



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월11일

(11) 등록번호 10-2043381

(24) 등록일자 2019년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/52 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7007128

(22) 출원일자(국제) 2012년08월17일

심사청구일자 2017년08월11일

(85) 번역문제출일자 2014년03월18일

(65) 공개번호 10-2014-0057346

(43) 공개일자 2014년05월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/051347

(87) 국제공개번호 WO 2013/028519

국제공개일자 2013년02월28일

(30) 우선권주장

61/525,659 2011년08월19일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

US20100285549 A1*

US20110201089 A1*

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol.107,
No.25, pp.11265-11270 (2010.06.22.)

WO2011031897 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

게노마티카 인코포레이티드

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 넥서스 센터
드라이브 4757

(72) 발명자

오스터아웃 로빈 이.

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 씨클
10520

버가드 안쑤니 피.

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 씨클
10520

버크 마크 제이.

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 씨클
10520

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 문명순

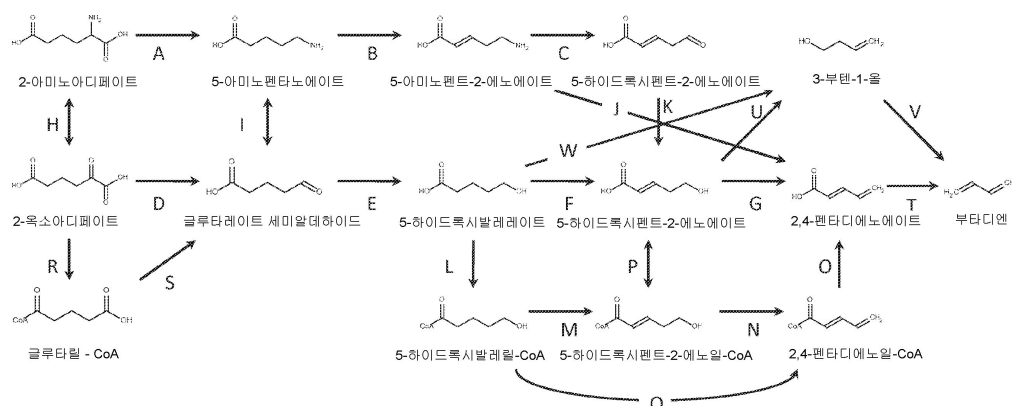
(54) 발명의 명칭 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올 및 관련 알코올을 생합성하기 위한 미생물과 방법

(57) 요약

본 발명은 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물

(뒷면에 계속)

대표도



유기체를 제공한다. 또한, 본 발명은, 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하기 위한 조건과 충분한 기간 동안 본원에 기술된 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 포함하는 비-천연성 미생물을 배양함으로써, 상기한 미생물 유기체를 이용한 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 제조 방법을 제공한다.

(30) 우선권주장

61/530,885	2011년09월02일	미국(US)
61/535,264	2011년09월15일	미국(US)
61/645,509	2012년05월10일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

1,3-부탄디올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체로서,

상기 경로는 1,3-부탄디올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부탄디올 경로 효소를 각각 코딩하는 외인성 핵산들을 포함하며,

상기 1,3-부탄디올 경로가 하기 경로들로부터 선택되는 경로를 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체:

(33) 7AS, 7P, 7N 및 7AA;

(27) 7AS, 7E, 7F, 7G 및 7S;

(28) 7AS, 7I, 7G 및 7S;

(29) 7AS, 7K, 및 7S;

(30) 7AS, 7I, 7R 및 7AA;

(31) 7AS, 7E, 7F, 7R 및 7AA;

(32) 7AS, 7E, 7Q, 7Z 및 7AA;

(34) 7AS, 7P, 7Y, 7Z 및 7AA; 및

(35) 7AS, 7P 및 7O;

상기 경로에서, 7E는 아세토아세틸-CoA에서 아세토아세테이트로의 전환을 촉매하는, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 신데타제이고, 7F는 아세토아세테이트에서 3-옥소부티르알데하이드로의 전환을 촉매하는 아세토아세테이트 리덕타제 (산 환원)이고, 7G는 3-옥소부티르알데하이드에서 4-하이드록시-2-부타논으로의 전환을 촉매하는 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원)이고, 7I는 아세토아세틸-CoA에서 3-옥소부티르알데하이드로의 전환을 촉매하는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존성, 알데하이드 형성)이고, 7K는 아세토아세틸-CoA에서 4-하이드록시-2-부타논으로의 전환을 촉매하는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (알코올 형성)이고, 7N은 3-하이드록시부티릴-CoA에서 3-하이드록시부티르알데하이드로의 전환을 촉매하는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7O는 3-하이드록시부티릴-CoA에서 1,3-부탄디올로의 전환을 촉매하는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성)이고, 7P는 아세토아세틸-CoA에서 3-하이드록시부티릴-CoA로의 전환을 촉매하는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7Q는 아세토아세테이트에서 3-하이드록시부티레이트로의 전환을 촉매하는 아세토아세테이트 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7R은 3-옥소부티르알데하이드에서 3-하이드록시부티르알데하이드로의 전환을 촉매하는 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7S는 4-하이드록시-2-부타논에서 1,3-부탄디올로의 전환을 촉매하는 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제이고, 7Y는 3-하이드록시부티릴-CoA에서 3-하이드록시부티레이트로의 전환을 촉매하는, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신데타제이고, 7Z는 3-하이드록시부티레이트에서 3-하이드록시부티르알데하이드로의 전환을 촉매하는 3-하이드록시부티레이트 리덕타제이고, 7AA는 3-하이드록시부티르알데하이드에서 1,3-부탄디올로의 전환을 촉매하는 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제이고, 및 7AS는 말로닐-CoA에서 아세토아세틸-CoA로의 전환을 촉매하는 아세토아세틸-CoA 신데타제임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 1,3-부탄디올 경로가 경로 (27) 7AS, 7E, 7F, 7G 및 7S를 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 1,3-부탄디올 경로가 경로 (28) 7AS, 7I, 7G 및 7S를 포함하는, 비-천연성 미생물 유기

체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 1,3-부탄디올 경로가 경로 (29) 7AS, 7K, 및 7S 을 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 1,3-부탄디올 경로가 경로 (30) 7AS, 7I, 7R 및 7AA 을 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 1,3-부탄디올 경로가 경로 (31) 7AS, 7E, 7F, 7R 및 7AA 을 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 1,3-부탄디올 경로가 경로 (32) 7AS, 7E, 7Q, 7Z 및 7AA 을 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 1,3-부탄디올 경로가 경로 (33) 7AS, 7P, 7N 및 7AA 을 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 1,3-부탄디올 경로가 경로 (34) 7AS, 7P, 7Y, 7Z 및 7AA 을 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 1,3-부탄디올 경로가 경로 (35) 7AS, 7P 및 7O 을 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 11

제1항에 있어서,

적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5종의 상기 외인성 핵산이 이중 핵산인,

비-천연성 미생물 유기체.

청구항 12

제1항에 있어서,

하기 구성 요소를 더 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체:

(i) ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 시트릴-CoA 신테타제, 시트릴-CoA 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제로부터 선택되는, 환원성 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 환원성 TCA 경로;

(ii) 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제로부터 선택되는, 환원성 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 환원성 TCA 경로; 또는

(iii) CO 데하이드로게나제, H₂ 하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 비-천연성 미생물 유기체가 박테리아, 효모 또는 진균의 종인, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 박테리아가 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*), 클렙시엘라 옥시토카 (*Klebsiella oxytoca*), 안에어로비오스피릴럼 속시니시프로두센스 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 액티노바실러스 속시노게네스 (*Actinobacillus succinogenes*), 만하이미아 속시니시프로두센스 (*Mannheimia succiniciproducens*), 리조비움 에틀리 (*Rhizobium etli*), 바실러스 썩틸리스 (*Bacillus subtilis*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 쿠프리아비두스 네카토르 (*Cupriavidus necator*), 글루코노박터 옥시단스 (*Gluconobacter oxydans*), 자이모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*), 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*), 락토바실러스 플라타룸 (*Lactobacillus plantarum*), 스트렙토마이세스 코엘리콜러 (*Streptomyces coelicolor*), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 (*Clostridium acetobutylicum*), 슈도모나스 플루오레센스 (*Pseudomonas fluorescens*) 및 슈도모나스 푸티타 (*Pseudomonas putida*)로부터 선택되는 것인, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 효모 또는 진균이 사카로마이세스 세레비지애, 시조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 클루베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*), 클루베로마이세스 마르시아누스 (*Kluyveromyces marxianus*), 아스퍼질러스 테레우스 (*Aspergillus terreus*) 아스퍼질러스 나이거 (*Aspergillus niger*), 피키아 패스토리스 (*Pichia pastoris*), 리조푸스 아리주스 (*Rhizopus arrhizus*), 리조부스 오리제 (*Rhizobus oryzae*), 야오이와 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*), 및 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*) 로부터 선택되는 것인, 비-천연성 미생물 유기체.

청구항 16

1,3-부탄디올을 생산하기 위한 조건과 충분한 기간 동안 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 비-천연성 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는,

1,3-부탄디올의 제조 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 방법이 배양물내 다른 성분들로부터 1,3-부탄디올을 분리하는 것을 더욱 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 분리가 추출, 연속적인 액체-액체 추출, 투석증발(pervaporation), 막 여과, 막 분리, 역삼투압, 전기투석, 증류, 결정화, 원심분리, 추출 여과(extractive filtration), 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 및 한외여과 중 하나 이상을 포함하는, 제조 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 분리가 증류를 포함하는, 제조 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2012년 5월 10일자 미국 가출원 번호 61/645,509, 2011년 9월 15일자 미국 가출원 번호 61/535,264, 2011년 9월 2일자 미국 가출원 번호 61/530,885 및 2011년 8월 19일자 미국 가출원 번호 61/525,659에 대한 우

선권을 주장하며, 이들 문헌은 각각의 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0002] 본 발명은 일반적으로 생합성 공정에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합력을 가진 유기체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 부타디엔 (1,3-부타디엔, BD)이 연간 250억 파운드 이상으로 생산되며, 합성 고무 및 ABS 수지 등의 폴리머와 헥사메틸렌디아민 및 1,4-부탄디올 등의 화합물의 제조에 활용되고 있다. 부타디엔은 전형적으로 나프타와 같은 석유 공급원료, 액화된 석유 가스, 에탄 또는 천연 가스를 에틸렌 및 기타 올레핀으로 변환하는 증기 분해 반응(steam cracking)의 부산물로 생성된다. 대체 공급원료 및/또는 재생 원료로부터 부타디엔을 제조하는 역량은 보다 지속가능한 화학적 생산 공정을 탐색하는데 크게 유용할 것이다.

[0004] 부타디엔을 재생가능한 방식으로 생산할 수 있는 가능성있는 한가지 방법은, 당 또는 기타 공급원료를 발효시켜 1,4-부탄디올 또는 1,3-부탄디올 등의 디디계 화합물을 생산한 다음, 이를 분리 및 정제한 후, 금속계 촉매를 사용하는 2차 단계에서 탈수 반응을 수행하여 부타디엔을 제조하는 공정을 포함한다. 재생 원료로부터 부타디엔을 직접 발효에 의해 생산하는 방법은 탈수 단계가 필요없을 것이며, 부타디엔 가스 (bp -4.4°C)가 발효기에서 계속적으로 방출되어 이를 용이하게 응결시켜 수집할 수 있을 것이다. 발효 생산 공정의 개발로 화석 원료로부터 부타디엔을 제조할 필요가 없어지며, 석유화학적으로 제조되는 부타디엔에 비해 비용, 에너지 및 유해 폐기물과 배기물을 상당히 절감할 수 있을 것이다.

[0005] 2,4-펜타디엔노에이트는 그 자체로도 유용한 치환된 부타디엔 유도체이며, 예를들면, 쿠르티우스 (curtius) 전위 반응을 통해 입수가능한 1-카르바모일-1,3-부타디엔 등의 다른 치환된 1,3-부타디엔 유도체를 제조하는 경로의 중요한 중간산물이다. 제조되는 N-보호된-1,3-부타디엔 유도체는 치환된 아닐린을 제조하기 위해 딜스 알더 (Doels alder) 반응에 이용할 수 있다. 2,4-펜타디엔노에이트는 다양한 폴리머들과 코폴리머의 제조에 사용될 수 있다.

[0006] 1,3-부탄디올 (1,3-BDO)은 전통적으로 아세틸렌으로부터 수화 반응을 통해 제조되는 4 탄소 디올이다. 제조된 아세트알데하이드를 3-하이드록시부티르알데하이드로 변환시킨 후, 환원하여 1,3-BDO를 제조한다. 최근 몇년간, 아세트알데하이드의 원료가 아세틸렌에서 보다 저렴한 에틸렌으로 대체되고 있다. 1,3-BDO는 식품 향미제의 유기 용매로 통상 사용된다. 또한, 이것은 폴리우레탄과 폴리에스테르 수지에 대한 공-단량체로서 사용되며, 저혈당 제제로서 널리 사용되고 있다. 광학적으로 활성이 있는 1,3-BDO는 생물학적 활성 화합물과 액정 합성에 이용가능한 출발 물질이다. 상업적으로는 1,3-부탄디올은 탈수 반응을 통해 합성 고무(예, 타이어), 라텍스 및 수지 제조에 사용되는 1,3-부타디엔을 250 억 lb/yr 석유화학제품으로 공급한다 (Ichikawa et al., *J. of Molecular Catalysis A-Chemical*, 256:106-112 (2006); Ichikawa et al., *J. of Molecular Catalysis A-Chemical*, 231:181-189 (2005)). 아세틸렌 또는 에틸렌의 석유계 원료에 대한 의존성은 재생 원료 기반의 1,3-부탄디올 및 부타디엔 제조 경로의 개발을 보장한다.

[0007] 3-부텐-1-올은 약제, 농화학제, 향료 및 수지에 사용되는 원료이다. 팔라듐 촉매에 의한 3-부텐-1-올과 아릴 할라이드의 커플링은, 예를 들어, 항염산 화합물인 페메트렉시드 디소듐과 같은 아릴-치환된 알데하이드계 화합물을 제조하는데 있어 중요한 공정이다 (R. C. Larock et al., *Tetrahedron Letters*, 30, 6629 (1989) 및 미국 특허 6,262,262). 3-부텐-1-올은 촉매의 존재 하에 고온 및 고압에서 프로필렌 및 포름알데하이드로부터 일반적으로 제조된다. 다른 예로, 이것은 3,4-에폭시-1-부텐으로부터 제조된다. 재생 원료로부터 3-부텐-1-올을 제조하는 것에 대해서는 아직까지 개시되지 않았다.

[0008] 프로필렌은 석유 정제 공정과 탄화수소 원료의 증기 분해 반응에 의한 에틸렌 제조 공정의 부산물로서 주로 생성된다. 프로필렌은 분해 반응과 기타 정제 공정으로부터 발생하는 탄화수소 혼합물을 분별 증류함으로써 분리된다. 전형적인 탄화수소 원료는 석유, 천연 가스와 같은 재생할 수 없는 화석 연료로부터 기원된 것이며, 그 수준은 훨씬 낮지만 석탄으로부터도 기원된다. 프로필렌은 연간 750억 파운드 이상 생산되고 있어, 에틸렌 다음으로 2번째로 가장 많이 생산되는 화석 유래 화합물이다. 프로필렌은 매우 다양한 폴리머, 폴리머 중간체 및 화합물들로 변환되는 기본 화합물이다. 화합물 및 폴리머 등급의 프로필렌 중에서 가장 보편적인 유도체는 폴리프로필렌, 아크릴산, 부탄올, 부탄디올, 아크릴로니트릴, 프로필렌 옥사이드, 이소프로판올 및 큐멘이다. 프로필렌 유도체인 폴리프로필렌이 사출 성형과 같은 플라스틱 및 카페트와 같은 섬유의 제조에 사용되는 비중은 미국에서의 이들 유도체 소비량의 1/3을 웃돈다. 또한, 프로필렌은 합성 고무와 에어로졸의 추진체 또는 성분의 제조에도 사용되고 있다.

[0009] 대체 및/또는 재생 원료로부터 프로필렌을 제조하는 역량은 보다 지속가능한 화학적 생산 공정을 탐색하는데 큰 이점이 될 것이다. 프로필렌을 재생가능한 방식으로 생산할 수 있는 가능한 방법은 당 또는 기타 원료를 발효시켜, 알코올 2-프로판올 (이소프로판올) 또는 1-프로판올을 제조하고, 이를 분리, 정제한 다음 금속계 촉매를 사용하는 2차 단계에서 프로필렌으로 탈수시키는 것이다. 재생 원료로부터 직접 발효를 통해 프로필렌을 제조하는 방법은 탈수 공정이 필요 없을 것이다. 발효 생산 공정에서, 프로필렌 가스를 계속적으로 발효기에서 배출시켜, 용이하게 수집 및 응결시킬 수 있다. 또한, 발효 생산 공정의 개발로 프로필렌을 석유화학공정으로 제조할 필요가 없게 될 것이며, 석유화학적으로 제조되는 프로필렌에 비해 비용, 에너지 및 유해 폐기물과 배기물을 상당히 절감할 수 있을 것이다.

[0010] 크로틸 알코올은 2-부텐-1올로도 지칭되는 것으로서, 중요한 화학 중간산물이다. 이 화합물은, 단량체, 정제 화학제, 농화학제 및 약제를 제조하는 화학 중간체인, 크로틸 할라이드, 에스테르 및 에테르의 전구체로 사용된다. 정제 화학 제품의 예로는 소르브산, 트리메틸하이드로퀴논, 크로톤산 및 3-메톡시부탄올이 있다. 크로틸 알코올 역시 1,3-부타디엔의 전구체이다. 크로틸 알코올의 제조에는 현재 석유 원료만 사용되고 있다. 예를 들어, 일본 특허 47-013009 및 미국 특허들 제 3,090,815호, 제 3,090,816호 및 제 3,542,883호에 1,2-에폭시부탄의 이성화에 의한 크로틸 알코올 생산 방법이 개시되어 있다. 대체 및/또는 재생 원료로부터 크로틸 알코올을 제조하는 방법은 보다 지속적인 화학 제조 공정을 탐구하는데 중대한 진전이 될 것이다.

[0011] 이에, 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올과 같은 화합물을 상업적인 양으로 효율적으로 생산하는 대안적인 방법들이 요구되고 있다. 본 발명은 이러한 요구를 충족시키고, 관련된 이점들을 아울러 제공한다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은, 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 포함하는 비-천연성 미생물 유기체를 제공한다. 본 발명은, 또한, 본원에 기술된 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 포함하는 비-천연성 미생물 유기체를 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하기 위한 조건 하에 충분한 시간 동안 배양함으로써, 상기한 미생물 유기체를 이용한 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 제조 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 2-옥소아디페이트, 2-아미노아디페이트, 5-아미노펜타노에이트 및 글루타릴-CoA로부터 3-부텐-1-올, 2,4-펜타디엔노에이트 및 부타디엔을 제조하는 경로의 예를 도시한 것이다. 효소들은 다음과 같다: A. 2-아미노아디페이트 데카르복실라제, B. 5-아미노펜타노에이트 리덕타제, C. 5-아미노펜트-2-에노에이트 아미노트랜스퍼라제, 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제, D. 2-옥소아디페이트 데카르복실라제, E. 글루타레이트 세미알데하이드 리덕타제, F. 5-하이드록시발레레이트 데하이드로게나제, G. 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 데하이드라타제, H. 2-아미노아디페이트 아미노트랜스퍼라제, 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제, I. 5-아미노펜타노에이트 아미노트랜스퍼라제, 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제, J. 5-아미노펜트-2-에노에이트 데아미나제, K. 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 리덕타제, L. 5-하이드록시발레릴-CoA 트랜스퍼라제 및/또는 신테타제, M. 5-하이드록시펜타노일-CoA 데하이드로게나제, N. 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 데하이드라타제, O. 2,4-펜타디엔노일-CoA 트랜스퍼라제, 신테타제 또는 하이드롤라제, P. 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 트랜스퍼라제 또는 신테타제, Q. 5-하이드록시발레릴-CoA 데하이드라타제/데하이드로게나제, R. 2-옥소아디페이트 데하이드로게나제, 2-옥소아디페이트:페리독신 옥시도리덕타제 또는 2-옥소아디페이트 포르메이트 리아제, S. 글루타릴-CoA 리덕타제, T. 2,4-펜타디엔노에이트 데카르복실라제, U. 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 데카르복실라제, V. 3-부텐-1-올 데하이드라타제 또는 화학적 변환, W. 5-하이드록시발레레이트 데카르복실라제.

도 2는 아세틸-CoA에서 2,4-펜타디엔노에이트 전구체 글루타릴-CoA를 제조하는 예시적인 탄소-활용 경로를 도시한 것이다. 효소는 다음과 같다: A. 아세토아세틸-CoA 티올라제 또는 신타제, B. 아세토아세틸-CoA 리덕타제, C. 3-하이드록시부틸릴-CoA 데하이드라타제, D. 글루타릴-CoA 데하이드로게나제.

도 3는 프로피오닐-CoA를 2,4-펜타디엔노에이트로 변환하는 경로의 예를 도시한 것이다. 효소는 다음과 같다: A. 3-옥소펜타노일-CoA 티올라제 또는 신타제, B. 3-옥소펜타노일-CoA 리덕타제, C. 3-하이드록시펜타노일-CoA

데하이드라타제, D. 펜트-2-에노일-CoA 이소머라제, E. 펜트-3-에노일-CoA 데하이드로게나제, F. 2,4-펜타디에노일-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제, G. 펜트-2-에노일-CoA 데하이드로게나제.

도 4는 3-하이드록시프로피오닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 1,3-부탄디올을 제조하는 경로의 예를 도시한 것이다. 효소는 다음과 같다: A. 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 티올라제 또는 신타제, B. 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제, C. 3-옥소-5-하이드록시펜타노에이트 데카르복실라제 및 D. 3-옥소부탄올 리덕타제.

도 5는 피루베이트 및 아세트알데하이드로부터 1,3-부탄디올 (13-BDO), 3-부텐-1-올 및 부타디엔을 제조하는 경로의 예를 도시한 것이다. 효소는 다음과 같다: A. 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 알돌라제, B. 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 데하이드라타제, C. 2-옥소펜타노에이트 데카르복실라제, D. 3-부텐-1-알 리덕타제, E. 3-부텐-1-올 데하이드라타제, F. 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 데카르복실라제, G. 3-하이드록시부타날 리덕타제, H. 4-하이드록시-2-옥소펜타노에이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시-2-옥소펜타노에이트:페레독신 옥시도리덕타제 또는 4-하이드록시-2-옥소펜타노에이트 포르메이트 리아제, I. 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), J. 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제, K. 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, L. 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성). 공정 E는 화학적 탈수를 통해 촉매될 수도 있다.

도 6는 2,4-펜타디에노에이트 및 2,4-펜타디에노일-CoA로부터 부타디엔을 제조하는 경로의 예를 도시한 것이다. 효소는 다음과 같다: A. 2,4-펜타디에노에이트 리덕타제 (산 환원), B. 펜타-2,4-디에날데카르보닐라제, C. 2,4-펜타디에노일-CoA 리덕타제 (산 환원), D. 2,4-펜타디에노일-CoA 포스포트랜스퍼라제, E. 2,4-펜타디에노일-포스페이트 리덕타제, F. 2,4-펜타디에노일-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제, G. 2,4-펜타디에노에이트 데카르복실라제, H. 2,4-펜타디에노에이트 키나제.

도 7은 말로닐-ACP로부터 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 및 프로필렌을 제조하는 경로의 예를 도시한 것이다. 효소는 다음과 같다: A. 3-케토아실-ACP 신타제, B. 아세토아세틸-ACP 리덕타제, C. 3-하이드록시부티릴-ACP 데하이드라타제, D. 아세토아세틸-CoA:ACP 트랜스퍼라제, E. 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제, F. 아세토아세테이트 리덕타제 (산 환원), G. 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원), H. 아세토아세틸-ACP 티오에스테라제, I. 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존성, 알데하이드 형성), J. 아세토아세틸-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성), K. 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (알코올 형성), L. 3-하이드록시부티릴-ACP 티오에스테라제, M. 3-하이드록시부티릴-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성), N. 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), O. 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성), P. 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원), Q. 아세토아세테이트 리덕타제 (케톤 환원), R. 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원), S. 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제, T. 크로토닐-ACP 티오에스테라제, U. 크로토닐-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성), V. 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), W. 크로토닐-CoA (알코올 형성), X. 3-하이드록시부티릴-CoA:ACP 트랜스퍼라제, Y. 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제, Z. 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, AA. 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, AB. 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, AC. 3-하이드록시부티레이트 데하이드라타제, AD. 3-하이드록시부티르알데하이드 데하이드라타제, AE. 크로토닐-CoA:ACP 트랜스퍼라제, AF. 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제, AG. 크로토네이트 리덕타제, AH. 크로톤알데하이드 리덕타제, AI. 부티릴-CoA:ACP 트랜스퍼라제, AJ. 부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제 또는 신테타제, AK. 부티레이트 데카르복실라제, AL. 크로토닐-ACP 리덕타제, AM. 크로토닐-CoA 리덕타제, AN. 크로토네이트 리덕타제, AO. 크로톤알데하이드 데카르보닐라제, AP. 부티릴-ACP 티오에스테라제, AQ. 크로토네이트 데카르복실라제, AR. 3-하이드록시부티레이트 데카르복실라제, AS. 아세토아세틸-CoA 신타제. ACP는 아실 캐리어 단백질이다.

도 8은 기질로서 탄수화물에 CO₂를 고정하기 위한 리버스(reverse) TCA 사이클을 도시한다. 효소적 변환은 표시된 효소들로 수행한다.

도 9는 합성가스 (syngas)를 아세틸-CoA로 변환하기 위한, 일산화탄소 데하이드로게나제 및 하이드로게나제와 커플링된 리버스 TCA 사이클 경로를 나타낸 것이다.

도 10은 ACS90 (1번 라인), ACS91 (2번 라인), Mta98/99 (3번 라인 및 4번 라인) 세포 추출물 10 µg과, 크기 표준 물질 (5번 라인) 및 대조군 무렐라 서모아세티카 (*M. thermoacetica*) CODH (Moth_1202/1203) 또는 Mtr (Moth_1197) 단백질 (50, 150, 250, 350, 450, 500, 750, 900 및 1000 ng)에 대한 웨스턴 블롯이다.

도 11은 CO 산화 분석 결과를 나타낸 것이다. 세포 (CODH/ACS 오페론을 가진 무렐라 서모아세티카 또는 *E. coli*; ACS90 또는 ACS91 또는 빈 벡터: pZA33S)를 배양하여 추출물을 준비하였다. 추출물을 준비한 당일 여러 시간대에 55℃에서 분석을 수행하였다. 메틸비올로겐의 환원을 120초 동안 578 nm에서 추적하였다.

도 12는 크로틸 알코올을 부타디엔으로 변환하는 경로를 나타낸 것이다. 효소는 다음과 같다: A. 크로틸 알코올 키나제, B. 2-부텐-1-올-4-포스페이트 키나제, C. 부타디엔 신타제, 및 D. 크로틸 알코올 디포스포키나제. 공정 E는 비-효소적으로 촉매화된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 능력을 가진 세포 및 유기체의 설계와 제조에 관한 것이다. 본 발명은, 특히, 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 도입함으로써, 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산할 수 있는 미생물 유기체의 설계에 관한 것이다.
- [0015] 일 구현예에서, 본 발명은 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생합성하기 위한 대사적 설계를 확인하는 에스케리키아 콜라이(*E. coli*) 대사의 인 실리코(*in silico*) 화학량론적 모델을 이용한다. 본원에 기술된 결과들은, 대사 경로가 에스케리키아 콜라이 및 기타 세포 또는 유기체에서 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생합성이 달성되도록 설계 및 재조합적으로 조작할 수 있음을 보여준다. 예컨대, 인 실리코 설계에서, 생합성에 의한 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생산은, 설계된 대사관련 유전자형을 가지는 균주를 구축함으로써, 검증할 수 있다. 또한, 대사적으로 조작된 세포 또는 유기체는, 이론적 최대 성장을 달성하는 조건 등의, 부타디엔 생합성을 더욱 증대시키기 위한 적응 진화(*adaptive evolution*)를 거칠 수 있다.
- [0016] 특정 구현예에서, 설계된 균주의 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 특징들은 균주를 유전학적으로 안정하게 만들며, 특히 계속적인 생물학적 제조에 유용하다. 각각의 균주 설계 전략들은, 에스케리키아 콜라이 또는 다른 숙주 유기체에 여러가지 비-천연 또는 이중적인 반응 능력을 병합하여, 2-아미노아디페이트, 5-아미노펜타노에이트, 2-옥소아디페이트, 글루타릴-CoA, 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 3-하이드록시프로피오닐-CoA 또는 피루베이트로부터 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하는 대사 경로를 구축하여, 동정되었다. 미생물에서 이들 기질 또는 대사 중간체 각각으로부터 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생합성하는 인 실리코 대사 설계가 확인되었다.
- [0017] 플랫폼의 전산 컴포넌트(*computational component*)를 통해 동정된 균주들은 예상되는 대사적 변이들 중 임의의 변이를 유전학적으로 조작함으로써 실제 생산에 투입시킬 수 있으며, 2,4-펜타디엔노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 기타 중간체 및/또는 하위 산물의 생합성 생산을 유도할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 이들 화합물들을 생합성하는 균주는, 추가적으로 산물의 생합성을 증대시키기 위해 적응 진화를 추가로 수행할 수 있다. 또한, 적응 진화를 거친 후 산물의 생합성 수율 수준은 시스템의 전산 컴포넌트를 통해 예측할 수 있다.
- [0018] 글루코스로부터 2,4-펜타디엔노에이트를 생산하는 이론적인 최대 수율은 1.09 mol/mol (0.59 g/g)이다:
- [0019]
$$11 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 12 \text{ C}_5\text{H}_8\text{O}_2 + 6 \text{ CO}_2 + 30 \text{ H}_2\text{O}$$
- [0020] 도 1에 나타난 경로에서는, 이용되는 글루코스 1 몰 당 2,4-펜타디엔노에이트 0.85 몰의 수율이 달성된다. 세포가 환원성 (또는 역) TCA 사이클 또는 Wood-Ljungdahl 경로 등의 경로를 통해 CO₂를 고정할 수 있다면, 산물의 수율 증가가 가능하다. 또한, 도 1에 도시된 경로를 가지도록 조작된 유기체는 2,4-펜타디엔노에이트의 거의 이론적 최대치에 도달할 수 있다.
- [0021] 글루코스로부터 부타디엔을 생산하는 이론적인 최대 수율은 1.09 mol/mol (0.327g/g)이다.
- [0022]
$$11 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 12 \text{ C}_4\text{H}_6 + 18 \text{ CO}_2 + 30 \text{ H}_2\text{O}$$
- [0023] 도 1에 나타난 경로에서는, 이용되는 글루코스 1 몰 당 부타디엔 0.85 몰의 수율이 달성된다. 세포가 환원성

(또는 역) TCA 사이클 또는 Wood-Ljungdahl 경로 등의 경로를 통해 CO₂를 고정할 수 있다면, 산물의 수율이 거의 이론적 최대치로의 증가가 가능하다. 또한, 도 5, 6 또는 1에 도시된 경로를 도 12에 도시된 경로와 조합하여 가지도록 조작된 유기체는 부타디엔의 거의 이론적 최대치에 도달할 수 있다.

[0024] 글루코스로부터 1,3-부탄디올을 생산하는 이론적인 최대 수율은 1.09 mol/mol (0.54 g/g)이다.

[0025] $11 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 12 \text{ C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2 + 18 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$

[0026] 도 5에 나타낸 경로에서는, 이용되는 글루코스 1 몰 당 1,3-부탄디올 1 몰의 수율이 달성된다. 세포가 환원성 (또는 역) TCA 사이클 또는 Wood-Ljungdahl 경로 등의 경로를 통해 CO₂를 고정할 수 있다면, 산물의 수율이 거의 이론적 최대치로의 증가가 가능하다. 또한, 도 7에 도시된 경로를 가지도록 조작된 유기체는 1,3-부탄디올의 거의 이론적 최대치에 도달할 수 있다.

[0027] 글루코스로부터 3-부텐-1-올을 생산하는 이론적인 최대 수율은 1.09 mol/mol (0.437 g/g)이다.

[0028] $11 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 12 \text{ C}_4\text{H}_8\text{O} + 18 \text{ CO}_2 + 18 \text{ H}_2\text{O}$

[0029] 도 1에 나타낸 경로에서는, 이용되는 글루코스 1 몰 당 3-부텐-1-올 0.85 몰의 수율이 달성된다. 세포가 환원성 (또는 역) TCA 사이클 또는 Wood-Ljungdahl 경로 등의 경로를 통해 CO₂를 고정할 수 있다면, 산물의 수율이 거의 이론적 최대치로의 증가가 가능하다. 또한, 도 5에 도시된 경로를 가지도록 조작된 유기체는 부타디엔의 거의 이론적 최대치에 도달할 수 있다.

[0030] 글루코스로부터 크로틸 알코올을 생산하는 이론적인 최대 수율은 1.09 mol/mol (0.436 g/g)이다.

[0031] $11 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 12 \text{ C}_4\text{H}_8\text{O} + 18 \text{ CO}_2 + 18 \text{ H}_2\text{O}$

[0032] 도 7에 나타낸 경로에서는, 이용되는 글루코스 1 몰 당 크로틸 알코올 1.08 몰의 수율이 달성된다. 세포가 환원성 (또는 역) TCA 사이클 또는 Wood-Ljungdahl 경로 등의 경로를 통해 CO₂를 고정할 수 있다면, 산물의 수율이 거의 이론적 최대치로의 증가가 가능하다.

[0033] 글루코스로부터 프로필렌을 생산하는 이론적인 최대 수율은 1.33 mol/mol (0.31 g/g)이다.

[0034] $3 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 4 \text{ C}_4\text{H}_8\text{O} + 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$

[0035] 도 7에 나타낸 경로에서는, 이용되는 글루코스 1 몰 당 프로필렌 1.2 몰의 수율이 달성된다. 세포가 환원성 (또는 역) TCA 사이클 또는 Wood-Ljungdahl 경로 등의 경로를 통해 CO₂를 고정할 수 있다면, 산물의 수율이 거의 이론적 최대치로의 증가가 가능하다.

[0036] 본원에서, 용어 "비천연(non-naturally occurring)"은, 본 발명의 미생물 유기체 또는 미생물에 대해 사용되는 경우, 언급된 종의 야생형 균주를 비롯하여, 언급된 종의 천연 균주에서는 정상적으로는 발견되지 않는 하나 이상의 유전자 변형을 포함한다는 의미이다. 유전자 변형은, 예를 들어, 대사 폴리펩타이드를 코딩하는 발현 가능한 핵산의 도입, 다른 핵산의 부가, 핵산의 결손 및/또는 미생물 유기체의 유전 물질의 기타 기능적 파괴를 포함한다. 이러한 변형은, 예컨대, 언급된 종에 대해 이중, 상동, 또는 이중 및 상동의 폴리펩타이드에 대한 코딩 영역 및 이의 기능성 단편을 포함한다. 다른 변형으로는, 예컨대 상기 변형이 유전자 또는 오페론의 발현을 변형시키는 비-코딩 조절 영역을 포함한다. 예시적인 대사 폴리펩타이드는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로의 효소 또는 단백질을 포함한다.

[0037] 대사 변형은 이의 본래의 상태에서 변형된 생화학적 반응을 지칭한다. 따라서, 비-천연성 미생물은 대사 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 단편을 코딩하는 핵산에 대한 유전자 변형을 포함할 수 있다. 대사 변형의 예는 본원에 기술되어 있다.

[0038] 본원에서, 용어 "분리된"은 미생물 유기체에 대해 사용되는 경우, 이는 언급된 미생물 유기체가 자연 상태에서 발견될 때의 성분들 중 하나 이상이 실질적으로 결여된 유기체를 의미한다. 이 용어는 자연 환경에서 발견될 때의 성분들 일부 또는 전체가 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 또한, 이 용어는 미생물 유기체가 비천연 환경에서 발견될 때의 성분들이 부분적으로 또는 전체가 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 즉, 분리된 미생물 유기체는 유기체가 자연에서 발견되거나 또는 비천연 환경에서 증식, 보관 또는 유지될 때의 기타 성분들로부터

일부 또는 완전히 분리된다. 분리된 미생물 유기체의 구체적인 예로는 부분적으로 순수한 미생물, 실질적으로 순수한 미생물 및 비천연성 배지에서 배양된 미생물을 포함한다.

[0039] 본원에서, 용어 "미생물(microbial)", "미생물 유기체" 또는 "미생물(microorganism)"은 고세균, 박테리아 또는 진핵생물류에 속하는 미시 세포로서 존재하는 모든 유기체를 의미한다. 즉, 이 용어는 미시적인 크기의 원핵 또는 진핵 세포 또는 유기체를 포괄하며, 모든 종의 박테리아, 고세균류 및 유박테리아(eubacteria) 뿐만 아니라 효모 및 진균과 같은 진핵 미생물을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 이 용어는 생화학적으로 생산하기 위해 배양할 수 있는 임의 종의 세포 배양물을 포함한다.

[0040] 본원에서, 용어 "CoA" 또는 "코엔자임 A"는, 활성 효소 시스템을 만들기 위해 다수 효소(주효소(apoenzyme))의 활성화에 필요한 유기 조인자 또는 보결기(효소의 비단백질 영역)를 의미한다. 코엔자임 A는 특정 축합 효소에 작용하며, 아세틸 또는 기타 아실기를 전달시키는 작용을 하며, 지방산 합성 및 산화, 피루베이트 산화 및 기타 아세틸화에 관여한다.

[0041] 본원에서, 용어 "ACP" 또는 "아실 캐리어 단백질"은 박테리아에서 식물에 이르는 다수 유기체들의 지방산 신진대사 시스템과 조합된 비교적 작은 임의의 산성 단백질을 지칭한다. ACP는 세린 잔기의 하이드록시기와 포스페이트 에스테르 결합함으로써 공유적으로 결합된 4'-포스포판테테인 보결기를 하나 포함할 수 있다. 4'-포스포판테테인 모이어티의 설프하이드릴 기는 지방산 합성시 아실 중간체가 (티오)에스테르화되는 앵커(anchor)로서 이용된다. ACP의 예는 포스포판테테인기가 세린 36에 연결된 아미노산 잔기 77개 (8.85 kDa)를 포함하는 개별 단일 단백질인 *Escherichia coli* ACP이다.

[0042] 본원에서, 용어 "부타디엔"은 분자식이 C_4H_6 이고 분자량이 54.09 g/mol (도 1, 5, 6 및 12) (IUPAC 명칭 부타-1,3-디엔)로서, 1,3-부타디엔, 바이에틸렌, 에리트렌, 디비닐, 비닐에틸렌과 상호 호환적으로 사용된다. 부타디엔은 약학 아로마 또는 가솔린과 비슷한 냄새를 가진 무색의 비-부식성 액화 가스이다. 부타디엔은 낮은 인화점으로 인해 폭발성이고 가연성이다.

[0043] 본원에서, 용어 "실질적으로 혐기성"은 배양 또는 성장 조건에 대해 사용되는 경우, 산소의 양이 액체 매질내 용해 산소 포화도 약 10% 미만임을 의미한다. 또한, 이 용어는 약 1% 미만의 산소 분위기로 유지되는 액체 또는 고체 배지가 들어있는 밀폐된 챔버를 포괄하는 의미이다.

[0044] 본원에서 "외인성"은 언급된 분자 또는 활성이 숙주 미생물 유기체에 도입되는 것을 의미한다. 상기 분자는, 예컨대, 플라스미드와 같은 숙주 염색체 또는 비-염색체성 유전 물질내로의 삽입에 의해서와 같이, 코딩 핵산을 숙주 유전 물질에 도입함으로써, 도입될 수 있다. 따라서, 이 용어는, 코딩 핵산의 발현에 대해 사용되는 바와 같이, 발현가능한 형태로 코딩 핵산을 미생물 유기체에 도입하는 것을 의미한다. 생합성 활성화에 대해 사용되는 경우, 이 용어는 숙주 참조 유기체에 도입되는 활성을 지칭한다. 그 소스는, 예컨대 숙주 미생물 유기체로 도입되어 언급된 활성을 발현하는 동종의 또는 이종의 코딩 핵산일 수 있다. 따라서, 용어 "내인성"은 숙주에 존재하는 언급된 분자 또는 활성에 대해 사용된다. 마찬가지로, 이 용어는, 코딩 핵산의 발현에 대해 사용되는 경우, 미생물 유기체에 함유된 코딩 핵산의 발현을 지칭한다. 용어 "이종"은 언급된 종 이외의 소스로부터 유래된 분자 또는 활성을 지칭하며, "동종"은 숙주 미생물 유기체로부터 유래된 분자 또는 활성을 지칭한다. 즉, 본 발명의 코딩 핵산의 외인성 발현시 이종 또는 동종의 코딩 핵산 중 어느 하나 또는 둘다를 이용할 수 있다.

[0045] 2종 이상의 외인성 핵산이 미생물 유기체에 포함되는 경우, 2종 이상의 외인성 핵산은 전술한 바와 같이 언급된 코딩 핵산 또는 생합성 활성을 지칭하는 것으로 이해된다. 또한, 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 2종 이상의 외인성 핵산은 숙주 미생물 유기체에 별개의 핵산 분자로, 폴리시스트론 핵산 분자로 또는 이의 조합으로 도입될 수 있으며, 여전히 2종 이상의 외인성 핵산으로서 간주될 수 있는 것으로 또한 이해된다. 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 미생물 유기체는 원하는 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 2종 이상의 외인성 핵산을 발현하도록 조작할 수 있다. 원하는 활성을 코딩하는 2개의 외인성 핵산이 숙주 미생물 유기체로 도입되는 경우, 상기 2개의 외인성 핵산은 단일 핵산으로서, 예컨대 단일 플라스미드 형태로 또는 분리된 플라스미드 형태로 도입될 수 있으며, 숙주 염색체에서 단일 부위 또는 복수의 부위에 통합될 수 있으며, 여전히 2개의 외인성 핵산으로 간주되는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 3개 이상의 외인성 핵산을, 숙주 유기체에 임의의 바람직한 조합으로, 예컨대 단일 플라스미드로, 각각의 개별 플라스미드로 도입할 수 있으며, 숙주 염색체에서 단일 위치 또는 복수 위치로 삽입할 수 있으며, 여전히 2종 이상의 외인성 핵산, 예컨대 3개의 외인성 핵산으로 간주되는 것으로 이해된다. 따라서, 언급되는 외인성 핵산 또는 생합성 활성의 수는 숙주 유기체로 도입되는 개별 핵산의 수를 지칭하는 것이 아니라, 코딩 핵산의 수 또는 생합성 활성의 수를 지칭한다.

- [0046] 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체는 안정적인 유전자 변형을 포함할 수 있는데, 이는 상기한 변형을 유지하면서 5 세대 이상 배양할 수 있는 미생물을 지칭한다. 일반적으로, 안정적인 유전자 변형은 10 세대 이상 유지되는 변형을 포함하며, 특히 안정적인 변형은 약 25 세대 이상 유지될 것이며, 보다 구체적으로는 안정적인 유전자 변형은 무한정을 비롯하여 50 세대 이상 유지될 것이다.
- [0047] 당해 기술 분야의 당업자라면, 본원에 예시된 대사적 변이를 포함한 유전자 변형이, 에스케리키아 콜라이와 같은 적정 숙주 유기체와 이의 해당 대사 반응 또는 원하는 대사 경로에 관여하는 유전자 등의 바람직한 유전 물질에 대해 적합한 소스 유기체를 참조하여 기술됨을 알 것이다. 그러나, 매우 다양한 유기체의 전체 게놈 서열 분석과 게놈학 분야의 높은 기술 수준을 감안하면, 당해 기술 분야의 당업자는 본원에 기술된 내용 및 설명을 다른 모든 유기체들에도 적용할 수 있음을 쉽게 알 것이다. 예를 들어, 본원에 예시된 에스케리키아 콜라이의 대사 변형은 언급된 종이 아닌 다른 종 유래의 동일 또는 유사 코딩 핵산을 병합함으로써, 다른 종에도 쉽게 적용할 수 있다. 이러한 유전자 변형으로는, 예컨대 일반적으로 종 상동체들의 유전자 변형이 있으며, 구체적으로 오르소로그(ortholog), 파라로그(paralog) 또는 비-오르소로그형 유전자 치환(non-orthologous gene displacement)을 포함한다.
- [0048] 오르소로그는 수직 직계(vertical descent) 관계이며, 여러가지 유기체들에서 실질적으로 동일하거나 상동한 기능을 담당하는 유전자 또는 유전자들이다. 예를 들어, 마우스 에폭사이드 하이드롤라제와 인간 에폭사이드 하이드롤라제는 에폭사이드의 가수분해라는 생물학적 기능상 오르소로그로 간주할 수 있다. 유전자들은, 예컨대 유전자들이 상동적이거나 또는 공통 조상으로부터 진화적으로 관련있는 것으로 지칭되기에 충분한 서열 유사성을 공유하는 경우, 수직 직계 관계이다. 또한, 유전자는, 3차 구조를 공유하지만, 1차 서열 유사성이 확인불가한 수준으로 공통 조상으로부터 진화된 것임을 의미하는 충분한 수준의 서열 유사성을 반드시 가지고 있지 않은 경우에도, 오르소로그로 간주할 수 있다. 오르소로그인 유전자들은 아미노산 서열 동일성이 약 25% 내지 100%인 서열 유사성을 가진 단백질을 코딩할 수 있다. 25% 미만의 아미노산 유사성을 공유하는 단백질을 코딩하는 유전자들 역시, 이들의 3차원 구조에 유사성이 있다면, 수직 직계에 의해 생겨난 것으로 간주할 수 있다. 조직 플라스미노겐 활성화 및 엘라스타제 등의 세린 프로테아제 유형의 효소의 구성원들은 공통 조상의 수직 직계에서 생겨난 것으로 간주된다.
- [0049] 오르소로그는, 예를 들어, 진화를 통해 구조적으로 또는 전체 활성 측면에서 분화된 유전자, 또는 이로 코딩되는 유전자 산물을 포함한다. 예를 들어, 어떤 종이 2가지 기능을 나타내는 유전자 산물을 코딩하고 있으며 이 기능들이 제2의 종에서는 별개의 유전자로 분리되어 있는 경우, 이들 3종의 유전자와 이의 대응 산물들은 오르소로그로 간주된다. 생화학적 산물의 제조시, 당해 기술 분야의 당업자들은, 비-천연성 미생물을 구축하기 위해, 도입 또는 파괴할 대사 활성을 가지고 있는 오르소로그형 유전자를 선택해야 함을 알 것이다. 분리가능한 활성을 나타내는 오르소로그의 예는, 개개 활성이 2종 이상의 종들에서 또는 하나의 종에서 개별 유전자 산물로 분리되어 있는 경우이다. 구체적인 예는, 세린 프로테아제의 2가지 활성인 엘라스타제 단백질 분해 활성과 플라스미노겐 단백질 분해 활성이, 플라스미노겐 활성화 및 엘라스타제로서 개별 분자로 분리되는 경우이다. 두 번째 예는, 마이코플라스마 5'-3' 엑소뉴클레아제와 드로소필라 DNA 폴리머라제 III 활성이 분리되는 경우이다. 상기 첫 번째 종 유래의 DNA 폴리머라제는, 2번째 종 유래의 엑소뉴클레아제 또는 폴리머라제 중 어느 하나 또는 이들 둘다에 대해 오르소로그인 것으로 간주할 수 있으며, 그 역도 성립된다.
- [0050] 이와는 반대로, 파라로그는 예를 들어 복제와 이후 진화적 분화 관계에 있는 상동체이며, 유사하거나 공통되지만, 기능이 동일하진 않은 것이다. 파라로그는, 예컨대, 동일 종 또는 다른 종으로부터 기원하거나 유래될 수 있다. 예를 들어, 마이크로솜 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 I)와 가용성 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 II)는, 이들이 별개의 반응을 촉매하고, 동일 종에서 다른 기능을 가지고 있는, 공통 조상으로부터 함께 진화된 2개 별개의 효소이기 때문에, 파라로그로 간주될 수 있다. 파라로그는 서로 유의한 서열 유사성을 보이는 동일한 종으로부터 유래된 단백질들이므로, 이들은 상동적이거나 또는 공통 조상으로부터 함께 진화된 관계임을 시사한다. 파라로그 패밀리 그룹으로는 HipA 상동체, 루시퍼라제 유전자, 펩티다제 등이 있다.
- [0051] 비-오르소로그 유전자 치환(nonorthologous gene displacement)은 다른 종에서 언급된 유전자의 기능을 치환할 수 있는 어떤 종 유래의 비-오르소로그 유전자이다. 치환은, 예를 들어 다른 종들에서 언급된 기능과 비교하여, 기원 종에서 실질적으로 동일하거나 유사한 작용을 수행할 수 있음을 포함한다. 일반적으로, 비-오르소로그 유전자 치환은 언급된 기능을 코딩하는 공지된 유전자와 구조적으로 관련있는 것으로 구분할 수 있지만, 구조적으로는 관련성이 낮지만 기능적으로는 유사한 유전자 및 이의 유전자 산물도 그럼에도 불구하고 여전히 본 발명에서 사용되는 용어의 의미에 포함될 것이다. 기능 유사성에는, 예를 들어 치환하고자 하는 기능을

코딩하는 유전자에 대해, 비-오르소로그 유전자 산물의 활성부 또는 결합부에서의 어느 정도 이상의 구조 유사성이 요구된다. 따라서, 비-오르소로그 유전자는 예를 들어 파라로그 또는 비관련 유전자를 포함한다.

[0052] 따라서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 능력을 갖춘 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체를 동정하고 구축함에 있어, 당해 기술 분야의 당업자들은, 본 발명에 제공된 교시 및 지침을 특정 종들에 적용하여, 대사 변형 확인에 오르소로그의 동정 및 이의 함유 또는 불활성화가 포함될 수 있음을 인지할 것이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 또한, 파라로그 및/또는 비-오르소로그 유전자 치환이, 유사하거나 또는 실질적으로 유사한 대사 반응을 촉매하는 효소를 코딩하는 참조 미생물에 존재하는 한, 진화적으로 관련성 있는 유전자들을 사용할 수 있다.

[0053] 오르소로그, 파라로그 및 비-오르소로그 유전자 치환은 당해 기술 분야의 당업자에게 널리 공지된 방법으로 결정할 수 있다. 예를 들어, 2개의 폴리펩타이드에 대해 핵산 또는 아미노산 서열을 검사하여, 상기 비교되는 서열들 간의 서열 동일성과 유사성을 확인한다. 이러한 유사성을 토대로, 당해 기술 분야의 당업자는 상기 유사성이 상기 단백질들이 공통 조상으로부터 진화된 관계임을 의미할 만큼 충분히 높은지를 결정할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자들에게 널리 공지된 알고리즘, 예컨대 Align, BLAST, Clustal W 등으로 원(raw) 서열의 유사성 또는 동일성을 비교 및 확인하며, 또한, 웨이트 또는 스코어를 할당할 수 있는 서열내 갭의 존재나 유의 수준을 정할 수 있다. 이러한 알고리즘들은 또한 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 뉴클레오타이드 서열 유사성 또는 동일성 결정에 마찬가지로 적용가능하다. 관계(relatedness)를 정할 만큼 충분한 유사성에 대한 매개변수들은, 널리 공지된 통계학적 유사성 계산법, 또는 랜덤 폴리펩타이드내에서 유사한 매칭을 발견할 확률, 그리고 확인된 매칭의 유의 수준을 근거로 산정된다. 2개 이상 서열들의 컴퓨터 비교는, 또한, 필요한 경우, 당해 기술 분야의 당업자에 의해 가시적으로 최적화할 수 있다. 관련 유전자 산물 또는 단백질은 높은 유사성, 예를 들어 25% 내지 100%의 서열 동일성을 가지는 것으로 볼 수 있다. 비관련 단백질은, 충분한 크기의 데이터 베이스 검색시 우연히 발생할 수 있는 수준과 기본적으로 동일한 동일성(약 5%)을 가질 수 있다. 5% 내지 24%의 서열이, 비교 서열들과 관련성 있다고 판단할 만큼 충분한 상동성을 보이거나 그렇지 않을 수 있다. 데이터 세트의 크기를 제시하는 이러한 매칭 유의 수준을 결정하기 위한 추가적인 통계학적 분석을 수행하여, 이들 서열들의 관련성을 결정할 수 있다.

[0054] BLAST 알고리즘을 이용하여 2종 이상의 서열의 관계를 측정하기 위한 매개변수의 예는, 다음과 같을 수 있다. 간략하게는, 아미노산 서열 정렬은 BLASTP 버전 2.0.8(1999년 1월 5일) 및 하기의 매개변수들을 사용하여 수행할 수 있다: 매트릭스: 0 BLOSUM62; 갭 오픈(gap open): 11; 갭 연장(gap extension): 1; x_드롭오프: 50; 예상: 10.0; 워드크기: 3; 필터: 온(on). 핵산 서열 정렬은 BLASTN 버전 2.0.6(1998년 9월 16일) 및 하기의 매개변수들을 사용하여 수행할 수 있다: 매치: 1; 미스매치: -2; 갭 오픈: 5; 갭 연장: 2; x_드롭오프: 50; 예상: 10.0; 워드크기: 11; 필터: 오프. 당해 기술 분야의 당업자는, 상기 매개변수들에 대해 예를 들어 상기 비교의 엄격성을 높이거나 낮추고, 2종 이상 서열의 관계를 정하기 위한 변형을 가할 수 있음을 알 것이다.

[0055] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 2,4-펜타디에노에이트 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하여, 비-천연성 미생물 유기체를 제공하며, 상기 경로는 (1) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K 및 1G; (2) 1D, 1E, 1F 및 1G; (3) 1D, 1E, 1L, 1M, 1P 및 1G; (4) 1D, 1I, 1B 및 1J; (5) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N 및 10; (6) 1D, 1E, 1F, 1P, 1N 및 10; (7) 1D, 1E, 1L, 1M, 1N 및 10; (8) 1D, 1E, 1L, 1Q 및 10; (9) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K 및 1G; (10) 1S, 1E, 1F 및 1G; (11) 1S, 1I, 1B 및 1J; (12) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N 및 10; (13) 1S, 1E, 1F, 1P, 1N 및 10; (14) 1S, 1E, 1L, 1M, 1N 및 10; (15) 1S, 1E, 1L, 1Q 및 10; (16) 1B, 1C, 1K 및 1G; (17) 1I, 1E, 1F 및 1G; (18) 1I, 1E, 1L, 1M, 1P 및 1G; (19) 1B 및 1J; (20) 1I, 1E, 1F, 1P, 1N 및 10; (21) 1I, 1E, 1L, 1M, 1N 및 10; (22) 1I, 1E, 1L, 1Q 및 10; (23) 3A, 3B, 3C, 3D, 3E 및 3F; 및 (24) 3A, 3B, 3C, 3G 및 3F로부터 선택되는 도 1 및/또는 3에 도시된 경로를 포함하며, 여기서 1B는 5-아미노펜타노에이트 리덕타제이고, 1C는 5-아미노펜트-2-에노에이트 아미노트랜스퍼라제, 5-아미노펜트-2-에노에이트 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제이고, 1D는 2-옥소아디페이트 데카르복실라제이고, 1E는 글루타레이트 세미알데하이드 리덕타제이고, 1F는 5-하이드록시발레레이트 데하이드로게나제이고, 1G는 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 데하이드라타제이고, 1I는 5-아미노펜타노에이트 아미노트랜스퍼라제, 5-아미노펜타노에이트 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제이고, 1J는 5-아미노펜트-2-에노에이트 데아미나제이고, 1K는 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 리덕타제이고, 1L은 5-하이드록시발레릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 5-하이드록시발레릴-CoA 신테타제이고, 1M은 5-하이드록시펜타노일-CoA 데하이드로게나제이고, 1N은 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 데하이드라타제이고, 10는 2,4-펜타디에노일-CoA 트랜스퍼라제, 2,4-펜타디에노일-CoA 신테타제 또는 2,4-펜타디에노

일-CoA 하이드롤라제이고, 1P는 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 트랜스퍼라제 또는 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 신테타제이고, 1Q는 5-하이드록시발레릴-CoA 데하이드라타제/데하이드로게나제이고, 1S는 글루타릴-CoA 리덕타제이고, 3A는 3-옥소펜타노일-CoA 티올라제 또는 3-옥소펜타노일-CoA 신타제이고, 3B는 3-옥소펜타노일-CoA 리덕타제이고, 3C는 3-하이드록시펜타노일-CoA 데하이드라타제이고, 3D는 펜트-2-에노일-CoA 이소머라제이고, 3E는 펜트-3-에노일-CoA 데하이드로게나제이고, 3F는 2,4-펜타디에노일-CoA 하이드롤라제, 2,4-펜타디에노일-CoA 트랜스퍼라제 또는 2,4-펜타디에노일-CoA 신테타제이고, 3G는 펜트-2-에노일-CoA 데하이드로게나제이다.

[0056] 본 발명의 일부 측면들에서, 미생물 유기체는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 각각 코딩하는 외인성 핵산을 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 포함할 수 있다. 본 발명의 일부 측면들에서, 미생물 유기체는 전술한 바와 같이 (1)-(24)로부터 선택되는 한가지 이상의 경로의 효소들 각각을 코딩하는 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 일부 측면들에서, 하나 이상의 외인성 핵산은 이중 핵산이다. 일부 측면들에서, 비-천연성 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지 중에 존재한다.

[0057] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 전술한 바와 같이 (9)-(15)로부터 선택되는 2,4-펜타디에노에이트 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체가 글루타릴-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 글루타릴-CoA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 글루타릴-CoA 경로를 추가로 포함하는, 본원에 기술된 비-천연성 미생물 유기체를 제공하며, 여기서 글루타릴-CoA 경로는 아세트아세틸-CoA 티올라제 또는 아세트아세틸-CoA 신타제; 아세트아세틸-CoA 리덕타제; 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 글루타릴-CoA 데하이드로게나제; 또는 2-아미노아디페이트 아미노트랜스퍼라제, 2-아미노아디페이트 데하이드로게나제 또는 2-아미노아디페이트 아민 옥시다제; 및 2-옥소아디페이트 데하이드로게나제, 2-옥소아디페이트:페리독신 옥시도리덕타제 또는 2-옥소아디페이트 포르메이트 리아제로부터 선택되는 경로를 가진다.

[0058] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 전술한 바와 같이 (16)-(22)로부터 선택되는 2,4-펜타디에노에이트 경로를 구비한 비천연성 미생물 유기체가 5-아미노펜타노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 5-아미노펜타노에이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 5-아미노펜타노에이트 경로를 추가로 포함하는, 본원에 기술된 비-천연성 미생물 유기체를 제공하며, 여기서 5-아미노펜타노에이트 경로는 2-아미노아디페이트 데카르복실라제; 또는 2-아미노아디페이트 데카르복실라제 및 2-아미노아디페이트 아미노트랜스퍼라제, 2-아미노아디페이트 데하이드로게나제 또는 2-아미노아디페이트 아민 옥시다제를 포함한다.

[0059] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 전술한 바와 같이 (1)-(8)로부터 선택되는 2,4-펜타디에노에이트 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체가 2-옥소아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2-옥소아디페이트 경로 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 포함하는 2-옥소아디페이트 경로를 더 포함하는, 본원에 기술된 비-천연성 미생물 유기체를 제공하며, 여기서 2-옥소아디페이트 경로는 2-아미노아디페이트 아미노트랜스퍼라제, 2-아미노아디페이트 데하이드로게나제 또는 2-아미노아디페이트 아민 옥시다제를 포함한다.

[0060] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 2,4-펜타디에노에이트 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체를 제공하며, 여기서 2,4-펜타디에노에이트 경로는 전술한 경로를 포함하며, 추가적으로, (i) 환원적 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 환원적 TCA 경로로서, 하나 이상의 외인성 핵산이 ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제로부터 선택되는 것인 환원적 RCA 경로; (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 환원적 TCA 경로로서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산이 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제로부터 선택되는 것인, 환원적 TCA 경로; 또는 (iii) CO 데하이드로게나제, H₂ 하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진다.

[0061] 일부 측면들에서, 전술한 (i)를 구비한 미생물 유기체는, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, 아세테이트 키나제, 포스포트랜스아세틸라제, 아세틸-CoA 신테타제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 페레독신 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 일부 측면들에서, (ii)를 구비한 미생물 유기체는, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 일부 측면들에서, 전술한 (i)를 구비한 미생물 유기체는, ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제를 코

당하는 4개의 외인성 핵산을 포함하거나; (ii)를 구비한 미생물 유기체는, 전술한 바와 같이, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제, 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 5종의 외인성 핵산을 포함하거나; 또는 (iii)를 구비한 전술한 미생물 유기체는 CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다.

[0062] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하는 조건과 충분한 시간 동안 본원에 기술된 비-천연성 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트의 생산 방법을 제공한다.

[0063] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 부타디엔 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하여, 이때 부타디엔 경로는, (1) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1G 및 1T; (2) 1D, 1E, 1F, 1G 및 1T; (3) 1D, 1E, 1L, 1M, 1P, 1G 및 1T; (4) 1D, 1I, 1B, 1J 및 1T; (5) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N, 1O 및 1T; (6) 1D, 1E, 1F, 1P, 1N, 1O 및 1T; (7) 1D, 1E, 1L, 1M, 1N, 1O 및 1T; (8) 1D, 1E, 1L, 1Q, 1O 및 1T; (9) 1D, 1E, 1F, 1U 및 1V; (10) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1U 및 1V; (11) 1D, 1E, 1L, 1M, 1P, 1U 및 1V; (12) 1D, 1E, 1W 및 1V; (13) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1G, 6A 및 6B; (14) 1D, 1E, 1F, 1G, 6A 및 6B; (15) 1D, 1E, 1L, 1M, 1P, 1G, 6A 및 6B; (16) 1D, 1I, 1B, 1J, 6A 및 6B; (17) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N, 1O, 6A 및 6B; (18) 1D, 1E, 1F, 1P, 1N, 1O, 6A 및 6B; (19) 1D, 1E, 1L, 1M, 1N, 1O, 6A 및 6B; (20) 1D, 1E, 1L, 1Q, 1O, 6A 및 6B; (21) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1G, 6H, 6E 및 6B; (22) 1D, 1E, 1F, 1G, 6H, 6E 및 6B; (23) 1D, 1E, 1L, 1M, 1P, 1G, 6H, 6E 및 6B; (24) 1D, 1I, 1B, 1J, 6H, 6E 및 6B; (25) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N, 1O, 6H, 6E 및 6B; (26) 1D, 1E, 1F, 1P, 1N, 1O, 6H, 6E 및 6B; (27) 1D, 1E, 1L, 1M, 1N, 1O, 6H, 6E 및 6B; (28) 1D, 1E, 1L, 1Q, 1O, 6H, 6E 및 6B; (29) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N, 6C 및 6B; (30) 1D, 1E, 1F, 1P, 1N, 6C 및 6B; (31) 1D, 1E, 1L, 1M, 1N, 6C 및 6B; (32) 1D, 1E, 1L, 1Q, 6C 및 6B; (33) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N, 6D, 6E 및 6B; (34) 1D, 1E, 1F, 1P, 1N, 6D, 6E 및 6B; (35) 1D, 1E, 1L, 1M, 1N, 6D, 6E 및 6B; (36) 1D, 1E, 1L, 1Q, 6D, 6E 및 6B; (37) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1G, 6F, 6C 및 6B; (38) 1D, 1E, 1F, 1G, 6F, 6C 및 6B; (39) 1D, 1E, 1L, 1M, 1P, 1G, 6F, 6C 및 6B; (40) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K, 1G, 6F, 6D, 6E 및 6B; (41) 1D, 1E, 1F, 1G, 6F, 6D, 6E 및 6B; (42) 1D, 1E, 1L, 1M, 1P, 1G, 6F, 6D, 6E 및 6B; (43) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1G 및 1T; (44) 1S, 1E, 1F, 1G 및 1T; (45) 1S, 1I, 1B, 1J 및 1T; (46) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N, 1O 및 1T; (47) 1S, 1E, 1F, 1P, 1N, 1O 및 1T; (48) 1S, 1E, 1L, 1M, 1N, 1O 및 1T; (49) 1S, 1E, 1L, 1Q, 1O 및 1T; (50) 1S, 1E, 1F, 1U 및 1V; (51) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1U 및 1V; (52) 1S, 1E, 1L, 1M, 1P, 1U 및 1V; (53) 1S, 1E, 1W 및 1V; (54) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1G, 6A 및 6B; (55) 1S, 1E, 1F, 1G, 6A 및 6B; (56) 1S, 1I, 1B, 1J, 6A 및 6B; (57) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N, 1O, 6A 및 6B; (58) 1S, 1E, 1F, 1P, 1N, 1O, 6A 및 6B; (59) 1S, 1E, 1L, 1M, 1N, 1O, 6A 및 6B; (60) 1S, 1E, 1L, 1Q, 1O, 6A 및 6B; (61) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1G, 6H, 6E 및 6B; (62) 1S, 1E, 1F, 1G, 6H, 6E 및 6B; (63) 1S, 1I, 1B, 1J, 6H, 6E 및 6B; (64) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N, 1O, 6H, 6E 및 6B; (65) 1S, 1E, 1F, 1P, 1N, 1O, 6H, 6E 및 6B; (66) 1S, 1E, 1L, 1M, 1N, 1O, 6H, 6E 및 6B; (67) 1S, 1E, 1L, 1Q, 1O, 6H, 6E 및 6B; (68) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N, 6C 및 6B; (69) 1S, 1E, 1F, 1P, 1N, 6C 및 6B; (70) 1S, 1E, 1L, 1M, 1N, 6C 및 6B; (71) 1S, 1E, 1L, 1Q, 6C 및 6B; (72) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1P, 1N, 6D, 6E 및 6B; (73) 1S, 1E, 1F, 1P, 1N, 6D, 6E 및 6B; (74) 1S, 1E, 1L, 1M, 1N, 6D, 6E 및 6B; (75) 1S, 1E, 1L, 1Q, 6D, 6E 및 6B; (76) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1G, 6F, 6C 및 6B; (77) 1S, 1E, 1F, 1G, 6F, 6C 및 6B; (78) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K, 1G, 6F, 6D, 6E 및 6B; (79) 1S, 1E, 1F, 1G, 6F, 6D, 6E 및 6B; (80) 1B, 1C, 1K, 1G 및 1T; (81) 1I, 1E, 1F, 1G 및 1T; (82) 1I, 1E, 1L, 1M, 1P, 1G 및 1T; (83) 1B, 1J 및 1T; (84) 1I, 1E, 1F, 1P, 1N, 1O 및 1T; (85) 1I, 1E, 1L, 1M, 1N, 1O 및 1T; (86) 1I, 1E, 1L, 1Q, 1O 및 1T; (87) 1B, 1C, 1K, 1U 및 1V; (88) 1I, 1E, 1F, 1U 및 1V; (89) 1I, 1E, 1L, 1M, 1P, 1U 및 1V; (90) 1I, 1E, 1W 및 1V; (91) 1B, 1C, 1K, 1G, 6A 및 6B; (92) 1I, 1E, 1F, 1G, 6A 및 6B; (93) 1I, 1E, 1L, 1M, 1P, 1G, 6A 및 6B; (94) 1B, 1J, 6A 및 6B; (95) 1I, 1E, 1F, 1P, 1N, 1O, 6A 및 6B; (96) 1I, 1E, 1L, 1M, 1N, 1O, 6A 및 6B; (97) 1I, 1E, 1L, 1Q, 1O, 6A 및 6B; (98) 1B, 1C, 1K, 1G, 6H, 6E 및 6B; (99) 1I, 1E, 1F, 1G, 6H, 6E 및 6B; (100) 1I, 1E, 1L, 1M, 1P, 1G, 6H, 6E 및 6B; (101) 1B, 1J, 6H, 6E 및 6B; (102) 1I, 1E, 1F, 1P, 1N, 1O, 6H, 6E 및 6B; (103) 1I, 1E, 1L, 1M, 1N, 1O, 6H, 6E 및 6B; (104) 1I, 1E, 1L, 1Q, 1O, 6H, 6E 및 6B; (105) 1I, 1E, 1F, 1P, 1N, 6C 및 6B; (106) 1I, 1E, 1L, 1M, 1N, 6C 및 6B; (107) 1I, 1E, 1L, 1Q, 6C 및 6B; (108) 1I, 1E, 1F, 1P, 1N, 6D, 6E 및 6B; (109) 1I, 1E, 1L, 1M, 1N, 6D, 6E 및 6B; (110) 1I, 1E, 1L, 1Q, 6D, 6E 및 6B; (111) 1B, 1C, 1K, 1G, 6F, 6C 및 6B; (112) 1I, 1E, 1F, 1G, 6F, 6C 및 6B; (113) 1I, 1E, 1L, 1M, 1P, 1G, 6F, 6C 및 6B; (114) 1B, 1C, 1K, 1G, 6F, 6D, 6E 및 6B; (115) 1I, 1E, 1F, 1G, 6F, 6D, 6E 및 6B; (116) 1I, 1E, 1L, 1M, 1P, 1G, 6F, 6D, 6E 및 6B; (117) 3A, 3B, 3C, 3D,

3E, 3F 및 1T; (118) 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 6A 및 6B; (119) 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 6H, 6E 및 6B; (120) 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 6C 및 6B; (121) 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 6D, 6E 및 6B; 및 (122) 3A, 3B, 3C, 3G, 3F 및 1T; (123) 3A, 3B, 3C, 3G, 3F, 6A 및 6B; (124) 3A, 3B, 3C, 3G, 3F, 6H, 6E 및 6B; (125) 3A, 3B, 3C, 3G, 6C 및 6B; (126) 3A, 3B, 3C, 3G, 6D, 6E 및 6B; (127) 5A, 5B, 5C, 5D 및 5E; (128) 7A, 7J, 7R, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (129) 7A, 7H, 7F, 7R, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (130) 7A, 7H, 7Q, 7Z, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (131) 7A, 7H, 7Q, 7AC, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (132) 7A, 7D, 7I, 7R, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (133) 7A, 7D, 7E, 7F, 7R, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (134) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7Z, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (135) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7AC, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (136) 7A, 7D, 7P, 7N, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (137) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7Z, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (138) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7AC, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (139) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7V, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (140) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7AF, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (141) 7A, 7B, 7M, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (142) 7A, 7B, 7L, 7Z, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (143) 7A, 7B, 7L, 7AC, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (144) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7Z, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (145) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7AC, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (146) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7V, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (147) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7AF, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (148) 7A, 7B, 7C, 7U, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (149) 7A, 7B, 7C, 7T, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (150) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7AF, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (151) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7W, 12A, 12B 및 12C; (152) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7W, 12A, 12B 및 12C; (153) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7W, 12A, 12B 및 12C; (154) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7V, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (155) 7A, 7J, 7R, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (156) 7A, 7H, 7F, 7R, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (157) 7A, 7H, 7Q, 7Z, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (158) 7A, 7H, 7Q, 7AC, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (159) 7A, 7D, 7I, 7R, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (160) 7A, 7D, 7E, 7F, 7R, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (161) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7Z, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (164) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7AC, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (163) 7A, 7D, 7P, 7N, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (164) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7Z, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (165) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7AC, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (166) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7V, 7AH, 12D 및 12C; (167) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7AF, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (168) 7A, 7B, 7M, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (169) 7A, 7B, 7L, 7Z, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (170) 7A, 7B, 7L, 7AC, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (171) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7Z, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (172) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7AC, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (173) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7V, 7AH, 12D 및 12C; (174) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7AF, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (175) 7A, 7B, 7C, 7U, 7AH, 12D 및 12C; (176) 7A, 7B, 7C, 7T, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (177) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7AF, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (178) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7W, 12D 및 12C; (179) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7W, 12D 및 12C; (180) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7W, 12D 및 12C; (181) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7V, 7AH, 12D 및 12C; (182) 7I, 7R, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (183) 7E, 7F, 7R, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (184) 7E, 7Q, 7Z, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (185) 7E, 7Q, 7AC, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (186) 7P, 7N, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (187) 7P, 7Y, 7Z, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (188) 7P, 7Y, 7AC, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (189) 7P, 7AB, 7V, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (190) 7P, 7AB, 7AF, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (191) 7P, 7AB, 7W, 12A, 12B 및 12C; (192) 7I, 7R, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (193) 7E, 7F, 7R, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (194) 7E, 7Q, 7Z, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (195) 7E, 7Q, 7AC, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (196) 7P, 7N, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (197) 7P, 7Y, 7Z, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (198) 7P, 7Y, 7AC, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (199) 7P, 7AB, 7V, 7AH, 12D 및 12C; (200) 7P, 7AB, 7AF, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (201) 7P, 7AB, 7W, 12D 및 12C; (202) 7AS, 7I, 7R, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (203) 7AS, 7E, 7F, 7R, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (204) 7AS, 7E, 7Q, 7Z, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (205) 7AS, 7E, 7Q, 7AC, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (206) 7AS, 7P, 7N, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (207) 7AS, 7P, 7Y, 7Z, 7AD, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (208) 7AS, 7P, 7Y, 7AC, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (209) 7AS, 7P, 7AB, 7V, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (210) 7AS, 7P, 7AB, 7AF, 7AG, 7AH, 12A, 12B 및 12C; (211) 7AS, 7P, 7AB, 7W, 12A, 12B 및 12C; (212) 7AS, 7I, 7R, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (213) 7AS, 7E, 7F, 7R, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (214) 7AS, 7E, 7Q, 7Z, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (215) 7AS, 7E, 7Q, 7AC, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (216) 7AS, 7P, 7N, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (217) 7AS, 7P, 7Y, 7Z, 7AD, 7AH, 12D 및 12C; (218) 7AS, 7P, 7Y, 7AC, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; (219) 7AS, 7P, 7AB, 7V, 7AH, 12D 및 12C; (220) 7AS, 7P, 7AB, 7AF, 7AG, 7AH, 12D 및 12C; 및 (221) 7AS, 7P, 7AB, 7W, 12D 및 12C로부터 선택되는 도 1, 3, 5, 6 및/또는 12에 도시된 경로를 포함하며, 여기서 1B는 5-아미노펜타노에이트 리덕타제, 5-아미노펜트-2-에노에이트 아미노트랜스퍼라제, 5-아미노펜트-2-에노에이트 데하이드로게나제 또는 5-아미노펜트-2-에노에이트 아민 옥시다제이고, 1D는 2-옥소아디페이트 테카르복실라제이고, 1E는 글루타레이트 세미알데하이드 리덕타제이고, 1F는 5-하이드록시발레레이트 리덕타제이고, 1G는 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 테하이드라타제이고, 1I는 5-아미노펜타노에이트 아미노트랜스퍼라제, 5-아미노펜타노에이

트 데하이드로게나제 또는 5-아미노펜타노에이트 아민 옥시다제이고, 1J는 5-아미노펜트-4-에노에이트 데아미나제이고, 1K는 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 리덕타제이고, 1L은 5-하이드록시발레릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 5-하이드록시발레릴-CoA 신테타제이고, 1M은 5-하이드록시펜타노일-CoA 데하이드로게나제이고, 1N은 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 데하이드라타제이고, 1O는 2,4-펜타디에노일-CoA 트랜스퍼라제, 2,4-펜타디에노일-CoA 신테타제 또는 2,4-펜타디에노일-CoA 하이드롤라제이고, 1P는 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 트랜스퍼라제 또는 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 신테타제이고, 1Q는 5-하이드록시발레릴-CoA 데하이드라타제/데하이드로게나제이고, 1S는 글루타릴-CoA 리덕타제이고, 1T는 2,4-펜타디에노에이트 데카르복실라제이고, 1U는 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 데카르복실라제이고, 1V는 3-부텐-1-올 데하이드라타제이고, 1W는 5-하이드록시발레이트 데카르복실라제, 3A는 3-옥소펜타노일-CoA 티올라제 또는 3-옥소펜타노일-CoA 신타제이고, 3B는 3-옥소펜타노일-CoA 리덕타제이고, 3C는 3-하이드록시펜타노일-CoA 데하이드라타제이고, 3D는 펜트-2-에노일-CoA 이소머라제이고, 3E는 펜트-3-에노일-CoA 데하이드로게나제이고, 3F는 2,4-펜타디에노일-CoA 하이드롤라제, 2,4-펜타디에노일-CoA 트랜스퍼라제 또는 2,4-펜타디에노일-CoA 신테타제이고, 3G는 펜트-2-에노일-CoA 데하이드로게나제이고, 5A는 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 알돌라제이고, 5B는 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 데하이드라타제이고, 5C는 2-옥소펜타노에이트 데카르복실라제이고, 5D는 3-부텐-1-알 리덕타제이고, 5E는 3-부텐-1-올 데하이드라타제이고, 6A는 2,4-펜타디에노에이트 리덕타제 (산 환원)이고, 6B는 펜타-2,4-디에날데카르보닐라제이고, 6C는 2,4-펜타디에노일-CoA 리덕타제 (산 환원)이고, 6D는 2,4-펜타디에노일-Co포스포트랜스퍼라제이고, 6E는 2,4-펜타디에노일-포스페이트 리덕타제이고, 6F는 2,4-펜타디에노일-CoA 하이드롤라제, 2,4-펜타디에노일-CoA 트랜스퍼라제 또는 2,4-펜타디에노일-CoA 신테타제이고, 6H는 2,4-펜타디에노에이트 키나제이고, 7A는 3-케토아실-ACP 신타제이고, 7B는 아세토아세틸-ACP 리덕타제이고, 7C는 3-하이드록시부티릴-ACP 데하이드라타제이고, 7D는 아세토아세틸-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7E는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 신테타제이고, 7F는 아세토아세테이트 리덕타제 (산 환원)이고, 7H는 아세토아세틸-ACP 티오에스테라제이고, 7I는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존성, 알데하이드 형성)이고, 7J는 아세토아세틸-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7K는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (알코올 형성)이고, 7L은 3-하이드록시부티릴-ACP 티오에스테라제이고, 7M은 3-하이드록시부티릴-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7N은 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7O는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성)이고, 7P는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7Q는 아세토아세테이트 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7R은 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7T는 크로토닐-ACP 티오에스테라제이고, 7U는 크로토닐-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7V는 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7W는 크로토닐-CoA (알코올 형성)이고, 7X는 3-하이드록시부티릴-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7Y는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신테타제이고, 7Z는 3-하이드록시부티레이트 리덕타제이고, 7AB는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제이고, 7AC는 3-하이드록시부티레이트 데하이드라타제이고, 7AD는 3-하이드록시부티르알데하이드 데하이드라타제이고, 7AE는 크로토닐-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7AF는 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 크로토닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 크로토닐-CoA 신테타제이고, 7AG는 크로토네이트 리덕타제이고, 7AH는 크로톤알데하이드 리덕타제이고, 7AS는 아세토아세틸-CoA 신타제이고, 12A는 크로틸 알코올 키나제이고, 12B는 2-부테닐-4-포스페이트 키나제이고, 12C는 부타디엔 신타제이고, 12D는 크로틸 알코올 디포스포키나제이다.

[0064] 본 발명의 일부 측면들에서, 미생물 유기체는 부타디엔 경로 효소를 각각 코딩하는 외인성 핵산 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개를 포함할 수 있다. 일부 측면들에서, 미생물 유기체는 (1)-(221)로부터 선택되는 하나 이상의 경로의 효소 각각을 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 일부 측면들에서, 하나 이상의 외인성 핵산은 이중 핵산이다. 일부 측면들에서, 비-천연성 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다.

[0065] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 전술한 바와 같이 (43)-(79)로부터 선택되는 부타디엔 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체가 글루타릴-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 글루타릴-CoA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 글루타릴-CoA 경로를 더 포함하는, 본원에 기술된 비-천연성 미생물 유기체를 제공하며, 여기서 글루타릴-CoA 경로는 아세토아세틸-CoA 티올라제 또는 아세토아세틸-CoA 신타제; 아세토아세틸-CoA 리덕타제; 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 글루타릴-CoA 데하이드로게나제; 또는 2-아미노아디페이트 아미노트랜스퍼라제, 2-아미노아디페이트 데하이드로게나제 또는 2-아미노아디페이트 아민 옥시다제; 및 2-옥소아디페이트 데하이드로게나제, 2-옥소아디페이트:페리독신 옥시도리덕타제 또는 2-옥소아디페이트 포르메이트 리아제를 포함한다.

[0066] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 전술한 바와 같이 (80)-(116)로부터 선택되는 부타디엔 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체가 5-아미노펜타노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 5-아미노펜타노에이트 경로 효

소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 5-아미노펜타노에이트 경로를 더 포함하는, 본원에 기술된 비-천연성 미생물 유기체를 제공하며, 상기 5-아미노펜타노에이트 경로는 2-아미노아디페이트 데카르복실라제; 또는 2-아미노아디페이트 데카르복실라제 및 2-아미노아디페이트 아미노트랜스퍼라제, 2-아미노아디페이트 데하이드로게나제 또는 2-아미노아디페이트 아민 옥시다제를 포함한다.

[0067] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 전술한 바와 같이 (1)-(42)로부터 선택되는 부타디엔 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체가 2-옥소아디페이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2-옥소아디페이트 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 2-옥소아디페이트 경로를 더 포함하는, 본원에 기술된 비-천연성 미생물 유기체를 제공하며, 상기 2-옥소아디페이트 경로는 2-아미노아디페이트 아미노트랜스퍼라제, 2-아미노아디페이트 데하이드로게나제 또는 2-아미노아디페이트 아민 옥시다제를 포함한다.

[0068] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 부타디엔 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 부타디엔 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체를 제공하되, 상기 부타디엔 경로는 전술한 바와 같은 경로를 포함하며, (i) 환원적 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 환원적 TCA 경로로서, 하나 이상의 외인성 핵산이 ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제로부터 선택되는 것인 환원적 RCA 경로; (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 환원적 TCA 경로로서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산이 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제로부터 선택되는 것인, 환원적 TCA 경로; 또는 (iii) CO 데하이드로게나제, H₂ 하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 추가로 포함한다.

[0069] 일부 측면들에서, 전술한 (i)를 구비한 미생물 유기체는, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, 아세테이트 키나제, 포스포트랜스아세틸라제, 아세틸-CoA 신테타제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 페레독신 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, (ii)를 구비한 미생물 유기체는, 전술한 바와 같이, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 일부 측면들에서, 전술한 (i)를 구비한 미생물 유기체는, ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제를 코딩하는 4개의 외인성 핵산을 포함하거나; (ii)를 구비한 전술한 미생물 유기체는 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제, 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 5종의 외인성 핵산을 포함하거나; 또는 (iii)를 구비한 전술한 미생물 유기체는 CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다.

[0070] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 부타디엔을 생산하는 조건과 충분한 시간 동안 본원에 기술된 비-천연성 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는 부타디엔 제조 방법을 제공한다.

[0071] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 1,3-부탄디올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부탄디올 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 1,3-부탄디올 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하여, 비-천연성 미생물 유기체를 제공하되, 상기 1,3-부탄디올 경로는 (1) 4A, 4B, 4C 및 4D; (2) 5A, 5H, 5J, 5K 및 5G; (3) 5A, 5H, 5I 및 5G; (4) 5A, 5H 및 5L; (5) 5A, 5F 및 5G; (6) 7A, 7D, 7E, 7F, 7G 및 7S; (7) 7A, 7D, 7I, 7G 및 7S; (8) 7A, 7D, 7K, 및 7S; (9) 7A, 7H, 7F, 7G 및 7S; (10) 7A, 7J, 7G 및 7S; (11) 7A, 7J, 7R 및 7AA; (12) 7A, 7H, 7F, 7R 및 7AA; (13) 7A, 7H, 7Q, 7Z 및 7AA; (14) 7A, 7D, 7I, 7R 및 7AA; (15) 7A, 7D, 7E, 7F, 7R 및 7AA; (16) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7Z 및 7AA; (17) 7A, 7D, 7P, 7N 및 7AA; (18) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7Z 및 7AA; (19) 7A, 7B, 7M 및 7AA; (20) 7A, 7B, 7L, 7Z 및 7AA; (21) 7A, 7B, 7X, 7N 및 7AA; (22) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7Z 및 7AA; (23) 7A, 7D, 7P 및 7O; (24) 7A, 7B, 7X 및 7O; (25) 7A, 7D, 7E, 7F, 7R, 7AA; (26) 7A, 7D, 7E, 7F, 7G, 7S, (27) 7AS, 7E, 7F, 7G 및 7S; (28) 7AS, 7I, 7G 및 7S; (29) 7AS, 7K, 및 7S; (30) 7AS, 7I, 7R 및 7AA; (31) 7AS, 7E, 7F, 7R 및 7AA; (32) 7AS, 7E, 7Q, 7Z 및 7AA; (33) 7AS, 7P, 7N 및 7AA; (34) 7AS, 7P, 7Y, 7Z 및 7AA; (35) 7AS, 7P 및 7O; (36) 7AS, 7E, 7F, 7R, 및 7AA; 및 (37) 7AS, 7E, 7F, 7G, 및 7S로부터 선택되는 도 4, 5 및/또는 7에 도시된 경로를 포함하며, 여기서 4A는 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 티올라제 또는 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 신테타제이고, 4B는 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 하이드롤라제, 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 신테타제이고, 4C는 3-옥소-5-하이드록시펜타노에이트 데카르복실라제이고, 4D는 3-옥소부탄올 리덕타제이고, 5A는 4-하

이드록시-2-옥소발레레이트 알돌라제이고, 5F는 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 데카르복실라제이고, 5G는 3-하이드록시부타날 리덕타제이고, 5H는 4-하이드록시-2-옥소펜타노에이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시-2-옥소펜타노에이트:페레독신 옥시도리덕타제 또는 4-하이드록시-2-옥소펜타노에이트 포르메이트 리아제이고, 5I는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 5J는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신테타제이고, 5K는 3-하이드록시부티레이트 리덕타제이고, 5L은 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성)이고, 7A는 3-케토아실-ACP 신타제이고, 7B는 아세토아세틸-ACP 리덕타제이고, 7D는 아세토아세틸-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7E는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 신테타제이고, 7F는 아세토아세테이트 리덕타제 (산 환원)이고, 7G는 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (알데하이드 환원)이고, 7H는 아세토아세틸-ACP 티오에스테라제이고, 7I는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존성, 알데하이드 형성)이고, 7J는 아세토아세틸-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7K는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (알코올 형성)이고, 7L은 3-하이드록시부티릴-ACP 티오에스테라제이고, 7M은 3-하이드록시부티릴-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7N은 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7O는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성)이고, 7P는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7Q는 아세토아세테이트 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7R은 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7S는 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제이고, 7X는 3-하이드록시부티릴-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7Y는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신테타제이고, 7Z는 3-하이드록시부티레이트 리덕타제이고, 7AA는 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제이고, 7AS는 아세토아세틸-CoA 신타제이다.

