



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0068021  
(43) 공개일자 2012년06월26일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)<br/>C12P 7/04 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-7008948</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2010년09월09일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2012년04월06일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2010/048318</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2011/031897<br/>국제공개일자 2011년03월17일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>61/240,959 2009년09월09일 미국(US)<br/>61/254,650 2009년10월23일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>게노마티카 인코포레이티드<br/>미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 워터리지 씨클 10520</p> <p>(72) 발명자<br/>파키아 프리티<br/>미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 씨클 10520<br/>버가드 안토니 피<br/>미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 씨클 10520<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>제일특허법인</p> |
|--|--|

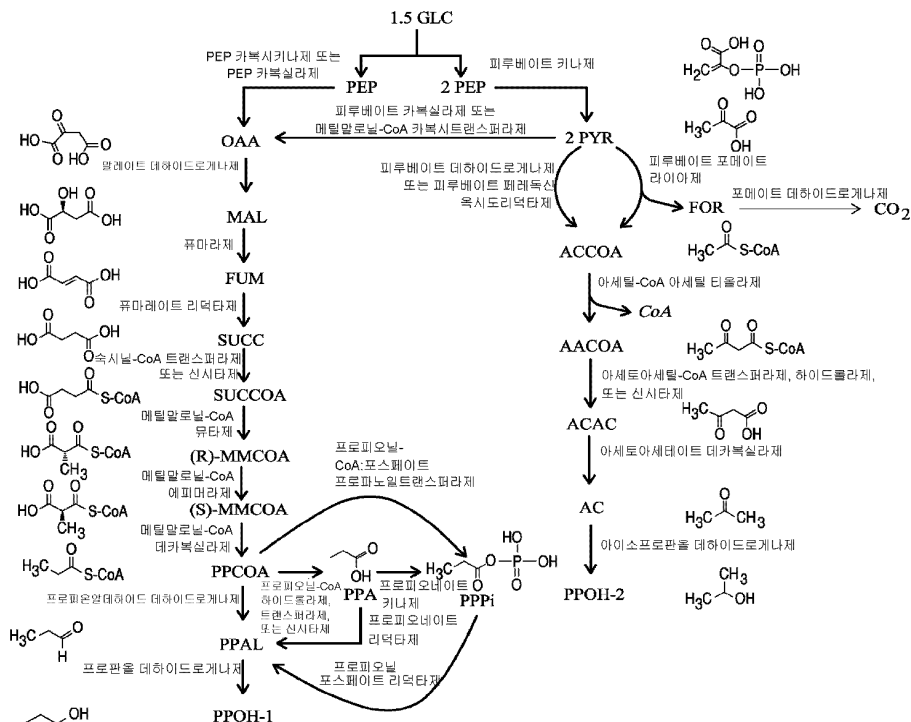
전체 청구항 수 : 총 91 항

(54) 발명의 명칭 아이소프로판올과 1차 알콜, 다이올 및 산과의 공동 생산을 위한 미생물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 n-프로판올 및 아이소프로판올 경로, 1,4-부탄다이올(14-BDO) 및 아이소프로판올 경로, 1,3-부탄다이올(13-BDO) 및 아이소프로판올 경로 또는 메틸아크릴산(MAA) 및 아이소프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체에 관한 것이다. 상기 미생물 유기체는 각각의 n-프로판올, 14-BDO, 13-BDO 또는 MAA 및 아이소프로판올 경로 각각의 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 함유한다. 본 발명은 또한 n-프로판올 및 아이소프로판올, 1,4-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올, 또는 MAA 및 아이소프로판올의 공동 생산 방법을 제공한다. 상기 방법은 n-프로판올 및 아이소프로판올 공동 생산 미생물 유기체를 배양함을 포함할 수 있으며, 이때 상기 미생물 유기체는 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 효소들 각각을 생산하는 조건 하에서 상기 생산에 충분한 기간 동안 상기 각각의 생성물들을 각각 생산하기에 충분한 양으로 상기 각각의 생성물들을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 발현한다.

대표도



(72) 발명자

**오스터하우트 로빈 이**

미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 서  
클 10520

**버크 마크 제이**

미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 서  
클 10520

**순 준**

미국 캘리포니아주 92121 샌 디에고 워터리지 서  
클 10520

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 n-프로판올 경로가 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고,

상기 n-프로판올 경로가 프로판올 데하이드로게나제, 프로피온알데하이드 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오네이트 리덕타제 또는 프로피오닐 포스페이트 리덕타제를 포함하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제 또는 아세토아세테이트 데카복실라제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서,

아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 아세틸-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 아세틸-CoA 경로가 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 또는 포메이트 데하이드로게나제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서,

프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 프로피오닐-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 프로피오닐-CoA 경로가 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 뮤타제, 메틸말로닐-CoA 에피머라제 또는 메틸말로닐-CoA 데카복실라제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 4**

제 3 항에 있어서,

프로피오닐-CoA 경로가 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 또한 포함하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서,

프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외

래 핵산을 포함하는 프로피오닐-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 프로피오닐-CoA 경로가 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 쓰레오닌 데아미나제 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

#### 청구항 6

제 5 항에 있어서,

n-프로판올 경로가 2-옥소부타노에이트 데카복실라제를 또한 포함하는 비-천연 미생물 유기체.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서,

프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 프로피오닐-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 프로피오닐-CoA 경로가 아세틸-CoA 카복실라제, 말로닐-CoA 리덕타제, 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제 또는 프로피오닐-CoA 신타제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

#### 청구항 8

제 1 항에 있어서,

프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 프로피오닐-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 프로피오닐-CoA 경로가 락테이트 데하이드로게나제, 락테이트-CoA 트랜스퍼라제, 락틸-CoA 데하이드라타제 또는 아크틸로일-CoA 리덕타제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

#### 청구항 9

n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 n-프로판올 경로가 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

#### 청구항 10

제 9 항에 있어서,

아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 포함하는 아세틸-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 3 세트가 피루베이트 키나제; 및 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 및 포메이트 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 11**

제 9 항에 있어서,

프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 포함하는 프로피오닐-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 3 세트가 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 말레이트 데하이드로게나제; 퓨마라제; 퓨마레이트 리덕타제; 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제; 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 및 메틸말로닐-CoA 데카복실라제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 12**

제 11 항에 있어서,

외래 핵산의 제 3 세트가 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 또한 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 13**

제 9 항에 있어서,

프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 포함하는 프로피오닐-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 3 세트가 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 쓰레오닌 데아미나제; 및 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 14**

제 13 항에 있어서,

외래 핵산의 제 3 세트가 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제 또는 피루베이트 카복실라제를 또한 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 15**

제 13 항에 있어서,

외래 핵산의 제 2 세트가 2-옥소부타노에이트 데카복실라제를 또한 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 16**

제 9 항에 있어서,

프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 포함하는 프로피오닐-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 3 세트가 아세틸-CoA 카복실라제; 말로닐-CoA 리덕타제; 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제; 및 프로피오닐-CoA 신타제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 17**

제 9 항에 있어서,

프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 포함하는 프로피오닐-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 3 세트가 락테이트 데하이드로게나제; 락테이트-CoA 트랜스퍼라제; 락틸-CoA 데하이드라타제; 및 아크릴로일-CoA 리덕타제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 18**

n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 n-프로판올 경로가 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 말레이트 데하이드로게나제; 퓨마라제; 퓨마레이트 리덕타제; 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제; 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 데카복실라제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제 및 프로피오닐 포스페이트 리덕타제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 19**

제 18 항에 있어서,

외래 핵산의 제 1 세트가 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 또한 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 20**

n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 n-프로판올 경로가 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 쓰레오닌 데아미나제; 및 2-옥소부타노에이트 데카복실라제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판

을 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 21**

제 20 항에 있어서,

외래 핵산의 제 2 세트가 메틸말로닐-CoA 데카복실라제 또는 피루베이트 카복실라제를 또한 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 22**

n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 n-프로판올 경로가 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 카복실라제; 말로닐-CoA 리덕타제; 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제; 프로피오닐-CoA 신시타제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 23**

n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 n-프로판올 경로가 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 락테이트 데하이드로게나제; 락테이트-CoA 트랜스퍼라제; 락틸-CoA 데하이드라타제; 아크틸로일-CoA 리덕타제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피

오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 24**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,  
외래 핵산이 이중 핵산인 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 25**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,  
실질적으로 혐기성인 배양 배지 중에 있는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 26**

n-프로판올 및 아이소프로판올의 제조 방법으로서,  
제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 따른 비-천연 미생물 유기체를 n-프로판올 및 아이소프로판올을 생산하는 조건 하에서 상기 생산에 충분한 기간 동안 배양함을 포함하는 제조 방법.

