디트로피쿠스
syn_01146	ABC76260	85721317	신트로푸스 액시디트로피쿠스

[0209] **3-아미노부티릴-CoA 데아미나제 (도 2, 단계 N)**

[0210] 3-아미노부티릴-CoA는 라이신 발현의 중간산물이다. 또한, 이는 트랜스아미나제 또는 아민화 데하이드로게나제를 통해 아세토아세틸-CoA로부터 만들어질 수 있다. 3-아미노부티릴-CoA 데아미나제 (또는 3-아미노부티릴-CoA 암모니아 리아제)는 3-아미노부티릴-CoA의 탈아민화를 촉매하여 크로토닐-CoA를 만든다. 이러한 가역적인 효소는 푸조박테리움 뉴클레아툼, 포르피로모나스 긴기발리스, 서모안에어로박터 텡콩엔시스 및 수종의 기타 유기체들에 존재하며, 라이신 발효에 참여하는 수종의 유전자와 함께-위치한다 (Kreimeyer et al., J Biol Chem, 2007, 282(10) 7191-7197).

표 36

[0211]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
kal	NP_602669.1	19705174	푸조박테리움 뉴클레아툼 subsp. 뉴클레아툼 ATCC 25586
kal	NP_905282.1	34540803	포르피로모나스 긴기발리스 W83
kal	NP_622376.1	20807205	서모안에어로박터 텡공엔시스 MB4

[0212] **4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 (도 2, 단계 O)**

[0213] 몇몇 효소들이 본래 4-하이드록시부티릴-CoA를 크로토노일-CoA로 탈수하는 과정을 촉매한다. 이러한 변환은 클로스트리듐 아미노부티리컴에 의한 4-아미노부티레이트 발효 (Scherf et al., *Eur.J Biochem.* 215:421-429 (1993))와 클로스트리듐 클루이베리에 의한 숙시네이트-에탄올 발효 (Scherf et al., *Arch.Microbiol* 161:239-245 (1994))에 필요하다. 변환은 또한 고세균, 예컨대 메탈로스페어라 세둘라에서 3-하이드록시프로피오네이트/4-하이드록시부티레이트 자가 영양성 이산화탄소 동화 경로의 일부분으로서 주요한 단계이다 (Berg et al., 상기 참조, (2007)). 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제의 가역성은 충분히 기록되어 있으며 (Muh et al., *Biochemistry.* 35:11710-11718 (1996); Friedrich et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47:3254-3257 (2008); Muh et al., *Eur. J. Biochem.* 248:380-384 (1997)), 크로토노일-CoA에 대한 평형 상수는 약 4로 기록되어 있다 (Scherf and Buckel, 상기 참조, (1993)).

표 37

[0214]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
AbfD	CAB60035	70910046	클로스트리듐 아미노부티리컴
AbfD	YP_001396399	153955634	클로스트리듐 클루이베리
Msed_1321	YP_001191403	146304087	메탈로스페어라 세둘라
Msed_1220	YP_001191305	146303989	메탈로스페어라 세둘라

[0215] **크로틸 알코올 디포스포키나제 (도 2, 단계 P)**

[0216] 크로틸 알코올 디포스포키나제 효소는 디포스페이트기의 크로틸 알코올의 하이드록실기로의 전이를 촉매한다. 아래 기술된 효소는 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 디포스페이트기의 전이를 촉매하는 키나제는 EC 2.7.6 효소 클래스에 속한다. 아래 표는 EC 2.7.6 효소 클래스에 속하는 몇가지 유용한 키나제 효소를 열거한다.

표 38

[0217]

EC 번호	효소명
2.7.6.1	리보스-포스페이트 디포스포키나제
2.7.6.2	티아민 디포스포키나제
2.7.6.3	2-아미노-4-하이드록시-6-하이드록시메틸디하이드로프테리딘 디포스포키나제
2.7.6.4	뉴클레오티드 디포스포키나제
2.7.6.5	GTP 디포스포키나제

[0218] 특히 흥미로운 효소는 에스케리치아 콜라이 (Hove-Jenson et al., J Biol Chem, 1986, 261(15);6765-71)와 미코플라스마 뉴모니애 M129 (McElwain et al, International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38:417-423)에서 동정된 리보스-포스페이트 디포스포키나제 효소와, 티아민 디포스포키나제 효소이다. 티아민 디포스포키나제 효소의 예는 아라비돕시스 탈리아나에서도 확인된다 (Ajjawi, Plant Mol Biol, 2007, 65(1-2);151-62).

표 39

[0219]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
prs	NP_415725.1	16129170	에스케리치아 콜라이
prsA	NP_109761.1	13507812	미코플라스마 뉴모니애 M129
TPK1	BAH19964.1	222424006	아라비돕시스 탈리아나 col
TPK2	BAH57065.1	227204427	아라비돕시스 탈리아나 col

[0220] **에리트로스-4-포스페이트 리덕타제 (도 3, 단계 A)**

[0221] 경로의 단계 A에서, 에리트로스-4-포스페이트는 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제 또는 에리트리톨-4-포스페이트 데하이드로게나제에 의해 에리트리톨-4-포스페이트로 변환된다. 에리트로스-4-포스페이트의 환원은 에리트리톨을 생산하는 동안에 루코노스톡 오엔노스(*Leuconostoc oenos*)에서 관찰되었다(Veiga-da-Cunha et al., *J Bacteriol.* 175:3941-3948 (1993)). NADPH는 조인자로 동정되었다 (Veiga-da-Cunha et al., 상기 참조, (1993)). 그러나, 에리트로스-4-포스페이트의 유전자는 동정되지 않았다. 따라서, 루코노스톡 오엔노스로부터 에리트로스-4-포스페이트 리덕타제 유전자를 동정하여 이 단계를 적용할 수 있다. 부가적으로, 비슷한 반응을 촉매하는 효소도 이 단계에 이용할 수 있다. 이러한 효소의 예는, 단계 A와 비교하여 하나의 추가적인 메틸기를 가진 1-데옥시-D-자일릴로스 5-포스페이트의 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트로의 변환을 촉매하는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제 (EC 1.1.1.267)이다. *dxr* 또는 *ispC* 유전자들은 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 리덕토이소머라제를 코딩하며, 충분한 연구가 이루어졌는데, 에스케리치아 콜라이와 미코박테리움 투베큘로시스 유래의 Dxr 단백질이 정제 및 결정 구조 해명되었고 (Yajima et al., *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 63:466-470 (2007); Mac et al., *J Mol.Biol.* 345:115-127 (2005); Henriksson et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 62:807-813 (2006); Henriksson et

al., *J Biol.Chem.* 282:19905-19916 (2007)); 시네코시스티스 sp 유래의 Dxr 단백질은 부위-특이적인 돌연변이 유발을 통해 연구되었으며, 변형된 활성과 변이된 카이네틱스를 가진다 (Fernandes et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1764:223-229 (2006); Fernandes et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 444:159-164 (2005)). 아울러, 에스케리치아 콜라이의 글리세르알데하이드 3-포스페이트 리덕타제 YghZ는 글리세르알데하이드 3-포스페이트의 글리세롤-3-포스페이트로의 변환을 촉매하며 (Desai et al., *Biochemistry* 47:7983-7985 (2008)), 또한 이 단계에 적용할 수 있다. 아래 유전자는 단계 A 변환에 이용가능하다:

표 40

[0222]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
dxr	P45568.2	2506592	에스케리치아 콜라이 strain K12
dxr	A5U6M4.1	166218269	미코박테리움 투베쿨로시스
dxr	Q55663.1	2496789	시네코시스티스 *sp.* strain PCC6803
yghZ	NP_417474.1	16130899	에스케리치아 콜라이 strain K12

[0223] **에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제 (도 3, 단계 B)**

[0224] 경로의 단계 B에서, 에리트리톨-4-포스페이트는 에리트리톨-4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제 또는 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 신타제에 의해 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨로 변환된다. 이 단계에서 실제 효소는 동정되지 않았다. 그러나, 비슷한 반응을 촉매하는 효소를 이 단계에 적용할 수 있다. 그 예는 2-C-메틸-D-에리트리톨 4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제 또는 4-(시티딘 5'-디포스포)-2-C-메틸-D-에리트리톨 신타제 (EC 2.7.7.60)이다. 2-C-메틸-D-에리트리톨 4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제는 이소프레노이드 생합성을 위한 메틸에리트리톨 포스페이트 경로에 존재하며, 2-C-메틸-D-에리트리톨 4-포스페이트의 4-(시티딘 5'-디포스포)-2-C-메틸-D-에리트리톨로의 변환을 촉매하며, 단계 B 변환과 비교하여 여분의 메틸기를 가진다. 2-C-메틸-D-에리트리톨 4-포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제는 *ispD* 유전자에 의해 코딩되며, 에스케리치아 콜라이 IspD의 결정 구조는 해명되었다 (Kemp et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 57:1189-1191 (2001); Kemp et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 59:607-610 (2003); Richard et al., *Nat.Struct.Biol.* 8:641-648 (2001)). 미코박테리움 투베쿨로시스 H37Rv 유래의 *ispD* 유전자가 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이에서 발현되었으며, 재조합 단백질이 N-말단 His-테그를 이용하여 정제되었다 (Shi et al., *J Biochem.Mol.Biol.* 40:911-920 (2007)). 부가적으로, 스트렙토마이세스 코엘리콜러 *ispD* 유전자도 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이에서 발현되었으며, 재조합 단백질이 물리적으로 카이네틱적으로 특정화되었다 (Cane et al., *Bioorg.Med.Chem.* 9:1467-1477 (2001)). 아래 유전자들은 단계 B 변환에 사용될 수 있다:

표 41

[0225]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
ispD	Q46893.3	2833415	에스케리치아 콜라이 strain K12
ispD	A5U8Q7.1	166215456	미코박테리움 투베쿨로시스
ispD	Q9L0Q8.1	12230289	스트렙토마이세스 코엘리콜러

[0226] **4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제 (도 3, 단계 C)**

[0227] 경로의 단계 C에서, 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨은 4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨 키나제에 의해 2-포스포-4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨로 변환된다. 이 단계의 실제 효소는 동정된 바 없다. 그러나, 유사 반응을 촉매하는 효소를 이 단계에 적용할 수 있다. 그 예는 4-디포스포시티딜-2-C-메틸에리트리톨 키나제 (EC 2.7.1.148)이다. 4-디포스포시티딜-2-C-메틸에리트리톨 키나제는 또한 이소프레노이드 생합성의 메틸에리트리톨 포스페이트 경로에 존재하며, 4-(시티딘 5'-디포스포)-2-C-메틸-D-에리트리톨의 2-포스포-4-(시티딘 5'-디포스포)-2-C-메틸-D-에리트리톨로의 변환을 촉매하며 단계 C 변환과 비교하여 여분의 메틸기를 가진다. 4-디포스포시티딜-2-C-메틸에리트리톨 키나제는 *ispE* 유전자에 코딩되어 있으며, 에스케리치아 콜라이, 서무스 서모필러스 HB8 및 아퀴펙스 에어올리쿠스에서 IspE 결정 구조가 해명되었다 (Sgraja et al., *FEBS J* 275:2779-2794 (2008); Miallau et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:9173-9178 (2003); Wada et al., *J Biol. Chem.* 278:30022-30027 (2003)). 상기 유기체에서 *ispE* 유전자들이 클로닝 및 발현되었고, 재조합 단백

질이 결정화를 위해 정제되었다. 아래 유전자를 단계 C 변환에 이용할 수 있다.

