(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월09일
(11) 등록번호 10-2099295
(24) 등록일자 2020년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 1/00* (2017.01)
C12N 1/02 (2017.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01) *C12P 13/00* (2006.01)
C12P 13/02 (2006.01) *C12P 13/04* (2006.01)
C12P 17/12 (2006.01) *C12P 7/44* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/52 (2013.01)
C12N 1/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7030720(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년05월07일
심사청구일자 2019년11월15일
(85) 번역문제출일자 2019년10월18일
(65) 공개번호 10-2019-0121869
(43) 공개일자 2019년10월28일
(62) 원출원 특허 10-2018-7035955
원출원일자(국제) 2010년05월07일
심사청구일자 2019년01월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/034144
(87) 국제공개번호 WO 2010/129936
국제공개일자 2010년11월11일
(30) 우선권주장
61/176,196 2009년05월07일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
US20070254341 A1

(73) 특허권자
게노마티카 인코포레이티드
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 넥서스 센터 드라이브 4757
(72) 발명자
버크 마크 제이
미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 써클 10520
버가드 안쏘니 피
미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 써클 10520
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 김정태

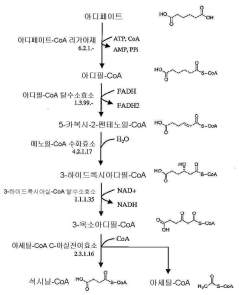
(54) 발명의 명칭 **아디페이트, 헥사메틸렌디아민 및 6-아미노카프로산의 생합성을 위한 미생물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 미생물 유기체는 각각의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로에서 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산, 카프로락

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산하기 위한 방법을 제공한다. 이 방법은 6-아미노카프로산, 카프로락탐 또는 헥사메틸렌디아민 생산 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산하기에 충분한 조건하에 충분한 시간 동안 각각의 생성물을 생산하기에 충분한 양으로 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 발현한다.

(52) CPC특허분류
C12N 1/02 (2013.01)
C12N 1/20 (2013.01)
C12N 1/38 (2013.01)
C12P 13/001 (2013.01)
C12P 13/005 (2013.01)
C12P 13/02 (2013.01)
C12P 13/04 (2013.01)
C12P 17/12 (2013.01)
C12P 7/44 (2013.01)

(72) 발명자
오스터아우트 로빈 이
미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 써클 10520
파크야 프리티
미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 써클 10520

(30) 우선권주장
61/219,365 2009년06월22일 미국(US)
61/244,844 2009년09월22일 미국(US)
61/246,973 2009년09월29일 미국(US)
61/247,533 2009년09월30일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

헥사메틸렌디아민을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 헥사메틸렌디아민 경로 효소를 코딩하는 1종 이상의 외인성 핵산을 포함하는 헥사메틸렌디아민 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 헥사메틸렌디아민 경로가 6-아미노카프로에이트 키나아제, [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP) 산화환원효소, 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소, 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 6-AHOP 아실전이효소, 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소, 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제 또는 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소를 포함하되, 상기 헥사메틸렌디아민 경로가 6-아미노카프로에이트 환원효소를 포함하지 않는 것인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 헥사메틸렌디아민 경로가 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 헥사메틸렌디아민 경로가 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 아실전이효소; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 헥사메틸렌디아민 경로가 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 헥사메틸렌디아민 경로가 상기 헥사메틸렌디아민을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 헥사메틸렌디아민 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 상기 외인성 핵산 세트가 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 코딩하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 헥사메틸렌디아민 경로가 상기 헥사메틸렌디아민을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 헥사메틸렌디아민 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 상기 외인성 핵산 세트가 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 아실전이효소; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 코딩하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 헥사메틸렌디아민 경로가 상기 헥사메틸렌디아민을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 헥사메틸렌디아민 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 상기 외인성 핵산 세트가 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 코딩하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 미생물 유기체가 각각 헥사메틸렌디아민 경로 효소를 코딩하는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 1종 이상의 외인성 핵산이 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 10

제1항에 있어서,

실질적으로 혐기성인 배양물 배지 중에 존재하는 비-천연 미생물 유기체.

청구항 11

헥사메틸렌디아민을 생산하기에 충분한 기간 동안 및 조건하에 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 헥사메틸렌디아민을 생산하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 헥사메틸렌디아민이 추출 절차에 의해 배양물 중의 다른 성분들로부터 분리되는, 헥사메틸렌디아민을 생산하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 헥사메틸렌디아민이, 연속 액체-액체 추출, 투과증발(pervaporation), 막 여과, 막 분리, 역삼투압, 전기투석, 증류, 결정화, 원심분리, 추출성 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 및 한외여과로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 기술에 의해 배양물 중의 다른 성분들로부터 분리되는, 헥사메틸렌디아민을 생산하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 미국 가특허 출원 일련 번호 제61/176,196호(2009년 5월 7일자로 출원됨), 미국 가특허 출원 일련 번호 제61/219,365호(2009년 6월 22일자로 출원됨), 미국 가특허 출원 일련 번호 제61/244,844호(2009년 9월 22일자로 출원됨), 미국 가특허 출원 일련 번호 제61/246,973호(2009년 9월 29일자로 출원됨), 및 미국 가특허 출원 일련 번호 제61/247,533호(2009년 9월 30일자로 출원됨)를 우선권 주장하고, 이들 각각은 전체 내용이 본원에 참고로 인용된다.

[0002] 본 발명은 일반적으로 생합성 방법, 및 더 구체적으로 아디페이트, 헥사메틸렌디아민, 6-아미노카프로산 및 카프로락탐 생합성 능력을 갖는 유기체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 디카복실산인 아디프산은 146.14의 분자량을 갖는다. 이는 아디프산을 헥사메틸렌디아민과 축합시킴으로써 제조되는 선형 폴리아미드인 나일론 6,6을 생산하기 위해 사용될 수 있다. 이는 상이한 종류의 섬유를 제작하기 위해 이용된다. 아디프산의 다른 용도로는 가소화제, 불포화 폴리에스테르, 및 폴리에스테르 폴리올에서의 이의 용도가 포함된다. 추가적인 용도로는 폴리우레탄, 윤활제 성분들의 생산에서의 용도, 및 향미제 및 겔화 보조제와 같은 식품 구성성분으로서의 용도가 포함된다.

[0004] 역사적으로, 아디프산은 산화를 사용하여 다양한 지방으로부터 제조되었다. 아디프산 합성을 위한 몇몇 현행 공정은 과량의 강한 질산을 사용하는 KA 오일의 산화, 사이클로헥사논, 케톤 또는 K 성분, 및 사이클로헥산올, 알코올 또는 A 성분의 혼합물의 산화, 또는 순수 사이클로헥산올의 산화에 기초한다. KA 또는 사이클로헥산올의 생산을 위한 경로가 상이한 상기 주제에 대한 일부 변화가 존재한다. 예를 들면, 페놀은 KA 오일 생산에서 대체 원료 물질이고, 페놀로부터 아디프산을 합성하는 방법이 기재되어 있다. 이러한 방법의 다른 형태는 질산 이외의 산화제, 예컨대 과산화수소, 공기 또는 산소를 사용하는 경향이 있다.

[0005] 상기 기재된 바와 같이 헥사메틸렌디아민(HMDA)이 나일론-6,6의 생산에 사용되는 것에 더하여, 이는 폴리우레탄의 생산에서 사용되는 단량체 공급원료인 헥사메틸렌 디이소시아네이트를 제조하기 위해 이용되기도 한다. 디아민은 또한 에폭시 수지에서 가교결합제로서 작용한다. HMDA는 아디포니트릴의 수소화에 의해 현재 생산된다.

[0006] 카프로락탐은 6-아미노헥산산(ε-아미노헥산산, 6-아미노카프로산)의 락탐인 유기 화합물이다. 이는 다르게는 카프로산의 환형 아미드로 고려될 수 있다. 카프로락탐의 한가지 용도는 나일론-6의 생산에서 단량체로서이다. 카프로락탐은 하이드록실암모늄 설페이트를 사용하는 옥심화 공정 이후 베크만(Beckmann) 재배열 공정 단계를 사용한 촉매적 재배열을 통해 사이클로헥사논으로부터 합성될 수 있다.

[0007] 상업적 양의 화합물, 예컨대 헥사메틸렌디아민, 6-아미노카프로산, 레불린산 및 카프로락탐을 생산하는 효과적인 방법이 본원에 기재되고, 이는 관련된 이점을 포함한다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 6-아미노카프로산, 카프로락탐 또는 헥사메틸렌디아민 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 미생물 유기체는 각각의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로에서 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산, 카프로락탐 또는 헥사메틸렌디아민을 생산하는 방법을 제공한다. 이 방법은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하고, 여기서 미생물 유기체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산하기에 충분한 시간 및 조건하에 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 발현한다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 페니실리엄 크리소제넘(*Penicillium chrysogenum*)의 퍼옥시좀에서의 아디페이트 분해를 위한 예시적인 경로를 도시한다.

도 2는 역 분해 경로를 통한 아디페이트 형성을 위한 예시적인 경로를 도시한다. 몇몇 선택사항이 아디필-CoA의 아디페이트로의 최종 전환을 위해 제공된다.

도 3은 3-옥소아디페이트 경로를 통한 아디페이트 형성을 위한 예시적인 경로를 도시한다.

도 4는 아디페이트 합성을 위한 3-옥소아디페이트 경로의 마지막 3개 단계 및 환원적 TCA 사이클의 유사한 효소화학을 도시한다.

도 5는 시스,시스-뮤콘산을 통해 글루코스로부터 아디프산을 합성하기 위한 예시적인 경로를 도시한다. 생합성 중간체(약어): D-에리트로스 4-포스페이트(E4P), 포스포에놀피루브산(PEP), 3-데옥시-D-아라비노헵툴로손산 7-포스페이트(DAHP), 3-데하이드로퀸산(DHQ), 3-데하이드로쉬킴산(dehydroshikimic acid)(DHS), 프로토카테쿠산(protocatechuic acid)(PCA). 효소(코딩 유전자) 또는 반응 조건: (a) DAHP 신타아제(synthase)(*aro*FFBR), (b) 3-데하이드로퀴네이트 신타아제(*aro*B), (c) 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타아제(dehydratase)(*aro*D), (d) DHS 데하이드라타아제(*aro*Z), (e) 프로토카테쿠에이트(protocatechuate) 데카복실라아제(*aro*Y), (f) 카테콜 1,2-2산소화효소(dioxygenase)(*cat*A), (g) 10% Pt/C, H_2, 3400 kPa, 25℃. 문헌[Niu et al., Biotechnol.

Prog. 18:201-211(2002)]으로부터 취해진 도면.

도 6은 알파-케토글루타레이트를 출발점으로 사용하여 알파-케토아디페이트를 경유하는 아디페이트 합성을 위한 예시적인 경로를 도시한다.

도 7은 라이신을 출발점으로 사용하는 아디페이트 합성을 위한 예시적인 경로를 도시한다.

도 8은 아디필-CoA를 출발점으로 사용하는 예시적인 카프로락탐 합성 경로를 도시한다.

도 9는 알파-케토아디페이트를 출발점으로 사용하는 예시적인 아디페이트 합성 경로를 도시한다.

도 10은 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 헥사메틸렌디아민(HMDA) 및 카프로락탐으로의 예시적인 경로를 도시한다. 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 아디페이트, 6-아미노카프로에이트, 카프로락탐, 및 헥사메틸렌디아민을 생산하기 위한 경로가 도시되어 있다. 약어: A) 3-옥소아디필-CoA 티올라아제(thiolase), B) 3-옥소아디필-CoA 환원효소, C) 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, D) 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소, E) 3-옥소아디필-CoA/아실-CoA 전이효소, F) 3-옥소아디필-CoA 신타아제, G) 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소, H) 3-옥소아디페이트 환원효소, I) 3-하이드록시아디페이트 데하이드라타아제, J) 5-카복시-2-펜타노에이트 환원효소, K) 아디필-CoA/아실-CoA 전이효소, L) 아디필-CoA 신타아제, M) 아디필-CoA 가수분해효소, N) 아디필-CoA 환원효소(알데히드 형성), O) 6-아미노카프로에이트 아미노전이효소, P) 6-아미노카프로에이트 탈수소효소, Q) 6-아미노카프로일-CoA/아실-CoA 전이효소, R) 6-아미노카프로일-CoA 신타아제, S) 아미도가수분해효소, T) 자발적인 고리화, U) 6-아미노카프로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), V) HMDA 아미노전이효소, W) HMDA 탈수소효소.

도 11은 4-아미노부티릴-CoA 및 아세틸-CoA로부터 헥사메틸렌디아민 및 카프로락탐으로의 예시적인 경로를 도시한다. 4-아미노부티릴-CoA 및 아세틸-CoA로부터의 6-아미노카프로에이트, 카프로락탐, 및 헥사메틸렌디아민의 생산을 위한 경로가 도시되어 있다. 약어: A) 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제, B) 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 환원효소, C) 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA 데하이드라타아제, D) 6-아미노헥스-2-에노일-CoA 환원효소, E) 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA/아실-CoA 전이효소, F) 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 신타아제, G) 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 가수분해효소, H) 3-옥소-6-아미노헥사노에이트 환원효소, I) 3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트 데하이드라타아제, J) 6-아미노헥스-2-에노에이트 환원효소, K) 6-아미노카프로일-CoA/아실-CoA 전이효소, L) 6-아미노카프로일-CoA 신타아제, M) 6-아미노카프로일-CoA 가수분해효소, N) 6-아미노카프로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), O) HMDA 아미노전이효소, P) HMDA 탈수소효소, Q) 자발적인 고리화, R) 아미도가수분해효소.

도 12는 피루베이트 및 석신산 세미알데히드로부터의 6-아미노카프로에이트로의 경로를 도시한다. 효소는 A) HODH 알돌라아제, B) OHED 수화효소, C) OHED 환원효소, D) 2-OHD 데카복실라아제, E) 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 및/또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화), F) OHED 데카복실라아제, G) 6-OHE 환원효소, H) 2-OHD 아미노전이효소 및/또는 2-OHD 산화환원효소(아민화), I) 2-AHD 데카복실라아제, J) OHED 아미노전이효소 및/또는 OHED 산화환원효소(아민화), K) 2-AHE 환원효소, L) HODH 포메이트-리아제(lyase) 및/또는 HODH 탈수소효소, M) 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, N) 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소, O) 아디필-CoA 탈수소효소, P) OHED 포메이트-리아제 및/또는 OHED 탈수소효소, Q) 2-OHD 포메이트-리아제 및/또는 2-OHD 탈수소효소이다. 약어는: HODH = 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트, OHED = 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트, 2-OHD = 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트, 2-AHE = 2-아미노헵트-4-엔-1,7-디오에이트, 2-AHD = 2-아미노헵탄-1,7-디오에이트, 및 6-OHE = 6-옥소헥스-4-에노에이트이다.

도 13은 6-아미노카프로에이트로부터 헥사메틸렌디아민으로의 경로를 도시한다. 효소는 A) 6-아미노카프로에이트 키나아제, B) 6-AHOP 산화환원효소, C) 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 및/또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화), D) 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소, E) 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제(kinase), F) 6-AAHOP 산화환원효소, G) 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 및/또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화), H) 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 및/또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드), I) 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 전이효소 및/또는 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 리가아제(ligase), J) 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소, K) 6-AAHOP 아실전이효소, L) 6-AHOP 아실전이효소, M) 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 및/또는 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제, N) 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소이다. 약어는: 6-AAHOP = [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트 및 6-AHOP = [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트이다.

도 14: A)는 아르기닌 생합성의 아세틸-CoA 사이클을 도시한다. 반응(1) 및 (2)는 아세틸글루타메이트 신타아

제 및 오르니틴 아실전이효소 작용성과 함께 오르니틴 아세틸전이효소에 의해 촉매화된다. 반응(3)은 아세틸글루타메이트 키나아제, N-아세틸글루타밀포스페이트 환원효소, 및 아세틸오르니틴 아미노전이효소에 의해 촉매화되는 일괄된 반응이다; B)는 HMDA 생합성의 아세틸-CoA 사이클을 도시한다. 반응(1) 및(2)는 HMDA 아세틸전이효소에 의해 촉매화된다. 반응(3)은 도 13에 도시된 6-아세트아미도헥사노에이트로부터의 6-아세트아미도헥산아민으로의 모든 경로를 포함하는 일괄된 반응이다.

도 15는 다양한 농도의 6-ACA를 포함하는 배지에서의 에스케리치아 콜라이(*Escherichia Coli*)의 성장을 도시한다. 에스케리치아 콜라이는 배지에 접종되고 호기성(왼쪽 및 오른쪽 막대) 또는 혐기성(중간 막대) 조건하에 성장되었다. 배양물은 제1 시험시 48시간 동안, 및 제2 시험시 30시간 동안 호기성 조건(오른쪽 막대)에서 성장되었다.

도 16은 6-ACA에 노출될 경우의 에스케리치아 콜라이의 내인성을 도시한다. 미드로그(midlog)(OD600 = 0.3, 하부 점선) 또는 초기 정지(OD600 = 0.6, 상부 점선) 세포는 스핀다운(spindown)되고 다양한 농도의 6-ACA를 갖는 신선한 M9-글루코스 배지에 재현탁되었다. 하룻밤 성장한 후, 배양물은 OD600을 측정함으로써 성장에 대해 측정되었다.

도 17은 다양한 농도의 6-ACA에 노출된 배양물로부터의 에탄올의 생산을 도시한다. 미드로그 또는 초기 정지 세포는 스핀다운되고 다양한 농도의 6-ACA를 갖는 신선한 M9-글루코스 배지에 재현탁되었다. 하룻밤 성장한 후, 배양물은 에탄올 생산에 의해 검정되는 대사 활성 및 OD600를 측정함으로써 성장에 대해 측정되었다.

도 18, 패널(panel) A 및 B는 글리신 베타인(glycine betaine)의 존재 또는 부재하에 다양한 농도의 6-ACA에서의 성장을 도시한다. 패널 A. 2 mM 글리신 베타인의 존재(오른쪽 막대) 및 부재(왼쪽 막대)하에 다양한 농도의 6-ACA를 갖는 에스케리치아 콜라이의 미드로그 배양물로 접종된 배지의 OD600 측정값. 패널 B. 혐기성 병에서 동일한 배양물의 성장을 보여주는 사진.

도 19는 시험관내 티올라아제 반응의 LC/MS 분석을 도시한다. 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA는 His-표식된, 정제된 티올라아제에 2:1(석시닐-CoA:아세틸-CoA)의 비율로 첨가되었다. 반응은 LC/MS로 분석되었고, 아세토아세틸-CoA에 대한 표준값 또는 3-옥소아디필-CoA(β-케토아디필-CoA)에 대해 결정된 피이크 면적에 비교함으로써 정량화되었다.

도 20은 글루타메이트로부터 헥사메틸렌디아민(HMDA) 및 6-아미노카프로에이트로의 예시적인 경로를 도시한다. 효소는 다음과 같이 지정된다: A) 글루타밀-CoA 전이효소 및/또는 리가아제, B) 베타-케토티올라아제, C) 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소, D) 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제, E) 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소, F) 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), G) 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소 및/또는 아민화 산화환원효소, H) 호모라이신 데카복실라아제, I) 6-아미노피멜로일-CoA 가수분해효소, 전이효소 및/또는 리가아제, J) 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제. 각각의 반응에 대해 지시된 효소 위원회 번호(enzyme commission number)는 이후 실시예 XXVI에서 설명된다.

도 21은 글루타릴-CoA로부터의 헥사메틸렌디아민(HMDA) 및 6-아미노카프로에이트로의 예시적인 경로를 도시한다. 효소는 다음과 같이 지정된다: A) 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, B) 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 전이효소 및/또는 리가아제, C) 3-옥소피멜레이트 환원효소, D) 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소 및/또는 7-아민화 산화환원효소, E) 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소 및/또는 3-아민화 산화환원효소, F) 3-옥소피멜레이트 키나아제, G) 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소, H) 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소 및/또는 리가아제, I) 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), J) 3-옥소피멜레이트 3-아미노전이효소 및/또는 3-아민화 산화환원효소, K) 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소 및/또는 리가아제, L) 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), M) 3-아미노피멜레이트 키나아제, N) 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, O) 3-아미노피멜레이트 환원효소, P) 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제(aminomutase), Q) 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 및/또는 아민화 산화환원효소, R) 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, S) 호모라이신 데카복실라아제, T) 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, U) 2-아미노피멜레이트 키나아제, V) 2-아미노피멜레이트 CoA 전이효소 및/또는 리가아제, W) 2-아미노피멜레이트 환원효소, X) 6-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, Y) 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), Z) 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 및/또는 7-아민화 산화환원효소, AA) 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제 및 AB) 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소 및/또는 3-아민화 산화환원효소. 각각의 반응에 대해 지시된 효소 위원회 번호는 하기 실시예 XXVI에서 설명된다.

도 22는 피루베이트 및 4-아미노부타날로부터의 헥사메틸렌디아민(HMDA)으로의 예시적인 경로를 도시한다. 효소는 다음과 같이 지정된다: A) 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 알돌라아제, B) 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 데하이드라타아제, C) 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트 환원효소, D) 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소 및/또는 아민화 산화환원효소, E) 호모라이신 데카복실라아제, F) 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 데카복실라아제, G) 6-아미노헥사날 아미노전이효소 및/또는 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소. 각각의 반응에 대해 지시된 효소 위원회 번호는 이후 실시예 XXVI에서 설명된다.

도 23은 호모라이신으로부터 6-아미노카프로에이트로의 예시적인 경로를 도시한다. 단계 A는 호모라이신 2-모노옥시게나아제(monooxygenase)에 의해 촉매화된다. 단계 B는 희석 산 또는 염기에 의해 촉매화되는 가수분해이다.

도 24는 6-아미노카프로에이트로부터의 헥사메틸렌디아민으로의 예시적인 경로를 도시한다. 이 도면은 도 13에 제시된 경로에 추가적인 경로를 도시한다. 효소는 다음과 같이 지정된다: A) 6-아미노카프로에이트 키나아제, B) 6-AHOP 산화환원효소, C) 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 및/또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화), D) 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소, E) 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제, F) 6-AAHOP 산화환원효소, G) 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 및/또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화), H) 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 및/또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드), I) 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 전이효소 및/또는 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 리가아제, J) 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소, K) 6-AAHOP 아실전이효소, L) 6-AHOP 아실전이효소, M) 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 및/또는 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제, N) 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소, O) 6-아미노카프로에이트 환원효소 및 P) 6-아세트아미도헥사노에이트 환원효소. 약어는: 6-AAHOP = [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트 및 6-AHOP = [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트이다. 각각의 반응에 대해 지시된 효소 위원회 번호는 이후 실시예 XXVI에서 설명된다.

도 25는 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 헥사메틸렌디아민(HMDA), 카프로락탐 또는 레불린산으로의 예시적인 경로를 도시한다. 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터의 아디페이트, 6-아미노카프로에이트, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 및 레불린산의 생산을 위한 경로가 도시된다. 이 도면은 도 10에 제시된 경로에 추가적인 경로를 도시한다. 효소는 다음과 같이 지정된다: A) 3-옥소아디필-CoA 티올라아제, B) 3-옥소아디필-CoA 환원효소, C) 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, D) 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소, E) 3-옥소아디필-CoA/아실-CoA 전이효소, F) 3-옥소아디필-CoA 신타아제, G) 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소, H) 3-옥소아디페이트 환원효소, I) 3-하이드록시아디페이트 데하이드라타아제, J) 5-카복시-2-펜타노에이트 환원효소, K) 아디필-CoA/아실-CoA 전이효소, L) 아디필-CoA 신타아제, M) 아디필-CoA 가수분해효소, N) 아디필-CoA 환원효소(알데히드 형성), O) 6-아미노카프로에이트 아미노전이효소, P) 6-아미노카프로에이트 탈수소효소, Q) 6-아미노카프로일-CoA/아실-CoA 전이효소, R) 6-아미노카프로일-CoA 신타아제, S) 아미도가수분해효소, T) 자발적인 고리화, U) 6-아미노카프로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), V) HMDA 아미노전이효소, W) HMDA 탈수소효소, X) 아디페이트 환원효소, Y) 아디페이트 키나아제, Z) 아디필포스페이트 환원효소, 및 AA) 3-옥소아디페이트 데카복실라아제.

도 26은 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터의 헥사메틸렌디아민(HMDA) 및 6-아미노카프로에이트로의 예시적인 경로를 도시한다. 효소는 다음과 같이 지정된다: A) 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제, B) 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제, C) 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소 및/또는 6-아미노헥사날 아미노전이효소, D) 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 산화환원효소, E) 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제, F) 6-아미노헥사날 산화환원효소, G) 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제, H) 호모라이신 데카복실라아제, I) 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제, J) 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아민화 산화환원효소 및/또는 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소, K) 2-아미노-7-옥소수바레이트 아민화 산화환원효소 및/또는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노전이효소, L) 2,7-디아미노수바레이트 데카복실라아제 및 M) 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소 및/또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소. 각각의 반응에 대해 지시된 효소 위원회 번호는 이후 실시예 XXVI에서 설명된다.

도 27은 글루타메이트-5-세미알데히드로부터 2-아미노-7-옥소수바레이트로의 예시적인 경로를 도시한다. 효소는 다음과 같이 지정된다: A) 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 알돌라아제, B) 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 데하이드라타아제, C) 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트 환원효소.

도 28은 ADHEr, LDH_D 돌연변이체에 대한 성장 수율 대 6-ACA를 도시한다.

도 29는 ADHEr, MDH, ASPT, LDH_D 돌연변이체에 대한 성장 수율 대 6-ACA를 도시한다.

도 30은 ADHEr, MDH, ASPT, LDH_D, THD2 돌연변이체에 대한 성장 수율 대 6-ACA를 도시한다.

도 31은 ADHEr, MDH, ASPT, LDH_D, GLUDy 돌연변이체에 대한 성장 수율 대 6-ACA를 도시한다.

도 32는 PGI, EDA 돌연변이체 또는 PGI, PGDHy 돌연변이체에 대한 성장 수율 대 6-ACA를 도시한다.

도 33은 PGI, EDA, ADHEr 돌연변이체 또는 PGI, PGDHy, ADHEr 돌연변이체에 대한 성장 수율 대 6-ACA를 도시한다.

도 34는 ADHEr, PGI, HEX1 돌연변이체에 대한 성장 수율 대 6-ACA를 도시한다.

도 35는 야생형 에스케리치아 콜라이(흑색)와 비교된 최우선 순위의 균주 고안물(회색)의 성장-결부된 아디페이트 생산 특징을 도시한다. 10 mmol/gDW/시간의 글루코스 섭취 속도가 가정된다.

도 36은 20 mM의 아디페이트를 사용하는 CAR 889 및 891의 활성을 도시한다. 활성은 조질의 용해물(lysate)중 총 단백질 1 mg 당 유닛으로서 제시된다.

도 37은 50 mM의 6-아미노카프로에이트를 사용하는 CAR 720, 889, 890, 891의 활성을 도시한다. 활성은 조질의 용해물중 총 단백질 1 mg 당 유닛으로서 제시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산에 대한 생합성 생산 능력을 갖는 세포 및 유기체의 고안 및 생산에 관한 것이다. 본원에 기재된 결과는, 대사 경로가 고안될 수 있고 재조합적으로 조작되어 에스케리치아 콜라이 및 다른 세포 또는 유기체에서 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성을 달성할 수 있음을 나타낸다. 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성 생산은 고안된 대사 유전자형을 갖는 균주의 구축에 의해 확인될 수 있다. 이들 대사적으로 조작된 세포 또는 유기체는 또한 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성을 추가로 증진시키기 위해 이론적인 최대 성장에 접근하는 조건하에 처함을 비롯하여 적응 진화될 수 있다.

[0011] 본원에 개시된 바와 같이, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 위한 다수의 대사 경로가 설명된다. 2가지 경로, 즉 역 아디페이트 분해 경로 및 3-옥소아디페이트 경로는 다음과 관련하여 유리한 것으로 밝혀졌다: (i) 아디페이트 수율(글루코스에 대해 92% 몰 수율), (ii) 아디페이트 합성을 위한 산소 요건의 불필요성, (iii) 연관된 에너지, 및 (iv) 아디페이트를 유일한 발효 생성물로서 생산하는 이론적 능력. α-케토아디페이트 또는 라이신을 통한 아디페이트 생산을 위한 대사 경로가 또한 기재되어 있지만, 수율이 더 낮고, 최대 생산을 위해 통기를 필요로 한다. 역 분해 경로에서 전구체인 아디필-CoA로부터의 6-아미노카프로에이트 및 카프로락탐중 하나 또는 둘다를 생산하는 경로가 또한 본원에 개시된다.

[0012] 본원에 개시된 바와 같이, 아디페이트의 생합성을 위한 다수의 예시적인 경로가 기재된다. 한 예시적인 경로는 유기체, 예컨대 페니실리엄 크리소제넘에서 설명된 아디페이트 분해의 가역성에 기초하는 경로를 통한 아디페이트 합성을 포함한다(실시예 I 및 II 참조). 제2의 예시적 경로는 3-옥소아디페이트의 형성 후 그의 환원, 탈수 및 다시 환원을 수반하여 아디페이트를 형성한다(실시예 III 및 IV 참조). 이들 2가지 경로중 하나를 사용한 아디페이트 수율은 소비된 글루코스 1 몰 당 0.92 몰이다. 산소의 섭취는 이들 이론적인 최대 수율을 얻기 위해 요구되지 않고, 혐기성 조건하의 에너지상태는 성장 및 생성물 분비에 유리하다. 글루코스-유도된 시스,시스-뮤콘산으로부터 아디페이트를 생산하는 방법은 이전에 기재되어 있다(프로스트(Frost) 등의 미국 특허 제5,487,987호(1996년 1월 30일자로 허여됨))(실시예 V 참조). 이전에 기재된 방법을 뛰어 넘는 본원에 개시된 실시태양의 이점이 논의된다. α-케토아디페이트(실시예 VI) 또는 라이신(실시예 VII) 전구체를 통한 아디페이트 생산을 위한 대사 경로는 수율이 더 낮고 최대 생산을 위해 통기가 필요하다. 역 분해 경로에서 전구체인 아디필-CoA로부터의 6-아미노카프로에이트 및 카프로락탐중 하나 또는 둘다를 생산하기 위한 경로가 기재되어 있다(실시예 VIII 및 IX 참조). 아디페이트를 생산하기 위한 추가적인 경로는 실시예 X 및 XI에 기재되어 있다. 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 6-아미노카프로에이트, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 및 레불린산중 임의의 1종, 2종, 3종 또는 4종 모두를 생산하는 경로는 실시예 XII, XXVIII에 기재되어 있다. 석신산 세미알데히드 및 피루베이트로부터 6-아미노카프로에이트를 생산하는 수 개의 경로가 실시예 XIX에 기재되어 있다. 6-아미노카프로에이트로부터 헥사메틸렌디아민을 생산하는 수 개의 경로가 실시예 XX 및 XXVII에 기재되어 있다. 글루타메이트로부터 6-아미노카프로에이트 및 헥사메틸렌디아민중 하나 또는 둘다를 생산하는 경로는 실

시예 XXIV 및 XXV에 기재되어 있다. 글루타릴-CoA로부터 헥사메틸렌디아민을 생산하는 수 개의 경로 및 글루타릴-CoA로부터의 6-아미노카프로에이트를 생산하는 적어도 하나의 경로가 실시예 XXIV 및 XXV에 기재되어 있다. 호모라이신으로부터 6-아미노카프로에이트를 생산하는 경로가 실시예 XXV에 기재되어 있다. 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터 헥사메틸렌디아민을 생산하는 경로가 실시예 XXIV에 기재되어 있다. 6-아미노카프로에이트를 생산하는 수 개의 경로가 실시예 XXV에 기재되어 있다. 이러한 능력을 갖는 미생물을 구축하기 위해 필요한 예시적인 유전자 및 효소, 뿐만 아니라 클로닝 및 형질전환을 위한 방법, 생성물 형성 모니터링 방법, 및 생산을 위한 조작된 미생물의 사용이 기재되어 있다.

[0013] 본원에 개시된 바와 같이, 탄소 기질로서 글루코스/수크로스를 사용하는 아디프산 합성을 위한 6개의 상이한 경로가 설명된다. 모든 최대 수율 계산을 위해, 소정의 경로에서 제외된 반응은 이전에 기재된 것과 유사한 심페니(SimPheny)에서 에스케리치아 콜라이 화학양론적 조직망에 첨가되었다(Reed et al., Genome Biol. 4:R54(2003)). 아디페이트는 생리학적 조건하에서 하전된 분자이고, 조직망 밖으로 분비되는 양자-기재 공동수송 시스템의 형태에서 에너지를 필요로 하는 것으로 가정되었다. 이러한 수송 시스템은 발효가 중성 또는 거의 중성 pH에서 실행된다면 열역학적으로 실현가능하다. 낮은 pH 아디프산 형성은 ATP-의존성 배출 기작, 예를 들면, 양자 공동수송에 반대인 ABC 시스템을 필요로 한다. 경로에서의 반응 및 이들 경로의 실행 방법이 실시예 I-XI에 기재되어 있다.

[0014] 본원에 사용될 경우, "비-천연"이라는 용어는 본 발명의 미생물 유기체 또는 미생물에 관하여 사용될 경우 언급된 종의 야생형 균주를 비롯하여 언급된 종의 천연 균주에서 정상적으로 발견되지 않는 적어도 하나의 유전적 변경을 가짐을 의미하고자 한다. 유전적 변경으로는, 예를 들면, 대사적 폴리펩티드를 코딩하는 발현가능한 핵산을 도입하는 개질, 다른 핵산 첨가, 핵산 결실 및/또는 미생물 유전 물질의 다른 기능의 손상이 포함된다. 이러한 개질로는, 예를 들면, 언급된 종에 대한 이종, 동종, 또는 이종과 동종 둘다의 폴리펩티드에 대한 코딩 영역 및 이의 작용성 단편이 포함된다. 추가적인 개질로는, 예를 들면, 비-코딩 조절 영역이 포함되고, 여기서 개질은 유전자 또는 오페론의 발현을 변경시킨다. 예시적인 대사적 폴리펩티드는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로내의 효소를 포함한다.

[0015] 대사 개질은 천연 상태로부터 변경된 생화학 반응을 지칭한다. 따라서, 비-천연 미생물은 대사 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 또는 이의 작용성 단편에 대한 유전적 개질을 가질 수 있다. 예시적인 대사 개질은 본원에 개시되어 있다.

[0016] 본원에 사용될 경우, "단리된"이라는 용어는 미생물 유기체에 관하여 사용될 경우 언급된 미생물 유기체가 자연에서 발견될 때 적어도 하나의 성분이 실질적으로 존재하지 않는 유기체를 의미하고자 한다. 이 용어는 미생물 유기체가 그의 자연 환경에서 발견될 때 일부 또는 모든 성분들이 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 이 용어는 또한 미생물 유기체가 비-천연 환경에서 발견될 때 일부 또는 모든 성분들이 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 따라서, 단리된 미생물 유기체는 자연적으로 발견되거나 비-천연 환경에서 성장, 저장 또는 존속되는 바와 같이 다른 성분으로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된다. 단리된 미생물 유기체의 구체적인 예로는 부분적으로 순수한 미생물체, 실질적으로 순수한 미생물체 및 비-천연 배지에서 배양된 미생물체가 포함된다.

[0017] 본원에 사용될 경우, "미생물성", "미생물 유기체" 또는 "미생물"이라는 용어는 고세균(archaea), 박테리아(bacteria) 또는 진핵생물(eukarya)의 범주내에 포함되는 미시적 세포로서 존재하는 임의의 유기체를 의미하고자 한다. 따라서, 이 용어는 미시적 크기의 원핵 세포 및 진핵 세포 또는 유기체를 내포하고자 하며, 이는 모든 종류의 박테리아, 고세균 및 진정세균(eubacteria) 뿐만 아니라 진핵 미생물, 예컨대 효모 및 곰팡이를 포함한다. 이 용어는 또한 생화학물질의 생산을 위해 배양될 수 있는 임의의 종의 세포 배양물을 포함한다.

[0018] 본원에 사용될 경우, 용어 "CoA" 또는 "조효소 A"는 활성 효소 시스템을 형성하기 위해 많은 효소(주효소)들의 활성을 위해 필요한 유기 보조인자 또는 보결분자단(효소의 비단백질 부분)을 의미한다. 특정 축합 효소에서 조효소 A 기능은 아세틸 또는 다른 아실 기 전달 및 지방산 합성 및 산화, 피루베이트 산화 및 다른 아세틸화에서 작용한다.

[0019] 본원에 사용될 경우, 화학식 $-OOC-(CH_2)_4-COO-$를 갖는 "아디페이트"(도 2 참조)(IUPAC 명칭 헥산디오에이트)는 아디프산(IUPAC 명칭 헥산디오산)의 이온화된 형태이고, 아디페이트 및 아디프산은 이의 임의의 염 형태를 비롯하여 이의 임의의 천연 또는 이온화된 형태의 화합물을 지칭하기 위해 전체에 걸쳐 상호교환적으로 사용될 수 있음을 알아야 한다. 당분야의 숙련가라면 특정 형태는 pH에 따라 달라질 것임을 알 것이다.

[0020] 본원에 사용될 경우, 화학식 $-OOC-(CH_2)_5-NH_2$를 갖는 "6-아미노카프로에이트"(도 8 및 12 참조)는 6-아미노카프

로산(IUPAC 명칭 6-아미노헥산산)의 이온화된 형태이고, 6-아미노카프로에이트 및 6-아미노카프로산은 이의 임의의 염 형태를 비롯하여 이의 임의의 천연 또는 이온화된 형태의 화합물을 지칭하기 위해 전체에 걸쳐 상호교환적으로 사용될 수 있음을 알아야 한다. 당분야의 숙련가라면 특정 형태는 pH에 따라 달라질 것임을 알 것이다.

[0021] 본원에 사용될 경우, "카프로락탐"(IUPAC 명칭 아제판-2-온)은 6-아미노헥산산의 락탐(도 8 참조)이다.

[0023] 본원에 사용될 경우, 1,6-디아미노헥산 또는 1,6-헥산디아민으로도 지칭되는 "헥사메틸렌디아민"은 화학식 $H_2N(CH_2)_6ONH_2$를 갖는다(도 10, 11 및 13 참조).

[0024] 본원에 사용될 경우, 용어 "실질적으로 혐기성"은 배양 또는 성장 조건에 관하여 사용될 경우 산소의 양이 액체 매질에 용해된 산소에 대하여 약 10% 포화 미만임을 의미하고자 한다. 이 용어는 또한 약 1% 미만의 산소 분위기로 유지되는 액체 또는 고체 배지의 밀봉된 챔버를 포함하고자 한다.

[0025] 본원에 사용될 경우, 용어 "삼투압보호제(osmoprotectant)"는, 배양 또는 성장 조건에 관하여 사용될 경우 삼투압조절자(osmolyte)로서 작용하고 본원에 기재된 미생물 유기체가 삼투압 스트레스에서 생존하는 것을 돕는 화합물을 의미하고자 한다. 삼투압보호제로는, 예를 들면, 베타인, 아미노산, 및 당 트레할로스가 포함된다. 이의 비제한적인 예는 글리신 베타인, 프랄린 베타인, 디메틸쎄틴, 디메틸설포니오프로피오네이트, 3-디메틸설포니오-2-메틸프로피오네이트, 피페콜산, 디메틸설포니오아세테이트, L-카르니틴 및 엑토인이이다.

[0026] 본원에 사용될 경우, 용어 "성장-결부된"은, 생화학물질의 생산과 관련되어 사용되는 경우 지칭된 생화학물질의 생합성이 미생물의 성장 상 동안 생산됨을 의미하고자 한다. 특정 실시태양에서, 성장-결부된 생산은 의무적일 수 있고, 이는 지칭된 생화학물질의 생합성이 미생물의 성장 상 동안 생산되는 의무적인 생성물임을 의미한다.

[0027] 본원에 사용될 경우, "대사 개질"은 천연 상태로부터 변경되는 생화학 반응을 지칭하고자 한다. 대사 개질로는, 예를 들면, 반응에 참여하는 효소를 코딩하는 1종 이상의 유전자의 기능 손상에 의한 생화학 반응 활성의 제거가 포함된다. 예시적인 대사 개질은 본원에 기재되어 있다(실시예 XXX 참조).

[0028] 본원에 사용될 경우, 용어 "유전적 손상" 또는 이의 문법적으로 상응하는 문구는 코딩된 유전자 생성물을 비활성으로 만드는 유전적 변경을 의미하고자 한다. 유전적 변경은, 예를 들면, 전체 유전자의 결실, 전사 또는 번역에 필요한 조절 서열의 결실, 절단된(truncated) 유전자 생성물을 만드는 유전자 일부의 결실일 수 있거나, 코딩된 유전자 생성물을 비활성화시키는 임의의 다양한 돌연변이 전략에 의해서일 수 있다. 유전자 손상의 특히 유용한 방법은 완전 유전자 결실인데, 이는 본 발명의 비-천연 미생물에서 유전적 역전의 발생을 감소시키거나 제거하기 때문이다.

[0029] 본원에 사용될 경우 "외인성"은 언급된 분자 또는 언급된 활성이 숙주 미생물 유기체로 도입됨을 의미하고자 한다. 분자는, 코딩 핵산의 숙주 유전 물질로의 도입에 의해, 예컨대 숙주 염색체내로의 통합에 의해 도입되거나, 비염색체성 유전 물질, 예컨대 플라스미드로서 도입될 수 있다. 따라서, 코딩 핵산의 발현에 관하여 사용될 경우 이 용어는 발현가능한 형태의 코딩 핵산을 미생물 유기체로 도입함을 지칭한다. 생합성 활성에 관련되어 사용될 경우, 이 용어는 숙주 기준 유기체로 도입되는 활성을 지칭한다. 공급원은, 예를 들면 숙주 미생물 유기체내로 도입되는 언급된 활성을 발현하는 동종 또는 이종 코딩 핵산일 수 있다. 따라서, 용어 "내인성"은 숙주에 존재하는 언급된 분자 또는 활성을 지칭한다. 유사하게, 코딩 핵산의 발현에 관련하여 사용될 경우, 이 용어는 미생물 유기체내에 포함된 코딩 핵산의 발현을 지칭한다. 용어 "이종"은 언급된 종 이외의 공급원으로부터 유도된 분자 또는 활성을 지칭하는 반면, "동종"은 미생물 유기체로부터 유도된 분자 또는 활성을 지칭한다. 따라서, 본 발명의 코딩 핵산의 외인성 발현은 이종 또는 동종 코딩 핵산 둘다를 이용할 수 있다.

[0030] 1종 이상의 외인성 핵산이 미생물 유기체에 포함되는 경우, 1종 이상의 외인성 핵산은, 상기 논의된 바와 같이, 언급된 코딩 핵산 또는 생합성 활성을 지칭함을 알아야 한다. 본원에 개시된 바와 같이, 이러한 1종 이상의 외인성 핵산은 숙주 미생물 유기체내로 별도의 핵산 분자 상에, 다중시스트론성(polycistronic) 핵산 분자 상에, 또는 이의 조합된 분자 상에 도입될 수 있고, 여전히 1종 이상의 외인성 핵산으로서 고려될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같이 미생물 유기체는 원하는 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 2종 이상의 외인성 핵산을 발현하도록 조작될 수 있다. 원하는 활성을 코딩하는 2종의 외인성 핵산이 숙주 미생물 유기체에 도입되는 경우에, 2종의 외인성 핵산은 단일한 핵산으로서, 예를 들면, 단일 플라스미드 상에, 별도의 플라스미드 상에 도입될 수 있고, 숙주 염색체내로 단일 부위에 또는 다수의 부위에 통합될 수 있으며, 여전히 2종의 외인성 핵산으로서 고려됨을 알아야 한다. 유사하게, 2종 이상의 외인성 핵산이 숙주 유기체내로 임의의

원하는 조합으로, 예를 들면, 단일 플라스미드 상에, 별도의 플라스미드 상에 도입될 수 있고, 숙주 염색체내로 단일 부위에 또는 다수의 부위에 통합될 수 있으며, 여전히 2종 이상, 예를 들면 3종의 외인성 핵산으로서 고려됨을 알아야 한다. 이와 같이, 언급된 외인성 핵산 또는 생합성 활성의 수는 코딩 핵산의 수 또는 생합성 활성의 수를 지칭하고, 숙주 유기체내로 도입되는 별도의 핵산의 수를 지칭하지 않는다.

[0031] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 안정한 유전적 변경을 포함할 수 있고, 이는 변경의 손실 없이 5 세대 보다 더 많이 배양될 수 있는 미생물을 지칭한다. 일반적으로, 안정한 유전적 변경은 10 세대 보다 더 지속되는 개질을 포함하고, 특히 안정한 개질은 25 세대 보다 더 오래 지속할 것이고, 보다 특별히, 안정한 유전적 개질은 50 세대 보다 더 지속될 것이고, 무한정 지속됨을 포함한다.

[0032] 유전자 손상의 경우, 특히 유용한 안정한 유전적 변경은 유전자 결실이다. 안정한 유전적 변경을 도입하기 위해 유전자 결실을 사용하는 것은 유전적 변경 이전의 표현형으로의 역전 가능성을 감소시키기 위해 특히 유용하다. 예를 들면, 생화학물질의 안정한 성장-결부된 생산은, 예를 들면, 한 세트의 대사 개질내에서 1종 이상의 반응을 촉매화하는 효소를 코딩하는 유전자의 결실에 의해 달성될 수 있다. 생화학물질의 성장-결부된 생산의 안정성은 다수의 결실을 통해 추가로 증진되어, 각각의 손상된 활성에 대해 초래되는 다수의 보상 역전의 가능성을 크게 감소시킨다.

[0033] 당분야의 숙련가라면, 본원에 예시된 대사 개질을 비롯한 유전적 변경이 적합한 숙주 유기체, 예컨대 에스케리치아 콜라이 및 이들의 상응하는 대사 반응, 또는 원하는 유전적 물질, 예컨대 원하는 대사 경로를 위한 유전자를 위한 적합한 공급원 유기체와 관련되어 설명됨을 알 것이다. 그러나, 다양한 유기체의 완전한 게놈 서열 및 유전체학 분야의 높은 기술 수준을 참고하여, 당분야의 숙련가는 본원에 제공된 교시 및 지침을 본질적으로 모든 다른 유기체에 쉽게 적용시킬 것이다. 예를 들면, 본원에 예시된 에스케리치아 콜라이 대사 변경은 언급된 종 이외의 종으로부터의 동일하거나 유사한 코딩 핵산을 혼입함으로써 다른 종으로 쉽게 적용될 수 있다. 이러한 유전적 변경으로는, 예를 들면, 종 상동체(homolog)의 유전적 변경, 일반적으로, 특히, 오솔로그(ortholog), 파랄로그(paralog), 또는 비오솔로그성(nonrothologous) 유전적 대체가 포함된다.

[0034] 오솔로그는 수직 강하로 연관되고 상이한 유기체에서 실질적으로 같거나 동일한 기능을 맡은 유전자 또는 유전자들이다. 예를 들면, 마우스 에폭시드 가수분해효소 및 인간 에폭시드 가수분해효소는 에폭시드의 가수분해라는 생물학적 기능에 대해 오솔로그로 고려된다. 유전자는 이들이 동종임을 나타내기에 충분한 양의 서열 유사성을 공유할 경우 수직 강하로 관련되거나, 공통의 조상으로부터의 진화와 연관된다. 유전자는 또한 이들이 3차원 구조를 공유하지만 이들이 주요 서열 유사성이 식별가능하지 않는 정도로 공통의 조상으로부터 진화됨을 지시하기에 충분한 양의 서열 유사성을 필수적으로 공유하지 않는 경우 오솔로그로 고려될 수 있다. 오솔로그성인 유전자들은 약 25% 내지 100% 아미노산 서열 동일성의 서열 유사성을 갖는 단백질을 코딩할 수 있다. 25% 미만의 아미노산 유사성을 공유하는 단백질을 코딩하는 유전자는 또한 이들의 3차원 구조가 또한 유사성을 갖는다면 수직 강하로 발생된 것으로 고려될 수 있다. 조직 플라스미노겐(plasminogen) 활성화제 및 엘라스타아제(elastase)를 비롯한 효소의 세린 프로테아제(protease) 계열의 구성원은 공통의 조상으로부터의 수직 강하에 의해 야기된 것으로 고려된다.

[0035] 오솔로그는 예를 들면, 진화를 통해 구조 또는 전체 활성이 나눠진 유전자 또는 이들의 코딩된 유전자 생성물을 포함한다. 예를 들면, 하나의 종이 2개의 기능을 나타내는 유전자 생성물을 코딩하고 이러한 기능이 제2 종에서 별개의 유전자로 분리되는 경우, 3개의 유전자 및 이들의 상응하는 생성물은 오솔로그로서 고려된다. 생화학적 생성물의 생산의 경우, 당분야의 숙련가라면 도입되거나 손상된 대사 활성을 나타내는 오솔로그 유전자가 비-천연 미생물의 구축을 위해 선택됨을 알 것이다. 분리가능한 활성을 나타내는 오솔로그의 예는 둘 이상의 종 사이에서 또는 단일한 종내에서 별개의 유전자 생성물로 분리되는 경우이다. 구체적인 예는 엘라스타아제 단백질분해 및 플라스미노겐 단백질분해, 즉 프로테아제 활성의 2가지 유형의 플라스미노겐 활성화제 및 엘라스타아제로서의 개별 분자로의 분리이다. 제2의 예는 마이코플라스마(mycoplasma) 5'-3' 엑소뉴클레아제(exonuclease) 및 드로소필라(*Drosophila*) DNA 폴리머라아제(polymerase) III 활성의 분리이다. 제1 종으로부터의 DNA 폴리머라아제는 제2종으로부터의 엑소뉴클레아제 또는 폴리머라아제중 하나 또는 둘다에 오솔로그인 것으로 고려되고, 또 이의 반대도 고려된다.

[0036] 대조적으로, 파랄로그는, 예를 들면, 진화적 분기(divergence)가 수반되는 복제에 의해 관련되고 유사하고 공통적이지만 동일하지 않은 기능을 갖는 상동체이다. 파랄로그는, 예를 들면, 동일한 종 또는 상이한 종으로부터 기원되거나 유도될 수 있다. 예를 들면, 마이크로솜성(microsomal) 에폭시드 가수분해효소(에폭시드 가수분해효소 I) 및 가용성 에폭시드 가수분해효소(에폭시드 가수분해효소 II)는, 공통의 조상으로부터 동시진화된, 동

일한 종에서 별개의 반응을 촉매화하고 별개의 기능을 수행하는 2개의 별개의 효소를 나타내므로, 이들은 파랄로그로 고려될 수 있다. 파랄로그는, 이들이 동종이거나 공통의 조상으로부터 동시진화를 통해 연관됨을 제시하는 서로에 대한 상당한 서열 유사성을 갖는 동일한 종으로부터의 단백질이다. 파랄로그성 단백질 계열로는 HipA 상동체, 루시퍼라아제(luciferase) 유전자, 펩티다아제 등이 포함된다.

[0037] 비오솔로그성 유전자 대체는 상이한 종에서 언급된 유전자 기능을 치환할 수 있는 한 종으로부터의 비오솔로그성 유전자이다. 치환은, 예를 들면, 상이한 종에서 언급된 기능에 비하여 기원 종에서 실질적으로 동일하거나 유사한 기능을 수행할 수 있음을 포함한다. 일반적으로, 비오솔로그성 유전자 대체는 언급된 기능을 코딩하는 공지된 유전자와 구조적으로 관련되는 것으로 식별가능할 것일 지라도, 구조적으로는 덜 관련되지만 기능적으로 유사한 유전자 및 이들의 상응하는 유전자 생성물은 본원에 사용되는 용어의 의미에 여전히 속할 것이다. 기능적 유사성은, 예를 들면, 치환되어질 기능을 코딩하는 유전자와 비교하여 비오솔로그성 유전자 생성물의 결합 영역 또는 활성 부위에서 적어도 일부의 구조적 유사성을 필요로 한다. 따라서, 비오솔로그성 유전자는, 예를 들면, 파랄로그 또는 관련되지 않은 유전자를 포함한다.

[0038] 따라서, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 능력을 갖는 본 발명의 비-천연 미생물 유기체를 식별하고 구축하는데 있어서, 당분야의 숙련가는 특정 종에 대해 본원에 제공된 교시 및 지침을 적용함으로써 대사 개질의 식별이 오솔로그의 식별 및 포함 또는 비활성화를 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 유사하거나 실질적으로 유사한 대사 반응을 촉매화하는 효소를 코딩하는 언급된 미생물에 파랄로그 및/또는 비오솔로그성 유전자 대체가 존재하는 정도로, 당분야의 숙련가는 또한 이들 진화적으로 관련된 유전자를 이용할 수 있다. 유전자 손상 전략에서, 진화적으로 관련된 유전자는 또한 숙주 미생물 유기체, 파랄로그 또는 오솔로그에서 손상되거나 결실되어, 손상을 위해 표적화된 효소 활성에서의 임의의 기능적 중복이 고안된 대사 개질을 단락(short circuit)시키지 않음을 보장하도록 활성을 감소 또는 제거할 수 있다.

[0039] 오솔로그, 파랄로그 및 비오솔로그성 유전자 대체는 당분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 2개의 폴리펩티드에 대한 핵산 또는 아미노산 서열을 조사하면 비교된 서열 사이의 서열 동일성 및 유사성을 알 수 있을 것이다. 이러한 유사성에 기초하여, 당분야의 숙련가는 단백질이 공통의 조상으로부터의 진화를 통해 관련된다고 지시하기에 유사성이 충분히 높은지의 여부를 결정할 수 있다. 당분야의 숙련가에게 공지된 알고리즘, 예컨대 얼라인(Align), BLAST, 클러스탈(Clustal) W 등은 미가공 서열 유사성 또는 동일성을 비교 및 결정하고, 또한 중량이나 득점으로 할당될 수 있는 서열중의 갭(gap)의 존재 또는 중요성을 결정할 수 있다. 이러한 알고리즘은 또한 당분야에 공지되어 있고 뉴클레오티드 서열 유사성 또는 동일성을 결정하기 위해 유사하게 적용가능하다. 관련성을 결정하기에 충분한 유사성을 위한 매개변수는 통계적 유사성을 계산하기 위한 공지된 방법, 또는 무작위 폴리펩티드에서 유사성 부합을 발견하는 기회, 및 결정된 부합의 중요성에 기초하여 컴퓨터처리된다. 둘 이상의 서열의 컴퓨터 비교는, 원할 경우, 당분야의 숙련가에 의해 육안으로 최적화될 수 있다. 관련된 유전자 생성물 또는 단백질은 높은 유사성, 예를 들면, 25% 내지 100% 서열 동일성을 갖는 것으로 예상될 수 있다. 관련되지 않은 단백질은, 충분한 크기의 데이터베이스가 스캐닝된다면, 우연히 초래될 것으로 예상되는 바와 본질적으로 동일한 동일성을 가질 수 있다(약 5%). 5% 내지 24% 사이의 서열은 비교된 서열이 관련되는 것으로 결론짓기에 충분한 상동성을 나타내거나 나타내지 않을 수 있다. 데이터 세트의 크기가 제공되는 이러한 부합의 중요성을 결정하기 위한 추가의 통계 분석은 이들 서열의 관련성을 결정하기 위해 수행될 수 있다.

[0040] BLAST 알고리즘을 사용하여 둘 이상의 서열의 관련성을 결정하기 위한 예시적인 매개변수는, 예를 들면, 하기 제시된 바와 같을 수 있다. 간단히, 아미노산 서열 정렬은 BLASTP 버전 2.0.8(1999년 1월 5일) 및 하기 매개변수를 사용하여 수행될 수 있다: 매트릭스: 0 BLOSUM62; 갭 개방: 11; 갭 연장: 1; x_dropoff: 50; 예상치: 10.0; 단어크기: 3; 필터: 켜짐. 핵산 서열 정렬은 BLASTN 버전 2.0.6(1998년 9월 16일) 및 하기 매개변수를 사용하여 수행될 수 있다: 부합: 1; 비부합: -2; 갭 개방: 5; 갭 연장: 2; x_dropoff: 50; 예상치: 10.0; 단어크기: 11; 필터: 꺼짐. 당분야의 숙련가는, 예를 들면 비교의 수렴성을 증가 또는 감소시키기 위해 상기 매개변수에 어떤 변형을 가할 수 있는지 알 것이고 둘 이상의 서열의 관련성을 결정할 수 있을 것이다.

[0041] 아디페이트, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산할 수 있는 비천연 미생물 유기체가 본원에 개시되어 있다. 예를 들면, 아디페이트 경로는 역 아디페이트 분해 경로일 수 있다(실시예 I 및 II 참조). 예를 들면, 비-천연 미생물 유기체는 아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 아디페이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 아디페이트 경로를 가질 수 있고, 아디페이트 경로는 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소, 및 아디필-CoA 합성효소(synthetase) 또는 포스포트랜스아디

필라아제(phosphotransadipylase)/아디페이트 키나아제 또는 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소 또는 아디필-CoA 가수분해효소를 포함한다. 또한, 아디페이트 경로는 3-옥소아디페이트 경로를 통해서일 수 있다(실시예 III 및 IV 참조). 비-천연 미생물 유기체는 아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 아디페이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 아디페이트 경로를 가질 수 있고, 아디페이트 경로는 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디페이트 환원효소, 3-하이드록시아디페이트 데하이드라타아제, 및 2-에노에이트 환원효소를 포함한다.

[0042] 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-아미노카프로산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 6-아미노카프로산 경로는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소 및 아미노전이효소를 포함한다(실시예 VIII 및 IX 참조). 다르게는, 6-아미노카프로에이트 탈수소효소는 아디페이트 세미알데히드를 전환시켜 6-아미노카프로에이트를 형성하기 위해 사용될 수 있다(도 8 참조). 비-천연 미생물 유기체는 카프로락탐을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 카프로락탐 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 카프로락탐 경로를 가질 수 있고, 카프로락탐 경로는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소, 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 탈수소효소, 및 아미도가수분해효소를 포함한다(실시예 VIII 및 IX 참조).

[0043] 본원에 개시된 바와 같이, 6-아미노카프로산 또는 카프로락탐 생산 미생물 유기체는 6-아미노카프로산 및/또는 카프로락탐을 아디필-CoA 전구체로부터 생산할 수 있다(도 8 및 실시예 VIII 및 IX 참조). 따라서, 6-아미노카프로산 또는 카프로락탐 생산 미생물 유기체는 추가로 아디필-CoA를 생산하는 경로를 추가로 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들면 아디필-CoA 경로는 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA를 아디필-CoA의 생산에 있어서 전구체로서 이용하는 도 2의 효소를 포함할 수 있고, 즉 아디필-CoA를 아디페이트로 전환시키는 최종 단계를 위한 효소가 결여된다. 이와 같이, 한 예시적인 아디필-CoA 경로는 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 3-하이드록시 아디필-CoA 데하이드라타아제 및 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소를 포함할 수 있다.

[0044] 또한, 도 1에 도시된 바와 같이, 아디페이트 분해 경로는 아디페이트 CoA 리가아제에 의한 아디페이트의 아디필-CoA로의 전환 단계를 포함한다. 따라서, 아디필-CoA 경로는, 예를 들면, 도 1의 제 1 단계에서와 같은 아디페이트-CoA 리가아제 활성 또는 역 방향으로 수행되는 도 2의 최종 단계에서의 임의의 효소, 예를 들면, 임의의 아디필-CoA 합성효소(또한 아디페이트 Co-A 리가아제로 지칭됨), 포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제, 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소 또는 아디필-CoA 가수분해효소를 비롯하여, 아디페이트를 아디필-CoA로 전환시키는 효소 활성을 추가로 포함하는 아디페이트 경로일 수 있다. 아디페이트의 아디필-CoA로의 활성을 갖는 효소는 내인성 활성일 수 있거나, 본원에 개시된 바와 같이, 효소를 코딩하는 외인성 핵산으로서 제공될 수 있다. 이와 같이, 임의의 아디페이트 경로는 아디페이트의 아디필-CoA로의 효소 활성에 의해 이용되어 아디필-CoA 경로를 생산할 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 경로는 6-아미노카프로산 또는 카프로락탐 생산 미생물 유기체에 포함되어 6-아미노카프로산 및/또는 카프로락탐 생산을 위한 아디필-CoA 전구체를 제공할 수 있다.

[0045] 추가의 예시적인 아디페이트 경로는 알파-케토아디페이트를 전구체로서 이용한다(도 6 및 실시예 VI 참조). 예를 들면, 비-천연 미생물 유기체는 아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 아디페이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 아디페이트 경로를 가질 수 있고, 아디페이트 경로는 호모시트레이트 신타아제, 호모아코니타아제(homoaconitase), 호모이소시트레이트 탈수소효소, 2-케토아디페이트 환원효소, 알파-하이드록시아디페이트 데하이드라타아제 및 산화환원효소를 포함한다. 추가의 예시적인 아디페이트 경로는 라이신 분해 경로를 이용한다(도 7 및 실시예 VII 참조). 또 다른 비-천연 미생물 유기체는 아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 아디페이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 아디페이트 경로를 갖고, 아디페이트 경로는 탄소 질소 리아제, 산화환원효소, 아미노전이효소 및 산화환원효소를 포함한다.

[0046] 또 다른 예시적인 아디페이트 경로는 알파-케토아디페이트를 전구체로서 이용한다(도 9 및 실시예 X 및 XI 참조). 이와 같이, 비-천연 미생물 유기체는 아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 아디페이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 아디페이트 경로를 갖고, 아디페이트 경로는 알파-케토아디필-CoA 합성효소, 포스포트랜스케토아디필라아제/알파-케토아디페이트 키나아제 또는 알파-케토아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소; 2-하이드록시아디필-CoA 탈수소효소; 2-하이드록시 아디필-CoA 데하이드라타아제; 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소; 및 아디필-CoA 합성효소, 포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제, 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소 또는 아디필-CoA 가수분해효소를 포함한다. 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 아디페이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성

핵산을 포함하는 아디페이트 경로를 갖고, 아디페이트 경로는 2-하이드록시아디페이트 탈수소효소; 2-하이드록시아디필-CoA 합성효소, 포스포트랜스하이드록시아디필라아제/2-하이드록시아디페이트 키나아제 또는 2-하이드록시아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소; 2-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제; 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소; 및 아디필-CoA 합성효소, 포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제, 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소 또는 아디필-CoA 가수분해효소를 포함한다.

[0047] 본원에 개시된 바와 같이, 본 발명은 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 이는 6-아미노카프로산을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-아미노카프로산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-아미노카프로산 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하고, 6-아미노카프로산 경로는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 환원효소; 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA 데하이드라타아제; 6-아미노헥스-2-에노일-CoA 환원효소; 및 6-아미노카프로일-CoA/아실-CoA 전이효소, 6-아미노카프로일-CoA 신타아제, 또는 6-아미노카프로일-CoA 가수분해효소를 포함한다(실시예 XII 및 XIII; 도 11의 단계 A/B/C/D/K/L/M 참조). 본 발명은 추가적으로 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 이는 6-아미노카프로산을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-아미노카프로산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-아미노카프로산 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하고, 6-아미노카프로산 경로는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA/아실-CoA 전이효소, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 신타아제, 또는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 가수분해효소; 3-옥소-6-아미노헥사노에이트 환원효소; 3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트 데하이드라타아제; 및 6-아미노헥스-2-에노에이트 환원효소를 포함한다(실시예 XII 및 XIV; 도 11의 단계 A/E/F/G/H/I/J 참조).

[0048] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 카프로락탐을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 카프로락탐 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 카프로락탐 경로를 갖는 미생물 유기체를 비롯한 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 카프로락탐 경로는 6-아미노카프로일-CoA/아실-CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로일-CoA 신타아제를 포함한다(실시예 XII 및 XV; 도 11의 단계 K/L 참조). 이러한 카프로락탐 경로를 포함하는 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산 경로를 추가로 포함할 수 있다(도 11 참조). 예시적인 6-아미노카프로산 경로는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소를 포함하는 6-아미노카프로산 경로; 및 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 탈수소효소 또는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제를 포함하는 6-아미노카프로산 경로; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA/아실-CoA 전이효소, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 신타아제, 또는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 가수분해효소; 3-옥소-6-아미노헥사노에이트 환원효소; 3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트 데하이드라타아제; 및 6-아미노헥스-2-에노에이트 환원효소를 포함한다(도 11의 단계 A/E/F/G/H/I/J 참조). 본원에 개시된 이들 또는 다른 예시적인 6-아미노카프로산 경로는 원할 경우 카프로락탐 경로를 갖는 미생물 유기체에 추가적으로 포함될 수 있다. 본 발명은 또한 헥사메틸렌디아민을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 헥사메틸렌디아민 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 헥사메틸렌디아민 경로를 갖는 미생물 유기체를 비롯한 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 헥사메틸렌디아민 경로는 6-아미노카프로일-CoA/아실-CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로일-CoA 신타아제; 6-아미노카프로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 및 헥사메틸렌디아민 아미노전이효소 또는 헥사메틸렌디아민 탈수소효소를 포함한다(실시예 XII 및 XVI; 도 11의 단계 K/L/N/O/P 참조). 이러한 헥사메틸렌디아민 경로를 포함하는 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산 경로를 추가로 포함할 수 있다(도 11 참조). 예시적인 6-아미노카프로산 경로는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소를 포함하는 6-아미노카프로산 경로; 및 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 탈수소효소 또는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제를 포함하는 6-아미노카프로산 경로; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA/아실-CoA 전이효소, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 신타아제, 또는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 가수분해효소; 3-옥소-6-아미노헥사노에이트 환원효소; 3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트 데하이드라타아제; 및 6-아미노헥스-2-에노에이트 환원효소를 포함한다(도 11의 단계 A/E/F/G/H/I/J). 본원에 개시된 이들 또는 다른 예시적인 6-아미노카프로산 경로는, 원할 경우, 헥사메틸렌디아민 경로를 갖는 미생물 유기체에 추가적으로 포함될 수 있다.

[0049] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 카프로락탐을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 카프로락탐 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 카프로락탐 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 카프로락탐 경로는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 환원효소; 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA 데하이드라타아제; 및 6-아미노헥스-2-에노일-CoA 환원효소를 포함한다(실시예 XII 및 XVII; 도 11의 단계 A/B/C/D 참조). 또한 헥사메틸렌디아민을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 헥사메틸렌디아민 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 헥사메틸렌디아민 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체가 제공되고, 헥사메틸렌디아민 경로는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 환원효소; 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA 데하이드라타아제; 6-아미노헥

스-2-에노일-CoA 환원효소; 6-아미노카프로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 및 헥사메틸렌디아민 아미노전이효소 또는 헥사메틸렌디아민 탈수소효소를 포함한다(실시예 XII 및 XVIII; 도 11의 단계 A/B/C/D/N/O/P 참조).

[0050] 역시 또 다른 실시태양에서, 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH) 알돌라아제, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 수화효소, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 환원효소, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 데카복실라아제, 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소, 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 데카복실라아제, 6-옥소헥스-4-에노에이트(6-OHE) 환원효소, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 아미노전이효소, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 산화환원효소(아민화), 2-아미노헵탄-1,7-디오에이트(2-AHD) 데카복실라아제, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 아미노전이효소, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 산화환원효소(아민화), 2-아미노헵트-4-엔-1,7-디오에이트(2-AHE) 환원효소, 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH) 포메이트-리아제, 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH) 탈수소효소, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소, 아디필-CoA 탈수소효소, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 포메이트-리아제, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 탈수소효소, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 포메이트-리아제, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 탈수소효소, 또는 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A-Q 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제를 포함한다.

[0051] 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 데카복실라아제; 또는 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/C/D/E 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이러한 세트는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 데카복실라아제; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 코딩한다.

[0052] 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 데카복실라아제; 6-OHE 환원효소; 또는 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/F/G/E 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 데카복실라아제; 6-OHE 환원효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 코딩한다.

[0053] 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 아미노전이효소 또는 OHED 산화환원효소(아민화); 2-AHE 환원효소; 또는 2-AHD 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/J/D/I 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 아미노전이효소 또는 OHED 산화환원효소(아민화); 2-AHE 환원효소; 및 2-AHD 데카복실라아제를 코딩한다.

[0054] 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 아미노전이효소 또는 2-OHD 산화환원효소(아민화); 또는 2-AHD 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/C/H/I 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베

이트(PEP) 카복시키나아제를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 아미노전이효소 또는 2-OHD 산화환원효소(아민화); 및 2-AHD 데카복실라아제를 코딩한다.

[0055] 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; HODH 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 HODH 탈수소효소; 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제; 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 또는 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/L/M/N/O/E 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 HODH 알돌라아제; HODH 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 HODH 탈수소효소; 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제; 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 코딩한다.

[0056] 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 OHED 탈수소효소; 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 또는 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/P/N/O/E 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 OHED 탈수소효소; 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 코딩한다.

[0057] 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 2-OHD 탈수소효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 또는 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/C/Q/O/E). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 2-OHD 탈수소효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 코딩한다. 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 글루타밀-CoA 전이효소, 글루타밀-CoA 리가아제, 베타-케토티올라아제, 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소, 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제, 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소, 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 또는 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 20의 단계 A/B/C/D/E/I/J 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타밀-CoA 전이효소 또는 글루타밀-CoA 리가아제; 베타-케토티올라아제; 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소; 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제; 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소; 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 및 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제를 코딩한다.

[0058] 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로

는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/T/AA 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제를 코딩한다. 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 호모라이신 2-모노옥시게나아제를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 23의 단계 A 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 희석 산 또는 염기에 의한 6-아미노헥산아미드 생성물의 가수분해를 포함하여 6-아미노헥산아미드를 6-아미노카프로에이트로 전환시킨다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 23의 단계 B 참조).

[0059] 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 아디페이트 환원효소, 아디페이트 키나아제 또는 아디필포스페이트 환원효소를 포함한다(실시예 XXVIII; 도 25의 단계 X/Y/Z 및 실시예 XXXI 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 아디페이트 환원효소를 포함한다. 또 다른 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 아디페이트 키나아제 및 아디필포스페이트 환원효소를 포함한다. 역시 또 다른 양태에서, 상기 6-아미노카프로산(6-ACA) 경로를 갖는 미생물 유기체는 본원에 기재된 아디페이트 경로, 카프로락탐 경로 및/또는 헥사메틸렌디아민 경로를 추가로 포함한다(실시예 XXVIII; 도 25의 단계 A-W 참조).

[0060] 한 실시태양에서, 본 발명은 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 6-ACA 경로는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 산화환원효소, 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제, 6-아미노헥사날 산화환원효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제, 또는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 26의 단계 A/B/D/E/F/G/I 참조). 추가의 양태에서, 미생물 유기체는 2-아미노-7-옥소수바레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로를 갖고, 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로는 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 알돌라아제, 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 데하이드라타아제, 또는 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트 환원효소를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 27의 단계 A/B/C 참조).

[0061] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 산화환원효소; 및 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제를 코딩한다(실시예 XXV; 도 26의 단계 A/D/E 참조). 본 발명의 역시 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제; 및 6-아미노헥사날 산화환원효소를 코딩한다(실시예 XXV; 도 26의 단계 A/B/F 참조). 본 발명의 여전히 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제; 및 6-아미노헥사날 산화환원효소를 코딩한다(실시예 XXV; 도 26의 단계 I/G/F). 상기 실시태양 각각의 추가의 양태에서, 미생물 유기체는 2-아미노-7-옥소수바레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산의 제2 세트를 갖는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로를 갖고, 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로는 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 알돌라아제; 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 데하이드라타아제; 및 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트 환원효소를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 27의 단계 A/B/C 참조).

[0062] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 키나아제, [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP) 산화환원효소, 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소, 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소

(아민화), 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소, 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제, [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP) 산화환원효소, 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소, 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화), 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소, 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드), 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 전이효소, 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 리가아제, 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소, [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP) 아실전이효소, [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP) 아실전이효소, 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 및 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 A-N 참조).

[0063] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 산화환원효소; 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 A/B/C 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 코딩한다.

[0064] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 아실전이효소; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 A/L/N/C 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 아실전이효소; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 코딩한다.

[0065] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 M/N/C 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 코딩한다.

[0066] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제; 6-AAHOP 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 또는 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 D/E/F/G/H 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제; 6-AAHOP 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 코딩한다.

[0067] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 전이효소 또는 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 리가아제; 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 또는 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 D/I/J/G/H 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 전이효소 또는 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 리가아제; 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이

효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 코딩한다. 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제; 6-AAHOP 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 또는 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 D/E/K/J/G 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제; 6-AAHOP 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 코딩한다. 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타밀-CoA 전이효소, 글루타밀-CoA 리가아제, 베타-케토티올라아제, 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소, 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제, 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소, 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 20의 단계 A-H 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타밀-CoA 전이효소 또는 리가아제; 베타-케토티올라아제; 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소; 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제; 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소; 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0068] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 환원효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 아민화 산화환원효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소, 3-옥소피멜레이트 키나아제, 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소, 3-옥소피멜레이트 리가아제, 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소, 3-아미노피멜레이트 리가아제, 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-아미노피멜레이트 키나아제, 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-아미노피멜레이트 환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 호모라이신 데카복실라아제, 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노피멜레이트 키나아제, 2-아미노피멜레이트 CoA 전이효소, 2-아미노피멜레이트 CoA 리가아제, 2-아미노피멜레이트 환원효소, 6-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21 참조).

[0069] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 환원효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/C/D/E/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 환원효소; 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소; 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0070] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 키나아제, 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/F/G/D/E/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 키나아제; 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소; 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소; 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0071] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소, 3-옥소피멜레이트 CoA 리가아제, 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/H/I/D/E/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 CoA 리가아제; 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소; 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0072] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 환원효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/C/AB/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 환원효소; 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0073] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 키나아제, 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/H/I/AB/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 키나아제; 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효

소; 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0074] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 CoA 리가아제, 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/F/G/AB/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 CoA 리가아제; 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0075] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B//J/O/P/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0076] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 키나아제, 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/M/N/P/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 키나아제; 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0077] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소, 3-아미노피멜레이트 CoA 리가아제, 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21

의 단계 A/B/J/K/L/P/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-아미노피멜레이트 CoA 리가아제; 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0078] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/O/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0079] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소, 3-아미노피멜레이트 CoA 리가아제, 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/K/L/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-아미노피멜레이트 CoA 리가아제; 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0080] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 키나아제, 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/M/N/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 키나아제; 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0081] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피

멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노피멜레이트 환원효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/T/W/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노피멜레이트 환원효소; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0082] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노피멜레이트 키나아제, 6-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/T/U/X/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노피멜레이트 키나아제; 6-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0083] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노피멜레이트 CoA 전이효소, 2-아미노피멜레이트 CoA 리가아제, 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/T/V/Y/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노피멜레이트 CoA 전이효소 또는 2-아미노피멜레이트 CoA 리가아제; 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0084] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 알돌라아제, 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 데하이드라타아제, 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트 환원효소, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소 아민화 산화환원효소, 호모라이신 데카복실라아제, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 데카복실라아제, 6-아미노헥사날 아미노전이효소 또는 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 22의 단계 A-G 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 알돌라아제; 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 데하이드라타아제; 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트 환원효소; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소 또는 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 알돌라아제; 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 데하이드라타아제; 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트 환원효소; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 데카복실라아제; 및 6-아미노헥사날 아미노전이효소 또는 6-

아미노헥사날 아민화 산화환원효소를 코딩한다.

[0085] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 환원효소, 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소, 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소, 6-아세트아미도헥사노에이트 환원효소, 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소, 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화), 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다(실시예 XXVII; 도 24의 단계 O/C 또는 D/P/G/H 및 실시예 XXXI). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 6-아미노카프로에이트 환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 코딩한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 코딩한다. 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, HMDA 경로는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제, 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소, 6-아미노헥사날 아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제, 호모라이신 데카복실라아제, 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소수바레이트 아민화 산화환원효소, 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노전이효소, 2,7-디아미노수바레이트 데카복실라아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 A/B/C/G/H/I/J/K/L/M 참조). 추가의 양태에서, 미생물 유기체는 2-아미노-7-옥소수바레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로를 갖고, 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로는 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 알돌라아제, 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 데하이드라타아제, 또는 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트 환원효소를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 27의 단계 A/B/C 참조).

[0086] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아민화 산화환원효소 또는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노전이효소; 2,7-디아미노수바레이트 데카복실라아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 K/L/H 참조). 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아민화 산화환원효소 또는 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 I/J/H 참조). 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 데카복실라아제; 및 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소 또는 6-아미노헥사날 아미노전이효소를 코딩한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 I/G/C 참조). 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제; 및 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소 또는 6-아미노헥사날 아미노전이효소를 코딩한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 A/B/C 참조). 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 A/M/H 참조). 상기 실시태양 각각의 추가의 양태에서, 미생물 유기체는 2-아미노-7-옥소수바레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산의 제2 세트를 갖는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로를 갖고, 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로는 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 알돌라아제; 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 데하이드라타아제; 및 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트 환원효소를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 27의 단계 A/B/C 참조). 본 발명은 추가적으로 레불린산(LA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 LA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함

하는 LA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, LA 경로는 3-옥소아디필-CoA 티올라아제, 3-옥소아디필-CoA/아실-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 신타아제, 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소, 또는 3-옥소아디페이트 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIX; 도 25의 단계 A/E/F/G/AA 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 LA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 3-옥소아디필-CoA 티올라아제; 3-옥소아디필-CoA/아실-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 신타아제, 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 및 3-옥소아디페이트 데카복실라아제를 코딩한다.

[0087] 본원에 개시된 비-천연 미생물 유기체는, 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로를 가질 수 있고, 여기서 비-천연 미생물 유기체는, 본원에 개시된 바와 같이, 기질을 생성물로 전환시키는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 이와 같이, 비-천연 미생물 유기체는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함할 수 있고, 여기서 폴리펩티드는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로의 기질 및 생성물을 전환시키는 효소 또는 단백질, 예컨대 도 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13 및 20 내지 27에 제시된 것들이다.

[0088] 예를 들면, 비-천연 미생물 유기체는 아디페이트 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 3-옥소아디필-CoA로; 3-옥소아디필-CoA로부터 3-하이드록시아디필-CoA로; 3-하이드록시아디필-CoA로부터 5-카복시-2-펜테노일-CoA로; 5-카복시-2-펜테노일-CoA로부터 아디필-CoA로; 아디필-CoA로부터 아디페이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 2 참조). 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 아디페이트 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 3-옥소아디필-CoA로; 3-옥소아디필-CoA로부터 3-옥소아디페이트로; 3-옥소아디페이트로부터 3-하이드록시 아디페이트로; 3-하이드록시아디페이트로부터 헥사-2-엔디오에이트(또한 본원에 5-카복시-2-펜타노에이트로서 지칭됨)로; 헥사-2-엔디오에이트로부터 아디페이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 3 참조). 또한, 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 아디필-CoA로부터 아디페이트 세미알데히드로; 및 아디페이트 세미알데히드에서 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 8 참조). 게다가, 비-천연 미생물 유기체는 카프로락탐 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 아디필-CoA로부터 아디페이트 세미알데히드로; 아디페이트 세미알데히드에서 6-아미노카프로에이트로; 및 6-아미노카프로에이트로부터 카프로락탐으로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 아디페이트 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 알파-케토아디페이트로부터 알파-케토아디필-CoA로; 알파-케토아디필-CoA로부터 2-하이드록시아디필-CoA로; 2-하이드록시아디필-CoA로부터 5-카복시-2-펜테노일-CoA로; 5-카복시-2-펜테노일-CoA로부터 아디필-CoA로; 및 아디필-CoA로부터 아디페이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 9 참조). 또한, 비-천연 미생물 유기체는 아디페이트 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 알파-케토아디페이트로부터 2-하이드록시아디페이트로; 2-하이드록시아디페이트로부터 2-하이드록시아디필-CoA로; 2-하이드록시아디필-CoA로부터 5-카복시-2-펜테노일-CoA로; 5-카복시-2-펜테노일-CoA로부터 아디필-CoA로; 및 아디필-CoA로부터 아디페이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 9).

[0089] 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로일-CoA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 4-아미노부티릴-CoA 및 아세틸-CoA로부터 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA로; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA로부터 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA로; 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA로부터 6-아미노헥스-2-에노일-CoA로; 6-아미노헥스-2-에노일-CoA로부터 6-아미노카프로일-CoA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 11). 이러한 경로의 추가의 기질 및 생성물은 6-아미노카프로일-CoA로부터 6-아미노카프로에이트로; 6-아미노카프로일-CoA로부터 카프로락탐으로; 또는 6-아미노카프로일-CoA로부터 6-아미노카프로에이트 세미알데히드로, 및 6-아미노카프로에이트 세미알데히드에서 헥사메틸렌디아민으로의 기질 및 생성물을 포함할 수 있다(도 11). 비-천연 미생물 유기체는 또한 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 4-아미노부티릴-CoA 및 아세틸-CoA로부터 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA로; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA로부터 3-옥소-6-아미노헥사노에이트로; 3-옥소-6-아미노헥사노에이트로부터 3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트로; 3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트로부터 6-아미노헥스-2-에노에이트로; 및 6-아미노헥스-2-에노에이트로부터 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 11). 이러한 경

로의 추가의 기질 및 생성물은 6-아미노카프로에이트로부터 카프로락탐으로 또는 6-아미노카프로에이트로부터 6-아미노카프로일-CoA로, 6-아미노카프로일-CoA로부터 6-아미노카프로에이트 세미알데히드로, 및 6-아미노카프로에이트 세미알데히드에서 헥사메틸렌디아민으로의 기질 및 생성물을 포함할 수 있다(도 11).

[0090] 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 피루베이트 및 석신산 세미알데히드에서 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트로; 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH)에서 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)로: 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)에서 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD)로; 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD)에서 아디페이트 세미알데히드로; 및 아디페이트 세미알데히드에서 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 12). 비-천연 미생물 유기체는 다른 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 피루베이트 및 석신산 세미알데히드에서 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트로; 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH)에서 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)로; 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)에서 6-옥소헥스-4-에노에이트(6-OHE)로: 6-옥소헥스-4-에노에이트(6-OHE)에서 아디페이트 세미알데히드로; 및 아디페이트 세미알데히드에서 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 12). 비-천연 미생물 유기체는 다른 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 피루베이트 및 석신산 세미알데히드에서 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트로; 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH)에서 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)로; 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)에서 2-아미노헵트-4-엔-1,7-디오에이트(2-AHE)로; 2-아미노헵트-4-엔-1,7-디오에이트(2-AHE)에서 2-아미노헵탄-1,7-디오에이트(2-AHD)로; 및 2-아미노헵탄-1,7-디오에이트(2-AHD)에서 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 12). 비-천연 미생물 유기체는 다른 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 피루베이트 및 석신산 세미알데히드에서 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트로; 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH)에서 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)로; 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)에서 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD)로; 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD)에서 2-아미노헵탄-1,7-디오에이트(2-AHD)로; 및 2-아미노헵탄-1,7-디오에이트(2-AHD)에서 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 12). 비-천연 미생물 유기체는 다른 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 피루베이트 및 석신산 세미알데히드에서 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트로; 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH)에서 3-하이드록시아디필-CoA로; 3-하이드록시 아디필-CoA로부터 2,3-데하이드로아디필-CoA로; 2,3-데하이드로아디필-CoA로부터 아디필-CoA로; 아디필-CoA로부터 아디페이트 세미알데히드로; 및 아디페이트 세미알데히드에서 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 12). 비-천연 미생물 유기체는 다른 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 피루베이트 및 석신산 세미알데히드에서 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트로; 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH)에서 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)로; 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)에서 2,3-데하이드로아디필-CoA로; 2,3-데하이드로아디필-CoA로부터 아디필-CoA로; 아디필-CoA로부터 아디페이트 세미알데히드로; 및 아디페이트 세미알데히드에서 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 12). 비-천연 미생물 유기체는 다른 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 피루베이트 및 석신산 세미알데히드에서 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트로; 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH)에서 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)로; 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)에서 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD)로; 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD)에서 아디필-CoA로; 아디필-CoA로부터 아디페이트 세미알데히드로; 및 아디페이트 세미알데히드에서 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 12).

[0091] 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타메이트로부터 글루타밀-CoA로; 글루타밀-CoA로부터 3-옥소-6-아미노-피멜로일-CoA로; 3-옥소-6-아미노-피멜로일-CoA로부터 3-하이드록시-6-아미노-피멜로일-CoA로; 3-하이드록시-6-아미노-피멜로일-CoA로부터 6-아미노-7-카복시-헵트-2-에노일-CoA로; 6-아미노-7-카복시-헵트-2-에노일-CoA로부터 6-아미노피멜로일-CoA로; 6-아미노피멜로일-CoA로부터 2-아미노피멜레이트로; 및 2-아미노피멜레이트로부터 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 20). 비-천연 미생물 유기체는 다른 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로

부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-아미노피멜레이트로; 3-아미노피멜레이트로부터 2-아미노피멜레이트로; 및 2-아미노피멜레이트로부터 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 호모라이신으로부터 6-아미노헥산아미드로; 및 6-아미노헥산아미드로부터 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 23). 비-천연 미생물 유기체는 다른 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 아디페이트로부터 아디페이트 세미알데히드로; 아디페이트로부터 아디필포스페이트로; 및 아디필포스페이트로부터 아디페이트 세미알데히드로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 25).

[0092] 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 6-아미노헥사날로; 6-아미노헥사날로부터 6-아미노카프로에이트로; 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 6-아미노헥사날로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 2-아미노피멜레이트로; 및 2-아미노피멜레이트로부터 6-아미노카프로에이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 26). 비-천연 미생물 유기체는 추가로 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타메이트-5-세미알데히드에서 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트로; 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트로부터 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트로; 및 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트로부터 2-아미노-7-옥소수바레이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 27). 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 헥사메틸렌디아민(HMDA) 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 6-아미노카프로에이트로부터 [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP)로; [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP)에서 6-아미노카프로산 세미알데히드로; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드에서 헥사메틸렌디아민으로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 13). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 6-아미노카프로에이트로부터 [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP)로; [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP)에서 6-아미노카프로일-CoA로; 6-아미노카프로일-CoA로부터 6-아미노카프로산 세미알데히드로; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드에서 헥사메틸렌디아민으로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 13). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 6-아미노카프로에이트로부터 6-아미노카프로일-CoA로; 6-아미노카프로일-CoA로부터 6-아미노카프로산 세미알데히드로; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드에서 헥사메틸렌디아민으로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 13). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 6-아미노카프로에이트로부터 6-아세트아미도헥사노에이트로; 6-아세트아미도헥사노에이트로부터 [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP)로; [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP)에서 6-아세트아미도헥사날로; 6-아세트아미도헥사날로부터 6-아세트아미도헥산아민으로; 및 6-아세트아미도헥산아민으로부터 헥사메틸렌디아민으로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 13). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 6-아미노카프로에이트로부터 6-아세트아미도헥사노에이트로; 6-아세트아미도헥사노에이트로부터 6-아세트아미도헥사노일-CoA로; 6-아세트아미도헥사노일-CoA로부터 6-아세트아미도헥사날로; 6-아세트아미도헥사날로부터 6-아세트아미도헥산아민으로; 및 6-아세트아미도헥산아민으로부터 헥사메틸렌디아민으로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 13). 비-천연 미생물 유기체 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 6-아미노카프로에이트로부터 6-아세트아미도헥사노에이트로; 6-아세트아미도헥사노에이트로부터 [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP)로; [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP)에서 6-아세트아미도헥사노일-CoA로; 6-아세트아미도헥사노일-CoA로부터 6-아세트아미도헥사날로; 6-아세트아미도헥사날로부터 6-아세트아미도헥산아민으로; 및 6-아세트아미도헥산아민으로부터 헥사메틸렌디아민으로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 13).

[0093] 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 헥사메틸렌디아민(HMDA) 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타메이트로부터 글루타밀-CoA로; 글루타밀-CoA로부터 3-옥소-6-아미노-피멜로일-CoA로; 3-옥소-6-아미노-피

멜로일-CoA로부터 3-하이드록시-6-아미노-피멜로일-CoA로; 3-하이드록시-6-아미노-피멜로일-CoA로부터 6-아미노-7-카복시-헵트-2-에노일-CoA로; 6-아미노-7-카복시-헵트-2-에노일-CoA로부터 6-아미노피멜로일-CoA로; 6-아미노피멜로일-CoA로부터 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 20). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-옥소-1-카복시 헵타날로; 3-옥소-1-카복시 헵타날으로부터 3-옥소-7-아미노 헵타노에이트로; 3-옥소-7-아미노 헵타노에이트로부터 3,7-디아미노 헵타노에이트로; 3,7-디아미노 헵타노에이트로부터 호모라이신로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 5-옥소피멜로일 포스포네이트로; 5-옥소피멜로일 포스포네이트로부터 3-옥소-1-카복시 헵타날로; 3-옥소-1-카복시 헵타날으로부터 3-옥소-7-아미노 헵타노에이트로; 3-옥소-7-아미노 헵타노에이트로부터 3,7-디아미노 헵타노에이트로; 3,7-디아미노 헵타노에이트로부터 호모라이신으로, 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-옥소-1-카복시 헵타날로; 3-옥소-1-카복시 헵타날으로부터 3-옥소-7-아미노 헵타노에이트로; 3-옥소-7-아미노 헵타노에이트로부터 3,7-디아미노 헵타노에이트로; 3,7-디아미노 헵타노에이트로부터 호모라이신으로, 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-옥소-1-카복시 헵타날로; 3-옥소-1-카복시 헵타날으로부터 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 3,7-디아미노 헵타노에이트로; 3,7-디아미노 헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 5-옥소피멜로일 포스포네이트로; 5-옥소피멜로일 포스포네이트로부터 3-옥소-1-카복시 헵타날로; 3-옥소-1-카복시 헵타날으로부터 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 3,7-디아미노 헵타노에이트로; 3,7-디아미노 헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 5-옥소피멜로일 포스포네이트로; 5-옥소피멜로일 포스포네이트로부터 3-옥소-1-카복시 헵타날로; 3-옥소-1-카복시 헵타날으로부터 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 3,7-디아미노 헵타노에이트로; 3,7-디아미노 헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-아미노피멜레이트로; 3-아미노피멜레이트로부터 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-아미노피멜레이트로; 3-아미노피멜레이트로부터 5-아미노피멜로일 포스포네이트로; 5-아미노피멜로일 포스포네이트로부터 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 5-아미노피멜로일-CoA로; 5-아미노피멜로일-CoA

로부터 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-아미노피멜레이트로; 3-아미노피멜레이트로부터 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 3,7-디아미노 헵타노에이트로; 3,7-디아미노 헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-아미노피멜레이트로; 3-아미노피멜레이트로부터 5-아미노피멜로일-CoA로; 5-아미노피멜로일-CoA로부터 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 3,7-디아미노 헵타노에이트로; 3,7-디아미노 헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-아미노피멜레이트로; 3-아미노피멜레이트로부터 5-아미노피멜로일 포스포네이트로; 5-아미노피멜로일 포스포네이트로부터 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 3,7-디아미노 헵타노에이트로; 3,7-디아미노 헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-아미노피멜레이트로; 3-아미노피멜레이트로부터 2-아미노피멜레이트로; 2-아미노피멜레이트로부터 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-아미노피멜레이트로; 3-아미노피멜레이트로부터 2-아미노피멜레이트로; 2-아미노피멜레이트로부터 6-아미노피멜로일포스포네이트로; 6-아미노피멜로일포스포네이트로부터 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타릴-CoA로부터 3-옥소피멜로일-CoA로; 3-옥소피멜로일-CoA로부터 3-옥소피멜레이트로; 3-옥소피멜레이트로부터 3-아미노피멜레이트로; 3-아미노피멜레이트로부터 2-아미노피멜레이트로; 2-아미노피멜레이트로부터 6-아미노피멜로일-CoA로; 6-아미노피멜로일-CoA로부터 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 21). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 피루베이트 및 4-아미노부타날로부터 2-옥소-4-하이드록시 7-아미노헵타노에이트로; 2-옥소-4-하이드록시 7-아미노헵타노에이트로부터 2-옥소-7-아미노 헵트-3-에노에이트로; 2-옥소-7-아미노 헵트-3-에노에이트로부터 2-옥소-7-아미노 헵타노에이트로; 2-옥소-7-아미노 헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 및 호모라이신으로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 22). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 피루베이트 및 4-아미노부타날로부터 2-옥소-4-하이드록시 7-아미노헵타노에이트로; 2-옥소-4-하이드록시 7-아미노헵타노에이트로부터 2-옥소-7-아미노 헵트-3-에노에이트로; 2-옥소-7-아미노 헵타노에이트로부터 6-아미노헥사날로; 및 6-아미노헥사날로부터 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 22). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 6-아미노카프로에이트로부터 6-아미노카프로산 세미알데히드로; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드에서 HMDA로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 24). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 6-아미노카프로에이트로부터 6-아세트아미도헥사노에이트로; 6-아세트아미도헥사노에이트로부터 6-아세트아미도헥사날로; 6-아세트아미도헥사날로부터 6-아세트아미도헥산아민로; 6-아세트아미도헥산아민으로부터 HMDA로의

전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 24). 비-천연 미생물 유기체는 다른 HMDA 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 아미노헥사날로; 6-아미노헥사날로부터 HMDA로; 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터 2-옥소-7-아미노헵타노에이트로; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 호모라이신으로부터 HMDA로; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트로부터 호모라이신으로; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트로부터 6-아미노헥사날로; 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터 2,7-디아미노수바레이트로; 및 2,7-디아미노수바레이트로부터 호모라이신으로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 26). 비-천연 미생물 유기체는 추가로 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 글루타메이트-5-세미알데히드에서 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트로; 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트로부터 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트로; 및 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트로부터 2-아미노-7-옥소수바레이트로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다(도 27).

[0094] 추가적으로, 비-천연 미생물 유기체는 레불린산 경로를 가질 수 있고, 여기서 미생물 유기체는 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 3-옥소아디필-CoA로; 3-옥소아디필-CoA로부터 3-옥소아디페이트로; 및 3-옥소아디페이트로부터 레불린산로의 전환에서 선택된, 기질의 생성물로의 전환을 수행하는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 하나의 경로의 중간체를 생산하는 본원에 개시된 임의의 경로는 원할 경우 또 다른 경로를 위해 그 중간체를 생산하기 위해 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들면, 본원에 개시된 바와 같이, 도 9에 도시된 알파-케토아디페이트로부터 아디페이트로의 경로는 중간체 아디필-CoA를 생산하고, 이는 도 10에 도시된 경로에서 또한 중간체이다. 이와 같이, 다른 경로는 알파-케토아디페이트로부터 아디필-CoA로의 전환을 포함하고, 아디필-CoA는 도 10에 도시된 바와 같이 아디페이트, 6-아미노카프로에이트, 카프로락탐 또는 헥사메틸렌디아민으로 전환될 수 있는 것으로 이해된다. 원하는 중간체를 생산하는 본원에 개시된 임의의 경로는 원하는 생성물이 생산되는 한 본원에 개시된 임의의 다른 경로와 함께 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들면, 본원에 개시된 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 및 헥사메틸렌디아민 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 핵산을 가질 수 있고, 이러한 효소들은 예컨대 2-AHD 데카복실라아제(도 12의 단계 I) 및 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제(도 13의 단계 E), 또는 다르게는 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 데카복실라아제(도 12의 단계 F), 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소(도 12의 단계 E) 및 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소(도 13의 단계 J), 또는 다르게는 5-카복시-2펜테노일-CoA 환원효소(도 10의 단계 D), 아디필-CoA 탈수소효소(도 12의 단계 O) 및 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소(도 13의 단계 N), 또는 다르게는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소(도 20의 단계 G) 및 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제(도 21의 단계 R), 또는 다르게는 6-아미노카프로에이트 환원효소(도 24의 단계 O) 및 6-아미노헥스-2-에노에이트 환원효소(도 11의 단계 J), 또는 다르게는 아디페이트 환원효소(도 25의 단계 X) 및 6-아세트아미도헥사노에이트 환원효소(도 24의 단계 P)이다.

[0095] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 여기서 비-천연 미생물 유기체는 본원에 개시되거나 도 1 내지 14 및 20 내지 27중 임의의 도면에 도시된 임의의 기질 또는 생성물로부터 선택된 기질에서 생성물로의 전환을 수행하는 효소 또는 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 당분야의 숙련가라면 원하는 생성물을 생산하기에 적합한 본원에 개시된 임의의 기질-생성물 쌍 및 이의 기질의 생성물로의 전환에 이용가능한 적절한 활성이 본원의 교시에 기초하여 당분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있음을 이해할 것이다. 이와 같이, 본 발명은 효소 또는 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 여기서 효소 또는 단백질은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로의 기질 및 생성물, 예컨대 도 1 내지 14 및 20 내지 27에 제시된 것들을 전환시킨다.

[0096] 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로를 포함하는 미생물 유기체로서 일반적으로 본원에 기재되지만, 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로의 중간체를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, 본원에 개시된 바와 같이, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로는 도 1 내지 14 및 20 내지 27에 예시되어 있다. 따라서, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산하는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로를 포함하는 미생물 유기체에 더하여, 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아

민 또는 레불린산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 중간체, 예를 들면, 도 1 내지 14 및 20 내지 27에 도시된 임의의 중간체를 생산하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다.

[0097] 실시예에 기재되고 도면에 예시된 바와 같은 경로, 예컨대 도 1 내지 14 및 20 내지 27의 경로를 비롯한 본원에 개시된 임의의 경로는, 원할 경우, 임의의 경로 중간체 또는 생성물을 생산하는 비-천연 미생물 유기체를 생성하기 위해 이용될 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 중간체를 생산하는 이러한 미생물 유기체는 원하는 생성물을 생산하는 다운스트림 경로 효소를 발현하는 또 다른 미생물 유기체와 함께 사용될 수 있다. 그러나, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 중간체를 생산하는 비-천연 미생물 유기체는 원하는 생성물로서 중간체를 생산하기 위해 이용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0098] 본 발명은 일반적으로 대사 반응, 반응물 또는 이의 생성물에 관하여, 또는 언급된 대사 반응, 반응물 또는 생성물과 연관되거나 이를 촉매화하는 효소를 코딩하는 1종 이상의 핵산 또는 유전자에 관하여 본원에 기재된다. 본원에 명백히 달리 언급되지 않는 한, 당분야의 숙련가라면 반응에 관한 언급은 또한 반응의 반응물 및 생성물에 관한 언급을 포함함을 이해할 것이다. 유사하게, 본원에 달리 명백히 지시되지 않는 한, 반응물 또는 생성물에 대한 언급은 또한 반응을 지칭하고, 임의의 이들 대사 구성성분들에 대한 언급은 지칭된 반응, 반응물 또는 생성물을 촉매화하는 효소를 코딩하는 유전자 또는 유전자들을 지칭한다. 유사하게, 대사 생화학, 효소학 및 유전체학의 공지된 분야를 참고하여, 유전자 또는 코딩 핵산에 대한 언급은 또한 상응하는 코딩된 효소 및 이것이 촉매화하는 반응, 뿐만 아니라 반응의 반응물 및 생성물에 대한 언급을 포함한다.

[0099] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 1종 이상의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로에 참여하는 1종 이상의 효소를 코딩하는 발현가능한 핵산을 도입함으로써 생산될 수 있다. 생합성을 위해 선택되는 숙주 미생물 유기체에 따라서, 특정 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로의 일부 또는 모두를 위한 핵산이 발현될 수 있다. 예를 들면, 선택된 숙주에서 원하는 생합성 경로를 위해 1종 이상의 효소가 결핍된다면, 결핍 효소를 위한 발현가능한 핵산은 후속적인 외인성 발현을 위해 숙주로 도입된다. 다르게는, 선택된 숙주가 몇몇 경로 유전자의 내인성 발현을 나타내지만 다른 것에서 결핍된 경우, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성을 달성하기 위한 결핍 효소를 위해 코딩 핵산이 필요하다. 이와 같이, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 외인성 효소 활성을 도입함으로써 생산되어 원하는 생합성 경로를 수득할 수 있거나, 원하는 생합성 경로는 1종 이상의 내인성 효소와 함께 원하는 생성물, 예컨대 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산하는 1종 이상의 외인성 효소 활성을 도입함으로써 수득될 수 있다.

[0100] 선택된 숙주 미생물 유기체의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로 구성요소에 의존하여, 본 발명의 비-천연 미생물은 적어도 하나의 외인성으로 발현되는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로-코딩 핵산, 및 1종 이상의 아디페이트, 6-아미노카프로산 또는 카프로락탐 생합성 경로를 위한 모든 수 까지의 코딩 핵산을 포함할 것이다. 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성은 상응하는 코딩 핵산의 외인성 발현을 통해 경로 효소가 결핍된 숙주에서 달성될 수 있다. 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로의 모든 효소가 결핍된 숙주에서, 이 경로중의 모든 효소의 외인성 발현이 포함될 수 있지만, 숙주가 적어도 하나의 경로 효소를 포함할 지라도 경로의 모든 효소가 발현될 수 있는 것으로 이해된다.

[0101] 예를 들면, 아디페이트의 생산을 위한 경로중 모든 효소, 예컨대 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시 아실-CoA 탈수소효소, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소, 및 아디필-CoA 합성효소 또는 포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제 또는 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소 또는 아디필-CoA 가수분해효소의 외인성 발현은 숙주 유기체에 포함될 수 있다. 특별히, 숙주 유기체는 아디페이트 경로 효소인 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소, 및 아디필-CoA 합성효소를 포함할 수 있다. 다르게는, 숙주 유기체는 아디페이트 경로 효소인 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소, 및 포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제를 포함할 수 있다. 또한, 숙주 유기체는 아디페이트 경로 효소인 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소, 및 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소를 포함할 수 있다. 추가로, 숙주 유기체는 아디페이트 경로 효소인 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소, 및 아디필-CoA 가수분해효

소를 포함할 수 있다.

[0102] 6-아미노카프로산 생산 미생물 유기체의 경우, 6-아미노카프로산의 생산을 위한 경로중의 모든 효소, 예컨대 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소 및 아미노전이효소 또는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소 및 6-아미노카프로에이트 탈수소효소의 외인성 발현이 숙주 유기체에 포함될 수 있다. 카프로락탐 생산 미생물의 유기체의 경우, 카프로락탐의 생산을 위한 경로중의 모든 효소, 예컨대 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소, 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 탈수소효소, 및 아미도가수분해효소의 외인성 발현이 숙주 유기체에 포함될 수 있다. 또 다른 예에서, 6-아미노카프로산(6-ACA)의 생산을 위한 경로중의 모든 효소, 예컨대 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 데카복실라아제; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 또는 다르게는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 데카복실라아제; 6-OHE 환원효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 또는 다르게는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 아미노전이효소 또는 OHED 산화환원효소(아민화); 2-AHE 환원효소; 및 2-AHD 데카복실라아제, 또는 다르게는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 아미노전이효소 또는 2-OHD 산화환원효소(아민화); 및 2-AHD 데카복실라아제, 또는 다르게는 HODH 알돌라아제; HODH 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 HODH 탈수소효소; 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제; 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 또는 다르게는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 OHED 탈수소효소; 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 또는 다르게는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 2-OHD 탈수소효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)의 외인성 발현이 숙주 유기체에 포함될 수 있다. 추가의 양태에서, 상기 기재된 모든 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 6-아미노카프로산(6-ACA)의 생산을 위한 경로중의 모든 효소, 예컨대 글루타밀-CoA 전이효소 또는 글루타밀-CoA 리가아제; 베타-케토티올라아제; 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소; 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제; 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소; 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 및 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제의 외인성 발현이 숙주 유기체에 포함될 수 있다.

[0103] 또 다른 예에서, 헥사메틸렌디아민의 생산을 위한 경로중의 모든 효소, 예컨대 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소, 또는 다르게는 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 아실전이효소; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소, 또는 다르게는 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소, 또는 다르게는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제; 6-AAHOP 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드), 또는 다르게는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 전이효소 또는 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 리가아제; 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드), 또는 다르게는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제; 6-AAHOP 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)의 외인성 발현이 숙주 유기체에 포함될 수 있다. 또 다른 예에서, 헥사메틸렌디아민의 생산을 위한 경로중의 모든 효소, 예컨대 글루타밀-CoA 전이효소 또는 리가아제; 베타-케토티올라아제; 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소; 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제; 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소; 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 2-아미

노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 환원효소; 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소; 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 키나아제; 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소; 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소; 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 CoA 리가아제; 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소; 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 환원효소; 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 CoA 리가아제; 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 5-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소 또는 5-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 키나아제; 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-아미노피멜레이트 CoA 리가아제; 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 3,7-

디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 키나아제; 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 3, 7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노피멜레이트 환원효소; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노피멜레이트 키나아제; 6-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노피멜레이트 CoA 전이효소 또는 2-아미노피멜레이트 CoA 리가아제; 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 알돌라아제; 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 데하이드라타아제; 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트 환원효소; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소 또는 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 다르게는 6-아미노카프로에이트 환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 또는 다르게는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)의 외인성 발현이 숙주 유기체에 포함될 수 있다.

[0104] 선택된 숙주 미생물 유기체의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로 구성요소에 의존하여, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 적어도 하나의 외인성으로 발현된 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로-코딩 핵산 및 1종 이상의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로를 위한 모든 수 까지의 코딩 핵산을 포함할 것이다. 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성은 상응하는 코딩 핵산의 외인성 발현을 통해 경로 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에서 달성될 수 있다. 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로의 모든 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에서, 경로중의 모든 효소 또는 단백질의 외인성 발현이 포함될 수 있지만, 숙주가 적어도 하나의 경로 효소 또는 단백질을 포함할 지라도 경로의 모든 효소 또는 단백질이 발현될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들면, 본원에 개시된 바와 같이, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 위한 경로중의 모든 효소 또는 단백질의 외인성 발현이 포함될 수 있다.

[0105] 본원에 제공된 교시 및 지침을 참고하여, 당분야의 숙련가라면 발현가능한 형태로 도입되는 코딩 핵산의 수는, 적어도 선택된 숙주 미생물 유기체의 아디페이트, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 결핍에 병행될 것임을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로를 구성하는 상기 효소들을 코딩하는 적어도 1종, 2종, 3종, 4종, 5종, 6종, 7종, 8종, 9종, 10종, 11종 또는 12종 내지 모든 핵산을 가질 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 또한 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성을 조장하거나 최적화하는 다른 유전적 개질, 또는 숙주 미생물 유기체에 다른 유용한 기능을 부여하는 다른 유전적 개질을 포함할 수 있다. 이러한 다른 작용성으로는, 예를 들면, 아디페이트 합성의 경우 1종 이상의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 전구체, 예컨대 석시닐-CoA 및/또는 아세틸-CoA의 합성의 증진, 또는 본원에 개시된 아디페이트 경로 효소를 비롯하여, 6-아미노카프로산 또는 카프로락탐 합성의 경우 아디필-CoA 또는 아디페이트 합성의 증진, 또는 6-아미노카프리오에이트 합성의 경우 피루베이트 및 석신산 세미알데히드, 글루타메이트, 글루타릴-CoA, 호모라이신 또는 2-아미노-7-옥소수바레이트 합성의 증진, 또는 헥사메틸렌디아민 합성의 경우 6-아미노카프로에이트, 글루타메이트, 글루타릴-CoA, 피루베이트 및 4-

아미노부타날, 또는 2-아미노-7-옥소수바레이트 합성의 증진이 포함된다.

[0106] 일반적으로, 숙주 미생물 유기체는, 이것이 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로의 전구체를, 천연적으로 생산된 분자로서, 또는 원하는 전구체의 데노보(de novo) 생산을 제공하거나 숙주 미생물 유기체에 의해 천연적으로 생산된 전구체의 증진된 생산을 제공하는 조작된 생성물로서 생산하도록 선택된다. 숙주 유기체는, 본원에 개시된 바와 같이, 전구체의 생산을 증가시키기 위해 조작될 수 있다. 또한, 원하는 전구체를 생산하도록 조작된 미생물 유기체는 숙주 유기체로서 사용될 수 있고, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로의 효소 또는 단백질을 발현하도록 추가로 조작될 수 있다.

[0107] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 합성하는 효소적 능력을 갖는 숙주로부터 생성된다. 이러한 구체적인 실시태양에서, 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 반응을 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산으로 유도하기 위해, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 생성물의 합성 또는 축적을 증가시키는 것이 유용할 수 있다. 증가된 합성 또는 축적은, 예를 들면, 1종 이상의 상기 기재된 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 효소를 코딩하는 핵산의 과발현에 의해 달성될 수 있다. 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 효소 또는 효소들의 과발현은, 예를 들면, 내인성 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 또는 이종 유전자 또는 유전자들의 과발현을 통해 초래될 수 있다. 따라서, 천연 유기체는 본 발명의 비-천연 미생물 유기체로 쉽게 생성되어, 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로 효소를 코딩하는 적어도 적어도 1종, 2종, 3종, 4종, 5종, 6종, 7종, 8종, 9종, 10종, 11종, 12종, 13종, 14종, 즉 모든 핵산의 과발현을 통해 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산할 수 있다. 또한, 비-천연 유기체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로에서 효소의 활성 증가를 가져오는 내인성 유전자의 돌연변이에 의해 생성될 수 있다.

[0108] 특히 유용한 실시태양에서, 코딩 핵산의 외인성 발현이 이용된다. 외인성 발현은 발현 및/또는 조절 요소를 맞춤변경가능(custom tailor)하게 하는 능력을 숙주 및 적용분야에 제공하여 사용자에 의해 조절되는 원하는 발현 수준을 달성할 수 있다. 그러나, 내인성 발현은 또한 다른 실시태양에서, 예컨대 유도가능한 프로모터 또는 다른 조절 요소에 연결될 경우 네가티브 조절 효과자의 제거 또는 유전자의 프로모터의 유도에 의해 이용될 수 있다. 이와 같이, 유도가능한 프로모터를 천연적으로 발생하는 내인성 유전자는 적절한 유도제를 제공하여 상향조절(up-regulate)될 수 있거나, 내인성 유전자의 조절 영역은 유도가능한 조절 요소를 혼입하도록 조작됨으로써 원하는 시간에 내인성 유전자의 증가된 발현의 조절을 허용할 수 있다. 유사하게, 유도가능한 프로모터는 비-천연 미생물 유기체에 도입된 외인성 유전자에 대한 조절 요소로서 포함될 수 있다.

[0109] 본 발명은 추가적으로 1종 이상의 유전자 손상, 예컨대 실시예 XXX 및 표 14 내지 16에 개시된 유전자 손상을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 여기서 유기체는 6-ACA, 아디페이트 및/또는 HMDA를 생산한다. 유전자 손상이 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA의 증가된 생산을 비-천연 유기체에 제공하도록, 손상은 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA의 생산을 유기체의 성장과 결부시키는 효소를 코딩하는 유전자에서 초래된다(유전자 손상이 효소의 활성을 감소시킬 경우). 이와 같이, 본 발명은 1종 이상의 유전자 손상을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 이러한 1종 이상의 유전자 손상은 단백질 또는 효소를 코딩하는 유전자에서 초래되며, 여기서 1종 이상의 유전자 손상은 유기체에서 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA의 증가된 생산을 제공한다. 본원에 개시된 바와 같이, 이러한 유기체는 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA의 생산을 위한 경로를, 또한 유전자 손상, 예컨대 실시예 XXX 및 표 14 내지 16에 예시된 바와 같은 손상에 더하여 포함한다.

[0110] 본 발명의 방법에서, 임의의 1종 이상의 외인성 핵산은 미생물 유기체로 도입되어 본 발명의 비-천연 미생물 유기체를 생산할 수 있는 것으로 이해된다. 핵산은, 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로를 미생물 유기체에 부여하도록 도입될 수 있다. 다르게는, 코딩 핵산은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 능력을 제공하기 위해 필요한 몇몇 반응을 촉매화하는 생합성 능력을 갖는 중간 미생물 유기체를 생산하도록 도입될 수 있다. 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체는 원하는 효소를 코딩하는 적어도 2종의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 아디페이트 생산의 경우, 적어도 2종의 외인성 핵산은 효소, 예컨대 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소 및 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 또는 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소 및 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 또는 3-하이드록시아디필-CoA 및 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소, 또는 3-하이드록시 아실-CoA 및 아디필-CoA 합성효소 등의 조합을 코딩할 수 있다. 카프로락탐 생산의 경우에, 적어도 2종의 외인성 핵산은 효소, 예컨대 CoA-의존성 알데히드

탈수소효소 및 아미노전이효소, 또는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소 및 아미도가수분해효소, 또는 아미노전이효소 및 아미도가수분해효소의 조합을 코딩할 수 있다. 6-아미노카프로산 생산의 경우, 적어도 2종의 외인성 핵산은 효소, 예컨대 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH) 알돌라아제 및 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 수화효소, 또는 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 수화효소 및 2-아미노헵탄-1,7-디오에이트(2-AHD) 데카복실라아제, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제 및 아디필-CoA 탈수소효소, 글루타밀-CoA 전이효소 및 6-아미노피멜로일-CoA 가수분해효소, 또는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제 및 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제의 조합을 코딩할 수 있다. 헥사메틸렌디아민 생산의 경우, 적어도 2종의 외인성 핵산은 효소, 예컨대 6-아미노카프로에이트 키나아제 및 [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP) 산화환원효소, 또는 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제 및 아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP) 산화환원효소, 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소 및 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소, 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제 및 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소, 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩할 수 있다. 이와 같이, 생합성 경로의 둘 이상의 효소의 임의의 조합이 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에 포함될 수 있는 것으로 이해된다.

[0111] 유사하게, 원한다면, 생합성 경로의 효소의 조합이 상응하는 원하는 생성물을 생산하는 한, 생합성 경로의 3종 이상의 효소의 임의의 조합이 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에 포함될 수 있는 것으로 이해되고, 예를 들면, 아디페이트 생산의 경우, 효소 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 및 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제; 또는 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소 및 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소; 또는 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소 및 아디필-CoA 합성효소; 또는 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제 및 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소 등의 조합이 포함된다. 6-아미노카프로산 생산의 경우, 적어도 3종의 외인성 핵산은 효소, 예컨대 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH) 알돌라아제, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 수화효소 및 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 데카복실라아제, 또는 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 수화효소, 2-아미노헵트-4-엔-1,7-디오에이트(2-AHE) 환원효소 및 2-아미노헵탄-1,7-디오에이트(2-AHD) 데카복실라아제, 또는 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소 및 아디필-CoA 탈수소효소, 또는 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소, 6-아미노피멜로일-CoA 가수분해효소 및 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제, 또는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-아민화 산화환원효소 및 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제, 또는 3-옥소아디필-CoA 티올라아제, 5-카복시-2-펜타노에이트 환원효소 및 아디페이트 환원효소의 조합을 코딩할 수 있다. 헥사메틸렌디아민 생산의 경우, 적어도 3종의 외인성 핵산은 효소, 예컨대 6-아미노카프로에이트 키나아제, [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP) 산화환원효소 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소, 또는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소, 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제 및 [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP) 산화환원효소, 또는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소, [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP) 아실전이효소 및 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소, 또는 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소, 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 알돌라아제, 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트 환원효소 및 호모라이신 데카복실라아제, 또는 6-아세트아미도헥사노에이트 환원효소, 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소의 조합을 코딩할 수 있다. 유사하게, 원한다면, 생합성 경로의 효소의 조합이 상응하는 원하는 생성물을 생산하는 한, 본원에 개시된 바와 같은 생합성 경로의 4종 이상의 효소의 임의의 조합이 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에 포함될 수 있다.

[0112] 본원에 개시된 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성에 더하여, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체 및 방법은 서로 및 당분야에 공지된 다른 미생물 유기체 및 방법과 다양한 조합으로 이용되어 다른 경로에 의한 생성물 생합성을 달성할 수 있다. 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산자의 사용 이외의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산하는 다른 대안은 아디페이트, 6-아미노카프로산 또는 카프로락탐 경로 중간체를 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산으로 전환시킬 수 있는 또 다른 미생물 유기체의 첨가를 통해서이다. 이러한 절차로는, 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 중간체를 생산하는 미생물 유기체의 발효가 포함된다. 이어서 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 중간체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 중간체를 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산으로 전환시키는 제2 미생물 유기체를 위한 기질로서 사용될 수 있다. 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 중간체는 제2 유

기체의 또 다른 배양물에 직접 첨가될 수 있거나, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 중간체 생산자의 본래의 배양물로부터, 예를 들면, 세포 분리에 의해 이들 미생물 유기체를 제거하고, 이어서 제2 유기체를 발효 브로쓰(broth)에 후속적으로 첨가함으로써 중간체 정제 단계 없이 최종 생성물을 생산할 수 있다.

[0113] 다른 실시태양에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체 및 방법은, 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성을 달성하기 위해 다양한 하위경로에서 조립될 수 있다. 이들 실시태양에서, 본 발명의 원하는 생성물을 위한 생합성 경로는 상이한 미생물 유기체들로 분리될 수 있고, 상이한 미생물 유기체들은 동시배양되어 최종 생성물을 생산할 수 있다. 이러한 생합성 반응식에서, 하나의 미생물 유기체의 생성물은 최종 생성물이 합성될 때까지 제2 미생물 유기체의 기질이다. 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성은, 하나의 경로 중간체를 또 다른 경로 중간체 또는 생성물로 전환시키기 위한 생합성 경로를 포함하는 미생물 유기체를 구축함으로써 달성될 수 있다. 다르게는, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산은 또한 동일한 용기중에 2종의 유기체를 사용하는 동시 배양 또는 동시 발효를 통해 미생물 유기체로부터 생합성적으로 생산될 수 있고, 여기서 제1 미생물 유기체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 중간체를 생산하고 제2 미생물 유기체는 중간체를 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산으로 전환시킨다.

[0114] 본원에 제공된 교시 및 지침을 참고하여, 당분야의 숙련가라면 하위경로를 갖는 다른 비-천연 미생물 유기체와의 동시 배양에 의해, 및 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산하는 당분야에 공지된 다른 화학적 및/또는 생화학 절차의 조합에 의해, 다른 미생물 유기체와 함께의 본 발명의 비-천연 미생물 유기체 및 방법을 위해 다양한 조합 및 순열이 존재함을 잘 알 것이다.

[0115] 유사하게, 당분야의 숙련가라면 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 증가시키기 위한 1종 이상의 유전자 손상의 도입을 위한 원하는 특징에 기초하여 숙주 유기체가 선택될 수 있음을 이해한다. 이와 같이, 유전적 개질이 유전자를 손상시키기 위해 숙주 유기체에 도입된다면, 임의의 유사하지만 동일하지 않은 대사 반응을 촉매화하는 상동체, 오솔로그 또는 파랄로그가 유사하게 손상되어 원하는 대사 반응이 충분히 손상되는 것을 보장하는 것으로 이해된다. 특정한 차이가 상이한 유기체 사이의 대사 조직망 사이에 존재하므로, 당분야의 숙련가라면 소정의 유기체에서 손상된 실제 유전자가 유기체들 사이에서 상이할 수 있음을 이해할 것이다. 그러나, 본원에 제공된 교시 및 지침을 참고하여, 당분야의 숙련가라면 또한 본 발명의 방법이 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성을 증가시킬 흥미로운 종의 유기체를 구축하는데 필요한 동계의(cognate) 대사 변경을 식별하기 위해 임의의 적합한 숙주 미생물에 적용될 수 있음을 이해할 것이다. 특정 실시태양에서, 증가된 생산은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성을 유기체의 성장과 결부시키고, 원할 경우 본원에 개시된 바와 같이, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 유기체의 성장과 의무적으로 결부시킬 수 있다.

[0116] 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 효소를 위한 코딩 핵산의 공급원으로는, 예를 들면, 코딩된 유전자 생성물이 언급된 반응을 촉매화할 수 있는 임의이 종이 포함된다. 이러한 종으로는 원핵 및 진핵 유기체, 제한되지 않지만, 박테리아, 예컨대 고세균 및 진정세균, 및 진핵생물, 예컨대 효모, 식물, 곤충, 동물, 및 포유동물, 예컨대 인간이 포함된다. 이러한 공급원을 위한 예시적인 종으로는, 예를 들면, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 에스케리치아 콜라이 균주 K12, 에스케리치아 콜라이 C, 에스케리치아 콜라이 W, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종, 슈도모나스 내크무시(*Pseudomonas knackmussii*), 슈도모나스 종 균주 B13, 슈도모나스 푸티다((*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*), 슈도모나스 멘도시나(*Pseudomonas mendocina*), 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rodopseudomonas palustris*), 마이코박테리엄 투베르큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholera*), 헬리코박터 필로리(*Heliobacter pylori*), 클레브시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 세라티아 프로테아마큘란스(*Serratia proteamaculans*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 종 2065, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 아에루기노사 PAO1, 랄스토니아 유트로파(*Ralstonia eutropha*), 랄스토니아 유트로파 H16, 클로스트리디엄 아세토부틸리컴(*Clostridium acetobutylicum*), 유글레나 그라실리스(*Euglena gracilis*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema Denticola*), 클로스트리디엄 클루이베리(*Clostridium kluyveri*), 호모 사피엔스(*Homo sapiens*), 래터스 노르베기커스(*Rattus norvegicus*), 아시네토박터(*Acinetobacter*) 종 ADP1, 아시네토박터 종 균주 M-1, 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*Streptomyces coelicolor*), 유박테리움 바르케리(*Eubacterium barkeri*), 펩토스트렙토코커스 아사카로라이티커스(*Peptostreptococcus asaccharolyticus*), 클로스트리디엄 보툴리넘(*Clostridium botulinum*), 클로스트리디

엄 보툴리넘 A3 균주, 클로스트리디엄 티로부티리컴(*Clostridium tyrobutyricum*), 클로스트리디엄 파스퇴리아넘(*Clostridium pasteurianum*), 클로스트리디엄 써모아세티컴(*Clostridium thermoaceticum*)(무렐라 써모아세티컴; *Moorella thermoaceticum*), 무렐라 써모아세티카(*Moorella thermoacetica*), 아시네토박터 칼코아세티커스(*Acinetobacter calcoaceticus*), 무스 무스큘러스(*Mus musculus*), 서스 스크로파(*Sus scrofa*), 플라보박테리엄(*Flavobacterium*) 종, 아르트로박터 아우레센스(*Arthrobacter aurescens*), 페니실리엄 크리소제넘, 아스퍼길러스 니거(*Aspergillus niger*), 아스퍼길러스 니듈란스(*Aspergillus nidulans*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*), 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*), 만하이미아 석시니시프로두센스(*Mannheimia succiniciproducens*), 클로스트리디엄 리정다리(*Clostridium ljungdahlii*), 클로스트리디엄 카복시디보란스(*Clostridium Carboxydivorans*), 게오바실러스 스테아로써모필러스(*Geobacillus stearothermophilus*), 아그로박테리엄 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 아크로모박터 데니트리피칸스(*Achromobacter denitrificans*), 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 아시드아미노코커스 페르멘탄스(*Acidaminococcus fermentans*), 클로스트리디엄 종 M62/1, 푸소박테리엄 누클레아텀(*Fusobacterium nucleatum*), 보스 타우러스(*Bos taurus*), 주글로에아 라미게라(*Zoogloea ramigera*), 로도박터 스파에로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*), 클로스트리디엄 베이제린키(*Clostridium beijerinckii*), 메탈로스파에라 세듈라(*Metallosphaera sedula*), 써모언에어로박터(*Thermoanaerobacter*) 종, 써모언에어로박터 브록키(*Thermoanaerobacter brockii*), 아시네토박터 바일리(*Acinetobacter baylyi*), 포르피로모나스 진기발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 설폴로버스 토코다이(*Sulfolobus tokodaii*), 설폴로버스 토코다이 7, 설폴로버스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*), 설폴로버스 솔파타리쿠스, 설폴로버스 아시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*), 살모넬라 티피뮤리엄(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 써모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*), 할로박테리엄 살리나럼(*Halobacterium salinarum*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 클로스트리디엄 디피실레(*Clostridium difficile*), 알칼리필러스 메탈리레디제네스(*Alkaliphilus Metallidigenes*), 써모언에어로박터 텡콘젠시스(*Thermoanaerobacter tengcongensis*), 사카로마이세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*), 헬리코박터 필로리, 코리네박테리엄 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*), 클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*), 슈도모나스 클로로라피스(*Pseudomonas chlororaphis*), 스트렙토마이세스 클라불리게러스(*Streptomyces clavuligerus*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 써머스 써모필러스(*Thermus thermophilus*), 펠로토마큘럼 써모프로피오니컴(*Pelotomaculum thermopropionicum*), 박테로이데스 카필로서스(*Bacteroides capillosus*), 언에어로트룬커스 콜리호미니스(*Anaerotruncus colihominis*), 나트란에어로비우스 써모필러스(*Natranaerobius thermophilius*), 아르카에오글로버스 펄지더스(*Archaeoglobus fulgidus*), 아르카에오글로버스 펄지더스 DSM 4304, 할로아르큘라 마리스모르튀(*Haloarcula marismortui*), 피로바큘럼 에어로필럼(*Pyrobaculum aerophilum*), 피로바큘럼 에어로필럼 균주 IM2, 니코티아나 타바컴(*Nicotiana tabacum*), 멘터 피페리타(*Menthe piperita*), 피너스 타에다(*Pinus taeda*), 호르데엄 불가레(*Hordeum vulgare*), 지아 메이스(*Zea mays*), 로도코커스 오파커스(*Rhodococcus opacus*), 쿠프리아비더스 네카터(*Cupriavidus necator*), 브라디리조븀 자포니컴(*Bradyrhizobium japonicum*), 브라디리조븀 자포니컴 USDA110, 아스카리스 섬(*Ascaris suum*), 부티레이트 생산 박테리아 L2-50, 바실러스 메가테리엄(*Bacillus megaterium*), 메타노코커스 마리팔루디스(*Methanococcus maripaludis*), 메타노사르시나 마제이(*Methanosarcina mazei*), 메타노사르시나 마제이, 메타노사르시나 바르케리(*Methanosarcina barkeri*), 메타노칼도코커스 자나쉬(*Methanocaldococcus jannaschii*), 카에노르햅디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*), 레쉬마니아 메이저(*Leishmania major*), 메틸로미크로븀 알칼리필럼(메틸*omicrobium alcaliphilum*) 20Z, 크로모할로박터 살렉시겐스(*Chromohalobacter salexigens*), 아르카에글루버스 펄지더스(*Archaeglubus fulgidus*), 클라미도모나스 레인하르드티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 트리코모나스 바기날리스(*trichomonas vaginalis*) G3, 트리파노소마 브루세이(Trypanosoma brucei), 마이코플라나 라모스(*Mycoplana ramose*), 마이크로코커스 루테아스(*Micrococcus luteas*), 아세토박터 파스퇴리안스(*Acetobacter pasteurians*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 메소리조븀 로티(*Mesorhizobium loti*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 리시니바실러스 스파에리커스(*Lysinibacillus sphaericus*), 캔디다 보이디니(*Candida boidinii*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) SC5314, 부르크홀데리아 암비파리아(*Burkholderia ambifaria*) AMMD, 아스카리스 수운(*Ascaris suun*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumanii*), 아시네토박터 칼코아세티커스, 부르크홀데리아 파이마텀(*Burkholderia phymatum*), 캔디다 알비칸스, 클로스트리디엄 서브터미날레(*Clostridium subterminale*), 쿠프리아비더스 타이와넨시스(*Cupriavidus taiwanensis*), 플라보박테리엄 루테센스(*Flavobacterium lutescens*), 라찬세아 클루이베리(*Lachancea kluyveri*), 락토바실러스(*Lactobacillus*) 종

30a, 렙토스피라 인테로간스(*Leptospira interrogans*), 무렐라 써모아세티카, 마익소코커스 잔터스(*Myxococcus xanthus*), 니코티아나 글루티노사(*Nicotiana glutinosa*), 노카디아 이오웬시스(*Nocardia iowensis*)(종 NRRL 5646), 슈도모나스 레이네케이(*Pseudomonas reinekei*) MT1, 랄스토니아 유트로파 JMP134, 랄스토니아 메탈리듀란스(*Ralstonia metallidurans*), 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*), 쉬조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 셀레노모나스 루미난튬(*Selenomonas ruminantium*), 스트렙토마이세스 클라불리제너스(*Streptomyces clavuligenus*), 신트로퍼스 아시디트로피커스(*Syntrophus aciditrophicus*), 비브리오 파라헤모라이티커스(*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 불니피커스(*Vibrio vulnificus*), 뿐만 아니라 본원에 개시된 다른 예시적인 종 또는 상응하는 유전자를 위한 원료 유기체로서 유용한 종(실시예 참조)이 포함된다. 그러나, 395개의 미생물 게놈 및 다양한 효모, 곰팡이, 식물, 및 포유동물 게놈을 포함하여, 이제 550 종 이상(공용 데이터베이스, 예컨대 NCBI에서 이용가능한 것들의 반 이상)에 대해 이용가능한 완전한 게놈 서열에 의해, 예를 들면, 공지된 유전자의 상동체, 오솔로그, 파랄로그 및 비오솔로그성 유전자 대체, 및 유기체 사이의 유전적 변경의 상호교환을 포함하여, 관련되거나 별개의 종에서 1종 이상의 유전자에 대한 필수적인 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 활성을 코딩하는 유전자의 확인은 통상적이고 당분야에 공지되어 있다. 따라서, 특정 유기체, 예컨대 에스케리치아 콜라이에 관하여 본원에 기재된 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성을 가능하게 하는 대사 변경은 다른 미생물, 예컨대 원핵 및 진핵 유기체 등에게 쉽게 적용될 수 있다. 본원에 개시된 교시 및 지침을 참고하여 당분야의 숙련가라면 하나의 유기체에서 예시된 대사 변경이 다른 유기체에 동일하게 적용될 수 있음음을 이해할 것이다.