**청구항 27**

제 26 항에 있어서,  
조건이 실질적으로 혐기성인 배양 조건을 포함하는 제조 방법.

**청구항 28**

제 26 항에 있어서,  
외래 핵산이 이중 핵산인 제조 방법.

**청구항 29**

n-프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,  
상기 n-프로판올 경로가 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고,

상기 n-프로판올 경로가 프로판올 데하이드로게나제, 프로피온알데하이드 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오네이트 리덕타제 또는 프로피오닐 포스페이트 리덕타제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 30**

n-프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,  
상기 n-프로판올 경로가 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 세트가 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 31**

제 29 항 또는 제 30 항에 있어서,  
외래 핵산이 이중 핵산인 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 32**

제 29 항 또는 제 30 항에 있어서,  
실질적으로 혐기성인 배양 배지 중에 있는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 33**

n-프로판올의 제조 방법으로서,  
제 29 항 또는 제 30 항에 따른 비-천연 미생물 유기체를 n-프로판올을 생산하는 조건 하에서 상기 생산에 충분한 기간 동안 배양함을 포함하는 제조 방법.

**청구항 34**

제 33 항에 있어서,  
조건이 실질적으로 혐기성인 배양 조건을 포함하는 제조 방법.

**청구항 35**

제 33 항에 있어서,  
외래 핵산이 이중 핵산인 제조 방법.

**청구항 36**

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,  
상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 포함하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제 또는 아세토아세테이트 데카복실라제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 37**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고,

상기 1,3-부탄다이올 경로가 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제 (알데하이드-형성) 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 포함하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제 또는 아세토아세테이트 데카복실라제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 38**

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고,

상기 메틸아크릴산 경로가 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제, 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제, 메틸말로닐-CoA 뮤타제, 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제, 메틸말로네이트 리덕타제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성) 또는 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 포함하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제 또는 아세토아세테이트 데카복실라제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 39**

제 36 항 내지 제 38 항 중 어느 한 항에 있어서,

아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 아세틸-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 아세틸-CoA 경로가 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 또는 포메이트 데하이드로게나제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 40**

제 36 항 내지 제 38 항 중 어느 한 항에 있어서,

숙시닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 숙시닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 숙시닐-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 숙시닐-CoA 경로가 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 푸마라제, 푸마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제를 포함하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 41**

제 40 항에 있어서,

숙시닐-CoA 경로가 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 포함하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 42**

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 43**

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 44**

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를

암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

#### 청구항 45

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제; 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

#### 청구항 46

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 및 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

#### 청구항 47

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록

시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 및 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 48**

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 49**

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 50**

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를

암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드릴라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 51**

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제; 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드릴라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 52**

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 및 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드릴라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 53**

1,4-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,4-부탄다이올 경로가 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 및 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세

틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 54**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 55**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 56**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 57**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 58**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 59**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 60**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 61**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 62**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를

암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드릴라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 63**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드릴라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드릴라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 64**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드릴라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 65**

1,3-부탄다이올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 1,3-부탄다이올 경로가 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를

암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 66**

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 67**

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 68**

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를

암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 69**

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 70**

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 71**

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를

암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드릴라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

### 청구항 72

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드릴라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드릴라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

### 청구항 73

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드릴라제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드릴라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

### 청구항 74

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 75**

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 에피머라제; 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제 또는 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제; 메틸말로네이트 리덕타제; 3-하이드록시 아이소부티레이트 데하이드로게나제; 및 3-하이드록시 아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 76**

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제 또는 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제; 메틸말로네이트 리덕타제; 3-하이드록시 아이소부티레이트 데하이드로게나제; 및 3-하이드록시 아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 77**

메틸아크릴산 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서,

상기 메틸아크릴산 경로가 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 1 세트가 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성); 및 3-하이드록시 아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고,

상기 아이소프로판올 경로가 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 2 세트가 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 78**

제 42 항 내지 제 77 항 중 어느 한 항에 있어서,

아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 포함하는 아세틸-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 3 세트가 피루베이트 키나제; 및 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 79**

제 42 항 내지 제 77 항 중 어느 한 항에 있어서,

숙시닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 숙시닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 포함하는 숙시닐-CoA 경로를 또한 포함하고,

상기 외래 핵산의 제 3 세트가 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 푸마라제, 푸마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 및 숙시닐-CoA 신시타제를 암호화하는

비-천연 미생물 유기체.

**청구항 80**

제 79 항에 있어서,

외래 핵산의 제 3 세트가 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 또한 암호화하는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 81**

제 36 항 내지 제 38 항 및 제 42 항 내지 제 77 항 중 어느 한 항에 있어서,

외래 핵산이 이중 핵산인 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 82**

제 36 항 내지 제 38 항 및 제 42 항 내지 제 77 항 중 어느 한 항에 있어서,

실질적으로 혐기성인 배양 배지 중에 있는 비-천연 미생물 유기체.

**청구항 83**

1,4-부탄다이올 및 아이소프로판올의 제조 방법으로서,

제 36 항 및 제 42 항 내지 제 53 항 중 어느 한 항에 따른 비-천연 미생물 유기체를 1,4-부탄다이올 및 아이소프로판올을 생산하는 조건 하에서 상기 생산에 충분한 기간 동안 배양함을 포함하는 제조 방법.

**청구항 84**

제 83 항에 있어서,

조건이 실질적으로 혐기성인 배양 조건을 포함하는 제조 방법.

**청구항 85**

제 83 항에 있어서,

외래 핵산이 이중 핵산인 제조 방법.

**청구항 86**

1,3-부탄다이올 및 아이소프로판올의 제조 방법으로서,

제 37 항 및 제 54 항 내지 제 65 항 중 어느 한 항에 따른 비-천연 미생물 유기체를 1,3-부탄다이올 및 아이소프로판올을 생산하는 조건 하에서 상기 생산에 충분한 기간 동안 배양함을 포함하는 제조 방법.

**청구항 87**

제 86 항에 있어서,

조건이 실질적으로 혐기성인 배양 조건을 포함하는 제조 방법.

**청구항 88**

제 86 항에 있어서,

외래 핵산이 이중 핵산인 제조 방법.

**청구항 89**

메틸아크릴산 및 아이소프로판올의 제조 방법으로서,

제 38 항 및 제 67 항 내지 제 77 항 중 어느 한 항에 따른 비-천연 미생물 유기체를 메틸아크릴산 및 아이소프로판올을 생산하는 조건 하에서 상기 생산에 충분한 기간 동안 배양함을 포함하는 제조 방법.

**청구항 90**

제 89 항에 있어서,

조건이 실질적으로 혐기성인 배양 조건을 포함하는 제조 방법.

