



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0068763  
(43) 공개일자 2012년06월27일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)<br/>C12N 15/63 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7028541</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2010년04월30일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년11월29일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2010/033271</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/127303<br/>국제공개일자 2010년11월04일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>61/174,482 2009년04월30일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>게노마티카 인코포레이티드<br/>미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 워터리지 씨클 10520</p> <p>(72) 발명자<br/>버가드 안쑨니 피<br/>미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 씨클 10520</p> <p>(74) 대리인<br/>제일특허법인</p> |
|--|---|

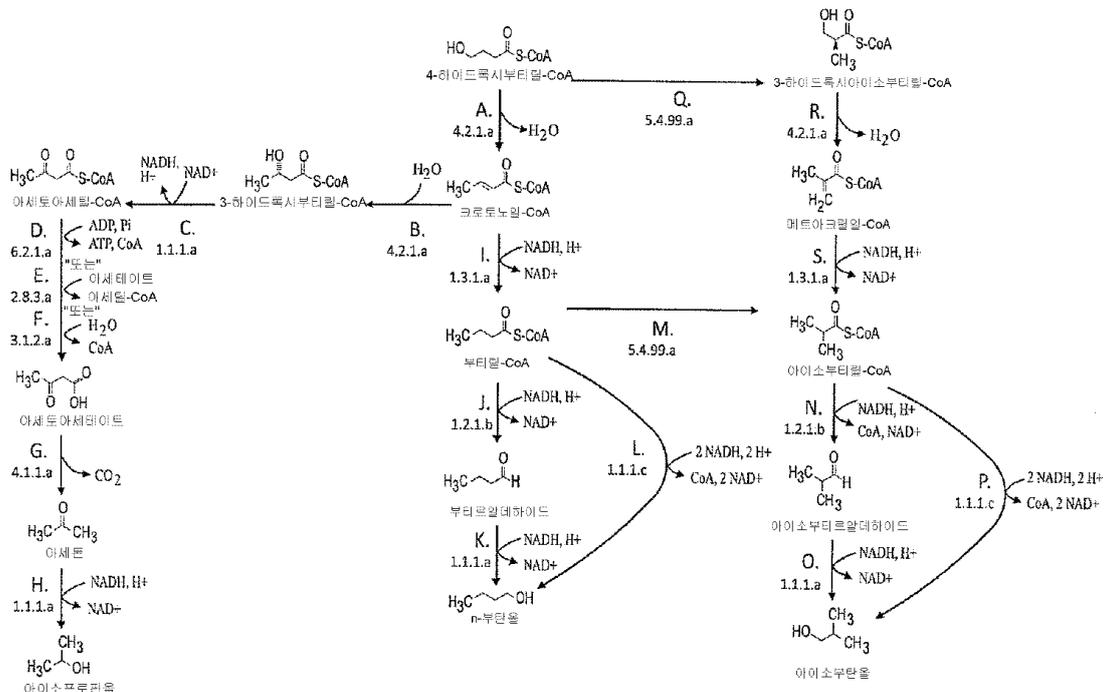
전체 청구항 수 : 총 141 항

(54) 발명의 명칭 아이소프로판올, n-부탄올 및 아이소부탄올 생산 유기체

(57) 요약

아이소프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체는 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다. 상기 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세틸-CoA:아세토아세테이트-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세테이트 데카복실라제, 및 아세톤 리덕타제 중에서 선택된 효소를 포함한다. n-부탄올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체는 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다. 다른 비-천연 미생물 유기체는 n-부탄올 또는 아이소부탄올 경로를 갖는다. 상기 유기체를 배양하여 아이소프로판올, n-부탄올 또는 아이소부탄올을 생산한다.

대표도



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 아이소프로판올 경로가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세틸-CoA:아세토아세테이트-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세테이트 데카복실라제, 및 아세톤 리덕타제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소를 포함하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서,  
2 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서,  
3 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 4**

제 1 항에 있어서,  
4 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서,  
5 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 6**

제 1 항에 있어서,  
6 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 7**

제 1 항에 있어서,  
7 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 8**

제 1 항에 있어서,  
8 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 9**

제 1 항에 있어서,  
 하나 이상의 외래 핵산이 이중 핵산인 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 10**

제 1 항에 있어서,  
 실질적으로 혐기성 배양 배지 중에 있는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 11**

제 1 항에 있어서,  
 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제가 *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD* 및 *Msed\_1220*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 12**

제 11 항에 있어서,  
 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제가 *abfD*에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 13**

제 1 항에 있어서,  
 크로토나제가 *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD* 및 *Msed\_1220*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 14**

제 13 항에 있어서,  
 크로토나제가 *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF* 및 *paaG*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 15**

제 1 항에 있어서,  
 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제가 *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed\_1423*, *Msed\_0399*, *Msed\_0389*, *Msed\_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh* 및 *bdh*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 16**

제 15 항에 있어서,  
 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제가 *hbd*, *Hbd2*, *Hbd1*, *Msed\_1423*, *Msed\_0399*, *Msed\_0389*, *Msed\_1993*, *fadB* 및 *fadJ*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 17**

제 1 항에 있어서,  
 아세트아세틸-CoA 신시타제가 *sucC*, *sucD*, *AACS*, *AF1211*, *scs* 및 *PAE3250*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 18**

제 17 항에 있어서,

아세트아세틸-CoA 신시타제가 *sucC*, *sucD*, *AACS* 및 *AF1211*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 19**

제 1 항에 있어서,

아세틸-CoA:아세트아세테이트-CoA 트랜스퍼라제가 *atoA*, *atoD*, *actA*, *cg0592*, *ctfA*, *ctfB*, *cat1*, *cat2*, *cat3*, *gctA*, *gctB*, *HPAG1\_0676*, *HPAG1\_0677*, *ScoA* 및 *ScoB*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 20**

제 19 항에 있어서,

아세틸-CoA:아세트아세테이트-CoA 트랜스퍼라제가 *atoA*, *atoD*, *actA*, *cg0592*, *ctfA*, *ctfB*, *HPAG1\_0676*, *HPAG1\_0677*, *ScoA* 및 *ScoB*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 21**

제 1 항에 있어서,

아세트아세틸-CoA 하이드롤라제가 *acot12*, *hibch*, *BC\_2292*, *tesB*, *acot8*, *tesA*, *ybgC*, *paaI* 및 *ybdB*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 22**

제 21 항에 있어서,

아세트아세틸-CoA 하이드롤라제가 *acot12*, *hibch* 및 *tesA*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 23**

제 1 항에 있어서,

아세트아세테이트 데카복실라제가 *pdC*, *pdC1*, *md1C*, *dpgB*, *ilvB-1*, *kgd*, *kdcA*, *lysA*, *panD*, *dmpH*, *dmpE*, *xy1III*, *xy1III*, *Reut\_B5691*, *Reut\_B5692*, *CAD*, *pad1*, *poFK*, (*pad*), *padC* 및 *pad*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 24**

제 23 항에 있어서,

아세트아세테이트 데카복실라제가 *Adc*, *cbei\_3835*, *CLL\_A2135* 및 *RBAM\_030030*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 25**

제 1 항에 있어서,

아세톤 리덕타제가 *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed\_1423*, *Msed\_0399*, *Msed\_0389*, *Msed\_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh* 및 *bdh*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 26**

제 25 항에 있어서,

아세톤 리덕타제가 *adh*, *adhA* 및 *adh-A*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되

는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 27**

아이소프로판올을 생산하기에 충분한 기간 및 조건 하에서 제 1 항에 따른 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 아이소프로판올의 생산 방법.

**청구항 28**

제 27 항에 있어서,

미생물 유기체가 2 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 29**

제 27 항에 있어서,

미생물 유기체가 3 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 30**

제 27 항에 있어서,

미생물 유기체가 4 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 31**

제 27 항에 있어서,

미생물 유기체가 5 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 32**

제 27 항에 있어서,

미생물 유기체가 6 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 33**

제 27 항에 있어서,

미생물 유기체가 7 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 34**

제 27 항에 있어서,

미생물 유기체가 8 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 35**

제 27 항에 있어서,

비-천연 미생물 유기체가 실질적으로 혐기성 배양 배지 중에 있는 방법.

**청구항 36**

제 27 항에 있어서,  
하나 이상의 외래 핵산이 이중 핵산인 방법.

**청구항 37**

제 27 항에 있어서,  
4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제가 *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD* 및 *Msed\_1220*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 38**

제 37 항에 있어서,  
4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제가 *abfD*에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 39**

제 27 항에 있어서,  
크로토나제가 *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD* 및 *Msed\_1220*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 40**

제 39 항에 있어서,  
크로토나제가 *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF* 및 *paaG*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 41**

제 27 항에 있어서,  
3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제가 *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed\_1423*, *Msed\_0399*, *Msed\_0389*, *Msed\_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh* 및 *bdh*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 42**

제 41 항에 있어서,  
3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제가 *hbd*, *Hbd2*, *Hbd1*, *Msed\_1423*, *Msed\_0399*, *Msed\_0389*, *Msed\_1993*, *fadB* 및 *fadJ*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 43**

제 27 항에 있어서,  
아세트아세틸-CoA 신시타제가 *sucC*, *sucD*, *AACS*, *AF1211*, *scs* 및 *PAE3250*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 44**

제 43 항에 있어서,  
아세트아세틸-CoA 신시타제가 *sucC*, *sucD*, *AACS* 및 *AF1211*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 45**

제 27 항에 있어서,

아세틸-CoA:아세토아세테이트-CoA 트랜스퍼라제가 *atoA*, *atoD*, *actA*, *cg0592*, *ctfA*, *ctfB*, *cat1*, *cat2*, *cat3*, *gctA*, *gctB*, *HPAG1\_0676*, *HPAG1\_0677*, *ScoA* 및 *ScoB*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 46**

제 45 항에 있어서,

아세틸-CoA:아세토아세테이트-CoA 트랜스퍼라제가 *atoA*, *atoD*, *actA*, *cg0592*, *ctfA*, *ctfB*, *HPAG1\_0676*, *HPAG1\_0677*, *ScoA* 및 *ScoB*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 47**

제 27 항에 있어서,

아세토아세틸-CoA 하이드롤라제가 *acot12*, *hibch*, *BC\_2292*, *tesB*, *acot8*, *tesA*, *ybgC*, *paaI* 및 *ybdB*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 48**

제 47 항에 있어서,

아세토아세틸-CoA 하이드롤라제가 *acot12*, *hibch* 및 *tesA*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 49**

제 27 항에 있어서,

아세토아세테이트 데카복실라제가 *pdC*, *pdC1*, *md1C*, *dpgB*, *ilvB-1*, *kgd*, *kdcA*, *lysA*, *panD*, *dmpH*, *dmpE*, *xyIII*, *xyIIII*, *Reut\_B5691*, *Reut\_B5692*, *CAD*, *pad1*, *poFK(pad)*, *padC* 및 *pad*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 50**

제 27 항에 있어서,

아세토아세테이트 데카복실라제가 *Adc*, *cbei\_3835*, *CLL\_A2135* 및 *RBAM\_030030*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 51**

제 27 항에 있어서,

아세톤 리덕타제가 *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed\_1423*, *Msed\_0399*, *Msed\_0389*, *Msed\_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh* 및 *bdh*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 52**

제 51 항에 있어서,

아세톤 리덕타제가 *adh*, *adhA* 및 *adh-A*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 53**

n-부탄올을 생산하기에 충분한 양으로 발견된 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 n-부탄올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 n-부탄올 경로가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성), 부티르알데하이드 리덕타제 및 부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소를 포함

하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 54**

제 53 항에 있어서,

2 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 55**

제 53 항에 있어서,

3 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 56**

제 53 항에 있어서,

4 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 57**

제 53 항에 있어서,

하나 이상의 외래 핵산이 이중 핵산인 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 58**

제 53 항에 있어서,

실질적으로 혐기성 배양 배지 중에 있는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 59**

제 53 항에 있어서,

4-하이드록시부티릴-CoA 테하이드라타제가 *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD* 및 *Msed\_1220*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 60**

제 59 항에 있어서,

4-하이드록시부티릴-CoA 테하이드라타제가 *abfD*에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 61**

제 53 항에 있어서,

크로토노일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter*, *TDE0597*, *IBD*, *RPA3448*, *FadH* 및 *enr*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 62**

제 61 항에 있어서,

크로토노일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter* 및 *TDE0597*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 63**

제 53 항에 있어서,

부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)가 *acr1*, *sucD*, *bphG*, *adhE*, *Msed\_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci\_2370*, *Ald*

및 *eutE*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 64**

제 63 항에 있어서,

부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)가 *sucD*, *bphG*, *Msed\_0709*, *mcr* 및 *Ald*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 65**

제 53 항에 있어서,

부티르알데하이드 리덕타제가 *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdhI*, *bdhII*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsb*, *dhat* 및 *3hidh*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 66**

제 65 항에 있어서,

부티르알데하이드 리덕타제가 *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdhI*, *bdhII*, *4hbd*, *adhI* 및 *mmsb*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 67**

제 53 항에 있어서,

부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)가 *adhE*, *adhE2*, *mcr*, *Rcas\_2929*, *NAPI\_02720*, *MGP2080\_00535* 및 *FAR*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 68**

제 67 항에 있어서,

부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)가 *adhE2*, *mcr* 및 *FAR*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 69**

n-부탄올을 생산하기에 충분한 기간 및 조건 하에서 제 53 항에 따른 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-부탄올의 생산 방법.

**청구항 70**

제 69 항에 있어서,

미생물 유기체가 2 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 71**

제 69 항에 있어서,

미생물 유기체가 3 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 72**

제 69 항에 있어서,

미생물 유기체가 4 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 73**

제 69 항에 있어서,

하나 이상의 외래 핵산이 이중 핵산인 방법.

**청구항 74**

제 69 항에 있어서,  
비-천연 미생물 유기체가 실질적으로 혐기성 배양 배지 중에 있는 방법.

**청구항 75**

제 69 항에 있어서,  
4-하이드록시부티릴-CoA 테하이드라타제가 *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD* 및 *Msed\_1220*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 76**

제 75 항에 있어서,  
4-하이드록시부티릴-CoA 테하이드라타제가 *abfD*에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 77**

제 69 항에 있어서,  
크로토노일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter*, *TDE0597*, *IBD*, *RPA3448*, *FadH* 및 *enr*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 78**

제 77 항에 있어서,  
크로토노일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter* 및 *TDE0597*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 79**

제 69 항에 있어서,  
부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)가 *acr1*, *sucD*, *bphG*, *adhE*, *Msed\_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci\_2370*, *Ald* 및 *eutE*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 80**

제 79 항에 있어서,  
부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)가 *sucD*, *bphG*, *Msed\_0709*, *mcr* 및 *Ald*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 81**

제 69 항에 있어서,  
부티르알데하이드 리덕타제가 *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdhI*, *bdhII*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsb*, *dhat* 및 *3hidh*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 82**

제 81 항에 있어서,  
부티르알데하이드 리덕타제가 *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdhI*, *bdhII*, *4hbd*, *adhI* 및 *mmsb*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 83**

제 69 항에 있어서,

부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)가 *adhE*, *adhE2*, *mcr*, *Rcas\_2929*, *NAPI\_02720*, *MGP2080\_00535* 및 *FAR*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 84**

제 83 항에 있어서,

부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)가 *adhE2*, *mcr* 및 *FAR*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 85**

아이소부탄올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 아이소부탄올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 아이소부탄올 경로가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 아이소부티릴-CoA 뮤타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA-리덕타제, 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성), 아이소부티르알데하이드 리덕타제 및 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소를 포함하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 86**

제 85 항에 있어서,

2 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 87**

제 85 항에 있어서,

3 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 88**

제 85 항에 있어서,

4 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 89**

제 85 항에 있어서,

5 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 90**

제 85 항에 있어서,

하나 이상의 외래 핵산이 이중 핵산인 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 91**

제 85 항에 있어서,

실질적으로 혐기성 배양 배지 중에 있는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 92**

제 85 항에 있어서,

일련의 아이소부탄올 경로 효소가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 아이소부티릴-CoA 뮤타제, 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성) 및 아이소부티르알데하이드 리덕타제를 포함하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 93**

제 85 항에 있어서,

일련의 아이소부탄올 경로 효소가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 아이소부티릴-CoA 뮤타제 및 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)를 포함하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 94**

제 85 항에 있어서,

일련의 아이소부탄올 경로 효소가 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA-리덕타제, 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성) 및 아이소부티르알데하이드 리덕타제를 포함하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 95**

제 85 항에 있어서,

일련의 아이소부탄올 경로 효소가 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA-리덕타제 및 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)를 포함하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 96**

제 85 항에 있어서,

4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제가 *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD* 및 *Msed\_1220*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 97**

제 96 항에 있어서,

4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제가 *abfD*에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 98**

제 85 항에 있어서,

크로토노일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter*, *TDE0597*, *IBD*, *RPA3448*, *FadH* 및 *enr*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 99**

제 98 항에 있어서,

크로토노일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter* 및 *TDE0597*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 100**

제 85 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 뮤타제가 *icm*, *icmB*, *icmA*, *Mpe\_B0538*, *Mpe\_B0541*, *scpA*, *mutA*, *mutB*, *mcmA*, *mcmB*, *sbm*,

*SARI\_04585*, *YfreA\_01000861*, *argK*, *PPA0597* 및 *meaB*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 101**

제 100 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 뮤타제가 *icmB*, *icmA*, *Mpe\_B0538* 및 *Mpe\_B0541*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 102**

제 85 항에 있어서,

4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제가 *icm*, *icmB*, *icmA*, *Mpe\_B0538*, *Mpe\_B0541*, *scpA*, *mutA*, *mutB*, *mcmA*, *mcmB*, *sbm*, *SARI\_04585*, *YfreA\_01000861*, *argK*, *PPA0597* 및 *meaB*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 103**

제 102 항에 있어서,

4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제가 *icmB*, *icmA*, *Mpe\_B0538* 및 *Mpe\_B0541*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 104**

제 85 항에 있어서,

3-하이드록시아이소부티릴-CoA 테하이드라타제가 *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD* 및 *Msed\_1220*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 105**

제 104 항에 있어서,

3-하이드록시아이소부티릴-CoA 테하이드라타제가 *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF* 및 *paaG*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 106**

제 85 항에 있어서,

메트아크릴일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter*, *TDE0597*, *IBD*, *RPA3448*, *FadH* 및 *enr*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 107**

제 106 항에 있어서,

메트아크릴일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter* 및 *TDE0597*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 108**

제 85 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)가 *acr1*, *sucD*, *bphG*, *adhE*, *Msed\_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci\_2370*, *Ald* 및 *eutE*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 109**

제 108 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)가 *sucD*, *bphG*, *Msed\_0709*, *mcr* 및 *Ald*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 110**

제 85 항에 있어서,

아이소부티르알데하이드 리덕타제가 *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdhI*, *bdhII*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsb*, *dhat* 및 *3hidh*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 111**

제 110 항에 있어서,

아이소부티르알데하이드 리덕타제가 *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdhI*, *bdhII*, *4hbd*, *adhI*, *P84067* 및 *mmsb*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 112**

제 85 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)가 *adhE*, *adhE2*, *mcr*, *Rcas\_2929*, *NAPI\_02720*, *MGP2080\_00535* 및 *FAR*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 113**

제 112 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)가 *adhE2*, *mcr* 및 *FAR*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 114**

아이소부탄올을 생산하기에 충분한 기간 및 조건 하에서 제 85 항에 따른 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 아이소부탄올의 생산 방법.

**청구항 115**

제 114 항에 있어서,

미생물 유기체가 2 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 116**

제 114 항에 있어서,

미생물 유기체가 3 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 117**

제 114 항에 있어서,

미생물 유기체가 4 개의 외래 핵산을 포함하고, 상기 핵산이 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 방법.

**청구항 118**

제 114 항에 있어서,

하나 이상의 외래 핵산이 이중 핵산인 방법.

**청구항 119**

제 114 항에 있어서,

비-천연 미생물 유기체가 실질적으로 혐기성 배양 배지 중에 있는 방법.

**청구항 120**

제 114 항에 있어서,

일련의 아이소부탄올 경로 효소가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 아이소부티릴-CoA 뮤타제, 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성) 및 아이소부티르알데하이드 리덕타제를 포함하는 방법.

**청구항 121**

제 114 항에 있어서,

일련의 아이소부탄올 경로 효소가 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 아이소부티릴-CoA 뮤타제 및 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)를 포함하는 방법.

**청구항 122**

제 114 항에 있어서,

일련의 아이소부탄올 경로 효소가 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA-리덕타제, 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성) 및 아이소부티르알데하이드 리덕타제를 포함하는 방법.

**청구항 123**

제 114 항에 있어서,

일련의 아이소부탄올 경로 효소가 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA-리덕타제 및 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)를 포함하는 방법.

**청구항 124**

제 114 항에 있어서,

4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제가 *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD* 및 *Msed\_1220*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 125**

제 124 항에 있어서,

4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제가 *abfD*에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 126**

제 114 항에 있어서,

크로토노일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter*, *TDE0597*, *IBD*, *RPA3448*, *FadH* 및 *enr*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 127**

제 126 항에 있어서,

크로토노일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter* 및 *TDE0597*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 128**

제 114 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 뮤타제가 *icm*, *icmB*, *icmA*, *Mpe\_B0538*, *Mpe\_B0541*, *scpA*, *mutA*, *mutB*, *mcmA*, *mcmB*, *sbm*, *SARI\_04585*, *YfreA\_01000861*, *argK*, *PPA0597* 및 *meaB*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 129**

제 128 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 뮤타제가 *icmB*, *icmA*, *Mpe\_B0538* 및 *Mpe\_B0541*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 130**

제 114 항에 있어서,

4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제가 *icm*, *icmB*, *icmA*, *Mpe\_B0538*, *Mpe\_B0541*, *scpA*, *mutA*, *mutB*, *mcmA*, *mcmB*, *sbm*, *SARI\_04585*, *YfreA\_01000861*, *argK*, *PPA0597* 및 *meaB*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 131**

제 130 항에 있어서,

4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제가 *icmB*, *icmA*, *Mpe\_B0538* 및 *Mpe\_B0541*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 132**

제 114 항에 있어서,

3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제가 *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD* 및 *Msed\_1220*으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 133**

제 132 항에 있어서,

3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제가 *crt*, *crt1*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF* 및 *paaG*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 134**

제 114 항에 있어서,

메트아크릴일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter*, *TDE0597*, *IBD*, *RPA3448*, *FadH* 및 *enr*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 135**

제 134 항에 있어서,

메트아크릴일-CoA 리덕타제가 *bcd*, *etfA*, *etfB*, *Ter* 및 *TDE0597*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 136**

제 114 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)가 *acr1*, *sucD*, *bphG*, *adhE*, *Msed\_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci\_2370*, *Ald* 및 *eutE*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 137**

제 136 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)가 *sucD*, *bphG*, *Msed\_0709*, *mcr* 및 *Ald*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 138**

제 114 항에 있어서,

아이소부티르알데하이드 리덕타제가 *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdhI*, *bdhII*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsb*, *dhat* 및 *3hidh*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 139**

제 138 항에 있어서,

아이소부티르알데하이드 리덕타제가 *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdhI*, *bdhII*, *4hbd*, *adhI*, *P84067* 및 *mmsb*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 140**

제 114 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)가 *adhE*, *adhE2*, *mcr*, *Rcas\_2929*, *NAPI\_02720*, *MGP2080\_00535* 및 *FAR*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**청구항 141**

제 140 항에 있어서,

아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)가 *adhE2*, *mcr* 및 *FAR*로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 일반적으로, 유기 화합물을 생산할 수 있는 생합성 방법 및 유기체에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 범용 소제 화학물질인 아이소프로판올, n-부탄올 또는 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비-천연 유기체에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 본 출원은 2009년 4월 30일자로 출원된 미국 가 출원 제 61/174,482 호를 우선권 주장하며, 상기 출원은 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.

[0003] 아이소프로판올은 물을 포함한 대부분의 용매와 완벽하게 혼합되는 무색의 인화성 3-탄소 알콜이다. 아이소프로판올의 가장 큰 용도는, 널리 알려졌지만 작은 용도인 "소독용 알콜"(아이소프로판올과 물의 혼합물이다)로서의 용도를 포함한, 용매로서의 용도이다. 용매로서, 아이소프로판올은 다수의 일상 제품들, 예를 들어 도료, 래커, 용제, 잉크, 접착제, 범용 세척제, 살균제, 화장품, 세면도구, 제빙제 및 약품들에서 발견된다. 저급 아이소프로판올은 또한 자동차 오일에 사용된다. 두 번째로 큰 용도는 아이소프로필아민(예를 들어 농산물에서), 아이소프로필에테르 및 아이소프로필 에스터의 생성을 위한 화학 중간체로서의 용도이다. 아이소프로판올은 2 개의 석유화학 경로에 의해 제조된다. 주 공정은 황산 촉매화의 존재 또는 부재 하에서의 프로필렌의 수화를 수반한다. 두 번째로, 아이소프로판올은, 페놀과 프로필렌 옥사이드의 생산 시 형성되

는 부산물인 아세톤의 수소화를 통해 생성된다. 고가의 프로필렌은 현재 가격이 치솟고 있으며 화학 산업 전체를 통해 마진은 내려가 확대된 범위의 저렴한 공급원료의 필요성을 유발하고 있다.

[0004] 부탄올, 또는 동등하게, n-부탄올은 현재 석유화학 원료 물질의 사용을 통해 거의 독점적으로 제조되고 있는 4 탄소 알콜이다. 주요 석유화학 공정은 프로필렌의 부티르알데하이드로의 카보닐화에 이어서, 부탄올로의 접촉 수소화를 수반한다. 부탄올의 수요는 부틸아크릴레이트 및 부틸 메트아크릴레이트의 제조를 위한 그의 용도에 의해 움직이며, 이 둘은 모두 수계 라텍스 코팅제, 에나멜 및 래커에 사용되는 유화 및 용액 중합체에 사용된다. 다른 용도는 다량의 화학물질용 중간체, 예를 들어 부틸 아세테이트 및 글리콜 부틸 에테르로서의 용도뿐만 아니라 용매로서의 그의 직접적인 용도를 포함한다. 부탄올은 또한 재생 가능 자원으로부터 유래하는 생물연료로서의 잠재적인 용도가 고려되고 있다. 부탄올은 에탄올보다 상기를 연료로서 더 적합하게 하는 광범위한 성질들을 갖는다. 예를 들어, 부탄올은 보다 높은 에너지 함량, 보다 낮은 휘발성 및 흡습성을 가지며, 송유관 기본구조를 통해 선적될 수 있고, 블렌딩 없이 바로 사용될 수 있으며, 디젤 또는 바이오디젤과 블렌딩될 수 있다.

[0005] 아이소부탄올은 생물연료로서 적극적으로 추구하고 있는 또 다른 무색의 인화성 4 탄소 알콜이다. 현재, 그의 주요 용도는 래커 및 코팅제의 생산에 사용되는 통상적인 용매인 아이소부틸 아세테이트에 대한 출발 물질로서, 및 또한 식품 산업의 풍미제로서의 용도이다. 아이소부틸 에스터는 플라스틱, 고무, 및 다른 분산액들에 사용된다. 아이소부탄올의 추가적인 용도는 도료, 바니시 제거제, 및 잉크 중의 용매로서의 그의 용도를 포함한다. 석유 유래된 공급원료로부터의 아이소부탄올 합성 방법은 옥소 합성(Weber et al., Industrial & Engineering Chemistry Research, 62:33-37(1970)) 및 메탄올과 n-프로판올의 가베트(Guerbet) 축합(Carlini et al., J. of Molecular Catalyst A: Chemical, 220:215-220(2004); Carlini et al., J. of Molecular Catalyst A: Chemical, 184:273-280(2002); Carlini et al., J. of Molecular Catalyst A: Chemical, 200:137-146(2003); Carlini et al., J. of Molecular Catalyst A: Chemical, 206:409-418(2003))을 포함한다.

**발명의 내용**

[0006] 따라서, 저렴한 공급원료를 사용하여 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 생산하기 위한 미생물 및 그의 사용 방법을 개발할 필요가 있다. 본 발명은 상기 필요성을 만족시키며 또한 관련된 이점들을 제공한다.

[0007] 일부 실시태양에서, 본 발명은 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 상기 아이소프로판올 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세틸-CoA:아세토아세테이트-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세테이트 데카복실라제, 및 아세톤 리덕타제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소를 포함한다.

[0008] 일부 실시태양에서, 본 발명은 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 기간 및 조건 하에서 아이소프로판올 경로를 갖는 상기와 같은 비 천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는, 아이소프로판올의 생산 방법을 제공한다.

[0009] 일부 실시태양에서, 본 발명은 n-부탄올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 n-부탄올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 상기 n-부탄올 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성), 부티르알데하이드 리덕타제, 및 부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소를 포함한다.

[0010] 일부 실시태양에서, 본 발명은 n-부탄올을 생산하기에 충분한 기간 및 조건 하에서 n-부탄올 경로를 갖는 비 천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는, n-부탄올의 생산 방법을 제공한다.

[0011] 일부 실시태양에서, 본 발명은 아이소부탄올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 아이소부탄올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 상기 아이소부탄올 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 아이소부티릴-CoA 뮤타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이

트라타제, 메트아크릴일-CoA-리덕타제, 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성), 아이소부티르알데하이드 리덕타제, 및 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소를 포함한다.

[0012] 일부 실시태양에서, 본 발명은 아이소부탄올을 생산하기에 충분한 기간 및 조건 하에서 아이소부탄올 경로를 갖는 비 천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는, 아이소부탄올의 생산 방법을 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

[0013] 도 1은 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올, n-부탄올 및 아이소부탄올로의 경로를 도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0014] 본 발명은 부분적으로 아이소프로판올, n-부탄올 또는 아이소부탄올 생산을 촉매화하는 효소를 암호화하는 유전자를 발현하는 비 천연 미생물에 관한 것이다. 본 발명에 개시된 아이소프로판올, n-부탄올 또는 아이소부탄올의 생산을 위한 경로는 도 1에 도시된 바와 같이 출발 물질로서 4-하이드록시부티릴-CoA를 기본으로 한다. 이들 경로의 성공적인 공학은 충분한 활성 및 특이성을 갖는 적합한 세트의 효소를 동정하고, 이의 상응하는 유전자를 생산 숙주 내로 클로닝하고, 발효 조건을 최적화하고, 발효에 따른 생성물 형성을 분석함을 수반한다.

[0015] 4-하이드록시부티릴-CoA가 대단히 통상적인 중심 대사 산물은 아니지만, 4-하이드록시부티릴-CoA를 합성하는 균주를 조작하는 방법은 앞서 미국 특허 출원 제 2009/0075351 호(내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)에서 출원인들에 의해 개시되었다. 예시적인 방법은 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제(CoA-의존성), 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 및 포스포트랜스부티릴라제 활성을 암호화하는 유전자들을 사용함으로써 숙시닐-CoA로부터 4-하이드록시부티릴-CoA를 합성함을 포함한다.

[0016] 상기 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올의 합성은 글루코스를 탄수화물 공급원료로서 가정할 때 1.33 mol/mol의 이론적인 수율을 갖는다. 이는 수비안(Subbian) 등의 미국 특허 제 2008/0293125 호에 의해 개시된 경로를 사용하여 획득할 수 있는 최대 수율보다 33% 더 많다. 상기 4-하이드록시부티릴-CoA에서 아이소프로판올로의 경로의 또 다른 이점은 상기 경로가 외부 전자 수용체의 부재 하에서 산화환원 균형을 가능하게 할 수 있는 반면, 상기 수비안 등에 개시된 경로는 과잉의 NADH를 생산하며 이는 전자를 외부 전자 수용체로 운반함으로써 소산되어야 한다는 것이다.

[0017] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 합성될 수 있는 또 다른 화합물은 n-부탄올이다. 글루코스를 탄수화물 공급원료로서 가정할 때 상기 경로는 n-부탄올의 수율 몰당 약 1.00 몰의 이론적인 수율을 갖는다. 상기 수율은, 아세틸-CoA로부터 아세토아세틸-CoA를 형성한 다음 4 회의 환원과 수화가 수행됨을 수반하는, 다수의 클로스트리듐 종들에 고유한 n-부탄올로의 경로에 필적한다(Jones et al., Microbiol. Rev., 50:484-524(1986)). 본 발명의 이점은 2 개의 아세틸-CoA 분자로부터 하나의 크로토노일-CoA 분자를 형성하는 상기 전통적인 부탄올 생산 경로의 처음 3 단계(즉 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제, 및 크로토나제)를 앞지른다는 것이다. 이들 효소 중 어느 하나 또는 전부는 생산에 대해 잠재적인 장애를 나타낸다. 예를 들어, 이 콜라이의 재조합체 균주는 상기 전통적인 부탄올 합성 경로에 필수적인 클로스트리듐 유전자를 발현하도록 조작되었지만, 1 g/L 미만의 역가가 보고되었다(Atsumi, et al., Metabolic Engineering, 2008, 10, 305-311). 본 발명의 추가의 이점은 2 개의 아세틸-CoA 분자로부터 n-부탄올을 생산하는 것과 상반되게 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 n-부탄올을 생산하는데 필요한 근원적인 중심 대사에서 발견된다. 구체적으로, 혐기성 조건 하에서 최고의 수율 및 산화환원 균형을 확립시키기 위해서, 상기 전통적인 클로스트리듐 경로는 n-부탄올 당 2 개의 환원 당량을 피루베이트로부터 아세틸-CoA로의 전환으로부터 추출하는 것이 요구된다(즉 2 개의 피루베이트 분자를 생산되는 부탄올 당 2 개의 아세틸-CoA 분자로 산화시켜야 한다). 이는 에스케리키아 콜라이와 같은 유기체에서는 도전을 나타내는데, 상기 유기체에서 피루베이트 데하이드로게나제는 혐기성 또는 미세호기성 조건 하에서 자연적으로 고도의 활성은 아니다. 본 발명에 개시된 생산 경로는 생산되는 n-부탄올 당 단지 하나의 피루베이트만을 아세틸-CoA로 산화시키는 것이 필요하다. 추가의 환원 당량은 아이소시트레이트 데하이드로게나제에 의한 아이소시트레이트의 알파-케토글루타레이트로의 전환에 의해 생성된다.