[0117] 몇몇 경우에, 예컨대 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로가 관련되지 않은 종에 존재할 경우, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성은, 예를 들면 언급된 반응을 대체하기 위해 유사하지만 동일하지 않은 대사 반응을 촉매화하는 관련되지 않은 종으로부터의 파랄로그 또는 파랄로그들의 외인성 발현에 의해 숙주 종으로 제공될 수 있다. 대사 조직망 사이의 특정한 차이가 상이한 유기체 사이에 존재하므로, 당분야의 숙련가라면 상이한 유기체 사이의 실제 유전자 용법이 상이할 수 있음을 이해할 것이다. 그러나, 본원에 개시된 교시 및 지침을 참고하여 당분야의 숙련가라면 또한 본 발명의 교시 및 방법이 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 합성할 흥미로운 종에서 미생물 유기체를 구축하기 위해 본원에 예시된 것들에 동계의 대사 변경을 사용하여 모든 미생물 유기체에 적용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0118] 숙주 미생물 유기체는, 예를 들면, 박테리아, 효모, 곰팡이 또는 발효 공정에 적용가능한 임의의 다양한 다른 미생물로부터 선택될 수 있고, 비-천연 미생물 유기체는 이들로부터 생성될 수 있다. 예시적인 박테리아는 에스케리치아 콜라이, 클레브시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 언에어로비오스피릴럼 석시니시프로두센스(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 악티노바실러스 석시노게네스(*Actinobacillus succinogenes*), 만하이미아 석시니시프로두센스, 리조비엄 에틀리(*Rhizobium etli*), 바실러스 서브틸리스, 코리네박테리엄 글루타미컴, 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*), 자이모모나스 모빌리스, 락토코커스 락티스, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 스트렙토마이세스 코엘리컬러, 클로스트리디엄 아세토부틸리컴, 슈도모나스 플루오레센스, 및 슈도모나스 푸티다로부터 선택된 종을 포함한다. 예시적인 효모 또는 곰팡이는 사카로마이세스 세레비지아, 쉬조사카로마이세스 폼베, 클루이베로마이세스 락티스, 클루이베로마이세스 마르시아너스(*Kluyveromyces marxianus*), 아스퍼길러스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 아스퍼길러스 니거, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 리조퍼스 아르히주스(*Rhizopus arrhizus*), 리조퍼스 오리자에(*Rhizopus oryzae*) 등으로부터 선택되는 종을 포함한다. 예를 들면, 에스케리치아 콜라이는, 유전적 조작에 적합한 잘 특징규명된 미생물 유기체이므로, 특히 유용한 숙주 유기체이다. 다른 특히 유용한 숙주 유기체로는 효모, 예컨대 사카로마이세스 세레비지아가 포함된다. 임의의 적합한 미생물 숙주 유기체는 원하는 생성물을 생산하도록 대사적 및/또는 유전적 개질을 도입하기 위해 사용될 수 있다.

[0119] 비-천연 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산-생산 숙주를 구축하는 방법 및 이의 발현 수준을 시험하는 방법은, 예를 들면, 당분야에 공지된 재조합 및 검출 방법에 의해 수행될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들면, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York(2001)]; 및 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD(1999)]에서 찾아볼 수 있다.

[0120] 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 위한 경로에 관여된 외인성 핵산 서열은 당분야에 공지된 기법, 예컨대 제한되지 않지만 컨쥬게이션, 전기천공, 화학적 형질전환, 형질도입, 형질감염, 및 초음파 형질전환을 사용하여 숙주 세포 내로 안정적으로 또는 일시적으로 도입될 수 있다. 에스케리

치아 콜라이 또는 다른 원핵 세포에서 외인성 발현의 경우, 진핵생물 핵산의 cDNA 또는 유전자에서의 일부 핵산 서열은 표적화 신호, 예컨대 N-말단 미토콘드리아 또는 다른 표적화 신호를 코딩할 수 있고, 이는 원할 경우 원핵 숙주 세포내로 형질전환되기 전에 제거될 수 있다. 예를 들면, 미토콘드리아 리더 서열의 제거는 에스케리치아 콜라이에서 증가된 발현을 유도할 수 있다(Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338(2005)). 효모 또는 다른 진핵 세포에서의 외인성 발현의 경우, 유전자는 리더 서열의 첨가 없이 사이토졸에서 발현될 수 있거나, 미토콘드리아 또는 다른 세포소기관으로 표적화되거나, 표적화 서열, 예컨대 숙주 세포에 적합한 미토콘드리아 표적화 또는 분비 신호의 첨가에 의해 분비에 대해 표적화될 수 있다. 이와 같이, 표적화 서열을 제거하거나 포함하기 위한 핵산 서열에 대한 적절한 개질은 외인성 핵산 서열내로 혼입되어 원하는 특성을 부여할 수 있는 것으로 이해된다. 게다가, 유전자는 단백질의 최적화된 발현을 달성하기 위한 당분야에 공지된 기법에 의해 코돈 최적화될 수 있다.

[0121] 발현 벡터 또는 벡터들은 숙주 유기체에서 작용성인 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된 본원에 예시된 바와 같은 1종 이상의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로 코딩 핵산을 포함하도록 구축될 수 있다. 본 발명의 미생물 숙주 유기체에 사용하기에 적용가능한 발현 벡터로는, 예를 들면, 플라스미드, 파아지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜(episome) 및 인공 염색체, 예컨대 숙주 염색체로의 안정한 통합을 위해 작동가능한 벡터 및 선택 서열 또는 마커가 포함된다. 추가적으로, 발현 벡터는 1종 이상의 선택가능한 마커 유전자 및 적절한 발현 조절 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 항생제 또는 독소에 대한 내성을 제공하거나, 영양요구성 결핍을 보충하거나, 배양 매질에 없는 중요 영양분을 공급하는 선택가능한 마커 유전자가 또한 포함될 수 있다. 발현 조절 서열은 당분야에 공지된 구성적 및 유도성 프로모터, 전사 증폭자(transcription enhancer), 전사 종결자(transcription terminator) 등을 포함할 수 있다. 둘 이상의 외인성 코딩 핵산이 공동 발현되는 경우, 두 핵산 모두, 예를 들면, 단일 발현 벡터내로 또는 별도의 발현 벡터에 삽입될 수 있다. 단일 벡터 발현의 경우, 코딩 핵산은 하나의 공통 발현 조절 서열에 또는 상이한 발현 조절 서열, 예컨대 하나의 유도성 프로모터 및 하나의 구성적 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 대사 또는 합성 경로에 관여된 외인성 핵산 서열의 형질전환은 당분야에 공지된 방법에 의해 확인될 수 있다. 이러한 방법으로는, 예를 들면, 핵산 분석, 예컨대 노던 블롯(Northern blot) 또는 mRNA의 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR) 증폭, 또는 유전자 생성물의 발현을 위한 면역블로팅(immunoblotting), 또는 도입된 핵산 서열 또는 그의 상응하는 유전자 생성물의 발현을 시험하기 위한 다른 적합한 분석 방법이 포함된다. 당분야의 숙련가라면 외인성 핵산이 원하는 생성물을 생산하기에 충분한 양으로 발현됨을 알 것이고, 발현 수준이 당분야에 공지되고 본원에 개시된 바와 같은 방법을 사용하여 충분한 발현을 수득하기 위해 최적화될 수 있음을 추가로 알 것이다.

[0122] 방향 진화는 효소의 특성을 개선 및/또는 변경시키기 위해 특정 유전자에 표적화된 돌연변이의 도입을 포함하는 하나의 접근방법이다. 개선되고/되거나 변경된 효소는 유용한 변이체의 식별을 허용하는 실행 스크리닝 검정을 통해 식별될 수 있다. 특히 유용한 스크리닝 방법은 많은 효소 변이체(예를 들어, $>10^4$)의 자동화된 스크리닝을 허용하는 민감한 고처리량 검정을 포함한다. 돌연변이생성 및 스크리닝의 반복적 순환이 전형적으로 수행되어 최적화된 특성을 갖는 효소를 식별한다. 스크리닝된 변이체의 수가 많을수록, 이상적으로 적합한 변이체를 식별할 가능성이 높아진다. 돌연변이생성을 위한 유전자의 영역을 식별하는 것을 도울 수 있는 컴퓨터 알고리즘이 개발되었고, 이는 생성되고 스크리닝될 필요가 있는 효소 변이체의 수를 크게 감소시킬 수 있다.

[0123] 다양한 변이체 라이브러리를 생성하는데 효과적인 다수의 방향 진화 기술이 개발되었고(고찰을 위해, 문헌[Hibbert et al., Biomol.Eng 22:11-19(2005)]; [Huisman and Lalonde, In Biocatalysis in the pharmaceutical Computational and biotechnology industries pgs. 717-742(2007), Patel(ed.), CRC Press]; [Otten and Quax. Biomol.Eng 22:1-9(2005)]; 및 문헌[Sen et al., Appl Biochem.Biotechnol 143:212-223(2007)] 참고), 이들 방법은 많은 효소 부류에 걸친 광범위한 특성의 개선에 성공적으로 적용되었다.

[0124] 방향 진화 기술에 의해 개선되고/되거나 변경된 효소 특징으로는, 예를 들면, 비천연 기질의 전환을 위한 선택성/특이성; 고온 가공을 위한 온도 안정성; 더 낮거나 높은 pH 조건하에서의 생물가공을 위한 pH 안정성; 높은 생성물 역가가 달성되기 위한 기질 또는 생성물 내인성; 비천연 기질을 포함하는 기질 결합을 확장시키는 결합도(K_m); 생성물, 기질, 또는 핵심 중간체에 의한 저해를 제거하기 위한 저해도(K_i); 원하는 플럭스(flux)를 달성하기 위해 효소 반응 속도를 증가시키는 활성(kcat); 단백질 수율 및 전체 경로 플럭스를 증가시키는 발현 수준; 호기성 조건하의 공기 감수성 효소의 작동을 위한 산소 안정성; 및 산소의 부재하의 호기성 효소의 작동을 위한 혐기성 활성이 포함된다.

[0125] 하기 예시적인 방법은 특정 효소의 원하는 특성을 표적화하기 위한 유전자의 돌연변이생성 및 다양화를 위해 개

발되었다. 이들중 임의의 방법은 데카복실라아제 효소의 활성을 변경/최적화하기 위해 사용될 수 있다.

[0126] EpPCR(Pritchard et al., J Theor.Biol 234:497-509(2005))은 Mn^{2+} 이온의 첨가, dNTP 농도의 바이어스화(biasing), 또는 다른 조건의 변화에 의해 PCR 반응에서 DNA 폴리머라아제의 충실도(fidelity)를 감소시킴으로써 무작위 점 돌연변이를 도입한다. 흥미로운 표적 유전자에 돌연변이생성을 국한시키기 위한 5개 단계의 클로닝 공정은 다음을 포함한다: 1) 흥미로운 유전자의 오류 발생이 쉬운(error-prone) PCR 증폭; 2) 제한 효소 분해; 3) 원하는 DNA 단편의 겔 정제; 4) 벡터내로의 결찰; 5) 유전자 변이체의 적합한 숙주내로의 형질전환 및 개선된 성능을 위한 라이브러리의 스크리닝. 이러한 방법은 단일 유전자에서 동시에 다수의 돌연변이를 생성할 수 있고, 이는 유용할 수 있다. 다수의 돌연변이체는 EpPCR에 의해 생성되어, 고처리량의 스크리닝 검정 또는 선택 방법(특히 로봇공학을 사용함)은 원하는 특징을 갖는 돌연변이체를 식별하는데 유용하다.

[0127] 오류 발생이 쉬운 롤링 서클 증폭(epRCA: error-prone Rolling Circle Amplification)(문헌[Fujii et al., Nucleic acids Res 32:e145(2004)]; 및 [Fujii et al., Nat.Protoc. 1:2493-2497(2006)])은 전체 환형 플라스미드가 주형으로 사용되고 엑소뉴클레아제 저항성 티오포스페이트 결합을 마지막 2개의 뉴클레오티드 상에 갖는 무작위 6량체가 사용되어 플라스미드를 증폭시킨 후 세포로 형질전환(여기서 플라스미드는 텐덤(tandem) 반복부로 재순환됨)된다는 점을 제외하고 epPCR과 동일한 많은 요소들을 갖는다. Mn^{2+} 농도의 조정은 어느 정도 돌연변이 속도를 변화시킬 수 있다. 이러한 기법은 오류 발생이 쉬운, 단일-단계 방법을 사용하여 3-4 돌연변이/kbp를 갖는 플라스미드의 전체 복사물을 생성한다. 제한 효소 분해 또는 특정 프라이머는 필요하지 않다. 추가적으로, 이러한 방법은 전형적으로 키트로서 이용가능하다.

[0128] DNA 또는 패밀리 셔플링(Family Shuffling)(문헌[Stemmer, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 91: 10747-10751(1994)]; 및 [Stemmer, Nature 370:389-391(1994)])은 전형적으로 뉴클레아제, 예컨대 디나아제(Dnase) I 또는 EndoV에 의한 둘 이상의 변형 유전자의 분해를 포함함으로써 DNA 폴리머라아제의 존재하에 어닐링 및 연장의 사이클에 의해 재조립된 무작위 단편의 푸울을 생성하여 키메라성(chimeric) 유전자의 라이브러리를 생성한다. 단편들은 서로를 프라이밍(priming)하고 재조합은 하나의 복사물이 또 다른 복사물을 프라이밍할 경우(주형 스위치) 일어난다. 이러한 방법은 >1kbp DNA 서열에 의해 사용될 수 있다. 단편 재조립에 의해 생성된 돌연변이성 재조합체에 더하여, 이러한 방법은 연장 단계에서 오류 발생이 쉬운 PCR과 유사한 속도로 점 돌연변이를 도입한다. 이 방법은 항원성을 부여할지도 모르는 유해한 무작위적 중성 돌연변이를 제거하기 위해 사용될 수 있다.

[0129] 시차 연장(StEP: Staggered Extension)(Zhao et al., Nat.Biotechnol 16:258-261(1998))은 주형 프라이밍 이후, 변성 및 매우 짧은 기간의 어닐링/연장(5초 만큼 짧게)에 의한 2 단계 PCR의 반복된 사이클이 수반된다. 성장중인 단편은 상이한 주형으로 어닐링되고 추가로 연장되고, 이는 전장 서열이 만들어질 때까지 반복된다. 주형 스위칭은 대부분의 생성된 단편이 다수의 부모(parent)를 가짐을 의미한다. 낮은-충실도의 폴리머라아제의 조합(Taq 및 뮤타자임(Mutazyme))은 반대 돌연변이 스펙트럼으로 인하여 오류 발생이 쉬운 바이어스를 감소시킨다.

[0130] 무작위 프라이밍 재조합(RPR: Random Priming Recombination)에서 무작위 서열 프라이머가 사용되어 주형의 상이한 부분에 상보성인 많은 짧은 DNA 단편을 생성한다(Shao et al., Nucleic acids Res 26:681-683(1998)). epPCR을 통한 염기의 잘못된 혼입 및 잘못된 프라이밍은 점 돌연변이를 제공한다. 짧은 DNA 단편은 상동성에 기초하여 서로 프라이밍하고, 재조합되고, 반복된 열순환(thermocycling)에 의해 전장으로 재조립된다. 상기 단계 이전에 주형의 제거는 낮은 부모 재조합체를 확보한다. 대부분의 다른 방법과 마찬가지로 이러한 방법은 다수 회 반복 수행되어 개별적 특성들을 진화시킨다. 이러한 기술은 서열 바이어스를 방지하고, 유전자 길이와 무관하며, 적용을 위해 부모 DNA를 거의 필요로하지 않는다.

[0131] 헤테로듀플렉스 재조합(Heteroduplex Recombination)에서, 선형화된 플라스미드 DNA가 사용되어 부정합 수선에 의해 수선되는 헤테로듀플렉스를 형성한다(문헌[Volkov et al, Nucleic acids Res 27:e18(1999)]; 및 문헌[Volkov et al., Methods Enzymol. 328:456-463(2000)]). 부정합 수선 단계는 적어도 어느정도 돌연변이유발성이다. 헤테로듀플렉스는 선형 호모듀플렉스에 비해 더 효율적으로 형질전환된다. 이러한 방법은 큰 유전자 및 전체 오페론에 적합하다.

[0132] 일시적 주형 상에서의 무작위 키메라생성(RACHITT: Random Chimeragenesis on Transient Templates)(Coco et al., Nat.Biotechnol 19:354-359(2001))은 디나아제 I 단편화 및 ssDNA의 크기 단편화를 이용한다. 상동성 단편은 폴리머라아제의 부재하에 상보성 ssDNA 스캐폴드(scaffold)로 하이브리드화된다. 임의의 중첩 비하이브리

드화(unhybridized) 단편 말단은 엑소뉴클레아제에 의해 트리밍된다. 단편 사이의 갭은 충전된 후 결찰되어 스캐폴드(이는 증폭을 배제하기 위해 U를 포함함)에 하이브리드화된 전장의 다양한 스트랜드의 푸울을 제공한다. 이어서 스캐폴드는 파괴되고, PCR 증폭에 의해 다양한 스트랜드에 상보성인 새로운 스트랜드에 의해 대체된다. 이 방법은 단지 하나의 부모로부터의 하나의 스트랜드(스캐폴드)를 포함하지만 프라이밍 단편은 다른 유전자로부터 유도되고; 부모 스캐폴드는 이에 반하여 선택된다. 이와 같이, 부모 단편에 의한 재어닐링은 초래되지 않는다. 중첩 단편은 엑소뉴클레아제에 의해 트리밍된다. 다르게는, 이는 개념적으로 DNA 셔플링 및 StEP와 유사하다. 따라서, 형제가 없고 불활성화체가 거의 없으며 셔플링되지 않은 부모가 없어야 한다. 이러한 기법은 부모 유전자가 거의 또는 전혀 생성되지 않고 표준 DNA 셔플링에 비해 더 많은 크로스오버(crossover)가 생성될 수 있다는 이점을 갖는다.

[0133] 절단된 주형상의 재조합된 연장(RETT: Recombined Extension on Truncated template)은 주형의 푸울로서 사용된 단일방향성 ssDNA 단편의 존재하에 프라이머로부터 단일방향으로 성장하는 스트랜드의 주형 스위칭을 수반한다(Lee et al., J. Molec. Catalysis 26: 119-129(2003)). DNA 엔도뉴클레아제는 사용되지 않는다. 단일방향성 ssDNA는 무작위 프라이머를 갖는 DNA 폴리머라아제에 의해 또는 엑소뉴클레아제에 의한 일련의 결실에 의해 제조될 수 있다. 단일방향성 ssDNA는 단지 주형이지 프라이머가 아니다. 무작위 프라이밍 및 엑소뉴클레아제는 DNA 셔플링/RACHITT의 효소적 분할로 인해 서열 바이어스를 도입하지 않는다. RETT는, 매우 짧은 연장 대신 정상적인 PCR 조건을 사용하므로 StEP에 비해 최적화하기 더 쉬울 수 있다. 재조합은 PCR 단계의 구성원으로서 초래되고-직접 셔플링되지 않는다. 이러한 방법은 정지 기간이 없으므로 StEP에 비해 더 무작위적일 수 있다.

[0134] 변성 올리고뉴클레오티드 유전자 셔플링(DOGS: Degenerate Oligonucleotide Genes Shuffling)에서는, 변성 프라이머가 사용되어 분자간의 재조합을 조절하고(문헌[Bergquist and Gibbs, Methods Mol. Biol 352: 191-204(2007)]; [Bergquist et al., Biomol.Eng 22:63-72(2005)]; 및 [Gibbs et al., Genes 271:13-20(2001)]), 이는 부모 유전자를 재생하는 다른 방법, 예컨대 DNA 셔플링의 경향을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법은 선택된 유전자 부분의 무작위 돌연변이생성(epPCR)과 조합될 수 있다. 이는 부모 서열의 수정(reformation)을 차단하기 위한 우수한 방법일 수 있다. 엔도뉴클레아제는 첨가되지 않는다. 만들어진 부분의 투입 농도를 조정함으로써, 원하는 주쇄로 바이어스될 수 있다. 이러한 방법은 제한 효소 분해없이 관련되지 않은 부모로부터의 DNA 셔플링을 허용하고, 무작위 돌연변이생성 방법의 선택을 허용한다.

[0135] 하이브리드 효소의 생성을 위한 증분 절단(ITCHY: Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzyme)은 흥미로운 유전자 또는 유전자 단편의 1개 염기쌍 결실을 갖는 조합적 라이브러리를 생성한다(문헌[Ostermeier et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 96:3562-3567(1999)]; 및 [Ostermeier et al., Nat.Biotechnol 17: 1205-1209(1999)]). 절단은 2개의 상이한 유전자의 조각 상에 반대 방향으로 도입된다. 이들은 함께 결찰되고, 융합체가 클로닝된다. 이러한 기법은 2개의 부모 유전자 사이에 상동성을 요구하지 않는다. ITCHY가 DNA 셔플링과 조합되면, 이 시스템은 SCRATCHY로 지칭된다(하기 참조). 이들의 주요 이점은 부모 유전자 사이에 상동성이 필요없다는 것이고; 예를 들면, 에스케리치아 콜라이 및 인간 유전자 사이의 기능적 융합이 ITCHY를 통해 생성된다. ITCHY 라이브러리가 제조될 경우, 모든 가능한 크로스오버가 포획된다.

[0136] 하이브리드 효소의 생성을 위한 티오-증분 절단(THIO-ITCHY: Thio-Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzyme)은, 포스포티오에이트 dNTP가 절단부를 생성하기 위해 사용됨을 제외하고는 ITCHY와 유사하다(Lutz et al., Nucleic acids Res 29:E16(2001)). ITCHY에 비해, THIO-ITCHY는 최적화하기 더 쉽고, 더 높은 재현성 및 조절성을 제공한다.

[0137] SCRATCHY는 2가지의 유전자 재조합 방법, 즉 ITCHY 및 DNA 셔플링을 조합한다(Lutz et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 98:11248-11253(2001)). SCRATCHY는 ITCHY 및 DNA 셔플링의 가장 좋은 특징들을 조합한다. 우선, ITCHY는 DNA 상동성-비의존성 방식으로 유전자의 단편들 사이의 융합의 포괄적 세트를 생성하기 위해 사용된다. 이러한 인공 계열은 이어서 DNA-셔플링 단계를 거쳐 크로스오버의 수를 증대시킨다. 컴퓨터에 의한 예측이 최적화에 사용될 수 있다. SCRATCHY는 서열 동일성이 80% 미만인 경우 DNA 셔플링에 비해 더 효과적이다.

[0138] 무작위 드리프트 돌연변이생성(RNDM: Random Drift Mutagenesis)에서, 돌연변이는 epPCR을 경유하여 이루어지고, 이후 유용한 활성을 보유하는 것에 대해 스크리닝/선택된다(Bergquist et al., Biomol.Eng 22:63-72(2005)). 이어서, 이들은 DOGS에서 사용되어 다수의 활성 돌연변이체들 사이 또는 돌연변이체와 다른 바람직한 부모 사이에 융합부를 갖는 재조합체를 생성한다. 중성 돌연변이의 단리를 촉진시키도록 고안되고; 이의 목적은 이러한 활성이 본래 유전자 경우에 비해 더 높은지 낮은지의 여부를 보유된 촉매 활성에 대해 스크리닝하기 위한 것이다. RNDM은 스크리닝이 배경에 비해 높은 활성을 검출할 수 있는 경우 고처리량 검정에서 이용가

능하다. RNDM은 다양성을 생산하는데 있어서 DOGS에 전방 말단으로 사용된다. 이 기법은 셔플링 또는 다른 후속 단계 이전에 활성에 대한 요건을 부과하고; 중성 드리프트(drift) 라이브러리는 더 작은 라이브러리로부터 활성에 있어서 더 높고/더 신속한 개선을 초래하는 것으로 나타난다. 공개된 epPCR의 사용을 통해, 이는 다른 대규모 돌연변이생성 방법에 적용될수 있다.

[0139] 서열 포화 돌연변이생성(SeSaM: Sequence Saturation Mutagenesis)은 1) 포스포티오에이트 뉴클레오티드의 무작위 혼입 및 분할을 사용하여 무작위 길이 단편의 푸울을 생성하는 무작위 돌연변이생성 방법으로; 이러한 푸울은 2) "보편적" 염기, 예컨대 이노신(inosine)의 존재하에 연장되는 주형으로 사용되며; 3) 이노신-포함 상보체의 복제는 무작위 염기 혼입, 및 결과적으로 돌연변이생성을 일으킨다(문헌[Wong et al., Biotechnol J 3:74-82(2008)]; [Wong et al., Nucleic acids Res 32:e26(2004)]; 및 [Wong et al., Anal.Biochem. 341:187-189(2005)]). 이러한 기법을 사용하여, 돌연변이체의 큰 라이브러리를 2 내지 3일 이내에 간단한 방법을 사용하여 생성할 수 있다. 이러한 기법은 DNA 폴리머라아제의 돌연변이성 바이어스에 비해 비방향성이다. 이러한 접근방법에서의 차이는 이러한 기법을 epPCR에 상보적(또는 대안적)으로 만든다.

[0140] 합성 셔플링에서, 중첩 올리고뉴클레오티드는 "표적중의 모든 유전적 다양성"을 코딩하고 셔플링된 자손의 높은 다양성을 허용하도록 고안된다(Ness et al., Nat.Biotechnol 20: 1251-1255(2002)). 이러한 기법에서, 셔플링될 단편을 고안할 수 있다. 이는 자손의 생성된 다양성을 증가시키는데 도움을 준다. 덜 관련된 서열이 더 관련된 서열에서 관찰되는 비율에 근접한 비율로 재조합되도록 만드는 서열/코돈 바이어스를 고안할 수 있다. 추가적으로, 이 기법은 주형 유전자를 물리적으로 소유할 필요가 없다.

[0141] 뉴클레오티드 교환 및 삭제 기술(NexT: Nucleotide Exchange and Excision Technology)은 dUTP 혼입의 조합을 조사한 후 우라실 DNA 글리코실라아제(glycosylase) 및 이어서 피페리딘으로 처리하여 종점 DNA 단편화를 수행한다(Muller et al., Nucleic acids Res 33:e117(2005)). 유전자는 교정 폴리머라아제에 의한 내부 PCR 프라이머 연장을 사용하여 재조립된다. 셔플링의 크기는 dUPT::dTTP 비율을 다르게함으로써 직접 조절될 수 있다. 이는 우라실 혼입 및 분할을 위한 간다한 방법을 사용하는 종점 반응이다. 다른 뉴클레오티드 유사체, 예컨대 8-옥소-구아닌이 이러한 방법과 함께 사용될 수 있다. 추가적으로, 이러한 기법은 매우 짧은 단편(86 bp)에 잘 작동하고 오차율이 낮다. 이러한 기법에 사용된 DNA의 화학적 분할은 셔플링되지 않은 클론을 극소수로 생성한다.

[0142] 서열 상동성-비의존성 단백질 재조합(SHIPREC: Sequence Homology-Independent Protein Recombination)에서, 연결기는 2가지 멀리 떨어진/비연관된 유전자 사이의 융합을 촉진하기 위해 사용된다. 뉴클레아제 처리가 사용되어 두 유전자 사이의 키메라의 범위를 생성한다. 이러한 융합은 단일-크로스오버 하이브리드의 라이브러리를 생산한다(Sieber et al., Nat.Biotechnol 19:456-460(2001)). 이는 제한된 유형의 셔플링을 생산하고 분리 공정은 돌연변이생성을 위해 필요하다. 또한, 상동성이 필요하지 않으므로, 이러한 기법은 2가지 관련없는 부모 유전자 각각의 비율을 달리하여 키메라의 라이브러리를 생성할 수 있다. SHIPREC은 포유동물 CP450의 N-말단 영역에 융합된 박테리아 CP450의 헴(heme)-결합 도메인으로 시험되었고; 이는 더욱 가용성인 효소에서 포유동물 활성을 생산하였다.

[0143] 유전자 부위 포화 돌연변이생성(등록상표)(GSSM: Gene Site Saturation Mutagenesis)에서, 출발 물질은 돌연변이의 원하는 부위에서 변성된 2개의 프라이머 및 삽입부를 포함하는 슈퍼코일링된(supercoiled) dsDNA 플라스미드이다(Kretz et al., Methods Enzymol. 388:3-11(2004)). 흥미로운 돌연변이를 갖는 프라이머는 DNA의 반대 스트랜드 상에서 동일한 서열에 어닐링된다. 돌연변이는 전형적으로 프라이머의 중간에 있고, 보정 서열의 약 20개 뉴클레오티드에 의해 각각의 측면상에 플랭킹된다(flanked). 프라이머중의 서열은 NNN 또는 NNK(코딩) 및 MNN(비코딩)이다(N = 모두 4, K = G, T, M = A, C). 연장 후, DpnI가 사용되어 dam-메틸화 DNA를 분해시켜 야생형 주형을 제거한다. 이러한 기법은 소정의 자리(즉, 하나의 코돈)에서의 모든 가능한 아미노산 치환을 조사한다. 이러한 기법은 넌센스(nonsense) 코돈이 없는 단일-부위에서 모든 가능한 대체를 생성함을 촉진하고, 가장 가능한 대립유전자를 동일 내지 거의 동일하게 나타낸다. 이러한 기법은 표적 효소의 구조, 기작 또는 도메인에 대한 사전 지식을 필요로 하지 않는다. 셔플링 또는 유전자 재조립이 수반된다면, 이러한 기법은 단일 부위 상향-돌연변이의 모든 가능한 조합을 포함하는 재조합체의 다양한 라이브러리를 생성한다. 이러한 기술 조합의 유용성은 50개 이상의 상이한 효소에 대한 성공적인 진화에 대해서, 및 소정의 효소에서 1종 이상의 특성에 대해서 입증되었다.

[0144] 조합 카세트 돌연변이생성(CCM: Combinatorial Cassette Mutagenesis)은 다수의 가능한 아미노산 서열 변경을 갖는 제한된 영역을 대체하기 위해 짧은 올리고뉴클레오티드 카세트를 사용함을 포함한다(문헌[Reidhaar-Olson

et al. Methods Enzymol. 208:564-586(1991)]; 및 [Reidhaar-Olson et al. Science 241:53-57(1988)]). 2개 또는 3개 부위에서의 동시적 치환이 상기 기법에 의해 가능하다. 추가적으로, 이 방법은 제한된 범위의 부위에서 다양한 가능한 서열 변화를 시험한다. 이러한 기법은 람다 리프레서(lambda repressor) DNA-결합 도메인의 정보를 조사하기 위해 사용된다.

[0145] 조합 다중 카세트 돌연변이생성(CMCM: Combinatorial Multiple Cassette Mutagenesis)은 이것이 보다 큰 프로그램의 부분으로서 이용된다는 점을 제외하고 본질적으로 CCM과 유사하다: 1) 높은 돌연변이율에서의 epPCR의 사용하여, 2) 고온 지점 및 고온 영역을 식별하고, 이어서 3) CMCM에 의해 연장하여 단백질 서열 공간의 한정된 영역을 커버한다(Reetz, M. T., S. Wilensek, D. Zha, 및 K. E. Jaeger, 2001, Directed Evolution of Enantioselective Enzymes through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis. Angew.Chem.Int.Ed Engl. 40:3589-3591). CCM과 함께, 이러한 방법은 표적 영역에 대하여 실질적으로 모든 가능한 변경을 시험할 수 있다. 무작위 돌연변이 및 셔플링된 유전자를 생성하는 방법과 함께 사용된다면, 이는 다양한 셔플링된 단백질을 생성하는 탁월한 수단을 제공한다. 이러한 시도는 효소의 거울상선택성을 51배 증가시키는데 성공하였다.

[0146] 돌연변이 균주 기법(Mutator Strains technique)에서, 조건적 *ts* 돌연변이 유발 유전자 플라스미드는 선택 동안 무작위 및 천연 돌연변이 빈도를 20 내지 4000배 증가시킬 수 있고, 선택이 필요하지 않는 경우 해로운 돌연변이의 축적을 차단한다(Selifonova et al., Appl Environ Microbiol 67:3645-3649(2001)). 이 기술은 플라스미드-유도된 *mutD5* 유전자에 기초하고, 이는 DNA 폴리머라아제 III의 돌연변이체 서브유닛을 코딩한다. 이러한 서브유닛은 내인성 DNA 폴리머라아제 III에 결합하고, 플라스미드를 갖는 임의의 균주에서 폴리머라아제 III의 교정 능력을 절충한다. 광범위 염기 치환 및 골격전이(frameshift) 돌연변이가 일어난다. 효과적인 사용을 위해, 돌연변이 유발 유전자 플라스미드는 원하는 표현형이 달성될 때까지 제거되어야 하고; 이는 복제의 온도 감수성 기원을 통해 달성되는데, 이는 41℃에서 플라스미드 경화를 허용한다. 돌연변이 유발 유전자 균주가 일정 시간 동안 조사되었음을 주지해야 한다(예를 들어, 문헌[Low et al., J. Mol. Biol. 260:359-3680(1996)] 참조). 이러한 기법에서, 매우 높은 자발적인 돌연변이 속도가 관찰된다. 조건적 특성은 원치않는 배경 돌연변이를 최소화한다. 이러한 기술은 적응 진화와 조합되어 돌연변이생성 속도를 증진시키고 보다 신속히 원하는 표현형을 달성한다.

[0147] "룩-쓰루 돌연변이생성(LTM: Look-Through Mutagenesis)"은 선택된 아미노산의 조합적 돌연변이를 평가하고 최적화하는 다차원의 돌연변이생성 방법이다(Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 102:8466-8471(2005)). 모든 가능한 아미노산으로 각각의 부위를 포화시키기 보다는, 9개로 구성된 하나의 세트를 선택하여 아미노산 R-기 화학물질 범위를 커버한다. 부위 당 소수의 변화는 다수의 부위가 이러한 유형의 돌연변이생성을 겪을 수 있도록 한다. 낮은 나노몰에서 피코몰까지 항체에 대한 결합 친화도의 >800 배의 증가가 이러한 방법을 통해 달성되었다. 이러한 방법은 무작위 조합의 수를 최소화시키는 이성적인 접근방법이고, 스크리닝되는 클론의 수를 크게 감소시킴으로써 개선된 특징을 찾는 능력을 증가시킬 수 있다. 이는 항체 조작에 적용되어, 구체적으로 결합 친화도를 증가시키고/시키거나 해리를 감소시킨다. 이 기법은 스크리닝 또는 선택과 조합될 수 있다.

[0148] 유전자 재조립(Gene Reassembly)은 한번에 다중 유전자에 적용되거나 단일 유전자의 키메라(다중 돌연변이)의 큰 라이브러리를 생성하는데 적용될 수 있는 DNA 셔플링 방법이다[튜너블 진리젬블리(TGR: Tunable GeneReassembly: 등록상표)TGR(등록상표), 베레니엄 코포레이션(Verenium Corporation)에 의해 공급된 기술]. 전형적으로 이러한 기법은 초-고처리량 스크리닝과 함께 사용되어 원하는 개선을 위해 제시된 서열 공간을 제기한다. 이 기법은 다중 유전자 재조합이 상동성과 무관하도록 허용한다. 크로스오버의 정확한 수 및 위치는 생물정보 분석을 통해 고안된 단편을 사용하여 예정될 수 있다. 이러한 기술은 실제로 부모 유전자 수정 없이 낮은 수준의 비활성 유전자를 가지면서 매우 높은 수준의 다양성을 유도한다. GSSM(등록상표)과 조합되어, 큰 범위의 돌연변이가 개선된 활성을 위해 시험될 수 있다. 이 방법은 DNA 셔플링의 "블렌딩" 및 "미세 튜닝(fine tuning)"을 허용하고, 예를 들면 코돈 용법이 최적화될 수 있다.

[0149] 인실리코(in silico) 단백질 고안 자동화(PDA: Protein Design Automation)는 특정한 절첩부를 갖는 구조적으로 한정된 단백질 주쇄를 고정시키고 절첩부 및 전체 단백질 에너지를 안정화시킬 수 있는 아미노산 치환을 위한 서열 공간을 조사하는 최적화 알고리즘이다(Hayes et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 99:15926-15931(2002)). 이러한 기술은 단백질 아미노산 변형에 대한 구조적 내인성을 조사하기 위해 인실리코 구조에 기초한 엔트로피 예측을 사용한다. 각각의 위치에서의 커플링 상호작용을 계산하도록 통계 기법이 적용된다. 아미노산 치환에 대한 구조적 내인성은 커플링의 측정값이다. 궁극적으로, 이러한 기술은 단백질 특성의 원하는 개질을 수득하면서도 구조적 특징의 완전성을 유지시키도록 고안된다. 이 방법은 컴퓨터로 평가하고, 가능

한 서열 변이체에 대한 매우 큰 수의 필터링을 허용한다(10^{50}). 시험에 대한 서열 변이체의 선택은 가장 유리한 열동력학에 기초한 예측에 관련된다. 표면상으로 유일한 안정성 또는 안정성과 연결된 특성은 이러한 기술에 의해 효과적으로 설명될 수 있다. 이 방법은 몇몇 치료 단백질에서, 특히 면역글로불린의 조작시에 성공적으로 사용되었다. 인실리코 예측은 가능한 변이체를 과도한 수로 시험하는 것을 방지한다. 현존하는 3차원 구조에 기초한 예측은 가설적 구조에 기초한 예측에 비해 더 성공적으로 보인다. 이러한 기술은 동시적인 다중 돌연변이의 표적화된 스크리닝을 쉽게 예측하고 허용할 수 있지만, 몇몇은 기하급수적인 수의 증가로 인해 순수하게 실험적 기술로는 가능하지 않다.

[0150] 반복적 포화 돌연변이생성(ISM: Iterative Saturation Mutagenesis)은: 1) 효소 개선을 위한 가능한 부위를 선택하기 위한 구조/기능에 대한 지식을 사용하고; 2) 스트라타겐 퀵체인지(Stratagene QuikChange)(또는 다른 적합한 수단)를 사용하여 선택된 부위에서 포화 돌연변이를 생성하고; 3) 원하는 특성을 위해 스크린/선택하고; 및 4) 개선된 클론에 의해, 또 다른 부위서 출발하고 반복을 지속함을 포함한다(문헌[Reetz et al., Nat.Protoc. 2:891-903(2007)]; 및 [Reetz et al., Angew.Chem.Int.Ed Engl. 45:7745-7751(2006)]). 이는 소정의 위치에서 모든 가능한 대체가 스크리닝/선택을 위해 만들어지는 것을 보장하는 입증된 방법이다.

[0151] 돌연변이생성을 위한 임의의 전술된 방법은 단독으로 또는 임의로 조합하여 사용될 수 있다. 추가적으로, 방향 진화 방법중 임의의 하나 또는 조합된 방법은 적응 진화 기법과 연관되어 사용될 수 있다.

[0152] 본 발명은 추가적으로 원하는 중간체 또는 생성물, 예컨대 아디페이트, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 아디페이트를 생산하기 위한 방법은 아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 아디페이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 아디페이트 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 아디페이트를 생산하기에 충분한 기간 동안 및 조건하에 배양하는 단계를 포함할 수 있고, 아디페이트 경로는 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소, 및 아디필-CoA 합성효소 또는 포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제 또는 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소 또는 아디필-CoA 가수분해효소를 포함한다. 추가적으로, 아디페이트를 생산하기 위한 방법은 아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 아디페이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 아디페이트 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 아디페이트를 생산하기에 충분한 기간 동안 및 조건하에 배양하는 단계를 포함할 수 있고, 아디페이트 경로는 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디페이트 환원효소, 3-하이드록시 아디페이트 데하이드라타아제, 및 2-에노에이트 환원효소를 포함한다.

[0153] 추가로, 6-아미노카프로산를 생산하기 위한 방법은 6-아미노카프로산를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-아미노카프로산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-아미노카프로산 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 6-아미노카프로산을 생산하기에 충분한 기간 동안 및 조건하에 배양하는 단계를 포함할 수 있고, 6-아미노카프로산 경로는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소 및 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 탈수소효소를 포함한다. 추가적으로, 카프로락탐을 생산하기 위한 방법은 카프로락탐을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 카프로락탐 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 카프로락탐 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 카프로락탐을 생산하기에 충분한 기간 동안 및 조건하에 배양하는 단계를 포함할 수 있고, 카프로락탐 경로는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소, 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 탈수소효소, 및 아미도가수분해효소를 포함한다.

[0154] 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 조건하에 충분한 시간 동안 본원에 기재된 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 6-ACA를 생산하는 방법을 제공한다. 한 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 데카복실라아제; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다. 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 데카복실라아제; 6-OHE 환원효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다. 역시 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 아미노전이효소 또는 OHED 산화환원효소(아민화); 2-AHE 환원효소; 및 2-AHD 데카복실라아제를 포함한다. 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 아미노전이효소 또는 2-OHD 산화환원효소(아민화); 및 2-AHD 데카복실라아제를 포함한다. 역시 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; HODH 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 HODH 탈수소효소; 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제; 2,3-데하이드로아디

필-CoA 환원효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다. 역시 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 OHED 탈수소효소; 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다. 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 2-OHD 탈수소효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다. 추가의 양태에서, 상기 기재된 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제를 포함할 수 있다.

[0155] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 조건하에 충분한 시간 동안 본원에 기재된 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공한다. 한 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 포함한다. 또 다른 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 아실트랜스퍼라아제; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 포함한다. 또 다른 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 포함한다. 또 다른 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제; 6-AAHOP 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다. 또 다른 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 전이효소 또는 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 리가아제; 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다. 또 다른 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제; 6-AAHOP 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다.

[0156] 또한, 아디페이트를 생산하기 위한 방법은 아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 아디페이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 아디페이트 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 아디페이트를 생산하기에 충분한 기간 동안 및 조건하에 배양하는 단계를 포함할 수 있고, 아디페이트 경로는 알파-케토아디필-CoA 합성효소, 포스포트랜스케토아디필라아제/알파-케토아디페이트 키나아제 또는 알파-케토아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소; 2-하이드록시아디필-CoA 탈수소효소; 2-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제; 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소; 및 아디필-CoA 합성효소, 포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제, 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소 또는 아디필-CoA 가수분해효소를 포함한다. 게다가, 아디페이트를 생산하기 위한 방법은 아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 아디페이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 아디페이트 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 아디페이트를 생산하기에 충분한 기간 동안 및 조건하에 배양하는 단계를 포함할 수 있고, 아디페이트 경로는 2-하이드록시아디페이트 탈수소효소; 2-하이드록시아디필-CoA 합성효소, 포스포트랜스하이드록시아디필라아제/2-하이드록시아디페이트 키나아제 또는 2-하이드록시아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소; 2-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제; 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소; 및 아디필-CoA 합성효소, 포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제, 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소 또는 아디필-CoA 가수분해효소를 포함한다.

[0157] 본원에 개시된 바와 같이, 본 발명은 6-아미노카프로산을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-아미노카프로산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-아미노카프로산 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 6-아미노카프로산을 생산하는 방법을 제공하고, 6-아미노카프로산 경로는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 환원효소; 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA 데하이드라타아제; 6-아미노헥스-2-에노일-CoA 환원효소; 및 6-아미노카프로일-CoA/아실-CoA 전이효소, 6-아미노카프로일-CoA 신타아제, 또는 6-아미노카프로일-CoA 가수분해효소를 포함한다(실시예 XII 및 XIII; 도 11의 단계 A/B/C/D/K/L/M 참조). 본 발명은 추가적으로 6-아미노카프로산을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-아미노카프로산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-아미노카프로산 경로를 갖는 비-천연

미생물 유기체를 배양함으로써 6-아미노카프로산을 생산하는 방법을 제공하고, 6-아미노카프로산 경로는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA/아실-CoA 전이효소, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 신타아제, 또는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 가수분해효소; 3-옥소-6-아미노헥사노에이트 환원효소; 3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트 데하이드라타아제; 및 6-아미노헥스-2-에노에이트 환원효소를 포함한다(실시예 XII 및 XIV; 도 11의 단계 A/E/F/G/H/I/J 참조).

[0158] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 카프로락탐을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 카프로락탐 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 카프로락탐 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 카프로락탐을 생산하는 방법을 제공하고, 카프로락탐 경로는 6-아미노카프로일-CoA/아실-CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로일-CoA 신타아제를 포함한다(실시예 XII 및 XV; 도 11의 단계 K/L 참조). 이러한 방법에서, 카프로락탐은 6-아미노카프로일-CoA의 카프로락탐으로의 자발적 고리화에 의해 생산될 수 있다(실시예 XII; 도 11의 단계 Q 참조). 본 발명은 또한 헥사메틸렌디아민을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 헥사메틸렌디아민 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 헥사메틸렌디아민 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 헥사메틸렌디아민 경로는 6-아미노카프로일-CoA/아실-CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로일-CoA 신타아제; 6-아미노카프로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 및 헥사메틸렌디아민 아미노전이효소 또는 헥사메틸렌디아민 탈수소효소를 포함한다(실시예 XII 및 XVI; 도 11의 단계 K/L/N/O/P 참조).

[0159] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 카프로락탐을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 카프로락탐 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 카프로락탐 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 카프로락탐을 생산하는 방법을 제공하고, 카프로락탐 경로는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 환원효소; 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA 데하이드라타아제; 및 6-아미노헥스-2-에노일-CoA 환원효소를 포함한다(실시예 XII 및 XVII; 도 11의 단계 A/B/C/D 참조). 이러한 방법에서, 카프로락탐은 6-아미노카프로일-CoA의 카프로락탐으로의 자발적인 고리화에 의해 생산될 수 있다(실시예 XII; 도 11의 단계 Q 참조). 또한, 헥사메틸렌디아민을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 헥사메틸렌디아민 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 헥사메틸렌디아민 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 헥사메틸렌디아민을 생산하는 방법이 제공되고, 헥사메틸렌디아민 경로는 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제; 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 환원효소; 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA 데하이드라타아제; 6-아미노헥스-2-에노일-CoA 환원효소; 6-아미노카프로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 및 헥사메틸렌디아민 아미노전이효소 또는 헥사메틸렌디아민 탈수소효소를 포함한다(실시예 XII 및 XVIII; 도 11의 단계 A/B/C/D/N/O/P 참조).

[0160] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 6-아미노카프로산(6-ACA) 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 6-ACA를 생산하는 방법을 제공하고, 미생물 유기체는 6-ACA를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제, 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제, 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH) 알돌라아제, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 수화효소, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 환원효소, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 데카복실라아제, 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소, 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 데카복실라아제, 6-옥소헥스-4-에노에이트(6-OHE) 환원효소, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 아미노전이효소, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 산화환원효소(아민화), 2-아미노헵탄-1,7-디오에이트(2-AHD) 데카복실라아제, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 아미노전이효소, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 산화환원효소(아민화), 2-아미노헵트-4-엔-1,7-디오에이트(2-AHE) 환원효소, 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH) 포메이트-리아제, 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH) 탈수소효소, 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제, 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소, 아디필-CoA 탈수소효소, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 포메이트-리아제, 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 탈수소효소, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 포메이트-리아제, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD) 탈수소효소, 또는 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A-Q 참조).

[0161] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 6-아미노카프로산(6-ACA) 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 6-ACA를 생산하는 방법을 제공하고, 미생물 유기체는 6-ACA를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 한 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 데카복실라아제; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/C/D/E 참조). 본

발명의 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 데카복실라아제; 6-OHE 환원효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/F/G/E 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 아미노전이효소 또는 OHED 산화환원효소(아민화); 2-AHE 환원효소; 및 2-AHD 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/J/D/I 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 아미노전이효소 또는 2-OHD 산화환원효소(아민화); 및 2-AHD 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/C/H/I 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; HODH 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 HODH 탈수소효소; 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제; 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/L/M/N/O/E 참조). 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 OHED 탈수소효소; 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/P/N/O/E 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 6-ACA 경로는 HODH 알돌라아제; OHED 수화효소; OHED 환원효소; 2-OHD 포메이트-리아제 및 피루베이트 포메이트-리아제 활성화 효소 또는 2-OHD 탈수소효소; 아디필-CoA 탈수소효소; 및 아디페이트 세미알데히드 아미노전이효소 또는 아디페이트 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 포함한다(실시예 XIX 및 XXI; 도 12의 단계 A/B/C/Q/O/E 참조). 추가의 양태에서, 상기 기재된 6-ACA 경로는 석신산 세미알데히드 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 또는 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제를 포함할 수 있다.

[0162] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 6-ACA를 생산하는 방법을 제공하고, 6-ACA 경로는 글루타밀-CoA 전이효소, 글루타밀-CoA 리가아제, 베타-케토티올라아제, 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소, 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제, 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소, 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 또는 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 20의 단계 A/B/C/D/E/I/J 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타밀-CoA 전이효소 또는 글루타밀-CoA 리가아제; 베타-케토티올라아제; 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소; 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제; 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소; 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 및 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제를 코딩한다.

[0163] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 6-ACA를 생산하는 방법을 제공하고, 6-ACA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/T/AA 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제를 코딩한다.

[0164] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 6-ACA를 생산하는 방법을 제공하고, 6-ACA 경로는 호모라이신 2-모노옥시게나아제를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 23의 단계 A 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 희석 산 또는 염기에 의해 6-아미노헥산아미드 생성물을 가수분해하여 6-아미노헥산아미드를 6-아미노카프로에이트로 전환시킴을 포함한다(실시예 XXV; 도 23의 단계 B 참조).

[0165] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양

함으로써 6-ACA를 생산하는 방법을 제공하고, 6-ACA 경로는 아디페이트 환원효소, 아디페이트 키나아제 또는 아디필포스페이트 환원효소를 포함한다(실시예 XXVIII; 도 25의 단계 X/Y/Z 참조). 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 아디페이트 환원효소를 포함한다. 또 다른 추가의 양태에서, 6-ACA 경로는 아디페이트 키나아제 및 아디필포스페이트 환원효소를 포함한다. 역시 또 다른 양태에서, 상기 6-아미노카프로산(6-ACA) 경로를 갖는 미생물 유기체는 추가로 본원에 기재된 아디페이트 경로, 카프로락탐 경로 및/또는 헥사메틸렌디아민 경로를 포함한다(실시예 XXVIII; 도 25의 단계 A-W 참조).

[0166] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 6-ACA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 6-ACA를 생산하는 방법을 제공하고, 6-ACA 경로는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 산화환원효소, 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제, 6-아미노헥사날 산화환원효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제, 또는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 26의 단계 A/B/D/E/F/G/I 참조). 추가의 양태에서, 미생물 유기체는 2-아미노-7-옥소수바레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 갖는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로를 갖고, 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로는 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 알돌라아제, 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 데하이드라타아제, 또는 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트 환원효소를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 27의 단계 A/B/C 참조).

[0167] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 6-아미노카프로산(6-ACA)을 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하는 6-아미노카프로산(6-ACA) 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 6-아미노카프로산(6-ACA)을 생산하는 방법을 제공하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 산화환원효소; 및 2-아미노피멜레이트 데카복실라아제를 코딩한다(실시예 XXV; 도 26의 단계 A/D/E 참조). 본 발명의 역시 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제; 및 6-아미노헥사날 산화환원효소를 코딩한다(실시예 XXV; 도 26의 단계 A/B/F 참조). 본 발명의 여전히 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 6-ACA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제; 및 6-아미노헥사날 산화환원효소를 코딩한다(실시예 XXV; 도 26의 단계 I/G/F 참조). 상기 각각의 실시태양의 추가의 양태에서, 미생물 유기체는 2-아미노-7-옥소수바레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산의 제2 세트를 갖는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로를 갖고, 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로는 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 알돌라아제; 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 데하이드라타아제; 및 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트 환원효소를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 27의 단계 A/B/C 참조).

[0168] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA) 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하기 위한 방법을 제공하고, 미생물 유기체는 HMDA를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하고, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 키나아제, [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP) 산화환원효소, 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소, 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소, 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제, [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP) 산화환원효소, 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소, 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화), 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소, 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드), 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 전이효소, 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 리가아제, 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소, [(6-아세트아미도헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AAHOP) 아실전이효소, [(6-아미노헥사노일)옥시]포스포네이트(6-AHOP) 아실전이효소, 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 및 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 A-N 참조).

[0169] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA) 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하기 위한 방법을 제공하고, 미생물 유기체는 HMDA를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 한 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 A/B/C 참조). 본 발명의 또

다른 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 키나아제; 6-AHOP 아실전이효소; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 A/L/N/C 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 CoA 전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 CoA 리가아제; 6-아미노카프로일-CoA 산화환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화) 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 M/N/C 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제; 6-AAHOP 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 D/E/F/G/H 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 전이효소 또는 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA 리가아제; 6-아세트아미도헥사노일-CoA 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 D/I/J/G/H 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제; 6-AAHOP 산화환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다(실시예 XX 및 XXI; 도 13의 단계 D/E/K/J/G 참조).

[0170] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타밀-CoA 전이효소, 글루타밀-CoA 리가아제, 베타-케토티올라아제, 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소, 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제, 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소, 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 20의 단계 A-H 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타밀-CoA 전이효소 또는 리가아제; 베타-케토티올라아제; 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA 산화환원효소; 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA 데하이드라타아제; 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA 환원효소; 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0171] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 환원효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 아민화 산화환원효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소, 3-옥소피멜레이트 키나아제, 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소, 3-옥소피멜레이트 리가아제, 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소, 3-아미노피멜레이트 리가아제, 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-아미노피멜레이트 키나아제, 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-아미노피멜레이트 환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 호모라이신 데카복실라아제, 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노피멜레이트 키나아제, 2-아미노피멜레이트 CoA 전이효소, 2-아미노피멜레이트 CoA 리가아제, 2-아미노피멜레이트 환원효소, 6-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21 참조).

[0172] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 환원효소, 3-옥

소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/C/D/E/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 환원효소; 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소; 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0173] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 키나아제, 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/F/G/D/E/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 키나아제; 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소; 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소; 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2, 3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0174] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소, 3-옥소피멜레이트 CoA 리가아제, 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소, 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/H/I/D/E/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 CoA 리가아제; 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 7-아민화 산화환원효소; 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-7-아미노헵타노에이트 3-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0175] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 환원효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/C/AB/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 환원효소; 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트

2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0176] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 키나아제, 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/H/I/AB/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 키나아제; 5-옥소피멜로일포스포네이트 환원효소; 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0177] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 CoA 리가아제, 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소, 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/F/G/AB/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 CoA 리가아제; 5-옥소피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아미노전이효소 또는 3-옥소-1-카복시헵타날 3-아민화 산화환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0178] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B//J/O/P/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0179] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 키나아제, 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-

아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/M/N/P/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 키나아제; 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0180] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소, 3-아미노피멜레이트 CoA 리가아제, 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/K/L/P/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-아미노피멜레이트 CoA 리가아제; 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0181] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/O/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0182] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소, 3-아미노피멜레이트 CoA 리가아제, 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/K/L/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 CoA 전이효소 또는 3-아미노피멜레이트 CoA 리가아제; 5-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0183] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 키나아제, 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/M/N/Z/R/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 키나아제; 5-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소; 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0184] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노피멜레이트 환원효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/T/W/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노피멜레이트 환원효소; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0185] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노피멜레이트 키나아제, 6-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/T/U/X/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노피멜레이트 키나아제; 6-아미노피멜로일포스포네이트 환원효소; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0186] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 글루타릴-CoA 베타-케토티올라아제, 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소, 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제, 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소, 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소, 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제, 2-아미노피멜레이트 CoA 전이효소, 2-아미노피멜레이트 CoA 리가아제, 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 또는 호모라이신 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 21의 단계 A/B/J/T/V/Y/Q/S 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 글루타릴-

CoA 베타-케토티올라아제; 3-옥소피멜로일-CoA 가수분해효소, 3-옥소피멜로일-CoA 전이효소 또는 3-옥소피멜로일-CoA 리가아제; 3-옥소피멜레이트 아미노전이효소 또는 3-옥소피멜레이트 아민화 산화환원효소; 3-아미노피멜레이트 2,3-아미노뮤타아제; 2-아미노피멜레이트 CoA 전이효소 또는 2-아미노피멜레이트 CoA 리가아제; 6-아미노피멜로일-CoA 환원효소(알데히드 형성); 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 7-아미노전이효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다.

[0187] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 알돌라아제, 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 데하이드라타아제, 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트 환원효소, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소 아민화 산화환원효소, 호모라이신 데카복실라아제, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 데카복실라아제, 6-아미노헥사날 아미노전이효소 또는 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 22의 단계 A-G). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 알돌라아제; 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 데하이드라타아제; 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트 환원효소; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소 또는 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아민화 산화환원효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 알돌라아제; 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 데하이드라타아제; 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트 환원효소; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 데카복실라아제; 및 6-아미노헥사날 아미노전이효소 또는 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소를 코딩한다.

[0188] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 6-아미노카프로에이트 환원효소, 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소, 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화), 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소, 6-아세트아미도헥사노에이트 환원효소, 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소, 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화), 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 포함한다(실시예 XXVII; 도 24의 단계 O/C 또는 D/P/G/H 참조). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 6-아미노카프로에이트 환원효소; 및 6-아미노카프로산 세미알데히드 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로산 세미알데히드 산화환원효소(아민화)를 코딩한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소; 6-아세트아미도헥사노에이트 환원효소; 6-아세트아미도헥사날 아미노전이효소 또는 6-아세트아미도헥사날 산화환원효소(아민화); 및 6-아세트아미도헥산아민 N-아세틸전이효소 또는 6-아세트아미도헥산아민 가수분해효소(아미드)를 코딩한다.

[0189] 본 발명은 추가적으로 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, HMDA 경로는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제, 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소, 6-아미노헥사날 아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 데카복실라아제, 호모라이신 데카복실라아제, 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아민화 산화환원효소, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소, 2-아미노-7-옥소수바레이트 아민화 산화환원효소, 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노전이효소 또는 2,7-디아미노수바레이트 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 A/B/C/G/H/I/J/K/L/M 참조). 추가의 양태에서, 미생물 유기체는 2-아미노-7-옥소수바레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 갖는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로를 갖고, 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로는 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 알돌라아제, 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 데하이드라타아제, 또는 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트 환원효소를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 27의 단계 A/B/C 참조).

[0190] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 헥사메틸렌디아민(HMDA) 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하는 HMDA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 HMDA를 생산하는 방법을 제공하고, 여기서 이 세트는

2-아미노-7-옥소수바레이트 아민화 산화환원효소 또는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노전이효소; 2,7-디아미노수바레이트 데카복실라아제; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 K/L/H). 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아민화 산화환원효소 또는 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 I/J/H 참조). 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 아미노산 데카복실라아제; 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 데카복실라아제; 및 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소 또는 6-아미노헥사날 아미노전이효소를 코딩한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 I/G/C 참조). 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 데카복실라아제; 및 6-아미노헥사날 아민화 산화환원효소 또는 6-아미노헥사날 아미노전이효소를 코딩한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 A/B/C 참조). 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 비-천연 미생물 유기체는 HMDA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 2-아미노-7-옥소수바레이트 케토-산 데카복실라아제; 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아민화 산화환원효소 또는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 아미노전이효소; 및 호모라이신 데카복실라아제를 코딩한다(실시예 XXIV 및 XXVI; 도 26의 단계 A/M/H). 상기 각각의 실시태양의 추가의 양태에서, 미생물 유기체는 2-아미노-7-옥소수바레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산의 제2 세트를 갖는 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로를 갖고, 2-아미노-7-옥소수바레이트 경로는 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 알돌라아제; 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트 데하이드라타아제; 및 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트 환원효소를 포함한다(실시예 XXV 및 XXVI; 도 27의 단계 A/B/C 참조).

[0191] 본 발명은 추가적으로 레불린산(LA)을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 LA 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 외인성 핵산을 포함하는 LA 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함으로써 헥사메틸렌디아민(HMDA)을 생산하는 방법을 제공하고, LA 경로는 3-옥소아디필-CoA 티올라아제, 3-옥소아디필-CoA/아실-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 신타아제, 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소, 또는 3-옥소아디페이트 데카복실라아제를 포함한다(실시예 XXIX; 도 25의 단계 A/E/F/G/AA). 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 LA 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산 세트를 포함하고, 여기서 이 세트는 3-옥소아디필-CoA 티올라아제; 3-옥소아디필-CoA/아실-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 신타아제, 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 및 3-옥소아디페이트 데카복실라아제를 코딩한다.

[0192] 본 발명은 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA의 증가된 생산을 부여하는 1종 이상의 유전자의 손상에 의해 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA의 생산이 증가된 천연 미생물 유기체를 생산하는 방법을 추가로 제공한다. 이러한 유전자 손상은 실시예 XXX 및 표 14 내지 16에 예시된 손상을 포함한다.

[0193] 본 발명은 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA의 증가된 생산을 부여하는 1종 이상의 유전자의 손상을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA를 생산하는 방법을 추가적으로 제공한다. 이러한 손상은, 유전자 손상이 효소의 활성을 감소시킬 경우 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA 생산을 미생물의 성장과 결부시키는 것을 의무로 하는 효소를 코딩하는 유전자에서 초래될 수 있어서, 이러한 손상은 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA의 안정한 성장-결부된 생산을 비천연 미생물 유기체에 부여하게 된다.

[0194] 몇몇 실시태양에서, 유전자 손상은 완전한 유전자 결실을 포함할 수 있다. 유전자 손상을 위한 방법은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있고 본원에 기재되어 있다(실시예 XXX 참조). 몇몇 실시태양에서 유전자를 손상시키는 다른 방법으로는, 예를 들면, 생략, 올리고뉴클레오티드의 첨가 또는 유전자를 비작동성으로 만드는 돌연변이에 의한 골격전이가 포함된다. 당분야의 숙련가라면 유전자 결실의 이점을 인식할 것이지만, 안정성으로 인해, 이는 미리 손상된 유전자를 발현하는 표현형으로의 복귀로부터 비-천연 유기체에 부여된다. 특별히, 유전자 손상은 표 14 내지 16에 기재된 유전자 세트로부터 선택된다.

[0195] 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산에 대하여 시험하기 위해 적합한 정제 및/또는 검정은 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 적합한 복제물, 예컨대 3중 배양물이 시험될 각각의 조작된 균주에 대해 성장될 수 있다. 예를 들면, 조작된 생산 숙주에서 생성물 및 부산물 형성이 모니터링될 수 있다. 최종 생성물 및 중간체, 및 다른 유기 화합물은 방법들, 예컨대 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC: High Performance Liquid Chromatography), 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectroscopy) 및 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy) 또는

통상적인 절차를 사용하는 다른 적합한 분석 방법에 의해 분석될 수 있다. 발효 브로쓰에서의 생성물의 방출은 배양 상청액으로 시험될 수 있다. 부산물 및 잔여 글루코스는 HPLC에 의해, 예를 들면, 글루코스 및 알코올에 대한 굴절 지수 검출기, 및 유기 산에 대한 UV 검출기(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 90:775-779(2005)), 또는 당분야에 공지된 다른 적합한 검정 및 검출 방법을 사용하여 정량화될 수 있다. 외인성 DNA 서열로부터의 개별 효소 활성은 당분야에 공지된 방법을 사용하여 검정될 수 있다.

[0196] 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산은 당분야에 공지된 다양한 방법을 사용하여 배양물중의 다른 성분들로부터 분리될 수 있다. 이러한 분리 방법으로는, 예를 들면, 추출 절차 뿐만 아니라, 연속 액체-액체 추출, 투과증발(pervaporation), 막 여과, 막 분리, 역삼투압, 전기투석, 증류, 결정화, 원심분리, 추출성 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 및 한외여과를 포함하는 방법이 포함된다. 모든 상기 방법은 당분야에 공지되어 있다.

[0197] 본원에 기재된 임의의 비-천연 미생물 유기체는 배양되어 본 발명의 생합성 생성물을 생산 및/또는 분비할 수 있다. 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산자는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성 생산을 위해 배양될 수 있다.

[0198] 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 위해, 재조합 균주는 탄소원 및 다른 필수 영양소를 갖는 배지에서 배양된다. 때때로 발효기에 혐기성 조건을 유지시켜 전체 공정의 비용을 감소시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 조건은, 예를 들면, 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 플라스크를 격벽 및 크림프-캡(crimp-cap)으로 밀봉함으로써 수득될 수 있다. 성장이 혐기성으로 관찰되지 않은 균주의 경우, 제한된 통기를 위한 작은 구멍을 갖도록 격벽을 천공함으로써 미세호기성 또는 실질적으로 혐기성인 조건이 적용될 수 있다. 예시적인 혐기성 조건은 이전에 기재되었고, 당분야에 공지되어 있다. 예시적인 호기성 및 혐기성 조건은, 예를 들면, 2007년 8월 10일자로 출원된 미국 특허 출원 공개공보 제2009/0047719호(일련 번호 제11/891,602호)에 기재되어 있다. 발효는, 본원에 개시된 바와 같이, 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행될 수 있다.

[0199] 원할 경우, 배지의 pH는, 원하는 pH에서 배양 배지를 유지할 필요가 있을 경우, 염기, 예컨대 NaOH 또는 다른 염기, 또는 산을 첨가하여 원하는 pH, 특히 중성 pH, 예컨대 대략 7의 pH에서 유지될 수 있다. 성장 속도는 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 결정될 수 있고, 글루코스 섭취 속도는 시간에 대한 탄소원 고갈을 모니터링함으로써 결정될 수 있다.

[0200] 성장 배지는, 예를 들면, 비-천연 미생물에게 탄소 공급원을 제공할 수 있는 임의의 탄수화물 공급원을 포함할 수 있다. 이러한 원료로는, 예를 들면, 당, 예컨대 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스, 프럭토스, 수크로스 및 전분이 포함된다. 탄수화물의 다른 공급원으로는, 예를 들면, 재생가능한 공급원료 및 바이오매스(biomass)가 포함된다. 본 발명의 방법에서 공급원료로서 사용될 수 있는 바이오매스의 예시적인 유형으로는 셀룰로스성 바이오매스, 헤미셀룰로스성 바이오매스 및 리기닌 공급원료 또는 공급원료의 일부가 포함된다. 이러한 바이오매스 공급원료는, 예를 들면, 탄소 공급원으로서 유용한 탄수화물 기질, 예컨대 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스, 프럭토스 및 전분을 포함한다. 본원에 개시된 교시 및 지침을 참고하여 당분야의 숙련가라면 상기 예시된 것들 이외의 재생가능한 공급원료 및 바이오매스가 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 위해 본 발명의 미생물 유기체를 배양하기 위해 사용될수 있음을 알 것이다.

[0201] 재생가능한 공급원료, 예컨대 상기 예시된 바와 같은 공급원료 이외에, 본 발명의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 미생물 유기체는 그의 탄소 공급원으로서의 합성기체 상에서 성장하기 위해 개질될 수 있다. 이러한 구체적인 실시태양에서, 1종 이상의 단백질 또는 효소는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산 유기체에서 발현되어 합성기체(syngas) 또는 다른 기체성 탄소 공급원의 이용을 위한 대사 경로를 제공한다.

[0202] 합성기체로서도 공지된 합성 가스, 또는 생산자 기체는 석탄 및 탄소성 물질, 예컨대 바이오매스 물질, 예를 들면 농작물 및 잔여물의 기체화의 주요 생성물이다. 합성기체는 주로 H_2 및 CO의 혼합물이고, 임의의 유기 공급원료, 제한되지 않지만 예컨대 석탄, 석탄 오일, 천연 기체, 바이오매스, 및 유기 폐기물의 기체화로부터 수득될 수 있다. 기체화는 일반적으로 높은 연료 대 산소 비율에서 수행된다.

[0203] 대부분이 H_2 및 CO이지만, 합성기체는 또한 CO_2 및 다른 기체를 소량으로 포함할 수 있다. 이와 같이, 합성 가

스는 기체성 탄소, 예컨대 CO 및, 추가적으로, CO_2의 비용 효과적인 공급원을 제공한다.

[0204] 우드-엘정달(Wood-Ljungdahl) 경로는 CO 및 H_2의 아세틸-CoA 및 다른 생성물, 예컨대 아세테이트로의 전달을 촉매화한다. CO 및 합성기체를 이용할 수 있는 유기체는 또한 일반적으로 우드-엘정달 경로에 의해 포함되는 형질전환 및 효소의 동일한 기본 세트를 통해 CO_2 및 CO_2/H_2 혼합물을 이용하는 능력을 갖는다. 미생물에 의한 CO_2의 아세테이트로의 H_2-의존성 전환은, CO가 동일한 유기체에 의해 사용될 수도 있고 동일한 경로가 관여됨이 밝혀지기 오래 전에 인식되었다. 많은 아세토겐(acetogen)은, 수소가 필수적인 환원 등가물을 제공하기 위해 존재하는 한, CO_2의 존재하에 성장하고, 화합물, 예컨대 아세테이트를 생산하는 것으로 보인다(예를 들면, 문헌 [Drake, Acetogenesis, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York,(1994)] 참조). 이는 하기 식에 의해 요약될 수 있다:

[0205] $2\ CO_2 + 4\ H_2 + n\ ADP + n\ Pi \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O + n\ ATP$

[0206] 따라서, 우드-엘정달 경로를 갖는 비-천연 미생물은 아세틸-CoA 및 다른 원하는 생성물의 생산을 위해 CO_2 및 H_2 혼합물을 또한 이용할 수 있다.

[0207] 우드-엘정달 경로는 당분야에 공지되어 있고, 다음의 2개의 분지로 분리될 수 있는 12개의 반응으로 구성된다: (1) 메틸 분지 및 (2) 카보닐 분지. 메틸 분지는 합성기체를 메틸-테트라하이드로폴레이트(메틸-THF)로 전환시키는 반면, 카보닐 분지는 메틸-THF를 아세틸-CoA로 전환시킨다. 메틸 분지에서의 반응은 하기 효소의 순서로 촉매화된다: 페레독신 산화환원효소, 포메이트 탈수소효소, 포밀테트라하이드로폴레이트 합성효소, 메테닐테트라하이드로폴레이트 사이클로데하이드라타아제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 탈수소효소 및 메틸렌테트라하이드로폴레이트 환원효소. 카보닐 분지에서의 반응은 하기 효소 또는 단백질의 순서로 촉매화되고: 코발아미드 코리노이드(cobalamide corrinoid)/철-황 단백질, 메틸전이효소, 일산화탄소 탈수소효소, 아세틸-CoA 신타아제, 아세틸-CoA 신타아제 디설파이드 환원효소 및 수소화효소; 이들 효소는 또한 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸전이효소(예를 들면, AcsE), 코리노이드 철-황 단백질, 니켈-단백질 조립 단백질(예를 들면, AcsF), 페레독신(ferredoxin), 아세틸-CoA 신타아제, 일산화탄소 탈수소효소 및 니켈-단백질 조립 단백질(예를 들면, CooC)로 지칭될 수 있다. 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로를 생산하기 위한 코딩 핵산의 충분한 수를 도입하기 위해 본원에 제공된 교시 및 지침을 참고하여, 당분야의 숙련가라면 적어도 숙주 유기체에 존재하지 않는 우드-엘정달 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산을 도입함에 있어서 동일한 조작 고안이 또한 수행될 수 있음을 알 것이다. 따라서, 개질된 유기체가 완전한 우드-엘정달 경로를 포함하도록 본 발명의 미생물 유기체내로 1종 이상의 코딩 핵산을 도입함은 합성기체 이용 능력을 부여할 것이다.

[0208] 추가적으로, 일산화탄소 탈수소효소 및/또는 수소화효소 활성과 결부된 환원적 (역) 트리카복실산 사이클은 CO, CO_2 및/또는 H_2의 아세틸-CoA 및 다른 생성물, 예컨대 아세테이트로의 전환에 사용될 수 있다. 환원적 TCA 경로를 통해 탄소를 고정시킬 수 있는 유기체는 1종 이상의 하기 효소를 이용할 수 있다: ATP 시트레이트-리아제, 시트레이트 리아제, 아코니타아제, 이소시트레이트 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소, 석시닐-CoA 합성효소, 석시닐-CoA 전이효소, 푸마레이트 환원효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 일산화탄소 탈수소효소, 및 수소화효소. 구체적으로, 일산화탄소 탈수소효소 및 수소화효소에 의해 CO 및/또는 H_2로부터 추출된 환원 등가물은 환원적 TCA 사이클을 통해 아세틸-CoA 또는 아세테이트로 CO_2를 고정하기 위해 이용된다. 아세테이트는 효소 예컨대 아세틸-CoA 전이효소, 아세테이트 키나아제/인산아세틸전이효소, 및 아세틸-CoA 합성효소에 의해 아세틸-CoA로 전환될 수 있다. 아세틸-CoA는 피루베이트:페레독신 산화환원효소 및 글루코스신생합성 효소에 의해 p-톨루에이트, 테레프탈레이트, 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 전구체, 글리세르알데히드-3-포스페이트, 포스포에놀피루베이트, 및 피루베이트로 전환될 수 있다. p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 (2-하이드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 생성하는 충분한 수의 코딩 핵산을 도입하기 위해 본원에 제공된 교시 및 지침을 참고하여, 당분야의 숙련가라면 적어도 숙주 유기체에 존재하지 않는 환원적 TCA 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산을 도입함에 있어서 동일한 조작 고안이 또한 수행될 수 있음을 알 것이다. 따라서, 개질된 유기체가 완전한 환원적 TCA 경로를 포함하도록 본 발명의 미생물 유기체내로 1종 이상의 코딩 핵산을 도입함은 합성기체 이용 능력을 부여할 것이다.

[0209] 본원에 개시된 교시 및 지침을 참고하여 당분야의 숙련가라면 탄소 공급원, 예컨대 탄수화물 상에서 성장될 경우 본 발명의 생합성된 화합물을 분비하는 비-천연 미생물 유기체가 생산될 수 있음을 알 것이다. 이러한 화합

물로는, 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산, 및 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로중의 임의의 중간 대사산물이 포함된다. 요구되는 모든 것은, 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성 경로의 일부 또는 전부를 비롯한 원하는 화합물 또는 중간체의 생합성을 달성하기 위해 필요한 1종 이상의 효소 활성을 조작하는 것이다. 따라서, 본 발명은 탄수화물 상에서 성장될 경우 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산 및/또는 분비하고, 탄수화물 상에서 성장될 경우 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로에서 보여지는 임의의 중간 대사산물을 생산 및/또는 분비하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 예를 들면, 아디페이트 생산 미생물 유기체는, 원할 경우, 중간체, 예를 들면, 3-옥소아디필-CoA, 3-하이드록시아디필-CoA, 5-카복시-2-펜테노일-CoA, 또는 아디필-CoA로부터의 합성을 개시할 수 있다(도 2 참조). 또한, 아디페이트 생산 미생물 유기체는 중간체, 예를 들면, 3-옥소아디필-CoA, 3-옥소아디페이트, 3-하이드록시아디페이트, 또는 헥사-2-엔디오에이트로부터의 합성을 개시할 수 있다(도 3 참조). 본 발명의 6-아미노카프로산 생산 미생물 유기체는 중간체, 예를 들면, 아디페이트 세미알데히드로부터의 합성을 개시할 수 있다(도 8 참조). 본 발명의 카프로락탐 생산 미생물 유기체는, 원할 경우, 중간체, 예를 들면, 아디페이트 세미알데히드 또는 6-아미노카프로산로부터의 합성을 개시할 수 있다(도 8 참조).

[0210] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산하기에 충분한 양의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 경로 효소를 코딩하는 적어도 하나의 핵산을 외인성으로 발현하기 위해 본원에 예시된 바와 같은 공지된 방법을 사용하여 구축된다. 본 발명의 미생물 유기체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 생산하기에 충분한 조건하에 배양되는 것으로 이해된다. 본원에 제공된 교시 및 지침을 따라서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성을 달성하여, 약 0.1 내지 200 mM 이상의 세포내 농도를 생성한다. 일반적으로, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 세포내 농도는 약 3 내지 150 mM, 특별히 약 5 내지 125 mM, 및 보다 특별히 약 8 내지 100 mM, 예컨대 약 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM, 또는 그 이상이다. 이들 예시적인 범위 각각의 사이 및 그 이상의 세포내 농도는 또한 본 발명의 비-천연 미생물 유기체로부터 달성될 수 있다.

[0211] 몇몇 실시태양에서, 배양 조건은 혐기성 또는 실질적으로 혐기성인 성장 또는 유지 조건을 포함한다. 예시적인 혐기성 조건은 이전에 기재되고 당분야에 공지되어 있다. 발효 공정을 위한 예시적인 혐기성 조건은 본원에 기재되고, 예를 들면, 2007년 8월 10일자로 출원된 미국 특허 출원 공개공보 제2009/0047719호에 기재되어 있다. 임의의 이들 조건은 비-천연 미생물 유기체 뿐만 아니라 당분야에 공지된 다른 혐기성 조건과 함께 이용될 수 있다. 이러한 혐기성 조건하에, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산자는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 5 내지 10 mM 이상 뿐만 아니라 본원에 예시된 모든 다른 농도로 합성할 수 있다. 비록 상기 설명이 세포내 농도를 지칭할 지라도, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산 미생물 유기체는 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 세포내에 생산하고/하거나 배양 배지로 생성물을 분비할 수 있는 것으로 이해된다.

[0212] 배양 조건은, 예를 들면, 액체 배양 절차 뿐만 아니라 발효 및 다른 큰 규모의 배양 절차를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명의 생합성 생성물의 특히 유용한 수율은 혐기성 또는 실질적으로 혐기성인 배양 조건하에 수득될 수 있다.

[0213] 본원에 기재된 바와 같이, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성을 달성하기 위한 하나의 예시적인 성장 조건은 혐기성 배양 또는 발효 조건을 포함한다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 혐기성 또는 실질적으로 혐기성인 조건하에 유지되거나, 배양되거나 발효된다. 간단하게, 혐기성 조건은 산소가 없는 환경을 지칭한다. 실질적으로 혐기성인 조건은, 예를 들면, 0 내지 10%의 포화도를 유지하도록 하는 배양, 배치식 발효 또는 연속 발효를 포함한다. 실질적으로 혐기성인 조건은 또한 1% 미만의 산소 분위기로 유지되는 밀봉된 챔버 내부의 고체 한천 상에서 또는 액체 배지에서 성장 또는 휴지중인 세포를 포함한다. 산소의 퍼센트는,예를 들면, N_2/CO_2 혼합물 또는 다른 적합한 비산소 기체 또는 기체들로 배양물을 스파징함으로써 유지될 수 있다.

[0214] 본원에 기재된 배양 조건은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 제작을 위해 연속적으로 규모 확대되고 성장될 수 있다. 예시적인 성장 절차는, 예를 들면, 공급-배치식 발효 및 배치식 분리; 공급-배치식 발효 및 연속적 분리, 또는 연속적 발효 및 연속적 분리를 포함한다. 모든 이들 공정은 당분야에 공지되어 있다. 발효 절차는 상업적 양의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불

린산의 생합성적 생산을 위해 특히 유용하다. 일반적으로, 및 비연속적 배양 절차에 있어서, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 연속적 및/또는 거의-연속적 생산은 본 발명의 비-천연 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산 유기체를 지수 상으로 성장을 유지 및/또는 거의 유지시키기에 충분한 영양소 및 배지에서 배양하는 단계를 포함할 것이다. 이러한 조건하에서의 연속적 배양은, 예를 들면, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 이상을 포함할 수 있다. 추가적으로, 연속적 배양은 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주 이상 내지 수 개월 까지를 포함할 수 있다. 다르게는, 본 발명의 유기체는 특정 적용분야를 위해 적합하다면 수 시간 동안 배양될 수 있다. 연속적 및/또는 거의-연속적 배양 조건은 또한 이들 예시적인 기간 사이의 모든 시간 간격을 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 본 발명의 미생물 유기체를 배양하는 시간은 원하는 목적을 위한 생성물의 충분한 양을 생산하기에 충분한 기간 동안인 것으로 추가로 이해된다.

[0215] 발효 절차는 당 분야에 공지되어 있다. 간단하게는, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성을 위한 발효는, 예를 들면, 공급-배치식 발효 및 배치식 분리; 공급-배치식 발효 및 연속적 분리, 또는 연속적 발효 및 연속적 분리에 이용될 수 있다. 배치 및 연속적 발효 절차의 예는 당분야에 공지되어 있다.

[0216] 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 상당량의 연속적 생산을 위한 본 발명의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 절차를 사용하는 상기 발효 절차에 더하여, 원한다면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산자에게, 예를 들면, 생성물을 다른 화합물로 전환시키는 화학적 합성 절차가 동시에 가해지거나, 생성물은 발효 배양물로부터 분리되고 연속적으로 화학적 전환이 가해져서 다른 화합물로 전환될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 3-옥소아디페이트, 헥사-2-엔디오에이트를 이용하는 아디페이트 경로에서 중간체는, 예를 들면, 백금 촉매 상에서 화학적 수소화에 의해 아디페이트로 전환될 수 있다(실시예 III 참조).

[0217] 본원에 기재된 바와 같이, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생합성을 달성하기 위한 예시적인 성장 조건은 삼투압보호제를 배양 조건에 첨가함을 포함한다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 삼투압보호제의 존재하에 상기 기재된 바와 같이 유지되거나, 배양되거나 발효될 수 있다. 간단히, 삼투압보호제는 삼투압조절자로서 작용하고 본원에 기재된 미생물 유기체가 삼투압 스트레스에서 생존하는 것을 돕는 화합물을 의미한다. 삼투압보호제로는, 제한되지 않지만, 베타인, 아미노산, 및 당 트레할로스가 포함된다. 이의 비제한적인 예는 글리신 베타인, 프랄린 베타인, 디메틸쎄틴, 디메틸설포니오프로피오네이트, 3-디메틸설포니오-2-메틸프로피오네이트, 피페콜산, 디메틸설포니오아세테이트, L-카르니틴 및 엑토인이이다. 한 양태에서, 삼투압보호제는 글리신 베타인이다. 당분야의 숙련가라면 본원에 기재된 미생물 유기체를 삼투압 스트레스로부터 보호하기에 적합한 삼투압보호제의 양 및 유형은 사용된 미생물 유기체에 좌우될 것임을 이해할 것이다. 예를 들면, 실시예 XXII에 기재된 바와 같이, 다양한 양의 6-아미노카프로산의 존재하의 에스케리치아 콜라이는 2 mM 글리신 베타인의 존재하에 적절히 성장된다. 배양 조건에서 삼투압보호제의 양은, 예를 들면, 약 0.1 mM 이하, 약 0.5 mM 이하, 약 1.0 mM 이하, 약 1.5 mM 이하, 약 2.0 mM 이하, 약 2.5 mM 이하, 약 3.0 mM 이하, 약 5.0 mM 이하, 약 7.0 mM 이하, 약 10 mM 이하, 약 50 mM 이하, 약 100 mM 이하 또는 약 500 mM 이하일 수 있다.

[0218] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링이 성장 조건을 최적화하기 위해 이용될 수 있다. 모델링은 또한 경로의 이용을 추가적으로 최적화하는 유전자 넉아웃(knockout)을 고안하기 위해 사용될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 보다 효과적인 생산을 향하여 대사작용의 전이의 세포 성장에 미치는 효과를 실현가능하게 예측할 수 있도록 한다.

[0219] 원하는 생성물의 생합성을 유리하게 하는 대사 변경을 식별 및 고안하기 위한 한 컴퓨터이용 방법은 OptKnock 컴퓨터 체제(framework)이다(Burgard et al., Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003)). OptKnock은 표적 생성물을 과생산하는 유전적으로 안정한 미생물을 만드는 유전자 결실 전략을 제안하는 대사 모델링 및 모의 프로그램이다. 구체적으로, 이 체제는 원하는 생화학물질이 세포 성장의 의무적 부산물이 되도록 하는 유전적 취급을 제안하기 위해 미생물의 완전한 대사 및/또는 생화학 조직망을 검사한다. 전략적으로 위치된 유전자 결실 또는 다른 기능적 유전자 손상을 통해 생화학물질 생산을 세포 성장과 결부시킴으로써, 생물반응기에서 장기간 성장한 후 조작된 균주에 부과된 성장 선택 압력은 의무적인 성장-결부된 생화학물질 생산의 결과로서 성능의 개선을 유도한다. 마지막으로, 유전자 결실이 구축될 경우, OptKnock에 의해 선택된 유전자가 게놈으로부터 완전히

제거되므로, 고안된 균주가 이들의 야생형 상태로 되돌아갈 가능성은 거의 없다. 따라서, 이러한 컴퓨터이용 방법은 원하는 생성물의 생합성을 유도하는 대안의 경로를 식별하기 위해 사용될 수 있거나, 원하는 생성물의 생합성의 추가의 최적화를 위해 비-천연 미생물 유기체와 함께 사용될 수 있다.

[0220] 성장-결부된 생화학물질 생산의 개념은 인실리코 모델을 사용하여 계산되는 전형적인 대사 조직망의 생화학물질 생산 한계의 맥락에서 시각화될 수 있다. 이들 제한은 제한 기질의 섭취 속도를 이들의 실험적으로 측정된 값에 고정시키고 각각의 달성가능한 성장 수준에서 생화학물질 생산의 최대 및 최소 속도를 계산함으로써 수득된다. 예외가 존재하지만, 전형적으로 원하는 생화학물질 생산은 세포내 자원을 위한 바이오매스 형성과 직접 경쟁한다. 이와 같이, 생화학물질 생산의 증진된 속도는 필수적으로 하위 최대 성장 속도를 초래할 것이다. OptKnock에 의해 제안된 넉아웃은 야생형 균주로부터의 대사적 행태에서의 변화를 강요하는 허용가능한 해결책 경계를 제한하도록 고안된다. 소정의 균주를 위한 실제 해결책 경계는 기질 섭취 속도가 증가하거나 감소할 때 팽창하거나 수축할 것이지만, 각각의 실험 값은 계산된 해결책 경계내에 있어야 한다. 예컨대 이와 같은 플롯은, 균주가 그들의 성능 제한과 얼마나 밀접한지, 달리 말하면 개선을 위해 얼마나 많은 공간이 이용가능한지를 보여줄 수 있다. OptKnock 체제는 이미 생화학물질 과생산을 위한 유망한 유전자 결실 전략을 식별할 수 있고 (문헌[Burgard et al., Biotechnol Bioeng, 84(6):647-657(2003)]; 및 [Pharkya et al., Biotechnol Bioeng, 84(7):887-899(2003)]), 대사 및 규제 모델링 체제에 추가의 개선을 천연적으로 포함하는 계통적 체제를 수립한다.

[0221] 간단히, OptKnock은 세포 대사를 모델링하기 위한 컴퓨터이용 방법 및 시스템을 지칭하기 위해 본원에 사용되는 용어이다. OptKnock 프로그램은 특정한 제약을 플럭스 밸런스 분석(FBA: flux balance analysis) 모델로 혼입하는 모델 및 방법의 체제에 관한 것이다. 이러한 제약으로는, 예를 들면, 정량적 운동 정보, 정량적 조절 정보, 및/또는 DNA 마이크로어레이(microarray) 실험 데이터가 포함된다. OptKnock은 또한, 예를 들면, 플럭스 밸런스 모델을 통해 유도되는 플럭스 경계를 엄격히 하고 후속적으로 유전자 첨가 또는 결실의 존재하에 대사 조직망의 성능을 탐침함으로써 다양한 대사 문제에 대한 해결책을 컴퓨터화한다. OptKnock 컴퓨터 체제는 대사 조직망의 성능 제한에 대한 효과적인 질문을 가능하게 하는 모델 공식을 구축할 수 있고 생성된 혼합된-정수 선형 프로그래밍 문제를 해결하기 위한 방법을 제공한다. 본원에 OptKnock로서 지칭된 대사 모델링 및 모의 방법은, 예를 들면, 미국 특허출원 공개공보 제2002/0168654호(출원일: 2002년 1월 10일), 국제 특허 제PCT/US02/00660호(출원일: 2002년 1월 10일), 및 미국 특허출원 일련번호 제2009/0047719호(출원일: 2007년 8월 10일 출원)에 기재되어 있다.

[0222] 생성물의 생합성적 생산에 유리한 대사 변경을 식별 및 고안하기 위한 또 다른 컴퓨터이용 방법은 심페니(등록상표)라는 대사 모델링 및 모의 시스템이다. 이러한 컴퓨터이용 방법 및 시스템은, 예를 들면, 미국 특허출원 공개공보 제2003/0233218호(2002년 6월 14일 출원), 및 국제 특허출원 공개공보 제PCT/US03/18838호(출원일: 2003년 1월 13일)에 기재되어 있다. 심페니(등록상표)는 조직망 모델 인실리코를 생산하고, 시스템중 화학 반응의 임의의 및 모든 가능한 작용성을 포함하는 해결 공간을 규정하는 생물 시스템의 화학적 반응을 통해 질량, 에너지 또는 전하의 플럭스를 모의함으로써 생물 시스템을 위해 허용되는 활성의 범위를 결정하기 위해 사용될 수 있는 컴퓨터 시스템이다. 이러한 접근방법은 제약에 기초한 모델링으로 지칭되는데, 해결 공간이 포함된 반응의 공지된 화학양론과 같은 제약 뿐만 아니라 반응 열역학 및 반응을 통한 최대 플럭스와 연관된 용량 제약에 의해 규정되기 때문이다. 이들 제약에 의해 규정되는 공간은 생물 시스템 또는 그의 생화학적 성분의 행태 및 표현형 능력을 결정하기 위해 심문될 수 있다. 분석 방법, 예컨대 볼록형(convex) 분석, 선형 프로그래밍 및 극한 경로의 계산(예를 들면, 문헌[Schilling et al., J. Theor. Biol. 203:229-248(2000)]; [Schilling et al., Biotech. Bioeng. 71:286-306(2000)] 및 [Schilling et al., Biotech. Prog. 15:288-295(1999)]에 기재됨)이 이러한 표현형 능력을 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0223] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명에 적용가능한 컴퓨터 프로그램에서 사용되는 제약에 기초한 방법은 플럭스 밸런스 분석이다. 플럭스 밸런스 분석은 정지 상태 조건에서의 플럭스 균형에 기초하고, 예를 들면, 문헌[Varma and Palsson, Biotech. Bioeng. 12:994-998(1994)]에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 플럭스 밸런스 접근방법은 반응 조직망에 적용되어, 예를 들면, 문헌[Fell and Small, J. Biochem. 138:781-786(1986)]에 기재된 바와 같은 지방세포 대사, 문헌[Majewski and Domach, Biotech. Bioeng. 35:732-738(1990)]에 기재된 바와 같은 ATP 최대화 조건하의 에스케리치아 콜라이로부터의 아세테이트 분비, 또는 문헌[Vanrolleghem et al., Biotech. Prog. 12:434-448(1996)]에 기재된 바와 같은 효모에 의한 에탄올 분비의 계통적 특성을 모의하거나 예측한다. 추가적으로, 이러한 접근방법은 문헌[Edwards and Palsson, Proc. Natl. Acad. Sci. 97:5528-5533(2000)], [Edwards and Palsson, J. Bio. Chem. 274:17410-17416(1999)] 및 [Edwards et al., Nature

Biotech. 19:125-130(2001)]에 기재된 바와 같이 다양한 단일 탄소 공급원 상에서의 사카로마이세스 세레비지아의 성장, 뿐만 아니라 헤모필러스 인플루엔자의 대사를 예측하거나 모의하기 위해 사용될 수 있다.

[0224] 일단 해결 공간이 한정되면, 이는 분석되어 다양한 조건하에서 가능한 해결책을 결정할 수 있다. 이러한 컴퓨터이용 접근방법은, 생물 시스템이 변동가능하고 많은 상이한 방식으로 동일한 결과에 도달할 수 있으므로, 생물학적 현실과 일치한다. 생물 시스템은 모든 생명체가 직면해야 하는 근본적 제약에 의해 제한되는 진화 기작을 통해 고안된다. 따라서, 제약에 기초한 모델링 전략은 이러한 일반적인 현실을 내포한다. 추가로, 제약의 엄격화를 통해 조직망 모델에 추가의 제한을 연속적으로 부과하는 능력으로 인해 해결 공간의 크기를 감소시키고, 이에 따라 생리학적 성능 또는 표현형이 예측될 수 있는 정밀성을 증진시킨다.

[0225] 이러한 컴퓨터이용 접근방법은, 생물 시스템이 변동가능하고 많은 상이한 방식으로 동일한 결과에 도달할 수 있으므로, 생물학적 현실과 일치한다. 생물 시스템은 모든 생물이 직면해야 하는 근본적 제약에 의해 제한되는 진화 기작을 통해 고안된다. 따라서, 제약에 기초한 모델링 전략은 이러한 일반적인 현실을 내포한다. 추가로, 제약의 구속을 통해 조직망 모델에 추가의 제한을 연속적으로 부과하는 능력으로 인해 용액 공간의 크기를 감소시키고, 이에 따라 생리학적 성능 또는 표현형이 예측될 수 있는 정밀성을 증진시킨다.

[0226] 본원에 개시된 교시 및 지침을 참고하여, 당분야의 숙련가라면 대사 모델링 및 모의를 위한 다양한 컴퓨터 체제를 적용하여 숙주 미생물 유기체에 원하는 화합물의 생합성을 고안하고 실행할 수 있을 것이다. 이러한 대사 모델링 및 모의 방법으로는,예를 들면, 심페니(등록상표) 및 OptKnock로서 상기 예시된 컴퓨터 시스템이 포함된다. 본 발명의 예시를 위해, 몇몇 방법은 모델링 및 모의를 위한 OptKnock 컴퓨터 체제에 관하여 본원에 기재된다. 당분야의 숙련가라면 OptKnock을 사용하는 대사 변경의 식별, 고안 및 실행을 당분야에 공지된 이러한 임의의 다른 대사 모델링 및 모의 컴퓨터 체제에 어떻게 적용하는지를 알 것이다.

[0227] 생화학적 생성물의 생산에 성장을 의무적으로 결부시키는 세포 또는 유기체의 능력은 인실리코 모델을 사용하여 계산된 전형적인 대사 조직망의 생화학적 생산 제한의 맥락에서 예시될 수 있다. 이들 제한은 제한 기질의 섭취 속도를 이들의 실험 측정값에 고정시키고 생화학적 생산의 최대 및 최소 속도를 각각 달성가능한 성장 수준에서 계산함으로써 수득된다. 원하는 생화학물질의 생산은 일반적으로 세포내 자원을 위한 바이오매스 형성과 직접 경쟁한다. 이들 환경하에, 생화학물질 생산의 증진된 속도는 하위 최대 성장 속도를 필수적으로 초래할 것이다. 상기 대사 모델링 및 모의 프로그램, 예컨대 OptKnock에 의해 제안된 넉아웃은 야생형 균주로부터의 대사적 행태에서 변화를 강요하는 허용가능한 해결책 경계를 제한하도록 고안된다. 비록 소정의 균주에 대한 실제 해결책 경계가 기질 섭취 속도의 증가 또는 감소시 확장 또는 수축될 것이지만, 각각의 실험 포인트는 그의 계산된 해결책 경계내에 놓일 것이다. 예컨대 이들과 같은 플롯은 고안된 균주가 그들의 성능 제한에 얼마나 밀접한지를 정확히 예측할 수 있도록 하고, 이는 또한 개선을 위해 얼마나 많은 공간이 이용가능한지를 지시한다.

[0228] OptKnock 수학적 체제는 성장-결부된 생화학물질 생산을 유도하는 유전자 결실을 정확히 찾아내기 위해 본원에 예시된다(실시예 XXX 참조). 이 절차는 세포계가 지배적인 생리화학적 제약의 성공적인 부과를 통해 나타날 수 있는 가능한 표현형의 범위를 좁히는 제약에 기초한 대사 모델링을 기반으로 한다(Price et al., Nat Rev Microbiol, 2: 886-97(2004)). 상기 기재된 바와 같이, 제약에 기초한 모델 및 모의는 당분야에 공지되어 있고, 일반적으로 특정 세포 대상의 최적화를 조직망 화학양론에 적용하여 가능한 플럭스 분포를 제안한다.

[0229] 간단히, 대사물질의 세트 N = {1,..., N} 및 대사 반응의 세트 M = {1,..., M}을 포함하는 정지 상태의 대사 조직망에 대한 총 반응 플럭스로서 정량화된 세포 목적물의 최대화는 하기와 같이 수학적으로 표시된다:

[0230] 최대화 $v_{세포\ 목적물}$

적용 $\sum_{j=1}^{M} S_{ij} v_j = 0, \quad \forall i \in N$

$v_{기질} = v_{기질\_섭취}$ mmol/gDW·시간 $\forall i \in$ {제한 기질(들)}

$v_{atp} \geq v_{atp\_유지}$ mmol/gDW·시간

$v_j \geq 0, \quad \forall j \in$ {비가역성 반응}

[0231] 상기 식에서,

[0232] S_{ij}는 반응 j에서 대사물질 i의 화학양론적 계수이고, v_j는 반응 j의 플럭스이고, $v_{기질_섭취}$는 제한 기질의 추정되거나 측정된 섭취 속도를 나타내고, $v_{atp_유지}$는 성장 연관되지 않은 ATP 유지 요건이다. 벡터 v는 내부 및 외부 플럭스 둘다를 포함한다. 이 연구에서, 세포 목적물은 종종 바이오매스 형성을 위해 필요한 비율로의 생합성 전구체의 소모(drain)로 추정된다(Neidhardt, F.C. et al., 2nd ed. 1996, Washington, D.C.: ASM Press. 2 v.(xx, 2822, lxxvi)). 플럭스는 일반적으로 1 gDW · 시간 당으로 표시되어(건조 중량 g×시간) 바이오매스 형성은 생산된 바이오매스 g/gDW · 시간 또는 1/시간으로 표시된다.

[0233] 유전자 결실, 및 이에 따른 반응 제거의 모델링은 우선 제약에 기초한 접근방법 체제로의 2가지 변수의 혼입을 이용한다(문헌[Burgard et al., Biotechnol Bioeng, 74: 364-375(2001)], 및 [Burgard et al., Biotechnol Prog, 17: 791-797(2001)]). 이들 2가지 변수,

[0234] $$y_j = \begin{cases} \text{반응 플럭스 vj가 활성이면 1} \\ \text{반응 플럭스 vj가 비활성이면 0} \end{cases}, \forall j \in M$$

[0235] 는 반응 j가 활성이면 1의 값을 갖고, 비활성이면 0의 값을 갖는다. 하기 제약,

[0236] $$v_j^{최소} \cdot y_j \le v_j \le v_j^{최대} \cdot y_j, \quad \forall j \in M$$

[0237] 는 변수 y_j가 0인 경우에만 반응 플럭스 v_j가 0으로 설정됨을 보장한다. 다르게는, y_j가 0인 경우, v_j는 하위 $v_j^{최소}$ 내지 상위 $v_j^{최대}$ 경계 사이의 임의의 값을 취하도록 허용된다. 여기서, $v_j^{최소}$ 및 $v_j^{최대}$는 모든 반응 플럭스를 상기 기재된 조직망 제약에 각각 최소화시키고 최대화시킴으로써 식별된다(Mahadevan et al., Metab Eng, 5: 264-76(2003)).

[0238] 최적의 유전자/반응 넉아웃은, 활성 반응 세트(y_j = 1)를 선택하는 2레벨 최적화 문제를 해결함으로써 식별되어, 생성된 조직망을 위한 최적 성장 해결책이 흥미로운 화학물질을 과생산하도록 한다. 개략적으로, 이러한 2레벨 최적화 문제는 도 2에 예시된다. 수학적으로, 이러한 2레벨 최적화 문제는 하기 2레벨 혼합된-정수 최적화 문제로서 표현된다:

$$\underset{y_j}{\text{최대화}} \quad v_{화학물질} \qquad \textbf{(OptKnock)}$$

$$\left(\begin{array}{lll} \underset{v_j}{\text{최대화}} & v_{바이오매스} & \\ \text{적용} & \sum_{j=1}^{M} S_{ij} v_j = 0, & \forall i \in N \\ & v_{기질} = v_{기질\_섭취} & \forall i \in \{\text{제한 기질(들)}\} \\ & v_{atp} \ge v_{atp\_유지} & \\ & v_{바이오매스} \ge v_{바이오매스}^{표적} & \end{array} \right)$$

$$v_j^{최소} \cdot y_j \le v_j \le v_j^{최대} \cdot y_j, \qquad \forall j \in M$$

$$\sum_{j \in M^{정방향}} (1 - y_j) = K$$

[0239] $$y_j \in \{0,1\}, \qquad \forall j \in M$$

[0240] 상기 식에서,

[0241] $v_{화학물질}$은 원하는 표적 생성물, 예를 들면 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA, 또는 다른 생화학적 생성물의 생산이고, K는 허용가능한 넉아웃의 수이다. K를 0으로 설정하면 완전한 조직망의 최대 바이오매스 해결책으로 돌아가는 반면, K를 1로 설정하면 단일 유전자/반응 넉아웃을 식별하여(y_j = 0) 생성된 조직망은 그의 최대 바이오매스 수율에서 제공되는 최대 과생산을 포함함을 주지한다. 최종 제약은 생성된 조직망이 최소의 바이오매스 수율을 충족하도록 보장한다. 문헌[Burgard et al., Biotechnol Bioeng, 84: 647-57(2003)]에 모델 공식 및

해결 절차에 대해 더 자세히 기재되어 있다. 수 백개의 2항 변수를 포함하는 문제는 분에서 시간의 순서로 GAMS(Brooke et al., GAMS Development Corporation(1998))를 통해 평가된 CPLEX 8.0(GAMS: The Solver Manuals. 2003: GAMS 디벨롭먼트 코포레이션(Development Corporation))을 사용하여, IBM RS6000-270 단말기 상에서 환경을 모델링하여 해결된다. OptKnock 체제는 이미 생화학물질 생산을 위한 유망한 유전자 결실 전략을 식별할 수 있고(문헌[Burgard et al., Biotechnol Bioeng, 84(6):647-657(2003)]; 및 [Pharkya et al., Biotechnol Bioeng, 84(7):887-899(2003)]), 대사 및 조절 모델링 체제에 추가의 개선을 자연히 포함할 계통적 체제를 수립한다.

[0242] 상기 기재된 방법은 손상될 한 세트의 대사 반응을 제공할 것이다. 이 세트내의 각각의 반응의 제거 또는 대사 개질은 유기체의 성장 상 동안 의무적 생성물로서 원하는 생성물을 생성할 것이다. 반응은 공지되어 있으므로, 2레벨 OptKnock 문제에 대한 해결책은 또한 이러한 반응 세트내의 각각의 반응을 촉매화하는 1종 이상의 효소를 코딩하는 연관된 유전자 또는 유전자들을 제공할 것이다. 반응 세트 및 각각의 반응에 참여하는 효소를 코딩하는 이들의 상응하는 유전자의 식별은 일반적으로 자동화된 공정이고, 효소 및 코딩 유전자 사이의 관계를 갖는 반응 데이터베이스에 의한 반응의 관계를 통해 달성된다.

[0243] 일단 식별되면, 원하는 생성물의 생산을 달성하기 위해 손상되는 반응 세트는 표적 세포 또는 유기체에서 세트내의 각각의 대사 반응을 코딩하는 적어도 하나의 유전자의 기능적 손상에 의해 실행된다. 반응 세트의 기능적 손상을 달성하기 위한 특히 유용한 수단은 각각의 코딩 유전자의 결실이다. 그러나, 몇몇 경우에, 예를 들면, 돌연변이, 조절 영역, 예컨대 프로모터 또는 조절 인자에 대한 시스 결합 부위의 결실을 비롯한 다른 유전적 생략, 또는 임의의 수의 자리에서의 코딩 서열의 절단에 의해 반응을 손상시키는 것이 유리할 수 있다. 유전자 세트의 전체를 결실하지 않는 후자의 생략은, 예를 들면, 생성물의 결부에 대한 신속한 평가가 요망되거나 유전적 복귀가 별로 일어날 것 같지 않은 경우 유용할 수 있다.

[0244] 추가의 반응 세트의 손상, 및 생합성, 예컨대 원하는 생성물의 성장-결부된 생합성을 초래할 수 있는 대사 개질을 유도하는 상기 기재된 2레벨 OptKnock 문제에 대한 추가의 생산적 해결책을 식별하기 위해, 정수 커트(integer cut)라는 최적화 방법이 실행될 수 있다. 이러한 방법은 각각의 반복시 정수 커트로 지칭되는 추가의 제약을 혼입하여 상기 예시된 OptKnock 문제를 반복적으로 해결함으로써 진행된다. 정수 커트 제약은 생성물 생합성을 성장에 의무적으로 결부시키는 임의의 이전의 반복작업에서 식별된 정확히 동일한 반응 세트를 해결 절차가 선택하는 것을 효과적으로 방지한다. 예를 들면, 이전에 식별된 성장-결부된 대사 개질이 손상을 위해 반응 1, 2, 및 3을 구체화하였다면, 수반되는 제약은 동일한 반응이 후속적인 해결책에서 동시에 고려되는 것을 방지한다. 정수 커트 방법은 당분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[Burgard et al., Biotechnol. Prog. 17:791-797(2001)]에서 찾아볼 수 있다. 대사 모델링 및 모의를 위한 OptKnock 컴퓨터 체제와 조합된 사용에 관하여 본원에 기재된 모든 방법에 있어서, 반복적 컴퓨터 분석시 중복을 감소시키는 정수 커트 방법은 또한 당분야에 공지된 다른 컴퓨터 체제, 예를 들면, 심페니(등록상표)와 함께 적용될 수 있다.

[0245] 본원에 예시된 방법은, 식별된 유전적 변경을 내포하도록 조작된 세포 또는 유기체의 성장에 표적 생화학적 생성물의 생산을 의무적으로 결부시킴을 포함하여, 원하는 생성물을 생합성적으로 생산하는 세포 및 유기체의 구축을 허용한다. 따라서, 본원에 기재된 컴퓨터이용 방법은 OptKnock 또는 심페니(등록상표)로부터 선택된 인실리코 방법에 의해 식별되는 대사 개질의 식별 및 실행을 가능하게 한다. 대사 개질의 세트는, 예를 들면, 1종 이상의 생합성 경로 효소의 첨가 및/또는 1종 이상의 대사 반응의 기능적 손상, 예를 들면, 유전자 결실에 의한 손상을 포함할 수 있다

[0246] 상기 논의된 바와 같이, OptKnock 방법은 장기간의 성장 선택에 처할 경우 그들의 컴퓨터 예측된 최대 성장 표현형으로 진화될 수 있다는 전제하에 개발되었다. 달리 말하면, 이 접근방법은 선택적 압력하에 자가 최적화하는 유기체의 능력에 영향을 준다. OptKnock 체제는 조직망 화학양론에 기초하여 생화학물질 생산 및 세포 성장 사이의 결부를 강화하는 유전자 결실 조합의 빠짐없는 목록을 허용한다. 최적 유전자/반응 넉아웃의 식별은, 생성된 조직망을 위한 최적의 성장 해결책이 흥미로운 생화학물질을 과생산하도록 활성 반응 세트를 선택하는 2레벨 최적화 문제의 해결책을 필요로 한다(Burgard et al., Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003)).

[0247] 에스케리치아 콜라이 대사의 인실리코 화학양론적 모델은 이전에 예시된 바와 같이 대사 경로를 위한 필수 유전자를 식별하기 위해 사용될 수 있고, 예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호 및 미국 특허 제7,127,379호에 기재되어 있다. 본원에 개시된 바와 같이, OptKnock 수학적 체제는 원하는 생성물의 성장-결부된 생산을 유도하는 유전자 결실을 정확히 찾아내기 위해 적용될 수 있다. 추

가로, 2레벨 OptKnock 문제의 해결책은 단지 하나의 결실 세트를 제공한다. 모든 의미있는 해결책, 즉 성장-결부된 생산 형성을 유도하는 넉아웃의 모든 세트을 열거하기 위해, 정수 커트라는 최적화 기법이 실행될 수 있다. 이는 각각의 반복시 정수 커트로 지칭된 추가의 제약을 혼입하여 상기 예시된 OptKnock 문제를 반복적으로 해결함을 수반한다.

[0248] 본원에 제공된 교시 및 지침을 참고하여, 당분야의 숙련가는 효소 반응을 손상시키기 위해 반응에 관여된 1종 이상의 효소의 촉매 활성이 손상되어야 함을 알 것이다. 손상은 다양한 수단, 예를 들면, 코딩 유전자의 결실 또는 1종 이상의 코딩 유전자 서열에서의 유전적 변경의 혼입에 의해 일어날 수 있다. 손상을 위해 표적화된 코딩 유전자는 촉매 활성에 관여된 효소를 코딩하는 1개, 수 개 또는 모든 유전자일 수 있다. 예를 들면, 하나의 효소가 표적화된 촉매 활성에 관여되는 경우, 코딩된 유전자 생성물의 촉매 활성을 감소 또는 파괴하는 유전자 변경에 의해 손상이 초래될 수 있다. 유사하게, 하나의 효소가 다량체성, 예컨대 이종결합성인 경우, 코딩된 유전자 생성물의 하나 또는 모든 서브유닛의 기능을 감소 또는 파괴하는 유전자 변경에 의해 손상이 초래될 수 있다. 활성의 파괴는 활성 착체를 형성하기 위한 1종 이상의 서브유닛의 결합 활성을 손실시키거나 다량체성 착체의 촉매 서브유닛을 파괴하거나, 이들 둘다에 의해 달성될 수 있다. 다량체성 단백질 회합 및 활성의 다른 기능은 또한 본 발명의 대사 반응을 손상시키기 위해 표적화될 수 있다. 이러한 다른 기능은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 추가로, 단일 폴리펩티드 또는 다량체성 착체의 몇몇 또는 모든 기능은, 본 발명의 반응 또는 대사 개질에 관여된 1종 이상의 효소의 촉매 활성을 감소 또는 파괴하기 위해 본 발명에 따라 손상될 수 있다. 유사하게, 본 발명의 반응 또는 대사 개질에 관여된 몇몇 또는 모든 효소는, 표적화된 반응이 감소 또는 제거되는 한 손상될 수 있다.

[0249] 본원에 제공된 교시 및 지침을 참고하여, 당분야의 숙련가라면 효소 반응이 공통의 유전자 및/또는 유사하거나 실질적으로 동일한 활성을 나타내는 그 유전자의 1종 이상의 오솔로그에 의해 코딩되는 반응을 감소 또는 제거함으로써 손상될 수 있음을 알 것이다. 공통의 유전자 및 모든 오솔로그 둘다의 감소는 표적화된 반응의 임의의 촉매 활성을 완전히 없앨 수 있다. 그러나, 공통의 유전자 또는 1종 이상의 오솔로그중 한가지의 손상은 생성물 생합성에 성장을 결부시킴을 촉진하기에 충분한 표적화된 반응의 촉매 활성의 감소를 유도할 수 있다. 다양한 대사 개질을 위한 촉매 활성을 코딩하는 공통의 유전자 뿐만 아니라 이들의 오솔로그가 본원에 예시되어 있다. 당분야의 숙련가라면 성장-결부된 생성물 생산을 달성하기 위해 표적화된 대사반응의 효소를 코딩하는 몇몇 또는 모든 유전자의 손상이 본 발명의 방법에 의해 실행되고 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에 혼입됨을 알 것이다. 아디페이트, 6-ACA 및/또는 HMDA의 생산을 증가시키는 예시적인 손상이 실시예 XXX 및 표 14 내지 16에 기재되어 있다.

[0250] 상기 예시된 방법을 사용하여, 본 발명의 방법은, 예를 들면, 식별된 유전적 변경을 내포하도록 조작된 세포 또는 유기체의 성장에 원하는 생성물의 생산을 결부시킴으로써 원하는 생성물의 생산을 증가시키는 세포 및 유기체의 구축을 허용한다. 본원에 개시된 바와 같이, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 유기체의 성장에 결부시키는 대사 변경이 식별되었다. 식별된 대사 변경을 갖도록 구축된 미생물 유기체 균주는 대사 변경이 없는 경우에 비해 상승된 수준의 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산을 지수 성장 상 동안 생산한다. 이들 균주는 유리하게는 이전에 기재된 부정적인 선택적 압력을 겪지 않고 연속적 발효로 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 상업용 생산을 위해 사용될 수 있다. 본원에 대사 변경, 특별히 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 성장 결부된 생산을 제공하는 1종 이상의 유전자 손상으로서 예시되었지만, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 증가시키는 임의의 유전자 손상이 원할 경우 숙주 미생물 유기체로 도입될 수 있는 것으로 이해된다.

[0251] 따라서, 본 발명의 방법은 인실리코 방법, 예컨대 OptKnock에 의해 식별된 대사 개질의 세트를 제공한다. 대사 개질의 세트는 1종 이상의 대사 반응의 기능적 손상, 예를 들면, 유전자 결실에 의한 손상을 포함할 수 있다. 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산의 경우, 대사 개질은 표 14 내지 16에 열거된 대사 개질의 세트로부터 선택될 수 있다(실시예 XXX 참조).

[0252] 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 안정한 성장-결부된 생산을 갖는 비-천연 미생물 유기체를 생산하는 방법이 또한 제공된다. 이 방법은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 증가시키는, 예를 들면, 지수 성장 동안 생산을 증가시키는 대사 개질의 인실리코 세트를 식별하는 단계; 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 증가시키는 대사 개질 세트를 포함하도록 유전적으로 유기체를 개질시키는 단계, 및 유전적으로 개질된 유기체를 배양하는 단계를 포함한다. 원할 경우, 배양은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산에 필

요한 조건하에 유전적으로 개질된 유기체를 적응 진화시킴을 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은, 본원에 개시된 바와 같이 박테리아, 효모 및 곰팡이 뿐만 아니라, 다양한 다른 세포 및 미생물에 적용가능하다.

[0253] 이와 같이, 본 발명은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 증가된 생산을 부여하는 1종 이상의 유전자 손상을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 한 실시태양에서, 1종 이상의 유전자 손상은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 성장-결부된 생산을 부여하고, 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 안정한 성장-결부된 생산을 부여할 수 있다. 또 다른 실시태양에서,1종 이상의 유전자 손상은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산을 미생물 유기체의 성장에 의무적으로 결부시킬 수 있다. 이러한 1종 이상의 유전자 손상은 개별적인 1종 이상의 코딩된 효소의 활성을 감소시킬 수 있다.

[0254] 비-천연 미생물 유기체는 표 14 내지 16에 열거된 대사 개질에 포함된 1종 이상의 유전자 손상을 가질 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 1종 이상의 유전자 손상은 결실될 수 있다. 이러한 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는, 본원에 개시된 바와 같이, 발효 공정에 적용가능한 박테리아, 효모, 곰팡이, 또는 임의의 다양한 다른 미생물을 포함한다.

[0255] 이와 같이, 본 발명은 1종 이상의 유전자 손상을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 여기서 1종 이상의 유전자 손상은 단백질 또는 효소를 코딩하는 유전자에서 일어나고, 여기서 1종 이상의 유전자 손상은 유기체에서 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 증가된 생산을 부여한다. 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산은 성장-연관되거나 성장-연관되지 않을 수 있다. 특정 실시태양에서, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산은, 본원에 개시된 바와 같이, 유기체의 성장에 의무적으로 결부될 수 있다.

[0256] 본 발명은 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산, 예를 들면, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 성장-결부된 생산을 증가시키는 유전적 변경, 예컨대 유전자 손상을 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 생성물 생산은, 예를 들면, 본원에 개시된 바와 같이, 세포의 대사 경로를 유전적으로 바꿈으로써 미생물의 지수 성장 상에 의무적으로 연결될 수 있다. 유전적 변경은 원하는 생성물의 생산을 증가시키거나 원하는 생성물이 성장 상 동안 의무적인 생성물이도록 만들 수 있다. 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생합성의 증가된 생산 및 상승된 수준을 초래하는 대사 변경 또는 형질전환의 세트는 표 14 내지 16에 예시된다(실시예 XXX 참조). 세트내의 각각의 변경은 기능적으로 손상되어야 하는 필수 대사 반응에 상응한다. 각각의 세트내의 모든 반응의 기능적 손상은 성장 상 동아 조작된 균주에 의해 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산의 생산을 증가시킬 수 있다. 언급된 변경에 상응하는 반응은 표 14 내지 16에서 찾아볼 수 있고(실시예 XXX 참조), 반응을 수행하는 효소 또는 단백질을 코딩하는 유전자 또는 유전자들은 표 14 내지 16에 제시된다.

[0257] 예를 들면, 표 14 내지 16에 예시된 각각의 균주의 경우, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산을 위해 생성될 수 있는 대사 변경은 각각의 열에 제시된다. 이들 변경은 표 14 내지 16에 제시된 반응의 기능적 손상을 포함한다. 이들 각각의 비-천연 변경은 이러한 대사 변경을 포함하지 않는 균주에 비하여 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민 또는 레불린산 생산의 증가된 생산 및 증진된 수율을, 예를 들면, 미생물 유기체의 지수 성장 상 동안, 적절한 배양 조건하에 일으킨다. 적절한 조건은, 예를 들면, 본원에 개시된 조건, 예컨대 특정 탄소 공급원 또는 반응물 이용성 및/또는 적응 진화를 포함한다.

[0258] 본 발명의 다양한 실시태양의 활성에 실질적으로 영향을 주지 않는 개질이 또한 본원에 제공된 본 발명의 정의 내에서 제공되는 것으로 이해된다. 따라서, 하기 실시예는 본 발명을 제한하는 것이 아니고 예시하려는 것이다.

[0259] **실시예 I**

[0260] **역 아디페이트 분해 경로**

[0261] 본 실시예는 역 아디페이트 분해 경로를 통한 예시적인 아디페이트 합성 경로를 설명한다

[0262] 유기체, 예컨대 페니실리엄 크리소제넘은 아디페이트를 자연 분해하는 능력을 갖는다(Thykaer et al., Metab. Eng. 4:151-158.(2002)). 이 기작은 지방산의 산화와 유사하다(도 1 참조). 아디페이트 분해에서 제1 단계는 아디페이트를 CoA로 활성화시키는 ATP-의존성 반응이다. 제2 반응은 탈수소효소에 의해 촉매화되어 아디필-CoA로부터 5-카복시-2-펜테노일-CoA를 형성한다. 퍼옥시좀성 아디페이트 분해 동안, 탈수소효소는 FAD를 포함하는데, 이는 전자를 수용하여 이를 산소에 직접 전달한다. 카탈라아제(catalase) 효소는 산소의 환원에 의해 형성

된 H_2O_2를 소멸시킨다. 미토콘드리아 지방산 산화에서, 탈수소효소로부터의 FAD는 전자 수송 쇄에 적접적으로 전자를 전달한다. 진핵생물, 예컨대 사카로마이세스 세레비지아 및 페니실리엄 크리소제넘중의 다작용성 지방산 산화 단백질은 다음의 수화효소 및 탈수소효소 단계를 수행한다. 최종 단계는 3-옥소아디필 CoA를 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA로 분할시키는 아실 전이효소이다.

[0263] 아디페이트를 생산하기 위한 매우 효과적인 경로는 유사한 효소 반응이 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 아디페이트를 합성하기 위해 이용되도록 미생물을 유전적으로 변경시킴으로써 달성된다(도 2 참조). 이의 성공적인 실행은 적절한 유전자의 발현, 이의 발현의 조정, 및 배양 조건의 변경을 수반하여 높은 아세틸-CoA, 석시닐-CoA, 및/또는 산화환원반응(예를 들면, $NADH/NAD^+$) 비율이 분해에 비해 아디페이트 합성의 방향의 상기 경로를 통해 대사 플럭스를 유도할 것이다. 클로스트리디아에서 부티레이트 형성에 대한 강한 평행(Kanehisa and Goto, Nucl. Acids Res. 28:27-30(2000))은, 아디페이트 합성 경로에서의 각각의 단계가 참여 대사물질의 농도에 의해 지배되는 반응 방향성에 의해 열역학적으로 실현가능하게됨을 지지한다. 아디필-CoA로부터 아디페이트를 형성하는 최종 단계는 합성효소, 포스포트랜스아디필라아제/키나아제, 전이효소, 또는 가수분해효소 기작을 통해 발생될 수 있다.

[0264] 이러한 경로를 사용하는 아디페이트의 최대 이론적 수율을 외부 전자 수용체, 예컨대 산소의 존재 및 부재 둘다하에 계산하였다. 이들 계산으로부터, 경로는 혐기성 조건하에 92%의 몰 수율을 갖고 글루코스를 아디페이트 및 CO_2로 효과적으로 변형시킴을 알 수 있다(표 1). 이러한 경로를 사용하는 아디페이트의 생산은 산소의 섭취를 필요로하지 않는데, 이는 NAD^+가 2개의 수소화효소 단계에서 재생되어 3-하이드록시아디필-CoA 및 아디필-CoA를 형성할 수 있기 때문이다(도 2 참조). 추가로, 최종 전환 단계를 위해 합성효소, 포스포트랜스아디필라아제/키나아제, 또는 전이효소 기작을 가정하여 아디페이트 최대 이론적 수율에서 소비되는 글루코스 1몰당 1.55 몰 이하의 ATP가 형성되므로 경로는 에너지적으로 유리하다. ATP 수율은, 포스포에놀피루베이트 카복시키나아제(PPCK)가 옥살로아세이트 형성을 향한 ATP-생성 방향으로 기능을 나타낸다면, 글루코스 1 몰 당 2.47 몰의 ATP가 생산되어 추가로 개선된다. 이어서 아디필-CoA의 아디페이트로의 형질전환이 가수분해 단계라는 가정하에 최대 ATP 수율 계산을 수행하였다. 이는 최대 아디페이트 생산에서의 최대 ATP 수율을, PPCK가 각각 비가역성이고 가역성인 경우, 소비된 글루코스 1 몰 당 0.85 및 1.77 몰의 ATP로 감소시킨다. 그럼에도 불구하고, 이들 ATP 수율은 세포 성장, 유지 및 생산을 위해 충분하다.

표 1

[0265] 경로중의 최종 단계가 합성효소, 포스포트랜스아디필라아제/키나아제, 또는 전이효소라는 가정하에 역 분해 경로를 사용하는 글루코스 1몰 당 아디페이트의 최대 이론적 수율 및 회합된 ATP 수율

	호기성	혐기성
아디페이트 수율	0.92	0.92
최대 아디페이트 수율에서의 최대 ATP 수율	1.55	1.55
PPCK 가정된 최대 아디페이트 수율에서의 최대 아디페이트 수율	2.47	2.47

[0266] 이러한 경로를 성공적으로 조작함은 충분한 활성 및 특이성을 갖는 효소의 적절한 세트를 식별함과 관련된다. 이는 적절한 효소 세트를 식별하고, 상응하는 유전자를 생산 숙주내로 클로닝하고, 발효 조건을 최적화하고, 발효 후 생성물 형성에 대해 검정함을 수반한다. 아디페이트의 생산을 위해 생산 숙주를 조작하기 위해, 1종 이상의 외인성 DNA 서열은 적합한 숙주 미생물에서 발현된다. 또한, 미생물은 기능적으로 결실된 내인성 유전자를 가질 수 있다. 이들 개질은 재생가능한 공급원료를 사용하여 아디페이트의 생산을 허용한다. 역 아디페이트 분해 경로의 각각의 단계를 생산 숙주에서 촉매화하는 효소를 코딩하는 다수의 생화학적으로 특징규명된 후보 유전자가 하기에 기재된다. 경로를 조작하기 위한 숙주 유기체로서 에스케리치아 콜라이를 사용함이 기재되어 있지만, 본질적으로 임의의 적합한 숙주 유기체가 사용될 수 있다. 에스케리치아 콜라이에 고유한 유전자뿐만 아니라, 적절히 클로닝되고 발현될 경우 적절한 형질전환을 촉매화하기 위해 적용될 수 있는 다른 유기체중의 유전자가 구체적으로 열거된다.

[0267] 도 2를 참고하여, 단계 1은 석시닐 CoA:아세틸 CoA 아실 전이효소(β-케토티올라아제)를 포함한다. 경로중 제1단계는 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA를 3-옥소아디필-CoA에 결합시킨다. 슈도모나스 균주 B13중 *pcaF*(Kaschabek et al., J. Bacteriol. 184:207-215(2002)), 슈도모나스 푸티다 U중의 *phaD*(Olivera et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 95:6419-6424(1998)), 슈도모나스 플루오레센스 ST중의 *paaE*(Di Gennaro et al., Arch. Microbiol. 188:117-125(2007)), 및 에스케리치아 콜라이로부터의 *paaJ*(Nogales et al., Microbiol. 153:357-365(2007))에 의해 코딩되는 유전자 생성물은 3-옥소아디필-CoA의 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로의 전환을 방향족 화합물, 예컨대 페닐아세테이트 또는 스타이렌의 분해 동안 촉매화한다. β-케토티올라아제 효소는 가역성 형질전환을 촉매화하므로, 이들 효소는 도 2에 제시된 아디페이트 합성에서 제1 단계를 위해 이용될 수 있다. 예를 들면, 랄스토니아 유트로파로부터의 케토티올라아제 *phaA*는 아세틸-CoA의 2개 분자를 결합시켜 아세토아세틸-CoA를 형성한다(Sato et al., J. Biosci. Bioengineer. 103:38-44(2007)). 유사하게, β-케토 티올라아제(*bktB*)는 아세틸-CoA 및 프로피오닐-CoA의 축합을 촉매화하여 β-케토발레릴-CoA(Slater et al., J. Bacteriol. 180: 1979-1987(1998))를 랄스토니아 유트로파에서 형성하는 것으로 보고되었다. 추가의 후보는 부르크홀데리아 암비파리아 AMMD에서 발견된다. 상기 언급된 유전자 생성물을 위한 단백질 서열은 당분야에 공지되어 있고, 공용 데이터베이스, 예컨대 GenBank에서 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 평가될 수 있다:

[0268]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
paaJ	16129358	NP_415915.1	에스케리치아 콜라이
pcaF	17736947	AAL02407	슈도모나스 내크무쉬(B13)
phaD	3253200	AAC24332.1	슈도모나스 푸티다
paaE	106636097	ABF82237.1	슈도모나스 플루오레센스
Bamb_0447	115350501	YP_772340	부르크홀데리아 암비파리아 AMMD

[0269] 이들 예시적인 서열은 서열 유사성 조사(예를 들면, BLASTp)를 통해 GenBank 또는 다른 데이터베이스에서 상동 단백질을 식별하기 위해 사용될 수 있다. 생성된 상동 단백질 및 이들의 상응하는 유전자 서열은 에스케리치아 콜라이 또는 다른 적합한 숙주 미생물로의 형질전환을 위한 추가의 외인성 DNA 서열을 제공하여 생산 숙주를 생성한다.