**청구항 91**

제 89 항에 있어서,

외래 핵산이 이중 핵산인 제조 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 일반적으로 생합성 방법, 및 보다 구체적으로 n-프로판올 및 아이소프로판올, 1,4-부탄다이올 및 아이소프로판올, 1,3-부탄다이올 및 아이소프로판올 또는 메틸아크릴 및 아이소프로판올 생합성 능력을 갖는 유기체에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 아이소프로판올(IPA)은 물을 포함한 대부분의 용매와 완벽하게 혼합되는 무색의 인화성 액체이다. IPA의 가장 큰 용도는, 널리 알려졌지만 작은 용도인 "소독용 알콜"(IPA와 물의 혼합물이다)로서의 용도를 포함한, 용매로서의 용도이다. 용매로서, IPA는 다수의 일상 제품들, 예를 들어 도료, 래커, 용제, 잉크, 접착제, 범용 세척제, 살균제, 화장품, 세면도구, 제빙제 및 약품들에서 발견된다. 저급 IPA는 또한 자동차 오일에 사용된다. 두 번째로 큰 용도는 아이소프로필아민, 아이소프로필에테르 및 아이소프로필 에스터의 생성을 위한 화학 중간체로서의 용도이다. 아이소프로판올을 잠재적으로는 탈수시켜, 연간 2 백만 메트릭 톤 초과를 시장을 갖는 중합체 전구체인 프로필렌을 형성시킬 수 있다.

[0003] 현재 아이소프로판올(IPA)의 세계적인 생산 능력은 대략 6 B lb/yr이며, 이때 전세계 IPA 생산 능력의 대략 75%는 미국, 유럽 및 일본에 집중되어 있다. 아이소프로판올은 2 개의 석유화학 경로에 의해 제조된다. 우세한 경로는 황산 촉매화의 존재 또는 부재 하의 프로필렌의 수화를 수반한다. 다음으로, IPA는 페놀 및 산화 프로필렌의 생산 시 형성되는 부산물인 아세톤의 수소화를 통해 생산된다. 고가의 프로필렌은 현재 가격

이 치솟고 있으며 화학 산업 전체를 통해 마진은 내려가 확대된 범위의 저렴한 공급원료의 필요성을 유발하고 있다.

[0004] n-프로판올은 잠재적으로 가솔린 대체물로서 사용될 수 있다. 상기 n-프로판올은 현재 제약 산업에서 다목적 용매로서, 표면 코팅제 및 잉크 제형에 사용되고 있다. 상기 n-프로판올은 수지 및 에스터, 프로필 아민 및 할라이드용 구성 블록으로서 사용된다. 상기 n-프로판올은 또한 포장 및 식품 접촉 용도에 사용된다. 2005년에 n-프로판올의 총 생산은 140,000 메트릭 톤보다 많았다.

[0005] n-프로판올을 프로피온알데하이드의 접촉 수소화에 의해 제조한다. 프로피온알데하이드는 자체가 옥소 공정을 통해, 촉매, 예를 들어 코발트 옥타카보닐 또는 로듐 착체의 존재 하에서 일산화 탄소 및 수소를 사용하여 에틸렌의 하이드로폼일화에 의해 생성된다. 상기 n-프로판올은 다수의 발효 공정들에서 자연적으로 소량 형성된다. 예를 들어, 매우 소량의 n-프로판올의 미생물 생산이 맥주 발효 시 효모로부터 및 쓰레오닌 이화작용을 통해 클로스트리듐(*Clostridium*)의 몇몇 종들로부터 검출되었다. 당으로부터 1-프로판올을 현저한 양으로 생산하는 기존의 미생물은 보고되지 않았다.

[0006] 1,4-부탄다이올(1,4-BDO)은 연간 약 30억 lb의 세계 시장을 갖는 중합체 중간체 및 산업 용매이다. BDO는 현재 석유화학 전구체, 주로 아세틸렌, 말레산 무수물, 및 프로필렌 옥사이드로부터 생산된다. 예를 들어, 아세틸렌은 2 분자의 폼알데하이드와 레페 합성 반응(Kroschwitz and Grant, Encyclopedia of Chem. Tech., John Wiley and Sons, Inc., New York(1999))에서 반응한 다음, 접촉 수소화에 의해 1,4-부탄다이올을 형성한다. 하류 부분인 1,4-BDO는 예를 들어 감마-부티로락톤으로의 산화에 의해서 추가로 변형될 수 있으며, 상기 락톤은 피롤리돈 및 N-메틸-피롤리돈으로 추가 전환되거나 또는 가수분해에 의해 테트라하이드로피란으로 전환될 수 있다. 이들 화합물은 중합체 중간체, 용매 및 첨가제로서 다양한 용도를 가지며 연간 거의 20억 lb의 복합 시장을 갖는다. 1,3-부탄다이올(1,3-BDO)은 식품 품미제용 유기 용매로서 흔히 사용되는 4 탄소 다이올이다. 1,3-BDO는 또한 폴리우레탄 및 폴리에스터 수지용 공-단량체로서 사용되며 혈당강하제로서 널리 사용된다. 광학적으로 활성인 1,3-BDO는 생물학적 활성 화합물 및 액정의 합성에 유용한 출발 물질이다. 1,3-부탄다이올의 실질적인 상업적 용도는 후속 탈수되어, 합성 고무(예를 들어 타이어), 라텍스 및 수지의 제조에 연간 250억 lb가 사용되는 석유화학물질인 1,3-부타다이엔을 제공하는 것이다(Ichikawa et al., J. M. Catalysis, 256:106-112(2006)). 1,3-BDO는 전통적으로 아세틸렌으로부터 그의 수화를 통해 생성된다. 이어서 상기 생성되는 아세트알데하이드는 3-하이드록시부티르알데하이드로 전환되고, 이는 후속적으로 환원되어 1,3-BDO를 형성한다. 보다 최근 수년간, 아세틸렌은 아세트알데하이드의 공급원으로서 에틸렌에 의해 대체되어 왔다.

[0007] 메틸아크릴산(MAA)은 연간 45억 파운드가 넘는 전 세계 수요를 갖는 화학 중간체인 메틸 메트아크릴레이트(MMA)의 핵심 중간체이며, 이들 중 다수는 폴리아크릴레이트로 전환된다. 메틸 메트아크릴레이트의 통상적인 합성 경로(즉 아세톤 시아노하이드린 경로)는 수소 시아나이드(HCN) 및 아세톤의 아세톤 시아노하이드린으로의 전환을 수반하며 이어서 상기 아세톤 시아노하이드린은 산 지원된 가수분해 및 메탄올에 의한 에스터화를 겪어 MAA를 제공한다. 고 비용의 부산물 폐기(MAA의 톤당 1.2 톤의 암모늄 바이설페이트가 형성된다)와 함께 잠재적으로 치명적인 HCN의 취급의 어려움은 세계 및 보다 경제적인 공정을 목적으로 한 상당히 많은 연구를 유발시켰다. 출발 물질로서, MAA는 메탄올에 의한 에스터화를 통해 MAA로 쉽게 전환될 수 있다. 당으로부터 MAA를 현저한 양으로 생성시키는 기존의 미생물은 보고되지 않았다.

[0008] 상업적인 양의 n-프로판올 및 아이소프로판올, 1,4-BDO 및 아이소프로판올, 1,3-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올을 유효하게 공동 생산하는 미생물 유기체 및 방법이 본 발명에 개시되며 관련된 이점들을 포함한다.

**발명의 내용**

[0009] 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 하나의 태양에서, 본 발명에 개시된 실시태양은 n-프로판올 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체에 관한 것이며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다. 하나의 태양에서, 상기 n-프로판올 경로는 프로피온알데하이드 데하이드로게나제, 프로

관을 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오네이트 리덕타제 또는 프로피오닐 포스페이트 리덕타제를 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함한다.

[0010] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 제 1 세트의 외래 핵산을 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 제 2 세트의 외래 핵산을 포함한다. 하나의 태양에서, 상기 제 1 세트는 프로피오날데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 포함하는 n-프로판올 경로 효소를 암호화한다. 또 다른 태양에서, 상기 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함하는 아이소프로판올 경로 효소를 암호화한다.