표 42

[0228]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
ispE	P62615.1	50402174	에스케리치아 콜라이 strain K12
ispE	P83700.1	51316201	서무스 서모필러스 HB8
ispE	O67060.1	6919911	아퀴펙스 에어올리쿠스

[0229] **에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제 (도 3, 단계 D)**

[0230] 경로의 단계 D에서, 2-포스포-4-(시티딘 5'-디포스포)-에리트리톨은 에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제에 의해 에리트리톨-2,4-사이클로디포스페이트로 변환된다. 그러나, 비슷한 반응을 촉매하는 효소를 이 단계에 적용할 수 있다. 그 예는 2-C-메틸-D-에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제 (EC 4.6.1.12)이다. 2-C-메틸-D-에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제는 또한 이소프레노이드 생합성을 위한 메틸에리트리톨 포스페이트 경로에 존재하며, 2-포스포-4-(시티딘 5'디포스포)-2-C-메틸-D-에리트리톨의 2-C-메틸-D-에리트리톨-2,4-사이클로디포스페이트로의 변환을 촉매하며, 단계 D 변환과 비교하여 여분의 메틸기를 가진다. 2-C-메틸-D-에리트리톨 2,4-사이클로디포스페이트 신타제는 *ispF* 유전자에 코딩되어 있으며, 에스케리치아 콜라이, 서무스 서모필러스, 헤모필러스 인플루엔자 및 캄필로박터 제주니에서 IspF의 결정 구조가 해명되었다 (Richard et al., *J Biol.Chem.* 277:8667-8672 (2002); Steinbacher et al., *J Mol.Biol.* 316:79-88 (2002); Lehmann et Protein Exs 49:135-138 (2002); Kishida et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59:23-31 (2003); Gabrielsen et al., *J Biol. Chem.* 279:52753-52761 (2004)). 상기 유기체로부터 *ispF* 유전자들이 클로닝 및 발현되었고, 재조합 단백질이 결정화를 위해 정제되었다. 아래 유전자들을 단계 D 변환에 이용할 수 있다:

표 43

[0231]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
ispF	P62617.1	51317402	에스케리치아 콜라이 strain K12
ispF	Q8RQP5.1	51701599	서무스 서모필러스 HB8
ispF	P44815.1	1176081	헤모필러스 인플루엔자
ispF	Q9PM68.1	12230305	캄필로박터 제주니

[0232] **1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제 (도 3, 단계 E)**

[0233] 도 3의 단계 E는 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 신타제에 의해 에리트리톨-2,4-사이클로디포스페이트의 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트로의 변환을 수반한다. 이러한 활성을 가진 효소는 아직까지 특정화되지 않았다. 이러한 변환은 (E)-4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐-디포스페이트 신타제 (EC 1.17.7.1)에 의한 2-C-메틸-D-에리트리톨-2,4-사이클로디포스페이트에서 1-하이드록시-2-메틸-2-(E)-부테닐 4-디포스페이트로의 환원과 유사하다. 이 효소는 박테리아와 식물에서 발견된 이소프레노이드 생합성을 위한 비-메발로네이트 경로에 참여하는 철-황 단백질이다. 에스케리치아 콜라이의 *ispG*에 코딩되는 효소 등의 대부분의 박테리아 효소는 전자 공여체로서 환원형 페레독신 또는 플라보독신을 이용한다 (Zepeck et al., *J Org.Chem.* 70:9168-9174 (2005)). 호열성 시아노박테리아인 서모시네코코커스 일롱가투스 BP-1의 *gcpE*에 코딩된 유사 효소는 에스케리치아 콜라이에서 이종적으로 발현 및 특정화되었다 (Okada et al., *J Biol. Chem.* 280:20672-20679 (2005)). 서무스 서모필러스와 아라비돕시스 탈리아나 유래의 추가적인 후보 효소들이 특정화되고, 에스케리치아 콜라이에서 발현되었다 (Seemann et al., *J Biol. Inorg. Chem.* 10:131-137 (2005); Kollas et al., *FEBS Lett.* 532:432-436 (2002)).

표 44

[0234]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
ispG	NP_417010.1	16130440	에스케리치아 콜라이
gcpE	NP_681786.1	22298539	서모시네코코커스 일롱가투스

gcpE	AAO21364.1	27802077	서무스 서모필러스
gcpE	AAO15446.1	27462472	아라비돕시스 탈리아나

[0235] **1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제 (도 3, 단계 F)**

[0236] 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트의 동시적인 탈수와 환원은 1-하이드록시-2-부테닐 4-디포스페이트 리덕타제 활성을 가진 효소에 의해 촉매된다 (도 3, 단계 F). 상기한 효소는 산물, 부테닐 4-디포스페이트 또는 2-부테닐 4-디포스페이트의 혼합물을 만들 것이다. 유사 반응은 이소프레노이드를 생합성하기 위한 비-메발로네이트 경로에서 4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐 디포스페이트 리덕타제 (EC 1.17.1.2)에 의해 촉매된다. 이 효소는 전자 공여체로서 환원된 페레독신 또는 플라보독신을 이용하는 철-황 단백질이다. 에스케리치아 콜라이의 *ispH*에 코딩되는 4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐 디포스페이트 리덕타제의 최대 활성은 플라보독신 및 플라보독신 리덕타제 둘다에 필요하다 (Wolff et al., *FEBS Lett.* 541:115-120 (2003); Grawert et al., *J Am. Chem. Soc.* 126:12847-12855 (2004)). 특정화된 촉매 시스템에서, 환원된 플라보독신은 NAD(P)+-의존적인 플라보독신 리덕타제에 의해 재생된다. 아퀴펙스 에어올리쿠스의 *lytB*에 코딩되는 효소는 에스케리치아 콜라이에서 His-테깅된 효소로서 발현되었고 특정화되었다 (Altincicek et al., *FEBS Lett.* 532:437-440 (2002)). 식물에서 유사 효소는 아라비돕시스 탈리아나의 *hdr*에 코딩되어 있다 (Botella-Pavia et al., *Plant J* 40:188-199 (2004)).

표 45

[0237]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
ispH	AAL38655.1	18652795	에스케리치아 콜라이
lytB	O67625.1	8928180	아퀴펙스 에어올리쿠스
hdr	NP_567965.1	18418433	아라비돕시스 탈리아나

[0238] 철-황 클러스터를 형성하는 유전자들의 발현 수준을 변형시키는 것이 제시된 경로에서의 철-황 단백질의 활성에 유익한 효과를 나타낼 수 있다 (예, 도 3의 단계 E 및 F에서 필요한 효소). 에스케리치아 콜라이의 경우, 철-황 함유 단백질 IspH의 과다 발현 (도 3의 단계 F와 유사함)은 철-황 클러스터의 어셈블리에 참여하는 *isc* 영역으로부터 유전자의 공동 발현에 의해 강화되는 것으로 입증되었다 (Grawert et al., *J Am. Chem. Soc.* 126:12847-12855 (2004)). 유전자 클러스터는 유전자들 *icsS*, *icsU*, *icsA*, *hscB*, *hscA* 및 *fdx*로 구성된다. 이들 유전자의 과다 발현이, 철-황 단백질의 기능적 발현에 필요한, 철-황 어셈블리 피펠린의 합성 역량을 개선시키는 것으로 입증되었다. 비슷한 방식을 이러한 방식에 적용할 수 있다.

표 46

[0239]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
iscS	AAT48142.1	48994898	에스케리치아 콜라이
iscU	AAC75582.1	1788878	에스케리치아 콜라이
iscA	AAC75581.1	1788877	에스케리치아 콜라이
hscB	AAC75580.1	1788876	에스케리치아 콜라이
hscA	AAC75579.1	1788875	에스케리치아 콜라이
fdx	AAC75578.1	1788874	에스케리치아 콜라이

[0240] **부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 (도 3, 단계 G)**

[0241] 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제는 2-부테닐-4-디포스페이트와 부테닐-4-디포스페이트의 가역적인 상호 변환을 촉매한다. 하기 효소는 이러한 활성을 본래 가지고 있거나, 또는 이러한 활성을 나타내도록 조작될 수 있다. 유용한 유전자로는, 이소페네닐 디포스페이트와 디메틸알릴 디포스페이트를 상호 변환하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함한다. 이러한 것으로는, 에스케리치아 콜라이 (Rodriguez-Concepcion et al., FEBS Lett, 473(3):328-332), 사카로마이세스 세레비지애 (Anderson et al., J Biol Chem, 1989, 264(32):19169-75), 및 설폴로부스 쉬바타에 (Yamashita et al, Eur J Biochem, 2004, 271(6):1087-93) 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라제 효소를 포함한다. 에스케리치아 콜라이의 Idi 단백질에 의해 촉매되는 이성질화의 반응 기전이

기계적으로 상세하게 특정화되었다 (de Ruyck et al., *J Biol.Chem.* 281:17864-17869 (2006)). 사카로마이세스 세레비지애, 바실러스 섭틸리스 및 헤마토코커스 플루비알리스 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라제 효소는 에스케리치아 콜라이에서 이종적으로 발현된 바 있다 (Laupitz et al., *Eur.J Biochem.* 271:2658-2669 (2004); Kajiwara et al., *Biochem.J* 324 (Pt 2):421-426 (1997)).

표 47

[0242]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
Idi	NP_417365.1	16130791	에스케리치아 콜라이
IDI1	NP_015208.1	6325140	사카로마이세스 세레비지애
Idi	BAC82424.1	34327946	설폴로부스 시바타에
Idi	AAC32209.1	3421423	헤마토코커스 플루비알리스
Idi	BAB32625.1	12862826	바실러스 섭틸리스

[0243] **부타디엔 신타제 (도 3, 단계 H)**

[0244] 부타디엔 신타제는 2-부테닐-4-디포스페이트의 1,3-부타디엔으로의 변환을 촉매한다. 아래 기술된 효소는 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 이소프렌 신타제는 본래 디메틸알릴 디포스페이트의 이소프렌로의 변환을 촉매하지만, 2-부테닐-4-디포스페이트로부터 1,3-부타디엔의 합성을 촉매할 수 있다. 이소프렌 신타제는 포폴루스 알바 (Sasaki et al., FEBS Letters, 579 (11), 2514-2518 (2005)), 푸라리아 몬타나 (Lindberg et al., *Metabolic Eng*, 12(1):70-79 (2010); Sharkey et al., *Plant Physiol.*, 137(2):700-712 (2005)), 및 포폴루스 트레뮬라 x 포폴루스 알바 (Miller et al., *Planta*, 213(3):483-487 (2001)) 등의 수종의 유기체들에서도 확인할 수 있다. 부가적인 이소프렌 신타제 효소는 (Chotani et al., WO/2010/031079, Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene; Cervin et al., US Patent Application 20100003716, Isoprene Synthase Variants for Improved Microbial Production of Isoprene)에 기술되어 있다.