[0018] 유사하게, 상기 4-하이드록시부티릴-CoA 경로를 통한 아이소부탄올의 이론적인 수율은 글루코스를 공급원료로 가정할 때 약 1.00 mol/mol이다. 본 발명의 한 가지 이점은 본 발명이 도날드슨(Donaldson) 등의 미국 특허

제 20070092957 호에 개시된 아이소부탄올로의, 피루베이트로부터 아이소부티릴-CoA로의 전환 경로의 아세트 락테이트 신타제, 아세트하이드록시 산 아이소머리덕타제, 아세트하이드록시산 테하이드라타제, 및 분지쇄 알파-케토산 테하이드로게나제 단계들을 앞지른다는 것이다. 한편으로, 본 발명은 도날드슨 등에 또한 개시된 또 다른 생합성 경로를 통해 부티릴-CoA 및 아이소부탄올의 생산에 필요한 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 테하이드로게나제, 및 크로토나제 단계들을 앞지른다. 본 발명이 앞지른 이들 효소 단계들 중 어느 하나 또는 전부는 아이소부탄올 생산에 대한 잠재적인 장애를 나타낸다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 상기 부티릴-CoA 중간체는 4-하이드록시부티릴-CoA를 3-하이드록시아이소부티릴-CoA(이는 후속적으로 탈수되고 아이소부티릴-CoA로 환원된다)로 전환시킴으로써 완벽하게 우회된다.

[0019] 마지막으로, 본 발명은 또한 부분적으로 상기 비-천연 미생물 유기체의 배양을 통해 아이소프로판올, n-부탄올 또는 아이소부탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명에 개시된 균주들 중 임의의 균주를 상기 범용 소재 화합물질인 아이소프로판올, n-부탄올 또는 아이소부탄올을 제공하기에 충분한 기간 동안, 적합한 조건 하에서 배양할 수 있다.

[0020] 본 발명에 사용된 바와 같은 "비-천연"이란 용어는 본 발명의 미생물 유기체 또는 미생물과 관련하여 사용될 때 상기 미생물 유기체가 기준 종의 야생형 균주를 포함하여, 상기 기준 종의 천연 균주에서 통상적으로 발견되지 않는 하나 이상의 유전자 변경을 가짐을 의미한다. 유전자 변경은 예를 들어 대사 폴리펩타이드를 암호화하는 발현 가능한 핵산 도입, 다른 핵산 첨가, 핵산 결실 및/또는 상기 미생물 유전 물질의 다른 작용성 파괴의 변형들을 포함한다. 상기와 같은 변형들은 예를 들어 상기 기준 종들에 대한 이중, 동중, 또는 이중 및 동중 모두의 폴리펩타이드에 대한 암호화 부위 및 그의 작용성 단편을 포함한다. 추가적인 변형은 예를 들어 상기 변형이 유전자 또는 오페론의 발현을 변경시키는 비-암호화 조절 부위를 포함한다. 예시적인 대사 폴리펩타이드는 아이소프로판올, n-부탄올 또는 아이소부탄올 생합성 경로 내의 효소 또는 단백질을 포함한다.

[0021] 대사 변형은 천연 상태에서부터 변경되는 생화학적 반응을 지칭한다. 따라서, 비-천연 미생물은 대사 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 또는 그의 작용성 단편에 대한 유전자 변형을 가질 수 있다. 예시적인 대사 변형은 본 발명에 개시된다.

[0022] 본 발명에 사용된 바와 같은 "단리된"이란 용어는 미생물 유기체와 관련하여 사용 시, 기준 미생물 유기체가 자연에서 발견될 때 하나 이상의 성분이 실질적으로 없는 유기체를 의미한다. 상기 용어는 자연 환경에서 발견될 때 일부 또는 전체 성분이 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 상기 용어는 상기 미생물 유기체가 비-천연 환경에서 발견될 때 일부 또는 전체 성분이 제거된 미생물 유기체를 또한 포함한다. 따라서, 단리된 미생물 유기체는 자연에서 발견되거나 또는 비-천연 환경에서 생육, 저장 또는 연명될 때 다른 물질들과 부분적으로 또는 완전히 분리된다. 단리된 미생물 유기체의 구체적인 예는 부분적으로 순수한 미생물, 실질적으로 순수한 미생물 및 비-천연 배지에서 배양된 미생물을 포함한다.

[0023] 본 발명에 사용된 바와 같은 "미생물의", "미생물 유기체" 또는 "미생물"이란 용어는 고세균, 세균 또는 진핵생물 영역 내에 포함되는 미시적인 세포로서 존재하는 임의의 유기체를 의미한다. 따라서, 상기 용어는 미시적인 크기를 갖는 원핵생물 또는 진핵생물 세포 또는 유기체를 포함함을 의미하고 효모 및 진균과 같은 진핵 미생물뿐만 아니라 모든 종의 세균, 고세균 및 진정세균을 포함한다. 상기 용어는 또한 생화학적 생산을 위해 배양될 수 있는 임의의 종의 세포 배양물을 포함한다.

[0024] 본 발명에 사용된 바와 같은 "CoA" 또는 "조효소 A"란 용어는 활성 효소 시스템을 형성하기 위해 다수의 효소(주효소) 활성화에 필요한 유기 보조인자 또는 보결분자단(효소의 비 단백질 부분)을 의미한다. 조효소 A는 몇몇 촉합 효소에서 작용하고, 아세틸 또는 다른 아실 그룹 전달 및 지방산 합성 및 산화, 피루베이트 산화 및 다른 아세틸화에 작용한다.

[0025] 본 발명에 사용된 바와 같은 "실질적으로 혐기성"이란 용어는 배양 또는 생육 조건과 관련하여 사용될 때, 산소의 양이 액체 배지 중의 용존 산소 포화의 약 10% 미만임을 의미한다. 상기 용어는 또한 약 1% 미만의 산소 분위기에서 유지되는 액체 또는 고체 배지의 밀폐된 챔버를 포함함을 의미한다.

[0026] "외래"는 본 발명에서 사용 시 기준 분자 또는 기준 활성이 숙주 미생물 유기체 내에 도입됨을 의미한다. 상기 분자는 예를 들어 암호화 핵산의 숙주 유전 물질 내로의 도입에 의해, 예를 들어 숙주 염색체 내로의 통합 또는 비-염색체 유전 물질, 예를 들어 플라스미드로서의 통합에 의해 도입될 수 있다. 따라서, 상기 용어는 암호화 핵산의 발현과 관련하여 사용될 때 상기 암호화 핵산이 발현 가능한 형태로 미생물 유기체 내에 도입됨을 지칭한다. 생합성 활성과 관련하여 사용될 때, 상기 용어는 상기 숙주 기준 유기체 내로 도입되는 활성을 지칭한다. 상기 공급원은 예를 들어 상기 숙주 미생물 유기체 내로의 도입에 이어서 상기 기준 활성을 발

현하는 동종 또는 이종 암호화 핵산일 수 있다. 따라서, "내생적인"이란 용어는 상기 숙주 중에 존재하는 기준 분자 또는 활성을 지칭한다. 유사하게, 상기 용어는 암호화 핵산의 발현과 관련하여 사용될 때 상기 미생물 유기체 내에 함유된 암호화 핵산의 발현을 지칭한다. "이종"이란 용어는 상기 기준 중 이외의 공급원으로부터 유래하는 분자 또는 활성을 지칭하는 반면, "동종"은 상기 숙주 미생물 유기체로부터 유래하는 분자 또는 활성을 지칭한다. 따라서, 본 발명의 암호화 핵산의 외래 발현은 이종 또는 동종 암호화 핵산 중 어느 하나 또는 이들 모두를 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 안정한 유전자 변경을 함유할 수 있으며, 이는 상기 변경의 상실 없이 5 세대를 초과하여 배양될 수 있는 미생물에 적용된다. 일반적으로, 안정한 유전자 변경은 10 세대를 초과하여 지속하는 변형을 포함하며, 특히 안정한 변형은 약 25 세대를 초과하여 지속할 것이고, 보다 특히 안정한 유전자 변형은 무한을 포함하여, 50 세대를 초과할 것이다.

[0028] 당해 분야의 숙련가들은 본 발명에 예시된 대사 변형을 포함하여, 유전자 변경을 이 콜라이와 같은 적합한 숙주 유기체 및 그의 상응하는 대사 반응 또는 목적하는 유전 물질에 적합한 공급원 유기체, 예를 들어 목적하는 대사 경로에 대한 유전자들에 관하여 개시한다. 그러나, 광범위하게 다양한 유기체의 완전한 게놈 서열화 및 상기 유전체학 분야의 높은 기술 수준의 제공으로, 당해 분야의 숙련가들은 본 발명에 제공된 교시 및 지침을 필수적으로 모든 다른 유기체들에 쉽게 적용할 수 있을 것이다. 예를 들어, 본 발명에 예시된 이 콜라이 대사 변경을, 상기 기준 중 이외의 종들로부터 동일하거나 유사한 암호화 핵산을 통합시킴으로써 다른 종들에 쉽게 적용할 수 있다. 상기와 같은 유전자 변경은 예를 들어 일반적으로 종 상동 기관의 유전자 변경, 및 특히 이종 상동체, 상동체 또는 비 이종 상동성 유전자 치환을 포함한다.

[0029] 이종 상동체(ortholog)는 수직 혈통에 의해 관계되고 상이한 유기체에서 실질적으로 동일한 작용들을 맡고 있는 유전자 또는 유전자들이다. 예를 들어, 마우스 에폭사이드 하이드롤라제 및 인간 에폭사이드 하이드롤라제를 에폭사이드의 가수분해의 생물학적 작용에 대해 이종 상동체인 것으로 간주할 수 있다. 유전자들은 예를 들어 이들이 동종임을 가리키기에 충분한 양의 서열 유사성을 공유하거나 공통 조상으로부터의 진화에 의해 관계되는 경우 수직 혈통에 의해 관계된다. 유전자들을 또한 이들이 3 차원 구조는 공유하지만 이들이 1 차 서열 유사성을 식별할 수 없을 정도로, 공통 조상으로부터 진화했음을 가리키기에 충분한 양의 서열 유사성을 반드시 갖지는 않는 경우 이종 상동체인 것으로 간주할 수 있다. 이종 상동성인 유전자는 약 25% 내지 100% 아미노산 서열 일치성의 서열 유사성을 갖는 단백질들을 암호화한다. 25% 미만의 아미노산 유사성을 공유하는 단백질들을 암호화하는 유전자를 또한 이들의 3차원 구조가 또한 유사성을 보이는 경우 수직 혈통에 의해 발생한 것으로 간주할 수 있다. 조직 플라스미노겐 활성화제 및 엘라스타제를 포함한 효소들의 세린 프로테아제 패밀리의 구성원들은 공통 조상으로부터 수직 혈통에 의해 발생한 것으로 간주된다.

[0030] 이종 상동체는 예를 들어 진화를 통해 구조 또는 전체 활성이 갈라진 유전자 또는 그의 암호화된 유전자 산물을 포함한다. 예를 들어, 하나의 종이 2 개의 작용을 나타내는 유전자 산물을 암호화하고 상기와 같은 작용들이 두 번째 종에서 별도의 유전자로 분리된 경우, 상기 3 개의 유전자 및 이들의 상응하는 산물은 이종 상동체인 것으로 간주된다. 생화학적 생성물의 제조를 위해서, 당해 분야의 숙련가들은 비 천연 미생물의 제작을 위해 도입하거나 파괴하려는 대사 활성을 갖는 이종 상동성 유전자를 선택해야 함을 알 것이다. 분리 가능한 활성들을 나타내는 이종 상동체의 예는 별개의 활성들이 2 개 이상의 종 사이에서 또는 단일 종 내에서 별도의 유전자 산물들로 분리된 경우이다. 구체적인 예는 세린 프로테아제 활성의 2 가지 유형인 엘라스타제 단백질 분해 및 플라스미노겐 단백질 분해의, 플라스미노겐 활성화제 및 엘라스타제로서의 별개의 분자들로의 분리이다. 두 번째 예는 마이코플라스마 5'-3' 엑소뉴클레아제와 드로소필라 DNA 폴리머라제 III 활성의 분리이다. 상기 첫 번째 종으로부터의 DNA 폴리머라제를 두 번째 종으로부터의 엑소뉴클레아제 또는 폴리머라제 중 어느 하나 또는 이들 모두에 대한 이종 상동체인 것으로, 또 이와 역으로 간주할 수 있다.

[0031] 대조적으로, 상동체(paralog)는 예를 들어 복제에 이은 진화적 분기에 의해 관계된 동족체이며 유사하거나 공통의, 그러나 동일하지는 않은 작용들을 갖는다. 상동체는 예를 들어 동일한 종으로부터 또는 상이한 종으로부터 기원하거나 유래할 수 있다. 예를 들어, 미생물 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 I) 및 용해성 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 II)는 이들이 별개의 반응들을 촉매화하고 동일한 종에서 별개의 작용을 갖는, 공통의 조상으로부터 함께 진화한 2 개의 별개의 효소를 나타내므로 상동체로서 간주될 수 있다. 상동체는 서로 상당한 서열 유사성을 갖는 동일한 종으로부터의 단백질이며, 이는 이들이 동종이거나 또는 공통의 조상으로부터 공 진화를 통해 관계됨을 암시한다. 상동성 단백질 패밀리의 그룹은 HipA 동족체, 루시페라제 유전자, 펩티다제 등을 포함한다.

[0032] 비 이종 상동성(nonorthologous) 유전자 치환은 상이한 종들에서 기준 유전자 작용을 대체할 수 있는 하나의

종으로부터의 비 이중 상동성 유전자이다. 치환은 예를 들어 상이한 종들에서의 기준 작용에 비해 기원 종들에서 실질적으로 동일하거나 유사한 작용을 수행할 수 있음을 포함한다. 일반적으로 비 이중 상동성 유전자 치환을 상기 기준 작용을 암호화하는 기지 유전자와 구조적으로 관련된 것으로서 식별하겠지만, 구조적으로는 덜 관련되었지만 작용상 유사한 유전자들 및 그들의 상응하는 유전자 산물들은 그럼에도 불구하고 여전히 본 발명에 사용되는 상기 용어의 의미 내에 있을 것이다. 작용 유사성은 예를 들어 치환하고자 하는 작용을 암호화하는 유전자에 비해 비 이중 상동성 유전자 산물의 활성 부위 또는 결합 부위에서 적어도 일부의 구조 유사성을 필요로 한다. 따라서, 비 이중 상동성 유전자는 예를 들어 상동체 또는 관련되지 않은 유전자를 포함한다.

[0033] 따라서, 아이소프로판올, n-부탄올 또는 아이소부탄올 생합성 능력을 갖는 본 발명의 비 천연 미생물 유기체의 동정 및 제작에 있어서, 당해 분야의 숙련가들은 대사 변형의 확인이 이중 상동체의 동정 및 포함 또는 불활성화를 포함할 수 있도록 본 발명에 제공된 교시 및 지침을 특정 종들에 적용함을 이해할 것이다. 당해 분야의 숙련가들은 또한 상동체 및/또는 비 이중 상동성 유전자 치환이 유사하거나 또는 실질적으로 유사한 대사 반응을 촉매화하는 효소를 암호화하는 기준 미생물 중에 존재하는 만큼, 이들 진화에 의해 관계된 유전자들을 사용할 수 있다.

[0034] 이중 상동체, 상동체 및 비 이중 상동성 유전자 치환을 당해 분야의 숙련가들에게 널리 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 2 개의 폴리펩타이드에 대한 핵산 또는 아미노산 서열의 검사는 상기 두 비교된 서열들 간의 서열 일치성 및 유사성을 밝힐 것이다. 상기와 같은 유사성을 근거로, 당해 분야의 숙련가는 상기 유사성이 상기 단백질들이 공통 조상으로부터 진화를 통해 관계됨을 가리킬 만큼 충분히 높은지를 결정할 수 있다. 당해 분야의 숙련가들에게 널리 공지된 연산, 예를 들어 Align, BLAST, Clustal W 등은 원 서열 유사성 또는 일치성을 비교하고 측정하며, 중량 또는 점수를 지정할 수 있는 상기 서열 중 틈의 존재 또는 유의 수준을 또한 측정할 수 있다. 상기와 같은 연산은 또한 당해 분야에 공지되어 있으며 뉴클레오타이드 서열 유사성 또는 일치성의 측정에 유사하게 적용될 수 있다. 관련성을 결정하기에 충분한 유사성에 대한 매개변수들을, 통계학적 유사성을 계산하기 위해 널리 공지된 방법, 또는 랜덤 폴리펩타이드에서 유사한 합치를 발견할 기회, 및 상기 측정된 합치의 유의수준을 근거로 측정한다. 2 개 이상 서열들의 컴퓨터 비교를 또한 경우에 따라 당해 분야의 숙련가들에 의해 가지적으로 최적화할 수 있다. 관련된 유전자 산물들 또는 단백질들은 높은 유사성, 예를 들어 25% 내지 100% 서열 일치성을 가질 것으로 예상될 수 있다. 관련되지 않은 단백질들은, 충분한 크기의 데이터베이스를 스캐닝하는 경우(약 5%), 우연히 발생할 것으로 예상되는 바와 같이 필수적으로 동일한 일치성을 가질 수 있다. 5% 내지 24%의 서열은, 비교된 서열들이 관련 있다는 결론을 내릴 만큼 충분한 상동성을 나타낼 수도, 나타내지 않을 수도 있다. 상기 데이터 세트의 크기가 제공된, 상기와 같은 합치의 유의수준을 측정하기 위한 추가적인 통계학적 분석을 이들 서열의 관련성을 측정하기 위해 수행할 수 있다.

[0035] 예를 들어 BLAST 연산을 사용하는 2 개 이상 서열의 관련성을 측정하기 위한 예시적인 매개변수들을 하기에 열거할 수 있다. 간단히, 아미노산 서열 정렬을 BLASTP 버전 2.0.8(1999년 1월 5일) 및 하기의 매개변수들을 사용하여 수행할 수 있다: 행렬: 0 BLOSUM62; 간격 개방(gap open): 11; 간격 연장(gap extension): 1; x\_드롭오프: 50; 예상: 10.0; 워드크기: 3; 필터: 온. 핵산 서열 정렬을 BLASTN 버전 2.0.6(1998년 9월 16일) 및 하기의 매개변수들을 사용하여 수행할 수 있다: 합치: 1; 불합치: -2; 간격 개방: 5; 간격 연장: 2; x\_드롭오프: 50; 예상: 10.0; 워드크기: 11; 필터: 오프. 당해 분야의 숙련가들은 상기 매개변수들에 대해 예를 들어 상기 비교의 엄격성을 증가시키거나 감소시키고 2 개 이상 서열의 관련성을 측정하기 위해 변형을 수행할 수 있음을 알 것이다.

[0036] 일부 실시태양에서, 본 발명은 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비 천연 미생물 유기체를 제공한다. 상기 아이소프로판올 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세틸-CoA:아세토아세테이트-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세테이트 데카복실라제, 및 아세톤 리덕타제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소를 포함한다.

[0037] 일부 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 2 개의 외래 핵산을 포함하며, 이들 핵산은 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 반면, 다른 실시태양에서 상기 미생물 유기체는 3 개의 외래 핵산을 포함하고, 이들 핵산은 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화한다. 일부 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 4 개의 외래 핵산을 포함하며, 이들 핵산은 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화한다. 추가의 실시태양에서, 상기

미생물 유기체는 5 개의 외래 핵산을 포함하며, 이들 핵산은 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화한다. 더욱 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 6 개의 외래 핵산을 포함하며, 이들 핵산은 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화한다. 상기 미생물 유기체는 또한 7 개의 외래 핵산을 포함할 수 있고, 이들 핵산은 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화한다. 마지막으로, 상기 미생물 유기체는 8 개의 외래 핵산을 포함하며, 이들 핵산은 각각 아이소프로판올 경로 효소를 암호화한다. 상기 숙주 유기체 내로 삽입되는 상기 언급한 유전자들 중 임의의 유전자는 이중 핵산일 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 비 천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성 배양 배지 중에 있다.

[0038] 상기에 따라서, 본 발명은 도 1의 단계 A에 도시된 바와 같이 4-하이드록시부티릴-CoA의 탈수를 수행하여 크로토노일-CoA를 형성하는 효소를 암호화하는 핵산을 제공하는 4-하이드록시부티릴-CoA에서 아이소프로판올로의 경로를 제공한다. 크로토나제는 후속적으로 크로토노일-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로 수화시키고(단계 B), 이는 차례로 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제에 의해 아세토아세틸-CoA로 산화된다(단계 C). 아세토아세틸-CoA는 신시타제, 트랜스퍼라제 또는 하이드롤라제에 의해 아세토아세테이트로 전환된다(단계 D, E 또는 F). 상기 최종 두 단계는 아세톤을 형성하는 아세토아세테이트의 탈카복실화(단계 G) 및 아이소프로판올로의 그의 후속 환원(단계 H)을 수반한다.

[0039] 추가의 실시태양에서, 본 발명은 아이소프로판올 경로를 갖는 비 천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비 천연 미생물 유기체는 4-하이드록시부티릴-CoA에서 크로토노일-CoA로, 크로토노일-CoA에서 3-하이드록시부티릴-CoA로, 3-하이드록시부티릴-CoA에서 아세토아세틸-CoA로, 아세토아세틸-CoA에서 아세토아세테이트로, 아세토아세테이트에서 아세톤으로, 및 아세톤에서 아이소프로판올로 전환시키는 것들로 이루어진 그룹 중에서 선택된, 기질을 생성물로 전환시키는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다.

[0040] 일부 실시태양에서, 본 발명은 n-부탄올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 n-부탄올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비 천연 미생물 유기체를 제공한다. 상기 n-부탄올 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성), 부티르알데하이드 리덕타제 및 부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소를 포함한다.

[0041] 일부 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 2 개의 외래 핵산을 포함하며, 이들 핵산은 각각 n-부탄올 경로 효소를 암호화하는 반면, 다른 실시태양에서 상기 미생물 유기체는 3 개의 외래 핵산을 포함하고, 이들 핵산은 각각 n-부탄올 경로 효소를 암호화한다. 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 4 개의 외래 핵산을 포함하며, 이들 핵산은 각각 n-부탄올 경로 효소를 암호화한다. 상기 언급한 핵산들 중 임의의 핵산은 이중 핵산일 수 있다. 상기와 같은 비 천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성 배양 배지 중에서 생육될 수 있다.

[0042] 추가의 실시태양에서, 본 발명은 n-부탄올 경로를 갖는 비 천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비 천연 미생물 유기체는 4-하이드록시부티릴-CoA에서 크로토노일-CoA로, 크로토노일-CoA에서 부티릴-CoA로, 부티릴-CoA에서 n-부탄올로, 부티릴-CoA에서 부티르알데하이드로, 및 부티르알데하이드에서 n-부탄올로 전환시키는 것들로 이루어진 그룹 중에서 선택된, 기질을 생성물로 전환시키는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다.

[0043] 상기 4-하이드록시부티릴-CoA에서 n-부탄올로의 경로는 도 1의 단계 A에 나타낸 바와 같이 4-하이드록시부티릴-CoA에서 크로토노일-CoA로의 탈수로 시작하며, 이어서 상기 화합물은 부티릴-CoA로 환원된다(단계 I). 이어서 부티릴-CoA는 2 개의 별도 효소들, 단계 J 및 K, 또는 단계 L에 나타낸 바와 같은 단일의 이중-작용 효소에 의해 수행되는 2 개의 환원을 겪는다.

[0044] 일부 실시태양에서, 본 발명은 아이소부탄올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 아이소부탄올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비 천연 미생물 유기체를 제공한다. 상기 아이소부탄올 경로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 아이소부티릴-CoA 뮤타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA-리덕타제, 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성), 아이소부티르알데하이드 리덕타제, 및 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소를 포함한다.

[0045] 일부 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 2 개의 외래 핵산을 포함하며, 이들 핵산은 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화하는 반면, 다른 실시태양에서 상기 미생물 유기체는 3 개의 외래 핵산을 포함하고, 이들 핵산은 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화한다. 다른 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 4 개의 외래 핵

산을 포함하며, 이들 핵산은 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화한다. 더욱 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 5 개의 외래 핵산을 포함하며, 이들 핵산은 각각 아이소부탄올 경로 효소를 암호화한다. 상기 외래 핵산들 중 임의의 핵산은 이중 핵산일 수 있다. 상기와 같은 비 천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성 배양 배지 중에서 생육될 수 있다.

[0046] 일부 실시태양에서, 상기 비 천연 유기체는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA 리덕타제, 아이소부티릴-CoA 뮤타제, 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성) 및 아이소부티르알데하이드 리덕타제를 포함하는 일련의 아이소부탄올 경로 효소를 갖는다. 상기와 같은 유기체는 외래 핵산으로서 제공된, 1, 2, 3, 4, 5, 전체 이하의 아이소부탄올 경로 효소 암호화 핵산을 가질 수 있다.

[0047] 일부 실시태양에서, 상기 비 천연 유기체는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토노일-CoA-리덕타제, 아이소부티릴-CoA 뮤타제, 및 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)를 포함하는 일련의 아이소부탄올 경로 효소를 갖는다. 상기와 같은 유기체는 외래 핵산으로서 제공된, 1, 2, 3, 4, 전체 이하의 아이소부탄올 경로 효소 암호화 핵산을 가질 수 있다.

[0048] 일부 실시태양에서, 상기 비 천연 유기체는 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA-리덕타제, 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성) 및 아이소부티르알데하이드 리덕타제를 포함하는 일련의 아이소부탄올 경로 효소를 갖는다. 상기와 같은 유기체는 외래 핵산으로서 제공된, 1, 2, 3, 4, 5, 전체 이하의 아이소부탄올 경로 효소 암호화 핵산을 가질 수 있다.

[0049] 일부 실시태양에서, 상기 비 천연 유기체는 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA-리덕타제, 및 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)를 포함하는 일련의 아이소부탄올 경로 효소를 갖는다. 상기와 같은 유기체는 외래 핵산으로서 제공된, 1, 2, 3, 4, 전체 이하의 아이소부탄올 경로 효소 암호화 핵산을 가질 수 있다.

[0050] 추가의 실시태양에서, 본 발명은 아이소부탄올 경로를 갖는 비 천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비 천연 미생물 유기체는 4-하이드록시부티릴-CoA에서 크로토노일-CoA로, 크로토노일-CoA에서 부티릴-CoA로, 부티릴-CoA에서 아이소부티릴-CoA로, 4-하이드록시부티릴-CoA에서 3-하이드록시아이소부티릴-CoA로, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA에서 메트아크릴일-CoA로, 메트아크릴일-CoA에서 아이소부티릴-CoA로, 아이소부티릴-CoA에서 아이소부탄올로, 아이소부티릴-CoA에서 아이소부티르알데하이드로, 및 아이소부티르알데하이드에서 아이소부탄올로 전환시키는 것들로 이루어진 그룹 중에서 선택된, 기질을 생성물로 전환시키는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다.

[0051] 상기 4-하이드록시부티릴-CoA에서 아이소부탄올로의 전환은 아이소부티릴-CoA 중간체의 형성을 수반한다. 아이소부티릴-CoA는 도 1의 단계 A, I 및 M에 나타낸 바와 같이 탈수, 환원, 및 탄소 주쇄 재배열을 통해 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 형성될 수 있다. 한편으로, 상기 중간체를 도 1의 단계 Q, R 및 S에 나타낸 바와 같이 먼저 탄소 주쇄 재배열에 이어서 탈수 및 환원을 통해 획득할 수 있다. 이어서 아이소부티릴-CoA는 2 개의 환원을 겪어 아이소부탄올을 형성한다. 상기 환원은 2 개 효소, 단계 N 및 O, 또는 단계 P에 나타낸 바와 같은 단일의 이중-작용 효소에 의해 수행된다.

[0052] 상기 경로들 중 임의의 경로의 성공적인 조작은 충분한 활성 및 특이성을 갖는 적합한 효소 조합을 동정하고, 이들의 상응하는 유전자를 생산 숙주에 클로닝하고, 발효 조건을 최적화하고, 발효에 따른 생성물 형성을 분석함을 수반한다. 상기 언급한 생성물들 중 임의의 생성물의 생산을 위해 생산 숙주를 조작하기 위해서, 하나 이상의 외래 DNA 서열(들)을 미생물에서 발현시킬 수 있다. 또한, 상기 미생물은 작용적으로 결실된 내생 유전자(들)를 가질 수 있다. 상기 변형은 재생 가능한 공급원료를 사용하여 아이소프로판올, n-부탄올 또는 아이소부탄올의 생산을 가능하게 할 것이다.

[0053] 하기에, 우리는 도 1에 도시된 각각의 단계들을 촉매화하는 효소들을 암호화할 수 있는 다수의 생화학적으로 특성화된 유전자를 개시한다. 우리는 상기 방법을 이 폴라이에 대해 개시하지만, 당해 분야의 숙련가는 이들 교시를 필수적으로 임의의 다른 유기체에 적용할 수 있다. 구체적으로, 적합하게 클로닝 및 발현 시 적합한 형질전환을 촉매화하기 위해 적용될 수 있는 다른 유기체들 중의 유전자 이외에, 이 폴라이에 고유한 유전자들을 나열한다.

[0054] 본 발명을 대사 반응, 반응물 또는 그의 생성물을 일반적으로 언급하거나, 또는 상기 언급된 대사 반응, 반응물 또는 생성물과 관련되거나 이를 촉매화하는 효소 또는 이와 관련된 단백질을 암호화하는 하나 이상의 핵산 또는 유전자를 구체적으로 언급하여 본 발명에서 개시한다. 달리 본 발명에 명확히 나타내지 않는 한, 당해

분야의 숙련자들은 반응에 대한 언급이 또한 상기 반응의 반응물 및 생성물에 대한 언급을 구성함을 알 것이다. 유사하게, 본 발명에서 명확히 나타내지 않는 한, 반응물 또는 생성물에 대한 언급은 또한 상기 반응을 언급하며, 이들 대사 구성성분들 중 임의의 구성성분에 대한 언급은 상기 언급한 반응, 반응물 또는 생성물을 촉매화하는 효소 또는 상기 중에 수반되는 단백질을 암호화하는 유전자 또는 유전자들을 또한 언급한다. 마찬가지로, 대사 생화학, 효소학 및 유전체학의 널리 공지된 분야에 제공된 바와 같이, 본 발명에서 유전자 또는 핵산 암호화에 대한 언급은 상응하는 암호화된 효소 및 상기 효소가 촉매화하는 반응 또는 상기 반응과 관련된 단백질뿐만 아니라 상기 반응의 반응물 및 생성물에 대한 언급을 또한 구성한다.

[0055] 도 1에 도시된 모든 형질전환들은 표 1에 나타낸 형질전환의 10 개의 일반적인 범주 내에 있다. 하기에는 각 범주 중의 다수의 생화학적으로 특성화된 유전자들이 개시되어 있다. 적합하게 클로닝되고 발현시 도 1에서 적합한 형질전환을 촉매화하기 위해 적용될 수 있는 유전자들을 구체적으로 나열한다. 도 1의 각 단계들에 대한 예시적인 유전자들을 하기 표 37에 추가로 제공한다.

[0056] 표 1은 통상적인 중심 대사 중간체를 아이소프로판올, n-부탄올 또는 아이소부탄올로 전환시키기에 유용한 효소 유형들을 나타낸다. 각 표지의 처음 3 개 숫자는 기질 특이성과 무관하게 일반적인 형질전환 유형을 나타내는 상기 처음 3 개 효소 위원회 번호 숫자에 상응한다.

표 1

표지	작용
1.1.1.a	옥시도리덕타제(케톤에서 하이드록실로 또는 알데하이드에서 알콜로)
1.1.1.c	옥시도리덕타제(2 단계, 아실-CoA에서 알콜로)
1.2.1.b	옥시도리덕타제(아실-CoA에서 알데하이드로)
1.3.1.a	CH-CH 공여체 상에서 작용하는 옥시도리덕타제
2.8.3.a	조효소-A 트랜스퍼라제
3.1.2.a	티올에스터 하이드롤라제(CoA 특이적)
4.1.1.a	카복시-라이아제
4.2.1.a	하이드로-라이아제
5.4.99.a	아미노뮤타제
6.2.1.a	산-티올 리가제

[0058] 도 1의 2 개의 형질전환들은 알데하이드를 알콜로 환원시키는 옥시도리덕타제의 범주 내에 있다. 구체적으로, 이들은 각각 단계 K 및 O에 나타낸 바와 같은 부티르알데하이드 리덕타제 및 아이소부티르알데하이드 리덕타제이다.