[0072] 일부 측면들에서, 미생물 유기체는 1,3-부탄디올 경로 효소를 각각 코딩하는 외인성 핵산 2, 3, 4 또는 5종을 포함한다. 일부 측면들에서, 미생물 유기체는 전술한 바와 같이 (1)-(37)로부터 선택되는 하나 이상의 경로의 효소 각각을 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 일부 측면들에서, 하나 이상의 외인성 핵산은 이중 핵산이다. 일부 측면들에서, 비-천연성 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다.

[0073] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 1,3-부탄디올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부탄디올 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 1,3-부탄디올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체를 제공하되, 상기 1,3-부탄디올 경로는 전술한 경로를 포함하며, 추가적으로 (i) 환원적 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 환원적 TCA 경로로서, 하나 이상의 외인성 핵산이 ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제로부터 선택되는 것인 환원적 RCA 경로; (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 환원적 TCA 경로로서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산이 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제로부터 선택되는 것인, 환원적 TCA 경로; 또는 (iii) CO 데하이드로게나제, H₂ 하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함한다.

[0074] 일부 측면들에서, 전술한 (i)를 구비한 미생물 유기체는, 추가적으로, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, 아세테이트 키나제, 포스포트랜스아세틸라제, 아세틸-CoA 신테타제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 페레독신 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 일부 측면들에서, (ii)를 구비한 전술한 미생물 유기체는, 추가적으로, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 일부 측면들에서, 전술한 바와 같이 (i)를 구비한 미생물 유기체는, ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제를 코딩하는 4개의 외인성 핵산을 포함하거나; (ii)를 구비한 미생물 유기체는, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제, 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 5종의 외인성 핵산을 포함하거나; 또는 (iii)를 구비한 미생물 유기체는 CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다.

[0075] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 1,3-부탄디올을 생산하는 조건과 충분한 시간 동안 본원에 기술된 비-천연성 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 1,3-부탄디올 제조 방법을 제공한다.

[0076] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 3-부텐-1-올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 3-부텐-1-올 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 3-부텐-1-올 경로를 구비한 미생물 유기체를 포함하여, 비-천연성 미생물 유기체를 제공하되, 상기 3-부텐-1-올 경로는 (1) 1D, 1E, 1F 및 1U; (2) 1D, 1I, 1B, 1C, 1K 및 1U; (3)

1D, 1E, 1L, 1M, 1P 및 1U; (4) 1D, 1E 및 1W; (5) 1S, 1E, 1F 및 1U; (6) 1S, 1I, 1B, 1C, 1K 및 1U; (7) 1S, 1E, 1L, 1M, 1P 및 1U; (8) 1S, 1E 및 1W; (9) 1B, 1C, 1K 및 1U; (10) 1I, 1E, 1F 및 1U; (11) 1I, 1E, 1L, 1M, 1P 및 1U; (12) 1I, 1E 및 1W; 및 (13) 5A, 5B, 5C 및 5D로부터 선택되는 도 1 및/또는 5에 도시된 경로를 포함하며; 여기서 1B는 5-아미노펜타노에이트 리덕타제이고, 1C는 5-아미노펜트-2-에노에이트 아미노트랜스퍼라제, 5-아미노펜트-2-에노에이트 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제이고, 1D는 2-옥소아디페이트 데카르복실라제이고, 1E는 글루타레이트 세미알데하이드 리덕타제이고, 1F는 5-하이드록시발레레이트 데하이드로게나제이고, 1I는 5-아미노펜타노에이트 아미노트랜스퍼라제, 5-아미노펜타노에이트 데하이드로게나제 또는 5-아미노펜타노에이트 아민 옥시다제이고, 1K는 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 리덕타제이고, 1L은 5-하이드록시발레틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 5-하이드록시발레틸-CoA 신테타제이고, 1M은 5-하이드록시펜타노일-CoA 데하이드로게나제이고, 1P는 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 트랜스퍼라제 또는 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 신테타제이고, 1S는 글루타릴-CoA 리덕타제이고, 1U는 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 데카르복실라제이고, 1W는 5-하이드록시발레레이트 데카르복실라제이고, 5A는 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 알돌라제이고, 5B는 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 데하이드라타제이고, 5C는 2-옥소펜테노에이트 데카르복실라제이고, 5D는 3-부텐-1-알 리덕타제이다.

[0077] 일부 측면들에서, 미생물 유기체는 3-부텐-1-올 경로 효소를 각각 코딩하는 외인성 핵산 2, 3, 4, 5 또는 6종을 포함한다. 일부 측면들에서, 미생물 유기체는 전술한 바와 같이 (1)-(13)으로부터 선택되는 하나 이상의 경로의 효소 각각을 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 일부 측면들에서, 하나 이상의 외인성 핵산은 이중 핵산이다. 일부 측면들에서, 비-천연성 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다.

[0078] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 3-부텐-1-올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 3-부텐-1-올 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체를 제공하되, 상기 3-부텐-1-올 경로는 전술한 바와 같은 경로를 포함하며, 추가적으로, (i) 환원적 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 환원적 TCA 경로로서, 하나 이상의 외인성 핵산이 ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제로부터 선택되는 것인 환원적 RCA 경로; (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 환원적 TCA 경로로서, 상기 하나 이상의 외인성 핵산이 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제로부터 선택되는 것인, 환원적 TCA 경로; 또는 (iii) CO 데하이드로게나제, H₂ 하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함한다.

[0079] 일부 측면들에서, 전술한 (i)를 구비한 미생물 유기체는, 추가적으로, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, 아세테이트 키나제, 포스포트랜스아세틸라제, 아세틸-CoA 신테타제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 페레독신 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 일부 측면들에서, 전술한 바와 같이 (ii)를 구비한 미생물 유기체는, 추가적으로, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 일부 측면들에서 전술한 (i)를 구비한 미생물 유기체는, ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제를 코딩하는 4개의 외인성 핵산을 포함하거나; 전술한 바와 같이 (ii)를 구비한 미생물 유기체는 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제, 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 5종의 외인성 핵산을 포함하거나; 또는 (iii)를 구비한 전술한 미생물 유기체는 CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다.

[0080] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 3-부텐-1-올을 생산하는 조건과 충분한 시간 동안 전술한 비-천연성 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 3-부텐-1-올 제조 방법을 제공한다.

[0081] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 3-부텐-1-올을 생산하는 조건과 충분한 시간 동안 전술한 비-천연성 미생물 유기체를 배양하는 단계 및 3-부텐-1-올을 화학적으로 탈수시켜 부타디엔을 제조하는 단계를 포함하는, 부타디엔 제조 방법을 제공한다.

[0082] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 크로틸 알코올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 크로틸 알코올 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 크로틸 알코올 경로를 구비한 미생물 유기체를 비롯한, 비-천연성

미생물 유기체를 제공하되, 상기 크로틸 알코올 경로는 (1) 7A, 7J, 7R, 7AD 및 7AH; (2) 7A, 7H, 7F, 7R, 7AD 및 7AH; (3) 7A, 7H, 7Q, 7Z, 7AD 및 7AH; (4) 7A, 7H, 7Q, 7AC, 7AG 및 7AH; (5) 7A, 7D, 7I, 7R, 7AD 및 7AH; (6) 7A, 7D, 7E, 7F, 7R, 7AD 및 7AH; (7) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7Z, 7AD 및 7AH; (8) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7AC, 7AG 및 7AH; (9) 7A, 7D, 7P, 7N, 7AD 및 7AH; (10) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7Z, 7AD 및 7AH; (11) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7AC, 7AG 및 7AH; (12) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7V 및 7AH; (13) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7AF, 7AG 및 7AH (14) 7A, 7B, 7M, 7AD 및 7AH; (15) 7A, 7B, 7L, 7Z, 7AD 및 7AH; (16) 7A, 7B, 7L, 7AC, 7AG 및 7AH; (17) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7Z, 7AD 및 7AH; (18) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7AC, 7AG 및 7AH; (19) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7V 및 7AH; (20) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7AF, 7AG 및 7AH; (21) 7A, 7B, 7C, 7U 및 7AH; (22) 7A, 7B, 7C, 7T, 7AG 및 7AH; (23) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7AF, 7AG 및 7AH; (24) 7A, 7D, 7P, 7AB 및 7W; (25) 7A, 7B, 7X, 7AB 및 7W; (26) 7A, 7B, 7C, 7AE 및 7W; (27) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7V 및 7AH; (28) 7I, 7R, 7AD 및 7AH; (29) 7E, 7F, 7R, 7AD 및 7AH; (30) 7E, 7Q, 7Z, 7AD 및 7AH; (31) 7E, 7Q, 7AC, 7AG 및 7AH; (32) 7P, 7N, 7AD 및 7AH; (33) 7P, 7Y, 7Z, 7AD 및 7AH; (34) 7P, 7Y, 7AC, 7AG 및 7AH; (35) 7P, 7AB, 7V 및 7AH; (36) 7P, 7AB, 7AF, 7AG 및 7AH; (37) 7P, 7AB 및 7W, (38) 7AS, 7I, 7R, 7AD 및 7AH; (39) 7AS, 7E, 7F, 7R, 7AD 및 7AH; (40) 7AS, 7E, 7Q, 7Z, 7AD 및 7AH; (41) 7AS, 7E, 7Q, 7AC, 7AG 및 7AH; (42) 7AS, 7P, 7N, 7AD 및 7AH; (43) 7AS, 7P, 7Y, 7Z, 7AD 및 7AH; (44) 7AS, 7P, 7Y, 7AC, 7AG 및 7AH; (45) 7AS, 7P, 7AB, 7V 및 7AH; (46) 7AS, 7P, 7AB, 7AF, 7AG 및 7AH; 및 (47) 7AS, 7P, 7AB 및 7W로부터 선택되는 도 7에 도시된 경로를 포함하며, 여기서 7A는 3-케토아실-ACP 신테타제이고, 7B는 아세토아세틸-ACP 리덕타제이고, 7C는 3-하이드록시부티릴-ACP 데하이드라타제이고, 7D는 아세토아세틸-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7E는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 신테타제이고, 7F는 아세토아세테이트 리덕타제 (산 환원)이고, 7H는 아세토아세틸-ACP 티오에스테라제이고, 7I는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존성, 알데하이드 형성)이고, 7J는 아세토아세틸-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7K는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (알코올 형성)이고, 7L은 3-하이드록시부티릴-ACP 티오에스테라제이고, 7M은 3-하이드록시부티릴-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7N은 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7O는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성)이고, 7P는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7Q는 아세토아세테이트 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7R은 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7T는 크로토닐-ACP 티오에스테라제이고, 7U는 크로토닐-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7V는 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7W는 크로토닐-CoA (알코올 형성)이고, 7X는 3-하이드록시부티릴-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7Y는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신테타제이고, 7Z는 3-하이드록시부티레이트 리덕타제이고, 7AB는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제이고, 7AC는 3-하이드록시부티레이트 데하이드라타제이고, 7AD는 3-하이드록시부티르알데하이드 데하이드라타제이고, 7AE는 크로토닐-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7AF는 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 크로토닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 크로토닐-CoA 신테타제이고, 7AG는 크로토네이트 리덕타제이고, 7AH는 크로톤알데하이드 리덕타제이고, 7AS는 아세토아세틸-CoA 신테타제이다.

[0083] 일부 측면들에서, 본 발명은, 미생물 유기체가 크로틸 알코올 경로 효소를 각각 코딩하는 외인성 핵산 2, 3, 4, 5, 6 또는 7종을 포함하는, 전술한 크로틸 알코올 경로를 구비한 미생물 유기체를 제공한다. 일부 측면들에서, 미생물 유기체는 전술한 바와 같이 (1)-(47)로부터 선택되는 하나 이상의 크로틸 알코올 경로의 효소를 각각 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 일부 측면들에서, 하나 이상의 외인성 핵산은 이중 핵산이다. 일부 측면들에서, 비-천연성 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다.

[0084] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 크로틸 알코올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 크로틸 알코올 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 크로틸 알코올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체를 제공하되, 상기 크로틸 알코올 경로는 전술한 바와 같이 경로를 포함하며, 추가적으로, (i) 환원성 TCA 경로 효소를 코딩하는, ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제로부터 선택되는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 환원성 TCA 경로; (ii) 환원성 TCA 경로 효소를 코딩하는, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제로부터 선택되는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 환원성 TCA 경로; 또는 (iii) CO 데하이드로게나제, H₂ 하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함한다.

[0085] 일부 측면들에서, 전술한 바와 같이 (i)을 구비한 미생물 유기체는, 추가적으로, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, 아세테이트 키나제, 포스포트랜스아세틸라제, 아세틸-CoA 신테타제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 페레독신 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을

포함한다. 일부 측면들에서, 전술한 바와 같이 (ii)을 구비한 미생물 유기체는, 추가적으로, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신데타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 일부 측면들에서, 전술한 바와 같이 (i)을 구비한 미생물 유기체는, ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제를 코딩하는 4종의 외인성 핵산을 포함하거나; (ii)을 구비한 미생물 유기체는, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제, 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 5종의 외인성 핵산을 포함하거나; 또는 (iii)을 구비한 미생물 유기체는, CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다.

[0086] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 크로틸 알코올을 생산하는 조건과 충분한 기간 동안 전술한 비-천연성 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 크로틸 알코올 제조 방법을 제공한다.

[0087] 일부 구현예들에서, 부타디엔으로의 접근은 크로틸 알코올의 생합성 생산 및 후속적인 부타디엔으로의 화학적 탈수에 의해 달성될 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 발명은, (a) 충분한양의 영양 및 배지에서 크로틸 알코올을 생산하는 전술한 비-천연성 미생물 유기체를 발효시켜 배양하는 단계, 및 (b) 상기 비-천연성 미생물 유기체를 배양하여 생산되는 크로틸 알코올을 부타디엔으로 변환하는 단계를 포함하는, 부타디엔 제조 방법을 제공한다.

[0088] 알코올의 탈수는 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 촉매화된 및 비-촉매화된 다양한 열적 프로세스를 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서, 촉매화된 열적 탈수는 금속 산화물 촉매 또는 실리카를 활용한다. 일부 구현예들에서, 상기 방법의 단계 (b)는 촉매의 존재 하에서의 화학적 탈수에 의해 수행된다. 예를 들어, 크로틸 알코올은 비스무스 몰리브데이트를 통해 탈수되어, 1,3-부타디엔이 만들어질 수 있는 것으로 기술되어 있다 (Adams, C.R. J. Catal. 10:355-361, 1968).

[0089] 탈수는 알코올기의 활성화와 이후의 E1 또는 E2 소거 등의 표준 소거 기전에 의한 소거를 통해 달성될 수 있다. 활성화는 알코올기를 요오드화물, 염화물 또는 브롬화물 등의 할로겐으로 변환하는 방식으로 달성될 수 있다. 또한, 활성화는 알코올을 양호한 이탈기로 변환하는 설포닐, 포스페이트 또는 기타 활성화 관능기를 통해 달성될 수 있다. 일부 구현예들에서, 상기 활성화 기는 설페이트, 또는 토실레이트, 메실레이트, 노실레이트, 브로실레이트 및 트리플레이트로부터 선택되는 설페이트 에스테르이다. 일부 구현예들에서, 상기 이탈기는 포스페이트 또는 포스페이트 에스테르이다. 이러한 일부 구현예들에서, 탈수 제제는 포스포러스 펜톡사이드이다.

[0090] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 프로필렌을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 프로필렌 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 프로필렌 경로를 구비한 미생물 유기체를 비롯한, 미생물 유기체를 제공하되, 상기 프로필렌 경로는 (1) 7A, 7J, 7R, 7AD 및 7AO; (2) 7A, 7H, 7F, 7R, 7AD 및 7AO; (3) 7A, 7D, 7I, 7R, 7AD 및 7AO; (4) 7A, 7D, 7E, 7F, 7R, 7AD 및 7AO; (5) 7A, 7H, 7Q, 7Z, 7AD 및 7AO; (6) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7AD 및 7AO; (7) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7Z, 7AD 및 7AO; (8) 7A, 7D, 7P, 7N, 7AD 및 7AO; (9) 7A, 7B, 7X, 7N, 7AD 및 7AO; (10) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7Z, 7AD 및 7AO; (11) 7A, 7H, 7Q, 7V, 7AG 및 7AO; (12) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7AC, 7AG 및 7AO; (13) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7AC, 7AG 및 7AO; (14) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7AF, 7AG 및 7AO; (15) 7A, 7P, 7AB, 7V 및 7AO; (16) 7A, 7B, 7M, 7AD 및 7AO; (17) 7A, 7B, 7L, 7Z, 7AD 및 7AO; (18) 7A, 7B, 7X, 7N, 7AD 및 7AO; (19) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7Z, 7AD 및 7AO; (20) 7A, 7B, 7C, 7U 및 7AO; (21) 7A, 7B, 7C, 7T, 7AG 및 7AO; (22) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7V 및 7AO; (23) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7AF, 7AG 및 7AO; (24) 7A, 7H, 7Q 및 7AR; (25) 7A, 7D, 7E, 7Q 및 7AR; (26) 7A, 7D, 7P, 7Y 및 7AR; (27) 7A, 7B, 7X, 7Y 및 7AR; (28) 7A, 7B, 7L 및 7AR; (29) 7A, 7H, 7Q, 7AC 및 7AQ; (30) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7AC 및 7AQ; (31) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7AC 및 7AQ; (32) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7AF 및 7AQ; (33) 7A, 7B, 7L, 7AC 및 7AQ; (34) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7AC 및 7AQ; (35) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7AF 및 7AQ; (36) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7AF 및 7AQ; (37) 7A, 7B, 7C, 7T 및 7AQ; (38) 7A, 7H, 7Q, 7AC, 7AN 및 7AK; (39) 7A, 7D, 7E, 7Q, 7AC, 7AN 및 7AK; (40) 7A, 7D, 7P, 7Y, 7AC, 7AN 및 7AK; (41) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7AF, 7AN 및 7AK; (42) 7A, 7D, 7P, 7AB, 7AM, 7AJ 및 7AK; (43) 7A, 7B, 7L, 7AC, 7AN 및 7AK; (44) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7AC, 7AN 및 7AK; (45) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7AF, 7AN 및 7AK; (46) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7AM, 7AJ 및 7AK; (47) 7A, 7B, 7C, 7T, 7AN 및 7AK; (48) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7AF, 7AN 및 7AK; (49) 7A, 7B, 7C, 7AE, 7AM, 7AJ 및 7AK; (50) 7A, 7B, 7C, 7AL, 7AP 및 7AK; (51) 7A, 7B, 7C, 7AL, 7AI, 7AJ 및 7AK; (52) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7V 및 7AO; (53) 7A, 7B, 7L, 7AC, 7AG 및 7AO; (54) 7A, 7B, 7X, 7Y, 7AC, 7AC, 7AG 및 7AO; (55) 7A, 7B, 7X, 7AB, 7AF, 7AG 및 7AO; 및 (56) 7A, 7H, 7Q, 7AC, 7AG 및 7AO; (57) 7I, 7R, 7AD 및 7AO; (58) 7E, 7F, 7R, 7AD 및 7AO; (59) 7E, 7Q, 7Z, 7AD 및 7AO; (60) 7P, 7Y, 7Z, 7AD 및 7AO; (61) 7P, 7N, 7AD 및 7AO; (62) 7E, 7Q, 7AC, 7AG 및

7AO; (63) 7P, 7Y, 7AC, 7AG 및 7AO; (64) 7P, 7AB, 7AF, 7AG 및 7AO; (65) 7P, 7AB, 7V 및 7AO; (66) 7E, 7Q 및 7AR; (67) 7P, 7Y 및 7AR; (68) 7E, 7Q, 7AC 및 7AQ; (69) 7P, 7Y, 7AC 및 7AQ; (70) 7P, 7AB, 7AF 및 7AQ; (71) 7E, 7Q, 7AC, 7AN 및 7AK; (72) 7P, 7Y, 7AC, 7AN 및 7AK; (73) 7P, 7AB, 7AF, 7AN 및 7AK; (74) 7P, 7AB, 7AM, 7AJ 및 7AK, (75) 7AS, 7I, 7R, 7AD 및 7AO; (76) 7AS, 7E, 7F, 7R, 7AD 및 7AO; (77) 7AS, 7E, 7Q, 7AD 및 7AO; (78) 7AS, 7P, 7Y, 7Z, 7AD 및 7AO; (79) 7AS, 7P, 7N, 7AD 및 7AO; (80) 7AS, 7E, 7Q, 7AC, 7AG 및 7AO; (81) 7AS, 7P, 7Y, 7AC, 7AG 및 7AO; (82) 7AS, 7P, 7AB, 7AF, 7AG 및 7AO; (83) 7AS, 7E, 7Q 및 7AR; (84) 7AS, 7P, 7Y 및 7AR; (85) 7AS, 7E, 7Q, 7AC 및 7AQ; (86) 7AS, 7P, 7Y, 7AC 및 7AQ; (87) 7AS, 7P, 7AB, 7AF 및 7AQ; (88) 7AS, 7E, 7Q, 7AC, 7AN 및 7AK; (89) 7AS, 7P, 7Y, 7AC, 7AN 및 7AK; (90) 7AS, 7P, 7AB, 7AF, 7AN 및 7AK; 및 (91) 7AS, 7P, 7AB, 7AM, 7AJ 및 7AK로부터 선택되는 도 7에 도시된 경로를 포함하며, 여기서 7A는 3-케토아실-ACP 신타제이고, 7B는 아세토아세틸-ACP 리덕타제이고, 7C는 3-하이드록시부티릴-ACP 데하이드라타제이고, 7D는 아세토아세틸-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7E는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 신테타제이고, 7F는 아세토아세테이트 리덕타제 (산 환원)이고, 7H는 아세토아세틸-ACP 티오에스테라제이고, 7I는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (CoA-의존성, 알데하이드 형성)이고, 7J는 아세토아세틸-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7L은 3-하이드록시부티릴-ACP 티오에스테라제이고, 7M은 3-하이드록시부티릴-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7N은 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7P는 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7Q는 아세토아세테이트 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7R은 3-옥소부티르알데하이드 리덕타제 (케톤 환원)이고, 7S는 4-하이드록시-2-부타논 리덕타제이고, 7T는 크로토닐-ACP 티오에스테라제이고, 7U는 크로토닐-ACP 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7V는 크로토닐-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성)이고, 7X는 3-하이드록시부티릴-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7Y는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신테타제이고, 7Z는 3-하이드록시부티레이트 리덕타제이고, 7AB는 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제이고, 7AC는 3-하이드록시부티레이트 데하이드라타제이고, 7AD는 3-하이드록시부티르알데하이드 데하이드라타제이고, 7AE는 크로토닐-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7AF는 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 크로토닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 크로토닐-CoA 신테타제이고, 7AG는 크로토네이트 리덕타제이고, 7AI는 부티릴-CoA:ACP 트랜스퍼라제이고, 7AJ는 부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 부티릴-CoA 하이드롤라제 또는 부티릴-CoA 신테타제이고, 7AK는 부티레이트 데카르복실라제이고, 7AL은 크로토닐-ACP 리덕타제이고, 7AM은 크로토닐-CoA 리덕타제이고, 7AN은 크로토네이트 리덕타제이고, 7AO는 크로톤알데하이드 데카르복실라제이고, 7AP는 부티릴-ACP 티오에스테라제이고, 7AQ는 크로토네이트 데카르복실라제이고, 7AR은 3-하이드록시부티레이트 데카르복실라제이고, 7AS는 아세토아세틸-CoA 신타제이다.

[0091] 일부 측면들에서, 본 발명은, 미생물 유기체가 프로필렌 경로 효소를 각각 코딩하는 외인성 핵산 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8종을 포함하는, 전술한 프로필렌 경로를 구비한, 미생물 유기체를 제공한다. 일부 측면들에서, 미생물 유기체는 전술한 바와 같이 (1)-(91)로부터 선택되는 하나 이상의 경로의 효소 각각을 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 일부 측면들에서, 하나 이상의 외인성 핵산은 이중 핵산이다. 일부 측면들에서, 비-천연성 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다.

[0092] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 프로필렌을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 프로필렌 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 프로필렌 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체를 제공하되, 상기 프로필렌 경로는 전술한 바와 같은 경로를 포함하며, 추가적으로, (i) 환원적 TCA 경로 효소를 코딩하는, ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제로부터 선택되는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 환원적 TCA 경로; (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 코딩하는, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제, 및 H₂ 하이드로게나제로부터 선택되는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 환원적 TCA 경로; 또는 (iii) CO 데하이드로게나제, H₂ 하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함한다.

[0093] 일부 측면들에서, 전술한 바와 같이 (i)을 구비한 미생물 유기체는, 추가적으로, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, 아세테이트 키나제, 포스포트랜스아세틸라제, 아세틸-CoA 신테타제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 페레독신 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 일부 측면들에서, 전술한 바와 같이 (ii)을 구비한 미생물 유기체는, 추가적으로, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 일부 측면들에서,

전술한 바와 같이 (i)을 구비한 미생물 유기체는, ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제를 코딩하는 4개의 외인성 핵산을 포함하거나; 전술한 바와 같이 (ii)을 구비한 미생물 유기체는, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제, 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 5종의 외인성 핵산을 포함하거나; 또는 (iii)을 구비한 미생물 유기체는, 전술한 바와 같이, CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다.

[0094] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 프로필렌을 생산하기 위한 조건과 충분한 기간 동안 전술한 비-천연성 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함하는, 프로필렌 제조 방법을 제공한다.

[0095] 부가적인 구현예에 있어서, 본 발명은, 2-아미노아디페이트를 5-아미노펜타노에이트로, 2-아미노아디페이트를 2-옥소아디페이트로, 5-아미노펜타노에이트를 글루타레이트 세미알데하이드로, 2-옥소아디페이트를 글루타레이트 세미알데하이드로, 2-옥소아디페이트를 글루타릴-CoA로, 글루타릴-CoA를 글루타레이트 세미알데하이드로, 글루타레이트 세미알데하이드를 5-하이드록시발레레이트로, 5-아미노펜타노에이트를 5-아미노펜트-2-에노에이트로, 5-아미노펜트-2-에노에이트를 5-하이드록시펜트-2-에노에이트로, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트를 5-하이드록시펜트-2-에노에이트로, 5-하이드록시발레레이트를 5-하이드록시펜트-2-에노에이트로, 5-하이드록시발레레이트를 5-하이드록시발레릴-CoA로, 5-하이드록시발레레이트를 3-부텐-1-올로, 5-아미노펜트-2-에노에이트를 2,4-펜타디에노에이트로, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트를 3-부텐-1-올로, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트를 2,4-펜타디에노에이트로, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트를 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA로, 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA를 5-하이드록시펜트-2-에노에이트로, 글루타레이트 세미알데하이드를 5-아미노펜타노에이트로, 2-옥소아디페이트를 2-아미노아디페이트로, 5-하이드록시발레릴-CoA를 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA로, 5-하이드록시발레릴-CoA를 2,4-펜타디에노일-CoA로, 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA를 2,4-펜타디에노일-CoA로, 2,4-펜타디에노일-CoA를 2,4-펜타디에노에이트로, 2,4-펜타디에노에이트를 부타디엔으로, 3-부텐-1-올을 부타디엔으로, 아세틸-CoA를 아세토아세틸-CoA로, 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 크로토닐-CoA로, 크로토닐-CoA, 글루타릴-CoA, 프로피오닐-CoA 및 아세틸-CoA를 3-옥소펜타노일-CoA로, 프로피오닐-CoA 및 말로닐-CoA를 3-옥소펜타노일-CoA로, 3-옥소펜타노일-CoA를 3-하이드록시펜타노일-CoA로, 3-하이드록시펜타노일-CoA를 펜트-2-오노일-CoA로, 펜트-2-오노일-CoA를 펜트-3-에노일-CoA로, 펜트-3-에노일-CoA를 2,4-펜타디에노일-CoA로, 3-하이드록시프로피오닐-CoA 및 아세틸-CoA를 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA로, 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA를 3-옥소-5-하이드록시펜타노에이트로, 3-옥소-5-하이드록시펜타노에이트를 3-옥소부탄올로, 3-옥소부탄올을 1,3-부탄디올로, 피루베이트 및 아세트알데하이드를 4-하이드록시-2-옥소발레레이트로, 4-하이드록시-2-옥소발레레이트를 2-옥소펜테노에이트로, 2-옥소펜테노에이트를 3-부텐-1-알로, 3-부텐-1-알을 3-부텐-1-올로, 4-하이드록시-2-옥소발레레이트를 3-하이드록시부티릴-CoA로, 4-하이드록시-2-옥소발레레이트를 3-하이드록시부타날로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 3-하이드록시부타날로, 3-하이드록시부타날을 1,3-부탄디올로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 3-하이드록시부티레이트로, 3-하이드록시부티레이트를 3-하이드록시부타날로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 1,3-부탄디올로, 2,4-펜타디에노에이트를 2,4-펜타디에노일-CoA로, 2,4-펜타디에노에이트를 펜타-2,4-디에날로, 펜타-2,4-디에날을 부타디엔으로, 2,4-펜타디에노에이트를 2,4-펜타디에노일-포스페이트로, 2,4-펜타디에노일-포스페이트를 펜타-2,4-디에날로, 2,4-펜타디에노일-CoA를 2,4-펜타디에노일-포스페이트로, 2,4-펜타디에노일-CoA를 펜타-2,4-디에날로, 말로닐-ACP 및 아세틸-CoA 또는 아세틸-ACP를 아세토아세틸-ACP로, 아세토아세틸-ACP를 3-하이드록시부티릴-ACP로, 3-하이드록시부티릴-ACP를 크로토닐-ACP로, 아세토아세틸-ACP를 아세토아세틸-CoA로, 말로닐-CoA 및 아세틸-CoA를 아세토아세틸-CoA로, 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트로, 아세토아세테이트를 3-옥소부티르알데하이드로, 3-옥소부티르알데하이드를 4-하이드록시-2-부타논으로, 아세토아세틸-ACP를 아세토아세테이트로, 아세토아세틸-CoA를 3-옥소부티르알데하이드로, 아세토아세틸-ACP를 3-옥소부티르알데하이드로, 아세토아세틸-CoA를 4-하이드록시-2-부타논으로, 3-하이드록시부티릴-ACP를 3-하이드록시부티레이트로, 3-하이드록시부티릴-ACP를 3-하이드록시부티르알데하이드로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 3-하이드록시부티르알데하이드로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 1,3-부탄디올로, 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로, 아세토아세테이트를 3-하이드록시부티레이트로, 3-옥소부티르알데하이드를 3-하이드록시부티르알데하이드로, 4-하이드록시-2-부타논을 1,3-부탄디올로, 크로토닐-ACP를 크로토네이트로, 크로토닐-ACP를 크로톤알데하이드로, 크로토닐-CoA를 크로톤알데하이드로, 크로토닐-CoA를 크로틸 알코올로, 3-하이드록시부티릴-ACP를 3-하이드록시부티릴-CoA로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 3-하이드록시부티레이트로, 3-하이드록시부티레이트를 3-하이드록시부티르알데하이드로, 3-하이드록시부티르알데하이드를 1,3-부탄디올로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 크로토닐-CoA로, 3-하이드록시부티레이트를 크로토네이트로, 3-하이드록시부티르알데하이드를 크로톤알데하이드로, 크로토닐-ACP를 크로토닐-CoA로, 크로토닐-CoA를 크로토네이트로, 크로토네이트를 크로톤알

데하이드로, 크로톤알데하이드를 크로틸 알코올로, 부티릴-ACP를 부티릴-CoA로, 부티릴-CoA를 부티레이트로, 부티레이트를 프로필렌으로, 크로토닐-ACP를 부티릴-ACP로, 크로토닐-CoA를 부티릴-CoA로, 크로토네이트를 부티레이트로, 크로톤알데하이드를 프로필렌으로, 부티릴-ACP를 부티레이트로, 크로토네이트를 프로필렌으로, 3-하이드록시부티레이트를 프로필렌으로, 크로틸 알코올을 2-부테닐-4-포스페이트로, 2-부테닐-4-포스페이트를 2-부테닐-4-디포스페이트로, 크로틸 알코올을 2-부테닐-4-디포스페이트 및 2-부테닐-4-디포스페이트를 부타디엔으로 변환하는 것으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기질을 산물로 변환하는 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체를 제공한다. 당해 기술 분야의 당업자는, 이는 예에 불과하며, 바람직한 산물을 생산하는데 적합하며 적정 활성을 기질을 산물로 변환하는데 이용가능한, 본원에 기술된 기질-산물의 임의 쌍을, 본원에 기술된 내용을 기초로 당해 기술 분야의 당업자라면 쉽게 결정할 수 있을 것으로 이해될 것이다. 즉, 본 발명은, 효소 또는 단백질이 도 1-7 및 12에 나타난 바와 같이, 기질을 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 산물을 변환하는, 상기 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비-천연성 미생물 유기체를 제공한다.

[0096] 본원에 일반적으로 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 포함하는 미생물 유기체로서 기술되지만, 본 발명은, 부가적으로, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연성 미생물 유기체를 제공하는 것으로 이해된다. 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로는 도 1-7 및 12에 예시된다. 따라서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 포함하는 미생물 유기체와 더불어, 본 발명은 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함하는 비-천연성 미생물 유기체를 제공하되, 이 미생물 유기체는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물, 예컨대, 5-아미노펜트-2-에노에이트, 글루타레이트 세미알데하이드, 5-하이드록시발레레이트, 5-하이드록시발레릴-CoA, 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA, 2,4-펜타디에노일-CoA, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트, 아세토아세틸-CoA, 3-하이드록시부티릴-CoA, 크로토일-CoA, 글루타릴-CoA, 3-옥소펜타노일-CoA, 3-하이드록시펜타노일-CoA, 펜트-2-에노일-CoA, 펜트-3-에노일-CoA, 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA, 3-옥소-5-하이드록시펜타노에이트, 3-옥소부탄올, 4-하이드록시-2-옥소발레레이트, 2-옥소펜테노에이트, 3-부텐-1-알, 3-하이드록시부티릴-CoA, 3-하이드록시부티레이트, 3-하이드록시부타날, 2,4-펜타디에노일-포스페이트, 펜타-2,4-디에날, 아세토아세틸-ACP, 아세토아세틸-CoA, 아세토아세테이트, 3-옥소부티르알데하이드, 4-하이드록시-2-부타논, 3-하이드록시부티릴-ACP, 3-하이드록시부티릴-CoA, 3-하이드록시부티레이트, 3-하이드록시부티르알데하이드, 크로토닐-ACP, 크로토닐-CoA, 크로토네이트, 크로톤알데하이드, 부티릴-ACP, 부티릴-CoA, 부티레이트, 2-부테닐-4-포스페이트, or 2-부테닐-4-디포스페이트를 생산한다.

[0097] 실시예에 기술되고, 도 1-9 및 12의 경로 등의 도면들에서 예시된 바와 같이, 본원에 기술된 임의의 경로를 활용하여, 원하는 임의의 경로 중간 산물 또는 산물을 생산하는 비-천연성 미생물 유기체를 제조할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 중간 산물을 생산하는 그러한 미생물 유기체는 원하는 산물을 생산하기 위해 하류 경로 효소를 발현하는 다른 미생물 유기체와 조합하여 사용할 수 있다. 그러나, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로 중간 산물을 생산하는 비-천연성 미생물 유기체를 이용하여, 원하는 산물로서 상기 중간 산물을 생산할 수 있는 것으로 이해된다.

[0098] 본 발명은, 대사 반응, 반응체 또는 그 산물을 일반적으로 참조하거나, 또는 언급된 대사 반응, 반응체 또는 산물과 연관된 효소, 촉매하는 효소, 또는 연관된 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산 또는 유전자를 구체적으로 참조하여 기술된다. 본원에 명확하게 언급되어 있지 않은 한, 당해 기술 분야의 당업자는 반응에 대한 언급이 반응체 및 반응의 산물에 대한 언급으로 구성됨을 이해할 것이다. 마찬가지로, 본원에서 명확하게 언급되지 않은 한, 반응체 또는 산물에 대한 언급은 또한 반응을 지칭하며, 이들 대사적 구성 요소들 중 임의의 것에 대한 언급 역시 언급된 반응, 반응체 또는 산물을 촉매하는 효소 또는 관여하는 단백질을 코딩하는 유전자 또는 유전자들을 지칭한다. 이와 같이, 잘 알려진 대사적 생화학, 효소학 및 계놈학 분야에서 본다면, 유전자 또는 코딩 핵산에 대한 본원의 언급은 대응되는 코딩된 효소와 이를 촉매하는 반응 또는 반응과 관련된 단백질 뿐만 아니

라 반응의 반응체 및 산물에 대한 언급을 포함한다.

[0099]

본원에 기술된 바와 같이, 산물, 2,4-펜타디에노에이트와 중간 산물, 5-아미노펜타노에이트, 5-아미노펜트-2-에노에이트, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트, 5-하이드록시발레레이트, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트, 3-옥소-5-하이드록시펜타노에이트, 3-하이드록시부티레이트, 4-하이드록시-2-엑소발레레이트, 2-옥소펜테노에이트, 아세토아세테이트, 크로토네이트, 부티레이트, 뿐만 아니라 기타 중간 산물은, 카르복시산이며, 완전히 양성자화된 형태, 부분 양성자화된 형태 및 완전히 탈양성자화된 형태 등의 다양한 이온화된 형태로 발생할 수 있다. 이에, 접미사 "-에이트" 또는 산 형태는 호환적으로 사용되며, 이온화된 형태는 화합물이 발견되는 pH에 따라 결정되는 것으로 알려져 있어, 유리 산 형태와 특히 임의의 탈양성자화된 형태 둘다를 나타낼 수 있다. 카르복실레이트 산물 또는 중간 산물은 O-카르복실레이트 및 S-카르복실레이트 에스테르와 같은 카르복실레이트 산물의 에스테르 형태 또는 경로 중간 산물을 포함하는 것으로 이해된다. O-카르복실레이트 및 S-카르복실레이트는, C1 - C6의 분지쇄 또는 직쇄 카르복실레이트인 저급 알킬을 포함할 수 있다. 이러한 O-카르복실레이트 또는 S-카르복실레이트의 일부로는, 비제한적인 예로, 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, i-프로필, sec-부틸 및 tert-부틸, 펜틸, 헥실 O- 또는 S-카르복실레이트를 포함하며, 이들 모두 추가로 불포화될 수 있으며, 예로, 프로페닐, 부테닐, 펜틸 및 헥세닐 O- 또는 S-카르복실레이트를 포함한다. O-카르복실레이트는 생합성 경로의 산물일 수 있다. 생합성 경로를 통해 입수되는 O-카르복실레이트로는, 비제한적인 예로, 메틸 2,4-펜타디에노에이트, 에틸 2,4-펜타디에노에이트, 및 n-프로필 2,4-펜타디에노에이트를 포함할 수 있다. 그외 생합성에 의해 입수가 가능한 O-카르복실레이트로는, C7-C22인 중쇄 - 장쇄기, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실, 라우릴, 트리데실, 미리스틸, 펜타데실, 세틸, 팔미톨릴, 헵타데실, 스테아릴, 노나데실, 아라키딜, 헤네이코실 및 베헤닐 알코올과 같은 지방 알코올로부터 유래된 O-카르복실레이트 에스테르를 포함할 수 있으며, 이들 중 임의의 것은 선택적으로 분지화되거나 및/또는 불포화를 포함할 수 있다. O-카르복실레이트 에스테르는, 또한, 유리 카르복시산 산물의 에스테르화 또는 O- 또는 S-카르복실레이트의 트랜스에스테르화 등의, 생화학적 과정 또는 화학적 과정을 통해 입수할 수 있다. S-카르복실레이트는 CoA S-에스테르, 시스테이닐 S-에스테르, 알킬 티오에스테르 및 다양한 아릴 및 헤테로아릴 티오에스테르로 예시된다. 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체는, 하나 이상의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로에 참여하는 하나 이상의 효소 또는 단백질을 코딩하는 발현가능한 핵산을 도입함으로써, 제조할 수 있다. 생합성용으로 선택된 숙주 미생물 유기체에 따라, 특정 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로의 일부 또는 전체에 대한 핵산들을 발현시킬 수 있다. 예를 들어, 선택한 숙주에 원하는 생합성 경로에서 하나 이상의 효소 또는 단백질이 결핍된 경우, 결핍된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대한 발현가능한 핵산을 이후 외인성 발현을 위해 숙주에 도입한다. 다른 예로서, 선택한 숙주가 일부 경로 유전자들을 내인성 발현하지만 다른 유전자들은 결핍된 경우, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성을 달성하기 위해서는 결핍된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대한 코딩 핵산이 필요하다. 따라서, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체는 원하는 생합성 경로를 획득하기 위해 외인성 효소 또는 단백질 활성을 도입함으로써 제조하거나, 또는 원하는 생합성 경로는, 하나 이상의 내인성 효소 또는 단백질과 함께, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올과 같은 원하는 산물을 생산하는, 하나 이상의 외인성 효소 또는 단백질 활성을 도입함으로써, 획득할 수 있다.

[0100]

숙주 미생물 유기체는, 예컨대 세균, 효모, 진균 또는 발효 공정이 적용가능한 기타 다양한 미생물들 중 임의의 미생물로부터 선택할 수 있으며, 비천연 미생물 유기체는 이들로부터 제조될 수 있다. 세균의 예로는, 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*), 클렙시엘라 옥시토카 (*Klebsiella oxytoca*), 안에어로비오스피릴룸 숙시니시프로두센스 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 액티노바실러스 숙시노게네스 (*Actinobacillus succinogenes*), 만하이미아 숙시니시프로두센스 (*Mannheimia succiniciproducens*), 리조비움 에틀리 (*Rhizobium etli*), 바실러스 썩틸리스 (*Bacillus subtilis*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 쿠프리아비두스 네카토르 (*Cupriavidus necator*), 글루코노박터 옥시단스 (*Gluconobacter oxydans*), 자이모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*), 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*), 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*), 스트렙토마이세스 코엘리콜러 (*Streptomyces coelicolor*), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 (*Clostridium acetobutylicum*), 슈도모나스 플루오레센스 (*Pseudomonas fluorescens*) 및 슈도모나스 푸티타 (*Pseudomonas putida*)로부터 선택되는 종을 포함한다. 효모 또는 진균의 예로는, 사카로마이세스 세레비지애, 시조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 클루베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*), 클루베로마이세스 마르시아누스 (*Kluyveromyces marxianus*), 아스퍼질러스 테레우스 (*Aspergillus terreus*) 아스퍼질러스 나이거 (*Aspergillus niger*), 피키아 패스토리스 (*Pichia pastoris*), 리

조푸스 아리주스 (*Rhizopus arrhizus*), 리조부스 오리제 (*Rhizobus oryzae*), 야오이와 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*) 등으로부터 선택되는 종을 포함한다. 에스케리키아 콜라이는 유전자 조작에 적합한 잘 특정화된 미생물이기 때문에, 특히 유용한 숙주 미생물이다. 그의 특히 유용한 숙주 유기체는 사카로마이세스 세레비지에와 같은 효모이다. 임의의 적합한 미생물 숙주 유기체를 사용하여, 원하는 산물을 생산하도록 대사성 및/또는 유전자 변형을 도입할 수 있는 것으로 이해된다.

[0101] 선택된 숙주 미생물 유기체의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로의 구성 요소들에 따라, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체는, 하나 이상의 외인성으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 코딩하는 핵산, 최대 하나 이상의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로를 코딩하는 전체 핵산들을 포함할 것이다. 예컨대, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성은, 대응되는 코딩 핵산의 외인성 발현을 통해 경로 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에서 확립할 수 있다. 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 효소 또는 단백질들이 모두 결핍된 숙주인 경우, 상기 경로의 전체 효소 또는 단백질의 외인성 발현이 포함될 수 있지만, 경로의 전체 효소 또는 단백질을 숙주가 하나 이상의 경로 효소 또는 단백질을 포함하더라도 발현시킬 수 있는 것으로 이해된다. 예컨대, 부타디엔을 생산하는 경로의 전체 효소 또는 단백질, 예를 들면, 글루타릴-CoA 리덕타제, 글루타레이트 세미알데하이드 리덕타제, 5-하이드록시발레릴-CoA 트랜스퍼라제 및/또는 신테타제, 5-하이드록시발레릴-CoA 데하이드라타제/데하이드로게나제, 2,4-펜타디에노일-CoA 트랜스퍼라제, 신테타제 또는 하이드롤라제 및 2,4-펜타디에노에이트 데카르복실라제 등의, 외인성 발현도 포함될 수 있다. 다른 예로, 1,3-부탄디올을 생산하는 경로의 전체 효소 또는 단백질, 예를 들어, 3-케토아실-ACP 신타제, 아세토아세틸-ACP 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA:ACP 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제의 외인성 발현도 포함될 수 있다. 또 다른 예로, 크로틸-알코올을 생산하는 경로의 전체 효소 또는 단백질, 예를 들어, 3-케토아실-ACP 신타제, 아세토아세틸-ACP 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-ACP 데하이드라타제, 크로토닐-CoA:ACP 트랜스퍼라제, 크로토닐-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로톤알데하이드 리덕타제의 외인성 발현도 포함될 수 있다.

[0102] 본원에 제공되는 교시 및 지침 하에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 발현가능한 형태로 도입되는 코딩 핵산의 수가, 적어도, 선택된 숙주 미생물 유기체의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 결핍과 대응됨을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체는, 본원에 기술된 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로를 구성하는 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산을 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11종, 최대 전부를 구비할 수 있다. 일부 구현예에서, 또한, 비-천연성 미생물 유기체는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성을 촉진시키거나 최적화하는, 또는 숙주 미생물 유기체에 다른 유용한 기능을 부여하는, 다른 유전적 변형을 포함할 수도 있다. 이러한 다른 기능성으로, 예컨대, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 하나 이상의 전구체, 예컨대 2-아미노아디페이트, 5-아미노펜타노에이트, 2-옥소아디페이트, 글루타릴-CoA, 프로피오닐-CoA, 아세틸-CoA, 말로닐-CoA, 3-하이드록시프로피오닐-CoA, 말로닐-ACP 또는 피루베이트의 합성 증대를 포함할 수 있다.

[0103] 일반적으로, 숙주 미생물 유기체는, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 전구체를, 자연적으로 생산되는 분자로서 또는 숙주 미생물 유기체에 의해 자연적으로 생산되는 전구체의 생산 증가 또는 원하는 전구체의 데 노보 생산을 제공하는 조작된 산물로서 생산하도록, 선택된다. 예를 들어, 2-아미노아디페이트, 5-아미노펜타노에이트, 2-옥소아디페이트, 글루타릴-CoA, 프로피오닐-CoA, 아세틸-CoA, 말로닐-CoA, 3-하이드록시프로피오닐-CoA, 피루베이트 또는 말로닐-ACP는 에스케리키아 콜라이와 같은 숙주 유기체에서 천연적으로 생산된다. 숙주 유기체는, 본원에 기술된 바와 같이, 전구체의 생산을 증가시키도록 조작될 수 있다. 또한, 원하는 전구체를 생산하도록 조작된 미생물 유기체를 숙주 유기체로 사용할 수 있으며, 또한 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 효소 또는 단백질을 발현하도록 추가로 조작될 수 있다.

[0104] 일부 구현예에서, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체는, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 합성하기 위한 효소적 역량을 포함하는 숙주로부터 제조된다. 이러한 구체적인 구현예에서, 이 유기체는, 예컨대 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸

알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하는 방향으로 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로 반응을 진행시키도록, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로 산물의 합성 또는 축적을 높이는데 유용할 수 있다. 합성 또는 축적의 증가는, 예컨대, 전술한 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 효소 또는 단백질들 중 하나 이상을 코딩하는 핵산의 과다발현에 의해 달성될 수 있다. 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 효소 또는 효소들 및/또는 단백질 또는 단백질들의 과다 발현은, 예컨대 내인성 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 또는 이중의 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 이루어질 수 있다. 따라서, 천연 유기체는, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11종, 즉 최대 전체 핵산의 과다 발현을 통해, 예컨대 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하는 비-천연성 미생물 유기체로, 쉽게 제조할 수 있다. 또한, 비-천연성 유기체는, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로에서 효소의 활성을 증가시키게 되는, 내인성 유전자의 돌연변이 유발에 의해, 제조할 수 있다.

[0105] 특히 유용한 구현예에서, 코딩 핵산의 외인성 발현이 적용된다. 외인성 발현은 숙주 및 용도에 맞게, 사용자에게 의해 조절되는 바람직한 발현 수준을 달성하도록 발현 및/또는 조절 인자를 맞춤형으로 조절하는 능력을 부여한다. 그러나, 또한, 내인성 발현은, 다른 구현예에서, 유도성 프로모터나 다른 조절 인자에 연결되었을 때, 부정적인 조절 작동자의 제거 또는 유전자의 프로모터 도입 등에 의해서와 같이, 이용할 수 있다. 따라서, 천연적인 유도성 프로모터를 가진 내인성 유전자는, 적정 유도제를 제공함으로써, 상향-조절시킬 수 있거나, 또는 내인성 유전자의 조절 부위를 유도성 조절 인자가 병합되도록 조작하여, 원하는 시기에 내인성 유전자의 발현이 증가되도록 조절할 수 있다. 마찬가지로, 유도성 프로모터를 비-천연성 미생물 유기체에 도입되는 외인성 유전자에 대한 조절 요소로서 포함시킬 수 있다.

[0106] 본 발명의 방법에서, 하나 이상의 외인성 핵산들 중 임의의 핵산을 미생물 유기체에 도입하여 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체를 제조할 수 있는 것으로 이해된다. 핵산을, 미생물 유기체에, 예컨대 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로를 부여하도록 도입시킬 수 있다. 다른 예로서, 코딩 핵산을 도입하여, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 능력을 부여하는데 필요한 반응들 중 일부를 촉매하는 생합성 능력을 가진 중간 미생물 유기체를 제조할 수 있다. 예컨대, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는, 바람직한 효소 또는 단백질을 코딩하는 2 이상의 외인성 핵산을 포함할 수 있으며, 예를 들어 5-하이드록시펜타노일-CoA 데하이드로게나제와 2,4-펜타디에노일-CoA 트랜스퍼라제의 조합, 또는 다른 예로서 5-아미노펜타노에이트 리덕타제와 5-아미노펜트-2-에노에이트 데아미나제의 조합, 또는 다른 예로서 2,4-펜타디에노에이트 데카르복실라제와 3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제의 조합, 또는 다른 예로서 3-옥소펜타노일-CoA 리덕타제와 2,4-펜타디에노일-CoA 하이드롤라제의 조합, 또는 다른 예로서 4-하이드록시-2-옥소펜타노에이트 데하이드로게나제와 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성)의 조합, 또는 다른 예로서 3-하이드록시부티레이트 리덕타제와 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제의 조합 등을 포함할 수 있다. 따라서, 생합성 경로의 2 이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합이 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체에 포함될 수 있는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 생합성 경로의 3 개 이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합이, 원하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 원하는 산물의 생산으로 귀결되는 한, 예컨대, 필요에 따라, 5-하이드록시발레레이트 데하이드로게나제, 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 트랜스퍼라제 및 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 데하이드라타제, 또는 다른 예로 펜타-2,4-디에날데카르보닐라제, 2,4-펜타디에노일-CoA 리덕타제 (산 환원) 및 5-하이드록시발레릴-CoA 데하이드라타제/데하이드로게나제, 또는 다른 예로서 2-옥소펜테노에이트 데카르복실라제, 3-부텐-1-알 리덕타제 및 3-부텐-1-올 데하이드라타제, 또는 다른 예로서 크로톤알데하이드 리덕타제, 크로토네이트 리덕타제 및 크로토닐-CoA 하이드롤라제 등의 조합이, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체에 포함될 수 있는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 생합성 경로의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11종 이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합이, 원하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 원하는 산물의 생산으로 귀결되는 한, 필요에 따라, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체에 포함될 수 있다.

[0107] 본원에 기술된 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생합성 외에도, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체 및 방법은, 또한, 다른 경로들에 의한 산물의 생합성을 달성하기 위해, 서로간의 다양한 조합으로, 그리고 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 다른 미생물 유기체 및 방법

들과의 다양한 조합으로 이용할 수 있다. 예를 들어, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생산체를 이용하는 것 이외의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하는 다른 방법은, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물을 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올로 변환시킬 수 있는 다른 미생물 유기체를 추가하는 것이다. 이러한 방법으로는, 예컨대 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물을 생산하는 미생물 유기체의 발효를 포함한다. 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물은 그런 후 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물을 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올로 변환하는 2번째 미생물에 대한 기질로서 사용할 수 있다. 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물은, 제2 유기체의 다른 배양물에 직접 첨가할 수 있거나, 또는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물 생산체의 오리지널 배양물을, 예컨대 세포 분리에 의해 이들 미생물 유기체를 제거한 다음, 발효 브로스에 제2 유기체를 첨가하여, 중간 정제 단계 없이 최종 산물을 생산할 수 있다.

[0108] 다른 구현예에서, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체 및 방법은, 예컨대, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생합성을 달성하기 위해, 매우 다양한 서브경로들로 조합될 수 있다. 이들 구현예에서, 본 발명의 바람직한 산물의 생합성 경로들을 여러가지 미생물 유기체들에 분산시키고, 이 여러가지 미생물 유기체를 공-배양하여 최종 산물을 생산할 수 있다. 이러한 생합성 공정에서, 한가지 미생물 유기체의 산물은 최종 산물이 합성될 때 까지 2번째 유기체의 기질이다. 예컨대, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생합성은, 한가지 경로의 중간 산물을 다른 경로의 중간 산물 또는 산물로의 변환시키기 위한 생합성 경로를 구비한 미생물 유기체를 구축함으로써 달성할 수 있다. 다른 예로서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올은, 또한, 동일 용기에서 2가지 유기체, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 중간 산물을 생산하는 1번째 미생물 유기체와 상기 중간 산물을 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올로 변환시키는 2번째 미생물 유기체를 이용하여 공-배양 또는 공-발효시킴으로써, 미생물 유기체로부터 생합성 방법으로 생산할 수 있다.

[0109] 본원에 제시된 교시 및 지침을 감안하여, 당해 기술 분야의 당업자라면, 다른 미생물 유기체, 서브경로를 구비한 다른 비-천연성 미생물 유기체들의 공-배양, 및 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하기 위한 당해 기술 분야에 잘 공지된 다른 화학 공정 및/또는 생화학 공정의 조합과 더불어, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체 및 방법에 대해, 매우 다양한 조합 및 변경이 존재함을 이해할 것이다.

[0110] 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로 효소 또는 단백질의 코딩 핵산의 소스는, 예컨대, 상기 코딩된 유전자 산물이 언급된 반응을 촉매할 수 있는 임의의 종을 포함할 수 있다. 이러한 종으로는, 비제한적으로, 고세균 및 유박테리아를 비롯한 박테리아, 및 효모, 식물, 곤충, 동물 및 인간을 포함한 포유류를 비롯한 진핵생물 등의, 원핵 생물 및 진핵 생물 둘다를 포함하나, 이로 한정되지 않는다. 이러한 소스의 예시적인 종으로는, 예컨대, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 아세토박터 아세티(*Acetobacter aceti*), 아세토박터 파스페리안스(*Acetobacter pasteurians*), 아크로모박터 데니트리피칸스(*Achromobacter denitrificans*), 액시드아미노코커스 퍼멘탄스(*Acidaminococcus fermentans*), 액시네토박터 바우마니이(*Acinetobacter baumanii*), 액시네토박터 베일리이(*Acinetobacter baylyi*), 액시네토박터 칼코아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*), 액시네토박터 sp. ADP1 액시네토박터 sp. Strain M-1, 액티노바실러스 숙시노게네스(*Actinobacillus Succinogenes*), 아시르토시폰 피숨(*Acyrrhosiphon pisum*), 에어로피룸 퍼닉스(*Aeropyrum pernix*), 아그로박테리움 투메팩시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 알로크로마티움 비노숨(*Allochroamatium vinosum*) DSM 180, 아나바에나 베리어빌리스(*Anabaena variabilis*), 안에어로바리오스피릴룸 숙시니시프로두센스(*Anaerobiospirillum Succiniproducens*), 안에어로스티페스 카카이(*Anaerostipes caccae*) DSM 14662, 안에어로트룬쿠스 콜리호미니스(*Anaerotruncus colihominis*), 안테라리아 야마마이(*Antheraea yamamai*), 에퀴팩스 에어올리쿠스(*Aquifex aeolicus*), 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 아르카에글로부스 풀기두스(*Archaeoglobus fulgidus*), 아르카에오글로부스 풀기두스(*Archaeoglobus fulgidus*), 아로마톨레움 아로마티쿰(*Aromatoleum aromaticum*) EbN1, 아스카리 숨(*Ascaris*

suum), 아스카리우스 슴 (*Ascarius suum*), 아스퍼질러스 니둘란스 (*Aspergillus nidulans*), 아스퍼질러스 나이거 (*Aspergillus niger*), 아스퍼질러스 오리제 (*Aspergillus oryzae*), 아스퍼질러스 테레우스 (*Aspergillus terreus*), 아스퍼질러스 테레우스 (*Aspergillus terreus*) NIH2624, 아조아르쿠스 (*Azoarcus*) *sp. CIB*, 아조아르쿠스 *sp. T*, 아조토박터 비넬란디 (*Azotobacter vinelandii*) *DJ*, 아나바에나 베리어빌리스 (*Anabaena variabilis*), 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*), 바실러스 아밀로리케팩시엔스 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*), 바실러스 코아후일렌시스 (*Bacillus coahuilensis*), 바실러스 메가테리움 (*Bacillus megaterium*), 바실러스 슈도피르무스 (*Bacillus pseudofirmus*), 바실러스 푸밀루스 (*Bacillus pumilus*), 바실러스 스페어리쿠스 (*Bacillus sphaericus*), 바실러스 썩틸리스 (*Bacillus subtilis*), 박테로이데스 카필로수스 (*Bacteroides capillosus*), 발네아리움 리소트로피쿰 (*Balnearium lithotrophicum*), 보스 타우루스 (*Bos taurus*), 브래디리조비움 자포니쿰 (*Bradyrhizobium japonicum*), 브래디리조비움 자포니쿰 *USDA110*, 브라시카 나프수스 (*Brassica napsus*), 버크홀데리아 암비파리아 (*Burkholderia ambifaria*) *AMMD*, 버크홀데리아 피마툼 (*Burkholderia phymatum*), 버크홀데리아 제노보란스 (*Burkholderia xenovorans*), 부티레이트 생산 세균 *L2-50*, 부티레이트 생산 세균 *L2-50*, 부티레이트 생산 세균 *SS3/4*, 캄필로박터 쿠르부스 (*Campylobacter curvus*) *525.92*, 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 칸디다 파랍실로시스 (*Candida parapsilosis*), 칸디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*), 카복시도서무스 하이드로게노포르만스 (*Carboxydothermus hydrgenoformans*), 클라미도모나스 라인하르트티 (*Chlamydomonas reinhardtii*), 클로로비움 리미콜라 (*chlorobium limicola*), 클로로비움 페어오박테로이데스 (*chlorobium phaeobacteroides*) *DSM 266*, 클로로비움 테피둠 (*chlorobium tepidum*), 클로로비움 테피둠 (*chlorobium tepidum*), 클로로플렉수스 아우란티아쿠스 (*chloroflexus aurantiacus*), 시트로박터 아말로나티쿠스 (*Citrobacter amalonaticus*), 시트로박터 윤게이 (*Citrobacter youngae*) *ATCC 29220*, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 (*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리듐 아미노부틸리쿰 (*Clostridium aminobutyricum*), 클로스트리듐 베이예린스키 (*Clostridium beijerinckii*), 클로스트리듐 베이예린스키 *NRRL B593*, 클로스트리듐 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 보툴리눔 *A3 str.*, 클로스트리듐 보툴리눔 *C str. Eklund*, 클로스트리듐 카복시디보란스 (*Clostridium carboxidivorans*) *P7*, 클로스트리듐 카복시디보란스 *P7*, 클로스트리듐 셀룰로리티쿰 (*Clostridium cellulolyticum*) *H10*, 클로스트리듐 클루이베리 (*Clostridium kluyveri*), 클로스트리듐 클루이베리 *DSM 555*, 클로스트리듐 노비 (*Clostridium novyi*) *NT*, 클로스트리듐 파스테우리아눔 (*Clostridium pasteurianum*), 클로스트리듐 프로피오니쿰 (*Clostridium propionicum*), 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰 (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*), 클로스트리듐 *sp. SS2/1*, 클로스트리듐 테타니 (*Clostridium tetani*), 클로스트리듐 테타노모르푸 (*Clostridium tetanomorphum*), 클로스트리듐 티로부틸리쿰 (*Clostridium tyrobutyricum*), 코마모나스 (*Comamonas*) *sp. CNB-1*, 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 글루타미쿰 *ATCC 13032*, 코리네박테리움 글루타니쿰 (*Corynebacterium glutanicum*), 쿠쿠미스 사티부스 (*Cucumis sativus*), 쿠프리아비두스 네카토르 (*Cupriavidus necator*), 쿠프리아비두스 타이바넨시스 (*Cupriavidus taiwanensis*), 시아노비움 (*Cyanobium*) *PCC7001*, 데설포비브리오 아프리카누스 (*Desulfovibrio africanus*), 데설포비브리오 데설포리칸스 (*DesulfoVibrio desulfuricans*) *G20*, 데설포비브리오 데설포리칸스 subsp. 데설포리칸스 *str. ATCC 27774*, 데설포비브리오 프럭토소보란스 (*Desulfovibrio fructosovorans*) *JJ*, 데설포비브리오 불가리스 *str. 힐덴보러프* (*Desulfovibrio vulgaris str. Hildenborough*), 디티오스텔리움 디스코이데움 (*Dictyostelium discoideum*) *AX4*, 드로소필라 멜라노가스테르 (*Drosophila melanogaster*), 엘리자베스킹기아 메닝고셉티카 (*Elizabethkingia meningoseptica*), 에리트로박터 (*Erythrobacter*) *sp. NAP1*, 에스케리키아 콜라이 *C*, 에스케리키아 콜라이 *K12*, 에스케리키아 콜라이 *K12 subsp. MG1655*, 에스케리키아 콜라이 *O157:H7 str. Sakai*, 에스케리키아 콜라이 *str. K-12 substr. MG1655*, 에스케리키아 콜라이 *W*, 유박테리움 바르케리 (*Eubacterium barkeri*), 유박테리움 렉탈 (*Eubacterium rectale*) *ATCC 33656*, 유박테리움 유리 (*Eubacterium yurii*), 유글레나 그라실리스 (*Euglena gracilis*), 플라보박테리움 루테스센스 (*Flavobacterium lutescens*), 푸조박테리움 고니디아포르만스 (*Fusobacterium gonidiaformans*), 푸조박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*), 지오바실러스 스테아로thermophilus (*Geobacillus stearothermophilus*), 지오바실러스 서모글루코시다시우스 (*Geobacillus thermoglucosidasius*), 지오박터 메탈리레두센스 (*Geobacter metallireducens*) *GS-15*, 지오박터 설푸레두센스 (*Geobacter sulfurreducens*), 지베렐라 지에이 (*Gibberella zeae*), 헤모필러스 인플루엔자 (*Haemophilus influenza*), 할로아르쿨라 마리스모르투이 (*Haloarcula marismortui*), 할로바실러스 다바넨시스 (*Halobacillus dabanensis*), 할로박테리움 살리나룸 (*Halobacterium salinarum*), 할로페락스 메디테라네이 (*Haloferax mediterranei*), 헬리코박터 필로리 (*Helicobacter pylori*), 헬리코박터 필로리 *26695*, 헬리코베르파 지아 (*Helicoverpa zea*), 헬리코박터 필로리, 호모사피엔스 (*Homo*

sapiens), 하이드로게노박터 서포밀루스 (*Hydrogenobacter thermophilus*), 제오토탄리코커스 (*Jeotgalicoccus*) *sp.* ATCC8456, 클렙시엘라 옥시토카 (*Klebsiella oxytoca*), 클렙시엘라 뉴모니아 (*Klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 뉴모니아, 클루베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*), 코쿠리아 로지아 (*Kocuria rosea*), 락토바실러스 플라나룸 (*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 *sp.* 30a, 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*), 루코노스톡 메센테로이데스 (*Leuconostoc mesenteroides*), 마크로코커스 카세올리티쿠스 (*Macrococcus caseolyticus*), 만하이미아 숙시니시프로두센스 (*Mannheimia succiniciproducens*), 마린 감마 프로테오박테리움 (*marine gamma proteobacterium*) HTCC2080, 마리노코커스 할로필러스 (*Marinococcus Halophilus*), 마리노모나스 메디테라니아 (*Marinomonas mediterranea*), 메디카고 트룬카툴라 (*Medicago truncatula*), 메조리조비움 로티 (*Mesorhizobium loti*), 메탈로스페라 세둘라 (*Metallosphaera sedula*), 메타노칼도코커스 야나치이 (*Methanocaldococcus jannaschii*), 메타노사르시나 서모필라 (*Methanosarcina thermophila*), 메타노서모박터 서마우토티로피쿠스 (*Methanothermobacter thermautotrophicus*), 메틸박테리움 엑스토르쿠엔스 (*methylobacterium extorquens*), 모렐라 서모아세티카 (*Moorella thermoacetica*), 무스 무스쿨루스 (*Mus musculus*), 무스카 도메스티카 (*Musca domestica*), 미코박테리움 아비움 (*Mycobacterium avium*), 미코박테리움 아비움 subsp. 파라투베르쿨로시스 (*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*) K-10, 미코박테리움 아비움 야종 파라투베르쿨로시스 (*Mycobacterium avium subsp. Pratum tuberculosis*), 미코박테리움 보비스 (*Mycobacterium bovis*) BCG, 미코박테리움 마리눔 (*Mycobacterium marinum*) M, 미코박테리움 스메그마티스 (*Mycobacterium smegmatis*), 미코박테리움 스미그마티스 MC2 155, 미코박테리움 투베르쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*), 나트란에이로비우스 서모필러스 (*Natranaerobius thermophilus*), 네오사르토르야 피세리 (*Neosartorya fischeri*), 니코티아나 글루티노사 (*Nicotiana glutinosa*), 니코티아나 타바쿰 (*Nicotiana tabacum*), 노크리디아 파르시니아 (*Nocardia farcinica*) IFM 10152, 노카르디아 아이오웬시스 (*Nocardia iowensis*), 노스톡 (*Nostoc*) *sp.* PCC 7120, 오리톨라구스 쿠니쿨루스 (*Oryctolagus cuniculus*), 오리자 사티바 (*Oryza sativa*), 파라코커스 데니트리피칸스 (*Paracoccus denitrificans*), 페디코커스 펜토사세우스 (*Pedicoccus pentosaceus*), 펠로박터 카르비놀리쿠스 (*Pelobacter carbinolicus*) DSM 2380, 펠로토마쿨룸 서모프로피오니쿰 (*Pelotomaculum thermopropionicum*), 페니실리움 크리스소게눔 (*Penicillium chrysogenum*), 펩톤이필루스 하레이 (*Peptoniphilus harei*), 피키아 스티피티스 (*Pichia stipitis*), 포르피로모나스 갱기발리스 (*Porphyromonas gingivalis*), 슈도알테로마노사 투니카트 (*Pseudoalteromonas tunicate*), 슈도모나스 에어루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 에어루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) PA01, 슈도모나스 플루오레센스 (*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 플루오레센스 KU-7, 슈도모나스 플루오레센스 Pf-5, 슈도모나스 크낙쿠시이 (*Pseudomonas knackmussii*) (B13), 슈도모나스 멘도시나 (*Pseudomonas mendocina*), 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 푸티다 KT2440, 슈도모나스 레이네케이 (*Pseudomonas reinekei*) MT1, 슈도모나스 *sp.*, 슈도모나스 *sp.* CF600, 슈도모나스 *sp.* CF600, 슈도모나스 *sp.* CF600, 슈도모나스 *sp.* strain B13, 슈도모나스 스투체리 (*Pseudomonas stutzeri*), 슈도라미박터 알락톨리티쿠스 (*Pseudoramibacter alactolyticus*), 피크로플렉수스 토르퀴스 (*Psychroflexus torquis*) ATCC 700755, 피로바쿨럼 에어로필룸 (*Pyrobaculum aerophilum*) str. IM2, 피로코커스 푸리오수스 (*Pyrococcus furiosus*), 랄스토니아 유티로파 (*Ralstonia eutropha*), 랄스토니아 유티로파 H16, 랄스토니아 유티로파 JMP134, 랄스토니아 메탈리두란스 (*Ralstonia metallidurans*), 랄스토니아 픽케티이 (*Ralstonia pickettii*), 라투스 노르베기쿠스 (*Rattus norvegicus*), 리조비움 레구미노사룸 (*Rhizobium leguminosarum*), 로도박터 캡슐라테스 (*Rhodobacter capsulatus*), 로도박터 캡슐라투스 (*Rhodobacter capsulatus*), 로도박터 스페어로이데스 (*Rhodobacter sphaeroides*), 로도코커스 오파쿠스 (*Rhodococcus opacus*), 로도코커스 루버 (*Rhodococcus ruber*), 로도슈도모나스 팔루스트리스 (*Rhodopseudomonas palustris*), 로도슈도모나스 팔루스트리스 CGA009, 포로스피릴룸 루브룸 (*Rhodospirillum rubrum*), 로세부리아 인테스티날리스 (*Roseburia intestinalis*) L1-82, 로세부리아 이눌리니보란스 (*Roseburia inulinivorans*), 로세부리아 (*Roseburia*) *sp.* A2-183, 로세이플렉스스 카스텐홀지이 (*Roseiflexus castenholzii*), 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 살리니스포라 아레니콜라 (*Salinispora arenicola*), 살모넬라 엔테릭 (*Salmonella enterica*), 살모넬라 엔테리카 야종 아리조네어 세로바르 (*Salmonella enterica subsp. arizonae serovar*), 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 티피무리움 LT2, 시조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 셀레노모나스 루미난티움 (*Selenomonas ruminantium*), 세라티아 마르세센스 (*Serratia marcescens*), 시몬드시아 친넨시스 (*Simmondsia chinensis*), 솔리바실러스 실베스트리스 (*Solibacillus silvestris*), 소르다리아 마크로스포라 (*Sordaria macrospora*), 스포로사르시나 유오르켄시스 (*Sporosarcina newyorkensis*), 스타필로코커스 슈드인테르메디우스 (*Staphylococcus pseudintermedius*), 스트렙토코커스 무탄스 (*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 올리고퍼멘탄스 (*Streptococcus oligofermentans*), 스트렙토코커스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) ATCC

10782, 스트렙토마이세스 클라블리게누스 (*Streptomyces clavuligenus*), 스트렙토마이세스 코엘리콜러 (*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 그리세우스 (*Streptomyces griseus*), 스트렙토마이세스 그리세우스 아종 그리세우스 (*Streptomyces griseus subsp. griseus*) NBRC 13350, 설폴로부스 액시도칼라리우스 (*Sulfolobus acidocalarius*), 설폴로부스 sp. strain 7, 설폴로부스 토코다이 (*Sulfolobus tokodaii*), 설폴로부스 토코다이 7, 설푸리하이드로게니비움 섭테라네움 (*Sulfurihydrogenibium subterraneum*), 설푸리모나스 데니트리피칸스 (*Sulfurimonas denitrificans*), 수스 스크로파 (*Sus scrofa*), 시네크코사이스티스 (*Synechocystis*) str. PCC 6803, 신티트로푸스 액시트로피쿠스 (*Syntrophus aciditrophicus*), 타우에라 아로마틱 (*Thauera aromatic*), 타우에라 아로마틱, 서모안에어로박터 브록키 (*Thermoanaerobacter brockii*) HTD4, 서모크리니스 알부스 (*Thermocrinis albus*), 서모프로테우스 뉴트로필러스 (*Thermoproteus neutrophilus*), 서모토가 마리티임 (*Thermotoga maritima*), 서무스 서모필러스 (*Thermus thermophilus*), 티오바실러스 데니트리피칸스 (*Thiobacillus denitrificans*), 트레포네마 덴티콜라 (*Treponema denticola*), 트리코모나스 바기날리스 (*Trichomonas vaginalis*) G3, 트리파노소마 브루세이 (*Trypanosoma brucei*), 츠카무렐라 파우로메타볼라 (*Tsukamurella paurometabola*) DSM 20162, 비브리오 콜레라 (*Vibrio cholera*), 비브리오 파라하몰리티쿠스 (*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 불니피쿠스 (*Vibrio vulnificus*), 비티스 비니페라 (*Vitis vinifera*), 야로이와 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*), 예르시니아 인터메디아 (*Yersinia intermedia*) ATCC 29909, 지아메이스 (*Zea mays*), 주글로에아 라미게라 (*Zoogloea ramigera*), 자이모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*), 카르타무스 틴크토리우스 (*Carthamus tinctorius*), 쿠페아 후케리아나 (*Cuphea hookeriana*), 쿠페아 팔루스트리스 (*Cuphea palustris*), 시아노테세 (*Cyanotheca*) sp. PCC 7425, 엘리자베스킹기아 메닝고셉티카 (*Elizabethkingia meningoseptica*), 링비아 (*Lyngbya*) sp. PCC 8106, 노둘라리아 스푸미게나 (*Nodularia spumigena*) CCY9414, 노스톡 아졸레이 (*Nostoc azollae*), 플라스모디움 팔시파룸 (*Plasmodium falciparum*), 프로클로로코커스 마리누스 (*Prochlorococcus marinus*), 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코커스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) ATCC 10782, 스트렙토마이세스 아버미틸리스 (*Streptomyces avermitilis*), 시네크코커스 엘롱가투스 (*Synechococcus elongatus*), 시네크코커스 엘롱가투스 PCC7942, 서모마이세스 라누기노수스 (*Thermomyces lanuginosus*), 움벨루라리아 칼리포르니카 (*Umbellularia californica*), 아라비돕시스 탈리아나 (*Arabidopsis thaliana*) col, 엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*), 미코플라스마 뉴모니아 (*Mycoplasma pneumoniae*) M129, 포플루스 알바 (*Populus alba*), 포플루스 트레몰라 (*Populus tremula*), 푸에라리아 몬타나 (*Pueraria montana*), 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 스트렙토마이세스 sp. ACT-1, 서모토가 마리티임 (*Thermotoga maritima*) MSB8, 스트렙토마이세스 sp. CL190, 스트렙토마이세스 sp. KO-3988, 스트렙토마이세스 시나몬엔시스 (*Streptomyces cinnamonensis*), 스트렙토마이세스 아눌라투스 (*Streptomyces anulatus*), 노카르디아 브라질리엔시스 (*Nocardia brasiliensis*) 뿐만 아니라 본원에 기술된 기타 예시적인 종들을 포함하며, 해당 유전자에 대한 소스 유기체로서 이용가능하다. 그러나, 395종의 미생물 계통 및 다양한 효모, 진균, 식물 및 포유류 계통을 비롯하여, 현재 550 종 이상에 대해 이용가능한 전체 계통 서열을 이용하여 (NCBI 등의 공공 데이터베이스에 이용가능한 것의 절반 이상), 예컨대 공지 유전자의 상동체, 오르소로그, 파라로그 및 비-오르소로그 유전자 치환, 및 유기체들 간의 유전자 변이의 상호교환을 비롯하여, 관련 또는 비관련 종들에서의 하나 이상의 유전자에 대한 필수적인 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 활성을 코딩하는 유전자의 동정은, 일상적이며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 즉, 에스케리키아 콜라이 등의 특정 유기체에 대해, 본원에 기술된 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생합성이 가능한 대사적 변이는, 원핵 및 진핵 유기체 등의, 다른 미생물들에도 쉽게 적용할 수 있다. 본원에 제시된 교시 내용과 지침을 감안하여, 당해 기술 분야의 당업자라면, 한가지 유기체에서 예시된 대사적 변이를 다른 유기체에도 동일하게 적용할 수 있다는 것을 알 것이다.

[0111]

비관련 종들에 대한적인 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로가 존재하는 경우 등의 일부 경우들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성은, 예컨대 언급된 반응을 대체하기 위해 유사하지만 동일하지 않은 대사 반응을 촉매하는 비관련 종들로부터 파라로그 또는 파라로그들을 외인적으로 발현시킴으로써, 숙주 종에 부여할 수 있다. 여러가지 유기체들 간에 대사 네트워크에 대한 일정한 차이가 존재하기 때문에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 상이한 유기체들간의 실제 유전자 용법은 상이할 수 있음을 이해할 것이다. 그러나, 본원에 제시된 교시 및 지침 하에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 합성할 대상 종에서 미생물 유기체를 구축하기 위해, 본 발명의 내용과 방법들을 본원에 예시된 내용에 동족의 대사 변이를 이용하여 모든 미생물 유기체에 적용할 수 있음

을 이해할 것이다.

- [0112] 비천연성 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생산 속주의 구축 방법 및 발현 수준을 테스트하는 방법은, 예컨대 당해 기술 분야에 공지된 재조합 및 검출 방법에 의해 수행할 수 있다. 이러한 방법은, 예컨대, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); 및 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)에 언급된 내용에서 볼 수 있다.
- [0113] 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생산 경로에 참여하는 외인성 핵산 서열은, 비제한적인 예로서, 접합, 전기충격, 화학적 형질전환, 형질전이, 형질감염 및 초음파 형질전환 등의 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 기법을 이용하여 숙주 세포로 안정적으로 또는 일시적으로 도입할 수 있다. 에스케리키아 콜라이 또는 다른 원핵 생물 세포에서의 외인성 발현을 위해서는, 진핵 생물의 핵산의 유전자 또는 cDNA내 일부 핵산 서열은 N-말단 미토콘드리아 신호 또는 다른 타겟팅 신호와 같은 타겟팅 신호를 코딩할 수 있으며, 상기 신호는 필요에 따라 원핵 생물 숙주 세포에 형질전환시키기 전에 제거될 수 있다. 예컨대, 미토콘드리아 리더 서열을 제거하면, 에스케리키아 콜라이에서의 발현 증가로 이어진다 (Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005)). 효모 또는 다른 진핵 생물 세포에서의 외인성 발현을 위해서는, 유전자를 리더 서열을 첨가하지 않고, 세포질에서 발현시키거나, 또는 숙주 세포에 적합한 미토콘드리아 표적 또는 분비 신호 등의 적합한 표적 신호를 부가함으로써, 미토콘드리아 또는 다른 기관으로 타겟팅하거나 또는 분비되도록 타겟화할 수 있다. 즉, 타겟팅 서열을 제거하거나 포함시키기 위한 핵산 서열에서의 적절한 변형이 바람직한 특성을 부여하기 위해 외인성 핵산 서열에 통합시킬 수 있는 것으로 이해된다. 아울러, 유전자는 단백질의 발현 최적화를 달성하기 위해, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 기법으로 코돈 최적화를 수행할 수 있다.
- [0114] 발현 벡터 또는 벡터들은, 숙주 유기체에서 기능하는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본원에 예시된 바와 같은 하나 이상의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로를 코딩하는 핵산을 포함하도록 구축할 수 있다. 본 발명의 미생물 숙주 유기체에서 이용하기 위해 적용가능한 발현 벡터는, 예컨대, 플라스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜 및 숙주 염색체내로의 안정적인 삽입을 위해 작동가능한 벡터 및 선택 서열 또는 마커를 포함하는 인공 염색체를 포함한다. 또한, 발현 벡터는 하나 이상의 선택성 마커 유전자와 적합한 발현 조절 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항생제 또는 독소에 대한 내성, 보완적인 영양요구성 결핍, 또는 배양 배지에 없는 주요 영양원의 공급을 제공하는, 선택성 마커 유전자도 포함시킬 수 있다. 발현 조절 서열은 당해 기술 분야에 널리 공지된 구성적인 프로모터, 유도성 프로모터, 전사 인핸서, 전사 종결자 등을 포함할 수 있다. 2 이상의 외인성 코딩 핵산을 공동으로 발현시켜야 하는 경우, 이들 핵산 둘다를 예를 들어 하나의 발현 벡터 또는 각각의 발현 벡터에 삽입시킬 수 있다. 하나의 벡터에서 발현시키는 경우, 코딩 핵산을 하나의 공통 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결시키거나 또는 하나의 유도성 프로모터 및 하나의 구성적 프로모터와 같은 다른 발현 조절 서열에 연결시킬 수 있다. 대사 또는 합성 경로에 관여하는 외인성 핵산 서열의 형질전환은 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법으로 검증할 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 핵산 분석, 예를 들어 mRNA의 노던 블롯 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭, 또는 유전자 산물의 발현에 대한 면역블롯팅, 또는 도입된 핵산 서열 또는 이의 상응하는 유전자 산물의 발현을 테스트하기 위한 기타 적합한 분석 방법을 포함한다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 외인성 핵산이 바람직한 산물을 생산하기에 충분한 양으로 발현됨을 알 것이며, 발현 수준을 당해 기술 분야에 널리 공지되고 본원에 개시된 방법을 이용하여 충분한 발현이 이루어지도록 최적화할 수 있음을 또한 알 것이다.
- [0115] 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생산을 테스트하기 위한 적합한 정제 및/또는 분석은 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 테스트할 조작된 각 군주에 대해 3세트 배양물 등의 적정 레플리케이트로 증식시킬 수 있다. 예를 들어, 조작된 생산 숙주에서의 산물 및 부산물의 생성을 모니터링할 수 있다. 최종 산물 및 중간산물, 및 기타 유기 화합물은 HPLC(고성능 액체 크로마토그래피), GC-MS(기체 크로마토그래피-질량 분광학) 및 LC-MS(액체 크로마토그래피-질량 분광학) 또는 당해 기술 분야에 널리 공지된 통상적인 절차를 이용하는 그외 적정 분석 방법으로 분석할 수 있다. 발효 브로스내 산물의 분비는, 또한, 배양 상층액을 이용하여 테스트할 수 있다. 부산물 및 잔류 글루코스는, 예컨대 글루코스 및 알코올의 경우 굴절률 검출기, 유기산의 경우 UV 검출기(Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779 (2005))를 이용하여 HPLC로, 또는 당해 기술 분야에 널리 공지된 그외 적합한 분석 및 검출 방법으로 정량할 수 있다. 또한, 외인성 DNA 서열로부터 유래된 각 효소 또는 단백질의 활성은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 분석할 수 있다.