표 48

[0245]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
ispS	BAD98243.1	63108310	포폴루스 알바
ispS	AAQ84170.1	35187004	푸라리아 몬타나
ispS	CAC35696.1	13539551	포폴루스 트레뮬라 x 포폴루스 알바

[0246] **에리트로스-4-포스페이트 키나제 (도 3, 단계 I)**

[0247] 경로의 단계 I에서, 에리트로스-4-포스페이트는 에리트로스-4-포스페이트 키나제에 의해 에리트로스로 변환된다. 효소에 의한 에리트리톨의 공업적인 발효 생산에서, 글루코스는 펜토스 포스페이트 경로를 통해 에리트로스-4-포스페이트로 변환되며, 에리트로스-4-포스페이트는 탈인산화 및 환원되어, 에리트리톨이 만들어진다 (Moon et al., *Appl.Microbiol Biotechnol.* 86:1017-1025 (2010)). 따라서, 에리트로스-4-포스페이트 키나제는 트리코스포로노이데스 메가킬리엔시스 SN-G42(Sawada et al., *J Biosci. Bioeng.* 108:385-390 (2009)), 칸디다 마그놀리아 (Kohl et al., *Biotechnol. Lett.* 25:2103-2105 (2003)) 및 토룰라 sp. (HAJNY et al., *Appl. Microbiol* 12:240-246 (1964); Oh et al., *J Ind. Microbiol Biotechnol.* 26:248-252 (2001)) 등의 다수의 에리트리톨-생산 효소들에 존재한다. 그러나, 에리트로스-4-포스페이트 키나제 유전자는 아직 동정되지 않았다. 이 단계에 이용할 수 있는 기질 범위가 넓은 다수의 폴리올 포스포트랜스퍼라제들이 존재한다. 일 예는 트리오스 키나제 (EC 2.7.1.28)이며, 이는 글리세르알데하이드와 글리세르알데하이드-3-포스페이트의 가역적인 변환을 촉매하지만, 단계 I과 비교하여 탄소 1개가 짧다. 다른 예는 자일룰로키나제 (EC 2.7.1.17) 또는 아라비노키나제 (EC 2.7.1.54)이며, 이는 5C 폴리올 알데하이드의 인산화를 촉매한다. 아래 유전자들은 단계 I 변환에 이용할 수 있다:

표 49

[0248]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
xylB	P09099.1	139849	에스케리치아 콜라이 strain K12
xks1	P42826.2	1723736	사카로마이세스 세레비지애
xylB	P29444.1	267426	클렙시엘라 뉴모니애
dak1	Q9HFC5	74624685	지고사카로마이세스 로욱시이

[0249] **에리트로스 리덕타제 (도 3, 단계 J)**

[0250] 경로의 단계 J에서, 에리트로스는 에리트로스 리덕타제에 의해 에리트리톨로 변환된다. 효소에 의한 에리트리톨의 공업적인 발현 생산산에서, 글루코스는 펜토스 포스페이트 경로를 통해 에리트로스-4-포스페이트로 변환되고, 에리트로스-4-포스페이트는 탈인산화 및 환원되어 에리트리톨이 된다 (Moon et al., 상기 참조, (2010)). 따라서, 에리트로스 리덕타제는 트리코스포로노이데스 메가킬리엔시스 SN-G42 (Sawada et al., 상기 참조, (2009)), 칸디다 마그놀리아 (Kohl et al., 상기 참조, (2003)) 및 토룰라 sp. (HAJNY et al., 상기 참조, (1964); Oh et al., 상기 참조, (2001)) 등의 에리트리톨-생성 효소 다수들에 존재한다. 에리트로스 리덕타제는 특정화되었고, 토룰라 코랄리나(*Torula corallina*) (Lee et al., *Biotechnol.Prog.* 19:495-500 (2003); Lee et al., *Appl.Environ.Microbiol* 68:4534-4538 (2002)), 칸디다 마그놀리아(Lee et al., *Appl.Environ.Microbiol* 69:3710-3718 (2003)) 및 트리코스포로노이데스 메가킬리엔시스 SN-G42 (Sawada et al., 상기 참조, (2009))로부터 정제되었다. 몇몇 에리트로스 리덕타제 유전자들이 클로닝되었고, 이를 단계 J에 적용할 수 있다. 아래 유전자들을 단계 J 변환에 이용할 수 있다:

표 50

[0251]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
alr	ACT78580.1	254679867	칸디다 마그놀리아
er1	BAD90687.1	60458781	트리코스포로노이데스 메가킬리엔시스
er2	BAD90688.1	60458783	트리코스포로노이데스 메가킬리엔시스
er3	BAD90689.1	60458785	트리코스포로노이데스 메가킬리엔시스

[0252] **에리트리톨 키나제 (도 3, 단계 K)**

[0253] 경로의 단계 K에서, 에리트리톨은 에리트리톨 키나제에 의해 에리트리톨-4-포스페이트로 변환된다. 에리트리톨 키나제 (EC 2.7.1.27)는 에리트리톨의 인산화를 촉매한다. 에리트리톨 키나제는 브루셀라 아보르투스(*Brucella abortus*) 등의 에리트리톨을 이용하여 박테리아에서 특정화되었다 (Sperry et al., *J Bacteriol.* 121:619-630 (1975)). 브루셀라 아보르투스의 *eryA* 유전자는 에스케리치아 콜라이에서 기능적으로 발현되었고, 제조된 EryA는 에리트리톨을 에리트리톨-4-포스페이트로 ATP-의존적인 방식으로 변환하는 과정을 촉매하는 것으로 확인되었다 (Lillo et al., *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 13:737-739 (2003)). 아래 유전자들은 단계 K 변환에 사용할 수 있다:

표 51

[0254]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
eryA	Q8YCU8	81850596	브루셀라 아보르투스
eriA	Q92NH0	81774560	시노리조비움 멜릴로티
eryA	YP_001108625.1	134102964	사카로폴리스포라 에리트라에 NRRL 2338

[0255] **말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제 (도 4, 단계 A)**

[0256] 도 4에 도시된 경로의 단계 A에서, 말로닐-CoA:아세틸-CoA 아실 트랜스퍼라제, 베타-케오티올라제에 의해, 말로닐-CoA와 아세틸-CoA가 축합되어, 3-옥소글루타릴-CoA가 만들어진다. 말로닐-CoA에 대해 활성을 가진 효소는 아직 보고된 바 없지만, 이 변환에 적합한 후보 효소는 베타-케토아디필-CoA 티올라제 (EC 2.3.1.174)이며, 이는 3-옥소아디필-CoA 티올라제라고도 하는데, 이는 베타-케토아디필-CoA를 숙시닐-CoA와 아세틸-CoA로

변환하며, 방향족 화합물을 분해하는 베타-케토아디페이트 경로의 주된 효소이다. 이 효소는 슈도모나스 푸티다 (Harwood et al., *J Bacteriol.* 176:6479-6488 (1994)) 및 액시네토박터 칼코아세티쿠스 (Doten et al., *J Bacteriol.* 169:3168-3174 (1987)) 등의 토양 박테리아와 진균에 널리 존재하고 있다. 슈도모나스 strain B13 *pcaF* (Kaschabek et al., *J Bacteriol.* 184:207-215 (2002)), 슈도모나스 푸티다 *U phaD* (Olivera et al., 상기 참조, (1998)), 슈도모나스 플루오레센스 *ST paaE* (Di Gennaro et al., *Arch Microbiol.* 88:117-125 (2007)), 및 에스케리치아 콜라이 *paaJ* (Nogales et al., *Microbiology*, 153:357-365 (2007))에 의해 코딩되는 유전자 산물은 역시 이러한 변환을 촉매한다. 몇몇 베타-케토티올라제들은 슈도모나스 푸티다 *bkt*, 슈도모나스 에어루지노사 *PAO1 pcaF* 및 *bkt*, 버크홀데리아 암비파리아(*Burkholderia ambifaria*) AMMD *bkt*, 에스케리치아 콜라이 *paaJ*, 및 슈도모나스 푸티다 *phaD* 등의 옥소아디필-CoA를 만드는 방향으로 유의하며 선택적인 활성을 나타낸다. 또한, 이들 효소는 3-옥소아디필-CoA와 구조적으로 유사한 화합물인 3-옥소글루타릴-CoA의 합성에 사용할 수 있다.

표 52

[0257]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
paaJ	NP_415915.1	16129358	에스케리치아 콜라이
pcaF	AAL02407	17736947	슈도모나스 낙크무시이 (B13)
phaD	AAC24332.1	3253200	슈도모나스 푸티다
pcaF	AAA85138.1	506695	슈도모나스 푸티다
pcaF	AAC37148.1	141777	액시네토박터 칼코아세티쿠스
paaE	ABF82237.1	106636097	슈도모나스 플루오레센스
bkt	YP_777652.1	115360515	버크홀데리아 암비파리아 AMMD
bkt	AAG06977.1	9949744	슈도모나스 에어루지노사 PAO1
pcaF	AAG03617.1	9946065	슈도모나스 에어루지노사 PAO1

[0258] 다른 관련 베타-케토티올라제는 글루타릴-CoA를 아세틸-CoA와 조합하여 3-옥소피멜로일-CoA를 만드는 옥소피멜로일-CoA:글루타릴-CoA 아실트랜스퍼라제 (EC 2.3.1.16)이다. 이러한 변환을 촉매하는 효소는 랄스토니아 유트로파 (기존에는 알칼리게네스 유트로푸스(*Alcaligenes eutrophus*)로 알려져 있음)의 코딩 유전자 *bktB* 및 *bktC* (Slater et al., *J.Bacteriol.* 180:1979-1987 (1998); Haywood et al., *FEMS Microbiology Letters* 52:91-96 (1988))에서 확인된다. BktB 단백질의 서열은 공지되어 있지만, BktC 단백질 서열은 보고된 바 없다. 로도슈도모나스 파울스트리스의 *pim* 오페론도 *pimB*에 코딩된 베타-케토티올라제를 코딩하고 있으며, 이는 벤조일-CoA 분해시 분해 방향으로 변환을 촉매하는 것으로 예측된다 (Harrison et al., *Microbiology* 151:727-736 (2005)). 신트로푸스 액시디트로피쿠스에서 베타-케토티올라제 후보 효소가 *bktB*에 대한 서열 상동성에 의해 동정되었다 (상동성 43%, e 값 = 1e-93).