[0059] 알데하이드의 알콜로의 전환을 촉매화하는 효소(즉 알콜 데하이드로게나제 또는 동등하게 알데하이드 리덕타제)를 암호화하는 예시적인 유전자는 C2-C14의 경우 중간-쇄 알콜 데하이드로게나제를 암호화하는 alrA(Tani et al., Appl. Environ. Microbiol., 66:5231-5235(2000)), 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터 ADH2(Atsumi et al., Nature, 451:86-89(2008)), C3보다 긴 분자를 선호하는 이 콜라이로부터의 yqhD(Sulzenbacher et al., J. of Molecular Biology, 342:489-502(2004)), 및 부티르알데하이드를 부탄올로 전환시키는 씨 아세토부틸리쿰(*C. acetobutylicum*)으로부터의 bdhI 및 bdhII(Walter et al., J. of Bacteriology, 174:7149-7158(1992))를 포함한다. yqhD의 유전자 산물은 보조 인자로서 NADPH를 사용하는 아세트알데하이드, 말론다이알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인의 환원을 촉매화한다(Perez et al., J. Biol. Chem., 283:7346-7353(2008)). 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*)로부터의 ADH1은 폼알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인을 포함한 다수의 알데하이드에 대해 활성을 갖는 것으로 입증되었다(Kinoshita et al., Appl. Microbiol. Biotechnol, 22:249-254(1985)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 2에 나타낸 진뱅크(GenBank) 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 2

alrA	BAB12273.1	애시네토박터 스페이즈 균주 M-1
ADH2	NP_014032.1	사카로마이세스 세레비지아에
yqhD	NP_417484.1	에스케리키아 콜라이
bdh I	NP_349892.1	클로스트리듐 아세토부틸리쿰

bdh II	NP_349891.1	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
adhA	YP_162971.1	자이모모나스 모빌리스

[0061] 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제 활성을 나타내는 효소들(EC 1.1.1.61)이 또한 상기 범주 내에 있다. 상기와 같은 효소들은 랄스토니아 유티로파(*Ralstonia eutropha*)(Bravo et al., J. Forensic Sci., 49:379-387(2004)), 클로스트리듐 클루이베리(*kluveri*)(Wolff et al., Protein Expr. Purif., 6:206-212(1995)) 및 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)(Breitkreuz et al., J. Biol. Chem., 278:41552-41556(2003))에서 특성화되었다. 더욱 또 다른 유전자는 제오바실러스 썬모글루코시다시우스(*Geobacillus thermoglucosidasius*)로부터의 알콜 데하이드로게나제 adhI(Jeon et al., J. Biotechnol., 135:127-133(2008))이다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 3에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 3

4hbd	YP_726053.1	알스토니아 유티로파 H16
4hbd	21902.1	로스트리듐 클루이베리 DSM 555
4hbdQ94B07		라비도프시스 탈리아나
adhI	AAR91477.1	제오바실러스 썬모글루코시다시우스 M10EXG

[0062] 또 다른 예시적인 효소는 3-하이드록시아이소부티레이트의 메틸말로네이트 세미알데하이드로의 가역적인 산화를 촉매화하는 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제이다. 상기 효소는 발린, 류신 및 아이소류신 분해에 관여하며 세균, 진핵생물 및 포유동물에서 동정되었다. 썬무스 썬모필루스(*Thermus thermophilus*) HB8로부터 P84067에 의해 암호화된 효소가 구조적으로 특성화되었다(Lokanath et al., J. Mol. Biol., 352:905-917(2005)). 상기 인간 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제의 가역성을 동위원소 표지된 기질을 사용하여 입증하였다(Manning et al., Biochem J., 231:481-484(1985)). 상기 효소를 암호화하는 추가의 유전자들은 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)(Hawes et al., Methods Enzymol, 324:218-228(2000)) 및 오리кто라구스 쿠니쿨러스(*Oryctolagus cuniculus*)(상기 Hawes et al.; Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol Biochem., 60:2043-2047(1996)) 중의 3hidh, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 중의 mmsb, 및 슈도모나스 푸티다(*putida*) 중의 dhat(상기 Hawes et al.; Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol Biochem., 60:2043-2047(1996); Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol Biochem., 67:438-441(2003))를 포함한다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 4에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 4

P84067	P84067	썬무스 썬모필루스
mmsb	P28811.1	슈도모나스 아에루기노사
dhat	Q59477.1	슈도모나스 푸티다
3hidh	P31937.2	호모 사피엔스
3hidh	P32185.1	오리кто라구스 쿠니쿨러스

[0063] 케톤 작용기를 상응하는 하이드록실 그룹으로 전환시키는 옥시도리덕타제가 도 1에 도시된 바와 같이, 아세톤의 아이소프로판올로의 전환에 대한 단계 H에 의해서 및 3-하이드록시부티릴-CoA의 아세토아세틸-CoA로의 전환에 대한 단계 C에 의해서 예시된다. 아세톤을 아이소프로판올로 전환시키는 예시적인 알콜 데하이드로게나제는 썬 베이제링키이(*C. beijerinckii*)(Ismail et al., J. Bacteriol., 175:5097-5105(1993)) 및 티 브록키이(*T. brockii*)(Lamed et al., Biochem. J., 195:183-190(1981); Peretz et al., Biochemistry, 28:6549-6555(1989))에서 나타났다. 2-펜탄올 및 피루브알데하이드에 대해 최대 활성을 나타내는, 파이로코커스 퓨리 오수스(*Pyrococcus furiosus*)로부터의 adhA의 유전자 산물은 아이소프로판올 및 아세톤을 포함하여 매우 넓은 특이성을 갖는 것으로 나타났다(van der et al., Eur J Biochem, 268:3062-3068(2001)). 아이소프로판올 및 아세톤에 대한 활성을 갖는 더욱 또 다른 2차 알콜 데하이드로게나제는 로도코커스 루버(*Rhodococcus ruber*)로부터의 adh-A의 유전자 산물에 의해 암호화된다(Kosjek et al., Biotechnol Bioeng, 86:55-62(2004)). 이

들 유전자를 다른 것들과 함께 하기 표 5에 나타낸다.

표 5

[0066]

adh	AAA23199.2	클로스트리듐 베이제링키이 NRRL B593
adh	P14941.1	씨모아나에로박터 브록키이 HTD4
adhA	AAC25556	파이로코커스 퓨리오수스
adh-A	CAD36475	로도코커스 루버

[0067]

3-하이드록시부틸릴-CoA로부터 아세트아세틸-CoA의 형성을 촉매화하는 3-하이드록시부틸릴-CoA 데하이드로게나제(단계 C)는 몇몇 클로스트리듐 종들에서 부티레이트로의 아세트-CoA 발효 경로에 관여하며 상세히 연구되었다(Jones et al., Microbiol. Rev., 50:484-524(1986)). hbd에 의해 암호화된, 클로스트리듐 아세트부틸리쿰으로부터의 효소가 클로닝되었고 이 콜라이에서 작용적으로 발현되었다(Youngleson et al., J. Bacteriol., 171:6800-6807(1989)). 또한, fadB 및 fadJ에 의해 암호화된, 이 콜라이 중의 2 개 지방산 산화 복합체의 서브유닛들은 3-하이드록시아실-CoA 데하이드로게나제로서 작용한다(Binstock et al., Methods Enzymol., 71C:403-411(1981)). 상기 가역적인 형질전환을 촉매화하는 것으로 입증된 더욱 다른 유전자들은 주글로에아 라미게라(*Zoogloea ramigera*)로부터의 phbB(Ploux et al., Eur. J. Biochem., 174:177-182(1988)) 및 로도박터 스파에로이테스(*Rhodobacter sphaeroides*)로부터의 phaB(Alber et al., Mol. Microbiol., 61:297-309(2006))이다. 상기 앞의 유전자는 NADPH-의존성이며, 그의 뉴클레오타이드 서열이 결정되었고(Peoples et al., Mol. Microbiol. 3:349-357(1989)) 상기 유전자는 이 콜라이에서 발현되었다. 상기 유전자에 대한 기질 특이성 연구는 상기 유전자가 아세트아세틸-CoA 이외에 기질로서 3-옥소프로피오닐-CoA를 수용할 수 있다는 결론을 도출하였다(상기 Ploux et al.). 추가적인 유전자는 클로스트리듐 클루이베리 중의 Hbd1(C-말단 도메인) 및 Hbd2(N-말단 도메인)(Hillmer and Gottschalk, Biochim. Biophys. Acta 3334:12-23(1974)) 및 보스 타우루스(*Bos taurus*) 중의 HSD17B10(Wakil et al., J. Biol. Chem., 207:631-638(1954))을 포함한다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 6에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 6

[0068]

fadB	P21177.2	에스케리키아 콜라이
fadJ	P77399.1	에스케리키아 콜라이
Hbd2	EDK34807.1	클로스트리듐 클루이베리
Hbd1	EDK32512.1	클로스트리듐 클루이베리
hbd	P52041.2	클로스트리듐 아세트부틸리쿰
HSD17B10	002691.3	보스 타우루스
phbB		주글로에아 라미게라
phaB		로도박터 스파에로이테스

[0069]

다수의 유사한 효소들이 표 7에 나타낸 바와 같이 클로스트리듐 및 메탈로스파에라 세둘라(*Metallosphaera sedula*)의 다른 종들에서 발견되었다(Berg et al., Archaea. Science, 318:1782-1786(2007)).

표 7

[0070]

hbd	NP_349314.1	클로스트리듐 아세트부틸리쿰
hbd	AAM14586.1	클로스트리듐 베이제링키이
Msed_1423	YP_001191505	메탈로스파에라 세둘라
Msed_0399	YP_001190500	메탈로스파에라 세둘라
Msed_0389	YP_001190490	메탈로스파에라 세둘라
Mesd_1993	YP_001192057	메탈로스파에라 세둘라

[0071]

한편으로, 케톤을 하이드록실 작용기로 전환시키는 여러 개의 예시적인 알콜 데하이드로게나제가 존재한다. 이 콜라이로부터의 2 개의 상기와 같은 효소들은 말레이트 데하이드로게나제(mdh) 및 락테이트 데하이드로게나제(ldhA)에 의해 암호화된다. 또한, 랄스토니아 유티로파(*Ralstonia eutropha*)로부터의 락테이트 데하이드로게나제는 다양한 쇠 길이의 기질들, 예를 들어 락테이트, 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소

글루타레이트에 대해 높은 활성을 나타내는 것으로 입증되었다(Steinbuechel et al., Eur. J. Biochem. 130:329-334(1983)).

[0072] 도 1의 형질전환들은 아실-CoA에서 상응하는 알콜로의 2-단계 환원에 의존한다. 예를 들어, 상기 부탄올 경로의 단계 L 및 아이소부탄올 경로의 단계 P가 상기 형질전환에 의존한다. 아실-CoA를 알콜로 전환시키는 예시적인 2-단계 옥시도리덕타제는 기질을 형질전환시키는 것들, 예를 들어 아세틸-CoA를 에탄올로(예를 들어 이 콜라이로부터 adhE(Kessler et al., FEBS. Lett., 281:59-63(1991)) 및 부티릴-CoA를 부탄올로(예를 들어 썬 아세토부틸리쿰으로부터 adhE2(Fontaine et al., J. Bacteriol., 184:821-830(2002))로 형질전환시키는 것들을 포함한다. 아세틸-CoA를 에탄올로 환원시키는 것 이외에, 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 중의 adhE에 의해 암호화되는 효소는 분지쇄 화합물 아이소부티르알데하이드를 아이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 입증되었다(Kazahaya et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 18:43-55(2005)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 8에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 8

[0073]

adhE	NP_415757.1	에스케리키아 콜라이
adhE2	AAK09379.1	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
adhE	AAV66076.1	류코노스톡 메센테로이데스

[0074] 또 다른 예시적인 효소는 말로닐-CoA를 3-HP로 전환시킬 수 있다. 상기 활성을 갖는 NADPH-의존성 효소는 클로로플렉수스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)에서 특성화되었으며, 여기에서 3-하이드록시프로피오네이트 주기에 관여한다(Hugler et al., J. Bacteriol., 184:2404-2410(2002); Strauss et al., Eur. J. Biochem., 215:633-643(1993)). 상기 효소는 300 kDa의 질량을 가지며, 매우 기질-특이성이고, 다른 공지된 옥시도리덕타제들과 서열 유사성을 거의 나타내지 않는다(상기 Hugler et al.). 로세이플렉수스 카스텐홀지이(*Roseiflexus castenholzii*), 에리쓰로박터(*Erythrobacter*) 스페시즈 NAP1 및 해양 감마 프로테오박테리움 HTCC2080을 포함한 다른 유기체들 중의 효소들이 서열 유사성에 의해 추리될 수 있다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 9에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 9

[0075]

mcr	AAS20429.1	클로로플렉수스 아우란티아쿠스
Rcas_2929	YP_001433009.1	로세이플렉수스 카스텐홀지이
NAP1_02720	ZP_01039179.1	에리쓰로박터 스페시즈 NAP1
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	해양 감마 프로테오박테리움 HTCC2080

[0076] 보다 긴 쇠 아실-CoA 분자들이 알콜-형성 지방 아실-CoA 리덕타제를 암호화하는 호호바(심몬드시아 키넨시스(*Simmondsia chinensis*)) FAR과 같은 효소들에 의해 환원될 수 있다. 이 콜라이에서의 그의 과발현은 FAR 활성 및 지방 알콜의 축적을 생성시켰다(Metz et al., Plant Physiology, 122:635-644(2000))(FAR, AAD38039.1, 5020215, *Simmondsia chinensis*).

[0077] 본 발명에 개시된 경로들은 아실-CoA를 알데하이드로 전환시키는 다수의 옥시도리덕타제-유형 형질전환들을 수반한다. 구체적으로, 단계 J 및 N은 각각 부티릴-CoA의 부티르알데하이드로의 환원 및 아이소부티릴-CoA의 아이소부티르알데하이드로의 환원을 촉매화한다. 몇몇 아실-CoA 데하이드로게나제들이 아실-CoA를 그의 상응하는 알데하이드로 환원시킬 수 있다. 상기와 같은 효소를 암호화하는 예시적인 유전자는 지방산-CoA 리덕타제를 암호화하는 애시네토박터 칼코아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*) acr1(Reiser et al., J. of Bacteriology, 179:2969-2975(1997)), 애시네토박터 스페시즈 M-1 지방 아실-CoA 리덕타제(Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol., 68:1192-1195(2002)) 및 클로스트리듐 클루이베리 중의 sucD 유전자에 의해 암호화되는 CoA- 및 NADP-의존성 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제(Sohling et al., J. Bacteriol., 178:871-880(1996))를 포함한다. 피 진지발리스(*P. gingivalis*)의 SucD는 또 다른 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제이다(Takahashi et al., J. Bacteriol., 182:4704-4710(2000)). bphG에 의해 암호화되는, 슈도모나스 스페시즈 중의 아세트알데하이드 데하이드로게나제를 아실화하는 효소는 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 아이소부티르알데하이드 및 폼알데하이드를 산화하고 아실화하는 것으로 입증된 더욱 또 다른 효소이다(Powlowski et al., J. Bacteriol., 175:377-385(1993)). 아세틸-

CoA의 에탄올로의 환원 이외에, 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 중의 adhE에 의해 암호화되는 효소가 분지쇄 화합물 아이소부티르알데하이드를 아이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 입증되었다(Kazahaya et al. J. Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55(1972); Koo et al., Bacteriol Lett. 27:505-510(2005)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 10에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 10

[0078]

acr1	YP_047869.1	애시네토박터 칼코아세티쿠스
acr1	AAC45217	애시네토박터 베이리이
acr1	BAB85476.1	애시네토박터 스페시즈 균주 M-1
sucD	P38947.1	클로스트리듐 클루이베리
sucD	NP_904963.1	포르피로모나스 진지발리스
bphG	BAA03892.1	슈도모나스 스페시즈
adhE	AAV66076.1	류코노스톡 메센테로이데스

[0079]

아실-CoA를 그의 상응하는 알데하이드로 전환시키는 추가의 효소 유형은 말로닐-CoA를 말로닉 세미알데하이드로 형질전환시키는 말로닐-CoA 리덕타제이다. 말로닐-CoA 리덕타제는 호열호산성 고세균에서 3-하이드록시프로피오네이트 주기를 통한 독립영양성 탄소 고정에 핵심 효소이다(Berg et al. Science 318:1782-1786(2007); Thauer Science 318:1732-1733(2007)). 상기 효소는 보조인자로서 NADPH를 이용하며 메탈로스파에라(*Metallosphaera*) 및 설포르부스 스페시즈(*Sulfolobus spp*)에서 특성화되었다(상기 Alber et al.; Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002)). 상기 효소는 메탈로스파에라 세둘라(*sedula*)에서 Msed\_0709에 의해 암호화된다(상기 Alber et al.; 상기 Berg et al.). 설포르부스 토크다이어(*tokodai*)로부터의 말로닐-CoA 리덕타제를 암호화하는 유전자가 클로닝되었으며 이 콜라이에서 이종 발현되었다(상기 Alber et al.). 상기 효소는 또한 메틸말로닐-CoA의 그의 상응하는 알데하이드로의 전환을 촉매화하는 것으로 입증되었다. 이들 효소의 알데하이드 데하이드로게나제 작용성이 클로로플렉수스 아우란티아쿠스로부터의 이작용성 데하이드로게나제와 유사하지만, 서열 유사성은 거의 없다. 상기 두 말로닐-CoA 리덕타제 효소들은 모두 아스파테이트-4-포스페이트의 아스파테이트 세미알데하이드로의 환원 및 동시적인 탈인산화를 촉매화하는 효소인 아스파테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제와 높은 서열 유사성을 갖는다. 추가적인 유전자들을 설포르부스 솔파타리쿠스(*solfataricus*) 및 설포르부스 애시도칼다리우스(*acidocaldarius*)를 포함한 다른 유기체들 중의 단백질들에 대한 서열 상동성에 의해 발견할 수 있으며 이들은 하기에 나열되었다. CoA-아실화 알데하이드 데하이드로게나제에 대한 더욱 또 다른 효소는 클로스트리듐 베이제링키이로부터의 ald 유전자이다(Toth et al., Appl. Environ. Microbiol., 65:4973-4980(1999)). 상기 효소는 아세틸-CoA 및 부티릴-CoA를 그들의 상응하는 알데하이드로 환원시키는 것으로 보고되었다. 상기 유전자는 살모넬라 티피뮤리움(*typhimurium*) 및 이 콜라이의 아세틸알데하이드 데하이드로게나제를 암호화하는 eutE와 매우 유사하다(상기 Toth et al.). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 11에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 11

[0080]

MSED_0709	YP_001190808.1	메탈로스파에라 세둘라
mcr	NP_378167.1	설포르부스 토크다이어
asd-2	NP_343563.1	설포르부스 솔파타리쿠스
Saci_2370	YP_256941.1	설포르부스 애시도칼다리우스
Ald	AAT66436	클로스트리듐 베이제링키이
eutE	AAA80209	살모넬라 티피뮤리움
eutE	P77445	에스케리키아 콜라이

[0081]

도 1에 관하여, 단계 I는 크로토닐-CoA 리덕타제에 의한 크로토닐-CoA에서 부티릴-CoA로의 전환에 관한 것이고, 단계 S는 메트아크릴일-CoA 리덕타제에 의한 메트아크릴-CoA에서 아이소부티릴-CoA로의 전환에 관한 것이다. 에노일-CoA 리덕타제 효소는 상기 중 어느 한 단계를 수행할 수 있는 효소이다. 하나의 예시적인 에노일-CoA 리덕타제는 씨 아세토부틸리쿰(*C. acetobutylicum*)으로부터의 bcd의 유전자 산물(Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015-3024(1996); Atsumi et al., Metab. Eng(2007))이고, 이는 크로토닐-CoA의 부티릴-CoA로

의 환원을 자연적으로 촉매화한다. 상기 효소의 활성은, 전자 전달 플라보 단백질을 암호화하는 씨 아세트부틸리쿰 *etfAB* 유전자의 발현과 함께 *bcd*를 발현함으로써 향상될 수 있다. 상기 에노일-CoA 리덕타제 단계에 대한 추가의 효소는 이 그라실리스(*E. gracilis*)로부터의 미토콘드리아 에노일-CoA 리덕타제(Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338(2005))이다. 미토콘드리아 표적화 리더 서열의 제거에 따라 상기 서열로부터 유도된 구조물을 이 콜라이에 클로닝하여 활성 효소를 생성시켰다(상기 Hoffmeister et al.). 상기 접근법은 진핵생물 유전자, 특히 유전자 산물을 원핵생물 유기체 중에서 특정한 세포 내 구획에 표적화할 수 있는 리더 서열을 갖는 것들을 발현하는 분야의 숙련자들에게 널리 공지되어 있다. 원핵생물 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*)로부터의 상기 유전자의 밀접한 동족체 TDE0597은, 클로닝되고 이 콜라이에서 발현된 제 3의 에노일-CoA 리덕타제를 나타낸다(Tucci et al., FEBS Lett, 581:1561-1566(2007)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 12에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 12

[0082]

bcd	NP_349317.1	클로스트리듐 아세트부틸리쿰
etfA	NP_349315.1	클로스트리듐 아세트부틸리쿰
etfB	NP_349316.1	클로스트리듐 아세트부틸리쿰
TER	Q5EU90.1	유글레나 그라실리스
TDE0597	NP_971211.1	트레포네마 덴티콜라

[0083]

아이소부티릴-CoA 데하이드로게나제는 도 1의 단계 S에 대한 또 다른 효소이지만, 아이소부티릴-CoA에서 메트아크릴일-CoA로의 산화를 자연적으로 촉매화한다. 상기 결합된 기질의 존재 및 부재 하에서의 인간 아이소부티릴-CoA 데하이드로게나제의 결정 구조가 측정되었다(Battaile et al., J. Biol. Chem. 279:16526-16534(2004)). 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 및 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rhodospseudomonas palustris*)로부터의 추가적인 아이소부티릴-CoA 데하이드로게나제가 서열 유사성에 의해 추리될 수 있다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 13에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 13

[0084]

IBD	1RX0_A	호모 사피엔스
IBD	NP_080138.2	무스 무스쿨루스
RPA3448	NP_948787	로도슈도모나스 팔루스트리스

[0085]

더욱 추가의 효소는 광범위한  $\alpha, \beta$ -불포화된 카복실산 및 알데하이드의 NADH-의존성 환원을 촉매화하는 것으로 공지된 2-에노에이트 리덕타제(EC 1.3.1.31)를 포함한다(Rohdich et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787(2001)). 2-에노에이트 리덕타제는 씨 타이로부티리쿰(*C. tyrobutyricum*) 및 씨 씨모아세티쿰(*C. thermoacetikum*)(현재는 무어렐라 씨모아세티쿰(*Moorella thermoacetikum*)으로서 지칭됨)을 포함하여 클로스트리듐의 몇몇 종 중의 *enr*(Giesel, et al. Arch. Microbiol. 135:51-57(1983))에 의해 암호화된다(상기 Rohdich et al.). 씨 클루이베리(*C. kluveri*)의 최근에 공개된 게놈 서열에서 에노에이트 리덕타제에 대한 9 개의 암호화 서열들이 보고되었으며, 이들 중 하나가 특성화되었다(Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:2128-2133(2008)). 상기 두 씨 타이로부티리쿰 및 씨 씨모아세티쿰으로부터의 *enr* 유전자들이 클로닝되고 서열화되었으며 서로 59% 일치성을 나타낸다. 앞의 유전자가 또한 씨 클루이베리에서 특성화된 유전자와 대략 75% 유사성을 갖는 것으로 밝혀졌다(상기 Giesel et al.). 이러한 서열 결과를 근거로 *enr*은 이 콜라이 중의 다이에노일 CoA 리덕타제(*fadH*)와 매우 유사한 것으로 보고되었다(상기 Rohdich et al.). 상기 씨 씨모아세티쿰 *enr* 유전자는 이 콜라이에서 효소 활성 형태로 또한 발현되었다(상기 Rohdich et al.). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 14에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 14

[0086]

<i>fadH</i>	NP_417552.1	에스캐리키아 콜라이
<i>enr</i>	ACA54153.1	클로스트리듐 보툴리눔 A3 str

enr	CAA71086.1	클로스트리듐 타이로부틸리쿰
enr	CAA76083.1	클로스트리듐 클루이베리
enr	YP_430895.1	무어렐라 썬모아세티카

[0087] 도 1의 단계 E는 아세틸-CoA:아세토아세테이트-CoA 트랜스퍼라제 또는 유사한 트랜스퍼라제에 의한 아세토아세틸-CoA의 아세토아세테이트로의 전환에 관한 것이다. atoA(알파 서브유닛) 및 atoD(베타 서브유닛)에 의해 암호화되는 이 콜라이 효소(Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 33:902-908(1968)); Korolev et al., Acta Crystallagr. D Biol Crystallagr. 58:2116-2121(2002))(또한 아세테이트-CoA 트랜스퍼라제(EC 2.8.3.8)로도 공지됨)는 상기 정확한 형질전환을 촉매화하며 아이소부틸레이트(Matthies et al., Appl. Environ. Microbiol. 58:1435-1439(1992)), 발레레이트(상기 Vanderwinkel) 및 부타노에이트(상기 Vanderwinkel)를 포함하여, 다양한 분지 및 선형 아실-CoA 기질로부터 상기 CoA 부분을 아세테이트로 운반하는 것으로 또한 입증되었다. 유사한 효소들이 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032(Duncan et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:5186-5190(2002)), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(90) 및 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰(112) 중에 존재한다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 15에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 15

[0088]

atoA	P76459.1	에스케리키아 콜라이 K12
atoD	P76458.1	에스케리키아 콜라이 K12
actA	YP_226809.1	코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032
cg0592	YP_224801.1	코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032
ctfA	NP_149326.1	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
ctfB	NP_149327.1	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
ctfA	AAP42564.1	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰
ctfB	AAP42565.1	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰

[0089] 추가의 예시적인 트랜스퍼라제 형질전환들이 각각 숙시닐-CoA, 4-하이드록시부틸릴-CoA, 및 부틸릴-CoA 아세틸트랜스퍼라제 활성을 나타내는 것으로 입증된 클로스트리듐 클루이베리의 cat1, cat2 및 cat3의 유전자 산물에 의해 촉매화된다(Aberthart et al., J. Chem. Soc. 6:1404-1406(1979); Agnihotri et al. Med. Chem. 11:9-20(2003)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 16에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 16

[0090]

cat1	P38946.1	클로스트리듐 클루이베리
cat2	P38942.2	클로스트리듐 클루이베리
cat3	EDK35586.1	클로스트리듐 클루이베리

[0091] 혐기성 세균 애시드아미노코커스 페르멘탄스(*Acidaminococcus fermentans*)로부터의 글루타코네이트-CoA-트랜스퍼라제(EC 2.8.3.12) 효소는 이산 글루타코닐-CoA 및 3-부테노일-CoA와 반응한다(Mack et al., FEBS Lett. 405:209-212(1997)). 상기 효소를 암호화하는 유전자는 gctA 및 gctB이다. 상기 효소는 글루타릴-CoA, 2-하이드록시글루타릴-CoA, 아디필-CoA 및 아크릴일-CoA를 포함한 다른 CoA 유도체들을 환원시키지만 이들에 의해 검출 가능한 활성을 갖는다(상기 Buckel et al.). 상기 효소는 클로닝되고 이 콜라이에서 발현되었다(Mack et al., Eur. J. Biochem. 226:41-51(1994)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 17에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 17

[0092]

gctA	CAA57199.1	애시드아미노코커스 페르멘탄스
gctB	CAA57200.1	애시드아미노코커스 페르멘탄스

[0093] 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트로 전환시킬 수 있는 추가의 효소는 CoA 수용체로서 숙시네이트를 사용

하는 숙시닐-CoA:3-케토산 CoA 트랜스퍼라제를 포함한다. 예시적인 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제는 헬리코박터 파이로리(Corthesy-Theulaz et al., J. Biol. Chem. 272:25659-25667(1997)) 및 바실러스 서브틸리스(Stols et al., Protein. Expr. Purif. 53:396-403(2007)) 중에 존재한다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 18에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 18

HPAG1_0676	YP_627417	헬리코박터 파이로리
HPAG1_0677	YP_627418	헬리코박터 파이로리
ScoA	NP_391778	바실러스 서브틸리스
ScoB	NP_391777	바실러스 서브틸리스

[0094]

도 1의 단계 F는 아세트아세틸-CoA 하이드롤라제에 의한 아세트아세틸-CoA의 아세트아세테이트로의 전환에 관한 것이다. 상기와 같은 활성은 라투스 노르베기쿠스(Patel et al., Biochem. J. Biochem. J. 176:951-958(2978)), 보스 타우루스(*Bos taurus*)(Drummond et al., J. Biol. Chem. 235:318-325(1960)) 및 호모 사피엔스(Rous, Biochem. Biophys. Res. Commun. 69:74-78(1976))에서 검출되었지만, 상응하는 효소들을 암호화하는 유전자 서열들은 알려져 있지 않다. 몇몇 진핵생물 아세틸-CoA 하이드롤라제(EC 3.1.2.1)는 광범위한 기질 특이성을 가지며 따라서 아세트아세틸-CoA를 가수분해시키기에 적합한 효소를 나타낸다. 예를 들어, 라투스 노르베기쿠스 균주로부터의 효소, acot12(NP\_570103.1)(Robinson, Jr. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 71:959-965(1976))는 부티릴-CoA, 헥사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응할 수 있다.