[0011] 또 다른 태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트 및 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 제 1 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 말레이트 데하이드로게나제; 퓨마라제; 퓨마레이트 리덕타제; 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제; 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 데카복실라제; 및 프로피오날데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제 및 프로피오닐 포스페이트 리덕타제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 제 2 세트는 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0012] 또 다른 태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트 및 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 제 1 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 쓰레오닌 데아미나제; 및 2-옥소부타노에이트 데카복실라제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오날데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 제 2 세트는 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0013] 또 다른 태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트 및 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 제 1 세트는 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아

세틸-CoA 카복실라제; 말로닐-CoA 리덕타제; 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제; 프로피오닐-CoA 신타제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0014] 또 다른 태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트 및 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 제 1 세트는 락테이트 데하이드로게나제; 락테이트-CoA 트랜스퍼라제; 락틸-CoA 데하이드라타제; 아크릴로일-CoA 리덕타제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 제 2 세트는 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0015] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다. 하나의 태양에서 상기 n-프로판올 경로는 프로피온알데하이드 데하이드로게나제, 프로판올 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오네이트 리덕타제 또는 프로피오닐 포스페이트 리덕타제를 포함한다.

[0016] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산 세트는 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0017] 더욱 다른 태양에서, 본 발명에 개시된 실시태양은 상기 언급한 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-프로판올 및 아이소프로판올의 제조 방법에 관한 것이다. 더욱 다른 태양에서, 본 발명에 개시된 실시태양은 상기 언급한 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-프로판올의 제조 방법에 관한 것이다.

[0018] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 아이소프로판올 경로 및 1,4-부탄다이올(14-BDO) 경로, 1,3-부탄다이올(13-BDO) 경로 또는 메틸아크릴산(MAA) 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 하나의 태양에서, 본 발명에 개시된 실시태양은 1,4-부탄다이올 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체에 관한 것이며, 이때 상기 1,4-부탄다이올 경로는 1,4-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,4-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다. 하나의 태양에서, 본 발명에 개시된 실시태양은 1,3-부탄다이올 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체에 관한 것이며, 이때 상기 1,3-부탄다이올 경로는 1,3-부탄다이올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 1,3-부탄다이올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아

이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다. 하나의 태양에서, 본 발명에 개시된 실시태양은 메틸아크릴산 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체에 관한 것이며, 이때 상기 메틸아크릴산 경로는 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다.

[0019] 하나의 실시태양에서, 상기 아이소프로판올 경로는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함한다.

[0020] 하나의 실시태양에서, 상기 14-BDO 경로는 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제, 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 포함한다.

[0021] 하나의 실시태양에서, 상기 13-BDO 경로는 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성), 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 또는 3-하이드록시부티레이트 리덕타제를 포함한다.

[0022] 하나의 실시태양에서, 상기 MAA 경로는 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제, 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제, 메틸말로닐-CoA 뮤타제, 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제, 메틸말로네이트 리덕타제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성) 또는 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 포함한다.

[0023] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 제 1 세트의 외래 핵산을 포함하고 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 제 2 세트의 외래 핵산을 포함한다.

[0024] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 제 1 세트의 외래 핵산을 포함하고 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 제 2 세트의 외래 핵산을 포함한다.

[0025] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 메틸아크릴산 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 메틸아크릴산 경로는 메틸아크릴산을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 메틸아크릴산 경로 효소를 암호화하는 제 1 세트의 외래 핵산을 포함하고 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 제 2 세트의 외래 핵산을 포함한다.

[0026] 3-하이드록시아이소부티레이트 중간체를 통과하는 메틸아크릴산 경로를, 하부 효소, 즉 데하이드라타제가 생략되는 경우(도 7 및 8 참조) 메틸아크릴산 생산과 상반되게 3-하이드록시아이소부티레이트 생산에 적용할 수 있다고 생각된다. 이 경우, 상기 비-천연 유기체는 메틸아크릴산 대신에 3-하이드록시아이소부티레이트를 생산할 것이다. 상기 비-천연 유기체는 한편으로 3-하이드록시아이소부티레이트와 메틸아크릴산의 혼합물을 생산한다. ATP 및 생성물의 최대 몰 수율은 메틸아크릴산이 생산되든지 혹은 3-하이드록시아이소부티레이트가

생산되든지 간에 변하지 않을 것이다.

[0027] 경우에 따라, 본 발명의 미생물 유기체에 의해 발현된 3-하이드록시아이소부티르산을 메틸아크릴산으로 화학적으로 전환할 수 있을 것으로 또한 생각된다. 예를 들어, 미국 특허 제 7,186,856 호에 개시된 바와 같이 3-하이드록시아이소부티르산, 또는  $\beta$ -하이드록시아이소부티르산을 탈수시켜 메틸아크릴산을 형성시킬 수 있다.

[0028] 더욱 다른 태양들에서, 본 발명에 개시된 실시태양들은 상기 언급한 비-천연 미생물 유기체들을 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법에 관한 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0029] 도 1은 글루코스로부터 n-프로판올 및 아이소프로판올의 공동 생산에 대한 예시적인 경로를 도시한다. 약어: Glc - 글루코스, PEP - 포스포에놀피루베이트, PYR - 피루베이트, FOR - 포메이트, ACCOA - 아세틸-CoA, AACOA - 아세토아세틸-CoA, ACAC - 아세토아세테이트, AC - 아세톤, PPOH-2 - 아이소프로판올, OAA - 옥살로아세테이트, MAL - 말레이트, FUM - 푸마레이트, SUCC - 숙시네이트, SUCCOA - 숙시닐-CoA, MMCOA - 메틸말로닐-CoA, PPCOA - 프로피오닐-CoA, PPA - 프로피오네이트, PPAL - 프로피온알데하이드, PPPi - 프로피오닐 포스페이트, PPOH-1 - n-프로판올.

도 2는 글루코스로부터 n-프로판올 및 아이소프로판올의 공동 생산에 대한 예시적인 경로를 도시한다. 약어: Glc - 글루코스, PEP - 포스포에놀피루베이트, PYR - 피루베이트, FOR - 포메이트, ACCOA - 아세틸-CoA, AACOA - 아세토아세틸-CoA, ACAC - 아세토아세테이트, AC - 아세톤, PPOH-2 - 아이소프로판올, OAA - 옥살로아세테이트, THR - 스레오닌, 2-OBUT - 2-옥소부타노에이트, PPCOA - 프로피오닐-CoA, PPA - 프로피오네이트, PPAL - 프로피온알데하이드, PPPi - 프로피오닐 포스페이트, PPOH-1 - n-프로판올.

도 3은 글루코스로부터 n-프로판올 및 아이소프로판올의 공동 생산에 대한 예시적인 경로를 도시한다. 약어: Glc - 글루코스, PEP - 포스포에놀피루베이트, PYR - 피루베이트, FOR - 포메이트, ACCOA - 아세틸-CoA, AACOA - 아세토아세틸-CoA, ACAC - 아세토아세테이트, AC - 아세톤, PPOH-2 - 아이소프로판올, MALCOA - 말로닐-CoA, MALAL - 말로네이트 세미알데하이드, 3HP - 3-하이드록시프로피오네이트, PPCOA - 프로피오닐-CoA, PPA - 프로피오네이트, PPAL - 프로피온알데하이드, PPPi - 프로피오닐 포스페이트, PPOH-1 - n-프로판올.

도 4는 글루코스로부터 n-프로판올 및 아이소프로판올의 공동 생산에 대한 예시적인 경로를 도시한다. 약어: Glc - 글루코스, PEP - 포스포에놀피루베이트, PYR - 피루베이트, FOR - 포메이트, ACCOA - 아세틸-CoA, AACOA - 아세토아세틸-CoA, ACAC - 아세토아세테이트, AC - 아세톤, PPOH-2 - 아이소프로판올, LAC - D-락테이트, LACCOA - 락토일-CoA, ACRYLCOA - 아크릴로일-CoA, PPCOA - 프로피오닐-CoA, PPA - 프로피오네이트, PPAL - 프로피온알데하이드, PPPi - 프로피오닐 포스페이트, PPOH-1 - n-프로판올.

