(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0129953
(43) 공개일자 2012년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 15/53* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7023730
(22) 출원일자(국제) 2011년02월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년09월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/024482
(87) 국제공개번호 WO 2011/142865
국제공개일자 2011년11월17일
(30) 우선권주장
61/282,641 2010년03월10일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 캘리포니아주 91125 파사데나 이스트 캘리포니아 불바드 1200
게보 인코포레이티드
미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 345 인버네스 드라이브 사우스
(72) 발명자
웰터 토마스
미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내
호킨스 앤드류
미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김용인, 석혜선

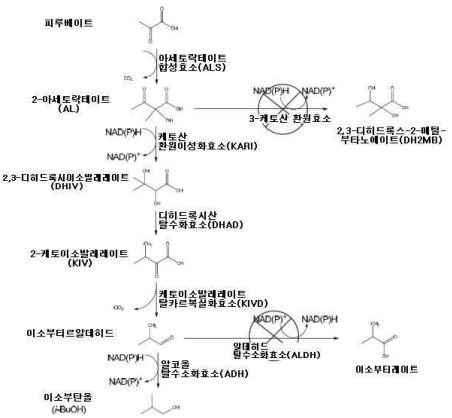
전체 청구항 수 : 총 165 항

(54) 발명의 명칭 **연료, 화학물질, 그리고 아미노산의 향상된 생산을 위한 감소된 부산물 축적을 갖는 효모 미생물**

(57) 요 약

본 발명은 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물, 그리고 다양한 유익한 대사산물을 생산하기 위해 상기 재조합 미생물을 이용하는 방법에 관계한다. 본 발명의 다양한 측면에서, 재조합 미생물은 3 케토산(가령, 아세토락테이트와 2-아세토-2-히드록시부티레이트) 및/또는 알데히드-유래된 부산물의 감소 또는 제거를 유발하는 하나 또는 그 이상의 변형을 더욱 포함할 수 있다. 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 재조합 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*) 계통분기의 미생물, 크랩트리-음성 효모 미생물, 크랩트리-양성 효모 미생물, WGD (전체 유전체 복제)-이후 효모 미생물, WGD (전체 유전체 복제)-이전 효모 미생물, 그리고 비-발효 효모 미생물일 수 있다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

포터 샤인먼 스테파니

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

마인홀드 피터

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

던든 캐서린 애슬러슨

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

아리스티두 아리스토스

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

어라노 준

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

라이스 더그

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

피터스 매튜

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

데이 멜리사

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

얀카우스카스 유스타스

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

에반스 켄트

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

켈리 쥴리

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

베리 루스

미국 콜로라도 80112 잉글우드 스위트 310 빌딩 씨 인버네스 드라이브 사우스 345 게보 인코포레이티드 내

바스티안 사비네

미국 캘리포니아 91125 파사데나 엠/씨 210-85 이스트 캘리포니아 불러바드 1200 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지 내

아놀드 프랜시스

미국 캘리포니아 91125 파사데나 엠/씨 210-85 이스트 캘리포니아 불러바드 1200 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지 내

(30) 우선권주장

61/304,069 2010년02월12일 미국(US)
61/308,568 2010년02월26일 미국(US)
61/352,133 2010년06월07일 미국(US)
61/411,885 2010년11월09일 미국(US)
61/430,801 2011년01월07일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

3-케토산을 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은 상기 3-케토산의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이고, 그리고 상기 3-히드록시산 부산물은 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 50% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 75% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 5

청구항 2에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 95% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 6

청구항 2에 있어서, 상기 재조합 미생물은 아세토락테이트-유래된 산물을 생산하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 아세토락테이트-유래된 산물은 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 그리고 조효소 A에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이고, 그리고 상기 3-히드록시산 부산물은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트 탄소 수율은 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 50% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트 탄소 수율은 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는

그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 75% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트 탄소 수율은 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 95% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 12

청구항 8에 있어서, 상기 재조합 미생물은 2-아세토-2-히드록시부티레이트-유래된 산물을 생산하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 2-아세토-2-히드록시부티레이트-유래된 산물은 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 14

전술한 청구항중 어느 한 항에 있어서, 3-케토산의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 상기 효소는 3-케토산 환원효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) YMR226 (서열 번호: 1) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 서열 번호: 10, 서열 번호: 11, 서열 번호: 12, 서열 번호: 13, 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 서열 번호: 21, 서열 번호: 22, 그리고 서열 번호: 23, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 17

알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은 상기 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 알데히드 중간물질로부터 산성 부산물 탄소 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 35% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 알데히드 중간물질로부터 산성 부산물 탄소 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 75% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 20

청구항 17에 있어서, 알데히드 중간물질로부터 산성 부산물 탄소 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물

과 비교하여 적어도 95% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 21

청구항 17에 있어서, 알데히드를 중간물질로서 이용하는 상기 생합성 경로는 이소부탄올, 1-부탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 1-프로판올, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생합성을 위한 경로에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 22

청구항 17 내지 21중 어느 한 항에 있어서, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 상기 효소는 알데히드 탈수소효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6 (서열 번호: 25) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 24

청구항 22에 있어서, 상기 알데히드 탈수소효소는 서열 번호: 26, 서열 번호: 27, 서열 번호: 28, 서열 번호: 29, 서열 번호: 30, 서열 번호: 31, 서열 번호: 32, 서열 번호: 33, 서열 번호: 34, 서열 번호: 35, 서열 번호: 36, 서열 번호: 37, 서열 번호: 38, 서열 번호: 39, 서열 번호: 40, 그리고 서열 번호: 41, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 25

3-케토산과 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은

(i) 상기 3-케토산의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 그리고

(ii) 상기 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이고, 그리고 상기 3-히드록시산 부산물은 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 50% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 28

청구항 26에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 75% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 29

청구항 26에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 95% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 30

청구항 26에 있어서, 상기 재조합 미생물은 아세토락테이트-유래된 산물을 생산하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 상기 아세토락테이트 유래된 산물은 이소부탄올, 1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 32

청구항 25에 있어서, 상기 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이고, 그리고 상기 3-히드록시산 부산물은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트 탄소 수율은 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 50% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 34

청구항 32에 있어서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트 탄소 수율은 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 75% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 35

청구항 32에 있어서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트 탄소 수율은 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 95% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 36

청구항 32에 있어서, 상기 재조합 미생물은 2-아세토-2-히드록시부티레이트-유래된 산물을 생산하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 상기 2-아세토-2-히드록시부티레이트-유래된 산물은 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 38

청구항 25 내지 37중 어느 한 항에 있어서, 3-케토산의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 상기 효소는 3-케토산 환원효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) YMR226 (서열 번호: 1) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 40

청구항 38에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 서열 번호: 10, 서열 번호: 11, 서열 번호: 12, 서열 번호: 13, 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서

열 번호: 20, 서열 번호: 21, 서열 번호: 22, 그리고 서열 번호: 23, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 41

청구항 25 내지 40에 있어서, 알데히드 중간물질로부터 산성 부산물 탄소 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 35% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 42

청구항 25 내지 40중 어느 한 항에 있어서, 알데히드 중간물질로부터 산성 부산물 탄소 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 75% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 43

청구항 25 내지 40중 어느 한 항에 있어서, 알데히드 중간물질로부터 산성 부산물 탄소 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 95% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 44

청구항 25 내지 43중 어느 한 항에 있어서, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 상기 효소는 알데히드 탈수소효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 상기 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6 (서열 번호: 25) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 46

청구항 44에 있어서, 상기 알데히드 탈수소효소는 서열 번호: 26, 서열 번호: 27, 서열 번호: 28, 서열 번호: 29, 서열 번호: 30, 서열 번호: 31, 서열 번호: 32, 서열 번호: 33, 서열 번호: 34, 서열 번호: 35, 서열 번호: 36, 서열 번호: 37, 서열 번호: 38, 서열 번호: 39, 서열 번호: 40, 그리고 서열 번호: 41, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 47

전술한 청구항중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 피루베이트 탈카르복실화효소 (PDC) 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 48

전술한 청구항중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD) 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 49

전술한 청구항중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 50

청구항 49에 있어서, 상기 재조합 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*) 계통분기의 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 51

청구항 49에 있어서, 상기 재조합 미생물은 사카로미세스 센수 스트릭토(*Saccharomyces sensu stricto*) 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 상기 사카로미세스 센수 스트릭토(*Saccharomyces sensu stricto*) 미생물은 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), 사카로미세스 쿠드리아브제비(*S. kudriavzevii*), 사카로미세스 미카태(*S. mikatae*), 사카로미세스 바야누스(*S. bayanus*), 사카로미세스 우바룸(*S. uvarum*), 사카로미세스 카로카니스(*S. carocanis*) 및 이들의 하이브리드로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 53

청구항 49에 있어서, 상기 재조합 미생물은 크랩트리 (Crabtree)-음성 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 상기 크랩트리-음성 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 한세눌라(*Hansenula*), 아이사첸키아(*Issatchenkia*) 및 칸디다(*Candida*)로 구성된 군에서 선택되는 속 (genus)으로 분류되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 55

청구항 54에 있어서, 상기 크랩트리-음성 효모 미생물은 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 피치아 아노말라(*Pichia anomala*), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*), 피치아 쿠드리아브제비(*Pichia kudriavzevii*), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*), 한세눌라 아노말라(*Hansenula anomala*), 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*) 및 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 56

청구항 49에 있어서, 상기 재조합 미생물은 크랩트리-양성 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 상기 크랩트리-양성 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 지고사카로미세스(*Zygosaccharomyces*), 데바리오미세스(*Debaryomyces*), 피치아(*Pichia*), 칸디다(*Candida*), 그리고 시조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 58

청구항 57에 있어서, 상기 크랩트리-양성 효모 미생물은 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로미세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*), 사카로미세스 파라독수스(*Saccharomyces paradoxus*), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 지고사카로미세스 바일리(*Zygosaccharomyces bailli*), 지고사카로미세스 로욱시(*Zygosaccharomyces rouxii*), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 그리고 사카로미세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 59

청구항 49에 있어서, 상기 재조합 미생물은 WGD (전체 유전체 복제)-이후 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 상기 WGD-이후 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*) 또는 칸디다(*Candida*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 61

청구항 60에 있어서, 상기 WGD-이후 효모 미생물은 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로미세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*), 사카로미세스 파라독수스(*Saccharomyces paradoxus*), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*), 그리고 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 62

청구항 49에 있어서, 상기 재조합 미생물은 WGD (전체 유전체 복제)-이전 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 63

청구항 62에 있어서, 상기 WGD-이전 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 칸디다(*Candida*), 피치아(*Pichia*), 데바리오미세스(*Debaryomyces*), 한세눌라(*Hansenula*), 아이사첸키아(*Issatchenkia*), 파키솔렌(*Pachysolen*), 야로위아(*Yarrowia*) 및 시조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 64

청구항 63에 있어서, 상기 WGD-이전 효모 미생물은 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 피치아 아노말라(*Pichia anomala*), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*), 피치아 쿠드리아브제비(*Pichia kudriavzevii*), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*), 한세눌라 아노말라(*Hansenula anomala*), 파키솔렌 탄노필리스(*Pachysolen tannophilis*), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 65

하기 단계를 포함하는, 3-케토산 중간물질로부터 유래된 유익한 대사산물을 생산하는 방법:

(a) 청구항 1 내지 16 및 25 내지 64중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 제공하는 단계;

(b) 유익한 대사산물의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 재조합 미생물을 배양하는 단계; 그리고

(c) 유익한 대사산물을 회수하는 단계.

청구항 66

청구항 65에 있어서, 상기 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이고, 그리고 유익한 대사산물은 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 그리고 조효소 A에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67

청구항 65에 있어서, 상기 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이고, 그리고 유익한 대사산물은 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 68

하기 단계를 포함하는, 알데히드 중간물질로부터 유래된 유익한 대사산물을 생산하는 방법:

(a) 청구항 17 내지 64중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 제공하는 단계;

(b) 유익한 대사산물의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 재조합 미생물을 배양하는 단계; 그리고

(c) 유익한 대사산물을 회수하는 단계.

청구항 69

청구항 68에 있어서, 상기 알데히드 중간물질은 이소부티르알데히드, 1-부타날, 2-메틸-1-부타날, 3-메틸-1-부타날, 1-프로파날, 1-펜타날, 1-헥사날, 3-메틸-1-펜타날, 4-메틸-1-펜타날, 4-메틸-1-헥사날, 그리고 5-메틸-1-헵타날에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 70

청구항 69에 있어서, 상기 유익한 대사산물은 이소부탄올, 1-부탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 1-프로판올, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 71

하기 단계를 포함하는, 3-케토산과 알데히드 중간물질로부터 유래된 유익한 대사산물을 생산하는 방법:

(a) 청구항 25 내지 64중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 제공하는 단계;

(b) 유익한 대사산물의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 재조합 미생물을 배양하는 단계; 그리고

(c) 유익한 대사산물을 회수하는 단계.

청구항 72

청구항 71에 있어서, 상기 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이고, 그리고 유익한 대사산물은 이소부탄올, 1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 73

청구항 71에 있어서, 상기 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이고, 그리고 유익한 대사산물은 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 74

이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은 아세토락테이트의 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)으로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 75

청구항 74에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 50% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 76

청구항 74에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 75% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 77

청구항 74에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 95% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 78

청구항 74 내지 77중 어느 한 항에 있어서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 상기 효소는 3-케토산 환원효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 79

청구항 78에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) YMR226 (서열 번호: 1) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 80

청구항 78에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 서열 번호: 10, 서열 번호: 11, 서열 번호: 12, 서열 번호: 13, 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 서열 번호: 21, 서열 번호: 22, 그리고 서열 번호: 23, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 81

이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 82

청구항 81에 있어서, 이소부티르알데히드로부터 이소부티레이트 탄소 수율은 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 35% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 83

청구항 81에 있어서, 이소부티르알데히드로부터 이소부티레이트 탄소 수율은 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 75% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 84

청구항 81에 있어서, 이소부티르알데히드로부터 이소부티레이트 탄소 수율은 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 95% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 85

청구항 81 내지 84중 어느 한 항에 있어서, 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 상기 효소는 알데히드 탈수소효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 86

청구항 85에 있어서, 상기 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6 (서열 번호: 25) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 87

청구항 86에 있어서, 상기 알데히드 탈수소효소는 서열 번호: 26, 서열 번호: 27, 서열 번호: 28, 서열 번호: 29, 서열 번호: 30, 서열 번호: 31, 서열 번호: 32, 서열 번호: 33, 서열 번호: 34, 서열 번호: 35, 서열 번호: 36, 서열 번호: 37, 서열 번호: 38, 서열 번호: 39, 서열 번호: 40, 그리고 서열 번호: 41, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 88

이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은

(i) 아세토락테이트의 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 그리고

(ii) 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 89

청구항 88에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 50% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 90

청구항 88에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 75% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 91

청구항 88에 있어서, 아세토락테이트로부터 DH2MB 탄소 수율은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 95% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 92

청구항 88 내지 91중 어느 한 항에 있어서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 상기 효소는 3-케토산 환원효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 93

청구항 92에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) YMR226 (서열 번호: 1) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 94

청구항 92에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 서열 번호: 10, 서열 번호: 11, 서열 번호: 12, 서열 번호: 13, 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 서열 번호: 21, 서열 번호: 22, 그리고 서열 번호: 23, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 95

청구항 88에 있어서, 이소부티르알데히드로부터 이소부티레이트 탄소 수율은 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 35% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 96

청구항 88에 있어서, 이소부티르알데히드로부터 이소부티레이트 탄소 수율은 이소부티르알데히드의 이소부티레

이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 75% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 97

청구항 88에 있어서, 이소부티르알데히드로부터 이소부티레이트 탄소 수율은 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 95% 감소하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 98

청구항 88 내지 97중 어느 한 항에 있어서, 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 상기 효소는 알데히드 탈수소효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 99

청구항 98에 있어서, 상기 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6 (서열 번호: 25) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 100

청구항 98에 있어서, 상기 알데히드 탈수소효소는 서열 번호: 26, 서열 번호: 27, 서열 번호: 28, 서열 번호: 29, 서열 번호: 30, 서열 번호: 31, 서열 번호: 32, 서열 번호: 33, 서열 번호: 34, 서열 번호: 35, 서열 번호: 36, 서열 번호: 37, 서열 번호: 38, 서열 번호: 39, 서열 번호: 40, 그리고 서열 번호: 41, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 101

청구항 88 내지 100중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 피루베이트 탈카르복실화효소 (PDC) 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 102

청구항 88 내지 101중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD) 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 103

청구항 88 내지 102중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 104

청구항 103에 있어서, 상기 재조합 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*) 계통분기의 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 105

청구항 103에 있어서, 상기 재조합 미생물은 사카로미세스 센수 스트릭토(*Saccharomyces sensu stricto*) 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 106

청구항 105에 있어서, 상기 사카로미세스 센수 스트릭토(*Saccharomyces sensu stricto*) 미생물은 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), 사카로미세스 쿠드리아브제비(*S. kudriavzevii*), 사카로미세스 미카태(*S. mikatae*), 사카로미세스 바야누스(*S. bayanus*), 사카로미세스 우바룸(*S. uvarum*), 사카로미세스 카로카니스(*S. carocanis*) 및 이들의 하이브리드로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 107

청구항 103에 있어서, 상기 재조합 미생물은 크랩트리-음성 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 108

청구항 107에 있어서, 상기 크랩트리-음성 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 한세눌라(*Hansenula*), 아이사첸키아(*Issatchenkia*) 및 칸디다(*Candida*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 109

청구항 108에 있어서, 상기 크랩트리-음성 효모 미생물은

사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 피치아 아노말라(*Pichia anomala*), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*), 피치아 쿠드리아브제비(*Pichia kudriavzevii*), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*), 한세눌라 아노말라(*Hansenula anomala*), 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*) 및 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 110

청구항 103에 있어서, 상기 재조합 미생물은 크랩트리-양성 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 111

청구항 110에 있어서, 상기 크랩트리-양성 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 지고사카로미세스(*Zygosaccharomyces*), 데바리오미세스(*Debaryomyces*), 피치아(*Pichia*), 칸디다(*Candida*), 그리고 시조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 112

청구항 111에 있어서, 상기 크랩트리-양성 효모 미생물은 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로미세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*), 사카로미세스 파라독수스(*Saccharomyces paradoxus*), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 지고사카로미세스 바일리(*Zygosaccharomyces bailli*), 지고사카로미세스 로욱시(*Zygosaccharomyces rouxii*), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 그리고 사카로미세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 113

청구항 103에 있어서, 상기 재조합 미생물은 WGD (전체 유전체 복제)-이후 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 114

청구항 113에 있어서, 상기 WGD-이후 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*) 또는 칸디다(*Candida*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 115

청구항 114에 있어서, 상기 WGD-이후 효모 미생물은 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로미세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*), 사카로미세스 파라독수스(*Saccharomyces paradoxus*), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*), 그리고 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 116

청구항 103에 있어서, 상기 재조합 미생물은 WGD (전체 유전체 복제)-이전 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 117

청구항 116에 있어서, 상기 WGD-이전 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 칸디다(*Candida*), 피치아(*Pichia*), 데바리오미세스(*Debaryomyces*), 한세눌라(*Hansenula*), 아이사첸키아(*Issatchenkia*), 파키솔렌(*Pachysolen*), 야로위아(*Yarrowia*), 그리고 시조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 118

청구항 117에 있어서, 상기 WGD-이전 효모 미생물은 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 피치아 아노말라(*Pichia anomala*), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*), 피치아 쿠드리아브제비(*Pichia kudriavzevii*), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*), 한세눌라 아노말라(*Hansenula anomala*), 파키솔렌 탄노필리스(*Pachysolen tannophilis*), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 119

하기 단계를 포함하는, 이소부탄올을 생산하는 방법:

(a) 청구항 74 내지 118중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 제공하는 단계;

(b) 이소부탄올의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 재조합 미생물을 배양하는 단계; 그리고

(c) 이소부탄올을 회수하는 단계.

청구항 120

3-케토산을 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은:

(a) 상기 3-케토산의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 및/또는

(b) 3-케토산의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 121

알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은:

(a) 상기 알데히드 중간물질의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 및/또는

(b) 알데히드 중간물질의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 122

3-케토산과 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은:

(a) 상기 3-케토산의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 및/또는

(b) 3-케토산의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없고; 그리고

(c) 상기 알데히드 중간물질의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 및/또는

(d) 알데히드 중간물질의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 123

이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은:

(a) 아세토락테이트의 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)으로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 및/또는

(b) 아세토락테이트의 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)으로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 124

이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은:

(a) 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 및/또는

(b) 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 125

이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은:

(a) 아세토락테이트의 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)으로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 및/또는

(b) 아세토락테이트의 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)으로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없고; 그리고

(c) 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 및/또는

(d) 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 126

하기를 포함하는 재조합 미생물:

(a) 아세토락테이트 신타아제 활성을 갖는 시토졸에 국한된 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자, 그리고 여기서 세포는 피루베이트를 아세토락테이트로 전환시키고; 그리고

(b) 과다발현된 케톨산 환원이성화효소, 여기서 상기 KARI는 야생형 또는 부모 KARI와 비교하여, 아세토락테이트에 대한 감소된 K_M 및/또는 아세토락테이트에 대한 증가된 k_{cat}를 나타내도록 조작된다.

청구항 127

하기를 포함하는 재조합 미생물:

(a) 적어도 0.5U/mg 용해물 아세토락테이트 신타아제 활성을 갖는 시토졸에 국한된 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자, 그리고 여기서 세포는 피루베이트를 아세토락테이트로 전환시키고; 그리고

(b) 과다발현된 케톨산 환원이성화효소 (KARI), 여기서 상기 KARI는 적어도 0.03U/mg 용해물 KARI 활성을 갖는다.

청구항 128

하기를 포함하는 재조합 미생물:

(a) 적어도 0.5U/mg 용해물 아세토락테이트 신타아제 활성을 갖는 시토졸에 국한된 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자, 그리고 여기서 세포는 피루베이트를 아세토락테이트로 전환시키고; 그리고

(b) 과다발현된 디히드록시산 탈수화효소 (DHAD), 여기서 상기 DHAD는 적어도 0.03U/mg 용해물 DHAD 활성을 갖는다.

청구항 129

하기를 포함하는 재조합 미생물:

(a) 아세토락테이트 신타아제 활성을 갖는 시토졸에 국한된 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자, 그리고 여기서 세포는 피루베이트를 아세토락테이트로 전환시키고;

(b) 아세토락테이트의 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)으로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 결실; 그리고

(c) 과다발현된 케톨산 환원이성화효소.

청구항 130

이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)을 아세토락테이트로 전환시킬 수 있는 내생성 또는 이종기원성 단백질을 과다발현하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 131

이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하는 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)을 2,3-디히드록시이소발레레이트 (DHIV)로 전환시킬 수 있는 내생성 또는 이종기원성 단백질을 과다발현하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 132

2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)의 생산을 위한 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은 아세토락테이트를 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)으로 전환시킬 수 있는 하나 또는 그 이상의 효소를 과다발현하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 133

청구항 132에 있어서, 아세토락테이트를 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)으로 전환시킬 수 있는 상기 효소는 3-케토산 환원효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 134

청구항 133에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) YMR226 (서열 번호: 1) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 135

청구항 133에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 서열 번호: 10, 서열 번호: 11, 서열 번호: 12, 서열 번호: 13, 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 서열 번호: 21, 서열 번호: 22, 그리고 서열 번호: 23, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 136

하기 단계를 포함하는, 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)의 생산 방법:

(a) 청구항 132 내지 135중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 제공하는 단계;

(b) DH2MB의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 재조합 미생물을 배양하는 단계; 그리고

(c) DH2MB을 회수하는 단계.

청구항 137

2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트의 생산을 위한 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로 전환시킬 수 있는 하나 또는 그 이상의 효소를 과다발현하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 138

청구항 137에 있어서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로 전환시킬 수 있는 상기 효소는 3-케토산 환원효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 139

청구항 138에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) YMR226 (서열 번호: 1) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 140

청구항 138에 있어서, 상기 3-케토산 환원효소는 서열 번호: 2, 서열 번호: 3, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9, 서열 번호: 10, 서열 번호: 11, 서열 번호: 12, 서열 번호: 13, 서열 번호: 14, 서열 번호: 15, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17, 서열 번호: 18, 서열 번호: 19, 서열 번호: 20, 서열 번호: 21, 서열 번호: 22, 그리고 서열 번호: 23, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 141

하기 단계를 포함하는, 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트의 생산 방법:

(a) 청구항 137 내지 140중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 제공하는 단계;

(b) 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 재조합 미생물을 배양하는 단계; 그리고

(c) 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트를 회수하는 단계.

청구항 142

산성 산물의 생산을 위한 재조합 미생물에 있어서, 상기 재조합 미생물은 알데히드를 산성 부산물로 전환시킬 수 있는 하나 또는 그 이상의 효소를 과다발현하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 143

청구항 142에 있어서, 알데히드의 산성 산물로의 전환을 촉진하는 상기 효소는 알데히드 탈수소효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 144

청구항 143에 있어서, 상기 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6 (서열 번호: 25) 또는 이의 동족체 또는 변이체인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 145

청구항 143에 있어서, 상기 알데히드 탈수소효소는 서열 번호: 26, 서열 번호: 27, 서열 번호: 28, 서열 번호: 29, 서열 번호: 30, 서열 번호: 31, 서열 번호: 32, 서열 번호: 33, 서열 번호: 34, 서열 번호: 35, 서열

번호: 36, 서열 번호: 37, 서열 번호: 38, 서열 번호: 39, 서열 번호: 40, 그리고 서열 번호: 41, 또는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 146

하기 단계를 포함하는, 산성 산물의 생산 방법:

(a) 청구항 142 내지 145중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 제공하는 단계;

(b) 산성 산물의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 재조합 미생물을 배양하는 단계; 그리고

(c) 산성 산물을 회수하는 단계.

청구항 147

청구항 146에 있어서, 상기 산성 부산물은 이소부티레이트, 부티레이트, 2-메틸-1-부티레이트, 3-메틸-1-부티레이트, 프로피오네이트, 펜타노에이트, 헥사노에이트, 3-메틸-1-펜타노에이트, 4-메틸-1-펜타노에이트, 4-메틸-1-헥사노에이트, 그리고 5-메틸-1-헵타노에이트에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 148

(a) 야생형 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 2)의 티로신 50; (b) 야생형 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA의 글루타민 77; (c) 야생형 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA의 발린 108; (d) 야생형 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA의 티로신 113; (e) 야생형 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA의 이소류신 212; 그리고 (f) 야생형 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA의 류신 264로 구성된 군에서 선택되는 아미노산에 상응하는 위치에서 하나 또는 그 이상의 변형을 포함하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 149

청구항 148에 있어서, 상기 티로신 50 잔기는 페닐알라닌 또는 트립토판 잔기로 대체되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 150

청구항 148에 있어서, 상기 글루타민 77 잔기는 아르기닌 또는 세린 잔기로 대체되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 151

청구항 148에 있어서, 상기 발린 108 잔기는 세린 또는 알라닌 잔기로 대체되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 152

청구항 148에 있어서, 상기 티로신 113 잔기는 페닐알라닌 또는 글리신 잔기로 대체되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 153

청구항 148에 있어서, 상기 이소류신 212 잔기는 트레오닌, 알라닌, 또는 발린 잔기로 대체되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 154

청구항 148에 있어서, 상기 류신 264 잔기는 발린 잔기로 대체되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 155

청구항 148에 있어서, 변형된 ADH의 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환에 대한 촉매 효율은 야생형 ADH

와 비교하여 적어도 대략 50% 증강되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 156

청구항 148에 있어서, 변형된 ADH의 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환에 대한 촉매 효율은 야생형 ADH와 비교하여 적어도 대략 100% 증강되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 157

청구항 148에 있어서, 변형된 ADH의 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환에 대한 촉매 효율은 야생형 ADH와 비교하여 적어도 대략 200% 증강되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 158

청구항 148에 있어서, ADH는 락토코커스(*Lactococcus*), 락토바실루스(*Lactobacillus*), 페디오코커스(*Pediococcus*), 바실루스(*Bacillus*), 렙토트리키아(*Leptotrichia*), 액티노바실루스(*Actinobacillus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 스트렙토바실루스(*Streptobacillus*), 스타필로코커스(*Staphylococcus*), 아이케넬라(*Eikenella*), 바이셀라(*Weissella*), 킹겔라(*Kingella*), 로티아(*Rothia*), 그리고 엑시구오박테륨(*Exiguobacterium*)에서 선택되는 속 (genus)으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 159

청구항 158에 있어서, ADH는 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈 최적화되는 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 160

청구항 159에 있어서, 상기 숙주 세포는 효모인 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 161

청구항 159에 있어서, 상기 숙주 세포는 대장균(*E. coli*)인 것을 특징으로 하는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH).

청구항 162

청구항 148 내지 161중 어느 한 항에 따른 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH)를 인코딩하는 핵산 구조체로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 163

청구항 15에 있어서, 상기 재조합 미생물은 아세토락테이트 신타아제 (ALS), 케톨산 환원이성화효소 (KARI), 디히드록시산 탈수화효소 (DHAD), 그리고 2-케토산탈카르복실화효소 (KIVD)에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 이소부탄올 대사 경로 효소를 포함하는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 164

청구항 163에 있어서, 상기 재조합 미생물은 효모 미생물인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 165

하기 단계를 포함하는, 이소부탄올을 생산하는 방법:

(a) 청구항 148 내지 164중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 제공하는 단계; 그리고

(b) 이소부탄올의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **관련된 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 2010년 2월 12일 제출된 U.S. 가출원 일련 번호 61/304,069; 2010년 2월 26일 제출된 U.S. 가출원 일련 번호 61/308,568; 2010년 3월 10일 제출된 U.S. 가출원 일련 번호 61/282,641; 2010년 6월 7일 제출된 U.S. 가출원 일련 번호 61/352,133; 2010년 11월 9일 제출된 U.S. 가출원 일련 번호 61/411,885; 그리고 2011년 1월 7일 제출된 U.S. 가출원 일련 번호 61/430,801에 우선권을 주장하고, 이들 각각은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0003] **정부 후원에 대한 사사**

[0004] 본 발명은 미국 농무부 (United States Department of Agriculture)에 의해 수여된 계약 번호 2009-10006-05919 하에, 그리고 미국 무기재료위원회 (United States Army Research Laboratory)에 의해 수여된 계약 번호 W911NF-09-2-0022 하에 정부 지원을 받아 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 일정한 권리를 갖는다.

[0005] **기술 분야**

[0006] 재조합 미생물 및 이런 생명체를 생산하는 방법이 제시된다. 또한, 적절한 기질을 재조합 미생물 및 이들로부터 효소 제조물 (enzymatic preparation)과 접촉시킴에 의해 연료, 화학물질, 그리고 아미노산을 비롯한 유익한 대사산물을 생산하는 방법이 제시된다.

[0007] **전자적으로 제출된 텍스트 파일에 관한 설명**

[0008] 전자적으로 제출된 텍스트 파일의 내용물은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다: 서열 목록 (파일명: GEVO_045_03WO_SeqList_ST25.txt, 기록 일자: 2011년 2월 9일, 파일 크기: 306 킬로바이트)의 컴퓨터 판독가능 형식의 사본.

배 경 기 술

[0009] **배경 기술**

[0010] 연료, 화학물질, 그리고 아미노산을 비롯한 유익한 대사산물로 피루베이트를 전환시키는 미생물의 능력은 근년의 문헌에서 폭넓게 보고되었다 (참조: Alper *et al.*, 2009, *Nature Microbiol. Rev.* 7: 715-723). 재조합 조작 기술은 다수의 유용한 산물, 예를 들면, 발린, 이소류신, 류신, 그리고 판토텐산 (비타민 B5)을 생산할 수 있는 생합성 경로를 발현하는 미생물의 산출을 가능하게 하였다. 이에 더하여, 이소부탄올과 같은 연료가 이종 기원성 대사 경로를 발현하는 미생물에서 재조합 방식으로 생산되었다 (참조: WO/2007/050671 (Donaldson *et al.*), 그리고 WO/2008/098227 (Liao, *et al.*)). 비록 조작된 미생물이 연료, 화학물질, 그리고 아미노산의 재생가능 생산을 위한 잠재적으로 유용한 도구를 대표하긴 하지만, 이들 미생물 중에서 대다수는 낮은 생산성 (productivity), 낮은 역가 (titer), 그리고 낮은 수율 (yield)을 비롯한 낮은 성능 특성 (performance characteristics)으로 인하여 상업적 관련성 (commercial relevance)이 부족하다.

[0011] 많은 현존하는 미생물에서 관찰되는 최적하 성능 (sub-optimal performance)에 대한 일차적인 이유 중의 하나는 경로 중간물질의 원치 않는 부산물로의 바람직하지 않은 전환이다. 본 발명자들은 연료, 화학물질, 그리고 아미노산을 생산하는데 이용되는 생합성 경로의 다양한 중간물질로부터 유래되는, 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB) (CAS #14868-24-7), 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트, 2,3-디히드록시-2-메틸-부타노에이트, 이소부티레이트, 3-메틸-1-부티레이트, 2-메틸-1-부티레이트, 그리고 프로피오네이트를 비롯한 다양한 부산물을 확인하였다. 이들 부산물의 축적은 다양한 발효 반응에서 바람직한 대사산물의 합성과 수율에 부정적인 영향을 준다. 지금까지, 이들 원치 않는 부산물의 생산을 책임지는 효소적 활성은 특성화되지 않았다. 더욱 구체적으로, 본 출원은 3-케토산 환원효소 (3-KAR)와 알데히드 탈수소효소 (ALDH)의 활성이 중요한 생합성 경로 중간물질로부터 이들 부산물의 형성을 가능하게 한다는 것을 증명한다.

[0012] 본 발명은 이들 효소적 활성의 연구로부터 결과이고, 그리고 3-KAR 및/또는 ALDH 효소의 억제가 원치 않는 부산물의 형성을 현저하게 감소시키거나 제거하고, 이와 동시에 유익한 대사산물의 수율과 역가를 향상시킨다는 것을 증명한다. 게다가, 본 출원은 3-KAR 및/또는 ALDH 효소적 활성의 증강이 다양한 부산물, 예를 들면, 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB), 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트, 2,3-디히드록시-2-메틸-부타노에이트, 이소부티레이트, 3-메틸-1-부티레이트, 2-메틸-1-부티레이트, 그리고 프로피오네이트의 생산을 증가시키는데 이용될

수 있다는 것을 증명한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] **본 발명의 요약**

[0014] 본 발명자들은 원치 않는 부산물이 생물연료 후보인 이소부탄올의 발효를 비롯한 다양한 발효 과정 동안 축적될 수 있다는 것을 발견하였다. 이들 원치 않는 부산물의 축적은 3-케토산, 아세토락테이트와 2-아세토-2-히드록시부티레이트, 및/또는 알데히드, 예를 들면, 이소부티르알데히드, 1-부타날, 1-프로파날, 2-메틸-1-부타날, 그리고 3-메틸-1-부타날을 비롯한 경로 중간물질의 바람직하지 않은 전환에 기인한다. 이들 중간물질의 원치 않는 부산물로의 전환은 3-케토산- 및/또는 알데히드-유래된 산물의 최적 생산성과 수율을 방해할 수 있다. 이런 이유로, 본 발명자들은 3-케토산 및/또는 알데히드가 경로 중간물질로서 기능하는 공정 동안 3-케토산 및/또는 알데히드 중간물질의 다양한 발효 부산물로의 전환을 감소시키기 위한 방법을 개발하였다.

[0015] 첫 번째 측면에서, 본 발명은 3-케토산 및/또는 알데히드가 중간물질(들)인 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 (a) 3-케토산의 3-히드록시산으로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없고; (b) 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없고; (c) 3-케토산의 3-히드록시산으로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 및/또는 (d) 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 한 구체예에서, 3-케토산은 아세토락테이트이다. 다른 구체예에서, 3-케토산은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이다.

[0016] 한 구체예에서, 본 발명은 3-케토산인 아세토락테이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 아세토락테이트의 상응하는 3-히드록시산, DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 일부 구체예에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다.

[0017] 한 구체예에서, 본 발명은 3-케토산인 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 아세토락테이트의 상응하는 3-히드록시산, 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 일부 구체예에서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다.

[0018] 한 구체예에서, 본 발명은 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 일부 구체예에서, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다.

[0019] 한 구체예에서, 본 발명은 3-케토산과 알데히드 둘 모두를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 (a) 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고; 그리고 (b) 알데히드 중간물질의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 한 구체예에서, 3-케토산은 아세토락테이트이고, 그리고 3-히드록시산 부산물은 DH2MB이다. 다른 구체예에서, 3-케토산은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이고, 그리고 3-히드록시산 부산물은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트이다. 일부 구체예에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 일부 다른 구체예에서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 일부 다른 구체예에서, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다. 또 다른 일부 구체예에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이고, 그리고 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다. 또 다른 일부 구체예에서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이고, 그리고 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다.

[0020] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 결실을

포함할 수 있다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현은 적어도 대략 50% 감소된다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현은 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 결실을 포함하지 않는 재조합 미생물과 비교하여 적어도 대략 60%, 적어도 대략 65%, 적어도 대략 70%, 적어도 대략 75%, 적어도 대략 80%, 적어도 대략 85%, 적어도 대략 90%, 적어도 대략 95%, 또는 적어도 대략 99% 감소된다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이고, 그리고 3-히드록시산 부산물은 DH2MB이다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이고, 그리고 3-히드록시산 부산물은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트이다.

[0021] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 단백질은 케토환원효소이다. 예시적인 구체예에서, 케토환원효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 다른 구체예에서, 단백질은 짧은 사슬 알코올 탈수소효소이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 중간 사슬 알코올 탈수소효소이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 알도오스 환원효소이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 D-히드록시산 탈수소효소이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 락테이트 탈수소효소이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 및 이들의 동족체의 YAL060W, YJR159W, YGL157W, YBL114W, YOR120W, YKL055C, YBR159W, YBR149W, YDL168W, YDR368W, YLR426W, YCR107W, YIL124W, YML054C, YOL151W, YMR318C, YMR226C, YBR046C, YHR104W, YIR036C, YDL174C, YDR541C, YBR145W, YGL039W, YCR105W, YDL124W, YIR035C, YFL056C, YNL274C, YLR255C, YGL185C, YGL256W, YJR096W, YMR226C, YJR155W, YPL275W, YOR388C, YLR070C, YMR083W, YER081W, YJR139C, YDL243C, YPL113C, YOL165C, YML086C, YMR303C, YDL246C, YLR070C, YHR063C, YNL331C, YFL057C, YIL155C, YOL086C, YAL061W, YDR127W, YPR127W, YC1018W, YIL074C, YIL124W, 그리고 YEL071W 유전자로 구성된 군에서 선택된다.

[0022] 한 구체예에서, 내생성 단백질은 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 예시적인 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 본 명세서에서 "TMA29"와 교체가능하게 이용되는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) YMR226C (서열 번호: 1) 단백질이다. 일부 구체예에서, 내생성 단백질은 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) YMR226C (서열 번호: 1) 단백질 또는 이의 동족체 또는 변이체일 수 있다. 한 구체예에서, 동족체는 반더왈톰지마 폴리스포라(*Vanderwaltomzyma polyspora*) (서열 번호: 2), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 3), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 4), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 5), 지고사카로미세스 로욱시(*Zygosaccharomyces rouxii*) (서열 번호: 6), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) (서열 번호: 7), 아시비아 고시피(*Ashbya gossypii*) (서열 번호: 8), 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*) (서열 번호: 9), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 10), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 11), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*) (서열 번호: 12), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*) (서열 번호: 13), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 14), 칸디다 두블리니엔시스(*Candida dubliniensis*) (서열 번호: 15), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) (서열 번호: 16), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (서열 번호: 17), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) (서열 번호: 18), 아스페르길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) (서열 번호: 19), 아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*) (서열 번호: 20), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) (서열 번호: 21), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 22), 그리고 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 23)로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0023] 한 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자에서 돌연변이를 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 3-케토산 환원효소 활성의 감소를 유발한다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 유전자의 부분 결실을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 3-케토산 환원효소 활성의 감소를 유발한다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 유전자의 완전한 결실을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 3-케토산 환원효소 활성의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 유전자와 연관된 조절 영역의 변형을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 발현의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 전사 조절자의 변형을 포함하고, 이것은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 유전자의 전사의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 모든 유전자에서 돌연변이를 포함하고, 이것은 상기 유전자(들)에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 활성의 감소를 유발한다. 한 구체예에서, 3-케토산 환원효소 활성 또는 발현은 적어도 대략 50% 감

소된다. 다른 구체예에서, 3-케토산 환원효소 활성 또는 발현은 3-케토산 환원효소 활성 또는 발현의 감소를 포함하지 않는 재조합 미생물과 비교하여, 적어도 대략 60%, 적어도 대략 65%, 적어도 대략 70%, 적어도 대략 75%, 적어도 대략 80%, 적어도 대략 85%, 적어도 대략 90%, 적어도 대략 95%, 또는 적어도 대략 99% 감소된다. 한 구체예에서, 상기 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29* (YMR226C) 유전자 또는 이의 동족체에 의해 인코딩된다.

[0024] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 결실을 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현은 적어도 대략 50% 감소된다. 다른 구체예에서, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 결실을 포함하지 않는 재조합 미생물과 비교하여 적어도 대략 60%, 적어도 대략 65%, 적어도 대략 70%, 적어도 대략 75%, 적어도 대략 80%, 적어도 대략 85%, 적어도 대략 90%, 적어도 대략 95%, 또는 적어도 대략 99% 감소된다.

[0025] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 내생성 단백질은 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다. 한 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 *ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6*, 그리고 *HFD1*, 그리고 이들의 동족체와 변이체로 구성된 군에서 선택되는 유전자에 의해 인코딩된다. 예시적인 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6 (서열 번호: 25) 단백질이다. 일부 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6 (서열 번호: 25) 단백질 또는 이의 동족체 또는 변이체이다. 한 구체예에서, 동족체는 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 26), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 27), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 28), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) (서열 번호: 29), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 30), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 31), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) YJ789 (서열 번호: 32), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) JAY291 (서열 번호: 33), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) EC1118 (서열 번호: 34), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) DBY939 (서열 번호: 35), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) AWRI1631 (서열 번호: 36), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) RM11-1a (서열 번호: 37), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 38), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 39), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 40), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 41)로 구성된 군에서 선택된다.

[0026] 한 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자에서 돌연변이를 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 알데히드 탈수소효소 활성의 감소를 유발한다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 유전자의 부분적인 결실을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 알데히드 탈수소효소 활성의 감소를 유발한다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 유전자의 완전한 결실을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 알데히드 탈수소효소 활성의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 유전자와 연관된 조절 영역의 변형을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 발현의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 전사 조절자의 변형을 포함하고, 이것은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 유전자의 전사의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 모든 유전자에서 돌연변이를 포함하고, 이것은 상기 유전자(들)에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 활성의 감소를 유발한다. 한 구체예에서, 알데히드 탈수소효소 활성 또는 발현은 적어도 대략 50% 감소된다. 다른 구체예에서, 알데히드 탈수소효소 활성 또는 발현은 알데히드 탈수소효소 활성 또는 발현의 감소를 포함하지 않는 재조합 미생물과 비교하여, 적어도 대략 60%, 적어도 대략 65%, 적어도 대략 70%, 적어도 대략 75%, 적어도 대략 80%, 적어도 대략 85%, 적어도 대략 90%, 적어도 대략 95%, 또는 적어도 대략 99% 감소된다. 한 구체예에서, 상기 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *ALD6* 유전자 또는 이의 동족체에 의해 인코딩된다.

[0027] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산을 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이다. 아세토락테이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로는 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린,

류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 그리고 조효소 A의 생합성을 위한 경로에서 선택될 수 있다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이다. 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로는 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생합성을 위한 경로에서 선택될 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함할 수 있다. 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로는 이소부탄올, 1-부탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 1-프로판올, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생합성을 위한 경로에서 선택될 수 있다. 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 알데히드 중간물질은 이소부티르알데히드, 1-부타날, 2-메틸-1-부타날, 3-메틸-1-부타날, 1-프로파날, 1-펜타날, 1-헥사날, 3-메틸-1-펜타날, 4-메틸-1-펜타날, 4-메틸-1-헥사날, 그리고 5-메틸-1-헵타날에서 선택될 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산과 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이다. 아세토락테이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로는 이소부탄올, 1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올의 생합성을 위한 경로에서 선택될 수 있다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이다. 2-아세토-2-히드록시부티레이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로는 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생합성을 위한 경로에서 선택될 수 있다.

[0030] 한 구체예에서, 본 발명은 이소부탄올을 생산하기 위한 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 그리고 여기서 상기 미생물은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 일부 구체예에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 특정 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29* (YMR226C) 유전자 또는 이의 동족체에 의해 인코딩된다.

[0031] 다른 구체예에서, 본 발명은 이소부탄올을 생산하기 위한 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 그리고 여기서 상기 미생물은 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 일부 구체예에서, 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소이다. 특정 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *ALD6* 유전자 또는 이의 동족체에 의해 인코딩된다.

[0032] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 이소부탄올을 생산하기 위한 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 그리고 여기서 상기 미생물은 (i) 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고, 그리고 (ii) 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 일부 구체예에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 특정 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29* (YMR226C) 유전자 또는 이의 동족체에 의해 인코딩되다. 일부 구체예에서, 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소이다. 특정 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *ALD6* 유전자 또는 이의 동족체에 의해 인코딩된다.

[0033] 한 구체예에서, 이소부탄올 생산 대사 경로는 피루베이트의 이소부탄올로의 전환에서 한 단계를 촉진하는 적어도 하나의 외생성 유전자를 포함한다. 다른 구체예에서, 이소부탄올 생산 대사 경로는 피루베이트의 이소부탄올로의 전환에서 단계들을 촉진하는 적어도 2개의 외생성 유전자를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 이소부탄올 생산 대사 경로는 피루베이트의 이소부탄올로의 전환에서 단계들을 촉진하는 적어도 3개의 외생성 유전자를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 이소부탄올 생산 대사 경로는 피루베이트의 이소부탄올로의 전환에서 단계들을 촉진하는 적어도 4개의 외생성 유전자를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 이소부탄올 생산 대사 경로는 피루베이트의 이소부탄올로의 전환에서 단계들을 촉진하는 5개의 외생성 유전자를 포함한다.

[0034] 한 구체예에서, 이소부탄올 경로 유전자 중에서 하나 또는 그 이상은 시토졸에 국한되는 효소를 인코딩한다. 한 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 하나의 이소부탄올 경로 효소가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함한다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 2개의 이소부탄올 경로 효소가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 3개의 이소부탄올 경로 효소가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 4개의 이소부탄올 경로 효소가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함한다. 예시적인 구체예

에서, 재조합 미생물은 5개의 이소부탄올 경로 효소가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함한다.

[0035] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 이소부탄올 경로 유전자는 아세토락테이트 신타아제 (ALS), 케톨산 환원이성화효소 (KARI), 디히드록시산 탈수화효소 (DHAD), 2-케토산탈카르복실화효소 (KIVD), 그리고 알코올 탈수소효소 (ADH)로 구성된 군에서 선택되는 효소(들)를 인코딩한다.

[0036] 다른 측면에서, 재조합 미생물은 하나 또는 그 이상의 알코올 탈수소효소의 발현을 감소시키고 및/또는 제거함으로써, 이소부탄올의 이소부티르알데히드로의 전환이 감소하도록 조작될 수 있다. 특정 구체예에서, 알코올 탈수소효소는 *ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6,* 그리고 *ADH7*, 그리고 이들의 동족체와 변이체로 구성된 군에서 선택되는 유전자에 의해 인코딩된다.

[0037] 다른 측면에서, 본 발명은 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는데 증강된 능력을 보이는 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH)에 관계한다. 일반적으로, 이들 향상된 ADH 효소를 발현하는 세포는 발효 반응 동안 증가된 수준의 이소부탄올을 생산할 것이다. 본 발명의 변형된 ADH 효소가 이소부탄올-생산 발효 반응에서 유용성을 갖긴 하지만, 본 발명이 속하는 분야에서 평균적 기술자는 이들 변형된 ADH 효소가 다른 알코올, 예를 들면, 1-프로판올, 2-프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, 1-펜탄올, 2-메틸-1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올을 생산하는 발효 반응에서도 유용하다는 것을 이해할 것이다.

[0038] 일정한 측면에서, 본 발명은 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 능력을 증강시키기 위해 변형된 알코올 탈수소효소 (ADH)에 관계한다. 이런 ADH의 실례에는 하기에서 선택되는 아미노산에 상응하는 위치에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 갖는 효소가 포함된다: (a) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 티로신 50; (b) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 글루타민 77; (c) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 발린 108; (d) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 티로신 113; (e) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 이소류신 212; 그리고 (f) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 류신 264, 여기서 AdhA (서열 번호: 185)는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) 알코올 탈수소효소 (ADH) 유전자 *adhA* (서열 번호: 184) 또는 이의 코돈-최적화된 이형 (서열 번호: 206)에 의해 인코딩된다.

[0039] 한 구체예에서, 변형된 ADH 효소는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 위치 50에 상응하는 아미노산에서 돌연변이를 내포한다. 다른 구체예에서, 변형된 ADH 효소는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 위치 77에 상응하는 아미노산에서 돌연변이를 내포한다. 또 다른 구체예에서, 변형된 ADH 효소는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 위치 108에 상응하는 아미노산에서 돌연변이를 내포한다. 또 다른 구체예에서, 변형된 ADH 효소는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 위치 113에 상응하는 아미노산에서 돌연변이를 내포한다. 또 다른 구체예에서, 변형된 ADH 효소는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 위치 212에 상응하는 아미노산에서 돌연변이를 내포한다. 또 다른 구체예에서, 변형된 ADH 효소는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 위치 264에 상응하는 아미노산에서 돌연변이를 내포한다.

[0040] 한 구체예에서, ADH 효소는 앞서 기술된 위치에 상응하는 아미노산에서 2개 또는 그 이상의 돌연변이를 내포한다. 다른 구체예에서, ADH 효소는 앞서 기술된 위치에 상응하는 아미노산에서 3개 또는 그 이상의 돌연변이를 내포한다. 또 다른 구체예에서, ADH 효소는 앞서 기술된 위치에 상응하는 아미노산에서 4개 또는 그 이상의 돌연변이를 내포한다. 또 다른 구체예에서, ADH 효소는 앞서 기술된 위치에 상응하는 아미노산에서 5개 또는 그 이상의 돌연변이를 내포한다. 또 다른 구체예에서, ADH 효소는 앞서 기술된 위치에 상응하는 아미노산에서 6개의 돌연변이를 내포한다.

[0041] 특정 구체예에서, 본 발명은 위치 50에서 티로신이 페닐알라닌 또는 트립토판 잔기로 대체되는 ADH 효소에 관계한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 위치 77에서 글루타민이 아르기닌 또는 세린 잔기로 대체되는 ADH 효소에 관계한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 위치 108에서 발린이 세린 또는 알라닌 잔기로 대체되는 ADH 효소에 관계한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 위치 113에서 티로신이 페닐알라닌 또는 글리신 잔기로 대체되는 ADH 효소에 관계한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 위치 212에서 이소류신이 트레오닌 또는 발린 잔기로 대체되는 ADH 효소에 관계한다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명은 위치 264에서 류신이 발린 잔기로 대체되는 ADH 효소에 관계한다. 한 구체예에서, ADH 효소는 이들 특정 구체예에서 기술된 위치에 상응하는 아미노산에서 2개 또는 그 이상의 돌연변이를 내포한다. 다른 구체예에서, ADH 효소는 이들 특정 구체예에서 기술된 위치에 상응하는 아미노산에서 3개 또는 그 이상의 돌연변이를 내포한다. 또 다른 구체예에서, ADH 효소는 이들

특정 구체예에서 기술된 위치에 상응하는 아미노산에서 4개 또는 그 이상의 돌연변이를 내포한다. 또 다른 구체예에서, ADH 효소는 이들 특정 구체예에서 기술된 위치에 상응하는 아미노산에서 5개 또는 그 이상의 돌연변이를 내포한다. 또 다른 구체예에서, ADH 효소는 이들 특정 구체예에서 기술된 위치에 상응하는 아미노산에서 6개의 돌연변이를 내포한다.

[0042] 일정한 예시적인 구체예에서, ADH 효소는 서열 번호: 189, 서열 번호: 191, 서열 번호: 193, 서열 번호: 195, 서열 번호: 197, 서열 번호: 199, 서열 번호: 201, 서열 번호: 203, 서열 번호: 205, 서열 번호: 208, 서열 번호: 210, 서열 번호: 212, 서열 번호: 214, 서열 번호: 216, 서열 번호: 218, 서열 번호: 220, 서열 번호: 222, 서열 번호: 224, 그리고 야생형 또는 부모 효소와 비교하여 상응하는 돌연변이를 포함하는 이들의 동족체 또는 변이체에서 선택되는 서열을 포함한다.

[0043] 앞선 단락에서 언급된 바와 같이, 본 발명의 범위 내에 앞서 설명된 것들에 상응하는 변형을 내포하는, 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185) 이외의 ADH 효소가 더욱 포함된다. 이런 ADH 효소에는 표 97에 열거된 ADH 효소가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0044] 일부 구체예에서, 변형되는 ADH 효소는 NADH-의존성 ADH 효소이다. 이런 NADH-의존성 ADH 효소의 실례는 공동 소유된 동시-계속 출원 U.S. Patent Publication No. 2010/0143997에서 기술되는데, 이것은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다. 일부 구체예에서, NADPH-이용 ADH 효소를 원래 인코딩하는 유전자는 상기 효소의 보조인자 선호 (co-factor preference)를 NADH로 전환하기 위해 변형된다.

[0045] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 이들 변형된 ADH는 일반적으로 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여, 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 증강된 능력을 보일 것이다. 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율(k_{cat}/K_M)은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 5% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 15% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 25% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 50% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 75% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 100% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 200% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 500% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 1000% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 2000% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 3000% 증강된다. 가장 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 3500% 증강된다.

[0046] 추가의 측면에서, 본 발명은 일정한 바람직한 숙주 생명체, 예를 들면, 효모와 대장균(*E. coli*)에서 발현을 위해 코돈 최적화된 변형된 ADH 효소에 관계한다. 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 변형된 ADH 효소를 포함하는 재조합 숙주 세포에 관계한다. 이러한 측면에 따라, 본 발명은 또한, 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환이 요망되는 임의의 발효 과정에서 이들 변형된 ADH 효소를 이용하는 방법에 관계한다. 이러한 측면에 따른 한 구체예에서, 변형된 ADH 효소는 이소부탄올을 생산하는 숙주 세포의 능력을 증강시키는데 적합할 수 있다. 이러한 측면에 따른 다른 구체예에서, 변형된 ADH 효소는 1-프로판올, 2-프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, 1-펜탄올, 2-메틸-1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올을 생산하는 숙주 세포의 능력을 증강시키는데 적합할 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 변형된 ADH를 포함하는 재조합 미생물은 이소부탄올 생산 대사 경로를 발현하도록 더욱 조작될 수 있다. 한 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 하나의 외생성 유전자를 포함하는 이소부탄올 생산 대사 경로를 발현하도록 조작될 수 있다. 한 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 2개의 외생성 유전자를 포함하는 이소부탄올 생산 대사 경로를 발현하도록 조작될 수 있다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 3개의 외생성 유전자를 포함하는 이소부탄올 생산 대사 경로를 발현하도록 조작될 수 있다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 4개의 외생성 유전자를 포함하는 이소부탄올 생산 대사 경로를 발현하도록 조작될 수 있다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 5개의 외생성 유전자를 포함하는 이소부탄올 생산 대사 경로를 발현하도록 조작될 수 있다. 따라서 본 발명에서는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하는 재조합 미생물, 그리고 상기 재조합 미생물을 이용하여 이소부탄올을 생산하는 방법을 더욱 제시한다.

[0048] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 이소부탄올 경로 효소(들)는 아세토락테이트 신타아제 (ALS), 케톨산

환원이성화효소 (KARI), 디히드록시산 탈수화효소 (DHAD), 2-케토산탈카르복실화효소 (KIVD), 그리고 알코올 탈수소효소 (ADH)에서 선택된다.

[0049] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 이소부탄올 경로 효소는 원핵 생명체로부터 유래될 수 있다. 본 명세서에서 기술된 대안적 구체예에서, 이소부탄올 경로 효소는 진핵 생명체로부터 유래될 수 있다. 피루베이트를 이소부탄올로 전환시키는 예시적인 대사 경로는 예로써 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*)로부터 *alsS*에 의해 인코딩된 아세토히드록시산 신타아제 (ALS) 효소, 예로써 대장균(*E. coli*)으로부터 *ilvC*에 의해 인코딩된 케톨산 환원이성화효소 (KARI), 예로써 락토코커스 락티스(*L. lactis*)로부터 *ilvD*에 의해 인코딩된 디히드록시산 탈수화효소 (DHAD), 예로써 락토코커스 락티스(*L. lactis*)로부터 *kivD*에 의해 인코딩된 2-케토산탈카르복실화효소 (KIVD), 그리고 예로써 본 명세서에서 기술된 바와 같이 위치 Y50, Q77, V108, Y113, I212, 그리고 L264에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 갖는 락토코커스 락티스(*L. lactis*)로부터 *adhA*에 의해 인코딩된 알코올 탈수소효소 (ADH) (가령, 본 명세서에서 기술된 변형된 ADH)로 구성될 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 재조합 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*) 계통분기의 미생물, 사카로미세스 센수 스트릭토(*Saccharomyces sensu stricto*) 미생물, 크랩트리-음성 효모 미생물, 크랩트리-양성 효모 미생물, WGD (전체 유전체 복제)-이후 효모 미생물, WGD (전체 유전체 복제)-이전 효모 미생물, 그리고 비-발효 효모 미생물일 수 있다.

[0051] 일부 구체예에서, 재조합 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*) 계통분기의 효모 재조합 미생물일 수 있다.

[0052] 일부 구체예에서, 재조합 미생물은 사카로미세스 센수 스트릭토(*Saccharomyces sensu stricto*) 미생물일 수 있다. 한 구체예에서, 사카로미세스 센수 스트릭토(*Saccharomyces sensu stricto*)는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), 사카로미세스 쿠드리아브제비(*S. kudriavzevii*), 사카로미세스 미카태(*S. mikatae*), 사카로미세스 바야누스(*S. bayanus*), 사카로미세스 우바룸(*S. uvarum*). 사카로미세스 카로카니스(*S. carocanis*) 및 이들의 하이브리드로 구성된 군에서 선택된다.

[0053] 일부 구체예에서, 재조합 미생물은 크랩트리-음성 재조합 효모 미생물일 수 있다. 한 구체예에서, 크랩트리-음성 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 아이사첸키아(*Issatchenkia*), 한세눌라(*Hansenula*), 또는 칸디다(*Candida*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류된다. 추가의 구체예에서, 크랩트리-음성 효모 미생물은 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 피치아 아노말라(*Pichia anomala*), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*), 한세눌라 아노말라(*Hansenula anomala*), 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*) 및 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*)에서 선택된다.

[0054] 일부 구체예에서, 재조합 미생물은 크랩트리-양성 재조합 효모 미생물일 수 있다. 한 구체예에서, 크랩트리-양성 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 지고사카로미세스(*Zygosaccharomyces*), 데바리오미세스(*Debaryomyces*), 칸디다(*Candida*), 피치아(*Pichia*) 및 시조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류된다. 추가의 구체예에서, 크랩트리-양성 효모 미생물은 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로미세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*), 사카로미세스 파라독수스(*Saccharomyces paradoxus*), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 지고사카로미세스 바일리(*Z. bailli*), 지고사카로미세스 로욱시(*Z. rouxii*), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 그리고 사카로미세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*)으로 구성된 군에서 선택된다.

[0055] 일부 구체예에서, 재조합 미생물은 WGD (전체 유전체 복제)-이후 효모 재조합 미생물일 수 있다. 한 구체예에서, WGD-이후 효모 재조합 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*) 또는 칸디다(*Candida*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류된다. 추가의 구체예에서, WGD-이후 효모는 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로미세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*), 사카로미세스 파라독수스(*Saccharomyces paradoxus*), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*), 그리고 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*)로 구성된 군에서 선택된다.

[0056] 일부 구체예에서, 재조합 미생물은 WGD (전체 유전체 복제)-이전 효모 재조합 미생물일 수 있다. 한 구체예에서, WGD-이전 효모 재조합 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*),

칸디다(*Candida*), 피치아(*Pichia*), 아이사첸키아(*Issatchenkia*), 데바리오미세스(*Debaryomyces*), 한세눌라(*Hansenula*), 파키솔렌(*Pachysolen*), 야로위아(*Yarrowia*) 및 시조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류된다. 추가의 구체예에서, WGD-이전 효모는 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 피치아 아노말라(*Pichia anomala*), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*), 아이싸첸키아 옥시덴탈리스(*Issatchenkia occidentalis*), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*), 한세눌라 아노말라(*Hansenula anomala*), 파키솔렌 탄노필리스(*Pachysolen tannophilis*), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)로 구성된 군에서 선택된다.

[0057] 일부 구체예에서, 재조합 미생물은 트리코스포론(*Tricosporon*), 로도토룰라(*Rhodotorula*), 믹소지마(*Myxozyma*), 또는 칸디다(*Candida*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 비-발효 효모 미생물인 미생물일 수 있다. 특정 구체예에서, 비-발효 효모는 칸디다 제스토비(*C. xestobii*)이다.

[0058] 다른 측면에서, 본 발명에서는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 재조합 미생물을 이용하여 연료, 화학물질, 그리고 아미노산을 비롯한 유익한 대사산물을 생산하는 방법을 제시한다. 한 구체예에서, 방법은 대사산물의 회수 가능한 양이 생산될 때까지 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 재조합 미생물을 배양하는 단계, 그리고 선택적으로, 대사산물을 회수하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 미생물은 이론적으로 적어도 대략 5 퍼센트의 수율에서 탄소 공급원으로부터 대사산물을 생산한다. 다른 구체예에서, 미생물은 이론적으로 적어도 대략 10 퍼센트, 적어도 대략 15 퍼센트, 적어도 대략 20 퍼센트, 적어도 대략 25 퍼센트, 적어도 대략 30 퍼센트, 적어도 대략 35 퍼센트, 적어도 대략 40 퍼센트, 적어도 대략 45 퍼센트, 적어도 대략 50 퍼센트, 적어도 대략 55 퍼센트, 적어도 대략 60 퍼센트, 적어도 대략 65 퍼센트, 적어도 대략 70 퍼센트, 적어도 대략 75 퍼센트, 적어도 대략 80 퍼센트, 적어도 대략 85 퍼센트, 적어도 대략 90 퍼센트, 적어도 대략 95 퍼센트, 또는 적어도 대략 97.5 퍼센트의 수율에서 대사산물을 생산한다. 한 구체예에서, 대사산물은 3-케토산을 중간물질로서 이용하는 생합성 경로로부터 유래될 수 있다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이다. 따라서 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 그리고 조효소 A가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 대사산물은 아세토락테이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로로부터 유래될 수 있다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이다. 따라서 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 대사산물은 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로로부터 유래될 수 있다. 다른 구체예에서, 이소부탄올, 1-부탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 1-프로판올, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 대사산물은 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로로부터 유래될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 대사산물은 이소부탄올, 1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올 생합성 경로가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 아세토락테이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로로부터 유래될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 대사산물은 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올 생합성 경로가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 2-아세토-2-히드록시부티레이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로로부터 유래될 수 있다.

[0059] 한 구체예에서, 재조합 미생물은 호기성 조건 하에 성장된다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 미세호기성 조건 하에 성장된다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 혐기성 조건 하에 성장된다.

과제의 해결 수단

[0060] **상세한 설명**

[0061] 본 명세서에서 및 첨부된 특허청구범위에서, 단수 형태는 문맥에서 명백하게 달리 지시되지 않으면, 복수 지시 대상을 포함한다. 따라서 예로써, "폴리뉴클레오티드"에 대한 지시는 복수의 이런 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 그리고 "미생물"에 대한 지시는 하나 또는 그 이상의 미생물 등에 대한 지시를 포함한다.

[0062] 달리 정의되지 않으면, 본 명세서에 이용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 비록 본 명세서에서 기술된 것들에 유사하거나 동등한 방법과

물질이 이들 개시된 방법과 조성물의 실시에 이용될 수 있긴 하지만, 예시적인 방법, 장치와 물질은 본 명세서에서 기술된다.

[0063] 상기에서 및 본 명세서 전반에서 논의된 임의의 간행물은 본 출원의 출원 일자에 앞서 그들의 개시 목적으로만 제공된다. 이들 중에서 어느 것도 본 발명자들이 앞선 발표에 의해 이런 공개에 앞서는 권리가 없음을 인정하는 것으로 간주되지 않는다.

[0064] 용어 "미생물"은 역 (domain) 고세균류 (Archaea), 세균류 (Bacteria)와 진핵생물계 (Eucarya) (후자는 효모 및 섬유성 진균 포함), 원충, 조류, 또는 고등 원생생물로부터 원핵과 진핵 세균 종을 포함한다. 용어 "세균 세포" 및 "세균"은 용어 미생물과 교체가능하게 이용된다.

[0065] 용어 "속"은 Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea (Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, J.R., Harrison, S.H., Euzeby, J., 그리고 Tindall, B.J. (2007) The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. TOBA Release 7.7, March 2007. Michigan State University Board of Trustees. [http://www.taxonomicoutline.org/]])에 따른 관련된 종의 분류학적 그룹으로서 정의된다.

[0066] 용어 "종"은 97% 이상의 16S 리보솜 RNA 서열 상동성 및 70% 이상의 유전체 혼성화 (genomic hybridization)를 갖고, 그리고 별개의 단위로서 인식될 만큼 모든 다른 생명체로부터 충분히 상이한 밀접하게 관련된 생명체의 집합으로서 정의된다.

[0067] 용어 "재조합 미생물," "변형된 미생물," 및 "재조합 숙주 세포"은 본 명세서에서 교체가능하게 이용되고, 그리고 내생성 폴리뉴클레오티드를 발현하거나 과다발현하고, 이종기원성 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, 벡터 내에 포함된 것들, 통합 구조체 내에 포함된 것들, 또는 내인성 유전자의 발현에서 변경을 갖는 것들을 발현하도록 유전학적으로 변형된 미생물을 지칭한다. "변경"은 발현, 수준, 또는 활성이 변경의 부재에서 관찰되는 것보다 크거나 작도록 하기 위해, 유전자의 발현, 또는 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 아단위를 인코딩하는 RNA 분자 또는 동등한 RNA 분자의 수준, 또는 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 아단위의 활성이 상향 조절되거나 하향 조절된다는 것을 의미한다. 가령, 용어 "변경한다"는 "저해한다"를 의미할 수 있지만, 단어 "변경한다"의 이용은 이러한 정의에 한정되지 않는다.

[0068] 유전자 서열에 관하여 용어 "발현"은 유전자의 전사, 그리고 적절한 경우에, 결과의 mRNA 전사체의 단백질로의 번역을 지칭한다. 따라서 문맥으로부터 명백하게 확인되는 바와 같이, 단백질의 발현은 개방 해독 틀 서열의 전사와 번역으로부터 결과이다. 숙주 세포에서 원하는 산물의 발현 수준은 세포 내에 존재하는 상응하는 mRNA의 양, 또는 선별된 서열에 의해 인코딩된 원하는 산물의 양의 기초에서 결정될 수 있다. 가령, 선별된 서열로부터 전산된 mRNA는 qRT-PCR 또는 노던 혼성화 (Northern hybridization)에 의해 정량될 수 있다 (참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). 선별된 서열에 의해 인코딩된 단백질은 다양한 방법에 의해, 예를 들면, ELISA에 의해, 단백질의 생물학적 활성을 분석함에 의해, 또는 상기 단백질을 인식하고 여기에 결합하는 항체를 이용하는, 이런 활성과 무관한 검사법, 예를 들면, 웨스턴 블롯팅 (western blotting) 또는 방사면역검정 (radioimmunoassay)을 이용함에 의해 정량될 수 있다 (참조: Sambrook *et al.*, 1989, *supra*). 폴리뉴클레오티드는 일반적으로, 원하는 대사산물을 생산하기 위한 대사 경로에 관련된 표적 효소를 인코딩한다. 용어 "재조합 미생물" 및 "재조합 숙주 세포"는 특정 재조합 미생물뿐만 아니라 이런 미생물의 자손 또는 잠재적 자손 역시 지칭하는 것으로 이해된다. 일정한 변형이 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 계속되는 세대에서 일어나기 때문에, 이런 자손은 실제로, 부모 세포와 일치하지 않을 수도 있지만, 본 명세서에서 상기 용어의 범위 내에 여전히 포함된다.

[0069] 용어 "과다발현"은 기초 수준의 mRNA (가령, Aft 단백질을 인코딩하는 것들)을 발현하거나 기초 수준의 단백질을 갖는 유사한 상응하는 변형되지 않은 세포와 비교하여, 세포 내에서 단백질(들) (가령, TMA29 단백질 또는 이의 동족체)을 인코딩하는 mRNA의 상승된 수준 (가령, 비정상적 수준) 및/또는 단백질(들) (가령, TMA29)의 상승된 수준을 지칭한다. 특정 구체예에서, TMA29, 또는 이들의 동족체는 증가된 *TMA29* mRNA, 단백질, 및/또는 활성을 나타내도록 조작된 미생물에서 적어도 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 8-배, 10-배, 12-배, 15-배 또는 그 이상 과다발현될 수 있다.

[0070] 본 명세서에서 및 당업자가 이해하는 바와 같이, 단백질, 예를 들면, 효소의 "감소된 활성 및/또는 발현"은 단백질의 감소된 특이적 촉매 활성 (가령, 감소된 활성) 및/또는 세포 내에서 단백질의 감소된 농도 (가령, 감소된 발현)을 의미할 수 있고, 반면 단백질, 예를 들면, 효소의 "결실된 활성 및/또는 발현" 또는 "제거된 활성 및/또는 발현"은 효소의 거의 또는 전혀 없는 특이적 촉매 활성 (가령. 결실된 활성) 및/또는 세포 내에서 효소

의 거의 또는 전혀 없는 농도 (가령. 결실된 발현)을 의미할 수 있다.

[0071] 용어 "야생형 미생물"은 자연에서 발생하는 세포, 다시 말하면, 유전학적으로 변형되지 않은 세포를 지칭한다. 야생형 미생물은 첫 번째 표적 효소를 발현하거나 과다발현하도록 유전학적으로 변형될 수 있다. 이러한 미생물은 두 번째 표적 효소를 발현하거나 과다발현하도록 변형된 미생물의 산출에서 부모 미생물로서 기능할 수 있다. 차례로, 첫 번째와 두 번째 표적 효소를 발현하거나 과다발현하도록 변형된 미생물은 세 번째 표적 효소를 발현하거나 과다발현하도록 변형될 수 있다.

[0072] 따라서 "부모 미생물"은 연속하는 유전자 변형 사건에 대한 참고 세포로서 기능한다. 각 변형 사건은 참고 세포 내로 핵산 분자를 도입함으로써 달성될 수 있다. 이러한 도입은 표적 효소의 발현 또는 과다발현을 조장한다. 용어 "조장한다"는 부모 미생물에서 예로써, 프로모터 서열의 유전자 변형을 통한, 표적 효소를 인코딩하는 내생성 폴리뉴클레오티드의 활성화를 포함하는 것으로 이해된다. 게다가, 용어 "조장한다"는 표적 효소를 인코딩하는 이종기원성 폴리뉴클레오티드의 부모 미생물 내로의 도입을 포함하는 것으로 이해된다.

[0073] 용어 "조작한다"는 미생물에서 검출가능한 변화를 유발하는 미생물의 임의의 조작을 지칭하는데, 여기서 조작은 미생물에 이종기원성인 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드를 삽입하고, 그리고 미생물에 선천성인 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드를 돌연변이시키는 것을 포함하지만 이들에 국한되지 않는다.

[0074] 본 명세서에서, 용어 "돌연변이"는 변경된 핵산 또는 폴리펩티드를 유발하는 핵산 및/또는 폴리펩티드의 임의의 변형을 지칭한다. 돌연변이에는 예로써, 폴리뉴클레오티드 내에서 점 돌연변이, 결실, 또는 단일 또는 복수 잔기의 삽입이 포함되고, 이것은 유전자의 단백질-인코딩 영역 내에서 발생하는 변경, 그리고 조절 또는 프로모터 서열이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 단백질-인코딩 서열의 외부에서 영역의 변경이 포함한다. 유전자 변경은 임의의 유형의 돌연변이일 수 있다. 가령, 돌연변이는 점 돌연변이, 해독틀 이동 (frame-shift) 돌연변이, 난센스 돌연변이, 삽입, 또는 유전자의 일부 또는 전부의 결실을 구성할 수 있다. 이에 더하여, 변형된 미생물의 일부 구체예에서, 미생물 유전체의 일부가 이종기원성 폴리뉴클레오티드로 대체된다. 일부 구체예에서, 돌연변이는 자연-발생한다. 다른 구체예에서, 돌연변이는 인위적 선택압 (artificial selection pressure)을 통해 확인되고 및/또는 농축된다. 또 다른 구체예에서, 미생물 유전체에서 돌연변이는 유전자 조작의 결과이다.

[0075] "대사 경로"로도 지칭되는 용어 "생합성 경로"는 한 가지 화학 종을 다른 화학 종으로 전환시키기 위한 일단의 동화 또는 이화 생화학적 반응을 지칭한다. 유전자 산물은 그들이 병렬로 또는 연속적으로, 동일한 기질에 작용하거나, 동일한 산물을 생산하거나, 또는 동일한 기질과 대사산물 최종 산물 사이의 물질대사 중간물질 (즉, 대사산물)에 작용하거나 이를 생산하는 동일한 "대사 경로"에 속한다.

[0076] 본 명세서에서, 용어 "이소부탄올 생산 대사 경로"는 피루베이트로부터 이소부탄올을 생산하는 효소 경로를 지칭한다.

[0077] 분자, 특히 효소와 폴리뉴클레오티드와 관련하여, 본 명세서에서 용어 "이종기원성"은 선천성 미생물에서 분자의 발현 수준과 비교하여 더욱 낮은, 동등한 또는 더욱 높을 수 있는 발현 수준과 상관없이, 그들이 기원하거나 자연적으로 발견되는 생명체 이외의 생명체에서 발현되는 분자를 지시한다.

[0078] 다른 한편, 분자, 특히 효소와 폴리뉴클레오티드와 관련하여, 본 명세서에서 용어 "선천성" 또는 "내생성"은 선천성 미생물에서 분자의 발현 수준과 비교하여 더욱 낮은, 동등한 또는 더욱 높을 수 있는 발현 수준과 상관없이, 그들이 기원하거나 자연적으로 발견되는 생명체에서 발현되는 분자를 지시한다. 선천성 효소 또는 폴리뉴클레오티드의 발현은 재조합 미생물에서 변화될 수 있는 것으로 이해된다.

[0079] 용어 "공급원료 (feedstock)"은 다른 산물이 만들어질 수 있는 미생물 또는 발효 과정에 공급된 원료 또는 원료의 혼합물로서 정의된다. 가령, 탄소 공급원, 예를 들면, 바이오매스 (biomass) 또는 바이오매스로부터 유래된 탄소 화합물은 발효 과정에서 생물연료를 생산하는 미생물에 대한 공급원료이다. 하지만, 공급원료는 탄소 공급원 이외의 영양소를 내포할 수도 있다.

[0080] 용어 "기질" 또는 "적절한 기질"은 효소의 작용에 의해 다른 화합물로 전환되거나, 또는 전환되도록 의도되는 임의의 물질 또는 화합물을 지칭한다. 상기 용어는 단일 화합물뿐만 아니라 화합물의 조합, 예를 들면, 적어도 하나의 기질, 또는 이의 유도체를 내포하는 용액, 혼합물 및 기타 물질 역시 포함한다. 게다가, 용어 "기질"은 출발 물질로서 이용에 적합한 탄소 공급원, 예를 들면, 임의의 바이오매스 유래된 당을 제공하는 화합물뿐만 아니라, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 재조합 미생물과 연관된 경로에 이용되는 중간물질과 최종 산물 대사산물 역시 포함한다. 모든 피루베이트 탈카르복실화효소 (PDC) 유전자에서 돌연변이로 상기 유전자의 피루베이트 탈카르복실화효소 활성이 감소되는 조작된 효모 미생물에 대한 탄소 공급원으로서 이용되는 용어 "C2-화합물"은

에탄올과 아세테이트가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 2개의 탄소 원자로 구성되는 유기 화합물을 지칭한다.

[0081] 용어 "발효" 또는 "발효 과정"은 미생물이 원료, 예를 들면, 공급원료와 영양소를 내포하는 배양 배지에서 배양되는 과정으로 정의되고, 여기서 상기 미생물은 원료, 예를 들면, 공급원료를 산물로 전환시킨다.

[0082] 용어 "부피 생산성" 또는 "생산율"은 시간 단위당 형성된 산물의 양/배지의 부피로서 정의된다. 부피 생산성은 시간당 그램/리터 (g/ℓ/h)로 보고된다.

[0083] 용어 "비생산성" 또는 "비생산율"은 세포의 양에 대해 시간 단위당 형성된 산물의 양/배지의 부피로서 정의된다. 비생산성은 OD에 대해 시간당 그램 또는 밀리그램/리터 (g/ℓ/h/OD)로 보고된다.

[0084] 용어 "수율"은 원료의 단위 중량당 획득된 산물의 양으로서 정의되고, 그리고 산물 g/기질 g (g/g)으로서 표현될 수 있다. 수율은 이론적 수율의 백분율로서 표현될 수도 있다. "이론적 수율"은 산물을 만드는데 이용되는 대사 경로의 화학량론 (stoichiometry)에 의해 지시되는 바와 같이, 기질의 소정의 양에 대해 산출될 수 있는 산물의 최대량으로서 정의된다. 가령, 글루코오스의 이소부탄올로의 전형적인 전환에 대한 이론적 수율은 0.41 g/g이다. 따라서 0.39 g/g의 글루코오스로부터 이소부탄올의 수율은 이론적 수율의 95% 또는 95이론적 % 수율로서 표현될 것이다.

[0085] 용어 "역가"는 용액의 세기 또는 용액 내에 물질의 농도로서 정의된다. 가령, 발효액 내에서 생물연료의 역가는 발효액 리터당 용액 내에 생물연료의 g (g/ℓ)으로 표현된다.

[0086] "호기성 조건"은 발효 배지 내에서 산소 농도가 호기성 또는 조건 혐기성 미생물에 의해 최종 전자 수용자 (terminal electron acceptor)로서 이용될 만큼 충분히 높은 조건으로서 정의된다.

[0087] 대조적으로, "혐기성 조건"은 발효 배지 내에서 산소 농도가 미생물에 의해 최종 전자 수용자 (terminal electron acceptor)로서 이용되기에는 너무 낮은 조건으로서 정의된다. 혐기성 조건은 산소가 최종 전자 수용자로서 미생물에게 더 이상 가용하지 않을 때까지, 질소와 같은 비활성 가스를 발효 배지에 살포함으로써 달성될 수 있다. 대안으로, 혐기성 조건은 산소가 최종 전자 수용자로서 미생물에게 가용하지 않을 때까지, 발효의 가용 산소를 소모하는 미생물에 의해 달성될 수 있다. 혐기성 조건 하에 이소부탄올의 생산 방법은 공동 소유된 동시-계속 출원 US 2010/0143997에서 기술되고, 이의 내용은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0088] "호기성 물질대사"는 산소가 탄수화물로부터 전형적으로 ATP의 형태에서 에너지를 만들기 위해 최종 전자 수용자로서 이용되는 생화학적 과정을 지칭한다. 호기성 물질대사는 예로써, 해당 (glycolysis) 및 TCA 사이클을 거쳐 일어나는데, 여기서 단일 글루코오스 분자는 산소의 존재에서 이산화탄소로 완전하게 물질대사된다.

[0089] 대조적으로, "혐기성 물질대사"는 산소가 NADH에 내포된 전자의 최종 수용자가 아닌 생화학적 과정을 지칭한다. 혐기성 물질대사는 혐기성 호흡 (여기서 산소 이외의 화합물이 최종 전자 수용자로서 기능한다), 그리고 기질 수준 인산화 (여기서 NADH로부터 전자가 "발효 경로"를 거쳐 환원된 산물을 산출하는데 이용된다)로 구분될 수 있다.

[0090] "발효 경로"에서, NAD(P)H는 NAD(P)H에서 운반된 전자를 생산하는 동일한 대사 경로에 의해 생산된 분자에 전자를 공여한다. 가령, 일정한 효모 균주의 발효 경로 중에서 하나에서, 해당을 통해 산출된 NAD(P)H는 피루베이트에 전자를 전달하여 에탄올을 산출한다. 발효 경로는 일반적으로 혐기성 조건 하에 활발하지만, 호기성 조건 하에, NADH가 호흡 연쇄 (respiratory chain)를 거쳐 완전하게 산화되지 않는 조건 하에서도 일어날 수 있다. 가령, 일정한 글루코오스 농도 이상에서, 크랩트리 양성 효모는 호기성 조건 하에 다량의 에탄올을 생산한다.

[0091] 용어 "부산물"은 아미노산, 아미노산 전구물, 화학물질, 화학물질 전구물, 생물연료, 또는 생물연료 전구물의 생산에 관련된 바람직하지 않은 산물을 의미한다. 원하는 대사 경로 (가령, 이소부탄올-생산 대사 경로)와 경쟁하는 탄소 경로에서 효소적 활성 (3-KAR, ALDH, PDC, GPD 등)의 존재 또는 부재와 관련하여 이용될 때 용어 "실질적으로 없는"은 효소의 수준이 야생형 숙주 내에서 동일한 효소의 수준보다 훨씬 낮다는 것을 의미하고, 여기서 야생형 수준의 대략 50% 이하가 바람직하고 대략 30% 이하가 더욱 바람직하다. 활성은 야생형 활성의 대략 20% 이하, 대략 10% 이하, 대략 5% 이하, 또는 대략 1% 이하일 수 있다. 특정 효소적 활성 (3-KAR, ALDH, PDC, GPD 등)이 "실질적으로 없는" 미생물은 재조합 수단을 통해 산출되거나, 자연에서 확인될 수 있다.

[0092] 용어 "비-발효 효모"는 NADH로부터 전자가 발효 경로, 예를 들면, 글루코오스로부터 에탄올과 CO_2의 생산을 거쳐 환원된 산물을 산출하는데 이용되는 혐기성 물질대사를 실현하지 못하는 효모 종이다. 비-발효 효모는 "다람

발효관 (Durham Tube) 검사"에 의해 (J.A. Barnett, R.W. Payne, and D. Yarrow. 2000. Yeasts Characteristics and Identification. 3rd edition. p. 28-29. Cambridge University Press, Cambridge, UK) 또는 에탄올과 CO_2와 같은 발효 산물의 생산을 모니터링함으로써 확인될 수 있다.

[0093] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 본 명세서에서 용어 "핵산"과 교체가능하게 이용되고, 그리고 임의의 길이의 단일 가닥 또는 이중 가닥, 센스 또는 안티센스 데옥시리보핵산 (DNA) 및 적절한 경우에, siRNA를 비롯한 임의의 길이의 단일 가닥 또는 이중 가닥, 센스 또는 안티센스 리보핵산 (RNA)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 뉴클레오티드, 뉴클레오시드 또는 이들의 상사체를 포함하는 2개 또는 그 이상의 단위체로 구성되는 유기 중합체를 지칭한다. 용어 "뉴클레오티드"는 퓨린 또는 피리미딘 염기 및 포스페이트 기에 연결된 리보오스 또는 데옥시리보오스 당으로 구성되고, 그리고 핵산의 염기성 구조적 단위인 임의의 몇몇 화합물을 지칭한다. 용어 "뉴클레오시드"는 데옥시리보오스 또는 리보오스와 결합된 퓨린 또는 피리미딘 염기로 구성되고 특히 핵산에서 발견되는 화합물 (구아노신 또는 아데노신으로서)을 지칭한다. 용어 "뉴클레오티드 상사체" 또는 "뉴클레오시드 상사체"는 각각, 하나 또는 그 이상의 개별 원자가 상이한 원자 또는 상이한 기능기로 대체되는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드를 지칭한다. 따라서 용어 폴리뉴클레오티드는 임의의 길이의 핵산, DNA, RNA, 상사체 및 이들의 단편을 포함한다. 3개 또는 그 이상의 뉴클레오티드의 폴리뉴클레오티드는 또한, 뉴클레오티드성 올리고머 (nucleotidic oligomer) 또는 올리고뉴클레오티드로 불린다.

[0094] 본 명세서에서 기술된 폴리뉴클레오티드는 "유전자"를 포함하고, 그리고 본 명세서에서 기술된 핵산 분자는 "벡터" 또는 "플라스미드"를 포함하는 것으로 이해된다. 따라서 용어 "유전자" (일명, "구조적 유전자")는 아미노산의 특정 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭하는데, 이것은 하나 또는 그 이상의 단백질 또는 효소의 전부 또는 일부를 포함하고, 그리고 예로써, 유전자가 발현되는 조건을 결정하는 조절 (비-전사된) DNA 서열, 예를 들면, 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 유전자의 전사된 영역은 코딩 서열뿐만 아니라 인트론, 5'-비번역 영역 (UTR), 그리고 3'-UTR을 비롯한 비번역 영역을 포함할 수 있다.

[0095] 용어 "오페론"은 공통 프로모터로부터 단일 전사 단위로서 전사되는 2개 또는 그 이상의 유전자를 지칭한다. 일부 구체예에서, 오페론을 포함하는 유전자는 연속된 유전자이다. 전체 오페론의 전사는 공통 프로모터를 변형함으로써 변화 (즉, 증가, 감소, 또는 제거)될 수 있는 것으로 이해된다. 대안으로, 오페론 내에 임의의 유전자 또는 유전자의 조합이 인코딩된 폴리펩티드의 기능 또는 활성을 변화시키기 위해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 인코딩된 폴리펩티드의 활성에서 증가를 유발할 수 있다. 게다가, 이러한 변형은 인코딩된 폴리펩티드에 새로운 활성을 부여할 수 있다. 예시적인 새로운 활성에는 대안적 기질의 이용 및/또는 대안적 환경 조건에서 기능하는 능력이 포함된다.

[0096] "벡터"는 핵산이 증식하고 및/또는 생명체, 세포, 또는 세포 성분 사이에서 이전될 수 있는 임의의 수단이다. 벡터에는 바이러스, 박테리오파지, 프로-바이러스, 플라스미드, 파지미드, 트랜스포손, 그리고 인공 염색체, 예를 들면, YAC (효모 인공 염색체), BAC (박테리아 인공 염색체), 그리고 PLAC (식물 인공 염색체) 등이 포함되는데, 이들은 자율적으로 복제하거나, 또는 숙주 세포의 염색체 내로 통합될 수 있는 "에피솜 (episome)"이다. 벡터는 또한, 나신 RNA 폴리뉴클레오티드, 나신 DNA 폴리뉴클레오티드, 동일한 가닥 내에서 DNA와 RNA 둘 모두로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 폴리-리신-접합된 DNA 또는 RNA, 펩티드-접합된 DNA 또는 RNA, 리포좀-접합된 DNA 등일 수 있는데, 이들은 자연 상태에서 에피솜이 아니고, 또는 이것은 상기 폴리뉴클레오티드 구조체 중에서 하나 또는 그 이상을 포함하는 생명체, 예를 들면, 아그로박테륨 (agrobacterium) 또는 세균류일 수 있다.

[0097] "형질전환 (transformation)"은 벡터가 숙주 세포 내로 도입되는 과정을 지칭한다. 형질전환 (또는 형질도입 (transduction), 또는 형질감염 (transfection))은 화학적 형질전환 (가령, 리튬 아세테이트 형질전환), 전기천공 (electroporation), 미세주입 (microinjection), 바이오블리스틱 (biolistics) (또는 입자 폭발-매개된 전달 (particle bombardment-mediated delivery)), 또는 아그로박테륨 매개된 형질전환을 비롯한 다수의 수단 중에서 한 가지로 달성될 수 있다.

[0098] 본 명세서에서, 용어 "효소"는 하나 또는 그 이상의 화학적 또는 생화학적 반응을 촉진하거나 증진하는 임의의 물질을 지칭하고, 여기에는 일반적으로, 폴리펩티드로 완전하게 또는 부분적으로 구성되는 효소가 포함되지만, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 상이한 분자로 구성되는 효소가 포함될 수 있다.

[0099] 본 명세서에서, 용어 "단백질," "펩티드," 또는 "폴리펩티드"는 2개 또는 그 이상의 아미노산 단위체 및/또는 이들의 상사체로 구성되는 유기 중합체를 지칭한다. 본 명세서에서, 용어 "아미노산" 또는 "아미노산 단위체"는 글리신 및 D 또는 L 광학 이성질체 (optical isomer)를 포함하는 임의의 자연 및/또는 합성 아미노산을 지칭한

다. 용어 "아미노산 상사체"는 하나 또는 그 이상의 개별 원자가 상이한 원자, 또는 상이한 기능기로 대체되는 아미노산을 지칭한다. 따라서 용어 폴리펩티드는 전장 단백질을 비롯한 임의 길이의 아미노산 중합체, 그리고 펩티드 및 이들의 상사체와 단편을 포함한다. 3개 또는 그 이상의 아미노산의 폴리펩티드는 또한, 단백질 올리고머 또는 올리고펩티드로 불린다.

[0100] 첫 번째 과 (family) 또는 종 (species)의 본래 효소 또는 유전자와 관련하여 이용된 용어 "동족체 (homolog)"는 기능적, 구조적 또는 유전체적 분석에 의해, 첫 번째 과 또는 종의 본래 효소 또는 유전자에 상응하는 두 번째 과 (family) 또는 종 (species)의 효소 또는 유전자인 것으로 결정되는 두 번째 과 또는 종의 별개의 효소 또는 유전자를 지칭한다. 가장 빈번하게는, 동족체는 기능적, 구조적 또는 유전체적 유사성을 가질 것이다. 유전자 프로브 및 PCR을 이용하여 효소 또는 유전자의 동족체를 용이하게 클로닝할 수 있는 기술은 공지되어 있다. 클로닝된 서열의 동족체로서의 정체는 기능적 검사법을 이용하고 및/또는 유전자의 유전체 맵핑 (genomic mapping)에 의해 확인될 수 있다.

[0101] 단백질은 유전자에 의해 인코딩된 아미노산 서열이 두 번째 유전자의 아미노산 서열과 유사한 아미노산 서열을 가지면, 두 번째 단백질에 "상동성 (homology)"을 갖거나 또는 "상동하다". 대안으로, 단백질은 이들 두 단백질이 "유사한" 아미노산 서열을 가지면, 두 번째 단백질에 상동성을 갖는다 (따라서 용어 "상동한 단백질"은 이들 두 단백질이 유사한 아미노산 서열을 갖는다는 것을 의미하는 것으로 정의된다).

[0102] 용어 "상사체 (analog)" 또는 "상사한"은 기능에서만 서로 관련되고, 그리고 공통 혈통으로부터 유래되지 않거나 공통 조상 서열을 공유하지 않는 핵산 또는 단백질 서열 또는 단백질 구조를 지칭한다. 상사체는 서열에서 상이하지만, 수렴 진화 (convergent evolution)로 인하여 유사한 구조를 공유할 수 있다. 가령, 두 효소는 이들 효소가 기질의 산물로의 전환의 동일한 반응을 촉진하고 서열에서 무관하면, 이들 두 효소가 구조에서 관련되는지에 상관없이, 상사체이거나 상사하다.

[0103] 감소된 부산물 축적을 갖는 재조합 미생물

[0104] 효모 세포는 당을 전환시켜 피루베이트를 생산하고, 이것은 이후, 세포 물질대사의 다수의 경로에서 이용된다. 근년에, 효모 세포는 피루베이트-주동된 생합성 경로를 거쳐 다수의 바람직한 산물을 생산하기 위해 조작되고 있다. 이들 생합성 경로 중에서 다수에서, 최초 경로 단계는 내생성 피루베이트의 3-케토산으로의 전환이다.

[0105] 본 명세서에서, "3-케토산"은 C1 탄소 상에서 카르복실산 모이어티 (moiety) 및 C3 탄소 상에서 케톤 모이어티를 내포하는 유기 화합물을 지칭한다. 가령, 아세토락테이트 및 2-히드록시-2-메틸-3-옥소부탄산은 C3 탄소에서 케톤 기를 갖는 3-케토산이다 (예로써, 도 2 참조).

[0106] 많은 생합성 경로에 공통적인 3-케토산의 실례는 아세토락테이트인데, 이것은 효소 아세토락테이트 신타아제 (일명, 아세토히드록시산 신타아제)의 작용에 의해 피루베이트로부터 형성된다. 아세토락테이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로 중에는 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 그리고 조효소 A의 생산을 위한 경로가 포함된다. 이들 유익한 아세토락테이트-유래된 대사산물의 합성을 위한 조작된 생합성 경로는 표 1 및 도 18에서 제시된다.

표 1

[0107] 아세토락테이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로

생합성 경로	*참고문헌*[a]
이소부탄올	US 2009/0226991 (Feldman *et al.*), US 2011/0020889 (Feldman *et al.*), 그리고 US 2010/0143997 (Buelter *et al.*)
1-부탄올	WO/2010/017230 (Lynch), WO/2010/031772 (Wu *et al.*), 그리고 KR2011002130 (Lee *et al.*)
2-부탄올	WO/2007/130518 (Donaldson *et al.*), WO/2007/130521 (Donaldson *et al.*), 그리고 WO/2009/134276 (Donaldson *et al.*)
2-부타논	WO/2007/130518 (Donaldson *et al.*), WO/2007/130521 (Donaldson *et al.*), 그리고 WO/2009/134276 (Donaldson *et al.*)
2-3-부탄디올	WO/2007/130518 (Donaldson *et al.*), WO/2007/130521 (Donaldson *et al.*), 그리고 WO/2009/134276 (Donaldson *et al.*)
아세토인	WO/2007/130518 (Donaldson *et al.*), WO/2007/130521 (Donaldson *et al.*), 그리고 WO/2009/134276 (Donaldson *et al.*)

디아세틸	Gonzalez *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem* 275: 35876-85 및 Ehsani *et al.*, 2009, *App. Environ. Micro.* 75: 3196-205
발린	WO/2001/021772 (Yocum *et al.*) 및 McCourt *et al.*, 2006, *Amino Acids* 31: 173-210
류신	WO/2001/021772 (Yocum *et al.*) 및 McCourt *et al.*, 2006, *Amino Acids* 31: 173-210
판토텐산	WO/2001/021772 (Yocum *et al.*)
3-메틸-1-부탄올	WO/2008/098227 (Liao *et al.*), Atsumi *et al.*, 2008, *Nature* 451: 86-89, 그리고 Connor *et al.*, 2008, *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5769-5775
4-메틸-1-펜탄올	WO/2010/045629 (Liao *et al.*), Zhang *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20653-20658
조효소 A	WO/2001/021772 (Yocum *et al.*)

[0108] [a] - 본 표에서 각 참고문헌의 내용은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0109] 표 1에 열거된 각 생합성 경로는 공통의 3-케토산 중간물질, 아세토락테이트를 공유한다. 이런 이유로, 이들 생합성 경로로부터 산물 수율은 상기 생합성 경로의 하류 효소에 가용한 아세토락테이트의 양에 부분적으로 의존할 것이다.

[0110] 많은 생합성 경로에 공통적인 3-케토산의 다른 실례는 2-아세토-2-히드록시부티레이트인데, 이것은 효소 아세토락테이트 신타아제 (일명, 아세토히드록시산 신타아제)의 작용에 의해 피루베이트 및 2-케토부티레이트로부터 형성된다. 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로 중에는 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생산을 위한 경로가 포함된다. 이들 유익한 2-아세토-2-히드록시부티레이트-유래된 대사산물의 합성을 위한 조작된 생합성 경로는 표 2 및 도 19에서 제시된다.

표 2

[0111] 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로

생합성 경로	***참고문헌***[a]
2-메틸-1-부탄올	WO/2008/098227 (Liao *et al.*), WO/2009/076480 (Picataggio *et al.*), 그리고 Atsumi *et al.*, 2008, *Nature* 451: 86-89
이소류신	McCourt *et al.*, 2006, *Amino Acids* 31: 173-210
3-메틸-1-펜탄올	WO/2010/045629 (Liao *et al.*), Zhang *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20653-20658
4-메틸-1-헥산올	W WO/2010/045629 (Liao *et al.*), Zhang *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20653-20658
5-메틸-1-헵탄올	WO/2010/045629 (Liao *et al.*), Zhang *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20653-20658

[0112] [a] - 본 표에서 각 참고문헌의 내용은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0113] 표 2에 열거된 각 생합성 경로는 공통의 3-케토산 중간물질, 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 공유한다. 이런 이유로 이들 생합성 경로로부터 산물 수율은 상기 생합성 경로의 하류 효소에 가용한 아세토락테이트의 양에 부분적으로 의존할 것이다.

[0114] 유사하게, 효모 세포는 알데히드를 경로 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 거쳐 다수의 바람직한 산물을 생산하기 위해 조작될 수 있다. 알데히드 중간물질을 포함하는 조작된 생합성 경로에는 이소부탄올, 1-부탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 1-프로판올, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생산을 위한 생합성 경로가 포함된다 (표 3 및 도 18, 19, 그리고 20 참조).

표 3

[0115] 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로

생합성 경로	*알데히드 중간물질*	*참고문헌*[a]
이소부탄올	이소부티르알데히드	US 2009/0226991 (Feldman *et al.*), US 2011/0020889 (Feldman *et al.*), 그리고 US 2010/0143997 (Buelter *et al.*)
1-부탄올	1-부타날	WO/2010/017230 (Lynch), WO/2010/031772 (Wu *et al.*), WO/2010/045629 (Liao *et al.*), WO/2007/041269 (Donaldson *et al.*), WO/2008/052991 (Raamsdonk *et al.*), WO/2008/143704 (Buelter *et al.*), 그리고 WO/2008/080124 (Gunawardena *et al.*)
2-메틸-1-부탄올	2-메틸-1-부타날	WO/2008/098227 (Liao *et al.*), WO/2009/076480 (Picataggio *et al.*), 그리고 Atsumi *et al.*, 2008, *Nature* 451: 86-89
3-메틸-1-부탄올	3-메틸-1-부타날	WO/2008/098227 (Liao *et al.*), Atsumi *et al.*, 2008, *Nature* 451: 86-89, 그리고 Connor *et al.*, 2008, *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5769-5775
1-프로판올	1-프로파날	WO/2008/098227 (Liao *et al.*)
1-펜탄올	1-펜타날	WO/2010/045629 (Liao *et al.*), Zhang *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20653-20658
1-헥산올	1-헥사날	WO/2010/045629 (Liao *et al.*), Zhang *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20653-20658
3-메틸-1-펜탄올	3-메틸-1-펜타날	WO/2010/045629 (Liao *et al.*), Zhang *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20653-20658
4-메틸-1-펜탄올	4-메틸-1-펜타날	WO/2010/045629 (Liao *et al.*), Zhang *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20653-20658
4-메틸-1-헥산올	4-메틸-1-헥사날	WO/2010/045629 (Liao *et al.*), Zhang *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20653-20658
5-메틸-1-헵탄올	5-메틸-1-헵타날	WO/2010/045629 (Liao *et al.*), Zhang *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20653-20658

[0116] [a] - 본 표에서 각 참고문헌의 내용은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0117] 표 3에 열거된 각 생합성 경로는 알데히드 중간물질을 갖는다. 가령, 이소부탄올 생산 대사 경로에서 알데히드 중간물질은 이소부티르알데히드이고 (도 1 참조), 반면 1-부탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 1-프로판올, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생산을 위한 경로는 각각, 1-부타날, 2-메틸-1-부타날, 3-메틸-1-부타날, 1-프로파날, 1-펜타날, 1-헥사날, 3-메틸-1-펜타날, 4-메틸-1-펜타날, 4-메틸-1-헥사날, 그리고 5-메틸-1-헵탄올을 알데히드 중간물질로서 이용한다. 이런 이유로, 이들 알데히드 중간물질을 이용하는 생합성 경로에서 산물 수율은 상기 생합성 경로의 하류 효소에 가용한 알데히드 중간물질의 양에 부분적으로 의존할 것이다.

[0118] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 3-케토산 및/또는 알데히드 중간물질로부터 유래된 원치 않는 부산물의 축적을 담당하는 효소적 활성을 발견하였다. 구체적으로, 이들은 3-케토산 환원효소 및 알데히드 탈수소효소가 각각, 3-케토산 및 알데히드의 원치 않는 부산물로의 전환을 책임진다는 것을 확정하였다. 이들 효소의 활성은 표 1-3에 열거된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 3-케토산- 및/또는 알데히드-유래된 산물의 최적 생산성과 수율을 방해하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자들은 이들 새로 특징화된 효소적 활성을 억제하면, 원치 않는 부산물의 형성이 상당히 감소되거나 제거되고, 그리고 유익한 대사산물의 수율과 역가가 부수적으로 향상된다는 것을 발견하였다.

[0119] 3-케토산으로부터 3-히드록시산의 감소된 축적

[0120] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 원치 않는 부산물, 3-히드록시산이 3-케토산 중간물질을 수반하는 경로를 포함하는 미생물로 발효 반응 동안 축적될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0121] 본 명세서에서, "3-히드록시산"은 C1 탄소 상에서 카르복실산 모이어티 및 C3 탄소 탄소 상에서 알코올 모이어티를 내포하는 유기 화합물이다. 3-히드록시산은 3-케토산 케톤 모이어티의 알코올 모이어티로의 화학적 환원에 의해 3-케토산으로부터 획득될 수 있다. 가령, 아세토락테이트 또는 2-히드록시-2-메틸-3-옥소부탄산에서 케톤 모이어티의 환원은 3-히드록시산 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)의 형성을 유발한다 (예로써, 도 2 참

조).

[0122] 본 발명자들은 3-히드록시산 부산물, 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (CAS # 14868-24-7) (DH2MB)이 3-케토산 중간물질, 아세토락테이트를 수반하는 생합성 경로를 포함하는 미생물로 발효 반응 동안 축적된다는 것을 발견하였다. 이러한 부산물의 축적은 생합성 경로의 표적 대사산물의 최적 생산성과 수율을 방해하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자들은 DH2MB의 생산이 아세토락테이트의 환원에 의해 유발된다는 것을 발견하였다. DH2MB의 생산을 책임지는 활성을 감소시키거나 제거하기 위해, 이러한 반응을 촉진하는 상응하는 효소적 활성이 확인되고 감소되거나 제거되어야 했다. 본 발명자들은 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 이와 같은 한 가지 효소가 YMR226C (일명, *TMA29*)라는 것을 발견하였다. 이것은 효모에서, 아세토락테이트를 DH2MB로 전환시키는 단백질을 최초로 보고한다.

[0123] 본 발명자들은 또한, 3-히드록시산 부산물, 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트가 3-케토산 중간물질, 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 수반하는 생합성 경로를 포함하는 미생물로 발효 반응 동안 축적된다는 것을 발견하였다. 이러한 부산물의 축적은 생합성 경로의 표적 대사산물의 최적 생산성과 수율을 방해하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자들은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트의 생산이 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 감소에 의해 유발된다는 것을 발견하였다. 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트의 생산을 책임지는 활성을 감소시키거나 제거하기 위해, 이러한 반응을 촉진하는 상응하는 효소적 활성이 확인되고 감소되거나 제거되어야 했다. 본 발명자들은 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소 YMR226C (일명, *TMA29*)가 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환 역시 촉진한다는 것을 발견하였다. 이것은 효모에서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로 전환시키는 단백질을 최초로 보고한다.