[0095]

추가적인 하이드롤라제 효소는 발린 분해 중에 3-하이드록시아이소부티릴-CoA의 3-하이드록시아이소부티레이트로의 전환을 효율적으로 촉매화하는 것으로 개시된 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 라이드롤라제를 포함한다(Shimomura et al., J. Biol. Chem. 269:14248-14253(1994)). 상기 효소를 암호화하는 유전자는 라투스 노르베기쿠스(상기 Shimomura; Shimomura et al., 2000) 및 호모 사피엔스(Shimomura et al., Methods Enzymol. 324:229-240(2000))의 hibch를 포함한다. 서열 상동성에 의해 동정된 유전자는 사카로마이세스 세레비지아에의 hibch 및 바실러스 세레우스의 BC\_2292를 포함한다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 19에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

[0096]

표 19

hibch	Q5XIE6.2	라투스 노르베기쿠스
hibch	Q6NVY1.2	호모 사피엔스
hibch	P28817.2	사카로마이세스 세레비지아에
BC 2292	Q81DR3	바실러스 세레우스

[0097]

더욱 또 다른 하이드롤라제는 글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 수베릴-CoA, 세바실-CoA, 및 도데칸다이오일-CoA에 대한 활성을 나타내는 인간 다이카복실산 티오에스테라제, acot8(Westin et al., J. Biol. Chem. 280:38125-38132(2005)) 및 광범위한 CoA 티올에스터를 또한 가수분해할 수 있는 가장 가까운 이 콜라이 동족체, tesB(Naggert et al., J. Biol. Chem. 266:11044-11050(1991))이다. 유사한 효소가 또한 래트의 간에서 특성화되었다(Deana, Biochem. Int. 26:767-773(1992)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 20에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

[0098]

표 20

tesB	NP_414986	에스케리키아 콜라이
acot8	CAA15502	호모 사피엔스
acot8	NP_570112	라투스 노르베기쿠스

[0099]

다른 잠재적인 이 콜라이 티올에스터 하이드롤라제는 tesA(Bonner et al., J. Biol. Chem. 247:3123-3133(1972)), ybgC(Kuznetsova et al., FEMS Microbiol. Rev. 29:263-279(2005); Zhuang et al., FEBS Lett. 516:161-163(2002)), paaI(Song et al., J. Biol. Chem. 281:11028-11038(2006)) 및 ybdB(Leduc et al., J. Bacteriol. 189:7112-7126(2007))의 유전자 산물을 포함한다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서

[0100]

열과 관련된 데이터를 하기 표 21에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 21

[0101]

tesA	NP_415027	에스케리키아 콜라이
ybgC	NP_415264	에스케리키아 콜라이
paaI	NP_415914	에스케리키아 콜라이
ybdB	NP_415129	에스케리키아 콜라이

[0102]

도 1, 단계 G에서, 아세트아세테이트는 탈카복실화되어 아세톤을 형성한다. 상기 반응은 세균 용매발생에서의 역할에 대해 연구된 효소인 아세트아세테이트 데카복실라제(EC 4.1.1.4)에 의해 촉매화될 수 있다. 예시적인 세균 효소는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(Benner et al., J. Am. Chem. So. 103:993-994(1981); Highbarger et al., Biochemistry 35:41-46(1996); Petersen et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:3491-3498(1990); Rozzel et al. J. Am. Chem. Soc. 106:4937-4941(1984)) 및 클로스트리듐 베이제링키이(Ravagnani et al. Mol. Microbiol. 37:1172-1185(2000))로부터 특성화되었다. 아세트아세테이트 데카복실라제 활성은 또한 슈도모나스 푸티다 및 바실러스 폴리믹사(*polymyxa*)에서 입증되었으나 유전자들은 지금까지 상기 활성과 관련되지 않았다(Matiasek et al., Curr. Microbiol. 42:276-281(2001)). 다른 유기체, 예를 들어 클로스트리듐 보툴리눔(*botulinum*) 및 바실러스 아밀로리퀘파시엔스(*amyloliquefaciens*) FZB42 중의 세균 유전자들이 서열 상동성에 의해 동정될 수 있다. 인간 및 다른 포유동물에서, 아세트아세테이트 데카복실라제는 케톤-체 경로의 최종 단계를 촉매화하나(Kalapos, Biochim. Biophys. Acta 1621:122-139(2003)), 상기 활성과 관련된 유전자들은 지금까지 동정되지 않았다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 22에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 22

[0103]

adc	NP_149328.1	클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824
cbei_3835	YP_001310906.1	클로스트리듐 베이제링키이 NCIMB 8052
CLL_A2135	YP_001886324.1	클로스트리듐 보툴리눔
RBAM_030030	YP_001422565.1	바실러스 아밀로리퀘파시엔스 FZB42

[0104]

다른 예시적인 데카복실라제 효소는 피루베이트 데카복실라제(EC 4.1.1.1) 및 벤조일포메이트 데카복실라제(EC 4.1.1.7)를 포함한다. 피루베이트 데카복실라제(PDC)(또한 케토산 데카복실라제로 지칭됨)는 알콜 발효에 핵심 효소이며, 피루베이트의 아세트알데하이드로의 탈카복실화를 촉매화한다. 사카로마이세스 세레비지아에로부터의 효소는 2-케토부티레이트, 2-케토발레레이트, 3-하이드록시피루베이트 및 2-페닐피루베이트를 포함한 지방족 2-케토산에 대해 광범위한 기질 범위를 갖는다(Li et al., Biochemistry, 38:10004-10012(1999)). 상기 효소는 광범위하게 연구되어 왔으며, 변경된 활성에 대해 조작되었고, 이 콜라이에서 작용적으로 발현되었다(Killenberg-Jabs et al., Eur. J. Biochem., 268:1698-1704(2001); 상기 Li et al.; ter Schure et al., Appl. Environ. Microbiol., 64:1303-1307(1998)). pdc에 의해 암호화되는, 자이모모나스 모빌루스(*Zymomonas mobilus*)로부터의 PDC는 또한 광범위한 기질 범위를 가지며 상이한 기질들에 대한 친화성 변경에 지정된 공학 연구의 주제였다(Siegert et al., Protein Eng. Des. Sel., 18:345-357(2005)). 상기 효소의 결정 구조를 입수할 수 있다(상기 Killenberg-Jabs). 다른 잘-특성화된 PDC 효소는 아세트박터 파스퇴리안스(*Acetobacter pasteurians*)(Chandra et al., Arch. Microbiol. 176:443-451(2001)) 및 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)(Krieger et al., Eur. J. Biochem., 269:3256-3263(2002))로부터의 효소들을 포함한다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 23에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 23

[0105]

pdc	06672.1	자이모모나스 모빌루스
pdc1P06169		사카로마이세스 세레비지아에
pdc	Q8L388	세토박터 파스퇴리안스
pdc1	Q12629	루이베로마이세스 락티스

[0106] PDC처럼, 벤조일포메이트 데카복실라제(EC 4.1.1.7)는 광범위한 기질 범위를 가지며 효소 공학 연구의 표적이었다. 슈도모나스 푸티다(*putida*)로부터의 효소가 광범위하게 연구되어 왔으며 상기 효소의 결정 구조를 입수할 수 있다(Polovnikova et al., *Biochemistry* 42:1820-1830(2003); Hasson et al., *Biochemistry*, 37:9918-9930(1998)). 상기 슈도모나스 푸티다 효소의 활성 부위 중 2 개 잔사의 부위-지정된 돌연변이는 천연 및 비 천연 기질들의 친화성(Km)을 변경시켰다(Siegert et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 18:345-357(2005)). 상기 효소의 성질들은 지정된 공학에 의해 추가로 개질되었다(Lingen et al., *Chembiochem* 4:721-726(2003); Lingen et al., *Protein Eng.*, 15:585-593(2002)). md1C에 의해 암호화되는, 슈도모나스 아에루기노사로부터의 효소가 또한 실험적으로 특성화되었다(Barrowman et al., *FEMS Microbiol Letters*, 34:57-60(1986)). 슈도모나스 스투트제리(*stutzeri*), 슈도모나스 플루오레센스(*fluorescens*) 및 다른 유기체들로부터의 추가의 유전자들이 서열 상동성에 의해 추리되거나 또는 슈도모나스 푸티다에서 개발된 생육 선택 시스템을 사용하여 동정될 수 있다(Henning et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:7510-7512(2006)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 24에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 24

[0107] md1C	P20906.2	슈도모나스 푸티다
md1C	Q9HUR2.1	슈도모나스 아에루기노사
dpgB	ABN80423.1	슈도모나스 스투트제리
ilvB-1	YP_260581.1	슈도모나스 플루오레센스

[0108] 2-옥소산을 탈카복실화할 수 있는 세 번째 효소는 알파-케토글루타레이트 데카복실라제(KGD)이다. 상기 부류 효소의 기질 범위는 지금까지 연구되지 않았다. 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)로부터의 KDC(Tian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:10670-10675(2005))가 제노마티카(Genomata)에서 클로닝되었고 이 콜라이에서 작용적으로 발현되었다. KDC 효소 활성은 브라디리조븀 자포니쿰(*Bradyrhizobium japonicum*) 및 메소리조븀 로티(*Mesorhizobium loti*)를 포함한 리조비아의 몇몇 종들에서 검출되었다(Green et al., *J. Bacteriol.*, 182:2838-2844(2000)). 상기 KDC-암호화 유전자(들)가 이들 유기체에서 단리되지 않았지만, 게놈 서열을 입수할 수 있으며 각 게놈 중의 여러 유전자들이 추정적인 KDC로서 주석이 달린다. 유글레나 그라실리스(*Euglena gracilis*)로부터의 KDC가 또한 특성화되었으나 상기 활성과 관련된 유전자는 지금까지 동정되지 않았다(Shigeoka et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 288:22-28(1991)). 상기 N-말단으로부터 시작하여 처음 20 개 아미노산이 서열화되었다 MTYKAPVKDKVFLLDKVFVKV(상기 Shigeoka et al.). 상기 유전자는 KDC 활성에 대해 상기 N-말단 서열을 함유하는 유전자들을 시험함으로써 동정될 수 있다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 25에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 25

[0109] kgd	O50463.4	마이코박테리움 투베르쿨로시스
kgd	NP_767092.1	브라디리조븀 자포니쿰 USDA110
kgd	NP_105204.1	메소리조븀 로티

[0110] 3-하이드록시부티릴-CoA를 형성하는 크로토닐-CoA의 수화(단계 B, 도 1)는 크로토나제(EC 4.2.1.55)에 의해 촉매화된다. 상기 효소는 일부 유기체, 특히 클로스트리듐 종에서 n-부탄을 형성을 위한 경로의 일부이며, 또한 설포로부스, 애시디아누스, 및 메탈로스파에라 속의 호열호산성 고세균의 3-하이드록시프로피오네이트/4-하이드록시부티레이트 주기의 한 단계를 포함한다. 크로토나제 효소를 암호화하는 예시적인 유전자들을 썬 아세토부틸리쿰(Boynton et al., *J. Bacteriol.*, 178:3015-3024(1996)), 썬 클루이베리(Hillmer et al., *FEBS Lett.*, 21:351-354(1972)), 및 메탈로스파에라 세둘라(Berg et al., *Archaea. Science*. 318:1782-1786(2007))에서 발견할 수 있지만, 상기 나중 유전자의 서열은 알려져 있지 않다. 지방산 베타-산화 및/또는 다양한 아미노산들의 대사에 관련된 에노일-CoA 하이드라타제들이 또한 크로노닐-CoA의 수화를 촉매화하여 3-하이드록시부티릴-CoA를 형성시킬 수 있다(Agnihotri et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 11:9-20(2003); Conrad et al., *J. Bacteriol.* 118:103-111(1974)). 상기 피 푸티다의 에노일-CoA 하이드라타제, phaA 및 phaB는 페닐아세테이트 이화 작용 중에 이중 결합의 하이드록실화를 수행함을 보였다(Olivera et al., *Proc. Natl.*

Acad. Sci USA, 95:6419-6424(1998)). 피 플루오레센스로부터의 paaA 및 paaB는 유사한 형질전환을 촉매화한다(상기 Olivera et al.). 마지막으로, 다수의 에스케리키아 콜라이 유전자들이 maoC(Park et al., J. Bacteriol., 185:5391-5397(2003)), paaF(Ismail et al., Eur. J. Biochem., 270:3047-3054(2003); Park et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 113-116:335-346(2004); Park et al., Biotechnol Bioeng., 86:681-686(2004)) 및 paaG(상기 Ismail et al.; 상기 Park et al.; 상기 Park et al.)를 포함한 에노일-CoA 하이드라타제 작용기들을 나타내는 것으로 입증되었다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 26에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 26

[0111]

crt	NP_349318.1	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
crt1	YP_001393856	클로스트리듐 클루이베리 DSM 555
paaA	NP_745427.1	슈도모나스 플루오레센스
paaB	NP_745426.1	슈도모나스 플루오레센스
phaA	ABF82233.1	슈도모나스 푸티다
phaB	ABF82234.1	슈도모나스 푸티다
maoC	NP_415905.1	에스케리키아 콜라이
paaF	NP_415911.1	에스케리키아 콜라이
paaG	NP_415912.1	에스케리키아 콜라이

[0112]

한편으로, fadA 및 fadB의 이 콜라이 유전자 산물들이 에노일-CoA 하이드라타제 활성을 나타내는 지방산 산화에 관여하는 다중효소 복합체를 암호화한다(Haller et al., Biochemistry 39:4622-4629(2000); Martinez-Carrion et al., J. Biol. Chem. 240:3538-3546(1965); and Matthies et al., Appl. Environ. Microbiol. 58:1435-1439(1992)). fadR에 의해 암호화되는 음성 조절 인자의 녹아웃을 사용하여 상기 fadB 유전자 산물을 활성화시킬 수 있다(Jeng et al., Biochem. 13:2898-2903(1974)). 상기 fadI 및 fadJ 유전자는 유사한 작용들을 암호화하며 혐기성 조건 하에서 자연적으로 발현된다(Atsumi et al., Nature451:86-89(2008)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 27에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 27

[0113]

fadA	YP_026272.1	에스케리키아 콜라이
fadB	NP_418288.1	에스케리키아 콜라이
fadI	NP_416844.1	에스케리키아 콜라이
fadJ	NP_416843.1	에스케리키아 콜라이
fadR	NP_415705.1	에스케리키아 콜라이

[0114]

4-하이드록시부티릴-CoA의 크로토닐-CoA로의 가역적인 전환(단계 A, 도 1)은 이작용성 효소 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제/비닐아세틸-CoA Δ-아이소머라제에 의해 촉매화된다. 상기 효소는 먼저 4-하이드록시부티릴-CoA를 비닐아세틸-CoA로 탈수시키고, 이는 후속적으로 재배열되어 크로토노일-CoA를 형성한다. 클로스트리듐 클루이베리 및 씨 아미노부티리움으로부터의 효소들이 정제되고, 특성화되고, N-말단 도메인에서 서열화되었다(Scherf et al., Eur. J. Biochem., 215:421-429(1993); Scherf et al., Arch. Microbiol., 161:239-245(1994)). 씨 아미노부티리움(*C. aminobutyrium*) 및 씨 클루이베리로부터의 abfD 유전자는 상기 N-말단 아미노산 서열과 정확히 합치하며, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제/비닐아세틸-CoA Δ-아이소머라제 활성을 암호화하는 것으로 나타났다. 또한, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) ATCC 33277로부터의 abfD 유전자가 계놈 프로젝트로부터 상동성을 통해 동정된다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 27a에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

[0115] [표 27a]

abfD	YP_001396399.1	클로스트리듐 클루이베리 DSM 555
abfD	P55792	클로스트리듐 아미노부티리쿰
abfD	YP_001928843	포르피로모나스 진지발리스 ATCC 33277
Msed_1220	YP_001191305.1	메탈로스파에라 세둘라

[0116]

[0117]

3-하이드록시아이소부티릴-CoA에서 메트아크릴일-CoA로의 탈수(단계 R)는 가역적인 3-하이드록시아실-CoA 데하이드라타제, 예를 들어 크로토나제(또한 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, EC 4.2.1.55이라 지칭됨) 또는 에노일-CoA 하이드라타제(또한 3-하이드록시아실-CoA 데하이드라타제, EC 4.2.1.17이라 지칭됨)에 의해 수행될 수 있다. 이들 효소는 일반적으로 가역적이다(Moskowitz et al., Biochemistry 8:2748-2755(1969); Durre et al., FEMS Microbiol Rev 17:251-262(1995)). 예시적인 효소들을 상기에 나타낸다. 3-하이드록시아이소부티릴-CoA는 이들 효소의 천연 기질이 아니지만, 고유 기질인 3-하이드록시부티릴-CoA와 구조가 유사하다.

[0118]

도 1에 관하여, 단계 M은 부티릴-CoA의 탄소 주쇄를 아이소부티릴-CoA로 가역적으로 재배열하는 코발아민-의존성 메틸류타제인 아이소부티릴-CoA 류타제(ICM)에 의해 수행된다(Ratnatilleke et al., J Biol Chem 274:31679-31685(1999)). 상기와 같은 효소는 또한 도 1의 단계 Q에 의해 개시된, 4-하이드록시부티릴-CoA의 3-하이드록시아이소부티릴-CoA로의 전환을 촉매화하기에 적합하다. 이중이량체성 ICM을 암호화하는 유전자는 스트렙토마이세스 신나모넨시스(상기 Ratnatilleke et al.; Vrijbloed et al., J Bacteriol 181:5600-5606(1999); Zerbe-Burkhardt et al., J. Biol Chem 273:6508-6517(1988))의 icm 및 icmB를 포함한다. 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*avermililis*) MA-4680 중의 동종 유전자들이 동일하거나 유사한 형질전환을 촉매화하는 듯하다. 메틸리쿰(*Methylibium*) 페트롤에필룸 PM1으로부터의 상응하는 펩타이드 서열과 거의 100% 일치하는 β-프로테오박테리움 L108 중의 신규의 ICM-유사 효소가 2-하이드록시아이소부티릴-CoA를 3-하이드록시부티레이트로 전환시키는 것으로 나타났다(Rohwerder et al., Appl Environ Microbiol 72:4128-4135(2006)). 본 연구는 또한 80 번 위치에서 Ile에 의한 전형적인 ICM 효소(예를 들어 상기 Ratnatilleke et al.) 중의 Phe 잔기의 치환이 2-하이드록시아이소부티릴-CoA에 대한 활성을 책임지는 돌연변이들 중 하나일 수 있음을 가리킨다. 이는 고유 ICM 또는 ICM 유사 효소가 4-하이드록시부티릴-CoA의 3-하이드록시아이소부티릴-CoA로의 전환을 자연적으로 촉매화할 수 없는 경우, 그렇게 하도록 조작할 수 있음을 암시한다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 28에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 28

[0119]

icm	AAC08713.1	스트렙토마이세스 신나모넨시스
icmB	CAB59633.1	스트렙토마이세스 신나모넨시스
icmA	NP_824008.1	스트렙토마이세스 아베르미틸리스 MA-4680
icmB	NP_824637.1	스트렙토마이세스 아베르미틸리스 MA-4680
Mpe_B0538	YP_001023543.1	메틸리쿰 페트롤에필룸 PM1
Mpe_B0541	YP_001023546.1	메틸리쿰 페트롤에필룸 PM1

[0120]

메틸말로닐-CoA 류타제(MCM) 효소들은 도 3의 단계 P 또는 T에 의해 개시된 형질전환을 촉매화하기 위한 추가의 적합한 부류의 효소들을 나타내나, 단 상기 효소들은 각각 부티릴-CoA 또는 4-하이드록시부티릴-CoA에 대한 활성을 나타내거나 활성을 나타내도록 조작될 수 있다. MCM은 숙시닐-CoA의 메틸말로닐-CoA로의 전환을 자연적으로 촉매화한다. 이 콜라이에서, 상기 가역적인 아데노실코발아민-의존성 류타제는 3 단계 경로에 참여하여 숙시네이트의 프로피오네이트로의 전환을 이끈다(Haller et al., Biochemistry. 39:4622-4629(2000)). MCM은 에스케리키아 콜라이 중의 유전자 scpA(상기 Haller et al.; Bobik et al., Anal Bioanal Chem 375:344-349(2003) 및 호모 사피엔스 중의 mutA(Padovani et al., Biochemistry 45:9300-9306(2006))에 의해 암호화된다. 몇몇 다른 유기체들에서 MCM은 알파 및 베타 서브유닛을 함유하며 2 개의 유전자에 의해 암호화된다. 상기 두 서브유닛 단백질들을 암호화하는 예시적인 유전자는 프로피오니박테리움 프레텐레이키이 스페이즈 셰르마니(*Propionibacterium fredenreichii sp. shermani*) mutA 및 mutB 및 메틸로박테리움 엑스토쿠엔

스(*Methylobacterium extorquens*) mcmA 및 mcmB이다(Korotkova et al., J Biol Chem. 279:13652-13658(2004)). 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 29에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 29

[0121]

scpA	NP_417392.1	에스케리키아 콜라이 K12
mutA	P22033.3	호모 사피엔스
mutA	P11652.3	프로피오니박테리움 프레텐레이키이 스페시즈 셰르마니이
mutB	P11653.3	프로피오니박테리움 프레텐레이키이 스페시즈 셰르마니이
mcmA	Q84FZ1	메틸로박테리움 엑스토쿠엔스
mcmB	Q6TMA2	메틸로박테리움 엑스토쿠엔스

[0122]

이들 서열을 사용하여 서열 유사성 탐색(예를 들어 BLASTp)을 통해 진뱅크 또는 다른 데이터베이스에서 동종 단백질들을 동정할 수 있다. 상기 생성되는 동종 단백질 및 그의 상응하는 유전자 서열은 이 콜라이 또는 다른 적합한 숙주 미생물 내로의 형질전환을 위한 추가적인 외래 DNA 서열을 제공하여 생산 숙주를 생성시킨다. 추가의 유전자들은 하기를 포함하며, 이들은 상기 이 콜라이 scpA 유전자 산물에 대한 높은 상동성을 근거로 동정되었다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 30에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 30

[0123]

sbm	NP_838397.1	시젤라 플렉스네리
SARI_04585	ABX24358.1	살모넬라 엔테리카
YfreA_01000861	ZP_00830776.1	예르시니아 프레데릭세니이

[0124]

상기 메틸말로닐-CoA 뮤타제 촉매 유전자에 인접한 유전자들이 최대 활성에 기여한다는 증거가 존재한다. 예를 들어, 엠 엑스토쿠엔스로부터의 meaB 유전자는 메틸말로닐-CoA 뮤타제와 복합체를 형성하고, 시험관 내 뮤타제 활성을 자극하며, 가능하게는 상기 복합체를 비가역적인 불활성화로부터 보호하는 것으로 나타났다(상기 Korotkova et al.). 상기 엠 엑스토쿠엔스 meaB 유전자 산물은 염색체 상의 scpA에 인접한 이 콜라이 argK 유전자의 산물과 매우 유사하다(BLASTp: 45% 일치성, e-값: 4e-67). 피 프레우덴라이키이 종의 meaB 동족체에 대한 서열은 진뱅크에 분류되어 있지 않다. 그러나, 프로피오니박테리움 에크네스(*acnes*) KPA171202 유전자 산물, YP\_055310.1은 상기 엠 엑스토쿠엔스 meaB 단백질과 51% 동일하며 그의 유전자는 또한 상기 염색체 상의 메틸말로닐-CoA 뮤타제 유전자에 인접한다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 31에 나타난 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 31

[0125]

argK	AAC75955.1	에스케리키아 콜라이 K12
PPA0597	YP_055310.1	프로피오니박테리움 에크네스 KPA171202
meaB	2QM8_B	메틸로박테리움 엑스토쿠엔스

[0126]

이 콜라이는 중간체 코빈아미드 또는 코발아민과 함께 공급될 때 상기 반응에 대한 필수 보조인자인 아데노실코발아민을 합성할 수 있다(Lawrence et al., J Bacteriol 177:6371-6380(1995); Lawrence et al., Genetics 142:11-24(1996)). 한편으로, 코발아민을 드 노보 합성하는 능력은 이중 유전자의 발현에 따라 이 콜라이에 부여되었다(Raux et al, J Bacteriol 178:753-767(1996)).

[0127]

도 1의 단계 D는 아세트아세틸-CoA의 아세트아세테이트로의 전환을 촉매화하는 산-티올 리가제에 관한 것이다. 예시적인 산-티올 리가제는 생체 내에서 가역적인 반응인, 하나의 ATP 소비와 동반하여 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA의 형성을 촉매화하는 이 콜라이의 sucCD에 의해 암호화되는 효소이다(Buck et al., Biochemistry 24:6245-6252(1985)). 추가의 효소는 아세트아세테이트의 아세트아세틸-CoA로의 ATP-의존성 전환을 자연적으로 촉매화하는 무스 무스쿨루스(Hasegawa et al., Biochim Biophys Acta 1779:414-419(2008))

및 호모 사피엔스(Ohgami et al., Biochem Pharmacol 65:989-994(2003))로부터의 아세토아세틸-CoA 신시타제이다. 상기와 같은 효소는 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트로 전환시킬 수 있으며 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 활성을 나타낸다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 32에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 32

[0128]

sucC	NP_415256.1	에스케리키아 콜라이
sucD	AAC73823.1	에스케리키아 콜라이
AACS	NP_084486.1	무스 무스쿨루스
AACS	NP_076417.2	호모 사피엔스

[0129]

ADP-형성 아세틸-CoA 신시타제(ACD, EC 6.2.1.13)는 아실-CoA 에스터의 그의 상응하는 산으로의 전환을 ATP의 동시적인 합성과 결합시키는 또 다른 효소이다. 상기 효소는 기질로서 아세토아세틸-CoA와 반응하는 것으로 나타나지는 않았지만, 넓은 기질 특이성을 갖는 몇몇 효소들이 문헌에 개시되었다. AF1211에 의해 암호화되는, 알카에오글로부스 풀기두스(*Archaeoglobus fulgidus*)로부터의 ACDI은 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 아이소부티레이트, 아이소발레레이트, 숙시네이트, 퓨마레이트, 페닐아세테이트, 인돌아세테이트를 포함한 다양한 선형 및 분지쇄 기질들 상에서 작용하는 것으로 나타났다(Musfeldt et al., J Bacteriol 184:636-644(2002)). 할로알콜라 마리스몰투이(*Haloarcula marismortui*)로부터의 효소(숙시닐-CoA 신시타제로서 주석이 달린다)는 기질로서 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지쇄 산(아이소발레레이트 및 아이소부티레이트)을 수용하고, 순 방향 및 역방향으로 작용하는 것으로 나타났다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004)). 초고온성 크레나카에온 피로바쿨룸 아에로필룸(*Pyrobaculum aerophilum*)으로부터의 PAE3250에 의해 암호화된 ACD는 모든 특성화된 ACD 중 가장 넓은 기질 범위를 보였으며, 아세틸-CoA, 아이소부티릴-CoA(바람직한 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응하였다(상기 Brasen et al.). 에이 풀기두스, 에이치 마리스몰투이 및 피 아에로필룸으로부터의 효소들이 모두 클로닝되었으며, 작용적으로 발현되었고, 이 콜라이에서 특성화되었다(상기 Musfeldt et al.; 상기 Brasen et al.). 도 1의 단계 D에 의해 묘사된 전체 형질전환이 또한 2 개의 효소, 예를 들어 아세테이트 키나제 및 포스포트랜스아세틸라제 또는 부티레이트 키나제 및 포스포트랜스부티릴라제에 의해 수행될 수 있다. 이들 예시적인 유전자 산물들 각각에 대한 서열과 관련된 데이터를 하기 표 33에 나타낸 진뱅크 수납 번호를 사용하여 찾을 수 있다.

표 33

[0130]

AF1211	NP_070039.1	알카에오글로부스 풀기두스 DSM 4304
sca	YP_135572.1	할로알콜라 마리스몰투이 ATCC 43049
PAE3250	NP_560604.1	피로바쿨룸 아에로필룸 str IM2

[0131]

4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 fumA, fumB, fumC, fumH, fumI, MmcB, MmcC, hmd, BACCAP\_02294, ANACOL\_02527, NtherDRAFT\_2368, dmdA, dmdB, crt, crt1, paaA, paaB, phaA, phaB, maoC, paaF, paaG, abfD 및 Msed\_1220으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제는 abfD에 의해 암호화된다.

[0132]

4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 fumA, fumB, fumC, fumH, fumI, MmcB, MmcC, hmd, BACCAP\_02294, ANACOL\_02527, NtherDRAFT\_2368, dmdA, dmdB, crt, crt1, paaA, paaB, phaA, phaB, maoC, paaF, paaG, abfD 및 Msed\_1220으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 크로토나제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 크로토나제는 crt, crt1, paaA, paaB, phaA, phaB, maoC, paaF 및 paaG로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.

[0133]

4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 thrA, akthr2, hom6, hom1, hom2, fadB, fadJ, Hbd2, Hbd1, hbd, HSD17B10, phbB, phaB, Msed\_1423, Msed\_0399, Msed\_0389, Msed\_1993, adh, adhA, adh-A, mdh, ldhA, ldh 및 bdh로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 3-

하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제는 hbd, Hbd2, Hbd1, Msed\_1423, Msed\_0399, Msed\_0389, Msed\_1993, fadB 및 fadJ로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.

- [0134] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 sucC, sucD, AACS, AF1211, scs, 및 PAE3250으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된 아세트아세틸-CoA 신시타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 아세트아세틸-CoA 신시타제는 sucC, sucD, AACS 및 AF1211로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.
- [0135] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 atoA, atoD, actA, cg0592, ctfA, ctfB, cat1, cat2, cat3, gctA, gctB, HPAG1\_0676, HPAG1\_0677, ScoA, 및 ScoB로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된 아세트아세틸-CoA:아세트아세테이트-CoA 트랜스퍼라제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 아세트-CoA:아세트아세테이트-CoA 트랜스퍼라제는 atoA, atoD, actA, cg0592, ctfA, ctfB, HPAG1\_0676, HPAG1\_0677, ScoA, 및 ScoB로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.
- [0136] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 acot12, hibch, BC\_2292, tesB, acot8, tesA, ybgC, paaI 및 ybdB로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된 아세트아세틸-CoA 하이드롤라제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 아세트아세틸-CoA 하이드롤라제는 acot12, hibch 및 tesA로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.
- [0137] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 pdc, pdc1, md1C, dpdB, ilvB-1, kgd, kdcA, lysA, panD, dmpH, dmpE, xylII, xylIII, Reut\_B5691, Reut\_B5692, CAD, pad1, pofK(pad), padC, 및 pad로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된 아세트아세테이트 데카복실라제를 포함할 수 있다. 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 또한 Adc, cbei\_3835, CLL\_A2135, RBAM\_030030으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된 아세트아세테이트 데카복실라제를 포함할 수 있다.
- [0138] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 thrA, akthr2, hom6, hom1, hom2, fadB, fadJ, Hbd2, Hbd1, hbd, HSD17B10, phbB, phaB, Msed\_1423, Msed\_0399, Msed\_0389, Msed\_1993, adh, adhA, adh-A, mdh, ldhA, ldh 및 bdh로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 아세톤 리덕타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 아세톤 리덕타제는 adh, adhA 및 adh-A로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.
- [0139] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 n-부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 fumA, fumB, fumC, fumH, fumI, MmcB, MmcC, hmd, BACCAP\_02294, ANACOL\_02527, NtherDRAFT\_2368, dmdA, dmdB, crt, crt1, paaA, paaB, phaA, phaB, maoC, paaF, paaG, abfD 및 Msed\_1220으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제는 abfD에 의해 암호화된다.
- [0140] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 n-부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 bcd, etfA, etfB, Ter, TDE0597, IBD, RPA3448, FadH 및 enr로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 크로토노일-CoA 리덕타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 크로토노일-CoA 리덕타제는 bcd, etfA, etfB, Ter 및 TDE0597에 의해 암호화된다.
- [0141] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 n-부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 acr1, sucD, bphG, adhE, Msed\_0709, mcr, asd-2, Saci\_2370, Ald 및 eutE로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)는 sucD, bphG, Msed\_0709, mcr 및 Ald로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.
- [0142] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 n-부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 alrA, ADH2, yqhD, bdhI, bdhII, adhA, 4hbd, adhI, P84067, mmsb, dhat 및 3hidh로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된 부티르알데하이드 리덕타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 부티르알데하이드 리덕타제는 alrA, ADH2, yqhD, bdhI, bdhII, 4hbd, adhI, 및 mmsb로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.
- [0143] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 n-부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 adhE, adhE2, mcr,

Rcas\_2929, NAPI\_02720, MGP2080\_00535, 및 FAR로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)는 adhE2, mcr 및 FAR로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.

[0144] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 fumA, fumB, fumC, fumH, fumI, MmcB, MmcC, hmd, BACCAP\_02294, ANACOL\_02527, NtherDRAFT\_2368, dmdA, dmdB, crt, crt1, paaA, paaB, phaA, phaB, maoC, paaF, paaG, abfD 및 Msed\_1220으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제는 crt, crt1, paaA, paaB, phaA, phaB, maoC, paaF 및 paaG에 의해 암호화된다.

[0145] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 bcd, etfA, etfB, Ter, TDE0597, IBD, RPA3448, FadH 및 enr로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 크로토노일-CoA 리덕타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 크로토노일-CoA 리덕타제는 bcd, etfA, etfB, Ter 및 TDE0597에 의해 암호화된다.

[0146] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 icm, icmB, icmA, Mpe\_B0538, Mpe\_B0541, scpA, mutA, mutB, mcmA, mcmB, sbm, SARI\_04585, YfreA\_01000861, argK, PPA0597, 및 meaB로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 아이소부티릴-CoA 뮤타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 아이소부티릴-CoA 뮤타제는 icmB, icmA, Mpe\_B0538 및 Mpe\_B0541로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.

[0147] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 icm, icmB, icmA, Mpe\_B0538, Mpe\_B0541, scpA, mutA, mutB, mcmA, mcmB, sbm, SARI\_04585, YfreA\_01000861, argK, PPA0597, 및 meaB로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제는 icmB, icmA, Mpe\_B0538 및 Mpe\_B0541로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.

[0148] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 fumA, fumB, fumC, fumH, fumI, MmcB, MmcC, hmd, BACCAP\_02294, ANACOL\_02527, NtherDRAFT\_2368, dmdA, dmdB, crt, crt1, paaA, paaB, phaA, phaB, maoC, paaF, paaG, abfD 및 Msed\_1220으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제는 crt, crt1, paaA, paaB, phaA, phaB, maoC, paaF 및 paaG에 의해 암호화된다.

[0149] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 bcd, etfA, etfB, Ter, TDE0597, IBD, RPA3448, FadH 및 enr로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 메트아크릴일-CoA 리덕타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 메트아크릴일-CoA 리덕타제는 bcd, etfA, etfB, Ter 및 TDE0597에 의해 암호화된다.

[0150] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 acr1, sucD, bphG, adhE, Msed\_0709, mcr, asd-2, Saci\_2370, Ald 및 eutE로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성)는 sucD, bphG, Msed\_0709, mcr 및 Ald로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.

[0151] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 alrA, ADH2, yqhD, bdhI, bdhII, adhA, 4hbd, adhI, P84067, mmsb, dhat 및 3hidh로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된 아이소부티르알데하이드 리덕타제를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 아이소부티르알데하이드 리덕타제는 alrA, ADH2, yqhD, bdhI, bdhII, 4hbd, adhI, P84067, 및 mmsb로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다.

[0152] 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물 유기체는 adhE, adhE2, mcr, Rcas\_2929, NAPI\_02720, MGP2080\_00535, 및 FAR로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화되는 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성)는 adhE2, mcr 및 FAR로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 유전자에 의해

암호화된다.

- [0153] 본 발명의 비 천연 미생물 유기체는 하나 이상의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로에 관여하는 효소 또는 단백질 중 하나 이상을 암호화하는 발현 가능한 핵산을 도입시킴으로써 생성시킬 수 있다. 생합성에 대해 선택된 숙주 미생물 유기체에 따라, 특정 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로 중 일부 또는 전체에 대한 핵산을 발현시킬 수 있다. 예를 들어, 선택된 숙주가 목적하는 생합성 경로에 대해 하나 이상의 효소 또는 단백질이 결핍된 경우, 상기 결핍된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대해 발현 가능한 핵산을 후속의 외래 발현을 위해 상기 숙주에 도입시킨다. 한편으로, 상기 선택된 숙주가 일부 경로 유전자들의 내생적인 발현을 나타내지만 다른 것들은 결핍된 경우, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성을 성취하기 위해 상기 결핍 효소(들) 또는 단백질(들)에 대해 암호화 핵산이 필요하다. 따라서, 본 발명의 비 천연 미생물 유기체를, 목적하는 생합성 경로를 획득하기 위해 외래 효소 또는 단백질 활성을 도입시킴으로써 생성시키거나, 또는 하나 이상의 내생적인 효소 또는 단백질과 함께 목적하는 생성물, 예를 들어 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 생산하는 하나 이상의 외래 효소 또는 단백질 활성을 도입시킴으로써 목적하는 생합성 경로를 획득할 수 있다.
- [0154] 선택된 숙주 미생물 유기체의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로 구성성분들에 따라, 본 발명의 비 천연 미생물 유기체는 하나 이상의 외부적으로 발현된 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로-암호화 핵산 내지 하나 이상의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로에 대한 암호화 핵산 전체를 포함할 것이다. 예를 들어, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성을, 상응하는 암호화 핵산의 외부 발현을 통해 경로 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에 확립시킬 수 있다. 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로의 모든 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에서, 상기 경로 중의 모든 효소 또는 단백질의 외부 발현을 포함할 수 있지만, 상기 숙주가 경로 효소 또는 단백질 중 하나 이상을 함유한다 하더라도 상기 경로의 모든 효소 또는 단백질이 발현될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생산 경로 중의 모든 효소 또는 단백질의 외부 발현을 포함할 수 있다.
- [0155] 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 발현 가능한 형태로 도입되는 암호화 핵산의 수가 적어도 상기 선택된 숙주 미생물 유기체의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 결핍에 필적할 것임을 알 것이다. 따라서, 본 발명의 비 천연 미생물 유기체는 본 발명에 개시된 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로를 구성하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 1, 2, 3, 4, 5, 전체 이하 핵산을 가질 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 비 천연 미생물 유기체는 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성을 촉진 또는 최적화하거나, 또는 상기 숙주 미생물 유기체에 다른 유용한 작용들을 부여하는 다른 유전자 변형을 또한 포함할 수 있다. 하나의 상기와 같은 다른 작용성은 예를 들어 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 전구체, 예를 들어 아세틸-CoA 중 하나 이상의 합성의 증대를 포함할 수 있다.
- [0156] 일반적으로, 숙주 미생물 유기체는 상기 유기체가 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로의 전구체를, 자연적으로 생성된 분자로서 또는 목적하는 전구체의 드 노보 생산을 제공하거나 또는 상기 숙주 미생물 유기체에 의해 자연적으로 생산된 전구체의 증가된 생산을 제공하도록 조작된 생성물로서 생산하도록 선택된다. 예를 들어, 아세틸-CoA는 이 콜라이와 같은 숙주 유기체에서 자연적으로 생산된다. 숙주 유기체를 본 발명에 개시된 바와 같이, 전구체의 생산을 증가하도록 조작할 수 있다. 또한, 목적하는 전구체를 생산하도록 조작된 미생물 유기체를 숙주 유기체로서 사용하고 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로의 효소 또는 단백질을 발현하도록 추가로 조작할 수 있다.
- [0157] 일부 실시태양에서, 본 발명의 비 천연 미생물 유기체는 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 합성하는 효소적 능력을 함유하는 숙주로부터 생성된다. 상기 특정한 실시태양에서, 예를 들어 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 반응이 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생산을 향하도록 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 생성물의 합성 또는 축적을 증가시키는 것이 유용할 수 있다. 증가된 합성 또는 축적을 예를 들어 상술한 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 효소 또는 단백질 중 하나 이상을 암호화하는 핵산의 과발현에 의해 수행할 수 있다. 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로의 효소 또는 효소들 및/또는 단백질 또는 단백질들의 과발현은 예를 들어 내생적인 유전자 또는 유전자들의 외부 발현을 통해서, 또는 이중 유전자 또는 유전자들의 외부 발현을 통해서 일어날 수 있다. 따라서, 천연 유기체를, 본 발명의 비 천연 미생물 유기체, 예를 들어 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로 효소 또는 단백질을 암호화하는 1, 2, 3, 4, 5, 즉 전체

이하의 핵산의 과발현을 통해 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 생산하는 유기체가 되도록 쉽게 생성시킬 수 있다. 또한, 비 천연 유기체를 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로 효소의 활성을 증가시키는 내생 유전자의 돌연변이에 의해 생성시킬 수 있다.