- [0116] 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올은 당해 기술 분야에 잘 알려진 다양한 방법을 이용하여 배양물내 다른 성분들로부터 분리할 수 있다. 이러한 분리 방법으로는, 예컨대 추출 방법 뿐만 아니라, 연속적인 액체-액체 추출, 투석증발(pervaporation), 막 여과, 막 분리, 역삼투압, 전기투석, 증류, 결정화, 원심분리, 추출 여과(extractive filtration), 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 및 한외여과를 비롯한 방법들을 포함한다. 상기 방법들 모두 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.
- [0117] 본원에 기술된 임의의 비-천연성 미생물 유기체는 배양하여, 본 발명의 생합성 산물을 생산 및/또는 분리할 수 있다. 예컨대, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생산체를 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생합성 생산을 위해 배양할 수 있다.
- [0118] 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하기 위해, 재조합 균주를 탄소원과 기타 필수 영양원이 첨가된 배지에서 배양한다. 전 공정의 단가를 낮추기 위해, 발효기를 혐기성 조건으로 유지하는 것이 때로는 바람직하며, 매우 바람직할 수 있다. 이러한 조건은, 예컨대, 배지에 질소를 일차 분사한 다음, 격막(septum)과 크림프-캡으로 플라스크를 밀봉함으로써 달성할 수 있다. 혐기 조건에서는 증식이 관찰되지 않는 균주의 경우, 제한된 호기를 위해 격막에 작은 구멍을 뚫어 미세호기 조건 또는 실질적으로 혐기 조건을 적용할 수 있다. 혐기 조건의 예들은 종래에 개시되어 있으며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 호기 조건 및 혐기 조건의 예들은 2007년 8월 10일자 미국 공개 공보 2009/0047719에 기술되어 있다. 발효는 본원에 개시된 바와 같이 배치, 피드-배치 또는 연속적인 방식으로 수행할 수 있다. 또한, 발효는 필요에 따라 2개의 단계로 수행할 수 있다. 제1 단계는 고증식과 그에 따른 고 생산성을 위한 호기 조건일 수 있으며, 그런 후, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 고수율을 위한 혐기 조건이 후속될 수 있다.
- [0119] 적절한 경우, 배지의 pH는, 배양 배지를 원하는 pH로 유지하기 위해, 필요에 따라, NaOH 또는 기타 염기, 또는 산을 첨가함으로써, 바람직한 pH, 특히 pH 약 7과 같은 중성 pH로 유지시킬 수 있다. 증식율은 분광광도계(600 nm)를 이용하여 광학 밀도를 측정함으로써 결정할 수 있으며, 글루코스 흡수율(uptake rate)은 시간에 따른 탄소원 고갈을 모니터링함으로써 결정할 수 있다.
- [0120] 배양 배지는, 예컨대 비-천연성 미생물에 탄소원을 공급할 수 있는 임의의 탄수화물원을 포함할 수 있다. 이러한 탄수화물원으로는, 예컨대 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스, 프럭토스, 슈크로스 및 스타치와 같은 당을 포함한다. 기타 탄수화물원으로는, 예컨대 재생 원료 및 바이오매스를 포함한다. 본 발명의 방법에 공급 원료로서 이용될 수 있는 타입의 바이오매스의 예로는, 셀룰로직 바이오매스, 헤미셀룰로직 바이오매스 및 리그닌 공급원료 또는 공급원료의 일부를 포함한다. 이러한 바이오매스 공급원료로는, 예컨대 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스, 프럭토스 및 스타치와 같이 탄소원으로서 이용가능한 탄수화물 기질을 포함한다. 본원에 제시된 교시 및 지침을 고려하여, 당해 기술 분야의 당업자라면, 상기에 예시된 것 이외의 재생 원료 및 바이오매스가 또한 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하기 위한 발명의 미생물 유기체 배양에 사용될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0121] 상기 예시된 바와 같은 재생 원료 외에도, 본 발명의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 미생물 유기체는 또한 탄소원으로서 합성가스(syngas)에서도 성장하도록 변형될 수 있다. 이러한 구체적인 구현예에서, 합성 가스 또는 기타 가스상 탄소원을 이용하는 대사 경로를 제공하기 위해, 하나 이상의 단백질 또는 효소를 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생산 유기체에서 발현시킨다.
- [0122] 합성 가스(syngas) 또는 발생로 가스(producer gas)라고도 하는 합성 가스(synthesis gas)는, 석탄의 기체화와, 농업 작물 및 잔류물 등의 바이오매스 물질과 같은 탄소질 물질의 주요 산물이다. 합성 가스는 주로 H_2 및 CO로 구성된 혼합물이며, 비제한적인 예로, 석탄, 석탄 오일, 천연 가스, 바이오매스 및 폐 유기 물질 등의 임의의 유기 공급원의 기체화로부터 수득할 수 있다. 기체화는 일반적으로 높은 연료 대 산소 비율 하에 수행된다. 주로 H_2 및 CO이지만, 합성 가스는 CO_2 및 다른 기체도 소량 포함할 수 있다. 따라서, 합성 가스는 CO, 추가적으로 CO_2 등의 가스상 탄소에 대한 비용 효율적인 소스로 제공된다.
- [0123] Wood-Ljungdahl 경로는 CO와 H_2 의 아세틸-CoA와 아세테이트 등의 기타 산물로의 변환을 촉매한다. 또한, CO 및 합성가스를 이용할 수 있는 유기체는, 일반적으로, Wood-Ljungdahl 경로에 포함된 효소 및 변환

(transformation)의 동일한 기본적인 세트를 통해, CO₂ 및 CO₂/H₂ 혼합물을 이용하는 능력을 가진다. 또한, 동일 유기체에 의해 CO가 이용될 수 있으며 동일한 경로가 관여된다는 것이 밝혀지기 전까지는, 오랜동안 미생물이 이산화탄소를 H₂-의존적인 방식으로 아세테이트로 변환시키는 것으로 인식되었다. 수소가 필수 환원 당량(reducing equivalent)의 공급원으로서 제공되는 한, 다수의 초산 생성균들을 이산화탄소의 존재 하에 증식시킬 수 있으며 아세테이트와 같은 화합물이 생산된다는 것이 확인되었다(예, Drake, *Acetogenesis*, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994)). 이를 아래 등식으로 정리할 수 있다:



[0125] 이때, Wood-Ljungdah 경로를 가지고 있는 비-천연성 미생물은 CO₂ 및 H₂ 혼합물을 이용할 수 있을 뿐만 아니라, 아세틸-CoA와 기타 원하는 산물을 만들 수 있다.

[0126] Wood-Ljungdahl 경로는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 2가지의 분지로 분류될 수 있는 12가지의 반응으로 구성되어 있다: (1) 메틸 분지와 (2) 카르보닐 분지. 메틸 분지는 합성 가스를 메틸-테트라하이드로폴레이트(메틸-THF)로 변환시키고, 카르보닐 분지는 메틸-THF를 아세틸-CoA로 변환시킨다. 메틸 분지에서의 반응들은 다음과 같은 효소 또는 단백질에 의해 순차적으로 촉매된다: 페레독신 옥시도리덕타제, 포르메이트 데하이드로게나제, 포르밀테트라하이드로폴레이트 신테타제, 메틸테트라하이드로폴레이트 사이클로데하이드라타제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제 및 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제. 카르보닐 분지에서의 반응들은 다음과 같은 효소 또는 단백질에 의해 순차적으로 촉매된다: 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제(예, AcsE), 코리노이드 철-황 단백질, 니켈-단백질 어셈블리 단백질(예, AcsF), 페레독신, 아세틸-CoA 신테타제, 카본 모노옥사이드 데하이드로게나제 및 니켈-단백질 어셈블리 단백질(예, CooC). 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구현하기 위해 충분한 수의 코딩 핵산을 도입하는 것에 대한 본원에 제공된 내용 및 지침에 따라, 당해 기술 분야의 당업자는, 숙주 유기체에 존재하지 않는 Wood-Ljungdahl 효소 또는 단백질을 코딩하는 핵산을 적어도 도입하는 측면에 대해, 동일한 조작 설계를 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 변형된 유기체에 Wood-Ljungdah의 전 경로가 포함되도록, 하나 이상의 코딩 핵산을 본 발명의 미생물에 도입함으로써, 합성 가스의 이용 능력이 부여될 것이다.

[0127] 부가적으로, 일산화탄소 데하이드로게나제 및/또는 하이드로게나제 활성화와 커플링된 환원성(리버스) 트리카르복실산 사이클로 CO, CO₂ 및/또는 H₂의 아세틸-CoA 및 아세테이트와 같은 기타 산물로의 변환에 사용될 수 있다. 환원성 TCA 경로를 경유하여 탄소를 고정할 수 있는 유기체들은 다음과 같은 효소들 하나 이상을 이용할 수 있다: ATP 시트레이트-리아제, 시트레이트 리아제, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마레이트 리덕타제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 일산화탄소 데하이드로게나제 및 하이드로게나제. 특히, 일산화탄소 데하이드로게나제와 하이드로게나제에 의해 CO 및/또는 H₂로부터 추출된 환원 당량은 환원성 TCA 사이클을 통해 CO₂를 아세틸-CoA 또는 아세테이트로 고정하는데 사용된다. 아세테이트는 아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세테이트 키나제/포스포트랜스아세틸라제 및 아세틸-CoA 신테타제 등의 효소에 의해 아세틸-CoA로 변환될 수 있다. 아세틸-CoA는, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제와 글로코신합성 효소에 의해, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 전구체, 글리세르알데하이드-3-포스페이트, 포스포에놀피루베이트 및 피루베이트로 변환될 수 있다. 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구축하기 위해 충분한 수의 코딩 핵산을 도입하는 본원에 제시된 교시와 지침에 따라, 당해 기술 분야의 당업자는, 숙주 유기체에 없는 환원성 TCA 경로 효소들 또는 단백질들을 코딩하는 핵산을 적어도 도입하는 것과 관련하여, 동일한 조작 설계를 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 변형된 유기체가 환원성 TCA 경로를 구비하도록 본 발명의 미생물 유기체에 하나 이상의 코딩 핵산을 도입함으로써, 합성가능 이용력을 부여할 수 있다.

[0128] 이에, 본 발명은 또한 부분적으로 중요한 대사 중간 산물에서 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올로의 경로를 통한 탄소 플럭스를 개선시키도록 조작된 생합성 경로에 관한 것이다. 본 발명은, 다양한 효소적 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 변환 경로를 촉매할 수 있는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 가진 비-천연성 미생물 유기체를 제공한다. 일부 구현예들에서, 이들 효소적 변환은 환원성 트리카르복실산(RTCA)의 일부이며, 이를 사용하여 비제한적인 예로 탄수화물-기반의 탄소 공급원료로부터의 생산 수율을 개선시킨다.

- [0129] 다양한 조작된 경로에서, 환원 당량 부족 또는 환원 당량 및/또는 탄소의 부산물로의 소실은 탄수화물 공급원료를 기반으로 한 최대 생산 수율 실현을 저해한다. 일부 구현예들에 따라, 본 발명은 (i) 환원성 TCA 사이클을 통한 탄소 고정을 강화하거나 및/또는 (ii) CO, CO₂ 및/또는 H₂와 같은 기체상 탄소원 및/또는 합성가스 성분으로부터 추가적인 환원 당량을 입수함으로써, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 수율을 높인다. 합성가스 외에도, 이러한 가스의 다른 소스로, 비제한적인 예로, 천연 또는 인공 대기를 포함한다.
- [0130] CO₂를 고정하는 환원성 트리카르복실산 (RTCA) 사이클은 환원 당량과 ATP를 이용하여 CO₂를 동화하는 내인성 동화 경로이다 (도 8). RTCA 사이클 1회 작동으로, CO₂ 2몰이 아세틸-CoA 1몰로 또는 CO₂ 4몰이 옥살로아세테이트 1몰로 동화된다. 이러한 추가적인 아세틸-CoA 이용성은 탄수화물-기반의 탄소 공급원료로부터 유래되는 생산 분자들의 이론적인 최대 수율을 개선시킨다. 탄수화물의 예로는 글루코스, 슈크로스, 자일로스, 아라비노스 및 글리세롤을 포함하나, 이들로 한정되지 않는다.
- [0131] 일부 구현예들에서, 환원성 TCA 사이클은, 일산화탄소 데하이드로게나제 및/또는 하이드로게나제 효소들과 함께 사용하여, 미생물에 의한 합성가스, CO₂, CO, H₂ 및/또는 기타 기체상 탄소원 활용을 가능하게 할 수 있다. 합성가스 (synthesis gas, syngas)는, 임의의 유기 공급원료, 예를 들면 석탄, 석유, 천연 가스, 바이오매스, 또는 폐 유기물의 기체화를 통해 수득할 수 있는, 특히 주로 H₂ 및 CO의 혼합물이며, 때로는 일정량의 CO₂를 포함한다. 수많은 기체화 공정들이 개발되었으며, 대부분의 설계는 부분 산화를 기반으로 하며, 이 경우 산소 제한은 고온 (500-1500℃)에서 유기물의 완전 연소를 방지하여 합성가스를 0.5:1-3:1 H₂/CO 혼합물로서 수득되게 한다. 석탄 외에도, 많은 유형의 바이오매스들이 합성가스 생산에 사용되고 있으며, 재생가능한 화학물질과 연료를 생물학적으로 생산하기 위한 저렴하고 유연한 공급원료이다. 이산화탄소는 대기로부터 또는 예를 들면, 탱크 실린더로부터 압축된 형태로, 또는 고체 CO₂의 승화를 통해 제공될 수 있다. 마찬가지로, CO 및 수소 가스는 시약 형태로 및/또는 임의의 원하는 비율로 혼합된 형태로 제공될 수 있다. 기타 기체상 탄소 형태로는, 예를 들면, 메탄올 또는 유사한 휘발성 유기 용매를 포함할 수 있다.
- [0132] 합성가스 및/또는 기타 탄소원 성분들은 환원성 TCA 사이클을 작동시키기 위한 충분한 CO₂, 환원 당량 및 ATP를 제공할 수 있다. RTCA 사이클 1회 작동시, CO₂ 2몰이 아세틸-CoA 1몰로 동화되며, 이때 ATP 2개와 및 환원 당량 4개가 필요하다. CO 및/또는 H₂는 각각 일산화탄소 데하이드로게나제 및 하이드로게나제 효소를 이용함으로써 환원 당량을 제공할 수 있다. 환원 당량은 NADH, NADPH, FADH, 환원된 퀴논, 환원된 페레독신, 환원된 플라보독신 및 티오레독신 형태로 유입될 수 있다. 환원 당량들, 특히 NADH, NADPH 및 환원된 페레독신은, RTCA 사이클 효소들, 예를 들면, 말레이트 데하이드로게나제, 푸마레이트 리덕타제, 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제 (2-옥소글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제, 알파-케토글루타레이트 신타제, 또는 2-옥소글루타레이트 신타제라고도 함), 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제 및 이소시트레이트 데하이드로게나제의 조인자로 사용할 수 있다. 이들 환원 당량으로부터 유래된 전자는, 대안적으로는, 이온-농도구배를 형성하는 전자 전달 체인을 통해 흐를 수 있으며, 이때 전자는 어셉터, 예를 들면 산소, 질산염, 산화된 금속 이온, 양성자 또는 전극으로 전달된다. ATP 신타제 또는 유사 효소를 통한 ATP 생성에 이온-농도구배가 이용될 수 있다.
- [0133] 환원성 TCA 사이클은 녹황 광합성 박테리아인 클로로븀 리미콜라 (*Chlorobium limicola*)에서 처음으로 보고되었다 (Evans et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55:928-934 (1966)). 일부 원핵생물 (프로테오박테리아, 녹황 세균 및 호열성 크날가스 (Knallgas) 세균) 및 황-의존성 고세균에서도 유사한 경로들이 특정화되었다 (Hugler et al., *J. Bacteriol.* 187:3020-3027 (2005); Hugler et al., *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007)). 일부 사례들에서는, 환원적 및 산화적 (크랩) TCA 사이클들이 동일한 유기체에 존재하고 있다 (Hugler et al., *supra* (2007); Siebers et al., *J. Bacteriol.* 186:2179-2194 (2004)). 일부 메탄생성 및 편성 혐기성균들은 생합성 중간산물을 합성하는 기능을 할 수 있는 불완전한 산화적 또는 환원성 TCA 사이클을 가지고 있다 (Ekiel et al., *J. Bacteriol.* 162:905-908 (1985); Wood et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 28:335-352 (2004)).
- [0134] 환원성 TCA 사이클의 주된 탄소-고정 효소는 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제 및 이소시트레이트 데하이드로게나제이다. 포스포에놀피루베이트 카르복실라제 또는 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제에 의한 포스포에놀피루베이트의 옥살로아세테이트로의 변환, 또는 말릭 효소에 의한 피루베이트의 말레이트로의 변환이 이루어지는 동안, 추가적인 탄소가 고정될 수도 있다.

- [0135] TCA 사이클에서 다수의 효소들이 가역적이며, 환원 방향과 산화 방향으로 반응을 촉매할 수 있다. 그러나, 일부 TCA 사이클 반응들은 생체내에서 비가역적이어서, 리버스 TCA 사이클에 필요한 방향으로 이들 반응들을 촉매하기 위해서는 다른 효소들이 사용된다. 이러한 반응으로는, (1) 시트레이트의 옥살로아세테이트 및 아세틸-CoA로의 변환, (2) 푸마레이트의 숙시네이트로의 변환, 및 (3) 숙시닐-CoA의 알파-케토글루타레이트로의 변환이 있다. TCA 사이클에서, 시트레이트는 옥살로아세테이트와 아세틸-CoA의 축합으로 생성된다. 역방향 반응, 즉 시트레이트를 옥살로아세테이트 및 아세틸-CoA로 절단하는 반응은 ATP-의존적이며, ATP-시트레이트 리아제, 또는 사이트릴-CoA 신테타제 및 사이트릴-CoA 리아제에 의해 촉매된다. 다른 예로, 시트레이트 리아제는 아세틸-CoA 신테타제, 아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 포스포트랜스아세틸라제 및 아세테이트 키나제와 커플링되어, 시트레이트로부터 아세틸-CoA와 옥살로아세테이트를 만들어 낼 수 있다. 숙시네이트를 푸마레이트로 변환하는 반응은 숙시네이트 데하이드로게나제에 의해 촉매되며, 역방향 반응은 푸마레이트 리덕타제에 의해 촉매된다. TCA 사이클에서, 숙시닐-CoA는 알파-케토글루타레이트 데하이드로게나제 복합체에 의해, 알파-케토글루타레이트의 NAD(P)^+ 의존적인 탈카르복시화로부터 만들어진다. 역방향 반응은 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제에 의해 촉매된다.
- [0136] 1) CO, 2) CO₂ 및 H₂, 3) CO 및 CO₂, 4) CO 및 H₂를 포함하는 합성 기체, 및 5) CO, CO₂ 및 H₂를 포함하는 합성 기체 또는 다른 기체성 탄소원에서 아세틸-CoA 유래 산물을 생산할 수 있도록 역방향 트리카르복실산 사이클을 이용할 수 있는 유기체는, 다음과 같은 임의의 효소 활성을 포함할 수 있다: ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마레이트 리덕타제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, 아세테이트 키나제, 포스포트랜스아세틸라제, 아세틸-CoA 신테타제, 아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 일산화탄소 데하이드로게나제, 하이드로게나제, 및 페레독신 (도 9 참조). 이러한 활성에 필요한 효소와 해당 유전자들은 본원에 기술되어 있다.
- [0137] 합성가스 또는 기타 기체성 탄소원으로부터 유래된 탄소는 리버스 TCA 사이클 및 이의 구성원을 경유하여 고정할 수 있다. 구체적으로, 특정 탄소 기체-활용 경로 구성요소들을, 아세틸-CoA로부터 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 제조하는 경로와 조합하는 경우, 외부에서 제공되거나 또는 CO로부터 내부적으로 생성되는 일산화탄소에 존재하는 탄소를 아세틸-CoA로 고정하기 위한 효율적인 기전을 제공함으로써 이들 산물의 고수율이 달성된다.
- [0138] 일부 구현예들에서, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체에서는, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로가, (1) CO, (2) CO₂, (3) H₂, 또는 이들의 혼합물 중 임의의 조합을 이용함으로써, 환원성 TCA 사이클 운영을 비롯하여, 환원에 참여하는 생합성 공정들의 수율을 높일 수 있다.
- [0139] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 환원성 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함한다. 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 아코니타제, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제; 및 (1) CO, (2) CO₂, (3) H₂, (4) CO₂ + H₂, (5) CO + CO₂, (6) CO + H₂, 또는 (7) CO + CO₂ + H₂를 이용할 수 있을 만큼 충분한 양으로 발현되는, 일산화탄소 데하이드로게나제, 하이드로게나제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제 및 페레독신으로부터 선택되는 하나 이상의 외인성 효소로부터 선택된다.
- [0140] 일부 구현예들에서, 방법은, 환원성 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 또한 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함한다. 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 아코니타제, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제로부터 선택된다. 부가적으로, 이러한 유기체는 또한 산물을 생산하기 위해, (1) CO, (2) CO₂, (3) H₂, (4) CO₂ + H₂, (5) CO + CO₂, (6) CO + H₂, 또는 (7) CO + CO₂ + H₂를 이용할 수 있을 만큼 충분한 양으로 발현되는, 일산화탄소 데하이드로게나제, 하이드로게나제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제 및 페레독신으로부터 선택되는 하나 이상의 외인성 효소를 포함할 수 있다.
- [0141] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는, 일산화탄소 및/또는 수소의 존재 하에 환원 당량의 이용성을

강화함으로써 탄수화물-기반의 탄소 공급원료를 통해 레독스-제한된 산물의 수율을 높이기 위해, 충분한 양으로 발현되는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함한다.

[0142] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는, 아세틸-CoA를 경유한 탄소 흐름을 강화하기 위해 충분한 양으로 발현되는 환원성 TCA 경로 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 추가로 포함한다. 하나 이상의 외인성 핵산은 ATP-시트레이트 리아제, 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 아코니타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제로부터 선택된다.

[0143] 일부 구현예에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는, 일산화탄소 및/또는 수소의 존재 하에 환원 당량의 이용성을 강화함으로써 탄수화물-기반의 탄소 공급원료를 통해 레독스-제한된 산물의 수율을 높이기 위해, 충분한 양으로 발현되는 효소를 코딩하는 하나 이상의 외인성 핵산을 포함한다. 상기 하나 이상의 외인성 핵산은 일산화탄소 데하이드로게나제, 하이드로게나제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제 및 페레독신으로부터 선택된다. 일부 구현예들에서, 본 발명은, 이러한 비-천연성 미생물 유기체를 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하는 조건과 충분한 기간 동안 배양하는 단계를 포함하는, 일산화탄소 및/또는 수소의 존재 하에 환원 당량의 이용성을 강화함으로써 당 또는 기체상 탄소 소스 등의 탄수화물-기반의 탄소 공급원료를 통한 레독스-제한된 산물의 수율을 높이는 방법을 제공한다.

[0144] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 환원성 TCA 경로 효소를 각각 코딩하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 환원성 TCA 경로 효소를 각각 코딩하는 3종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 구현예들에서, 상기 비-천연성 미생물 유기체는 ATP-시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제를 코딩하는 3종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 구현예들에서, 상기 비-천연성 미생물 유기체는 시트레이트 리아제, 푸마레이트 리덕타제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제를 코딩하는 3종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 구현예들에서, 상기 비-천연성 미생물 유기체는 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제; 포스포에놀피루베이트 카르복실라제 또는 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, CO 데하이드로게나제; 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 4종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 구현예들에서, 상기 비-천연성 미생물 유기체는 CO 데하이드로게나제 및 H₂ 하이드로게나제를 코딩하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다.

[0145] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, 아세테이트 키나제, 포스포트랜스아세틸라제, 아세틸-CoA 신테타제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다.

[0146] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 일산화탄소 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 신테타제, 페레독신, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제 및 이들의 조합으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 외인성 핵산을 추가로 포함한다.

[0147] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는, (1) CO, (2) CO₂, (3) CO₂ + H₂, (4) CO + H₂, 또는 (5) CO + CO₂ + H₂로부터 선택되는 탄소 공급원료를 이용한다. 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 환원 당량을 위해 수소를 이용한다. 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 환원 당량을 위해 CO를 이용한다. 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 환원 당량을 위해 CO와 수소의 조합을 이용한다.

[0148] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-

1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, 피루베이트 카르복실라제 및 말릭 효소 (malic enzyme)로부터 선택되는 효소를 코딩하는 1종 이상의 핵산을 추가로 포함한다.

[0149] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 말레이트 데하이드로게나제, 푸마라제, 푸마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 신테타제, 및 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제로부터 선택되는 효소를 코딩하는 1종 이상의 핵산을 추가로 포함한다.

[0150] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로를 구비한 비-천연성 미생물 유기체는 시트레이트 리아제, ATP-시트레이트 리아제, 사이트릴-CoA 신테타제, 사이트릴-CoA 리아제, 아코니타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 숙시닐-CoA 신테타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, 아세테이트 키나제, 포스포트랜스아세틸라제, 아세틸-CoA 신테타제, 및 페레독신을 코딩하는 1종 이상의 외인성 핵산을 추가적으로 포함한다.

[0151] 이에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 본원에 기술된 교시 및 지침을 참조하여, 탄수화물 등의 탄소원에서 배양하였을 때 본 발명의 생합성한 화합물을 분비하는 비-천연성 미생물 유기체를 생산할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 이러한 화합물로는 예를 들어 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올과, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 임의의 중간 대사산물을 포함한다. 예를 들어 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생합성 경로들 일부 또는 전체를 포함하는 등의, 원하는 화합물 또는 중간 산물의 생합성을 달성하기 위해 한가지 이상의 필수 효소 또는 단백질 활성 중 한가지 이상을 조작하는 것이 필요한 전부이다. 이에, 본 발명은, 탄수화물 또는 기타 탄소원에서 배양하였을 때 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산 및/또는 분비하고, 탄수화물 또는 기타 탄소원에서 배양하였을 때 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로에서 보여지는 임의의 중간 대사산물을 생산 및/또는 분비하는 비-천연성 미생물 유기체를 제공한다. 본 발명의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하는 미생물 유기체는 중간 산물, 예컨대, 5-아미노펜트-2-에노에이트, 글루타레이트 세미알데하이드, 5-하이드록시발레레이트, 5-하이드록시발레릴-CoA, 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA, 2,4-펜타디에노일-CoA, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트, 아세토아세틸-CoA, 3-하이드록시부티릴-CoA, 크로토일-CoA, 글루타릴-CoA, 3-옥소펜타노일-CoA, 3-하이드록시펜타노일-CoA, 펜트-2-에노일-CoA, 펜트-3-에노일-CoA, 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA, 3-옥소-5-하이드록시펜타노에이트, 3-옥소부탄올, 4-하이드록시-2-옥소발레레이트, 2-옥소펜테노에이트, 3-부텐-1-알, 3-하이드록시부티릴-CoA, 3-하이드록시부티레이트, 3-하이드록시부타날, 2,4-펜타디에노일-포스페이트 또는 펜타-2,4-디에날로부터의 합성을 개시할 수 있다.

[0152] 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하기에 충분한 양으로 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로 효소 또는 단백질을 코딩하는 하나 이상의 핵산을 외인적으로 발현하도록 본원에 예시된 바와 같이 당해 기술 분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 구축한다. 본 발명의 미생물 유기체는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하기에 충분한 조건 하에서 배양하는 것으로 이해된다. 본원에 제시된 교시 내용 및 지침에 따라, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체는, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 세포내 농도 약 0.1-200 mM 또는 그 이상이 되도록 생합성을 달성할 수 있다. 일반적으로, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 세포내 농도는 약 3-150 mM, 특히 약 5-125 mM, 보다 구체적으로 약 8-100 mM이며, 예로 약 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM 또는 그 이상이다. 이들 예시된 범위들 사이의 범위, 그리고 그 이상의 세포내 농도도 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체로부터 달성할 수 있다.

[0153] 일부 구현예에서, 배양 조건은 혐기적 또는 실질적으로 혐기적 배양 또는 유지 조건을 포함한다. 예시적인 혐기 조건은 종래에 개시되어 있으며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 발효 공정에 대한 예시적인 혐기 조건은 본원에 기술되어 있으며, 예컨대 2007년 8월 10일자 미국 공개공보 2009/0047719에 기술되어 있다. 이러한 조건들 중 임의의 조건을 비-천연성 미생물 유기체와 함께 이용할 수 있으며, 뿐만 아니라 당해 기술 분야에 잘 알려진 다른 혐기 조건을 이용할 수 있다. 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생산체들은, 상기한 혐기 또는 실질적인 혐기 조건 하에서, 2,4-펜타디에노에이트,

부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 세포내 농도 5-10 mM 또는 그 이상으로, 뿐만 아니라 본원에 예시된 다른 모든 농도들로 합성할 수 있다. 전술한 내용이 세포내 농도를 언급하는 것이더라도, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하는 미생물 유기체가 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 세포내에서 생산할 수 있으며, 및/또는 배양 배지로 산물을 분비할 수 있는 것으로 이해된다.

[0154] 본원에 기술된 배양 및 발효 조건 외에도, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생합성을 달성하기 위한 생육 조건은, 배양 조건에 내삼투압제(osmoprotectant)의 첨가를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체는 내삼투압제가 존재하는 조건에서 유지, 증식 및 발효시킬 수 있다. 간략하게는, 내삼투압제는 삼투 물질 (osmolyte)로서 작용하며 본원에 기술된 미생물 유기체를 삼투 스트레스로부터 생존하는데 일조하는 화합물을 지칭한다. 내삼투압제로는, 베타인, 아미노산 및 당 트레할로스를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 이러한 것에 대한 비제한적인 예로는 글리신 베타인, 프탈린 베타인, 디메틸테틴, 디메틸설포니오프로피오네이트, 3-디메틸설포니오-2-메틸프로피오네이트, 피페콜산, 디메틸설포니오아세테이트, 콜린, L-카르니틴 및 액토인이 있다. 일 측면에서, 상기 내삼투압제는 글리신 베타인이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 본원에 기술된 미생물 유기체를 삼투 스트레스로부터 보호하기에 적합한 내삼투압제의 양과 타입이, 사용되는 미생물 유기체에 따라 결정됨을 알 것이다. 배양 조건에서의 내삼투압제의 양은, 예컨대 약 0.1 mM 이하, 약 0.5 mM 이하, 약 1.0 mM 이하, 약 1.5 mM 이하, 약 2.0 mM 이하, 약 2.5 mM 이하, 약 3.0 mM 이하, 약 5.0 mM 이하, 약 7.0 mM 이하, 약 10 mM 이하, 약 50 mM 이하, 약 100 mM 이하, 또는 약 500 mM 이하일 수 있다.

[0155] 일부 구현예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 임의의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물에 존재하는 원자의 동위원소 분포 (isotopic distribution)를 바꾸기 위해, 탄소 공급 원료 및 기타 세포 흡수원, 예를 들어 포스페이트, 암모니아, 설페이트, 클로라이드 및 기타 할로젠 화합물들을 선택할 수 있다. 상기에 열거된 다양한 탄소 공급 원료 및 기타 흡수원들은 총체적으로 "흡수원 (uptake source)"로서 본원에 지칭될 것이다. 흡수원은 산물, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 중간 산물에 존재하는 임의의 원소, 또는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로로부터 분기된 반응들에서 제조되는 부산물에 대해 동위원소 농화를 제공할 수 있다. 동위원소 농화는 예를 들어 탄소, 수소, 산소, 질소, 황, 인, 염소 또는 기타 할로젠 화합물을 비롯한 임의의 타겟 원소에서 달성될 수 있다.

[0156] 일부 구현예들에서, 탄소-12, 탄소-13 및 탄소-14의 비율이 바뀌도록 흡수원을 선택할 수 있다. 일부 구현예들에서, 흡수원은 산소-16, 산소-17 및 산소-18의 비율이 바뀌도록 선택될 수 있다. 일부 구현예들에서, 흡수원은 수소, 중수소 및 삼중수소의 비율이 바뀌도록 선택될 수 있다. 일부 구현예들에서, 흡수원은 질소-14 및 질소-15의 비율이 바뀌도록 선택될 수 있다. 일부 구현예들에서, 흡수원은 황-32, 황-33, 황-34 및 황-35의 비율이 바뀌도록 선택될 수 있다. 일부 구현예들에서, 흡수원은 인-31, 인-32 및 인-33의 비율이 바뀌도록 선택될 수 있다. 일부 구현예들에서, 흡수원은 염소-35, 염소-36 및 염소-37의 비율이 바뀌도록 선택될 수 있다.

[0157] 일부 구현예들에서, 타겟 원소의 동위원소 비율은 하나 이상의 흡수원을 선택함으로써 원하는 비율로 바꿀 수 있다. 흡수원은 자연에서 발견되는 천연 소스나 인간이 제조한 소스로부터 유래될 수 있으며, 당해 기술 분야의 당업자는, 타겟 원소의 바람직한 동위원소 비율을 달성하기 위해, 천연 소스, 인간이 제조한 소스 또는 이들의 조합을 선택할 수 있다. 인간이 만든 소스의 예로는, 예를 들어, 화학 합성 반응으로부터 적어도 부분적으로 유래되는 흡수원을 포함한다. 이러한 동위원소 농화된 흡수원은 상업적으로 구입하거나 또는 실험실에서 제조하거나, 및/또는 선택적으로 상기 흡수원들의 천연 소스를 혼합하여 원하는 동위원소 비율을 달성할 수 있다. 일부 구현예들에서, 흡수원의 타겟 동위원소 비율은 자연에서 발견되는 흡수원의 바람직한 오리진을 선택함으로써 달성할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이, 천연 소스는 생물학적 유기체로부터 유래되거나 이에 의해 합성되는 바이오베이스(biobase)이거나 또는 석유계 산물 또는 대기 등의 소스일 수 있다. 이러한 일부 구현예들에서, 탄소원은, 예를 들어, 탄소-14가 고갈될 수 있는 화석 연료-유래 탄소원, 또는 석유 유래 카운터파트 보다 탄소-14를 더 많이 포함할 수 있는 이산화탄소 등의 환경 또는 대기 탄소원으로부터 선택할 수 있다.

[0158] 불안정한 탄소 동위원소인 탄소-14 또는 방사성 탄소 (radiocarbon)는 지구의 대기에서 탄소 원자 10^{12} 개 중 거

의 1개이며, 반감기가 약 5700년이다. 탄소 스톡 (stock)은 우주선과 일반 질소 (^{14}N)가 참여하는 핵 반응에 의해 대기 상층에 풍부하다. 화석 연료는 오래전에 부패되어 탄소-14가 없다. 화석 연료의 연소는 대기 중의 탄소-14의 비율 (fraction)을 낮출 것이며, 이를 '수소 효과(Suess effect)'라고 한다.

[0159] 화합물에서 원소의 동위원소 비율을 확인하는 방법은 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려져 있다. 동위원소 농화는 AMS (accelerated mass spectrometry), SIRS (Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry) 및 SNIF-NMR (Site-Specific Natural Isotopic Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance) 등의 당해 기술 분야에 공지된 기법을 이용한 질량 분광측정으로 쉽게 분석한다. 이러한 질량 분광 기법들은 액체 크로마토그래피 (LC), 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 및/또는 기체 크로마토그래피 등의 분리 기법과 통합될 수 있다.

[0160] 탄소의 경우, 미국에서는 국제 ASTM (the American Society for Testing and Materials)의 방사성탄소 연대 측정법을 이용하여 고체, 액체 및 기체 샘플의 바이오베이스 함량(biobased content)을 측정하기 위한 표준화된 분석 방법으로서 ASTM D6866을 개발하였다. 이 표준법은 제품의 바이오베이스 함량을 측정하기 위한 방사성탄소 연대 측정법을 이용하는데 근간이 된다. ASTM D6866은 2004년에 최초로 공개되었으며, 현재 사용되는 버전은 ASTM D6866-11 (2011년 4월 1일 발효됨)이다. 방사성탄소 연대 측정 기법들은 본원에 기술된 바 등의 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0161] 화합물의 바이오베이스 함량은 탄소-14 (^{14}C) 대 탄소-12 (^{12}C)의 비율 통해 추정한다. 구체적으로, 프랙션 모던 (Fm: Fraction Modern)은 식: $Fm = (S-B)/(M-B)$ 으로부터 계산되며, 이때 B, S 및 M은 각각 블랭크, 샘플 및 모던 레퍼런스 (modern reference)의 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 비율이다. 프랙션 모던은 "모던"에 대한 샘플 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 비율의 편차 값이다. 모던은 mil 당 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -19$ 에 대해 정규화한 NBS (National Bureau of Standard) 옥살산 I (즉, 표준 레퍼런스 물질 (SRM) 4990b)의 방사성 탄소 농도(AD 1950)의 95%로서 정의된다 (Olsson, *The use of Oxalic acid as a Standard*. In, *Radiocarbon Variations and Absolute Chronology*, Nobel Symposium, 12th Proc., John Wiley & Sons, New York (1970)). 예를 들어, AMS로 측정한 질량 분광측정 결과는 mil 당 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -19$ 에 대해 정규화한 NBS 옥살산 I (즉, SRM 4990b)의 비활성 * 0.95라는 국제적으로 합의된 정의를 이용하여 계산한다. 이는 절대 (AD 1950) $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 비율 $1.176 \pm 0.010 \times 10^{-12}$ 와 등가이다 (Karlen et al., *Arkiv Geofysik*, 4:465-471 (1968)). 표준 계산은 서로 간에 하나의 동위원소 흡수 차이, 예를 들어, 생물 시스템의 C^{12} 대비 C^{13} 대비 C^{14} 의 선호적인 흡수성 (preferential uptake)를 계산에 참작하며, 이들 보정은 δ^{13} 에 대해 보정된 Fm 으로서 반영된다.

[0162] 옥살산 표준물질 (SRM 4990b 또는 HOx 1)은 1955년 사탕무 작물로부터 제조되었다. 1000 lbs가 제조되었지만, 이 옥살산 표준물질은 더 이상 시판되지 않는다. 옥살산 II 표준물질 (HOx 2; N.I.S.T designation SRM 4990 C)은 1977년 프랑스 사탕무 당밀로부터 제조되었다. 1980년대 초반에, 12곳의 실험실 그룹이 2가지 표준물질의 비율 측정하였다. 옥살산 II / I의 활성 비율은 1.2933 ± 0.001 (중량 기준)이었다. HOx II의 동위원소 비율은 -17.8 / mille이다. ASTM D6866-11은 모던 표준물질로 이용가능한 옥살산 II 표준물질 SRM 4990 C (Hox2)를 사용할 것을 권고한다 (Mann, *Radiocarbon*, 25(2):519-527 (1983)에서의, 오리지널 대 현재 시판되는 옥살산 표준물질을 비교한 내용 참조). Fm = 0%는 물질에 탄소-14가 전혀 없으며, 즉 화석 (예, 석유계) 탄소원임을 의미한다. 1950년대 이후 핵 폭발 실험을 통해 대기로 탄소-14가 발산된 것을 보정한 다음, Fm = 100%은 전체가 모던 탄소원임을 나타낸다. 본원에서, "모던" 소스는 바이오베이스 소스를 포함한다.

[0163] ASTM D6866에 기술된 바와 같이, 모던 탄소의 퍼센트 (pMC)는 1950년대 핵 실험 프로그램의 효력이 지속되고 있고 소멸되지 않았기 때문에 100% 보다 클 수 있으며, 그 결과 ASTM D6866-11에 기술된 바와 같이 대기에 탄소-14가 상당히 농화되었다. 모든 샘플의 탄소-14 활성이 "pre-bomb" 표준물을 참조하고, 거의 모든 새로운 바이오베이스 제품들은 post-bomb 환경에서 만들어지기 때문에, 모든 pMC 값들은 (동위원소 분석에 대해 보정 후) 샘플의 진성의 바이오베이스의 함량을 더 잘 반영하도록 0.95 (2010 현재)를 곱해야 한다. 바이오베이스의 함량이 103% 보다 높다는 것은 분석 에러가 발생하였거나 또는 바이오베이스의 탄소 소스가 수년 이상 오래되었다는 것을 의미한다.

[0164] ASTM D6866은 물질의 총 유기 함량에 대해 바이오베이스 함량을 정량하며, 존재하는 무기 탄소와 기타 비-탄소 함유 물질은 고려하지 않는다. 예를 들어, 50%가 전분-기재 물질이고 50%가 물인 제품은, ASTM D6866을 기반으로, 바이오베이스 함량 = 100%인 것으로 간주된다 (유기 탄소 함량이 50%이고, 그 분석의 100%가 바이오베이스

임). 다른 예로, 전분-기재 물질 50%, 석유계 물질 25% 및 물 25%로 구성된 제품은, 바이오베이스 함량 = 66.7% (유기 탄소 함량이 75%이나, 제품의 50%만 바이오베이스임)이다. 다른 예로, 유기 탄소가 50%인 제품과 석유계 제품은 바이오베이스 함량 = 0% (유기 탄소 함량이 50%이나, 화석 소스로부터 유래됨)이다. 즉, 화합물 또는 물질에서 바이오베이스 함량을 측정하는 잘 알려져 있는 방법 및 공지된 표준물질을 기반으로, 당해 기술 분야의 당업자는, 쉽게 바이오베이스 함량을 측정할 수 있거나, 또는 본원에서 이용하여 원하는 바이오베이스 함량을 가진 하위 제품 (downstream product)을 제조할 수 있다.

[0165] 탄소-14를 이용한 연대 측정 기법을 사용하여 물질의 바이오베이스 함량을 정량하는 것은 당해 기술 분야에 공지되어 있다 (Currie et al., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 172:281-287 (2000)). 예를 들어, 탄소-14 연대 측정법은 테레프탈레이트 함유 물질에서 바이오베이스 함량을 정량하는데 사용되고 있다 (Colonna et al., *Green Chemistry*, 13:2543-2548 (2011)). 특히, 재생가능한 1,3-프로판디올로부터 유래된 폴리프로필렌 테레프탈레이트 (PPT) 폴리머와 석유계 테레프탈산은 Fm 값이 거의 30%이었다 (즉, 폴리머 탄소의 3/11은 재생가능한 1,3-프로판디올로부터 유래되며, 8/11은 화석 최종 멤버 테레프탈산으로부터 유래됨) (Currie et al., *supra*, 2000). 반면, 재생가능한 1,4-부타디올과 재생가능한 테레프탈산으로부터 유래된 폴리부틸렌 테레프탈레이트 폴리머는 바이오베이스 함량이 90%를 초과하였다 (Colonna et al., *supra*, 2011).

[0166] 이에, 일부 구현예에서, 본 발명은, 환경 탄소 흡수원으로 지칭되는, 대기 탄소 흡수원(atmospheric carbon uptake source)을 반영하는 탄소-12, 탄소-13 및 탄소-14 비율을 가지는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간산물을 제공한다. 예를 들어, 일부 측면들에서, 상기 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간산물은 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상 또는 많게는 100%의 Fm 값을 가질 수 있다. 일부 구현예들에서, 흡수원은 CO₂이다. 일부 구현예들에서, 본 발명은 석유계 탄소 흡수원 (petroleum-based carbon uptake source)을 반영하는 탄소-12, 탄소-13 및 탄소-14 비율을 가지는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 중간산물을 제공한다. 이러한 측면에서, 상기 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간산물은 95% 미만, 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 50% 미만, 45% 미만, 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만의 Fm 값을 가질 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 발명은 대기 탄소 흡수원과 석유계 탄소 흡수원의 조합에 의해 달성되는 탄소-12, 탄소-13 및 탄소-14 비율을 가지는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 중간산물을 제공한다. 이러한 흡수원들의 조합을 이용하는 것은 탄소-12, 탄소-13 및 탄소-14 비율을 다변화할 수 있는 한가지 수단이며, 해당 비율들은 흡수원들의 비율을 반영할 것이다.

[0167] 나아가, 본 발명은, 본원에 기술된 생물학적으로 생산된 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물, 및 이로부터 유래된 산물에 관한 것으로서, 이때 상기 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물은 환경에 형성된 CO₂에서와 대략 동일한 수치의 탄소-12, 탄소-13 및 탄소-14 동위원소 비율을 가진다. 예를 들어, 일부 측면들에서, 본 발명은, 환경에 형성된 CO₂에서와 대략 동일한 수치의 탄소-12 대 탄소-13 대 탄소-14 동위원소 비율을 가진, 또는 본원에 기술된 다른 임의의 비율을 가진, 생물 유래 (bioderived) 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물을 제공한다. 본원에 기술된 바와 같이, 산물은 환경에 형성된 CO₂에서와 대략 동일한 수치의 탄소-12 대 탄소-13 대 탄소-14 동위원소 비율, 또는 본원에 기술된 다른 임의의 비율을 가질 수 있는 것으로 이해되며, 여기서 상기 산물은, 본원에 기술된 바와 같

이, 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 중간 산물로부터 제조되며, 상기 생물 유래 산물은 화학적으로 변형되어 최종 산물로 제조된다. 원하는 산물을 제조 하기 위해, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 이의 중간 산물의 생물 유래 산물을 화학적으로 변형시키는 방법은, 본원에 기술된 바와 같이, 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려져 있다. 본 발명은, 환경에 형성된 CO₂에서와 대략 동일한 수치의 탄소-12 대 탄소-13 대 탄소-14 동위원소 비율을 가진, 폴리우레탄, 폴리머, 코폴리머, 합성 고무, 수지, 화학적, 폴리머 중간산물, 유기 용매, 저혈당제, 폴리에스테르 수지, 라텍스, 단량체, 정제 화학, 농화학제, 약제 또는 향제를 추가로 제공하며, 여기서 상기 폴리우레탄, 폴리머, 코폴리머, 합성 고무, 수지, 화학제, 폴리머 중간 산물, 유기 용매, 저혈당제, 폴리에스테르 수지, 라텍스, 단량체, 정제 화학제, 농화학제, 약제 또는 향제는, 본원에 기술된 바와 같이, 직접 제조되거나, 또는 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 또는 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 중간 산물과 조합되어 제조된다.

[0168] 2,4-펜타디에노에이트는, 유용한 치환된 부타디엔 유도체로서, 예를들면, 1-카르바모일-1,3-부타디엔 등의 다른 치환된 1,3-부타디엔 유도체를 제조하는 경로의 중요한 중간산물이다. 2,4-펜타디에노에이트가 활용되는 비제한적인 예로는, 폴리우레탄 등의 다수의 공업 화학제의 전구체인 아닐린의 제조와 다양한 폴리머 및 코폴리머의 제조에 사용될 수 있는 N-보호된-1,3-부타디엔 유도체의 생산을 포함한다. 즉, 일부 구현예들에서, 본 발명은, 본 발명의 비-천연성 미생물에 의해 생산되거나 본원에 기술된 방법을 이용하여 제조되는 하나 이상의 생물 유래의 2,4-펜타디에노에이트 또는 생물 유래의 2,4-펜타디에노에이트 중간산물을 포함하는, 바이오베이스의 폴리우레탄, 폴리머 또는 코폴리머를 제공한다.

[0169] 부타디엔은 다수의 상업적인 공업적인 용도로 널리 사용되는 화합물이다. 이러한 용도에 대한 비제한적인 예로는 합성 고무 및 ABS 수지 등의 폴리머와 헥사메틸렌디아민 및 1,4-부탄디올 등의 화합물의 제조를 포함한다. 이에, 일부 구현예들에서, 본 발명은, 본 발명의 비-천연성 미생물에 의해 생산되거나 본원에 기술된 방법을 이용하여 제조되는 하나 이상의 생물 유래의 부타디엔 또는 생물 유래의 부타디엔 중간산물을 포함하는, 바이오베이스의 폴리머, 합성 고무, 수지 또는 화합물을 제공한다.

[0170] 프로필렌은 다수의 상업적인 공업적인 용도로 널리 사용되는 화합물이다. 이러한 용도에 대한 비제한적인 예로는 폴리머, 폴리머 중간 산물 및 화합물, 예를 들어 폴리프로필렌, 아크릴산, 부탄올, 부탄디올, 아크릴로니트릴, 프로필렌 옥사이드, 이소프로판올 및 쿠멘의 제조를 포함한다. 아울러, 폴리프로필렌 등의 이러한 프로필렌 유도체들은 사출 성형과 같은 플라스틱 및 카펫과 같은 섬유를 비롯한 매우 다양한 제품을 제조하는데 사용된다. 이에, 일부 구현예들에서, 본 발명은, 본 발명의 비-천연성 미생물에 의해 생산되거나 본원에 기술된 방법을 이용하여 제조되는 하나 이상의 생물 유래의 프로필렌 또는 생물 유래의 프로필렌 중간산물을 포함하는, 바이오베이스의 폴리머, 폴리머 중간 산물 또는 화합물을 제공한다.

[0171] 1,3-부탄디올은 다수의 상업적인 공업적인 용도로 널리 사용되는 화합물이다. 이러한 용도에 대한 비제한적인 예로는 식품 향미제의 유기용매로서 또는 저혈당제로서의 용도와 폴리우레탄 및 폴리에스테르 수지의 제조에서의 용도를 포함한다. 아울러, 광학 활성의 1,3-부탄디올은 또한 생물 활성 화합물의 합성과 액정에 사용된다. 또한, 1,3-부탄디올은 합성 고무 제품 (예, 타이어), 라텍스 및 수지를 제조하는데 사용되는 화합물인 1,3-부타디엔을 공업적으로 제조하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 발명은, 본 발명의 비-천연성 미생물에 의해 생산되거나 본원에 기술된 방법을 이용하여 제조되는 하나 이상의 생물 유래의 1,3-부탄디올 또는 생물 유래의 1,3-부탄디올 중간산물을 포함하는, 바이오베이스의 유기 용매, 저혈당제, 폴리우레탄, 폴리에스테르 수지, 합성 고무, 라텍스 또는 수지를 제공한다.

[0172] 크로틸 알코올은 다수의 상업적인 공업적인 용도로 널리 사용되는 화합물이다. 이러한 용도에 대한 비제한적인 예로는 단량체, 정제 화학제, 예컨대 소르브산, 트리메틸하이드로퀴논, 크로톤산 및 3-메톡시부탄올, 농화학제 및 약제를 제조하는 화학 중간체인, 크로틸 할라이드, 에스테르 및 에테르의 제조를 포함한다. 크로틸 알코올은 또한 1,3-부타디엔을 제조하는 전구체로도 사용될 수 있다. 이에, 일부 구현예들에서, 본 발명은, 본 발명의 비-천연성 미생물에 의해 생산되거나 본원에 기술된 방법을 이용하여 제조되는 하나 이상의 생물 유래의 크로틸 알코올 또는 생물 유래의 크로틸 알코올 중간산물을 포함하는, 바이오베이스의 단량체, 정제 화합물, 농화학물, 또는 약제를 제공한다.

[0173] 3-부텐-1-올은 다수의 상업적인 공업적인 용도로 널리 사용되는 화합물이다. 이러한 용도에 대한 비제한적인

예로는 약제, 농화학제, 향료 및 수지의 제조를 포함한다. 이에, 일부 구현예들에서, 본 발명은, 본 발명의 미-천연성 미생물에 의해 생산되거나 본원에 기술된 방법을 이용하여 제조되는 하나 이상의 생물 유래의 3-부텐-1-올 또는 생물 유래의 3-부텐-1-올 중간산물을 포함하는, 바이오베이스의 약제, 농화학제, 향료 및 수지를 제공한다.

[0174] 본원에서, 용어 "생물 유래"는 생물 유기체로부터 유래되거나 합성되는 것을 의미하며, 생물 유기체에 의해 제조가능하므로 재생가능한 자원으로 간주될 수 있다. 이러한 생물 유기체는, 특히 본원에 기술된 본 발명의 미생물 유기체는, 공급 원료 또는 바이오매스, 예컨대 농작물, 식물, 세균 또는 동물 소스로부터 수득되는 당 또는 탄수화물을 활용할 수 있다. 다른 예로, 생물 유기체는 대기 탄소를 이용할 수 있다. 본원에서, 용어 "바이오베이스"는 전술한 바와 같이 본 발명의 생물 유래 화합물로 전체가 또는 일부분이 구성된 산물을 의미한다. 바이오베이스 또는 생물 유래 산물은 석유 또는 석유화학 공급 원료로부터 유래되거나 합성되는 석유 유래 산물과는 반대된다.

[0175] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트 또는 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트 경로의 중간산물을 포함하는 폴리우레탄, 폴리머 또는 코폴리머를 제공하며, 여기서 상기 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트 또는 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트 경로의 중간산물은 폴리우레탄, 폴리머 또는 코폴리머의 제조에 사용되는 2,4-펜타디에노에이트 또는 2,4-펜타디에노에이트 경로의 중간 산물의 전체 또는 일부이다. 즉, 일부 측면들에서, 본 발명은, 본원에 기술된 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트 또는 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트 경로의 중간산물을 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%로 포함하는, 바이오베이스의 폴리우레탄, 폴리머 또는 코폴리머를 제공한다. 부가적으로, 일부 측면들에서, 본 발명은, 제조에 사용되는 2,4-펜타디에노에이트 또는 2,4-펜타디에노에이트 경로의 중간 산물이 2,4-펜타디에노에이트 또는 2,4-펜타디에노에이트 경로의 중간 산물들의 생물 유래의 것과 석유 유래의 것의 조합인, 바이오베이스의 폴리우레탄, 폴리머 또는 코폴리머를 제공한다. 예컨대, 바이오베이스의 폴리우레탄, 폴리머 또는 코폴리머는 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트 50%와 석유 유래 2,4-펜타디에노에이트 50%를 이용하거나, 또는 상기 산물의 적어도 일부분이 본원에 기술된 미생물 유기체에 의해 생산되는 생물 유래 산물을 포함하는 한, 생물 유래/석유 유래 전구체들을 60%/40%, 70%/30%, 80%/20%, 90%/10%, 95%/5%, 100%/0%, 40%/60%, 30%/70%, 20%/80%, 10%/90% 등의 다른 적정 비율로 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트 또는 생물 유래 2,4-펜타디에노에이트 경로의 중간산물을 이용하여 폴리우레탄, 폴리머 또는 코폴리머를 제조하는 방법들은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있는 것으로 이해된다.

[0176] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 생물 유래 부타디엔 또는 생물 유래 부타디엔 경로의 중간 산물이 폴리머, 합성 고무, 수지 또는 화합물의 제조에 사용되는 부타디엔 또는 부타디엔 경로의 중간 산물의 일부 또는 전체인, 생물 유래 부타디엔 또는 생물 유래 부타디엔 경로의 중간 산물을 포함하는 폴리머, 합성 고무, 수지 또는 화합물을 제공한다. 이에, 일부 측면들에서, 본 발명은, 본원에 기술된 생물 유래 부타디엔 또는 생물 유래 부타디엔 경로의 중간 산물을 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%로 포함하는 바이오베이스의 폴리머, 합성 고무, 수지 또는 화합물을 제공한다. 부가적으로, 일부 측면들에서, 본 발명은, 제조에 사용되는 부타디엔 또는 부타디엔 경로의 중간 산물이 부타디엔 또는 부타디엔 경로의 중간 산물의 생물 유래와 석유 유래의 조합인, 바이오베이스의 폴리머, 합성 고무, 수지 또는 화합물을 제공한다. 예컨대, 바이오베이스의 폴리머, 합성 고무, 수지 또는 화합물은 생물 유래 부타디엔 50%와 석유 유래 부타디엔 50%를 이용하거나, 또는 상기 산물의 적어도 일부분이 본원에 기술된 미생물 유기체에 의해 생산되는 생물 유래 산물을 포함하는 한, 생물 유래/석유 유래 전구체들을 60%/40%, 70%/30%, 80%/20%, 90%/10%, 95%/5%, 100%/0%, 40%/60%, 30%/70%, 20%/80%, 10%/90% 등의 다른 적정 비율로 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 생물 유래 부타디엔 또는 생물 유래 부타디엔 경로의 중간산물을 이용하여 폴리머, 합성 고무, 수지 또는 화합물을 제조하는 방법들은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있는 것으로 이해된다.

[0177] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 생물 유래 프로필렌 또는 생물 유래 프로필렌 경로의 중간 산물이 폴리머, 폴리머 중간 산물 또는 화합물의 제조에 사용되는 프로필렌 또는 프로필렌 경로의 중간 산물의 일부 또는 전부인, 생물 유래 프로필렌 또는 생물 유래 프로필렌 경로의 중간 산물을 포함하는 폴리머, 폴리머 중간 산물 또는 화합물을 제공한다. 이에, 일부 측면들에서, 본 발명은, 본원에 기술된 생물 유래 프로필렌 또는 생물 유래 프로필렌 경로의 중간 산물을 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도

95%, 적어도 98% 또는 100%로 포함하는 바이오베이스의 폴리머, 폴리머 중간 산물 또는 화합물을 제공한다. 부가적으로, 일부 측면들에서, 본 발명은, 제조에 사용되는 프로필렌 또는 프로필렌 경로의 중간 산물이 프로필렌 또는 프로필렌 경로의 중간 산물의 생물 유래와 석유 유래의 조합인, 바이오베이스의 폴리머, 폴리머 중간 산물 또는 화합물을 제공한다. 예컨대, 바이오베이스의 폴리머, 폴리머 중간 산물 또는 화합물은 생물 유래 프로필렌 50% 및 석유 유래 프로필렌 50%를 이용하거나, 또는 상기 산물의 적어도 일부분이 본원에 기술된 미생물 유기체에 의해 생산되는 생물 유래 산물을 포함하는 한, 생물 유래/석유 유래 전구체들을 60%/40%, 70%/30%, 80%/20%, 90%/10%, 95%/5%, 100%/0%, 40%/60%, 30%/70%, 20%/80%, 10%/90% 등의 다른 적정 비율로 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 생물 유래 프로필렌 또는 생물 유래 프로필렌 경로의 중간산물을 이용하여 폴리머, 폴리머 중간 산물 또는 화합물을 제조하는 방법들은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있는 것으로 이해된다.

[0178] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 생물 유래 1,3-부탄디올 또는 생물 유래 1,3-부탄디올 경로의 중간 산물이 유기 용매, 저혈당제, 폴리우레탄, 폴리에스테르 수지, 합성 고무, 라텍스, 또는 수지의 제조에 사용되는 1,3-부탄디올 또는 1,3-부탄디올 경로의 중간 산물의 일부 또는 전부인, 생물 유래 1,3-부탄디올 또는 생물 유래 1,3-부탄디올 경로의 중간 산물을 포함하는 유기 용매, 저혈당제, 폴리우레탄, 폴리에스테르 수지, 합성 고무, 라텍스, 또는 수지를 제공한다. 이에, 일부 측면들에서, 본 발명은, 본원에 기술된 생물 유래 1,3-부탄디올 또는 생물 유래 1,3-부탄디올 경로의 중간 산물을 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%로 포함하는 바이오베이스의 유기 용매, 저혈당제, 폴리우레탄, 폴리에스테르 수지, 합성 고무, 라텍스, 또는 수지를 제공한다. 부가적으로, 일부 측면들에서, 본 발명은, 제조에 사용되는 1,3-부탄디올 또는 1,3-부탄디올 경로의 중간 산물이 1,3-부탄디올 또는 1,3-부탄디올 경로의 중간 산물의 생물 유래와 석유 유래의 것의 조합인, 바이오베이스의 유기 용매, 저혈당제, 폴리우레탄, 폴리에스테르 수지, 합성 고무, 라텍스, 또는 수지를 제공한다. 예컨대, 바이오베이스의 유기 용매, 저혈당제, 폴리우레탄, 폴리에스테르 수지, 합성 고무, 라텍스, 또는 수지는 생물 유래 1,3-부탄디올 50% 및 석유 유래 1,3-부탄디올 50%를 이용하거나, 또는 상기 산물의 적어도 일부분이 본원에 기술된 미생물 유기체에 의해 생산되는 생물 유래 산물을 포함하는 한, 생물 유래/석유 유래 전구체들을 60%/40%, 70%/30%, 80%/20%, 90%/10%, 95%/5%, 100%/0%, 40%/60%, 30%/70%, 20%/80%, 10%/90% 등의 다른 적정 비율로 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 생물 유래 1,3-부탄디올 또는 생물 유래 1,3-부탄디올 경로의 중간산물을 이용하여 유기 용매, 저혈당제, 폴리우레탄, 폴리에스테르 수지, 합성 고무, 라텍스, 또는 수지를 제조하는 방법들은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있는 것으로 이해된다.

[0179] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 생물 유래 크로틸 알코올 또는 생물 유래 크로틸 알코올 경로의 중간 산물이 단량체, 정제 화학제, 농화학제 또는 약제의 제조에 사용되는 크로틸 알코올 또는 크로틸 알코올 경로의 중간 산물의 일부 또는 전체인, 생물 유래 크로틸 알코올 또는 생물 유래 크로틸 알코올 경로의 중간 산물을 포함하는 단량체, 정제 화학제, 농화학제 또는 약제를 제공한다. 이에, 일부 측면들에서, 본 발명은, 본원에 기술된 생물 유래 크로틸 알코올 또는 생물 유래 크로틸 알코올 경로의 중간 산물을 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%로 포함하는 바이오베이스의 단량체, 정제 화학제, 농화학제 또는 약제를 제공한다. 부가적으로, 일부 측면들에서, 본 발명은, 제조에 사용되는 크로틸 알코올 또는 크로틸 알코올 경로의 중간 산물이 크로틸 알코올 또는 크로틸 알코올 경로의 중간 산물의 생물 유래와 석유 유래의 것들의 조합인, 바이오베이스의 단량체, 정제 화학제, 농화학제 또는 약제를 제공한다. 예컨대, 바이오베이스의 단량체, 정제 화학제, 농화학제 또는 약제는 생물 유래 크로틸 알코올 50% 및 석유 유래 크로틸 알코올 50%를 이용하거나, 또는 상기 산물의 적어도 일부분이 본원에 기술된 미생물 유기체에 의해 생산되는 생물 유래 산물을 포함하는 한, 생물 유래/석유 유래 전구체들을 60%/40%, 70%/30%, 80%/20%, 90%/10%, 95%/5%, 100%/0%, 40%/60%, 30%/70%, 20%/80%, 10%/90% 등의 다른 적정 비율로 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 생물 유래 크로틸 알코올 또는 생물 유래 크로틸 알코올 경로의 중간산물을 이용하여 단량체, 정제 화학제, 농화학제 또는 약제를 제조하는 방법들은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있는 것으로 이해된다.

[0180] 일부 구현예들에서, 본 발명은, 생물 유래 3-부텐-1-올 또는 생물 유래 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물이 약제, 농화학제, 향제 또는 수지의 제조에 사용되는 3-부텐-1-올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물의 일부 또는 전부인, 생물 유래 3-부텐-1-올 또는 생물 유래 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물을 포함하는 약제, 농화학제, 향제 또는 수지를 제공한다. 이에, 일부 측면들에서, 본 발명은, 본원에 기술된 생물 유래 3-부텐-1-올 또는 생물 유래 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물을 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%,

적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%로 포함하는 바이오베이스의 약제, 농화학제, 향제 또는 수지를 제공한다. 부가적으로, 일부 측면들에서, 본 발명은, 제조에 사용되는 3-부텐-1-올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물이 3-부텐-1-올 또는 3-부텐-1-올 경로의 중간 산물의 생물 유래의 것과 석유 유래의 것의 조합인, 바이오베이스의 약제, 농화학제, 향제 또는 수지를 제공한다. 예컨대, 바이오베이스의 약제, 농화학제, 향제 또는 수지는 생물 유래 3-부텐-1-올 50% 및 석유 유래 크로틸 3-부텐-1-올 50%를 이용하거나, 또는 상기 산물의 적어도 일부분이 본원에 기술된 미생물 유기체에 의해 생산되는 생물 유래 산물을 포함하는 한, 생물 유래/석유 유래 전구체들을 60%/40%, 70%/30%, 80%/20%, 90%/10%, 95%/5%, 100%/0%, 40%/60%, 30%/70%, 20%/80%, 10%/90% 등의 다른 적정 비율로 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 생물 유래 3-부텐-1-올 또는 생물 유래 3-부텐-1-올 경로의 중간산물을 이용하여 약제, 농화학제, 향제 또는 수지를 제조하는 방법들은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있는 것으로 이해된다.

[0181] 배양 조건은, 예컨대 액체 배양 과정 뿐만 아니라 발효 및 그외 대규모 배양 과정을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명의 생합성 산물에 대해 특히 유효한 수율은 혐기 또는 실질적으로 혐기적 배양 조건에서 달성될 수 있다.

[0182] 본원에 기술된 바와 같이, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 생합성을 달성하기 위한 배양 조건의 일 예는 혐기성 배양 또는 발효 조건을 포함한다. 특정 구현예들에서, 본 발명의 비-천연성 미생물 유기체는 혐기 또는 실질적인 혐기 조건에서 유지, 배양 또는 발효시킬 수 있다. 간략하게는, 혐기 조건은 산소가 없는 환경을 지칭한다. 실질적인 혐기 조건은, 예를 들어, 배지내 용해된 산소 농도가 0 내지 10%의 포화율로 존재하는, 배양, 배치 발효 또는 연속 발효를 포함한다. 실질적인 혐기 조건은 또한 산소 1% 미만의 분위기로 유지되는 밀폐된 챔버 안에서 액체 배지내에서 또는 고체 한천 배지 상에서의 세포의 증식 또는 휴지를 포함한다. 상기 산소 비율은, 예컨대 상기 배양물에 N_2/CO_2 혼합물 또는 그외 적절한 산소 이외의 기체 또는 기체들을 투입함으로써 유지시킬 수 있다.

[0183] 본원에 기술된 배양 조건은 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하기 위한 규모 확대 및 연속 배양일 수 있다. 배양 공정의 예는, 피드-배치 발효 (fed-batch fermentation) 및 배치 분리 (batch separation); 피드-배치 발효 및 연속 분리, 또는 연속 발효 및 연속 분리를 들 수 있다. 이러한 공정들 모두 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 상업적인 양으로 생합성에 의해 생산하는데에는 발효 공정이 특히 유용하다. 일반적으로, 그리고 비-연속식 배양 공정을 이용하는 경우와 같이, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올의 연속 및/또는 거의 연속적인 생산은, 본 발명의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생산하는 비-천연성 유기체를 지수기 (exponential phase)로의 증식을 유지 및/또는 거의 유지시키기에 충분한 영양분 및 배지에서 배양하는 단계를 포함할 것이다. 이러한 조건에서의 연속 배양은, 예컨대 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 이상의 기간 동안의 배양을 포함할 수 있다. 추가적으로, 연속 배양은 1주일, 2주일, 3주일, 4주일 또는 5주일 이상에서, 최대 수 개월까지의 장기간을 포함할 수 있다. 다른 예로서, 본 발명의 유기체는 특정 용도에서 적합하다면, 수시간 배양할 수 있다. 상기 연속 및/또는 거의 연속 배양 조건은 이러한 예시적인 기간에 포함된 모든 시간 간격을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 아울러, 본 발명의 미생물 유기체의 배양 시간은 원하는 목적을 위해 산물을 충분한 양으로 생산하기에 충분한 기간인 것으로 이해된다.

[0184] 발효 공정은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 간략하게는, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 생합성 생산하기 위한 발효는, 예컨대 피드-배치 발효 및 배치 분리; 피드-배치 발효 및 연속 분리, 또는 연속 발효 및 연속 분리로 실시할 수 있다. 배치 및 연속 발효 공정의 예는 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다.

[0185] 상당량의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 연속 생산하기 위해, 본 발명의 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생산체를 이용한 전술한 발효 공정 외에도, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생산체는, 또한, 예컨대, 산물을 다른 화합물로 변환시키는 화학적 합성 공정에 동시에 투입하거나, 또는 산물을 발효 배양물로부터 분리한 다음 순차적으로 이를 필요에 따라 산물을 다른 화합물로 변환시키는 화학적 또는 효소적 변환 공정을 진행할 수 있다.

[0186] 보다 우수한 생산체를 제조하기 위해, 대사 모델 연구를 이용하여 생장 조건을 최적화할 수 있다. 모델 연구를

통해 또한 경로의 이용성을 추가적으로 최적화하는 유전자 낮아움을 설계할 수 있다 (예, 미국 특허 공개번호 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466, 미국 특허 7,127,379). 모델 분석을 통해 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올을 보다 효율적으로 생산하는 방향으로 대사를 이동시키는 세포 생육에 대한 효과들을 신뢰성있게 예견할 수 있다.

[0187] 원하는 산물의 생합성에 유익한 대사 변이를 동정 및 설계하기 위한 한가지 컴퓨터 작업 방식은 OptKnock 전산 프레임워크이다 (Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)). OptKnock는 표적 산물을 과생산하는 유전적으로 안정한 미생물을 만드는, 유전자 결손 또는 파괴 전략을 제시하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 프로그램이다. 구체적으로, 상기 프레임워크에서 원하는 생화학물질이 세포 생육의 필수 부산물이 되도록 강제하는 유전자 조작을 제안하기 위해, 미생물의 전체 대사 및/또는 생화학적 네트워크를 조사한다. 전략적으로 배치시킨 유전자 결손 또는 그외 기능성 유전자의 파괴를 통해, 생화학적 생산을 세포 생육과 커플링시킴으로써, 생물반응기에서의 장시간 경과 후 상기 조작된 균주에 부과되는 생육 선택압은 강제적인 생육과 커플링된 생화학적 생산의 결과로서 성능을 개선시킨다. 마지막으로, 유전자 결손의 구축시, OptKnock에서 선택된 유전자들은 계놈에서 완전히 제거되기 때문에, 설계된 균주는 야생형 형태로 되돌아갈 가능성이 거의 없다. 따라서, 상기 컴퓨터를 통한 계산 방법을 이용하여, 원하는 산물의 생합성을 도출하는 대안적인 경로를 동정하거나, 또는 원하는 산물의 생합성을 추가로 최적화하기 위해 비-천연성 미생물 유기체와 조합하여 사용할 수 있다.

[0188] 간략하게 설명하면, OptKnock는 본원에서 세포 대사를 모델링하기 위한 계산 방법 및 시스템을 지칭하는 용어이다. OptKnock 프로그램은 특정 제한(particular constraint)을 플럭스 밸런스 분석(FBA) 모델과 통합시킨 방법 및 모델 프레임워크와 관련있다. 이러한 제한으로는, 예컨대 정성적인 동역학 정보(qualitative kinetic information), 정성적인 조절 정보, 및/또는 DNA 마이크로어레이 실험 데이터를 포함한다. 또한, OptKnock는, 예를 들어, 플럭스 밸런스 모델로부터 나오는 플럭스 바운더리를 엄격하게 하고 후속적으로 유전자 추가 또는 결손시의 대사 네트워크의 성능 한계를 탐지함으로써, 다양한 대사 문제들에 대한 해법을 도출한다. OptKnock 전산 프레임워크는 대사 네트워크의 성능 한계의 유효 쿼리를 허용하는 모델 포물레이션을 구축할 수 있으며, 구해지는 혼성-정수 선형 프로그래밍 문제점을 해결하는 방법을 제공할 수 있다. 본원에서 OptKnock로 지칭되는 대사 모델링 및 시뮬레이션 방법들은, 예를 들어 2002년 1월 10일자로 출원된 미국 공개공보 2002/016854, 2002년 1월 10일자로 출원된 국제 특허 제 PCT/US02/00660, 및 2007년 8월 10일자로 출원된 미국 공개공보 2009/0047719에 개시되어 있다.

[0189] 산물의 생합성 생산에 유리한 대사 변이를 동정 및 설계하기 위한 또 다른 계산법은, SimPheny[®]로 칭하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 시스템이다. 이 계산법 및 시스템은 예컨대 2002년 6월 14일자로 출원된 미국 공개공보 2003/0233218 및 2003년 6월 13일자로 출원된 국제 특허 출원 PCT/US03/18838에 개시되어 있다. SimPheny[®]는 인 실리코(*in silico*) 네트워크 모델을 만들고, 생물 시스템의 화학 반응들을 통해 매스, 에너지 또는 전하의 흐름을 시뮬레이션하여 상기 시스템에서의 화학 반응의 임의의 및 모든 가능한 작용기를 포괄하는 해결 영역을 규정함으로써, 상기 생물 시스템에서 허용되는 다양한 활성들을 결정하기 위해 사용될 수 있는 전산 시스템이다. 이러한 방식은, 상기 해결 영역이 포함된 반응들의 공지된 화학량론 뿐만 아니라 반응을 통한 최대 플럭스와 조합된 반응 열역학적 한계 및 용량 한계 등의 한계로 규정되기 때문에, 제한 조건 기반의 모델링(constraints-based modeling)으로 지칭된다. 이러한 제한에 의해 규정되는 영역을 조사하여, 상기 생물 시스템 또는 그것의 생화학적 성분들의 표현형적 역량 및 행태를 결정할 수 있다.

[0190] 이러한 계산법은, 생물 시스템들이 유연하고 다수의 다른 방식으로도 동일한 결과에 도달할 수 있기 때문에, 생물학적 현실에 부합된다. 생물 시스템은 모든 살아있는 시스템들이 직면해야 하는 기본적인 제약들에 의해 제한되는 진화 기전을 통해 설계된다. 따라서, 제한 조건 기반의 모델링 전략은 이러한 일반적인 현실을 포괄한다. 더욱이, 제한 조건의 엄격화를 통해 네트워크 모델에 추가적인 제한을 계속적으로 부과하는 능력은 상기 해결 영역의 크기를 줄이게 되고, 그래서 생리학적 성능 또는 표현형을 예견할 수 있는 정확도가 향상된다.

[0191] 본 발명의 교시 및 지침을 감안하여, 당해 기술 분야의 당업자는 숙주 미생물 유기체에서 원하는 화합물의 생합성을 설계 및 구현하기 위해 대사 모델링 및 시뮬레이션에 다양한 계산 프레임워크를 적용할 수 있을 것이다. 이러한 대사 모델링 및 시뮬레이션 방법은, 예를 들어 SimPheny[®] 및 OptKnock로 상기에 예시된 전산 시스템을 포함한다. 본 발명을 예시하기 위해, 모델링 및 시뮬레이션을 위한 OptKnock 계산 프레임워크 체계와 관련하여 일부 방법들을 본원에서 기술한다. 당해 기술 분야의 당업자들은, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 임의의 이

러한 다른 대사 모델링 및 시뮬레이션 계산 프레임워크 및 방법에, OptKnock를 이용한 대사 변이의 동정, 설계 및 구현을 적용하는 방법을 알 것이다.

- [0192] 전술한 방법들은 파괴할 한가지 이상의 대사 반응 세트를 제공할 것이다. 상기 세트 또는 대사 변이에서 각 반응의 제거시, 원하는 산물은 유기체의 증식기 동안에 필수 산물로서 생산될 수 있다. 반응들은 공지되어 있으므로, bilevel OptKnock 문제에 대한 해법은, 또한, 반응 세트의 각 반응을 촉매하는 하나 이상의 효소를 코딩하는 관련 유전자 또는 유전자들을 제공해 줄 것이다. 반응 세트와, 각 반응에 참여하는 효소를 코딩하는 해당 유전자를 동정하는 것은, 일반적으로 효소와 코딩 유전자 간의 관련성이 포함된 반응 데이터베이스를 이용한 반응들의 상관 관계를 통해 달성되는 자동화된 과정이다.
- [0193] 일단 동정되면, 원하는 산물의 생산을 달성하기 위해 파괴시켜야 하는 반응 세트는, 세트에 포함된 각 대사 반응을 코딩하는 하나 이상의 유전자의 기능적 파괴에 의해, 타겟 세포 또는 유기체에서 구현된다. 상기 반응의 기능적 파괴를 달성하는데 특히 유용한 한가지 수단은, 각 코딩 유전자의 결손이다. 그러나, 일부 경우에, 예컨대 프로모터 또는 조절 인자에 대한 cis 결합 부위와 같은 조절 영역의 돌연변이, 결손 등의 기타 유전적 이상에 의해, 또는 다수 위치들 중 임의 위치에서의 코딩 서열의 절단(truncation)에 의해, 상기 반응을 파괴하는 것이 유익할 수 있다. 유전자 세트의 전체 결손까지는 아닌 그 미만의 수준의 결손을 발생시키는 상기한 이상은, 예컨대 산물의 커플링의 신속한 평가가 필요할 때 또는 유전자 복원이 이루어질 가능성이 거의 없을 경우에, 유용할 수 있다.
- [0194] 추가적인 반응 세트의 파괴 또는 생육과 커플링된 원하는 산물의 생합성 등의 생합성을 달성할 수 있는 대사 변이를 유도하는, 전술한 bilevel OptKnock 문제에 대한 추가적인 생산적인 해법을 동정하기 위해, 정수 컷(integer cut)으로 칭해지는 최적화 방법을 실행할 수 있다. 상기 방법은, 상기 예시된 OptKnock 문제를, 각 반복시 정수 컷으로 지칭되는 추가적인 제한을 통합하여, 반복적으로 해결함으로써, 진행된다. 정수 컷 제한은, 상기 해결 과정이, 산물 생합성과 생육을 필수적으로 조합시킨 임의의 이전 반복에서 동정된 반응의 실제 동일한 세트가 선택되지 않게 방지한다. 예컨대, 앞서 동정된 생육과 결합된 대사 변이에서 파괴시킬 반응들 1, 2 및 3가지가 확인된다면, 하기 제한으로 동일 반응이 후속 해법에서 동시에 고려되지 않도록 한다. 정수 컷 방법은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 예컨대 Burgard et al., *Biotechnol. Prog.* 17:791-797 (2001)에서 찾아 볼 수 있다. 대사 모델링 및 시뮬레이션을 위해 OptKnock 계산 프레임워크와의 조합 사용에 대한 본원에 기술된 모든 방법들에서와 같이, 반복적인 계산 분석에서 쓸데없는 반복을 줄이는 정수 컷 방법을, 또한, 예컨대, SimPheny[®] 등의 당해 기술 분야에 널리 공지된 그외 계산 프레임워크와 함께 적용할 수 있다.
- [0195] 타겟 생화학 산물의 생산을 동정된 유전자 변이를 가지도록 조작된 세포 또는 유기체의 생육과 필연적으로 커플링시키는 방법을 비롯하여, 본원에 예시된 방법들로, 원하는 산물을 생합성으로 생산하는 세포 및 유기체를 구축할 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 계산법으로 OptKnock 및 SimPheny[®] 중에서 선택되는 인 실리코(*in silico*) 방법으로 확인되는 대사 변이를 동정 및 구현할 수 있다. 대사 변이 세트는, 예컨대 하나 이상의 생합성 경로 효소들의 부가 및/또는 유전자 결손에 의한 파괴 등의 한가지 이상의 대사 반응의 기능적 파괴를 포함할 수 있다.
- [0196] 전술한 바와 같이, OptKnock 방법은 오랜 기간의 생육 선택을 거쳤을 때 미생물 돌연변이 네트워크가 계산적으로 예측되는 최대-증식 표현형을 나타내는 방향으로 진화할 수 있다는 전제에서 개발되었다. 즉, 이러한 방법은 선택압 하에서 유기체의 자기 최적화 능력을 활용한다. OptKnock 프레임워크는 네트워크 화학량론에 근거하여 생화학적 생산과 세포 증식을 강제로 커플링시키는 유전자 결손의 조합을 철저하게 조사할 수 있다. 최적 유전자/반응 낮아움을 확인하는데에는, 형성되는 네트워크에 대한 최적 증식 해법이 대상 생화학적 산물을 과생산하도록, 활성 반응 세트를 선택하는 2단식 최적화 문제의 해법이 요구된다(Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)).
- [0197] 에스케리키아 콜라이 대사의 인 실리코 화학량론 모델을 채택하여, 기존에 예시되고, 예를 들어 미국 특허 공개 공보 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466, 및 미국 특허 7,127,379에 기술된 바와 같이, 대사 경로의 필수 유전자들을 동정할 수 있다. 본 발명에 개시된 바와 같이, OptKnock의 수리적 프레임워크를 적용하여, 원하는 산물을 증식과 조합하여 생산가능하게 하는, 유전자 결손을 정확하게 파악할 수 있다. 나아가, 상기 이단식 OptKnock 문제 해법은 오직 하나의 결손 세트만을 제공한다. 모든 의미 있는 해법들, 즉 증식과 조합되어 생산되게 하는 낮아움 세트들을 모두 열거하기 위해, 정수 컷으로 지칭되는 최적화 기법을 구현할 수 있다. 이는, 전술한 바와 같이, 각 반복에서 정수 컷으로 지칭되는 추가적인 제한을 추가하면서 OptKonck 문제를 반복적으로 해결하는 과정

을 수반한다.

- [0198] 본원에 기술된 바와 같이, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로의 원하는 활성을 코딩하는 핵산을 숙주 유기체에 도입할 수 있다. 일부 경우에, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로 효소 또는 단백질의 활성을 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 생산을 증가시키도록 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 예컨대, 단백질 또는 효소의 활성을 증가시키는 공지된 돌연변이는 코딩 핵산 분자에 도입시킬 수 있다. 아울러, 효소 또는 단백질의 활성을 높이거나 및/또는 저해 활성을 낮추기 위해, 예컨대 네거티브 조절자의 활성을 낮추기 위해, 최적화 방법을 적용할 수 있다.
- [0199] 이러한 최적화 방법의 한가지가 방향성 진화(directed evolution)이다. 방향성 진화는, 효소의 특성을 개선 및/또는 변이시키기 위해, 특정 유전자로 표적화된 돌연변이를 도입하는 과정을 포함하는, 강력한 방법이다. 향상된 및/또는 변이된 효소는 다수의 (예, $>10^4$) 효소 변이체를 자동으로 스크리닝할 수 있는 민감성 고성능 스크리닝 분석을 개발 및 구현하여 동정할 수 있다. 돌연변이 유발 및 스크리닝의 반복 라운드를 전형적으로 수행하여 효소에 최적화된 특성을 부여할 수 있다. 돌연변이를 유발하기 위한 유전자의 영역들을 동정하는데 도움이 될 수 있는 수리적 알고리즘들도 또한 개발되었고, 제조 및 스크리닝할 필요가 있는 효소 변이체들의 수를 현저하게 줄일 수 있다. 다양한 변이체 라이브러리 제조에 유효한 다수의 방향성 진화 기법들이 개발되었고 (Hibbert et al., *Biomol.Eng* 22:11-19 (2005); Huisman and Lalonde, *In Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries* pgs. 717-742 (2007), Patel (ed.), CRC Press; Otten and Quax, *Biomol.Eng* 22:1-9 (2005).; 및 Sen et al., *Appl Biochem.Biotechnol* 143:212-223 (2007)), 많은 효소 클래스들에서의 매우 다양한 특성을 개선시키기 위해, 이러한 방법들이 성공적으로 적용되었다. 방향적 진화 기법에 의해 향상 및/또는 변이시킨 효소 특징들로는, 예컨대 비-천연성 기질의 변환을 위한, 선택성/특이성; 확실한 고온 처리를 위한 온도 안정성; 높거나 낮은 pH 조건에서의 생물학적 처리를 위한 pH 안정성; 기질 또는 산물 관용성, 이로써 높은 생산 역가를 달성할 수 있음; 비-천연성 기질들을 포괄하기 위한 광범위한 기질 결합성 등의, 결합성 (K_m); 산물, 기질 또는 주요 중간산물에 의한 저해를 없애기 위한, 저해성 (K_i); 원하는 플럭스를 달성하기 위해 효소적 반응 속도를 높이기 위한, 활성 (kcat); 단백질 수율 및 전체 경로 플럭스를 높이기 위한, 발현 수준; 호기 조건에서 공기 민감성 효소 작동을 위한, 산소 안정성; 및 산소가 존재하지 않는 조건에서 호기성 효소의 작동을 위한, 혐기 활성을 포함한다.
- [0200] 특정 효소의 원하는 특징을 표적하기 위한 유전자의 돌연변이 유발 및 다양화를 위해 다수의 예시적인 방법들이 개발되었다. 이러한 방법들은 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 이러한 방법들 중 임의의 방법을 이용하여 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 프로필렌, 1,3-부탄디올, 크로틸 알코올 또는 3-부텐-1-올 경로 효소 또는 단백질의 활성을 변형 및/또는 최적화할 수 있다. 그러한 방법으로는, 비제한적인 예로서, PCR 반응에 DNA 중합효소의 피델리티(fidelity)를 낮춤으로써 랜덤 포인트 돌연변이를 도입하는 EpPCR (Pritchard et al., *J Theor.Biol.* 234:497-509 (2005)); 완전한 환형 플라스미드를 주형으로 사용하고, 마지막 뉴클레오티드 2개에 엑소뉴클레아제 내성 티오포스페이트 결합을 구비한 랜덤 6 mer를 이용하여 플라스미드를 증폭시킨 다음, 세포로 형질전환시키고, 세포내에서 플라스미드는 탠덤 리피트에서 다시 환화되는 것을 제외하고는, epPCR과 동일한 에러-유발 롤링 서클 증폭(Error-prone Rolling Circle Amplification) (epRCA) (Fujii et al., *Nucleic Acids Res.* 32:e145 (2004); 및 Fujii et al., *Nat. Protoc.* 1:2493-2497 (2006)); 전형적으로 Dnase I 또는 Endo V와 같은 뉴클레아제로 2개 이상의 변이체 유전자를 절단하여, DNA 중합효소의 존재 중에서 어닐링 및 연장 사이클에 의해 재조합되는 랜덤 단편 풀을 제조함으로써, 키메라 유전자 라이브러리를 구축하는 과정을 수반하는, DNA 또는 패밀리 서플링 (Stemmer, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747-10751 (1994); 및 Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994)); 주형을 프라이밍한 후 변성과 매우 짧은 시간 기간(약 5초)의 어닐링/연장으로 이루어진 2단계 PCR 사이클을 반복하는 과정을 수반하는 스테저드 연장(Staggered Extension) (StEP) (Zhao et al., *Nat. Biotechnol.* 16:258-261 (1998)); 랜덤 서열 프라이머를 사용하여 주형의 여러가지 세그먼트에 대해 상보적인 다수의 짧은 DNA 단편을 제조하는 랜덤 프라이밍 재조합 (Random Priming Recombination, RPR) (Shao et al., *Nucleic Acids Res* 26:681-683 (1998))을 포함한다.
- [0201] 추가적인 방법으로, 선형화된 플라스미드 DNA를 사용하여 미스매치 복원에 의해 복원되는 헤테로두플렉스를 형성하는 헤테로두플렉스 재조합(Heteroduplex Recombination) (Volkov et al, *Nucleic Acids Res.* 27:e18 (1999); 및 Volkov et al., *Methods Enzymol.* 328:456-463 (2000)); Dnase I 단편화와 단일 가닥 DNA(ssDNA)의 크기 분획화를 이용한 RACHITT (Random Chimeragenesis on Transient Templates) (Coco et al., *Nat. Biotechnol.* 19:354-359 (2001)); 주형의 풀로서 사용되는 단방향성 ssDNA 단편의 존재 중에서 프라이머로부터

한쪽 방향으로 자라는 가닥들의 주형 스위칭을 수반하는 RETT (Recombined Extension on Truncated templates) (Lee et al., *J. Molec. Catalysis* 26:119-129 (2003)); 축중 프라이머를 사용하여 분자들 간의 재조합을 제어하는 DOGS (Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling) (Bergquist and Gibbs, *Methods Mol.Biol* 352:191-204 (2007); Bergquist et al., *Biomol.Eng* 22:63-72 (2005); Gibbs et al., *Gene* 271:13-20 (2001)); 대상 유전자 또는 유전자 단편에서 1 bp가 결손된 조합 라이브러리(combinatorial library)를 구축하는 ITCHY(Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzyme) (Ostermeier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3562-3567 (1999); 및 Ostermeier et al., *Nat. Biotechnol.* 17:1205-1209 (1999)); 포스포티오에이트 dNTA를 이용하여 절단체(truncation)를 제조하는 것을 제외하고는 ITCHY와 유사한 THIO-ITCHY(Thio-Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzyme) (Lutz et al., *Nucleic Acids Res* 29:E16 (2001)); 재조합 유전자에 대한 ITCHY와 DNA 서플링 방법 2가지를 조합한 SCRATCHY (Lutz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11248-11253 (2001)); epPCR로 제작한 후, 유용한 활성을 보유한 것을 스크리닝/선별하는 RNDM (Random Drift Mutagenesis) (Bergquist et al., *Biomol. Eng.* 22:63-72 (2005)); 포스포티오에이트 뉴클레오티드의 랜덤 병합 및 절단을 이용하여 랜덤 길이의 단편들의 풀을 제조하고, 이러한 풀을 주형으로 사용하여 이노신 등의 "유니버설" 염기들의 존재 하에 연장시키고, 이노신-함유 상보체의 복제로 랜덤 염기 병합이 이루어지고, 결과적으로 돌연변이가 유발되는, 랜덤 돌연변이 유발 방법인, SeSaM (Sequence Saturation Mutagenesis) (Wong et al., *Biotechnol. J.* 3:74-82 (2008); Wong et al., *Nucleic Acids Res.* 32:e26 (2004); 및 Wong et al., *Anal. Biochem.* 341:187-189 (2005)); "타겟에서 모든 유전자 다양성"을 코딩하고 서플링된 후대(shuffled progeny)에 대해 매우 다양한 다양성을 허용할 수 있도록 설계된 중첩되는 올리고뉴클레오티드를 이용하는 합성 서플링(Synthetic Shuffling) (Ness et al., *Nat. Biotechnol.* 20:1251-1255 (2002)); dUTP를 병합 후 우라실 DN글리코실라제 처리한 다음 피페리딘 처리를 처리하여 엔드포인트 DNA 단편화를 수행하는, 뉴클레오티드 교환 및 절개 기법(Nucleotide Exchange and Excision Technology) Next (Muller et al., *Nucleic Acids Res.* 33:e117 (2005))를 포함한다.