[0124] 본 발명자들은 본 명세서에서, 바람직한 대사산물의 수율에서 증가를 동반하는 과정인, 3-케토산 중간물질의 상응하는 3-히드록시산 부산물로의 전환을 감소시키기 위한 복수 전략을 기술한다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이고, 그리고 상응하는 3-히드록시산은 DH2MB이다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 감소시키는 것은 아세토락테이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로로부터 유래되는 유익한 대사산물, 예를 들면, 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 그리고 조효소 A의 증가된 생산을 가능하게 한다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이고, 그리고 상응하는 3-히드록시산은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트이다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트로의 전환을 감소시키는 것은 유익한 대사산물, 예를 들면, 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 증가된 생산을 가능하게 한다.

[0125] 따라서 본 발명의 한 측면은 3-케토산을 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이고, 그리고 3-히드록시산 부산물은 DH2MB이다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이고, 그리고 3-히드록시산 부산물은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트이다.

[0126] 다른 측면에서, 본 발명은 3-케토산을 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이고, 그리고 3-히드록시산 부산물은 DH2MB이다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이고, 그리고 3-히드록시산 부산물은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트이다.

[0127] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 단백질은 케토환원효소이다. 예시적인 구체예에서, 케토환원효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 본 명세서에서, 용어 "3-케토산 환원효소"는 3-케토산의 3-옥소 기를 향하여 활동성인 케토환원효소 (즉, 케톤 환원효소)를 지칭한다. 3-케토산 환원효소에 의해 촉진될 수 있는 예시적인 반응의 도해는 도 2에 도시된다. 적절한 3-케토산 환원효소는 일반적으로, 효소 분류 하위집단 1.1.1.X에서 확인되는데, 여기서 마지막 자리 숫자 X는 기질에 좌우된다. 예시적인 3-케토산 환원효소의 무제한적 목록 및 이들의 상응하는 효소 분류 번호는 도 3에 도시된다.

[0128] 예시적인 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 본 명세서에서 "TMA29"와 교체가능하게 이용되는 사카로미세스 세레

비지에(*S. cerevisiae*) YMR226C (서열 번호: 1) 단백질이다. 일부 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) YMR226C (서열 번호: 1) 단백질 또는 이의 동족체 또는 변이체이다. 한 구체예에서, 동족체는 반더왈톰지마 폴리스포라(*Vanderwaltomzyma polyspora*) (서열 번호: 2), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 3), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 4), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 5), 지고사카로미세스 로욱시(*Zygosaccharomyces rouxii*) (서열 번호: 6), 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) (서열 번호: 7), 아시비아 고시피(*Ashbya gossypii*) (서열 번호: 8), 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*) (서열 번호: 9), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 10), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 11), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*) (서열 번호: 12), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*) (서열 번호: 13), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 14), 칸디다 두블리니엔시스(*Candida dubliniensis*) (서열 번호: 15), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) (서열 번호: 16), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (서열 번호: 17), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) (서열 번호: 18), 아스페르길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) (서열 번호: 19), 아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*) (서열 번호: 20), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) (서열 번호: 21), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 22), 그리고 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 23)로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0129] 한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자에서 돌연변이를 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 3-케토산 환원효소 활성의 감소를 유발한다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산 환원효소 유전자를 인코딩하는 유전자의 부분적인 결실을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 3-케토산 환원효소 활성의 감소를 유발한다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 유전자의 완전한 결실을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 3-케토산 환원효소 활성의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 유전자와 연관된 조절 영역의 변형을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 발현의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 전사 조절자의 변형을 포함하고, 이것은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 유전자의 전사의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 3-케토산 환원효소를 인코딩하는 모든 유전자에서 돌연변이를 포함하고, 이것은 상기 유전자(들)에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 활성의 감소를 유발한다. 한 구체예에서, 상기 3-케토산 환원효소 유전자는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29* (YMR226C) 유전자 또는 이의 동족체이다. 당분야에서 이해되는 바와 같이, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 이외의 효모에서 *TMA29*의 자연 발생 동족체는 본 발명의 방법을 이용하여 유사하게 비활성화될 수 있다. *TMA29* 동족체 및 이런 *TMA29* 동족체를 확인하는 방법은 본 명세서에서 기술된다.

[0130] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 조절된 프로모터의 이용, 약한 구조성 프로모터의 이용, 이배체 효모에서 유전자의 2개 사본 중에서 하나의 파괴, 이배체 효모에서 유전자의 2개 사본 모두의 파괴, 안티센스 핵산의 발현, siRNA의 발현, 내인성 프로모터의 부정적 조절자의 과다발현, 내인성 또는 이종기원성 유전자의 활성의 변경, 더욱 낮은 비활성을 갖는 이종기원성 유전자의 이용 등 또는 이들의 조합이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 3-케토산 환원효소와 같은 단백질의 활성을 감소시키거나 파괴하는데 이용가능한 몇몇 추가의 기전이 존재한다.

[0131] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 본 발명의 재조합 미생물은 변형되지 않은 부모 미생물보다 더욱 적은 3-히드록시산 부산물을 생산하도록 조작된다. 한 구체예에서, 재조합 미생물은 대략 20 퍼센트 이하의 탄소 수율에서 탄소 공급원으로부터 3-히드록시산 부산물을 생산한다. 다른 구체예에서, 미생물은 대략 10 이하, 대략 5 이하, 대략 2 이하, 대략 1 이하, 대략 0.5 이하, 대략 0.1 이하, 또는 대략 0.01 퍼센트 이하의 탄소 수율에서 탄소 공급원으로부터 3-히드록시산 부산물을 생산한다. 한 구체예에서, 3-히드록시산 부산물은 3-케토산, 아세토락테이트로부터 유래된 DH2MB이다. 다른 구체예에서, 3-히드록시산 부산물은 3-케토산, 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 유래된 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트이다.

[0132] 한 구체예에서, 3-케토산으로부터 유래된 3-히드록시산 부산물 탄소 수율은 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 결실을 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 재조합 미생물에서 적어도 대략 50% 감소된다. 다른 구체예에서, 3-케토산으로부터 유래된 3-히드록시산 부산물은 3-케토산의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 결실을 포함하지 않는 부모 미생물과

비교하여 적어도 대략 60%, 적어도 대략 65%, 적어도 대략 70%, 적어도 대략 75%, 적어도 대략 80%, 적어도 대략 85%, 적어도 대략 90%, 적어도 대략 95%, 적어도 대략 99%, 적어도 대략 99.9%, 또는 적어도 대략 100% 감소된다. 한 구체예에서, 3-히드록시산 부산물은 3-케토산, 아세토락테이트로부터 유래된 DH2MB이다. 다른 구체예에서, 3-히드록시산 부산물은 3-케토산, 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 유래된 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트이다.

[0133] 추가의 구체예에서, 바람직한 발효 산물의 수율은 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 제거를 포함하는 재조합 미생물에서 증가된다. 한 구체예에서, 바람직한 발효 산물의 수율은 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 1% 증가된다. 다른 구체예에서, 바람직한 발효 산물의 수율은 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 5%, 적어도 대략 10%, 적어도 대략 25%, 또는 적어도 대략 50% 증가된다. 한 구체예에서, 3-히드록시산 부산물은 3-케토산, 아세토락테이트로부터 유래된 DH2MB이다. 따라서 한 구체예에서, 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 그리고 조효소 A가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 바람직한 발효 산물은 아세토락테이트가 중간물질로서 기능하는 임의의 생합성 경로로부터 유래된다. 다른 구체예에서, 3-히드록시산 부산물은 3-케토산, 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 유래된 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트이다. 따라서 다른 구체예에서, 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 바람직한 발효 산물은 2-아세토-2-히드록시부티레이트가 중간물질로서 기능하는 임의의 생합성 경로로부터 유래된다.

[0134] 진전된 구체예에서, 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 잠재적으로 촉진하는 추가의 효소는 3-케토산을 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물의 유전체로부터 결실된다. 3-케토산 중간물질을 3-히드록시산 부산물로 전환시키는 잠재력을 갖는 내생성 효모 유전자에는 케토환원효소, 짧은 사슬 알코올 탈수소효소, 중간 사슬 알코올 탈수소효소, 알도오스 환원효소 패밀리의 구성원, D-히드록시산 탈수소효소 패밀리의 구성원, 알코올 탈수소효소, 그리고 락테이트 탈수소효소가 포함된다. 한 구체예에서, 3-히드록시산 부산물은 3-케토산, 아세토락테이트로부터 유래된 DH2MB이다. 다른 구체예에서, 3-히드록시산 부산물은 3-케토산, 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 유래된 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트이다.

[0135] 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 추가의 효소를 확인하는 방법은 하기와 같이 개설된다:

[0136] 케토환원효소, 짧은 사슬 알코올 탈수소효소, 중간 사슬 알코올 탈수소효소, 알도오스 환원효소 패밀리의 구성원, D-히드록시산 탈수소효소 패밀리의 구성원, 알코올 탈수소효소, 그리고 락테이트 탈수소효소를 코딩하는 내생성 효모 유전자는 3-케토산 (가령, 아세토락테이트 또는 2-아세토-2-히드록시부티레이트)이 중간물질인 생합성 경로를 포함하는 효모 균주의 유전체로부터 결실된다. 이들 결실 균주는 상응하는 3-히드록시산 부산물 (가령, 아세토락테이트 및 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 각각 유래된 DH2MB 또는 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트)의 존재와 농도에 대해 발효액의 발효와 분석에 의해 부모 균주와 비교된다. 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서, 3-히드록시산 부산물의 생산을 감소시키는 결실은 복수 결실을 보유하는 균주의 작제에 의해 합동된다. 후보 유전자에는 YAL060W, YJR159W, YGL157W, YBL114W, YOR120W, YKL055C, YBR159W, YBR149W, YDL168W, YDR368W, YLR426W, YCR107W, YILL24W, YML054C, YOL151W, YMR318c, YBR046C, YHR104W, YIR036C, YDL174C, YDR541C, YBR145W, YGL039W, YCR105W, YDL124W, YIR035C, YFL056C, YNL274c, YLR255C, YGL185C, YGL256W, YJR096W, YJR155W, YPL275W, YOR388C, YLR070C, YMR083W, YER081W, YJR139C, YDL243C, YPL113C, YOL165C, YML086C, YMR303C, YDL246C, YLR070C, YHR063C, YNL331C, YFL057C, YIL155C, YOL086C, YAL061W, YDR127W, YPR127W, YCL018W, YIL074C, YIL124W, 그리고 YEL071W가 포함될 수 있지만 이들에 국한되지 않는다. 이들 결실 균주 중에서 다수는 상업적으로 구입가능하다 (가령, Open Biosystems YSC1054). 이들 결실 균주는 ALS 유전자 (가령, 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*) alsS)가 *CUP1* 프로모터의 제어 하에 발현되는 플라스미드 pGV2435로 형질전환된다. 형질전환체 (transformant)는 교반 배양기 내에서 48시간 동안 30℃, 75 rpm에서 교반 플라스크에서 150 g/ℓ 글루코오스를 내포하는 YPD 배지에서 배양된다. 48시간후, 교반 플라스크로부터 샘플은 3-히드록시산 부산물 (가령, 아세토락테이트 및 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 각각 유래된 DH2MB 및 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트)의 농도에 대해 HPLC에 의해 분석된다. 당분야에서 이해되는 바와 같이, 사카

로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 이외의 효모에서 3-케토산 환원효소 유전자 (*가령, TMA29*)의 자연 발생 동족체는 유사하게 비활성화될 수 있다. 3-케토산 환원효소 유전자 (가령, *TMA29*) 동족체 및 이런 3-케토산 환원효소 유전자 동족체를 확인하는 방법은 본 명세서에서 기술된다.

[0137] 결실 라이브러리를 스크리닝하는 다른 방법은 효모 세포를 3-케토산 중간물질 (가령, 아세토락테이트 또는 2-아세토-2-히드록시부티레이트)과 함께 배양하고, 그리고 상응하는 3-히드록시산 부산물 (가령, 아세토락테이트 및 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 각각 유래된, DH2MB 또는 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트)의 생산에 대해 배양액을 분석하는 것이다.

[0138] 열거된 유전자 중에서 일부는 탠덤 복제 또는 전체 유전체 복제 사건의 결과이고, 그리고 유사한 기질 특이성을 가질 것으로 예상된다. 실례는 YAL061W (BDH1), 그리고 YAL060W (BDH2), YDR368W (YPR1) 및 YOR120W (GCY1)이다. 복제된 유전자 중에서 단지 하나의 결실은 표현형을 유발하지 않을 것으로 생각된다. 이들 유전자 쌍은 양쪽 유전자에서 결실을 보유하는 균주에서 분석되어야 한다.

[0139] 3-히드록시산 부산물 (가령, 아세토락테이트 및 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 각각 유래된 DH2MB 또는 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트)의 생산을 책임지는 추가의 내인성 활성을 찾기 위한 대안적 접근법은 이러한 3-히드록시산 부산물의 생산을 책임지는 효소를 인코딩하는 것으로 의심되는 유전자를 과다발현하는 효모 균주를 분석하는 것이다. 이런 균주는 앞서 열거된 다수의 후보 유전자 (가령, Open Biosystems YSC3870)에 대해 상업적으로 구입가능하다. ORF 과다발현 균주는 결실 균주에서와 동일한 방식으로 처리된다. 이들은 ALS 발현을 위해 플라스미드로 형질전환되고 3-히드록시산 부산물 (가령, DH2MB 또는 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트) 생산 수준에 대해 스크리닝되었다. 3-히드록시산 부산물 (가령, DH2MB 또는 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트)의 생산을 유발하는 가능한 유전자의 목록을 좁히기 위해, 이들의 발현은 발효 샘플에서 분석될 수 있다. 3-히드록시산 부산물 (가령, DH2MB 또는 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트)을 생산하는 발효 동안 발현되지 않는 유전자는 가능한 표적의 목록으로부터 배제될 수 있다. 이러한 분석은 발효조 샘플로부터 RNA의 추출 및 이들 샘플을 예로써, Roche NimbleGen에 의한 전체 유전체 발현 분석에 종속시킴에 의해 수행될 수 있다.

[0140] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 낮은 수준의 하나 또는 그 이상의 3-히드록시산 부산물을 자연적으로 생산하는 균주는 3-케토산 중간물질을 포함하는 생합성 경로로부터 유래되는, 증가된 수준의 바람직한 발효 산물을 생산하는 데에도 적용가능성 (applicability)을 가질 수 있다. 본 발명이 속하는 분야의 평균적 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 낮은 수준의 하나 또는 그 이상의 3-히드록시산 부산물을 자연적으로 생산하는 균주는 본질적으로 낮거나 검출되지 않는 수준의 내생성 효소 활성을 나타내고 3-케토산의 3-히드록시산으로의 감소된 전환을 유발하는데, 이러한 속성은 바람직한 발효 산물, 예를 들면, 이소부탄올의 생산에 유리하다. 3-케토산 환원효소 활성이 실질적으로 없는 선천성 숙주 미생물을 확인하기 위한 몇몇 접근법이 본 명세서에서 기술된다. 가령, 3-히드록시산 부산물 (가령, DH2MB 또는 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트)의 생산을 책임지는, 본질적으로 낮거나 검출되지 않는 내생성 효소 활성을 나타내는 숙주 미생물을 찾는 한 가지 접근법은 효모 세포를 3-케토산 (가령, 아세토락테이트 또는 2-아세토-2-히드록시부티레이트)과 함께 배양함으로써 효모 균주를 분석하고, 그리고 상응하는 3-히드록시산 부산물 (가령, 아세토락테이트 및 2-아세토-2-히드록시부티레이트로부터 각각 유래된 DH2MB 또는 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트)의 생산에 대해 배양액을 분석하는 것이다.

[0141] 3-케토산을 중간물질로서 이용하는 생합성 경로로부터 유래된 유익한 대사산물을 생산하는 본 명세서에서 기술된 재조합 미생물은 피루베이트의 3-케토산 (가령, 아세토락테이트 및/또는 2-아세토-2-히드록시부티레이트) 이외의 산물로의 전환을 위한 효소적 활성이 감소되거나 제거되도록 더욱 조작될 수 있다. 한 구체예에서, 피루베이트 탈카르복실화효소 (PDC), 락테이트 탈수소효소 (LDH), 피루베이트 산화효소, 피루베이트 탈수소효소, 및/또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD)의 효소적 활성이 감소되거나 제거된다.

[0142] 특정 구체예에서, 유익한 대사산물은 아세토락테이트 신타아제 (ALS) 유전자를 과다발현하는 재조합 PDC-마이너스 GPD-마이너스 효모 미생물에서 생산된다. 다른 특정 구체예에서, ALS는 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*) *als*S에 의해 인코딩된다.

[0143] 알데히드 중간물질로부터 산성 부산물의 감소된 축적

[0144] 실시예에서 더욱 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 또한, 원치 않는 산성 부산물 (가령, 이소부탄올의 경우에 이소부티레이트)이 알데히드 중간물질 (가령, 이소부탄올의 경우에 이소부티르알데히드)을 수반하는 경로를 포함하는 미생물로 발효 반응 동안 축적될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0145] 본 명세서에서, "산성 부산물"은 카르복실산 모이어티를 내포하는 유기 화합물을 지칭한다. 산성 부산물은 알데히드의 산화에 의해 획득될 수 있다. 가령, 이소부티르알데히드의 산화는 이소부티르산의 형성을 유발한다 (예로써, 도 4 참조).

[0146] 본 발명자들은 이들 산성 부산물의 축적이 알데히드 중간물질을 이용하는 생합성 경로의 최적 생산성과 수율을 방해한다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 이들 산성 부산물의 생산이 상응하는 알데히드의 탈수소화에 의해 유발된다는 것을 발견하였다. 산성 부산물의 생산을 책임지는 활성을 감소시키거나 제거하기 위해, 이러한 반응을 촉진하는 상응하는 효소적 활성은 확인되고 감소되거나 제거되어야 했다. 본 발명자들은 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 이와 같은 한 가지 효소가 알데히드 탈수소효소라는 것을 발견하였다.

[0147] 본 발명자들은 본 명세서에서, 바람직한 대사산물, 예를 들면, 이소부탄올, 1-부탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 1-프로판올, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 수율에서 증가를 동반하는 과정인, 산성 부산물 형성을 감소시키기 위한 복수 전략을 기술한다.

[0148] 따라서 본 발명의 한 측면은 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없다.

[0149] 다른 측면에서, 본 발명은 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다.

[0150] 한 구체예에서, 알데히드 중간물질은 이소부티르알데히드이고, 그리고 산성 부산물은 이소부티레이트이다. 다른 구체예에서, 알데히드 중간물질은 1-부타날이고, 그리고 산성 부산물은 부티레이트이다. 또 다른 구체예에서, 알데히드 중간물질은 2-메틸-1-부타날이고, 그리고 산성 부산물은 2-메틸-1-부티레이트이다. 또 다른 구체예에서, 알데히드 중간물질은 3-메틸-1-부타날이고, 그리고 산성 부산물은 3-메틸-1-부티레이트이다. 또 다른 구체예에서, 알데히드 중간물질은 1-프로파날이고, 그리고 산성 부산물은 프로피오네이트이다. 또 다른 구체예에서, 알데히드 중간물질은 1-펜타날이고, 그리고 산성 부산물은 펜타노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 알데히드 중간물질은 1-헥사날이고, 그리고 산성 부산물은 헥사노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 알데히드 중간물질은 3-메틸-1-펜타날이고, 그리고 산성 부산물은 3-메틸-1-펜타노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 알데히드 중간물질은 4-메틸-1-펜타날이고, 그리고 산성 부산물은 4-메틸-1-펜타노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 알데히드 중간물질은 4-메틸-1-헥사날이고, 그리고 산성 부산물은 4-메틸-1-헥사노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 알데히드 중간물질은 5-메틸-1-헵타날이고, 그리고 산성 부산물은 5-메틸-1-헵타노에이트이다.

[0151] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 단백질은 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다.

[0152] 본 명세서에서, 용어 "알데히드 탈수소효소"는 하기 반응을 촉진하는 효소를 지칭한다:

[0153] 알데히드 + 산화된 보조인자 + H_2O = 산 + 환원된 보조인자 + H^+

[0154] 알데히드 탈수소효소에 의해 촉진될 수 있는 예시적인 반응의 도해는 도 4에 도시된다. 적절한 알데히드 탈수소효소는 일반적으로, 효소 분류 하위집단 EC 1.2.1.X에서 확인되는데, 여기서 마지막 자리 숫자 X는 기질 또는 보조인자에 좌우된다. 가령, EC 1.2.1.3은 하기 반응을 촉진한다: 알데히드 + NAD^+ + H_2O = 산 + NADH + H^+); EC 1.2.1.4는 하기 반응을 촉진한다: 알데히드 + $NADP^+$ + H_2O = 산 + NADPH + H^+); 그리고 EC1.2.1.5는 하기 반응을 촉진한다: 알데히드 + $NAD(P)^+$ + H_2O = 산 + NAD(P)H + H^+.

[0155] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 단백질은 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다. 한 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 *ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6*, 그리고 *HFD1*, 그리고 이들의 동족체와 변이체로 구성된 군에서 선택되는 유전자에 의해 인코딩된다. 예시적인 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 알데히드 탈수소효소 ALD6 (서열 번호: 25) 또는 이의 동족체 또는 변이체이다. 한 구체예에서, 동족체는 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 26), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 27), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces*

bayanus) (서열 번호: 28), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) (서열 번호: 29), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 30), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 31), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) YJ789 (서열 번호: 32), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) JAY291 (서열 번호: 33), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) EC1118 (서열 번호: 34), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) DBY939 (서열 번호: 35), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) AWRI1631 (서열 번호: 36), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) RM11-1a (서열 번호: 37), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 38), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 39), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 40), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 41)로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0156] 한 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자에서 돌연변이를 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 알데히드 탈수소효소 활성의 감소를 유발한다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 유전자의 부분적인 결실을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 알데히드 탈수소효소 활성의 감소를 유발한다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 유전자의 완전한 결실을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 알데히드 탈수소효소 활성의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 유전자와 연관된 조절 영역의 변형을 포함하고, 이것은 상기 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 발현의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 전사 조절자의 변형을 포함하고, 이것은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 유전자의 전사의 감소를 유발한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 알데히드 탈수소효소를 인코딩하는 모든 유전자에서 돌연변이를 포함하고, 이것은 상기 유전자(들)에 의해 인코딩된 폴리펩티드의 활성의 감소를 유발한다. 한 구체예에서, 상기 알데히드 탈수소효소는 *ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6*, 그리고 *HFD1*, 그리고 이들의 동족체와 변이체로 구성된 군에서 선택되는 유전자에 의해 인코딩된다. 당분야에서 이해되는 바와 같이, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 이외의 효모에서 알데히드 탈수소효소의 자연 발생 동족체는 본 발명의 방법을 이용하여 유사하게 비활성화될 수 있다. 알데히드 탈수소효소 동족체 및 이런 알데히드 탈수소효소 동족체를 확인하는 방법은 본 명세서에서 기술된다.

[0157] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 조절된 프로모터의 이용, 약한 구조성 프로모터의 이용, 이배체 효모에서 유전자의 2개 사본 중에서 하나의 파괴, 이배체 효모에서 유전자의 2개 사본 모두의 파괴, 안티센스 핵산의 발현, siRNA의 발현, 내인성 프로모터의 부정적 조절자의 과다발현, 내인성 또는 이종기원성 유전자의 활성의 변경, 더욱 낮은 비활성을 갖는 이종기원성 유전자의 이용 등 또는 이들의 조합이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 알데히드 탈수소효소와 같은 단백질의 활성을 감소시키거나 파괴하는데 이용가능한 몇몇 추가의 기전이 존재한다.

[0158] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 하나 이상의 알데히드 탈수소효소의 활성 또는 발현이 감소되거나 제거될 수 있다. 특정 구체예에서, *ALD4*와 *ALD6* 또는 이들의 동족체 또는 변이체의 활성 또는 발현이 감소되거나 제거된다. 다른 특정 구체예에서, *ALD5*와 *ALD6* 또는 이들의 동족체 또는 변이체의 활성 또는 발현이 감소되거나 제거된다. 또 다른 특정 구체예에서, *ALD4*, *ALD5*, 그리고 *ALD6* 또는 이들의 동족체 또는 변이체의 활성 또는 발현이 감소되거나 제거된다. 또 다른 특정 구체예에서, 시토졸에 국한된 알데히드 탈수소효소 *ALD2*, *ALD3*, 그리고 *ALD6* 또는 이들의 동족체 또는 변이체의 활성 또는 발현이 감소되거나 제거된다. 또 다른 특정 구체예에서, 미토콘드리아에 국한된 알데히드 탈수소효소 *ALD4*와 *ALD5* 또는 이들의 동족체 또는 변이체의 활성 또는 발현이 감소되거나 제거된다.

[0159] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 본 발명의 재조합 미생물은 변형되지 않은 부모 미생물보다 더욱 적은 산성 부산물을 생산하도록 조작된다. 한 구체예에서, 재조합 미생물은 부모 미생물과 비교하여 대략 50 퍼센트 이하의 탄소 수율에서 탄소 공급원으로부터 산성 부산물을 생산한다. 다른 구체예에서, 미생물은 부모 미생물과 비교하여 대략 25 퍼센트 이하, 대략 10 퍼센트 이하, 대략 5 퍼센트 이하, 대략 1 퍼센트 이하, 대략 0.5 퍼센트 이하, 대략 0.1 퍼센트 이하, 또는 대략 0.01 퍼센트 이하의 탄소 수율에서 탄소 공급원으로부터 산성 부산물을 생산한다. 한 구체예에서, 산성 부산물은 이소부탄올 생합성 경로의 중간물질인 이소부티르알데히드로부터 유래된 이소부티레이트이다. 다른 구체예에서, 산성 부산물은 1-부탄올 생합성 경로의 중간물질인 1-부타날로부터 유래된 부티레이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 2-메틸-1-부탄올 생합성 경로의 중간물질인 2-메틸-1-부타날로부터 유래된 2-메틸-1-부티레이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 3-메틸-1-부탄올 생합성 경로의 중간물질인 3-메틸-1-부타날로부터 유래된 3-메틸-1-부티레이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물

은 1-프로판올 생합성 경로의 중간물질인 1-프로파날로부터 유래되는 프로피오네이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 1-펜탄올 생합성 경로의 중간물질인 1-펜타날로부터 유래된 펜타노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 1-헥산올 생합성 경로의 중간물질인 1-헥사날로부터 유래된 헥사노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 3-메틸-1-펜탄올 생합성 경로의 중간물질인 3-메틸-1-펜타날로부터 유래된 3-메틸-1-펜타노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 4-메틸-1-펜탄올 생합성 경로의 중간물질인 4-메틸-1-펜타날로부터 유래된 4-메틸-1-펜타노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 4-메틸-1-헥산올 생합성 경로의 중간물질인 4-메틸-1-헥사날로부터 유래된 4-메틸-1-헥사노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 5-메틸-1-헵탄올 생합성 경로의 중간물질인 5-메틸-1-헵타날로부터 유래된 5-메틸-1-헵타노에이트이다.

[0160] 한 구체예에서, 상응하는 알데히드로부터 산성 부산물 탄소 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 결실을 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 재조합 미생물에서 적어도 대략 50% 감소된다. 다른 구체예에서, 아세토락테이트로부터 산성 부산물 탄소 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 결실을 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 60%, 적어도 대략 65%, 적어도 대략 70%, 적어도 대략 75%, 적어도 대략 80%, 적어도 대략 85%, 적어도 대략 90%, 적어도 대략 95%, 적어도 대략 99%, 적어도 대략 99.9%, 또는 적어도 대략 100% 감소된다. 한 구체예에서, 산성 부산물은 이소부탄올 생합성 경로의 중간물질인 이소부티르알데히드로부터 유래된 이소부티레이트이다. 다른 구체예에서, 산성 부산물은 1-부탄올 생합성 경로의 중간물질인 1-부타날로부터 유래된 부티레이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 2-메틸-1-부탄올 생합성 경로의 중간물질인 2-메틸-1-부타날로부터 유래된 2-메틸-1-부티레이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 3-메틸-1-부탄올 생합성 경로의 중간물질인 3-메틸-1-부타날로부터 유래된 3-메틸-1-부티레이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 1-프로판올 생합성 경로의 중간물질인 1-프로파날로부터 유래된 프로피오네이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 1-펜탄올 생합성 경로의 중간물질인 1-펜타날로부터 유래된 펜타노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 1-헥산올 생합성 경로의 중간물질인 1-헥사날로부터 유래된 헥사노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 3-메틸-1-펜탄올 생합성 경로의 중간물질인 3-메틸-1-펜타날로부터 유래된 3-메틸-1-펜타노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 4-메틸-1-펜탄올 생합성 경로의 중간물질인 4-메틸-1-펜타날로부터 유래된 4-메틸-1-펜타노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 4-메틸-1-헥산올 생합성 경로의 중간물질인 4-메틸-1-헥사날로부터 유래된 4-메틸-1-헥사노에이트이다. 또 다른 구체예에서, 산성 부산물은 5-메틸-1-헵탄올 생합성 경로의 중간물질인 5-메틸-1-헵타날로부터 유래된 5-메틸-1-헵타노에이트이다.

[0161] 추가의 구체예에서, 바람직한 발효 산물의 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 제거를 포함하는 재조합 미생물에서 증가된다. 한 구체예에서, 바람직한 발효 산물의 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 1% 증가된다. 다른 구체예에서, 바람직한 발효 산물의 수율은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 하나 또는 그 이상의 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 감소 또는 제거를 포함하지 않는 부모 미생물과 비교하여 적어도 대략 5%, 적어도 대략 10%, 적어도 대략 25%, 또는 적어도 대략 50% 증가된다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 바람직한 발효 산물은 이소부탄올, 1-부탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 1-프로판올, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올 생합성 경로가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 알데히드가 중간물질로서 기능하는 임의의 생합성 경로로부터 유래될 수 있다.

[0162] 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 추가의 효소를 확인하는 방법은 하기와 같이 개설된다:

[0163] 추정 알데히드와 알코올 탈수소효소를 코딩하는 내생성 효모 유전자는 효모 균주의 유전체로부터 결실된다. 이들 결실 균주는 효소적 검사법에 의해 부모 균주와 비교된다. 이들 결실 균주 중에서 다수는 상업적으로 구입가능하다 (가령, Open Biosystems YSC1054).

[0164] 결실 라이브러리를 스크리닝하는 다른 방법은 효모 세포를 알데히드 (가령, 이소부티르알데히드 또는 1-부타날)와 함께 배양하고, 그리고 상응하는 산성 부산물 (가령, 이소부티르알데히드 또는 1-부타날로부터 각각 유래된 이소부티레이트 또는 부티레이트)의 생산에 대해 배양액을 분석하는 것이다.

[0165] 산성 부산물 (가령, 이소부티르알데히드 또는 1-부타날로부터 각각 유래된 이소부티레이트 또는 부티레이트)의 생산을 책임지는 추가의 내인성 활성을 찾는 대안적 접근법은 산성 부산물의 생산을 책임지는 효소를 인코딩하

는 것으로 의심되는 유전자를 과다발현하는 효모 균주를 분석하는 것이다. 이런 균주는 앞서 열거된 다수의 후보 유전자에 대해 상업적으로 구입가능하다 (가령, Open Biosystems YSC3870). ORF 과다발현 균주는 증가된 산성 부산물 생산 수준에 대해 스크리닝된다. 대안으로, ORF 과다발현 균주의 세포 용해물은 증가된 알데히드 산화 활성에 대해 분석된다. 산성 부산물의 생산을 유발하는 가능한 유전자의 목록을 좁히기 위해, 이들의 발현은 발효 샘플에서 분석될 수 있다. 산성 부산물을 생산하는 발효 동안 발현되지 않는 유전자는 가능한 표적의 목록으로부터 배제될 수 있다. 이러한 분석은 발효조 샘플로부터 RNA의 추출 및 이들 샘플을 예로써, Roche NimbleGen에 의한 전체 유전체 발현 분석에 종속시킴에 의해 수행될 수 있다.

[0166] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 낮은 수준의 하나 또는 그 이상의 산성 부산물을 자연적으로 생산하는 균주는 알데히드 중간물질을 포함하는 생합성 경로로부터 유래되는, 증가된 수준의 바람직한 발효 산물을 생산하는 데에도 적용가능성 (applicability)을 가질 수 있다. 본 발명이 속하는 분야의 평균적 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 낮은 수준의 하나 또는 그 이상의 산성 부산물을 자연적으로 생산하는 균주는 본질적으로 낮거나 검출되지 않는 수준의 내생성 효소 활성을 나타내고 알데히드의 산성 부산물로의 감소된 전환을 유발하는데, 이러한 속성은 바람직한 발효 산물, 예를 들면, 이소부탄올의 생산에 유리하다. 알데히드 탈수소효소 활성이 실질적으로 없는 선천성 숙주 미생물을 확인하기 위한 몇몇 접근법이 본 명세서에서 기술된다. 가령, 산성 부산물 (가령, 이소부티레이트 또는 부티레이트)의 생산을 책임지는, 본질적으로 낮거나 검출되지 않는 내생성 효소 활성을 나타내는 숙주 미생물을 찾는 한 가지 접근법은 효모 세포를 알데히드 (가령, 이소부티르알데히드 또는 1-부타날)와 함께 배양함으로써 효모 균주를 분석하고, 그리고 상응하는 산성 부산물 (가령, 이소부티르알데히드 또는 1-부타날로부터 각각 유래된 이소부티레이트 또는 부티레이트)의 생산에 대해 배양액을 분석하는 것이다.

[0167] 앞서 기술된 바와 같이, 산성 부산물, 이소부티레이트의 생산을 감소시키는 한 가지 전략은 이소부티르알데히드를 이소부티레이트로 전환시킬 수 있는 효모 내에 존재하는 하나 또는 그 이상의 내생성 알데히드 탈수소효소 단백질의 활성 또는 발현을 감소시키거나 제거하는 것이다.

[0168] 이소부티레이트의 생산을 감소시키는 다른 전략은 하나 또는 그 이상의 내생성 효모 알코올 탈수소효소의 활성 또는 발현의 감소 또는 제거이다. 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7, 그리고 SFA1, 그리고 이들의 동족체 또는 변이체가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 하나 또는 그 이상의 알코올 탈수소효소의 발현을 감소시키거나, 또는 이들을 결실시키는 것은 일반적으로, 이소부티레이트의 감소된 생산 및 이소부탄올 수율에서 부수적 증가를 유발할 것이다. 추가의 탈수소효소의 감소 및/또는 결실이 본 발명에서 계획되고 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 이들 탈수소효소에는 아릴 알코올 탈수소효소, 예를 들면, AAD3, AAD4, AAD6, AAD10, AAD14, AAD15, AAD16, 그리고 YPL088W, 그리고 이들의 동족체 또는 변이체뿐만 아니라 추가의 알코올 탈수소효소, 예를 들면, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) BDH1, BDH2, SOR1, SOR2, XYL1, 그리고 이들의 동족체 또는 변이체가 포함된다.

[0169] 다른 구체예에서, 본 발명에서는 카르보닐/알데히드 환원효소를 인코딩하는 하나 또는 그 이상의 추가의 유전자가 감소되고 및/또는 결실되도록 조작된 재조합 미생물을 제시한다. 이들 카르보닐/알데히드 환원효소에는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ARI1, YPR1, TMA29, YGL039W, 그리고 UGA2, 그리고 이들의 동족체 또는 변이체가 포함된다.

[0170] 부산물 이소부티레이트의 생산을 감소시키기 위한 본 명세서에서 기술된 추가의 전략은 이소부탄올 경로 중간물질 2-케토이소발레레이트로부터 이소부티레이트를 생산할 수 있는 효모 내에 존재하는 내생성 단백질의 활성 또는 발현을 감소시키거나 제거하는 것이다. 이런 효소는 일반적으로, 케토산 탈수소효소 (KDH)로 지칭된다. 이들 내생성 단백질의 활성 또는 발현의 제거 또는 감소는 원치 않는 부산물, 이소부티레이트의 생산을 감소시키거나 제거할 수 있다. KDH 효소 활성은 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 확인되었다 (Dickinson, J. R., and I. W. Dawes, 1992, The catabolism of branched-chain amino acids occurs via a 2-oxoacid dehydeogenase in *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2029-2033). 하나 또는 그 이상의 케토산 탈수소효소 및 이들의 동족체 또는 변이체의 발현을 감소시키거나, 또는 이들을 결실시키는 것은 일반적으로, 이소부티레이트의 감소된 생산 및 이소부탄올 수율에서 부수적인 증가를 유발할 것이다.

[0171] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 및 기타 효모에서 유전자의 발현 감소 또는 결실은 당업자에게 공지된 방법, 예를 들면, 대립형질 대체 또는 교체, 그리고 다른 유전자 또는 마커 카세트 (marker cassette)의 삽입에 의한 유전자 파괴에 의해 달성될 수 있다.

[0172] 부산물 이소부티레이트의 생산을 감소시키기 위한 본 명세서에서 기술된 다른 전략은 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환을 책임지는 알코올 탈수소효소 (ADH)의 활성 및/또는 발현을 증가시키는 것이다. 이러한 전

략은 이소부탄올 경로 중간물질, 이소부티르알데히드에 대한 내생성 효소에 의한 경쟁을 예방한다. 알코올 탈수소효소의 활성 및/또는 발현에서 증가는 다양한 수단에 의해 달성될 수 있다. 가령, 알코올 탈수소효소 활성은 증가된 프로모터 세기를 갖는 프로모터를 이용함으로써, 알코올 탈수소효소 유전자의 사본 수를 증가시킴으로써, 또는 증가된 비활성을 갖는 대안적 또는 변형된 알코올 탈수소효소를 이용함으로써 증가될 수 있다.

[0173] 부산물 이소부티레이트의 생산을 감소시키기 위한 본 명세서에서 기술된 대안적 전략은 미카엘리스-멘텐 상수(Michaelis-Menten constant, K_M)에서 감소를 나타내는, 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환을 책임지는 이소부탄올 경로에서 알코올 탈수소효소 (ADH)를 이용하는 것이다. 이러한 전략은 또한, 이소부탄올 경로 중간물질, 이소부티르알데히드에 대한 내생성 효소에 의한 경쟁을 예방한다.

[0174] 부산물 이소부티레이트의 생산을 감소시키기 위한 본 명세서에서 기술된 다른 전략은 증가된 활성 및 미카엘리스-멘텐 상수 (K_M)에서 감수를 나타내는, 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환을 책임지는 이소부탄올 경로에서 알코올 탈수소효소 (ADH)를 이용하는 것이다. 이러한 전략 역시 이소부탄올 경로 중간물질, 이소부티르알데히드에 대한 내생성 효소에 의한 경쟁을 예방한다.

[0175] 게다가, 변형된 ADH 효소를 이용함으로써, 본 발명자들은 정반응 (forward reaction) (즉, 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환)이 역반응 (reverse reaction) (즉, 이소부탄올의 이소부티르알데히드로의 전환)에 비하여 선호되는 반응인 상황을 구축할 수 있다.

[0176] 앞서 기술된 전략은 일반적으로, 이소부티레이트 수율에서 감소를 유발하고, 이것은 이소부탄올 수율에서 증가를 동반한다. 따라서 이들 전략은 이소부티레이트 수율 및/또는 역가를 감소시키고, 그리고 이소부티레이트 수율에 대한 이소부탄올 수율의 비율을 증가시키는데 유용하다.

[0177] 한 구체예에서, 이소부티레이트 수율 (mol 이소부티레이트 / mol 글루코오스)은 대략 5% 이하이다. 다른 구체예에서, 이소부티레이트 수율 (mol 이소부티레이트 / mol 글루코오스)은 대략 1% 이하이다. 또 다른 구체예에서, 이소부티레이트 수율 (mol 이소부티레이트 / mol 글루코오스)은 대략 0.5% 이하, 대략 0.1% 이하, 대략 0.05% 이하, 또는 대략 0.01% 이하이다.

[0178] 한 구체예에서, 이소부탄올 대(對) 이소부티레이트 수율 비율은 적어도 대략 2이다. 다른 구체예에서, 이소부탄올 대(對) 이소부티레이트 수율은 적어도 대략 5이다. 또 다른 구체예에서, 이소부탄올 대(對) 이소부티레이트 수율 비율은 적어도 대략 20, 적어도 대략 100, 적어도 대략 500, 또는 적어도 대략 1000이다.

[0179] 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로로부터 유래된 유익한 대사산물을 생산하는 본 명세서에서 기술된 재조합 미생물은 피루베이트의 3-케토산 (가령, 아세토락테이트 및/또는 2-아세토-2-히드록시부티레이트) 이외의 산물로의 전환을 위한 효소적 활성이 감소되거나 제거되도록 더욱 조작될 수 있다. 한 구체예에서, 피루베이트 탈카르복실화효소 (PDC), 락테이트 탈수소효소 (LDH), 피루베이트 산화효소, 피루베이트 탈수소효소, 및/또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD)의 효소적 활성이 감소되거나 제거된다.

[0180] 특정 구체예에서, 유익한 대사산물은 아세토락테이트 신타아제 (ALS) 유전자를 과다발현하는 재조합 PDC-마이너스 GPD-마이너스 효모 미생물에서 생산된다. 다른 특정 구체예에서, ALS는 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*) *als*S에 의해 인코딩된다.

[0181] <u>3-히드록시산 부산물과 산성 부산물의 감소된 축적</u>

[0182] 본 발명자들은 본 명세서에서, 바람직한 대사산물의 수율에서 증가를 동반하는 과정인 3-케토산 중간물질의 상응하는 3-히드록시산 부산물로의 전환을 감소시키기 위한 복수 전략을 기술한다. 또한, 본 발명자들은 본 명세서에서, 바람직한 대사산물의 수율에서 더욱 증가를 동반하는 과정인 알데히드 중간물질의 상응하는 산성 부산물로의 전환을 감소시키기 위한 복수 전략을 기술한다.

[0183] 따라서 한 측면에서, 본 발명은 3-케토산을 중간물질로서 이용하고 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 (i) 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없고, 그리고 (ii) 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이다. 아세토락테이트와 알데히드 중간물질로서 이용하는 생합성 경로는 이소부탄올, 1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올의 생합성을 위한 경로에서 선택될 수 있다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이다. 2-아세토-2-히드록시부티레이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로는 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-펜탄

올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생합성을 위한 경로에서 선택될 수 있다.

[0184] 다른 측면에서, 본 발명은 3-케토산을 중간물질로서 이용하고 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 (i) 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고, 그리고 (ii) 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이다. 아세토락테이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로는 이소부탄올, 1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올의 생합성을 위한 경로에서 선택될 수 있다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이다. 2-아세토-2-히드록시부티레이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로는 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생합성을 위한 경로에서 선택될 수 있다.

[0185] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 3-케토산 중간물질의 3-히드록시산 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 단백질은 케토환원효소이다. 예시적인 구체예에서, 케토환원효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 다른 예시적인 구체예, 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) YMR226C (서열 번호: 1) 단백질 또는 이의 동족체 또는 변이체이다. 한 구체예에서, 동족체는 반더왈톰지마 폴리스포라(*Vanderwaltomzyma polyspora*) (서열 번호: 2), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 3), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 4), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 5), 지고사카로미세스 로욱시(*Zygosaccharomyces rouxii*) (서열 번호: 6), 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) (서열 번호: 7), 아시비아 고시피(*Ashbya gossypii*) (서열 번호: 8), 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*) (서열 번호: 9), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 10), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 11), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*) (서열 번호: 12), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*) (서열 번호: 13), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 14), 칸디다 두블리니엔시스(*Candida dubliniensis*) (서열 번호: 15), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) (서열 번호: 16), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (서열 번호: 17), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) (서열 번호: 18), 아스페르길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) (서열 번호: 19), 아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*) (서열 번호: 20), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) (서열 번호: 21), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 22), 그리고 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 23)로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0186] 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는데 관여하는 단백질은 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다. 한 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 *ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6*, 그리고 *HFD1*, 그리고 이들의 동족체와 변이체로 구성된 군에서 선택되는 유전자에 의해 인코딩된다. 예시적인 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 알데히드 탈수소효소 ALD6 (서열 번호: 25) 또는 이의 동족체 또는 변이체이다. 한 구체예에서, 동족체는 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 26), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 27), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 28), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) (서열 번호: 29), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 30), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 31), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) YJ789 (서열 번호: 32), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) JAY291 (서열 번호: 33), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) EC1118 (서열 번호: 34), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) DBY939 (서열 번호: 35), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) AWRI1631 (서열 번호: 36), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) RM11-1a (서열 번호: 37), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 38), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 39), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 40), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 41)로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0187] 3-케토산과 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로로부터 유래된 유익한 대사산물을 생산하는 본 명세서에서 기술된 재조합 미생물은 피루베이트의 3-케토산 (가령, 아세토락테이트 및/또는 2-아세토-2-히드록시부티레이트) 이외의 산물로의 전환을 위한 효소적 활성이 감소되거나 제거되도록 더욱 조작될 수 있다. 한 구체예에서, 피루베이트 탈카르복실화효소 (PDC), 락테이트 탈수소효소 (LDH), 피루베이트 산화효소, 피루베이트 탈수소효소, 및/또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD)의 효소적 활성이 감소되거나 제거된다.

[0188] 특정 구체예에서, 유익한 대사산물은 아세토락테이트 신타아제 (ALS) 유전자를 과다발현하는 재조합 PDC-마이너스 GPD-마이너스 효모 미생물에서 생산된다. 다른 특정 구체예에서, ALS는 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*) *als*S에 의해 인코딩된다.

[0189] 3-히드록시산 부산물 및/또는 산성 부산물의 축적을 감소시키기 위한 전략의 예시적인 구체예

[0190] 특정한 예시적인 구체예에서, 재조합 미생물은 아세토락테이트와 이소부티르알데히드가 중간물질인 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 아세토락테이트 중간물질의 DH2MB로의 전환 및 이소부티르알데히드 중간물질의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없다. 다른 특정 구체예에서, 재조합 미생물은 아세토락테이트와 이소부티르알데히드가 중간물질인 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 (i) 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고, 그리고 (ii) 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 한 구체예에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 다른 구체예에서, 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다. 3-케토산 환원효소 (3-KAR)와 알데히드 탈수소효소 (ALDH)가 제거되는 이런 경로의 무제한적 실례는 도 5에 도시된다.

[0191] 더욱 특정한 예시적인 구체예에서, 재조합 미생물은 아세토락테이트와 3-메틸-1-부타날이 중간물질인 3-메틸-1-부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 아세토락테이트 중간물질의 DH2MB로의 전환 및 3-메틸-1-부타날 중간물질의 3-메틸-1-부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없다. 다른 특정 구체예에서, 재조합 미생물은 아세토락테이트와 3-메틸-1-부타날이 중간물질인 3-메틸-1-부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 (i) 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고, 그리고 (ii) 3-메틸-1-부타날의 3-메틸-1-부티레이트로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 한 구체예에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 다른 구체예에서, 3-메틸-1-부타날의 3-메틸-1-부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다. 3-케토산 환원효소 (3-KAR)와 알데히드 탈수소효소 (ALDH)가 제거되는 이런 경로의 무제한적 실례는 도 6에 도시된다.

[0192] 더욱 특정한 예시적인 구체예에서, 재조합 미생물은 아세토락테이트와 2-메틸-1-부타날이 중간물질인 2-메틸-1-부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 2-아세토-2-히드록시부티레이트 중간물질의 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트로의 전환 및 2-메틸-1-부타날 중간물질의 2-메틸-1-부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소가 실질적으로 없다. 다른 특정 구체예에서, 재조합 미생물은 2-아세토-2-히드록시부티레이트와 2-메틸-1-부타날이 중간물질인 2-메틸-1-부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 (i) 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고, 그리고 (ii) 2-메틸-1-부타날의 2-메틸-1-부티레이트로의 전환을 촉진하는 하나 또는 그 이상의 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 한 구체예에서, 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 다른 구체예에서, 2-메틸-1-부타날의 2-메틸-1-부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소 (ALDH)이다. 3-케토산 환원효소 (3-KAR)와 알데히드 탈수소효소 (ALDH)가 제거되는 이런 경로의 무제한적 실례는 도 7에 도시된다.

[0193] DH2MB를 이소부탄올 경로 중간물질로 전환시키는 효소의 과다발현

[0194] 이소부탄올 생산 효모에서 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (CAS# 14868-24-7)의 생산을 감소시키거나 제거하는 상이한 접근법은 DH2MB를 이소부탄올 경로 중간물질로 전환시키는 효소를 과다발현하는 것이다. 이를 달성하는 한 가지 방법은 DH2MB와 아세토락테이트의 상호 전환을 촉진하지만, DH2MB의 산화에 호의적인 효소를 이용하는 것이다. 이런 이유로, 한 구체예에서, 본 발명에서는 이소부탄올을 생산하기 위한 재조합 미생물을 제공하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 DH2MB를 아세토락테이트로 전환시킬 수 있는 내생성 또는 이종기원성 단백질을 과다발현한다.

[0195] 한 구체예에서, 내생성 또는 이종기원성 단백질은 산화 반응에 동역학적으로 호의적이다. 다른 구체예에서, 내생성 또는 이종기원성 단백질은 DH2MB에 대한 낮은 K_M 및 아세토락테이트에 대한 높은 K_M을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 내생성 또는 이종기원성 단백질은 이의 보조인자의 산화된 형태에 대한 낮은 K_M 및 이의 보조인자의

상응하는 환원된 형태에 대한 높은 K_M을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 내생성 또는 이종기원성 단백질은 환원 방향보다는 산화 반응에 대한 더욱 높은 k_{cat}를 갖는다. 이러한 내생성 또는 이종기원성 단백질은 바람직하게는, 이의 환원된 형태에 비하여 이의 산화된 형태의 높은 농도를 갖는 산화환원 보조인자를 이용하는 능력을 가질 것이다.

[0196] 한 구체예에서, 내생성 또는 이종기원성 단백질은 YAL060W, YJR159W, YGL157W, YBL114W, YOR120W, YKL055C, YBR159W, YBR149W, YDL168W, YDR368W, YLR426W, YCR107W, YILL24W, YML054C, YOL151W, YMR318c, YBR046C, YHR104W, YIR036C, YDL174C, YDR541C, YBR145W, YGL039W, YCR105W, YDL124W, YIR035C, YFL056C, YNL274c, YLR255C, YGL185C, YGL256W, YJR096W, YJR155W, YPL275W, YOR388C, YLR070C, YMR083W, YER081W, YJR139C, YDL243C, YPL113C, YOL165C, YML086C, YMR303C, YDL246C, YLR070C, YHR063C, YNL331C, YFL057C, YIL155C, YOL086C, YAL061W, YDR127W, YPR127W, YCL018W, YIL074C, YIL124W, 그리고 YEL071W로 구성된 군에서 선택되는 유전자에 의해 인코딩된다. 이에 더하여, 이종기원성 유전자는 이소부탄올 생산 효모에서 과다발현될 수 있다. 가령, 베타-히드록시산 탈수소효소 (EC1.1.1.45 및 EC1.1.1.60)는 과다발현을 위한 후보일 것이다.

[0197] 다른 구체예에서, 환원 반응에 동역학적으로 호의적인 내생성 또는 이종기원성 단백질은 산화 반응에 호의적이도록 조작된다. 다른 구체예에서, 단백질은 DH2MB에 대한 낮은 K_M 및 아세토락테이트에 대한 높은 K_M을 갖도록 조작된다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 이의 보조인자의 산화된 형태에 대한 낮은 K_M 및 이의 보조인자의 상응하는 환원된 형태에 대한 높은 K_M을 갖도록 조작된다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 환원 방향보다 산화 반응에 대한 더욱 높은 k_{cat}를 갖도록 조작된다. 이러한 조작된 단백질은 바람직하게는, 이의 환원된 형태에 비하여 이의 산화된 형태의 높은 농도를 갖는 산화환원 보조인자를 이용하는 능력을 가질 것이다.

[0198] 대안으로, DH2MB를 DHIV로 이성화시키는 효소가 과다발현될 수 있다. 이러한 접근법은 피루베이트로부터 이소부탄올의 생산을 위한 신규한 경로를 대표한다. 따라서 한 구체예에서, 본 발명에서는 이소부탄올을 생산하기 위한 재조합 미생물을 제공하는데, 여기서 상기 재조합 미생물은 DH2MB를 2,3-디히드록시이소발레레이트로 전환시킬 수 있는 내생성 또는 이종기원성 단백질을 과다발현한다.

[0199] 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트를 생합성 경로 중간물질로 전환시키는 효소의 과다발현

[0200] 효모에서 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트의 생산을 감소시키거나 제거하는 상이한 접근법은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트를 생합성 경로 중간물질로 전환시키는 효소를 과다발현하는 것이다. 이러한 접근법은 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 중간물질로서 이용하는 임의의 생합성 경로에 유용하다. 이를 달성하는 한 가지 방법은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트와 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 상호 전환을 촉진하지만, 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트의 산화에 호의적인 효소를 이용하는 것이다. 이런 이유로, 한 구체예에서, 본 발명에서는 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올에서 선택되는 산물을 생산하기 위한 재조합 미생물을 제공하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트를 2-아세토-2-히드록시부티레이트로 전환시킬 수 있는 내생성 또는 이종기원성 단백질을 과다발현한다.

[0201] 한 구체예에서, 내생성 또는 이종기원성 단백질은 산화 반응에 동역학적으로 호의적이다. 다른 구체예에서, 내생성 또는 이종기원성 단백질은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트에 대한 낮은 K_M 및 2-아세토-2-히드록시부티레이트에 대한 높은 K_M을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 내생성 또는 이종기원성 단백질은 이의 보조인자의 산화된 형태에 대한 낮은 K_M 및 이의 보조인자의 상응하는 환원된 형태에 대한 높은 K_M을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 내생성 또는 이종기원성 단백질은 환원 방향보다 산화 반응에 대한 더욱 높은 k_{cat}를 갖는다. 이러한 내생성 또는 이종기원성 단백질은 바람직하게는, 이의 환원된 형태에 비하여 이의 산화된 형태의 높은 농도를 갖는 산화환원 보조인자를 이용하는 능력을 가질 것이다.

[0202] 한 구체예에서, 내생성 또는 이종기원성 단백질은 YAL060W, YJR159W, YGL157W, YBL114W, YOR120W, YKL055C, YBR159W, YBR149W, YDL168W, YDR368W, YLR426W, YCR107W, YILL24W, YML054C, YOL151W, YMR318c, YBR046C, YHR104W, YIR036C, YDL174C, YDR541C, YBR145W, YGL039W, YCR105W, YDL124W, YIR035C, YFL056C, YNL274c, YLR255C, YGL185C, YGL256W, YJR096W, YJR155W, YPL275W, YOR388C, YLR070C, YMR083W, YER081W, YJR139C, YDL243C, YPL113C, YOL165C, YML086C, YMR303C, YDL246C, YLR070C, YHR063C, YNL331C, YFL057C, YIL155C,

YOL086C, YAL061W, YDR127W, YPR127W, YCL018W, YIL074C, YIL124W, 그리고 YEL071W로 구성된 군에서 선택되는 유전자에 의해 인코딩된다. 이에 더하여, 이종기원성 유전자는 이소류신 생산 효모에서 과다발현될 수 있다. 가령, 베타-히드록시산 탈수소효소 (EC1.1.1.45 및 EC1.1.1.60)는 과다발현을 위한 후보일 것이다.

[0203] 대안적으로, 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트 2,3-디히드록시-3-메틸발레레이트로 이성화시키는 효소는 과다발현될 수 있다. 이러한 접근법은 피루베이트로부터 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생산을 위한 신규한 경로를 대표한다. 따라서 한 구체예에서, 본 발명에서는 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올에서 선택되는 산물을 생산하기 위한 재조합 미생물을 제공하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 2-에틸-2,3-디히드록시부타노에이트를 α,β-디히드록시-β-메틸발레레이트로 전환시킬 수 있는 내생성 또는 이종기원성 단백질을 과다발현한다.

[0204] DH2MB의 생산을 감소시키기 위한, 과다발현된 케톨산 환원이성화효소 (KARI) 및/또는 변형된 케톨산 환원이성화효소 (KARI)의 이용

[0205] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환은 중간물질 아세토락테이트에 대해 이소부탄올 경로와 경쟁한다. 현재의 효모 이소부탄올 생산 균주에서, 케톨산 환원이성화효소 (KARI)는 아세토락테이트의 DHIV로의 전환을 촉진한다.

[0206] 한 구체예에서, 본 발명에서는 아세토락테이트의 2,3-디히드록시이소발레레이트 (DHIV)로의 전환을 촉진하는 과다발현된 케톨산 환원이성화효소 (KARI)를 갖는 재조합 미생물을 제공한다. KARI의 과다발현은 DH2MB 생산을 감소시키는 효과를 갖는다. 한 구체예에서, KARI는 용해물에서 적어도 0.01 U/mg의 활성을 갖는다. 다른 구체예에서, KARI는 용해물에서 적어도 0.03 U/mg의 활성을 갖는다. 또 다른 구체예에서, KARI는 용해물에서 적어도 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 또는 10 U/mg의 활성을 갖는다.

[0207] 바람직한 구체예에서, 과다발현된 KARI는 야생형 또는 부모 KARI와 비교하여 아세토락테이트에 대한 감소된 K_M을 나타내도록 조작된다. 아세토락테이트에 대한 더욱 낮은 K_M을 갖는 변형된 KARI의 이용은 부산물 DH2MB의 생산을 감소시킬 것으로 예상된다. 더욱 낮은 기질 K_M을 갖는 KARI는 동족체를 스크리닝함으로써 확인된다. 대안적으로, KARI는 당분야에 공지된 기술을 이용한 방향적 진화 (directed evolution)에 의해 감소된 K_M을 나타내도록 조작될 수 있다.

[0208] 이들 구체예 각각에서, KARI는 NADH (NADPH보다는)를 보조인자로서 이용하는 변이체 효소일 수 있다. 이런 효소는 공동 소유된 동시-계속 출원 U.S. Patent Publication No. 2010/0143997에서 기술되는데, 이것은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0209] DH2MB의 생산을 감소시키기 위한 과다발현된 디히드록시산 탈수화효소 (DHAD)의 이용

[0210] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 이소부탄올 경로 효소, 디히드록시산 탈수화효소 (DHAD)의 과다발현이 부산물, DH2MB의 생산을 감소시킨다는 것을 발견하였다.

[0211] 따라서 한 구체예에서, 본 발명에서는 2,3-디히드록시이소발레레이트 (DHIV)의 2-케토이소발레레이트 (KIV)로의 전환을 촉진하는 디히드록시산 탈수화효소 (DHAD)를 갖는 재조합 미생물을 제공한다. DHAD의 과다발현은 DH2MB 생산을 감소시키는 효과를 갖는다. 한 구체예에서, DHAD는 용해물에서 적어도 0.01 U/mg의 활성을 갖는다. 다른 구체예에서, DHAD는 용해물에서 적어도 0.03 U/mg의 활성을 갖는다. 또 다른 구체예에서, DHAD는 용해물에서 적어도 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 또는 10 U/mg의 활성을 갖는다.

[0212] 3-히드록시산의 생산을 위한 재조합 미생물

[0213] 본 발명에서는 추가의 측면에서, 산물 또는 물질대사 중간물질로서 3-히드록시산의 생산을 위한 재조합 미생물을 제공한다. 한 구체예에서, 이들 3-히드록시산-생산 재조합 미생물은 2-아세토락테이트의 DH2MB로의 환원을 촉진하는 아세토락테이트 신타아제 (ALS)와 3-케토산 환원효소를 발현한다. 다른 구체예에서, 이들 3-히드록시산-생산 재조합 미생물은 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트로의 환원을 촉진하는 아세토락테이트 신타아제 (ALS)와 3-케토산 환원효소를 발현한다.

[0214] 이들 3-히드록시산-생산 재조합 미생물은 피루베이트의 아세토락테이트 이외의 산물로의 전환을 위한 효소적 활성이 감소되거나 제거되도록 더욱 조작될 수 있다. 한 구체예에서, 피루베이트 탈카르복실화효소 (PDC), 락테이트 탈수소효소 (LDH), 피루베이트 산화효소, 피루베이트 탈수소효소, 및/또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효

소 (GPD)의 효소적 활성이 감소되거나 제거된다.

[0215] 특정 구체예에서, DH2MB는 ALS 유전자를 과다발현하고 3-케토산 환원효소를 발현하는 재조합 PDC-마이너스 GPD-마이너스 효모 미생물에서 생산된다. 한 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 선천성으로 발현된다. 다른 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 이종기원성으로 발현된다. 또 다른 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 과다발현된다. 특정 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29* 유전자 또는 이의 동족체에 의해 인코딩된다. 다른 특정 구체예에서, ALS는 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*) *als*S에 의해 인코딩된다.

[0216] 다른 특정 구체예에서, 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트는 ALS 유전자를 과다발현하고 3-케토산 환원효소를 발현하는 재조합 PDC-마이너스 GPD-마이너스 효모 미생물에서 생산된다. 한 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 선천성으로 발현된다. 다른 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 이종기원성으로 발현된다. 또 다른 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 과다발현된다. 특정 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29* 유전자 또는 이의 동족체에 의해 인코딩된다. 다른 특정 구체예에서, ALS는 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*) *als*S에 의해 인코딩된다.

[0217] 이들 추가의 측면에 따라서, 본 발명에서는 또한, 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB)을 생산하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 2-아세토락테이트의 DH2MB로의 환원을 촉진하는 아세토락테이트 신타아제 (ALS)와 3-케토산 환원효소를 발현하는 DH2MB-생산 재조합 미생물을 제공하는 단계, 그리고 (b) DH2MB의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계.

[0218] 이들 추가의 측면에 따라서, 본 발명에서는 또한, 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트를 생산하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트로의 환원을 촉진하는 아세토락테이트 신타아제 (ALS)와 3-케토산 환원효소를 발현하는 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트-생산 재조합 미생물을 제공하는 단계, 그리고 (b) 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계.

[0219] 산성 산물의 생산을 위한 재조합 미생물

[0220] 본 발명에서는 추가의 측면에서, 알데히드로부터 유래된 산성 산물의 생산을 위한 재조합 미생물을 제공한다. 한 구체예에서, 이들 산성 산물 생산 재조합 미생물은 알데히드의 상응하는 산성 산물로의 전환을 촉진하는 알데히드 탈수소효소를 발현한다. 이들 산성 산물 생산 재조합 미생물은 원하는 산성 산물의 상류의 대사산물의 바람직하지 않은 전환에 대한 경쟁하는 효소적 활성이 감소되거나 제거되도록 더욱 조작될 수 있다.

[0221] 특정 구체예에서, 산성 산물은 알데히드 탈수소효소를 과다발현하는 재조합 효모 미생물에서 생산된다. 한 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 선천성으로 발현된다. 다른 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 이종기원성으로 발현된다. 또 다른 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 과다발현된다. 특정 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *ALD6* 유전자 또는 이의 동족체에 의해 인코딩된다.

[0222] 이러한 추가의 측면에 따라서, 본 발명에서는 또한, 산성 산물을 생산하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 알데히드의 산성 산물로의 전환을 촉진하는 알데히드 탈수소효소를 발현하는 산성 산물-생산 재조합 미생물을 제공하는 단계, 그리고 (b) 바람직한 산성 산물의 회수가능한 양이 생산될 때까지, 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계.

[0223] **전반적인 미생물**

[0224] 본 발명에서 제공된 재조합 미생물은 적절한 탄소 공급원으로부터 유익한 대사산물, 예를 들면, 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 조효소 A, 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 5-메틸-1-헵탄올, 그리고 1-프로판올의 생산을 위한 경로에 관여하는 복수의 이종기원성 및/또는 선천성 효소를 발현할 수 있다. 조작된 생합성 경로에서 생산된 유익한 대사산물의 무제한적 목록은 본 명세서의 표 1-3에서 확인된다.

[0225] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, "조작된" 또는 "변형된" 미생물은 선택된 숙주 또는 부모 미생물 내로 유전자 물질의 도입을 거쳐 및/또는 선천성 유전자의 발현의 변화, 따라서 미생물의 세포 생리와 생화학의 변화 또는

변경에 의해 생산된다. 유전자 물질의 도입 및/또는 선천성 유전자의 발현의 변형을 통해, 부모 미생물은 새로운 성질, 예를 들면, 새로운 또는 더욱 많은 양의 세포내 및/또는 세포외 대사산물을 생산하는 능력을 획득한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 부모 미생물 내로 유전자 물질의 도입 및/또는 부모 미생물 내에서 선천성 유전자의 발현의 변화는 적절한 탄소 공급원으로부터 유익한 대사산물, 예를 들면, 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 조효소 A, 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 5-메틸-1-헵탄올, 그리고 1-프로판올을 생산하는 새로운 또는 변화된 능력을 유발한다. 부모 미생물 내로 도입된 유전자 물질 및/또는 부모 미생물에서 발현을 위해 변형된 유전자는 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 조효소 A, 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 5-메틸-1-헵탄올, 그리고 1-프로판올에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 대사산물의 생산을 위한 생합성 경로에 관여하는 효소 중에서 하나 또는 그 이상을 코딩하는 유전자(들), 또는 유전자의 일부를 내포하고, 또한 이들 유전자의 발현 및/또는 발현 조절을 위한 추가의 요소, 예를 들면, 프로모터 서열을 포함할 수도 있다.

[0226] 숙주 또는 부모 미생물 내로 유전자 물질의 도입에 추가하여, 조작된 또는 변형된 미생물은 또한, 미생물의 세포 생리와 생화학을 변화시키기 위해 유전자 또는 폴리뉴클레오티드의 변경, 파괴, 결실 또는 적중 (knocking-out)을 포함할 수 있다. 유전자 또는 폴리뉴클레오티드의 이러한 변경, 파괴, 결실 또는 적중을 통해, 미생물은 새로운 또는 향상된 성질 (가령, 새로운 대사산물 또는 더욱 많은 양의 세포내 대사산물을 생산하고, 원하는 경로 방향으로 대사산물의 흐름을 향상시키고, 및/또는 부산물의 생산을 감소시키는 능력) 성질을 획득한다.

[0227] 본 발명에서 제공된 재조합 미생물은 또한, 부모 미생물에서 가능하지 않은 양으로 대사산물을 생산할 수 있다. "대사산물"은 물질대사에 의해 생산된 임의의 물질, 또는 특정 물질대사 과정에 필요하거나 참여하는 물질을 지칭한다. 대사산물은 물질대사의 출발 물질 (가령, 글루코오스 또는 피루베이트), 중간물질 (가령, 2-케토이소발레레이트), 또는 최종 산물 (가령, 이소부탄올)인 유기 화합물일 수 있다. 대사산물은 더욱 복잡한 분자를 구축하는데 이용되거나, 또는 이들은 더욱 단순한 분자로 부셔질 수 있다. 중간물질 대사산물은 종종 화학적 에너지의 방출과 함께 아마도, 더욱 복잡한 물질을 만드는데 이용되거나, 또는 더욱 단순한 화합물로 부셔지는 다른 대사산물로부터 합성될 수 있다.

[0228] 본 발명에서는 본 발명의 방법, 조성물과 생명체에서 유용한 특정 유전자를 확인한다; 하지만 이런 유전자에 대한 절대 동일성 (absolute identity)이 필요하지는 않을 것으로 인지될 것이다. 가령, 폴리펩티드 또는 효소를 인코딩하는 서열을 포함하는 특정 유전자 또는 폴리뉴클레오티드에서 변화가 수행되고 활성에 대해 스크리닝될 수 있다. 전형적으로, 이런 변화는 보존성 돌연변이 및 침묵 돌연변이를 포함한다. 이런 변형된 또는 돌연변이된 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드는 당분야에 공지된 방법을 이용한 기능적 효소의 발현에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0229] 유전자 코드의 본질적 축퇴 (degeneracy)로 인하여, 실질적으로 동일하거나 또는 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 인코딩하는 다른 폴리뉴클레오티드 역시 이런 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 클로닝하고 발현하는데 이용될 수 있다.

[0230] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 특정 숙주에서 이의 발현을 증강시키기 위해 코딩 서열을 변경하는 것이 유리할 수 있다. 유전자 코드는 64개의 가능한 코돈으로 중복되지만, 대부분의 생명체는 전형적으로, 이들 코돈의 부분집합을 이용한다. 종 내에서 가장 빈번하게 이용되는 코돈은 최적 코돈 (optimal codon)으로 불리고, 그리고 매우 빈번하게 이용되지 않는 것들은 드문 또는 낮은-사용빈도 코돈으로 분류된다. 코돈은 때때로, "코돈 최적화" 또는 "종 코돈 바이어스 (codon bias)에 대한 제어"라고 불리는 과정 동안, 숙주의 선호되는 코돈 사용빈도를 반영하기 위해 치환될 수 있다.

[0231] 특정 원핵 또는 진핵 숙주에 의해 선호되는 코돈을 내포하는 최적화된 코딩 서열 (Murray *et al.*, 1989, *Nucl Acids Res.* 17: 477-508)은 예로써, 비-최적화된 서열로부터 생산된 전사체와 비교하여, 예로써 번역 속도를 증가시키거나, 또는 바람직한 성질, 예를 들면, 더욱 긴 반감기 (half-life)를 갖는 재조합 RNA 전사체를 생산하기 위해 제조될 수 있다. 번역 종결 코돈은 또한, 숙주 선호도 (host preference)를 반영하기 변형될 수 있다. 가령, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)와 포유동물에 대한 전형적인 종결 코돈은 각각, UAA와 UGA이다. 외떡잎 식물 (monocotyledonous plant)에 대한 전형적인 종결 코돈은 UGA이고, 반면 곤충과 대장균(*E. coli*)은 통상적으로, UAA를 종결 코돈으로서 이용한다 (Dalphin *et al.*, 1996, *Nucl Acids Res.* 24: 216-8). 식물에서 발현을 위한 뉴클레오티드 서열을 최적화하는 방법은 예로써, U.S. Pat. No. 6,015,891, 그리고 여기에서 인용

된 참고문헌에서 제공된다.

[0232] 당업자는 유전자 코드의 축퇴성으로 인하여, 그들의 뉴클레오티드 서열에서 상이한 다양한 DNA 화합물이 본 발명의 소정의 효소를 인코딩하는데 이용될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 앞서 기술된 생합성 효소를 인코딩하는 선천성 DNA 서열은 본 발명의 구체예를 단순히 예시하기 위해 본 명세서에서 언급되고, 그리고 본 발명은 본 발명의 방법에 이용되는 효소의 폴리펩티드와 단백질의 아미노산 서열을 인코딩하는 임의의 서열의 DNA 화합물을 포함한다. 유사한 방식으로, 폴리펩티드는 원하는 활성의 상실 또는 현저한 상실 없이 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 결실, 그리고 삽입을 전형적으로 견뎌낼 수 있다. 본 발명은 변형된 또는 변이체 폴리펩티드가 참고 폴리펩티드의 효소적 동화 또는 이화 활성을 갖기만 하면, 본 명세서에서 기술된 특정 단백질과 상이한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 게다가, 본 발명에서 제시된 DNA 서열에 의해 인코딩된 아미노산 서열은 본 발명의 구체예를 단순히 예시한다.

[0233] 이에 더하여, 대사산물을 산출하는데 유용한 효소의 동족체는 본 발명에서 제시된 미생물과 방법에 의해 포함된다.

[0234] 본 명세서에서, 2개의 단백질 (또는 이들 단백질의 영역)은 아미노산 서열이 적어도 대략 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 가질 때, 실질적으로 상동하다. 2개의 아미노산 서열, 또는 2개의 핵산 서열의 동일성 퍼센트를 결정하기 위해, 이들 서열은 최적 비교 목적을 위해 정렬된다 (가령, 최적 배열을 위해 첫 번째와 두 번째 아미노산 또는 핵산 서열 중에서 한쪽 또는 양쪽에 갭이 도입될 수 있고, 그리고 비-상동한 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 한 구체예에서, 비교 목적을 위해 정렬된 참고 서열의 길이는 참고 서열의 길이의 적어도 30%, 전형적으로 적어도 40%, 더욱 전형적으로 적어도 50%, 이보다 더욱 전형적으로 적어도 60%, 그리고 이보다 더욱 전형적으로 적어도 70%, 80%, 90%, 100%이다. 이후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 비교된다. 첫 번째 서열에서 위치가 두 번째 서열에서 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유될 때, 이후 이들 분자는 상기 위치에서 동일하다 (본 명세서에서, 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"에 동등하다). 이들 두 서열 간에 동일성 퍼센트는 이들 두 서열의 최적 배열을 위해 도입되어야 하는 갭의 숫자, 그리고 각 갭의 길이를 고려한, 이들 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 숫자의 함수이다.

[0235] "상동한"이 단백질 또는 펩티드를 참고하여 이용될 때, 동일하지 않은 잔기 위치는 종종, 보존성 아미노산 치환에 의해 달라지는 것으로 인지된다. "보존성 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 성질 (가령, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄 (R 기)를 갖는 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존성 아미노산 치환은 단백질의 기능적 성질을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다.

[0236] 2개 또는 그 이상의 아미노산 서열이 보존성 치환에 의해 서로 달라지는 경우에, 서열 동일성 퍼센트 또는 상동성 정도는 치환의 보존성 성격을 보정하기 위하여 상향 조정될 수 있다. 이러한 조정을 달성하는 수단은 당업자에게 널리 공지되어 있다 (참조: Pearson W.R., 1994, *Methods in Mol Biol* 25: 365-89).

[0237] 하기 6가지 군은 각각, 서로에 대해 보존성 치환인 아미노산을 내포한다: 1) 세린 (S), 트레오닌 (T); 2) 아스파르트산 (D), 글루타민산 (E); 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q); 4) 아르기닌 (R), 리신 (K); 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 알라닌 (A), 발린 (V), 그리고 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W).

[0238] 서열 동일성 퍼센트로 지칭되는 폴리펩티드에 대한 서열 상동성은 전형적으로, 서열 분석 소프트웨어를 이용하여 측정된다. 공동 소유된 동시-계속 출원 US 2009/0226991을 참조한다. 상이한 생명체로부터 다수의 서열을 내포하는 데이터베이스에 분자 서열을 비교하는데 이용되는 전형적인 알고리즘은 컴퓨터 프로그램 BLAST이다. 다수의 상이한 생명체로부터 서열을 내포하는 데이터베이스를 검색할 때, 아미노산 서열을 비교하는 것은 전형적이다. 아미노산 서열을 이용한 데이터베이스 검색은 공동 소유된 동시-계속 출원 US 2009/0226991에서 기술된 알고리즘에 의해 측정될 수 있다. 폭넓은 미생물이 아세토락테이트- 및/또는 알데히드 중간물질-요구 생합성 경로로부터 유익한 대사산물의 생산에 적합한 재조합 대사 경로를 포함하도록 변형될 수 있는 것으로 이해된다. 다양한 구체예에서, 미생물은 효모 미생물에서 선택될 수 있다. 대사산물, 예를 들면, 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 조효소 A, 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 5-메틸-1-헵탄올, 그리고 1-프로판올의 생산을 위한 효모 미생물은 일정한 특징에 기초하여 선택될 수 있다:

[0239] 한 가지 특징은 미생물이 다양한 탄소 공급원을 유익한 대사산물, 예를 들면, 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 조효소 A, 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 5-메틸-1-헵탄올, 그리고 1-프로판올로 전환시키기 위해 선택되는 성질을 포함할 수 있다. 용어 "탄소 공급원"은 일반적으로, 원핵 또는 진핵 세포 성장을 위한 탄소 공급원으로서 이용하기 적합한 물질을 지칭한다. 적절한 탄소 공급원의 실례는 공동 소유된 동시-계속 출원 US 2009/0226991에서 기술된다. 따라서 한 구체예에서, 본 발명에서 개시된 재조합 미생물은 다양한 탄소 공급원을 글루코오스, 갈락토오스, 만노오스, 자일로오스, 아라비노오스, 락토오스, 수크로오스, 그리고 이들의 혼합물이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 산물로 전환시킬 수 있다.

[0240] 따라서 재조합 미생물은 자일로오스를 비롯한 5-탄소 (펜토오스) 당으로부터 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 조효소 A, 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 5-메틸-1-헵탄올, 그리고 1-프로판올의 생산을 위한 경로를 더욱 포함할 수 있다. 대부분의 효모 종은 복잡한 루트를 거쳐 자일로오스를 물질대사시키는데, 여기서 자일로오스는 먼저, 자일로오스 환원효소 (XR) 효소에 의해 자일리톨로 환원된다. 자일리톨은 이후, 자일리톨 탈수소효소 (XDH) 효소에 의해 자일룰로스 (xylulose)로 산화된다. 자일룰로스는 이후, 자일룰로키나아제 (xylulokinase) (XK) 효소에 의해 인산화된다. 이러한 경로는 효모 종에서 비효율적으로 작동하는데, 그 이유는 이것이 세포 내에서 산화환원 불균형 (redox imbalance)을 유발하기 때문이다. 자일로오스→자일리톨 단계는 NADH를 보조인자로서 이용하는 반면, 자일리톨→자일룰로스 단계는 NADPH를 보조인자로서 이용한다. 세포 내에서 산화환원 불균형을 회복하는 다른 과정이 작동하여야 한다. 이것은 종종, 생명체가 자일로오스 또는 다른 펜토오스 당 상에서 혐기성으로 성장할 수 없다는 것을 의미한다. 따라서 자일로오스 및 기타 펜토오스 당을 원하는 발효 산물로 효율적으로 발효시킬 수 있는 효모 종이 매우 바람직하다.

[0241] 따라서 한 측면에서, 재조합 미생물은 기능적 외생성 자일로오스 이성화효소를 발현하도록 조작된다. 효모에서 기능적인 외생성 자일로오스 이성화효소는 당분야에 공지되어 있다. 예로써, Rajgarhia *et al.*, US2006/0234364를 참조하고, 이것은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다. 이러한 측면에 따른 한 구체예에서, 외생성 자일로오스 이성화효소 유전자는 효모 세포에서 기능적인 프로모터와 종결자 서열에 작동가능하게 연결된다. 바람직한 구체예에서, 재조합 미생물은 자일로오스의 자일리톨로의 전환을 촉진하는 효소 (가령, XR 및/또는 XDH)를 인코딩하는 선천성 유전자의 결실 또는 파괴를 더욱 갖는다. 더욱 바람직한 구체예에서, 재조합 미생물은 또한, 효모 세포에서 기능적인 프로모터와 종결자 서열에 작동가능하게 연결된 기능적, 외생성 자일룰로키나아제 (XK) 유전자를 내포한다. 한 구체예에서, 자일룰로키나아제 (XK) 유전자는 과다발현된다.

[0242] 한 구체예에서, 미생물은 감소된 피루베이트 탈카르복실화효소 (PDC) 활성을 갖거나 갖지 않는다. PDC는 피루베이트의 아세트알데히드로의 탈카르복실화 (decarboxylation)를 촉진하고, 이것은 이후, NADH의 NAD+로의 산화를 거쳐 ADH에 의해 에탄올로 환원된다. 에탄올 생산은 해당으로부터 NADH를 산화시키는 주요 경로이다. 이러한 경로의 결실은 생합성 경로에 기용한 피루베이트 및 환원 등가물 (NADH)을 증가시킨다. 따라서 *PDC* 유전자의 결실은 원하는 대사산물의 수율을 더욱 증가시킬 수 있다.

[0243] 다른 구체예에서, 미생물은 감소된 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD) 활성을 갖거나 갖지 않는다. GPD는 NADH의 NAD+로의 산화를 거쳐, 디히드록시아세톤 포스페이트 (DHAP)의 글리세롤-3-포스페이트 (G3P)로의 환원을 촉진한다. 글리세롤은 이후, 글리세롤-3-포스파타아제 (GPP)에 의해 G3P로부터 생산된다. 글리세롤 생산은 해당으로부터 과잉의 NADH를 산화시키는 이차적인 경로이다. 이러한 경로의 감소 또는 제거는 생합성 경로에 가용한 피루베이트 및 환원 등가물 (NADH)을 증가시킬 것이다. 따라서 *GPD* 유전자의 결실은 원하는 대사산물의 수율을 더욱 증가시킬 수 있다.

[0244] 또 다른 구체예에서, 미생물은 감소된 PDC 활성을 갖거나 갖지 않고, 그리고 감소된 GPD 활성을 갖거나 갖지 않는다. PDC-마이너스/GPD-마이너스 효모 생산 균주는 공동 소유된 동시-계속 출원, US 2009/0226991 및 US 2011/0020889에서 기술되고, 이들 둘 모두 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0245] 한 구체예에서, 효모 미생물은 공동 소유된 동시-계속 출원 US 2009/0226991에서 기술된 바와 같이, "사카로미세스 (*Saccharomyces*) 효모 계통분기"에서 선택될 수 있다.

[0246] 용어 "사카로미세스 센수 스트릭토(*Saccharomyces sensu stricto*)" 분류학 군은 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에 고도로 관련되는 효모 종의 클러스터이다 (Rainieri *et al.*, 2003, *J. Biosci Bioengin* 96: 1-

9). 사카로미세스 센수 스트릭토(*Saccharomyces sensu stricto*) 효모 종에는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), 사카로미세스 쿠드리아브제비(*S. kudriavzevii*), 사카로미세스 미카태(*S. mikatae*), 사카로미세스 바야누스(*S. bayanus*), 사카로미세스 우바룸(*S. uvarum*), 사카로미세스 카로카니스(*S. carocanis*), 그리고 이들 종으로부터 유래된 하이브리드가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다 (Masneuf *et al.*, 1998, *Yeast* 7: 61-72).

[0247] 고대의 전체 유전체 복제 (whole genome duplication, WGD) 사건은 반자낭 균류 (hemiascomycete) 효모의 진화 동안 발생하고, 그리고 비교 유전체 도구 (comparative genomic tool)를 이용하여 발견되었다 (Kellis *et al.*, 2004, *Nature* 428: 617-24; Dujon *et al.*, 2004, *Nature* 430:35-44; Langkjaer *et al.*, 2003, *Nature* 428: 848-52; Wolfe *et al.*, 1997, *Nature* 387: 708-13). 이러한 주요 진화적 사건을 이용하여, 효모는 WGD 사건 이후에 공통 조상으로부터 분기하는 종 (본 명세서에서 "WGD-이후 효모") 및 WGD 사건 이전에 효모 계통으로부터 분기하는 종 (본 명세서에서, "WGD-이전 효모")으로 구분될 수 있다.

[0248] 따라서 한 구체예에서, 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*)와 캔디다(*Candida*)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 WGD-이후 효모 속에서 선택될 수 있다. 선호되는 WGD-이후 효모 종에는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), 사카로미세스 우바룸(*S. uvarum*), 사카로미세스 바야누스(*S. bayanus*), 사카로미세스 파라독수스(*S. paradoxus*), 사카로미세스 카스텔리(*S. castelli*), 그리고 칸디다 글라브라타(*C. glabrata*)가 포함된다.

[0249] 다른 구체예에서, 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 칸디다(*Candida*), 피치아(*Pichia*), 아이사첸키아(*Issatchenkia*), 데바리오미세스(*Debaryomyces*), 한세눌라(*Hansenula*), 야로위아(*Yarrowia*) 및 시조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 전체 유전체 복제-이전 (WGD-이전) 효모 속에서 선택될 수 있다. 대표적인 WGD-이전 효모 종에는 사카로미세스 클루이베리(*S. kluyveri*), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*K. thermotolerans*), 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*), 클루이베로미세스 왈티(*K. waltii*), 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 피치아 패스토리스(*P. pastoris*), 피치아 아노말라(*P. anomala*), 피치아 스티피티스(*P. stipitis*), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*I. orientalis*), 아이싸첸키아 옥시덴탈리스(*I. occidentalis*), 아이싸첸키아 스쿠툴라타(*I. scutulata*), 데바리오미세스 한세니(*D. hansenii*), 한세눌라 아노말라(*H. anomala*), 야로위아 리폴리티카(*Y. lipolytica*), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*S. pombe*)가 포함된다.

[0250] 효모 미생물은 공동 소유된 동시-계속 출원 US 2009/0226991에서 기술된 바와 같이 크랩트리-음성 또는 크랩트리-양성일 수 있다. 한 구체예에서, 효모 미생물은 하기 속 (genera): 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 아이사첸키아(*Issatchenkia*), 한세눌라(*Hansenula*), 그리고 칸디다(*Candida*)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 크랩트리-음성 표현형을 갖는 효모에서 선택될 수 있다. 크랩트리-음성 종에는 사카로미세스 클루이베리(*S. kluyveri*), 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*), 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*), 피치아 아노말라(*P. anomala*), 피치아 스티피티스(*P. stipitis*), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*I. orientalis*), 아이싸첸키아 옥시덴탈리스(*I. occidentalis*), 아이싸첸키아 스쿠툴라타(*I. scutulata*), 한세눌라 아노말라(*H. anomala*), 그리고 칸디다 유틸리스(*C. utilis*)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 다른 구체예에서, 효모 미생물은 사카로미세스(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*), 지고사카로미세스(*Zygosaccharomyces*), 데바리오미세스(*Debaryomyces*), 피치아(*Pichia*) 및 시조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 크랩트리-양성 표현형을 갖는 효모에서 선택될 수 있다. 크랩트리-양성 효모 종에는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), 사카로미세스 우바룸(*S. uvarum*), 사카로미세스 바야누스(*S. bayanus*), 사카로미세스 파라독수스(*S. paradoxus*), 사카로미세스 카스텔리(*S. castelli*), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*K. thermotolerans*), 칸디다 글라브라타(*C. glabrata*), 지고사카로미세스 바일리(*Z. bailli*), 지고사카로미세스 로욱시(*Z. rouxii*), 데바리오미세스 한세니(*D. hansenii*), 피치아 패스토리스(*P. pastoris*), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*S. pombe*)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0251] 다른 특징은 미생물이 비-발효성인 성질을 포함할 수 있다. 다시 말하면, 이것은 탄소 공급원을 혐기성으로 물질대사시킬 수 있지만, 상기 효모는 산소의 존재에서 탄소 공급원을 물질대사시킬 수 있다. 비-발효 효모는 자연 발생 효모와 유전학적으로 변형된 효모 둘 모두를 지칭한다. 발효 효모로 혐기성 발효 동안, 해당으로부터 NADH를 산화시키는 주요 경로는 에탄올의 생산을 통하는 것이다. 에탄올은 피루베이트 탈카르복실화효소 (PDC)에 의해 피루베이트로부터 산출되는, 아세트알데히드의 환원을 거쳐 알코올 탈수소효소 (ADH)에 의해 생산된다. 한 구체예에서, 발효 효모는 선천성 PDC 활성의 감소 또는 제거에 의해 비-발효성이 되도록 조작될 수 있다. 따

라서 해당에 의해 생산된 대부분의 피루베이트는 PDC에 의해 소비되지 않고 이소부탄올 경로에 이용가능하다. 이러한 경로의 결실은 생합성 경로에 이용가능한 피루베이트 및 환원 등가물을 증가시킨다. 발효 경로는 원하는 대사산물, 예를 들면, 이소부탄올의 낮은 수율과 낮은 생산성의 원인이 된다. 따라서 *PDC* 유전자의 결실은 원하는 대사산물, 예를 들면, 이소부탄올의 수율과 생산성을 증가시킬 수 있다.

[0252] 일부 구체예에서, 재조합 미생물은 트리코스포론(*Tricosporon*), 로도토룰라(*Rhodotorula*), 믹소지마(*Myxozyma*), 또는 칸디다(*Candida*)로 구성된 군에서 선택되는 속으로 분류되는 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 비-발효 효모 미생물인 미생물일 수 있다. 특정 구체예에서, 비-발효 효모는 칸디다 제스토비(*C. xestobii*)이다.

[0253] 이소부탄올-생산 효모 미생물

[0254] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 한 구체예에서, 효모 미생물은 해당에 의해 탄소 공급원, 예를 들면, 글루코오스가 피루베이트로 전환되도록 조작되고, 그리고 피루베이트는 이소부탄올 생산 대사 경로를 거쳐 이소부탄올로 전환된다 (참조: WO/2007/050671, WO/2008/098227, 그리고 Atsumi *et al., 2008, Nature* 45: 86-9). 이소부탄올의 대안적 생산을 위한 경로는 WO/2007/050671 및 Dickinson *et al.*, 1998, *J Biol Chem* 273:25751-6에서 기술된다.

[0255] 따라서 한 구체예에서, 피루베이트를 이소부탄올로 전환시키는 이소부탄올 생산 대사 경로는 하기 반응을 포함할 수 있다:

[0256] 1. 2 피루베이트 → 아세토락테이트 + CO_2

[0257] 2. 아세토락테이트 + NAD(P)H → 2,3-디히드록시이소발레레이트 + $NAD(P)^+$

[0258] 3. 2,3-디히드록시이소발레레이트 → 알파-케토이소발레레이트

[0259] 4. 알파-케토이소발레레이트 → 이소부티르알데히드 + CO_2

[0260] 5. 이소부티르알데히드 +NAD(P)H → 이소부탄올 + $NAD(P)^+$

[0261] 이들 반응은 효소 1) 아세토락테이트 신타아제 (ALS), 2) 케톨산 환원이성화효소 (KARI), 3) 디히드록시산 탈수화효소 (DHAD), 4) 케토-이소발레레이트 탈카르복실화효소 (KIVD), 그리고 5) 알코올 탈수소효소 (ADH)에 의해 수행된다 (도 1). 다른 구체예에서, 효모 미생물은 이들 효소가 과다발현되도록 조작된다. 가령, 이들 효소는 선천성 유전자에 의해 인코딩될 수 있다. 대안으로, 이들 효소는 이종기원성 유전자에 의해 인코딩될 수 있다. 가령, ALS는 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*)의 *alsS* 유전자, 락토코커스 락티스(*L. lactis*)의 *alsS*, 또는 클렙시엘라 유모니아(*K. pneumonia*)의 *ilvK* 유전자에 의해 인코딩될 수 있다. 가령, KARI는 대장균(*E. coli*), 코리네박테륨 글루타미쿰(*C. glutamicum*), 메타노코커스 마리팔루디스(*M. maripaludis*), 또는 피로미세스(*Piromyces*) *종 E2*의 *ilvC* 유전자에 의해 인코딩될 수 있다. 가령, DHAD는 대장균(*E. coli*), 코리네박테륨 글루타미쿰(*C. glutamicum*), 또는 락토코커스 락티스(*L. lactis*)의 *ilvD* 유전자에 의해 인코딩될 수 있다. 가령, KIVD는 락토코커스 락티스(*L. lactis*)의 *kivD* 유전자에 의해 인코딩될 수 있다. ADH는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)의 *ADH2, ADH6,* 또는 *ADH7*, 또는 락토코커스 락티스(*L. lactis*)의 *adhA*에 의해 인코딩될 수 있다.

[0262] 한 구체예에서, 경로 단계 2와 5는 NADH (NADPH보다는)를 보조인자로서 이용하는 KARI와 ADH 효소에 의해 수행될 수 있다. 이들 효소는 공동 소유된 동시-계속 출원, US 2010/0143997에서 기술되고, 이것은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다. 본 발명자들은 경로 단계 2와 5를 각각 촉진하는 NADH-의존성 KARI와 ADH 효소의 이용이 놀랍게도, 혐기성 조건 하에 이소부탄올의 생산을 가능하게 한다는 것을 발견하였다. 따라서 한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 아세토락테이트 (+NADH)의 전환을 촉진하여 2,3-디히드록시이소발레레이트를 생산하는 NADH-의존성 KARI를 이용할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 이소부티르알데히드 (+NADH)의 전환을 촉진하여 이소부탄올을 생산하는 NADH-의존성 ADH를 이용할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 아세토락테이트 (+NADH)의 전환을 촉진하여 2,3-디히드록시이소발레레이트를 생산하는 NADH-의존성 KARI, 그리고 이소부티르알데히드 (+NADH)의 전환을 촉진하여 이소부탄올을 생산하는 NADH-의존성 ADH 둘 모두를 이용할 수도 있다.

[0263] 다른 구체예에서, 효모 미생물은 피루베이트를 이소부탄올로 전환시키는 증가된 능력을 갖도록 조작될 수 있다.

한 구체예에서, 효모 미생물은 피루베이트를 이소부티르알데히드로 전환시키는 증가된 능력을 갖도록 조작될 수 있다. 다른 구체예에서, 효모 미생물은 피루베이트를 케토-이소발레레이트를 전환시키는 증가된 능력을 갖도록 조작될 수 있다. 다른 구체예에서, 효모 미생물은 피루베이트를 2,3-디히드록시이소발레레이트로 전환시키는 증가된 능력을 갖도록 조작될 수 있다. 다른 구체예에서, 효모 미생물은 피루베이트를 아세토락테이트로 전환시키는 증가된 능력을 갖도록 조작될 수 있다.

[0264] 게다가, 전술한 효소 (또는 본 명세서에서 언급된 임의의 다른 것들 (또는 이들의 발현을 제어하거나 조정하는 임의의 조절 요소))를 인코딩하는 임의의 유전자는 당업자에게 공지된 유전자/단백질 조작 기술, 예를 들면, 방향적 진화 (directed evolution) 또는 논리적 돌연변이유발 (rational mutagenesis)에 의해 최적화될 수 있다. 이런 작용은 당업자가 효모에서 발현과 활성에 대해 이들 효소를 최적화할 수 있도록 한다.

[0265] 이에 더하여, 이들 효소를 인코딩하는 유전자는 다른 진균과 세균 종으로부터 확인될 수 있고, 그리고 이러한 경로의 조정을 위해 발현될 수 있다. 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)와 사카로미세스 우바룸(*S. uvarum*)을 비롯한 사카로미세스(*Saccharomyces*) 종, 클루이베로미세스 써모톨레란스(*K. thermotolerans*), 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*), 그리고 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*)를 비롯한 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*) 종, 피치아(*Pichia*) 종, 한세눌라 폴리모파(*H. polymorpha*)를 비롯한 한세눌라(*Hansenula*) 종, 칸디다(*Candida*) 종, 트리코스포론(*Trichosporon*) 종, 야마다지마 스티피티스(*Y. stipitis*)를 비롯한 야마다지마(*Yamadazyma*) 종, 토룰라스포라 프레토리엔시스(*Torulaspora pretoriensis*), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*), 시조사카로미세스 폼베(*S. pombe*)를 비롯한 시조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*) 종, 크립토코커스(*Cryptococcus*) 종, 아스페르길루스(*Aspergillus*) 종, 뉴로스포라(*Neurospora*) 종, 또는 우스틸라고(*Ustilago*) 종이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다양한 생명체가 이들 효소에 대한 출처로서 기능할 수 있다. 혐기성 진균으로부터 유전자의 출처에는 피로미세스(*Piromyces*) 종, 오르피노미세스(*Orpinomyces*) 종, 또는 네오칼리마스트릭스(*Neocallimastix*) 종이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 유용한 원핵 효소의 출처에는 대장균(*Escherichia. coli*), 지모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실루스(*Bacillus*) 종, 클로스트리듐(*Clostridium*) 종, 코리네박테륨(*Corynebacterium*) 종, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종, 락토코커스(*Lactococcus*) 종, 엔테로박터(*Enterobacter*) 종, 그리고 살모넬라(*Salmonella*) 종이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0266] 한 구체예에서, 본 발명은 이소부탄올을 생산하기 위한 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 그리고 여기서 상기 미생물은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 일부 구체예에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 특정 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29* (YMR226C) 유전자 또는 이의 동족체에 의해 인코딩된다. 한 구체예에서, 동족체는 반더왈톰지마 폴리스포라(*Vanderwaltomzyma polyspora*) (서열 번호: 2), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 3), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 4), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 5), 지고사카로미세스 로욱시(*Zygosaccharomyces rouxii*) (서열 번호: 6), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) (서열 번호: 7), 아시비아 고시피(*Ashbya gossypii*) (서열 번호: 8), 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*) (서열 번호: 9), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 10), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 11), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*) (서열 번호: 12), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*) (서열 번호: 13), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 14), 칸디다 두블리니엔시스(*Candida dubliniensis*) (서열 번호: 15), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) (서열 번호: 16), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (서열 번호: 17), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) (서열 번호: 18), 아스페르길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) (서열 번호: 19), 아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*) (서열 번호: 20), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) (서열 번호: 21), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 22), 그리고 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 23)로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0267] 다른 구체예에서, 본 발명은 이소부탄올을 생산하기 위한 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 그리고 여기서 상기 미생물은 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 일부 구체예에서, 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소이다. 예시적인 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 알데히드 탈수소효소 ALD6 (서열 번호: 25) 또는

이의 동족체 또는 변이체이다. 한 구체예에서, 동족체는 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 26), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 27), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 28), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) (서열 번호: 29), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 30), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 31), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) YJ789 (서열 번호: 32), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) JAY291 (서열 번호: 33), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) EC1118 (서열 번호: 34), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) DBY939 (서열 번호: 35), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) AWRI1631 (서열 번호: 36), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) RM11-1a (서열 번호: 37), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 38), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 39), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 40), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 41)로 구성된 군에서 선택된다.

[0268] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 이소부탄올을 생산하기 위한 재조합 미생물에 관계하고, 여기서 상기 재조합 미생물은 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함하고, 그리고 여기서 상기 미생물은 (i) 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작되고, 그리고 (ii) 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 일부 구체예에서, 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소는 3-케토산 환원효소 (3-KAR)이다. 특정 구체예에서, 3-케토산 환원효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29* (YMR226C) 유전자 또는 이의 동족체 또는 변이체에 의해 인코딩된다.

[0269] 한 구체예에서, 동족체는 반더왈톰지마 폴리스포라(*Vanderwaltomzyma polyspora*) (서열 번호: 2), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 3), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 4), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 5), 지고사카로미세스 로욱시(*Zygosaccharomyces rouxii*) (서열 번호: 6), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) (서열 번호: 7), 아시비아 고시피(*Ashbya gossypii*) (서열 번호: 8), 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*) (서열 번호: 9), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 10), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 11), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*) (서열 번호: 12), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*) (서열 번호: 13), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 14), 칸디다 두블리니엔시스(*Candida dubliniensis*) (서열 번호: 15), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) (서열 번호: 16), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (서열 번호: 17), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) (서열 번호: 18), 아스페르길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) (서열 번호: 19), 아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*) (서열 번호: 20), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) (서열 번호: 21), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 22), 그리고 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 23)로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소는 알데히드 탈수소효소이다. 특정 구체예에서, 알데히드 탈수소효소는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 알데히드 탈수소효소 ALD6 (서열 번호: 25) 또는 이의 동족체 또는 변이체이다. 한 구체예에서, 동족체는 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 26), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 27), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 28), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) (서열 번호: 29), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 30), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 31), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) YJ789 (서열 번호: 32), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) JAY291 (서열 번호: 33), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) EC1118 (서열 번호: 34), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) DBY939 (서열 번호: 35), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) AWRI1631 (서열 번호: 36), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) RM11-1a (서열 번호: 37), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 38), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 39), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 40), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 41)로 구성된 군에서 선택된다.

[0270] 한 구체예에서, 이소부탄올 생산 대사 경로는 피루베이트의 이소부탄올로의 전환에서 한 단계를 촉진하는 적어도 하나의 외생성 유전자를 포함한다. 다른 구체예에서, 이소부탄올 생산 대사 경로는 피루베이트의 이소부탄올로의 전환에서 단계들을 촉진하는 적어도 2개의 외생성 유전자를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 이소부탄올 생

산 대사 경로는 피루베이트의 이소부탄올로의 전환에서 단계들을 촉진하는 적어도 3개의 외생성 유전자를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 이소부탄올 생산 대사 경로는 피루베이트의 이소부탄올로의 전환에서 단계들을 촉진하는 적어도 4개의 외생성 유전자를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 이소부탄올 생산 대사 경로는 피루베이트의 이소부탄올로의 전환에서 단계들을 촉진하는 5개의 외생성 유전자를 포함한다.

[0271] 한 구체예에서, 이소부탄올 경로 유전자 중에서 하나 또는 그 이상은 시토졸에 국한되는 효소를 인코딩한다. 한 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 하나의 이소부탄올 경로 효소가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함한다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 2개의 이소부탄올 경로 효소가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 3개의 이소부탄올 경로 효소가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 적어도 4개의 이소부탄올 경로 효소가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함한다. 예시적인 구체예에서, 재조합 미생물은 5개의 이소부탄올 경로 효소가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로를 포함한다. 하나 또는 그 이상의 유전자가 시토졸에 국한되는 이소부탄올 생산 대사 경로는 공동 소유된 동시-계속 출원 U.S. Application Serial No. 12/855,276에서 기술되고, 이것은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0272] 이소부탄올의 생산에서 변형된 알코올 탈수소효소의 발현

[0273] 부산물 이소부티레이트의 생산을 감소시키기 위한, 본 명세서에서 기술된 다른 전략은 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환을 책임지는 알코올 탈수소효소 (ADH)의 활성 및/또는 발현을 증가시키는 것이다. 이러한 전략은 이소부탄올 경로 중간물질, 이소부티르알데히드에 대한 내생성 효소에 의한 경쟁을 예방한다. ADH의 활성 및/또는 발현에서 증가는 다양한 수단에 의해 달성될 수 있다. 가령, ADH 활성은 증가된 프로모터 세기를 갖는 프로모터를 이용함으로써 또는 알코올 탈수소효소 유전자의 사본 수를 증가시킴으로써 증가될 수 있다.

[0274] 대안적 구체예에서, 부산물 이소부티레이트의 생산은 이소부티르알데히드에 대한 증가된 비활성을 갖는 ADH를 이용함으로써 감소될 수 있다. 이소부티르알데히드에 대한 증가된 비활성을 갖는 이런 ADH 효소는 자연에서 확인되거나, 또는 ADH 효소에 대한 변형, 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 변형으로부터 생길 수 있다. 일부 구체예에서, 이들 변형은 이소부티르알데히드에 대한 미카엘리스-멘텐 상수 (Michaelis-Menten constant, K_M)에서 감소를 유발할 것이다. 이런 변형된 ADH 효소의 이용을 통해, 이소부티르알데히드에 대한 내생성 효소에 의한 경쟁이 더욱 제한된다. 한 구체예에서, 본 명세서에서 기술된 바와 같이 변형된 ADH를 포함하는 재조합 미생물에서 이소부티레이트 수율 (mol 이소부티레이트 / mol 글루코오스)은 대략 5% 이하이다. 다른 구체예에서, 본 명세서에서 기술된 바와 같이 변형된 ADH를 포함하는 재조합 미생물에서 이소부티레이트 수율 (mol 이소부티레이트 / mol 글루코오스)은 대략 1% 이하이다. 또 다른 구체예에서, 본 명세서에서 기술된 바와 같이 변형된 ADH를 포함하는 재조합 미생물에서 이소부티레이트 수율 (mol 이소부티레이트 / mol 글루코오스)은 대략 0.5% 이하, 대략 0.1% 이하, 대략 0.05% 이하, 또는 대략 0.01% 이하이다.

[0275] 게다가, 변형된 ADH 효소를 이용함으로써, 본 발명자들은 정반응 (forward reaction) (즉, 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환)이 역반응 (reverse reaction) (즉, 이소부탄올의 이소부티르알데히드로의 전환)에 비하여 선호되는 반응인 상황을 구축할 수 있다.

[0276] 앞서 기술된 전략은 일반적으로, 이소부티레이트 수율에서 감소를 유발하고, 이것은 이소부탄올 수율에서 증가를 동반한다. 따라서 이들 전략은 이소부티레이트 수율 및/또는 역가를 감소시키고, 그리고 이소부티레이트 수율에 대한 이소부탄올 수율의 비율을 증가시키는데 유용하다.

[0277] 따라서 한 측면에서, 본 출원에서는 나머지 4개의 이소부탄올 경로 효소와 공동-발현될 때, 향상된 이소부탄올 생산을 조장할 수 있는 증강된 활성을 갖는 변형된 ADH의 산출을 기술한다. 이러한 측면에 따른 한 구체예에서, 본 출원은 하나 또는 그 이상의 변형된 ADH를 포함하는 재조합 미생물에 관계한다. 한 구체예에서, 재조합 미생물은 본 명세서에서 기술된 바와 같이 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 더욱 조작된다. 다른 구체예에서, 재조합 미생물은 본 명세서에서 기술된 바와 같이 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 더욱 조작된다.

[0278] 이소부탄올 생합성 경로 이외에, 다른 생합성 경로는 알데히드의 알코올로의 전환을 위해 ADH 효소를 이용한다. 가령, ADH 효소는 1-프로판올, 2-프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, 1-펜탄올, 2-메틸-1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올의 생산을 위한 생합성 경로의 일부로서 다양한 알데히드를 알코올로 전환시킨다.