[0158] 특히 유용한 실시태양에서, 상기 암호화 핵산의 외부 발현을 사용한다. 외부 발현은 상기 발현 및/또는 조절 요소를 상기 숙주 및 용도의 주문에 맞추어 사용자에게 의해 조절되는 목적하는 발현 수준을 성취하는 능력을 부여한다. 그러나, 내생적인 발현은 또한 예를 들어 유도 프로모터 또는 다른 조절 요소에 결합 시 상기 유전자의 프로모터의 음의 조절 효과기 또는 유도를 제거함으로써 다른 실시태양들에도 사용될 수 있다. 따라서, 천연 유도 프로모터를 갖는 내생 유전자를 적합한 유도체의 제공에 의해 상향 조절하거나, 또는 내생 유전자의 조절 부위를 유도 조절 요소를 통합하도록 조작할 수 있으며, 이에 의해 목적하는 시기에 내생 유전자의 증가된 발현의 조절을 허용할 수 있다. 유사하게, 유도 프로모터를 비 천연 미생물 유기체 내에 도입된 외래 유전자에 대한 조절 요소로서 포함할 수 있다.

[0159] 본 발명의 방법에서, 상기 하나 이상의 외래 핵산 중 어느 것이든 미생물 유기체에 도입시켜 본 발명의 비 천연 미생물 유기체를 생산시킬 수 있는 것으로 생각된다. 상기 핵산을 예를 들어 상기 미생물 유기체에 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로가 부여되도록 도입시킬 수 있다. 한편으로, 암호화 핵산을 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 능력을 부여하도록 상기 필요한 반응들 중 일부를 촉매화하는 생합성 능력을 갖는 중간 미생물 유기체를 생산하도록 도입시킬 수 있다. 예를 들어, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로를 갖는 비 천연 미생물 유기체는 목적하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 2 개 이상의 외래 핵산을 포함할 수 있다. 따라서 생합성 경로의 2 개 이상의 효소 또는 단백질의 임의의 조합을 본 발명의 비 천연 미생물 유기체에 포함시킬 수 있는 것으로 생각된다. 유사하게, 경우에 따라, 목적하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 상응하는 목적하는 생성물을 생성시키는 한, 생합성 경로의 3 개 이상의 효소 또는 단백질의 임의의 조합을 본 발명의 비 천연 미생물 유기체 등에 포함시킬 수 있는 것으로 생각된다. 유사하게, 경우에 따라, 목적하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 상응하는 목적하는 생성물을 생성시키는 한, 본 발명에 개시된 바와 같은 생합성 경로의 4 개 이상의 효소 또는 단백질의 임의의 조합을 본 발명의 비 천연 미생물 유기체에 포함시킬 수 있다.

[0160] 본 발명에 개시된 바와 같은 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생합성 이외에, 본 발명의 비 천연 미생물 유기체 및 방법을 또한 서로 및 다른 경로들에 의해 생성물 생합성을 성취하기 위해 당해 분야에 널리 공지된 다른 미생물 유기체 및 방법들과 다양한 조합으로 사용할 수 있다. 예를 들어 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생산자의 사용 이외에 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 생산하는 한 가지 대안은 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 중간체를 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올로 전환시킬 수 있는 또 다른 미생물 유기체의 첨가를 통해서이다. 한 가지 상기와 같은 과정은 예를 들어 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 중간체를 생산하는 미생물 유기체의 발효를 포함한다. 이어서 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 중간체를, 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 중간체를 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올로 전환시키는 두 번째 미생물 유기체에 대한 기질로서 사용할 수 있다. 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 중간체를 상기 두 번째 유기체의 또 다른 배양물에 직접 가하거나 또는 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 중간체 생산자의 원래 배양물을 예를 들어 세포 분리에 의해 상기 미생물 유기체에서 고갈시킬 수 있으며, 이어서 상기 두 번째 유기체의 발효 브로쓰에의 후속 첨가를 사용하여 중간 정제 단계 없이 최종 생성물을 생성시킬 수 있다.

[0161] 다른 실시태양에서, 본 발명의 비 천연 미생물 유기체 및 방법을 광범위하게 다양한 하위 경로들로 조립하여 예를 들어 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생합성을 성취할 수 있다. 이들 실시태양에서, 본 발명의 목적하는 생성물에 대한 생합성 경로들을 상이한 미생물 유기체들로 분리할 수 있으며, 상기 상이한 미생물 유기체들을 함께 배양하여 최종 생성물을 생산할 수 있다. 상기와 같은 생합성 설계에서, 한 미생물 유기체의 생성물은 상기 최종 생성물이 합성될 때까지 두 번째 미생물 유기체에 대한 기질이다. 예를 들어, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생합성을, 하나의 경로 중간체의 또 다른 경로 중간체 또는 생성물로의 전환에 대한 생합성 경로를 함유하는 미생물 유기체를 제작함으로써 수행할 수 있다. 한편으로, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 또한 동일한 용기에서 2 개의 유기체를 사용하여 공동 배양 또는 공동 발효를 통해 미생물 유기체들로부터 생합성적으로 생산할 수 있으며, 이때 첫 번째 미생물 유기체는 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 중간체를 생산하고 두 번째 미생물 유기체는 상기 중간체를 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올로 전환시킨다.

- [0162] 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 본 발명의 비 천연 미생물 유기체 및 방법들에 대해서, 다른 미생물 유기체, 하위 경로들을 갖는 다른 비 천연 미생물 유기체들의 공동 배양, 및 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 생성시키는 것으로 당해 분야에 널리 공지된 다른 화학적 및/또는 생화학적 과정들의 조합과 함께 광범위하게 다양한 조합 및 순열들이 존재함을 알 것이다.
- [0163] 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 효소 또는 단백질에 대한 암호화 핵산의 공급원은 예를 들어 상기 암호화된 유전자 산물이 기준 반응을 촉매화할 수 있는 임의의 종들을 포함할 수 있다. 상기와 같은 종들은 원핵 및 진핵 유기체 모두, 예를 들어 비 제한적으로 고세균 및 진정세균을 포함한 세균, 및 효모, 식물, 곤충, 동물, 및 인간을 포함한 포유동물을 포함한 진핵생물 유기체를 포함한다. 상기와 같은 공급원에 대한 예시적인 종은 예를 들어 에스케리키아 콜라이뿐만 아니라 본 발명에 개시되거나 상응하는 유전자에 대한 공급원 유기체로서 입수할 수 있는 다른 예시적인 종들을 포함한다. 그러나, 395 개 미생물 계능 및 다양한 효모, 진균, 식물 및 포유동물 계능을 포함하여, 현재 550 초과인 종들(이들 중 절반 이상을 NCBI와 같은 공개적인 데이터베이스 상에서 입수할 수 있다)에 대해 입수할 수 있는 완전한 계능 서열과 함께, 관련된 또는 떨어진 종들 중의 하나 이상의 유전자들에 대한 필수적인 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 활성을 암호화하는 유전자들의 동정, 예를 들어 공지된 유전자들의 상동 기관, 이종 상동체, 상동체 및 비 이종 상동성 유전자 치환, 및 유기체들 간의 유전자 변경의 교환은 통상적이며 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 따라서, 이 콜라이와 같은 특정 유기체에 관하여 본 발명에 개시된 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생합성을 가능하게 하는 대사적 변경을 다른 미생물들, 예를 들어 원핵생물 및 진핵생물 유기체에도 마찬가지로 쉽게 적용할 수 있다. 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 하나의 유기체에서 예시된 대사적 변경을 다른 유기체에도 동등하게 적용할 수 있음을 알 것이다.
- [0164] 일부 예에서, 예를 들어 대안적인 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로가 관련없는 종들에서 존재하는 경우, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성을, 예를 들어 유사하지만, 동일하지는 않은 대사 반응을 촉매화하는 상기 관련없는 종들로부터의 상동체 또는 상동체들의 외부 발현에 의해 숙주 종에 부여하여 상기 기준 반응을 대체할 수 있다. 대사 네트워크들 간에 어떤 차이가 상이한 유기체들 간에 존재하므로, 당해 분야의 숙련가들은 상이한 유기체들 간의 실제 유전자 사용이 상이할 수 있음을 알 것이다. 그러나, 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 또한 본 발명의 교시 및 방법을 본 발명에 예시된 것들과 동종의 대사 변경을 사용하는 모든 미생물 유기체들에 적용하여 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 합성하는 관심 종의 미생물 유기체를 제작할 수 있다.
- [0165] 숙주 미생물 유기체를 예를 들어 세균, 효모, 진균 또는 발효 공정에 적용할 수 있는 임의의 다양한 다른 미생물들 중에서 선택할 수 있으며 상기 비 천연 미생물 유기체를 이들 중에서 생성시킬 수 있다. 예시적인 세균은 에스케리키아 콜라이, 클렙시엘라 옥시토카, 아나에로비오스피릴럼 숙시니시프로듀센스 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 액티노바실러스 숙시노제네스(*Actinobacillus succinogenes*), 만헤이미아 숙시니시프로듀센스, 리조븀 에틀리(*etli*), 바실러스 서브틸리스, 코리네박테리움 글루타미쿰, 글루코노박터 옥시단스, 자이모모나스 모빌리스, 락토코커스 락티스, 락토바실러스 플라타룸, 스트렙토마이세스 코엘리콜로르(*coelicolor*), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 슈도모나스 플루오레센스, 및 슈도모나스 푸티다 중에서 선택된 종을 포함한다. 예시적인 효모 또는 진균은 사카로마이세스 세레비지아에, 시조사카로마이세스 폼베, 클루이베로마이세스 락티스, 클루이베로마이세스 마르시아누스(*marxianus*), 아스퍼질러스 테레우스(*terreus*), 아스퍼질러스 니거 및 피키아 파스토리스 중에서 선택된 종을 포함한다. 이 콜라이가 특히 유용한 숙주 유기체인데, 그 이유는 유전 공학에 적합한 널리 특성화된 미생물 유기체이기 때문이다. 다른 특히 유용한 유기체는 효모, 예를 들어 사카로마이세스 세레비지아에를 포함한다.
- [0166] 비 천연 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올-생산 숙주의 발현 수준을 구성하고 시험하기 위한 방법을 예를 들어 당해 분야에 널리 공지된 재조합체 및 검출 방법에 의해 수행할 수 있다. 상기와 같은 방법들은 예를 들어 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York(2001)] 및 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD(1999)]에 개시되어 있다.
- [0167] 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생산을 위한 경로에 관여하는 외부 핵산 서열들을 당해 분야에 널리 공지된 기법들, 예를 들어 비 제한적으로 접합, 일렉트로포레이션, 화학적 변환, 형질도입, 형질감염, 및 초음파 변환을 사용하여 숙주 세포에 안정하게 또는 일시적으로 도입시킬 수 있다. 이 콜라이 또는 다른 원핵 세포에서의 외부 발현을 위해서, 상기 유전자의 일부 핵산 서열 또는 진핵생물 핵산의 cDNA는 표적화 신호, 예를 들어 N-말단 미토콘드리아 또는 다른 표적화 신호를 암호화할 수 있으며, 상기 신호를 경

우에 따라 원핵생물 숙주 세포로의 형질전환 전에 제거할 수 있다. 예를 들어, 미토콘드리아 리더 서열의 제거로 이 콜라이에서의 발현이 증가되었다(Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338(2005)). 효모 또는 다른 진핵생물 세포에서의 외부 발현을 위해서, 유전자를 리더 서열의 첨가 없이 시토솔에서 발현시키거나, 또는 미토콘드리아 또는 다른 세포 소기관에 표적화하거나, 또는 적합한 표적화 서열, 예를 들어 미토콘드리아 표적화 또는 상기 숙주 세포에 적합한 분비 신호의 첨가에 의해 분비에 대해 표적화할 수 있다. 따라서, 표적화 서열의 제거 또는 포함을 위한 핵산 서열에 대한 적합한 변형을 외래 핵산 서열에 결합시켜 바람직한 성질들을 부여할 수 있을 것으로 생각된다. 더욱 또한, 유전자에 대해 당해 분야에 널리 공지된 기법으로 코돈 최적화를 수행하여 상기 단백질의 최적화된 발현을 성취할 수 있다.

[0168] 숙주 유기체 중에서 작용성인 발현 조절 서열에 작동적으로 결합된, 본 발명에 예시된 바와 같은 핵산을 암호화하는 하나 이상의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로를 포함하는 발현 벡터 또는 벡터들을 제작할 수 있다. 본 발명의 미생물 숙주 유기체에 사용하기에 적용 가능한 발현 벡터는 예를 들어 플라스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜 및 인공 염색체, 예를 들어 숙주 염색체 내로의 안정적인 통합을 위해 작동 가능한 벡터 및 선택 서열 또는 마커를 포함한다. 또한, 상기 발현 벡터는 하나 이상의 선택성 마커 유전자 및 적합한 발현 조절 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어 항생제 또는 독소에 대한 내성, 상보성 영양요구성 결핍, 또는 배양 배지 중에 없는 결정적인 영양소를 제공하는 선택성 마커 유전자가 또한 포함될 수 있다. 발현 조절 서열은 당해 분야에 널리 공지된 구성 및 유도 프로모터, 전사 증진인자, 전사 종결자 등을 포함할 수 있다. 2 개 이상의 외래 암호화 핵산을 공동 발현시켜야 하는 경우, 상기 두 핵산을 모두 예를 들어 단일 발현 벡터 또는 별도의 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 단일 벡터 발현의 경우, 상기 암호화 핵산을 하나의 공통 발현 조절 서열에 작동적으로 결합시키거나 또는 상이한 발현 조절 서열, 예를 들어 하나의 유도 프로모터 및 하나의 구성 프로모터에 결합시킬 수 있다. 대사 또는 합성 경로에 관여하는 외래 핵산 서열의 형질전환을 당해 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 확인할 수 있다. 상기와 같은 방법은 예를 들어 핵산 분석, 예를 들어 mRNA의 노던 블롯 또는 폴리머라제 쉐 반응(PCR) 증폭, 또는 유전자 산물의 발현에 대한 면역블롯팅, 또는 도입된 핵산 서열 또는 그의 상응하는 유전자 산물의 발현을 시험하기 위한 다른 적합한 분석 방법을 포함한다. 당해 분야의 숙련가들은 상기 외래 핵산이 목적하는 생성물을 생산하기에 충분한 양으로 발현됨을 알 것이며, 발현 수준을 당해 분야에 널리 공지되고 본 발명에 개시된 바와 같은 방법을 사용하여 충분한 발현이 획득되도록 최적화할 수 있음을 또한 알 것이다.

[0169] 본 발명은 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생산에 충분한 시간 및 조건 하에서 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로를 완성하는 효소를 암호화하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 전체 이하의 외래 핵산을 포함하는 유기체를 포함한, 본 발명에 개시된 비 천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생산 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 비 천연 미생물 유기체의 배양을 실질적으로 혐기성 배양 배지 중에서 수행할 수 있다.

[0170] 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생산을 시험하기에 적합한 정제 및/또는 분석을 널리 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 3종 배양물과 같은 적합한 복제물을 시험되는 각각의 조작된 균주에 대해 생육시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 조작된 생산 숙주 중의 생성물 및 부산물 형성을 모니터링할 수 있다. 최종 생성물 및 중간체, 및 다른 유기 화합물들을 HPLC(고성능 액체 크로마토그래피), GC-MS(기체 크로마토그래피-질량 분광학) 및 LC-MS(액체 크로마토그래피-질량 분광학) 또는 당해 분야에 널리 공지된 통상적인 과정을 사용하는 다른 적합한 분석 방법에 의해 분석할 수 있다. 발효 브로쓰 중의 생성물의 방출을 또한 배양 상등액을 사용하여 시험할 수 있다. 부산물 및 잔류 글루코스를 예를 들어 글루코스 및 알코올의 경우 굴절률 검출기, 및 유기산의 경우 UV 검출기(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 90:775-779(2005))를 사용하는 HPLC, 또는 당해 분야에 널리 공지된 다른 적합한 분석 및 검출 방법에 의해 정량분석할 수 있다. 상기 외래 DNA 서열로부터의 개별적인 효소 또는 단백질 활성을 당해 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 분석할 수 있다(예를 들어 WO/2008/115840 및 문헌[Hanai et al., Appl. Environ. Microbiol. 73:7814-7818(2007)]을 참조하시오).

[0171] 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 당해 분야에 널리 공지된 다양한 방법을 사용하여 상기 배양물 중의 다른 성분들로부터 분리시킬 수 있다. 상기와 같은 분리 방법은 예를 들어 추출 과정뿐만 아니라 연속적인 액체-액체 추출, 투석 증발, 막 여과, 막 분리, 역삼투, 전기투석, 증류, 결정화, 원심분리, 추출 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 및 한외여과를 포함한다. 상기 방법들은 모두 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

[0172] 본 발명에 개시된 비 천연 미생물 유기체들 중 어느 것이든 본 발명의 생합성 산물을 생성 및/또는 분리하도

록 배양할 수 있다. 예를 들어, 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생산자를 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생합성 생산을 위해 배양할 수 있다.

[0173] 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생산을 위해서, 상기 재조합 균주를 탄소원 및 다른 필수 영양소를 갖는 배지에서 배양한다. 전체 공정의 비용을 줄이기 위해서 상기 발효기 중에 혐기성 조건을 유지시키는 것이 매우 바람직하다. 상기와 같은 조건은 예를 들어 먼저 상기 배지를 질소로 살포하고 이어서 상기 플라스크를 격막 및 크림프(crimp)-뚜껑으로 밀봉하여 획득할 수 있다. 생육이 혐기성 조건 하에서 관찰되지 않는 균주의 경우, 상기 격막에 제한된 통기를 위한 작은 구멍을 뚫어 미세 호기성 조건을 적용시킬 수 있다. 예시적인 혐기성 조건은 앞서 개시되었으며 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예시적인 호기성 및 혐기성 조건들은 예를 들어 2007년 8월 10일자로 출원된, 미국 공보 제 US-2009-0047719 호에 개시되어 있다. 발효를 본 발명에 개시된 바와 같이 배치, 유가 또는 연속 방식으로 수행할 수 있다.

[0174] 경우에 따라, 상기 배지의 pH를 필요에 따라 목적하는 pH에서 유지시키기 위해 염기, 예를 들어 NaOH 또는 다른 염기, 또는 산의 첨가에 의해 목적하는 pH, 특히 중성 pH, 예를 들어 대략 7의 pH에서 유지시킬 수 있다. 생육물을 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 측정할 수 있고 글루코스 흡수율을 시간에 따른 탄소원 고갈을 모니터링함으로써 측정할 수 있다.

[0175] 상기 예시된 바와 같은 재생 가능한 공급 원료 이외에, 본 발명의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 미생물 유기체를 그의 탄소 원으로서 합성 가스상에서의 생육을 위해 변형시킬 수 있다. 상기 특정 실시태양에서, 하나 이상의 단백질 또는 효소를 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생산 유기체 중에서 발현시켜 합성 가스 또는 다른 기상 탄소 원의 사용을 위한 대사 경로를 제공한다.

[0176] 본 발명의 유기체들은 예를 들어 상기 비 천연 미생물에 탄소 원을 공급할 수 있는 임의의 탄수화물 공급원을 이용할 수 있다. 상기와 같은 공급원은 예를 들어 당, 예를 들어 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노오스, 프럭토스 및 전분을 포함한다. 탄수화물의 다른 공급원으로는 예를 들어 재생 가능한 공급원료 및 바이오매스가 있다. 본 발명의 방법에 공급원료로서 사용될 수 있는 예시적인 유형의 바이오매스는 셀룰로스 바이오매스, 헤미셀룰로스 바이오매스 및 리그닌 공급원료 또는 공급원료의 부분들을 포함한다. 상기와 같은 바이오매스 공급원료는 예를 들어 탄소 원으로서 유용한 탄수화물 기질, 예를 들어 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노오스, 프럭토스 및 전분을 포함한다. 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 상기 예시된 것들 이외의 재생 가능한 공급원료 및 바이오매스를 또한 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생산을 위한 본 발명의 미생물 유기체의 발현에 사용할 수 있음을 알 것이다.

[0177] 따라서, 본 발명의 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 탄소 원, 예를 들어 합성 가스, CO 및/또는 CO<sub>2</sub> 상에서 생육 시 본 발명의 생합성된 화합물을 분비하는 비 천연 미생물 유기체를 생성시킬 수 있음을 알 것이다. 상기와 같은 화합물은 예를 들어 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 및 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로의 중간 대사산물들 중 어느 것이든 포함한다. 필요한 것은 상기 필요한 효소 또는 단백질 활성들 중 하나 이상에서 상기 목적하는 화합물 또는 중간체의 생합성을 성취하도록, 예를 들어 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생합성 경로 중 일부 또는 전부를 포함하도록 조작하는 것이다. 따라서, 본 발명은 탄수화물 또는 다른 탄소 원 상에서 생육 시 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 생산 및/또는 분비하고 탄수화물 또는 다른 탄소 원 상에서 생육 시 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 중에 나타난 중간 대사 산물들 중 임의의 것을 생산 및/또는 분비하는 비 천연 미생물 유기체를 제공한다. 본 발명의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생산 미생물 유기체는 중간체, 예를 들어 아세틸-CoA로부터의 합성을 개시시킬 수 있다.

[0178] 본 발명의 비 천연 미생물 유기체를, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 생성시키기에 충분한 양의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 경로 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 외부적으로 발현하도록 본 발명에 예시된 바와 같이 당해 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 제작한다. 본 발명의 미생물을 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 생산하기에 충분한 조건 하에서 배양함이 이해된다. 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 본 발명의 비 천연 미생물 유기체는 약 0.1 내지 2000 mM 이상의 세포 내 농도를 생성시키는 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생합성을 성취할 수 있다. 일반적으로, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 세포 내 농도는 약 3 내지 1800 mM, 특히 약 5 내지 1700 mM 및 보다 특히 약 8 내지 1600 mM, 예를 들어 약 100 mM, 200 mM, 500 mM, 800 mM 또는 그 이상이다. 이들 예시적인 범위 사이 및 그 이상의 세포 내 농도도 또한 본 발명의 비 천연 미생물 유기체

로부터 성취될 수 있다.

- [0179] 일부 실시태양에서, 배양 조건은 혐기성 또는 실질적으로 혐기성인 생육 또는 유지 조건을 포함한다. 예시적인 혐기성 조건들은 앞서 개시되었으며 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 발효 공정에 예시적인 혐기성 조건은 본 발명에 개시되어 있으며, 예를 들어 2007년 8월 10일자로 출원된 미국 특허 출원 제 2009/0047719 호에 개시되어 있다. 이들 조건 중 어느 것이든 상기 비 천연 미생물 유기체뿐만 아니라 당해 분야에 널리 공지된 다른 혐기성 조건들과 함께 사용될 수 있다. 상기와 같은 혐기성 조건 하에서, 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생산자는 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 5 내지 10 mM 이상의 세포 내 농도뿐만 아니라 본 발명에 예시된 다른 농도들로 합성할 수 있다. 비록 상기 설명이 세포 내 농도를 지칭하지만, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생산 미생물 유기체가 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올을 세포 내적으로 및/또는 상기 생성물을 배양 배지 내로 분비할 수 있음이 이해된다.
- [0180] 상기 배양 조건은 예를 들어 액체 배양 과정뿐만 아니라 발효 및 다른 대규모 배양 과정을 포함할 수 있다. 본 발명에 개시된 바와 같이, 본 발명의 생합성 생성물의 특히 유용한 수율을 혐기성 또는 실질적으로 혐기성 배양 조건 하에서 획득할 수 있다.
- [0181] 본 발명에 개시된 바와 같이, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생합성을 성취하기 위한 하나의 예시적인 생육 조건은 혐기성 배양 또는 발효 조건을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 비 천연 미생물 유기체를 혐기성 또는 실질적으로 혐기성인 조건 하에서 지속시키거나, 배양하거나 발효시킬 수 있다. 간단히, 혐기성 조건은 산소가 없는 환경을 지칭한다. 실질적으로 혐기성 조건은 예를 들어 배지 중에 용해된 산소 농도가 0 내지 10%의 포화율로 남아 있도록 하는 배양, 배치 발효 또는 연속 발효를 포함한다. 실질적으로 혐기성 조건은 또한 1% 미만의 산소 분위기로 유지된 밀폐된 챔버 내부의 액체 배지 중에서 또는 고체가 상에서의 세포의 생육 또는 휴지를 포함한다. 상기 산소의 퍼센트를 예를 들어 상기 배양물에 N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 혼합물 또는 다른 적합한 비-산소 기체 또는 기체들을 살포함으로써 유지시킬 수 있다.
- [0182] 본 발명에 개시된 배양 조건을 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 제조를 위해 규모 확대하고 연속적으로 키울 수 있다. 예시적인 생육 과정은 예를 들어 유가 발효(fed-batch) 및 배치 분리; 유가 발효 및 연속 분리, 또는 연속 발효 및 연속 분리를 포함한다. 이들 과정은 모두 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 발효 과정은 상업적인 양의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생합성적 생산에 특히 유용하다. 일반적으로, 및 비-연속 배양 과정의 경우에서와 같이, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 연속 및/또는 거의 연속 생산은 본 발명의 비 천연 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생산 유기체를, 생육을 지수 생육기에서 유지 및/또는 거의 유지시키기에 충분한 양분 및 배지에서 배양함을 포함할 것이다. 상기와 같은 조건 하에서 연속 배양은 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 또한, 연속 배양은 1, 2, 3, 4 또는 5 주 또는 그 이상 수 개월 이하를 포함할 수 있다. 한편으로, 본 발명의 유기체를 특정 용도에 적합한 경우, 수 시간 동안 배양할 수 있다. 상기 연속 및/또는 거의 연속 배양 조건이 이들 예시적인 기간들 사이의 모든 시간 간격들을 포함할 수 있음은 물론이다. 본 발명의 미생물 유기체의 배양 시간은 원하는 목적을 위해 충분한 양의 생성물을 생산하기에 충분한 기간 동안인 것으로 또한 여겨진다.
- [0183] 발효 과정은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 간단히, 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 생합성적 생산을 위한 발효를 예를 들어 유가 발효 및 배치 분리; 유가 발효 및 연속 분리, 또는 연속 발효 및 연속 분리에 사용할 수 있다. 배치 및 연속 발효 과정의 예들은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.
- [0184] 상당량의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 연속 생산을 위해 본 발명의 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 과정을 사용하는 상기 발효 과정 이외에, 상기 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올 생산자에 또한 상기 생성물을 다른 화합물로 전환시키는 화학적 합성 과정을 동시에 가하거나, 또는 상기 생성물을 상기 발효 배양물로부터 분리시키고 경우에 따라 상기 생성물을 다른 화합물로 전환시키는 화학적 전환을 연속해서 가할 수 있다.
- [0185] 일부 실시태양에서, 합성가스가 탄소 공급원료로서 사용될 수 있다. 합성가스 발효에 중요한 공정 고려사항은 높은 바이오매스 농도 및 양호한 기체-액체 물질 이동이다(Bredwell et al., Biotechnol Prog., 15:834-844(1999)). 물에 대한 CO의 용해도는 산소의 경우보다 다소 작다. 연속적인 기체-살포식 발효를 질량 분광 측정 및 주기적인 액체 샘플링에 의한 일정한 오프-가스 분석 및 GC 및 HPLC에 의한 분석과 함께 조절된 발효 기에서 수행할 수 있다. 상기 액체 상은 배치식으로 작용할 수 있다. 알콜, 유기산, 및 잔류 메탄올과 함께 잔류 글루코스와 같은 발효 산물들을 HPLC(Shimadzu, Columbia MD)에 의해, 예를 들어 HPLC 컬럼의 애미넥스

(Aminex)(등록상표) 시리즈(예를 들어 HPX-87 시리즈)(BioRad, Hercules CA)를 사용하여, 글루코스 및 알콜의 경우 굴절률 검출기, 및 유기산의 경우 UV 검출기를 사용하여 정량화한다. 상기 생물질을 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 측정할 수 있다. 이들 시스템의 모든 배관은 혐기성 조건을 유지시키기 위해 유리 또는 금속이다. 상기 기체 살포를 기포 크기를 감소시키고 물질 이동을 개선시키기 위해 유리 프리트를 사용하여 수행한다. 약 0.1 내지 1 vvm(증기 부피/분) 범위의 다양한 살포율을 시험한다. 기체 흡수율을 정확히 측정하기 위해서, 상기 기체 흐름을 일시적으로 중단시키는 주기적인 도전을 수행하며, 상기 기상 조성을 시간의 함수로서 모니터한다.

[0186] 전체적인 표적 생산성을 성취하기 위해서, 세포 체류 또는 재순환 방법을 사용한다. 상기 미생물 농도를 증가시키는 한 가지 방법은 세포를 부 스트림으로부터 접선 흐름 막을 통해 재순환시키는 것이다. 앞서 무어렐라(Moorella)에 의한 아세테이트의 생산에 대해 개시된 바와 같이(Sakai et al, J Biosci.Bioeng, 99:252-258(2005)), 반복된 배치 배양을 또한 사용할 수 있다. 다양한 다른 방법들을 또한 사용할 수 있다(Bredwell et al., Biotechnol Prog., 15:834-844(1999); Datar et al., Biotechnol Bioeng, 86:587-594(2004)). 추가적인 최적화, 예를 들어 물질 이동을 개선시키기 위한 1.5 atm의 과도한 압력을 시험할 수 있다(Najafpour et al., Enzyme and Microbial Technology, 38[1-2], 223-228(2006)).

[0187] 공급물로서 순수한 H<sub>2</sub>/CO를 사용하여 일단 만족할만한 실행이 성취되면, 상업적인 합성가스 중에 존재하는 듯한 억제제를 함유하는 합성 가스 혼합물이 생성된다. 예를 들어, 전형적인 불순물 프로파일은 4.5% CH<sub>4</sub>, 0.1% C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, 0.35% C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, 1.4% C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 및 150 ppm 산화 질소이다(Datar et al., Biotechnol Bioeng, 86:587-594(2004)). 벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, p-자일렌, o-자일렌, 및 나프탈렌 등의 화합물로 대표되는 타르를 ppm 수준으로 가하여 생산 시 임의의 영향에 대해 시험한다. 예를 들어, 40 ppm NO는 씨 카르복시디보란스(C. carboxidivorans)에 대해 억제성인 것으로 나타났다(Ahmed et al., Biotechnol Bioeng, 97:1080-1086(2007)). 배양물을 발효기로 이동하기 전에 진탕-플라스크 배양물 중에서 시험한다. 또한, 상이한 수준의 이들 잠재적인 억제성 화합물들을 시험하여 이들 화합물이 세포 생육에 미치는 영향을 정량분석한다. 상기 지식을 사용하여 합성가스 순도에 대한 명세서를 개발하고, 이를 규모 확대 연구 및 생산에 이용한다. 임의의 특정 성분이 규모확대에 사용되는 합성가스로부터 감소 또는 제거하기 어려운 것으로 밝혀지면, 적합한 점진적인 변화 과정을 사용하여 세포를 하나 이상의 불순물에 견디도록 순응시킨다.

[0188] 단백질 공학 분야의 진보는 효소들에 대해 자연적인 것으로 공지되지 않은 기질 상에서 효율적으로 작용하도록 본 발명에 개시된 효소들 중 어느 것이든 변경할 수 있게 한다. 다양한 관심 부류들로부터의 광범위한-특히 효소들의 몇몇 예 및 상기와 같은 효소들이 비-천연 기질 상에서 작용하도록 점진적으로 변화시키는데 사용된 방법들이 하기에 있다.