[0202] 추가적인 방법으로, 링커를 사용하여 2개의 관련성이 멀거나 관련성이 없는 유전자들이 융합되게 촉진시키고, 2종의 유전자들 간에 다양한 키메라를 재조합으로써 단일-교차 하이브리드 라이브러리를 제조하는, 서열 상동성-독립적인 단백질 재조합(SHIPREC) (Sieber et al., *Nat. Biotechnol.* 19:456-460 (2001)); 출발 물질이 삽입체를 포함하는 슈퍼코일형의 dsDNA 플라스미드와 원하는 돌연변이 부위에 대해 축중인 2개의 프라이머를 포함하는, 유전자 부위 포화 돌연변이 유발(Gene Site Saturation Mutagenesis, GSSM™) (Kretz et al., *Methods Enzymol.* 388:3-11 (2004)); 제한된 영역을 다수의 가능한 아미노산 서열 변이로 치환시키는 짧은 올리고뉴클레오티드 카세트를 사용하는, 조합 카세트 돌연변이 유발(Combinatorial Cassette Mutagenesis, CCM) (Reidhaar-Olson et al. *Methods Enzymol.* 208:564-586 (1991); 및 Reidhaar-Olson et al. *Science* 241:53-57 (1988)); 기본적으로 CCM과 비슷하지만, 높은 돌연변이 유발율로 epPCR을 이용하여 핫 스팟과 핫 영역을 동정한 다음 CMCM으로 연장하여 단백질 서열 스페이스의 한정된 영역을 포괄(cover)하는, 조합형 다중 카세트 돌연변이 유발(Combinatorial Multiple Cassette Mutagenesis, CMCM) (Reetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591 (2001)); DNA 중합효소 III의 돌연변이 서브유닛을 코딩하는 플라스미드-유래의 *mutD5* 유전자를 이용하여 조건부 *ts* 돌연변이 유발 플라스미드가 선택 과정 중에 랜덤 및 천연 돌연변이 빈도를 20에서 4000 X로 증가시키며, 선택 과정이 필요없을 때에는 유해한 돌연변이가 축적되는 것을 차단할 수 있는 돌연변이 유발 균주 기법(Mutator Strains technique) (Selifonova et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3645-3649 (2001)); Low et al., *J. Mol. Biol.* 260:359-3680 (1996))을 포함한다.

[0203] 추가적인 방법의 예로는, 선택된 아미노산의 조합 돌연변이(combinatorial mutation)를 분석 및 최적화하는 방향성 돌연변이를 유발하는, LTM (Look-Through Mutagenesis) (Rajpal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8466-8471 (2005)); 한번에 복수의 유전자에 적용할 수 있거나, 또는 단일 유전자의 대규모 키메라(복수의 돌연변이) 라이브러리를 제조할 수 있는 DNA 서플링 방법인, 유전자 어셈블리 (Tunable GeneReassembly™ (TGR™) Technology supplied by Verenum Corporation); 특정 폴드를 가지고 있는 구조적으로 정의된 단백질 백본을 고정하고, 폴드와 전체 단백질 에너제틱스를 안정화시킬 수 있는 아미노산 치환에 대해 서열 스페이스를 검색하며, 일반적으로 공지된 3차원 구조를 가진 단백질에 대해 가장 효과적으로 작용하는 최적화 알고리즘인, PDA (*in Silico* Protein Design Automation) (Hayes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15926-15931 (2002)); 및 구조/기능에 대한 지식을 이용하여 효소 개선이 가능한 부위를 선택하는 단계, Stratagene QuikChange (Stratagene; San Diego CA)와 같은 돌연변이 유발 방법을 이용하여 선택한 부위에서의 포화 돌연변이 유발(saturation mutagenesis)을 수행하는 단계, 원하는 특징을 스크리닝/선별하는 단계, 및 개선된 클론(들)을 이용하여 다른 부위에 대해서도 다시 시작하여 원하는 활성이 달성될 때까지 계속 반복하는 단계를 포함

하는, ISM (Iterative Saturation Mutagenesis) (Reetz et al., *Nat. Protoc.* 2:891-903 (2007); 및 Reetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45:7745-7751 (2006))을 포함한다.

[0204] 돌연변이를 유발하기 위한 임의의 전술한 방법들은 단독으로 또는 임의 조합하여 사용할 수 있다. 아울러, 방향성 진화 방법들 중 임의의 한가지 방법 또는 조합을 본원에 기술된 후천적인 진화 기법과 더불어 사용할 수 있다.

[0205] 본원에 제공된 본 발명의 내용에는 본 발명의 다양한 구현예들의 활성에 실질적으로 영향을 미치지 않은 변형이 포함되는 것으로 이해된다. 따라서, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0206] 실시예 I

[0207] **2-아미노펜타노에이트, 2-옥소아디페이트 및 글루타릴-CoA로부터 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올 및 부타디엔의 생산 경로**

[0208] 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올 및 부타디엔까지의 몇몇 경로를 도 1에 도시한다. 출발 대사산물은 2-옥소아디페이트, 글루타릴-CoA 및 5-아미노펜타노에이트를 포함한다. 이들 경로는, 다음과 같은 효소 하나 이상에 의해 촉매된다: 2-아미노아디페이트 데카르복실라제, 5-아미노펜타노에이트 리덕타제, 5-아미노펜트-2-에노에이트 아미노트랜스퍼라제, 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제, 2-옥소아디페이트 데카르복실라제, 글루타레이트 세미알데하이드 리덕타제, 5-하이드록시발레레이트 데하이드로게나제, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 데하이드라타제, 2-아미노아디페이트 아미노트랜스퍼라제, 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제, 5-아미노펜타노에이트 아미노트랜스퍼라제, 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제, 5-아미노펜트-2-에노에이트 데아미나제, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 리덕타제, 5-하이드록시발레릴-CoA 트랜스퍼라제 및/또는 신테타제, 5-하이드록시펜타노일-CoA 데하이드로게나제, 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 데하이드라타제, 2,4-펜타디에노일-CoA 트랜스퍼라제, 신테타제 또는 하이드롤라제, 5-하이드록시펜트-2-에노일-CoA 트랜스퍼라제 또는 신테타제, 5-하이드록시발레릴-CoA 데하이드라타제/데하이드로게나제, 2-옥소아디페이트 데하이드로게나제, 2-옥소아디페이트:페리독신 옥시도리덕타제, 2-옥소아디페이트 포르메이트 리아제, 글루타릴-CoA 리덕타제, 2,4-펜타디에노에이트 데카르복실라제, 5-하이드록시펜트-2-에노에이트 데카르복실라제, 3-부텐-1-올 데하이드라타제 및 5-하이드록시발레레이트 데카르복실라제.

[0209] 글루타릴-CoA는 벤조일-CoA, 라이신 및 트립토판 등의 수많은 대사산물들의 분해에 있어 중간 산물이다. 또한, 글루타릴-CoA는 예를 들어 도 2에 도시된 경로를 이용하여 생합성할 수도 있다. 글루타릴-CoA는 5가지 이상의 효소 단계들에서 2,4-펜타디에노에이트로 변환될 수 있다. 제1 단계에서는, 글루타릴-CoA가 글루타레이트 세미알데하이드로 글루타릴-CoA 리덕타제에 의해 환원된다 (단계 S). 알데하이드 리덕타제 효소에 의해 다시 5-하이드록시발레레이트로의 환원이 촉매된다 (단계 E). 5-하이드록시발레레이트는 그런 후 단계 L에서 CoA 트랜스퍼라제 또는 신테타제에 의해 5-하이드록시발레릴-CoA로 활성화된다. 데하이드라타제 및 데하이드로게나제 활성을 가진 2가지 기능의 효소에 의해 5-하이드록시발레릴-CoA는 2,4-펜타디에노일-CoA로의 변환이 촉매된다 (단계 Q). 다른 예로, 이 반응은 개별 효소들에 의해 2 단계로 촉매된다 (단계 M, N). 2,4-펜타디에노에이트는 CoA 트랜스퍼라제, 신테타제 또는 하이드롤라제에 의해 CoA 모이어티가 제거되어 형성된다 (단계 O). 2,4-펜타디에노에이트 또는 2,4-펜타디에노일-CoA는 도 6에 도시된 다수의 경로들에 의해 부타디엔으로 추가로 변환될 수 있다. 5-하이드록시발레레이트를 2,4-펜타디에노에이트 및 부타디엔로 변환하는 다른 경로들도 알려져 있다. 또한, 5-하이드록시발레레이트 중간 산물은 하나 이상의 효소 단계에서 3-부텐-1-올로 변환될 수 있다. 5-하이드록시발레레이트에서 3-부텐-1-올로의 직접 변환은 알켄을 형성하는 데카르복실라제에 의해 촉매된다 (단계 W). 간접 변환은 5-하이드록시발레레이트에서 5-하이드록시펜트-2-에노에이트로의 산화 및 이후 3-부텐-1-올로의 탈카르복시화 (단계 F 및 U)를 수반한다. 3-부텐-1-올을 산물로서 분리하거나, 또는 추가로 탈수시켜 부타디엔을 제조할 수 있다. 탈수는 효소 또는 촉매 반응을 통해 진행된다.

[0210] 도 1에 도시된 경로의 다른 출발 물질은 5-아미노펜타노에이트이다. 5-아미노펜타노에이트는 라이신, 오르니틴 및 프롤린 분해시 형성되는 중간산물이다. 5-아미노펜타노에이트를 글루타레이트 세미알데하이드로 변환시키는데에는 아미노트랜스퍼라제, 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제가 필요하다. 그런 후, 글루타레이트 세미알데하이드는 전술한 바와 같이 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올 또는 부타디엔으로 변환된다. 다른 예로, 5-아미노펜타노에이트는 에노익산 리덕타제에 의해 5-아미노펜트-2-에노에이트로 산화된다 (단계 B). 5-아미노펜트-2-에노에이트는 탈아민화되어 2,4-펜타디에노에이트가 된다. 또 다른 구현예로, 5-아미노펜트-2-에노에이트가 아미노트랜스퍼라제, 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제에 의해 먼저 이의 대응되는 알데하이드인, 5-

하이드록시펜트-2-에노에이트로 변환된다. 5-하이드록시펜트-2-에노에이트는 그런 후 직접 (단계 G) 또는 CoA 중간 산물 (단계 P, N, Q)을 경유하여 2,4-펜타디에노에이트로 탈수된다.

[0211] 2-아미노아디페이트 및 2-옥소아디페이트 (알파-케토아디페이트로도 지칭됨)는 사카로마이세스 세레비지에 등의 유기체에서 라이신 대사의 중간산물이다. 2-옥소아디페이트는 또한 효소 호모시트레이트 신타제, 호모아코니타제 및 호모이소시트레이트 데하이드로게나제에 의해 알파-케토글루타레이트 및 아세틸-CoA로부터 생성되는, 코엔자임 B 생합성의 중간산물이다. 2-옥소아디페이트 및 2-아미노아디페이트는 아미노트랜스퍼라제, 데하이드로게나제 또는 아민 옥시다제 효소에 의해 상호 변환된다. 케토-산 데카르복실라제에 의한 2-옥소아디페이트의 탈카르복시화로 글루타레이트 세미알데하이드가 수득된다 (단계 D). 다른 예로, 알파-케토아디페이트 데하이드로게나제 활성을 가진 아실화 데카르복실라제는 2-옥소아디페이트로부터 글루타릴-CoA를 형성한다 (단계 R). 아미노산 데카르복실라제에 의해 2-아미노아디페이트가 탈카르복시화되어 5-아미노펜타노에이트가 된다. 글루타릴-CoA, 글루타레이트 세미알데하이드 또는 5-아미노펜타노에이트 중간 산물의 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올 또는 부타디엔로의 추가적인 변환은 도 1에 도시된 바와 같이, 종래에 개시된 바와 같이 진행된다.

[0212] 도 1에 도시된 반응의 후보 효소는 실시예 VII에 기술되어 있다.

[0213] **실시예 II.**

[0214] **아세틸-CoA로부터 글루타릴-CoA를 제조하는 경로**

[0215] 도 2는 아세틸-CoA 2 분자를 글루타릴-CoA로 변환하는 효율적인 탄소 경로를 나타낸다. 제1 단계에서는, 아세토아세틸-CoA 티올라제, 베타-케토티올라제 효소에 의해 아세틸-CoA 2 분자가 축합되어 아세토아세틸-CoA가 형성된다. 아세토아세틸-CoA는 다른 예로 아세토아세틸-CoA 신타제에 의해 말로닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 형성될 수도 있다. 그런 후, 아세토아세틸-CoA의 3-케토기가 환원 및 탈수되어 크로토닐-CoA가 된다. 크로토닐-CoA가 환원성 카르복시화에 의해 글루타릴-CoA가 된다. 아세토아세틸-CoA를 글루타릴-CoA로 변환하는 후보 효소들과 유전자들이 실시예 VII에 보다 상세하게 기술되어 있다.

[0216] **실시예 III.**

[0217] **프로피오닐-CoA로부터 2,4-펜타디에노에이트를 생성하는 경로**

[0218] 본 실시예는 도 3에 도시된 프로피오닐-CoA를 2,4-펜타디에노에이트로 변환하는 경로를 기술한다. 효소로는 3-옥소펜타노일-CoA 티올라제 또는 신타제, 3-옥소펜타노일-CoA 리덕타제, 3-하이드록시펜타노일-CoA 데하이드라타제, 펜트-2-에노일-CoA 이소머라제, 펜트-3-에노일-CoA 데하이드로게나제; 2,4-펜타디에노일-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제 중 하나 이상; 및 펜트-2-에노일-CoA 데하이드로게나제를 포함한다.

[0219] 프로피오닐-CoA는 CO₂ 고정, 숙시네이트 또는 피루베이트의 프로피오네이트로의 변환, 글리옥실레이트 동화 및 아미노산 분해에 대한 3-하이드록시프로피오네이트/4-하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시프로피오네이트 사이클들을 비롯한 수많은 생물학적 경로들에서 대사 중간 산물로서 형성된다. 도 3의 경로들에서, 프로피오닐-CoA는 2,4-펜타디에노에이트로 추가로 변환된다. 경로의 제1 단계에서, 프로피오닐-CoA 및 아세틸-CoA가 3-옥소펜타노일-CoA 티올라제에 의해 3-옥소펜타노일-CoA로 축합된다. 다른 예로, 프로피오닐-CoA 및 말로닐-CoA는 3-옥소펜타노일-CoA 신타제 활성을 가진 효소에 의해 축합된다. 다른 예로, 먼저 프로피오닐-CoA 및 말로닐-ACP를 3-옥소펜타노일-ACP로 변환한 다음, ACP가 CoA로 변환되는 2 단계로, 3-옥소펜타노일-CoA 중간 산물이 형성될 수 있다. 3-옥소펜타노일-CoA는 그런 후 3-옥소아실-CoA 리덕타제 및 3-하이드록시아실-CoA 데하이드라타제에 의해 3-하이드록시펜타노일-CoA로 환원된 다음, 펜트-2-에노일-CoA로 탈수된다 (단계 B, C). 델타-이소머라제는 이중 결합을 2-위치에서 3-위치로 이동시켜 펜트-3-에노일-CoA 데하이드로게나제의 기질인 펜트-3-에노일-CoA를 형성한다 (단계 D 및 E). 아울러, 효소 촉매 단계 B, C, D 및 E는 클로스트리듐 아미노발레리쿰과 같은 5-아미노발레레이트 이용 유기체에서 역 방향으로 참여한다. 다른 예로, 펜트-2-에노일-CoA 중간 산물은 펜트-2-에노일-CoA 데하이드로게나제에 의해 2,4-펜타디에노일-CoA로 산화된다. 경로의 최종 단계에서, 2,4-펜타디에노일-CoA는 CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제에 의해 해당 산으로 변환된다 (단계 F). 2,4-펜타디엔은 산물로서 분리되거나, 또는 도 6에 도시된 바와 같이 2,4-펜타디에노에이트 또는 2,4-펜타디에노일-CoA가 부타디엔으로 추가로 변환될 수 있다. 프로피오닐-CoA를 2,4-펜타디에노에이트로 변환하는 후보 효소들과 유전자들은 실시예 VII에 보다 상세하게 기술되어 있다.

[0220] **실시예 IV.**

[0221] **3-하이드록시프로피오닐-CoA로부터 1,3-부탄디올을 합성하는 경로**

- [0222] 본 실시예는 도 4에 도시된 3-하이드록시프로피오닐-CoA를 1,3-부탄디올로 변환하는 경로를 기술한다. 효소들로는 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 티올라제 또는 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 신타제, 3-옥소-5-하이드록시펜타노에이트 데카르복실라제, 3-옥소부탄올 리덕타제 및 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제 중 하나 이상을 포함한다.
- [0223] 3-하이드록시프로피오닐-CoA는 독립 영양 생물의 -하이드록시프로피오네이트/4-하이드록시부티레이트 CO₂ 고정 사이클과 광영양 세균에서 발견된 관련된 3-하이드록시프로피오네이트 사이클의 중간 산물이다 (Berg et al, *Science* 318(5857):1782-6 (2007); Strauss and Fuchs, *Eur J Biochem* 215(3):633-43 (1993)). 1,3-부탄디올 경로에서, 3-하이드록시프로피오닐-CoA 및 아세틸-CoA는 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 티올라제에 의해 축합되어, 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA가 된다 (단계 A). 다른 예로, 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 중간 산물은 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 신타제에 의해 3-HP-CoA 및 말로닐-CoA로부터 형성된다. CoA 신테타제, 트랜스퍼라제 또는 하이드롤라제에 의해 CoA 모이어티가 제거되어, 3-옥소-5-하이드록시펜타노에이트가 된다 (단계 B). 3-옥소-5-하이드록시펜타노에이트의 3-옥소부탄올로의 탈카르복시화는 케토-산 데카르복실라제에 의해 촉매된다 (단계 C). 경로의 최종 단계에서, 3-옥소부탄올이 알코올 데하이드로게나제 또는 케톤 리덕타제에 의해 1,3-부탄올로 환원된다. 후보 효소들과 유전자들은 실시예 VII에서 보다 상세하게 설명된다.
- [0224] **실시예 V.**
- [0225] **피루베이트 및 아세트알데하이드로부터 1,3-부탄디올, 3-부텐-1-올 및 부타디엔을 생성하는 경로들**
- [0226] 본 실시예는 피루베이트 및 아세트알데하이드의 1,3-부탄디올, 3-부텐-1-올 및 부타디엔으로의 변환 경로를 기술한다. 경로들은 도 5에 도시되어 있다. 관련 효소들로는 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 알돌라제, 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 데하이드라타제, 2-옥소펜텐노에이트 데카르복실라제, 3-부텐-1-알 리덕타제, 3-부텐-1-올 데하이드라타제, 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 데카르복실라제, 3-하이드록시부타날 리덕타제, 4-하이드록시-2-옥소펜타노에이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시-2-옥소펜타노에이트:페레독신 옥시도리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드 형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신테타제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알코올 형성)를 포함한다. 또한, 단계 E는 화학적 탈수를 통해서도 촉매될 수 있다.
- [0227] 피루베이트 및 아세트알데하이드의 3-부텐-1-올로의 변환은 효소적 4 단계로 이루어진다. 먼저, 피루베이트 및 아세트알데하이드가 4-하이드록시-2-케토발레레이트 알돌라제에 의해 4-하이드록시-2-옥소발레레이트로 축합된다 (도 5의 단계 A). 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 산물은 이후 2-옥소펜텐노에이트로 탈수된다 (도 5의 단계 B). 2-옥소펜텐노에이트가 탈카르복시화되어 3-부텐-1-알이되며 (단계 C), 추가로 알코올 데하이드로게나제에 의해 3-부텐-1-올로 환원된다 (단계 D). 3-부텐-1-올 산물의 부타디엔로의 추가적인 탈수가 효소 또는 화학 촉매에 의해 수행된다.
- [0228] 또한, 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 중간 산물은 2 단계 이상의 효소 단계를 통해 1,3-부탄디올로 변환될 수 있다. 일 구현예에서, 4-하이드록시-2-옥소발레레이트가 3-하이드록시부타날로 탈카르복시화되고 (단계 F), 환원되어 1,3-부탄디올을 형성한다 (단계 G). 다른 예로, 4-하이드록시-2-옥소발레레이트가 아실화 및 탈카르복시화 옥시도리덕타제 또는 포르메이트 리아제에 의해 3-하이드록시부티릴-CoA로 변환된다 (단계 H). 3-하이드록시부티릴-CoA 중간 산물은 알데하이드-형성 아실-CoA 리덕타제 (단계 I) 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제 및 3-하이드록시부티레이트 리덕타제의 조합 반응 (단계 J, K)을 통해 1 또는 2 단계 효소 단계를 통해 3-하이드록시부타날로 더욱 환원된다. 3-하이드록시부타날은 다시 3-하이드록시부타날 리덕타제에 의해 1,3-부탄디올로 환원된다 (단계 G). 다른 구현예에서, 3-하이드록시부티릴-CoA 중간 산물은 알코올을 형성하는 2가지 기능의 알데하이드/알코올 데하이드로게나제에 의해 바로 1,3-부탄디올로 환원된다 (단계 L). 후보 효소들과 유전자들은 실시예 VII에서 보다 상세하게 설명된다.
- [0229] **실시예 VI.**
- [0230] **2,4-펜타디에노에이트 또는 2,4-펜타디에노일-CoA의 부타디엔으로의 변환 경로.**
- [0231] 도 1 및 3은 공통적인 대사 전구체들로부터 2,4-펜타디에노에이트 또는 2,4-펜타디에노일-CoA를 형성하는 경로들을 도시한다. 도 6은 2,4-펜타디에노에이트 또는 2,4-펜타디에노일-CoA를 부타디엔으로 다시 변환하는 경로들을 도시한다. 2,4-펜타디에노에이트는 몇가지 대안적인 경로들에 의해 부타디엔으로 변환된다. 한가지 경로는 단계 G에 도시된 직접 탈카르복시화이다. 다른 예로, 산 모이어티는 카르복실산리덕타제 효소에 의해 알데하이드로 환원된다 (단계 A). 펜타-2,4-디에날중간 산물의 탈카르보닐화에 의해 부타디엔이 형성된다 (단계

B). 단계 H 및 E는, 2,4-펜타디에노에이트가 키나제에 의해 먼저 2,4-펜타디에노일-포스페이트로 변환된 다음 포스페이트 리덕타제에 의해 펜타-2,4-디에날로 환원되는 다른 경로를 나타낸다. 2,4-펜타디에노에이트 및 2,4-펜타디에노일-CoA는 CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제 또는 신테타제에 상호 변환된다. 2,4-펜타디에노일-CoA의 이의 대응되는 알데하이드로의 환원은 아실화 알데하이드 데하이드로게나제에 의해 촉매된다 (단계 C). 다른 예로, CoA 모이어티는 2,4-펜타디에노일-CoA 포스포트랜스퍼라제에 의해 포스페이트와 치환된다 (단계 D). 2,4-펜타디에노일-포스페이트 또는 펜타-2,4-디에날 중간 산물들은 전술한 바와 같이 부타디엔으로 추가로 변환된다. 도 6에 도시된 반응들의 후보 효소들과 유전자들은 실시예 VII에서 더욱 상세하게 기술된다.

[0232]

실시예 VII.

[0233]

도 1-6에 도시된 반응들의 후보 효소들

라벨	기능	단계
1.1.1.a	옥시도리덕타제 (옥소 -> 알코올)	1E, 1K; 2B; 3B; 4D; 5D, 5G
1.1.1.c	옥시도리덕타제 (아실-CoA -> 알코올)	5L
1.2.1.b	옥시도리덕타제 (아실-CoA -> 알데하이드)	1S, 5I, 6C
1.2.1.c	옥시도리덕타제 (2-옥소 산 -> 아실-CoA)	1R, 5H
1.2.1.d	옥시도리덕타제 (탈인산화)	6E
1.2.1.e	옥시도리덕타제 (산 -> 알데하이드)	5K, 6A
1.3.1.a	옥시도리덕타제 (알칸 -> 알켄)	1B, 1F, 1M; 3E, 3G
1.4.1.a	옥시도리덕타제 (아민 -> 옥소)	1C, 1H, 1I
1.4.3.a	아민 옥시다제	1C, 1H, 1I
2.3.1.a	아실트랜스퍼라제 (CoA에 포스페이트 전달; 포스포트랜스아실라제)	6D
2.3.1.b	베타-케토퇴올라제	2A, 3A, 4A
2.3.1.d	포르메이트 C-아실트랜스퍼라제	1R, 5H
2.3.1.e	신타제	2A, 3A, 4A
2.6.1.a	아미노트랜스퍼라제	1C, 1H, 1I
2.7.2.a	포스포트랜스퍼라제 (키나제)	6H
2.8.3.a	CoA 트랜스퍼라제	1L, 1P, 1O; 3F; 4B; 5J; 6F
3.1.2.a	CoA 하이드롤라제	1O; 3F; 4B; 5J; 6F
4.1.1.a	테카르복실라제	1A, 1D, 1T, 1U; 2D; 4C; 5C, 5F; 6G
4.1.1.b	테카르복실라제, 알켄 형성	1W
4.1.99.a	테카르보닐라제	6B
4.1.3.a	리아제	5A
4.2.1.a	하이드로-리아제	1G, 1N, 1V; 2C, 3C; 5B, 5E
4.3.1.a	암모니아-리아제	1J
5.3.3.a	Delta-이소머라제	3D
6.2.1.a	CoA 신테타제	1L, 1P, 1O; 3F; 4B; 5J; 6F
N/A	2가지 기능의 테하이드라타제/테하이드로게나제	1Q

[0234]

[0235]

1.1.1.a 옥시도리덕타제 (옥소 -> 알코올)

[0236]

도 1-5에 도시된 몇가지 반응들은 알코올 데하이드로게나제 효소들에 의해 촉매된다. 이들 반응들로는 도 1의 단계 E와 K, 도 2의 단계 B, 도 4의 단계 D 및 도 5의 단계 D와 G를 포함한다. 알코올 데하이드로게나제 효소들의 예는 아래에서 보다 자세하게 기술한다.

[0237]

글루타레이트 세미알데하이드 리덕타제에 의한 글루타레이트 세미알데하이드의 5-하이드록시발레레이트로의 환원은 알데하이드를 이의 대응되는 알코올로 변환하는 반응을 수반한다. 글루타레이트 세미알데하이드 리덕타제 활성을 가진 효소로는 아스퍼질러스 테레우스의 ATEG_00539 유전자 산물과 아라비둡시스 탈리아나의 *4hbd*에 의해 코딩된 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 (WO 2010/068953A2)가 있다. 상기 아라비둡시스 탈리아나 효소는 클로닝되었으며, 효소에서 특정화되었다 (Breitkreuz et al., *J.Biol.Chem.* 278:41552-41556 (2003)).

표 1

[0238]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
ATEG_00539	XP_001210625.1	115491995	아스퍼질러스 테레우스 NIH2624
<i>4hbd</i>	AAK94781.1	15375068	아라비둡시스 탈리아나

[0239]

알데하이드를 알코올로 환원을 촉매하는 효소를 코딩하는 추가적인 유전자들로는 (즉, 알코올 데하이드로게나제 또는 등가의 알데하이드 리덕타제), C2-C14에 대한 중쇄 알코올 데하이드로게나제를 코딩하는 *alrA* (Tani et

al., *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5231-5235 (2000)), 에스케리키아 콜라이의 *yqhD* 및 *fucO* (Sulzenbacher et al., 342:489-502 (2004)), 및 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 부티리알데하이드를 부탄올로 변환하는 *bdh* I 및 *bdh* II (Walter et al., 174:7149-7158 (1992))가 있다. YqhD는 조인자로서 NADPH를 이용하여 매우 다양한 알데하이드 화합물들의 환원을 촉매하며, C(3) 보다 긴 체인을 선호한다 (Sulzenbacher et al., 342:489-502 (2004); Perez et al., *J Biol. Chem.* 283:7346-7353 (2008)). 자이모모나스 모빌리스E의 *adhA* 유전자는 포름알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인 등의 다수의 알데하이드 화합물들에 대해 활성을 가지는 것으로 입증되었다 (Kinoshita et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 22:249-254 (1985)). 추가적인 알데하이드 리덕타제 후보들은 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴의 *bdh* 및 클로스트리듐 베이예린키의 *Cbei_1722*, *Cbei_2181* 및 *Cbei_2421*에 의해 코딩된다. 추가적인 알데하이드 리덕타제 후보 유전자로는 사카로마이세스 세레비지애의 경우 알데하이드 리덕타제 GRE3, ALD2-6 및 HFD1, 글리옥살레이트 리덕타제 GOR1 및 YPL113C, 글리세롤 데하이드로게나제 GCY1 (WO 2011/022651A1; Atsumi et al., *Nature* 451:86-89 (2008))을 포함한다. 메틸글리옥살의 아세트 또는 락트알데하이드로의 환원을 촉매하는 전술한 후보 효소들 역시 적합한 락트알데하이드 리덕타제 후보 효소이다.

표 2

[0240]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>alrA</i>	BAB12273.1	9967138	엑시네토타터 sp. strain M-1
<i>ADH2</i>	NP_014032.1	6323961	사카로마이세스 세레비지애
<i>yqhD</i>	NP_417484.1	16130909	에스케리키아 콜라이
<i>fucO</i>	NP_417279.1	16130706	에스케리키아 콜라이
<i>bdh</i> I	NP_349892.1	15896543	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>bdh</i> II	NP_349891.1	15896542	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>adhA</i>	YP_162971.1	56552132	자이모모나스 모빌리스
<i>bdh</i>	BAF45463.1	124221917	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴
<i>Cbei_1722</i>	YP_001308850	150016596	클로스트리듐 베이예린키
<i>Cbei_2181</i>	YP_001309304	150017050	클로스트리듐 베이예린키
<i>Cbei_2421</i>	YP_001309535	150017281	클로스트리듐 베이예린키
<i>GRE3</i>	P38715.1	731691	사카로마이세스 세레비지애
<i>ALD2</i>	CAA89806.1	825575	사카로마이세스 세레비지애
<i>ALD3</i>	NP_013892.1	6323821	사카로마이세스 세레비지애
<i>ALD4</i>	NP_015019.1	6324950	사카로마이세스 세레비지애
<i>ALD5</i>	NP_010996.2	330443526	사카로마이세스 세레비지애
<i>ALD6</i>	ABX39192.1	160415767	사카로마이세스 세레비지애
<i>HFD1</i>	Q04458.1	2494079	사카로마이세스 세레비지애
<i>GOR1</i>	NP_014125.1	6324055	사카로마이세스 세레비지애
<i>YPL113C</i>	AAB68248.1	1163100	사카로마이세스 세레비지애
<i>GCY1</i>	CAA99318.1	1420317	사카로마이세스 세레비지애

[0241]

4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 (EC 1.1.1.61) 활성을 나타내는 효소들 역시 이 카테고리에 포함된다. 이러한 효소들은 랄스토니아 유트로파 (Bravo et al., *J Forens Sci*, 49:379-387 (2004))와 클로스트리듐 클루이베리 (Wolff et al., *Protein Expr. Purif.* 6:206-212 (1995))에서 특정화되었다. 또 다른 유전자는 지오바실러스 썬모글루코시다시우스의 알코올 데하이드로게나제 *adhI*이다 (Jeon et al., *J Biotechnol* 135:127-133 (2008)).

표 3

[0242]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>4hbd</i>	YP_726053.1	113867564	랄스토니아 유트로파 H16
<i>4hbd</i>	L21902.1	146348486	클로스트리듐 클루이베리 DSM 555
<i>adhI</i>	AAR91477.1	40795502	지오바실러스 썬모글루코시다시우스

[0243] 알데하이드 리덕타제의 다른 예는 메틸말로네이트 세미알데하이드 리덕타제로서, 이는 3-하이드록시이소부티레이트 데하이드로게나제로도 알려져 있다 (EC 1.1.1.31). 이 효소는 발린, 루신 및 이소루신의 분해에 참여하며, 세균, 진핵생물 및 포유류에서 동정되었다. 서무스 서모필러스 HB8의 P84067에 의해 코딩되는 효소가 구조적으로 특정되었다 (Lokanath et al., *J Mol Biol*, 352:905-17 (2005)). 인간 3-하이드록시이소부티레이트 데하이드로게나제의 가역성이 동위 원소로 표지된 기질을 이용하여 입증되었다 (Manning et al., *Biochem J*, 231:481-4 (1985)). 이러한 효소를 코딩하는 추가적인 유전자들로는, 호모 사피엔스 (Hawes et al., *Methods Enzymol*, 324:218-228 (2000))와 오릭톨라구스 쿠니쿨루스 (Hawes et al., *supra*; Chowdhury et al., *Biosci.Biotechnol Biochem*. 60:2043-2047 (1996))의 *3hidh*, 슈도모나스 에우루지노사 및 슈도모나스 푸티다의 *mmsB*, 슈도모나스 푸티다 *dhat*(Aberhart et al., *J Chem.Soc.[Perkin 1]* 6:1404-1406 (1979); Chowdhury et al., *Biosci.Biotechnol Biochem*. 60:2043-2047 (1996); Chowdhury et al., *Biosci.Biotechnol Biochem*. 67:438-441 (2003))가 있다. 슈도모나스 에우루지노사 *mmsB* (Gokarn et al., US Patent 739676, (2008)) 및 슈도모나스 푸티다 *mmsB* 등의 수종의 3-하이드록시이소부티레이트 데하이드로게나제 효소들이 환원 방향에서 특정화되었다.

표 4

[0244]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
P84067	P84067	75345323	서무스 서모필러스
<i>3hidh</i>	P31937.2	12643395	호모 사피엔스
<i>3hidh</i>	P32185.1	416872	오릭톨라구스 쿠니쿨루스
<i>mmsB</i>	NP_746775.1	26991350	슈도모나스 푸티다
<i>mmsB</i>	P28811.1	127211	슈도모나스 에우루지노사
<i>dhat</i>	Q59477.1	2842618	슈도모나스 푸티다

[0245]

케톤을 하이드록실 관능기로 변환시키는 몇가지 알코올 데하이드로게나제들이 존재한다. 에스케리키아 콜라이로부터 유래된 이러한 효소 2가지는 말레이트 데하이드로게나제 (*mdh*)와 락테이트 데하이드로게나제 (*ldhA*)에 의해 코딩되어 있다. 아올러, 랄스토니아 유트로파의 락테이트 데하이드로게나제는 락테이트, 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소글루타레이트 등의 다양한 체인 길이의 2-케토산에 대해 높은 활성을 나타내는 것으로 입증되었다 (Steinbuchel et al., *Eur.J.Biochem*. 130:329-334 (1983)). 알파-케토아디페이트의 알파-하이드록시아디페이트로의 변환은 인간 및 랫의 태반에서 발견된 것으로 보고된 효소인 2-케토아디페이트 리덕타제에 의해 촉매될 수 있다 (Suda et al., *Arch.Biochem.Biophys*. 176:610-620 (1976); Suda et al., *Biochem.Biophys.Res.Comm*. 77:586-591 (1977)). 추가적인 옥시도리덕타제는 클로닝되고 특정화된 인간 심장 유래 미토콘드리아 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 (*bdh*) 이다 (Marks et al., *J.Biol.Chem*. 267:15459-15463 (1992)). 클로스트리듐 베이예린키 (Ismail et al., *J.Bacteriol*. 175:5097-5105 (1993)) 및 서모안에어로박터 브룩키 (Lamed et al., *Biochem.J*. 195:183-190 (1981); Peretz et al., *Biochemistry*. 28:6549-6555 (1989))의 알코올 데하이드로게나제 효소는 아세톤을 이소프로판올로 변환시킨다. 메틸 에틸 케톤 리덕타제는 MEK의 2-부탄올로의 환원을 촉매한다. MEK 리덕타제 효소의 예들은 로도코커스 루버 (Kosjek et al., *Biotechnol Bioeng*. 86:55-62 (2004))와 피로코커스 푸리오수스 (van der Oost et al., *Eur.J.Biochem*. 268:3062-3068 (2001))에서 확인될 수 있다.

표 5

[0246]

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>mdh</i>	AAC76268.1	1789632	에스케리키아 콜라이
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	에스케리키아 콜라이
<i>ldh</i>	YP_725182.1	113866693	랄스토니아 유트로파
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	호모 사피엔스
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	클로스트리듐 베이예린키 NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	서모안에어로박터 브룩키 HTD4
<i>sadh</i>	CAD36475	21615553	로도코커스 루버
<i>adhA</i>	AAC25556	3288810	피로코커스 푸리오수스

[0247] Matsuyama et al. *J Mol Cat B Enz*, 11:513-521 (2001)에 기술된 바와 같이, 특히 바실러스, 브레비박테리움 (*Brevibacterium*), 칸디다 및 클렙시엘라 (*Klebsiella*) 속에 속하는 유기체를 비롯하여, 다수의 유기체들은 3-옥소부탄올의 1,3-부탄디올로의 환원을 촉매하는 유전자들을 코딩한다. 이러한 효소들 중 한가지인 칸디다 파랍실로시스 SADH가 에스케리키아 콜라이에서 클로닝되었으며 특정화되었다. 돌변연이된 로도코커스 페닐아세트알데하이드 리덕타제 (Sar268)와 레이포니아 (*Leifonia*) 알코올 데하이드로게나제 역시 고수율로 이러한 변환을 촉매하는 것으로 확인되었다 (Itoh et al., *Appl.Microbiol Biotechnol.* 75:1249-1256 (2007)).

표 6

유전자	유전자는행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>sadh</i>	BAA24528.1	2815409	칸디다 파랍실로시스

[0249] 3-옥소아실-CoA 기질을 이의 대응되는 3-하이드록시아실-CoA 산물로 환원하는 알코올 데하이드로게나제 효소도 도 2 (단계 B) 및 도 3 (단계 B)에 도시된 경로들과 관련이 있다. 효소의 예로는 3-옥소아실-CoA 리덕타제 및 아세토아세틸-CoA 리덕타제가 있다. 3-옥소아실-CoA 리덕타제 효소 (EC 1.1.1.35)는 3-옥소아실-CoA 분자를 3-하이드록시아실-CoA 분자로 변환하며, 종종 지방산 베타-산화나 페닐 아세테이트 이화 작용에 참여한다. 예를 들어, 에스케리키아 콜라이 *fadB* 및 *fadJ*에 의해 코딩되는 2개의 지방산 산화 복합체들의 서브유닛들은 3-하이드록시아실-CoA 데하이드로게나제 (Binstock et al., *Methods Enzymol.* 71 Pt C:403-411 (1981))로서 기능한다. 에스케리키아 콜라이에서 *paah*가 페닐아세테이트 분해 오페론의 다른 유전자들과의 근접성 (Nogales et al., 153:357-365 (2007))과 *paah* 돌연변이가 페닐아세테이트에서는 생장할 수 없다 (Ismail et al., *Eur.J Biochem.* 270:3047-3054 (2003))는 점을 감안하면, 에스케리키아 콜라이 *paah* 유전자 역시 3-하이드록시아실-CoA 데하이드로게나제를 코딩하는 것으로 예상된다. 추가적인 3-옥소아실-CoA 효소들로는 슈도모나스 푸티다 *phaC* (Olivera et al., *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998))와 슈도모나스 플루오레센스 *paac* (Di et al., 188:117-125 (2007)) 유전자 산물들이 있다. 이들 효소들은 페닐아세테이트 또는 스티렌의 이화 작용시에 3-하이드록시아디필-CoA를 3-옥소아디필-CoA로 가역적 산화하는 과정을 촉매한다.

[0250] 아세토아세틸-CoA 리덕타제 (EC 1.1.1.36)는 아세토아세틸-CoA의 3-하이드록시부티릴-CoA로의 환원을 촉매한다. 이 효소는, 수 중의 클로스트리디아의 경우 아세틸-CoA의 부티레이트로의 발효 경로에 참여하며, 상세하게 연구되었다 (Jones et al., *Microbiol Rev.* 50:484-524 (1986)). 아세토아세틸-CoA 리덕타제는 또한 다수의 유기체들에서 폴리하이드록시부티레이트 생합성에 참여하며, PHB와 3-하이드록시이소부티레이트의 과다 생산을 위한 대사적 조작 응용들에서 사용되고 있다 (Liu et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:811-818 (2007); Qui et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:537-542 (2006)). *hbd*에 코딩된 클로스트리듐 아세토부틸리컴 유래 효소는 에스케리키아 콜라이에서 클로닝되었으며, 기능적으로 발현되었다 (Youngleson et al., *J Bacteriol.* 171:6800-6807 (1989)). 추가적인 후보 유전자들로는 주글로에아 라미게라 *phbB* (Ploux et al., *Eur.J Biochem.* 174:177-182 (1988))와 로도박터 스페어로이테스 *phaB* (Alber et al., *Mol.Microbiol* 61:297-309 (2006))가 있다. 주글로에아 라미게라 유전자는 NADPH-의존형이며, 이 유전자는 에스케리키아 콜라이에서 발현된 바 있다 (Peoples et al., *Mol.Microbiol* 3:349-357 (1989)). 이 유전자에 대한 기질 특이성 연구를 통해, 아세토아세틸-CoA 이외에도 기질로서 3-옥소프로피오닐-CoA를 허용할 수 있다는 결론에 도달하였다 (Ploux et al., *Eur.J Biochem.* 174:177-182 (1988)). 추가적인 유전자들로는 파라코커스 데니트리피칸스 *phaB*, 클로스트리듐 클루이베리의 *Hbd1* (C-말단 도메인) 및 *Hbd2* (N-말단 도메인) (Hillmer and Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 3334:12-23 (1974)) 및 보스 타우루스 *HSD17B10* (Wakil et al., *J Biol.Chem.* 207:631-638 (1954))이 있다. 파라코커스 데니트리피칸스 유래 효소는 에스케리키아 콜라이에서 기능적으로 발현시켜 특정화되었다 (Yabutani et al., *FEMS Microbiol Lett.* 133:85-90 (1995)). 다수의 유사 효소들도 클로스트리디아의 다른 종들과 메탈로스페라 세둘라에서 발견되었다 (Berg et al., *Science.* 318:1782-1786 (2007)). 칸디다 트로피칼리스 유래 효소는 페록시좀 지방산 베타-분해의 다중 기능의 효소 타입 2 (MFE-2)의 한 구성 요소이다. 이 단백질의 데하이드로게나제 B 도메인은 아세토아세틸-CoA에 대해 이화 작용을 나타낸다. 이 도메인은 에스케리키아 콜라이에서 기능적으로 발현된 바 있으며, 결정 구조가 이용가능하며, 촉매 기전이 잘 파악되어 있다 (Ylianttila et al., *Biochem Biophys Res Commun* 324:25-30 (2004); Ylianttila et al., *J Mol Biol* 358:1286-1295 (2006)).

표 7

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fadB</i>	P21177.2	119811	에스케리키아 콜라이
<i>fadJ</i>	P77399.1	3334437	에스케리키아 콜라이
<i>paaH</i>	NP_415913.1	16129356	에스케리키아 콜라이
<i>Hbd2</i>	EDK34807.1	146348271	클로스트리듐 클루이베리
<i>Hbd1</i>	EDK32512.1	146345976	클로스트리듐 클루이베리
<i>phaC</i>	NP_745425.1	26990000	슈도모나스 푸티다
<i>paaC</i>	ABF82235.1	106636095	슈도모나스 플루오레센스
<i>HSD17B10</i>	O02691.3	3183024	보스 타우루스
<i>phbB</i>	P23238.1	130017	주글로에아 라미게라
<i>phaB</i>	YP_353825.1	77464321	로도박터 스페어로이데스
<i>phaB</i>	BAA08358	675524	파라코커스 데니트리피칸스
<i>Hbd</i>	NP_349314.1	15895965	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>Hbd</i>	AAM14586.1	20162442	클로스트리듐 베이에린키
<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	146304189	메탈로스페라 세둘라
<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	146303184	메탈로스페라 세둘라
<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	146303174	메탈로스페라 세둘라
<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	146304741	메탈로스페라 세둘라
<i>Fox2</i>	Q02207	399508	칸디다 트로피칼리스

1.1.1.c 옥시도리덕타제 (아실-CoA → 알코올)

2가지 기능의 옥시도리덕타제는 아실-CoA를 이의 대응되는 알코올로 변환시킨다. 이러한 활성을 가진 효소들은 3-하이드록시부틸-CoA를 1,3-부탄디올로 변환하는데 필요하다 (단계 L, 도 5).

아실-CoA를 알코올로 변환하는 2가지 기능의 옥시도리덕타제의 예로는, 아세틸-CoA 등의 기질을 에탄올로 (예, 에스케리키아 콜라이 *adhE* (Kessler et al., *FEBS.Lett.* 281:59-63 (1991))) 및 부틸-CoA를 부탄올로 (예, 클로스트리듐 아세토부틸리컴 *adhE2* (Fontaine et al., *J.Bacteriol.* 184:821-830 (2002))) 변환하는 것이 있다. *bdh I* 및 *bdh II*에 의해 코딩된 클로스트리듐 아세토부틸리컴 효소들 (Walter, et al., *J. Bacteriol.* 174:7149-7158 (1992))은, reduce 아세틸-CoA 및 부틸-CoA를 에탄올과 부탄올로 각각 환원시킨다. 아세틸-CoA를 에탄올로 환원시키는 것 외에도, 루코노스톡 메센테로이데스의 *adhE*에 의해 코딩된 효소는 분지쇄 화합물 이소부티르알데하이드를 이소부틸-CoA로 산화하는 것으로 입증되었다 (Kazahaya et al., *J.Gen.Appl.Microbiol.* 18:43-55 (1972); Koo et al., *Biotechnol Lett.* 27:505-510 (2005)). 효소의 다른 예는 말로닐-CoA를 3-HP로 변환할 수 있다. 이러한 활성을 가진 NADPH-의존성 효소는 클로로플렉수스 아우란티아쿠스에서 특정화되었으며, 이 균주에서는 3-하이드록시프로피오네이트 사이클에 참여한다 (Hugler et al., *J Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002); Strauss et al., *Eur J Biochem.* 215:633-643 (1993)). 이 효소는 질량이 300 kDa이며, 기질 특이성이 높으며, 다른 공지의 옥시도리덕타제와의 서열 유사성이 거의 없다 (Hugler et al., *supra*). 다른 유기체들에서는 이러한 특정 반응을 촉매하는 효소는 확인되지 않았지만, 다른 유기체들이 비슷한 경로를 가질 수 있다는 생물정보학적인 증거는 존재한다 (Klatt et al., *Env Microbiol.* 9:2067-2078 (2007)). 로세이플렉수스 카스텐홀지이, 에리트로박터 *sp. NAPI* 및 마린 감마 프로테오박테리움 HTCC2080 등의 다른 유기체들에서의 후보 효소들은 서열 유사성을 통해 추론할 수 있다.

표 8

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	에스케리키아 콜라이
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	루코노스톡 메센테로이데스
<i>mcr</i>	AAS20429.1	42561982	클로로플렉수스 아우란티아쿠스

<i>Rcas_2929</i>	YP_001433009.1	156742880	로세이플렉수스 카스텐홀지이
<i>NAP1_02720</i>	ZP_01039179.1	85708113	에리트로박터 <i>sp.</i> <i>NAP1</i>
<i>MGP2080_00535</i>	ZP_01626393.1	119504313	마린 감마 프로테오박테리움 <i>HTCC2080</i>

- [0256] 쇠의 길이가 긴 아실-CoA 분자들은, 알코올-형성 지방 아실-CoA 리덕타제를 코딩하는 호호바 (심몬드시아 치넨시스) *FAR* 등의 효소에 의해 이의 대응되는 알코올 화합물로 환원될 수 있다. 에스케리키아 콜라이에서의 이의 과다 발현시 *FAR* 활성이 형성되었으며, 지방 알코올이 축적되었다 (Metz et al., *Plant Physiol*, 122:635-644 (2000)).

표 9

[0257]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>FAR</i>	AAD38039.1	5020215	심몬드시아 치넨시스

- [0258] 이들 단계들을 촉매하는 다른 후보는 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타제 (또는 HMG-CoA 리덕타제)이다. 이 효소는 천연적으로 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA에서 CoA 기를 알코올을 형성하는 메탈로네이트로 환원한다. 설폴로부스 솔파타리쿠스의 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자 *hmgA*는 에스케리키아 콜라이에서 클로닝, 서열분석 및 발현되었다 (Bochar et al., *J. Bacteriol.* 179:3632-3638 (1997)). 사카로마이세스 세레비지에 역시 2개의 HMG-CoA 리덕타제를 가지고 있다 (Basson et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:5563-5567 (1986)). 이 유전자는 아라비도시스 탈리아나에서도 분리되었으며, 사카로마이세스 세레비지에에서 HMG-CoA 리덕타제 활성을 보완하는 것으로 입증되었다 (Learned et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:2779-2783 (1989)).

표 10

[0259]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>HMG1</i>	CAA86503.1	587536	사카로마이세스 세레비지에
<i>HMG2</i>	NP_013555	6323483	사카로마이세스 세레비지에
<i>HMG1</i>	CAA70691.1	1694976	아라비도시스 탈리아나
<i>hmgA</i>	AAC45370.1	2130564	설폴로부스 솔파타리쿠스

[0260] 1.2.1.b 옥시도리덕타제 (아실-CoA → 알데하이드)

- [0261] 1.2.1 유형의 아실-CoA 리덕타제는 아실-CoA를 이의 대응되는 알데하이드로 환원한다. 이러한 변환에는 글루타릴-CoA의 글루타레이트 세미알데하이드로 (단계 S, 도 1) 및 3-하이드록시부티릴-CoA의 3-하이드록시부티르알데하이드 (단계 I, 도 5)로의 환원의 촉매가 요구된다. 수종의 아실-CoA 리덕타제 효소들이 공개된 문헌들에 기술되어 있으며, 이 단계에 적합한 후보들이 나타나 있다. 이들은 아래에 기술한다.

- [0262] 아실-CoA 리덕타제 또는 아실화 알데하이드 데하이드로게나제는 아실-CoA를 이의 대응되는 알데하이드로 환원한다. 효소의 예로는 지방 아실-CoA 리덕타제, 숙시닐-CoA 리덕타제 (EC 1.2.1.76), 아세틸-CoA 리덕타제, 부티릴-CoA 리덕타제 및 프로피오닐-CoA 리덕타제 (EC 1.2.1.3)가 있다. 지방 아실-CoA 리덕타제 효소의 예들은 액시네토박터 칼코아세티쿠스 (Reiser, *Journal of Bacteriology* 179:2969-2975 (1997))와 액시네토박터 *sp.* *M-1* (Ishige et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192-1195 (2002))의 *acr1*에 의해 코딩된다. 숙시닐-CoA 리덕타제 활성을 가진 효소들은 클로스트리움 클루이베리 *sucD* (Sohling, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996))와 포르피로모나스 킵기발리스 *sucD* (Takahashi, *J. Bacteriol.* 182:4704-4710 (2000))에 의해 코딩된다. 추가적인 숙시닐-CoA 리덕타제 효소들은 메탈로스테라 세둘라 (Berg et al., *Science* 318:1782-1786 (2007)) 및 서모프로테우스 뉴트로필러스 (Ramos-Vera et al., *J. Bacteriol.*, 191:4286-4297 (2009)) 등의 호열성 고세균의 3-하이드록시프로피오네이트/4-하이드록시부티레이트 사이클에 참여한다. *Msd_0709*에 의해 코딩되는 메탈로스테라 세둘라 효소는 엄격하게 NADPH-의존형이며, 또한 말로닐-CoA 리덕타제 활성을 가진다. 서모프로테우스 뉴트로필러스 효소는 NADPH와 NADH 둘다를 이용하여 활성을 나타낸다. 슈도모나스 *sp.* *bphG*에 의해 코딩되는 효소 아실화 아세트알데하이드 데하이드로게나제는, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 이소부티르알데하이드 및 포름알데하이드를 산화하고 아실화하는 것으로 입증된, 또 다른 예이다 (Powlowski, *J.*

Bacteriol. 175:377-385 (1993)). 루코노스톡 메센테로이데스의 *adhE*에 의해 코딩되는 효소는, 아세틸-CoA를 에탄올로 환원하는 것 외에도, 분지쇄 화합물인 이소부티르알데하이드를 이소부티릴-CoA로 산화하는 것으로 확인되었다 (Kazahaya, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43-55 (1972); 및 Koo et al., *Biotechnol Lett.* 27:505-510 (2005)). 부티르알데하이드 데하이드로게나제는 유사 반응, 클로스트리움 사카로퍼부틸아세토니컴 등의 용매생산 (solventogenic) 유기체에서 부티릴-CoA의 부티르알데하이드로의 변환을 촉매한다 (Kosaka et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71:58-68 (2007)). 프로피오닐-CoA 리덕타제 효소의 예로는 살모넬라 티피무리움 *LT2*의 *pduP* (Leal, *Arch. Microbiol.* 180:353-361 (2003)) 및 에스케리키아 콜라이 *eutE* (Skraly, WO Patent No. 2004/024876)가 있다. 천연적으로 프로피오닐-CoA를 프로피온알데하이드로 변환하는 살모넬라 티피무리움 *LT2*의 프로피오닐-CoA 리덕타제는, 5-하이드록시발레릴-CoA를 5-하이드록시펜타날의 환원도 촉매한다 (WO 2010/068953A2).

표 11

[0263]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>acr1</i>	YP_047869.1	50086359	엑시네토박터 칼코아세티쿠스
<i>acr1</i>	AAC45217	1684886	엑시네토박터 베일리
<i>acr1</i>	BAB85476.1	18857901	엑시네토박터 <i>sp.</i> Strain M-1
<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	메탈로스페라 세둘라
<i>Tneu_0421</i>	ACB39369.1	170934108	서모프로테우스 뉴트로필러스
<i>sucD</i>	P38947.1	172046062	클로스트리움 클루이베리
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	포르피로모나스 갱기발리스
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	슈도모나스 <i>sp</i>
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	루코노스톡 메센테로이데스
<i>bld</i>	AAP42563.1	31075383	클로스트리움 사카로퍼부틸아세토니컴
<i>pduP</i>	NP_460996	16765381	살모넬라 티피무리움 <i>LT2</i>
<i>eutE</i>	NP_416950	16130380	에스케리키아 콜라이

[0264]

아실-CoA를 이의 대응되는 알데하이드로 변환하는 다른 효소로는, 말로닐-CoA를 말로닉 세미알데하이드로 변환하는 말로닐-CoA 리덕타제가 있다. 말로닐-CoA 리덕타제는 호열호산성 고세균 박테리아에서 3-하이드록시프로피오네이트 사이클을 통해 독립 영양성 탄소 고정에 참여하는 주요 효소이다 (Berg, *Science* 318:1782-1786 (2007); 및 Thauer, *Science* 318:1732-1733 (2007)). 이 효소는 조인자로서 NADPH를 이용하며, 메탈로스페라 (*Metallosphaera*)와 설폴로부스 *sp.*에서 특정화되었다 (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); 및 Hugler, *J. Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002)). 이 효소는 메탈로스페라 세둘라의 *Msed_0709*에 의해 코딩된다 (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); 및 Berg, *Science* 318:1782-1786 (2007)). 설폴로부스 토코다이 유래 말로닐-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자가 클로닝되었으며, 에스케리키아 콜라이에서 이종적으로 발현되었다 (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006)). 또한, 이 효소는 메틸말로닐-CoA의 이의 대응되는 알데하이드로의 변환을 촉매하는 것으로 확인되었다 (WO2007141208 (2007)). 이들 효소의 알데하이드 데하이드로게나제 기능성이 클로로플렉투스 아우란티아쿠스 유래의 2가지 기능의 데하이드로게나제와 비슷함에도 불구하고, 서열 유사성은 거의 없다. 말로닐-CoA 리덕타제 후보 효소 둘다 아스파르틸-4-포스페이트의 아스파르테이트 세미알데하이드로의 환원과 동시적인 탈인산화를 촉매하는 효소인 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제와 서열 유사성이 높다. 추가적인 후보 유전자들은 설폴로부스 술파타리쿠스 및 설폴로부스 엑시도칼다리우스 등의 다른 유기체들에서 단백질 서열 상동성을 통해 발굴할 수 있으며, 아래에 열거한다. CoA-아실화 알데하이드 데하이드로게나제에 대한 또 다른 후보는 클로스트리움 베이에런키의 *ald* 유전자이다 (Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999)). 이 효소는 아세틸-CoA 및 부티릴-CoA을 이의 대응되는 알데하이드로 환원하는 것으로 보고된 바 있다. 이 유전자는 살모넬라 티피무리움 및 에스케리키아 콜라이의 아세트알데하이드 데하이드로게나제를 코딩하는 *eutE*와 매우 유사하다 (Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999)).

표 12

[0265]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	메탈로스페라 세둘라

<i>Mcr</i>	NP_378167.1	15922498	설펴로부스 토크다이
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	15898958	설펴로부스 슬파타리쿠스
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	70608071	설펴로부스 액시도칼다리우스
<i>Ald</i>	AAT66436	49473535	클로스트리듐 베이예린키
<i>eutE</i>	AAA80209	687645	살모넬라 티피무리움
<i>eutE</i>	P77445	2498347	에스케리키아 콜라이

[0266] 1.2.1.c 옥시도리덕타제 2-옥소산 → 아실-CoA, 탈카르복시화

[0267] 2-옥소아디페이트의 글루타레이트 세미알데하이드로의 환원성 탈카르복시화 및 아실화 (단계 D, 도 1)는 EC 클래스 1.2의 옥시도리덕타제에 의해 촉매된다. 4-하이드록시-2-옥소발레레이트를 3-하이드록시부티릴-CoA로 변환시키는데 비슷한 효소가 요구된다 (단계 H, 도 5). 효소의 예는 2-케토산 데하이드로게나제 및 2-케토글루타레이트 페레독신 옥시도리덕타제 (OFOR) 패밀리들에서 확인된다.

[0268] 알파-케토글루타레이트 데하이드로게나제 (AKGD)는 알파-케토글루타레이트를 숙시닐-CoA로 변환하며, TCA 사이클을 통한 대사 흐름을 조절하는 주요 부위이다 (Hansford, *Curr.Top.Bioenerg.* 10:217-278 (1980)). 에스케리키아 콜라이의 유전자들 *sucA*, *sucB* 및 *lpd*에 의해 코딩되는, AKGD 유전자 발현은 혐기 조건과 글루코스 생육 조건시에 하향 조절된다 (Park et al., 15:473-482 (1995)). AKGD의 기질 종류는 적지만, E2 컴포넌트의 촉매 코어에 대한 구조 연구는 기질 특이성을 담당하는 특이 잔기에 초점이 맞추어져 있다 (Knapp et al., *J.Mol.Biol.* 280:655-668 (1998)). *odhAB* (E1 및 E2) 및 *pdhD* (E3, 공유 도메인)에 의해 코딩되는 바실러스 셉틸리스 AKGD는 전사 수준에서 조절되며, 탄소원과 유기체의 증식 단계에 의존적이다 (Resnekov et al., *Mol.Gen.Genet.* 234:285-296 (1992)). 효모의 경우, E3 컴포넌트를 코딩하는 *LPD1* 유전자는 글루코스에 의해 전사 수준에서 조절된다 (Roy et al., *J.Gen.Microbiol.* 133:925-933 (1987)). 또한, *KGD1*에 의해 코딩되는 E1 컴포넌트는 글루코스에 의해 조절되며, HAP2 및 HAP3 산물들에 의해 활성화된다 (Repetto et al., *Mol.Cell Biol.* 9:2695-2705 (1989)). AKGD 효소 컴플렉스는 산물 NADH와 숙시닐-CoA에 의해 저해되며, 이의 기능 손상이 몇가지 신경 질환들과 연계되어 있어 포유류 시스템에서 잘 연구되어 있다.

표 13

[0269]

유전자	GI #	등재 번호	유기체
<i>sucA</i>	16128701	NP_415254.1	에스케리키아 콜라이
<i>sucB</i>	16128702	NP_415255.1	에스케리키아 콜라이
<i>lpd</i>	16128109	NP_414658.1	에스케리키아 콜라이
<i>odhA</i>	51704265	P23129.2	바실러스 셉틸리스
<i>odhB</i>	129041	P16263.1	바실러스 셉틸리스
<i>pdhD</i>	118672	P21880.1	바실러스 셉틸리스
<i>KGD1</i>	6322066	NP_012141.1	사카로마이세스 세레비지에
<i>KGD2</i>	6320352	NP_010432.1	사카로마이세스 세레비지에
<i>LPD1</i>	14318501	NP_116635.1	사카로마이세스 세레비지에

[0270]

분지쇄 2-케토-산 데하이드로게나제 컴플렉스 (BCKAD)는 2-옥소이소발레레이트 데하이드로게나제라고도 하며, 분지쇄 아미노산 분해 경로들에 참여하여, 발린, 루신 및 이소루신을 이의 아실-CoA 유도체 및 CO₂로 변환시킨다. 이 컴플렉스는 바실러스 셉틸리스 (Wang et al., *Eur.J.Biochem.* 213:1091-1099 (1993)), 라투스 노르베기쿠스 (Namba et al., *J.Biol.Chem.* 244:4437-4447 (1969)) 및 슈도모나스 푸티다 (Sokatich et al., 148:647-652 (1981)) 등의 다수 유기체들에서 연구되었다. 바실러스 셉틸리스에서는, 이 효소는 유전자 *pdhD* (E3 컴포넌트), *bfbBB* (E2 컴포넌트), *bfbBAA* 및 *bfbBAB* (E1 컴포넌트)에 코딩되어 있다 (Wang et al., *Eur.J.Biochem.* 213:1091-1099 (1993)). 포유류에서, 이 컴플렉스는 특정 포스포타제 및 단백질 키나제에 의한 인산화에 의해 조절된다. 이 컴플렉스는 랫 간세포에서 연구되었으며 (Chicco et al., *J.Biol.Chem.* 269:19427-19434 (1994)), *Bckdha* (E1 alpha), *Bckdhb* (E1 beta), *Dbt* (E2), and *Dld* (E3)에 코딩되어 있다. 슈도모나스 푸티다 BCKAD 컴플렉스의 E1 및 E3 컴포넌트들은 결정화되었으며 (Aevansson et al., *Nat.Struct.Biol.* 6:785-792 (1999); Mattevi et al., *Science.* 255:1544-1550 (1992)), 이 효소 컴플렉스는

연구되었다 (Sokatch et al., 148:647-652 (1981)). 슈도모나스 푸티다 BCKAD 유전자들의 전사는 *bkdR* 유전자 산물에 의해 활성화된다 (HESTER et al., 233:828-836 (1995)). 라투스 노르베기쿠스 (Paxton et al., *Biochem.J.* 234:295-303 (1986)) 및 사카로마이세스 세레비지에 (Sinclair et al., *Biochem.Mol.Biol.Int.* 31:911-922 (1993))를 비롯한 일부 유기체들에서는, 이러한 컴플렉스가 분지쇄 아미노산 전구체들 외에도, 2-옥소부타노에이트 및 알파-케토글루타레이트와 같은 선형 옥소-산을 포함하는 광범위한 기질 범주를 가지는 것으로 확인되었다. 보바인 BCKAD의 활성부는 대안 기질인 아세틸-CoA를 선호하도록 조작되었다 (Meng et al., *Biochemistry.* 33:12879-12885 (1994)).

표 14

[0271]

유전자	등재 번호	GI #	유기체
<i>bfmBB</i>	NP_390283.1	16079459	바실러스 셉틸리스
<i>bfmBAA</i>	NP_390285.1	16079461	바실러스 셉틸리스
<i>bfmBAB</i>	NP_390284.1	16079460	바실러스 셉틸리스
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	바실러스 셉틸리스
<i>lpdV</i>	P09063.1	118677	슈도모나스 푸티다
<i>bkdB</i>	P09062.1	129044	슈도모나스 푸티다
<i>bkdA1</i>	NP_746515.1	26991090	슈도모나스 푸티다
<i>bkdA2</i>	NP_746516.1	26991091	슈도모나스 푸티다
<i>Bckdha</i>	NP_036914.1	77736548	라투스 노르베기쿠스
<i>Bckdhb</i>	NP_062140.1	158749538	라투스 노르베기쿠스
<i>Dbt</i>	NP_445764.1	158749632	라투스 노르베기쿠스
<i>Dld</i>	NP_955417.1	40786469	라투스 노르베기쿠스

[0272]

피루베이트의 아세틸-CoA로의 변환을 촉매하는 피루베이트 데하이드로게나제 복합체도 광범위하게 연구되고 있다. 에스케리키아 콜라이 효소의 경우, E1 컴포넌트의 특정 잔기들이 기질 특이성을 담당한다 (Bisswanger, 256:815-822 (1981); Bremer, 8:535-540 (1969); Gong et al., 275:13645-13653 (2000)). 앞서 언급한 바와 같이, 효소 조작 시도는 혐기 조건에서 에스케리키아 콜라이의 PDH 효소 활성을 개선시키게 되었다 (Kim et al., *J.Bacteriol.* 190:3851-3858 (2008); Kim et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 73:1766-1771 (2007); Zhou et al., *Biotechnol.Lett.* 30:335-342 (2008)). 에스케리키아 콜라이 PDH와의 대조적으로, 바실러스 셉틸리스의 복합체는 혐기 조건에서 활성을 띄며, 혐기 조건에서의 증식을 위해 필요하다 (Nakano et al., 179:6749-6755 (1997)). 글리세롤에서 증식하는 동안에 특정화된 클렙시엘라 뉴모니아 PDH 역시 혐기 조건에서 활성을 나타낸다 (Menzel et al., 56:135-142 (1997)). 보바인 신장 유래 효소 복합체 (Zhou et al., 98:14802-14807 (2001))와 아조박터 비넬란디이의 E2 촉매 도메인에 대한 결정 구조들은 입수 가능하다 (Mattevi et al., *Science.* 255:1544-1550 (1992)). 일부 포유류 PDH 효소 복합체들은 2-옥소부타노에이트와 같은 대안 기질에 반응할 수 있다. 라투스 노르베기쿠스의 PDH 및 BCKAD에 대한 비교 카이네틱스에 따르면, BCKAD가 기질로서 2-옥소부타노에이트에 대해 높은 활성을 가지는 것으로 나타났다 (Paxton et al., *Biochem.J.* 234:295-303 (1986)). 사카로마이세스 세레비지에의 컴플렉스는 E1 (PDA1, PDB1)에 결합하는 E2 (LAT1) 코어, E3 (LPD1), 및 단백질 X (PDX1) 컴포넌트들로 구성된다 (Pronk et al., *Yeast* 12:1607-1633 (1996)).

표 15

[0273]

유전자	등재 번호	GI #	유기체
<i>aceE</i>	NP_414656.1	16128107	에스케리키아 콜라이
<i>aceF</i>	NP_414657.1	16128108	에스케리키아 콜라이
<i>lpd</i>	NP_414658.1	16128109	에스케리키아 콜라이
<i>pdhA</i>	P21881.1	3123238	바실러스 셉틸리스
<i>pdhB</i>	P21882.1	129068	바실러스 셉틸리스
<i>pdhC</i>	P21883.2	129054	바실러스 셉틸리스
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	바실러스 셉틸리스
<i>aceE</i>	YP_001333808.1	152968699	클렙시엘라 뉴모니아
<i>aceF</i>	YP_001333809.1	152968700	클렙시엘라 뉴모니아

<i>lpdA</i>	YP_001333810.1	152968701	클렙시엘라 뉴모니아
<i>Pdha1</i>	NP_001004072.2	124430510	라투스 노르베기쿠스
<i>Pdha2</i>	NP_446446.1	16758900	라투스 노르베기쿠스
<i>Dlat</i>	NP_112287.1	78365255	라투스 노르베기쿠스
<i>Dld</i>	NP_955417.1	40786469	라투스 노르베기쿠스
<i>LAT1</i>	NP_014328	6324258	사카로마이세스 세레비지애
<i>PDA1</i>	NP_011105	37362644	사카로마이세스 세레비지애
<i>PDB1</i>	NP_009780	6319698	사카로마이세스 세레비지애
<i>LPD1</i>	NP_116635	14318501	사카로마이세스 세레비지애
<i>PDX1</i>	NP_011709	6321632	사카로마이세스 세레비지애

[0274]

전술한 거대 멀티효소 2-케노-산 데하이드로게나제 복합체의 대안으로서, 일부 혐기 유기체들은 2-케토산 옥시도리덕타제 패밀리에 속한 효소를 이용하여, 2-케토-산의 아실화 산화성 탈카르복시화를 촉매한다. 데하이드로게나제 복합체와는 다르게, 이들 효소는 철-황 클러스터를 함유하며, 여러가지 조인자들을 이용하여, 페레독신, 플라보딘 또는 FAD를 NAD(P)H에 대한 전자 도너로서 사용한다. 이들 패밀리에 속하는 대부분의 효소들은 기질로서 피루베이트 (POR)에 특이적이지만, 일부 2-케토-산:페레독신 옥시도리덕타제들은 알파-케토글루타레이트 및 2-옥소부타노에이트를 비롯하여 기질로서 매우 다양한 2-케토산 화합물들을 수용하는 것으로 확인되었다 (Zhang et al., J.Biochem. 120:587-599 (1996); Fukuda et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1597:74-80 (2002)). 이러한 효소 한가지는 호열호산성 고세균인 설폴로부스 토코다이 7으로부터 유래된 OFOR로서, 이는 유전자 *ST2300* (Zhang et al., J.Biochem. 120:587-599 (1996); Fukuda and Wakagi, *Biochim.Biophys.Acta* 1597:74-80 (2002))에 의해 코딩되는 알파 및 베타 서브유닛을 포함한다. 에스케리키아 콜라이에서 이들 단백질을 효율적으로 발현시키기 위해 플라스미드를 이용한 발현 시스템이 개발되었으며 (Fukuda et al., *Eur.J.Biochem.* 268:5639-5646 (2001)), 기질 특이성에 참여하는 잔기들이 결정되었다 (Fukuda and Wakagi, *Biochim.Biophys.Acta* 1597:74-80 (2002)). 설폴로부스 솔파타리쿠스 P1 유래 2-옥소산:페레독신 옥시도리덕타제는 또한 매우 다양한 2-옥소산 화합물에 대해 활성을 나타낸다 (Park et al., *J.Biochem.Mol.Biol.* 39:46-54 (2006)). 최근 에어로피룸 퍼닉스 str. K1으로부터 Ape1472/Ape1473에 의해 코딩된 OFOR 효소가 에스케리키아 콜라이에서 클로닝되어 특정화되었으며, 2-옥소글루타레이트와 매우 다양한 2-옥소산과 반응하는 것으로 확인되었다 (Nishizawa et al., *FEBS Lett.* 579:2319-2322 (2005)). 유사한 효소들이 모든 고세균과, 일부 혐기성 세균 및 미토콘드리아가 없는 진핵생물들에 존재한다는 생물정보학적 증거들이 존재한다 (Fukuda and Wakagi, *supra*). 또한, OFOR 효소들은 하이드로게노박터 서모필러스, 데설포박터 하이드로게노필러스 및 클로로비움 속을 비롯하여, RTCA 사이클을 통해 탄소를 고정하는 유기체들에서도 발견된다 (Shiba et al., *Archives of Microbiology* 141:198-203 (1985); Evans et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 55:928-934 (1966)). *H.* 서모필러스로부터 유래된 *korAB*에 의해 코딩되는 2-서브유닛 효소는 에스케리키아 콜라이에 클로닝되어 발현되었다 (Yun et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 282:589-594 (2001)).

표 16

[0275]

유전자	GI #	등록 번호	유기체
<i>ST2300</i>	NP_378302.1	15922633	설폴로부스 토코다이 7
<i>Ape1472</i>	BAA80470.1	5105156	에어로피룸 퍼닉스
<i>Ape1473</i>	BAA80471.2	116062794	에어로피룸 퍼닉스
<i>korA</i>	BAB21494	12583691	하이드로게노박터 서모필러스
<i>korB</i>	BAB21495	12583692	하이드로게노박터 서모필러스

[0276]

1.2.1.d 옥시도리덕타제 (탈인산화)

[0277]

포스폰산의 이의 대응되는 알데하이드로의 환원은 EC 클래스 1.2.1.의 옥시도리덕타제 또는 포스페이트 리덕타제에 의해 촉매된다. 도 6의 단계 E에는 2,4-펜타디에노일-포스페이트의 이의 대응되는 알데하이드로의 환원을 위한 상기한 효소가 필요하다. 이런 변환은 지금까지 문헌에서 파악되지 않았다. 포스포네이트 리덕타제 효소의 예로는 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제 (EC 1.2.1.12), 아스파르테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제 (EC 1.2.1.11), 아세틸글루타미드포스페이트 리덕타제 (EC 1.2.1.38) 및 글루타메이트-5-세미알

데하이드 데하이드로게나제 (EC 1.2.1.-)가 있다. 아스파르테이트 세미알데하이드 데하이드로게나제 (ASD, EC 1.2.1.11)는 4-아스파르틸 포스페이트의 아스파르테이트-4-세미알데하이드로의 NADPH-의존성 환원을 촉매한다. 아미노산 생합성에 ASD가 참여하며, 최근 항미생물 타겟으로서 연구되고 있다 (Hadfield et al., *Biochemistry* 40:14475-14483 (2001)). 에스케리키아 콜라이 ASD의 구조는 규명되었으며 (Hadfield et al., *J Mol.Biol.* 289:991-1002 (1999)), 이 효소는 대안 기질로서 베타-3-메틸아스파르틸 포스페이트를 수용하는 것으로 확인되었다 (Shames et al., *J Biol.Chem.* 259:15331-15339 (1984)). 헤모필러스 인플루엔자 효소는 활성부에 기질 결합 친화성을 변형시키기 위한 효소 조작 연구의 대상이 되고 있다 (Blanco et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 60:1388-1395 (2004); Blanco et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 60:1808-1815 (2004)). 다른 ASD 후보들도 미코박테리움 투베르쿨로시스 (Shafiani et al., *J Appl Microbiol* 98:832-838 (2005)), 메타노코커스 야나스키이 (Faehnle et al., *J Mol.Biol.* 353:1055-1068 (2005)), 및 감염성 미생물 비브리오 콜레라와 헬리코박터 필로리 (Moore et al., *Protein Expr.Purif.* 25:189-194 (2002))에서 확인되었다. 관련 후보 효소는 아세틸글루타미닐포스페이트 리덕타제 (EC 1.2.1.38)이며, 이 효소는 천연적으로 아세틸글루타미닐포스페이트를 아세틸글루타메이트-5-세미알데하이드로 환원하며, 사카로마이세스 세레비지에 (Pauwels et al., *Eur.J Biochem.* 270:1014-1024 (2003)), B. 썩틸리스 (O'Reilly et al., *Microbiology* 140 (Pt 5):1023-1025 (1994)), 에스케리키아 콜라이 (Parsot et al., *유전자.* 68:275-283 (1988)), 및 기타 유기체들에서 발견되었다. 에스케리키아 콜라이의 추가적인 포스페이트 리덕타제 효소들로는 글리세르알데하이드 3-포스페이트 데하이드로게나제 (*gapA* (Branlant et al., *Eur.J.Biochem.* 150:61-66 (1985))) 및 글루타메이트-5-세미알데하이드 데하이드로게나제 (*proA* (Smith et al., *J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984)))가 있다. 살모넬라 티피무리움 (Mahan et al., *J Bacteriol.* 156:1249-1262 (1983)) 및 캄필로박터 제주니 (Louie et al., *Mol.Gen.Genet.* 240:29-35 (1993))로부터 유래된 글루타메이트-5-세미알데하이드 데하이드로게나제 효소를 코딩하는 유전자들은 클로닝되었으며, 에스케리키아 콜라이에서 발현되었다.

표 17

[0278]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>asd</i>	NP_417891.1	16131307	에스케리키아 콜라이
<i>asd</i>	YP_248335.1	68249223	헤모필러스 인플루엔자
<i>asd</i>	AAB49996	1899206	미코박테리움 투베르쿨로시스
<i>VC2036</i>	NP_231670	15642038	비브리오 콜레라
<i>asd</i>	YP_002301787.1	210135348	헬리코박터 필로리
<i>ARG5,6</i>	NP_010992.1	6320913	사카로마이세스 세레비지에
<i>argC</i>	NP_389001.1	16078184	바실러스 썩틸리스
<i>argC</i>	NP_418393.1	16131796	에스케리키아 콜라이
<i>gapA</i>	POA9B2.2	71159358	에스케리키아 콜라이
<i>proA</i>	NP_414778.1	16128229	에스케리키아 콜라이
<i>proA</i>	NP_459319.1	16763704	살모넬라 티피무리움
<i>proA</i>	P53000.2	9087222	캄필로박터 제주니

[0279]

1.2.1.e 옥시도리덕타제 (산 → 알데하이드)

[0280]

산에서 알데하이드로의 변환은 열역학적으로 우호적이지 않으며, 전형적으로 에너지가 풍부한 조인자와 효소적 다단계가 요구된다. 단일 효소에 의한 산의 알데하이드로의 직접 변환은 1.2.1 패밀리의 산 리덕타제 효소에 의해 촉매된다. 이 EC 클래스에 속하는 효소는 3-하이드록시부티레이트를 3-하이드록시부탈 (단계 5K, 도 5)로, 2,4-펜타디에노에이트를 펜타-2,4-디에날로 (단계 A, 도 6) 변환하는데 필요하다.

[0281]

산 리덕타제 효소의 예로는 카르복실산리덕타제, 알파-아미노아디페이트 리덕타제 및 레티노익산 리덕타제가 있다. 노카르디아 아이오웬시스에서 발견된 카르복실산리덕타제 (CAR)는 카르복실산을 이의 대응되는 알데하이드로 마그네슘, ATP 및 NADPH-의존적으로 환원하는 과정을 촉매한다 (Venkitasubramanian et al., *J Biol.Chem.* 282:478-485 (2007)). 이 효소의 천연 기질은 벤조에이트이며, 이 효소는 p-톨루에이트 등의 다양한 방향족 기질 수용성을 나타낸다 (Venkitasubramanian et al., *Biocatalysis in Pharmaceutical and Biotechnology Industries.* CRC press (2006)). 노카르디아 아이오웬시스로부터 *car*에 의해 코딩되는 이러한 효소가 클로닝되

었으며, 에스케리키아 콜라이에서 기능적으로 발현되었다 (Venkitasubramanian et al., *J Biol.Chem.* 282:478-485 (2007)). CAR은, 비활성형 주효소 (apoenzyme)를 활성형의 전효소로 변환시키는 포스포판테테인 트랜스퍼라제 (PPTase)에 의한 번역 후 활성화를 필요로 한다 (Hansen et al., *Appl.Environ.Microbiol* 75:2765-2774 (2009)). 특이적인 PPTase 산물을 코딩하는 *npt* 유전자의 발현은 효소의 활성을 개선시켰다. 스트렙토마이세스 그리세우스에서 발굴된 추가적인 후보 효소는 *griC* 및 *griD* 유전자들에 코딩되어 있다. *griC* 또는 *griD* 중 어느 하나의 결손시 3-아미노-4-하이드록시벤조산 대사의 섀트 산물인 세포외 3-아세틸아미노-4-하이드록시벤조산이 축적되기 때문에, 이 효소는 -아미노-4-하이드록시벤조산을 3-아미노-4-하이드록시벤즈알데하이드로 변환시키는 것으로 생각된다 (Suzuki, et al., *J. Antibiot.* 60(6):380-387 (2007)). 노카르디아 아이오웬시스 *npt*의 서열과 유사한 효소인 SGR_665를 *griC* 및 *griD*와 함께 발현시키는 것이 유익할 수 있다.

표 18

[0282]

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>car</i>	AAR91681.1	40796035	노카르디아 아이오웬시스
<i>npt</i>	ABI83656.1	114848891	노카르디아 아이오웬시스
<i>griC</i>	YP_001825755.1	182438036	스트렙토마이세스 그리세우스
<i>griD</i>	YP_001825756.1	182438037	스트렙토마이세스 그리세우스

[0283]

추가적인 *car* 및 *npt* 유전자들을 서열 상동성을 토대로 동정할 수 있다.

표 19

[0284]

유전자명	GI 번호	유전자은행 등재번호	유기체
<i>fadD9</i>	121638475	YP_978699.1	미코박테리움 보비스 BCG
<i>BCG_2812c</i>	121638674	YP_978898.1	미코박테리움 보비스 BCG
<i>nfa20150</i>	54023983	YP_118225.1	노카르디아 파르시니카 IFM 10152
<i>nfa40540</i>	54026024	YP_120266.1	노카르디아 파르시니카 IFM 10152
<i>SGR_6790</i>	182440583	YP_001828302.1	스트렙토마이세스 그리세우스 아종 그리세우스 NBRC 13350
<i>SGR_665</i>	182434458	YP_001822177.1	스트렙토마이세스 그리세우스 아종 그리세우스 NBRC 13350
<i>MSMEG_2956</i>	YP_887275.1	YP_887275.1	미코박테리움 스메그마티스 MC2 155
<i>MSMEG_5739</i>	YP_889972.1	118469671	미코박테리움 스메그마티스 MC2 155
<i>MSMEG_2648</i>	YP_886985.1	118471293	미코박테리움 스메그마티스 MC2 155
<i>MAP1040c</i>	NP_959974.1	41407138	미코박테리움 아비움 아종 파라투베르쿨로시스 K-10
<i>MAP2899c</i>	NP_961833.1	41408997	미코박테리움 아비움 아종 파라투베르쿨로시스 K-10
<i>MMAR_2117</i>	YP_001850422.1	183982131	미코박테리움 마리눔 M
<i>MMAR_2936</i>	YP_001851230.1	183982939	미코박테리움 마리눔 M
<i>MMAR_1916</i>	YP_001850220.1	183981929	미코박테리움 마리눔 M
<i>TpauDRAFT_33060</i>	ZP_04027864.1	227980601	츠카무렐라 파우로메타볼라 DSM 20162
<i>TpauDRAFT_20920</i>	ZP_04026660.1	ZP_04026660.1	츠카무렐라 파우로메타볼라 DSM 20162
<i>CPCC7001_1320</i>	ZP_05045132.1	254431429	시아노비움 PCC7001
<i>DDBDRAFT_0187729</i>	XP_636931.1	66806417	덱티오스텔리움 디스코이테움 AX4

[0285]

특징이 비슷한 효소인 알파-아미노아디페이트 리덕타제 (AAR, EC 1.2.1.31)는 일부 진균 종들에서 라이신 생합성에 관여한다. 이 효소는 천연적으로 알파-아미노아디페이트를 알파-아미노아디페이트 세미알데하이드로 환원한다. 카르복실기가 먼저 ATP-의존적인 아데닐레이트의 형성을 통해 활성화된 다음, 아데닐레이트는 NAD(P)H에 의해 환원되어 알데하이드와 AMP가 만들어진다. CAR 처럼, 이 효소는 마그네슘을 이용하며, PPTase에 의한 활성화를 필요로 한다. AAR의 효소 후보들과 이의 대응되는 PPTase는 사카로마이세스 세레비지에 (Morris et al., 유전자 98:141-145 (1991)), 칸디다 알비칸스 (Guo et al., *Mol.Genet.Genomics* 269:271-279 (2003)), 및

시조사카로마이세스 품배 (Ford et al., *Curr.Genet.* 28:131-137 (1995))에서 확인되었다. 시조사카로마이세스 품배의 AAR은 에스케리키아 콜라이에서 발현시켰을 때 유의한 활성을 나타내었다 (Guo et al., *Yeast* 21:1279-1288 (2004)). 페니실리움 크리소게눔의 AAR은 대안 기질로서 S-카르복시메틸-L-시스테인을 수용하지 만, 아디페이트, L-글루타메이트 또는 디아미노피멜레이트와는 반응하지 않는다 (Hijarrubia et al., *J Biol.Chem.* 278:8250-8256 (2003)). 페니실리움 크리소게눔 PPTase를 코딩하는 유전자는 아직까지 규명되지 않았으며, 서열 비교 상동성 검색을 통해서도 확인성이 높은 것은 확인되지 않았다.