표 53

[0259]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
bktB	YP_725948	11386745	랄스토니아 유트로파
pimB	CAE29156	39650633	로도슈도모나스 파울스트리스
syn_02642	YP_462685.1	85860483	신트로푸스 액시디트로피쿠스

[0260] 아세틸-CoA와 프로피오닐-CoA로부터 베타-케토발레렐-CoA의 생성을 촉매하는 베타-케토티올라제 효소는 3-옥소글루타릴-CoA의 생성도 촉매할 수 있다. 주글레아 라미게라는 프로피오닐-CoA와 아세틸-CoA로부터 베타-케토발레렐-CoA를 만들 수 있는 2개의 케토티올라제를 가지고 있으며, 랄스토니아 유트로파는 이 변환을 또한 촉매할 수 있는 베타-산화 케토티올라제를 가지고 있다 (Slater et al., *J. Bacteriol*, 180:1979-1987 (1998)). 이들 유전자 또는 이의 번역된 단백질 서열은 아직 보고되지 않았고, 랄스토니아 유트로파, 주글레아 라미게라 또는 기타 유기체에서 몇가지 후보체들이 랄스토니아 유트로파의 *bktB*에 대한 서열 상동성을 기반으로 동정할 수 있다. 그러한 것으로는 하기를 포함한다:

표 54

[0261]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
phaA	YP_725941.1	113867452	랄스토니아 유트로파
h16_A1713	YP_726205.1	113867716	랄스토니아 유트로파
pcaF	YP_728366.1	116694155	랄스토니아 유트로파
h16_B1369	YP_840888.1	116695312	랄스토니아 유트로파
h16_A0170	YP_724690.1	113866201	랄스토니아 유트로파
h16_A0462	YP_724980.1	113866491	랄스토니아 유트로파
h16_A1528	YP_726028.1	113867539	랄스토니아 유트로파
h16_B0381	YP_728545.1	116694334	랄스토니아 유트로파
h16_B0662	YP_728824.1	116694613	랄스토니아 유트로파
h16_B0759	YP_728921.1	116694710	랄스토니아 유트로파
h16_B0668	YP_728830.1	116694619	랄스토니아 유트로파
h16_A1720	YP_726212.1	113867723	랄스토니아 유트로파
h16_A1887	YP_726356.1	113867867	랄스토니아 유트로파
phbA	P07097.4	135759	주글레아 라미게라
bktB	YP_002005382.1	194289475	쿠프리아비두스 타이완엔시스
Rmet_1362	YP_583514.1	94310304	랄스토니아 메탈리두란스
Bphy_0975	YP_001857210.1	186475740	버크홀데리아 피마툼

[0262] 추가적인 후보체는 아세틸-CoA 2분자를 아세토아세틸-CoA로 변환시키는 것으로 공지된 베타-케토티올라제(EC 2.1.3.9)이다. 아세토아세틸-CoA 티올라제 효소의 예는 에스케리치아 콜라이의 atoB (Martin et al., 상기 참조, (2003)), 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 thlA 및 thlB (Hanai et al., 상기 참조, (2007); Winzer et al., 상기 참조, (2000))및 사카로마이세스 세레비지애의 ERG10 (Hiser et al., 상기 참조, (1994)) 유전자 산물이다.

표 55

[0263]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
toB	NP_416728	16130161	에스케리치아 콜라이
thlA	NP_349476.1	15896127	클로스트리듐 아세토부틸리컴
thlB	NP_149242.1	15004782	클로스트리듐 아세토부틸리컴
ERG10	NP_015297	6325229	사카로마이세스 세레비지애

[0264] **3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (케톤-환원성) (도 4, 단계 B)**

[0265] 이 효소는 도 4에 나타낸 경로의 단계 B에서 3-옥소글루타릴-CoA의 3-옥소기를 3-하이드록시기로 환원시키는 과정을 촉매한다.

[0266] 3-옥소아실-CoA 데하이드로게나제 효소는 3-옥소아실-CoA 분자를 3-하이드록시아실-CoA 분자로 변환하며, 지방산 베타-산화 또는 페닐 아세테이트 이화작용에 대개 참여한다. 예를 들어, 에스케리치아 콜라이에서 *fadB*와 *fadJ*에 코딩된 2개의 지방산 산화 복합체들이 서브유닛들은 3-하이드록시아실-CoA 데하이드로게나제로 기능한다 (Binstock et al., *Methods Enzymol.* 71 Pt C:403-411 (1981)). 아울러, 슈도모나스 푸티다 *U*의 *phaC* (Olivera et al., 상기 참조, (1998)) 및 슈도모나스 플루오레센스 *ST*의 *paaC* (Di et al., 상기 참조, (2007))에 코딩된 유전자 산물들은, 페닐아세테이트 또는 스티렌의 이화작용 동안에 3-하이드록시아디필-CoA의 3-옥소아디필-CoA로의 가역적인 산화를 촉매한다. 또한, 페닐아세테이트 분해 오페론에서 에스케리치아 콜라이의 *paaH*의 다른 유전자에 대한 근접성 (Nogales et al., 상기 참조, (2007))과, *paaH* 돌연변이는 페닐아세테이트에서 생장할 수 없는 점(Ismail et al., 상기 참조, (2003))을 감안하면, 에스케리치아 콜라이 *paaH* 유전자는 3-하이드록시아실-CoA 데하이드로게나제를 코딩하는 것으로 예상된다.

표 56

[0267]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
fadB	P21177.2	119811	에스케리치아 콜라이
fadJ	P77399.1	3334437	에스케리치아 콜라이
paaH	NP_415913.1	16129356	에스케리치아 콜라이
phaC	NP_745425.1	26990000	슈도모나스 푸티다
paaC	ABF82235.1	106636095	슈도모나스 플루오레센스

[0268] 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제는 아세토아세틸-CoA 리덕타제라고도 불리우며, 아세토아세틸-CoA의 3-하이드록시부티릴-CoA로의 가역적인 NAD(P)H-의존적인 변환을 촉매한다. 이 효소는 여러가지 클로스트리디아 종들에서 부티레이트로의 아세틸-CoA 발효 경로에 참여하며, 자세히 연구되었다 (Jones and Woods, 상기 참조, (1986)). 후보 효소로는 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *hbd* (Boynton et al., *J. Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996)), 클로스트리듐 베이예린스키이의 *hbd* (Colby et al., *Appl Environ.Microbiol* 58:3297-3302 (1992)), 및 메탈로스페어라 세둘라 유래의 다수의 유사 효소 (Berg et al., 상기 참조, (2007))들이 있다. 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 hbd에 의해 코딩되는 효소가 클로닝되었고, 에스케리치아 콜리아에서 기능적으로 발현되었다 (Youngleson et al., 상기 참조, (1989)). 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로 환원시키는 것으로 확인된 또 다른 유전자는, 주글로에아 라미게라 유래 *phbB* (Ploux et al., 상기 참조, (1988)) 및 로도박터 스페어로이데스 유래 *phaB*(Alber et al., 상기 참조, (2006))이다. 전자 유전자는 NADPH-의존적이며, 이의 뉴클레오티드 서열이 결정되었으며 (Peoples and Sinskey, 상기 참조, (1989)), 유전자를 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨 바 있다. 추가적인 유전자로는 클로스트리듐 클루이베리의 *hbd1* (C-말단 도메인) 및 *hbd2* (N-말단 도메인) (Hillmer and Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 3334:12-23 (1974))과 보스 타우루스의 *HSD17B10* (WAKIL et al., 상기 참조, (1954))가 있다.

표 57

[0269]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
hbd	NP_349314.1	15895965	클로스트리듐 아세토부틸리컴
hbd	AAM14586.1	20162442	클로스트리듐 베이예린키이
Msed_1423	YP_001191505	146304189	메탈로스페어라 세둘라
Msed_0399	YP_001190500	146303184	메탈로스페어라 세둘라
Msed_0389	YP_001190490	146303174	메탈로스페어라 세둘라
Msed_1993	YP_001192057	146304741	메탈로스페어라 세둘라
hbd2	EDK34807.1	146348271	클로스트리듐 클루이베리
hbd1	EDK32512.1	146345976	클로스트리듐 클루이베리
HSD17B10	O02691.3	3183024	보스 타우루스
phaB	YP_353825.1	77464321	로도박터 스페에로이데스
phbB	P23238.1	130017	주글로에아 라미게라

[0270] **3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성) (도 4, 단계 C)**

[0271] 3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제는 3-하이드록시글루타릴-CoA를 3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트로 환원한다. 몇몇 아실-CoA 데하이드로게나제들은 아실-CoA를 이의 대응되는 알데하이드 (EC 1.2.1)로 환원한다. 이러한 효소를 코딩하는 유전자의 예로는, 지방 아실-CoA 리덕타제를 코딩하는 액시네토박터 칼코아세티쿠스 *acr1* (Reiser and Somerville, 상기 참조, (1997)), 액시네토박터 *sp. M-1* 지방 아실-CoA 리덕타제 (Ishige et al., 상기 참조, (2002)), 및 클로스트리듐 클루이베리의 *sucD* 유전자에 의해 코딩되는 CoA- 및 NADP-의존적인 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제 (Sohling and Gottschalk, 상기 참조, (1996); Sohling and Gottschalk, 상기 참조, (1996))를 포함한다. 포르피로모나스 긴기발리스의 *SucD*는 다른 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제이다 (Takahashi et al., 상기 참조, (2000)). 슈도모나스 *sp*에서 *bphG*에 의해 코딩되는 효소 아실화 아세트알데하이드 데하이드로게나제는, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 이소부티르알데하이드 및 포름알데하이드를 산화 및 아실화하는 것으로 입증되었으므로, 또 다른 효소이다

(Powlowski et al., 상기 참조, (1993)). 루코노스톡 메센테로이데스의 *adhE*에 의해 코딩되는 효소는, 아세틸-CoA를 에탄올로 환원할 뿐만 아니라, 분지쇄 화합물 이소부티르알데하이드를 이소부티릴-CoA로 산화하는 것으로 확인되었다 (Koo et al., *Biotechnol Lett.* 27:505-510 (2005)). 부티르알데하이드 데하이드로게나제는 유사 반응, 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴과 같은 용매생성 유기체(solventogenic organism)에서 부티릴-CoA의 부티르알데하이드로의 변환을 촉매한다 (Kosaka et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)).