[0279] 본 명세서에서, 용어 "ADH" 또는 "ADH 효소" 또는 "알코올 탈수소효소"는 본 명세서에서 교체가능하게

이용되고, 그리고 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환을 촉진하는 효소를 지칭한다. ADH 서열은 락토코커스 락티스(*L. lactis*) (서열 번호: 175), 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*), 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 그리고 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 광범위한 미생물로부터 가용하다. 본 발명의 방법에 의해 변형가능한 ADH 효소에는 공동 소유된 동시-계속 출원 U.S. Patent Publication No. 2010/0143997에서 개시된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 명세서에서 기술된 방법에 의해 변형가능한 ADH 효소의 대표적인 목록은 표 97에서 찾아볼 수 있다.

[0280] 변형된 ADH 효소

[0281] 본 발명에 따라서, 임의의 숫자의 돌연변이가 ADH 효소에 만들어질 수 있고, 그리고 한 구체예에서, 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 증가된 능력을 유발하기 위해 복합 돌연변이가 만들어질 수 있다. 이런 돌연변이에는 점 돌연변이, 해독틀 이동 돌연변이, 결실, 그리고 삽입이 포함되고, 하나 또는 그 이상 (가령, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 등)의 점 돌연변이가 선호된다. 예시적인 구체예에서, 변형된 ADH 효소는 (a) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 티로신 50; (b) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 글루타민 77; (c) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 발린 108; (d) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 티로신 113; (e) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 이소류신 212; 그리고 (f) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 류신 264에서 선택되는 아미노산에 상응하는 위치에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함하고, 여기서 AdhA (서열 번호: 185)는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) 알코올 탈수소효소 (ADH) 유전자 *adhA* (서열 번호: 184) 또는 이의 코돈-최적화된 이형 (서열 번호: 206)에 의해 인코딩된다.

[0282] 돌연변이는 당업자에게 공지된 임의의 방법을 이용하여 본 발명의 ADH 효소 내로 도입될 수 있다. 돌연변이는 예로써, 이가 금속 이온 보조인자로서 망간의 존재에서 PCR 반응을 수행함으로써 무작위로 도입될 수 있다. 대안으로, 올리고뉴클레오티드 지향된 돌연변이유발은 인코딩 DNA 분자를 따라서 임의의 결정된 부위에서 모든 가능한 부류의 염기쌍 변화 (base pair change)를 가능하게 하는 변형된 ADH 효소를 산출하는데 이용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 기술은 목적되는 ADH 효소를 코딩하는 단일 가닥 뉴클레오티드 서열에 상보적인 (하나 또는 그 이상의 미스매치 제외) 올리고뉴클레오티드의 어닐링을 수반한다. 미스매치된 올리고뉴클레오티드는 이후, DNA 중합효소에 의해 신장되어, 한쪽 가닥에서 서열 내에 원하는 변화를 내포하는 이중-가닥 이중-가닥 DNA 분자가 산출된다. 서열에서 이들 변화는 예로써, 아미노산의 결실, 치환, 또는 삽입을 유발한다. 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 이후, 적절한 발현 벡터 내로 삽입될 수 있고, 따라서 돌연변이체 또는 변형된 폴리펩티드가 생산될 수 있다. 앞서 기술된 올리고뉴클레오티드 지향된 돌연변이유발은 예로써, PCR에 의해 수행될 수 있다.

[0283] 본 발명의 조성물과 방법에서 이용을 위한 효소에는 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 능력을 갖는 임의의 효소가 포함된다. 이런 효소에는 특히, 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA, 스트렙토코커스 뉴모니애(*S. pneumoniae*) AdhA, 스타필로코커스 아우레우스 (*S. aureus*) AdhA, 그리고 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) AdhA가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 발명의 방법에 의해 변경가능한 추가의 ADH 효소에는 공동 소유된 동시-계속 출원 U.S. Patent Publication No. 2010/0143997에서 개시된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 명세서에서 기술된 방법에 의해 변경가능한 ADH 효소의 대표적인 목록은 표 16에서 찾아볼 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 변형된 ADH 효소는 일과적이고 당분야에 널리 공지된 재조합 또는 유전자 조작 기술에 의해 획득될 수 있다. 변형된 ADH 효소는 예로써, 특정 부위 돌연변이유발 또는 무작위 돌연변이유발에 의해, 목적되는 ADH 효소를 인코딩하는 유전자 또는 유전자들을 돌연변이시킴으로써 획득될 수 있다. 이런 돌연변이에는 점 돌연변이, 결실 돌연변이, 그리고 삽입 돌연변이가 포함된다. 가령, 하나 또는 그 이상의 점 돌연변이 (가령, 하나 또는 그 이상의 상이한 아미노산으로 하나 또는 그 이상의 아미노산의 치환)가 본 발명의 변형된 ADH 효소를 작제하는데 이용될 수 있다.

[0284] 더 나아가, 본 발명은 아미노산 수준에서 야생형 ADH 효소 (가령, 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA 또는 대장균(*E. coli*) AdhA)에 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하고 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 증가된 능력을 나타내는 상동한 ADH 효소를 포함한다.

[0285] 아미노산 수준에서, 서열 번호: 185에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 ADH 효소에 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하고, 그리고 변형되지 않은 야생형 효소와 비교하여 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 증가된 능력을 나타내는 ADH 효소 역시 본 발명에 포함된다. 본 발명은 또한, 앞서 기술된 ADH 효소를 인코딩하는 핵산 분자를 포함한다.

[0286] 본 발명은 또한, 적어도 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 또는 600개 아미노산 잔기를 포함하고 ADH 효소와 연관된 하나 또는 그 이상의 활성을 유지하는 ADH 효소의 단편을 포함한다. 이런 단편은 결실 돌연변이에 의해, 일과적이고 당분야에 널리 공지된 재조합 기술에 의해, 또는 다수의 널리 공지된 단백분해 효소 중에서 한 가지를 이용한 목적되는 ADH 효소(들)의 효소적 절단에 의해 획득될 수 있다. 더 나아가, 본 발명은 앞서 기술된 변형된 ADH 효소 및 ADH 효소 단편을 인코딩하는 핵산 분자를 포함한다.

[0287] 예로써, 참고 아미노산 서열에 적어도 50% "동일한" 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 단백질 단편에 의해, 단백질의 아미노산 서열은 단백질 서열이 참고 단백질의 아미노산 서열의 각 100개 아미노산마다 50개까지의 아미노산 변경을 포함할 수 있는 점을 제외하고, 참고 서열과 동일한 것으로 의도된다. 다시 말하면, 참고 아미노산 서열에 적어도 50% 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 획득하기 위해, 참고 서열 내에 아미노산 잔기 중에서 50%까지 결실되거나, 또는 다른 아미노산으로 치환되거나, 또는 참고 서열 내에 전체 아미노산 잔기 중에서 50%까지 다수의 아미노산이 참고 서열 내로 삽입될 수 있다. 참고 서열의 이들 변경은 참고 아미노산 서열의 아미노 (N-) 및/또는 카르복시 (C-) 말단 위치에서 및/또는 이들 말단 위치 사이에 임의의 위치에서, 참고 서열에서 잔기 간에 및/또는 참고 서열 내에 하나 또는 그 이상의 인접한 그룹에서 개별적으로 산재되게 일어날 수 있다. 실제로, 소정의 아미노산 서열이 예로써, 참고 단백질의 아미노산 서열에 적어도 50% 동일한 지는 핵산 서열 동일성 결정을 위해 앞서 기술된 것들과 같은 공지된 컴퓨터 프로그램을 이용하여, 또는 CLUSTAL W 프로그램을 이용하여 통상적으로 결정될 수 있다 (Thompson, J. D., *et al., Nucleic Acids Res.* 22:4673 4680 (1994)).

[0288] 한 측면에서, 아미노산 치환은 앞서 확인된 위치 (즉, 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 Y50, Q77, V108, Y113, I212, 또는 L264에 동등하거나 상응하는 아미노산 위치) 중에서 하나 또는 그 이상에서 만들어진다. 따라서 이들 위치에서 아미노산은 Ala, Asn, Arg, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 그리고 Val을 비롯한 임의의 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 증가된 능력을 나타내는 ADH 효소의 특정 실례는 (1) 위치 50에서 티로신이 페닐알라닌 또는 트립토판 잔기로 대체되고, (2) 위치 77에서 글루타민이 아르기닌 또는 세린 잔기로 대체되고, (3) 위치 108에서 발린이 세린 또는 알라닌 잔기로 대체되고, (4) 위치 113에서 티로신이 페닐알라닌 또는 글리신 잔기로 대체되고, (5) 위치 212에서 이소류신이 트레오닌 또는 발린 잔기로 대체되고, 및/또는 (6) 위치 264에서 류신이 발린 잔기로 대체되는 ADH이다.

[0289] 본 발명에서 이용을 위한, 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 능력을 갖는 폴리펩티드는 당업자에게 널리 공지된, 자연 단백질을 단리하고 정제하기 위한 표준 절차에 따라 그들의 자연 원핵 또는 진핵 출처로부터 단리될 수 있다 (참조: Houts, G. E., et al., J. Virol. 29:517 (1979)). 이에 더하여, 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 능력을 갖는 폴리펩티드는 당업자에게 익숙한 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다 (참조: Kotewicz, M. L., *et al., Nucl. Acids Res.* 16:265 (1988); Soltis, D. A., 그리고 Skalka, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3372 3376 (1988)).

[0290] 본 발명의 한 측면에서, 변형된 ADH 효소는 재조합 기술에 의해 만들어진다. 본 발명에 따라서 변형되는 ADH 효소를 인코딩하는 유전자 또는 기타 핵산 분자를 클로닝하기 위해, ADH 효소 유전자 또는 개방 해독 틀을 내포하는 단리된 DNA는 재조합 DNA 라이브러리를 작제하는데 이용될 수 있다. 당분야에 널리 공지된 임의의 벡터가 목적되는 ADH 효소를 클로닝하는데 이용될 수 있다. 하지만, 이용된 벡터는 재조합 벡터가 형질전환될 숙주와 양립해야 한다.

[0291] 플라스미드 라이브러리를 작제하기 위한 원핵 벡터에는 대장균(*E. coli*)에서 복제할 수 있는 것들과 같은 플라스미드, 예를 들면, pBR322, ColE1, pSC101, pUC-벡터 (pUC18, pUC19 등: In: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); 그리고 Sambrook et al., In: Molecular Cloning A Laboratory Manual (2d ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))가 포함된다. 바실루스(*Bacillus*) 플라스미드에는 pC194, pUB110, pE194, pC221, pC217 등이 포함된다. 이런 플라스미드는 Glyczan, T. In: The Molecular Biology Bacilli, Academic Press, York (1982), 307 329에 의해 개시된다. 적절한 스트렙토미세스(*Streptomyces*) 플라스미드에는 pIJ101 (Kendall *et al., J. Bacteriol.* 169:4177 4183 (1987))이 포함된다. 슈도모나스(*Pseudomonas*) 플라스미드는 John et al., (Rad. Insec. Dis. 8:693 704 (1986)), 그리고 Igaki, (Jpn. J. Bacteriol. 33:729 742 (1978))에서 재검토된다. 넓은-숙주 범위 플라스미드 또는 코스미드, 예를 들면, pCP13 (Darzins and Chakrabarty, *J. Bacteriol.* 159:9 18 (1984)) 역시 본 발명에 이용될 수 있다.

[0292] 목적되는 ADH 핵산 분자를 클로닝하는데 적합한 숙주는 원핵 숙주이다. 원핵 숙주의 한 가지 실례는 대장균(*E. coli*)이다. 하지만, 본 발명의 원하는 ADH 핵산 분자는 에스체르키아(*Escherichia*), 바실루스(*Bacillus*), 스트렙토미세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*), 그리고 프로테우스(*Proteus*) 속의 숙주가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다른 원핵 숙주에서 클로닝될 수도 있다.

[0293] 목적되는 ADH 효소의 클로닝과 발현을 위한 진핵 숙주에는 효모와 진균 세포가 포함된다. 특히 바람직한 진핵 숙주는 효모이다. 이런 진핵 세포에서 원하는 ADH 효소의 발현은 진핵 프로모터를 포함하는 진핵 조절 영역의 이용을 요구할 지도 모른다. 진핵 세포에서 ADH 핵산 분자의 클로닝과 발현은 널리 공지된 진핵 벡터 시스템을 이용한 널리 공지된 기술에 의해 달성될 수 있다.

[0294] 본 발명에 따라서 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 효소의 능력을 증가시키거나, 또는 본 발명에 따라서 효소에 본 명세서에서 기술된 다른 성질을 공여하기 위해, 하나 또는 그 이상의 돌연변이가 목적되는 임의의 ADH 효소에서 만들어질 수 있다. 이런 돌연변이에는 점 돌연변이, 해독틀 이동 돌연변이, 결실, 그리고 삽입이 포함된다. 바람직하게는, 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 유발하는 하나 또는 그 이상의 점 돌연변이가 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 증강된 능력을 갖는 ADH 효소를 생산하는데 이용된다. 본 발명의 바람직한 측면에서, 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185) 효소의 위치 Y50 (가령, Y50W 또는 Y50F), Q77 (가령, Q77S 또는 Q77R), V108 (가령. V108S 또는 V108A), Y113 (가령, Y113F 또는 Y113G), I212 (가령, I212T 또는 I212V), 및/또는 L264 (가령. L264V)에 동등하거나 상응하는 위치에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이가 목적되는 다른 ADH 효소에서 원하는 결과를 산출하기 위해 만들어질 수 있다.

[0295] 본 발명에서 확인된 ADH 효소의 상응하는 위치 (가령, 서열 번호: 185의 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA)는 당업자에 의해 다른 ADH 효소에 대해 쉽게 확인될 수 있다. 따라서 정의된 영역 및 본 출원에서 기술된 검사법을 고려하면, 당업자는 하나 또는 다수의 변형을 만들 수 있고, 이것은 목적되는 임의의 ADH 효소에서 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 증가된 능력을 유발할 것이다.

[0296] 바람직한 구체예에서, 변형된 ADH 효소는 야생형 ADH 효소와 비교하여 Y50, Q77, V108, Y113, I212, 또는 L264에 상응하는 위치에서 선택되는 1 내지 6개 아미노산 치환을 갖는다. 다른 구체예에서, 이들 변형된 ADH 효소는 개별 야생형 ADH 효소와 비교하여 다른 위치에서 추가의 아미노산 치환을 갖는다. 따라서 변형된 ADH 효소는 개별 야생형 ADH 효소와 비교하여 다른 위치에서 적어도 대략 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40개의 상이한 잔기를 가질 수 있다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 아미노산 치환을 갖는 추가의 위치의 숫자는 변이체를 산출하는데 이용되는 야생형 ADH 효소에 좌우될 것이다. 따라서 일부 경우에, 50개까지의 상이한 위치가 아미노산 치환을 가질 수 있다.

[0297] 다양한 미생물은 본 발명에서 제시된 재조합 미생물에서 이용하기 적합한 ADH 효소를 인코딩하는 유전자 물질에 대한 "출처"로서 기능할 수 있는 것으로 이해된다. 가령, 이에 더하여, 이들 효소를 인코딩하는 유전자는 다른 진균과 세균 종으로부터 확인될 수 있고, 그리고 이러한 경로의 조정을 위해 발현될 수 있다. 락토코커스 락티스(*L. lactis*)를 비롯한 락토코커스(*Lactococcus*) 종, 락토바실루스 브레비스(*L. brevis*), 락토바실루스 부츠네리(*L. buchneri*), 락토바실루스 힐가르디(*L. hilgardii*), 락토바실루스 퍼멘툼(*L. fermentum*), 락토바실루스 루테리(*L. reuteri*), 락토바실루스 바기날리스(*L. vaginalis*), 락토바실루스 안트리(*L. antri*), 락토바실루스 오리스(*L. oris*), 그리고 락토바실루스 콜레오호미니스(*L. coleohominis*)를 비롯한 락토바실루스(*Lactobacillus*) 종, 페디오코커스 아시딜락티시(*P. acidilactici*)를 비롯한 페디오코커스(*Pediococcus*) 종, 바실루스 세레우스(*B. cereus*), 바실루스 투린기엔시스(*B. thuringiensis*), 바실루스 코아굴란스(*B. coagulans*), 바실루스 안트라시스(*B. anthracis*), 바실루스 웨이헨스테파넨시스(*B. weihenstephanensis*), 바실루스 미코이데스(*B. mycoides*), 그리고 바실루스 아밀로리퀘파시엔스(*B. amyloliquefaciens*)를 비롯한 바실루스(*Bacillus*) 종, 렙토트리키아 굿펠로위(*L. goodfellowii*), 렙토트리키아 부칼리스(*L. buccalis*), 그리고 렙토트리키아 호프스타디(*L. hofstadii*)를 비롯한 렙토트리키아(*Leptotrichia*) 종, 액티노바실루스 플로로뉴모니애(*A. pleuropneumoniae*)를 비롯한 액티노바실루스(*Actinobacillus*) 종, 스트렙토코커스 상귀니스(*S. sanguinis*), 스트렙토코커스 파라상귀니스(*S. parasanguinis*), 스트렙토코커스 고르도니(*S. gordonii*), 스트렙토코커스 뉴모니애(*S. pneumoniae*), 그리고 스트렙토코커스 미티스(*S. mitis*)를 비롯한 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 종, 스트렙토바실루스 모닐리포르미스(*S. moniliformis*)를 비롯한 스트렙토바실루스(*Streptobacillus*) 종, 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)를 비롯한 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 종, 아이케넬라 코로덴스(*E. corrodens*)를 비롯한 아이케넬라(*Eikenella*) 종, 바이셀라 파라메센테로이데스(*W. paramesenteroides*)를 비롯한 바이셀라(*Weissella*) 종, 킹겔라 오랄리스(*K. oralis*)를 비롯한 킹겔라

(*Kingella*) 종, 그리고 로티아 덴토카리오사(*R. dentocariosa*)를 비롯한 로티아(*Rothia*) 종, 그리고 엑시구오박테륨(*Exiguobacterium*) 종이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다양한 생명체가 이들 효소에 대한 출처로서 기능할 수 있다.

[0298] 몇몇 ADH 효소에 대한 뉴클레오티드 서열이 공지되어 있다. 가령, ADH 효소의 서열은 락토코커스 락티스(*L. lactis*) (서열 번호: 185), 스트렙토코커스 뉴모니애(*S. pneumoniae*), 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*), 그리고 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다양한 미생물로부터 획득가능하다. 본 발명의 방법에 의해 변형가능한 ADH 효소에는 공동 소유된 동시-계속 출원 U.S. Patent Publication No. 2010/0143997에서 개시된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 명세서에서 기술된 방법에 의해 변형가능한 ADH 효소의 대표적인 목록은 표 97에서 찾아볼 수 있다.

[0299] 이에 더하여, 비활성을 갖는 ADH 효소를 인코딩하는 유전자를 확인하기 위해 임의의 방법이 이용될 수 있다. 일반적으로, 유사한 활성을 갖는 상동한 또는 상사한 유전자는 기능적, 구조적, 및/또는 유전적 분석에 의해 확인될 수 있다. 대부분의 경우에, 유사한 활성을 갖는 상동한 또는 상사한 유전자는 기능적, 구조적, 또는 유전적 유사성을 가질 것이다. 상동한 유전자 및 상동한 효소를 확인하기 위해 당업자에게 공지된 기술이 적합할 수 있다. 일반적으로, 상사한 유전자 및/또는 상사한 효소는 기능적 분석에 의해 확인될 수 있고 기능적 유사성을 가질 것이다. 상사한 유전자 및 상사한 효소를 확인하기 위해 당업자에게 공지된 기술이 적합할 수 있다. 가령, 상동한 또는 상사한 유전자, 단백질, 또는 효소를 확인하기 위한 기술에는 유전자/효소의 공개된 서열에 기초된 프라이머를 이용한 PCR에 의한, 또는 유전자 간에 보존된 영역을 증폭하도록 설계된 축퇴 프라이머를 이용한 축퇴 PCR에 의한 유전자의 클로닝이 포함될 수 있지만 이에 국한되지 않는다. 게다가, 당업자는 기능적 상동성 또는 유사성을 갖는 상동한 또는 상사한 유전자, 단백질, 또는 효소를 확인하는 기술을 이용할 수 있다. 기술에는 활성에 대한 시험관내 효소 검사법을 통한 효소의 촉매 효율 또는 비활성에 대한 세포 또는 세포 배양액 조사, 그 다음 정제를 통한 상기 활성을 갖는 효소의 단리, 에드만 분해 (Edman degradation)와 같은 기술을 통한 효소의 단백질 서열 결정, 개연적 핵산 서열에 대한 PCR 프라이머의 설계, PCR을 통한 상기 DNA 서열의 증폭, 그리고 상기 핵산 서열의 클로닝이 포함된다. 유사한 활성을 갖는 상동한 또는 상사한 유전자를 확인하는 기술에는 또한, 후보 유전자 또는 효소와 관련된 데이터의 BRENDA, KEGG, 또는 MetaCYC와의 같은 데이터베이스와의 비교가 포함된다. 후보 유전자 또는 효소는 본 발명의 교시에 따라, 전술한 데이터베이스 내에서 확인될 수 있다. 게다가, 효소적 활성은 표현형적으로 결정될 수 있다.

[0300] 증강된 촉매 효율을 갖는 ADH 효소를 만드는 방법

[0301] 본 발명에서는 또한, 촉매 효율을 증강시키기 위해 ADH 효소를 조작하는 방법을 제시한다.

[0302] ADH 효소의 촉매 효율을 증가시키는 한 가지 접근법은 NNK 라이브러리로 포화 돌연변이유발 (saturation mutagenesis)이다. 이들 라이브러리는 어떤 단일 돌연변이가 이소부티르알데히드를 이소부탄올로 전환시키는 증가된 능력에 기여하는 지를 확인하기 위해, 촉매 효율에서 증가에 대해 스크리닝될수 있다. 전술한 잔기에서 돌연변이의 조합은 임의의 방법에 의해 조사될 수 있다. 가령, 돌연변이체의 조합 라이브러리가 포화 돌연변이유발 연구의 결과에 기초하여 설계될 수 있다.

[0303] 다른 접근법은 합성 올리고뉴클레오티드 상에서 인코딩된 무작위 돌연변이를 효소 내로 함입 (incorporation)함으로써 다양성 (diversity)을 산출하는 무작위 올리고뉴클레오티드 돌연변이유발을 이용하는 것이다. 집단 내에서 개별 효소에서 돌연변이의 숫자는 올리고뉴클레오티드의 합성 동안 표적 서열의 길이 및 무작위화의 정도를 변화시킴으로써 제어될 수 있다. 이러한 더욱 정의된 접근법의 이점은 모든 가능한 아미노산 돌연변이 및 결부된 돌연변이가 발견될 수 있다는 점이다.

[0304] 앞서 기술된 실험으로부터 최고 변이체들이 충분한 활성을 나타내지 않으면, 오류-유발 (error-prone) PCR에 의한 방향적 진화가 진전된 향상을 획득하는데 이용될 수 있다. ADH 효소의 오류-유발 PCR 돌연변이유발 이후에, ADH 활성에 대한 스크리닝이 수행될 수 있다.

[0305] 증강된 ADH 촉매 효율

[0306] 한 측면에서, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 증강된다. 본 명세서에서, 구(句) "촉매 효율"은 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환을 가능하게 하는 ADH 효소의 성질을 지칭한다.

[0307] 한 구체예에서, 변형된 ADH의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 증강된다. 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 5% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 15% 증강된다. 더욱 바람직하게는,

변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 25% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 50% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 75% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 100% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 200% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 500% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 1000% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 2000% 증강된다. 더욱 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 3000% 증강된다. 가장 바람직하게는, 변형된 ADH 효소의 촉매 효율은 야생형 또는 부모 ADH와 비교하여 적어도 대략 3500% 증강된다.

[0308] 변형된 ADH 효소의 유전자 발현

[0309] 본 발명에서는 유익한 대사산물의 생산에 관여하는 하나 또는 그 이상의 변형된 ADH 효소 유전자의 발현을 위한 방법, 그리고 이러한 방법에 유용한 재조합 DNA 발현 벡터가 제시된다. 따라서 이런 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터는 본 발명의 범위 내에 포함된다. 용어 발현 벡터는 숙주 미생물 또는 세포-없는 전사와 번역 시스템 내로 도입될 수 있는 핵산을 지칭한다. 발현 벡터는 미생물 또는 임의의 세포 구획 내에 염색체 또는 다른 DNA, 예를 들면, 세포질 내에 복제 벡터의 일부로서 인지에 상관없이, 미생물 내에 영구적으로 또는 일시적으로 유지될 수 있다. 발현 벡터는 또한, RNA의 발현을 주동하는 프로모터를 포함하고, RNA는 전형적으로 미생물 또는 세포 추출물 내에서 폴리펩티드로 번역된다. RNA의 단백질로의 효율적인 번역을 위해, 발현 벡터는 전형적으로 발현되는 유전자의 코딩 서열의 출발 코돈의 상류에 위치된 리보솜-결합 부위 서열 역시 내포한다. 다른 요소, 예를 들면, 인핸서, 분비 신호 서열, 전사 종결 서열, 그리고 벡터를 내포하는 숙주 미생물이 확인되고 및/또는 선별될 수 있는 하나 또는 그 이상의 마커 유전자 역시 발현 벡터 내에 존재할 수 있다. 선별가능 마커, 다시 말하면, 항생제 내성 또는 감수성을 공여하는 유전자가 이용되고, 그리고 형질전환된 세포가 적절한 선택성 배지에서 성장될 때 이들 세포에 선별가능 표현형을 공여한다.

[0310] 발현 벡터의 다양한 성분은 벡터의 의도된 용도 및 벡터가 복제하거나 발현을 주동하도록 의도되는 숙주 세포(들)에 따라 광범위하게 변할 수 있다. 대장균(*E. coli*), 효모, 스트렙토미세스(*Streptomyces*), 그리고 기타 통상적으로 이용되는 세포에서 유전자의 발현과 벡터의 유지에 적합한 발현 벡터 성분은 폭넓게 공지되어 있고 상업적으로 구입가능하다. 가령, 본 발명의 발현 벡터 내에 포함을 위한 적절한 프로모터에는 진핵 또는 원핵 숙주 미생물에서 기능하는 것들이 포함된다. 프로모터는 숙주 미생물의 성장에 비하여 발현의 조절이 가능하거나, 또는 화학적 또는 물리적 자극에 응하여 유전자의 발현이 켜지거나 꺼지도록 하는 조절 서열을 포함할 수 있다. 대장균(*E. coli*) 및 일정한 다른 세균 숙주 세포의 경우에, 생합성 효소, 항생제-내성 공여 효소, 그리고 파지 단백질에 대한 유전자로부터 유래된 프로모터가 이용될 수 있고, 여기에는 예로써, 갈락토오스, 락토오스(lac), 말토오스, 트립토판 (trp), 베타-락타마아제 (bla), 박테리오파지 람다 PL, 그리고 T5 프로모터가 포함된다. 이에 더하여, 합성 프로모터, 예를 들면, tac 프로모터 (U.S. Pat. No. 4,551,433) 역시 이용될 수 있다. 대장균(*E. coli*) 발현 벡터의 경우에, 예로써 pUC, p1P, p1, 그리고 pBR로부터 대장균(*E. coli*) 복제 기원을 포함하는 것이 유용하다.

[0311] 따라서 재조합 발현 벡터는 적어도 하나의 발현 시스템을 내포하고, 이것은 차례로, 프로모터에 작동가능하게 연결된 생합성 유전자 코딩 서열의 적어도 일부분 및 선택적으로, 양립성 숙주 세포에서 코딩 서열의 발현을 실행하도록 작동하는 종결 서열로 구성된다. 숙주 세포는 염색체외 요소 (extrachromosomal element)로서 또는 염색체 내로 통합된 발현 시스템 서열을 내포하는 본 발명의 재조합 DNA 발현 벡터로 형질전환에 의해 변형된다.

[0312] 게다가, 특정 미생물 (즉, 효모 미생물)에 특이적인 핵산 분자로부터 폴리펩티드를 발현하는 방법은 널리 공지되어 있다. 가령, 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*) 및 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 내에서 이종기원성 폴리펩티드의 발현에 이용되는 핵산 구조체는 널리 공지되어 있다 (참조: U.S. Pat. Nos. 4,859,596과 4,943,529, 이들 각각은 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*)에 대해 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다; 그리고 사카로미세스(*Saccharomyces*)에 대해 예로써 Gellissen *et al.*, Gene 190(1):87-97 (1997)). 효모 플라스미드는 선별가능 마커 및 복제 기원 (일명, 자율 복제 서열, Autonomously Replicating Sequence (ARS))을 갖는다. 이에 더하여, 일정한 플라스미드는 또한, 동원체 서열 (centromeric sequence)을 내포한다. 이들 동원체 플라스미드는 일반적으로, 단일 또는 낮은 사본 플라스미드이다. 동원체 서열이 없고, 그리고 2 마이크론 (사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)) 또는 1.6 마이크론 (클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*))

복제 기원을 이용하는 플라스미드는 높은 사본 플라스미드이다. 선별가능 마커는 자가영양성 마커, 예를 들면, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *URA3* 또는 *ADE2*, 또는 항생제 내성 마커, 예를 들면, *bar*, *ble*, *hph*, 또는 *kan*일 수 있다.

[0313] 본 발명의 핵산은 표준 PCR 증폭 기술 및 하기 실시예 섹션에서 기술된 절차에 따라, 주형 (template)으로서 cDNA, mRNA 합성 DNA, 또는 대안으로, 유전체 DNA, 그리고 적절한 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 증폭될 수 있다. 이렇게 증폭된 핵산은 적절한 벡터 내로 클로닝되고 DNA 서열 분석에 의해 특성화될 수 있다. 게다가, 뉴클레오티드 서열에 상응하는 올리고뉴클레오티드는 예로써, 자동화된 DNA 합성장치를 이용한 표준 합성 기술에 의해 만들어질 수 있다.

[0314] 또한, 본 명세서에서 기술된 효소에 상동한 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 핵산 분자는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실이 인코딩된 단백질 내로 도입되도록 특정 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 내로 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실을 도입함으로써 산출될 수 있는 것으로 이해된다. 돌연변이는 표준 기술, 예를 들면, 특정 부위 돌연변이유발 및 PCR-매개된 돌연변이유발에 의해 폴리뉴클레오티드 내로 도입될 수 있다. 비-보존성 아미노산 치환 (상기 참조)을 만드는 것이 바람직한 이들 위치에 대조적으로, 일부 위치에서는 보존성 아미노산 치환을 만드는 것이 바람직하다. "보존성 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당분야에서 확인되었다. 이들 패밀리에는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (가령, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (가령, 아스파르트산, 글루타민산), 하전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (가령, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (가령, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산 (가령, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (가령, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)이 포함된다.

[0315] 비록 아미노산 변경의 효과가 인산화, 당화, 사슬내 연쇄, 삼차 구조, 그리고 활성 부위 또는 가능한 알로스테릭 부위 (allosteric site)에서 아미노산의 역할과 같은 인자에 따라 달라지긴 하지만, 치환된 아미노산은 대체되는 아미노산과 동일한 그룹으로부터 나오는 것이 일반적으로 바람직하다. 어느 정도, 하기 그룹은 교체가능한 아미노산을 내포한다: 염기성 아미노산 리신, 아르기닌, 그리고 히스티딘; 산성 아미노산 아스파르트산과 글루타민산; 중성 극성 아미노산 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아스파라긴 및 정도가 덜하지만, 메티오닌; 비극성 지방족 아미노산 글리신, 알라닌, 발린, 이소류신, 그리고 류신 (하지만, 크기로 인하여, 글리신과 알라닌이 더욱 밀접하게 관련되고, 그리고 발린, 이소류신과 류신이 더욱 밀접하게 관련된다); 그리고 방향족 아미노산 페닐알라닌, 트립토판, 그리고 티로신. 이에 더하여, 비록 상이한 부류로 분류되긴 하지만, 알라닌, 글리신, 그리고 세린은 어느 정도 교체가능한 것으로 보이고, 그리고 시스테인은 이러한 그룹에 추가로 적합하거나, 또는 이들 극성 중성 아미노산과 함께 분류될 수 있다.

[0316] **일반적인 방법**

[0317] 3-케토산 환원효소 동족체의 확인

[0318] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) TMA29가 포함되지만 이에 국한되지 않는, 3-케토산 환원효소 활성을 갖는 효소를 인코딩하는 유전자를 확인하기 위해 임의의 방법이 이용될 수 있다. 일반적으로, 3-케토산 환원효소에 상동한 또는 유사한 유전자, 예를 들면, TMA29는 기능적, 구조적, 및/또는 유전적 분석에 의해 확인될 수 있다. 많은 경우에, 상동한 또는 유사한 유전자 및/또는 상동한 또는 유사한 효소는 기능적, 구조적, 또는 유전적 유사성을 가질 것이다.

[0319] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 유전자 *TMA29*는 또한, YMR226C로 알려져 있다. 개방 해독 틀 (ORF) YMR226C는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 염색체 XIII 상에서 위치 722395…721592에서 발견된다. YMR226C의 염색체 위치는 많은 관련된 효모에서 염색체에 고도로 신터닉(syntenic)한 영역이다 [Byrne, K.P. and K. H. Wolfe (2005) "The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species." Genome Res. **15**(10):1456-61. Scannell, D. R., K. P. Byrne, J. L. Gordon, S. Wong, and K. H. Wolfe (2006) "Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploidy yeasts." *Nature* 440: 341-5. Scannell, D. R., A. C. Frank, G. C. Conant, K. P. Byrne, M. Woolfit, and K. H. Wolfe (2007)" Independent sorting-out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole-genome duplication." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8397-402.]

[0320] 가령, 다른 효모 종으로부터 YMR226C의 신터닉 이형의 위치는 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*)에서 염색체 13, 지고사카로미세스 로욱시(*Zygosaccharomyces rouxii*)에서 염색체 1, 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*)에서 염색체 2, 아시비아 고시피(*Ashbya gossypii*)에서 염색체 6, 사카로미세스 클루이베리(*S. kluyveri*)에서 염색체 8, 클루이베로미세스 써모톨레란스(*K. thermotolerans*)에서 염색체 4, 그리고 추론된 조상 효모 종으로부터 염색체 8 상에서 발견될 수 있다 [Gordon, J. L., K. P. Byrne, and K. H. Wolfe (2009) "Additions, losses, and rearrangements on the evolutionary route from a reconstructed ancestor to the modern *Saccharomyces cerevisiae* genome." *PLoS Genet.* 5: e1000485.]

[0321] 이러한 신터닉 상관관계를 이용하여, 상기 유전자의 종-특이적 이형은 쉽게 확인되고, 그리고 실례는 표 4에서 찾아볼 수 있다.

표 4

[0322] **YMR226C 및 이들의 동족체.**

종	유전자 명칭	서열 번호:
사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)	YMR226C	1
카바티엘라 폴리스포라(*K. polyspora*)	Kpol_1043p53	2
사카로미세스 카스텔리(*S. castelli*)	Scas_594.12d	3
칸디다 글라브라타(*C. glabrata*)	CAGL0M11242g	4
사카로미세스 바야누스(*S. bayanus*)	Sbay_651.2	5
지고사카로미세스 로욱시(*Z. rouxii*)	ZYRO0A05742p	6
클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*)	KLLA0B08371g	7
아시비아 고시피(*A. gossypii*)	AFR561Wp	8
사카로미세스 클루이베리(*S. kluyveri*)	SAKL0H04730g	9
클루이베로미세스 써모톨레란스(*K. thermotolerans*)	KLTH0D13002p	10
클루이베로미세스 왈티(*K. waltii*)	Kwal_26.9160	11

[0323] 신터니에 더하여, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29* 유전자에 대한 진균 동족체가 BLAST와 같은 도구 및 서열 배열을 통해 당업자에 의해 확인될 수 있다. 이들 다른 동족체는 3-히드록시산 부산물의 축적을 제거하기 위해 개별 효모 종으로부터 유사한 방식으로 결실될 수 있다. 상동한 단백질의 실례는 반더왈톰지마 폴리스포라(*Vanderwaltomzyma polyspora*) (서열 번호: 2), 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 3), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 4), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 5), 지고사카로미세스 로욱시(*Zygosaccharomyces rouxii*) (서열 번호: 6), 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) (서열 번호: 7), 아시비아 고시피(*Ashbya gossypii*) (서열 번호: 8), 사카로미세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*) (서열 번호: 9), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 10), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 11), 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*) (서열 번호: 12), 데바리오미세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*) (서열 번호: 13), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 14), 칸디다 두블리니엔시스(*Candida dubliniensis*) (서열 번호: 15), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) (서열 번호: 16), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (서열 번호: 17), 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) (서열 번호: 18), 아스페르길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) (서열 번호: 19), 아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*) (서열 번호: 20), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) (서열 번호: 21), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 22), 그리고 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 23)에서 발견될 수 있다.

[0324] 당업자에게 공지된 기술이 추가의 상동한 유전자 및 상동한 효소를 확인하는데 적합할 수 있다. 일반적으로, 상사한 유전자 및/또는 상사한 효소는 기능적 분석에 의해 확인되고 기능적 유사성을 가질 것이다. 당업자에게 공지된 기술이 상사한 유전자 및 상사한 효소를 확인하는데 적합할 수 있다. 가령, 상동한 또는 상사한 유전자, 단백질, 또는 효소를 확인하기 위한 기술에는 유전자/효소의 공개된 서열에 기초된 프라이머를 이용한 PCR에 의한, 또는 탈수화효소 유전자 사이에 보존된 영역을 증폭하도록 설계된 축퇴 프라이머를 이용한 축퇴 PCR에 의한 탈수화효소 유전자 클로닝이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 게다가, 당업자는 기능적 상동성 또는 유사성을 갖는 상동한 또는 상사한 유전자, 단백질, 또는 효소를 확인하는 기술을 이용할 수 있다. 기술에는 상기 활성에 대한 시험관내 효소 검사법을 통한 효소의 촉매 활성에 대한 세포 또는 세포 배양액 조사(가령, 본 명세서에서 또는 Kiritani, K. *Branched-Chain Amino Acids* Methods Enzymology, 1970에서 기술된 바와 같이), 그 다음 정제를 통한 상기 활성을 갖는 효소의 단리, 에드만 분해 (Edman degradation)와 같은 기술을 통한 효소의 단백질 서열 결정, 개연적 핵산 서열에 대한 PCR 프라이머의 설계, PCR을 통한 상기 DNA 서열의 증폭, 그리고 상기 핵산 서열의 클로닝이 포함된다. 상동한 또는 유사한 유전자 및/또는 상동한 또는 유사한 효소, 상사한 유전자 및/또는 상사한 효소 또는 단백질을 확인하기 위한 기술에는 또한, 후보 유전자 또는 효소와 관련된 데이터의 BRENDA, KEGG, 또는 MetaCYC와 같은 데이터베이스와의 비교가 포함된다. 후보 유전자 또는 효소는 본 발명의 교시에 따라서, 앞서 언급된 데이터베이스 내에서 확인될 수 있다.

[0325] 알데히드 탈수소효소 동족체의 확인

[0326] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6이 포함되지만 이에 국한되지 않는, 알데히드 탈수소효소 활성을 갖는 효소를 인코딩하는 유전자를 확인하기 위해 임의의 방법이 이용될 수 있다. 일반적으로, 알데히드 탈수소효소에 상동한 또는 유사한 유전자, 예를 들면, ALD6은 기능적, 구조적, 및/또는 유전적 분석에 의해 확인될 수 있다. 많은 경우에, 상동한 또는 유사한 유전자 및/또는 상동한 또는 유사한 효소는 기능적, 구조적, 또는 유전적 유사성을 가질 것이다.

[0327] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 유전자 *ALD6*은 또한, 분류명 YPL061W로 알려져 있다. 개방 해독 틀(ORF) YPL061W는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 염색체 XVI 상에서 위치 432585…434087에서 발견된다. YPL061W의 염색체 위치는 많은 관련된 효모에서 염색체에 고도로 신터닉(syntenic)한 영역이다 [Byrne, K.P. and K. H. Wolfe (2005) "The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species." Genome Res. **15**(10):1456-61. Scannell, D. R., K. P. Byrne, J. L. Gordon, S. Wong, and K. H. Wolfe (2006) "Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploidy yeasts." *Nature* 440: 341-5. Scannell, D. R., A. C. Frank, G. C. Conant, K. P. Byrne, M. Woolfit, and K. H. Wolfe (2007)" Independent sorting-out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole-genome duplication." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8397-402.]

[0328] 가령, 다른 효모 종으로부터 YPL061W의 신터닉 이형의 위치는 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*)에서 염색체 8, 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*)에서 염색체 5, 클루이베로미세스 써모톨레란스(*K. thermotolerans*)에서 염색체 5, 그리고 추론된 조상 효모 종으로부터 염색체 8 상에서 발견될 수 있다 [Gordon, J. L., K. P. Byrne, and K. H. Wolfe (2009) "Additions, losses, and rearrangements on the evolutionary route from a reconstructed ancestor to the modern *Saccharomyces cerevisiae* genome." *PLoS Genet.* 5: e1000485.]

[0329] 이러한 신터닉 상관관계를 이용하여, 상기 유전자의 종-특이적 이형은 쉽게 확인되고, 그리고 실례는 표 5에서 찾아볼 수 있다.

표 5

[0330] **ALD6 및 이들의 동족체.**

종	유전자 명칭	서열 번호:
사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)	YPL061W	25
사카로미세스 카스텔리(*S. castelli*)	Scas_664.24	26
칸디다 글라브라타(*C. glabrata*)	CAGL0H05137g	27

사카로미세스 바야누스(*S. bayanus*)	Sbay_623.4	28
클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*)	KLLA0E23057	29
클루이베로미세스 써모톨레란스(*K. thermotolerans*)	KLTH0E12210g	30
클루이베로미세스 왈티(*K. waltii*)	Kwal_27.119760	31

[0331] 신터니에 더하여, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *ALD6* 유전자에 대한 진균 동족체가 BLAST와 같은 도구 및 서열 배열을 통해 당업자에 의해 확인될 수 있다. 이들 다른 동족체는 알데히드 부산물의 축적을 제거하기 위해 개별 효모 종으로부터 유사한 방식으로 결실될 수 있다. 상동한 단백질의 실례는 사카로미세스 카스텔리(*Saccharomyces castelli*) (서열 번호: 26), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*) (서열 번호: 27), 사카로미세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*) (서열 번호: 28), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) (서열 번호: 29), 클루이베로미세스 써모톨레란스(*Kluyveromyces thermotolerans*) (서열 번호: 30), 클루이베로미세스 왈티(*Kluyveromyces waltii*) (서열 번호: 31), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) YJ789 (서열 번호: 32), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) JAY291 (서열 번호: 33), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) EC1118 (서열 번호: 34), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) DBY939 (서열 번호: 35), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) AWRI1631 (서열 번호: 36), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) RM11-1a (서열 번호: 37), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*) (서열 번호: 38), 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) (서열 번호: 39), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 40), 그리고 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (서열 번호: 41)에서 찾아볼 수 있다.

[0332] 미생물에서 ADH 또는 KDH의 확인

[0333] 알코올 탈수소효소 (ADH) 또는 케토산 탈수소효소 (KDH) 활성을 갖는 효소를 인코딩하는 유전자를 확인하기 위해 임의의 방법이 이용될 수 있다. 알코올 탈수소효소 (ADH)는 이소부탄올의 이소부티르알데히드로의 가역적 전환을 촉진할 수 있다. 케토산 탈수소효소 (KDH)는 2-케토이소발레레이트의 이소부티릴-CoA로의 전환을 촉진할 수 있고, 이것은 아세틸전달효소 및 카르복실산 키나아제 효소의 작용에 의해 이소부티레이트로 더욱 전환될 수 있다. 일반적으로, 공지된 알코올 탈수소효소 및 케토산 탈수소효소에 상동한 또는 유사한 유전자는 기능적, 구조적, 및/또는 유전적 분석에 의해 확인될 수 있다. 많은 경우에, 상동한 또는 유사한 알코올 탈수소효소 유전자 및/또는 상동한 또는 유사한 알코올 탈수소효소 효소는 기능적, 구조적, 또는 유전적 유사성을 가질 것이다. 유사하게, 상동한 또는 유사한 케토산 탈수소효소 유전자 및/또는 상동한 또는 유사한 케토산 탈수소효소 효소는 기능적, 구조적, 또는 유전적 유사성을 가질 것이다.

[0334] 효모 미생물에서 PDC와 GPD의 확인

[0335] 피루베이트 탈카르복실화효소 (PDC) 활성 또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD) 활성을 갖는 효소를 인코딩하는 유전자를 확인하기 위해 임의의 방법이 이용될 수 있다. PDC와 GPD의 확인을 위한 적절한 방법은 공동 소유된 동시-계속 출원, US 2009/0226991과 US 2011/0020889에서 기술되고, 이들 둘 모두 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0336] 유전자 삽입과 결실

[0337] 핵산 분자를 효모 내로 도입하기 위해 임의의 방법이 이용될 수 있고, 그리고 이와 같은 많은 방법이 널리 공지되어 있다. 가령, 형질전환과 전기천공 (electroporation)은 핵산을 효모 세포 내로 도입하기 위한 통상의 방법이다 (참조: Gietz *et al.*, 1992, *Nuc Acids Res.* 27: 69-74; Ito *et al.*, 1983, *J. Bacteriol.* 153: 163-8; 그리고 Becker *et al.*, 1991, *Methods in Enzymology* 194: 182-7).

[0338] 한 구체예에서, 목적되는 유전자의 효모 미생물의 DNA 단편 또는 표적 유전자로의 통합은 상동성 재조합 (homologous recombination)의 원리에 따라 일어난다. 이러한 구체예에 따라서, 적어도 하나의 효모 마커 유전자 및/또는 통합되는 유전자를 포함하는 모듈 (module) (내부 모듈)을 내포하는 통합 카세트 (integration cassette)는 표적화된 통합 부위의 단부에 상동한 DNA 단편 (재조합원성 (recombinogenic) 서열)에 의해 한쪽 측면 상에서 접한다. 효모를 적절한 방법에 의해 카세트로 형질전환시킨 이후, 재조합원성 서열 사이에 상동성 재조합은 통합 카세트의 재조합원성 서열에 상응하는 유전제의 두 부위 간에서 염색체 영역을 대체하는 내부 모

듈을 유발할 수 있다 (Orr-Weaver *et al.*, 1981, *PNAS USA* 78: 6354-58).

[0339] 한 구체예에서, 효모 미생물 내로 목적되는 유전자의 통합을 위한 통합 카세트는 효모 염색체 내로 이종기원성 유전자의 통합을 위한 재조합원성 서열에 의해 접하는 선별가능 마커와 함께, 적절한 프로모터와 종결자의 제어 하에 이종기원성 유전자를 포함한다. 한 구체예에서, 이종기원성 유전자는 선천성 유전자(들)의 사본 수를 증가시키기 위해 요망되는 적절한 선천성 유전자를 포함한다. 선별가능 마커 유전자는 *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *URA3*, *bar*, *ble*, *hph*, 그리고 *kan*이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 효모에 이용되는 임의의 마커 유전자일 수 있다. 재조합원성 서열은 원하는 적용에 적합한 원하는 통합 부위에 따라, 자유롭게 선택될 수 있다.

[0340] 다른 구체예에서, 효모 미생물의 염색체 내로 유전자의 통합은 무작위 통합에 의해 일어날 수 있다 (Kooistra *et al.*, 2004, *Yeast* 21: 781-792).

[0341] 추가적으로, 한 구체예에서, 일정한 도입된 마커 유전자는 당업자에게 널리 공지된 기술을 이용하여 유전체로부터 제거된다. 가령, URA3 마커 상실은 *URA3* 내포 세포를 FOA (5-플루오르-오르트산) 내포 배지에 도말하고 FOA 내성 집락을 선별함으로써 획득될 수 있다 (Boeke *et al.*, 1984, *Mol. Gen. Genet* 197: 345-47).

[0342] 본 발명의 효모 세포 내에 포함된 외생성 핵산 분자는 상기 세포 내에서 임의의 형태로 유지될 수 있다. 가령, 외생성 핵산 분자는 세포의 유전체 내로 통합되거나, 또는 딸 세포에 안정적으로 전달 ("유전")될 수 있는 에피솜 상태 (episomal state)로 유지될 수 있다. 이런 염색체외 유전자 요소 (가령, 플라스미드, 미토콘드리아 유전체 등)은 딸 세포에서 이런 유전자 요소의 존재를 담보하는 선별 마커를 추가적으로 내포할 수 있다. 게다가, 효모 세포는 안정적으로 또는 일시적으로 형질전환될 수 있다. 이에 더하여, 본 명세서에서 기술된 효모 세포는 앞서 기술된 바와 같은 특정 외생성 핵산 분자의 단일 사본 또는 복수 사본을 내포할 수 있다.

[0343] 효소적 활성의 감소

[0344] 본 발명의 범위 내에 효모 미생물은 감소된 효소적 활성, 예를 들면, 감소된 3-케토산 환원효소, PDC, ALDH, 또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD) 활성을 가질 수 있다. 특정 효소적 활성과 관련하여 본 명세서에서 용어 "감소된"은 동일한 종의 동등한 효소 세포에서 측정된 것보다 더욱 낮은 수준의 효소적 활성을 지칭한다. 용어 "감소된"은 또한, 동일한 종의 동등한 효모 세포와 비교하여 효소적 활성의 제거를 지칭한다. 따라서 3-케토산 환원효소, PDC, ALDH 또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD) 활성이 없는 효모 세포는 감소된 3-케토산 환원효소, PDC, ALDH 또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD) 활성을 갖는 것으로 간주되는데, 그 이유는 비록 전부는 아니지만 대부분의 동등한 효모 균주가 적어도 어느 정도의 3-케토산 환원효소, PDC, ALDH, 또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD) 활성을 갖기 때문이다. 이런 감소된 효소적 활성은 더욱 낮은 효소 농도, 효소의 더욱 낮은 비활성, 또는 이들의 조합의 결과일 수 있다. 많은 상이한 방법이 감소된 효소적 활성을 갖는 효모를 만드는데 이용될 수 있다. 가령, 효모 세포는 통상의 돌연변이유발 또는 적중 (knock-out) 기술을 이용하여 파괴된 효소-인코딩 좌위 (locus)를 갖도록 조작될 수 있다 (참조: Methods in Yeast Genetics (1997 edition), Adams, Gottschling, Kaiser, and Stems, Cold Spring Harbor Press (1998). 이에 더하여, 감소된 활성을 갖는 효소를 발생시키는 일정한 점-돌연변이(들)가 도입될 수 있다. 또한, 자연에서 발견될 때 3-케토산 환원효소, PDC, ALDH, 또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD) 활성에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 활성이 실질적으로 없는 효모 균주는 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0345] 대안으로, 안티센스 기술이 효소적 활성을 감소시키는데 이용될 수 있다. 가령, 효모는 효소가 만들어지는 것을 예방하는 안티센스 분자를 인코딩하는 cDNA를 내포하도록 조작될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "안티센스 분자"는 내생성 폴리펩티드의 코딩 가닥에 상응하는 서열을 내포하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 안티센스 분자는 또한, 측면 서열 (가령, 조절 서열)을 가질 수 있다. 따라서 안티센스 분자는 리보자임 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 리보자임은 상기 분자가 RNA를 절단한다면, 헤어핀 (hairpin), 해머머리 (hammerhead), 또는 도끼머리 (axhead) 구조가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 임의의 포괄적 구조를 가질 수 있다.

[0346] 감소된 효소적 활성을 갖는 효모는 많은 방법을 이용하여 확인될 수 있다. 가령, 감소된 3-케토산 환원효소, PDC, ALDH, 또는 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (GPD) 활성을 갖는 효모는 통상의 방법을 이용하여 쉽게 확인될 수 있는데, 이들 방법은 예로써, 액체 크로마토그래피 (liquid chromatography)를 거쳐 글리세롤 형성을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0347] 이종기원성 유전자의 과다발현

[0348] 선천성 또는 이종기원성 핵산 분자로부터 폴리펩티드를 과다발현하는 방법은 널리 공지되어 있다. 이런 방법은

제한 없이, 조절 요소가 원하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열의 발현을 증진하도록 핵산 서열을 작제하는 것을 포함한다. 전형적으로, 조절 요소는 전사 수준에서 다른 DNA 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열이다. 따라서 조절 요소에는 제한 없이, 프로모터, 인핸서 등이 포함된다. 가령, 외생성 유전자는 유도성 프로모터 또는 구조성 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 게다가, 효모에서 외생성 핵산 분자로부터 폴리펩티드를 발현하는 방법은 널리 공지되어 있다. 가령, 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*)와 사카로미세스(*Saccharomyces*) 내에서 외생성 폴리펩티드의 발현에 이용되는 핵산 구조체는 널리 공지되어 있다 (참조: 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*)의 경우에 U.S. Pat. No. 4,859,596와 4,943,529, 그리고 사카로미세스(*Saccharomyces*)의 경우에 예로써, Gellissen *et al.*, Gene 190(1):87-97 (1997)). 효모 플라스미드는 선별가능 마커 및 복제 기원을 갖는다. 게다가, 일정한 플라스미드는 동원체 서열 (centromeric sequence) 역시 내포할 수 있다. 이들 동원체 플라스미드는 일반적으로, 단일 또는 낮은 사본 플라스미드이다. 동원체 서열이 없고 2 마이크론 (사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)) 또는 1.6 마이크론 (클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*)) 복제 기원을 이용하는 플라스미드는 높은 사본 플라스미드이다. 선별가능 마커는 자가영양성 마커, 예를 들면, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *URA3* 또는 *ADE2*, 또는 항생제 내성 마커, 예를 들면, *bar*, *ble*, *hph*, 또는 *kan*일 수 있다.

[0349] 다른 구체예에서, 이종기원성 제어 요소는 내생성 유전자의 발현을 활성화시키거나 억제하는데 이용될 수 있다. 추가적으로, 발현이 억제되거나 제거될 때, 관련된 효소, 단백질 또는 RNA에 대한 유전자는 공지된 결실 기술에 의해 제거될 수 있다.

[0350] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 본 발명의 범위 내에 임의의 효모는 발현되거나, 과다발현되거나, 또는 억제되는 특정 효소에 특이적인 선별 기술에 의해 확인될 수 있다. 원하는 표현형을 갖는 균주를 확인하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 이런 방법에는 제한 없이, PCR, RT-PCR, 그리고 핵산 혼성화 기술, 예를 들면, 노던과 서던 분석, 특정 기질 상에서 또는 특정 기질, 화학적 화합물, 선별 작용제 등의 존재에서 변경된 성장 능력이 포함된다. 일부 경우에, 인코딩된 폴리펩티드의 발현을 검출함으로써 세포가 특정 핵산을 내포하는 지를 결정하는데 면역조직화학 및 생화학적 기술이 이용될 수 있다. 가령, 인코딩된 효소에 대한 특이성 (specificity)을 갖는 항체가 특정 효모 세포가 상기 인코딩된 효소를 내포하는 지의 여부를 결정하는데 이용될 수 있다. 더 나아가, 효소적 폴리펩티드의 발현의 결과로써 생산된 산물을 검출함으로써 세포가 효소적 폴리펩티드를 인코딩하는 특정 핵산 분자를 내포하는 지를 결정하는데 생화학적 기술이 이용될 수 있다. 가령, 아세토락테이트 신타아제를 인코딩하는 벡터로 세포를 형질전환시키고, 그리고 벡터가 없는 세포와 비교하여 증가된 아세토락테이트 농도를 검출하는 것은 상기 벡터가 존재할 뿐만 아니라 유전자 산물이 활동성이라는 것을 지시한다. 특정한 효소적 활성 또는 특정 산물의 존재를 검출하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 가령, 아세토락테이트의 존재는 Hugenholtz and Starrenburg, 1992, *Appl. Micro. Biot.* 38:17-22에서 기술된 바와 같이 결정될 수 있다.

[0351] 효소적 활성의 증가

[0352] 본 발명의 효모 미생물은 효소의 증가된 활성 (가령, 이소부탄올 생산 대사 경로에 관여하는 효소의 증가된 활성)을 갖도록 더욱 조작될 수 있다. 특정 효소적 활성과 관련하여 본 명세서에서 용어 "증가된"은 동일한 종의 동등한 효모 세포에서 측정된 것보다 더욱 높은 수준의 효소적 활성을 지칭한다. 가령, 특정 효소의 과다발현은 상기 효소에 대한 세포 내에서 활성의 증가된 수준을 유발할 수 있다. 해당 또는 이소부탄올 경로에 관련된 효소에 대한 증가된 활성은 이소부탄올의 증가된 생산성과 수율을 유발할 것이다.

[0353] 효소적 활성을 증가시키는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 이런 기술에는 증가된 사본 수 및/또는 강한 프로모터의 이용, 효소의 음성 조절을 경감시키는 돌연변이의 도입, 기질에 대한 비활성을 증가시키고 및/또는 Km을 감소시키는 특정한 돌연변이의 도입에 의한, 또는 방향적 진화에 의한 효소의 발현 증가가 포함될 수 있다 (참조: Methods in Molecular Biology (vol. 231), ed. Arnold and Georgiou, Humana Press (2003)).

[0354] 고수율 발효를 위해 재조합 미생물을 이용하는 방법

[0355] 유익한 대사산물을 가장 경제적으로 생산하기 위한 생체촉매 (biocatalyst)의 경우에, 상기 대사산물을 높은 수율에서 생산하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 생산된 유일한 산물은 원하는 대사산물인데, 그 이유는 여분의 산물 (즉, 부산물)이 특히 이들 여분의 산물이 거의 또는 전혀 가치가 없는 경우에, 원하는 대사산물의 수율 감소 및 자본과 경상비 (operating cost)의 증가를 유발하기 때문이다. 이들 여분의 산물은 또한, 이들 산물을 원하는 대사산물로부터 분리하기 위해, 추가의 자본과 경상비를 필요로 한다.

[0356] 한 측면에서, 본 발명에서는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물로부터 유래된 유익한 대사산물을 생산하는

방법을 제시한다.

[0357] 한 구체예에서, 상기 방법은 유익한 대사산물의 회수가능한 양이 생산될 때까지 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 3-케토산을 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물을 배양하는 단계, 그리고 선택적으로, 대사산물을 회수하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 아세토락테이트이다. 예시적인 구체예에서, 상기 재조합 미생물은 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 유익한 대사산물은 이소부탄올, 2-부탄올, 1-부탄올, 2-부타논, 2,3-부탄디올, 아세토인, 디아세틸, 발린, 류신, 판토텐산, 이소부틸렌, 3-메틸-1-부탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 그리고 조효소 A의 생산을 위한 생합성 경로가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 아세토락테이트를 중간물질로서 이용하는 임의의 생합성 경로로부터 유래될 수 있다. 특정 구체예에서, 유익한 대사산물은 이소부탄올이다. 다른 구체예에서, 3-케토산 중간물질은 2-아세토-2-히드록시부티레이트이다. 예시적인 구체예에서, 상기 재조합 미생물은 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 유익한 대사산물은 2-메틸-1-부탄올, 이소류신, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생산을 위한 생합성 경로가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 중간물질로서 이용하는 임의의 생합성 경로로부터 유래될 수 있다.

[0358] 다른 구체예에서, 상기 방법은 유익한 대사산물의 회수가능한 양이 생산될 때까지 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물을 배양하는 단계, 그리고 선택적으로, 대사산물을 회수하는 단계를 포함한다. 예시적인 구체예에서, 상기 재조합 미생물은 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 유익한 대사산물은 이소부탄올, 1-부탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 1-프로판올, 1-펜탄올, 1-헥산올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생산을 위한 생합성 경로가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 알데히드를 중간물질로서 이용하는 임의의 생합성 경로로부터 유래될 수 있다. 특정 구체예에서, 유익한 대사산물은 이소부탄올이다.

[0359] 다른 구체예에서, 상기 방법은 유익한 대사산물의 회수가능한 양이 생산될 때까지 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 아세토락테이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물을 배양하는 단계, 그리고 선택적으로, 대사산물을 회수하는 단계를 포함한다. 예시적인 구체예에서, 상기 재조합 미생물은 (i) 아세토락테이트의 DH2MB로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되고, 그리고 (ii) 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 유익한 대사산물은 이소부탄올, 1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올의 생산을 위한 생합성 경로가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 아세토락테이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 임의의 생합성 경로로부터 유래될 수 있다. 특정 구체예에서, 유익한 대사산물은 이소부탄올이다.

[0360] 다른 구체예에서, 상기 방법은 유익한 대사산물의 회수가능한 양이 생산될 때까지 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 2-아세토-2-히드록시부티레이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 포함하는 재조합 미생물을 배양하는 단계, 그리고 선택적으로, 대사산물을 회수하는 단계를 포함한다. 예시적인 구체예에서, 상기 재조합 미생물은 (i) 2-아세토-2-히드록시부티레이트의 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되고, 그리고 (ii) 알데히드의 산성 부산물로의 전환을 촉진하는 효소의 발현 또는 활성이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 유익한 대사산물은 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생산을 위한 생합성 경로가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 2-아세토-2-히드록시부티레이트와 알데히드를 중간물질로서 이용하는 임의의 생합성 경로로부터 유래될 수 있다.

[0361] 다른 구체예에서, 본 발명에서는 알코올 탈수소효소 (ADH)-요구 생합성 경로로부터 유래된 유익한 대사산물을 생산하는 방법을 제시한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 유익한 대사산물의 회수가능한 양이 생산될 때까지 탄소 공급원을 제공하는 공급원료를 내포하는 배양 배지에서 본 명세서에서 기술된 변형된 ADH를 포함하는 재조합 미생물을 배양하는 단계, 그리고 선택적으로, 대사산물을 회수하는 단계를 포함한다. 유익한 대사산물은 1-프로판올, 2-프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, 1-펜탄올, 2-메틸-1-부탄올, 그리고 3-메틸-1-부탄올의 생산을 위한 생합성 경로가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 임의의 ADH-요구 생합성 경로로부터 유래될 수 있다. 특정 구체예에서, 유익한 대사산물은 이소부탄올이다.

[0362] 탄소 공급원으로부터 유익한 대사산물을 생산하는 방법에서, 효모 미생물은 탄소 공급원을 내포하는 적절한 배

양 배지에서 배양된다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 배양 배지로부터 유익한 대사산물을 단리하는 단계를 더욱 포함한다. 가령, 이소부탄올은 당업자에게 공지된 임의의 방법, 예를 들면, 증류 (distillation), 투석증발 (pervaporation), 또는 액체-액체 추출에 의해 배양 배지로부터 단리될 수 있다.

[0363] 한 구체예에서, 재조합 미생물은 탄소 공급원으로부터 유익한 대사산물을 적어도 5 퍼센트의 이론적 수율로 생산할 수 있다. 다른 구체예에서, 미생물은 탄소 공급원으로부터 유익한 대사산물을 적어도 대략 10 퍼센트, 적어도 대략 15 퍼센트, 적어도 대략 20 퍼센트, 적어도 대략 25 퍼센트, 적어도 대략 30 퍼센트, 적어도 대략 35 퍼센트, 적어도 대략 40 퍼센트, 적어도 대략 45 퍼센트, 적어도 대략 50 퍼센트, 적어도 대략 55 퍼센트, 적어도 대략 60 퍼센트, 적어도 대략 65 퍼센트, 적어도 대략 70 퍼센트, 적어도 대략 75 퍼센트, 적어도 대략 80 퍼센트, 적어도 대략 85 퍼센트, 적어도 대략 90 퍼센트, 적어도 대략 95 퍼센트, 또는 적어도 대략 97.5%의 이론적 수율로 생산할 수 있다. 특정 구체예에서, 유익한 대사산물은 이소부탄올이다.

[0364] 본 발명은 하기 실시예에 의해 더욱 예시되고, 이들 실시예는 한정으로서 간주되지 않는다. 도면과 서열 목록뿐만 아니라 본 출원 전반에서 인용된 모든 참고문헌, 특허, 그리고 공개된 특허 출원의 내용은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

도면의 간단한 설명

[0365] 본 발명의 예시적인 구체예가 하기 도면에서 도시된다:

도 1에서는 이소부탄올 경로의 예시적인 구체예를 도시한다.

도 2에서는 3-케토산 환원효소에 의해 촉진될 수 있는 예시적인 반응을 도시한다.

도 3에서는 예시적인 3-케토산 환원효소의 무제한적 목록 및 이들의 상응하는 효소 분류 번호를 도시한다.

도 4에서는 알데히드 탈수소효소에 의해 촉진될 수 있는 예시적인 반응을 도시한다.

도 5에서는 이소부탄올-생산 재조합 미생물에서 DH2MB와 이소부티레이트의 생산을 감소시키기 위한 전략을 도시한다.

도 6에서는 3-메틸-1-부탄올-생산 재조합 미생물에서 DH2MB와 3-메틸-1-부티레이트의 생산을 감소시키기 위한 전략을 도시한다.

도 7에서는 2-메틸-1-부탄올 생산 재조합 미생물에서 2-에틸-2,3-디히드록시부티레이트와 2-메틸-1-부티레이트의 생산을 감소시키기 위한 전략을 도시한다.

도 8에서는 DH2MB와 아세테이트를 내포하는 샘플 (위쪽) 및 아세테이트와 DHIV를 내포하는 샘플 (아래쪽)을 보여주는 LC4 크로마토그램의 중첩 오버레이 (stacked overlay)를 도시한다. 용출 순서: DH2MB, 그 이후에 아세테이트 (위쪽); 락테이트, 아세테이트, DHIV, 이소부티레이트, 피루베이트 (아래쪽).

도 9에서는 LC1 상에서 수집된 DHIV에 상응하는 체류 시간에서 수집되고, 그리고 전도도 검출 (Conductivity Detection)과 함께 AS-11 칼럼 상에서 LC4에 의해 분석된 샘플 분획에 대한 크로마토그램을 도시한다.

도 10에서는 LC1로부터 분리된 피크의 1H-COSY 스펙트럼을 도시한다. 상기 스펙트럼은 0.95 ppm에서 DH2MB 메틸 양성자 (이중항)가 3.7 ppm에서 메틴 양성자 (사중항)에 결합된다는 것을 지시한다.

도 11에서는 LC1로부터 분리된 피크의 1H-NMR 스펙트럼을 도시한다. 상기 스펙트럼은 DH2MB의 존재를 지시한다: 적분 값 3을 갖는 1.2 ppm에서 메틸 양성자 (a)의 단일항, 적분 값 3을 갖는 0.95 ppm에서 메틸 양성자 (b)의 이중항, 그리고 적분 값 1.84를 갖는 3.7 ppm에서 메틴 양성자 (c)의 사중항. 메틴 양성자 (c)의 적분 값은 동일한 영역 내에서 글루코오스 공명과의 겹침으로 인하여 1보다 크다.

도 12에서는 LC1로부터 분리된 피크의 LC-MS 분석을 도시한다. 여러 분자 이온이 상기 도면의 위쪽 부분에서 지시된 바와 같이, 샘플 내에서 확인되었다. 134 분자 이온의 더욱 단편화 (MS2)는 분리된 LC1 분획이 CO_2 (*) 및 H_2O + CO_2 (**)의 특징적인 상실에 의해 히드록실 카르복실산을 내포한다는 것을 지시하였다.

도 13에서는 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (2R,3S)-1a, (2S,3R)-1b, (2R,3R)-2a, (2S,3S)-2b의 부분입체이성질성 및 거울상이성질성 구조를 도시한다.

도 14에서는 D_2O에서 결정화된 DH2MB의 1H 스펙트럼을 도시한다. 1H NMR (TSP) 1.1 (d, 6.5 Hz, 3H), 1.3 (s,

3H), 3.9 (q, 6.5 Hz, 3H)

도 15에서는 D_2O에서 결정화된 DH2MB의 13C 스펙트럼을 도시한다. 상기 스펙트럼은 5가지 상이한 탄소 공명을 지시하는데, 이들 중에서 하나는 181 ppm에서 특징적인 카르복실산 공명이다.

도 16에서는 GEVO3160으로 단일 발효로부터 이소부탄올과 부산물의 발효 프로필을 도시한다. 생산 통기(production aeration)는 접종후 93시간 시점에 0.8 mM/h의 OTR에서 0.3 mM/h로 감소하였다. 열린 다이아몬드 = iBuOH, 정사각형 = DH2MB로서 정량된 미지의 것, 별표 = 세포 건조 중량 (cdw), 그리고 닫힌 삼각형 = 총부산물.

도 17에서는 지오바실루스 스테아로써모필루스(*G. stearothermophilus*) (Pymol)의 구조를 갖는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA 아미노산 서열의 구조적 배열을 도시한다. 활성 부위 돌연변이가 도시된다 (Y50F와 L264V). 보조인자 결합 도메인에서 돌연변이 역시 도시된다 (I212T와 N219Y).

도 18에서는 아세토락테이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 도시한다. 1-부탄올, 이소부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 그리고 4-메틸-1-펜탄올의 생산을 위한 생합성 경로는 아세토락테이트와 알데히드 둘 모두를 중간물질로서 이용한다.

도 19에서는 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 중간물질로서 이용하는 생합성 경로를 도시한다. 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-펜탄올, 4-메틸-1-헥산올, 그리고 5-메틸-1-헵탄올의 생산을 위한 생합성 경로는 2-아세토-2-히드록시부티레이트와 알데히드 둘 모두를 중간물질로서 이용한다.

도 20에서는 알데히드를 중간물질로서 이용하는 추가의 생합성 경로를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0366] **실시예**

[0367] **실시예 1-26에 대한 일반적인 방법**

[0368] **서열:** 본 명세서에서 개시된 아미노산과 뉴클레오티드 서열은 표 6에서 제시된다.

표 6

다양한 실시예에서 개시된 효소와 유전자의 아미노산과 뉴클레오티드 서열.

Enz.	출처	유전자 (서열 번호)	상응하는 단백질 (서열 번호)
ALS	바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*)	*Bs_alsS1_coSc* (서열 번호: 42)	Bs_AlsS1 (서열 번호: 43)
KARI	대장균(*E. coli*)	*Ec_ilvC_coSc*^{Q110T} (서열 번호: 44)	Ec_IlvC^{Q110T} (서열 번호: 45)
	대장균(*E. coli*)	*Ec_ilvC_coSc*$^{P381-A1}$ (서열 번호: 46)	Ec_ilvC_coSc$^{P381-A1}$ (서열 번호: 47)
KIVD	락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_kivD2_coEc* (서열 번호: 48)	Ll_Kivd2 (서열 번호: 49)
DHAD	락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_ilvD_coSc* (서열 번호: 50)	Ll_IlvD (서열 번호: 51)
	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)	*Sc_ILV3ΔN* (서열 번호: 52)	Sc_Ilv3ΔN (서열 번호: 53)
ADH	노랑초파리(*D. melanogaster*)	*Dm_ADH* (서열 번호: 54)	Dm_Adh (서열 번호: 55)
	락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA* (서열 번호: 56)	Ll_AdhA (서열 번호: 57)
	락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA_coSc*^{H19S} (서열 번호: 58)	Ll_AdhA^{H19S} (서열 번호: 59)
	락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA*^{RE1}*_coSc*^{H19S} (서열 번호: 60)	Ll_AdhA$^{RE1-H19S}$ (서열 번호: 61)

[0369]

[0370] **배지:** 이용된 배지는 표준 효모 배지 (참조: Sambrook, J., Russel, D.W. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 그리고 Guthrie, C. and Fink, G.R. eds. Methods in Enzymology Part B: Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology **350:**3-623 (2002)). YP 배지는 1% (w/v) 효모 추출물, 2% (w/v) 펩톤을 내포한다. YPD는 달리 명시되지 않으면 2% 글루코오스를 내포하는 YP이다. YPE는 25 ㎖/ℓ 에탄올을 내포하는 YP이다. SC 배지는 6.7 g/ℓ Difco™ 효모 질소 염기, 14g/ℓ Sigma™ 합성 드롭아웃 배지 보충물 (히스티딘, 트립토판, 우라실, 그리고 류신을 제외한 아미노산과 영양소 포함), 0.076 g/ℓ 히스티딘, 0.076 g/ℓ 트립토판, 0.380 g/ℓ 류신, 그리고 0.076 g/ℓ 우라실이다. SCD는 달리 명시되지 않으면, 2% (w/v) 글루코오스를 내포하는 SC이다. SC와 SCD 배지의 드롭아웃 이형은 히스티딘 (-H), 트립토판 (-W), 류신 (-L), 또는 우라실 (-U) 중에서 하나 또는 그 이상을 생략함으로써 만들어진다. 앞서 기술된 배지의 고형 이형은 2% (w/v) 아가를 내포한다.

[0371] **클로닝 기술:** 달리 명시되지 않으면, 클로닝 및 플라스미드 작제를 위한 표준 분자 생물학 방법이 일반적으로 이용되었다 (Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). 클로닝 기술에는 제한 효소로 절단, DNA 단편을 산출하기 위한 PCR (KOD Hot Start 중합효소, Cat# 71086, Merck, Darmstadt, Germany), DNA 결찰 키트 (Mighty Mix Cat# TAK 6023, Clontech Laboratories, Madison, WI)를 이용한 2개 DNA 단편의 결찰, 그리고 적격성 대장균(*E. coli*) 세포 내로 세균 형질전환 (Xtreme Efficiency DH5a 적격 세포, Cat# ABP-CE-CC02096P, Allele Biotechnology, San Diego, CA)이 포함되었다. 플라스미드 DNA는 Qiagen QIAprep Spin Miniprep 키트 (Cat# 27106, Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 대장균(*E. coli*) 세포로부터 정제되었다. DNA는 제조업체의 프로토콜에 따라 Zymoclean Gel DNA Recovery 키트 (Zymo Research, Orange, CA; Catalog #D4002)를 이용하여 아가로오스 겔로부터 정제되었다.

[0372] **집락 PCR:** 효모 집락 PCR은 제조업체의 프로토콜에 따라, FailSafe™ PCR System (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI; Catalog #FS99250)을 이용하였다. 15 ㎕의 Master Mix E 완충액, 10.5 ㎕ 물, 10 μM 농도에서 2 ㎕의 각 프라이머, 키트로부터 0.5 ㎕ 중합효소 효소 혼합물을 내포하는 PCR 칵테일이 각 샘플 (각각 30 ㎕)에 대한 0.2 ㎖ PCR 튜브에 첨가되었다. 각 후보에서, 소량의 세포가 무균 피펫 팁 (sterile pipette tip)을 이용하여 반응 튜브에 첨가되었다. 양성 PCR 산물의 존재는 아가로오스 겔 전기영동을 이용하여 평가되었다.

[0373] **SOE PCR:** PCR 반응물은 하기 PCR 조건을 이용하여 유전자증폭기에서 배양되었다: 94℃ x 2 min의 1회 사이클, 94℃ x 30 s, 53℃ x 30 s, 72℃ x 2 min의 35회 사이클, 그리고 72℃ x 10 min의 1회 사이클. 각 반응물이 하기를 내포하도록 마스터 혼합물 (master mix)이 만들어졌다: 3 ㎕ $MgSO_4$ (25 mM), 5 ㎕ 10X KOD 완충액, 5 ㎕ 50% DMSO, 5 ㎕ dNTP 혼합물 (각각 2 mM), 1 ㎕ KOD, 28 ㎕ dH_2O, 1.5 ㎕ 전방 프라이머 (10 μM), 1.5 ㎕ 후방 프라이머 (10 μM), 0.5 ㎕ 주형 (플라스미드 또는 유전체 DNA).

[0374] **유전체 DNA 단리:** Zymo Research ZR 진균/세균 DNA 키트 (Zymo Research Orange, CA; Catalog #D6005)가 하기와 같이 변형된 제조업체의 프로토콜에 따라, 유전체 DNA 단리에 이용되었다. 펠릿의 재현탁후, 200 ㎕가 2개의 분리된 ZR BashingBead™ 용해 튜브 (수율을 극대화시키기 위해)로 이전되었다. 비드 비팅 (bead beating)에 의한 용해 (lysis)후, 각각의 ZR BashingBead™ 용해 튜브로부터 400 ㎕의 상층액이 2개의 분리된 Zymo-Spin™ IV 스핀 필터로 이전되고 7,000 rpm에서 1분 동안 원심분리되었다. 회전후, 1.2 ㎖의 진균/세균 DNA 결합 완충액이 각 여과액에 첨가되었다. 800 ㎕ 분취량에서, 양쪽 필터로부터 여과액은 수집 튜브 내에 단일 Zymo-Spin™ IIC 칼럼으로 이전되고 10,000 x g에서 1분 동안 원심분리되었다. 용출 단계의 경우에, 100 ㎕의 EB (용출 완충액, Qiagen)에서 용리하는 대신에, 50 ㎕의 EB가 첨가되고, 1분 동안 배양되고, 그 이후 이들 칼럼은 1분 동안 원심분리되었다. 이러한 용출 단계는 100 ㎕의 최종 용출 부피를 위해 반복되었다.

[0375] **사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 형질전환.** 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주는 1% 에탄올을 내포하는 YPD에서 성장되었다. 형질전환-적격 세포는 100 mM 리튬 아세테이트에서 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 세포의 재현탁에 의해 제조되었다. 일단 세포가 준비되면, DNA (무균수로 15 ㎕의 최종 부피), 72 ㎕ 50% PEG, 10 ㎕ 1M 리튬 아세테이트, 그리고 3 ㎕의 변성된 연어 정액 DNA (10 mg/㎖)의 혼합물이 각 형질전환을 위해 만들어졌다. 1.5 ㎖ 튜브에서, 15 ㎕의 세포 현탁액이 DNA 혼합물 (100 ㎕)에 첨가되고, 그리고 형질전환 현탁액이 5회 짧은 펄스 (short pulse) 동안 와동되었다. 형질전환체는 30℃에서 30분 동안 배양되고,

그 이후에 42℃에서 22분 동안 배양되었다. 세포는 원심분리 (18,000 x g, 10 s, 25℃)에 의해 수집되었다. 세포는 350 ㎕ YPD에서 재현탁되고, 그리고 30℃에서 250 rpm으로 하룻밤 회복 교반 (recovery shaking)후, 세포는 0.2 g/ℓ G418 선택성 평판을 내포하는 YPD 평판 위에 전개되었다. 이후, 형질전환체는 G418 선택성 평판 상에 단일 집락 정제되었다.

[0376] **클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*) 형질전환:** 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*) 균주는 3 ㎖의 적절한 배양 배지에서 250 rpm과 30℃에서 하룻밤동안 성장되었다. 익일에, 배양액은 50 ㎖의 동일한 배지에서 희석되고 1 내지 4의 OD_{600}으로 성장되었다. 세포는 원심분리 (실온에서 1600 x g, 5분)에 의해 무균 50 ㎖ 코니칼 튜브에서 수집되었다. 세포는 10 ㎖의 전기천공 완충액 (10 mM Tris-Cl, 270 mM 수크로오스, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.5)에서 재현탁되고, 그리고 1600 x g에서 실온에서 5분 동안 수집되었다. 세포는 10 ㎖ IB (YPE, 25 mM DTT, 20 mM HEPES, pH 8.0; 100 ㎕의 2.5 M DTT 및 200 ㎕의 1 M HEPES, pH 8.0을 10 ㎖의 YPD로 희석함으로써 새로 만들어짐)에서 재현탁되었다. 세포는 250 rpm, 30℃에서 30분 동안 배양되었다 (튜브는 수직으로 놓임). 세포는 실온에서 5분 동안 1600 x g으로 수집되고 10 ㎖의 차가운 전기천공 완충액에 재현탁되었다. 세포는 4℃에서 5분 동안 1600 x g로 펠릿화 (pelleting)되었다. 세포는 1 ㎖의 차가운 전기천공 완충액에 재현탁되고 마이크로퓨지 튜브 (microfuge tube)로 이전되었다. 세포는 4℃에서 20 sec동안 >10,000 x g로 원심분리에 의해 수집되었다. 세포는 30-38 OD_{600}/㎖의 최종 바이오매스 농도를 위해 적절한 양의 차가운 전기천공 완충액에서 재현탁되었다. 400 ㎕의 세포가 차가운 전기천공 큐벳 (0.4 cm 갭)에 첨가되고, 50 ㎕의 SOE PCR 산물 (또는 물 대조)이 첨가되고 위아래로 피펫팅 (pipetting)에 의해 혼합되고, 그리고 큐벳은 얼음 위에서 30분 동안 배양되었다. 샘플은 1.8 kV, 1000 Ohm, 25 μF에서 전기천공되었다. 샘플은 이후, 1 ㎖의 적절한 배양 배지를 포함하는 50 ㎖ 튜브로 이전되고, 그리고 이들 샘플은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 배양후, 세포는 적절한 아가 평판 상에 도말되었다.

[0377] **클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) 형질전환:** 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) 균주는 3 ㎖ YPD에서 250 rpm과 30℃에서 하룻밤동안 성장되었다. 익일에, 배양액은 50 ㎖ YPD에서 희석되고, 그리고 ~0.8의 OD_{600}에 도달할 때까지 성장되었다. 50 ㎖ YPD 배양액으로부터 세포는 원심분리 (2700 rcf, 2분, 25℃)에 의해 수집되었다. 세포는 50 ㎖ 무균수로 세척되고 RT에서 2분 동안 2700 rcf로 원심분리에 의해 수집되었다. 세포는 25 ㎖ 무균수로 다시 한 번 세척되고 RT에서 2분 동안 2700 rcf로 원심분리에 의해 수집되었다. 세포는 1 ㎖ 100 mM 리튬 아세테이트에서 재현탁되고 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브 (Eppendorf tube)로 이전되었다. 세포는 RT에서 10 sec동안 18,000 rcf로 원심분리에 의해 수집되었다. 세포는 세포 펠릿의 부피의 대략 4x인 부피의 100 mM 리튬 아세테이트에서 재현탁되었다. 10-15 ㎕ 부피의 DNA, 72 ㎕ 50% PEG (3350), 10 ㎕ 1 M 리튬 아세테이트, 3 ㎕ 변성된 연어 정액 DNA, 그리고 무균수가 각 형질전환을 위한 100 ㎕의 최종 부피로 합동되었다. 1.5 ㎖ 튜브에서, 15 ㎕의 세포 현탁액이 DNA 혼합물에 첨가되고, 그리고 형질전환 현탁액은 5회 짧은 펄스로 와동되었다. 형질전환체는 30℃에서 30분 동안 배양되고, 그 이후에 42℃에서 22분 동안 배양되었다. 세포는 RT에서 10 sec동안 18,000 rcf로 원심분리에 의해 수집되었다. 세포는 400 ㎕의 적절한 배지에서 재현탁되고 형질전환된 세포를 선별하기 위해 적절한 배지를 내포하는 아가 평판 위에 전개되었다.

[0378] 분석 화학:

[0379] **가스 크로마토그래피 (방법 GC1).** 에탄올과 이소부탄올을 비롯한 휘발성 유기 화합물의 분석은 불꽃 이온화 검출기 (flame ionization detector, FID)에 연결된 Agilent 7673 오토샘플러, ZB-FFAP 칼럼 (J&W; 30 m 길이, 0.32 mm ID, 0.25 μM 필름 두께) 또는 등가물이 구비된 Agilent 5890/6890/7890 가스 크로마토그래프 상에서 수행되었다. 온도 프로그램은 아래와 같았다: 주입기의 경우 200℃, 검출기의 경우 300℃, 1분 동안 100℃ 오븐, 230℃까지 70℃/분 구배, 이후 2.5분 동안 유지. 분석은 인증된 표준 (>99%, Sigma-Aldrich로부터 획득됨), 그리고 1-펜탄올을 내부 표준으로 하는 5-포인트 보정 곡선 (calibration curve)을 이용하여 수행되었다.

[0380] **고성능 액체 크로마토그래피 (방법 LC1):** 2,3-디히드록시이소발레레이트 (DHIV), 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (DH2MB), 이소부티레이트와 글루코오스를 비롯한 유기 산 대사산물의 분석은 Bio-Rad Micro-guard Cation H 카트리지와 2개의 Phenomenex Rezex RFQ-Fast Fruit H+ (8%), 연속적으로 100 x 7.8-mm 칼럼, 또는 등가물이 구비된 Agilent 1200 또는 등가의 고성능 액체 크로마토그래피 시스템 상에서 수행되었다. 유기 산 대사산물은 Agilent 1100 또는 동등한 UV 검출기 (210 nm) 및 굴절률 검출기 (refractive index detector)를 이용하여 검출되었다. 칼럼 온도는 60℃이었다. 이러한 방법은 이동상 (mobile phase)으로서 Milli-Q 물에서 0.0180 N

H_2SO_4와 등용매성이었다. 유속은 1.1 ㎖/min으로 설정되었다. 주입 부피는 20 ㎕이고, 그리고 작업 시간 (run time)은 16분이었다. 유기 산 대사산물의 정량은 Cioffi *et al*. (Cioffi, E. *et al*. *Anal Biochem* **1980**, 104, pp.485)에 따라 합성된 DHIV (2,3-디히드록시-3-메틸-부타노에이트, CAS 1756-18-9), 그리고 DHIV와 DH2MB가 동일한 반응률 (response factor)을 나타낸다는 가정에 기초하여 정량된 DH2MB를 제외하고, 인증된 표준 (>99% 또는 가능한 최대 순도)으로 5-포인트 보정 곡선을 이용하여 수행되었다. 이러한 방법에서, DHIV와 DH2MB는 공동-용리하는데, 그 이유는 그들의 농도가 이들 두 농도의 합인 것으로 보고되기 때문이다.

[0381] **고성능 액체 크로마토그래피 (방법 LC4):** 2,3-디히드록시이소발레레이트 (DHIV, CAS 1756-18-9), 2,3-디히드록시-2-메틸부티르산 (DH2MB), 락테이트, 아세테이트, 아세토락테이트, 이소부티레이트, 그리고 피루베이트)를 비롯한 옥소 산 (oxo acid)의 분석은 IonPac AG11-HC 가드 칼럼 (Dionex: 13 μm, 4.6 x 50 mm) 및 IonPac ATC-3 음이온 트랩 칼럼 (Dionex: 9 x 24 mm)과 결합된 IonPac AS11-HC 분석 칼럼 (Dionex: 9 μm, 4.6 x 250 mm)이 구비된 Agilent-1100 고성능 액체 크로마토그래피 시스템 상에서 수행되었다. 아세토락테이트는 225nm에서 UV 검출기를 이용하여 검출되고, 반면 모든 다른 분석물은 전도도 검출기 (AutoSuppression 리사이클 양식에서 ASRS 4 mm를 갖는 ED50-억제 전도도, 200 mA 억제자 전류 (suppressor current))를 이용하여 검출되었다. 칼럼 온도는 35℃이었다. 주입 크기는 10 ㎕이었다. 상기 방법은 하기 용출 프로필을 이용하였다: 3분 동안 0.25 mM NaOH, 그 이후에 22분 동안 0.25에서 5 mM NaOH로 선형 구배 (linear gradient) 및 0.1분 동안 5 mM에서 38.25 mM로 2차 선형 구배, 그 이후에 4.9분 동안 38.25 mM NaOH 및 7분 동안 0.25 mM NaOH에서 재-평형화 (re-equilibrating)에 앞서 0.1분 동안 38.25 mM에서 0.25 mM로 최종 선형 구배. 유속은 2 ㎖/min으로 설정되었다. 분석은 하기를 제외하고, 인증된 표준 (>99%, 또는 가능한 최대 순도)으로 4-포인트 보정 곡선을 이용하여 수행되었다: DHIV는 Cioffi *et al*. (Cioffi, E. *et al*. *Anal Biochem* 1980, 104, pp.485)에 따라 합성되었다. DH2MB는 실시예 8에 기술된 바와 같이 합성되고 DHIV와 DH2MB가 동일한 반응률을 나타낸다는 가정에 기초하여 정량되었다. 라세미 아세토락테이트는 NaOH로 에틸-2-아세톡시-2-메틸아세토아세테이트 (EAMMA)의 가수분해에 의해 만들어졌다 (Krampitz, L.O. *Methods in Enzymology* ***1957***, 3, 277-283.). 이러한 방법에서, DHIV와 DH2MB는 분리된다 (도 8).

[0382] 효소 검사법

[0383] **단백질 농도의 결정:** 단백질 농도 (효모 용해물 또는 정제된 단백질의)는 BioRad Bradford 단백질 검사 시약 키트 (Cat# 500-0006, BioRad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하고, 그리고 표준 곡선 (standard curve)의 경우에 BSA를 이용하여 결정되었다. 이러한 검사법에 대한 표준 곡선은 500 ㎍/㎖ BSA의 표준 단백질 스톡 (stock)의 연속 희석도를 이용하여 작성되었다. BioRad 단백질 표준 곡선의 선형 범위 (linear range) 내에 속하는 각 용해물의 OD_{595} 치수를 획득하기 위해 세포 용해물의 적절한 희석액이 물에서 만들어졌다. 10 ㎕의 용해물 희석액이 500 ㎕의 희석된 BioRad 단백질 검사 염료에 첨가되고, 샘플은 와동에 의해 혼합되고, 그리고 실온에서 6분 동안 배양되었다. 샘플은 큐벳으로 이전되고 분광광도계에서 595 nm에서 판독되었다. 이들 표준의 선형 회귀 (linear regression)는 각 샘플의 단백질 농도를 계산하는데 이용되었다.

[0384] **알코올 탈수소효소 (ADH) 검사법.** 세포는 얼음 위에서 해동되고 용해 완충액 (100 mM Tris-HCl pH 7.5)에서 재현탁되었다. 1000 ㎕의 유리 비드 (glass bead) (0.5 mm 직경)가 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브에 첨가되고 875 ㎕의 세포 현탁액이 첨가되었다. 효모 세포는 Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA)을 이용하여 용해되고, 각각 전속에서 6 X 1분 혼합되고, 각 비드-비팅 단계 간에 얼음 위에서 1분 배양되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 23,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액은 이용을 위해 이동되었다. 이들 용해물은 검사 때까지 얼음 위에 유지되었다. 효모 용해물 단백질 농도는 앞서 기술된 바와 같이 결정되었다.

[0385] 샘플의 희석액은 활성 판독 (activity reading)이 달성될 수 있도록 만들어졌다. 일반적으로, 낮은 ADH 활성을 갖는 것으로 예상되는 균주로부터 샘플은 용해 완충액 (100 mM Tris-HCl pH 7.5)에서 1:5 희석되고, 그리고 높은 ADH 활성을 갖는 것으로 예상되는 균주, 예를 들면, ADH 유전자가 높은 사본 수 플라스미드로부터 발현되는 균주로부터 샘플은 1:40 내지 1:100 희석되었다. 반응은 SpectraMax®

340PC 멀티-평판 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 내에 96-웰 평판에서 90 ㎕의 반응 완충액 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 μM NADH; 11 mM 이소부티르알데히드)로 10 ㎕의 적절하게 희석된 세포 추출물을 이용하여 삼중으로 수행되었다. 반응은 340nm에서 5분 동안 추적되고, 흡광도가 10초마다 판독되었다. 반응은 30℃에서 수행되었다. 반응은 완전한 완충액 및 기질이 없는 완충액에서 수행되었다.

[0386] **이소부티르알데히드 산화 검사법 (ALD6 검사법):** 세포 펠릿은 얼음 위에서 해동되고 용해 완충액 (10 mM 인산나트륨 pH7.0, 1 mM 디티오트레이톨, 5% w/v 글리세롤)에서 재현탁되었다. 1 ㎖의 유리 비드 (0.5 mm 직경)가 각 샘플에 대한 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브에 첨가되고 850 ㎕의 세포 현탁액이 첨가되었다. 효모 세포는 Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA)을 이용하여 용해되고, 각각 전속에서 6 X 1분 혼합되고, 그 사이에 얼음 위에서 1분 배양되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 21,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액은 새로운 튜브로 이전되었다. 추출물은 검사 때까지 얼음 위에 유지되었다. 효모 용해물 단백질 농도는 앞서 기술된 바와 같이 결정되었다.

[0387] 세포 용해물에서 이소부티르알데히드의 이소부티레이트로의 산화를 촉진하는 효소의 효소 활성을 측정하는데 이용되는 방법은 Meaden et al. 1997, *Yeast* 13: 1319-1327 및 Postma et al. 1988, *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 468-477로부터 변경되었다. 간단히 말하면, 각 샘플에서, 10 ㎕의 희석되지 않은 세포 용해물이 UV 마이크로역가 평판의 6개 웰에 첨가되었다. 3개 웰은 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 0.4 mM $NADP^+$, 3.75 mM $MgCl_2$, 그리고 0.1 mM, 1 mM, 또는 10 mM 이소부티르알데히드를 내포하는 90 ㎕ 검사 완충액이 제공되었다. 나머지 3개 웰은 90 ㎕의 기질 없음 완충액 (이소부티르알데히드가 없는 점을 제외하고 검사 완충액과 동일)이 제공되었다. 이들 완충액은 위아래로 피펫팅에 의해 웰 내에서 용해물과 혼합되었다. 이후, 반응이 340 nm에서 5분 동안 모니터링되고, 흡광도가 SpectraMax®

340PC 평판 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 10초마다 판독되었다. 반응은 30℃에서 수행되었다. 각 샘플에 대한 V_{max}는 기질 없음 대조의 배경 시도 (background reading)를 뺄셈함으로써 측정되었다. 용해물 없음 대조 역시 각 기질 농도에 대해 삼중으로 수행되었다.

[0388] **ALS 검사법:** 실시예 1-18에서 기술된 ALS 검사법의 경우에, 세포는 얼음 위에서 해동되고 용해 완충액 (50 mM 인산칼륨 완충액 pH 6.0 및 1 mM $MgSO_4$)에서 재현탁되었다. 1000 ㎕의 유리 비드 (glass bead) (0.5 mm 직경)가 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브에 첨가되고 875 ㎕의 세포 현탁액이 첨가되었다. 효모 세포는 Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA)을 이용하여 용해되고, 각각 전속에서 6 X 1분 혼합되고, 각 비드-비팅 단계 간에 얼음 위에서 1분 배양되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 23,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액은 이용을 위해 이동되었다. 이들 용해물은 검사 때까지 얼음 위에 유지되었다. 용해물의 단백질 함량은 앞서 기술된 바와 같이 결정되었다. 모든 ALS 검사는 기질과 함께 및 기질 없이, 각 용해물에 대해 삼중으로 수행되었다. 각 용해물을 검사하기 위해, 15 ㎕의 용해물이 135 ㎕의 완충액 (50 mM 인산칼륨 완충액 pH 6.0, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM 티아민-피로포스페이트, 110 mM 피루베이트)과 혼합되고, 그리고 30℃에서 15분 동안 배양되었다. 완충액은 실온에서 제조되었다. 기질 없음 대조 (피루베이트가 없는 완충액) 및 용해물 없음 대조 (용해물 대신에 용해 완충액) 역시 포함되었다. 배양후, 21.5 ㎕의 35% H_2SO_4가 각 반응물에 첨가되고 37℃에서 1시간 동안 배양되었다.

[0389] 실시예 19-25에서 기술된 ALS 검사의 경우에, 세포는 얼음 위에서 해동되고 용해 완충액 (100 mM $NaPO_4$ pH 7.0, 5 mM $MgCl_2$ 및 1 mM DTT)에서 재현탁되었다. 1 ㎖의 유리 비드 (0.5 mm 직경)가 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브에 첨가되고 800 ㎕의 세포 현탁액이 유리 비드를 내포하는 튜브에 첨가되었다. 효모 세포는 각각 30회 사이클/초 (second)에서 1분 동안 6회 혼합 및 혼합 간에 1분 결빙 (icing)에 의해, Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA) 및 냉각 블록 (cooling block)을 이용하여 용해되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 21,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액이 이동되었다. 추출물은 검사 때까지 얼음 위에 유지되었다. 효모 용해물 단백질 농도는 앞서 기술된 바와 같이, BioRad Bradford 단백질 검사 시약 키트 (Cat# 500-0006, BioRad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하고, 그리고 표준 곡선의 경우에 BSA를 이용하여 측정되었다. 모든 ALS 검사는 각 용해물에 대해 삼중으로 수행되었다. 모든 완충액, 용해물 및 반응 튜브는 얼음 위에서 미리 냉각되었다. 각 용해물을 검사하기 위해, 15 ㎕의 용해물 (필요에 따라 용해 완충액으로 희석됨)이 135 ㎕의 검사 완충액 (50 mM KPi, pH 7.0, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM 티아민-피로포스페이트, 110 mM 피루베이트)과 혼합되고, 그리고 30℃에서 15분 동안 배양되었다. 기질 없음 대조 (피루베이트가 없는 완충액) 및 용해물 없음 대조 (용해물 대신에 용해 완충액) 역시 포함되었다. 배양후, 각 반응물은 21.5 ㎕의 35% H_2SO_4와 혼합되고, 37℃에서 1시간 동안 배양되고, 그리고 임의의 불용성 침전물을 제거하기 위해 5분 동안 5,000 x g로 원심분리되었다.

[0390] 모든 검사 샘플은 2개의 Restek RFQ 150 x 4.6 mm 칼럼이 일련으로 구비된 HP-1200 고성능 액체 크로마토그래피

시스템인 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 검사 기질 (피루베이트)과 산물 (아세토인)에 대해 분석되었다. 유기 산 대사산물은 HP-1100 UV 검출기 (210 nm) 및 굴절률을 이용하여 검출되었다. 칼럼 온도는 60℃이었다. 이러한 방법은 이동상으로서 0.0180 N H_2SO_4 (Milli-Q 물에서)와 등용매성이었다. 유속은 1.1 ㎖/min으로 설정되었다. 주입 부피는 20 ㎕이고, 그리고 작업 시간은 8분이었다. 분석은 인증된 표준 (>99%, Sigma-Aldrich로부터 획득됨) 및 5-포인트 보정 곡선을 이용하여 수행되었다.

[0391] **TMA29 효소 검사법:** 세포 펠릿은 얼음 위에서 해동되고 용해 완충액 (10 mM 인산나트륨 pH7.0, 1 mM 디티오트레이톨, 5% w/v 글리세롤)에서 재현탁되었다. 1 ㎖의 유리 비드 (0.5 mm 직경)가 각 샘플에 대한 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브에 첨가되고 850 ㎕의 세포 현탁액이 첨가되었다. 효모 세포는 Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA)을 이용하여 용해되고, 각각 전속에서 6 X 1분 혼합되고, 그 사이에 얼음 위에서 1분 배양되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 21,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액은 새로운 튜브로 이전되었다. 추출물은 검사 때까지 얼음 위에 유지되었다. 효모 용해물 단백질 농도는 앞서 기술된 바와 같이, BioRad Bradford 단백질 검사 시약 키트 (Cat# 500-0006, BioRad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하고, 그리고 표준 곡선의 경우에 BSA를 이용하여 측정되었다.

[0392] (*S*)-2-아세토락테이트 ((*S*)-AL)의 효소적 합성은 혐기성 플라스크에서 수행되었다. 반응은 20 mM 인산칼륨 pH 7.0, 1 mM $MgCl_2$, 0.05 mM 티아민 피로포스페이트 (TPP), 그리고 200 mM 나트륨 피루베이트를 내포하는 55 ㎖의 총 부피에서 수행되었다. 합성은 65 단위 (unit)의 정제된 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*) AlsS의 부가에 의해 시작되고, 그리고 반응물은 고정 배양기에서 30℃에서 7.5시간 동안 배양되었다.

[0393] 라세미 2-아세토락테이트 ((*R/S*)-2-AL)의 화학적 합성은 50 ㎕의 에틸-2-아세톡시-2-메틸아세토아세테이트 (EAMMA)를 990 ㎕의 물과 혼합함으로써 수행되었다. 이후, 260 ㎕의 2 N NaOH가 각 첨가후 15초의 와동과 함께 10 ㎕ 증분 (increment)으로 첨가되었다. 그 다음, 용액은 오비탈 교반기 상에서 20분 동안 혼합되었다.

[0394] 라세미 AHB ((*R/S*)-AHB)의 화학적 합성은 50 ㎕의 에틸-2-아세톡시-2-에틸-3-옥소부타노에이트를 990 ㎕의 물과 혼합함으로써 수행되었다. 이후, 2 N NaOH가 각 첨가후 15초의 와동과 함께 10 ㎕ 증분 (increment)으로 첨가되었다. NaOH는 용액의 pH가 12가 될 때까지 첨가되었다 (~180 ㎕의 2 N NaOH). 그 다음, 용액은 오비탈 교반기 상에서 20분 동안 혼합되었다.

[0395] (*S*)-AL, (*R/S*)-AL 또는 (*R/S*)-AHB 감소 활성의 결정을 위해, 10 ㎕의 희석되지 않은 세포 용해물이 UV 마이크로역가 평판의 6개 웰에 첨가되었다. 3개 웰은 100 mM KPO_4 (pH 7.0), 150 μM NADPH, 그리고 5 mM (*S*)-AL 또는 10 mM (*R/S*)-AL 또는 10 mM (*R/S*)-AHB를 기질로서 내포하는 90 ㎕ 검사 완충액이 제공되었다. 나머지 3개 웰은 90 ㎕의 기질 없는 검사 완충액이 제공되었다. 이들 완충액은 위아래로 피펫팅에 의해 웰 내에서 용해물과 혼합되었다. 이후, 반응이 340 nm에서 모니터링되고, 흡광도가 SpectraMax®

340PC 평판 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 10초마다 판독되었다. 반응은 30℃에서 수행되었다. 각 샘플에 대한 (*S*)-AL, (*R/S*)-AL 또는 (*R/S*)-AHB 감소 활성은 기질 없음 대조의 배경 시도 (background reading)를 뺄셈함으로써 측정되었다. 용해물 없음 대조 역시 삼중으로 수행되었다.

[0396] **DHAD 효소 검사법:** 세포 펠릿은 얼음 위에서 해동되고 용해 완충액 (50 mM Tris pH 8.0, 5 mM $MgSO_4$, 그리고 G Biosciences 효모/ 진균 ProteaseArrest™ (St. Louis, MO, USA, Catalog #788-333))에서 재현탁되었다. 1 ㎖의 유리 비드 (0.5 mm 직경)가 각 샘플에 대한 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브에 첨가되고 850 ㎕의 세포 현탁액이 첨가되었다. 효모 세포는 Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA)을 이용하여 용해되고, 각각 전속에서 6 X 1분 혼합되고, 그 사이에 얼음 위에서 1분 배양되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 21,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액은 새로운 튜브로 이전되었다. 추출물은 검사 때까지 얼음 위에 유지되었다. 효모 용해물 단백질 농도는 앞서 기술된 바와 같이 결정되었다. 각 샘플로부터 단백질은 DHAD 검사 완충액 (50 mM Tris pH8, 5 mM $MgSO_4$)에서 0.5 ㎍/㎕의 최종 농도로 희석되었다. 각 용해물의 3개 샘플이 용해물 없음 대조와 함께 조사되었다. 10 ㎕의 각 샘플 (또는 DHAD 검사 완충액)이 0.2 ㎖ PCR 튜브에 첨가되었다. 다중-채널 피펫을 이용하여, 90 ㎕의 기질이 각 튜브에 첨가되었다 (기질 혼합물은 4 ㎖ DHAD 검사 완충액을 0.5 ㎖ 100 mM DHIV에 첨가함으로써 제조되었다). 샘플은 35℃에서 30분 동안 유전자증폭기 (Eppendorf Mastercycler)에 넣어지고, 그 이후에 95℃에서 5분 배양되었다. 샘플은 유전자증폭기 상에서 4℃로 냉각되고, 이후 5분 동안 3000xg로 원심분리되었다. 최종적으로, 75 ㎕의 상층액이 새로운 PCR 튜브로 이전되고 아래와 같이 HPLC에 의해 분석되었다: 100 ㎕ DNPH 시약 (12 mM 2,4 - 디니트로페닐 히드라진 10 mM 구연산 pH 3.0 80% 아세토니트

릴 20% MilliQ H_2O)이 100 ㎕의 각 샘플에 첨가되었다. 샘플은 유전자증폭기 (Eppendorf, Mastercycler)에서 70℃에서 30분 동안 배양되었다. 케토-이소발레레이트와 이소부티르알데히드의 분석은 Eclipse XDB C-18 역상 칼럼 (Agilent) 및 C-18 역상 칼럼 가드 (Phenomenex)가 구비된 HP-1200 고성능 액체 크로마토그래피 시스템 상에서 수행되었다. 케토이소발레레이트와 이소부티르알데히드는 HP-1100 UV 검출기 (210 nm)를 이용하여 검출되었다. 칼럼 온도는 50℃이었다. 이러한 방법은 2.5% 희석된 인산 (4%)을 갖는 이동상으로서 물에서 70% 아세토니트릴과 등용매성이었다. 유속은 3 ㎖/min으로 설정되었다. 주입 크기는 10 ㎕이고, 그리고 작업 시간은 2분이었다.