[0270] 예를 들면, 에스케리치아 콜라이 K12로부터의 *paaJ*의 오솔로그는 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

[0271]

유전자 명칭	수납 번호	유기체
152970031	YP_001335140.1	클레브시엘라 뉴모니아
157371321	YP_001479310.1	세라티아 프로테아마큘란스
3253200	AAC24332.1	슈도모나스 푸티다

[0272] 슈도모나스 내크무시로부터의 *pcaF*의 오솔로그 예는 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

[0273]

유전자 명칭	수납 번호	유기체
4530443	AAD22035.1	스트렙토마이세스 종 2065
24982839	AAN67000.1	슈도모나스 푸티다
115589162	ABJ15177.1	슈도모나스 아에루기노사

[0274] 케토티올라아제 단계에 대한 추가의 천연 후보 유전자는 2개의 아세틸-CoA 분자의 가역적 축합을 촉매화할 수 있는 *atoB*(Sato et al., J. Biosci. Bioengineer. 103:38-44(2007)), 및 그의 상동체 *yqeF*를 포함한다. 비-천연 유전자 후보는 랄스토니아 유트로파로부터의 *phaA*(Sato et al., supra, 2007) 및 *bktB*(Slater et al., J. Bacteriol. 180:1979-1987(1998)), 및 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 2종의 케토티올라아제, *thiA* 및 *thiB*(Winzer et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:531-541(2000))를 포함한다. 각각의 이들 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
atoB	16130161	NP_416728.1	에스케리치아 콜라이
yqeF	90111494	NP_417321.2	에스케리치아 콜라이
phaA	113867452	YP_725941	랄스토니아 유트로파
bktB	3046397	AAC38322.1	랄스토니아 유트로파
thiA	15896127	NP_349476.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
thiB	15004782	NP_149242.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴

[0275]

[0276] 상기 예시적인 경로에서 에스케리치아 콜라이중의 지방산 분해 경로에 티올라아제-코딩 유전자 *fadA* 및 *fadB*를 사용하는 것은 덜 바람직하다. 이들 유전자는 다중 활성을 위해 코딩하는 착체를 형성하고, 이의 대부분은 상기 경로에서 요구되지 않는다.

[0277] 도 2를 참고하여, 단계 2는 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소를 포함한다. 경로중 제2 단계는 3-옥소아디필-CoA의 3-하이드록시아디필-CoA로의 환원을 포함한다. 슈도모나스 푸티다 U중의 *phaC*(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:6419-6424(1998)) 및 슈도모나스 플루오레센스 ST중의 *paaC*(Di Gennaro et al., Arch. Microbiol. 188:117-125(2007))에 의해 코딩된 유전자 생성물은 역 반응, 즉 3-하이드록시 아디필-CoA를 산화시켜 3-옥소아디필-CoA를 형성하는 반응을 페닐아세테이트 또는 스타이렌의 이화작용 동안 촉매화한다. 이러한 탈수소효소에 의해 촉매화된 반응은 가역성이고, 따라서 이들 유전자는 도 2에 도시된 바와 같은 아디페이트 합성의 제2 단계를 수행하는 후보를 나타낸다. 유사한 형질전환이 또한 클로스트리디엄 아세토부틸리컴에서 *hbd*의 유전자 생성물에 의해 수행된다(문헌[Atsumi et al., Metab. Eng.(epub Sep. 14, 2007)]; [Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015-3024(1996)]). 이 효소는 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로 전환시킨다. 최근에, 페닐아세테이트 분해 오페론에서 *paaH*의 다른 유전자로의 에스케리치아 콜라이에서의 근접성(Nogales et al.,. Microbiol. 153:357-365(2007)) 및 *paaH* 돌연변이체가 페닐아세테이트 상에서 성장될 수 없다는 사실(Ismail et al., Eur. J. Biochem. 270:3047-3054(2003))을 참고하여, 에스케리치아 콜라이 *paaH* 유전자가 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소를 코딩하는 것으로 예상된다. 각각의 이들 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
paaH	16129356	NP_415913.1	에스케리치아 콜라이
phaC	26990000	NP_745425.1	슈도모나스 푸티다
paaC	106636095	ABF82235.1	슈도모나스 플루오레센스
hbd	15895965	NP_349314.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴

[0278]

[0279] 도 2를 참고하여, 단계 3은 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제를 포함한다. 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *crt*의 유전자 생성물은 3-하이드록시부티릴-CoA의 크로토닐-CoA로의 탈수를 촉매화한다(도 2 참조)(Atsumi et al., supra, 2007; Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015-3024(1996)). 이러한 유전자의 상동체는 도 2에 예시된 아디페이트 합성 경로의 제3 단계를 실행하는 강한 후보이다. 또한, 에노일-CoA 화합물중 이중 결합의 하이드록실화를 촉매화하는 것으로 공지된 유전자는 이러한 효소 형질전환의 가역성이 제공되는 추가의 후보를 나타낸다. 예를 들면, 슈도모나스 푸티다의 에노일-CoA 수화효소, *phaA* 및 *phaB*는 페닐아세테이트 이화작용 동안 이중 결합의 하이드록실화를 수행하는 것으로 믿겨지고(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:6419-6424(1998)), 따라서 에스케리치아 콜라이로 혼입하기 위한 추가의 후보를 나타낸다. 이들 유전자의 결실은 슈도모나스 푸티다에서 페닐아세테이트 분해를 배제한다. 슈도모나스 플루오레센스로부터의 *paaA* 및 *paaB*는 유사 형질전환을 촉매화한다(Olivera et al., supra, 1998). 최근에, 다수의 에스케리치아 콜라이 유전자가 *maoC*(Park and Lee, J. Bacteriol. 185:5391-5397(2003)), *paaF*(문헌[Ismail et al., Eur. J. Biochem. 270:3047-3054(2003)]; [Park and Lee, Biotechnol. Bioeng. 86:681-686(2004)]; 및 [Park and Lee, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116:335-346(2004)]), 및 *paaG*(문헌[Ismail et al., supra, 2003]; [Park and Lee, supra, 2004]; 및 [Park and Lee, supra, 2004])를 포함하는 에노일-CoA 수화효소 작용성을 나타내는 것으로 보여졌다. 각각의 이들 예시적인 유전자 생성물의 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
maoC	16129348	NP_415905.1	에스케리치아 콜라이
paaF	16129354	NP_415911.1	에스케리치아 콜라이
paaG	16129355	NP_415912.1	에스케리치아 콜라이
cr	15895969	NP_349318.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
paaA	26990002	NP_745427.1	슈도모나스 푸티다
paaB	26990001	NP_745426.1	슈도모나스 푸티다
phaA	106636093	ABF82233.1	슈도모나스 플루오레센스
phaB	106636094	ABF82234.1	슈도모나스 플루오레센스

[0280]

[0281] 다르게는, 베타-산화 유전자는 아디페이트 합성에서 처음 세 개 단계에 대한 후보이다. 제안된 아디페이트 합성 경로에 대한 후보 유전자는 또한 에스케리치아 콜라이의 천연 지방산 산화 유전자 및 다른 유기체중의 이들의 상동체를 포함한다. 에스케리치아 콜라이 유전자 *fadA* 및 *fadB*는 케토아실-CoA 티올라아제, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 및 에노일-CoA 수화효소 활성을 나타내는 다중효소 착체를 코딩한다(문헌[Yang et al., Biochem. 30:6788-6795(1991)]; [Yang et al., J. Biol. Chem. 265:10424-10429(1990)]; [[Yang et al., J. Biol. Chem. 266: 16255(1991)]; 및 [Nakahigashi and Inokuchi, Nucl. Acids Res. 18: 4937(1990)]). 이들 활성은 도 2에 도시된 처음 세 개의 형질전환에 기계적으로 유사하다. *fadI* 및 *fadJ* 유전자는 유사한 기능을 코딩하고, 천연적으로 단지 혐기성으로 발현된다(Campbell et al., Mol. Microbiol. 47:793-805(2003)). 이들 유전자 생성물은 천연적으로 작동하여, 도 2에 제안된 바와 같이 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA를 5-카복시-2-펜테노일-CoA로 전환시키기 보다는 단쇄, 중쇄 및 장쇄 지방-아실-CoA 화합물을 아세틸-CoA로 분해한다. 그러나, 케토아실-CoA 티올라아제, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 및 에노일-CoA 수화효소가 가역성 형질전환을 촉매화할 수 있음이 공지되어 있다. 게다가, 방향 진화 및 관련된 접근방법을 적용하여 에스케리치아 콜라이의 고유 베타-산화 기계의 기질 특이성을 조정한다. 이와 같이 이들 효소 또는 이의 상동체는 아디페이트 생산에 적용될 수 있다. 고유 유전자가 작동하여 아디페이트 또는 그의 전구체를 생체내에서 분해한다면, 적절한 유전적 개질이 이루어져서 이들 기능을 약화 또는 제거한다. 그러나, 네가티브 조절자, *fadR*를 넉아웃시킴으로써 *fadB*를 활성화하고, 랄스토니아 유트로파로부터의 비-천연 키토티올라아제, *phA*를 동시발현시킴을 포함하는, 에스케리치아 콜라이에서 폴리[(R)-3-하이드록시부티레이트]를 생산하는 방법이 기재되었므로 이는 필수적이지 않을 수 있다(Sato et al., J. Biosci. Bioeng. 103:38-44(2007)). 이러한 작업은 명백히 베타-산화 효소, 특히 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소 및 에노일-CoA 수화효소 활성 둘다를 코딩하는 *fadB*의 유전자 생성물이 아세틸-CoA 전구체로부터 장쇄 분자를 생산하는 경로의 일부로서 기능할 수 있음을 분명히 입증하였다. 각각의 이들 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
fadA	49176430	YP_026272.1	에스케리치아 콜라이
fadB	16131692	NP_418288.1	에스케리치아 콜라이
fadI	16130275	NP_416844.1	에스케리치아 콜라이
fadJ	16130274	NP_416843.1	에스케리치아 콜라이
fadR	16129150	NP_415705.1	에스케리치아 콜라이

[0282]

[0283] 도 2를 참고하여, 단계 4는 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소를 포함한다. 케토티올라아제, 탈수소효소, 및 에노일-CoA 수화효소 단계는 일반적으로 가역성인 반면, 에노일-CoA 환원효소 단계는 생리학적 조건하에 항상 산화적이고 비가역적이다(Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338(2005)). *FadE*는 에스케리치아 콜라이에서 유사한 비가역성 형질전환을 촉매화한다(Campbell and Cronan, J. Bacteriol. 184:3759-3764(2002)). 경로는, 예컨대 단지 아실-CoA를 2-에노일-CoA 화합물로 산화시킬 *FadE*가 아닌, 2-에노일-CoA 중간체를 환원시킬 수 있는 효소를 필요로 한다. 게다가, 에스케리치아 콜라이가 천연적으로 에노일-CoA 환원을 위한 효소를 소유하는 것으로 제안되었지만(문헌[Mizugaki et al., J. Biochem. 92:1649-1654(1982)]; 및 [Nishimaki et al., J. Biochem. 95:1315-1321(1984)]), 이러한 기능을 갖는 어떠한 에스케리치아 콜라이 유전자도 생화학적으로 특징규명되지 않았다.

[0284] 에노일-CoA 환원효소 단계에 대한 한 후보는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *bcd*의 유전자 생성물이고(Atsumi et al., supra, 2007; Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015-3024(1996)), 이는 크로토닐-CoA의

부티릴-CoA로의 환원을 천연적으로 촉매화하고, 이 반응은 아디페이트 합성 경로에서 5-카복시-2-펜테노일-CoA의 아디필-CoA로의 원하는 환원과 기작이 유사하다. 이러한 효소의 활성은 클로스트리디엄 아세토부틸리컴 *etfAB* 유전자의 발현과 함께 *bcd*를 발현시킴으로써 증진될 수 있고, 이는 전자 전달 플라보단백질을 코딩한다. 에노일-CoA 환원효소 단계에 대한 추가의 후보는 유글레나 그라실리스로부터의 미토콘드리아 에노일-CoA 환원효소이다(Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338(2005)). 미토콘드리아 표적화 리더 서열의 제거 후 상기 서열로부터 유도된 구축물은 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되어 활성 효소를 생성한다(Hoffmeister et al., supra, 2005). 진핵생물 유전자, 특히 원핵생물 유기체에서 유전자 생성물을 특정 세포내 구획으로 표적화할 수 있는 리더 서열을 갖는 유전자를 발현하는 이러한 접근방법은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 원핵생물 트레포네마 덴티콜라로부터의 이러한 유전자의 근접한 상동체, TDE0597은 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 발현되는 제3 에노일-CoA 환원효소를 나타낸다(Tucci and Martin, FEBS Lett. 581: 1561-1566(2007)). 각각의 이들 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
bcd	15895968	NP_349317.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
etfA	15895966	NP_349315.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
etfB	15895967	NP_349316.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
TER	62287512	Q5EU90.1	유글레나 그라실리스
TDE0597	42526113	NP_971211.1	트레포네마 덴티콜라

[0285]

[0286] 도 2를 참고하여, 단계 5는 아디필-CoA 합성효소(또한 아디페이트-CoA 리가아제로 지칭됨), 포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제, 아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소, 또는 아디필-CoA 가수분해효소를 포함한다. 에너지적 관점에서, 아디페이트 합성 경로에서 최종 단계는 아디필-CoA의 티오에스테르 결합에 저장된 ATP 등가물을 전환시킬 수 있는 효소 또는 효소 쌍에 의해 촉매화되는 것이 바람직하다. 에스케리치아 콜라이, 또는 이의 상동체의 *sucC* 및 *sucD* 유전자의 생성물은 도 2에 도시된 최종 형질전환을 잠재적으로 촉매화할 수 있고, 이들은 아디필-CoA 상에 활성을 나타낸다. *sucCD* 유전자는 하나의 ATP의 소비와 동시에 석시네이트로부터 석시닐-CoA의 형성을 촉매화하는 석시닐-CoA 합성효소 착체를 천연적으로 형성하고, 이 반응은 생체내에서 가역성이다(Buck et al., Biochem. 24:6245-6252(1985)). 석시네이트 및 아디페이트 사이의 구조적 유사성이 제공되므로, 즉 둘다 선형 디카복실산이므로, 아디필-CoA에 대한 *sucCD* 효소의 일정한 활성을 예상하는 것은 당연하다. 아디필-CoA 리가아제 활성을 나타내는 효소는, 도 1에 도시된 바와 같이 반대의 생리학적 방향으로 작동할 경우 AMP 및 PPi를 보조 인자로 사용하여, 아디필-CoA로부터의 아디페이트의 ATP-발생 생산을 동등하게 수행할 수 있다. 예시적인 CoA-리가아제는 래트의 디카복실레이트-CoA 리가아제(이에 대한 서열은 아직 특징규명되지 않았음)(Vamecq et al., Biochem. J. 230:683-693(1985)), 페니실리엄 크리소제넘으로부터의 2개의 특징규명된 페닐아세테이트-CoA 리가아제(Lamas-Maceiras et al., Biochem. J. 395, 147-155(2005); Wang et al., Biochem. Biophy. Res. Commun. 360:453-458(2007)), 슈도모나스 푸티다로부터의 페닐아세테이트-CoA 리가아제(Martinez-Bianco et al., J. Biol. Chem. 265:7084-7090(1990)), 및 바실러스 서브틸리스(*Bacilis subtilis*)로부터의 6-카복시헥사노에이트-CoA 리가아제(Bower et al., J. Bacteriol. 178:4122-4130(1996))가 포함된다. 각각의 이들 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
sucC	16128703	NP_415256.1	에스케리치아 콜라이
sucD	1786949	AAC73823.1	에스케리치아 콜라이

[0287]

[0288] 포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제를 사용하는 또 다른 선택사항은, 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *buk1*, *buk2*, 및 *ptb*의 유전자 생성물(Walter et al., Genes 134:107-111(1993); Huang et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:33-38(2000)), 또는 이의 상동체에 의해 촉매화된다. *ptb* 유전자는 부티릴-CoA를 부티릴-포스페이트로 전환시킬 수 있는 효소를 코딩하고, 이후 부티릴-포스페이트는 ATP의 동시적인 발생과 함께 *buk* 유전자 생성물을 경유해 부티레이트로 전환된다. 유사한 형질전환 세트, 즉 아디필-CoA의 아디필-포스페이트로의 전환(이후 아디필-포스페이트는 아디페이트로 전환됨)은, *buk1*, *buk2*, 및 *ptb* 유전자 생성물에 의해 수행될 수 있다. 각각의 이들 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는

GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ptb	15896327	NP_349676	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
buk1	15896326	NP_349675	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
buk2	20137415	Q97II1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴

[0289]

[0290] 다르게는, 아디필-CoA로부터 아세테이트로의 CoA 기를 전달할 수 있는 아세틸전이효소가 적용될 수 있다. 유사한 형질전환은 클로스트리디엄 클루이베리의 *cat1*, *cat2*, 및 *cat3*의 유전자 생성물에 의해 촉매화되고, 이는 석시닐-CoA, 4-하이드록시부티릴-CoA, 및 부티릴-CoA 아세틸전이효소 활성을 각각 나타내는 것으로 제시되었다(Sohling and Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880(1996); Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 105:2128-2133(2008)). 각각의 이들 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
cat1	729048	P38946.1	클로스트리디엄 클루이베리
cat2	172046066	P38942.2	클로스트리디엄 클루이베리
cat3	146349050	EDK35586.1	클로스트리디엄 클루이베리

[0291]

[0292] 최종적으로, 에너지적 견지로부터 바람직하지 않지만, 아디필-CoA의 아디페이트로의 전환은 아실-CoA 가수분해효소 또는 동등하게 티오에스테라아제(thioesterase)에 의해 수행될 수 있다. 상위 에스케리치아 콜라이 유전자 후보는 *tesB*(Naggert et al., J. Biol. Chem. 266:11044-11050(1991))이고, 이는 아디필-CoA에 대해 활성을 갖는 디카복실산 아세틸전이효소인 인간 *acot8*과 높은 유사성을 나타낸다(Westin et al., J. Biol. Chem. 280:38125-38132(2005)). 이 활성은 또한 래트 간에서 특징규명되었다(Deana, Biochem. Int. 26:767-773(1992)). 각각의 이들 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
tesB	16128437	NP_414986	에스케리치아 콜라이
acot8	3191970	CAA15502	호모 사피엔스
acot8	51036669	NP_570112	래터스 노르베기커스

[0293]

[0294] 다른 고유의 후보 유전자로는 *tesA*(Bonner and Bloch, J. Biol. Chem. 247:3123-3133(1972)), *ybgC*(Kuznetsova et al., FEMS Microbiol. Rev. 29:263-279(2005); Zhuang et al., FEBS Lett. 516:161-163(2002)), *paaI*(Song et al., J. Biol. Chem. 281:11028-11038(2006)), 및 *ybdB*(Leduc et al., J. Bacteriol. 189:7112-7126(2007))가 포함된다. 이들 각각의 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
tesA	16128478	NP_415027	에스케리치아 콜라이
ybgC	16128711	NP_415264	에스케리치아 콜라이
paaI	16129357	NP_415914	에스케리치아 콜라이
ybdB	16128580	NP_415129	에스케리치아 콜라이

[0295]

[0296] 상기 기재내용은 역 아디페이트 분해 경로에 의한 예시적인 아디페이트 합성 경로를 제공한다.

[0297] **실시예 II**

[0298] **역 분해 경로를 갖는 아디페이트 생산 미생물 유기체의 제조**

[0299] 본 실시예는 역 분해 경로를 사용하여 아디페이트를 생산할 수 있는 미생물 유기체의 생성을 설명한다.

[0300] 에스케리치아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여 도 2에 도시된 아디페이트 역 분해 경로를 조작한다. 에스케리치아 콜라이는 아디페이트를 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위한 양호한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산 및 석신산과 같은 다양한 생성물

을 혐기성 또는 미세호기성 조건하에 효과적으로 생산할 수 있다.

[0301] 아디페이트를 생산하도록 조작된 에스케리치아 콜라이 균주를 생성하기 위해, 역 분해 경로에 이용되는 효소를 코딩하는 핵산을 공지의 분자 생물학 기법을 사용하여 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨다(예를 들면, 문헌 [Sambrook, supra, 2001]; [Ausubel supra, 1999] 참조). 특히, 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 및 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제 활성을 각각 코딩하는 *paaJ*(NP_415915.1), *paaH*(NP_415913.1), 및 *maoC*(NP_415905.1) 유전자를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스(Expressys))내로 PA1/lacO 프로모터하에 코딩한다. 또한, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소 및 아디필-CoA 합성효소 활성을 각각 코딩하는 *bcd*(NP_349317.1), *etfAB*(349315.1 및 349316.1), 및 *sucCD*(NP_415256.1 및 AAC73823.1) 유전자를 pZA33 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 플라스미드의 두 세트를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655내로 형질전환시켜 역 분해 경로를 통한 아디페이트 합성에 필요한 단백질 및 효소를 발현한다.

[0302] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차에 따라서 글루코스-포함 배지에서 배양한다(예를 들면, 문헌[Sambrook et al., supra, 2001] 참조). 역 분해 경로 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯(Northern blot), mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅(immunoblotting) 등을 포함하는, 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성을 개별 활성에 특이적인 검정을 사용하여 확인한다. 아디페이트를 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS: gas chromatography-mass spectrometry) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS: liquid chromatography-mass spectrometry)에 의해 확인한다.

[0303] 작용성 아디페이트 합성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0304] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 아디페이트의 더 효율적인 생산으로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2 레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 종합적으로 아디페이트의 더 나은 생산을 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA 중간체 또는 아디페이트 생성물의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 아디페이트 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0305] 아디페이트의 대규모 생산을 위해, 상기 역 분해 경로-포함 유기체를, 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지하고, 예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다. 제한된 통기를 위해 격벽에 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 대략 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, 예를 들면, HPLC 칼럼의 아미넥스(Aminex: 등록상표) 시리즈(예를 들면, HPX-87 시리즈)(캘리포니아주 헤르큘레스 소재의 바이오래드(BioRad)), 글루코스 및 알코올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(매릴랜드주 컬럼비아 소재의 시마추(Shimadzu))에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0306] 본 실시예는 역 분해 경로를 사용하는 아디페이트 생산 미생물 유기체의 제조를 설명한다.

[0307] **실시예 III**

[0308] **3-옥소아디페이트를 통한 아디페이트 합성**

[0309] 본 실시예는 3-옥소아디페이트를 통한 예시적인 아디페이트 합성 경로를 설명한다.

[0310] 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA를 아디페이트 형성을 위한 전구체로서 사용하고 대사 중간체, 3-옥소아디페이트를 통과하는 실시예 I 및 II에 기재된 추가의 경로가 도 3에 도시된다. 이러한 경로에서 초기 2가지 형질전환은 역방향으로 작동하는 방향족화합물 및 클로로방향족 화합물에 대한 분해 경로의 2가지 종결 단계이다(Kaschabek et al., J. Bacteriol. 184:207-215(2002); Nogales et al., Microbiol. 153:357-365(2007); Ismail et al., Eur. J. Biochem. 270:3047-3054(2003)). 구체적으로, 제1 단계는 석시닐- 및 아세틸-CoA의 축합에 의해 3-옥소아디필 CoA를 형성한다. 제2 단계는 3-옥소아디페이트를 형성하고, 슈도모나스 종 균주 B13에서 가역성인 것으로 보고되었다(Kaschabek et al., J. Bacteriol. 184:207-215(2002)).

[0311] 후속 단계는 3-옥소아디페이트의 3-하이드록시아디페이트로의 환원(케토 기의 하이드록실 기로의 전환), 3-하이드록시아디페이트의 탈수에 의한 헥사-2-엔디오에이트의 수득, 및 헥사-2-엔디오에이트의 환원에 의한 아디페이트의 형성을 포함한다. 경로의 이들 단계는 환원적 TCA 사이클을 통한 옥살로아세테이트의 석시네이트로의 전환과 유사하다(도 4 참조). 이는 경로중의 단계가 적절한 대사물질 농도의 존재에 열역학적으로 유리함을 지지한다. 최종 환원단계를 생화학적으로, 또는 화학적 촉매를 이용함으로써 수행하여 헥사-2-엔디오에이트를 아디페이트로 전환시킬 수 있다. 화학적 수소화는 문헌에 기재된 바와 같이 활성화된 탄소 상의 Pt 촉매를 이용하여 수행될 수 있다(Niu et al., Biotechnol. Prog. 18:201-211(2002)).

[0312] 이러한 경로를 사용한 아디페이트의 최대 이론적 수율은 소비된 글루코스 1 몰 당 0.92 몰이고, 산소는 이들 수율을 달성하기 위해 필요하지 않다(표 2 참조). 관련된 에너지는 역 아디페이트 경로의 에너지와 동일하다. 이론적으로, 이 경로를 통해 이용된 글루코스 1 몰 당 1.55 몰 이하의 ATP 형성이 관찰된다. 포스포에놀피루베이트 키나아제(PPCK)가 ATP 생성 방향으로 작동하는 것으로 가정될 경우 ATP 수율은 대략 2.47 몰로 개선된다. 흥미롭게도, 생성물 수율은, 화학적 수소화가 최종 단계를 위해 사용되고 촉매의 100% 효능이 가정될 경우, 글루코스 1 몰 당 1 몰의 아디페이트로 추가로 증가될 수 있다. 이러한 시나리오에서, PPCK의 역 작용성을 가정하지 않고 1.95 몰 이하의 ATP가 이론적으로 형성된다.

표 2

[0313] 3-옥소아디페이트 경로를 사용하여 글루코스 1 몰 당의 아디페이트의 최대 이론적 수율 및 관련된 ATP 수율

	최종 단계 효소		최종 단계 화학적 수소화	
	호기성	혐기성	호기성	혐기성
아디페이트 수율	0.92	0.92	1.00	1.00
최대 아디페이트 수율에서의 최대 ATP 수율	1.55	1.55	1.95	1.95

[0314] 이러한 경로를 성공적으로 조작함은, 충분한 활성 및 특이성을 갖고 효소의 적절한 세트를 식별함을 포함한다. 이는 효소의 적절한 세트의 식별, 이의 상응하는 유전자의 생산 숙주로의 클로닝, 발효 조건의 최적화, 및 발효 후 생성물 형성의 검정을 수반한다. 아디페이트의 생산을 위한 생산 숙주를 조작하기 위해, 1종 이상의 외인성 DNA 서열을 숙주 미생물에서 발현시킬 수 있다. 또한, 숙주 미생물은 기능적으로 결실된 내인성 유전자를 가질 수 있다. 이러한 개질은 재생가능한 공급원료를 사용하여 아디페이트를 생산할 수 있도록 한다.아디페이트 합성을 위한 3-옥소아디페이트 경로의 각각의 단계를 촉매화하는 효소를 코딩할 수 있는 생화학적으로 특징규명된 다수의 후보 유전자가 이후 기재된다. 이러한 방법이 에스케리치아 콜라이에 대해 기재되지만, 당분야의 숙련가라면 임의의 다른 적합한 숙주 유기체에 이들 교시내용을 적용할 수 있다. 구체적으로, 에스케리치아 콜라이에 고유적인 유전자 뿐만 아니라 적절히 클로닝되고 발현될 경우 적절한 형질전환을 촉매화하기 위해 적용될 수 있는 다른 유기체중의 유전자가 이후 열거된다.

[0315] 도 3을 참고하여, 단계 1은 석시닐 CoA:아세틸 CoA 아실 전이효소(β-케토티올라아제)를 포함한다. 이러한 효소를 위한 유전자 후보는 상기 열거된다(도 2, 단계 1).

[0316] 도 3을 참고하여, 단계 2는 3-옥소아디필-CoA 전이효소를 포함한다. 이러한 단계에서, 3-옥소아디페이트는 3-옥소아디필-CoA로부터 석시네이트로 CoA 기를 전달함으로써 형성된다. 이러한 활성은 슈도모나스에서 *pcaI* 및 *pcaJ* 에 의해 코딩되는 2-유닛 효소로 보고되었다(Kaschabek et al., J. Bacteriol. 184:207-215(2002)). 이 효소는 가역성 형질전환을 촉매화한다. 이러한 착체의 서브유닛 A에 대한 예시적인 유전자 생성물의 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pcaI	24985644	AAN69545.1	슈도모나스 푸티다
pcaI	50084858	YP_046368.1	아시네토박터 종 ADP1
pcaI	21224997	NP_630776.1	스트렙토마이세스 코엘리컬러

[0317]

[0318] 이러한 착체의 서브유닛 B에 대한 예시적인 유전자 생성물의 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pcaJ	26990657	NP_746082.1	슈도모나스 푸티다
pcaJ	21224996	NP_630775.1	스트렙토마이세스 코엘리컬러
pcaJ	141776	AAC37147.1	아시네토박터 종 ADP1

[0319]

[0320] 도 3을 참고하여, 단계 3은 3-옥소아디페이트 환원효소를 포함한다. 에스케리치아 콜라이는 수 개의 후보 알코올 탈수소효소를 갖고; 유사한 기능을 갖는 2종은 말레이트 탈수소효소(*mdh*) 및 락테이트 탈수소효소(*ldhA*)이다. 이들 두 효소는 에스케리치아 콜라이에서 광범위한 기질 특이성을 갖는 것으로 보이지 않지만, 랄스토니아 유트로파로부터의 락테이트 탈수소효소는 다양한 쇄 길이의 기질, 예컨대 락테이트, 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소글루타레이트 상에서 높은 활성을 나타내는 것으로 제시되었다(Steinbuchel and Schlegel, Eur. J. Biochem. 130:329-334(1983)). 이 단계를 위한 추가의 비-고유 효소 후보는 인간 심장으로부터의 미토콘드리아 3-하이드록시 부티레이트 탈수소효소(*bdh*)이고, 이는 클로닝되고 특징규명되었다(Marks et al., J. Biol. Chem. 267:15459-15463(1992)). 이 효소는 3-하이드록시 산에서 작동하는 탈수소효소라는 점에서 특히 흥미롭다. 탈수소효소가 전형적으로 가역성이므로, 이러한 유전자 생성물, 또는 이의 상동체는 3-옥소산, 예를 들면, 3-옥소아디페이트를 상응하는 3-하이드록시산, 예를 들면, 3-하이드록시아디페이트로 환원시킬 수 있을 것으로 기대된다. 각각의 이들 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
mdh	1789632	AAC76268.1	에스케리치아 콜라이
ldhA	16129341	NP_415898.1	에스케리치아 콜라이
ldh	113866693	YP_725182.1	랄스토니아 유트로파
bdh	177198	AAA58352.1	호모 사피엔스

[0321]

[0322] 도 3을 참고하여, 단계 4는 3-하이드록시 아디페이트 데하이드라타아제를 포함한다. 이러한 반응에서, 3-하이드록시아디페이트는 헥사-2-엔디오에이트로 탈수된다. 이러한 효소 형질전환에 대한 직접적 증거가 식별되지 않았지만, 대부분의 데하이드라타아제는 물의 α,β-제거를 촉매화한다. 이는 전자 유인 카보닐, 카복실레이트, 또는 CoA-티올 에스테르 기에 의한 α-수소의 활성화, 및 β-위치로부터의 하이드록실 기의 제거를 포함한다(Martins et al., Proc. Natl. Acad .Sci USA 101:15645-15649(2004); Buckel and Golding,. FEMS Microbiol. Rev. 22:523-541(1998)). 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
acnA	166215073	P25516.3	에스케리치아 콜라이
fumB	33112655	P14407.2	에스케리치아 콜라이
ilvD	146451	AAA24013.1	에스케리치아 콜라이

[0323]

[0324] 이러한 기능을 실행하기 위한 다른 후보는 세린 데하이드라타아제이다. 이들 효소는 이러한 탈수 단계에 요구되는 바와 같이 세린으로부터의 암모니아 제거에서 매우 유사한 형질전환을 촉매화한다. 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
dsdA	2507445	P00926	에스케리치아 콜라이

[0325]

[0326] 이러한 형질전환을 위한 비-고유 유전자 후보는 잘 식별되었다. 예를 들면, 펩토스트렙토코커스 아사카로라이티커스로부터의 다중-서브유닛 L-세린 데하이드라타아제는 L-세린 데하이드라타아제 활성이 결핍된 에스케리치아 콜라이 균주를 보완하는 것으로 보여졌다(Hofmeister et al., J. Bacteriol. 179:4937-4941(1997)). 추가로, 유박테리움 바르케리에서 유전자 *hmd*에 의해 코딩되는 추정적 2-(하이드록시메틸)글루타레이트 데하이드라타아제는 [4Fe-4S]-포함 박테리아 세린 데하이드라타아제의 α- 및 β-서브유닛 둘다와 유사한 것으로 보인다(Alhapel et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 103: 12341-12346(2006)). 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

[0327]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
Hmd	86278275	ABC88407.1	유박테리움 바르케리

[0328] 도 3을 참고하여, 단계 5는 2-에노에이트 환원효소를 포함한다. 3-옥소아디페이트 경로에서의 최종 단계는 헥사-3-엔디오에이트로부터 이중 결합이 환원되어 아디페이트를 형성하는 것이다. 생화학적으로, 이러한 형질전환은 다양한 α,β-불포화 카복실산 및 알데히드의 NADH-의존성 환원을 촉매화하는 것으로 공지된 2-에노에이트 환원효소(EC 1.3.1.31)에 의해 촉매화될 수 있다(Rohdich et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787(2001)). 이러한 효소는 클로스트리디엄 티로부티리컴 및 클로스트리디엄 써모아세티컴(현재 무렐라 써모아세티컴으로 지칭됨)(Rohdich, et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787(2001))을 포함하는 클로스트리디아(Giesel and Simon, Arch. Microbiol. 135:51-57(1983))의 수 개의 종에서 *enr*에 의해 코딩된다. 클로스트리디엄 클루이베리의 최근에 공개된 게놈에서, 에노에이트 환원효소를 위한 9개의 코딩 서열이 보고되었고, 이중 하나가 특징규명되었다(Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 105:2128-2133(2008)). 클로스트리디엄 티로부티리컴 및 클로스트리디엄 써모아세티컴으로부터의 *enr* 유전자는 클로닝되고 서열화되고 서로 59%의 동일성을 나타냈다. 전자의 유전자는 또한 클로스트리디엄 클루이베리에서 특징규명된 유전자에 대략 75% 유사성을 갖는 것으로 밝혀졌다(Giesel and Simon, Arch. Microbiol. 135:51-57(1983)). 이들 서열 결과에 기초하여 *enr*이 에스케리치아 콜라이에서의 디에노일 CoA 환원효소(*fadH*)와 매우 유사하다는 것이 보고되었다(Rohdich et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787(2001)). 수 개의 유전자 후보는 이와 같이 3-옥소아디페이트 경로에서 최종 단계를 촉매화하기 위해 존재하고, 이는 이후 열거된다. 클로스트리디엄 써모아세티컴 *enr* 유전자는 에스케리치아 콜라이에서 효소적으로 활성인 형태로 발현되었다(Rohdich et al., supra, 2001). 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

[0329]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
fadH	16130976	NP_417552.1	에스케리치아 콜라이
enr	169405742	ACA54153.1	클로스트리디엄 보툴리넘 A3 균주
enr	2765041	CAA71086.1	클로스트리디엄 티로부티리컴
enr	3402834	CAA76083.1	클로스트리디엄 클루이베리

[0330] 상기 기재내용은 3-옥소아디페이트 경로에 의한 예시적인 아디페이트 합성 경로를 제공한다.

[0331] **실시예 IV**

[0332] **3-옥소아디페이트 경로를 갖는 아디페이트 생산 미생물 유기체의 제조**

[0333] 본 실시예는 3-옥소아디페이트 경로를 사용하여 아디페이트를 생산할 수 있는 미생물 유기체의 생성을 설명한다.

[0334] 에스케리치아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여 도 3에 도시된 바와 같이 3-옥소아디페이트 경로를 조작한다. 에스케리치아 콜라이는 아디페이트를 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위해 우수한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 다양한 생성물, 예컨대 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산, 및 석신산을 혐기성 또는 미세호기성 조건하에 효과적으로 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0335] 아디페이트를 생산하도록 조작된 에스케리치아 콜라이 균주를 생성하기 위해, 3-옥소아디페이트 경로에서 이용되는 효소를 코딩하는 핵산을 공지된 분자 생물학적 기법에 의해 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨다(예를 들면, 문헌[Sambrook, supra, 2001]; [Ausubel supra, 1999] 참조). 특별히, 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 및 3-옥소아디페이트 환원효소 활성을 각각 코딩하는 *paaJ*(NP_415915.1), *pcaIJ*(AAN69545.1 및 NP_746082.1), 및 *bdh*(AAA58352.1) 유전자를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레

시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 또한, 3-하이드록시아디페이트 데하이드라타아제 및 2-에노에이트 환원효소 활성을 각각 코딩하는 *acnA*(P25516.3) 및 *enr*(ACA54153.1) 유전자를 pZA33 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 플라스미드의 두 세트를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655로 형질전환시켜 3-옥소아디페이트 경로를 통해 아디페이트 합성에 요구되는 단백질 및 효소를 발현한다.

[0336] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차를 수행하여 글루코스 포함 배지에서 배양시킨다(예를 들면, [Sambrook et al., supra, 2001] 참조). 아디페이트 합성을 위한 3-옥소아디페이트 경로 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅 등을 비롯하여 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성은 개별 활성에 대해 특이적인 검정을 사용하여 확인된다. 아디페이트를 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS)에 의해 확인한다.

[0337] 작용성 아디페이트 합성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0338] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 아디페이트의 더 효율적인 생산으로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 종합적으로 아디페이트의 더 나은 생산을 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA 중간체 또는 아디페이트 생성물의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 아디페이트 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0339] 아디페이트의 대규모 생산을 위해, 3-옥소아디페이트 경로-포함 유기체를, 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지하고, 예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다. 제한된 통기를 위해 격벽에 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 대략 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, 예를 들면, HPLC 칼럼의 아미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들면, HPX-87 시리즈)(바이오래드), 글루코스 및 알코올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(시마추)에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0340] 본 실시예는 3-옥시도아디페이트 경로를 포함하는 아디페이트-생산 미생물 유기체의 제조를 설명한다.

[0341] **실시예 V**

[0342] **시스,시스-뮤콘산을 통한 아디페이트 합성**

[0343] 본 실시예는 이전에 기재된 아디페이트 합성 경로를 설명한다(문헌[Niu et al., Biotechnol. Prog. 18(2): p. 201-11. 2002]; 1996년 1월 30일자로 허여된 프로스트(Frost) 등의 미국 특허 제5,487,987호 참조).

[0344] 조합된 생물학적 및 화학적 전환 공정을 통한 아디페이트 합성은 이전에 기재되었고(Niu et al., Biotechnol. Prog. 18:201-211(2002)) 도 5에 도시되어 있다. 이러한 방법은 추가로 미국 특허 제5,487,987호에 기재되어 있다. 이 경로를 통한 아디페이트 합성은 데하이드로쉬키메이트를 시스,시스-뮤콘산으로 전환시킬 수 있는 에스케리치아 콜라이내로의 3종의 이종 유전자를 도입함을 수반한다(Niu et al., supra, 2002). 최종 화학적 수소화 단계는 아디프산의 형성을 유도한다. 이러한 단계에서, 150 mM 시스,시스-뮤코네이트를 포함하는 예비처리된 발효 브로쓰를 활성 탄소 상 10% 백금(Pt)과 혼합하였다. 수소화 반응을 교반하에 3400 KPa의 수소 압력

에서 2시간 30분 동안 250℃에서 수행하였다. 효소적 또는 화학적 촉매작용 단계가 이용되어 시스,시스-뮤코네이트를 아디페이트로 전환시킨다는 가정하에 계산된 아디페이트 수율이 표 3에 도시된다. 화학적 반응이 수소화를 위해 이용될 경우 호기성 조건하에, 85% 몰 수율의 아디페이트가 수득되고, NADH-기재 수소화효소가 사용될 경우 75%의 몰 수율이 수득된다.

표 3

[0345] 시스,시스-뮤콘산 경로를 사용하는 글루코스 1 몰 당 아디페이트의 최대 이론적 수율

	최종 단계 효소		최종 단계 화학적 수소화	
	호기성	혐기성	호기성	혐기성
아디페이트 수율	0.75	0.00	0.85	0.00

[0346] 이는 예시적인 방법이지만, 이 방법은 다른 방법, 예컨대 실시예 I 내지 IV에 기재된 방법과 비교하여 단점이 존재한다. 예를 들면, 이러한 방법의 제1의 제한점은 역 아디페이트 분해 및 3-옥소아디페이트 경로에 비해 더 낮은 이론적 수율이다. 제2의 제한점은 이러한 경로의 ATP 수율이 무시가능하다는 것이다. 이 경로의 제3의 제한점은 2산소화효소를 포함하여, 반응기로의 산소의 공급이 필수적이고 혐기성 발효의 선택사항을 배제한다는 것이다.상기 기재내용은 시스,시스-뮤콘산 경로에 의한 예시적인 아디페이트 합성 경로를 제공한다.

[0347] **실시예 VI**

[0348] **알파-케토아디페이트를 통한 아디페이트 합성**

[0349] 본 실시예는 알파-케토아디페이트 경로를 통한 예시적인 아디페이트 합성 경로를 설명한다.

[0350] 알파-케토 아디페이트는 사카로마이세스 세레비지아에서의 라이신 생합성에서 공지된 중간체이고, 이러한 정보는 아디프산 생합성을 위한 추가의 경로를 식별하기 위해 사용되었다(도 6 참조). 알파-케토글루타레이트의 알파-케토아디페이트로의 전환은 도 6에서 점선 화살표로 지시된 바와 같이 호모시트레이트 신타아제, 호모아코니타아제, 및 호모이소시트레이트 탈수소효소로 촉매화된다. 알파-케토아디페이트의 알파-하이드록시아디페이트로의 전환은 2-케토아디페이트 환원효소에 의해 촉매화될 수 있고, 효소는 래트 및 인간 췌장에서 발견된다고 보고되었다(Suda et al., Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620(1976); Suda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591(1977)). 후속 단계는 알파-하이드록시아디페이트의 헥사-2-엔디오에이트로의 전환을 위한 데하이드라타아제를 포함하고, 이후 이는 아디프산으로 환원된다. 최종 단계는 효소에 의해 촉매화되거나 실시예 II에 기재된 바와 같은 화학 반응을 통해 일어날 수 있다. 알파-케토아디페이트 경로를 위한 효소를 코딩하는 유전자는 실시예 I 내지 IV에 기재된 바와 같이 식별된다.

[0351] 이러한 경로와 연관된 아디페이트 수율은 표 4에 제시된다. 아세틸-CoA의 아디페이트로의 전환 동안 2개의 CO_2 분자의 손실로 인해, 단지 67%의 글루코스가 아디페이트로 전환될 수 있다. 이는 호기성 조건하에 이러한 경로에 대해 몰 수율로 반영된다. 수율은 산소 섭취의 부재하에 추가로 감소된다. 또한 혐기성 조건하에 최대 ATP 수율은 무시할만 하므로, 조작된 유기체는 세포 성장 및 유지를 위한 에너지를 이러한 조건하에 형성하기 위해 추가의 기질을 사용해야할 것이다.

표 4

[0352] 알파-케토아디페이트 경로를 사용하는 글루코스 1 몰 당 아디페이트의 최대 이론적 수율 및 연관된 ATP 수율

	최종 단계 효소		최종 단계 화학적 수소화	
	호기성	혐기성	호기성	혐기성
아디페이트 수율	0.67	0.45	0.67	0.40
최대 아디페이트 수율에서의 최대 ATP 수율	6.17	0.00	7.50	0.00

[0353] 상기 기재내용은 알파-케토아디페이트 경로에 의한 예시적인 아디페이트 합성 경로를 제공한다.

[0354] **실시예 VII**

[0355] **라이신 분해를 통한 아디페이트 합성**

[0356] 본 실시예는 라이신 분해 경로를 통한 예시적인 아디페이트 합성 경로를 예시한다.

[0357] 아디페이트 합성을 위한 2가지 추가의 경로는 라이신 분해에 기초하여 아디페이트를 형성한다. 하나의 경로는 알파-케토글루타레이트로부터 출발하여 라이신을 형성하고(에스케리치아 콜라이에 비고유적이고 사카로마이세스 세레비지아에서 발견되는 경로), 나머지는 아스파테이트를 라이신 생합성을 위한 출발점으로서 사용한다(에스케리치아 콜라이에 고유적인 경로). 도 7은 라이신으로부터의 아디페이트 형성을 도시한다. 산소의 존재 및 부재하에 에스케리치아 콜라이 화학양론적 모델을 사용한 아디페이트를 위한 최대 이론적 수율은 표 5 및 6에 제시되고, 알파-케토글루타레이트 및 아스파테이트가 라이신을 위한 각각의 출발점으로 사용된다. 이들 이론적 수율과 동반된 최대 ATP 수율을 계산하였고 이는 동일한 표에 제시된다. 이들 수율은 실시예 I 내지 IV에 기재된 다른 경로와 비교하여 더 낮다. 알파-케토아디페이트 경로를 위한 효소를 코딩하는 유전자가 실시예 I 내지 IV에 기재된 바와 같이 식별된다.

표 5

[0358] 알파-케토글루타레이트를 출발점으로서 갖는 라이신 생합성 경로를 가정하여, 글루코스 1 몰 당 아디페이트의 최대 이론적 수율 및 연관된 ATP 수율

	호기성	혐기성
아디페이트 수율	0.40	0.20
최대 아디페이트 수율에서 최대 ATP 수율	5.60	0.00

표 6

[0359] 아스파테이트를 출발점으로서 갖는 라이신 생합성 경로를 가정하여, 글루코스 1 몰 당 아디페이트의 최대 이론적 수율 및 연관된 ATP 수율

	호기성	혐기성
아디페이트 수율	0.50	0.34
최대 아디페이트 수율에서 최대 ATP 수율	0.50	0.04

[0360] 상기 기재내용은 라이신 분해 경로에 의한 예시적인 아디페이트 합성 경로를 제공한다.

[0361] **실시예 VIII**

[0362] **아디필-CoA를 통한 카프로락탐 및 6-아미노카프로산의 생산**

[0363] 본 실시예는 아디필-CoA 경로를 통한 예시적인 카프로락탐 및/또는 6-아미노카프로산 합성 경로를 설명한다.

[0364] 전구체로서 아디필-CoA를 사용하여 카프로락탐 및/또는 6-아미노카프로산을 형성하는 예시적인 경로가 도 8에 도시된다. 이 경로는 아디필-CoA를 아디페이트 세미알데히드로 환원시킬 수 있는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소, 및 이러한 분자를 6-아미노카프로산으로 변형시킬 수 있는 아미노전이효소 또는 6-아미노카프로에이트 탈수소효소를 포함한다. 6-아미노카프로에이트를 카프로락탐으로 전환시키는 마지막 단계는 아미도가수분해효소 또는 화학적 전환을 통해 달성될 수 있다(귀트(Guit) 및 부이스(Buijs)의 미국 특허 제6,353,100호(2002년 3월 7일자로 허여됨); 월터스(Wolters) 등의 미국 특허 제5,700,934호(1997년 12월 23일자로 허여됨); 어그터버그(Agterberg) 등의 미국 특허 제6,660,857호(2003년 12월 9일자로 허여됨)). 역 아디페이트 분해 경로가 도 8에 도시된 반응식으로 보완된다는 가정하에 카프로락탐의 최대 이론적 수율을 계산한 결과 소비된 글루코스 1 몰 당 0.8 몰이었다(표 7 참조). 이 경로는 카프로락탐의 최대 이론적 수율에서 소비되는 글루코스 1 몰 당 0.78 몰의 ATP가 형성되므로 에너지적으로 유리하다. ATP 수율은, 포스포에놀피루베이트 카복시키나아제(PPCK)가 옥살로아세테이트 형성을 향한 ATP-생성 방향으로 작용함을 가정한다면, 글루코스 1 몰당 생산되는 ATP가 1.63 몰로 추가로 개선된다.

[0365] 최종 아미도가수분해효소 단계는 에너지적으로 및 산화환원반응적으로 중립적이고, 따라서 6-아미노카프로산 생산과 연관된 생성물 및 ATP 몰 수율은 카프로락탐 생산과 연관된 몰수율과 동등하다. 이와 같이 다르게는 카프로락탐 대신 6-아미노카프로산을 형성하는 미생물 및 연관된 발효 공정을 구현할 수 있고, 이후 6-아미노카프로산을 카프로락탐으로 탈수/환화시키는 추가의 단위 조작이 수반된다.

표 7

[0366] 역 지방산 분해 경로가 도 8의 반응식으로 보완됨을 가정하여 글루코스 1 몰 당 카프로락탐의 최대 이론적 수율 및 수반되는 ATP 수율

	호기성	혐기성
카프로락탐 수율	0.80	0.80
최대 카프로락탐 수율에서 최대 ATP 수율	0.78	0.78
PPCK 가정된 최대 카프로락탐 수율에서 최대 ATP 수율	1.63	1.63

[0367] 이러한 경로를 성공적으로 조작함은, 충분한 활성 및 특이성을 갖는 효소의 적절한 세트를 식별함을 포함한다. 이는 효소의 적절한 세트의 식별, 이의 상응하는 유전자의 생산 숙주로의 클로닝, 발효 조건의 최적화, 및 발효 후 생성물 형성의 검정을 수반한다. 6-아미노카프로산 또는 카프로락탐의 생산을 위한 생산 숙주를 조작하기 위해, 1종 이상의 외인성 DNA 서열을 숙주 미생물에서 발현시킬 수 있다. 또한, 미생물은 기능적으로 결실된 내인성 유전자를 가질 수 있다. 이러한 개질은 재생가능한 공급원료를 사용하여 6-아미노카프로에이트 또는 카프로락탐을 생산할 수 있도록 한다.도 8에 기재된 카프로락탐 형성 경로의 각각의 단계를 촉매화하는 효소를 코딩할 수 있는 생화학적으로 특징규명된 다수의 후보 유전자가 이후 기재된다. 이러한 방법이 에스케리치아 콜라이에 대해 기재되지만, 당분야의 숙련가라면 임의의 다른 적합한 숙주 유기체에 이들 교시내용을 적용할 수 있다. 구체적으로, 열거된 유전자는 에스케리치아 콜라이에 고유적이거나, 적절히 클로닝되고 발현될 경우 적절한 형질전환을 촉매화하기 위해 적용될 수 있는 다른 유기체중의 유전자이다.

[0368] 도 8을 참고하여, 단계 1은 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소를 포함한다. 아실-coA를 그의 상응하는 알데히드로 환원시킴을 촉매화하기 위한 효소를 코딩하는 예시적인 유전자로는 지방 아실-CoA 환원효소를 코딩하는 아시네토박터 칼코아세티커스 *acr1*(Reiser and Somerville,. J. Bacteriol. 179:2969-2975(1997)), 석시닐-CoA를 석시네이트 세미알데히드로 전환시킬 수 있는 아시네토박터 종. M-1 지방 아실-CoA 환원효소(Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195(2002)) 및 클로스트리디엄 클루이베리로부터의 *sucD* 유전자(Sohling and Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880(1996))가 포함된다.

[0369]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
acr1	50086359	YP_047869.1	아시네토박터 칼코아세티커스
	18857901	BAB85476.1	아시네토박터 종 M-1
sucD	172046062	P38947.1	클로스트리디엄 클루이베리

[0370] 도 8을 참고하여, 단계 2는 아미노전이효소를 포함한다. 경로중 제2 단계는 6-알데히드의 아민으로의 전환이다. 이러한 형질전환은 유사하게 글루타메이트로부터의 아미노 기를 석시닐 세미알데히드의 말단 알데히드로 전달하는 *gabT*에 의해 코딩되는 고유의 효소인 감마-아미노부티레이트 아미노전이효소(GABA 아미노전이효소)에 의해 달성될 수 있다(Bartsch et al., J. Bacteriol 172:7035-7042(1990)). *puuE*의 유전자 생성물은 에스케리치아 콜라이에서 또 다른 4-아미노부티레이트 아미노전이효소를 촉매화한다(Kurihara et al., J. Biol. Chem. 280:4602-4608(2005)). 무스 무스큘러스, 슈도모나스 플루오레센스, 및 서스 스크로파에서의 GABA 아미노전이효소는 6-아미노카프로산과 반응하는 것으로 제시되었다(Cooper, Methods Enzymol. 113:80-82(1985); Scott and Jakoby, J. Biol. Chem. 234:932-936(1959)). 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

[0371]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gabT	16130576	NP_417148.1	에스케리치아 콜라이
puuE	16129263	NP_415818.1	에스케리치아 콜라이
abat	37202121	NP_766549.2	무스 무스큘러스
gabT	70733692	YP_257332.1	슈도모나스 플루오레센스
abat	47523600	NP_999428.1	서스 스크로파

[0372] 도 8을 참고하여, 단계 2는 다르게는 아디페이트 세미알데히드를 환원적으로 아민화하여 6-아미노카프로에이트를 형성함을 포함하는 6-아미노카프로에이트 탈수소효소를 포함한다. 이러한 형질전환은 L-라이신을 2-아미노아디페이트-6-세미알데히드로 천연적으로 전환시키는 라이신-6-탈수소효소에 의해 달성될 수 있다. 예시적인

효소는 게오바실러스 스테아로써모필러스(Heydari et al., Appl. Environ. Microbiol. 70(2):937-942(2004)), 아그로박테리엄 투메파시엔스(Hashimoto et al., J. Biochem.(Tokyo), 106(1):76-80(1989); Misono et al., J. Biochem.(Tokyo), 105(6):1002-1008(1989)), 및 아크로모박터 데니트리피칸스(Ruldeekulthamrong et al., BMB Reports 790-795(2008))에서 발견된다.

[0373]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
lysDH	13429872	BAB39707	게오바실러스 스테아로써모필러스
lysDH	15888285	NP_353966	아그로박테리엄 투메파시엔스
lysDH	74026644	AAZ94428	아크로모박터 데니트리피칸스

[0374] 도 8을 참고하여, 단계 3은 아미도가수분해효소를 포함한다. 카프로락탐 합성의 최종 단계는 6-아미노카프로산의 고리화이다. 이러한 형질전환은 효소적으로 특징규명되지 않았지만, 크립토코커스 라우렌티(*Cryptococcus laurentii*)로부터의 D-라이신 락타마아제(lactamase)(EC 3.5.2.11)에 의한 라이신의 고리화와 매우 유사하다(Fukumura et al., FEBS Lett. 89:298-300(1978)). 그러나, 이러한 효소의 단백질 및 뉴클레오티드 서열은 현재 공지되지 않고, 아직까지 라이신 락타마아제 활성은 다른 유기체에서 입증되지 않았다.

[0375] 토양으로부터 단리된 슈도모나스 종의 몇몇 균주에 포함된 플라스미드는 유일한 탄소 공급원으로서의 카프로락탐 상에서 성장하는 능력을 부여하는 것으로 보이지만(Boronin et al., FEMS Microbiol. Lett. 22:167-170(1984)); 연관된 유전자 또는 단백질 서열은 지금까지 이러한 기능과 관련되지 않았다.

[0376] 이용가능한 서열 정보를 갖는 가장 밀접하게 연관된 후보 효소는 6-아미노헥사노에이트-환형 이량체 가수분해효소이고, 이는 슈도모나스 종 및 플라보박테리엄 종에서 특징규명되었다. 슈도모나스 종 NK87로부터의 *nylB* 유전자 생성물을 에스케리치아 콜라이에서 클로닝하고 발현시켰다(Kanagawa et al., J. Gen. Microbiol. 139:787-795(1993)). 효소의 기질 특이성을 플라보박테리엄 종 K172에서 시험하였고, 이는 카프로락탐이 아니라 6-아미노헥사노에이트의 더 고급 올리고머와 반응하는 것으로 제시되었다(Kinoshita et al., Eur. J. Biochem. 116:547-551(1981)). 다른 유기체에서 흥미로운 방향으로 원하는 기질과 반응하는 6-아미노헥사노에이트 이량체 가수분해효소의 재현성 및 능력을 추가로 실험할 수 있다. 예시적인 유전자 생성물에 대한 단백질 서열은 하기 GI 수 및/또는 GenBank 식별자를 사용하여 밝혀질 수 있다:

[0377]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
nylB	148711	AAA24929.1	슈도모나스 종 NK87
nylB	129000	P13397	플라보박테리엄 종 K172
nylB	119961013	YP_949627.1	아르트로박터 아우레센스 TC1

[0378] 상기 기재내용은 아디필-CoA 경로에 의한 카프로락탐 및/또는 6-아미노카프로산을 생산하는 예시적인 경로를 제공한다.

[0379] **실시예 IX**

[0380] **3-옥소아디페이트 경로를 갖는 6-아미노카프로에이트 또는 카프로락탐 생산 미생물 유기체의 제조**

[0381] 본 실시예는 역 분해 경로를 사용하여 아디페이트를 생산하고 세포내 아디페이트를 6-아미노카프로에이트 및/또는 카프로락탐으로 전환시킬 수 있는 미생물 유기체의 생성을 설명한다.

[0382] 에스케리치아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여 아디페이트, 6-아미노카프로에이트, 및/또는 카프로락탐 합성을 위한 필수 유전자를 조작한다(도 2 및 도 8 참조). 에스케리치아 콜라이는 아디페이트, 6-아미노카프로에이트, 및/또는 카프로락탐를 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위해 우수한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 다양한 생성물, 예컨대 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산, 및 석신산을 혐기성 또는 미세호기성 조건하에 효과적으로 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0383] 6-아미노카프로에이트 및/또는 카프로락탐을 생산하도록 조작된 에스케리치아 콜라이 균주를 생성하기 위해, 역 아디페이트 분해 경로 및 6-아미노카프로에이트 또는 카프로락탐 합성 경로에서 이용되는 효소를 코딩하는 핵산을 공지된 분자 생물학적 기법에 의해 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨다(예를 들면, 문헌[Sambrook, supra, 2001]; [Ausubel supra, 1999] 참조). 특별히, 석시닐-CoA:아세틸-CoA 아실 전이효소, 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소, 및 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제 활성을 각각 코딩하는 *paaJ*(NP_415915.1), *paaH*(NP_415913.1), 및 *maoC*(NP_415905.1) 유전자를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 또한, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소 및 아디필-CoA 합성효소 활성을

각각 코딩하는 *bcd*(NP_349317.1), *etfAB*(349315.1 및 349316.1), 및 *sucCD*(NP_415256.1 및 AAC73823.1) 유전자를 pZA33 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 최종적으로, CoA-의존성 알데히드 탈수소효소, 아미노전이효소, 및 아미도가수분해효소 활성을 코딩하는 유전자 *acr1*(YP_047869.1), *gabT*(NP_417148.1), *ny1B*(AAA24929.1)를 제3의 화합성 플라스미드 pZS23내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. pZS23은 공지된 분자 생물학 기법에 의해 pZS13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)의 앰피실린 내성 모듈을 카나마이신(kanamycin) 내성 모듈로 대체함으로써 수득된다. 플라스미드의 3 세트를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655로 형질전환시켜 6-아미노카프로에이트 및/또는 카프로락탐 합성에 요구되는 단백질 및 효소를 발현한다.

[0384] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차를 수행하여 글루코스 포함 배지에서 배양시킨다(예를 들면, [Sambrook et al., supra, 2001] 참조). 6-아미노카프로에이트 및 카프로락탐 합성 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅 등을 비롯하여 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성은 개별 활성에 대해 특이적인 검정을 사용하여 확인된다. 6-아미노카프로에이트를 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS)에 의해 확인한다.

[0385] 6-아미노카프로에이트 및/또는 카프로락탐의 합성을 위한 작용성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0386] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 6-아미노카프로에이트 및/또는 카프로락탐의 더 효율적인 생산으로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 6-아미노카프로에이트 및/또는 카프로락탐의 더 나은 생산을 종합적으로 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, 생성물의 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA 중간체의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 6-아미노카프로에이트 및/또는 카프로락탐 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0387] 6-아미노카프로에이트 및/또는 카프로락탐의 대규모 생산을 위해, 상기 유기체를, 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지하고, 예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다. 제한된 통기를 위해 격벽에 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 대략 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, 예를 들면, HPLC 칼럼의 아미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들면, HPX-87 시리즈)(바이오래드), 글루코스 및 알코올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(시마추)에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0388] **실시예 X**

[0389] **2-하이드록시아디필-CoA를 통한 아디페이트 합성**

[0390] 본 실시예는 알파-케토아디페이트로부터 진행되고 2-하이드록시아디필-CoA 중간체를 통과하는 2가지 예시적인 아디페이트 합성 경로를 설명한다.

[0391] 실시예 VI에 기재된 바와 같이, 알파-케토아디페이트는 호모시트레이트 신타아제, 호모아코니타아제, 및 호모이소시트레이트 탈수소효소를 통해 알파-케토글루타레이트로부터 형성될 수 있는 라이신 생합성중의 공지된 중간체이다. 알파-케토아디페이트는 도 9에 도시된 2가지 경로에 의해 2-하이드록시아디필-CoA로 전환될 수 있다.

2-하이드록시아디필-CoA는 도 9에 도시된 바와 같이 후속적으로 탈수되고 아디필-CoA로 환원될 수 있고, 이는 이어서 아디페이트로 전환될 수 있다. 이들 경로를 통한 글루코스로부터의 아디페이트의 최대 수율은 0.67 몰/몰이다.

[0392] 알파-케토아디페이트의 2-하이드록시아디페이트로의 전환은 2-케토아디페이트 환원효소에 의해 촉매화될 수 있고, 이 효소는 래트 및 인간 췌장에서 발견된다고 보고되었다(Suda et al., Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620(1976); Suda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591(1977). 다르게는, 알파-케토글루타레이트를 2-하이드록시글루타레이트로 환원시킬 수 있는 효소는 또한 단지 하나의 탄소가 더 긴 알파-케토아디페이트에 대해 활성을 나타낸다. 알파-케토글루타레이트 환원효소 활성을 갖는 이러한 효소중 하나는 에스케리치아 콜라이의 *serA*이다(Zhao and Winkler, J. Bacteriol. 178(1):232-9(1996)). 추가의 예시적인 효소는 아라비돕시스 탈리아나(Ho, et al., J. Biol. Chem. 274(1):397-402(1999)) 및 헤모필러스 인플루엔자에서 발견된다.

[0393]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
serA	16130814	NP_417388.1	에스케리치아 콜라이
PGDH	18394525	NP_564034	아라비돕시스 탈리아나
serA	1173427	P43885	헤모필러스 인플루엔자

[0394] 도 9를 참조하여, 2-하이드록시아디페이트는 실시예 I에 기재된 합성효소, 전이효소, 포스포트랜스아디필라아제 및 키나아제에 의해 2-하이드록시아디필-CoA로 유사하게 전환될 수 있다. 다르게는, 2-하이드록시글루타레이트 CoA-전이효소 또는 글루타코네이트 CoA-전이효소 활성을 갖는 효소는 CoA 잔기를 2-하이드록시아디페이트에 전달하기에 적합할 것이다. 이러한 효소의 한 예는 아시드아미노코커스 페르멘탄스의 *gctA* 및 *gctB* 유전자에 의해 코딩된다(Buckel, et al., Eur. J. Biochem. 118(2):315-321(1981); Mack, et al., Eur. J. Biochem. 226(1):41-51(1994)). 유사하게, 도 9에 도시된 바와 같이 합성효소, 전이효소, 또는 포스포트랜스아디필라아제 및 키나아제 활성은 알파-케토아디페이트를 알파-케토아디필-CoA로 전환시키기 위해 요구될 것이다. 알파-케토아디필-CoA의 2-하이드록시아디필-CoA로의 전환은 알파-하이드록시아실-CoA 탈수소효소에 의해 수행될 수 있다. 유사한 활성이 프로피오네이트-적응된 에스케리치아 콜라이에서 보고되는데, 이의 세포 추출물은 락틸-CoA의 산화에 의해 피루빌-CoA를 형성함을 촉매화한다(Megraw et al., J. Bacteriol. 90(4): 984-988(1965)). 추가의 하이드록시아실-CoA 탈수소효소는 실시예 I에서 설명되었다.

[0395]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gctA	3122155	Q59111	아시드아미노코커스 페르멘탄스
gctB	3122156	Q59112	아시드아미노코커스 페르멘탄스

[0396] 2-하이드록시아디필-CoA의 탈수에 의해 5-카복시-2-펜테노일-CoA를 형성함은 2-하이드록시아실-CoA 데하이드라타아제에 의해 수행될 수 있다. 2-하이드록시글루타릴-CoA 데하이드라타아제 시스템은 아시드아미노코커스 페르멘탄스에서 특징규명되고, 최적 활성을 위해 *hgdA* 및 *hgdB* 서브유닛, 및 활성화제 단백질, *hgdC*를 필요로 한다(Dutscho et al., Eur. J. Biochem. 181(3):741-746(1989); Locher et al. J. Mol. Biol. 307(1):297-308; Muller and Buckel, Eur. J. Biochem. 230(2):698-704(2001); Schweiger et al. Eur. J. Biochem. 169(2):441-448(1987)). 이 효소 시스템은 기작면에서 클로스트리디엄 프로피오니컴(*Chlostridium propionicum*)으로부터의 락토일-CoA 데하이드라타아제와 유사하다(Hofmeister and Buckel, Eur. J. Biochem. 206(2):547-552(1992); Kuchta and Abeles, J. Biol. Chem. 260(24):13181-13189(1985)). *hgdA*, *hgdB*, 및 *hgdC*에 대한 상동체가 몇몇 유기체에 존재한다.

[0397]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hgdA	123112	P11569	아시드아미노코커스 페르멘탄스
hgdB	123113	P11570	아시드아미노코커스 페르멘탄스
hgdC	2506909	P11568	아시드아미노코커스 페르멘탄스
hgdA	225177593	ZP_03731126.1	클로스트리디엄 종 M62/1
hgdB	225177592	ZP_03731125.1	클로스트리디엄 종 M62/1
hgdC	225177594	ZP_03731127.1	클로스트리디엄 종 M62/1
hgdA	19703552	NP_603114.1	푸소박테리엄 누클레아텀
hgdB	19703553	NP_603115.1	푸소박테리엄 누클레아텀
hgdC	19703551	NP_603113.1	푸소박테리엄 누클레아텀

[0398] 5-카복시-2-펜테노일-CoA의 아디페이트로의 전환은 실시예 I에 기재된 효소에 의해 수행된다.

[0399] 상기 설명은 2-하이드록시아디필-CoA 경로에 의한 예시적인 아디페이트 합성 경로를 제공한다

[0400] **실시예 XI**

[0401] **2-하이드록시아디필-CoA 경로를 갖는 아디페이트 생산 미생물 유기체의 제조**

[0402] 본 실시예는 2-하이드록시아디필-CoA 경로를 사용하여 아디페이트를 생산할 수 있는 미생물 유기체의 생성을 설명한다.

[0403] 에스케리치아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여 아디페이트 합성을 위한 필수 유전자를 조작한다(도 9 참조). 에스케리치아 콜라이는 아디페이트를 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위해 우수한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 다양한 생성물, 예컨대 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산, 및 석신산을 혐기성 또는 미세호기성 조건하에 효과적으로 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0404] 아디페이트를 생산하도록 조작된 에스케리치아 콜라이 균주를 생성하기 위해, 2-하이드록시아디필-CoA의 아디페이트로의 경로에서 이용되는 효소를 코딩하는 핵산을 공지된 분자 생물학적 기법에 의해 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨다(예를 들면, 문헌[Sambrook, supra, 2001]; [Ausubel supra, 1999] 참조). 특별히, 2-하이드록시아디페이트 탈수소효소 및 2-하이드록시아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소 활성을 각각 코딩하는 *serA*(NP_417388.1), *gctA*(Q59111), 및 *gctB*(Q59112) 유전자를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 또한, 2-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제 활성을 각각 코딩하는 *hgdA*(P11569), *hgdB*(P11570), 및 *hgdC*(P11568) 유전자를 pZA33 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 추가로, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소 및 아디필-CoA 합성효소 활성을 코딩하는 *bcd*(NP_349317.1), *etfAB*(349315.1 및 349316.1), 및 *sucCD*(NP_415256.1 및 AAC73823.1) 유전자를 제3의 화합성 플라스미드 pZS23내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. pZS23은 공지된 분자 생물학 기법에 의해 pZS13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)의 앰피실린 내성 모듈을 카나마이신 내성 모듈로 대체함으로써 수득된다. 플라스미드의 3 세트를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655로 형질전환시켜 아디페이트 합성에 요구되는 단백질 및 효소를 발현한다.

[0405] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차를 수행하여 글루코스 포함 배지에서 배양시킨다(예를 들면, [Sambrook et al., supra, 2001] 참조). 아디페이트 합성을 위한 2-하이드록시아디필-CoA 경로 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅 등을 비롯하여 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성은 개별 활성에 대해 특이적인 검정을 사용하여 확인된다. 아디페이트를 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS)에 의해 확인한다.

[0406] 작용성 아디페이트 합성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0407] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 아디페이트의 더 효율적인 생산으로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2 레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 종합적으로 아디페이트의 더 나은 생산을 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, 알파-케토아디페이트 중간체 또는 아디페이트 생성물의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 아디페이트 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0408] 아디페이트의 대규모 생산을 위해, 2-하이드록시아디필-CoA 경로-포함 유기체를, 이 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연

속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지하고, 예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다. 제한된 통기를 위해 격벽에 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 대략 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, 예를 들면, HPLC 칼럼의 아미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들면, HPX-87 시리즈)(바이오래드), 글루코스 및 알코올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(시마추)에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0409] 본 실시예는 2-하이드록시아디필-CoA 경로를 포함하는 아디페이트-생산 미생물 유기체의 제조를 설명한다.

[0410] **실시예 XII**

[0411] **헥사메틸렌디아민, 카프로락탐 및 6-아미노카프로산의 생산을 위한 경로**

[0412] 본 실시예는 헥사메틸렌디아민, 카프로락탐 및 6-아미노카프로산의 생산을 위한 예시적인 경로를 설명한다.

[0413] 이후 공통의 중심 대사물질로부터 카프로락탐, 헥사메틸렌디아민(HMDA), 또는 6-아미노카프로에이트 생산을 유도하는 다양한 경로가 기재된다. 기재된 제1 경로는 6-아미노카프로에이트의 6-아미노카프로일-CoA로의 전이효소 또는 신타아제 효소에 의한 활성화를 수반하고(도 10, 단계 Q 또는 R), 이후 6-아미노카프로일-CoA의 자발적인 고리화에 의해 카프로락탐이 형성된다(도 10, 단계 T). 기재된 제2 경로는 6-아미노카프로에이트의 6-아미노카프로일-CoA로의 활성화를 수반하고(도 10, 단계 Q 또는 R), 이후 환원(도 10, 단계 U) 및 아민화(도 10, 단계 V 또는 W)에 의해 HMDA를 형성한다. 6-아미노카프로산은 다르게는 6-아미노카프로일-CoA 대신 6-아미노카프로일-포스페이트로 활성화될 수 있다. 6-아미노카프로일-포스페이트는 자발적으로 고리화되어 카프로락탐을 형성할 수 있다. 다르게는, 6-아미노카프로일-포스페이트는 6-아미노카프로에이트 세미알데히드로 환원될 수 있고, 이는 이후 도 10 및 11에 도시된 바와 같이 HMDA로 전환될 수 있다. 이러한 경우, 아민화 반응이 비교적 신속히 일어나서 6-아미노카프로에이트 세미알데히드의 환형 이민을 자발적으로 형성하는 것을 최소화해야 한다. 참여 효소를 연결시키거나 없애는 것은 6-아미노카프로에이트 세미알데히드 중간체가 환원효소로부터 아민화 효소로 효과적으로 채널링함을 보장하기 위한 잠재적인 강력한 선택사항을 나타낸다.

[0414] 6-아미노카프로산이 HMDA로 전환되는 동안 환형 이민 또는 카프로락탐의 형성을 최소화하거나 제거하기 위한 추가의 선택사항은 고리화되는 것을 방지하기 위해 6-아미노카프로산의 아민 기에 작용기(예를 들면, 아세틸, 석시닐)를 첨가함을 수반한다. 이는 에스케리치아 콜라이중 L-글루타메이트로부터의 오르니틴 형성과 유사하다. 구체적으로 글루타메이트는 우선 N-아세틸-1-글루타메이트로 N-아세틸글루타메이트 신타아제에 의해 전환된다. 이어서 N-아세틸-1-글루타메이트는 N-아세틸글루타밀-포스페이트로 활성화되고, 이는 환원되고 아미노전이되어 N-아세틸-L-오르니틴을 형성한다. 이어서 아세틸 기는 N-아세틸-L-오르니틴으로부터 N-아세틸-L-오르니틴 데아세틸라아제에 의해 제거되어 L-오르니틴을 형성한다. 이러한 경로는, 글루타메이트로부터 글루타메이트-5-포스페이트가 형성된 후 글루타메이트-5-세미알데히드로 환원되는 것이 글루타메이트-5-세미알데히드로부터 자발적으로 형성된 환형 이민, (S)-1-피롤리돈-5-카복실레이트의 형성을 유도하므로 필수적이다. 6-아미노카프로산으로부터 HMDA를 형성하는 경우, 이 단계는 6-아미노카프로산의 아세틸-6-아미노카프로산으로의 아세틸화, CoA 또는 포스페이트 기에 의한 카복실산 기의 활성화, 환원, 아민화 및 아세틸제거를 포함할 수 있다.

[0415] 6-아미노카프로에이트가 다양한 출발 물질로부터 형성될 수 있음을 주지한다. 예를 들면, 6-아미노카프로에이트의 탄소 주쇄는 도 10에 도시되고 또한 도 2, 3 및 8에 기재된 바와 같이 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 유도될 수 있다. 다르게는, 6-아미노카프로에이트는 알파-케토아디페이트로부터 유도될 수 있고, 여기서 알파-케토아디페이트는 아디필-CoA(도 9 참조)로 전환되고, 아디필-CoA는 도 10에 도시된 바와 같이 6-아미노카프로에이트로 전환된다.

[0416] 도 11은 4-아미노부티릴-CoA 및 아세틸-CoA로부터 출발하여 6-아미노카프로에이트 또는 6-아미노카프로일-CoA로의 추가의 2가지 대사경로를 제공한다. 제1 경로는 4-아미노부티릴-CoA 및 아세틸-CoA의 축합을 수반하여 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA를 형성하고(단계 A), 이후 환원(단계 B), 탈수(단계 C), 및 환원(단계 D)되어 6-아미노카프로일-CoA를 형성한다. 6-아미노카프로일-CoA는 6-아미노카프로에이트로 전이효소(단계 K), 신타아제(단계 L), 또는 가수분해효소(단계 M) 효소에 의해 전환될 수 있다. 다르게는, 6-아미노카프로일-CoA는 카프로락탐으로 자발적인 고리화에 의해(단계 Q), 또는 HMDA로 그의 환원(단계 N) 및 아민화(단계 O 또는 P)를 수행하여 전환된다. 도 11에 기재된 제2 경로는 4-아미노부티릴-CoA 및 아세틸-CoA의 축합을 수반하여 3-옥소-6-아미노

헥사노일-CoA를 형성하고(단계 A), 이후 이는 3-옥소-6-아미노헥사노에이트로 전이효소(단계 E), 신타아제(단계 F), 또는 가수분해효소(단계 G)에 의해 전환된다. 이어서 3-옥소-6-아미노헥사노에이트는 환원되고(단계 H), 탈수되고(단계 I), 환원되어(단계 J) 6-아미노카프로에이트를 형성한다.

[0417] 출발 분자, 4-아미노부티릴-CoA는 다양한 공통의 중심 대사물질로부터 형성될 수 있다. 예를 들면, 글루타메이트는 탈카복실화되어 4-아미노부티레이트를 형성하고, 이어서 이는 CoA-전이효소 또는 신타아제에 의해 4-아미노부티릴-CoA로 활성화된다. 다르게는, 석시닐-CoA의 환원 또는 알파-케토글루타레이트의 탈카복실화로부터 형성된 석시네이트 세미알데히드는, 트랜스아민화되어 4-아미노부티레이트를 형성하고, 이후 CoA-전이효소 또는 신타아제에 의해 활성화되어 4-아미노부티릴-CoA를 형성한다. 4-아미노부티릴-CoA, 및 4-아미노부티릴-CoA의 6-아미노카프로일-CoA 경로로의 몇몇 중간체는 자발적으로 이의 상응하는 락탐으로 고리화된다. 이와 같이, 4-아미노부티릴-CoA 및/또는 몇몇 아미노-CoA 중간체의 말단 아민 기에 보호기를 첨가하면 원치않는 환형 부산물의 형성을 최소화할 수 있다. 이러한 경우, 도 11에 도시된 것과 동일한 일반적 세트의 형질전환이 적용될 수 있지만, 두가지의 추가의 단계, 예를 들면, 아세틸라아제 및 데아세틸라아제가 경로에 첨가될 수 있다.

[0418] 도 10 및 11에 도시된 모든 형질전환은 표 8에 도시된 형질전환의 12가지 일반적 범주내에 속한다. 이후 각각의 범주내에 생화학적으로 특징규명된 다수의 후보 유전자가 기재된다. 클로닝되고 발현될 경우 도 10 및 11에서 적절한 형질전환을 촉매화하기 위해 적용될 수 있는 유전자가 구체적으로 열거된다.

표 8

[0419] 석시닐-CoA, 아세틸-CoA, 및/또는 4-아미노부티릴-CoA의 6-아미노카프로에이트, 카프로락탐, 및/또는 헥사메틸렌디아민으로의 전환을 위한 효소 유형(각각의 라벨의 처음 3개의 숫자는 기질 특이성과 무관한 형질전환의 일반적 유형을 표시하는 처음 3개의 효소 위원회 번호에 상응함)

라벨	기능
1.1.1.a	산화환원효소(케톤으로부터 하이드록실로, 또는 알데히드로부터 알코올로)
1.2.1.b	산화환원효소(아실-CoA로부터 알데히드로)
1.3.1.a	CH-CH 공여체 상에서 작동하는 산화환원효소
1.4.1.a	아미노산 상에서 작동하는 산화환원효소 20
2.3.1.a	아실전이효소
2.6.1.a	아미노전이효소
2.8.3.a	조효소-A 전이효소
3.1.2.a	티올에스테르 가수분해효소(CoA 특이적)
4.2.1.a	가수분해효소
6.2.1.a	산-티올 리가아제
6.3.1.a/6.3.2.a	아미드 신타아제/펩티드 신타아제
필요한 효소가 없음	자발적 고리화 25

[0420] 1.1.1.a 산화환원효소. 도 10 및 11에 도시된 4가지 형질전환은 케톤 작용기를 하이드록실 기로 전환시키는 산화환원효소를 필요로 한다. 도 10 및 11 둘다에서 단계 B는 3-옥소아실-CoA를 3-하이드록시아실-CoA로 전환시킴을 포함한다. 도 1 및 2 둘다에서 단계 H는 3-옥소산을 3-하이드록시산으로 전환시킴을 포함한다.3-옥소아실-CoA 분자, 예컨대 3-옥소아디필-CoA 및 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA를 3-하이드록시아실-CoA 분자, 예컨대 3-하이드록시아디필-CoA 및 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA로 각각 전환시킬 수 있는 예시적인 효소로는, 천연의 생리학적 역할이 지방산 베타-산화 또는 페닐아세테이트 이화작용인 효소가 포함된다. 예를 들면, 에스케리치아 콜라이중 *fadB* 및 *fadJ*에 의해 코딩되는 2가지 지방산 산화 착체의 서브유닛은 3-하이드록시 아실-CoA 탈수소효소로서 작용한다(Binstock et al., Methods Enzymol. 71:403-411(1981)). 게다가, 슈도모나스 푸티다 U중 *phaC*(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6419-6424(1998)) 및 슈도모나스 플루오레센스 ST중 *paaC*(Di Gennaro et al., Arch. Microbiol. 188:117-125(2007))에 의해 코딩되는 유전자 생성물은 도 10에서 단계 B의 역 반응을 촉매화하고, 즉 페닐아세테이트 또는 스타이렌의 이화작용 동안 3-하이드록시아디필-CoA의 산화로 3-옥소아디필-CoA를 형성함을 촉매화한다. 이러한 효소에 의해 촉매화되는 반응은 가역성임을 주지한다. 또한, 페닐아세테이트 분해 오페론에서 다른 유전자에 대한 *paaH*의 에스케리치아 콜라이에서의 근접성(Nogales et al., Microbiology 153:357-365(2007)) 및 *paaH* 돌연변이체가 페닐아세테이트에서 성장할 수 없다는 사실(Ismail et al., Eur.J Biochem. 270:3047-3054(2003))을 참고하여, 에스케리치아 콜라이 *paaH* 유전

자가 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소를 코딩하는 것이 예상된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
fadB	119811	P21177.2	에스케리치아 콜라이
fadJ	3334437	P77399.1	에스케리치아 콜라이
paaH	16129356	NP_415913.1	에스케리치아 콜라이
phaC	26990000	NP_745425.1	슈도모나스 푸티다
paaC	106636095	ABF82235.1	슈도모나스 플루오레센스

[0421]

[0422] 3-옥소아실-CoA 분자를 이의 상응하는 3-하이드록시아실-CoA 분자로 전환시킬 수 있는 추가의 예시적인 산화환원효소는 3-하이드록시부티릴-CoA 탈수소효소를 포함한다. *hbd*에 의해 코딩되는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 효소는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 작용적으로 발현된다(Youngleson et al., J. Bacteriol. 171:6800-6807(1989)). 추가적인 유전자 후보는 클로스트리디엄 클루이베리중의 *Hbd1*(C-말단 도메인) 및 *Hbd2*(N-말단 도메인)(Hillmer et al., FEBS Lett. 21:351-354(1972)) 및 보스 타우러스중의 *HSD17B10*(Wakil et al., J. Biol. Chem. 207:631-638(1954))을 포함한다. 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로 환원시키는 것으로 입증된 다른 유전자 후보는 주글로에아 라미게라로부터의 *phbB*(Ploux et al., Eur. J. Biochem. 174:177-182(1988)) 및 로도박터 스파에로이데스로부터의 *phaB*(Alber et al., Mol.Microbiol 61:297-309(2006))를 포함한다. 앞에 언급된 유전자 후보는 NADPH-의존성이고, 이의 뉴클레오티드 서열은 결정되었고(Peoples et al., Mol. Microbiol 3:349-357(1989)), 이 유전자는 에스케리치아 콜라이에서 발현되었다. 유전자에 대한 기질 특이성 연구 결과, 이는 아세토아세틸-CoA 이외의 기질로서 3-옥소프로피오닐-CoA를 수용할 수 있는 것으로 결론내려졌다(Ploux et al., supra).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hbd	18266893	P52041.2	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
Hbd2	146348271	EDK34807.1	클로스트리디엄 클루이베리
Hbd1	146345976	EDK32512.1	클로스트리디엄 클루이베리
HSD17B10	3183024	O02691.3	보스 타우러스
phbB	130017	P23238.1	주글로에아 라미게라
phaB	146278501	YP_001168660.1	로도박터 스파에로이데스

[0423]

[0424] 다수의 유사한 효소가 다른 종의 클로스트리디아 및 메탈로스파에라 세듈라에서 발견되었다(Berg et al., Science 318:1782-1786(2007)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hbd	15895965	NP_349314.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
hbd	20162442	AAM14586.1	클로스트리디엄 베이제린키
Msed_1423	146304189	YP_001191505	메탈로스파에라 세듈라
Msed_0399	146303184	YP_001190500	메탈로스파에라 세듈라
Msed_0389	146303174	YP_001190490	메탈로스파에라 세듈라
Msed_1993	146304741	YP_001192057	메탈로스파에라 세듈라

[0425]

[0426] 다양한 알코올 탈수소효소는 3-옥소아디페이트를 3-하이드록시아디페이트로 전환시키거나(단계 H, 도 10) 또는 3-옥소-6-아미노헥사노에이트를 3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트로 전환시키기 위한(단계 H, 도 11) 우수한 후보를 나타낸다. 옥소산을 하이드록시산으로 전환시킬 수 있는 2가지 이러한 효소는 에스케리치아 콜라이중의 말레이트 탈수소효소(*mdh*) 및 락테이트 탈수소효소(*ldhA*) 유전자에 의해 코딩된다. 또한, 랄스토니아 유트로파로부터의 락테이트 탈수소효소는 다양한 쇄 길이의 기질, 예컨대 락테이트, 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소글루타레이트에 대해 높은 활성을 나타내는 것으로 제시되었다(Steinbuchel et al., Eur. J. Biochem. 130:329-334(1983)). 알파-케토아디페이트의 알파-하이드록시아디페이트로의 전환은 2-케토아디페이트 환원효소에 의해 촉매화될 수 있고, 효소는 래트 및 인간 췌장에서 발견된다고 보고되었다(Suda et al., Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620(1976); Suda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591(1977). 이들 단계를 위한 추가적인 후보는 인간 심장으로부터의 미토콘드리아 3-하이드록시부티레이트 탈수소효소(*bdh*)이고, 이는 클로닝되고 특징규명되었다(Marks et al., J. Biol. Chem. 267: 15459-15463(1992)). 이 효소는 3-하이드록시산 상에서 작동하는 탈수소효소이다. 또 다른 예시적인 알코올 탈수소효소는 클로스트

리디엄 베이제린키(Ismaiel et al., J. Bacteriol. 175:5097-5105(1993)) 및 써모에어로박터 브록키(*Thermoanaerobacter brockii*)(Lamed et al., Biochem. J. 195: 183-190(1981); Peretz et al., Biochemistry 28:6549-6555(1989))에서 볼 수 있듯이 아세톤을 이소프로판올로 전환시킨다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
mdh	1789632	AAC76268.1	에스케리치아 콜라이
ldhA	16129341	NP_415898.1	에스케리치아 콜라이
ldh	113866693	YP_725182.1	랄스토니아 유트로파
bdh	177198	AAA58352.1	호모 사피엔스
adh	60592974	AAA23199.2	클로스트리디엄 베이제린키
adh	113443	P14941.1	써모언에어로박터 브록키

[0427]

[0428] 1.2.1.b 산화환원효소(아실-CoA로부터 알데히드로). 아디필-CoA로부터 아디페이트 세미알데히드로(단계 N, 도 10) 및 6-아미노카프로일-CoA로부터 6-아미노카프로에이트 세미알데히드로(단계 U, 도 10; 단계 N, 도 11)의 형질전환은 아실-CoA를 그의 상응하는 알데히드로 환원시킬 수 있는 아실-CoA 탈수소효소를 필요로 한다. 이러한 효소를 코딩하는 예시적인 유전자는 지방 아실-CoA 환원효소를 코딩하는 아시네토박터 칼코아세티커스 *acr1*(Reiser et al., J. Bacteriology 179:2969-2975(1997)), 아시네토박터 종 M-1 지방 아실-CoA 환원효소(Ishige et al., Appl.Environ.Microbiol. 68:1192-1195(2002)), 및 클로스트리디엄 클루이베리에서 *sucD* 유전자에 의해 코딩되는 CoA- 및 NADP-의존성 석시네이트 세미알데히드 탈수소효소(Sohling et al., J. Bacteriol. 178:871-880(1996))이다. 포르피로모나스 진기발리스의 SucD는 또 다른 석시네이트 세미알데히드 탈수소효소이다(Takahashi et al., J. Bacteriol. 182:4704-4710(2000)). *bphG*에 의해 코딩되는 슈도모나스 종에서의 아세트알데히드 탈수소효소를 아실화하는 효소는, 아세트알데히드, 프로피온알데히드, 부티르알데히드, 이소부티르알데히드 및 폼알데히드(Powlowski et al., J Bacteriol. 175:377-385(1993))를 산화하고 아실화하는 것으로 입증되었으므로, 역시 또 다른 후보이다. 아세틸-CoA를 에탄올로 환원시키는 것에 더하여, 이 류코노스톡 메센테로이데스에서 adhE에 의해 코딩되는 효소는 분지형 화합물 이소부티르알데히드를 이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 나타났다(Kazahaya et al., J .Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55(1972); Koo et al., Biotechnol Lett. 27:505-510(2005)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
acr1	50086359	YP_047869.1	아시네토박터 칼코아세티커스
acr1	1684886	AAC45217	아시네토박터 바일리
acr1	18857901	BAB85476.1	아시네토박터 종 균주 M-1
sucD	172046062	P38947.1	클로스트리디엄 클루이베리
sucD	34540484	NP_904963.1	포르피로모나스 진기발리스
bphG	425213	BAA03892.1	슈도모나스 종
adhE	55818563	AAV66076.1	류코노스톡 메센테로이데스

[0429]

[0430] 아실-CoA를 그의 상응하는 알데히드로 전환시키는 추가적인 효소 유형은 말로닐-CoA를 말론산 세미알데히드로 변형시키는 말로닐-CoA 환원효소이다. 말로닐-CoA 환원효소는 호열호산성 고세균 박테리아에서 3-하이드록시프로피오네이트 사이클을 통한 독립영양 탄소 고정화에서 핵심 효소이다(Berg et al., supra; Thauer R.K., Science 318:1732-1733(2007)). 이 효소는 NADPH를 보조인자로 이용하고, 메탈로스파에라 및 설폴로버스 종에서 특징규명되었다(Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006); Hugler et al., J.Bacteriol. 184:2404-2410(2002)). 효소는 메탈로스파에라 세듈라에서 *Msed_0709*에 의해 코딩된다(Alber et al., supra; Berg et al., supra). 설폴로버스 토코다이로부터의 말로닐-CoA 환원효소를 코딩하는 유전자를 클로닝하고 에스케리치아 콜라이에서 이종으로 발현한다(Alber et al., supra). 이 효소는 메틸말로닐-CoA의 그의 상응하는 알데히드로의 전환을 촉매화하는 것으로 제시되었다(국제 특허출원 공개공보 제WO/2007/141208호). 이들 효소의 알데히드 탈수소효소 작용성이 클로로플렉서스 아우란티커스(*Chloroflexus aurantiacus*)로부터의 이작용성 탈수소효소와 유사하지만, 서열 유사성이 거의 없다. 말로닐-CoA 환원효소 후보는 아스파테이트-세미알데히드 탈수소효소에 높은 서열 유사성을 갖고, 효소는 아스파틸-4-포스페이트를 아스파테이트 세미알데히드로 환원과 동시에 탈포스포릴화함을 촉매화한다. 추가적인 유전자 후보는 설폴로버스 솔파타리쿠스 및 설폴로버스 아시도칼다리우스를 비롯한 다른 유기체에서 단백질에 상동성인 서열에 의해 밝혀질 수 있고 이후 열거되었다. CoA-아세틸화 알데히드 탈수소효소를 위한 또 다른 후보는 클로스트리디엄 베이제린키로부터의 *ald* 유전자이다(Toth et al., Appl Environ Microbiol 65:4973-4980(1999)). 이 효소는 아세틸-CoA 및 부티릴-CoA를 이의 상응하는

알데히드로 환원시키는 것으로 보고되었다. 이 유전자는 살모넬라 티피뮤리엄 및 에스케리치아 콜라이의 아세트알데히드 탈수소효소를 코딩하는 *eutE*와 매우 유사하다(Toth et al., supra).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
Msed_0709	146303492	YP_001190808.1	메탈로스파에라 세듈라
mcr	15922498	NP_378167.1	설폴로버스 토코다이
asd-2	15898958	NP_343563.1	설폴로버스 솔파타리쿠스
Saci_2370	70608071	YP_256941.1	설폴로버스 아시도칼다리우스
Ald	49473535	AAT66436	클로스트리디엄 베이제린키
eutE	687645	AAA80209	살모넬라 티피뮤리엄
eutE	2498347	P77445	에스케리치아 콜라이

[0431]

[0432] 1.3.1.a CH-CH 공여체 상에서 작용하는 산화환원효소. 도 10을 참조하여, 단계 D는 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소에 의한 5-카복시-2-펜테노일-CoA의 아디필-CoA로의 전환을 지칭한다. 도 11을 참조하여, 단계 D는 6-아미노헥스-2-에노일-CoA의 6-아미노카프로일-CoA로의 전환을 지칭한다. 에노일-CoA 환원효소는 형질전환을 위한 적합한 효소이다. 하나의 예시적인 에노일-CoA 환원효소는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *bcd*로부터의 유전자 생성물이고(Boynton et al., J Bacteriol. 178:3015-3024(1996); Atsumi et al., Metab. Eng. 2008 10(6):305-311(2008)(Epub Sep. 14, 2007), 이는 크로토닐-CoA의 부티릴-CoA로의 환원을 천연적으로 촉매화한다. 이러한 효소의 활성은 전자 전달 플라보단백질을 코딩하는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴 *etfAB* 유전자의 발현과 함께 *bcd*를 발현함으로써 증진될 수 있다. 에노일-CoA 환원효소 단계를 위한 추가적인 후보는 유글레나 그라실리스로부터의 미토콘드리아 에노일-CoA 환원효소이다(Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338(2005)). 미토콘드리아 표적화 리더 서열의 제거 후 상기 서열로부터 유도된 구축물은 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되어 활성 효소를 생성한다(Hoffmeister et al., supra). 진핵생물 유전자, 특히 원핵생물 유기체에서 특이적 세포내 구획으로 유전자 생성물을 표적화할 수 있는 리더 서열을 갖는 유전자를 발현하는 이러한 접근방법은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 원핵생물 트레포네마 덴티콜라로부터의 상기 유전자의 근접한 상동체, TDE0597은 제3 에노일-CoA 환원효소를 나타내고, 이는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 발현되었다(Tucci et al., FEBS Letters 581: 1561-1566(2007)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
bcd	15895968	NP_349317.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
etfA	15895966	NP_349315.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
etfB	15895967	NP_349316.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
TER	62287512	Q5EU90.1	유글레나 그라실리스
TDE0597	42526113	NP_971211.1	트레포네마 덴티콜라

[0433]

[0434] 도 10 및 11 둘다의 단계 J는 2-에노에이트 환원효소를 필요로 한다. 2-에노에이트 환원효소(EC 1.3.1.31)는 다양한 α,β-불포화 카복실산 및 알데히드의 NAD(P)H-의존성 환원을 촉매화하는 것으로 공지되어 있다(Rohdich et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787(2001)). 2-에노에이트 환원효소는 클로스트리디엄 티로부티리컴, 및 클로스트리디엄 써모아세티컴(현재 무렐라 써모아세티컴으로 지칭됨)(Rohdich et al., supra)을 포함하는 클로스트리디아의 수 개의 종에서 *enr*에 의해 코딩된다(Giesel and Simon, Arch. Microbiol. 135:51-57(1983)). 클로스트리디엄 클루이베리의 공개된 게놈 서열에서, 에노에이트 환원효소를 위한 9개의 코딩 서열이 보고되어 있고, 이로부터 특징규명되었다(Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 105:2128-2133(2008)). 클로스트리디엄 티로부티리컴 및 클로스트리디엄 써모아세티컴으로부터의 *enr* 유전자는 클로닝되고 서열화되고 서로 59%의 동일성을 나타낸다. 전자의 유전자는 또한 클로스트리디엄 클루이베리에서 특징규명된 유전자에 대략 75%의 유사성을 갖는 것으로 밝혀졌다(Giesel et al., supra). 이들 서열 결과에 기초하여 *enr*이 에스케리치아 콜라이에서의 디에노일 CoA 환원효소(*fadH*)와 매우 유사하다고 보고되었다(Rohdich et al., supra). 클로스트리디엄 써모아세티컴 *enr* 유전자는 또한 에스케리치아 콜라이에서 효소적으로 활성인 형태로 발현되었다(Rohdich et al., supra).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
fadH	16130976	NP_417552.1	에스케리치아 콜라이
enr	169405742	ACA54153.1	클로스트리디엄 보툴리넘 A3 균주
enr	2765041	CAA71086.1	클로스트리디엄 티로부티리컴
enr	3402834	CAA76083.1	클로스트리디엄 클루이베리
enr	83590886	YP_430895.1	무렐라 써모아세티카

[0435]

[0436] 1.4.1.a 아미노산 상에서 작동하는 산화환원효소. 도 10은 2가지 환원성 아민화를 도시한다. 구체적으로 도 10의 단계 P는 아디페이트 세미알데히드의 6-아미노카프로에이트로의 전환을 포함하고 도 10의 단계 W는 6-아미노카프로에이트 세미알데히드의 헥사메틸렌디아민으로의 전환을 수반한다. 후자의 형질전환은 또한 도 11, 단계 P에서 필요하다.

[0437] 아미노산 상에서 작동하는 대부분의 산화환원효소는 수용체로서의 NAD^+ 또는 $NADP^+$에 의해 알파-아미노산의 산화적 탈아민화를 촉매화하지만, 이 반응은 전형적으로 가역성이다. 아미노산 상에서 작동하는 예시적인 산화환원효소로는 *gdhA*에 의해 코딩되는 글루타메이트 탈수소효소(탈아민화), *ldh*에 의해 코딩되는 로이신 탈수소효소(탈아민화), 및 *nadX*에 의해 코딩되는 아스파테이트 탈수소효소(탈아민화)가 포함된다. 에스케리치아 콜라이로부터의 *gdhA*(McPherson et al., Nucleic.Acids Res. 11:5257-5266(1983); Korber et al., J. Mol. Biol. 234:1270-1273(1993)), 써모토가 마리티마로부터의 *gdh*(Kort et al., Extremophiles 1:52-60(1997); Lebbink et al., J. Mol. Biol. 280:287-296(1998); Lebbink et al., J. Mol. Biol. 289:357-369(1999)), 및 할로박테리엄 살리나럼으로부터의 *gdhA1*(Ingoldsby et al., Gene. 349:237-244(2005)) 유전자 생성물은 글루타메이트의 2-옥소글루타레이트 및 암모니아로의 가역적 상호전환을 촉매화하는 한편, NADP(H), NAD(H), 또는 이들 둘다를 각각 촉진시킨다. 바실러스 세레우스의 *ldh* 유전자는 로이신, 이소로이신, 발린, 및 2-아미노부타노에이트를 비롯한 광범위한 기질을 갖는 LeuDH 단백질을 코딩한다(Stoyan et al., J.Biotechnol 54:77-80(1997); Ansorge et al., Biotechnol Bioeng. 68:557-562(2000)). 아스파테이트 탈수소효소를 코딩하는 써모토가 마리티마의 *nadX* 유전자는 NAD의 생합성에 관여된다(Yang et al., J. Biol. Chem. 278:8804-8808(2003)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gdhA	118547	P00370	에스케리치아 콜라이
gdh	6226595	P96110.4	써모토가 마리티마
gdhA1	15789827	NP_279651.1	할로박테리엄 살리나럼
ldh	61222614	P0A393	바실러스 세레우스
nadX	15644391	NP_229443.1	써모토가 마리티마

[0438]

[0439] *lysDH* 유전자에 의해 코딩되는 라이신 6-탈수소효소(탈아민화)는 L-라이신의 ε-아미노 기의 산화적 탈아민화를 촉매화하여 2-아미노아디페이트-6-세미알데히드를 형성하고, 이는 다시 비효소적으로 고리화되어 Δ^1-피페리딘-6-카복실레이트를 형성한다(Misono et al., J.Bacteriol. 150:398-401(1982)). 예시적인 효소는 게오바실러스 스테아로써모필러스(Heydari et al., Appl Environ.Microbiol 70:937-942(2004)), 아그로박테리엄 투메파시엔스(Hashimoto et al., J Biochem 106:76-80(1989); Misono et al., supra), 및 아크로모박터 데니트리피칸스(Ruldeekulthamrong et al., BMB.Rep. 41:790-795(2008))에서 발견될 수 있다. 이러한 효소는 아디페이트 세미알데히드를 6-아미노카프로에이트로 전환시키기 위한 특히 유사한 후보이고, 아디페이트 세미알데히드 및 2-아미노아디페이트-6-세미알데히드 사이에 구조적 유사성이 제공된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
lysDH	13429872	BAB39707	게오바실러스 스테아로써모필러스
lysDH	15888285	NP_353966	아그로박테리엄 투메파시엔스
lysDH	74026644	AAZ94428	아크로모박터 데니트리피칸스

[0440]

[0441] 2.3.1.b 아실 전이효소. 도 10을 참조하여, 단계 A는 3-옥소아디필-CoA 티올라아제, 또는 동등하게 석시닐 CoA:아세틸 CoA 아실 전이효소(β-케토티올라아제)를 포함한다. 슈도모나스 균주 B13중의 *pcaF*(Kaschabek et al., J.Bacteriol. 184:207-215(2002)), 슈도모나스 푸티다 U중의 *phaD*(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6419-6424(1998)), 슈도모나스 플루오레센스 ST중 *paaE*(Di Gennaro et al., Arch. Microbiol. 188:117-125(2007)), 및 에스케리치아 콜라이로부터의 *paaJ*(Nogales et al., Microbiol. 153:357-365(2007))에

의해 코딩되는 유전자 생성물은 3-옥소아디필-CoA의 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로의 전환을 방향족 화합물, 예컨대 페닐아세테이트 또는 스타이렌의 분해 동안 촉매화한다. β-케토티올라아제 효소는 가역성 형질전환을 촉매화하므로, 이들 효소는 3-옥소아디필-CoA 합성을 위해 이용될 수 있다. 예를 들면, 랄스토니아 유트로파로부터의 케토티올라아제 *phaA*는 아세틸-CoA의 2개 분자를 결합시켜 아세토아세틸-CoA를 형성한다(Sato et al., J. Biosci. Bioengineer. 103:38-44(2007)). 유사하게, β-케토 티올라아제(*bktB*)는 아세틸-CoA 및 프로피오닐-CoA의 축합을 촉매화하여 β-케토 발레릴-CoA(Slater et al., J. Bacteriol. 180: 1979-1987(1998))를 랄스토니아 유트로파에서 형성하는 것으로 보고되었다. 3-옥소아디필-CoA 티올라아제 활성을 소유하는 경향 이외에, 모든 이러한 효소는 그의 고유의 형태로, 또는 이들이 적절히 조작되면, 4-아미노부티릴-CoA 및 아세틸-CoA를 축합하여 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA를 형성하는 우수한 후보를 나타낸다(단계 A, 도 11)

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
paaJ	16129358	NP_415915.1	에스케리치아 콜라이
pcaF	17736947	AAL02407	슈도모나스 내크무쉬(B13)
phaD	3253200	AAC24332.1	슈도모나스 푸티다
paaE	106636097	ABF82237.1	슈도모나스 플루오레센스

[0442]

[0443] 2-아미노-4-옥소펜타노에이트(AKP) 티올라아제 또는 AKP 티올라아제(AKPT) 효소는 도 10 및 11에서의 단계 A를 수행하는 추가적인 후보를 나타낸다. AKPT는 클로스트리디엄 스티크랜디(*Clostridium sticklandii*)에서 오르니틴 분해에 참여하는 피리독살 포스페이트-의존성 효소이다(Jeng et al., Biochemistry 13:2898-2903(1974); Kenklies et al., Microbiology 145:819-826(1999)). AKPT(*or-2(ortA)* 및 *or-3(ortB)*)의 알파 및 베타 서브유닛을 코딩하는 유전자 군집이 최근 식별되었고, 효소의 생화학 특성이 특징규명되었다(Fonknechten et al., J.Bacteriol. In Press(2009)). 효소는 양쪽 방향으로 작동할 수 있고 알라닌의 D-이성체와 천연적으로 반응한다. 클로스트리디엄 스티크랜디로부터의 AKPT는 특징규명되었지만 그의 단백질 서열은 아직 공개되지 않았다. 높은 서열 상동성을 갖는 효소가 클로스트리디엄 디피실레, 알칼리필러스 메탈리레디제네스 QYF, 써모언에어로박터 종 X514, 및 써모언에어로박터 텡콘젠시스 MB4에서 발견된다(Fonknechten et al., supra).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ortA (α)	126698017	YP_001086914.1	클로스트리디엄 디피실레 630
ortB (β)	126698018	YP_001086915.1	클로스트리디엄 디피실레 630
Amet_2368 (α)	150390132	YP_001320181.1	알칼리필러스 메탈리레디제네스 QYF
Amet_2369 (β)	150390133	YP_001320182.1	알칼리필러스 메탈리레디제네스 QYF
Teth514_1478 (α)	167040116	YP_001663101.1	써모언에어로박터 종 X514
Teth514_1479 (β)	167040117	YP_001663102.1	써모언에어로박터 종 X514
TTE1235 (α)	20807687	NP_622858.1	써모언에어로박터 텡콘젠시스 MB4
thrC (β)	20807688	NP_622859.1	써모언에어로박터 텡콘젠시스 MB4

[0444]

[0445] 2.6.1. 아미노전이효소. 도 10 및 11의 단계 O 및 도 10의 단계 V는 6-알데히드의 아민으로의 트랜스아민화를 필요로 한다. 이들 형질전환은 감마-아미노부티레이트 아미노전이효소(GABA 아미노전이효소)에 의해 촉매화된다. 에스케리치아 콜라이 GABA 아미노전이효소는 *gabT*에 의해 코딩되고 아미노 기를 글루타메이트로부터 석시닐 세미알데히드의 말단 알데히드로 전달한다(Bartsch et al., J. Bacteriol. 172:7035-7042(1990)). *puuE*의 유전자 생성물은 에스케리치아 콜라이에서 또 다른 4-아미노부티레이트 아미노전이효소를 촉매화한다(Kurihara et al., J. Biol. Chem. 280:4602-4608(2005)). 무스 무스큘러스, 슈도모나스 플루오레센스, 및 서스 스크로파에서 GABA 아미노전이효소는 6-아미노카프로산과 반응하는 것으로 제시되었다(Cooper, Methods Enzymol. 113:80-82(1985); Scott et al., J. Biol. Chem. 234:932-936(1959)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gabT	16130576	NP_417148.1	에스케리치아 콜라이
puuE	16129263	NP_415818.1	에스케리치아 콜라이
abat	37202121	NP_766549.2	무스 무스큘러스
gabT	70733692	YP_257332.1	슈모도나스 플루오레센스
abat	47523600	NP_999428.1	서스 스크로파

[0446]

[0447] 추가적인 효소 후보는 푸트레신(putrescine) 아미노전이효소 또는 다른 디아민 아미노전이효소를 포함한다. 이

러한 효소는 6-아미노카프로에이트 세미알데히드의 헥사메틸렌디아민으로의 전환을 실행하기에 특히 적합하다. 에스케리치아 콜라이 푸트레신 아미노전이효소는 *ygjG* 유전자에 의해 코딩되고, 정제된 효소는 또한 카다베린(cadaverine) 및 스페르미딘(spermidine)을 트랜스아민화할 수 있다(Samsonova et al., BMC Microbiol 3:2(2003)). 또한, 2-옥소글루타레이트 이외의 아미노 수용체(예를 들어, 피루베이트, 2-옥소부타노에이트)를 갖는, 1,7-디아미노헵탄 상의 상기 효소의 활성이 보고되었다(Samsonova et al., supra; Kim, K.H., J Biol Chem 239:783-786(1964)). 알파-케토글루타레이트 이외의 아미노 수용체로서의 피루베이트와 더 높은 활성을 갖는 푸트레신 아미노전이효소는 슈도모나스 아에루기노사의 *spuC* 유전자이다(Lu et al., J Bacteriol 184:3765-3773(2002)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ygjG	145698310	NP_417544	에스케리치아 콜라이
spuC	9946143	AAG03688	슈도모나스 아에루기노사

[0448]

[0449] 추가적인 후보 효소는 베타-알라닌으로부터 말로네이트 세미알데히드를 생산하는 베타-알라닌/알파-케토글루타레이트 아미노전이효소를 포함한다(국제 특허출원 공개공보 제WO08027742호). 사카로마이세스 클루이베리중의 SkPYD4의 유전자 생성물은 아미노 기 공여체로서 베타-알라닌을 우선적으로 사용하는 것으로 제시되었다(Andersen et al., FEBSJ. 274:1804-1817(2007)). SkUGA1은 사카로마이세스 세레비지아 GABA 아미노전이효소, UGA1의 상동체를 코딩하는 반면(Ramos et al., Eur.J.Biochem., 149:401-404(1985)), SkPYD4는 β-알라닌 및 GABA 트랜스아민화 둘다에 관여된 효소를 코딩한다(Andersen et al., supra). 3-아미노-2-메틸프로피오네이트 아미노전이효소는 메틸말로네이트 세미알데히드로부터 3-아미노-2-메틸프로피오네이트로의 형질전환을 촉매화한다. 이 효소는 래터스 노르베기커스 및 서스 스크로파에서 특징규명되고 *Abat*에 의해 코딩된다(Tamaki et al, Methods Enzymol, 324:376-389(2000)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
SkyPYD4	98626772	ABF58893.1	사카로마이세스 클루이베리
SkUGA1	98626792	ABF58894.1	사카로마이세스 클루이베리
UGA1	6321456	NP_011533.1	사카로마이세스 세레비지아
Abat	122065191	P50554.3	래터스 노르베기커스
Abat	120968	P80147.2	서스 스크로파

[0450]

[0451] 2.8.3.a 조효소-전이효소. CoA 전이효소는 하나의 분자로부터 또 다른 분자로의 CoA 잔기의 전이를 포함하는 가역성 반응을 촉매화한다. 예를 들면, 도 10의 단계 E는 3-옥소아디필-CoA 전이효소에 의해 촉매화된다. 이러한 단계에서, 3-옥소아디페이트는 3-옥소아디필-CoA로부터 석시네이트, 아세테이트, 또는 또 다른 CoA 수용체로의 CoA 기의 전달에 의해 형성된다. 도 11의 단계 E는 또 다른 3-옥소아실-CoA, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA로부터의 CoA 잔기의 전달을 수반한다. 이들 단계를 위한 하나의 후보 효소는 슈도모나스중 *pcaI* 및 *pcaJ*에 의해 코딩되는 2-유닛 효소이고, 이는 3-옥소아디필-CoA/석시네이트 전이효소 활성을 갖는 것으로 제시되었다(Kaschabek et al., supra). 상동성에 기초한 유사한 효소는 아시네토박터 종 ADP1(Kowalchuk et al., Gene 146:23-30(1994)) 및 스트렙토마이세스 코엘리컬러에 존재한다. 추가의 예시적인 석시닐-CoA:3:옥소산-CoA 전이효소는 헬리코박터 필로리(Corthesy-Theulaz et al., J. Biol. Chem. 272:25659-25667(1997)) 및 바실러스 서브틸리스(Stols et al., Proteins. Expr. Purif. 53:396-403(2007))에 존재한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pcaI	24985644	AAN69545.1	슈도모나스 푸티다
pcaJ	26990657	NP_746082.1	슈도모나스 푸티다
pcaI	50084858	YP_046368.1	아시네토박터 종 ADP1
pcaJ	141776	AAC37147.1	아시네토박터 종 ADP1
pcaI	21224997	NP_630776.1	스트렙토마이세스 코엘리컬러
pcaJ	21224996	NP_630775.1	스트렙토마이세스 코엘리컬러
HPAG1_0676	108563101	YP_627417	헬리코박터 필로리
HPAG1_0677	108563102	YP_627418	헬리코박터 필로리
ScoA	16080950	NP_391778	바실러스 서브틸리스
ScoB	16080949	NP_391777	바실러스 서브틸리스

[0452]

[0453] CoA 수용체로서 아세테이트를 이용할 수 있는 3-옥소아실-CoA 전이효소는 에스케리치아 콜라이 *atoA*(알파 서브

유닛) 및 *atoD*(베타 서브유닛) 유전자에 의해 코딩된 아세토아세틸-CoA 전이효소이다(Vanderwinkel et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 33:902-908(1968); Korolev et al., Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr. 58:2116-2121(2002)). 이 효소는 또한 다양한 분지형 및 선형 아실-CoA 기질, 예컨대 이소부티레이트(Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58:1435-1439(1992)), 발러레이트(Vanderwinkel et al., supra) 및 부타노에이트(Vanderwinkel et al., supra)로부터 아세테이트에 CoA 잔기를 전달하는 것으로 제시되었다. 유사한 효소는 코리네박테리엄 글루타미컴 ATCC 13032(Duncan et al., Appl Environ Microbiol 68:5186-5190(2002)), 클로스트리디엄 아세토부틸리컴(Cary et al., Appl Environ Microbiol 56:1576-1583(1990)), 및 클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴(Kosaka et al., Biosci.Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007))에 존재한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
atoA	2492994	P76459.1	에스케리치아 콜라이 K12
atoD	2492990	P76458.1	에스케리치아 콜라이 K12
actA	62391407	YP_226809.1	코리네박테리엄 글루타미컴 ATCC 13032
cg0592	62389399	YP_224801.1	코리네박테리엄 글루타미컴 ATCC 13032
ctfA	15004866	NP_149326.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
ctfB	15004867	NP_149327.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
ctfA	31075384	AAP42564.1	클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴
ctfB	31075385	AAP42565.1	클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴

[0454]

[0455] 상기 효소는 아디필-CoA 및 아디페이트(도 10, 단계 K) 또는 6-아미노카프로에이트 및 6-아미노카프로일-CoA(도 10, 단계 Q; 도 2, 단계 K) 상에서 원하는 활성을 나타낼 수 있다. 그럼에도 불구하고, 추가의 예시적인 전이효소 후보는, 석시닐-CoA, 4-하이드록시부티릴-CoA, 및 부티릴-CoA 전이효소 활성을 각각 나타내는 것으로 제안되는 클로스트리디엄 클루이베리의 *cat1*, *cat2*, 및 *cat3*의 유전자 생성물에 의해 촉매화된다(Seedorf et al., supra; Sohling et al., Eur J Biochem. 212:121-127(1993); Sohling et al., J Bacteriol. 178:871-880(1996)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
cat1	729048	P38946.1	클로스트리디엄 클루이베리
cat2	172046066	P38942.2	클로스트리디엄 클루이베리
cat3	146349050	EDK35586.1	클로스트리디엄 클루이베리

[0456]

[0457] 혐기성 박테리아 아시드아미노코커스 페르멘탄스로부터의 글루타코네이트-Co A-전이효소(EC 2.8.3.12)는 이산 글루타코닐-CoA 및 3-부텐오일-CoA(Mack et al., FEBS Lett. 405:209-212(1997))와 반응한다. 이러한 효소를 코딩하는 유전자는 *gctA* 및 *gctB*이다. 이러한 효소는 글루타릴-CoA, 2-하이드록시글루타릴-CoA, 아디필-CoA 및 아크릴일-CoA를 포함하는 다른 CoA 유도체와 감소되었지만 탐지가능한 활성을 갖는다(Buckel et al., Eur. J. Biochem. 118:315-321(1981)). 효소는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 발현되었다(Mack et al., Eur. J. Biochem. 226:41-51(1994)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gctA	559392	CAA57199.1	아시드아미노코커스 페르멘탄스
gctB	559393	CAA57200.1	아시드아미노코커스 페르멘탄스

[0458]

[0459] 3.1.2.a 티올에스테르 가수분해효소(CoA 특이적). 수 개의 진핵생물 아세틸-CoA 가수분해효소는 광범위한 기질 특이성을 갖고, 이와 같이 3-옥소아디필-CoA, 아디필-CoA, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA, 또는 6-아미노카프로일-CoA를 가수분해하기 위한 적합한 후보 효소를 나타낸다(도 10 및 11의 단계 G 및 M). 예를 들면, 래터스 노르베기커스 뇌로부터의 효소(Robinson et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 71:959-965(1976))는 부티릴-CoA, 헥사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응할 수 있다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
acot12	18543355	NP_570103.1	래터스 노르베기커스

[0460]

[0461] 추가적인 가수분해효소는 3-하이드록시이소부티릴-CoA 가수분해효소를 포함하고, 이는 3-하이드록시이소부티릴-CoA의 3-하이드록시이소부티레이트로의 전환을 발린 분해 동안 효과적으로 촉매화하는 것으로 기재되었다

(Shimomura et al., J Biol Chem. 269: 14248-14253(1994)). 이러한 효소를 코딩하는 유전자는 래터스 노르베기커스(Shimomura et al., supra; Shimomura et al., Methods Enzymol. 324:229-240(2000)) 및 호모 사피엔스(Shimomura et al., supra)의 *hibch*를 포함한다. 서열 상동성에 의한 후보 유전자는 사카로마이세스 세레비지아의 *hibch* 및 바실러스 세레우스의 *BC_2292*를 포함한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hibch	146324906	Q5XIE6.2	래터스 노르베기커스
hibch	146324905	Q6NVY1.2	호모 사피엔스
hibch	2506374	P28817.2	사카로마이세스 세레비지아
BC_2292	29895975	AP09256	바실러스 세레우스

[0462]

[0463] 또 다른 후보 가수분해효소는 글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 수베릴-CoA, 세바실-CoA, 및 도데칸디오일-CoA(Westin et al., J. Biol. Chem. 280:38125-38132(2005)) 및 가장 근접한 에스케리치아 콜라이 상동체, *tesB* 상에 활성을 나타내는 인간 디카복실산 티오에스테라아제, *acot8*이고, 이는 또한 광범위한 CoA 티올에스테르를 가수분해할 수 있다(Naggert et al., J Biol Chem 266: 11044-11050(1991)). 유사한 효소는 또는 래트 간에서 특징규명되었다(Deana R., Biochem Int 26:767-773(1992)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
tesB	16128437	NP_414986	에스케리치아 콜라이
acot8	3191970	CAA15502	호모 사피엔스
acot8	51036669	NP_570112	래터스 노르베기커스

[0464]

[0465] 다른 잠재적인 에스케리치아 콜라이 티올에스테르 가수분해효소는 *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 Left 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 생성물을 포함한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
tesA	16128478	NP_415027	에스케리치아 콜라이
ybgC	16128711	NP_415264	에스케리치아 콜라이
paaI	16129357	NP_415914	에스케리치아 콜라이
ybdB	16128580	NP_415129	에스케리치아 콜라이

[0466]

[0467] 6.3.1.a/6.3.2.a 아미드 신타아제/펩티드 신타아제. 6-아미노카프로에이트의 카프로락탐으로의 직접적인 전환(단계 S, 도 10; 단계 R, 도 11)은 분자간 펩티드 결합의 형성을 필요로 한다. 번역 동안 아미노산을 단백질로 조립하는 리보솜은 천연의 가장 풍부한 펩티드 결합-형성 촉매이다. 비리보솜성 펩티드 합성효소는 메신저 mRNA를 포함하지 않는 펩티드 결합 형성 촉매이다(Schwarzer et al., Nat Prod.Rep. 20:275-287(2003)). 펩티드 결합을 형성할 수 있는 추가적인 효소는 슈도모나스 클로로라피스로부터의 아실-CoA 합성효소(Abe et al., J Biol Chem 283: 11312-11321(2008)), 에스케리치아 콜라이로부터의 감마-글루타밀푸트레신 합성효소(Kurihara et al., J Biol Chem 283: 19981-19990(2008)), 및 스트렙토마이세스 클라불리게러스로부터의 베타-락탐 합성효소(문헌[Bachmann et al., Proc Natl Acad Sci U S 95:9082-9086(1998)]; [Bachmann et al., Biochemistry 39:11187-11193(2000)]; [Miller et al., Nat Struct.Biol 8:684-689(2001)]; [Miller et al., Proc Natl Acad Sci U SA 99:14752-14757(2002)]; 및 [Tahlan et al., Antimicrob.Agents.Chemother. 48:930-939(2004)])를 포함한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
acsA	60650089	BAD90933	슈도모나스 클로로라피스
puuA	87081870	AAC74379	에스케리치아 콜라이
bls	41016784	Q9R8E3	스트렙토마이세스 클라불리게러스

[0468]

[0469] 4.2.1.a 하이드롤리아제. 대부분의 데하이드라타아제는 물의 α,β-제거를 촉매화한다. 이는 전자-유인 카보닐, 카복실레이트, 또는 CoA-티올 에스테르 기에 의한 α-수소의 활성화, 및 β-위치로부터의 하이드록실 기의 제거를 포함한다. 전자-유인 카복실레이트 기를 갖는 기질에 대해 활성을 나타내는 효소는 3-하이드록시아디페이트(도 10, 단계 I) 또는 3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트(도 11, 단계 I)를 탈수시키기 위한 탁월한 후보

이다.

[0470] 예를 들면, 푸마라아제 효소는 천연적으로 말레이트의 푸마레이트로의 가역적 탈수를 천연적으로 촉매화한다. 에스케리치아 콜라이는 성장 조건에 의해 조절되는 3가지 푸마라아제: FumA, FumB, 및 FumC를 갖는다. FumB는 산소 민감성이고 혐기성 조건하에서만 활성이다. FumA는 미세혐기성 조건하에 활성이고, FumC는 호기성 성장에서 단지 활성인 효소이다(문헌[Tseng et al., J Bacteriol 183:461-467(2001)]; [Woods et al., Biochim Biophys Acta 954:14-26(1988)]; 및 [Guest et al., J Gen Microbiol 131:2971-2984(1985)]). 추가적인 효소 후보는 캄필로박터 제주니(Smith et al., Int. Biochem. Cell Biol 31:961-975(1999)), 써머스 써모필러스(Mizobata et al., Arch.Biochem.Biophys. 355:49-55(1998)) 및 래터스 노르베기커스(Kobayashi et al., J Biochem. 89:1923-1931(1981))에서 발견된다. 높은 서열 상동성을 갖는 유사한 효소는 아라비돕시스 탈리아나로부터의 *fum1* 및 코리네박테리엄 글루타미컴으로부터의 *fumC*를 포함한다. 펠로토마큘럼 써모프로피오니컴로부터의 *MmcBC* 푸마라아제는 2개의 서브유닛을 갖는 푸마라아제의 또 다른 유형이다(Shimoyama et al., FEMS Microbiol Lett 270:207-213(2007)).

[0471]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
fumA	81175318	P0AC33	에스케리치아 콜라이
fumB	33112655	P14407	에스케리치아 콜라이
fumC	120601	P05042	에스케리치아 콜라이
fumC	9789756	O69294	캄필로박터 제주니
fumC	3062847	BAA25700	써머스 써모필러스
fumH	120605	P14408	래터스 노르베기커스
fum1	39931311	P93033	아라비돕시스 탈리아나
fumC	39931596	Q8NRN8	코리네박테리엄 글루타미컴
MmcB	147677691	YP_001211906	펠로토마큘럼 써모프로피오니컴
MmcC	147677692	YP_001211907	펠로토마큘럼 써모프로피오니컴

[0472] 2종의 추가적인 데하이드라타아제 후보는 2-(하이드록시메틸)글루타레이트 데하이드라타아제 및 디메틸말리에이트 수화효소, 유박테리움 바르케리에서 니코티네이트 이화작용에서의 역할로 연구된 효소(이전에 클로스트리디엄 바르케리였음)이다(Alhapel et al., Proc Natl Acad Sci U SA 103:12341-6(2006)). 2-(하이드록시메틸)글루타레이트 데하이드라타아제는 2-(하이드록시메틸)글루타레이트를 2-메틸렌-글루타레이트로 탈수시키는 [4Fe-4S]-포함 효소이다. 이러한 효소는 유박테리움 바르케리에서 *hmd*에 의해 코딩된다(Alhapel et al., supra). 높은 서열 상동성을 갖는 유사 효소는 박테로이데스 카필로서스, 언에어로트룬커스 콜리호미니스, 및 나트란에어로비우스 써모필러스에서 발견된다. 이들 효소는 [4Fe-4S]-포함 박테리아 세린 데하이드라타아제의 알파 및 베타 서브유닛에 상동성이다(예를 들어, *tdcG*, *sdhB*, 및 *sdaA*에 의해 코딩된 에스케리치아 콜라이 효소).

[0473]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hmd	86278275	ABC88407.1	유박테리움 바르케리
BACCAP_02294	154498305	ZP_02036683.1	박테로이데스 카필로서스
ANACOL_02527	167771169	ZP_02443222.1	언에어로트룬커스 콜리호미니스 DSM 17241
NtherDRAFT_2368	169192667	ZP_02852366.1	나트란에어로비우스 써모필러스 JW/NM-WN-LF

[0474] 디메틸말레이트 수화효소(EC 4.2.1.85)는 디메틸말레이트를 수화시켜 (2R,3S)-2,3-디메틸말레이트를 형성하는 아코니타아제 계열중 가역성 Fe^{2+}-의존성 및 산소-감수성 효소이다. 이러한 효소는 유박테리움 바르케리중의 *dmdAB*에 의해 코딩된다(Alhapel et al., supra; Kollmann-Koch et al., Hoppe Seylers.ZPhysiol Chem. 365:847-857(1984)).

[0475]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
dmdA	86278276	ABC88408	유박테리움 바르케리
dmdB	86278277	ABC88409.1	유박테리움 바르케리

[0476] 추가적인 효소 후보는 2-메틸말레이트 데하이드라타아제(또한 시트라말레이트 가수분해효소로 지칭됨), 즉 시트라말레이트로부터 물의 알파, 베타 제거를 촉매화하여 메사코네이트를 형성하는 가역성 가수분해효소이다. 이러한 효소는 클로스트리디엄 테타노모폼(*Chlostridium tetanomorphum*)에서 정제되고 특징규명되었다(Wang et al., J Biol.Chem. 244:2516-2526(1969)). 이러한 효소의 활성은 또한 글루타메이트 분해 VI 경로의 맥락에서

시트로박터(*Citrobacter*) 및 모르가넬라(*Morganella*) 속의 몇몇 박테리아에서 검출되었다(Kato et al., Arch. Microbiol 168:457-463(1997)). 이 효소를 코딩하는 유전자는 아직까지 어떠한 유기체에서도 식별되지 않았다.