표 20

[0286]

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>LYS2</i>	AAA34747.1	171867	사카로마이세스 세레비지에
<i>LYS5</i>	P50113.1	1708896	사카로마이세스 세레비지에
<i>LYS2</i>	AAC02241.1	2853226	칸디다 알비칸스
<i>LYS5</i>	AA026020.1	28136195	칸디다 알비칸스
<i>Lys1p</i>	P40976.3	13124791	시조사카로마이세스 품배
<i>Lys7p</i>	Q10474.1	1723561	시조사카로마이세스 품배
<i>Lys2</i>	CAA74300.1	3282044	페니실리움 크리소게눔

[0287]

1.3.1.a 옥시도리덕타제 (알칸 → 알켄)

[0288]

도 1에 도시된 몇몇 변환들은 단계 B, F 및 M을 비롯하여 알칸의 알켄으로의 산화를 수반한다. 단계 B와 F는 역 방향으로 작동하는 데하이드로게나제 또는 에노에이트 리덕타제에 의해 촉매된다. 단계 M은 5-하이드록시발 레틸-CoA 데하이드로게나제, 아실-CoA 데하이드로게나제 또는 에노에이트 리덕타제에 의해 촉매된다. 도 3의 단계 E와 G는 각각 펜트-3-에노일-CoA 또는 펜트-2-에노일-CoA의 2,4-펜타디에노일-CoA로의 산화를 수반한다. 후보 효소의 예들은 아래에 기술한다.

[0289]

펜트-3-에노일-CoA 또는 펜트-2-에노일-CoA의 2,4-펜타디에노일-CoA로의 산화는 2,4-펜타디에노일-CoA를 형성하 는 데하이드로게나제 효소에 의해 촉매된다. 2,4-디에노일-CoA 리덕타제 효소 (EC 1.3.1.34)가 이러한 변환에 적합한 후보 효소이다. 일반적으로, 박테리아의 2,4-디에노일-CoA 리덕타제는 2-에노일-CoA 산물을 생산하는데 반해, 진핵 생물의 2,4-디에노일-CoA 리덕타제는 3-에노일-CoA 산물을 생산한다 (Dommes and Kunau, *J Biol Chem*, 259:1781-1788 (1984)). 에스케리키아 콜라이의 *fadH* 유전자 산물은 NADPH-의존성 2,4-디에노일-CoA 리 덕타제로서, 이것은 불포화 지방산의 베타-산화에 참여한다 (Tu et al, *Biochem*, 47:1167-1175 (2008)). DCR 돌연변이 시리즈들이 구축되었으며, 2-에노일-CoA 및 3-에노일-CoA 산물 둘다를 생성하는 것으로 확인되었다 (Tu et al, *supra*). 진핵 생물의 DCR 효소들은 인간과 마우스에서 특정화되었다 (Koivuranta et al, *Biochem J*, 304:787-792 (1994); Geisbrecht et al, *J Biol Chem* 274:25814-20 (1999); Miinalainen et al, *PLoS genet.* 5: E1000543 (2009)). 클로스트리둠 아미노발레리쿰의 2,4-펜타디에노일-CoA 리덕타제는 3-펜트-3-에 노일-CoA의 2,4-펜타디에노일-CoA로의 산화를 촉매하는 것으로 확인되었다. 이 효소는 정제 및 특정화되었으며, 구조가 결정되었다 (Eikmanns, *Acta Cryst*, D50: 913-914 (1994); 및 Eikmanns and Buckel, *Eur J Biochem* 198:263-266 (1991)). 이 효소의 전자 캐리어는 비-공지이지만, NAD(P)H는 아니다. 효소의 서 열은 아직까지 공개되지 않았다.

표 21

[0290]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fadH</i>	NP_417552.1	16130976	에스케리키아 콜라이
<i>Decr1</i>	Q16698.1	3913456	호모 사피엔스
<i>Pdcr</i>	Q9WV68.1	90109767	무스 무스쿨루스
<i>Decr</i>	NP_080448.1	13385680	무스 무스쿨루스

[0291]

EC 클래스 1.3.* 의 2-에노에이트 리덕타제 효소는 매우 다양한 알파, 베타-불포화 카르복실산 및 알데하이드 화합물의 가역적인 환원을 촉매하는 것으로 알려져 있다 (Rohdich et al., *J Biol Chem* 276:5779-5787 (2001)). 최근 공개된 클로스트리둠 클루이베리의 게놈 서열에서, 에노에이트 리덕타제에 대한 9개의 코딩 서 열들이 보고되었으며, 이중 하나가 특정화되었다 (Seedorf et al., *PNAS* 105:2128-2133 (2008)). 클로스트리

들 티로부티리쿰 및 무렐라 서모아세티쿰으로부터 유래된 *enr* 유전자들이 클로닝되었으며, 서로 59%의 동일성을 나타낸다. 전자 유전자는 또한 클로스트리둠 클루이베리에서 특정화된 유전자와의 유사성이 대략 75%인 것으로 확인된다 (Giesel et al., 135:51-57 (1983)). 클로스트리둠 티로부티리쿰의 *enr*이 에스케리키아 콜라이의 FadH 디에노일 CoA 리덕타제와 매우 유사하다는 것이 이들 서열 결과들을 기초로 보고된 바 있다 (Rohdich et al., *supra*). 무렐라 서모아세티쿰 *enr* 유전자는 에스케리키아 콜라이에서 촉매적으로 활성인 형태로 발현되었다 (Rohdich et al., *supra*). 이 효소는 매우 다양한 알파, 베타-불포화 카르보닐 화합물들에 대해 활성을 나타낸다.

표 22

[0292]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>enr</i>	ACA54153.1	169405742	클로스트리둠 보톨리눔 A3 str
<i>enr</i>	CAA71086.1	2765041	클로스트리둠 티로부티리쿰
<i>enr</i>	CAA76083.1	3402834	클로스트리둠 클루이베리
<i>enr</i>	YP_430895.1	83590886	무렐라 서모아세티카

[0293]

다른 후보 효소인 2-에노에이트 리덕타제는 말레일아세테이트 리덕타제 (MAR, EC 1.3.1.32)로서, 이 효소는 2-말레일아세테이트 (4-옥소헥스-2-에네티오에이트)의 3-옥소아디페이트로의 환원을 촉매한다. MAR 효소는 천연적으로 방향족 분해 경로에 참여한다 (Kaschabek et al., J Bacteriol. 175:6075-6081 (1993); Kaschabek et al., J Bacteriol. 177:320-325 (1995); Camara et al., J Bacteriol. (2009); Huang et al., Appl Environ.Microbiol 72:7238-7245 (2006)). 이 효소 활성은 규명되었으며, 슈도모나스 sp. strain B13에서 특정되었으며 (Kaschabek et al., 175:6075-6081 (1993); Kaschabek et al., 177:320-325 (1995)), 코딩 유전자가 클로닝되었고, 서열 분석되었다 (Kasberg et al., J Bacteriol. 179:3801-3803 (1997)). 추가적인 MAR 후보 유전자로는 슈도모나스 sp. strain B13의 *clcE* 유전자 (Kasberg et al., J Bacteriol. 179:3801-3803 (1997)), 로도코쿠스 오파쿠스의 *macA* 유전자 (Seibert et al., 180:3503-3508 (1998)), 랄스토니아 유트로파 (쿠프리아비두스 네카토르라고도 함)의 *macA* 유전자 (Seibert et al., Microbiology 150:463-472 (2004)), 랄스토니아 유트로파의 *tfdFII* (Seibert et al., J Bacteriol. 175:6745-6754 (1993)) 및 코리네박테리움 글루타미컴 NCgl1112 (Huang et al., Appl Environ.Microbiol 72:7238-7245 (2006))를 포함한다. *ccaD*에 의해 코딩되는 슈도모나스 라이네카이 MT1의 MAR은 최근에 동정되었다 (Camara et al., J Bacteriol. (2009)).

표 23

[0294]

유전자	GI #	등록 번호	유기체
<i>clcE</i>	3913241	030847.1	슈도모나스 sp. strain B13
<i>macA</i>	7387876	084992.1	로도코쿠스 오파쿠스
<i>macA</i>	5916089	AAD55886	쿠프리아비두스 네카토르
<i>tfdFII</i>	1747424	AC44727.1	랄스토니아 유트로파 JMP134
<i>NCgl1112</i>	19552383	NP_600385	코리네박테리움 글루타미컴
<i>ccaD</i>	ABO61029.1	134133940	슈도모나스 라이네카이 MT1

[0295]

알켄을 형성하는 산화 방향을 선호하는 에노에이트 리덕타제의 예는 숙시네이트 데하이드로게나제 (EC 클래스 1.3.99 또는 1.3.5)이며, 이는 또한 숙시네이트-유비퀴논 옥시도리덕타제 및 컴플렉스 II로도 알려져 있다. SDH는 숙시네이트를 푸마레이트로 변환하며 전자를 유비퀴논으로 전달하는 막-결합형 효소 컴플렉스이다. 이 효소는 *sdhAB*에 의해 코딩된 2개의 촉매 서브유닛과 *sdhCD*에 의해 코딩되는 2개의 막 서브유닛들로 구성된다. 에스케리키아 콜라이 SDH는 가역적이지만, 이 효소는 푸마레이트의 환원 보다는 숙시네이트를 산화하는데 50배 이상 강력하다 (Maklashina et al J Biol.Chem. 281:11357-11365 (2006)).

표 24

[0296]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>sdhA</i>	AAC73817.1	1786942	에스케리키아 콜라이
<i>sdhB</i>	AAC73818.1	1786943	에스케리키아 콜라이

<i>sdhC</i>	AAC73815.1	1786940	에스케리키아 콜라이
<i>sdhD</i>	AAC73816.1	1786941	에스케리키아 콜라이

- [0297] 아실-CoA 테하이드로게나제 또는 에노일-CoA 리덕타제의 예는 클로스트리듐 아세토부틸리컴 유래 *bcd*의 유전자 산물이며 (Atsumi et al., 10:305-311 (2008); Boynton et al., *J Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996)), 이는 천연적으로 크로토닐-CoA의 부티릴-CoA로의 환원을 촉매한다 (EC 1.3.99.2). 이 효소는 클로스트리디아 종들에서 부티레이트로의 아세틸-CoA 발효 경로에 참여한다 (Jones et al., *Microbiol Rev.* 50:484-524 (1986)). 부티릴-CoA 리덕타제의 활성은 전자 전달체 플라보단백질을 코딩하는 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *etfAB* 유전자 발현과 더불어 *bcd*를 발현함으로써 강화될 수 있다. 에노일-CoA 리덕타제 단계의 추가적인 후보는 유글레나 그라실리스의 미토콘드리아 에노일-CoA 리덕타제 (EC 1.3.1.44)이다 (Hoffmeister et al., *J Biol.Chem* 280:4329-4338 (2005)). 미토콘드리아를 타겟팅하는 리더 서열이 제거된 이 서열로부터 파생된 구조체는 에스케리키아 콜라이에서 클로닝되었으며, 활성형의 효소가 생성되었다 (Hoffmeister et al, *supra*). TDE0597에 의해 코딩되는 원핵 생물 트레포네마 텐티콜라 유래 단백질의 밀접한 상동체도 클로닝되었고, 에스케리키아 콜라이에서 발현되었다 (Tucci et al., *FEBS Lett.* 581:1561-1566 (2007)). 신티로푸스 액시디트로피쿠스에서 유전자 6종이 클로스트리듐 아세토부틸리컴 *bcd* 유전자 산물에 대한 서열 상동성을 통해 동정되었다. 신티로푸스 액시디트로피쿠스의 유전자 *syn_02637*과 *syn_02636*은 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *etfAB* 유전자와 높은 서열 상동성을 가지며, 전자 전달체 플라보단백질의 알파 및 베타 서브유닛을 코딩하는 것으로 예측된다.

표 25

[0298]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>bcd</i>	NP_349317.1	15895968	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>etfA</i>	NP_349315.1	15895966	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>etfB</i>	NP_349316.1	15895967	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>TER</i>	Q5EU90.1	62287512	유글레나 그라실리스
<i>TDE0597</i>	NP_971211.1	42526113	트레포네마 텐티콜라
<i>syn_02587</i>	ABC76101	85721158	신티로푸스 액시디트로피쿠스
<i>syn_02586</i>	ABC76100	85721157	신티로푸스 액시디트로피쿠스
<i>syn_01146</i>	ABC76260	85721317	신티로푸스 액시디트로피쿠스
<i>syn_00480</i>	ABC77899	85722956	신티로푸스 액시디트로피쿠스
<i>syn_02128</i>	ABC76949	85722006	신티로푸스 액시디트로피쿠스
<i>syn_01699</i>	ABC78863	85723920	신티로푸스 액시디트로피쿠스
<i>syn_02637</i>	ABC78522.1	85723579	신티로푸스 액시디트로피쿠스
<i>syn_02636</i>	ABC78523.1	85723580	신티로푸스 액시디트로피쿠스

- [0299] 추가적인 에노일-CoA 리덕타제의 후보 효소들은, 방향족 화합물들을 분해하는 유기체들에서 발견되었다. 벤조 에이트 분해를 위한 모델 유기체인 로도슈도모나스 팔루스트리스는 피멜로일-CoA의 베타-산화를 경유하여 피멜 레이트를 분해하는 효소적 능력을 가지고 있다. *pim* 오페론에서 인접한 유전자들 *pimC* 및 *pimD*는 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 *bcd*와 서열 상동성을 가지고 있으며, 플라빈을 함유한 피멜로일-CoA 테하이드로게나제를 코딩하는 것으로 예측된다 (Harrison et al., 151:727-736 (2005)). 질소를 고정하는 대두 공생균 브라디리조비움 자포니쿰의 게놈도 *R. 팔루스트리스*의 *pimC* 및 *pimD*와의 서열 유사성이 높은 유전자들로 구성된 *pim* 오페론을 가지고 있다 (Harrison and Harwood, *Microbiology* 151:727-736 (2005)).

표 26

[0300]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>pimC</i>	CAE29155	39650632	로도슈도모나스 팔루스트리스
<i>pimD</i>	CAE29154	39650631	로도슈도모나스 팔루스트리스
<i>pimC</i>	BAC53083	27356102	브라디리조비움 자포니쿰
<i>pimD</i>	BAC53082	27356101	브라디리조비움 자포니쿰

[0301] 다른 후보 효소는 2-메틸-분지쇄 에노일-CoA 리덕타제 (EC 1.3.1.52 및 EC 1.3.99.12)이며, 이 효소는 입체 방해 받는 트랜스-에노일-CoA 기질의 환원을 촉매한다. 이 효소는 선충 아스카리우스 속에서 분지쇄 지방산 합성에 참여하며, 2-메틸발레릴-CoA, 2-메틸부타노일-CoA, 2-메틸펜타노일-CoA, 옥타노일-CoA 및 펜타노일-CoA 등의 다양한 직쇄 및 분지쇄 기질들을 환원할 수 있다 (Duran et al., 268:22391-22396 (1993)). 유전자 *acad1* 과 *acad*에 의해 코딩되는 이 효소의 2가지 이소형들이 특정화되었다.

표 27

[0302]	단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
	<i>acad1</i>	AAC48316.1	2407655	아스카리우스 슴
	<i>acad</i>	AAA16096.1	347404	아스카리우스 슴

[0303] **1.4.1.a 옥시도리덕타제 (아민 → 옥소)**

[0304] EC 클래스 1.4.1의 효소들은 아민 화합물의 알데하이드 화합물 또는 케톤 화합물로의 산화적 탈아민화를 촉매한다. 이 EC 클래스의 효소들은 전형적으로 전자 여셉터로서 NAD⁺, NADP⁺ 또는 FAD를 사용하며, 반응은 전형적으로 가역적이다. 도 1의 단계들 C, H 및 I는 옥시도리덕타제를 탈아민화함으로써 촉매될 수 있다. 후보 효소는 아래에 기술되어 있다.

[0305] 글루타메이트 데하이드로게나제 (EC 1.4.1.2), 루신 데하이드로게나제 (EC 1.4.1.9) 및 아스파르테이트 데하이드로게나제 (EC 1.4.1.21)는 아미노산을 이의 대응되는 2-케토산으로 변환한다. 에스케리키아 콜라이의 *gdhA* 유전자 산물 (Korber et al., *J Mol.Biol.* 234:1270-1273 (1993); McPherson et al., *Nucleic Acids Res.* 11:5257-5266 (1983)), 서모토가 마리타임의 *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 할로박테리움 살리나룸 *gdhA1* (Ingoldsby et al., 유전자 349:237-244 (2005))은 글루타메이트를 2-옥소글루타레이트와 암모니아로 가역적으로 변환하는 과정을 촉매하며, NADP(H), NAD(H) 또는 둘다를 각각 선호한다. 추가적인 글루타메이트 데하이드로게나제 후보 유전자는 바실러스 썩틸리스 (Khan et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 69:1861-1870 (2005)), 니코티아나 타바쿰 (Purnell et al., *Planta* 222:167-180 (2005)), 오리자 사티바 (Abiko et al., *Plant Cell Physiol* 46:1724-1734 (2005)), 할로페락스 메디테라나이 (Diaz et al., *Extremophiles.* 10:105-115 (2006)) 및 할로박트라움 살리나룸 (Hayden et al., *FEMS Microbiol Lett.* 211:37-41 (2002))에서 확인된다. 니코티아나 타바쿰의 효소는 *gdh1* 및 *gdh2*에 의해 코딩되는 알파 및 베타 서브유닛들로 구성된다 (Purnell et al., *Planta* 222:167-180 (2005)). NADH-의존성 글루타메이트 데하이드로게나제의 과다 발현이 사카로마이세스 세레비지애의 조작된 균주들에서 에탄올 생산을 향상시키는 것으로 확인되었다 (Roca et al., *Appl Environ.Microbiol* 69:4732-4736 (2003)). 바실러스 세레우스의 *ldh* 유전자는 루신, 이소루신, 발린 및 2-아미노부타노에이트 등의 매우 다양한 기질을 수용하는 LeuDH 단백질을 코딩한다 (Ansorge et al., *Biotechnol Bioeng* 68:557-562 (2000); Stoyan et al., *J Biotechnol* 54:77-80 (1997)). 서모토가 마리타의 *nadX* 유전자는 NAD의 생합성에 참여하는 아스파르테이트 데하이드로게나제를 코딩한다 (Yang et al., *J Biol.Chem.* 278:8804-8808 (2003)).

표 28

[0306]	단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
	<i>gdhA</i>	P00370	118547	에스케리키아 콜라이
	<i>gdh</i>	P96110.4	6226595	서모토가 마리타
	<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	15789827	할로박테리움 살리나룸
	<i>rocG</i>	NP_391659.1	16080831	바실러스 썩틸리스
	<i>gdh1</i>	AAR11534.1	38146335	니코티아나 타바쿰
	<i>gdh2</i>	AAR11535.1	38146337	니코티아나 타바쿰
	<i>GDH</i>	Q852M0	75243660	오리자 사티바
	<i>GDH</i>	Q977U6	74499858	할로페락스 메디테라나이
	<i>GDH</i>	P29051	118549	할로박트라움 살리나룸
	<i>GDH2</i>	NP_010066.1	6319986	사카로마이세스 세레비지애
	<i>ldh</i>	POA393	61222614	바실러스 세레우스

<i>nadX</i>	NP_229443.1	15644391	서모토가 마리티마
-------------	-------------	----------	-----------

[0307]

1차 아민 화합물을 이의 대응되는 알데하이드 화합물로 변환하는 과정을 촉매하는 효소의 예는 lysDH 유전자에 의해 코딩되는 라이신 6-데하이드로게나제 (EC 1.4.1.18)이다. 이 효소는 L-라이신의 6-아미노기의 산화적 탈아민화를 촉매하여, 2-아미노아디페이트-6-세미알데하이드를 형성한다 (Misono et al., *J Bacteriol.* 150:398-401 (1982)). 라이신 6-데하이드로게나제 효소의 예들은 지오바실러스 스테아로서모필러스 (Heydari et al., *AEM* 70:937-942 (2004)), 아그로박테리움 투메팍시엔스 (Hashimoto et al., *J Biochem.* 106:76-80 (1989); Misono and Nagasaki, *J Bacteriol.* 150:398-401 (1982)), 및 아크로모박터 테니트리피칸스 (Ruldeekulthamrong et al., *BMB.Rep.* 41:790-795 (2008))에서 확인된다.

표 29

[0308]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>lysDH</i>	BAB39707	13429872	지오바실러스 스테아로서모필러스
<i>lysDH</i>	NP_353966	15888285	아그로박테리움 투메팍시엔스
<i>lysDH</i>	AAZ94428	74026644	아크로모박터 테니트리피칸스

[0309]

1.4.3.a 아민 옥시다제

[0310]

EC 클래스 1.4.3의 아민 옥시다제 효소는 아미노기의 이의 대응되는 알데하이드 화합물 또는 케톤 화합물의 산화적 탈아민화를 촉매한다. 이 클래스의 효소는 전자 어셉터로서 산소를 이용하여, 아민, O₂ 및 물을 알데하이드 또는 케톤, 암모니아 및 과산화수소로 변환한다. L-아미노-산 옥시다제는 다수의 L-아미노산의 이의 대응되는 2-옥소산 화합물로의 산화적 탈아민화를 촉매한다. 스트렙토코커스 올리고퍼멘탄스의 효소는 에스케리키아 콜라이에서 과다 발현되었다 (Tong et al, *J Bacteriol* 190:4716-21 (2008)). 라이신-6-옥시다제 (EC 1.4.3.20) 및 푸트레신 옥시다제 (EC 1.4.3.10) 등의 기타 아민 옥시다제 효소들은 말단 아민 화합물들에 특이적이다. 라이신-6-옥시다제 효소들은 마리노모나스 메디테라니아의 *lodA* (Lucas-Elio et al, *J Bacteriol* 188:2493-501 (2006))와 슈도알테로모나스 투니카타의 *alpP* (Mai-Prochnow et al, *J Bacteriol* 190:5493-501 (2008))에 의해 코딩된다. 푸트레신 옥시다제 효소는 코쿠리아 로세아의 *puo* (Ishizuka et al, *J Gen Microbiol* 139:425-32 (1993))와 아라비돕시스 탈리아나의 *ATAOI* (Moller and McPherson, *Plant J* 13:781-91 (1998))에 의해 코딩된다.

표 30

[0311]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
EU495328.1:1..1176	ACA52024.1	169260271	스트렙토코커스 올리고퍼멘탄스
<i>lodA</i>	AAV33849.1	83940756	마리노모나스 메디테라니아
<i>alpP</i>	AAP73876.1	32396307	슈도알테로모나스 투니카타
<i>puo</i>	BAA02074.1	303641	코쿠리아 로세아
<i>ATAOI</i>	AAB87690.1	2654118	아라비돕시스 탈리아나

[0312]

2.3.1.a 아실트랜스퍼라제 (포스페이트기 CoA 전달; 포스포트랜스아실라제)

[0313]

2,4-펜타디에노일-CoA 포스포트랜스퍼라제 활성을 가진 효소는 2,4-펜타디에노일-CoA를 2,4-펜타디에노일-포스페이트로 변환하는데 필요하다 (도 6, 단계 D). 포스페이트를 전달하는 아실트랜스퍼라제의 예로는 포스포트랜스아세틸라제 (EC 2.3.1.8)와 포스포트랜스부틸라제 (EC 2.3.1.19)가 있다. 에스케리키아 콜라이의 *pta* 유전자는 아세틸-CoA를 아세틸-포스페이트로 가역적으로 변환하는 포스포트랜스아세틸라제를 코딩한다 (Suzuki, *Biochim.Biophys.Acta* 191:559-569 (1969)). 또한, 이 효소는 기질로서 프로피오닐-CoA를 이용하여, 프로세스에서 프로피오네이트를 형성할 수 있다 (Hesslinger et al., *Mol.Microbiol* 27:477-492 (1998)). 프로피오닐-CoA에 대해 활성을 나타내는 그외포스페이트 아세틸트랜스퍼라제는 바실러스 섭틸리스 (Rado et al., *Biochim.Biophys.Acta* 321:114-125 (1973)), 클로스트리듐 클루이베리 (Stadtman, *Methods Enzymol* 1:596-599 (1955)), 및 서모토가 마리티마 (Bock et al., *J Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999))에서 확인된다. 마찬가지로, 클로스트리듐 아세트부틸리쿰의 *ptb* 유전자는 부틸-CoA를 부틸-포스페이트로 가역적으로 변환하는 효소

인 포스포트랜스부틸라제를 코딩한다 (Wiesenborn et al., *Appl Environ.Microbiol* 55:317-322 (1989); Walter et al., *Gene* 134:107-111 (1993)). 추가적인 *ptb* 유전자들이 부티레이트 생산 박테리움 L2-50 (Louis et al., *J.Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004))과 바실러스 메가테리움 (Vazquez et al., *Curr.Microbiol* 42:345-349 (2001))에서 확인된다.

표 31

[0314]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>pta</i>	NP_416800.1	71152910	에스케리키아 콜라이
<i>pta</i>	P39646	730415	바실러스 섭틸리스
<i>pta</i>	A5N801	146346896	클로스트리듐 클루이베리
<i>pta</i>	Q9XOL4	6685776	서모토가 마리티마
<i>ptb</i>	NP_349676	34540484	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>ptb</i>	AAR19757.1	38425288	부티레이트 생산 박테리움 L2-50
<i>ptb</i>	CAC07932.1	10046659	바실러스 메가테리움

[0315]

2.3.1.b 베타-케토티올라제

[0316]

EC 클래스 2.3.1의 베타-케토티올라제 효소들은 2개의 아실-CoA 기질의 축합을 촉매한다. 도 2의 단계 A, 도 3의 단계 A 및 도 4의 단계 A를 비롯하여, 도 2-4에 도시된 몇가지 변환들에는 베타-케토티올라제가 요구된다.

[0317]

아세토아세틸-CoA 티올라제 활성을 가진 베타-케토티올라제의 예로는, 에스케리키아 콜라이 *atoB* (Martin et al., *Nat.Biotechnol* 21:796-802 (2003)), 클로스트리듐 아세토부틸리컴 *thlA* 및 *thlB* (Hanai et al., *Appl Environ Microbiol* 73:7814-7818 (2007); Winzer et al., *J.Mol.Microbiol Biotechnol* 2:531-541 (2000)), 및 사카로마이세스 세레비지애 *ERG10* (Hiser et al., *J.Biol.Chem.* 269:31383-31389 (1994))로부터 유래된 유전자 산물들을 포함한다.

표 32

[0318]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>atoB</i>	NP_416728	16130161	에스케리키아 콜라이
<i>thlA</i>	NP_349476.1	15896127	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>thlB</i>	NP_149242.1	15004782	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>ERG10</i>	NP_015297	6325229	사카로마이세스 세레비지애

[0319]

아세틸-CoA 및 프로피오닐-CoA로부터의 베타-케토티올라제의 형성을 촉매하는 베타-케토티올라제 효소들 역시 적합한 후보 효소이다. 주글로에아 라미게라는 프로피오닐-CoA 및 아세틸-CoA로부터 3-케토티올라제-CoA를 형성할 수 있는 2가지 케토티올라제를 가지고 있으며, 랄스토니아 유트로파는 또한 이러한 변환을 촉매할 수 있는 베타-산화 케토티올라제를 가진다 (Gruys et al., US Patent 5,958,745 (1999)). 이들 유전자 또는 이의 번역된 단백질의 서열들은 보고되지 않았지만, 랄스토니아 유트로파, 주글로에아 라미게라, 또는 기타 유기체들에서 몇가지 후보 효소들이 랄스토니아 유트로파의 *bktB*와의 서열 상동성을 토대로 동정될 수 있다. 이러한 것으로는 하기를 포함한다:

표 33

[0320]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>phaA</i>	YP_725941.1	113867452	랄스토니아 유트로파
<i>h16_A1713</i>	YP_726205.1	113867716	랄스토니아 유트로파
<i>pcaF</i>	YP_728366.1	116694155	랄스토니아 유트로파
<i>h16_B1369</i>	YP_840888.1	116695312	랄스토니아 유트로파
<i>h16_A0170</i>	YP_724690.1	113866201	랄스토니아 유트로파
<i>h16_A0462</i>	YP_724980.1	113866491	랄스토니아 유트로파
<i>h16_A1528</i>	YP_726028.1	113867539	랄스토니아 유트로파

<i>h16_B0381</i>	YP_728545.1	116694334	칼스토니아 유트로파
<i>h16_B0662</i>	YP_728824.1	116694613	칼스토니아 유트로파
<i>h16_B0759</i>	YP_728921.1	116694710	칼스토니아 유트로파
<i>h16_B0668</i>	YP_728830.1	116694619	칼스토니아 유트로파
<i>h16_A1720</i>	YP_726212.1	113867723	칼스토니아 유트로파
<i>h16_A1887</i>	YP_726356.1	113867867	칼스토니아 유트로파
<i>phbA</i>	P07097.4	135759	주글로에아 라미게라
<i>bktB</i>	YP_002005382.1	194289475	쿠프리아비두스 타이와넨시스
<i>Rmet_1362</i>	YP_583514.1	94310304	칼스토니아 메탈리두란스
<i>Bphy_0975</i>	YP_001857210.1	186475740	버크홀데리아 피마툼

[0321]

다른 적합한 후보 효소는, 베타-케토아디필-CoA를 숙시닐-CoA 및 아세틸-CoA로 변환하며, 방향족 화합물 분해를 위한 베타-케토아디페이트 경로의 주된 효소인, 3-옥소아디필-CoA 티올라제 (EC 2.3.1.174)이다. 이 효소는 슈도모나스 푸티다 (Harwood et al., *J Bacteriol.* 176:6479-6488 (1994)) 및 액시네토박터 칼코아세티쿠스 (Doten et al., *J Bacteriol.* 169:3168-3174 (1987))를 비롯한 토양 세균과 진균들에 널리 분포되어 있다. 슈도모나스 strain B13 *pcaF* (Kaschabek et al., *J Bacteriol.* 184:207-215 (2002)), 슈도모나스 푸티다 *U phaD* (Olivera et al., *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998)), 슈도모나스 플루오레센스 *ST paaE* (Di et al., *Arch.Microbiol* 188:117-125 (2007)), 및 에스케리키아 콜라이 *paaJ* (Nogales et al., *Microbiology* 153:357-365 (2007))에 의해 코딩된 유전자 산물들은 또한 이러한 변환을 촉매한다. 슈도모나스 푸티다의 *bkt*, 슈도모나스 에우루지노사 *PAO1*의 *pcaF* 및 *bkt*, 버크홀데리아 엠비파리아의 *AMMD bkt*, 에스케리키아 콜라이의 *paaJ*, 및 슈도모나스 푸티다의 *phaD* 등의 수종의 베타-케토티올라제가 옥소아디필-CoA를 형성하는 방향으로 유의하며 선택적인 활성을 발휘한다.

표 34

[0322]

유전자명	GI#	유전자은행 등재번호	유기체
<i>paaJ</i>	16129358	NP_415915.1	에스케리키아 콜라이
<i>pcaF</i>	17736947	AAL02407	슈도모나스 낙크무시이 (B13)
<i>phaD</i>	3253200	AAC24332.1	슈도모나스 푸티다
<i>pcaF</i>	506695	AAA85138.1	슈도모나스 푸티다
<i>pcaF</i>	141777	AAC37148.1	액시네토박터 칼코아세티쿠스
<i>paaE</i>	106636097	ABF82237.1	슈도모나스 플루오레센스
<i>bkt</i>	115360515	YP_777652.1	버크홀데리아 엠비파리아 <i>AMMD</i>
<i>bkt</i>	9949744	AAG06977.1	슈도모나스 에우루지노사 <i>PAO1</i>
<i>pcaF</i>	9946065	AAG03617.1	슈도모나스 에우루지노사 <i>PAO1</i>

[0323]

2.3.1.d 포르메이트 C-아실트랜스퍼라제

[0324]

EC 클래스 2.3.1의 포르메이트 C-아실트랜스퍼라제 효소는 케토산의 아실화와 동시적인 포르메이트 해리를 촉매한다. 이러한 효소는 도 1 (단계 R)에서 2-옥소아디페이트의 글루타릴-CoA로의 변환과 도 5의 단계 H에서 4-하이드록시-2-옥소발레레이트의 3-하이드록시부티릴-CoA로의 변환에 적합하다.

[0325]

이 클래스의 효소로는 피루베이트 포르메이트-리아제와 케토산 포르메이트-리아제가 있다. 에스케리키아 콜라이에서 *pf1B*에 의해 코딩된 피루베이트 포르메이트-리아제 (PFL, EC 2.3.1.54)는 피루베이트를 아세틸-CoA와 포르메이트로 변환한다. PFL의 활성부는 *pf1A*에 의해 코딩된 PFL-활성화 효소 (PFL-AE, EC 1.97.1.4)에 의해 혐기 조건에서 번역 후 활성화되는 촉매적으로 필연적인 글리실 라디칼을 함유한다 (Knappe et al., *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 81:1332-1335 (1984); Wong et al., *Biochemistry* 32:14102-14110 (1993)). 케토산 포르메이트-리아제 (EC 2.3.1.-)는 또한 2-케토부티레이트 포르메이트-리아제 (KFL) 및 피루베이트 포르메이트-리아제 4로도 알려져 있으며, 에스케리키아 콜라이에서는 *tdcE*의 유전자 산물이다. 이 효소는 혐기적인 트레오닌 분해 시에 2-케토부티레이트의 프로피오닐-CoA와 포르메이트로의 변환을 촉매하며, 또한 혐기적인 이화작용에서 피루베이트 포르메이트-리아제를 대체할 수 있다 (Simanshu et al., *J Biosci.* 32:1195-1206 (2007)). 이 효소는 산소에 민감하며, Pf1B와 마찬가지로, 활성부의 글리실 라디칼을 활성화하기 위해 PFL-AE에

의한 번역 후 수정을 필요로 한다 (Hesslinger et al., *Mol. Microbiol.* 27:477-492 (1998)). *pflD*에 의해 코딩되는 아르카에글루부스 풀기두스 유래 피루베이트 포르메이트-리아제가 클로닝되어 에스케리키아 콜라이에서 발현되었으며, 특정화되었다 (Lehtio et al., *Protein Eng Des Sel* 17:545-552 (2004)). 아르카에글루부스 풀기두스 및 에스케리키아 콜라이의 효소들의 결정 구조들이 해명되었다 (Lehtio et al., *J Mol. Biol.* 357:221-235 (2006); Leppanen et al., *Structure.* 7:733-744 (1999)). 추가적인 PFL 및 PFL-AE 후보들은 락토코커스 락티스 (Melchiorson et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 58:338-344 (2002)), 스트렙토코커스 무탄스 (Takahashi-Abbe et al., *경구. Microbiol Immunol.* 18:293-297 (2003)), 클라미도모나스 라인하르트티이 (Hemschemeier et al., *Eukaryot. Cell* 7:518-526 (2008b); Atteia et al., *J. Biol. Chem.* 281:9909-9918 (2006)) 및 클로스트리듐 파스테우리아눔 (Weidner et al., *J Bacteriol.* 178:2440-2444 (1996))에서 발견된다.

표 35

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>pflB</i>	NP_415423	16128870	에스케리키아 콜라이
<i>pflA</i>	NP_415422.1	16128869	에스케리키아 콜라이
<i>tdcE</i>	AAT48170.1	48994926	에스케리키아 콜라이
<i>pflD</i>	NP_070278.1	11499044	아르카에글루부스 풀기두스
<i>pfl</i>	CAA03993	2407931	락토코커스 락티스
<i>pfl</i>	BAA09085	1129082	스트렙토코커스 무탄스
<i>PFL1</i>	XP_001689719.1	159462978	클라미도모나스 라인하르트티이
<i>pflA1</i>	XP_001700657.1	159485246	클라미도모나스 라인하르트티이
<i>pfl</i>	Q46266.1	2500058	클로스트리듐 파스테우리아눔
<i>act</i>	CAA63749.1	1072362	클로스트리듐 파스테우리아눔

2.3.1.h 3-옥소아실-CoA 신타제

아세트아세틸-CoA, 3-옥소펜타노일-CoA, 3-옥소-5-하이드록시펜타노일-CoA 등의 3-옥소아실-CoA 산물들은 3-옥소아실-CoA 신타제 (단계 2A, 3A, 4A, 7AS)에 의해 아실-CoA 및 말로날-CoA 기질로부터 합성될 수 있다. 이 클래스의 효소들은 필연적으로 비가역적인 반응을 촉매하므로, 이는 대사산물, 연료 또는 아세트아세틸-CoA와 같은 3-옥소아실-CoA 중간 산물로부터 유래된 화학제를 파다 생산하기 위한 대사 조작 용도에 특히 유용하다. 예를 들어, 아세트아세틸-CoA 신타제는 부탄올 (Lan et al, *PNAS USA* (2012))와 폴리-(3-하이드록시부티레이트) (Matsumoto et al, *Biosci Biotech Biochem.* 75:364-366 (2011))를 생합성하는 유기체에서 이중적으로 발현시킨 바 있다. 아세트아세틸-CoA 신타제 (EC 2.3.1.194) 효소 (FhsA)는 토양 박테리아인 스트렙토마이세스 sp. CL190에서 특정되었으며, 이는 메발로네이트 생합성에 참여한다 (Okamura et al, *PNAS USA* 107:11265-70 (2010)). 그외 아세트아세틸-CoA 신타제 유전자들도 *fhsA*에 대한 서열 상동성을 통해 동정할 수 있다.

표 36

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fhsA</i>	BAJ83474.1	325302227	스트렙토마이세스 sp. CL190
<i>AB183750.1:11991..12971</i>	BAD86806.1	57753876	스트렙토마이세스 sp. K0-3988
<i>epzT</i>	ADQ43379.1	312190954	스트렙토마이세스 시나모넨시스
<i>ppzT</i>	CAX48662.1	238623523	스트렙토마이세스 아놀라투스
<i>03L_22085</i>	ZP_09840373.1	378817444	노카르디아 브라실리엔시스

2.6.1.a 아미노트랜스퍼라제

아미노트랜스퍼라제는 아미노기를 알데하이드 또는 케톤으로 가역적으로 변환한다. 알데하이드를 1차 아민으로 변환하는 효소의 예로는, 라이신-6-아미노트랜스퍼라제 (EC 2.6.1.36), 5-아미노발레레이트 아미노트랜스퍼라제 (EC 2.6.1.48), 감마-아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 및 디아민 아미노트랜스퍼라제, 예를 들어, 푸트레신 아미노트랜스퍼라제 (EC 2.6.1.82 및 2.6.1.29)를 포함한다. 이들 효소들은 도 1의 단계 C와 I를 촉매하는데 적합하다. 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제와 유사 효소들은 아미노산을 이의 대응되는 2-케토산으로 변환한다. 아미노산 아미노트랜스퍼라제는 2-옥소아디페이트와 2-아미노아디페이트를 상호 변환시키는데 적합한

후보 효소이다 (단계 H, 도 1).

- [0332] 라이신-6-아미노트랜스퍼라제 (EC 2.6.1.36)는 라이신을 알파-아미노아디페이트 세미알데하이드로 변환하며, 효모와 박테리아에서 특정되었다. 칸디다 유틸리스 (Hammer et al., *J Basic Microbiol* 32:21-27 (1992)), 플라보박테리움 루테센스 (Fujii et al., *J Biochem.* 128:391-397 (2000)) 및 스트렙토마이세스 클라볼리게누스 (Romero et al., *J Ind.Microbiol Biotechnol* 18:241-246 (1997))로부터 후보 효소들이 특정되었다. 스트렙토마이세스 클라볼리게누스로부터 유래된 재조합 라이신-6-아미노트랜스퍼라제는 에스케리키아 콜라이에서 기능적으로 발현되었다 (Tobin et al., *J Bacteriol.* 173:6223-6229 (1991)). 플라보박테리움 루테센스의 효소는 아미노 어셉터로서 알파-케토글루타레이트에 특이적이다 (Soda et al., *Biochemistry* 7:4110-4119 (1968)). 관련 효소인 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 (EC 2.6.1.46 and EC 2.6.1.76)는 액시네토박터 바우마니이와 헤모필러스 인플루엔자에서 *dat* 유전자 산물에 의해 코딩된다 (Ikai et al., *J Bacteriol.* 179:5118-5125 (1997); Ikai et al., *Biol Pharm.Bull.* 21:170-173 (1998)). 액시네토박터 바우마니이의 DAT는, 이의 천연 기질인 2,4-디아미노부티레이트 외에도, 라이신, 4-아미노부티레이트 및 오르니틴의 말단 아민을 전달한다. 추가적인 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제의 후보 유전자로는 마리노코커스 할로필러스와 할로바실러스 다바넨시스의 *ectB* 유전자 산물 (Zhao et al., *Curr Microbiol* 53:183-188 (2006); Louis et al., *Microbiology* 143 (Pt 4):1141-1149 (1997)) 및 슈도모나스 에우루지노사의 *pvdH* 유전자 산물 (Vandenende et al., *J Bacteriol.* 186:5596-5602 (2004))이 있다. 또한, 슈도모나스 플루오레센스의 베타-알라닌 아미노트랜스퍼라제는 기질로서 2,4-디아미노부티레이트를 수용하지만 (Hayaishi et al., *J Biol Chem* 236:781-790 (1961)); 이의 활성화는 지금까지 유전자와 연관시키지 못하였다.

표 37

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>lat</i>	BAB13756.1	10336502	플라보박테리움 루테센스
<i>lat</i>	AAA26777.1	153343	스트렙토마이세스 클라볼리게누스
<i>dat</i>	P56744.1	6685373	액시네토박터 바우마니이
<i>dat</i>	P44951.1	1175339	헤모필러스 인플루엔자
<i>ectB</i>	AAB57634.1	2098609	마리노코커스 할로필러스
<i>ectB</i>	AAZ57191.1	71979940	할로바실러스 다바넨시스
<i>pvdH</i>	AAG05801.1	9948457	슈도모나스 에우루지노사

- [0334] 또한, 알데하이드의 말단 아민으로의 변환은 감마-아미노부티레이트 (GABA) 트랜스아미나제 (EC 2.6.1.19) 또는 5-아미노발레레이트 트랜스아미나제에 의해 촉매될 수 있다. GABA 아미노트랜스퍼라제는 숙시닉 세미알데하이드와 글루타메이트를 4-아미노부티레이트와 알파-케토글루타레이트로 상호 변환하며, 광범위한 기질 범위를 가지는 것으로 알려져 있다 (Schulz et al., 56:1-6 (1990); Liu et al., 43:10896-10905 (2004)). 에스케리키아 콜라이에서 2개의 GABA 트랜스아미나제 효소들은 *gabT* (Bartsch et al., *J Bacteriol.* 172:7035-7042 (1990))와 *puuE* (Kurihara et al., *J.Biol.Chem.* 280:4602-4608 (2005))에 의해 코딩된다. 또한, 무스 무스쿨루스와 수스 스크로파에서는 GABA 트랜스아미나제가 6-아미노카프로산 등의 대안 기질의 아미노기 전달을 촉매한다 (Cooper, *Methods Enzymol.* 113:80-82 (1985)). 5-아미노발레레이트 아미노트랜스퍼라제 (EC 2.6.1.48)는 라이신이 분해되는 동안 5-아미노발레레이트를 5-옥소발레레이트로 변환한다. 이 효소는 슈도모나스 푸티다 *davT* (Espinosa-Urgel et al, *Appl Env Microbiol.* 67:5219-24 (2001))와 슈도모나스 에우루지노사 *PA0266* (Yamanishi et al, *FEBS J.* 274:2262-73 (2007))에 의해 코딩된다. 클로스트리듐 아미노발레리쿰으로부터 5-아미노발레레이트 아미노트랜스퍼라제가 정제되고 특정화되었지만, 서열은 아직까지 공개되지 않았다 (Barker et al, *J Biol Chem.* 262:8994-9003 (1987)).

표 38

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>gabT</i>	NP_417148.1	16130576	에스케리키아 콜라이
<i>puuE</i>	NP_415818.1	16129263	에스케리키아 콜라이
<i>Abat</i>	NP_766549.2	37202121	무스 무스쿨루스
<i>gabT</i>	YP_257332.1	70733692	슈도모나스 플루오레센스
<i>Abat</i>	NP_999428.1	47523600	수스 스크로파

<i>davT</i>	AAK97868.1	15428718	슈도모나스 푸티다
PA0266	NP_248957.1	15595463	슈도모나스 에우루지노사

[0336]

푸트레신 아미노트랜스퍼라제 (EC 2.6.1.82)와 기타 디아민 아미노트랜스퍼라제 (EC 2.6.1.29)는 또한 알데하이드 화합물과 일차 아민 화합물 간의 상호 변환을 촉매한다. 에스케리키아 콜라이의 푸트레신 아미노트랜스퍼라제는 *ygjG* 유전자에 의해 코딩되며, 정제된 효소는 대안 기질인 카다베린, 스페르미딘 및 1,7-디아미노헵탄에 아미노기를 전달한다 (Samsonova et al., *BMC.Microbiol* 3:2 (2003)). 2-옥소글루타레이트 (예, 피루베이트, 2-옥소부타노에이트) 이외의 아미노 어셉터를 가진 이 효소의 활성이 보고되었다 (Samsonova et al., *BMC.Microbiol* 3:2 (2003); KIM, *J Biol.Chem.* 239:783-786 (1964)). 다른 푸트레신 아미노트랜스퍼라제 효소는 슈도모나스 에우루지노사의 *spuC* 유전자에 의해 코딩된다 (Lu et al., *J Bacteriol.* 184:3765-3773 (2002)).

표 39

[0337]

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>ygjG</i>	NP_417544	145698310	에스케리키아 콜라이
<i>spuC</i>	AAG03688	9946143	슈도모나스 에우루지노사

[0338]

몇몇 아미노트랜스퍼라제는 아미노산 그룹의 아미노기를 이동시켜, 2-옥소산을 형성시킨다. 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제는 옥살로아세테이트에서 글루타메이트로 옥소기를 천연적으로 전달하여, 알파-케토글루타레이트와 아스파르테이트를 형성하는 효소이다. 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 활성은, 예를 들어, 에스케리키아 콜라이의 *aspC* (Yagi et al., 100:81-84 (1979); Yagi et al., 113:83-89 (1985)), 사카로마이세스 세레비지에의 *AAT2* (Yagi et al., 92:35-43 (1982)) 및 아라비도시스 탈리아나의 *ASP5* (Kwok et al., 55:595-604 (2004); de la et al., 46:414-425 (2006); Wilkie et al., *Protein Expr.Purif.* 12:381-389 (1998))로부터 유래된 유전자 산물에 의해 촉매된다. 라투스 노르베기쿠스로부터 유래된 효소는 2-아미노헥산디오익산과 2,4-디아미노부티르산과 같은 대안 기질에 아미노기를 전달하는 것으로 확인되었다 (Recasens et al., *Biochemistry* 19:4583-4589 (1980)). 또한, 다른 아미노-산 기질에 작용하는 아미노트랜스퍼라제도 이러한 변환을 촉매할 수 있을 수 있다. 발린 아미노트랜스퍼라제는 발린과 피루베이트를 2-케토이소발레레이트와 알라닌으로 변환하는 과정을 촉매한다. 에스케리키아 콜라이 유전자인 *avtA*는 이러한 효소를 코딩한다 (Whalen et al., *J.Bacteriol.* 150:739-746 (1982)). 또한, 이 유전자 산물은 알파-케토부티레이트의 아미노기 전달을 촉매하여 알파-아미노부티레이트를 형성하지만, 이 반응에서 아민 공여체는 규명되지 않았다 (Whalen et al., *J.Bacteriol.* 158:571-574 (1984)). 에스케리키아 콜라이 *serC*의 유전자 산물은 2가지 반응, 포스포세린 아미노트랜스퍼라제 및 포스포하이드록시트레오닌 아미노트랜스퍼라제를 촉매하며 (Lam et al., *J.Bacteriol.* 172:6518-6528 (1990)), 비-인산화된 기질에 대한 활성은 검출할 수 없었다 (Drewke et al., *FEBS.Lett.* 390:179-182 (1996)). 다른 효소 후보는, 일부 유기체에서 라이신 생합성과 분해에 참여하는 효소인 알파-아미노아디페이트 아미노트랜스퍼라제 (EC 2.6.1.39)이다. 이 효소는 아미노 어셉터로서 알파-케토글루타레이트를 이용하여 2-아미노아디페이트와 2-옥소아디페이트를 상호 변환한다. 유전자 후보는 호모 사피엔스 (Okuno et al., *Enzyme protein* 47:136-148 (1993))와 서머스 서모필러스 (Miyazaki et al., *Microbiology* 150:2327-2334 (2004))에서 발견된다. *lysN*에 의해 코딩되는 서머스 서모필러스의 효소는 옥살로아세테이트, 2-옥소이소카프로에이트, 2-옥소이소발레레이트 및 2-옥소-3-메틸발레레이트 등의 수종의 대안 기질에 대해 활성을 나타낸다.

표 40

[0339]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>aspC</i>	NP_415448.1	16128895	에스케리키아 콜라이
<i>AAT2</i>	P23542.3	1703040	사카로마이세스 세레비지에
<i>ASP5</i>	P46248.2	20532373	아라비도시스 탈리아나
<i>got2</i>	P00507	112987	라투스 노르베기쿠스
<i>avtA</i>	YP_026231.1	49176374	에스케리키아 콜라이
<i>lysN</i>	BAC76939.1	31096548	서머스 서모필러스
<i>AadAT-II</i>	Q8N5Z0.2	46395904	호모 사피엔스

[0340] **2.7.2.a 포스포트랜스퍼라제 (키나제)**

[0341] EC 클래스 2.7.2의 키나제 또는 포스포트랜스퍼라제 효소들은 ATP 하나를 동시에 가수분해하면서 카르복실산을 포스포산에 이동시킨다. 2,4-펜타디에노에이트 키나제 활성을 가진 효소는 도 6의 단계 H에서 요구된다. 후보 효소의 예로는 부티레이트 키나제 (EC 2.7.2.7), 이소부티레이트 키나제 (EC 2.7.2.14), 아스파르토키나제 (EC 2.7.2.4), 아세테이트 키나제 (EC 2.7.2.1) 및 글리세레이트 키나제를 포함한다. 부티레이트 키나제는 클로스트리디아 종들에서 산생성 동안에 부티릴-포스페이트의 부티레이트로의 가역적인 변환을 촉매한다 (Cary et al., *Appl Environ Microbiol* 56:1576-1583 (1990)). 클로스트리듐 아세토부틸리컴의 효소는 2개의 *buk* 유전자 산물들 중 어느 하나에 의해 코딩된다 (Huang et al., *J Mol.Microbiol Biotechnol* 2:33-38 (2000)). 다른 부티레이트 키나제 효소들은 클로스트리듐 부틸리컴과 클로스트리듐 테타노모르폼에서 발견된다 (Twarog et al., *J Bacteriol.* 86:112-117 (1963)). 서모토가 마리티마로부터 유래된, 관련 효소인, 이소부티레이트 키나제는 에스케리키아 콜라이에서 발현되었으며, 결정 구조가 규명되었다 (Diao et al., *J Bacteriol.* 191:2521-2529 (2009); Diao et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 59:1100-1102 (2003)). 아스파르토키나제는 아스파르테이트의 ATP-의존적인 인산화를 촉매하며, 수 종의 아미노산들의 합성에 참여한다. 에스케리키아 콜라이에서 *lysC*에 코딩된 아스파르토키나제 III 효소는 광범위한 기질 범위를 가지며, 기질 특이성에 참여하는 촉매 잔기들이 해명되었다 (Keng et al., *Arch Biochem Biophys* 335:73-81 (1996)). 또한, 에스케리키아 콜라이에서의 2종의 추가적인 키나제는 아세테이트 키나제와 감마-글루타밀 키나제이다. *ackA*에 코딩된 에스케리키아 콜라이의 아세테이트 키나제 (Skarstedt et al., *J.Biol.Chem.* 251:6775-6783 (1976))는 아세테이트 외에도 프로피오네이트를 인산화한다 (Hesslinger et al., *Mol.Microbiol* 27:477-492 (1998)). *proB*에 코딩된 에스케리키아 콜라이의 감마-글루타밀 키나제 (Smith et al., *J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984))는 글루타메이트의 감마 탄산기를 인산화한다.

표 41

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>buk1</i>	NP_349675	15896326	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>buk2</i>	Q97II1	20137415	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>buk2</i>	Q9X278.1	6685256	서모토가 마리티마
<i>lysC</i>	NP_418448.1	16131850	에스케리키아 콜라이
<i>ackA</i>	NP_416799.1	16130231	에스케리키아 콜라이
<i>proB</i>	NP_414777.1	16128228	에스케리키아 콜라이

[0343] 글리세레이트 키나제 (EC 2.7.1.31)는 글리세레이트를 글리세레이트-2-포스페이트 또는 글리세레이트-3-포스페이트로 활성화한다. 3가지 클래스의 글리세레이트 키나제들이 동정되었다. 클래스 I과 II의 효소들은 글리세레이트-2-포스페이트를 생성하는데 반해, 클래스 III의 효소는 식물과 효모에서 발견되며 글리세레이트-3-포스페이트를 생성한다 (Bartsch et al., *FEBS Lett.* 582:3025-3028 (2008)). 최근 연구에서, 사카로마이세스 세레비지에, 오리자 사티바 및 아라비도시스 탈리아나로부터 유래된 클래스 III의 글리세레이트 키나제 효소들이 에스케리키아 콜라이에서 이종적으로 발현되었으며, 특정화되었다 (Bartsch et al., *FEBS Lett.* 582:3025-3028 (2008)). 또한, 본 연구에서는 에스케리키아 콜라이의 *glxK* 유전자 산물에 대해 글리세레이트-3-포스페이트 생성 능력을 분석하였으며, 이 효소가 이전 연구에서는 대조적으로 글리세레이트-2-포스페이트의 형성을 유일하게 촉매할 수 있다는 것을 확인하였다 (Doughty et al., *J Biol.Chem.* 241:568-572 (1966)).

표 42

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>glxK</i>	AAC73616.1	1786724	에스케리키아 콜라이
YGR205W	AAS56599.1	45270436	사카로마이세스 세레비지에
<i>Os01g0682500</i>	BAF05800.1	113533417	오리자 사티바
<i>At1g80380</i>	BAH57057.1	227204411	아라비도시스 탈리아나

[0345] **2.8.3.a CoA 트랜스퍼라제**

[0346] 2.8.3 패밀리의 효소들은 CoA 모이어티를 한 분자에서 다른 분자로 가역적으로 전달하는 과정을 촉매한다. 이러한 변환은 도 1의 단계 L, P 및 O, 도 3의 단계 F, 도 4의 단계 B, 도 5의 단계 J 및 도 6의 단계 F에서 요구된다. 수종의 CoA 트랜스퍼라제 효소들이 공개된 문헌들에 기술되어 있으며, 이들 단계들에 적합한 후보 효소들이 제시되어 있다. 이는 하기에 기술된다.

[0347] 다수의 트랜스퍼라제들은 특이성이 넓어, 특히 아세테이트, 숙시네이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 2-메틸아세토아세테이트, 3-케토희사노에이트, 3-케토판타노에이트, 발레레이트, 크로토네이트, 3-머캅토프로피오네이트, 프로피오네이트, 비닐아세테이트, 부티레이트와 같이 다양한 CoA 어셉터를 이용할 수 있다. 예를 들어, 로세부리아 sp. A2-183로부터 유래된 효소는 부티릴-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제 및 프로피오닐-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제 활성을 가지는 것으로 입증되었다 (Charrier et al., *Microbiology* 152, 179-185 (2006)). 예를 들어, 로세부리아 인테스티날리스 L1-82, 로세부리아 이눌리니보란스 DSM 16841, 유박테리움 렉탈 ATCC 33656에서 밀접한 상동체를 발견할 수 있다. 클로스트리듐 프로피오니컴에서 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 활성을 가진 다른 효소를 발견할 수 있다 (Selmer et al., *Eur J Biochem* 269, 372-380 (2002)). 이 효소는 CoA 어셉터로서 아세테이트, (R)-락테이트, (S)-락테이트, 아크릴레이트 및 부티레이트를 이용할 수 있다 (Selmer et al., *Eur J Biochem* 269, 372-380 (2002); Schweiger and Buckel, *FEBS Letters*, 171(1) 79-84 (1984)). 예컨대, 클로스트리듐 노비이 NT, 클로스트리듐 베이예린키 NCIMB 8052, 및 클로스트리듐 보톨리눔 C str. Eklund에서 밀접한 상동체들을 발견할 수 있다. *YgfH*는 에스케리키아 콜라이에서 프로피오닐 CoA:숙시네이트 CoA 트랜스퍼라제를 코딩한다 (Haller et al., *Biochemistry*, 39(16) 4622-4629). 예컨대, 시트로박터 용게이 ATCC 29220, 살모넬라 엔테리카 아종 아리조나 세로바 및 예르시니아 인터메디아 ATCC 29909에서 밀접한 상동체들을 발견할 수 있다. 이들 단백질들은 아래에서 확인된다.

표 43

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>Ach1</i>	AAX19660.1	60396828	로세부리아 sp. A2-183
<i>ROSINTL182_07121</i>	ZP_04743841.2	257413684	로세부리아 인테스티날리스 L1-82
<i>ROSEINA2194_03642</i>	ZP_03755203.1	225377982	로세부리아 이눌리니보란스
<i>EUBREC_3075</i>	YP_002938937.1	238925420	유박테리움 렉탈 ATCC 33656
<i>Pct</i>	CAB77207.1	7242549	클로스트리듐 프로피오니컴
<i>NT01CX_2372</i>	YP_878445.1	118444712	클로스트리듐 노비이 NT
<i>Cbei_4543</i>	YP_001311608.1	150019354	클로스트리듐 베이예린키
<i>CBC_A0889</i>	ZP_02621218.1	168186583	클로스트리듐 보톨리눔 C str. Eklund
<i>ygfH</i>	NP_417395.1	16130821	에스케리키아 콜라이
<i>CIT292_04485</i>	ZP_03838384.1	227334728	시트로박터 용게이 ATCC 29220
<i>SARI_04582</i>	YP_001573497.1	161506385	살모넬라 엔테리카 아종 아리조나 세로바
<i>yinte0001_14430</i>	ZP_04635364.1	238791727	예르시니아 인터메디아 ATCC 29909

[0349] 추가적인 후보 효소는 3-옥소아디필-CoA/숙시네이트 트랜스퍼라제 활성을 가진 것으로 입증된, 슈도모나스의 *pcaI* 및 *pcaJ*에 코딩된 2-유닛 효소이다 (Kaschabek et al., *supra*). 상동성을 토대로 유사한 효소들은 액시네토박터 sp. ADP1 (Kowalchuk et al., *Gene* 146:23-30 (1994))과 스트렙토마이세스 코엘리콜러에 존재한다. 헬리코박터 필로리 (Corthesy-Theulaz et al., *J.Biol.Chem.* 272:25659-25667 (1997))와 바실러스 썩틸리스 (Stols et al., *Protein.Expr.Purif.* 53:396-403 (2007))에 다른 숙시닐-CoA:3-옥소산-CoA 트랜스퍼라제의 예가 존재한다. 이들 단백질을 아래에 나타낸다.

표 44

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>pcaI</i>	AAN69545.1	24985644	슈도모나스 푸티다
<i>pcaJ</i>	NP_746082.1	26990657	슈도모나스 푸티다
<i>pcaI</i>	YP_046368.1	50084858	액시네토박터 sp. ADP1
<i>pcaJ</i>	AAC37147.1	141776	액시네토박터 sp. ADP1

<i>pcaI</i>	NP_630776.1	21224997	스트렙토마이세스 코엘리콜러
<i>pcaJ</i>	NP_630775.1	21224996	스트렙토마이세스 코엘리콜러
<i>HPAG1_0676</i>	YP_627417	108563101	헬리코박터 필로리
<i>HPAG1_0677</i>	YP_627418	108563102	헬리코박터 필로리
<i>ScoA</i>	NP_391778	16080950	바실러스 섭틸리스
<i>ScoB</i>	NP_391777	16080949	바실러스 섭틸리스

- [0351] CoA 어셈블로서 아세테이트를 이용할 수 있는 CoA 트랜스퍼라제는 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제이며, 이는 에스케리키아 콜라이의 *atoA* (알파 서브유닛)와 *atoD* (베타 서브유닛) 유전자에 코딩되어 있다 (Vanderwinkel et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 33:902-908 (1968); Korolev et al., *Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002)). 또한, 이 효소는 이소부티레이트 (Matthies et al., *Appl Environ Microbiol* 58:1435-1439 (1992)), 발레레이트 (Vanderwinkel et al., *supra*) 및 부타노에이트 (Vanderwinkel et al., *supra*)를 비롯하여 다양한 분지형 및 선형 아실-CoA 기질로부터 아세테이트로 CoA 모이어티를 전달하는 것으로 입증되었다. 코리네박테리움 글루타미컴 ATCC 13032 (Duncan et al., *Appl Environ Microbiol* 68:5186-5190 (2002)), 클로스트리듐 아세토부틸리컴 (Cary et al., *Appl Environ Microbiol* 56:1576-1583 (1990)), 및 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴 (Kosaka et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007))에 유사한 효소들이 존재한다. 이들 단백질은 아래에 나타낸다.

표 45

[0352]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>atoA</i>	P76459.1	2492994	에스케리키아 콜라이 K12
<i>atoD</i>	P76458.1	2492990	에스케리키아 콜라이 K12
<i>actA</i>	YP_226809.1	62391407	코리네박테리움 글루타미컴 ATCC 13032
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	62389399	코리네박테리움 글루타미컴 ATCC 13032
<i>ctfA</i>	NP_149326.1	15004866	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>ctfB</i>	NP_149327.1	15004867	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>ctfA</i>	AAP42564.1	31075384	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴
<i>ctfB</i>	AAP42565.1	31075385	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니컴

- [0353] 추가적인 트랜스퍼라제 후보의 예들은 각각 숙시닐-CoA, 4-하이드록시부틸-CoA, 및 부틸-CoA 트랜스퍼라제 활성을 발휘하는 것으로 입증된, 클로스트리듐 클루이베리의 *cat1*, *cat2* 및 *cat3* 유전자 산물들에 의해 촉매된다 (Seedorf et al., *supra*; Sohling et al., *Eur.J Biochem.* 212:121-127 (1993); Sohling et al., *J Bacteriol.* 178:871-880 (1996)). 비슷한 CoA 트랜스퍼라제 활성들은 또한 트리코모나스 바기날리스 (van Grinsven et al., *J.Biol.Chem.* 283:1411-1418 (2008))와 트리파노소마 브루세이 (Riviere et al., *J.Biol.Chem.* 279:45337-45346 (2004))에도 존재한다. 이들 단백질은 아래에 나타낸다.

표 46

[0354]

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

- [0355] 혐기성 박테리아인 액시드아미노코쿠스 퍼멘탄스로부터 유래된 글루타코네이트-CoA-트랜스퍼라제 (EC 2.8.3.12) 효소는 2산 글루타코닐-CoA 및 3-부테노일-CoA와 반응한다 (Mack et al., *FEBS Lett.* 405:209-212 (1997)). 이 효소를 코딩하는 유전자가 *gctA*와 *gctB*이다. 이 효소는 글루타릴-CoA, 2-하이드록시글루타릴-CoA, 아디필-CoA 및 아크릴릴-CoA 등의 다른 CoA 유도체와 감소되었지만 검출가능한 수준의 활성을 가진다 (Buckel et al., *Eur.J.Biochem.* 118:315-321 (1981)). 이 효소는 클로닝되었으며, 에스케리키아 콜라이에서 발현되었다 (Mack

et al., *Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). 이들 단백질은 아래에 나타낸다.

표 47

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>gctA</i>	CAA57199.1	559392	엑시드아미노코커스 퍼멘탄스
<i>gctB</i>	CAA57200.1	559393	엑시드아미노코커스 퍼멘탄스

3.1.2.a CoA 하이드롤라제

3.1.2 패밀리의 효소들은 아실-CoA 분자를 이의 대응되는 산으로 가수분해한다. 이러한 변환은 도 1의 단계 0, 도 3의 단계 F, 도 4의 단계 B, 도 5의 단계 J 및 단계 6의 단계 F에 요구된다. 이러한 효소 수종이 문헌에 기술되어 있으며, 이들 단계에 적합한 후보 효소들이 제시되어 있다.

예를 들어, 라투스 노르베기쿠스의 뇌로부터 유래된 *acot12*에 코딩된 효소 (Robinson et al., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 71:959-965 (1976))는 부티릴-CoA, 헥사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응할 수 있다. *acot8*에 코딩된 인간 디카복실산티오에스테라제는 글루타릴-CoA, 아디팔-CoA, 서베릴-CoA, 세바실-CoA 및 도데칸디오일-CoA에 대해 활성을 나타낸다 (Westin et al., *J.Biol.Chem.* 280:38125-38132 (2005)). 이 효소와 가장 근접한 에스케리키아 콜라이 상동체는 *tesB*로서, 이것 역시 다양한 CoA 티올에스테르 화합물들을 가수분해할 수 있다 (Naggert et al., *J Biol Chem* 266:11044-11050 (1991)). 유사 효소는 또한 랫의 간에서도 특정되었다 (Deana R., *Biochem Int* 26:767-773 (1992)). 에스케리키아 콜라이에서 하이드롤라제 활성을 가진 다른 효소로는 *ybgC*, *paaI*, 및 *ybdB*를 포함한다 (Kuznetsova, et al., *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(2):263-279; Song et al., *J Biol Chem*, 2006, 281(16):11028-38). 이 서열은 보고되지 않았지만, 완두콩 잎의 미토콘드리아로부터 유래된 효소가 광범위한 기질 특이성을 가지며, 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 팔미토일-CoA, 올레오일-CoA, 숙시닐-CoA 및 크로토닐-CoA에 대해 입증된 활성을 가진다 (Zeihner et al., *Plant.Physiol.* 94:20-27 (1990)). 사카로마이세스 세레비지에로부터 유래된 아세틸-CoA 하이드롤라제, *ACH1*은 또 다른 하이드롤라제 후보 효소이다 (Buu et al., *J.Biol.Chem.* 278:17203-17209 (2003)).

표 48

단백질	유전자은행 등재번호	GI#	유기체
<i>acot12</i>	NP_570103.1	18543355	라투스 노르베기쿠스
<i>tesB</i>	NP_414986	16128437	에스케리키아 콜라이
<i>acot8</i>	CAA15502	3191970	호모 사피엔스
<i>acot8</i>	NP_570112	51036669	라투스 노르베기쿠스
<i>tesA</i>	NP_415027	16128478	에스케리키아 콜라이
<i>ybgC</i>	NP_415264	16128711	에스케리키아 콜라이
<i>paaI</i>	NP_415914	16129357	에스케리키아 콜라이
<i>ybdB</i>	NP_415129	16128580	에스케리키아 콜라이
<i>ACH1</i>	NP_009538	6319456	사카로마이세스 세레비지에

추가적인 하이드롤라제 효소로는, 발린이 분해되는 동안 3-하이드록시이소부티릴-CoA의 3-하이드록시이소부티레이트로의 변환을 효율적으로 촉매하는 것으로 기술된, 3-하이드록시이소부티릴-CoA 하이드롤라제를 포함한다 (Shimomura et al., *J Biol Chem.* 269:14248-14253 (1994)). 이 효소를 코딩하는 유전자로는 라투스 노르베기쿠스 (Shimomura et al., *Methods Enzymol.* 324:229-240 (2000))와 호모 사피엔스 (Shimomura et al., *supra*)의 *hibch*가 있다. 서열 상동성을 통해 사카로마이세스 세레비지에의 *hibch* 및 바실러스 세레우스 *BC_2292* 등의 비슷한 후보 유전자들을 동정할 수 있다.

표 49

단백질	유전자은행 등재번호	GI#	유기체
<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	146324906	라투스 노르베기쿠스
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	146324905	호모 사피엔스
<i>hibch</i>	P28817.2	2506374	사카로마이세스 세레비지에

BC_2292	AP09256	29895975	바실러스 세레우스
---------	---------	----------	-----------

[0363] 또 다른 하이드롤라제 후보 효소는 엑시드아미노코커스 퍼멘탄스의 글루타코네이트 CoA-트랜스퍼라제이다. 이 효소는 글루타릴-CoA, 아세틸-CoA 및 3-부테노일-CoA에 대해 활성을 가진 아실-CoA 하이드롤라제로 부위-특이적인 돌연변이 유발을 도입함으로써 변형되었다 (Mack et al., *FEBS.Lett.* 405:209-212 (1997)). 이는, 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제와 아세토아세틸-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제를 코딩하는 효소들이 이러한 반응 단계의 후보 효소로서 사용할 수 있지만, 이의 기능을 바꾸기 위해 특정 돌연변이가 필요할 것임을 시사한다. *gctA* 유전자와 *gctB* 유전자에 대한 유전자은행 등재 번호들을 위에 열거한다.

[0364] **4.1.1.a 데카르복실라제**

[0365] EC 클래스 4.1.1의 데카르복실라제 효소는 도 1의 단계 A, D, T 및 U, 도 2의 단계 D, 도 4의 단계 C, 도 5의 단계 C 및 F, 및 도 6의 단계 G를 촉매하는데 필요하다.

[0366] 2,4-펜타디에노에이트의 부타디엔로의 탈카르복시화 반응 (도 1의 단계 T, 및 도 6의 단계 G)과 5-하이드록시벤트-2-에노에이트의 3-부텐-1-올로의 탈카르복시화 반응 (도 1의 단계 U)은 에노익산 데카르복실라제 효소들에 의해 촉매된다. 효소의 예는 소르브산 데카르복실라제, 아코니테이트 데카르복실라제, 4-옥살로크로토네이트 데카르복실라제 및 신나메이트 데카르복실라제를 포함한다. 소르브산 데카르복실라제는 소르브산을 1,3-펜타디엔으로 변환한다. 아스퍼질러스 나이거에서의 소르브산 탈카르복시화에는 유전자 3종이 요구된다: *padA1*, *ohbA1* 및 *sdrA* (Plumridge et al. *Fung. Genet. Bio.* 47:683-692 (2010)). *PadA1*은 페닐아크릴산 데카르복실라제로, *ohbA1*은 추정의 4-하이드록시벤조산 데카르복실라제로, *sdrA*는 소르브산 데카르복실라제 조절자로 주석이 첨부된다. 또한, 수종의 진균 및 효모 종들을 비롯하여 다른 종들에서도 소르브산을 탈카르복시화하는 것으로 입증되었다 (Kinderlerler and Hatton, *Food Addit Contam.*, 7(5):657-69 (1990); Casas et al., *Int J Food Micro.*, 94(1):93-96 (2004); Pinches and Apps, *Int. J. Food Microbiol.* 116: 182-185 (2007)). 예컨대, 아스퍼질러스 오리제와 네오사르토르야 피세리는 소르브산을 탈카르복시화하는 것으로 확인되었으며, *padA1*, *ohbA1* 및 *sdrA*와 가까운 상동체를 가진다.

표 50

유전자명	GenBankID	GI 번호	유기체
<i>padA1</i>	XP_001390532.1	145235767	아스퍼질러스 나이거
<i>ohbA1</i>	XP_001390534.1	145235771	아스퍼질러스 나이거
<i>sdrA</i>	XP_001390533.1	145235769	아스퍼질러스 나이거
<i>padA1</i>	XP_001818651.1	169768362	아스퍼질러스 오리제
<i>ohbA1</i>	XP_001818650.1	169768360	아스퍼질러스 오리제
<i>sdrA</i>	XP_001818649.1	169768358	아스퍼질러스 오리제
<i>padA1</i>	XP_001261423.1	119482790	네오사르토르야 피세리
<i>ohbA1</i>	XP_001261424.1	119482792	네오사르토르야 피세리
<i>sdrA</i>	XP_001261422.1	119482788	네오사르토르야 피세리

[0367] 아코니테이트 데카르복실라제 (EC 4.1.1.6)는 칸디다 균주와 또한 필라멘트형 진균인 아스퍼질러스 테레우스에서 이타코네이트 합성의 최종 단계를 촉매한다 (Bonnarme et al. *J Bacteriol.* 177:3573-3578 (1995); Willke and Vorlop, *Appl Microbiol. Biotechnol* 56:289-295 (2001)). *cis*-아코니테이트 데카르복실라제 (CAD) (EC 4.1.16)가 정제되었으며, 아스퍼질러스 테레우스로부터 특정화되었다 (Dwiarti et al., *J. Biosci. Bioeng.* 94(1): 29-33 (2002)). 최근, 유전자가 클로닝되었고, 기능적으로 특정화되었다 (Kanamasa et al., *Appl.Microbiol Biotechnol* 80:223-229 (2008)) 및 (WO/2009/014437). CAD에 대한 밀접한 상동체 수종을 아래에 나열한다 (EP 2017344A1; WO 2009/014437 A1). CAD의 유전자 및 단백질 서열들은 종래에 보고되었으며 (EP 2017344 A1; WO 2009/014437 A1), 하기 표에 수종의 밀접한 상동체들을 열거한다.

표 51

유전자명	GenBankID	GI 번호	유기체
<i>CAD</i>	XP_001209273	115385453	아스퍼질러스 테레우스

	XP_001217495	115402837	아스퍼질러스 테레우스
	XP_001209946	115386810	아스퍼질러스 테레우스
	BAE66063	83775944	아스퍼질러스 오리제
	XP_001393934	145242722	아스퍼질러스 나이거
	XP_391316	46139251	지베렐라 지에
	XP_001389415	145230213	아스퍼질러스 나이거
	XP_001383451	126133853	파키아 스티피티스
	YP_891060	118473159	미코박테리움 스메그마티스
	NP_961187	41408351	미코박테리움 아비움 아종 파라투베르쿨로시스
	YP_880968	118466464	미코박테리움 아비움
	ZP_01648681	119882410	살리넨스포라 아레니콜라

[0370]

신나메이트 (페닐아크릴레이트)와 치환된 신나메이트 유도체의 대응되는 스티렌 유도체로의 변환을 촉매하는 데 카르복실라제의 다른 클래스가 특정화되었다. 이들 효소들은 다양한 유기체들에서 공통적으로, 에스케리키아 콜라이에서 클로닝되고 발현된 이들 효소를 코딩하는 특이적인 유전자들로는 사카로마이세스 세레비지에 *pad 1* (Clausen et al., *Gene* 142:107-112 (1994)), 락토바실러스 플란타룸 *pdC* (Barthelmebs et al., 67:1063-1069 (2001); Qi et al., *Metab Eng* 9:268-276 (2007); Rodriguez et al., *J.Agric.Food Chem.* 56:3068-3072 (2008)), 클렙시엘라 옥시토카 *pofK* (*pad*) (Uchiyama et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 72:116-123 (2008); Hashidoko et al., *Biosci.Biotech.Biochem.* 58:217-218 (1994)), 페디코커스 펜토사세우스 (Barthelmebs et al., 67:1063-1069 (2001)), 바실러스 쉼틸리스 및 바실러스 푸밀루스의 *padC* (Shingler et al., 174:711-724 (1992))가 있다. 또한, 슈도모나스 플루오레센스 유래 페룰릭산 데카르복실라제도 정제 및 특정화되었다 (Huang et al., *J.Bacteriol.* 176:5912-5918 (1994)). 중요하게도, 이 클래스의 효소는 안정적인 것으로 입증되었으며, 외인성 또는 내부 결합형 조인자를 필요로 하지 않아, 이 효소는 생물변환에 이상적으로 적합하다 (Sariaslani, *Annu.Rev.Microbiol.* 61:51-69 (2007)).

표 52

[0371]

단백질	유전자는 ID	GI 번호	유기체
<i>pad1</i>	AAB64980.1	1165293	사카로마이세스 세레비지에
<i>pdC</i>	AAC45282.1	1762616	락토바실러스 플란타룸
<i>pad</i>	BAF65031.1	149941608	클렙시엘라 옥시토카
<i>padC</i>	NP_391320.1	16080493	바실러스 쉼틸리스
<i>pad</i>	YP_804027.1	116492292	페디코커스 펜토사세우스
<i>pad</i>	CAC18719.1	11691810	바실러스 푸밀루스

[0372]

4-옥살로크로노에이트 데카르복실라제는 4-옥살로크로노에이트의 2-옥소펜타노에이트로의 탈카르복시화를 촉매한다. 이 효소는 다수의 유기체들에서 분리되었고, 특정화되었다. 데카르복실라제는 전형적으로 비닐피루베이트 하이드라타제와의 콤플렉스로 기능한다. 이 효소를 코딩하는 유전자로는 슈도모나스 *sp.* (strain 600)의 *dmpH* 및 *dmpE* (Shingler et al., 174:711-724 (1992)), 슈도모나스 푸티다의 *xyIII* 및 *xyIIII* (Kato et al., *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997); Stanley et al., *Biochemistry* 39:3514 (2000); Lian et al., *J.Am.Chem.Soc.* 116:10403-10411 (1994)) 및 랄스토니아 유트로파 *JMP134*의 *Reut_B5691* 및 *Reut_B5692* (Hughes et al., *J Bacteriol*, 158:79-83 (1984))가 있다. 슈도모나스 *sp.* (strain 600) 으로부터 유래된 효소를 코딩하는 유전자가 클로닝되어, 에스케리키아 콜라이에서 발현되었다 (Shingler et al., *J. Bacteriol.* 174:711-724 (1992)). 슈도모나스 푸티다의 *xyII*에 코딩된 4-옥살로크로노에이트 데카르복실라제는 비닐피루베이트 하이드라타제와의 콤플렉스로 기능한다. 하이드라타제 활성이 결여되고 야행성 데카르복실라제 활성을 유지한 이 효소의 재조합 형태가 특정화되었다 (Stanley et al., *Biochem.* 39:718-26 (2000)). 유사 효소는 랄스토니아 픽케티이에서 확인된다 (종래 슈도모나스 픽케티이) (Kukor et al., *J Bacteriol.* 173:4587-94 (1991)).

표 53

[0373]

유전자	유전자는 ID	GI 번호	유기체
<i>dmpH</i>	CAA43228.1	45685	슈도모나스 <i>sp.</i> CF600
<i>dmpE</i>	CAA43225.1	45682	슈도모나스 <i>sp.</i> CF600

<i>xylIII</i>	YP_709328.1	111116444	슈도모나스 푸티다
<i>xylIII</i>	YP_709353.1	111116469	슈도모나스 푸티다
<i>Reut_B5691</i>	YP_299880.1	73539513	탈스토니아 유트로파 <i>JMP134</i>
<i>Reut_B5692</i>	YP_299881.1	73539514	탈스토니아 유트로파 <i>JMP134</i>
<i>xyII</i>	P49155.1	1351446	슈도모나스 푸티다
<i>tbuI</i>	YP_002983475.1	241665116	탈스토니아 픽케티이
<i>nbaG</i>	BAC65309.1	28971626	슈도모나스 플루오레센스 <i>KU-7</i>

- [0374] 2-옥소아디페이트와 같은 2-케토-산의 탈카르복시화 (단계 D, 도 1)는 피루베이트 데카르복실라제 (EC 4.1.1.1), 벤조일포르메이트 데카르복실라제 (EC 4.1.1.7), 알파-케토글루타레이트 데카르복실라제 및 분지쇄 알파-케토산 데카르복실라제 등의 다양한 기질 특이성을 다양한 효소에 의해 촉매된다. 케토-산 데카르복실라제로도 지칭되는 피루베이트 데카르복실라제 (PDC)는 피루베이트의 아세트알데하이드로의 탈카르복시화를 촉매하는, 알코올 발효에 있어 주요 효소이다. 사카로마이세스 세레비지에 유래 효소는 2-케토부티레이트, 2-케토발레레이트, 3-하이드록시피루베이트 및 2-페닐피루베이트 (22)를 비롯한 지방족 2-케토 산 화합물들에 대해 넓은 기질 범위를 가진다. 이 효소는 광범위하게 연구되었으며, 활성 변이를 위해 조작되었고, 에스케리키아 콜라이에서 기능적으로 발현되었다 (Killenberg-Jabs et al., *Eur.J.Biochem.* 268:1698-1704 (2001); Li et al., *Biochemistry.* 38:10004-10012 (1999); ter Schure et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 64:1303-1307 (1998)). 자이모모나스 모빌리스로부터 유래된 *pdC*에 코딩된 PDC 역시 넓은 기질 범위를 가지며, 다른 기질에 대한 친화성을 변형시키기 위한 특이적인 조작 연구의 대상이 되어 왔다 (Siegert et al., *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)). 이 효소의 결정 구조는 이용가능하다 (Killenberg-Jabs et al., *Eur.J.Biochem.* 268:1698-1704 (2001)). 그외 잘-특정화된 PDC 후보 효소로는 아세토박터 파스테우리안스 (Chandra et al., 176:443-451 (2001))와 클루베로마이세스 락티스 (Krieger et al., 269:3256-3263 (2002))로부터 유래된 효소가 있다.

표 54

[0375]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>pdC</i>	P06672.1	118391	자이모모나스 모빌리스
<i>pdC1</i>	P06169	30923172	사카로마이세스 세레비지에
<i>pdC</i>	Q8L388	20385191	아세토박터 파스테우리안스
<i>pdC1</i>	Q12629	52788279	클루베로마이세스 락티스

- [0376] PDC 처럼, 벤조일포르메이트 데카르복실라제 (EC 4.1.1.7)도 넓은 기질 범위를 가지고 있으며, 효소 조작 연구의 타겟이 되고 있다. 슈도모나스 푸티다 유래 효소가 광범위하게 연구되었고, 이 효소의 결정 구조를 이용할 수 있다 (Polovnikova et al., 42:1820-1830 (2003); Hasson et al., 37:9918-9930 (1998)). 슈도모나스 푸티다 유래 효소의 활성 부위에 위치한 잔기 2개에 부위 특이적인 돌연변이를 유발한 바, 천연 및 비-천연 기질에 대한 친화성 (Km)이 변형되었다 (Siegert et al., *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)). 이 효소의 특징들은 특이적인 조작에 의해 더욱 변형되었다 (Lingen et al., *Chembiochem.* 4:721-726 (2003); Lingen et al., *Protein Eng* 15:585-593 (2002)). *mdIC*에 코딩된 슈도모나스 에우루지노사 유래의 효소 역시 실험적으로 특정화되었다 (Barrowman et al., 34:57-60 (1986)). 슈도모나스 스투체리, 슈도모나스 플루오레센스 및 기타 유기체들로부터 유래된 다른 유전자 후보들은 슈도모나스 푸티다에서 개발된 증식 선별 시스템을 이용하여 동정하거나 또는 서열 상동성으로 추론할 수 있다 (Henning et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 72:7510-7517 (2006)).

표 55

[0377]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>mdIC</i>	P20906.2	3915757	슈도모나스 푸티다
<i>mdIC</i>	Q9HUR2.1	81539678	슈도모나스 에우루지노사
<i>dpgB</i>	ABN80423.1	126202187	슈도모나스 스투체리
<i>ilvB-1</i>	YP_260581.1	70730840	슈도모나스 플루오레센스

- [0378] 2-옥소산을 탈카르복시화할 수 있는 3번째 효소는 알파-케토글루타레이트 데카르복실라제 (KGD)이다. 이 효소 클래스의 기질 범위는 지금까지 연구되지 않았다. 미코박테리움 투베르쿨로시스로부터 KDC (Tian et al., 102:10670-10675 (2005))가 클로닝되었으며, 기능적으로 발현되었다. KDC 효소의 활성은 브라디리조비움 자포니쿰 및 메소리조비움 로티 등의 수종의 리조비아에서 검출되었다 (Green et al., 182:2838-2844 (2000)). KDC-코딩 유전자(들)가 이들 유기체들에서 분리되진 않았지만, 계놈 서열들을 입수가능하며, 각 계놈에서 수개의 유전자들이 추정된 KDC로 주석이 달려있다. 또한, 유글레나 그라실리스 유래 KDC도 특정되었지만, 이 활성과 관련된 유전자는 아직까지 규명되지 않았다 (Shigeoka et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 288:22-28 (1991)). N-말단에서 시작해서 처음 20개의 아미노산들은 MTYKAPVKDVKFLDKVFKV (서열번호)로 서열 분석되었다 (Shigeoka and Nakano, *Arch.Biochem.Biophys.* 288:22-28 (1991)). 이 유전자는 KDC 활성을 위한 N-말단 서열을 가진 후보 유전자를 테스트함으로써 동정할 수 있었다.