표 58

[0272]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
acr1	YP_047869.1	50086359	액시네토박터 칼코아세티쿠스
acr1	AAC45217	1684886	액시네토박터 베일리이
acr1	BAB85476.1	18857901	액시네토박터 sp. Strain 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

[0273] 아실-CoA를 이의 대응되는 알데하이드로 변환시키는 다른 효소 타입은, 말로닐-CoA를 말론 세미알데하이드로 전환하는 말로닐-CoA 리덕타제이다. 말로닐-CoA 리덕타제는 호열호산성 고세균 박테리아에서 3-하이드록시프로피오네이트 사이클을 통해 자가 영양성 탄소를 고정하는 주요 효소이다 (Berg et al., 상기 참조, (2007b); Thauer, 상기 참조, (2007)). 이 효소는 조인자로서 NADPH를 이용하며, 메탈로스페어라와 설폴로부스 spp에서 특정화되었다 (Alber et al., 상기 참조, (2006); Hugler et al., 상기 참조, (2002)). 효소는 메탈로스페어라 세둘라의 *Msed_0709*에 코딩되어 있다 (Alber et al., 상기 참조, (2006); Berg et al., 상기 참조, (2007b)). 설폴로부스 토코다이 유래 말로닐-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자가 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이에서 이종 발현되었다 (Alber et al., 상기 참조, (2006)). 이 효소는 메틸말로닐-CoA를 대응되는 알데하이드로 변환시키는 과정을 촉매하는 것으로 확인되었다 (WO/2007/141208). 이들 효소의 알데하이드 데하이드로게나제 기능성이 클로로플렉수스 아우란티아쿠스 유래의 2중 기능의 데하이드로게나게와 유사하지만, 서열 유사성은 거의 없다. 이들 2종의 말로닐-CoA 리덕타제 후보 효소들은 아스파르틸-4-포스페이트의 아스파르테이트 세미알데하이드로의 환원과 탈인산화를 동시에 촉매하는 효소인 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제와 서열 유사성이 높다. 추가적인 후보 유전자는 설폴로부스 솔파타리쿠스 및 설폴로부스 액시도칼다리우스 등의 다른 유기체들에서 단백질 서열 상동성에 의해 발견할 수 있다. 또 다른 아실-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성) 후보 유전자는 클로스트리듐 베이예린키이의 *ald* 유전자이다 (Toth et al., *Appl Environ.Microbiol* 65:4973-4980 (1999)). 이 효소는 아세틸-CoA와 부티릴-CoA를 대응되는 알데하이드로 환원시키는 것으로 보고된 바 있다. 이 유전자는 살모넬라 티피무리움 및 에스케리치아 콜라이의 아세트알데하이드 데하이드로게나제를 코딩하는 *eutE*와 매우 유사하다 (Toth et al., 상기 참조, (1999)).

표 59

[0274]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	*메탈로스페어라 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 베이예린키이*
eutE	AAA80209	687645	*살모넬라 티피무리움*
eutE	P77445	2498347	에스케리치아 콜라이

[0275] **3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트 리덕타제 (도 4, 단계 D)**

[0276] 이 효소는 3-하이드록시-5-옥소 펜타노트에서 말단 알데하이드기를 알코올기로 환원시킨다. 알데하이드의 알코올로의 변환을 촉매하는 효소 (즉, 알코올 데하이드로게나제 또는 등가의 알데하이드 리덕타제, 1.1.1.a)를 코

딩하는 유전자의 예는, C2-C14에 대한 중쇄 알코올 데하이드로게나제를 코딩하는 *alrA* (Tani et al., 상기 참조, (2000)), 사카로마이세스 세레비지애의 ADH2 (Atsumi et al., 상기 참조, (2008)), C(3) 보다 긴 분자를 선호하는 에스케리치아 콜라이의 *yqhD* (Sulzenbacher et al., 상기 참조, (2004)), 및 부티리알데하이드를 부탄올로 변환시키는 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *bdh* I과 *bdh* II (Walter et al., 상기 참조, (1992))를 포함한다. *yqhD*의 유전자 산물은 조인자로서 NADPH를 이용하여 아세트알데하이드, 말론디알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드 및 아크롤레인의 환원을 촉매한다 (Perez et al., 283:7346-7353 (2008); Perez et al., *J Biol.Chem.* 283:7346-7353 (2008)). 자이모모나스 모빌리스의 *adhA* 유전자 산물은 포름알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드 및 아크롤레인 등의 다수의 알데하이드계 화합물에 대해 활성을 나타내는 것으로 확인되었다 (Kinoshita et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 22:249-254 (1985)).

표 60

[0277]

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

[0278] 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 활성을 가지는 효소 (EC 1.1.1.61)또한 이 카테고리에 포함된다. 이 효소는 랄스토니아 유트로파 (Bravo et al., 상기 참조, (2004)), 클로스트리듐 클루이베리 (Wolff and Kenealy, 상기 참조, (1995)) 및 아라비돕시스 탈리아나 (Breitkreuz et al., 상기 참조, (2003))에서 특정화되었다. 아라비돕시스 탈리아나 효소가 효모[12882961]에서 클로닝되었고, 특정화되었다. 또 다른 유전자는 지오바실러스 서모글루코시다시우스 유래 알코올 데하이드로게나제 *adhI*이다 (Jeon et al., *J Biotechnol* 135:127-133 (2008)).

표 61

[0279]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
4hbd	YP_726053.1	113867564	랄스토니아 유트로파 H16
4hbd	EDK35022.1	146348486	클로스트리듐 클루이베리
4hbd	Q94B07	75249805	아라비돕시스 탈리아나
adhI	AAR91477.1	40795502	지오바실러스 서모글루코시다시우스

[0280] 효소의 다른 예는 3-하이드록시이소부티레이트의 메틸말로네이트 세미알데하이드로의 가역적인 산화를 촉매하는 3-하이드록시이소부티레이트 데하이드로게나제 (EC 1.1.1.31)이다. 이 효소는 발신, 루신 및 이소루신 분해에 참여하며, 박테리아, 진핵생물 및 포유류에서 동정되었다. 서무스 서모필러스 HB8 유래 *P84067*에 의해 코딩되는 효소는 구조적으로 특정화되었다 (Lokanath et al., *J Mol Biol* 352:905-17 (2005)). 인간 3-하이드록시이소부티레이트 데하이드로게나제의 가역성은 동위원소로 표지된 기질을 이용하여 입증되었다 (Manning et al., *Biochem J* 231:481-4 (1985)). 이 효소를 코딩하는 추가적인 유전자들로는 호모 사피엔스(Hawes et al., *Methods Enzymol* 324:218-228 (2000))와 오릭톨라구스 쿠니쿨루스(*Oryctolagus cuniculus*)(Hawes et al., 상기 참조, (2000); Chowdhury et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 60:2043-2047 (1996))의 *3hidh*, 슈도모나스 에어루지노사의 *mmsb*, 및 슈도모나스 푸티다의 *dhat* (Aberhart et al., *J Chem.Soc.[Perkin 1]* 6:1404-1406 (1979); Chowdhury et al., 상기 참조, (1996); Chowdhury et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 67:438-441 (2003))를 포함한다.

표 62

[0281]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
P84067	P84067	75345323	서무스 서모필러스
mmsb	P28811.1	127211	슈도모나스 에어루지노사
dhat	Q59477.1	2842618	슈도모나스 푸티다

3hidh	P31937.2	12643395	호모 사피엔스
3hidh	P32185.1	416872	오릭톨라구스 쿠니쿨루스

[0282] 말론 세미알데하이드에서 3-HP로의 변환은 또한 다른 2종의 효소에 의해 달성될 수 있다: NADH-의존적인 3-하이드록시프로피오네이트 데하이드로게나제 및 NADPH-의존적인 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제. NADH-의존적인 3-하이드록시프로피오네이트 데하이드로게나제는 박테리아 및 식물에서 프로피오네이트로부터 베타-알라닌 생합성 경로에 참여하는 것으로 생각된다 (Rathinasabapathi B., *Journal of Plant Pathology* 159:671-674 (2002); Stadtman, *J. Am. Chem. Soc.* 77:5765-5766 (1955)). 이 효소는 지금까지 임의 유기체의 유전자와의 연관성은 파악되지 않았다. NADPH-의존적인 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제는 자가영양성 이산화탄소-고정 박테리아에서 역 반응을 촉매한다. 효소 활성이 메탈로스페어라 세둘라에서 검출되었지만, 유전자의 실체는 확인되지 않았다 (Alber et al., 상기 참조, (2006)).

[0283] **3,5-디하이드록시펜타노에이트 키나제 (도 4, 단계 E)**

[0284] 이 효소는 도 4 (단계 E)에서 3,5-디하이드록시펜타노트를 인산화하여 3-하이드록시-5-포스포네이토옥시펜타노에이트 (3H5PP)를 합성한다. 이러한 변환은 포스페이트기를 알코올로 ATP-의존적인 방식으로 전이할 수 있는 EC 클래스 2.7.1의 효소에 의해 촉매될 수 있다.

[0285] 이 단계에 적합한 후보 효소는 메틸 유사체, 메발로네이트, 3,5-디하이드록시펜타노트의 말단 하이드록실기를 인산화하는 메발로네이트 키나제 (EC 2.7.1.36)이다. 이 단계의 일부 후보 유전자로는 사카로마이세스 세레비지애의 erg12, 메타노칼도코커스 야나스키의 *mvk*, 호모 사피엔스의 *MVK* 및 아라비돕시스 탈리아나 *col*의 *mvk*가 있다.

표 63

[0286]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
erg12	*CAA39359.1*	3684	사카로마이세스 세레비지애
mvk	Q58487.1	2497517	메타노칼도코커스 야나스키
mvk	AAH16140.1	16359371	호모 사피엔스
M/mvk	NP_851084.1	30690651	아라비돕시스 탈리아나

[0287] 글리세롤 키나제는 또한 글리세롤의 말단 하이드록실기를 인산화하여, 글리세롤-3-포스페이트를 합성한다. 이 반응은 에스케리치아 콜라이, 사카로마이세스 세레비지애 및 서모토가 마리티마 등의 몇몇 종들에서 이루어진다. 에스케리치아 콜라이의 글리세롤 키나제는 디하이드록시아세톤 및 글리세르알데하이드와 같은 대체 기질을 허용하는 것으로 알려져 있다 (Hayashi and Lin, 상기 참조, (1967)). 서모토가 마리팀은 2개의 글리세롤 키나제를 가지고 있다 (Nelson et al., 상기 참조, (1999)). 글리세롤 키나제는 기질 특이성이 매우 넓은 것으로 확인되었다. Crans 및 Whiteside는 4종의 유기체들(에스케리치아 콜라이, 사카로마이세스 세레비지애, 바실러스 스테아로서모필러스 및 칸디다 미코더마) 유래의 글리세롤 키나제들을 연구하였다 (Crans and Whitesides, 상기 참조, (2010); Nelson et al., 상기 참조, (1999)). 이들은 66종의 상이한 글리세롤 유사체들을 연구하였고, 이 효소가 하나의 말단 하이드록실기 대시 다양한 치환기를 허용할 수 있으며, C2 위치의 수소 원자를 메틸기로 치환시킬 수 있는 것으로 확인하였다. 흥미롭게도, 이들 4종 유기체들로부터 유래된 효소들의 카이네틱 상수들은 매우 비슷하였다. 후보 유전자는 다음과 같다:

표 64

[0288]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
glpK	AP_003883.1	89110103	에스케리치아 콜라이 *K12*
glpK1	NP_228760.1	15642775	서모토가 마리타임 MSB8
glpK2	NP_229230.1	15642775	서모토가 마리타임 MSB8
Gut1	NP_011831.1	82795252	사카로마이세스 세레비지애