[0477] α-수소에 인접한 전자-유인 CoA-티올 에스테르 기를 갖는 기질에 대해 활성을 나타내는 효소는 3-하이드록시아디필-CoA(도 10, 단계 C) 또는 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA(도 11, 단계 C)를 탈수하기 위한 탁월한 후보이다. 슈도모나스 푸티다의 에노일-CoA 수화효소, *phaA* 및 *phaB*는 페닐아세테이트 이화작용 동안 이중 결합의 하이드록실화를 수행하는 것으로 믿겨진다(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:6419-6424(1998)). 슈도모나스 플루오레센스로부터의 *paaA* 및 *paaB*는 유사한 형질전환을 촉매화한다(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:6419-6424(1998)). 마지막으로, *maoC*(Park et al., JBacteriol. 185:5391-5397(2003)), *paaF*(Ismail et al., supra;Vark et al., Appl.Biochem.Biotechnol 113-116:335-346(2004); Park et al., Biotechnol Bioeng 86:681-686(2004)) 및 *paaG*(Ismail et al., rapra;Park et al., Appl.Biochem.Biotechnol 113-116:335-346(2004); Park et al., Biotechnol Bioeng 86:681-686(2004))를 포함하여 다수의 에스케리치아 콜라이 유전자가 에노일-CoA 수화효소 작용성을 나타내는 것으로 제시되었다. 크로토나아제(Crotonase) 효소는 도 10 및 도 11에 도시된 필요한 3-하이드록시아실-CoA 분자를 탈수시키기 위한 추가적인 후보이다. 이들 효소는 일부 유기체, 특별히 클로스트리디아 종에서 n-부탄올을 형성하기 위해 필요하고, 또한 3-하이드록시프로피오네이트/4-하이드록시부티레이트 사이클의 하나의 단계를 설폴로버스, 아시디아너스(*Acidianus*), 및 메탈로스파에라 속의 호열호산성 고세균에서 포함한다. 크로토나아제 효소를 코딩하는 예시적인 유전자는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴(Boynton et al., supra), 클로스트리디엄 클루이베리(Hillmer et al., FEBS Lett. 21:351-354(1972)), 및 메탈로스파에라 세둘라(Berg et al., supra)에서 발견될 수 있지만, 후자의 유전자의 서열은 공지되어 있지 않다. 지방산 베타-산화 및/또는 다양한 아미노산의 대사작용에 관여되는 에노일-CoA 수화효소는 또한 크로토닐-CoA의 수화를 촉매화하여 3-하이드록시부티릴-CoA를 형성할 수 있다(Roberts et al., Arch.Microbiol 117:99-108(1978); Agnihotri et al., Bioorg.Med.Chem. 11:9-20(2003); Conrad et al., J Bacteriol. 118:103-111(1974)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
paaA	26990002	NP_745427.1	슈도모나스 플루오레센스
paaB	26990001	NP_745426.1	슈도모나스 플루오레센스
phaA	106636093	ABF82233.1	슈도모나스 푸티다
phaB	106636094	ABF82234.1	슈도모나스 푸티다
maoC	16129348	NP_415905.1	에스케리치아 콜라이
paaF	16129354	NP_415911.1	에스케리치아 콜라이
paaG	16129355	NP_415912.1	에스케리치아 콜라이
crt	15895969	NP_349318.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
crt1	153953091	YP_001393856	클로스트리디엄 클루이베리 DSM 555

[0478]

[0479] 6.2.1.a 산-티올 리가아제. 도 10의 단계 F, L, 및 R, 및 도 11의 단계 F 및 L은 산-티올 리가아제 또는 합성효소 작용성을 필요로 한다(리가아제, 합성효소, 및 신타아제라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되고 동일한 효소 부류를 지칭함). 이들 형질전환을 수행하기 쉬운 효소를 코딩하는 예시적인 유전자로는 석시닐-CoA 합성효소 착체를 천연적으로 형성하는 에스케리치아 콜라이의 *sucCD* 유전자가 포함된다. 이러한 효소 착체는 하나의 ATP의 소비와 동시에 석시네이트로부터 석시닐-CoA의 형성을 천연적으로 촉매화하고, 이 반응은 생체내에서 가역성이다(Buck et al., Biochem. 24:6245-6252(1985)). 석시네이트 및 아디페이트 사이의 구조적 유사성, 즉 둘다 선형 디카복실산임을 참고하여, 아디필-CoA 상에서 *sucCD* 효소의 일부 활성을 예상하는 것은 당연하다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
sucC	16128703	NP_415256.1	에스케리치아 콜라이
sucD	1786949	AAC73823.1	에스케리치아 콜라이

[0480]

[0481] 추가의 예시적인 CoA-리가아제로는 서열이 아직 특징규명되지 않은 래트 디카복실레이트-CoA 리가아제(Vamecq et al., Biochemical Journal 230:683-693(1985)), 페니실리엄 크리소제넘으로부터의 2종의 특징규명된 페닐아세테이트-CoA 리가아제(Lamas-Maceiras et al., Biochem. J. 395:147-155(2005); Wang et al., Biochem Biophy Res Commun 360(2):453-458(2007)), 슈도모나스 푸티다로부터의 페닐아세테이트-CoA 리가아제(Martinez-Bianco et al., J. Biol. Chem. 265:7084-7090(1990)), 및 바실러스 서브틸리스로부터의 6-카복시헥

사노에이트-CoA 리가아제(Boweret al., J. Bacteriol. 178(14):4122-4130(1996))가 포함된다. 추가적인 후보 효소는 무스 무스큘러스(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 합성효소이고, 이는 아세토아세테이트의 아세토아세틸-CoA로의 ATP-의존성 전환을 천연적으로 촉매화한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
phl	77019264	CAJ15517.1	페니실리엄 크리소제넘
phlB	152002983	ABS19624.1	페니실리엄 크리소제넘
paaF	22711873	AAC24333.2	슈도모나스 푸티다
bioW	50812281	NP_390902.2	바실러스 서브틸리스
AACS	21313520	NP_084486.1	무스 무스큘러스
AACS	31982927	NP_076417.2	호모 사피엔스

[0482]

[0483] ADP-형성 아세틸-CoA 합성효소(ACD, EC 6.2.1.13)는 아실-CoA 에스테르의 그의 상응하는 산으로의 전환을 동시적인 ATP 합성과 결부시키는 또 다른 후보 효소이다. 광범위한 기질 특이성을 갖는 몇몇 효소는 문헌에 기재되어 있다. *AF1211*에 의해 코딩되는 아르카에오글로버스 펄지더스로부터의 ACD I은 다양한 선형 및 분지형 기질, 예컨대 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 이소부티레이트, 이소발러레이트, 석시네이트, 푸마레이트, 페닐아세테이트, 인돌아세테이트 상에서 작동하는 것으로 제시되었다(Musfeldt et al., J Bacteriol 184:636-644(2002)). 할로아르큘라 마리스모르튀(주석: 석시닐-CoA 합성효소)로부터의 효소는 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지형 산(이소발러레이트 및 이소부티레이트)를 기질로서 수용하고, 정방향 및 역방향으로 작동하는 것으로 제시되었다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004)). 극한호열성 크레나카에온(hyperthermophilic crenarchaeon) 피로바큘럼 에어로필럼으로부터의 *PAE3250*에 의해 코딩되는 ACD는, 아세틸-CoA, 이소부티릴-CoA(바람직한 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응하여, 모든 특징규명된 ACD중 가장 넓은 기질 범위를 보여주었다(Brasen et al., supra). 아르카에오글로버스 펄지더스, 할로아르큘라 마리스모르튀 및 피로바큘럼 에어로필럼으로부터의 효소는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고, 작용적으로 발현되고 특징규명되었다(문헌[Musfeldt et al., supra]; 및 [Bmsen et al., supra]).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
AF1211	11498810	NP_070039.1	아르카에오글로버스 펄지더스 DSM 4304
scs	55377722	YP_135572.1	할로아르큘라 마리스모르튀 ATCC 43049
PAE3250	18313937	NP_560604.1	피로바큘럼 에어로필럼 균주 IM2

[0484]

[0485] 또 다른 선택사항은 순(net) 리가아제 또는 합성효소 활성을 갖는 효소 세트를 이용하는 것이다. 예를 들면, 포스포트랜스아디필라아제 및 아디페이트 키나아제 효소는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *buk1*, *buk2*, 및 *ptb*의 유전자 생성물에 의해 촉매화된다(Walter et al., Gene 134:107-111(1993); Huang et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:33-38(2000)). *ptb* 유전자는 부티릴-CoA를 부티릴-포스페이트로 전환시킬 수 있는 효소를 코딩하고, 이어서 이는 ATP의 동시적인 발생과 함께 *buk* 유전자 생성물을 통해 부티레이트로 전환될 수 있다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ptb	15896327	NP_349676	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
buk1	15896326	NP_349675	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
buk2	20137415	Q97II1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴

[0486]

[0487] 어떠한 효소도 자발적인 고리화를 필요로 하지 않았다. 6-아미노카프로일-CoA는 자발적으로 카프로락탐으로 고리화되고, 따라서 이 단계를 위한 효소의 필요성을 제거한다. 유사한 자발적인 고리화는 피롤리디논을 형성하는 4-아미노부티릴-CoA에 의해 관찰된다(Ohsugi et al., J Biol Chem 256:7642-7651(1981)).

[0488] **실시예 XIII**

[0489] **아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA를 6-아미노카프로산으로 전환시키기 위한 경로를 갖는 6-아미노카프로산 생산 미생물 유기체의 제조**

[0490] 본 실시예는 아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA로부터 6-아미노카프로산을 생산할 수 있는 미생물 유기체의 생성을 설명한다.

[0491] 에스케리치아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여 아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA로부터 출발하는 도 11에 도시된 6-아미노카프로산 경로를 조작한다. 에스케리치아 콜라이는 6-아미노카프로산을 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위한 우수한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 다양한 생성물, 예컨대 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산, 및 석신산을 혐기성 또는 미세호기성 조건하에 효과적으로 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0492] 6-아미노카프로산을 생산하도록 조작된 에스케리치아 콜라이 균주를 생성하기 위해, 필수 효소를 코딩하는 핵산을 공지된 분자 생물학적 기법에 의해 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨다(예를 들면, 문헌[Sambrook, supra, 2001]; [Ausubel supra, 1999] 참조). 특별히, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 환원효소, 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA 데하이드라타아제 활성을 각각 코딩하는 *paaJ*(NP_415915.1), *paaH*(NP_415913.1), 및 *maoC*(NP_415905.1) 유전자를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 또한, 6-아미노헥스-2-에노일-CoA 환원효소 및 6-아미노카프로일-CoA 가수분해효소 활성을 코딩하는 *bcd*(NP_349317.1), *etfAB*(NP_349315.1 및 NP_349316.1), 및 *acot8*(CAA15502) 유전자를 pZA33 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 최종적으로, 석시닐-CoA 환원효소(알데히드 형성), GABA 아미노전이효소, 및 4-아미노부티릴-CoA/아실-CoA 전이효소 활성을 코딩하는 *sucD*(NP_904963.1), *gabT*(NP_417148.1), *cat2*(P38942.2) 유전자를 제3의 화합성 플라스미드 pZS23내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝하여, 4-아미노부티릴-CoA의 이용성을 증가시킨다. pZS23은 공지된 분자 생물학 기법에 의해 pZS13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)의 앰피실린 내성 모듈을 카나마이신 내성 모듈로 대체함으로써 수득된다. 플라스미드의 3 세트를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655로 형질전환시켜 6-아미노카프로산 합성에 요구되는 단백질 및 효소를 발현한다.

[0493] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차를 수행하여 글루코스 포함 배지에서 배양시킨다(예를 들면, [Sambrook et al., supra, 2001] 참조). 6-아미노카프로산 합성 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅 등을 비롯하여 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성은 개별 활성에 대해 특이적인 검정을 사용하여 확인된다. 6-아미노카프로산을 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS)에 의해 확인한다.

[0494] 6-아미노카프로산의 합성을 위한 작용성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0495] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 6-아미노카프로산의 더 효율적인 생산으로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 6-아미노카프로산의 더 나은 생산을 종합적으로 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, 6-아미노카프로산의 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA 중간체의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 6-아미노카프로산 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0496] 6-아미노카프로산의 대규모 생산을 위해, 상기 유기체를, 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지하고, 예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다. 제한된 통기를 위해 격벽에 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 대략 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, 예를 들면, HPLC 칼럼의 아미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들면, HPX-87 시리즈)(바이오래드), 글루코스 및 알코

올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(시마추)에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0497] **실시예 XIV**

[0498] **아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA를 6-아미노카프로산으로 전환시키기 위한 경로를 갖는 6-아미노카프로산 생산 미생물 유기체의 제조**

[0499] 본 실시예는 6-아미노카프로산을 아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA로부터 생산할 수 있는 미생물 유기체의 생성을 설명한다.

[0500] 에스케리치아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여 아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA로부터 출발하는 도 11에 도시된 6-아미노카프로산 경로를 조작한다. 에스케리치아 콜라이는 6-아미노카프로산을 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위한 우수한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 다양한 생성물, 예컨대 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산, 및 석신산을 혐기성 또는 미세호기성 조건하에 효과적으로 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0501] 6-아미노카프로산을 생산하도록 조작된 에스케리치아 콜라이 균주를 생성하기 위해, 필수 효소를 코딩하는 핵산을 공지된 분자 생물학적 기법에 의해 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨다(예를 들면, 문헌[Sambrook, supra, 2001]; [Ausubel supra, 1999] 참조). 특별히, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA/아실-CoA 전이효소, 3-옥소-6-아미노헥사노에이트 환원효소 활성을 각각 코딩하는 *paaJ*(NP_415915.1), *pcaIJ*(AAN69545.1 및 NP_746082.1), 및 *bdh*(AAA58352.1) 유전자 를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 또한, 6-아미노헥스-2-에노에이트 환원효소 및 3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트 데하이드라타아제 활성을 각각 코딩하는 *enr*(CAA76083.1) 및 *hmd*(ABC88407.1) 유전자를 pZA33 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 최종적으로, 석시닐-CoA 환원효소(알데히드 형성), GABA 아미노전이효소, 및 4-아미노부티릴-CoA/아실-CoA 전이효소 활성을 코딩하는 *sucD*(NP_904963.1), *gabT*(NP_417148.1), *cat2*(P38942.2) 유전자를 제3의 화합성 플라스미드 pZS23내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝하여, 4-아미노부티릴-CoA의 이용성을 증가시킨다. pZS23은 공지된 분자 생물학 기법에 의해 pZS13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)의 앰피실린 내성 모듈을 카나마이신 내성 모듈로 대체함으로써 수득된다. 플라스미드의 3 세트를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655로 형질전환시켜 6-아미노카프로산 합성에 요구되는 단백질 및 효소를 발현한다.

[0502] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차를 수행하여 글루코스 포함 배지에서 배양시킨다(예를 들면, [Sambrook et al., supra, 2001] 참조). 6-아미노카프로산 합성 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅 등을 비롯하여 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성은 개별 활성에 대해 특이적인 검정을 사용하여 확인된다. 6-아미노카프로산을 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS)에 의해 확인한다.

[0503] 6-아미노카프로산의 합성을 위한 작용성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0504] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 6-아미노카프로산의 더 효율적인 생산으로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 6-아미노카프로산의 더 나은 생산을 종합적으로 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, 6-아미노카프로산 생성물의 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA 중간체의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 6-아미노카프로산 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0505] 6-아미노카프로산의 대규모 생산을 위해, 상기 유기체를, 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지하고, 예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다. 제한된 통기를 위해 격벽에 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 대략 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, 예를 들면, HPLC 칼럼의 아미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들면, HPX-87 시리즈)(캘리포니아주 헤르큘레스 소재의 바이오래드), 글루코스 및 알코올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(매릴랜드주 컬럼비아 소재의 시마추)에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0506] **실시예 XV**

[0507] **아세틸-CoA 및 석시닐-CoA를 6-아미노카프로산으로 전환시키기 위한 경로를 갖는 카프로락탐 생산 미생물 유기체의 제조**

[0508] 본 실시예는 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA로부터 카프로락탐을 생산할 수 있는 미생물 유기체를 생성함을 설명한다.

[0509] 에스케리치아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA로부터 출발하는 도 10에 도시된 카프로락탐 경로를 조작한다. 에스케리치아 콜라이는 카프로락탐을 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위한 우수한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 다양한 생성물, 예컨대 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산, 및 석신산을 혐기성 또는 미세호기성 조건하에 효과적으로 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0510] 카프로락탐을 생산하도록 조작된 에스케리치아 콜라이 균주를 생성하기 위해, 필수 효소를 코딩하는 핵산을 공지된 분자 생물학적 기법에 의해 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨다(예를 들면, 문헌[Sambrook, supra, 2001]; [Ausubel supra, 1999] 참조). 특별히, 3-옥소아디필-CoA 티올라아제, 3-옥소아디필-CoA 환원효소, 및 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제 활성을 각각 코딩하는 *paaJ*(NP_415915.1), *paaH*(NP_415913.1), 및 *maoC*(NP_415905.1) 유전자를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 또한, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소 활성을 코딩하는 *bcd*(NP_349317.1) 및 *etfAB*(NP_349315.1 및 NP_349316.1) 유전자를 pZA33 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 최종적으로, 아디필-CoA 환원효소(알데히드 형성), 6-아미노카프로산 아미노전이효소, 및 6-아미노카프로일-CoA 신타아제 활성을 코딩하는 유전자 *acr1*(YP_047869.1), *gabT*(NP_417148.1), 및 *bioW*(NP_390902.2) 유전자를 제3의 화합성 플라스미드 pZS23내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. pZS23은 공지된 분자 생물학 기법에 의해 pZS13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)의 앰피실린 내성 모듈을 카나마이신 내성 모듈로 대체함으로써 수득된다. 플라스미드의 3 세트를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655로 형질전환시켜 카프로락탐 합성에 요구되는 단백질 및 효소를 발현한다.

[0511] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차를 수행하여 글루코스 포함 배지에서 배양시킨다(예를 들면, [Sambrook et al., supra, 2001] 참조). 카프로락탐 합성 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅 등을 비롯하여 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성은 개별 활성에 대해 특이적인 검정을 사용하여 확인된다. 카프로락탐을 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS)에 의해 확인한다.

[0512] 작용성 카프로락탐의 합성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0513] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 카프로락탐의 더 효율적인 생산으

로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2 레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 카프로락탐의 더 나은 생산을 종합적으로 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, 카프로락탐 생성물의 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA 중간체의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 카프로락탐 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0514] 카프로락탐의 대규모 생산을 위해, 상기 유기체를, 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지하고, 예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다. 제한된 통기를 위해 격벽에 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 대략 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, 예를 들면, HPLC 칼럼의 아미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들면, HPX-87 시리즈)(캘리포니아주 헤르큘레스 소재의 바이오래드), 글루코스 및 알코올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(매릴랜드주 컬럼비아 소재의 시마추)에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0515] **실시예 XVI**

[0516] **아세틸-CoA 및 석시닐-CoA를 6-아미노카프로산으로 전환시키기 위한 경로를 갖는 헥사메틸렌디아민 생산 미생물 유기체의 제조**

[0517] 본 실시예는 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA으로부터 헥사메틸렌디아민을 생산할 수 있는 미생물 유기체를 생성함을 설명한다.

[0518] 에스케리치아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA로부터 출발하는 도 10에 도시된 헥사메틸렌디아민 경로를 조작한다. 에스케리치아 콜라이는 헥사메틸렌디아민을 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위해 우수한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 다양한 생성물, 예컨대 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산, 및 석신산을 혐기성 또는 미세호기성 조건하에 효과적으로 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0519] 헥사메틸렌디아민을 생산하도록 조작된 에스케리치아 콜라이 균주를 생성하기 위해, 필수 효소를 코딩하는 핵산을 공지된 분자 생물학적 기법에 의해 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨다(예를 들면, 문헌[Sambrook, supra, 2001]; [Ausubel supra, 1999] 참조). 특별히, 3-옥소아디필-CoA 티올라아제, 3-옥소아디필-CoA 환원효소, 및 3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제 활성을 각각 코딩하는 *paaJ*(NP_415915.1), *paaH*(NP_415913.1), 및 *maoC*(NP_415905.1) 유전자를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 또한, 5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소 활성을 코딩하는 *bcd*(NP_349317.1) 및 *etfAB*(NP_349315.1 및 NP_349316.1) 유전자를 pZA33 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 최종적으로, 아디필-CoA 환원효소(알데히드 형성), 6-아미노카프로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 6-아미노카프로산 아미노전이효소, 6-아미노카프로일-CoA 신타아제, 및 헥사메틸렌디아민 아미노전이효소 활성을 코딩하는 유전자 *acr1*(YP_047869.1), *gabT*(NP_417148.1), *bioW*(NP_390902.2), 및 *ygjG*(NP_417544) 유전자를 제3의 화합성 플라스미드 pZS23내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝하였다. pZS23은 공지된 분자 생물학 기법에 의해 pZS13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)의 앰피실린 내성 모듈을 카나마이신 내성 모듈로 대체함으로써 수득된다. 플라스미드의 3 세트를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655로 형질전환시켜 헥사메틸렌디아민 합성에 요구되는 단백질 및 효소를 발현한다.

[0520] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차를 수행하여 글루코스 포함 배지에서 배양시킨다(예를 들면, [Sambrook et al., supra, 2001] 참조). 헥사메틸렌디아민 합성 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅 등을 비롯하여 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성은 개별 활성에 대해 특이적인 검정을 사용하여 확인된다. 헥사메틸렌디아민을 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS)에 의해 확인한다.

[0521] 작용성 헥사메틸렌디아민의 합성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0522] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 헥사메틸렌디아민의 더 효율적인 생산으로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 헥사메틸렌디아민의 더 나은 생산을 종합적으로 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, 헥사메틸렌디아민 생성물의 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA 중간체의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 헥사메틸렌디아민 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0523] 헥사메틸렌디아민의 대규모 생산을 위해, 상기 유기체를, 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지하고, 예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다. 제한된 통기를 위해 격벽에 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 대략 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, 예를 들면, HPLC 칼럼의 아미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들면, HPX-87 시리즈)(캘리포니아주 헤르큘레스 소재의 바이오래드), 글루코스 및 알코올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(매릴랜드주 컬럼비아 소재의 시마추)에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0524] **실시예 XVII**

[0525] **아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA를 6-아미노카프로일-CoA로 전환시키기 위한 경로를 갖는 카프로락탐 생산 미생물 유기체의 제조**

[0526] 본 실시예는 아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA로부터 카프로락탐을 생산할 수 있는 미생물 유기체의 생성을 설명한다.

[0527] 에스케리치아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여 아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA로부터 출발하는 도 11에 도시된 카프로락탐 경로를 조작한다. 에스케리치아 콜라이는 카프로락탐 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위한 우수한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 다양한 생성물, 예컨대 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산, 및 석신산을 혐기성 또는 미세호기성 조건하에 효과적으로 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0528] 카프로락탐을 생산하도록 조작된 에스케리치아 콜라이 균주를 생성하기 위해, 필수 효소를 코딩하는 핵산을 공지된 분자 생물학적 기법에 의해 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨다(예를 들면, 문헌[Sambrook, supra, 2001]; [Ausubel supra, 1999] 참조). 특별히, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 환원효소, 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA 데하이드라타아제 활성을 각각 코딩하는 *paaJ*(NP_415915.1), *paaH*(NP_415913.1), 및 *maoC*(NP_415905.1) 유전자를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 또한, 6-아미노헥스-2-에노일-CoA 환원효소 활성을 코딩하는 *bcd*(NP_349317.1) 및 *etfAB*(NP_349315.1 및 NP_349316.1) 유전자를 pZA33 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 최종적으로, 석시닐-CoA 환원효소(알데히드 형성), GABA 아미노전이효소, 및 4-아미노부티릴-CoA/아실-CoA 전이효소 활성을 코딩하는 유전자 *sucD*(NP_904963.1), *gabT*(NP_417148.1), 및 *cat2*(P38942.2) 유전자를 제3의 화합성 플라스미드 pZS23내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝하여, 4-아미노부티릴-CoA의 이용성을 증가시킨다. pZS23은 공지된 분자 생물학 기법에 의해 pZS13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)의 앰피실린 내성 모듈을 카나마이신 내성 모듈로 대체함으로써 수득된다.

플라스미드의 3 세트를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655로 형질전환시켜 카프로락탐 합성에 요구되는 단백질 및 효소를 발현한다.

[0529] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차를 수행하여 글루코스 포함 배지에서 배양시킨다(예를 들면, [Sambrook et al., supra, 2001] 참조). 카프로락탐 합성 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅 등을 비롯하여 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성은 개별 활성에 대해 특이적인 검정을 사용하여 확인된다. 카프로락탐을 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS)에 의해 확인한다.

[0530] 작용성 카프로락탐의 합성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0531] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 카프로락탐의 더 효율적인 생산으로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2 레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 카프로락탐의 더 나은 생산을 종합적으로 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, 카프로락탐 생성물의 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA 중간체의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 카프로락탐 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0532] 카프로락탐의 대규모 생산을 위해, 상기 유기체를, 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지하고, 예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다. 제한된 통기를 위해 격벽에 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 대략 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, 예를 들면, HPLC 칼럼의 아미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들면, HPX-87 시리즈)(캘리포니아주 헤르큘레스 소재의 바이오래드), 글루코스 및 알코올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(매릴랜드주 컬럼비아 소재의 시마추)에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0533] **실시예 XVIII**

[0534] **아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA를 6-아미노카프로일-CoA로 전환시키기 위한 경로를 갖는 헥사메틸렌디아민 생산 미생물 유기체의 제조**

[0535] 본 실시예는 아세틸-CoA 및 4-아미노부티릴-CoA로부터 헥사메틸렌디아민을 생산할 수 있는 미생물 유기체의 생성을 설명한다.

[0536] 에스케리치아 콜라이를 표적 유기체로서 사용하여 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA로부터 출발하는 XVII에 도시된 헥사메틸렌디아민 경로를 조작한다. 에스케리치아 콜라이는 헥사메틸렌디아민을 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위해 우수한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 다양한 생성물, 예컨대 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산, 및 석신산을 혐기성 또는 미세호기성 조건하에 효과적으로 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0537] 헥사메틸렌디아민을 생산하도록 조작된 에스케리치아 콜라이 균주를 생성하기 위해, 필수 효소를 코딩하는 핵산을 공지된 분자 생물학적 기법에 의해 에스케리치아 콜라이에서 발현시킨다(예를 들면, 문헌[Sambrook, supra, 2001]; [Ausubel supra, 1999] 참조). 특별히, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 티올라아제, 3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA 환원효소, 3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA 데하이드라타아제 활성을 각각 코딩하는

paaJ(NP_415915.1), *paaH*(NP_415913.1), 및 *maoC*(NP_415905.1) 유전자를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 또한, 6-아미노헥스-2-에노일-CoA 환원효소, 6-아미노카프로일-CoA 환원효소(알데히드 형성), 및 헥사메틸렌디아민 아미노전이효소 활성을 코딩하는 *bcd*(NP_349317.1), *etfAB*(NP_349315.1 및 NP_349316.1), *acr1*(YP_047869.1), 및 *ygjG*(NP_417544) 유전자를 pZA33 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝한다. 최종적으로, 석시닐-CoA 환원효소(알데히드 형성), GABA 아미노전이효소, 및 4-아미노부티릴-CoA/아실-CoA 전이효소 활성을 코딩하는 유전자 *sucD*(NP_904963.1), *gabT*(NP_417148.1), 및 *cat2*(P38942.2) 유전자를 제3의 화합성 플라스미드 pZS23내로 PA1/lacO 프로모터하에 클로닝하여, 4-아미노부티릴-CoA의 이용성을 증가시킨다. pZS23은 공지된 분자 생물학 기법에 의해 pZS13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)의 앰피실린 내성 모듈을 카나마이신 내성 모듈로 대체함으로써 수득된다. 플라스미드의 3 세트를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655로 형질전환시켜 헥사메틸렌디아민 합성에 요구되는 단백질 및 효소를 발현한다.

[0538] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차를 수행하여 글루코스 포함 배지에서 배양시킨다(예를 들면, [Sambrook et al., supra, 2001] 참조). 헥사메틸렌디아민 합성 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅 등을 비롯하여 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성은 개별 활성에 대해 특이적인 검정을 사용하여 확인된다. 헥사메틸렌디아민을 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS)에 의해 확인한다.

[0539] 헥사메틸렌디아민의 합성을 위한 작용성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0540] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 헥사메틸렌디아민의 더 효율적인 생산으로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 헥사메틸렌디아민의 더 나은 생산을 종합적으로 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, 헥사메틸렌디아민 생성물의 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA 중간체의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 헥사메틸렌디아민 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0541] 헥사메틸렌디아민의 대규모 생산을 위해, 상기 유기체를, 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지하고, 예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다. 제한된 통기를 위해 격벽에 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 대략 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, 예를 들면, HPLC 칼럼의 아미넥스(등록상표) 시리즈(예를 들면, HPX-87 시리즈)(캘리포니아주 헤르큘레스 소재의 바이오래드), 글루코스 및 알코올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(매릴랜드주 컬럼비아 소재의 시마추)에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0542] **실시예 XIX**

[0543] **석신산 세미알데히드 및 피루베이트로부터 6-아미노카프로산을 생산하기 위한 경로**

[0544] 본 실시예는 6-아미노카프로산의 생산을 위한 예시적인 경로를 설명한다.

[0545] 6-아미노카프로산(6-ACA) 및 관련 생성물을 생산하기 위해 신규 경로는 본원에 기재된다. 이들 경로는 4-하이드록시페닐아세트산 분해 경로로부터의 알돌라아제 및 수화효소를 사용하여 석신산 세미알데히드 및 피루베이트

로부터 6-ACA를 합성한다. 후보 효소, 및 실행과 연관된 위험성은 하기 실시예 XXI에서 논의된다.

[0546] 본 발명은, 부분적으로는, 6-ACA 생산을 촉매화하는 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는 비-천연 미생물에 관한 것이다. 성공적으로 이들 경로를 조작함은 충분한 활성 및 특이성을 갖는 효소의 적절한 세트를 식별하는 단계, 이들의 상응하는 유전자를 생산 숙주로 클로닝하는 단계, 생산 숙주에서 이들 유전자의 발현을 최적화하는 단계, 발효 조건을 최적화하는 단계, 및 발효 후 생성물 형성을 검정하는 단계를 수반한다.

[0547] 6-아미노카프로산 및 유도체는 석신산 세미알데히드 및 피루베이트로부터 최소 5개의 효소 단계에서 생산된다. 모든 경로의 제1 단계에서, 피루베이트 및 석신산 세미알데히드는 4-하이드록시-2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(HODH) 알돌라아제에 의해 연결된다. 이어서 이 반응의 생성물, HODH는 2-옥소헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED) 수화효소에 의해 탈수되어 OHED를 형성한다. 후속 단계에서, OHED는 도 12에 도시된 바와 같이 트랜스아민화되거나, 탈카복실화되거나, 환원된다.

[0548] 한 경로에서, OHED의 알켄은 OHED 환원효소에 의해 환원되어, 2-옥소헵탄-1,7-디오에이트(2-OHD)(도 12, 단계 C), 2-케토산을 형성한다. 이어서 2-OHD는 아디페이트 세미알데히드로 케토산 데카복실라아제에 의해 전환된다(도 12, 단계 D). 최종 단계에서, 아디페이트 세미알데히드의 알데히드는 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 아민으로 전환된다(도 12, 단계 E).

[0549] 유사한 경로에서, 2-OHD의 2-케토 기는 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 트랜스아민화되어(도 12, 단계 H) 2-아미노헵탄-1,7-디오에이트(2-AHD)를 형성한다. 이어서 이러한 생성물은 2-AHD 데카복실라아제에 의해 탈카복실화되어 6-아미노카프로에이트를 형성한다(도 12, 단계 I).

[0550] 다른 경로에서, OHED는 우선 OHED 데카복실라아제에 의해 탈카복실화되어(도 12, 단계 F), 6-옥소헥스-4-에노에이트(6-OHE)를 형성한다. 6-OHE의 알케날 기는 산화환원효소에 의해 아디페이트 세미알데히드로 환원된다(도 12, 단계 G). 이어서 아디페이트 세미알데히드는 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 6-아미노카프로에이트로 전환된다(도 12, 단계 E).

[0551] 또 다른 경로는 OHED를 2-아미노헵트-4-엔-1,7-디오에이트(2-AHE)로 전환시키기 위해 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소를 필요로 한다(도 12, 단계 J). 2-AHE의 알켄은 후속적으로 알켄 산화환원효소에 의해 환원된다(도 12, 단계 K). 이어서 이 반응의 생성물, 2-AHD은 아미노산 데카복실라아제에 의해 탈카복실화되어(도 12, 단계 I) 6-아미노카프로에이트를 형성한다.

[0552] 또 다른 경로에서, HODH는 HODH 탈수소효소 또는/및 HODH 포메이트-리아제에 의해 3-하이드록시아디필-CoA로 전환된다(도 12, 단계 L). 3-하이드록시아디필-CoA는 후속적으로 탈수되고 환원되어 아디필-CoA를 형성한다(도 12, 단계 M, N). 아디필-CoA는 환원되고 탈아실화되어 아디페이트 세미알데히드를 형성하고(도 12, 단계 O), 이어서 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 6-아미노카프로에이트로 전환된다(도 12, 단계 E).

[0553] 유사한 경로에서, HODH는 상기 기재된 바와 같이 우선 OHED로 전환된다(도 12, 단계 B). 이어서 OHED는 탈수소효소 또는 OHED 포메이트-리아제에 의해 2,3-데하이드로아디필-CoA로 전환된다(도 12, 단계 P). 이어서 2,3-디하이드로아디필-CoA는 아디필-CoA로 환원되고(도 12, 단계 N), 이는 이전에 기재된 바와 같이 아디페이트 세미알데히드를 경유해 6-아미노카프로에이트로 전환된다(도 12, 단계 O, E).

[0554] 최종 경로에서, HODH는 이전에 기재된 바와 같이 단계 B 및 C를 경유하여 2-OHD로 전환된다. 2-OHD 포메이트-리아제 또는 탈수소효소는 2-OHD를 아디필-CoA로 전환시키고(도 12, 단계 Q), 이어서 이는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소에 의해 환원된다(도 12, 단계 O). 생성물, 아디페이트 세미알데히드는 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 6-아미노카프로에이트로 전환된다(도 12, 단계 E).

[0555] 도 12에 상세화된 경로는 이용된 글루코스 1 몰 당 0.8 몰의 6-ACA의 최대 이론적 6-ACA 수율을 달성할 수 있다. 에너지 수율이 또한 유리하고, 최대 생성물 수율에서 이용되는 글루코스 1 몰 당 1.6 몰의 ATP의 최대값을 갖는다. 하기 가정이 수율을 계산하기 위해 사용되었다: 1) 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복시키나아제는 ATP-생성 방향으로 작동할 수 있고, 2) NH_4 및 6-ACA는 양성자 역수송에 의해 세포로 수송되고, 3) 석신산 세미알데히드는 알파-케토글루타레이트 및/또는 석시닐-CoA로부터 형성된다. 석신산 세미알데히드 탈수소효소는 석시닐-CoA를 석신산 세미알데히드로 전환시키는 NAD(P)H 및 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소이다. 석신산 세미알데히드는 2가지 효소: 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 및 4-아미노부티레이트 아미노전이효소에 의해 알파-케토글루타레이트로부터 형성된다.

[0556] **실시예 XX**

[0557] **6-아미노카프로에이트로부터의 헥사메틸렌디아민의 생산 경로**

[0559] 본 실시예는 헥사메틸렌디아민의 생산을 위한 예시적인 경로를 설명한다.

[0560] 헥사메틸렌디아민(HMDA) 및 관련된 생성물을 생산하기 위한 신규 경로는 본원에 기재된다. 이러한 경로는 6-아미노카프로에이트(6-ACA)로부터의 HMDA를 합성한다. 이들 경로는 포스포릴화 및/또는 아실화에 의한 산 기의 활성화를 포함한다. 최종 아미노 기의 아세틸화는 경로 중간체의 자발적인 고리화로부터 보호를 제공한다. 후보 효소, 및 실행과 연관된 위험성은 하기 실시예 XXI에서 논의된다.

[0561] 본 발명은, 부분적으로는, HMDA 생산을 촉매화하는 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는 비-천연 미생물에 관한 것이다. 성공적으로 이들 경로를 조작함은 충분한 활성 및 특이성을 갖는 효소의 적절한 세트를 식별하는 단계, 이들의 상응하는 유전자를 생산 숙주로 클로닝하는 단계, 생산 숙주에서 이들 유전자의 발현을 최적화하는 단계, 발효 조건을 최적화하는 단계, 및 발효 후 생성물 형성을 검정하는 단계를 수반한다.

[0562] 6-아미노카프로에이트로부터 HMDA를 생산하기 위한 수 개의 경로는 도 13에 상세화된다. 모든 경로는 카복실산 기의 활성화, 이후 환원 및 트랜스아민화를 수반한다. 3가지 경로에서, 6-아미노카프로에이트는 직접적으로 활성화되는 반면, 다른 경로에서, 최종 아민 기는 N-아세틸화에 의해 보호되어 자발적인 고리화를 방지한다.

[0563] 한 경로에서, 6-아미노카프로에이트는 6-아미노카프로에이트 키나아제에 의해 6-AHOP로 포스포릴화된다(도 13, 단계 A). 이어서 6-AHOP는 6-아미노카프로산 세미알데히드로 환원되고(도 13, 단계 B), 후속적으로 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 트랜스아민화된다(도 13, 단계 C).

[0564] 다르게는, 6-AHOP는 아실전이효소에 의해 6-아미노카프로일-CoA로 전환된다(도 13, 단계 L). 이어서 6-아미노카프로일-CoA는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소에 의해 6-아미노카프로산 세미알데히드로 환원된다(도 13, 단계 N). 이어서 HMDA는 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의한 6-아미노카프로산 세미알데히드의 트랜스아민화에 의해 형성된다(도 13, 단계 C).

[0565] 또 다른 경로에서, 6-아미노카프로에이트는 우선 CoA 전이효소 또는 CoA 리가아제에 의해 CoA 유도체로 활성화된다(도 13, 단계 M). 생성물, 6-아미노카프로일-CoA는 자발적으로 고리화되거나, 알데히드-형성 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소에 의해 6-아미노카프로산 세미알데히드로 전환된다(도 13, 단계 N). 6-아미노카프로산 세미알데히드는 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 HMDA로 전환된다(도 13, 단계 C).

[0566] 추가적인 경로는 6-아세트아미도헥사노에이트, 6-아미노카프로에이트 N-아세틸전이효소의 아세틸화된 생성물로부터 진행된다. 6-아세트아미도헥사노에이트는 상이한 경로에 의해 6-아세트아미도헥사날로 전환된다(이후 기재됨). 이들 경로의 최종 2 단계에서, 6-아세트아미도헥사날은 우선 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 6-아세트아미도헥산아민으로 전환된다(도 13, 단계 G). 6-아세트아미도헥산아민은 후속적으로 아미드가수분해효소 또는 N-아세틸전이효소에 의해 HMDA로 전환된다(도 13, 단계 H).

[0567] 한 경로에서, 6-아세트아미도헥사노에이트는 6-아세트아미도헥사노에이트 키나아제에 의해 포스포릴화된다(도 13, 단계 E). 생성물, 6-AAHOP는 환원되어 6-아세트아미도헥사날을 형성하고(도 13, 단계 F), 이는 상기 기재된 바와 같이 HMDA로 전환된다.

[0568] 또 다른 경로에서, 6-아세트아미도헥사노에이트는 CoA 전이효소 또는 CoA 리가아제에 의해 6-아세트아미도헥사노일-CoA로 활성화된다(도 13, 단계 I). 이어서 CoA 유도체는 알데히드-형성 CoA-의존성 산화환원효소에 의해 6-아세트아미도헥사날로 환원된다(도 13, 단계 J). 이어서 6-아세트아미도헥사날은 상기 기재된 바와 같이 HMDA로 전환된다.

[0569] 다르게는, 6-아세트아미도헥사노에이트는 6-AAHOP로 포스포릴화되고(도 13, 단계 E) 후속적으로 6-아세트아미도헥사노일-CoA로 아실전이효소에 의해 전환된다(도 13, 단계 K). 이어서 6-아세트아미도헥사노일-CoA는 이전에 기재된 바와 같이 HMDA로 환원된다.

[0570] **실시예 XXI**

[0571] **6-아미노카프로산 및 헥사메틸렌디아민의 생산을 위한 효소 분류 시스템**

[0572] 본 실시예는 6-아미노카프로에이트 또는 헥사메틸렌디아민의 생산을 위해 실시예 XIX 및 XX에서 기재된 예시적인 경로를 위한 효소 분류 시스템을 설명한다.

[0573] 도 12 및 13에 도시된 모든 형질전환은 표 9에 도시된 형질전환의 일반적 범주에 속한다. 이후 각각의 범주에

서 다수의 생화학적으로 특징규명된 유전자가 기재된다. 적절히 클로닝되고 발현될 경우 도 12 및 도 13에서 적절한 형질전환을 촉매화하기 위해 적용될 수 있는 유전자는 구체적으로 열거된다.

[0574] 표 9는 공통의 중심 대사 중간체를 6-아미노카프로에이트 및 헥사메틸렌디아민으로 전환시키기 위해 유용한 효소 유형을 보여준다. 각각의 라벨의 처음 3개의 숫자는 기질 특이성과 무관한 형질전환의 일반적 유형을 표시하는 처음 3개의 효소 위원회 번호 숫자에 상응한다.

표 9

[0575]

라벨	기능
1.2.1.b	산화환원효소(아실-CoA로부터 알데히드로)
1.2.1.c	산화환원효소(2-케토산으로부터 아실-CoA로)
1.2.1.d	산화환원효소(포스폰산으로부터 알데히드로)
1.3.1.a	산화환원효소(알켄으로부터 알칸으로)
1.4.1.a	산화환원효소(케톤 또는 알데히드로부터 아미노로)
2.3.1.a	아실전이효소(CoA의 포스포로의 전이)
2.3.1.c	아실전이효소(N-아실전이효소)
2.3.1.d	아실전이효소(포메이트 C-아실전이효소)
2.6.1.a	아미노전이효소
2.7.2.a	인산전이효소(카복시 수용체)
2.8.3.a	조효소-A 전이효소
3.5.1.a	가수분해효소(선형 아미드 상에서 작용)
4.1.1.a	카복시-리아제
4.1.2.a	알데히드-리아제
4.2.1.a	하이드로-리아제
6.2.1.a	산-티올 리가아제

[0576] 1.2.1.b 산화환원효소(아실-CoA로부터 알데히드로). 6-아세트아미도헥사노일-CoA의 6-아세트아미도헥사날로의 형질전환(도 13, 단계 J) 및 6-아미노카프로일-CoA의 6-아미노카프로산 세미알데히드로의 형질전환(도 13, 단계 N)은 EC 부류 1.2.1중의 CoA-의존성 산화환원효소에 의해 촉매화된다. 아디필-CoA는 아디페이트 세미알데히드로 아디필-CoA 산화환원효소에 의해 전환되고, 이 효소는 유사한 작용성을 갖는다(도 12, 단계 O). 도 12의 전구체 석신산 세미알데히드를 석시닐-CoA로부터 형성하는 효소인 석신산 세미알데히드 탈수소효소는 또한 CoA-의존성 산화환원효소이다. EC 부류 1.2.1.중의 산화환원효소는 아실-CoA를 그의 상응하는 알데히드로 환원시킬 수 있다. 이러한 효소를 코딩하는 예시적인 유전자는 지방 아실-CoA 환원효소를 코딩하는 아시네토박터 칼코아세티커스 *acr1*(Reiser and Somerville, Journal of Bacteriology 179:2969-2975(1997)), 아시네토박터 종 M-1 지방 아실-CoA 환원효소(Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195(2002)), 및 CoA- 및 NADP-의존성 석신산 세미알데히드 탈수소효소를 코딩하는 클로스트리디엄 클루이베리중 *sucD* 유전자(Sohling 및 Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880(1996))를 포함한다. 포르피로모나스 진기발리스의 *SucD*는 또 다른 석신산 세미알데히드 탈수소효소이다(Takahashi et al., J. Bacteriol. 182:4704-4710(2000)). *bphG*에 의해 코딩되는 슈도모나스 종에서의 아실화 아세트알데히드 탈수소효소는, 아세트알데히드, 프로피온알데히드, 부티르알데히드, 이소부티르알데히드 및 폼알데히드를 산화 및 아실화하는 것으로 입증된 바와 같이 또 다른 후보이다(Powlowski et al., J. Bacteriol. 175:377-385(1993)). 아세틸-CoA를 에탄올로 환원시키는 것에 대하여, 류코노스톡 메센테로이데스중의 *adhE*에 의해 코딩되는 효소는 분지형 화합물 이소부티르알데히드를 이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 제시되었다(문헌[Kazahaya et al., J. Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55(1972)]; 및 [Koo et al., Biotechnol Lett. 27:505-510(2005)]).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
acr1	50086359	YP_047869.1	아시네토박터 칼코아세티커스
acr1	1684886	AAC45217	아시네토박터 바일리
acr1	18857901	BAB85476.1	아시네토박터 종 M-1
sucD	172046062	P38947.1	클로스트리디엄 클루이베리
sucD	34540484	NP_904963.1	포르피로모나스 진기발리스
bphG	425213	BAA03892.1	슈도모나스 종
adhE	55818563	AAV66076.1	류코노스톡 메센테로이데스

[0577] 아실-CoA를 그의 상응하는 알데히드로 전환시키는 추가적인 효소는 말로닐-CoA를 말론산 세미알데히드로 형질전환시키는 말로닐-CoA 환원효소이다. 말로닐-CoA 환원효소는 호열호산성 고세균 박테리아에서 3-하이드록시프로피오네이트 사이클을 경유하여 독립영양 탄소 고정화에서 핵심 효소이다(문헌[Berg et al., Science 318:1782-1786(2007)]; 및 [Thauer, R. K., Science. 318: 1732-1733(2007)]). 이 효소는 NADPH를 보조인자로 이용하고, 메탈로스파에라 및 설폴로버스 종에서 특징규명되었다(Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006); Hugler et al., J.Bacteriol. 184:2404-2410(2002)). 효소는 메탈로스파에라 세듈라에서 *Msed_0709*에 의해 코딩된다(문헌[Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006)]; 및 [Berg et al., Science. 318:1782-1786(2007)]). 설폴로버스 토코다이로부터의 말로닐-CoA 환원효소를 코딩하는 유전자가 클로닝되고 에스케리치아 콜라이에서 이종으로 발현되었다(Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006)). 이 효소는 메틸말로닐-CoA의 그의 상응하는 알데히드로의 전환을 촉매화하는 것으로 제시되었다(WIPO 특허출원 공개공보 제WO/2007/141208호, 킨드 코드(Kind Code): A2). 이들 효소의 알데히드 탈수소효소 작용성이 클로로플렉서스 아우란티커스로부터의 이작용성 탈수소효소와 유사하지만, 서열 유사성이 거의 없다. 말로닐-CoA 환원효소 둘다는 아스파테이트-세미알데히드 탈수소효소에 높은 서열 유사성을 갖고, 이 효소는 아스파틸-4-포스페이트의 아스파테이트 세미알데히드로의 환원 및 동시적인 탈포스포릴화를 촉매화한다. 추가적인 유전자 후보는 설폴로버스 솔파타리쿠스 및 설폴로버스 아시도칼다리우스를 포함하는 다른 유기체에서의 단백질에 대한 서열 상동성에 의해 발견될 수 있고, 이는 이후 열거되었다. CoA-아실화 알데히드 탈수소효소를 위한 또 다른 후보는 클로스트리디엄 베이제린키로부터의 *ald* 유전자이다(Toth et al., Appl Environ Microbiol 65:4973-4980(1999)). 이러한 효소는 아세틸-CoA 및 부티릴-CoA를 이의 상응하는 알데히드로 환원시키는 것으로 보고되었다. 이러한 유전자는 살모넬라 티피뮤리엄 및 에스케리치아 콜라이의 아세트알데히드 탈수소효소를 코딩하는 *eutE*와 매우 유사하다(Toth et al., Appl Environ Microbiol 65:4973-4980(1999)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
Msed_0709	146303492	YP_001190808.1	메탈로스파에라 세듈라
mcr	15922498	NP_378167.1	설폴로버스 토코다이
asd-2	15898958	NP_343563.1	설폴로버스 솔파타리쿠스
Saci_2370	70608071	YP_256941.1	설폴로버스 아시도칼다리우스
Ald	49473535	AAT66436	클로스트리디엄 베이제린키
eutE	687645	AAA80209	살모넬라 티피뮤리엄
eutE	2498347	P77445	에스케리치아 콜라이

[0578]

[0579] 1.2.1.c 산화환원효소(2-케토산으로부터 아실-CoA로). 도 12에서의 몇몇 형질전환은 EC 부류 1.2.1에서의 효소에 의한 2-케토산의 아실-CoA로의 전환(단계 L, P 및 Q)을 필요로 한다. 이러한 반응은 2-케토-산의 산화적 탈카복실화를 아크릴화하는 일련의 일부 반응을 촉매화하는 다중 효소 착체에 의해 촉매화된다. 예시적인 효소로는, 1) 분지형 2-케토-산 탈수소효소, 2) 알파-케토글루타레이트 탈수소효소, 및 3) 피루베이트 탈수소효소 다중효소 착체(PDHC)가 포함된다. 각각의 2-케토-산 탈수소효소 착체는 중간 대사작용에서 핵심 위치를 차지하고, 효소 활성은 전형적으로 엄격히 조절된다(Fries et al., Biochemistry 42:6996-7002(2003)). 효소는 다음의 3가지 촉매 성분의 다중 복사물로 구성된 착체이지만 통상적인 구조를 공유한다: 알파-케토산 데카복실라아제(E1), 디하이드로리포아미드 아실전이효소(E2) 및 디하이드로리포아미드 탈수소효소(E3). E3 성분은 유기체중의 모든 2-케토-산 탈수소효소 착체 사이에 공유되는 반면, E1 및 E2 성분은 상이한 유전자로 코딩된다. 효소 성분은 착체에서 다수의 복사물로 존재하고, 기질 채널링(channeling)을 경유해 반응의 방향화된 서열을 촉매화하기 위해 다수의 보조인자를 이용한다. 이들 탈수소효소 착체의 전체 크기는 매우 크고, 분자 질량은 4 내지 10 밀리온 Da이다(즉, 리보솜 보다 더 큼).

[0580] 2-케토-산 탈수소효소 계열중의 효소의 활성은 에스케리치아 콜라이에서 혐기성 조건하에 일반적으로 낮거나 제한된다. NADH(또는 NADPH)의 증가된 생산은 산화환원반응-불균형을 유도하고, NADH 그 자체는 효소 기능에 대한 저해제로서 작용한다. 조작은 에스케리치아 콜라이 피루베이트 탈수소효소 착체의 혐기성 활성를 증가시켰다(문헌[Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 73: 1766-1771(2007)]; [Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008)]; 및 [Zhou et al., Biotechnol. Lett. 30:335-342(2008)]). 예를 들면, NADH의 저해 효과는 E3 성분에서 H322Y 돌연변이를 조작함으로써 극복될 수 있다(Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008)). 개별 성분의 구조적 연구 및 이들의 착체에서 함께 작용하는 방식은 이러한 계열에서 촉매 기작 및 효소의 구조에 대한 이해를 제공한다(문헌[Aevarsson et al., Nat. Struct. Biol. 6:785-792(1999)]; 및 [Zhou et al., Proc. Natl. Acad. ScL U. S. 98:14802-14807(2001)]). 탈수소효소 착체의 기질 특이성은 상이

한 유기체에서 상이하지만, 일반적으로 분지형 케토-산 탈수소효소는 가장 광범위한 기질 범위를 갖는다.

[0581] 알파-케토글루타레이트 탈수소효소(AKGD)는 알파-케토글루타레이트를 석시닐-CoA로 전환시키고, TCA 사이클을 통한 대사 플럭스의 조절의 주요 부위이다(Hansford, Curr. Top. Bioenerg. 10:217-278(1980)). 에스케리치아 콜라이에서 유전자 *sucA*, *sucB* 및 *lpd*에 의해 코딩되는, AKGD 유전자 발현은 혐기성 조건하에 글루코스 상에서 성장 동안 하향조절된다(Park et al., Mol. Microbiol. 15:473-482(1995)). AKGD의 기질 범위가 좁지만, E2 성분의 촉매 코어의 구조적 연구는 기질 특이성에 책임이 있는 특이적 잔기를 정확히 찾아낸다(Knapp et al., J. Mol. Biol. 280:655-668(1998)). *odhAB*(E1 및 E2) 및 *pdhD*(E3, 공유 도메인)에 의해 코딩되는 바실러스 서브틸리스 AKGD는 전사 수준에서 조절되고, 탄소 공급원 및 유기체의 성장 상에 의존한다(Resnekov et al., Mol. Gen. Genet. 234:285-296(1992)). 효모에서, E3 성분을 코딩하는 *LPD1* 유전자는 글루코스에 의해 전사 수준에서 조절된다(Roy and Dawes, J. Gen. Microbiol. 133:925-933(1987)). *KGD1*에 의해 코딩된 E1 성분은 글루코스에 의해 또한 조절되고 HAP2 및 HAP3의 생성물에 의해 활성화된다(Repetto and Tzagoloff, Mol. Cell Biol. 9:2695-2705(1989)). 생성물 NADH 및 석시닐-CoA에 의해 저해되는 AKGD 효소 착체는 포유동물 시스템에서 연구되고, 손상된 기능은 몇몇 신경학 질환으로 연결된다(Tretter and dam-Vizi, Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 360:2335-2345(2005)).

[0582]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
sucA	16128701	NP_415254.1	에스케리치아 콜라이
sucB	16128702	NP_415255.1	에스케리치아 콜라이
lpd	16128109	NP_414658.1	에스케리치아 콜라이
odhA	51704265	P23129.2	바실러스 서브틸리스
odhB	129041	P16263.1	바실러스 서브틸리스
pdhD	118672	P21880.1	바실러스 서브틸리스
KGD1	6322066	NP_012141.1	사카로마이세스 세레비지아
KGD2	6320352	NP_010432.1	사카로마이세스 세레비지아
LPD1	14318501	NP_116635.1	사카로마이세스 세레비지아

[0583] 2-옥소이소발러레이트 탈수소효소로서도 공지된 분지형 2-케토-산 탈수소효소 착체(BCKAD)는 분지형 아미노산 분해 경로에 참여하여, 발린, 로이신 및 이소로이신의 2-케토산 유도체를 이들의 아실-CoA 유도체 및 CO_2로 전환시킨다. 착체는 바실러스 서브틸리스(Wang et al., Eur. J. Biochem. 213: 1091-1099(1993)), 래터스 노르베기커스(Namba et al., J. Biol. Chem. 244:4437-4447(1969)) 및 슈도모나스 푸티다(Sokatch et al., J. Bacteriol. 148:647-652(1981))를 비롯한 많은 유기체에서 연구되었다. 바실러스 서브틸리스에서, 효소는 유전자 *pdhD*(E3 성분), *bfmBB*(E2 성분), *bfmBAA* 및 *bfmBAB*(E1 성분)에 의해 코딩된다(Wang et al., Eur. J. Biochem. 213: 1091-1099(1993)). 포유동물에서, 착체는 특정 포스파타아제 및 단백질 키나아제에 의한 포스포릴화에 의해 조절된다. 착체는 래트 간세포에서 연구되었고(Chicco et al., J. Biol. Chem. 269:19427-19434(1994)), 유전자 *Bckdha*(E1 알파), *Bckdhb*(E1 베타), *Dbt*(E2), 및 *Dld*(E3)에 의해 코딩된다. 슈도모나스 푸티다 *BCKAD* 착체의 E1 및 E3 성분은 결정화되고(문헌[Aevarsson et al., Nat. Struct. Biol. 6:785-792(1999)]; 및 [Mattevi et al., Science. 255:1544-1550(1992)]) 효소 착체는 연구되었다(Sokatch et al., J. Bacteriol. 148:647-652(1981)). 슈도모나스 푸티다 *BCKAD* 유전자의 전사는 *bkdR*의 유전자 생성물에 의해 활성화되었다(Hesslinger et al., Mol. Microbiol 27:477-492(1998)). 래터스 노르베기커스(Paxton et al., Biochem. J. 234:295-303(1986)) 및 사카로마이세스 세레비지아(Sinclair et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 31:911-922(1993))를 비롯한 몇몇 유기체에서, 이러한 착체는 선형 옥소산, 예컨대 2-옥소부타노에이트 및 알파-케토글루타레이트, 뿐만 아니라 분지형 아미노산 전구체를 포함하는 넓은 기질 범위를 갖는 것으로 제시되었다. 소의 BCKAD의 활성 부위는 다른 기질 아세틸-CoA를 선호하도록 조작되었다(Meng and Chuang, Biochemistry. 33:12879-12885(1994)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
bfmBB	16079459	NP_390283.1	바실러스 서브틸리스
bfmBAA	16079461	NP_390285.1	바실러스 서브틸리스
bfmBAB	16079460	NP_390284.1	바실러스 서브틸리스
pdhD	118672	P21880.1	바실러스 서브틸리스
lpdV	118677	P09063.1	슈도모나스 푸티다
bkdB	129044	P09062.1	슈도모나스 푸티다
bkdA1	26991090	NP_746515.1	슈도모나스 푸티다
bkdA2	26991091	NP_746516.1	슈도모나스 푸티다
Bckdha	77736548	NP_036914.1	래터스 노르베기커스
Bckdhb	158749538	NP_062140.1	래터스 노르베기커스
Dbt	158749632	NP_445764.1	래터스 노르베기커스
Dld	40786469	NP_955417.1	래터스 노르베기커스

[0584]

[0585] 피루베이트의 아세틸-CoA로의 전환을 촉매화하는 피루베이트 탈수소효소 착체는 또한 광범위하게 연구되었다. 에스케리치아 콜라이 효소에서, E1 성분에서 특정 잔기는 기질 특이성을 좌우한다(문헌[Bisswanger, J Biol Chem. 256:815-822(1981)]; [Bremer, Eur. J Biochem. 8:535-540(1969)]; 및 [Gong et al., J Biol Chem. 275:13645-13653(2000)]). 이전에 언급된 바와 같이, 효소 조작은 에스케리치아 콜라이 PDH 효소 활성을 혐기성 조건하에 개선시켰다(문헌[Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771(2007)]; [Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008)]); 및 [Zhou et al., Biotechnol. Lett. 30:335-342(2008)]). 에스케리치아 콜라이 PDH에 대조적으로, 바실러스 서브틸리스 착체는 활성이고 혐기성 조건하에 성장될 필요가 있다(Nakano et al., J. Bacteriol. 179:6749-6755(1997)). 글리세롤에서 성장되는 동안 특징규명된 클레브시엘라 뉴모니아 PDH는 또한 혐기성 조건하에 활성이다(Menzel et al., J. Biotechnol. 56:135-142(1997)). 소 신장으로부터의 효소 착체의 결정 구조(Zhou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 98:14802-14807(2001)) 및 아조토박터 비넬란디(*Azotobacter vinelandii*)로부터의 E2 촉매 도메인이 이용가능하다(Mattevi et al., Science. 255:1544-1550(1992)). 몇몇 포유동물 PDH 효소 착체는 다른 기질, 예컨대 2-옥소부타노에이트 상에서 반응할 수 있지만, 래터스 노르베기커스 PDH 및 BCKAD의 동역학 비교로부터, BCKAD가 기질로서의 2-옥소부타노에이트 상에 대해 더 높은 활성을 가짐을 알 수 있다(Paxton et al., Biochem. J. 234:295-303(1986)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
aceE	16128107	NP_414656.1	에스케리치아 콜라이
aceF	16128108	NP_414657.1	에스케리치아 콜라이
lpd	16128109	NP_414658.1	에스케리치아 콜라이
pdhA	3123238	P21881.1	바실러스 서브틸리스
pdhB	129068	P21882.1	바실러스 서브틸리스
pdhC	129054	P21883.2	바실러스 서브틸리스
pdhD	118672	P21880.1	바실러스 서브틸리스
aceE	152968699	YP_001333808.1	클레브시엘라 뉴모니아
aceF	152968700	YP_001333809.1	클레브시엘라 뉴모니아
lpdA	152968701	YP_001333810.1	클레브시엘라 뉴모니아
Pdha1	124430510	NP_001004072.2	래터스 노르베기커스
Pdha2	16758900	NP_446446.1	래터스 노르베기커스
Dlat	78365255	NP_112287.1	래터스 노르베기커스
Dld	40786469	NP_955417.1	래터스 노르베기커스

[0586]

[0587] 상기 기재된 큰 다중효소 2-케토-산 탈수소효소 착체에 대한 대안으로서, 몇몇 혐기성 유기체는 2-케토산 산화환원효소 계열(OFOR)의 효소를 이용하여 2-케토산의 산화적 탈카복실화의 아크릴화를 촉매화한다. 탈수소효소 착체와 달리, 이들 효소는 철-황 클러스터를 포함하고, 상이한 보조인자를 이용하고, 페레독신 또는 플라보독신(flavodoxin)을 NAD(P)H 대신에 전자 수용체로서 사용한다. 이러한 계열중의 대부분의 효소는 기질로서의 피루베이트(POR)에 특이적이고, 몇몇 2-케토-산:페레독신 산화환원효소는 알파-케토글루타레이트 및 2-옥소부타노에이트를 비롯한 광범위한 2-케토산을 기질로서 허용하는 것으로 제시되었다(문헌[Fukuda and Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80(2002)]; 및 [Zhang et al., J. Biochem. 120:587-599(1996)]). 이러한 효소는 유전자 *ST2300*에 의해 코딩된 알파 및 베타 서브유닛을 포함하는 호열호산성 고세균 설폴로버스 토코다이 7로부터의 OFOR이다(문헌[Fukuda and Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80(2002)]; 및 [Zhang et al., J. Biochem. 120:587-599(1996)]). 플라스미드-기재 발현 시스템이 에스케리치아 콜라이에서 상기 단백질을 효과적으로 발현하기 위해 개발되었고(Fukuda et al., Eur. J. Biochem. 268:5639-5646(2001)), 기질 특이성에 관

여된 잔기가 결정되었다(Fukuda and Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80(2002)). 에어로피럼 페르닉스(*Aeropyrum pernix*) 종 K1으로부터의 2개의 OFOR이 또한 최근에 에스케리치아 콜라이내로 클로닝되고, 특징규명되고, 광범위한 2-옥소산과 반응하는 것으로 밝혀졌다(Nishizawa et al., FEBS Lett. 579:2319-2322(2005)). 이들 OFOR 후보의 유전자 서열은 현재까지 GenBank 식별자가 부여되지 않았지만, 이들은 이용가능하다. 유사한 효소가 모든 고세균, 일부 혐기성 박테리아 및 어미토콘드리아(amitochondrial) 진핵생물에 존재한다는 생물정보학적 증거가 있다(Fukuda and Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80(2002)). 이러한 부류의 효소는 또한 에너지 견지에서 흥미로운데, 감소된 페레독신이 페레독신-NAD 환원효소에 의해 NADH를 생성하기 위해 사용될 수 있기 때문이다(Petitdemange et al., Biochim. Biophys. Acta 421:334-337(1976)). 또한, 대부분의 효소는 혐기성 조건하에 조작되도록 고안되므로, 혐기성 환경에서의 활성을 위한 2-케토-산 탈수소효소 착체 계열에서의 효소에 비해 효소 조작이 덜 필요하다.

[0588]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ST2300	15922633	NP_378302.1	설폴로버스 토코다이 7

[0589] 1.2.1.d 산화환원효소(포스폰산으로부터 알데히드로). 포스폰산의 이의 상응하는 알데히드로의 환원은 EC 부류 1.2.1중의 산화환원효소에 의해 촉매화된다. 도 13에서 단계 B 및 F는 6-AHOP 및 6-AAHOP를 이의 상응하는 알데히드로 환원시키기 위한 효소를 필요로 한다. 이들 반응은 공지된 효소에 의해 촉매화되지 않지만, 유사한 반응이 아스파테이트 세미알데히드 탈수소효소(ASD, EC 1.2.1.11)에 의해 촉매화된다: 4-아스파틸 포스페이트의 아스파테이트-4-세미알데히드로의 NADPH-의존성 환원. ASD는 아미노산 생합성에 참여하고 항미생물 표적으로서 최근에 연구되었다(Hadfield et al., Biochemistry 40: 14475-14483(2001)). 에스케리치아 콜라이 ASD 구조는 해결되었고(Hadfield et al., J. Mol. Biol. 289:991-1002(1999)), 효소는 대안의 기질 베타-3-메틸아스파틸 포스페이트을 허용하는 것으로 제시되었다(Shames et al., J Biol. Chem. 259: 15331-15339(1984)). 헤모필러스 인플루엔자 효소는 활성 부위에 기질 결합 친화성을 변경시키는 효소 조작 연구의 대상이었다(Blanco et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60:1388-1395(2004); 및 Blanco et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60:1808-1815(2004)). 다른 ASD 후보는 마이코박테리엄 투베르큘로시스(Shafiani et al., J Appl Microbiol 98:832-838(2005)), 메타노코커스 자나쉬(Faehnle et al., J Mol. Biol. 353:1055-1068(2005)), 및 감염성 미생물 비브리오 콜레라 및 헬리코박터 필로리(Moore et al., Proteins Expr. Purif. 25:189-194(2002))에서 발견된다. 관련된 효소 후보는 아세틸글루타밀포스페이트 환원효소(EC 1.2.1.38), 즉 아세틸글루타밀포스페이트를 아세틸글루타메이트-5-세미알데히드로 천연적으로 환원시키는, 사카로마이세스 세레비지아(Pauwels et al., Eur. J Biochem. 270:1014-1024(2003)), 바실러스 서브틸리스(O'Reilly 및 Devine, Microbiology 140(Pt 5):1023-1025(1994)) 및 다른 유기체에서 발견되는 효소이다.

[0590]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
Asd	16131307	NP_417891.1	에스케리치아 콜라이
Asd	68249223	YP_248335.1	헤모필러스 인플루엔자
Asd	1899206	AAB49996	마이코박테리엄 투베르큘로시스
VC2036	15642038	NP_231670	비브리오 콜레라
Asd	210135348	YP_002301787.1	헬리코박터 필로리
ARG5,6	6320913	NP_010992.1	사카로마이세스 세레비지아
argC	16078184	NP_389001.1	바실러스 서브틸리스

[0591] 1.3.1.a 산화환원효소(알켄으로부터 알칸으로). 몇몇 형질전환이 알켄을 알칸으로 환원시키는 산화환원효소의 범주(EC 1.3.1.-)에 속한다. 예를 들면, OHED 환원효소, 6-OHE 환원효소, 2-AHE 환원효소 및 2,3-데하이드로아디필-CoA 환원효소에 의해 각각 촉매화되는 도 12에서의 단계 C, G, K 및 N은 이 범주에 속한다. 에논 환원효소, 알케날 환원효소, 및 에노에이트 환원효소가 단계 C, G 및 K의 형질전환을 촉매화하기에 적합한 효소 후보이다. 에노일-CoA 환원효소는 2,3-데하이드로아디필-CoA의 아디필-CoA로의 전환을 촉매화한다(단계 N).

[0592] 에논 환원효소 활성을 갖는 효소는 원핵생물, 진핵생물 및 식물에서 식별되었다(문헌[Shimoda et al., Bulletin of the chemical Society of Japan 77:2269-2(2004)]; 및 [Wanner 및 Tressl, Eur. J Biochem. 255:271-278(1998)]). 사카로마이세스 세레비지아의 사이토졸 분별물로부터의 2개의 에논 환원효소는 정제되고, 특징규명되고, 다양한 알케날(6-OHE와 유사) 및 에노일 케톤(OHED와 유사)을 기질로서 수용하는 것으로 밝혀졌다(Wanner and Tressl, Eur. J Biochem. 255:271-278(1998)). 이들 효소를 코딩하는 유전자는 아직까지 식별되지 않았다. 시아노박테리엄 시네초코커스(*cyanobacterium Synechococcus*) 종 PCC7942의 세포 추출물은 다양한

에논 기질을 이들의 상응하는 알킬 케톤으로 환원시켰다(Shimoda et al., Bulletin of the chemical Society of Japan 77:2269-2(2004)). 유전자는 이 유기체에서 이러한 활성과 회합되지 않았다. 다른 유기체에서 에논 환원효소는 이러한 형질전환을 촉매화할 수 있다.

[0593] *NtRed1*에 의해 코딩되는 니코티아나 타바컴으로부터의 재조합 NADPH-의존성 에논 환원효소는 에스케리치아 콜라이에서 작용적으로 발현되고 특징규명되었다(Matsushima et al., Bioorganic Chemistry 36:23-28(2008)). 이 환원효소는 외향고리 에노일 케톤 풀레곤(pulegone) 상에서 작용성이었다(Matsushima et al., Bioorganic Chemistry 36:23-28(2008)). 사카로마이세스 세레비지아에서 *YML131W* 자리에서의 효소 후보는 *NtRed1*에 30%의 동일성을 갖는다(측정값 = 1e-26). *NtRed1*의 아미노산 서열은 아라비돕시스 탈리아나로부터의 2-알케날 환원효소, 아라비돕시스 탈리아나로부터의 제타-결정질 상동체, 멘터 피페리타로부터의 풀레곤 환원효소 및 피너스 타에다로부터의 페닐프로페날 알켄 환원효소와 상당한 상동성을 공유한다. 이들 효소는 α,β-불포화 케톤 및 알데히드의 알켄의 환원을 촉매화하는 것으로 공지되어 있다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
NtRed1	6692816	BAA89423	니코티아나 타바컴
YML131W	45269874	AAS56318.1	사카로마이세스 세레비지아
AtDBR1	15237888	NP-197199	아라비돕시스 탈리아나
P2	886430	CAA89262	아라비돕시스 탈리아나
PulR	34559418	AAQ75423	멘터 피페리타
PtPPDBR	110816011	ABG91753	피너스 타에다

[0594]

[0595] 2-알케날 환원효소는 알데히드 및 케톤의 α,β-불포화 이중 결합의 환원을 촉매화한다. 알케날 수소화효소 ALH1은, 트랜스-2-노네날, 2-헥사날, 트라우마틴 및 1-옥텐-3-온을 비롯한 α,β-불포화 케톤 및 알데히드의 범위에 대한 활성을 갖는 것으로 거의 식별되지 않았다(Hambraeus and Nyberg, JAgHc. Food Chem. 53:8714-8721(2005)). 호르데엄 불가레 ALH1 cDNA는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 발현되었다(Hambraeus and Nyberg, J Agric. Food Chem. 53:8714-8721(2005)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ALH1	62765876	AAX99161	호르데엄 불가레
ALH1	195652571	ACG45753	지아 메이스

[0596]

[0597] 2-에노에이트 환원효소는 다양한 α,β-불포화 카복실산 및 알데히드의 NAD(P)H-의존성 환원을 촉매화하는 것으로 공지되어 있다(Rohdich et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787(2001)). 클로스트리디엄 클루이베리의 최근 공개된 게놈 서열에서, 에노에이트 환원효소를 위한 9개의 코딩 서열이 보고되었고, 이들중 하나로부터 특징규명되었다(Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. 105:2128-2133(2008)). 클로스트리디엄 티로부티리컴 및 무렐라 써모아세티컴으로부터의 *enr* 유전자는 클로닝되고 서열화되었고, 서로 59%의 동일성을 보여준다. 앞서 말한 유전자는 또한 클로스트리디엄 클루이베리에서 특징규명된 유전자에 대략 75% 유사성을 갖는 것으로 밝혀졌다(Giesel and Simon, Arch. Microbiol 135:51-57(1983)). 이들 서열 결과에 기초하여 *enr*이 에스케리치아 콜라이중의 디에노일 CoA 환원효소(*fadH*)에 매우 유사한 것으로 보고되었다(Rohdich et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787(2001)). 클로스트리디엄 써모아세티컴 *enr* 유전자는 또한 에스케리치아 콜라이에서 촉매적으로 활성인 형태로 발현되었다(Rohdich et al., J. Biol. Chem. 276:5779-5787(2001)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
enr	169405742	ACA54153.1	클로스트리디엄 보툴리넘 A3 균주
enr	2765041	CAA71086.1	클로스트리디엄 티로부티리컴
enr	3402834	CAA76083.1	클로스트리디엄 클루이베리
enr	83590886	YP_430895.1	무렐라 써모아세티카
fadH	16130976	*NP_417552.1*	에스케리치아 콜라이

[0598]

[0599] 또 다른 후보 에노에이트 환원효소는 3-옥소아디페이트 산화환원효소(말레일아세테이트 환원효소)이고, 이 효소는 2-말레일아세테이트(4-옥소헥스-2-엔디오에이트)의 3-옥소아디페이트로의 환원을 촉매화한다. 효소 활성은 슈도모나스 종 균주 B13에서 식별되고 특징규명되었고(문헌[Kaschabek and Reineke, J. Bacteriol 177:320-325(1995)]; 및 [Kaschabek. 및 Reineke, J. Bacteriol. 175:6075-6081(1993)]), 코딩 유전자는 클로닝되고 서열화되었다(Kasberg et al., J. Bacteriol. 179:3801-3803(1997)). 3-옥소아디페이트 산화환원효소를 위한 후

보 유전자로는 슈도모나스 종 균주 B13으로부터의 *clcE* 유전자(Kasberg et al., J. Bacteriol. 179:3801-3803(1997)), 로도코커스 오파커스로부터의 *macA* 유전자(Seibert et al., J. Bacteriol. 180:3503-3508(1998)), 및 랄스토니아 유트로파(또한 쿠프리아비더스 네카터로도 공지됨)로부터의 *macA* 유전자(Seibert et al., Microbiology 150:463-472(2004))가 포함된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
clcE	3913241	O30847.1	슈도모나스 종 균주 B13
macA	7387876	O84992.1	로도코커스 오파커스
macA	5916089	AAD55886	쿠프리아비더스 네카터

[0600]

[0601] 에노일-CoA 환원효소는 2,3-데하이드로아디필-CoA의 아디필-CoA로의 환원을 촉매화하기에 적합한 효소이다(도 12, 단계 N). 한 예시적인 에노일-CoA 환원효소는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *bcd*의 유전자 생성물이고(문헌[Atsumi et al., Metab Eng 10:305-311(2008)]; 및 [Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015-3024(1996)]), 이는 크로토닐-CoA의 부티릴-CoA로의 환원을 천연적으로 촉매화한다. 이러한 효소의 활성은 클로스트리디엄 아세토부틸리컴 *etfAB* 유전자의 발현과 연관된 *bcd*를 발현함으로써 증진될 수 있고, 이는 전자 전달 플라보단백질을 코딩한다. 에노일-CoA 환원효소 단계의 추가적인 후보는 유클레나 그라실리스로부터의 미토콘드리아 에노일-CoA 환원효소이다(Hoffmeister et al., J Biol. Chem. 280:4329-4338(2005)). 미토콘드리아 표적화 리더 서열의 제거 후 상기 서열로부터 유도된 구축물은 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되어 활성 효소를 생성한다(Hoffmeister et al, J Biol. Chem. 280:4329-4338(2005)). 진핵생물 유전자, 특히 원핵생물 유기체에서 유전자 생성물을 특정 세포내 구획으로 표적화할 수 있는 리더 서열을 갖는 유전자를 발현하는 이러한 접근방법은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 원핵생물 트레포네마 덴티콜라로부터의 상기 유전자에 근접한 상동체, TDE0597은 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 발현된 제3의 에노일-CoA 환원효소를 나타낸다(Tucci and Martin, Febs Letters 581:1561-1566(2007)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
bcd	15895968	NP_349317.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
etfA	15895966	NP_349315.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
etfB	15895967	NP_349316.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
TER	62287512	Q5EU90.1	유글레나 그라실리스
TDE0597	42526113	NP_971211.1	트레포네마 덴티콜라

[0602]

[0603] 추가적인 에노일-CoA 환원효소 후보는 방향족 화합물을 분해하는 유기체에서 발견된다. 벤조에이트 분해를 위한 모델 유기체인 로도슈도모나스 팔루스트리스는 피멜로일-CoA의 베타-산화를 경유해 피멜레이트를 분해하는 효소 능력을 갖는다. *pim* 오페론에서 인접 유전자, *pimC* 및 *pimD*는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴 *bcd*에 서열 상동성을 갖고, 플라빈-포함 피멜로일-CoA 탈수소효소를 코딩하는 것으로 예상된다(Harrison and Harwood, Microbiology 151:727-736(2005)). 질소-고정 대두 공생자 브라디리조븀 자포니컴의 게놈은 또한 로도슈도모나스 팔루스트리스의 *pimC* 및 *pimD*에 높은 서열 유사성을 갖는 유전자로 구성된 *pim* 오페론을 포함한다(Harrison and Harwood, Microbiology 151:727-736(2005)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pimC	39650632	CAE29155	로도슈도모나스 팔루스트리스
pimD	39650631	CAE29154	로도슈도모나스 팔루스트리스
pimC	27356102	BAC53083	브라디리조븀 자포니컴
pimD	27356101	BAC53082	브라디리조븀 자포니컴

[0604]

[0605] 추가적인 후보는 2-메틸-분지형 에노일-CoA 환원효소(EC 1.3.1.52)이고, 이 효소는 입체 장애 트랜스-에노일-CoA 기질의 환원을 촉매화한다. 이러한 효소는 선충 아스카리스 섬에서 분지형 지방산 합성에 참여하고, 2-메틸부타노일-CoA, 2-메틸펜타노일-CoA, 옥타노일-CoA 및 펜타노일-CoA를 비롯한 다양한 선형 및 분지형 기질을 환원시킬 수 있다(Duran et al., J Biol. Chem. 268:22391-22396(1993)). 유전자 *acad1* 및 *acad*에 의해 코딩된 효소의 2가지 이소형(isoform)은 특징규명되었다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
acad1	2407655	AAC48316.1	아스카리스 섬
acad	347404	AAA16096.1	아스카리스 섬

[0606]

[0607] 1.4.1.a 산화환원효소(케톤 또는 알데히드로부터 아미노로). 알데히드 또는 케톤을 그의 상응하는 아민 기로 전환시키는 EC 부류 1.4.1중의 산화환원효소는 개시된 경로에서 수 개의 생합성 단계를 촉매화한다. 도 12에서, OHED의 2-AHE로의 전환(단계 J), 2-OHD의 2-AHD로의 전환(단계 H) 및 아디페이트 세미알데히드의 6-아미노카프로에이트로의 전환(단계 E)은 OHED 아민화 산화환원효소, 2-OHD 아민화 산화환원효소 및 아디페이트 세미알데히드 아민화 산화환원효소로 촉매화된다. 도 13에서, 6-아미노카프로에이트 세미알데히드의 HMDA로의 전환(단계 H) 및 6-아세트아미도헥사날의 6-아세트아미도헥산아민으로의 전환(단계 G)은 아민화 산화환원효소에 의해 또한 촉매화된다.

[0608] 대부분의 아민화 산화환원효소는 수용체로서의 NAD^+ 또는 $NADP^+$에 의한 알파-아미노산의 가역성인 산화적 탈아민화를 촉매화하고, 반응은 전형적으로 가역성이다. 예시적인 효소는 *gdhA*에 의해 코딩되는 글루타메이트 탈수소효소(탈아민화), *ldh*에 의해 코딩되는 로이신 탈수소효소(탈아민화), 및 *nadX*에 의해 코딩되는 아스파테이트 탈수소효소(탈아민화)를 포함한다. 에스케리치아 콜라이(문헌[Korber et al., J Mol. Biol. 234: 1270-1273(1993)]; 및 [McPherson et al., Nucleic acids Res. 11:5257-5266(1983)])로부터의 *gdhA*, 써모토가 마리티마로부터의 *gdh*(문헌[Kort et al., Extremophiles. 1:52-60(1997)]; [Lebbink et al., J Mol. Biol. 280:287-296(1998)]; 및 [Lebbink et al., J. Mol. Biol. 289:357-369(1999)]), 및 할로박테리엄 살리나럼로부터의 *gdhA1*(Ingoldsby et al., Genes 349:237-244(2005)) 유전자 생성물은 글루타메이트의 2-옥소글루타레이트 및 암모니아로의 가역성 상호전환을 촉매화하는 한편, 각각 NADP(H), NAD(H), 또는 둘 다를 촉진한다. 바실러스 세레우스의 *ldh* 유전자는 로이신, 이소로이신, 발린, 및 2-아미노부타노에이트를 포함하는 광범위한 기질을 갖는 LeuDH 단백질을 코딩한다(문헌[Ansorge and Kula, Biotechnol Bioeng 68:557-562(2000)]; 및 [Stoyan et al., J Biotechnol. 54:77-80(1997)]). 아스파테이트 탈수소효소를 코딩하는 써모토가 마리티마로부터의 *nadX* 유전자는 NAD의 생합성에 관여된다(Yang et al., J Biol. Chem. 278:8804-8808(2003)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gdhA	118547	P00370	에스케리치아 콜라이
gdh	6226595	P96110.4	써모토가 마리티마
gdhA1	15789827	NP_279651.1	할로박테리엄 살리나럼
ldh	61222614	P0A393	바실러스 세레우스
nadX	15644391	NP_229443.1	써모토가 마리티마

[0609]

[0610] *lysDH*에 의해 코딩되는 라이신 6-탈수소효소(탈아민화)는 L-라이신의 6-아미노 기의 산화적 탈아민화를 촉매화하여 2-아미노아디페이트-6-세미알데히드를 형성하고, 이는 다시 비촉매적으로 고리화되어 Δ^1-피페리딘-6-카복실레이트를 형성한다(Misono and Nagasaki, J. Bacteriol. 150:398-401(1982)). 예시적인 효소는 게오바실러스 스테아로써모필러스(Heydari et al., Appl Environ. Microbiol 70:937-942(2004)), 아그로박테리엄 투메파시엔스(문헌[Hashimoto et al., J Biochem. 106:76-80(1989)]; 및 [Misono 및 Nagasaki, J. Bacteriol. 150:398-401(1982)]), 및 아크로모박터 데니트리피칸스(Ruldeekulthamrong et al., BMB. Rep. 41:790-795(2008))에서 발견될 수 있다. 이러한 효소는 아디페이트 세미알데히드를, 아디페이트 세미알데히드 및 2-아미노아디페이트-6-세미알데히드 사이의 구조적 유사성이 제공된 6-아미노카프로에이트로 전환시키기에 특히 우수한 후보이다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
lysDH	13429872	BAB39707	게오바실러스 스테아로써모필러스
lysDH	15888285	NP_353966	아그로박테리엄 투메파시엔스
lysDH	74026644	AAZ94428	아크로모박터 데니트리피칸스

[0611]

[0612] 2.3.1.a 아실전이효소(CoA의 인으로의 전달). 포스페이트를 위해 CoA 잔기를 교환하는 아실전이효소는 EC 부류 2.3.1에 속한다. 이 범주내의 형질전환은 6-AAHOP의 6-아세트아미도헥사노일-CoA로의 전환(도 13, 단계 K) 및 6-AHOP의 6-아미노카프로일-CoA로의 전환(도 13, 단계 L)을 포함한다. 예시적인 포스페이트-전달 아실전이효소

는 *pta*에 의해 코딩되는 인산아세틸전이효소(EC 2.3.1.8),및 *ptb*에 의해 코딩되는 포스포트랜스부티릴라아제(EC 2.3.1.19)를 포함한다. 에스케리치아 콜라이로부터의 *pta* 유전자는 아세틸-CoA를 아세틸-포스페이트로 가역적으로 전환시키는 효소를 코딩한다(Suzuki, T., Biochim. Biophys. Acta 191:559-569(1969)). 이러한 효소는 또한 기질로서 프로피오닐-CoA를 이용하여 공정중에 프로피오네이트를 형성할 수 있다(Hesslinger et al., Mol. Microbiol 27:477-492(1998)). 유사하게, 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *ptb* 유전자는 포스페이트 트랜스부티릴라아제를 코딩하고, 이 효소는 부티릴-CoA를 부티릴-포스페이트로 가역적으로 전환시킨다(문헌[Walter et al., Gene 134:107-111(1993)]; 및 [Wiesenborn et al., Appl Environ Microbiol 55:317-322(1989)]). 추가의 *ptb* 유전자는 부티레이트 생산 박테리아 L2-50(Louis et al., J. Bacteriol. 186:2099-2106(2004)) 및 바실러스 메가테리엄(Vazquez et al., Curr. Microbiol 42:345-349(2001))에서 발견된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
Pta	16130232	NP_416800.1	에스케리치아 콜라이
Ptb	15896327	NP_349676	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
Ptb	38425288	AAR19757.1	부티레이트-생산 박테리아 L2-50
Ptb	10046659	CAC07932.1	바실러스 메가테리엄

[0613]

[0614] 2.3.1.c 아실전이효소(N-아세틸전이효소). N-아세틸전이효소는 아세틸 기를 아민에 전달하여, N-아세틸 기를 형성한다. N-아세틸화는 전사 조절, 핵 수입, 염색체 조립 및 누클레오솜(nucleosome) 리모델링을 비롯한 생물학적 시스템에서 다양한 작용을 한다(Kouzarides, EMBO J 19:1176-1179(2000)). 아르기닌 생합성 경로의 대사 중간체의 N-아세틸화는 자발적인 고리화로부터의 반응성 중간체를 보호하고, 또한 경로 중간체를 경쟁 경로로부터의 격리시키는 작용을 둘다 한다(Caldovic 및 Tuchman, Biochem. J 372:279-290(2003)). 6-ACA의 아세틸화(도 13, 단계 D)는 도 13의 제안된 HMDA 생합성 경로에서 유사한 역할을 수행하여, 자발적인 고리화로부터 반응성 중간체를 보호한다.

[0615] 6-ACA를 아세틸화하기 위한 하나의 후보 효소는 라이신 N-아세틸전이효소(EC 2.3.1.32)이고, 이 효소는 아세틸 포스페이트로부터 아세틸 잔기를 L-라이신, 베타-L-라이신 또는 L-오르니틴의 말단 아미노 기로 선택적으로 전달한다. 이 효소는 6-ACA를 아세틸화하는 것으로 알려져 있지 않지만, 이 기질은 천연 기질과 구조적으로 유사하다. 라이신 N-아세틸전이효소는 보스 타우러스(Paik. and Kim, Arch. Biochem. Biophys. 108:221-229, 1964) 및 메타노사르시나 마제이(Pfluger et al., Appl Environ. Microbiol 69:6047-6055(2003))에서 특징규명되었다. 메탄생성 고세균 메타노코커스 마리팔루디스, 메타노사르시나 아세티보란스(*Methanosarcina acetivorans*), 메타노사르시나 바르케리 및 메타노칼도코커스 자나쉬는 또한 이러한 작용성을 갖는 효소를 코딩하는 것으로 예측된다(Pfluger et al., Appl Environ. Microbiol 69:6047-6055(2003)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ablB	21227037	NP_632959.1	메타노사르시나 마제이
yodP	44921183	CAF30418	메타노코커스 마리팔루디스
MA3978	20092772	NP_618847.1	메타노사르시나 아세티보란스
MJ0635	15668816	NP_247619.1	메타노칼도코커스 자나쉬
Mbar_A0671	73668215	YP_304230.1	메타노사르시나 바르케리

[0616]

[0617] 다르게는, 6-ACA 아세틸화는 N-아세틸전이효소의 GNAT 계열에서 효소에 의해 촉매화될 수 있다. 이러한 효소는 아세틸-CoA로부터의 아세틸 기를 1차 아민으로 전달시킨다. 디아민 N-아세틸전이효소(EC 2.3.1.57)로서도 공지된 효소 스페르미딘(spermidine) N-아세틸전이효소(SSAT)는 다양한 소분자 기질을 아세틸화할 수 있다. 아스카리스 섬 및 온코세라 볼불러스(*Onchocerca volvulus*)로부터의 정제된 효소는 HMDA를 포함하는 광범위한 기질 범위를 나타내지만(문헌[Davids et al., Mol. Biochem. Parasitol. 64:341-344(1994)]; 및 [Wittich and Walter, Mol. Biochem. Parasitol. 38:13-17(1990)]), 연결된 유전자는 아직까지 식별되지 않았다. 이러한 작용성을 갖는 다른 효소는 바실러스 서브틸리스(Forouhar et al., J Biol. Chem. 280:40328-40336(2005)) 및 호모 사피엔스(Casero and Pegg, FASEB J 7:653-661(1993))에서 발견된다. 밀접하게 연관된 효소는 카에노르햅디티스 엘레간스중의 티아라이신 N-아세틸전이효소이고, 이 효소는 라이신, 오르니틴, 티아라이신 등을 비롯한 기질 범위를 허용한다(bo-Dalo et al., Biochem. J 384:129-137(2004)). 기질 결합에 연관된 아미노산 잔기는 레쉬마니아 메이저로부터의 티아라이신 N-아세틸전이효소에서 식별되었다(Luersen, K., FEBS Lett. 579:5347-5352(2005)). 추가적인 후보는 디아미노부티레이트 아세틸전이효소(EC 2.3.1.178)이고, 이 효소는 메틸로미크로븀 알칼리필럼(Reshetnikov et al., Arch. Microbiol 184:286-297(2006)), 크로모할로박터 살렉시겐스(이전에 할로모나스 엘론가타(*Halomonas elongata*)였음)(Canovas et al., Syst. Appl Microbiol 21:487-

497(1998))에서 엑토인 생합성에 참여한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
paiA	16080268	NP_391095.1	바실러스 서브틸리스
SSAT1	114322	P21673	호모 사피엔스
D2023.4	17559148	NP_505978.1	카에노르햅디티스 엘레간스
LmjF36.2750	68129928	CAJ09234.1	레쉬마니아 메이저
ectA	68366269	AAY96770.1	메틸로미크로븀 알칼리필럼 20Z
ectA	6685422	Q9ZEU8.1	크로모할로박터 살렉시겐스

[0618]

[0619] 6-ACA의 아세틸화(도 13, 단계 D) 및 6-아세트아미드헥산아민의 탈아세틸화(도 13, 단계 H)를 위한 추가적인 효소 후보는 아르기닌 생합성의 2개 단계를 촉매화하는 이작용성 효소인 오르니틴 아세틸전이효소(OAT, EC 2.3.1.35 및 EC 2.3.1.1)이다(도 14A). 아르기닌 생합성의 제1 단계(도 14A, 단계 1)는 아세틸 공여체로서 아세틸-CoA를 갖는 OAT에 의해 촉매화되는 글루타메이트의 N-아세틸화이다(O'Reilly and Devine, Microbiology 140(Pt 5):1023-1025(1994)). OAT는 또한 아르기닌 생합성의 제5 단계를 촉매화하고(도 14A, 단계 2), 여기서 N-아세틸 기는 N-아세틸-L-오르니틴로부터 아르기닌 생합성 경로의 제1 대사물질인 L-글루타메이트로 전달된다. 이러한 형질전환은 아세틸 기를 재순환시키고 N-아세틸글루타메이트를 재생하여, 에너지를 보존함으로써 선형 경로를 순환 경로로 만든다. 유사한 전략은 6-아미노카프로에이트로부터의 HMDA 생합성에서 사용될 수 있고, 단일 효소는 6-아미노카프로에이트를 아세틸화하고 6-아세트아미도헥산아민을 탈아세틸화하여 HMDA를 형성한다(도 14B). 예시적인 OAT 효소는 바실러스 서브틸리스중 *argJ*(문헌[O'Reilly and Devine, Microbiology 140(Pt 5):1023-1025(1994)]; 및 [Sakanyan et al., Journal of General Microbiology 138:125-130(1992)]) 및 사카로마이세스 세레비지아중 ECM40(문헌[Abadjieva et al., J Biol. Chem. 275: 11361-11367(2000)]; 및 [Liu et al., Eur. J Biochem. 228:291-296(1995)])에 의해 코딩된다. 효모(Maes et al., Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 62: 1294-1297(2006)) 및 마이코박테리엄 투베르큘로시스(Sankaranarayanan et al., Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 65: 173-176(2009))로부터의 효소의 결정 구조가 이용가능하다. 단일 개방 판독 프레임(open reading frame)에 의해 코딩되지만, OAT 효소는 별개의 알파 및 베타 서브유닛 펩티드를 갖는다(Liu et al., Eur. J Biochem. 228:291-296(1995)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
argJ	16078185	NP_389002.1	바실러스 서브틸리스
ECM40 (ARG7)	6323707	NP_013778.1	사카로마이세스 세레비지아
Rv1653	15608791	NP_216169.1	마이코박테리엄 투베르큘로시스

[0620]

[0621] 2.3.1.d 아실전이효소(포메이트 C-아실전이효소). 케토산 HODH, OHED 및 2-OHD의 이들의 상응하는 CoA 유도체로의 아실화(도 12, 단계 L, P 및 Q) 및 동시적인 포메이트의 방출은 EC 부류 2.3.1중의 포메이트 C-아실전이효소에 의해 촉매화된다. 이러한 부류중의 효소로는 피루베이트 포메이트-리아제 및 케토산 포메이트-리아제가 포함된다. 에스케리치아 콜라이에서 *pflB*에 의해 코딩되는 피루베이트 포메이트-리아제(PFL, EC 2.3.1.54)는 피루베이트를 아세틸-CoA 및 포메이트로 전환시킨다. PFL의 활성 부위는 촉매적으로 필수적인 글리실 라디칼을 포함하는데, 이는 혐기성 조건하에 *pflA*에 의해 코딩되는 PFL-활성화 효소(PFL-AE, EC 1.97.1.4)에 의해 번역후 활성화된다(문헌[Knappe et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. 81:1332-1335(1984)]; 및 [Wong et al., Biochemistry 32: 14102-14110(1993)]). *pflD*에 의해 코딩되는 아르카에글루버스 펄지더스로부터의 피루베이트 포메이트-리아제는 에스케리치아 콜라이에서 발현되고 특징규명되었다(Lehtio, L. and A. Goldman, Protein Eng Des SeI 17:545-552(2004)). 아르카에오글로버스 펄지더스 및 에스케리치아 콜라이 효소의 결정 구조는 해결되었다(Lehtio et al., J Mol. Biol. 357:221-235(2006)). 추가적인 PFL 및 PFL-AE 후보는 클로스트리디엄 파스퇴리아넘(Weidner and Sawers, J. Bacteriol. 178:2AAO-2AAA(1996)) 및 진핵생물성 조류 클라미도모나스 레인하르드티(Cary et al., Appl. Environ. Microbiol 56:1576-1583(1990))에서 발견되었다. 2-케토부티레이트 포메이트-리아제(KFL) 및 피루베이트 포메이트-리아제 4로도 공지된 케토산 포메이트-리아제(EC 2.3.1.-)는 에스케리치아 콜라이에서 *tdcE*의 유전자 생성물이다. 이 효소는 2-케토부티레이트의 프로피오닐-CoA 및 포메이트로의 전환을 혐기성 트레오닌 분해 동안 촉매화하고, 혐기성 이화작용에서 피루베이트 포메이트-리아제를 대체할 수도 있다(Simanshu et al., J Biosci. 32:1195-1206(2007)). 이 효소는 산소-감수성이고, PflB와 같이 활성 부위에서 글리실 라디칼을 활성화하기 위해 PFL-AE에 의한 후-번역 개질이 필요하다(Hesslinger et al., Mol. Microbiol 27:477-492(1998)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pflB	16128870	NP_415423.1	에스케리치아 콜라이
pflA	16128869	NP_415422.1	에스케리치아 콜라이
tdcE	48994926	AAT48170.1	에스케리치아 콜라이
pflD	11499044	NP_070278.1	아르카에오글로버스 펄지더스
pfl	2500058	Q46266.1	클로스트리디엄 파스퇴리아넘
act	1072362	CAA63749.1	클로스트리디엄 파스퇴리아넘
pfl1	159462978	XP_001689719.1	클라미도모나스 레인하르드티
pflA1	159485246	XP_001700657.1	클라미도모나스 레인하르드티

[0622]

[0623] 2.6.1.a 아미노전이효소. 도 12의 단계 E, H 및 J 및 도 13의 단계 C 및 G는 알데히드 또는 케콘의 아미노 기로의 전환을 필요로 한다. 이러한 형질전환은 아미노전이효소(EC 2.6.1.-)에 의해 달성될 수 있다. 알데히드의 말단 아민으로의 전환(도 12, 단계 E; 도 13, 단계 C 및 G)은 감마-아미노부티레이트 아미노전이효소(GABA 아미노전이효소)에 의해 촉매화될 수 있다. 하나의 에스케리치아 콜라이 GABA 아미노전이효소는 *gabT*에 의해 코딩되고 글루타메이트로부터의 아미노기를 석신산 세미알데히드의 말단 알데히드에 전달한다(Bartsch et al., J. Bacteriol 172:7035-7042(1990)). 이러한 효소는 넓은 기질 범위를 나타낸다(Liu et al., Biochemistry 43:10896-10905(2004)). *puuE*의 유전자 생성물은 에스케리치아 콜라이에서 다른 4-아미노부티레이트 아미노전이효소를 코딩한다(Kurihara et al., J. Biol. Chem. 280:4602-4608(2005)). 무스 무스큘러스, 슈도모나스 플루오레센스, 및 서스 스크로파에서 GABA 아미노전이효소는 6-아미노카프로산와 반응하는 것으로 제시되었다(문헌[Cooper, Methods Enzymol. 113:80-82(1985)]; 및 [Scott and Jakoby, J Biol. Chem. 234:932-936(1959)]).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gabT	16130576	NP_417148.1	에스케리치아 콜라이
puuE	16129263	NP_415818.1	에스케리치아 콜라이
abat	37202121	NP_766549.2	무스 무스큘러스
gabT	70733692	YP_257332.1	슈도모나스 플루오레센스
abat	47523600	NP_999428.1	서스 스크로파

[0624]

[0625] 추가적인 효소 후보로는 푸트레신 아미노전이효소 또는 다른 디아민 아미노전이효소가 포함된다. 이러한 효소는 6-아미노카프로에이트 세미알데히드의 HMDA로의 전환을 수행하는데 특히 적합하다. 에스케리치아 콜라이 푸트레신 아미노전이효소는 *ygjG* 유전자에 의해 코딩되고, 정제된 효소는 또한 카다베린(cadaverine) 및 스페르미딘(spermidine)을 트랜스아민화할 수 있었다(Samsonova et al., BMC. Microbiol 3:2(2003)). 또한, 2-옥소글루타레이트 이외의 아미노 수용체(예를 들어, 피루베이트, 2-옥소부타노에이트)를 갖는 1,7-디아미노헵탄 상에서의 이러한 효소의 활성은 보고되었다(문헌[Kim, J Biol. Chem. 239:783-786(1964)]; 및 [Samsonova et al., BMC. Microbiol 3:2(2003)]). 알파-케토글루타레이트 이외의 아미노 수용체로서 피루베이트에 대한 더 높은 활성을 갖는 푸트레신 아미노전이효소는 슈도모나스 아에루기노사의 *spuC* 유전자이다(Lu et al., J. Bacteriol. 184:3765-3773(2002)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ygjG	145698310	NP_417544	에스케리치아 콜라이
spuC	9946143	AAG03688	슈도모나스 아에루기노사

[0626]

[0627] 추가적인 후보 효소는 베타-알라닌으로부터 말론산 세미알데히드를 생산하는 베타-알라닌/알파-케토글루타레이트 아미노전이효소를 포함한다(국제 특허출원 공개공보 제WO08027742호). 사카로마이세스 클루이베리중의 SkPYD4의 유전자 생성물은 아미노 기로서 베타-알라닌을 우선적으로 사용하는 것으로 제시되었다(Andersen and Hansen, Gene 124: 105-109(1993)). *SkUGA1*은 사카로마이세스 세레비지아 GABA 아미노전이효소, UGA1의 상동체를 코딩하는 반면(Ramos et al., Eur.J.Biochem., 149:401-404(1985)), *SkPYD4*는 β-알라닌 및 GABA 트랜스아민화 둘다에 관여된 효소를 코딩한다(Andersen and Hansen, Gene 124: 105-109(1993)). 3-아미노-2-메틸프로피오네이트 아미노전이효소는 메틸말로네이트 세미알데히드로부터 3-아미노-2-메틸프로피오네이트로의 형질전환을 촉매화한다. 이 효소는 래터스 노르베기커스 및 서스 스크로파에서 특징규명되고 *Abat*에 의해 코딩된다(문헌[Kakimoto et al., Biochim. Biophys. Acta 156:374-380(1968); 및 [Tamaki et al, Methods Enzymol, 324:376-389(2000)]).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
SkyPYD4	98626772	ABF58893.1	사카로마이세스 클루이베리
SkUGA1	98626792	ABF58894.1	사카로마이세스 클루이베리
UGA1	6321456	NP_011533.1	사카로마이세스 세레비지아
Abat	122065191	P50554.3	래터스 노르베기커스
Abat	120968	P80147.2	서스 스크로파

[0628]

[0629] 도 12의 단계 J 및 H는 아미노산을 옥소산으로 형질전환하는 아미노전이효소에 의해 촉매화된다. 단계 J에서, OHED는 트랜스아민화되어 2-AHE를 OHED 아미노전이효소에 의해 형성한다. 2-OHD 아미노전이효소에 의한 2-OHD의 2-AHD로의 트랜스아민화(단계 H)는 유사한 반응이다. 이들 반응을 촉매화하기 위한 예시적인 효소 후보는 아스파테이트 아미노전이효소이고, 이 효소는 옥살로아세테이트로부터 옥소 기를 글루타메이트에 천연적으로 전달하여 알파-케토글루타레이트 및 아스파테이트를 형성한다. 아스파테이트는 OHED 및 2-AHD에 구조적으로 유사하다. 아스파테이트 아미노전이효소 활성은, 예를 들면 에스케리치아 콜라이로부터의 *aspC*(문헌[Yagi et al., FEBS Lett. 100:81-84,(1979)]; 및 [Yagi et al., Methods Enzymol. 113:83-89(1985)]), 사카로마이세스 세레비지아로부터의 *AAT2*(Yagi et al., J Biochem. 92:35-43(1982)) 및 아라비돕시스 탈리아나로부터의 *ASP5*(문헌[de Ia Torre et al., Plant J 46:414-425(2006)]; [Kwok and Hanson, J Exp. Bot. 55:595-604(2004)]; 및 [Wilkie and Warren, Protein Expr. Purif. 12:381-389(1998)])의 유전자 생성물에 의해 촉매화된다. 래터스 노르베기커스로부터의 효소는 다른 기질, 예컨대 2-아미노헥산디오산 및 2,4-디아미노부티르산을 트랜스아민화하는 것으로 제시되었다(Recasens et al., Biochemistry 19:4583-4589(1980)). 다른 아미노산 기질 상에 작용하는 아미노전이효소는 이러한 형질전환을 촉매화한다. 발린 아미노전이효소는 발린 및 피루베이트의 2-케토이소발러레이트 및 알라닌으로의 전환을 촉매화한다. 에스케리치아 콜라이 유전자, *avtA*는 하나의 이러한 효소를 코딩한다(Whalen and Berg, C. J. Bacteriol. 150:739-746(1982)). 이러한 유전자 생성물은 또한 α-케토부티레이트의 트랜스아민화를 촉매화하여 α-아미노부티레이트를 생성하지만, 이러한 반응에서의 아민 공여체는 식별되지 않았다(Whalen and Berg, J. Bacteriol. 158:571-574(1984)). 에스케리치아 콜라이 serC의 유전자 생성물은 2가지 반응, 즉 포스포세린 아미노전이효소 및 포스포하이드록시트레오닌 아미노전이효소를 촉매화하고(Lam and Winkler, J. Bacteriol. 172:6518-6528(1990)), 및 비포스포릴화 기질 상에서의 활성은 검출되지 않았다(Drewke et al., FEBS. Lett. 390:179-182(1996)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
aspC	16128895	NP_415448.1	에스케리치아 콜라이
AAT2	1703040	P23542.3	사카로마이세스 세레비지아
ASP5	20532373	P46248.2	아라비돕시스 탈리아나
Got2	112987	P00507	래터스 노르베기커스
avtA	49176374	YP_026231.1	에스케리치아 콜라이
serC	16128874	NP_415427.1	에스케리치아 콜라이

[0630]

[0631] 2.7.2.a 인산전이효소(카복시 수용체). EC 부류 2.7.2중의 인산전이효소는 하나의 ATP의 동시적인 가수분해와 함께 카복실산을 포스폰산으로 형질전환시킨다. 도 13에서 단계 A 및 E는 6-ACA(단계 A) 및 6-아세트아미도헥사노에이트(단계 E)의 카복실 기를 이의 상응하는 포스폰산으로 활성화시키는 인산전이효소를 필요로 한다. 부티레이트 키나아제는 부티릴-포스페이트의 부티레이트로의 가역성 전환을 클로스트리디엄 아세토부틸리컴에서 산 생성 동안 수행한다(Cary et al., Appl. Environ. Microbiol 56:1576-1583(1990)). 이러한 효소는 2가지 *buk* 유전자 생성물에 의해 코딩된다(Huang et al., J Mol. Microbiol Biotechnol 2:33-38(2000)). 써모토가 마리티마로부터의 관련 효소 이소부티레이트 키나아제는 또한 에스케리치아 콜라이에서 발현되고 결정화되었다(문헌[Diao et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59:1100-1102(2003)]; 및 [Diao and Hasson, J. Bacteriol. 191:2521-2529(2009)]). 아스파토키나아제는 아스파테이트의 ATP-의존성 인산화를 촉매화하고 수 개의 아미노산 합성에 참여한다. *lysC*에 의해 코딩되는 에스케리치아 콜라이중의 아스파토키나아제 III 효소는 넓은 기질 범위를 갖고, 기질 특이성에 관여된 촉매 잔기가 밝혀졌다(Keng and Viola, Arch. Biochem. Biophys. 335:73-81(1996)). 에스케리치아 콜라이에서 2가지 추가적인 키나아제는 또한 우수한 후보이다: 아세테이트 키나아제 및 감마-글루타밀 키나아제. *ackA*에 의해 코딩되는 에스케리치아 콜라이 아세테이트 키나아제(Skarstedt and Silverstein, J. Biol. Chem. 251:6775-6783(1976))는 아세테이트에 더하여 프로피오네이트를 인산화시킨다(Hesslinger et al., Mol. Microbiol 27:477-492(1998)). *porB*에 의해 코딩되는 에스케리치아 콜라이 감마-글루타밀 키나아제(Smith et al., J. Bacteriol. 157:545-551(1984))는 글루타메이트의 감마 탄산

기를 인산화시킨다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
buk1	15896326	NP_349675	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
buk2	20137415	Q97II1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
buk2	6685256	Q9X278.1	써모토가 마리티마
lysC	16131850	NP_418448.1	에스케리치아 콜라이
ackA	16130231	NP_416799.1	에스케리치아 콜라이
proB	16128228	NP_414777.1	에스케리치아 콜라이

[0632]

[0633] 아세틸글루타메이트 키나아제는 아세틸화된 글루타메이트를 아르기닌 생합성 동안 인산화시키고, 이는 6-아세트아미도헥사노에이트를 인산화하기 위한 우수한 후보이다(도 13, 단계 E). 이러한 효소는 다른 기질을 수용하는 것으로 공지되지 않지만, 기질 결합 및 인산화에 관여된 에스케리치아 콜라이 효소의 수 개의 잔기는 부위-지향된 돌연변이생성에 의해 밝혀졌다(문헌[Marco-Martin et al., J Mol. Biol. 334:459-476(2003)]; 및 [Ramon-Maiques et al., Structure. 10:329-342(2002)]). 이 효소는 바실러스 서브틸리스 및 에스케리치아 콜라이중의 *argB*(Parsot et al., Gene 68:275-283(1988)), 및 사카로마이세스 세레비지아중의 *ARG5,6*(Pauwels et al., Eur. J Biochem. 270:1014-1024(2003))에 의해 코딩된다. 사카로마이세스 세레비지아의 *ARG5,6* 유전자는 미토콘드리아 기질에서 성숙하여 아세틸글루타메이트 키나아제 및 아세틸글루타밀포스페이트 환원효소가 되는 폴리단백질 전구체를 코딩하고, 이는 6-AAHOP의 환원을 위한 효소 후보이다(도 13, 단계 F).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
argB	145698337	NP_418394.3	에스케리치아 콜라이
argB	16078186	NP_389003.1	바실러스 서브틸리스
ARG5,6	6320913	NP_010992.1	사카로마이세스 세레비지아

[0634]

[0635] 2.8.3.a 조효소-A 전이효소. 조효소-A(CoA) 전이효소는 하나의 분자로부터 다른 분자로 CoA 잔기의 가역적 전달을 촉매화한다. 도 13의 단계 M에서, 3-아미노카프로일-CoA는 CoA 기를 아세틸-CoA, 석시닐-CoA, 또는 또 다른 CoA 공여체로부터 전달함으로써 형성된다. 유사한 형질전환은 도 13의 단계 I에 도시된 6-아세트아미도헥사노에이트 CoA-전이효소에 의해 촉매화된다. 예시적인 CoA 전이효소 후보는 석시닐-CoA, 4-하이드록시부티릴-CoA, 및 부티릴-CoA 전이효소 활성을 각각 나타내는 것으로 제시된 클로스트리디엄 클루이베리의 *cat1*, *cat2*, 및 *cat3*의 유전자 생성물에 의해 촉매화된다(문헌[Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. 105:2128-2133(2008)]; 및 [Sohling and Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880(1996)]). 유사한 CoA 전이효소 활성은 또한 트리코모나스 바기날리스(van Grinsven et al., J. Biol. Chem. 283: 1411-1418(2008)) 및 트리파노소마 브루세이(Riviere et al., J. Biol. Chem. 279:45337-45346(2004))에 존재한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
cat1	729048	P38946.1	클로스트리디엄 클루이베리
cat2	172046066	P38942.2	클로스트리디엄 클루이베리
cat3	146349050	EDK35586.1	클로스트리디엄 클루이베리
TVAG_395550	123975034	XP_001330176	트리코모나스 바기날리스 G3
Tb11.02.0290	71754875	XP_828352	트리파노소마 브루세이

[0636]

[0637] 아세틸-CoA를 CoA 공여체로 이용할 수 있는 CoA 전이효소는 에스케리치아 콜라이 *atoA*(알파 서브유닛) 및 *atoD*(베타 서브유닛) 유전자에 의해 코딩되는 아세토아세틸-CoA 전이효소이다(문헌[Korolev et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 58:2116-2121(2002)]; 및 [Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908(1968)]). 이러한 효소는 넓은 기질 범위를 갖고(Sramek and Frerman, Arch. Biochem. Biophys. 171: 14-26(1975)), 다양한 분지형 및 선형 아실-CoA 기질로부터의 아세테이트(Matthies and Schink, Appl Environ. Microbiol 58:1435-1439(1992)), 발러레이트(Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908(1968)) 및 부타노에이트(Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908(1968))에 CoA 잔기를 전달하는 것으로 제시되었다. 이러한 효소는 아세토아세테이트에 의해 전사 수준에서 유도되므로, 규제적 조절의 개질이 이러한 효소를 경로내로 조작하기 위해 필수적일 수 있다(Pauli and Overath, Eur. J Biochem. 29:553-562(1972)). 유사한 효소가 코리네박테리엄 글루타미컴 ATCC 13032(Duncan et al., Appl. Environ. Microbiol 68:5186-5190(2002)), 클로스트리디엄 아세토부틸리컴(문헌[Cary et al., Appl. Environ. Microbiol 56:1576-1583(1990)]; 및 [Wiesenborn et al., Appl. Environ.

Microbiol 55:323-329(1989)]), 및 클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴(Kosaka et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007))에 존재한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
AtoA	2492994	NP_416726	에스케리치아 콜라이 K12
AtoD	2492990	NP_416725	에스케리치아 콜라이 K12
actA	62391407	YP_226809.1	코리네박테리엄 글루타미컴 ATCC 13032
cg0592	62389399	YP_224801.1	코리네박테리엄 글루타미컴 ATCC 13032
ctfA	15004866	NP_149326.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
ctfB	15004867	NP_149327.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
ctfA	31075384	AAP42564.1	클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴
ctfB	31075385	AAP42565.1	클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴

[0638]

[0639] 혐기성 박테리아 아시드아미노코커스 페르멘탄스로부터의 글루타코닐-CoA-전이효소(EC 2.8.3.12)는 글루타코닐-CoA 및 3-부테노일-CoA와 반응한다(Mack et al., Eur. J. Biochem. 226:41-51(1994)). 이 효소를 코딩하는 유전자는 *gctA* 및 *gctB*이다. 이러한 효소는 글루타릴-CoA, 2-하이드록시글루타릴-CoA, 아디필-CoA 및 아크릴릴-CoA를 비롯한 다른 CoA 유도체에 의해 감소되었지만 검출가능한 활성을 갖는다(Buckel et al., Eur. J Biochem. 118:315-321(1981)). 이 효소는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 발현되었다(Mack et al., Eur. J. Biochem. 226:41-51(1994)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gctA	559392	CAA57199.1	아시드아미노코커스 페르멘탄스
gctB	559393	CAA57200.1	아시드아미노코커스 페르멘탄스

[0640]

[0641] 또 다른 CoA 전이효소는 슈도모나스 푸티다중의 *pcaI* 및 *pcaJ*에 의해 코딩되는 2개 유닛의 석시닐-CoA:3:옥소산-CoA 전이효소이다(Kaschabek et al., J. Bacteriol. 184:207-215(2002)). 상동성에 기초한 유사한 효소는 아시네토박터 종 ADP1에 존재한다(Kowalchuk et al., Gene 146:23-30(1994)). 추가의 예시적인 석시닐-CoA:3:옥소산-CoA 전이효소는 헬리코박터 필로리(Corthesy-Theulaz et al., J Biol. Chem. 272:25659-25667(1997)) 및 바실러스 서브틸리스(Stols et al., Protein Expr. Purif. 53:396-403(2007))에 존재한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pcaI	24985644	AAN69545.1	슈도모나스 푸티다
pcaJ	26990657	NP_746082.1	슈도모나스 푸티다
pcaI	50084858	YP_046368.1	아시네토박터 종 ADP1
pcaJ	141776	AAC37147.1	아시네토박터 종 ADP1
pcaI	21224997	NP_630776.1	스트렙토마이세스 코엘리컬러
pcaJ	21224996	NP_630775.1	스트렙토마이세스 코엘리컬러
HPAG1_0676	108563101	YP_627417	헬리코박터 필로리
HPAG1_0677	108563102	YP_627418	헬리코박터 필로리
ScoA	16080950	NP_391778	바실러스 서브틸리스
ScoB	16080949	NP_391777	바실러스 서브틸리스

[0642]

[0643] 3.5.1.a 가수분해효소(선형 아미드 상에서 작용). 선형 아세트아미드의 탈아세틸화는 효소의 3.5.1 계열중의 아미도가수분해효소에 의해 촉매화된다. 이러한 효소는 6-아세트아미도헥산아민의 HMDA로의 탈아세틸화를 위해 필요하다(도 13, 단계 H). 유사한 형질전환을 촉매화하는 효소는 4-아세트아미도부티레이트 데아세틸라아제(EC 3.5.1.63)이고, 이는 천연적으로 4-아세트아미도부티레이트를 탈아세틸화한다. 캔디다 보이디니에서 푸트레신 분해시의 역할에 대해 연구된 효소(Gillyon et al., Journal of General Microbiology 133:2477-2485(1987))는 6-아세트아미도헥사노에이트를 비롯한 다양한 기질을 탈아세틸화하는 것으로 제시되었다(Haywood and Large, Journal of General Microbiology 132:7-14(1986)). 6-아세트아미도헥사노에이트가 구조면에서 원하는 기질과 유사하지만, 이러한 화합물의 탈아세틸화(도 13, 단계 D, 역 반응)는 HMDA의 효율적인 생산을 방해할 수 있다. 단백질 조작 또는 방향 진화는 6-아세트아미도헥산아민에 대한 특이성을 개선시키기 위해 요구될 수 있다. 이러한 활성에 연관된 유전자는 아직까지 식별되지 않았다.