표 56

[0379]	단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
	kgd	050463.4	160395583	미코박테리움 투베르쿨로시스
	kgd	NP_767092.1	27375563	브라디리조비움 자포니쿰 <i>USDA110</i>
	kgd	NP_105204.1	13473636	메소리조비움 로티

- [0380] 이러한 반응을 촉매하는 4번째 후보 효소는 분지쇄 알파-케토산 데카르복실라제 (BCKA)이다. 이 클래스의 효소는 탄소수 3-6 체인 길이의 다양한 화합물에 작용하는 것으로 입증되었다 (Oku et al., *J Biol Chem.* 263:18386-18396 (1988); Smit et al., *Appl Environ Microbiol* 71:303-311 (2005)). 이 효소는 락토코커스 락티스에서 2-옥소부타노에이트, 2-옥소헥사노에이트, 2-옥소펜타노에이트, 3-메틸-2-옥소부타노에이트, 4-메틸-2-옥소부타노에이트 및 이소카프로에이트 등의 다양한 분지형 및 선형 기질에 대해 특정화되었다 (Smit et al., *Appl Environ Microbiol* 71:303-311 (2005)). 이 효소는 구조적으로 파악되었다 (Berg et al., *Science.* 318:1782-1786 (2007)). 락토코커스 락티스 효소와 자이모모나스 모빌리스의 피루베이트 데카르복실라제 간의 서열 정렬은, 촉매 및 기질 인지 잔기들이 거의 동일한 것으로 나타나 (Siegert et al., *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)), 이 효소는 특이적인 가공에 유망한 후보였다. BCKA에 의한 알파-케토글루타레이트의 탈카르복시화가 바실러스 썩틸리스에서 검출되었지만, 이 활성은 다른 분지쇄 기질에 대한 활성 보다 낮으며 (5%) (Oku and Kaneda, *J Biol Chem.* 263:18386-18396 (1988)), 이 효소를 코딩하는 유전자는 아직까지 규명되지 않았다. 추가적인 BCKA 유전자 후보는 락토코커스 락티스 단백질 서열에 대한 상동성을 통해 동정할 수 있다. 이 효소에 대한 BLASTp 히트 수가 높은 다수는 인돌피루베이트 데카르복실라제 (EC 4.1.1.74)로 주해가 첨부되어 있다. 인돌피루베이트 데카르복실라제 (IPDA)는 식물과 식물 박테리아에서 인돌피루베이트의 인돌아세트알데하이드로의 탈카르복시화를 촉매하는 효소이다. 호모 사피엔스와 보스 타우루스로부터 미토콘드리아 분지쇄 케토산 데하이드로게나제 컴플렉스의 E1 서브유닛들로부터 유래된 재조합 분지쇄 알파-케토산 데카르복실라제 효소가 클로닝되었고, 에스케리키아 콜라이에서 기능적으로 발현되었다 (Davie et al., *J.Biol.Chem.* 267:16601-16606 (1992); Wynn et al., *J.Biol.Chem.* 267:12400-12403 (1992); Wynn et al., *J.Biol.Chem.* 267:1881-1887 (1992)). 이들 연구들에서, 저자들은, 샤페론인 GroEL과 GroES가 데카르복실라제의 비활성을 500배까지 강화한다는 것을 발견하였다 (Wynn et al., *J.Biol.Chem.* 267:12400-12403 (1992)). 이들 효소는 2개의 알파 및 2개의 베타 서브유닛들로 구성된다.

표 57

[0381]	단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
	kdcA	AAS49166.1	44921617	락토코커스 락티스
	BCKDHB	NP_898871.1	34101272	호모 사피엔스
	BCKDHA	NP_000700.1	11386135	호모 사피엔스
	BCKDHB	P21839	115502434	보스 타우루스
	BCKDHA	P11178	129030	보스 타우루스

- [0382] 3-케토산의 탈카르복시화에 적합한 데카르복실라제 효소는 아세토아세테이트 데카르복실라제 (EC 4.1.1.4)이다. *adc*에 코딩된 클로스트리듐 아세토부틸리컴으로부터 유래된 이 효소는 기질 특이성이 넓으며, 2-케토사이클로헥

산 카르복실레이트, 3-옥소펜타노에이트, 2-옥소-3-페닐프로피온산, 2-메틸-3-옥소부티레이트 및 벤조일-아세테이트 등의 수종의 다른 기질들을 탈카르복시화하는 것으로 입증되었다 (Rozzel et al., *J. Am. Chem. Soc.* 106:4937-4941 (1984); Benner and Rozzell, *J. Am. Chem. Soc.* 103:993-994 (1981); Autor et al., *J Biol. Chem.* 245:5214-5222 (1970)). 또한, 아세트아세테이트 데카르복실라제는 클로스트리듐 베이예린키에서도 특정화되었다 (Ravagnani et al., *Mol. Microbiol* 37:1172-1185 (2000)). 바실러스 폴리믹사로부터 유래되며 세포-비함유 추출물에서 특정화된 아세트아세테이트 데카르복실라제 역시 3-케토산 화합물들에 대해 넓은 기질 특이성을 가지며, 3-옥소펜타노에이트를 탈카르복시화할 수 있다 (Matiasek et al., *Curr. Microbiol* 42:276-281 (2001)). 이 효소를 코딩하는 유전자는 아직까지 규명되지 않았고, 바실러스 폴리믹사의 계능 유전자는 아직 이용불가하다. 다른 *adc*가 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니킴에서 발견되었다 (Kosaka, et al., *Biosci. Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007)). 클로스트리듐 보툴리눔과 바실러스 아밀로리케팩시엔스 FZB42 등의 다른 유기체에서도 다른 유전자 후보들이 서열 상동성을 통해 동정될 수 있다.

표 58

[0383]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>adc</i>	NP_149328.1	15004868	클로스트리듐 아세트부틸리킴
<i>adc</i>	AAP42566.1	31075386	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니킴
<i>adc</i>	YP_001310906.1	150018652	클로스트리듐 베이예린키
<i>CLL_A2135</i>	YP_001886324.1	187933144	클로스트리듐 보툴리눔
<i>RBA_M030030</i>	YP_001422565.1	154687404	바실러스 아밀로리케팩시엔스

[0384]

아스파르테이트 데카르복실라제, 라이신 데카르복실라제 및 오르니틴 데카르복실라제를 비롯하여 수많은 특정화된 효소들이 아미노산들과 유사 화합물들을 탈카르복시화한다. 아스파르테이트 데카르복실라제 (EC 4.1.1.11)는 아스파르테이트를 탈카르복시화하여 베타-알라닌을 만든다. 이 효소는 판토테네이트 생합성에 참여하며, 에스케리키아 콜라이에 유전자 *panD*에 코딩된다 (Dusch et al., *Appl. Environ. Microbiol* 65:1530-1539 (1999); Ramjee et al., *Biochem. J* 323 (Pt 3):661-669 (1997); Merkel et al., *FEMS Microbiol Lett.* 143:247-252 (1996); Schmitzberger et al., *EMBO J* 22:6193-6204 (2003)). 미코박테리움 투베르쿨로시스 (Chopra et al., *Protein Expr. Purif.* 25:533-540 (2002))와 코리네박테리움 글루타니쿰 (Dusch et al., *Appl. Environ. Microbiol* 65:1530-1539 (1999))으로부터 유래된 효소들이 에스케리키아 콜라이에서 발현 및 특정화되었다.

표 59

[0385]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>panD</i>	P0A790	67470411	에스케리키아 콜라이 K12
<i>panD</i>	Q9X4N0	18203593	코리네박테리움 글루타니쿰
<i>panD</i>	P65660.1	54041701	미코박테리움 투베르쿨로시스

[0386]

라이신 데카르복실라제 (EC 4.1.1.18)는 라이신을 카다베린으로 탈카르복시화하는 과정을 촉매한다. 이 효소에 대한 2가지 이소자임들은 에스케리키아 콜라이의 계능에 유전자 *cadA* 및 *ldcC*에 코딩되어 있다. CadA는 산 내성에 관여하며, *cadC* 유전자 산물에 의해 파지티브 조절을 거친다 (Lemonnier et al., *Microbiology* 144 (Pt 3):751-760 (1998)). CadC는 대안 기질로서 하이드록시라이신과 S-아미노에틸시스테인을 수용하며, 2-아미노피렐레이트와 6-아미노카프로에이트가 이 효소에 대한 경쟁적인 저해제로서 작용한다 (Sabo et al., *Biochemistry* 13:662-670 (1974)). 구성적으로 발현된 *ldc* 유전자 산물은 CadA 보다 활성이 낮다 (Lemonnier and Lane, *Microbiology* 144 (Pt 3):751-760 (1998)). CadA와 유사한 라이신 데카르복실라제가 최근 비브리오 파라헤몰리티쿠스에서 동정되었다 (Tanaka et al., *J Appl Microbiol* 104:1283-1293 (2008)). *ldc*에 코딩된 셀레노모나스 루미난티움의 라이신 데카르복실라제는 진핵생물의 오르니틴 데카르복실라제와 서열 유사성을 가지며, 기질로서 L-라이신과 L-오르니틴 둘다를 수용한다 (Takatsuka et al., *Biosci. Biotechnol Biochem.* 63:1843-1846 (1999)). 활성부의 잔기들이 동정되었고, 이 효소의 기질 특이성을 변형시키기 위해 조작되었다 (Takatsuka et al., *J Bacteriol.* 182:6732-6741 (2000)). 또한, 수종의 오르니틴 데카르복실라제 효소들 (EC 4.1.1.17) 역시 라이신과 다른 유사 화합물에 대해 활성을 나타낸다. 이러한 효소들은 니코티아나 글루티노사 (Lee et al., *Biochem. J* 360:657-665 (2001)), 락토바실러스 *sp.* 30a (Guirard et al., *J Biol. Chem.* 255:5960-5964

(1980)) 및 비브리오 불니피쿠스 (Lee et al., *J Biol.Chem.* 282:27115-27125 (2007))에서 확인된다. 락토바실러스 *sp. 30a* (Momany et al., *J Mol.Biol.* 252:643-655 (1995))와 *V. 불니피쿠스*로부터 유래된 효소들이 결정 구조가 파악되었다. *V. 불니피쿠스*의 효소는 라이신 데카르복실라제를 효과적으로 촉매하며, 기질 특이성에 참여하는 잔기들이 해명되었다 (Lee et al., *J Biol.Chem.* 282:27115-27125 (2007)). 유사한 효소는 트리코모나스 바기날리스에서 특정화되었지만, 이 효소를 코딩하는 유전자는 미확인되었다 (Yarlett et al., *Biochem.J* 293 (Pt 2):487-493 (1993)).

표 60

[0387]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>cadA</i>	AAA23536.1	145458	에스케리키아 콜라이
<i>ldcC</i>	AAC73297.1	1786384	에스케리키아 콜라이
<i>ldc</i>	O50657.1	13124043	셀레노모나스 루미난티움
<i>cadA</i>	AB124819.1	44886078	비브리오 파라헤몰리티쿠스
<i>AF323910.1:1..1299</i>	AAG45222.1	12007488	니코티아나 글루티노사
<i>odc1</i>	P43099.2	1169251	락토바실러스 <i>sp. 30a</i>
<i>VV2_1235</i>	NP_763142.1	27367615	비브리오 불니피쿠스

[0388]

글루타릴-CoA 데하이드로게나제 (GCD, EC 1.3.99.7 및 EC 4.1.1.70)는 글루타릴-CoA의 크로토닐-CoA (도 3, 단계 3)로의 산화적 탈카르복시화를 촉매하는 2가지 기능을 가진 효소이다. 2가지 기능을 가진 GCD 효소들은 전자 어셉터로서 전자 전달체 플라보단백질을 이용하여 호모테트라머이다 (Hartel et al., *Arch.Microbiol* 159:174-181 (1993)). 이들 효소는 방향족 화합물에서 배양하는 동안에 슈도모나스 균주들 KB740 및 K172의 세포 추출물에서 처음으로 특정화되었지만 (Hartel et al., *Arch.Microbiol* 159:174-181 (1993)), 이들 유기체에서 관련 유전자들은 확인되지 않았다. 글루타릴-CoA 데하이드로게나제 (*gcdH*)를 코딩하는 유전자와 이의 동족 전사 조절자 (*gcdR*)가 아조아르쿠스 *sp. CIB*에서 동정되었다 (Blazquez et al., *Environ.Microbiol* 10:474-482 (2008)). *gcdH* 활성이 결핍된 아조아르쿠스 균주를 이용하여, 슈도모나스 푸티다로부터 이종의 *gcdH* 유전자가 동정되었다 (Blazquez et al., *Environ.Microbiol* 10:474-482 (2008)). 슈도모나스 푸티다에서 동족 전사 조절자는 동정되지 않았지만, locus *PP_0157*은 아조아르쿠스 효소와 높은 서열 상동성 (> 69% 동일성)을 가진다. 슈도모나스 플루오레센스와 파라코커스 데니트리피칸스에서 다른 GCD 효소들이 확인되었다 (Husain et al., *J Bacteriol.* 163:709-715 (1985)). 인간 GCD가 광범위하게 연구되었고, 에스케리키아 콜라이에서 과다 발현되었고 (Dwyer et al., *Biochemistry* 39:11488-11499 (2000)), 결정 구조가 파악되었으며, 이 활성부에 존재하는 보존된 글루타메이트 잔기가 참여하는 촉매 기전이 개시되었다 (Fu et al., *Biochemistry* 43:9674-9684 (2004)). GCD는 신티로푸스 액시디트로피쿠스에서 크로토네이트에서 성장하는 동안에 CO₂를 동화하는 방향으로 작동한다 (Mouttaki et al., 73:930-938 (2007)). 신티로푸스 액시디트로피쿠스에서의 GCD 유전자 2종이 아조아르쿠스 *GcdH*: *syn_00480* (31%) 및 *syn_01146* (31%)에 대한 단백질 서열 상동성을 통해 동정되었다. 아조아르쿠스 *GcdR* 조절 단백질에 대해 유의한 상동성은 확인되지 않았다.

표 61

[0389]

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

[0390] 다른 예로, 크로토닐-CoA의 글루타코닐-CoA로의 카르복시화와 이후의 글루타릴-CoA로의 환원은 별개의 효소들로 촉매될 수 있다: 글루타코닐-CoA 데카르복실라제 및 글루타코닐-CoA 리덕타제. 글루타메이트를 발효하는 혐기성 박테리아에서 특정화된 글루타코닐-CoA 데카르복실라제 효소는, 조인자로서 바이오틴을 이용하여 4개의 서브유닛들 (알파, 베타, 감마, 델타)로 구성된 소듐 이온을 전이시키는 데카르복실라제이다 (Boiangiu et al., J Mol.Microbiol Biotechnol 10:105-119 (2005); Buckel, Biochim.Biophys.Acta 1505:15-27 (2001)). 이들 효소는 푸조박테리움 뉴클레아툼 (Beatrix et al., Arch.Microbiol 154:362-369 (1990))과 액시드아미노코커스 퍼멘탄스 (Braune et al., Mol.Microbiol 31:473-487 (1999))에서 특정되었다. 푸조박테리움 뉴클레아툼 글루타코닐-CoA 데카르복실라제의 알파, 베타 및 델타 서브유닛에 대한 유사체들은 신티로푸스 액시디트로피쿠스에서 확인된다. 에노일-CoA 데하이드로게나제, *syn_00480*로 주석이 달린 유전자인 다른 GCD가 바이오틴-카르복실 캐리어 (*syn_00479*)와 글루타코닐-CoA 데카르복실라제 알파 서브유닛 (*syn_00481*) 사이의 예상되는 오페론에 위치한다. 예시적인 유전자 산물에 대한 단백질 서열들은 하기 나타낸 유전자은행 등재 번호를 이용하여 발구리할 수 있다. 에노일-CoA 리덕타제 효소들은 상기에 기술되어 있다 (EC 1.3.1).

표 62

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

[0392] 4.1.1.b 데카르복실라제, 알켄 형성

[0393] 올레핀을 형성하는 데카르복실라제 효소는 5-하이드록시발레레이트의 3-부텐-1-올로의 변환을 촉매한다 (단계 W, 도 1). 말단의 올레핀을 형성하는 지방산 데카르복실라제는 제오트갈코쿠스 sp. ATCC8456의 *oleT* 유전자 산물에 의해 코딩된다 (Rude et al, AEM 77(5):1718-27 (2011)). 최근 확인된 이 효소는 시토크롬 P450 효소 패밀리에 속하는 것으로서, 지방산 하이드록시화를 촉매하는 P450과 유사하다. *OleT*와 상동체들은 아래 표에 열거된다. 다른 지방산 데카르복실라제 효소들은 US 2011/0196180에서 확인된다.

표 63

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>oleT</i>	ADW41779.1	320526718	제오트갈코쿠스 sp. ATCC8456
<i>MCCL_0804</i>	BAH17511.1	222120176	마크로코커스 카세올리티쿠스
<i>SPSE_1582</i>	ADX76840.1	323464687	스타필로코커스 슈트인터메디우스
<i>fahH</i>	ADC49546.1	288545663	바실러스 슈도퍼무스
<i>cypC2</i>	EGQ19322.1	339614630	스포로사르시나 뉴이오르겐시스
<i>cypC</i>	BAK15372.1	32743900	솔리바실러스 실베스트리스
<i>Bcoam_010100017440</i>	ZP_03227611.1	205374818	바실러스 코아후일렌시스

[0395] 4.1.99.a 데카르보닐라제

[0396] 펜타-2,4-디에날의 부타디엔으로의 변환은 데카르보닐라제에 의해 촉매된다 (단계 B, 도 6). 데카르보닐라제 효소는 식물, 포유류 및 박테리아에서 알칸 생합성 최종 단계를 촉매한다 (Dennis et al., Arch. Biochem.

Biophys. 287:268-275 (1991)). 비-산화적 데카르보닐라제는 CO를 동시에 발생시키면서 알칸으로 알데하이드를 전달한다. 데카르보닐라제 효소의 예로는 옥타데카날 데카르보닐라제 (EC 4.1.99.5), 스테롤 테세투라제 및 지방 알데하이드 데카르보닐라제를 포함한다. 데카르보닐라제를 함유한 코발트-포르핀이 정제되었으며, 조류 보트리오크커스 브라우니이 (*Botryococcus braunii*)에서 특정화되었지만, 지금까지 이 활성과 연관된 유전자는 없다 (Dennis et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:5306-5310 (1992)). 피습 사티붐 (*Pisum sativum*) 유래 구리-함유 데카르보닐라제도 정제되었으며, 특정화되었다 (Schneider-Belhaddad et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 377:341-349 (2000)). 아라비돕시스 탈리아나의 CER1 유전자는 에피쿠티쿨러 왁스 형성에 참여하는 지방산 데카르보닐라제를 코딩한다 (US 6,437,218). 추가적인 지방산 데카르보닐라제는 메디카고 트룬카톨라, 비티스 비니페라 및 오리자 사티바에서 확인된다 (US 특허 출원 2009/0061493).

표 64

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
CER1	NP_850932	145361948	아라비돕시스 탈리아나
MtrDRAFT_AC153128g2v2	ABN07985	124359969	메디카고 트룬카톨라
VITISV_029045	CAN60676	147781102	비티스 비니페라
OSJNBa0004N05.14	CAE03390.2	38345317	오리자 사티바

다른 예로, 산화적 데카르보닐라제는 알데하이드를 알칸으로 변환시킬 수 있다. 산화적 데카르보닐라제는 조인자로서 NADPH와 O₂를 이용하며, CO₂, 물 및 NADP⁺를 방출하는 시토크롬 P450 효소이다. 이러한 활성은 무스카도메스티카와 드로소필라 멜라노가스테르의 CYP4G2v1 및 CYP4G1 유전자 산물들에서 확인되었다 (US 특허 출원 2010/0136595). 산화적 데카르보닐라제 활성을 가진 추가적인 후보 효소들을 다른 유기체들, 예컨대 마메스트라 브라시카에 (*Mamestra brassicae*), 헬리코버과 지아 및 아시르토시폰 피습에서 서열 상동성을 통해 동정할 수 있다.

표 65

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
CYP4G2v1	ABV48808.1	157382740	무스카 도메스티카
CYP4G1	NP_525031.1	17933498	드로소필라 멜라노가스테르
CYP4G25	BAD81026.1	56710314	안테리어 야마마이
CYP4M6	AAM54722.1	21552585	헬리코버과 지아
LOC100164072	XP_001944205.1	193650239	아시르토시폰 피습

4.1.3.a 리아제

피루베이트 및 아세트알데하이드의 4-하이드록시-2-옥소발레이트로의 축합 (단계 A, 도 5)은 4-하이드록시-2-옥소발레이트 알돌라제 (EC 4.1.3.39)에 의해 촉매된다. 이 효소는 페놀, 크레졸 및 카테콜 분해 경로들에 참여한다. *mhpE*에 코딩된 에스케리키아 콜라이의 효소는 어셉터로서 아세트알데하이드에 대한 특이성이 높지만, 공여체로서 대안 기질 2-케토푸티레이트 또는 페닐피루베이트를 수용한다 (Pollard et al., *Appl Environ Microbiol* 64:4093-4094 (1998)). 비슷한 효소들은 슈도모나스 푸티다의 *cmtG* 및 *todH* 유전자에 의해 코딩된다 (Lau et al., *Gene* 146:7-13 (1994); Eaton, *J Bacteriol.* 178:1351-1362 (1996)). 슈도모나스 CF600에서, 이 효소는 *dmpFG*에 의해 코딩되는 2가지 기능을 가진 알돌라제-테하이드로게나제 헤테로다이머의 일부이다 (Manjasetty et al., *Acta Crystallogr.D.Biol Crystallogr.* 57:582-585 (2001)). 테하이드로게나제 기능은 아세트알데하이드와 아세틸-CoA를 상호 변환하여, 일부 세포에 유해한 아세트알데하이드의 세포내 농도를 감소시키는 이점을 제공한다. 유사 알돌라제-테하이드로게나제 컴플렉스는 버크홀데리아 제노보란스의 BphIJ에 의해 코딩된다 (Baker et al, *Biochem* 48:6551-8 (2009)).

표 66

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>mhpE</i>	AAC73455.1	1786548	에스케리키아 콜라이

<i>cmtG</i>	AAB62295.1	1263190	슈도모나스 푸티다
<i>todH</i>	AAA61944.1	485740	슈도모나스 푸티다
<i>dmpG</i>	CAA43227.1	45684	슈도모나스 <i>sp.</i> CF600
<i>dmpF</i>	CAA43226.1	45683	슈도모나스 <i>sp.</i> CF600
<i>bphI</i>	ABE37049.1	91693852	버크홀데리아 제노보란스
<i>bphJ</i>	ABE37050.1	91693853	버크홀데리아 제노보란스

[0403] **4.2.1.a 하이드로-리아제**

[0404] 물을 제거하여 이중 결합을 형성하는 과정은 4.2.1 패밀리의 데하이드라타제 효소에 의해 촉매된다. 하이드라타제 효소는 때로는 가역적이며, 또한 탈수를 촉매한다. 데하이드라타제 효소는 때로는 가역적이며, 또한 수화도 촉매한다. 소정의 기질로부터 물을 제거하는 과정은 도 1의 단계 G, N 및 V, 도 2의 단계 C, 도 3의 단계 C 및 도 5의 단계 B와 E에 필요하다. 수중의 하이드라타제 효소와 데하이드라타제 효소들이 문헌에 개시되어 있으며, 이들 단계들에 적합한 후보를 제시한다.

[0405] 예를 들어, 수많은 데하이드라타제 효소들이 전자-구인성 카르보닐, 카르복실레이트 또는 CoA-티올 에스테르기에 의한 알파-수소의 활성화와, 베타 위치에서 하이드록시기의 제거에 참여하는, 알파, 베타에서의 물 제거를 촉매한다 (Buckel et al, *J Bacteriol*, 117:1248-60 (1974); Martins et al, *PNAS* 101:15645-9 (2004)). 효소의 예로는 2-(하이드록시메틸)글루타레이트 데하이드라타제 (EC 4.2.1.-), 푸마라제 (EC 4.2.1.2), 3-데하이드로퀴네이트 데하이드라타제 (EC 4.2.1.10), 사이클로헥산 하이드라타제 (EC 4.2.1.-) 및 2-케토-4-펜텐오에이트 데하이드라타제 (EC 4.2.1.80), 시트랄레이트 하이드로리아제 및 디메틸말리에이트 하이드라타제를 포함한다.

[0406] 2-(하이드록시메틸)글루타레이트 데하이드라타제는 유박테리움 바케리 (종래에 클로스트리듐 바케리라 함)에서의 니코티네이트 동화 작용에 있어서의 이의 역할이 연구된, 2-(하이드록시메틸)글루타레이트를 2-메틸렌-글루타레이트로 탈수하는 [4Fe-4S]-함유 효소이다 (Alhapel et al., *Proc Natl Acad Sci* 103:12341-6 (2006)). 서열 상동성이 높은 유사한 효소들은 박테로이데스 카필로수스, 안에어로트룬쿠스 콜리호미니스 및 나트란에어로비우스 서모필러스에서 발견된다. 이들 효소는 [4Fe-4S]를 함유한 박테리아 세린 데하이드라타제 (예, 에스케리키아 콜라이의 *tdcG*, *sdhB*, 및 *sdaA*에 코딩된 효소)의 알파 및 베타 서브유닛들과 상동적이다. 유박테리움 바케리에서 유사한 기능을 가진 효소는, 디메틸말리에이트를 수화시켜 (2R,3S)-2,3-디메틸말레이트를 형성하는 아코니타제 패밀리에 속하는 가역적인 Fe²⁺-의존성 및 산소-민감성 효소인, 디메틸말리에이트 하이드라타제이다. 이 효소는 *dmdAB*에 의해 코딩된다 (Alhapel et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12341-6 (2006); Kollmann-Koch et al., *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* 365:847-857 (1984)).

표 67

[0407]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>hmd</i>	ABC88407.1	86278275	유박테리움 바케리
<i>BACCAP_02294</i>	ZP_02036683.1	154498305	박테로이데스 카필로수스
<i>ANACOL_02527</i>	ZP_02443222.1	167771169	안에어로트룬쿠스 콜리호미니스
<i>NtherDRAFT_2368</i>	ZP_02852366.1	169192667	나트란에어로비우스 서모필러스
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	유박테리움 바케리
<i>dmdB</i>	ABC88409	86278277	유박테리움 바케리

[0408] 푸마레이트 하이드라타제 (EC 4.2.1.2) 효소는 천연적으로 푸마레이트의 말레이트로의 가역적인 수화를 촉매한다. 기질로서 3-옥소부탄올과 반응하는 푸마레이트 하이드라타제의 역량이 문헌에 기술되어 있지만, 이 효소에 대해 상당한 구조적인 정보의 입수가 가능하며, 다른 연구자들도 활성화, 저해 및 위치화를 변형시키도록 효소를 성공적으로 조작하였다 (Weaver, 61:1395-1401 (2005)). 에스케리키아 콜라이는 푸마라제 3종, FumA, FumB 및 FumC를 가지며, 이는 증식 조건에 의해 조절된다. FumB는 산소 민감성이며, 혐기 조건에서만 활성을 나타낸다. FumA는 미세혐기 조건에서 활성을 나타내며, FumC는 호기 증식의 유일한 활성 효소이다 (Tseng et al., *J Bacteriol*, 183:461-467 (2001); Woods et al., 954:14-26 (1988); Guest et al., *J Gen Microbiol* 131:2971-2984 (1985)). 추가적인 후보 효소들은 캄필로박터 제주니 (Smith et al., *Int.J Biochem.Cell Biol* 31:961-

975 (1999)), 서무스 서모필러스 (Mizobata et al., Arch.Biochem.Biophys. 355:49-55 (1998)) 및 라투스 노르베기쿠스 (Kobayashi et al., J. Biochem, 89:1923-1931 (1981))에서 확인된다. 서열 상동성이 높은 유사한 효소들로는 아라비돕시스 탈리아나 *fum1*과 코리네박테리움 글루타미킴 *fumC*를 포함한다. 펠로토마쿨룸 서모프로피오니킴으로부터 유래된 *MmcBC* 푸마라제는 2개의 서브유닛을 가진 다른 클래스의 푸마라제이다 (Shimoyama et al., FEMS Microbiol Lett, 270:207-213 (2007)).

표 68

[0409]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fumA</i>	NP_416129.1	16129570	에스케리키아 콜라이
<i>fumB</i>	NP_418546.1	16131948	에스케리키아 콜라이
<i>fumC</i>	NP_416128.1	16129569	에스케리키아 콜라이
<i>fumC</i>	O69294	9789756	캠필로박터 제주니
<i>fumC</i>	P84127	75427690	서무스 서모필러스
<i>fumH</i>	P14408	120605	라투스 노르베기쿠스
<i>fum1</i>	P93033	39931311	아라비돕시스 탈리아나
<i>fumC</i>	Q8NRN8	39931596	코리네박테리움 글루타미킴
<i>MmcB</i>	YP_001211906	147677691	펠로토마쿨룸 서모프로피오니킴
<i>MmcC</i>	YP_001211907	147677692	펠로토마쿨룸 서모프로피오니킴

[0410]

4-하이드록시-2-옥소발레레이트의 2-옥소펜테노에이트로의 탈수는 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 하이드라타제 (EC 4.2.1.80)에 의해 촉매된다. 이 효소는 방향족 분해 경로에 참여하며, 전형적으로 4-하이드록시-2-옥소발레레이트 알돌라제 활성을 가진 효소를 코딩하는 유전자와 함께 전사된다. 예시적인 유전자 산물들은 에스케리키아 콜라이의 *mhpD* (Ferrandez et al., J Bacteriol. 179:2573-2581 (1997); Pollard et al., Eur J Biochem. 251:98-106 (1998)), 슈도모나스 푸티다의 *todG* 및 *cmtF* (Lau et al., 유전자 146:7-13 (1994); Eaton, J Bacteriol. 178:1351-1362 (1996)), 코마모나스 sp. CNB-1의 *cnbE* (Ma et al., Appl Environ Microbiol 73:4477-4483 (2007)) 및 버크홀데리아 제노보란스의 *mhpD* (Wang et al., FEBS J 272:966-974 (2005))에 의해 코딩된다. 가장 근접한 효소인 2-옥소헵타-4-엔-1,7-디오에이트 하이드라타제는 4-하이드록시 페닐아세트산 분해에 참여하며, 조인자로서 마그네슘을 이용하여 2-옥소-헵트-4-엔-1,7-디오에이트 (OHED)를 2-옥소-4-하이드록시-헵타-1,7-디오에이트로 변환한다 (Burks et al., J.Am.Chem.Soc. 120: (1998)). OHED 하이드라타제 후보 효소가 에스케리키아 콜라이 *C* (Roper et al., 유전자 156:47-51 (1995); Izumi et al., J Mol.Biol. 370:899-911 (2007))와 에스케리키아 콜라이 # (Prieto et al., J Bacteriol. 178:111-120 (1996))에서 동정 및 특정화되었다. 서열 비교를 통해, 매우 다양한 박테리아 식물 및 동물들에서 상동체들이 확인된다. 서열 유사성이 높은 효소들이 특히 클렙시엘라 뉴모니아 (동일성 91%, eval = 2e-138)와 살모넬라 엔테리카 (동일성 91%, eval = 4e-138)에 함유되어 있다.

표 69

[0411]

단백질	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>mhpD</i>	AAC73453.2	87081722	에스케리키아 콜라이
<i>cmtF</i>	AAB62293.1	1263188	슈도모나스 푸티다
<i>todG</i>	AAA61942.1	485738	슈도모나스 푸티다
<i>cnbE</i>	YP_001967714.1	190572008	코마모나스 sp. CNB-1
<i>mhpD</i>	Q13VU0	123358582	버크홀데리아 제노보란스
<i>hpcG</i>	CAA57202.1	556840	에스케리키아 콜라이 <i>C</i>
<i>hpaH</i>	CAA86044.1	757830	에스케리키아 콜라이 #
<i>hpaH</i>	ABR80130.1	150958100	클렙시엘라 뉴모니아
<i>Sar i_01896</i>	ABX21779.1	160865156	살모넬라 엔테리카

[0412]

다른 후보 효소는 천연적으로 2-메틸말레이트를 메사코네이트로 탈수하는 효소인 시트라말레이트 하이드로리아제 (EC 4.2.1.34)이다. 이 효소는 메타노칼도코커스 야나스키에서 피루베이트의 2-옥소부타노에이트로의 경로 측면에서 연구되었으며, 넓은 기질 범위를 가지는 것으로 확인되었다 (Drevland et al., J Bacteriol.

189:4391-4400 (2007)). 또한, 이 효소의 활성은 클로스트리듐 테타노모르퓀, 모르가넬라 모르가니이 (*Morganella morganii*), 시트로박터 아말로나티쿠스에서도 검출되었는데, 글루타메이트 분해에 참여하는 것으로 생각된다 (Kato et al., *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997)). 메타노칼도코커스 야나스키이의 단백질 서열은 이들 유기체의 유전자와 유의한 상동성을 가지지 않는다.

표 70

[0413]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>leuD</i>	Q58673.1	3122345	메타노칼도코커스 야나스키이

[0414]

디메틸말리에이트 하이드라타제 (EC 4.2.1.85)는 디메틸말리에이트를 수화하여 (2R,3S)-2,3-디메틸말리에이트를 형성하는 아코니타제 패밀리에 속하는 가역적이고 Fe^{2+} -의존적이며 산소-민감성 효소이다. 이 효소는 유박테리움 바케리의 dmdAB에 코딩되어 있다 (Alhapel et al., supra; Kollmann-Koch et al., Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem. 365:847-857 (1984)).

표 71

[0415]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	유박테리움 바케리
<i>dmdB</i>	ABC88409.1	86278277	유박테리움 바케리

[0416]

올리에이트 하이드라타제는 W02011076691에서 제시된 바와 같이 다른 적정 후보 효소이다. 예로는 하기 단백질들을 포함한다.

표 72

[0417]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>OhvA</i>	ACT54545.1	254031735	엘리자베스킹기아 메닌고셉티카
HMPREF0841_1446	ZP_07461147.1	306827879	스트렙토코커스 피오게네스 ATCC 10782
P700755_13397	ZP_01252267.1	91215295	피크로플렉수스 토르퀴스 ATCC 700755
RPB_2430	YP_486046.1	86749550	로도슈도모나스 팔루스트리스

[0418]

에노일-CoA 하이드라타제 (EC 4.2.1.17)는 다양한 3-하이드록시아실-CoA 기질의 탈수를 촉매한다 (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)). ech에 코딩된 슈도모나스 푸티다의 에노일-CoA 하이드라타제는 3-하이드록시부티릴-CoA의 크로토닐-CoA로의 변환을 촉매한다 (Roberts et al., *Arch.Microbiol* 117:99-108 (1978)). 이런 변환은 또한 클로스트리듐 아세트부틸리컴의 crt 유전자 산물, 클로스트리듐 클루이베리의 crt1 유전자 산물 및 기타 클로스트리디아 유기체에 의해 촉매된다 (Atsumi et al., *Metab Eng* 10:305-311 (2008); Boynton et al., *J Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996); Hillmer et al., *FEBS Lett.* 21:351-354 (1972)). 추가적인 에노일-CoA 하이드라타제 후보는 슈도모나스 푸티다의 phaA와 phaB, 및 슈도모나스 플루오레센스의 paaA와 paaB이다 (Olivera et al., *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998)). 로도슈도모나스 팔루스트리스에서 pimF의 유전자 산물은 피멜로일-CoA 분해에 참여하는 에노일-CoA 하이드라타제를 코딩하는 것으로 생각된다 (Harrison et al., *Microbiology* 151:727-736 (2005)). 최근, 다수의 에스케리키아 콜라이 유전자들이 maoC (Park et al., *J Bacteriol.* 185:5391-5397 (2003)), paaF (Ismail et al., *Eur.J Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park et al., *Appl.Biochem.Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park et al., *Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004)) 및 paaG (Ismail et al., *Eur.J Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park and Lee, *Appl.Biochem.Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park and Yup, *Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004))를 비롯하여 에노일-CoA 하이드라타제 기능성을 나타내는 것으로 입증되었다.

표 73

[0419]

단백질	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>ech</i>	NP_745498.1	26990073	슈도모나스 푸티다
<i>crt</i>	NP_349318.1	15895969	클로스트리듐 아세트부틸리킴
<i>crt1</i>	YP_001393856	153953091	클로스트리듐 클루이베리
<i>phaA</i>	ABF82233.1	26990002	슈도모나스 푸티다
<i>phaB</i>	ABF82234.1	26990001	슈도모나스 푸티다
<i>paaA</i>	NP_745427.1	106636093	슈도모나스 플루오레센스
<i>paaB</i>	NP_745426.1	106636094	슈도모나스 플루오레센스
<i>maoC</i>	NP_415905.1	16129348	에스케리키아 콜라이
<i>paaF</i>	NP_415911.1	16129354	에스케리키아 콜라이
<i>paaG</i>	NP_415912.1	16129355	에스케리키아 콜라이

[0420]

다른 예로, 에스케리키아 콜라이에서 *fadA*와 *fadB*의 유전자 산물은, 지방산 산화에 참여하는 에노일-CoA 하이드라타제 활성을 나타내는 멀티효소 컴플렉스를 코딩한다 (Yang et al., *Biochemistry* 30:6788-6795 (1991); Yang, *J Bacteriol.* 173:7405-7406 (1991); Nakahigashi et al., *Nucleic Acids Res.* 18:4937 (1990)). *fadR*에 코딩된 네거티브 조절자의 낫 아웃을 이용하여 *fadB* 유전자 산물을 활성화할 수 있다 (Sato et al., *J Biosci.Bioeng* 103:38-44 (2007)). *fadI*와 *fadJ* 유전자들은 유사한 기능을 코딩하며, 천연적으로 혐기 조건에서 발현된다 (Campbell et al., *Mol.Microbiol* 47:793-805 (2003)).

표 74

[0421]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fadA</i>	YP_026272.1	49176430	에스케리키아 콜라이
<i>fadB</i>	NP_418288.1	16131692	에스케리키아 콜라이
<i>fadI</i>	NP_416844.1	16130275	에스케리키아 콜라이
<i>fadJ</i>	NP_416843.1	16130274	에스케리키아 콜라이
<i>fadR</i>	NP_415705.1	16129150	에스케리키아 콜라이

[0422]

4.3.1.a 암모니아-리아제

[0423]

도 1의 단계 J에서, 5-아미노펜-2-에노에이트의 2,4-펜타디에노에이트로의 탈아민화를 촉매하는데 EC 클래스 4.3.1의 암모니아 리아제가 필요하다. 예시적인 효소는 아스파르타제와 3-메틸아스파르타제이다. 아스파르테이트의 푸마레이트로의 탈아민화를 촉매하는 아스파르타제 (EC 4.3.1.1)가 충분히 특정화되었다 (Viola, *Adv Enzym Relat Areas Mol Biol*, 74:295-341 (2000)). 에스케리키아 콜라이의 효소는 아스파르테이트페닐메틸에스테르, 아스파라긴, 벤질-아스파르테이트 및 말레이트 등의 대안적인 다양한 기질에 대해 활성을 나타낸다 (Ma et al., *Ann NY Acad Sci*, 672:60-65 (1992)). 아울러, 기질 특이성을 변형시키기 위해 이 효소에 방향성 진화 (directed evolution)가 적용되었다 (Asano et al., *Biomol Eng* 22:95-101 (2005)). *aspA*에 코딩된 에스케리키아 콜라이의 아스파르타제의 결정 구조가 해명되었다 (Shi et al., *Biochem*, 36:9136-9144 (1997)). 또한, 아스파르타제 기능성을 가진 효소가 헤모필러스 인플루엔자 (Sjostrom et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1324:182-190 (1997)), 슈도모나스 플루오레센스 (Takagi et al., *J.Biochem.* 96:545-552 (1984)), 바실러스 섭틸리스 (Sjostrom et al., *Biochim Biophys Acta* 1324:182-190 (1997)) 및 세라티아 마르세센스 (Takagi et al., *J Bacteriol*, 161:1-6 (1985))에서 특정화되었다. 3-메틸아스파르타제는 트레오-3-메틸아스파르테이트의 메사코네이트로의 탈아민을 촉매한다. 클로스트리듐 테타노모르폴 유래의 3-메틸아스파르타제가 클로닝되었고, 에스케리키아 콜라이에서 기능적으로 발현되었으며, 결정 구조가 해명되었다 (Asuncion et al., *Acta Cryst D Biol Crystallog*, 57:731-733 (2001); Asuncion et al., *J Biol Chem.* 277:8306-8311 (2002); Botting et al., *Biochem* 27:2953-2955 (1988); Goda et al., *Biochem* 31:10747-10756 (1992)). 시트로박터 아말로나티쿠스에서, 이 효소는 *BAA28709* (Kato et al., *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997))에 코딩되어 있다. 또한, 3-메틸아스파르타제의 결정 구조가 에스케리키아 콜라이 *YG1002*로부터 해명되었지만 (Asano et al., *FEMS Microbiol Lett.* 118:255-258 (1994)), 단백질 서열은 유전자은행과 같은 공공 데이터베이스에 등록되어 있지

않다. 서열 상동성을 이용하여 *C. 테타니*의 *CTC_02563*와 에스케리키아 콜라이 *O157:H7*의 *ECs0761* 등의 추가적인 후보 유전자들을 동정할 수 있다.

표 75

[0424]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>aspA</i>	NP_418562	90111690	에스케리키아 콜라이 K12 아종 MG1655
<i>aspA</i>	P44324.1	1168534	헤모필러스 인플루엔자
<i>aspA</i>	P07346.1	114273	슈도모나스 플루오레센스
<i>ansB</i>	P26899.1	251757243	바실러스 섭틸리스
<i>aspA</i>	P33109.1	416661	세라티아 마르세센스
<i>MAL</i>	AAB24070.1	259429	클로스트리듐 테타노모르폼
<i>BAA28709</i>	BAA28709.1	3184397	시트로박터 아말로나티쿠스
<i>CTC_02563</i>	NP_783085.1	28212141	클로스트리듐 테타니
<i>ECs0761</i>	BAB34184.1	13360220	에스케리키아 콜라이 O157:H7 str. Sakai

[0425]

5.3.3.a 델타-이소머라제

[0426]

특정화된 몇가지 효소들은 에노일-CoA 기질의 이중 결합을 2-위치에서 3-위치로 이동시킨다. 이러한 변환은 도 3의 단계 D에서 필요하다. 효소의 예로는 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제/비닐아세틸-CoA 델타-이소머라제 (EC 5.3.3.3), 델타-3, 델타-2-에노일-CoA 이소머라제 (EC 5.3.3.8) 및 지방산 산화 컴플렉스를 포함한다. 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 효소는 4-하이드록시부티릴-CoA의 크로토닐-CoA로의 가역적인 변환을 촉매한다. 이들 효소는 4-하이드록시부티릴-CoA의 비닐아세틸-CoA로의 탈수와, 비닐아세틸-CoA 및 크로토닐-CoA의 이성체화를 모두 촉매하는 2가지 기능을 가진다. 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 효소들이 클로스트리듐 아미노부티리움과 클로스트리듐 클루이베리로부터 정제 및 특정화되었으며, N-말단의 서열이 분석되었다 (Scherf et al., *Arch.Microbiol* 161:239-245 (1994); Scherf and Buckel, *Eur.J Biochem.* 215:421-429 (1993)). *abfD*에 코딩된 클로스트리듐 클루이베리의 효소가 클로닝되고 서열분석되었으며, 에스케리키아 콜라이에서 발현되었다 (Gerhardt et al., *Arch.Microbiol* 174:189-199 (2000)). 포르피로모나스 강기발리스 ATCC 33277로부터 유래된 *abfD* 유전자 산물은 클로스트리듐의 유전자 산물들과 서열 상동성이 매우 유사하다. 또한, 메탈로스페라 세둘라에서도 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제/이소머라제 활성이 검출되었으며, *Msed_1220* 유전자와 연관된 것으로 보인다 (Berg et al, *Science* 318(5857):1782-6 (2007)). 또한, 델타 이성체화 반응은 지방산 산화 컴플렉스에 의해 촉매된다. 에스케리키아 콜라이의 경우, *fadJ*와 *fadB* 유전자 산물들은 호기 조건과 혐기 조건에서 각각 cis-3-에노일-CoA 분자를 trans-2-에노일-CoA 분자로 변환한다 (Campbell et al, *Mol Micro* 47(3):793-805 (2003)). 쿠쿠미스 사티부스 폐육시좀으로부터 분리된 단일 기능의 델타-이소머라제는 cis- 및 trans-3-에노일-CoA의 trans-2-에노일-CoA로의 가역적인 변환을 촉매한다 (Engeland et al, *Eur J Biochem*, 196 (3):699-705 (1991)). 이 효소와 연관된 유전자는 지금까지 동정되지 않았다. 또한, MFP-a 유전자 산물을 비롯하여, 쿠쿠미스 사티부스로부터 유래된 다중 기능의 다수의 단백질 (MFP)들도 이러한 활성을 촉매한다 (Preisig-Muller et al, *J Biol Chem* 269:20475-81 (1994)).

표 76

[0427]

유전자	GenBank	GI 번호	유기체
<i>abfD</i>	P55792	84028213	클로스트리듐 아미노부티리쿰
<i>abfD</i>	YP_001396399.1	153955634	클로스트리듐 클루이베리
<i>abfD</i>	YP_001928843	188994591	포르피로모나스 강기발리스
<i>Msed_1220</i>	ABP95381.1	145702239	메탈로스페라 세둘라
<i>fadJ</i>	AAC75401.1	1788682	에스케리키아 콜라이
<i>fadB</i>	AAC76849.1	1790281	에스케리키아 콜라이
<i>MFP-a</i>	Q39659.1	34922495	쿠쿠미스 사티부스

[0428]

6.2.1.a 산-티올 리가제

[0429]

아실-CoA 기질의 이의 산 생성물로의 변환은 6.2.1 패밀리 효소들 중 CoA 산-티올 리가제 또는 CoA 신테타제에

의해 촉매될 수 있으며, 이중 몇몇은 가역적이다. 도 1-6에 나타난 몇몇 반응들은 산-티올 리가제 효소에 의해 촉매된다. 이들 반응으로는 도 1의 단계 L, P 및 O, 도 3의 단계 F, 도 4의 단계 B, 도 5의 단계 J 및 도 6의 단계 F를 포함한다. CoA 산-티올 리가제 또는 CoA 신테타제 활성을 촉매하는 효소들 몇몇이 문헌에 개시되었으며, 이들 단계에 적합한 후보 효소들이 제시되어 있다.

[0430]

예컨대, ADP를 생성하는 아세틸-CoA 신테타제 (ACD, EC 6.2.1.13)는 아실-CoA 에스테르의 이의 대응되는 산으로의 변환과 동시적인 ATP 합성을 커플링하는 효소이다. AF1211에 코딩된 아르카에오글로부스 풀기두스 유래의 ACD I은 이소부티레이트, 이소펜타노에이트 및 푸마레이트를 비롯한 다양한 직쇄 및 분지쇄 기질에 작용하는 것으로 입증되었다 (Musfeldt et al., *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 또한, AF1983에 코딩된 아르카에오글로부스 풀기두스의 2번째 가역적인 ACD도 사이클릭 화합물인 페닐아세테이트 및 인돌아세테이트에 대해 활성이 높은 광범위한 기질 범위를 가지는 것으로 입증되었다 (Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 할로아르쿨라 마리스모라투이로부터 유래된 이 효소 (숙시닐-CoA 신테타제로 주석이 달림)는 기질로서 프로피오네이트, 부티레이트 및 분지쇄 산 (이소발레레이트 및 이소부티레이트)을 수용하며, 정방향 및 역방향으로 작용하는 것으로 입증되었다 (Brasen et al., *Arch Microbiol* 182:277-287 (2004)). 초고온성 크레나르케온 (hyperthermophilic crenarchaeon) 피로바쿨룸 에어로필룸의 PAE3250에 코딩된 ACD는 모든 특정화된 ACD들 중에서 가장 광범위한 기질 범위를 나타내었으며, 아세틸-CoA, 이소부티릴-CoA (선호 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응한다 (Brasen et al., *supra*). 방향성 진화 또는 가공을 적용하여, 숙주 유기체의 생리 온도에서 작동하도록 이 효소를 변형시킬 수 있다. 아르카에글루부스 풀기두스, *H. 마리스모라투이* 및 *P. 에어로필룸*으로부터 유래된 효소들 모두 클로닝되었으며, 기능적으로 발현되었고, 에스케리키아 콜라이에서 특정화되었다 (Brasen and Schonheit, *supra*; Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 추가적인 후보 효소는 에스케리키아 콜라이의 *sucCD*과 사카로마이세스 세레비지애의 *LSC1* 및 *LSC2* 유전자에 코딩된 숙시닐-CoA 신테타제이다. 이 효소는 생체내에서 가역적인 반응으로 ATP 한개를 소비하면서 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA를 형성하는 과정을 촉매한다 (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). 슈도모나스 푸티다로부터 유래된 아실 CoA 리가제는 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산, 헥사노익산, 헵타노익산, 옥타노익산 및 페닐 아세트산과 페녹시아세트산 등의 방향족 화합물을 비롯한 수개의 지방족 기질에 작용하는 것으로 입증되었다 (Fernandez-Valverde et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). 리조비움 레구미노사룸 유래의 관련 효소인 말로닐 CoA 신테타제 (6.3.4.9)는 몇몇 2산 화합물, 즉, 에틸-, 프로필-, 알릴-, 이소프로필-, 디메틸-, 사이클로프로필-, 사이클로프로필메틸렌-, 사이클로부틸- 및 벤질-말로네이트를 이의 대응되는 모노티오에스테르로 변환할 수 있었다 (Pohl et al., *J. Am. Chem. Soc.* 123:5822-5823 (2001)).

표 77

[0431]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
AF1211	NP_070039.1	11498810	아르카에오글로부스 풀기두스
AF1983	NP_070807.1	11499565	아르카에오글로부스 풀기두스
Scs	YP_135572.1	55377722	할로아르쿨라 마리스모라투이
PAE3250	NP_560604.1	18313937	피로바쿨룸 에어로필룸 str. IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이
LSC1	NP_014785	6324716	사카로마이세스 세레비지애
LSC2	NP_011760	6321683	사카로마이세스 세레비지애
paaF	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸티다
matB	AAC83455.1	3982573	리조비움 레구미노사룸

[0432]

이 단계들에서 다른 후보 효소는 피멜로일-CoA 리가제 (EC 6.2.1.14)로도 불리우는 6-카르복시헥사노에이트-CoA 리가제이며, 이는 천연적으로 그람 양성 박테리아에서 바이오틴 생합성 과정 중에 피멜레이트를 피멜로일-CoA로 활성화한다. 슈도모나스 멘도시나 유래의 효소는 에스케리키아 콜라이에서 클로닝하였으며, 대안 기질인 헥산디오에이트 및 노난디오에이트를 수용하는 것으로 입증되었다 (Binieda et al., *Biochem. J* 340 (Pt 3):793-801 (1999)). 바실러스 썩틸리스 (Bower et al., *J Bacteriol.* 178:4122-4130 (1996))와 라이시니바실러스 스파에리쿠스 (종래에 바실러스 스파에리쿠스로 지칭됨) (Ploux et al., *Biochem. J* 287 (Pt 3):685-690 (1992))에서 다른 후보 효소들이 확인된다.

표 78

[0433]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>bioW</i>	NP_390902.2	50812281	바실러스 섭틸리스
<i>bioW</i>	CAA10043.1	3850837	슈도모나스 멘도시나
<i>bioW</i>	P22822.1	115012	바실러스 스파에리쿠스

[0434]

추가적인 CoA-리가제로는 서열이 아직 규명되지 않은 랫의 디카르복실레이트-CoA 리가제 (Vamecq et al., *Biochem.J* 230:683-693 (1985)), 2종의 특정화된 페니실리움 크리스게눔 유래 페닐아세테이트-CoA 리가제 (Lamas-Maceiras et al., *Biochem.J* 395:147-155 (2006); Wang et al., 360:453-458 (2007)), 슈도모나스 푸티다 유래 페닐아세테이트-CoA 리가제 (Martinez-Blanco et al., *J Biol Chem* 265:7084-7090 (1990)) 및 바실러스 섭틸리스 유래 6-카르복시헥사노에이트-CoA 리가제 (Bower et al. *J Bacteriol* 178(14):4122-4130 (1996))가 있다. 무스 무스쿨루스 (Hasegawa et al., *Biochim Biophys Acta* 1779:414-419 (2008))와 호모 사피엔스 (Ohgami et al., *Biochem.Pharmacol.* 65:989-994 (2003))로부터 유래된 아세토아세틸-CoA 신테타제는 천연적으로 ATP 의존적으로 아세토아세테이트의 아세토아세틸-CoA로의 변환을 촉매한다.

표 79

[0435]

단백질	등재 번호	GI 번호	유기체
<i>phl</i>	CAJ15517.1	77019264	페니실리움 크리스게눔
<i>phlB</i>	ABS19624.1	152002983	페니실리움 크리스게눔
<i>paaF</i>	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸티다
<i>bioW</i>	NP_390902.2	50812281	바실러스 섭틸리스
<i>AACS</i>	NP_084486.1	21313520	무스 무스쿨루스
<i>AACS</i>	NP_076417.2	31982927	호모 사피엔스

[0436]

다른 클래스의 효소들과 마찬가지로, EC 클래스 6.2.1의 특정 효소들은 넓은 기질 특이성을 가지는 것으로 확인되었다. 슈도모나스 푸티다로부터 유래된 아실 CoA 리가제는 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산, 헥사노익산, 헵타노익산, 옥타노익산과 페닐아세트산 및 페녹시아세트산 등의 방향족 화합물을 비롯한 수종의 지방족 기질에 작용하는 것으로 입증되었다 (Fernandez-Valverde et al., *Applied and Environmental Microbiology* 59:1149-1154 (1993)). 리조비움 트리폴리이 (*Rhizobium trifolii*)로부터 유래된 관련 효소인 말로닐 CoA 신테타제 (6.3.4.9)는 수종의 2산 화합물들, 즉, 에틸-, 프로필-, 알릴-, 이소프로필-, 디메틸-, 사이클로프로필-, 사이클로프로필메틸렌-, 사이클로부틸- 및 벤질-말로네이트를 이의 대응되는 모노티오에스테르 화합물로 변환시킬 수 있었다 (Pohl et al., *J.Am.Chem.Soc.* 123:5822-5823 (2001)).

[0437]

N/A (EC 번호 없음)

[0438]

도 1의 단계 Q에서, 5-하이드록시발레릴-CoA의 2,4-펜타디에노일-CoA로의 변환은 2가지 기능을 갖춘 효소인 5-하이드록시발레릴-CoA 데하이드라타제/데하이드라타제에 의해 촉매된다. 클로스트리듐 아미노발레리쿰에서의 5-아미노발레레이트 발효에 참여하는 이 효소는 정제 및 특정화되었으며, 결정 구조가 해명되었다 (Eikmanns et al, *Proteins: Struct Fun Gen* 19:269-271 (1994), Eikmanns and Buckel, *Eur J Biochem*, 197:661-668 (1991)). 단백질 서열은 공지되어 있지만 지금까지 유전자은행 식별자로 등재되지 않았다. 단백질 서열이 비슷한 상동체들을 아래 표에 열거한다.

표 80

[0439]

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>CLOSS21_02963</i>	ZP_02440459.1	167768406	클로스트리듐 <i>sp.</i> SS2/1
<i>CK3_30740</i>	CBL42530.1	291563714	부티레이트 생산 박테리움 SS3/4
<i>ANACAC_01346</i>	ZP_02418762.1	167746635	안에어로스티페스 카케이 <i>DSM 14662</i>
<i>mmgC2</i>	ZP_07921990.1	315925783	슈도라미박터 알락톨리티쿠스
<i>ANACAC_01346</i>	ZP_07822451.1	167746635	웍토니필루스 하레이
<i>FgonA2_010100002879</i>	ZP_05630680.1	257466369	푸조박테리움 고니디아포르만스

<i>FNP_2146</i>	ZP_04969457.1	254302099	푸조박테리움 뉴클레아툼
<i>acdA2</i>	ZP_07921487.1	315925275	슈도라미박터 알락톨리티쿠스
<i>CHY_1732</i>	YP_360552.1	78043883	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
<i>acdA</i>	ZP_07454495.1	306820875	유박테리움 유리

[0440]

실시예 VIII

[0441]

1,3-부탄디올과 3-부텐-1-올의 부타디엔으로의 화학적 탈수

[0442]

적절한 조건에서는 적합한 탈수 촉매를 이용한 반응을 통해 알코올을 올레핀으로 변환시킬 수 있다. 부탄올 및 펜타놀 등의 알코올을 올레핀으로 변환하는 전형적인 탈수 촉매로는, 다양한 산 처리된 및 무처리된 알루미늄 (예, 감마-알루미나)와 실리카 촉매들, 및 제올라이트 (예, 베타형 제올라이트, ZSM-5 또는 Y형 제올라이트, 플루오라이드 처리된 베타-제올라이트 촉매, 플루오라이드 처리된 클레이 촉매 등), 설펜산 수지 (예, 설펜화된 스티렌 수지, 예컨대 Amberlyst® 15), 강산, 예컨대 인산 및 황산, 루이스 산, 예컨대 보론 트리플루오라이드 및 알루미늄 트리클로라이드, 및 여러가지 타입의 다수의 금속염, 예컨대 금속 산화물 (지르코늄 산화물 또는 티타늄 이산화물) 및 금속 염화물 (예, Latshaw B E, Dehydration of Isobutanol to Isobutylene in a Slurry Reactor, Department of Energy Topical Report, February 1994)을 포함한다.

[0443]

탈수 반응은 다수의 여러가지 반응조 배열에서 혼성 및 동종의 촉매 시스템을 이용하여 기상 및 액상에서 수행될 수 있다. 전형적으로, 사용되는 촉매는 반응을 통해 생성되는 물에 안정적이다. 물은 통상 생성물을 이용하여 반응존으로부터 제거된다. 제조되는 알켄(들)은 기상 또는 액상 (예, 반응조의 조건에 따라)으로 반응조에서 배출되며, 하류 정제 공정에 의해 포획되거나 또는 본원에 기술된 바와 같이 반응조에서 다른 화합물들 (예, 부타디엔 또는 이소프렌)으로 추가로 변환된다. 탈수 반응으로 생성되는 물은 반응하지 않은 알코올과 알켄 생성물(들)과 함께 반응조에서 배출되며, 증류 또는 산 분리에 의해 분리된다. 물이 탈수 단계에서 다량으로 생성되기 때문에, 사용되는 탈수 촉매는 일반적으로 물에 관대하며, 기질 및 생성물로부터 물을 제거하는 공정은 탈수 단계를 포함하는 임의의 공정의 일부일 수 있다. 이러한 이유로, 탈수 반응을 위한 기질로서 습식 (즉, 수분량 최대 약 95 중량% 또는 98 중량%) 알코올을 이용하고, 탈수 반응으로 생성되는 물로 이 물을 제거할 수 있다 (예, 미국 특허 4,698,452 및 4,873,392에 기술된 바와 같이 제올라이트 촉매를 이용함). 부가적으로, 중성 알루미나 및 제올라이트는 알코올을 알켄으로 탈수하지만, 일반적으로 이들 촉매의 산성 버전 보다는 높은 온도와 압력에서 이루어질 것이다.

[0444]

1,3-부탄디올의 3-부텐-1-올 및 부타디엔으로의 탈수는 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 3가 금속 설펜이트의 존재 하에 디올 화합물을 70 - 100 °C의 온도로 가열함으로써 1,3-부탄디올로부터 3-부텐-1-올을 합성한다 (US 특허 44005612). 1,3-부탄디올의 부타디엔으로의 탈수는, 예를 들어, 과일 증기와 포스페이트-인산 촉매의 존재 하에 1,3-부탄디올을 가열하는 단계를 포함한다 (Sato, et al, Catalysis Communications, 5 (8), 2004, p. 397-400). 3-부텐-1-올의 부타디엔으로의 탈수는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다 (Gustav. Egloff and George. Hulla, Chem. Rev., 1945, 36 (1), pp 63-141).

[0445]

실시예 IX

[0446]

합성가스로부터 환원 당량을 추출하기 위한 하이드로게나제 및 CO 데하이드로게나제 효소의 예, 및 환원성 TCA 사이클 효소의 예

[0447]

본 발명의 비-천연성 미생물 유기체에서 이용가능한 환원성 TCA 사이클 효소로는, 하나 이상의 ATP-시트레이트 리아제와 3개의 CO₂-고정 효소를 포함한다: 이소시트레이트 데하이드로게나제, 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제. ATP-시트레이트 리아제 또는 시트레이트 리아제 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제가 존재한다는 것은 유기체에 활성형의 환원성 TCA 회로가 존재한다는 것을 의미한다. 환원성 TCA 회로 각각의 공정의 효소들을 하기에 나타낸다.

[0448]

ATP-시트레이트 리아제 (ACL, EC 2.3.3.8)는, ATP 시트레이트 신타제라고도 불리며, 시트레이트를 옥살로아세트이트 및 아세틸CoA로의 ATP-의존적인 절단을 촉매한다. ACL은 녹색유향 박테리아인 클로로비움 리미콜라 (*Chlorobium limicola*) 및 클로로비움 테피둠 (*Chlorobium tepidum*)에서 연구된 RTCA 회로의 효소이다. 클로로비움 리미콜라 유래의 알파(4)베타(4) 헤테로머 (heteromeric) 효소가 클로닝되었고 *E. coli*에서 특정되었다 (Kanao et al., Eur. J. Biochem. 269:3409-3416 (2002)). *acIAB*에 의해 코딩되는 클로로비움 리미콜라 효소는

비가역적이며, 효소 활성이 ADP/ATP 비율에 의해 조절된다. 클로로비움 테피둠 유래의 제조합 ACL 역시 *E. coli*에서 발현되었고, 촉매 기전에서 알파 및 베타 서브유닛들의 역할을 평가하기 위한 실험에서 전효소가 시험 관내에서 재구성되었다 (Kim and Tabita, *J. Bacteriol.* 188:6544-6552 (2006)). 또한, ACL 효소들은 발레아리움 리토트로피쿰 (*Balnearium lithotrophicum*), 설푸리하이드로게니비움 섭테라네움 (*Sulfurihydrogenibium subterraneum*) 및 박테리아 문 (phylum) 아퀴피카이 (*Aquificae*)에 속하는 다른 구성원에서도 확인되었다 (Hugler et al., *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007)). 이러한 활성은 일부 진균에서도 보고되었다. 유기체의 예로는 솔다리아 마크로스포라 (*Sordaria macrospora*) (Nowrousian et al., *Curr. Genet.* 37:189-93 (2000)), 아스퍼질러스 니둘란스 (*Aspergillus nidulans*), 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*) (Hynes and Murray, *Eukaryotic Cell, July: 1039-1048, (2010)*) 및 아스퍼질러스 나이거 (*Meijer et al. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:1275-1280 (2009))을 포함한다. 기타 후보들은 서열 상동성에 기반하여 발굴할 수 있다. 이들 효소와 관련된 정보는 아래에 표로 작성한다:

표 81

[0449]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>ac1A</i>	BAB21376.1	12407237	클로로비움 리미콜라
<i>ac1B</i>	BAB21375.1	12407235	클로로비움 리미콜라
<i>ac1A</i>	AAM72321.1	21647054	클로로비움 테피둠
<i>ac1B</i>	AAM72322.1	21647055	클로로비움 테피둠
<i>ac1A</i>	ABI50076.1	114054981	발니어리움 리소트로피쿰
<i>ac1B</i>	ABI50075.1	114054980	발니어리움 리소트로피쿰
<i>ac1A</i>	ABI50085.1	114055040	설푸리하이드로게니비움 섭테라네움
<i>ac1B</i>	ABI50084.1	114055039	설푸리하이드로게니비움 섭테라네움
<i>ac1A</i>	AAX76834.1	62199504	설푸리모나스 데니트리피칸스
<i>ac1B</i>	AAX76835.1	62199506	설푸리모나스 데니트리피칸스
<i>ac11</i>	XP_504787.1	50554757	야로위아 리폴리티카
<i>ac12</i>	XP_503231.1	50551515	야로위아 리폴리티카
<i>SPBC1703.07</i>	NP_596202.1	19112994	시조사카로마이세스 폼베
<i>SPAC22A12.16</i>	NP_593246.1	19114158	시조사카로마이세스 폼베
<i>ac11</i>	CAB76165.1	7160185	소르다리아 마크로스포라
<i>ac12</i>	CAB76164.1	7160184	소르다리아 마크로스포라
<i>ac1A</i>	CBF86850.1	259487849	아스퍼질러스 니둘란스
<i>ac1B</i>	CBF86848	259487848	아스퍼질러스 니둘란스

[0450]

일부 유기체에서 시트레이트에서 옥살로아세테이트 및 아세틸CoA로의 변환은 사이트릴-CoA 중간산물을 통해 진행되며, 2종의 개별 효소, 사이트릴-CoA 신테타제 (EC 6.2.1.18)와 사이트릴-CoA 리아제 (EC 4.1.3.34)에 의해 촉매된다 (Aoshima, M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:249-255 (2007)). 사이트릴-CoA 신테타제는 시트레이트의 사이트릴-CoA로의 활성화를 촉매한다. 하이드로게노박터 서모필러스 (*Hydrogenobacter thermophilus*) 효소는 각각 *ccsA* 및 *ccsB*에 의해 코딩되는 대형 및 소형 서브단위로 구성된다 (Aoshima et al., *Mol. Microbiol.* 52:751-761 (2004)). 아퀴팩스 에어올리쿠스 (*Aquifex aeolicus*)의 사이트릴-CoA 신테타제는 *sucC1* 및 *sucD1*로 코딩되는 알파 및 베타 서브단위로 구성된다 (Hugler et al., *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007)). 사이트릴-CoA 리아제는 사이트릴-CoA를 옥살로아세테이트와 아세틸CoA로 분할한다. 이 효소는 하이드로게노박터 서모필러스의 *ccl* (Aoshima et al., *Mol. Microbiol.* 52:763-770 (2004))과 아퀴팩스 에어올리쿠스의 *aq_150* (Hugler et al., *supra* (2007))에 의해 코딩되는 동형삼량체이다. 시트레이트를 옥살로아세테이트 및 사이트릴-CoA로 변환하는 이러한 기전에 대한 유전자들이 최근 클로로비움 테피둠에서도 보고되었다 (Eisen et al., *PNAS* 99(14): 9509-14 (2002)).

표 82

[0451]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>ccsA</i>	BAD17844.1	46849514	하이드로게노박터 서모필러스
<i>ccsB</i>	BAD17846.1	46849517	하이드로게노박터 서모필러스

<i>sucC1</i>	AAC07285	2983723	아퀴팩스 에어올리쿠스
<i>sucD1</i>	AAC07686	2984152	아퀴팩스 에어올리쿠스
<i>ccl</i>	BAD17841.1	46849510	하이드로게노박터 서모필러스
<i>aq_150</i>	AAC06486	2982866	아퀴팩스 에어올리쿠스
<i>CT0380</i>	NP_661284	21673219	클로로비움 테피둠
<i>CT0269</i>	NP_661173.1	21673108	클로로비움 테피둠
<i>CT1834</i>	AAM73055.1	21647851	클로로비움 테피둠

- [0452] 옥살로아세트산은 말레이트 탈하이드로게나제 (EC 1.1.1.37)에 의해 말레이트로 변환되는데, 이 효소는 정방향과 역방향 둘다로 작용한다. 사카로마이세스 세레비지에는 말레이트 탈하이드로게나제 3카피, *MDH1* (McAlister-Henn and Thompson, *J. Bacteriol.* 169:5157-5166 (1987), *MDH2* (Minard and McAlister-Henn, *Mol. Cell. Biol.* 11:370-380 (1991); Gibson and McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 278:25628-25636 (2003)), 및 *MDH3* (Steffan and McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 267:24708-24715 (1992))를 가지고 있으며, 각각 미토콘드리아, 세포질 및 퍼옥시좀에 위치되어 있다. *E. coli*는 *mdh*에 의해 코딩되는 활성 말레이트 탈하이드로게나제를 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

표 83

[0453]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>MDH1</i>	NP_012838	6322765	사카로마이세스 세레비지애
<i>MDH2</i>	NP_014515	116006499	사카로마이세스 세레비지애
<i>MDH3</i>	NP_010205	6320125	사카로마이세스 세레비지애
<i>Mdh</i>	NP_417703.1	16131126	에스케리키아 콜라이

- [0454] 푸마레이트 하이드라타제 (EC 4.2.1.2)는 푸마레이트의 말레이트로의 가역적인 수화를 촉매한다. *fumA*, *fumB* 및 *fumC*에 의해 코딩되는 *E. coli*의 3종의 푸마라제는 다른 산소이용성 조건에서 조절된다. FumB는 산소에 민감하며, 혐기성 조건에서 활성을 띈다. FumA는 미세혐기성 조건에서 활성을 띄며, FumC는 호기성 생장 조건들에서 활성을 띈다 (Tseng et al., *J. Bacteriol.* 183:461-467 (2001); Woods et al., *Biochim. Biophys. Acta* 954:14-26 (1988); Guest et al., *J. Gen. Microbiol.* 131:2971-2984 (1985)). 사카로마이세스 세레비지애는 푸마라제-코딩 유전자, *FUM1*을 1 카피 가지고 있으며, 이의 산물은 세포질과 미토콘드리아 둘다에 국지화된다 (Sass et al., *J. Biol. Chem.* 278:45109-45116 (2003)). 추가적인 푸마라제 효소로는 캄필로박터 제주니 (Smith et al., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31:961-975 (1999)), 서무스 서모필러스 (Mizobata et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 355:49-55 (1998)) 및 라투스 노르베기쿠스 (Kobayashi et al., *J. Biochem.* 89:1923-1931 (1981))에서 확인된다. 서열 상동성이 높은 유사한 효소로는 아라비도시스 탈리아나 유래의 *fum1*과 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 *fumC*를 포함한다. 펠로토마쿨럼 서모프로피오니쿰 (*Pelotomaculum thermopropionicum*) 유래의 *MmcBC* 푸마라제는 2개의 서브유닛을 포함하는 다른 유형의 푸마라제이다 (Shimoyama et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 270:207-213 (2007)).

표 84

[0455]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fumA</i>	NP_416129.1	16129570	에스케리키아 콜라이
<i>fumB</i>	NP_418546.1	16131948	에스케리키아 콜라이
<i>fumC</i>	NP_416128.1	16129569	에스케리키아 콜라이
<i>FUM1</i>	NP_015061	6324993	사카로마이세스 세레비지애
<i>fumC</i>	Q8NRN8.1	39931596	코리네박테리움 글루타미쿰
<i>fumC</i>	O69294.1	9789756	캄필로박터 제주니
<i>fumC</i>	P84127	75427690	서무스 서모필러스
<i>fumH</i>	P14408.1	120605	라투스 노르베기쿠스
<i>MmcB</i>	YP_001211906	147677691	펠로토마쿨럼 서모프로피오니쿰
<i>MmcC</i>	YP_001211907	147677692	펠로토마쿨럼 서모프로피오니쿰

[0456] 푸마레이트 리덕타제는 푸마레이트의 숙시네이트로의 환원을 촉매한다. *E. coli*의 푸마레이트 리덕타제는 *frdABCD*에 의해 코딩된 4개의 서브유닛들로 구성되어 있으며, 막-결합형이며, 혐기성 조건에서 활성을 나타낸다. 이러한 반응의 전자 공여체는 메나퀴논이고, 이 반응에서 생성되는 2개의 양성자는 양성자 구배를 야기하지 않는다 (Iverson et al., *Science* 284:1961-1966 (1999)). 효모 계놈은 FRDS1 (Enomoto et al., *DNA Res.* 3:263-267 (1996)) 및 FRDS2 (Muratsubaki et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 352:175-181 (1998))에 의해 코딩되는 2개의 가용성 푸마레이트 리덕타제 이소자임을 코딩하며, 이들은 각각 세포질과 프로미토콘드리아에 국지적으로 위치하며, 글루코스에서의 혐기성 증식에 사용된다 (Arikawa et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 165:111-116 (1998)).

표 85

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>FRDS1</i>	P32614	418423	사카로마이세스 세레비지애
<i>FRDS2</i>	NP_012585	6322511	사카로마이세스 세레비지애
<i>frdA</i>	NP_418578.1	16131979	에스케리키아 콜라이
<i>frdB</i>	NP_418577.1	16131978	에스케리키아 콜라이
<i>frdC</i>	NP_418576.1	16131977	에스케리키아 콜라이
<i>frdD</i>	NP_418475.1	16131877	에스케리키아 콜라이

[0458] ATP-의존적인 방식으로 숙시네이트를 숙시닐-CoA로 아실화하는 과정은 숙시닐-CoA 신테타제 (EC 6.2.1.5)에 의해 촉매된다. 사카로마이세스 세레비지애의 *LSC1* 및 *LSC2* 유전자와, *E. coli*의 *sucC* 및 *sucD* 유전자 산물은, 천연적으로, 하나의 ATP를 소비하면서 동시에 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA를 제조하는, 생체내에서의 가역적인 반응을 촉매하는 숙시닐-CoA 신테타제 복합체를 형성한다 (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). 이들 단백질을 하기에 나타낸다:

표 86

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>LSC1</i>	NP_014785	6324716	사카로마이세스 세레비지애
<i>LSC2</i>	NP_011760	6321683	사카로마이세스 세레비지애
<i>sucC</i>	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
<i>sucD</i>	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이

[0460] 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제 (EC 1.2.7.3)는, 2-옥소글루타레이트 신타제 또는 2-옥소글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제 (OFOR)로도 알려져 있으며, 2개의 페레독신 환원 당량들을 소비하면서 CO₂와 숙시닐-CoA로부터 알파-케토글루타레이트를 만든다. OFOR와 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제 (PFOR)는 티아민 피로프스페이트, CoA 및 철-황 클러스터들을 조인자로, 페레독신, 플라보독신 및 FAD를 전자전달체로 이용하는, 다양한 2-옥소산:페레독신 (플라보독신) 옥시도리덕타제 패밀리에 속한다 (Adams et al., *Archaea. Adv. Protein Chem.* 48:101-180 (1996)). 이러한 유형의 효소들은 가역적이며, 탄소를 RTCA 회로에 의해 고정하는 유기체, 예를 들면 하이드로게노박터 서모필러스, 데설포박터 하이드로게노필러스 (*Desulfobacter hydrogenophilus*) 및 클로로비움 중에서 카르복시화하는 방향으로 작용한다 (Shiba et al. 1985; Evans et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55:92934 (1966); Buchanan, 1971). *korAB*에 의해 코딩되는 하이드로게노박터 서모필러스 유래의 2개의 서브유닛 효소들은 클로닝되었으며 *E. coli*에서 발현되었다 (Yun et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:589-594 (2001)). 동일 유기체로부터 유래된 숙시닐-CoA에 대한 엄격한 기질 특이성을 가지며 *forDABGE*에 의해 코딩되는, 5 서브유닛 OFOR도 최근에 동정되었으며, *E. coli*에서 발현되었다 (Yun et al. 2002). 이들 2가지 하이드로게노박터 서모필러스의 OFOR 효소들 모두 CO₂ 고정에 대한 카이네틱스가 특정화되었다 (Yamamoto et al., *Extremophiles* 14:79-85 (2010)). 클로로비움 티오설파토필럼 (*Chlorobium thiosulfatophilum*)으로부터 CO₂를 고정하는 OFOR가 정제되었으며, 특정화되었지만, 이 효소를 코딩하는 유전자는 지금까지 동정되지 않았다. 클로로비움 중에서 후보 효소들을 하이드로게노박터 서모필러스

유전자에 대한 서열 유사성을 통해 추론할 수 있다. 예를 들어, 클로로비움 리미콜라 계놈은 유사 단백질 2개를 코딩한다. 초산생성균, 예컨대 무렐라 서모아세티카 (*Moorella thermoacetica*)는 2개의 OFOR 효소들을 코딩하는 것으로 예측된다. *Moth_0034* 에 의해 코딩되는 이 효소는 CO₂-동화 방향으로 작용할 것으로 예상된다. 이 효소와 연관되는 유전자 *Moth_0034*는 지금까지 실험적으로 검증되지 않았지만 공지된 OFOR 효소들과의 서열 유사성을 통해 추정할 수 있다.

[0461]

생리적 조건에서 탈카르복시화 방향으로 작용하는 OFOR 효소들은 또한 역 반응도 촉매할 수 있다. 호열호산성 고세균인 설폴로부스 sp. strain 7로부터 유래된 ST2300에 의해 코딩되는 OFOR에 대해서는 광범위하게 연구되었다 (Zhang et al. 1996). 플라스미드-기반의 발현 시스템이 *E. coli*에서 이 단백질을 효율적으로 발현시키기 위해 개발되었으며 (Fukuda et al., Eur. J. Biochem. 268:5639-5646 (2001)), 기질 특이성에 관여하는 잔기들이 결정되었다 (Fukuda and Wakagi, Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002)). 에어로피럼 페르닉스 (*Aeropyrum pernix*) str K1으로부터 유래된 *Ape1472/Ape1473*에 의해 코딩되는 OFOR가 최근 *E. coli*에 클로닝 및 특정화되었으며, 2-옥소글루타레이트 및 매우 다양한 2-옥소산 화합물과 반응하는 것으로 확인되었다 (Nishizawa et al., FEBS Lett. 579:2319-2322 (2005)). OFOR의 다른 예는 헬리코박터 필로리의 *oorDABC*에 의해 코딩된다 (Hughes et al. 1998). 알파-케토글루타레이트 특이적인 효소가 타우에라 아로마티카 (*Thauera aromatica*)에서 보고되었다 (Dorner and Boll, J. Bacteriol. 184 (14), 3975-83 (2002)). 유사 효소는 로도스피릴럼 루브럼 (*Rhodospirillum rubrum*)에서도 서열 상동성에 의해 확인할 수 있다. 2 서브유닛 효소는 또한 클로로비움 테피둠에서도 동정되었다 (Eisen et al., PNAS 99(14): 9509-14 (2002)).

표 87

[0462]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>korA</i>	BAB21494	12583691	하이드로게노박터 서모필러스
<i>korB</i>	BAB21495	12583692	하이드로게노박터 서모필러스
<i>forD</i>	BAB62132.1	14970994	하이드로게노박터 서모필러스
<i>forA</i>	BAB62133.1	14970995	하이드로게노박터 서모필러스
<i>forB</i>	BAB62134.1	14970996	하이드로게노박터 서모필러스
<i>forG</i>	BAB62135.1	14970997	하이드로게노박터 서모필러스
<i>forE</i>	BAB62136.1	14970998	하이드로게노박터 서모필러스
<i>Clim_0204</i>	ACD89303.1	189339900	클로로비움 리미콜라
<i>Clim_0205</i>	ACD89302.1	189339899	클로로비움 리미콜라
<i>Clim_1123</i>	ACD90192.1	189340789	클로로비움 리미콜라
<i>Clim_1124</i>	ACD90193.1	189340790	클로로비움 리미콜라
<i>Moth_1984</i>	YP_430825.1	83590816	무렐라 서모아세티카
<i>Moth_1985</i>	YP_430826.1	83590817	무렐라 서모아세티카
<i>Moth_0034</i>	YP_428917.1	83588908	무렐라 서모아세티카
<i>ST2300</i>	NP_378302.1	15922633	설폴로부스 sp. strain 7
<i>Ape1472</i>	BAA80470.1	5105156	에어로피럼 페르닉스
<i>Ape1473</i>	BAA80471.2	116062794	에어로피럼 페르닉스
<i>oorD</i>	NP_207383.1	15645213	헬리코박터 필로리
<i>oorA</i>	NP_207384.1	15645214	헬리코박터 필로리
<i>oorB</i>	NP_207385.1	15645215	헬리코박터 필로리
<i>oorC</i>	NP_207386.1	15645216	헬리코박터 필로리
<i>CT0163</i>	NP_661069.1	21673004	클로로비움 테피둠
<i>CT0162</i>	NP_661068.1	21673003	클로로비움 테피둠
<i>korA</i>	CAA12243.2	19571179	타우에라 아로마티카
<i>korB</i>	CAD27440.1	19571178	타우에라 아로마티카
<i>Rru_A2721</i>	YP_427805.1	83594053	로도스피릴럼 루브럼
<i>Rru_A2722</i>	YP_427806.1	83594054	로도스피릴럼 루브럼

[0463]

이소시트레이트 데하이드로게나제는 NAD(P)⁺ 환원과 커플링된 이소시트레이트의 2-옥소글루타레이트로의 가역적

인 탈카르복시화를 촉매한다. 사카로마이세스 세레비지에와 에스케리키아 콜라이의 IDH 효소들은 각각 *IDP1* 및 *icd*에 코딩되어 있다 (Haselbeck and McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 266:2339-2345 (1991); Nimmo, H.G., *Biochem. J.* 234:317-2332 (1986)). 환원성 TCA 사이클에서 역 반응, 즉 2-옥소글루타레이트를 이소시트레이트로 환원성 카르복시화하는 반응은 클로로비움 리미콜라 유래의 NADPH-의존적인 CO₂-고정성 IDH에 의해 이루어지며, 기능적으로 *E. coli*에서 발현되었다 (Kanao et al., *Eur. J. Biochem.* 269:1926-1931 (2002)). 하기에 열거된 일부 다른 후보 효소들 외에도, 서열 동일성이 95%인 유사 효소는 클로로비움 테피둠 계놈에서도 확인된다.

표 88

[0464]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>Icd</i>	ACI84720.1	209772816	에스케리키아 콜라이
<i>IDP1</i>	AAA34703.1	171749	사카로마이세스 세레비지에
<i>Idh</i>	BAC00856.1	21396513	클로로비움 리미콜라
<i>Icd</i>	AAM71597.1	21646271	클로로비움 테피둠
<i>icd</i>	NP_952516.1	39996565	지오박터 셀푸레두센스
<i>icd</i>	YP_393560.	78777245	셀푸리모나스 데니트리피칸스

[0465]

하이드로게노박터 서모필러스에서 2-옥소글루타레이트를 이소시트레이트로 환원적으로 카르복시화하는 반응은 2개의 효소에 의해 촉매된다: 2-옥소글루타레이트 카르복실라제 및 옥살로숙시네이트 리덕타제. 2-옥소글루타레이트 카르복실라제 (EC 6.4.1.7)는 알파-케토글루타레이트를 옥살로숙시네이트로 ATP-의존적으로 카르복시화하는 반응을 촉매한다 (Aoshima and Igarashi, *Mol. Microbiol.* 62:748-759 (2006)). 이 효소는 2개의 서브유닛으로 구성된 큰 복합체이다. 큰 (A) 서브유닛의 비오틴화는 효소 기능에 필수적이다 (Aoshima et al., *Mol. Microbiol.* 51:791-798 (2004)). 옥살로숙시네이트 리덕타제 (EC 1.1.1.-)는 옥살로숙시네이트를 D-트레오-이소시트레이트로 NAD-의존적인 방식으로 변환하는 과정을 촉매한다. 이 효소는 하이드로게노박터 서모필러스의 *icd*에 의해 코딩되는 동형이량체이다. 기타 유기체에서의 이소시트레이트 데하이드로게나제 효소와는 대조적으로, 이 효소의 카이네틱 파라미터들은, 이 효소가 생체내에서 환원성 카르복시화 방향으로만 작동하는 것으로 나타났다 (Aoshima and Igarashi, *J. Bacteriol.* 190:2050-2055 (2008)). 서열 상동성을 토대로, 티오바실러스 데니트리피칸스 (*Thiobacillus denitrificans*)와 서모크리니스 알부스 (*Thermocrinis albus*)에서도 후보 유전자들을 확인하였다.

표 89

[0466]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>cfiA</i>	BAF34932.1	116234991	하이드로게노박터 서모필러스
<i>cfiB</i>	BAF34931.1	116234990	하이드로게노박터 서모필러스
<i>Icd</i>	BAD02487.1	38602676	하이드로게노박터 서모필러스
<i>Tbd_1556</i>	YP_315314	74317574	티오바실러스 데니트리피칸스
<i>Tbd_1555</i>	YP_315313	74317573	티오바실러스 데니트리피칸스
<i>Tbd_0854</i>	YP_314612	74316872	티오바실러스 데니트리피칸스
<i>Thal_0268</i>	YP_003473030	289548042	서모크리니스 알부스
<i>Thal_0267</i>	YP_003473029	289548041	서모크리니스 알부스
<i>Thal_0646</i>	YP_003473406	289548418	서모크리니스 알부스

[0467]

아코니타제 (EC 4.2.1.3)는 중간산물 시스-아코니테이트를 경유하여 시트레이트와 이소-시트레이트의 가역적인 이성체화를 촉매하는 철-황-함유 단백질이다. 이들 2가지 아코니타제는 *E. coli* 계놈에 *acnA* 및 *acnB*에 의해 코딩되어 있다. AcnB는 주요 이화작용 효소이고, AcnA는 보다 안정적이며 산화 또는 산 스트레스 조건에서 활성을 나타내는 것으로 보인다 (Cunningham et al., *Microbiology* 143 (Pt 12):3795-3805 (1997)). 살모넬라 티피무리움에는 2개의 아코니타제 이소자임이 *acnA*와 *acnB*에 코딩되어 있다 (Horswill and Escalante-Semerena, *Biochemistry* 40:4703-4713 (2001)). 사카로마이세스 세레비지에 아코니타제는 *ACO1*에 의해 코딩되어 있으며, TCA 사이클에 참여하는 경우 미토콘드리아 (Gangloff et al., *Mol. Cell. Biol.* 10:3551-3561

(1990))에, 글리옥실레이트 셉트 (glyoxylate shunt)에 참여하는 경우 세포질 (Regev-Rudzki et al., *Mol. Biol. Cell.* 16:4163-4171 (2005))에 국지화된다.