도 5는 글루코스로부터 1,4-BDO 및 아이소프로판올의 공동 생산에 대한 예시적인 경로를 도시한다. 약어: Glc - 글루코스, PEP - 포스포에놀피루베이트, PYR - 피루베이트, FOR - 포메이트, ACCOA - 아세틸-CoA, AACOA - 아세토아세틸-CoA, ACAC - 아세토아세테이트, AC - 아세톤, PPOH-2 - 아이소프로판올, OAA - 옥살로아세테이트, MAL - 말레이트, FUM - 푸마레이트, SUCC - 숙시네이트, SUCCOA - 숙시닐-CoA, SUCSAL - 숙시닉 세미알데하이드, 4-HB - 4-하이드록시부티레이트, 4-HBCOA - 4-하이드록시부티릴-CoA, 4-HBALD - 4-하이드록시부티르알데하이드, 14-BDO - 1,4-부탄다이올, 4-HBP - 4-하이드록시부티릴-포스페이트.

도 6은 글루코스로부터 1,3-BDO 및 아이소프로판올의 공동 생산에 대한 예시적인 경로를 도시한다. 약어: Glc - 글루코스, PEP - 포스포에놀피루베이트, PYR - 피루베이트, FOR - 포메이트, ACCOA - 아세틸-CoA, AACOA - 아세토아세틸-CoA, ACAC - 아세토아세테이트, AC - 아세톤, PPOH-2 - 아이소프로판올, OAA - 옥살로아세테이트, MAL - 말레이트, FUM - 푸마레이트, SUCC - 숙시네이트, SUCCOA - 숙시닐-CoA, SUCSAL - 숙시닉 세미알데하이드, 3-HB - 3-하이드록시부티레이트, 4-HB - 4-하이드록시부티레이트, 4-HBCOA - 4-하이드록시부티릴-CoA, CRTCOA - 크로토닐-CoA, 3-HBCOA - 3-하이드록시부티릴-CoA, 3-HBALD - 3-하이드록시부티르알데하이드, 13-BDO - 1,3-부탄다이올.

도 7은 글루코스로부터 메틸아크릴산 및 아이소프로판올의 공동 생산에 대한 예시적인 경로를 도시한다. 약어: Glc - 글루코스, PEP - 포스포에놀피루베이트, PYR - 피루베이트, FOR - 포메이트, ACCOA - 아세틸-CoA,

AACOA - 아세토아세틸-CoA, ACAC - 아세토아세테이트, AC - 아세톤, PPOH-2 - 아이소프로판올, OAA - 옥살로아세테이트, MACOA -메티아크릴일-CoA, MAL - 말레이트, FUM - 퓨마레이트, SUCC - 숙시네이트, SUCCOA - 숙시닐-CoA, SUCSAL - 숙시닉 세미알데하이드, 4-HB - 4-하이드록시부티레이트, 4-HBCOA - 4-하이드록시부티릴-CoA, 3-HBCOA - 3-하이드록시아이소부티릴-CoA, 3-HIB - 3-하이드록시아이소부티레이트, MAA - 메틸아크릴산.

도 8은 글루코스로부터 메티아크릴산 및 아이소프로판올의 공동 생산에 대한 예시적인 경로를 도시한다. 약어: Glc - 글루코스, PEP - 포스포에놀피루베이트, PYR - 피루베이트, FOR - 포메이트, ACCOA - 아세틸-CoA, AACOA - 아세토아세틸-CoA, ACAC - 아세토아세테이트, AC - 아세톤, PPOH-2 - 아이소프로판올, OAA - 옥살로아세테이트, MAL - 말레이트, FUM - 퓨마레이트, SUCC - 숙시네이트, SUCCOA - 숙시닐-CoA, MM - 메틸말로네이트, MMSA - 메틸말로네이트 세미알데하이드, 3-HIB - 3-하이드록시아이소부티레이트, MAA - 메틸아크릴산.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0030] 본 발명의 실시태양은 도 1 내지 4에 예시된 바와 같이 3 개의 포스포에놀피루베이트(PEP) 분자로부터 n-프로판올 및 아이소프로판올의 공동 생산을 위한 산화환원-균형된 혐기성 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 상기 공동 생산 전략의 몇 가지 이점은 하기를 포함한다: (1) 상기 공동 생산은 글루코스 몰당 총 1.33 몰의 n-프로판올 및 아이소프로판올의 최대 이론 수율을 제공하고; (2) 상기 공동 생산 경로는 완벽하게 산화환원 균형을 이루며 양의 순 ATP 수율을 갖는다. 이는 NAD의 재생을 위해 통기를 필요로 하는, 상기 아이소프로판올 경로를 단독으로 갖는 미생물 유기체의 배양과 상반되게 C3 알코올의 완벽하게 혐기적인 생산을 촉진한다.

[0031] 본 발명의 실시태양은 또한 도 1 내지 4에 도시된 바와 같이 재생 자원으로부터 n-프로판올 및 아이소프로판올을 공동 생산할 수 있는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 구체적으로, 상기 유기체는 아세틸-CoA 및 프로피오닐-CoA로부터 n-프로판올 및 아이소프로판올의 공동 생산에 이용되는 모든 효소를 포함한다. 포메이트는 포메이트 데하이드로게나제에 의해 이산화 탄소로 전환될 수 있으며 이는 n-프로판올 및 아이소프로판올 합성에 사용될 수 있는 추가적인 환원 당량을 제공한다. 또한, 환원 당량을 상기 경로의 다른 단계들로부터, 예를 들어 글루코스의 포스포에놀피루베이트로의 전환 중 해당 경로, 피루베이트의 아세틸-CoA로의 전환 중 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 또는 2-옥소부타노에이트의 프로피오닐-CoA로의 전환 중 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제로부터 획득할 수 있다.

[0032] 본 발명의 실시태양은 또한 프로피오닐-CoA를 통해 n-프로판올을 생산할 수 있는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 상기 전환을 2 개의 상이한 효소, 즉 알데하이드 및 알코올 데하이드로게나제에 의해서 또는 이각용성 알데하이드/알코올 데하이드로게나제에 의해 한 단계로 수행한다. 한편으로, 프로피오닐-CoA는 프로피오닐 포스페이트로 전환되고 이어서 아실 포스페이트 리덕타제에 의해 프로피온알데하이드로 변형될 수 있다. 한편으로, 프로피오닐-CoA는 각각 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제, 또는 신시타제와 프로피오네이트 다이아제에 의해 프로피오네이트로 전환되고 이어서 프로피오닐 포스페이트로 전환될 수 있다. 한편으로, 프로피오네이트는 프로피오네이트 리덕타제에 의해 프로피온알데하이드로 전환될 수 있다. 프로피오닐-CoA의 생산 경로를 도 1 내지 4에 예시한다. 하나의 실시태양에서, 프로피오닐-CoA의 생산 경로는 도 1에 예시된 바와 같이 옥살로아세테이트를 통해 진행된다. 옥살로아세테이트는 환원적 TCA 주기, 메틸류타제, 데카복실라제, 및 데카복실라제에 의해 프로피오닐-CoA로 전환된다. 메틸말로닐-CoA의 (R) 입체이성질체의 (S) 형태로의 전환에 에피머라제가 필요할 수도 있다. 또 다른 실시태양에서, 프로피오닐-CoA의 생산 경로는 도 2에 예시된 바와 같이 쓰레오닌을 통해 진행된다. 옥살로아세테이트는 고 수율을 위해 조작된 고유 쓰레오닌 경로에 의해 쓰레오닌으로 전환된다. 이어서 상기 쓰레오닌은 탈아민화되어 2-옥소부타노에이트를 형성하고 후속적으로 프로피오닐-CoA로 전환된다. 하나의 대안으로, 2-옥소부타노에이트는 데카복실라제에 의해 프로피온알데하이드로 전환되고, 이어서 프로판올 데하이드로게나제에 의해 n-프로판올로 환원된다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 프로피오닐-CoA의 생산 경로는 도 3에 예시된 바와 같이 말로닐-CoA를 통해 진행된다. 아세틸-CoA는 카복실화되어 말로닐-CoA를 형성한다. 이어서 상기 말로닐-CoA는 말로네이트 세미알데하이드로 환원되고 후속적으로 3-하이드록시프로피오네이트(3HP)로 변형된다. 3HP는 프로피오닐-CoA 신타제를 통해 프로피오닐-CoA로 전환된다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 프로피오닐-CoA의 생산 경로는 도 4에 예시된 바와 같이 락테이트를 통해 진행된다. 피루베이트는 환원되어 락테이트를 형성하고 이어서 활성화되어 락토일-CoA를 형성한다. 상기 락토일-CoA는 탈수되어 아크릴로일-CoA를 형성하고 이어서 환원되어 프로피오닐-

CoA를 생성시킨다.