[0644] 아세틸폴리아민 아미도가수분해효소(EC 3.5.1.62)는 이들의 아세틸화된 전구체로부터 디아민 푸트레신 및 카다베린을 형성하는 또 다른 후보 효소이다. 마이코플라나 라모스(*Mycoplana ramose*)로부터의 아세틸폴리아민 데

아세틸라아제(AphA)는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 특징규명되었고(Sakurada et al., J. Bacteriol. 178:5781-5786(1996)), 결정 구조가 이용가능하다(Fujishiro et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 157:1169-1174(1988)). 이러한 효소는 또한 마이크로코커스 루테어스(*Micrococcus luteus*)에서 연구되었지만, 연관된 유전자는 아직까지 식별되지 않았다(Suzuki et al., Biochim. Biophys. Acta 882:140-142(1986)). *AphA*에 대해 높은 서열 유사성을 갖는 단백질인 히스톤 데아세틸라아제 상위계열(superfamily)은 엠. 루테어스 게놈에서 식별되었다(평가 = 1e-18, 37% 동일성). 에스케리치아 콜라이로부터의 N-아세틸-L-오르니틴 데아세틸라아제가 또 다른 후보 아미도가수분해효소(EC 3.5.1.16)이다. *argE* 유전자에 의해 코딩된 에스케리치아 콜라이 효소(문헌[McGregor et al., J Am. Chem. Soc. 127:14100-14107(2005)]; 및 [Meinnel et al., J. Bacteriol. 174:2323-2331(1992)])는 오르니틴, 라이신, 글루카민, 및 기타 아미노산을 비롯한 다양한 기질로부터 N-아세틸 기를 제거한다(Javid-Majd and Blanchard, Biochemistry 39:1285-1293(2000)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
aphA	3023317	Q48935.1	마이코플라나 라모스
MlutDRAFT_1143	172071524	EDT57566.1	마이크로코커스 루테어스
argE	16131795	NP_418392.1	에스케리치아 콜라이

[0645]

[0646] 4.1.1.a 카복시-리아제. 도 12에서 단계 D 및 F는 OHED(단계 F) 및 2-OHD(단계 D)로부터 6-OHE 및 아디페이트 세미알데히드를 생성하는 2-케토산 데카복실라아제 효소에 의해 촉매화된다. 또한, 알파-케토글루타레이트는 탈카복실화되어 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제, 케토-산 데카복실라아제에 의해 경로 전구체 석신산 세미알데히드를 형성한다. 케토산의 탈카복실화는 피루베이트 데카복실라아제(EC 4.1.1.1), 벤조일포메이트 데카복실라아제(EC 4.1.1.7), 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 및 분지형 알파-케토산 데카복실라아제을 비롯한 다양한 기질 특이성을 갖는 다양한 효소로 촉매화된다. 케토-산 데카복실라아제로도 지칭되는 피루베이트 데카복실라아제(PDC)는 알코올성 발효에서의 핵심 효소이고, 이는 피루베이트의 아세트알데히드로의 탈카복실화를 촉매화한다. 사카로마이세스 세레비지아로부터의 효소는 2-케토부티레이트, 2-케토발러레이트, 3-하이드록시피루베이트 및 2-페닐피루베이트를 비롯한 지방족 2-케토산을 위한 광범위한 기질 범위를 갖는다(22). 이러한 효소는 광범위하게 연구되고, 변경된 활성을 위해 조작되고, 에스케리치아 콜라이에서 작용적으로 발현된다(문헌[Killenberg-Jabs et al., Eur. J. Biochem. 268: 1698-1704(2001)]; [Li, H. and F. Jordan, Biochemistry. 38:10004-10012(1999)]; 및 [ter Schure et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:1303-1307(1998)]). *pdc*에 의해 코딩되는 자이모모나스 모빌러스(*Zymomonas mobilus*)로부터의 PDC는 또한 광범위한 기질 범위를 갖고, 상이한 기질을 위한 친화도를 변경하기 위한 방향 조작 연구의 대상이었다(Siegert et al., Protein Eng Des SeI 18:345-357(2005)). 이러한 효소의 결정 구조는 이용가능하다(Killenberg-Jabs et al., Eur. J. Biochem. 268:1698-1704(2001)). 다른 특징규명된 PDC 후보는 아세토박터 파스퇴리안스(Chandra et al., Arch. Microbiol. 176:443-451(2001)) 및 클루이베로마이세스 락티스(Krieger et al., Eur. J. Biochem. 269:3256-3263(2002))로부터의 효소를 포함한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pdc	118391	P06672.1	자이모모나스 모빌리스
pdc1	30923172	P06169	사카로마이세스 세레비지아
pdc	20385191	Q8L388	아세토박터 파스퇴리안스
pdc1	52788279	Q12629	클루이베로마이세스 락티스

[0647]

[0648] PDC와 같이, 벤조일포메이트 데카복실라아제(EC 4.1.1.7)는 넓은 기질 범위를 갖고 효소 조작 연구의 표적이다. 슈도모나스 푸티다로부터의 효소는 널리 연구되고 이러한 효소의 결정 구조는 이용가능하다(문헌[Hasson et al., Biochemistry 37:9918-9930(1998)]; 및 [Polovnikova et al., Biochemistry 42:1820-1830(2003)]). 슈도모나스 푸티다 효소의 활성 부위에서 2개의 잔기의 부위-지향된 돌연변이생성은 천연적으로 및 비-천연적으로 발생된 기질의 친화도(Km)를 변경시켰다(Siegert et al., Protein Eng Des SeI 18:345-357(2005)). 이러한 효소의 특성은 방향 조작에 의해 추가로 개질되었다(문헌[Lingen et al., Protein Eng 15:585-593(2002)]; 및 [Lingen et al., Chembiochem. 4:721-726(2003)]). *mdlC*에 의해 코딩되는 슈도모나스 아에루기노사로부터의 효소는 또한 실험적으로 특징규명되었다(Barrowman et al., FEMS Microbiology Letters 34:57-60(1986)). 슈도모나스 스투체리, 슈도모나스 플루오레센스 및 다른 유기체로부터의 추가적인 유전자 후보는 서열 상동성에 의해 추론될 수 있거나, 슈도모나스 푸티다에서 개발된 성장 선택 시스템을 사용하여 식별될 수 있다(Henning et al., Appl. Environ. Microbiol. 72:7510-7517(2006)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
mdlC	3915757	P20906.2	슈도모나스 푸티다
mdlC	81539678	Q9HUR2.1	슈도모나스 아에루기노사
dpgB	126202187	ABN80423.1	슈도모나스 스투체리
ilvB-1	70730840	YP_260581.1	슈도모나스 플루오레센스

[0649]

[0650] 2-옥소산을 탈카복실화할 수 있는 제3 효소는 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제(KGD)이다. 효소의 이러한 부류의 기질 범위는 아직까지 연구되지 않았다. 마이코박테리엄 투베르큘로시스로부터의 KDC(Tian et al., Proc Natl Acad Sci U S. 102: 10670-10675(2005))는 게노마티카(*Genomatica*)에서 다른 내부 돌출부에서 클로닝되고 작용적으로 발현되었다. 그러나, 이는 크고(약 130 kD) GC가 풍부하므로 균주 조작을 위한 이상적인 후보가 아니다. KDC 효소 활성은 브라디리조븀 자포니컴 및 메소리조븀 로티를 비롯한 수 종의 근류균(rhizobia)에서 검출되었다(Green et al., J. Bacteriol. 182:2838-2844(2000)). KDC-코딩 유전자가 이들 유기체에서 단리되지 않았지만, 게놈 서열은 이용가능하고, 각각의 게놈에서 몇몇 유전자는 추정적 KDC로서 해석된다. 유글레나 그라실리스로부터의 KDC는 또한 특징규명되었지만, 이러한 활성과 연관된 유전자는 아직까지 식별되지 않았다(Shigeoka and Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28(1991)). N-말단으로부터 출발한 제1의 20개 아미노산은 다음과 같이 서열화되었다: MTYKAPVKDVKFLLDKVFKV(서열 번호:)(Shigeoka and Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28(1991)). 유전자는 KDC 활성을 위한 이러한 N-말단 서열을 포함하는 후보 유전자를 시험함으로써 식별될 수 있다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
kgd	160395583	O50463.4	마이코박테리엄 투베르큘로시스
kgd	27375563	NP_767092.1	브라디리조븀 자포니컴
kgd	13473636	NP_105204.1	메소리조븀 로티

[0651]

[0652] 이 단계를 촉매화하기 위한 제4 후보 효소는 분지형 알파-케토산 데카복실라아제(BCKA)이다. 이러한 부류의 효소는 탄소수 3 내지 6의 쇄 길이의 다양한 화합물 상에서 작용하는 것으로 제시되었다(문헌[Oku and Kaneda, J Biol Chem. 263:18386-18396(1988)]; 및 [Smit et al., Appl Environ Microbiol. 71:303-311(2005)]). 락토코커스 락티스에서 효소는 2-옥소부타노에이트, 2-옥소헥사노에이트, 2-옥소펜타노에이트, 3-메틸-2-옥소부타노에이트, 4-메틸-2-옥소부타노에이트 및 이소카프로에이트를 비롯한 다양한 분지형 및 선형 기질에 대해 특징규명되었다(Smit et al., Appl Environ Microbiol. 71:303-311(2005)). 이 효소는 구조적으로 특징규명되었다(Berg et al., Science. 318:1782-1786(2007)). 락토코커스 락티스 효소 및 자이모모나스 모빌러스의 피루베이트 데카복실라아제 사이의 서열 정렬로부터, 촉매 및 기질 인식 잔기가 거의 동일함을 알 수 있고(Siegert et al., Protein Eng Des SeI 18:345-357(2005)), 따라서 이 효소는 방향 조작을 위한 유망한 후보일 수 있다. 알파-케토글루타레이트의 BCKA에 의한 탈카복실화는 바실러스 서브틸리스에서 검출되었지만; 이러한 활성은 다른 분지형 기질에 대한 활성에 비해 낮았고(5%)(Oku and Kaneda, J Biol Chem. 263: 18386-18396(1988)), 이 효소를 코딩하는 유전자는 아직까지 식별되지 않았다. 추가적인 BCKA 유전자 후보는 락토코커스 락티스 단백질 서열에 대한 상동성으로 식별될 수 있다. 이 효소에 대한 많은 높은 스코어의 BLASTp는 인돌피루베이트 데카복실라아제(EC 4.1.1.74)로 해석된다. 인돌피루베이트 데카복실라아제(IPDA)는 식물 및 식물 박테리아에서 인돌피루베이트의 인돌아세트알데히드로의 탈카복실화를 촉매화하는 효소이다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
kdcA	44921617	AAS49166.1	락토코커스 락티스

[0653]

[0654] 호모 사피엔스 및 보스 타우러스로부터의 미토콘드리아 분지형 케토산 탈수소효소 착체의 E1 서브유닛으로부터 유도된 재조합 분지형 알파-케토산 데카복실라아제 효소는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 작용적으로 발현되었다(문헌[Davie et al., J. Biol. Chem. 267:16601-16606(1992)]; [Wynn et al., J. Biol. Chem. 267:1881-1887(1992)]; 및 [Wynn et al., J. Biol. Chem. 267:12400-12403(1992)]). 이들 연구에서, 샤페로닌(chaperonin) GroEL 및 GroES의 동시발현이 데카복실라아제의 특이적 활성을 500배 증가시킴이 밝혀졌다(Wynn et al., J. Biol. Chem. 267:12400-12403(1992)). 이들 효소는 2개의 알파 서브유닛 및 2개의 베타 서브유닛으로 구성된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
BCKDHB	34101272	NP_898871.1	호모 사피엔스
BCKDHA	11386135	NP_000700.1	호모 사피엔스
BCKDHB	115502434	P21839	보스 타우러스
BCKDHA	129030	P11178	보스 타우러스

[0655]

[0656] 2-AHD의 6-아미노카프로에이트로의 탈카복실화(도 12, 단계 I)는 아미노산 데카복실라아제, 예컨대 아스파테이트 데카복실라아제에 의해 촉매화된다. 아스파테이트 데카복실라아제는 판토네네이트 생합성에 참여하고 에스케리치아 콜라이에서 유전자 *panD*에 의해 코딩된다(문헌[Dusch et al., Appl. Environ. Microbiol 65:1530-1539(1999)]; [Merke and Nichols, FEMS Microbiol Lett. 143:247-252(1996)]; [Ramjee et al., Biochem. J 323(Pt 3):661-669(1997)]; 및 [Schmitzberger et al., EMBO J 22:6193-6204(2003)]). 마이코박테리엄 투베르큘로시스(Chopra et al., Protein Expr. Purif. 25:533-540(2002)) 및 코리네박테리엄 글루타미컴(Dusch et al., Appl. Environ. Microbiol 65:1530-1539(1999))으로부터의 유사한 효소가 에스케리치아 콜라이에서 발현되고 특징규명되었다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
panD	67470411	P0A790	에스케리치아 콜라이 K12
panD	18203593	Q9X4N0	코리네박테리엄 글루타미컴
panD	54041701	P65660.1	마이코박테리엄 투베르큘로시스

[0657]

[0658] 4.1.2.a 알데히드-리아제. HHED 알돌라아제로서도 공지된 HOHD 알돌라아제는 4-하이드록시-2-옥소-헵탄-1,7-디오에이트(HOHD)의 피루베이트 및 석신산 세미알데히드로의 전환을 촉매화한다(도 12, 단계 A). 이 효소는 2가 금속 이온 의존성 부류 II 알돌라아제이고, 에스케리치아 콜라이 C, 에스케리치아 콜라이 W, 및 다른 유기체에서 4-하이드록시페닐아세트산 분해의 최종 단계를 촉매화한다. 고유의 개념에서, 효소는 분해 방향으로 작용한다. 역(축합) 반응은 열역학적으로 바람직하지 않지만; 평형은 반응 생성물에 대해 효과적으로 작용하는 다운스트림 경로 효소와 HOHD 알돌라아제의 커플링을 통해 전이될 수 있다. 이러한 전략은 축합 방향에서 다른 알돌라아제의 평형을 전이시키기 위해 효과적이다(문헌[Nagata et al., Appl Microbiol Biotechnol 44:432-438(1995)]; 및 [Pollard et al., Appl Environ. Microbiol 64:4093-4094(1998))]. *hpcH*에 의해 코딩된 에스케리치아 콜라이 C 효소는 광범위하게 연구되었고 최근에 결정화되었다(문헌[Rea et al., J Mol. Biol. 373:866-876(2007)]; 및 [Stringfellow et al., Gene 166:73-76(1995)]). 에스케리치아 콜라이 W 효소는 *hpaI*에 의해 코딩된다(Prieto et al., J. Bacteriol. 178:111-120(1996)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hpcH	633197	CAA87759.1	에스케리치아 콜라이 C
hpaI	38112625	AAR11360.1	에스케리치아 콜라이 W

[0659]

[0660] 4.2.1.a 하이드로-리아제. 효소 OHED 수화효소는 4-하이드록시페닐아세트산 분해에 참여하고, 여기서 이는 마그네슘을 보조인자로 사용하여 2-옥소-헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)를 2-옥소-4-하이드록시-헵타-1,7-디오에이트(HODH)로 전환시킨다(Burks et al., J. Am. Chem. Soc. 120(1998))(도 12, 단계 B). OHED 수화효소 후보는 에스케리치아 콜라이 C(문헌[Izumi et al., J Mol. Biol. 370:899-911(2007)]; 및 [Roper et al., Gene 156:47-51(1995)]) 및 에스케리치아 콜라이 W(Prieto et al., J. Bacteriol. 178:111-120(1996))에서 식별되고 특징규명되었다. 서열 비교는 박테리아, 식물 및 동물의 범위에서 상동체를 밝혀낸다. 매우 유사한 서열을 갖는 효소는 무엇보다도 클레브시엘라 뉴모니아(91% 동일성, 평가 = 2e-138) 및 살모넬라 엔테리카(91% 동일성, 평가 = 4e-138)에 포함된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hpcG	556840	CAA57202.1	에스케리치아 콜라이 C
hpaH	757830	CAA86044.1	에스케리치아 콜라이 W
hpaH	150958100	ABR80130.1	클레브시엘라 뉴모니아
Sari_01896	160865156	ABX21779.1	살모넬라 엔테리카

[0661]

[0662] 3-하이드록시아디필-CoA의 2,3-데하이드로아디필-CoA로의 탈수(도 12, 단계 M)는 에노일-CoA 수화효소 활성을 갖는 효소로 촉매화된다. 크로토나아제로도 지칭되는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타아제(EC 4.2.1.55)는 3-하이드록시이소부티릴-CoA를 탈수시켜 크로토닐-CoA를 형성한다(도 14, 단계 2). 크로토나아제 효소는 몇

몇 유기체, 특히 클로스트리디엄 종에서 n-부탄올 형성을 위해 필요하고, 또한 설폴로버스, 아시디아너스, 및 메탈로스파에라 속의 호열호산성 고세균에서 3-하이드록시프로피오네이트/4-하이드록시부티레이트 사이클의 하나의 단계를 포함한다. 크로토나아제 효소를 코딩하는 예시적인 유전자는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴(문헌[Atsumi et al., Metab Eng 10:305-311(2008)]; 및 [Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015-3024(1996)]), 클로스트리디엄 클루이베리(Hillmer and Gottschalk, FEBS Lett. 21:351-354(1972)), 및 메탈로스파에라 세듈라(Berg et al., Science. 318:1782-1786(2007))에서 발견될 수 있지만, 후자의 유전자 서열은 공지되어 있지 않다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
crt	15895969	NP_349318.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
crt1	153953091	YP_001393856.1	클로스트리디엄 클루이베리

[0663]

[0664] 에노일-CoA 수화효소(EC 4.2.1.17)는 또한 3-하이드록시아실-CoA 기질의 탈수를 촉매화한다(문헌[Agnihotri and Liu., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2003)]; [Conrad et al., J. Bacteriol. 118: 103-111(1974)]; 및 [Roberts et al., Arch. Microbiol 117:99-108(1978)]). *ech*에 의해 코딩되는 슈도모나스 푸티다의 에노일-CoA 수화효소는 3-하이드록시부티릴-CoA의 크로토닐-CoA로의 전환을 촉매화한다(Roberts et al., Arch. Microbiol 117:99-108(1978)). 추가적인 에노일-CoA 수화효소 후보는 슈도모나스 푸티다의 *phaA* 및 *phaB*, 및 슈도모나스 플루오레센스의 *paaA* 및 *paaB*이다(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. 95:6419-6424(1998)). 로도슈도모나스 팔루스트리스에서의 *pimF*의 유전자 생성물은 피멜로일-CoA 분해에 참여하는 에노일-CoA 수화효소를 코딩하는 것으로 예측된다(Harrison and Harwood, Microbiology 151:727-736(2005)). 최근에, 다수의 에스케리치아 콜라이 유전자는 *maoC*(Park and Lee, J. Bacteriol. 185:5391-5397(2003)), *paaF*(문헌[Ismail et al., J Biochem. 270:3047-3054(2003)]; [Park and Lee, Appl. Biochem. Biotechnol 113-116:335-346(2004)]; 및 [Park and Yup, Biotechnol Bioeng 86:681-686(2004)]) 및 *paaG*(문헌[Ismail et al, J Biochem. 270:3047-3054(2003)]; [Park and Lee, Appl. Biochem. Biotechnol 113-116:335-346(2004)]; 및 [Park and Yup, Biotechnol Bioeng 86:681-686(2004)])를 비롯하여 에노일-CoA 수화효소 작용성을 나타내는 것으로 제시되었다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ech	26990073	NP_745498.1	슈도모나스 푸티다
paaA	26990002	NP_745427.1	슈도모나스 푸티다
paaB	26990001	NP_745426.1	슈도모나스 푸티다
phaA	106636093	ABF82233.1	슈도모나스 플루오레센스
phaB	106636094	ABF82234.1	슈도모나스 플루오레센스
pimF	39650635	CAE29158	로도슈도모나스 팔루스트리스
maoC	16129348	NP_415905.1	에스케리치아 콜라이
paaF	16129354	NP_415911.1	에스케리치아 콜라이
paaG	16129355	NP_415912.1	에스케리치아 콜라이

[0665]

[0666] 다르게는, fadA 및 fadB의 에스케리치아 콜라이 유전자 생성물은 에노일-CoA 수화효소 활성을 나타내는 지방산 산화에 관여된 다중효소 착체를 코딩한다(문헌[Nakahigashi and Inokuchi, Nucleic acids Res. 18:4937(1990)]; [Yang, J. Bacteriol. 173:7405-7406(1991)]; 및 [Yang et al., Biochemistry 30:6788-6795(1991)]). *fadR*에 의해 코딩되는 네가티브 조절자를 넉아웃하여 *fadB* 유전자 생성물을 활성화시킬 수 있다(Sato et al., J Biosci. Bioeng 103:38-44 (2007)). *fadI* 및 *fadJ* 유전자는 유사한 작용을 코딩하고 혐기성 조건하에 천연적으로 발현된다(Campbell et al., Mol. Microbiol 47:793-805(2003)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
fadA	49176430	YP_026272.1	에스케리치아 콜라이
fadB	16131692	NP_418288.1	에스케리치아 콜라이
fadI	16130275	NP_416844.1	에스케리치아 콜라이
fadJ	16130274	NP_416843.1	에스케리치아 콜라이
fadR	16129150	NP_415705.1	에스케리치아 콜라이

[0667]

[0668] 6.2.1.a 산-티올 리가아제(또한 CoA 합성효소로 지칭됨). 도 13의 단계 I 및 M은 6-ACA 및 6-아세트아미도헥사노에이트를 이의 상응하는 CoA 유도체로 형질전환시키기 위해 산-티올 리가아제 또는 CoA 합성효소 작용성을 필

요로 한다(용어 리가아제, 합성효소, 및 신타아제는 본원에 상호교환적으로 사용되고 동일한 효소 부류를 지칭한다). 이러한 정확한 형질전환을 촉매화하는 효소는 아직까지 특징규명되지 않았지만; 넓은 기질 특이성을 갖는 몇몇 효소가 문헌에 기재되어 있다. ADP-형성 아세틸-CoA 합성효소(ACD, EC 6.2.1.13)는 아실-CoA 에스테르의 이들의 상응하는 산으로의 전환을 ATP의 동시적인 합성과 결부시키는 효소이다. *AF1211*에 의해 코딩되는 아르카에오글로버스 펄지더스로부터의 ACD I은 이소부티레이트, 이소펜타노에이트, 및 푸마레이트를 비롯한 다양한 선형 및 분지형 기질 상에서 작동하는 것으로 제시되었다(Musfeldt and Schonheit, J. Bacteriol. 184:636-644(2002)). *AF1983*에 의해 코딩되는 아르카에오글로버스 펄지더스에서 제2의 가역성 ACD가 또한 환형 화합물 페닐아세테이트 및 인돌아세테이트에 대해 높은 활성을 가지면서 넓은 기질 범위를 갖는 것으로 제시되었다(Musfeldt and Schonheit, J. Bacteriol. 184:636-644(2002)). 할로아르큘라 마리스모르튀로부터의 효소(주석: 석시닐-CoA 합성효소)는 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지형 산(이소발러레이트 및 이소부티레이트)을 기질로서 수용하고, 순방향 및 역방향으로 작동하는 것으로 제안되었다(Brasen and Schonheit, Arch. Microbiol 182:277-287(2004)). 과호열성 크레나카에온 피로바큘럼 에어로필럼으로부터 *PAE3250*에 의해 코딩된 ACD는 모든 특징규명된 ACD의 가장 광범위한 기질을 나타내고, 아세틸-CoA, 이소부티릴-CoA(바람직한 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응한다(Brasen and Schonheit, Arch. Microbiol 182:277-287(2004)). 방향 진화 또는 조작은 이러한 효소를 숙주 유기체의 생리학적 온도에서 작동하도록 개질시키기 위해 사용될 수 있다. 아르카에오글로버스 펄지더스, 할로아르큘라 마리스모르튀 및 피로바큘럼 에어로필럼으로부터의 효소는 모두 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고, 작용적으로 발현되고, 특징규명되었다(문헌[Brasen and Schonheit, Arch. Microbiol 182:277-287(2004)]; 및 [Musfeldt and Schonheit, J. Bacteriol. 184:636-644(2002)]). 추가적인 후보는 에스케리치아 콜라이에서 *sucCD*에 의해 코딩되는 효소이고, 이는 석시네이트로부터 석시닐-CoA의 형성을 천연적으로 촉매화하는 동시에 하나의 ATP를 소비하고, 이 반응은 생체내에서 가역적이다(Buck et al., Biochemistry 24:6245-6252(1985)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
AF1211	11498810	NP_070039.1	아르카에오글로버스 펄지더스 DSM 4304
AF1983	11499565	NP_070807.1	아르카에오글로버스 펄지더스 DSM 4304
scs	55377722	YP_135572.1	할로아르큘라 마리스모르튀 ATCC 43049
PAE3250	18313937	NP_560604.1	피로바큘럼 에어로필럼 균주 IM2
sucC	16128703	NP_415256.1	에스케리치아 콜라이
sucD	1786949	AAC73823.1	에스케리치아 콜라이

[0669]

[0670] 이 단계를 위한 또 다른 후보 효소는 피멜로일-CoA 리가아제(EC 6.2.1.14)로서도 공지된 6-카복시헥사노에이트-CoA 리가아제이고, 이는 그램-포지티브(gram-positive) 박테리아에서 비오틴의 생합성 동안 천연적으로 피멜레이트를 피멜로일-CoA로 활성화시킨다. 에스케리치아 콜라이로 클로닝되는 슈도모나스 멘도시나(*Pseudomonas mendocina*)로부터의 효소는 다른 기질들, 헥산디오에이트 및 노난디오에이트를 수용하는 것으로 제시되었다(Binieda et al., Biochem. J 340(Pt 3):793-801(1999)). 다른 후보는 바실러스 서브틸리스(Bower et al., J. Bacteriol. 178:4122-4130(1996)) 및 리시니바실러스 스파에리커스(이전에 바실러스 스파에리커스였음)(Ploux et al., Biochem. J 287(Pt 3):685-690(1992))에서 발견된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pauA	15596214	NP_249708.1	슈도모나스 멘도시나
bioW	50812281	NP_390902.2	바실러스 서브틸리스
bioW	115012	P22822.1	리시니바실러스 스파에리커스

[0671]

[0672] 추가적인 CoA-리가아제로는 서열이 아직 특징규명되지 않은 래트 디카복실레이트-CoA 리가아제(Vamecq et al., Biochem. J 230:683-693(1985)), 페니실리엄 크리소제넘으로부터의 2가지 특징규명된 페닐아세테이트-CoA 리가아제(문헌[Lamas-Maceiras et al., Biochem. J 395:147-155(2006)]; 및 [Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 360:453-458(2007)]) 및 슈도모나스 푸티다로부터의 페닐아세테이트-CoA 리가아제 (Martinez-Bianco et al., J Biol. Chem. 265:7084-7090(1990))가 포함된다. 추가적인 후보 효소는 무스 무스큘러스(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 합성효소이고, 이는 아세토아세테이트의 아세토아세틸-CoA로의 ATP-의존성을 천연적으로 촉매화한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
phl	77019264	CAJ15517.1	페니실리엄 크리소제넘
phlB	152002983	ABS19624.1	페니실리엄 크리소제넘
paaF	22711873	AAC24333.2	슈도모나스 푸티다
AACS	21313520	NP_084486.1	무스 무스큘러스
AACS	31982927	NP_076417.2	호모 사피엔스

[0673]

[0674] **실시예 XXII**

[0675] **6-아미노카프로에이트에 대한 에스케리치아 콜라이 내인성 입증**

[0676] 에스케리치아 콜라이를 다양한 농도의 6-아미노카프로에이트(6-ACA)에 노출시키는 동안 내인성, 대사 활성 및 성장에 대해 평가하였다. 호기성 배양물은 10% 이하의 6-ACA를 갖는 배지에서 성장 가능한 반면, 혐기성 배양물은 대략 6%의 6-ACA를 갖는 배지에서 성장할 수 있었다(도 15). 6-ACA를 생산하는 경로가 혐기성 조건을 필요로 할 수 있으므로, 모든 다른 추가의 시험은 혐기성 조건하에 수행되었다. 내인성을 검정하기 위해, 배양물을 미드-로그(0.3 OD) 및 초기 정지 상(0.6 OD)으로 혐기성으로 성장시켰고, 세포를 스핀 다운시키고, 다양한 농도의 6-ACA가 포함된 배지에서 재현탁시켰다. 배양액을 캐핑된 마이크로퓨즈(microfuge) 관에서 성장시키고, 하룻밤 성장시키고, 배양액의 OD를 검정하였다(도 16). 이들 조건하에, 배양액은 10% 이하의 6-ACA에서 성장할 수 있었다(최소한 1회 2배). 추가적인 내인성은 추가적인 글루코스로부터 신선한 M9-글루코스 배지에 배양물을 재현탁시킴으로써 또는 캐핑된 마이크로퓨즈 관에 존재하는 제한된 산소로부터 존재할 수 있다. 세포가 6-ACA의 존재하에 대사적으로 활성인지를 결정하기 위해, 샘플을 취하여 에탄올 생산에 대해 검정하였다(도 17). OD에 의해 근접하게 추적된 에탄올 생산(및 이에 따른 대사 활성)으로부터, 세포가 존재한다면, 이들이 대사적으로 활성일 것임이 제안된다. 이는 세포가 생성물의 축적에 의해 성장이 저해될지라도 이들은 여전히 생성물을 생산할 수 있음을 제안하므로, 이해에 도움을 준다.

[0677] 높은 농도(> 65g/ℓ)에서, 6-ACA의 오스모몰 농도(osmolarity)는 ~0.5 M이고, 이는 삼투압 스트레스를 초래할 수 있다. 6-ACA 성장 저해에 대한 근거로서 삼투압 스트레스를 결정하기 위해, 배양물을 삼투압보호제 글리신 베타인의 존재 및 부재하에 다양한 농도의 6-ACA에서 성장시켰다. 도 18에 도시된 바와 같이, 10 내지 12%의 6-ACA를 갖는 배지에서의 혐기성 성장은 글리신 베타인인 존재하는 경우 달성될 수 있지만, 글리신 베타인이 없는 경우 단지 4 내지 6%였다. 따라서, 6-ACA의 독성의 대부분은 삼투압 스트레스에 기인할 것이다. 그러나, 6-ACA가 아미노산 라이신과 유사하고, 세포 바깥에 비해 세포질내에서 더 큰 독성 효과를 가질 수 있음을 주지해야 한다.

[0678] **실시예 XXIII**

[0679] **석시닐-CoA 및 아세틸-CoA를 축합시켜 β-케토아디필-CoA를 형성하기 위한 효소 활성의 입증**

[0680] 수 개의 β-케토티올라아제 효소는 β-케토아디필-CoA를 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA로 분해하는 것으로 제시되었다. 예를 들면, 슈도모나스 균주 B13중의 *pcaF*(Kaschabek et al., J. Bacteriol, 184(1): 207-15(2002)), 슈도모나스 푸티다 U중의 *phaD*(Olivera et al., Proc Natl Acad Sci U SA, 95(11), 6419-24(1998)), 슈도모나스 플루오레센스 ST중의 *paaE*(Di Gennaro et al., Arch Microbiol, 188(2), 117-25(2007)), 및 에스케리치아 콜라이중의 *paaJ*(Nogales et al., Microbiology, 153(Pt 2), 357-65(2007))에 의해 코딩된 유전자 생성물은 방향족 화합물, 예컨대 페닐아세테이트 또는 스타이렌의 분해 동안 3-옥소아디필-CoA의 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로의 전환을 촉매화한다. β-케토티올라아제 효소가 축합 활성을 나타내는 것을 확인하기 위해, 수 개의 티올라아제(표 10; 각각의 서열 번호)를 카복시-말단 6xHis 태그를 갖는 클론을 생성하는 pZE13의 유도체내로 클로닝하였다(Lutz et al., Nucleic acids Res, 29(18), 3873-81(2001)).

표 10

효소	출처	균주	유전자	길이	5' 프라이머	3' 프라이머	ORF 서열
베타-케토티올라아제	랄스토니아 유트로파 H16		bktB	1185	ATGACGCGTG AAGTGGTAGT GGTAAG	GATACGCTCGA AGATGGCGG	atgacgcgtgaagtggtagtggtaagccgatccgtaccgcgattcgtaccgcgaccttgagc gcgcgctgaagtcgttgaccgcgtcgtcgcgcagctgaagaacgaagtgccgttgagc gctgccgcgcgcaagtcgcgcgacatgatccgcgaccgtgtgcgcgagcgcaacgt gatcagcaccgagcgcgtgaccgtgccgtacgtatccgcgcgcgtgccgcaccgagc ggtgacgatcaacgcccgcgctaccgtgaccacctttgcgctccagcgcgtcgc agcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcg agcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcg gcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcg atccctcatcgccaccatggcgtgaccgcgatgtccgcgagaatacga catctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcg cagcgatcgcgcgcactcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcg gcaagcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc gatgacgatgaccatcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc gcatgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc cgatgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc ccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc gctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc cttgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc ttaccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc tgatcgcgtgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc tgcgcgtgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc gctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc cc

효소	숙주	종 조합	유전자	길이	5' 프라이머	3' 프라이머	ORF 서열
2-메틸아세토아세틸-CoA 티올라아제 (곧자형?)	슈도모나스 푸티다 (KT2440)		fadAx	1194	ATGACCCTCG CCAATGACCC	GTACAGGCATTC AACAGCCATGG	atgaccctcgccaatgacccatcgttatcgtcagccgatcgccacgcccatgagcg gttcgacgacgtgaccctcaagcctgactgccgcaacctgggcatgccgcgccatc gtgctgccgtcgaacgacgcatcgtgccgcatgccgcgatcatgtcg gcctgctgcccgccgcacacaccctgcacccctgaacatgatgcgcctcgg gtatcaagccgacatcgccatcgtcgtcgccgccgcctcgatgtcg tagtcgacgacgccgtcgaaaagctcaagtcgcgcctgaagatgctcgacctg gtgctgctgtcgcaccaggacctgtcgttcgacgagaccaagcccgtcacc cgcgacgccctacagcaacacaccctgcaccccctgaacatgatgcgcctcgg gtgctgccgtcgaacgacgcatcgtgccgcatgccgcgatcatgtcg gcctgctgcccgccgcacacaccctgcacccctgaacatgatgcgcctcgg gtatcaagccgacatcgccatcgtcgtcgccgccgcctcgatgtcg tagtcgacgacgccgtcgaaaagctcaagtcgcgcctgaagatgctcgacctg gtgctgctgtcgcaccaggacctgtcgttcgacgagaccaagcccgtcacc cgcgacgccctacagcaacacaccctgcacc

[0683]

효소	출처	유전자	길이	5' 프라이머	3' 프라이머	ORF 서열
베타-케토티올라아제	카에노르햅디티스 엘레간스	kat-1	1167	ATGAACAAAC ATGCTTTCATC GTCG	TAATTTCTGGAT AACCATTCCACT TGAGC	atgaacaaacatgctttcatcgtcggagccgccgtaacctatggatcattcgttctic tctctttcggatactgctccagagctcgctcgtggtgccatcaaagccgagcatggagcg tggagcagtggagccgagttcaattcgagggtgttcttgtcatcgatctgtcaagcaa atgctggtcaagctcccgctctgtcaagcagctcttggagccggactcgatttcggttg ctgttaccacgtcaaaaagtgtgctctcgggctgaaagcaatcatctgtgcccca gcaaattcaaccgttcatcagattttgccattgccgagaatgagagcatgttcac aagtaccatttatgttcaaagagagagatccatagggtgattcaagtgatgatgc aatcgcaaagcacggactgaccgatgcttatgataaagttcacatgggaaccgcgag agaagacttcaaagaaatggaaattacgtaaagccaagcgaatatgctatcaa cagctccaaaaagtcagctaagcatgggaaatgcgaaatccgagccgagtgt gccagtgaagcgtcaaatcaagaggagtcacgatttgataaagatgaagagttca caaaagtcaatttcgacaagttcaccttgagaactgtttccagaaagacggaacta tcactgctcgtaatgcttcacattgaacgacgtgctgtcatgtgcctcaca ggaagcagtttccgagcaagcttaagcctgccccgatttgcgtatgcgcatgc cgccacgcacccactcgatttccgtagtcaccactttgatgtccaaaatttctgaa agagcgagagtgaagcaatcgatgtgctcaaggagtttaatgagtcctctgt gtccctgtttcatcaaaaactaggagtcgatccatcctgtgaaccccactggag gagctgttcaattgatgcacccatcgaaatgtccgagccgcctcatcactctgt gcacacatcaaaatgtggcaaatcgaatgtgccattgcaatgagagtgtggct caagtggaatgttatccgaaattaa

atgcgtgaagcttattgtgacgaaatcgtacgccaattgctccacgcgggaca ttatcagtgtcgggctgatgatctgctcctcctgcgaactctgctgtgcgaa accgcgctcgatgcgagtgtatcgatgtgatcctcgcgctgtgctaatcgcg gagagaataaccgtaacgtagccgtgatgctgacttactgcgggctgccgtag agttccgcacaccattaccgcttgttcctcgctgcacctgggttt gccgcacgcgcgattaagcgggcgatttgtatgagcgaattcgatccgtgcgcg tcaagctccgggcaccgttgtatgggcaagcagccagtgcattctcgtcagct gagtgtcgatacactattgctgcgattgcgaaccgctcatgctcagcaatttg gtactacgcgaacgcagagaagtgctgaactgtaaaatctcag agatgatcagatgttgcgctacgcgtgtcagcaacgtacgcaaagcgcaatcc tcaggcatctgctgagagattgttccgtgtgttgaaaacaagaaagtgtgta acagaataacactgagcatgcgccgaaacgagctgaaacagtacgag agtaaagcaccattcgtgccaagcgagcatgctccgggg aatgaccgaccgcgcgtatcgtgccaatgccgcgcaccgcgcct ctgaccgccgcgtcgtccgtctccaactcgccgggtgaaccgcgct gatgaggctgagtccgtgcctcgcaactcgccgggtgaaccgcgct tatcacgatatgacgtatgacgtcgtatgaccccacatgaacccaccgtgtgg tactacgcgatgagcatccgtgcgtgccgatgccccacatgaaccccaccgtgg atcgcttagccatccgtgcgaatgagtgcccgcctgactgcctgcagcc

[0684]

효소	출처	균주형	유전자	길이	5' 프라이머	3' 프라이머	ORF 서열
베타-케토티올라아제 AAN68887.1	슈도모나스 푸티다 (KT2440)		phaD	1221	ATGAATGAACCGACCCACGC C	GAGGCGCTCGATGATCATGG	atgaatgaaccgacccacgccgatgcctgatcatcgacgccgtgcgcacgcccatgggcgctatgccggcagcctgaagcagttctcggccatcgacctgggcgccatcgtgatcaaggaagtgatcgcccgcgccaacgtcgacagcaaggaagtcggcgacgtgatcttcggcaacgtgctgcaggccggcgccggccagaacccggcccgccaggtcgccatcaacgccggcgtgccgtacgaaaccccggcctacaccatcaacaagctgtgcggctccggcctgaaggccgtgatgctggccgcccagagcatccagctgggcgacgccgacgtgctggtggccggcggcatggagaacatgagccaggcccccaagctgcagcgcttcaactacgacaccgaggtgtacgacgccttcttctgggacgccatgctgaaggtgaccaagggctacgagatgaccatgcagaacctggccgagcagtacgacatcagccgcgaggagcaggacgagttcgccgtgcagagccagcagaaggccgaggccgccgccgccggcaagttcgacgacgagatcgtgcccgtgaccatcaagggcttcaagggcgacaccgtggtggaccgcgacgagcacatgcgcccccagaccaccctggagaagctgcgcaccctgcgcccctgcttcaagaaggacggcaccgtgaccgccggcaacgcctcccagatcagcgacggcgccgccgccgtgctgatgatggagcgcagcgaggccgagaagcgcggcctgaagcccctggccaagatcgtgtcctacggcagcgccggcgtggacccccgcgtgatgggctacggccccgtgcccgccaccaagctgaccctgaagctgggcctgaccgtggacgacatcgacctgatcgagtccaacgaggccttcgccgcccagagcgtggccgtgatccgcgagctggacctgcccatggacaaggtgaacgtgaacggcggcgccatcgccctgggccacccccttggctgcagcggcgcccgcatcctggtgaccctgctgcacgagatgcagcgccgcgacgccaagaagggcctggccaccctgtgcatcggcggcggcatgggcgtggccctgctgctggagaagtgaatgaaccgacccacgccgatgcctgatcatcgacgccgtgcgcacgcccatgggcgctatgccggcagcctgaagcagttctcggccatcgacctgggcgccatcgtgatcaaggaagtgatcgcccgcgccaacgtcgacagcaaggaagtcggcgacgtgatcttcggcaacgtgctgcaggccggcgccggccagaacccggcccgccaggtcgccatcaacgccggcgtgccgtacgaaaccccggcctacaccatcaacaagctgtgcggctccggcctgaaggccgtgatgctggccgcccagagcatccagctgggcgacgccgacgtgctggtggccggcggcatggagaacatgagccaggcccccaagctgcagcgcttcaactacgacaccgaggtgtacgacgccttcttctgggacgccatgctgaaggtgaccaagggctacgagatgaccatgcagaacctggccgagcagtacgacatcagccgcgaggagcaggacgagttcgccgtgcagagccagcagaaggccgaggccgccgccgccggcaagttcgacgacgagatcgtgcccgtgaccatcaagggcttcaagggcgacaccgtggtggaccgcgacgagcacatgcgcccccagaccaccctggagaagctgcgcaccctgcgcccctgcttcaagaaggacggcaccgtgaccgccggcaacgcctcccagatcagcgacggcgccgccgccgtgctgatgatggagcgcagcgaggccgagaagcgcggcctgaagcccctggccaagatcgtgtcctacggcagcgccggcgtggacccccgcgtgatgggctacggccccgtgcccgccaccaagctgaccctgaagctgggcctgaccgtggacgacatcgacctgatcgagtccaacgaggccttcgccgcccagagcgtggccgtgatccgcgagctggacctgcccatggacaaggtgaacgtgaacggcggcgccatcgccctgggccacccccttggctgcagcggcgcccgcatcctggtgaccctgctgcacgagatgcagcgccgcgacgccaagaagggcctggccaccctgtgcatcggcggcggcatgggcgtggccctgctgctggagaagtga

효소	숙주	유전자	길이	5' 프라이머	3' 프라이머	ORF 서열
베타-케토티올라아제 NP_349476.1	클로스트리디엄 아세토뷰틸리컴 ATCC 824	thlA	1179	ATGAAAGAAG TTGTAATAGCT AGTGCAGTAA GAAC	GCAGTTTTCTAG CAATATTGCTGT TCC	atgaagaatgtaatagctatgcagtagaacgcgattgaacttatggaaagct ctaaggatgtaccgcagtagattatggagctacagctataaggaagcagttaaaa agcaggaataaaccagcgagtgttaatgagctcatttgggaaatgtctcaagcgag tttgagcagaatccagctagacagggcatctttaaagcaggattaccagttgaaatcc agcttgactattaataggttgtggtcctagaacagttgcttagcagcaca atataaaagccaggagatgctgcagtaataagcaggtgatggaaaaatagctaga gctcctacttagcgaataccgctagatgggatatagaaggaaacgctaaattgct gatgaaatgatcactgacggattgtgggatgcattaatgattaccacatgggaataca gcagaaacatagctgcgagatgtgaacttcaggagaagacaagatgagttgctct tgcatcacaaaaaaagctgaagactataaaatcaggtcaattaagatgaaatagt tcctgtagtaattaaggcagaaaggcgaaactgtagttgatacagatgagcaccca gattggatcactataggagctgcaaaattaaaaccttgcctccaaaaagatggaa cagttacagctggtaatgcatcaggattaaatgactgtgcagcagtactgtaatcatgag tgcagaaaagctaaaggcttgagtataaaccactgctagatagttcttatggtca gctggagtgacccagcataaatggaatatggaccttctatgcacaaagcagctatt gaaaagcaggttgacagttgatgaattaatagaattaaatgaagctttgcag ctcaaagtttagcagtgccaaagatttaaattgtatgataaagtaaatgtaaatggt agggctatttgccttggtcatccaattggagcatcaggtgcagaatactcgttactct gtacacgcaatgcaaaaaagagatgcaaaaaaggcttagcaacttatgtatagtgg oggacaaggaacagcaatatgctagaaaggtgctag	GTCTCTTTCAAC TACGAGAGCTGT TCCC
베타-케토티올라아제 NP_149242.1	클로스트리디엄 아세토뷰틸리컴 ATCC 824	thlB	1179	ATGAGAGATG TAGTAATAGT AAGTGCTGTA AGAACTG	GTCTCTTTCAAC TACGAGAGCTGT TCCC	atgagagatgtagtaatagtgctatgagtcgattgaacttatggaaaac attaaggatgtaccgcagtagttagagctatagctataaggaagcagttaaaa gagctatattaaaaccaaagagatgatttttggaatgtctcaagcgag ttagcccaaacccgcagacagcagcagataaagcagattacctttgaaacac cgcgttacaatcatagaggttgggttcaggtttagcttatagcttagcagtcaaa tataaaagcgaggatgctgatcaccatgtagtggtgaaaatatgtctagatc accatattgattacatcgagatggcgtcaaggatggagatagtgatga tgaaatgataagagatggttgtggatgcatttaatgcatatgatcatgagatc gaaaatttgcagacaatggatatacagagagcagaatgaatttcactatg tcacacaaaagctgaaaagccattaaaatggagatttaggatgaaatgtcct gtattataagactaaaaaggtgaatagtcttgatcagatgaattcctagatcgg aaactcttgaagcattagaaactaaccatttttcagaaaatggtactgttaca gcaggtatgcatccggattaaatgtgagctgcagcactagtaataatgagcgcta taagctaacgctctcggatataaccacttgctagattacttctacggatcatagg gtagatccatcataatggagtatggcgtttttatgcactaaagcgccttagataaaat taatttaaacctgaagcttagatttaatgaagctaacgaggcatatgcttctcaaagta tagcgtaactcgagattaaattgatatgagtaaagtaatgtggagctata gcactggagcatccatcaggtgcatctggtgcacgtatttgtatcactactatacgctat gcaaaaaagagatcaaaaaaaggcttgctacctatgtatgtggtgaggtcagggaa

[0685]

효소	종 주형	유전자	길이	5' 프라이머	3' 프라이머	ORF 서열
						cagctctcgtagtgaaagagacta
3-옥소아디필-CoA 티올라아제	캔디다 알비칸스 SC5314	POT9 8	1182	ATGTTCAAGA AATCAGCTAA TGATATTGTTG	CTCGTTAGCAAA CAAGGCAGCG	atgttcagaaatcgctaatgaatgttgttatgcagcaaagagaactccatcacca agtcaattaaggtttggttcgtgaatattccgaggaaaatattatcaagtggttaag gaactgatcagatcacaagttgatttaacttgattgatgatgtgttagtcggtacggatc ttgcaaacttaggggagagaaagctagtgccttggccattaaaagattggattcca attaagccacggttaatacggtcaatgctagttcgtcgtccaagcgattacta tcaagcaggtagtttgcgtagtgggagaatcaatttgctattgctgtggagtagaaag tatgactcatgatatttctcatgtggattcccacagaattcgaatcatttagctg atgcatccgatgaagctaaaacgtctgtatgccaatgggataccagtgaaaatgtt gcacaataatggaatttctgtaaacacaagatgagtttgccttaattctcatttgaa agcagacaagctcaaactgggtcatttgcaaagaaatcattcttatcaaacaac ggatgaaaacaccaacagttcaataaccaaagatgtgatataaggggaagtcaa catttgaaagttgggtggctaaaacctgtgttcaaggatgatgggactacttcgctg gtaattcctgcaaatttcagtggagagtcgtcgtgatttaacttctgtcaaatgct gagaaatctgggagtaaagccaatgctagatttatgtgttcgtcagtagctgttctt caggacttatgggaatgtgccacggctgctaatcccatgtgtgagattaatgtt gacacgaagagcattgatattttgaattgaacggagcattgcatcccaactgatttatg tatgaaaatgggcttgattaagaatgcatccatatgtggtagctataggcttgc gacatccatagagccactggcgcaagattacgccaacttgcttaatggattaaaa gatcagaataaagcttgagtgtcatctcaatgtgcacatccacaggtaaggatagc tgccttgttgctaacgatag	
3-옥소아디필-CoA 티올라아제	캔디다 알비칸스 SC5314	POT1	1227	ATGGATAGAT TAAATCAATT AAGTGGTCAA TTAAAACC	TTCCTTAATCAA TATGGAGGCAG CAC	atggatgattaatcaatatagtggcaattaaaaccactcaaacaatcctcatcica aaagtaccgacgattgtcatcgttgcagcatacgaactgccatcggtaaaggtt caaaggcttttcaaatctgtgcaatctgaatcacttgactgaattcttgaaagaatttatt aaaagactgagtcgatgcattttgatgaagttgctcattggaatgttgcaaccgttttt agctgttgtgccaccgaacacgaggctagtttggctgcaggtattccttcacctgc agcttcctttgccatcacagattgtttcctcaggattatggccattttcgacattgcca acaaaatcaaaaccggtgaaatcgaattggcttgctggtgtattgaatccatgtctaa aaactatgtagtccaaagattttccaagattgaccccacttgcgtgtatgcgaaca aatgagaaagttgattccaatggatcaccacgaaaatgtgctaatgaattcaac attccaagagaaaacagatgcttctgctaaatcttatagtaaagccgaaaaagcc atctcctgagcttcaaagatgaaatctttcgatacgacgaagttccaagaaaggtgtgac acggttctttgagcaaatgaaaccgcattttgtgtactaccactgccggtaacgctt ctcaaattccgatgtgctcctggtttattgatgaagaagatttggctgaagccaa aggttacccaattgttgctaatacattgcttgttcactgtggtgttccgcagaaatcat	

[0686]

[0687]

효소	출처	균주형	유전자	길이	5' 프라이머	3' 프라이머	ORF 서열
3-옥소아디필-CoA 티올라아제	캔디다 알비칸스 SC5314		POT2	1233	ATGTCATCCA AACAACAATA CTTGAAGAAG	TTCTCTAACCAA AACAGAAGCAG CACC	atgtcatccaaacaacaatactgaagaagaatcctgacgatgctgttgctgcagcat actgaactgcttaaccaaaggtggaagcggtggaatccaaagatggtggaatctgatttcc tttgaaaaattgactgaagaattgttaaaaaactggtgtgaccctaaaatcatcaaa gatgctgccattggtaaatgtctgaacagaagagctggtgattccgaacatagaggtgca ttattatctgctgaattacctattcagttccattgtgccctaacgacaatgttcatctgg gttatgccattttccagtggccacagatcagactggtgaaattgcaatgtggttta gctggtggtgttgaagatatgacaaaaaactatggtccagaagcattgctatgcac cctgctatgaaaagaccgagttgttaaaacggtattccaatggtattactaatg aaaatgttgtgccaaattcaatattcaagcgatgttcagatcaattgctgctgaatct atcaaaaagctgaaaagcacaaaaagaagctaattgatgatgaaattaccaattg aagtttccaagaagatgaagctgtagatgaagacgaagatgaagatgaagatgc tgaaccaaaagaaaaattggttgttattgtaaagatgaaggtattagaccaggttact aaagaaaaattggctaaattaaaccagcttcaaatctgaatggtatctcagctgta actcttcacaagttccgatggtgctgccttggttattgatgaaacgttcattttgctgaaa agaatggattcaaaccattggctaaatacattctttgtggtttgtgggtgtcccaccaga aattatgggattggtccagctgtgccattccaaaagtttgaaacaaactggattatcag tcagtgaattgattattgaaatcaatgaagcatttgccggtcaatgttgtactcaattga aagtgctaatattccaagagaaaaagtcaatcttaatgaggctgctattgccttggctac cctctggttgtactggtgctagacatacgctactatttaagattgttaaaaccaggtga attggtgtgactctatgtgatggctctgctctgttttgttagtagaa taa	

[0688]

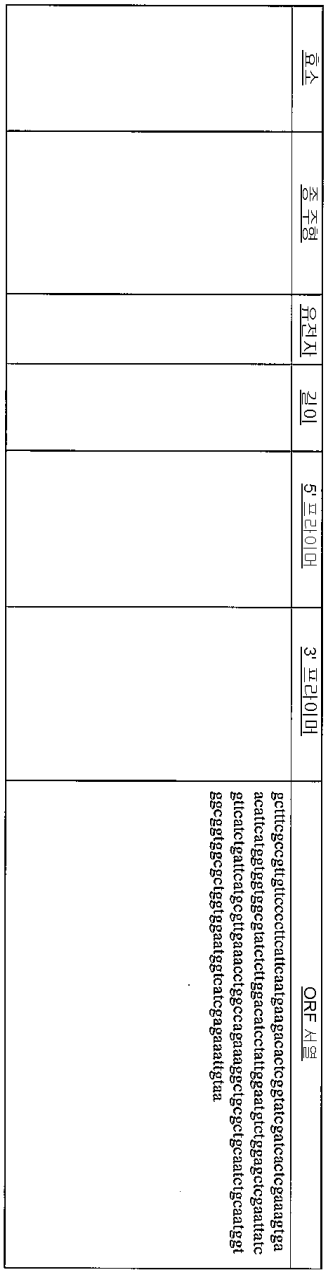
효소	종 주형	유전자	길이	5' 프라이머	3' 프라이머	ORF 서열
베타-케토아디필 CoA 티올라이제 pcaF	슈도모나스 아에루기노사 PAO1	pcaF	1206	ATGAGCCGGCG AGGTATTCAT CTG	GACCCGCTCGAT GGCCAG	atgagccgagatatcatcgatgccgccagcgatcgcgttcgag gagttccgcgccgaggtcaaccagcacctgatcgaggacgtcgtc tcgagcgcaaccgggacgtcgtcgaggtcgtcgacgaggcc ccaaccgagccgaagacaccgtaacgtcgccatgcgcctgacc gttgccgagatcgccgtcaccctcaccgccctgaacgtcgag gacgtcgccgccgtcgtcgccgtcgtcgagtacgccgtcaag gccgaggtcgtcgtcgccgtcgagaccgacgtcgtcgagacc cgcctcgagtcgccgccagaggtcgaggccaccctcgagtcg cgcctgatgaggagcagtacgccgtcgtcgccgagcgcatg cgcgtcgagcgcgacctcgtcgccgtcgtcgccgagcgcgtc ccgatgaccgtcgccgagctcgtcgccgagcgcgtcgccgag tggccgctcgacgtcgtcgccgtcgtcgccgagcgcgtcgcc gacctcgacgagctcgtcgccgagcgcgtcgccgagcgcgtc gccgacgccgtcgccgccgtcgtcgccgagcgcgtcgccgag

[0689]

효소	출처	ORF 서열	3' 프라이머	5' 프라이머	길이	유전자	숙주형
3-옥소아디필-CoA 티올라아제	슈도모나스 푸티다 (KT2440)	atgcacgacgatttcatcatcgtgaccgatcccgtaccccgatcgagccgcatcgagcgc cctggcagtgctgcgagccgaccgtgccgccgtgccctgaagccgtatcg agcacaccctcgcgtgcgtgaccagcgaaggcgtgatcctcgaagccgtgatcg accgccgtgaagaacgccatcgtgccgatcaccctgctgcgccatgccgccatt ctcgccgagcgcgtgcaccgcgtgatcccgcacgccgtgtcgctgcgcgtgcca agcaccctcgcgtgcgtgaccagcgaaggcgtgatcctcgaagccgtgatcg tatcgccacgatgaccgtgaacaccatcgccgatttcatcaccgcct gatgaaccgcgagcgcgtgatcaccatgctgcgcgtgccgttcagcgtg ctcaacaaggagaacgccgtgatcgccgaaatcgccgaaaccctgctgaaggag cacgagcgcgtgctgaacgtgctgctgcgcgaaaacctgctgaccgaaacca gcgaaatcaccgccgaaatcgtgaaccgcggctttaccctgcccgaaaact gcgaaatcaccgccgaaatcgtgcgcgaaaccgtgctgcgcgaaaccg gtga

[0690]

효소	ORF 서열	3' 프라이머	5' 프라이머	길이	유전자	효소	효소
3-옥소아디필-CoA 티올라이제	atgaccgagcgcatcaacatggtgattgacggcatcaccaccgagttcgagtccgagatgcagtccgtgctcaccgagggc gtccatgaaagagttcgtgtccgacctcgccgtcgagtccggcgagcgcaagcacgaggtgatcgccggcctcaccttc gtcaacgacaacgtgaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgag aacctgaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtc ctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatc cccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggc gagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgac gacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaag gtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgcc gacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggc ctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgac gtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgag aaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggc gagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtc ctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaag aacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgcc gccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgcc gtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctc gtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtcc ctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagccc ccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatc gagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtc aagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttc gccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctc ggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgag tccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaag cacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttc ctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgac ccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtc ctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctc gtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctc atcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgcc gccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaac ctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggc gagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaag aaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtac atcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgag aagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaac gcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctc gccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaac gagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggc gagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtc gacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccag gagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctc gagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggc gagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggc agcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccacc gacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgac accatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtc ctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtc gtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtc atcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaac gccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtgg atgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatc gtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggc gtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtc ggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgcc gtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtc gtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtc aacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctc gacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtcc ctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagc ttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgcc gtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatc gtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgac gccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaag tccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaac gacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctc accgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggc aagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggc ttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtcc aagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtc gtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgac gagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaag atcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcacc ttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctc gagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtc gtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagacc atccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaag ggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctc gacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaag aaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctc gccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgcc ggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatc gacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgc gagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaag ggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctc gtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgag aagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttc gccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgcc gccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgag ctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaag tccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccag cccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaac atcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggc gtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgag ttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaag ctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtc gagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgc aagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggac ttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgac gacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtcc gtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctac ctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgag ctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtac gccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaag aacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgcc ggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcag aagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaag tacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatc gagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgac aacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctc ctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatc aacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaag ggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgcc gtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccc caggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatc ctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaag ggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcacc ggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcacc accgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaac gacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctc gtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggc gtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttc gtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgag aacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgag tggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgac atcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgag ggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtc gtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgac gccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtc gtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaac gtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtc ctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcag tccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggc agcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttc gccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgac atcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggc gacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgag aagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctc aacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaac ctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctc ggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatcccc ggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgag tccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgac gtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtc gacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgac aagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctc accttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtc ctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaag gtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgag accatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctc aagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaac ctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgcc aagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtc ctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtc gccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctc atcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagccccc ccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcg agaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtca agctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttc gccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagct cggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcg agtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgc aagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggac ttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgac gacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtcc gtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctac ctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgag ctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtac gccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaag aacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgcc ggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcag aagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaag tacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatc gagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgac aacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctc ctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatc aacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaag ggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgcc gtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccc caggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatc ctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaag ggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcacc ggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcacc accgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaac gacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctc gtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggc gtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttc gtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgag aacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgag tggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgac atcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgag ggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtc gtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgac gccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtc gtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaac gtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtc ctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcag tccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggc agcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttc gccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgac atcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggc gacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgag aagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctc aacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaac ctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctc ggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatcccc ggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgag tccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgac gtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtc gacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgac aagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctc accttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtc ctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaag gtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgag accatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctc aagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaac ctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgcc aagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtc ctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtc gccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctc atcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagccccc ccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcg agaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtca agctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttc gccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagct cggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcg agtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgc aagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggac ttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgac gacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtcc gtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctac ctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgag ctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtac gccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaag aacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgcc ggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccccaggagcag aagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatcctcgagaag tacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaagggcgagatc gagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcaccggcagcgac aacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcaccaccgacctc ctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaacgacaccatc aacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctcgtcctcaag ggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgcc gtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttcgtcatcccc caggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgagaacgccatc ctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgagtggatgaag ggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgacatcgtcacc ggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgagggcgtcacc accgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtcgtcggcaac gacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgacgccgtcctc gtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtcgtcgtcggc gtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaacgtcaacttc gtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtcctcgacgag aacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcagtccctcgag tggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggcagcttcgac atcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttcgccgtcgag ggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgacatcgtcgtc gtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggcgacgccgac gccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgagaagtccgtc gtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctcaacgacaac gtcaacttcgtcatcccccaggagcagaagaaggacttcctcaagtccctcatcgacgtcctcgagaacctcaccgtc ctcgacgagaacgccatcctcgagaagtacatcgacgacccccagcccccccgcgagaaggtcgtcctcggcaagcag tccctcgagtggatgaagggcgagatcgagaagtccgtcctcaacatcgagaagggcgagaccatccccggcttcggc agcttcgacatcgtcaccggcagcgacaacgcctacctcgtcggcgtcaagctcgtcctcaagggcgagtccaagttc gccgtcgagggcgtcaccaccgacctcctcgccgagctcatcgagttcgccgagaagaacctcgacgacgtcgtcgac atcgtcgtcgtcggcaacgacaccatcaacgagtacgccgccaagctcggcttcgccgccaagaaggtcgacgagggc gacgccgacgccgtcctcgtcctcaagggcgagaagaacctcgtcgagtccgccgccgtcctcgccgacaagatcgag aagtccgtcgtcgtcggcgtcgtcgccgtcgacgccggcgagcgcaagcacgagctcgtcgccggcctcaccttcctc aacgacaac



[0691]

[0692] 유전자를 에스케리치아 콜라이에서 발현시키고, 단백질을 Ni-NTA 스핀 칼럼을 사용하여 정제하고 정량화하였다. 시험관내 효소 활성을 검정하기 위해, 5X CoA:DTNB(엘만(Ellman)의 시약, 또는 5,5'-디티오비스-(2-니트로벤조산)) 혼합물을 제조하였다. 혼합물은 100 mM 트리스 완충액(pH 7.4)중 10 mM 석시닐-CoA, 5 mM 아세틸-CoA, 30 mM DTNB로 구성되었다. 5 ㎕의 CoA:DTNB 혼합물을 100 mM 트리스 완충액(pH 7.8)중 0.5 μM의 정제된 티올라아제 효소에 50 ㎕의 최종 부피로 첨가하였다. 반응물을 30℃에서 30분 동안 항온처리한 다음, 2.5 ㎕의 10% 폼산으로 급랭시키고, 샘플을 LC/MS에 의한 분석을 준비할 때까지 -20℃에서 동결시켰다. 많은 티올라아제가 2개의 아세틸-CoA 분자를 아세토아세틸-CoA로 축합시킬 수 있기 때문에, 아세토아세틸-CoA의 생산을 검사하였다. 도 19는 3개의 티올라아제가 티올라아제 활성을 나타내어 아세토아세틸-CoA를 형성함을 보여준다. 이들은 슈도모나스 푸티다로부터의 *fadAx*, 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *thiA* 및 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *thiB*였다. 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA의 β-케토아디필-CoA로의 축합에 대해 효소를 검정하였고, 수 개의 후보는 원하는 활성을 나타내었다; 에스케리치아 콜라이로부터의 *paaJ*(Nogales et al., Microbiol. 153:357-365(2007)), 슈도모나스 푸티다로부터의 *phaD*(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:6419-6424(1998)), 부르크홀데리아 암비파리아 AMMD로부터의 *bkt*, 슈도모나스 푸티다 KT2440로부터의 *pcaF*(Harwood et al., J. Bacteriol. 176:6479-6488(1994)), 및 슈도모나스 아에루기노사 PAO1로부터의 *pcaF*. 티올라아제 사이에 탁월한 특이성이 있다. 상당량의 β-케토아디필-CoA를 생산하는 후보는 상당량의 아세토아세틸-CoA를 생산하지 않았고, 유사하게 아세토아세틸-CoA를 제조하는 후보는 검출가능한 양의 β-케토아디필-CoA를 제조하

지 않았다.

[0693] **실시예 XXIV**

[0694] **글루타메이트, 글루타릴-CoA 또는 피루베이트 및 4-아미노부타날로부터의 헥사메틸렌디아민의 생산을 위한 경로**

[0695] 본 실시예는 글루타메이트, 글루타릴-CoA, 피루베이트 및 4-아미노부타날, 또는 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터 호모라이신, 즉 라이신의 7개 탄소 유사체를 통한 헥사메틸렌디아민(HMDA)의 생산을 위한 예시적인 경로를 설명한다. 호모라이신은 HMDA로의 바람직한 전구체이다. 호모라이신이 잠재적으로 귀중한 전구체이지만, 이는 어떠한 유기체의 공지된 대사 중간체도 아니다. 호모라이신은 중심 대사 전구체 글루타메이트, 글루타릴-CoA 또는 피루베이트 및 4-아미노부타날로부터 생물촉매적으로 형성될 수 있다. 라이신 데카복실라아제와 유사한 효소에 의해 호모라이신을 후속적으로 탈카복실화하면 HMDA를 수득할 수 있다.

[0696] 본 실시예는 2-아미노-7-옥소수바레이트, 또는 피루베이트 및 4-아미노부타날로부터 중간체 6-아미노헥사날을 통해 진행되는 추가적인 경로를 설명한다. 6-아미노헥사날은 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 HMDA로 쉽게 전환될 수 있다.

[0697] HMDA의 최대 이론적 수율은 이용된 글루코스 몰 당 0.71 몰(0.46 g/g)이다. 도 20 내지 22 및 26에 개시된 경로는 0.67 몰/몰(0.43 g/g)의 최대 HMDA 수율을 달성한다.

[0698] $C_6H_{12}O_6 + 1.41\ NH_4 \rightarrow 0.71\ C_6H_{18}N_2 + 1.76\ CO_2 + 2.47\ H_2O$

[0699] 헥사메틸렌디아민(HMDA) 및 관련 생성물을 생산하기 위한 신규 경로는 본원에 기재된다. 후보 효소, 및 실행과 연관된 위험성은 하기 실시예 XXVI에 논의된다.

[0700] 본 발명은, 부분적으로는, HMDA 생산을 촉매화하는 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는 비-천연 미생물에 관한 것이다. 성공적으로 이들 경로를 조작함은 충분한 활성 및 특이성을 갖는 효소의 적절한 세트를 식별하는 단계, 이들의 상응하는 유전자를 생산 숙주로 클로닝하는 단계, 생산 숙주에서 이들 유전자의 발현을 최적화하는 단계, 발효 조건을 최적화하는 단계, 및 발효 후 생성물 형성을 검정하는 단계를 수반한다.

[0701] HMDA는 도 20에 도시된 8개 효소 단계에서 글루타메이트로부터 글루타릴-CoA를 통해 생산될 수 있다. 이러한 경로에서, 글루타메이트는 CoA 전이효소 또는 리가아제에 의해 글루타밀-CoA로 아실화된다(도 20의 단계 A). 글루타밀-CoA 및 아세틸-CoA는 베타-케토티올라아제에 의해 연결되어 C_7 화합물 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA를 형성한다(도 20의 단계 B). 이어서 이러한 생성물의 3-옥소 기는 환원되고 탈수되어, 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA를 생성한다(도 20의 단계 C 및 D). 에노일-CoA 환원효소는 이중 결합을 환원시켜 6-아미노피멜로일-CoA를 형성한다(도 20의 단계 E). 이어서 6-아미노피멜로일-CoA는 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소에 의해 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로 전환된다(단계 F). 알데히드의 아민으로의 트랜스아민화는 호모라이신을 생산한다(도 20의 단계 G). 최종적으로, HMDA는 호모라이신의 탈카복실화 생성물로서 형성된다(도 20의 단계 H). 이러한 경로를 위한 최대 이론적 HMDA 수율은 이용된 글루코스 1 몰 당 0.67 몰의 HMDA이다. 수율 계산은 호기성 조건 및 단계 A에서 CoA 전이효소의 이용을 가정한다.

[0702] HMDA는 수 개의 경로에 의해 글루타릴-CoA로부터 생산될 수 있다. HMDA 생산을 위한 예시적인 경로는 도 21에 도시된다. 글루타릴-CoA는 방향족 화합물을 대사화하는 유기체에서 공통의 대사 중간체이다. HMDA로의 개시된 경로에서, 글루타릴-CoA는 우선 베타-케토티올라아제에 의해 아세틸-CoA와 축합되어 3-옥소피멜로일-CoA를 형성한다(도 21의 단계 A). 3-옥소피멜로일-CoA의 CoA 잔기는 CoA 가수분해효소, 전이효소 및 리가아제에 의해 제거된다(도 21의 단계 B). 옥소피멜레이트를 HMDA로 전환시키기 위한 수 개의 다른 경로가 도 21에 개략화되고 본원에 기재된다. HMDA로의 모든 경로의 최종 단계는 호모라이신의 탈카복실화를 수반한다(도 21의 단계 S).

[0703] 한 경로는 3-옥소피멜레이트의 3-옥소-1-카복시헵타날로의 전환을 수반한다. 이러한 전환은 3-옥소피멜레이트 환원효소 활성을 갖는 ATP- 및 NAD(P)H 의존성 효소에 의해 촉매화될 수 있거나(도 21의 단계 C), 또는 다르게는 활성화된 중간체 5-옥소피멜로일-CoA(도 21의 단계 H, I) 또는 5-옥소피멜로일-포스포네이트(도 21의 단계 F, G)를 통해 진행될 수 있다. 일단 형성되면, 3-옥소-1-카복시헵타날은 3-위치(도 21의 단계 AB) 또는 7-위치(도 21의 단계 D)에서 트랜스아민화된다. 3-옥소-7-아미노헵타노에이트(도 21의 단계 E) 또는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트(도 21의 단계 Z)의 후속적인 트랜스아민화는 3,7-디아미노헵타노에이트를 수득한다. 이어서 3,7-디아미노헵타노에이트 2,3-아미노뮤타아제 활성을 갖는 효소는 호모라이신을 형성하고(도 21의 단계 R), 이는 HMDA로 탈카복실화된다(도 21의 단계 S).

[0704] 다른 경로에서, 3-옥소피멜레이트는 3-아미노피멜레이트로 트랜스아민화된다(도 21의 단계 J). 이어서 3-아미노피멜레이트는 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로 직접(도 21의 단계 O) 또는 CoA를 경유하거나(도 21의 단계 K, L) 포스폰산 중간체를 경유하여(도 21의 단계 M, N) 전환된다. 3-아미노-7-옥소헵타노에이트는 후속적으로 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로 2,3-아미노뮤타아제에 의해 전환된다(도 21의 단계 P). 2-아미노-7-옥소헵타노에이트는 호모라이신으로 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 전환된다. 다르게는, 3-아미노-7-옥소헵타노에이트는 우선 트랜스아민화되고(도 21의 단계 Z), 이후 호모라이신으로 아미노뮤타아제에 의해 전환된다(도 21의 단계 R).

[0705] 3-아미노피멜레이트는 2-아미노피멜레이트로 2,3-아미노뮤타아제 효소에 의해 전환될 수 있다(도 21의 단계 T). 이러한 중간체를 포함하는 HMDA 경로는 7-카복시산의 알데히드로의 환원을 필요로 한다. 이러한 환원은 이작용성 환원효소(도 21의 단계 W) 또는 CoA(도 21의 단계 V, Y) 또는 포스폰산(도 21의 단계 U, X) 중간체를 통해 진행되는 2가지 효소에 의해 촉매화된다. 생성물, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트는 상기 기재된 바와 같이 HMDA로 전환된다.

[0706] 피루베이트 및 4-아미노부타날로부터의 HMDA를 생산하기 위한 2가지 경로가 도 22에 도시된다. 경로는 혐기성 및 호기성 조건하에 이용되는 글루코스 1 몰 당 0.67 몰(0.43 g/g)의 HMDA의 최대 수율을 달성한다. 4-아미노부타날은 푸트레신 및 후속적인 트랜스아민화로의 탈카복실화에 의해 오르니틴으로부터 천연적으로 유도된다. 4-아미노부타날은 또한 4-아미노부타노에이트로부터 기원될 수 있다. 하나의 경로에서, 4-아미노부타날 및 피루베이트는 알돌 축합에 의해 연결되어 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트를 형성한다(도 22의 단계 A). 축합 생성물은 후속적으로 탈수되고(도 22의 단계 B) 환원된다(도 22의 단계 C). 2-옥소-7-아미노헵타노에이트의 트랜스아민화는 호모라이신을 수득한다(도 22의 단계 D). HMDA는 호모라이신 데카복실라아제의 탈카복실화 생성물이다(도 22의 단계 E). 다르게는, 경로 중간체 2-옥소-7-아미노헵타노에이트는 탈카복실화되어 6-아미노헥사날을 형성한다(도 22의 단계 F). 6-아미노헥사날은 후속적으로 HMDA로 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 전환된다(도 22의 단계 G).

[0707] HMDA를 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터 생산하기 위한 수 개의 경로는 도 26에 도시된다. 2-아미노-7-옥소수바레이트는 천연적으로 발생하는 대사물질인 것으로 공지되지 않는다. 2-아미노-7-옥소수바레이트를 합성하기 위한 예시적인 경로는 도 27에 도시된다. 이 경로는 오르니틴 생합성 동안 천연적으로 형성되는 대사물인 글루타메이트-5-세미알데히드에 기원한다. 이어서 2-아미노-7-옥소수바레이트는 3가지 효소 단계에서 합성된다. 제1 단계에서, 글루타메이트-5-세미알데히드는 알돌라아제에 의해 피루베이트와 축합된다(도 27, 단계 A). 생성물, 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트는 후속적으로 탈수되고, 생성된 알켄은 환원되어 2-아미노-7-옥소수바레이트를 형성한다(도 27, 단계 B/C). 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터 HMDA로의 하나의 제안된 경로에서, 2-옥소산은 우선 탈카복실화되어 2-아미노-7-옥소헵타노에이트를 형성한다(도 26의 단계 A). 이러한 생성물은 탈카복실화되어 6-아미노헥사날을 형성한다(도 26의 단계 B). 최종적으로, 6-아미노헥사날은 HMDA로 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 전환된다(도 26의 단계 C).

[0708] 다르게는, 중간체 2-아미노-7-옥소헵타노에이트는 우선 호모라이신으로 아미노전이효소 또는 아민화 산화환원효소에 의해 전환된다(도 26의 단계 M). 호모라이신은 이전에 기재된 바와 같이 HMDA로 탈카복실화된다(도 26의 단계 H).

[0709] 또 다른 경로에서, 2-아미노-7-옥소수바레이트의 2-아미노산 기는 탈카복실화되어 2-옥소-7-아미노헵타노에이트를 수득한다(도 26의 단계 I). 이러한 생성물은 추가로 6-아미노헥사날로 탈카복실화되고(도 26의 단계 G) 또는 호모라이신으로 트랜스아민화된다(도 26의 단계 J). 이어서 호모라이신 또는 6-아미노헥사날은 이전에 기재된 바와 같이 HMDA로 전환된다.

[0710] 또 다른 경로에서, 2-아미노-7-옥소수바레이트의 2-옥소 기는 아미노 기로 전환되어, 2,7-디아미노수바레이트를 형성한다(도 26의 단계 K). 2가지 후속적인 탈카복실화는 HMDA를 수득한다(도 26의 단계 L, H).

[0711] 도 22(단계 A-E)에 도시된 바와 같이, 피루베이트 및 4-아미노부타날로부터 HMDA를 생산하도록 조작된 미생물 유기체의 생성이 본원에 기재된다. 이러한 실시예는 또한 HMDA를 과생산하는 균주를 조작하기 위한 방법을 교시한다.

[0712] 에스케리치아 콜라이는 도 22에 도시된 HMDA-생산 경로를 조작하기 위한 표적 유기체로서 사용된다. 에스케리치아 콜라이는 HMDA를 생산할 수 있는 비-천연 미생물을 생성하기 위한 양호한 숙주를 제공한다. 에스케리치아 콜라이는 유전적 취급이 가능하고, 다양한 생성물, 예컨대 에탄올, 아세트산, 폼산, 락트산, 및 석신산을 혐기

성, 미세호기성 또는 호기성 조건하에 생산할 수 있는 것으로 공지되어 있다.

[0713] 에스케리치아 콜라이 균주를 조작하여 도 22에 개략화된 경로를 통해 4-아미노부타날로부터 HMDA를 생산한다. 경로 구축의 제1 단계를 위해, 4-아미노부타날 및 피루베이트를 호모라이신으로 형질전환(도 3, 단계 A-D)시키는 효소를 코딩하는 유전자를 벡터로 조립한다. 특별히, 각각 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 알돌라아제, 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트 데하이드라타아제, 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트 환원효소 및 2-옥소-7-아미노헵타노에이트 아미노전이효소를 코딩하는 유전자 *hpcH*(CAA87759), *hpcG*(CAA57202), *enr*(YP_430895) 및 *lysN*() 유전자를 pZE13 벡터(독일 루엘자임 소재의 엑스프레시스)내로 PA1/lacO 프로모터의 조절하에 클로닝한다. 플라스미드를 에스케리치아 콜라이 균주 MG1655내로 형질전환시켜 4-아미노부타날로부터의 HMDA 합성에 필요한 단백질 및 효소를 발현한다. 에스케리치아 콜라이는 호모라이신을 HMDA로 전환시키는 2가지 라이신 데카복실라아제 효소를 천연적으로 코딩한다.

[0714] 생성된 유전적으로 조작된 유기체를 당분야에 공지된 절차를 수행하여 글루코스 포함 배지에서 배양시킨다(예를 들면, [Sambrook et al., supra, 2001] 참조). HMDA 경로 유전자의 발현은, 예를 들면, 노던 블롯, mRNA의 PCR 증폭, 면역블로팅 등을 비롯하여 폴리펩티드 발현 또는 효소 활성을 결정하기 위한 당분야에 공지된 방법을 사용하여 뒷받침된다. 발현된 효소의 효소적 활성은 개별 활성에 대해 특이적인 검정을 사용하여 확인된다. 이러한 경로를 통해 HMDA를 생산하는 조작된 이 콜라이 균주의 능력을 HPLC, 기체 크로마토그래피-질량 분광법(GCMS) 및/또는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LCMS)에 의해 확인한다.

[0715] 4-아미노부타날로부터의 작용성 HMDA 합성 경로를 갖도록 조작된 미생물 균주를 경로의 효과적인 이용을 위한 최적화에 의해 추가로 증가시킨다. 간단히, 조작된 균주를 임의의 외인성 유전자가 속도 제한 수준으로 발현되는지의 여부에 대해 결정하기 위해 평가한다. 경로를 통해 플럭스를 제한할 수 있는 낮은 수준에서 발현된 임의의 효소를 위해, 예를 들면 추가의 유전자 복사물 수를 도입함으로써 발현을 증가시킨다.

[0716] 외인성 효소의 활성을 경유해 증진된 HMDA 생산의 성공적인 입증 후, 이들 효소를 코딩하는 유전자를 당분야에 공지된 방법을 사용하여 야생형 에스케리치아 콜라이 숙주의 염색체내로 삽입한다. 이러한 방법으로는, 예를 들면, 순차적인 단일 크로스오버(Gay et al., J. Bacteriol. 3:153(1983)). 및 진브릿지스(GeneBridges)로부터의 Red/ET 방법(Zhang et al., European Patent Application No. 01117(2001))이 포함된다. 염색체 삽입은 플라스미드 기재 시스템을 뛰어 넘는 수 개의 이점, 예컨대 보다 큰 안정성 및 경로 유전자의 발현을 공동편재화하는 능력을 제공한다.

[0717] 더 나은 생산자를 생성하기 위해, 대사 모델링을 이용하여 성장 조건을 최적화한다. 또한 모델링을 사용하여 추가적으로 경로의 이용을 최적화하는 유전자 넉아웃을 고안한다(예를 들면, 미국 특허 출원 공개공보 제2002/0012939호, 제2003/0224363호, 제2004/0029149호, 제2004/0072723호, 제2003/0059792호, 제2002/0168654호 및 제2004/0009466호, 및 미국 특허 제7,127,379호 참조). 모델링 분석은 HMDA의 더 효율적인 생산으로 대사를 전이시키는 세포 성장에 미치는 효과에 대한 실현가능한 예측을 허용한다. 하나의 모델링 방법은 2레벨 최적화 접근방법, OptKnock(Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657(2003))이고, 이는 HMDA의 더 나은 생산을 종합적으로 일으키는 유전자 넉아웃을 선택하기 위해 적용된다. 적응 진화를 또한 사용하여, 예를 들면, HMDA 생성물의 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA 중간체의 더 나은 생산자를 생성할 수 있다. 적응 진화를 수행하여 성장 및 생산 특징 둘다를 개선시킨다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Alper et al., Science 314:1565-1568(2006)). 결과에 기초하여, 모델링의 후속적인 라운드, 유전적 조작 및 적응 진화를 HMDA 생산자에게 적용하여 추가로 생산을 증가시킨다.

[0718] HMDA의 대규모 생산을 위해, 상기 HMDA 경로-포함 유기체를, 유기체의 성장을 혐기성 조건에서 지지하는 당분야에 공지된 배지를 사용하여 발효기에서 배양한다. 발효는 배치식, 공급-배치식 또는 연속적 방식으로 수행된다. 우선 배지를 질소로 스파징한 다음 배양 용기를 밀봉함으로써 혐기성 조건을 유지한다(예를 들면 플라스크를 격벽 및 크림프-캡으로 밀봉할 수 있다). 제한된 통기를 위해 작은 구멍을 제공함으로써 미세호기성 조건을 또한 이용할 수 있다. 배지의 pH를 산, 예컨대 H_2SO_4의 첨가에 의해 7로 유지시킨다. 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 성장 속도를 결정하고, 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링함으로써 글루코스 섭취를 결정한다. 부산물, 예컨대 바람직하지 않은 알코올, 유기산, 및 잔여 글루코스를, HPX-087 칼럼(바이오래드)을 갖고, 글루코스 및 알코올용 굴절 지수 검출기, 및 유기산용 UV 검출기를 사용하는 HPLC(시마추)에 의해 정량화할 수 있다(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 775-779(2005)).

[0719] **실시예 XXV**

[0720] **글루타메이트, 글루타릴-CoA, 호모라이신, 또는 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터의 6-아미노카프로에이트의 생산 경로**

[0721] 6-아미노카프로에이트(6-ACA) 및 관련된 생성물을 생산하기 위한 새로운 경로가 본원에 기재된다. 후보 효소, 및 실행과 연관된 위험성이 이후 실시예 XXVI에서 논의된다.

[0722] 본 발명은, 부분적으로는, 6-ACA 생산을 촉매화하는 효소를 코딩하는 유전자를 발현하는 비-천연 미생물에 관한 것이다. 성공적으로 이들 경로를 조작함은 충분한 활성 및 특이성을 갖는 효소의 적절한 세트를 식별하는 단계, 이들의 상응하는 유전자를 생산 숙주로 클로닝하는 단계, 생산 숙주에서 이들 유전자의 발현을 최적화하는 단계, 발효 조건을 최적화하는 단계, 및 발효 후 생성물 형성을 검정하는 단계를 수반한다.

[0723] 6-ACA는 출발 물질로서의 글루타메이트로부터 생산될 수 있다. 글루타메이트는 이전에 기재된 바와 같이 6-아미노피멜로일-CoA로 형질전환된다(도 20, 단계 A-E). CoA 가수분해효소, 전이효소 또는 리가아제에 의해 6-아미노피멜로일-CoA의 CoA 잔기를 제거하여 2-아미노피멜레이트를 수득한다(도 20의 단계 I). 이러한 생성물의 탈카복실화는 6-ACA를 수득한다(도 20의 단계 J).

[0724] 6-ACA는 또한 출발 물질로서의 글루타릴-CoA로부터 생산될 수 있다. 상기 기재된 HMDA 경로와 유사한, 개시된 6-ACA로의 경로에서, 글루타릴-CoA는 우선 베타-케토티올라아제에 의해 아세틸-CoA와 축합되어 3-옥소피멜로일-CoA를 형성한다(도 21의 단계 A). 3-옥소피멜로일-CoA의 CoA 잔기는 CoA 가수분해효소, 전이효소 및 리가아제에 의해 제거된다(도 21의 단계 B). 이어서 3-옥소피멜레이트는 3-아미노피멜레이트로 트랜스아민화된다(도 21의 단계 J). 3-아미노피멜레이트는 2-아미노피멜레이트로 2,3-아미노뮤타아제 효소에 의해 전환될 수 있다(도 21의 단계 T). 아미노피멜레이트는 탈카복실화되어 6-아미노카프로산을 형성한다(도 21의 단계 AA).

[0725] 호모라이신은 또한 6-아미노카프로에이트(6-ACA) 생산에 대한 바람직한 전구체이다. 호모라이신이 잠재적으로 귀중한 전구체이지만, 이는 어떠한 유기체의 대사 중간체로도 공지되어 있지 않다. 호기성 조건하에, 라이신 2-모노옥시게나아제에 의한 호모라이신의 산화는 6-아미노헥산아미드를 수득하고, 이는 묽은 산 또는 염기성 용액중에서 쉽게 6-ACA로 가수분해 된다(도 23).

[0726] 6-ACA는 또한 출발 물질로서의 2-아미노-7-옥소수바레이트로부터 생성될 수 있다(도 26). 2-아미노-7-옥소수바레이트는 천연적으로 발생하는 대사물질로 공지되어 있지 않다. 2-아미노-7-옥소수바레이트를 합성하는 예시적인 경로는 도 27에 제시되어 있다. 이 경로는 오르니틴 생합성 동안 천연적으로 형성되는 대사물질인 글루타메이트-5-세미알데히드에서 기원한다. 이어서 2-아미노-7-옥소수바레이트는 3개의 효소 단계로 합성된다. 제1 단계에서, 글루타메이트-5-세미알데히드는 알돌라아제에 의해 피루베이트와 축합한다(도 27, 단계 A). 생성물, 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트는 후속적으로 탈수되고, 생성된 알켄은 환원되어 2-아미노-7-옥소수바레이트를 형성한다(도 27, 단계 B/C). 제안된 한 경로에서, 2-아미노-7-옥소수바레이트는 탈카복실화되어 2-아미노-7-옥소헵타노에이트를 형성한다(도 26의 단계 A). 2-아미노-7-옥소헵타노에이트의 알데히드는 산화환원효소에 의해 산화되어 2-아미노피멜레이트를 형성한다(도 26의 단계 D). 6-ACA는 2-아미노피멜레이트의 탈카복실화 생성물이다(도 26의 단계 E). 다르게는, 2-아미노-7-옥소헵타노에이트 중간체는 탈카복실화되어 6-아미노헥사날을 형성하고(도 26의 단계 B), 이는 6-ACA로 트랜스아민화된다(도 26의 단계 F). 제3의 제안된 경로에서, 2-아미노-7-옥소수바레이트의 2-아미노산 기는 탈카복실화되어, 2-옥소-7-아미노헵타노에이트를 수득한다(도 26의 단계 I). 이어서 이러한 생성물은 추가로 6-아미노헥사날로 탈카복실화된다(도 26의 단계 G). 최종적으로, 6-아미노헥사날은 6-ACA로 트랜스아민화된다(도 26의 단계 F).

[0727] **실시예 XXVI**

[0728] **헥사메틸렌디아민 및 6-아미노카프로산의 생성을 위한 효소 분류 시스템**

[0729] 본 실시예는 헥사메틸렌디아민 또는 6-아미노카프로에이트의 생산을 위해 실시예 XXIV 및 XXV에 기재된 예시적인 경로를 위한 효소 분류 시스템을 설명한다.

[0730] 도 20 내지 23 및 26의 모든 형질전환은 표 11에 도시된 형질전환의 일반적 범주에 속한다. 각각의 범주에서 생화학적으로 특징규명된 다수의 유전자가 아래에 기재된다. 적절히 클로닝되고 발현될 경우, 도 20 내지 23 및 26에서 적절한 형질전환을 촉매화하기 위해 적용될 수 있는 유전자가 구체적으로 열거된다.

[0731] 표 11은 6-아미노카프로에이트 및 헥사메틸렌디아민으로 공통의 중심 대사 중간체를 전환시키는데 유용한 효소 유형을 제시한다. 각각의 라벨의 처음 3개의 숫자는 기질 특이성과 무관한 형질전환의 일반적 유형을 표시하는 처음 3개의 효소 위원회 번호 숫자에 상응한다.

표 11

[0732]

라벨	기능
1.1.1.a	산화환원효소(옥소로부터 알코올로)
1.13.12.a	모노옥시게나아제(O_2 혼입)
1.2.1.a	산화환원효소(알데히드로부터 산으로)
1.2.1.b	산화환원효소(아실-CoA로부터 알데히드로)
1.2.1.d	산화환원효소(포스포네이트 환원효소)
1.2.1.e	산 환원효소
1.3.1.a	산화환원효소(알켄으로부터 알칸으로)
1.4.1.a	산화환원효소(아민화)
2.3.1.b	아실전이효소(베타-케토티올라아제)
2.6.1.a	아미노전이효소
2.7.2.a	인산전이효소(카복시 수용체)
2.8.3.a	조효소-A 전이효소
3.1.2.a	CoA 가수분해효소
4.1.1.a	카복시-리아제
4.1.2.a	알데히드-리아제
4.2.1.a	하이드로-리아제
5.4.3.a	아미노뮤타아제
6.2.1.a	산-티올 리가아제

[0733] 1.1.1.a산화환원효소(옥소로부터 알코올로) - 3-옥소-6-아미노피멜로일-CoA의 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA로의 환원은 3-옥소아실-CoA 탈수소효소에 의해 촉매화된다(도 20, 단계 C). 이러한 효소는 3-옥소아실-CoA 분자를 3-하이드록시아실-CoA 분자로 전환시키고, 종종 지방산 베타-산화 또는 페닐아세테이트 이화작용에 관여한다. 예를 들면, *fadB* 및 *fadJ*에 의해 코딩되는 에스케리치아 콜라이에서의 2가지 지방산 산화 착체의 서브유닛은 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소 작용을 한다(Binstock et al., Methods Enzymol. 71 Pt C:403-411(1981)). 게다가, 슈도모나스 푸티다 U중의 *phaC*(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. 95:6419-6424(1998)) 및 슈도모나스 플루오레센스 ST중 *paaC*(Di Arch et al., Microbiol 188:117-125(2007))에 의해 코딩되는 유전자 생성물은 도 10에서 단계 B의 역 반응을 촉매화하고, 즉 페닐아세테이트 또는 스타이렌의 이화작용 동안 3-하이드록시아디필-CoA를 산화시켜 3-옥소아디필-CoA를 형성한다. 이러한 효소에 의해 촉매화되는 반응은 가역성임을 주지한다. 또한, 페닐아세테이트 분해 오페론에서 다른 유전자에 대한 *paaH*의 에스케리치아 콜라이에서의 근접성(Nogales et al., Microbiology 153:357-365(2007)) 및 *paaH* 돌연변이체가 페닐아세테이트에서 성장할 수 없다는 사실(Ismail et al., Eur. J Biochem. 270:3047-3054(2003))을 참고하여, 에스케리치아 콜라이 *paaH* 유전자가 3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소를 코딩함이 예상된다.

[0734]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
fadB	119811	P21177.2	에스케리치아 콜라이
fadJ	3334437	P77399.1	에스케리치아 콜라이
paaH	16129356	NP_415913.1	에스케리치아 콜라이
phaC	26990000	NP_745425.1	슈도모나스 푸티다
paaC	106636095	ABF82235.1	슈도모나스 플루오레센스

[0735] 3-옥소아실-CoA 분자를 이의 상응하는 3-하이드록시아실-CoA 분자로 전환시킬 수 있는 추가의 예시적인 산화환원효소는 3-하이드록시부티릴-CoA 탈수소효소를 포함한다. *hbd*에 의해 코딩되는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 효소는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 작용적으로 발현된다(Youngleson et al., J Bacteriol. 171:6800-6807(1989)). 추가적인 유전자 후보로는 클로스트리디엄 클루이베리중의 *Hbd1*(C-말단 도메인) 및 *Hbd2*(N-말단 도메인)(Hillmer et al., FEBS Lett. 21:351-354(1972)) 및 보스 타우러스중의 *HSD17B10*(Wakil et al, J Biol. Chem. 207:631-638(1954))이 포함된다. 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로 환원시키는 것으로 입증된 다른 유전자 후보는 주글로에아 라미게라(Zoogloea ramigera)로부터의 *phbB*(Ploux et al., Eur. J Biochem. 174:177-182(1988)) 및 로도박터 스파에로이데스로부터의 *phbB*(Alber et al., Mol. Microbiol. 61:297-309(2006))이다. 전자의 유전자 후보는 NADPH-의존성이고, 이의 뉴클레오티드 서열은 결정되었고(Peoples et al., Mol. Microbiol 3:349-357(1989)), 이 유전자는 에스케리치아 콜라이에서 발현되었다. 유전자에 대한 기질 특이성 연구로부터, 이는 3-옥소프로피오닐-CoA를 대안의 기질로 수용할 수

있는 것으로 결론지었다(Peoples et al., Mol. Microbiol 3:349-357(1989)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hbd	18266893	P52041.2	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
Hbd2	146348271	EDK34807.1	클로스트리디엄 클루이베리
Hbd1	146345976	EDK32512.1	클로스트리디엄 클루이베리
HSD17B10	3183024	O02691.3	보스 타우러스
phaB	77464321	YP_353825.1	로도박터 스파에로이데스
phbB	130017	P23238.1	주글로에아 라미게라

[0736]

[0737] 다수의 유사한 효소가 다른 클로스트리디아 및 메탈로스파에라 세듈라 종에서 발견되었다(Berg et al., Science. 318:1782-1786(2007)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hbd	15895965	NP_349314.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
hbd	20162442	AAM14586.1	클로스트리디엄 베이제린키
Msed_1423	146304189	YP_001191505	메탈로스파에라 세듈라
Msed_0399	146303184	YP_001190500	메탈로스파에라 세듈라
Msed_0389	146303174	YP_001190490	메탈로스파에라 세듈라
Msed_1993	146304741	YP_001192057	메탈로스파에라 세듈라

[0738]

[0739] 1.13.12.a 모노옥시게나아제(O_2 혼입) - 하나의 O_2 혼입 모노옥시게나아제가 호모라이신을 6-아미노헥산아미드로 전환시키기 위해 필요하다(도 23의 단계 A). 슈도모나스 플루오레센스로부터의 라이신 2-모노옥시게나아제(EC 1.13.12.2)는 기질로서의 호모라이신와 반응한다(Nakazawa et al., J Biol. Chem. 247:3439-3444(1972)). 슈도모나스 푸티다로부터의 효소는 생화학적으로 특징규명되었고, 이 유전자는 식별되었다(Karyakin et al., Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya 27:825-832(1991)). 슈도모나스 플루오레센스(평가 = 0.0, 90% 동일성), 스트렙토마이세스 코엘리컬러(평가 = 0.0, 58% 동일성), 로도코커스 조스티(평가 = 0.0, 56% 동일성) 등에서 라이신 2-모노옥시게나아제를 코딩하는 유전자는 슈도모나스 푸티다 효소에 대한 단백질 서열 상동성에 의해 식별되었다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
davB	193805882	BAG54787.1	슈도모나스 푸티다
pfl_5670	68347255	AAY94861.1	슈도모나스 플루오레센스
SCO1454	7209214	CAB76876.1	스트렙토마이세스 코엘리컬러
RHA1_ro03531	110820050	ABG95334.1	로도코커스 조스티

[0740]

[0741] 1.2.1.a 산화환원효소(알데히드로부터 산으로) 도 26에서의 2가지 형질전환은 알데히드의 산으로의 전환, 즉 2-아미노-7-옥소헵타노에이트의 2-아미노피멜레이트로의 전환(단계 D) 및 6-아미노헥사날의 6-아미노카프로에이트로의 전환(단계 F)을 필요로 한다. 이러한 반응은 알데히드를 산으로 전환시키는 EC 부류 1.2.1중의 NAD(P)+-의존성 산화환원효소에 의해 촉매화된다. 후보 효소는 NAD+-의존성 알데히드 탈수소효소(EC 1.2.1.3)이다. 인간 간에서 발견되는 2가지 알데히드 탈수소효소, ALDH-1 및 ALDH-2는 다양한 지방족, 방향족 및 다중환식 알데히드에 대한 넓은 기질 범위를 갖는다(Klyosov et al., Biochemistry 35:4457-4467(1996)). 활성 ALDH-2는 GroEL 단백질을 샤페로닌으로 사용하여 에스케리치아 콜라이에서 효과적으로 발현되었다(Lee et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 298:216-224(2002)). 래트 미토콘드리아 알데히드 탈수소효소는 또한 에노일-알데히드 크로톤알데히드를 비롯한 넓은 기질 범위를 갖는다(Siew et al., Arch. Biochem. Biophys. 176:638-649(1976)). 에스케리치아 콜라이 유전자 *astD*는 석신산 세미알데히드를 석시네이트로 전환시키는 NAD+-의존성 알데히드 탈수소효소를 코딩한다(Kuznetsova et al., FEMS Microbiol Rev 29:263-279(2005)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ALDH-2	118504	P05091.2	호모 사피엔스
ALDH-2	14192933	NP_115792.1	래터스 노르베기커스
astD	3913108	P76217.1	에스케리치아 콜라이

[0742]

[0743] 1.2.1.b 산화환원효소(아실-CoA로부터 알데히드로) - 3-옥소피멜로일-CoA(도 21, 단계 I), 5-아미노피멜로일-CoA(도 21, 단계 L) 및 6-아미노피멜로일-CoA(도 21, 단계 Y)의 이들의 상응하는 알데히드로의 환원적 탈카복실산은 EC 부류 1.2.1의 효소에 의해 촉매화된다. 아실-CoA를 이의 상응하는 알데히드로 환원시키는 예시적인 아실-CoA 탈수소효소로는 아시네토박터 칼코아세티커스(Reiser et al., Journal of Bacteriology 179:2969-2975(1997)) 및 아시네토박터 속 M-1(Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195(2002))의 지방산 아실-CoA 환원효소, 및 클로스트리디엄 클루이베리중의 *sucD* 유전자에 의해 코딩되는 CoA- 및 NADP-의존성 석시네이트 세미알데히드 탈수소효소(문헌[Sohling et al., J Bacteriol. 178:871-880(1996)]; 및 [Sohling et al., J Bacteriol 178:871-80(1996)])가 포함된다. 포르피로모나스 진기발리스의 *SucD*는 또 다른 석시네이트 세미알데히드 탈수소효소이다(Takahashi et al., J. Bacteriol. 182:4704-4710(2000)). *bphG*에 의해 코딩되는, 슈도모나스 종에서 아세트알데히드 탈수소효소를 아실화하는 효소는 아세트알데히드, 프로피온알데히드, 부티르알데히드, 이소부티르알데히드 및 폼알데히드를 산화 및 아실화하는 것으로 입증되었으므로 또 다른 후보이다(Powlowski et al., J Bacteriol. 175:377-385(1993)). 아세틸-CoA를 에탄올로 환원시키는 것에 더하여, 류코노스톡 메센테로이데스에서 *adhE*에 의해 코딩되는 효소는 분지형 화합물인 이소부티르알데히드를 이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 제시되었다(Koo et al., Biotechnol Lett. 27:505-510(2005)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
acr1	50086359	YP_047869.1	아시네토박터 칼코아세티커스
acr1	1684886	AAC45217	아시네토박터 바일리
acr1	18857901	BAB85476.1	아시네토박터 종 M-1
sucD	172046062	P38947.1	클로스트리디엄 클루이베리
sucD	34540484	NP_904963.1	포르피로모나스 진기발리스
bphG	425213	BAA03892.1	슈도모나스 푸티다 종

[0744]

[0745] 아실-CoA를 이의 상응하는 알데히드로 전환시키는 추가적인 효소 유형은 말로닐-CoA 환원효소로서, 이는 말로닐-CoA를 말론산 세미알데히드로 형질전환시킨다. 말로닐-CoA 환원효소는 3-하이드록시프로피오네이트 사이클을 통한 호열호산성 고세균 박테리아에서의 독립영양 탄소 고정에서 핵심적인 효소이다(문헌[Berg et al., Science. 318: 1782-1786(2007)]; 및 [Thauer et al., Science. 318:1732-1733(2007)]). 효소는 보조인자로서 NADPH를 이용하고 메탈로스파에라 및 설폴로버스 종에서 특징규명된다(문헌[Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006)]; 및 [Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002)]). 효소는 메탈로스파에라 세듈라에서 Msed_0709에 의해 코딩된다(문헌[Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006)]; 및 [Berg et al., Science. 318:1782-1786(2007)]). 설폴로버스 토코다이로부터의 말로닐-CoA 환원효소를 코딩하는 유전자는에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 이종으로 발현되었다(Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006)). 이러한 효소는 메틸말로닐-CoA의 이의 상응하는 알데히드로의 전환을 촉매화하는 것으로도 제시되었다(국제 특허출원 공개공보 제WO/2007/141208호). 이들 효소의 알데히드 탈수소효소 작용이 클로로플렉서스 아우란티커스로부터의 이작용성 탈수소효소와 유사할지라도, 서열 유사성은 거의 없다. 말로닐-CoA 환원효소 후보들은 둘다 아스파틸-4-포스페이트의 아스파테이트 세미알데히드로의 환원 및 동시적인 탈인산화를 촉매화하는 효소인 아스파테이트-세미알데히드 탈수소효소에 높은 서열 유사성을 갖는다. 추가적인 유전자 후보는 다른 유기체중, 예컨대 설폴로버스 솔파타리쿠스 및 설폴로버스 아시도칼다리우스중의 단백질에 대한 서열 상동성에 의해 발견될 수 있다. CoA-아실화 알데히드 탈수소효소를 위한 또 다른 후보는 클로스트리디엄 베이제린키로부터의 *ald* 유전자이다(Toth et al., Appl Environ. Microbiol 65:4973-4980(1999)). 이러한 효소는 아세틸-CoA 및 부티릴-CoA를 이들의 상응하는 알데히드로 환원시키는 것으로 보고되었다. 이러한 유전자는 살모넬라 티피뮤리엄 및 에스케리치아 콜라이의 아세트알데히드 탈수소효소를 코딩하는 *eutE*와 매우 유사하다(Toth et al., Appl Environ. Microbiol 65:4973-4980(1999)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
Msed_0709	146303492	YP_001190808.1	메탈로스파에라 세듈라
mcr	15922498	NP_378167.1	설폴로버스 토코다이
asd-2	15898958	NP_343563.1	설폴로버스 솔파타리쿠스
Saci_2370	70608071	YP_256941.1	설폴로버스 아시도칼다리우스
Ald	49473535	AAT66436	클로스트리디엄 베이제린키
eutE	687645	AAA80209	살모넬라 티피뮤리엄
eutE	2498347	P77445	에스케리치아 콜라이

[0746]

[0747] 1.2.1.d 산화환원효소(포스포네이트 환원효소) - 포스폰산의 이의 상응하는 알데히드로의 환원은 EC 부류 1.2.1 중의 산화환원효소에 의해 촉매화된다. 도 21에서 단계 G, N 및 X는 5-옥소피멜로일-포스포네이트, 5-아미노피멜로일포스포네이트 및 6-아미노피멜로일포스포네이트의 이들의 상응하는 알데히드로의 환원을 위해 상기 효소를 필요로 한다. 이들 반응은 공지된 효소에 의해 촉매화되지 않는다. 유사한 반응이 아스파테이트 세미알데히드 탈수소효소(ASD, EC 1.2.1.11)에 의해 촉매화된다: 4-아스파틸 포스페이트의 아스파테이트-4-세미알데히드로의 NADPH-의존성 환원. ASD는 아미노산 생합성에 참여하고, 최근에 항미생물 표적으로 연구되었다(Hadfield et al., Biochemistry 40:14475-14483(2001)). 에스케리치아 콜라이 ASD 구조가 해결되었고(Hadfield et al., J. Mol. Biol. 289:991-1002(1999)) 이 효소는 다른 기질, 베타-3-메틸아스파틸 포스페이트를 수용하는 것으로 제시되었다(Shames, et al., J Biol. Chem. 259:15331-15339(1984)). 헤모필러스 인플루엔자 효소는 활성 부위에서의 기질 결합 친화도를 변경시키기 위한 효소 조작 연구의 대상이었다(Blanco et al., Crystallogr. 60:1388-1395(2004)). 다른 ASD 후보는 마이코박테리엄 투베르큘로시스(Shafiani et al., J Appl Microbiol 98:832-838(2005)), 메타노코커스 자나쉬(Faehnle et al. J. Mol. 353:1055-1068(2005)) 및 감염성 미생물 비브리오 콜레라 및 헬리코박터 필로리(Moore et al., Protein Expr. Purif. 25:189-194(2002))에서 발견된다. 아세틸글루타밀포스페이트 환원효소(EC 1.2.1.38)는 아세틸글루타밀포스페이트를 아세틸글루타메이트-5-세미알데히드로 천연적으로 환원시키는 연관된 효소이다. 이러한 효소를 코딩하는 유전자는 사카로마이세스 세레비지아(Pauwels et al., Eur. J Biochem. 270:1014-1024(2003)), 바실러스 서브틸리스(O'Reilly et al., Microbiology 140(Pt 5):1023-1025(1994)) 및 다른 유기체에서 발견된다.

[0748]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
asd	16131307	NP_417891.1	에스케리치아 콜라이
asd	68249223	YP_248335.1	헤모필러스 인플루엔자
asd	1899206	AAB49996	마이코박테리엄 투베르큘로시스
VC2036	15642038	NP_231670	비브리오 콜레라
asd	210135348	YP_002301787.1	헬리코박터 필로리
ARG5,6	6320913	NP_010992.1	사카로마이세스 세레비지아
argC	16078184	NP_389001.1	바실러스 서브틸리스

[0749] 다른 예시적인 포스포네이트 환원효소로는 글리세르알데히드-3-포스페이트를 D-글리세레이트 1,3-비스포스페이트로 전환시키는 글리세르알데히드 3-포스페이트 탈수소효소(예를 들어, 에스케리치아 콜라이 *gapA*(Branlant et al., Eur. J. Biochem. 150:61-66(1985)).23)), N-아세틸-1-글루타메이트-5-세미알데히드를 N-아세틸-L-글루타밀-5-포스페이트로 전환시키는 N-아세틸-감마-글루타밀-포스페이트 환원효소(예를 들어, 에스케리치아 콜라이 *argC*(Parsot et al., Gene. 68:275-283(1988)), 및 L-글루타메이트-5-세미알데히드를 L-글루타밀-5-포스페이트로 전환시키는 글루타메이트-5-세미알데히드 탈수소효소(예를 들어, 에스케리치아 콜라이 *proA*(Smith et al., J. Bacteriol. 157:545-551(1984)))가 포함된다. 살모넬라 티피뮤리엄(Mahan et al., J Bacteriol. 156:1249-1262(1983)) 및 캄필로박터 제주니(Louie et al., Mol. Gen. Genet. 240:29-35(1993))로부터의 글루타메이트-5-세미알데히드 탈수소효소를 코딩하는 유전자는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 발현되었다.

[0750]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gapA	71159358	P0A9B2.2	에스케리치아 콜라이
argC	16131796	NP_418393.1	에스케리치아 콜라이
proA	16128229	NP_414778.1	에스케리치아 콜라이
proA	16763704	NP_459319.1	살모넬라 티피뮤리엄
proA	9087222	P53000.2	캄필로박터 제주니

[0751] 1.2.1.e 산 환원효소 - 도 21에서 수 개의 형질전환은 산의 알데히드로의 전환을 필요로 한다(도 21, 단계 C, O, W). 이러한 형질전환은 열역학적으로 바람직하지 않고, 전형적으로 에너지 다량함유 보조인자 및 다중 효소 단계를 필요로 한다. 예를 들면, 부탄올 생합성에서, 부티레이트의 부티르알데히드로의 전환은 CoA 전이효소 또는 리가아제에 의한 부티레이트의 그의 상응하는 아실-CoA로의 활성화에 의해 촉매화되고, 이후 CoA-의존성 알데히드 탈수소효소에 의해 부티르알데히드로 환원된다. 다르게는, 산은 아실-포스페이트로 활성화되고 후속적으로 포스페이트 환원효소에 의해 환원될 수 있다. 단일 효소에 의한 산의 알데히드로의 직접적인 전환은 1.2.1 계열중의 효소에 의해 촉매화된다. 이들 형질전환을 촉매화하는 예시적인 효소로는 카복실산 환원효소, 알파-아미노아디페이트 환원효소 및 레티노산 환원효소가 포함된다.

[0752] 노카디아 이오웬시스에서 발견된 카복실산 환원효소는 카복실산의 이들의 상응하는 알데히드로의 마그네슘, ATP 및 NADPH-의존성 환원을 촉매화한다(Venkitasubramanian et al., J Biol. Chem. 282:478-485(2007)). *car*에 의해 코딩된 이러한 효소는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 작용적으로 발현되었다(Venkitasubramanian et al., J Biol. Chem. 282:478-485(2007)). *npt* 유전자 생성물의 발현은 전사후 개질을 통한 효소의 활성을 개선시켰다. *npt* 유전자는 비활성 아포(apo)-효소를 활성 홀로(holo)-효소로 전환시키는 특정 포스포판테테인 전이효소(PPTase)를 코딩한다. 이러한 효소의 천연 기질은 바닐산이고, 이 효소는 방향족 및 지방족 기질의 넓은 수용성을 갖는다(Venkitasubramanian et al. "Biocatalytic Reduction of Carboxylic acid: Mechanism and Applications" Chapter 15 in Biocatalysis in the Pharmaceutical anc Biotechnology Industires, ed. R.N. Patel, CRC Press LLC, Boca Raton, FL.(2006)).

[0753]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
car	40796035	AAR91681.1	노카디아 이오웬시스(종 NRRL 5646)
npt	114848891	ABI83656.1	노카디아 이오웬시스(종 NRRL 5646)

[0754] 유사한 특징을 갖는 효소인 알파-아미노아디페이트 환원효소(AAR, EC 1.2.1.31)는 몇몇 곰팡이 종의 라이신 생합성 경로에 참여한다. 이러한 효소는 천연적으로 알파-아미노아디페이트를 알파-아미노아디페이트 세미알데히드로 환원시킨다. 카복실 기는 우선 아데닐레이트의 ATP-의존성 형성을 통해 활성화되고, 이어서 NAD(P)H에 의해 환원되어 알데히드 및 AMP를 수득한다. CAR과 유사하게, 이러한 효소는 마그네슘을 이용하고, PPTase에 의한 활성화를 필요로 한다. AAR 및 이의 상응하는 PPTase를 위한 효소 후보는 사카로마이세스 세레비지아(Morris et al., Molecules 98:141-145(1991)), 캔디다 알비칸스(Guo et al., Mol. Genet. Genomics 269:271-279(2003)), 및 쉬조사카로마이세스 폼베(Ford et al., Curr. Genet. 28:131-137(1995))에서 발견된다. 쉬조사카로마이세스 폼베로부터의 AAR은 에스케리치아 콜라이에서 발현될 경우 상당한 활성을 나타내었다(Guo et al., Yeast 21:1279-1288(2004)). 페니실리엄 크리소제넘으로부터의 AAR은 5-카복시메틸-L-시스테인을 대안의 기질로서 허용하지만, 아디페이트, L-글루타메이트 또는 디아미노피멜레이트와 반응하지 않았다(Hijarrubia et al., J Biol. Chem 278:8250-8256(2003)). 페니실리엄 크리소제넘 PPTase를 코딩하는 유전자는 아직까지 식별되지 않았고, 높은 신뢰도가 서열 비교 상동성 조사에 의해 식별되지 않았다. 방향 진화 또는 다른 효소 조작 방법이 도 21에서 기질과의 반응성을 증진시키기 위해 요구될 수 있다.

[0755]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
LYS2	171867	AAA34747.1	사카로마이세스 세레비지아
LYS5	1708896	P50113.1	사카로마이세스 세레비지아
LYS2	2853226	AAC02241.1	캔디다 알비칸스
LYS5	28136195	AAO26020.1	캔디다 알비칸스
Lys1p	13124791	P40976.3	쉬조사카로마이세스 폼베
Lys7p	1723561	Q10474.1	쉬조사카로마이세스 폼베
Lys2	3282044	CAA74300.1	페니실리엄 크리소제넘

[0756] 1.3.1.a 산화환원효소(알켄으로부터 알칸으로) - 3가지 형질전환은 알켄을 알칸으로 환원시키는 산화환원효소(EC 1.3.1.-)의 범주에 속한다. 6-아미노-7-카복시-헵트-2-에노일-CoA의 6-아미노피멜로일-CoA로의 전환(도 20, 단계 E), 2-옥소-7-아미노헵트-3-오노에이트의 2-옥소-7-아미노헵타노에이트로의 전환(도 22, 단계 C) 및 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트의 2-아미노-7-옥소수바레이트로의 전환(도 27, 단계 C)은 2-에노에이트 환원효소에 의해 촉매화된다. 2-에노에이트 환원효소는 다양한 α,β-불포화 카복실산 및 알데히드의 NAD(P)H-의존성 환원을 촉매화하는 것으로 공지되어 있다(Rohdich, et al., J Biol. Chem. 276:5779-5787(2001)). 클로스트리디엄 클루이베리의 최근 공개된 게놈 서열에서, 에노에이트 환원효소를 위한 9개의 코딩 서열이 보고되었고, 이 중 하나가 특징규명되었다(Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. 105:2128-2133(2008)). 클로스트리디엄 티로부티리컴 및 무렐라 써모아세티컴 둘다로부터의 *enr* 유전자는 클로닝되고 서열화되고 서로 59% 동일성을 나타낸다. 전자의 유전자는 또한 클로스트리디엄 클루이베리에서 특징규명된 유전자에 대략 75% 유사성을 갖는 것으로 밝혀졌다(Giesel et al., Arch. Microbiol 135:51-57(1983)). 이들 서열 결과에 기초하여, *enr*이 에스케리치아 콜라이중의 디에노일 CoA 환원효소(*fadH*)에 매우 유사하다고 보고되었다(Rohdich et al., J Biol. Chem. 276:5779-5787(2001)). 무렐라 써모아세티카(이전에 클로스트리디엄 써모아세티컴이였음) *enr* 유전자는 에스케리치아 콜라이에서 촉매적으로 활성인 형태로 발현되었다(Ohdich, et al, J Biol. Chem. 276:5779-5787(2001)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
enr	169405742	ACA54153.1	클로스트리디엄 보툴리넘 A3 균주
enr	2765041	CAA71086.1	클로스트리디엄 티로부티리컴
enr	3402834	CAA76083.1	클로스트리디엄 클루이베리
enr	83590886	YP_430895.1	무렐라 써모아세티카
fadH	16130976	*NP_417552.1*	에스케리치아 콜라이

[0757]

[0758] 또 다른 후보인 2-에노에이트 환원효소는 말레일아세테이트 환원효소(MAR)이고, 이 효소는 2-말레일아세테이트(4-옥소헥스-2-엔디오에이트)의 3-옥소아디페이트로의 환원을 촉매화한다. MAR 효소는 방향족 분해 경로에 천연적으로 참여한다(문헌[Camara et al., J Bacteriol.(2009)]; [Huang et al., Appl Environ. Microbiol 72:7238-7245(2006)]; [Kaschabek et al., J Bacteriol. 177:320-325(1995)] 및 [Kaschabek et al., J Bacteriol. 175:6075-6081(1993)]). 효소 활성은 슈도모나스 속. 균주 B13에서 식별되고 특징규명되었고(문헌[Kaschabek et al., J Bacteriol 177:320-325(1995)]; 및 [Kaschabek et al., J Bacteriol 175:6075-6081(1993)]), 코딩 유전자는 클로닝되고 서열화되었다(Kasberg et al., J Bacteriol. 179:3801-3803(1997)). 추가적인 MAR 유전자 후보로는 슈도모나스 종 균주 B13으로부터의 *clcE* 유전자(Kasberg et al., J Bacteriol. 179:3801-3803(1997)), 로도코커스 오파커스로부터의 *macA* 유전자(Seibert et al., J Bacteriol 180:3503-3508(1998)), 랄스토니아 유트로파(또한 쿠프리아비더스 네카터로서 공지됨)로부터의 *macA* 유전자(Seibert et al., Microbiology 150:463-472(2004)), 랄스토니아 유트로파로부터의 *tfdFII*(Seibert et al., J Bacteriol. 175:6745-6754(1993)) 및 코리네박테리엄 글루타미컴으로부터의 *NCgl1112*(Huang et al., Appl Environ. Microbiol 72:7238-7245(2006))가 포함된다. *ccaD*에 의해 코딩되는 슈도모나스 레이네케이 MT1중의 MAR은 최근에 식별되었고, 뉴클레오티드 서열은 DBJ/EMBL GenBank 수납 번호 EF159980하에 이용가능하다(Camara et al, J Bacteriol.(2009)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
clcE	3913241	O30847.1	슈도모나스 종 균주 B13
macA	7387876	O84992.1	로도코커스 오파커스
macA	5916089	AAD55886	쿠프리아비더스 네카터
tfdFII	1747424	AAC44727.1	랄스토니아 유트로파 JMP13
NCgl1112	19552383	NP_600385	코리네박테리엄 글루타미컴
ccaD	134133940	ABO61029.1	슈도모나스 레이네케이 MT1

[0759]

[0760] 에노일-CoA 환원효소는 6-아미노-7-카복시헵트-2-에노일-CoA의 6-아미노피멜로일-CoA로의 환원을 촉매화하기에 적합한 효소이다(도 20, 단계 E). 하나의 예시적인 에노일-CoA 환원효소는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *bcd*의 유전자 생성물이고(문헌[Atsumi et al., Metab Eng. 10:305-311(2008)]; 및 [Boynton et al., J Bacteriol. 178:3015-3024(1996)]), 이는 크로토닐-CoA의 부티릴-CoA로의 환원을 천연적으로 촉매화한다. 이러한 효소의 활성은 전자 전달 플라보단백질을 코딩하는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴 *etfAB* 유전자의 발현과 함께 *bcd*를 발현함으로써 증진될 수 있다. 에노일-CoA 환원효소 단계를 위한 추가적인 후보는 유클레나 그라실리스로부터의 미토콘드리아 에노일-CoA 환원효소이다(Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338(2005)). 미토콘드리아 표적화 리더 서열의 제거 후 상기 서열로부터 유도된 구축물은 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되어 활성 효소를 생성한다(Hoffmeister,et al., J Biol. Chem. 280:4329-4338(2005)). 진핵생물 유전자, 특히 원핵생물 유기체에서 유전자 생성물을 특정 세포내 구획으로 표적화할 수 있는 유전자를 발현하는 이러한 접근방법은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 원핵생물 트레포네마 덴티콜라로부터의 이러한 유전자의 근접한 상동체, TDE0597은 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 발현된 제3의 에노일-CoA 환원효소를 나타낸다(Tucci et al., Febs Letters 581: 1561-1566(2007)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
bcd	15895968	NP_349317.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
etfA	15895966	NP_349315.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
etfB	15895967	NP_349316.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
TER	62287512	Q5EU90.1	유글레나 그라실리스
TDE0597	42526113	NP_971211.1	트레포네마 덴티콜라

[0761]

[0762] 추가적인 에노일-CoA 환원효소 후보는 방향족 화합물을 분해하는 유기체에서 발견된다. 벤조에이트 분해를 위한 모델 유기체인 로도슈도모나스 팔루스트리스는 피멜로일-CoA의 베타-산화를 경유해 피멜레이트를 분해하는

효소 능력을 갖는다. *pim* 오페론에서 인접한 유전자 *pimC* 및 *pimD*는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴 *bcd*에 서열 상동성을 갖고, 플라빈-포함 피멜로일-CoA 탈수소효소를 코딩하는 것으로 예상된다(Harrison and Harwood, Microbiology 151:727-736(2005)). 질소-고정 대두 공생자 브라디리조븀 자포니컴의 게놈은 또한 로도슈도모나스 팔루스트리스의 *pimC* 및 *pimD*에 높은 서열 유사성을 갖는 유전자로 구성된 *pim* 오페론을 포함한다(Harrison and Harwood, Microbiology 151:727-736(2005)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pimC	39650632	CAE29155	로도슈도모나스 팔루스트리스
pimD	39650631	CAE29154	로도슈도모나스 팔루스트리스
pimC	27356102	BAC53083	브라디리조븀 자포니컴
pimD	27356101	BAC53082	브라디리조븀 자포니컴

[0763]

[0764] 추가적인 후보는 2-메틸-분지형 에노일-CoA 환원효소(EC 1.3.1.52)이고, 이 효소는 입체 장애 트랜스-에노일-CoA 기질의 환원을 촉매화한다. 이러한 효소는 선충 아스카리스 섬에서 분지형 지방산 합성에 참여하고, 2-메틸부타노일-CoA, 2-메틸펜타노일-CoA, 옥타노일-CoA 및 펜타노일-CoA를 비롯한 다양한 선형 및 분지형 기질을 환원시킬 수 있다(Duran et al., J Biol. Chem. 268:22391-22396(1993)). 유전자 *acad1* 및 *acad*에 의해 코딩된 효소의 2가지 이소형(isoform)은 특징규명되었다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
acad1	2407655	AAC48316.1	아스카리스 섬
Acad	347404	AAA16096.1	아스카리스 섬

[0765]

[0766] 1.4.1.a 산화환원효소(아민화) - 도 20 내지 23에서 수 개의 반응은 케톤 또는 알데히드의 아미노 기로의 전환을 필요로 한다. 이러한 형질전환은 EC 부류 1.4.1중의 아민화 산화환원효소에 의해 달성될 수 있다. EC 부류에서의 효소는 NAD^+ 또는 $NADP^+$를 수용체로서 갖는 아미노 기의 산화적 탈아민화를 촉매화하고, 이 반응은 전형적으로 가역성이다.

[0767] 도 22의 단계 D에서 2-옥소산 2-옥소-7-아미노헵타노에이트는 아미노산을 닮은 분자인 호모라이신으로 전환된다(도 22, 단계 D; 도 26, 단계 J). 2-아미노-7-옥소수바레이트의 2,7-디아미노수바레이트로의 전환(도 26의 단계 K)은 유사한 형질전환이다. 이들 반응을 촉매화하는 예시적인 효소로는 글루타메이트 탈수소효소(EC 1.4.1.2), 로이신 탈수소효소(EC 1.4.1.9), 및 아스파테이트 탈수소효소(EC 1.4.1.21)가 포함된다. 에스케리치아 콜라이로부터의 *gdhA*(Korber, .et al., J Mol. Biol. 234:1270-1273.(1993)), 써모토가 마리티마로 부터의 *gdh*(문헌[Kort al., Extremophiles 1:52-60. 1997]; [Lebbink et al., J Mol. Biol. 280:287-296(1998)] 및 [Lebbink et al., J Mol. Biol. 289:357-369(1999)]), 및 할로박테리엄 살리나럼으로부터의 *gdhA1*(Ingoldsby et al., Gene 349:237-244(2005)) 유전자 생성물은 글루타메이트의 2-옥소글루타레이트 및 암모니아로의 가역성 전환을 촉매화하는 한편, NADP(H), NAD(H), 또는 둘다를 각각 촉진시킨다. 바실러스 세레우스의 *ldh* 유전자는 로이신, 이소로이신, 발린, 및 2-아미노부타노에이트를 비롯한 광범위한 기질을 갖는 LeuDH 단백질을 코딩한다(문헌[Ansorge et al., Biotechnol Bioeng. 68:557-562(2000)]; 및 [Stoyan et al., J Biotechnol 54:77-80 066662-0304 252(1997)]). 아스파테이트 탈수소효소를 코딩하는 써모토가 마리티마로부터 *nadX* 유전자는 NAD의 생합성에 관여된다(Yang et al, J Biol. Chem. 278:8804-8808(2003)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gdhA	118547	P00370	에스케리치아 콜라이
gdh	6226595	P96110.4	써모토가 마리티마
gdhA1	15789827	NP_279651.1	할로박테리엄 살리나럼
ldh	61222614	P0A393	바실러스 세레우스
nadX	15644391	NP_229443.1	써모토가 마리티마

[0768]

[0769] 2가지 반응은 3-옥소산의 3-아미노산으로의 전환: 3-옥소-7-아미노헵타노에이트의 3,7-디아미노헵타노에이트로의 전환(도 21, 단계 E), 3-옥소피멜레이트의 3-아미노피멜레이트로의 전환(도 21, 단계 J) 및 3-옥소-1-카복시헵타날의 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로의 전환(도 21, 단계 AB)을 수반한다. 3-옥소산과 반응하는 효소는 3,5-디아미노헥사노에이트 탈수소효소(EC 1.4.1.11)이고, 이 효소는 라이신을 발효하는 유기체에서 발견된다. 이러한 효소를 코딩하는 유전자, *kdd*는 최근에 푸소박테리엄 누클레아텀에서 식별되었다(Kreimeyer et al., J Biol. Chem. 282:7191-7197(2007)). 이 효소는 다른 유기체에서 정제되고 특징규명되었지만(문헌[Baker et

al., Chem. 247:7724-7734(1972)]; 및 [Baker et al., Biochemistr. 13:292-299(1974)]), 이들 효소와 연관된 유전자는 공지되어 있지 않다. 마익소코커스 잔터스, 포르피로모나스 진기발리스 W83 및 다른 서열화된 유기체에서의 후보는 서열 상동성에 의해 추론될 수 있다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
kdd	19713113	AAL93966.1	푸소박테리엄 누클레아텀
mxan_4391	108462082	ABF87267.1	마익소코커스 잔터스
pg_1069	34397119	AAQ66183.1	포르피로모나스 진기발리스

[0770]

[0771] 2-아미노-7-옥소헵타노에이트의 호모라이신으로의 전환(도 20, 단계 G; 도 21, 단계 Q; 도 26, 단계 M), 3-옥소-1-카복시헵타날의 3-옥소-7-아미노헵타노에이트로의 전환(도 21, 단계 D), 3-아미노-7-옥소헵타노에이트의 3,7-디아미노헵타노에이트로의 전환(도 21, 단계 Z) 및 6-아미노헥사날의 HMDA의 전환(도 26, 단계 C; 도 22, 단계 G)은 알데히드를 이들의 상응하는 1차 아민으로 형질전환시키는 아민화 산화환원효소에 의해 촉매화된다. 유사한 반응을 촉매화하는 효소는 *lysDH* 유전자에 의해 코딩되는 라이신 6-탈수소효소(EC 1.4.1.18)이다. 이러한 효소는 L-라이신의 6-아미노 기의 가역적인 산화적 탈아민화를 촉매화하여 2-아미노아디페이트-6-세미알데히드를 형성한다(Misono et al., J Bacteriol. 150:398-401(1982)). 예시적인 효소 후보는 게오바실러스 스테아로써모필러스(Heydari et al., Appl Environ. Microbiol 70:937-942(2004)), 아그로박테리엄 투메파시엔스(문헌[Hashimoto et al., J Biochem 066662-0304 253 106:76-80(1989)]; 및 [Misono et al., J Bacteriol. 150:398-401(1982)]), 및 아크로모박터 데니트리피칸스(Ruldeekulthamrong et al., BMP Rep. 41:790-795(2008))에서 발견된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
lysDH	13429872	BAB39707	게오바실러스 스테아로써모필러스
lysDH	15888285	NP_353966	아그로박테리엄 투메파시엔스
lysDH	74026644	AAZ94428	아크로모박터 데니트리피칸스

[0772]

[0773] 2.3.1.b 아실전이효소(베타-케토티올라아제) - 도 21의 단계 A에서, 글루타릴-CoA 및 아세틸-CoA는 옥소피멜로일-CoA:글루타릴-CoA 아실전이효소, 베타-케토티올라아제(EC 2.3.1.16)에 의해 축합되어 3-옥소피멜로일-CoA를 형성한다. 이러한 형질전환를 촉매화하는 효소는 랄스토니아 유트로파(이전에 알칼리게네스 유트로퍼스(*Alcaligenes eutrophus*)로 공지됨)에서 발견되고, 유전자 *bktB* 및 *bktC*에 의해 코딩된다(문헌[Haywood et al., FEMS Microbiology Letters 52:91-96(1988)]; 및 [Slater et al., J. Bacteriol. 180:1979-1987(1998)]). BktB 단백질의 서열은 공지되어 있지만; BktC 단백질의 서열은 보고되지 않았다. 로도슈도모나스 팔루스트리스의 *pim* 오페론은 *pimB*에 의해 코딩되는 베타-케토티올라아제를 또한 코딩하고, 벤조일-CoA 분해 동안 분해 방향으로 이러한 형질전환을 촉매화하는 것으로 예측된다(Harrison et al., Microbiology 151:727-736(2005)). 신트로퍼스 아시디트로피커스에서 베타-케토티올라아제 효소 후보는 *bktB*에 대한 서열 상동성으로 식별되었다(43% 동일성, 평가 = 1e-93).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
bktB	11386745	YP_725948	랄스토니아 유트로파
pimB	39650633	CAE29156	로도슈도모나스 팔루스트리스
syn_02642	85860483	YP_462685.1	신트로퍼스 아시디트로피커스

[0774]

[0775] 아세틸-CoA 및 프로피오닐-CoA로부터 베타-케토발러레이트의 형성을 촉매화하는 베타-케토티올라아제 효소는 3-옥소피멜로일-CoA의 형성을 촉매화할 수 있다. 주글로에아 라미게라는 프로피오닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 β-케토발레릴-CoA를 형성할 수 있는 2가지 케토티올라아제를 갖고, 랄스토니아 유트로파는 이러한 형질전환을 촉매화할 수 있는 β-산화 케토티올라아제를 갖는다(그루이스(Gruys)등의 미국 특허 제5,958,745호(1999)). 이들 유전자 또는 이들의 번역된 단백질의 서열은 보고되지 않았지만, 랄스토니아 유트로파, 주글로에아 라미게라, 또는 다른 유기체에서 수 개의 후보가 랄스토니아 유트로파로부터의 *bktB*에 대한 서열 상동성에 기초하여 식별될 수 있다. 이들은 다음을 포함한다:

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
phaA	113867452	YP_725941.1	랄스토니아 유트로파
h16_A1713	113867716	YP_726205.1	랄스토니아 유트로파
pcaF	116694155	YP_728366.1	랄스토니아 유트로파
h16_B1369	116695312	YP_840888.1	랄스토니아 유트로파
h16_A0170	113866201	YP_724690.1	랄스토니아 유트로파
h16_A0462	113866491	YP_724980.1	랄스토니아 유트로파
h16_A1528	113867539	YP_726028.1	랄스토니아 유트로파
h16_B0381	116694334	YP_728545.1	랄스토니아 유트로파
h16_B0662	116694613	YP_728824.1	랄스토니아 유트로파
h16_B0759	116694710	YP_728921.1	랄스토니아 유트로파
h16_B0668	116694619	YP_728830.1	랄스토니아 유트로파
h16_A1720	113867723	YP_726212.1	랄스토니아 유트로파
h16_A1887	113867867	YP_726356.1	랄스토니아 유트로파
phbA	135759	P07097.4	주글로에아 라미게라
bktB	194289475	YP_002005382.1	쿠프리아비더스 타이와넨시스
Rmet_1362	94310304	YP_583514.1	랄스토니아 메탈리듀란스
Bphy_0975	186475740	YP_001857210.1	부르크홀데리아 파이마텀

[0776]

[0777] 추가적인 후보는 아세틸-CoA의 2개 분자를 아세토아세틸-CoA로 전환시키는 것으로 공지된 베타-케토티올라아제(EC 2.1.3.9)를 포함한다. 예시적인 아세토아세틸-CoA 티올라아제 효소는 에스케리치아 콜라이로부터의 *atoB*(Martin et al., Nat. Biotechnol 21:796-802(2003)), 클로스트리디엄 아세토부틸리컴으로부터의 *thlA* 및 *thlB*(문헌[Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818(2007)]; 및 [Winzer et al., J. Mol. Microbiol Biotechnol 2:531-541(2000)]), 및 사카로마이세스 세레비지아로부터의 *ERG10*(Hiser,et al., J. Biol. Chem. 269:31383-31389(1994))의 유전자 생성물을 포함한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
atoB	16130161	NP_416728	에스케리치아 콜라이
thlA	15896127	NP_349476.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
thlB	15004782	NP_149242.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
ERG10	6325229	NP_015297	사카로마이세스 세레비지아

[0778]

[0779] 3-옥소아디필-CoA 티올라아제로도 지칭되는 베타-케토아디필-CoA 티올라아제(EC 2.3.1.174)는 베타-케토아디필-CoA를 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로 전환시키고, 이는 방향족 화합물 분해를 위한 베타-케토아디페이트 경로의 핵심 효소이다. 이 효소는 슈도모나스 푸티다(Harwood et al., J Bacteriol 176:6479-6488(1994)) 및 아시네토박터 칼코아세티커스(Doten et al., J Bacteriol. 169:3168-3174(1987))를 비롯한 토양 박테리아 및 곰팡이에 널리 퍼져있다. 슈도모나스 균주 B13중의 *pcaF*(Kaschabek et al., J Bacteriol. 184:207-215(2002)), 슈도모나스 푸티다 U중의 *phaD*(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. 95:6419-6424(1998)), 슈도모나스 플루오레센스 ST 중의 *paaE*(Di Arch et al., Microbiol 188: 117-125(2007)), 및 에스케리치아 콜라이로부터의 *paaJ*(Nogales et al., Microbiology 153:357-365(2007))에 의해 코딩되는 유전자 생성물은 또한 이러한 형질전환을 촉매화한다. 수 개의 베타-케토티올라아제는 상당하고 선택적인 활성을 옥소아디필-CoA 형성 방향으로 나타내고, 슈도모나스 푸티다로부터의 *bkt*, 슈도모나스 아에루기노사 PAO1로부터의 *pcaF* 및 *bkt*, 부르크홀데리아 암비파리아 AMMD로부터의 *bkt*, 에스케리치아 콜라이로부터의 *paaJ*, 및 슈도모나스 푸티다로부터의 *phaD*를 포함한다. 이들 효소는 3-옥소아디필-CoA과 구조적으로 유사한 화합물인 3-옥소피멜로일-CoA의 합성을 위해 이용될 수도 있다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
paaJ	16129358	NP_415915.1	에스케리치아 콜라이
pcaF	17736947	AAL02407	슈도모나스 내크무쉬(B13)
phaD	3253200	AAC24332.1	슈도모나스 푸티다
pcaF	506695	AAA85138.1	슈도모나스 푸티다
pcaF	141777	AAC37148.1	아시네토박터 칼코아세티커스
paaE	106636097	ABF82237.1	슈도모나스 플루오레센스
bkt	115360515	YP_777652.1	부르크홀데리아 암비파리아 AMMD
bkt	9949744	AAG06977.1	슈도모나스 아에루기노사 PAO1
pcaF	9946065	AAG03617.1	슈도모나스 아에루기노사 PAO1

[0780]

[0781] 베타-케토티올라아제는 또한 글루타밀-CoA 및 아세틸-CoA를 축합시키기 위해 필요하다(도 20, 단계 B). 이러한 형질전환은 천연적으로 발생되는 것으로 공지되어 있지 않다. 상기 기재된 베타-케토티올라아제 후보는 또한 이러한 형질전환을 촉매화하기 위한 예시적인 후보이다.

[0782] 2.6.1.a 아미노전이효소 - 도 20 내지 26에서 수 개의 반응은 EC 부류 2.6.1중의 아미노전이효소에 의해 촉매화된다. 이러한 효소는 아민화된 공여체로부터 아미노 기를 수용체, 예컨대 피루베이트 및 알파-케토글루타레이트로 가역적으로 전달한다.