[0397] 실시예 1: 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 ADH 활성을 증가시킴으로써 증가된 이소부탄올/이소부티레이트 비율

[0398] 본 실시예의 목적은 증가된 알코올 탈수소효소 활성이 증가된 이소부탄올 수율, 감소된 이소부티레이트 수율, 그리고 이소부탄올 수율 대(對) 이소부티레이트 수율의 비율에서 증가를 유발한다는 것을 증명하는 것이다.

[0399] 본 실시예에서 개시된 균주와 플라스미드는 각각, 표 7과 8에서 제시된다.

표 7

[0400] 실시예 1에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO 번호	유전형
GEVO2843	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), *MATa ura3 leu2 his3 trp1 pdc1△::P_{CUP1}:[Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}: P_{PGK1}: Ll_kivD2: P_{ENO2}: Sp_HIS5] pdc5△::[LEU2: bla: P_{TEF1}: ILV3△N: P_{TDH3}: Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6△::[URA3: bla: P_{TEF1}: Ll_kivD2: P_{TDH3}: Dm_ADH*] {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}

표 8

[0401] 실시예 1에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	관련된 유전자/용법	유전형
pGV2011	KARI, 그리고 DHAD를 발현하는 2μ 플라스미드	P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}, P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*, *2μ ori, bla,* G418R
pGV2485	KARI, DHAD, 그리고 ADH를 발현하는 2μ 플라스미드	P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}, P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*, P_{ENO2}:*Ll_adhA*, *2μ ori, bla,* G418R

[0402] 염색체 DNA로부터 단일 알코올 탈수소효소 (노랑초파리(*D. melanogaster*) ADH, Dm_ADH)를 발현하는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO2843은 앞서 기술된 바와 같이, KARI와 DHAD만을 보유하는 2μ 플라스미드 pGV2011 (각각, *Ec_ilvC_Q110V*와 *Ll_ilvD_coSc*), 또는 KARI, DHAD와 ADH를 보유하는 pGV2485 (각각, *Ec_ilvC_Q110V*, *Ll_ilvD_coSc*, 그리고 *Ll_adhA*)로 형질전환되었다.

[0403] 발효 배양을 시작하기 위하여, 형질전환된 균주의 소규모 하룻밤 배양이 1% 에탄올과 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD 배지에서 시작되고 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 각 균주의 3가지 생물학적 복제물이 조사되었다. 다음날 아침, 이들 배양액의 OD_{600}이 측정되고, 그리고 적절한 양이 50 ㎖ 차단된 (baffled) 플라스크에서 50 ㎖의 동일한 배지를 대략 0.1의 OD_{600}까지 접종하는데 이용되었다. 이들 전배양액 (preculture)은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 배양액이 대략 5-6의 OD_{600}에 도달했을 때, 이들은 50 ㎖ Falcon 튜브에서 25℃에서 5분 동안 2700 rpm으로 원심분리되었다. 한 가지 50 ㎖ 배양액 (한 가지 클론)으로부터 세포는 8% 글루코오스, 0.2 g/ℓ G418, 1% (v/v) 에탄올 (3 g/ℓ 에르고스테롤 및 132 g/ℓ Tween-80을 내포)을 내포하는 YPD에서 재현탁되고, 그리고 pH 6.5에서 200 mM MES로 완충되었다. 배양액은 이후, 250 ㎖ 차단되지 않은

(unbaffled) 플라스크로 이전되고 30℃와 75 rpm에서 배양되었다.

[0404] 72시간 시점에, 각 발효 플라스크로부터 샘플이 OD_{600}, ADH 활성을 측정하기 위해, 그리고 GC1과 LC1에 의한 분석을 위해 채취되었다. GC1과 LC1 분석을 위한 샘플을 준비하기 위해, 적절한 부피의 세포 배양액이 마이크로원심분리기에서 10분 동안 최대 속도로 회전되고, 그리고 상층액이 GC1과 LC1 분석을 위해 이동되었다. 4℃에서 5분 동안 3000 x g로 14 mℓ의 배양 배지를 원심분리함으로써 ADH 검사를 위한 세포 펠릿이 만들어졌다. 상층액은 제거되고, 그리고 세포는 3 mℓ 차가운 무균수에서 세척되었다. 튜브는 이후, 2분 동안 앞서 기술된 바와 같이 원심분리되고, 상층액이 제거되고, 그리고 이들 튜브는 총 세포 중량 (total cell weight)을 결정하기 위해 다시 칭량되었다. 이들 Falcon 튜브는 -80℃에서 보관되었다. ADH 검사는 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다.

[0405] 표 9에서는 발효 과정 동안 각 균주에 대한 OD_{600}을 보여준다. 72시간의 이러한 발효 동안, 이들 균주의 OD_{600}은 유사하였다: 이들은 대략 7의 OD_{600}에서 시작되고 대략의 9의 OD_{600}에서 종결되었다. 상기 두 플라스미드로 형질전환된 GEVO2843으로부터 용해물의 시험관내 ADH 효소적 활성은 72시간 시점에서 측정되었다. 표 9에서는 시험관내에서 측정된, 용해물에서 ADH 활성을 보여준다. ADH가 없는 플라스미드 (pGV2011)를 보유하는 균주는 대략 0.04 U/mg의 활성을 보였다. *Ll_adhA* 유전자를 갖는 플라스미드 (pGV2485)를 보유하는 균주는 대략 7-배 높은 ADH 활성을 보였다.

표 9

[0406] 72시간 발효후, 플라스미드 pGV2011 또는 pGV2485로 형질전환된 균주 GEVO2843의 OD_{600} 및 알코올 탈수소효소 활성.

GEVO2843 형질전환	OD_{600}	**ADH 활성 [U/mg]**
pGV2011	8.5	0.04
pGV2485	9.1	0.29

[0407] 72시간 발효후 이소부탄올과 이소부티레이트 역가는 표 10에서 제시된다. 0.04 U/mg의 낮은 ADH 활성을 갖는 균주에서 이소부탄올 역가는 0.29 U/mg의 높은 ADH 활성을 갖는 균주에 비하여 훨씬 낮았다. 0.04 U/mg의 낮은 ADH 활성을 갖는 균주에서 이소부티레이트 역가는 0.29 U/mg의 높은 ADH 활성을 갖는 균주에 비하여 훨씬 높았다. 표 10에서는 또한, 72시간 발효후 이소부티레이트와 이소부탄올에 대한 수율을 보여준다. 0.04 U/mg의 낮은 ADH 활성을 갖는 균주에서 이소부탄올 수율은 0.29 U/mg의 높은 ADH 활성을 갖는 균주에 비하여 훨씬 낮았다. 0.04 U/mg의 낮은 ADH 활성을 갖는 균주에서 이소부티레이트 수율은 0.29 U/mg의 높은 ADH 활성을 갖는 균주에 비하여 훨씬 높았다.

표 10

[0408] 72시간 발효후, 플라스미드 pGV2011 또는 pGV2485로 형질전환된 균주 GEVO2843에서 이소부탄올과 이소부티레이트에 대한 역가와 수율.

	이소부탄올 역가 [g/ℓ]	**이소부티레이트 역가 [g/ℓ]**	**이소부탄올 수율 [mol/mol 글루코오스]**	**이소부티레이트 수율 [mol/mol 글루코오스]**	**수율 비율 (이소부탄올/이소부티레이트)**
pGV2011	3.2	3.8	0.22	0.22	1.0
pGV2485	4.7	1.9	0.33	0.11	3.0

[0409] 실시예 2: 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 변이체 ADH Ll_AdhA^{RE1}의 이용에 의한 더욱 증가된 이소부탄올/이소부티레이트 비율

[0410] 본 실시예의 목적은 증가된 k_{cat}와 감소된 K_M을 갖는 알코올 탈수소효소의 발현이 이소부탄올 수율에서 더욱 증가, 이소부티레이트 수율에서 감소, 그리고 이소부탄올 수율 대(對) 이소부티레이트 수율의 비율에서 증가를 유발한다는 것을 증명하는 것이다.

표 11

[0411] 실시예 2에서 개시된 균주의 유전형 .

GEVO 번호	유전형
GEVO2843	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), *MATa ura3 leu2 his3 trp1* pdc1△::P_{CUP1}:*[Bs_alsS1_coSc*:T_{CYC1}: P_{PGK1}: *Ll_kivD2*: P_{ENO2}: *Sp_HIS5]* *pdc5△::[LEU2: bla*: P_{TEF1}: *ILV3△N*: P_{TDH3}: *Ec_ilvC_coSc*^{Q110V} *]* *pdc6△::[URA3: bla*: P_{TEF1}: *Ll_kivD2*: P_{TDH3}: *Dm_ADH*] {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}

표 12

[0412] 실시예 2에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	관련된 유전자/용법	유전형
pGV2543	KARI, DHAD, KIVD, 그리고 ADH (Ll_AdhA^{his6})를 발현하는 2μ 플라스미드	P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}, P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*, P_{PGK1}:*Ll_kivD_coEc*, P_{ENO2}: *Ll_AdhA*^{his6}, *2μ ori*, *bla*, G418R
pGV2545	KARI, DHAD, KIVD, 그리고 ADH (Ll_AdhA$^{RE1-his6}$)를 발현하는 2μ 플라스미드	P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}, P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*, P_{PGK1}:*Ll_kivD_coEc*, P_{ENO2}: *Ll_AdhA*$^{RE1-his6}$, *2μ ori*, *bla*, G418R

[0413] 염색체 DNA로부터 단일 알코올 탈수소효소 (노랑초파리(*D. melanogaster*) ADH, *Dm_ADH*)를 발현하는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO2843는 KARI, DHAD, KIVD 및 his-표식되고 코돈-최적화된 야생형 ADH를 보유하는 2μ 플라스미드 pGV2543 (각각, *Ec_ilvC*^{Q110V}, *Ll_ilvD_coSc*, 그리고 *Ll_adhA_coSc*^{his6}) 또는 KARI, DHAD, KIVD 및 his-표식되고 코돈-최적화된 돌연변이체 ADH를 보유하는 pGV2545 (각각, *Ec_ilvC*^{Q110V}, *Ll_ilvD_coSc*, 그리고 *Ll_adhA*^{RE1}*_coSc*^{his6})로 형질전환되었다. 이들 균주는 배양되고, 그리고 앞서 기술된 바와 같이 GC1과 LC1에 의해 ADH 효소 활성 및 세포외 대사산물의 생산에 대해 평가되었다.

[0414] *Ll_adhA_coSc*^{his6} *Ll_adhA*^{RE1}*_coSc*^{his6}의 유전자 산물 (각각, Ll_adhA^{his6} 및 Ll_adhA$^{RE1-his6}$)의 동역학적 파라미터는 표 13에서 제시된다.

표 13

[0415] NADH를 보조인자로 하여 이소부티르알데히드에 대해 측정된, 야생형 Ll_adhA^{his6} 및 변형된 Ll_adhA^{RE1}의 동역학적 파라미터 비교.

변이체	K_M [mM 이소부티르알데히드]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat} /K_M [$M^{-1}*s^{-1}$]
Ll_adhA^{his6}	11.7	51	4400
Ll_adhA$^{RE1-his6}$	1.6	84	49700

[0416] 표 14에서는 발효 과정 동안 각 균주에 대한 OD_{600}을 보여준다. 72시간의 이러한 발효 동안, 이들 균주의 OD_{600}은 유사하였다: 이들은 대략 6의 OD_{600}에서 시작되고 대략의 9의 OD_{600}에서 종결되었다. 상기 두 플라스미드로 형질전환된 GEVO2843으로부터 용해물의 시험관내 ADH 효소적 활성은 72시간 시점에서 측정되었다. 표 14에서는 앞서 기술된 바와 같이 시험관내에서 측정된, 용해물에서 ADH 활성을 보여준다. *Ll_adhA_coSc*^{his6}을 갖는 플라스미드(pGV2543)를 보유하는 균주는 대략 0.38 U/mg의 활성을 보였다. *Ll_adhA*^{RE1}*_coSc*^{his6} 유전자를 갖는 플라스미드(pGV2545)를 보유하는 균주는 대략 7-배 높은 ADH 활성을 보였다.

표 14

[0417] 72시간 발효후, 플라스미드 pGV2543 또는 pGV2545로 형질전환된 균주 GEVO2843의 OD_{600} 및 알코올 탈수소효소 활성.

GEVO2843 형질전환	OD_{600}	ADH 활성 [U/mg]
pGV2543	8.5	0.38
pGV2545	8.8	2.46

[0418] 72시간 발효후 이소부탄올과 이소부티레이트 역가와 수율은 표 15에 도시된다. pGV2543을 보유하는 균주에서 이소부탄올 역가와 수율은 pGV2545를 보유하는 균주에 비하여 낮았다. pGV2543을 보유하는 균주에서 이소부티레이트 역가와 수율은 pGV2545를 보유하는 균주에 비하여 훨씬 높았다.

표 15

[0419] 72시간 발효후, 플라스미드 pGV2453 또는 pGV2485로 형질전환된 균주 GEVO2843에서 이소부탄올과 이소부티레이트에 대한 역가와 수율.

GEVO2843 형질전환	이소부탄올 [g/ℓ]	이소부티레이트 [g/ℓ]	이소부탄올 수율 [mol/mol 글루코오스]	이소부티레이트 수율 [mol/mol 글루코오스]	수율 비율 (이소부탄올/이소부티레이트)
pGV2543	4.6	1.3	0.28	0.06	4
pGV2545	4.9	0.3	0.29	0.01	20

[0420] 실시예 3: RE1의 발현에 의한 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 더욱 증가된 이소부탄올/이소부티레이트 비율

[0421] 본 실시예의 목적은 증가된 k_{cat}와 감소된 K_M을 갖는 알코올 탈수소효소의 발현이 발효조 용기에서 수행된 발효 동안 이소부탄올 수율에서 증가 및 이소부티레이트 수율에서 감소를 유발한다는 것을 증명하는 것이다.

[0422] 발효는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO3519와 GEVO3523의 성과를 비교하기 위해 수행되었다. 이소부탄올과 이소부티레이트 역가와 수율은 발효 동안 측정되었다. GEVO3519는 하기 효소를 인코딩하는 유전자를 내포하는 2μ 플라스미드 pGV2524를 보유한다: KARI, DHAD, KIVD 및 his-표식된, 코돈-최적화된 야생형 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) ADH. GEVO3523은 하기 효소를 인코딩하는 유전자를 내포하는 2μ 플라스미드 pGV2524를 보유한다: KARI, DHAD, KIVD 및 감소된 K_M과 증가된 k_{cat}를 갖는 his-표식된, 코돈-최적화된 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) ADH의 향상된 변이체. 이들 균주는 LC1과 GC1에 의한 이소부탄올, 이소부티르알데히드, 글루코오스 소비, 그리고 DasGip 발효조 용기에서 발효 동안 OD_{600}에 대해 평가되었다.

표 16

[0423] 실시예 3에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO 번호	유전형
GEVO3128	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), ***MATa ura3 leu2 his3 trp1*** *gpd2△::[$T_{K1_URA3_short}$:P_{FBA1}:K1_URA3:T_{K1_URA3}]* *gpd1△::P_{ccw12}:hph* *pdc1△ ::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivDkivD2:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5△::[LEU2:bla:P_{TEF1};ILV3△N:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6△::[P_{TEF1}:Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}*
GEVO3519	플라스미드 pGV2524로 형질전환된 GEVO3128
GEVO3523	플라스미드 pGV2546로 형질전환된 GEVO3128

표 17

[0424] 실시예 3에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	관련된 유전자/용법	유전형
pGV2524	2μ 플라스미드	*P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$, P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc, P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc P_{ENO2}:Ll_adhA_coSc^{his6}, 2μ ori, bla,* G418R
pGV2546	2μ 플라스미드	*P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$, P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc, P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc P_{ENO2}:Ll_adhA_coSc$^{RE1-his6}$, 2μ ori, bla,* G418R

[0425] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO3128은 앞서 기술된 바와 같이 균주 GEVO3519와 GEVO3523을 산출하기 위해 각각, 2μ 플라스미드 pGV2524 또는 pGV2546로 형질전환되었다. GEVO3519와 GEVO3523의 접종물 배양은 80 mℓ의 YPD 배지 0.2g/ℓ G418 항생제, 1% v/v 에탄올, 그리고 0.019 g/ℓ 트립토판을 내포하는 500 mℓ 차단된 플라스크를 접종함으로써 시작되었다. 배양액은 대략 34시간 동안 배양되었다. 오비탈 교반기는 양쪽 실험에서 250 rpm과 30℃로 설정되었다. GEVO3519와 GEVO3523 균주에 대해 유사한 세포 덩어리가 획득되었다. 배양후 획득된 세포 밀도 (cell density)는 8.0 OD_{600}이었다. 배치 발효 (batch fermentation)는 용기당 0.9 ℓ의 작업 부피를 갖는 2 ℓ 탑 드라이브 모터 DasGip 용기를 이용하여, 80 g/ℓ 글루코오스, 0.2 g/ℓ G418, 1% v/v 에탄올, 그리고 0.019 g/ℓ 트립토판을 내포하는 YPD 배지에서 수행되었다. 용기는 적절한 용존 산소 및 pH 프로브 (probe)와 함께, 121℃에서 60분 동안 살균되었다. 용존 산소 프로브는 편극 (polarization)을 가능하게 하기 위해 살균후 보정되지만, pH 프로브는 살균전 보정되었다. pH는 6N KOH와 2N H_2SO_4를 이용하여 pH 6.0에서 조절되었다. 배양의 성장 기 (growth phase) 동안, 산소 전달 속도 (oxygen transfer rate, OTR)는 10 mM/h이고, 그리고 배양의 생산 기 동안 OTR은 0.2 mM/h이었다.

[0426] 표 18에서는 배양의 생산 기 동안 계산된 이소부탄올 역가와 수율 (이론적 %로서)을 보여준다. 이소부탄올 역가와 수율 둘 모두 감소된 K_M과 증가된 k_{cat}를 갖는 알코올 탈수소효소를 보유하는 균주 GEVO3523에서 증가된다. 표 18에서는 또한, 도달된 최대 역가로서 보고되는 이소부티레이트 역가, 그리고 탄소 수율로서 수율 (%)을 보여준다. 이소부티레이트 역가와 수율 둘 모두 감소된 K_M과 증가된 k_{cat}를 갖는 알코올 탈수소효소를 보유하는 균주 GEVO3523에서 감소된다.

표 18

[0427] 이소부탄올과 이소부티레이트 역가와 수율.

균주	이소부탄올 역가 [g/ℓ]	이소부탄올 수율 [이론적 %]	이소부티레이트 역가 [g/ℓ]	이소부티레이트 수율 [C-수율 %]
GEVO3519	3.9 ± 0.4	50.5 ± 2.1	0.82 ± 0.04	4.0 ± 0.0
GEVO3523	5.0 ± 0.3	59.5 ± 2.1	0.40 ± 0.01	2.0 ± 0.0

[0428] 실시예 4: 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 *ALD6* 유전자의 결실에 의한 발효 동안 감소된 이소부티레이트와 아세테이트 생산

[0429] 하기 실시예는 *ALD6* 유전자의 결실이 발효 동안 이소부티레이트와 아세테이트 생산의 감소를 유발한다는 것을 예증한다.

[0430] ***ALD6* 결실 균주의 작제:** 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)로부터 *ALD6*의 결실을 위한 *ALD6*의 결실 대립형질을 내포하는 DNA 단편을 산출하기 위해 PCR이 이용되었다. 한 가지 PCR 반응은 프라이머 oGV2834와 oGV2835를 이용하여 DNA 단편 (A)를 증폭하고, 이러한 단편은 *ALD6*의 상류 측면 영역 및 상기 DNA 단편의 3' 단부에서 pGV1954로부터 P_{Sc_CCW12} 프로모터 영역의 5' 단부와의 겹침 영역을 포함한다. 다른 PCR 반응은 프라이머 oGV2836과 oGV2837을 이용하여 DNA 단편 (D)를 증폭하고, 이러한 단편은 *ALD6*의 하류 측면 영역 및 상기 DNA 단편의 5' 단부에서 pGV2074로부터 *hph* 히그로마이신 내성 ORF의 3' 단부와의 겹침 영역을 포함한다. 또 다른 PCR 반응은 프라이머 oGV2631과 oGV2632를 이용하여 DNA 단편 (B)를 증폭하고, 이러한 단편은 상기 DNA 단편의 5' 단부에서 *ALD6*의 상류 측면 영역의 3' 단부와의 겹침 영역 (단편 A) 및 상기 DNA 단편의 3' 단부에서 pGV2074로부터 *hph* 히그로마이신 내성 ORF의 5' 단부와의 겹침 영역을 갖는 pGV1954로부터 P_{Sc_CCW12} 프로모터 영역을 포함한다. 또 다른 PCR 반응은 프라이머 oGV2633과 oGV2634를 이용하여 DNA 단편 (C)를 증폭하고, 이러한 단편은 상기 DNA 단편의 5' 단부에서 pGV1954로부터 P_{Sc_CCW12} 프로모터 영역의 3' 단부와의 겹침 영역 (단편 B) 및 상기 DNA 단편의 3' 단부에서 *ALD6*의 하류 측면 영역의 5' 단부와의 겹침 영역 (단편 D)을 갖는 pGV2074로부터 *hph* 히그로마이신 내성 ORF를 포함한다. DNA 단편 A와 B는 프라이머 oGV2834와 oGV2632를 이용한 PCR에 의해 결합되어 DNA 단편 AB가 산출되고, 그리고 DNA 단편 C와 D는 프라이머 oGV2633과 oGV2837을 이용한 PCR에 의해 결합되어 DNA 단편 CD가 산출되었다. DNA 단편 AB와 CD는 프라이머 oGV2834와 oGV2837를 이용한 PCR에 의해 결합되어, *ALD6*의 결실 대립형질을 내포하는 최종 DNA 단편 ABCD가 산출되었다.

표 19

실시예 4에 개시된 프라이머 서열.

oGV No.	서열
oGV968	ACTCGCCGATAGTGGAAACCGACG (서열 번호: 62)
oGV1965	CAAACTGTGATGGACGACACC (서열 번호: 63)
oGV2631	CAATACGTTATGCCGTAATGAAG (서열 번호: 64)
oGV2632	GCTTTTTACCCATTATTGATATAGTGTTTAAGCGAATG (서열 번호: 65)
oGV2633	CACTATATCAATAATGGGTAAAAAGCCTGAACTCAC (서열 번호: 66)
oGV2634	TTATTCCTTTGCCCTCGGACG (서열 번호: 67)
oGV2680	TGCACTGCTGTCTTCACTTC (서열 번호: 68)
oGV2796	TGTCAGCGCTTCAGACTC (서열 번호: 69)
oGV2797	AAGTATTTTTAAGGATTCGCTC (서열 번호: 70)
oGV2798	CTTCATTACGGCATAACGTATTGAAGTATTTTTAAGGATTCGCTC (서열 번호: 71)
oGV2800	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAAGATAGTTATCATTATGTAAGTGCG (서열 번호: 72)
oGV2801	GGGAGTTTAGCAATCAGC (서열 번호: 73)
oGV2802	TGGTTGACCCGCAAACTTC (서열 번호: 74)
oGV2803	ACAATCTCCCTGTCTCCTCCC (서열 번호: 75)
oGV2804	AAGGTGATTTGGCACAAATTTTAC (서열 번호: 76)
oGV2805	GGTACAATTCTGTCCTGAATTGTAG (서열 번호: 77)
oGV2806	AGGTCCTAGAAATCCCTTAAG (서열 번호: 78)
oGV2808	CTTCATTACGGCATAACGTATTGCGATATCAGTATACAAGGTAGGC (서열 번호: 79)
oGV2810	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAAGGATTTAAGATGAGTGGTATTGG (서열 번호: 80)
oGV2811	TGTTCGTAACTTTTGTCATCAC (서열 번호: 81)
oGV2812	TCAGCATGCGGAACAATTG (서열 번호: 82)
oGV2813	TCCACACGGTATCATACGATC (서열 번호: 83)
oGV2814	GCGGTCGACAAGTTCAATATG (서열 번호: 84)
oGV2815	TACTGAGCCGCCAACCTTAGTA (서열 번호: 85)
oGV2816	CATAACTATACCCGTACGCAG (서열 번호: 86)
oGV2818	CTTCATTACGGCATAACGTATTGAGCGTAGATCTACTGAACATGC (서열 번호: 87)
oGV2820	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAACATGAGATTGTCAAAGAGG (서열 번호: 88)
oGV2821	CACCAGGCTTATTGATGACC (서열 번호: 89)
oGV2822	CATTACCGGCAGTTGCTC (서열 번호: 90)
oGV2824	TATGACAGTGCCTATCAAGC (서열 번호: 91)

[0431]

oGV2825	AATGGGTTCTACCAGTATC (서열 번호: 92)
oGV2826	AAGCCGGGAACGTGCGTAAC (서열 번호: 93)
oGV2827	CTTCATTACGGCATAACGTATTGGGAACGCGTAATGGTGCTTG (서열 번호: 94)
oGV2828	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAACCCGAGTTGACTGCTCATTG (서열 번호: 95)
oGV2829	AATACTCGCCGAGGCGTAGG (서열 번호: 96)
oGV2830	TTGGAGCTGGGAGGTAAATC (서열 번호: 97)
oGV2831	TGCGGCTAACCCATATTGAG (서열 번호: 98)
oGV2832	TACGCTGAGCGTAGTACAAC (서열 번호: 99)
oGV2833	TAAAGCGCTGGGTGGACAACCG (서열 번호: 100)
oGV2834	GCACCGAGACGTCATTGTTG (서열 번호: 101)
oGV2835	CTTCATTACGGCATAACGTATTGTAAACACGCCAGGCTTGACC (서열 번호: 102)
oGV2836	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAATCCATTCGGTGGTGTTAAGC (서열 번호: 103)
oGV2837	ATGGCGAAATGGCAGTACTC (서열 번호: 104)
oGV2838	ACCAACGACCCAAGAATC (서열 번호: 105)
oGV2839	CTTTGCGACAGTGACAAC (서열 번호: 106)
oGV2840	CCTCACGTAAGGGCATGATAG (서열 번호: 107)
oGV2841	GCATTGCAGCGGTATTGTCAGG (서열 번호: 108)
oGV2842	CAGCAGCCACATAGTATACC (서열 번호: 109)
oGV2843	CTTCATTACGGCATAACGTATTGAGCCGTCGTTTGACATGTTG (서열 번호: 110)
oGV2844	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAACGCTCCATTTGGAGGGATCG (서열 번호: 111)
oGV2845	GAATGCGCTTGCTGCTAGGG (서열 번호: 112)
oGV2846	CAGCTCTTGCTGCAGGTAACAC (서열 번호: 113)
oGV2847	GGCACAATCTTGGAGCCGTTAG (서열 번호: 114)
oGV2848	ACCAAGCCATCAAGGTTGTC (서열 번호: 115)
oGV2849	TGGGTGATGGTTTGGCGAATGC (서열 번호: 116)
oGV2896	GAAATGATGACATGTGGAAATATAACAG (서열 번호: 117)

[0432]

[0433] *ALD6*의 결실에 의해 감소된 이소부티레이트와 아세테이트 생산을 나타내는 균주는 *ALD6*의 결실 대립형질을 내포하는 ABCD DNA 단편으로 GEVO3198의 형질전환에 의해 작제되었다. 형질전환체는 0.1 g/ℓ 히그로마이신에 대한 내성에 대해 선별되고, 그리고 형질전환체 집락은 프라이머 쌍 oGV2840/oGV2680, oGV968/oGV2841, 그리고 oGV2838/oGV2839를 이용한 ABCD DNA 단편의 정확한 통합을 위해 집락 PCR에 의해 스크리닝되었다. 균주 GEVO3711, GEVO3712와 GEVO3713은 이러한 집락 PCR에 의해, ABCD DNA 단편의 정확한 통합에 의해 *ALD6*이 결실되는 것으로 확인되었다.

[0434] *ALD6*의 결실에 의해 감소된 이소부티레이트와 아세테이트 생산을 나타내는 이소부탄올 생산 경로를 내포하는 균주는 KARI, DHAD, KIVD와 ADH를 발현하는 유전자를 보유하는 2μ 복제 기원 플라스미드, pGV2247 (각각, *Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$, *Ll_ilvD_coSc*, *Ll_kivD2_coEc*, 그리고 *Ll_adhA*)로 GEVO3711, GEVO3712와 GEVO3713의 형질전환에 의해 작제되었다. 형질전환체는 0.2 g/ℓ G418 및 0.1 g/ℓ 히그로마이신에 대한 내성에 대해 선별되고, 그리고 0.1 g/ℓ 히그로마이신 및 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 배지 상에 재-스트리킹 (re-streaking)에 의해 정제되어, 균주 GEVO3714, GEVO3715와 GEVO3716이 산출되었다. 이소부탄올 생산 경로를 내포하는 *ALD6* 대조 균주, GEVO3466은 플라스미드 pGV2247로 GEVO3198의 형질전환에 의해 산출되었다. 형질전환체는 0.2 g/ℓ G418에 대한 내성에 대해 선별되고, 그리고 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 배지 상에 재-스트리킹 (re-streaking)에 의해 정제되었다

[0435] ***ald2△, ald3△, ald4△, ald5△와 hfd1△ 결실 균주의 작제:*** 별개의 균주에서 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)로부터 개별적으로 *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5*와 *HFD1*의 결실을 위한 *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5*와 *HFD1*의 개별 결실 대립형질을 내포하는 별개의 DNA 단편을 산출하기 위해 PCR이 이용되었다. 추가적으로, 개별 균주

에서 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)로부터 *ALD2*와 *ALD3* 둘 모두의 결실 (*ald2*△ *ald3*△)을 위한, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 유전체에서 인접하는 유전자인 *ALD2*와 *ALD3* 둘 모두를 커버하는 결실 대립형질을 내포하는 DNA 단편을 산출하기 위해 PCR이 이용되었다. 각 개별 유전자에 대해, 상류 측면 영역, pGV1954로부터 P_{Sc_CCW12} 프로모터 영역, pGV2074로부터 *hph* 히그로마이신 내성 ORF 및 하류 측면 영역을 내포하는 4-성분 단편은 표 20에 열거된 프라이머 쌍을 이용하는 점을 제외하고, *ALD6*의 결실을 위한 ABCD 단편의 산출에서와 같이 PCR에 의해 산출되었다. *ALD2*와 *ALD3* 둘 모두의 결실을 위한 이러한 4-성분 단편은 *ALD2*로부터 상류 측면 영역 및 *ALD3*으로부터 하류 측면 영역을 내포하고, 그리고 표 20에 열거된 프라이머 쌍을 이용한 PCR에 의해 유사하게 작제되었다. pGV1954로부터 P_{Sc_CCW12} 프로모터 영역은 프라이머 쌍 oGV2631/oGV2632로 항상 증폭되었고, 그리고 pGV2074로부터 *hph* 히그로마이신 내성 ORF는 프라이머 쌍 oGV2633/oGV2634로 항상 증폭되었다.

표 20

[0436] 유전자 결실을 위해 상류와 하류 영역을 증폭하는데 이용되는 프라이머.

유전자 결실	상류 영역을 위한 프라이머 쌍	하류 영역을 위한 프라이머 쌍
ald2△	oGV2796/oGV2797, oGV2796/oGV2798	oGV2800/oGV2801
ald3△	oGV2806/oGV2808	oGV2810/oGV2811
ald2△ *ald3*△	oGV2796/oGV2798	oGV2810/oGV2811
ald4△	oGV2816/oGV2818	oGV2820/oGV2821
ald5△	oGV2826/oGV2827	oGV2828/oGV2829
ald6△	oGV2834/oGV2835	oGV2836/oGV2837
hfd1△	oGV2842/oGV2843	oGV2844/oGV2845

[0437] 개별적으로 *ALD2, ALD3, ALD4, ALD5*와 *HFD1*의 결실을 갖는 균주 및 *ALD2*와 *ALD3* 둘 모두의 결실을 갖는 균주는 *ALD2, ALD3, ALD4, ALD5* 또는 *HFD1*의 개별 결실 대립형질을 내포하는 개별 4-성분 DNA 단편, 또는 *ALD2*와 *ALD3* 둘 모두의 결실 대립형질을 내포하는 4-성분 DNA 단편으로 GEVO3198 또는 GEVO3466의 형질전환에 의해 작제되었다. 형질전환체는 0.1 g/ℓ 히그로마이신에 대한 내성에 대해 선별되고, 그리고 형질전환체 집락은 표 21에 열거된 프라이머 쌍을 이용한 4-성분 DNA 단편의 정확한 통합을 위해 집락 PCR에 의해 스크리닝되었다. 균주 GEVO3567은 이러한 집락 PCR에 의해, *ALD2*가 정확하게 결실되는 것으로 확인되었다; 균주 GEVO3568은 이러한 집락 PCR에 의해, *ALD3*이 정확하게 결실되는 것으로 확인되었다; 균주 GEVO3569는 이러한 집락 PCR에 의해, *ALD2*와 *ALD3* 둘 모두 정확하게 결실되는 것으로 확인되었다; 균주 GEVO3579는 이러한 집락 PCR에 의해, *ALD4*가 정확하게 결실되는 것으로 확인되었다; 균주 GEVO3705, GEVO3706과 GEVO3707은 이러한 집락 PCR에 의해, *ALD5*가 정확하게 결실되는 것으로 확인되었다; 그리고 균주 GEVO3720, GEVO3721과 GEVO3722는 이러한 집락 PCR에 의해, *HFD1*이 정확하게 결실되는 것으로 확인되었다.

[0438] 이소부탄올 생산 경로를 내포하고 개별적으로 *ALD2, ALD3*과 *ALD5*의 결실 또는 *ALD2*와 *ALD3* 둘 모두의 결실을 갖는 균주는 플라스미드 pGV2247로 균주 GEVO3567, GEVO3568, GEVO3569, GEVO3705, GEVO3706과 GEVO3707의 형질전환에 의해 작제되었다. 형질전환체는 0.2 g/ℓ G418 및 0.1 g/ℓ 히그로마이신에 대한 내성에 대해 선별되고, 그리고 0.1 g/ℓ 히그로마이신 및 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 배지 상에 재-스트리킹 (re-streaking)에 의해 정제되어, 균주 GEVO3586, GEVO3587, GEVO3588, GEVO3590, GEVO3591, GEVO3592, GEVO3593, GEVO3594, GEVO3595, GEVO3708, GEVO3709와 GEVO3710이 산출되었다. 균주 GEVO3579, GEVO3720, GEVO3721과 GEVO3722는 GEVO3466로부터 산출되고, 따라서 플라스미드 pGV2247을 내포하였다.

표 21

[0439] 유전자 결실의 확인을 위해 집락을 스크리닝하는데 이용되는 프라이머.

유전자 결실	프라이머 쌍
ald2△	oGV2802/oGV2632, oGV968/oGV2803, oGV2804/oGV2805
ald3△	oGV2812/oGV2632, oGV968/oGV2813, oGV2814/oGV2815
ald2△ *ald3*△	oGV2802/oGV2632, oGV968/oGV2813, oGV2804/oGV2805, oGV2814/oGV2815
ald4△	oGV2822/oGV2632, oGV968/oGV2896, oGV2824/oGV2825

ald5△	oGV2832/oGV2680, oGV1965/oGV2833, oGV2830/oGV2831
ald6△	oGV2840/oGV2680, oGV968/oGV2841, oGV2838/oGV2839
hfd1△	oGV2848/oGV2680, oGV968/oGV2849, oGV2846/oGV2847

표 22

실시예 4에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO No.	유전형
GEVO3198	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{FBA1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P1D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEVO3466	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{FBA1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P1D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}: pGV2247로 형질전환됨
GEVO3567	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{FBA1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P1D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] *ald2*△::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEVO3568	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{FBA1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P1D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] *ald3*△::P_{Sc_CCW12}-*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEVO3669	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{FBA1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P1D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] *ald2*△ :*ald3*△::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEVO3679	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{FBA1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P1D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] *ald4*△::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}; pGV2247로 형질전환됨
GEVO3686, GEVO3687 및 GEVO3688	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{FBA1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P1D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*]

[0440]

	ald2△: *ald3*△::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}; pGV2247로 형질전환됨
GEV03690, GEV03691 및 GEV03692	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{S110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] *ald2*△::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}; pGV2247로 형질전환됨
GEV03693, GEV03694 및 GEV03696	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*::T_{Kl_URA3} *gpd2*::$T_{Kl_URA3_short}$-P_{FBA1}-*Kl_URA3*-T_{Kl_URA3} *pdc1*::P_{CUP1}-*Bs_alsS_coSc*-T_{CYC1}-P_{PGK1}-*Ll_kivD2_coEc*-P_{ENO2}-*Sp_HIS5* *pdc6*::*LEU2*-*bla*-P_{TEF1}-*Sc_ILV3*△*N*-P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{S110V} *pdc6*::P_{TEF1}-*Ll_ilvD_coSc*-P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$-P_{ENO2}-*Ll_adhA*-P_{FBA1}-*Sc_TRP1* *ald3*△::P_{Sc_CCW12}-*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}; pGV2247로 형질전환됨
GEV03705, GEV03706 및 GEV03707	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{S110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] *ald6*△::P_{Sc_CCW12}-*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEV03708, GEV03709 및 GEV03710	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{S110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] *ald6*△::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}; pGV2247로 형질전환됨
GEV03711, GEV03712 및 GEV03713	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{S110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] *ald6*△::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEV03714, GEV03716 및 GEV03716	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{S110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] *ald6*△::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}; pGV2247로 형질전환됨
GEV03720, GEV03721 및 GEV03722	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△::[T_{Kl_URA3}] *gpd2* △::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc6*△::[*LEU2*: *bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3*△*N*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{S110V}] *pdc6*△::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] *hfd1*△::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}; pGV2247로 형질전환됨

[0441]

표 23

[0442] 실시예 4에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	유전형
pGV2247	P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc* P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$ P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc* P_{ENO2}: *Ll_adhA* 2μ-*ori*, pUC-ori, *bla*, *G418R*.

[0443] **교반 플라스크 발효:** GEV03466의 성과를 *ald2*△, *ald3*△, *ald2*△ *ald3*△, *ald4*△, *ald5*△, *hfd1*△와 *ald6*△ 결실 돌연변이를 내포하는 균주와 비교하기 위해 발효가 수행되었다. 효모 균주는 14 ㎖ 둥근-바닥 스냅-캡 튜브에서, 세포 패치로부터, 또는 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD 아가 평판으로부터 정제된 단일 집락으로부터 0.2 g/ℓ G418 및 1% v/v 에탄올 배지를 내포하는 3 ㎖의 YPD 내로 접종되었다. 배양액은 250 rpm과 30℃에서 비스듬히 최대 24시간 교반하면서 하룻밤동안 배양되었다. 각 균주에 대해 별개로, 이들 하룻밤 배양액은 슬리브 클

로저 (sleeve closure)를 갖는 250 ㎖ 차단된 플라스크에서 0.2 g/ℓ G418 및 1% v/v 에탄올 배지를 내포하는 50 ㎖의 YPD를 0.1의 OD_{600}까지 접종하는데 이용되었다. 이들 플라스크 배양액은 250 rpm과 30℃에서 최대 24시간 교반하면서 하룻밤동안 배양되었다. 이들 플라스크 배양액으로부터 세포는 5분 동안 3000xg로 원심분리에 의해 각 균주에 대해 별개로 수확되고, 그리고 각 세포 펠릿은 80 g/ℓ 글루코오스, 에탄올에 용해된 3 g/ℓ 에르고스테롤과 132 g/ℓ Tween 80의 1% v/v 저장 용액, 200 mM MES 완충액, pH 6.5, 그리고 0.2 g/ℓ G418 배지를 내포하는 5 ㎖의 YPD에서 별개로 재현탁되었다. 각 세포 현탁액은 벤트 스크루-캡 (vented screw-cap)을 갖는 250 ㎖ 비-차단된 플라스크에서 80 g/ℓ 글루코오스, 에탄올에 용해된 3 g/ℓ 에르고스테롤과 132 g/ℓ Tween 80의 1% v/v 저장 용액, 200 mM MES 완충액, pH 6.5, 그리고 0.2 g/ℓ G418 배지를 내포하는 50 ㎖의 YPD를 대략 5의 OD_{600}까지 접종하는데 이용되었다. 이들 발효액은 250 rpm과 30℃에서 교반 배양되었다. 주기적으로, 각 교반 플라스크 발효액으로부터 샘플은 OD_{600}을 측정하고, 그리고 이소부탄올과 기타 대사산물에 대한 가스 크로마토그래피 (GC1) 분석, 그리고 유기 산과 글루코오스에 대한 고성능 액체 크로마토그래피 (LC1) 분석에 대비하기 위해 이동되었다. 2 ㎖의 샘플은 마이크로원심분리기 튜브로 이동되고 10분 동안 최대 rpm으로 마이크로원심분리기에서 원심분리되었다. 1 ㎖의 상층액은 앞서 기술된 바와 같이 GC1과 LC1에 의해 세포외 대사산물이 분석되었다.

[0444] **교반 플라스크 발효액에서 ALD6의 결실은 이소부티레이트와 아세테이트 생산을 감소시켰다:** GEVO3466 및 *ald6*△ 균주 GEVO3714, GEVO3715와 GEVO3716에 대한 52시간 교반 플라스크 발효 결과는 표 24에 요약된다. *ald6*△ 균주 GEVO3714, GEVO3715와 GEVO3716은 *ALD6* 균주 GEVO3466보다 71% 적은 이소부티레이트를 생산하였다. *ald6*△ 균주 GEVO3714, GEVO3715와 GEVO3716 역시 *ALD6* 균주 GEVO3466보다 86% 적은 아세테이트를 생산하였다. *ald6*△ 균주 GEVO3714, GEVO3715와 GEVO3716에서 이소부탄올 수율은 *ALD6* 균주 GEVO3466과 별다른 차이가 없었다. *ald6*△ 균주 GEVO3714, GEVO3715와 GEVO3716에서 이소부탄올 역가는 *ALD6* 균주 GEVO3466보다 23% 높았다.

표 24

[0445] *ALD6*의 결실에 의한 감소된 이소부티레이트와 아세테이트 생산을 증명하는 교반 플라스크 발효 결과

균주	이소부탄올 역가 [g/ℓ]	이소부탄올 수율 [이론적 %]	생산된 이소부티레이트 [g/ℓ]	생산된 아세테이트 [g/ℓ]
GEVO3466 (*ALD6*)	2.6 ± 0.1	44 ± 2	0.48 ± 0.06	0.59 ± 0.04
GEVO3714, GEVO3715 및 GEVO3716 (ald6△)	3.2 ± 0.2	42 ± 2	0.14 ± 0.06	0.08 ± 0.01

[0446] GEVO3466 및 *ald2*△, *ald3*△, *ald2*△, *ald3*△, *ald4*△, *ald5*△와 *hfd1*△ 균주에 대한 72시간 교반 플라스크 발효 결과는 표 25와 표 26에서 요약된다. *ALD3*, *ALD2*와 *ALD3* 둘 모두, 또는 *ALD4*에서 결실을 갖는 균주는 야생형 *ALDH* 균주 GEVO3466과 비교하여 이소부티레이트 생산에서 감소가 없었다. *ALD2*, *ALD5* 또는 *HFD1*에서 결실을 갖는 균주는 야생형 *ALDH* 균주 GEVO3466과 비교하여 이소부티레이트 생산에서 현저한 감소가 없었다. *ALD2*와 *ALD3* 둘 모두의 결실을 갖는 균주는 야생형 *ALDH* 균주 GEVO3466보다 19% 적은 아세테이트를 생산하지만, *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5* 또는 *HFD1*의 개별 결실을 갖는 균주는 야생형 *ALD* 균주 GEVO3466과 비교하여 아세테이트 생산에서 현저한 감소가 없었다.

표 25

[0447] *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, 또는 *ALD2*와 *ALD3* 둘 모두의 결실에 의한 이소부티레이트와 아세테이트 생산에서 감소 없음을 증명하는 교반 플라스크 발효 결과.

균주	이소부탄올 역가 [g/ℓ]	이소부탄올 수율 [이론적 %]	생산된 이소부티레이트 [g/ℓ]	생산된 아세테이트 [g/ℓ]
GEVO3466 (야생형)	5.1 ± 0.1	42 ± 2	1.24 ± 0.15	0.95 ± 0.07

GEVO3590, GEVO3591 및 GEVO3592 (ald2△)	5.2 ± 0.2	45 ± 2	1.21 ± 0.06	0.85 ± 0.07
GEVO3593, GEVO3594 및 GEVO3595 (*ald3*△)	5.5 ± 0.6	45 ± 6	1.34 ± 0.16	0.91 ± 0.07
GEVO3596, GEVO3597 및 GEVO3598 (*ald2*△ *ald3*△)	6.8 ± 0.1	51 ± 1	1.41 ± 0.09	0.77 ± 0.08
GEVO3579 (*ald4*△)	5.6 ± 0.7	46 ± 6	1.34 ± 0.13	0.89 ± 0.15

표 26

[0448] *ALD5* 또는 *HFD1*의 결실에 의한 이소부티레이트와 아세테이트 생산에서 감소 없음을 증명하는 교반 플라스크 발효 결과.

균주	이소부탄올 역가 [g/ℓ]	이소부탄올 수율 [이론적 %]	생산된 이소부티레이트 [g/ℓ]	생산된 아세테이트 [g/ℓ]
GEVO3466 (야생형)	4.0 ± 0.4	44 ± 7	0.47 ± 0.04	0.75 ± 0.05
GEVO3708, GEVO3709 및 GEVO3710 (ald5△)	3.8 ± 0.8	46 ± 15	0.41 ± 0.04	0.64 ± 0.08
GEVO3720, GEVO3721 및 GEVO3722 (*hfd1*△)	4.4 ± 1.0	54 ± 14	0.40 ± 0.07	0.56 ± 0.18

[0449] **벤치탑 발효조에서 발효:** 벤치탑 발효조에서 발효는 GEVO3466 (*ALD6*)의 성과를 GEVO3714과 GEVO3715 (*ald6*△)와 비교하기 위해 수행되었다. 글루코오스 소비, 이소부탄올 생산, 이소부티레이트 생산, 그리고 그리고 OD_{600}이 발효 동안 측정되었다. 이들 발효에서, 도말 평판으로부터 정제된 균주는 1% v/v 에탄올, 100 μM $CuSO_4 \cdot 5H_20$ 및 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 80 mℓ의 YPD 배지를 포함하는 500 mℓ 차단된 플라스크로 이전되고 250 rpm으로 오비탈 교반기에서 30℃에서 32시간 동안 배양되었다. 플라스크 배양액은 0.5의 출발 OD_{600}을 위해 용기당 80 g/ℓ 글루코오스, 1% v/v 에탄올, 100 μM $CuSO_4 \cdot 5H_20$ 및 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 0.9 ℓ의 작업 부피의 YPD 배지를 갖는 개별 2 ℓ 탑 드라이브 모터 발효조 용기로 이전되었다. 발효조는 30℃와 pH 6.0에서 가동되고, 그리고 산소 전달 속도 (OTR)에 기초된 2-기 (phase) 호기성 조건하에 6N KOH와 2N H_2SO_4로 제어되었다. 초기에, 발효조는 700 rpm의 고정된 휘저음 및 5 sL/h의 공기 오버레이 (air overlay)에 의해 10 mM/h의 성장기 OTR에서 가동되었다. 배양액은 대략 9-10 OD_{600}까지 24시간 동안 성장되고, 그 직후에 24시간 내지 86.5시간의 기간 동안 휘저음을 700 rpm에서 450 rpm으로 감소시킴으로써 생산 통기 OTR = 2.0 mM/h로 전환되었다. 주기적으로, 각 발효조로부터 샘플은 OD_{600}을 측정하고, 그리고 이소부탄올과 기타 대사산물에 대한 가스 크로마토그래피 (GC1) 분석, 그리고 유기 산과 글루코오스에 대한 고성능 액체 크로마토그래피 (LC1) 분석에 대비하기 위해 이동되었다. 2 mℓ의 샘플은 마이크로원심분리기 튜브로 이동되고 10분 동안 최대 rpm으로 마이크로원심분리기에서 원심분리되었다. 1 mℓ의 상층액은 앞서 기술된 바와 같이 GC1과 LC1에 의해 분석되었다.

[0450] **벤치탑 발효조 발효에서 ALD6의 결실은 이소부티레이트와 아세테이트 생산을 감소시키고 이소부탄올 수율을 증가시켰다:** 86.5시간 벤치탑 발효조 발효 결과는 표 27에 요약된다. *ald6*△ 균주 GEVO3714와 GEVO3715는 *ALD6* 균주 GEVO3466보다 38% 적은 이소부티레이트를 생산하였다. *ald6*△ 균주 GEVO3714와 GEVO3715는 또한, *ALD6* 균주 GEVO3466보다 61% 적은 아세테이트를 생산하였다. *ald6*△ 균주 GEVO3714와 GEVO3715에서 이소부탄올 수율은 *ALD6* 균주 GEVO3466보다 25% 높았다. *ald6*△ 균주 GEVO3714와 GEVO3715에서 이소부탄올 역가 역시 *ALD6* 균주 GEVO3466보다 35% 높았다.

표 27

[0451] *ALD6*의 결실에 의한 감소된 이소부티레이트와 아세테이트 생산 및 증가된 이소부탄올 수율을 증명하는 벤치탑 발효조 발효 결과.

균주	이소부탄올 역가 [g/ℓ]	이소부탄올 수율 [이론적 %]	생산된 이소부티레이트 [g/ℓ]	생산된 아세테이트 [g/ℓ]
GEVO3466 (*ALD6*)	8.2 ± 0.1	32 ± 1	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.3
GEVO3714 및 GEVO3715 (ald6△)	11.1 ± 0.1	40 ± 0	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1

[0452] 실시예 5: 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 ALD6 활성의 결정

[0453] 하기 실시예는 이소부티르알데히드 산화 활성이 *ald6*△ 균주에서 훨씬 감소된다는 것을 예증한다.

표 28

[0454] 실시예 5에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO #	유전형	출처
GEVO3527	*MAT a his3△-1 leu2△ lys2△ ura3△*	ATCC# 201389 (BY4742)
GEVO3940	*MAT a his3△-1 leu2△ lys2△ ura3△* ***ald6*** *△::kan*^{R}	OpenBiosystems cat# YSC1054 (Yeast MATalpha collection)

[0455] *ALD6* (YPL061W) 유전자가 결실되는 효모 균주 GEVO3940 및 이의 부모 GEVO3527은 각 균주에 대해 삼중으로 3 mℓ의 YPD 배지를 14 mℓ 배양액 튜브에 접종함으로써 각각 삼중으로 배양되었다. 배양은 GEVO3527의 경우에 YPD 아가 평판 상에서, 그리고 GEVO3940의 경우에 0.2 g/ℓ G418 평판을 내포하는 YPD 아가 평판 상에서 패치(patch)로부터 시작되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 익일에, 하룻밤 배양액의 OD_{600}이 측정되고, 그리고 50 mℓ 배양액을 0.1의 OD_{600}까지 접종하기 위한 각 배양액의 부피가 계산되었다. 계산된 부피의 각 배양액은 250 mℓ 차단된 플라스크에서 50 mℓ의 YPD를 접종하는데 이용되었고, 그리고 이들 배양액은 30℃와 250 rpm에서 배양되었다. 이들 세포는 7시간의 성장후 1.6-2.1의 OD에서 중간-로그 기 (mid-log phase) 동안 수확되었다. 배양액은 미리 칭량된 50 mℓ Falcon 튜브로 이전되고, 그리고 세포가 5분 동안 3000 x g로 원심분리에 의해 수집되었다. 배지의 제거후, 세포는 10 mℓ MilliQ H_2O로 세척되었다. 물의 제거후, 세포는 5분 동안 3000 x g로 다시 한 번 원심분리되고, 그리고 남아있는 물은 1 mℓ 피펫 팁 (pipette tip)을 이용하여 조심스럽게 제거되었다. 세포 펠릿은 칭량되고, 이후 그들이 용해되고 앞서 기술된 바와 같이 이소부티르알데히드 산화 활성에 대해 조사될 때까지 -80℃에서 보관되었다.

[0456] 표 29에서 제시된 바와 같이, 10 mM 이소부티르알데히드의 산화에 대한 GEVO3527 용해물에서 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6의 비활성은 13.9 mU/mg이었다. *ALD6* 결실을 갖는 동일한 균주는 22-배 적은 0.6 mU/mg의 비활성을 가졌다. 1.0 mM 이소부티르알데히드의 산화에 대한 GEVO3527 용해물에서 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6의 비활성은 17.6 mU/mg이었다. *ALD6* 결실을 갖는 동일한 균주는 8-배 적은 2.1 mU/mg의 비활성을 가졌다. 0.1 mM 이소부티르알데히드의 산화에 대한 GEVO3527 용해물에서 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) ALD6의 비활성은 6.7 mU/mg이었다. *ALD6* 결실을 갖는 동일한 균주는 5-배 적은 1.3 mU/mg의 비활성을 가졌다. 이들 데이터는 내생성 ALD6 효소가 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 이소부탄올 경로의 이소부티레이트 부산물을 책임진다는 것을 증명한다.

표 29

다양한 이소부티르알데히드 농도를 이용한 균주 GEVO3527과 GEVO3940의 특정한 이소부티르알데히드 산화 활성. 비활성은 GEVO3527과 GEVO3940의 3가지 병렬 배양액으로부터 용해물에서 측정되었다. 생물학적 복제물 배양액에서 측정된 활성의 평균과 표준 편차가 제시된다.

균주	이소부티르알데히드로 측정된 활성 [mU/mg 총 단백질]		
	0.1 mM 이소부티르알데히드	1.0 mM 이소부티르알데히드	10 mM 이소부티르알데히드
GEVO3527	6.7 ± 0.4	17.6 ± 1.2	13.9 ± 0.4
GEVO3940	1.3 ± 0.2	2.1 ± 0.2	0.6 ± 0.1

[0457]

[0458] 실시예 6: 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 *ALD6* 유전자의 결실 및 향상된 알코올 탈수소효소의 과다발현으로 더욱 감소된 이소부티레이트 생산

[0459] 하기 실시예는 *ALD6* 결실 및 향상된 동역학적 성질을 갖는 ADH 과다발현의 합동이 이소부티레이트 생산에서 더욱 감소 및 이소부탄올 생산에서 더욱 증가를 유발한다는 것을 예증한다.

[0460] 이소부티레이트는 효모에서 이소부티르알데히드 물질대사의 부산물이고, 그리고 탄소 수율의 유의미한 분획을 포함할 수 있다. 하기 효모 균주가 작제되었다: GEVO3466은 균주 GEVO3198을 하기 효소: KARI, DHAD, KIVD 및 야생형 ADH를 인코딩하는 유전자를 보유하는 2μ 플라스미드, pGV2247 (각각, *Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$, *Ll_ilvD_coSc*, *Ll_kivD2_coEc*, 그리고 *Ll_adhA*)로 형질전환시킴으로써 작제되었다. GEVO3198은 염색체 DNA로부터 단일 사본의 알코올 탈수소효소 (락토코커스 락티스(*L. lactis*) ADH, *Ll_adhA*)를 발현한다. 생물학적 복제물이 GEVO3714와 GEVO3715로 명명되는 두 번째 균주는 2가지 독립된 균주, GEVO3711과 GEVO3712를 하기 효소: KARI, DHAD, KIVD 및 야생형 ADH를 인코딩하는 유전자를 보유하는 2μ 플라스미드 pGV2247 (각각, *Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1,}$, *Ll_ilvD_coSc*, *Ll_kivD2_coEc*, 그리고 *Ll_adhA*)로 형질전환시킴으로써 작제되었다. GEVO3711과 3712는 단일 알코올 탈수소효소 (락토코커스 락티스(*L. lactis*) ADH, *Ll_adhA*)를 발현하고 염색체 DNA로부터 *ALD6* 유전자가 결실된다. 생물학적 복제물이 GEVO3855와 GEVO3856으로 명명되는 세 번째 균주는 균주, GEVO3711을 하기 효소: KARI, DHAD, KIVD 및 돌연변이체 ADH를 인코딩하는 유전자를 보유하는 2μ 플라스미드 pGV2602 (각각, *Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1-his6,}$, *Ll_ilvD_coSc*, *Ll_kivD2_coEc*, 그리고 *Ll_adhA*^{RE1})를 형질전환시킴으로써 작제되었다.

표 30

[0461] 실시예 6에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO No.	유전형
GEVO3198	*MATa ura3 leu2 his3 trp1* *gpd1*△::T_{K1_URA3} *gpd2*△::[$T_{K1_URA3_short}$:P_{FBA1}:*K1_URA3*:T_{K1_URA3}] *pdc1*△::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivDkivD*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] *pdc5*△::[*LEU2*:*bla*:P_{TEF1}:*ILV3*△*N*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] *pdc6*△::[P_{TEF}:*Ll_ilvD*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}

GEVO3466	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1△::T* $_{K1_URA3}$ *gpd2△::[T* $_{K1_URA3_short}$ *:P*$_{FBA1}$ *:K1_URA3:T*$_{K1_URA3}$ *] pdc1△::[P*$_{CUP1}$ *:Bs_alsS_coSc:T*$_{CYC1}$ *:P*$_{PGK1}$ *:Ll_kivDkivD:P*$_{ENO2}$ *:Sp_HIS5] pdc5△::[LEU2:bla:P*$_{TEF1}$ *:ILV3△N:P*$_{TDH3}$ *:Ec_ilvC_coSc*^{Q110V} *] pdc6△::[P*$_{TEF}$ *:Ll_ilvD:P*$_{TDH3}$ *:Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$ *:P*$_{ENO2}$ *:Ll_adhA:P*$_{FBA1}$ *:Sc_TRP1]* pGV2247로 형질전환됨 {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEVO3711, GEVO3712	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1△::T* $_{K1_URA3}$ *gpd2△::[T* $_{K1_URA3_short}$ *:P*$_{FBA1}$ *:K1_URA3:T*$_{K1_URA3}$ *] pdc1△::[P*$_{CUP1}$ *:Bs_alsS_coSc:T*$_{CYC1}$ *:P*$_{PGK1}$ *:Ll_kivD:P*$_{ENO2}$ *:Sp_HIS5] pdc5△::[LEU2:bla:P*$_{TEF1}$ *:ILV3△N:P*$_{TDH3}$ *:Ec_ilvC_coSc*^{Q110V} *] pdc6△::[P*$_{TEF}$ *:Ll_ilvD:P*$_{TDH3}$ *:Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$ *:P*$_{ENO2}$ *:Ll_adhA:P*$_{FBA1}$ *:Sc_TRP1] ald6△::P*$_{CCW12}$ *: hph* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEVO3714, GEVO3715	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1△::T* $_{K1_URA3}$ *gpd2△::[T* $_{K1_URA3_short}$ *:P*$_{FBA1}$ *:K1_URA3:T*$_{K1_URA3}$ *] pdc1△::[P*$_{CUP1}$ *:Bs_alsS_coSc:T*$_{CYC1}$ *:P*$_{PGK1}$ *:Ll_kivD:P*$_{ENO2}$ *:Sp_HIS5] pdc5△::[LEU2:bla:P*$_{TEF1}$ *:ILV3△N:P*$_{TDH3}$ *:Ec_ilvC_coSc*^{Q110V} *] pdc6△::[P*$_{TEF}$ *:Ll_ilvD:P*$_{TDH3}$ *:Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$ *:P*$_{ENO2}$ *:Ll_adhA:P*$_{FBA1}$ *:Sc_TRP1] ald6△::P*$_{CCW12}$ *: hph* pGV2247로 형질전환됨 {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEVO3855, GEVO3856	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1△::T* $_{K1_URA3}$ *gpd2△::[T* $_{K1_URA3_short}$ *:P*$_{FBA1}$ *:K1_URA3:T*$_{K1_URA3}$ *] pdc1△::[P*$_{CUP1}$ *:Bs_alsS_coSc:T*$_{CYC1}$ *:P*$_{PGK1}$ *:Ll_kivD:P*$_{ENO2}$ *:Sp_HIS5] pdc5△::[LEU2:bla:P*$_{TEF1}$ *:ILV3△N:P*$_{TDH3}$ *:Ec_ilvC_coSc*^{Q110V} *] pdc6△::[P*$_{TEF}$ *:Ll_ilvD:P*$_{TDH3}$ *:Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$ *:P*$_{ENO2}$ *:Ll_adhA:P*$_{FBA1}$ *:Sc_TRP1] ald6△::P*$_{CCW12}$ *: hph* pGV2602로 형질전환됨 {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}

표 31

[0462] 실시예 6에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	유전형
pGV2247	*P*$_{TEF1}$ *:Ll_ilvD_coSc, P*$_{TDH3}$ *:Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$ *, P*$_{PGK1}$ *:Ll_kivD2_coEc, P*$_{ENO2}$ *: Ll_adhA. 2μ-ori,* pUC-ori, *bla, G418R.*
pGV2602	*P*$_{TEF1}$ *:Ll_ilvD_coSc, P*$_{TDH3}$ *:Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1-his6}$ *, P*$_{PGK1}$ *:Ll_kivD2_coEc, P*$_{ENO2}$ *: Ll_adhA*^{RE1} *. 2μ-ori,* pUC-ori, *bla, G418R.*

[0463] 2가지 상이한 세트의 발효가 수행되었다. 발효 세트 A는 GEVO3466 (*Ll_adhA*)의 성과를 GEVO3714-GEVO3715 (*Ll-adhA*, ald6△)와 비교하기 위해 수행되었다. 발효 세트 B는 GEVO3714 (*Ll_adhA*, *ald6*△)의 성과를 GEVO3855-GEVO3856 (*Ll_adhA*^{RE1}, *ald6*△)과 각각 비교하기 위해 수행되었다. 글루코오스 소비, 이소부탄올 생산, 이소부티레이트 생산, 그리고 OD_{600}이 발효 동안 측정되었다. 이들 발효에서, YPD 아가 평판 상에서 성장된 단일 격리된 세포 집락이 1% v/v 에탄올, 100 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 및 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 80 mℓ의 YPD 배지를 포함하는 500 mℓ 차단된 플라스크로 이전되고 250 rpm으로 오비탈 교반기에서 30℃에서 32시간 동안 배양되었다. 플라스크 배양액은 0.5의 출발 OD_{600}을 위해 용기당 80 g/ℓ 글루코오스, 1% v/v 에탄올, 100 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 및 0.2

g/ℓ G418을 내포하는 0.9 ℓ의 작업 부피의 YPD 배지를 갖는 개별 2 ℓ 탑 드라이브 모터 발효조 용기로 이전되었다. 발효조는 30℃와 pH 6.0에서 가동되고, 그리고 산소 전달 속도 (OTR)에 기초된 2-기 (phase) 호기성 조건하에 6N KOH로 제어되었다. 초기에, 발효조는 양쪽 실험에서 700 rpm의 고정된 휘저음 및 5 sL/h의 공기 오버레이 (air overlay)에 의해 10 mM/h의 성장기 OTR에서 가동되었다. 배양액은 대략 9-10 OD_{600}까지 24시간 동안 성장되고, 그 직후에 48.5시간 동안 생산 통기 조건으로 전환되었다. 첫 번째 실험에서, 2.5 - 3.0 mM/h의 OTR은 휘저음을 700 rpm에서 425 rpm으로 감소시킴으로써 지속되고, 반면 두 번째 실험에서, 2.0 - 2.5 mM/h의 OTR은 휘저음을 700 rpm에서 400 rpm으로 감소시킴으로써 지속되었다. 주기적으로, 각 발효조로부터 샘플은 OD_{600}을 측정하고, 그리고 가스 크로마토그래피 (GC1) 분석 및 액체 크로마토그래피 (LC1) 분석에 대비하기 위해 이동되었다. GC1과 LC1을 위해, 2 mℓ의 샘플이 에펜도르프 튜브로 이동되고 10분 동안 최대 rpm으로 마이크로원심분리기에서 원심분리되었다. 1 mℓ의 상층액은 GC1 (이소부탄올, 기타 대사산물)에 의해 분석되고, 그리고 1 mℓ는 고성능 액체 크로마토그래피 (LC1)에 의해 유기 산과 글루코오스에 대해 분석되었다.

[0464] 2가지 별개의 발효 세트 A와 B로부터 72.5시간 데이터는 표 32와 33에 요약된다. 발효 세트 A는 GEVO3466 (WT ADH)을 GEVO3714와 3715 (WT ADH, ald6△)와 비교하고, 반면 발효 세트 B는 GEVO3714 (WT ADH, *ald6*△)를 GEVO3855와 3856 (*LI_adhA*^{RE1}, *ald6*△)과 비교하였다.

[0465] 발효 세트 A를 지시하는 데이터 (표 32)는 *ALD6* 유전자 결실을 갖는 *LI_adhA*를 보유하는 균주에서 이소부탄올 역가와 이론적 수율이 *ALD6* 유전자 결실을 갖지 않는 *LI_adhA*를 보유하는 균주와 비교하여, 각각 1.4-배와 1.3-배 높다는 것을 증명한다. *ALD6* 유전자 결실을 갖지 않는 *LI_adhA*를 보유하는 균주 (GEVO3466)는 0.040 g/g의 이소부티레이트 수율 (생산된 이소부티레이트 그램/소비된 글루코오스 그램)을 갖는 반면, *ALD6* 유전자 결실을 갖는 *LI_adhA*를 보유하는 균주 (GEVO3714, GEVO3715)는 0.017 g/g의 더욱 낮은 이소부티레이트 수율을 가졌다. *ALD6* 유전자 결실을 갖지 않는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) *adhA*를 보유하는 균주는 2.3 g/ℓ 아세테이트를 생산하는 반면, *ALD6* 유전자 결실을 갖는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) *adhA*를 보유하는 균주는 0.6 g/ℓ 아세테이트를 생산하였다.

표 32

[0466] 발효 세트 A로부터 데이터.

균주	OD_{600}	생산된 이소부탄올 [g/ℓ]	생산된 이소부티레이트 [g/ℓ]	이소부탄올 수율 [이론적 %]	이소부티레이트 수율 [g/g]	생산된 아세테이트 [g/ℓ]
GEVO3466 (WT ADH)	9.7 ± 0.1	7.4 ± 0.6	1.7 ± 0.0	48.1 ± 2.6	0.040 ± 0.004	2.3 ± 0.1
GEVO3714, GEVO3715 (WT ADH, ALD6△)	10.0 ± 0.7	10.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1	55.3 ± 0.6	0.017 ± 0.003	6.1 ± 0.1

[0467] 발효 세트 B를 지시하는 데이터 (표 33)은 *ALD6* 유전자 결실을 갖는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) *adhA*^{RE1}을 보유하는 균주에서 이소부탄올 역가와 이론적 수율이 *ALD6* 유전자 결실을 갖는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) *adhA*를 보유하는 균주와 비교하여 각각, 1.2배와 1.1-배 높다는 것을 증명한다. *ALD6* 유전자 결실을 갖는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) *adhA*^{RE1}을 보유하는 균주 (GEVO3855, GEVO3856)는 0.014 g/g의 더욱 높은 이소부티레이트 수율 및 0.0 g/ℓ의 유사한 아세테이트 역가를 갖는 *ALD6* 유전자 결실을 갖는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) *adhA*를 보유하는 균주 (GEVO3714)와 비교하여, 가장 낮은 이소부티레이트 수율 (생산된 이소부티레이트 그램/소비된 글루코오스 그램), 0.005 g/g을 갖고, 그리고 0.0 g/ℓ 아세테이트를 생산하였다 (표 33)

표 33

[0468] 발효 세트 B로부터 데이터.

균주	OD_{600}	생산된 이소부탄올 [g/ℓ]	생산된 이소부티레이트 [g/ℓ]	이소부탄올 수율 [이론적 %]	이소부티레이트 수율 [g/g]	생산된 아세테이트 [g/ℓ]

GEV03714, (WT ADH, *ALD6*△)	9.7 ± 0.2	10.3 ± 0.1	0.8 ± 0.0	46.5 ± 1.6	0.014 ± 0.000	0.0 ± 0.0
GEV03855, GEV03856 (*Ll_adhA*^{RE1}, *ALD6*△)	9.9 ± 0.3	12.0 ± 0.0	0.3 ± 0.0	51.5 ± 0.8	0.005 ± 0.000	0.0 ± 0.0

[0469] 실시예 7: 이소부탄올 발효의 부산물로서 DH2MB의 확인

[0470] 이소부탄올-생산 효모 균주의 발효 동안, 방법 LC1에서 2,3-디히드록시 이소발레레이트 (DHIV)와 공동-용리하고, 그리고 이러한 기초에서 정량된 미지의 피크는 이용된 탄소 중에서 실질적인 부분에 대한 싱크(sink)로서 기능하는 것으로 밝혀졌다.

[0471] 초기에, 이러한 피크는 오로지 2,3-디히드록시이소발레레이트 (DHIV)인 것으로 생각되었지만, 차후 연구는 KARI 산물 저해가 이들 수준의 DHIV에서 발생하고, 따라서 이런 농도를 불가능하게 만든다는 것을 지시하였다. 추가의 실험은 이러한 만회된 피크가 효소 검사법에서 DHAD와 반응하지 않고, 따라서 유의미한 양의 DHIV가 존재할 가능성이 배제된다는 것을 증명하였다.

[0472] 고성능 액체 크로마토그래피 LC1: 2개의 Rezex RFQ-Fast Fruit H+ (8%)150 x 4.6 mm 칼럼 (Phenomenex)이 일련으로 구비된 Agilent-1200 고성능 액체 크로마토그래피 시스템 상에서 유기 산 대사산물의 분석이 수행되었다. 유기 산 대사산물은 Agilent-1100 UV 검출기 (210 nm) 및 굴절률 (RI) 검출기를 이용하여 검출되었다. 칼럼 온도는 60℃이었다. 이러한 방법은 이동상으로서 0.0128 N H_2SO_4 (Milli-Q 물에서 25% 0.0512 N H_2SO_4)와 등용매성이었다. 유속은 1.1 ㎖/min으로 설정되었다. 주입 부피는 20 ㎕이고 작업 시간은 16분이었다.

[0473] 고성능 액체 크로마토그래피 LC3: 최대 10 mM 알데히드, 케톤과 케토산 중간물질 (합동된)을 내포하는 샘플의 경우에, DNPH 시약이 각 샘플에 1:1 비율로 첨가되었다. 100 ㎕ DNPH 시약 (12 mM 2,4 - 디니트로페닐 히드라진 20 mM 구연산 pH 3.0 80% 아세토니트릴 20% MilliQ H_2O)이 100 ㎕의 각 샘플에 첨가되었다. 샘플은 유전자증폭기 (Eppendorf, Mastercycler)에서 70℃에서 30분 동안 배양되었다. 아세토인, 디아세틸, 케토이소발레레이트 및 이소부티르알데히드의 분석은 Eclipse XDB C-18 150 x 4 mm; 5 μm 입자 크기 역상 칼럼 (Agilent) 및 C-18 역상 가드 칼럼 (Phenomenex)이 구비된 Agilent-1200 고성능 액체 크로마토그래피 시스템에서 수행되었다. 모든 분석물은 Agilent-1100 UV 검출기 (360 nm)를 이용하여 검출되었다. 칼럼 온도는 50℃이었다. 이러한 방법은 이동상으로서 60% 아세토니트릴 2.5% 인산 (0.4%), 37.5% 물과 등용매성이었다. 유속은 2 ㎖/min으로 설정되었다. 주입 크기는 10 ㎕이고 작업 시간은 10분이었다.

[0474] 고성능 액체 크로마토그래피 LC4: IonPac AS11-HC Analytical, IonPac AG11-HC 가드 칼럼 (IonPac ATC 칼럼, Dionex의 경우에 3-4 mm) 또는 등가물 및 IonPac ATC-1 음이온 트랩 칼럼 또는 등가물이 구비된 Agilent-1100 고성능 액체 크로마토그래피 시스템에서 옥소산의 분석이 수행되었다. 옥소산은 전도도 검출기 (ED50-억제 전도도, 억제자 유형: AutoSuppression 리사이클 양식에서 ASRS 4 mm, 억제자 전류: 300 mA)를 이용하여 검출되었다. 칼럼 온도는 35℃이었다. 이러한 방법은 하기 용출 프로필을 이용하였다: 0.25 mM에서 3분 동안 유지; 25분 시점에 5 mM로 선형 구배 (linear gradient); 25.1분 시점에 38.5 mM로 선형 구배, 38.5 mM에서 4.9분 동안 유지; 30.1분 시점에 0.25 mM로 선형 구배; 7분 동안 평형으로 유지. 유속은 2 ㎖/min로 설정되었다. 주입 크기는 5 ㎕이고 작업 시간은 37.1분이었다.

[0475] GC-MS: 단일 쿼드 (quad) 320MS가 구비된 Varian 3800CP GC 시스템; DB-5ms 칼럼; 250℃에서 1079 주입 포트; 100 분할비 (split ration)에서 일정한 유속 1.0㎖/min; 오븐 프로필: 최초 온도, 40℃, 5분 동안 유지, 235℃까지 20℃/min의 램프 (ramp)와 2분 동안 유지; 0.5 ㎕의 샘플을 전달하는 combiPAL 오토샘플러; 35 내지 100의 수집된 덩어리. BSTFA 도출: (1) 샘플을 GC 바이알에서 질소 하에 증발 건조시킨다; (2) 0.5 ㎖의 아세토니트릴과 0.5 ㎖의 BSTFA 시약을 첨가한다; (3) 50℃에서 30분 동안 항온처리한다; (4) GC-MS 상에 주입한다.

[0476] LC-MS: LC1 피크 분획의 LC-MS 분석을 위해, 샘플은 복수 파장 검출기 및 LC/MSD 트랩 질량 분석계 (이온 트랩)가 구비된 Agilent 1100 Series 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템 내로 주입되었다. 이들 분리는 샘플 내에 성분의 확인을 제공하기 위해, 질량 분석 (mass spectrometry)에 의해 모니터링되었다. 질량 분석계는 샘플 주입을 위한 대기압 화학적 이온화 (APCI) 양식으로 가동되었다. 이들 분석은 양성과 음성 APCI 양식을 이용하여 수행되었다. "미지의 것"의 검출은 음성 이온화 양식에서만 관찰되었다. 분석은 샘플 분석물에 관한 단편화 데이터를 획득하기 위해 MSn을 이용하여 수행되었다. 분리는 5 ㎛ 입자를 갖는 4.6 x 150 mm Agilent

Zorbax SB C-18 칼럼을 이용하여 달성되었다. 샘플은 90% HPLC 물과 10% 메탄올의 용리액 (eluent)을 이용하는 등용매성 방법을 이용하여 이동되었다. 10 ㎕ 주입이 샘플 용액의 분석에 이용되었다. 샘플은 또한, 크로마토그래피 칼럼을 우회함으로써 분석되었다.

[0477] DHIV와 이의 이성질체, DH2MB는 LC1에서 동일한 체류 시간에서 용리한다. 이들 화합물에 관련된 피크는 발효 샘플 내에 다른 화합물로부터 분리된다. 피크는 HPLC로부터 수집되고 추가 분석에 이용되었다. DHIV (및 DH2MB)에 대한 LC1에서 관찰된 RI 검출기 신호 대(對) UV 검출기 신호의 신호 비율은 통상의 유기 산 (가령, 락테이트, 아세테이트 등)에 특징적이다; 접합된 산 (가령, 피루베이트)은 극히 상이한 RI/UV 신호 비율을 갖는다. 만회된 "피크 DHIV"는 비-접합된 산에 특징적이었다:

[0478] 비율 (RI/UV): 만회된 DHIV/DH2MB 피크 (130); DHIV Std (150); 피루베이트 (14).

[0479] "미스터리 피크"에서 카르보닐 모이어티의 결여는 LC1로부터 만회된 피크 분획 및 DNPH 사이에 반응의 완전한 결여에 의해 확증되었다: LC3 크로마토그래피 시스템에서 부가 피크 없음이 분명하였다.

[0480] LC1로부터 만회된 피크 분획은 이후, 알칼리성 조건 하에 작업되는 방법 LC4에 의해 분석되고, 그리고 DHIV와 아세토락테이트를 분리할 수 있다. 이의 결과는 표준 혼합물의 오버레이와 함께, 도 9에서 도시된다. 이것은 DH2MB (이것이 차후에 확인되기 때문에), 그리고 DHIV 사이에 분리를 분명하게 증명한다. 일부 피루베이트 역시 DH2MB 피크의 컬렉션에 들어갔다.

[0481] NMR 분석: 방법 LC1로부터 만회된 샘플 피크는 중화되고 냉동 건조되고 NMR 분석을 위해 발송되었다. 1H-COSY NMR (도 10) 및 양성자 NMR 스펙트럼 (도 11)에 의한 2-D 연결도 분석은 우수한 결과를 산출하였다.

[0482] DHIV와 함께 용리하는 "미스터리 피크"의 2-D 분석 (도 10): 다운필드 전위된 하나의 메틸 기는 임의의 인접하는 양성자에 의해 분할되지 않고, 여기서 0.95 ppm에서 메틸 기는 히드록실에 인접하는 하나의 양성자에 의해 이중항으로 분할된다. 양성자는 차례로, 인접하는 메틸 기에 의해 사중항으로 분할된다. 3.1과 3.7 ppm 사이에 복잡한 패턴은 "DHIV"의 피크 컬렉션 동안 운반된 글루코오스의 상이한 아노머 (anomer)를 지시한다.

[0483] NMR 피크의 지정은 하기 스펙트럼 (도 11)에서 도시되고, "미스터리 피크"의 실체가 2,3-디히드록시-2-부티레이트 (DH2MB)라는 것을 분명하게 지시한다.

[0484] 1H NMR과 COSY 스펙트럼은 디히드록시이소발레르산의 구조적 이성질체인 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산의 존재를 뒷받침한다. 이들 스펙트럼에서 다른 신호는 아노머 단백질, 따라서 당 성분의 존재를 뒷받침한다. 게다가, 3.1-3.8 ppm 사이에 신호의 복잡한 집단화 (grouping)는 종종, 올리고사카라이드에서 관찰된다. 13C NMR 스펙트럼은 매우 약하고, 그리고 기준선 (base line)에 미치지 못하는 45 ppm에서 신호에 기초된 첨부된 양성자 검사 (Attached Proton Test, APT) 실험인 것으로 보인다.

[0485] LC-MS 역시 LC1 피크 분획에서 수행되었다. LC-MS는 상기 화합물이 134의 질량 (DHIV와 DH2MB 둘 모두)을 갖는다는 것을 증명하는데 충분하였다 (도 12).

[0486] 이러한 분석은 미지의 부산물을 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 (CAS # 14868-24-7)으로 최종적으로 확인하였다. 상기 화합물은 4가지 상이한 입체이성질체 형태 (stereoisomeric form)로 존재한다. 2,3-디히드록시-2-메틸부탄산은 일단의 시스 (cis)와 트랜스 (trans) 부분입체이성질체 (diastereomer)로서 존재하고, 이들 각각은 일단의 거울상이성질체 (enantiomer)로서 존재한다. 이들 4가지 화합물은 도 13에 도시된다.

[0487] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, DH2MB는 (2S)-2-히드록시-2-메틸-3-옥소부티레이트 (아세토락테이트)로부터 유래된다. 이러한 반응의 산물은 (2S,3R)-2,3-디히드록시-2-메틸부탄산, (2S,3S)-2,3-디히드록시-2-메틸부탄산 또는 이들 두 부분입체이성질체의 혼합물일 수 있는데, 이것은 이러한 전환을 촉진하는 내생성 효소(들)의 입체선택성 (stereoselectivity)에 좌우된다.

[0488] 실시예 8: DH2MB의 생산과 정제

[0489] 본 실시예의 목적은 DH2MB가 어떻게 생산되고 정제되는 지를 예시하는 것이다.

[0490] 플라스미드 pGV2247 (*Ec_ilvC*_P2D1-A1, *Ll_ilvD*, *Ll_kivD2*, 그리고 *Ll_adhA*의 발현을 위한 2-마이크론, G418 내성 플라스미드)을 발현하는, ALS 활성을 포함하는 조작된 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2 균주 (GEVO3160, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2: *MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△*::*P_{CCW12}*: Hph gpd2*△*::*$T_{Kl_URA3-short}$*:* P_{FBA1}*: Kl_URA3:* T_{Kl_URA3} *pdc1*△*::*P_{CUP1}*: Bs_alsS_coSc:* T_{CYC1}*:* P_{PGK1}*: Ll_kivD:*

P_{ENO2_Sp}*_HIS5 pdc5△::LEU2: bla: P_{TEF1}: ILV3△N: P_{TDH3}: ilvC_coSc_Q110V pdc6△::P_{TEF1}: L1_ilvD_P_{TDH3}: Ec_ilvC_coSc_P2D1-A1: P_{ENO2}: L1_adhA: P_{FBA1}: Sc_TRP1* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨})는 30℃, pH6.0, 그리고 대략 10 mmol/h의 OTR에서 1L 배양 배지 배지 (10 g/ℓ 효모 추출물, 20 g/ℓ 펩톤, 80 g/ℓ 글루코오스, 1% v/v 에탄올, 100 μM $CuSO_4 \cdot 5H_20$, 0.2 g/ℓ G418)로 채워진 2 ℓ 탑 드라이브 모터 DasGip 용기를 이용한 배치 발효 (batch fermentation)에서 대략 10 g/ℓ DH2MB를 생산하는데 이용되었다.

[0491] 세포-없는 발효액은 농축된 H_2SO_4를 이용하여 pH 2로 산성화되었다. 산성화된 배양액은 Buchi Rotovapor R-215를 이용하여 감압 (0-100 mbar) 하에 350 mℓ로 농축되었다. 배양액을 내포하는 플라스크는 증발 동안 물 전해조에서 20-30℃로 가열되었다. 70 mℓ 부피의 MeOH가 농축된 배양액에 첨가되고, 그리고 혼합물은 500 mℓ 액체-액체 추출기 (Sigma-Aldrich cat. # Z562432)로 이전되고, 상기 추출기는 에틸 아세테이트 (EtOAc)로 연속 추출을 위해 제조업체의 명세에 따라 설치되었다. 연속 추출은 3일 동안, EtOAc 추출물을 매일 새로운 EtOAc로 교체하면서 수행되었다.

[0492] 추출후, EtOAc 내에서 DH2MB 추출물의 첫 2개의 배치 (batch)는 합동되고 무수성 $MgSO_4$로 건조되고, 그 이후에 여과되었다. 건성 추출물은 진공 하에 500 mℓ까지 농축되고 실온에서 교반에 의해 30분 동안 3 g의 활성화된 목탄 (Fluka cat# 05105)으로 처리되었다. 탈색된 용액은 여과되고 진공 (Buchi Rotovapor R-215를 이용하여 0-100 mbar) 하에 대략 50 mℓ로 농축되었다. 용액은 4℃에서 2일 동안 배양되었다. 획득된 결정은 여과되고 얼음같이 차가운 디에틸에테르와 아세톤으로 세척되었다. 결정은 감압 (0.05 mbar) 하에 하루 동안 냉동 건조기를 이용하여 건조되었다.

[0493] 단리된 DH2MB는 1H (도 14)와 13C (도 15) NMR에 의해 분석되었다. 1H NMR (TSP) 1.1 (d, 6.5 Hz, 3H), 1.3 (s, 3H), 3.9 (q, 6.5 Hz, 3H). 13C 스펙트럼은 샘플 내에 존재하는 5가지 상이한 탄소 원자를 지시하였다. 181 ppm에서 공명은 샘플 내에 존재하는 카르복실산 탄소를 지시하였다. 결론적으로, NMR 스펙트럼에 기초하여 단리된 DH2MB의 99% 순도를 추정할 수 있었다.

[0494] 실시예 9: 발효 동안 이소부탄올 수율에 대한 DH2MB 생산의 영향

[0495] 본 실시예의 목적은 DH2MB가 ALS와 TMA29 활성을 포함하는 효모 균주에서 실질적인 수준으로 축적된다는 것을 증명하는 것이다.

[0496] 본 실시예에서 개시된 균주와 플라스미드는 각각, 표 34와 35에서 제시된다.

표 34

[0497] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO3160의 유전형.

균주	유전형
GEVO3160	MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1△::[P_{CCW12}: *hph*] *gpd2*△::[$T_{K1_URA3_short}$: P_{FBA1}: *K1_URA3*:T_{K1_URA3}] *pdc1*△:: [P_{CUP1}: *Bs_alsS_coSc*: T_{CYC1}: P_{PGK1}: *L1_kivD*: P_{ENO2}: *Sp_HIS5*] *pdc5*△::[*LEU2*: *bla*: P_{TEF}: -*ILV3*△*N*: P_{TDH3}: *Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] *pdc6*△:: [P_{TEF1}: *L1_ilvD*_P_{TDH3}: *Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$: P_{ENO2}: *L1_adhA*: P_{FBA1}: *Sc_TRP1*]{C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨} pGV2247

표 35

[0498] 플라스미드 pGV2247의 유전형.

플라스미드	유전형
pGV2247	P_{Sc_TEF1} : *L1_ilvD_coSc*, P_{Sc_TDH3}: *Ec_ilvC_coSc*^{P2D1A1}, P_{Sc_TPI1}: *G418R*, P_{Sc_PGK1}: *L1_kivD_coEc*, P_{Sc_ENO2}: *L1_adhA*, 2μ, AP^r, PMB1

[0499] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO3160은 앞서 기술된 바와 같이 pGV2247로 형질전환되었다.

형질전환된 균주를 특징짓기 위해 발효가 수행되었다. 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD 아가 평판 상에서 성장된 단일 격리된 세포 집락이 80 g/ℓ 글루코오스, 1% v/v 에탄올, 100 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 그리고 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 5 mℓ의 YPD 배지를 포함하는 500 mℓ 차단된 플라스크로 이전되고 30℃와 250 rpm에서 24시간 동안 배양되었다. 그 다음, 상기 배양액은 80 mℓ의 동일한 배지를 내포하는 500 mℓ 차단된 플라스크로 이전되고 250 rpm으로 오비탈 교반기에서 30℃에서 24시간 동안 배양되었다. 플라스크 배양액은 0.5의 출발 OD_{600}을 위해 0.9 ℓ의 작업 부피의 동일한 배지를 갖는 2 ℓ 탑 드라이브 모터 발효조 용기로 이전되었다. 발효조는 30℃와 pH 6.0에서 가동되고, 그리고 산소 전달 속도 (OTR)에 기초된 2-기 (phase) 호기성 조건하에 6N KOH로 제어되었다. 초기에, 발효조는 양쪽 실험에서 700 rpm의 고정된 휘저음 및 5 sL/h의 공기 오버레이 (air overlay)에 의해 10 mM/h의 성장기 OTR에서 가동되었다. 배양액은 대략 8의 OD_{600}까지 대략 20시간 동안 성장되고, 그 직후에 생산 통기 조건으로 전환되었다. 1 mM/h의 OTR은 휘저음을 700 rpm에서 350 rpm으로 감소시킴으로써 지속되었다. 접종후 93시간 시점에, 각 균주로부터 하나의 복제물 용기는 휘저음을 350 rpm에서 180 rpm으로 감소시킴으로써 OTR = 0.3 mM/h로 더욱 감소되었다. 주기적으로, 각 발효조로부터 샘플은 OD_{600}을 측정하고, 그리고 가스 크로마토그래피 (GC1) 분석 및 액체 크로마토그래피 (LC1) 분석에 대비하기 위해 이동되었다. GC1과 LC1을 위해, 2 mℓ의 샘플이 에펜도르프 튜브로 이동되고 10분 동안 최대 rpm으로 마이크로원심분리기에서 원심분리되었다. 1 mℓ의 상층액은 GC1 (이소부탄올, 기타 대사산물)에 의해 분석되고, 그리고 1 mℓ는 고성능 액체 크로마토그래피 (LC1)에 의해 유기 산과 글루코오스에 대해 분석되었다.

[0500] 도 16에서는 pGV2247로 형질전환된 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) GEVO3160의 산물과 부산물 프로필을 도시한다. 이들 프로필은 이소부탄올 생산 Pdc-마이너스, Gpd-마이너스 효모 균주를 표시한다. Pdc-마이너스/Gpd-마이너스 효모 생산 균주는 공동 소유된 동시-계속 출원, US 2009/0226991과 US 2011/0020889에서 기술되는데, 이들 모두 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다. 도 16에서는 이소부탄올 (13.9 g/ℓ) 및 "DHIV"로서 정량되고 DH2MB (8.4 g/ℓ)로서 확인된 미지의 화합물이 미세호기성 생산 OTR 동안 생산된 일차 산물이라는 것을 보여준다. DHIV의 반응률 (response factor)을 이용한 정량이 DH2MB의 정확한 정량을 유발한다고 가정하면, 소비된 탄소 중에서 대략 12-13%는 DH2MB의 생산으로 전환된다. DH2MB로 전환되는 아세토락테이트가 그 대신에 이소부탄올로 전환되면, 도 16에서 도시된 발효의 전체 기간 동안 이소부탄올 수율이 훨씬 높을 것이다.

[0501] 실시예 10: ALS 발현은 DH2MB 생산에 필수적이다

[0502] 본 실시예의 목적은 외생성으로 발현된 ALS 활성이 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 DH2MB 축적에 필수적이라는 것을 증명하는 것이다.

[0503] 본 실험은 ALS가 DH2MB의 생산에 필수적인 지를 결정하기 위해 실행되었다. 본 실험에 이용된 균주는 GEVO1187 (사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2; MAT*a ura3-52 leu2-3_112 his3△1 trp1-289* ADE2) 및 GEVO2280 (사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2; MAT*a ura3 leu2 his3 trp1 ADE2 pdc1 △::*P_{CUP1}*:Bs_alsS2:TRP1*)이었다. 발효에 앞서, 양쪽 균주는 앞서 기술된 바와 같이 2 마이크론 플라스미드 pGV2082 (P_{TDH3}*:Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}, P_{TEF1}*:Ll_ilvD_coSc*, P_{PGK1}*:Ll_kivD_coEc*, *and* P_{ENO2}*:Dm_ADH*, *2μ ori*, *bla*, *G418R*)로 형질전환되었다.

[0504] ALS 활성을 측정하기 위해, GEVO1187과 GEVO2280으로부터 효모 세포 추출물이 준비되었다. 세포는 대략 1의 OD_{600}까지 성장되고, 1 mM $CuSO_4$로 2시간 동안 유도되고, 이후 수확되었다. 검사를 위한 세포를 준비하기 위해, 50 mℓ의 세포가 2700 x g로 원심분리에 의해 수집되었다. 배지의 제거후, 세포는 무균 dH_2O에서 재현탁되고, 2700 X g로 원심분리되고, 그리고 남아있는 배지가 1 mℓ 피펫 팁 (pipette tip)을 이용하여 조심스럽게 제거되었다. 세포 펠릿은 칭량되고 (빈 튜브가 미리 칭량되었다), 이후 이용될 때까지 -80℃에서 동결되었다. 세포 용해물은 아래에 기술된 바와 같이 하기 SOP를 이용하여 준비되었다. 세포는 얼음 위에서 해동되고, 그리고 결과물이 질량으로 20% 세포 현탁액이 되도록 용해 완충액 (250 mM KPO_4 pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$ 및 1 mM DTT)에서 재현탁되었다. 1000 μℓ 부피의 유리 비드 (glass bead) (0.5 mm 직경)가 1.5 mℓ 에펜도르프 튜브에 첨가되고 875 μℓ의 세포 현탁액이 첨가되었다. 효모 세포는 각각 전속에서 6 X 1분 혼합 및 그 사이에 1분 결빙 단계에 의해, Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA)을 이용하여 용해되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 23,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액이 이동되었다. 추출물은 검사 때까지 얼음 위에 유지되었다. 용해물 단백질 농도는 앞서 기술된 바와 같이, BioRad Bradford 단백질 검사 시약 키트 (Cat# 500-0006, BioRad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하고, 그리고 표준 곡선의 경우에 BSA를 이용하여 측정되었

다. 간단히 말하면, 모든 ALS 검사는 기질과 함께 및 기질 없이, 각 용해물에 대해 삼중으로 수행되었다. 각 용해물을 검사하기 위해, 용해 완충액으로 1:2 희석된 100 ㎕의 용해물은 900 ㎕의 완충액 (50 mM 인산칼륨 완충액 pH 6.0, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM 티아민-피로포스페이트, 110 mM 피루베이트)과 혼합되고, 그리고 30℃에서 15분 동안 배양되었다. 완충액은 실온에서 제조되었다. 기질 없음 대조 (피루베이트가 없는 완충액) 및 용해물 없음 대조 (용해물 대신에 용해 완충액) 역시 포함되었다. 배양후, 각 반응물로부터 175 ㎕가 25 ㎕의 35% H_2SO_4와 혼합되고 37℃에서 1시간 동안 배양되었다. 샘플은 LC1에 의해 분석되었다. 이러한 방법을 이용하여, 야생형 균주 GEVO1187은 검출가능한 ALS 활성을 갖지 않는 반면, ALS-발현 균주 GEVO2280은 0.65 단위/mg 용해물 ALS 활성을 갖는 것으로 결정되었다.

[0505] 이들 두 균주 (이종기원성 *ALS* 통합된 발현 구조체와 함께 또는 이러한 구조체 없이)의 성과는 하기 교반 플라스크 발효 조건을 이용하여 비교되었다. 균주는 0.2 mg/㎖ G418을 내포하는 YPD 평판 상에 패칭 (patching)되었다. 하룻밤 성장후, 세포는 무균 이쑤시개로 평판으로부터 이동되고 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 4 ㎖의 YPD에서 재현탁되었다. 각 배양액에 대한 OD_{600}이 측정되었다. 0.1의 최종 OD_{600}이 획득되도록, 세포가 50 g/ℓ 덱스트로스와 0.2 mg/㎖ G418을 내포하는 50 ㎖ YP에 첨가되었다. ALS 발현을 주동하는 *CUP1* 프로모터를 유도하기 위해, 1mM 황산구리가 24시간 시점에서 첨가되었다. 이용되지 않는 배지는 GC와 LC를 위한 배지 블랭크 (medium blank)로서 기능하고, 그리고 발효의 경우에 t=0 샘플로서 기능하기 위해 4℃에서 보관되었다. t=24, 48과 72시간 시점에서 샘플이 GC1에 의한 분석을 위해 준비되고, 그리고 72시간 시점에서 샘플이 LC1에 의해 추가적으로 분석되었다. 24와 48시간 시점에서, 각 배양액의 상층액의 1:10 희석액이 YSI에 의해 분석되었다. 필요한 경우에, 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 50% 글루코오스가 100 g/ℓ 글루코오스의 최종 농도로 첨가되었다. 발효는 250 RPM으로 교반하면서 30℃에서 수행되었다.

[0506] 72시간의 교반 플라스크 발효에서 도달된 DH2MB 역가는 ALS가 없는 WT 균주 (BUD1187) 및 *PDC1*에서 P_{CUP1}:*Bs_alsS2*를 발현하는 균주 (BUD2280) 둘 모두에 대해 LC1 방법을 이용하여 측정되었다. 각 균주는 4-성분 플라스미드 pGV2082로 형질전환되었다. 발효는 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. 외생성 ALS 발현이 없는 균주는 DH2MB를 생산하지 못하는 반면, ALS 발현을 갖는 균주는 최대 1.4 g/ℓ DH2MB + DHIV를 생산하였다.

[0507] 실시예 11: 단지 ALS 발현만 DH2MB 생산에 필수적이다

[0508] 본 실시예의 목적은 ALS 활성 단독이 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 DH2MB 축적을 책임진다는 것을 증명하는 것이다.

[0509] 본 실험은 단독으로 또는 KARI, DHAD, KIVD, ADH 발현 플라스미드와 공동으로 ALS가 DH2MB의 생산을 책임지는지를 결정하기 위해 실행되었다. 본 실험에서 이용된 균주는 GEVO2618 (*MATa ura3 leu2 his3 trp1 pdc1*△::[P_{CUP1}: *Bs_alsS1_coSc*: *TRP1*)이었다. 본 실험에서 조사된 플라스미드는 나머지 4가지 경로 유전자 (-P_{TEF1}:*Ll_ilvD*_coSc: P_{TDH3}:*Ec_ilvC*_coSc^{Q110V}:P_{Sc_TPI1}: *G418*: P_{PGK1}: *Ll_kivD2_coEc*:*PDC1*-3'영역: P_{ENO2}: *Ll_adhA* 2μ bla, pUC-ori)를 내포하는 pGV2227, 그리고 pGV2020, 빈 벡터 대조 (P_{Sc_TEF1}, P_{Sc_TPI1} , G418R, APr, 2μ)이었다.

[0510] pGV2020로 형질전환된 GEVO2618 및 pGV2227로 형질전환된 GEVO2618의 교반 플라스크 배양은 OD600 ~0.1에서 200 mM MES pH6.5 및 0.4 g/ℓ G418을 내포하는 YPD (15% 글루코오스)에서 시작되고, 그리고 교반 배양기에서 30℃와 75 rpm에서 진행되었다. 샘플은 24시간과 48시간 시점에 채취되고, 그리고 이들 샘플은 HPLC (LC1)와 GC (GC1)에 의해 대사산물 수준에 대해 분석되었다. 48시간후, 모든 글루코오스가 양쪽 균주에 의해 배지로부터 소비되었다. 빈 벡터를 내포하는 균주 (GEVO2618 + pGV2020)는 3.8% 수율을 의미하는 4.6 g/ℓ의 DHIV + DH2MB를 생산하였다. 추가의 4가지 경로 유전자를 발현하는 벡터를 내포하는 균주 (GEVO2618 + pGV2227)는 3.1% 수율을 의미하는 5.6 g/ℓ의 유사한 역가의 DHIV + DH2MB를 생산하였다.

[0511] 실시예 12: DH2MB 생산에 대한 증가된 KARI 활성의 효과

[0512] 본 실시예의 목적은 증가된 KARI 활성이 ALS 활성을 포함하는 효모에서 감소된 DH2MB 생산을 유발하는 지를 증명하는 것이다.

[0513] 본 실시예에서 개시된 균주와 플라스미드는 각각, 표 36과 37에서 제시된다.

표 36

[0514] 실시예 12에서 개시된 균주의 유전형.

균주	유전형
GEVO2843	*S. cerevisiae, MATa ura3 leu2 his3 trp1 pdc1△::P_{CUP1}:[Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}: P_{PGK1}: Ll_kivD2: P_{ENO2}: Sp_HIS5] pdc5△::[LEU2: bla: P_{TEF1}: ILV3△N: P_{TDH3}: Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6△::[URA3: bla: P_{TEF1}: Ll_kivD2: P_{TDH3}: Dm_ADH]* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}

표 37

[0515] 실시예 12에서 개시된 플라스미드.

플라스미드	유전형
pGV2196	*CEN, ARS, hph, bla, pUC-ori.*
pGV2377	*P_{TEF1}: Ll_ilvD_coSc, P_{ScPGK1}: Ll_kivD_coEc, P_{ScENO2}: Ll_adhA, 2μ ori, pUC ori, bla, G418R*
pGV2466	*P_{TEF1}: Ll_ilvD_coSc, P_{SCTDH3}: Ec_ilvC_coSc^{his6}, P_{ScPGK1}: Ll_kivD_coEc, P_{ScENO2}: Ll_adhA, 2μ ori, pUC ori, bla, G418R*
pGV2398	*P_{TEF1}: Ll_ilvD_coSc, P_{SCTDH3}: Ec_ilvC_coSc$^{Q110V-his6}$, P_{ScPGK1}: Ll_kivD_coEc, P_{ScENO2}:Ll_adhA, 2μ ori, pUC ori, bla, G418R*
pGV2400	*P_{TEF1}: Ll_ilvD_coSc, P_{SCTDH3}: Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1-his6}$, P_{ScPGK1}: Ll_kivD_coEc, P_{ScENO2}: Ll_adhA, 2μ ori, pUC ori, bla, G418R*
pGV2406	*P_{Sc_TEF1}: Ec_ilvC_coSc$^{Q110V-his6}$, CEN, ARS, hph, bla, pUC ori.*

[0516] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO2843은 야생형 또는 조작된 KARI의 발현이 DH2MB의 더욱 큰 축적을 유발하는 지를 결정하기 위해, 앞서 기술된 바와 같이 2μ 플라스미드 pGV2377, pGV2466, pGV2398, 그리고 pGV2400로 형질전환되었다.

[0517] 2μ 플라스미드 (pGV2377, 2466, 2398, 2400)로 형질전환된 GEVO2843의 전배양은 1% 에탄올 및 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD에서 시작되고 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 이들 전배양액은 차단된 플라스크에서 50 mℓ의 동일한 배지를 접종하는데 이용되고 ~5의 OD_{600}에 도달할 때까지 30℃와 250 rpm에서 배양되었다. 이들은 25℃에서 5분 동안 2700 rcf로 50 mℓ Falcon 튜브에서 펠릿화되었다. 그 다음, 각 50 mℓ 배양액으로부터 세포는 8% 글루코오스, 1% (v/v) 에탄올, 에르고스테롤, Tween-80, 0.2 g/ℓ G418, 그리고 200 mM MES, pH6.5를 내포하는 50 mℓ YPD에서 재현탁되었다. 배양액은 250 mℓ 차단되지 않은 플라스크에 첨가되고 30℃와 75 rpm에서 배양기에 배치되었다. 샘플은 OD_{600}을 측정하고, 그리고 발효액을 GC1과 LC1 분석으로 세포외 대사산물에 대해 분석하기 위해 72시간후 채취되었다.

[0518] 표 38에서는 pGV2377로 형질전환된 균주 (플라스미드로부터 임의의 KARI 유전자를 과다발현하지 않음)가 합동된 DH2MB + DHIV에 대한 15%의 가장 높은 탄소 수율을 생산하는 반면, pGV2466 (Ec_ilvC_coSc^{his6}을 내포함), pGV2398 (Ec_ilvC_coSc$^{Q110V-his6}$을 내포함), 그리고 pGV2400 (Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1-his6}$을 내포함)을 갖는 균주가 8-10%의 유사한 합동된 DH2MB + DHIV 탄소 수율을 갖는다는 것을 보여준다. 유사하게, pGV2377로 형질전환된 균주는 6%의 가장 낮은 탄소 수율에서 이소부탄올을 생산하였다. 플라스미드 상에서 KARI 유전자를 포함하는 나머지 균주는 더욱 높은 탄소 수율에서 이소부탄올을 생산하였다.

[0519] 감소된 DH2MB 생산이 증가된 이소부탄올 생산과 상관한다는 관찰 결과는 DH2MB가 KARI를 필요로 하지 않는 반응을 거쳐 아세토락테이트로부터 생산된다는 조사 결과와 일치한다.

표 38

[0520] 이소부탄올 및 합동된 DH2MB + DHIV 탄소 수율

균주	플라스미드	KARI	이소부탄올 탄소 수율 [%]	DH2MB + DHIV 탄소 수율 [%]
GEVO2843	pGV2377	n/a	6	15
GEVO2843	pGV2466	Ec_ilvC_coSc^{his6}	18	8
GEVO2843	pGV2398	Ec_ilvC_coSc$^{Q110V-his6}$	15	8
GEVO2843	pGV2400	Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1-his6}$	18	10

[0521] 두 번째 실험이 실행되었는데, 여기서 균주는 플라스미드로부터 KARI를 발현하지 않거나, 낮은 수준의 KARI를 발현하거나, 또는 높은 수준의 KARI를 발현하였다. 본 실험에서, 세포 용해물의 KARI 활성이 측정되었다.