[0189] 본 발명에 개시된 경로들 중 한 가지 부류의 효소는 케톤 또는 알데하이드를 알콜로 상호전환시키는 옥시도리덕타제(1.1.1)이다. 상기 부류의 효소들은 광범위한 기질 상에서 작용할 수 있다. 토양 세균 브레비박테리움(Brevibacterium) sp KU 1309로부터 정제된 알콜 데하이드로게나제(1.1.1.1)(Hirano et al., J. Biosci. Bioeng. 100:318-322(2005))는 과잉의 지방족뿐만 아니라 방향족 알콜 상에서 고 활성으로 작용하는 것으로 입증되었다. 표 34는 상기 효소의 활성 및 상이한 알콜 상에서의 그의 K<sub>m</sub>을 나타낸다. 상기 효소는 가역적이며 표 34에 나타낸 바와 같이 여러 알데하이드 상에서 매우 높은 활성을 갖는다.

표 34

기질	상대 활성(%)	K <sub>m</sub> (MM)
2-페닐에탄올	100	0.025
(S)-2-페닐프로판올	156	0.157
(R)-2-페닐프로판올	63	0.020
벤질 알콜	199	0.012
3-페닐프로판올	135	0.033
에탄올	76	
1-부탄올	111	
1-옥탄올	101	
1-도데칸올	68	
1-페닐에탄올	46	
2-프로판올	54	

[0191] 상기 표에서, 2-페닐에탄올의 활성(19.2 U/mg에 상응한다)을 100%로서 간주하였다.

표 35

기질	상대 활성(%)	K <sub>M</sub> (MM)
페닐아세트알데하이드	100	0.261
2-페닐프로피온알데하이드	188	0.864
1-옥틸알데하이드	87	
아세트페논	0	

[0193] 칼스토니아 유티로파로부터의 락테이트 데하이드로게나제(1.1.1.27)는 여러 2-옥소산, 예를 들어 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소글루타레이트(2-옥소아디페이트와 유사한 C5 화합물)에 대해 높은 활성을 갖는 것으로 입증된 또 다른 효소이다(Steinbuechel et al., Eur. J. Biochem. 130:329-334(1983)). 표 36의 컬럼 2는 알 유티로파(이전에는 에이 유티로푸스(*A. eutrophus*))로부터의 ldhA의 상이한 기질들에 대한 활성을 나타낸다(상기 Steinbuechel et al.).

표 36

기질	활성		
	L(+)-	L(+)-	D(-)-
	에이 유티로푸스( <i>A. eutrophus</i> )로부터의 락테이트 데하이드로게나제	토끼 근육으로부터의 락테이트 데하이드로게나제	엘 레이슈마니이( <i>L. leischmanii</i> )로부터의 락테이트 데하이드로게나제
	%		
글리옥실레이트	8.7	23.9	5.0
피루베이트	100.0	100.0	100.0
2-옥소부티레이트	107.0	18.6	1.1
2-옥소발레레이트	125.0	0.7	0.0
3-메틸-2-옥소부티레이트	28.5	0.0	0.0
3-메틸-2-옥소발레레이트	5.3	0.0	0.0
4-메틸-2-옥소펜타노에이트	39.0	1.4	1.1
옥살로아세테이트	0.0	33.1	23.1
2-옥소글루타레이트	79.6	0.0	0.0
3-플루오로피루베이트	33.6	74.3	40.0

[0195] 2-옥소산을 그의 아실-CoA 대응물로 전환시킬 수 있는 옥시도리덕타제(1.2.1)가 또한 다수의 기질들을 수용하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 분지쇄 2-케토산 데하이드로게나제 복합체(BCKAD)(또한 2-옥소아이스발레레이트 데하이드로게나제(1.2.1.25)로서 공지됨)는 분지쇄 아미노산 분해 경로에 관여하여, 발린, 류신 및 아이소류신의 2-케토산 유도체를 그들의 아실-CoA 유도체와 CO<sub>2</sub>로 전환시킨다. 라투스 노르베기쿠스(Paxton et al., Biochem. J. 234:295-303(1986)) 및 사카로마이세스 세레비지아에(Sinclair et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 31:911-922(1993))를 포함한 일부 유기체들에서, 상기 복합체는 상기 분지쇄 아미노산 전구체들 이외에, 선형 옥소산, 예를 들어 2-옥소부타노에이트 및 알파-케토글루타레이트를 포함한 광범위한 기질 범위를 갖는 것으로 나타났다.

[0196] CoA 트랜스퍼라제(2.8.3)는 하나보다 많은 기질 상에서 작용하는 능력을 갖는 것으로 입증되었다. 구체적으로, CoA 트랜스퍼라제는 클로스트리듐 아세트부틸리쿰으로부터 정제되었으며 아세테이트, 프로피오네이트 및 부티레이트 상에서 최대의 활성을 갖는 것으로 보고되었다. 상기 효소는 또한 발레레이트, 아이소부티레이트 및 크로토네이트에 대해 현저한 활성을 가졌다(Wiesenborn et al., Appl. Environ. Microbiol. 55:323-329(1989)). 또 다른 연구에서, 이 콜라이 효소 아실-CoA:아세테이트-CoA 트랜스퍼라제(또한 아세테이트-CoA 트랜스퍼라제(EC 2.8.3.8)로서 공지됨)는 다양한 분지 및 선형 아실-CoA 기질, 예를 들어 아이소부티레이트(Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58:1435-1439(1992)), 발레레이트(Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968)) 및 부타노에이트(상기 Vanderwinkel et al.)로부터 CoA 부분을 아세

테이트로 운반하는 것으로 입증되었다.

[0197] 상기 효소들의 넓은 기질 특이성에 대한 논의는 다른 효소 부류들을 조사할 때 더욱 보장된다. 일부 아이소머라제(5.3.3)가 또한 다수의 기질 상에서 작용하는 것으로 입증되었다. 예를 들어, 슈도모나스 스투트제리(*stutzeri*)로부터의 L-람노스 아이소머라제는 다양한 알돌라제와 케토오스 간의 이성화를 촉매화한다(Yoshida et al., J. Mol. Biol. 365:1505-1516(2007)). 여기에는 L-람노스와 L-람놀로스, L-만노스와 L-프럭토스, L-자일로스와 L-자일롤로스, D-리보스와 D-리블로스, 및 D-알로스와 D-프시코스 간의 이상화가 있다.

[0198] 더욱 또 다른 효소 부류에서, L-호모세린을 L-호모세린 포스페이트로 전환시키는 이 콜라이로부터의 호모세린 키나제(2.7.1.39), 포스포트랜스퍼라제(2.7.1)는 다수의 호모세린 동족체들을 인산화하는 것으로 밝혀졌다. 이들 기질에서, R-위치에서 카복시 작용기는 에스터 또는 하이드록시메틸 그룹에 의해 치환되었다(Huo et al., Biochemistry 35:16180-16185(1996)). 표 37은 상기 키나제의 넓은 기질 특이성을 나타낸다.

표 37

기질	$K_{CAT}$	$\%K_{CAT}$	$K_M$ (mM)	$K_{CAT}/K_M$
L-호모세린	18.3 ± 0.1	100	0.14 ± 0.04	184 ± 17
D-호모세린	8.3 ± 1.1	32	31.8 ± 7.2	0.26 ± 0.03
L-아스파테이트 β-세미알데하이드	2.1 ± 0.1	8.2	0.28 ± 0.02	7.5 ± 0.3
L-2-아미노-1,4-부탄다이올	2.0 ± 0.5	7.9	11.6 ± 6.5	0.17 ± 0.06
L-2-아미노-5-하이드록시발레레이트	2.5 ± 0.4	9.9	1.1 ± 0.5	2.3 ± 0.3
L-호모세린 메틸 에스터	14.7 ± 2.6	80	4.9 ± 2.0	3.0 ± 0.6
L-호모세린 에틸 에스터	13.6 ± 0.8	74	1.9 ± 0.5	7.2 ± 1.7
L-호모세린 아이소프로필 에스터	13.6 ± 1.4	74	1.2 ± 0.5	11.3 ± 1.1
L-호모세린 n-프로필 에스터	14.0 ± 0.4	76	3.5 ± 0.4	4.0 ± 1.2
L-호모세린 아이소부틸 에스터	16.4 ± 0.8	84	6.9 ± 1.1	2.4 ± 0.3
L-호모세린 n-부틸 에스터	29.1 ± 1.2	160	5.8 ± 0.8	5.0 ± 0.5

[0199] 상기 제안된 경로들에서 조우한 또 다른 부류의 효소는 산-티올 리가제(6.2.1)이다. 다른 부류의 효소들처럼, 상기 부류의 몇몇 효소는 넓은 기질 특이성을 갖는 것으로 측정되었다. 예를 들어, 슈도모나스 푸티다로부터의 아실 CoA 리가제는 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산, 핵산산, 헵탄산 및 옥탄산을 포함한 다수의 지방족 기질들, 및 페닐아세트산 및 페녹시아세트산과 같은 방향족 화합물들 상에서 작용하는 것으로 나타났다(Fernandez-Valverde et al, Appl. Environ. Microbiol. 59:1149-1154(1993)). 리조뎀 트리폴리이(*Rhizobium trifolii*)로부터의 관련된 효소, 말로닐 CoA 신시타제(6.3.4.9)는 몇몇 이산, 즉 에틸-, 프로필-, 알릴-, 아이소프로필-, 다이메틸-, 사이클로프로필-, 사이클로프로필메틸렌-, 사이클로부틸- 및 벤질-말로네이트를 그들의 상응하는 모노티오에스터로 전환시킬 수 있었다(Pohl et al., J. Am. Chem. Soc. 123:5822-5823(2001)). 유사한 정맥에서, 우리는 또한 넓은 기질 범위를 갖는 데카복실라제(4.1.1)를 발견하였다. 피루베이트 데카복실라제(PDC)(또한 케토산 데카복실라제로 지칭됨)는 알콜 발효에 핵심 효소이며, 피루베이트의 아세트알데하이드로의 탈카복실화를 촉매화한다. 사카로마이세스 세레비지아에로부터의 효소는 2-케토부티레이트, 2-케토발레레이트, 및 2-페닐피루베이트를 포함한 지방족 2-케토산에 대해 광범위한 기질 범위를 갖는다(Li et al., Biochemistry, 38:10004-10012(1999)). 유사하게, 벤조일포메이트 데카복실라제는 넓은 기질 범위를 가지며 효소 공학 연구의 표적이었다. 슈도모나스 푸티다로부터의 효소가 광범위하게 연구 되었으며 상기 효소의 결정 구조를 입수할 수 있다(Polovnikova et al., Biochemistry 42:1820-1830(2003); Hasson et al., Biochemistry 37:9918-9930(1998)). 분지쇄 알파-케토산 데카복실라제(BCKA)가 탄소수 3 내지 6의 다양한 쇠 길이의 다양한 화합물들 상에서 작용하는 것으로 나타났다. 락토코커스 락티스 중의 효소가 2-옥소부타노에이트, 2-옥소헥사노에이트, 2-옥소펜타노에이트, 3-메틸-2-옥소부타노에이트, 4-메틸-2-옥소부타노에이트 및 아이소카프로에이트를 포함한 다양한 분지 및 선형 기질들 상에서 특성화되었다(Smit et al., Appl Environ Microbiol 71:303-311(2005)).

[0201] 흥미롭게, 하나의 우세한 활성을 갖는 효소들이 또한 매우 상이한 작용을 촉매화하는 것으로 지적되었다. 예를 들어, 바실러스 스테아로써모필루스(*stearothermophilus*) 및 바실러스 서브틸리스로부터의 보조인자-의존

성 포스포글리세레이트 뮤타제(5.4.2.1)는 또한 포스포타제로서 작용하는 것으로 공지되어 있다(Rigden et al., Protein Sci. 10:1835-1846(2001)). 비 스테아로씨모필루스로부터의 효소는 3-포스포글리세레이트, 알파-나프틸포스페이트, p-나이트로페닐포스페이트, AMP, 프럭토스-6-포스페이트, 리보스-5-포스페이트 및 CMP를 포함한 몇몇 기질들에 대해 활성을 갖는 것으로 공지되어 있다.

[0202] 상기 효소가 자연적으로 광범위한 기질 특이성을 갖는 상기 예와 대조적으로, 다수의 효소들을 비 천연 기질에 대한 그들의 특이성을 확장시키는 방향 진화를 사용하여 변형시켰다. 한편으로, 효소의 기질 선호를 또한 방향 진화를 사용하여 변화시켰다. 상기 방법의 성공은 문헌에 잘 기록되어 있으며 천연/비 천연 기질 상에서 효율적인 작용을 위해 주어진 효소를 더 잘 조작할 수 있다는 우리의 청구의 범위를 보강한다. 예를 들어, 슈도모나스 아에루기노사로부터의 리파제의 거울상 선택성이 현저하게 개선된 것으로 보고되었다. 상기 효소는 p-나이트로페닐 2-메틸테카노에이트를 (S)-산의 편에서 단지 2%의 거울상이성체 과잉(ee)으로 가수분해하였다. 그러나, 4 회의 연속적인 라운드의 실수유발 돌연변이 및 선별 후에, 상기 필수 반응을 81% ee로 촉매화한 변체가 생성되었다(Reetz et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. 36:2830-2832(1997)).

[0203] 앞서 언급한 바와 같이, 방향 진화 방법은 효소에 대해 자연적이지 않은 기질들의 배열상에서 작용하도록 상기 효소의 변형을 가능하게 하였다. 피 아에루기노사 중의 리파제의 기질 특이성은 활성 부위 부근의 아미노산 잔기의 랜덤화에 의해 확대되었다. 이는 상기 효소에 의한 알파-치환된 카복실산 에스터의 수용을 허용하였다(Reetz et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. 44:4192-4196(2005)). 또 다른 성공적인 시도에서, DNA 셔플링을 사용하여 β-분지된 기질(야생형 효소에 의해서는 불충분하게 수용되었다)을 수용한 에스케리키아 콜라이 아미노트랜스퍼라제를 생성시켰다(Yano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:5511-5515(1998)). 구체적으로, 4 라운드의 셔플링의 끝에서, 발린 및 2-옥소발린에 대한 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제의 활성이 5 이하 정도의 크기까지 증가한 반면, 천연 기질인 아스파테이트에 대한 활성은 30 배 이하까지 감소하였다. 매우 최근의 과학 보고서에서, 연산방식을 사용하여, 비-천연 및 비-생물 기질, 4-하이드록시-4-(6-메톡시-2-나프틸)-2-부탄온 중의 탄소-탄소 결합 절단을 촉매화하는데 사용될 수 있는 레트로-알돌라제를 디자인하였다. 상기 연산방식은 4 개의 상이한 촉매 동기들의 상이한 조합을 사용하여 새로운 효소들을 디자인하였으며, 상기 실험 특성화를 위해 선택된 디자인들 중 20 개는 촉매화되지 않은 반응에 대해 4 배 개선된 비율을 가졌다(Jiang et al., Science 319:1387-1391(2008)). 따라서, 이들 공학적 접근법은 효소가 작용할 수 있는 기질들의 배열을 확장시킬 수 있을 뿐만 아니라 매우 효율적인 효소들의 디자인 및 제작을 허용한다. 예를 들어, DNA 셔플링 방법(일시적인 주형 상의 랜덤한 키메라 발생 또는 RACHITT)은 비-천연 기질의 20 배 더 빠른 전환뿐만 아니라 복합체 기질 상에서의 개선된 탈황 속도를 갖는 조작된 모노옥시게나제를 유도하는 것으로 보고되었다(Coco et al. Nat. Biotechnol. 19:354-359(2001)). 유사하게, 느린 돌연변이체 트라이오스포스페이트 아이소머라제 효소의 비 활성이 1.3배에서 19배까지 개선되었다(Hermes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 87:696-700(1990)). 이러한 비 활성의 향상은 상기 단백질의 전체 길이에 걸쳐 랜덤 돌연변이를 사용함으로써 성취되었으며 상기 개선은 6 개 아미노산 잔기 중의 돌연변이에 대해 역 추적될 수 있었다.

[0204] 목적하는 기질에 대한 효소의 기질 특이성을 변경시키기 위한 단백질 공학 접근법의 유효성이 또한 몇몇 연구들에서 입증되었다. 씨무스 씨모필루스로부터의 아이소프로필말레이트 데하이드로게나제를, 상기 활성 부위에 가까운 잔기들을 이들 잔기가 기질로서 말레이트 및 D-락테이트 상에서 작용할 수 있도록 변화시킴으로써 변형시켰다(Fujita et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 65:2695-2700(2001)). 이 연구에서뿐만 아니라 다른 연구들에서, 하나 또는 몇 개의 잔기들을 상기 기질 특이성의 변경을 위해 변형시킬 수 있음이 지적되었다. 적절한 예는 단일 아미노산을, 다이하이드로카엠페롤을 우선적으로 환원시킬 수 있는 추정된 기질-결합 부위에서 변화시킨 다이하이드로플라보놀 4-리덕타제이다(Johnson et al., Plant J. 25:325-333(2001)). 에스케리키아 콜라이로부터의 매우 특이적인 아이소시트레이트 데하이드록시게나제의 기질 특이성을, 상기 활성 부위 중의 하나의 잔기를 변화시킴으로써 아시소시트레이트에서 아이소프로필말레이트로 변화시켰다(Doyle et al., Biochemistry 40:4234-4241(2001)). 유사한 정맥에서, NAD<sup>+</sup>- 의존성 1,5-하이드록시프로스타글란딘 데하이드로게나제의 보조인자 특이성을 상기 N-말단 단부 부근의 몇 개의 잔기를 변화시킴으로써 NAPD<sup>+</sup>로 변경시켰다(Cho et al., Arch. Biochem. Biophys. 419:139-146(2003)). 서열 분석 및 분자 모델링 분석을 사용하여 변형을 위한 핵심 잔기를 동정하고, 이를 부위 지정 돌연변이에 의해 추가로 연구하였다.

[0205] 효소의 작용을, 상기 효소의 천연 기질에 대해 하나의 비 천연 기질에 유리하도록 변화시킨 다양한 부류의 효소들에 걸쳐 있는 다수의 다른 예들이 존재한다. 푸코시다제는 DNA 셔플링 및 선별에 의해 이 콜라이 중의

갈락토시다제로부터 진화되었다(Zhang et al., Proc natl Acad Sci U.S.A 94:4504-4509(1997)). 유사하게, 이 콜라이로부터의 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제를 상동성 모델링 및 부위 지정 돌연변이를 사용하여 타이로신 아미노트랜스퍼라제로 전환시켰다(Onuffer et al., Protein Sci. 4:1750-1757(1995)). 피 푸티다로부터의 벤조일포에이트 대카복실라제의 활성 부위 중의 2 개 잔사의 부위 지정 돌연변이는 전하는 바에 따르면, 천연 및 비 천연 기질들에 대한 친화성( $K_m$ )을 변경시켰다(Siegert et al., Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005)). 사카로마이세스 세레비지아에로부터의 시토크롬 c 퍼옥시다제(CCP)에 지정된 분자 진화를 가하여 전통적인 퍼옥시다제 기질 구아이아콜에 대한 증가된 활성을 갖는 돌연변이체를 생성시켜, 상기 CCP의 기질 특이성을 단백질 시토크롬 c로부터 작은 유기 분자로 변화시켰다. 3 라운드의 DNA 서플링 및 선별 후에, 구아이아콜에 대해 300 배 증가된 활성 및 상기 천연 기질에 대한 경우에 비해 상기 기질에 대해 1000 배까지 증가한 특이성을 갖는 돌연변이체를 단리하였다(Iffland et al., Biochemistry 39:10790-10798(2000)).

[0206] 일부의 경우에, 상기 2 개의 모 효소와 상이한 기질 선호를 갖는 효소들이 획득되었다. 예를 들어, 다중 염소화된 바이페닐의 바이페닐-다이옥시게나제-매개된 분해는 2 개의 세균, 슈도모나스 슈도알칼리젠스(*pseudoalcaligenes*) 및 부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*)로부터 유전자들을 서플링함으로써 개선되었다(Kumamaru et al., Nat. Biotechnol 16, 663-666(1998)). 상기 생성되는 키메릭 바이페닐 옥시게나제는 상기 2 개의 모 효소와 상이한 기질 선호를 나타내었으며, 관련된 바이페닐 화합물 및 단일 방향족 고리 탄화수소, 예를 들어 톨루엔 및 벤젠(원래는 상기 효소에 대해 불량한 기질이었다)에 대한 분해 활성을 향상시켰다.

[0207] 상기 효소 특이성을 변화시키는 것뿐만 아니라 상기 효소가 천연적으로 낮은 활성을 갖는 기질들에 대한 활성을 향상시키는 것 또한 가능하다. 하나의 연구는 광범위한 기질 특이성(다른 것들 중에서도 리신, 아르기닌, 알라닌, 세린, 메티오닌, 시스테인, 류신 및 히스티딘에 대한)을 갖지만 트립토판에 대한 활성은 낮은, 피 푸티다로부터의 아미노산 라세마제가 랜덤 돌연변이에 의해 현저하게 개선될 수 있음을 입증하였다(Kino et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 73:1299-1305(2007)). 유사하게, 소 BCKAD의 활성 부위를, 또 다른 기질인 아세틸-CoA에 유리하도록 조작하였다(Meng et al. Biochemistry 33:12879-12885(1994)). 이러한 접근법에 대해 흥미로운 면은 랜덤한 방법을 적용하여 유효한 활성을 갖는 돌연변이된 효소들을 생성시켰을 때조차, 활성에 개선을 부여하는 정확한 돌연변이 또는 구조적 변화를 확인할 수 있다는 것이다. 예를 들어, 상기 언급한 연구에서, 트립토판에 대한 개선된 활성을 촉진한 돌연변이를 2 개의 상이한 위치에 대해 역추적할 수 있었다.

[0208] 방향 진화를 또한 발전시키기 어려운 단백질들의 발현에 사용하였다. 예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제에 랜덤한 돌연변이를 가하고 유전자 재조합에 의해, 야생형보다 14 배 더 큰 활성을 갖는 돌연변이체를 추출할 수 있었다(Lin et al., Biotechnol. Prog. 15:467-471(1999)).

[0209] 방향 진화의 최종 예는 일련의 목적하는 작용들을 성취하도록 효소에 가할 수 있는 광범위한 변형들을 나타낸다. 바실러스 스테아로씨모필루스로부터의 효소, 락테이트 데하이드로게나제에 부위-지정된 돌연변이를 가하고, 지정된 부위에서 3 개의 아미노산 치환을 수행하여 상이한 하이드록시산들에 대한 특이성을 측정하였다(Clarke et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 148:15-23(1987)). 이러한 돌연변이 후에, 피루베이트보다 옥살로아세테이트에 대한 특이성이, 옥살로아세테이트보다 1000의 피루베이트에 대한 촉매 특이성을 갖는 야생형 효소와 대조적으로 500까지 증가하였다. 상기 효소를 분지쇄 치환된 피루베이트에 대한 활성을 갖도록 부위 지정 돌연변이를 사용하여 추가로 조작하였다(Wilks et al., Biochemistry 29:8587-8591(1990)). 구체적으로, 상기 효소는 알파-케토아이스카프로에이트에 대한  $K_{cat}$ 가 55 배 개선되었다. 3 개의 구조적 변형들이 동일한 효소에서 수행되어 그의 기질 특이성이 락테이트에서부터 말레이트로 변화하였다. 상기 효소는 말레이트에 대해 매우 활성이고 특이적이었다(Wilks et al., Science 242:1541-1544(1988)). 비 스테아로씨모필루스로부터의 동일한 효소를, 양으로 하전된 측쇄를 갖는 알파-케토산, 예를 들어 암모늄 그룹을 갖는 것들에 대해 높은 촉매 활성을 갖도록 후속적으로 조작하였다(Hogan et al., Biochemistry 34:4225-4230(1995)). 상기 효소의 102번 위치에 산성 아미노산이 도입된 돌연변이체들은 상기와 같은 측쇄 암모늄 그룹의 결합을 촉진하였다. 상기 획득된 결과는 상기 돌연변이체가 오메가-아미노-알파-케토산 기질에 대한  $K_{cat}/K_m$  값을 25배까지 개선시킴을 입증하였다. 상기 효소를 또한 락테이트 데하이드로게나제 대신에 페닐아세테이트 데하이드로게나제로서 작용하도록 구조적으로 변형시켰다(Wilks et al., Biochemistry 31:7802-7806(1992)). 제한 부위들을 상기 효소에 대한 유전자에 도입시켜 상기 유전자의 부위가 절제되도록 하였다. 상기 부위는 벌크 용매로부터 활성 부위 액포를 통상적으로 밀봉하고 기질 특이성의 주요 결정인자인 폴리펩타이드의 이동성 표면 고리(잔기 98 내지 110)를 암호화하였다. 상기 가변적인 길이 및 서열 고리를 상기 절단 유전자에 삽입하여

변경된 기질 특이성을 갖는 하이드록시산 데하이드로게나제를 합성하는데 사용하였다. 하나의 보다 긴 고리 제작과 함께, 피루베이트에 대한 활성이 100 만배 감소되었으나 페닐피루베이트에 대한 활성은 대체로 변경되지 않았다. 390,000 배의 특이성 변환( $K_{cat}/K_m$ )이 성취되었다. 피루베이트에 비해 페닐피루베이트에 대한 상기 효소의 1700:1 선택성은 페닐락테이트 데하이드로게나제에 필요한 것이다.

[0210] 상기 가리킨 바와 같이, 방향 진화는 효소의 성질들을 개선 및/또는 변경시키기 위해서 특정 유전자에 표적화된 돌연변이의 도입을 수반하는 강력한 접근법이다. 개선 및/또는 변경된 효소를 다수의 효소 변체들(예를 들어 >10<sup>4</sup>)의 자동화된 선별을 허용하는 민감한 고속 대량 선별 분석의 개발 및 실행을 통해 확인할 수 있다. 반복되는 라운드의 돌연변이 및 선별을 전형적으로 수행하여 최적화된 성질을 갖는 효소를 제공한다. 돌연변이에 대한 유전자 영역을 확인하는데 일조할 수 있는 컴퓨터 연산방식이 또한 개발되었으며 이는 생성 및 선별에 필요한 효소 변체의 수를 현저하게 줄일 수 있다.

[0211] 다양한 변체 라이브러리를 생성시키는데 유효한 다수의 방향 진화 기술들이 개발되었으며(Hibbert et al., Eng 22:11-19(2005); Huisman et al., Enzyme evolution for chemical process applications, p. 717-742(2007)). In R.N. Patel(ed.), Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries. CRC Press; Otten, et al., Biomol.Eng 22:1-9(2005); and Sen et al., Appl Biochem.Biotechnol 143:212-223(2007)), 이들 방법은 다수의 효소 부류들에 걸쳐 광범위한 성질들의 개발에 성공적으로 적용되었다.

[0212] 방향 진화 기술에 의해 개선되고/되거나 변경된 효소 특징들은 예를 들어 비 천연 기질 전환의 경우 선택성/특이성; 확고한 고온 처리의 경우 온도 안정성; 보다 낮거나 보다 높은 pH 조건 하에서 생물처리의 경우 pH 안정성; 높은 생성물 역가를 성취할 수 있도록 하기 위한 기질 또는 생성물 허용성; 비 천연 기질을 포함하도록 기질 결합을 확장시키는 결합( $K_m$ ); 생성물, 기질 또는 핵심 중간체에 의한 억제제를 제거하기 위한 억제( $K_i$ ); 목적하는 유출을 성취하기 위해 효소 반응 속도를 증가시키는 활성(kcat); 단백질 수율 및 전체 경로 유출을 증가시키는 발현 수준; 호기성 조건 하에서 공기 민감성 효소의 작용을 위한 산소 안정성; 및 산소의 부재 하에서 호기성 효소의 작용을 위한 혐기성 활성을 포함한다.

[0213] 하기의 예시적인 방법들이 특정 효소들의 목적하는 성질들을 표적화하기 위한 유전자들의 돌연변이 및 변형을 위해 개발되었다. 이들 중 어느 것이든 사용하여 데카복실라제 효소의 활성을 변경/최적화할 수 있다.

[0214] EpPCR(Pritchard et al., J Theor. Biol 234:497-509(2005))은  $Mn^{2+}$  이온의 첨가에 의해 PCR 반응에서 DNA 폴리머라제의 충실도를 감소시키거나, dNTP 농도를 치우치게 하거나, 또는 다른 조건 변화에 의해 랜덤한 점 돌연변이를 도입시킨다. 돌연변이를 관심 표적 유전자에 국한하기 위한 5 단계 클로닝 공정은 1) 상기 관심 유전자의 실수유발 PCR 증폭; 2) 제한 효소 절단; 3) 목적하는 DNA 단편의 젤 정제; 4) 벡터 내로의 연결; 5) 유전자 변체의 적합한 숙주 내로의 형질전환 및 개선된 실행을 위한 상기 라이브러리의 선별을 수반한다. 상기 방법은 단일 유전자에서 다수의 돌연변이를 동시에 발생시킬 수 있으며, 이는 유용할 수 있다. 다수의 돌연변이체가 EpPCR에 의해 생성될 수 있으며, 따라서 고속 대량 선별 분석 또는 선택 방법(특히 로봇공학 사용)은 바람직한 특성들을 갖는 것들을 확인하는데 유용하다.

[0215] 실수유발 회전 환 증폭(epRCA)(Fujii et al., Nucleic Acids Res 32:e145(2004); and Fujii et al., Nat.Protoc. 1:2493-2497(2006))은, 전체 환상 플라스미드가 주형으로서 사용되고 마지막 2 개의 뉴클레오타이드 상에 엑소뉴클레아제 내성 티오포스페이트 결합을 갖는 랜덤한 6-머들을 사용하여 상기 플라스미드를 증폭시킨 다음 세포 내로 형질전환시키고, 여기에서 상기 플라스미드를 직렬 반복부에서 다시 환화시킴을 제외하고, epPCR과 동일한 다수의 요소들을 갖는다. 상기  $Mn^{2+}$  농도를 조절하는 것은 상기 돌연변이율을 다소 변화시킬 수 있다. 상기 기법은 단순한 실수 유발, 단일 단계 방법을 사용하여 3 내지 4 개 돌연변이/kbp를 갖는 플라스미드의 전체 사본을 생성시킨다. 제한효소 절단이나 특정 프라이머들을 필요로 하지 않는다. 또한, 상기 방법을 전형적으로는 키트로서 입수할 수 있다.

[0216] DNA 또는 패밀리 셔플링(Stemmer, W.P. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91:10747-10751(1994); and Stemmer, W.P. Nature 370:389-391(1994))은 전형적으로는 Dnase I 또는 EndoV와 같은 뉴클레아제들로 2 개 이상의 변체 유전자를 절단하여 DNA 폴리머라제의 존재 하에서 어닐링 및 연장의 주기에 의해 재조립되어 키메라 유전자들의 라이브러리를 생성시키는 랜덤한 단편들의 풀을 생성시킴을 수반한다. 단편들은 서로 점화(prime)시키며 하나의 사본이 또 다른 사본을 점화(prime)할 때(주형 스위치) 재조합이 발생한다. 상기 방법을 >1kbp DNA 서열과 함께 사용할 수 있다. 단편 재조립에 의해 생성된 돌연변이 재조합체 이외에, 상기 방법은 연장 단계에서 실수유발 PCR과 유사한 비율로 점 돌연변이를 도입시킨다. 상기 방법을, 항원성을 부여할 수도 있

는 유해한 랜덤 중성 돌연변이를 제거하는데 사용할 수 있다.