[0783] 알데히드에 선택적인 아미노전이효소는 2-아미노-7-옥소헵타노에이트(도 20, 단계 G; 도 21, 단계 Q; 도 26, 단계 M), 3-옥소-1-카복시헵타날(도 21, 단계 D) 3-아미노-7-옥소헵타노에이트(도 21, 단계 Z) 및 6-아미노헥사날(도 26, 단계 C; 도 22, 단계 G)을 트랜스아민화하기 위해 필요하다. 알데히드를 1차 아민으로 전환시키는 예시적인 효소는 라이신-6-아미노전이효소(EC 2.6.1.36)이다. 라이신을 알파-아미노아디페이트 세미알데히드를 전환시키는 이러한 효소 기능은 효모 및 박테리아에서 입증되었다. 칸디다 유틸리스(Candida utilis)(Hammer et al., J Basic Microbiol 32:21-27(1992)), 플라보박테리엄 루테센스(Fujii et al., J Biochem. 128:391-397(2000)) 및 스트렙토마이세스 클라불리제너스(Romero et al., Microbiol Biotechnol 18:241-246(1997))로부터의 후보는 특징규명되었다. 스트렙토마이세스 클라불리제너스로부터의 재조합 라이신-6-아미노전이효소는 에스케리치아 콜라이에서 작용적으로 발현되었다(Tobin et al., J Bacteriol. 173:6223-6229(1991)). 플라보박테리엄 루테센스 효소는 아미노 수용체로서 알파-케토글루타레이트에 특이적이다(Soda et al., Biochemistry 7:4110-4119(1968)). 알데히드를 말단 아민으로 전환시키는 다른 효소는 2,4-디아미노부타노에이트:2-케토글루타레이트 4-아미노전이효소를 코딩하는 아시네토박터 바우마니중의 *dat* 유전자 생성물을 포함한다(Ikai et al., JBacteriol. 179:5118-5125(1997)). 그의 천연 기질, 2,4-디아미노부티레이트에 더하여, DAT는 라이신, 4-아미노부티레이트 및 오르니틴의 말단 아민을 트랜스아민화한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
lat	10336502	BAB13756.1	플라보박테리엄 루테센스
lat	153343	AAA26777.1	스트렙토마이세스 클라불리게러스
dat	6685373	P56744.1	아시네토박터 바우마니

[0784]

[0785] 추가적인 효소 후보로는 푸트레신 아미노전이효소 또는 다른 디아민 아미노전이효소가 포함된다. 에스케리치아 콜라이 푸트레신 아미노전이효소는 *ygjG* 유전자에 의해 코딩되고, 정제된 효소는 또한 카다베린 및 스페르미딘을 트랜스아민화할 수 있었다(Samsonova et al., BMC. Microbiol 3:2(2003)). 또한, 2-옥소글루타레이트 이외의 아미노 수용체(예를 들어, 피루베이트, 2-옥소부타노에이트)를 갖는 1,7-디아미노헵탄 상에서의 이러한 효소의 활성은 보고되었다(문헌[Kim, J Biol. Chem. 239:783-786(1964)]; 및 [Samsonova et al., BMC. Microbiol 3:2(2003)]). 슈도모나스 아에루기노사의 *spuC* 유전자는 알파-케토글루타레이트 이외의 아미노 수용체로서의 피루베이트에 대해 더 높은 활성을 갖는 푸트레신 아미노전이효소를 코딩한다(Lu et al., J. Bacteriol. 184:3765-3773(2002)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ygjG	145698310	NP_417544	에스케리치아 콜라이
spuC	9946143	AAG03688	슈도모나스 아에루기노사

[0786]

[0787] 알데히드의 말단 아민으로의 전환은 또한 감마-아미노부티레이트 아미노전이효소(GABA 아미노전이효소)에 의해 촉매화될 수 있다. 이러한 효소는 천연적으로 석신산 세미알데히드 및 글루타메이트를 4-아미노부티레이트 및 알파-케토글루타레이트로 상호전환시키고, 넓은 기질 범위를 갖는 것으로 공지되어 있다(문헌[Liu et al.,

Biochemistry 43: 10896-10905(2004)]; 및 [Schulz et al., Appl Environ Microbiol 56:1-6(1990)]). 에스케리치아 콜라이에서 2가지 GABA 아미노전이효소는 *gabT*(Bartsch et al., J Bacteriol. 172:7035-7042(1990)) 및 *puuE*(Kurihara et al., J. Biol. Chem. 280:4602-4608(2005))에 의해 코딩된다. 무스 무스큘러스, 슈도모나스 플루오레센스, 및 수스 스크로파에서 GABA 아미노전이효소는 6-아미노카프로산을 비롯한 일정 범위의 다른 기질과 반응하는 것으로 제시되었다(문헌[Cooper, Methods Enzymol. 113:80-82(1985); 및 [Scott and Jakoby, J Biol. Chem. 234:932-936(1959)]).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gabT	16130576	NP_417148.1	에스케리치아 콜라이
puuE	16129263	NP_415818.1	에스케리치아 콜라이
abat	37202121	NP_766549.2	무스 무스큘러스
gabT	70733692	YP_257332.1	슈도모나스 플루오레센스
abat	47523600	NP_999428.1	서스 스크로파

[0788]

[0789] 3-옥소산을 트랜스아민화하는 효소는 3-옥소-7-아미노헵타노에이트를 3,7-디아미노헵타노에이트로(도 21, 단계 E), 3-옥소피멜레이트를 3-아미노피멜레이트로(도 21, 단계 J) 및 3-옥소-1-카복시헵타날을 3-아미노-7-옥소헵타노에이트로(도 21, 단계 AB) 전환시키기에 필요하다. 이러한 정확한 형질전환을 촉매화하는 효소는 아직까지 식별되지 않았다. 베타-알라닌/알파-케토글루타레이트 아미노전이효소(국제 특허출원 공개공보 제WO08027742호)는 말론산 세미알데히드, 3-옥소산을 형성하는 베타-알라닌과 반응한다. 사카로마이세스 클루이베리중의 *SkPYD4*의 유전자 생성물은 아미노 기 공여체로서 베타-알라닌을 우선적으로 사용하는 것으로 제시되었다(Andersen et al., FEBSJ. 274:1804-1817(2007)). *SkUGA1*은 사카로마이세스 세레비지아 GABA 아미노전이효소, *UGA1*의 상동체를 코딩하는 반면(Ramos et al., Eur.J.Biochem., 149:401-404(1985)), *SkPYD4*는 베타-알라닌 및 GABA 트랜스아민화 둘다에 관여된 효소를 코딩한다(Andersen and Hansen, Gene 124: 105-109(1993)). 3-아미노-2-메틸프로피오네이트 아미노전이효소는 메틸말로네이트 세미알데히드로부터 3-아미노-2-메틸프로피오네이트로의 형질전환을 촉매화한다. 이 효소는 래터스 노르베기커스 및 서스 스크로파에서 특징규명되고 *Abat*에 의해 코딩된다(Tamaki et al, Methods Enzymol, 324:376-389(2000)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
SkyPYD4	98626772	ABF58893.1	라찬세아 클루이베리
SkUGA1	98626792	ABF58894.1	라찬세아 클루이베리
UGA1	6321456	NP_011533.1	사카로마이세스 세레비지아
Abat	122065191	P50554.3	래터스 노르베기커스
Abat	120968	P80147.2	서스 스크로파

[0790]

[0791] 수 개의 아미노전이효소는 2-옥소산의 아미노 기를 트랜스아민화하여 아미노산을 형성한다. 이러한 효소는 2-옥소-7-아미노헵타노에이트를 호모라이신으로(도 22, 단계 D; 도 26, 단계 M), 2-아미노-7-옥소수바레이트를 2,7-디아미노수바레이트로(도 26, 단계 K) 트랜스아민화하기 위해 필요하다. 유망한 효소 후보는 몇몇 유기체에서 라이신 생합성 및 분해에 참여하는 효소인 알파-아미노아디페이트 아미노전이효소(EC 2.6.1.39)이다. 이러한 효소는 알파-케토글루타레이트를 아미노 수용체로서 사용하여 2-아미노아디페이트 및 2-옥소아디페이트를 상호전환시킨다. 유전자 후보는 호모 사피엔스(Okuno et al., Enzyme Protein 47:136-148(1993)) 및 써머스 써모필러스(Miyazaki et al., Microbiology 150:2327-2334(2004))에서 발견된다. *lysN*에 의해 코딩되는 써머스 써모필러스 효소는 옥살로아세테이트, 2-옥소이소카프로에이트, 2-옥소이소발러레이트, 및 2-옥소-3-메틸발러레이트를 비롯한 수 개의 다른 기질에 대해 활성이다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
lysN	31096548	BAC76939.1	써머스 써모필러스
AadAT-II	46395904	Q8N5Z0.2	호모 사피엔스

[0792]

[0793] 또 다른 후보는 옥살로아세테이트로부터 옥소 기를 글루타메이트로 천연적으로 전달하여 알파-케토글루타레이트 및 아스파테이트를 형성하는 아스파테이트 아미노전이효소이다. 아스파테이트 아미노전이효소 활성은, 예를 들면, 에스케리치아 콜라이로부터의 *aspC*(문헌[Yagi et al., FEBS Lett. 100:81-84(1979)]; 및 [Yagi et al., Methods Enzymol. 113:83-89(1985)]), 사카로마이세스 세레비지아로부터의 *AAT2*(Yagi et al., J Biochem. 92:35-43(1982)) 및 아라비돕시스 탈리아나로부터의 *ASP5*(문헌[de Ia et al., Plant J 46:414-425(2006)]; [Kwok et al., J Exp. Bot. 55:595-604(2004)] 및 [Wilkie et al., Proteins Expr. Purif. 12:381-

389(1998)])의 유전자 생성물에 의해 촉매화된다. 래터스 노르베기커스로부터의 효소는 다른 기질, 예컨대 2-아미노헥산디오산 및 2,4-디아미노부티르산을 트랜스아민화시키는 것으로 제시되었다(Recasens et al., Biochemistry 19:4583-4589(1980)). 다른 아미노산 기질에 대해 작용하는 아미노전이효소는 또한 이러한 형질 전환을 촉매화할 수 있다. 발린 아미노전이효소는 발린 및 피루베이트의 2-케토이소발러레이트 및 알라닌으로의 전환을 촉매화한다. 에스케리치아 콜라이 유전자, *avtA*는 이러한 하나의 효소를 코딩한다(Whalen et al., J. Bacteriol. 150:739-746(1982)). 이러한 유전자 생성물은 또한 α-케토부티레이트의 트랜스아민화를 촉매화하여 α-아미노부티레이트 생성하지만, 이러한 반응에서 아민 공여체는 식별되지 않았다(Whalen et al., J. Bacteriol. 158:571-574(1984)). 에스케리치아 콜라이 *serC*의 유전자 생성물은 2가지 반응, 즉 포스포세린 아미노전이효소 및 포스포하이드록시트레오닌 아미노전이효소를 촉매화하고(Lam, J. et al., Bacteriol. 172:6518-6528(1990)), 비-포스포릴화된 기질에 대한 활성은 검출될 수 없었다(Drewke et al., FEBS. Lett. 390: 179-182(1996)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
aspC	16128895	NP_415448.1	에스케리치아 콜라이
AAT2	1703040	P23542.3	사카로마이세스 세레비지아
ASP5	20532373	P46248.2	아라비돕시스 탈리아나
Got2	112987	P00507	래터스 노르베기커스
avtA	49176374	YP_026231.1	에스케리치아 콜라이
serC	16128874	NP_415427.1	에스케리치아 콜라이

[0794]

[0795] 2.7.2.a 인산전이효소(카복시 수용체) - EC 부류 2.7.2중의 인산전이효소는 하나의 ATP를 동시에 가수분해시키면서 카복실산을 포스폰상으로 형질전환시킨다. 도 21에서 단계 F, M 및 U는 3-옥소피멜레이트(단계 F), 3-아미노피멜레이트(단계 M) 및 2-아미노피멜레이트(단계 U)의 카복실기를 이들의 상응하는 포스폰산으로 활성화시키기 위해 인산전이효소를 필요로 한다. 부티레이트 키나아제(EC 2.7.2.7)는 부티릴-포스페이트의 부티레이트로의 가역성 전환을 클로스트리디엄 아세토부틸리컴에서 산 생성 동안 수행한다(Cary et al., Appl. Environ. Microbiol 56:1576-1583(1990)). 이러한 효소는 2가지 *buk* 유전자 생성물에 의해 코딩된다(Huang et al., J Mol. Microbiol Biotechnol 2:33-38(2000)). 다른 부티레이트 키나아제 효소는 클로스트리디엄 부티리컴 및 클로스트리디엄 테타노모폼에서 발견된다(Twarog et al., J Bacteriol. 86:112-117(1963)). 써모토가 마리티마로부터의 관련 효소 이소부티레이트 키나아제는 또한 에스케리치아 콜라이에서 발현되고 결정화되었다(문헌 [Diao et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59:1100-1102(2003)]; 및 [Diao and Hasson, J. Bacteriol. 191:2521-2529(2009)]). 아스파토키나아제는 아스파테이트의 ATP-의존성 인산화를 촉매화하고 수개의 아미노산 합성에 참여한다. *lysC*에 의해 코딩되는 에스케리치아 콜라이중의 아스파토키나아제 III 효소는 넓은 기질 범위를 갖고, 기질 특이성에 관여된 촉매 잔기는 밝혀졌다(Keng and Viola, Arch. Biochem. Biophys. 335:73-81(1996)). 에스케리치아 콜라이에서 2가지 추가적인 키나아제는 또한 우수한 후보이다: 아세테이트 키나아제 및 감마-글루타밀 키나아제. *ackA*에 의해 코딩되는 에스케리치아 콜라이 아세테이트 키나아제(Skarstedt and Silverstein, J. Biol. Chem. 251:6775-6783(1976))는 아세테이트에 더하여 프로피오네이트를 인산화시킨다(Hesslinger et al., Mol. Microbiol 27:477-492(1998)). *proB*에 의해 코딩되는 에스케리치아 콜라이 감마-글루타밀 키나아제(Smith et al., J. Bacteriol. 157:545-551(1984))는 글루타메이트의 감마 탄산기를 인산화시킨다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
buk1	15896326	NP_349675	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
buk2	20137415	Q97II1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
buk2	6685256	Q9X278.1	써모토가 마리티마
lysC	16131850	NP_418448.1	에스케리치아 콜라이
ackA	16130231	NP_416799.1	에스케리치아 콜라이
proB	16128228	NP_414777.1	에스케리치아 콜라이

[0796]

[0797] 2.8.3.a 조효소-A 전이효소- CoA 전이효소는 한 분자에서 또 다른 분자로의 CoA 잔기의 전달을 촉매화한다. 도 20 및 21에서의 수 개의 형질전환은 카복실산을 이들의 상응하는 아실-CoA 유도체로 활성화시키기 위해 CoA 전이효소를 필요로 한다(도 20, 단계 A 및 I; 도 21, 단계 H, J, V). 이들 형질전환을 촉매화하기 위한 후보 효소로는 클로스트리디엄 클루이베리의 *cat1*, *cat2*, 및 *cat3*의 유전자 생성물이 포함되고, 이는 각각 석시닐-CoA,

4-하이드록시부티릴-CoA, 및 부티릴-CoA 전이효소 활성을 나타내는 것으로 제시되었다(문헌[Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. 105:2128-2133(2008)]; 및 [Sohling et al., J Bacteriol. 178:871-880(1996)]). 유사한 CoA 전이효소 활성은 또한 트리코모나스 바기날리스(van Grinsven et al., J. Biol. Chem. 283: 1411-1418(2008)) 및 트리파노소마 브루세이(Riviere et al., J. Biol. Chem. 279:45337-45346(2004))에 존재한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
cat1	729048	P38946.1	클로스트리디엄 클루이베리
cat2	172046066	P38942.2	클로스트리디엄 클루이베리
cat3	146349050	EDK35586.1	클로스트리디엄 클루이베리
TVAG_395550	123975034	XP_001330176	트리코모나스 바기날리스 G3
Tb11.02.0290	71754875	XP_828352	트리파노소마 브루세이

[0798]

[0799] 혐기성 박테리아 아시드아미노코커스 페르멘탄스로부터의 글로타코닐-CoA-전이효소(EC 2.8.3.12)는 2,3-데하이드로아디필-CoA와 구조적으로 유사한 기질인 글루타코닐-CoA 및 3-부테노일-CoA와 반응한다(Mack et al., Eur. J. Biochem. 226:41-51(1994)). 이러한 효소를 코딩하는 유전자는 *gctA* 및 *gctB*이다. 이러한 효소는 글루타릴-CoA, 2-하이드록시글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 크로토닐-CoA 및 아크릴일-CoA를 비롯한 다른 CoA 유도체에 대해 감소되었지만 검출가능한 활성을 갖는다(Buckel et al., Eur. J Biochem. 118:315-321(1981)). 이 효소는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 발현되었다(Mack et al., Eur. J. Biochem. 226:41-51(1994)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gctA	559392	CAA57199.1	아시드아미노코커스 페르멘탄스
gctB	559393	CAA57200.1	아시드아미노코커스 페르멘탄스

[0800]

[0801] 아세틸-CoA를 CoA 공여체로 이용할 수 있는 CoA 전이효소는 에스케리치아 콜라이 *atoA*(알파 서브유닛) 및 *atoD*(베타 서브유닛) 유전자에 의해 코딩되는 아세토아세틸-CoA 전이효소이다(문헌[Korolev et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 58:2116-2121(2002)]; 및 [Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908(1968)]). 이러한 효소는 넓은 기질 범위를 갖고(Sramek and Frerman, Arch. Biochem. Biophys. 171: 14-26(1975)), 다양한 분지형 및 선형 아실-CoA 기질로부터의 아세테이트, 예컨대 이소부티레이트(Matthies and Schink, Appl Environ. Microbiol 58:1435-1439(1992)), 발러레이트(Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908(1968)) 및 부타노에이트(Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908(1968))에 CoA 잔기를 전달하는 것으로 제시되었다. 이러한 효소는 아세토아세테이트에 의해 전사 수준에서 유도되고, 따라서 이러한 효소를 일정 경로로 조작하기 위해 규제적 조절의 개질이 필수적일 수 있다(Pauli and Overath, Eur. J Biochem. 29:553-562(1972)). 유사한 효소가 코리네박테리엄 글루타미컴 ATCC 13032(Duncan et al., Appl. Environ. Microbiol 68:5186-5190(2002)), 클로스트리디엄 아세토부틸리컴(문헌[Cary et al., Appl. Environ. Microbiol 56:1576-1583(1990)]; 및 [Wiesenborn et al., Appl. Environ. Microbiol 55:323-329(1989)]), 및 클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴(Kosaka et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007))에 존재한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
atoA	2492994	P76459.1	에스케리치아 콜라이
atoD	2492990	P76458.1	에스케리치아 콜라이
actA	62391407	YP_226809.1	코리네박테리엄 글루타미컴
cg0592	62389399	YP_224801.1	코리네박테리엄 글루타미컴
ctfA	15004866	NP_149326.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
ctfB	15004867	NP_149327.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
ctfA	31075384	AAP42564.1	클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴
ctfB	31075385	AAP42565.1	클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴

[0802]

[0803] 3-옥소피멜로일-CoA의 3-옥소피멜레이트로의 탈아실화(도 21, 단계 B)는 3-옥소산-CoA 전이효소(EC 2.8.3.6)에 의해 촉매화된다. 베타-케토아디필-CoA 전이효소로도 공지된 석시닐-CoA:3-옥소산-CoA 전이효소는 슈도모나스 푸티다중의 *pcaI* 및 *pcaJ*에 의해 코딩된다(Kaschabek et al., J Bacteriol. 184:207-215(2002)). 상동성에 기초한 유사한 효소는 아시네토박터 종 ADP1(Kowalchuk et al., Gene 146:23-30(1994))에 존재한다. 추가의 예시적인 석시닐-CoA:3:옥소산-CoA 전이효소는 헬리코박터 필로리(Corthesy-Theulaz et al., J. Biol. Chem. 272:25659-25667(1997)) 및 바실러스 서브틸리스(Stols et al., Proteins. Expr. Purif. 53:396-403(2007))에

존재한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pcaI	24985644	AAN69545.1	슈도모나스 푸티다
pcaJ	26990657	NP_746082.1	슈도모나스 푸티다
pcaI	50084858	YP_046368.1	아시네토박터 종 ADP1
pcaJ	141776	AAC37147.1	아시네토박터 종 ADP1
pcaI	21224997	NP_630776.1	스트렙토마이세스 코엘리컬러
pcaJ	21224996	NP_630775.1	스트렙토마이세스 코엘리컬러
HPAG1_0676	108563101	YP_627417	헬리코박터 필로리
HPAG1_0677	108563102	YP_627418	헬리코박터 필로리
ScoA	16080950	NP_391778	바실러스 서브틸리스
ScoB	16080949	NP_391777	바실러스 서브틸리스

[0804]

[0805] 3.1.2.a CoA 가수분해효소 - 6-아미노피멜로일-CoA의 6-아미노피멜레이트로의 가수분해(도 20, 단계 I)는 3.1.2 계열중의 아실 CoA 가수분해효소에 의해 수행된다. 이러한 형질전환을 촉매화하는 효소는 아직까지 입증되지 않았다. 수 개의 진핵생물성 아세틸-CoA 가수분해효소(EC 3.1.2.1)는 광범위한 기질 특이성을 갖고, 따라서 6-아미노피멜레이트를 가수분해하기 위한 적합한 후보 효소를 나타낸다. 예를 들면, 래터스 노르베기커스 뇌로부터의 효소(Robinson et al., Res. Commun. 71:959-965(1976))는 부티릴-CoA, 헥사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응할 수 있다. 비록 이의 서열이 보고되지 않았지만, 콩잎의 미토콘드리아로부터의 효소는 또한 넓은 기질 특이성을 갖고, 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 팔미토일-CoA, 올레오일-CoA, 석시닐-CoA, 및 크로토닐-CoA에 대한 활성을 나타내었다(Zeiher et al., Plant. Physiol. 94:20-27(1990)). 사카로마이세스 세레비지아로부터의 아세틸-CoA 가수분해효소, *ACH1*은 또 다른 후보 가수분해효소를 나타낸다(Buu et al., J. Biol. Chem. 278: 17203-17209(2003)) .

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
acot12	18543355	NP_570103.1	래터스 노르베기커스
ACH1	6319456	NP_009538	사카로마이세스 세레비지아

[0806]

[0807] 또 다른 후보 가수분해효소는 글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 수베릴-CoA, 세바실-CoA, 및 도데칸디오일-CoA에 대한 활성을 나타내는 인간 디카복실산 티오에스테라아제, *acot8*(Westin et al, J Biol. Chem. 280:38125-38132(2005)), 및 또한 광범위한 CoA 티오에스테르를 가수분해할 수 있는 가장 근접한 에스케리치아 콜라이 상동체, *tesB*(Naggert et al., J Biol. Chem. 266:11044-11050(1991))이다. 유사한 효소는 또한 래트 간에서 특징규명되었다(Deana et al., Biochem. Int. 26:767-773(1992)). 다른 가능한 에스케리치아 콜라이 티오에스테르 가수분해효소는 *tesA*(Bonner et al., Chem. 247:3123-3133(1972)), *ybgC*(문헌[Kuznetsova et al., FEMS Microbiol Rev 29:263-279(2005)]; 및 [Zhuang et al., FEBS Lett. 516:161-163(2002)]), *paaI*(Song et al., J Biol. Chem. 281:11028-11038(2006)), 및 *ybdB*(Leduc et al., J Bacteriol. 189:7112-7126(2007))의 유전자 생성물을 포함한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
tesB	16128437	NP_414986	에스케리치아 콜라이
acot8	3191970	CAA15502	호모 사피엔스
acot8	51036669	NP_570112	래터스 노르베기커스
teas	16128478	NP_415027	에스케리치아 콜라이
ybgC	16128711	NP_415264	에스케리치아 콜라이
paaI	16129357	NP_415914	에스케리치아 콜라이
ybdB	16128580	NP_415129	에스케리치아 콜라이

[0808]

[0809] 또 다른 후보 가수분해효소는 아시드아미노코커스 페르멘탄스로부터의 글루타코네이트 CoA-전이효소이다. 이러한 효소는 부위-지향된 돌연변이생성에 의해 글루타릴-CoA, 아세틸-CoA 및 3-부테노일-CoA에 대한 활성을 갖는 아실-CoA 가수분해효소로 형질전환된다(Mack et al., FEBS. Lett. 405:209-212(1997)). 이로부터, 석시닐-CoA:3-케토산-CoA 전이효소 및 아세토아세틸-CoA:아세틸-CoA 전이효소를 코딩하는 효소는 이러한 반응 단계를 위한 후보로 작용하지만, 이들의 기능을 변화시키기 위해 특정 돌연변이가 필요할 수 있음이 제안된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
gctA	559392	CAA57199	아시드아미노코커스 페르멘탄스
gctB	559393	CAA57200	아시드아미노코커스 페르멘탄스

[0810]

[0811] 4.1.1.a 카복시-리아제 - 호모라이신의 HMDA로의(도 20, 단계 H; 도 21, 단계 S; 도 22, 단계 E; 도 26, 단계 H), 2-아미노피멜레이트의 6-ACA로의(도 20, 단계 J, 도 21, 단계 AA 및 도 26, 단계 E), 2,7-디아미노수바레이트의 호모라이신으로의(도 26, 단계 L), 2-아미노-7-옥소헵타노에이트의 6-아미노헥사날로의(도 26, 단계 B; 도 22, 단계 F) 및 2-아미노-7-옥소수바레이트의 2-옥소-7-아미노헵타노에이트로의(도 26, 단계 I) 탈카복실화 반응은 아미노산 데카복실라아제 효소에 의해 촉매화된다. 라이신 데카복실라아제(EC 4.1.1.18)는 유사한 형질 전환, 즉 라이신의 탈카복실화를 촉매화하여 카다베린을 형성한다. 이러한 효소의 2가지 동질 효소는 유전자 *cadA* 및 *ldcC*에 의해 에스케리치아 콜라이 게놈에서 코딩된다. *cadA*는 산 저항성에 관여되고, *cadC* 유전자 생성물에 의한 포지티브 조절을 받는다 (Lemonnier et al., Microbiology 144(Pt 3):751-760(1998)). *cadC*는 하이드록시라이신 및 S-아미노에틸시스테인을 대안의 기질로서 수용하지만, 2-아미노피멜레이트 및 6-ACA는 이러한 효소에 경쟁 저해제로서 작용한다(Sabo et al., Biochemistry 13:662-670(1974)). 방향 진화 또는 다른 효소 조작 방법은 이러한 효소가 2-아미노피멜레이트를 탈카복실화하기 위해 요구될 수 있다. 구조적으로 발현된 *ldc* 유전자 생성물은 *CadA*에 비해 덜 활성적이다(Lemonnier et al., Microbiology 144(Pt 3):751-760(1998)). *CadA*에 유사한 라이신 데카복실라아제는 최근에 비브리오 파라헤모라이티커스에서 식별되었다(Tanaka, et al., J Appl Microbiol 104: 1283-1293(2008)). *ldc*에 의해 코딩되는 셀레노모나스 루미난튬으로부터의 라이신 데카복실라아제는 진핵생물 오르니틴 데카복실라아제에 서열 유사성을 갖고, L-라이신 및 L-오르니틴 둘다를 기질로서 수용한다(Takatsuka et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 63: 1843-1846(1999)). 활성 부위 잔기가 식별되었고 효소의 기질 특이성을 변경시키기 위해 조작되었다(Takatsuka et al., J Bacteriol. 182:6732-6741(2000)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
cadA	145458	AAA23536.1	에스케리치아 콜라이
ldcC	1786384	AAC73297.1	에스케리치아 콜라이
ldc	13124043	O50657.1	셀레노모나스 루미난튬
cadA	44886078	AB124819.1	비브리오 파라헤모라이티커스

[0812]

[0813] 수 개의 오르니틴 데카복실라아제 효소(EC 4.1.1.17)가 라이신 및 다른 유사한 화합물에 대해 활성을 나타낸다. 이러한 효소는 니코티아나 글루티노사(Lee et al., Biochem. J 360:657-665(2001)), 락토바실러스 종 30a(Guirard et al., J Biol. Chem. 255:5960-5964 (1980)) 및 비브리오 불니피커스(Lee et al, J Biol. Chem. 282:27115-27125(2007))에서 발견된다. 락토바실러스 종 30a(Momany et al., J Mol. Biol. 252:643-655(1995)) 및 비브리오 불니피커스로부터의 효소는 결정화되었다. 비브리오 불니피커스 효소는 라이신 탈카복실화를 효과적으로 촉매화하고 기질 특이성이 관여된 잔기는 밝혀졌다(Lee et al., J Biol. Chem. 282:27115-27125(2007)). 유사한 효소가 트리코모나스 바기날리스에서 특징규명되었지만, 이 효소를 코딩하는 유전자는 공지되어 있지 않다(Yarlett et al., Biochem. J 293(Pt 2):487-493(1993)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
AF323910.1:1..1299	12007488	AAG45222.1	니코티아나 글루티노사
odc1	1169251	P43099.2	락토바실러스 종 30a
VV2_1235	27367615	NP_763142.1	비브리오 불니피커스

[0814]

[0815] 케토-산 데카복실라아제 효소는 2-옥소-7-아미노헵타노에이트를 6-아미노헥사날로 전환(도 22의 단계 F; 도 26의 단계 G)시키고 2-아미노-7-옥소수바레이트를 2-아미노-7-옥소헵타노에이트로 전환(도 26의 단계 A)시키는데 필요하다. 케토산의 탈카복실화는 피루베이트 데카복실라아제(EC 4.1.1.1), 벤조일포메이트 데카복실라아제(EC 4.1.1.7), 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제 및 분지쇄 알파-케토산 데카복실라아제를 비롯한 다양한 기질 특이성을 갖는 다양한 효소로 촉매화된다. 케토-산 데카복실라아제로도 지칭되는 피루베이트 데카복실라아제(PDC)는 알코올성 발효에서 핵심 효소로서, 피루베이트의 아세트알데히드로의 탈카복실화를 촉매화한다. 사카로마이세스 세레비지아로부터의 효소는 2-케토부티레이트, 2-케토발러레이트, 3-하이드록시피루베이트 및 2-페닐피루베이트를 비롯한 지방족 2-케토산에 대해 넓은 기질 범위를 갖는다(Henning et al., Appl. Environ. Microbiol. 72:7510-7517(2006)). 이러한 효소는 널리 연구되고, 변경된 활성을 위해 조작되고, 에스케리치아

콜라이에서 작용적으로 발현되었다(문헌[Killenberg-Jabs et al., Eur. J. Biochem. 268:1698-1704(2001)]; [Li, H. and F. Jordan, Biochemistry. 38:10004-10012(1999)]; 및 [ter Schure et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:1303-1307(1998)]). *pdc*에 의해 코딩되는 자이모나스 모빌러스로부터의 PDC는 또한 넓은 기질 범위를 갖고, 상이한 기질에 대한 친화도를 변경하기 위한 방향 조작 연구의 대상이었다(Siegert et al., Protein Eng Des SeI 18:345-357(2005)). 이러한 효소의 결정 구조는 이용가능하다(Killenberg-Jabs et al., Eur. J. Biochem. 268:1698-1704(2001)). 다른 잘 특징규명된 PDC 후보로는 아세토박터 파스퇴리안스(Chandra et al., Arch. Microbiol. 176:443-451(2001)) 및 클루이베로마이세스 락티스(Krieger et al., Eur. J. Biochem. 269:3256-3263(2002))로부터의 효소가 포함된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pdc	118391	P06672.1	자이모모나스 모빌리스
pdc1	30923172	P06169	사카로마이세스 세레비지아
pdc	20385191	AM21208	아세토박터 파스퇴리안스
pdc1	52788279	Q12629	클루이베로마이세스 락티스

[0816]

[0817] PDC와 유사하게, 벤조일포메이트 데카복실라아제(EC 4.1.1.7)는 넓은 기질 범위를 갖고, 효소 조작 연구의 표적이었다. 슈도모나스 푸티다로부터의 효소는 널리 연구되었고, 이러한 효소의 결정 구조는 이용가능하다(문헌[Hasson et al., Biochemistry 37:9918-9930(1998)]; 및 [Polovnikova et al., Biochemistry 42:1820-1830(2003)]). 슈도모나스 푸티다 효소의 활성 부위에서 2개 잔기의 부위-지향된 돌연변이생성은 천연 및 비-천연 기질의 친화도(Km)를 변경시켰다(Siegert et al., Protein Eng Des SeI 18:345-357(2005)). 이러한 효소의 특성은 추가로 방향 조작에 의해 개질되었다(문헌[Lingen et al., Protein Eng 15:585-593(2002)]; 및 [Lingen et al., Chembiochem. 4:721-726(2003)]). *mdlC*에 의해 코딩되는 슈도모나스 아에루기노사로부터의 효소는 실험적으로 특징규명되었다(Barrowman et al., FEMS Microbiology Letters 34:57-60(1986)). 슈도모나스 스투체리, 슈도모나스 플루오레센스 및 다른 유기체로부터의 추가적인 유전자 후보는 서열 상동성에 의해 추론되거나 슈도모나스 푸티다에서 개발된 성장 선택 시스템을 사용하여 식별되었다(Henning et al., Appl. Environ. Microbiol. 72:7510-7517(2006)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
mdlC	3915757	P20906.2	슈도모나스 푸티다
mdlC	81539678	Q9HUR2.1	슈도모나스 아에루기노사
dpgB	126202187	ABN80423.1	슈도모나스 스투체리
ilvB-1	70730840	YP_260581.1	슈도모나스 플루오레센스

[0818]

[0819] 2-옥살산을 탈카복실화할 수 있는 제3의 효소는 알파-케토글루타레이트 데카복실라아제(KGD)이다. 이러한 부류의 효소의 기질 범위는 아직까지 연구되지 않았다. 마이코박테리엄 투베르큘로시스로부터의 KDC(Tian et al., Proc Natl Acad Sci U S. 102:10670-10675(2005))는 클로닝되었고, 게노마티카에서 다른 내부 돌출부에서 작용적으로 발현되었다. 그러나, 이는 크고(약 130 kD) GC가 풍부하므로 균주 조작을 위한 이상적인 후보가 아니다. KDC 효소 활성은 브라디리조븀 자포니컴 및 메소리조븀 로티를 비롯한 수 종의 근류균에서 검출되었다(Green et al., J. Bacteriol. 182:2838-2844(2000)). KDC-코딩 유전자가 이들 유기체에서 단리되지 않았지만, 게놈 서열은 이용가능하고, 각각의 게놈에서 몇몇 유전자는 추정적 KDC로서 해석된다. 유글레나 그라실리스로부터의 KDC는 또한 특징규명되었지만, 이러한 활성과 연관된 유전자는 아직까지 식별되지 않았다(Shigeoka and Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28(1991)). N-말단으로부터 출발한 제1의 20개 아미노산은 다음과 같이 서열화되었다: MTYKAPVKDVKFLLDKVFKV(서열 번호:)(Shigeoka and Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28(1991)). 유전자는 KDC 활성을 위한 N-말단 서열을 포함하는 후보 유전자를 시험함으로써 식별될 수 있다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
kgd	160395583	O50463.4	마이코박테리엄 투베르큘로시스
kgd	27375563	NP_767092.1	브라디리조븀 자포니컴
kgd	13473636	NP_105204.1	메소리조븀 로티

[0820]

[0821] 이 단계를 촉매화하기 위한 제4 후보 효소는 분지형 알파-케토산 데카복실라아제(BCKA)이다. 이러한 부류의 효소는 탄소수 3 내지 6의 쇄 길이로 다양한 화합물에 작용하는 것으로 제시되었다(문헌[Oku and Kaneda, J Biol Chem. 263:18386-18396(1988)]; 및 [Smit et al., Appl Environ Microbiol. 71:303-311(2005)]). 락토코커스

락티스에서 효소는 2-옥소부타노에이트, 2-옥소헥사노에이트, 2-옥소펜타노에이트, 3-메틸-2-옥소부타노에이트, 4-메틸-2-옥소부타노에이트 및 이소카프로에이트를 비롯한 다양한 분지형 및 선형 기질에 대해 특징규명되었다(Smit et al., Appl Environ Microbiol. 71:303-311(2005)). 이 효소는 구조적으로 특징규명되었다(Berg et al., Science. 318:1782-1786(2007)). 락토코커스 락티스 효소 및 자이모모나스 모빌러스의 피루베이트 데카복실라아제 사이의 서열 정렬로부터, 촉매 및 기질 인식 잔기가 거의 동일함을 알 수 있고(Siegert et al., Protein Eng Des SeI 18:345-357(2005)), 따라서 이 효소는 방향 조작을 위한 유망한 후보일 수 있다. 알파-케토글루타레이트의 BCKA에 의한 탈카복실화는 바실러스 서브틸리스에서 검출되었지만; 이러한 활성은 다른 분지형 기질에 대한 활성에 비해 낮았고(5%)(Oku and Kaneda, J Biol Chem. 263: 18386-18396(1988)) 이 효소를 코딩하는 유전자는 아직까지 식별되지 않았다. 추가적인 BCKA 유전자 후보는 락토코커스 락티스 단백질 서열에 대한 상동성으로 식별될 수 있다. 이 효소에 대한 많은 높은 스코어의 BLASTp는 인돌피루베이트 데카복실라아제(EC 4.1.1.74)로 해석된다. 인돌피루베이트 데카복실라아제(IPDA)는 식물 및 식물 박테리아에서 인돌 피루베이트의 인돌아세트알데히드로의 탈카복실화를 촉매화하는 효소이다.

[0822]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
kdcA	44921617	AAS49166.1	락토코커스 락티스

[0823] 호모 사피엔스 및 보스 타우러스로부터의 미토콘드리아 분지형 케토산 탈수소효소 착체의 E1 서브유닛으로부터 유도된 재조합 분지형 알파-케토산 데카복실라아제 효소는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 작용적으로 발현되었다(문헌[Davie et al., J. Biol. Chem. 267:16601-16606(1992)]; [Wynn et al., J. Biol. Chem. 267:1881-1887(1992)]; 및 [Wynn et al., J. Biol. Chem. 267:12400-12403(1992)]). 이들 연구에서, 샤페로닌 GroEL 및 GroES의 동시발현이 데카복실라아제의 특이적 활성을 500배 증가시킴을 발견하였다(Wynn et al., J. Biol. Chem. 267:12400-12403(1992)). 이들 효소는 2개의 알파 서브유닛 및 2개의 베타 서브유닛으로 구성된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
BCKDHB	34101272	NP_898871.1	호모 사피엔스
BCKDHA	11386135	NP_000700.1	호모 사피엔스
BCKDHB	115502434	P21839	보스 타우러스
BCKDHA	129030	P11178	보스 타우러스

[0824]

[0825] 4.1.2.a 피루베이트의 4-아미노부타날(도 22, 단계 A) 또는 글루타메이트-5-세미알데히드(도 27, 단계 A)와의 축합은 EC 부류 4.1.2중의 알데히드 리아제에 의해 촉매화된다. 다양한 알데히드 리아제 효소는 피루베이트를 수용체로서 이용하지만; 4-아미노부타날 또는 글루타메이트-5-세미알데히드를 공여체로서 이용함은 입증되지 않았다. 효소 4-하이드록시-2-옥소피멜레이트(HODH) 알돌라아제(EC 4.1.2.-)는 석신산 세미알데히드 및 피루베이트를 축합하여 4-하이드록시-2-옥소피멜레이트의 형성을 촉매화한다. 이러한 효소는 2가 금속 이온-의존성 부류 II 알돌라아제로서, 에스케리치아 콜라이 C, 에스케리치아 콜라이 W, 및 다른 유기체에서 4-하이드록시페닐아세트산 분해의 최종 단계를 촉매화한다. 고유적으로, 효소는 분해 방향으로 작용한다. 역(축합) 반응은 열역학적으로 바람직하지 않지만; 평형은 반응 생성물에 대해 효과적으로 작용하는 다운스트림 경로 효소와 HOHD 알돌라아제의 커플링을 통해 전이될 수 있다. 이러한 전략은 축합 반응에서 다른 알돌라아제의 평형을 전이시키기 위해 효과적이다(문헌[Nagata et al., Appl Microbiol Biotechnol 44:432-438(1995)]; 및 [Pollard et al., Appl Environ. Microbiol 64:4093-4094(1998))]. *hpcH*에 의해 코딩되는 에스케리치아 콜라이 C 효소는 광범위하게 연구되고 최근에 결정화되었다(문헌[Rea et al., J Mol. Biol. 373:866-876(2007)]; 및 [Stringfellow et al., Gene 166:73-76(1995)]). 에스케리치아 콜라이 W 효소는 *hpaI*에 의해 코딩된다(Prieto et al., J. Bacteriol. 178:111-120(1996)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hpcH	633197	CAA87759.1	에스케리치아 콜라이 C
hpaI	38112625	AAR11360.1	에스케리치아 콜라이 W

[0826]

[0827] 또 다른 피루베이트-이용 알데히드 리아제는 2-데하이드로-3-데옥시글루카레이트 알돌라아제(DDGA, EC 4.1.2.20), 즉 에스케리치아 콜라이에서 D-글루카레이트/갈락타레이트 이용을 위한 이화 경로에 참여하는 유형 II 알돌라아제이다. 이러한 효소의 천연 공여체는 타르트로네이트 세미알데히드이지만, 이러한 효소는 넓은 기

질 특이성을 갖고, 광범위한 알데히드를 피루베이트와 가역적으로 축합시키는 것으로 제시되었다(Fish et al., Methods Enzymol. 9:529-534(1966)). 이러한 효소의 결정 구조는 측정되었고, 촉매 기작이 제안되었다(Izard et al., EMBO J 19:3849-3856(2000)). 추가적인 후보 DDGA 효소는 렙토스피라 인테로간스(118) 및 설폴로버스 솔파타리쿠스에서 발견된다(Buchanan et al., Biochem. J 343 Pt 3:563-570(1999)). 설폴로버스 솔파타리쿠스 효소는 매우 열에 안정하고 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 발현되었다(Buchanan et al., Biochem. J 343 Pt 3:563-570(1999)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
garL	1176153	P23522.2	에스케리치아 콜라이
LA_1624	24195249	AAN48823.1	렙토스피라 인테로간스
AJ224174.1:1..885	2879782	CAA11866.1	설폴로버스 솔파타리쿠스

[0828]

[0829] 4.2.1.a 하이드로-리아제 - 도 20 및 22에서 2가지 반응은 데하이드라타아제 부류(EC 4.1.2)중의 효소를 이용한다. 3-하이드록시-6-아미노피멜로일-CoA의 탈수(도 20, 단계 D)는 에노일-CoA 수화효소에 의해 촉매화된다. 이러한 반응은 천연적으로 발생되는 것으로 공지되어 있지 않지만; 3-하이드록시아실-CoA 유도체를 탈수하는 능력은 알려져 있다. 에노일-CoA 수화효소(EC 4.2.1.17)는 일정 범위의 3-하이드록시아실-CoA 기질을 탈수한다(문헌[Agnihotri et al., Bioorg. Med. Chem. 11:9-20(2003)]; [Conrad et al., J Bacteriol. 118:103-111(1974)] 및 [Roberts et al., Arch. Microbiol 117:99-108(1978)]). *ech*에 의해 코딩된 슈도모나스 푸티다의 에노일-CoA 수화효소는, 3-하이드록시부티릴-CoA의 크로토닐-CoA로의 전환을 촉매화한다(Roberts et al., Arch. Microbiol 117:99-108(1978)). 추가적인 에노일-CoA 수화효소 후보는 슈도모나스 푸티다의 *phaA* 및 *phaB*, 및 슈도모나스 플루오레센스의 *paaA* 및 *paaB*이다(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. 95:6419-6424(1998)). 로도슈도모나스 팔루스트리스에서 *pimF*의 유전자 생성물은 피멜로일-CoA 분해에 참여하는 에노일-CoA 수화효소를 코딩할 것으로 예측된다(Harrison et al., Microbiology 151:727-736(2005)). 마지막으로, *maoC*(Park et al., J Bacteriol. 185:5391-5397. 2003), *paaF*(문헌[Ismail et al., Eur. J Biochem. 270:3047-3054(2003)]; [Park et al., Appl. Biochem. Biotechnol 113-116:335-346(2004)] 및 [Park et al., Biotechnol Bioeng 86:681-686(2004)]) 및 *paaG*(Park et al., J Bacteriol. 185:5391-5397. 2003), *paaF*(문헌[Ismail et al., Eur. J Biochem. 270:3047-3054(2003)]; [Park et al., Appl. Biochem. Biotechnol 113-116:335-346(2004)] 및 [Park et al., Biotechnol Bioeng 86:681-686(2004)])를 포함하는 일정 수의 에스케리치아 콜라이 유전자는 에노일-CoA 수화효소 작용성을 나타내는 것으로 제시되었다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
ech	26990073	NP_745498.1	슈도모나스 푸티다
paaA	26990002	NP_745427.1	슈도모나스 푸티다
paaB	26990001	NP_745426.1	슈도모나스 푸티다
phaA	106636093	ABF82233.1	슈도모나스 플루오레센스
phaB	106636094	ABF82234.1	슈도모나스 플루오레센스
pimF	39650635	CAE29158	로도슈도모나스 팔루스트리스
maoC	16129348	NP_415905.1	에스케리치아 콜라이
paaF	16129354	NP_415911.1	에스케리치아 콜라이
paaG	16129355	NP_415912.1	에스케리치아 콜라이

[0830]

[0831] 크로토나아제로도 지칭되는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타아제(EC 4.2.1.55)는 3-하이드록시이소부티릴-CoA를 탈수시켜 크로토닐-CoA를 형성하는 에노일-CoA 수화효소이다. 크로토나아제 효소는 일부 유기체, 특별히 클로스트리디아 종에서 n-부탄올을 형성하기 위해 필요하고, 또한 3-하이드록시프로피오네이트/4-하이드록시부티레이트 사이클의 하나의 단계를 설폴로버스, 아시디아너스, 및 메탈로스파에라 속의 호열호산성 고세균에서 포함한다. 크로토나아제 효소를 코딩하는 예시적인 유전자는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴(문헌[Atsumi et al., Metab Eng. 10:305-311(2008)]; 및 [Boynton et al., J Bacteriol. 178:3015-3024(1996)]), 클로스트리디엄 클루이베리(Hillmer et al., FEBS Lett. 21:351-354(1972)), 및 메탈로스파에라 세듈라(Berg et al., Science. 318: 1782-1786(2007))에서 발견될 수 있지만, 후자의 유전자의 서열은 공지되어 있지 않다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
crt	15895969	NP_349318.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
crt1	153953091	YP_001393856.1	클로스트리디엄 클루이베리

[0832]

[0833] 다르게는, fadA 및 fadB의 에스케리치아 콜라이 유전자 생성물은 에노일-CoA 수화효소 활성을 나타내는 지방산 산화에 관여된 다중효소 착체를 코딩한다(문헌[Nakahigashi and Inokuchi, Nucleic acids Res. 18:4937(1990)]; [Yang, J. Bacteriol. 173:7405-7406(1991)]; 및 [Yang et al., Biochemistry 30:6788-6795(1991)]). *fadR*에 의해 코딩되는 네가티브 조절자를 넉아웃하여 *fadB* 유전자 생성물을 활성화시킬 수 있다(Sato et al., J Biosci. Bioeng 103:38-44 (2007)). *fadI* 및 *fadJ* 유전자는 유사한 작용을 코딩하고 혐기성 조건하에 천연적으로 발현된다(Campbell et al., Mol. Microbiol 47:793-805(2003)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
fadA	49176430	YP_026272.1	에스케리치아 콜라이
fadB	16131692	NP_418288.1	에스케리치아 콜라이
fadI	16130275	NP_416844.1	에스케리치아 콜라이
fadJ	16130274	NP_416843.1	에스케리치아 콜라이
fadR	16129150	NP_415705.1	에스케리치아 콜라이

[0834]

[0835] 2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트는 2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트의 탈수로부터 형성된다(도 22, 단계 B). 2-아미노-5-하이드록시-7-옥소수바레이트의 2-아미노-5-엔-7-옥소수바레이트로의 탈수(도 27, 단계 B)는 유사한 형질전환이다. 이들 정확한 반응을 촉매화하는 효소는 천연적으로 발생되는 것으로 공지되어 있지 않다. 유사한 반응을 촉매화하는 후보 효소는 OHED 수화효소이고, 이는 2-옥소-4-하이드록시-헵타-1,7-디오에이트(HODH)를 2-옥소-헵트-4-엔-1,7-디오에이트(OHED)로 천연적으로 탈수시킨다. HODH는 원하는 기질에 구조적으로 유사하다. 이러한 효소는 마그네슘을 보조인자로 필요로 한다(Burks et al., J. Am. Chem. Soc. 120(1998)). OHED 수화효소 후보는 에스케리치아 콜라이 C(문헌[Izumi et al., J Mol. Biol. 370:899-911(2007)]; 및 [Roper et al., Gene 156:47-51(1995)]) 및 에스케리치아 콜라이 W(Prieto et al., J. Bacteriol. 178:111-120(1996))에서 식별되고 특징규명되었다. 서열 비교는 박테리아, 식물 및 동물의 범위에서 상동체를 밝혀낸다. 높은 유사 서열을 갖는 효소는 무엇보다도 클레브시엘라 뉴모니아(91% 동일성, 평가 = 2e-138) 및 살모넬라 엔테리카(91% 동일성, 평가 = 4e-138)에 포함된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
hpcG	556840	CAA57202.1	에스케리치아 콜라이 C
hpaH	757830	CAA86044.1	에스케리치아 콜라이 W
hpaH	150958100	ABR80130.1	클레브시엘라 뉴모니아
Sari_01896	160865156	ABX21779.1	살모넬라 엔테리카

[0836]

[0837] 이러한 반응을 촉매화하는 다른 효소 후보는 푸마레이트 수화효소(EC 4.2.1.2)로도 공지된 푸마라아제이다. 에스케리치아 콜라이는 성장 조건에 의해 조절되는 3가지 푸마라아제: FumA, FumB, 및 FumC를 갖는다. FumB는 산소 민감성이고 혐기성 조건하에서만 활성이다. FumA는 미세혐기성 조건하에 활성이고, FumC는 호기성 성장에서만 활성인 효소이다(문헌[Guest et al., J Gen Microbiol. 131:2971-2984(1985)]; [Tseng et al., J Bacteriol 183:461-467(2001)] 및 [Woods et al., Biochim Biophys Acta 954:14-26(1988)]). FumC는 타트레이트 및 트레오-하이드록시아스파테이트를 비롯한 다른 기질을 탈수시키는 것으로 제시되었다(Teipel et al., J Biol. Chem. 243:5684-5694(1968)). 많은 구조적 정보가 FumC에 대해 이용가능하고, 연구자들은 효소를 성공적으로 조작하여 활성, 저해 및 편재화를 변경하였다(Weaver et al., D Biol Crystallogr. 61:1395-1401(2005)). 추가적인 푸마레이트 수화효소는 에스케리치아 콜라이(문헌[Estevez et al., Protein Sci 11:1552-1557(2002)]; [Hong,et al., Biotechnol. Bioprocess Eng. 9:252-255(2005)]; 및 [Rose et al., Proc Natl Acad Sci U S. 101:3393-3397(2004)]), 코리네박테리엄 글루타미컴(Genda et al., Biotechnol Biochem. 70:1102-1109(2006)), 캄필로박터 제주니(Smith et al., Cell Biol 31:961-975(1999)), 써머스 써모필러스(Mizobata et al., Arch. Biochem. Biophys. 355:49-55(1998)), 및 래터스 노르베기커스(Kobayashi et al, J Biochem. 89:1923-1931(1981))에서 발견된다. 퓔로토마큘럼 써모프로피오니컴로부터의 *MmcBC* 푸마라아제는 2개의 서브유닛을 갖는 푸마라아제의 또 다른 유형이다(Shimoyama et al., FEMS Microbiol Lett 270:207-213(2007)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
fumA	81175318	P0AC33	에스케리치아 콜라이 K12
fumB	33112655	P14407	에스케리치아 콜라이 K12
fumC	120601	P05042.1	에스케리치아 콜라이 K12
fumC	39931596	Q8NRN8.1	코리네박테리엄 글루타미컴
fumC	9789756	O69294.1	캄필로박터 제주니
fumC	75427690	P84127	써머스 써모필러스
fumH	120605	P14408.1	래터스 노르베기커스
MmcB	147677691	YP_001211906	펠로토마큘럼 써모프로피오니컴
MmcC	147677692	YP_001211907	펠로토마큘럼 써모프로피오니컴

[0838]

[0839] 또 다른 효소 후보는 2-메틸말레이트를 메사코네이트로 천연적으로 탈수시키는 시트라말레이트 가수분해효소(EC 4.2.1.34)이다. 이러한 효소는 2-옥소부타노에이트로의 피루베이트 경로에 있어서 메타노칼도코커스 자나쉬에서 연구되었고, 이는 넓은 기질 특이성을 갖는 것으로 제시되었다(Drevland et al., J Bacteriol. 189:4391-4400(2007)). 이러한 효소 활성은 또한 클로스트리디엄 테타노모폼, 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 시트로박터 아말로나티커스(*Citrobacter amalonaticus*)에서 검출되었고, 여기서 이는 글루타메이트 분해에 참여하는 것으로 생각된다(Kato et al., Arch. Microbiol 168:457-463 1997)). 메타노칼도코커스 자나쉬 단백질 서열은 이들 유기체에서 유전자에 대해 유의한 상동성을 갖지 않는다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
leuD	3122345	Q58673.1	메타노칼도코커스 자나쉬

[0840]

[0841] 5.4.3.a 아미노뮤타아제 - 도 21에서 수 개의 반응은 3-위치에서 2-위치로의 2차 아민의 전이를 포함한다(도 21, 단계 P, R, T). 이러한 형질전환을 촉매화하는 유망한 효소 후보는 라이신을 (3S)-3,6-디아미노헥사노에이트로 천연적으로 전환시키는 효소인 라이신 2,3-아미노뮤타아제(EC 5.4.3.2)이고, 아민 기를 2-위치에서 3-위치로 가역적으로 전이시킨다. 이 효소는 라이신을 아세테이트 및 부티레이트로 발효시키는 박테리아, 예컨대 푸소박테리엄 누클레아텀(*kamA*)(Barker et al., J. Bacteriol. 152:201-207(1982)) 및 클로스트리디엄 서브터미날레(*kamA*)(Chirpich et al., J. Biol. Chem. 245:1778-1789(1970))에서 발견된다. 클로스트리디엄 서브터미날레로부터의 효소는 결정화되었다(117). 이러한 작용을 코딩하는 효소는 또한 바실러스 서브틸리스에서 *yodO*에 의해 코딩된다(Chen et al., Biochem. J. 348 Pt 3:539-549(2000)). 이 효소는 보조 인자로서 피리독살 5'-포스페이트를 이용하고, S-아데노실메티오닌에 의한 활성화를 필요로 하며, L-라이신에 대해 입체선택적이다. 효소는 다른 기질과는 반응하는 것으로 제시되지 않았고, 따라서 방향 진화 또는 다른 조작 방법이 비-천연 기질, 3-아미노-7-옥소헥사노에이트, 3,7-디아미노헵타노에이트 및 3-아미노피멜레이트와 반응하기 위한 상기 효소를 위해 요구될 수 있다. 예를 들면, 카르길(Cargill)은 L-알라닌을 β-알라닌으로 전환시키는 라이신-2,3-아미노뮤타아제로부터 유도된 신규한 2,3-아미노뮤타아제 효소를 개발하였다(리아오(Liao) 등의 미국 특허 공고공보 제20050221466호(2005)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
kamA	75423266	Q9XBQ8.1	클로스트리디엄 서브터미날레
kamA	81485301	Q8RHX4	푸소박테리엄 누클레아텀
yodO	4033499	O34676.1	바실러스 서브틸리스

[0842]

[0843] 2,3-아미노뮤타아제 활성을 갖는 다른 효소로는 티로신 2,3-아미노뮤타아제(EC 5.4.3.6) 및 로이신 2,3-아미노뮤타아제(EC 5.4.3.7)가 포함된다. 티로신 2,3-아미노뮤타아제는 티로신 생합성에 참여하여, 아민을 2-위치에서 3-위치로 전이시킴으로써 티로신을 3-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-프로피오네이트로 가역적으로 전환시킨다. 스트렙토마이세스 글로비스포러스(*Streptomyces globisporus*)에서, 이 효소는 티로신 유도체와 반응하는 것으로 제시되었지만(Christenson et al., Biochemistry 42:12708-12718(2003)); 이러한 효소의 서열은 아직 이용가능하지 않다. 로이신 2,3-아미노뮤타아제는 로이신 생합성 및 분해 동안 L-로이신을 베타-로이신으로 전환시킨다. 로이신 2,3-아미노뮤타아제-특이적 검정은 많은 유기체에서 효소 활성을 검출하였지만(Poston et al., Methods Enzymol. 166:130-135(1988)), 이 효소를 코딩하는 유전자는 아직까지 식별되지 않았다.

[0844] 6.2.1.a 산-티올 리가아제 - 카복실산의 아실-CoA 유도체로의 활성화는 EC 부류 6.2.1중의 CoA 산-티올 리가아제 또는 CoA 합성효소에 의해 촉매화된다(리가아제, 합성효소, 및 신타아제라는 용어는 본원에 상호교환적으로

사용되고 동일한 효소 부류를 지칭함). 이러한 효소는 티오에스테르 결합 형성의 에너지 비용을 ATP의 ADP 또는 AMP로의 가수분해에 결부시킨다. 수 개의 ADP-형성 CoA 리가아제는 역 방향으로 반응하여 CoA 잔기를 아실-CoA 분자로부터 제거하고, 동시에 ATP를 형성하는 것으로 입증되었다. 가역성 CoA 리가아제는 6-아미노피멜로일-CoA(도 20, 단계 I) 및 3-옥소피멜로일-CoA(도 21, 단계 B)를 탈아실화하기 위해 필요한 반면, AMP 또는 ADP 형성 리가아제는 3-옥소피멜레이트(도 21, 단계 H), 3-아미노피멜레이트(도 21, 단계 K) 및 2-아미노피멜레이트(도 21, 단계 V)를 아실화할 수 있다. 이러한 정확한 형질전환을 촉매화하는 효소는 아직까지 특징규명되지 않았지만; 넓은 기질 특이성을 갖는 수 개의 효소가 문헌에 기재되어 있다.

[0845] ADP-형성 아세틸-CoA 합성효소(ACD, EC 6.2.1.13)는 아실-CoA 에스테르의 이의 상응하는 산으로의 전환을 ATP의 동시적인 합성과 결부시키는 효소이다. AF1211에 의해 코딩되는 아르카에오글로버스 펄지더스로부터의 ACD I는 다양한 선형 및 분지형 기질, 예컨대 이소부티레이트, 이소펜타노에이트 및 푸마레이트 상에서 작동하는 것으로 제시되었다(Musfeldt et al., J Bacteriol 184:636-644(2002)). AF1983으로 코딩되는 아르카에오글로버스 펄지더스에서 제2의 가역성 ACD는, 환형 화합물 페닐아세테이트 및 인돌아세테이트에 대해 높은 활성을 나타내는 광범위한 기질 범위를 갖는 것으로 제시되었다(Musfeldt et al., J Bacteriol. 184:636-644(2002)). 할로아르쿨라 마리스모르튀(주석: 석시닐-CoA 합성효소)로부터의 효소는 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지형 산(이소발러레이트 및 이소부티레이트)를 기질로서 수용하고, 정방향 및 역방향으로 작동하는 것으로 제시되었다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004)). 극한호열성 크레나카에온 피로바큘럼 에어로필럼으로부터의 *PAE3250*에 의해 코딩되는 ACD는, 아세틸-CoA, 이소부티릴-CoA(바람직한 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응하는, 모든 특징규명된 ACD의 가장 넓은 기질 범위를 보여주었다(Brasen et al., Arch. Microbiol 182:277-287(2004)). 방향 진화 또는 조작은 이 효소가 숙주 유기체의 생리학적 온도에서 작동하도록 개질시키기 위해 사용될 수 있다. 아르카에오글로버스 펄지더스, 할로아르쿨라 마리스모르튀 및 피로바큘럼 에어로필럼으로부터의 효소는 에스케리치아 콜라이에서 클로닝되고 작용적으로 발현되고 특징규명되었다(문헌[Brasen et al., Arch. Microbiol 182:277-287(2004)]; 및 [Musfeldt et al., J Bacteriol. 184:636-644(2002)]). 추가적인 후보는 에스케리치아 콜라이에서 *sucCD*에 의해 코딩되는 효소이고, 이는 석시네이트로부터 석시닐-CoA의 형성을 천여적으로 촉매화하고, 이때 하나의 ATP가 동시에 소비되며, 이 반응은 생체내에서 가역성이다(Buck et al., Biochemistry 24:6245-6252(1985)).

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
AF1211	11498810	NP_070039.1	아르카에오글로버스 펄지더스 DSM 4304
AF1983	11499565	NP_070807.1	아르카에오글로버스 펄지더스 DSM 4304
scs	55377722	YP_135572.1	할로아르큘라 마리스모르튀
PAE3250	18313937	NP_560604.1	피로바큘럼 에어로필럼 균주 IM2
sucC	16128703	NP_415256.1	에스케리치아 콜라이
sucD	1786949	AAC73823.1	에스케리치아 콜라이

[0846]

[0847] 또 다른 후보 효소는 AMP-형성 피멜로일-CoA 리가아제(EC 6.2.1.14)이고, 이는 비오틴 생합성 동안 그램-포지티브 박테리아에서 피멜레이트를 피멜로일-CoA로 천연적으로 활성화시킨다. 에스케리치아 콜라이로 클로닝되는 슈도모나스 멘도시나로부터의 효소는 다른 기질인 헥산디오에이트 및 노난디오에이트를 수용하는 것으로 제시되었다(Binieda et al., Biochem. J 340(Pt 3):793-801(1999)). 다른 피멜로일-CoA 리가아제 후보는 바실러스 서브틸리스(Bower et al., JBacteriol. 178:4122-4130(1996)) 및 리시니바실러스 스파에리커스(이전에 바실러스 스파에리커스였음)(Ploux et al., Biochem. J 287(Pt 3):685-690(1992))에서 발견된다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
pauA	15596214	NP_249708.1	슈도모나스 멘도시나
bioW	50812281	NP_390902.2	바실러스 서브틸리스
bioW	115012	P22822.1	리시니바실러스 스파에리커스

[0848]

[0849] 추가적인 CoA-리가아제로는 서열이 아직 특징규명되지 않은 래트 디카복실레이트-CoA 리가아제(Vamecq et al., Biochem J 230:683-693(1985)), 페니실리엄 크리소제넘으로부터의 2개의 특징규명된 페닐아세테이트-CoA 리가아제(문헌[Lamas-Maceiras et al., Biochem. J. 395, 147-155(2005)]; 및 [Wang et al., Biochem. Biophy. Res. Commun. 360:453-458(2007)]), 및 슈도모나스 푸티다로부터의 페닐아세테이트-CoA 리가아제(Martinez-Bianco et al., J. Biol. Chem. 265:7084-7090(1990))가 포함된다. 무스 무스큘러스(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 합성효소는 아세토아세테이트의 아세토아세틸-CoA로의 ATP-의존성 전환을 천연적으로 촉매화한다.

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
phl	77019264	CAJ15517.1	페니실리엄 크리소제넘
phlB	152002983	ABS19624.1	페니실리엄 크리소제넘
paaF	22711873	AAC24333.2	슈도모나스 푸티다
AACS	21313520	NP_084486.1	무스 무스큘러스
AACS	31982927	NP_076417.2	호모 사피엔스

[0850]

[0851] **실시예 XXVII**

[0852] **6-아미노카프로에이트로부터 헥사메틸렌디아민을 생산하기 위한 추가적인 경로**

[0853] 도 24는 HMDA 생산을 위한 추가적인 경로를 제공하고, 도 13 및 상기 실시예 XX에 추가적이다. 단계 O 및 P에 대한 화살표는 6-아미노카프로에이트 및 6-아세트아미도헥사노에이트의 6-아미노카프로산 세미알데히드 및 6-아세트아미도헥사날 각각으로의 직접적인 전환을 지시한다. 이들 반응은 EC 부류 1.2.1.e중의 환원효소에 의해 촉매화된다. 효소 후보의 설명을 위해, 실시예 XXVI(EC 1.2.1.e)를 참조한다.

[0854] **실시예 XXVIII**

[0855] **아디페이트로부터의 6-아미노카프로에이트의 생산을 위한 경로**

[0856] 도 25는 6-ACA 생산을 위한 추가적인 경로를 제공하고, 이는 도 10 및 상기 실시예 XVI에 추가적이다. 아디페이트의 아디페이트 세미알데히드로의 전환(도 25, 단계 X)은 아디페이트 환원효소 작용성을 갖는 효소에 의해 촉매화된다. 아디페이트 키나아제는 아디페이트로부터 아디필포스페이트의 형성을 촉매화한다(도 25, 단계 Y). 아디페이트 세미알데히드는 아디필포스페이트 환원효소에 의해 아디필포스페이트로부터 형성된다(도 25, 단계 Z). 이들 형질전환을 촉매화하기 위한 효소 후보는 실시예 XXVI에 기재된다.

[0857] **실시예 XXIX**

[0858] **레불린산의 생산을 위한 경로**

[0859] 4-옥소펜타노산 및 4-케토발레르산으로도 공지된 레불린산(LA)은 나일론-유사 중합체, 합성 고무 및 플라스틱에 대한 전구체이다. 이는 또한 다른 화학물질, 예컨대 메틸 테트라하이드로푸란, 발레로락톤 및 에틸 레불리네이트의 전구체이다. 다른 잠재적인 적용분야로는 연료 증진제 및 생물분해성 제초제/살충제로서의 용도가 포함된다. 이는 전통적으로 셀룰로스성 바이오매스를 강산, 예컨대 염산 및 황산으로 처리함으로써 제조된다. 이러한 공정은 낮은 LA 수율 및 다수의 부산물이라는 단점을 갖는다. 보다 최근에, 바이오파인 공정(Biofine Process)이 개발되었고, 이는 셀룰로스성 바이오매스를 LA, 폼산 및 푸르푸랄로 이론적 최대 수율의 70%로 전환시킨다(하이에스(Hayes) 등의 문헌[Biorefineries: Industrial Processes and Products. Wiley, Weinheim, Germany(2006), pp139-164]에 기재된 "리그노셀룰로스성 공급원료로부터의 레불린산, 푸르푸랄 및 폼산의 바이오파인 공정-생산(The biofine process-production of levulinic acid, furfural and formic acid from lignocellulosic feedstock)"). 미생물 유기체를 사용하여 당 또는 합성기체 공급원료로부터 LA를 선택적으로 생산하기 위한 공정이 본원에 기재된다.

[0860] 글루코스로부터 LA의 최대 이론적 수율은 하기 수학식에 따라서 이용되는 글루코스 1 몰 당 1.45 몰(0.938 g/g)의 LA이다:

[0861] 글루코스($C_6H_{12}O_2$) + 1.27 CO_2 → 1.45 LA($C_5H_8O_6$) + 0.18 H_2O

[0862] LA는 3개의 효소 단계에서 중심 대사물질인 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 생산된다. 제1 단계에서, 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA는 베타-케토티올라아제에 의해 축합되어 3-옥소아디필-CoA를 형성한다(도 25의 단계 A). CoA 잔기는 후속적으로 CoA 가수분해효소, 전이효소 또는 리가아제에 의해 제거된다(도 25의 단계 E/F/G). 경로의 최종 단계에서, 3-옥소아디페이트는 LA로 탈카복실화된다(도 25의 단계 AA).

[0863] 3-옥소아디페이트의 LA로의 탈카복실화는 효소적으로 또는 자발적으로 일어난다. 에스케리치아 콜라이에서, 아미노산 생합성 동안 생산되는 수 개의 3-옥소산은 자발적인 탈카복실화를 겪는 것으로 제시되었다(Boylan et

al., Biochem. Biophys. Res Commun. 85: 190-197(1978)). 3-옥소아디페이트의 LA로의 탈카복실화를 촉매화하는 효소는 알려지지 않았다. 유사한 반응을 촉매화하는 예시적인 효소 후보는 아세테이트 데카복실라아제(EC 4.1.1.4)이다. *adc*로 코딩되는 클로스트리디엄 아세토부틸리컴로부터의 아세토아세테이트 데카복실라아제는 넓은 기질 특이성을 갖고 3-옥소펜타노에이트, 2-옥소-3-페닐프로피온산 및 2-메틸-3-옥소부티레이트를 탈카복실화하는 것으로 제시되었다(문헌[Benner et al., J. Am. Chem. Soc. 103:993-994(1981)] 및 [Rozzel et al., J. Am. Chem. Soc. 106:4937-4941(1984)]). 아세토아세테이트 데카복실라아제는 클로스트리디엄 베이제린키에서 또한 특징규명되었다(Ravagnani et al., Mol. Microbiol 37:1172-1185(2000)). 세포 유리 추출물에서 특징규명된, 바실러스 폴리믹사(*Bacillus polymyxa*)로부터의 아세토아세테이트 데카복실라아제는 또한 3-케토산에 대한 넓은 기질 특이성을 갖고, 3-옥소펜타노에이트를 탈카복실화할 수 있다(Matiasek et al., Curr. Microbiol 42:276-281(2001)). 이러한 효소를 코딩하는 유전자는 아직까지 식별되지 않았고, 바실러스 폴리믹사의 게놈 서열은 아직 이용가능하지 않다. 또 다른 *adc*는 클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴에서 발견된다(Kosaka, et al., Biosci.Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007)).

[0864]

유전자 명칭	GI#	수납 번호	유기체
adc	15004868	NP_149328.1	클로스트리디엄 아세토부틸리컴
adc	31075386	AAP42566.1	클로스트리디엄 사카로퍼부틸아세토니컴
cbei_3835	150018652	YP_001310906.1	클로스트리디엄 베이제린키

[0865] **실시예 XXX**

[0866] **아디페이트, 6-ACA 및 HMDA의 생산을 위한 인실리코 넉아웃 전략**

[0867] 본 실시예는 아디페이트 6-아미노카프로산(6-ACA) 및 헥사메틸렌디아민(HMDA)의 생산을 위한 유전자 손상 전략을 설명한다.

[0868] 아디페이트, 6-아미노카프로산(6-ACA) 및 헥사메틸렌디아민(HMDA) 생산 경로, 예를 들면, 석시닐 CoA 및 아세틸 CoA를 전구체로서 사용하는 경로를 포함하도록 조작된 생산 숙주에서 적절한 유전자 손상 또는 결실에 의해 감소될 수 있는 효소 활성 세트가 이후 상세히 기재된다.

[0869] OptKnock은 유전적으로 안정한 과생산 미생물을 개발하는 전체 목적을 갖도록 공식화된 2레벨 컴퓨터 체제이다. 구체적으로 이 체제는 원하는 생화학물질이 세포 성장의 의무적인 부산물이 되도록 만드는 유전적 조작을 제안하기 위해 미생물의 완전한 조직망을 검사한다. 전략적으로 위치된 유전자 손상 또는 결실을 통해 생화학 생산을 세포 성장과 결부시킴으로써, 생물반응기에서 오랜 기간 이후 조작된 균주에 부과되는 성장 선택 압력은, 강제적인 성장-결부된 생화학물질 생산의 결과로서 성능을 개선시킨다. 마지막으로, 유전자 결실의 경우, 고안된 균주가 이들의 야생형 상태로 복귀될 가능성은 거의 없는데, 이는 OptKnock에 의해 선택된 유전자는 게놈으로부터 완전히 제거되기 때문이다.

[0870] 성장-결부된 생화학물질 생산은 인실리코 모델을 사용하여 계산되는 전형적인 대사 조직망의 생화학물질 생산 한계의 맥락에서 시각화될 수 있다. 이들 제한은 제한 기질의 섭취 속도를 이들의 실험적으로 측정된 값에 고정시키고 각각의 달성가능한 성장 수준에서 생화학물질 생산의 최대 및 최소 속도를 계산함으로써 수득된다. 예외가 존재하지만, 전형적으로 원하는 생화학물질 생산은 세포내 자원을 위한 바이오매스 형성과 직접 경쟁한다. 이와 같이, 생화학 생산의 증진된 속도는 일반적으로 하위 최대 성장 속도를 초래할 것이다. OptKnock에 의해 제안된 넉아웃은 야생형 균주로부터의 대사 행태에서의 변화를 강요하는 허용가능한 해결책 경계를 제한하도록 고안된다. 소정의 균주를 위한 실제 해결책 경계는 기질 섭취 속도가 증가하거나 감소할 때 팽창하거나 수축할 것이지만, 각각의 실험 값은 계산된 해결책 경계내에 있어야 한다. 이와 같은 플롯은, 균주가 그들의 성능 제한에 얼마나 밀접한지, 달리 말하면 개선을 위해 얼마나 많은 공간이 이용가능한지를 보여줄 수 있다. OptKnock 체제는 생화학물질 생산을 위한 유망한 유전자 결실 전략을 식별하기 위해 사용되었고, 대사 및 규제 모델링 체제에 추가의 개선을 천연적으로 포함하는 계통적 체제를 수립한다.

[0871] 석시닐-CoA 및 아세틸-CoA를 통해 진행되는 생합성 경로의 첨가시 성장-결부된 아디페이트, 6-ACA 또는 HMDA 생산을 달성하는 숙주 유기체를 생성하기 위해 제거되거나, 약화되거나 존재하지 않아야 하는 효소 활성 세트가 이후 기재된다. 모든 가능한 전략을 열거하기 위해, 정수 커트로 지칭되는 최적화 기법이 실행되고, 이는 각각의 반복시 정수 커트로 지칭된 추가의 제약을 혼입함으로써 OptKnock 문제를 반복적으로 해결함을 수반한다.

[0872] OptKnock 알고리즘은 에스케리치아 콜라이 대사의 화학양론적 모델에 기초한 고안물을 식별화하기 위해 사용되

었다. 가정은 (i) 10 mmol/gdw/시간의 글루코스 섭취 속도; (ii) 혐기성 또는 미세호기성 조건; 및 (iii) 4 mmol/gdw/시간의 최소 비-성장 연관된 유지 요건을 포함한다. 표 12는 전략에서 결실에 대해 식별된 반응과 연관된 것으로 공지된 관련 유전자 및 모든 반응 화학양론의 목록을 제공한다. 표 13은 대사물질 약어의 목록, 상응하는 명칭, 및 표 12에 나열된 반응에 참여하는 모든 대사물질의 위치를 제공한다. 아디프산, 6ACA 및 HMDA를 위한 성장-결부된 생산 고안물은 표 14 내지 16에 제공된다. 표 14 내지 16에 제시된 생성물 형성 속도는 mmol/gDCW·시간으로 표시된다. 기본 글루코스 섭취 속도는 10 mmol/gDCW·시간이고, 바이오매스 형성 속도는 1/시간의 단위로 제시된다. 이들 표는 특정 전략, 기대된 생성물 및 바이오매스 수율에서 넉아웃된 반응을 열거한다. 고안물은 에스케리치아 콜라이 대사의 대사 모델을 사용하여 식별되었고 열거된 유전자 명칭은 에스케리치아 콜라이에 특정적이지만, 대사 조작 전략의 선택 방법 및 또한 고안물 그 자체는 임의의 HMDA, 6-ACA 또는 아디페이트-생산 유기체에 적용가능하다. 이와 같이 고안물은 본질적으로 효소적 형질전환물의 열거이고, 이의 활성은 아디페이트, 6ACA 및 HMDA의 성장 결부된 생산을 제공하기 위해 미생물로부터 제거되거나, 약화되거나 초기부터 존재하지 않는다.

[0873] 고안물의 최종 선택을 우선적으로 정하기 위한 핵심 기준은 각각의 생성물의 성장-결부된 수율이었다. 이를 검사하기 위해, 상기 기재된 바와 같이 바이오매스 형성의 상이한 수율에서 생성물 수율을 우선 최대화한 후 이를 최소화함으로써 생산체를 각각의 전략을 위해 구축하였다. 돌연변이체 조직망의 모든 가능한 표현형의 최우측 경계가 단일 점이라면, 이는 조직망에서 가능한 최대 바이오매스 형성 속도에서 생성물의 고유의 최적 수율이 존재함을 내포한다. 다른 경우에, 실행가능한 표현형의 최우측 경계가 수직선이고, 이는 최대 바이오매스 지점에서 조직망이 계산된 범위내의 임의의 양의 생성물을 만들 수 있음을 지시하고, 예컨대 수직선의 최하위 지점에서 가장 낮은 양을 나타낸다. 이러한 고안물에게는 더 낮은 우선 순위가 제공되었다.

[0874] 이후 기재된 대사 조작 전략은 유기체가 아디페이트, 6-ACA 또는 HMDA를 석시닐 CoA 및 아세틸-CoA 이용 경로를 통해 생산할 수 있음을 가정한다. 이 경로를 통해 이들 생성물을 생산할 수 있는 재조합 숙주 유기체의 구축이 본원에 기재된다.

[0875] 균주 구축: 본 보고서에 제안된 컴퓨터이용 예측을 유효하게 하기 위해, 균주를 구축하고, 진화시키고, 시험한다. 석시닐-CoA-아세틸-CoA 경로를 갖는 에스케리치아 콜라이 K-12 MG1655는 결실이 도입된 균주로서 작용한다. 이 균주는 상동성 재조합을 사용하여 다트센코 앤 워너(Datsenko and Wanner)의 λ 레드 레콤비나아제(Red recombinase) 시스템을 통해 골격내(in-frame) 결실을 혼입함으로써 구축된다 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(12):6640-6645 2000)). 이 접근방법은 염색체 서열, 즉 제거되도록 표적화된 유전자를 선택가능한 항생제 내성 유전자(이는 그 자체로 나중에 제거됨)로 대체함을 포함한다. 넉아웃은 수여 균주내로 하나씩 통합된다. 항생제 내성 마커는 각각의 결실 후에 남지 않아서, 각 표적 균주에서 다중 돌연변이의 축적을 허용한다. 결실 기술은 구축된 돌연변이체가 야생형으로 복귀될 가능성을 실질적으로 감소시키도록 제거를 위해 표적화된 유전자를 완전히 제거한다.

[0876] 진탕 플라스크 특징규명: 중간체 균주가 구축될 때, 균주 성능을 진탕 플라스크 발효를 수행하여 정량화한다. 플라스크를 고무 격벽으로 밀봉하고 배지에 질소를 스파징하여 혐기성 조건을 수득한다. 성장이 엄격한 혐기성 조건하에 관찰되지 않는 균주의 경우, 플라스크를 호일로 싸고 제한된 통기를 위해 작은 구멍을 뚫음으로써 미세호기성 조건을 적용할 수 있다. 달리 지시되지 않는 한, 모든 실험을 글루코스가 보충된 M9 최소 배지를 사용하여 수행한다. 예비 배양물을 하룻밤 성장시키고, 지수 성장 동안 측정하기 위한 신선한 배치 배양물을 위해 접종물로서 사용한다. 성장 속도는 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 결정하고, 글루코스 섭취 속도는 시간에 대한 탄소 공급원 고갈을 모니터링하여 결정한다. 생성물, 에탄올, 및 유기산을 통상의 절차를 사용하여 GC-MS 또는 HPLC에 의해 분석한다. 3중 배양물을 각각의 균주에 대해 성장시킨다.

[0877] 배치식 발효기 시험: 선택 균주의 성능을 혐기성의 pH-조절된 배치식 발효에서 시험한다. 이는 모든 생성물의 성장, 글루코스 섭취, 및 형성 속도의 신뢰가능한 정량화를 허용할 뿐만 아니라, 산성 발효 생성물의 축적이 세포 성장을 제한하지 않도록 보장한다. 또한, 이는 균주 성능의 벤치마킹(benchmarking)에서 가장 중요한 매개변수중 2가지인 생성물 형성의 수율 및 용적 생산성을 정확히 결정하도록 한다. 온도 및 pH 조절기가 구비된, 600 ㎖의 처리 부피를 갖는 1ℓ 생물반응기에서 발효를 수행한다. 반응기를 N_2로 대략 0.5 ℓ/분으로 스파징하여, 용존 산소(DO) 수준이 검출 수준 미만이 되도록 한다. 배양 배지는, 글루코스 농도가 발효 용기에서 달성가능한 세포 밀도의 증가에 따라 증가됨을 제외하고는, 상기 기재된 바와 동일하다.

[0878] 케모스타트(Chemostat) 시험: 케모스타트 실험을 수행하여 발효 방식이 배치식으로부터 연속식으로 전환되는 것이 생성물 수율 및 용적 생산도에 어떤 영향을 주는지 직접적으로 측정한다. 배치 방식을 사용하는 상기 기재

된 생물반응기를, 배지의 연속적 공급 및 소비된 배양물의 제거를 통해 케모스타트 방식으로 조작한다. 배치중의 각각의 균주에 대해 측정된 최대 성장 속도의 80%의 일정한 희석 속도를 유지하도록 유입 유동 속도를 설정하고, 수준을 유지하도록 유출 유동을 조절한다. 글루코스는 배지에서 제한 영양소이고, 용기에서 원하는 광학 밀도를 달성하도록 설정한다.

[0879] 적응 진화: 넉아웃 균주는 초기에 이들의 대사 조직망이 이들의 손실 작용에 조정될 때까지 차선의 성장 속도를 나타낼 것으로 예상된다. 이러한 조정을 허용하기 위해, 균주는 적응 진화된다. 균주를 적응 진화시킴으로써, 세포 성장 속도는 1차적인 선택 압력이 되고, 돌연변이체 세포는 이들의 성장 속도를 증진시키기 위해 이들의 대사 플럭스를 재분배하도록 강요된다. 대사의 이러한 재프로그램화는 다양한 기질에서 적응적으로 진화해 인 실리코 모델에 의해 선험적으로 예측된 성장 속도에 도달된 수 개의 에스케리치아 콜라이 돌연변이체에 대해 최근에 입증되었다(Fong and Palsson, Nat. Genet. 36(10):1056-1058(2004)). OptKnock-생성된 균주는 나머지에 비해 탁월한 생산 품질을 갖는 균주를 잠재적으로 생성할 수 있는 에스케리치아 콜라이에서 이전에 목격된 진화 패턴에서의 차이에 기인하여 3중으로 적응 진화된다(평행으로 수행)(문헌[Fong and Palsson, Nat Genet. 36(10):1056-1058(2004)]; [Fong et al., J. Bacteriol. 185(21):6400-6408(2003)]; 및 [Ibarra et al., Nature 420(6912): 186-189(2002)]). 진화는 수득된 성장 개선 속도에 따라 2 내지 6주 동안 진행된다. 일반적으로, 진화는 일단 안정한 표현형이 수득되면 중단된다. Optknock 접근방식에 있어서 성장-결부된 생화학물질 생산 개념은 유전적으로 안정한 과생산자의 생성을 일으킨다.

[0880] 결실 세트로서 기재되지만, 본원에 개시된 바와 같이, 유전자 세트는 코딩된 유전자 생성물 활성이 감소되거나 제거되도록 결실되거나 손상될 수 있는 것으로 이해된다. 이와 같이, 표 14 내지 16의 유전자 결실 세트는 6-ACA, 아디페이트 및/또는 HMDA의 증가된 생산이 요구되는 숙주 유기체에서 유전자 세트를 결실 또는 손상시키기 위해 사용될 수 있다. 개시된 임의의 유전자 결실 세트는 6-ACA, 아디페이트 및/또는 HMDA의 증가된 생산을 부여하는 손상되거나 결실된 유전자를 갖는 넉아웃 균주를 생성하기 위해 사용될 수 있는 것으로 이해된다.

표 12

표 1 및 2에 열거된 전략에서 결실에 대해 식별된 반응과 연관된 것으로 공지된 모든 반응 화학양론 및 유전자의 목록

반응 약어	반응 명칭	반응 화학양론	관련 유전자
ACKr	아세테이트 키나아제	[c] : ac + atp <==> actp + adp	(b3115 또는 b2296 또는 b1849)
ADHEr	알코올 탈수소효소	[c] : accoa + (2) h + (2) nadh <==> coa + etoh + (2) nad	(b0356 또는 b1478 또는 b1241)
AKGD	알파-케토글루타레이트 탈수소효소	[c] : akg + coa + nad --> co2 + nadh + succoa	(b0116 및 b0726 및 b0727)
ALAR	알라닌 라세미화효소	[c] : ala-L <==> ala-D	b4053
ASNS2	아스파라긴 합성효소	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744
ASPT	L-아스파타아제	[c] : asp-L --> fum + nh4	b4139
ATPS4r	ATP 신타아제	adp[c] + (4) h[p] + pi[c] <==> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	(((b3736 및 b3737 및 b3738) 및 (b3731 및 b3732 및 b3733 및 b3734 및 b3735)) 또는 ((b3736 및 b3737 및 b3738) 및 (b3731) 및 b3732 및 b3733 및 b3734 및 b3735) 및 b3739))
CBMK2	카바메이트 키나아제	[c] : atp + co2 + nh4 --> adp + cbp + (2) h	(b0521 또는 b0323 또는 b2874)
DAAD	D-아미노산 탈수소효소	[c] : ala-D + fad + h2o --> fadh2 + nh4 + pyr	b1189
EDA	2-데하이드로-3-데옥시-포스포글루코네이트 알돌라아제	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850
ENO	에놀라아제	[c] : 2pg <==> h2o + pep	b2779
FBA	프럭토스-비스-포스페이트 알돌라아제	[c] : fdp <==> dhap + g3p	(b2097 또는 b2925 또는 b1773)
FRD	푸마레이트 환원효소	[c] : fum + mql8 --> mqn8 + succ	(b4151 및 b4152 및 b4153 및 b4154)
FUM	푸마라아제	[c] : fum + h2o <==> mal-L	(b1612 또는 b4122 또는 b1611)
G5SD	글루타메이트-5-세미알데하드 탈수소효소	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243
G6PDHy	글루코스-6-포스페이트 탈수소효소	[c] : g6p + nadp <==> 6pgl + h + nadph	b1852
GLCpts	PTS 기작을 통한 D-글루코스 수송	glc-D[e] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 및 b1101 및 b2415 및 b2416) 또는 (b1817 및 b1818 및 b1819 및 b2415 및 b2416) 또는 (b2417 및 b1621 및 b2415 및 b2416))
GLU5K	글루타메이트-5-키나아제	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	글루타메이트 탈수소효소	[c] : glu-L + h2o + nadp <==> akg + h + nadph + nh4	b1761
HEX1	헥소키나아제	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388
LDH_D	락테이트 탈수소효소	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	b1380 또는 b2133
MDH	말레이트 탈수소효소	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236

[0881]

ME1x	말산 효소(NAD)	[c] : mal-L + nad --> co2 + nadh + pyr	b1479
ME2	말산 효소(NADP)	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463
NADH12	NADH 탈수소효소 (유비퀴논-8)	[c] : h + nadh + ubq8 --> nad + ubq8h2	b1109
NADH6	NADH 탈수소효소 (유비퀴논-8 및 3.5 양자)	(4.5) h[c] + nadh[c] + ubq8[c] --> (3.5) h[e] + nad[c] + ubq8h2[c]	(b2276 및 b2277 및 b2278 및 b2279 및 b2280 및 b2281 및 b2282 및 b2283 및 b2284 및 b2285 및 b2286 및 b2287 및 b2288)
PDH	피루베이트 탈수소효소	[c] : coa + nad + pyr --> accoa + co2 + nadh	((b0114 및 b0115 및 b0116) 또는 (b0116 및 b0726 및 b0727) 또는 (b0116 및 b2903 및 b2904 및 b2905))
PFK	포스포프럭토키나아제	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916 또는 b1723)
PFLi	피루베이트 포메이트 리아제	[c] : coa + pyr --> accoa + for	(((b0902 및 b0903) 및 b2579) 또는 (b0902 및 b0903) 또는 (b0902 및 b3114) 또는 (b3951 및 b3952))
PGDH	포스포글루코네이트 탈수소효소	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
PGDHY	포스포글루코네이트 탈수소효소	[c] : 6pgc --> 2ddg6p + h2o	b1851
PGI	글루코스-6-포스페이트 이성화효소	[c] : g6p <==> f6p	b4025
PGL	6-포스포글루코노락토나아제	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767
PGM	포스포글리세레이트 뮤타아제	[c] : 3pg <==> 2pg	b3612
PPC	포스포에놀피루베이트 카복실라아제	[c] : co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956
PPCK	포스포에놀피루베이트 카복시키나아제	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
PRO1z	프롤린 산화효소	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014
PTAr	인산아세틸전이효소	[c] : accoa + pi <==> actp + coa	b2297
PYK	피루베이트 키나아제	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	(b1854 또는 b1676)
RPE	리불로스-5-포스페이트-5-에피머라아제	[c] : ru5p-D <==> xu5p-D	(b4301 또는 b3386)
SUCD4	석시네이트 탈수소효소	[c] : fadh2 + ubq8 <==> fad + ubq8h2	(b0721 및 b0722 및 b0723 및 b0724
SUCOAS	석시닐-CoA 합성효소	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	(b0728 및 b0729)
TAL	알돌전이효소	[c] : g3p + s7p <==> e4p + f6p	(b2464 또는 b0008)

[0882]

THD2	NADP 수소전이효소	(2) h[e] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 및 b1603)
THD5	NAD 수소전이효소	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962 또는 (b1602 및 b1603))
TKT1	케톨전이효소	[c] : r5p + xu5p-D <==> g3p + s7p	(b2935 또는 b2465)
TKT2	케톨전이효소	[c] : e4p + xu5p-D <==> f6p + g3p	(b2935 또는 b2465)
TPI	트리오스포스페이트 이성화효소	[c] : dhap <==> g3p	b3919
VALTA	발린 아미노전이효소	[c] : akg + val-L <==> 3mob + glu-L	b3770

[0883]

표 13

대사물질 약어, 상응하는 명칭 및 표 12에 열거된 반응에 참여하는 모든 대사물질의 위치의 목록

[0884]

대사물질 약어	구획	대사물질 명칭
13dpg	사이토졸	3-포스포-D-글리세로일 포스페이트
1pyr5c	사이토졸	1-피롤리딘-5-카복실레이트
2ddg6p	사이토졸	2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트 6-포스페이트
2pg	사이토졸	D-글리세레이트 2-포스페이트
3mob	사이토졸	3-메틸-2-옥소부타노에이트
3pg	사이토졸	3-포스포-D-글리세레이트
6pgc	사이토졸	6-포스포-D-글루코네이트
6pgl	사이토졸	6-포스포-D-글로코노-1,5-락톤
ac	사이토졸	아세테이트
accoa	사이토졸	아세틸-CoA
actp	사이토졸	아세틸 포스페이트
adp	사이토졸	아데노신 디포스페이트
akg	사이토졸	2-옥소글루타레이트
ala-D	사이토졸	D-알라닌
ala-L	사이토졸	L-알라닌
amp	사이토졸	아데노신 모노포스페이트
asn-L	사이토졸	L-아스파라긴

[0885]

대사물질 약어	구획	대사물질 명칭
asp-L	사이토졸	L-아스파테이트
atp	사이토졸	아데노신 트리포스페이트
cbp	사이토졸	카바모일 포스페이트
co2	사이토졸	이산화탄소
coa	사이토졸	조효소 A
dha	사이토졸	디하이드록시아세톤
dhap	사이토졸	디하이드록시아세톤 포스페이트
e4p	사이토졸	D-에리트로스 4-포스페이트
etoh	사이토졸	에탄올
f6p	사이토졸	D-프럭토스 6-포스페이트
fad	사이토졸	플라빈 아데닌 디뉴클레오티드
fadh2	사이토졸	플라빈 아데닌 디뉴클레오티드-환원됨
fdp	사이토졸	D-프럭토스 1,6-비스포스페이트
for	사이토졸	포메이트
fum	사이토졸	푸마레이트
g3p	사이토졸	글리세르알데히드 3-포스페이트
g6p	사이토졸	D-글루코스 6-포스페이트

[0886]

대사물질 약어	구획	대사물질 명칭
glc-D[e]	사이토졸	D-글루코스
glu5p	사이토졸	L-글루타메이트 5-포스페이트
glu5sa	사이토졸	L-글루타메이트 5-세미알데히드
glu-L	사이토졸	L-글루타메이트
h	사이토졸	H^+
h[e]	사이토졸	H^+
h2o	사이토졸	물
lac-D	사이토졸	D-락테이트
mal-L	사이토졸	M-말레이트
mql8	사이토졸	메나퀴놀-8
mqn8	사이토졸	메나퀴논-8
nad	사이토졸	니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드
nadh	사이토졸	니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드-환원됨
nadp	사이토졸	니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트
nadph	사이토졸	니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트-환원됨
nh4	사이토졸	암모늄
o2	사이토졸	산소

대사물질 약어	구획	대사물질 명칭
oaa	사이토졸	옥살로아세테이트
pep	사이토졸	포스포에놀피루베이트
pi	사이토졸	포스페이트
ppi	사이토졸	디포스페이트
pyr	사이토졸	피루베이트
r5p	사이토졸	알파-D-리보스 5-포스페이트
ru5p-D	사이토졸	D-리불로스 5-포스페이트
s7p	사이토졸	세도헵툴로스 7-포스페이트
succ	사이토졸	석시네이트
succoa	사이토졸	석시닐-CoA
ubq8	사이토졸	유비퀴논-8
ubq8h2	사이토졸	유비퀴놀-8
val-L	사이토졸	L-발린
xu5p-D	사이토졸	D-자일룰로스 5-포스페이트

[0887]

표 14

6-ACA 및 바이오매스의 수율을 보여주는, 6-ACA의 증가된 생산을 위한 넉아웃 균주 고안물

신규 고안물 서열	넉아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
1	1	1.72604	0.38773	ATPS4r
2	1	0.83466	0.26712	PGI
3	2	5.04234	0.22255	HEX1,PGI
4	2	4.11897	0.24338	EDA 및/또는 PGDHY,PGI
5	2	3.26272	0.35236	ADHEr,NADH6
6	2	2.8403	0.28275	ADHEr,PPCK
7	2	2.05537	0.33531	GLCpts,NADH6
8	2	2.0373	0.38161	ATPS4r,RPE
9	2	1.89007	0.3845	ATPS4r,TAL
10	2	1.49147	0.26024	PFLi,PGI
11	2	1.11406	0.32382	NADH6,PFLi
12	2	0.95551	0.27773	PFLi,PPCK
13	2	0.89333	0.37885	ADHEr,FUM
14	2	0.41621	0.38953	ADHEr,HEX1
15	2	0.31773	0.36065	ASPT,FUM
16	3	6.93034	0.18126	EDA 및/또는 PGDHY,NADH6,PGI
17	3	6.91845	0.19552	HEX1,PFLi,PGI
18	3	6.14899	0.1758	EDA 및/또는 PGDHY,PFLi,PGI
19	3	5.81422	0.16481	ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,PGI
20	3	5.71646	0.21908	ADHEr,HEX1,PGI
21	3	4.83364	0.29669	ADHEr,NADH6,PFLi
22	3	4.23803	0.24209	ACKr 및/또는 PTAr,EDA 및/또는 PGDHY,PGI
23	3	4.02855	0.29483	ADHEr,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
24	3	3.77533	0.25553	ADHEr,ASPT,MDH
25	3	3.65248	0.19372	ADHEr,NADH6,PGI

[0888]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
26	3	3.47283	0.25194	ADHEr,NADH6,PPCK
27	3	3.39319	0.29001	ADHEr,MDH,NADH6
28	3	3.35305	0.34906	ADHEr,NADH6,RPE
29	3	3.23462	0.28717	ACKr 및/또는 PTAr,ATPS4r,SUCOAS
30	3	3.0877	0.16431	ADHEr,PGI,PPCK
31	3	2.90019	0.24841	ADHEr,GLCpts,PPCK
32	3	2.89855	0.2815	ADHEr,PPCK,RPE
33	3	2.88617	0.25645	ADHEr,FUM,THD2 및/또는 GLUDy
34	3	2.72186	0.35068	ADHEr,FUM,HEX1
35	3	2.60615	0.3202	ATPS4r,HEX1,PFLi
36	3	2.54001	0.22798	PFLi,PGDH,PGI
37	3	2.5259	0.22921	PFLi,PGI,TAL
38	3	2.5129	0.23034	PFLi,PGI,RPE
39	3	2.50442	0.16853	ATPS4r,PFLi,PGI
40	3	2.38919	0.18418	GLCpts,NADH6,PGI
41	3	2.30741	0.33343	ATPS4r,GLCpts,NADH6
42	3	2.16995	0.33092	GLCpts,NADH6,RPE
43	3	2.11568	0.333	GLCpts,NADH6,TAL
44	3	2.10576	0.25488	ATPS4r,PPCK,PYK
45	3	1.5933	0.25891	FUM,PFLi,PGI
46	3	1.25154	0.3194	NADH6,PFLi,RPE
47	3	1.23093	0.32359	ACKr 및/또는 PTAr,NADH6,PFLi
48	3	1.18643	0.32149	NADH6,PFLi,TAL
49	3	1.08143	0.27599	PFLi,PPCK,RPE
50	3	1.0527	0.27673	ACKr 및/또는 PTAr,PFLi,PPCK
51	3	1.03356	0.34314	FUM,HEX1,PFLi
52	3	1.02156	0.27682	PFLi,PPCK,TAL
53	3	0.8538	0.24817	MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
54	3	0.5753	0.38695	ADHEr,HEX1,RPE
55	3	0.49968	0.38818	ADHEr,HEX1,TAL
56	3	0.31402	0.35643	FDH2,FUM,NADH6
57	3	0.23944	0.28074	FUM,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
58	3	0.23418	0.26581	ASPT,MDH,PFLi
59	3	0.20901	0.23724	ASPT,MDH,PYK
60	4	7.08404	0.12641	EDA 및/또는 PGDHY,NADH6,PFLi,PGI
61	4	7.0245	0.10838	EDA 및/또는 PGDHY,PFLi,PGI,PPCK
62	4	6.92332	0.16482	ADHEr,HEX1,NADH6,PGI
63	4	6.89839	0.18171	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,NADH6,PGI
64	4	6.58534	0.16513	EDA 및/또는 PGDHY,GLCpts,PFLi,PGI
65	4	6.36357	0.11937	EDA 및/또는 PGDHY,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
66	4	6.22082	0.11375	ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,PFLi,PGI
67	4	5.8701	0.13379	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,PGI,PPCK
68	4	5.85757	0.23874	ADHEr,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
69	4	5.85411	0.19685	ADHEr,HEX1,PGI,PPS
70	4	5.67774	0.13549	EDA 및/또는 PGDHY,PGI,PPCK,PYK

[0889]

[0890]

신규 고안물 서열	탄아오 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
71	4	5.46506	0.26673	EDA 및/또는 PGDHY,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
72	4	5.40131	0.26362	ADHEr,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
73	4	5.08219	0.13778	ATPS4r,NADH6,PFLi,PGI
74	4	4.88764	0.27849	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi
75	4	4.88489	0.27942	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi
76	4	4.81778	0.26037	ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6
77	4	4.73419	0.21859	ADHEr,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
78	4	4.63783	0.29595	ADHEr,ATPS4r,FDH2,NADH6
79	4	4.51525	0.21818	ADHEr,FUM,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
80	4	4.51525	0.21818	ADHEr,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
81	4	4.30547	0.19131	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PGI
82	4	4.2733	0.23078	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PPCK
83	4	4.16417	0.18771	ATPS4r,NADH6,PGI,RPE
84	4	4.16053	0.18697	ATPS4r,NADH6,PGI,TAL
85	4	4.15658	0.18617	ATPS4r,NADH6,PGDH,PGI
86	4	4.12032	0.32701	ADHEr,ATPS4r,FUM,NADH6
87	4	3.9718	0.23354	ADHEr,ATPS4r,MDH,PPCK
88	4	3.9718	0.23354	ADHEr,ATPS4r,FUM,PPCK
89	4	3.8747	0.21758	ADHEr,ASPT,GLCpts,MDH
90	4	3.84814	0.25342	ADHEr,ASPT,MDH,RPE
91	4	3.83986	0.2047	ADHEr,ASPT,MDH,PYK
92	4	3.75472	0.32987	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6
93	4	3.54965	0.29114	ADHEr,ATPS4r,MDH,PGDH
94	4	3.54605	0.21695	ADHEr,GLCpts,NADH6,PPCK
95	4	3.54385	0.218	ADHEr,NADH6,PPCK,PYK
96	4	3.53615	0.25027	ADHEr,NADH6,PPCK,RPE
97	4	3.5018	0.32809	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1
98	4	3.46904	0.25375	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6
99	4	3.46528	0.28851	ADHEr,MDH,NADH6,RPE
100	4	3.44916	0.13425	ADHEr,PFLi,PGI,PPCK
101	4	3.44555	0.26498	ADHEr,HEX1,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
102	4	3.43776	0.29402	ADHEr,ATPS4r,MDH,TAL
103	4	3.36596	0.19156	FUM,NADH6,PGI,THD5
104	4	3.36596	0.19156	MDH,NADH6,PGI,THD5
105	4	3.33377	0.2967	ADHEr,ATPS4r,MDH,RPE
106	4	3.33152	0.33978	ADHEr,FUM,NADH6,TAL
107	4	3.32935	0.34088	ADHEr,HEX1,NADH6,TAL
108	4	3.32788	0.32122	ADHEr,FUM,HEX1,NADH6
109	4	3.31278	0.3493	ADHEr,GLU5K,NADH6,TAL
110	4	3.31278	0.3493	ADHEr,G5SD,NADH6,TAL
111	4	3.17484	0.10602	ADHEr,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
112	4	3.16614	0.11184	ADHEr,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
113	4	3.16614	0.11184	ADHEr,FUM,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
114	4	3.11125	0.24826	ADHEr,ATPS4r,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
115	4	2.96628	0.21051	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy

신규 그인물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
116	4	2.95529	0.24477	ADHEr,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
117	4	2.95136	0.24731	ADHEr,GLCpts,PPCK,RPE
118	4	2.94249	0.25305	ADHEr,FUM,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
119	4	2.93765	0.22693	ADHEr,MDH,PPCK,PYK
120	4	2.93765	0.22693	ADHEr,FUM,PPCK,PYK
121	4	2.9332	0.24406	ADHEr,PPCK,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
122	4	2.90913	0.24328	ADHEr,PGDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
123	4	2.90913	0.24328	ADHEr,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
124	4	2.90081	0.26381	ADHEr,FUM,PPCK,TAL
125	4	2.90081	0.26381	ADHEr,MDH,PPCK,TAL
126	4	2.86334	0.28161	ATPS4r,GLCpts,NADH6,PFLi
127	4	2.79498	0.34856	ADHEr,FUM,HEX1,RPE
128	4	2.7362	0.31504	ATPS4r,HEX1,PFLi,RPE
129	4	2.70922	0.18179	ATPS4r,GLCpts,NADH6,PGI
130	4	2.67469	0.31748	ATPS4r,HEX1,PFLi,TAL
131	4	2.61943	0.36027	ADHEr,HEX1,PFLi,PPS
132	4	2.60629	0.2178	PFLi,PGDH,PGI,TAL
133	4	2.60314	0.31113	ADHEr,HEX1,MDH,PFLi
134	4	2.56456	0.18551	ASPT,NADH6,PGI,THD5
135	4	2.55949	0.17944	ATPS4r,PFLi,PPCK,PYK
136	4	2.45433	0.3546	ADHEr,ATPS4r,HEX1,THD2 및/또는 GLUDy
137	4	2.45166	0.03625	GLCpts,NADH6,PPCK,PYK
138	4	2.44258	0.32891	ATPS4r,GLCpts,NADH6,RPE
139	4	2.43939	0.25153	ATPS4r,PPCK,PYK,RPE
140	4	2.37857	0.33105	ATPS4r,GLCpts,NADH6,TAL
141	4	2.30961	0.22691	ATPS4r,NADH6,PPCK,PYK
142	4	2.28135	0.25311	ATPS4r,PPCK,PYK,TAL
143	4	2.18633	0.3609	ADHEr,HEX1,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
144	4	2.11347	0.31979	ADHEr,ATPS4r,HEX1,MDH
145	4	2.05497	0.19746	ASPT,ATPS4r,PGI,THD5
146	4	1.83108	0.25754	MDH,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
147	4	1.65594	0.25767	ACKr 및/또는 PTAr,FUM,PFLi,PGI
148	4	1.36673	0.31918	ACKr 및/또는 PTAr,NADH6,PFLi,RPE
149	4	1.30242	0.32127	ACKr 및/또는 PTAr,NADH6,PFLi,TAL
150	4	1.28243	0.32216	ACKr 및/또는 PTAr,GLU5K,NADH6,PFLi
151	4	1.28243	0.32216	ACKr 및/또는 PTAr,G5SD,NADH6,PFLi
152	4	1.26654	0.34191	ACKr 및/또는 PTAr,FUM,HEX1,PFLi
153	4	1.18926	0.34046	FUM,HEX1,PFLi,RPE
154	4	1.17756	0.275	ACKr 및/또는 PTAr,PFLi,PPCK,RPE
155	4	1.1182	0.27583	ACKr 및/또는 PTAr,PFLi,PPCK,TAL
156	4	1.1153	0.34173	FUM,HEX1,PFLi,TAL
157	4	0.95889	0.24471	MDH,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
158	4	0.9475	0.3633	ADHEr,FUM,PGL 및/또는 G6PDHy,TAL
159	4	0.9475	0.3633	ADHEr,FUM,PGDH,TAL
160	4	0.90913	0.24635	MDH,PFLi,TAL,THD2 및/또는 GLUDy

[0891]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
161	4	0.36773	0.36076	HEX1,PFLi,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
162	4	0.3476	0.2132	ADHEr,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
163	4	0.32915	0.27571	FUM,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
164	5	6.98742	0.06748	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
165	5	6.97749	0.0848	ACKr 및/또는 PTAr,ATPS4r,HEX1,PFLi,PGI
166	5	6.70882	0.01277	EDA 및/또는 PGDHY,FUM,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
167	5	6.70882	0.01277	EDA 및/또는 PGDHY,MDH,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
168	5	6.69134	0.13239	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,MDH
169	5	6.55123	0.09841	ADHEr,ASPT,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK
170	5	6.55123	0.09841	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,PYK
171	5	6.3052	0.17034	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy
172	5	6.20871	0.17434	EDA 및/또는 PGDHY,MDH,PFLi,PGI,THD5
173	5	6.12639	0.08557	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
174	5	6.03386	0.19348	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH
175	5	5.98628	0.0693	ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,PGI,PPCK,PYK
176	5	5.98165	0.07186	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,PGI,PPCK
177	5	5.93527	0.09761	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLCpts,PGI,PPCK
178	5	5.87444	0.0434	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
179	5	5.87444	0.0434	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FUM,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
180	5	5.82336	0.16439	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,MDH,PYK
181	5	5.75418	0.21654	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6
182	5	5.65488	0.26204	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
183	5	5.59555	0.20952	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,NADH6
184	5	5.30614	0.21123	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
185	5	5.21058	0.214	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH
186	5	5.20451	0.17174	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
187	5	5.1776	0.13724	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
188	5	5.11744	0.13758	ADHEr,MDH,NADH6,PFLi,PGI
189	5	5.11744	0.13758	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi,PGI
190	5	5.11714	0.20117	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
191	5	5.11714	0.20117	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
192	5	5.10437	0.12227	ADHEr,FUM,PFLi,PGI,PPCK
193	5	5.10437	0.12227	ADHEr,MDH,PFLi,PGI,PPCK
194	5	5.09877	0.17589	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PPCK
195	5	5.0606	0.22022	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
196	5	5.02693	0.21085	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PGDH,PPCK
197	5	5.02693	0.21085	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
198	5	5.00057	0.21154	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PPCK,TAL
199	5	4.97638	0.21218	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PPCK,RPE
200	5	4.88781	0.27844	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
201	5	4.88512	0.29281	ADHEr,GLU5K,NADH6,PFLi,RPE
202	5	4.88512	0.29281	ADHEr,G5SD,NADH6,PFLi,RPE
203	5	4.885	0.29286	ADHEr,ASNS2,NADH6,PFLi,RPE
204	5	4.85776	0.29446	ADHEr,ATPS4r,FDH2,NADH6,RPE

[0892]

[0893]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
205	5	4.83644	0.29517	ADHEr,ATPS4r,FDH2,NADH6,TAL
206	5	4.7175	0.34071	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
207	5	4.66386	0.18074	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,PPCK
208	5	4.66386	0.18074	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,PPCK
209	5	4.63095	0.20189	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,PFLi,PPCK
210	5	4.49707	0.25782	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
211	5	4.4958	0.1778	ADHEr,ASPT,MDH,NADH6,PYK
212	5	4.41977	0.25646	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
213	5	4.29965	0.18828	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PYK
214	5	4.29026	0.24034	ACKr 및/또는 PTAr,EDA 및/또는 PGDHY,GLU5K,GLYCL,PGI
215	5	4.29026	0.24034	ACKr 및/또는 PTAr,EDA 및/또는 PGDHY,G5SD,GLYCL,PGI
216	5	4.28287	0.11665	ACKr 및/또는 PTAr,ATPS4r,PPCK,PYK,SUCOAS
217	5	4.24299	0.26303	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6
218	5	4.18509	0.32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy
219	5	4.18509	0.32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6,PGDH
220	5	4.15013	0.1124	ADHEr,ASPT,MDH,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
221	5	4.14582	0.32483	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6,TAL
222	5	4.1099	0.32529	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6,RPE
223	5	4.04473	0.12883	ADHEr,PFLi,PGDH,PGI,PPCK
224	5	4.03844	0.12934	ADHEr,PFLi,PGI,PPCK,TAL
225	5	4.03266	0.12981	ADHEr,PFLi,PGI,PPCK,RPE
226	5	4.02531	0.1111	ADHEr,GLCpts,PFLi,PGI,PPCK
227	5	3.95205	0.10694	ACKr 및/또는 PTAr,ATPS4r,PGDH,PGI,SUCOAS
228	5	3.94203	0.1079	ACKr 및/또는 PTAr,ATPS4r,PGI,SUCOAS,TAL
229	5	3.9367	0.21579	ADHEr,ASPT,GLCpts,MDH,RPE
230	5	3.93273	0.1088	ACKr 및/또는 PTAr,ATPS4r,PGI,RPE,SUCOAS
231	5	3.88257	0.21457	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK
232	5	3.84571	0.22865	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6
233	5	3.76049	0.30843	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,PFLi
234	5	3.74674	0.21738	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PPCK
235	5	3.71345	0.27754	ADHEr,ATPS4r,MDH,PGDH,TAL
236	5	3.69299	0.14673	ADHEr,NADH6,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
237	5	3.64625	0.1409	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,PGI,PPCK
238	5	3.64625	0.1409	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,MDH,PGI,PPCK
239	5	3.60057	0.21551	ADHEr,GLCpts,NADH6,PPCK,RPE
240	5	3.59735	0.21725	ADHEr,NADH6,PPCK,PYK,RPE
241	5	3.59622	0.19297	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6,PPCK
242	5	3.59622	0.19297	ADHEr,FUM,GLCpts,NADH6,PPCK
243	5	3.59594	0.19311	ADHEr,MDH,NADH6,PPCK,PYK
244	5	3.59594	0.19311	ADHEr,FUM,NADH6,PPCK,PYK
245	5	3.59157	0.1952	ADHEr,FUM,GLCpts,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
246	5	3.57086	0.18962	ATPS4r,FUM,NADH6,PGI,THD5
247	5	3.57086	0.18962	ATPS4r,MDH,NADH6,PGI,THD5
248	5	3.55204	0.22769	ADHEr,FUM,NADH6,PPCK,TAL

[0894]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
249	5	3.55204	0.22769	ADHEr,MDH,NADH6,PPCK,TAL
250	5	3.53212	0.25244	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6,RPE
251	5	3.52326	0.22785	ADHEr,FUM,GLU5K,NADH6,PPCK
252	5	3.52326	0.22785	ADHEr,G5SD,MDH,NADH6,PPCK
253	5	3.52326	0.22785	ADHEr,GLU5K,MDH,NADH6,PPCK
254	5	3.52326	0.22785	ADHEr,FUM,G5SD,NADH6,PPCK
255	5	3.52319	0.22788	ADHEr,ASNS2,FUM,NADH6,PPCK
256	5	3.52319	0.22788	ADHEr,ASNS2,MDH,NADH6,PPCK
257	5	3.51328	0.26261	ADHEr,HEX1,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
258	5	3.40958	0.31856	ADHEr,FUM,HEX1,NADH6,RPE
259	5	3.19551	0.34972	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
260	5	3.04993	0.16253	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
261	5	3.04993	0.16253	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
262	5	3.02516	0.17674	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
263	5	2.95797	0.22895	ADHEr,GLCpts,MDH,PPCK,TAL
264	5	2.95797	0.22895	ADHEr,FUM,GLCpts,PPCK,TAL
265	5	2.94768	0.30664	ADHEr,ATPS4r,HEX1,MDH,PFLi
266	5	2.93267	0.03242	ATPS4r,GLCpts,NADH6,PPCK,PYK
267	5	2.93156	0.27787	ATPS4r,GLCpts,NADH6,PFLi,RPE
268	5	2.92149	0.26881	ADHEr,ATPS4r,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
269	5	2.76831	0.35787	ADHEr,HEX1,PFLi,PPS,RPE
270	5	2.73201	0.30945	ADHEr,HEX1,MDH,PFLi,RPE
271	5	2.69754	0.35901	ADHEr,HEX1,PFLi,PPS,TAL
272	5	2.69256	0.22448	ATPS4r,NADH6,PPCK,PYK,RPE
273	5	2.67071	0.31025	ADHEr,HEX1,MDH,PFLi,TAL
274	5	2.63273	0.17703	ATPS4r,PFLi,PPCK,PYK,RPE
275	5	2.61965	0.35455	ADHEr,ATPS4r,HEX1,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
276	5	2.5479	0.2938	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,THD2 및/또는 GLUDy
277	5	2.5408	0.35457	ADHEr,ATPS4r,HEX1,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
278	5	2.51093	0.22563	ATPS4r,NADH6,PPCK,PYK,TAL
279	5	2.50239	0.09117	GLCpts,PFLi,PGI,PPCK,PYK
280	5	1.97671	0.25583	ACKr 및/또는 PTAr,MDH,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
281	5	1.41987	0.33925	ACKr 및/또는 PTAr,FUM,HEX1,PFLi,RPE
282	5	1.41694	0.31779	ACKr 및/또는 PTAr,GLU5K,NADH6,PFLi,RPE
283	5	1.41694	0.31779	ACKr 및/또는 PTAr,G5SD,NADH6,PFLi,RPE
284	5	1.35397	0.34014	ACKr 및/또는 PTAr,FUM,GLU5K,HEX1,PFLi
285	5	1.35397	0.34014	ACKr 및/또는 PTAr,FUM,G5SD,HEX1,PFLi
286	5	1.35324	0.31986	ACKr 및/또는 PTAr,GLU5K,NADH6,PFLi,TAL
287	5	1.35324	0.31986	ACKr 및/또는 PTAr,G5SD,NADH6,PFLi,TAL
288	5	1.34703	0.34051	ACKr 및/또는 PTAr,FUM,HEX1,PFLi,TAL
289	5	1.16644	0.24173	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
290	5	0.935	0.24579	ACKr 및/또는 PTAr,ACS,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
291	5	0.5376	0.11141	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLUDy,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
292	5	0.44145	0.36033	HEX1,PFLi,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy

[0895]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
293	5	0.41407	0.27855	ACKr 및/또는 PTAr,ACS,FUM,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
294	5	0.34153	0.21403	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
295	5	0.29506	0.27092	FUM,PFLi,PGDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
296	5	0.29506	0.27092	FUM,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
297	5	0.29233	0.27766	FUM,GLYCL,PFLi,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
298	2	1.72604	0.38773	ADHEr,ATPS4r
299	2	0.83466	0.26712	ADHEr,PGI
300	3	4.11897	0.24338	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,PGI
301	3	2.0373	0.38161	ADHEr,ATPS4r,RPE
302	3	1.89007	0.3845	ADHEr,ATPS4r,TAL
303	3	1.49147	0.26024	ADHEr,PFLi,PGI
304	4	6.93034	0.18126	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,NADH6,PGI
305	4	6.91845	0.19552	ADHEr,HEX1,PFLi,PGI
306	4	6.14899	0.1758	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,PFLi,PGI
307	4	5.81422	0.16481	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,PGI
308	4	4.23803	0.24209	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,PGI
309	4	3.23462	0.28717	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,SUCOAS
310	4	2.60615	0.3202	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PFLi
311	4	2.54001	0.22798	ADHEr,PFLi,PGDH,PGI
312	4	2.5259	0.22921	ADHEr,PFLi,PGI,TAL
313	4	2.5129	0.23034	ADHEr,PFLi,PGI,RPE
314	4	2.50442	0.16853	ADHEr,ATPS4r,PFLi,PGI
315	4	1.5933	0.25891	ADHEr,FUM,PFLi,PGI
316	5	7.08404	0.12641	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,NADH6,PFLi,PGI
317	5	7.0245	0.10838	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,PFLi,PGI,PPCK
318	5	6.58534	0.16513	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLCpts,PFLi,PGI
319	5	6.36357	0.11937	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
320	5	6.22082	0.11375	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,PFLi,PGI
321	5	5.08219	0.13778	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PFLi,PGI
322	5	2.7362	0.31504	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PFLi,RPE
323	5	2.67469	0.31748	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PFLi,TAL
324	5	2.60629	0.2178	ADHEr,PFLi,PGDH,PGI,TAL
325	5	2.05497	0.19746	ADHEr,ASPT,ATPS4r,PGI,THD5
326	5	1.65594	0.25767	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,PFLi,PGI
327	6	7.82999	0.02101	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
328	6	7.21161	0.05631	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,HEX1,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
329	6	7.16447	0.10326	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PYK
330	6	6.97749	0.0848	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,PFLi,PGI
331	6	6.89088	0.16538	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy
332	6	6.86543	0.14022	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi
333	6	6.72704	0.08076	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,NADH6,PYK
334	6	6.72704	0.08076	ADHEr,ASPT,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK
335	6	6.67303	0.15616	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
336	6	6.67303	0.15616	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy

신규 고안물 서열	탄아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
337	6	6.62564	0.17535	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
338	6	6.44535	0.24832	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
339	6	6.44535	0.24832	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
340	6	6.3515	0.04992	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
341	6	6.3052	0.17034	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,PGDH
342	6	6.25221	0.15227	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH
343	6	6.22508	0.18792	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
344	6	6.20871	0.17434	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,PFLi,PGI,THD5
345	6	6.19852	0.09326	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
346	6	6.19408	0.16324	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK
347	6	6.19255	0.17194	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,TAL
348	6	6.18674	0.18098	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6
349	6	6.18358	0.11862	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,NADH6,PFLi
350	6	6.12313	0.19075	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6
351	6	6.09846	0.03275	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
352	6	6.09846	0.03275	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
353	6	6.08794	0.17343	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,RPE
354	6	6.01307	0.17456	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
355	6	6.00837	0.14517	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
356	6	5.99004	0.18339	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
357	6	5.9797	0.19373	ACKr 및/또는 PTAr,ACS,ADHEr,HEX1,PGI,PPS
358	6	5.97334	0.11266	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6,PFLi,PGI
359	6	5.96643	0.16387	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,MDH,PYK,RPE
360	6	5.8983	0.16412	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,MDH,PYK,TAL
361	6	5.89777	0.06803	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,HEX1,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
362	6	5.81808	0.13048	ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6,PFLi,PGI
363	6	5.77313	0.13132	ADHEr,ATPS4r,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
364	6	5.75832	0.26044	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLU5K,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
365	6	5.75832	0.26044	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,G5SD,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
366	6	5.75556	0.13165	ADHEr,ATPS4r,FUM,NADH6,PFLi,PGI
367	6	5.68405	0.15589	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
368	6	5.64518	0.25081	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
369	6	5.61474	0.1274	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
370	6	5.57706	0.11542	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
371	6	5.55724	0.20645	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6
372	6	5.39028	0.01098	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
373	6	5.36336	0.12039	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
374	6	5.35114	0.12824	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi,PGI,RPE
375	6	5.34992	0.12867	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi,PGI,RPE
376	6	5.34421	0.12775	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi,PGI,TAL
377	6	5.34298	0.12817	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi,PGI,TAL
378	6	5.33668	0.12721	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi,PGDH,PGI

[0896]

[0897]

신규 고인물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
379	6	5.33544	0.12763	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
380	6	5.3133	0.13509	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
381	6	5.30121	0.14588	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PPCK,RPE
382	6	5.29298	0.14544	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PPCK,TAL
383	6	5.28823	0.16642	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK
384	6	5.28401	0.14496	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
385	6	5.28401	0.14496	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PGDH,PPCK
386	6	5.28388	0.145	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
387	6	5.23479	0.26578	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
388	6	5.22487	0.16488	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
389	6	5.22487	0.16488	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
390	6	5.18966	0.19912	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
391	6	5.18966	0.19912	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
392	6	5.17671	0.18111	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
393	6	5.17275	0.18244	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
394	6	5.16547	0.14992	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,PFLi
395	6	5.14231	0.02949	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
396	6	5.1335	0.31969	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
397	6	5.12241	0.20902	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
398	6	5.11384	0.20727	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
399	6	5.1046	0.2054	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
400	6	5.00987	0.10652	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
401	6	4.99324	0.24292	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
402	6	4.98859	0.24448	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
403	6	4.91516	0.18237	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK
404	6	4.91516	0.18237	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
405	6	4.90997	0.20313	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
406	6	4.86469	0.20078	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,PFLi,PPCK,RPE
407	6	4.79988	0.22937	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,MDH,NADH6,PYK
408	6	4.75998	0.22327	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
409	6	4.75998	0.22327	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
410	6	4.75352	0.20131	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,PFLi,PPCK,TAL
411	6	4.72575	0.27672	ADHEr,ATPS4r,FDH2,HEX1,LDH_D,NADH6
412	6	4.68468	0.22968	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
413	6	4.67203	0.24577	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
414	6	4.6646	0.15914	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
415	6	4.6568	0.25634	ADHEr,ATPS4r,ICL,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
416	6	4.6568	0.25634	ADHEr,ATPS4r,FUM,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
417	6	4.6568	0.25634	ADHEr,ATPS4r,MALS,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
418	6	4.64861	0.22305	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
419	6	4.61213	0.23585	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
420	6	4.54731	0.14834	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
421	6	4.45035	0.18822	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PYK,RPE

[0898]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
422	6	4.44107	0.285	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6
423	6	4.37848	0.18825	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PYK,TAL
424	6	4.35711	0.22671	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6
425	6	4.30745	0.05232	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
426	6	4.29111	0.05856	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
427	6	4.29026	0.24034	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,G5SD,GLYCL,PGI
428	6	4.29026	0.24034	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLU5K,GLYCL,PGI
429	6	4.19017	0.18892	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
430	6	4.14405	0.19951	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGDH,PPCK
431	6	4.14405	0.19951	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
432	6	4.14405	0.19951	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH,PPCK
433	6	4.13843	0.19251	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,PPCK,RPE
434	6	4.11865	0.20026	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
435	6	4.11865	0.20026	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
436	6	4.10258	0.11665	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,PPCK,PYK,SUCOAS
437	6	4.09791	0.11017	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
438	6	4.09791	0.11017	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
439	6	4.09533	0.20095	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
440	6	4.09533	0.20095	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
441	6	4.08336	0.13789	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
442	6	4.08234	0.13828	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
443	6	4.0683	0.31169	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
444	6	4.05789	0.14762	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
445	6	4.04139	0.17129	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
446	6	3.97871	0.17786	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
447	6	3.95205	0.10694	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,PGDH,PGI,SUCOAS
448	6	3.95184	0.18812	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
449	6	3.94624	0.19026	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
450	6	3.94455	0.21245	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
451	6	3.94203	0.1079	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,PGI,SUCOAS,TAL
452	6	3.93874	0.25675	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
453	6	3.93273	0.1088	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,PGI,RPE,SUCOAS
454	6	3.91186	0.22634	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
455	6	3.90038	0.04761	ADHEr,GLCpts,NADH6,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
456	6	3.8947	0.05032	ADHEr,FUM,GLCpts,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
457	6	3.8947	0.05032	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
458	6	3.84046	0.12564	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
459	6	3.81228	0.08972	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,NADH6,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
460	6	3.81228	0.08972	ADHEr,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
461	6	3.76251	0.07312	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy

[0899]

산규 고안물 서열	녁아웃 수	6ACA. 수율	바아오매스	반응목록
462	6	3.70324	0.1395	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
463	6	3.70023	0.1556	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
464	6	3.70023	0.1556	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
465	6	3.67651	0.1546	ADHEr,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,PYK
466	6	3.67651	0.1546	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,MDH,NADH6,PPCK,PYK
467	6	3.652	0.16631	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
468	6	3.64497	0.19156	ADHEr,FUM,GLCpts,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
469	6	3.62254	0.1804	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
470	6	3.5494	0.21535	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
471	6	3.41696	0.27865	ADHEr,DAAD,FDH2,NADH12,NADH6,PRO1z
472	6	3.41696	0.27865	ADHEr,ALAR,FDH2,NADH12,NADH6,PRO1z
473	6	3.40228	0.13474	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
474	6	3.27381	0.03414	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
475	6	3.22868	0.19148	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
476	6	3.11905	0.12289	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
477	6	3.11905	0.12289	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
478	6	3.10777	0.12936	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
479	6	3.10777	0.12936	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
480	6	2.9427	0.20328	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MALS,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
481	6	2.9427	0.20328	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,ICL,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
482	6	2.80361	0.3231	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
483	6	2.79375	0.29126	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
484	6	2.68652	0.29222	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
485	6	2.62059	0.29297	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
486	6	2.46956	0.30762	ADHEr,FUM,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
487	6	0.97386	0.28207	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,SUCOAS
488	6	0.97386	0.28207	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ICL,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,SUCOAS
489	6	0.97386	0.28207	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,MDH,PGDH,SUCOAS
490	6	0.97386	0.28207	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,MALS,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,SUCOAS
491	6	0.97386	0.28207	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ICL,MDH,PGDH,SUCOAS
492	6	0.97386	0.28207	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,MALS,MDH,PGDH,SUCOAS
493	6	0.90686	0.28301	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,MALS,MDH,SUCOAS,TAL
494	6	0.90686	0.28301	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ICL,MDH,SUCOAS,TAL
495	6	0.84537	0.28387	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ICL,MDH,RPE,SUCOAS
496	6	0.84537	0.28387	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,MALS,MDH,RPE,SUCOAS
497	3	3.26272	0.35236	ADHEr,LDH_D,NADH6
498	3	2.8403	0.28275	ADHEr,LDH_D,PPCK
499	3	1.72604	0.38773	ADHEr,ATPS4r,LDH_D
500	3	0.89333	0.37885	ADHEr,FUM,LDH_D

전규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
501	3	0.83466	0.26712	ADHEr,LDH_D,PGI
502	3	0.41621	0.38953	ADHEr,HEX1,LDH_D
503	4	5.71646	0.21908	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI
504	4	4.83364	0.29669	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi
505	4	4.11897	0.24338	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI
506	4	3.77533	0.25553	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH
507	4	3.65248	0.19372	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI
508	4	3.47283	0.25194	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK
509	4	3.39319	0.29001	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6
510	4	3.35305	0.34906	ADHEr,LDH_D,NADH6,RPE
511	4	3.0877	0.16431	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK
512	4	2.90019	0.24841	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK
513	4	2.89855	0.2815	ADHEr,LDH_D,PPCK,RPE
514	4	2.88617	0.25645	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
515	4	2.72186	0.35068	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D
516	4	2.0373	0.38161	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,RPE
517	4	1.89007	0.3845	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TAL
518	4	1.49147	0.26024	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI
519	4	0.5753	0.38695	ADHEr,HEX1,LDH_D,RPE
520	4	0.49968	0.38818	ADHEr,HEX1,LDH_D,TAL
521	5	6.93034	0.18126	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,NADH6,PGI
522	5	6.92332	0.16482	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PGI
523	5	6.91845	0.19552	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
524	5	6.89839	0.18171	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI
525	5	6.14899	0.1758	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI
526	5	5.8701	0.13379	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI,PPCK
527	5	5.85757	0.23874	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
528	5	5.85411	0.19685	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI,PPS
529	5	5.81422	0.16481	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI
530	5	5.40131	0.26362	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
531	5	4.88764	0.27849	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
532	5	4.88489	0.27942	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi
533	5	4.81778	0.26037	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
534	5	4.73419	0.21859	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
535	5	4.63783	0.29595	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6
536	5	4.30547	0.19131	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGI
537	5	4.2733	0.23078	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK
538	5	4.23803	0.24209	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI
539	5	4.12032	0.32701	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6
540	5	3.9718	0.23354	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK
541	5	3.9718	0.23354	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK
542	5	3.8747	0.21758	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH
543	5	3.84814	0.25342	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,RPE
544	5	3.83986	0.2047	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK
545	5	3.75472	0.32987	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6

[0900]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA. 수율	바이오매스	반응목록
546	5	3.54965	0.29114	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
547	5	3.54605	0.21695	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
548	5	3.54385	0.218	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
549	5	3.53615	0.25027	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
550	5	3.5018	0.32809	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D
551	5	3.46904	0.25375	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
552	5	3.46528	0.28851	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
553	5	3.44916	0.13425	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
554	5	3.44555	0.26498	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
555	5	3.43776	0.29402	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
556	5	3.33377	0.2967	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
557	5	3.33152	0.33978	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TAL
558	5	3.32935	0.34088	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
559	5	3.32788	0.32122	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6
560	5	3.31278	0.3493	ADHEr,G5SD,LDH_D,NADH6,TAL
561	5	3.31278	0.3493	ADHEr,GLU5K,LDH_D,NADH6,TAL
562	5	3.23462	0.28717	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,SUCOAS
563	5	3.17484	0.10602	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
564	5	3.16614	0.11184	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
565	5	3.16614	0.11184	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
566	5	3.11125	0.24826	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
567	5	2.95529	0.24477	ADHEr,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
568	5	2.95136	0.24731	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK,RPE
569	5	2.94249	0.25305	ADHEr,FUM,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
570	5	2.93765	0.22693	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
571	5	2.93765	0.22693	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
572	5	2.9332	0.24406	ADHEr,LDH_D,PPCK,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
573	5	2.90913	0.24328	ADHEr,LDH_D,PGDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
574	5	2.90913	0.24328	ADHEr,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
575	5	2.90081	0.26381	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
576	5	2.90081	0.26381	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
577	5	2.79498	0.34856	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,RPE
578	5	2.61943	0.36027	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS
579	5	2.60615	0.3202	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi
580	5	2.60314	0.31113	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
581	5	2.54001	0.22798	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI
582	5	2.5259	0.22921	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,TAL
583	5	2.5129	0.23034	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,RPE
584	5	2.50442	0.16853	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGI
585	5	2.45433	0.3546	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
586	5	2.18633	0.3609	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
587	5	2.11347	0.31979	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH
588	5	1.5933	0.25891	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI
589	5	0.9475	0.3633	ADHEr,FUM,LDH_D,PGDH,TAL

[0901]

신규 관련물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
590	5	0.9475	0.3633	ADHEr,FUM,LDH_D,PGL and/or G6PDHy,TAL
591	6	7.08404	0.12641	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
592	6	7.0245	0.10838	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
593	6	6.98742	0.06748	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
594	6	6.69134	0.13239	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH
595	6	6.58534	0.16513	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI
596	6	6.55123	0.09841	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK
597	6	6.55123	0.09841	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PYK
598	6	6.36357	0.11937	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
599	6	6.22082	0.11375	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI
600	6	5.98165	0.07186	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI,PPCK
601	6	5.93527	0.09761	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLCpts,LDH_D,PGI,PPCK
602	6	5.87444	0.0434	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FUM,LDH_D,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
603	6	5.87444	0.0434	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
604	6	5.65488	0.26204	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
605	6	5.59555	0.20952	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
606	6	5.1776	0.13724	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
607	6	5.11744	0.13758	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
608	6	5.11744	0.13758	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI
609	6	5.09877	0.17589	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
610	6	5.08219	0.13778	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
611	6	5.02693	0.21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
612	6	5.02693	0.21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
613	6	5.00057	0.21154	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
614	6	4.97638	0.21218	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
615	6	4.88512	0.29281	ADHEr,GLU5K,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
616	6	4.88512	0.29281	ADHEr,G5SD,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
617	6	4.885	0.29286	ADHEr,ASNS2,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
618	6	4.85776	0.29446	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,RPE
619	6	4.83644	0.29517	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,TAL
620	6	4.66386	0.18074	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK
621	6	4.66386	0.18074	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
622	6	4.63095	0.20189	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
623	6	4.49707	0.25782	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
624	6	4.4958	0.1778	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PYK
625	6	4.41977	0.25646	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
626	6	4.18509	0.32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy
627	6	4.18509	0.32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGDH
628	6	4.15013	0.1124	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
629	6	4.14582	0.32483	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
630	6	4.1099	0.32529	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE

[0902]

[0903]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA. 수율	바이오매스	반응목록
631	6	4.04473	0.12883	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,PPCK
632	6	4.03844	0.12934	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,TAL
633	6	4.03266	0.12981	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,RPE
634	6	4.02531	0.1111	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
635	6	3.9367	0.21579	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,RPE
636	6	3.76049	0.30843	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi
637	6	3.71345	0.27754	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH,TAL
638	6	3.69299	0.14673	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
639	6	3.64625	0.1409	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,PPCK
640	6	3.64625	0.1409	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,PPCK
641	6	3.60057	0.21551	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
642	6	3.59735	0.21725	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK,RPE
643	6	3.59622	0.19297	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
644	6	3.59622	0.19297	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
645	6	3.59594	0.19311	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
646	6	3.59594	0.19311	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK
647	6	3.59157	0.1952	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
648	6	3.55204	0.22769	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,TAL
649	6	3.55204	0.22769	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
650	6	3.53212	0.25244	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
651	6	3.52326	0.22785	ADHEr,GLU5K,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
652	6	3.52326	0.22785	ADHEr,G5SD,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
653	6	3.52326	0.22785	ADHEr,FUM,GLU5K,LDH_D,NADH6,PPCK
654	6	3.52326	0.22785	ADHEr,FUM,G5SD,LDH_D,NADH6,PPCK
655	6	3.52319	0.22788	ADHEr,ASNS2,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK
656	6	3.52319	0.22788	ADHEr,ASNS2,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
657	6	3.51328	0.26261	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
658	6	3.40958	0.31856	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
659	6	3.19551	0.34972	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
660	6	2.95797	0.22895	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,TAL
661	6	2.95797	0.22895	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
662	6	2.94768	0.30664	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
663	6	2.92149	0.26881	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
664	6	2.76831	0.35787	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,RPE
665	6	2.7362	0.31504	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,RPE
666	6	2.73201	0.30945	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,RPE
667	6	2.69754	0.35901	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,TAL
668	6	2.67469	0.31748	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,TAL
669	6	2.67071	0.31025	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,TAL
670	6	2.61965	0.35455	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
671	6	2.60629	0.2178	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,TAL
672	6	2.5479	0.2938	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
673	6	2.5408	0.35457	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
674	6	2.05497	0.19746	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,PGI,THD5
675	6	1.65594	0.25767	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI

신규 고안물 서열	탄아웃 수	6ACA. 수율	바이오매스	반응목록
676	7	7.90077	0.01226	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
677	7	7.84104	0.01965	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
678	7	7.7052	0.03644	ADHEr,ASPT,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
679	7	7.67191	0.04055	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
680	7	7.61518	0.06956	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
681	7	7.57942	0.07603	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
682	7	7.57942	0.07603	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGDH
683	7	7.57606	0.07664	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
684	7	7.57606	0.07664	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,TAL
685	7	7.57295	0.0772	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
686	7	7.57295	0.0772	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,RPE
687	7	7.55163	0.08105	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
688	7	7.38115	0.07649	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi
689	7	7.293	0.07152	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
690	7	7.21161	0.05631	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,HEX1,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
691	7	7.10953	0.03056	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
692	7	7.04629	0.01861	ADHEr,ARGt4,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
693	7	7.04629	0.01861	ADHEr,ARGt4,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
694	7	7.01619	0.17329	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
695	7	7.00623	0.10284	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
696	7	7.00542	0.17519	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
697	7	6.99744	0.05155	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
698	7	6.99744	0.05155	ACKr and/or PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
699	7	6.99744	0.05155	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
700	7	6.99618	0.02608	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
701	7	6.99539	0.17696	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
702	7	6.99098	0.13845	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy
703	7	6.99098	0.13845	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi
704	7	6.97749	0.0848	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
705	7	6.95495	0.04834	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
706	7	6.94643	0.04549	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
707	7	6.94643	0.04549	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
708	7	6.94035	0.16409	ACKr 및/또는

[0904]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
				PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
709	7	6.93216	0.19304	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
710	7	6.9218	0.16465	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
711	7	6.90477	0.16517	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
712	7	6.89223	0.07039	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
713	7	6.89088	0.16538	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PGDH
714	7	6.88301	0.07117	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
715	7	6.88301	0.07117	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
716	7	6.86164	0.16622	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,TAL
717	7	6.83471	0.167	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,RPE
718	7	6.81823	0.05671	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
719	7	6.75858	0.12153	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
720	7	6.75858	0.12153	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
721	7	6.74354	0.0559	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
722	7	6.72704	0.08076	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PYK
723	7	6.72704	0.08076	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK
724	7	6.72478	0.09245	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
725	7	6.71779	0.1313	ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
726	7	6.71371	0.1397	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
727	7	6.69882	0.08259	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
728	7	6.69814	0.08084	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
729	7	6.68517	0.13281	ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
730	7	6.67827	0.0833	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
731	7	6.67803	0.08153	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
732	7	6.66553	0.13149	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
733	7	6.65922	0.08397	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
734	7	6.65477	0.13422	ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
735	7	6.65444	0.13292	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
736	7	6.64411	0.13426	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
737	7	6.54706	0.05865	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
738	7	6.50546	0.0488	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,FUM,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
739	7	6.4951	0.09302	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
740	7	6.48152	0.09261	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,TAL,THD2

[0905]

[0906]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
				및/또는 GLUDy
741	7	6.4815	0.14937	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
742	7	6.4814	0.1488	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
743	7	6.48129	0.14819	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
744	7	6.46677	0.09217	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
745	7	6.46677	0.09217	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
746	7	6.40404	0.13985	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
747	7	6.39358	0.0544	ADHEr,ASPT,FUM,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
748	7	6.36333	0.16503	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
749	7	6.35537	0.14906	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PYK
750	7	6.34075	0.15004	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FDH2,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
751	7	6.33847	0.16728	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
752	7	6.30136	0.19463	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
753	7	6.30082	0.1583	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PYK
754	7	6.23552	0.18763	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
755	7	6.23519	0.15548	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
756	7	6.22748	0.15693	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
757	7	6.22033	0.15828	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
758	7	6.2176	0.1588	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
759	7	6.21321	0.15963	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
760	7	6.20917	0.16039	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
761	7	6.20871	0.17434	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD5
762	7	6.18575	0.17904	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FDH2,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6
763	7	6.17771	0.01562	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
764	7	6.17771	0.01562	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
765	7	6.10255	0.12296	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
766	7	6.08364	0.10963	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
767	7	6.05909	0.217	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy

[0907]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
768	7	5.99909	0.09659	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
769	7	5.99909	0.09659	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK
770	7	5.9797	0.19373	ACKr 및/또는 PTAr,ACS,ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI,PPS
771	7	5.97334	0.11266	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI
772	7	5.94122	0.14646	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,PYK
773	7	5.94122	0.14646	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,PYK
774	7	5.9395	0.02821	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
775	7	5.89777	0.06803	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,HEX1,LDH_D,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
776	7	5.86803	0.06511	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
777	7	5.84763	0.01509	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
778	7	5.80727	0.03994	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
779	7	5.80665	0.23182	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
780	7	5.77313	0.13132	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
781	7	5.77052	0.23124	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
782	7	5.75832	0.26044	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,G5SD,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
783	7	5.75832	0.26044	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLU5K,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
784	7	5.75556	0.13165	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
785	7	5.75413	0.21628	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
786	7	5.75142	0.15	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
787	7	5.75142	0.15	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
788	7	5.73569	0.11619	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
789	7	5.73112	0.23062	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
790	7	5.73112	0.23062	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,THD2 및/또는 GLUDy
791	7	5.7037	0.1229	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
792	7	5.7037	0.1229	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
793	7	5.67082	0.04313	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
794	7	5.67082	0.04313	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
795	7	5.6689	0.01529	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
796	7	5.57706	0.11542	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
797	7	5.57479	0.20482	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
798	7	5.56128	0.20483	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,THD2 및/또는 GLUDy
799	7	5.53687	0.15179	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 및/또는

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
				GLUDy
800	7	5.48032	0.07882	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
801	7	5.48032	0.07882	ADHEr,ATPS4r,FDH2,FUM,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
802	7	5.4574	0.07896	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
803	7	5.43688	0.14109	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 및/또는GLUDy
804	7	5.42926	0.03599	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는GLUDy
805	7	5.41288	0.10644	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,RPE
806	7	5.41288	0.10644	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK,RPE
807	7	5.40727	0.10598	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,TAL
808	7	5.40727	0.10598	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK,TAL
809	7	5.40541	0.10406	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
810	7	5.40329	0.10477	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
811	7	5.40329	0.10477	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
812	7	5.40117	0.10549	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,PGI,PPCK
813	7	5.40117	0.10549	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,PPCK
814	7	5.38947	0.11011	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
815	7	5.37417	0.11441	ACKr 및/또는PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
816	7	5.37043	0.12143	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI,RPE
817	7	5.37015	0.12013	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
818	7	5.36414	0.12087	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI,TAL
819	7	5.3573	0.12027	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
820	7	5.3512	0.12232	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z,THD2 및/또는 GLUDy
821	7	5.35114	0.12824	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI,RPE
822	7	5.34992	0.12867	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,RPE
823	7	5.34421	0.12775	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI,TAL
824	7	5.34298	0.12817	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,TAL
825	7	5.33668	0.12721	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
826	7	5.33544	0.12763	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
827	7	5.32853	0.04869	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
828	7	5.32586	0.13717	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
829	7	5.31986	0.13616	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
830	7	5.31768	0.14006	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,RPE
831	7	5.31768	0.14006	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
832	7	5.31338	0.13506	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
833	7	5.31338	0.13506	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
834	7	5.31161	0.139	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
835	7	5.31161	0.139	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,TAL
836	7	5.30507	0.13786	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
837	7	5.30507	0.13786	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,PPCK

[0908]

[0909]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
838	7	5.30507	0.13786	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
839	7	5.30121	0.14588	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
840	7	5.29298	0.14544	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
841	7	5.29144	0.14245	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
842	7	5.28753	0.08933	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
843	7	5.28422	0.14489	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
844	7	5.28422	0.14489	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
845	7	5.28401	0.14496	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
846	7	5.28401	0.14496	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
847	7	5.27588	0.18393	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
848	7	5.27588	0.18393	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
849	7	5.2736	0.14846	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
850	7	5.25759	0.18586	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
851	7	5.24329	0.06953	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
852	7	5.24057	0.18767	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
853	7	5.23194	0.07004	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
854	7	5.22143	0.07051	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
855	7	5.1096	0.03265	ADHEr,ASPT,FUM,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
856	7	5.07833	0.23187	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
857	7	4.9126	0.20186	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
858	7	4.9126	0.20186	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
859	7	4.89537	0.08136	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
860	7	4.86469	0.20078	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE
861	7	4.86188	0.1035	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
862	7	4.85917	0.04186	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
863	7	4.85917	0.04186	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
864	7	4.84043	0.16101	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
865	7	4.75352	0.20131	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL
866	7	4.6646	0.15914	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
867	7	4.6568	0.25634	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MALS,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
868	7	4.6568	0.25634	ADHEr,ATPS4r,ICL,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
869	7	4.6568	0.25634	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
870	7	4.60984	0.1687	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy

[0910]

신규 고안물 서열	탄아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
871	7	4.60771	0.13834	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
872	7	4.5647	0.0741	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
873	7	4.51839	0.16783	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
874	7	4.48284	0.18237	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK
875	7	4.46608	0.18828	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6
876	7	4.43524	0.31394	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS
877	7	4.43524	0.31394	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
878	7	4.43072	0.22439	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,RPE
879	7	4.41919	0.16689	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
880	7	4.4053	0.01495	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
881	7	4.39394	0.31457	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,TAL
882	7	4.37728	0.02565	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
883	7	4.37061	0.04989	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
884	7	4.36653	0.05265	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
885	7	4.36374	0.03082	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
886	7	4.36277	0.03119	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
887	7	4.35613	0.31514	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,RPE
888	7	4.29026	0.24034	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLU5K,GLYCL,LDH_D,PGI
889	7	4.29026	0.24034	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,G5SD,GLYCL,LDH_D,PGI
890	7	4.25283	0.07318	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
891	7	4.17894	0.31889	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
892	7	4.17527	0.08598	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,MALS,THD2 및/또는 GLUDy
893	7	4.17527	0.08598	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,ICL,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
894	7	4.17215	0.10398	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
895	7	4.15042	0.11229	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
896	7	4.14938	0.11268	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
897	7	4.141	0.08314	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
898	7	4.10258	0.11665	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,PYK,SUCOAS
899	7	4.08743	0.09886	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
900	7	4.04907	0.15099	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
901	7	4.03008	0.1761	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
902	7	4.01398	0.06136	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy

[0911]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
903	7	4.00698	0.18592	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,RPE
904	7	4.00128	0.18834	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
905	7	3.95205	0.10694	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGDH,PGI,SUCOAS
906	7	3.94203	0.1079	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGI,SUCOAS,TAL
907	7	3.93273	0.1088	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGI,RPE,SUCOAS
908	7	3.90038	0.04761	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
909	7	3.8947	0.05032	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
910	7	3.8947	0.05032	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
911	7	3.88125	0.03656	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
912	7	3.86624	0.19846	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,CITL,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
913	7	3.82356	0.31976	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
914	7	3.81228	0.08972	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
915	7	3.81228	0.08972	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
916	7	3.77115	0.10937	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
917	7	3.7291	0.12947	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
918	7	3.7245	0.13167	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
919	7	3.68994	0.14818	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
920	7	3.67651	0.1546	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,PYK
921	7	3.67651	0.1546	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK
922	7	3.64497	0.19156	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
923	7	3.60739	0.21183	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
924	7	3.41696	0.27865	ADHEr,ALAR,FDH2,LDH_D,NADH12,NADH6,PRO1z
925	7	3.41696	0.27865	ADHEr,DAAD,FDH2,LDH_D,NADH12,NADH6,PRO1z
926	7	3.40396	0.28486	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
927	7	3.25909	0.04258	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
928	7	3.25909	0.04258	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
929	7	3.2372	0.06431	ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
930	7	3.2372	0.06431	ADHEr,FBP,FUM,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
931	7	3.23399	0.06432	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
932	7	3.23399	0.06432	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
933	7	3.22783	0.06435	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,PPCK,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
934	7	3.22783	0.06435	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,TAL,THD2 및/또는 GLUDy

신규 고안물 서열	녹아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
935	7	3.01859	0.19992	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
936	7	3.00174	0.19757	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MALS,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
937	7	3.00174	0.19757	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,ICL,LDH_D,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
938	7	2.96091	0.22716	ADHEr,FUM,GLUDy,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
939	7	2.93716	0.22721	ADHEr,FUM,GLU5K,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
940	7	2.93716	0.22721	ADHEr,FUM,G5SD,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
941	7	2.93711	0.22724	ADHEr,ASNS2,FUM,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
942	7	2.7731	0.32129	ADHEr,ASNS2,FUM,GLU5K,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
943	7	2.7731	0.32129	ADHEr,ASNS2,FUM,G5SD,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
944	7	2.68652	0.29222	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
945	7	2.62059	0.29297	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
946	7	2.35991	0.29396	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,RPE,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
947	7	2.35766	0.29368	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,SUCOAS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
948	7	2.3552	0.29337	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
949	7	2.3552	0.29337	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PGDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
950	7	1.91133	0.2766	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,SUCOAS
951	7	1.91133	0.2766	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS
952	7	1.91133	0.2766	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS
953	7	1.91133	0.2766	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,SUCOAS
954	7	1.91133	0.2766	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,SUCOAS
955	7	1.91133	0.2766	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,PGDH,SUCOAS
956	7	1.86676	0.2774	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
957	7	1.86676	0.2774	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,SUCOAS,TAL
958	7	1.86676	0.2774	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
959	7	1.8259	0.27813	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,RPE,SUCOAS
960	7	1.8259	0.27813	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
961	7	1.8259	0.27813	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
962	7	1.11652	0.25888	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MALS,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
963	7	1.11652	0.25888	ADHEr,ASPT,FUM,ICL,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
964	5	7.09275	0.11213	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi
965	5	6.00696	0.20464	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi
966	5	5.40138	0.11184	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI

[0912]

신규 고안물 서열	탄소 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
967	5	2.59719	0.29318	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi
968	5	2.57488	0.22587	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK
969	5	0.16844	0.19119	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PFLi
970	6	7.39516	0.07475	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi
971	6	7.007	0.09285	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
972	6	6.90414	0.13454	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi
973	6	6.57261	0.1606	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
974	6	6.00781	0.09114	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK
975	6	6.00781	0.09114	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
976	6	5.39072	0.10901	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK
977	6	5.38861	0.10972	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
978	6	5.38861	0.10972	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK
979	6	5.06553	0.21856	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
980	6	5.00212	0.2515	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
981	6	4.98367	0.25221	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,TAL
982	6	4.96609	0.25206	ADHEr,GLU5K,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
983	6	4.96609	0.25206	ADHEr,G5SD,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
984	6	4.96599	0.2521	ADHEr,ASNS2,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
985	6	4.95562	0.24186	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
986	6	2.71835	0.29123	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,RPE
987	6	2.66849	0.22473	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE
988	6	2.66076	0.29216	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,TAL
989	6	1.85699	0.28717	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,SUCOAS
990	6	1.63724	0.03081	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
991	6	1.63724	0.03081	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
992	6	1.38263	0.33268	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
993	6	0.25855	0.07515	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi
994	7	7.86642	0.01651	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PYK
995	7	7.71509	0.0515	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,PPS
996	7	7.70416	0.03656	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
997	7	7.48515	0.04452	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
998	7	7.44181	0.09832	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
999	7	7.06656	0.04513	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
1000	7	7.00811	0.04002	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
1001	7	7.00811	0.04002	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK
1002	7	7.00532	0.07752	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
1003	7	6.99105	0.04159	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK
1004	7	6.96695	0.09776	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi
1005	7	6.69345	0.1479	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
1006	7	6.49322	0.12467	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS
1007	7	6.43565	0.1244	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi
1008	7	6.21891	0.18801	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PGDH,PPS
1009	7	6.21891	0.18801	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PGL 및/또는

[0913]

신규 그인돌 서열	노아웃 수	6ACA. 수율	바이오매스	반응목록
				G6PDHy,PPS
1010	7	6.21459	0.18835	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS,TAL
1011	7	6.21064	0.18866	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS,RPE
1012	7	6.16665	0.08397	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
1013	7	6.13458	0.01447	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI,PPCK
1014	7	6.13051	0.01457	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI,PPCK
1015	7	6.13051	0.01457	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,PPCK
1016	7	5.49961	0.07232	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK
1017	7	5.49821	0.07279	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
1018	7	5.49821	0.07279	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK
1019	7	5.22113	0.16614	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
1020	7	5.17418	0.18196	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
1021	7	5.15097	0.18978	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
1022	7	4.01417	0.12149	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
1023	7	3.75439	0.27459	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS
1024	7	3.75439	0.27459	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PPS
1025	7	2.64048	0.21814	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGL and/or G6PDHy,PPCK,TAL
1026	7	2.64048	0.21814	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGDH,PPCK,TAL
1027	7	2.62716	0.22497	ADHEr,GLYCL,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL
1028	7	1.5697	0.24425	ACKr 및/또는PTAr,ACS,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는GLUDy
1029	7	1.09053	0.33566	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PGDH,PPS
1030	7	1.09053	0.33566	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PGL 및/또는G6PDHy,PPS
1031	7	0.78572	0.33663	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPS,TAL
1032	7	0.50621	0.33751	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPS,RPE
1033	8	7.88716	0.0204	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
1034	8	7.88653	0.02051	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,POX
1035	8	7.88026	0.02165	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 및/또는GLUDy
1036	8	7.84104	0.02874	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,PPS
1037	8	7.80925	0.03448	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
1038	8	7.80925	0.03448	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
1039	8	7.67439	0.05735	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
1040	8	7.42051	0.09374	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS
1041	8	7.32674	0.0933	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi
1042	8	6.93593	0.04641	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,PFLi,PPCK,THD2 및/또는GLUDy
1043	8	6.58791	0.09796	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
1044	8	6.58791	0.09796	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,PGDH,PPS
1045	8	6.5802	0.09979	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS,TAL
1046	8	6.57291	0.10152	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS,RPE
1047	8	5.75656	0.15131	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPS,THD2

[0914]

[0915]

신규 고인돌 서열	덕아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
				및/또는GLUDy
1048	8	5.74602	0.16073	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,PFLi,PPS,THD2 및/또는GLUDy
1049	8	5.67321	0.16148	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,PFLi,THD2 및/또는GLUDy
1050	8	5.60169	0.03793	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
1051	8	5.60169	0.03793	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
1052	8	5.56692	0.04965	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
1053	8	5.56692	0.04965	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,PYK
1054	8	5.50925	0.07241	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
1055	8	5.50597	0.07191	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
1056	8	5.50242	0.07138	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,THD2 및/또는GLUDy
1057	8	5.50242	0.07138	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PGDH,PPCK,THD2 및/또는GLUDy
1058	8	5.44507	0.0907	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z,THD2 및/또는GLUDy
1059	8	5.37306	0.11496	ADHEr,DAAD,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z
1060	8	5.37306	0.11496	ADHEr,ALAR,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z
1061	8	5.33606	0.12742	ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PYK
1062	8	5.17764	0.18079	ADHEr,DAAD,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z
1063	8	5.17764	0.18079	ADHEr,ALAR,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z
1064	8	5.17492	0.2398	ACKr 및/또는PTAr,ACS,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는GLUDy
1065	8	4.65995	0.20434	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PPS,RPE
1066	8	4.6123	0.20163	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PPS,TAL
1067	8	4.56149	0.19874	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,PPS
1068	8	4.13777	0.23628	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,RPE
1069	8	4.06785	0.23403	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,TAL
1070	8	4.04062	0.10178	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PDH,PFLi,PPS
1071	8	4.04062	0.10178	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PDH,PFLi,PPS
1072	8	3.9927	0.23161	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
1073	8	3.9927	0.23161	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PGDH,PPS
1074	8	2.03637	0.11796	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
1075	8	1.98516	0.11932	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
1076	8	1.93743	0.12058	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FBP,LDH_D,MDH,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
1077	8	1.76983	0.24401	ACKr 및/또는 PTAr,ACS,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
1078	8	1.5107	0.31956	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy,TAL,THD2 및/또는GLUDy

신규 고안물 서열	넉아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
1079	8	1.5107	0.31956	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,PFLi,PGDH,TAL,THD2 및/또는GLUDy
1080	8	1.45644	0.3201	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PGDH,PPS,TAL
1081	8	1.45644	0.3201	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,TAL
1082	3	0.165681142	0.248770484	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는FBA 및/또는TPI
1083	3	2.792461067	0.310192487	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,LDH_D
1084	4	0.245091981	0.278197481	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D
1085	4	1.163607813	0.384018912	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D
1086	4	2.27265597	0.332308612	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6
1087	4	1.260046787	0.384504476	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TKT1
1088	4	1.454891201	0.378757536	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TKT2
1089	4	2.042634808	0.153142196	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK 및/또는FBA 및/또는TPI
1090	4	2.041701304	0.149789093	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는FBA 및/또는TPI,PPCK
1091	4	0.270967943	0.244721556	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는FBA 및/또는TPI,TKT2
1092	4	2.907366868	0.244293538	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK
1093	4	0.363337262	0.340044232	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH
1094	4	2.907366868	0.244293538	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK
1095	4	2.085082479	0.31290916	ADHEr,LDH_D,ME2,NADH6
1096	4	2.881545955	0.259101938	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,LDH_D,ME2
1097	4	3.647199605	0.168610416	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는FBA 및/또는TPI
1098	4	2.774595569	0.320438424	ADHEr,FDH2,LDH_D,NADH6
1099	4	3.335904914	0.317384404	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6
1100	4	3.331989713	0.319255557	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6
1101	4	2.224731454	0.327457036	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT2
1102	4	0.23734264	0.246014656	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는FBA 및/또는TPI,RPE
1103	4	0.454138927	0.26931886	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT2
1104	4	0.413317212	0.38682004	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS
1105	4	2.860294682	0.306273023	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,LDH_D,RPE
1106	4	2.808840722	0.300798688	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,FUM,LDH_D
1107	4	2.817574813	0.295789651	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,HEX1,LDH_D
1108	4	2.916137696	0.239263432	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,LDH_D,MDH
1109	4	2.973865652	0.206156212	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,LDH_D,PPCK
1110	4	2.892050239	0.30443817	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,LDH_D,TKT2
1111	4	0.203360099	0.247321495	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는FBA 및/또는TPI,TAL
1112	4	2.117903686	0.331070152	ADHEr,LDH_D,NADH6,TAL
1113	4	0.34884992	0.271004016	ADHEr,LDH_D,PPCK,TAL
1114	4	2.828154021	0.308130129	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,LDH_D,TAL
1115	4	0.203360099	0.247321495	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는FBA 및/또는TPI,TKT1
1116	4	2.117903686	0.331070152	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT1
1117	4	0.34884992	0.271004016	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT1
1118	4	2.828154021	0.308130129	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,LDH_D,TKT1
1119	5	3.948360602	0.222825522	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TKT2
1120	5	3.966967048	0.182343827	ADHEr,ASPT,FRD 및/또는SUCD4,LDH_D,MDH
1121	5	3.752898719	0.126622688	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는SUCD4,LDH_D,ME2
1122	5	4.408716092	0.258053531	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,THD2 및/또는GLUDy

[0916]

[0917]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
1123	5	6.415221004	0.039824926	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는GLUDy
1124	5	2.983060356	0.241650921	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT2
1125	5	2.997718029	0.231538695	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2 및/또는GLUDy,TKT2
1126	5	2.937396425	0.227071464	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
1127	5	3.001461104	0.190330107	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
1128	5	2.935886887	0.22793719	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
1129	5	3.081083028	0.144666606	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
1130	5	2.988449413	0.197792365	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PRO1z,THD2 및/또는 GLUDy
1131	5	2.948350239	0.234817401	ADHEr,FUM,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
1132	5	3.101419157	0.133003752	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
1133	5	2.948350239	0.234817401	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy,TKT1
1134	5	2.983060356	0.241650921	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT2
1135	5	2.916137696	0.239263432	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,ME2
1136	5	3.711787388	0.165696592	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT2
1137	5	3.457829994	0.311699463	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TKT2
1138	5	3.451407023	0.315392099	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT2
1139	5	3.543757983	0.262298527	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT2
1140	5	3.445461549	0.265025086	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6
1141	5	3.609567252	0.224464061	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT2
1142	5	3.691174432	0.166626529	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,RPE
1143	5	3.065706296	0.153485225	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
1144	5	3.071383178	0.15022951	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
1145	5	5.367175665	0.178044995	ADHEr,CBMK2,HEX1,LDH_D,PGI
1146	5	5.888703714	0.106589745	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGI
1147	5	3.110919215	0.148780301	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PGI
1148	5	2.958795095	0.242498072	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
1149	5	2.958795095	0.242498072	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
1150	5	2.936051582	0.257223558	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,RPE
1151	5	3.418935049	0.313512999	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,RPE
1152	5	3.413158878	0.316629525	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
1153	5	2.967063614	0.237144547	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,RPE
1154	5	3.018085814	0.204109778	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,RPE
1155	5	3.009552774	0.185689501	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,PPCK
1156	5	3.009552774	0.185689501	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PPCK
1157	5	2.991038247	0.23614703	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,TKT2
1158	5	2.961772661	0.256337155	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,TKT2
1159	5	3.106778446	0.151550201	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,PGI
1160	5	3.04583421	0.164881948	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,PYK
1161	5	3.038870487	0.203147899	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT2
1162	5	3.886386663	0.225053566	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TAL
1163	5	3.670328799	0.167566962	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TAL

[0918]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	6ACA 수율	바이오매스	반응목록
1164	5	3.480501908	0.264053132	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
1165	5	3.554829627	0.226273464	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
1166	5	2.942885577	0.238150528	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,TAL
1167	5	2.99710338	0.20508081	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,TAL
1168	5	3.964901837	0.267840742	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
1169	5	3.00074032	0.229453637	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy,TKT2
1170	5	4.557091208	0.201359081	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
1171	5	2.935925119	0.227915263	ADHEr,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
1172	5	2.97971305	0.22895456	ADHEr,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
1173	5	2.958777052	0.228457649	ADHEr,LDH_D,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
1174	5	3.886386663	0.225053566	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TKT1
1175	5	2.934359102	0.243351183	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT1
1176	5	2.934359102	0.243351183	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT1
1177	5	3.670328799	0.167566962	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT1
1178	5	3.379584856	0.31534776	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TKT1
1179	5	3.374609422	0.317876699	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT1
1180	5	3.480501908	0.264053132	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT1
1181	5	3.554829627	0.226273464	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT1
1182	5	2.942885577	0.238150528	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,TKT1
1183	5	2.99710338	0.20508081	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT1
1184	5	2.958777052	0.228457649	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy,TKT1

표 15

아디페이트 및 바이오매스의 수율을 보여주는, 아디페이트의 증가된 생산을 위한 넉아웃 균주 고안물

신규 고안물 서열	넉아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
1	3	5.47908	0.34054	ADHEr,LDH_D,NADH6
2	3	4.26684	0.28031	ADHEr,LDH_D,PPCK
3	3	2.76166	0.38773	ADHEr,ATPS4r,LDH_D
4	3	1.54669	0.25966	ADHEr,LDH_D,PGI
5	3	1.33726	0.37808	ADHEr,FUM,LDH_D
6	3	0.83242	0.38953	ADHEr,HEX1,LDH_D
7	4	7.52636	0.16586	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI
8	4	6.84269	0.27849	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi
9	4	6.5702	0.20631	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH
10	4	6.16994	0.16614	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI
11	4	6.0882	0.30766	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
12	4	5.87407	0.22728	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK
13	4	5.68406	0.28176	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6
14	4	5.62555	0.33704	ADHEr,LDH_D,NADH6,RPE
15	4	5.60596	0.30416	ADHEr,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
16	4	5.55606	0.3387	ADHEr,LDH_D,NADH6,TAL
17	4	5.54557	0.32148	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6

[0919]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
18	4	5.16028	0.24175	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK
19	4	4.91511	0.27067	ADHEr,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
20	4	4.3568	0.24592	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK
21	4	4.35358	0.27902	ADHEr,LDH_D,PPCK,RPE
22	4	4.34095	0.25198	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK
23	4	4.34095	0.25198	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK
24	4	4.28493	0.2734	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
25	4	4.0889	0.34834	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D
26	4	3.25969	0.38161	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,RPE
27	4	3.18007	0.37054	ADHEr,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
28	4	3.11658	0.34524	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
29	4	3.02411	0.3845	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TAL
30	4	1.1506	0.38695	ADHEr,HEX1,LDH_D,RPE
31	4	0.99936	0.38818	ADHEr,HEX1,LDH_D,TAL
32	5	7.63281	0.14897	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
33	5	7.60368	0.23979	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
34	5	7.25714	0.17876	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
35	5	7.21061	0.18996	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
36	5	7.21061	0.18996	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
37	5	7.11676	0.21254	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
38	5	7.10568	0.21521	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
39	5	6.9706	0.24771	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
40	5	6.90675	0.27577	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
41	5	6.83498	0.1681	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH
42	5	6.80758	0.29402	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
43	5	6.79015	0.29114	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
44	5	6.76743	0.17785	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
45	5	6.76201	0.23293	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
46	5	6.66991	0.23493	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
47	5	6.66754	0.2967	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
48	5	6.57746	0.21333	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
49	5	6.34963	0.21785	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK
50	5	6.225	0.14772	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
51	5	6.18982	0.20058	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
52	5	6.18254	0.21218	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
53	5	6.18254	0.21218	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
54	5	5.99792	0.19177	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
55	5	5.97051	0.22537	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
56	5	5.92744	0.32733	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6
57	5	5.92472	0.22627	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
58	5	5.81113	0.24533	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
59	5	5.80132	0.28014	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
60	5	5.74556	0.28091	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
61	5	5.74235	0.20973	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
62	5	5.73575	0.30136	ADHEr,LDH_D,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy

[0920]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	아데페이트 수율	바이오매스	반응목록
63	5	5.72421	0.22208	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK
64	5	5.72421	0.22208	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK
65	5	5.68542	0.31766	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,RPE
66	5	5.67414	0.30269	ADHEr,LDH_D,NADH6,TAL,THD2 및/또는GLUDy
67	5	5.62871	0.29764	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6
68	5	5.61913	0.31947	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TAL
69	5	5.56433	0.06187	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI
70	5	5.53618	0.32417	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
71	5	5.36114	0.24084	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE
72	5	5.35732	0.32317	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D
73	5	5.29193	0.25262	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
74	5	5.26552	0.24127	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL
75	5	5.23886	0.36027	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS
76	5	5.2123	0.3202	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi
77	5	5.20628	0.31113	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi
78	5	5.20628	0.31113	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
79	5	5.00885	0.16853	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGI
80	5	4.73325	0.11896	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
81	5	4.71871	0.12544	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
82	5	4.71871	0.12544	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
83	5	4.46543	0.20438	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
84	5	4.45303	0.23609	ADHEr,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
85	5	4.44799	0.21105	ADHEr,LDH_D,MDH,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
86	5	4.43313	0.21674	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
87	5	4.43313	0.21674	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK
88	5	4.43289	0.24479	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK,RPE
89	5	4.42239	0.22084	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
90	5	4.4202	0.25027	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
91	5	4.4202	0.25027	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
92	5	4.41922	0.25069	ADHEr,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
93	5	4.41348	0.22425	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
94	5	4.41348	0.22425	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
95	5	4.3742	0.27012	ADHEr,FUM,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
96	5	4.34566	0.25018	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
97	5	4.22695	0.31979	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH
98	5	4.21297	0.36989	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
99	5	4.19799	0.34618	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,RPE
100	5	4.15986	0.32121	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
101	5	4.14613	0.34721	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL
102	5	4.14548	0.36885	ADHEr,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
103	5	4.09366	0.36854	ADHEr,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
104	5	4.03694	0.36821	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,THD2 및/또는 GLUDy
105	5	4.03694	0.36821	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
106	5	3.55579	0.34037	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy

[0921]

신규 고안된 서열	넉아웃 수	아데베이트 수율	바이오매스	반응목록
107	5	3.35244	0.11579	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
108	5	3.34785	0.34268	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TAL,THD2 및/또는GLUDy
109	5	2.86477	0.08801	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FUM,LDH_D,PGI
110	5	1.41816	0.36252	ADHEr,FUM,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,TAL
111	5	1.41816	0.36252	ADHEr,FUM,LDH_D,PGDH,TAL
112	6	8.40974	0.12863	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
113	6	8.3656	0.13555	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
114	6	8.3656	0.13555	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
115	6	8.30583	0.11621	ACKr and/or PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
116	6	8.24494	0.15445	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
117	6	7.99084	0.19426	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
118	6	7.9508	0.20053	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
119	6	7.92831	0.12763	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
120	6	7.91305	0.13531	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
121	6	7.91305	0.13531	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK
122	6	7.87012	0.02274	ACKr and/or PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
123	6	7.7587	0.21695	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
124	6	7.75003	0.03607	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
125	6	7.74149	0.21948	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6
126	6	7.7368	0.0672	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
127	6	7.72197	0.07098	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
128	6	7.72197	0.07098	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
129	6	7.67273	0.08355	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,THD2 및/또는GLUDy
130	6	7.64843	0.19881	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
131	6	7.61824	0.14232	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
132	6	7.60825	0.2542	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
133	6	7.5467	0.16899	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
134	6	7.48349	0.12429	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
135	6	7.4685	0.07894	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK
136	6	7.4685	0.07894	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PYK
137	6	7.44298	0.08037	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2 및/또는GLUDy
138	6	7.40415	0.13677	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
139	6	7.4	0.14438	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
140	6	7.36241	0.15343	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
141	6	7.36241	0.15343	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
142	6	7.27527	0.1744	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy

[0922]

신규 고안물 서열	녁아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
143	6	7.27448	0.17459	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
144	6	7.24864	0.17893	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,THD2 및/또는 GLUDy
145	6	7.24278	0.26146	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
146	6	7.20895	0.28496	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
147	6	7.18819	0.12101	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
148	6	7.17088	0.20914	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
149	6	7.15564	0.2082	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
150	6	7.1458	0.12325	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
151	6	7.13909	0.20717	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
152	6	7.12504	0.22071	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
153	6	7.10894	0.21971	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
154	6	7.09146	0.21863	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
155	6	7.09146	0.21863	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
156	6	7.0863	0.31638	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
157	6	7.06893	0.22405	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
158	6	7.054	0.1365	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
159	6	7.02653	0.24555	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
160	6	6.99568	0.14491	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
161	6	6.92353	0.16046	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
162	6	6.90243	0.27063	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,TAL
163	6	6.8314	0.18819	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
164	6	6.79251	0.30763	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi
165	6	6.70257	0.21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
166	6	6.70257	0.21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
167	6	6.66743	0.21154	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
168	6	6.63518	0.21218	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
169	6	6.48093	0.19172	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
170	6	6.48093	0.19172	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGDH,PPCK
171	6	6.44865	0.19659	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
172	6	6.44275	0.19249	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
173	6	6.40767	0.1932	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
174	6	6.33204	0.06396	ACKr and/or PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
175	6	6.28774	0.02127	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
176	6	6.27764	0.32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy
177	6	6.27764	0.32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGDH
178	6	6.21873	0.32483	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL

[0923]

[0924]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
179	6	6.16484	0.32529	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
180	6	6.12301	0.15589	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
181	6	6.09151	0.3086	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
182	6	6.08785	0.16598	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
183	6	6.08785	0.16598	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK
184	6	6.07929	0.19015	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
185	6	6.0681	0.17164	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
186	6	6.04302	0.20189	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
187	6	6.01911	0.18569	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK
188	6	6.01911	0.18569	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK
189	6	5.98595	0.1952	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
190	6	5.93003	0.21123	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
191	6	5.91322	0.24391	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
192	6	5.89537	0.30664	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
193	6	5.86467	0.24459	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
194	6	5.8616	0.12855	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
195	6	5.8616	0.12855	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
196	6	5.75652	0.29464	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
197	6	5.71417	0.25845	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
198	6	5.69588	0.29606	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
199	6	5.53662	0.35787	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,RPE
200	6	5.4724	0.31504	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,RPE
201	6	5.46402	0.30945	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,RPE
202	6	5.46402	0.30945	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,RPE
203	6	5.39509	0.35901	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,TAL
204	6	5.34939	0.31748	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,TAL
205	6	5.34143	0.31025	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,TAL
206	6	5.34143	0.31025	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,TAL
207	6	5.07203	0.20521	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,PGI
208	6	5.07203	0.20521	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI
209	6	5.04668	0.20656	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,TAL
210	6	5.04668	0.20656	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,TAL
211	6	5.02327	0.2078	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,RPE
212	6	5.02327	0.2078	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,RPE
213	6	4.96889	0.09918	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
214	6	4.92469	0.33322	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
215	6	4.92469	0.33322	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
216	6	4.8531	0.05616	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
217	6	4.8531	0.05616	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy

[0925]

신규 균일물 서열	노아웃 수	아니페이드 수율	바이오매스	반응목록
218	6	4.80931	0.34014	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
219	6	4.69982	0.3467	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
220	6	4.69121	0.11806	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
221	6	4.64152	0.13706	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
222	6	4.64152	0.13706	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
223	6	4.6299	0.1415	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
224	6	4.6299	0.1415	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
225	6	4.60999	0.16834	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
226	6	4.60999	0.16834	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
227	6	4.52953	0.20307	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
228	6	4.5125	0.21043	ADHEr,LDH_D,MDH,PYK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
229	6	4.50129	0.21526	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
230	6	4.50129	0.21526	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,RPE
231	6	4.49048	0.21993	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
232	6	4.48211	0.22354	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK,RPE
233	6	4.48211	0.22354	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,RPE
234	6	4.42882	0.24654	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
235	6	4.36373	0.24327	ADHEr,FUM,GLUDy,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
236	6	4.35757	0.26123	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
237	6	4.31718	0.27765	ADHEr,ASNS2,GLU5K,LDH_D,PPCK,TAL
238	6	4.31718	0.27765	ADHEr,ASNS2,G5SD,LDH_D,PPCK,TAL
239	6	4.2573	0.32058	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
240	6	4.22017	0.33524	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
241	6	4.17617	0.33499	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
242	6	4.12454	0.33472	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
243	6	4.12454	0.33472	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,THD2 및/또는 GLUDy
244	6	3.51205	0.21436	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
245	6	3.23372	0.26787	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
246	6	2.95584	0.24016	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPS
247	6	2.95584	0.24016	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPS
248	7	9.10608	0.01953	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
249	7	9.10608	0.01953	ADHEr,FUM,GLUDy,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
250	7	9.00855	0.03482	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
251	7	8.9957	0.03683	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
252	7	8.9957	0.03683	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy

신규 고안물 서열	넉아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
253	7	8.98751	0.03811	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
254	7	8.98549	0.03843	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
255	7	8.78817	0.06934	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
256	7	8.78695	0.06953	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
257	7	8.78371	0.07004	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
258	7	8.78071	0.07051	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
259	7	8.7615	0.07352	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
260	7	8.7615	0.07352	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
261	7	8.5647	0.10435	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
262	7	8.54703	0.10712	ADHEr,GLCpts,GLUDy,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
263	7	8.53424	0.10913	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
264	7	8.53424	0.10913	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
265	7	8.50919	0.10634	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
266	7	8.50798	0.11324	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
267	7	8.50798	0.11324	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
268	7	8.43629	0.12447	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
269	7	8.38405	0.13266	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
270	7	8.37888	0.03978	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
271	7	8.29239	0.14702	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
272	7	8.27109	0.10802	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
273	7	8.25238	0.15328	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
274	7	8.24277	0.01559	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
275	7	8.13676	0.03579	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
276	7	8.112	0.11376	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
277	7	8.112	0.11376	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
278	7	8.02815	0.13154	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는

[0926]

[0927]

신규 균일 서열	탄소수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
				GLUDy
279	7	8.00984	0.13929	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
280	7	8.0064	0.13951	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
281	7	8.0064	0.13951	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
282	7	7.98007	0.18432	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
283	7	7.97463	0.15783	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
284	7	7.90344	0.19562	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
285	7	7.89808	0.01471	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
286	7	7.89024	0.02802	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
287	7	7.88378	0.02967	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
288	7	7.88242	0.11605	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
289	7	7.87634	0.01837	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK
290	7	7.87634	0.01837	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PYK
291	7	7.84906	0.21647	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,PFLi,THD2 및/또는GLUDy
292	7	7.84582	0.02225	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
293	7	7.81872	0.2081	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PPS
294	7	7.7627	0.0571	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
295	7	7.7627	0.0571	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
296	7	7.76232	0.02662	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
297	7	7.74907	0.0281	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
298	7	7.74444	0.06699	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
299	7	7.71368	0.10674	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
300	7	7.69617	0.04384	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
301	7	7.69209	0.0741	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
302	7	7.61698	0.05527	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
303	7	7.58851	0.09902	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
304	7	7.55893	0.07788	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy

신규 고원물 서열	넉아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
305	7	7.55773	0.07778	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
306	7	7.55641	0.07767	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
307	7	7.55604	0.07774	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
308	7	7.52827	0.18666	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,PPS
309	7	7.5043	0.12303	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
310	7	7.50321	0.07168	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
311	7	7.50183	0.1239	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
312	7	7.49954	0.12472	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
313	7	7.44132	0.08061	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
314	7	7.43036	0.11712	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLUDy,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
315	7	7.38132	0.14888	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PRO1z,THD2 및/또는 GLUDy
316	7	7.37291	0.17014	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
317	7	7.37059	0.09082	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
318	7	7.3166	0.16445	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
319	7	7.2905	0.10237	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
320	7	7.24864	0.17893	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
321	7	7.2288	0.11128	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
322	7	7.22725	0.1115	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
323	7	7.21589	0.1796	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
324	7	7.21263	0.18991	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
325	7	7.20753	0.1999	ADHEr,GLUDy,LDH_D,PFLi,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
326	7	7.20507	0.13919	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
327	7	7.20507	0.13919	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
328	7	7.20053	0.0557	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy

[0928]

[0929]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
329	7	7.20053	0.0557	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
330	7	7.19596	0.14141	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
331	7	7.19261	0.19908	ADHEr,GLUDy,LDH_D,PFLi,PPCK,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
332	7	7.18739	0.14349	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
333	7	7.18582	0.18022	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
334	7	7.18081	0.1906	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
335	7	7.17639	0.19819	ADHEr,GLUDy,LDH_D,PFLi,PGDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
336	7	7.17639	0.19819	ADHEr,GLUDy,LDH_D,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
337	7	7.15844	0.21228	ADHEr,FUM,GLU5K,LDH_D,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
338	7	7.15844	0.21228	ADHEr,FUM,G5SD,LDH_D,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
339	7	7.15832	0.21231	ADHEr,ASNS2,FUM,LDH_D,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
340	7	7.15023	0.12261	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
341	7	7.14754	0.30973	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
342	7	7.12499	0.05298	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
343	7	7.12287	0.13074	ADHEr,ASPT,GLCpts,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
344	7	7.12019	0.22193	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
345	7	7.11351	0.16642	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
346	7	6.91657	0.2887	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PGDH,PPS
347	7	6.89939	0.23701	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
348	7	6.89939	0.23701	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MALS,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
349	7	6.89939	0.23701	ADHEr,ATPS4r,ICL,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
350	7	6.84379	0.18963	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
351	7	6.75658	0.30629	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,RPE
352	7	6.62545	0.08375	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
353	7	6.61503	0.30219	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,TAL
354	7	6.5251	0.02706	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy

[0930]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	어디베이트 수율	바이오매스	반응목록
355	7	6.50064	0.04761	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
356	7	6.49117	0.05032	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
357	7	6.49117	0.05032	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
358	7	6.46411	0.29781	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
359	7	6.46411	0.29781	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS
360	7	6.37646	0.08322	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
361	7	6.37646	0.08322	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
362	7	6.33505	0.15513	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGDH,PGI
363	7	6.30836	0.31643	ADHEr,HEX1,LDH_D,MALS,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
364	7	6.30836	0.31643	ADHEr,HEX1,ICL,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
365	7	6.30836	0.31643	ADHEr,HEX1,LDH_D,MALS,PGDH,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
366	7	6.30836	0.31643	ADHEr,HEX1,ICL,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
367	7	6.29139	0.03885	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
368	7	6.27848	0.32143	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
369	7	6.27504	0.1561	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PGI,TAL
370	7	6.19234	0.13601	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
371	7	6.19234	0.13601	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
372	7	6.18835	0.15484	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
373	7	6.16073	0.14508	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK
374	7	6.16073	0.14508	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,PYK
375	7	6.15763	0.16479	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK,RPE
376	7	6.15763	0.16479	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK,RPE
377	7	6.14691	0.14904	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK
378	7	6.14691	0.14904	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK
379	7	6.14046	0.17035	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
380	7	6.13285	0.17281	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
381	7	6.09969	0.18355	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,RPE
382	7	6.09969	0.18355	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK,RPE
383	7	6.07495	0.19156	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
384	7	6.02503	0.20772	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,RPE,THD2 및/또는 GLUDy

[0931]

신규 고인물 서열	넉아웃 수	아데페이트 수율	바이오매스	반응목록
385	7	5.9952	0.19254	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
386	7	5.9868	0.32178	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
387	7	5.98012	0.20938	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
388	7	5.94711	0.3261	ADHEr,HEX1,ICL,LDH_D,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
389	7	5.94711	0.3261	ADHEr,HEX1,LDH_D,MALS,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
390	7	5.93766	0.22464	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH12,THD2 및/또는 GLUDy
391	7	5.84213	0.21172	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
392	7	5.77732	0.09217	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
393	7	5.77732	0.09217	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
394	7	5.7407	0.18622	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
395	7	5.72608	0.09261	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
396	7	5.67891	0.09302	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
397	7	5.62569	0.20722	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
398	7	5.60804	0.32285	ADHEr,GLU5K,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
399	7	5.60804	0.32285	ADHEr,G5SD,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
400	7	5.60791	0.32289	ADHEr,ASNS2,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
401	7	5.59783	0.33545	ADHEr,HEX1,ICL,LDH_D,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
402	7	5.59783	0.33545	ADHEr,HEX1,LDH_D,MALS,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
403	7	5.58104	0.23062	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,THD2 및/또는 GLUDy
404	7	5.58104	0.23062	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
405	7	5.35846	0.23124	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
406	7	5.27565	0.07793	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
407	7	5.19178	0.1965	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,TAL
408	7	5.19178	0.1965	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGDH,PGI,TAL
409	7	5.16412	0.3061	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy

신규 균일물 서열	녹아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
410	7	5.16412	0.3061	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
411	7	5.15646	0.16031	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,TAL
412	7	5.14711	0.23182	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
413	7	5.06593	0.18784	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
414	7	5.06354	0.16677	ADHEr,ATPS4r,GLYCL,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI
415	7	5.04267	0.18882	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
416	7	5.02125	0.18972	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
417	7	4.56087	0.18955	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
418	7	4.53442	0.18932	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
419	7	4.50549	0.18907	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,THD2 및/또는 GLUDy
420	7	4.50549	0.18907	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
421	7	4.43945	0.24195	ADHEr,FUM,GLUDy,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
422	7	4.33649	0.2698	ADHEr,ASNS2,FUM,G5SD,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
423	7	4.33649	0.2698	ADHEr,ASNS2,FUM,GLU5K,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
424	7	3.82299	0.23376	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,CITL,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
425	7	3.40957	0.10927	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGDH,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
426	7	3.40957	0.10927	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
427	7	3.30702	0.26731	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
428	7	1.7546	0.28013	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,CITL,FUM,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
429	7	0.1401	0.25687	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
430	7	0.13962	0.25599	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
431	7	0.13909	0.25503	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS
432	7	0.13909	0.25503	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,SUCOAS
433	3	0.331362284	0.248770484	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
434	3	4.1886916	0.310192487	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D
435	4	2.773932742	0.386261	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,LDH_D
436	4	2.792658751	0.384018912	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D
437	4	5.490131382	0.33737393	ADHEr,CBMK2,LDH_D,NADH6
438	4	6.078666008	0.168610416	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI

[0932]

[0933]

신규 균일들 서열	녹아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
439	4	0.474685279	0.246014656	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,RPE
440	4	0.406720198	0.247321495	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TAL
441	4	0.406720198	0.247321495	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT1
442	4	0.541935885	0.244721556	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는FBA 및/또는 TPI,TKT2
443	4	4.227003016	0.295544651	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D
444	4	2.774411941	0.386203624	ADHEr,ATPS4r,G5SD,LDH_D
445	4	2.774411941	0.386203624	ADHEr,ATPS4r,GLU5K,LDH_D
446	4	2.552977098	0.152232967	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는TPI
447	4	5.500068328	0.33452449	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6
448	4	4.226362219	0.295789651	ADHEr,FRD 및/또는SUCD4,HEX1,LDH_D
449	4	0.999358709	0.388175844	ADHEr,HEX1,LDH_D,TKT1
450	4	1.300899111	0.38573732	ADHEr,HEX1,LDH_D,TKT2
451	4	4.374206544	0.239263432	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH
452	4	4.29486095	0.269600115	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2
453	4	4.488943189	0.195395474	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK
454	4	4.312306765	0.279635371	ADHEr,LDH_D,PPCK,TAL
455	4	4.312306765	0.279635371	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT1
456	4	4.394666553	0.278410255	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT2
457	4	4.290442023	0.306273023	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,RPE
458	4	4.242231032	0.308130129	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,TAL
459	4	3.02411229	0.384504476	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TKT1
460	4	5.556064858	0.338701395	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT1
461	4	4.242231032	0.308130129	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,TKT1
462	4	3.491738883	0.378757536	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TKT2
463	4	5.694356782	0.335394947	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT2
464	4	4.338075359	0.30443817	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,TKT2
465	5	3.269904021	0.380186443	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,LDH_D,RPE
466	5	3.035292503	0.383059918	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,LDH_D,TAL
467	5	2.786583612	0.384746295	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,GLU5K,LDH_D
468	5	3.035292503	0.383059918	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,LDH_D,TKT1
469	5	4.891772757	0.345085032	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
470	5	4.906959994	0.170872463	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFK 및/또는FBA 및/또는 TPI,PFLi
471	5	2.80469336	0.382577993	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,CBMK2,LDH_D
472	5	4.199370617	0.306109514	ADHEr,ASNS2,CBMK2,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D
473	5	3.285503322	0.378014123	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D,RPE
474	5	3.052359629	0.380854732	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D,TAL
475	5	2.805163465	0.382521707	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,G5SD,LDH_D
476	5	4.199487305	0.3060649	ADHEr,CBMK2,FRD 및/또는 SUCD4,G5SD,LDH_D
477	5	2.805163465	0.382521707	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,GLU5K,LDH_D
478	5	4.199487305	0.3060649	ADHEr,CBMK2,FRD 및/또는 SUCD4,GLU5K,LDH_D
479	5	5.566341358	0.335567361	ADHEr,CBMK2,LDH_D,NADH6,TAL
480	5	6.853869476	0.27580388	ADHEr,CBMK2,LDH_D,NADH6,PFLi
481	5	3.052359629	0.380854732	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D,TKT1
482	5	5.566341358	0.335567361	ADHEr,CBMK2,LDH_D,NADH6,TKT1
483	5	3.515194954	0.375215574	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D,TKT2

신규 고안물 서열	낙아웃 수	어디베이트 수율	바이오매스	반응목록
484	5	4.886253722	0.208900511	ADHEr,LDH_D,MDH,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PFLi
485	5	4.621960711	0.144538077	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
486	5	6.151957387	0.166626529	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,RPE
487	5	6.117214665	0.167566962	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TAL
488	5	0.436376298	0.238196669	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PGDH,TAL
489	5	6.117214665	0.167566962	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT1
490	5	0.436376298	0.238196669	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PGDH,TKT1
491	5	6.186312313	0.165696592	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT2
492	5	5.556162772	0.318439293	ADHEr,CBMK2,FUM,LDH_D,NADH6
493	5	4.886253722	0.208900511	ADHEr,FUM,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PFLi
494	5	4.613740943	0.14768079	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
495	5	6.088195155	0.307660476	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
496	5	5.684064939	0.281763084	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6
497	5	4.673184878	0.145745102	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,PGI
498	5	4.572772914	0.163344346	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,PPCK
499	5	4.382533025	0.251079405	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
500	5	4.382533025	0.251079405	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT1
501	5	4.457618973	0.24945663	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT2
502	5	4.374206544	0.239263432	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,ME2
503	5	4.324805294	0.29144049	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,RPE
504	5	4.278495915	0.29338381	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,TAL
505	5	5.619129051	0.319468644	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TKT1
506	5	1.418161594	0.362515745	ADHEr,FUM,LDH_D,PGDH,TKT1
507	5	1.418161594	0.362515745	ADHEr,FUM,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,TKT1
508	5	4.278495915	0.29338381	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,TKT1
509	5	5.750964716	0.315868237	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TKT2
510	5	4.370505222	0.289522745	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,TKT2
511	5	2.786583612	0.384746295	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,G5SD,LDH_D
512	5	3.270303172	0.380130859	ADHEr,ATPS4r,G5SD,LDH_D,RPE
513	5	3.035729231	0.38300349	ADHEr,ATPS4r,G5SD,LDH_D,TAL
514	5	3.035729231	0.38300349	ADHEr,ATPS4r,G5SD,LDH_D,TKT1
515	5	3.270303172	0.380130859	ADHEr,ATPS4r,GLU5K,LDH_D,RPE
516	5	3.035729231	0.38300349	ADHEr,ATPS4r,GLU5K,LDH_D,TAL
517	5	4.101998016	0.149473222	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
518	5	5.510369128	0.331570715	ADHEr,CBMK2,HEX1,LDH_D,NADH6
519	5	3.359019108	0.150796918	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
520	5	4.301255739	0.267155156	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,HEX1,LDH_D
521	5	4.146125845	0.347209192	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TKT1
522	5	4.24954345	0.345156537	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TKT2
523	5	5.64062493	0.332159859	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
524	5	5.573829893	0.333283574	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
525	5	6.871954799	0.271451843	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi

[0934]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
526	5	1.026318237	0.371585169	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,TAL
527	5	1.026318237	0.371585169	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,TAL
528	5	4.321580803	0.292832307	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,RPE
529	5	4.27640137	0.294235511	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,TAL
530	5	4.292100506	0.270655532	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
531	5	5.573829893	0.333283574	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT1
532	5	1.026318237	0.371585169	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,TKT1
533	5	1.026318237	0.371585169	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,TKT1
534	5	4.27640137	0.294235511	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,TKT1
535	5	4.093661719	0.368542577	ADHEr,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy,TKT1
536	5	5.706971061	0.331043695	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT2
537	5	4.366331362	0.291442423	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,TKT2
538	5	4.197378033	0.36914891	ADHEr,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy,TKT2
539	5	6.584217406	0.204283888	ADHEr,ASPT,CBMK2,LDH_D,MDH
540	5	4.679174494	0.143073998	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PGI
541	5	4.572772914	0.163344346	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PPCK
542	5	4.382533025	0.251079405	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
543	5	4.382533025	0.251079405	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT1
544	5	4.457618973	0.24945663	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT2
545	5	4.450595421	0.237144547	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,RPE
546	5	4.414328365	0.238150528	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,TAL
547	5	6.807575806	0.294019202	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TKT1
548	5	5.745562276	0.280910173	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT1
549	5	4.414328365	0.238150528	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,TKT1
550	5	6.455745341	0.299423269	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TKT2
551	5	5.856779801	0.27936769	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT2
552	5	4.486557371	0.23614703	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,TKT2
553	5	6.254106519	0.315300181	ADHEr,LDH_D,ME2,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
554	5	4.339242812	0.268682419	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,TAL
555	5	6.224794308	0.229694348	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
556	5	6.876353164	0.277060587	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TAL
557	5	7.122630133	0.211129547	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi
558	5	4.216706856	0.262624991	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
559	5	5.563197905	0.034931763	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGI
560	5	5.66839105	0.263566425	ADHEr,LDH_D,ME2,PGL 및/또는 G6PDHy,THD2 및/또는 GLUDy
561	5	4.552158784	0.193305823	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,RPE
562	5	4.522175259	0.194296957	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,TAL
563	5	5.924716044	0.226273464	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT1
564	5	5.265518204	0.241270472	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,TKT1
565	5	4.522175259	0.194296957	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT1
566	5	6.01594542	0.224464061	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT2
567	5	5.456414614	0.240407987	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,TKT2

[0935]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	아디페이트 수율	바이오매스	반응목록
568	5	4.581837961	0.192324751	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT2
569	5	3.352437372	0.115790546	ADHEr,FADH4,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
570	5	4.568751314	0.164881948	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,PYK
571	5	4.379456454	0.26785091	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,RPE
572	5	3.035729231	0.38300349	ADHEr,ATPS4r,GLU5K,LDH_D,TKT1
573	5	6.876353164	0.277060587	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TKT1
574	5	4.339242812	0.268682419	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,TKT1
575	5	4.419421961	0.267024532	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,TKT2
576	5	6.185324416	0.166037364	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI,TKT2
577	5	6.936871903	0.274483161	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TKT2
578	6	7.614634412	0.238178822	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D,MDH,NADH6
579	6	7.603679301	0.239793337	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,ME2,NADH6
580	6	7.269154045	0.188693079	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,TKT2
581	6	7.539172655	0.163831584	ADHEr,ASNS2,CBMK2,HEX1,LDH_D,PGI
582	6	7.539312732	0.163809352	ADHEr,CBMK2,G5SD,HEX1,LDH_D,PGI
583	6	7.539312732	0.163809352	ADHEr,CBMK2,GLU5K,HEX1,LDH_D,PGI
584	6	7.497875069	0.097945448	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
585	6	7.316598461	0.164453176	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
586	6	7.269154045	0.188693079	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,TKT2
587	6	7.389036066	0.088156259	ADHEr,ASPT,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
588	6	8.258765764	0.152284822	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
589	6	8.999143093	0.036289126	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy

[0936]

표 16

HMDA 및 바이오매스의 수율을 보여주는, HMDA의 증가된 생산을 위한 넉아웃 균주 고안물

[0937]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
1	3	2.32302	0.35737	ADHEr,LDH_D,NADH6
2	3	2.12864	0.28397	ADHEr,LDH_D,PPCK
3	3	1.2553	0.38773	ADHEr,ATPS4r,LDH_D
4	3	1.11254	0.26898	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D
5	3	0.67068	0.37924	ADHEr,FUM,LDH_D
6	3	0.57155	0.26988	ADHEr,LDH_D,PGI
7	3	0.27747	0.38953	ADHEr,HEX1,LDH_D
8	4	4.46145	0.20591	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH
9	4	4.38802	0.23398	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D
10	4	4.03852	0.23697	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI
11	4	3.73656	0.30662	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi
12	4	3.05653	0.20692	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,PPCK
13	4	2.59406	0.20532	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI

[0938]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
14	4	2.58406	0.27187	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH
15	4	2.46512	0.26229	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK
16	4	2.41847	0.29351	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6
17	4	2.38828	0.35417	ADHEr,LDH_D,NADH6,RPE
18	4	2.29878	0.17947	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK
19	4	2.17588	0.24785	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
20	4	2.14745	0.26084	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI
21	4	2.03987	0.35185	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D
22	4	1.48168	0.38161	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,RPE
23	4	1.47082	0.28924	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
24	4	1.3746	0.3845	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TAL
25	4	1.26025	0.2616	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,SUCOAS
26	4	0.939	0.26603	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI
27	4	0.76149	0.2867	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D
28	4	0.38353	0.38695	ADHEr,HEX1,LDH_D,RPE
29	4	0.33312	0.38818	ADHEr,HEX1,LDH_D,TAL
30	5	5.53962	0.16718	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH
31	5	5.40224	0.22385	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
32	5	5.13405	0.1802	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi
33	5	5.0304	0.08351	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK
34	5	4.96585	0.07704	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
35	5	4.88127	0.20295	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,NADH6,PGI
36	5	4.78114	0.2037	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PGI
37	5	4.75518	0.09361	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,PYK
38	5	4.61203	0.20383	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI
39	5	4.60391	0.15144	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
40	5	4.56119	0.16777	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH
41	5	4.52834	0.20359	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,RPE
42	5	4.51845	0.20259	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS
43	5	4.46585	0.23056	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,RPE
44	5	4.45522	0.22919	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS
45	5	4.44183	0.21341	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
46	5	4.44155	0.21352	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D
47	5	4.42059	0.20565	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS
48	5	4.36907	0.15859	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI,PPCK
49	5	4.36067	0.16481	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI
50	5	4.33827	0.24026	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
51	5	4.24585	0.21569	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH
52	5	4.24585	0.21569	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH
53	5	4.24585	0.21569	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH
54	5	4.21843	0.08488	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
55	5	4.18265	0.21782	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH
56	5	4.13301	0.24796	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA. 수율	바이오매스	반응목록
57	5	4.03737	0.23515	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI
58	5	4.02056	0.22023	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
59	5	4.0188	0.18437	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
60	5	3.96576	0.20734	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
61	5	3.96576	0.20734	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
62	5	3.96266	0.23773	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6
63	5	3.92623	0.22446	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
64	5	3.81332	0.27196	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D
65	5	3.81332	0.27196	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH
66	5	3.79273	0.28229	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
67	5	3.77686	0.28031	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6
68	5	3.74717	0.3358	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
69	5	3.69789	0.22154	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
70	5	3.69693	0.23186	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH
71	5	3.57925	0.1851	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK
72	5	3.55622	0.22164	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
73	5	3.55622	0.22164	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
74	5	3.51036	0.26322	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
75	5	3.44912	0.18587	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK
76	5	3.44912	0.18587	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK
77	5	3.23914	0.31877	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6
78	5	3.23669	0.2512	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI
79	5	3.22027	0.23733	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK
80	5	3.21813	0.22145	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PPCK
81	5	3.20482	0.28717	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,SUCOAS
82	5	3.19987	0.14763	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
83	5	3.04087	0.23963	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK
84	5	3.04087	0.23963	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK
85	5	3.01019	0.28849	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
86	5	2.94161	0.20506	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGI
87	5	2.88011	0.33864	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6
88	5	2.85293	0.25411	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6
89	5	2.75034	0.26847	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
90	5	2.74759	0.33105	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6
91	5	2.67997	0.17637	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PGI,PPCK
92	5	2.67853	0.21976	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK
93	5	2.65374	0.15874	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK
94	5	2.65207	0.23435	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH
95	5	2.64298	0.23937	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK
96	5	2.63715	0.26997	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,RPE
97	5	2.60095	0.33049	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D
98	5	2.52584	0.22167	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK
99	5	2.5171	0.22752	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
100	5	2.48801	0.24981	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
101	5	2.47253	0.25734	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6

[0939]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	FMDA 수율	바이오매스	반응목록
102	5	2.47049	0.29207	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
103	5	2.38845	0.0995	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
104	5	2.3823	0.10498	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
105	5	2.3823	0.10498	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
106	5	2.37356	0.34412	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
107	5	2.36643	0.29114	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
108	5	2.33103	0.23832	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
109	5	2.32447	0.13422	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
110	5	2.29184	0.29402	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
111	5	2.282	0.28884	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
112	5	2.22251	0.2967	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
113	5	2.22197	0.24001	ADHEr,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
114	5	2.21206	0.24857	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK,RPE
115	5	2.20561	0.23941	ADHEr,LDH_D,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
116	5	2.20149	0.22826	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
117	5	2.20149	0.22826	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
118	5	2.19372	0.24909	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK,TAL
119	5	2.19132	0.23604	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
120	5	2.19132	0.23604	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK
121	5	2.18792	0.26941	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
122	5	2.18792	0.26941	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,RPE
123	5	2.18777	0.23875	ADHEr,LDH_D,MDH,PGDH,THD2 및/또는 GLUDy
124	5	2.09486	0.34975	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,RPE
125	5	1.89618	0.34765	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
126	5	1.74629	0.36027	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS
127	5	1.73743	0.3202	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi
128	5	1.73543	0.31113	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
129	5	1.69405	0.23402	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI
130	5	1.68439	0.23524	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,TAL
131	5	1.67549	0.23637	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,RPE
132	5	1.66962	0.16853	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PGI
133	5	1.66579	0.35584	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
134	5	1.44831	0.25358	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,SUCOAS
135	5	1.40898	0.31979	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH
136	5	1.33078	0.25859	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,SUCOAS
137	5	1.28594	0.26157	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,ICL,LDH_D
138	5	1.28594	0.26157	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MALS
139	5	1.15083	0.26676	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,SUCOAS
140	5	1.08556	0.26021	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI
141	5	1.08281	0.26394	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI
142	5	0.81325	0.32358	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS
143	5	0.73764	0.26814	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI,THD5
144	5	0.73764	0.26814	ADHEr,FUM,LDH_D,PGI,THD5
145	6	6.49204	0.11612	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy

[0940]

[0941]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	데이오배스	반응목록
146	6	6.18999	0.07445	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH
147	6	6.1414	0.1578	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy
148	6	5.80857	0.1099	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PYK
149	6	5.62948	0.09192	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
150	6	5.60131	0.13875	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
151	6	5.59693	0.15008	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
152	6	5.56181	0.13846	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
153	6	5.52668	0.15619	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
154	6	5.52416	0.10076	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PGI
155	6	5.44943	0.16764	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,SUCOAS
156	6	5.43906	0.17387	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,MDH
157	6	5.43906	0.17387	ADHEr,ASPT,ATPS4r,ICL,LDH_D,MDH
158	6	5.43906	0.17387	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MALS,MDH
159	6	5.4269	0.11474	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PGI
160	6	5.39974	0.15728	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
161	6	5.39974	0.15728	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
162	6	5.36516	0.17457	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
163	6	5.29594	0.12992	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PYK
164	6	5.28218	0.07163	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
165	6	5.28218	0.07163	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGDH,PPCK
166	6	5.27982	0.10569	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK
167	6	5.27077	0.07217	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,TAL
168	6	5.26177	0.14053	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi
169	6	5.26021	0.07267	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,RPE
170	6	5.22996	0.24218	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
171	6	5.22996	0.24218	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
172	6	5.10795	0.18114	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy
173	6	5.07418	0.20379	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,PPS
174	6	5.05205	0.12049	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK
175	6	5.02318	0.17043	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
176	6	5.02318	0.17043	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
177	6	4.96023	0.0152	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
178	6	4.96019	0.14703	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
179	6	4.95227	0.18511	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,NADH6,PGI
180	6	4.94767	0.18905	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
181	6	4.94078	0.08876	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK
182	6	4.88378	0.08315	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy

[0942]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	HMDA. 수율	바이오매스	반응목록
183	6	4.88138	0.0499	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
184	6	4.8705	0.04951	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
185	6	4.86653	0.05103	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
186	6	4.86653	0.05103	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
187	6	4.85555	0.05127	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
188	6	4.81179	0.07918	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
189	6	4.80834	0.05481	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
190	6	4.80834	0.05481	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
191	6	4.80546	0.08184	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
192	6	4.79254	0.05156	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
193	6	4.7879	0.08109	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MALS,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
194	6	4.7879	0.08109	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,ICL,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
195	6	4.7863	0.15759	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
196	6	4.78022	0.08403	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,MALS,THD2 및/또는 GLUDy
197	6	4.78022	0.08403	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,ICL,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
198	6	4.75362	0.1717	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS
199	6	4.74482	0.14204	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
200	6	4.74482	0.14204	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK
201	6	4.71665	0.15772	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
202	6	4.71665	0.15772	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI
203	6	4.67938	0.12258	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
204	6	4.67056	0.08187	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
205	6	4.65509	0.08572	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
206	6	4.65177	0.09959	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
207	6	4.64856	0.19942	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
208	6	4.64527	0.14923	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
209	6	4.62501	0.24401	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
210	6	4.61569	0.16588	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,RPE
211	6	4.58364	0.20034	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
212	6	4.54149	0.17531	ADHEr,ASPT,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PYK

[0943]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
213	6	4.53277	0.1423	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
214	6	4.53052	0.2259	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,RPE,SUCOAS
215	6	4.52789	0.16756	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS
216	6	4.52733	0.16694	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH
217	6	4.50564	0.17546	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,SUCOAS
218	6	4.48785	0.20333	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
219	6	4.45673	0.0937	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI,PPCK
220	6	4.44964	0.1574	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
221	6	4.38551	0.17574	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MALS,MDH
222	6	4.38551	0.17574	ADHEr,ASPT,FUM,GLCpts,LDH_D,MDH
223	6	4.38551	0.17574	ADHEr,ASPT,GLCpts,ICL,LDH_D,MDH
224	6	4.3659	0.18135	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,PYK
225	6	4.3659	0.18135	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,PYK
226	6	4.3659	0.18135	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,PYK
227	6	4.35016	0.23064	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,SUCOAS
228	6	4.34833	0.1713	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
229	6	4.34286	0.23323	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,SUCOAS
230	6	4.33401	0.17749	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH
231	6	4.31842	0.21314	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,RPE
232	6	4.31842	0.21314	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,RPE
233	6	4.31842	0.21314	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,RPE
234	6	4.31517	0.18251	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK
235	6	4.27405	0.08431	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
236	6	4.25521	0.17069	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
237	6	4.25521	0.17069	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK
238	6	4.23738	0.22036	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PGI,THD5
239	6	4.23738	0.22036	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PGI,THD5
240	6	4.21937	0.24412	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,RPE
241	6	4.20848	0.22638	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
242	6	4.1949	0.21515	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6
243	6	4.193	0.22615	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D
244	6	4.18464	0.18833	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
245	6	4.17022	0.12602	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
246	6	4.15452	0.23423	ACKr 및/또는 PTAr,ACS,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI
247	6	4.13958	0.1401	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
248	6	4.12806	0.09037	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
249	6	4.10281	0.14798	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
250	6	4.09944	0.14944	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,PYK
251	6	4.09149	0.20644	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6
252	6	4.08305	0.24974	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6
253	6	4.07707	0.21283	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6

[0944]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
254	6	4.07083	0.2483	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FDH2,HEX1,LDH_D,NADH6
255	6	4.0547	0.15755	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGDH,PGI
256	6	4.04976	0.14332	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGDH,PGI,PPCK
257	6	4.04925	0.17118	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
258	6	4.04925	0.17118	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
259	6	4.04921	0.20443	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK
260	6	4.04921	0.20443	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
261	6	4.04701	0.15816	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,TAL
262	6	4.04276	0.14386	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,TAL
263	6	4.03993	0.15872	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,RPE
264	6	4.03632	0.14436	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK,RPE
265	6	4.01325	0.18677	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
266	6	3.99577	0.19434	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
267	6	3.97712	0.21218	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
268	6	3.96781	0.21154	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
269	6	3.95767	0.21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
270	6	3.95767	0.21085	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGDH,PPCK
271	6	3.95117	0.22396	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
272	6	3.94143	0.22325	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
273	6	3.93082	0.22248	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
274	6	3.92007	0.30764	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
275	6	3.90761	0.02965	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
276	6	3.90761	0.02965	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FUM,LDH_D,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
277	6	3.88276	0.27815	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
278	6	3.87622	0.18142	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PGI
279	6	3.85591	0.25493	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi
280	6	3.85214	0.25656	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi
281	6	3.80756	0.28917	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,RPE
282	6	3.80403	0.29078	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
283	6	3.80376	0.2909	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE
284	6	3.79095	0.29004	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,TAL
285	6	3.78678	0.29189	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,TAL
286	6	3.74504	0.18693	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK
287	6	3.66618	0.23348	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6
288	6	3.65047	0.29574	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH12,NADH6
289	6	3.64636	0.29624	ADHEr,ATPS4r,FDH2,GLCpts,LDH_D,NADH6
290	6	3.61821	0.2978	ADHEr,ATPS4r,FDH2,FUM,LDH_D,NADH6
291	6	3.59369	0.11801	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
292	6	3.56749	0.21671	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
293	6	3.56467	0.20357	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
294	6	3.56467	0.20357	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK

신규 고인물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
295	6	3.54915	0.24121	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
296	6	3.54182	0.17698	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PGI,THD5
297	6	3.52871	0.18935	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
298	6	3.52871	0.18935	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK
299	6	3.48585	0.20551	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK
300	6	3.46875	0.14666	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
301	6	3.39774	0.24244	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
302	6	3.34501	0.09944	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGI
303	6	3.21571	0.21219	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,SUCOAS
304	6	3.13882	0.32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy
305	6	3.13882	0.32432	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,PGDH
306	6	3.10937	0.32483	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,TAL
307	6	3.08568	0.30099	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6
308	6	3.08242	0.32529	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
309	6	3.05396	0.31324	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
310	6	3.04084	0.1442	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,PGI,PPCK
311	6	3.0331	0.26033	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
312	6	2.95572	0.06686	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
313	6	2.95209	0.20166	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PYK
314	6	2.93749	0.26369	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
315	6	2.93137	0.23554	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FUM,LDH_D,PGI,THD5
316	6	2.93119	0.19434	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
317	6	2.92428	0.21637	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
318	6	2.90707	0.25203	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
319	6	2.88032	0.10845	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
320	6	2.85872	0.13782	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PGI
321	6	2.83622	0.13278	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
322	6	2.83037	0.25344	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
323	6	2.73678	0.18763	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
324	6	2.73413	0.26033	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy
325	6	2.70842	0.20327	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
326	6	2.68773	0.20429	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PGI,THD5
327	6	2.68773	0.20429	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD5
328	6	2.6871	0.26683	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
329	6	2.64071	0.07956	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
330	6	2.61399	0.16269	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
331	6	2.60256	0.17034	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
332	6	2.56541	0.1952	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy

[0945]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
333	6	2.53808	0.13335	ADHEr,ATPS4r,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
334	6	2.53559	0.33664	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
335	6	2.53316	0.24472	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,RPE
336	6	2.53316	0.24472	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
337	6	2.53266	0.21711	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
338	6	2.50897	0.31991	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
339	6	2.47564	0.27754	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH,TAL
340	6	2.37424	0.3231	ADHEr,GLU5K,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
341	6	2.37424	0.3231	ADHEr,G5SD,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
342	6	2.37418	0.32314	ADHEr,ASNS2,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
343	6	2.35165	0.11344	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
344	6	2.35165	0.11344	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
345	6	2.28934	0.18186	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
346	6	2.28203	0.17727	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
347	6	2.27443	0.17249	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
348	6	2.27443	0.17249	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
349	6	2.23539	0.22843	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPCK,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
350	6	2.2276	0.23515	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
351	6	2.22058	0.22724	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPCK,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
352	6	2.20452	0.22594	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
353	6	2.20452	0.22594	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
354	6	2.10135	0.3242	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
355	6	2.02123	0.34714	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
356	6	1.98114	0.30095	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
357	6	1.96512	0.30664	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi
358	6	1.96163	0.34738	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
359	6	1.94766	0.26881	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
360	6	1.84554	0.35787	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,RPE
361	6	1.84094	0.27637	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D
362	6	1.82413	0.31504	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,RPE
363	6	1.82134	0.30945	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,RPE
364	6	1.79836	0.35901	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,TAL
365	6	1.74423	0.2066	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,PGI,THD5
366	6	1.63108	0.27824	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS
367	6	1.63108	0.27824	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,SUCOAS
368	6	1.59283	0.279	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
369	6	1.55776	0.2797	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
370	6	1.35784	0.33828	ADHEr,FUM,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy

[0946]

[0947]

신규 고인물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
371	6	1.3281	0.25919	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,SUCOAS
372	6	1.25004	0.31142	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
373	6	1.16323	0.25946	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLYCL,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,TAL
374	6	1.16323	0.25946	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLYCL,LDH_D,PGDH,TAL
375	6	0.94735	0.32316	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,RPE
376	6	0.88343	0.32336	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TAL
377	6	0.83542	0.27562	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PGDH,TAL
378	6	0.83542	0.27562	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,TAL
379	6	0.81371	0.28445	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,ICL,LDH_D
380	6	0.81371	0.28445	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MALS
381	6	0.40293	0.37998	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,CITL,ICL,LDH_D,SUCOAS
382	6	0.40293	0.37998	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,CITL,LDH_D,MALS,SUCOAS
383	7	6.87929	0.03662	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy,PYK
384	7	6.87929	0.03662	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi,PYK
385	7	6.82182	0.04856	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
386	7	6.7498	0.06331	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
387	7	6.70416	0.07266	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
388	7	6.67113	0.07943	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
389	7	6.65401	0.08294	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,PGL 및/또는 G6PDHy
390	7	6.45147	0.12443	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGL 및/또는 G6PDHy
391	7	6.44861	0.08805	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MALS,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy
392	7	6.44861	0.08805	ADHEr,ASPT,ATPS4r,ICL,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy
393	7	6.44861	0.08805	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy
394	7	6.15823	0.07915	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MALS,MDH
395	7	6.15823	0.07915	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,ICL,LDH_D,MDH
396	7	6.15823	0.07915	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,GLCpts,LDH_D,MDH
397	7	6.14605	0.07491	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS
398	7	6.1414	0.1578	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
399	7	6.09037	0.16006	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
400	7	6.08683	0.10358	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
401	7	6.0464	0.06183	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PGI

신규 고안된 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
402	7	6.04253	0.16218	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
403	7	5.86291	0.1062	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
404	7	5.86291	0.1062	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
405	7	5.79637	0.08575	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PGI
406	7	5.74642	0.10456	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
407	7	5.71711	0.12348	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
408	7	5.71588	0.18172	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPS
409	7	5.71588	0.18172	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,PGDH,PPS
410	7	5.70575	0.12457	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi
411	7	5.69395	0.07981	ADHEr,ATPS4r,EDA and/or PGDHY,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PPCK
412	7	5.68826	0.10159	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
413	7	5.6857	0.18276	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,PPS,TAL
414	7	5.67373	0.1078	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
415	7	5.67231	0.09516	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH
416	7	5.65788	0.18372	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,PPS,RPE
417	7	5.65108	0.11748	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
418	7	5.64055	0.12198	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
419	7	5.63038	0.12633	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
420	7	5.63037	0.14151	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
421	7	5.61946	0.14377	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS
422	7	5.61946	0.14377	ADHEr,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS
423	7	5.60713	0.15264	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,MALS,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
424	7	5.60713	0.15264	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,ICL,LDH_D,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
425	7	5.60017	0.14365	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS
426	7	5.59518	0.14138	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
427	7	5.59117	0.14212	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,MDH,PGDH
428	7	5.58992	0.13977	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PGDH,TAL
429	7	5.57521	0.1433	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PPS,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy

[0948]

[0949]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
430	7	5.57521	0.1433	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
431	7	5.56382	0.059	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI,PPS,THD2 및/또는 GLUDy
432	7	5.55714	0.14423	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,FUM,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
433	7	5.5551	0.14719	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
434	7	5.54832	0.1485	ADHEr,ASPT,HEX1,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
435	7	5.54749	0.08705	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
436	7	5.54	0.14449	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,SUCOAS
437	7	5.53962	0.15019	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,SUCOAS
438	7	5.53831	0.08799	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
439	7	5.53831	0.08799	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
440	7	5.53405	0.05732	ACKr and/or PTAr,ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PGI
441	7	5.52463	0.06237	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PGI
442	7	5.51713	0.16489	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS
443	7	5.51587	0.14532	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,TAL
444	7	5.51034	0.14586	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGDH
445	7	5.51034	0.14586	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
446	7	5.5014	0.07482	ADHEr,ASPT,EDA 및/또는 PGDHY,GLCpts,LDH_D,MDH,PGI
447	7	5.49363	0.14609	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE,SUCOAS
448	7	5.49315	0.18499	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
449	7	5.48581	0.14671	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,TAL
450	7	5.48581	0.14671	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
451	7	5.47686	0.19195	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD5
452	7	5.47123	0.12153	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
453	7	5.47123	0.12153	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
454	7	5.46318	0.14749	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
455	7	5.46318	0.14749	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,RPE
456	7	5.43967	0.13732	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
457	7	5.41442	0.15603	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
458	7	5.41442	0.15603	ADHEr,ASPT,HEX1,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
459	7	5.41442	0.15603	ADHEr,ASPT,HEX1,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
460	7	5.32088	0.07204	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
461	7	5.29376	0.07385	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,MALS,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
462	7	5.29376	0.07385	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,ICL,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
463	7	5.29342	0.0731	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
464	7	5.29342	0.0731	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
465	7	5.20741	0.07603	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGDH,PPCK
466	7	5.20741	0.07603	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK
467	7	5.20289	0.16585	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,RPE
468	7	5.19469	0.07664	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
469	7	5.18818	0.16709	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,TAL
470	7	5.18292	0.0772	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,RPE
471	7	5.18092	0.10975	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
472	7	5.18092	0.10975	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK
473	7	5.18025	0.13169	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK
474	7	5.18025	0.13169	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK
475	7	5.17526	0.14527	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi
476	7	5.15999	0.12483	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI
477	7	5.15742	0.1471	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
478	7	5.13283	0.14064	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,PPCK
479	7	5.13283	0.14064	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,PPCK
480	7	5.11128	0.1487	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi
481	7	5.10917	0.0835	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,GLCpts,LDH_D,NADH6,PGI,PPCK
482	7	5.10795	0.18114	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,PGDH
483	7	5.08422	0.18199	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,TAL
484	7	5.08162	0.15602	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PGI
485	7	5.08154	0.15604	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PGI
486	7	5.07957	0.15652	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI
487	7	5.06238	0.18278	ADHEr,ASPT,ATPS4r,EDA 및/또는 PGDHY,LDH_D,MDH,RPE
488	7	5.04933	0.08188	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,PPCK,SUCOAS
489	7	5.04086	0.10883	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH,PGI
490	7	5.03782	0.10979	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,TAL
491	7	5.03499	0.11069	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,RPE
492	7	5.0347	0.123	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS
493	7	5.02325	0.08242	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,SUCOAS
494	7	5.02325	0.08242	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,SUCOAS

[0950]

[0951]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
495	7	5.02233	0.1115	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
496	7	5.00367	0.01301	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
497	7	5.00099	0.08371	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,SUCOAS
498	7	4.9785	0.07565	ADHEr,ATPS4r,FDH2,LDH_D,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
499	7	4.97218	0.04755	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,HEX1,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
500	7	4.96921	0.01295	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLUDy,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
501	7	4.96716	0.01165	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
502	7	4.96611	0.01426	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
503	7	4.96543	0.01322	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLUDy,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
504	7	4.96543	0.01322	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLUDy,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
505	7	4.96335	0.01401	ADHEr,AKGD,FRD 및/또는 SUCD4,ICL,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
506	7	4.96335	0.01401	ADHEr,AKGD,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MALS,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
507	7	4.96309	0.0131	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
508	7	4.96271	0.01323	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
509	7	4.96187	0.01458	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
510	7	4.96187	0.01458	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
511	7	4.95873	0.01465	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
512	7	4.95686	0.01531	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
513	7	4.95085	0.01406	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
514	7	4.95085	0.01406	ADHEr,ASPT,GLUDy,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
515	7	4.94529	0.0136	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
516	7	4.94524	0.01566	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
517	7	4.94524	0.01566	ADHEr,ASPT,GLCpts,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy

[0952]

전규 고인물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
518	7	4.94393	0.07737	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
519	7	4.94353	0.01615	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
520	7	4.94353	0.01615	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
521	7	4.94353	0.01615	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
522	7	4.94073	0.01473	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
523	7	4.9406	0.01618	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
524	7	4.93746	0.13888	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
525	7	4.93038	0.19331	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGDH
526	7	4.92604	0.19438	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
527	7	4.92485	0.04913	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PGI,THD2 및/또는 GLUDy
528	7	4.92203	0.19537	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,RPE
529	7	4.89572	0.18301	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
530	7	4.88586	0.18375	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
531	7	4.8768	0.18443	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
532	7	4.87463	0.19612	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGI,THD5
533	7	4.87463	0.19612	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PGI,THD5
534	7	4.85806	0.05038	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
535	7	4.85603	0.21579	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,PPS
536	7	4.84975	0.05712	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PGL 및/또는 G6PDHy,PPCK,PYK
537	7	4.84975	0.05712	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
538	7	4.81569	0.05271	ADHEr,ASPT,FUM,GLCpts,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
539	7	4.81323	0.1198	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
540	7	4.81194	0.09049	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,PYK,RPE,SUCOAS
541	7	4.81179	0.07918	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
542	7	4.79812	0.05498	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
543	7	4.79812	0.05498	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
544	7	4.79812	0.05498	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
545	7	4.79409	0.12192	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK
546	7	4.79101	0.05495	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy

[0953]

신규 리간드 서열	노이즈 수	HMDA 수율	데이오베스	반응목록
547	7	4.78296	0.12315	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK
548	7	4.78296	0.12315	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK
549	7	4.77588	0.08569	ADHEr,AKGD,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
550	7	4.77588	0.08569	ADHEr,AKGD,FRD 및/또는 SUCD4,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
551	7	4.77561	0.07964	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
552	7	4.77561	0.07964	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
553	7	4.77329	0.08047	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
554	7	4.77329	0.08047	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
555	7	4.7705	0.16052	ADHEr,ATPS4r,FDH2,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6
556	7	4.76518	0.08334	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
557	7	4.76374	0.0222	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
558	7	4.76264	0.08425	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
559	7	4.74028	0.09218	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK,PYK,SUCOAS
560	7	4.74028	0.09218	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK,SUCOAS
561	7	4.73717	0.09329	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,PYK,SUCOAS
562	7	4.73717	0.09329	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPCK,PYK,SUCOAS
563	7	4.71257	0.12092	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
564	7	4.69803	0.08636	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MALS,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
565	7	4.69803	0.08636	ADHEr,ASPT,FUM,ICL,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
566	7	4.69803	0.08636	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
567	7	4.69803	0.08636	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
568	7	4.68998	0.14917	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
569	7	4.68111	0.0912	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,MALS,THD2 및/또는 GLUDy
570	7	4.68111	0.0912	ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,ICL,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
571	7	4.68063	0.05195	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
572	7	4.67974	0.09159	ADHEr,AKGD,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
573	7	4.67974	0.09159	ADHEr,AKGD,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
574	7	4.6782	0.13538	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
575	7	4.67079	0.08656	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy

선구 고안물 서열	녹아웃 수	HMDA: 수율	바이오매스	반응목록
576	7	4.66866	0.1492	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
577	7	4.66526	0.1329	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
578	7	4.65177	0.09959	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,PPCK,PYK
579	7	4.65177	0.09959	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,PPCK,PYK
580	7	4.65148	0.09163	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
581	7	4.64795	0.13132	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
582	7	4.64717	0.13258	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
583	7	4.63555	0.16411	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
584	7	4.62743	0.13223	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PGDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
585	7	4.62722	0.10661	ADHEr,AKGD,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,PYK
586	7	4.62722	0.10661	ADHEr,AKGD,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,PYK
587	7	4.61442	0.12597	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
588	7	4.60692	0.10476	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGI
589	7	4.60239	0.15202	ADHEr,AKGD,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,MALS,THD2 및/또는 GLUDy
590	7	4.60239	0.15202	ADHEr,AKGD,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,ICL,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
591	7	4.59777	0.03574	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
592	7	4.59693	0.17398	ADHEr,ASPT,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PYK,RPE
593	7	4.59408	0.12607	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK
594	7	4.588	0.17333	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,SUCOAS
595	7	4.58269	0.16568	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
596	7	4.5614	0.17413	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,RPE,SUCOAS
597	7	4.55514	0.12723	ADHEr,ASPT,FUM,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
598	7	4.54823	0.19006	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
599	7	4.54674	0.19069	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS
600	7	4.53866	0.20774	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
601	7	4.53699	0.1728	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,MDH,PYK,TAL
602	7	4.53586	0.209	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,TAL
603	7	4.51849	0.13149	ADHEr,ATPS4r,FDH2,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK

[0954]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
604	7	4.51845	0.20259	ADHEr,FDH2,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,SUCOAS
605	7	4.50909	0.20652	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
606	7	4.50549	0.20804	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,GLU5K,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
607	7	4.50549	0.20804	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,G5SD,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
608	7	4.50543	0.20807	ADHEr,ASNS2,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
609	7	4.50378	0.20876	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
610	7	4.50198	0.20952	ADHEr,ATPS4r,FDH2,HEX1,LDH_D,NADH6,SUCOAS
611	3	0.669528208	0.263200019	ADHEr,FADH4,LDH_D
612	3	0.110808857	0.249569497	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
613	4	0.93088625	0.384018912	ADHEr,ATPS4r,CBMK2,LDH_D
614	4	1.163912961	0.378757536	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TKT2
615	4	4.552254757	0.171189177	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH
616	4	0.710935568	0.257359864	ADHEr,FADH4,LDH_D,RPE
617	4	0.702400877	0.260125701	ADHEr,FADH4,LDH_D,TAL
618	4	0.719290675	0.254652225	ADHEr,FADH4,LDH_D,TKT2
619	4	2.283994469	0.165173433	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PPCK
620	4	0.18159615	0.246009686	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT2
621	4	4.555303308	0.170023606	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2
622	4	0.710935568	0.257359864	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,RPE
623	4	0.702400877	0.260125701	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,TAL
624	4	0.753832099	0.262897433	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
625	4	0.719290675	0.254652225	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,TKT2
626	4	2.165485624	0.255793845	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK
627	4	2.279039418	0.168962421	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
628	4	0.24281895	0.340878264	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH
629	4	2.165485624	0.255793845	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK
630	4	4.555303308	0.170023606	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2
631	4	2.575639756	0.188350402	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
632	4	2.359364668	0.333057496	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6
633	4	2.365271913	0.329105029	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6
634	4	2.381170653	0.338701395	ADHEr,LDH_D,NADH6,TAL
635	4	2.440438621	0.335394947	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT2
636	4	0.303924042	0.270354967	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT2
637	4	0.276184314	0.387717801	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS
638	4	0.158957458	0.24714816	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,RPE
639	4	0.268683115	0.271077634	ADHEr,LDH_D,PPCK,RPE
640	4	2.268133298	0.177302028	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
641	4	2.303972218	0.174839451	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGI
642	4	2.202777355	0.227277897	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK
643	4	0.136108259	0.248297219	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TAL

[0955]

[0956]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
644	4	0.233253283	0.271804175	ADHEr,LDH_D,PPCK,TAL
645	4	0.753832099	0.262897433	ADHEr,FADH4,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
646	4	1.00803743	0.384504476	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,TKT1
647	4	0.702400877	0.260125701	ADHEr,FADH4,LDH_D,TKT1
648	4	0.136108259	0.248297219	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT1
649	4	0.702400877	0.260125701	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,TKT1
650	4	2.381170653	0.338701395	ADHEr,LDH_D,NADH6,TKT1
651	4	0.233253283	0.271804175	ADHEr,LDH_D,PPCK,TKT1
652	5	0.506864978	0.275350379	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,TKT2
653	5	2.69303784	0.249064654	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TKT2
654	5	4.367851715	0.180794605	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2
655	5	0.41729748	0.278421057	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,RPE
656	5	0.325709758	0.281560994	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,TAL
657	5	2.645877173	0.251090969	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TAL
658	5	0.746129455	0.280922235	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
659	5	1.038232852	0.250484522	ADHEr,ATPS4r,FADH4,LDH_D,SUCOAS
660	5	1.091156432	0.260562519	ADHEr,ATPS4r,FADH4,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
661	5	3.468709118	0.171072336	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2
662	5	1.635653331	0.170872463	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PFLi
663	5	0.971889592	0.254878539	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK,PYK
664	5	2.773151559	0.15594541	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGI
665	5	0.794188757	0.220436537	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,TKT2
666	5	4.635305085	0.167733685	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,TKT2
667	5	0.726213349	0.222710178	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,RPE
668	5	4.60885325	0.168834272	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,RPE
669	5	4.600497528	0.168070055	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,SUCOAS
670	5	4.582051994	0.169949398	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,TAL
671	5	1.218736747	0.252980412	ADHEr,FADH4,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
672	5	2.323324205	0.162516565	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PPCK,TKT2
673	5	0.794188757	0.220436537	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,TKT2
674	5	1.080064187	0.261131964	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,ICL,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
675	5	1.080064187	0.261131964	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MALS,THD2 및/또는 GLUDy
676	5	4.635305085	0.167733685	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,TKT2
677	5	4.611480051	0.167700442	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,RPE
678	5	4.603168381	0.166946432	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,SUCOAS
679	5	4.584877196	0.168800591	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,TAL
680	5	4.692124349	0.117711987	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
681	5	4.637738386	0.16661454	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,TKT2
682	5	4.582051994	0.169949398	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,TAL
683	5	1.218736747	0.252980412	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
684	5	2.22459069	0.253337321	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT2
685	5	2.084553651	0.317680271	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,GLU5K,LDH_D

[0957]

신규 고인물 서열	낙아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
686	5	2.319043241	0.166454441	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT2
687	5	0.379133409	0.337257295	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TKT2
688	5	0.379133409	0.337257295	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,TKT2
689	5	1.080064187	0.261131964	ADHEr,FADH4,ICL,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
690	5	1.080064187	0.261131964	ADHEr,FADH4,LDH_D,MALS,THD2 및/또는 GLUDy
691	5	2.22459069	0.253337321	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT2
692	5	4.611480051	0.167700442	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,RPE
693	5	4.603168381	0.166946432	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,SUCOAS
694	5	4.584877196	0.168800591	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,TAL
695	5	4.692124349	0.117711987	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
696	5	4.637738386	0.16661454	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,TKT2
697	5	2.871064894	0.268281645	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,ME2,NADH6
698	5	2.165924808	0.255458013	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,ME2
699	5	4.328684855	0.179395311	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2
700	5	1.421860815	0.279607649	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
701	5	2.626697246	0.185479991	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT2
702	5	2.515320971	0.228708985	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK
703	5	2.3870222	0.31455217	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6
704	5	2.452754421	0.325482265	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT2
705	5	2.515320971	0.228708985	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK
706	5	2.517581576	0.273304492	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT2
707	5	2.44490357	0.275824433	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6
708	5	2.6103794	0.186397367	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,RPE
709	5	2.555986853	0.242393036	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT2
710	5	2.421064631	0.329399782	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,RPE
711	5	2.424713593	0.326643472	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,RPE
712	5	2.535155189	0.243219368	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,RPE
713	5	2.593899337	0.187323863	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TAL
714	5	2.391804455	0.331134392	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TAL
715	5	2.470792173	0.274926806	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TAL
716	5	2.514181006	0.244051353	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TAL
717	5	0.318612958	0.180159999	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
718	5	2.298067641	0.164222738	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PPCK,TAL
719	5	1.630847318	0.197351873	ADHEr,LDH_D,MDH,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PFLi
720	5	4.068156517	0.116307981	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PFLi,PPCK
721	5	1.630847318	0.197351873	ADHEr,FUM,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PFLi
722	5	1.732749142	0.29901565	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi
723	5	1.717432965	0.229711682	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPCK
724	5	3.998783556	0.193038233	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi
725	5	4.075902556	0.129526478	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PFLi
726	5	3.837085522	0.275765851	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,RPE

[0958]

신규 고안물 서열	억아웃 수	HMDA 수율	베이오매스	반응목록
727	5	3.820196202	0.277060587	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TAL
728	5	3.853817724	0.274483161	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TKT2
729	5	3.839632897	0.261974412	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
730	5	4.393030474	0.140852085	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGI
731	5	0.430495607	0.382946425	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TKT2
732	5	0.381078242	0.384474433	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,RPE
733	5	0.331264934	0.386014683	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TAL
734	5	0.331264934	0.386014683	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS,TKT1
735	5	0.318612958	0.180159999	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI
736	5	2.310761865	0.163365197	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PPCK,RPE
737	5	2.306254619	0.167256205	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,RPE
738	5	0.335428873	0.338418234	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,RPE
739	5	2.674115155	0.222196435	ADHEr,ASPT,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH
740	5	2.310408468	0.174397201	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT2
741	5	2.084492611	0.317726946	ADHEr,ASNS2,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D
742	5	2.086878053	0.315902866	ADHEr,CBMK2,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D
743	5	2.084553651	0.317680271	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,G5SD,LDH_D
744	5	2.221671127	0.212830356	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,PPCK
745	5	2.110766092	0.297636347	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,HEX1,LDH_D
746	5	2.221671127	0.212830356	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PPCK
747	5	2.29690811	0.175324843	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,RPE
748	5	2.283263365	0.176262405	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TAL
749	5	2.799273371	0.150483141	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PGI
750	5	2.255979533	0.224464061	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT2
751	5	4.330026614	0.179036754	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH
752	5	2.238942691	0.225365131	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,RPE
753	5	2.119938959	0.309086971	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,TAL
754	5	2.221768517	0.226273464	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,TAL
755	5	2.186545813	0.254918542	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TAL
756	5	2.293342202	0.16806573	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TAL
757	5	0.29142241	0.339587193	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TAL
758	5	0.29142241	0.339587193	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,TAL
759	5	2.186545813	0.254918542	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TAL
760	5	3.603753429	0.189374217	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
761	5	4.688321717	0.11916587	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
762	5	3.879826068	0.057433556	ADHEr,FADH4,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
763	5	2.092923946	0.31127974	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
764	5	1.181362879	0.252361787	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
765	5	0.325709758	0.281560994	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,TKT1
766	5	2.645877173	0.251090969	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,TKT1
767	5	4.582051994	0.169949398	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,TKT1

[0959]

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
768	5	2.298067641	0.164222738	ADHEr,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,PPCK,TKT1
769	5	4.582051994	0.169949398	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,TKT1
770	5	4.584877196	0.168800591	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,TKT1
771	5	2.186545813	0.254918542	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK,TKT1
772	5	2.293342202	0.16806573	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT1
773	5	0.29142241	0.339587193	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,TKT1
774	5	0.29142241	0.339587193	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,TKT1
775	5	2.186545813	0.254918542	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK,TKT1
776	5	4.584877196	0.168800591	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,TKT1
777	5	2.593899337	0.187323863	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT1
778	5	2.391804455	0.331134392	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,TKT1
779	5	2.396471968	0.327812994	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,TKT1
780	5	2.470792173	0.274926806	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,TKT1
781	5	2.514181006	0.244051353	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK,TKT1
782	5	3.820196202	0.277060587	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,TKT1
783	5	2.283263365	0.176262405	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PFK 및/또는 FBA 및/또는 TPI,TKT1
784	5	2.119938959	0.309086971	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,TKT1
785	5	2.221768517	0.226273464	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,TKT1
786	6	4.63815309	0.138347146	ADHEr,ASPT,FADH4,LDH_D,MDH,PYK
787	6	4.459389393	0.176944819	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,TKT2
788	6	4.380192095	0.177265253	ADHEr,ASPT,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MALS,MDH
789	6	4.40071793	0.179412355	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,TAL
790	6	4.60130813	0.167781976	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT2
791	6	4.459389393	0.176944819	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,TKT2
792	6	4.430256792	0.178170044	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,RPE
793	6	4.40071793	0.179412355	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,TAL
794	6	4.563806878	0.124751372	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
795	6	4.380192095	0.177265253	ADHEr,ASPT,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,MDH
796	6	4.380192095	0.177265253	ADHEr,ASPT,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,ME2
797	6	4.40071793	0.179412355	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,TAL
798	6	4.547590285	0.169998972	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
799	6	4.32598859	0.179624623	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
800	6	4.503409516	0.124027245	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,TKT2
801	6	4.55209485	0.121669936	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGDH
802	6	4.519337222	0.123256037	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,RPE
803	6	4.535068073	0.12249436	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,TAL
804	6	5.189612621	0.143792027	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi
805	6	4.321178853	0.120168187	ADHEr,ATPS4r,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PGI
806	6	4.555303308	0.170023606	ADHEr,DAAD,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,PRO1z
807	6	4.552254757	0.171189177	ADHEr,DAAD,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PRO1z
808	6	4.611166872	0.137118286	ADHEr,FADH4,FUM,LDH_D,MDH,PYK
809	6	4.681108251	0.164738111	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT2

[0960]

신규 고안물 서열	녹아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
810	6	4.655427003	0.165799614	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,RPE,SUCOAS
811	6	4.62941265	0.166874885	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
812	6	4.57471951	0.178914826	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
813	6	4.72140048	0.117206382	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
814	6	5.77503303	0.099302315	ADHEr,EDA 및/또는 PGDHY,FADH4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy
815	6	4.802404267	0.049107371	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FADH4,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
816	6	4.611166872	0.137118286	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,MDH,PYK
817	6	4.681108251	0.164738111	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT2
818	6	4.640728933	0.137362308	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,ME2,PYK
819	6	4.657699713	0.164706045	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,RPE,SUCOAS
820	6	4.683198197	0.163658455	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TKT2
821	6	4.63187269	0.165767133	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TAL
822	6	5.443882794	0.111598427	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,HEX1,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
823	6	4.714403301	0.10919394	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
824	6	4.727966085	0.117420509	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
825	6	4.724744313	0.115799637	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
826	6	4.710892193	0.11755936	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
827	6	4.744999691	0.117281986	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy,TKT2
828	6	4.62941265	0.166874885	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TAL
829	6	4.74186178	0.118725202	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy,TKT2
830	6	4.512318137	0.052959973	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
831	6	4.724614564	0.118867157	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
832	6	4.707326054	0.119009453	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
833	6	4.459389393	0.176944819	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,TKT2
834	6	4.380192095	0.177265253	ADHEr,ASPT,FRD 및/또는 SUCD4,ICL,LDH_D,MDH
835	6	4.40071793	0.179412355	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,TAL
836	6	4.874048363	0.048155873	ADHEr,FADH4,ICL,LDH_D,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
837	6	4.520685593	0.183259208	ADHEr,FADH4,HEX1,ICL,LDH_D,THD2 및/또는 GLUDy
838	6	4.459389393	0.176944819	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,TKT2
839	6	4.520685593	0.183259208	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,MALS,THD2 및/또는 GLUDy
840	6	4.874048363	0.048155873	ADHEr,FADH4,LDH_D,MALS,PPCK,THD2 및/또는 GLUDy
841	6	4.517532821	0.171239478	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,SUCOAS
842	6	4.640728933	0.137362308	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,ME2,PYK
843	6	4.657699713	0.164706045	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,RPE,SUCOAS

신규 고안물 서열	넉아웃 수	HMDA 수율	바이오매스	반응목록
844	6	4.683198197	0.163658455	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TKT2
845	6	4.63187269	0.165767133	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TAL
846	6	4.724744313	0.115799637	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
847	6	4.744999691	0.117281986	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy,TKT2
848	6	4.526462669	0.168070055	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,FUM,LDH_D,ME2,SUCOAS
849	6	5.443882794	0.111598427	ADHEr,FADH4,HEX1,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
850	6	4.714403301	0.10919394	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy
851	6	4.727966085	0.117420509	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
852	6	4.710892193	0.11755936	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
853	6	4.33071542	0.180983121	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6
854	6	4.313819364	0.203396482	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2 및/또는 GLUDy
855	6	4.836109146	0.120863498	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi,PGI
856	6	5.044438059	0.165184738	ACKr 및/또는 PTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI
857	6	5.168015107	0.134224131	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
858	6	5.320455827	0.059323173	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 및/또는 GLUDy
859	6	4.74186178	0.118725202	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy,TKT2
860	6	4.512318137	0.052959973	ADHEr,FADH4,LDH_D,PPCK,PYK,THD2 및/또는 GLUDy
861	6	4.724614564	0.118867157	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,RPE,THD2 및/또는 GLUDy
862	6	4.888461627	0.046924032	ADHEr,FADH4,LDH_D,PPCK,SUCOAS,THD2 및/또는 GLUDy
863	6	4.707326054	0.119009453	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,TAL,THD2 및/또는 GLUDy
864	6	4.40071793	0.179412355	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH,TKT1
865	6	4.547590285	0.169998972	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT1
866	6	4.535068073	0.12249436	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,TKT1
867	6	4.62941265	0.166874885	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT1
868	6	4.63187269	0.165767133	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TKT1
869	6	4.710892193	0.11755936	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy,TKT1
870	6	4.62941265	0.166874885	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,SUCOAS,TKT1
871	6	4.707326054	0.119009453	ADHEr,FRD 및/또는 SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy,TKT1
872	6	4.40071793	0.179412355	ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH,TKT1
873	6	4.40071793	0.179412355	ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH,TKT1
874	6	4.40071793	0.179412355	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,ME2,TKT1
875	6	4.63187269	0.165767133	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,SUCOAS,TKT1
876	6	4.710892193	0.11755936	ADHEr,FADH4,LDH_D,ME2,THD2 및/또는 GLUDy,TKT1
877	6	4.707326054	0.119009453	ADHEr,FADH4,LDH_D,MDH,THD2 및/또는 GLUDy,TKT1

[0961]

[0962] 6-ACA의 증진된 생산을 위한 최소 유전자 결실 세트. 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA를 경유하여 6-아미노카프로에이트(6-ACA) 경로를 갖는 미생물에서 6-ACA 생산을 개선시키기 위한 균주 고안 전략이 상기 기재되어 있다. 표 14에 기재된 6-ACA 생산을 위한 균주 고안물의 광범위한 분석에 기초하여, 성장-결부된 6-ACA 생산에 필요한 최소 결실 세트가 식별되었다. 포스포에놀피루베이트 카복시키나아제(PPCK)가 가역성인 것으로 가정되었음을 주지한다.

[0963] 간단히, 아세트알데히드 탈수소효소(ADHEr) 및 락테이트 탈수소효소(LDH_D)에서의 결실은 경쟁 부산물, 에탄올 및 락테이트의 형성을 방지하기 위해 필요하다. 따라서, 최소 결실 세트는 아세트알데히드 탈수소효소(ADHEr) 및 락테이트 탈수소효소(LDH_D)의 결실을 포함한다. 추가적인 결실 균주는 ADHEr 및 LDH_D에 더하여 적어도 하나의 하기 활성이 없는 균주를 포함한다: 말레이트 탈수소효소(MDH), 아스파타아제(ASPT), NAD(P) 수소전이효소(THD2), 및 글루타메이트 탈수소효소(GLUDy). 이러한 추가적인 결실로 인해 생산은 세포 성장과 엄격히 결부된다. 도 28 내지 31은 ADHEr 및 LDH_D의 최소 결실을 갖는 결실 돌연변이체에 대한 계산된 6-ACA 대 성장 수율을 도시한다(도 28). 추가적인 결실을 갖는 균주에 대한 계산된 수율은 도 29 내지 31에 도시된다.

[0964] 추가적인 최소 결실 세트는 포스포글루코이성화효소(PGI)를 포함한다. 이러한 고안은 펜토스 포스페이트 경로를 경유하여 환원 등가물을 생성하는데 초점을 둔다. 추가적인 유리한 결실은 다음을 포함한다: 아세트알데히드 탈수소효소(ADHEr), 헥소키나아제(HEX1), 2-데하이드로-3-데옥시-포스포글루코네이트 알돌라아제(EDA) 및 포스포글루코네이트 데하이드라타아제(PGDHy). 도 32 내지 34는 PGI의 최소 결실을 갖는 결실 돌연변이체에 대한 계산된 6-ACA 대 성장 수율을 도시하고, 추가의 예시적인 돌연변이체는 도 32 내지 34에 도시된다.

[0965] 각각의 이들 균주는, 예측된 균주 고안물이 생성물의 형성을 바이오매스 형성과 충분히 결부시키지 않는 것으로 결정된 경우, 또는 생성물의 형성을 바이오매스 형성과 결부시키는 효능을 증가시키기 위해 추가적인 결실로 보강될 수 있다. 다르게는, 성장 조건하에 상당한 활성을 갖는 것으로 공지되지 않은 몇몇 다른 효소는 적응 진화 또는 무작위 돌연변이생성에 기인하여 활성이 될 수 있다. 이러한 효소 활성은 또한 넉아웃될 수도 있다. 예를 들면, 석시네이트를 푸마레이트로 산화시키고 호기성 조건하에서만 활성인 것으로 공지된 석시네이트 탈수소효소는 혐기성 조건하에서 조차 상당한 활성을 나타낼 수 있고, 따라서 이러한 활성은 넉아웃될 수 있다. 그

러나, 본원에 제공된 유전자 결실 세트의 목록은 고-수율의 성장-결부된 6-ACA 생산 균주의 구축을 위한 우수한 출발점으로서 작용한다.

[0966] 아디페이트의 증진된 생산을 위한 최소 유전자 결실 세트. 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA를 경유하여 아디페이트 경로를 갖는 미생물에서 아디페이트 생산을 개선시키기 위한 균주 고안 전략이 상기에 기재되어 있다. 표 15에 기재된 아디페이트 생산을 위한 균주 고안물의 광범위한 분석에 기초하여, 성장-결부된 아디페이트 생산에 필요한 최소 결실 세트가 식별되었다. 포스포에놀피루베이트 카복시키나아제(PPCK)가 조직망에서 가역성인 것으로 가정되었음을 주지한다.

[0967] 간단히, 아세트알데히드 탈수소효소(ADHEr) 및 락테이트 탈수소효소(LDH_D)의 결실은 경쟁 부산물, 에탄올 및 락테이트의 형성을 방지하기 위해 필요하다. 따라서, 최소 결실 세트는 아세트알데히드 탈수소효소(ADHEr) 및 락테이트 탈수소효소(LDH_D)의 결실을 포함한다. 추가적인 결실 균주는 아세트알데히드 탈수소효소(ADHEr) 및 락테이트 탈수소효소(LDH_D)에 더하여 적어도 하나의 하기 활성이 없는 균주를 포함한다: 푸마라아제(FUM), 포스포글루코스이성화효소(PGI), PEP 카복시키나아제(PPCK), 헥소키나아제(HEX1), 말레이트 탈수소효소(MDH), 및 NADH 탈수소효소(NADH6).

[0968] 추가적인 결실은 아디페이트의 성장-결부된 형성을 개선하기 위한 OptKnock 체제에 의해 식별되었다. 이들은 1종 이상의 하기 효소를 포함한다: 말산 효소(ME2), 아스파테이트 아미노전이효소(ASPT), 아세테이트 키나아제(ACKr), 인산아세틸전이효소(PTAr), 피루베이트 포메이트 리아제(PFL), 수소전이효소(THD2), 및 글루타메이트 탈수소효소(GLUDy), 및 글루코스 섭취의 PTS 시스템(GLCpts). 수율의 추가의 개선은 임의의 하기 효소의 추가적인 결실에 의해 달성될 수 있다: ATP 신타아제(ATPS4r), 포스포글루코네이트 데하이드라타아제(PGDHY), 2-데하이드로-3-데옥시-포스포글루코네이트 알돌라아제(EDA), 6-포스포글루코노락토나아제(PGL), 글루코스 6-포스페이트 탈수소효소(G6PDHY), 및 포스포글루코네이트 탈수소효소(PGDH).

[0969] 예측된 균주 고안물은, 생성물의 형성을 바이오매스 형성과 충분히 결부시키지 않는 것으로 결정된 경우, 또는 생성물의 형성을 바이오매스 형성과 결부시키는 효능을 증가시키기 위해 추가적인 결실로 보강될 수 있다. 다르게는, 성장 조건하에 상당한 활성을 갖는 것으로 공지되지 않은 몇몇 다른 효소는 적응 진화 또는 무작위 돌연변이생성에 기인하여 활성이 될 수 있다. 이러한 효소 활성은 또한 넉아웃될 수도 있다. 그러나, 본원에 제공된 유전자 결실 세트의 목록은 고-수율의 성장-결부된 아디페이트 생산 균주의 구축을 위한 우수한 출발점으로서 작용한다.

[0970] HMDA의 증진된 생산을 위한 최소 유전자 결실 세트. 아세틸-CoA 및 석시닐-CoA를 경유하여 헥사메틸렌 디아민(HMDA) 경로를 갖는 미생물에서 HMDA 생산을 개선시키기 위한 균주 고안 전략이 상기 기재되어 있다. 표 16에 기재된 HMDA 생산을 위한 균주 고안물의 광범위한 분석에 기초하여, 성장-결부된 HMDA 생산에 필요한 최소 결실 세트가 식별되었다. 포스포에놀피루베이트 카복시키나아제(PPCK)가 조직망에서 가역성인 것으로 가정되었음을 주지한다.

[0971] 간단히, 아세트알데히드 탈수소효소(ADHEr) 및 락테이트 탈수소효소(LDH_D)에서의 결실은 경쟁 부산물, 에탄올 및 락테이트의 형성을 방지하기 위해 필요하다. 따라서, 최소 결실 세트는 아세트알데히드 탈수소효소(ADHEr) 및 락테이트 탈수소효소(LDH_D)의 결실을 포함한다. 추가적인 결실 균주는 아세트알데히드 탈수소효소(ADHEr) 및 락테이트 탈수소효소(LDH_D)에 더하여 적어도 하나의 하기 활성이 없는 균주를 포함한다: 푸마레이트 환원효소(FRD2), 푸마라아제(FUM), 포스포글루코스 이성화효소(PGI), 또는 PEP 카복시키나아제(PPCK).

[0972] 추가적인 결실은 HMDA의 성장-결부된 형성을 개선하기 위한 OptKnock 체제에 의해 식별되었다. 이들은 1종 이상의 하기 효소를 포함한다: 헥소키나아제(HEX1), 말산 효소(ME2), 말레이트 탈수소효소(MDH), 아스파테이트 아미노전이효소(ASPT), 아세테이트 키나아제(ACKr), 인산아세틸전이효소(PTAr), 피루베이트 포메이트 리아제(PFL), 및 피루베이트 키나아제(PYK). HMDA 수율은 임의의 하기 효소의 추가적인 결실에 의해 개선될 수 있다: 수소전이효소(THD2), 글루타메이트 탈수소효소(GLUDy), ATP 신타아제(ATPS4r), GLCpts(글루코스 섭취의 PTS 시스템), PGDHY(포스포글루코네이트 데하이드라타아제) 및 EDA(2-데하이드로-3-데옥시-포스포글루코네이트 알돌라아제).

[0973] 각각의 이들 균주는, 예측된 균주 고안물이 생성물의 형성을 바이오매스 형성과 충분히 결부시키지 않는 것으로 결정된 경우, 또는 생성물의 형성을 바이오매스 형성과 결부시키는 효능을 증가시키기 위해 추가적인 결실로 보강될 수 있다. 다르게는, 성장 조건하에 상당한 활성을 갖는 것으로 공지되지 않은 몇몇 다른 효소는 적응 진화 또는 무작위 돌연변이생성에 기인하여 활성이 될 수 있다. 이러한 효소 활성은 또한 넉아웃될 수도 있다.

예를 들면, 석시네이트를 푸마레이트로 산화시키고 호기성 조건하에서만 활성인 것으로 공지된 석시네이트 탈수소효소는 혐기성 조건하에서 조차 상당한 활성을 나타낼 수 있고, 따라서 이러한 활성은 넉아웃될 수 있다. 그러나, 본원에 제공된 유전자 결실 세트의 목록은 고-수율의 성장-결부된 HMDA 생산 균주의 구축을 위한 우수한 출발점으로서 작용한다.

[0974] 아디프산의 성장-결부된 생산을 위한 Optknock 균주 고안물. 석시닐-CoA 경로를 사용하는 아디페이트를 합성하는 균주를 조작하기 위한 결실 전략의 추가의 예가 아래에 기재된다. 아디페이트 합성을 위한 모든 높은-우위의 성장-결부된 고안물을, 상기 논의된 바와 같이 발효 부산물의 형성을 방지하기 위해 아세틸알데히드-CoA 탈수소효소(ADHEr) 및 락테이트 탈수소효소(LDH_D) 활성이 결핍된 균주상에서 수립한다. 말레이트 탈수소효소(MDH)의 추가의 결실은 또한 부산물 생산을 감소시킨다. 도 35는 야생형 에스케리치아 콜라이(흑색)와 비교하여 높은 우위의 균주 고안물(회색)의 성장-결부된 아디페이트 생산 특징을 도시한다. 10 mmol/gDW/시간의 글루코스 섭취 속도가 가정된다. ADHEr, LDH_D 및 MDH 활성이 결핍된 균주(도 35에서 고안물 1)는 최대 바이오매스 수율에서 이용된 글루코스 1 그램 당 0.51 그램의 아디페이트의 아디페이트 수율(g/g)을 달성할 것으로 예측된다.

[0975] 고안물 2 내지 4는 기본 고안물로서의 고안물 1 상에서 만들어진다. 고안물 2는 포스포에놀피루베이트 카복시키나아제(PPCK)의 제거를 수반한다. 이러한 고안물은 최대 바이오매스 수율에서 아디페이트 수율을 3.6 g/g으로 개선시켰다. 고안물 3에서 피루베이트 포메이트 리아제(PFLi) 활성의 추가적인 결실은 부산물로서의 포메이트의 분비를 방지함으로써 수율을 추가로 개선시킨다. 이러한 고안물의 예측된 아디페이트 수율은 5.8 g/g이다. 고안물 4는 ADHEr, LDH_D, MDH, PPCK 및 PFLi에 더하여 NAD(P) 수소전이효소(THD2)가 결실됨을 특징으로 한다. 이는 0.117 1/시간의 성장 속도에서 6.8 g/g의 아디페이트 수율을 나타낸다. 고안물 4는 아디페이트 생산을 세포 성장에 엄격히 결부시키는 작용을 하면서도, 91%의 이론적 최대 수율을 달성한다.

[0976] **실시예 XXXI**

[0977] **아디페이트로부터의 아디페이트 세미알데히드의 생합성 및 6-아미노카프로에이트로부터의 6-아미노카프로에이트 세미알데히드의 생합성**

[0978] 본 실시예는 아디페이트로부터의 아디페이트 세미알데히드의 생합성 생산 및 6-아미노카프로에이트로부터의 6-아미노카프로에이트 세미알데히드의 생합성 생산을 설명한다.

[0979] 아디페이트로부터 아디페이트 세미알데히드로의 형질전환(도 25, 단계 X)은 카복실산 환원효소(CAR)에 의해 촉매화될 수 있다. 이는 하기 결과에 의해 입증된다. f'pKLJ33s를 갖는 에스케리치아 콜라이 균주 ECKh-422의 화학적 컴피턴트(competent) 세포(Δ*adhE*, Δ*ldhA*, Δ*pflB*, Δ*lpdA*, 클레브시엘라 뉴모니아로부터의 통합된 *lpdA*::E354K, Δ*mdh*, Δ*arcA*, *gltA*-R163L)를, 다양한 CAR 유전자(표 17)를 갖는 pZs*13s 플라스미드, 또는 CAR 유전자가 없는 대조 플라스미드에 의해 형질전환시켰다. 형질전환체의 단일 콜로니를 선택하고 하룻밤 LB 중에서 37℃에서 100 ㎍/㎖의 카베네실린(carbenecillin) 및 10 ㎍/㎖의 클로람페니콜(chloramphenicol)과 함께 성장시켰다. 세포를 1:50의 비율로 계대배양시키고, 0.6의 OD600에서 200 μM IPTG로 유도하였다. 세포를 5시간 동안 37℃에서 항온처리한 후, 수거하였다. 세포 배양물을 15 ㎖의 샘플로 분취하고, 펠릿화하였다. 세포 펠릿을 검정에 사용할 때까지 -80℃에서 저장하였다.

표 17

[0980] 본 실시예에서 사용된 CAR 유전자

단백질	GenBank ID	GI 수	유기체
720	AAR91681.1	40796035	노카디아 이오웬시스
889	YP_887275.1	118473501	마이코박테리엄 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis*) 균주 MC2 155
890	YP_889972.1	118469671	마이코박테리엄 스메그마티스 균주 MC2 155
891	NP_959974.1	41407138	마이코박테리엄 아비엄(*Mycobacterium avium*) 하위종 파라튜베르큘로시스(*paratuberculosis*) K-10
892	YP_001850422.1	183982131	마이코박테리엄 마리넘(*Mycobacterium marinum*) M

[0981] 0.5 ㎕의 라이오자임(lysozyme) 및 벤조나아제(benzonase)를 갖는 500 ㎕의 B-PER의 첨가에 의해 세포 펠릿을 용해하였다. 총 250 ㎕ 부피의 96 웰 포맷 마이크로플레이트에서 50 mM 트리스(pH 7.2), 1 mM EDTA, 10 mM

$MgCl_2$, 1 mM DTT, 10%(부피/부피) 글리세롤, 1 mM ATP, 0.5 mM NADPH 및 20 mM 아디페이트 또는 50 mM 6-아미노카프로에이트의 검정 용액을 2 ㎕의 조질의 용해물에 첨가함으로써 CAR 활성을 측정하였다. NADPH의 $NADP^+$로의 산화를 30분 동안 340 nm의 흡광도에서 모니터링하였다. NADPH 소실 속도를 사용하여 다양한 CAR 단백질의 활성을 계산하였다. 각각의 용해물의 총 단백질 농도를 브래드포드(Bradford)에 의해 결정하고, 활성을 총 단백질 농도(유닛/mg)로 정규화하였다.**아디페이트로부터 아디페이트 세미알데히드로의 형질전환**(도 24, 단계). 도 36에서 도시된 바와 같이, 아디페이트를 기질로서 사용하는 상당한 CAR 활성이 CAR 유전자 889 및 891 둘다에 의해 관찰된 반면, 대조 용해물은 CAR 활성을 나타내지 않았다.

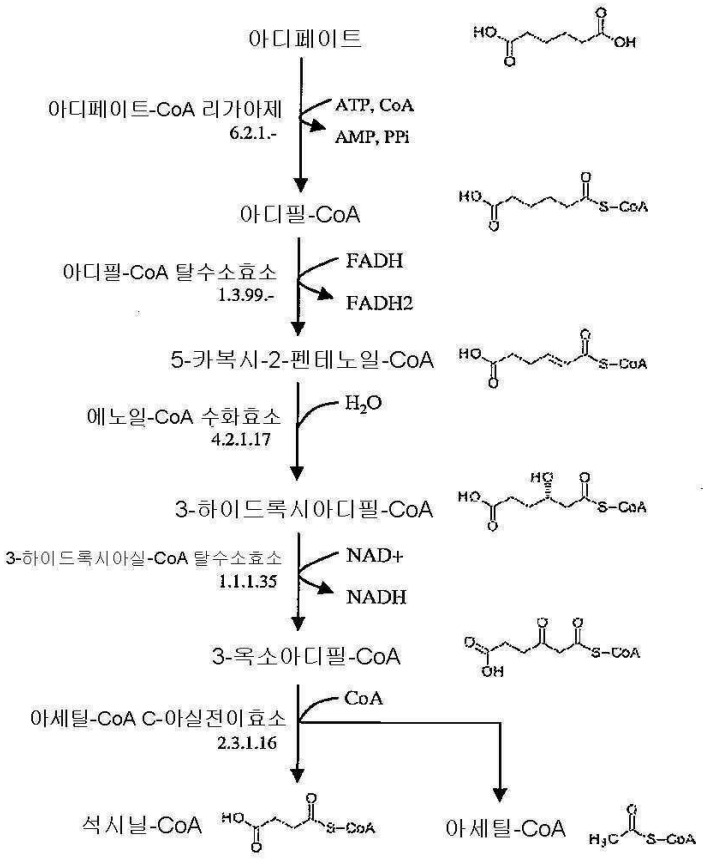
[0982] 게다가, 500 ㎕의 50 mM 트리스(pH 7.2), 1 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10%(부피/부피) 글리세롤, 5 mM ATP, 3 mM NADPH 및 20 mM 아디페이트로 구성되도록 반응물을 설정하였다. 반응물을 실온에서 30분 동안 항온처리하고, 1% 폼산을 첨가하여 중지시켰다. 이어서 샘플을 원심분리하고 상청액을 LC-MS로 분석하였다. 낮은 mM 수준의 아디페이트 세미알데히드가 검출되었고, 이로써 아디페이트로부터 아디페이트 세미알데히드로 형질전환을 확인하였다.

[0983] **6-아미노카프로에이트로부터 6-아미노카프로에이트 세미알데히드로의 형질전환**. 도 37에 도시된 바와 같이, 기질로서 6-아미노카프로에이트를 사용하는 상당한 CAR 활성이 수 개의 CAR 유전자 720, 889, 890, 891 및 892에 의해 관찰된 반면, 대조 용해물은 CAR 활성을 나타내지 않았다. 이들 결과는 6-아미노카프로에이트로부터 6-아미노카프로에이트 세미알데히드로의 형질전환을 지시한다.