[0522] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO2843은 표 37에서 기술된 바와 같은 플라스미드의 조합에서 기술된 바와 같이 형질전환되었다; KARI 없음 균주는 pGV2377 + pGV2196을 내포하고 플라스미드-유래 KARI을 갖지 않았고, 낮은 KARI 균주는 pGV2377 + pGV2406을 내포하고 낮은 사본 플라스미드로부터 KARI를 발현하고, 그리고 높은 KARI 균주는 pGV2398 + pGV2196을 내포하고 높은 사본 플라스미드로부터 KARI를 발현하였다. 발효 및 샘플링 (sampling)은 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. GC1과 LC1 방법은 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. KARI 검사를 위한 세포는 용해 완충액이 250 mM KPO_4 pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$ 및 1 mM DTT인 점을 제외하고, 앞서 기술된 바와 같이 용해되었다. 용해물의 단백질 농도는 앞서 기술된 바와 같이 측정되었다.

[0523] 시험관내 KARI 활성을 측정하기 위해, 아세토락테이트 기질이 50 ㎕의 에틸-2 아세톡시-2-메틸-아세토아세테이트를 990 ㎕의 물과 혼합함으로서 만들어졌다. 그 다음, 260 ㎕의 NaOH가 첨가될 때까지 10 ㎕의 2 N NaOH가 순차적으로 첨가되고, 첨가 간에 15초 동안 와동 혼합되었다. 아세토락테이트는 실온에서 20분 휘저어지고 얼음 위에 유지되었다. NADPH는 0.01N NaOH에서 50 mM의 농도로 준비되었다. 상기 농도는 분광광도계에서 340 nm에서 희석된 샘플의 OD를 판독하고, 그리고 정확한 농도를 계산하기 위해 6.22 $M^{-1}cm^{-1}$의 몰 흡광 계수 (molar extinction coefficient)를 이용함으로써 결정되었다. 3가지 완충액이 준비되고 얼음 위에 유지되었다. 반응 완충액은 250 mM KPO_4 pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10 mM 아세토락테이트, 그리고 0.2 mM NADPH를 내포하였다. 기질 없음 완충액은 아세토락테이트가 제외되었다. NADPH 없음 완충액은 NADPH가 제외되었다. 반응은 SpectraMax 340PC 다중-평판 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 내에 96-웰 평판에서 90 ㎕의 반응 완충액과 함께 10 ㎕의 세포 추출물을 이용하여 삼중으로 수행되었다. 반응은 5분 동안 동역학적 곡선을 측정함으로써 340 nm에서 추적되고, OD가 30℃에서 10초마다 판독되었다. 각 추출물에 대한 V_{max}는 완전한 완충액에서 시도로부터 기질 없음 대조의 배경 시도 (background reading)를 뺄셈한 이후 측정되었다.

[0524] 표 39에서는 이소부탄올 및 합동된 DH2MB + DHIV에 대한 탄소 수율 (%)뿐만 아니라 KARI 활성에 대한 데이터를 보여준다. KARI 활성이 증가함에 따라서, 이소부탄올 탄소 수율이 증가하고 합동된 DH2MB + DHIV 탄소 수율이 감소하였다.

표 39

[0525] KARI 활성, 이소부탄올 및 합동된 DH2MB + DHIV 탄소 수율.

균주	플라스미드	KARI 활성 μmol/min/mg	이소부탄올 탄소 수율 [%]	DH2MB + DHIV 탄소 수율 [%]
GEVO2843	pGV2377 + pGV2196	0.011 ± .002	5	19
GEVO2843	pGV2377 + pGV2406	0.030*	11*	16*
GEVO2843	pGV2398 + pGV2196	0.151 ± .005	19	11

[0526] *이 데이터는 한 가지 샘플만을 포함한다

[0527] 실시예 13: 증가된 DHAD 활성의 효과

[0528] 본 실시예의 목적은 증가된 DHAD 활성이 ALS 활성을 포함하는 효모에서 감소된 DH2MB 생산을 유발한다는 것을 증명하는 것이다.

[0529] 본 실시예에서 개시된 균주와 플라스미드는 각각, 표 40과 41에서 제시된다.

[0530] GEVO2843은 상이한 쌍의 플라스미드로 형질전환되었다. 균주 A는 pGV2227 + pGV2196을 내포한다. 균주 B는 pGV2284 + pGV2196을 내포한다. 균주 C는 pGV2284 + pGV2336을 내포한다. 이들 3가지 2-플라스미드 조합 중에서 한 가지로 BUD2843의 단일 형질전환체는 히그로마이신을 내포하는 YPD 평판 상에서 단일 집락 정제되고, 그리고 패칭된 세포는 1% 에탄올 (v/v), 0.2 g/ℓ G418 및 0.1 g/ℓ 히그로마이신을 내포하는 3 ㎖ YPD를 접종하는데 이용되었다. 배양액은 1% 에탄올 (v/v), 0.2 g/ℓ G418 및 0.1 g/ℓ 히그로마이신을 내포하는 3 ㎖ YPD를 접종하는데 이용되기에 앞서, 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 이들 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 익일에, 배양액은 8% 글루코오스, 200 mM MES pH6.5, 에르고스테롤 및 Tween80을 내포하는 50 ㎖ YPD를 대략 0.1의 OD_{600}까지 접종하는데 이용되었다. 이들 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 익일에, 배양액은 50 ㎖의 동일한 배지에서 ~0.1의 OD_{600}까지 희석되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 배양되고, 그리고 0, 24, 47, 70, 그리고 92시간의 배양후 1.5 ㎖ 샘플이 이동되었다. 이들 샘플은 앞서 기술된 바와 같이 GC와 LC 분석에 대비되었다. 92시간후, 나머지 모든 샘플은 원심분리되고, 그리고 펠릿은 칭량되고 -80℃에서 보관되었다. DHAD 검사는 앞서 기술된 바와 같이, 동결된 펠릿으로부터 준비된 용해물로 수행되었다. LC1과 GC1 분석은 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다.

표 40

[0531] 실시예 13에서 개시된 균주의 유전형.

균주	유전형
GEVO2843	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 pdc1* *△::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5* *△::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3△N:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6* *△::[URA3:bla:P_{TEF1}:Ll_kivD:P_{TDH3}:DmADH]* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}

표 41

[0532] 실시예 13에서 개시된 플라스미드.

플라스미드	유전형
pGV2227	P_{Sc_TEF1}: *Ll_ilvD_coSc*, P_{Sc_TDH3}: *Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}, P_{Sc_TPI1}: *G418*, P_{Sc_PGK1}: *Ll_kivD_coEc*, P_{Sc_ENO2}: *Ll_adhA*, 2μ, AP^r, PMB1
pGV2284	P_{Sc_TEF1}, P_{Sc_TDH3}: *Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$, P_{Sc_TPI1}: *G418*, P_{Sc_PGK1}: *Ll_kivD_coEc*, P_{Sc_ENO2}: *Ll_adhA*, 2μ, AP^r, PMB1
pGV2196	P_{Sc_PGK1} P_{Sc_TEF1}, P_{Sc_TPI1}: *hph*, CEN, AP^r, pUC ORI
pGV2336	P_{Sc_ENO}, T_{ScPDC6} P_{Sc_PGK}, P_{Sc_TEF1}: *Ll_ilvD_coSc* P_{Sc_TDH3}, P_{Sc_TPI1}: *hph*, CEN, AP^r, pUC ORI

[0533] 표 42에서는 DHAD 활성, 이소부탄올 수율 및 합동된 DHIV + DH2MB 수율을 보여준다. pGV2284 + pGV2196으로 형질전환된 균주 (플라스미드로부터 발현된 DHAD 없음)는 합동된 DH2MB + DHIV에 대한 19%의 가장 높은 탄소 수율 및 이소부탄올에 대한 9%의 가장 낮은 탄소 수율을 산출하였다. pGV2227 + pGV2196으로 형질전환된 균주 (플라스미드로부터 최대 DHAD 발현)는 합동된 DH2MB + DHIV에 대한 9%의 가장 낮은 탄소 수율 및 이소부탄올에 대한 18%의 가장 높은 탄소 수율을 산출하였다. pGV2284 + pGV2336으로 형질전환된 균주 (플라스미드로부터 낮은 사본 DHAD 발현)는 합동된 DH2MB + DHIV에 대한 16% 및 이소부탄올에 대한 12%의 중간 탄소 수율을 산출하였다.

표 42

[0534] 92시간 발효에서 DHAD 활성, 이소부탄올 및 합동된 DH2MB + DHIV 탄소 수율.

균주	플라스미드	DHAD 활성	이소부탄올 탄소 수율 [%]	DH2MB + DHIV 탄소 수율 [%]
A	pGV2227 + pGV2196	0.29 ± 0.05	18	9
B	pGV2284 + pGV2196	0.05 ± 0.00	9	19
C	pGV2284 + pGV2336	0.08 ± 0.01	12	16

[0535] 두 번째 실험에서, GEVO2843은 상이한 쌍의 플라스미드 (표 43)로 형질전환되고 앞서 기술된 바와 같은 교반 플라스크 발효액에서 평가되었다. 균주 D는 pGV2196 + pGV2589를 내포한다. 균주 E는 pGV2529 + pGV2589를 내포한다. 균주 F는 pGV2196 + pGV2485를 내포한다. pGV2196 + pGV2589로 형질전환된 균주 (플라스미드-유래 DHAD 없음)는 1.25 g/ℓ 이소부탄올 및 5.67 g/ℓ DH2MB + DHIV를 생산하였다. 높은-사본 플라스미드로부터 발현된 DHAD를 갖는 균주 (pGV2196 + pGV2485)는 2.74 g/ℓ 이소부탄올 및 3.71 g/ℓ DH2MB + DHIV를 생산하였는데, 이것은 DHAD 발현에서 증가가 DH2MB + DHIV 축적에서 감소를 유발한다는 것을 지시하였다. 낮은-사본 플라스미드로부터 발현된 DHAD를 갖는 균주 (pGV2529 + pGV2485)는 중간 수준의 양쪽 대사산물을 생산하였는데, 이것은 중간 수준의 DHAD 활성과 일치하였다.

표 43

[0536] 실시예 13에서 개시된 추가의 플라스미드.

플라스미드	유전형
2196	P_{Sc_PGK1}, P_{Sc_TEF1}, P_{Sc_TPI1}*hph*, *CEN*, AP^r, *pUC ORI*
2529	P_{Sc_PGK1}, P_{Sc_TEF1}*L1_ilvD_coSc4*, P_{Sc_TPI1}*hph*, *CEN*, AP^r, *pUC ORI*
2589	P_{Sc_TDH3}*Ec_ilvC_coSc_Q110V*, P_{Sc_TPI1}*G418R*, P_{Sc_ENO2}*L1_ adhA*, *2μ*, AP^r, *PMB1*

표 44

[0537] 72시간 발효에서 DHAD 활성, 이소부탄올 역가와 수율, 그리고 합동된 DH2MB + DHIV 역가.

균주	플라스미드(들)	플라스미드-유래 DHAD	이소부탄올 역가 (g/ℓ)	이소부탄올 수율 (%)	DH2MB + DHIV (g/ℓ)
D	pGV2196 + pGV2589	없음	1.25 ± 0.27	16.1	5.67 ± 0.29
E	pGV2529 + pGV2589	낮은 사본	2.15 ± 0.05	24.8	5.00 ± 0.20
F	pGV2196 + pGV2485	높은 사본	2.74 ± 0.22	31.0	3.71 ± 0.11

[0538] 실시예 14: 표적화된 결실에 의한 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 *TMA29*의 결실

[0539] 하기 실시예에서는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 유전체로부터 *TMA29* 유전자의 결실이 아세토락테이트 신타아제가 과다발현될 때 DH2MB의 생산을 제거한다는 것을 예증한다.

[0540] *TMA29* 유전자 산물을 비롯하여, DH2MB의 생산을 촉진할 수 있는 몇몇 환원효소 후보가 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 유전체에서 확인되었다. 이들 환원효소를 인코딩하는 유전자는 URA3 마커의 통합을 이용하여, g/ℓ 양의 DH2MB를 생산하는 것으로 알려져 있는 균주인 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO2618에서 결실되었다. *TMA29*를 비롯한 임의의 후보 유전자의 결실이 DH2MB의 생산을 감소시키거나 제거하는지를 결정하기 위해, 이들 균주로 발효가 수행되었다.

[0541] 균주, 플라스미드, 그리고 프라이머 서열은 각각, 표 45, 46, 그리고 47에 열거된다.

표 45

[0542] 실시예 14에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO No.	유전형
GEVO1187	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2 *MAT*a *ura3-52 leu2-3_112 his3*△*1 trp1-289 ADE2*
GEVO2618	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), *MAT*a *ura3 leu2 his3 trp1 pdc1*△*::[*P_{CUP1-1}*: Bs_alsS1_coSc: TRP1].*
GEVO3638	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), *MAT*a *ura3 leu2 his3 trp1 pdc1*△*::[*P_{CUP1-1}*: Bs_alsS1_coSc: TRP1] tma29*△*::[*$T_{K1_URA3_short}$*:* P_{FBA1}*: K1_URA3:* T_{K1_URA3}*]*
GEVO3639	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), *MAT*a *ura3 leu2 his3 trp1 pdc1*△*::[*P_{CUP1-1}*: Bs_alsS1_coSc: TRP1] tma29*△*::[*$T_{K1_URA3_short}$*:*P_{FBA1}*: K1_URA3:* T_{K1_URA3}*]*
GEVO3640	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), *MAT*a *ura3 leu2 his3 trp1 pdc1*△*::[*P_{CUP1-1}*: Bs_alsS1_coSc: TRP1] tma29*△*::[*$T_{K1_URA3_short}$*:* P_{FBA1}*: K1_URA3:*T_{K1_URA3}*]*

표 46

[0543] 실시예 14에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	유전형
pGV1299	*K1_URA3, bla, pUC-ori.*
pGV2129	*K1_URA3-5', bla.*

표 47

[0544] 실시예 14에서 개시된 올리고뉴클레오티드 서열.

oGV #	서열
893	GGATGTGAAGTCGTTGACACAG (서열 번호: 118)
2231	TTGAAACGTTGGGTCCATAC (서열 번호: 119)
2232	TTCACCGTGTGCTAGAGAAC (서열 번호: 120)
2862	TTATACAGGAAACTTAATAGAACAAATC (서열 번호: 121)
2867	TGAAACAGCATGGCGCATAG (서열 번호: 122)
2869	CTGTGTCAACGACTTCACATCCGAGGTAACGAGGAACAAGCC (서열 번호: 123)
2870	TTTCGCCGGTATATTCCGTAG (서열 번호: 124)
2891	GTTCTATTAAGTTTCCTGTATAACGGCATTGTTCACCAGAATGTC (서열 번호: 125)
2902	TCCCGACGGCTGCTAGAATG (서열 번호: 126)
2904	CGCTCCCCATTAATTATACA (서열 번호: 127)
2913	GAAAGGCTCTTGGCAGTGAC (서열 번호: 128)
2914	GCCCTGGTGCAATTAGAATG (서열 번호: 129)
2915	TGCAGAGGGTGATGAGTAAG (서열 번호: 130)
2916	GGCCAAAGGTAAGGAGAACG (서열 번호: 131)

[0545] **균주 작제:** 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO3638, GEVO3639, 그리고 GEVO3640은 *TMA29*를 *URA3* 마커로 대체하기 위해 GEVO2618을 2부 통합 SOE PCR 산물로 형질전환시킴으로써 작제되었다. 환원효소 유전자에 대한 5'와 3' 표적화 서열을 증폭하기 위한 프라이머는 *URA3* 단편에 상동한 20 bp 서열로 설계되었다. 이것은 SOE PCR이 *URA3* 마커 및 목적되는 환원효소 유전자에 접하는 상동한 영역을 내포하는 단편을 산출하는데 이용될 수 있도록 하기 위해 수행되었다. PCR은 Eppendorf Mastercycler® (Cat# 71086, Novagen, Madison WI) 상에서 수행되었다. SOE PCR 단편을 산출하는데 이용된 프라이머 세트에

대해 하기 PCR 프로그램이 추종되었다: 2분 동안 94℃, 이후 (94℃ 30초, 53℃ 30초, 72℃ 1.5분)의 30회 사이클, 이후 10분 동안 72℃. 하기 프라이머 쌍과 주형이 SOE 반응의 첫 번째 단계에 이용되었다.

[0546] 5' URA3 단편을 산출하기 위해, oGV2232와 oGV2862가 pGV2129를 주형으로 이용하여 5' *URA3* 단편을 증폭하는데 이용되었다. 상기 1364 bp 단편은 겔 전기영동에 의해 정제되었다. 3' *URA3* 단편을 산출하기 위해, oGV2231과 oGV893이 pGV1299를 주형으로 이용하여 3' *URA3* 단편을 증폭하는데 이용되었다. 상기 1115 bp 단편은 겔 전기영동에 의해 정제되었다.

[0547] 5' *TMA29* 단편을 산출하기 위해, oGV2867과 oGV2891이 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) S288c 유전체 DNA를 주형으로서 이용하여 5' *TMA29* 단편을 증폭하는데 이용되었다. 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) S288c 균주는 ATCC (ATCC#204508)로부터 구입되었다. 상기 412 bp 단편은 겔 전기영동에 의해 정제되었다. 3' *TMA29* 단편을 산출하기 위해, oGV2869와 oGV2870이 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) S288c 유전체 DNA를 주형으로서 이용하여 3' *TMA29* 단편을 증폭하는데 이용되었다. 상기 305 bp 단편은 겔 전기영동에 의해 정제되었다.

[0548] 하기 프라이머 쌍과 주형이 SOE PCR 산물을 산출하는데 이용되었다. 5' *TMA29* SOE PCR 산물을 산출하기 위해, oGV2232와 oGV2867이 이용되었다. 5' *URA3* 단편 및 5' *TMA29* 단편이 주형으로서 이용되었다. 3' *TMA29* SOE PCR 산물을 산출하기 위해, oGV2231과 oGV2870이 이용되었다. 3' *URA3* 단편 및 3' *TMA29* 단편이 주형으로서 이용되었다.

[0549] 2부 통합 SOE PCR 산물로 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO2618의 형질전환은 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. 형질전환 이후에, 세포는 원심분리 (18,000 x g, 10초, 25℃)에 의해 수집되고 400 ㎕ SCD-HLWU 배지에서 재현탁되었다. 통합성 형질전환체는 형질전환된 세포를 SCD-Ura 아가 배지 상에 도말함으로써 선별되었다. 일단 형질전환체가 단일 집락 정제되면, 이들은 SCD-Ura 평판 상에 유지되었다.

[0550] 집락 PCR은 정확한 통합을 확증하는데 이용되었다. 정확한 5'-단부를 스크리닝하기 위해, *URA3*: *TMA29* 5' 연접 프라이머 oGV2915와 oGV2902가 991 bp에서 예측된 밴드를 제공하는데 이용되었다. 정확한 3'-단부를 스크리닝하기 위해, *URA3*: *TMA29* 3' 연접 프라이머 oGV2904와 oGV2916이 933 bp에서 예측된 밴드를 제공하는데 이용되었다. *TMA29* 유전자의 결실을 스크리닝하기 위해, 프라이머 oGV2913과 oGV2914가 이용되었는데, 상기 CDS가 결실되면 288 bp의 결여가 예측되었다.

[0551] **발효:** 발효는 tma29△ 균주 GEVO3638, GEVO3639와 GEVO3640, 그리고 부모 *TMA29* 균주 GEVO2618로 수행되었다. 배양은 30℃와 250 rpm에서 교반하면서 YPD에서 시작되었다. 4회 계대 (doubling)후, 각 배양액에 대한 OD_{600}이 측정되었다. 0.05의 최종 OD_{600}이 획득되도록, 15% 글루코오스를 내포하는 50 ㎖ YPD에 세포가 첨가되었다. t=24 시간에서, 2 ㎖의 배지가 이동되고 25 ㎕가 OD_{600}을 측정하기 위해 1:40 희석도에서 이용되었다. 남아있는 배양액은 10분 동안 최대 속도로 마이크로원심분리기에서 원심분리되고, 그리고 1 ㎖의 상층액이 이동되고 LC1과 LC4 분석이 수행되었다. t=48시간에서, 2 ㎖의 배지가 이동되고 25 ㎕가 OD_{600}을 측정하기 위해 1:40 희석도에서 이용되었다. 1 ㎖의 상층액은 LC1에 의해 분석되었다. 이에 더하여, 14 ㎖가 2700 x g로 원심분리에 의해 수집되었다. 배지의 제거후, 세포는 무균 dH_20에서 재현탁되고, 2700 X g로 원심분리되고, 그리고 남아있는 배지가 1 ㎖ 피펫 팁 (pipette tip)을 이용하여 조심스럽게 제거되었다. 세포 펠릿은 칭량되고 (빈 튜브가 미리 칭량되었다), 이후 앞서 기술된 바와 같이 ALS 검사를 위해 해동될 때까지 -80℃에서 동결되었다

[0552] DH2MB의 생산은 이종기원성 ALS 발현, 예를 들면, *Bs_alsS1_coSc* 유전자에 의존한다. 세포 용해물의 ALS 활성은 *TMA29* 결실이 ALS 발현 및/또는 활성에 어떤 영향도 주지 않는다는 것을 증명하기 위해 앞서 기술된 바와 같이 측정되었다. *TMA29* 결실을 보유하는 균주로부터 추출물의 ALS 활성은 부모 균주로부터 추출물의 활성보다 못하지 않고, 그리고 약간 높다. 24시간 (ALS 활성의 경우에 48시간) 시점에서 결과는 표 48에 요약되고, 그리고 *TMA29* 결실을 갖는 균주에서 DH2MB 생산의 결여를 분명하게 증명한다. LC4 분석은 GEVO3527이 DHIV를 생산하지 않는다는 것을 확증하였다.

표 48

[0553] TMA29 결실을 갖는 균주에서 DH2MB의 생산.

균주	OD_{600}	LC1에 의해 소비된 글루코오스 [g/ℓ]	LC1에 의한 DH2MB [g/ℓ]	ALS 활성 [U/mg]
GEVO2618	9.2 ± 0.9	61.56 ± 12.0	1.51 ± 0.1	0.44 ± 0.06
GEVO3638, GEVO3639, GEVO3640 (*tma29△*)	12.5 ± 5.0	68.44 ± 12.5	0.00 ± 0.0	0.57 ± 0.04

[0554] 실시예 15: 결실 라이브러리에 의한 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 *TMA29*의 결실

[0555] 하기 실시예에서는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 유전체로부터 *TMA29* 유전자의 결실이 아세토락테이트 신타아제가 과다발현될 때 DH2MB의 생산을 제거한다는 것을 예증한다.

[0556] 균주, ORF 결실, 그리고 플라스미드는 각각, 표 49, 50, 그리고 51에 열거된다.

표 49

[0557] 실시예 15에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO #	유전형/출처
GEVO3527	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) BY4742: MATa his3△1 leu2△0 lys2△0 ura3△0 /ATCC #201389, ATCC 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110-2209로부터 구입됨

표 50

[0558] 실시예 15에서 개시된 ORF 결실.

ORF 결실	유전자 명칭	출처
YMR226C	*TMA29*	결실 라이브러리는 Open Biosystems, cat # YSC 1054로부터 획득되었다

표 51

[0559] 실시예 15에서 개시된 플라스미드.

플라스미드	관련된 유전자
pGV2435	P_{ScCUP1}: *Bs_alsS1_coSc*:P_{ScTPI1}:*hph*:T_{ScCYC1}, *CEN/ARS, bla, pUC-ori*

[0560] 균주마다 하나의 유전자/ORF가 결실된 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주의 상업적 라이브러리가 DH2MB의 생산을 촉진할 지도 모르는 결실을 스크리닝하는데 이용되었다. *TMA29* (즉, YMR226C) ORF의 결실을 내포하는 후보 균주가 선별되었다. 외생성 ALS 발현이 DH2MB의 생산에 요구되기 때문에, *CUP1* 프로모터에 의해 주동된 *Bs_alsS1_coSc* 유전자를 내포하는 CEN 플라스미드 (pGV2435)가 앞서 기술된 바와 같이 균주 내로 형질전환되었다. 형질전환체는 0.2 g/ℓ 히그로마이신을 내포하는 YPD 평판 상에 도말하기에 앞서, 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 회수되었다. 형질전환체는 이후, 0.2 g/ℓ 히그로마이신을 내포하는 YPD 평판 상에 패칭되고 30℃에서 배양되었다. *TMA29* (YMR226C)의 결실이 DH2MB의 생산을 감소시키거나 제거하는 지를 결정하기 위해, 이들 균주로 발효가 수행되었다. 각 균주의 3가지 독립된 형질전환체가 하룻밤동안 성장된 발효 전배양액을 30℃와 250 rpm에서, 0.2 g/ℓ 히그로마이신을 내포하는 YPD에서 포화까지 접종하는데 이용되었다. 익일에, 전배양액의 OD_{600}이 측정되고, 그리고 50 mℓ 배양액을 0.1의 OD_{600}까지 접종하는데 필요한 하룻밤 배양액의 부피가 각 배양액에 대해 계산되었다. 250 mℓ 비-차단된 플라스크에서 150 g/ℓ 글루코오스, 200 mM MES, pH 6.5 및 0.2 g/ℓ 히그로마이신을 내포하는 50 mℓ의 YPD가 계산된 양의 하룻밤 배양액으로 접종되었다. 세포는 오비탈 교반기에서 30℃와 75 rpm에서 배양되었다. 24시간 시점에, 모든 배양액은 각 플라스크에 8.8 mℓ의 50% 글루코오스 용액의

첨가에 의해 추가의 75 g/ℓ 글루코오스가 공급되고, 이후 30℃와 75 rpm에서 배양으로 복귀되었다. 72시간 시점에, 1.5 mℓ가 각 플라스크로부터 샘플링되었다 (2개의 에펜도르프 튜브 간에 750 μℓ 분할됨). 각 배양액 (H_2O에서 1:40 희석도)에 대해 OD_{600}이 측정되었다. 세포는 마이크로원심분리기에서 10분 동안 ≥14000 x g로 원심분리에 의해 샘플로부터 이동되었다. 이들 샘플로부터 상층액이 수집되고 LC1에 의한 분석 때까지 4℃에서 보관되었고, 그리고 세포 펠릿은 앞서 기술된 바와 같이 ALS 검사를 위해 해동될 때까지 -80℃에서 보관되었다.

[0561] 72시간 시점에서 GEVO3527의 경우에 13.7 및 *TMA29* 결실 균주의 경우에 15.7의 OD_{600} 값으로, 이들 두 균주 간에 성장에서 일부 편차가 있었다 (표 52). 이들 균주는 72시간까지 대략 223 g/ℓ의 동일한 양의 글루코오스를 소비하였다 (표 52). GEVO3527은 72시간까지 2.8 g/ℓ의 DH2MB를 생산하였다. YMR226C 결실 균주 (*tma29*△)는 검출가능한 수준의 DH2MB를 생산하지 못하였다. GEVO3527에 대한 특정한 DH2MB 역가는 0.2 g/ℓ/OD이었다; YMR226C 결실 균주 (*tma29*△)는 검출가능한 수준의 DH2MB를 생산하지 못하였다. LC4 분석은 GEVO3527이 DHIV를 생산하지 못한다는 것을 확증하였다.

표 52

[0562] 72시간 시점에 세포 성장, 소비된 글루코오스, 그리고 DH2MB 생산.

균주	OD_{600}	LC1에 의해 소비된 글루코오스 [g/ℓ]	LC1에 의한 DH2MB 역가 [g/ℓ]	특정한 DH2MB 역가 [g/ℓ/OD]
GEVO3527	13.7 ± 0.3	223.3 ± 0.6	2.8 ± 0.1	0.2 ± 0.01
TMA29△	15.7 ± 5.5	223.9 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

[0563] 실시예 16: 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 *TMA29* 유전자의 결실로 향상된 이소부탄올 비율, 수율, 그리고 역가

[0564] 하기 실시예에서는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 유전체로부터 *TMA29* 유전자의 결실이 원하는 산물, 이소부탄올의 생산성, 수율, 그리고 역가에서 증가를 유발한다는 것을 예증한다. 이에 더하여, 이것은 DH2MB 생산성, 수율과 역가에서 감소를 유발한다.

[0565] DH2MB는 효모에서 아세토락테이트 물질대사의 부산물이다. 이소부탄올 발효에서, DH2MB는 탄소 수율 중에서 10% 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 야생형 *TMA29*를 갖는 균주는 *Bs_alsS1_coSc* (서열 번호: 23)에 의해 인코딩된 발현된 아세토락테이트 신타아제 (ALS)의 존재에서 DH2MB를 생산한다. *TMA29*가 결실된 균주는 발현된 *Bs_alsS1_coSc*의 존재에서 DH2MB를 생산하지 못한다. 염색체로부터 ALS를 발현하는 모든 *PDC*와 *GPD* 유전자 (*Bs_alsS1_coSc*)가 결실된 효모 균주는 *TMA29*가 결실되고, 그리고 DHAD (*L1_ilvD_coSc*), *KARI* (*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1\text{-}A1\text{-}his6}$), KIVD (*L1_kivD2_coEc*) 및 ADH (*L1_adhA_coSc*$^{RE1\text{-}his6}$)에 대한 유전자를 갖는 높은 사본 4-성분 이소부탄올 경로 플라스미드, pGV2550으로 형질전환되었다. 상기 균주의 이소부탄올 역가, 수율과 생산성은 교반 플라스크 발효액 및 발효조 둘 모두에서, *TMA29* 유전자가 결실되지 않은 부모 균주의 이소부탄올 역가, 수율과 생산성과 비교되었다. 균주와 플라스미드는 각각, 표 53과 54에 열거된다.

표 53

[0566] 실시예 16에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO No.	유전형
GEVO1187	사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2 *MATa ura3 leu2 his3 trp1 ADE2*
GEVO3351	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1*△*::[TK1_URA3] gpd2* △*::TK1_URA3 pdc1* △*::[*P_{CUP1}*:Bs_alsS1_coSc:*T_{CYC1}*:*P_{PGK1}*:L1_kivD-*P_{ENO2}*:Sp_HIS5] pdc5* △*::[LEU2;bla;*P_{TEF1}*:ILV3*△*N;*P_{TDH3}*;ilvC_coSc*^{Q110V}*] pdc6* △*::[*P_{TEF}*-L1_ilvD:*P_{TDH3}*:Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1\text{-}A1}$*:*P_{ENO2}*:L1_adhA:*P_{FBA1}*:Sc_TRP1]* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}

GEVO3663	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1::T_{K1_URA3} gpd1△::[T_{K1_URA3}] gpd2 △::T_{K1_URA3}* *pdc1 △::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5 △::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3△N;P_{TDH3};ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6 △::[P_{TEF}-Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* *tma29△::[$T_{K1_URA3_short}$: P_{FBA1}:K1_URA3: T_{K1_URA3}]* {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEVO3690, GEVO3691, GEVO3692	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1△::[T_{K1_URA3}] gpd2 △::T_{K1_URA3}* *pdc1 △::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5 △::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3△N;P_{TDH3};ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6 △::[P_{TEF}-Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* 형질전환된 with pGV2550 {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}
GEVO3694, GEVO3695, GEVO3696 GEVO3697	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1△::[T_{K1_URA3}] gpd2 △::T_{K1_URA3}* *pdc1 △::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5 △::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3△N;P_{TDH3};ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6 △::[P_{TEF}-Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* *tma29△::[$T_{K1_URA3_short}$: P_{FBA1}:K1_URA3: T_{K1_URA3}]*형질전환된 with pGV2550 {C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}

표 54

[0567] 실시예 16에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	유전형
pGV1299	*K1_URA3, bla,* pUC-ori.
pGV2129	*K1_URA3-5', bla,* pUC ori
pGV2550	P_{ScTEF1}:Ll_ilvD_coS, P_{ScTDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1-his6}$:P_{ScPGK1}:Ll_kivD2_coEc: P_{ScENO2}:Ll_adhA_coSc$^{RE1-his6}$, 2μ-ori, pUC-ori, bla, G418R.

[0568] **효모 균주 작제:** GEVO3663은 형질전환후 세포가 SCD-Ura 평판 위에 전개되기에 앞서 350 ㎕ SCD-Ura 배지에서 재현탁되는 점을 제외하고, 앞서 기술된 바와 같이 *TMA29*를 *URA3* 마커로 대체하기 위해 GEVO3351을 실시예 14에서 기술된 2부 통합 SOE PCR 산물로 형질전환시킴으로써 작제되었다.

[0569] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO3690, GEVO3691, 그리고 GEVO3692는 GEVO3351을 플라스미드 pGV2550로 형질전환시킴으로써 작제되었다. 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 GEVO3694, GEVO3695, 그리고 GEVO3697은 GEVO3663을 플라스미드 pGV2250로 형질전환시킴으로써 작제되었다. 간단히 말하면, 적격 세포는 새로운 평판으로부터 세포를 100 ㎕ 100 mM 리튬 아세테이트로 이동시킴으로써 준비되었다. 세포 현탁액은 30분 동안 실온에서 배양되었다. 플라스미드 DNA는 앞서 기술된 바와 같이 형질전환되었다. 형질전환후, 세포는 1% 에탄올을 내포하는 400 ㎕ YPD에서 재현탁되고 250 rpm으로 교반하면서 30℃에서 6시간 동안 배양되었다. 세포는 이후, 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD 평판 위에 전개되었다. 형질전환체는 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD 평판 상에 단일 집락 정제되었다. 일단 형질전환체가 단일 집락 정제되면, 이들은 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD 평판 상에 유지되었다.

[0570] **발효:** 교반 플라스크 발효는 GEVO3690-GEVO3692 (*TMA29*)의 성과를 GEVO3694-GEVO3695 및 GEVO3697 (*tma29*△)과 비교하기 위해 수행되었다. 배양 (3 mℓ)은 1% 에탄올 및 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD에서 시작되고 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 대략 20시간후 이들 배양액의 OD_{600}이 측정되었다. 적절한 양의 각 배양액이 250 mℓ 차단된 플라스크에서 1% 에탄올 및 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 50 mℓ의 YPD를 대략 0.1의 OD_{600}까지 접종하는데 이용되었다. 이들 전배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 배양액이 대략 5의 OD_{600}에

도달했을 때, 이들은 50 ㎖ Falcon 튜브에서 25℃에서 5분 동안 2700 rcf로 원심분리되었다. 각 50 ㎖ 배양액으로부터 세포는 앞서 기술된 바와 같이 50 ㎖의 발효 배지에서 재현탁되었다. 배양액은 이후, 250 ㎖ 차단되지 않은 벤트 스크루-캡 플라스크로 이전되고 30℃와 75 rpm에서 배양되었다. 24시간과 48시간 시점에, 각 플라스크로부터 샘플은 OD_{600}을 측정하고 GC1 분석에 대비하기 위해 이동되었다. GC1 분석을 위해, 2 ㎖ 샘플이 에펜도르프 튜브로 이동되고 10분 동안 최대로 마이크로원심분리기에서 원심분리되었다. 1 ㎖의 상층액은 GC1에 의해 분석되었다. 72시간 시점에, OD_{600}과 GC 분석을 위한 세포를 수집하기 위해 동일한 절차가 이용되었고, 그리고 게다가, 이들 샘플은 고성능 액체 크로마토그래피 (LC1)에 의해 DH2MB와 DHIV를 비롯한 유기 산, 그리고 글루코오스에 대해 분석되었다.

[0571] 72시간 시점에 결과는 표 55에 요약된다. 이소부탄올 역가, 수율과 비율은 *TMA29* 유전자의 결실로 증가하는 반면, DH2MB 생산은 감소한다.

표 55

[0572] 72시간 시점에 이소부탄올 역가, 수율과 비율 증가.

균주	OD_{600}	소비된 글루코오스 [g/ℓ]	생산된 이소부탄올 [g/ℓ]	이소부탄올 수율 [이론적 %]	이소부탄올 비율 [g/ℓ/h]	생산된 DH2MB [g/ℓ]
GEVO3690, GEVO3691, GEVO3692	8.3 ± 0.3	29.8 ± 1.3	5.5 ± 0.4	45.1 ± 4	0.08	3.1
GEVO3694, GEVO3695, GEVO3697 (*TMA29*△)	8.3 ± 0.7	33.4 ± 1.0	7.6 ± 0.2	55.1 ± 2	0.11	0.03

[0573] 이에 더하여, GEVO3690-GEVO3691 (*TMA29*) 대(對) GEVO3694-GEVO3696 (*tma29*△)의 성과는 또한, 발효조 용기에서 수행된 발효 동안 비교되었다. 도말된 배양액은 20 g/ℓ 글루코오스, 1% v/v 에탄올, 100 μM $CuSO_4 \cdot 5H_20$, 그리고 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 80 ㎖의 YP 배지를 포함하는 500 ㎖ 차단된 플라스크로 이전되고 250 rpm으로 오비탈 교반기에서 30℃에서 34.5시간 동안 배양되었다. 플라스크 배양액은 0.2의 시작 OD_{600}을 위해 20 g/ℓ 글루코오스, 1% v/v 에탄올, 100 μM $CuSO_4.5H_20$, 그리고 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 80 ㎖의 YP 배지를 포함하는 1.2 ℓ의 작업 부피를 갖는 개별 2 ℓ 탑 드라이브 모터 발효조 용기로 이전되었다. 발효조는 30℃와 pH 6에서 가동되고, 2-기 호기성 발효 하에 6N KOH로 제어되었다. 초기에, 발효조는 850 rpm의 고정된 휘저음 및 5 sL/h의 공기 오버레이 (air overlay)에 의해 10 mM/h의 성장기 산소 전달 속도 (OTR)에서 가동되었다. 배양액은 31시간 동안 대략 6-7 OD_{600}까지 성장되고, 그 직후에 111시간의 나머지 발효 동안 휘저음을 850 rpm에서 300 rpm으로 감소시킴으로써 0.5 mM/h의 생산 통기 OTR로 전환되었다. 주기적으로, 각 발효조로부터 샘플은 OD_{600}을 측정하고 가스 크로마토그래피 (GC1) 분석에 대비하기 위해 이동되었다. GC를 위해, 2 ㎖의 샘플이 에펜도르프 튜브로 이동되고 10분 동안 최대로 마이크로원심분리기에서 원심분리되었다. 1 ㎖의 상층액은 GC1 (이소부탄올, 기타 대사산물)에 의해 분석되었다. 72시간 시점에, OD_{600}과 GC 분석을 위한 세포를 수집하기 위해 동일한 절차가 이용되었고, 그리고 게다가, 이들 샘플은 고성능 액체 크로마토그래피 (LC1)에 의해 유기 산과 글루코오스에 대해 분석되었다.

[0574] 111시간 시점에 결과는 표 56에 요약된다. 이소부탄올 역가, 수율과 비율은 *TMA29* 유전자의 결실로 증가하는 반면, DH2MB 생산은 검출되지 않는 수준까지 감소한다.

표 56

[0575] 111시간 시점에서 이소부탄올 역가, 수율과 비율 증가.

균주	OD_{600}	소비된 글루코오스[a] [g/ℓ]	생산된 이소부탄올[a] [g/ℓ]	생산된 DH2MB[a] [g/ℓ]	이소부탄올 수율[b] [이론적 %]	이소부탄올 비율[b] [g/ℓ/h]

GEVO3690, GEVO3691 (*TMA29+*)	7.2 ± 0.7	29.7 ± 1.1	8.6 ± 0.1	2.9	62.4 ± 3	0.09
GEVO3694, GEVO3695, GEVO3696 (TMA29△)	7.4 ± 1.3	35.7 ± 3.9	12.3 ± 1.2	0	75.0 ± 0.01	0.14

[0576] [a] 글루코오스, 이소부탄올, 그리고 DH2MB 역가는 최종 역가, 다시 말하면, 111시간 발효 시점에서 역가이다.

[0577] [b] 이소부탄올 수율과 비율은 생산 단계, 다시 말하면, 31 내지 111시간의 발효에만 기초하여 계산된다.

[0578] 실시예 17: 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 TMA29 활성의 결정

[0579] 하기 실시예에서는 (*S*)-2-아세토락테이트 감소 활성이 *tma29*△ 균주에서 유의미하게 감소한다는 것을 예증한다.

표 57

[0580] 실시예 17에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO #	유전형	출처
GEVO3527	*MAT*α *his3*△*-1 leu2*△ *lys2*△ *ura3*△	ATCC# 201389 (BY4742)
GEVO3939	*MAT*α *his3*△*-1 leu2*△ *lys2*△ *ura3*△ *tma29::kan*^{R}	OpenBiosystems cat# YSC1054 (Yeast MATalpha collection)

[0581] *TMA29* (YMR226C) 유전자가 결실된 효모 균주 GEVO3939 및 이의 부모 GEVO3527은 각 균주에 대해 삼중으로 14 mℓ 배양액 튜브에서 3 mℓ의 YPD를 접종함으로써 각각 삼중으로 배양되었다. 배양은 GEVO3527의 경우에 YPD 아가 평판 상에서, 그리고 GEVO3939와 GEVO3940의 경우에 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD 평판 상에서 패치 (patch)로부터 시작되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 익일에, 하룻밤 배양액의 OD_{600}이 측정되고, 그리고 50 mℓ 배양액을 0.1의 OD_{600}까지 접종하기 위한 각 배양액의 부피가 계산되었다. 계산된 부피의 각 배양액이 250 mℓ 차단된 플라스크에서 50 mℓ의 YPD를 접종하는데 이용되고, 그리고 이들 배양액은 30℃와 250 rpm에서 배양되었다.

[0582] 세포는 7시간 성장후, 1.6-2.1의 OD에서 중간-로그 기 동안 수확되었다. 배양액은 미리 칭량된 50 mℓ Falcon 튜브로 이전되고, 그리고 세포가 5분 동안 3000 x g로 원심분리에 의해 수집되었다. 배지의 제거후, 세포는 10 mℓ MilliQ H_2O로 세척되었다. 물의 제거후, 세포는 5분 동안 3000 x g로 다시 한 번 원심분리되고, 그리고 남아있는 물은 1 mℓ 피펫 팁을 이용하여 조심스럽게 제거되었다. 세포 펠릿은 칭량되고, 이후 추가 이용 때까지 -80℃에서 보관되었다.

[0583] 세포 펠릿은 얼음 위에서 해동되고, 그리고 결과물이 질량으로 20% 세포 현탁액이 되도록 용해 완충액 (10 mM 인산나트륨 pH7.0, 1 mM 디티오트레이톨, 5% w/v 글리세롤)에서 재현탁되었다. 각 샘플에 대해 1 mℓ의 유리 비드 (glass bead) (0.5 mm 직경)가 1.5 mℓ 에펜도르프 튜브에 첨가되고 850 ㎕의 세포 현탁액이 첨가되었다. 효모 세포는 각각 전속에서 6 X 1분 혼합 및 그 사이에 얼음 위에서 1분 배양에 의해, Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA)을 이용하여 용해되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 21,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액이 새로운 튜브로 이전되었다. 추출물은 앞서 기술된 바와 같이 TMA29 검사를 이용하여 조사될 때까지 얼음 위에 유지되었다.

[0584] (*S*)-2-아세토락테이트의 환원에 대한, 야생형 MATα 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주인 GEVO3527 용해물에서 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29*의 비활성은 6.9 ± 0.2 mU/mg이었다. *tma29*△ 균주 GEVO3939는 0.7 ± 0.3 mU/mg의 비활성을 가졌다. 야생형 GEVO3527 균주는 결실 균주보다 대략 10-배 높은 TMA29 비활성을 가졌다.

[0585] 실시예 18. 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)에서 TMA29 활성의 결정

[0586] 하기 실시예에서는 (*S*)-2-아세토락테이트 감소 활성이 *tma29*△ 균주에서 유의미하게 감소한다는 것을 예증한다.

표 58

[0587] 실시예 18에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO #	유전형
GEVO1287	클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), *MAT a uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8* [pKD1]
GEVO1742	클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), *MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1△::kan*
GEVO4458	클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), *MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1△::kan tma29△::hph*

표 59

[0588] 실시예 18에서 개시된 올리고뉴클레오티드 서열.

oGV #	서열
821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG (서열 번호: 132)
2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG (서열 번호: 133)
3065	AAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGCGTTGATAAGGGCAACAACGTTAGTATC (서열 번호: 134)
3066	ATACTAACGTTGTTGCCCTTATCAACGCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTAC (서열 번호: 135)
3067	TCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGTTACCCAAGCTGTTTTGCCTATTTTCAAAGC (서열 번호: 136)
3068	GCTTTGAAAATAGGCAAAACAGCTTGGGTAACTGTACAGAAAAAAAAGAAAAATTTG (서열 번호: 137)
3069	AGTTCAAATCAGTTCGAGGATAATTTAAG (서열 번호: 138)
3070	TTAATAAATGCTCAAAAGAAAAAAGGCTGGCG (서열 번호: 139)
3103	ACCGGTGCTTCTGCAGGTATTG (서열 번호: 140)
3106	ATGCTTGGTTGGAAGCAAATAC (서열 번호: 141)

[0589] 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) 균주 GEVO4458은 하기와 같이 GEVO1742로부터 작제되었다. SOE PCR을 이용하여 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*)의 *TMA29* 좌위가 결실된 DNA 구조체가 만들어졌다. 5' 표적화 서열은 프라이머 oGV3103과 oGV3065와 함께, GEVO1287 유전체 DNA를 주형으로서 이용한 PCR에 의해 증폭되었다. 376 bp 단편은 겔 전기영동에 의해 정제되었다. 3' 표적화 서열은 프라이머 oGV3106과 oGV3067과 함께, GEVO1287 유전체 DNA를 주형으로서 이용한 PCR에 의해 증폭되었다. 405 bp 단편은 겔 정제되었다. Hph 마커는 프라이머 oGV3066과 oGV3068과 함께, pGV2701 (P_{TEF1}-*Hph, CEN/ARS, pUC-ori, bla*)을 주형으로서 이용한 PCR에 의해 증폭되었다. 1,165 bp 단편은 겔 정제되었다. 그 다음, 5' 표적화 서열 및 hph 마커는 주형으로서 기술된 PCR 산물을 이용하여 서로 결합되었다. 반응은 프라이머 oGV3068과 oGV3103을 이용하여 증폭되었다. 1,984 bp 단편은 겔 정제되었다. 그 다음, 5' 표적화 서열 + Hph 마커 PCR 단편은 프라이머 oGV3103과 oGV3106과 함께, PCR을 이용하여 3' 표적화 서열과 결합되었다. 2,331 bp는 겔 정제되고 형질전환에 이용되었다. 효모 DNA는 Zymo Research ZR 진균/세균 DNA 키트 (Zymo Research Orange, CA; Catalog #D6005)를 이용하여 단리되었다. GEVO1287은 차단된 125 ㎖ 플라스크에서 12.5 ㎖의 YPD에서 포화까지 성장되었다. 전체 배양액은 15 ㎖ Falcon 튜브에서 수집되고, 그리고 세포가 2700 rcf에서 5분 동안 수집되었다. 유전체 DNA는 제조업체의 지시에 따라 단리되었다. DNA 농도가 측정되고, 그리고 모든 유전체 DNA 준비물이 25 ng/㎕의 최종 농도로 희석되었다.

[0590] GEVO1742는 하기와 같이 형질전환되었다. 250 ㎖ 차단된 플라스크에서 50 ㎖ YPD 배지는 새로운 평판으로부터 GEVO1742 세포로 접종되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 다음날 아침, 배양액은 YPD 배지에서 1:50 희석되고 6시간 동안 성장되었다. 세포는 30℃에서 2분 동안 2700 rcf로 원심분리에 의해 수집되었다. 세포는 세포를 50 ㎖ 무균 MilliQ 물로 완전하게 재현탁함으로써 세척되었다. 세포는 30℃에서 2분 동안

2700 rcf로 원심분리에 의해 수집되었다. 세포는 25 ㎖ 무균 MilliQ 물로 재현탁함으로써 세척되었다. 세포는 30℃에서 2분 동안 2700 rcf로 원심분리에 의해 수집되었다. 세포는 1 ㎖ 100mM 리튬 아세테이트에서 재현탁되고, 에펜도르프 튜브로 이전되고, 그리고 10초 동안 14,000 rcf로 원심분리에 의해 수집되었다. 상층액은 이동되고, 그리고 세포가 100mM LiOAc에서 4X 펠릿 부피로 재현탁되었다. DNA (15 ㎕의 PCR 산물), 72 ㎕ 50% PEG, 10 ㎕ 1 M 리튬 아세테이트, 그리고 3 ㎕의 변성된 연어 정액 DNA (10 mg/㎖)의 혼합물이 각 형질전환을 위해 준비되었다. 1.5 ㎖ 튜브에서, 15 ㎕의 세포 현탁액이 DNA 혼합물 (170 ㎕)에 첨가되고, 그리고 형질전환 현탁액은 5회 짧은 펄스 동안 와동되었다. 형질전환체는 30℃에서 30분 동안 배양되고, 그 이후에 42℃에서 22분 동안 배양되었다. 세포는 원심분리 (18,000 x g, 10초, 25℃)에 의해 수집되었다. 세포는 400 ㎕ YPD 배지에서 재현탁되고 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 회수되었다. 다음날 아침, 세포는 0.1 g/ℓ 히그로마이신으로 보충된 YPE 평판 (1% (w/v) 효모 추출물, 2% (w/v) 펩톤, 25 ㎖/ℓ 에탄올) 위에 전개되었다. 형질전환체는 0.1 g/ℓ 히그로마이신으로 보충된 YPE 평판 상에 단일 집락 정제되었다.

[0591] 단일 집락 단리물은 0.1 g/ℓ 히그로마이신으로 보충된 YPE 평판 상에 패칭되고, 그리고 이들 패치는 집락 PCR에 의해 정확한 통합에 대해 스크리닝되었다. 정확한 PCR 산물의 존재는 아가로오스 겔 전기영동을 이용하여 확증되었다. 내부 *TMA29* 코딩 영역을 스크리닝하기 위해, 프라이머 oGV3103과 oGV3106이 이용되었다. 5' 통합 연접을 스크리닝하기 위해, 프라이머 oGV3069과 oGV821이 이용되었다. 3' 통합 연접을 스크리닝하기 위해, 프라이머 oGV2320과 oGV3070이 이용되었다.

[0592] 효모 세포는 각 균주에 대해 삼중으로 14 ㎖ 배양액 튜브에 3 ㎖의 YPD 배지 (1% (w/v) 효모 추출물, 2% (w/v) 펩톤, 2% (w/v) 글루코오스)를 접종함으로써 배양되었다. 배양은 YPD 평판 (1% (w/v) 효모 추출물, 2% (w/v) 펩톤, 2% (w/v) 글루코오스, 2% 아가) 상에서 패치 (patch)로부터 시작되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 익일에, 하룻밤 배양액의 OD_{600}이 측정되고, 그리고 50 ㎖ 배양액을 0.1의 OD_{600}까지 접종하기 위한 각 배양액의 부피가 계산되었다. 계산된 부피의 각 배양액이 250 ㎖ 차단된 플라스크에서 50 ㎖의 YPD를 접종하는데 이용되었고, 그리고 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 세포는 1.8 - 2.2의 OD에서 중간-로그 기 동안 수확되었다. 배양액은 미리 칭량된 50 ㎖ Falcon 튜브로 이전되고, 그리고 세포가 5분 동안 3000 x g로 원심분리에 의해 수집되었다. 배지의 제거후, 세포는 10 ㎖ MilliQ H_2O로 세척되었다. 물의 제거후, 세포는 5분 동안 3000 x g로 다시 한 번 원심분리되고, 그리고 남아있는 물은 1 ㎖ 피펫 팁으로 조심스럽게 제거되었다. 세포 펠릿은 칭량되고, 이후 -80℃에서 보관되었다.

[0593] 세포 펠릿은 얼음 위에서 해동되고, 그리고 결과물이 질량으로 20% 세포 현탁액이 되도록 용해 완충액 (10 mM 인산나트륨 pH7.0, 1 mM 디티오트레이톨, 5% w/v 글리세롤)에서 재현탁되었다. 각 샘플에 대해 1 ㎖의 유리 비드 (glass bead) (0.5 mm 직경)가 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브에 첨가되고 850 ㎕의 세포 현탁액이 첨가되었다. 효모 세포는 각각 전속에서 6 X 1분 혼합 및 그 사이에 얼음 위에서 1분 배양에 의해, Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA)을 이용하여 용해되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 21,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액이 새로운 튜브로 이전되었다. 추출물은 앞서 기술된 바와 같이 TMA29 검사를 이용하여 조사될 때까지 얼음 위에 유지되었다.

[0594] (*S*)-2-아세토락테이트의 환원에 대한, *TMA29* 유전자를 갖는 Gevo1742의 비활성은 0.0043 ± 0.0005 μmol/min/mg 용해물이었다. *TMA29* 유전자가 결실된 Gevo4459의 비활성은 0.0019 ± 0.0003 μmol/min/mg 용해물이었다.

[0595] 실시예 19: 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에서 *ALD6* 결실, *TMA29* 결실, 그리고 증가된 k_{cat}와 감소된 K_M을 갖는 알코올 탈수소효소를 포함하는 균주에서 증가된 이소부탄올 수율

[0596] 하기 실시예에서는 *ALD6* 결실, *TMA29* 결실, 그리고 향상된 동역학적 성질을 갖는 ADH를 인코딩하는 유전자의 과다발현의 합동이 증가된 이소부탄올 생산과 이론적 수율을 유발한다는 것을 예증한다.

[0597] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2 균주, GEVO3991은 염색체 DNA로부터 향상된 알코올 탈수소효소 (락토코커스 락티스(*L. lactis*) ADH*, *LI_ADH**) 및 탈카르복실화효소 (락토코커스 락티스(*L. lactis*) KIVD, *LI_kivD2*)를 발현하는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2 균주, GEVO3956을 효소: KARI, DHAD, 그리고 향상된 ADH를 인코딩하는 유전자 (각각, $Ec_ilvC_coSc^{P2D1\text{-}A1\text{-}his6}$, *Ll_ilvD_coSc*, 그리고 Ll_adhA^{RE1})를 발현하는 2μ 플라스미드, pGV2603 (P_{TDH3}:$Ec_ilvC_coSc^{P2D1\text{-}A1\text{-}his6}$, P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*, P_{ENO2}:Ll_adhA^{RE1}, *2μ-ori*, pUC-ori, *bla*, *G418R*)으로 형질전환시킴으로써 작제되었다.

표 60

[0598] 실시예 19에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO No.	유전형
GEVO3991	*MATa ura3 leu2 his3 trp1* *ald6△::[P_{ENO2}:*L1_adhA*^{RE1}:P_{FBA1}:*Sc_TRP1* *gpd1△::T_{K1_URA3}* *gpd2△::T_{K1_URA3}* *tma29△::T_{K1_URA3}* *pdc1 △::[P_{PDC1}:L1_kivD2_coSc5:P_{FBA1}:LEU2:T_{LEU2}:P_{ADH1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:L1_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5△::T_{K1_URA3}* *pdc6△::P_{TDH3}:Sc_AFT1:P_{ENO2}:L1_adhA*^{RE1}:$T_{K1_URA3_short}$:P_{FBA1}:K1_URA3:T_{K1_URA3}]{C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}, [pGV2603]
GEVO3956	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 ald6△::[P_{ENO2}:L1_adhA*^{RE1}:P_{FBA1}:*Sc_TRP1* *gpd1△::T_{K1_URA3}* *gpd2△::T_{K1_URA3}* *tma29△::T_{K1_URA3}* *pdc1 △::[P_{PDC1}:L1_kivD2_coSc5:P_{FBA1}:LEU2:T_{LEU2}:P_{ADH1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:L1_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5△::T_{K1_URA3}* *pdc6△::P_{TDH3}:Sc_AFT1:P_{ENO2}:L1_adhA*^{RE1}:$T_{K1_URA3_short}$:P_{FBA1}:K1_URA3:T_{K1_URA3}]{C2 보충-독립성, 글루코오스 내성 및 더욱 빠른 성장을 위해 진화됨}

[0599] 발효는 4가지 복제물 발효조에서 GEVO3991 (*L1_adhA*^{RE1}, *ALD6△*, *TMA29△*)의 성과를 결정하기 위해 수행되었다. 글루코오스 소비, 이소부탄올 생산, 이소부티레이트 생산, 아세테이트 생산 및 OD_{600}이 발효 동안 측정되었다. 이들 발효에서, YPD 아가 평판 상에 성장된 단일 격리된 세포 집락은 80 g/ℓ 글루코오스, 5 g/ℓ 에탄올, 0.5 g/ℓ $MgSO_4$, 그리고 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 80 mℓ의 YPD를 포함하는 500 mℓ 차단된 플라스크로 이전되고 250 rpm으로 오비탈 교반기에서 30℃에서 30시간 동안 배양되었다. 플라스크 배양액은 0.3의 시작 OD_{600}을 위해 용기당 80 g/ℓ 글루코오스, 5 g/ℓ 에탄올, 0.5 g/ℓ $MgSO_4$, 그리고 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD를 포함하는 0.9 ℓ의 작업 부피를 갖는 4개의 개별 2 ℓ 탑 드라이브 모터 발효조 용기로 이전되었다. 발효조는 30℃와 pH 6.0에서 가동되고, 그리고 산소 전달 속도 (OTR)에 기초된 2-기 (phase) 호기성 조건하에 6N KOH로 제어되었다. 초기에, 발효조는 700 rpm의 고정된 휘저음 및 5 sL/h의 공기 오버레이 (air overlay)에 의해 10 mM/h의 성장기 OTR에서 가동되었다. 배양액은 대략 10-11의 OD_{600}까지 22.5시간 동안 성장되고, 그 직후에 40.7시간 동안 생산 통기 조건으로 전환되었다. 생산 기 동안 세포 밀도는 13 - 14 OD_{600}에 접근하였다. 생산 기는 300 rpm의 고정된 휘저음에 의해 0.5 mM/h의 OTR에서 가동되었다. 주기적으로, 각 발효조로부터 샘플은 OD_{600}을 측정하고, 그리고 가스 크로마토그래피 (GC) 분석 및 액체 크로마토그래피 (LC) 분석에 대비하기 위해 이동되었다. GC와 LC를 위해, 2 mℓ의 샘플이 에펜도르프 튜브로 이동되고 10분 동안 최대로 마이크로원심분리기에서 원심분리되었다. 1 mℓ의 상층액은 GC1 (이소부탄올, 기타 대사산물)에 의해 분석되고, 그리고 1 mℓ는 고성능 액체 크로마토그래피 (LC1)에 의해 유기 산과 글루코오스에 대해 분석되었다.

[0600] GEVO3991은 22.5시간 성장기 동안 13.8의 세포 밀도를 달성하였다. 실험의 전체 지속 기간 (63.2시간) 동안 생산된 이소부탄올은 18.6 ± 0.9 g/ℓ, 생산된 이소부티레이트는 0.84 ± 0.10 g/ℓ, 그리고 생산된 아세테이트는 0.15 ± 0.02 g/ℓ이었다. 실험의 생산 기 (22.5 - 63.5시간) 동안 달성된 이론적 이소부탄올 수율은 80.3

± 1.1%인 반면, 이소부티레이트 수율은 단지 0.013 ± 0.001 g/g 글루코오스이었다. DH2MB의 생산은 검출되지 않았다.

[0601] 이에 더하여, GEVO3991의 3가지 독립된 형질전환체 역시 교반 플라스크에서 특성화되었다. 이들 균주는 1% 에탄올 및 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 3 mℓ의 YPD에서 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 성장되었다. 이들 배양액은 차단된 250 mℓ 플라스크에서 50 mℓ의 동일한 배지에서 0.1의 OD_{600}으로 희석되고 하룻밤동안 성장되었다. OD_{600}이 측정되고, 그리고 250 OD_{600}에 대략 동등한 부피의 세포가 2분 동안 2700 rcf로 원심분리에 의해 각 배양액에 대해 수집되고, 그리고 이들 세포는 50 mℓ의 발효 배지 (80 g/ℓ 글루코오스, 0.03 g/ℓ 에르고스테롤, 1.32 g/ℓ Tween80, 1% v/v 에탄올, 200 mM MES, pH6.5을 내포하는 YPD)에서 재현탁되고, 그리고 차단되지 않은 벤트 스크루 캡 250mℓ 플라스크로 이전되었다. OD_{600}이 체크되고, 그리고 배양액이 미세호기성 발효를 개시하기 위해 30℃와 75 rpm에 배치되었다. 액체 크로마토그래피 (LC), 가스 크로마토그래피 (GC) 분석 및 OD_{600}을 위한 샘플이 거의 24시간 간격으로 채취되었다. 이들 샘플 (2 mℓ)은 10분 동안 18,000 x g으로 원심분리되고, 그리고 1.5 mℓ의 정화된 상층액이 GC1과 LC1에 의한 분석에 이용되었다.

[0602] 발효는 대략 4의 OD_{600}에서 시작되었다. 세포는 72시간의 미세호기성 발효에 의해 대략 8의 OD_{600}까지 성장하였다. 72시간후, 이소부탄올 역가는 12.3 g/ℓ이고, 그리고 이소부탄올 수율은 이론값의 67.2%이었다. 이소부티레이트 역가와 수율은 낮았다: 0.6 g/ℓ 이소부티레이트가 0.013 g/g 글루코오스의 수율에서 생산되었다. DH2MB의 생산은 검출되지 않았다.

[0603] 실시예 20: 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*)에서 *TMA29* 결실의 효과

[0604] 본 실시예의 목적은 ALS 활성을 포함하는 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 균주에서 *TMA29*의 결실이 감소된 DH2MB 생산을 유발한다는 것을 증명하는 것이다.

[0605] 본 실시예에서 개시된 균주, 플라스미드, 그리고 올리고뉴클레오티드 서열은 각각, 표 61, 62, 그리고 63에서 열거된다.

표 61

[0606] 실시예 20에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO No.	유전형
1947	*ura3-delta2*, 균주 NRRL-Y-7571 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)로부터 유래됨 (E.C. Hansen) van der Walt (1971)
2348	*ura3-delta2 pdc1△::G418R*, P_{Sc_PDC1}:*31COX4 MTS:Bs_alsS*:P_{Sc_FBA1}:*URA3 ura3-delta2*
6403, 6404	*ura3-delta2 pdc1△::G418R*, P_{Sc_PDC1}:*31COX4 MTS:alsS*: P_{Sc_FBA1}:*URA3 ura3-delta2 tma29△::*P_{Sc_TEF1}-*hph*

표 62

[0607] 실시예 20에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	관련된 유전자/용법	유전형
pGV2701	*hph* 단편을 제공하기 위한 SOE PCR을 위해	P_{TEF1}:*hph, CEN, pUC ori, bla*

표 63

[0608] 실시예 20에서 개시된 올리고뉴클레오티드 서열.

프라이머	서열
3498	ATGTCTCAAGGTAGAAGAGCTG (서열 번호: 142)
3137	GGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGTATATCTTCTGAATCAATTGCACCGAC (서열 번호: 143)

3140	CAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGAGAGGTATGATTAATACCAATGTCTTGGG (서열 번호: 144)
3499	TCATTCACCACGGTAAATGTGG (서열 번호: 145)
3138	GTCGGTGCAATTGATTCAGAAGATATACATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCC (서열 번호: 146)
3139	GTATTAATCATACCTCTCTGTACAGAAAAAAAAGAAAAATTTGAAATATAAATAACG (서열 번호: 147)
3501	GAAGGAAATTCCAGTCTCCTAGTTCCTTTGAACAC (서열 번호: 148)
2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG (서열 번호: 149)
3500	CAGAACAATCAATCAACGAACGAACGACCCACCC (서열 번호: 150)
821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG (서열 번호: 151)
3141	AAGGAGATGCTTGGTTTGTAGCAAACACC (서열 번호: 152)

[0609] **균주 작제:** 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*) TMA29 단백질 (서열 번호: 23)을 인코딩하는 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*) *TMA29* 유전자 동족체는 하기와 같이 부모 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*) 균주 GEVO2348로부터 결실되어 균주 GEVO6403과 GEVO6404가 산출되었다.

[0610] 유전체 DNA는 앞서 기술된 바와 같이 GEVO1947로부터 단리되었다. 앞서 기술된 바와 같이 SOE PCR에 의해 GEVO2348의 *TMA29* 좌위 내로 대장균(*E. coli*) *hph* (히그로마이신 내성) 카세트를 통합하는 구조체가 만들어졌다. PCR 단계 #1은 5' *TMA29* 표적화 서열, 3' *TMA29* 표적화 서열, 그리고 *hph* 마커를 산출하는 3가지 반응으로 구성되었다. 5' 표적화 서열은 준비된 GEVO1947 유전체 DNA로부터, 프라이머 oGV3498과 oGV3137로 증폭되었다. 상기 385 bp 단편은 겔 전기영동에 의해 정제되었다. 3' 표적화 서열은 준비된 GEVO1947 유전체 DNA로부터, 프라이머 oGV3140과 oGV3499로 증폭되었다. 상기 473 bp 단편은 겔 정제되었다. P_{TEF1}:*hph*:$T_{CYC1(부분)}$ 카세트는 pGV2701로부터, 프라이머 oGV3138과 oGV3139로 증폭되었다. 1,651 bp 단편은 겔 정제되었다. 최종 SOE PCR 단계는 단계 #1 (5' 표적화 서열/hph 마커/3' 표적화 서열)로부터 이들 3가지 산물을 연결하였다. 반응물은 프라이머 oGV3498과 oGV3499를 이용하여 증폭되었다. 2,414 bp 단편은 겔 정제되고 앞서 기술된 바와 같이 GEVO2348의 형질전환에 이용되었다. 형질전환을 위한 세포를 성장시키는데 이용되는 배지는 YPE이었다. 형질전환 이후에, 150 ㎕의 형질전환 배양액이 0.1 g/ℓ 히그로마이신을 내포하는 YPE 평판 위에 전개되었다. 이들 평판은 30℃에서 배양되고, 그리고 형질전환된 집락은 단일 집락 단리되고, 이후 0.1 g/ℓ 히그로마이신을 내포하는 YPE 평판 상에서 집락 PCR을 위해 패칭되었다.

[0611] 효모 집락 PCR은 앞서 기술된 바와 같이 적절한 3' 통합 연접, 5' 통합 연접, 그리고 *TMA29* 코딩 영역의 결여를 스크리닝하는데 이용되었다. 적절한 3' 통합 연접은 프라이머 oGV3501과 2320을 이용하여 확증되었다. 적절한 5' 통합 연접은 프라이머 oGV3500과 oGV0821을 이용하여 확증되었다. 최종적으로, *TMA29* 내부 코딩 영역의 결실을 스크리닝하기 위해, 프라이머 oGV3500과 oGV3141이 이용되었다.

[0612] **발효:** 교반 플라스크 발효는 *Bs_alsS*를 발현하는 균주에서 *TMA29*의 결실이 감소된 DH2MB의 생산을 유발하는 지를 결정하기 위해, 앞서 기술된 바와 같이 균주 GEVO2348 (*TMA29*), GEVO6403 (tma29△), 그리고 GEVO6404 (*tma29△*) 각각에 대해 삼중으로 수행되었다. *tma29△* 균주의 단일 집락 격리된 형질전환체는 0.1 g/ℓ 히그로마이신을 내포하는 YPE 평판에 패칭되는 반면, 부모 균주는 YPE 평판에 패칭되었다. 이들 패치로부터 세포는 YPE의 3 mℓ 배양액을 접종하는데 이용되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 하룻밤 배양후, 이들 배양액의 OD_{600}은 물에서 1:40 희석함으로써 측정되었다. 250 mℓ 차단된 플라스크에서 0.1의 OD_{600}을 획득하기 위해 적절한 양의 배양액이 50 mℓ의 YPE에 첨가되고 30℃와 250 rpm에서 배양되었다. 24시간 배양후, 이들 배양액의 OD_{600}이 물에서 1:40 희석함으로써 측정되었다. 5의 OD_{600}을 획득하기 위해 8% 글루코오스 및 200 mM MES, pH 6.5를 내포하는 50 mℓ의 YPD에 적절한 양의 배양액이 첨가되었다. 발효 배양액은 차단되지 않은 250 mℓ 플라스크에서 30℃와 75 rpm에서 배양되었다. 배지의 하나의 15 mℓ 분취량 역시 LC4 분석을 위한 블랭크로서 이용을 위해 수집되고 샘플 제출 때까지 4℃에 유지되었다. 72시간후, 1.5 mℓ의 배양액이 이동되고, 그리고 OD_{600}과 LC4 분석을 위해 샘플이 앞서 기술된 바와 같이 준비되었다. 이에 더하여, 효소 검사를 위한 샘플이 4℃에서 5분 동안 3000 x g로 원심분리된 2개의 15 mℓ Falcon 튜브에 80 OD의 적절한 샘플을 이전함으로써 72시간 시점에 수확되었다. 펠릿은 3 mℓ 차가운, 무균수에서 재현탁되고, 그리고 테이블탑 원심분리기 (tabletop centrifuge) 내에 스윙 버킷 로터 (swinging bucket rotor)에서 4℃에서 2분 동안 5000 x g로 원심분리되었다. 물은 진공 흡입기 (vacuum aspirator)에 의해 제거되었다. 코니칼 튜브는 -80℃에서 보관되었다.

[0613] 용해물의 시험관내 ALS 효소적 활성은 앞서 기술된 바와 같이 측정되었다. 표 64에서는 72시간후 균주로부터 용

해물의 평균 시험관내 ALS 효소적 활성을 제시한다. ALS 활성은 GEVO2348 (3.14 단위/mg 용해물의 평균)에서뿐만 아니라 *tma29*△ 균주 GEVO6403와 GEVO6404 (각각, 1.63과 1.58 단위/mg 용해물의 평균) 둘 모두에서 측정가능하다.

[0614] 표 64에서는 또한, 이들 균주에 대한 LC4에 의한 DH2MB와 DHIV 역가를 제시한다. GEVO2348 (*TMA29*) 균주는 0.89 g/ℓ의 평균 DH2MB 역가를 산출하는 반면, DHIV는 검출되지 않았다. DH2MB 역가는 *tma29*△ 균주 GEVO6403과 GEVO6404에서 유의미하게 감소하였는데, 각각 0.16과 0.15 g/ℓ로 측정되었다. ALS 활성이 *tma29*△ 균주에서 감소하긴 하지만, 이것은 결실 균주에서 DH2MB 역가의 >80% 감소를 설명하지 못한다. 가령, GEVO2348의 한 가지 기술적 복제물은 2.5 단위/mg 용해물의 ALS 활성을 나타내고 0.83 g/ℓ DH2MB를 생산하는 반면, *tma29*△ 균주 GEVO6404의 기술적 복제물 중에서 한 가지는 1.9 단위/mg 용해물의 유사한 활성을 갖고 단지 0.16 g/ℓ DH2MB만을 생산하였다.

표 64

[0615] 72시간 발효후, *tma29*△ 균주에서 ALS 활성, DH2MB와 DHIV 역가, 그리고 DH2MB 퍼센트 감소.

균주	*TMA29*	ALS 활성 (U/mg 용해물)	LC4에 의한 DH2MB (g/ℓ)	LC4에 의한 DHIV (g/ℓ)	DH2MB 감소 (%)
GEVO2348	+	3.1 ± 0.5	0.89 ± 0.07	n.d.	
GEVO6403	△	1.6 ± 0.2	0.16 ± 0.02	n.d.	82%
GEVO6404	△	1.6 ± 0.3	0.15 ± 0.01	n.d.	83%

[0616] n.d. = 검출되지 않음

[0617] 실시예 21: 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)에서 *TMA29* 결실의 효과

[0618] 본 실시예의 목적은 ALS 활성을 포함하는 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 균주에서 *TMA29* 의 결실이 감소된 DH2MB 생산을 유발한다는 것을 증명하는 것이다.

[0619] 본 실시예에 개시된 균주, 플라스미드, 그리고 올리고뉴클레오티드 프라이머는 각각, 표 65, 66, 그리고 67에서 열거된다.

표 65

[0620] 실시예 21에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO 번호	유전형
1742	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan*, 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) 균주 ATCC 200826로부터 유래됨 (*Kluyveromyces lactis* (Dombrowski) van der Walt, teleomorph)
4458	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph*
6310, 6311, 6312	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan* [pGV1429]
6313, 6314, 6315	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan* [pGV1645]
6316, 6317	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan* + *Bs_alsS:TRP1*의 무작위 통합
6318, 6319, 6320	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph* [pGV1429]
6321, 6322,6323	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph* [pGV1645]
6324, 6325	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph* + Bs_alsS:TRP1의 무작위 통합

표 66

[0621] 실시예 21에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	관련된 유전자/용법	유전형
pGV1429	*TRP1*을 내포하는 높은 사본 1.6 μ 빈 벡터	*1.6 μ-ori, PMB1 ori, bla, TRP1*
pGV1645	*TRP1*과 *Bs_alsS*를 내포하는 높은 사본 1.6 μ 벡터	*1.6 μ-ori, PMB1 ori, bla, TRP1, Bs_alsS*
pGV1726 (*Ahd*I로 선형화됨)	*TRP1*과 *Bs_alsS*를 내포하는 벡터	*PMB1 ori, bla, TRP1, Bs_alsS*

표 67

[0622] 실시예 21에서 개시된 올리고뉴클레오티드 서열.

프라이머	서열
oGV3065	AAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGCGTTGATAAGGGCAACAACGTTAGTATC (서열 번호: 153)
oGV3066	ATACTAACGTTGTTGCCCTTATCAACGCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTAC (서열 번호: 154)
oGV3067	TCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGTTACCCAAGCTGTTTTGCCTATTTTCAAAGC (서열 번호: 155)
oGV3068	GCTTTGAAAATAGGCAAAACAGCTTGGGTAACTGTACAGAAAAAAAAGAAAAATTTG (서열 번호: 156)
oGV3103	ACCGGTGCTTCTGCAGGTATTG (서열 번호: 157)
oGV3106	ATGCTTGGTTGGAAGCAAATAC (서열 번호: 158)
oGV1321	AATCATATCGAACACGATGC (서열 번호: 159)
oGV1324	AGCTGGTCTGGTGATTCTAC (서열 번호: 160)

[0623] **균주 작제:** 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) TMA29 단백질 (서열 번호: 7)을 인코딩하는 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) *TMA29* 유전자 동족체는 하기와 같이 부모 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) 균주 GEVO1742로부터 결실되어 실시예 18에서 기술된 바와 같이 균주 GEVO4458가 산출되었다.

[0624] 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) 균주 GEVO1742 (부모, *TMA29*) 및 GEVO4458 (*tma29*△)은 앞서 기술된 바와 같이 플라스미드 pGV1429 (빈 대조 벡터), pGV1645 (*Bs_alsS*를 발현), 또는 *Ahd*I 선형화된 플라스미드 pGV1726 (*Bs_alsS*의 무작위 통합을 유발)으로 형질전환되고, 400 ㎕의 1.25x SC-HWLU에서 재현탁되고, 그리고 형질전환된 세포를 선별하기 위해 SCD-W 평판 위에 전개되었다. GEVO1742와 *tma29*△ 균주 GEVO4458 둘 모두에서 *Ahd*I 선형화된 pGV1726의 무작위 통합은 앞서 기술된 바와 같이 내부 *Bs_alsS* 코딩 영역에 특이적인 프라이머 oGV1321과 oGV1324를 이용한 집락 PCR에 의해 확증되었다. 균주 GEVO6316, GEVO6317, GEVO6324, 그리고 GEVO6325는 유전자 통합에 양성이었다.

[0625] **발효:** 교반 플라스크 발효는 *Bs_alsS*를 발현하는 균주에서 *TMA29*의 결실이 감소된 DH2MB의 생산을 유발하는 지를 결정하기 위해 앞서 기술된 바와 같이 다양한 GEVO 균주 (표 65)에서 수행되었다. 단일 집락 단리된 형질전환체는 SCD-W 평판에 패칭되고, 비-형질전환된 부모는 YPD 상에 패칭되었다. 이들 패치로부터 세포는 YPD (부모 균주 및 통합된 균주) 또는 3 ㎖ SCD-W에서 3 ㎖ 배양액을 접종하는데 이용되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 하룻밤동안 배양후, 이들 배양액의 OD_{600}이 물에서 1:40 희석함으로써 측정되었다. 250 ㎖ 차단된 플라스크에서 0.1의 OD_{600}을 획득하기 위해 적절한 양의 배양액이 5% 글루코오스를 내포하는 50 ㎖의 YPD 또는 5% 글루코오스를 내포하는 SCD-W에 첨가되고 30℃와 250 rpm에서 배양되었다. 24시간 배양후, 이들 배양액의 OD_{600}이 물에서 1:40 희석함으로써 측정되었다. 5의 OD_{600}을 획득하기 위해 적절한 양의 배양액이 8% 글루코오스, 200 mM MES pH 6.5를 내포하는 50 ㎖의 YPD 또는 8% 글루코오스를 내포하는 SCD-W에 첨가되었다. 250 OD가 발효를 시작하는데 유효하지 않으면, 전체 50 ㎖ 배양액이 이용되었다. 발효 배양액은 차단되지 않은 250 ㎖ 플라스크에서 30℃와 75 rpm에서 배양되었다. 15 ㎖ 코니칼 튜브 역시 앞서 기술된 바와 같이 LC1과 LC4 분석을 위한 배지 블랭크 (media blank)로서 수집되고 샘플 제출 때까지 4℃에 유지되었다. 72시간 시점에, 1.5 ㎖의 배양액이 계산되었다. OD_{600} 값이 측정되고, 그리고 10분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하고 분석되는 1 ㎖

의 상층액을 이동함으로써 LC1과 LC4 분석을 위한 샘플이 준비되었다. 이에 더하여, 효소 검사를 위한 샘플이 72시간 시점에서 수확되었다. 60 OD의 적절한 샘플이 15 ㎖ Falcon 튜브 내로 이전되고 4℃에서 5분 동안 3000 X로 원심분리되었다. 펠릿은 3 ㎖ 차가운, 무균수에서 재현탁되고, 그리고 3 x 20 OD 복제물을 만들기 위해 3개의 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브 (각각 1 ㎖)로 이전되었다. 이들 튜브는 테이블탑 원심분리기 (tabletop centrifuge) 내에 스윙 버킷 로터 (swinging bucket rotor)에서 4℃에서 2분 동안 5000 x g로 원심분리되었다. 물은 진공 흡입기 (vacuum aspirator)에 의해 제거되었다. 에펜도르프 튜브는 -80℃에서 보관되었다.

[0626] 용해물의 시험관내 ALS 효소적 활성은 앞서 기술된 바와 같이 측정되었다. 표 68에서는 72시간후 균주로부터 용해물의 평균 시험관내 ALS 효소적 활성을 제시한다. ALS 활성은 *Bs_alsS*가 무작위로 통합된 균주 (GEVO6316, GEVO6317, GEVO6324, 6325) 또는 *Bs_alsS*가 플라스미드로부터 발현된 균주 (GEVO6313-6315, GEVO6321-6323)에서만 측정가능하였다. *Bs_alsS*가 통합된 균주에서 ALS 활성은 플라스미드로부터 *Bs_alsS*를 발현하는 균주에서보다 낮았다. 하지만, *Bs_alsS*가 통합된 *TMA29* 균주 (GEVO6316, GEVO6317)에서 0.25 단위/mg 용해물의 활성은 합동된 DHIV + DH2MB의 역가 1.06 g/ℓ를 산출하는데 여전히 충분하였다.

[0627] 표 68에서는 72시간 발효후 다양한 균주에 대한, LC1 분석에 기초된 합동된 DHIV + DH2MB 역가를 제시한다. 균주 GEVO1742 (부모, *TMA29*) 균주는 *Bs_alsS*가 무작위로 통합 (1.06 g/ℓ)되거나, 또는 플라스미드 pGV1645로부터 발현 (0.45 g/ℓ)될 때에만 측정가능한 합동된 DHIV + DH2MB 역가를 산출하였다. 이들 DHIV + DH2MB 역가는 무작위 통합 (GEVO6324, GEVO6325) 또는 플라스미드 (GEVO6321-6323)에 의해 *Bs_alsS*를 발현할 때 *tma29*△ 균주 GEVO4458에서 소멸되었다. LC4 분석은 합동된 DHIV + DH2MB 역가 중에서 대부분이 실제로는 DH2MB라는 것을 지시하였다.

표 68

[0628] ALS 활성, 합동된 DHIV + DH2MB 역가, 그리고 합동된 DHIV + DH2MB 역가 중에서 DH2MB의 백분율.

균주	부모 균주	통합된 플라스미드 (I), 플라스미드 (P), 또는 대조1 (C)	TMA29	ALS	ALS 활성 (U/mg 용해물)	LC1에 의한 DHIV + DH2MB (g/ℓ)	LC4에 의한 DH2MB + DHIV에서 DH2MB %
GEVO1742		없음	+	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n/a
GEVO6316, 6317	GEVO1742	pGV1726 (I)	+	+	0.25 ± 0.06	1.06 ± 0.23	80.0 ± 3.7
GEVO4458	GEVO1742	없음	△	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n/a
GEVO6324, 6325	GEVO4458	pGV1726 (I)	△	+	0.86 ± 0.28	0.00 ± 0.00	n/a
GEVO6310-6312	GEVO1742	pGV1429 (C)	+	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n/a
GEVO6313-6315	GEVO1742	pGV1645 (P)	+	+	6.12 ± 1.09	0.45 ± 0.02	87.2 ± 2.3
GEVO6318-6320	GEVO4458	pGV1429 (C)	△	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n/a
GEVO6321-6323	GEVO4458	pGV1645 (P)	△	+	1.23 ± 0.45	0.00 ± 0.00	n/a

[0629] n/a= 적용할 수 없음, 샘플이 LC1에 의한 검출가능한 피크를 갖지 않고, 따라서 LC4에 의해 분석되지 않았다.

[0630] 실시예 22: 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*I. orientalis*)에서 *TMA29* 결실의 효과

[0631] 하기 실시예에서는 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*I. orientalis*) *TMA29* 유전자의 결실이 감소된 TMA29 활성을 유발하고, 또한 ALS 활성을 포함하는 균주에서 DH2MB 생산의 감소를 유발한다는 것을 예증한다.

표 69

[0632] 실시예 22에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO #	관련 유전형
GEVO4450	*ura3△/ura3△* *pdc1-1△::Ll_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS /* *pdc1-2△::Ll_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS* *TMA29/TMA29*
GEVO12425	*ura3△/ura3△* *pdc1-1△:: Ll_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1} : Bs_alsS pdc1-2△:: Ll_kivD: loxP* *TMA29/ TMA29*
GEVO6155	*ura3△/ura3△* *pdc1-1△::Ll_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS* *pdc1-2△::Ll_kivD: loxP* *TMA29/* *tma29△::P_{PDC}:Ll_adhA^{RE1}: P_{TDH3}: Ec_ilvC$^{P2D1-A1}$: loxP: URA3: loxP: P_{ENO1}: Ll_ilvD*
GEVO6158	*ura3△/ ura3△* *pdc1-1△:: Ll_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS* *pdc1-2△:: Ll_kivD: loxP* *tma29△:: P_{PDC}: Ll_adhA^{RE1}: P_{TDH3}: Ec_ilvC$^{P2D1-A1}$_coCB: loxP: URA3: loxP: P_{ENO1}: Ll_ilvD /* *tma29△:: P_{PDC}: Ll_adhA^{RE1}: P_{TDH3}:Ec_ilvC$^{P2D1-A1}$: loxP: URA3: loxP: P_{ENO1}: Ll_ilvD*
GEVO12473	*ura3△/ ura3△* *pdc1-1△:: Ll_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1} : Bs_alsS* *pdc1-2△:: Ll_kivD: loxP* *tma29△:: loxP: URA3: loxP/* *tma29△::loxP: MEL5: loxP*
GEVO12474	*ura3△/ura3△* *pdc1-1△:: Ll_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS* *pdc1-2△:: Ll_kivD: loxP* *tma29△:: loxP: URA3: loxP/* *tma29△:: loxP: MEL5: loxP*

[0633] **균주 작제:** *TMA29* 유전자에 대해 야생형 (GEVO4450, GEVO12425)이거나, *TMA29* 유전자의 1개 사본의 결실에 대해 이형접합체 (GEVO6155)이거나, 또는 *TMA29* 유전자가 완전하게 결실된 (GEVO6158, GEVO12473, GEVO12474), PTA-6658로부터 유래된 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 균주가 표준 효모 유전학과 분자생물학 방법을 이용하여 작제되었다. 이들 균주는 또한, 바실루스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) *alsS* 유전자의 1개 사본을 보유한다.

[0634] **TMA29 효소 검사:** TMA29 시험관내 검사를 위해, 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*I. orientalis*) 균주 GEVO4450 (*TMA29/TMA29*), GEVO6155 (*tma29△/TMA29*), 그리고 GEVO6158 (완전한 *tma29△/tma29△*)는 새로운 YPD 평판으로부터 세포로, 125 ml 차단된 플라스크에서 25 ml YPD를 접종함으로써 성장되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 성장되었다. 이들 배양액은 250 ml 차단된 플라스크에서 50 ml의 YPD를 0.05의 OD_{600}까지 접종하는데 이용되었다. 배양액은 대략 5-8의 OD_{600}에 도달할 때 (후기 로그 기)까지 30℃와 250 rpm에서 성장되었다. 세포는 50 ml Falcon 튜브에서 80 OD의 세포를 수집하고 3분 동안 2,700 x g로 원심분리함으로써 수확되었다. 상층액의 제거후, 세포는 얼음 위에 배치되고 5 ml 차가운 물로 세척되었다. 세포는 3분 동안 2,700 x g로 원심분리되고, 그리고 물이 제거되었다. 세포 펠릿은 이용 때까지 -80℃에 보관되었다. 추가적으로, 동일한 균주가 새로운 평판으로부터 3 ml의 YPD를 접종하고 30℃와 250 rpm에서 8시간 동안 성장시킴으로써 성장되었다. 배양액은

250 ml 차단된 플라스크에서 50 ml의 YPD를 0.01의 OD_{600}까지 접종하는데 이용되고, 그리고 이들 배양액은 대략 4-8의 OD_{600}에 도달할 때까지 30℃와 250 rpm에서 성장되었다. 상기 배양액은 적절한 양의 배양액을 50 ml Falcon 튜브에서 3분 동안 2,700 x g로 원심분리하고, 이후 세포 펠릿을 50 ml의 지정된 배지에서 재현탁함으로써, 8% 글루코오스, 200 mM MES pH 6.5를 내포하는 50 ml의 YPD를 4-5의 최종 OD_{600}까지 접종하는데 이용되었다. 세포는 250 ml 비-차단된 플라스크에서 30℃와 75 rpm에서 48시간 동안 배양되었다 (발효 기). 80개의 OD 세포 펠릿이 앞서 기술된 바와 같이 수확되었다. 세포는 재현탁되고, 용해되고, 그리고 앞서 기술된 바와 같이 TMA29 활성에 대해 조사되었다.

[0635] 표 70에서는 U/mg 총 단백질에서 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*I. orientalis*) 균주 GEVO4450, 6155, 그리고 6158의 용해물의 특정한 TMA29 활성을 제시한다. 특정한 TMA29 활성은 GEVO4450 (*TMA29/TMA29*)와 비교하여 GEVO6155 (*tma29/TMA29*) 및 GEVO6158 (완전한 *tma29* 결실)에서 감소한다.

표 70

[0636] 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*I. orientalis*) 균주에서 TMA29 활성.

균주	TMA29 활성 후기 로그 기 [U/mg 총 단백질]	TMA29 활성 48시간 발효 기 [U/mg 총 단백질]
GEVO4450	0.0048 ± .0010	.0027 ± .0003
GEVO6155	0.0025 ± .0008	.0010 ± .0001
GEVO6158	0.0023 ± .0003	.0010 ± .0003

[0637] **발효:** 발효를 위해, 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*I. orientalis*) 균주 GEVO12425 (*TMA29/TMA29*), GEVO12473 (*tma29/tma29*), 그리고 GEVO12474 (*tma29/tma29*)는 새로운 YPD 평판으로부터 세포로, 125 ml 차단된 플라스크에서 12 ml YPD를 접종함으로써 성장되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 성장되었다. 12 ml 하룻밤 배양액의 OD_{600}이 측정되고, 그리고 적절한 양이 250 ml 차단된 플라스크에서 5% 글루코오스를 내포하는 50 ml YPD를 0.1의 OD_{600}까지 접종하는데 이용되었다. 플라스크는 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 50 ml 배양액의 OD_{600}이 측정되었다. 적절한 양의 배양액은 50 ml Falcon 튜브에서 25℃에서 5분 동안 2700 rcf로 원심분리되고, 그리고 상층액이 제거되었다. 각각 50 ml 배양액으로부터 세포는 8% 글루코오스, 200 mM MES, pH 6.5를 내포하는 50 ml YPD에서 재현탁되었다. 배양액은 이후, 250 ml 차단되지 않은 스크루-캡 플라스크로 이전되고 30℃와 75 rpm에서 배양되었다. 72시간 시점에, 각 플라스크로부터 샘플이 이동되고, OD_{600}이 측정되고, 그리고 1 ml 샘플을 에펜도르프 튜브로 이전하고 25℃에서 10초 동안 18,000 x g로 원심분리함으로써 LC4 분석을 위한 샘플이 준비되었다. 원심분리후, 0.75 ml의 상층액이 마이크로역가 평판으로 이전되고 LC4에 의해 분석되었다. 또한, 72시간 시점에 효소 검사를 위한 세포는 앞서 기술된 바와 같이 80 OD를 15 ml Falcon 튜브로 이전함으로써 수집되었다. ALS 검사를 위한 세포는 재현탁되고, 용해되고, 그리고 앞서 기술된 바와 같이 조사되었다.

[0638] 표 71에서는 72시간 시점에 GEVO12425, 12473, 그리고 12474에 대한 DH2MB 생산 및 ALS 활성을 제시한다. DH2MB 역가는 LC4에 의해 측정되었다. ALS 활성은 모든 균주에서 유사하였다.

표 71

[0639] 72시간 발효에서 아이싸첸키아 오리엔탈리스(*I. orientalis*) 균주에서 DH2MB 생산 및 ALS 활성.

균주	LC4에 의한 DH2MB [g/ℓ]	ALS 활성 [U/mg]
GEVO12425	1.87 ± 0.60	4.6 ± 1.1
GEVO12473	0.08 ± 0.01	4.0 ± 0.1
GEVO12474	0.07 ± 0.00	3.1 ± 1.1

[0640] 실시예 23: 시조사카로미세스 폼베(*S. pombe*)에서 TMA29 결실의 효과

[0641] 하기 실시예에서는 (*S*)-2-아세토락테이트 감소 활성이 시조사카로미세스 폼베(*S. pombe*) *TMA29* 균주와 비교하여 시조사카로미세스 폼베(*S. pombe*) *tma29*△ 균주에서 유의미하게 감소한다는 것을 예증한다.

표 72

[0642] 실시예 23에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO #	유전형	출처
GEVO6444	h^+ *ade6-M216, ura4-D18, leu1-32*	Bioneer 균주 BG_0000H8
GEVO6445	*h+ SPAC521.03*△*::kanMX4, ade6-M216, ura4-D18, leu1-32* *TMA29* 동족체 (서열 번호: 22) 결실됨	Bioneer 균주 BG_1772H

[0643] 본래의 *TMA29* 유전자 (서열 번호: 161)를 갖는 효모 균주 GEVO6444 및 *TMA29* 유전자가 결실된 GEVO6445는 125 ㎖ 차단된 플라스크 내에 12 ㎖ YPD에서 하룻밤동안 250 rpm과 30℃에서 성장되었다. 익일에, OD_{600} 값이 측정되고, 그리고 대략 0.3의 OD_{600}에서 5% 글루코오스를 내포하는 50 ㎖ YPD에서 기술적 삼중 배양이 시작되었다. 배양액은 하루 내내 250 rpm과 30℃에서 성장되었다. 하루의 종결 시점에서, 배양액은 5% 글루코오스를 내포하는 YPD에서 대략 0.15의 OD_{600}까지 희석되고 250 rpm과 30℃에서 하룻밤동안 배양되었다. 세포는 4 내지 6의 OD_{600}에 도달 시에 수확되었다. 효소 검사를 위한 펠릿을 수확하기 위해, 80 OD의 적절한 샘플이 2개의 15 ㎖ Falcon 튜브 (삼중 샘플을 위해)로 이전되고 4℃에서 5분 동안 3000 x g로 원심분리되었다. 펠릿은 3 ㎖ 차가운 무균수에서 재현탁되고 테이블탑 원심분리기 내에 스윙 버킷 로터에서 4℃에서 2분 동안 5000 X g로 원심분리되었다. 물은 진공 흡입기에 의해 제거되었다. 펠릿은 -80℃에서 보관되었다. 용해물이 준비되고, 그리고 TMA29 효소 검사가 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다.

[0644] (*S*)-2-아세토락테이트의 환원에 대한 시조사카로미세스 폼베(*S. pombe*) GEVO6444 용해물의 비활성은 0.018 ± 0.002 U/mg 총 단백질이었다. *tma29*△ 균주 GEVO6445의 용해물은 0.001 ± 0.002 U/mg 총 단백질의 비활성을 가졌다.

[0645] 실시예 24: 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*)에서 *ALD6* 결실의 효과

[0646] 본 실시예의 목적은 클루이베로미세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 균주에서 *ALD6*의 결실이 감소된 이소부티르알데히드 산화 활성과 이소부티레이트 생산을 유발한다는 것을 증명하는 것이다.

[0647] 본 실시예에서 개시된 균주, 플라스미드, 그리고 올리고뉴클레오티드 프라이머는 각각, 표 73, 74, 그리고 75에서 열거된다.

표 73

[0648] 실시예 24에서 개시된 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*) 균주의 유전형.

GEVO 번호	유전형
GEVO1947	*ura3-delta2*
GEVO6264, GEVO6265	ura3-delta2 ald6△::P_{TEF1}-*hph*
GEVO2087	*ura3-delta2, PDC1,* P_{Sc_PDC1}*:31COX4 MTS:alsS:*P_{Sc_TDH3}*:kivD co HMI1 MTS:*P_{Sc_ADH1}*:ADH7:*P_{Sc_FBA1}*:URA3*
GEVO6270 GEVO6271	*ura3-delta2, PDC1,* P_{Sc_PDC1}*:31COX4 MTS:alsS:*P_{Sc_TDH3}*:kivD co HMI1 MTS:*P_{Sc_ADH1}*:ADH7:*P_{Sc_FBA1}*:URA3 ald6*△*::*P_{TEF1}*-hph*

표 74

[0649] 실시예 24에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	관련된 유전자/용법	유전형
pGV2701	*hph* 단편을 제공하기 위한 SOE PCR을 위해	P_{TEF1}:*hph*, *CEN*, *pUC ori*, *bla*

표 75

[0650] 실시예 24에서 개시된 올리고뉴클레오티드 서열.

프라이머	서열
oGV3490	GTCAAGATTGTTGAACAAAAGCC (서열 번호: 162)
oGV3492	GAGTAAAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGGTTTAGTGGGGTTGGGGAAGCTGGC (서열 번호: 163)
oGV3493	CAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGGCCAACATCAAGAAGACTATTCCAAACTTGGTC (서열 번호: 164)
oGV3495	TGTATGATTCGAAAGCTTCTTCACC (서열 번호: 165)
oGV3491	GCCAGCTTCCCCAACCCCACTAAACCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTC (서열 번호: 166)
oGV3494	GACCAAGTTTGGAATAGTCTTCTTGATGTTGGCCTGTACAGAAAAAAAAGAAAAATTTG (서열 번호: 167)
oGV3497	TTACTCGAGCTTGATTCTGAC (서열 번호: 168)
oGV2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG (서열 번호: 169)
oGV3496	ATGTCTTCATCACTAGCAGAG (서열 번호: 170)
oGV0821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG (서열 번호: 171)
oGV0706	GGTTGGTATTCCAGCTGGTGTCG (서열 번호: 172)

[0651] **균주 작제:** 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*) ALD6 단백질 (서열 번호: 39)을 인코딩하는 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*) *ALD6* 유전자 동족체는 하기와 같이 부모 클루이베로미세스 막시아누스(*K. marxianus*) 균주 GEVO1947과 GEVO2087로부터 결실되어 각각, 균주 GEVO6264/GEVO6265, 그리고 GEVO6270/GEVO6271이 산출되었다.

[0652] 유전체 DNA는 앞서 기술된 바와 같이 GEVO1947로부터 단리되었다. 앞서 기술된 바와 같이 SOE PCR에 의해, 대장균(*E. coli*) *hph* (히그로마이신 내성) 카세트를 GEVO1947과 GEVO2087의 *ALD6* 좌위 내로 통합하기 위한 구조체가 만들어졌다. PCR 단계 #1은 3가지 반응물: 5' *ALD6* 표적화 서열, 3' *ALD6* 표적화 서열, 그리고 *hph* 마커로 구성되었다. 5' 표적화 서열은 준비된 GEVO1947 유전체 DNA로부터, 프라이머 oGV3490과 oGV3492로 증폭되었다. 상기 635 bp 단편은 겔 전기영동에 의해 정제되었다. 3' 표적화 서열은 준비된 GEVO1947 유전체 DNA로부터, 프라이머 oGV3493과 oGV3495로 증폭되었다. 상기 645 bp 단편은 겔 정제되었다. P_{TEF1}:*hph*:$T_{CYC1(부분)}$ 카세트는 pGV2701로부터, 프라이머 oGV3491과 oGV3494로 증폭되었다. 1,665 bp 단편은 겔 정제되었다. 최종 SOE PCR 단계는 단계 #1 (5' *ALD6* 표적화 서열/hph 마커/3' *ALD6* 표적화 서열)로부터 이들 3가지 산물을 연결하였다. 반응물은 프라이머 oGV3490과 oGV3495를 이용하여 증폭되었다. 2,826 bp 단편은 겔 정제되고 앞서 기술된 바와 같이 GEVO1947과 GEVO2087의 형질전환에 이용되었다. 형질전환을 위한 세포를 성장시키는데 이용되는 배지는 YPD이었다. 형질전환 이후에, 150 ㎕의 각 형질전환 배양액이 0.2 g/ℓ 히그로마이신으로 보충된 YPD 평판 위에 전개되었다. 이들 평판은 30℃에서 배양되었다. 형질전환된 집락은 최초 집락 PCR 스크리닝을 위해 패칭되고, 이후 단일 집락 단리되고 0.2 g/ℓ 히그로마이신으로 보충된 YPD 평판 상에 재패칭되었다.

[0653] 효모 집락 PCR은 앞서 기술된 바와 같이 적절한 3' 통합 연접, 5' 통합 연접, 그리고 *ALD6* 코딩 영역의 결여를 스크리닝하는데 이용되었다. 적절한 3' 통합 연접은 프라이머 oGV3497과 oGV2320을 이용하여 확증되었다. 적절한 5' 통합 연접은 프라이머 oGV3496과 oGV0821을 이용하여 확증되었다. 최종적으로, *ALD6* 내부 코딩 영역의 결실은 프라이머 oGV3495와 oGV0706을 이용하여 확증되었다.

[0654] **발효:** 2 g/ℓ 이소부티르알데히드로 교반 플라스크 발효는 앞서 기술된 바와 같이, *ALD6* 균주 GEVO6264/GEVO6265 및 GEVO6270/GEVO6271, 그리고 그들의 상응하는 *ALD6* 부모 균주 GEVO1947과 GEVO2087의 기술적 삼중을 이용하여 수행되었다.

[0655] 확증된 *ALD6*△ 균주의 단일 집락 격리된 형질전환체는 0.2 g/ℓ 히그로마이신으로 보충된 YPD 평판에 패칭되고, 그리고 부모 균주는 YPD 평판에 패칭되었다. 이들 패치로부터 세포는 YPD의 기술적 삼중 3 ml 배양액을 접종하는데 이용되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 하룻밤 배양후, 이들 배양액의 OD_{600}은 물에서 1:40 희석함으로써 측정되었다. 250 ml 차단된 플라스크에서 0.1의 OD_{600}을 획득하기 위해 적절한 양의 배양액이 5% 글루코오스를 내포하는 50 ml의 YPD에 첨가되고 30℃와 250 rpm에서 배양되었다. 24시간 배양후, 이들 배양액의 OD_{600}이 물에서 1:40 희석함으로써 측정되었다. 5의 OD_{600}을 획득하기 위해 8% 글루코오스, 200 mM MES, pH 6.5 및 2 g/ℓ 이소부티르알데히드를 내포하는 50 ml의 YPD에 적절한 양의 배양액이 첨가되었다. 발효 배양액은 차단되지 않은 250 ml 플라스크에서 30℃와 75 rpm에서 배양되었다. 이용되지 않는 배지는 LC 분석을 위한 배지 블랭크 (medium blank)로서 수집되고 샘플 제출 때까지 4℃에서 유지되었다. 48시간 시점에, 각 플라스크로부터 샘플이 하기와 같이 채취되었다. 1.5 ml의 배양액이 1.5 ml 에펜도르프 튜브로 이동되었다. OD_{600} 값이 측정되고, 그리고 샘플이 LC1 분석에 대비되었다. 각 튜브는 10분 동안 14,000 rpm으로 원심분리되고, 그리고 상층액이 LC1에 의해 분석되었다. 이에 더하여, 효소 검사를 위한 샘플이 48시간후 수확되었다. 80 OD의 적절한 샘플이 2개의 15 ml Falcon 튜브 (중복 샘플을 위해)로 이전되고 4℃에서 5분 동안 3000 x g로 원심분리되었다. 펠릿은 3 ml 차가운 무균수에서 재현탁되고 스윙 버킷 로터에서 4℃에서 2분 동안 5000 X g로 원심분리되었다. 물은 진공 흡입기 (vacuum aspirator)에 의해 제거되었다. 코니칼 튜브는 -80℃에서 보관되었다.

[0656] 표 76에서는 48시간 발효후 이소부티레이트 역가를 제시한다. *ALD6* 부모 균주 GEVO1947은 각각, 0.19 g/ℓ와 0.013 g/ℓ/OD의 평균 총 이소부티레이트 역가 및 평균 특정 이소부티레이트 역가를 산출하였다. 이들 총 이소부티레이트 역가와 특정 이소부티레이트 역가는 *ald6*△ *균주 GEVO6264* (각각, 0.06 g/ℓ와 0.004 g/ℓ/OD), 그리고 또한, *ald6*△ 균주 GEVO6265 (각각, 0.05 g/ℓ와 0.003 g/ℓ/OD)에서 유의미하게 감소하였다. *ALD6* 부모 균주 GEVO2087은 각각, 0.15 g/ℓ와 0.008 g/ℓ/OD의 총 이소부티레이트 역가 및 특정 이소부티레이트 역가를 산출하였다. 총 이소부티레이트 역가 및 특정 이소부티레이트 역가는 *ald6*△ 균주 GEVO6270 (0.05 g/ℓ와 0.003 g/ℓ/OD), 그리고 또한, *ald6*△ 균주 GEVO6271 (각각, 0.08 g/ℓ와 0.005 g/ℓ/OD)에서 유미하게 감소하였다.

표 76

ALD6 부모 균주 및 상기 *ALD6* 부모 균주로부터 유래된 *ald6*△ 균주의 이소부티레이트 생산.

균주	부모 균주	ALD6	이소부티르알데히드 공급 발효 (48 hr)	
			이소부티레이트 역가 (g/ℓ)	이소부티레이트 감소 (%)
GEVO1947		+	0.19 ± 0.05	
GEVO6264	GEVO1947	-	0.06 ± 0.02	68%
GEVO6265	GEVO1947	-	0.05 ± 0.02	74%
GEVO2087		+	0.15 ± 0.03	
GEVO6270	GEVO2087	-	0.05 ± 0.03	67%
GEVO6271	GEVO2087	-	0.08 ± 0.02	47%

[0657]

[0658] 실시예 25: 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*)에서 *ALD6* 결실의 효과

[0659] 본 실시예의 목적은 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) 균주에서 *ALD6*의 결실이 감소된 이소부티르알데히드 산화 활성과 이소부티레이트 생산을 유발한다는 것을 증명하는 것이다.