- [0217] 엇갈린 연장(StEP)(Zhao et al., Nat. Biotechnol 16:258-261(1998))은 주형 접화에 이어서 변성 및 어닐링/연장의 매우 짧은 지속(3초 정도로 짧은)의 반복된 주기의 2 단계 PCR을 수반한다. 성장하는 단편들이 상이한 주형에 어닐링하고 추가로 연장되며, 이는 충분한 길이의 서열이 만들어질 때까지 반복된다. 주형 스위칭은 대부분의 생성 단편들이 다수의 어버이를 가짐을 의미한다. 저 충실도 폴리머라제들의 조합(Taq 및 뮤타자임)은 정반대의 돌연변이 스펙트럼으로 인해 실수유발 치우침을 감소시킨다.
- [0218] 랜덤 프라이밍 재조합(RPR)에서 랜덤 서열 프라이머를 사용하여 상기 주형의 상이한 분절들에 상보성인 다수의 짧은 DNA 단편들을 생성시킨다(Shao et al., Nucleic Acids Res., 26:681-683(1998)). epPCR을 통한 염기 오결합(misincorporation) 및 오점화(mispriming)는 점 돌연변이를 제공한다. 짧은 DNA 단편들은 상동성을 근거로 서로 접화하고 재조합되며 반복된 열순환에 의해 완전한 길이로 재조립된다. 상기 단계에 앞서 주형의 제거는 낮은 어버이 재조합을 보장한다. 상기 방법은 대부분의 다른 방법들처럼 수 회의 반복에 걸쳐 수행되어 독특한 성질들을 진화시킬 수 있다. 이러한 기술은 서열 치우침을 피하며, 유전자 길이와 무관하고, 상기 용도를 위해 매우 적은 어버이 DNA를 필요로 한다.
- [0219] 이형 이중 가닥 재조합에서 선형화된 플라스미드 DNA를 사용하여 이형 이중 가닥을 형성시키며, 이는 불일치 수복에 의해 수복된다(Volkov et al., Nucleic Acids Res 27:e18(1999); and Volkov et al., Methods Enzymol. 328:456-463(2000)). 상기 불일치 수복 단계는 적어도 어느 정도 돌연변이 유발성이다. 이형 이중 가닥은 선형의 동형 이중 가닥보다 더 효율적으로 형질전환된다. 상기 방법은 큰 유전자 및 전체 오픈론에 적합하다.
- [0220] 일시적인 주형 상의 랜덤 키메라 발생(RACHITT)(Coco et al., Nat. Biotechnol 19:354-359(2001))은 Dnase I 단편화 및 ssDNA의 크기 분류를 사용한다. 동종 단편을 폴리머라제의 부재 하에서 상보성 ssDNA 골격에 하이브리드화한다. 임의의 중복되는 하이브리드화되지 않은 단편 단부들을 엑소뉴클레아제에 의해 다듬는다. 단편들 간의 틈을 채우고, 이어서 연결시켜 상기 골격(중폭을 방해하는 U를 함유한다)에 하이브리드화된 완전한 길이의 다양한 가닥들의 풀을 제공한다. 이어서 상기 골격을 파괴하고 PCR 증폭에 의해 상기 다양한 가닥에 상보성인 새로운 가닥으로 대체한다. 상기 방법은 오직 하나의 어버이로부터 나온 하나의 가닥(골격)을 수반하는 반면 상기 접화 단편들은 다른 유전자들로부터 유래하며; 상기 어버이 골격은 대비되게 선택된다. 따라서, 어버이 단편들과의 재 어닐링은 발생하지 않는다. 중복되는 단편들을 엑소뉴클레아제로 다듬는다. 그렇지 않으면, 이는 DNA 서플링 및 StEP와 개념상 유사하다. 따라서, 자매 세포가 없고, 불활성이 거의 없으며, 서플링되지 않은 어버이가 없어야 한다. 이러한 기법은 어버이 유전자가 거의 또는 전혀 생성되지 않으며 표준 DNA 서플링에 비해 다수의 보다 많은 교차들이 생성될 수 있다는 점에서 이점을 갖는다.
- [0221] 절두된 주형 상에서의 재조합 연장(RETT)은 주형의 풀로서 사용된 단일방향 ssDNA 단편들의 존재 하에서 프라이머들로부터 단일방향으로 성장하는 가닥들의 주형 스위칭을 수반한다(Lee et al., J. Molec. Catalysis 26:119-129(2003)). DNA 엔도뉴클레아제는 사용되지 않는다. 단일방향 ssDNA는 랜덤 프라이머와 DNA 폴리머라제에 의해 또는 엑소뉴클레아제에 의한 일련의 결실에 의해 제조된다. 단일 방향 ssDNA는 단지 주형이며 프라이머가 아니다. 랜덤 접화 및 엑소뉴클레아제는 DNA 서플링/RACHITT의 효소 절단의 사실로서 서열 치우침을 도입하지 않는다. RETT는 매우 짧은 연장 대신에 통상적인 PCR 조건을 사용하므로 StEP보다 최적화가 더 용이할 수 있다. 재조합은 상기 PCR 단계의 성분으로서 발생한다(직접 서플링이 없다). 상기 방법은 또한 중단의 부재로 인해 StEP보다 더 랜덤할 수 있다.
- [0222] 퇴화된 올리고뉴클레오타이드 유전자 서플링(DOGS)에서 퇴화된 프라이머를 사용하여 분자들 간의 재조합을 조절한다(Bergquist and Gibbs, Methods Mol. Biol 352:191-204(2007); Bergquist et al., Biomol.Eng 22:63-72(2005); Gibbs et al., Gene 271:13-20(2001)). 이를 사용하여 어버이 유전자를 재생시키는 DNA 서플링과 같은 다른 방법의 의도를 억제할 수 있다. 이 방법을 선택된 유전자 분절의 랜덤 돌연변이(epPCR)와 병행할 수 있다. 이는 어버이 서열의 재형성을 차단하는 좋은 방법일 수 있다. 엔도뉴클레아제는 필요하지 않다. 제조된 분절들의 투입 농도를 조절함으로써, 목적하는 주제를 향해 기울일 수 있다. 상기 방법은 제한 효소 절단 없이 관련되지 않은 어버이로부터 DNA 서플링을 허용하며 랜덤한 돌연변이 방법의 선택을 허용한다.
- [0223] 하이브리드 효소의 생성을 위한 점증적인 절두(ITCHY)는 관심 유전자 또는 유전자 단편의 1 염기쌍 결실과의 조합적인 라이브러리를 생성시킨다(Ostermeier et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 96:3562-3567(1999); Ostermeier et al, Nat. Biotechnol. 17:1205-1209(1999)). 절두를 2 개의 상이한 유전자 조각 상에서 반대 방향으로 도입시킨다. 이들을 함께 연결하고 융합물을 클로닝한다. 상기 기법은 상기 두 어버이 유전자들

간에 상동성을 필요로 하지 않는다. ITCHY를 DNA 서플링과 병행하는 경우, 상기 시스템을 SCRATCHY라 칭한다 (하기 참조). 상기 둘의 주요 이점은 어버이 유전자들 간에 상동성이 필요하지 않다는 것이다; 예를 들어 이 콜라이와 인간 유전자 간의 작용성 융합물이 ITCHY를 통해 생성되었다. ITCHY 라이브러리가 제조되면, 모든 가능한 교차가 포착된다.

[0224] 상기 하이브리드 효소의 생산을 위한 티오-중분 절두(THIO-ITCHY)는, 포스포티올레이트 dNTP를 사용하여 절두를 생성시킴을 제외하고 ITCHY와 거의 동일하다(Lutz, S., M. Ostermeier, and S.J. Benkovic, 2001, Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha-phosphothiolate nucleotides. *Nucleic Acids Res* 29:E16). ITCHY에 비해, THIO-ITCHY는 최적화하기에 보다 용이하고 보다 많은 재현성과 조절성을 제공할 수 있다.

[0225] SCRATCH - DNA 서플링과 병행된 ITCHY는 DNA 서플링과 ITCHY와의 조합이다; 따라서 다수의 교차를 허용한다 (Lutz et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98:11248-11253(2001)). SCRATCHY는 ITCHY와 DNA 서플링의 최상의 특징들을 겸비한다. 수치적인 예건을 최적화에 사용할 수 있다. 서열 일치성이 80% 이하인 경우 SCRATCHY가 DNA 서플링보다 더 유효하다.

[0226] 랜덤 표류 돌연변이(RNDM)에서 돌연변이는 epPCR에 이어서 유용한 활성을 보유하는 것들에 대한 선별/선택을 통해 이루어졌다(Bergquist et al., *Biomol. Eng.* 22:63-72(2005)). 이어서, 이들을 DOGS에 사용하여 다수의 활성 돌연변이체들 사이 또는 활성 돌연변이체와 일부 다른 바람직한 어버이 사이의 융합을 갖는 재조합체를 생성시킨다. 중립 돌연변이의 단리를 촉진하도록 디자인하는 목적은 보유된 촉매 활성이 원래의 유전자에서 보다 더 높은 더 낮은 간에 상기 활성을 선별하는 것이다. RNDM은 선별이 배경 이상의 활성을 검출할 수 있는 경우 고속 대량 분석에 사용 가능하다. RNDM을 다양성의 발생에 있어서 DOGS에 대한 전단(front end)으로서 사용하였다. 상기 기법은 서플링 또는 다른 후속 단계들에 앞서 활성에 대한 요구를 부과하며; 중립 표류 라이브러리는 보다 작은 라이브러리로부터 보다 높고/신속한 개선을 생성시키는 것으로 나타났다. epPCR을 사용함이 공개되었다 하더라도, 상기를 다른 대규모 돌연변이 방법들에 적용할 수 있다.

[0227] 서열 포화 돌연변이(SeSaM)는 1) 포스포티오에이트 뉴클레오타이드의 랜덤한 통합 및 절단을 사용하여 랜덤한 길이의 단편들의 풀을 생성시키고; 상기 풀을 주형으로서 사용하여 2) 이노신과 같은 "보편적인" 염기의 존재 하에서 연장시키고; 3) 이노신-함유 보체의 복제가 랜덤한 염기 통합 및 결과적으로 돌연변이를 제공하는 랜덤한 돌연변이 방법이다(Wong et al., *PCR. Biotechnol J.* 3:74-82(2008); Wong et al., *Nucleic Acids Res* 32:e26(2004); and Wong et al., *Anal.Biochem.* 341:187-189(2005)). 상기 기법을 사용하는 경우, 간단한 방법을 사용하여 2 내지 3일 이내에 돌연변이체의 큰 라이브러리를 생성시키는 것이 가능할 수 있다. 이는 DNA 폴리머라제의 돌연변이 치우침에 비해 매우 비 방향성이다. 상기 접근법의 차이는 상기 기법을 epPCR에 대해 상보성(또는 대안적)으로 만든다.

[0228] 합성 서플링에서, 중복되는 올리고뉴클레오타이드는 "표적 중의 모든 유전자 다양성"을 암호화하도록 디자인되며 상기 서플링된 자손에 대해 매우 높은 다양성을 허용한다(Ness, et al, *Nat. Biotechnol* 20:1251-1255(2002)). 상기 기법에서, 상기 단편이 서플링되도록 디자인할 수 있다. 이는 상기 생성되는 자손의 다양성을 증가시키는데 일조한다. 보다 멀리 관련된 서열들을 보다 밀접하게 관련된 서열들에 접근하는 비율로 재조합하기 위해서 서열/코돈 치우침을 디자인할 수 있으며 이는 상기 주형 유전자들을 물리적으로 소유할 것을 요구하지 않는다.

[0229] 뉴클레오타이드 교환 및 절제 기술 NexT는 dUTP 통합에 이은 유라실 DNA 글리코실라제 및 이어서 피페리딘에 의한 처리의 조합을 활용하여 중점 DNA 단편화를 수행한다(Muller et al., *Nucleic Acids Res* 33:e117(2005)). 상기 유전자를 교정 폴리머라제와 함께 내부 PCR 프라이머 연장을 사용하여 제조립한다. 상기 서플링의 크기는 변하는 dUPT::dTTP 비를 사용하여 직접 조절할 수 있다. 이는 간단한 유라실 통합 및 절단 방법을 사용하는 중점 반응이다. 상기 방법에 다른 뉴클레오타이드 동족체, 예를 들어 8-옥소-구아닌을 사용할 수 있다. 또한, 상기 기법은 매우 짧은 단편(86 pb)으로 잘 작용하며 낮은 오류율을 갖는다. DNA의 화학적 절단은 매우 적은 서플링되지 않은 클론들을 의미한다.

[0230] 서열 상동성-독립적인 단백질 재조합(SHIPREC)에서 링커를 사용하여 2 개의 먼/관련되지 않은 유전자들 간의 융합을 촉진하며; 뉴클레아제 처리를 사용하여 상기 둘 사이에 일련의 키메라들을 생성시킨다. 그 결과 이들 융합물의 단일 교차 라이브러리가 생성된다(Sieber et al., *Nat.Biotechnol* 19:456-460(2001)). 이는 제한된 유형의 서플링을 생성시키며; 돌연변이는 별도의 공정이다. 상기 기법은 2 개의 관련되지 않은 어버이 유전자들 각각의 변하는 분획들을 갖는 키메라의 라이브러리를 생성시킬 수 있다. 상동성은 필요하지 않다.

SHIPREC을 포유동물 CP450의 N-말단 부위에 융합된 세균 CP450의 헴-결합 도메인으로 시험하였으며; 이는 보다 용해성인 효소에서 포유동물 활성을 생성시켰다.

[0231] 유전자 부위 포화 돌연변이(GSSM)에서 출발 물질은 삽입물이 있는 초나선(supercoiled) dsDNA 플라스미드이며 2 개의 프라이머가 목적하는 돌연변이 부위에서 퇴화된다(Kretz et al., *Methods Enzymol.* 388:3-11(2004)). 프라이머는 관심 돌연변이를 지니며 DNA의 반대 가닥 상의 동일한 서열에 어닐링하고; 상기 프라이머의 가운데에 돌연변이 및 양쪽의 측면에 정확한 서열의 ~20 뉴클레오타이드. 상기 프라이머 중의 서열은 NNN 또는 NNK(암호화) 및 MNN(비 암호화)(N = 모두 4 개, K = G,T, M = A,C)이다. 연장 후에, DpnI를 사용하여 댄-메틸화된 DNA를 절단하여 야생형 주형을 제거한다. 상기 기법은 주어진 유전자 좌(즉 하나의 코돈)에서 모든 가능한 아미노산 치환들을 조사한다. 상기 기법은 넌센스 코돈 및 대부분의 가능한 대립유전자들의 동일하거나 거의 동일한 표시 없이 하나의 부위에서 모든 가능한 치환의 발생을 촉진한다. 상기 표적 효소의 구조, 기전, 또는 도메인에 대한 선행 지식은 필요하지 않다. 서플링 또는 유전자 재조합이 이어지는 경우, 상기 기술은 단일 부위 상향 돌연변이의 모든 가능한 조합들을 함유하는 다양한 재조합체 라이브러리를 생성시킨다. 상기 기술 조합의 유용성은 50 개 이상의 상이한 효소들의 성공적인 진화, 및 또한 주어진 효소에서 하나의보다 많은 성질에 대해 입증되었다.

[0232] 조합적인 카세트 돌연변이(CCM)는 한정된 부위들을 다수의 가능한 아미노산 서열 변경으로 대체하는 짧은 올리고뉴클레오타이드 카세트의 사용을 포함한다(Reidhaar-Olson et al., *Methods Enzymol.* 208:564-586(1991); and Reidhaar-Olson et al., *Science* 241:53-57(1988)). 2 또는 3 개 부위들에서의 동시 치환이 상기 기법을 사용하여 가능하다. 또한, 상기 방법은 제한된 범위의 부위들에서 대다수의 가능한 서열 변화들을 시험한다. 이는 람다 억제인자 DNA-결합 도메인의 정보 내용을 탐구하는데 사용되었다.

[0233] 조합적인 복합 카세트 돌연변이(CMCM)는 보다 큰 프로그램의 일부로서 사용됨을 제외하고 CCM과 본질적으로 유사하다, 즉 1) 높은 돌연변이율 내지 2) ID 다발점 및 다발 영역에서 epPCR의 사용 및 이어서 3) CMCM에 의한 연장으로 단백질 서열 공간의 한정된 부위를 포함한다(Reetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591(2001)). CCM과 같이, 상기 방법은 표적 부위에 걸쳐 사실상 모든 가능한 변경들을 시험할 수 있다. 랜덤 돌연변이 및 서플링된 유전자를 생성시키는 방법들과 함께 사용되는 경우, 다양한, 서플링된 단백질을 탁월한 생성 수단을 제공한다. 상기 접근법은 효소의 거울상 선택성을 51배까지 성공적으로 증가시켰다.

[0234] 돌연변이 유발 균주 기법에서 조합적인 ts 돌연변이유발 플라스미드는 선택 중에 랜덤한 천연 돌연변이 빈도의 20- 내지 4000-X의 증가를 허용하고 선택이 필요하지 않은 경우 유해 돌연변이의 축적을 방지한다(Selifonova et al., *Appl Environ Microbiol* 67:3645-3649(2001)). 상기 기술은 플라스미드-유래된 mutD5 유전자를 기본으로 하며, 상기 유전자는 DNA 폴리머라제 III의 돌연변이 서브유닛을 암호화한다. 상기 서브유닛은 내생적인 DNA 폴리머라제 III에 결합하고 상기 플라스미드를 갖고 있는 균주들 중 임의의 균주에서 폴리머라제 III의 교정 능력을 절충한다. 광범위한 염기 치환 및 프레임이동 돌연변이가 발생한다. 유효한 사용을 위해서, 일단 목적하는 표현형이 성취되면 상기 돌연변이 유발 플라스미드를 제거해야 하며; 이는 온도 민감성 복제 기원을 통해 수행되고, 이는 41 °C에서 플라스미드 경화를 허용한다. 돌연변이 유발 균주가 상당한 기간 동안 탐구되었음을 알아야 한다(Winter and coworkers, 1996, *J. Mol. Biol.* 260, 359-3680). 상기 기법에서 매우 높은 자발적인 돌연변이율이 관찰된다. 상기 조건적인 성질은 목적하지 않는 배경 돌연변이를 최소화한다. 이러한 기술을 적용 진화와 병행하여 돌연변이 발생률을 증대시키고 목적하는 표현형들을 보다 신속하게 성취할 수 있었다.

[0235] "룩-스루(Look-Through) 돌연변이(LTM)는 선택된 아미노산들의 조합적인 돌연변이들을 평가하고 최적화하는 다차원적 돌연변이 방법이다"(Rajpal et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 102:8466-8471(2005)). 각 부위를 모든 가능한 아미노산 변화들로 포화시키는 것보다 오히려, 아미노산 R-그룹 화학의 범위를 포함하도록 9 개의 세트를 선택한다. 부위당 더 적은 변화는 다수의 부위가 상기 유형의 돌연변이를 쉽게 일으키게 한다. 낮은 나노몰에서부터 피코몰까지의 항체의 결합 친화성의 >800 배 증가가 상기 방법을 통해 성취되었다. 이는 랜덤한 조합의 수를 최소화하는데 합리적인 접근법이며 선별할 클론들의 수를 크게 감소시킴으로써 개선된 특성을 찾는 능력을 증가시킬 것이다. 이를 항체 공학, 구체적으로 결합 친화성을 증가시키고/시키거나 해리를 감소시키는데 적용하였다. 상기 기법을 선별 또는 선택과 병행할 수 있다.

[0236] 유전자 재조합은 한번에 다수의 유전자에 적용되거나 또는 단일 유전자의 큰 키메라 라이브러리(다수의 돌연변이)를 생성시키는데 적용될 수 있는 DNA 서플링 방법이다([www.verenium.com/Pages/Technology/EnzymeTech/TechEnzyTGR.html](http://www.verenium.com/Pages/Technology/EnzymeTech/TechEnzyTGR.html)). 전형적으로 상기 기술을, 상기 나타낸

서열 공간을 목적하는 개선에 대해 질문하기 위해 초고속 대량 선별과 함께 사용한다. 상기 기법은 상동성과 무관하게 다수의 유전자 재조합을 허용한다. 교차 사건들의 정확한 수 및 위치를 생물정보 분석을 통해 디자인된 단편들을 사용하여 미리 측정할 수 있다. 상기 기술은 실질적으로 어버이 유전자 재형성 없이 낮은 수준의 불활성 유전자와 함께 매우 높은 수준의 다양성을 도출시킨다. GSSM과 병행 시, 큰 범위의 돌연변이들을 개선된 활성에 대해 시험할 수 있다. 상기 방법은 DNA 서플링의 "블렌딩" 및 "미세 조정"을 허용한다, 예를 들어 코돈 사용을 최적화할 수 있다.

[0237] 인 실리코(In silico) 단백질 디자인 자동화 PDA는 특정한 주름을 갖는 구조적으로 한정된 단백질 주쇄를 고정시키고 상기 주름 및 전체 단백질 에너지학을 안정화할 수 있는 아미노산 치환을 위한 서열 공간을 탐색하는 최적화 연산방식이다(Hayes et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 99:15926-15931(2002)). 상기 기술은 단백질 아미노산 변이에 대한 구조적 허용성을 탐색하기 위해서 인 실리코 구조 기제 엔트로피 예견을 허용한다. 통계 역학을 각 위치에서의 커플링 상호작용을 계산하는데 적용한다, 즉 아미노산 치환에 대한 구조 허용성이 커플링의 척도이다. 최종적으로, 상기 기술은 구조 특징들의 완전성을 유지하면서 단백질 성질의 목적하는 변형들을 제공하도록 디자인된다. 상기 방법은 매우 큰 수의 가능한 서열 변형들( $10^{50}$ )의 필터링을 계산적으로 평가하고 허용한다. 시험하기 위한 서열 변형의 선택은 가장 유리한 열역학에 근거한 예견과 관련되며 외면상 오직 안정성 또는 안정성과 연결된 성질들만이 상기 기술에 의해 유효하게 다루어질 수 있다. 상기 방법은 일부 치료학적 단백질들, 특히 공학용 면역글로불린에 성공적으로 사용되었다. 인 실리코 예견은 대단히 많은 수의 잠재적인 변형들을 시험하는 것을 피한다. 기존 3차원 구조에 근거한 예견이 가설적인 구조에 근거한 예견보다 더 성공할 듯하다. 상기 기술은 다수의 동시적인 돌연변이들, 급격한 수의 증가로 인해 순수하게 실험적인 기술들로는 가능하지 않은 것들의 표적화된 선별을 쉽게 예견할 수 있으며 이를 허용한다.

[0238] 반복하는 포화 돌연변이(ISM)는 1) 효소 개선에 가능한 부위를 선택하기 위한 구조/작용 지식의 사용, 2) 스트라타진 퀵체인지(Stratagene QuikChange)(또는 다른 적합한 수단들)를 사용하는 선택된 부위에서의 포화 돌연변이, 3) 목적하는 성질에 대한 선별/선택, 4) 개선된 클론(들)과 함께, 또 다른 부위에서의 다시 시작 및 연속적인 반복을 수반한다(Reetz et al., Nat. Protoc. 2:891-903(2007); and Reetz et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. 45:7745-7751(2006)). 이는 주어진 위치에서 모든 가능한 치환들이 선별/선택에 대해 수행됨을 보장하는 입증된 방법이다.

[0239] 상기 언급한 돌연변이 방법들 중 임의의 방법을 단독으로 사용하거나 병행할 수 있다. 또한, 상기 방향 진화 방법들 중 어느 하나 또는 조합을 적용 진화 기법들과 함께 사용할 수 있다.

[0240] 더 양호한 생산자를 생성시키기 위해서, 대사 모델링을 생육 조건의 최적화에 사용할 수 있다. 모델링을 또한 상기 경로의 사용을 추가로 최적화하는 유전자 녹아웃의 디자인에 사용할 수 있다(예를 들어 미국 특허 공보 제 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466 호, 및 미국 특허 제 7,127,379 호를 참조하시오). 모델링 분석은 상기 대사가 아이소프로판올, n-부탄올, 또는 아이소부탄올의 보다 효율적인 생산을 향해 이동하는 세포 생육에 대한 영향들의 신뢰성 있는 예견을 허용한다.

[0241] 목적하는 생성물의 생합성에 유리한 대사 변경들을 확인하고 디자인하기 위한 한 가지 계산적인 방법은 OptKnock 계산 체계이다(Burgard et al., Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003)). OptKnock은 표적 생성물을 과생산하는 유전적으로 안정한 미생물을 생성시키는 유전자 결실 전략을 제시하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 프로그램이다. 구체적으로, 상기 체계는 목적하는 생화학을 강제로 세포 생육의 필수적인 부산물로 되게 하는 유전자 조작을 제시하기 위해서 미생물의 완전한 대사 및/또는 생화학적 네트워크를 검사한다. 전략적으로 배치된 유전자 결실 또는 다른 작용성 유전자 파괴를 통해 생화학적 생산과 세포 생육을 결합시킴으로써, 생물반응기에서 보다 긴 시간 후에 상기 조작된 균주에 부과된 생육 선택 압력은 강제적인 생육-결합된 생화학적 생산의 결과로서 실행의 개선을 도출시킨다. 마지막으로, 유전자 결실을 제작하는 경우에, OptKnock에 의해 선택된 유전자들이 상기 계νομ으로부터 완전히 제거되기 때문에 상기 디자인된 균주가 그의 야생형 상태로 되돌아가는 가능성은 무시할만하다. 따라서, 상기 계산적인 방법을, 목적하는 생성물의 생합성을 도출하는 대안 경로를 확인하거나 또는 목적하는 생성물의 생합성을 추가로 최적화하기 위해 비 천연 미생물 유기체와 함께 사용할 수 있다.

[0242] 간단히, OptKnock는 본 발명에서 세포 대사를 모델링하기 위한 계산 방법 및 시스템을 지칭하는데 사용되는 용어이다. 상기 OptKnock 프로그램은 특정한 구속을 유출 균형 분석(FBA) 모델에 통합시키는 방법 및 모델

체계와 관련된다. 이들 구속은 예를 들어 정량적인 동역학 정보, 정량적인 조절 정보, 및/또는 DNA 미세배열 실험 데이터를 포함한다. OptKnock는 또한 예를 들어 유출 균형 모델로부터 유도된 유출 경계를 엄격히 하고 후속적으로 유전자 첨가 또는 결실의 존재 하에서 대사 네트워크의 실행 한계를 탐침함으로써 다양한 대사 문제들에 대한 해법을 계산한다. OptKnock 계산 체계는 상기 대사 네트워크의 실행 한계의 유효 질문을 가능하게 하는 모델 제형의 제작을 허용하며 상기 생성되는 혼합-정수 선형 프로그래밍 문제를 해결하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 OptKnock로서 지칭되는 대사 모델링 및 시뮬레이션 방법들이 예를 들어 US 2002/016854, WO 2002/055995, 및 US 2009/0047719에 개시되어 있다.

[0243] 생성물의 생합성 생산에 유리한 대사 변경을 확인하고 디자인하기 위한 또 다른 계산 방법은 심페니(SimPheny)(등록상표)라 칭하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 시스템이다. 상기 계산 방법 및 시스템은 예를 들어 2002년 6월 14일자로 출원된 US 2003/0233218 및 WO 2003/106998에 개시되어 있다. 심페니(등록상표)는 인실리코 네트워크 모델을 생성시키고 생물 시스템의 화학 반응들을 통해 질량, 에너지 또는 충전의 유출을 시뮬레이션하여 상기 시스템 중의 화학 반응들의 임의의 및 모든 가능한 작용기들을 함유하는 해법 공간을 한정하여, 상기 생물 시스템에 대한 일련의 허용되는 활성들을 결정할 수 있는 계산 시스템이다. 이러한 접근법은 상기 해법 공간이 상기 포함된 반응들의 공지된 화학량론 뿐만 아니라 반응 열역학과 같은 구속 및 반응들을 통한 최대 유출과 관련된 용량 구속에 의해 한정되므로 구속-기재 모델링이라 지칭된다. 이들 구속에 의해 한정된 공간은 상기 생물 시스템 또는 그의 생화학적 성분들의 표현형 능력 및 반응을 측정하기 위해 의심될 수 있다.

[0244] 이러한 계산적 접근법은 생물 시스템들이 가요성이고 많은 상이한 방법들에서 동일한 결과에 도달할 수 있기 때문에 생물학적 실재와 일치한다. 생물 시스템은 모든 살아있는 시스템들이 직면해야 하는 근본적인 구속들에 의해 제한된 진화 기전을 통해 디자인된다. 따라서, 구속 기재 모델링 전략은 이들 일반적인 실재를 포함한다. 더욱이, 구속의 엄격화를 통해 네트워크 모델에 추가의 제한들을 연속적으로 부과하는 능력은 상기 해법 공간의 크기를 감소시키고, 이에 의해 생리학적 실행 또는 표현형을 예견할 수 있는 예견을 향상시킨다.

[0245] 본 발명의 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 숙주 미생물 유기체에서의 목적하는 화합물의 생합성을 디자인 및 실행하는데 대사 모델링 및 시뮬레이션에 대한 다양한 계산 체계를 적용할 것이다. 상기와 같은 대사 모델링 및 시뮬레이션 방법은 예를 들어 심페니(등록상표) 및 OptKnock로서 상기 예시된 계산 시스템들을 포함한다. 본 발명의 예시를 위해서, 일부 방법들을 모델링 및 시뮬레이션에 대해 상기 OptKnock 계산 체계와 관련하여 본 발명에 개시한다. 당해 분야의 숙련가들은 상기 대사 변경의 확인, 디자인 및 실행을 OptKnock를 사용하여 당해 분야에 널리 공지된 상기와 같은 다른 대사 모델링 및 시뮬레이션 계산 체계 및 방법들에 어떻게 적용하는 지를 알 것이다.

[0246] 상술한 방법들은 파괴하고자 하는 하나의 대사 반응 세트를 제공할 것이다. 상기 세트 또는 대사 변형 내의 각 반응의 제거 결과 목적하는 생성물이 상기 유기체의 생육 단계 동안 필수적인 산물로서 생성될 수 있다. 상기 반응들은 공지되어 있으므로, 상기 2단 OptKnock 문제에 대한 해법은 또한 상기 반응 세트 내의 각 반응을 촉매화하는 하나 이상의 효소를 암호화하는 관련된 유전자 또는 유전자들을 제공할 것이다. 각 반응에 관여하는 효소들을 암호화하는 일련의 반응 및 그의 상응하는 유전자들의 확인은 일반적으로 자동화된 공정이며, 상기 반응과, 효소와 암호화 유전자들 간의 관계를 갖는 반응 데이터베이스와의 상관성을 통해 수행된다.

[0247] 목적하는 생성물의 생산을 성취하기 위해서 파괴해야 하는 반응 세트를 표적 세포 또는 유기체에서 상기 세트 내의 각 대사 반응을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 작용 파괴에 의해 실행한다. 상기 반응의 작용 파괴를 성취하는데 특히 유용한 하나의 수단은 각 암호화 유전자의 결실에 의한 것이다. 그러나, 일부의 경우, 상기 반응을 다른 유전자 이상, 예를 들어 돌연변이, 조절 부위, 예를 들어 프로모터 또는 조절 인자에 대한 시스 결합 부위의 결실에 의해, 또는 임의의 다수의 위치들에서 암호화 서열의 절두에 의해 파괴하는 것이 유리할 수 있다. 상기 후자의 이상(상기 유전자 세트의 전체 미만의 결실을 생성시킨다)은, 예를 들어 생성물의 결합에 대한 신속한 평가를 원하는 경우 또는 격세 유전이 덜 발생할 듯한 경우 유용할 수 있다.

[0248] 목적하는 생성물의 생육-결합된 생합성을 포함한 생합성을 생성시킬 수 있는 대사 변형 또는 파괴하고자 하는 반응들의 추가의 세트를 도출시키는 상술한 2단 OptKnock 문제에 대한 추가의 생산적인 해법들을 확인하기 위해서, 정수 컷이라 칭하는 최적화 방법을 실행시킬 수 있다. 상기 방법은 상기 예시된 OptKnock 문제를 각 반복부에서 정수 컷이라 지칭되는 추가의 구속의 통합에 의해 반복적으로 해결함으로써 진행된다. 정수 컷 구속은 상기 해결 과정이, 임의의 선행 반복 시 확인된 정확하게 동일한 반응 세트를 선택하는 것(생성물 생합성을 생육과 강제로 결합시킨다)을 유효하게 방지한다. 예를 들어 앞서 확인된 생육-결합된 대사 변형이

파괴를 위한 반응 1, 2 및 3을 명시하는 경우, 하기의 구속은 동일한 반응이 후속 해법에 동시에 고려되는 것을 방지한다. 상기 정수 컷 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며 예를 들어 문헌[Burgard et al., *Biotechnol. Prog.* 17:791-797(2001)]에서 찾을 수 있다. 본 발명에 개시된 모든 방법들을 대사 모델링 및 시뮬레이션에 대한 상기 OptKnock 계산 체계와 함께 이들의 사용에 관하여, 반복적인 계산 분석에서 쓸데없는 반복을 감소시키는 정수 컷 방법을 또한 예를 들어 심페니(등록상표)를 포함하여 당해 분야에 널리 공지된 다른 계산 체계와 함께 적용할 수 있다.

[0249] 본 발명에 예시된 방법들, 예를 들어 표적 생화학적 생성물의 생산을, 확인된 유전자 변경을 갖도록 조작된 세포 또는 유기체의 생육과 강제로 결합시키는 것은 목적하는 생성물을 생합성적으로 생산하는 세포 및 유기체를 제작할 수 있게 한다. 따라서, 본 발명에 개시된 계산 방법은 OptKnock 및 심페니(등록상표) 중에서 선택된 인 실리코 방법에 의해 확인되는 대사 변형의 확인 및 실행을 허용한다. 상기 대사 변형의 세트는 예를 들어 하나 이상의 생합성 경로 효소들의 첨가 및/또는 예를 들어 유전자 결실에 의한 파괴를 포함하여 하나 이상의 대사 반응들의 작용 파괴를 포함할 수 있다.

[0250] 상기 논의된 바와 같이, OptKnock 방법은 긴 생육 선택 기간이 가해지는 경우, 돌연변이 미생물 네트워크가 그의 계산적으로 예견된 최대-생육 표현형을 향해 진화할 수 있다는 전제 하에 개발되었다. 즉 상기 접근법은 선택성 압력 하에서 유기체의 자기 최적화 능력을 활용한다. 상기 OptKnock 체계는 네트워크 화학량론에 근거하여 생화학적 생산과 세포 생육 사이를 강제로 결부시키는 유전자 결실 조합을 총망라하여 열거한다. 최적의 유전자/반응 녹아웃의 확인은 상기 생성 네트워크에 대한 최적 생육 해법이 관심 생화학을 과생산하도록 활성 반응 세트를 선택하는 2단 최적화 문제의 해법을 필요로 한다(Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657(2003)).

[0251] 이 콜라이 대사의 인 실리코 화학량론 모델을 사용하여 앞서 예시되고 예를 들어 미국 특허 공보 제 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466 호, 및 미국 특허 제 7,127,379 호에 개시된 바와 같이 대사 경로에 대한 필수 유전자들을 동정할 수 있다. 본 발명에 개시된 바와 같이, 상기 OptKnock 수학 체계를 정밀한 유전자 결실에 적용하여 목적하는 생성물의 생육-결합된 생산을 도출시킬 수 있다. 더욱이, 상기 2단 OptKnock 문제의 해법은 오직 하나의 결실 세트만을 제공한다. 모든 의미 있는 해법들, 즉 생육-결합된 생산 형성을 도출하는 모든 녹아웃 세트들을 열거하기 위해서, 정수 컷이라 지칭되는 최적화 기법을 실행할 수 있다. 이는 상기 OptKonck 문제를 상기 논의된 바와 같이, 각 반복 시 정수 컷이라 지칭되는 추가의 구속을 결합시켜 반복적으로 해결함을 수반한다.