[0033] 본 발명의 실시태양은 또한 아세틸-CoA를 통해 아이소프로판올을 생산할 수 있는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 아이소프로판올 생성은 도 1 내지 4에 예시된 바와 같이 아세토아세틸-CoA 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세틸테 데카복실라제, 및 아이소프로판올 데하이드로게나제에 의한 아세틸-CoA의 전환을 통해 성취된다. 하나의 실시태양에서 상기 글루코스로부터의 아세틸-CoA의 생산 경로는 포스포에놀피루베이트(PEP)를 통해 진행된다. 글루코스는 상기 미생물 유기체의 고유 해당 경로에 의해 PEP로 전환된다. PEP는 피루베이트 키나제에 의해 피루베이트로 전환되고 이어서 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제에 의해 아세틸-CoA로 전환된다. 한편으로, 피루베이트는 피루베이트 포메이트 라이아제에 의해 아세틸-CoA 및 포메이트로 전환된다. 이어서 상기 포메이트는 포메이트 데하이드로게나제에 의해 이산화 탄소 및 수소로 전환된다.

[0034] 본 발명의 실시태양은 아이소프로판올과의 화합물 14-BDO, 13-BDO 및 MAA와의 공동생산을 위한 또 다른 방법을 제공한다. 상기 아이소프로판올의 생산은 상술한 바와 같이 아세틸-CoA를 통해 진행된다. 상기 경로는 단독으로는 산화환원이 균형을 이루지 않으며 따라서 높은 아이소프로판올 수율을 성취하기 위해서는 통기가 필요하다. 본 발명에 개시된 실시태양은 상기 경로를 사용하며 상기 경로를 공동 생성물 1,4-부탄다이올(14-BDO), 1,3-부탄다이올(13-BDO) 및 메틸아크릴산(MAA)의 합성 경로와 병행한다. 공동 생산 경로는, 아이소프로판올을 오직 아세톤을 통해 생산하는 경우 산소를 필요로 하는 것과 상반되게 혐기성 조건 하에서 산화 환원 균형을 이룬다. 공동 생산은 또한 관련된 이점들을 제공하며, 예를 들어 14-BDO(230 °C), 13-BDO(203 °C) 및 MAA(163 °C)에 비해 낮은 비점(82 °C)으로 인해 아이소프로판올을 다른 발효 산물들로부터 쉽게 분리시키며, 본 발명에 개시된 미생물 유기체들 중 임의의 것을 사용하는 공동 생산은 글루코스로부터 탄소의 최대 이론 수율이 제공하는 수율을 제공한다.

[0035] 본 발명의 실시태양은 숙시닐-CoA를 통해 또는 일부의 태양에서 숙시네이트를 통해 14-BDO를 생산할 수 있는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 14-BDO의 생산을 위해서, 숙시닐-CoA는 숙시닐-CoA 리덕타제에 의해 숙시닉 세미알데하이드로 전환된다. 한편으로, 숙시네이트는 숙시네이트 리덕타제에 의해 숙시닉 세미알데하이드로 전환될 수 있다. 이어서, 숙시닉 세미알데하이드는 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제를 통해 4-하이드록시부티레이트로 환원된다. 4-HB의 그의 아실-CoA로의 활성화는 CoA 트랜스퍼라제 또는 신시타제에 의해 촉매화된다. 한편으로, 4-HB는 4-하이드록시부티릴-포스페이트로 전환되고 후속적으로 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제에 의해 4-HB-CoA로 변형될 수 있다. 이어서 4-HB-CoA는 이작용성 CoA-의존성 알데하이드/알콜 데하이드로게나제에 의해서 또는 알데하이드 및 알콜 데하이드로게나제 활성을 갖는 2 개의 별도의 효소에 의해서 14-BDO로 전환된다. 상기 4-HB-CoA 중간체를 우회하는 더욱 또 다른 대안은 카복실산 리덕타제에 의한 4-HB의 4-하이드록시부티릴알데하이드로의 직접적인 환원이다. 4-하이드록시부티릴알데하이드는 알콜 데하이드로게나제에 의해 후속적으로 14-BDO로 환원된다. 4-HB-CoA를 우회하는 더욱 또 다른 경로는 포스페이트 리덕타제에 의한 4-하이드록시부티릴-포스페이트의 4-하이드록시부티릴알데하이드로의 환원을 수반한다.

[0036] 본 발명의 실시태양은 숙시닐-CoA를 통해 또는 일부의 태양에서 숙시네이트를 통해 13-BDO를 생산할 수 있는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 13-BDO의 생산은 또한 상술한 바와 같이 형성된 4-하이드록시부티릴-CoA를 통해 진행된다. 이 경로에서, 4-하이드록시부티릴-CoA는 탈수되고 이성화되어 크로토닐-CoA를 형성한다. 상기 탈수 및 비닐이성화 반응은 이작용성 효소, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제에 의해 촉매화된다. 이어서 크로토닐-CoA는 3-하이드록시부티릴-CoA로 수화된다. 상기 CoA 부분의 제거 및 동반되는 환원은 3-하이드록시부티르알데하이드를 제공한다. 한편으로, 3-하이드록시부티릴-CoA는 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 또는 신시타제에 의해 3-하이드록시부티레이트로 전환되고 이어서 3-하이드록시부티레이트 리덕타제에 의해 환원되어 3-하이드록시부티르알데하이드를 제공한다. 최종적으로 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제에 의한 상기 알데하이드의 환원은 13-BDO를 제공한다.

[0037] 본 발명의 실시태양은 2 개의 대안 경로를 통해 MAA를 생산할 수 있는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 첫 번째 경로는 상술한 바와 같이 형성된, 4-하이드록시부티릴-CoA를 통해 진행된다. 4-하이드록시부티릴-CoA는 메틸 류타제에 의해 3-하이드록시아이소부티릴-CoA로 전환된다. 이어서 상기 3-하이드록시아이소부티릴-CoA의 CoA 부분은 CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제 또는 신시타제에 의해 제거된다. 최종적으로, 상기 3-하이드록시 그룹의 탈수는 MAA를 제공한다. 한편으로, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제에 의해 메티아크릴일-CoA로 전환되고 이어서 상기 CoA 부분은 CoA 트랜스퍼라제,

하이드롤라제 또는 신시타제에 의해 제거되어 MAA를 제공한다. 또 다른 MAA 생산 경로에서, 숙시닐-CoA는 메틸말로닐-CoA 뮤타제에 의해 메틸말로닐-CoA로 전환된다. 메틸말로닐-CoA의 (R) 입체이성질체를 (S) 형태로 전환시키기 위해 에피머라제가 필요할 수도 있다. 이어서 CoA-의존성 알데하이드 데하이드로게나제는 메틸말로닐-CoA를 메틸말로네이트 세미알데하이드로 전환시킨다. 한편으로, 상기 (R)-메틸말로닐-CoA 또는 (S)-메틸말로닐-CoA의 CoA 부분은 CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제 또는 신시타제에 의해 제거되어 메틸말로네이트를 형성하고, 이어서 리덕타제에 의해 세미알데하이드로 전환된다. 상기 알데하이드의 3-하이드록시아이소부티레이트로의 환원에 이은 탈수는 MAA를 제공한다. 한편으로, 메틸말로닐-CoA는 알콜 형성 CoA 리덕타제에 의해 3-하이드록시아이소부티레이트로 전환된다.