[0289] 호모세린 키나제는 3,5-디하이드록시펜타노에이트의 인산화를 유도할 수 있는 잠재적인 다른 후보 효소이다. 이 효소는 또한 에스케리치아 콜라이, 스트렙토마이세스 sp 및 사카로마이세스 세레비지애 등의 다수의 유기체

들에 존재한다. 에스케리치아 콜라이 유래의 호모세린 키나제는 L-2-아미노,1,4- 부탄디올, 아스파르테이트 세미알데하이드 및 2-아미노-5-하이드록시발레레이트 등의 수많은 기질에 대해 활성을 가지는 것으로 입증되었다 (Huo and Viola, 상기 참조, (1996); Huo and Viola, 상기 참조, (1996)). 이 효소는 알파 위치의 카르복실기가 에스테르 또는 하이드록시메틸기로 치환된 기질에 작용할 수 있다. 후보 유전자는 다음과 같다:

표 65

[0290]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
thrB	BAB96580.2	85674277	에스케리치아 콜라이 *K12*
SACT1DRAFT_4809	ZP_06280784.1	282871792	스트렙토마이세스 sp. ACT-1
Thr1	AAA35154.1	172978	사카로마이세스 세레비지애

[0291] **3H5PP 키나제 (도 4, 단계 F)**

[0292] 3H5PP의 3H5PDP로의 인산화는 3H5PP 키나제에 의해 촉매된다 (도 4, 단계 F). 포스포메발로네이트 키나제 (EC 2.7.4.2)는 메발로네이트 경로에서 유사한 변환을 촉매한다. 이 효소는 사카로마이세스 세레비지애의 *erg8* (Tsay et al., *Mol.Cell Biol.* 11:620-631 (1991)) 및 스트렙토코커스 뉴모니애, 스타필로코커스 아우레우스와 엔테로코커스 패칼리스의 *mvaK2* (Doun et al., *Protein Sci.* 14:1134-1139 (2005); Wilding et al., *J Bacteriol.* 182:4319-4327 (2000))에 코딩되어 있다. 스트렙토코커스 뉴모니애와 엔테로코커스 패칼리스에서 효소가 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이에서 특정화되었다 (Pilloff et al., *J Biol.Chem.* 278:4510-4515 (2003); Doun et al., Protein *Sci.* 14:1134-1139 (2005)).

표 66

[0293]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
Erg8	AAA34596.1	171479	사카로마이세스 세레비지애
mvaK2	AAG02426.1	9937366	스타필로코커스 아우레우스
mvaK2	AAG02457.1	9937409	스트렙토코커스 뉴모니애
mvaK2	AAG02442.1	9937388	엔테로코커스 패칼리스

[0294] **3H5PDP 데카르복실라제 (도 4, 단계 G)**

[0295] 부테닐 4-디포스페이트는 3H5PDP 데카르복실라제에 의한 3H5PDP의 ATP-의존적인 탈카르복시화를 통해 합성된다 (도 4, 단계 G). 이러한 활성을 가진 효소는 지금까지 특정화되지 않았지만, 유사 반응이 이소프레노이드를 생합성하기 위한 메발로네이트 경로에 참여하는 효소인 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제 (EC 4.1.1.33)에 의해 촉매된다. 이 반응은 사카로마이세스 세레비지애의 MVD1, 호모 사피엔스의 MVD 및 스타필로코커스 아우레우스와 트립소노마 브루세이의 MDD (Toth et al., *J Biol.Chem.* 271:7895-7898 (1996); Byres et al., *J Mol.Biol.* 371:540-553 (2007))에 의해 촉매된다.

표 67

[0296]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
MVD1	P32377.2	1706682	사카로마이세스 세레비지애
MVD	NP_002452.1	4505289	호모 사피엔스
MDD	ABQ48418.1	147740120	스타필로코커스 아우레우스
MDD	EAN78728.1	70833224	트립소노마 브루세이

[0297] **부테닐 4-디포스페이트 이소머라제 (도 4, 단계 H)**

[0298] 부테닐 4-디포스페이트 이소머라제는 2-부테닐-4-디포스페이트와 부테닐-4-디포스페이트의 가역적인 상호 변환을 촉매한다. 하기 효소는 본래 이러한 활성을 가지고 있거나, 또는 이러한 활성을 나타내도록 조작될 수 있다. 유용한 유전자로는, 이소페네닐 디포스페이트와 디메틸알릴 디포스페이트를 상호 변환하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함한다. 이러한 것으로는, 에스케리치아 콜라이 (Rodriguez-Concepcion et al., *FEBS Lett*,

473(3):328-332), 사카로마이세스 세레비지애 (Anderson et al., *J Biol Chem*, 1989, 264(32);19169-75) 및 설폴로부스 쉬바타에 (Yamashita et al, Eur J Biochem, 2004, 271(6);1087-93) 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라제 효소가 있다. 에스케리치아 콜라이의 Idi 단백질에 의해 촉매되는 이성질화의 반응 기전이 기계적으로 상세하게 특정화되었다 (de Ruyck et al., *J Biol.Chem.* 281:17864-17869 (2006)). 사카로마이세스 세레비지애, 바실러스 섭틸리스 및 헤마토코커스 플루비알리스 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 이소머라제 효소가 에스케리치아 콜라이에서 이종적으로 발현된 바 있다 (Laupitz et al., *Eur.J Biochem.* 271:2658-2669 (2004); Kajiwara et al., *Biochem.J* 324 (Pt 2):421-426 (1997)).

표 68

[0299]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
Idi	NP_417365.1	16130791	에스케리치아 콜라이
IDI1	NP_015208.1	6325140	사카로마이세스 세레비지애
Idi	BAC82424.1	34327946	설폴로부스 쉬바타에
Idi	AAC32209.1	3421423	헤마토코커스 플루비알리스
Idi	BAB32625.1	12862826	바실러스 섭틸리스

[0300] **부타디엔 신타제 (도 4, 단계 I)**

[0301] 부타디엔 신타제는 2-부테닐-4-디포스페이트의 1,3-부타디엔으로의 변환을 촉매한다. 아래 기술된 효소는 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 이소프렌 신타제은 본래 디메틸알릴 디포스페이트의 이소프렌로의 변환을 촉매하지만, 2-부테닐-4-디포스페이트로부터 1.3-부타디엔의 합성도 촉매할 수 있다. 이소프렌 신타제는 포풀루스 알바 (Sasaki et al., FEBS Letters, 2005, 579 (11), 2514-2518), 푸라리아 몬타나 (Lindberg et al., *Metabolic Eng*, 12(1):70-79 (2010); Sharkey et al., *Plant Physiol.*, 137(2):700-712 (2005)), 및 포풀루스 트레뮬라 x 포풀루스 알바 (Miller et al., *Planta*, 213(3):483-487 (2001)) 등의 몇몇 유기체들에서 확인할 수 있다. 부가적인 이소프렌 신타제 효소들은 (Chotani et al., WO/2010/031079, Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene; Cervin et al., US Patent Application 20100003716, Isoprene Synthase Variants for Improved Microbial Production of Isoprene)에 기술되어 있다.

표 69

[0302]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
ispS	BAD98243.1	63108310	포풀루스 알바
ispS	AAQ84170.1	35187004	푸라리아 몬타나
ispS	CAC35696.1	13539551	포풀루스 트레뮬라 x 포풀루스 알바

[0303] **3-하이드록시글루타릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성) (도 4, 단계 J)**

[0304] 이 단계는 3-하이드록시글루타릴-CoA의 아실-CoA 기를 알코올기로 환원하는 과정을 촉매한다. 아실-CoA를 알코올로 변환하는 2중 기능성의 옥시도리덕타제의 예로는, 아세틸-CoA와 같은 기질을 에탄올로 변환시키는 효소 (예, 에스케리치아 콜라이의 *dhE* (Kessler et al., 상기 참조, (1991))와 부티릴-CoA를 부탄올로 변환시키는 효소 (예, 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *adhE2* (Fontaine et al., 상기 참조, (2002))를 포함한다. 루코노스톡 메센테로이데스의 *adhE*에 의해 코딩되는 효소는, 아세틸-CoA를 에탄올로 환원시킬 뿐만 아니라, 분지쇄 화합물 이소부티르알데하이드를 이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 확인되었다 (Kazahaya et al., 상기 참조, (1972); Koo et al., 상기 참조, (2005)).

[0305] 다른 예시적인 효소는 말로닐-CoA를 3-HP로 변환시킬 수 있다. 이러한 활성을 가진 NADPH-의존적인 효소는 3-하이드록시프로피오네이트 사이클에 참여하며, 클로로플렉수스 아우란티아쿠스에서 특정화되었다 (Hugler et al., 상기 참조, (2002); Strauss and Fuchs, 상기 참조, (1993)). 분자량 300 kDa인 이 효소는 기질 특이성이 높으며, 공지된 다른 옥시도리덕타제와의 서열 유사성이 거의 없다 (Hugler et al., 상기 참조, (2002)). 이러한 특이적인 반응을 촉매하는 효소는 다른 유기체들에서 확인되지 않았지만, 다른 유기체들이 유사한 경로를 가질 수 있다는 생물정보학적 증거는 존재한다 (Klatt et al., 상기 참조, (2007)). 서열 유사성을 통해 로즈이플렉수스 카스텐홀지이, 에리트로박터 *sp. NAP1* 및 마린 감마 프로테오박테리움 HTCC2080 등의 다른 유기체

들에서의 후보 효소들을 추론할 수 있다.

표 70

[0306]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
adhE	NP_415757.1	16129202	에스케리치아 콜라이
adhE2	AAK09379.1	12958626	클로스트리듐 아세토부틸리컴
adhE	AAV66076.1	55818563	루코노스톡 메센테로이데스
mcr	AAS20429.1	42561982	클로로플렉수스 아우란티아쿠스
Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	로즈이플렉수스 카스텐홀지이
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	에리트로박터 sp. NAP1
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	마린 감마 프로테오박테리움 HTCC2080

[0307] 장쇄 아실-CoA 분자는 알코올을 생산하는 지방 아실-CoA 리덕타제를 코딩하는 호호바 (*Simmondsia chinensis*) *FAR*와 같은 효소에 의해 대응되는 알코올로 환원될 수 있다. 이를 에스케리치아 콜라이에서 과다 발현시키면 FAR 활성이 나타나며, 지방 알코올이 축적된다 (Metz et al., *Plant Physiology* 122:635-644 (2000)).

표 71

[0308]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
FAR	AAD38039.1	5020215	심몬드시아 키넨시스

[0309] 이 단계를 촉매하는 다른 후보 효소는 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타제 (또는 HMG-CoA 리덕타제)이다. 이 효소는 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA에서 CoA 기를 알코올 형성 메발로네이트로 환원시킨다. 이 단계의 후보 유전자는 하기를 포함한다:

표 72

[0310]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
HMG1	*CAA86503.1*	587536	사카로마이세스 세레비지애
HMG2	NP_013555	6323483	사카로마이세스 세레비지애
HMG1	CAA70691.1	1694976	아라비돕시스 탈리아나
hmgA	AAC45370.1	2130564	설폴로부스 솔파타리쿠스

[0311] 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타제를 코딩하는 설폴로부스 솔파타리쿠스의 *hmgA* 유전자는 클로닝되었고, 에스케리치아 콜라이에서 발현된 바 있다 (Bochar et al., *J Bacteriol.* 179:3632-3638 (1997)). 사카로마이세스 세레비지애는 또한 2개의 HMG-CoA 리덕타제를 가지고 있다 (Basson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 83:5563-5567 (1986)). 또한, 유전자는 아라비돕시스 탈리아나에서 분리되었고, 사카로마이세스 세레비지애에서 HMG-COA 리덕타제 활성을 보완하는 것으로 확인되었다 (Learned et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86:2779-2783 (1989)).