[0660] 본 실시예에서 개시된 균주, 플라스미드, 그리고 올리고뉴클레오티드 프라이머는 각각, 표 77, 78과 79에 열거

된다.

표 77

[0661] 실시예 25에서 개시된 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) 균주의 유전형.

GEVO 번호	유전형
GEVO1287	*MATa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8* [pKD1], 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) (Dombrowski) van der Walt, teleomorph, ATCC 200826
GEVO6242	*MATa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8* [pKD1] *ald6 △::P_{TEF1}-hph*
GEVO1830	*MATa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8* [pKD1] *pdc1::kan:Ec_ilvC_△N:Ec_ilvD△N_coK1::Sc_LEU2 통합됨} {Ll_kivD;Sc_Adh7:Km_URA3 무작위로 통합됨} {P_{Sc_CUP1-1}:Bs_alsS:TRP1 무작위 통합됨}*
GEVO6244, GEVO6245	*MATa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8* [pKD1] pdc1::kan:Ec_ilvC_△N:Ec_ilvD△N_coK1::Sc_LEU2 통합됨} {Ll_kivD;Sc_Adh7:Km_URA3 통합됨} {P_{Sc_CUP1-1}:Bs_alsS:TRP1 무작위 통합됨} *ald6△::P_{TEF1}-hph*

표 78

[0662] 실시예 25에서 개시된 플라스미드.

플라스미드 명칭	유전형
pGV2701	*P_{TEF1}:hph, CEN, pUC ori, bla*

표 79

[0663] 실시예 25에서 개시된 올리고뉴클레오티드 서열.

프라이머	서열
oGV3502	GAAACACAGTGGATTAGTGCTGTC (서열 번호: 173)
oGV3504	GAAGAGTAAAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGCTCTTTGTAATTGTTGTTGGTG (서열 번호: 174)
oGV3505	CAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAAACAGAGTCCATCCGTTTGAAACTGATTGCATGTC (서열 번호: 175)
oGV3507	TCAAATTCTATTATCGCGCGGG (서열 번호: 176)
oGV3503	CACCAACAACAATTACAAAGAGCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTC (서열 번호: 177)
oGV3506	GACATGCAATCAGTTTCAAACGGATGGACTCTGTTTGTACAGAAAAAAAAGAAAAATTTG (서열 번호: 178)
oGV3509	CTCCTCCGTTGCAGAACAAGGCTTTG (서열 번호: 179)
oGV2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG (서열 번호: 180)
oGV3508	CGGTGTTAAGTGCCAGAAATTGGTTG (서열 번호: 181)
oGV0821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG (서열 번호: 182)
oGV3510	CGGCGTACTCGACGTCTTGAGAAGTAG (서열 번호: 183)

[0664] **균주 작제:** 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) ALD6 단백질 (서열 번호: 29)을 인코딩하는 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) *ALD6* 유전자 동족체는 하기와 같이 부모 클루이베로미세스 락티스(*K. lactis*) 균주 GEVO1287과 GEVO1830으로부터 결실되어 각각, 균주 GEVO6242와 GEVO6244/GEVO6245가 산출되었다.

[0665] 유전체 DNA는 앞서 기술된 바와 같이 GEVO1287로부터 단리되었다. 앞서 기술된 바와 같이 SOE PCR에 의해, 대장균(*E. coli*) *hph* (히그로마이신 내성) 카세트를 GEVO1287과 GEVO1830의 *ALD6* 좌위 내로 통합하기 위한 구조체가 만들어졌다. PCR 단계 #1은 3가지 반응물: 5' *ALD6* 표적화 서열, 3' *ALD6* 표적화 서열, 그리고 *hph* 마커로

구성되었다. 5' 표적화 서열은 준비된 GEVO1987 유전체 DNA로부터, 프라이머 oGV3502와 oGV3504로 증폭되었다. 상기 639 bp 단편은 겔 전기영동에 의해 정제되었다. 3' 표적화 서열은 준비된 GEVO1287 유전체 DNA로부터, 프라이머 oGV3505와 oGV3507로 증폭되었다. 상기 628 bp 단편은 겔 정제되었다. P_{TEF1}:*hph*:$T_{CYC1(부분)}$ 카세트는 pGV2701로부터, 프라이머 oGV3503과 oGV3506으로 증폭되었다. 1,663 bp 단편은 겔 정제되었다. 최종 SOE PCR 단계는 단계 #1 (5' 표적화 서열/hph 마커/3' 표적화 서열)로부터 이들 3가지 산물을 연결하였다. 반응물은 프라이머 oGV3502와 oGV3507을 이용하여 증폭되었다. 2,810 bp 단편은 겔 정제되고 앞서 기술된 바와 같이 GEVO1287과 GEVO1830의 형질전환에 이용되었다. 집락은 0.1 g/ℓ 히그로마이신으로 보충된 YPD 평판 상에서 히그로마이신 내성에 대해 선별되었다. 효모 집락 PCR은 앞서 기술된 바와 같이 적절한 3' 통합 연접, 5' 통합 연접, 그리고 *ALD6* 코딩 영역의 결여를 스크리닝하는데 이용되었다. 적절한 3' 통합 연접은 프라이머 oGV3509와 oGV2320을 이용하여 확증되었다. 적절한 5' 통합 연접은 프라이머 oGV3508과 oGV0821을 이용하여 확증되었다. 최종적으로, *ALD6* 내부 코딩 영역의 결실은 프라이머 oGV3508과 oGV3510을 이용하여 확증되었다.

[0666] **발효:** 배지에서 2 g/ℓ 이소부티르알데히드로 첫 번째 교반 플라스크 발효는 *ALD6* 균주 GEVO6242 및 *ALD6* 야생형 부모 균주 GEVO1287의 기술적 삼중을 이용하여 수행되었다. 확증된 *ALD6*△ 결실 균주의 단일 집락 격리된 형질전환체는 0.1 g/ℓ 히그로마이신으로 보충된 YPD 평판에 패칭되고, 그리고 부모 균주는 YPD 평판에 패칭되었다. 이들 패치로부터 세포는 YPD의 기술적 삼중 3 mℓ 배양액을 접종하는데 이용되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 하룻밤 배양후, 이들 배양액의 OD_{600}은 물에서 1:40 희석함으로써 측정되었다. 250 mℓ 차단된 플라스크에서 0.1의 OD_{600}을 획득하기 위해 적절한 양의 배양액이 5% 글루코오스를 내포하는 50 mℓ의 YPD에 첨가되고 30℃와 250 rpm에서 배양되었다. 24시간 배양후, 이들 배양액의 OD_{600}이 물에서 1:40 희석함으로써 측정되었다. 5의 OD_{600}을 획득하기 위해 8% 글루코오스, 200 mM MES, pH 6.5 및 2 g/ℓ 이소부티르알데히드를 내포하는 50 mℓ의 YPD에 적절한 양의 배양액이 첨가되었다. 발효 배양액은 차단되지 않은 250 mℓ 플라스크에서 30℃와 75 rpm에서 배양되었다. 이용되지 않는 배지는 LC1 분석을 위한 배지 블랭크 (medium blank)로서 수집되고 샘플 제출 때까지 4℃에서 유지되었다. 24시간 시점에, 각 플라스크로부터 샘플이 하기와 같이 채취되었다. 1.5 mℓ의 배양액이 1.5 mℓ 에펜도르프 튜브로 이동되었다. OD_{600} 값이 측정되고, 그리고 샘플이 LC1 분석에 대비되었다. 각 튜브는 10분 동안 14,000 rpm으로 원심분리되고, 그리고 상층액이 앞서 기술된 바와 같은 LC1 분석을 위해 수집되었다.

[0667] 2 g/ℓ 이소부티르알데히드로 두 번째 교반 플라스크 발효는 *ALD6* 결실 균주 GEVO6244/GEVO6245 및 이들의 상응하는 *ALD6* 부모 균주 GEVO1830의 기술적 삼중을 이용하여 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. 이러한 발효는 앞서 기술된 바와 같이 24와 48시간 시점에서 샘플링되었다. 표 80에서는 이들 양쪽 발효에 대한 이소부티레이트 역가를 제시한다. 이소부티레이트 역가는 *ALD6* 부모 균주와 비교하여 *ald6*△ 균주에서 유의미하게 감소한다.

표 80

ALD6 부모 균주 및 상기 *ALD6* 부모 균주로부터 유래된 *ald6*△ 균주의 이소부티레이트 생산.

균주	이소부티르알데히드 공급 발효 (24 hr)		이소부티르알데히드 공급 발효 (48 hr)	
	이소부티레이트 역가 (g/ℓ)	이소부티레이트 감소 (%)	이소부티레이트 역가 (g/ℓ)	이소부티레이트 감소 (%)
GEVO1287	0.19 ± 0.03		n.d.	n.d.
GEVO6242	0.12 ± 0.02	36.8%	n.d.	n.d.
GEVO1830	0.16 ± 0.00		0.12 ± 0.01	
GEVO6244	0.06 ± 0.02	62.5%	0.04 ± 0.01	66.7
GEVO6245	0.07 ± 0.00	56.3%	0.00 ± 0.00	≥79.2*

n.d.= 본 실험에서 측정되지 않음

*0.025 g/ℓ의 이소부티레이트에 대한 LOQ에 기초됨

[0668]

[0669] 실시예 26: 2-아세토-2-히드록시부티레이트를 향한 TMA29 활성

[0670] 하기 실시예에서는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) TMA29 단백질이 (*S*)-2-아세토락테이트 ((*S*)-AL)와 2-아세토-2-히드록시부티레이트 (AHB)를 향해 활동성이라는 것을 예증한다.

표 81

[0671] 실시예 26에서 개시된 균주의 유전형.

GEVO #	유전형	출처
GEVO3527	*MAT α his3△-1 leu2△ lys2△ ura3△*	ATCC# 201389 (BY4742)
GEVO3939	*MAT α his3△-1 leu2△ lys2△ ura3△ tma29::kan*^{R}	OpenBiosystems cat# YSC1054 (Yeast MATalpha collection)

[0672] *TMA29* (YMR226C) 유전자가 결실된 효모 균주 GEVO3939 및 이의 부모 GEVO3527은 각 균주에 대해 삼중으로 14 mℓ 배양액 튜브에서 3 mℓ의 YPD를 접종함으로써 각각 삼중으로 배양되었다. 배양은 GEVO3527의 경우에 YPD 아가 평판 상에서, 그리고 GEVO3939의 경우에 0.2 g/ℓ G418을 내포하는 YPD 평판 상에서 패치 (patch)로부터 시작되었다. 배양액은 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 익일에, 하룻밤 배양액의 OD_{600}이 측정되고, 그리고 50 mℓ 배양액을 0.1의 OD_{600}까지 접종하기 위한 각 배양액의 부피가 계산되었다. 계산된 부피의 각 배양액이 250 mℓ 차단된 플라스크에서 50 mℓ의 YPD를 접종하는데 이용되고, 그리고 이들 배양액은 30℃와 250 rpm에서 배양되었다.

[0673] 세포는 8시간 성장후, 2.2-2.7의 OD에서 중간-로그 기 동안 수확되었다. 배양액은 미리 칭량된 50 mℓ Falcon 튜브로 이전되고, 그리고 세포가 5분 동안 3000 x g로 원심분리에 의해 수집되었다. 배지의 제거후, 세포는 10 mℓ MilliQ H_2O로 세척되었다. 물의 제거후, 세포는 5분 동안 3000 x g로 다시 한 번 원심분리되고, 그리고 남아있는 물은 1 mℓ 피펫 팁을 이용하여 조심스럽게 제거되었다. 세포 펠릿은 칭량되고, 이후 추가 이용 때까지 -80℃에서 보관되었다.

[0674] 세포 펠릿은 얼음 위에서 해동되고, 그리고 결과물이 질량으로 20% 세포 현탁액이 되도록 용해 완충액 (10 mM 인산나트륨 pH7.0, 1 mM 디티오트레이톨, 5% w/v 글리세롤)에서 재현탁되었다. 각 샘플에 대해 1 mℓ의 유리 비드 (glass bead) (0.5 mm 직경)가 1.5 mℓ 에펜도르프 튜브에 첨가되고 850 μℓ의 세포 현탁액이 첨가되었다. 효모 세포는 각각 전속에서 6 X 1분 혼합 및 그 사이에 얼음 위에서 1분 배양에 의해, Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA)을 이용하여 용해되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 21,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액이 새로운 튜브로 이전되었다. 추출물은 (*R/S*)-AHB와 (*R/S*)-AL을 향한 TMA29 활성을 결정하기 위한 앞서 기술된 바와 같은 TMA29 검사를 이용하여 조사될 때까지 얼음 위에 유지되었다.

[0675] (*R/S*)-AHB의 환원에 대한, 야생형 MAT α 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주인 GEVO3527 용해물에서 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29*의 비활성은 10.5 ± 0.6 mU/mg이었다. *tma29△* 균주 GEVO3939는 4.8 ± 0.1 mU/mg의 비활성을 가졌다. 야생형 GEVO3527 균주는 결실 균주보다 대략 2-배 높은 TMA29 비활성을 가졌다.

[0676] (*R/S*)-AL의 환원에 대한, 야생형 MAT α 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주인 GEVO3527 용해물에서 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) *TMA29*의 비활성은 12.3 ± 0.2 mU/mg이었다. *tma29△* 균주 GEVO3939는 2.9 ± 0.3 mU/mg의 비활성을 가졌다. 야생형 GEVO3527 균주는 결실 균주보다 대략 4-배 높은 TMA29 비활성을 가졌다.

[0677] **실시예 27-30에 대한 일반적인 방법**

[0678] 실시예 27-30에서 기술된 균주, 플라스미드, 유전자/아미노산 서열, 그리고 프라이머 서열은 각각, 표 82, 83, 84와 85에서 열거된다.

표 82

[0679] 실시예 27-30에서 개시된 균주의 유전형.

유전형 또는 참고
대장균(*E. coli*) BL21(DE3) (Lucigen Corporation, Middleton, WI)
대장균(*E. coli*) *DH5α (Novagen, Gibbstown, NJ)*
사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2 (Euroscarf, Frankfurt, Germany)

표 83

[0680] 실시예 27-30에서 개시된 플라스미드.

Gevo No.	유전형 또는 참고
pET22(b)+	Novagen, Gibbstown, NJ
pGV1102	P_{Sc_TEF1}-*HA-tag-MCS-*T_{CYC1},*URA3, 2-마이크론, bla, pUC-ori*
pGV1662	P_{Sc_TEF1}-락토코커스 락티스(*L. lactis*) *kivD-*T_{Sc_CYC1}, *bla*, ColE1 ori, *URA3*, 2μ ori.
pGV1947	P_{Sc_TEF1}-*Ll_adhA-*T_{Sc_CYC1} *bla URA3 pMB1 ori 2μ ori*
pGV1947his	P_{Sc_TEF1}-*Ll_adhA*^{his6}-T_{Sc_CYC1} *bla URA3 pMB1 ori 2μ ori*
pET1947	P_{T7}::*Ll_adhA*^{his6}, *bla*, *ori*pBR322, *lac*I
pGV2274	*Ll_adhA_coSc* 서열을 내포하는 클로닝 벡터 (DNA2.0, Menlo Park, CA에 의해 합성됨)
pGV2475	P_{Sc_TEF1}-*Ll_adhA_coSc*$^{28E7-his6}$-T_{Sc_CYC1}, *bla*, *URA3*, *pMB1 ori*, *2μ ori*
pGV2476	P_{Sc_TEF1}-*Ll_adhA_coSc*^{his6}-T_{Sc_CYC1}, *bla*, *URA3*, *pMB1 ori*, *2μ ori*
pGV2477	P_{Sc_TEF1}-*Ll_adhA_coSc*$^{RE1-his6}$-T_{Sc_CYC1}, *bla*, *URA3*, *pMB1 ori*, *2μ ori*
pGV30C11	P_{Sc_TEF1}-*Ll_adhA_coSc*$^{30C11-his6}$-T_{Sc_CYC1}, *bla*, *URA3*, *pMB1 ori*, *2μ ori*

표 84

[0681] 실시예 27-30에서 개시된 핵산과 단백질 서열.

출처	유전자 (서열 번호)	단백질 (서열 번호)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA* (서열 번호: 184)	Ll_AdhA (서열 번호: 185)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA_coSc*^{his6} (서열 번호: 186)	Ll_AdhA^{his6} (서열 번호: 187)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA_coSc*$^{28E7-his6}$ (서열 번호: 188)	Ll_AdhA$^{28E7-his6}$ (서열 번호: 189)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA_coSc*$^{30C11-his6}$ (서열 번호: 190)	Ll_AdhA$^{30C11-his6}$ (서열 번호: 191)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA_coSc*$^{RE1-his6}$ (서열 번호: 192)	Ll_AdhA$^{RE1-his6}$ (서열 번호: 193)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA_coSc*$^{7A4-his6}$ (서열 번호: 194)	Ll_AdhA$^{7A4-his6}$ (서열 번호: 195)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA_coSc*$^{4A3-his6}$ (서열 번호: 196)	Ll_AdhA$^{4A3-his6}$ (서열 번호: 197)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA*$^{1H7-his6}$ (서열 번호: 198)	Ll_AdhA$^{1H7-his6}$ (서열 번호: 199)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA*$^{10F10-his6}$ (서열 번호: 200)	Ll_AdhA$^{10F10-his6}$ (서열 번호: 201)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*Ll_adhA*$^{8F11-his6}$ (서열 번호: 202)	Ll_AdhA$^{8F11-his6}$ (서열 번호: 203)

락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA*$^{8D10\text{-}his6}$ (서열 번호: 204)	L1_AdhA$^{8D10\text{-}his6}$ (서열 번호: 205)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA_coSc* (서열 번호: 206)	L1_AdhA (서열 번호: 185)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA_coSc*^{28E7} (서열 번호: 207)	L1_AdhA^{28E7} (서열 번호: 208)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA_coSc*^{30C11} (서열 번호: 209)	L1_AdhA^{30C11} (서열 번호: 210)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA_coSc*^{RE1} (서열 번호: 211)	L1_AdhA^{RE1} (서열 번호: 212)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA_coSc*^{7A4} (서열 번호: 213)	L1_AdhA^{7A4} (서열 번호: 214)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA_coSc*^{4A3} (서열 번호: 215)	L1_AdhA^{4A3} (서열 번호: 216)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA*^{1H7} (서열 번호: 217)	L1_AdhA^{1H7} (서열 번호: 218)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA*^{10F10} (서열 번호: 219)	L1_AdhA^{10F10} (서열 번호: 220)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA*^{8F11} (서열 번호: 221)	L1_AdhA^{8F11} (서열 번호: 222)
락토코커스 락티스(*L. lactis*)	*L1_adhA*^{8D10} (서열 번호: 223)	L1_AdhA^{8D10} (서열 번호: 224)

표 85

[0682] 실시예 27-30에서 개시된 프라이머 서열 (5'→ 3').

프라이머 명칭	서열*
XX7	GGAGAAAACCCATATGTCGTTTAC (서열 번호: 225)
XX9	GCAGCCGAACGCTCGAGGGCGGCCG (서열 번호: 226)
His_Not1_1947_rev	CTCGAGCGGCCGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTTTAGTAAAATCAA (서열 번호: 227)
Sal1_for	GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTT (서열 번호: 228)
adhAcoSc_SalIin_for	GTTTGTCGACATGAAGGCTGCAGTTGTCCGT (서열 번호: 229)
adhAcoSC_NotIin_his_rev	TCGAGCGGCCGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTTCGTGAAGTCTATAACCATTCTACC (서열 번호: 230)
pGV1994ep_for	CGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTTCTATTACAAC (서열 번호: 231)
pGV1994ep_rev	CTAACTCCTTCCTTTTCGGTTAGAGCGGATGTGGG (서열 번호: 232)
RecombADHY50_for	TGCTGCCGGAGATTWCGGCAACAAGGCAGG (서열 번호: 233)
RecombADHY50_rev	CCTGCCTTGTTGCCGWAATCTCCGGCAGCA (서열 번호: 234)
RecombADHL264_for	ATGGTAGCCGTTGCTKTACCAAACACAGAA (서열 번호: 235)
RecombADHL264_rev	TTCTGTGTTTGGTAMAGCAACGGCTACCAT (서열 번호: 236)
RecombADHI212_Y219_for	GCTGATGTCAYAATTAACTCTGGTGACGTTWACCCTGTAG (서열 번호: 237)
RecombADHI212_Y219_rev	CTACAGGGTWAACGTCACCAGAGTTAATTRTGACATCAGC (서열 번호: 238)
NNKADHF50_for	TGCTGCCGGAGATNNKGGCAACAAG (서열 번호: 239)
NNKADHF50_rev	GCCTTGTTGCCMNNATCTCCGGCAG (서열 번호: 240)
NNKADHR77_for	GTTAGTTCTCTCNNKGTAGGTGATAG (서열 번호: 241)
NNKADHR77_rev	CACTCTATCACCTACMNNGAGAGAAC (서열 번호: 242)
NNKADHA108_for	ACATTTTGCCGAGAANNKAAAAACGC (서열 번호: 243)
NNKADHA108_rev	ACCAGCGTTTTTMNNTTCTCGGCAAA (서열 번호: 244)
NNKADHF113_for	GTCAAAAACGCTGGTNNKAGCGTTGA (서열 번호: 245)
NNKADHF113_rev	ACCATCAACGCTMNNACCAGCGTTTT (서열 번호: 246)
NNKADHT212_for	AGATAGGTGCTGATGTCNNKATTAAC (서열 번호: 247)
NNKADHT212_rev	CAGAGTTAATMNNGACATCAGCACCT (서열 번호: 248)
NNKADHV264_for	GGTAGCCGTTGCTNNKCCAAACACAG (서열 번호: 249)
NNKADHV264_rev	ATTTCTGTGTTTGGMNNAGCAACGGC (서열 번호: 250)
Recomb2F50Minilib_for	GTTGCAGCAGGTGATTDKGGCAACAAAGCA (서열 번호: 251)
Recomb2F50Minilib_rev	TGCTTTGTTGCCMHAATCACCTGCTGCAAC (서열 번호: 252)

Recomb2Q77Gen5_for3	TGATGTAAGCTCGCTTCAAGTTGGTGATCG (서열 번호: 253)
Recomb2Q77Gen5_rev4	CGATCACCAACTTGAAGCGAGCTTACATCA (서열 번호: 254)
Recomb2R77Gen5_for5	TGATGTAAGCTCGCTTCGAGTTGGTGATCG (서열 번호: 255)
Recomb2R77Gen5_rev6	CGATCACCAACTCGAAGCGAGCTTACATCA (서열 번호: 256)
Recomb2S77Gen5_for7	TGATGTAAGCTCGCTTTCTGTTGGTGATCG (서열 번호: 257)
Recomb2S77Gen5_rev8	CGATCACCAACAGAAAGCGAGCTTACATCA (서열 번호: 258)
Recomb2Y113 Gen5_for9	TTAAAAATGCAGGATATTCAGTTGATGGCG (서열 번호: 259)
Recomb2Y113 Gen5_rev10	CGCCATCAACTGAATATCCTGCATTTTTAA (서열 번호: 260)
Recomb2F113 Gen5_for11	TTAAAAATGCAGGATTTTCAGTTGATGGCG (서열 번호: 261)
Recomb2F113 Gen5_rev12	CGCCATCAACTGAAAATCCTGCATTTTTAA (서열 번호: 262)
Recomb2G113 Gen5_for13	TTAAAAATGCAGGAGGGTCAGTTGATGGCG (서열 번호: 263)
Recomb2G113 Gen5_rev14	CGCCATCAACTGACCCTCCTGCATTTTTAA (서열 번호: 264)
Recomb2T212 Mini_for15	GAGCTGATGTGRYAATCAATTCTGGTGATG (서열 번호: 265)
Recomb2T212 Mini_rev16	CATCACCAGAATTGATTRYCACATCAGCTC (서열 번호: 266)
Recomb2V264 Mini_for17	TGGTTGCTGTGGCAKTACCCAATACTGAGA (서열 번호: 267)
Recomb2V264 Mini_rev18	TCTCAGTATTGGGTAMTGCCACAGCAACCA (서열 번호: 268)

[0683] * A (아데닌), G (구아닌), C (시토신), T (티민), U (우라실), R (퓨린 - A 또는 G), Y (피리미딘 - C 또는 T), N (임의의 뉴클레오티드), W (약함 - A 또는 T), S (강함 - G 또는 C), M (아미노 - A 또는 C), K (케토 - G 또는 T), B (A 아님 - G 또는 C 또는 T),시간 (G 아님 - A 또는 C 또는 T), D (C 아님 - A 또는 G 또는 T), 그리고 V (T 아님 - A 또는 G 또는 C)

[0684] 배지와 완충액:

[0685] SC-URA: 6.7 g/ℓ Difco™ 효모 질소 염기, 14 g/ℓ Sigma™ 합성 드롭아웃 배지 보충물 (히스티딘, 트립토판, 그리고 류신을 제외한 아미노산과 영양소 포함), 10 g/ℓ 카사미노산, 20 g/ℓ 글루코오스, 0.018 g/ℓ 아데닌 헤미황산염, 그리고 0.076 g/ℓ 트립토판.

[0686] SD-URA: MP Biomedicals (Irvine, CA)에서 상업적으로 구입가능. 조성: 1.7 g/ℓ 효모 질소 염기 (YNB), 5 g/ℓ 황산암모늄, 20 g/ℓ 글루코오스, 우라실 CSM-URA가 없는 카사미노산.

[0687] YPD (효모 펩톤 덱스트로스) 배지: 10 g/ℓ 효모 추출물, 20 g/ℓ 펩톤, 20 g/ℓ 글루코오스.

[0688] Tris-DTT: 1 mℓ의 1 M TrisHCl, pH 8.0당 0.39 g 1,4-디티오트레이톨, 필터 멸균됨.

[0689] 완충액 A: 20 mM Tris, 20 mM 이미다졸, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.4로 조정됨, 필터 멸균됨.

[0690] 완충액 B: 20 mM Tris, 300 mM 이미다졸, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.4로 조정됨, 필터 멸균됨

[0691] 완충액 E: 1.2 g Tris 염기, 92.4 g 글루코오스, 그리고 1 ℓ의 탈염수당 0.2 g $MgCl_2$, pH 7.5로 조정됨, 필터 멸균됨

[0692] pET1947의 작제: 락토코커스 락티스(*L. lactis*) *adh*A (Ll_adhA) 유전자는 프라이머 His_Not1_1947_fwd와 Sal1_rev를 이용하여 pGV1947의 외부에 클로닝되고 pET22b(+) 내로 결찰되어, 플라스미드 pET1947이 산출되었다.

[0693] pGV2476의 작제: 플라스미드 pGV2274는 전방 프라이머 adhAcoSc_SalIin_for 및 후방 프라이머 adhAcoSC_NotIin_his_rev를 이용한 PCR을 위한 주형으로서 기능하였다. PCR 산물은 정제되고, *Not*I과 *Sal*I로 제한 절단되고, 그리고 pGV1662 내로 결찰되고, 이것은 *Not*I과 *Sal*I로 절단되고 정제되었다.

[0694] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)의 형질전환: 예정된 형질전환의 전일 밤에, YPD 배양액은 단일 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2 집락으로 접종되고 30℃와 250 rpm에서 하룻밤동안 배양되었다. 다음날 아침에, 20 mℓ YPD 배양이 0.1의 OD_{600}에서 하룻밤 배양액으로 차단되지 않은 250 mℓ 에를렌마이어 플라스크에서 시작되었다. 상기 배양액은 1.3 - 1.5의 OD_{600}에 도달할 때까지 30℃와 250 rpm에서 배양되었다. 배양액이 원하는 OD_{600}에 도달할 때, 200 μℓ의 Tris-DTT가 첨가되고, 그리고 배양액은 30℃와 250 rpm에서 추가로 15분 동안 배양되었다. 세포는 이후, 4℃와 2,500xg에서 3분 동안 펠릿화되었다. 상층액을 제거한 이후, 펠릿은 10 mℓ의 얼음같이 차가운 완충액 E에서 재현탁되고 앞서 기술된 바와 같이 다시 한 번 스핀다운 (spin

down)되었다. 이후, 세포 펠릿은 1 ㎖의 얼음같이 차가운 완충액 E에 재현탁되고 앞에서와 같이 한 번 더 스핀다운되었다. 피펫으로 상층액의 제거후, 200 ㎕의 얼음같이 차가운 완충액 E가 첨가되고, 그리고 펠릿이 부드럽게 재현탁되었다. 6 ㎕의 삽입물/골격 혼합물은 반으로 분할되고 50 ㎕의 세포 현탁액에 첨가되었다. DNA/세포 혼합물은 0.2 cm 전기천공 큐벳 (BIORAD) 내로 이전되고 0.54 kV와 25 μF에서 펄스 컨트롤러 (pulse controller) 없이 전기천공되었다. 그 직후에, 1 ㎖의 미리 가온된 YPD가 첨가되고, 그리고 형질전환된 세포는 15 ㎖ 원형 바닥 배양 튜브 (Falcon)에서 30℃와 250 rpm에서 재생되었다. 1시간후, 세포는 4℃와 2,500xg에서 3분 동안 스핀다운되고, 그리고 펠릿은 1 ㎖ 미리 데워진 SD-URA 배지에서 재현탁되었다. 상이한 양의 형질전환된 세포가 SD-URA 평판 상에 도말되고 30℃에서 1.5일 동안 또는 집락이 무균 이쑤시개로 골라 뽑힐 수 있을 만큼 충분히 클 때까지 배양되었다.

[0695] 효모 세포의 플라스미드 미니-제조: Zymoprep™ II - 효모 플라스미드 Miniprep 키트 (Zymo Research, Orange, CA)는 약간 변경된 액체 배양을 위한 제조업체의 프로토콜에 따라 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 세포로부터 플라스미드 DNA를 준비하는데 이용되었다. 200 ㎕ 분취량의 효모 세포는 600xg에서 2분 동안 스핀다운되었다. 상층액을 따라버린 후, 200 ㎕의 용액 1이 펠릿을 재현탁하기 위해 첨가되었다. 이들 샘플에, 3 ㎕의 Zymolyase™가 첨가되고, 그리고 세포/효소 현탁액은 손가락으로 가볍게 침으로써 부드럽게 혼합되었다. 이들 샘플을 37℃에서 1시간 동안 배양한 이후, 용액 2와 3이 첨가되고 각 첨가후 충분하게 혼합되었다. 이들 샘플은 이후, 4℃와 최대 속도에서 10분 동안 스핀다운되었다. 그 이후에, Zymo 칼럼 위에서 정화 (clean-up)가 제조업체의 지시에 따라 수행되었다. 플라스미드 DNA는 10 ㎕의 PCR 등급 물로 용리되었다. 이러한 부피의 절반은 대장균(*E. coli*) DH5α를 형질전환시키는데 이용되었다.

[0696] 대장균(*E. coli*)에서 이종기원성 ADH 발현: 암피실린 (최종 농도 0.1 mg/㎖)을 내포하는 50 ㎖의 Luria-Bertani (LB) 배지 (리터당 10 g 트립톤, 10 g NaCl, 5 g 효모 추출물)를 내포하는 플라스크 (500 ㎖ Erlenmeyer)는 플라스미드 pET1947을 보유하는 단일 집락의 0.5 ㎖ 하룻밤 LB_{amp} 배양액을 이용하여 0.1의 최초 OD_{600}으로 접종되었다. 50 ㎖ LB 발현 배양액은 250 rpm과 37℃에서 3-4시간 동안 성장되었다. 단백질 발현은 0.5 mM의 최종 농도로 IPTG의 첨가로 대략 1의 OD_{600}에서 유도되었다. 단백질 발현은 225 rpm과 25℃에서 24시간 동안 지속되었다. 세포는 5300xg와 4℃에서 10분 동안 수확되고, 이후 세포 펠릿은 추가 이용 때까지 -20℃에서 동결되었다.

[0697] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2에서 이종기원성 발현: 100 ㎖의 SC-URA로 채워진 플라스크 (1000 ㎖ 에를렌마이어)는 1 ㎖ 하룻밤 배양액 (단일 CEN.PK2 집락으로 접종된 5 ㎖ SC-URA, 30℃와 250 rpm에서 성장됨)으로 접종되었다. 발현 배양액은 30℃와 250 rpm에서 24시간 동안 성장되었다. 세포는 5분 동안 5300xg에서 펠릿화되었다. 상층액은 버려지고, 그리고 펠릿은 다시 한 번 회전되었다. 이후, 잔류 상층액이 피펫으로 제거되었다. 펠릿은 추가 이용 때까지 -20℃에서 동결되었다.

[0698] 고처리량 검사을 위한 96-웰 평판 내에 CEN.PK2에서 이종기원성 발현: 300 ㎕의 SC-URA로 채워진, 웰당 1 ㎖ 수용량 (capacity)의 얕은 96-웰 평판은 Ll_adhA^{his6} 또는 이의 변이체를 코딩하는 플라스미드를 보유하는 단일 CEN.PK2 집락으로 접종되었다. 600 ㎕의 SC-URA로 채워진, 웰당 2 ㎖ 수용량 (capacity)의 깊은 96-웰 평판은 50 ㎕의 이들 하룻밤 배양액으로 접종되었다. 이들 평판은 30℃와 250 rpm에서 24시간 동안 성장되고, 이후 4℃와 5300xg에서 5분 동안 수확되고 -20℃에서 보관되었다.

[0699] 대장균(*E. coli*)으로부터 ADH-포함 추출물의 제조: 발현된 ADH를 내포하는 대장균(*E. coli*) 세포 펠릿은 해동되고 완충액 A에서 재현탁되었다 (0.25 g 습식 중량/㎖ 완충액). 재현탁된 세포는 50% 듀티 사이클 (duty cycle)로 1분 동안 초음파처리에 의해 용해되고 11000xg와 4℃에서 10분 동안 펠릿화되었다. 추출물은 4℃에서 보관되었다.

[0700] 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2로부터 ADH-포함 추출물의 제조: 발현된 ADH를 내포하는 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2 세포 펠릿은 해동되고 펠릿의 습식 중량을 획득하기 위해 칭량되었다. 세포는 이후, 결과물이 질량으로 20% 세포 현탁액이 되도록 완충액 A에서 재현탁되었다. 0.5 mm 직경의 유리 비드가 1000 ㎕-마크의 (0.5 mm 직경) 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브에 첨가되고, 그 이후 875 ㎕의 세포 현탁액이 첨가되었다. 효모 세포는 각각 전속에서 6 x 1분 혼합 및 그 사이에 1-분 결빙 단계에 의해, Retsch MM301 믹서 밀 (mixer mill) (Retsch Inc. Newtown, PA)을 이용한 비드 비팅에 의해 용해되었다. 이들 튜브는 4℃에서 10분 동안 23,500xg로 원심분리되고, 그리고 상층액이 제거되었다. 추출물은 4℃에서 보관되었다.

[0701] ADH의 정제: ADH는 Akta 정제장치 FPLC 시스템 (GE Healthcare)을 이용하여 니켈로 미리 충전된 1 ㎖ Histrap 고성능 (histrap HP) 칼럼 (GE Healthcare) 위에서 IMAC (Immobilized metal affinity chromatography)에 의해 정제되었다. 칼럼은 4 칼럼 부피 (cv)의 완충액 A로 평형화되었다. 조추출물을 칼럼 상에 주입한 이후, 상기 칼럼은 2 cv 동안 완충액 A로 세척되고, 그 이후에 15 cv 동안 100% 용출 완충액 B로 선형 구배되고 96-웰 평판에서 수집되었다. 단백질을 내포하는 분획물은 모아지고 4℃에서 보관되었다.

[0702] ADH 큐벳 검사: ADH 활성은 340 nm에서 흡광도를 측정함에 의해 NADH 농도에서 감소를 모니터링함으로써 동역학적으로 조사되었다. 100 mM Tris/HCl pH 7.0, 1 mM DTT, 11 mM 이소부티르알데히드, 그리고 200 μM NADH를 내포하는 반응 완충액이 준비되었다. 반응은 900 ㎕의 반응 완충액에 적절한 희석도에서 100 ㎕의 조추출물 또는 정제된 단백질의 첨가에 의해 개시되었다.

[0703] ADH 마이크로역가 평판 활성 검사: 마이크로역가 평판에서 활성 측정은 규모축소 큐벳 검사이다. 총 부피는 100 ㎕이었다. 적절하게 희석된 10 ㎕의 조용해물 또는 정제된 효소가 검사 평판에 배치되었다. 반응 완충액은 앞서 기술된 바와 같이 준비되고 (이소부티르알데히드 기질 단독) 이 중에서 90 ㎕가 평판 내에 효소 용액에 첨가되었다. NADH의 소비는 무한 M200 평판 판독기 (TECAN Trading AG, Switzerland)에서 340 nm에서 기록되었다.

[0704] ADH 고처리량 활성 검사: 96-웰 평판에서 동결된 효모 세포 펠릿은 실온에서 20분 동안 해동되고, 이후 100 ㎕의 Y-Per (Pierce, Cat# 78990)이 첨가되었다. 평판은 세포 펠릿을 재현탁하기 위해 간단히 와동되었다. 실온과 130 rpm에서 60-분 배양 기간후, 조추출물을 희석하기 위해 300 ㎕의 100 mM Tris-HCl (pH 7.0)이 평판에 첨가되었다. 5,300xg와 4℃에서 10분 동안 원심분리 단계 이후에, 40 ㎕의 결과의 조추출물이 액체 처리 로봇 (liquid handling robot)을 이용하여 검사 평판 (편평 바닥, Rainin)으로 이전되었다. 이들 검사 평판은 4,000 rpm과 실온에서 짧게 스핀다운되었다. 평판당 12 ㎖ 검사 완충액 (100 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM 또는 0.125 mM 이소부티르알데히드, 1 mM DTT, 200 μM NADH)이 준비되고 이 중에서 100 ㎕가 반응을 개시하기 위해 각 웰에 첨가되었다. NADH의 고갈은 무한 M200 평판 판독기 (TECAN Trading AG, Switzerland)에서 340 nm에서 2분 모니터링되었다.

[0705] 활성 검사로부터 획득된 데이터에 기초된 비활성의 측정: 이종기원성으로 발현된 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA를 내포하는 샘플, 예를 들면, 조추출물과 정제된 단백질의 단백질 농도는 제조업체의 지시에 따라, Quick Start™ Bradford 키트 (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 측정되었다. 1 단위의 효소 활성 (1 U)은 검사 방법의 명시된 조건 하에 분당 1 마이크로몰 (micromole) 기질의 전환을 촉진하는 효소의 양으로서 정의된다.

[0706] 열안정도 측정: 부모 Ll_adhA 및 이의 변이체의 T_{50} 값 (15분의 배양 시간후 효소 활성의 50%가 유지되는 온도)이 열안정도 데이터를 획득하기 위해 측정되었다. 30 ㎕ 분취량의 정제된 효소가 PCR 튜브 내로 이전되었다. 각 튜브는 특정한 배양 온도에 지정되었고, 상기 온도는 20℃-온도 범위를 커버하는 구배로 프로그래밍된 Mastercycler®

ep PCR 기계 (Eppendorf, Hamburg, Germany)의 블록 상에서 슬롯 (slot)에 상응하였다. 이들 튜브는 그들의 슬롯에서 15분 동안 배양되었다. 이후, 반응은 얼음 위에서 진정되었다. 잔여 활성은 앞서 기술된 바와 같이 ADH 마이크로역가 평판 활성 검사로 측정되었다.

[0707] 정제를 위한 His-태그의 이용: 하기에 기술된 각 실시예에서, his-태그를 포함하는 ADH 효소가 언급된다. 당분야에서 이해되는 바와 같이, 이런 his-태그는 단백질 정제를 용이하게 한다. 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 his-태그가 결여된 ADH 효소는 이소부티르알데히드의 이소부탄올로의 전환에 동등하게 또는 더욱 우수하게 적합하다. 정제-가능화 his-태그가 결여되는 본 명세서에서 기술된 변형된 ADH 효소의 실례는 서열 번호: 206-224에서 발견된다.

[0708] 실시예 27: 무작위 돌연변이유발에 의한 방향적 진화

[0709] 하기 실시예에서는 ADH의 동역학적 성질을 향상시키는 방법을 예증하고, 또한 이런 향상된 ADH 효소의 동역학적 성질을 기술한다. *Ll_adhA_coSc*^{his6} 유전자를 보유하고 플라스미드 pGV1662의 유도체인 플라스미드 pGV2476은 전방 프라이머 pGV1994ep_for 및 후방 프라이머 pGV1994_rev를 이용한 오류 유발 PCR을 위한 주형으로서 기능하였다. 이들 프라이머는 골격 pGV1662에 특이적이고, 그리고 ADH 삽입물의 50 bp 상류와 하류에 결합하여 효모에서 상동성 재조합을 위한 겹침을 발생시킨다. 3가지 오류 유발 PCR 반응의 조성은 표 86에 요약된다. 온도 프로필은 하기와 같았다: 95℃ 3분 최초 변성, 95℃ 30s 변성, 55℃ 30s 어닐링, 72℃ 2분 신장, 25회 사이클, 72℃에서 5분 최종 신장.

표 86

[0710] 오류 유발 라이브러리에 대한 PCR 조건.

최종 $MnCl_2$ 농도 [μM]	100	200	300
주형 [ng]	2	2	2
전방 프라이머 [μM]	0.2	0.2	0.2
후방 프라이머 [μM]	0.2	0.2	0.2
dNTP [μM]	400	400	400
Taq 완충액 (10x 스톡) [㎕]	10	10	10
$MgCl_2$ [μM]	7	7	7
Taq 중합효소 [U]	8	8	8
$MnCl_2$ (1 mM 스톡) [μM]	100	200	300
PCR 등급 물 [㎕]	41.4	31.4	21.4

[0711] PCR 산물은 1% 분석적 TAE 아가로오스 겔 상에서 체크되고, 미량의 주형 DNA를 제거하기 위해 37℃에서 1시간 동안 *Dpn*I 절단되고, 이후 1% 예비 TAE 아가로오스 겔을 이용하여 정화되었다. PCR 산물을 내포하는 아가로오스 조각은 제조업체의 프로토콜에 따라, Freeze 'n' Squeeze 튜브 (BIORAD, Hercules, CA; catalog #732-6166)를 이용하여 청소되고, 그 이후에 젤릿 착색 절차 (Novagen, catalog # 69049-3)가 수행되었다. 한편, 플라스미드 pGV1662는 *Not*I과 *Sal*I로 제한 절단되고, 그 이후 절단 혼합물이 아가로오스 겔 상에서 이동되고 젤릿 착색되었다. 각각 500 ng의 플라스미드와 삽입물은 서로 혼합되고, 젤릿 페인트로 침전되고, 6 ㎕의 PCR 등급 물에서 재현탁되고, 그리고 일반적 방법에서 앞서 기술된 바와 같이 전기적격 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 세포를 형질전환시키는데 이용되었다.

[0712] 100, 200, 그리고 300 μM $MnCl_2$ 라이브러리 각각으로부터 총 88개 클론은 비-ADH 대조로서 부모 플라스미드 pGV2476을 내포하는 4개의 클론 및 pGV1102를 내포하는 3개의 클론과 함께, 96-웰 평판 내로 채집되었다. 1개 웰은 빈 상태로 남겨졌고 무균 대조로서 기능하였다. 일반적 방법 (고처리량 검사, ADH 고처리량 활성 검사를 위한 96-웰 평판에서 CEN.PK2에서 이종기원성 발현) 하에 앞서 기술된 바와 같이 이들 라이브러리를 스크리닝한 이후, 300 μM 라이브러리가 선택되고 추가의 4,000개 클론이 동일한 방식으로 스크리닝되었다. 총 24개 변이체가 야생형과 비교하여 1.5-배 이상 향상되었고 삼중으로 재-스크리닝을 위해 선택되었다. 이들 중에서 상위 10개의 변이체는 성장되고 일반적 방법 (사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2에서 이종기원성 발현) 하에 앞서 기술된 바와 같이 100 ㎖ 배양액에서 발현되고, 그리고 효모 조추출물에서 그들의 비활성이 일반적 방법 (ADH 마이크로역가 평판 검사) 하에 앞서 기술된 바와 같이 측정되었다. 2가지 변이체, $Ll_AdhA^{28E7\text{-}his6}$과 $Ll_AdhA^{30C11\text{-}his6}$은 야생형 효소 Ll_AdhA^{his6} (0.1 U/mg 총 용해물 단백질)과 비교하여 활성에서 2-배 이상의 향상 (각각, 0.3과 0.25 U/mg 총 용해물 단백질)을 나타내고 더욱 상세하게 특성화되었다.

[0713] 이들 2가지 변이체로부터 플라스미드 DNA는 일반적 방법 (효모 세포의 플라스미드 미니-제조) 하에 앞서 기술된 바와 같이 추출되고 DNA 염기서열분석 (Laragen, Los Angeles, CA)에 종속되었는데, 이것은 표 87에서 열거된 바와 같이 변이체당 2개의 돌연변이를 노출시켰다. 이들 돌연변이 중에서 2가지 (Y50F와 L264V)는 기질 결합 도메인 (청록색)과 보조인자 결합 도메인 (녹색) 사이에 갭인 활성 부위에 매우 가깝게 위치한다. 돌연변이 I212T와 N219Y는 보조인자 결합 도메인의 표면 상에 위치한다 (도 17에 도시됨). 보조인자 결합 부위 돌연변이의 위치를 강조하기 위해, 도 17은 구조 배열에 관한 2가지 도면을 수반한다.

표 87

[0714] 첫 번째 오류 유발 라이브러리 (1 세대)의 2가지 향상된 변이체에서 발견된 돌연변이의 목록.

변이체	돌연변이
$Ll_adhA^{28E7\text{-}his6}$	N219Y, L264V
$Ll_adhA^{30C11\text{-}his6}$	Y50F, I212T

[0715] 2가지 효소 변이체, L1_AdhA$^{28E7-his6}$과 L1_AdhA$^{30C11-his6}$은 더욱 큰 규모 (각각, 100 ml 배양액)에서 각각, 플라스미드 pGV2475와 pGV30C11로부터 발현되고, 정제되고, 그리고 일반적 방법 (사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2에서 이종기원성 발현, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2로부터 ADH-포함 추출물의 제조, ADH의 정제) 하에 앞서 기술된 바와 같이 더욱 상세하게 특성화되었다. 야생형 L1_AdhA^{his6} 효소는 플라스미드 pGV2476으로부터 발현되고 동일한 방식으로 정제되었다. 이들 효소는 일반적 방법 (ADH 큐벳 검사) 하에 앞서 기술된 바와 같이 동역학적 성질에 대해 특성화되었다. 표 88에서는 이소부티르알데히드와 NADH로 측정된 동역학적 파라미터를 제시한다. 감소된 K_M-값은 양쪽 변이체에 대해 관찰되는 반면, k_{cat}는 단지 L1_AdhA^{28E7}에 대해서만 향상되었다.

표 88

[0716] 부모 효소와 비교하여 이소부티르알데히드에서 2가지 변이체 (1 세대)의 동역학적 파라미터.

변이체	조용해물	정제된 단백질			
	U/mg	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}*s^{-1}$]
L1_AdhA^{his6}	0.28 ± 0.08	11.7 ± 0.6	25 ± 0.2	30	2,800
L1_AdhA$^{28E7-his6}$	0.74 ± 0.15	2.7 ± 0.2	43 ± 2	60	21,000
L1_AdhA$^{30C11-his6}$	0.46 ± 0.2	3.9 ± 0.1	60 ± 0.2	80	20,000

[0717] 야생형 효소와 이들 2가지 변이체의 열안정도는 일반적 방법 (열안정도 측정) 하에 앞서 기술된 바와 같이 측정되었다. 발견된 돌연변이는 촉매 효율에 대한 유익한 효과뿐만 아니라 변이체의 안정성에도 긍정적인 영향을 주었다. 표 89에서는 부모와 변이체에 대해 측정된 T_{50}을 요약한다.

표 89

[0718] 부모 효소 및 변이체의 T_{50}의 요약.

변이체	T_{50} [℃], 15분
L1_AdhA^{his6}	54.4 ± 0.5
L1_AdhA$^{28E7-his6}$	62.3 ± 0.3
L1_AdhA$^{30C11-his6}$	57.6 ± 0.6

[0719] 실시예 28: 재조합에 의한 방향적 진화

[0720] 하기 실시예에서는 ADH의 동역학적 성질을 향상시키는 방법을 예증하고, 또한 이런 향상된 ADH 효소의 동역학적 성질을 예증한다. 첫 번째 오류 유발 라이브러리에서 발견된 유익한 돌연변이 및 이들 각 부위에서 야생형 잔기를 재조합하는 두 번째 유전자 라이브러리 (2 세대)가 작제되었다 (표 90).

표 90

[0721] 재조합 라이브러리 내에 포함된 아미노산 돌연변이.

아미노산 위치	야생형	돌연변이	총 # (야생형 포함)
50	Y	F	2
212	I	T	2

219	Y	N	2
264	L	V	2

[0722] 프라이머 RecombADHY50_rev와 pGV1994ep_for (단편 1), RecombADHY50_for과 RecombADHI212_Y219_rev (단편 2), RecombADHI212_Y219_와 RecombADHL264_rev (단편 3), 그리고 RecombADHL264_rev와 pGV1994ep_rev (단편 4)를 이용하여 4개의 PCR 단편이 산출되었다. 이들 단편은 분석적 1% TAE 겔에서 분석되고, *Dpn*I 절단되고, 1% 예비 TAE 아가로오스 겔 상에서 분리되고, Freeze'n'Squeeze (BIORAD) 처리되고, 그리고 최종적으로 펠릿 착색 (Novagen)되었다. 깨끗한 단편은 집합 PCR을 위한 주형으로서 기능하였다. 성공적인 집합 PCR후, PCR 산물은 실시예 27에서 앞서 기술된 바와 같이 처리되고, 실시예 27에서 앞서 기술된 바와 같이 pGV1662 골격과 혼합되고, 그리고 혼합물은 일반적 방법에서 실시예 27-30에 대해 앞서 기술된 바와 같이 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)를 형질전환시키는데 이용되었다. 재조합 라이브러리의 80개 단일 클론이 채취되고 고처리량 스크린에서, 야생형 및 오류 유발 라이브러리에서 발견된 2가지 변이체와 비교되었다.

[0723] 총 80개의 단일 클론이 최초 부모 및 2가지 향상된 변이체와 함께, 96-웰 평판 내로 채집되었다. 일반적 방법 (고처리량 검사, ADH 고처리량 활성 검사를 위한 96-웰 평판에서 CEN.PK2에서 이종기원성 발현) 하에 앞서 기술된 바와 같이 재조합 평판을 스크리닝한 이후, 부모 L1_AdhA$^{28E7\text{-}his6}$ 또는 L1_AdhA$^{30C11\text{-}his6}$과 비교하여 적어도 2-배 높은 활성을 나타내는 12개 변이체는 일반적 방법 (사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2에서 이종기원성 발현) 하에 앞서 기술된 바와 같이 100 ㎖ 배양액에서 성장되고 발현되며, 그리고 효모 조추출물에서 그들의 활성은 일반적 방법 (ADH 마이크로역가 평판 검사) 하에 앞서 기술된 바와 같이 측정되었다. 2가지 변이체는 조추출물에서 매우 유사한 비활성을 가졌다. L1_AdhA^{RE1}이 추가 변형을 위해 선택되었는데, 그 이유는 이의 활성이 L1_AdhA$^{28E7\text{-}his6}$보다 40% 및 L1_AdhA$^{30C11\text{-}his6}$보다 64% 높았기 때문이다.

[0724] 이러한 변이체로부터 플라스미드 DNA는 일반적 방법 (효모 세포의 플라스미드 미니-제조) 하에 앞서 기술된 바와 같이 추출되고 DNA 염기서열분석 (Laragen, Los Angeles, CA)에 종속되었는데, 이것은 돌연변이 Y50F, I212T, 그리고 L264V (L1_AdhA^{RE1}에서 발견됨)가 관찰된 향상에 기여하는 반면, 위치 219에서 돌연변이가 이들 변이체의 활성에 유해하고 재조합 라이브러리의 임의의 향상된 변이체에서 발견되지 않는다는 것을 노출시켰다.

[0725] 변이체 L1_AdhA$^{RE1\text{-}his6}$은 더욱 큰 규모 (각각, 100 ㎖ 배양액)에서 플라스미드 pGV2477로부터 발현되고, 정제되고, 그리고 일반적 방법 (사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2에서 이종기원성 발현, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) CEN.PK2로부터 ADH-포함 추출물의 제조, ADH의 정제) 하에 앞서 기술된 바와 같이 더욱 상세하게 특성화되었다. 야생형 L1_AdhA^{his6} 효소는 플라스미드 pGV2476으로부터 발현되고 동일한 방식으로 정제되었다. 이들 효소는 일반적 방법 (ADH 큐벳 검사) 하에 앞서 기술된 바와 같이 동역학적 성질에 대해 특성화되었다. 표 91에서는 이소부티르알데히드와 NADH로 측정된 동역학적 파라미터를 제시한다. L1_AdhA^{his6}, L1_AdhA$^{28E7\text{-}his6}$, L1_AdhA$^{30C11\text{-}his6}$과 비교하여, L1_AdhA$^{RE1\text{-}his6}$에 대해 감소된 K_M 및 증가된 k_{cat}가 관찰되었다.

표 91

이소부티르알데히드에서 측정된, L1_AdhA^{RE1}의 생화학적 성질.

변이체	조용해물	정제된 단백질			
	U/mg	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}*s^{-1}$]
L1_AdhA^{his6}	0.28 ± 0.08	11.7 ± 0.6	25 ± 0.2	30	2,800
L1_AdhA$^{28E7\text{-}his6}$	0.74 ± 0.15	2.7 ± 0.2	43 ± 2	60	21,000
L1_AdhA$^{30C11\text{-}his6}$	0.46 ± 0.2	3.9 ± 0.1	60 ± 0.2	80	20,000
L1_AdhA$^{RE1\text{-}his6}$	1.15 ± 0.2	1.7± 0.0	105 ± 1	140	82,000

[0726]

[0727] 변이체 Ll_adhA$^{RE1-his6}$은 wt의 T_{50}보다 5도 높고 재조합 라운드의 가장 안정된 부모, Ll_AdhA$^{28E7-his6}$보다 거의 1도 낮은 61.6 ± 0.1℃의 T_{50} 값을 보였다.

[0728] 실시예 29: 무작위 돌연변이유발, 부위 포화 돌연변이유발, 그리고 재조합에 의한 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA의 방향적 진화

[0729] 하기 실시예에서는 ADH의 동역학적 성질을 향상시키는 방법을 예증하고, 또한 이런 향상된 ADH 효소의 동역학적 성질을 기술한다.

[0730] *Ll_adhA*$^{RE1-his6}$ 유전자는 두 번째 라운드의 오류 유발 PCR과 스크리닝을 위한 주형으로서 기능하였다 (3 세대). 이러한 스크리닝 검사는 0.125 mM 이소부티르알데히드를 이용하였다. 상기 실시예 1에 따라 200 μM $MnCl_2$로 오류 유발 PCR을 이용하여 산출된 라이브러리 중에서 대략 3,000개 클론이 발현되고 고처리량 방식으로 스크리닝되었다. 몇몇 히트 (hit)가 삼중으로 재스크리닝을 위해 선택되고, 그리고 2가지 변이체, Ll_AdhA$^{7A4-his6}$과 Ll_AdhA$^{4A3-his6}$이 향상된 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 이들 변이체의 돌연변이는 표 92에 제시된다.

표 92

[0731] 3 세대 변이체 Ll_AdhA$^{7A4-his6}$과 Ll_AdhA$^{4A3-his6}$에서 축적된 돌연변이의 목록.

변이체	돌연변이
Ll_AdhA$^{7A4-his6}$	Y50F, I212T, L264V, Q77R, V108A
Ll_AdhA$^{4A3-his6}$	Y50F, I212T, L264V, Y113F

[0732] 부모뿐만 아니라 Ll_AdhA$^{7A4-his6}$과 Ll_AdhA$^{4A3-his6}$의 용해물에서 비활성 (U/mg)이 pH 7.0에서 생물학적 삼중으로 측정되었다 (표 93).

표 93

[0733] pH 7.0에서 Ll_AdhA$^{7A4-his6}$과 Ll_AdhA$^{4A3-his6}$의 생화학적 성질.

변이체	조용해물	정제된 단백질			
	[U/mg]	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}*s^{-1}$]
Ll_AdhA$^{7A4-his6}$	1.14 ± 0.1	1.2 ± 0.2	88.8 ± 2.9	117	94,000
Ll_AdhA$^{4A3-his6}$	1.36 ± 0.1	0.9 ± 0.1	70 ± 2.9	95	100,000

[0734] Ll_AdhA$^{7A4-his6}$ (59.4 ℃) 및 Ll_AdhA$^{4A3-his6}$ (57.6 ℃)의 T_{50} 값은 둘 모두 Ll_AdhA^{his6}보다 높고 Ll_AdhA$^{RE1-his6}$보다 낮았다.

[0735] 2 라운드의 오류 유발 PCR 및 1 라운드의 재조합 이후, 부위-포화 돌연변이유발이 6개 부위 각각에서 수행되어 6개 라이브러리 (라이브러리 50, 77, 108, 113, 212, 그리고 264)가 산출되었다. 최초 부모, Ll_AdhA^{his6}은 각 NNK 단편에 대한 주형으로서 이용되었다. 각 라이브러리에 대한 2개 단편이 표 4에 열거된 프라이머를 이용하여 증폭되고 (라이브러리 50의 단편 1의 경우에 pGV1994ep_for과 NNKADHF50_rev, 라이브러리 50의 단편 2의 경우에 NNKADHF50_for과 pGV1994ep_rev; 라이브러리 77의 단편 1의 경우에 pGV1994ep_for과 NNKADHR77_rev, 라이브러리 77의 단편 2의 경우에 NNKADHR77_for과 pGV1994ep_rev; 라이브러리 108의 단편 1의 경우에 pGV1994ep_for과 NNKADHA108_rev, 라이브러리 108의 단편 2의 경우에 NNKADHA108_for과 pGV1994ep_rev; 라이브러리 113의 단

편 1의 경우에 pGV1994ep_for과 NNKADHF113_rev, 라이브러리 113의 단편 2의 경우에 NNKADHF113_for과 pGV1994ep_rev; 라이브러리 212의 단편 1의 경우에 pGV1994ep_for과 NNKADHT212_rev, 라이브러리 212의 단편 2의 경우에 NNKADHT212_for과 pGV1994ep_rev; 라이브러리 264의 단편 1의 경우에 pGV1994ep_for과 NNKADHV264_rev, 라이브러리 264의 단편 2의 경우에 NNKADHV264_for과 pGV1994ep_rev), 이후 집합 PCR을 위한 주형으로서 이용되었다. 집합 PCR 산물은 효모에서 NNK 라이브러리를 산출하기 위해 앞서 기술된 바와 같이 처리되었다. 90개 클론이 각 NNK 라이브러리를 위해 채집되고, 그리고 별개로 스크리닝되었다. 재스크리닝후, 6개 라이브러리로부터 9개 클론이 효모로부터 미니-제조되고, 이들 플라스미드는 대장균(*E. coli*)을 형질전환시키는데 이용되고, 그리고 결과의 플라스미드는 염기서열분석되었다. 이들의 용해물 활성 및 염기서열분석 결과는 표 94에 요약된다.

표 94

[0736] 부위 포화 돌연변이유발의 요약 (4 세대).

NNK 라이브러리의 위치	변이체	용해물에서 U/mg	NNK 라이브러리에서 발견된 돌연변이	NNK 라이브러리에서 발견된 예시적인 돌연변이	재조합에 대한 돌연변이
-	Ll_adhA^{his6}	0.28 ± 0.08			
-	Ll_AdhA^{RE1}	1.15 ± 0.20			
50	1G4	0.78 ± 0.02	Y50W	F, W	C, L, F, W, Y, X
77	2G3	0.42 ±0.00	Q77S	R, S	Q, R, S
77	2H2	0.43 ± 0.00	-	-	-
108	3D10	0.61 ± 0.01	V108A	-	-
108	3D12	0.53 ± 0.07	V108S	-	-
113	4A3b	0.38 ± 0.05	Y113G	F, G	Y, F, G
113	4E6	0.30 ± 0.04	Y113G	-	-
212	5D2	0.92 ± 0.02	I212V	T, V	A, I, T, V
264	6E12	0.38 ± 0.07	L264V	V	I, V

[0737] 부위 포화 돌연변이유발 라이브러리에서 발견된 다양한 돌연변이는 SOE PCR을 이용한 조합 방식 (combinatorial fashion)으로 재조합되고, 그리고 라이브러리는 비-코돈 최적화된 부모, pGV1947his를 이용하여 작제되었다. 표 85에서 기술된 프라이머는 6개 표적화된 부위에서 야생형 서열 역시 허용하였다. 6개 단편은 Recomb2F50Minilib_rev 및 pGV1994ep_for (단편 1), Recomb2F50Minilib_for 및 Recomb2Q77Gen5_rev4, Recomb2R77Gen5_rev6과 Recomb2S77Gen5_rev8의 혼합 (단편 2), Recomb2Q77Gen5_for3, Recomb2R77Gen5_for5와 Recomb2S77Gen5_for7의 혼합 및 Recomb2Y113 Gen5_rev10, Recomb2F113 Gen5_rev12와 Recomb2G113 Gen5_rev14의 혼합 (단편 3), Recomb2Y113 Gen5_for9, Recomb2F113 Gen5_for11과 Recomb2G113 Gen5_for13의 혼합 및 Recomb2T212 Mini_rev16 (단편 4), Recomb2T212 Mini_for15 및 Recomb2V264 Mini_rev18 (단편 5), 그리고 Recomb2V264 Mini_for17 및 pGV1994ep_rev (단편 6)를 이용하여 산출되었다. 단편 PCR은 분석 1% TAE 겔에서 분석되고, 이후 산물은 37℃에서 1시간 동안 *Dpn*I 절단되고, 1% 예비 TAE 아가로오스 겔 상에서 분리되고, Freeze'n'Squeeze (BIORAD) 처리되고, 그리고 최종적으로 펠릿 착색 (Novagen)되었다. 깨끗한 단편은 집합 PCR을 위한 주형으로서 기능하였다. 성공적인 집합 PCR후, 상동성 재조합 (앞서 기술된 바와 같음)이 라이브러리를 산출하는데 이용되었다. 1000개 이상의 개별 클론이 0.125 mM의 이소부티르알데히드 농도를 이용하여 스크리닝되었다. 상위 60개 변이체로 구성되는 재스크리닝 평판이 수집되고 0.125 mM 이소부티르알데히드로 조사되었다.

[0738] 100 ㎖ SC-URA 배지에서 발현을 위해 10개의 변이체가 선택되고 용해물에서 그들의 비활성이 측정되었다. 이들 중에서 4개는 염기서열분석되고 (돌연변이에 대해 표 95를 참조한다), 정제되고, 그리고 더욱 상세하게 특성화되었다 (표 96). 이들 새로운 변이체는 Ll_AdhA^{RE1}과 같은 용해물에서 유사한 비활성을 보였다. 흥미롭게도, 변이체 4A3은 높은 비활성을 갖는 효소로서 두드러졌다.

표 95

[0739] 5 세대로부터 변이체에서 돌연변이의 목록.

변이체	돌연변이
Ll_AdhA$^{1H7\text{-}his6}$	Y50F, I212A, L264V, Y113F
Ll_AdhA$^{10F10\text{-}his6}$	Y50F, I212T, L264V, Q77S, Y113F
Ll_AdhA$^{8F11\text{-}his6}$	Y50F, I212A, L264V, Q77R, Y113F
Ll_AdhA$^{8D10\text{-}his6}$	Y50F, I212V, L264V, Q77S, Y113F

표 96

[0740] 5 세대로부터 변이체의 생화학적 성질.

	조용해물	정제된 단백질			
변이체	U/mg	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat} /K_M [$M^{-1}*s^{-1}$]
Ll_AdhA$^{1H7\text{-}his6}$	1.12 ± 0.11		39.9 ± 1.7		
Ll_AdhA$^{10F10\text{-}his6}$	1.15 ± 0.17		75.4 ± 12.3		
Ll_AdhA$^{8F11\text{-}his6}$	1.09 ± 0.13	0.8 ± 0.2	41.7 ± 0.2	55	68233
Ll_AdhA$^{8D10\text{-}his6}$	1.05 ± 0.08		58.8 ± 4.5		

[0741] 실시예 30: 상동한 ADH 효소의 조작

[0742] 하기 실시예에서는 추가의 ADH 효소가 추가의 ADH 효소의 동역학적 성질을 향상시키기 위해 어떻게 확인되고 조작되는 지를 예시한다.

[0743] 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA에 상동한 효소는 하기 검색 파라미터: 기대 역치 (Expect threshold)=10, 단어 크기 (word size)=3, 매트릭스 (matrix)=Blosum62, 갭 오프닝 (gap opening)=11, 갭 연장 (gap extension)= 1을 갖는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 아미노산 서열을 이용한 공개적으로 가용한 데이터베이스의 BlastP 검색을 통해 확인되었다. 대략 60% 이상의 서열 동일성을 갖는 동족체를 나타내는 상위 100개 히트가 선별되고 표 97에 열거된다. 이들 서열은 하기 파라미터를 갖는 벡터 NTI Advance 10.3.1의 구성요소인 복수 서열 배열 도구 AlignX를 이용하여 배열되었다: 갭 오프닝 페널티 (Gap opening penalty) = 10, 갭 연장 페널티 (gap extension penalty) = 0.05, 갭 분리 페널티 범위 (gap separation penalty range) = 8. 이들 복수 서열 배열은 (a) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 티로신 50; (b) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 글루타민 77; (c) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 발린 108; (d) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 티로신 113; (e) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 이소류신 212; 그리고 (f) 락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA (서열 번호: 185)의 류신 264에 상응하는 잔기 사이에 매우 높은 수준의 보존을 보였는데, 여기서 AdhA (서열 번호: 185)는 락토코커스 락티스(*L. lactis*) 알코올 탈수소효소 (ADH) 유전자 *adhA* (서열 번호: 184) 또는 이의 코돈-최적화된 이형 (서열 번호: 206)에 의해 인코딩된다.

표 97

락토코커스 락티스(*L. lactis*) AdhA에 > 60% 서열 동일성을 갖는 상동한 효소

접근	설명	서열 동일성 %	E 값	총 스코어
YP_003354381.1	알코올 탈수소효소 1 [락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) subsp. lactis KF147]	100	0	684
NP_267964.1	알코올 탈수소효소 [락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) subsp. lactis Il1403]	99	0	681
YP_001033251.1	알코올 탈수소효소 [락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) subsp. cremoris MG1363]	95	0	659
YP_811585.1	알코올 탈수소효소 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) subsp. cremoris SK11]	95	0	658
ZP_07367864.1	알코올 탈수소효소 [페디오코커스 아시딜락티시(*Pediococcus acidilactici*) DSM 20284]	69	2.00E-129	466
YP_794451.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) ATCC 367]	66	1.00E-127	460
ZP_06197454.1	알코올 탈수소효소 [페디오코커스 아시딜락티시(*Pediococcus acidilactici*) 7_4]	69	8.00E-124	447
YP_001374103.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) subsp. cytotoxis NVH 391-98]	65	1.00E-123	447
ZP_00741101.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 투린기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) serovar israelensis ATCC 35646]	64	9.00E-123	444
ZP_04431756.1	알코올 탈수소효소 GroES 도메인 단백질 [바실루스 코아귤란스(*Bacillus coagulans*) 36D1]	63	1.00E-122	444
ZP_04101989.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 투린기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) serovar berliner ATCC 10792]	64	1.00E-122	443
ZP_03943574.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 부스네리(*Lactobacillus buchneri*) ATCC 11577]	62	2.00E-122	443
YP_002338331.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) AH187]	64	2.00E-122	443
ZP_04145518.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 투린기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) serovar tochigiensis BGSC 4Y1]	64	2.00E-122	443
ZP_00236660.1	알코올 탈수소효소, 프로판올-선호 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) G9241]	64	2.00E-122	443
ZP_03954717.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 힐가르디(*Lactobacillus hilgardii*) ATCC 8290]	62	2.00E-122	443

[0744]

ZP_06011170.1	알코올 탈수소효소 1 [렙토트리키아 굿펠로위(*Leptotrichia goodfellowii*) F0264]	65	2.00E-122	442
ZP_07537679.1	알코올 탈수소효소 아연-결합 도메인 단백질 [액티노바실루스 플로로뉴모니애(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) serovar 9 str. CVJ13261]	63	2.00E-122	442
NP_844655.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 안트라시스(*Bacillus anthracis*) str. Ames]	64	3.00E-122	442
ZP_04071880.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 투린기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) IBL 200]	64	3.00E-122	442
YP_001844344.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) IFO 3956]	64	3.00E-122	442
ZP_04227732.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) Rock3-29]	64	4.00E-122	442
YP_002529920.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) Q1]	64	4.00E-122	442
ZP_03107320.1	추정 알코올 탈수소효소, 아연-포함 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) NVH0597-99]	64	5.00E-122	441
YP_001644942.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 웨이헨스테파넨시스(*Bacillus weihenstephanensis*) KBAB4]	64	5.00E-122	441
ZP_03940565.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) subsp. gravesensis ATCC 27305]	62	5.00E-122	441
ZP_05863633.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) 28-3-CHN]	64	5.00E-122	441
ZP_04174477.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) AH1273]	64	5.00E-122	441
ZP_04168725.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 미코이데스(*Bacillus mycoides*) DSM 2048]	64	5.00E-122	441
ZP_03945523.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 퍼멘툼(*Lactobacillus fermentum*) ATCC 14931]	64	5.00E-122	441
YP_894846.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 투린기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) str. Al Hakam]	64	6.00E-122	441
ZP_04273257.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) BDRD-ST24]	64	6.00E-122	441
ZP_07337905.1	알코올 탈수소효소 [액티노바실루스 플로로뉴모니애(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) serovar 2 str. 4226]	63	6.00E-122	441
YP_795183.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) ATCC 367]	64	6.00E-122	441

[0745]

ZP_03234447.1	추정 알코올 탈수소효소, 아연-포함 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) H3081.97]	64	7.00E-122	441
ZP_00134308.2	COG1064: Zn-의존성 알코올 탈수소효소 [액티노바실루스 플로로뉴모니애(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) serovar 1 str. 4074]	63	7.00E-122	441
NP_831985.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) ATCC 14579]	64	7.00E-122	441
NP_978607.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) ATCC 10987]	65	7.00E-122	441
YP_002366965.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) B4264]	64	8.00E-122	441
ZP_04283955.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) ATCC 4342]	64	8.00E-122	441
ZP_04218185.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) Rock3-44]	64	1.00E-121	441
ZP_04186048.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) AH1271]	64	1.00E-121	441
ZP_07542038.1	알코올 탈수소효소 아연-결합 도메인 단백질 [액티노바실루스 플로로뉴모니애(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) serovar 11 str. 56153]	63	1.00E-121	440
YP_003664530.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 투린기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) BMB171]	64	1.00E-121	440
ZP_04222478.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) Rock3-42]	64	1.00E-121	440
ZP_04305999.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) 172560W]	64	1.00E-121	440
ZP_04317351.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) ATCC 10876]	64	2.00E-121	440
YP_001035842.1	알코올 탈수소효소 [스트렙토코커스 상귀니스(*Streptococcus sanguinis*) SK36]	66	2.00E-121	439
ZP_07336540.1	알코올 탈수소효소 [액티노바실루스 플로로뉴모니애(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) serovar 6 str. Femo]	63	2.00E-121	439
ZP_03232573.1	추정 알코올 탈수소효소, 아연-포함 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) AH1134]	64	2.00E-121	439
ZP_04084316.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 투린기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) serovar huazhongensis BGSC 4BD1]	64	2.00E-121	439
YP_036379.1	알코올 탈수소효소 [바실루스 투린기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) serovar konkukian str. 97-27]	64	2.00E-121	439
ZP_03713785.1	가상 단백질 EIKCOROL_01470 [아이케넬라 코로덴스(*Eikenella corrodens*) ATCC 23834]	64	3.00E-121	439

[0746]

ZP_04300512.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) MM3]	64	3.00E-121	439
ZP_04261933.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) BDRD-ST196]	64	3.00E-121	439
ZP_04197309.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) AH603]	64	3.00E-121	439
ZP_04289229.1	알코올 탈수소효소 1 [바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*) R309803]	64	6.00E-121	438
YP_001449881.1	알코올 탈수소효소 [스트렙토코커스 고르도니(*Streptococcus gordonii*) str. Challis substr. CH1]	64	1.00E-120	437
YP_002886170.1	알코올 탈수소효소 아연-결합 도메인 단백질 [엑시구오박테륨(*Exiguobacterium*) 종 AT1b]	64	1.00E-120	437
ZP_03072955.1	알코올 탈수소효소 GroES 도메인 단백질 [락토바실루스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 100-23]	63	3.00E-120	435
ZP_01817011.1	알코올 탈수소효소, 아연-포함 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) SP3-BS71]	65	5.00E-120	435
ZP_03974464.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) CF48-3A]	63	6.00E-120	434
ZP_01824429.1	알코올 탈수소효소, 아연-포함 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) SP11-BS70]	65	8.00E-120	434
YP_002735395.1	알코올 탈수소효소 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) JJA]	65	8.00E-120	434
CAQ49114.1	알코올 탈수소효소, 프로판올-선호 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) subsp. aureus ST398]	63	1.00E-119	434
ZP_01819490.1	알코올 탈수소효소, 아연-포함 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) SP6-BS73]	65	1.00E-119	434
ZP_01832462.1	알코올 탈수소효소, 아연-포함 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) SP19-BS75]	65	1.00E-119	434
ZP_01834441.1	알코올 탈수소효소, 아연-포함 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) SP23-BS72]	65	1.00E-119	433
ZP_07644167.1	알코올 탈수소효소, 프로판올-선호 [스트렙토코커스 미티스(*Streptococcus mitis*) NCTC 12261]	65	1.00E-119	433
NP_344823.1	알코올 탈수소효소 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) TIGR4]	65	1.00E-119	433
YP_003878532.1	알코올 탈수소효소, 프로판올-선호 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 670-6B]	65	1.00E-119	433

[0747]

YP_001272079.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) DSM 20016]	63	1.00E-119	433
ZP_03960239.1	알코올 탈수소효소 [락토바실루스 바기날리스(*Lactobacillus vaginalis*) ATCC 49540]	62	1.00E-119	433
ZP_07646288.1	알코올 탈수소효소 [스트렙토코커스 미티스(*Streptococcus mitis*) SK564]	65	2.00E-119	433
YP_002739644.1	알코올 탈수소효소 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 70585]	65	2.00E-119	433
YP_002737553.1	알코올 탈수소효소 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) P1031]	65	2.00E-119	433
YP_002741829.1	알코올 탈수소효소 [[스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) Taiwan19F-14]	65	2.00E-119	433
ZP_05689169.1	알코올 탈수소효소 GroES 도메인-포함 단백질 [스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) A9299]	63	2.00E-119	432
ZP_07642509.1	알코올 탈수소효소 [스트렙토코커스 미티스(*Streptococcus mitis*) SK597]	65	2.00E-119	432
ZP_02718124.1	알코올 탈수소효소, 프로판올-선호 [스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) CDC3059-06]	65	2.00E-119	432
ZP_07647302.1	알코올 탈수소효소 집단 단백질 [스트렙토코커스 미티스(*Streptococcus mitis*) SK321]	65	2.00E-119	432
NP_371129.1	알코올 탈수소효소 [스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) subsp. aureus Mu50]	62	3.00E-119	432
NP_645385.1	알코올 탈수소효소 [스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) subsp. aureus MW2]	62	3.00E-119	432
ZP_01826570.1	알코올 탈수소효소, 아연-포함 [스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) SP14-BS69]	65	4.00E-119	432
CBW35926.1	알코올 탈수소효소 [스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) INV104]	65	4.00E-119	432
YP_003305918.1	알코올 탈수소효소 아연-결합 도메인 단백질 [스트렙토바실루스 모닐리포스미스(*Streptobacillus moniliformis*) DSM 12112]	63	4.00E-119	432
YP_003445415.1	알코올 탈수소효소, 프로판올-선호, COG1064 [스트렙토코커스 미티스(*Streptococcus mitis*) B6]	64	4.00E-119	432
ZP_05900148.1	알코올 탈수소효소, 프로판올-선호 [렙토트리키아 호프스타디(*Leptotrichia hofstadii*) F0254]	64	6.00E-119	431

[0748]

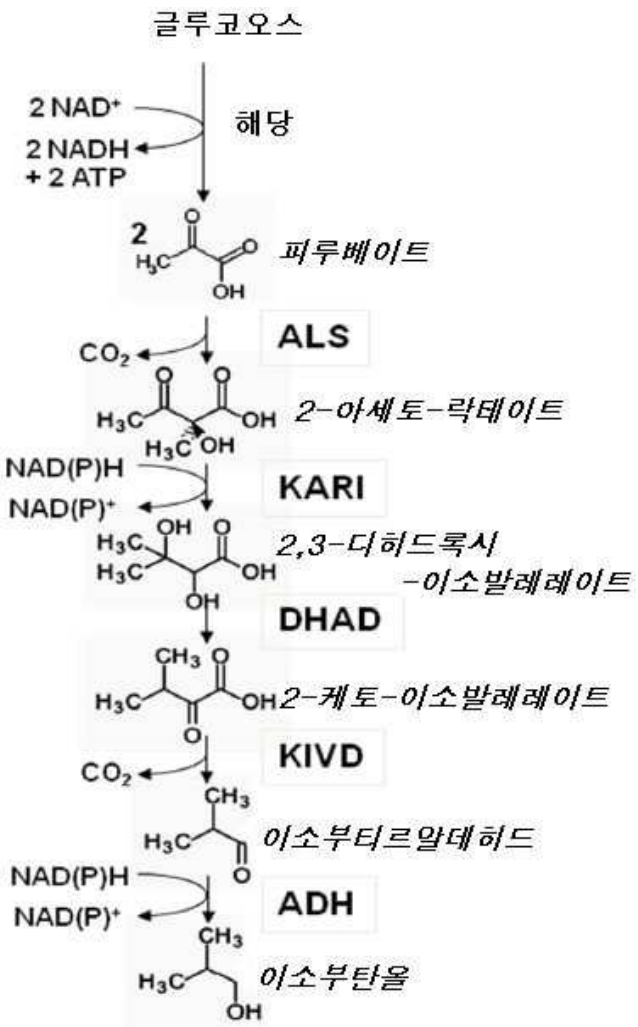
[0749] 상기 상세한 설명은 명료한 이해를 위해 제공되고 부당한 제한으로서 해석되지 않아야 하는데, 그 이유는 변형이 당업자에게 명백할 것이기 때문이다.

[0750] 본 발명이 특정 구체예와 관련하여 기술되긴 했지만, 추가의 변형이 가능하고, 그리고 일반적으로, 본 발명의 원리에 따라, 그리고 본 발명이 속하는 분야에서 공지되거나 관례적 실행 내에 있고, 앞서 진술된 본질적 특징(essential feature)에 적용될 수 있고, 첨부된 특허청구범위의 범위에서 추종되는 바와 같은 본 발명의 개시로부터 벗어남을 비롯하여, 본 발명의 임의의 변화, 용도, 또는 적응을 본 출원이 커버하는 것으로 이해될 것이다.

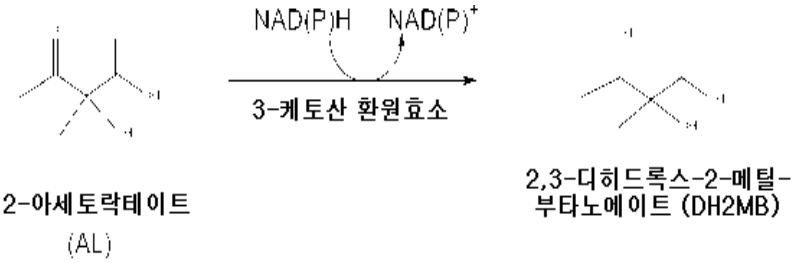
[0751] 본 명세서에서 인용된 모든 특허, 특허 출원, 그리고 간행물의 특허청구범위, 도면 및/또는 그림을 비롯한 개시는 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

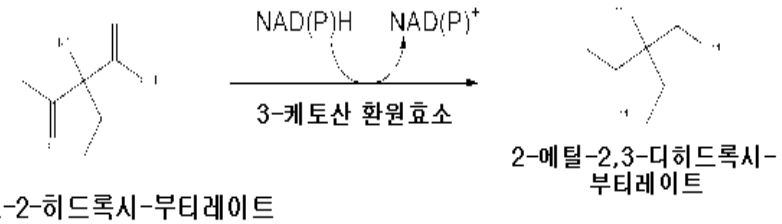
도면

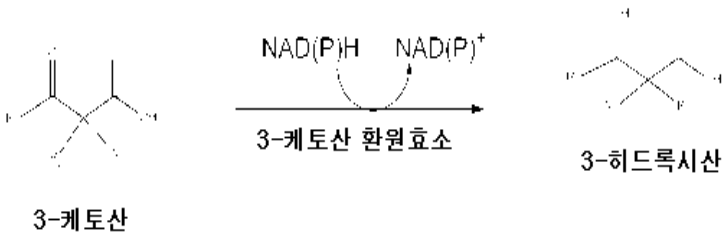
도면1


글루코오스
2 NAD+
2 NADH
+ 2 ATP
해당
2
피루베이트
CO2
ALS
2-아세토-락테이트
NAD(P)H
NAD(P)+
KARI
2,3-디히드록시
-이소발레레이트
DHAD
2-케토-이소발레레이트
CO2
KIVD
이소부티르알데히드
NAD(P)H
NAD(P)+
ADH
이소부탄올

도면2

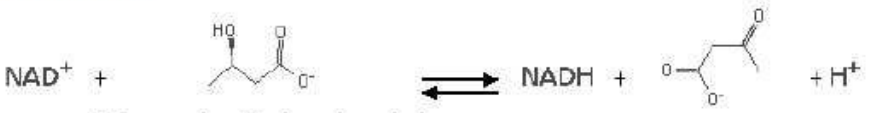

NAD(P)H
NAD(P)+
3-케토산 환원효소
2-아세토락테이트
(AL)
2,3-디히드록스-2-메틸-
부타노에이트 (DH2MB)


NAD(P)H
NAD(P)+
3-케토산 환원효소
2-에틸-2,3-디히드록시-
부티레이트
2-아세토-2-히드록시-부티레이트


NAD(P)H
NAD(P)+
3-케토산 환원효소
3-히드록시산
3-케토산

도면3

EC 1.1.1.30



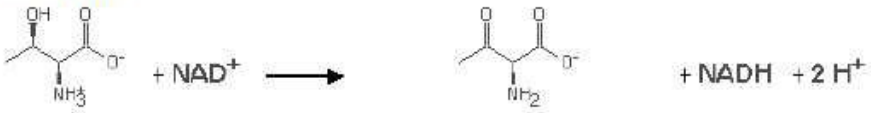
(R)-3-히드록시부타노에이트 아세토아세테이트

EC 1.1.1.31



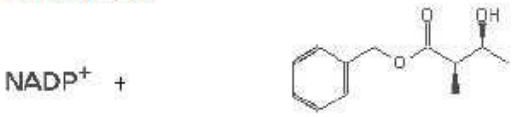
(S)-3-히드록시-이소부티레이트 (S)-메틸말로네이트-세미알데히드

EC 1.1.1.103

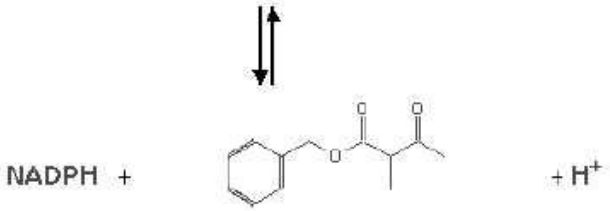


L-트레오닌 2-아미노-3-옥소부타노에이트

EC 1.1.1.217



벤질(2r,3s)-2-메틸-3-히드록시부타노에이트



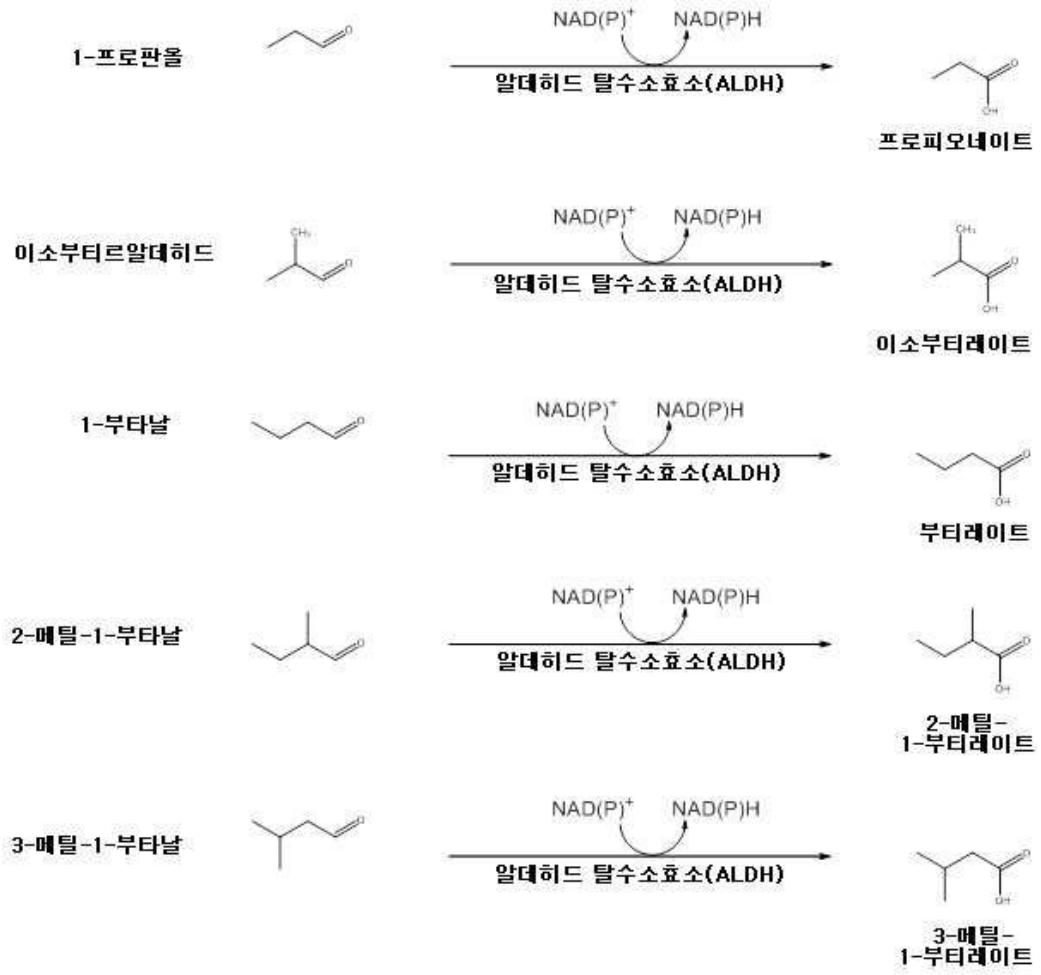
벤질-2-메틸-3-옥소부타노에이트

EC1.1.1.298

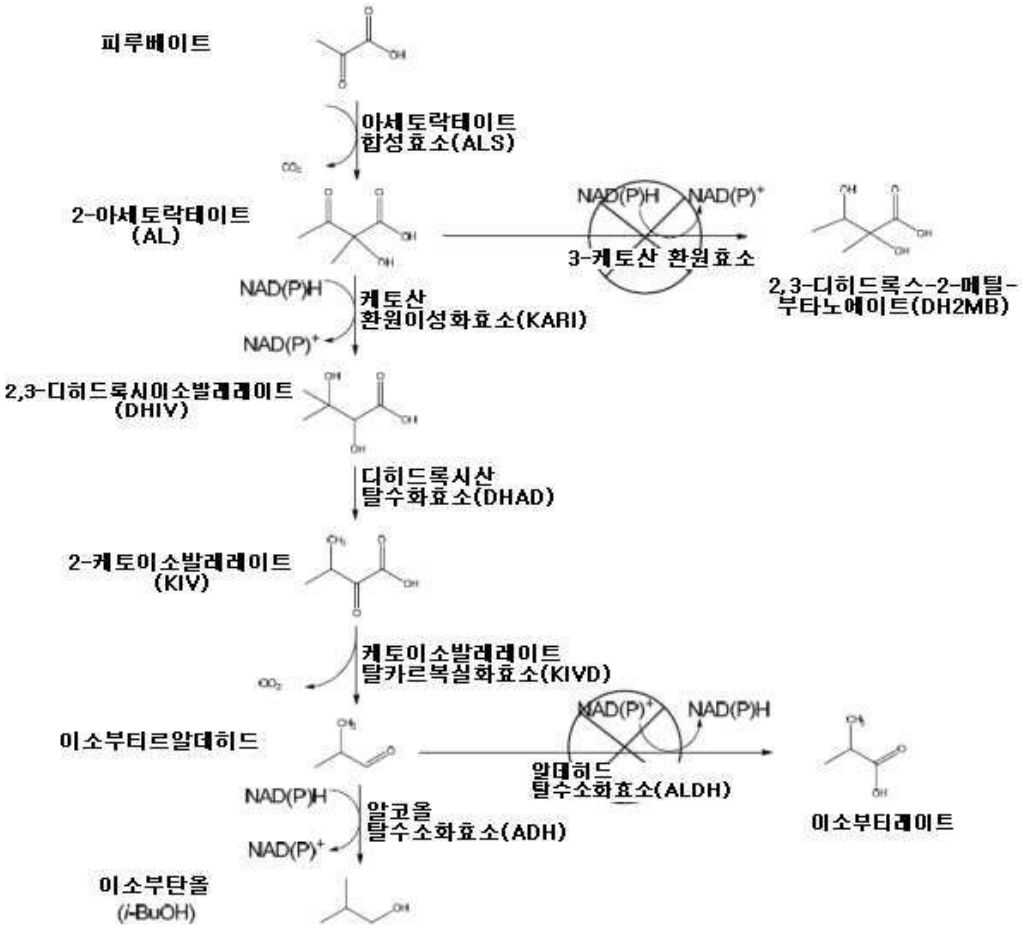


3-히드록시프로피오네이트 말로네이트 세미알데히드

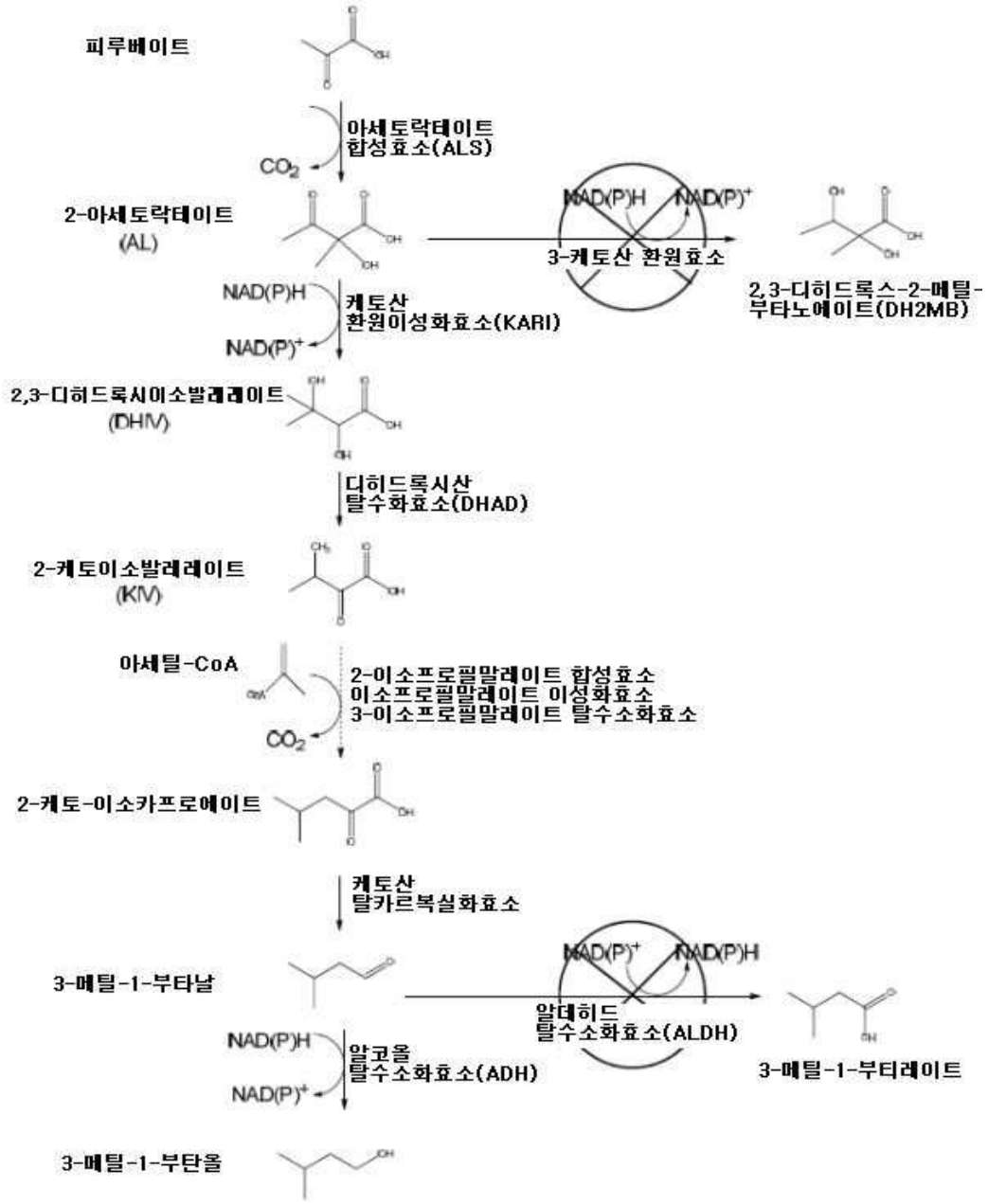
도면4


1-프로판올
NAD(P)+
NAD(P)H
알데히드 탈수소효소(ALDH)
프로피오네이트
이소부티르알데히드
NAD(P)+
NAD(P)H
알데히드 탈수소효소(ALDH)
이소부티레이트
1-부타날
NAD(P)+
NAD(P)H
알데히드 탈수소효소(ALDH)
부티레이트
2-메틸-1-부타날
NAD(P)+
NAD(P)H
알데히드 탈수소효소(ALDH)
2-메틸-
1-부티레이트
3-메틸-1-부타날
NAD(P)+
NAD(P)H
알데히드 탈수소효소(ALDH)
3-메틸-
1-부티레이트

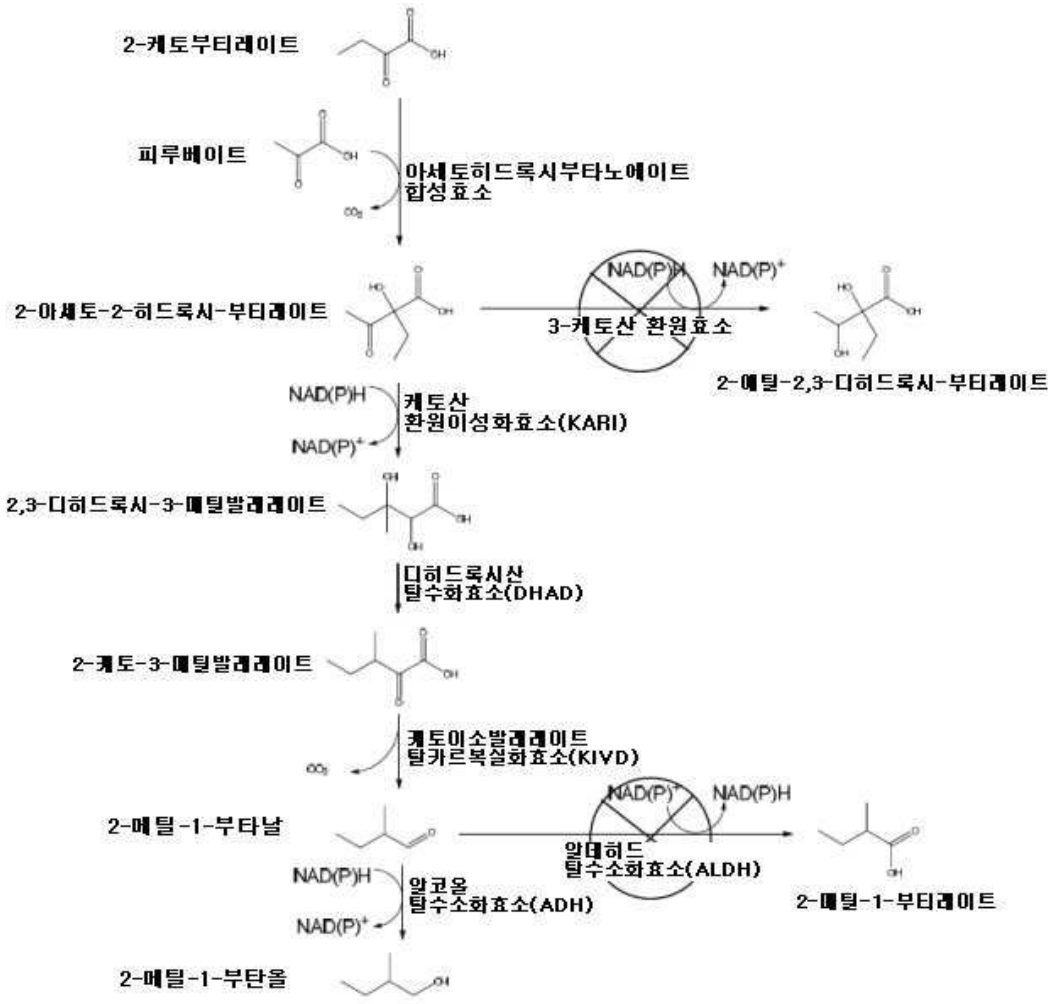
도면5


피루베이트
아세토락테이트
합성효소(ALS)
2-아세토락테이트
(AL)
NAD(P)H
NAD(P)+
3-케토산 환원효소
2,3-디히드록스-2-메틸-
부타노에이트(DH2MB)
NAD(P)H
케토산
환원이성화효소(KARI)
NAD(P)+
2,3-디히드록시이소발레레이트
(DHIV)
디히드록시산
탈수화효소(DHAD)
2-케토이소발레레이트
(KIV)
케토이소발레레이트
탈카르복실화효소(KIVD)
이소부티르알데히드
NAD(P)+
NAD(P)H
알데히드
탈수소화효소(ALDH)
이소부티레이트
NAD(P)H
알코올
탈수소화효소(ADH)
NAD(P)+
이소부탄올
(i-BuOH)

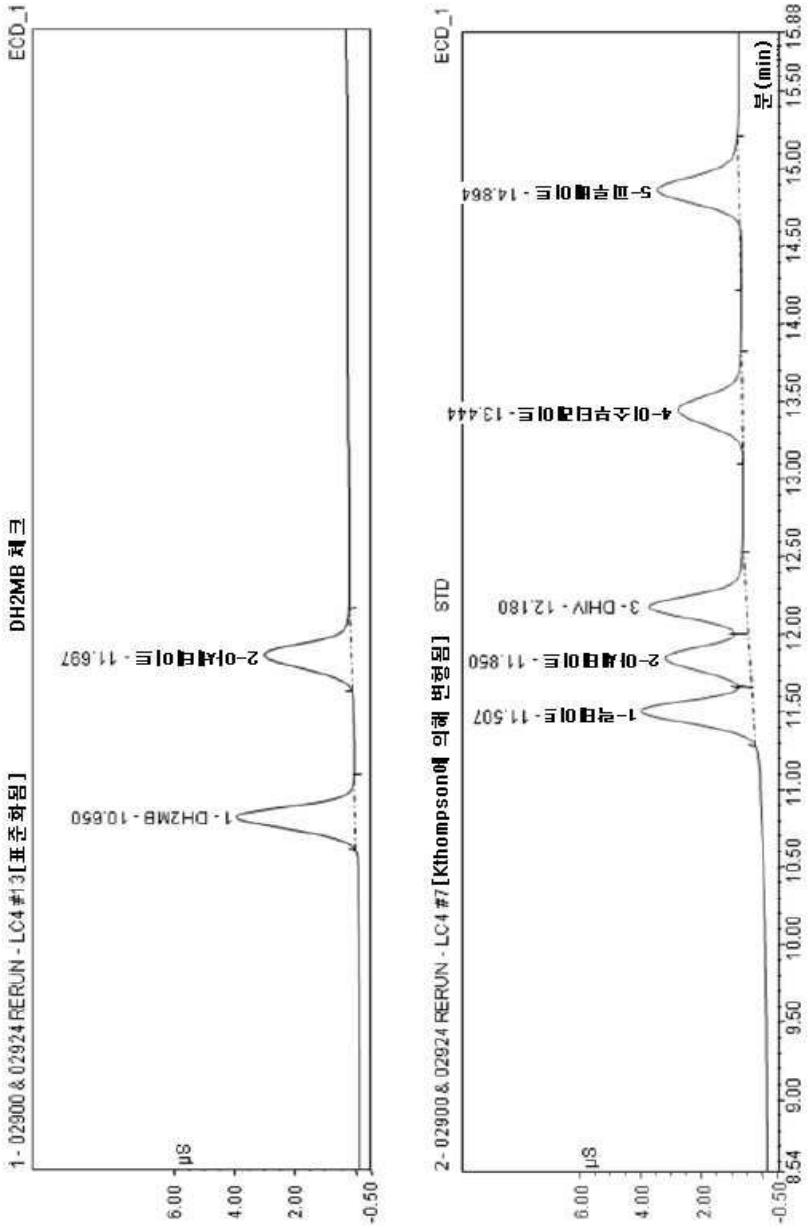
도면6


피루베이트
아세토락테이트
합성효소(ALS)
CO2
2-아세토락테이트
(AL)
NAD(P)H
NAD(P)+
3-케토산 환원효소
2,3-디히드록스-2-메틸-
부타노에이트(DH2MB)
NAD(P)H
케토산
환원이성화효소(KARI)
NAD(P)+
2,3-디히드록시이소발레레이트
(DHIV)
디히드록시산
탈수화효소(DHAD)
2-케토이소발레레이트
(KIV)
아세틸-CoA
2-이소프로필말레이트 합성효소
이소프로필말레이트 이성화효소
3-이소프로필말레이트 탈수소화효소
CO2
2-케토-이소카프로에이트
케토산
탈카르복실화효소
3-메틸-1-부타날
NAD(P)+
NAD(P)H
알데히드
탈수소화효소(ALDH)
3-메틸-1-부티레이트
NAD(P)H
알코올
탈수소화효소(ADH)
NAD(P)+
3-메틸-1-부탄올