[0038] 본 발명의 실시태양은 실시예 5 내지 8에 예시된 바와 같이 숙시닐-CoA의 생산 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 상기 숙시닐-CoA의 생산 경로는 옥살로아세테이트를 통해 진행된다. 옥살로아세테이트는 말레이트 데하이드로게나제, 푸마라제, 푸마레이트 리덕타제 및 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 한편으로 숙시닐-CoA 신시타제를 포함한, 환원적 TCA 주기에 의해 숙시닐-CoA로 전환된다.

[0039] 이들 경로를 미생물 내로 조작하는 것은 일련의 효소를 암호화하는 적합한 유전자 세트를 본 발명에 개시된 생산 숙주에 클로닝하고, 발효 조건을 최적화하고, 발효에 따른 생성물 형성을 분석함을 포함한다. n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올의 생산을 위한 생산 숙주를 조작하기 위해서, 하나 이상의 외래 DNA 서열(들)을 미생물에서 발현시킬 수 있다. 또한, 상기 미생물은 작용적으로 파괴되거나, 결실되거나 과발현된 내생 유전자(들)를 가질 수 있다. 본 발명에 개시된 대사 변형은 재생 가능한 공급원료를 사용하여 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올의 생산을 가능하게 한다.

[0040] 일부 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올의 생산에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다.

[0041] 일부 실시태양에서, 본 발명은 아이소프로판올의 생산에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다.

[0042] 더욱 다른 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올의 공동 생산 방법을 제공한다. 상기와 같은 방법은 본 발명에 개시된 미생물 유기체를 배양함을 포함한다.

[0043] 본 발명에 사용된 바와 같은 "비-천연"이란 용어는 본 발명의 미생물 유기체 또는 미생물과 관련하여 사용될 때 상기 미생물 유기체가 기준 종의 야생형 균주를 포함하여, 상기 기준 종의 천연 균주에서 통상적으로 발견되지 않는 하나 이상의 유전자 변형을 가짐을 의미한다. 유전자 변형은 예를 들어 대사 폴리펩타이드를 암호화하는 발현 가능한 핵산 도입, 다른 핵산 첨가, 핵산 결실 및/또는 상기 미생물 유전 물질의 다른 작용성 파괴의 변형들을 포함한다. 상기와 같은 변형들은 예를 들어 상기 기준 종들에 대한 이중, 동중, 또는 이중 및 동중 모두의 폴리펩타이드에 대한 암호화 부위 및 그의 작용성 단편을 포함한다. 추가적인 변형은 예를 들어 상기 변형이 유전자 또는 오페론의 발현을 변경시키는 비-암호화 조절 부위를 포함한다. 예시적인 대사 폴리펩타이드는 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로 내의 효소 또는 단백질을 포함한다.

[0044] 대사 변형은 천연 상태로부터 변경되는 생화학적 반응을 지칭한다. 따라서, 비-천연 미생물은 대사 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 또는 그의 작용성 단편에 대한 유전자 변형을 가질 수 있다. 예시적인 대사 변형은 본 발명에 개시된다.

[0045] 본 발명에 사용된 바와 같은 "단리된"이란 용어는 미생물 유기체와 관련하여 사용 시, 기준 미생물 유기체가 자연에서 발견될 때 하나 이상의 성분이 실질적으로 없는 유기체를 의미한다. 상기 용어는 자연 환경에서 발견될 때 일부 또는 전체 성분이 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 상기 용어는 상기 미생물 유기체가 비-천연 환경에서 발견될 때 일부 또는 전체 성분이 제거된 미생물 유기체를 또한 포함한다. 따라서, 단리된 미생물 유기체는 자연에서 발견되거나 또는 비-천연 환경에서 생육, 저장 또는 연명될 때 다른 물질들과 부분적으로 또는 완전히 분리된다. 단리된 미생물 유기체의 구체적인 예는 부분적으로 순수한 미생물, 실질적으로 순수한 미생물 및 비-천연 배지에서 배양된 미생물을 포함한다.

[0046] 본 발명에 사용된 바와 같은 "미생물의", "미생물 유기체" 또는 "미생물"이란 용어는 고세균, 세균 또는 진핵생물 영역 내에 포함되는 미시적인 세포로서 존재하는 임의의 유기체를 의미한다. 따라서, 상기 용어는 미시

적인 크기를 갖는 원핵생물 또는 진핵생물 세포 또는 유기체를 포함함을 의미하고 효모 및 진균과 같은 진핵 미생물뿐만 아니라 모든 종의 세균, 고세균 및 진정세균을 포함한다. 상기 용어는 또한 생화학적 생산을 위해 배양될 수 있는 임의의 종의 세포 배양물을 포함한다.

[0047] 본 발명에 사용된 바와 같이, "n-프로판올"은  $C_3H_8O$ 의 분자식 및 60.1 g/mol의 분자 질량을 갖는 1차 알콜을 의미하고자 한다. n-프로판올은 또한 당해 분야에서 1-프로판올, 1-프로필 알콜, n-프로필 알콜, 프로판-1-올, 또는 단순히 프로판올로서 공지되어 있다. n-프로판올은 아이소프로판올의 이성질체이다.

[0048] 본 발명에 사용된 바와 같이, "아이소프로판올"은  $C_3H_8O$ 의 분자식 및 60.1 g/mol의 분자 질량을 갖는 2차 알콜을 의미하고자 하며, 여기에서 상기 알콜 탄소는 2 개의 다른 탄소들에 부착된다. 상기 부착을 때때로  $(CH_3)_2CHOH$ 로서 나타낸다. 아이소프로판올은 또한 당해 분야에서 프로판-2-올, 2-프로판올 또는 약어 IPA로서 공지되어 있다. 아이소프로판올은 n-프로판올의 이성질체이다.

[0049] 본 발명에 사용된 바와 같이, "1,4-부탄다이올"은  $C_4H_{10}O_2$ 의 분자식 및 90.12 g/mol의 분자 질량을 갖는, 2 개의 하이드록실 그룹을 갖는 알칸 부탄의 알콜 유도체를 의미하고자 한다. 상기 화학적 화합물 1,4-부탄다이올은 또한 당해 분야에서 1,4-BDO로서 공지되어 있으며 화합물의 BDO 계열로서 통상적으로 지칭되는 화합물 계열에 대한 화학적 중간체 또는 전구체이다.

[0050] 본 발명에 사용된 바와 같이, "1,3-부탄다이올"이란 용어는  $C_4H_{10}O_2$ 의 분자식 및 90.12 g/mol의 분자 질량을 갖는 부탄다이올의 4 개의 안정한 이성질체들 중 하나를 의미하고자 한다. 상기 화학적 화합물 1,3-부탄다이올은 당해 분야에서 1,3-BDO 또는  $\beta$ -부탄 글리콜로서 공지되어 있으며 또한 화합물의 BDO 계열로서 통상적으로 지칭되는 화합물 계열에 대한 화학적 중간체 또는 전구체이다.