[0312] **3-옥소글루타릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성) (도 4, 단계 K)**

[0313] 몇가지 아실-CoA 데하이드로게나제들은 아실-CoA를 이의 대응되는 알데하이드로 환원시킬 수 있다. 따라서, 이들 효소는 3-옥소글루타릴-CoA를 3,5-디옥소펜타노에이트로 본래 환원시킬 수 있거나, 또는 그렇도록 조작될 수 있다. 상기한 효소를 코딩하는 유전자의 예는 도 4의 단계 C에서 언급되었다.

[0314] **3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (케톤 환원) (도 4, 단계 L)**

[0315] 케톤을 하이드록시 관능기로 변환시키는 알코올 데하이드로게나제의 몇몇 예들이 있다. 에스케리치아 콜라이 유래의 상기한 2가지 효소는 말레이트 데하이드로게나제 (*mdh*)와 락테이트 데하이드로게나제 (*ldhA*)에 코딩되어 있다. 또한, 랄스토니아 유트로파 유래의 락테이트 데하이드로게나제는, 락테이트, 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소글루타레이트 등의 다양한 체인 길이의 2-케토산에 대해 고활성을 나타내는 것으로 확인되었다 (Steinbuchel et al., *Eur. J. Biochem.* 130:329-334 (1983)). 알파-케토아디페이트의 알파-하이드록시아디페이트로의 변환은, 랫과 인간 태반에서 확인된 것으로 보고된 효소인 2-케토아디페이트 리덕타제에 의해

촉매될 수 있다 (Suda et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 176:610-620 (1976); Suda et al., *Biochem. Biophys. Res.Commun.* 77:586-591 (1977)). 이 단계에 대한 부가적인 후보 효소는 인간 심장 유래의 미토콘드리아 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 (*bdh*)이며, 이는 클로닝되고 특정화되었다 (Marks et al., *J. Biol. Chem.* 267:15459-15463 (1992)). 이 효소는 3-하이드록시산에 작용하는 데하이드로게나제이다. 다른 예시적인 알코올 데하이드로게나제는, 클로스트리듐 베이예린스키이 (Ismaiel et al., *J. Bacteriol.* 175:5097-5105 (1993)) 및 서모안에어로박터 브록키이 (Lamed et al., *Biochem. J.* 195:183-190 (1981); Peretz et al., *Biochemistry.* 28:6549-6555 (1989))에서 확인된 바와 같이, 아세톤을 이소프로판올로 변환시킨다. 메틸 에틸 케톤 리덕타제, 또는 다른 예로서, 2-부탄올 데하이드로게나제는 MEK를 환원하여 2-부탄올을 합성하는 과정을 촉매한다. 효소의 예는 로도코커스 루버 (Kosjek et al., *Biotechnol Bioeng.* 86:55-62 (2004))와 피로코커스 푸리오수스 (van der et al., *Eur. J. Biochem.* 268:3062-3068 (2001))에서 찾을 수 있다.

표 73

[0316]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
mdh	AAC76268.1	1789632	에스케리치아 콜라이
ldhA	NP_415898.1	16129341	에스케리치아 콜라이
ldh	YP_725182.1	113866693	랄스토니아 유트로파
bdh	AAA58352.1	177198	호모 사피엔스
adh	AAA23199.2	60592974	클로스트리듐 베이예린키이 NRRL B593
adh	P14941.1	113443	서모안에어로박터 브록키이 *HTD4*
adhA	AAC25556	3288810	피로코커스 푸리오수스
adh-A	CAD36475	21615553	로도코커스 루버

[0317] 다수의 유기체들이 4-하이드록시-2-부타논을 1,3-부탄디올로 환원하는 과정을 촉매할 수 있으며, 그러한 것으로는 Matsuyama et al. US Patent 5,413,922에 기술된 바와 같이 바실러스, 브레비박테리움, 칸디다 및 클렙시엘라 속에 속하는 유기체가 있다. 돌연변이된 로도코커스 페닐아세트알데하이드 리덕타제 (Sar268)와 레이포니아 알코올 데하이드로게나제 역시 이러한 변환을 고수율로 촉매하는 것으로 확인되었다 (Itoh et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75(6):1249-1256).

[0318] 호모세린 데하이드로게나제 (EC 1.1.1.13)는 아스파르테이트 세미알데하이드를 호모세린으로 NAD(P)H-의존적인 방식으로 환원하는 과정을 촉매한다. 에스케리치아 콜라이 등의 많은 유기체들에서, 호모세린 데하이드로게나제는 아스파르테이트를 아스파르틸-4-포스페이트로 ATP-의존적인 방식으로 변환하는 과정도 촉매하는 2중 기능의 효소이다 (Starnes et al., *Biochemistry* 11:677-687 (1972)). 기능성 도메인은 촉매적으로 독립적으로 링커부에 의해 연결되어 있으며 (Sibilli et al., *J Biol Chem* 256:10228-10230 (1981)), 2개의 도메인은 트레오닌에 의해 알로스테릭 저해를 받는다. *thrA*에 의해 코딩되는 에스케리치아 콜라이 효소의 호모세린 데하이드로게나제 도메인은, 특정화된 아스파르테이트 키나제 도메인과 분리되어 있으며, 높은 촉매 활성과 트레오닌에 의한 감소된 저해를 나타내는 것으로 확인되었다 (James et al., *Biochemistry* 41:3720-3725 (2002)). 이는 예로 락토바실러스 플란타럼 (Cahyanto et al., *Microbiology* 152:105-112 (2006)) 및 아라비돕시스 탈리아나의 *hom1* 등의, 다른 2중 기능의 트레오닌 키나제에도 적용될 수 있다. 사카로마이세스 세레비지애의 *hom6* (Jacques et al., *Biochim Biophys Acta* 1544:28-41 (2001)) 및 락토바실러스 플란타룸의 *hom2* (Cahyanto et al., 상기 참조, (2006))에 의해 코딩되는 한가지 기능성의 호모세린 데하이드로게나제는 에스케리치아 콜라이에서 기능적으로 발현되고 특정되었다.

표 74

[0319]

단백질	GenBank ID	GI 번호	유기체
thrA	AAC73113.1	1786183	에스케리치아 콜라이 *K12*
akthr2	081852	75100442	아라비돕시스 탈리아나
hom6	CAA89671	1015880	사카로마이세스 세레비지애
hom1	CAD64819	28271914	락토바실러스 플란타룸
hom2	CAD63186	28270285	락토바실러스 플란타룸

[0320] **3,5-디옥소펜타노에이트 리덕타제 (알데하이드 환원) (도 4, 단계 M)**

[0321] 수종의 알데하이드 환원성 리덕타제는 알데하이드를 대응되는 알코올로 환원할 수 있다. 즉, 이는 본래 3,5-디옥소펜타노에이트를 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트로 환원할 수 있거나, 또는 그렇도록 조작될 수 있다. 이러한 효소를 코딩하는 유전자의 예는 도 4, 단계 D에 언급되어 있다.

[0322] **5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트 리덕타제 (도 4, 단계 N)**

[0323] 몇몇 케톤 환원성 리덕타제는 케톤을 대응되는 하이드록실기로 환원할 수 있다. 즉, 이는 본래 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트를 3,5-디하이드록시펜타노에이트로 환원할 수 있거나, 또는 그렇도록 조작될 수 있다. 이러한 효소를 코딩하는 유전자의 예는 도 4, 단계 L에 언급되어 있다.

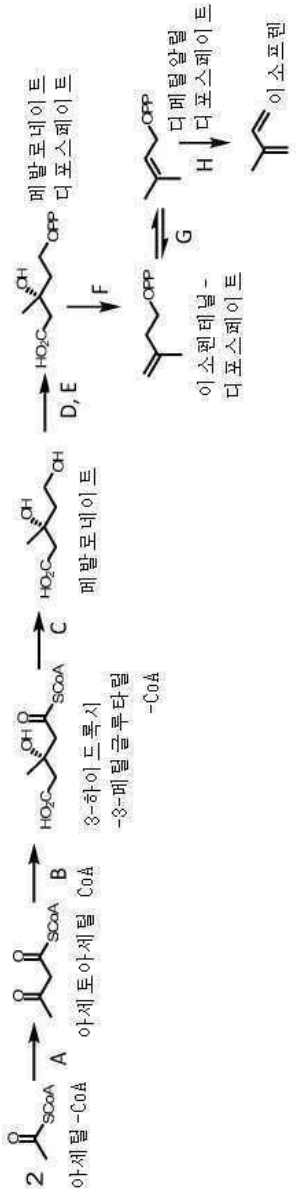
[0324] **3-옥소-글루타릴-CoA 리덕타제 (CoA 환원 및 알코올 형성) (도 4, 단계 O)**

[0325] 3-옥소-글루타릴-CoA 리덕타제 (CoA 환원 및 알코올 형성) 효소는 3-옥소-글루타릴-CoA로부터 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트를 합성하는데 필요한 2단계 환원을 촉매한다. 아실-CoA를 알코올로 변환하는 2단계 옥시도리덕타제의 예는 도 4의 단계 J에 제시되어 있다. 상기 효소는 본래 3-옥소-글루타릴-CoA를 5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트로 변환하거나, 또는 그렇도록 조작될 수 있다.