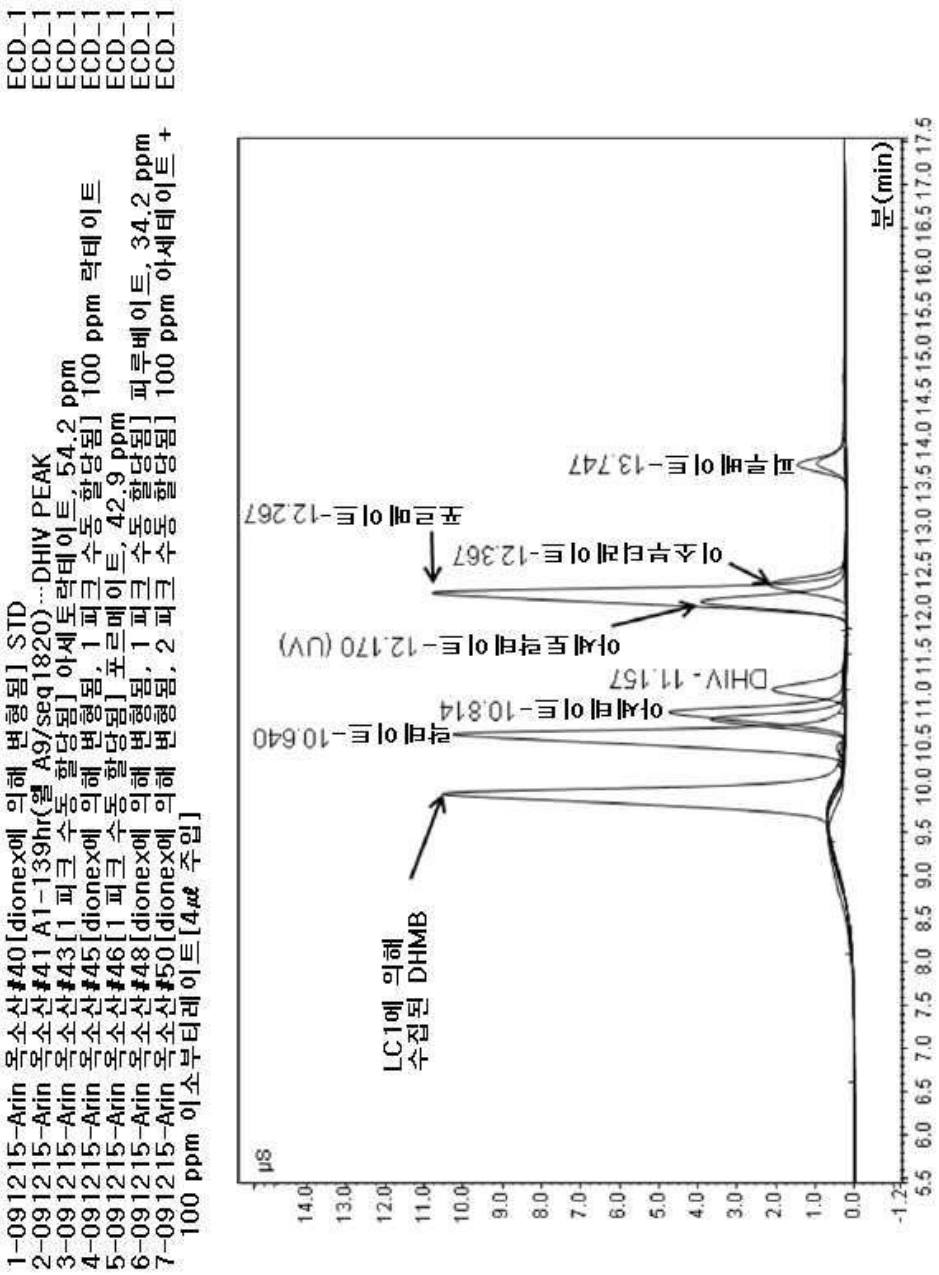
도면7


2-케토부티레이트
피루베이트
아세토히드록시부타노에이트
합성효소
2-아세토-2-히드록시-부티레이트
NAD(P)H
NAD(P)+
3-케토산 환원효소
2-에틸-2,3-디히드록시-부티레이트
NAD(P)H
케토산
환원이성화효소(KARI)
NAD(P)+
2,3-디히드록시-3-메틸발레레이트
디히드록시산
탈수화효소(DHAD)
2-케토-3-메틸발레레이트
케토이소발레레이트
탈카르복실화효소(KIVD)
2-메틸-1-부타날
NAD(P)+
NAD(P)H
알데히드
탈수소화효소(ALDH)
2-메틸-1-부티레이트
NAD(P)H
알코올
탈수소화효소(ADH)
NAD(P)+
2-메틸-1-부탄올

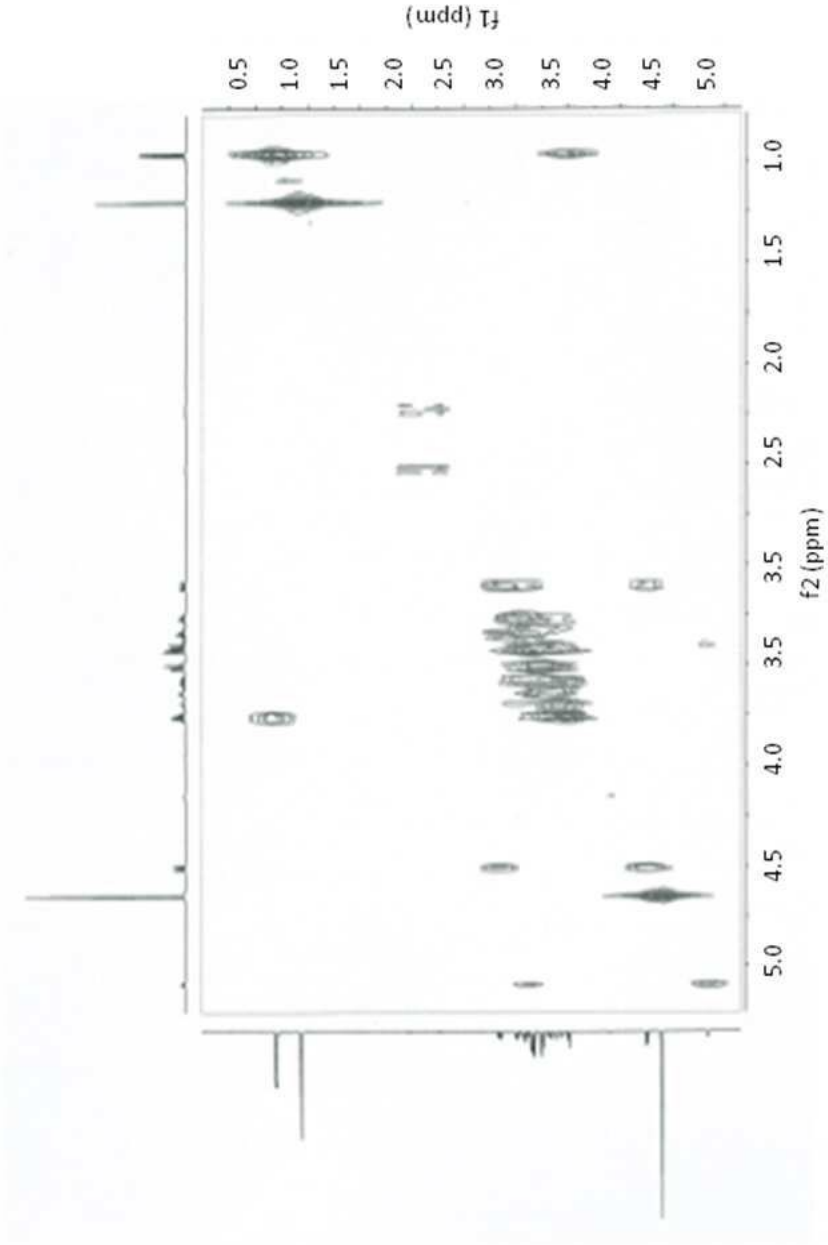
도면8


ECD_1
DH2MB 체크
1 - 02900 & 02924 RERUN - LC4 #13 [표준화됨]
1 - DH2MB - 10.650
2-아세틸이트 - 11.697
μS
6.00
4.00
2.00
-0.50
ECD_1
STD
2 - 02900 & 02924 RERUN - LC4 #7 [Kthompson에 의해 변형됨]
1-락틸이트 - 11.507
2-아세틸이트 - 11.850
3 - DHIV - 12.180
4-이소부티릴이트 - 13.444
5-피루빌이트 - 14.864
분 (min)
8.54
9.00
9.50
10.00
10.50
11.00
11.50
12.00
12.50
13.00
13.50
14.00
14.50
15.00
15.50
15.88

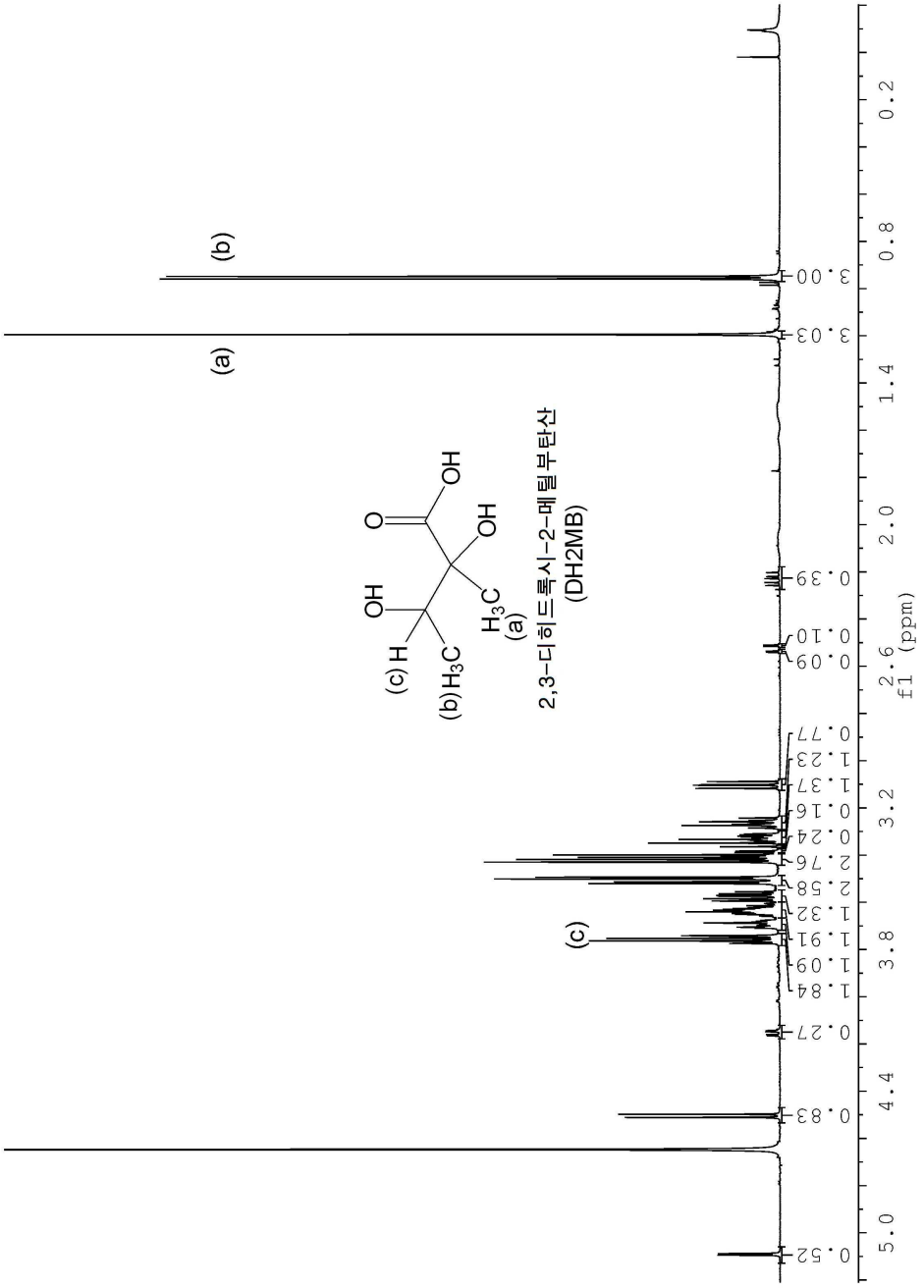
도면9


1-091215-Arin 옥소산#40[dionex에 의해 변형됨] STD ECD_1
2-091215-Arin 옥소산#41 A1-139hr(월 A9/seq1820)…DHIV PEAK ECD_1
3-091215-Arin 옥소산#43[1 피크 수동 할당됨] 아세토락테이트, 54.2 ppm ECD_1
4-091215-Arin 옥소산#45[dionex에 의해 변형됨, 1 피크 수동 할당됨] 100 ppm 락테이트 ECD_1
5-091215-Arin 옥소산#46[1 피크 수동 할당됨] 포르메이트, 42.9 ppm ECD_1
6-091215-Arin 옥소산#48[dionex에 의해 변형됨, 1 피크 수동 할당됨] 피루베이트, 34.2 ppm ECD_1
7-091215-Arin 옥소산#50[dionex에 의해 변형됨, 2 피크 수동 할당됨] 100 ppm 아세테이트 +
100 ppm 이소부티레이트 [4㎕ 주입]
LC1에 의해
수집된 DHMB
락테이트-10.640
아세테이트-10.814
DHIV - 11.157
아세토락테이트-12.170 (UV)
이소부티레이트-12.367
포르메이트-12.267
피루베이트-13.747
nA
분(min)

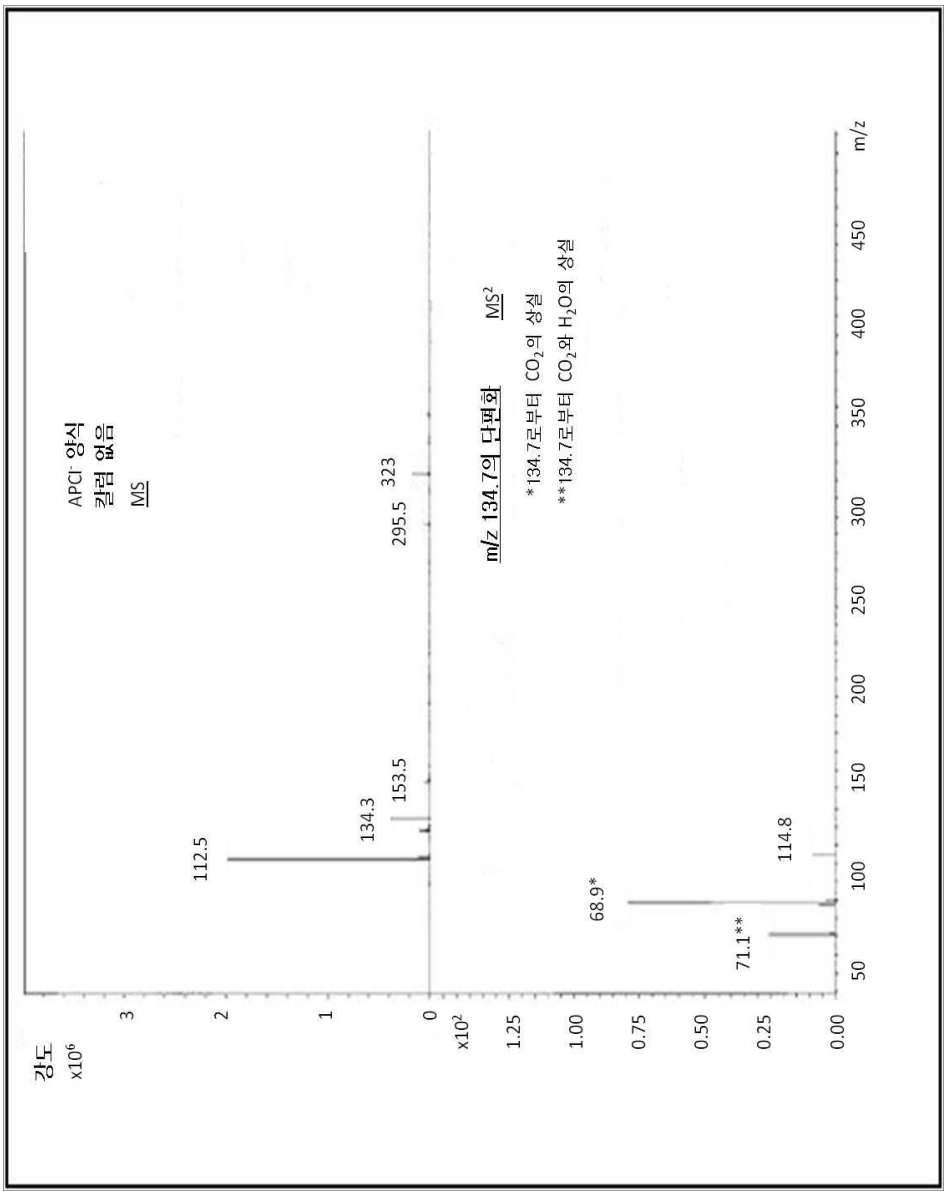
도면10



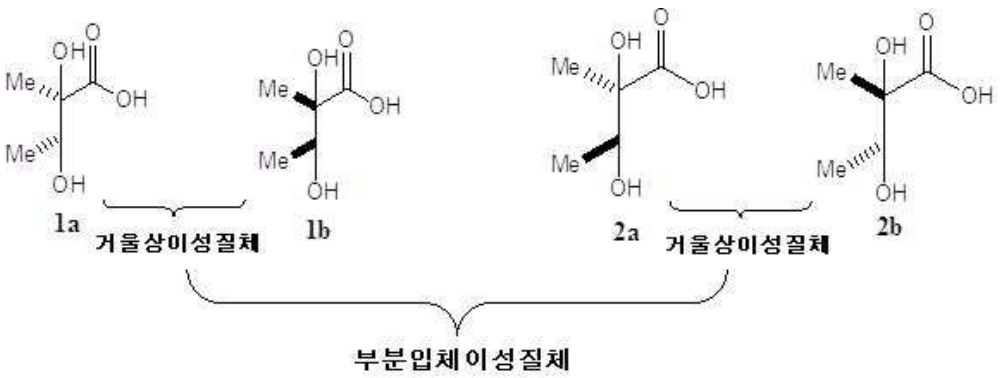
도면11


(b)
(a)
(c)
3.00
3.03
0.39
0.10
0.09
0.77
1.23
1.37
0.16
0.24
2.76
2.58
1.32
1.91
1.09
1.84
0.27
0.83
0.52
5.0
4.4
3.8
3.2
2.6
2.0
1.4
0.8
0.2
f1 (ppm)
OH
O
OH
OH
(c) H
(b) H3C
H3C
(a)
2,3-디하이드록시-2-메틸부탄산
(DH2MB)

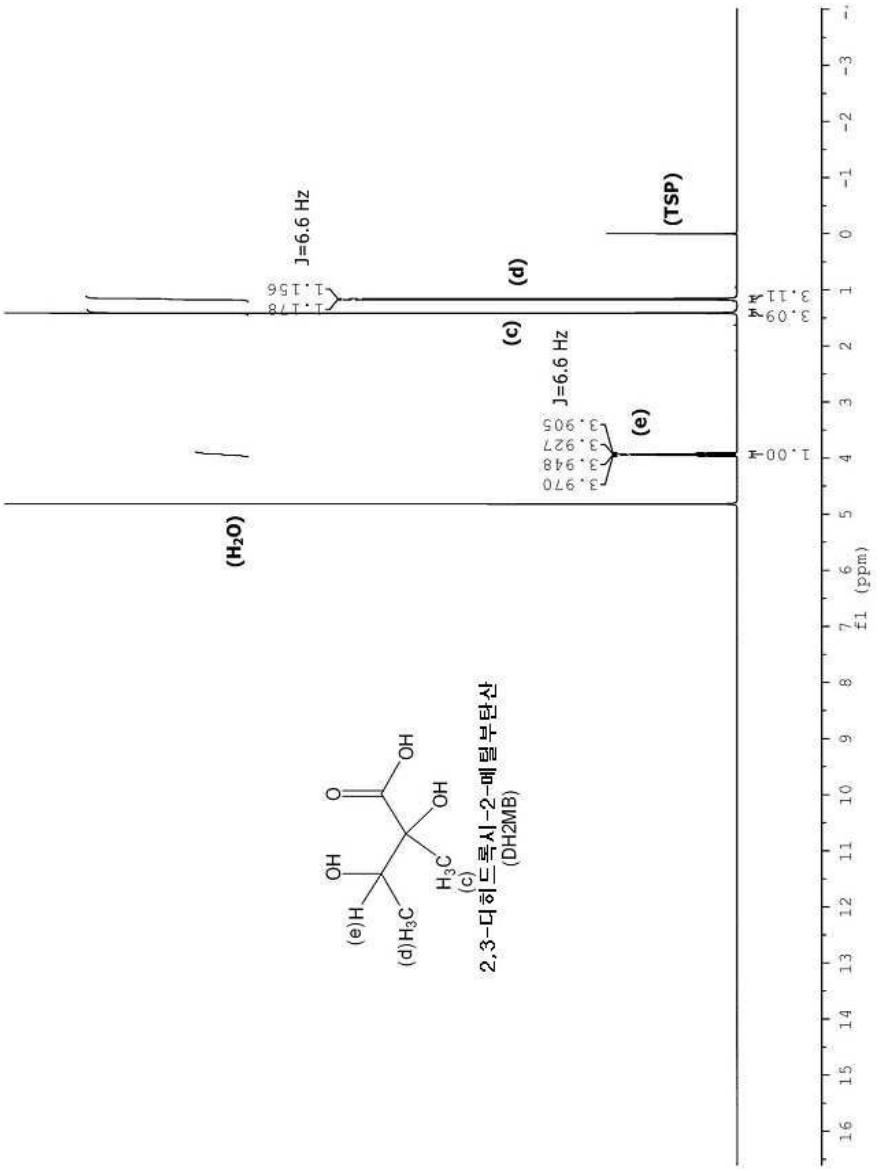
도면12


APCI- 양식
칼럼 없음
MS
m/z 134.7의 단편화
MS2
*134.7로부터 CO2의 상실
**134.7로부터 CO2와 H2O의 상실
강도
x10^6
x10^2
m/z
323
295.5
153.5
134.3
112.5
114.8
68.9*
71.1**

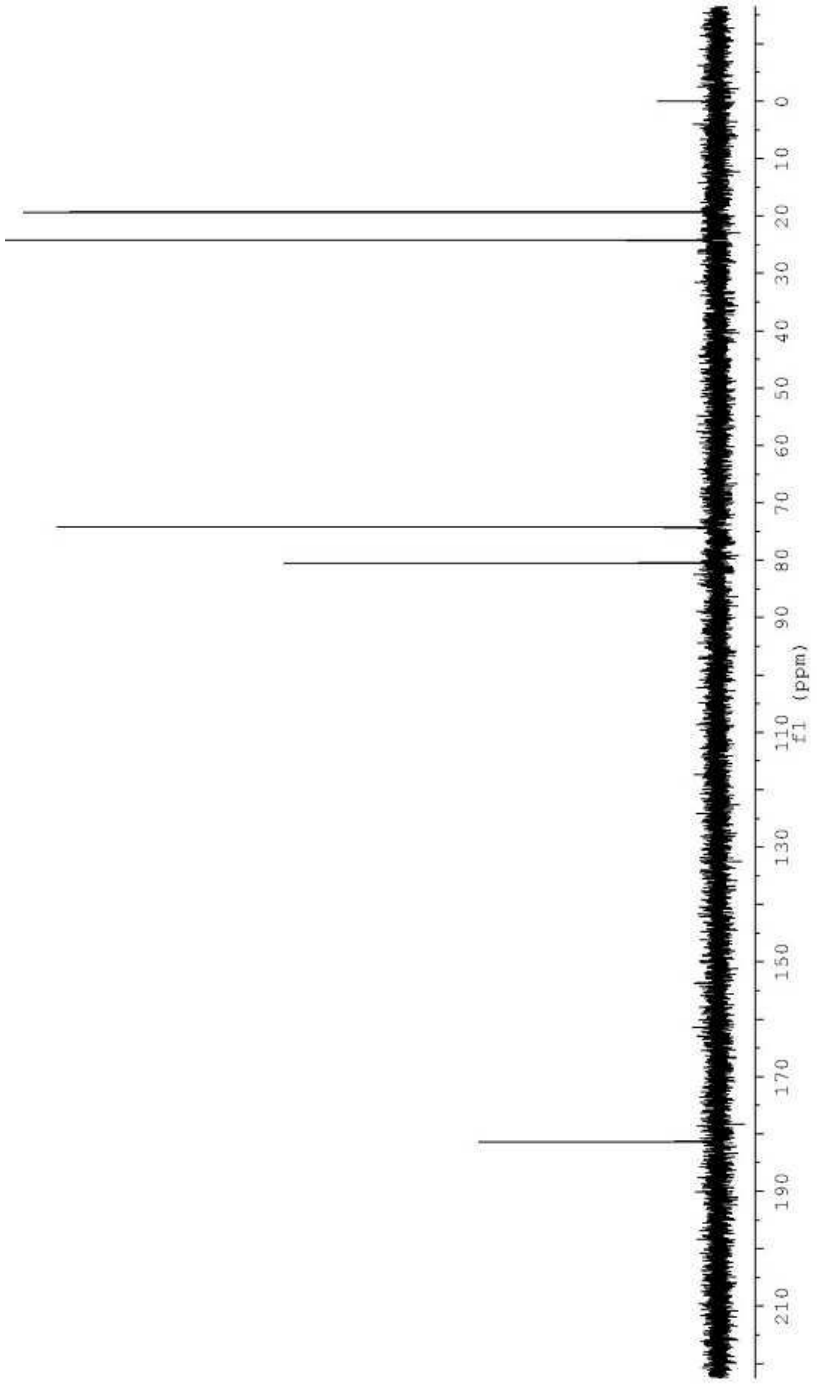
도면13


1a
1b
2a
2b
거울상이성질체
거울상이성질체
부분입체이성질체

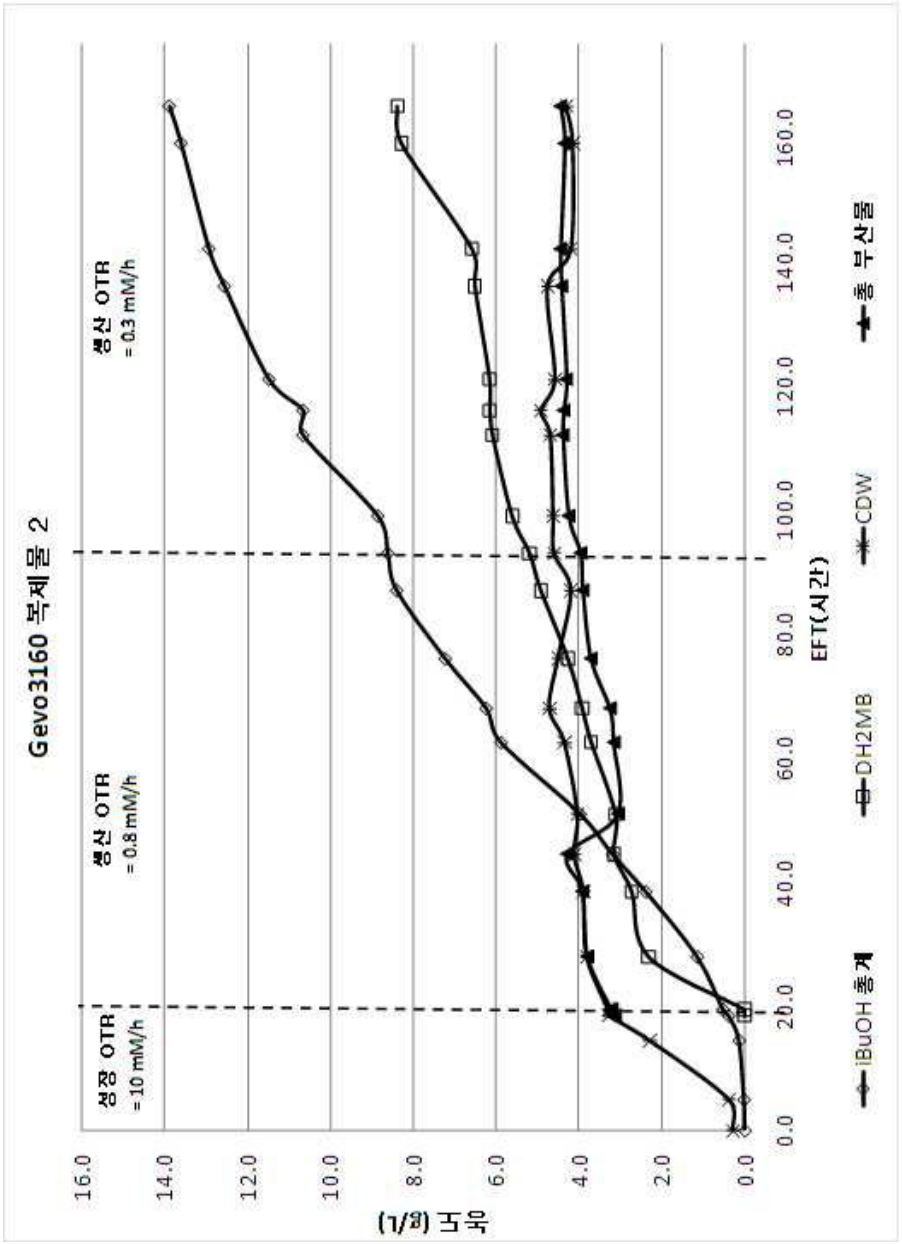
도면14


(H2O)
(TSP)
(d)
(c)
(e)
J=6.6 Hz
J=6.6 Hz
1.178
1.156
3.970
3.948
3.927
3.905
3.114
3.094
1.000
f1 (ppm)
2,3-디히드록시-2-메틸부탄산
(DH2MB)
OH
O
OH
OH
(e)H
(d)H3C
H3C
(c)

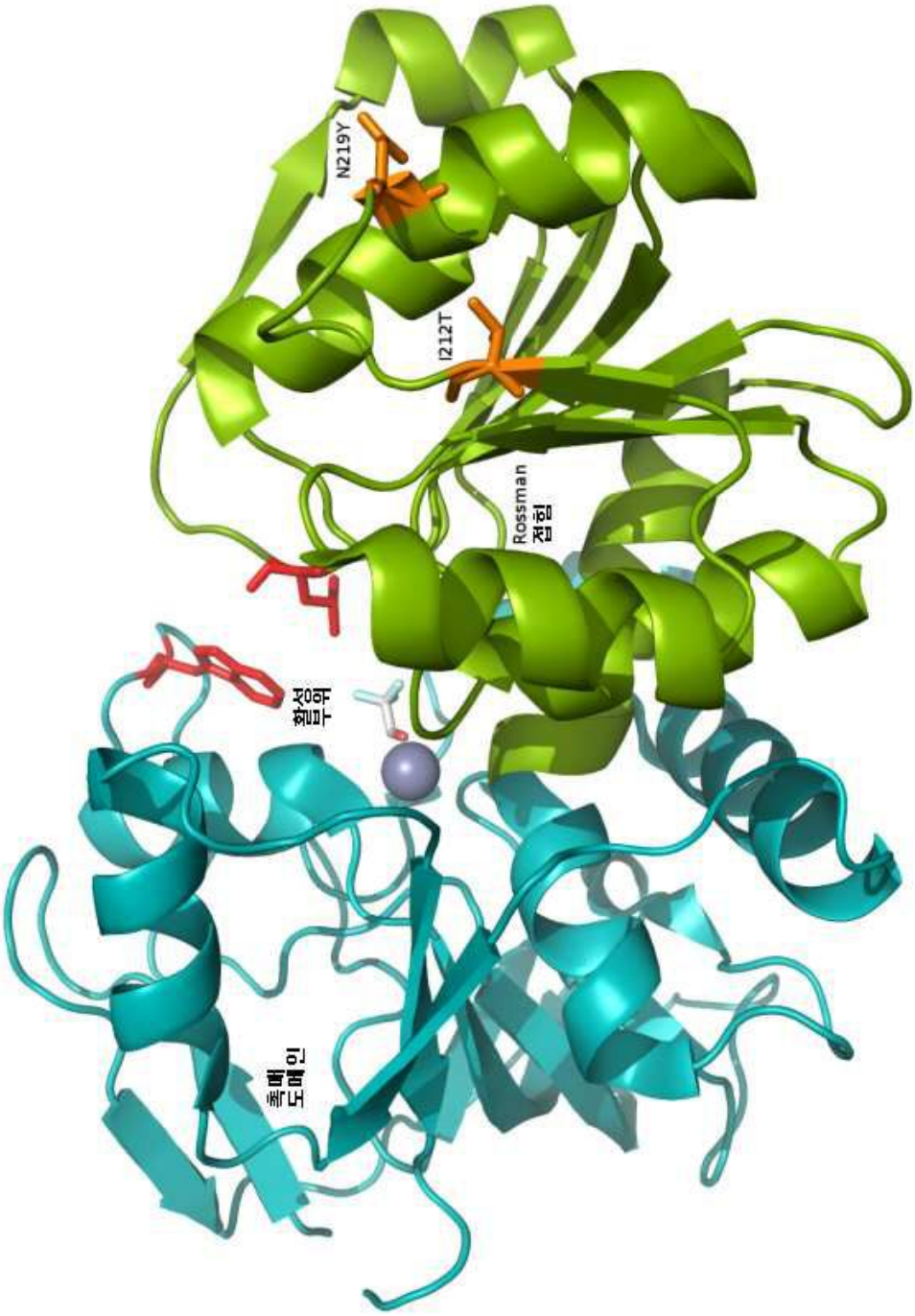
도면15



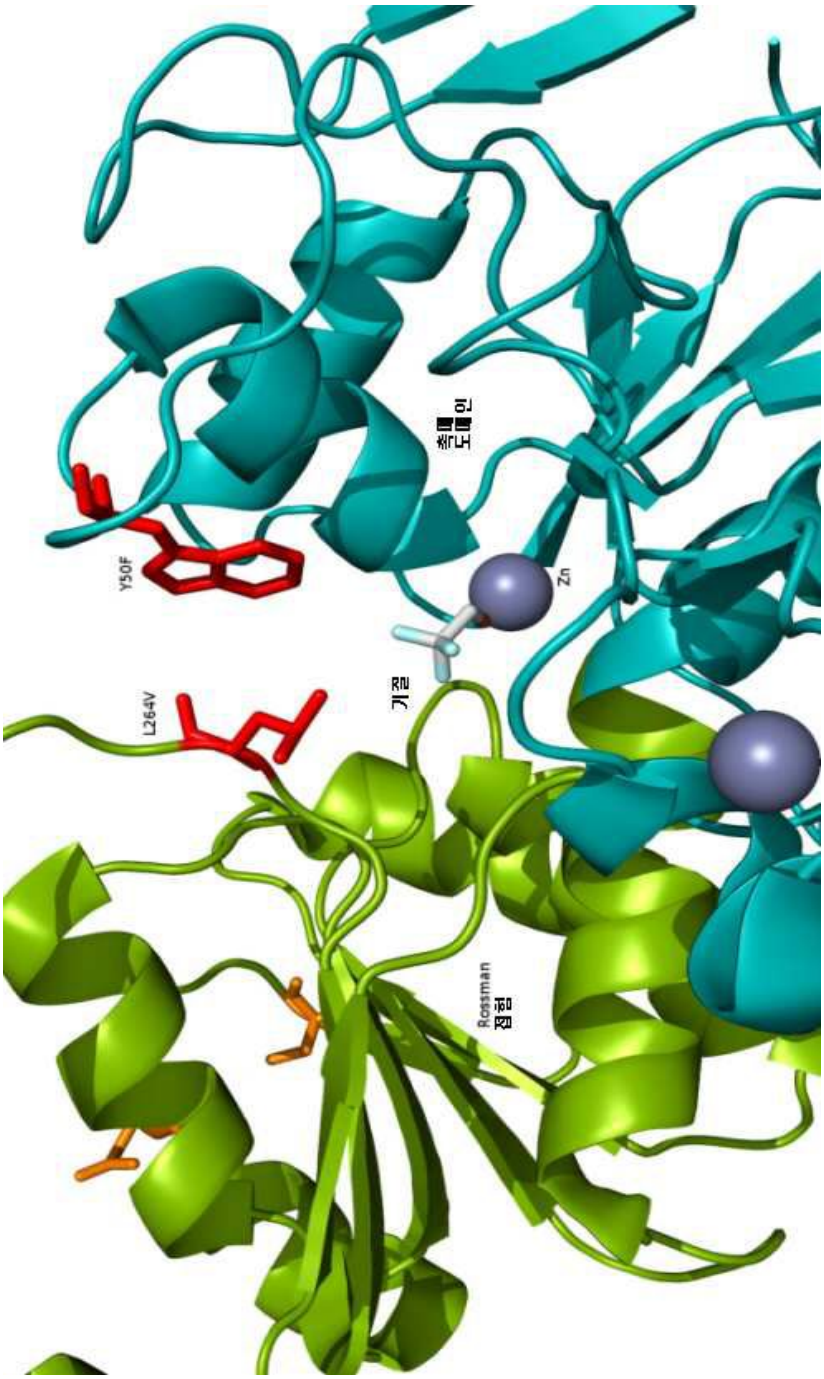
도면16


Gevo3160 복제물 2
성장 OTR
= 10 mM/h
생산 OTR
= 0.8 mM/h
생산 OTR
= 0.3 mM/h
농도 (g/L)
EFT(시간)
iBuOH 총계
DH2MB
CDW
총 부산물

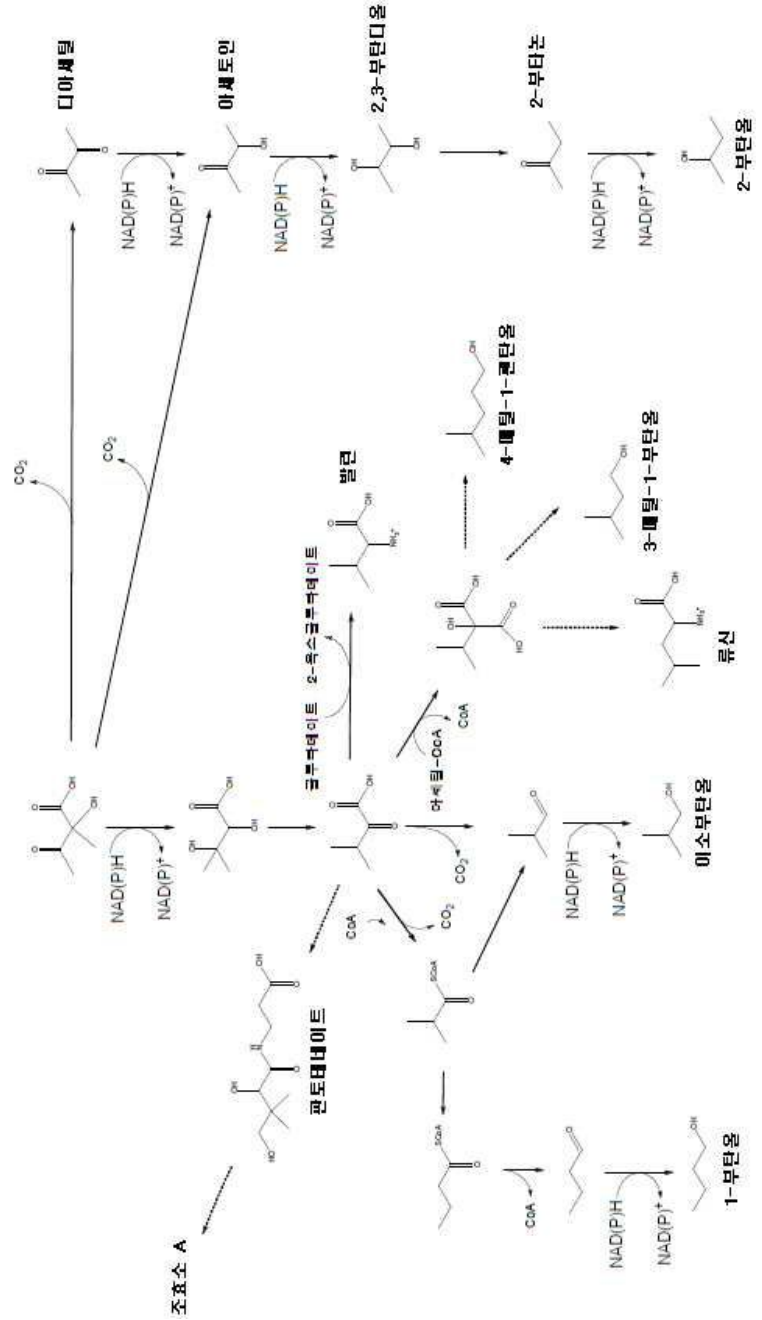
도면17a



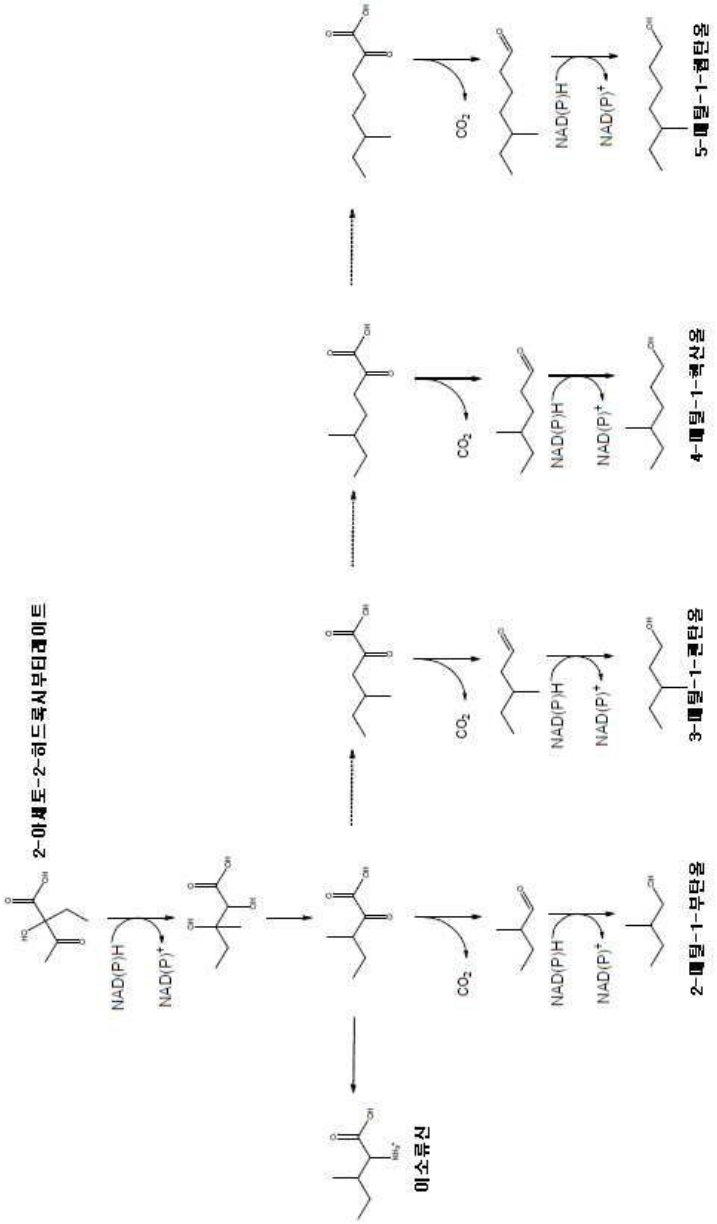
도면17b



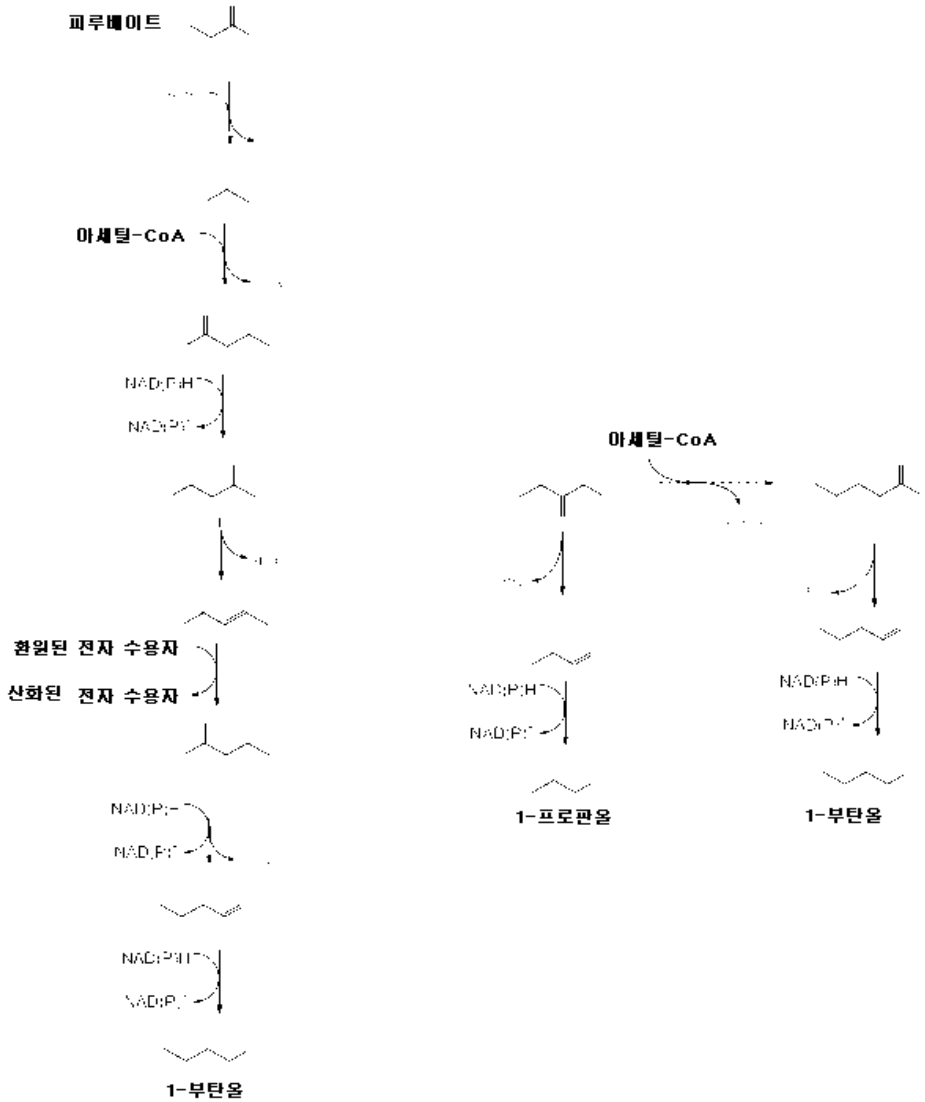
도면18


디아세틸
아세토인
2,3-부탄디올
2-부타논
2-부탄올
NAD(P)H
NAD(P)+
CO2
발린
2-옥스글루타레이트
글루타레이트
4-메틸-1-펜탄올
3-메틸-1-부탄올
류신
아세틸-CoA
CoA
이소부탄올
관토테나이트
조효소 A
1-부탄올

도면19


2-아세토-2-하드록시부티레이트
NAD(P)H
NAD(P)+
CO2
이소류신
2-메틸-1-부탄올
3-메틸-1-펜탄올
4-메틸-1-헥산올
5-메틸-1-헵탄올

도면20



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GEVO, INC.

Buelter, Thomas

Hawkins, Andrew

Porter-Scheinman, Stephanie

Meinhold, Peter

Dundon, Catherine Asleson

Aristidou, Aristos

Urano, Jun

Lies, Doug

Peters, Matthew

Dey, Melissa

Jancauskas, Justas

Evans, Kent

Kelly, Julie

Berry, Ruth

Bastian, Sabine

Arnold, Frances

<120> Yeast Microorganisms with Reduced By-Product Accumulation for

Improved Production of Fuels, Chemicals, and Amino Acids

<130> GEVO-045/03WO

<150> US 61/304,069

<151> 2010-02-12

<150> US 61/308,568

<151> 2010-02-26

<150> US 61/282,641

<151> 2010-03-10

<150> US 61/352,133

<151> 2010-06-07

<150> US 61/411,885

<151> 2010-11-09

<150> US 61/430,801

<151> 2010-01-07

<160> 268

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 267

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

Met Ser Gln Gly Arg Lys Ala Ala Glu Arg Leu Ala Lys Lys Thr Val

1 5 10 15

Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Lys Ala Thr Ala Leu Glu

20 25 30

Tyr Leu Glu Ala Ser Asn Gly Asp Met Lys Leu Ile Leu Ala Ala Arg
35 40 45
Arg Leu Glu Lys Leu Glu Glu Leu Lys Lys Thr Ile Asp Gln Glu Phe
50 55 60
Pro Asn Ala Lys Val His Val Ala Gln Leu Asp Ile Thr Gln Ala Glu

65 70 75 80
Lys Ile Lys Pro Phe Ile Glu Asn Leu Pro Gln Glu Phe Lys Asp Ile
85 90 95
Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ser Asp Arg Val
100 105 110
Gly Gln Ile Ala Thr Glu Asp Ile Gln Asp Val Phe Asp Thr Asn Val
115 120 125
Thr Ala Leu Ile Asn Ile Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Gln Ala

130 135 140
Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Ile Ala Gly Arg Asp
145 150 155 160
Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Ser Lys Phe Ala Val Gly
165 170 175
Ala Phe Thr Asp Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg
180 185 190
Val Ile Leu Ile Ala Pro Gly Leu Val Glu Thr Glu Phe Ser Leu Val

195 200 205
Arg Tyr Arg Gly Asn Glu Glu Gln Ala Lys Asn Val Tyr Lys Asp Thr
210 215 220
Thr Pro Leu Met Ala Asp Asp Val Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr
225 230 235 240
Ser Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Thr
245 250 255
Asn Gln Ala Ser Pro His His Ile Phe Arg Gly
260 265

<210> 2

<211> 267

<212> PRT

<213> Kabatiella polyspora

<400> 2

Met Ser Gln Gly Arg Lys Ala Ser Glu Arg Leu Ala Gly Lys Thr Val
1 5 10 15

Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Lys Ala Thr Ala Leu Glu
20 25 30

Tyr Leu Asp Ala Ser Asn Gly His Met Lys Leu Ile Leu Val Ala Arg
35 40 45

Arg Leu Glu Lys Leu Gln Glu Leu Lys Glu Thr Ile Cys Lys Glu Tyr

50 55 60

Pro Glu Ser Lys Val His Val Glu Glu Leu Asp Ile Ser Asp Ile Asn
65 70 75 80

Arg Ile Pro Glu Phe Ile Ala Lys Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile
85 90 95

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ser Asp Thr Ile
100 105 110

Gly Asn Ile Glu Asn Glu Asp Ile Lys Gly Met Phe Glu Thr Asn Val

115 120 125

Phe Gly Leu Ile Cys Leu Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Lys Ala
130 135 140

Lys Asn Gly Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Ile Ala Gly Ile Glu
145 150 155 160

Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys Phe Ala Val Lys
165 170 175

Ala Phe Thr Glu Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg

180 185 190

Val Ile Glu Ile Ala Pro Gly Met Val Asn Thr Glu Phe Ser Val Ile
195 200 205

Arg Tyr Lys Gly Asp Gln Glu Lys Ala Asp Lys Val Tyr Glu Asn Thr
210 215 220

Thr Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Thr Thr
225 230 235 240
Ser Arg Lys Ser Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Pro Thr

245 250 255
Cys Gln Ala Ser Ala Ser His Ile Tyr Arg Gly
260 265

<210> 3
<211> 267
<212> PRT
<213> Saccharomyces castellii
<400> 3
Met Ser Gln Gly Pro Lys Ala Ala Glu Arg Leu Asn Glu Lys Ile Val
1 5 10 15
Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Leu Glu
20 25 30
Tyr Met Asp Ala Ser Asn Gly Thr Val Lys Leu Val Leu Val Ala Arg

35 40 45
Arg Leu Glu Lys Leu Gln Gln Leu Lys Glu Val Ile Glu Ala Lys Tyr
50 55 60
Pro Lys Ser Lys Val Tyr Ile Gly Lys Leu Asp Val Thr Glu Leu Glu
65 70 75 80
Thr Ile Gln Pro Phe Leu Asp Asn Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile
85 90 95
Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ser Asp Arg Val

100 105 110
Gly Asp Ile Asp Ile Lys Asp Val Lys Gly Met Met Asp Thr Asn Val
115 120 125
Leu Gly Leu Ile Asn Val Thr Gln Ala Val Leu His Ile Phe Gln Lys
130 135 140
Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Asp
145 150 155 160

Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Ser Lys Phe Ala Val Arg

165 170 175

Ala Phe Thr Glu Ser Leu Arg Arg Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg

180 185 190

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

195 200 205

Arg Tyr Lys Gly Asp Asn Glu Arg Ala Lys Ser Val Tyr Asp Gly Val

210 215 220

His Pro Leu Glu Ala Asp Asp Val Ala Asp Leu Ile Val Tyr Thr Thr

225 230 235 240

Ser Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Thr

245 250 255

Ser Gln Gly Ser Ala Phe His Val His Arg Asp

260 265

<210> 4

<211> 268

<212> PRT

<213> Candida glabrata

<400> 4

Met Ser Gln Gly Arg Lys Ala Ala Glu Arg Leu Gln Gly Lys Ile Ala

1 5 10 15

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Lys Ala Thr Ala Ile Glu

20 25 30

Tyr Leu Asp Ala Ser Asn Gly Ser Val Lys Leu Val Leu Gly Ala Arg

35 40 45

Arg Met Glu Lys Leu Glu Glu Leu Lys Lys Glu Leu Leu Ala Gln Tyr

50 55 60

Pro Asp Ala Lys Ile His Ile Gly Lys Leu Asp Val Thr Asp Phe Glu

65 70 75 80

Asn Val Lys Gln Phe Leu Ala Asp Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile

85 90 95

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ser Asp Lys Val
100 105 110
Gly Asp Ile Asp Pro Glu Asp Ile Ala Gly Met Val Asn Thr Asn Val
115 120 125
Leu Ala Leu Ile Asn Leu Thr Gln Leu Leu Leu Pro Leu Phe Lys Lys
130 135 140
Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Ile Ala Gly Arg Asp

145 150 155 160
Ala Tyr Pro Thr Gly Ala Ile Tyr Cys Ala Thr Lys His Ala Val Arg
165 170 175
Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Asp Ile Arg
180 185 190
Val Ile Glu Ile Ala Pro Gly Met Val Glu Thr Glu Phe Ser Val Val
195 200 205
Arg Tyr Lys Gly Asp Lys Ser Lys Ala Asp Asp Val Tyr Arg Gly Thr

210 215 220
Thr Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ser Thr
225 230 235 240
Ser Arg Lys Pro Asn Met Val Val Ala Asp Val Leu Val Phe Pro Thr
245 250 255
His Gln Ala Ser Ala Ser His Ile Tyr Arg Gly Asp
260 265

<210> 5
<211> 267
<212> PRT
<213> Saccharomyces bayanus
<400> 5
Met Ser Gln Gly Arg Lys Ala Ala Glu Arg Leu Ala Asn Lys Thr Val

1 5 10 15
Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Lys Ala Thr Ala Leu Glu
20 25 30
Tyr Leu Glu Ala Ser Asn Gly Asn Met Lys Leu Ile Leu Ala Ala Arg

35 40 45

Arg Leu Glu Lys Leu Glu Glu Leu Lys Lys Thr Ile Asp Glu Glu Phe

50 55 60

Pro Asn Ala Lys Val His Val Gly Gln Leu Asp Ile Thr Gln Ala Glu

65 70 75 80

Lys Ile Lys Pro Phe Ile Glu Asn Leu Pro Glu Ala Phe Lys Asp Ile

85 90 95

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ser Glu Arg Val

100 105 110

Gly Glu Ile Ala Thr Gln Asp Ile Gln Asp Val Phe Asp Thr Asn Val

115 120 125

Thr Ala Leu Ile Asn Val Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Gln Ala

130 135 140

Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Asp

145 150 155 160

Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Ser Lys Phe Ala Val Gly

165 170 175

Ala Phe Thr Asp Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg

180 185 190

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

195 200 205

Arg Tyr Arg Gly Asn Glu Glu Gln Ala Lys Asn Val Tyr Lys Asp Thr

210 215 220

Thr Pro Leu Met Ala Asp Asp Val Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ser Thr

225 230 235 240

Ser Arg Lys Gln Asn Thr Val Val Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Thr

245 250 255

Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Phe Arg Gly

260 265

<210> 6

<211> 273

<212> PRT

<213> Zygosaccharomyces rouxii

<400> 6

Met Ser Gln Gly Val Lys Ala Ala Glu Arg Leu Ala Gly Lys Thr Val
1 5 10 15

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Lys Glu
20 25 30

Tyr Leu Asp Ala Ser Asn Gly Gln Ile Lys Leu Ile Leu Ala Ala Arg
35 40 45

Arg Leu Glu Lys Leu His Glu Phe Lys Glu Gln Thr Thr Lys Ser Tyr
50 55 60

Pro Ser Ala Gln Val His Ile Gly Lys Leu Asp Val Thr Ala Ile Asp
65 70 75 80

Thr Ile Lys Pro Phe Leu Asp Lys Leu Pro Lys Glu Phe Gln Asp Ile
85 90 95

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Thr Asp Lys Val
100 105 110

Gly Asp Ile Ala Asp Glu Asp Val Glu Gly Met Phe Asp Thr Asn Val
115 120 125

Leu Gly Leu Ile Lys Val Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Lys Arg
130 135 140

Lys Asn Ser Gly Asp Val Val Asn Ile Ser Ser Val Ala Gly Arg Glu
145 150 155 160

Ala Tyr Pro Gly Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys His Ala Val Lys
165 170 175

Ala Phe Thr Glu Ser Leu Arg Lys Glu Leu Val Asp Thr Lys Ile Arg
180 185 190

Val Met Ser Ile Asp Pro Gly Asn Val Glu Thr Glu Phe Ser Met Val
195 200 205

Arg Phe Arg Gly Asp Thr Glu Lys Ala Lys Lys Val Tyr Gln Asp Thr
210 215 220

Val Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr

225 230 235 240

Ser Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Ser Ser

245 250 255

Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Leu Tyr Arg Gly Ser Gln Asp Lys Thr

260 265 270

Asn

<210> 7

<211> 268

<212> PRT

<213> Kluyveromyces lactis

<400> 7

Met Ser Gln Gly Arg Lys Ala Ala Glu Arg Leu Gln Asn Lys Thr Ile

1 5 10 15

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Leu Glu

20 25 30

Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Gly Asn Val Lys Leu Ile Leu Ala Ala Arg

35 40 45

Arg Leu Ala Lys Leu Glu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Asn Ala Glu Tyr

50 55 60

Pro Gln Ala Lys Val Tyr Ile Gly Gln Leu Asp Val Thr Glu Thr Glu

65 70 75 80

Lys Ile Gln Pro Phe Ile Asp Asn Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile

85 90 95

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ser Asp Val Val

100 105 110

Gly Thr Ile Ser Ser Glu Asp Ile Lys Gly Met Ile Asp Thr Asn Val

115 120 125

Val Ala Leu Ile Asn Val Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Lys Ala

130 135 140

Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Asp

145 150 155 160

Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Ser Lys His Ala Val Arg
165 170 175
Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Gly Ile Arg
180 185 190
Val Ile Glu Ile Ala Pro Gly Asn Val Glu Thr Glu Phe Ser Leu Val
195 200 205
Arg Tyr Lys Gly Asp Ala Asp Arg Ala Lys Gln Val Tyr Lys Gly Thr
210 215 220

Thr Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr
225 230 235 240
Ser Arg Lys Pro Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Ala Ser
245 250 255
Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Tyr Arg Gly Glu
260 265

<210> 8
<211> 267
<212> PRT
<213> Ashbya gossypii
<400> 8
Met Ser Leu Gly Arg Lys Ala Ala Glu Arg Leu Ala Asn Lys Ile Val
1 5 10 15

Leu Val Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Arg Ala Thr Ala Ile Asn
20 25 30
Tyr Ala Asp Ala Thr Asp Gly Ala Ile Lys Leu Ile Leu Val Ala Arg
35 40 45
Arg Ala Glu Lys Leu Thr Ser Leu Lys Gln Glu Ile Glu Ser Lys Tyr
50 55 60
Pro Asn Ala Lys Ile His Val Gly Gln Leu Asp Val Thr Gln Leu Asp
65 70 75 80

Gln Ile Arg Pro Phe Leu Glu Gly Leu Pro Glu Glu Phe Arg Asp Ile

85 90 95

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Thr Glu Arg Val

100 105 110

Gly Glu Ile Ser Met Asp Asp Ile Gln Glu Val Phe Asn Thr Asn Val

115 120 125

Ile Gly Leu Val His Leu Thr Gln Glu Val Leu Pro Ile Met Lys Ala

130 135 140

Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Val Gly Ser Ile Ala Gly Arg Glu

145 150 155 160

Ala Tyr Pro Gly Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys His Ala Val Lys

165 170 175

Ala Phe Thr Arg Ala Met Arg Lys Glu Leu Ile Ser Thr Lys Ile Arg

180 185 190

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

195 200 205

Arg Met Arg Gly Asn Glu Glu Asn Ala Lys Lys Val Tyr Gln Gly Phe

210 215 220

Glu Pro Leu Asp Gly Asp Asp Ile Ala Asp Thr Ile Val Tyr Ala Thr

225 230 235 240

Ser Arg Arg Ser Asn Thr Val Val Ala Glu Met Val Val Tyr Pro Ser

245 250 255

Ala Gln Gly Ser Leu Tyr Asp Thr His Arg Asn

260 265

<210> 9

<211> 268

<212> PRT

<213> Saccharomyces kluyveri

<400> 9

Met Ser Gln Gly Arg Arg Ala Ala Glu Arg Leu Ala Asn Lys Thr Val

1 5 10 15

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Leu Glu

20 25 30

Tyr Cys Asp Ala Ser Asn Gly Lys Ile Asn Leu Val Leu Ser Ala Arg

35 40 45

Arg Leu Glu Lys Leu Gln Glu Leu Lys Asp Lys Ile Thr Lys Glu Tyr

50 55 60

Pro Glu Ala Lys Val Tyr Ile Gly Val Leu Asp Val Thr Glu Thr Glu

65 70 75 80

Lys Ile Lys Pro Phe Leu Asp Gly Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile

85 90 95

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ser Asp Pro Val

100 105 110

Gly Thr Ile Lys Thr Glu Asp Ile Glu Gly Met Ile Asn Thr Asn Val

115 120 125

Leu Ala Leu Ile Asn Ile Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Lys Ala

130 135 140

Lys Asn Phe Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Asp

145 150 155 160

Ala Tyr Pro Thr Gly Ala Ile Tyr Cys Ala Ser Lys His Ala Val Arg

165 170 175

Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Val Asn Thr Asn Ile Arg

180 185 190

Val Ile Glu Ile Ala Pro Gly Asn Val Glu Thr Glu Phe Ser Leu Val

195 200 205

Arg Tyr Lys Gly Asp Thr Asp Arg Ala Lys Lys Val Tyr Glu Gly Thr

210 215 220

Asn Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr

225 230 235 240

Ser Arg Lys Pro Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Ala Ser

245 250 255

Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Tyr Arg Gly Asp

260 265

<210> 10

<211> 267

<212> PRT

<213> Kluyveromyces thermotolerans

<400> 10

Met Ser Gln Gly Arg Arg Ala Ala Glu Arg Leu Ala Gly Lys Thr Val
1 5 10 15

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Gln Glu
20 25 30

Tyr Leu Glu Ala Ser Glu Gly Lys Ile Lys Leu Ile Leu Ala Ala Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Leu Glu Glu Ile Lys Ala Lys Val Ser Lys Asp Phe
50 55 60

Pro Glu Ala Gln Val His Ile Gly Gln Leu Asp Val Thr Gln Thr Asp
65 70 75 80

Lys Ile Gln Pro Phe Val Asp Asn Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile
85 90 95

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ser Asp Pro Val
100 105 110

Gly Thr Ile Asp Pro Asn Asp Ile Gln Gly Met Ile Gln Thr Asn Val
115 120 125

Ile Gly Leu Ile Asn Val Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Lys Ala
130 135 140

Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Glu
145 150 155 160

Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys His Ala Val Arg
165 170 175

Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Asn Ile Arg
180 185 190

Val Ile Glu Val Ala Pro Gly Asn Val Glu Thr Glu Phe Ser Leu Val
195 200 205

Arg Tyr Lys Gly Asp Ser Glu Lys Ala Lys Lys Val Tyr Glu Gly Thr

210 215 220

Gln Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr
225 230 235 240
Ser Arg Lys Pro Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Ala Ser
245 250 255
Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Tyr Arg Gly
260 265

<210> 11
<211> 267
<212> PRT
<213> Kluyveromyces waltii
<400> 11
Met Ser Gln Gly Arg Lys Ala Ser Glu Arg Leu Ala Gly Lys Thr Val
1 5 10 15

Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Leu Glu
20 25 30
Tyr Leu Asp Ala Ser Asn Gly Asn Ile Lys Leu Ile Leu Ala Ala Arg
35 40 45
Arg Leu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Lys Asp Phe
50 55 60
Pro Glu Ala Lys Val Tyr Ile Gly Gln Leu Asp Val Thr His Thr Asp
65 70 75 80

Glu Ile Lys Pro Phe Ile Asp Asn Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile
85 90 95
Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ser Asp Pro Val
100 105 110
Gly Thr Ile Asp Ala Ser Asp Ile Glu Gly Met Ile Gln Thr Asn Val
115 120 125
Val Ala Leu Ile Asn Met Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Lys Ala
130 135 140

Lys Asn Ala Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Glu

145 150 155 160

Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys His Ala Val Arg

165 170 175

Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Asn Ile Arg

180 185 190

Val Ile Glu Ile Ala Pro Gly Asn Val Glu Thr Glu Phe Ser Leu Val

195 200 205

Arg Tyr Lys Gly Asp Pro Glu Lys Ala Lys Lys Val Tyr Glu Gly Thr

210 215 220

Thr Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr

225 230 235 240

Ser Arg Lys Ser Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Ala Ser

245 250 255

Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Tyr Arg Gly

260 265

<210> 12

<211> 269

<212> PRT

<213> Pichia stipitis

<400> 12

Met Ser Phe Gly Lys Lys Ala Ala Glu Arg Leu Ala Asn Lys Ile Ile

1 5 10 15

Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala Arg Glu

20 25 30

Phe Ala Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Arg Leu Ile Leu Thr Ala Arg

35 40 45

Arg Lys Glu Lys Leu Ala Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Lys Glu Phe

50 55 60

Pro Thr Ile Lys Ile His Ser Ala Lys Leu Asp Val Thr Glu His Asp

65 70 75 80

Gly Ile Lys Pro Phe Ile Ser Gly Leu Pro Lys Asp Phe Ala Asp Ile

85 90 95

Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Lys Ala Ser Val
100 105 110
Gly Glu Ile Ser Asp Ser Asp Ile Gln Gly Met Met Gln Thr Asn Val

115 120 125
Leu Gly Leu Ile Asn Met Thr Gln Ala Val Ile Pro Ile Phe Lys Ala
130 135 140
Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Ile Gly Ser Ile Ala Gly Arg Asp
145 150 155 160
Pro Tyr Pro Gly Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Ala Val Lys
165 170 175
Phe Phe Ser His Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Arg Ile Arg

180 185 190
Val Leu Glu Val Asp Pro Gly Ala Val Leu Thr Glu Phe Ser Leu Val
195 200 205
Arg Phe His Gly Asp Gln Gly Ala Ala Asp Ala Val Tyr Glu Gly Thr
210 215 220
Gln Pro Leu Asp Ala Ser Asp Ile Ala Glu Val Ile Val Phe Gly Ile
225 230 235 240
Thr Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Glu Thr Leu Val Phe Pro Ser

245 250 255
His Gln Ala Ser Ala Ser His Val Tyr Lys Ala Pro Lys
260 265

<210> 13
<211> 270
<212> PRT
<213> Debaryomyces hansenii
<400> 13
Met Ser Tyr Gly Ser Lys Ala Ala Glu Arg Val Ala Asn Lys Ile Val
1 5 10 15
Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala Lys Glu
20 25 30

Ile Ala Ser Ala Ala Asn Gly Asn Leu Lys Leu Val Leu Cys Ala Arg
35 40 45
Arg Lys Glu Lys Leu Asp Asn Leu Ser Lys Glu Leu Thr Asp Lys Tyr
50 55 60
Ser Ser Ile Lys Val His Val Ala Gln Leu Asp Val Ser Lys Leu Glu
65 70 75 80
Thr Ile Lys Pro Phe Ile Asn Asp Leu Pro Lys Glu Phe Ser Asp Val
85 90 95

Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Leu Ala Leu Gly Arg Asp Glu Val
100 105 110
Gly Thr Ile Asp Thr Asp Asp Met Leu Ser Met Phe Gln Thr Asn Val
115 120 125
Leu Gly Leu Ile Thr Ile Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Met Lys Lys
130 135 140
Lys Asn Ser Gly Asp Val Val Asn Ile Gly Ser Ile Ala Gly Arg Asp
145 150 155 160

Ser Tyr Pro Gly Gly Gly Ile Tyr Cys Pro Thr Lys Ala Ser Val Lys
165 170 175
Ser Phe Ser Gln Val Leu Arg Lys Glu Leu Ile Ser Thr Lys Ile Arg
180 185 190
Val Leu Glu Val Asp Pro Gly Asn Val Glu Thr Glu Phe Ser Asn Val
195 200 205
Arg Phe Lys Gly Asp Met Glu Lys Ala Lys Ser Val Tyr Ala Gly Thr
210 215 220

Glu Pro Leu Leu Ser Glu Asp Val Ala Glu Val Val Val Phe Gly Leu
225 230 235 240
Thr Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Glu Thr Leu Val Phe Ser Thr
245 250 255
Asn Gln Ala Ser Ser Ser His Leu Tyr Arg Glu Ser Asp Lys
260 265 270
<210> 14
<211> 269

<212> PRT

<213> Pichia pastoris

<400> 14

Met Ser Tyr Gly Leu Ala Ala Ala Ser Arg Leu Ala Gly Lys Val Ile

1 5 10 15

Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala Leu Glu

20 25 30

Tyr Ala Asn Ala Ala Lys Gly Glu Ile Lys Leu Ala Leu Ser Ala Arg

35 40 45

Arg Phe Glu Lys Leu Glu Gly Leu Lys Glu Lys Leu Thr Thr Gln Trp

50 55 60

Pro Asn Ile Lys Val His Ile Ala Leu Leu Asp Val Ser Asn Ile Ala

65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Tyr Val Glu Ser Leu Pro Glu Glu Phe Lys Ala Val

85 90 95

Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ile Asp Arg Val

100 105 110

Gly Gln Ile Leu Gln Glu Asp Ile Asp Gly Met Phe Gln Thr Asn Val

115 120 125

Ile Gly Leu Ile Ser Leu Thr Gln Leu Ile Leu Pro Gly Met Lys Ala

130 135 140

Arg Asn Arg Gly Asp Ile Ile Gln Leu Gly Ser Ile Ala Gly Arg Asp

145 150 155 160

Pro Tyr Pro Gly Gly Gly Ile Tyr Cys Ala Thr Lys Ala Ala Val Arg

165 170 175

Ser Phe Ser His Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asp Thr Lys Ile Arg

180 185 190

Val Ile Glu Ile Asp Pro Gly Ala Val Gln Thr Glu Phe Ser Leu Val

195 200 205

Arg Tyr Lys Gly Ser Lys Glu Ser Ala Ser Lys Val Tyr Glu Gly Ala

210 215 220

Glu Pro Leu Asn Ala Leu Asp Ile Ala Glu Leu Ile Val Phe Ala Ser
225 230 235 240
Thr Arg Arg Glu Asn Thr Val Val Ala Glu Thr Leu Val Phe Pro Thr
245 250 255
Asn Gln Ala Gly Ala Gly Tyr Val Tyr Arg Lys Lys Asp

260 265

<210> 15
<211> 268
<212> PRT
<213> Candida dubliniensis
<400> 15
Met Ser Phe Gly Arg Lys Ala Ala Glu Arg Leu Ala Asn Arg Ser Ile
1 5 10 15
Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Glu Ala Cys Ala Lys Val
20 25 30
Phe Ala Glu Ala Ser Asn Gly Gln Val Lys Leu Val Leu Gly Ala Arg
35 40 45

Arg Lys Glu Arg Leu Val Lys Leu Ser Asp Thr Leu Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Asn Ile Lys Ile His His Asp Phe Leu Asp Val Thr Ile Lys Asp
65 70 75 80
Ser Ile Ser Lys Phe Ile Ala Gly Ile Pro His Glu Phe Glu Pro Asp
85 90 95
Val Leu Ile Asn Asn Ser Gly Lys Ala Leu Gly Lys Glu Glu Val Gly
100 105 110

Glu Leu Lys Asp Glu Asp Ile Thr Glu Met Phe Asp Thr Asn Val Ile
115 120 125
Gly Val Ile Arg Met Thr Gln Ala Val Leu Pro Leu Leu Lys Lys Lys
130 135 140
Pro Tyr Ala Asp Val Val Phe Ile Gly Ser Ile Ala Gly Arg Val Pro
145 150 155 160
Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Ala Val Arg Ser

165 170 175

Phe Thr Asp Thr Phe Arg Lys Glu Thr Ile Asn Thr Gly Ile Arg Val
180 185 190
Ile Glu Val Asp Pro Gly Ala Val Leu Thr Glu Phe Ser Val Val Arg
195 200 205
Tyr Lys Gly Asp Thr Asp Ala Ala Asp Ala Val Tyr Thr Gly Thr Glu
210 215 220
Pro Leu Thr Pro Glu Asp Val Ala Glu Val Val Val Phe Ala Ser Ser
225 230 235 240

Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Asn His
245 250 255
Gln Ala Ser Pro Asp His Val Tyr Arg Lys Pro Asn
260 265

<210> 16
<211> 268
<212> PRT
<213> Candida albicans
<400> 16

Met Ser Phe Gly Arg Lys Ala Ala Glu Arg Leu Ala Asn Arg Ser Ile
1 5 10 15
Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Glu Ala Cys Ala Lys Val
20 25 30

Phe Ala Glu Ala Ser Asn Gly Gln Ile Lys Leu Ile Leu Gly Ala Arg
35 40 45
Arg Lys Glu Arg Leu Ile Lys Leu Ser Asp Thr Leu Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Asn Ile Lys Ile His His Asp Phe Leu Asp Val Thr Ile Lys Asp
65 70 75 80
Ser Ile Ser Lys Phe Ile Ala Gly Ile Pro Thr Asp Phe Glu Pro Asp
85 90 95

Val Leu Ile Asn Asn Ser Gly Lys Ala Leu Gly Lys Glu Gln Val Gly

100 105 110

Glu Leu Lys Asp Glu Asp Ile Thr Glu Met Leu Asp Thr Asn Val Val

115 120 125

Gly Val Ile Arg Met Thr Gln Ala Val Leu Pro Leu Leu Lys Lys Lys

130 135 140

Asn Tyr Ala Asp Val Val Phe Ile Gly Ser Ile Ala Gly Arg Val Ala

145 150 155 160

Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Ala Val Arg Ser

165 170 175

Phe Val Asp Thr Phe Arg Lys Glu Thr Ile Asp Thr Gly Ile Arg Val

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Lys Gly Asp Thr Glu Ala Ala Asp Ala Val Tyr Thr Gly Thr Glu

210 215 220

Pro Leu Thr Pro Glu Asp Val Ala Glu Val Val Val Phe Ala Ala Ser

225 230 235 240

Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Asn His

245 250 255

Gln Ala Ser Pro Asp His Val Tyr Arg Lys Pro Asn

260 265

<210> 17

<211> 268

<212> PRT

<213> Yarrowia lipolytica

<400> 17

Met Ser Phe Gly Asp Lys Ala Ala Ala Arg Leu Ala Gly Lys Thr Val

1 5 10 15

Phe Val Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Gln Ala Thr Val Leu Ala

20 25 30

Leu Ala Glu Ala Ala Lys Gly Asp Leu Lys Phe Val Leu Ala Ala Arg

35 40 45

Arg Thr Asp Arg Leu Asp Glu Leu Lys Lys Lys Leu Glu Thr Asp Tyr
50 55 60
Lys Gly Ile Gln Val Leu Pro Phe Lys Leu Asp Val Ser Lys Val Glu
65 70 75 80

Glu Thr Glu Asn Ile Val Ser Lys Leu Pro Lys Glu Phe Ser Glu Val
85 90 95
Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Met Val His Gly Thr Glu Lys Val
100 105 110
Gly Ser Ile Asn Gln Asn Asp Ile Glu Ile Met Phe His Thr Asn Val
115 120 125
Leu Gly Leu Ile Ser Val Thr Gln Gln Phe Val Gly Glu Met Arg Lys
130 135 140

Arg Asn Lys Gly Asp Ile Val Asn Ile Gly Ser Ile Ala Gly Arg Glu
145 150 155 160
Pro Tyr Val Gly Gly Gly Ile Tyr Cys Ala Thr Lys Ala Ala Val Arg
165 170 175
Ser Phe Thr Glu Thr Leu Arg Lys Glu Asn Ile Asp Thr Arg Ile Arg
180 185 190
Val Ile Glu Val Asp Pro Gly Ala Val Glu Thr Glu Phe Ser Val Val
195 200 205

Arg Phe Arg Gly Asp Lys Ser Lys Ala Asp Ala Val Tyr Ala Gly Thr
210 215 220
Glu Pro Leu Val Ala Asp Asp Ile Ala Glu Phe Ile Thr Tyr Thr Leu
225 230 235 240
Thr Arg Arg Glu Asn Val Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Asn
245 250 255
His Gln Ala Ser Pro Thr His Val Tyr Arg Lys Asn
260 265

<210> 18

<211

> 270

<212> PRT

<213> Issatchenkia orientalis

<400> 18

Met Phe Gly Asn Ile Ser Gln Arg Leu Ala Gly Lys Asn Ile Leu Ile
1 5 10 15

Thr Gly Ala Ser Thr Gly Ile Gly Tyr His Thr Ala Lys Tyr Phe Ala
20 25 30

Glu Ala Ala Asn Gly Asp Leu Lys Leu Val Leu Ala Ala Arg Arg Lys
35 40 45

Glu Lys Leu Glu Ala Leu Lys Ala Asp Leu Leu Ala Lys Tyr Pro Ser
50 55 60

Ile Lys Val His Ile Glu Ser Leu Asp Val Ser Lys Thr Glu Thr Ile
65 70 75 80

Ala Pro Phe Leu Lys Gly Leu Pro Glu Glu Phe Ser Ile Val Asp Val
85 90 95

Leu Val Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Leu Asp Pro Ile Gly Ser
100 105 110

Val Asp Pro Lys Asp Val Asp Glu Met Phe Gln Thr Asn Val Leu Gly
115 120 125

Met Ile Gln Leu Thr Gln Leu Val Val Gln Gln Met Lys Glu Arg Asn
130 135 140

Ser Gly Asp Ile Val Gln Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Asn Pro Tyr
145 150 155 160

Pro Gly Gly Gly Ile Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Ala Leu Arg Ser Phe
165 170 175

Thr His Val Leu Arg Glu Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg Val Ile
180 185 190

Glu Ile Glu Pro Gly Asn Val Ala Thr Glu Glu Phe Ser Leu Thr Arg
195 200 205

Phe Lys Gly Asp Lys Ser Lys Ala Glu Lys Val Tyr Glu Gly Thr Glu
210 215 220

Pro Leu Tyr Gly Thr Asp Ile Ala Glu Leu Ile Leu Phe Ala Val Ser
225 230 235 240

Arg Pro Gln Asn Thr Val Ile Ala Glu Thr Leu Val Phe Ala Ser Asn

245 250 255

Gln Ala Ser Ala Tyr His Ile Phe Arg Gly Ser Leu Asp Lys

260 265 270

<210> 19

<211> 271

<212> PRT

<213> Aspergillus nidulans

<400> 19

Met Ala Ser Ala Met Ala Lys Arg Leu Glu Gly Lys Thr Ile Val Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Thr Ala Pro Lys Asp Leu Lys Leu Ile Val Thr Ala Arg Arg Ile

35 40 45

Asp Ala Leu Glu Glu Leu Ala Lys Glu Ile Lys Glu Glu Val Gly Glu

50 55 60

Gly Val Lys Thr Leu Pro Val Lys Leu Asp Val Ser Asn Pro Glu Glu

65 70 75 80

Val Lys Asn Phe Val Pro Ser Leu Pro Ala Glu Phe Gln Asp Ile Asp

85 90 95

Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Leu Val Lys Gly Val Ala Gln Ala Pro

100 105 110

Asn Ile Asp Pro Glu Asp Ile Asn Ile Met Phe Ala Thr Asn Val Thr

115 120 125

Gly Leu Ile Asn Leu Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Lys Lys Arg

130 135 140

Ser Asp Gly Gly Arg Gly Asp Ile Ile Asn Ile Gly Ser Ile Ala Gly

145 150 155 160

Arg Glu Pro Tyr Pro Gly Gly Ser Ile Tyr Cys Ser Thr Lys Ala Ala

165 170 175

Val Lys Ser Phe Thr Glu Ala Leu Arg Lys Glu Leu Ile Ser Thr Arg
180 185 190
Ile Arg Val Ile Glu Ile Asp Pro Gly Gln Val Glu Thr Glu Phe Ser
195 200 205
Ile Val Arg Phe Tyr Gly Asp Lys Ser Lys Ala Asn Ala Val Tyr Ala
210 215 220

Asn Cys Glu Pro Leu Thr Pro Asp Asp Ile Ala Glu Val Ile Val Phe
225 230 235 240
Ala Ala Gly Arg Arg Glu Asn Val Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe
245 250 255
Pro Ser His Gln Ala Ser Pro Gly His Leu Tyr Lys Lys Pro Gln
260 265 270

<210> 20
<211> 278
<212> PRT
<213> Aspergillus niger
<400> 20

Met Ala Thr Ala Met Ala Lys Arg Leu Glu Gly Lys Thr Ile Leu Val
1 5 10 15
Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Arg Ser Thr Ala Lys Glu Phe Ala
20 25 30
Arg Thr Ser Pro Lys Asp Leu Lys Ile Ile Val Thr Ala Arg Arg Ile
35 40 45
Asp Ser Leu Gln Glu Leu Ala Lys Glu Ile Lys Glu Glu Val Gly Glu
50 55 60
Gly Val Lys Val Leu Pro Val Gln Leu Asp Val Ser Asn Pro Glu Asp
65 70 75 80
Ile Lys Lys Phe Val Pro Ser Leu Pro Glu Glu Phe Lys Glu Ile Asp
85 90 95
Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Leu Val Lys Gly Val Ala Lys Ala Pro
100 105 110
Glu Ile Ala Pro Glu Asp Ile Asn Val Met Phe Ser Thr Asn Val Thr

115 120 125

Gly Leu Ile Asn Met Thr Gln Ala Ile Leu Pro Ile Phe Lys Lys Arg

130 135 140

Ala Asp Gly Gly Arg Gly Asp Ile Ile Asn Ile Gly Ser Ile Ala Gly

145 150 155 160

Arg Glu Ala Tyr Pro Gly Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys Ala Ala

165 170 175

Ile Arg Ser Phe Thr Asp Ala Leu Arg Lys Glu Leu Ile Ala Thr Arg

180 185 190

Ile Arg Ile Ile Glu Ile Asp Pro Gly Gln Val Glu Thr Glu Phe Ser

195 200 205

Val Val Arg Phe Tyr Gly Asp Lys Ala Lys Ala Asp Ala Val Tyr Ala

210 215 220

Gly Cys Glu Pro Leu Thr Pro Asp Asp Ile Ala Glu Val Val Val Phe

225 230 235 240

Ala Ala Gly Arg Arg Glu Asn Val Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe

245 250 255

Pro Ser His Gln Val Ser Gln Thr Ser His Thr Gly Leu Asn Ser Ile

260 265 270

Ala Asp Gly Thr Val Thr

275

<210> 21

<211> 270

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 21

Met Ser Ser Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Gly Lys Thr Ile Val Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Thr Ala Pro Asn His Gly Leu Lys Leu Ile Leu Thr Ala Arg Arg

35 40 45

Val Asp Ala Leu Glu Gln Ile Ala Lys Glu Ile Arg Gln Glu Val Gly

50 55 60

Glu Gly Val Gln Val Leu Pro Val Lys Leu Asp Val Ser Gln Pro Glu

65 70 75 80

Glu Val Arg Gly Phe Val Gly Asn Leu Pro Glu Glu Trp Arg Asp Ile

85 90 95

His Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Leu Val Lys Gly Ala Pro Ser Ile

100 105 110

Ala Glu Glu Asp Ile Asn Val Met Phe Ala Thr Asn Val Thr Gly Leu

115 120 125

Ile Asn Met Thr Gln Ala Ile Leu Pro Ile Phe Lys Ala Arg Gly Ser

130 135 140

Glu Gly Gly Ser Gly Asp Ile Val Asn Ile Gly Ser Ile Ala Gly Arg

145 150 155 160

Glu Pro Tyr Ala Gly Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys Ala Ala Val

165 170 175

Arg Ser Phe Thr Asp Ala Leu Arg Lys Glu Leu Ile Ala Thr Arg Ile

180 185 190

Arg Val Met Glu Ile Asp Pro Gly Gln Val Glu Thr Glu Phe Ser Val

195 200 205

Val Arg Phe Tyr Gly Asp Lys Asn Lys Ala Asp Ala Val Tyr Ala Gly

210 215 220

Val Asp Pro Leu Thr Pro Asp Asp Ile Ala Glu Ile Val Val Phe Val

225 230 235 240

Val Thr Arg Arg Glu Asn Val Val Val Ala Asp Thr Leu Val Phe Pro

245 250 255

Ser His Gln Ala Gly Ala Gly Ile Met His Arg Lys Ser Thr

260 265 270

<210> 22

<211> 259

<212> PRT

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 22

Met Ser Arg Leu Asp Gly Lys Thr Ile Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Gly Ile Gly Lys Ser Thr Ala Phe Glu Ile Ala Lys Val Ala Lys Val
20 25 30

Lys Leu Ile Leu Ala Ala Arg Arg Phe Ser Thr Val Glu Glu Ile Ala
35 40 45

Lys Glu Leu Glu Ser Lys Tyr Glu Val Ser Val Leu Pro Leu Lys Leu
50 55 60

Asp Val Ser Asp Leu Lys Ser Ile Pro Gly Val Ile Glu Ser Leu Pro
65 70 75 80

Lys Glu Phe Ala Asp Ile Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Leu Ala
85 90 95

Leu Gly Thr Asp Lys Val Ile Asp Leu Asn Ile Asp Asp Ala Val Thr
100 105 110

Met Ile Thr Thr Asn Val Leu Gly Met Met Ala Met Thr Arg Ala Val
115 120 125

Leu Pro Ile Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Gly Asp Ile Leu Asn Val Gly
130 135 140

Ser Ile Ala Gly Arg Glu Ser Tyr Val Gly Gly Ser Val Tyr Cys Ser
145 150 155 160

Thr Lys Ser Ala Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr
165 170 175

Ile Asp Thr Arg Ile Arg Ile Met Glu Val Asp Pro Gly Leu Val Glu
180 185 190

Thr Glu Phe Ser Val Val Arg Phe His Gly Asp Lys Gln Lys Ala Asp
195 200 205

Asn Val Tyr Lys Asn Ser Glu Pro Leu Thr Pro Glu Asp Ile Ala Glu
210 215 220

Val Ile Leu Phe Ala Leu Thr Arg Arg Glu Asn Val Val Ile Ala Asp

225 230 235 240

Thr Leu Val Phe Pro Ser His Gln Gly Gly Ala Asn His Val Tyr Arg

245 250 255

Lys Gln Ala

<210> 23

<211> 268

<212> PRT

<213> Kluyveromyces marxianus

<400> 23

Met Ser Gln Gly Arg Arg Ala Ala Glu Arg Leu Gln Asn Lys Thr Ile

1 5 10 15

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala Leu Glu

20 25 30

Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Gly Asn Val Lys Leu Val Leu Ala Ala Arg

35 40 45

Arg Leu Ser Lys Leu Gln Ala Leu Lys Asp Lys Ile Ala Ala Glu Tyr

50 55 60

Pro Glu Ala Lys Val Tyr Ile Gly Glu Leu Asp Val Thr Glu Thr Glu

65 70 75 80

Lys Ile Lys Pro Phe Ile Gln Gly Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile

85 90 95

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Val Asp Pro Val

100 105 110

Gly Ala Ile Asp Ser Glu Asp Ile Lys Gly Met Ile Asp Thr Asn Val

115 120 125

Leu Gly Leu Ile Asn Val Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Lys Ala

130 135 140

Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Glu

145 150 155 160

Ala Tyr Pro Asn Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys His Ala Val Arg

165 170 175

Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg
180 185 190
Val Ile Glu Ile Ala Pro Gly Asn Val Glu Thr Glu Phe Ser Tyr Val

195 200 205
Arg Tyr Lys Gly Asp Thr Asp Ala Ala Lys Lys Val Tyr Lys Gly Thr
210 215 220
Thr Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr
225 230 235 240
Ser Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Ala Thr
245 250 255
Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Tyr Arg Gly Glu

260 265
<210> 24
<400> 24
000
<210> 25
<211> 500
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae
<400> 25
Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu
1 5 10 15
Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn
20 25 30
Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp
50 55 60
Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu
65 70 75 80
Trp Ala Thr Gln Asp Pro Arg Glu Arg Gly Arg Leu Leu Ser Lys Leu
85 90 95

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala
100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile
115 120 125
Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val Asn
130 135 140
Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu
145 150 155 160
Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile
165 170 175

Met Met Leu Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val
180 185 190
Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe
195 200 205
Ala Ser Leu Cys Lys Lys Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile
210 215 220
Val Pro Gly Pro Gly Arg Thr Val Gly Ala Ala Leu Thr Asn Asp Pro
225 230 235 240

Arg Ile Arg Lys Leu Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Lys Ser
245 250 255
Val Ala Val Asp Ser Ser Glu Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu
260 265 270
Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asn Ile Lys
275 280 285
Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln
290 295 300

Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp
305 310 315 320
Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys Val
325 330 335
Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg

340 345 350

Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys Glu

355 360 365

Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Lys Gly Tyr

370 375 380

Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile

385 390 395 400

Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe Lys

405 410 415

Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly Leu

420 425 430

Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val Ala

435 440 445

Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe

450 455 460

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg

465 470 475 480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val

485 490 495

Arg Ile Lys Leu

500

<210> 26

<211> 499

<212> PRT

<213> Saccharomyces castellii

<400> 26

Met Thr Lys Ile Asn Phe Glu Ala Ala Glu Pro Ala Thr Ile Thr Leu

1 5 10 15

Pro Asn Gly Ile Thr Tyr Asn Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn

20 25 30

Glu Phe Met Lys Ser Gln Asp Tyr Lys Thr Ile Lys Val Glu Asn Pro

35 40 45

Ala Thr Ala Glu Ile Val Cys Glu Val Ser Ser Gly Thr Ser Glu Asp
50 55 60
Val Glu Tyr Ala Val Glu Ser Ala Glu His Ala Phe Asn Asp Thr Asp
65 70 75 80
Trp Ala Thr Gln Asp Pro Lys Ile Arg Gly Arg Tyr Leu Ser Lys Leu
85 90 95
Ala Asp Leu Met Glu Glu Asn Leu Glu Leu Met Ala Ser Ile Glu Thr
100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ser Arg Gly Asp Val Gly Leu
115 120 125
Ala Ile Asn Cys Ile Arg Asp Ala Ala Ser Tyr Ala Asp Lys Ile Asn
130 135 140
Gly Arg Thr Ile Asn Ser Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Val Lys
145 150 155 160
Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Leu
165 170 175

Met Met Leu Ser Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val
180 185 190
Ile Ile Leu Lys Pro Ala Ser Ala Thr Pro Leu Asn Ala Leu Phe Phe
195 200 205
Ala Ser Leu Cys Lys Lys Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile
210 215 220
Ile Pro Gly Pro Gly Arg Thr Val Gly Asn Ala Ile Thr Thr His Pro
225 230 235 240

Arg Ile Arg Lys Ala Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Ile Gly Lys Asp
245 250 255
Ile Ala Ile Lys Ala Ser Gly Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu
260 265 270
Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asn Ile Glu
275 280 285

Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln
290 295 300

Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp
305 310 315 320
Lys Leu Met Pro Ala Phe Lys Lys Tyr Val Glu Asn Leu Lys Val Gly
325 330 335
Asp Pro Phe Asp Glu Ser Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg Glu
340 345 350
Gln Tyr Glu Thr Ile Leu Lys Tyr Ile Lys Ile Gly Lys Glu Glu Gly
355 360 365

Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Thr Ile Gly Asn Lys Gly Tyr Phe
370 375 380
Ile Lys Pro Thr Ile Phe Tyr Asp Val Lys Glu Asp Met Glu Ile Val
385 390 395 400
Arg Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ser Lys Phe Lys Asp
405 410 415
Ile Glu Asp Gly Val Ala Met Ala Asn Ala Ser Glu Phe Gly Leu Gly
420 425 430

Ala Gly Ile Glu Thr Glu Asn Leu Ser Thr Ala Leu Lys Val Ala Lys
435 440 445
Met Leu Lys Ser Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe Asp
450 455 460
Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg Glu
465 470 475 480
Met Gly Glu Glu Val Tyr Asp Cys Tyr Thr Glu Val Lys Ala Ile Arg
485 490 495

Ile Lys Leu

<210> 27
<211> 497
<212> PRT

<213> Candida glabrata

<400> 27

Met Ala Tyr Lys Thr Ala Ala Thr Lys Thr Ile Lys Leu Pro Asn Gly
1 5 10 15

Leu Thr Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn Glu Phe Val
20 25 30

Glu Ser Ser Asp Gly Lys Thr Met Thr Ile Glu Asn Pro Ser Thr Gln
35 40 45

Glu Pro Ile Val Asp Val Phe Ser Ala Thr Lys Glu Asp Val Asp Tyr
50 55 60

Ala Val Asp Cys Ala Glu Arg Ala Phe Glu Lys Ser Asp Trp Ala Thr
65 70 75 80

Gln Asp Pro Lys Val Arg Ala Arg Tyr Leu Ser Lys Leu Ala Asp Leu
85 90 95

Met Glu Glu Gln Leu Glu Leu Ile Ala Ser Ile Glu Thr Leu Asp Asn
100 105 110

Gly Lys Thr Ile Ala Leu Ser Arg Gly Asp Val Gln Leu Ser Ile Asn
115 120 125

Cys Ile Arg Asp Ala Ala Ser Tyr Ala Asp Lys Val Asp Gly Arg Ser
130 135 140

Ile Asp Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Arg Glu Pro Ile
145 150 155 160

Gly Val Cys Ala Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Leu Met Met Leu
165 170 175

Ser Trp Lys Val Gly Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Cys Ile Val Leu
180 185 190

Lys Pro Ala Ser Ala Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe Ser Ser Leu
195 200 205

Cys Lys Gln Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile Ile Pro Gly
210 215 220

Pro Gly Gly Met Val Gly Thr Ala Leu Thr Thr His Pro Lys Val Arg
225 230 235 240

Lys Val Ala Phe Thr Gly Ser Thr Asp Ile Gly Lys Asp Ile Ala Val

245 250 255

Lys Ala Ser Ala Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu Leu Gly Gly

260 265 270

Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asn Asp Ala Asn Leu Glu Lys Thr Leu

275 280 285

Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln Ile Cys Ser

290 295 300

Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Ala Gln Ala Gly Ile Tyr Asp Arg Leu Leu

305 310 315 320

Lys Glu Phe Lys Ala Tyr Ile Glu Lys Asn Ile Lys Val Gly Asn Pro

325 330 335

Phe Asp Glu Ser Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Lys Glu Gln Tyr

340 345 350

Asn Thr Ile Leu Lys Tyr Ile Asn Ile Gly Lys Glu Glu Gly Ala Lys

355 360 365

Val Leu Thr Gly Gly Glu Thr Ala Ala Glu Lys Gly Tyr Phe Ile Lys

370 375 380

Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Lys Glu Asp Met Arg Val Val Lys Glu

385 390 395 400

Glu Ile Phe Gly Pro Cys Val Thr Ile Ser Lys Phe Glu Glu Ile Glu

405 410 415

Asp Gly Val Ala Met Ala Asn Asp Ser Glu Phe Gly Leu Gly Ala Gly

420 425 430

Ile Glu Thr Glu Asn Leu Ser Thr Ala Leu Lys Val Ala Lys Met Leu

435 440 445

His Ser Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Arg

450 455 460

Val Pro Phe Gly Gly Tyr Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg Glu Met Gly

465 470 475 480

Ser Glu Val Tyr Glu Cys Tyr Thr Gln Thr Lys Ala Val Arg Ile Lys

485 490 495

Leu

<210> 28

<211> 500

<212> PRT

<213> Saccharomyces bayanus

<400> 28

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Ala Val Lys Ile Thr Leu
1 5 10 15

Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn
20 25 30

Lys Phe Thr Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Ile Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp
50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu
65 70 75 80

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

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ser
100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile
115 120 125

Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Ile Asn
130 135 140

Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu
145 150 155 160

Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile
165 170 175

Met Met Leu Thr Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val

180 185 190

Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe
195 200 205
Ala Ser Leu Cys Lys Lys Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile
210 215 220
Val Pro Gly Pro Gly Arg Ser Val Gly Ala Ala Leu Thr Asn Asp Pro
225 230 235 240
Arg Ile Arg Lys Leu Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Lys Ser
245 250 255

Val Ala Ile Asp Ser Ser Glu Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu
260 265 270
Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asp Ile Lys
275 280 285
Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln
290 295 300
Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp
305 310 315 320

Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys Val
325 330 335
Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg
340 345 350
Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys Glu
355 360 365
Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Lys Gly Tyr
370 375 380

Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Glu Glu Asp Met Arg Ile
385 390 395 400
Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe Lys
405 410 415
Thr Leu Glu Glu Gly Val Ala Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly Leu
420 425 430

Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val Ala
435 440 445

Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe
450 455 460

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg
465 470 475 480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val
485 490 495

Arg Ile Lys Leu
500

<210> 29

<211> 507

<212> PRT

<213> Kluyveromyces lactis

<400> 29

Met Ser Ser Thr Ile Ala Glu Lys Leu Asn Leu Lys Ile Val Glu Gln
1 5 10 15

Asp Ala Val Ser Ile Thr Leu Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Gln Gln Pro
20 25 30

Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn Gln Phe Ile Lys Ser Gln Asp Gly Lys
35 40 45

Thr Leu Lys Val Glu Asn Pro Ser Thr Glu Glu Ile Ile Val Glu Val
50 55 60

Gln Ser Ala Thr Ser Gln Asp Val Glu Tyr Ala Val Glu Ala Ala Asp
65 70 75 80

Ala Ala Phe Asn Ser Glu Trp Ser Thr Met Asp Pro Lys Lys Arg Gly
85 90 95

Ser Leu Leu Phe Lys Leu Ala Asp Leu Ile Glu Ala Gln Lys Glu Leu
100 105 110

Ile Ala Ser Ile Glu Ser Ala Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala
115 120 125

Arg Gly Asp Val Gly Leu Val Ile Asp Tyr Ile Arg Ser Ala Ala Gly
130 135 140
Tyr Ala Asp Lys Leu Gly Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr
145 150 155 160
Ala Asn Phe Thr Tyr Lys Glu Pro Leu Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile
165 170 175
Pro Trp Asn Phe Pro Leu Met Met Leu Ser Trp Lys Ile Ala Pro Ala
180 185 190

Leu Val Ala Gly Asn Thr Val Ile Leu Lys Pro Ala Ser Pro Thr Pro
195 200 205
Leu Asn Ala Leu Phe Phe Ala Ser Leu Cys Lys Glu Ala Gly Ile Pro
210 215 220
Ala Gly Val Val Asn Ile Val Pro Gly Pro Gly Arg Ser Val Gly Asp
225 230 235 240
Thr Ile Thr Asn His Pro Lys Ile Arg Lys Ile Ala Phe Thr Gly Ser
245 250 255

Thr Asp Ile Gly Arg Asp Val Ala Ile Lys Ala Ala Gln Ser Asn Leu
260 265 270
Lys Lys Val Thr Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe
275 280 285
Glu Asp Ala Asn Ile Lys Lys Thr Ile Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile
290 295 300
Phe Lys Asn Ala Gly Gln Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val
305 310 315 320

Gln Asp Thr Ile Tyr Asp Gln Leu Leu Ser Glu Phe Lys Thr Tyr Leu
325 330 335
Glu Thr Glu Ile Lys Val Gly Ser Pro Phe Asp Glu Ser Asn Phe Gln
340 345 350
Ala Ala Ile Asn Asn Lys Ala Gln Phe Glu Thr Ile Leu Asn Tyr Ile
355 360 365
Asp Ile Gly Lys Lys Glu Gly Ala Ser Ile Leu Thr Gly Gly Glu Arg

370 375 380

Val Gly Asn Lys Gly Tyr Phe Ile Lys Pro Thr Val Phe Tyr Asn Val
385 390 395 400
Lys Glu Asp Met Arg Ile Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val
405 410 415
Thr Ile Ser Lys Phe Ser Thr Val Asp Glu Ala Val Ala Leu Ala Asn
420 425 430
Asp Ser Glu Phe Gly Leu Gly Ala Gly Ile Glu Thr Glu Asn Ile Ser
435 440 445

Val Ala Leu Lys Val Ala Lys Arg Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile
450 455 460
Asn Thr Tyr Asn Asp Phe Asp Ala Ala Val Pro Phe Gly Gly Tyr Lys
465 470 475 480
Gln Ser Gly Tyr Gly Arg Glu Met Gly Glu Glu Ala Phe Glu Ser Tyr
485 490 495
Thr Gln Ile Lys Ala Val Arg Ile Lys Leu Asp
500 505

<210> 30
<211> 526

<212> PRT
<213> Kluyveromyces thermotolerans
<400> 30
Met Asn Tyr Ala Cys Leu Arg Ser Gly Ser Ser Met Leu Gly Met Val
1 5 10 15
Lys Ala Ala Arg Ser Phe Ser Ile Ser Ala Arg Ala Leu Ser Ala Arg
20 25 30
Ala Lys Ala Asp Phe Val Lys Ile Thr Thr Pro Asn Gly His Thr Tyr
35 40 45
Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn Glu Phe Leu Lys Ser Gln

50 55 60
Lys Gly Glu Thr Ile Thr Val Glu Asp Pro Ser Thr Glu Gln Lys Ile

65 70 75 80

Val Glu Val Gln Ser Gly Thr Lys Glu Asp Val Glu Tyr Ala Val Glu

85 90 95

Cys Ala Glu Lys Ala Phe Asn Ser Ser Trp Ser Thr Gly Asp Pro Arg

100 105 110

Asn Arg Ala Arg Ser Leu Leu Lys Leu Ala Asp Leu Val Glu Glu Arg

115 120 125

Lys Glu Leu Ile Ala Ser Ile Glu Ser Met Asp Asn Gly Lys Thr Leu

130 135 140

Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Gly Ile Val Ile Asn Phe Leu Arg Ser

145 150 155 160

Ala Ala Gly Tyr Ala Asp Lys Leu Asp Gly Arg Ser Ile Asn Thr Gly

165 170 175

Asp Gly Tyr Val Asn Tyr Thr Ile Arg Glu Pro Val Gly Val Cys Gly

180 185 190

Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Leu Met Met Leu Ser Trp Lys Ile

195 200 205

Ala Pro Ala Leu Ala Ala Gly Asn Thr Val Ile Leu Lys Pro Ala Ser

210 215 220

Pro Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe Ala Ser Leu Cys Lys Glu Ala

225 230 235 240

Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile Ile Pro Gly Pro Gly Arg Gly

245 250 255

Val Gly Glu Thr Leu Thr Thr His Pro Lys Ile Arg Lys Ile Ala Phe

260 265 270

Thr Gly Ser Thr Gly Thr Gly Lys Gly Ile Ala Val Lys Ala Ala Gln

275 280 285

Ser Asn Leu Lys Lys Val Thr Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ser Ala His

290 295 300

Leu Val Phe Asn Asp Ala Asn Ile Glu Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val

305 310 315 320

Asn Gly Ile Phe Leu Asn Ala Gly Gln Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg
325 330 335
Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp Lys Leu Leu Pro Ala Phe Arg
340 345 350
Lys Tyr Val Glu Glu Lys Ile Thr Val Gly Ser Pro Phe Asp Glu Asn
355 360 365
Asn Phe Gln Gly Ala Ile Asn Asn Lys Ala Gln Phe Glu Thr Ile Met

370 375 380
Asn Tyr Val Gly Ile Gly Lys Ser Glu Gly Ala Lys Val Leu Thr Gly
385 390 395 400
Gly Glu Lys Val Asn Asp Lys Gly Tyr Phe Ile Arg Pro Thr Ile Phe
405 410 415
Tyr Asp Val Glu Glu Asp Met Arg Ile Val Lys Glu Glu Val Phe Gly
420 425 430
Pro Val Val Thr Ile Ser Lys Phe Lys Glu Ile Glu Asp Gly Val Ala