표 90

[0468]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>acnA</i>	AAC7438.1	1787531	에스케리키아 콜라이
<i>acnB</i>	AAC73229.1	2367097	에스케리키아 콜라이
<i>acnA</i>	NP_460671.1	16765056	살모넬라 티피무리움
<i>HP0779</i>	NP_207572.1	15645398	헬리코박터 필로리 26695
<i>H16_B0568</i>	CAJ95365.1	113529018	랄스토니아 유티로파
<i>DesfrDRAFT_3783</i>	ZP_07335307.1	303249064	데설포비브리오 프럭토소보란스 JJ
<i>Suden_1040 (acnB)</i>	ABB44318.1	78497778	셀푸리모나스 데니트리피칸스
<i>Hydth_0755</i>	ADO45152.1	308751669	하이드로게노박터 서모필러스
<i>CT0543 (acn)</i>	AAM71785.1	21646475	클로로비움 테피둠
<i>Clim_2436</i>	YP_001944436.1	189347907	클로로비움 리미콜라
<i>Clim_0515</i>	ACD89607.1	189340204	클로로비움 리미콜라
<i>acnB</i>	NP_459163.1	16763548	살모넬라 티피무리움
<i>ACO1</i>	AAA34389.1	170982	사카로마이세스 세레비자에

[0469]

피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제 (PFOR)는 피루베이트의 가역적 산화를 촉매하여 아세틸CoA를 형성한다. 데설포비브리오 아프리카누스 (*Desulfovibrio africanus*) 유래의 PFOR는 클로닝되어 *E. coli*에서 발현시켜, 산소 존재 하에 수일간 안정적인 활성형 재조합 효소를 수득하였다 (Pieulle et al., *J. Bacteriol.* 179:5684-5692 (1997)). 산소 안정성은 PFOR에서는 상대적으로 드문 일이며, 데설포비브리오 아프리카누스 효소의 폴리펩타이드 체인에 잔기 60개를 연장시킴으로써 부여되는 것으로 보인다. 이 효소에서 시스테인 잔기 2개가 이황화 결합을 형성하는데, 이는 산소 형태의 불활성화로부터 효소를 보호된다. 이러한 이황화 결합과 산소 존재 하에서의 안정성은 다른 데설포비브리오 sp.에서도 발견되었다 (Vita et al., *Biochemistry*, 47: 957-64 (2008)). 무렐라 서모아세티카 PFOR 역시 잘 특정화되어 있으며 (Menon and Ragsdale, *Biochemistry* 36:8484-8494 (1997)), 독립영양 생장시에 피루베이트를 합성하는 방향으로 높은 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다 (Furdui and Ragsdale, *J. Biol. Chem.* 275:28494-28499 (2000)). 또한, *E. coli*는 무렐라 서모아세티카 PFOR와 51% 동일한 단백질을 코딩하는 불특정화된 오픈 리딩 프레임 *ydbK*을 가지고 있다. *E. coli*에서 피루베이트 옥시도리덕타제 활성에 대한 증거가 개시되었다 (Blaschkowski et al., *Eur. J. Biochem.* 123:563-569 (1982)). PFOR는 또한 로도박터 캡슐라타스 (*Rhodobacter capsulatas*) (Yakunin and Hallenbeck, *Biochimica et Biophysica Acta* 1409 (1998) 39-49 (1998)) 및 콜로보움 테피둠 (*Choloboum tepidum*) (Eisen et al., *PNAS* 99(14): 9509-14 (2002))을 비롯한, 다른 유기체들에서도 보고되었다. 하이드로게노박터 서모필러스 유래의 *porEDABG*에 의해 코딩되는 5개의 서브유닛 PFOR을 *E. coli*에 클로닝하였고, 탈카르복시화와 CO₂를 동화하는 방향으로 작동하는 것으로 확인되었다 (Ikeda et al. 2006; Yamamoto et al., *Extremophiles* 14:79-85 (2010)). 또한, 상동체는 클로스트리둠 카복시디보란스 (*Clostridium carboxidivorans*) P7에도 존재한다. 여러 추가적인 PFOR 효소들은 리뷰에 기재되어 있다 (Ragsdale, S.W., *Chem. Rev.* 103:2333-2346 (2003)). 마지막으로, 플라보독신 리덕타제 (예, 헬리코박터 필로리 또는 캄필로박터 제주니 유래의 *fqrB*) (St Maurice et al., *J. Bacteriol.* 189:4764-4773 (2007)) 또는 Rnf-유형의 단백질들 (Seedorf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:2128-2133 (2008); 및 Herrmann, *J. Bacteriol* 190:784-791 (2008))은 PFOR에 의해 생성된 환원된 페레독신으로부터 NADH 또는 NADPH을 생성하는 수단을 제공한다. 이들 단백질은 아래에 나타낸다.

표 91

[0470]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>DesfrDRAFT_0121</i>	ZP_07331646.1	303245362	데설포비브리오 프럭토소보란스 JJ
<i>Por</i>	CAA70873.1	1770208	데설포비브리오 아프리카누스
<i>por</i>	YP_012236.1	46581428	데설포비브리오 불가리스 str. 힐덴보러프
<i>Dde_3237</i>	ABB40031.1	78220682	데설포비브리오 데설포푸리칸스 G20

Ddes_0298	YP_002478891.1	220903579	데셀포비브리오 데셀푸리칸스 아종 데셀푸리칸스 <i>str. ATCC 27774</i>
Por	YP_428946.1	83588937	무렐라 서모아세티카
YdbK	NP_415896.1	16129339	에스케리키아 콜라이
nifJ (CT1628)	NP_662511.1	21674446	클로로비움 테피둠
CJE1649	YP_179630.1	57238499	캡필로박터 제주니
nifJ	ADE85473.1	294476085	로도박터 캡슐라투스
porE	BAA95603.1	7768912	하이드로게노박터 서모필러스
porD	BAA95604.1	7768913	하이드로게노박터 서모필러스
porA	BAA95605.1	7768914	하이드로게노박터 서모필러스
porB	BAA95606.1	776891	하이드로게노박터 서모필러스
porG	BAA95607.1	7768916	하이드로게노박터 서모필러스
FqrB	YP_001482096.1	157414840	캡필로박터 제주니
HP1164	NP_207955.1	15645778	헬리코박터 필로리
RnfC	EDK33306.1	146346770	클로스트리듐 클루이베리
RnfD	EDK33307.1	146346771	클로스트리듐 클루이베리
RnfG	EDK33308.1	146346772	클로스트리듐 클루이베리
RnfE	EDK33309.1	146346773	클로스트리듐 클루이베리
RnfA	EDK33310.1	146346774	클로스트리듐 클루이베리
RnfB	EDK33311.1	146346775	클로스트리듐 클루이베리

[0471] 피루베이트의 아세틸-CoA로의 변환은 수종의 다른 효소들이나 이들의 조합에 의해 촉매될 수 있다. 예를 들어, 피루베이트 데하이드로게나제는 NAD 1분자를 NADH 환원시키면서 동시에 피루베이트를 아세틸-CoA로 변환한다. 이것은, 일련의 부분 반응들을 촉매하여 피루베이트의 아실화 산화적 탈카르복시화를 달성하는, 다중-효소 복합체이다. 이 효소는 3개의 서브유닛, 즉 피루베이트 데카르복실라제 (E1), 다이하이드로리포아미드 아실트랜스퍼라제 (E2) 및 다이하이드로리포아미드 데하이드로게나제 (E3)로 구성되어 있다. 이 효소는 천연적으로 여러 유기체들, 예를 들어 *E. coli* 및 사카로마이세스 세레비지에에 존재한다. *E. coli* 효소의 경우, E1 성분내 특정 잔기들이 기질 특이성을 담당한다 (Bisswanger, H., J. Biol. Chem. 256:815-82 (1981); Bremer, J., Eur. J. Biochem. 8:535-540 (1969); Gong et al., J. Biol. Chem. 275:13645-13653 (2000)). 효소 조작 시도를 통해 혐기성 조건에서 *E. coli*의 PDH 효소 활성이 개선되었다 (Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Zhou et al., Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). *E. coli*의 PDH와는 다르게, 바실러스 섭틸러스에서의 복합체는 혐기성 조건에서 활성을 나타내며, 혐기 조건에서 증식하는데 필수적이다 (Nakano et al., J. Bacteriol. 179:6749-6755 (1997)). 글리세롤에서의 배양에서 특화된 클렙시엘라 뉴모니애의 PDH 역시 혐기성 조건에서 활성을 나타낸다 (5). 소신장 유래의 효소 복합체의 결정 구조 (18)와 아조토박터 비넬란디이 유래의 E2 촉매 도메인이 이용가능하다 (4). 이러한 변환을 촉매할 수 있는 또 다른 효소는 피루베이트 포르메이트 리아제이다. 이 효소는 피루베이트와 CoA를 아세틸-CoA과 포르메이트로 변환하는 반응을 촉매한다. 피루베이트 포르메이트 리아제는 혐기성 레독스 균형 조절에 일조하는, 원핵 유기체에서 공통된 효소이다. 이 효소의 예로는 *pflB*에 의해 코딩되는 *에스케리키아 콜라이* (Knappe and Sawers, FEMS.Microbiol Rev. 6:383-398 (1990)), 락토코커스 락티스 (Melchiorsen et al., Appl Microbiol Biotechnol 58:338-344 (2002)), 및 스트렙토코커스 무탄스 (Takahashi-Abbe et al., Oral.Microbiol Immunol. 18:293-297 (2003))에서 확인할 수 있다. *E. coli*는 *tdcE*에 의해 코딩되는 추가적인 피루베이트 포르메이트 리아제를 가지고 있으며, 이것은 피루베이트 또는 2-옥소부타노에이트를 각각 아세틸-CoA 또는 프로피오닐-CoA로 변환하는 과정을 촉매한다 (Hesslinger et al., Mol. Microbiol 27:477-492 (1998)). *E. coli* 유래의 *pflB*와 *tdcE* 둘다 *pflA*에 코딩된 피루베이트 포르메이트 리아제 활성화 효소를 필요로 한다. 또한, *E. coli*의 *yfiD*에 코딩된 짧은 단백질은 산소-절단성 피루베이트 포르메이트 리아제와 관련있을 수 있으며, 활성을 복원할 수 있다 (Vey et al., Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:16137-16141 (2008)). WO/2008/080124에 기재된 바와 같이, 부탄올을 생산하기 위해 세포질내 아세틸-CoA를 증가시키기 위한 수단으로서 *E. coli* 유래의 *pflA*와 *pflB*를 사카로마이세스 세레비지에에서 발현시켰다. 각각 *pfl* 및 *act*에 의해 코딩되는 추가적인 피루베이트 포르메이트 리아제와 이의 활성화 효소에 대한 후보 효소는 클로스트리움 파스테리아눔에서 확인된다 (Weidner et al., J Bacteriol. 178:2440-2444 (1996)).

[0472] 또한, 피루베이트를 아세틸-CoA로 변환하기 위해 여러가지 효소들을 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 사카로마이세스 세레비지에에서, 아세틸-CoA는 세포질에서, 먼저 피루베이트가 탈카르복시화되어 아세트알데하이드

드로 된 다음, 아세트알데하이드 데하이드로게나제에 의해 아세테이트로 산화되고, 이어 아세틸-CoA 신테타제에 의해 아세틸-CoA로 활성화됨으로써, 수득된다. 아세틸-CoA 신테타제는, *E. coli* (Kumari et al., J. Bacteriol. 177:2878-2886 (1995)), 살모넬라 엔테리카 (Starai et al., Microbiology 151:3793-3801 (2005); Starai et al., J. Biol. Chem. 280:26200-26205 (2005)), 및 무렐라 서모아세티카 (상기에 기술됨) 등의 몇몇 다른 유기체들에 존재하는 천연적인 효소이다. 다른 예로, 아세테이트는 아세테이트 키나제와 포스포트랜스아세틸라제에 의해 활성화되어 아세틸-CoA가 된다. 아세테이트 키나제는 ATP 분자를 이용하면서 먼저 아세테이트를 아세틸포스페이트로 변환시킨다. 아세틸-포스페이트와 CoA는 포스포트랜스아세틸라제에 의해 포스페이트 1분자를 방출하면서 아세틸-CoA로 변환된다. 아세테이트 키나제와 포스포트랜스아세틸라제는 모두 수종의 클로스트리움 속 세균과 메타노사르시나 서모필라 (*Methanosarcina thermophila*)에서 잘 연구된 효소이다.

[0473] 피루베이트를 아세틸-CoA로 변환하는 또 다른 방법은 피루베이트 옥시다제에 의한 것이다. 피루베이트 옥시다제는 유비퀴논을 전자 어셉터로서 사용하여 피루베이트를 아세테이트로 변환시킨다. *E. coli*에서, 이러한 활성화는 *poxB*에 의해 코딩된다. *PoxB*는 사카로마이세스 세레비지애와 및 자이모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*)의 피루베이트 데카르복실라제와 유사성을 가진다. 이 효소는 티아민 피로포스페이트 조인자 (Koland and Gennis, Biochemistry 21:4438-4442 (1982)); O'Brien et al., Biochemistry 16:3105-3109 (1977); O'Brien and Gennis, J. Biol. Chem. 255:3302-3307 (1980))와 플라빈 아데닌 다이뉴클레오티드 (FAD) 조인자를 가진다. 그런 후, 아세테이트는 전술된 바와 같이 아세틸-CoA 신테타제 또는 아세테이트 키나제 및 포스포트랜스아세틸라제에 의해 아세틸-CoA로 변환시킬 수 있다. 이들 효소들 중 일부는 아세틸-CoA에서 피루베이트로의 역반응을 촉매할 수도 있다.

[0474] NADH 또는 NADPH 형태의 환원 당량들을 이용하는 효소들의 경우, 환원된 페레독신으로부터 전자들을 전달함으로써 이들 환원된 전달체를 재생할 수 있다. 2가지 효소는, 전자를 환원된 페레독신으로부터 페레독신:NAD⁺ 옥시도리덕타제 (EC 1.18.1.3)와 페레독신:NADP⁺ 옥시도리덕타제 (FNR, EC 1.18.1.2)로 가역적으로 전달하는 과정을 촉매한다. 페레독신:NADP⁺ 옥시도리덕타제 (FNR, EC 1.18.1.2)는 NADPH에서 저-전위 어셉터, 예를 들어 페레독신 또는 플라보독신으로 전자를 가역적으로 전달하는 과정을 촉진하는, 비공유적으로 결합된 FAD 조인자를 가진다 (Blaschkowski et al., Eur. J. Biochem. 123:563-569 (1982); Fujii et al., 1977). *HP1164* (*fqrB*)에 의해 코딩되는 헬리코박터 필로리의 FNR은, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제 (PFOR)의 활성화와 커플링되어 이어, 피루베이트-의존적으로 NADPH를 생산한다 (St et al. 2007). 유사한 효소는 캄필로박터 제주니에서도 확인된다 (St et al. 2007). 페레독신:NADP⁺ 옥시도리덕타제 효소는 *E. coli* 계놈에 *fpr*에 의해 코딩되어 있다 (Bianchi et al. 1993). 페레독신:NAD⁺ 옥시도리덕타제는 환원된 페레독신을 이용하여 NAD⁺로부터 NADH를 생성한다. *E. Coli*를 비롯하여, 몇몇 유기체들에서, 이 효소는 다기능성 다이옥시게나제 효소 복합체를 구성하는 한가지 성분이다. *E. Coli*의 페레독신:NAD⁺ 옥시도리덕타제는 *hcaD*에 의해 코딩되어 있으며, 방향족 산 이용에 참여하는 3-페닐프로피오네이트 다이옥시게나제 시스템의 한가지 성분이다 (Diaz et al. 1998). NADH:페레독신 리덕타제 활성화는 하이드로게노박터 서모필러스 균주 TK-6의 세포 추출물에서 검출되었지만, 이러한 활성을 가진 유전자는 아직 밝혀지지 않았다 (Yoon et al. 2006). 마지막으로, 에너지-보존형 (energy-conserving) 막-관련 Rnf 타입의 단백질 (Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:2128-2133 (2008); Herrmann et al., J. Bacteriol. 190:784-791 (2008))은 환원된 페레독신으로부터 NADH 또는 NADPH를 재생하기 위한 수단을 제공해준다. 다른 페레독신:NAD(P)⁺ 옥시도리덕타제들이 클로스트리움 카르복시디보란스 P7에서 보고되었다.

표 92

[0475]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>HP1164</i>	NP_207955.1	15645778	헬리코박터 필로리
<i>RPA3954</i>	CAE29395.1	39650872	로도슈도모나스 팔루스트리스
<i>fpr</i>	BAH29712.1	225320633	하이드로게노박터 서모필러스
<i>yumC</i>	NP_391091.2	255767736	바실러스 섭틸러스
CJE0663	AAW35824.1	57167045	캄필로박터 제주니
<i>fpr</i>	P28861.4	399486	에스케리키아 콜라이
<i>hcaD</i>	AAC75595.1	1788892	에스케리키아 콜라이
<i>LOC100282643</i>	NP_001149023.1	226497434	지 메이스
<i>RnfC</i>	EDK33306.1	146346770	클로스트리움 클루이베리

<i>RnfD</i>	EDK33307.1	146346771	클로스트리듐 클루이베리
<i>RnfG</i>	EDK33308.1	146346772	클로스트리듐 클루이베리
<i>RnfE</i>	EDK33309.1	146346773	클로스트리듐 클루이베리
<i>RnfA</i>	EDK33310.1	146346774	클로스트리듐 클루이베리
<i>RnfB</i>	EDK33311.1	146346775	클로스트리듐 클루이베리
<i>CcarbDRAFT_2639</i>	ZP_05392639.1	255525707	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>CcarbDRAFT_2638</i>	ZP_05392638.1	255525706	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>CcarbDRAFT_2636</i>	ZP_05392636.1	255525704	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>CcarbDRAFT_5060</i>	ZP_05395060.1	255528241	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>CcarbDRAFT_2450</i>	ZP_05392450.1	255525514	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>CcarbDRAFT_1084</i>	ZP_05391084.1	255524124	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7

[0476]

페레독신은 환원 전위가 낮은 세포내 전자 전달체로 기능하는, 하나 이상의 철-황 클러스터를 함유한 소형 산성 단백질이다. 환원된 페레독신은 Fe-의존적인 효소, 예컨대 페레독신-NADP⁺ 옥시도리덕타제, 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제 (PFOR) 및 2-옥소글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제 (OFOR)에 전자를 제공한다. 하이드로게노박터 서모필러스 유전자인 *fdxI*은 각각 OFOR 및 PFOR에 의한 2-옥소글루타레이트 및 피루베이트의 가역적인 카르복시화에 필수적인 [4Fe-4S]-유형의 페레독신을 코딩한다 (Yamamoto et al., *Extremophiles* 14:79-85 (2010)). 설폴로부스 술파타리쿠스 2-옥소산:페레독신 리덕타제와 조합된 페레독신은 단량체성 다이클러스터 [3Fe-4S][4Fe-4S] 타입의 페레독신이다 (Park et al. 2006). 이 단백질과 관련된 유전자는 아직 서열이 완전히 규명되지 않았지만, N-말단 도메인은 설폴로부스 액시도칼라리우스 유래 *zfx* 페레독신과 93%의 상동성을 공유한다. *E. coli* 계놈은 규명되지 않은 생리학적 기능을 가진 가용성 페레독신 *fdx*을 코딩하고 있다. 일부 증거에 서는, 이러한 단백질이 철-황 클러스터 어셈블리에 기능할 수 있는 것으로 나타났다 (Takahashi and Nakamura, 1999). 추가적인 페레독신 단백질은 헬리코박터 필로리 (Mukhopadhyay et al. 2003)와 캄필로박터 제주니 (van Vliet et al. 2001)에서도 특정화되었다. 클로스트리듐 파스테리아눔 유래의 2Fe-2S 페레독신이 클로닝되었으며, *E. coli*에서 발현되었다 (Fujinaga and Meyer, Biochemical and Biophysical Research Communications, 192(3): (1993)). 초산생성균, 예를 들어 무렐라 서모아세티카, 클로스트리듐 카르복시디보란스 P7 및 로도스피릴럼 루브럼 이 하기 표에 열거된 몇가지 페레독신을 코딩할 것으로 추측된다.

표 93

[0477]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fdxI</i>	BAE02673.1	68163284	하이드로게노박터 서모필러스
M11214.1	AAA83524.1	144806	클로스트리듐 파스테리아눔
<i>Zfx</i>	AAV79867.1	68566938	설폴로부스 액시도칼라리우스
<i>Fdx</i>	AAC75578.1	1788874	에스케리키아 콜라이
<i>hp_0277</i>	AAD07340.1	2313367	헬리코박터 필로리
<i>fdxA</i>	CAL34484.1	112359698	캄필로박터 제주니
<i>Moth_0061</i>	ABC18400.1	83571848	무렐라 서모아세티카
<i>Moth_1200</i>	ABC19514.1	83572962	무렐라 서모아세티카
<i>Moth_1888</i>	ABC20188.1	83573636	무렐라 서모아세티카
<i>Moth_2112</i>	ABC20404.1	83573852	무렐라 서모아세티카
<i>Moth_1037</i>	ABC19351.1	83572799	무렐라 서모아세티카
<i>CcarbDRAFT_4383</i>	ZP_05394383.1	255527515	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>CcarbDRAFT_2958</i>	ZP_05392958.1	255526034	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>CcarbDRAFT_2281</i>	ZP_05392281.1	255525342	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>CcarbDRAFT_5296</i>	ZP_05395295.1	255528511	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>CcarbDRAFT_1615</i>	ZP_05391615.1	255524662	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>CcarbDRAFT_1304</i>	ZP_05391304.1	255524347	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
<i>cooF</i>	AAG29808.1	11095245	카르복시오테무스 하이드로게노포르만스
<i>fdxN</i>	CAA35699.1	46143	로도박터 캡슐라투스
<i>Rru_A2264</i>	ABC23064.1	83576513	로도스피릴럼 루브럼

Rru_A1916	ABC22716.1	83576165	로도스피릴룸 루브럼
Rru_A2026	ABC22826.1	83576275	로도스피릴룸 루브럼
cooF	AAC45122.1	1498747	로도스피릴룸 루브럼
fdxN	AAA26460.1	152605	로도스피릴룸 루브럼
Alvin_2884	ADC63789.1	288897953	알로크로마티움 비노섬 DSM 180
Fdx	YP_002801146.1	226946073	아조토박터 비벨란디아 DJ
CKL_3790	YP_001397146.1	153956381	클로스트리듐 클루이베리 DSM 555
fer1	NP_949965.1	39937689	로도슈도모나스 팔루스트리스 CGA009
Fdx	CAA12251.1	3724172	타우에라 아로마티카
CHY_2405	YP_361202.1	78044690	카르복시오테무스 하이드로게노포르만스
Fer	YP_359966.1	78045103	카르복시오테무스 하이드로게노포르만스
Fer	AAC83945.1	1146198	바실러스 섭틸리스
fdx1	NP_249053.1	15595559	슈도모나스 에어루지노사 PA01
yfhL	AP_003148.1	89109368	에스케리키아 콜라이 K-12

[0478] 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제는 숙시닐-CoA의 숙시네이트로의 변환을 촉매하면서, CoA 모이어터를 CoA 어셉터 분자로 이동시킨다. 다수의 트랜스퍼라제들은 특이성이 넓으며, 특히 아세테이트, 숙시네이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 2-메틸아세토아세테이트, 3-케토헥사노에이트, 3-케토펜타노에이트, 발레레이트, 크로토네이트, 3-머캅토프로피오네이트, 프로피오네이트, 비닐아세테이트, 및 부티레이트와 같이 다양한 CoA 어셉터들을 이용할 수 있다.

[0479] 숙시네이트에서 숙시닐-CoA로의 변환은 ATP 또는 GTP의 직접 소비하지 않는 트랜스퍼라제에 의해 수행된다. 이러한 타입의 반응은 다수의 유기체들에서 일반적이다. 숙시네이트에서 숙시닐-CoA로의 변환은 숙시닐-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제에 의해서도 촉매할 수 있다. 클로스트리듐 클루이베리의 *cat1* 유전자 산물은 숙시닐-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제 활성을 발휘하는 것으로 밝혀졌다 (Sohling and Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)). 또한, 이 활성은 트리코모나스 바기날리스 (*Trichomonas vaginalis*) (van Grinsven et al. 2008)와 트립아노소마 브루세이 (*Trypanosoma brucei*) (Riviere et al. 2004)에도 존재한다. 아세트박터 아세티 유래의, *aarC*에 의해 코딩되는 숙시닐-CoA:아세테이트 CoA-트랜스퍼라제는 변이된 TCA 사이클에서 숙시닐-CoA 신테타제를 대체한다 (Mullins et al. 2008). 유사한 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 활성은 또한 트리코모나스 바기날리스 (van Grinsven et al. 2008), 트립파노소마 브루세이 (Riviere et al. 2004) 및 클로스트리듐 클루이베리 (Sohling and Gottschalk, 1996c)에도 존재한다. 슈도모나스 푸티타에 있는 *pcaI* 및 *pcaJ*에 의해 코딩되는 베타-케토아디페이트:숙시닐-CoA 트랜스퍼라제도 또 다른 후보체이다 (Kaschabek et al. 2002). 전술한 단백질들을 아래에 나타낸다.

표 94

[0480]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>cat1</i>	P38946.1	729048	클로스트리듐 클루이베리
<i>TVAG_395550</i>	XP_001330176	123975034	트리코모나스 바기날리스 G3
<i>Tb11.02.0290</i>	XP_828352	71754875	트리파노소마 브루세이
<i>pcaI</i>	AAN69545.1	24985644	슈도모나스 푸티타
<i>pcaJ</i>	NP_746082.1	26990657	슈도모나스 푸티타
<i>aarC</i>	ACD85596.1	189233555	아세트박터 아세티

[0481] 숙시네이트를 숙시닐-CoA로 변환하면서 3-케토아실-CoA를 3-케토산으로 변환하는 추가적인 트랜스퍼라제의 예는 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제 (EC 2.8.3.5)이다. 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제의 예는 헬리코박터 필로리 (Corthesy-Theulaz et al. 1997), 바실러스 섭틸리스, 및 호모 사피엔스 (Fukao et al. 2000; Tanaka et al. 2002)에도 존재한다. 전술한 단백질들을 아래에 나타낸다.

표 95

[0482]

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

[0483]

숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제에 의해, 숙시네이트를 숙시닐-CoA로 변환하는 반응에는, 3-케토아실-CoA, 예를 들어 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트와 같은 3-케토산으로 동시에 변환하는 과정이 필요하다. 3-케토산을 3-케토아실-CoA로 반대로 변환하는 과정은 아세토아세틸-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제에 의해 촉매될 수 있다. 아세토아세틸-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제는 아세토아세틸-CoA와 아세테이트를 아세토아세테이트 및 아세틸-CoA로, 또는 반대로도 변환한다. 효소의 예로는, *E. coli*의 *atoAD* (Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818 (2007)), 클로스트리움 아세토부틸리컴의 *ctfAB* (Jojima et al., Appl Microbiol Biotechnol 77:1219-1224 (2008)), 및 클로스트리움 사카로퍼부틸아세토니컴의 *ctfAB* (Kosaka et al., Biosci.Biotechnol Biochem. 71:58-68 (2007)) 유전자 산물들이 있으며, 아래에 나타낸다.

표 96

[0484]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>AtoA</i>	NP_416726.1	2492994	에스캐리키아 콜라이
<i>AtoD</i>	NP_416725.1	2492990	에스캐리키아 콜라이
<i>CtfA</i>	NP_149326.1	15004866	클로스트리움 아세토부틸리컴
<i>CtfB</i>	NP_149327.1	15004867	클로스트리움 아세토부틸리컴
<i>CtfA</i>	AAP42564.1	31075384	클로스트리움 사카로퍼부틸아세토니컴
<i>CtfB</i>	AAP42565.1	31075385	클로스트리움 사카로퍼부틸아세토니컴

[0485]

또 다른 가능성 있는 CoA 어셉터는 벤질숙시네이트이다. 숙시닐-CoA:(R)-벤질숙시네이트 CoA-트랜스퍼라제는 타우에라 아로마티카 등의 유기체에서 혐기적인 톨루엔 분해 경로의 일부분으로서 기능한다 (Leutwein and Heider, J. Bact. 183(14) 4288-4295 (2001)). 상동체는 아조아르쿠스 sp. T, 아로마톨레움 아로마티쿰 (*Aromatoleum aromaticum*) EbN1 및 지오박터 메탈리레두센스 (*Geobacter metallireducens*) GS-15에서 확인할 수 있다. 전술한 단백질들은 아래에 나타낸다.

표 97

[0486]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>bbsE</i>	AAF89840	9622535	타우에라 아로마티카
<i>Bbsf</i>	AAF89841	9622536	타우에라 아로마티카
<i>bbsE</i>	AAU45405.1	52421824	아조아르쿠스 sp. T
<i>bbsF</i>	AAU45406.1	52421825	아조아르쿠스 sp. T
<i>bbsE</i>	YP_158075.1	56476486	아로마톨레움 아로마티쿰 EbN1
<i>bbsF</i>	YP_158074.1	56476485	아로마톨레움 아로마티쿰 EbN1
<i>Gmet_1521</i>	YP_384480.1	78222733	지오박터 메탈리레두센스 GS-15
<i>Gmet_1522</i>	YP_384481.1	78222734	지오박터 메탈리레두센스 GS-15

[0487]

또한, *ygfH*는 *E. coli*에서 프로피오닐 CoA:숙시네이트 CoA 트랜스퍼라제를 코딩한다 (Haller et al., Biochemistry, 39(16) 4622-4629). 가까운 상동체는 예를 들어, 시트로박터 영에이 (*Citrobacter youngae*) ATCC 29220, 살모넬라 엔테리카 subsp. 아리조나 serovar, 및 예르시니아 인테르메디아 ATCC 29909에서 확인할 수 있다. 전술한 단백질들을 아래에 나타낸다.

표 98

[0488]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>ygfH</i>	NP_417395.1	16130821	에스케리키아 콜라이 <i>str. K-12</i> 아종 <i>MG1655</i>
<i>CIT292_04485</i>	ZP_03838384.1	227334728	시트로박터 용게이 <i>ATCC 29220</i>
<i>SARI_04582</i>	YP_001573497.1	161506385	살모넬라 엔테리카 아종 아리조나 세로바
<i>yinte0001_14430</i>	ZP_04635364.1	238791727	예르시니아 인터메디아 <i>ATCC 29909</i>

[0489]

시트레이트 리아제 (EC 4.1.3.6)는 일련의 반응들을 촉매하여, 시트레이트를 아세테이트와 옥살로아세테이트로 절단한다. 이 효소는 혐기성 조건에서 활성을 나타내며, 3개의 서브유닛, 즉 아실-운반체 단백질 (ACP, 감마), ACP 트랜스퍼라제 (알파), 및 아실 리아제 (베타)로 이루어져 있다. 효소의 활성화에는 아세틸-CoA와 구조적으로 비슷한 특이적 보결기, 2'-(5"-포스포리보실)-3'-'-테포스포-CoA의 공유 결합과 아세틸화가 이용된다. 아실화는 CitC, 시트레이트 리아제 신테타제에 의해 촉매된다. 2종의 추가적인 단백질, 즉 CitG와 CitX를 이용하여 아포(apo) 효소를 활성형의 홀로(holo) 효소로 변환시킨다 (Schneider et al., *Biochemistry* 39:9438-9450 (2000)). 야생형 *E. coli*는 시트레이트 리아제 활성이 없지만, 몰리브덴 조인자 합성이 결핍된 변이체들은 활성형의 시트레이트 리아제를 가진다 (Clark, *FEMS Microbiol. Lett.* 55:245-249 (1990)). *E. coli* 효소는 *citEFD*에 의해 코딩되어 있으며, 시트레이트 리아제 신테타제는 *citC*에 의해 코딩되어 있다 (Nilekani and SivaRaman, *Biochemistry* 22:4657-4663 (1983)). 루코노스톡 메센테로이데스의 시트레이트 리아제가 클로닝 및 특정화되었으며, *E. coli*에서 발현되었다 (Bekal et al., *J. Bacteriol.* 180:647-654 (1998)). 시트레이트 리아제는, 또한, 시트레이트를 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 장내세균, 예를 들어 살모넬라 티피무리움과 클렙시엘라 뉴모니아에서도 동정되었다 (Bott, *Arch. Microbiol.* 167: 78-88 (1997); Bott and Dimroth, *Mol. Microbiol.* 14:347-356 (1994)). 전술한 단백질들을 아래에 나타낸다.

표 99

[0490]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>citF</i>	AAC73716.1	1786832	에스케리키아 콜라이
<i>Cite</i>	AAC73717.2	87081764	에스케리키아 콜라이
<i>citD</i>	AAC73718.1	1786834	에스케리키아 콜라이
<i>citC</i>	AAC73719.2	87081765	에스케리키아 콜라이
<i>citG</i>	AAC73714.1	1786830	에스케리키아 콜라이
<i>citX</i>	AAC73715.1	1786831	에스케리키아 콜라이
<i>citF</i>	CAA71633.1	2842397	루코노스톡 메센테로이데스
<i>Cite</i>	CAA71632.1	2842396	루코노스톡 메센테로이데스
<i>citD</i>	CAA71635.1	2842395	루코노스톡 메센테로이데스
<i>citC</i>	CAA71636.1	3413797	루코노스톡 메센테로이데스
<i>citG</i>	CAA71634.1	2842398	루코노스톡 메센테로이데스
<i>citX</i>	CAA71634.1	2842398	루코노스톡 메센테로이데스
<i>citF</i>	NP_459613.1	16763998	살모넬라 티피무리움
<i>cite</i>	AAL19573.1	16419133	살모넬라 티피무리움
<i>citD</i>	NP_459064.1	16763449	살모넬라 티피무리움
<i>citC</i>	NP_459616.1	16764001	살모넬라 티피무리움
<i>citG</i>	NP_459611.1	16763996	살모넬라 티피무리움
<i>citX</i>	NP_459612.1	16763997	살모넬라 티피무리움
<i>citF</i>	CAA56217.1	565619	클렙시엘라 뉴모니아
<i>cite</i>	CAA56216.1	565618	클렙시엘라 뉴모니아
<i>citD</i>	CAA56215.1	565617	클렙시엘라 뉴모니아
<i>citC</i>	BAH66541.1	238774045	클렙시엘라 뉴모니아
<i>citG</i>	CAA56218.1	565620	클렙시엘라 뉴모니아
<i>citX</i>	AAL60463.1	18140907	클렙시엘라 뉴모니아

[0491]

아세테이트 키나제 (EC 2.7.2.1)는 아세테이트를 아세틸포스페이트로 변환하는 가역적인 ATP-의존성 인산화 반응을 촉매한다. 아세테이트 키나제 효소의 예들이 *E. coli*, 클로스트리듐 아세토부틸리컴 및 메타노사르시나 서모필라 (*Methanosarcina thermophila*) 등의 다수의 유기체들에서 특정화되었다 (Ingram-Smith et al., *J. Bacteriol.* 187:2386-2394 (2005); Fox and Roseman, *J. Biol. Chem.* 261:13487-13497 (1986); Winzer et al., *Microbiology* 143 (Pt 10):3279-3286 (1997)). 또한, 아세테이트 키나제 활성은 *E. coli*의 *purT* 유전자 산물에서도 확인되었다 (Marolewski et al., *Biochemistry* 33:2531-2537 (1994)). 일부 부티레이트 키나제 효소 (EC 2.7.2.7), 예를 들어 클로스트리듐 아세토부틸리컴 유래의 *buk1* 및 *buk2* 역시 기질로서 아세테이트를 받아들인다 (Hartmanis, M.G., *J. Biol. Chem.* 262:617-621 (1987)).

표 100

[0492]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>ackA</i>	NP_416799.1	16130231	에스케리키아 콜라이
<i>Ack</i>	AAB18301.1	1491790	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>Ack</i>	AAA72042.1	349834	메타노사르시나 서모필라
<i>purT</i>	AAC74919.1	1788155	에스케리키아 콜라이
<i>buk1</i>	NP_349675	15896326	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>buk2</i>	Q97II1	20137415	클로스트리듐 아세토부틸리컴

[0493]

아세틸포스페이트로부터 아세틸-CoA를 만드는 과정은 포스포트랜스아세틸라제 (EC 2.3.1.8)에 의해 촉매된다. *E. coli* 유래의 *pta* 유전자는 아세틸-CoA를 아세틸포스페이트로 가역적으로 변환하는 효소를 코딩한다 (Suzuki, T., *Biochim. Biophys. Acta* 191:559-569 (1969)). 추가적인 아세틸트랜스퍼라제 효소들이 바실러스 셉틸리스 (Rado and Hoch, *Biochim. Biophys. Acta* 321:114-125 (1973), 클로스트리듐 클루이베리 (*Clostridium kluyveri*) (Stadtman, E., *Methods Enzymol.* 1:5896-599 (1955), 및 서모토가 마리티마 (*Thermotoga maritima*) (Bock et al., *J. Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999))에서 특정화되었다. 이 반응은 클로스트리듐 아세토부틸리컴 유래의 *ptb* 유전자 산물을 비롯한 몇몇 포스포트랜스부틸라제 효소들 (EC 2.3.1.19)에 의해서도 촉매된다 (Wiesenborn et al., *App. Environ. Microbiol.* 55:317-322 (1989); Walter et al., 유전자 134:107-111 (1993)). 추가적인 *ptb* 유전자들은 부티레이트-생산 박테리움 L2-50 (Louis et al., *J. Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004)과 바실러스 메가테리움 (Vazquez et al., *Curr. Microbiol.* 42:345-349 (2001))에서도 확인된다.

표 101

[0494]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>Pta</i>	NP_416800.1	71152910	에스케리키아 콜라이
<i>Pta</i>	P39646	730415	바실러스 셉틸리스
<i>Pta</i>	A5N801	146346896	클로스트리듐 클루이베리
<i>Pta</i>	Q9XOL4	6685776	서모토가 마리티마
<i>Ptb</i>	NP_349676	34540484	클로스트리듐 아세토부틸리컴
<i>Ptb</i>	AAR19757.1	38425288	부티레이트 생산 박테리움 L2-50
<i>Ptb</i>	CAC07932.1	10046659	바실러스 메가테리움

[0495]

아세테이트를 아세틸-CoA로 아실화하는 반응은 아세틸-CoA 신테타제 활성을 가진 효소에 의해 촉매된다. 이 반응을 촉매하는 효소 2가지는 AMP를 형성하는 아세틸-CoA 신테타제 (EC 6.2.1.1)와 ADP를 형성하는 아세틸-CoA 신테타제 (EC 6.2.1.13)이다. AMP를 형성하는 아세틸-CoA 신테타제 (ACS)는 아세테이트를 아세틸-CoA로 활성화하는 주된 효소이다. ACS 효소의 예는 *E. coli* (Brown et al., *J. Gen. Microbiol.* 102:327-336 (1977)), 랄스토니아 유트로파 (Priefert and Steinbuchel, *J. Bacteriol.* 174:6590-6599 (1992)), 메타노서모박터 썬마유토트로피쿠스 (*Methanothermobacter thermautotrophicus*) (Ingram-Smith and Smith, *Archaea* 2:95-107 (2007)), 살모넬라 엔테리카 (Gulick et al., *Biochemistry* 42:2866-2873 (2003)) 및 사카로마이세스 세레비지에 (Jogl and Tong, *Biochemistry* 43:1425-1431 (2004))에서 확인된다. ADP를 형성하는 아세틸-CoA 신테타제는 일반적으로 기질 범위가 넓은 가역적인 효소이다 (Musfeldt and Schonheit, *J. Bacteriol.* 184:636-644

(2002)). ADP를 형성하는 아세틸-CoA 신테타제에 대한 2종의 이소자임이, 아케오글로부스 풀기두스 게놈에 AF1211 및 AF1983로 코딩되어 있다 (Musfeldt and Schonheit, *supra* (2002)). 할로아르쿨라 마리스모르투이 유래 효소(숙시닐-CoA 신테타제로 주석됨)도 아세테이트를 기질로 수용하며, 이 효소의 가역성이 입증되었다 (Brasen and Schonheit, *Arch. Microbiol.* 182:277-287 (2004)). 초고온성 크레나르케온 피로바쿨럼 에어로필룸 유래의 *PAE3250*에 의해 코딩되는 ACD는 특정화된 모든 ACD 중에서도 기질 범위가 가장 넓으며, 아세테이트, 이소부티릴-CoA (선호 기질임) 및 페닐아세틸-CoA와 반응한다 (Brasen and Schonheit, *supra* (2004)). 방향 진화 또는 조작을 적용하여, 이 효소가 숙주 유기체의 생리 온도에서 작동하도록 변형시킬 수 있다. 아케오글로부스 풀기두스, 할로마르쿨라 마리스모르투이 및 피로바쿨럼 에어로필룸으로부터 효소들이 모두 클로닝되었으며, 기능적으로 발현시켜, *E. coli*에서 특정화되었다 (Brasen and Schonheit, *supra* (2004); Musfeldt and Schonheit, *supra* (2002)). 추가적인 후보 효소로는 *E. coli*의 *sucCD*에 의해 코딩되는 숙시닐-CoA 신테타제 (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985))와 슈도모나스 푸티타의 아실-CoA 리가제 (Fernandez-Valverde et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993))가 있다. 전술한 단백질들을 아래에 나타낸다.

표 102

[0496]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>acs</i>	AAC77039.1	1790505	에스케리키아 콜라이
<i>acoE</i>	AAA21945.1	141890	랄스토니아 유트로파
<i>acs1</i>	ABC87079.1	86169671	메타노서모박터 서마우토티로피쿠스
<i>acs1</i>	AAL23099.1	16422835	살모넬라 엔테리카
<i>ACS1</i>	Q01574.2	257050994	사카로마이세스 세레비지에
<i>AF1211</i>	NP_070039.1	11498810	아르카에오글로부스 풀기두스
<i>AF1983</i>	NP_070807.1	11499565	아르카에오글로부스 풀기두스
<i>scs</i>	YP_135572.1	55377722	할로아르쿨라 마리스모라투이
<i>PAE3250</i>	NP_560604.1	18313937	피로바쿨럼 에어로필룸 str. IM2
<i>sucC</i>	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
<i>sucD</i>	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이
<i>paaF</i>	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸티다

[0497]

2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 1,3-부탄디올 또는 3-부텐-1-올 등의 환원된 발효 산물을 합성하는 미생물 세포의 기질의 C-mol 당 생산 수율은 탄수화물 공급 원료내 부족한 환원 당량에 의해 제한된다. 환원 당량 또는 전자는, 합성 가스 성분들로부터, 예를 들어 CO 및 H₂로부터, 각각 일산화탄소 데하이드로게나제 (CODH) 및 하이드로게나제를 이용하여 추출할 수 있다. 그런 후, 환원 당량을 어셉터, 예컨대 산화된 페레독신, 산화된 퀴논, 산화된 시토크롬, NAD(P)⁺, 물, 또는 과산화수소에 패스하여, 환원된 페레독신, 환원된 퀴논, 환원된 시토크롬, NAD(P)H, H₂, 또는 물을 각각 제조한다. 환원된 페레독신과 NAD(P)H는 다양한 Wood-Ljungdahl 경로와 환원성 TCA 사이클 효소들에게 레독스 캐리어로서 사용할 수 있어, 특히 유용하다.

[0498]

여기에서, 0 및 H₂로부터의 추가적인 레독스 이용가능성은 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 1,3-부탄디올 또는 3-부텐-1-올 등의 환원된 산물의 수율을 개선시킬 수 있다.

[0499]

본 발명의 일부 구현예들에서, 합성가스를 당 기반의 공급원료나 다른 탄소 기질과 조합하는 조합 공급원료 전략은 이론적인 수율을 크게 개선시킬 수 있다. 이러한 공동-공급 방식에서는, 합성가스 성분 H₂와 CO를 하이드로게나제 및 CO 데하이드로게나제에 의해 활용하여, 당 또는 기타 탄소 기질로부터 유래된 탄소가 최대로 보존되고 이론적인 수율이 개선된 화학적 생산 경로에 동력을 제공할 수 있는 환원 당량을 만들어 낼 수 있다. 이러한 개선은 환경적 및 경제적 이점을 제공하며, 지속가능한 화합물 생산을 크게 강화한다.

[0500]

이하, 합성가스 성분들로부터 레독스 (redox)를 추출하기 위해 사용되는 효소들과 상응하는 유전자들을 본원에서 기술한다. CODH는 전자의 소비 또는 획득으로 CO와 CO₂ 간의 상호 변환을 촉매하는 가역적인 효소이다. ACS/CODH 복합체에서 CODH의 천연적인 생리학적 역할은, 아세틸-CoA 신테타제에 의해 아세틸-CoA에 병합하기 위해 CO₂를 CO로 변환하는 것이다. 그럼에도 불구하고, 이들 효소의 가역적인 특성으로 인해 이러한 CODH 효소들은

CO로부터 환원 당량들을 추출하는데 적합하다. ACS 부재 하에 CODH 효소들을 발현시키면 이의 천연적인 생리학적 역할과는 반대 방향에서 작용하게 될 수 있다 (즉, CO 산화).

[0501] 무렐라 서모아세티카, 카르복시오테무스 하이드로게노포르만스, 클로스트리듐 카르복시디보란스 P7, 및 여러 기타 유기체들에서는, 추가적인 CODH 코딩 유전자들이 ACS/CODH 오페론 바깥쪽에 위치한다. 이들 효소는 일산화탄소를 이산화탄소로의 변환함으로써 전자 (또는 환원 당량)를 추출하는 수단을 제공한다. 무렐라 서모아세티카 유전자 (유전자은행 등재 번호: YP_430813)는 자체적으로 오페론에서 발현되며, "핑-퐁" 반응에서 전자를 CO에서 페레독신과 같은 외부 매개체로 전달하는 것으로 보인다. 환원된 매개체는 이후 다른 환원된 니코틴아미드 아데닌 다이뉴클레오티드 포스페이트 (NAD(P)H) 운반체 또는 페레독신-의존적인 세포 프로세스와 커플링된다 (Ragsdale, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 129-136 (2008)). 카르복시오테무스 하이드로게노포르만스 CODH-II 및 인접 단백질인 CooF를 코딩하는 유전자들은 클로닝되었으며, 서열도 규명되었다 (Gonzalez and Robb, *FEMS Microbiol Lett.* 191:243-247 (2000)). CODH-II의 세포질 분획이 동화작용을 시시하는 NADPH 형성을 촉매하는 것으로 확인되었지만, 형성되는 복합체는 막-결합형이었다 (Svetlitchnyi et al., *J Bacteriol.* 183:5134-5144 (2001)). CODH-II의 결정 구조도 이용가능하다 (Dobbek et al., *Science* 293:1281-1285 (2001)). 유사한 ACS-프리 CODH 효소는, 지오박터 메탈리레두센스 GS-15, 클로로비움 페어오박테로이데스 DSM 266, 클로스트리듐 셀룰로라이티쿰 H10, 데설포비브리오 데설푸리칸스 아종 데설푸리칸스 str. ATCC 27774, 펠로박터 카르비놀리쿠스 DSM 2380, 및 캄필로박터 쿠르부스 525.92를 포함한 다양한 유기체에서 발견할 수 있다.

표 103

[0502]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
CODH (추정)	YP_430813	83590804	무렐라 서모아세티카
CODH-II (CooS-II)	YP_358957	78044574	카르복시오테무스 하이드로게노포르만스
CooF	YP_358958	78045112	카르복시오테무스 하이드로게노포르만스
CODH (putative)	ZP_05390164.1	255523193	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_0341	ZP_05390341.1	255523371	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_1756	ZP_05391756.1	255524806	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_2944	ZP_05392944.1	255526020	클로스트리듐 카르복시디보란스 P7
CODH	YP_384856.1	78223109	지오박터 메탈리레두센스 GS-15
Cpha266_0148 (cytochrome c)	YP_910642.1	119355998	클로로비움 페어오박테로이데스 DSM 266
Cpha266_0149 (CODH)	YP_910643.1	119355999	클로로비움 페어오박테로이데스 DSM 266
Cce1_0438	YP_002504800.1	220927891	클로스트리듐 셀룰로라이티쿰 H10
Ddes_0382 (CODH)	YP_002478973.1	220903661	데설포비브리오 데설푸리칸스 아종 데설푸리칸스 str. ATCC 27774
Ddes_0381 (CooC)	YP_002478972.1	220903660	데설포비브리오 데설푸리칸스 아종 데설푸리칸스 str. ATCC 27774
Pcar_0057 (CODH)	YP_355490.1	7791767	펠로박터 카르비놀리쿠스 DSM 2380
Pcar_0058 (CooC)	YP_355491.1	7791766	펠로박터 카르비놀리쿠스 DSM 2380
Pcar_0058 (HypA)	YP_355492.1	7791765	펠로박터 카르비놀리쿠스 DSM 2380
CooS (CODH)	YP_001407343.1	154175407	캄필로박터 curvus 525.92

[0503]

일부 경우에서, 하이드로게나제 코딩 유전자는 CODH에 인접해 위치되어 있다. 로도스피릴럼 루브룸의 경우, 코딩된 CODH/하이드로게나제 단백질이 막-결합형 효소 복합체를 형성하는데, 이 복합체가 CO 및 H₂O에서 CO₂ 및 H₂로의 변환으로부터 양성자 구배 형태의 에너지가 생성되는 부위인 것으로 알려졌다 (Fox et al., *J Bacteriol.* 178:6200-6208 (1996)). 카르복시오테무스 하이드로게노포르만스의 CODH-I과 인접 유전자들은 로도스피릴럼 루브룸 CODH/하이드로게나제 유전자 클러스터와의 유사성을 근거로, 유사한 기능적인 역할을 촉매하는 것으로 제안되었다 (Wu et al., *PLoS Genet.* 1:e65 (2005)). 카르복시오테무스 하이드로게노포르만스 CODH-I는 또한 전

극에 연결시켰 때 상당한 CO 산화와 CO₂ 환원 활성을 발휘하는 것으로 확인되었다 (Parkin et al., *J Am.Chem.Soc.* 129:10328-10329 (2007)). 예시적 CODH와 하이드로게나제 유전자의 단백질 서열들을 아래 유전자 은행 등재 번호들로 식별할 수 있다.

표 104

[0504]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
CODH-I (CooS-I)	YP_360644	78043418	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
CooF	YP_360645	78044791	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
HypA	YP_360646	78044340	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
CooH	YP_360647	78043871	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
CooU	YP_360648	78044023	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
CooX	YP_360649	78043124	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
CooL	YP_360650	78043938	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
CooK	YP_360651	78044700	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
CooM	YP_360652	78043942	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
CooC	YP_360654.1	78043296	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
CooA-1	YP_360655.1	78044021	카르복시도서무스 하이드로게노포르만스
CooL	AAC45118	1515468	로도스피릴룸 루브룸
CooX	AAC45119	1515469	로도스피릴룸 루브룸
CooU	AAC45120	1515470	로도스피릴룸 루브룸
CooH	AAC45121	1498746	로도스피릴룸 루브룸
CooF	AAC45122	1498747	로도스피릴룸 루브룸
CODH (CooS)	AAC45123	1498748	로도스피릴룸 루브룸
CooC	AAC45124	1498749	로도스피릴룸 루브룸
CooT	AAC45125	1498750	로도스피릴룸 루브룸
CooJ	AAC45126	1498751	로도스피릴룸 루브룸

[0505]

천연적으로 *E. coli* 및 기타 장내세균은 최대 하이드로게나제 4개를 코딩하는 복수의 유전자들이 존재한다 (Sawers, G., *Antonie Van Leeuwenhoek* 66:57-88 (1994); Sawers et al., *J Bacteriol.* 164:1324-1331 (1985); Sawers and Boxer, *Eur.J Biochem.* 156:265-275 (1986); Sawers et al., *J Bacteriol.* 168:398-404 (1986)). 효소 활성들의 다중도를 감안하면, *E. coli* 또는 기타 숙주 유기체는 들어오는 분자 수소를 분열시켜 해당 어셈블리를 환원시키는 충분한 하이드로게나제 활성을 제공할 수 있다. *E. coli* 는 각각 *hyaABCDEF* 및 *hyoABCDEFG* 유전자 클러스터에 의해 코딩되는 두 종의 흡수 하이드로게나제, 즉, Hyd-1과 Hyd-2를 가진다 (Lukey et al., How *E. coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions, *J Biol Chem* published online Nov 16, 2009). Hyd-1은 내산소성이며, 비가역적이며, *hyaC* 시토크롬을 통해 퀴논 환원과 커플링되어 있다. Hyd-2는 O₂에 민감하고, 가역적이며, 전자를 주변세포질 공간에 존재하는 페레독신 *hyaA* 로 전달하며, 이것은 다시 *hybB* 내재 막단백질을 경유하여 퀴논을 환원시킨다. 환원된 퀴논은 TCA 사이클의 환원성 분지(reductive branch)에서 푸마레이트 리덕타제에 대한 전자 소스로서 제공할 수 있다. 환원된 페레독신들은 NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제 등의 효소에 의해 사용되어, NADPH 또는 NADH를 만들어낼 수 있다. 이것은 다른 예로는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, AKG 페레독신 옥시도리덕타제, 및 5,10-메틸렌-H4 폴레이트 리덕타제 등의 반응의 전자 공여체로서 사용될 수 있다.

표 105

[0506]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HyaA	AAC74057.1	1787206	에스케리키아 콜라이
HyaB	AAC74058.1	1787207	에스케리키아 콜라이
HyaC	AAC74059.1	1787208	에스케리키아 콜라이
HyaD	AAC74060.1	1787209	에스케리키아 콜라이
HyaE	AAC74061.1	1787210	에스케리키아 콜라이
HyaF	AAC74062.1	1787211	에스케리키아 콜라이

표 106

[0507]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HybO	AAC76033.1	1789371	에스케리키아 콜라이
HybA	AAC76032.1	1789370	에스케리키아 콜라이
HybB	AAC76031.1	2367183	에스케리키아 콜라이
HybC	AAC76030.1	1789368	에스케리키아 콜라이
HybD	AAC76029.1	1789367	에스케리키아 콜라이
HybE	AAC76028.1	1789366	에스케리키아 콜라이
HybF	AAC76027.1	1789365	에스케리키아 콜라이
HybG	AAC76026.1	1789364	에스케리키아 콜라이

[0508]

*E. coli*의 수소-리아제 시스템은 페레독신을 어셉터로서 이용하는 막-결합형 효소 복합체인 하이드로게나제 3와 페레독신 어셉터를 또한 이용하는 하이드로게나제 4를 포함한다. 하이드로게나제 3 및 4는 각각 *hyc* 및 *hyf* 유전자 클러스터에 의해 코딩된다. 하이드로게나제 3는 가역적인 효소로 밝혀졌다 (Maeda et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 76(5):1035-42 (2007)). *E. coli*에서 하이드로게나제 활성은 또한 *hyp* 유전자의 발견에 의존적인데, 이 유전자에 상응하는 단백질이 하이드로게나제 복합체의 조립에 관여한다 (Jacobi et al., *Arch.Microbiol* 158:444-451 (1992); Rangarajan et al., *J. Bacteriol.* 190:1447-1458 (2008)).

표 107

[0509]

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

표 108

[0510]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HyfA	NP_416976	90111444	에스케리키아 콜라이
HyfB	NP_416977	16130407	에스케리키아 콜라이
HyfC	NP_416978	90111445	에스케리키아 콜라이
HyfD	NP_416979	16130409	에스케리키아 콜라이
HyfE	NP_416980	16130410	에스케리키아 콜라이
HyfF	NP_416981	16130411	에스케리키아 콜라이
HyfG	NP_416982	16130412	에스케리키아 콜라이
HyfH	NP_416983	16130413	에스케리키아 콜라이
HyfI	NP_416984	16130414	에스케리키아 콜라이
HyfJ	NP_416985	90111446	에스케리키아 콜라이
HyfR	NP_416986	90111447	에스케리키아 콜라이

표 109

[0511]

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

HypF	NP_417192	16130619	에스케리키아 콜라이
------	-----------	----------	------------

[0512] 무렐라 서모아세티카의 하이드로게나제는 충분한 내인성 하이드로게나제 활성이 결핍된 숙주에게 적합하다. 무렐라 서모아세티카는 CO₂를 유일한 탄소원으로 사용하여 성장하는데, 이는 환원 당량을 H₂로부터 추출하여 Wood-Ljungdahl 경로를 통해 아세틸-CoA를 합성할 수 있다는 것을 의미한다 (Drake, H. L., *J. Bacteriol.* 150:702-709 (1982); Drake and Daniel, *Res. Microbiol.* 155:869-883 (2004); Kellum and Drake, *J. Bacteriol.* 160:466-469 (1984)) (참조 도 7). 무렐라 서모아세티카는 *E. coli* 유래의 몇가지 *hyp*, *hyc* 및 *hyf* 유전자들과 상동성을 가진다. 이들 유전자에 의해 코딩되는 단백질 서열들은 하기 유전자은행 등재 번호로 식별된다

[0513] *E. coli*의 *hyp* 유전자와 상동적인 무렐라 서모아세티카 단백질들을 아래에 나타낸다.

표 110

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

[0515] *E. coli* 하이드로게나제 3 및/또는 4 단백질과 상동적인 무렐라 서모아세티카 단백질들을 아래 표에 나타낸다.

표 111

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

[0517] 또한, 하이드로게나제 기능을 코딩하는 몇몇 유전자 클러스터들이 무렐라 서모아세티카에 존재하며, 이의 해당 단백질 서열들을 아래에 나타낸다.

표 112

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Moth_0439	YP_429313	83589304	무렐라 서모아세티카
Moth_0440	YP_429314	83589305	무렐라 서모아세티카
Moth_0441	YP_429315	83589306	무렐라 서모아세티카
Moth_0442	YP_429316	83589307	무렐라 서모아세티카
Moth_0809	YP_429670	83589661	무렐라 서모아세티카
Moth_0810	YP_429671	83589662	무렐라 서모아세티카
Moth_0811	YP_429672	83589663	무렐라 서모아세티카
Moth_0812	YP_429673	83589664	무렐라 서모아세티카
Moth_0814	YP_429674	83589665	무렐라 서모아세티카
Moth_0815	YP_429675	83589666	무렐라 서모아세티카
Moth_0816	YP_429676	83589667	무렐라 서모아세티카

Moth_1193	YP_430050	83590041	무렐라 서모아세티카
Moth_1194	YP_430051	83590042	무렐라 서모아세티카
Moth_1195	YP_430052	83590043	무렐라 서모아세티카
Moth_1196	YP_430053	83590044	무렐라 서모아세티카
Moth_1717	YP_430562	83590553	무렐라 서모아세티카
Moth_1718	YP_430563	83590554	무렐라 서모아세티카
Moth_1719	YP_430564	83590555	무렐라 서모아세티카
Moth_1883	YP_430726	83590717	무렐라 서모아세티카
Moth_1884	YP_430727	83590718	무렐라 서모아세티카
Moth_1885	YP_430728	83590719	무렐라 서모아세티카
Moth_1886	YP_430729	83590720	무렐라 서모아세티카
Moth_1887	YP_430730	83590721	무렐라 서모아세티카
Moth_1888	YP_430731	83590722	무렐라 서모아세티카
Moth_1452	YP_430305	83590296	무렐라 서모아세티카
Moth_1453	YP_430306	83590297	무렐라 서모아세티카
Moth_1454	YP_430307	83590298	무렐라 서모아세티카

[0519] 랄스토니아 유트로파 H16은 최종 전자 어셉터로서 산소를 가지고 수소를 에너지원으로 이용한다. 이것의 막-결합형 흡수 [NiFe]-하이드로게나제는 "O₂-허용성" 하이드로게나제이며 (Cracknell, et al. Proc Nat Acad Sci, 106(49) 20681-20686 (2009)), 주변세포질 공간에 위치하며 b 타입의 시토크롬을 통해 호흡사슬과 연결되어 있다 (Schink and Schlegel, *Biochim. Biophys. Acta*, 567, 315-324 (1979); Bernhard et al., *Eur. J. Biochem.* 248, 179-186 (1997)). 또한, 랄스토니아 유트로파는 *Hox* 오페론에 의해 코딩되는 O₂-허용성의 가용성 하이드로게나제를 가지고 있으며, 이 효소는 세포질에 존재하며, 수소를 소비하여 직접 NAD⁺를 환원시킨다 (Schneider and Schlegel, *Biochim. Biophys. Acta* 452, 66-80 (1976); Burgdorf, *J. Bact.* 187(9) 3122-3132(2005)). 가용성 하이드로게나제 효소는 지오박터 설푸레두센스 (*Geobacter sulfurreducens*) (Coppi, *Microbiology* 151, 1239-1254 (2005)), 시네코사이스티스 str. PCC 6803 (Germer, *J. Biol. Chem.*, 284(52), 36462-36472 (2009)), 및 티오캅사 로세오페르시키나 (Rakhely, *Appl. Environ. Microbiol.* 70(2) 722-728 (2004)) 등의 수종의 다른 유기체들에도 또한 존재한다. 시네코사이스티스 효소는 수소로부터 NADPH를 생성할 수 있다. 시네코사이스티스 str. PCC 6803 유래의 *Hox* 오페론 및 노스톡 sp. PCC 7120 유래의 *Hyp* 오페론에 의해 코딩되는 부속 유전자를 둘다 과다발현시키는 경우, *Hox* 유전자를 단독 발현한 경우에 비해 하이드로게나제 활성이 증가된다 (Germer, *J. Biol. Chem.* 284(52), 36462-36472 (2009)).

표 113

[0520]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HoxF	NP_942727.1	38637753	랄스토니아 유트로파 H16
HoxU	NP_942728.1	38637754	랄스토니아 유트로파 H16
HoxY	NP_942729.1	38637755	랄스토니아 유트로파 H16
HoxH	NP_942730.1	38637756	랄스토니아 유트로파 H16
HoxW	NP_942731.1	38637757	랄스토니아 유트로파 H16
HoxI	NP_942732.1	38637758	랄스토니아 유트로파 H16
HoxE	NP_953767.1	39997816	지오박터 설푸레두센스
HoxF	NP_953766.1	39997815	지오박터 설푸레두센스
HoxU	NP_953765.1	39997814	지오박터 설푸레두센스
HoxY	NP_953764.1	39997813	지오박터 설푸레두센스
HoxH	NP_953763.1	39997812	지오박터 설푸레두센스
GSU2717	NP_953762.1	39997811	지오박터 설푸레두센스
HoxE	NP_441418.1	16330690	시네코사이스티스 str. PCC 6803
HoxF	NP_441417.1	16330689	시네코사이스티스 str. PCC 6803
기능 불명	NP_441416.1	16330688	시네코사이스티스 str. PCC 6803
HoxU	NP_441415.1	16330687	시네코사이스티스 str. PCC 6803
HoxY	NP_441414.1	16330686	시네코사이스티스 str. PCC 6803
기능 불명	NP_441413.1	16330685	시네코사이스티스 str. PCC 6803
기능 불명	NP_441412.1	16330684	시네코사이스티스 str. PCC 6803

HoxH	NP_441411.1	16330683	시네코시스티스 str. PCC 6803
HypF	NP_484737.1	17228189	노스톡 sp. PCC 7120
HypC	NP_484738.1	17228190	노스톡 sp. PCC 7120
HypD	NP_484739.1	17228191	노스톡 sp. PCC 7120
기능 불명	NP_484740.1	17228192	노스톡 sp. PCC 7120
HypE	NP_484741.1	17228193	노스톡 sp. PCC 7120
HypA	NP_484742.1	17228194	노스톡 sp. PCC 7120
HypB	NP_484743.1	17228195	노스톡 sp. PCC 7120
Hox1E	AAP50519.1	37787351	티오캅사 로세오퍼시시나
Hox1F	AAP50520.1	37787352	티오캅사 로세오퍼시시나
Hox1U	AAP50521.1	37787353	티오캅사 로세오퍼시시나
Hox1Y	AAP50522.1	37787354	티오캅사 로세오퍼시시나
Hox1H	AAP50523.1	37787355	티오캅사 로세오퍼시시나

[0521] TCA 사이클의 중간산물인 옥살로아세테이트 또는 말레이트를 제조하기 위해, 피루베이트 또는 포스포에놀피루베이트에 이산화탄소를 고정하는데 사용되는 몇가지 효소들과 대응되는 유전자들을 아래에 기술한다.

[0522] 포스포에놀피루베이트의 옥살로아세테이트로의 카르복시화는 포스포에놀피루베이트 카르복실라제에 의해 촉매된다. 예시적 PEP 카르복실라제 효소는 *E. coli*의 *ppc* (Kai et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 414:170-179 (2003)), 메틸로박테리움 엑토르켄스 *AM1* 의 *ppcA* (Arps et al., *J. Bacteriol.* 175:3776-3783 (1993)), 및 코리네박테리움 글루타미컴의 *ppc* (Eikmanns et al., *Mol. Gen. Genet.* 218:330-339 (1989))에 의해 코딩된다.

표 114

[0523]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>Ppc</i>	NP_418391	16131794	에스케리키아 콜라이
<i>ppcA</i>	AAB58883	28572162	메틸로박테리움 엑토르켄스
<i>Ppc</i>	ABB53270	80973080	코리네박테리움 글루타미컴

[0524] 포스포에놀피루베이트를 옥살로아세테이트로 변환하는 다른 효소는 PEP 카르복시키나제이며, 이 효소는 ATP를 생성하면서 PEP를 카르복시화한다. 대부분의 유기체에서는, PEP 카르복시키나제가 글루코스 생성 기능을 제공하며, ATP 1개를 소비하면서 옥살로아세테이트를 PEP로 변환한다. 사카로마이세스 세레비지에는 이러한 유기체 중 하나이며, 이의 천연적인 PEP 카르복시키나제인 *PCK1*가 글루코스 생성 역할을 제공한다 (Valdes-Hevia et al., *FEBS Lett.* 258:313-316 (1989)). *E. coli*도 이러한 유기체들 중 하나이며, 옥살로아세테이트를 생성하는 PEP 카르복시키나제 역할은, 아마도 중탄산염에 대한 PEP 카르복시키나제의 K_m 값이 더 높아, PEP 카르복실라제에 비해 미미한 것으로 생각된다 (Kim et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1238-1241 (2004)). 그럼에도 불구하고, 천연적인 *E. coli* PEP 카르복시키나제가 PEP를 옥살로아세테이트로 변환하는 활성이 최근 *E. coli* K-12 *ppc* 변이체들에서 확인되었다 (Kwon et al., *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:1448-1452 (2006)). 이들 균주는 성장 결함을 나타내지 않았으며, NaHCO_3 고 농도에서 숙시네이트 생산이 증가되었다. *E. coli* 변이 균주는 적응 진화를 통해 *Pck*를 주요 CO_2 -고정 효소로서 적응할 수 있다 (Zhang et al. 2009). 일부 유기체의 경우, 특히 반추위 박테리아의 경우, PEP 카르복시키나제가 PEP로부터 옥살로아세테이트를 생산하고 ATP를 발생시키는 데 아주 효과적이다. *E. coli*에 클로닝된 PEP 카르복시키나제 유전자의 예로는 만하이미아 숙시니시프로두센스 (*Mannheimia succiniciproducens*) (Lee et al., *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7:95-99 (2002)), 안에어로비오스피릴럼 숙시니시프로두센스 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*) (Laivenieks et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2273-2280 (1997)), 및 액티노바실러스 숙시노게네스 (*Actinobacillus succinogenes*) (Kim et al. *supra*)로부터 유래된 유전자를 포함한다. 헤모필러스 인플루엔자 (*Haemophilus influenza*)에 의해 코딩되는 PEP 카르복시키나제 효소는 PEP로부터 옥살로아세테이트를 제조하는데 유효하다.

표 115

[0525]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>PCK1</i>	NP_013023	6322950	사카로마이세스 세레비지에
<i>pck</i>	NP_417862.1	16131280	에스케리키아 콜라이

<i>pckA</i>	YP_089485.1	52426348	만하이미아 숙시니시프로두센스
<i>pckA</i>	009460.1	3122621	안에어로바이오스피틸룸 숙시니시프로두센스
<i>pckA</i>	Q6W6X5	75440571	엑티노바실러스 숙시노게네스
<i>pckA</i>	P43923.1	1172573	헤모필러스 인플루엔자

- [0526] 피루베이트 카르복실라제 (EC 6.4.1.1)는 ATP 1개를 소비하면서 피루베이트를 옥살로아세테이트로 직접 변환한다. 피루베이트 카르복실라제 효소는 사카로마이세스 세레비지에의 *PYC1* (Walker et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:1210-1217 (1991))과 *PYC2* (Walker et al., *supra*), 및 미코박테리움 스메그마티스의 *pyc* (Mukhopadhyay and Purwantini, *Biochim. Biophys. Acta* 1475:191-206 (2000))에 의해 코딩된다.

표 116

[0527]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>PYC1</i>	NP_011453	6321376	사카로마이세스 세레비지에
<i>PYC2</i>	NP_009777	6319695	사카로마이세스 세레비지에
<i>Pyc</i>	YP_890857.1	118470447	미코박테리움 스메그마티스

- [0528] 말릭 효소 (malic enzyme)는 환원 당량 1개를 소비하면서 CO₂와 피루베이트를 말레이트로 변환하는데 이용할 수 있다. 이러한 목적의 말릭 효소로는, 비제한적인 예로, 말릭 효소 (NAD-의존형) 및 말릭 효소 (NADP-의존형)이 있다. 예를 들어, *E. coli* 말릭 효소들 중 한가지 효소 (Takeo, *J. Biochem.* 66:379-387 (1969)) 또는 활성이 보다 높은 유사 효소를 발현시켜, 피루베이트와 CO₂를 말레이트로 변환할 수 있다. 말릭 효소는, PEP와는 반대로 탄소를 피루베이트에 고정함으로써, PEP의 고-에너지 포스포이트 결합을 피루베이트 키나제에 의해 보존시킬 수 있으며, 그에 따라 ATP가 피루베이트 형성시 또는 글루코스 수송을 위한 포스포트랜스퍼라제 시스템에 의해 발생된다. 말릭 효소는 전형적으로 말레이트로부터 피루베이트를 만드는 방향으로 작동하는 것으로 추측되지만, *maeA*에 코딩된 NAD-의존적인 효소의 과다발현을 통해 *E. coli*에서 숙시네이트 생산을 증가시키고 동시에 탄소-고정 방향으로 작동함으로써 혐기성 조건에서 치사상 Dpf1-DldhA 표현형을 복원하는 것으로 밝혀졌다 (Stols and Donnelly, *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7) 2695-2701 (1997)). *E. coli*에서 아스카리스 수움 (*Ascaris suum*) 유래 말릭 효소를 과다발현시켰을 때, 비슷한 현상이 관찰되었다 (Stols et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65(1), 153-158 (1997)). *maeB*에 의해 코딩되는 2번째 *E. coli* 말릭 효소는 NADP-의존적이며, 옥살로아세테이트와 기타 알파-케토산을 또한 탈카르복시화한다 (Iwakura et al., *J. Biochem.* 85(5):1355-65 (1979)).

표 117

[0529]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>maeA</i>	NP_415996	90111281	에스케리키아 콜라이
<i>maeB</i>	NP_416958	16130388	에스케리키아 콜라이
<i>NAD-ME</i>	P27443	126732	아스카리스 수움

- [0530] TCA 사이클의 환원성 분지를 통해 옥살로아세테이트 (예를 들어, PEP 카르복실라제, PEP 카르복시키나제, 또는 피루베이트 카르복실라제로부터 형성됨) 또는 말레이트 (예를 들어, 말릭 효소 또는 말레이트 데하이드로게나제로부터 형성됨)를 숙시닐-CoA로 변환하기 위해 사용되는 효소들로는, 말레이트 데하이드로게나제, 푸마레이트 데하이드라타제 (푸마라제), 푸마레이트 리덕타제, 및 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제가 있다. 이들 각각의 효소들에 대한 유전자들은 전술한 바와 같이 본원에 기술되어 있다.

- [0531] 숙시닐-CoA로부터 다양한 산물을 제조하는 경로를 미생물에 조작하기 위한 효소, 유전자 및 방법들이 현재 당해 기술 분야에 공지되어 있다. CO 및/또는 H₂로부터 획득되는 추가적인 환원 당량은, 본원에 기술된 바와 같이, 탄수화물-기체의 공급원료를 활용하는 경우, 2,4-펜타디에노에이트, 부타디엔, 1,3-부탄디올 또는 3-부텐-1-올의 수율을 향상시킨다.

- [0532] 당분해 중간산물로부터 다양한 산물을 제조하는 경로를 미생물에 조작하기 위한 효소, 유전자 및 방법들이 당해

기술 분야에 공지되어 있다. CO 및/또는 H₂로부터 획득되는 추가적인 환원 당량은, 본원에 기술된 바와 같이, 탄수화물에 대한 이들 모든 산물들의 수율을 향상시킨다.

[0533]

실시예 X

[0534]

CO 및 혐기성 배양물을 취급하는 방법

[0535]

본 실시예는 CO와 혐기성 배양물의 취급에 적용되는 방법을 기술한다.

[0536]

A. 분석과 소규모 배양을 위한 소량의 CO 취급. CO는 무취, 무색 및 무미의 독성 가스이다. 따라서, CO를 사용하는 배양 및 분석에는 특수 관리가 요구된다. 소규모 배치 배양에서 CO 산화, 아세틸-CoA 합성, 미오글로빈을 이용한 CO 농축, 및 CO 내성(tolerance)/유용성 등의 여러가지 분석들에서는, 강제 급배기 시설 (fume hood) 안에서 분배하고 취급되는 소량의 CO 가스가 필요하였다. 생화학적 분석물은 극소량 (<2 mL)의 생화학적 분석 배지 또는 완충액을 CO로 포화시킨 후, 분석하여야 한다. 모든 CO 취급 공정들은 적당한 높이의 새시가 설치되고 송풍기가 작동되는 강제 급배기 시설에서 수행하였으며; CO는 압축가스 실린더 및 슈랭크 라인과 연결된 조절기로 공급되게 하였다. 조절기는 여러개의 어찌면 큐벳이나 바이얼 각각에 동일 농도의 CO가 분배되도록 한다. 슈랭크 라인은 입구측에는 산소 스크리버가, 다른 측에는 유압식 기포발생기와 벤트가 설치되어 있다. 분석 큐벳들은 혐기성이며 CO를 함유한다. 이에, 분석 큐벳을 고무 마개로 밀봉하였고, 시약은 기밀성 니들 및 시린지로 투입하거나 제거하였다. 다음으로, 단단히 밀봉된 혈청병에서 소량의 (~50 mL) 배양물을 CO로 포화하면서 배양하였다. 생화학적 분석물에서와 같이, CO-포화된 미생물 배양물을 슈랭크 라인이 설치된 강제 급배기 시설에서 평형화하였다. 강제 급배기 시설 밖에서 안정하게 취급하기 위해, 생화학적 분석물과 미생물 배양물을 운반이 용이한 밀폐 용기에 소량으로 넣었다. 압축 CO 탱크는 강제 급배기 시설 옆에 설치하였다.

[0537]

전형적으로, 슈랭크 라인은 CO를 큐벳에 분배하고 배출하기 위해 사용된다. 큐벳의 고무 마개에 19 또는 20 게이지의 1회용 시린지 니들로 구멍을 뚫고, 동일한 방법으로 배출시켰다. 오일 기포발생기는 CO 탱크 및 산소 스크리버와 함께 사용하였다. 유리 또는 석영 분광광도계 큐벳에는 상부에 둥근 구멍이 있으며, 여기에 Kontes 마개 슬리브, Sz7 774250-0007가 피팅된다. CO 검출기 유닛은 강제 급배기 시설 가까이 배치된다.

[0538]

B. 대규모 배양물에 공급되는 대량 CO 취급. 발효 생산에서 공급원료로 합성가스를 모방하기 위해 CO 또는 CO와 H₂의 혼합물을 발효 배양물에 공급한다. 즉, 1 리터 내지 수 리터의 세포 배양물에는, 배지내 CO 용해 농도를 높이기 위해, CO 가스가 첨가될 수 있다. 이럴 경우, 상당히 대규모의 CO 가스가 연속적으로 배양물에 투입된다. 여러 시점에, 배양물을 회수하거나 시료를 채취한다. 다른 예로, 발효기 일부인 일체형의 연속 유동 원심 분리기로 세포들을 회수한다.

[0539]

발효 과정은 혐기성 조건에서 진행된다. 일부 경우에, 호흡 환경을 제공하기 위하여 산소 또는 공기를 발효기에 투입하여 적당한 산소 포화도를 확보하는 것은 비경제적이다. 또한, 혐기성 발효 과정에서 발생하는 환원력은 호흡보다는 산물 형성에 필요할 수 있다. 더욱이, 다양한 경로들에서 다수 효소들이 차이는 있지만 산소에 민감하다. 무렐라 서모아세티카와 같은 초산생성균들은 절대적인 혐기성 미생물이고, Wood-Ljungdahl 경로의 효소들은 분자성 산소에 의해 비가역적으로 불활성화될 만큼 매우 민감하다. 산소-내성의 초산생성균들도 있지만, Wood-Ljungdahl 경로의 효소들은 대부분이 페레독신의 핵심 성분인 금속-효소이기 때문에, 산소의 존재와 양립 불가할 수 있으며, 조절을 통해 대사를 Wood-Ljungdahl 경로와는 다르게 변형시켜, 에너지 획득을 최대화할 수 있다. 동시에, 배양물 내의 세포들은 대규모 세포 생산에서 극단적인 조치 필요성을 완화시키는 산소 소거자들로 기능한다.

[0540]

C. 혐기 챔버 및 조건. 예시적 혐기 챔버는 상업적으로 입수가 가능하다 (참고, 예를 들어, Vacuum Atmospheres Company, Hawthorne CA; MBraun, Newburyport MA). 조건은 O₂ 농도 1 ppm 또는 이하, 및 1 atm의 순수 N₂이다. 일 예로, 3 산소 스크리버/촉매 재생기를 사용하였으며, 챔버에는 O₂ 전극을 포함시켰다 (예, Teledyne; City of Industry CA). 내부 챔버 문을 개방하기 전에 거의 모든 물품들과 시약들을 챔버 에어로크에서 4번 순환시켰다. 챔버에 넣기 전에 > 5 mL 부피의 시약에 순수 N₂를 살포하였다. 글로브는 2회/년 교체하며, 촉매 용기는 챔버가 산소 수준 변화로 반응이 점점 부진해되면 주기적으로 재생시켰다. 챔버 압력은 슬레노이드에 의한 일-방향 밸브들로 제어하였다. 이러한 특징부들로 인하여 챔버 압력은 주변보다 고압으로 설정되므로, 매우 작은 튜브들을 퍼지 밸브를 통하여 이동시킬 수 있다.

[0541]

혐기성 챔버를 일정하게 매우 낮고 고도의 산소 민감한 혐기성 조건에 요구되는, O₂ 수준에 도달하게 하였다.

그러나, 세포 증식 및 취급시에 통상 이러한 예비 조치가 필요한 것은 아니다. 다른 혐기성 챔버 구성으로, 믹스에 일부 수소 가스가 필요한 촉매로서 백금 또는 팔라듐을 사용할 수 있다. 숄레노이드 밸브 대신, 압력 방출은 기포발생기로 제어할 수 있다. 장치를 이용한 O₂ 감시 대신, 검사지가를 사용할 수 있다.

[0542] **D. 혐기성 미생물학.** 소량 배양물은 상기 CO 취급에서와 같이 취급한다. 특히, 혈청 또는 배지 병은 두꺼운 고무 마개를 끼우고 알루미늄 크립프로 병을 밀폐한다. 배지, 예를 들어 테리픽 (Terrific) 브로스는 통상적인 방법으로 제조하여 적정 크기의 혈청병에 배분한다. 병에 완전한 기포발생으로 30분 동안 질소를 살포한다. 이를 통해 배지에서 산소 대부분을 제거한 다음, 각 병에 고무 마개 (예를 들어 Bellco 20 mm 격막 마개; Bellco, Vineland, NJ)를 끼우고 크립프-밀폐한다 (Bellco 20 mm). 그런 후, 배지 병을 느린 (액상) 배기 사이클로 고압멸균한다. 적어도 가끔 니들로 마개를 관통시켜 고압멸균 중 배기시키고; 고압멸균기에서 꺼낸 후 니들은 즉시 제거한다. 멸균 배지에 나머지 배지 성분, 예를 들어 완충액 또는 항생제를 시린지 및 니들을 통해 첨가한다. 환원제를 넣기 전에, 병을 30 - 60 분 동안 질소 (또는 사용에 따라 CO)로 평형화한다. 환원제, 예를 들어 100 x 150 mM 황화나트륨, 200 mM 시스테인-HCl을 첨가한다. 황화나트륨은 건조 비이커에서 계량하고 시스테인은 혈청병에서 계량하여, 둘다 혐기성 챔버로 옮기고, 황화나트륨을 무산소수(anaerobic water)에 녹인 다음 혈청병 안에 든 시스테인에 첨가한다. 황화나트륨 용액이 시스테인과 접촉하여 황화수소 가스가 발생되는 즉시 마개를 덮는다. 배양물에 주입할 때, 시린지 필터를 사용하여 용액을 멸균한다. B12 (10 μ M 시아노코발라민), 염화니켈 (NiCl₂, 무산소수 중에서 챔버에서 제조하고, 배양물에 주입하기 전에 고압멸균 처리 또는 시린지 필터 사용에 의해 멸균처리한 40 mM 스톡용액을 사용하여, 최종 농도 20 μ M), 및 황산암모늄제일철 (필요한 최종 농도는 100 μ M임, 무산소수로 챔버에서 제조하고 배양물에 주입하기 전에 고압멸균 처리 또는 시린지 필터로 멸균한 100-1000x 스톡용액으로 사용됨)와 같은 기타 성분들을 시린지 니들을 통해 첨가한다. 혐기성 조건에서 더 빠르게 증식시키기 위해, 1 리터 병에 혐기적으로 배양한 전-배양물 50 mL을 접종하였다. 벡터의 pAl-lacO1 프로모터 유발은, 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 최종 농도 0.2 mM로 첨가함으로써 수행하였고, 약 3 시간 동안 수행하였다.

[0543] 대량 배양물은 기포를 발생시키면서 연속적인 가스 주입으로 더 큰 병에서 배양할 수 있다. 배지 첨가 후 급속성 기포발생기가 있는 고무 마개를 병에 장착하고 나머지를 설정 완료하기 전에 질소를 30 분 이상 살포한다. 멸균 필터가 주입 가스를 멸균시키고, 병 위의 호스를 작은 C 클램프로 압착할 수 있도록, 각각의 병을 모아둔다. 배지와 세포를 자석 교반 막대로 교반시킨다. 모든 배지 성분들과 세포를 첨가한 후, 계속하여 질소를 살포하면서 실온 배양기에서 배양한다.

[0544] **실시에 XI**

[0545] **CO 산화 (CODH) 분석**

[0546] 본 실시예는 CO 산화 (CO 데하이드로게나제; CODH) 측정을 위한 분석 방법을 기술한다.

[0547] 무렐라 서모아세티카의 7 유전자 CODH/ACS 오페론을 *E. coli* 발현 벡터에 클로닝하였다. 전체 ~10 kbp DNA 단편을 클로닝하였으며, 이 영역에 위치한 일부 유전자들은 자체 내인성 프로모터들로부터 발현되며, 모두 내인성 리보솜 결합 부위를 가지고 있을 것이다. CODH 활성을 정량적으로 측정하는 분석을 이용하여, 이들 클론들에서 CO 산화를 분석하였다. 비활성 (specific activity)을 평가하기 위해, 무렐라 서모아세티카 유전자 산물에 대한 항혈청을 웨스턴 블롯에 사용하였다. 무렐라 서모아세티카는 그람 양성이며, 리보솜 결합 부위 요소들이 *E. coli*에서 잘 작동할 것으로 예측된다. 하기에 상세히 기술된 이러한 활성은 무렐라 서모아세티카 비활성의 ~1/50 정도로 추정되었다. 무렐라 서모아세티카 효소는 약 55°C에서 최적이므로, 재조합 *E. coli* 세포의 CODH 활성에 제한이 될 수 있다. 이에, 중온성이며 명백하게 무손상 CODH/ACS 오페론과 Wood-Ljungdahl 경로를 가지고 있는, 무렐라와 매우 가까운 박테리아인, 데설프토박테리움 하프니엔세 (*Desulfitobacterium hafniense*)의 중온성 CODH/ACS 경로가 유리할 수 있다. 숙주 유기체로서 가능한 초산생성균으로는, 비제한적인 예로서, 로도스피릴럼 루브룸, 무렐라 서모아세티카 및 데설프토박테리움 하프니엔세를 포함한다.

[0548] CO 산화는 CODH/ACS 분석들에서 가장 민감성이 높고 가장 강력하다. *E. coli*-기반의 합성가스 이용 시스템은 궁극적으로는 특히 최적 활성을 위하여 클로스티리움 (즉, 무렐라) 계통과 같이 거의 혐기성이여야 할 것으로 보인다. CODH 개선은 가능하지만 궁극적으로 수중 CO 가스 용해도에 의해 제한적일 것이다.

[0549] 먼저, 각각의 유전자들을 발현 벡터에 클로닝하였다. 서브유닛들/1 복합체를 위한 조합 발현 유닛을 제조하였다. 단백질 수준에서 *E. coli* 발현을 확인하였다. 무렐라 서모아세티카의 CODH/ACS 조합 오페론 및 개별 발현 클론들을 모두 제작하였다.