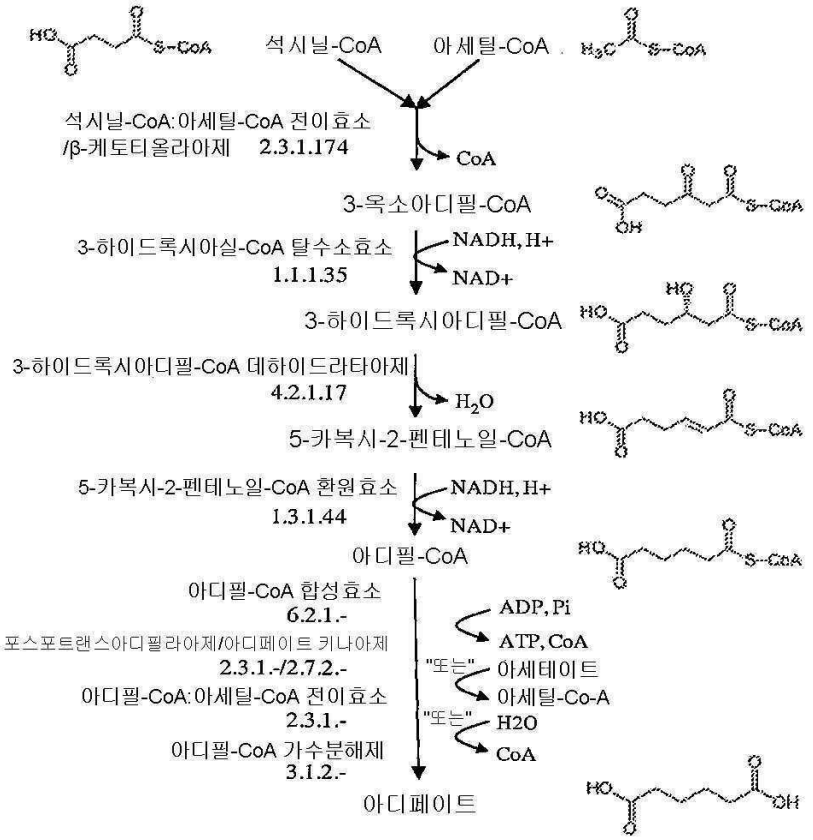
[0984] 본원 전체를 통해, 다양한 출판물이 인용되었다. 이들 전체 출판물의 개시내용은 본 발명이 속하는 기술 분야를 보다 자세히 설명하기 위해 본원에 참고로 인용된다. 본 발명이 상기 제공된 실시예를 참고하여 기재되었지만, 본 발명의 취지로부터 벗어나지 않고 다양하게 변형될 수 있음을 알아야 한다.

도면

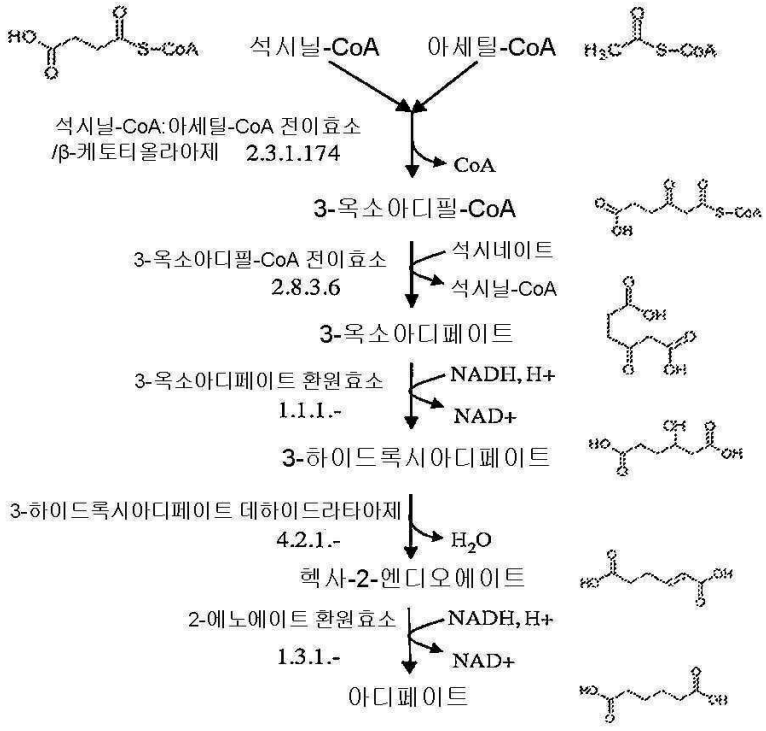
도면1



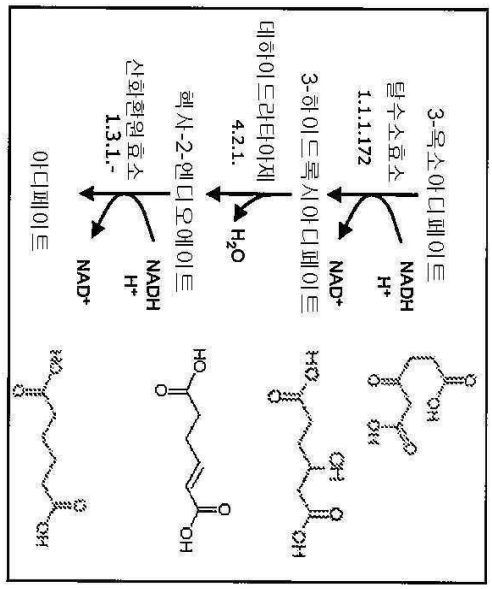
도면2

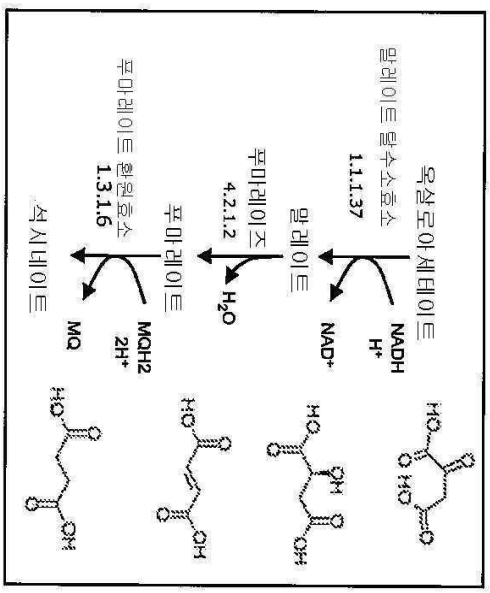

석시닐-CoA
아세틸-CoA
석시닐-CoA:아세틸-CoA 전이효소
/β-케토티올라아제 2.3.1.174
CoA
3-옥소아디필-CoA
3-하이드록시아실-CoA 탈수소효소
1.1.1.35
NADH, H+
NAD+
3-하이드록시아디필-CoA
3-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제
4.2.1.17
H2O
5-카복시-2-펜테노일-CoA
5-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소
1.3.1.44
NADH, H+
NAD+
아디필-CoA
아디필-CoA 합성효소
6.2.1.-
ADP, Pi
ATP, CoA
포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제
2.3.1.-/2.7.2.-
"또는"
아세테이트
아세틸-Co-A
아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소
2.3.1.-
"또는"
H2O
CoA
아디필-CoA 가수분해제
3.1.2.-
아디페이트

도면3

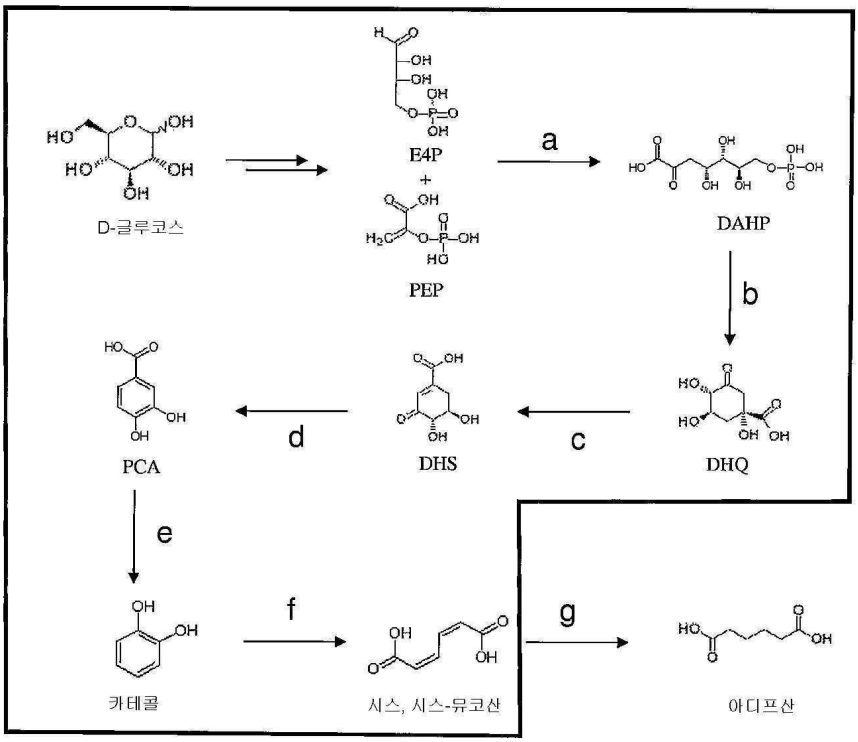

석시닐-CoA
아세틸-CoA
석시닐-CoA:아세틸-CoA 전이효소
/β-케토티올라아제 2.3.1.174
CoA
3-옥소아디필-CoA
3-옥소아디필-CoA 전이효소
2.8.3.6
석시네이트
석시닐-CoA
3-옥소아디페이트
3-옥소아디페이트 환원효소
1.1.1.-
NADH, H+
NAD+
3-하이드록시아디페이트
3-하이드록시아디페이트 데하이드라타아제
4.2.1.-
H2O
헥사-2-엔디오에이트
2-에노에이트 환원효소
1.3.1.-
NADH, H+
NAD+
아디페이트

도면4

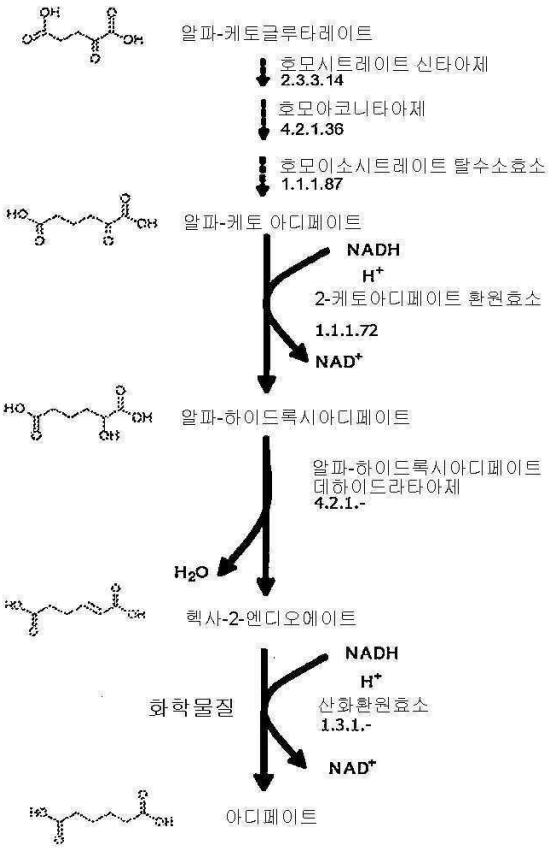

3-옥소아디페이트
탈수소효소
1.1.1.172
NADH
H+
NAD+
3-하이드록시아디페이트
헥사-2-엔디오에이트
4.2.1.
H2O
데하이드라타아제
산화환원효소
1.3.1.-
NADH
H+
NAD+
아디페이트


옥살로아세테이트
말레이트 탈수소효소
1.1.1.37
NADH
H+
NAD+
말레이트
푸마레이즈
4.2.1.2
H2O
푸마레이트
푸마레이트 환원효소
1.3.1.6
MQH2
2H+
MQ
석시네이트

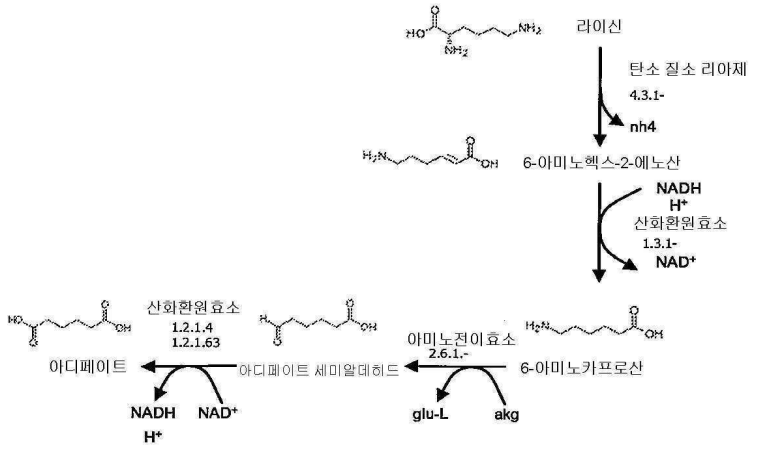
도면5


D-글루코스
E4P
PEP
a
DAHP
b
DHQ
c
DHS
d
PCA
e
카테콜
f
시스, 시스-뮤코산
g
아디프산

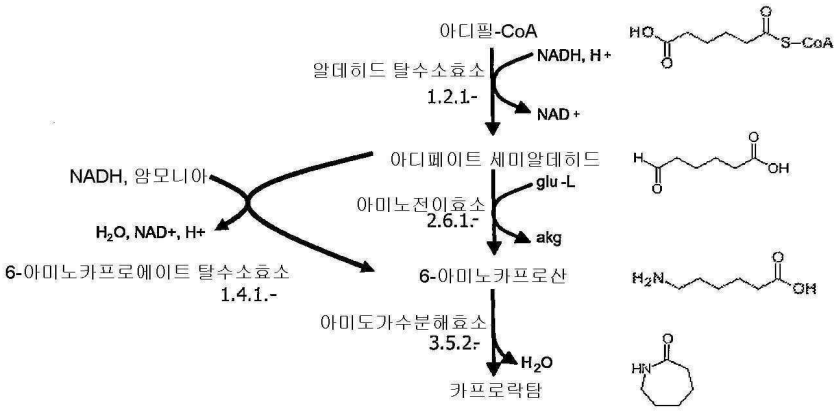
도면6


알파-케토글루타레이트
호모시트레이트 신타아제
2.3.3.14
호모아코니타아제
4.2.1.36
호모이소시트레이트 탈수소효소
1.1.1.87
알파-케토 아디페이트
NADH
H+
2-케토아디페이트 환원효소
1.1.1.72
NAD+
알파-하이드록시아디페이트
알파-하이드록시아디페이트
데하이드라타아제
4.2.1.-
H2O
헥사-2-엔디오에이트
화학물질
NADH
H+
산화환원효소
1.3.1.-
NAD+
아디페이트

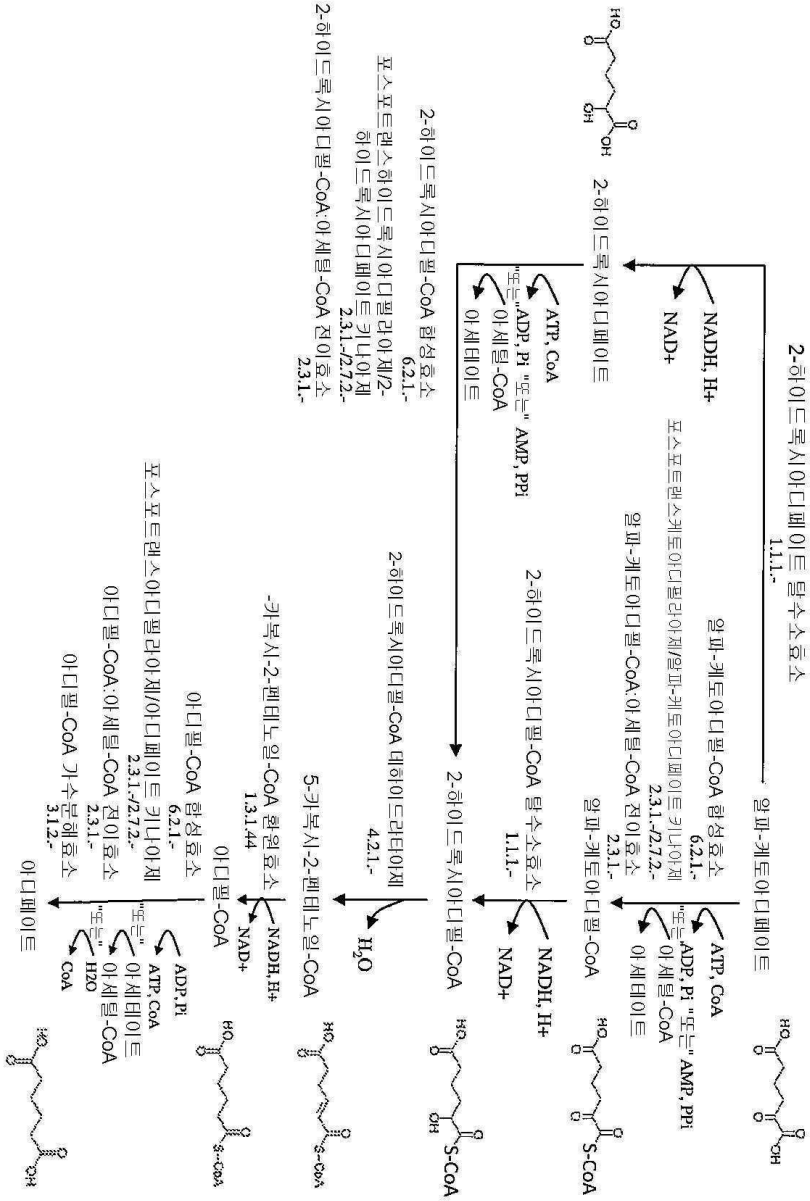
도면7


라이신
탄소 질소 리아제
4.3.1-
nh4
6-아미노헥스-2-에노산
NADH
H+
산화환원효소
1.3.1-
NAD+
산화환원효소
1.2.1.4
1.2.1.63
아디페이트
아디페이트 세미알데히드
아미노전이효소
2.6.1.-
6-아미노카프로산
NADH
H+
NAD+
glu-L
akg

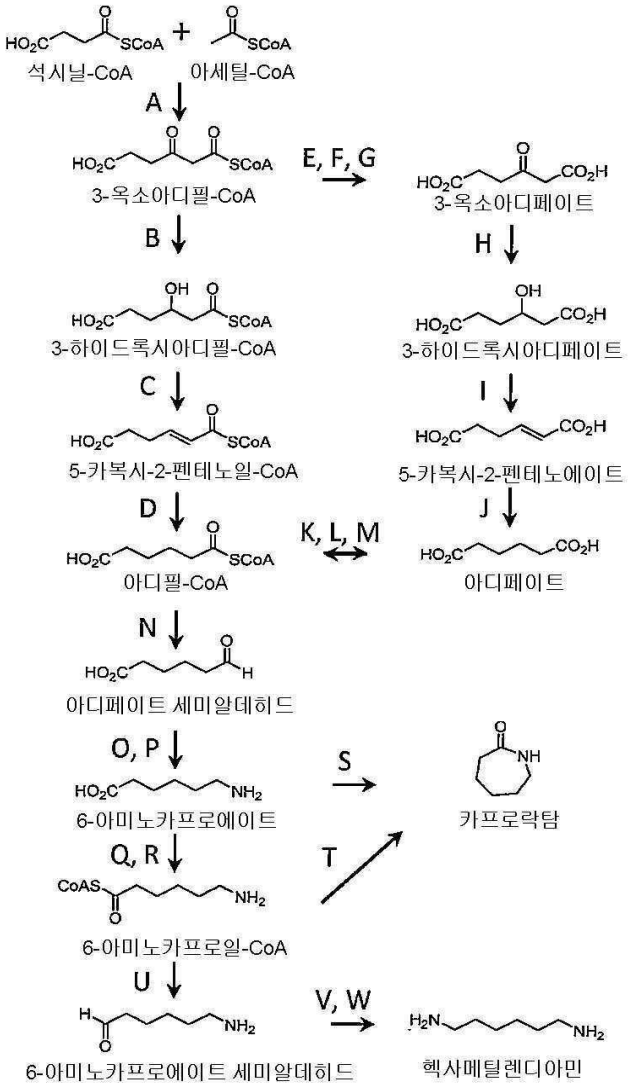
도면8


아디필-CoA
S-CoA
알데히드 탈수소효소
1.2.1.-
NADH, H+
NAD+
아디페이트 세미알데히드
NADH, 암모니아
H2O, NAD+, H+
아미노전이효소
2.6.1.-
glu-L
akg
6-아미노카프로에이트 탈수소효소
1.4.1.-
6-아미노카프로산
아미도가수분해효소
3.5.2-
H2O
카프로락탐

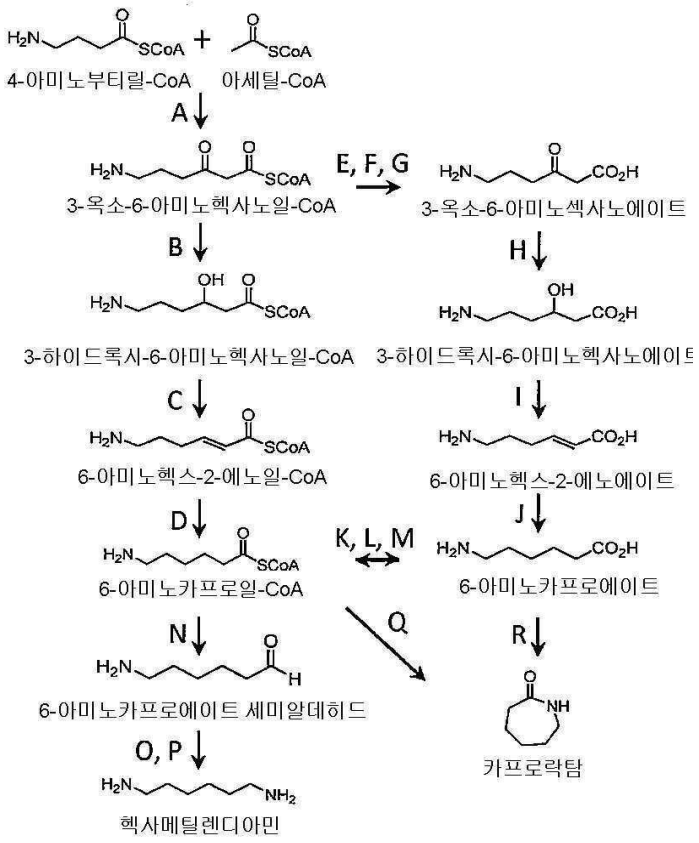
도면9


2-하이드록시아디페이트 탈수소효소
1.1.1.-
NADH, H+
NAD+
2-하이드록시아디페이트
알파-케토아디페이트
알파-케토아디필-CoA 합성효소
6.2.1.-
포스포트랜스케토아디필라아제/알파-케토아디페이트 키나아제
2.3.1.-/2.7.2.-
ATP, CoA
"또는" ADP, Pi "또는" AMP, PPi
아세틸-CoA
아세테이트
알파-케토아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소
2.3.1.-
알파-케토아디필-CoA
S-CoA
2-하이드록시아디필-CoA 탈수소효소
1.1.1.-
NADH, H+
NAD+
2-하이드록시아디필-CoA
2-하이드록시아디필-CoA 합성효소
6.2.1.-
포스포트랜스하이드록시아디필라아제/2-하이드록시아디페이트 키나아제
2.3.1.-/2.7.2.-
ATP, CoA
"또는" ADP, Pi "또는" AMP, PPi
아세틸-CoA
아세테이트
2-하이드록시아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소
2.3.1.-
2-하이드록시아디필-CoA 데하이드라타아제
4.2.1.-
H2O
5-카복시-2-펜테노일-CoA
-카복시-2-펜테노일-CoA 환원효소
1.3.1.44
NADH, H+
NAD+
아디필-CoA
아디필-CoA 합성효소
6.2.1.-
ADP, Pi
ATP, CoA
포스포트랜스아디필라아제/아디페이트 키나아제
2.3.1.-/2.7.2.-
"또는"
아세테이트
아디필-CoA:아세틸-CoA 전이효소
2.3.1.-
"또는"
H2O
CoA
아디필-CoA 가수분해효소
3.1.2.-
아디페이트

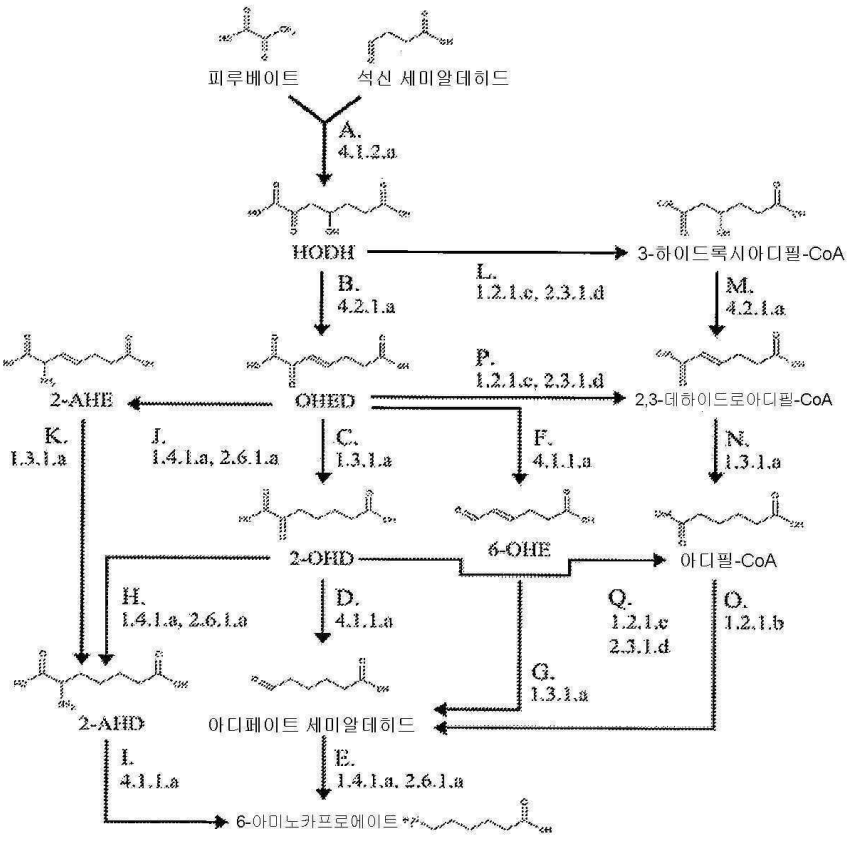
도면10


석시닐-CoA
아세틸-CoA
A
3-옥소아디필-CoA
E, F, G
3-옥소아디페이트
B
H
3-하이드록시아디필-CoA
3-하이드록시아디페이트
C
I
5-카복시-2-펜테노일-CoA
5-카복시-2-펜테노에이트
D
K, L, M
J
아디필-CoA
아디페이트
N
아디페이트 세미알데히드
O, P
S
6-아미노카프로에이트
카프로락탐
Q, R
T
6-아미노카프로일-CoA
U
V, W
6-아미노카프로에이트 세미알데히드
헥사메틸렌디아민

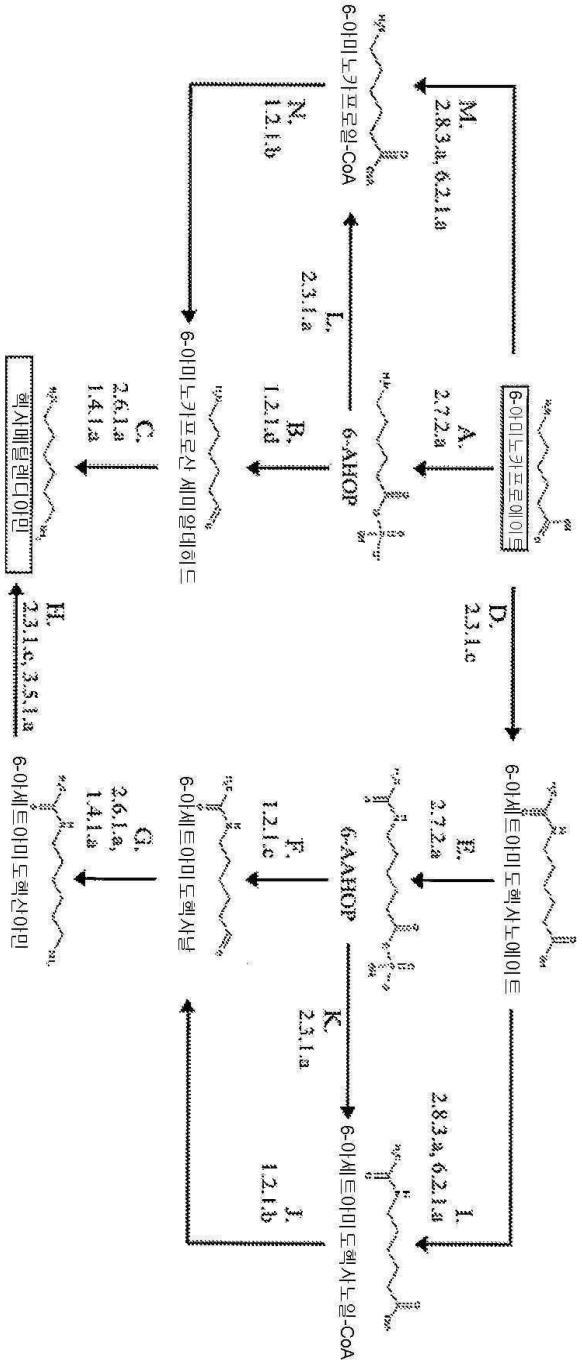
도면11


4-아미노부티릴-CoA
아세틸-CoA
A
3-옥소-6-아미노헥사노일-CoA
E, F, G
3-옥소-6-아미노섹사노에이트
B
H
3-하이드록시-6-아미노헥사노일-CoA
3-하이드록시-6-아미노헥사노에이트
C
I
6-아미노헥스-2-에노일-CoA
6-아미노헥스-2-에노에이트
D
K, L, M
J
6-아미노카프로일-CoA
6-아미노카프로에이트
Q
N
R
6-아미노카프로에이트 세미알데히드
O, P
카프로락탐
헥사메틸렌디아민

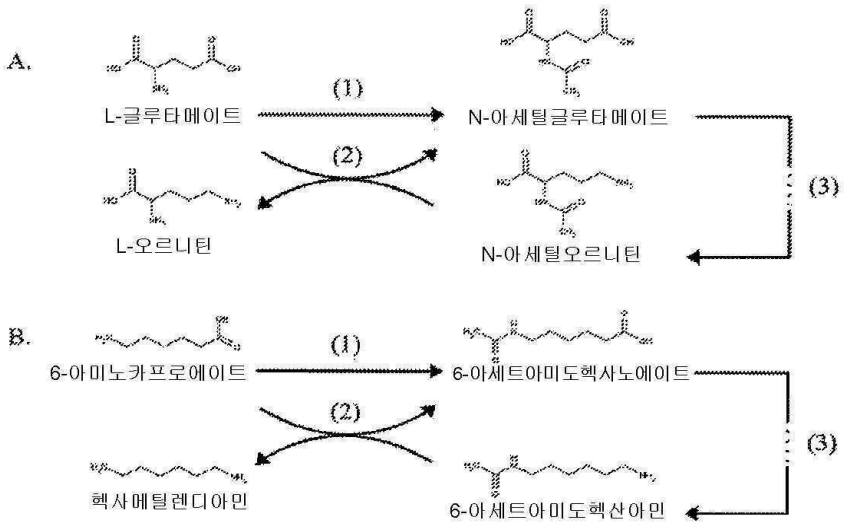
도면12


피루베이트
석신 세미알데히드
A. 4.1.2.a
HODH
3-하이드록시아디필-CoA
L. 1.2.1.c, 2.3.1.d
B. 4.2.1.a
M. 4.2.1.a
P. 1.2.1.c, 2.3.1.d
2-AHE
OHED
2,3-데하이드로아디필-CoA
K. 1.3.1.a
J. 1.4.1.a, 2.6.1.a
C. 1.3.1.a
F. 4.1.1.a
N. 1.3.1.a
2-OHD
6-OHE
아디필-CoA
H. 1.4.1.a, 2.6.1.a
D. 4.1.1.a
Q. 1.2.1.c 2.3.1.d
O. 1.2.1.b
G. 1.3.1.a
2-AHD
아디페이트 세미알데히드
I. 4.1.1.a
E. 1.4.1.a, 2.6.1.a
6-아미노카프로에이트

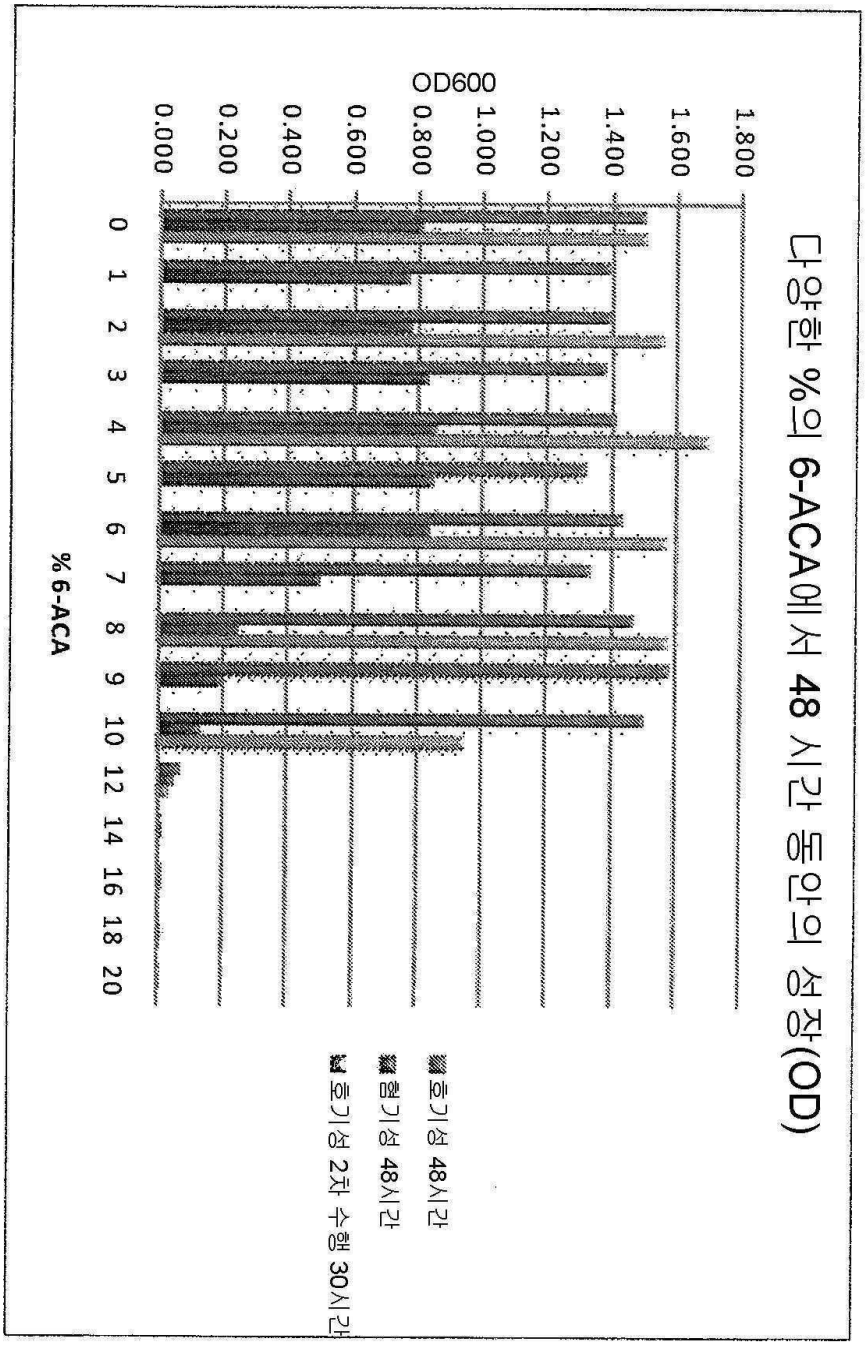
도면13


6-아미노카프로에이트
A.
2.7.2.a
6-AHOP
B.
1.2.1.d
6-아미노카프로산 세미알데하이드
C.
2.6.1.a
1.4.1.a
헥사메틸렌디아민
D.
2.3.1.c
6-아세트아미도헥사노에이트
E.
2.7.2.a
6-AAHOP
F.
1.2.1.c
6-아세트아미도헥사날
G.
2.6.1.a,
1.4.1.a
6-아세트아미도헥산아민
H.
2.3.1.e, 3.5.1.a
I.
2.8.3.a, 6.2.1.a
6-아세트아미도헥사노일-CoA
J.
1.2.1.b
K.
2.3.1.a
L.
2.3.1.a
6-아미노카프로일-CoA
M.
2.8.3.a, 6.2.1.a
N.
1.2.1.b

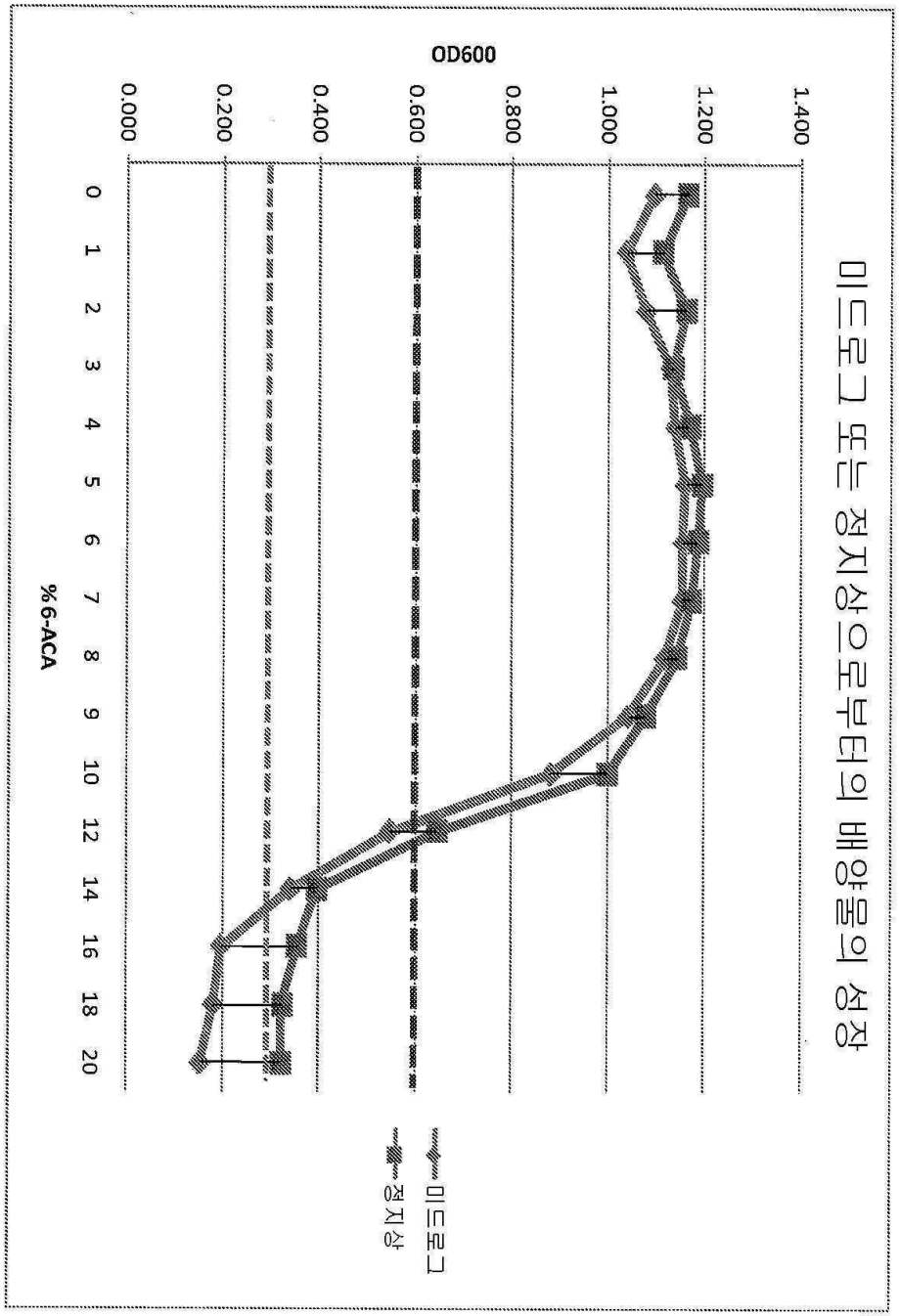
도면14


A.
L-글루타메이트
(1)
N-아세틸글루타메이트
(2)
L-오르니틴
N-아세틸오르니틴
(3)
B.
6-아미노카프로에이트
(1)
6-아세트아미도헥사노에이트
(2)
헥사메틸렌디아민
6-아세트아미도헥산아민
(3)

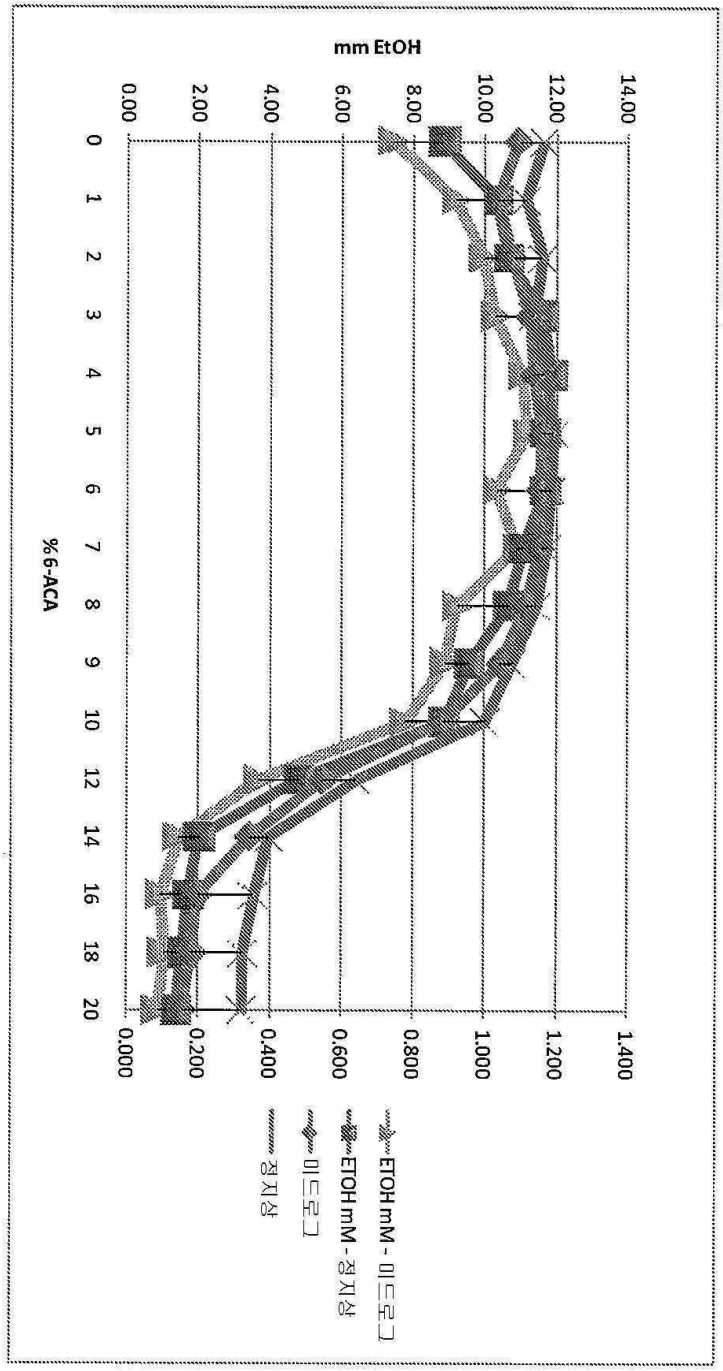
도면15


다양한 %의 6-ACA에서 48 시간 동안의 성장(OD)
OD600
1.800
1.600
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 14 16 18 20
% 6-ACA
호기성 48시간
혐기성 48시간
호기성 2차 수행 30시간

도면16

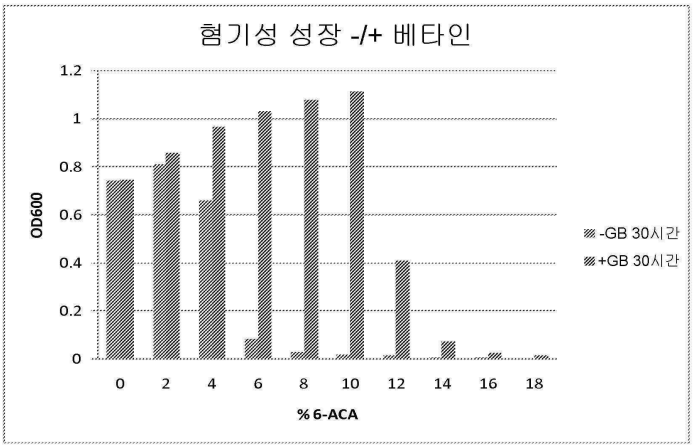

미드로그 또는 정지상으로부터의 배양물의 성장
OD600
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 14 16 18 20
%6-ACA
미드로그
정지상

도면17

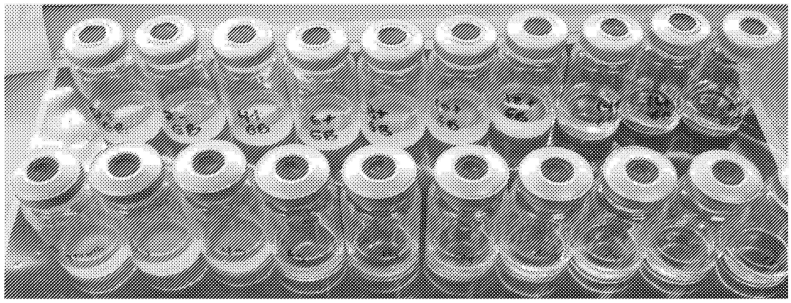

mm EtOH
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 14 16 18 20
%6-ACA
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
ETOH mM - 미드로그
ETOH mM - 정지상
미드로그
정지상

도면18

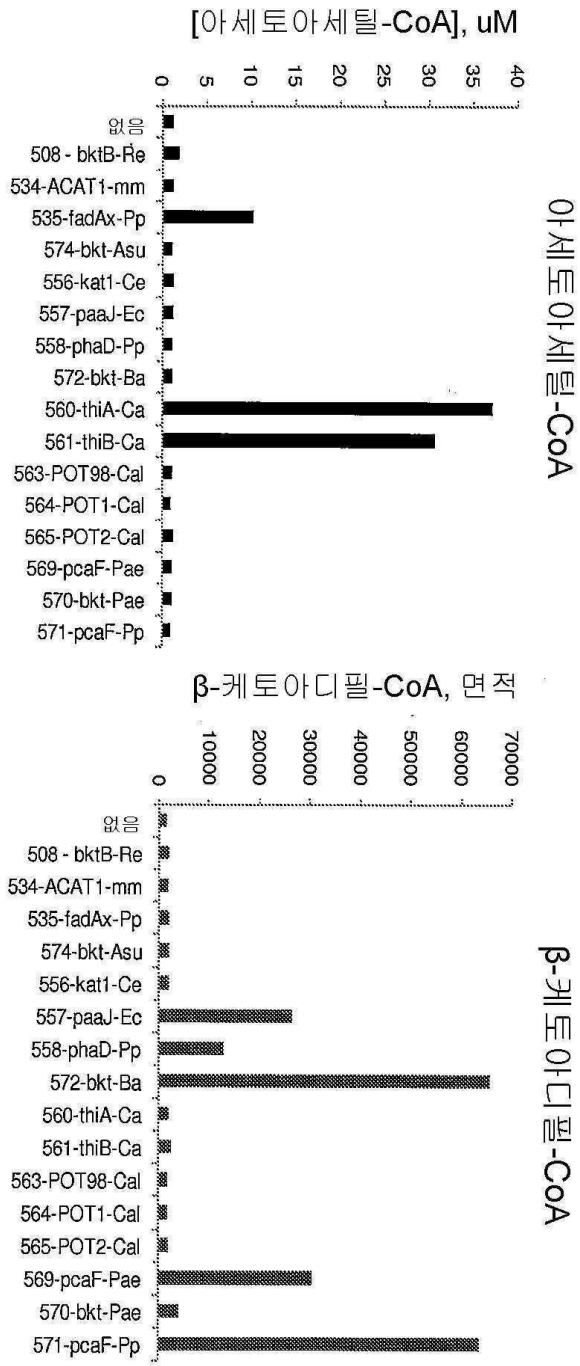
A


혐기성 성장 -/+ 베타인
OD600
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
% 6-ACA
-GB 30시간
+GB 30시간

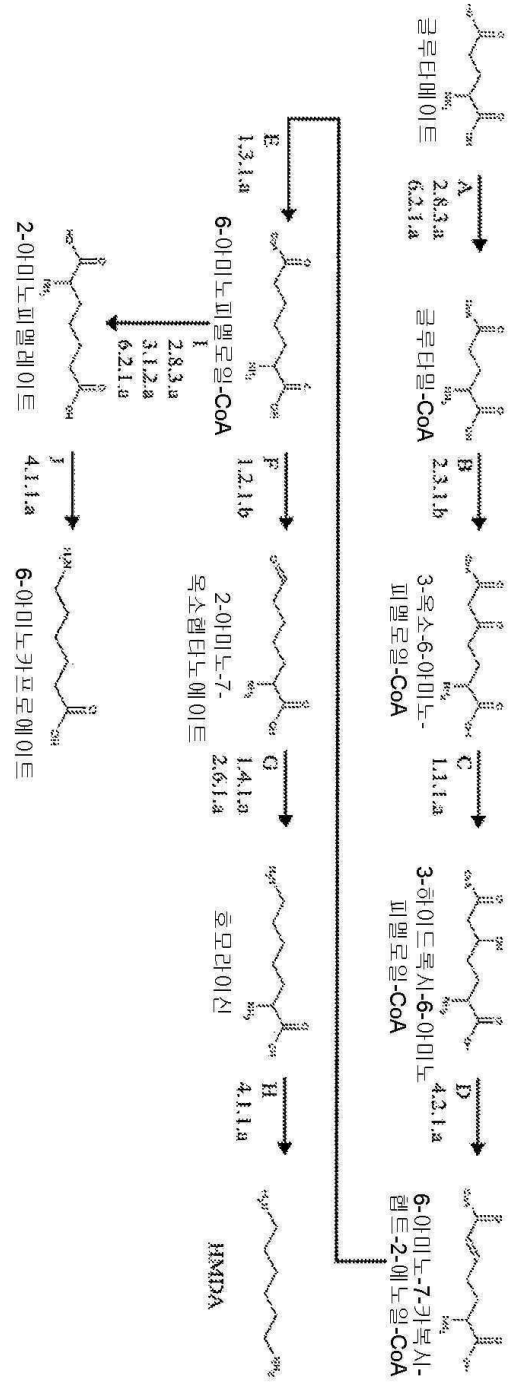
B



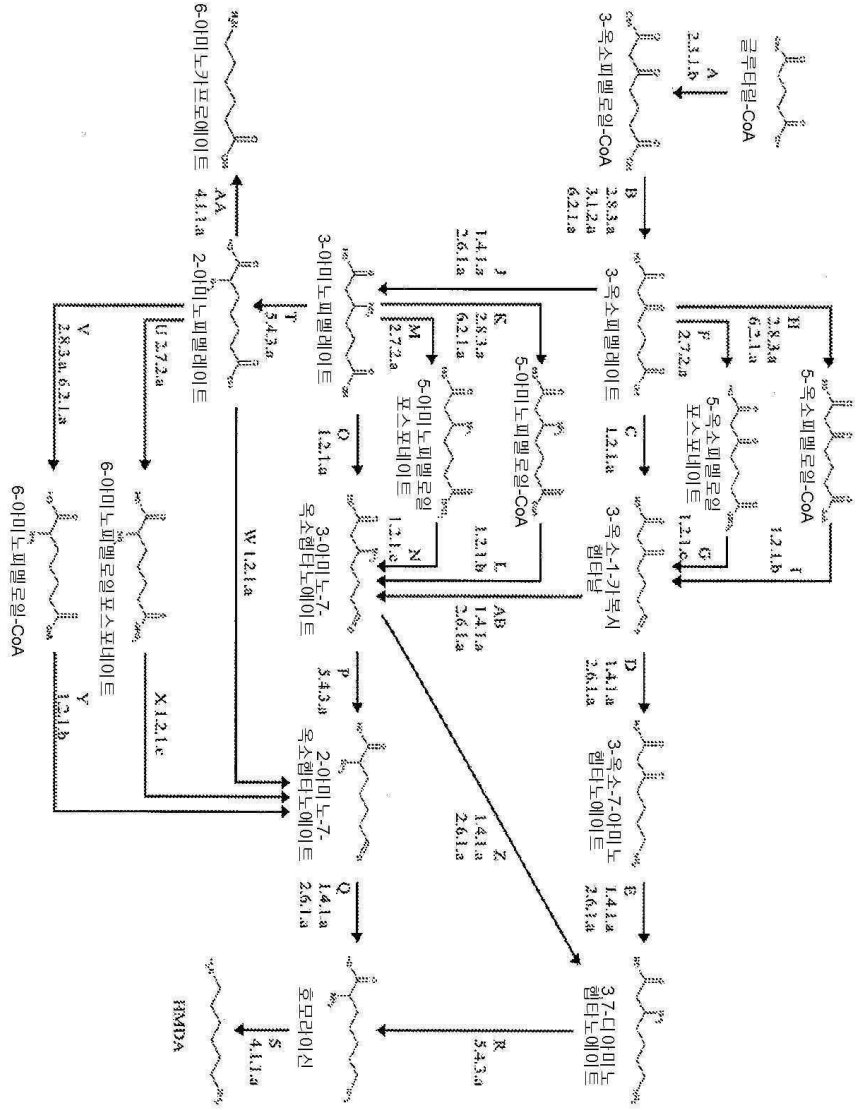
도면19


[아세토아세틸-CoA], uM
0
5
10
15
20
25
30
35
40
없음
508 - bktB-Re
534-ACAT1-mm
535-fadAx-Pp
574-bkt-Asu
556-kat1-Ce
557-paaJ-Ec
558-phaD-Pp
572-bkt-Ba
560-thiA-Ca
561-thiB-Ca
563-POT98-Cal
564-POT1-Cal
565-POT2-Cal
569-pcaF-Pae
570-bkt-Pae
571-pcaF-Pp
아세토아세틸-CoA
β-케토아디필-CoA, 면적
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
70000
없음
508 - bktB-Re
534-ACAT1-mm
535-fadAx-Pp
574-bkt-Asu
556-kat1-Ce
557-paaJ-Ec
558-phaD-Pp
572-bkt-Ba
560-thiA-Ca
561-thiB-Ca
563-POT98-Cal
564-POT1-Cal
565-POT2-Cal
569-pcaF-Pae
570-bkt-Pae
571-pcaF-Pp
β-케토아디필-CoA

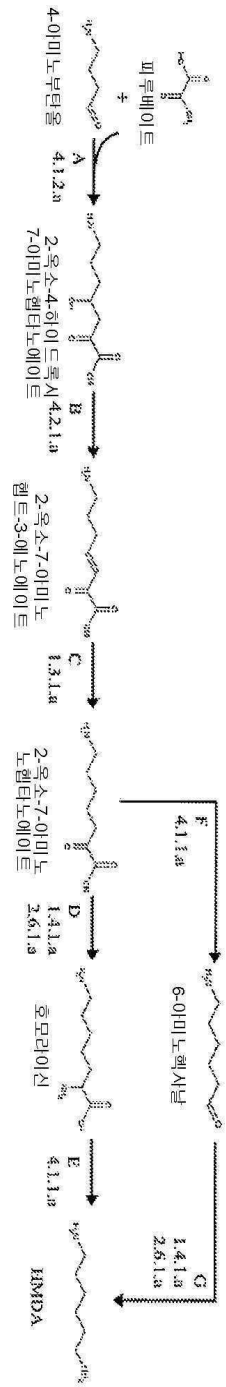
도면20


글루타메이트
A
2.8.3.a
6.2.1.a
글루타밀-CoA
B
2.3.1.b
3-옥소-6-아미노-
피멜로일-CoA
C
1.1.1.a
3-하이드록시-6-아미노
피멜로일-CoA
D
4.2.1.a
6-아미노-7-카복시-
헵트-2-에노일-CoA
E
1.3.1.a
6-아미노피멜로일-CoA
F
1.2.1.b
2-아미노-7-
옥소헵타노에이트
G
1.4.1.a
2.6.1.a
호모라이신
H
4.1.1.a
HMDA
I
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
2-아미노피멜레이트
J
4.1.1.a
6-아미노카프로에이트

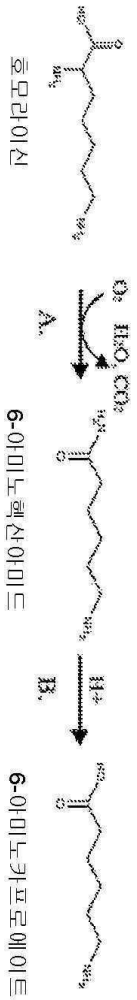
도면21


글루타릴-CoA
A 2.3.1.b
3-옥소피멜로일-CoA
B 2.8.3.a 3.1.2.a 6.2.1.a
5-옥소피멜로일-CoA
I 1.2.1.b
H 2.8.3.a 6.2.1.a
3-옥소피멜레이트
F 2.7.2.a
5-옥소피멜로일 포스포네이트
G 1.2.1.c
C 1.2.1.a
3-옥소-1-카복시 헵타날
D 1.4.1.a 2.6.1.a
3-옥소-7-아미노 헵타노에이트
E 1.4.1.a 2.6.1.a
3,7-디아미노 헵타노에이트
R 5.4.3.a
호모리이신
S 4.1.1.a
HMDA
Z 1.4.1.a 2.6.1.a
AB 1.4.1.a 2.6.1.a
5-아미노피멜로일-CoA
L 1.2.1.b
J 1.4.1.a 2.6.1.a
K 2.8.3.a 6.2.1.a
5-아미노피멜로일 포스포네이트
M 2.7.2.a
N 1.2.1.c
3-아미노피멜레이트
Q 1.2.1.a
3-아미노-7-옥소헵타노에이트
P 5.4.3.a
2-아미노-7-옥소헵타노에이트
Q 1.4.1.a 2.6.1.a
T 5.4.3.a
2-아미노피멜레이트
U 2.7.2.a
6-아미노피멜로일 포스포네이트
X 1.2.1.c
6-아미노피멜로일-CoA
Y 1.2.1.b
V 2.8.3.a, 6.2.1.a
W 1.2.1.a
6-아미노카프로에이트
AA 4.1.1.a

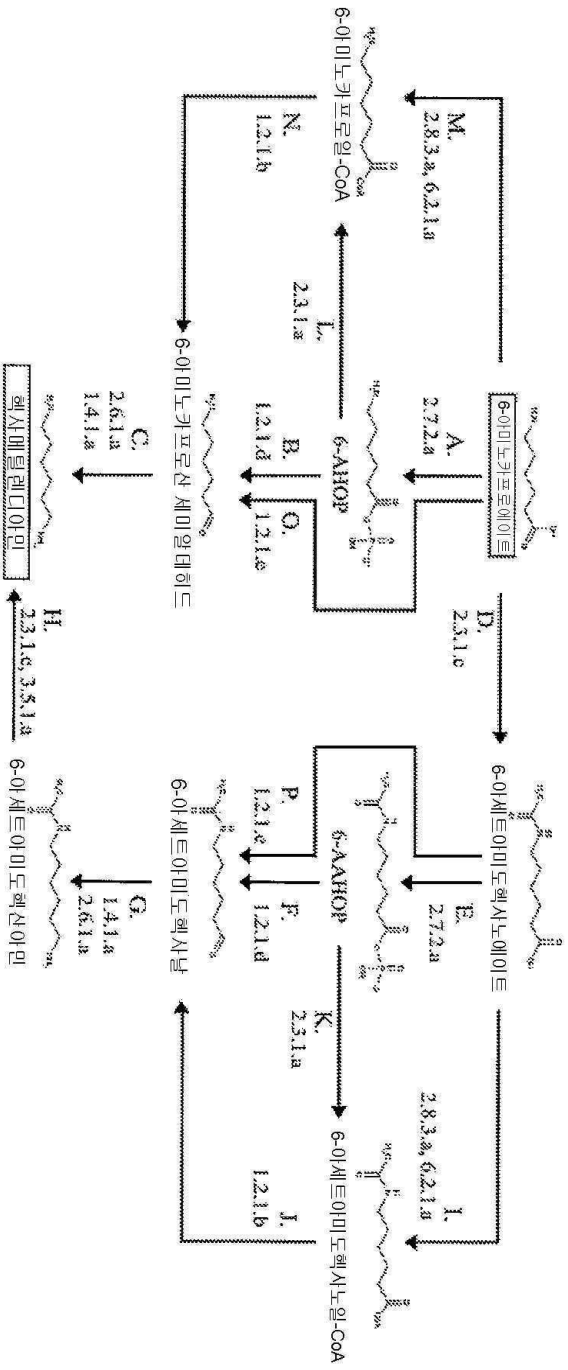
도면22


4-아미노부타올
A
4.1.2.n
2-옥소-4-하이드록시-7-아미노헵타노에이트
B
4.2.1.n
2-옥소-7-아미노헵트-3-에노에이트
C
1.3.1.n
2-옥소-7-아미노헵타노에이트
D
1.4.1.n
2.6.1.n
호모라이신
E
4.1.1.n
HMDA
피루베이트
+
F
4.1.1.n
6-아미노헥사날
G
1.4.1.n
2.6.1.n

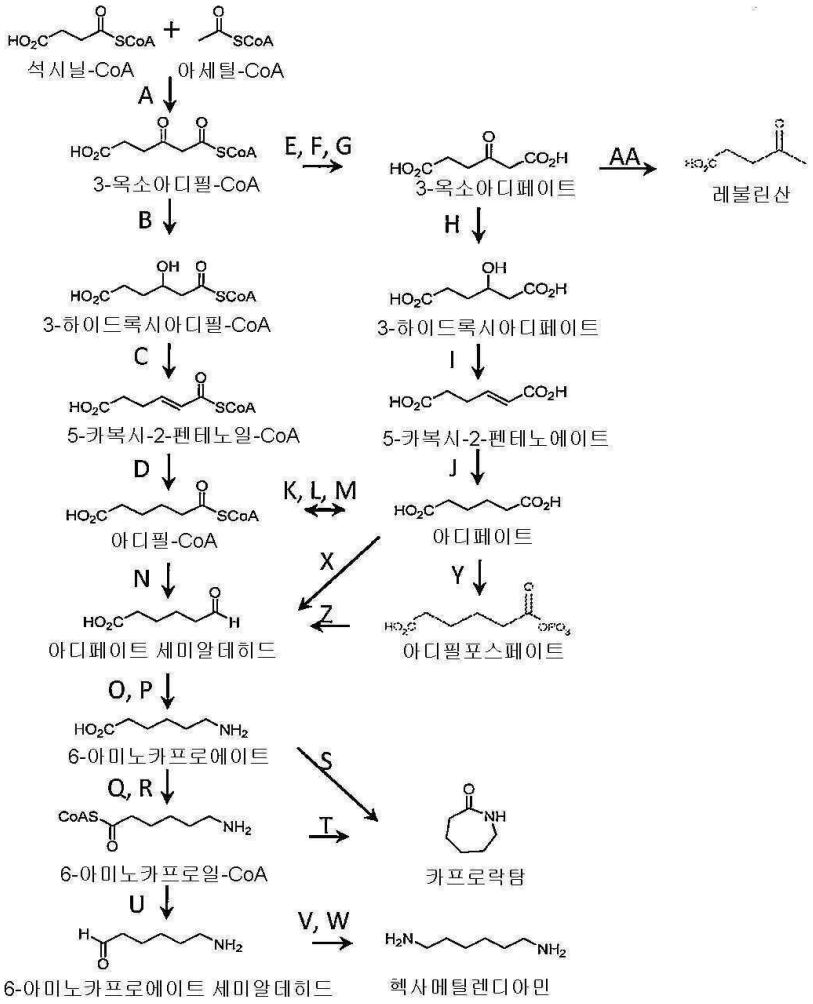
도면23



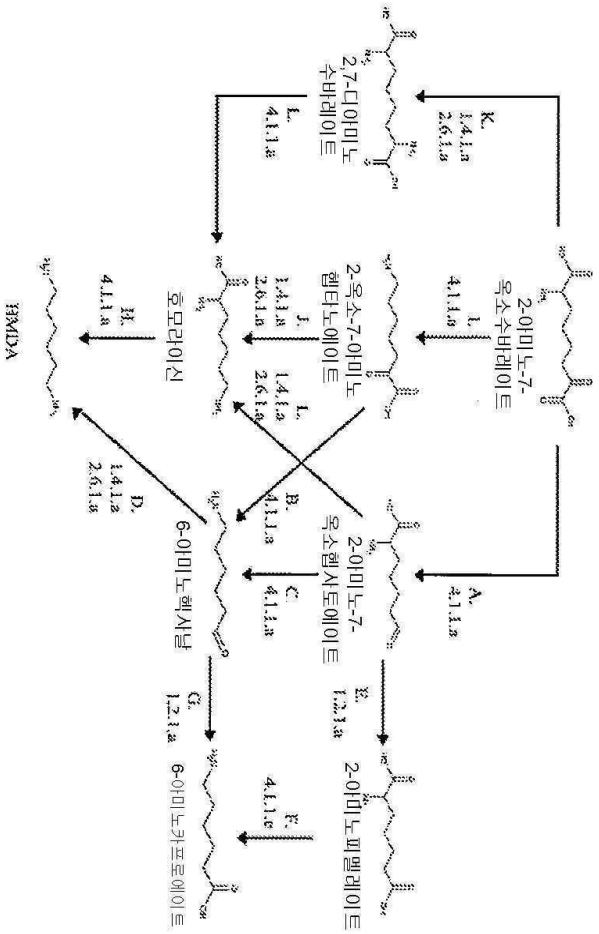
도면24


6-아미노카프로에이트
6-AAHOP
6-아세트아미도헥사노에이트
6-아세트아미도헥사노일-CoA
6-아세트아미도헥사날
6-아세트아미도헥산아민
헥사메틸렌디아민
6-아미노카프로산 세미알데하이드
6-아미노카프로일-CoA
A. 2.7.2.a
B. 1.2.1.d
C. 2.6.1.a 1.4.1.a
D. 2.5.1.c
E. 2.7.2.a
F. 1.2.1.d
G. 1.4.1.a 2.6.1.a
H. 2.3.1.c, 3.5.1.a
I. 2.8.3.a, 6.2.1.a
J. 1.2.1.b
K. 2.3.1.a
L. 2.3.1.a
M. 2.8.3.a, 6.2.1.a
N. 1.2.1.b
O. 1.2.1.e
P. 1.2.1.e

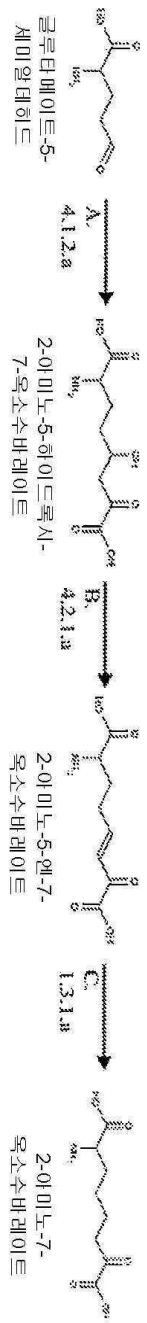
도면25


석시닐-CoA
아세틸-CoA
A
3-옥소아디필-CoA
E, F, G
3-옥소아디페이트
AA
레불린산
B
H
3-하이드록시아디필-CoA
3-하이드록시아디페이트
C
I
5-카복시-2-펜테노일-CoA
5-카복시-2-펜테노에이트
D
K, L, M
J
아디필-CoA
아디페이트
X
N
Y
Z
아디페이트 세미알데히드
아디필포스페이트
O, P
6-아미노카프로에이트
S
Q, R
T
6-아미노카프로일-CoA
카프로락탐
U
V, W
6-아미노카프로에이트 세미알데히드
헥사메틸렌디아민

도면26

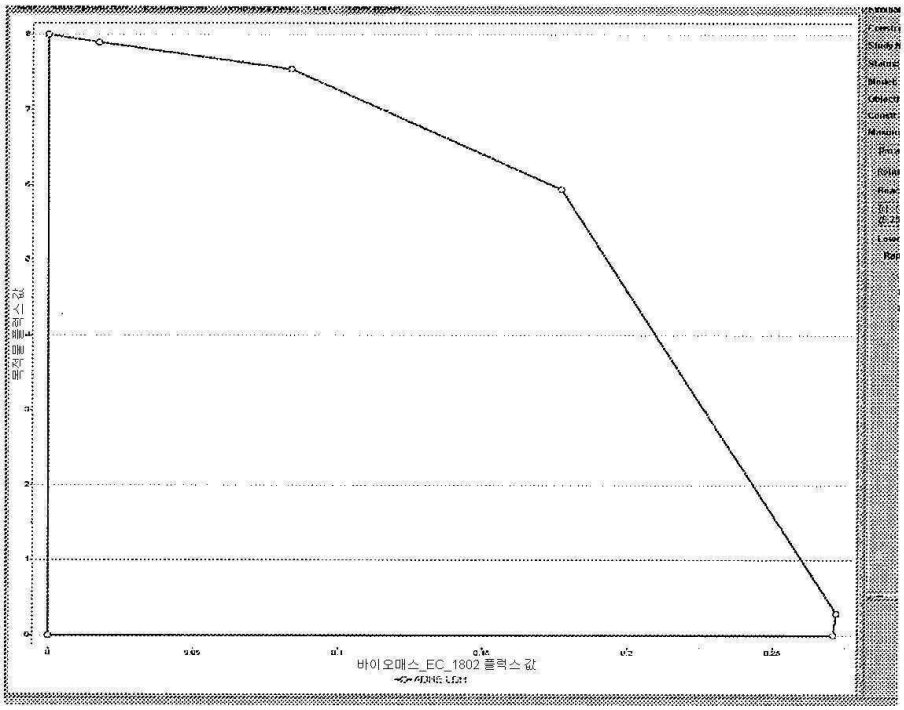

2-아미노-7-
옥소수바레이트
2-옥소-7-아미노
헵타노에이트
2-아미노-7-
옥소헵사토에이트
2-아미노피멜레이트
6-아미노헥사날
6-아미노카프로에이트
호모라이신
2,7-디아미노
수바레이트
HMDA
A.
4.1.1.a
B.
4.1.1.a
C.
4.1.1.a
D.
1.4.1.a
2.6.1.a
E.
1.2.1.a
F.
4.1.1.a
G.
1.2.1.a
H.
4.1.1.a
I.
4.1.1.a
J.
1.4.1.a
2.6.1.a
K.
1.4.1.a
2.6.1.a
L.
4.1.1.a
L.
1.4.1.a
2.6.1.a

도면27


글루타메이트-5-
세미알데히드
A.
4.1.2.a
2-아미노-5-하이드록시-
7-옥소수베레이트
B.
4.2.1.a
2-아미노-5-엔-7-
옥소수베레이트
C.
1.3.1.a
2-아미노-7-
옥소수베레이트

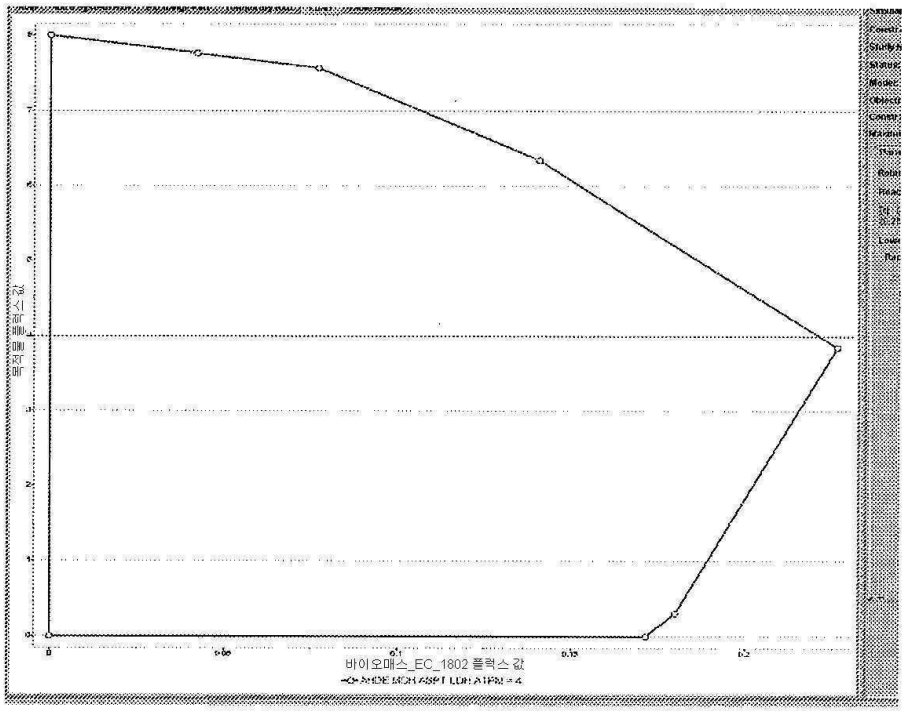
도면28

ADHEr, LDH_D



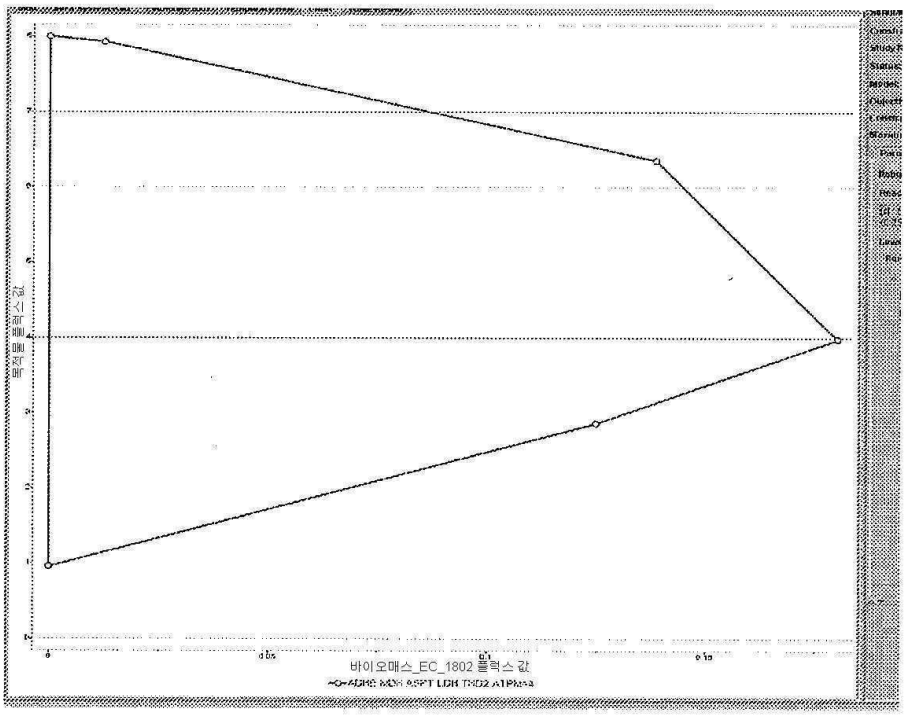
도면29

ADHEr, MDH, ASPT, LDH_D



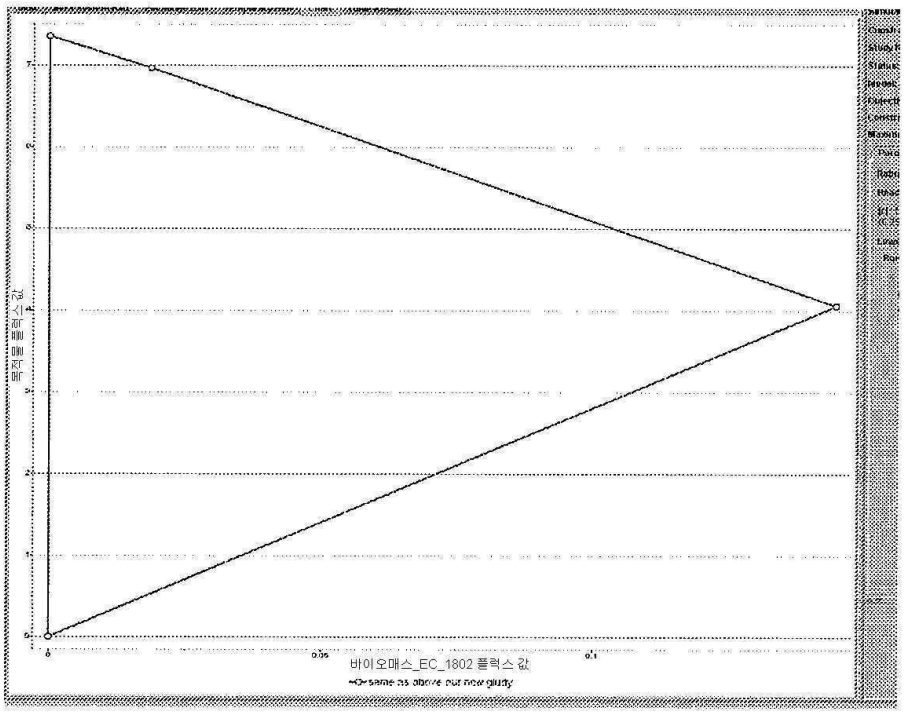
도면30

ADHEr, MDH, ASPT, LDH_D, THD2



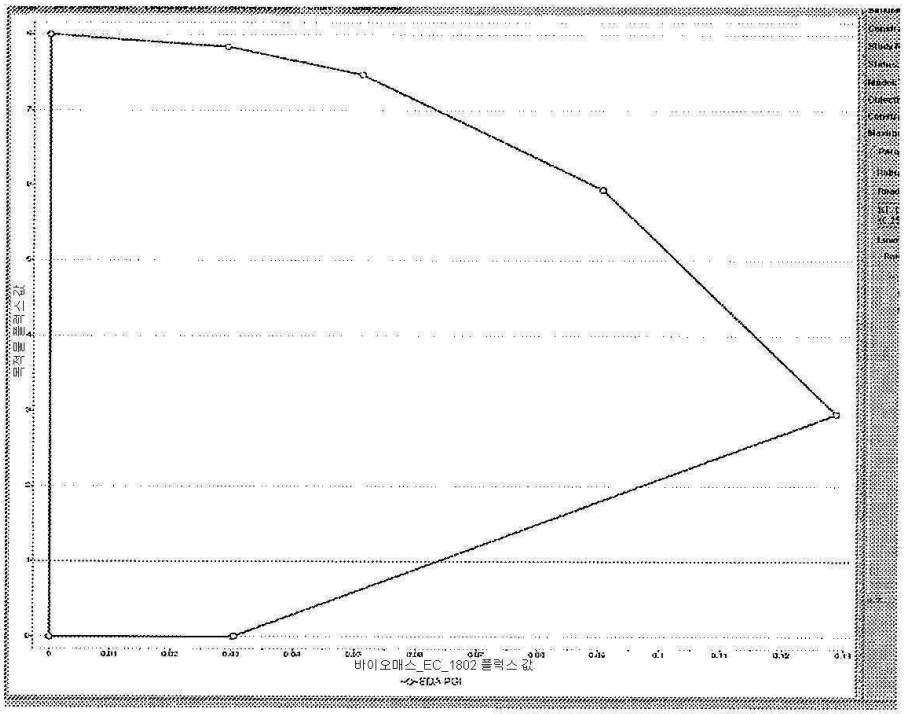
도면31

ADHEr, MDH, ASPT, LDH_D, GLUDy



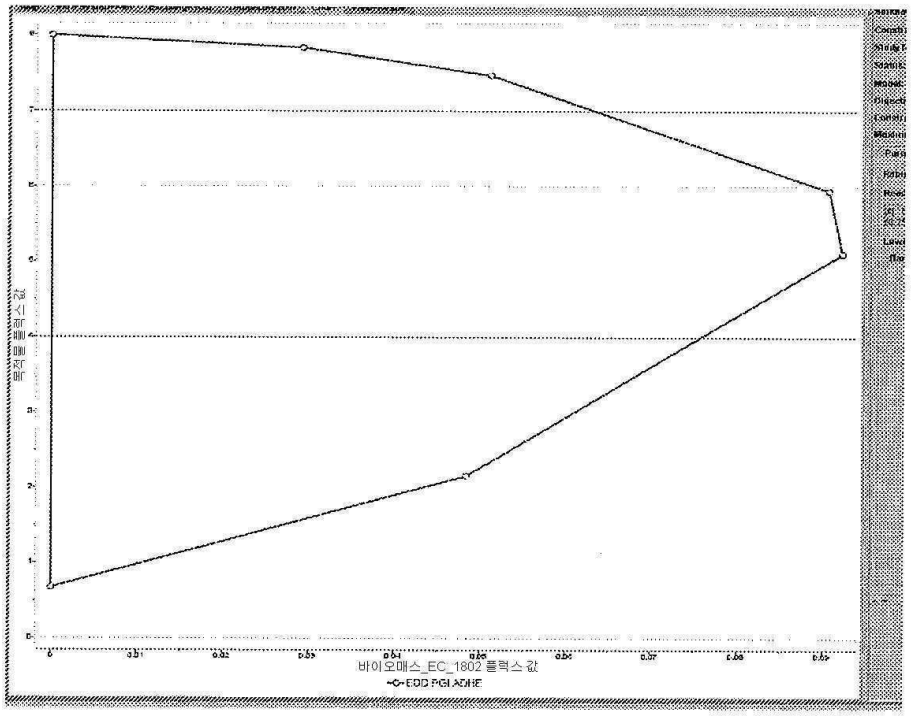
도면32

PGI, EDA 또는 PGDHy

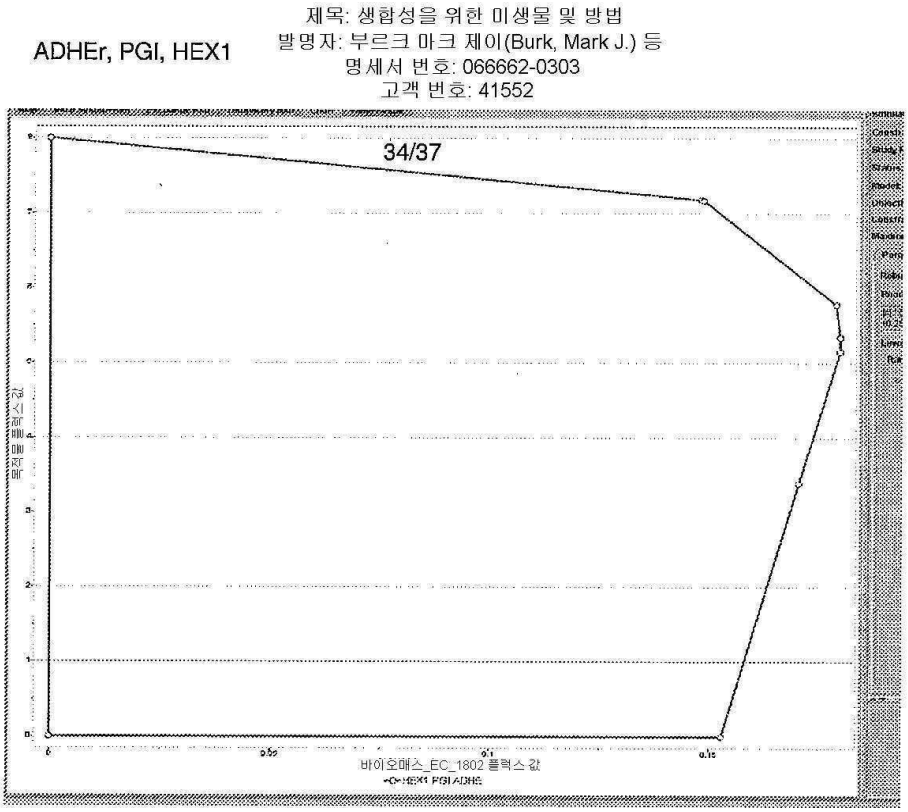


도면33

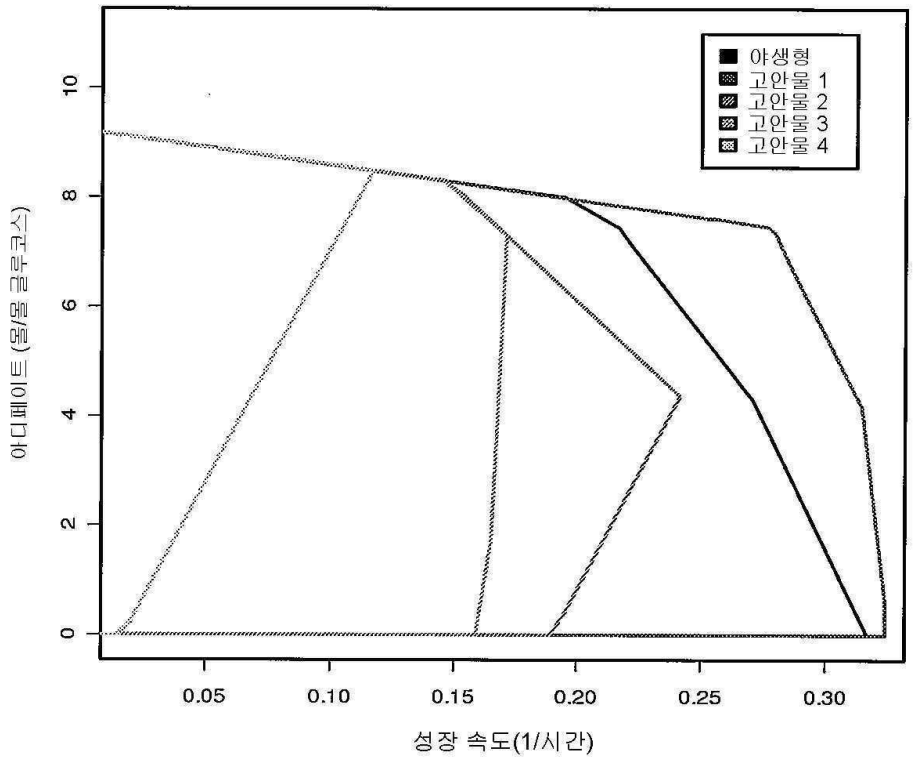
PGI, EDA 또는 PGDHy, ADHEr



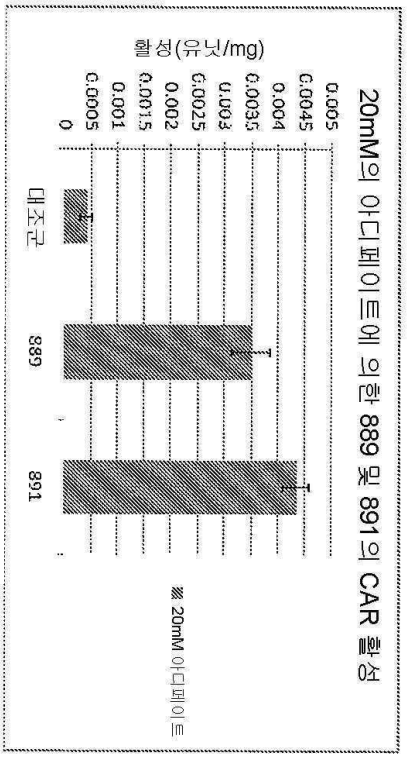
도면34


ADHEr, PGI, HEX1
제목: 생합성을 위한 미생물 및 방법
발명자: 부르크 마크 제이(Burk, Mark J.) 등
명세서 번호: 066662-0303
고객 번호: 41552
34/37
목적물플럭스값
바이오매스_EC_1802 플럭스값

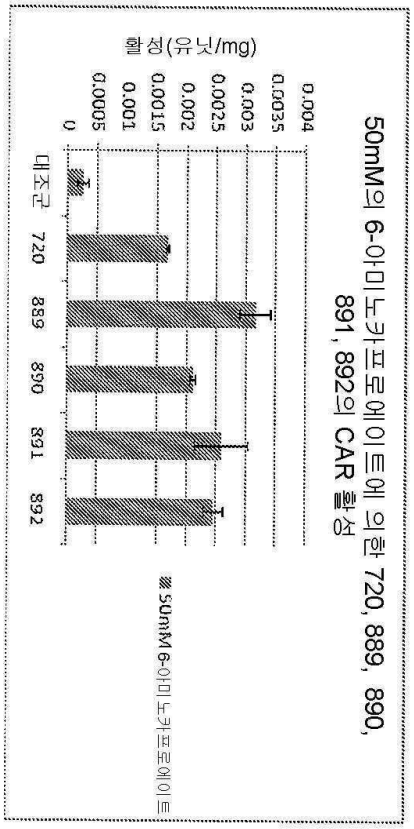
도면35


야생형
고안물 1
고안물 2
고안물 3
고안물 4
아디페이트 (몰/몰 글루코스)
0
2
4
6
8
10
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
0.30
성장 속도(1/시간)

도면36



도면37



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GENOMATICA, INC.

<120> MICROORGANISMS AND METHODS FOR THE BIOSYNTHESIS OF ADIPATE,
HEXAMETHYLENEDIAMINE AND 6-AMINOCAPROIC ACID

<130> 066662-0304

<140> PCT/US2010/034144

<141> 2010-05-07

<150> US 61/247,533

<151> 2009-09-30

<150> US 61/246,973

<151> 2009-09-29

<150> US 61/244,844

<151> 2009-09-22

<150> US 61/219,365

<151> 2009-06-22

<150> US 61/176,196

<151> 2009-05-07

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Euglena gracilis

<400> 1

Met Thr Tyr Lys Ala Pro Val Lys Asp Val Lys Phe Leu Leu Asp Lys
1 5 10 15

Val Phe Lys Val
20

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag

<400> 2

His His His His His His

1 5

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 3

atgacgcgtg aagtggtagt ggtaag 26

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 4

gatacgctcg aagatggcgg 20

<210> 5

<211> 1185

<212> DNA

<213> Ralstonia eutropha

<400> 5

atgacgcgtg aagtggtagt ggtaagcggt gtccgtaccg cgatcgggac ctttggcggc 60

agcctgaagg atgtggcacc ggcggagctg ggcgcactgg tggtgcgcga ggcgctggcg 120

cgcgcgcagg tgtcgggcga cgatgtcggc cacgtggtat tcggcaacgt gatccagacc 180

gagccgcgcg acatgtatct gggccgcgtc gcggccgtca acggcggggt gacgatcaac 240

gcccccgcgc tgaccgtgaa ccgcctgtgc ggctcgggcc tgcaggccat tgtcagcgcc 300

gcgcagacca tcctgctggg cgataccgac gtcgccatcg gcggcggcgc ggaaagcatg 360

agccgcgcac cgtacctggc gccggcagcg cgctggggcg cacgcatggg cgacgccggc 420

ctggtcgaca tgatgctggg tgcgctgcac gatcccttcc atcgcatcca catgggcgtg 480

accgccgaga atgtcgccaa ggaatacgac atctcgcgcg cgcagcagga cgaggccgcg 540

ctggaatcgc accgccgcgc ttcggcagcg atcaaggccg gctacttcaa ggaccagatc 600

gtcccggtgg tgagcaaggg ccgcaagggc gacgtgacct tcgacaccga cgagcacgtg 660

cgccatgacg ccaccatcga cgacatgacc aagctcaggc cggtcttcgt caaggaaaac 720

ggcacggtca cggccggcaa tgcctcgggc ctgaacgacg ccgccgccgc ggtggtgatg 780

atggagcgcg ccgaagccga gcgccgcggc ctgaagccgc tggcccgcct ggtgtcgtac 840

ggccatgccg gcgtggaccc gaaggccatg ggcatcggcc cggtgccggc gacgaagatc 900

gcgctggagc gcgccggcct gcaggtgtcg gacctggacg tgatcgaagc caacgaagcc 960

tttgccgcac aggcgtgcgc cgtgaccaag gcgctcggtc tggacccggc caaggttaac 1020

ccgaacggct cgggcatctc gctgggccac ccgatcggcg ccaccggtgc cctgatcacg 1080

gtgaaggcgc tgcatgagct gaaccgcgtg cagggccgct acgcgctggt gacgatgtgc 1140

atcggcggcg ggcagggcat tgccgccatc ttcgagcgta tctga 1185

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 6

atggaagtaa gatgcctgga acgaag 26

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 7

cagcttctca atcagcaggg c 21

<210> 8

<211> 1215

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 8

atggaagtaa gatgcctgga acgaagttat gcatccaaac ccactttgaa tgaagtggtt 60

atagtaagtg ctataagaac tcccattgga tccttcctgg gcagccttgc ctctcagccg 120

gccactaaac ttggtactgc tgcaattcag ggagccattg agaaggcagg gattccaaaa 180

gaagaagtga aggaagtcta catgggcaat gtcatccaag ggggtgaagg acaggcccct 240

accaggcaag caacactggg cgcaggttta cctatttcca ctccatgcac cacagtaaac 300

aaggtttgtg cttcaggaat gaaagccatc atgatggcct ctcaaagtct tatgtgtgga 360

catcaggatg tgatggtggc aggcgggatg gagagcatgt ccaatgtccc atacgtaatg 420

agcagaggag caacaccata tggtggggta aaacttgaag acctgattgt aaaagacggg 480

ctaactgatg tctacaataa aattcatatg ggtaactgtg ctgagaatac tgcaaagaag 540

atgaatatct cacggcagga acaggatacg tacgctctca gctcttacac cagaagtaaa 600

gaagcgtggg acgcagggaa gtttgccagt gagattactc ccatcaccat ctcagtgaaa 660

ggtaaaccag atgtggtggt gaaagaagat gaagaataca agcgtgttga ctttagtaaa 720

gtgccaaagc tcaagaccgt gttccagaaa gaaaatggca caataacagc tgccaatgcc 780

agcacactga acgatggagc agctgctctg gttctcatga ctgcagaggc agcccagagg 840

ctcaatgtta agccattggc acgaattgca gcatttgctg atgctgccgt agaccccatt 900

gattttccac ttgcgcctgc atatgccgta cctaaggttc ttaaatatgc aggactgaaa 960

aaagaagaca ttgccatgtg ggaagtaaat gaagcattca gtgtggttgt gctagccaac 1020

attaaaatgc tggagattga cccccaaaaa gtaaatatcc acggaggagc tgtttctctg 1080

ggccatccaa ttgggatgtc tggagcccgg attgttgttc atatggctca tgccctgaag 1140

ccaggagagt tcggtctggc tagtatttgc aacggaggag gaggtgcttc cgccctgctg 1200

attgagaagc tgtag 1215

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 9

atgaccctcg ccaatgaccc 20

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 10

gtacaggcat tcaacagcca tgg 23

<210> 11

<211> 1194

<212> DNA

<213> Pseudomonas putida

<400> 11

atgaccctcg ccaatgaccc catcgttatc gtcagcgccg tgcgcacgcc catgggcggg 60

ttgcagggcg acctcaagag cctgactgcg ccgcaactgg gcagcgccgc cattcgtgct 120

gccgtggaac gggccggcat cgatgccgcc ggtgtcgagc aggtactgtt cggctgcgtg 180

ctgccggccg gccagggcca ggcaccggca cgccaggccg cgctgggcgc cgggctggac 240

aagcacacca cctgcaccac cctgaacaag atgtgcggct cgggtatgca agccgcgatc 300

atggcccatg acctgctgct ggccggcacc gcagacgtgg tagtggcggg tggcatggaa 360

agcatgacca acgcgccgta cctgctggac aaagcccgtg gcggctaccg catgggccac 420

ggcaagatca tcgaccacat gttcatggac ggtctcgaag acgcctacga caaaggccgc 480

ctgatgggta cctttgccga ggactgtgcc caggccaatg ccttcagccg cgaggcccag 540

gaccagttcg ccatcgcctc gctgacccga gcgcaggaag ccatcagcag cggccgtttt 600

gccgccgaga tcgtgccggt ggaagtcacc gagggcaagg aaaagcgcgt catcaaggat 660

gacgagcagc cgcccaaggc gcgtctggac aagattgcgc agctcaaacc ggcgtttcgt 720

gaaggcggca ccgtgacggc ggccaacgcc agttcgattt ccgacggcgc tgcggcgctg 780

gtactgatgc gccgctccga ggccgacaaa cgtggcctca agccattggc cgtcatccac 840

ggccacgccg cctttgccga caccccggcg ctgttcccga ccgccccgat cggcgcgatc 900

gacaaactga tgaaacgcac cggctggaac ctggccgaag tcgacctgtt cgagatcaac 960

gaggccttcg ccgtggtcac cctggcggcc atgaaacacc tcgacctgcc acacgacaag 1020

gtcaatatcc acggcggcgc ctgcgccctc ggtcacccga tcggcgcttc tggcgcacgt 1080

attctggtca ccctgttgtc ggccttgcgc cagaacaatc tgcgtcgggg tgtggcggcc 1140

atctgcatcg gcggtggcga ggccacggcc atggctgttg aatgcctgta ctga 1194

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 12

atgaacaaac atgctttcat cgtcg 25

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 13

taatttctgg ataaccattc cacttgagc 29

<210> 14

<211> 1167

<212> DNA

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 14

atgaacaaac atgctttcat cgtcggagcc gcccgtacac ctattggatc atttcgttct 60

tctctctctt cggtaactgc tccagagctc gcctcggttg ccatcaaagc agcattggag 120

cgtggagcag tgaagccgag ttcaattcag gaggtgttcc ttggtcaagt ctgtcaagca 180

aatgctggtc aagctcccgc tcgtcaagca gctcttggag ccggactcga tctttcggtt 240

gctgttacca ccgtcaataa agtgtgctct tctgggctga aagcaatcat tcttgctgcc 300

cagcaaattc aaaccggtca tcaagatttt gccattggcg gaggaatgga gagcatgtca 360

caagtaccat tttatgttca aagaggagag atcccatatg gtggatttca agtgattgat 420

ggaatcgtca aagacggact gaccgatgct tatgataaag ttcacatggg aaactgcgga 480

gagaagactt caaaagaaat gggaattaca cgtaaagacc aagacgaata tgctatcaac 540

agctacaaaa agtcagctaa agcatgggag aatggaaata tcggaccaga agtggtgcca 600

gtgaacgtca aatcaaagaa gggagtcacg attgttgata aagatgaaga gttcacaaaa 660

gtcaatttcg acaagttcac ctcgctgaga actgttttcc agaaagacgg aactatcact 720

gctgctaatg cttcaacatt gaacgacggt gcagctgctg tcattgttgc ctcacaggaa 780

gcagtttccg agcaaagctt aaagcctctg gcccgaattt tggcttatgg agatgccgcc 840

acgcacccac tcgatttcgc tgtagcacca actttgatgt tcccaaaaat tcttgaaaga 900

gcaggagtga agcaatcaga tgttgctcaa tgggaagtta atgaagcctt ctcatgtgtt 960

ccccttgctt tcatcaaaaa actaggagtc gatccatccc ttgtgaaccc acatggagga 1020

gctgtttcaa ttggtcaccc catcggaatg tccggagccc gcctcatcac tcatcttgtg 1080

cacacactca aaagtggcca aatcggagtt gctgccattt gcaatggagg tggtggctca 1140

agtggaatgg ttatccagaa attataa 1167

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 15

atgcgtgaag cctttatttg tgacg 25

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 16

aacacgctcc agaatcatgg cg 22

<210> 17

<211> 1206

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 17

atgcgtgaag cctttatttg tgacggaatt cgtacgccaa ttggtcgcta cggcggggca 60

ttatcaagtg ttcgggctga tgatctggct gctatccctt tgcgggaact gctggtgcga 120

aacccgcgtc tcgatgcgga gtgtatcgat gatgtgatcc tcggctgtgc taatcaggcg 180

ggagaagata accgtaacgt agcccggatg gcgactttac tggcggggct gccgcagagt 240

gtttccggca caaccattaa ccgcttgtgt ggttccgggc tggacgcact ggggtttgcc 300

gcacgggcga ttaaagcggg cgatggcgat ttgctgatcg ccggtggcgt ggagtcaatg 360
tcacgggcac cgtttgttat gggcaaggca gccagtgcat tttctcgtca ggctgagatg 420
ttcgatacca ctattggctg gcgatttgtg aacccgctca tggctcagca atttggaact 480
gacagcatgc cggaaacggc agagaatgta gctgaactgt taaaaatctc acgagaagat 540
caagatagtt ttgcgctacg cagtcagcaa cgtacggcaa aagcgcaatc ctcaggcatt 600
ctggctgagg agattgttcc ggttgtgttg aaaaacaaga aaggtgttgt aacagaaata 660
caacatgatg agcatctgcg cccggaaacg acgctggaac agttacgtgg gttaaaagca 720

ccatttcgtg ccaatggggt gattaccgca ggcaatgctt ccggggtgaa tgacggagcc 780
gctgcgttga ttattgccag tgaacagatg gcagcagcgc aaggactgac accgcgggcg 840
cgtatcgtag ccatggcaac cgccggggtg gaaccgcgcc tgatggggct tggtccggtg 900
cctgcaactc gccgggtgct ggaacgcgca gggctgagta ttcacgatat ggacgtgatt 960
gaactgaacg aagcgttcgc ggcccaggcg ttgggtgtac tacgcgaatt ggggctgcct 1020
gatgatgccc cacatgttaa ccccaacgga ggcgctatcg ccttaggcca tccgttggga 1080
atgagtggtg cccgcctggc actggctgcc agccatgagc tgcatcggcg taacggtcgt 1140

tacgcattgt gcaccatgtg catcggtgtc ggtcagggca tcgccatgat tctggagcgt 1200
gtttga 1206
<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 18
atgaatgaac cgacccacgc c 21
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 19

gaggcgctcg atgatcatgg 20

<210> 20

<211> 1221

<212> DNA

<213> Pseudomonas putida

<400> 20

atgaatgaac cgacccacgc cgatgccttg atcatcgacg ccgtgcgcac gcccattggc 60

cgctatgccg gggccctgag cagcgtgcgc gccgacgacc tggcggccat cccgctcaaa 120

gccttgatcc agcgtcaccc cgaactggac tggaaagcca ttgatgacgt tatcttcggc 180

tgtgccaacc aggctggcga agacaaccgc aacgtggccc acatggcgag cctgctggcc 240

gggctgccac tcgaagtacc agggaccacg atcaaccgcc tgtgcggttc cggtctggat 300

gccatcggta atgcggcacg tgccctgcgc tgcggtgaag cggggctcat gctggccggt 360

ggtgtggagt ccatgtcgcg tgcaccgttt gtgatgggta agtcggagca ggcattcggg 420

cgtgcggccg agctgttcga caccaccatc ggctggcgtt tcgtcaaccc gctgatgaag 480

gccgcctacg gcatcgattc gatgccggaa acggctgaaa acgtggccga acagttcggc 540

atctcgcgcg ccgaccagga tgcctttgcc ctgcgcagcc agcacaaagc cgcagcagct 600

caggcccgcg gccgcctggc gcgggaaatc gtgccggtcg aaatcccgca acgcaaaggc 660

ccagccaaag tggtcgagca tgacgagcac ccgcgcggcg acacgaccct ggagcagctg 720

gctcggctcg ggacgccgtt tcgtgaaggc ggcagcgtaa cggcgggtaa tgcctccggc 780

gtgaatgacg gcgcttgcgc cctgctgctg gccagcagcg ccgcggcccg ccgccatggg 840

ttgaaggccc gcggccgcat cgtcggcatg gcggtggccg gggttgagcc caggctgatg 900

ggcattggtc cggtgcctgc gacccgcaag gtgctggcgc tcaccggcct ggcactggct 960

gacctggatg tcatcgaact caatgaggcc tttgccgccc aagggctggc cgtgttgcgc 1020

gagctgggcc tggccgacga cgacccgcga gtcaaccgca acggcggcgc catcgccctg 1080

ggccatcccc tgggcatgag cggtgcccgg ttggtgacca ctgccttgca cgagcttgaa 1140

gaaacggccg gccgctacgc cctgtgcacc atgtgcatcg gcgtaggcca aggcattgcc 1200

atgatcatcg agcgcctctg a 1221

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 21

atgaaagaag ttgtaatagc tagtgcagta agaac 35

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 22

gcacttttct agcaatattg ctgttcc 27

<210> 23

<211> 1179

<212> DNA

<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 23

atgaaagaag ttgtaatagc tagtgcagta agaacagcga ttggatctta tggaaagtct 60

cttaaggatg taccagcagt agatttagga gctacagcta taaaggaagc agttaaaaaa 120

gcaggaataa aaccagagga tgttaatgaa gtcattttag gaaatgttct tcaagcaggt 180

ttaggacaga atccagcaag acaggcatct tttaaagcag gattaccagt tgaaattcca 240

gctatgacta ttaataaggt ttgtggttca ggacttagaa cagttagctt agcagcacaa 300

attataaaag caggagatgc tgacgtaata atagcaggtg gtatggaaaa tatgtctaga 360

gctccttact tagcgaataa cgctagatgg ggatatagaa tgggaaacgc taaatttgtt 420

gatgaaatga tcactgacgg attgtgggat gcatttaatg attaccacat gggaataaca 480

gcagaaaaca tagctgagag atggaacatt tcaagagaag aacaagatga gtttgctctt 540

gcatcacaaa aaaaagctga agaagctata aaatcaggtc aatttaaaga tgaaatagtt 600

cctgtagtaa ttaaaggcag aaagggagaa actgtagttg atacagatga gcaccctaga 660

tttggatcaa ctatagaagg acttgcaaaa ttaaaacctg ccttcaaaaa agatggaaca 720

gttacagctg gtaatgcatc aggattaaat gactgtgcag cagtacttgt aatcatgagt 780

gcagaaaaag ctaaagagct tggagtaaaa ccacttgcta agatagtttc ttatggttca 840

gcaggagttg acccagcaat aatgggatat ggacctttct atgcaacaaa agcagctatt 900

gaaaaagcag gttggacagt tgatgaatta gatttaatag aatcaaatga agcttttgca 960

gctcaaagtt tagcagtagc aaaagattta aaatttgata tgaataaagt aaatgtaaat 1020

ggaggagcta ttgcccttgg tcatccaatt ggagcatcag gtgcaagaat actcgttact 1080

cttgtacacg caatgcaaaa aagagatgca aaaaaaggct tagcaacttt atgtataggt 1140

ggcggacaag gaacagcaat attgctagaa aagtgctag 1179

<210> 24

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 24

atgagagatg tagtaatagt aagtgctgta agaactg 37

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 25

gtctctttca actacgagag ctgttccc 28

<210> 26

<211> 1179

<212> DNA

<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 26

atgagagatg tagtaatagt aagtgctgta agaactgcaa taggagcata tggaaaaaca 60

ttaaaggatg tacctgcaac agagttagga gctatagtaa taaaggaagc tgtaagaaga 120

gctaatataa atccaaatga gattaatgaa gttatttttg gaaatgtact tcaagctgga 180

ttaggccaaa acccagcaag acaagcagca gtaaaagcag gattaccttt agaaacacct 240

gcgtttacaa tcaataaggt ttgtggttca ggtttaagat ctataagttt agcagctcaa 300

attataaaag ctggagatgc tgataccatt gtagtaggtg gtatggaaaa tatgtctaga 360

tcaccatatt tgattaacaa tcagagatgg ggtcaaagaa tgggagatag tgaattagtt 420

gatgaaatga taaaggatgg tttgtgggat gcatttaatg gatatcatat gggagtaact 480

gcagaaaata ttgcagaaca atggaatata acaagagaag agcaagatga attttcactt 540

atgtcacaac aaaaagctga aaaagccatt aaaaatggag aatttaagga tgaaatagtt 600

cctgtattaa taaagactaa aaaaggtgaa atagtctttg atcaagatga atttcctaga 660

ttcggaaaca ctattgaagc attaagaaaa cttaaaccta ttttcaagga aaatggtact 720

gttacagcag gtaatgcatc cggattaaat gatggagctg cagcactagt aataatgagc 780

gctgataaag ctaacgctct cggaataaaa ccacttgcta agattacttc ttacggatca 840

tatggggtag atccatcaat aatgggatat ggagcttttt atgcaactaa agctgcctta 900

gataaaatta atttaaaacc tgaagactta gatttaattg aagctaacga ggcatatgct 960

tctcaaagta tagcagtaac tagagattta aatttagata tgagtaaagt taatgttaat 1020

ggtggagcta tagcacttgg acatccaata ggtgcatctg gtgcacgtat tttagtaaca 1080

ttactatacg ctatgcaaaa aagagattca aaaaaaggtc ttgctactct atgtattggt 1140

ggaggtcagg gaacagctct cgtagttgaa agagactaa 1179

<210> 27

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 27

atgttcaaga aatcagctaa tgatattgtt g 31

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 28

ctcgttagca aacaaggcag cg 22

<210> 29

<211> 1182

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400

> 29

atgttcaaga aatcagctaa tgatattgtt gttattgcag caaagagaac tccaatcacc 60

aagtcaatta aaggtgggtt gagtagatta tttcctgagg aaatattata tcaagtggtt 120

aagggtactg tatcagattc acaagttgat ttaaacttga ttgatgatgt gttagtcggt 180

acggtcttgc aaactttagg gggacagaaa gctagtgcct tggccattaa aaagattgga 240

ttcccaatta agaccacggt taatacggtc aatcgtcaat gtgctagttc tgctcaagcg 300

attacttatc aagcaggtag tttgcgtagt ggggagaatc aatttgctat tgctgctgga 360

gtagaaagta tgactcatga ttattttcct catcgtggga ttcccacaag aatttctgaa 420

tcatttttag ctgatgcatc cgatgaagct aaaaacgtct tgatgccaat ggggataacc 480

agtgaaaatg ttgccactaa atatggaatt tctcgtaaac aacaagatga gtttgccctt 540

aattctcatt tgaaagcaga caaggctaca aaactgggtc attttgcaaa agaaatcatt 600

cctattcaaa caacggatga aaacaaccaa cacgtttcaa taaccaaaga tgatggtata 660

aggggaagtt caacaattga aaagttgggt ggcttaaaac ctgtgttcaa ggatgatggg 720

actactactg ctggtaattc ctcgcaaatt tcagatggag ggtctgctgt gattttaact 780

actcgtcaaa atgctgagaa atcgggagta aagccaatag ctagatttat tggttcgtca 840

gtagctggtg ttccttcggg acttatggga attggtccat cggctgctat tcctcaattg 900

ttgtcgagat taaatgttga cacgaaagac attgatattt ttgaattgaa cgaggcattt 960

gcatcccaac tgatttattg tattgaaaaa ttgggtcttg attatgataa agtcaatcca 1020

tatggtggag ctatagcctt gggacatcca ttaggagcca ctggcgcaag agttacggca 1080

acgttgctta atggattaaa agatcagaat aaagagttgg gtgtcatctc aatgtgcaca 1140

tccacaggtc aaggatacgc tgccttgttt gctaacgagt ag 1182

<210> 30

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 30

atggatagat taaatcaatt aagtggtcaa ttaaaacc 38

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 31

ttccttaatc aatatggagg cagcac 26

<210> 32

<211> 1227

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 32

atggatagat taaatcaatt aagtggtcaa ttaaaaccaa cttcaaaaca atcccttact 60

caaaagaacc cagacgatgt tgtcatcgtt gcagcataca gaactgccat cggtaaaggt 120

ttcaaagggt ctttcaaatc tgtgcaatct gaattcatct tgactgaatt cttgaaagaa 180

tttattaaaa agactggagt cgatgcatct ttgattgaag atgttgctat tggtaacgtt 240

ttgaaccaag ctgctggtgc caccgaacac agaggtgcta gtttggctgc aggtattcct 300

tacactgcag ctttccttgc catcaacaga ttgtgttcct cagggttaat ggccatttct 360

gacattgcca acaaaatcaa aaccggtgaa atcgaatgtg gtcttgctgg tggtattgaa 420

tccatgtcta aaaactatgg tagtccaaaa gttattccaa agattgaccc acacttggct 480

gatgacgaac aaatgagtaa atgtttgatt ccaatgggta tcaccaacga aaatgttgct 540

aatgaattca acattccaag agaaaaacaa gatgcctttg ctgctaaatc ttatagtaaa 600

gccgaaaaag ccatctcctc tggagctttc aaagatgaaa tcttaccaat cagatccatt 660

atcagatccc cagacggttc tgaaaaagaa atcattgtcg ataccgacga aggtccaaga 720

aagggtgttg acgctgcttc cttgagcaaa ttgaaaccag catttggtgg tactaccact 780

gccggtaacg cttctcaaat ttcagatggt gctgctggtg ttttattgat gaagagaagt 840

ttggctgaag ccaaaggtta cccaattgtt gctaaataca ttgcttgttc aactgttggt 900

gttccgccag aaatcatggg tgttggtcca gcttacgcca ttccagaagt gttgaagaga 960

actggattga ctgtggatga cgttgatgtg tttgaaatca acgaagcttt tgctgctcaa 1020

tgtctttact cagctgaaca atgtaatgtt ccagaagaaa aattgaacat aaacggtggt 1080

gccatcgctt taggtcatcc tcttggttgt actggtgcca gacaatatgc cactatcttg 1140

agattgttga aaccaggtga aattggtttg acttctatgt gtatcggtag tggtatgggt 1200

gctgcctcca tattgattaa ggaatag 1227

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 33

atgtcatcca aacaacaata cttgaagaag 30

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 34

ttctctaacc aaaacagaag cagcacc 27

<210> 35

<211> 1233

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 35

atgtcatcca aacaacaata cttgaagaag aatcctgacg atgtcgttgt cgttgcagca 60

tacagaactg ctttaaccaa aggtggaaga ggtggattca aagatgttgg atctgatttc 120

cttttgaaaa aattgactga agaatttgtt aaaaaaactg gtgttgaccc taaaatcatt 180

caagatgctg ccattggtaa tgtcttgaac agaagagctg gtgatttcga acatagaggt 240

gcattattat ctgctggatt accttattca gttccatttg ttgcccttaa cagacaatgt 300

tcatctgggt taatggccat ttctcaagtg gccaacaaga tcaagactgg tgaaattgaa 360

tgtggtttag ctggtggtgt tgaaagtatg acaaaaaact atggtccaga agcattgatt 420

gctattgacc ctgcttatga aaaagaccca gaatttgtta aaaacggtat tccaatgggt 480

attactaatg aaaatgtttg tgccaaattc aatatttcaa gagatgttca agatcaattt 540

gctgctgaat cttatcaaaa agctgaaaag gcacaaaaag aaggtaaatt tgatgatgaa 600

attttaccaa ttgaagtttt ccaagaagat gaagatgctg aagatgaaga cgaagatgaa 660

gatgaagatg ctgaaccaaa agaaaaattg gttgttatta gtaaagatga aggtattaga 720

ccaggtgtta ctaaagaaaa attggctaaa attaaaccag ctttcaaatc tgatggtgta 780

tcttcagctg gtaactcttc acaagtttcc gatggtgctg ccttggtgtt attgatgaaa 840

cgttcatttg ctgaaaagaa tggattcaaa ccattggcta aatacatttc ttgtggtgtt 900

gctggtgtcc caccagaaat tatgggtatt ggtccagctg ttgccattcc aaaagttttg 960

aaacaaactg gattatcagt cagtgatatt gatatttatg aaatcaatga agcatttgcc 1020

ggtcaatgtt tgtactcaat tgaaagttgt aatattccaa gagaaaaagt caatcttaat 1080

gggggtgcta ttgccttggg tcaccctctt ggttgtactg gtgctagaca atacgctact 1140

attttaagat tgttaaaacc aggtgaattt ggtgtgactt ctatgtgtat tggtactggt 1200

atgggtgctg cttctgtttt ggttagagaa taa 1233

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 36

atgagccgcg aggtattcat ctg 23

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 37

gacccgctcg atggccag 18

<210> 38

<211> 1206

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 38

atgagccgcg aggtattcat ctgcgatgcc gtgcgcacgc cgatcggccg tttcggcggc 60

agtctttccg cggtgcgcgc cgacgacctc gcggcggtgc cgctgaaggc cctggtcgag 120

cgcaacccgg gggtcgactg gtcggcgttg gacgaggtgt tcctcggctg cgccaaccag 180

gccggcgagg acaaccgtaa cgtggcgcgc atggcgctgc tgctggccgg tttgccggag 240

agcgtgcccg gcgtcaccct caaccgcctc tgcgcctcgg ggatggacgc catcggcacg 300

gcgttccgcg ccatcgcctg cggcgagatg gagctggcca tcgccggcgg cgtcgagtcg 360

atgtcgcgcg cgccgtacgt gatgggcaag gccgatagcg ccttcggtcg cggccagaag 420

atcgaggaca ccaccatcgg ctggcgcttc gtcaatccgc tgatgaagga gcagtacggc 480

atcgacccga tgccgcagac cgccgacaac gtcgccgacg actatcgcgt gtcgcgtgcc 540

gaccaggatg ccttcgccct gcgcagccag cagcgcgccg gcagggcgca ggaggccggt 600

ttcttcgccg aggaaatcgt cccggtgacg attcgcgggc gcaagggcga caccctggtc 660

gagcacgacg agcatccgcg tcccgacacc accctggagg cgctggcccg gctcaagccg 720

gtcaacgggc cggagaagac cgtcaccgcc ggcaacgcgt ccggggtcaa cgacggcgcc 780

gccgcgctgg tcctggcctc cgccgaggca gtggagaagc acggcctgac tccgcgcgcg 840

cgggtgctgg gcatggccag cgccggcgtc gccccacgga tcatgggcat cggcccggtg 900

ccggcggtgc gcaagctgct gcggcgcctg gacctggcga tcgacgcctt cgacgtgatc 960

gaactcaacg aagccttcgc cagccagggc ctggcctgcc tgcgcgaact gggcgtggcc 1020

gacgacagtg agaaggtcaa cccgaacggc ggtgccatcg ccctcggcca cccgctgggg 1080

atgagcggtg cgcggctggt cctcaccgcg ctccatcaac ttgagaagag cggcggccgg 1140

cgcggcctgg cgaccatgtg cgtaggcgtc ggccaaggcc tggcgctggc catcgagcgg 1200

gtctga 1206

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 39

atgctcgatg cctatatcta cgcc 24

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 40

tcggcagcgc tcgatcac 18

<210> 41

<211> 1206

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 41

atgctcgatg cctatatcta cgccggcctg cgtacgcctt tcggccggca tgccggtgca 60

ctctcgacgg tgcgtccgga cgacctggcc ggcctgctgc tggcgcgtct cgcggaaacc 120

tccgggttcg ccgtcgacga cctggaggat gtgatcctcg gttgcaccaa ccaggccggc 180

gaagacagcc gcaacctggc gcgcaacgcg ctgctcgcag ccggcctgcc ggcgcggctg 240

cccgggcaga cggtcaaccg cttgtgtgcc agcggactgt cggcggtgat cgacgcggcg 300

cgcgcgatca gttgcggtga gggccggctg tacctggccg gcggcgccga aagcatgtcc 360

cgggcgccgt tcgtcatggg caaggcggag agcgccttca gccgcacgct ggaggtcttc 420

gacagcacca tcggcgcgcg cttcgccaac cccaggctgg tcgagcgcta tggcaacgac 480

agcatgccgg agaccggcga caacgtggcc cgcgccttcg gcatcgcccg cgaagacgcc 540

gaccgtttcg ccgcttcttc ccaggcgcgc taccaggctg cgctggagga gggcttttc 600

ctcggcgaga tccttccggt ggaggtgcgt gccggacgca agggcgagac gcggctggtg 660

gagcgcgacg agcatccgcg accgcaggcc gacctggcgg ccctggcgcg cttgccggcg 720

ttgttcgccg gtggggtagt gaccgccggt aatgcgtctg ggatcaacga cggggcggcg 780

gtagtgctgc tgggcgatcg cgcgatcggc gagcgcgagg gcatccggcc gttggcgcgg 840

atcctcgcca gcgccagcgt cggcgtcgag ccccggttga tgggcatcgg cccgcagcag 900

gcgatcctcc gcgcgctgca acgcgccggc atcgacctgg acgaggtcgg cctgatcgag 960

atcaacgaag ccttcgcgcc gcaggtcctg gcctgcctga agttgctcgg cctggactac 1020

gaggacccgc gggtcaatcc ccatggcggc gccattgccc tcggccatcc gctcggcgcc 1080

tccggtgcgc gcctggtgct caccgccgcc cgcgggctgc aacgcatcga gcggcgctac 1140

gcggtggtca gcctgtgcgt cgggctcggc cagggcgtgg cgatggtgat cgagcgctgc 1200

cgatga 1206

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 42

atgcacgacg tattcatctg tgacg 25

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 43

aacccgctcg atggccaac 19

<210> 44

<211> 1203

<212> DNA

<213> Pseudomonas putida

<400> 44

atgcacgacg tattcatctg tgacgccatc cgtaccccga tcggccgctt cggcggcgcc 60

ctggccagcg tgcgggccga cgacctggcc gccgtgccgc tgaaggcgct gatcgagcgc 120

aaccctggcg tgcagtggga ccaggtagac gaagtgttct tcggctgcgc caaccaggcc 180

ggtgaagaca accgcaacgt ggcccgcatg gcactgctgc tggccggcct gccggaaagc 240

atcccgggcg tcaccctgaa ccgtctgtgc gcgtcgggca tggatgccgt cggcaccgcg 300

ttccgcgcca tcgccagcgg cgagatggag ctggtgattg ccggtggcgt cgagtcgatg 360

tcgcgcgccc cgttcgtcat gggcaaggct gaaagcgcct attcgcgcaa catgaagctg 420

gaagacacca ccattggctg gcgtttcatc aacccgctga tgaagagcca gtacggtgtg 480

gattccatgc cggaaaccgc cgacaacgtg gccgacgact atcaggtttc gcgtgctgat 540

caggacgctt tcgccctgcg cagccagcag aaggctgccg ctgcgcaggc tgccggcttc 600

tttgccgaag aaatcgtgcc ggtgcgtatc gctcacaaga agggcgaaat catcgtcgaa 660

cgtgacgaac acctgcgccc ggaaaccacg ctggaggcgc tgaccaagct caaaccggtc 720

aacggcccgg acaagacggt caccgccggc aacgcctcgg gcgtgaacga cggtgctgcg 780

gcgatgatcc tggcctcggc cgcagcggtg aagaaacacg gcctgactcc gcgtgcccgc 840

gttctgggca tggccagcgg cggcgttgcg ccacgtgtca tgggcattgg cccggtgccg 900

gcggtgcgca aactgaccga gcgtctgggg atagcggtaa gtgatttcga cgtgatcgag 960

cttaacgaag cgtttgccag ccaaggcctg gcggtgctgc gtgagctggg tgtggctgac 1020

gatgcgcccc aggtaaaccc taatggcggt gccattgccc tgggccaccc cctgggcatg 1080

agcggtgcac gcctggtact gactgcgttg caccagctgg agaagagtgg cggtcgcaag 1140

ggcctggcga ccatgtgtgt gggtgtcggc caaggtctgg cgttggccat cgagcgggtt 1200

tga 1203

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 45

atgaccgacg cctacatctg cg 22

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 46

cacgcgttcg atcgcgatc 19

<210> 47

<211> 1203

<212> DNA

<213> Burkholderia ambifaria

<400> 47

atgaccgacg cctacatctg cgatgcgatt cgcacaccca tcggccgcta cggcggcgcc 60

ctgaaagacg ttcgtgccga cgatctcggc gcggtgccgc tcaaggcgct gatcgaacgc 120

aaccggaacg tcgactggtc ggcgatcgac gacgtgatct atggctgcgc gaaccaggcc 180

ggcgaagaca accgcaacgt cgcgcgcatg tccgcgctgc tcgcgggctt gccgaccgcc 240

gtgccgggca cgacgctgaa ccggttatgc ggctcgggca tggacgccgt cggcacggcc 300

gcgcgcgcga tcaaggcggg cgaggcacgc ttgatgatcg cgggcggcgt cgaaagcatg 360

acgcgcgcgc cgttcgtgat gggcaaggcc gccagcgcat tcgcgcgcca ggctgcgatt 420

ttcgacacga cgatcggctg gcgtttcatt aatccgctga tgaaacagca atacggcgtc 480

gattcgatgc ccgagacggc cgagaacgtc gcggtcgact acaacatcag ccgcgccgac 540

caggatctat tcgcgctgcg cagccagcag aaggccgcgc gtgcgcagca ggacggcacg 600

ctcgccgccg aaatcgtccc cgtcacgatt gcgcagaaaa aaggcgacgc gctcgtcgta 660

tcgctcgacg agcatccgcg cgaaacatcg ctcgaagcgc tcgcgaagct gaagggcgtc 720

gtgcgtcccg acggctcggt cacggccggc aacgcgtcag gcgtcaacga cggcgcatgc 780

gcactgctgc tcgccaacgc ggaagccgcc gatcaatatg ggctgcgccg ccgcgcgcgt 840

gtcgtcggca tggcgagcgc cggcgtcgag ccgcgcgtga tgggtatcgg cccggcgccg 900

gccacgcaga aactgttgcg ccagctcggc atgacgatcg accagttcga cgtgatcgag 960

ctgaacgaag cgttcgcgtc gcagggtctc gcggtgctgc gcatgctcgg tgtcgccgac 1020

gacgatccgc gcgtgaaccc caacggcggt gcgatcgcgc tcggccatcc gctcggcgca 1080

tcgggtgcgc ggctcgtgac cacggcgctt caccaactcg agcgtacggg cggccgcttt 1140

gcgctctgta cgatgtgcat cggcgtcggc cagggcatcg cgatcgcgat cgaacgcgtg 1200

taa 1203

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 48

atggccacct caagacttgt ctgc 24

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 49

caatttctcg atgaccattc cacc 24

<210> 50

<211> 1242

<212> DNA

<213> Ascaris suum

<400> 50

gtgatggcca cctcaagact tgtctgcagc aatttaacga agcaatgctt tacgatctcg 60

tcacgtgctg ctagccaatt taccgatgtg gtattcgtgg gtgccgcacg aacaccggtc 120

ggatcgtttc gctcttcgct ttccactgtt ccagccactg tcctcggagc tgaggctatt 180

aagggtgcac ttaaacatgc caatctaaaa ccctcacaag tgcaagaggt gttctttggc 240

tgtgtcgttc catccaactg tggacaagtt cctgcccgtc aagcgacact tggagctgga 300

tgcgatcctt cgacaatcgt tacaactctc aataaattgt gcgcctcggg aatgaagtcg 360

attgcttgtg ccgcctcact tttgcaactt ggtcttcaag aggttaccgt tggtggcggt 420

atggagagca tgagcttagt gccgtactat cttgaacgtg gtgaaactac ttatggtgga 480

atgaagctca tcgacggtat cccaagagat ggtccgactg atgcatatag taatcaactt 540

atgggtgcat gcgctgataa tgtggctaaa cgattcaaca tcacccgtga ggaacaggat 600

aaattcgcta ttgaaagcta taaacgatct gctgctgcat gggagagtgg agcatgcaaa 660

gctgaagtag ttcctattga agtgacaaag ggcaagaaaa catacattgt caacaaggat 720

gaggaataca tcaaagtcaa cttcgagaag cttcccaaac tgaaacccgc cttcttgaaa 780

gacggaacca tcacggctgg caatgcttca acactgaacg atggtgctgc ggcagttgtg 840

atgacgactg tcgaaggagc gaaaaaatac ggtgtgaaac cattggcccg attgctctca 900

tatggtgatg cggcaacaaa tccagtcgat tttgctattg caccatcaat ggttatccca 960

aaggtactta aattggctaa tctcgagatc aaggatattg atttgtggga aatcaacgag 1020

gctttcgccg ttgttcccct tcattcaatg aagacactcg gtatcgatca ctcgaaagtg 1080

aacattcatg gtggtggcgt atctcttgga catcctattg gaatgtctgg agctcgaatt 1140

atcgttcatc tgattcatgc gttgaaacct ggccagaaag gctgcgctgc aatctgcaat 1200

ggtggcggtg gcgctggtgg aatggtcatc gagaaattgt aa 1242