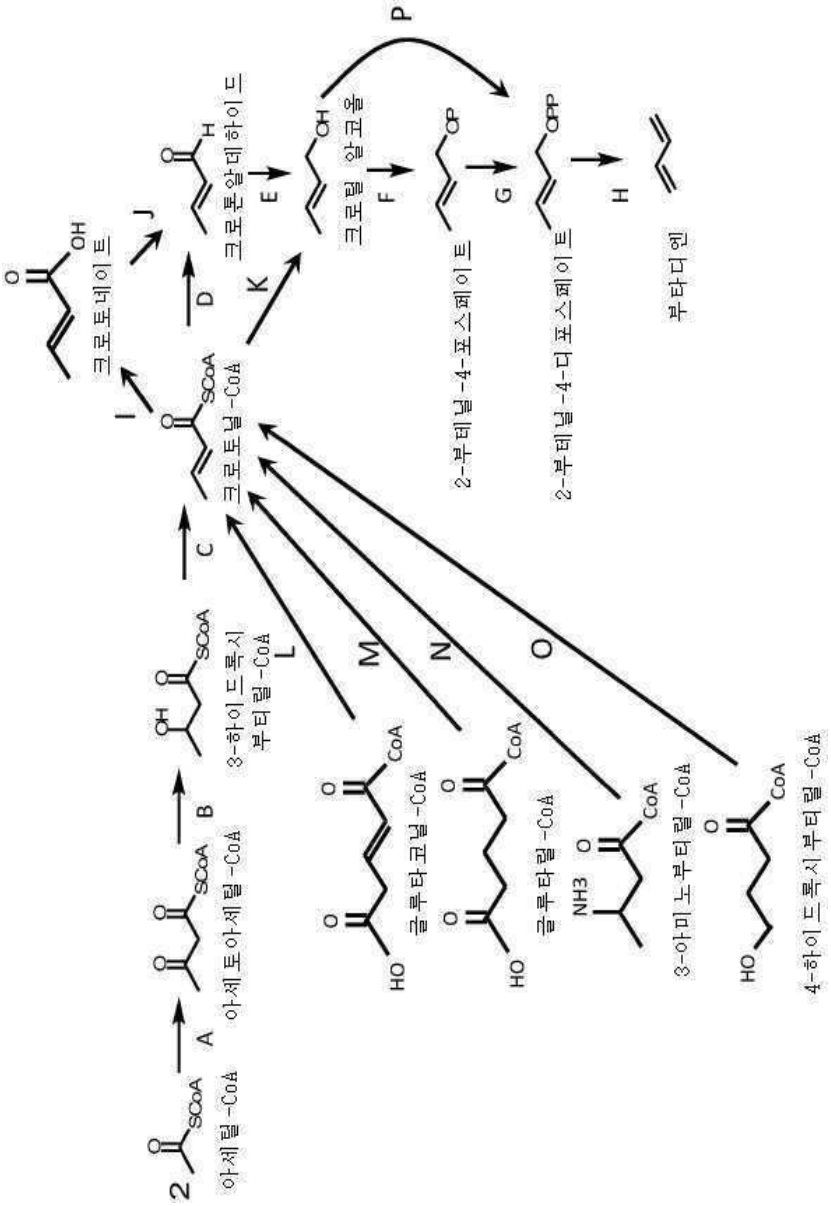
[0326] 본 명세서에서는 전체에 걸쳐 다양한 문헌들을 참조한다. 유전자은행 및 GI 번호 공개물을 비롯하여, 이들 공개 문헌의 내용은 그 전체가 본 발명이 속하는 기술 분야의 상황을 보다 충분히 설명하기 위해 본 명세서에 원용에 의해 포함된다. 본 발명은 전술한 실시예를 참조하여 설명되었지만, 본 발명의 사상으로부터 이탈되지 않는 범위내에서 다양한 변형이 이루어질 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

도면

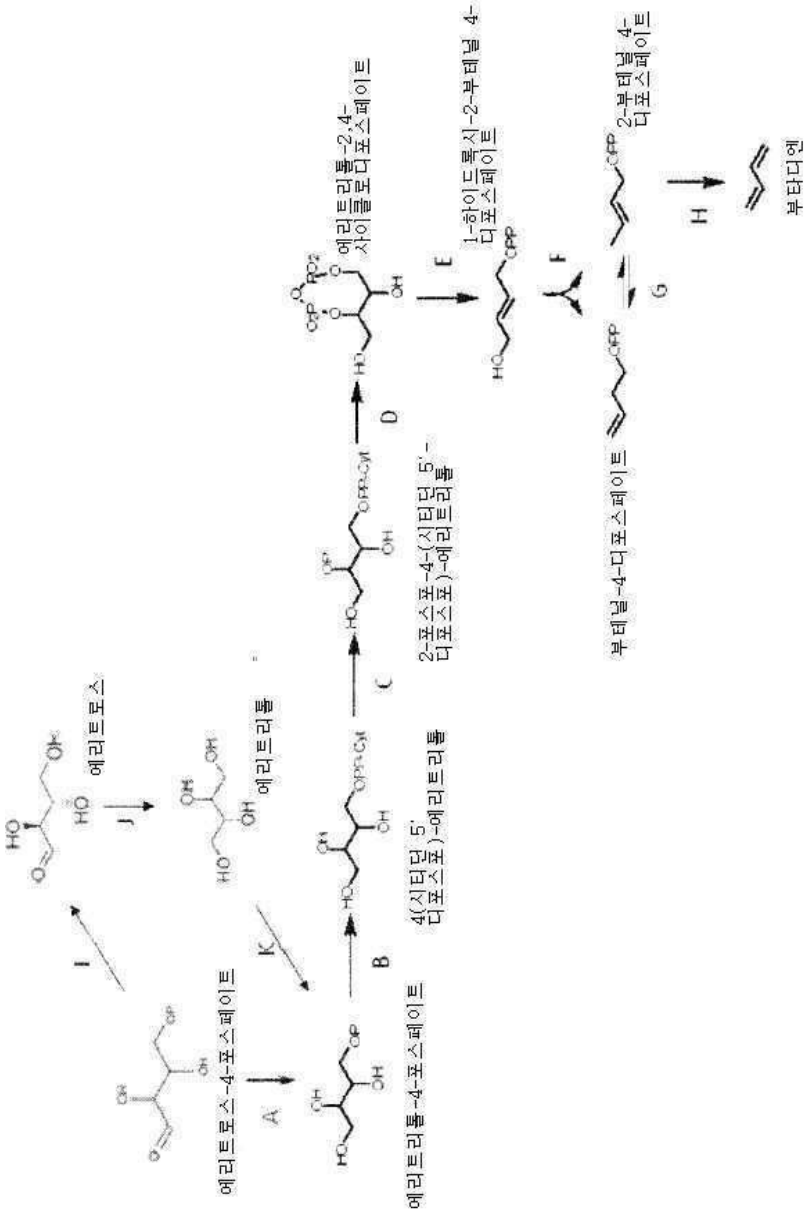
도면1


2
아세틸-CoA
A
아세토아세틸 CoA
B
3-하이드록시
-3-메틸글루타릴
-CoA
C
메발로네이트
D, E
메발로네이트
디포스페이트
F
이소펜테닐-
디포스페이트
G
디메틸알릴
디포스페이트
H
이소프렌

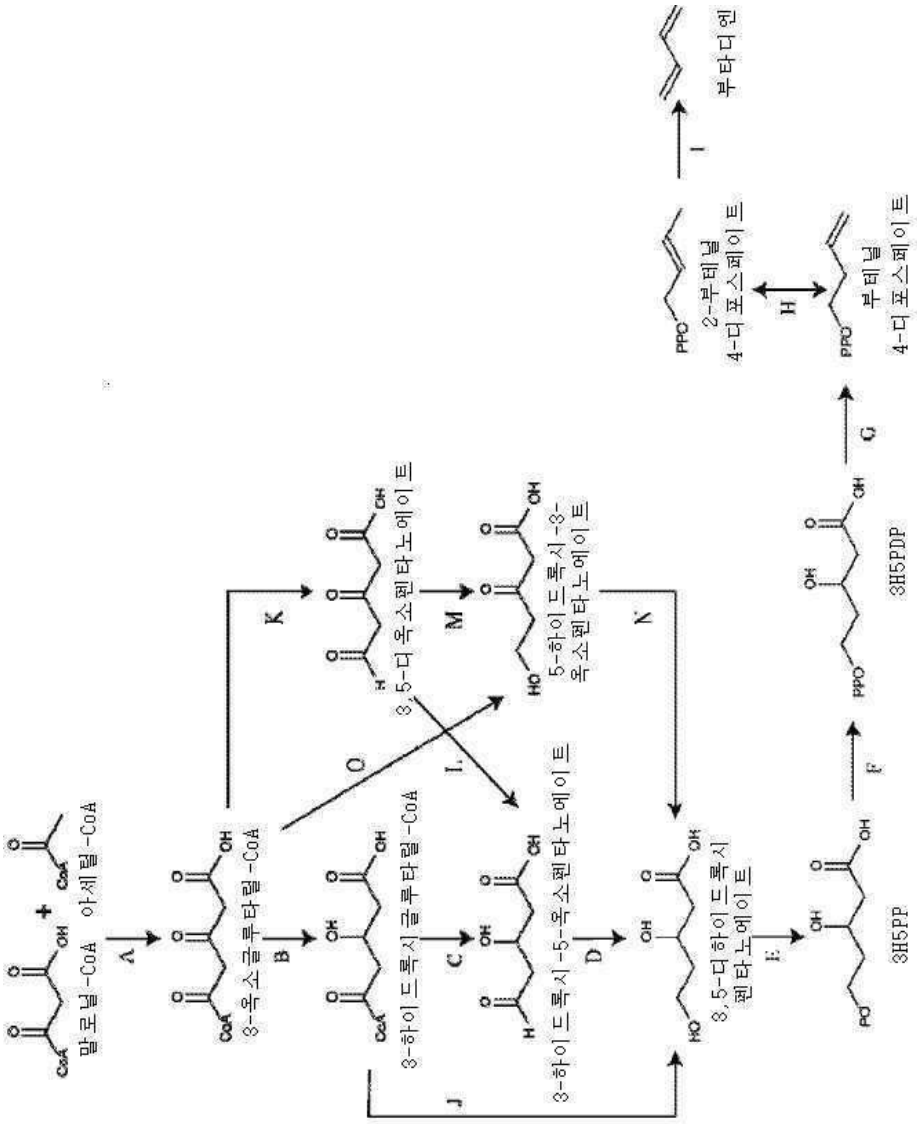
도면2


2
아세틸-CoA
A
아세토아세틸-CoA
B
3-하이드록시 부티릴-CoA
L
C
크로토닐-CoA
I
크로토네이트
J
D
크로톤알데하이드
E
K
크로틸 알코올
F
2-부테닐-4-포스페이트
G
2-부테닐-4-디포스페이트
H
부타디엔
P
M
글루타코닐-CoA
N
글루타릴-CoA
O
3-아미노부티릴-CoA
4-하이드록시부티릴-CoA

도면3


에리트로스
에리트로스-4-포스페이트
에리트리톨
에리트리톨-4-포스페이트
4(시티딘 5'
디포스포)-에리트리톨
2-포스포-4-(시티딘 5'-
디포스포)-에리트리톨
에리트리톨-2,4-
사이클로디포스페이트
1-하이드록시-2-부테닐 4-
디포스페이트
부테닐-4-디포스페이트
2-부테닐 4-
디포스페이트
부타디엔
I
J
K
A
B
C
D
E
F
G
H

도면4


말로닐-CoA
아세틸-CoA
A
3-옥소글루타릴-CoA
B
3-하이드록시글루타릴-CoA
C
3-하이드록시-5-옥소펜타노에이트
D
3,5-디하이드록시 펜타노에이트
E
3H5PP
F
3H5PDP
G
2-부테닐 4-디포스페이트
H
부테닐 4-디포스페이트
I
부타디엔
K
3,5-디옥소펜타노에이트
M
5-하이드록시-3-옥소펜타노에이트
N
O
L
J