[0550] CO 산화 분석. 본 분석은 Wood-Ljungdahl 경로에서 효소 활성을 분석하는 보다 단순하며, 믿을 수 있고, 보다 다재다능한 분석법이며, CODH를 테스트한다 (Seravalli et al., *Biochemistry* 43:3944-3955 (2004)). 무렐라 서모아세티카의 CODH 비활성은 55℃에서는 500 U이거나, 25℃에서는 ~60U이다. 이러한 분석은 CO 존재 하에 메틸 비올로겐의 환원을 이용한다. 마개를 덮은 혐기성의 유리 큐벳에서 578 nm에서 측정한다.

[0551] 보다 상세하게는, 먼저 탈이온수로 4번, 아세톤으로 1번 세척한 고무 마개가 있는 유리 큐벳을 준비하였다. 소량의 진공 그리스를 고무 가스켓 상부에 도포하였다. 큐벳에 CO를 주입하고, 22 Ga. 니들 + 배기 (exhaust) 니들로 10분 건조시켰다. 반응 완충액 (50 mM Hepes, pH 8.5, 2mM 디티오프레이톨 (DTT)) 0.98 mL을, 니들로 배기시키고, 100% CO 상태로, 22 Ga. 니들을 사용하여 첨가하였다. 메틸 비올로겐 (CH₃ 비올로겐) 스톡용액은 1 M 수용액이다. 각각의 분석에는 20 μ l를 20 mM 최종 농도로 사용하였다. 메틸 비올로겐을 첨가하였을 때, 18 Ga 니들 (부분)을 자켓으로 사용하여 해밀톤 시린지로 용이하게 CH₃ 비올로겐을 회수하였다. 4 -5 분취액들을 취하여 세척을 위해 버리고, 시린지를 가스 평형시켰다. CH₃ 비올로겐을 약간 환원하도록 CH₃ 비올로겐 스톡용액을 구성할 때, 소량의 디티온산나트륨 (0.1 M 스톡)을 첨가하였다. 온도는 가열된 Olis 분광광도계 (Bogart GA)에서 55℃로 맞추었다. 블랭크 반응 (CH₃ 비올로겐 + 완충액)을 먼저 수행하여 CH₃ 비올로겐 환원 기준율을 측정하였다. ACS90 및 ACS91 (각각 제1 *cooC*를 가지거나 가지지 않은 무렐라 서모아세티카의 CODH-ACS 오페론)인 *E. coli* 세포 추출물. 추출물 10 μ l를 한번에 첨가하여, 혼합 및 분석하였다. 환원된 CH₃ 비올로겐은 보라색이 되었다. 분석 결과를 표 I에 나타낸다.

[0552] 표 I. 조추출물의 CO 산화 활성

표 118

ACS90	7.7 mg/ml	ACS91	11.8 mg/ml	
Mta98	9.8 mg/ml	Mta99	11.2 mg/ml	
Extract	Vol	OD/	U/ml	U/mg
ACS90	10 microliters	0.073	0.376	0.049
ACS91	10 microliters	0.096	0.494	0.042
Mta99	10 microliters	0.0031	0.016	0.0014
ACS90	10 microliters	0.099	0.51	0.066
Mta99	25 microliters	0.012	0.025	0.0022
ACS91	25 microliters	0.215	0.443	0.037
Mta98	25 microliters	0.019	0.039	0.004
ACS91	10 microliters	0.129	0.66	0.056
Averages				
ACS90	0.057 U/mg			
ACS91	0.045 U/mg			
Mta99	0.0018 U/mg			

[0553]

[0554] Mta98/Mta99는 무렐라 서모아세티카 유래의 메탄올 메틸트랜스퍼라제 유전자들을 발현하는 *E. coli* MG1655 균주 이므로, 무렐라 서모아세티카 CODH 오페론을 가진 ACS90 ACS91 *E. coli* 균주에 대한 음성 대조군이다.

[0555] 세포 단백질의~ 1%가 CODH인 경우, 이들 수치는 순수한 무렐라 서모아세티카 CODH의 500 U/mg 활성보다 약 100X 낮을 것이다. 웨스턴 블롯에 따른 실제 평가에서, 세포 단백질의 0.5%이었으므로, 활성은 무렐라 서모아세티카 CODH보다 약 50X 낮다. 그러나, 본 실험에서 재조합 *E. coli*에서 CO 산화 활성이 확인되었으며, 음성 대조군에서는 훨씬 낮았다. 음성 대조군에서 확인된 낮은 CO 산화 수준 (CH₃ 비올로겐 환원)은 *E. coli*가 CH₃ 비올로겐을 환원시키는 능력에 한계가 있을 수 있음을 의미한다.

[0556] CODH 및 Mtr 단백질의 최종 농도를 평가하기 위하여, CO 산화, ACS, 메틸트랜스퍼라제, 및 코리노이드 Fe-S 분석에 사용한 동일한 세포 추출물을 대상으로 SDS-PAGE와 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 사용한 항혈청은 정제된 무렐라 서모아세티카 CODH-ACS 및 Mtr 단백질에 대한 다클론성 항체이며, 알칼리 포스파타제가 접합된 염소-항-토끼 2차 항체를 이용하여 가시화하였다. 웨스턴 블롯을 수행하였으며, 그 결과를 도 9에 나타낸다.

ACS90 및 ACS91에서의 CODH 함량은 대조군 레인과 비교하여 50 ng로 확인되었다. 2개의 CODH 서브유닛과 메틸 트랜스퍼라제를 포함하는 CODH-ACS 오페론 유전자의 발현이 웨스턴 블롯 분석으로 확인되었다. 즉, 재조합 *E. coli* 세포는 7개의 유전자로 구성된 오페론을 복수의 성분으로 발현한다. 또한, 메틸트랜스퍼라제 및 코리노이드 철-황 단백질 둘다, 동일한 재조합 *E. coli* 세포에서 활성을 나타내었다. 이들 단백질은 동일 세포에 클로닝한 동일 오페론의 일부이다.

[0557] 무렐라 서모아세티카 세포 추출물들을 이용하여 양성 대조군에 대하여 CO 산화 분석을 반복 실시하였다. *E. coli* ACS90 및 ACS91에서 CODH 활성을 측정가능한 수준이었지만, 무렐라 서모아세티카 대조군 보다 약 130 - 150 X 낮았다. 분석 결과는 도 10에 나타난다. 간략하게는, 세포 (CODH/ACS 오페론; ACS90 또는 ACS91 또는 빈 벡터: pZA33S를 포함하고 있는 무렐라 서모아세티카 또는 *E. coli*)를 배양하고, 전술한 바와 같이 추출물을 준비하였다. 추출물을 준비한 당일에, 55°C에서 여러 시간대에 전술한 바와 같이 분석을 수행하였다. 메틸비올로겐의 환원은 120 초 동안 578 nm에서 추적하였다.

[0558] 이들 결과는 CO 산화 (CODH) 분석과 결과를 기술한다. 재조합 *E. coli* 세포는 메틸 비올로겐 환원 분석으로 측정된 바와 같이 CO 산화 활성을 발현하였다.

[0559] **실시예 XII**

[0560] ***E. coli* CO 내성 실험 및 CO 농도 분석 (미오글로빈 분석)**

[0561] 본 실시예는 고농도 CO에 대한 *E. coli* 내성을 기술한다.

[0562] *E. coli*가 CO 포화 함량 하에 혐기적으로 증식가능하지 여부를 확인하기 위해, 상기 소량의 혐기성 미생물학에서 기술한 바와 같이, 테리픽 브로스 배지 (+ 환원성 용액, NiCl_2 , $\text{Fe(II)NH}_4\text{SO}_4$, 시아노코발라민, IPTG, 및 클로람페니콜) 50 ml이 든 120 ml 혈청병에서 배양을 준비하였다. 병의 절반을 30분 간 질소 가스로 평형화하고, 절반은 30분간 CO 가스로 평형화하였다. 빈 벡터 (pZA33)를 대조군으로 사용하였으며, pZA33 빈 벡터를 포함하는 배양물과 ACS90 및 ACS91가 포함된 배양물을 N_2 및 CO 둘다에서 실험하였다. 모두 접종하여, 36시간 동안 37°C에서 진탕 (250 rpm) 배양하였다. 36 시간 종료 후, 플라스크를 검사하여 모두에서 고도로 증식되었음을 확인하였다. 관찰된 상당한 증식은 밤새 이루어졌으며, 긴 지체기를 나타내었다.

[0563] 모든 배양물이 CO 존재 조건에서도 잘 증식된 것으로 보이므로, 최종 CO 농도를 확인하였다. 이는 CO에 노출시켰을 때의 미오글로빈의 분광학적 쉬프트 분석으로 이루어졌다. 디티온산나트륨을 이용하여 환원된 미오글로빈은 435 nm에서 흡광 피크를 가지는데, 이 피크는 CO에 의해 423 nm로 이동한다. 파장이 짧고 300 nm에서 위로 전 스펙트럼을 기록하여야 하므로, 석영 큐벳을 사용하여야 한다. CO 농도는 표준 곡선에서 구하였으며, CO의 최대 수용해도 = 20°C 및 1 atm에서 970 마이크로몰인 헨리 법칙 상수에 따라 달라진다.

[0564] CO 농도에 대한 미오글로빈 테스트를 위해, 큐벳을 물로 10X, 아세톤으로 1X 세척하고, CODH 분석에서와 같이 마개로 닫았다. N_2 를 ~10분 간 큐벳에 주입하였다. 1 ml의 혐기성 완충액 (HEPES, pH 8.0, 2 mM DTT)을 해밀톤 시린지로 블랭크 (CO로 평형화하지 않음)에 첨가하였다. 10 μl 의 미오글로빈 (~1 mM, 가변적임, 단 상당량이 필요함)과 1 μl 의 디티온산염 (20 mM 스톡)을 첨가하였다. 1 μl 증분으로 첨가한 CO 포화 완충액에 대해 CO 표준 곡선을 작성하였다. 피크 높이와 쉬프트를 각 증분마다 기록하였다. 테스트 배양물은 pZA33/CO, ACS90/CO 및 ACS91/CO이었다. 이들 각각을 동일한 큐벳에 1 μl 증분으로 첨가하였다. 실험 중에 제2 큐벳을 준비하여 사용하였다. 그 결과는 표 II에 나타낸다.

[0565] 표 II. 일산화 탄소 농도, 36시간

표 119

Strain and Growth Conditions	Final CO concentration (micromolar)
pZA33-CO	930
ACS90-CO	638
	494
	734
	883
ave	687
SD	164
ACS91-CO	728
	812
	760
	611
ave.	728
SD	85

[0566]

[0567]

표 II의 결과는, 균주를 CO 존재 또는 부재 하에서 배양하던지 간에 증식되었음을 나타내었다. 이들 결과는 *E. coli*가 혐기 조건에서 CO 노출에 허용적일 수 있으며, CODH-ACS 오페론을 발현하는 *E. coli* 세포가 CO 일부를 대사할 수 있음을 의미한다.

[0568]

이들 결과는 CODH/ACS 발현 여부와 무관하게, *E. coli* 세포들이 CO 포화 함량의 존재 하에서도 증식할 수 있음을 입증해준다. 아울러, 이는 CO 대신 질소 하에서도 대조군으로서 동일하게 잘 증식하였다. 이러한 실험을 통해, *E. coli* 실험 균주가 정상 대기압에서 수행한 합성가스 프로젝트에서 달성가능한 수준에서는 CO에 민감하지 않은 것으로 확인되었다. 아울러, 예비 실험에서 CODH/ACS를 발현하는 재조합 *E. coli* 세포가 실제 아마도 이산화탄소로 산화함으로써 일부 CO를 소비하는 것으로 나타났다.

[0569]

실시예 XIII

[0570]

1,3-부탄디올, 프로필렌 및 크로틸 알코올 합성 경로

[0571]

1,3-부탄디올, 프로필렌 및 크로틸 알코올의 합성 경로들을 도 7에 나타낸다. 이들 경로는, 말로닐-ACP를 아세틸-CoA 또는 아세틸-ACP와 축합하여 아세토아세틸-ACP (단계 A)를 제조하는, 지방산 생합성의 개시와 함께 시작할 수 있다. 2번째 단계는 아세토아세틸-ACP의 3-하이드록시부티릴-ACP로의 환원을 수반한다. 크로토닐-ACP로의 탈수 및 다른 환원을 거쳐, 부티릴-ACP가 생성된다. 체인 연장은 전형적으로 장쇄 아실쇄가 형성될 때까지 말로닐-ACP를 추가로 부가하여 계속되며, 그런 후 티오에스테라제에 의해 유리형 C16 지방산으로 가수분해된다. 박테리아의 지방산 합성 시스템 (FAS II)은 각 단계에서 개별 단백질을 이용하지만, 진균과 포유류의 지방산 합성 시스템 (FAS I)은 다중기능의 컴플렉스 단백질을 이용한다. 이 경로는 지방산 생합성의 하나 이상의 효소들을 이용하여, C3 및 C4 생성물, 프로필렌, 1,3-부탄디올 및 크로틸알코올을 생산한다.

[0572]

도 7에 아세토아세틸-ACP를 1,3-부탄디올로 변환하는 몇가지 경로들을 나타낸다. 몇몇 경로들에서, 아세토아세틸-ACP가 먼저 아세토아세틸-CoA로 변환된다 (단계 D). 다른 예로, 아세토아세틸-CoA도 아세토아세틸-CoA 신타제 (EC 2.3.1.194)에 의해 아세틸-CoA와 말로닐-CoA로부터 합성할 수 있다. 그런 후, 아세토아세틸-CoA가 CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제 또는 신테타제 (단계 E)에 의해 아세토아세테이트로 가수분해될 수 있다. 그 후, 아세토아세테이트는 카르복실산리덕타제 (단계 F)에 의해 3-옥소부티르알데하이드로 환원된다. 다른 예로, 아세토아세틸-CoA가 CoA-의존성 알데하이드 데하이드로게나제 (단계 I)에 의해 3-옥소부티르알데하이드로 바로 변환된다. 또 다른 구현예에서, 아세토아세틸-ACP가 아실-ACP 리덕타제에 의해 3-옥소부티르알데하이드로 바로 변환된다 (단계 J). 3-옥소부티르알데하이드는 다시 4-하이드록시-2-부탄논 또는 3-하이드록시부티르알데하이드 중간 산물을 경유하여 1,3-부탄디올로 환원된다 (단계 G 및 S, 또는 단계 R 및 AA). 다른 옵션은 알데하이드 데하이드로게나제/알코올 데하이드로게나제 활성을 가진 2중 기능의 효소에 의한 아세토아세틸-CoA의 4-하이드록시-2-부탄논으로의 직접 변환 (단계 K)이다. 또한, 1,3-부탄디올까지의 경로는 3-하이드록시부티릴-CoA 중간 산물을 경유하여 진행될 수 있다. 이 중간 산물은 아세토아세틸-CoA의 환원 (단계 P) 또는 3-하이드록시부

티릴-ACP의 트랜스아실화 (단계 X)에 의해 형성된다. 3-하이드록시부티릴-CoA는 다시 3-하이드록시부티레이트 (단계 Y), 3-하이드록시부티르알데하이드 (단계 N) 또는 1,3-부탄디올 (단계 O)로 변환된다. 다른 예로, 3-하이드록시부티레이트 중간 산물은 아세토아세테이트로부터 형성되거나 (단계 Q), 또는 3-하이드록시부티릴-ACP의 가수분해를 경유하여 형성된다 (단계 L). 또한, 3-하이드록시부티르알데하이드 중간 산물은 3-하이드록시부티릴-ACP 리덕타제의 산물 (단계 M)이다.

[0573] 도 7은 또한 말로닐-ACP에서 크로틸 알코올까지의 경로들을 나타낸다. 일 구현예에서, 지방산 개시 및 연장 효소들은 크로토닐-ACP 중간 산물들을 만들어낸다 (단계 A, B, C). 크로토닐-ACP는 그후 크로토닐-CoA, 크로토네이트 또는 크로톤알데하이드로 각각 트랜스아실화, 가수분해 또는 환원된다 (단계 AE, T, U). 크로토닐-CoA와 크로토네이트는 CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신테타제에 의해 상호 변환된다 (단계 AF). 크로토네이트는 카르복실산리덕타제에 의해 크로톤알데하이드로 환원된다 (단계 AG). 모든 경로들에서 마지막 단계에, 단계 AH에서 알데하이드 리덕타제에 의해 크로톤알데하이드가 크로틸 알코올로 환원된다. 아래 표에 열거된 다수의 대안적인 경로들 역시 본 발명에 포함된다. 크로토닐-CoA는 크로톤알데하이드 또는 크로틸 알코올로 환원될 수 있다 (단계 V, W). 다른 예로, 기존에 개시된 1,3-부탄디올 경로들의 3-하이드록시부티릴 중간 산물들 역시 크로틸 알코올 전구체로 변환될 수 있다. 예컨대, 3-하이드록시부티릴-CoA, 3-하이드록시부티레이트 또는 3-하이드록시부티르알데하이드의 탈수로 각각 크로토닐-CoA, 크로토네이트 또는 크로톤알데하이드가 수득된다 (단계 AB, AC, AD).

[0574] 또한, 프로필렌 경로를 도 7에 나타낸다. 일 구현예에서, 크로톤알데하이드 중간 산물은 프로필렌으로 탈카르보닐화된다 (단계 AO). 다른 구현예에서, 3-하이드록시부티레이트 중간 산물은 알켄을 형성하는 데카르복실라제에 의해 프로필렌으로 변환된다 (단계 AR). 또한, 크로토네이트의 탈카르복시화로 프로필렌이 형성된다 (단계 AQ). 또 다른 구현예에서, 지방산 생합성 효소들은 크로토닐-ACP를 부티릴-ACP (단계 AL)로 추가로 변환하며, 그런 후 부티릴-CoA (단계 AI)로 트랜스아실화되거나, 또는 부티레이트로 가수분해될 수 있다 (단계 AP). 또한, 부티릴-CoA 중간 산물은 크로토닐-CoA가 환원되어 형성된다 (단계 AM). 부티레이트 중간 산물 역시 크로토네이트의 환원 또는 부티릴-CoA의 CoA 모이어티 제거를 통해 형성된다 (단계 AN 또는 AJ). 프로필렌은 알켄을 형성하는 데카르복실라제에 의해 부티레이트로부터 형성된다 (단계 AK). 말로닐-ACP에서 프로필렌까지의 경로를 하기 표에 열거한다.

[0575] 도 7에 나타난 경로들의 예는 하기 표에 열거한다:

표 120

[0576]

생성물	경로		
1,3-BDO	A, D, E, F, G, S	A, D, K, S	AS, E, F, G, S
	A, D, E, F, R, AA	A, H, F, G, S	AS, I, G, S
	A, D, E, Q, Z, AA	A, H, F, R, AA	AS, K, S
	A, D, P, Y, Z, AA	A, H, Q, Z, AA	AS, I, R, AA
	A, D, P, O	A, J, G, S	AS, E, F, R, AA
	A, D, E, F, G, S	A, J, R, AA	AS, E, Q, Z, AA
	A, D, E, F, R, AA	A, B, X, Y, Z, AA	AS, P, N, AA
	A, D, P, N, AA	A, B, X, O	AS, P, Y, Z, AA
	A, D, I, G, S	A, B, X, N, AA	AS, P, O
	A, D, I R, AA	A, B, L, Z, AA	AS, E, F, R, AA
		A, B, M, AA	AS, E, F, G, S

크로틸 알코올	A, B, C, AE, AF, AG, AH A, B, C, AE, W A, B, C, AE, V, AH A, B, C, T, AG, AH A, B, C, U, AH A, B, X, Y, Z, AD, AH A, B, X, Y, AC, AG, AH A, B, X, AB, AF, AG, AH A, B, X, AB, V, AH A, B, X, AB, W A, B, L, Z, AD, AH A, B, L, AC, AG, AH A, B, M, AD, AH	A, D, P, AB, AF, AG, AH A, D, P, AB, V, AH A, D, P, AB, W A, D, P, Y, AC, AG, AH A, D, P, Y, Z, AD, AH A, D, P, N, AD, AH A, D, E, F, R, AD, AH A, D, E, Q, Z, AD, AH A, D, E, Q, AC, AG, AH A, D, I, R, AD, AH A, H, F, R, AD, AH A, H, Q, AC, AG, AH	A, H, Q, Z, AD, AH A, J, R, AD, AH AS, I, R, AD, AH AS, E, F, R, AD, AH AS, E, Q, Z, AD, AH AS, E, Q, AC, AG, AH AS, P, N, AD, AH AS, P, Y, Z, AD, AH AS, P, Y, AC, AG, AH AS, P, AB, V, AH AS, P, AB, AF, AG, AH AS, P, AB, W
프로필렌	A, B, C, AL, AI, AJ, AK A, B, C, AL, AP, AK A, B, C, AE, AF, AG, AO A, B, C, AE, AF, AQ A, B, C, AE, AF, AN, AK A, B, C, AE, AM, AJ, AK A, B, C, AE, V, AO A, B, C, T, AG, AO A, B, C, T, AQ A, B, C, T, AN, AK A, B, C, U, AO A, B, X, Y, Z, AD, AO A, B, X, Y, AR A, B, X, Y, AC, AN, AK A, B, X, Y, AC, AQ A, B, X, Y, AC, AG, AO A, B, X, N, AD, AO A, B, X, AB, AF, AG, AO A, B, X, AB, AF, AQ A, B, X, AB, AF, AN, AK A, B, X, AB, AM, AJ, AK A, B, X, AB, V, AO A, B, L, AR A, B, L, Z, AD, AO	A, B, L, AC, AG, AO A, B, L, AC, AN, AK A, B, L, AC, AQ A, B, M, AD, AO A, D, E, F, R, AD, AO A, D, E, Q, AR A, D, E, Q, Z, AD, AO A, D, E, Q, AC, AN, AK A, D, E, Q, AC, AG, AO A, D, E, Q, AC, AQ A, D, P, Y, Z, AD, AO A, D, P, N, AD, AO A, D, P, Y, AR A, D, P, Y, AC, AG, AO A, D, P, Y, AC, AQ A, D, P, Y, AC, AN, AK A, D, P, AB, AM, AJ, AK A, D, P, AB, AF, AG, AO A, D, P, AB, AF, AQ A, D, P, AB, AF, AN, AK A, D, P, AB, V, AO A, D, I, R, AD, AO A, J, R, AD, AO A, H, F, R, AD, AO	A, H, Q, AR A, H, Q, Z, AD, AO A, H, Q, AC, AQ A, H, Q, AC, AG, AO A, H, Q, AC, AN, AK A, H, Q, V, AG, AO AS, I, R, AD, AO AS, E, F, R, AD, AO AS, E, Q, AD, AO AS, P, Y, Z, AD, AO AS, P, N, AD, AO AS, E, Q, AC, AG, AO AS, P, Y, AC, AG, AO AS, P, AB, AF, AG, AO AS, E, Q, AR AS, P, Y, AR AS, E, Q, AC, AQ AS, P, Y, AC, AQ AS, P, AB, AF, AQ AS, E, Q, AC, AN, AK AS, P, Y, AC, AN, AK AS, P, AB, AF, AN, AK AS, P, AB, AM, AJ, AK

[0577] 도 7에 나타난 반응들에 필요한 효소들을 아래 표에 나타낸다.

표 121

[0578]

표시	기능	단계
1.1.1.a	옥시도리덕타제 (옥소 -> 알코올)	7B, 7G, 7P, 7Q, 7R, 7S, 7AA, 7AH
1.1.1.c	옥시도리덕타제 (아실-CoA를 알코올)	7K, 7O, 7W
1.2.1.b	옥시도리덕타제 (아실-CoA를 알데하이드)	7I, 7N, 7V
1.2.1.e	옥시도리덕타제 (산 -> 알데하이드)	7F, 7Z, 7AG
1.2.1.f	옥시도리덕타제 (아실-ACP -> 알데하이드)	7J, 7M, 7U
1.3.1.a	옥시도리덕타제 (알칸 -> 알켄)	7AL, 7AM, 7AN
2.3.1.e	아실-ACP C-아실트랜스퍼라제 (탈카르복시화)	7A
2.3.1.f	CoA-ACP 아실트랜스퍼라제	7D, 7X, 7AE, 7AI
2.3.1.g	지방산 신타제	7A, 7B, 7C, 7AL
2.8.3.a	CoA 트랜스퍼라제	7E, 7Y, 7AJ, 7AF
3.1.2.a	CoA 하이드롤라제	7E, 7Y, 7AJ, 7AF
3.1.2.b	아실-ACP 티오에스테라제	7H, 7L, 7T, 7AP

4.1.1.a	데카르복실라제	7AQ, 7AR
4.1.1.b	데카르복실라제, 알켄 형성	7AK
4.1.99.a	데카르보닐라제	7AO
4.2.1.a	하이드로-리아제	7C, 7AB, 7AC, 7AD
6.2.1.a	CoA 신테타제	7E, 7Y, 7AJ, 7AF

[0579] 이들 다수의 EC 클래스에 속하는 후보 효소들이 종래에 개시되었으며, 도 7에 나타난 변환에 적합한 후보 효소가 제시되었다. 이들 효소 클래스로는 EC 1.1.1.a, 1.1.1.c, 1.2.1.b, 1.2.1.e, 2.3.1.b, 2.3.1.h, 2.8.3.a, 3.1.2.a, 4.1.1.a, 4.1.99.a, 4.2.1.a 및 6.2.1.a를 포함한다. 도 7의 경로와 관련있는 새로운 후보 효소들은 아래에 나타낸다.

[0580] **1.1.1.a 옥시도리덕타제 (옥소 -> 알코올)**

[0581] 도 7에 나타난 몇가지 반응들은 알코올 데하이드로게나제 효소에 의해 촉매된다. 이러한 반응들로는 단계 B, G, P, Q, R, S, AA 및 AH를 포함한다. 단계 G, P, Q, R, S, AA 및 AH를 촉매하는 알코올 데하이드로게나제 효소의 예들은 실시예 VII에서 설명되었다. 단계 B를 촉매하는데 적합한 후보 효소들을 아래에 나타낸다.

[0582] 아세토아세틸-ACP의 3-하이드록시아세틸-ACP로의 환원은 아세토아세틸-ACP 리덕타제 또는 3-옥소아실-ACP 리덕타제 (EC 1.1.1.100)에 의해 촉매된다. 에스케리키아 콜라이의 3-옥소아실-ACP 리덕타제는 *fabG*에 의해 코딩된다. 아실-ACP 기질이 이 효소에 결합하는데 작용하는 주요 잔기들은 규명되었다 (Zhang et al, *J Biol Chem* 278:52935-43 (2003)). 바실러스 안트라시스 (Zaccai et al, *Prot Struct Funct Gen* 70:562-7 (2008))와 미코박테리움 투베르쿨로시스 (Gurvitz, *Mol Genet Genomics* 282:407-16 (2009))에서 추가적인 이러한 활성을 가진 효소들이 특정화되었다. 진핵 생물의 지방산 신타제의 베타-케토아실 리덕타제 (KR) 도메인도 이러한 활성을 촉매한다 (Smith, *FASEB J*, 8:1248-59 (1994)).

표 122

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fabG</i>	POAEK2.1	84028081	에스케리키아 콜라이
<i>fabG</i>	AAP27717.1	30258498	바실러스 안트라시스
<i>FabG1</i>	NP_215999.1	15608621	미코박테리움 투베르쿨로시스
<i>FabG4</i>	YP_003030167.1	253797166	미코박테리움 투베르쿨로시스

[0584] **1.2.1.f 옥시도리덕타제 (아실-ACP -> 알데하이드)**

[0585] 아실-ACP의 이의 대응되는 알데하이드로의 환원은 아실-ACP 리덕타제 (AAR)에 의해 촉매된다. 이러한 변환은 도 7의 단계 J, M 및 U에 도시되어 있다. 적합한 후보 효소로는 시네코코커스 엘롱가투스 PCC7942의 *orf1594* 유전자 산물과 이의 상동체를 포함한다 (Schirmer et al, *Science*, 329: 559-62 (2010)). 시네코코커스 엘롱가투스 PCC7942의 아실-ACP 리덕타제는, 대부분의 시아노박테리아 유기체에서 보존된 것으로 보이는 오페론에서 알데하이드 데카르보닐라제와 함께 발현된다. 이 효소는, 알데하이드 데카르보닐라제와 함께 에스케리키아 콜라이에서 발현되며, 알칸 생산력을 부여한다. 프로클로로코커스 마리누스의 AAR도 에스케리키아 콜라이에 클로닝되었으며, 데카르보닐라제와 함께 알칸을 생산하는 것으로 입증되었다 (US 출원 2011/0207203).

표 123

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>orf1594</i>	YP_400611.1	81300403	시네코코커스 엘롱가투스 PCC7942
<i>PMT9312_0533</i>	YP_397030.1	78778918	프로클로로코커스 마리누스 MIT 9312
<i>syc0051_d</i>	YP_170761.1	56750060	시네코코커스 엘롱가투스 PCC 6301
<i>Ava_2534</i>	YP_323044.1	75908748	아나바에나 베리어빌리스 ATCC 29413
<i>alr5284</i>	NP_489324.1	17232776	노스톡 <i>sp.</i> PCC 7120
<i>Aazo_3370</i>	YP_003722151.1	298491974	노스톡 아졸라이
<i>Cyan7425_0399</i>	YP_002481152.1	220905841	시아노테세 <i>sp.</i> PCC 7425
<i>N9414_21225</i>	ZP_01628095.1	119508943	노둘라리아 스푸미게나 CCY9414

L8106_07064	ZP_01619574.1	253797166	링바야 <i>sp.</i> PCC 8106
-------------	---------------	-----------	-------------------------

[0587] **1.3.1.a (알칸 → 알켄)**

[0588] 도 7에 나타난 몇몇 변환들은 알켄의 알칸으로의 환원을 수반한다. 단계 AM 및 AN에서, 에노일-CoA는 이의 대응되는 아실-CoA로 환원된다. 이들 반응을 촉매하는 후보 효소들은 실시예 VII에서 기술되었다. 단계 AL은 부티릴-ACP 리덕타제에 의해 촉매되는 크로토닐-ACP의 부티릴-ACP로의 환원을 도시한다. 이 단계에 적합한 후보 효소는 본원에 기술된다.

[0589] 에노일-ACP 리덕타제는 에노일-ACP 이중 결합의 NAD(P)H-의존적인 환원에 의한 포화된 아실-ACP의 형성을 촉매한다. 에스케리키아 콜라이의 FabI 단백질은 탄소수 4-16의 에노일 기질의 환원을 촉매하는, 잘 특정화된 에노일-ACP 리덕타제이다 (Rafi et al, JBC 281:39285-93 (2006)). FabI은 생성물 저해에 의해 아실-ACP에 의해 저해된다 (Heath, J Biol Chem 271:1833-6 (1996)). 바실러스 썩틸리스는 2종의 에노일-ACP 리덕타제 이소자임, FabI와 FabL을 함유하고 있다 (Heath et al, J Biol Chem 275:40128-33 (2000)). 스트렙토코커스 뉴모니아의 FabK 단백질은 동일한 활성을 촉매하는 트리클로산-내성의 플라보단백질이다 (Heath and Rock, Nature 406:145-6 (2000)). 추가적인 후보는 최근 결정 구조가 해명된 슈도모나스 에우루지노사의 FabI 단백질이다 (Lee et al, Acta Cryst Sect F 67:214-216 (2011)).

표 124

[0590]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fabI</i>	POAEK4.2	84028072	에스케리키아 콜라이
<i>fabI</i>	P54616.2	7531269	바실러스 썩틸리스
<i>fabL</i>	P71079.1	81817482	바실러스 썩틸리스
<i>fabK</i>	AAF98273.1	9789231	스트렙토코커스 뉴모니아
<i>fabI</i>	Q9ZFE4.1	7531118	슈도모나스 에우루지노사

[0591] **2.3.1.e 아실-ACP C-아실트랜스퍼라제 (탈카르복시화)**

[0592] 도 7의 단계 A에서, 아세토아세틸-ACP는 말로닐-ACP와 아세틸-CoA 또는 아세틸-ACP 중 어느 한가지로부터 형성된다. 이런 반응은 EC 클래스 2.3.1의 아실-ACP C-아실트랜스퍼라제에 의해 촉매된다. 말로닐-ACP와 아세틸-CoA의 축합은 베타-케토아실-ACP 신타제 (KAS, EC 2.3.1.180)에 의해 촉매된다. 에스케리키아 콜라이는 *fabB*, *fabF* 및 *fabH*. *FabH* (KAS III)에 의해 코딩된 3종의 KAS 효소로서, 에스케리키아 콜라이에서 지방산 생합성을 개시하는 주요 효소이며, 아세토아세틸-ACP 형성에 선택적이다. *FabB*와 *FabF*는 말로닐-ACP와 아실-ACP 기질의 축합을 촉매하며, 아세틸-ACP와 반응하여 지방산 개시에 참여할 수 있지만, 지방산 연장에 주로 기능한다. 예를 들어, 바실러스 썩틸리스의 KAS 효소들은 *FabH*와 유사하지만, 선택성이 낮으며, 분지형 아실-CoA 기질을 수용한다 (Choi et al, J Bacteriol 182:365-70 (2000)).

표 125

[0593]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fabB</i>	AAC75383.1	1788663	에스케리키아 콜라이
<i>fabF</i>	AAC74179.1	1787337	에스케리키아 콜라이
<i>fabH</i>	AAC74175.1	1787333	에스케리키아 콜라이
<i>FabHA</i>	NP_389015.1	16078198	바실러스 썩틸리스
<i>FabHB</i>	NP_388898.1	16078081	바실러스 썩틸리스

[0594] 다른 예로, 아세틸-CoA가 먼저 아세틸-ACP로 활성화된 다음, 2가지 효소, 즉 아세틸-CoA:ACP 트랜스아실라제 (EC 2.3.1.38) 및 아세토아세틸-ACP 신타제 (EC 2.3.1.41)에 의해 아세토아세틸-ACP로 축합될 수 있다. 아세틸-CoA:ACP 트랜스아실라제는 아세틸-CoA와 아실 캐리어 단백질을 아세틸-ACP로 변환하고, CoA를 방출한다. 아세틸-CoA:ACP 트랜스아실라제에 대한 후보 효소들은 아래 EC 2.3.1.f 섹션에 기술되어 있다. 아세토아세틸-ACP 신타제 효소는 아세틸-ACP와 말로닐-ACP의 축합을 촉매한다. 이런 활성은 에스케리키아 콜라이의 *FabF*와 *FabB*

뿐만 아니라 EC 2.3.1.g에 기술된 다중 기능의 진행 생물 지방산 신타제 효소 컴플렉스들에 의해 촉매된다.

[0595] **2.3.1.f CoA-ACP 아실트랜스퍼라제**

[0596] CoA의 ACP 모이어티로의 치환은 EC 클래스 2.3.1의 효소에 의해 촉매된다. 이 반응은 도 7의 단계 D, X, AE 및 AI에 나타나 있다. 또한, 아세틸-CoA의 아세틸-ACP로의 활성화 (단계 A, 도 7)는 CoA:ACP 아실트랜스퍼라제에 의해 촉매된다. CoA-ACP 아실트랜스퍼라제 활성을 가진 효소로는 아세틸-CoA:ACP 트랜스아실라제 (EC 2.3.1.38)와 말로닐-CoA:ACP 트랜스아실라제 (EC 2.3.1.39)가 있다.

[0597] 에스케리키아 콜라이의 FabH (KASIII) 효소는, 아세토아세틸-ACP를 형성하는 일차적인 활성 외에도, 아실-CoA:ACP 트랜스아실라제로서 기능한다. 부티릴-ACP는 FabH의 다른 기질로서 수용된다 (Prescott et al, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol, 36:269-311 (1972)). 플라스모디움 팔시파룸과 스트렙토마이세스 에버미틸리스로부터 유래된 아세틸-CoA:ACP 트랜스아실라제 효소들은 에스케리키아 콜라이에서 이중적으로 발현되었다 (Lobo et al, Biochem 40:11955-64 (2001)). fabH-결합성 락토코커스 락티스 숙주에서 발현시킨, 플라스모디움 팔시파룸 유래의 합성 KASIII (FabH)는 천연 fadH 활성을 보완할 수 있었다 (Du et al, AEM 76:3959-66 (2010)). 스피나시아 올레라세아 (Spinacia oleracea)로부터 유래된 아세틸-CoA:ACP 트랜스아실라제 효소는 기질로서, 부티릴-ACP 등의 다른 아실-ACP 분자들을 수용한다 (Shimakata et al, Methods Enzym 122:53-9 (1986)). 이 효소의 서열은 아직까지 결정되지 않았다. 말로닐-CoA:ACP 트랜스아실라제 효소로는 에스케리키아 콜라이와 브라시카 납수스의 FabD를 포함한다 (Verwoert et al, J Bacteriol, 174:2851-7 (1992); Simon et al, FEBS Lett 435:204-6 (1998)). 브라시카 납수스의 FabD는 fabL-결합성 에스케리키아 콜라이를 보완할 수 있었다. 다중 기능의 진행 생물의 지방산 신타제 효소 컴플렉스 (EC 2.3.1.g) 역시 이러한 활성을 촉매한다.

표 126

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fabH</i>	AAC74175.1	1787333	에스케리키아 콜라이
<i>fadA</i>	NP_824032.1	29829398	스트렙토마이세스 에버미틸리스
<i>fabH</i>	AAC63960.1	3746429	플라스모디움 팔시파룸
합성 구조체	ACX34097.1	260178848	플라스모디움 팔시파룸
<i>fabH</i>	CAL98359.1	124493385	락토코커스 락티스
<i>fabD</i>	AAC74176.1	1787334	에스케리키아 콜라이
<i>fabD</i>	CAB45522.1	5139348	브라시카 납수스

[0599] **2.3.1.g 지방산 신타제**

[0600] 도 7의 단계 A, B, C 및 AL은, 하나 이상의 서브유닛들의 멀티 카피들로 구성된 다중 기능의 효소 컴플렉스인 지방산 신타제 또는 지방-아실-CoA 신타제에 의해 촉매될 수 있다. 사카로마이세스 세레비지애의 지방산 신타제는, 지방산 합성: 활성화, 프라이밍, 연장 및 종결에 필요한 모든 반응들을 함께 촉매하는 다중 기능의 2개의 서브유닛들 FAS1과 FAS2으로 구성된 도데카머이다 (Lomakin et al, Cell 129:319-32 (2007)). 이 효소 컴플렉스는 아세틸-CoA와 말로닐-CoA로부터 장쇄 지방산을 형성하는 과정을 촉매한다. 진행 생물의 FAS 시스템의 신호 생성물은 팔미트산 (C16)이다. 칸디다 과랍실로시스와 서모마이세스 라누기노수스에서 유사한 지방산 신타제 컴플렉스들이 확인된다 (Nguyen et al, PLoS One 22:e8421 (2009); Jenni et al, Science 316:254-61 (2007)). 미코박테리움 투베르쿨로시스와 호모 사피엔스 등의 포유류의 다중 기능의 Fas 효소들 역시 적합한 후보 효소이다 (Fernandes and Kolattukudy, Gene 170:95-99 (1996) and Smith et al, Prog Lipid Res 42:289-317 (2003)).

표 127

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
FAS1	CAA82025.1	486321	사카로마이세스 세레비지애
FAS2	CAA97948.1	1370478	사카로마이세스 세레비지애
<i>Fas1</i>	AB037973.1	133751597	서모마이세스 라누기노수스
<i>Fas2</i>	AB037974.1	133751599	서모마이세스 라누기노수스
<i>Fas</i>	AAB03809.1	1036835	미코박테리움 투베르쿨로시스
<i>Fas</i>	NP_004095.4	41872631	호모 사피엔스

[0602] **3.1.2.b 아실-ACP 티오에스테라제**

[0603] 아실-ACP 티오에스테라제 효소는 아실-ACP를 이의 대응되는 산으로 변환한다. 이러한 변환은 도 7의 단계 H, L, T 및 AP에서 필요하다. 효소의 예로는 아라비도시스 탈리아나의 FatA와 FatB 이소형을 포함한다 (Salas et al, Arch Biochem Biophys 403:25-34 (2002)). 이들 2종의 단백질들의 활성은 탄소쇄 길이에 따라 달라지며, FatA는 올레일-ACP를 선호하고, FatB는 팔미토일-ACP를 선호한다. 3.1.2.14를 참조한다. 다양한 체인 길이 특이성을 가진 다수의 티오에스테라제들이 WO 2008/113041에 기술되어 있으며, 아래 표에 포함되어 있다 [특허의 p 126 표 2A를 참조함]. 예를 들어, 움벨룰라리아 칼리포르니카 유래의 FatB와 같이, 중쇄의 식물 티오에스테라제를 에스케리키아 콜라이에서 발현시키면 주로 라우레이트 (C12:0)인 중쇄 지방산 화합물들이 고농도로 축적된다는 것이 기존에 입증되었다. 마찬가지로, 에스케리키아 콜라이에서 쿠페아 팔루스트리스의 FatB1 티오에스테라제를 발현시킨 결과 C8-10:0 아실-ACP가 축적되었다 (Dehesh et al, Plant Physiol 110:203-10 (1996)). 마찬가지로, 무스 톨크토리우스의 티오에스테라제는, 에스케리키아 콜라이에서 발현시켰을 때, C18:1 체인 종결을 >50배 증가시키며, 유리형 지방산으로서 방출된다 (Knutzon et al, Plant Physiol 100:1751-58 (1992)). 아실-ACP 티오에스테라제의 기질 특이성을 변형시키는 방법 역시 당해 기술 분야에 공지되어 있다 (예컨대, EP1605048).

표 128

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fatA</i>	AEE76980.1	332643459	아라비도시스 탈리아나
<i>fatB</i>	AEE28300.1	332190179	아라비도시스 탈리아나
<i>fatB2</i>	AAC49269.1	1292906	쿠페아 호케리아나
<i>fatB1</i>	AAC49179.1	1215718	쿠페아 팔루스트리스
<i>M96568.1:94..1251</i>	AAA33019.1	404026	카르타무스 톨크토리우스
<i>fatB1</i>	Q41635.1	8469218	움벨룰라리아 칼리포르니카
<i>tesA</i>	AAC73596.1	1786702	에스케리키아 콜라이

[0605] **4.1.99.a 데카르보닐라제**

[0606] 실시예 VII에 기술된 데카르보닐라제 후보 효소들 역시 본원과 관련된다. 도 107에 나타난 탈카르보닐화 반응을 촉매하는데 적합한 추가적인 후보 효소로는 시네코코커스 엘롱가투스 PCC7942의 orf1593 유전자 산물과 이의 상동체를 포함한다 (US 출원 2011/0207203).

표 129

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>Orf1593</i>	YP_400610.1	81300402	시네코코커스 엘롱가투스 PCC7942

[0608] **4.2.1.a 하이드로-리아제**

[0609] 단계 C, AB, AC 및 AD를 비롯하여, 도 7의 몇몇 반응들은 탈수 반응을 도시한다. 또한, 실시예 VII에 도시된 하이드로-리아제 후보 효소들도 여기에 적용가능하다. 올리에이트 하이드라타제 효소들은 도 1-7의 모든 탈수 반응들, 특히 3-부텐-1-올의 부타디엔으로의 탈수 반응을 촉매하는데 이용할 수 있다. 올리에이트 하이드라타제 효소들은 비-활성화된 알켄의 이의 대응되는 알코올로의 가역적인 수화를 촉매한다. 이들 효소는 WO2011076691에서 제시된 바와 같이 적합한 추가적인 후보 효소이다. 엘리자베스킹기아 메닌고셉티카와 스트렙토코커스 피오게네스로부터 올리에이트 하이드라타제가 특정화되었다 (WO 2008/119735). 그 예로 하기 단백질들을 포함한다.

표 130

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>OhyA</i>	ACT54545.1	254031735	엘리자베스킹기아 메닌고셉티카

<i>HMPREF0841_1446</i>	ZP_07461147.1	306827879	스트렙토코커스 피오케네스 ATCC 10782
<i>P700755_13397</i>	ZP_01252267.1	91215295	피크로플렉투스 토르퀴스 ATCC 700755
<i>RPB_2430</i>	YP_486046.1	86749550	로도슈도모나스 팔루스트리스

- [0611] 3-하이드록시아실-ACP 데하이드라타제 효소는 3-하이드록시부티릴-ACP를 크로토닐-ACP로 탈수하는데 적합한 후보 효소이다 (단계 C, 도 7). 이러한 활성을 가진 효소로는 에스케리키아 콜라이의 FabA와 FabZ가 있으며, 이는 중첩되는 광범위한 기질 특이성을 가진다 (Heath, J Biol Chem 271:1833-6 (1996)). 전술한 지방산 신타제 콤플렉스 역시 이 반응을 촉매한다. 플라스모디움 팔시파룸로부터 FabZ 단백질의 구조가 결정되었다 (Kostrew et al, 단백질 Sci 14:1570-80 (2005)). 추가적인 후보는 효모의 Htd2p와, 효모 사피엔스 및 트리파노소마 브루세이의 TbHTD2에 코딩된, 미토콘드리아의 3-하이드록시아실-ACP 데하이드라타제이다 (Kastanoitis et al, Mol Micro 53:1407-21 (2004); Kaija et al, FEBS Lett 582:729-33 (2008)).

표 131

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fabA</i>	AAC74040.1	1787187	에스케리키아 콜라이
<i>fabZ</i>	AAC73291.1	1786377	에스케리키아 콜라이
<i>PfFabZ</i>	AAK83685.1	15080870	플라스모디움 팔시파룸
<i>Htd2p</i>	NP_011934.1	6321858	사카로마이세스 세레비지에
<i>HTD2</i>	P86397.1	281312149	효모 사피엔스

[0613] 실시예 XIV

[0614] 크로틸 알코올로부터 부타디엔의 화학적 생산

- [0615] 크로틸 알코올을 부타디엔으로 변환하는 전형적인 과정에서, 크로틸 알코올은 그대로 (neat) 또는 용매 중에서, 증기의 존재 또는 부재 하에, 반응 바셀 또는 튜브 안에서, 40-400 °C로 가열된 고정 무기, 유기 또는 금속-함유성 탈수 촉매 위를 통과하여, 물이 제거되고 부타디엔이 기체로서 방출되며, 이는 응결 (부타디엔 bp = -4.4 °C)되고 추가적인 가공, 저장 또는 사용을 위해 저장소에 수집된다. 전형적인 촉매로는 비스무스 몰리브데이트, 포스페이트-인산, 세슘 산화물, 카올린-철 산화물, 카올린-인산, 실리카-알루미나 및 알루미나가 있다. 전형적인 공정의 처리율은 0.1-20,000 kg/h이다. 전형적인 용매는 톨루엔, 헵탄, 옥탄, 에틸벤젠 및 자일렌이다.

[0616] 실시예 XV

[0617] 크로틸 알코올로부터 부타디엔을 생산하는 효소적 경로

- [0618] 본 실시예는 크로틸 알코올을 부타디엔으로 변환하는 효소 경로를 기술한다. 도 12에 2가지 경로가 도시된다. 한가지 경로로, 크로틸 알코올이 크로틸 알코올 키나제에 의해 2-부테닐-4-포스페이트로 인산화된다 (단계 A). 2-부테닐-4-포스페이트 중간 산물이 다시 2-부테닐-4-디포스페이트로 인산화된다 (단계 B). 부타디엔 신타제 효소는 2-부테닐-4-디포스페이트의 부타디엔으로의 변환을 촉매한다 (단계 C). 이러한 부타디엔 신타제는 본원에 기술된 바와 같이 방향성 진화 등의 방법을 이용하여 이소프렌 신타제와 같은 포스페이트 리아제 효소로부터 유래될 수 있다. 다른 경로로서, 크로틸 알코올이 디포스포키나제에 의해 2-부테닐-4-디포스페이트로 바로 변환된다 (단계 D). 단계 A-D의 후보 효소들을 아래에 제시한다.

[0619] 크로틸 알코올 키나제 (도 12, 단계 A)

- [0620] 크로틸 알코올 키나제 효소는 크로틸 알코올의 하이드록시기로 포스페이트기를 전달하는 과정을 촉매한다. 아래 기술된 효소들은 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발현하도록 조작될 수 있다. 포스페이트기를 알코올기로 전이하는 과정을 촉매하는 키나제는 EC 2.7.1 효소 클래스에 속한다. 아래 표에 EC 2.7.1 효소 클래스에서 몇가지 유용한 키나제 효소를 열거한다.

표 132

[0621]

EC 번호	효소명	EC 번호	효소명	EC 번호	효소명
2.7.1.1	헥소키나제	2.7.1.48	우리딘 키나제	2.7.1.94	아실글리세롤 키나제
2.7.1.2	글루코키나제	2.7.1.49	하이드록시메틸피리미딘 키나제	2.7.1.95	카나마이신 키나제
2.7.1.3	케토헥소키나제	2.7.1.50	하이드록시메틸티아졸 키나제	2.7.1.100	S-메틸-5-티오리보스 키나제
2.7.1.4	프럭토키나제	2.7.1.51	L-푸쿨로키나제	2.7.1.101	타가토스 키나제
2.7.1.5	람놀로키나제	2.7.1.52	푸코키나제	2.7.1.102	하마멜로스 키나제
2.7.1.6	갈락토키나제	2.7.1.53	L-자일룰로키나제	2.7.1.103	비오마이신 키나제
2.7.1.7	만노키나제	2.7.1.54	D-아라비노키나제	2.7.1.105	6-포스포프럭토-2-키나제
2.7.1.8	글루코사민 키나제	2.7.1.55	알로스 키나제	2.7.1.106	글루코스-1,6-비스포스페이트 신타제
2.7.1.10	포스포글루코키나제	2.7.1.56	1-포스포프럭토키나제	2.7.1.107	디아실글리세롤 키나제
2.7.1.11	6-포스포프럭토키나제	2.7.1.58	2-데하이드로-3-데옥시갈락토노키나제	2.7.1.108	돌리콜 키나제
2.7.1.12	글루코노키나제	2.7.1.59	N-아세틸글루코사민 키나제	2.7.1.113	데옥시구아노신 키나제
2.7.1.13	데하이드로글루코노키나제	2.7.1.60	N-아실만노사민 키나제	2.7.1.114	AMP-티미딘 키나제
2.7.1.14	세도헥툴로키나제	2.7.1.61	아실-포스페이트-헥소스 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.118	ADP-티미딘 키나제
2.7.1.15	리보키나제	2.7.1.62	포스포르아미데이트-헥소스 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.119	히드로마이신-B 7"-O-키나제
2.7.1.16	리블로키나제	2.7.1.63	폴리포스페이트-글루코스 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.121	포스포에놀피루베이트-글리세론 포스포트랜스퍼라제
2.7.1.17	자일룰로키나제	2.7.1.64	이노시톨 3-키나제	2.7.1.122	자일리톨 키나제
2.7.1.18	포스포리보키나제	2.7.1.65	스실로-이노사민 4-키나제	2.7.1.127	이노시톨-트리스포스페이트 3-키나제
2.7.1.19	포스포리블로키나제	2.7.1.66	운데카프레놀 키나제	2.7.1.130	테트라아실디사카라이드 4'-키나제
2.7.1.20	아데노신 키나제	2.7.1.67	1-포스파티딜이노시톨 4-키나제	2.7.1.134	이노시톨-테트라키스포스페이트 1-키나제
2.7.1.21	티미딘 키나제	2.7.1.68	1-포스파티딜이노시톨-4-포스페이트 5-키나제	2.7.1.136	마크롤라이드 2'-키나제
2.7.1.22	리보실니코틴아미드 키나제	2.7.1.69	단백질-Np-포스포히스티딘-당 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.137	포스파티딜이노시톨 3-키나제
2.7.1.23	NAD+ 키나제	2.7.1.70	EC 2.7.1.37와 상동	2.7.1.138	세라마이드 키나제
2.7.1.24	데포스포-CoA 키나제	2.7.1.71	슈키메이트 키나제	2.7.1.140	이노시톨-테트라키스포스페이트 5-키나제
2.7.1.25	아데닐릴-설페이트 키나제	2.7.1.72	스트렙토마이신 6-키나제	2.7.1.142	글리세롤-3-포스페이트-글루코스 포스포트랜스퍼라제
2.7.1.26	리보플라빈 키나제	2.7.1.73	이노신 키나제	2.7.1.143	디포스페이트-퓨린 뉴클레오사이드 키나제
2.7.1.27	에리트리톨 키나제	2.7.1.74	데옥시시티딘 키나제	2.7.1.144	타가토스-6-포스페이트 키나제
2.7.1.28	트리오키나제	2.7.1.76	데옥시아데노신 키나제	2.7.1.145	데옥시뉴클레오사이드 키나제
2.7.1.29	글리세론 키나제	2.7.1.77	뉴클레오사이드 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.146	ADP-의존형 포스포프럭토키나제
2.7.1.30	글리세롤 키나제	2.7.1.78	폴리뉴클레오타이드 5'-하이드록실-키나제	2.7.1.147	ADP-의존형 글루코키나제
2.7.1.31	글리세레이트 키나제	2.7.1.79	디포스페이트-글리세롤 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.148	4-(시티딘 5'-디포스포)-2-C-메틸-D-에리트리톨 키나제
2.7.1.32	콜린 키나제	2.7.1.80	디포스페이트-세린 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.149	1-포스파티딜이노시톨-5-포스페이트 4-키나제

2.7.1.33	판토테네이트 키나제	2.7.1.81	하이드록시라이신 키나제	2.7.1.150	1-포스파티딜이노시톨-3-포스페이트 5-키나제
2.7.1.34	판테테인 키나제	2.7.1.82	에탄올아민 키나제	2.7.1.151	이노시톨-폴리포스페이트 멀티키나제
2.7.1.35	피리독살 키나제	2.7.1.83	슈도우리딘 키나제	2.7.1.153	포스파티딜이노시톨-4,5-비스포스페이트 3-키나제
2.7.1.36	메발로네이트 키나제	2.7.1.84	알킬글리세론 키나제	2.7.1.154	포스파티딜이노시톨-4-포스페이트 3-키나제
2.7.1.39	호모세린 키나제	2.7.1.85	베타-글루코사이드 키나제	2.7.1.156	아데노실코빈아미드 키나제
2.7.1.40	피루베이트 키나제	2.7.1.86	NADH 키나제	2.7.1.157	N-아세틸갈락토사민 키나제
2.7.1.41	글루코스-1-포스페이트 포스포디스무타제	2.7.1.87	스트렙토마이신 3"-키나제	2.7.1.158	이노시톨-펜타키스포스페이트 2-키나제
2.7.1.42	리보플라빈 포스포트랜스퍼라제	2.7.1.88	디하이드로스트레토마이신-6-포스페이트 3'a-키나제	2.7.1.159	이노시톨-1,3,4-트리스포스페이트 5/6-키나제
2.7.1.43	글루쿠로노키나제	2.7.1.89	티아민 키나제	2.7.1.160	2'-포스포트랜스퍼라제
2.7.1.44	갈락투로노키나제	2.7.1.90	디포스페이트-프럭토스-6-포스페이트 1-포스포트랜스퍼라제	2.7.1.161	CTP-의존형 리보플라빈 키나제
2.7.1.45	2-데하이드로-3-데옥시글루코노키나제	2.7.1.91	스핀가닌 키나제	2.7.1.162	N-아세틸헥소사민 1-키나제
2.7.1.46	L-아라비노키나제	2.7.1.92	5-데하이드로-2-데옥시글루코노키나제	2.7.1.163	히그로마이신 B 4-O-키나제
2.7.1.47	D-리블로키나제	2.7.1.93	알킬글리세롤 키나제	2.7.1.164	O-포스포세틸-tRNA ^{Sec} 키나제

[0622]

메발로네이트 키나제 (EC 2.7.1.36)는 메발로네이트의 말단 하이드록시기를 인산화한다. 이 단계의 후보 유전 자로는 사카로마이세스 세레비지애의 *erg12*, 메타노칼도코커스 야나스키의 *mvk*, 호모 사피엔스의 *MVK* 및 아라비 둡시스 탈리아나 *col*의 *mvk*를 포함한다. 추가적인 메발로네이트 키나제 후보로는 아케온(archeon) 메타노사르 시나 마제이의 피드백-내성의 메발로네이트 키나제 (Primak et al, *AEM*, in press (2011))와 스트렙토코커스 뉴 모니아의 Mvk 단백질 (Andreassi et al, *Protein Sci*, 16:983-9 (2007))이 있다. 사카로마이세스 세레비지애, 스트렙토코커스 뉴모니아 및 메타노사르시나 마제이로부터 유래된 Mvk 단백질들이 이종적으로 발현되었으며, 에스케리키아 콜라이에서 특정화되었다 (Primak et al, *supra*). 스트렙토코커스 뉴모니아의 메발로네이트 키나제는 실로프로필메발로네이트, 비닐메발로네이트 및 에틸닐메발로네이트 등의 수종의 대안적인 기질에 활성을 나타내었으며 (Kudoh et al, *Bioorg Med Chem* 18:1124-34 (2010)), 후속적인 실험으로 리간드 결합부가 컴팩트한 전자가 풍부한 C(3)-치환기에 대해 선택적인 것으로 확인되었다 (Lefurgy et al, *J Biol Chem* 285:20654-63 (2010)).

표 133

[0623]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>erg12</i>	CAA39359.1	3684	사카로마이세스 세레비지애
<i>mvk</i>	Q58487.1	2497517	메타노칼도코커스 야나스키
<i>mvk</i>	AAH16140.1	16359371	호모 사피엔스
<i>mvk</i>	NP_851084.1	30690651	아라비둡시스 탈리아나
<i>mvk</i>	NP_633786.1	21227864	메타노사르시나 마제이
<i>mvk</i>	NP_357932.1	15902382	스트렙토코커스 뉴모니아

[0624]

글리세롤 키나제는 또한 글리세롤의 말단 하이드록시기를 인산화하여 글리세롤-3-포스페이트를 만든다. 이 반응은, 에스케리키아 콜라이, 사카로마이세스 세레비지애 및 서모토가 마리티마를 비롯하여 여러가지 종들에서 이루어진다. 에스케리키아 콜라이의 글리세롤 키나제는 대체 기질로서 디하이드록시아세톤과 글리세르알데하이드 등을 받아들이는 것으로 확인된 바 있다 (Hayashi et al., *J Biol.Chem.* 242:1030-1035 (1967)). 서모토가

마리티마는 2종의 글리세롤 키나제를 가진다 (Nelson et al., *Nature* 399:323-329 (1999)). 글리세롤 키나제는 기질 특이성이 넓은 것으로 알려져 있다. Crans와 Whiteside는 4종의 유기체(에스케리키아 콜라이, 사카로마이세스 세레비지에, 바실러스 스테아로써모필러스 및 칸디다 미코더마)에서 글리세롤 키나제를 연구하였다 (Crans et al., *J. Am. Chem. Soc.* 107:7008-7018 (2010); Nelson et al., 상기 참조, (1999)). 이들은 글리세롤의 66종의 유사체를 연구하였고, 이 효소가 하나의 말단 하이드록실기 대신 다양한 치환기를 허용할 수 있으며 메틸기로 C2의 수소 원자를 치환할 수 있다고 결론내렸다. 흥미롭게도, 4종의 유기체에서 유래한 효소들 모두 카이네틱 상수가 매우 비슷하였다.

표 134

[0625]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
glpK	AP_003883.1	89110103	에스케리키아 콜라이 K12
<i>glpK1</i>	NP_228760.1	15642775	서모토가 마리타임 <i>MSB8</i>
<i>glpK2</i>	NP_229230.1	15642775	서모토가 마리타임 <i>MSB8</i>
<i>Gut1</i>	NP_011831.1	82795252	사카로마이세스 세레비지에

[0626]

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

표 135

[0627]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
thrB	BAB96580.2	85674277	에스케리키아 콜라이 K12
SACT1DRAFT_4809	ZP_06280784.1	282871792	스트렙토마이세스 sp. <i>ACT-1</i>
<i>Thr1</i>	AAA35154.1	172978	사카로마이세스 세레비지에

[0628]

2-부테닐-4-포스페이트 키나제 (도 12, 단계 B)

[0629]

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

표 136

[0630]

EC 번호	효소명
2.7.4.1	폴리포스페이트 키나제
2.7.4.2	포스포메발로네이트 키나제
2.7.4.3	아데닐레이트 키나제
2.7.4.4	뉴클레오사이드-포스페이트 키나제
2.7.4.6	뉴클레오사이드-디포스페이트 키나제
2.7.4.7	포스포메틸피리미딘 키나제
2.7.4.8	구아닐레이트 키나제
2.7.4.9	dTMP 키나제
2.7.4.10	뉴클레오사이드-트리포스페이트-아데닐레이트 키나제
2.7.4.11	(데옥시)아데닐레이트 키나제
2.7.4.12	T2-유도성 데옥시뉴클레오타이드 키나제
2.7.4.13	(데옥시)뉴클레오사이드-포스페이트 키나제
2.7.4.14	시티딜레이트 키나제
2.7.4.15	티아민-디포스페이트 키나제
2.7.4.16	티아민-포스페이트 키나제

2.7.4.17	3-포스포글리세로일-포스페이트-폴리포스페이트 포스포트랜스퍼라제
2.7.4.18	파르네실-디포스페이트 키나제
2.7.4.19	5-메틸데옥시시티딘-5'-포스페이트 키나제
2.7.4.20	둘리킬-디포스페이트-폴리포스페이트 포스포트랜스퍼라제
2.7.4.21	이노시톨-헥사키스포스페이트 키나제
2.7.4.22	UMP 키나제
2.7.4.23	리보스 1,5-비스포스페이트 포스포키나제
2.7.4.24	디포스포이노시톨-펜타키스스페이트 키나제
2.7.4.-	파르네실 모노포스페이트 키나제
2.7.4.-	제라닐-제라닐 모노포스페이트 키나제
2.7.4.-	피틸-포스페이트 키나제

- [0631] 포스포메발로네이트 키나제 효소는 매우 흥미를 끈다. 포스포메발로네이트 키나제 (EC 2.7.4.2)는 2-부테닐-4-포스페이트 키나제로의 유사 변환을 촉매한다. 이 효소는 사카로마이세스 세레비지애의 *erg8* (Tsay et al., *Mol. Cell Biol.* 11:620-631 (1991))와 스트렙토코커스 뉴모니애, 스타필로코커스 아우레우스 및 엔테로코커스 패칼리스의 *mvaK2*에 의해 코딩된다 (Doun et al., *Protein Sci.* 14:1134-1139 (2005); Wilding et al., *J Bacteriol.* 182:4319-4327 (2000)). 스트렙토코커스 뉴모니애와 엔테로코커스 패칼리스에서 효소들이 클로닝되었고, 에스케리키아 콜라이에서 특정화되었다 (Pilloff et al., *J Biol. Chem.* 278:4510-4515 (2003); Doun et al., *Protein Sci.* 14:1134-1139 (2005)). 스트렙토코커스 뉴모니애의 포스포메발로네이트 키나제는 실로프로필메발로네이트 포스페이트, 비닐메발로네이트 포스페이트 및 에틸닐메발로네이트 포스페이트 등의 수종의 대안적인 기질에 대해 활성을 나타내었다 (Kudoh et al., *Bioorg Med Chem* 18:1124-34 (2010)).

표 137

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

- [0633] 파르네실 모노포스페이트 키나제 효소는 파르네실 모노포스페이트를 파르네실 디포스페이트로 CTP 의존적으로 인산화하는 과정을 촉매한다. 마찬가지로, 제라닐제라닐 포스페이트 키나제는 CTP 의존적인 인산화를 촉매한다. 이 활성을 가진 효소는 배양한 니코티아나 타바쿰의 미소체 분획에서 동정되었다 (Thai et al., *PNAS* 96:13080-5 (1999)). 그러나, 연관된 유전자는 아직까지 동정되지 않았다.

[0634] 부타디엔 신타제 (도 12, 단계 C)

- [0635] 부타디엔 신타제는 2-부테닐-4-디포스페이트의 1,3-부타디엔으로의 변환을 촉매한다. 하기 기술된 효소들은 천연적으로 이러한 활성을 가지고 있거나, 또는 이런 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 포스페이트에 작용하는 탄소-옥시젠 리아제는 EC 4.2.3 효소 클래스에서 확인된다. 하기 표에는 EC 클래스 4.2.3에 속하는 유용한 효소 몇종을 열거한다.

표 138

효소 위입 번호	효소명
4.2.3.15	미르센 신타제
4.2.3.26	리날롤 신타제
4.2.3.27	이소프렌 신타제
4.2.3.36	테르펜트리엔 신타제
4.2.3.46	(E, E)-알파-파르네센 신타제
4.2.3.47	베타-파르네센 신타제
4.2.3.49	네올리돌 신타제

- [0637] 특히 유용한 효소로는 이소프렌 신타제, 미르센 신타제와 파르네센 신타제가 있다. 아래에 후보 효소들을 나타

낸다.

- [0638] 이소프렌 신타제는 천연적으로 디메틸알릴 디포스페이트의 이소프렌으로의 변환을 촉매하지만, 또한, 2-부테닐-4-디포스페이트로부터 1,3-부타디엔의 합성도 촉매할 수 있다. 이소프렌 신타제는 포폴루스 알바 (Sasaki et al., FEBS Letters, 2005, 579 (11), 2514-2518), 퓨레라리아 몬타나 (Lindberg et al., *Metabolic Eng.*, 12(1):70-79 (2010); Sharkey et al., *Plant Physiol.*, 137(2):700-712 (2005)), 및 포폴루스 카네센스 (*Populus canescens*)로도 지칭되는 포폴루스 트레몰라 x 포폴루스 알바 (Miller et al., *Planta*, 2001, 213 (3), 483-487) 등의 수종의 유기체들에서 확인할 수 있다. 포폴루스 카네센스의 이소프렌 신타제의 결정 구조가 규명되었다 (Koksai et al, *J Mol Biol* 402:363-373 (2010)). 추가적인 이소프렌 신타제 효소들은 (Chotani et al., WO/2010/031079, Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene; Cervin et al., US 특허 출원 20100003716, Isoprene Syntase Variants for Improved Microbial Production of Isoprene)에 기술되어 있다.

표 139

[0639]	단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
	<i>ispS</i>	BAD98243.1	63108310	포폴루스 알바
	<i>ispS</i>	AAQ84170.1	35187004	퓨레라리아 몬타나
	<i>ispS</i>	CAC35696.1	13539551	포폴루스 트레몰라 x 포폴루스 알바

- [0640] 미르센 신타제 효소는 제라닐 디포스페이트를 베타-미르센으로 탈인산화하는 과정을 촉매한다 (EC 4.2.3.15). 예시적인 미르센 신타제는 솔라눔 리코페시쿰의 MST2 (van Schie et al, *Plant Mol Biol* 64:D473-79 (2007)), 피세아 아비에스의 TPS-Myr (Martin et al, *Plant Physiol* 135:1908-27 (2004)), 아비에스 그란디스의 g-myr (Bohlmann et al, *J Biol Chem* 272:21784-92 (1997)) 및 아라비둡시스 탈리아나의 TPS10 (Bohlmann et al, *Arch Biochem Biophys* 375:261-9 (2000))에 의해 코딩된다. 이들 효소는 에스케리키아 콜라이에서 이종적으로 발현되었다.

표 140

[0641]	단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
	<i>MST2</i>	ACN58229.1	224579303	솔라눔 리코페시쿰
	<i>TPS-Myr</i>	AAS47690.2	77546864	피세아 아비에스
	<i>G-myr</i>	O24474.1	17367921	아비에스 그란디스
	<i>TPS10</i>	EC07543.1	330252449	아라비둡시스 탈리아나

- [0642] 파르네실 디포스페이트는 알파-파르네센 신타제와 베타-파르네센 신타제에 의해 각각 알파-파르네센과 베타-파르네센으로 변환된다. 예시적인 알파-파르네센 신타제 효소로는 아라비둡시스 탈리아나의 TPS03와 TPS02 (Faladt et al, *Planta* 216:745-51 (2003); Huang et al, *Plant Physiol* 153:1293-310 (2010)), 쿠쿠미스 사티부스의 *afs* (Mercke et al, *Plant Physiol* 135:2012-14 (2004), 말루스 x 도메스티카의 *eafar* (Green et al, *Phytochem* 68:176-88 (2007)) 및 피세아 아비에스의 TPS-Far (Martin, *supra*)가 있다. 예시적인 베타-파르네센 신타제 효소는 지아 메이스의 *TPS1*에 의해 코딩된다 (Schnee et al, *Plant Physiol* 130:2049-60 (2002)).

표 141

[0643]	단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
	<i>TPS03</i>	A4FVP2.1	205829248	아라비둡시스 탈리아나
	<i>TPS02</i>	POCJ43.1	317411866	아라비둡시스 탈리아나
	<i>TPS-Far</i>	AAS47697.1	44804601	피세아 아비에스
	<i>afs</i>	AAU05951.1	51537953	쿠쿠미스 사티부스
	<i>eafar</i>	Q84LB2.2	75241161	말루스 x 도메스티카
	<i>TPS1</i>	Q84ZW8.1	75149279	지아 메이스

[0644] 크로틸 알코올 디포스포키나제 (도 12, 단계 D)

[0645] 크로틸 알코올 디포스포키나제 효소는 디포스페이트기의 크로틸 알코올의 하이드록실기와의 전이를 촉매한다. 아래 기술된 효소는 본래 이러한 활성을 가지거나, 이러한 활성을 발휘하도록 조작될 수 있다. 디포스페이트기의 전이를 촉매하는 키나제는 EC 2.7.6 효소 클래스에 속한다. 아래 표는 EC 2.7.6 효소 클래스에 속하는 몇가지 유용한 키나제 효소를 열거한다.

표 142

효소 위입 번호	효소명
2.7.6.1	리보스-포스페이트 디포스포키나제
2.7.6.2	티아민 디포스포키나제
2.7.6.3	2-아미노-4-하이드록시-6-하이드록시메틸디하이드로프테리딘 디포스포키나제
2.7.6.4	뉴클레오타이드 디포스포키나제
2.7.6.5	GTP 디포스포키나제

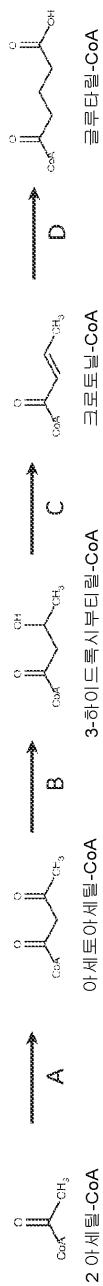
[0647] 특히 흥미로운 효소는 에스케리키아 콜라이 (Hove-Jenson et al., J Biol Chem, 1986, 261(15):6765-71)와 미코플라스마 뉴모니에 M129 (McElwain et al, International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38:417-423)에서 동정된 리보스-포스페이트 디포스포키나제 효소와, 티아민 디포스포키나제 효소이다. 티아민 디포스포키나제 효소의 예는 아라비도시스 탈리아나에서도 확인된다 (Ajajawi, Plant Mol Biol, 2007, 65(1-2);151-62).

표 143

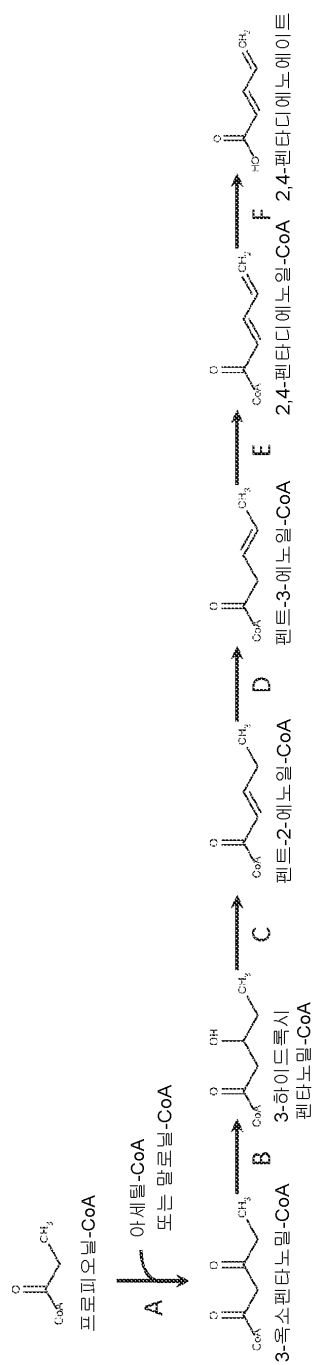
단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
prs	NP_415725.1	16129170	에스케리키아 콜라이
prsA	NP_109761.1	13507812	미코플라스마 뉴모니에 M129
TPK1	BAH19964.1	222424006	아라비도시스 탈리아나 col
TPK2	BAH57065.1	227204427	아라비도시스 탈리아나 col

[0649] 본 명세서에서는 전체에 걸쳐 다양한 문헌들을 참조한다. 유전자은행 및 GI 번호 공개물을 비롯하여, 이들 간행물의 내용은 그 전체가 본 발명이 속하는 기술 분야의 상황을 보다 충분히 설명하기 위해 본 명세서에 원용에 의해 포함된다. 본 발명은 전술한 실시예를 참조하여 설명되었지만, 본 발명의 사상으로부터 이탈되지 않는 범위 내에서 다양한 변형이 이루어질 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

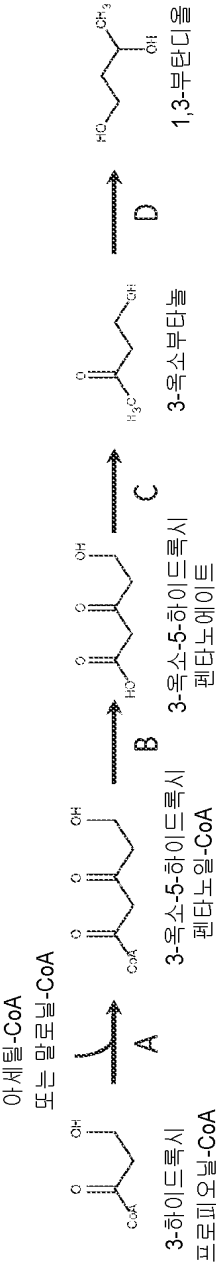
도면2



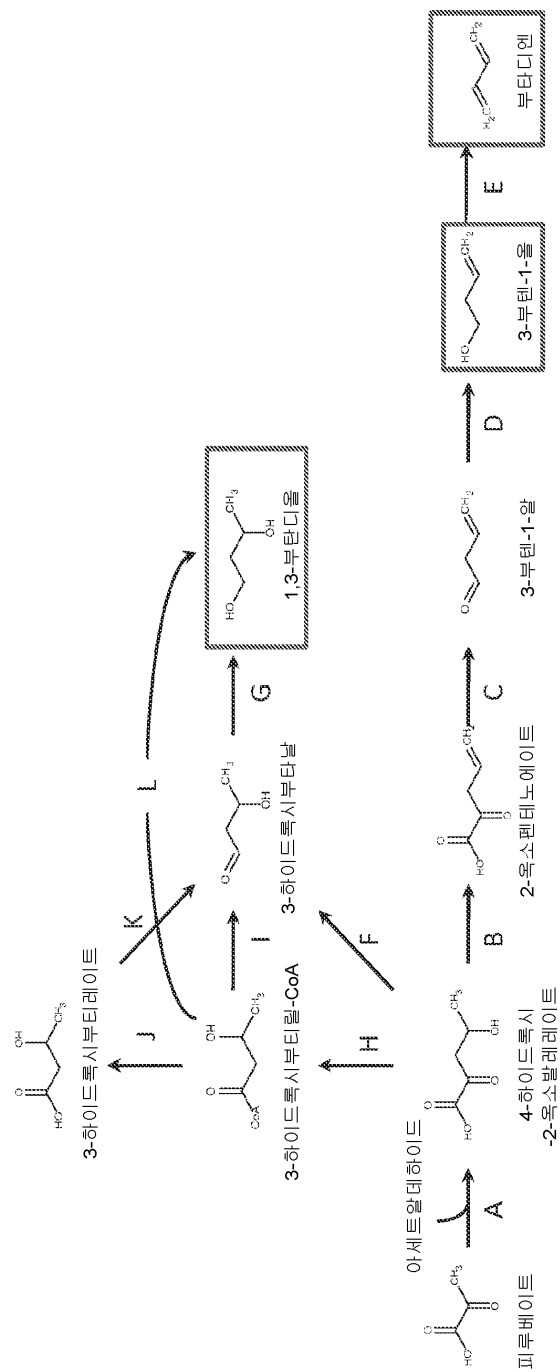
도면3



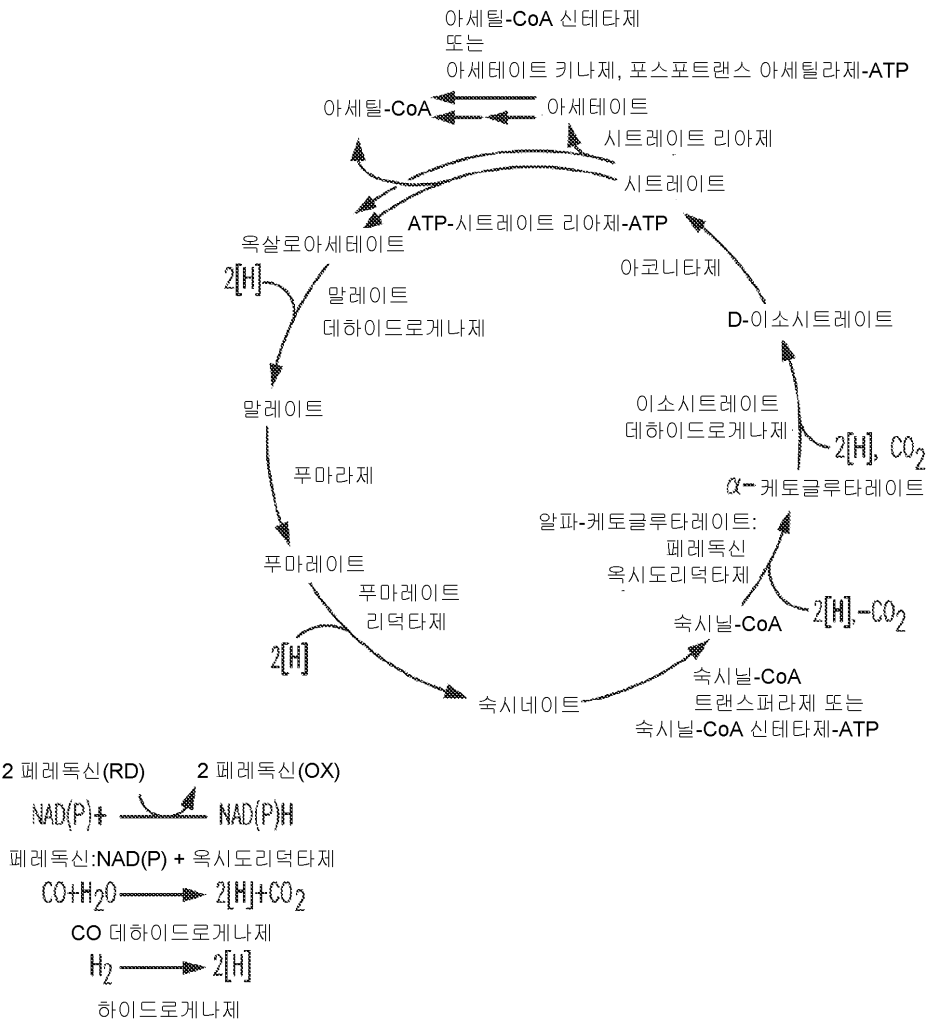
도면4



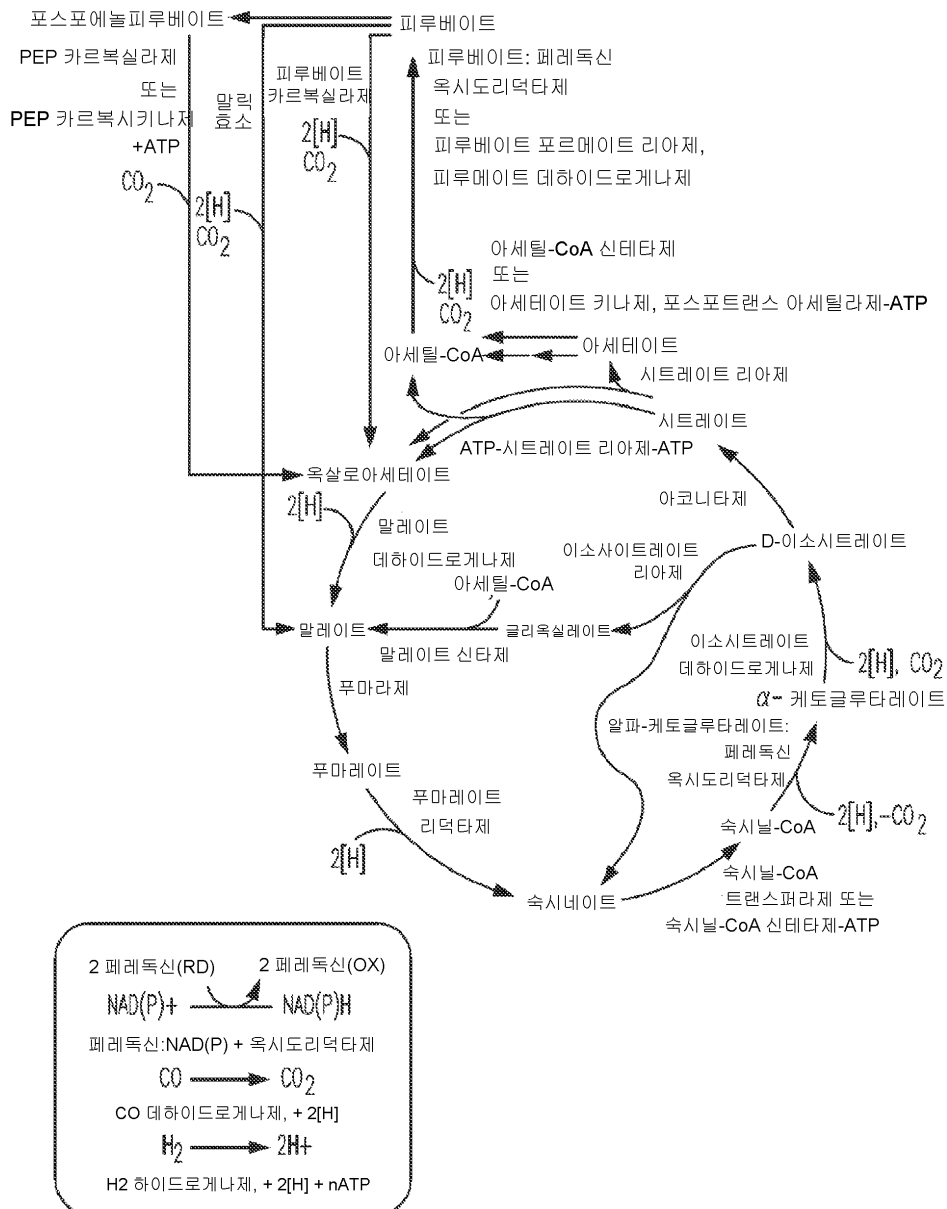
도면5



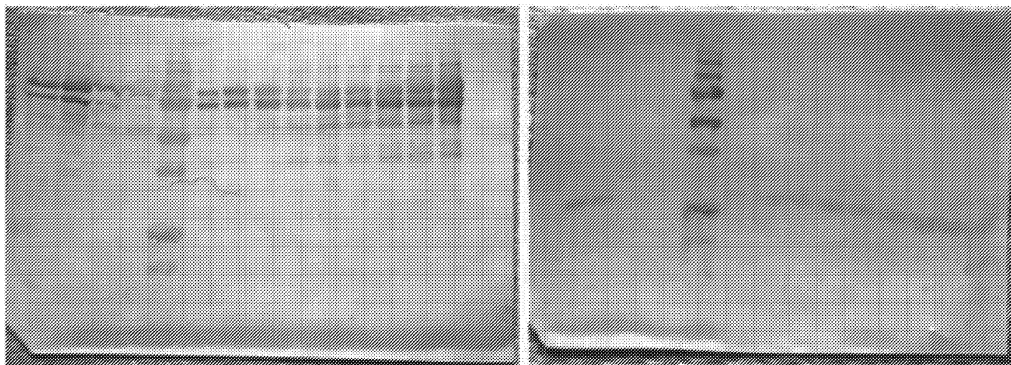
도면8



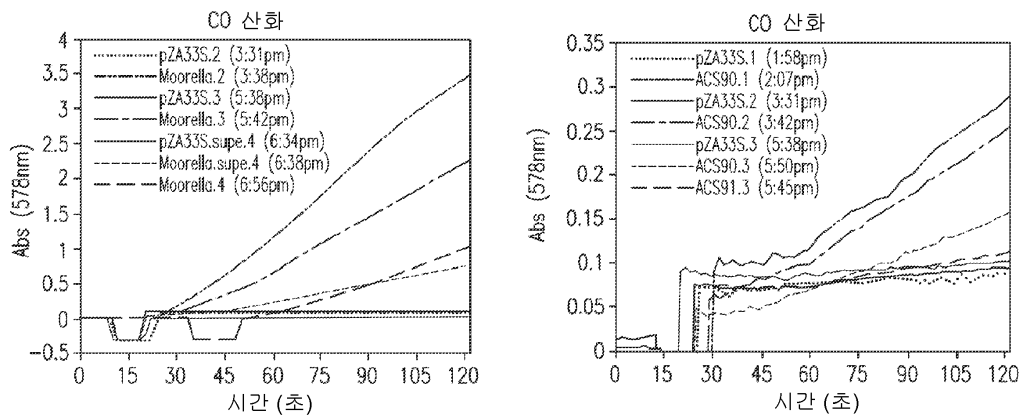
도면9



도면10



도면11



도면12