435 440 445
Met Ala Asn Asp Ser Glu Phe Gly Leu Gly Ala Gly Ile Gln Thr Glu
450 455 460
Asn Val Ser Thr Ala Leu Lys Val Ser Lys Met Leu Lys Ala Gly Ile
465 470 475 480
Val Trp Val Asn Thr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Val Pro Phe Gly
485 490 495
Gly Cys Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg Glu Met Gly Ile Glu Ala Phe

500 505 510
Glu Ala Tyr Thr Ser Val Lys Ala Val Arg Ile Lys Leu Ala
515 520 525

<210> 31
<211> 526
<212> PRT
<213> Kluyveromyces waltii
<400> 31
Met Asn Lys Met Ser Leu Lys Asn Ala Ser Thr Met Leu Arg Met Ala

1 5 10 15

Lys Tyr Ala Arg Asn Phe Ser Val Ser Ser Arg Ile Leu Ser Ala Lys

20 25 30

Met Lys Ala Asp Phe Val Lys Val Thr Thr Pro Asn Gly Leu Thr Tyr

35 40 45

Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn Glu Phe Val Lys Ser His

50 55 60

Asn Gly Ala Thr Ile Ala Val Glu Asp Pro Ala Thr Glu Lys Lys Ile

65 70 75 80

Val Glu Val Gln Ser Gly Thr Lys Glu Asp Val Glu Tyr Ala Val Glu

85 90 95

Cys Ala Glu Lys Ala Phe Asn Ser Ser Trp Ser Thr Gly Asp Pro Arg

100 105 110

Val Arg Ala Arg Ala Leu Leu Lys Leu Ala Asp Leu Ile Glu Gln Arg

115 120 125

Lys Glu Leu Ile Ser Ser Ile Glu Cys Met Asp Asn Gly Lys Ala Leu

130 135 140

Phe Leu Ala Lys Asn Asp Val Arg Ile Val Ile Asp Tyr Ile Arg Ser

145 150 155 160

Ser Ala Gly Phe Ala Asp Lys Leu Asp Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly

165 170 175

Asp Gly Tyr Val Asn Tyr Thr Leu Arg Glu Pro Val Gly Val Cys Gly

180 185 190

Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Leu Leu Met Leu Ser Trp Lys Ile

195 200 205

Ala Pro Ala Leu Ala Ala Gly Asn Thr Val Ile Leu Lys Pro Ala Ser

210 215 220

Pro Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe Ala Ser Leu Cys Lys Glu Ala

225 230 235 240

Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile Ile Pro Gly Pro Gly Arg Asp

245 250 255

Val Gly Glu Thr Leu Thr Thr His Pro Lys Ile Arg Lys Ile Ala Phe
260 265 270
Thr Gly Ser Thr Gly Thr Gly Lys Gly Ile Ala Val Lys Ala Ala Gln
275 280 285

Ser Asn Leu Lys Lys Val Thr Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ser Ala His
290 295 300
Met Val Phe Asn Asp Ala Asn Leu Glu Lys Thr Ile Pro Asn Leu Val
305 310 315 320
Asn Gly Ile Phe Leu Asn Ala Gly Gln Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg
325 330 335
Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp Lys Leu Leu Pro Ala Phe Lys
340 345 350

Lys Tyr Val Glu Glu Val Ile Thr Val Gly Ser Pro Phe Asp Glu Ser
355 360 365
Asn Phe Gln Gly Ala Ile Asn Asn Lys Ala Gln Phe Asp Thr Ile Met
370 375 380
Asn Tyr Val Gly Ile Gly Lys Glu Glu Gly Ala Lys Val Leu Thr Gly
385 390 395 400
Gly Lys Arg Ser Gly Asp Gln Gly Tyr Phe Ile Arg Pro Thr Ile Phe
405 410 415

Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly
420 425 430
Pro Val Val Thr Ile Ser Lys Phe Lys Glu Ile Glu Asp Gly Val Ala
435 440 445
Met Ala Asn Asn Ser Glu Phe Gly Leu Gly Ala Gly Ile Gln Thr Glu
450 455 460
Ser Val Ser Thr Ala Leu Lys Val Ser Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr
465 470 475 480

Val Trp Val Asn Thr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Val Pro Phe Gly
485 490 495
Gly Cys Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Met Gly Ile Glu Ala Phe

500 505 510

Asp Ser Tyr Thr Thr Thr Lys Ala Val Arg Ile Lys Leu Ala

515 520 525

<210> 32

<211> 500

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 32

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu

1 5 10 15

Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn

20 25 30

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro

35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp

50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu

65 70 75 80

Trp Ala Thr Gln Asp Pro Arg Glu Arg Gly Arg Leu Leu Ser Lys Leu

85 90 95

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala

100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile

115 120 125

Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val Asn

130 135 140

Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu

145 150 155 160

Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile

165 170 175

Met Met Leu Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val

180 185 190

Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe

195 200 205

Ala Ser Leu Cys Lys Lys Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile

210 215 220

Val Pro Gly Pro Gly Arg Thr Val Gly Ala Ala Leu Thr Asn Asp Pro

225 230 235 240

Arg Ile Arg Lys Leu Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Lys Ser

245 250 255

Val Ala Val Asp Ser Ser Glu Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu

260 265 270

Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asn Ile Lys

275 280 285

Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln

290 295 300

Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp

305 310 315 320

Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys Val

325 330 335

Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg

340 345 350

Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys Glu

355 360 365

Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Lys Gly Tyr

370 375 380

Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile

385 390 395 400

Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe Lys

405 410 415

Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly Leu

420 425 430

Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val Ala

435 440 445

Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe

450 455 460

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg

465 470 475 480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val

485 490 495

Arg Ile Lys Leu

500

<210> 33

<211> 500

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 33

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu

1 5 10 15

Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn

20 25 30

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro

35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp

50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu

65 70 75 80

Trp Ala Thr Gln Asp Pro Arg Glu Arg Gly Arg Leu Leu Ser Lys Leu

85 90 95

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala

100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile

115 120 125

Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val Asn

130 135 140

Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu

145 150 155 160

Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile

165 170 175

Met Met Leu Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val

180 185 190

Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe

195 200 205

Ala Ser Leu Cys Lys Lys Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile

210 215 220

Val Pro Gly Pro Gly Arg Thr Val Gly Ala Ala Leu Thr Asn Asp Pro

225 230 235 240

Arg Ile Arg Lys Leu Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Lys Ser

245 250 255

Val Ala Val Asp Ser Ser Glu Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu

260 265 270

Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asn Ile Lys

275 280 285

Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln

290 295 300

Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp

305 310 315 320

Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys Val

325 330 335

Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg

340 345 350

Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys Glu

355 360 365

Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Lys Gly Tyr

370 375 380

Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile

385 390 395 400

Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe Lys

405 410 415

Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly Leu

420 425 430

Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val Ala

435 440 445

Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe

450 455 460

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg

465 470 475 480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val

485 490 495

Arg Ile Lys Leu

500

<210> 34

<211> 500

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 34

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu

1 5 10 15

Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn

20 25 30

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro

35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp

50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu

65 70 75 80

```
Trp Ala Thr Gln Asp Pro Arg Glu Arg Gly Arg Leu Leu Ser Lys Leu
                85                  90                  95
Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala
            100                 105                 110
Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile
        115                 120                 125
Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val Asn

    130                 135                 140
Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu
145                 150                 155                 160
Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile
                165                 170                 175
Met Met Leu Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val
            180                 185                 190
Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe

        195                 200                 205
Ala Ser Leu Cys Lys Lys Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile
    210                 215                 220
Val Pro Gly Pro Gly Arg Thr Val Gly Ala Ala Leu Thr Asn Asp Pro
225                 230                 235                 240
Arg Ile Arg Lys Leu Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Lys Ser
                245                 250                 255
Val Ala Val Asp Ser Ser Glu Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu

            260                 265                 270
Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asn Ile Lys
        275                 280                 285
Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln
    290                 295                 300
Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp
305                 310                 315                 320
Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys Val
```

325 330 335

Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg

340 345 350

Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys Glu

355 360 365

Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Lys Gly Tyr

370 375 380

Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile

385 390 395 400

Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe Lys

405 410 415

Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly Leu

420 425 430

Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val Ala

435 440 445

Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe

450 455 460

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg

465 470 475 480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val

485 490 495

Arg Ile Lys Leu

500

<210> 35

<211> 501

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 35

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu

1 5 10 15

Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn

20 25 30

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45
Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp
50 55 60
Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu

65 70 75 80
Trp Ala Thr Gln Asp Pro Arg Glu Arg Gly Arg Leu Leu Ser Lys Leu
85 90 95
Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala
100 105 110
Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Phe Lys Ala Arg Gly Asp Val Thr
115 120 125
Ile Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val

130 135 140
Asn Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr
145 150 155 160
Leu Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro
165 170 175
Ile Met Met Leu Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn
180 185 190
Val Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr

195 200 205
Phe Ala Ser Leu Cys Lys Lys Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn
210 215 220
Ile Val Pro Gly Pro Gly Arg Thr Val Gly Ala Ala Leu Thr Asn Asp
225 230 235 240
Pro Arg Ile Arg Lys Leu Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Lys
245 250 255
Ser Val Ala Val Asp Ser Ser Glu Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu

260 265 270
Glu Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asn Ile

275 280 285

Lys Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly

290 295 300

Gln Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr

305 310 315 320

Asp Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys

325 330 335

Val Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn

340 345 350

Arg Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys

355 360 365

Glu Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Lys Gly

370 375 380

Tyr Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg

385 390 395 400

Ile Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe

405 410 415

Lys Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly

420 425 430

Leu Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val

435 440 445

Ala Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp

450 455 460

Phe Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly

465 470 475 480

Arg Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala

485 490 495

Val Arg Ile Lys Leu

500

<210> 36

<211> 500

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 36

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu

1 5 10 15

Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn

20 25 30

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro

35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp

50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Thr Phe His Asp Thr Glu

65 70 75 80

Trp Ala Thr Gln Asp Pro Arg Glu Arg Gly Arg Leu Leu Ser Lys Leu

85 90 95

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala

100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile

115 120 125

Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val Asn

130 135 140

Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu

145 150 155 160

Glu Pro Val Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile

165 170 175

Met Met Leu Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val

180 185 190

Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe

195 200 205

Ala Ser Leu Cys Lys Lys Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile

210 215 220

Val Pro Gly Pro Gly Arg Thr Val Gly Ala Ala Leu Thr Asn Asp Pro

225 230 235 240

Arg Ile Arg Lys Leu Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Lys Ser

245 250 255

Val Ala Val Asp Ser Ser Glu Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu

260 265 270

Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asn Ile Lys

275 280 285

Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln

290 295 300

Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp

305 310 315 320

Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys Val

325 330 335

Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg

340 345 350

Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys Glu

355 360 365

Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Lys Gly Tyr

370 375 380

Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile

385 390 395 400

Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe Lys

405 410 415

Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly Leu

420 425 430

Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val Ala

435 440 445

Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe

450 455 460

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg

465 470 475 480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val

485 490 495

Arg Ile Lys Leu

500

<210> 37

<211> 500

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 37

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu

1 5 10 15

Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn

20 25 30

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro

35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Pro Glu Asp

50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu

65 70 75 80

Trp Ala Thr Gln Asp Pro Arg Glu Arg Gly Arg Leu Leu Ser Lys Leu

85 90 95

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala

100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile

115 120 125

Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val Asn

130 135 140

Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu

145 150 155 160

Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile

165 170 175

Met Met Leu Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val

180 185 190

Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe

195 200 205

Ala Ser Leu Cys Lys Lys Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile

210 215 220

Val Pro Gly Pro Gly Arg Thr Val Gly Ala Ala Leu Thr Asn Asp Pro

225 230 235 240

Arg Ile Arg Lys Leu Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Lys Ser

245 250 255

Val Ala Val Asp Ser Ser Glu Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu

260 265 270

Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asn Ile Lys

275 280 285

Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln

290 295 300

Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp

305 310 315 320

Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys Val

325 330 335

Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg

340 345 350

Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys Glu

355 360 365

Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Lys Gly Tyr

370 375 380

Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile

385 390 395 400

Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe Lys

405 410 415

Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly Leu

420 425 430

Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val Ala
435 440 445
Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe

450 455 460
Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg
465 470 475 480
Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val
485 490 495
Arg Ile Lys Leu
500

<210> 38
<211> 497
<212> PRT
<213> Pichia pastoris
<400> 38
Met Ser Glu Phe Val Ala Lys Ile Asn Ile Pro Thr Ile Ala Glu Pro
1 5 10 15

Val Glu Val Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn Glu Trp Val Ala Ala
20 25 30
Lys Ser Gly Lys Thr Phe Ala Val Thr Ser Pro Ile Asp Glu Ser His
35 40 45
Leu Thr Asp Leu Gln Met Ala Gly Ala Asp Asp Val Asp Ile Ala Thr
50 55 60
Asp Phe Ala Tyr Lys Ala Phe Tyr Lys His Lys Phe Val Glu Pro Ser
65 70 75 80

Val Arg Gly Arg Trp Leu Tyr Lys Leu Ala Glu Leu Phe Glu Glu His
85 90 95
Lys Asp Thr Ile Ala Lys Leu Glu Ser Leu Asp Asn Gly Lys Ala Leu
100 105 110
His Cys Ala Gln Phe Asp Leu Asn Leu Val Val Glu Tyr Leu Arg Ser
115 120 125
Cys Ala Gly Tyr Ala Asp Lys Val Asp Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly

130 135 140

Lys Asp His Leu Asn Phe Thr Lys Arg Glu Pro Leu Gly Val Cys Gly
145 150 155 160
Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile Leu Met Trp Ala Trp Lys Ile
165 170 175
Gly Pro Ala Leu Ala Thr Gly Asn Ala Val Val Leu Lys Pro Ala Ser
180 185 190
Ala Thr Pro Leu Thr Ala Leu Tyr Ala Thr Lys Leu Val Lys Glu Ala
195 200 205

Gly Ile Pro Ala Gly Leu Val Asn Ile Val Pro Gly Ser Gly Arg Gly
210 215 220
Cys Gly Asn Ala Ile Leu Gln His Pro Lys Ile Lys Lys Ile Ala Phe
225 230 235 240
Thr Gly Ser Thr Ala Val Gly Ile Asp Val Met Val Ala Ala Ala Thr
245 250 255
Phe Asn Leu Lys Lys Val Thr Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ser Pro Asn
260 265 270

Ile Val Phe Asp Asp Cys Glu Leu Glu Ser Thr Ile Gln Asn Leu Ile
275 280 285
Thr Gly Ile Phe Phe Asn Gly Gly Glu Val Cys Cys Ala Gly Ser Arg
290 295 300
Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Glu Gln Val Leu Ser Lys Phe Lys
305 310 315 320
Glu Glu Ile Ser Lys Leu Lys Val Gly Asn Pro Phe Glu Glu Gly Thr
325 330 335

Tyr Gln Gly Ala Gln Ala Thr Pro Asp Gln Phe Glu Cys Val Leu Gly
340 345 350
Tyr Ile Glu Arg Ala Lys Lys Ala Gly Ala Lys Leu Leu Thr Gly Gly
355 360 365
Asn Arg Ile Gly Thr Lys Gly Tyr Phe Val Glu Pro Thr Val Phe Tyr
370 375 380

Asp Cys Asp Glu Asp Leu Glu Ile Val Lys Asp Glu Ile Phe Gly Pro
385 390 395 400

Val Ala Ser Ile Gly Lys Phe Lys Asp Val Ala Glu Leu Val Glu Lys
405 410 415
Ala Asn Asn Ser Glu Tyr Gly Leu Ala Ala Gly Ile His Thr Gln Asp
420 425 430
Leu Asn Lys Ala Phe Gly Val Ala Asp Gln Leu Glu Ala Gly Ser Val
435 440 445
Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Leu His Gln Ser Val Pro Phe Gly Gly
450 455 460

Tyr Lys Thr Ser Gly Ile Gly Arg Glu Met Gly Leu Glu Ala Phe Asp
465 470 475 480
Asn Tyr Thr Gln Val Lys Ala Val Arg Thr Arg Leu Asn Val Pro Thr
485 490 495
Ala

<210> 39
<211> 507
<212> PRT
<213> Kluyveromyces marxianus
<400> 39
Met Ser Ser Ser Leu Ala Glu Lys Leu Asn Val Lys Ile Val Glu Gln
1 5 10 15
Lys Pro Val Thr Val Thr Leu Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro

20 25 30
Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn Gln Phe Ile Arg Ser Gln Asp Gly Ser
35 40 45
Thr Leu Lys Val Glu Asn Pro Ser Thr Glu Glu Ile Ile Val Glu Val
50 55 60
Gln Ser Ala Thr Ala Gln Asp Val Glu Tyr Ala Val Glu Ser Ala Glu
65 70 75 80

Ala Ala Phe Asn Ser Glu Trp Ser Ser Met Asp Pro Arg Asn Arg Ala

85 90 95

Ala Tyr Leu Val Lys Leu Ala Asn Leu Ile Glu Glu Lys Lys Glu Leu

100 105 110

Ile Ala Ser Ile Glu Ser Thr Asp Asn Gly Lys Ala Leu Ala Leu Ala

115 120 125

Arg Gly Asp Val Gly Leu Val Ile Asp Tyr Ile Arg Ser Ala Ala Gly

130 135 140

Tyr Ala Asp Lys Leu Gly Gly Arg Thr Ile Asp Thr Gly Asp Gly Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Phe Thr Tyr Arg Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile

165 170 175

Pro Trp Asn Phe Pro Leu Met Met Leu Ser Trp Lys Ile Ala Pro Ala

180 185 190

Leu Val Ala Gly Asn Thr Val Ile Leu Lys Pro Ala Ser Pro Thr Pro

195 200 205

Leu Asn Ala Leu Phe Phe Ala Ser Leu Cys Lys Glu Ala Gly Ile Pro

210 215 220

Ala Gly Val Val Asn Ile Val Pro Gly Pro Gly Arg Ser Val Gly Asp

225 230 235 240

Thr Ile Thr Asn His Pro Lys Ile Arg Lys Ile Ala Phe Thr Gly Ser

245 250 255

Thr Asp Ile Gly Arg Asp Val Ala Ile Lys Ala Ala Gln Ser Asn Leu

260 265 270

Lys Lys Val Thr Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe

275 280 285

Ala Asp Ala Asn Ile Lys Lys Thr Ile Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile

290 295 300

Phe Lys Asn Ala Gly Gln Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val

305 310 315 320

Gln Asp Thr Ile Tyr Asp Glu Leu Leu Ser Glu Phe Lys Lys Tyr Leu

325 330 335

Glu Thr Glu Ile Lys Val Gly Ser Pro Phe Asp Glu Ser Asn Phe Gln

340 345 350

Ala Ala Ile Thr Asn Lys Ala Gln Phe Glu Thr Ile Leu Asn Tyr Ile

355 360 365

Asp Ile Gly Lys Lys Glu Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Arg

370 375 380

Val Gly Asn Lys Gly Tyr Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val

385 390 395 400

Lys Glu Asp Met Arg Ile Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val

405 410 415

Thr Ile Ser Lys Phe Ser Thr Val Asp Glu Ala Val Ala Leu Ala Asn

420 425 430

Asp Ser Glu Phe Gly Leu Gly Ala Gly Ile Glu Thr Glu Asn Leu Ser

435 440 445

Val Ala Leu Lys Val Ala Lys Arg Leu His Ala Gly Thr Val Trp Ile

450 455 460

Asn Thr Tyr Asn Asp Phe Asp Ala Ala Val Pro Phe Gly Gly Tyr Lys

465 470 475 480

Gln Ser Gly Tyr Gly Arg Glu Met Gly Glu Glu Ala Phe Glu Ser Tyr

485 490 495

Thr Gln Val Lys Ala Val Arg Ile Lys Leu Glu

500 505

<210> 40

<211> 503

<212> PRT

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 40

Met Ser Thr Lys Leu Val Asp His Val Glu Ile Thr Val Pro Thr Gly

1 5 10 15

Lys Thr Tyr Ile Gln Pro Val Gly Leu Phe Ile Asn Asn Gln His Val

20 25 30

Asp Ser Val His Gly Gly Arg Val Lys Val Tyr Ser Pro Ser Thr Glu

35 40 45

Lys Leu Ile Cys Glu Val Ala Asp Ala Asp Glu Glu Asp Val Asp Ile

50 55 60

Ala Val Lys Val Ala Arg Ala Ala Phe Gln Thr Asp Ala Pro Trp Arg

65 70 75 80

Lys Phe Ser Ser Ala Gln Arg Gly Arg Cys Leu Ser Arg Leu Ala Asp

85 90 95

Cys Ile Glu Gln Asn Leu Glu Tyr Leu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Asp

100 105 110

Asn Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ala Arg Gly Asp Val Gln Ala Ala Ala

115 120 125

Asp Cys Phe Arg Tyr Tyr Gly Gly Trp Ala Asp Lys Asp Tyr Gly Gln

130 135 140

Thr Ile Glu Thr Asp Ile Lys Arg Phe Ala Tyr Thr Arg His Glu Pro

145 150 155 160

Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Phe Leu Met

165 170 175

Cys Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Val Ala Cys Gly Asn Thr Ile Ile

180 185 190

Leu Lys Thr Ala Glu Leu Thr Pro Leu Ser Ala Leu Cys Leu Thr Lys

195 200 205

Phe Val Pro Glu Cys Gly Phe Pro Pro Gly Val Ile Asn Val Leu Ser

210 215 220

Gly Asp Gly Arg Arg Cys Gly Asn Ala Ile Ser Ser His Met Asp Ile

225 230 235 240

Asp Lys Val Ala Phe Thr Gly Ser Thr Gly Val Gly Arg Met Val Met

245 250 255

Arg Ala Ala Ala Ser Ser Asn Leu Lys Lys Val Thr Leu Glu Leu Gly

260 265 270

Gly Lys Ser Pro Asn Ile Val Phe Asn Asp Ala Asp Leu Asp Ser Ala

275 280 285

Ala Val Trp Thr Asn Tyr Gly Ile Phe Tyr Asn Ser Gly Gln Val Cys

290 295 300

Cys Ala Gly Ser Arg Val Tyr Val Gln Glu Asp Val Tyr Asp Glu Phe

305 310 315 320

Ile Lys Arg Met Val Ala Lys Ala Lys Thr Leu Lys Val Gly Asp Pro

325 330 335

Phe Ala Glu Asp Thr Phe Gln Gly Ala Gln Val Ser Lys Gln Gln Tyr

340 345 350

Glu Arg Ile Val Ser Tyr Ile Glu Ser Gly Ile Ala His Gly Ala Lys

355 360 365

Leu Glu Ile Gly Gly Lys Arg His Gly Asn Leu Gly Tyr Phe Val Glu

370 375 380

Pro Thr Ile Leu Ser Asn Val Thr Glu Asp Met Ala Val Gly Lys Glu

385 390 395 400

Glu Ile Phe Gly Pro Val Leu Ala Val Ile Lys Phe Lys Thr Ile Glu

405 410 415

Glu Ala Ile Arg Arg Gly Asn Asn Ser Thr Tyr Gly Leu Ala Ala Gly

420 425 430

Val His Thr Asn Asn Ile Thr Asn Ala Ile Lys Val Ser Asn Ala Leu

435 440 445

Glu Ala Gly Thr Val Trp Val Asn Cys Tyr Asn Leu Leu His His Gln

450 455 460

Ile Pro Phe Gly Gly Tyr Lys Glu Ser Gly Ile Gly Arg Glu Leu Gly

465 470 475 480

Ser Tyr Gly Leu Thr Asn Tyr Thr Gln Thr Lys Ala Val His Ile Asn

485 490 495

Leu Gly Met Asp Ser Pro Ile

500

<210> 41

<211> 496

<212> PRT

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 41

Met Ser Glu Asp Leu Phe Val Ser Ile Asn Phe Pro Asn Gly Lys Ser
1 5 10 15
Val Lys Gln Pro Ile Gly Leu Tyr Ile Asn Gly Glu Trp His Lys Ser

20 25 30
Ala Glu Thr Trp Glu Thr Val Asp Pro Ser Ile Glu Glu Val Ile Ala
35 40 45
Lys Val Tyr Leu Ala Gly Glu Lys Glu Ile Asp Tyr Ala Val Lys Ser
50 55 60
Ala Lys Glu Ala Phe Lys Thr Trp Lys Lys Val Pro Gly Ser Glu Lys
65 70 75 80
Gly Glu Leu Leu Met Lys Leu Ala Glu Leu Thr Glu Lys His Ala Asp

85 90 95
Thr Leu Ala Ala Ile Glu Ala Met Asp Ser Gly Lys Pro Leu Val Ser
100 105 110
Asn Ala Arg Gly Asp Val Asp Gly Thr Ile Ala Leu Leu Arg Tyr Cys
115 120 125
Ala Gly Trp Ala Asp Lys Ile Tyr Gly Gln Val Ile Pro Thr Gly Pro
130 135 140
Glu Lys Leu Ala Tyr Ala Lys Arg Thr Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln

145 150 155 160
Ile Val Pro Trp Asn Tyr Pro Leu Asn Met Ala Gly Trp Lys Ile Ala
165 170 175
Pro Ala Leu Ala Ala Gly Asn Cys Ile Ile Ile Lys Ser Ala Glu Thr
180 185 190
Thr Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Phe Ala Thr Leu Val Glu Glu Ala Gly
195 200 205
Phe Pro Lys Gly Val Val Asn Ile Ile Ser Gly Leu Gly Thr Val Ala

210 215 220

Gly Ser Tyr Met Ala Lys His Pro Gly Ile Asp Lys Ile Ala Phe Thr

225 230 235 240

Gly Ser Thr Lys Val Gly Val Ile Val Gln Gln Leu Ala Ala Ser Asn

245 250 255

Leu Lys Ala Val Thr Leu Glu Cys Gly Gly Lys Ser Pro Phe Leu Val

260 265 270

Phe Glu Asp Ala Asp Leu Asp Gln Ala Val Lys Trp Ala Ala Leu Gly

275 280 285

Ile Met Tyr Asn Ser Gly Gln Ile Cys Thr Ser Asn Ser Arg Ile Tyr

290 295 300

Val Gln Asp Ser Val Tyr Asp Lys Phe Ile Glu Leu Phe Lys Lys His

305 310 315 320

Val Ile Gln Asp Tyr Ile Val Gly Met Pro Phe Asp Asp Asn Thr Val

325 330 335

Val Gly Pro Val Val Asn Lys Thr Gln Tyr Asn Arg Ile Lys Asn Tyr

340 345 350

Ile Glu Gln Gly Lys Lys Glu Gly Ala Lys Leu Val Leu Gly Asp Glu

355 360 365

Pro Leu Pro Leu Lys Gln Gly Tyr Phe Ile Ser Pro Thr Ile Phe Ala

370 375 380

Asp Cys Ser Glu Asn Met Thr Ile Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro

385 390 395 400

Val Val Ala Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asp Glu Ala Ile Glu Lys

405 410 415

Ala Asn Asn Thr Thr Tyr Gly Leu Ala Ala Met Cys Phe Thr Lys Asp

420 425 430

Leu Glu Arg Ala His Arg Val Ser Asp Glu Leu Glu Ala Gly Met Val

435 440 445

Phe Ile Asn Ser Thr Glu Asn Ser Asp Ile Gln Ala Pro Phe Gly Gly

450 455 460

Ile Lys Met Ser Gly Ile Gly Asn Glu Leu Gly Ser Asn Gly Ile Glu

465 470 475 480

Met Tyr Thr Gln Ile Lys Ala Val His Ile Asn Phe Asn Asn Lys Leu

485 490 495

<210> 42

<211> 1716

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 42

atgttgacta aagctacaaa agagcagaaa tcattggtga aaaatagggg tgcagaactt 60

gttgtggact gtttggtaga acagggcgta acacatgttt ttggtatccc aggtgcaaaa 120

atcgacgccg tgtttgatgc attacaagac aagggtccag aaattattgt tgctagacat 180

gagcaaaatg ccgcatttat ggcgcaagct gtaggtaggc ttacaggtaa acctggtgtt 240

gtcctagtta cgtctggccc aggagcctcc aatttagcaa ctggtctatt gacagctaat 300

actgagggag atcctgtagt tgcgttagcc ggtaatgtaa ttagagctga taggcttaag 360

agaactcacc agtctctaga caacgctgct ttattccaac cgatcaccaa gtactcagta 420

gaggtacaag acgtaaagaa tatacctgaa gctgtgacaa acgcatttcg tatagcttct 480

gctggtcagg ctggtgccgc gtttgtttct tttcctcaag acgttgtcaa tgaagtgacc 540

aatactaaaa acgttagagc ggttgcagcc cctaaactag gtccagccgc agacgacgca 600

attagcgctg caattgctaa aattcagacg gcgaaactac cagtagtcct tgtcggtatg 660

aagggcggaa gaccagaagc aataaaagct gttcgtaagt tattgaagaa agtccaatta 720

cctttcgttg agacttacca agcagcaggt actttatcta gagatttaga ggatcagtat 780

tttggaagga taggtctatt tagaaaccaa ccaggagatt tactattaga acaagctgat 840

gttgtactta ctatcggtta tgatcctata gagtatgacc caaagttttg gaacataaat 900

ggggatagaa caattataca tctagacgag ataatcgccg acatcgatca cgcttatcaa 960

ccagatttag aactaatcgg agatatcccg tcaacaatca atcatattga acatgatgct 1020

gtaaaggttg agttcgctga acgtgagcag aaaatcttat ctgatctaaa gcaatatatg 1080

catgagggtg aacaagttcc agcagactgg aaatctgacc gtgcacatcc tttggaaatc 1140

gttaaggaac taagaaatgc ggtcgatgat catgtgactg ttacatgtga tatcggttca 1200

catgcaattt ggatgtcacg ttattttagg agctacgaac cattaacttt aatgatatct 1260

aacgggatgc aaactctggg ggttgcactt ccttgggcta ttggcgctag tttagttaag 1320

cccggtgaga aggtggtatc ggtatcaggt gatggtggct ttctgttttc ggctatggaa 1380

ttagaaactg cagtccgttt aaaagctccc attgtgcata ttgtctggaa tgattctact 1440

tacgacatgg ttgcttttca acagttgaag aaatacaata gaacttcggc tgtagacttt 1500

ggtaacatcg atattgtgaa atatgctgag tcttttggcg caacaggcct gagggtggaa 1560

agtccagatc agttagctga tgtgttgaga caagggatga atgccgaggg accggtaatc 1620

atagatgtgc cagttgacta ctcagacaat attaatttgg cttctgataa acttcctaaa 1680

gagtttggcg agctaatgaa gaccaaagcc ttataa 1716

<210> 43

<211> 571

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 43

Met Leu Thr Lys Ala Thr Lys Glu Gln Lys Ser Leu Val Lys Asn Arg
1 5 10 15

Gly Ala Glu Leu Val Val Asp Cys Leu Val Glu Gln Gly Val Thr His
20 25 30

Val Phe Gly Ile Pro Gly Ala Lys Ile Asp Ala Val Phe Asp Ala Leu
35 40 45

Gln Asp Lys Gly Pro Glu Ile Ile Val Ala Arg His Glu Gln Asn Ala
50 55 60

Ala Phe Met Ala Gln Ala Val Gly Arg Leu Thr Gly Lys Pro Gly Val
65 70 75 80

Val Leu Val Thr Ser Gly Pro Gly Ala Ser Asn Leu Ala Thr Gly Leu
85 90 95

Leu Thr Ala Asn Thr Glu Gly Asp Pro Val Val Ala Leu Ala Gly Asn
100 105 110

Val Ile Arg Ala Asp Arg Leu Lys Arg Thr His Gln Ser Leu Asp Asn
115 120 125

Ala Ala Leu Phe Gln Pro Ile Thr Lys Tyr Ser Val Glu Val Gln Asp
130 135 140

Val Lys Asn Ile Pro Glu Ala Val Thr Asn Ala Phe Arg Ile Ala Ser

145 150 155 160

Ala Gly Gln Ala Gly Ala Ala Phe Val Ser Phe Pro Gln Asp Val Val

165 170 175

Asn Glu Val Thr Asn Thr Lys Asn Val Arg Ala Val Ala Ala Pro Lys

180 185 190

Leu Gly Pro Ala Ala Asp Asp Ala Ile Ser Ala Ala Ile Ala Lys Ile

195 200 205

Gln Thr Ala Lys Leu Pro Val Val Leu Val Gly Met Lys Gly Gly Arg

210 215 220

Pro Glu Ala Ile Lys Ala Val Arg Lys Leu Leu Lys Lys Val Gln Leu

225 230 235 240

Pro Phe Val Glu Thr Tyr Gln Ala Ala Gly Thr Leu Ser Arg Asp Leu

245 250 255

Glu Asp Gln Tyr Phe Gly Arg Ile Gly Leu Phe Arg Asn Gln Pro Gly

260 265 270

Asp Leu Leu Leu Glu Gln Ala Asp Val Val Leu Thr Ile Gly Tyr Asp

275 280 285

Pro Ile Glu Tyr Asp Pro Lys Phe Trp Asn Ile Asn Gly Asp Arg Thr

290 295 300

Ile Ile His Leu Asp Glu Ile Ile Ala Asp Ile Asp His Ala Tyr Gln

305 310 315 320

Pro Asp Leu Glu Leu Ile Gly Asp Ile Pro Ser Thr Ile Asn His Ile

325 330 335

Glu His Asp Ala Val Lys Val Glu Phe Ala Glu Arg Glu Gln Lys Ile

340 345 350

Leu Ser Asp Leu Lys Gln Tyr Met His Glu Gly Glu Gln Val Pro Ala

355 360 365

Asp Trp Lys Ser Asp Arg Ala His Pro Leu Glu Ile Val Lys Glu Leu

370 375 380

Arg Asn Ala Val Asp Asp His Val Thr Val Thr Cys Asp Ile Gly Ser

385 390 395 400

His Ala Ile Trp Met Ser Arg Tyr Phe Arg Ser Tyr Glu Pro Leu Thr
405 410 415
Leu Met Ile Ser Asn Gly Met Gln Thr Leu Gly Val Ala Leu Pro Trp
420 425 430
Ala Ile Gly Ala Ser Leu Val Lys Pro Gly Glu Lys Val Val Ser Val
435 440 445
Ser Gly Asp Gly Gly Phe Leu Phe Ser Ala Met Glu Leu Glu Thr Ala
450 455 460

Val Arg Leu Lys Ala Pro Ile Val His Ile Val Trp Asn Asp Ser Thr
465 470 475 480
Tyr Asp Met Val Ala Phe Gln Gln Leu Lys Lys Tyr Asn Arg Thr Ser
485 490 495
Ala Val Asp Phe Gly Asn Ile Asp Ile Val Lys Tyr Ala Glu Ser Phe
500 505 510
Gly Ala Thr Gly Leu Arg Val Glu Ser Pro Asp Gln Leu Ala Asp Val
515 520 525

Leu Arg Gln Gly Met Asn Ala Glu Gly Pro Val Ile Ile Asp Val Pro
530 535 540
Val Asp Tyr Ser Asp Asn Ile Asn Leu Ala Ser Asp Lys Leu Pro Lys
545 550 555 560
Glu Phe Gly Glu Leu Met Lys Thr Lys Ala Leu
565 570

<210> 44
<211> 1476
<212> DNA
<213> Escherichia coli
<400> 44
atggcgaatt atttcaacac tctgaacctg cgtcaacaac tggcgcaact gggtaagtgc 60
cgtttcatgg gtcgtgacga gtttgcggac ggtgcttctt atctgcaagg caagaaggtt 120

gttattgttg gttgcggtgc gcaaggcctg aatcaaggtc tgaatatgcg cgacagcggc 180
ctggacatta gctatgcgct gcgcaaggag gctatcgcgg aaaaacgtgc tagctggcgc 240
aaggctactg agaacggctt caaggttggc acctatgagg agctgattcc gcaagctgac 300

ctggttatca atctgacccc agataaagtg catagcgacg ttgttcgtac tgttcaaccg 360

ctgatgaagg atggtgctgc tctgggttat agccacggct ttaacattgt tgaggtaggt 420

gaacaaattc gcaaggacat tactgttgtt atggtggctc caaagtgtcc gggtactgag 480

gttcgcgagg aatataagcg cggttttggt gttccaaccc tgatcgcggt gcatccagag 540

aatgacccaa agggtgaggg tatggctatc gcgaaggcgt gggctgcggc gactggcggc 600

catcgcgctg gcgttctgga gagcagcttt gtggctgagg ttaagagcga tctgatgggt 660

gaacagacta ttctgtgtgg tatgctgcaa gcgggtagcc tgctgtgttt tgataaactg 720

gttgaggagg gcactgaccc ggcgtatgcg gagaagctga tccaatttgg ctgggagact 780

attactgagg cgctgaagca aggtggtatt actctgatga tggatcgcct gagcaatcca 840

gctaagctgc gcgcgtacgc tctgagcgag caactgaagg aaattatggc accgctgttt 900

caaaagcaca tggatgatat cattagcggt gagtttagca gcggcatgat ggctgattgg 960

gcgaatgacg acaaaaagct gctgacttgg cgcgaggaaa ctggtaagac tgctttcgag 1020

actgctccac aatacgaggg taagattggt gaacaagaat attttgacaa gggtgttctg 1080

atgatcgcta tggttaaggc tggtgtggag ctggcttttg agactatggt tgacagcggt 1140

attatcgagg aaagcgcgta ctacgagagc ctgcatgaac tgccactgat cgcgaatact 1200

attgcgcgca aacgcctgta tgagatgaat gttgtgatta gcgacactgc ggaatatggc 1260

aattacctgt ttagctatgc gtgcgttcca ctgctgaagc cattcatggc ggaactgcag 1320

ccaggtgatc tgggcaaggc gatcccagag ggtgctgttg acaatggtca gctgcgcgac 1380

gttaatgagg ctatccgttc tcacgctatc gaacaagttg gcaaaaagct gcgtggttac 1440

atgaccgaca tgaagcgcat cgcggtggct ggctaa 1476

<210> 45

<211> 493

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 45

Met Ala Asn Tyr Phe Asn Thr Leu Asn Leu Arg Gln Gln Leu Ala Gln

1 5 10 15

Leu Gly Lys Cys Arg Phe Met Gly Arg Asp Glu Phe Ala Asp Gly Ala

20 25 30

Ser Tyr Leu Gln Gly Lys Lys Val Val Ile Val Gly Cys Gly Ala Gln

35 40 45

Gly Leu Asn Gln Gly Leu Asn Met Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ser

50 55 60

Tyr Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ile Ala Glu Lys Arg Ala Ser Trp Arg

65 70 75 80

Lys Ala Thr Glu Asn Gly Phe Lys Val Gly Thr Tyr Glu Glu Leu Ile

85 90 95

Pro Gln Ala Asp Leu Val Ile Asn Leu Thr Pro Asp Lys Val His Ser

100 105 110

Asp Val Val Arg Thr Val Gln Pro Leu Met Lys Asp Gly Ala Ala Leu

115 120 125

Gly Tyr Ser His Gly Phe Asn Ile Val Glu Val Gly Glu Gln Ile Arg

130 135 140

Lys Asp Ile Thr Val Val Met Val Ala Pro Lys Cys Pro Gly Thr Glu

145 150 155 160

Val Arg Glu Glu Tyr Lys Arg Gly Phe Gly Val Pro Thr Leu Ile Ala

165 170 175

Val His Pro Glu Asn Asp Pro Lys Gly Glu Gly Met Ala Ile Ala Lys

180 185 190

Ala Trp Ala Ala Ala Thr Gly Gly His Arg Ala Gly Val Leu Glu Ser

195 200 205

Ser Phe Val Ala Glu Val Lys Ser Asp Leu Met Gly Glu Gln Thr Ile

210 215 220

Leu Cys Gly Met Leu Gln Ala Gly Ser Leu Leu Cys Phe Asp Lys Leu

225 230 235 240

Val Glu Glu Gly Thr Asp Pro Ala Tyr Ala Glu Lys Leu Ile Gln Phe

245 250 255

Gly Trp Glu Thr Ile Thr Glu Ala Leu Lys Gln Gly Gly Ile Thr Leu

260 265 270

Met Met Asp Arg Leu Ser Asn Pro Ala Lys Leu Arg Ala Tyr Ala Leu

275 280 285

Ser Glu Gln Leu Lys Glu Ile Met Ala Pro Leu Phe Gln Lys His Met

290 295 300

Asp Asp Ile Ile Ser Gly Glu Phe Ser Ser Gly Met Met Ala Asp Trp

305 310 315 320

Ala Asn Asp Asp Lys Lys Leu Leu Thr Trp Arg Glu Glu Thr Gly Lys

325 330 335

Thr Ala Phe Glu Thr Ala Pro Gln Tyr Glu Gly Lys Ile Gly Glu Gln

340 345 350

Glu Tyr Phe Asp Lys Gly Val Leu Met Ile Ala Met Val Lys Ala Gly

355 360 365

Val Glu Leu Ala Phe Glu Thr Met Val Asp Ser Gly Ile Ile Glu Glu

370 375 380

Ser Ala Tyr Tyr Glu Ser Leu His Glu Leu Pro Leu Ile Ala Asn Thr

385 390 395 400

Ile Ala Arg Lys Arg Leu Tyr Glu Met Asn Val Val Ile Ser Asp Thr

405 410 415

Ala Glu Tyr Gly Asn Tyr Leu Phe Ser Tyr Ala Cys Val Pro Leu Leu

420 425 430

Lys Pro Phe Met Ala Glu Leu Gln Pro Gly Asp Leu Gly Lys Ala Ile

435 440 445

Pro Glu Gly Ala Val Asp Asn Gly Gln Leu Arg Asp Val Asn Glu Ala

450 455 460

Ile Arg Ser His Ala Ile Glu Gln Val Gly Lys Lys Leu Arg Gly Tyr

465 470 475 480

Met Thr Asp Met Lys Arg Ile Ala Val Ala Gly Leu Glu

485 490

<210> 46

<211> 1476

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 46

atggccaact attttaacac attaaatttg agacaacaat tggctcaact gggtaagtgc 60

agatttatgg gaagggacga gtttgctgat ggtgcttctt atctgcaagg aaagaaagta 120

gtaattgttg gctgcggtgc tcagggtcta aaccaaggtt taaacatgag agattcaggt 180

ctggatattt cgtatgcatt gaggaaagag tctattgcag aaaaggatgc cgattggcgt 240

aaagcgacgg aaaatgggtt caaagttggt acttacgaag aactgatccc tcaggcagat 300

ttagtgatta acctaacacc agataaggtt cactcagacg tagtaagaac agttcaaccg 360

ctgatgaagg atggggcagc tttaggttac tctcatggct ttaatatcgt tgaagtgggc 420

gagcagatca gaaaaggtat aacagtcgta atggttgcgc caaagtgccc aggtacggaa 480

gtcagagagg agtacaagag gggttttggt gtacctacat tgatcgccgt acatcctgaa 540

aatgacccca aacgtgaagg tatggcaata gcgaaggcat gggcagccgc aaccggaggt 600

catagagcgg gtgtgttaga gagttctttc gtagctgagg tcaagagtga cttaatgggt 660

gaacaaacca ttctgtgcgg aatgttgcag gcagggtctt tactatgctt tgataaattg 720

gtcgaagagg gtacagatcc tgcctatgct gaaaagttga tacaatttgg ttgggagaca 780

atcaccgagg cacttaaaca aggtggcata acattgatga tggatagact ttcaaatccg 840

gccaagctaa gagcctacgc cttatctgag caactaaaag agatcatggc accattattc 900

caaaagcaca tggacgatat tatctccggt gagttttcct caggaatgat ggcagattgg 960

gcaaacgatg ataaaaagtt attgacgtgg agagaagaaa ccggcaagac ggcattcgag 1020

acagccccac aatacgaagg taaaattggt gaacaagaat actttgataa gggagtattg 1080

atgatagcta tggtgaaggc aggggtagaa cttgcattcg aaactatggt tgactccggt 1140

atcattgaag aatctgcata ctatgagtct ttgcatgaat tgcctttgat agcaaatact 1200

attgcaagaa aaagacttta cgagatgaat gttgtcatat cagacactgc agaatatggt 1260

aattacttat ttagctacgc gtgtgtcccg ttgttagagc ccttcatggc cgagttacaa 1320

cctggtgatt tggggaaggc tattccggaa ggagcggttg acaatggcca actgagagac 1380

gtaaatgaag ctattcgttc gcatgctata gaacaggtgg gtaaaaagct gagaggatat 1440

atgaccgata tgaaaagaat tgcagtggca ggatga 1476

<210> 47

<211> 491

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 47

Met Ala Asn Tyr Phe Asn Thr Leu Asn Leu Arg Gln Gln Leu Ala Gln

1 5 10 15

Leu Gly Lys Cys Arg Phe Met Gly Arg Asp Glu Phe Ala Asp Gly Ala

```
            20                  25                  30
Ser Tyr Leu Gln Gly Lys Lys Val Val Ile Val Gly Cys Gly Ala Gln
        35                  40                  45
Gly Leu Asn Gln Gly Leu Asn Met Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ser
    50                  55                  60

Tyr Ala Leu Arg Lys Glu Ser Ile Ala Glu Lys Asp Ala Asp Trp Arg
65                  70                  75                  80
Lys Ala Thr Glu Asn Gly Phe Lys Val Gly Thr Tyr Glu Glu Leu Ile
                85                  90                  95
Pro Gln Ala Asp Leu Val Ile Asn Leu Thr Pro Asp Lys Val His Ser
            100                 105                 110
Asp Val Val Arg Thr Val Gln Pro Leu Met Lys Asp Gly Ala Ala Leu
        115                 120                 125

Gly Tyr Ser His Gly Phe Asn Ile Val Glu Val Gly Glu Gln Ile Arg
    130                 135                 140
Lys Gly Ile Thr Val Val Met Val Ala Pro Lys Cys Pro Gly Thr Glu
145                 150                 155                 160
Val Arg Glu Glu Tyr Lys Arg Gly Phe Gly Val Pro Thr Leu Ile Ala
                165                 170                 175
Val His Pro Glu Asn Asp Pro Lys Arg Glu Gly Met Ala Ile Ala Lys
            180                 185                 190

Ala Trp Ala Ala Ala Thr Gly Gly His Arg Ala Gly Val Leu Glu Ser
        195                 200                 205
Ser Phe Val Ala Glu Val Lys Ser Asp Leu Met Gly Glu Gln Thr Ile
    210                 215                 220
Leu Cys Gly Met Leu Gln Ala Gly Ser Leu Leu Cys Phe Asp Lys Leu
225                 230                 235                 240
Val Glu Glu Gly Thr Asp Pro Ala Tyr Ala Glu Lys Leu Ile Gln Phe
                245                 250                 255

Gly Trp Glu Thr Ile Thr Glu Ala Leu Lys Gln Gly Gly Ile Thr Leu
            260                 265                 270
```

Met Met Asp Arg Leu Ser Asn Pro Ala Lys Leu Arg Ala Tyr Ala Leu
275 280 285

Ser Glu Gln Leu Lys Glu Ile Met Ala Pro Leu Phe Gln Lys His Met
290 295 300

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

Ala Asn Asp Asp Lys Lys Leu Leu Thr Trp Arg Glu Glu Thr Gly Lys
325 330 335

Thr Ala Phe Glu Thr Ala Pro Gln Tyr Glu Gly Lys Ile Gly Glu Gln
340 345 350

Glu Tyr Phe Asp Lys Gly Val Leu Met Ile Ala Met Val Lys Ala Gly
355 360 365

Val Glu Leu Ala Phe Glu Thr Met Val Asp Ser Gly Ile Ile Glu Glu
370 375 380

Ser Ala Tyr Tyr Glu Ser Leu His Glu Leu Pro Leu Ile Ala Asn Thr
385 390 395 400

Ile Ala Arg Lys Arg Leu Tyr Glu Met Asn Val Val Ile Ser Asp Thr
405 410 415

Ala Glu Tyr Gly Asn Tyr Leu Phe Ser Tyr Ala Cys Val Pro Leu Leu
420 425 430

Glu Pro Phe Met Ala Glu Leu Gln Pro Gly Asp Leu Gly Lys Ala Ile
435 440 445

Pro Glu Gly Ala Val Asp Asn Gly Gln Leu Arg Asp Val Asn Glu Ala
450 455 460

Ile Arg Ser His Ala Ile Glu Gln Val Gly Lys Lys Leu Arg Gly Tyr
465 470 475 480

Met Thr Asp Met Lys Arg Ile Ala Val Ala Gly
485 490

<210> 48

<211> 1647

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 48

atgtatactg ttggtgatta tctgctggac cgtctgcatg aactgggtat cgaagaaatc 60

ttcggcgttc cgggtgatta caatctgcag ttcctggatc agatcatctc tcataaagac 120

atgaaatggg tgggtaacgc taacgaactg aacgcaagct acatggcaga tggttatgca 180

cgtaccaaga aagccgcggc atttctgacc actttcggtg ttggcgaact gagcgccgtc 240

aacggtctgg cgggctccta cgccgaaaac ctgccggtgg tggagatcgt aggcagccca 300

acgagcaaag ttcagaacga aggtaaattc gtccaccaca ctctggctga cggcgatttc 360

aaacacttca tgaaaatgca tgaacctgtg actgcggcac gtacgctgct gactgcagag 420

aacgctactg tggaaatcga ccgcgttctg tctgcgctgc tgaaagaacg caaaccagtt 480

tacatcaacc tgcctgtgga tgttgcggca gctaaagcgg aaaaaccgag cctgccgctg 540

aagaaagaaa actccacttc taacactagc gaccaggaaa tcctgaacaa aatccaggag 600

tctctgaaaa acgcaaagaa accaatcgtg atcaccggcc acgaaatcat ttcttttggt 660

ctggagaaga ccgtgaccca attcatcagc aaaaccaaac tgccgattac caccctgaac 720

ttcggcaagt cctctgttga cgaggctctg ccgtctttcc tgggcatcta caacggtact 780

ctgagcgaac cgaacctgaa agaatttgtt gaatctgcgg acttcatcct gatgctgggc 840

gttaaactga ccgactcttc taccggtgca ttcactcacc atctgaacga aaacaaaatg 900

attagcctga acatcgacga gggtaaaatc ttcaacgagc gtatccagaa cttcgacttc 960

gaaagcctga tcagctctct gctggacctg tccgaaatcg agtataaagg caaatacatt 1020

gacaaaaagc aagaagattt cgtaccatct aacgcactgc tgtcccagga tcgcctgtgg 1080

caggccgtgg agaacctgac ccagagcaat gaaaccatcg tggcggaaca aggtacgagc 1140

tttttcggcg cgtcttctat ctttctgaaa tccaaaagcc attttatcgg tcagccgctg 1200

tggggtagca ttggctatac tttcccggca gcgctgggct ctcagatcgc tgataaagaa 1260

tctcgtcatc tgctgttcat cggtgacggt tccctgcagc tgaccgtaca ggaactgggt 1320

ctggcaattc gtgaaaagat caacccgatt tgcttcatta ttaacaatga cggctacacc 1380

gttgagcgtg agatccacgg tccgaaccag tcttacaacg atatccctat gtggaactac 1440

tctaaactgc cggagtcctt cggcgcaact gaggaccgtg ttgtgtctaa aattgtgcgt 1500

accgaaaacg aatttgtgag cgtgatgaaa gaggcccagg ccgatccgaa ccgtatgtac 1560

tggatcgaac tgatcctggc gaaagaaggc gcaccgaagg tactgaagaa aatgggcaag 1620

ctgtttgctg aacagaataa atcctaa 1647

<210> 49

<211> 548

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 49

Met Tyr Thr Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu His Glu Leu Gly
1 5 10 15
Ile Glu Glu Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu Gln Phe Leu
20 25 30
Asp Gln Ile Ile Ser His Lys Asp Met Lys Trp Val Gly Asn Ala Asn
35 40 45
Glu Leu Asn Ala Ser Tyr Met Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Thr Lys Lys
50 55 60

Ala Ala Ala Phe Leu Thr Thr Phe Gly Val Gly Glu Leu Ser Ala Val
65 70 75 80
Asn Gly Leu Ala Gly Ser Tyr Ala Glu Asn Leu Pro Val Val Glu Ile
85 90 95
Val Gly Ser Pro Thr Ser Lys Val Gln Asn Glu Gly Lys Phe Val His
100 105 110
His Thr Leu Ala Asp Gly Asp Phe Lys His Phe Met Lys Met His Glu
115 120 125

Pro Val Thr Ala Ala Arg Thr Leu Leu Thr Ala Glu Asn Ala Thr Val
130 135 140
Glu Ile Asp Arg Val Leu Ser Ala Leu Leu Lys Glu Arg Lys Pro Val
145 150 155 160
Tyr Ile Asn Leu Pro Val Asp Val Ala Ala Ala Lys Ala Glu Lys Pro
165 170 175
Ser Leu Pro Leu Lys Lys Glu Asn Ser Thr Ser Asn Thr Ser Asp Gln
180 185 190

Glu Ile Leu Asn Lys Ile Gln Glu Ser Leu Lys Asn Ala Lys Lys Pro
195 200 205
Ile Val Ile Thr Gly His Glu Ile Ile Ser Phe Gly Leu Glu Lys Thr
210 215 220

Val Thr Gln Phe Ile Ser Lys Thr Lys Leu Pro Ile Thr Thr Leu Asn
225 230 235 240
Phe Gly Lys Ser Ser Val Asp Glu Ala Leu Pro Ser Phe Leu Gly Ile
245 250 255

Tyr Asn Gly Thr Leu Ser Glu Pro Asn Leu Lys Glu Phe Val Glu Ser
260 265 270
Ala Asp Phe Ile Leu Met Leu Gly Val Lys Leu Thr Asp Ser Ser Thr
275 280 285
Gly Ala Phe Thr His His Leu Asn Glu Asn Lys Met Ile Ser Leu Asn
290 295 300
Ile Asp Glu Gly Lys Ile Phe Asn Glu Arg Ile Gln Asn Phe Asp Phe
305 310 315 320

Glu Ser Leu Ile Ser Ser Leu Leu Asp Leu Ser Glu Ile Glu Tyr Lys
325 330 335
Gly Lys Tyr Ile Asp Lys Lys Gln Glu Asp Phe Val Pro Ser Asn Ala
340 345 350
Leu Leu Ser Gln Asp Arg Leu Trp Gln Ala Val Glu Asn Leu Thr Gln
355 360 365
Ser Asn Glu Thr Ile Val Ala Glu Gln Gly Thr Ser Phe Phe Gly Ala
370 375 380

Ser Ser Ile Phe Leu Lys Ser Lys Ser His Phe Ile Gly Gln Pro Leu
385 390 395 400
Trp Gly Ser Ile Gly Tyr Thr Phe Pro Ala Ala Leu Gly Ser Gln Ile
405 410 415
Ala Asp Lys Glu Ser Arg His Leu Leu Phe Ile Gly Asp Gly Ser Leu
420 425 430
Gln Leu Thr Val Gln Glu Leu Gly Leu Ala Ile Arg Glu Lys Ile Asn
435 440 445

Pro Ile Cys Phe Ile Ile Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Val Glu Arg Glu
450 455 460
Ile His Gly Pro Asn Gln Ser Tyr Asn Asp Ile Pro Met Trp Asn Tyr

465 470 475 480

Ser Lys Leu Pro Glu Ser Phe Gly Ala Thr Glu Asp Arg Val Val Ser

485 490 495

Lys Ile Val Arg Thr Glu Asn Glu Phe Val Ser Val Met Lys Glu Ala

500 505 510

Gln Ala Asp Pro Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Ile Leu Ala Lys

515 520 525

Glu Gly Ala Pro Lys Val Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu

530 535 540

Gln Asn Lys Ser

545

<210> 50

<211> 1713

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 50

atggagttta agtataacgg caaagttgaa tctgttgaac tgaataagta cagcaaaacg 60

ttgacacaag atcccacaca acccgccaca caggcaatgt attacggcat cgggtttaaa 120

gacgaagatt tcaagaaagc tcaagtgggt atagtgtcga tggactggga tggaaatcca 180

tgcaacatgc atttaggaac ccttggatca aagattaaaa gctcagtaaa tcagacagat 240

ggtctgatcg gcttacaatt tcatacgata ggagtttctg atgggatagc aaatggaaag 300

ttgggaatga gatactccct tgtttccaga gaagttatag ctgactctat tgaaaccaac 360

gctggcgctg aatactatga tgcaattgta gccatcccag gttgtgacaa aaatatgcca 420

ggttctatta ttggtatggc aagacttaat aggccaagca ttatggtgta tggaggaaca 480

atagaacacg gtgaatataa aggtgagaaa ttgaacatcg tatcggcttt tgaatctcta 540

ggccagaaaa ttaccggcaa tatctctgat gaagattatc acggtgttat ttgtaatgct 600

attcctggtc aaggggcatg tgggggggatg tacacagcta ataccttagc tgccgctatc 660

gaaacactag gtatgtcatt gccgtattct tcttcgaacc ctgcagtatc tcaagaaaaa 720

caagaagaat gtgatgagat tggattagcc attaagaatc ttttggaaaa agacatcaag 780

cctagtgata taatgactaa ggaggcgttc gagaacgcta ttaccattgt gatggtcttg 840

gggggtagta ctaatgctgt cttgcatatt attgcaatgg ctaacgcgat aggtgtcgaa 900

ataactcagg atgacttcca aagaattagt gacattactc cagtactagg tgattttaaa 960

ccttcaggta aatatatgat ggaagatttg cataaaattg gaggcttgcc agcagtgctt 1020
aagtaccttc taaaggaagg aaaattgcat ggtgactgcc ttactgtgac gggtaaaaca 1080
ttagccgaga atgtcgagac tgccctagac ttggatttcg actcacaaga tatcatgagg 1140
ccactaaaga atcctatcaa ggccaccggc cacttgcaga ttctgtacgg taatttagct 1200
caaggggtt ccgtagcaaa aattagcggt aaagaaggag agttcttcaa aggcactgcc 1260
agagtctttg atggtgaaca acattttatc gacggcatag aatctggtcg tttgcatgct 1320
ggagatgtag cggtaattag gaatataggt cccgtcggcg gacctggtat gcccgaaatg 1380

ctgaagccta catcagcatt aattggtgcg ggtttaggga aaagttgcgc gttaattacg 1440
gatggtagat tctccggtgg cactcacggt tttgttgtcg gccatattgt gcctgaagcc 1500
gttgagggtg gactaatcgg cttagttgaa gatgacgata taatagagat agatgcagtc 1560
aacaactcta tatccctgaa agtttccgat gaagaaatcg caaagagaag agctaattat 1620
cagaagccaa ctccgaaagc caccagggga gttttggcaa aattcgctaa attaacccgt 1680
cctgcatcgg aagggtgtgt tactgatctg taa 1713

<210> 51
<211> 570
<212> PRT
<213> Lactococcus lactis

<400> 51

Met Glu Phe Lys Tyr Asn Gly Lys Val Glu Ser Val Glu Leu Asn Lys
1 5 10 15
Tyr Ser Lys Thr Leu Thr Gln Asp Pro Thr Gln Pro Ala Thr Gln Ala
20 25 30
Met Tyr Tyr Gly Ile Gly Phe Lys Asp Glu Asp Phe Lys Lys Ala Gln
35 40 45
Val Gly Ile Val Ser Met Asp Trp Asp Gly Asn Pro Cys Asn Met His
50 55 60

Leu Gly Thr Leu Gly Ser Lys Ile Lys Ser Ser Val Asn Gln Thr Asp
65 70 75 80
Gly Leu Ile Gly Leu Gln Phe His Thr Ile Gly Val Ser Asp Gly Ile
85 90 95

Ala Asn Gly Lys Leu Gly Met Arg Tyr Ser Leu Val Ser Arg Glu Val
100 105 110
Ile Ala Asp Ser Ile Glu Thr Asn Ala Gly Ala Glu Tyr Tyr Asp Ala
115 120 125

Ile Val Ala Ile Pro Gly Cys Asp Lys Asn Met Pro Gly Ser Ile Ile
130 135 140
Gly Met Ala Arg Leu Asn Arg Pro Ser Ile Met Val Tyr Gly Gly Thr
145 150 155 160
Ile Glu His Gly Glu Tyr Lys Gly Glu Lys Leu Asn Ile Val Ser Ala
165 170 175
Phe Glu Ser Leu Gly Gln Lys Ile Thr Gly Asn Ile Ser Asp Glu Asp
180 185 190

Tyr His Gly Val Ile Cys Asn Ala Ile Pro Gly Gln Gly Ala Cys Gly
195 200 205
Gly Met Tyr Thr Ala Asn Thr Leu Ala Ala Ala Ile Glu Thr Leu Gly
210 215 220
Met Ser Leu Pro Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ala Val Ser Gln Glu Lys
225 230 235 240
Gln Glu Glu Cys Asp Glu Ile Gly Leu Ala Ile Lys Asn Leu Leu Glu
245 250 255

Lys Asp Ile Lys Pro Ser Asp Ile Met Thr Lys Glu Ala Phe Glu Asn
260 265 270
Ala Ile Thr Ile Val Met Val Leu Gly Gly Ser Thr Asn Ala Val Leu
275 280 285
His Ile Ile Ala Met Ala Asn Ala Ile Gly Val Glu Ile Thr Gln Asp
290 295 300
Asp Phe Gln Arg Ile Ser Asp Ile Thr Pro Val Leu Gly Asp Phe Lys
305 310 315 320

Pro Ser Gly Lys Tyr Met Met Glu Asp Leu His Lys Ile Gly Gly Leu
325 330 335
Pro Ala Val Leu Lys Tyr Leu Leu Lys Glu Gly Lys Leu His Gly Asp

340 345 350

Cys Leu Thr Val Thr Gly Lys Thr Leu Ala Glu Asn Val Glu Thr Ala

355 360 365

Leu Asp Leu Asp Phe Asp Ser Gln Asp Ile Met Arg Pro Leu Lys Asn

370 375 380

Pro Ile Lys Ala Thr Gly His Leu Gln Ile Leu Tyr Gly Asn Leu Ala

385 390 395 400

Gln Gly Gly Ser Val Ala Lys Ile Ser Gly Lys Glu Gly Glu Phe Phe

405 410 415

Lys Gly Thr Ala Arg Val Phe Asp Gly Glu Gln His Phe Ile Asp Gly

420 425 430

Ile Glu Ser Gly Arg Leu His Ala Gly Asp Val Ala Val Ile Arg Asn

435 440 445

Ile Gly Pro Val Gly Gly Pro Gly Met Pro Glu Met Leu Lys Pro Thr

450 455 460

Ser Ala Leu Ile Gly Ala Gly Leu Gly Lys Ser Cys Ala Leu Ile Thr

465 470 475 480

Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Thr His Gly Phe Val Val Gly His Ile

485 490 495

Val Pro Glu Ala Val Glu Gly Gly Leu Ile Gly Leu Val Glu Asp Asp

500 505 510

Asp Ile Ile Glu Ile Asp Ala Val Asn Asn Ser Ile Ser Leu Lys Val

515 520 525

Ser Asp Glu Glu Ile Ala Lys Arg Arg Ala Asn Tyr Gln Lys Pro Thr

530 535 540

Pro Lys Ala Thr Arg Gly Val Leu Ala Lys Phe Ala Lys Leu Thr Arg

545 550 555 560

Pro Ala Ser Glu Gly Cys Val Thr Asp Leu

565 570

<210> 52

<211> 1701

<212>

DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 52

atgaagaagc tcaacaagta ctcgtatatc atcactgaac ctaagggcca aggtgcgtcc 60

caggccatgc tttatgccac cggtttcaag aaggaagatt tcaagaagcc tcaagtcggg 120

gttggttcct gttggtggtc cggtaaccca tgtaacatgc atctattgga cttgaataac 180

agatgttctc aatccattga aaaagcgggt ttgaaagcta tgcagttcaa caccatcggt 240

gtttcagacg gtatctctat gggtactaaa ggtatgagat actcgttaca aagtagagaa 300

atcattgcag actcctttga aaccatcatg atggcacaac actacgatgc taacatcgcc 360

atcccatcat gtgacaaaaa catgcccggt gtcatgatgg ccatgggtag acataacaga 420

ccttccatca tggtatatgg tggtactatc ttgcccggtc atccaacatg tggttcttcg 480

aagatctcta aaaacatcga tatcgtctct gcgttccaat cctacggtga atatatttcc 540

aagcaattca ctgaagaaga aagagaagat gttgtggaac atgcatgccc aggtcctggt 600

tcttgtggtg gtatgtatac tgccaacaca atggcttctg ccgctgaagt gctaggtttg 660

accattccaa actcctcttc cttcccagcc gtttccaagg agaagttagc tgagtgtgac 720

aacattggtg aatacatcaa gaagacaatg gaattgggta ttttacctcg tgatatcctc 780

acaaaagagg cttttgaaaa cgccattact tatgtcgttg caaccggtgg gtccactaat 840

gctgttttgc atttggtggc tgttgctcac tctgcgggtg tcaagttgtc accagatgat 900

ttccaaagaa tcagtgatac tacaccattg atcggtgact tcaaaccttc tggtaaatac 960

gtcatggccg atttgattaa cgttggtggt acccaatctg tgattaagta tctatatgaa 1020

aacaacatgt tgcacggtaa cacaatgact gttaccggtg acactttggc agaacgtgca 1080

aagaaagcac caagcctacc tgaaggacaa gagattatta agccactctc ccacccaatc 1140

aaggccaacg gtcacttgca aattctgtac ggttcattgg caccaggtgg agctgtgggt 1200

aaaattaccg gtaaggaagg tacttacttc aagggtagag cacgtgtgtt cgaagaggaa 1260

ggtgccttta ttgaagcctt ggaaagaggt gaaatcaaga agggtgaaaa aaccgttgtt 1320

gttatcagat atgaaggtcc aagaggtgca ccaggtatgc ctgaaatgct aaagccttcc 1380

tctgctctga tgggttacgg tttgggtaaa gatgttgcat tgttgactga tggtagattc 1440

tctggtggtt ctcacgggtt cttaatcggc cacattgttc ccgaagccgc tgaaggtggt 1500

cctatcgggt tggtcagaga cggcgatgag attatcattg atgctgataa taacaagatt 1560

gacctattag tctctgataa ggaaatggct caacgtaaac aaagttgggt tgcacctcca 1620

cctcgttaca caagaggtac tctatccaag tatgctaagt tggtttccaa cgcttccaac 1680

ggttgtgttt tagatgcttg a 1701

<210> 53

<211> 566

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 53

Met Lys Lys Leu Asn Lys Tyr Ser Tyr Ile Ile Thr Glu Pro Lys Gly
1 5 10 15

Gln Gly Ala Ser Gln Ala Met Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Lys Lys Glu
20 25 30

Asp Phe Lys Lys Pro Gln Val Gly Val Gly Ser Cys Trp Trp Ser Gly
35 40 45

Asn Pro Cys Asn Met His Leu Leu Asp Leu Asn Asn Arg Cys Ser Gln
50 55 60

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

Val Ser Asp Gly Ile Ser Met Gly Thr Lys Gly Met Arg Tyr Ser Leu
85 90 95

Gln Ser Arg Glu Ile Ile Ala Asp Ser Phe Glu Thr Ile Met Met Ala
100 105 110

Gln His Tyr Asp Ala Asn Ile Ala Ile Pro Ser Cys Asp Lys Asn Met
115 120 125

Pro Gly Val Met Met Ala Met Gly Arg His Asn Arg Pro Ser Ile Met
130 135 140

Val Tyr Gly Gly Thr Ile Leu Pro Gly His Pro Thr Cys Gly Ser Ser
145 150 155 160

Lys Ile Ser Lys Asn Ile Asp Ile Val Ser Ala Phe Gln Ser Tyr Gly
165 170 175

Glu Tyr Ile Ser Lys Gln Phe Thr Glu Glu Glu Arg Glu Asp Val Val
180 185 190

Glu His Ala Cys Pro Gly Pro Gly Ser Cys Gly Gly Met Tyr Thr Ala
195 200 205

Asn Thr Met Ala Ser Ala Ala Glu Val Leu Gly Leu Thr Ile Pro Asn
210 215 220
Ser Ser Ser Phe Pro Ala Val Ser Lys Glu Lys Leu Ala Glu Cys Asp

225 230 235 240
Asn Ile Gly Glu Tyr Ile Lys Lys Thr Met Glu Leu Gly Ile Leu Pro
245 250 255
Arg Asp Ile Leu Thr Lys Glu Ala Phe Glu Asn Ala Ile Thr Tyr Val
260 265 270
Val Ala Thr Gly Gly Ser Thr Asn Ala Val Leu His Leu Val Ala Val
275 280 285
Ala His Ser Ala Gly Val Lys Leu Ser Pro Asp Asp Phe Gln Arg Ile

290 295 300
Ser Asp Thr Thr Pro Leu Ile Gly Asp Phe Lys Pro Ser Gly Lys Tyr
305 310 315 320
Val Met Ala Asp Leu Ile Asn Val Gly Gly Thr Gln Ser Val Ile Lys
325 330 335
Tyr Leu Tyr Glu Asn Asn Met Leu His Gly Asn Thr Met Thr Val Thr
340 345 350
Gly Asp Thr Leu Ala Glu Arg Ala Lys Lys Ala Pro Ser Leu Pro Glu

355 360 365
Gly Gln Glu Ile Ile Lys Pro Leu Ser His Pro Ile Lys Ala Asn Gly
370 375 380
His Leu Gln Ile Leu Tyr Gly Ser Leu Ala Pro Gly Gly Ala Val Gly
385 390 395 400
Lys Ile Thr Gly Lys Glu Gly Thr Tyr Phe Lys Gly Arg Ala Arg Val
405 410 415
Phe Glu Glu Glu Gly Ala Phe Ile Glu Ala Leu Glu Arg Gly Glu Ile

420 425 430
Lys Lys Gly Glu Lys Thr Val Val Val Ile Arg Tyr Glu Gly Pro Arg
435 440 445
Gly Ala Pro Gly Met Pro Glu Met Leu Lys Pro Ser Ser Ala Leu Met

450 455 460

Gly Tyr Gly Leu Gly Lys Asp Val Ala Leu Leu Thr Asp Gly Arg Phe

465 470 475 480

Ser Gly Gly Ser His Gly Phe Leu Ile Gly His Ile Val Pro Glu Ala

485 490 495

Ala Glu Gly Gly Pro Ile Gly Leu Val Arg Asp Gly Asp Glu Ile Ile

500 505 510

Ile Asp Ala Asp Asn Asn Lys Ile Asp Leu Leu Val Ser Asp Lys Glu

515 520 525

Met Ala Gln Arg Lys Gln Ser Trp Val Ala Pro Pro Pro Arg Tyr Thr

530 535 540

Arg Gly Thr Leu Ser Lys Tyr Ala Lys Leu Val Ser Asn Ala Ser Asn

545 550 555 560

Gly Cys Val Leu Asp Ala

565

<210> 54

<211> 771

<212> DNA

<213> Drosophila melanogaster

<400> 54

atgtcgttta ctttgaccaa caagaacgtg attttcgttg ccggtctggg aggcattggt 60

ctggacacca gcaaggagct gctcaagcgc gatctgaaga acctggtgat cctcgaccgc 120

attgagaacc cggctgccat tgccgagctg aaggcaatca atccaaaggt gaccgtcacc 180

ttctacccct atgatgtgac cgtgcccatt gccgagacca ccaagctgct gaagaccatc 240

ttcgcccagc tgaagaccgt cgatgtcctg atcaacggag ctggtatcct ggacgatcac 300

cagatcgagc gcaccattgc cgtcaactac actggcctgg tcaacaccac gacggccatt 360

ctggacttct gggacaagcg caagggcggt cccggtggta tcatctgcaa cattggatcc 420

gtcactggat tcaatgccat ctaccaggtg cccgtctact ccggcaccaa ggccgccgtg 480

gtcaacttca ccagctccct ggcgaaactg gcccccatta ccggcgtgac ggcttacact 540

gtgaaccccg gcatcacccg caccaccctg gtgcacacgt tcaactcctg gttggatgtt 600

gagcctcagg ttgccgagaa gctcctggct catcccaccc agccctcgtt ggcctgcgcc 660

gagaacttcg tcaaggctat cgagctgaac cagaacggag ccatctggaa actggacttg 720

ggcaccctgg aggccatcca gtggaccaag cactgggact ccggcatcta a 771

<210> 55

<211> 256

<212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

<400> 55

Met Ser Phe Thr Leu Thr Asn Lys Asn Val Ile Phe Val Ala Gly Leu
1 5 10 15

Gly Gly Ile Gly Leu Asp Thr Ser Lys Glu Leu Leu Lys Arg Asp Leu
20 25 30

Lys Asn Leu Val Ile Leu Asp Arg Ile Glu Asn Pro Ala Ala Ile Ala
35 40 45

Glu Leu Lys Ala Ile Asn Pro Lys Val Thr Val Thr Phe Tyr Pro Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Val Pro Ile Ala Glu Thr Thr Lys Leu Leu Lys Thr Ile
65 70 75 80

Phe Ala Gln Leu Lys Thr Val Asp Val Leu Ile Asn Gly Ala Gly Ile
85 90 95

Leu Asp Asp His Gln Ile Glu Arg Thr Ile Ala Val Asn Tyr Thr Gly
100 105 110

Leu Val Asn Thr Thr Thr Ala Ile Leu Asp Phe Trp Asp Lys Arg Lys
115 120 125

Gly Gly Pro Gly Gly Ile Ile Cys Asn Ile Gly Ser Val Thr Gly Phe
130 135 140

Asn Ala Ile Tyr Gln Val Pro Val Tyr Ser Gly Thr Lys Ala Ala Val
145 150 155 160

Val Asn Phe Thr Ser Ser Leu Ala Lys Leu Ala Pro Ile Thr Gly Val
165 170 175

Thr Ala Tyr Thr Val Asn Pro Gly Ile Thr Arg Thr Thr Leu Val His
180 185 190

Thr Phe Asn Ser Trp Leu Asp Val Glu Pro Gln Val Ala Glu Lys Leu
195 200 205

Leu Ala His Pro Thr Gln Pro Ser Leu Ala Cys Ala Glu Asn Phe Val
210 215 220

Lys Ala Ile Glu Leu Asn Gln Asn Gly Ala Ile Trp Lys Leu Asp Leu
225 230 235 240

Gly Thr Leu Glu Ala Ile Gln Trp Thr Lys His Trp Asp Ser Gly Ile
245 250 255

<210> 56

<211> 1023

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 56

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60

cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120

accgatttgc acgttgcagc aggtgattat ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180

gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttca agttggtgat 240

cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt 300

aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatatt cagttgatgg cggaatggct 360

gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgacccaatt 420

gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480

gtaaaacctg gtgattggca agtaatttttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt 540

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600

ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtgattatca attctggtga tgtaaatcca 660

gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720

gttgcaagga ttgcttttga acaagcggtt gcttctttga aacctatggg caaaatggtt 780

gctgtggcac ttcccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840

gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900

ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

taa 1023

<210> 57

<211> 340

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 57

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Ile Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Leu Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys

340

<210> 58

<211> 1041

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 58

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagattac ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcaa tcgtggttgc agattatgcc gtcaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcatcatta actctggtga cgttaaccct 660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780
gccgttgctt tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900
ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 59
<211> 346
<212> PRT
<213> Lactococcus lactis
<400> 59

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15
Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30
Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60
Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65 70 75 80
Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95
Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125
Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Ile Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Leu Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335

Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 60

<211> 1041

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 60

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 61

<211> 346

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 61

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu

1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp

20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly

35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly

50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp

65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr

85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly

100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp

115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly

165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile

180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly

195 200 205

Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys His His His His His His

340 345

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV698

<400

> 62

actcgccgat agtggaaacc gacg 24

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV1965

<400> 63

caaactgtga tggacgacac c 21

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2631

<400> 64

caatacgtta tgccgtaatg aag 23

<210> 65

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2632

<400> 65

gctttttacc cattattgat atagtgttta agcgaatg 38

<210> 66

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2633

<400> 66

cactatatca ataatgggta aaaagcctga actcac 36

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2634

<400> 67

ttattccttt gccctcggac g 21

<210> 68

<211> 20

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2680

<400> 68

tgcactgctg tcttcacttc 20

<210> 69

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2796

<400> 69

tgtcagcgct tcagactc 18

<210> 70

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2797

<400> 70

aagtattttt aaggattcgc tc 22

<210> 71

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2798

<400> 71

cttcattacg gcataacgta ttgaagtatt tttaaggatt cgctc 45

<210> 72

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2800

<400> 72

cgtccgaggg caaaggaata agatagttat cattatgtaa gtgcg 45

<210> 73

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2801

<400> 73

gggagtttag caatcagc 18

<210> 74

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2802

<400> 74

tggttgaccc gcaaacttc 19

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2803

<400> 75

acaatctccc tgtctcctcc c 21

<210> 76

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2804

<400> 76

aaggtgattt ggcacaaatt ttac 24

<210> 77

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2805

<400> 77

ggtacaattc tgtcctgaat tgtag 25

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2806

<400> 78

aggtcctaga aatcccttaa g 21

<210> 79

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer oGV2808

<400> 79

cttcattacg gcataacgta ttgcgatatc agtatacaag gtaggc 46

<210> 80

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2810

<400> 80

cgtccgaggg caaaggaata aggatttaag atgagtggta ttgg 44

<210> 81

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2811

<400> 81

tgttcgtaac ttttgtcatc ac 22

<210> 82

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2812

<400> 82

tcagcatgcg gaacaattg 19

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2813

<400> 83

tccacacggt atcatacgat c 21

<210> 84

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2814

<400> 84

gcggtcgaca agttcaatat g 21

<210> 85

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2815

<400> 85

tactgagccg ccaaccttag ta 22

<210> 86

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2816

<400> 86

cataactata cccgtacgca g 21

<210> 87

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2818

<400> 87

cttcattacg gcataacgta ttgagcgtag atctactgaa catgc 45

<210> 88

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2820

<400> 88

cgtccgaggg caaaggaata acatgagatt gtcaaagagg 40

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2821

<400> 89

caccaggctt attgatgacc 20

<210> 90

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2822

<400> 90

cattaccggc agttgctc 18

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2824

<400> 91

tatgacagtg cctatcaagc 20

<210> 92

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2825

<400> 92

aatgggttct accagtatc 19

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2826

<400> 93

aagccgggaa cgtgcgtaac 20

<210> 94

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2827

<400> 94

cttcattacg gcataacgta ttgggaacgc gtaatggtgc ttg 43

<210> 95

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2828

<400> 95

cgtccgaggg caaaggaata acccgagttg actgctcatt g 41

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2829

<400> 96

aatactcgcc gaggcgtagg 20

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2830

<400> 97

ttggagctgg gaggtaaatc 20

<210> 98

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2831

<400> 98

tgcggctaac ccatattgag 20

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2832

<400> 99

tacgctgagc gtagtacaac 20

<210> 100

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2833

<400> 100

taaagcgctg ggtggacaac cg 22

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2834

<400> 101

gcaccgagac gtcattgttg 20

<210> 102

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2835

<400> 102

cttcattacg gcataacgta ttgtaaacac gccaggcttg acc 43

<210> 103

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2836

<400> 103

cgtccgaggg caaaggaata atccattcgg tggtgttaag c 41

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2837

<400> 104

atggcgaaat ggcagtactc 20

<210> 105

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2838

<400> 105

accaacgacc caagaatc 18

<210> 106

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2839

<400> 106

ctttgcgaca gtgacaac 18

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2840

<400> 107

cctcacgtaa gggcatgata g 21

<210> 108

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2841

<400> 108

gcattgcagc ggtattgtca gg 22

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2842

<400> 109

cagcagccac atagtatacc 20

<210> 110

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2843

<400> 110

cttcattacg gcataacgta ttgagccgtc gtttgacatg ttg 43

<210> 111

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2844

<400> 111

cgtccgaggg caaaggaata acgctccatt tggagggatc g 41

<210> 112

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2845

<400> 112

gaatgcgctt gctgctaggg 20

<210> 113

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2846

<400> 113

cagctcttgc tgcaggtaac ac 22

<210> 114

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2847

<400> 114

ggcacaatct tggagccgtt ag 22

<210> 115

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2848

<400> 115

accaagccat caaggttgtc 20

<210> 116

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2849

<400> 116

tgggtgatgg tttggcgaat gc 22

<210> 117

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2896

<400> 117

gaaatgatga catgtggaaa tataacag 28

<210> 118

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 893

<400> 118

ggatgtgaag tcgttgacac ag 22

<210> 119

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2231

<400> 119

ttgaaacgtt gggtccatac 20

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2232

<400> 120

ttcaccgtgt gctagagaac 20

<210> 121

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2862

<400> 121

ttatacagga aacttaatag aacaaatc 28

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2867

<400> 122

tgaaacagca tggcgcatag 20

<210> 123

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2869

<400> 123

ctgtgtcaac gacttcacat ccgaggtaac gaggaacaag cc 42

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2870

<400> 124

tttcgccggt atattccgta g 21

<210> 125

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2891

<400> 125

gttctattaa gtttcctgta taacggcatt gttcaccaga atgtc 45

<210> 126

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2902

<400> 126

tcccgacggc tgctagaatg 20

<210> 127

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2904

<400> 127

cgctccccat taattataca 20

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2913

<400> 128

gaaaggctct tggcagtgac 20

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2914

<400> 129

gccctggtgc aattagaatg 20

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2915

<400> 130

tgcagagggt gatgagtaag 20

<210> 131

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2916

<400> 131

ggccaaaggt aaggagaacg 20

<210> 132

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 821

<400> 132

cgggtaatta acgacaccct agagg 25

<210> 133

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2320

<400> 133

ggctgtgtag aagtactcgc cgatag 26

<210> 134

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3065

<400> 134

aaaaaggagt agaaacattt tgaagctatg cgttgataag ggcaacaacg ttagtatc 58

<210> 135

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3066

<400> 135

atactaacgt tgttgccctt atcaacgcat agcttcaaaa tgtttctact ccttttttac 60

<210> 136

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3067

<400> 136

tcaaattttt ctttttttc tgtacagtta cccaagctgt tttgcctatt ttcaaagc 58

<210> 137

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3068

<400> 137

gctttgaaaa taggcaaaac agcttgggta actgtacaga aaaaaaagaa aaatttg 57

<210> 138

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3069

<400> 138

agttcaaatc agttcgagga taatttaag 29

<210> 139

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3070

<400> 139

ttaataaatg ctcaaaagaa aaaaggctgg cg 32

<210> 140

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3103

<400> 140

accggtgctt ctgcaggtat tg 22

<210> 141

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3106

<400> 141

atgcttggtt ggaagcaaat ac 22

<210> 142

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3498

<400> 142

atgtctcaag gtagaagagc tg 22

<210> 143

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3137

<400> 143

ggagtagaaa cattttgaag ctatgtatat cttctgaatc aattgcaccg ac 52

<210> 144

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3140

<400> 144

caaatttttc ttttttttct gtacagagag gtatgattaa taccaatgtc ttggg 55

<210> 145

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3499

<400> 145

tcattcacca cggtaaatgt gg 22

<210> 146

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3138

<400> 146

gtcggtgcaa ttgattcaga agatatacat agcttcaaaa tgtttctact cc 52

<210> 147

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3139

<400> 147

gtattaatca tacctctctg tacagaaaaa aaagaaaaat ttgaaatata aataacg 57

<210> 148

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3501

<400> 148

gaaggaaatt ccagtctcct agttcctttg aacac 35

<210> 149

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 2320

<400> 149

ggctgtgtag aagtactcgc cgatag 26

<210> 150

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3500

<400> 150

cagaacaatc aatcaacgaa cgaacgaccc accc 34

<210> 151

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 821

<400> 151

cgggtaatta acgacaccct agagg 25

<210> 152

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 3141

<400> 152

aaggagatgc ttggtttgta gcaaacacc 29

<210> 153

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3065

<400> 153

aaaaaggagt agaaacattt tgaagctatg cgttgataag ggcaacaacg ttagtatc 58

<210> 154

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3066

<400> 154

atactaacgt tgttgccctt atcaacgcat agcttcaaaa tgtttctact ccttttttac 60

<210> 155

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3067

<400> 155

tcaaattttt ctttttttc tgtacagtta cccaagctgt tttgcctatt ttcaaagc 58

<210> 156

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3068

<400> 156

gctttgaaaa taggcaaaac agcttgggta actgtacaga aaaaaaagaa aaatttg 57

<210> 157

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3103

<400> 157

accggtgctt ctgcaggtat tg 22

<210> 158

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3106

<400> 158

atgcttggtt ggaagcaaat ac 22

<210> 159

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV1321

<400> 159

aatcatatcg aacacgatgc 20

<210> 160

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV1324

<400> 160

agctggtctg gtgattctac 20

<210> 161

<211> 780

<212> DNA

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 161

atgagccgtt tggatggaaa aacgatttta atcactggtg cctcttctgg aattggaaaa 60

agcactgctt ttgaaattgc caaagttgcc aaagtaaaac ttattttggc tgctcgcaga 120

ttttctaccg ttgaagaaat tgcaaaggag ttagaatcga aatatgaagt atcggttctt 180

cctcttaaat tggatgtttc tgatttgaag tctattcctg gggtaattga gtcattgcca 240

aaggaatttg ctgatatcga tgtcttgatt aataatgctg gacttgctct aggtaccgat 300

aaagtcattg atcttaatat tgatgacgcc gttaccatga ttactaccaa tgttcttggt 360

atgatggcta tgactcgtgc ggttcttcct atattctaca gcaaaaacaa gggtgatatt 420

ttgaacgttg gcagtattgc cggcagagaa tcatacgtag gcggctccgt ttactgctct 480

accaagtctg cccttgctca attcacttcc gctttgcgta aggagactat tgacactcgc 540

attcgtatta tggaggttga tcctggcttg gtcgaaaccg aattcagcgt tgtgagattc 600

cacggagaca aacaaaaggc tgataatgtt tacaaaaata gtgagccttt gacacccgaa 660

gacattgctg aggtgattct ttttgccctc actcgcagag aaaacgtcgt tattgccgat 720

acacttgttt tcccatccca tcaaggtggt gccaatcatg tgtacagaaa gcaagcgtag 780

<210> 162

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3490

<400> 162

gtcaagattg ttgaacaaaa gcc 23

<210> 163

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3492

<400> 163

gagtaaaaaa ggagtagaaa cattttgaag ctatggttta gtggggttgg ggaagctggc 60

<210> 164

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3493

<400> 164

caaatttttc ttttttttct gtacaggcca acatcaagaa gactattcca aacttggtc 59

<210> 165

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3495

<400> 165

tgtatgattc gaaagcttct tcacc 25

<210> 166

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3491

<400> 166

gccagcttcc ccaaccccac taaaccatag cttcaaaatg tttctactcc ttttttactc 60

<210> 167

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3494

<400> 167

gaccaagttt ggaatagtct tcttgatgtt ggcctgtaca gaaaaaaaag aaaaatttg 59

<210> 168

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3497

<400> 168

ttactcgagc ttgattctga c 21

<210> 169

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2320

<400> 169

ggctgtgtag aagtactcgc cgatag 26

<210> 170

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3496

<400> 170

atgtcttcat cactagcaga g 21

<210> 171

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV0821

<400> 171

cgggtaatta acgacaccct agagg 25

<210> 172

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV0706

<400> 172

ggttggtatt ccagctggtg tcg 23

<210> 173

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3502

<400> 173

gaaacacagt ggattagtgc tgtc 24

<210> 174

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3504

<400> 174

gaagagtaaa aaaggagtag aaacattttg aagctatgct ctttgtaatt gttgttggtg 60

<210> 175

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3505

<400> 175

caaatttttc ttttttttct gtacaaacag agtccatccg tttgaaactg attgcatgtc 60

<210> 176

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3507

<400> 176

tcaaattcta ttatcgcgcg gg 22

<210> 177

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3503

<400> 177

caccaacaac aattacaaag agcatagctt caaaatgttt ctactccttt tttactcttc 60

<210> 178

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3506

<400> 178

gacatgcaat cagtttcaaa cggatggact ctgtttgtac agaaaaaaaa gaaaaatttg 60

<210> 179

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3509

<400> 179

ctcctccgtt gcagaacaag gctttg 26

<210> 180

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV2320

<400> 180

ggctgtgtag aagtactcgc cgatag 26

<210> 181

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3508

<400> 181

cggtgttaag tgccagaaat tggttg 26

<210> 182

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV0821

<400> 182

cgggtaatta acgacaccct agagg 25

<210> 183

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer oGV3510

<400> 183

cggcgtactc gacgtcttga gaagtag 27

<210> 184

<211> 1023

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 184

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60

cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120

accgatttgc acgttgcagc aggtgattat ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180

gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttca agttggtgat 240

cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt 300

aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatatt cagttgatgg cggaatggct 360

gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgacccaatt 420

gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480

gtaaaacctg gtgattggca agtaatttttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt 540

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600

ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtgattatca attctggtga tgtaaatcca 660

gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720

gttgcaagga ttgcttttga acaagcggtt gcttctttga aacctatggg caaaatggtt 780

gctgtggcac ttcccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840

gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900

ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

taa 1023

<210> 185

<211> 340

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 185

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu

1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp

20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly

35 40 45

Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly

50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp

65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr

85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly

100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp

115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly

165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile

180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly

195 200 205

Ala Asp Val Ile Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Leu Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335

Asp Phe Thr Lys
340

<210> 186

<211> 1041

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 186

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagattac ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcaa tcgtggttgc agattatgcc gtcaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcatcatta actctggtga cgttaaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctt tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 187

<211> 346

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 187

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Ile Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Leu Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335

Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 188

<211> 1041

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 188

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagattac ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcatcatta actctggtga cgtttaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctg tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 189

<211> 346

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 189

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp

115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly

165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile

180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly

195 200 205

Ala Asp Val Ile Ile Asn Ser Gly Asp Val Tyr Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys His His His His His His

340 345

<210> 190

<211> 1041

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 190

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctc tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 191

<211> 346

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 191

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

```
Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
    50                  55                  60
Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65                  70                  75                  80
Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
                85                  90                  95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
            100                 105                 110
Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
        115                 120                 125
Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
    130                 135                 140
Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145                 150                 155                 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
                165                 170                 175
Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
            180                 185                 190
Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
        195                 200                 205
Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
    210                 215                 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225                 230                 235                 240
Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
                245                 250                 255
Gly Lys Met Val Ala Val Ala Leu Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
            260                 265                 270
Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
        275                 280                 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
```

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys His His His His His His

340 345

<210> 192

<211> 1041

<212

> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 192

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 193

<211> 346

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 193

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240
Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255
Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285
Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300
Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320
Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335

Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 194
<211> 1041
<212> DNA
<213> Lactococcus lactis
<400> 194
atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60
ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120
actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctccg agtaggtgat 240
agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agccaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360
gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480
gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540
cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780
gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900
ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020
caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 195
<211> 346
<212> PRT
<213> Lactococcus lactis

<400> 195

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15
Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30
Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45
Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Arg Val Gly Asp
65 70 75 80
Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95
Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Ala Lys Asn Ala Gly
100 105 110
Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140
Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly

165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile

180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly

195 200 205

Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys His His His His His His

340 345

<210> 196

<211> 1041

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 196

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga attcaaaaac gctggtttta gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 197

<211> 346

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 197

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95
Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Phe Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Phe Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125
Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140
Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160
Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190
Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205
Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220
Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255
Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270
Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285
Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320
Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys His His His His His His

340 345

<210> 198

<211> 1041

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 198

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60

cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120

accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180

gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttca agttggtgat 240

cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt 300

aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct 360

gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgacccaatt 420

gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480

gtaaaacctg gtgattggca agtaatttttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt 540

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600

ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtggcaatca attctggtga tgtaaatcca 660

gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720

gttgcaagga ttgcttttga acaagcggtt gcttctttga aacctatggg caaaatggtt 780

gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840

gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900

ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 199

<211> 346

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 199

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu

1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp

20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly

35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly

50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp

65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr

85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly

100 105 110

Phe Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp

115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly

165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile

180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly

195 200 205

Ala Asp Val Ala Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270
Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285
Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300
Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320
Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335
Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 200

<211> 1041

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 200

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60

cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120
accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180
gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgctttc tgttggtgat 240
cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt 300
aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct 360
gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgacccaatt 420
gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480

gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt 540
caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600
ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtgacaatca attctggtga tgtaaatcca 660
gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720
gttgcaagga ttgcttttga acaagcggtt gcttctttga aacctatggg caaaatggtt 780
gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840

gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900

ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 201

<211> 346

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 201

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Ser Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Phe Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190
Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205
Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240
Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255
Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270
Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300
Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320
Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335
Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 202

<211> 1041

<212

> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 202

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60

cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120

accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180

gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttcg agttggtgat 240

cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt 300

aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct 360

gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgacccaatt 420

gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480

gtaaaacctg gtgattggca agtaatttttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt 540

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600

ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtggcaatca attctggtga tgtaaatcca 660

gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720

gttgcaagga ttgcttttga acaagcggtt gcttctttga aacctatggg caaaatggtt 780

gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840

gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900

ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 203

<211> 346

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 203

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Arg Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly

100 105 110

Phe Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp

115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly

165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile

180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly

195 200 205

Ala Asp Val Ala Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys His His His His His His

340 345

<210> 204

<211> 1041

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 204

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60

cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120

accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180

gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgctttc tgttggtgat 240

cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt 300

aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct 360

gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgacccaatt 420

gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480

gtaaaacctg gtgattggca agtaatttttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt 540

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600

ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtggtaatca attctggtga tgtaaatcca 660

gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720

gttgcaagga ttgcttttga acaagcggtt gcttctttga aacctatggg caaaatggtt 780

gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840

gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900

ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 205

<211> 346

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 205

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45
Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Ser Val Gly Asp
65 70 75 80
Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95
Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110
Phe Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140
Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160
Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175
Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205
Ala Asp Val Val Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220
Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240
Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270
Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys His His His His His His

340 345

<210> 206

<211> 1023

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 206

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagattac ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcaa tcgtggttgc agattatgcc gtcaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcatcatta actctggtga cgttaaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctt tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

taa 1023

<210> 207

<211> 1023

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 207

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagattac ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcatcatta actctggtga cgtttaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctg tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

taa 1023

<210> 208

<211> 340

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 208

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu

1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp

```
            20                  25                  30
Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
        35                  40                  45
Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
    50                  55                  60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65                  70                  75                  80
Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
                85                  90                  95
Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
            100                 105                 110
Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
        115                 120                 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
    130                 135                 140
Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145                 150                 155                 160
Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
                165                 170                 175
Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
            180                 185                 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
        195                 200                 205
Ala Asp Val Ile Ile Asn Ser Gly Asp Val Tyr Pro Val Asp Glu Ile
    210                 215                 220
Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225                 230                 235                 240
Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
                245                 250                 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
            260                 265                 270
```

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335

Asp Phe Thr Lys
340

<210> 209

<211> 1023

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 209

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctc tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

taa 1023

<210> 210

<211> 340

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 210

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly

195 200 205

Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Leu Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys

340

<210> 211

<211> 1023

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 211

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

taa 1023

<210> 212

<211> 340

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 212

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140
Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160
Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190
Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205
Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220
Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255
Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270
Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285
Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320
Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335
Asp Phe Thr Lys
340

<210> 213
<211> 1023
<212> DNA
<213> Lactococcus lactis

<400> 213

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120

actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180

gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctccg agtaggtgat 240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300

aacgagacat tttgccgaga agccaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360

gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420

gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540

cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600

ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct 660

gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780

gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840

gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960

atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020

taa 1023

<210> 214

<211> 340

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 214

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu

1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp

20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly

35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly

50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Arg Val Gly Asp

65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr

85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Ala Lys Asn Ala Gly

100 105 110

Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp

115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly

165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile

180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly

195 200 205

Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320
Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335
Asp Phe Thr Lys
340

<210> 215
<211> 1023
<212> DNA
<213> Lactococcus lactis
<400> 215
atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60

ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120
actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240
agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300
aacgagacat tttgccgaga attcaaaaac gctggtttta gcgttgatgg tggaatggca 360
gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540
cagtacgcca aaaacgtatt tggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct 660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780
gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900

ggtgcagaag ggaaggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020
taa 1023

<210> 216
<211> 340
<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 216

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Phe Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Phe Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys

340

<210> 217

<211> 1023

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 217

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60

cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120

accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180

gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttca agttggtgat 240

cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt 300

aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct 360

gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgacccaatt 420

gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480

gtaaaacctg gtgattggca agtaatttttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt 540

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600

ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtggcaatca attctggtga tgtaaatcca 660

gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720

gttgcaagga ttgcttttga acaagcggtt gcttctttga aacctatggg caaaatggtt 780

gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840

gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900

ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

taa 1023

<210> 218

<211> 340

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 218

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Gln Val Gly Asp
65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110

Phe Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175
Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190
Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Ala Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220
Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240
Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255
Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285
Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300
Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320
Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335

Asp Phe Thr Lys
340

<210> 219
<211> 1041
<212> DNA
<213> Lactococcus lactis
<400> 219
atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60
cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120
accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180

gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgctttc tgttggtgat 240

cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt 300

aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct 360

gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgacccaatt 420

gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480

gtaaaacctg gtgattggca agtaatttttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt 540

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600

ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtgacaatca attctggtga tgtaaatcca 660

gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720

gttgcaagga ttgcttttga acaagcggtt gcttctttga aacctatggg caaaatggtt 780

gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840

gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900

ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 220

<211> 340

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 220

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu

1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp

20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly

35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly

50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Ser Val Gly Asp

65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr

85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly

100 105 110

Phe Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp

115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly

165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile

180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly

195 200 205

Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile

210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala

225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys

340

<210> 221

<211> 1023

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 221

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60

cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120

accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180

gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttcg agttggtgat 240

cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt 300

aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct 360

gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgacccaatt 420

gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480

gtaaaacctg gtgattggca agtaatttttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt 540

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600

ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtggcaatca attctggtga tgtaaatcca 660

gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720

gttgcaagga ttgcttttga acaagcggtt gcttctttga aacctatggg caaaatggtt 780

gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840

gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900

ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

taa 1023

<210> 222

<211> 340

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 222

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu

1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp
20 25 30
Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45
Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Arg Val Gly Asp
65 70 75 80
Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95
Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110
Phe Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp
115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140
Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160
Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175
Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205
Ala Asp Val Ala Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220
Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240
Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser

260 265 270

Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val

275 280 285

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly

290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320

Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile

325 330 335

Asp Phe Thr Lys

340

<210> 223

<211> 1023

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 223

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60

cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120

accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180

gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgctttc tgttggtgat 240

cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt 300

aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct 360

gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgacccaatt 420

gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480

gtaaaacctg gtgattggca agtaatttttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt 540

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600

ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtggtaatca attctggtga tgtaaatcca 660

gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720

gttgcaagga ttgcttttga acaagcggtt gcttctttga aacctatggg caaaatggtt 780

gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840

gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900

ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

taa 1023

<210> 224

<211> 340

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 224

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu

1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp

20 25 30

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly

35 40 45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly

50 55 60

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Ser Val Gly Asp

65 70 75 80

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr

85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly

100 105 110

Phe Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp

115 120 125

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser

130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly

165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile

180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205
Ala Asp Val Val Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220
Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240
Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met

245 250 255
Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270
Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
275 280 285
Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300
Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp

305 310 315 320
Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
325 330 335
Asp Phe Thr Lys
340

<210> 225
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer XX7
<400> 225
ggagaaaacc catatgtcgt ttac 24

<210> 226
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer XX9
<400

> 226

gcagccgaac gctcgagggc ggccg 25

<210> 227

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer His_Not1_1947_rev

<400> 227

ctcgagcggc cgcttagtgg tggtggtggt ggtgtttagt aaaatcaa 48

<210> 228

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sal1_for

<400> 228

gaaagcatag caatctaatc taagtt 26

<210> 229

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer adhAcoSc_SalIin_for

<400> 229

gtttgtcgac atgaaggctg cagttgtccg t 31

<210> 230

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer adhAcoSC_NotIin_his_rev

<400> 230

tcgagcggcc gcttagtggt ggtggtggtg gtgcttcgtg aagtctataa ccattctacc 60

<210> 231

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer pGV1994ep_for

<400> 231

cggtcttcaa tttctcaagt ttcagtttca tttttcttgt tctattacaa c 51

<210> 232

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer pGV1994ep_rev

<400> 232

ctaactcctt ccttttcggt tagagcggat gtggg 35

<210> 233

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer RecombADHY50_for

<400> 233

tgctgccgga gattwcggca acaaggcagg 30

<210> 234

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer RecombADHY50_rev

<400> 234

cctgccttgt tgccgwaatc tccggcagca 30

<210> 235

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer RecombADHL264_for

<400> 235

atggtagccg ttgctktacc aaacacagaa 30

<210> 236

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer RecombADHL264_rev

<400> 236

ttctgtgttt ggtamagcaa cggctaccat 30

<210> 237

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer RecombADHI212_Y219_for

<400> 237

gctgatgtca yaattaactc tggtgacgtt waccctgtag 40

<210> 238

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer RecombADHI212_Y219_rev

<400> 238

ctacagggtw aacgtcacca gagttaattr tgacatcagc 40

<210> 239

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHF50_for

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 239

tgctgccgga gatnnkggca acaag 25

<210> 240

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHF50_rev

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 240

gccttgttgc cmnnatctcc ggcag 25

<210> 241

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHR77_for

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 241

gttagttctc tcnnkgtagg tgatag 26

<210> 242

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHR77_rev

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 242

cactctatca cctacmnnga gagaac 26

<210> 243

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHA108_for

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 243

acattttgcc gagaannkaa aaacgc 26

<210> 244

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHA108_rev

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 244

accagcgttt ttmnnttctc ggcaaa 26

<210> 245

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHF113_for

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 245

gtcaaaaacg ctggtnnkag cgttga 26

<210> 246

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHF113_rev

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 246

accatcaacg ctmnnaccag cgtttt 26

<210> 247

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHT212_for

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 247

agataggtgc tgatgtcnnk attaac 26

<210> 248

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHT212_rev

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 248

cagagttaat mnngacatca gcacct 26

<210> 249

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHV264_for

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 249

ggtagccgtt gctnnkccaa acacag 26

<210> 250

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer NNKADHV264_rev

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 250

atttctgtgt ttggmnnagc aacggc 26

<210> 251

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2F50Minilib_for

<400> 251

gttgcagcag gtgattdkgg caacaaagca 30

<210> 252

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2F50Minilib_rev

<400> 252

tgctttgttg ccmhaatcac ctgctgcaac 30

<210> 253

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2Q77Gen5_for3

<400> 253

tgatgtaagc tcgcttcaag ttggtgatcg 30

<210> 254

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2Q77Gen5_rev4

<400> 254

cgatcaccaa cttgaagcga gcttacatca 30

<210> 255

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2R77Gen5_for5

<400> 255

tgatgtaagc tcgcttcgag ttggtgatcg 30

<210> 256

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2R77Gen5_rev6

<400> 256

cgatcaccaa ctcgaagcga gcttacatca 30

<210> 257

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2S77Gen5_for7

<400> 257

tgatgtaagc tcgctttctg ttggtgatcg 30

<210> 258

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2S77Gen5_rev8

<400> 258

cgatcaccaa cagaaagcga gcttacatca 30

<210> 259

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2Y113 Gen5_for9

<400> 259

ttaaaaatgc aggatattca gttgatggcg 30

<210> 260

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2Y113 Gen5_rev10

<400> 260

cgccatcaac tgaatatcct gcatttttaa 30

<210> 261

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2F113 Gen5_for11

<400> 261

ttaaaaatgc aggattttca gttgatggcg 30

<210> 262

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2F113 Gen5_rev12

<400> 262

cgccatcaac tgaaaatcct gcatttttaa 30

<210> 263

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2G113 Gen5_for13

<400> 263

ttaaaaatgc aggagggtca gttgatggcg 30

<210> 264

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2G113 Gen5_rev14

<400> 264

cgccatcaac tgaccctcct gcatttttaa 30

<210> 265

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2T212 Mini_for15

<400> 265

gagctgatgt gryaatcaat tctggtgatg 30

<210> 266

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2T212 Mini_rev16

<400> 266

catcaccaga attgattryc acatcagctc 30

<210> 267

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2V264 Mini_for17

<400> 267

tggttgctgt ggcaktaccc aatactgaga 30

<210> 268

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Recomb2V264 Mini_rev18

<400> 268

tctcagtatt gggtamtgcc acagcaacca 30