[0252] 본 발명의 다양한 실시태양들의 활성화에 실질적으로 영향을 미치지 않는 변형들이 또한 본 발명에 제공된 본 발명의 정의 내에 있음은 물론이다. 따라서, 하기의 실시예들은 본 발명을 예시하고자 하는 것이지 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0253] **실시예 I**

[0254] **4-하이드록시부티릴-CoA의 아이소프로판올로의 전환을 위한 경로를 갖는 아이소프로판올 생산 미생물 유기체의 제조**

[0255] 본 실시예는 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올을 생산할 수 있는 미생물 유기체의 생성을 개시한다.

[0256] 에스케리키아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여, 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 시작하는 도 1에 도시된 아이소프로판올 경로를 조작한다. 이 콜라이는 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물의 생성에 양호한 숙주를 제공한다. 이 콜라이는 유전자 조작이 가능하며 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산 및 숙신산과 같은 다양한 생성물들을 혐기성 또는 미세호기성 조건 하에서 유효하게 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0257] 3-하이드록시아이소부티르산을 생산하도록 조작된 이 콜라이 균주를 생성시키기 위해서, 상기 경로에 사용된 상기 효소를 암호화하는 핵산들을 널리 공지된 분자 생물학 기법을 사용하여 이 콜라이에서 발현시킨다(예를 들어 상기 Sambrook, 2001; 상기 Ausubel, 1999 참조).

[0258] 특히, 각각 숙시닉 세미알데하이드 탈하이드로게나제(CoA-의존성), 4-하이드록시부티레이트 탈하이드로게나제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 및 포스포트랜스부티릴라제 활성을 암호화하는 sucD(YP\_001396394), 4hbd(YP\_001396393), buk1(Q45829), 및 ptb(NP\_349676) 유전자를 발현 벡터 내로 클로닝

하거나 염색체에 통합시킨다(Burk et al., 미국 공보 제 2009/0075351 호). 또한, 각각 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 비닐아세틸-CoA Δ-아이소머라제, 및 에노일-CoA 하이드라타제 활성을 암호화하는 abfD(P55792) 및 crt1(NP\_349318.1) 유전자를 PA1/lacO 프로모터 하에서 pZE13 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany) 내로 클로닝한다. 이어서, 각각 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제 및 아세틸-CoA:아세토아세테이트-CoA 트랜스퍼라제 활성을 암호화하는 hbd(NP\_349314.1) 및 atoA(P76459.1, P76458.1)를 PA1/lacO 프로모터 하에서 pZS23 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany) 내로 클로닝한다. 이어서, 아세토아세테이트 데카복실라제 및 아세톤 리덕타제 활성을 암호화하는 adc(NP\_149328.1) 및 adh(AAA23199.2) 유전자를 PA1/lacO 프로모터 하에서 pZS13 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany) 내로 클로닝한다. pZS23은 pZS13 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany)의 암피실린 내성 모듈을 널리 공지된 분자 생물학 기법에 의해 가나마이신 내성 모듈로 치환시켜 취득된다. 상기 세 세트의 플라스미드를 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소프로판올 합성에 필요한 상기 단백질과 효소를 발현하도록 이 콜라이의 4-하이드록시부티릴-CoA 생산 균주 내로 형질전환시킨다.

[0259] 생성되는 유전자 조작된 유기체를 당해 분야에 널리 공지된 과정에 따라 글루코스 함유 배지에서 배양한다(예를 들어 상기 Sambrook et al., 2001 참조). 이 콜라이의 숙주 균주를 코발아민을 드 노보 합성하도록 조작하지 않는 경우 코발아민을 또한 상기 배지에 공급하여 상기 뮤타제 효소의 활성을 확실하게 한다(Raux et al., J. Bacteriol. 178:753-767(1996)). 상기 아이소프로판올 합성 유전자의 발현은 폴리펩타이드 발현 또는 효소 활성의 측정에 대해 당해 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역 블롯팅을 사용하여 확인한다. 상기 발현된 효소의 효소 활성을 상기 개별적인 활성에 특이적인 분석들을 사용하여 확인한다. 아이소프로판올을 생산하는 상기 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광측정(GCMS) 또는 액체 크로마토그래피-질량 분광측정(LCMS)을 사용하여 확인한다.

[0260] 작용성 아이소프로판올 합성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 상기 경로의 효율적인 이용을 위해 최적화에 의해 더욱 증대시킨다. 간단히, 상기 조작된 균주를 상기 외래 유전자들 중 어느 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지를 결정하기 위해 평가한다. 발현을 예를 들어 추가적인 유전자 사본수의 도입에 의해, 상기 경로를 통해 유출을 제한할 수 있는 낮은 수준으로 발현된 임의의 효소에 대해 증가시킨다.

[0261] 더욱 양호한 생산자를 생성시키기 위해서, 대사 모델링을 사용하여 생육 조건을 최적화한다. 모델링을 또한 상기 경로의 이용을 추가로 최적화하는 유전자 녹아웃의 디자인에 사용한다(예를 들어 제 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466 호, 및 미국 특허 제 7,127,379 호 참조). 모델링 분석은 상기 대사가 아이소프로판올의 보다 효율적인 생산을 향해 이동하는 세포 생육에 대한 영향들의 신뢰성 있는 예견을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2단 최적화 접근법인 OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이며, 이를 집합적으로 아이소프로판올의 보다 양호한 생산을 생성시키는 유전자 녹아웃의 선택에 적용한다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들어 상기 아이소프로판올 생성물의 4-하이드록시부티릴-CoA 중간체의 보다 양호한 생산자를 생성시킬 수 있다. 적응 진화를 수행하여 생육과 생산 특징을 모두 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 상기 결과를 근거로, 후속의 모델링, 유전 공학 및 적응 진화 라운드를 상기 아이소프로판올 생산자에 적용시켜 생산을 더욱 증가시킬 수 있다.

[0262] 아이소프로판올의 대규모 생산을 위해서, 상기 유기체를 당해 분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양시켜 혐기성 조건 하에서 상기 유기체의 생육을 지원한다. 발효를 배치, 유가 또는 연속적인 방식으로 수행한다. 혐기성 조건은 먼저 상기 배지를 질소로 살포하고 이어서 배양 용기를 밀봉하여(예를 들어 플라스크를 격막 및 크립프-뚜껑으로 밀봉시킬 수 있다) 유지시킨다. 미세호기성 조건을 또한, 제한된 통기를 위해 작은 구멍을 제공함으로써 사용할 수 있다. 상기 배지의 pH를 산, 예를 들어 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 첨가에 의해 7의 pH에서 유지시킨다. 상기 생육물을, 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 측정하고, 글루코스 흡수율은 시간에 따른 탄소 원 고갈을 모니터링함으로써 측정한다. 바람직하지 못한 알콜, 유기산, 및 잔류 글루코스과 같은 부산물들을, 글루코스 및 알콜의 경우 굴절률 검출기 및 유기산의 경우 UV 검출기를 사용하여, HPLC(Shimadzu, Columbia MD)에 의해, 예를 들어 HPLC 컬럼의 애미넥스(Aminex)(등록상표) 시리즈(예를 들어 HPX-87 시리즈)(BioRad, Hercules CA))를 사용하여 정량분석할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng., 775-779(2005)).

[0263] 실시예 II

[0264] 4-하이드록시부티릴-CoA의 n-부탄올로의 전환을 위한 경로를 갖는 n-부탄올 생산 미생물 유기체의 제조

- [0265] 본 실시예는 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 n-부탄올을 생산할 수 있는 미생물 유기체의 생성을 개시한다.
- [0266] 에스케리키아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여, 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 시작하는 도 1에 도시된 부탄올 경로를 조작한다. 이 콜라이는 부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물의 생성에 양호한 숙주를 제공한다. 이 콜라이는 유전자 조작이 가능하며 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산 및 숙신산과 같은 다양한 생성물들을 혐기성 또는 미세호기성 조건 하에서 유효하게 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.
- [0267] 3-하이드록시아이소부티르산을 생산하도록 조작된 이 콜라이 균주를 생성시키기 위해서, 상기 경로에 사용된 상기 효소를 암호화하는 핵산들을 널리 공지된 분자 생물학 기법을 사용하여 이 콜라이에서 발현시킨다(예를 들어 상기 Sambrook, 2001; 상기 Ausubel, 1999 참조).
- [0268] 특히, 각각 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제(CoA-의존성), 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 및 포스포트랜스부티릴라제 활성을 암호화하는 *sucD*(YP\_001396394), *4hbd*(YP\_001396393), *buk1*(Q45829), 및 *ptb*(NP\_349676) 유전자를 발현 벡터 내로 클로닝하거나 염색체에 통합시킨다(Burk et al., 미국 공보 제 2009/0075351 호). 또한, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 및 비닐아세틸-CoA  $\Delta$ -아이소머라제 활성을 암호화하는 *abfD*(P55792) 유전자를 *PA1/lacO* 프로모터 하에서 *pZE13* 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany) 내로 클로닝한다. 이어서, 크로토닐-CoA 리덕타제 활성을 암호화하는 *bcd*(NP\_349317.1) 및 *etfAB*(NP\_349315.1, NP\_349316.1) 유전자를 *PA1/lacO* 프로모터 하에서 *pZS23* 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany) 내로 클로닝한다. 이어서, 부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드 형성) 및 부티르알데하이드 리덕타제 활성을 암호화하는 *ald*(AAT66436) 및 *adhI*(AAR91477.1) 유전자를 *PA1/lacO* 프로모터 하에서 *pZS13* 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany) 내로 클로닝한다. *pZS23*은 *pZS13* 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany)의 압피실린 내성 모듈을 널리 공지된 분자 생물학 기법에 의해 가나마이신 내성 모듈로 치환시켜 수득된다. 상기 세 세트의 플라스미드를 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 부탄올 합성에 필요한 상기 단백질과 효소를 발현하도록 이 콜라이의 4-하이드록시부티릴-CoA 생산 균주 내로 형질전환시킨다.
- [0269] 생성되는 유전자 조작된 유기체를 당해 분야에 널리 공지된 과정에 따라 글루코스 함유 배지에서 배양한다(예를 들어 상기 Sambrook et al., 2001 참조). 이 콜라이의 숙주 균주를 코발아민을 드 노보 합성하도록 조작하지 않는 경우 코발아민을 또한 상기 배지에 공급하여 상기 슈타제 효소의 활성을 확실하게 한다(Raux et al., J. Bacteriol. 178:753-767(1996)). 상기 부탄올 합성 유전자의 발현은 폴리펩타이드 발현 또는 효소 활성의 측정에 대해 당해 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역 블롯팅을 사용하여 확인한다. 상기 발현된 효소의 효소 활성을 상기 개별적인 활성에 특이적인 분석들을 사용하여 확인한다. 부탄올을 생산하는 상기 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광측정(GCMS) 또는 액체 크로마토그래피-질량 분광측정(LCMS)을 사용하여 확인한다.
- [0270] 작용성 부탄올 합성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 상기 경로의 효율적인 이용을 위해 최적화에 의해 더욱 증대시킨다. 간단히, 상기 조작된 균주를 상기 외래 유전자들 중 어느 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지를 결정하기 위해 평가한다. 발현을 예를 들어 추가적인 유전자 사본수의 도입에 의해, 상기 경로를 통해 유출을 제한할 수 있는 낮은 수준으로 발현된 임의의 효소에 대해 증가시킨다.
- [0271] 더욱 양호한 생산자를 생성시키기 위해서, 대사 모델링을 사용하여 생육 조건을 최적화한다. 모델링을 또한 상기 경로의 이용을 추가로 최적화하는 유전자 녹아웃의 디자인에 사용한다(예를 들어 제 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466 호, 및 미국 특허 제 7,127,379 호 참조). 모델링 분석은 상기 대사가 부탄올의 보다 효율적인 생산을 향해 이동하는 세포 생육에 대한 영향들의 신뢰성 있는 예견을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2단 최적화 접근법인 OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이며, 이를 집합적으로 부탄올의 보다 양호한 생산을 생성시키는 유전자 녹아웃의 선택에 적용한다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들어 상기 부탄올 생성물의 4-하이드록시부티릴-CoA 중간체의 보다 양호한 생산자를 생성시킬 수 있다. 적응 진화를 수행하여 생육과 생산 특징을 모두 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 상기 결과를 근거로, 후속의 모델링, 유전 공학 및 적응 진화 라운드를 상기 부탄올 생산자에 적용시켜 생산을 더욱 증가시킬 수 있다.
- [0272] 부탄올의 대규모 생산을 위해서, 상기 유기체를 당해 분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양시켜 혐기성 조건 하에서 상기 유기체의 생육을 지원한다. 발효를 배치, 유가 또는 연속적인 방식으로 수행한다. 혐기성 조건은 먼저 상기 배지를 질소로 살포하고 이어서 배양 용기를 밀봉하여(예를 들어 플라스크를 격막

및 크립프-뚜껍으로 밀봉시킬 수 있다) 유지시킨다. 미세호기성 조건을 또한, 제한된 통기를 위해 작은 구멍을 제공함으로써 사용할 수 있다. 상기 배지의 pH를 산, 예를 들어 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 첨가에 의해 7의 pH에서 유지시킨다. 상기 생육물을, 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 측정하고, 글루코스 흡수율은 시간에 따른 탄소 원 고갈을 모니터함으로써 측정한다. 바람직하지 못한 알콜, 유기산, 및 잔류 글루코스와 같은 부산물들을, 글루코스 및 알콜의 경우 굴절률 검출기 및 유기산의 경우 UV 검출기를 사용하여, HPLC(Shimadzu, Columbia MD)에 의해, 예를 들어 HPLC 컬럼의 애미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들어 HPX-87 시리즈)(BioRad, Hercules CA)를 사용하여 정량분석할 수 있다(Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 775-779(2005)).

[0273] 실시예 III

[0274] 4-하이드록시부티릴-CoA의 아이소부탄올로의 전환을 위한 경로를 갖는 아이소부탄올 생산 미생물 유기체의 제조

[0275] 본 실시예는 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올을 생산할 수 있는 미생물 유기체의 생성을 개시한다.

[0276] 에스케리키아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여, 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 시작하는 도 1에 도시된 아이소부탄올 경로를 조작한다. 이 콜라이는 아이소부탄올을 생산할 수 있는 비 천연 미생물의 생성에 양호한 숙주를 제공한다. 이 콜라이는 유전자 조작이 가능하며 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산 및 숙신산과 같은 다양한 생성물들을 혐기성 또는 미세호기성 조건 하에서 유효하게 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0277] 3-하이드록시아이소부티르산을 생산하도록 조작된 이 콜라이 균주를 생성시키기 위해서, 상기 경로에 사용된 상기 효소를 암호화하는 핵산들을 널리 공지된 분자 생물학 기법을 사용하여 이 콜라이에서 발현시킨다(예를 들어 상기 Sambrook, 2001; 상기 Ausubel, 1999 참조).

[0278] 특히, 각각 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제(CoA-의존성), 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 및 포스포트랜스부티릴라제 활성을 암호화하는 sucD(YP\_001396394), 4hbd(YP\_001396393), buk1(Q45829), 및 ptb(NP\_349676) 유전자를 발현 벡터 내로 클로닝하거나 염색체에 통합시킨다(Burk et al., 미국 공보 제 2009/0075351 호). 또한, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 비닐아세틸-CoA Δ-아이소머라제, 및 아이소부티릴-CoA 뮤타제 활성을 암호화하는 abfD(P55792), icm(AAC08713.1) 및 icmB(CAB59633.1) 유전자를 PA1/lacO 프로모터 하에서 pZE13 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany) 내로 클로닝한다. 이어서, 크로토닐-CoA 리덕타제 활성을 암호화하는 bcd(NP\_349317.1) 및 etfAB(NP\_349315.1, NP\_349316.1) 유전자를 PA1/lacO 프로모터 하에서 pZS23 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany) 내로 클로닝한다. 이어서, 아이소부티릴-CoA 리덕타제(알콜 형성) 활성을 암호화하는 adhE(AAV66076.1) 유전자를 PA1/lacO 프로모터 하에서 pZS13 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany) 내로 클로닝한다. pZS23은 pZS13 벡터(Expressys, Ruelzheim, Germany)의 암피실린 내성 모듈을 널리 공지된 분자 생물학 기법에 의해 가나마이신 내성 모듈로 치환시켜 취득된다. 상기 세 세트의 플라스미드를 4-하이드록시부티릴-CoA로부터 아이소부탄올 합성에 필요한 상기 단백질과 효소를 발현하도록 이 콜라이의 4-하이드록시부티릴-CoA 생산 균주 내로 형질전환시킨다.

[0279] 생성되는 유전자 조작된 유기체를 당해 분야에 널리 공지된 과정에 따라 글루코스 함유 배지에서 배양한다(예를 들어 상기 Sambrook et al., 2001 참조). 이 콜라이의 숙주 균주를 코발아민을 드 노보 합성하도록 조작하지 않는 경우 코발아민을 또한 상기 배지에 공급하여 상기 뮤타제 효소의 활성을 확실하게 한다(Raux et al., *J. Bacteriol.* 178:753-767(1996)). 상기 아이소부탄올 합성 유전자의 발현은 폴리펩타이드 발현 또는 효소 활성의 측정에 대해 당해 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역 블롯팅을 사용하여 확인한다. 상기 발현된 효소의 효소 활성을 상기 개별적인 활성에 특이적인 분석들을 사용하여 확인한다. 아이소부탄올을 생산하는 상기 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광측정(GCMS) 또는 액체 크로마토그래피-질량 분광측정(LCMS)을 사용하여 확인한다.

[0280] 작용성 아이소부탄올 합성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 상기 경로의 효율적인 이용을 위해 최적화에 의해 더욱 증대시킨다. 간단히, 상기 조작된 균주를 상기 외래 유전자들 중 어느 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지를 결정하기 위해 평가한다. 발현을 예를 들어 추가적인 유전자 사본수의 도입에 의해, 상기 경로를 통해 유출을 제한할 수 있는 낮은 수준으로 발현된 임의의 효소에 대해 증가시킨다.

[0281] 더욱 양호한 생산자를 생성시키기 위해서, 대사 모델링을 사용하여 생육 조건을 최적화한다. 모델링을 또한

상기 경로의 이용을 추가로 최적화하는 유전자 녹아웃의 디자인에 사용한다(예를 들어 제 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466 호, 및 미국 특허 제 7,127,379 호 참조). 모델링 분석은 상기 대사가 아이소부탄올의 보다 효율적인 생산을 향해 이동하는 세포 생육에 대한 영향들의 신뢰성 있는 예견을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2단 최적화 접근법인 OptKnock(Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657(2003))이며, 이를 집합적으로 아이소부탄올의 보다 양호한 생산을 생성시키는 유전자 녹아웃의 선택에 적용한다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들어 상기 아이소부탄올 생성물의 4-하이드록시부티릴-CoA 중간체의 보다 양호한 생산자를 생성시킬 수 있다. 적응 진화를 수행하여 생육과 생산 특징을 모두 개선시킨다(Fong and Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058(2004); Alper et al., *Science* 314:1565-1568(2006)). 상기 결과를 근거로, 후속의 모델링, 유전 공학 및 적응 진화 라운드를 상기 아이소부탄올 생산자에 적용시켜 생산을 더욱 증가시킬 수 있다.

[0282]

아이소부탄올의 대규모 생산을 위해서, 상기 유기체를 당해 분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양시켜 혐기성 조건 하에서 상기 유기체의 생육을 지원한다. 발효를 배치, 유가 또는 연속적인 방식으로 수행한다. 혐기성 조건은 먼저 상기 배지를 질소로 살포하고 이어서 배양 용기를 밀봉하여(예를 들어 플라스크를 격막 및 크럼프-뚜껑으로 밀봉시킬 수 있다) 유지시킨다. 미세호기성 조건을 또한, 제한된 통기를 위해 작은 구멍을 제공함으로써 사용할 수 있다. 상기 배지의 pH를 산, 예를 들어 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 첨가에 의해 7의 pH에서 유지시킨다. 상기 생육물을, 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 측정하고, 글루코스 흡수율은 시간에 따른 탄소 원 고갈을 모니터함으로써 측정한다. 바람직하지 못한 알콜, 유기산, 및 잔류 글루코스과 같은 부산물들을, 글루코스 및 알콜의 경우 굴절률 검출기 및 유기산의 경우 UV 검출기를 사용하여, HPLC(Shimadzu, Columbia MD)에 의해, 예를 들어 HPLC 컬럼의 애미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들어 HPX-87 시리즈)(BioRad, Hercules CA))를 사용하여 정량분석할 수 있다(Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 775-779(2005)).

표 38

문자	BC 분류	목적하는 기질	목적하는 생장물	중소영양	유전자명	진뱅크 ID (입수할 수 있는 경우)	유기체	공치된 기질
A	4.2.1.a	4-하이드록시-부티릴-CoA	크로토닐-CoA	4-하이드록시부티릴-CoA (테트라드라만체)	<i>ahfD</i>	YP_001396399.1	클로스트리움 클루이베리 DSM 535	4-하이드록시-부티릴-CoA
					<i>ahfD</i>	P53792	클로스트리움 아미노부티리움	4-하이드록시-부티릴-CoA
					<i>ahfD</i>	YP_001928843	포르피로모나스 진지말리스	4-하이드록시-부티릴-CoA
					<i>ahfD</i>	NP_349318.1	클로스트리움 아세토부틸리움	3-하이드록시-부티릴-CoA
B	4.2.1.a	크로토닐-CoA	3-하이드록시 부티릴-CoA	크로토닌체	<i>crtI</i>	YP_001393856	클로스트리움 클루이베리 DSM 535	3-하이드록시-부티릴-CoA
					<i>crtI</i>	YP_001929291.1	포르피로모나스 진지말리스	3-하이드록시-부티릴-CoA
					<i>crtI</i>	NP_745427.1	슈도모나스 푸티다	서열 유사성에 근거한 예
					<i>puuB</i>	NP_745426.1	슈도모나스 푸티다	에노일-CoA 페닐아세틸-CoA의 시스-다이하이드로 다이올 유도체
					<i>phdA</i>	ABR82233.1	슈도모나스 플루오레센스	에노일-CoA 페닐아세틸-CoA의 시스-다이하이드로 다이올 유도체
					<i>phdA</i>	ABR82234.1	슈도모나스 플루오레센스	에노일-CoA 페닐아세틸-CoA의 시스-다이하이드로 다이올 유도체
					<i>puuB</i>	NP_415905.1	에스케리키아 콜라이	에노일-CoA 페닐아세틸-CoA의 시스-다이하이드로 다이올 유도체
					<i>puuB</i>	NP_415911.1	에스케리키아 콜라이	에노일-CoA 페닐아세틸-CoA의 시스-다이하이드로 다이올 유도체
					<i>puuG</i>	NP_415912.1	에스케리키아 콜라이	에노일-CoA 페닐아세틸-CoA의 시스-다이하이드로 다이올 유도체

C	1.1.1.a	3-하이드록시부티랄-CoA	이세토이세틸-CoA	3-하이드록시부티랄-CoA, 테하이드도케나제	<i>hbd</i>	NP_349314.1	클로스트리움 이세토부틸리움	이세토이세틸-CoA
					<i>hbd</i>	AAAM14586.1	클로스트리움 배이세랑키아	이세토이세틸-CoA
					<i>Hhd2</i>	EDK34807.1	클로스트리움 클루이베리	이세토이세틸-CoA
					<i>Hbd1</i>	EDK32512.1	클로스트리움 클루이베리	이세토이세틸-CoA
					<i>Mced_1423</i>	YP_001191505	메탈로스테리아 세롤리	3-하이드록시부티랄-CoA
					<i>Mced_0399</i>	YP_001190500	메탈로스테리아 세롤리	3-하이드록시부티랄-CoA
					<i>Mced_0389</i>	YP_001190490	메탈로스테리아 세롤리	3-하이드록시부티랄-CoA (의심됨)
					<i>Mced_1993</i>	YP_001192057	메탈로스테리아 세롤리	3-하이드록시부티랄-CoA (의심됨)
					<i>JadB</i>	P21177.2	에스케리키아 콜리	3-옥소이질-CoA
					<i>JadI</i>	P77399.1	에스케리키아 콜리	3-옥소이질-CoA
D	6.2.1.a	이세토이세틸-CoA	이세토이세틸-이트	이세토이세틸-CoA 산화효소	<i>iscC, iscD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	에스케리키아 콜리	3-옥소이질-CoA
					<i>AACS</i>	NP_084486.1	무스 무스콜루스	이세토이세틸-이트
					<i>AF1211</i>	NP_070039.1	알키메로클로루스 풀키투스 DSM 4304	이세틸-CoA, 포스포인산-CoA, 푸티롤-CoA, 아세틸-이트, 포스포인산-이트, 부티레이트, 아이소부티레이트, 아이소발레레이트, 숙시네이트, 푸마레이트, 메틸아세틸-이트, 인돌아세틸-이트

E	2.8.3.a	아세트아세틸-CoA	아세트아세틸아이드	아세트아세틸-CoA: 아세트아세틸아이드-CoA 트랜스퍼라제	<i>atod, atod</i>	P76459.1, P76458.1	에스캐리키아 콜리아 K12	아세트아이드/아세트아세틸-CoA
					<i>actA</i>	YP_226809.1	코리네박테리움	아세트아이드/아세트아세틸-CoA
					<i>cg0592</i>	YP_224801.1	코리네박테리움	아세트아이드/아세트아세틸-CoA
					<i>Cjfa, Cjfb</i>	NP_149326.1, NP_149327.1	글로스타미움 ATCC 13032	아세트아이드/아세트아세틸-CoA
					<i>Cjfa, Cjfb</i>	NP_149326.1, AAP42564.1, AAP42565.1	글로스타미움 아세트아세틸리움	아세트아이드/아세트아세틸-CoA
					<i>HPAG1_0676, HPAG1_0677</i>	YP_627417, YP_627418	글로스타미움	아세트아이드/아세트아세틸-CoA
					<i>Scod, Scob</i>	NP_391778, NP_391777	헬리코박터 피로리	아세트아이드/아세트아세틸-CoA
					<i>tesB</i>	NP_414986	에스캐리키아 콜리아	아세트아이드/아세트아세틸-CoA
					<i>aca12</i>	NP_570103.1	라투스 노르베기쿠스	아세트아이드/아세트아세틸-CoA
					<i>hbhb</i>	Q6NYY1.2	호모 사피엔스	아세트아이드/아세트아세틸-CoA
G	4.11.a	아세트아세틸아이드	아세틸	아세트아세틸아이드 디카복실라제	<i>Ade</i>	NP_149328.1	글로스타미움 아세트아세틸리움	아세트아세틸아이드
					<i>Ade</i>	AAP42566.1	글로스타미움	아세트아세틸아이드
					<i>Ade</i>	YP_001422565	시카모과부생아세트니움	아세트아세틸아이드(역전되는 효소는 공지된 바실러스 풀리프시 출수액 시험 및 적용이 유사한 듯하다)
					<i>Ade</i>	YP_001310906.1	글로스타미움 메이제링키아	아세트아세틸아이드
					<i>cbet_3835</i>	YP_001886324.1	NCIMB 8032	아세트아세틸아이드
					<i>CLL_A2135</i>	YP_001422565.1	글로스타미움	아세트아세틸아이드
					<i>RBAM_030030</i>	<i>F2B42</i>	바실러스 이멜로리케피시엔스	아세트아세틸아이드

H	I.1.1.a	아세톤	아이소프로판올	아세톤 리덕타제	<i>adh</i>	AAA23199.2	글로스트리움 베이지엔키이 <i>NRRL B593</i>	아세톤
					<i>adh</i>	P14941.1	세모나에로버티 그록키이 <i>HZZM</i>	아세톤
					<i>adh-4</i>	CAD36475	로도코카스 루버	매우 광범위함 - 아세톤 및 아이소프로판올 포함
					<i>adh4</i>	AA025556	파이로코카스 퓨리오수스	매우 광범위함 - 아세톤 및 아이소프로판올 포함
I	I.3.1.a	크로토닐-CoA	부티릴-CoA	크로토닐-CoA 리덕타제	<i>bat, eifA, eifB</i>	NP_349317.1, NP_349315.1, NP_349316.1	글로스트리움 아세토부틸리움	크로토닐-CoA
					<i>ZER</i>	Q5BU90.1	유글레나 그라찰리스	크로토닐-CoA
					<i>TDEU597</i>	NP_971211.1	트레포네마 덴티콜라	크로토닐-CoA
					<i>Ald</i>	AA166436	글로스트리움 베이지엔키이	부티릴-CoA
J	I.2.1.b	부티릴-CoA	부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환성)	부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 환성)	<i>sacD</i>	NP_904963.1	포르피로모나스 긴지발리스	부티릴-CoA
					<i>bplG</i>	BA.A03892.1	슈도모나스 스페시즈	아세트알데하이드, 프로피알데하이드, 부티르알데하이드, 아이소부티르알데하이드 및 포알데하이드
					<i>Mscd_0709</i>	YP_001190808.1	메일로스파에리 세틀리	발코닐-CoA
					<i>mcr</i>	NP_378167	셀포모우스 도프다이어이	메틸발코닐-CoA

K	I.1.1.a	부티르알데하이드	n-부탄올	부티르알데하이드 리덕타제	btv4	BA1B12273.1	에시넬라박타 스페시즈 균주 M-1	C2C14 알데하이드							
					ADH2	NP_014032.1	사카로마이세스 세레비치아에	프로피온알데하이드, 아이소부티르알데하이드, 부티르알데하이드, 2-메틸부티르알데하이드, 3-메틸부티르알데하이드, 2-페닐아세트알데하이드							
					yphD	NP_417484.1	에스케리키아 콜리이	아세트알데하이드, 말론다이알데하이드, 프로판알데하이드, 부탄알데하이드 및 아크롤레인							
					bhh I	NP_349892.1	클로스트리움 아세토부틸리움	부티르알데하이드							
					bhh II	NP_349891.1	클로스트리움 아세토부틸리움	부티르알데하이드							
					4hhbI	YP_726053.1	칼스도니아 유드르코프 H16	숙시네이트 세미알데하이드							
					ADHII	AAK91477.1	제오베일러스 세모글루코시다시우스 MIOEXG	에탄올, 1-부탄올, 1-펜탄올, 1-헥산올, 1-옥탄올, 2-프로판올							
					mmsb	P28811.1	슈도모나스 아에루기노사	3-히이드록시 부티르알데하이드, 말론닉 세미알데하이드							
					adhE2	AAK09379.1	클로스트리움 아세토부틸리움	부티르알-CoA							
					L	I.1.1.c	부티르-CoA	n-부탄올	부티르-CoA 리덕타제(알콜 환성)	mcr	AA520429.1	클로스트리움 아우린티아루스	말론알-CoA		
FAR	AAAD38039.1	산모노시아 키네틱스	장쇄 아실-CoA												
icmB, icmB	AAAC08713.1, CAB59633.1	스트렙토마이세스 인다모벤시스	아이소부티르알-CoA												
icm4, icmB	NP_824008.1, NP_824637.1	스트렙토마이세스 아베르미탈 리스 MA-4680	아이소부티르알-CoA 부티르알-CoA												
Mpe_B0541, Mpe_B0538	YP_001023546.1, YP_001023543.1	메틸리폼 패드틀레이발롱 PMI	2-히이드록시아이 소부티르알-CoA, 3- 히이드록시부티르알-CoA												
M	5.4.99.a	부티르-CoA	아이소부티르알-CoA	아이소부티르알-CoA 유타제											

N	1.2.1.b	아이소부티릴-CoA	아이소부티릴 알데하이드	아이소부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 활성)	<i>ald</i>	AA156436	클로스트리움 페이세링키아	부티릴-CoA
					<i>suad</i>	NP_904963.1	포네프로모나스 진지발리스	숙시닐-CoA
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	슈도모나스 스페이조	포네프로모나스 진지발리스 부티릴알데하이드, 아이소부티릴알데하이드 및 포네프로모나스 진지발리스 숙시닐-CoA
					<i>Mscd_0709</i>	YP_001190808.1	메탈로스테레움 세틀라	말코닐-CoA
					<i>mcr</i>	NP_378167	셀코프로부스 토크다미아	말코닐-CoA
					<i>dh4</i>	BAB12273.1	에시네토박터 스페이조 균주 M-1	말코닐-CoA
O	1.1.1.a	아이소부티릴알데하이드	아이소부티릴알데하이드 리덕타제		<i>ADH2</i>	NP_014032.1	시카모마이세스 세레비치아에	포네프로모나스 진지발리스, 아이소부티릴알데하이드, 부티릴알데하이드, 2-메틸부티릴알데하이드, 3-메틸부티릴알데하이드, 2-페닐아세트알데하이드
					<i>yphD</i>	NP_417484.1	에스케리키아 콜리이	아세트알데하이드, 말론다이알데하이드, 프로판알데하이드, 부티릴알데하이드 및 아크롤레인
					<i>bph I</i>	NP_349892.1	클로스트리움 아세투부틸룸	부티릴알데하이드
					<i>bph II</i>	NP_349891.1	클로스트리움 아세투부틸룸	부티릴알데하이드
					<i>4hbd</i>	YP_726053.1	클로스트리아 우트로프 H16	숙시네이트 세미알데하이드
					<i>ADH1</i>	AAK91477.1	제오미실리우스 세오올루코사다시우스	에탄올, 1-부탄올, 1-헥산올, 1-헵탄올, 2-오ktan올
					<i>mmsb</i>	P28811.1	슈도모나스 아에루키노시	3-하이드록시-부티릴알데하이드, 말론다이알데하이드, 메틸말론다이알데하이드, 세미알데하이드
					<i>P84067</i>	P84067	세무스 세오올루쿠스	메틸말론다이알데하이드





도면

도면1