[0051] 본 발명에 사용된 바와 같이, 화학식  $CH_2=C(CH_3)CO_2$ 의 "메틸아크릴산"(또한 메트아크릴산으로서 공지되며 IUPAC 명 2-메틸-2-프로페노산)은 메틸아크릴레이트의 산 형태이며, 메틸아크릴산 및 메틸아크릴레이트는 그들의 임의의 염 형태를 포함하여, 그들의 중성 또는 이온화된 형태들 중 임의의 형태의 화합물을 지칭하는 것들 전체를 통해 호환 사용될 수 있는 것으로 생각된다. 당해 분야의 숙련가들은 상기 특정 형태가 pH에 의존함을 알 것으로 생각된다. 유사하게, 3-하이드록시아이소부티레이트 및 3-하이드록시아이소부티르산은 그들의 임의의 염 형태를 포함하여, 그들의 중성 또는 이온화된 형태들 중 임의의 형태의 화합물을 지칭하는 것들 전체를 통해 호환 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명에 사용된 바와 같은 "CoA" 또는 "조효소 A"란 용어는 활성 효소 시스템을 형성하기 위해 다수의 효소(주효소) 활성에 필요한 유기 보조인자 또는 보결분자단(효소의 비 단백질 부분)을 의미한다. 조효소 A는 몇몇 촉합 효소에서 작용하고, 아세틸 또는 다른 아실 그룹 전달 및 지방산 합성 및 산화, 피루베이트 산화 및 다른 아세틸화에 작용한다.

[0053] 본 발명에 사용된 바와 같은 "실질적으로 혐기성인"이란 용어는 배양 또는 생육 조건과 관련하여 사용될 때, 산소의 양이 액체 배지 중의 용존 산소 포화의 약 10% 미만임을 의미한다. 상기 용어는 또한 약 1% 미만의 산소 분위기에서 유지되는 액체 또는 고체 배지의 밀폐된 챔버를 포함함을 의미 한다.

[0054] "외래"는 본 발명에서 사용 시 기준 분자 또는 기준 활성이 숙주 미생물 유기체 내에 도입됨을 의미한다. 상기 분자는 예를 들어 암호화 핵산의 숙주 유전 물질 내로의 도입에 의해, 예를 들어 숙주 염색체 내로의 통합 또는 비-염색체 유전 물질, 예를 들어 플라스미드로서의 통합에 의해 도입될 수 있다. 따라서, 상기 용어는 암호화 핵산의 발현과 관련하여 사용될 때 상기 암호화 핵산이 발현 가능한 형태로 미생물 유기체 내에 도입됨을 지칭한다. 생합성 활성과 관련하여 사용될 때, 상기 용어는 상기 숙주 기준 유기체 내로 도입되는 활성을 지칭한다. 상기 공급원은 예를 들어 상기 숙주 미생물 유기체 내로의 도입에 이어서 상기 기준 활성을 발현하는 동종 또는 이종 암호화 핵산일 수 있다. 따라서, "내생적인"이란 용어는 상기 숙주 중에 존재하는 기준 분자 또는 활성을 지칭한다. 유사하게, 상기 용어는 암호화 핵산의 발현과 관련하여 사용될 때 상기 미생물 유기체 내에 함유된 암호화 핵산의 발현을 지칭한다. "이종"이란 용어는 상기 기준 중 이외의 공급원으로부터 유래하는 분자 또는 활성을 지칭하는 반면, "동종"은 상기 숙주 미생물 유기체로부터 유래하는 분자 또는 활성을 지칭한다. 따라서, 본 발명의 암호화 핵산의 외래 발현은 이종 또는 동종 암호화 핵산 중 어느 하나 또는 이들 모두를 사용할 수 있다.

[0055] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 안정한 유전자 변경을 함유할 수 있으며, 이는 상기 변경의 상실 없이 5 세대를 초과하여 배양될 수 있는 미생물에 적용된다. 일반적으로, 안정한 유전자 변경은 10 세대를 초과하여

지속하는 변형을 포함하며, 특히 안정한 변형은 약 25 세대를 초과하여 지속할 것이고, 보다 특히 안정한 유전자 변형은 무한을 포함하여, 50 세대를 초과할 것이다.

[0056] 당해 분야의 숙련가들은 본 발명에 예시된 대사 변형을 포함하여, 유전자 변형을 에스케리키아 콜라이와 같은 적합한 숙주 유기체 및 그의 상응하는 대사 반응 또는 목적하는 유전 물질에 적합한 공급원 유기체, 예를 들어 목적하는 대사 경로에 대한 유전자들에 관하여 개시한다. 그러나, 광범위하게 다양한 유기체의 완전한 게놈 서열화 및 상기 유전체학 분야의 높은 기술 수준의 제공으로, 당해 분야의 숙련가들은 본 발명에 제공된 교시 및 지침을 필수적으로 모든 다른 유기체들에 쉽게 적용할 수 있을 것이다. 예를 들어, 본 발명에 예시된 에스케리키아 콜라이 대사 변형을, 상기 기준 중 이외의 종들로부터 동일하거나 유사한 암호화 핵산을 통합시킴으로써 다른 종들에 쉽게 적용할 수 있다. 상기와 같은 유전자 변형은 예를 들어 일반적으로 종 상동 기관의 유전자 변형, 및 특히 이종 상동체, 상동체 또는 비-이종 상동성 유전자 치환을 포함한다.

[0057] 이종 상동체(ortholog)는 수직 혈통에 의해 관계되고 상이한 유기체에서 실질적으로 동일한 작용들을 맡고 있는 유전자 또는 유전자들이다. 예를 들어, 마우스 에폭사이드 하이드롤라제 및 인간 에폭사이드 하이드롤라제를 에폭사이드의 가수분해의 생물학적 작용에 대해 이종 상동체인 것으로 간주할 수 있다. 유전자들은 예를 들어 이들이 동종임을 가리키기에 충분한 양의 서열 유사성을 공유하거나 공통 조상으로부터의 진화에 의해 관계되는 경우 수직 혈통에 의해 관계된다. 유전자들을 또한 이들이 3 차원 구조는 공유하지만 이들이 1 차 서열 유사성을 식별할 수 없을 정도로, 공통 조상으로부터 진화했음을 가리키기에 충분한 양의 서열 유사성을 반드시 갖지는 않는 경우 이종 상동체인 것으로 간주할 수 있다. 이종 상동성인 유전자는 약 25% 내지 100% 아미노산 서열 일치성의 서열 유사성을 갖는 단백질들을 암호화한다. 25% 미만의 아미노산 유사성을 공유하는 단백질들을 암호화하는 유전자를 또한 이들의 3차원 구조가 또한 유사성을 보이는 경우 수직 혈통에 의해 발생한 것으로 간주할 수 있다. 조직 플라스미노겐 활성화제 및 엘라스타제를 포함한 효소들의 세린 프로테아제 계열의 구성원들은 공통 조상으로부터 수직 혈통에 의해 발생한 것으로 간주된다.

[0058] 이종 상동체는 예를 들어 진화를 통해 구조 또는 전체 활성이 갈라진 유전자 또는 그의 암호화된 유전자 산물을 포함한다. 예를 들어, 하나의 종이 2 개의 작용을 나타내는 유전자 산물을 암호화하고 상기와 같은 작용들이 두 번째 종에서 별도의 유전자로 분리된 경우, 상기 3 개의 유전자 및 이들의 상응하는 산물은 이종 상동체인 것으로 간주된다. 생화학적 생성물의 제조를 위해서, 당해 분야의 숙련가들은 비-천연 미생물의 제작을 위해 도입하거나 파괴하려는 대사 활성을 갖는 이종 상동성 유전자를 선택해야 함을 알 것이다. 분리 가능한 활성들을 나타내는 이종 상동체의 예는 별개의 활성들이 2 개 이상의 종 사이에서 또는 단일 종 내에서 별도의 유전자 산물들로 분리된 경우이다. 구체적인 예는 세린 프로테아제 활성의 2 가지 유형인 엘라스타제 단백질 분해 및 플라스미노겐 단백질 분해의, 플라스미노겐 활성화제 및 엘라스타제로서의 별개의 분자들로의 분리이다. 두 번째 예는 마이코플라스마 5'-3' 엑소뉴클레아제와 드로소필라 DNA 폴리머라제 III 활성의 분리이다. 상기 첫 번째 종으로부터의 DNA 폴리머라제를 두 번째 종으로부터의 엑소뉴클레아제 또는 폴리머라제 중 어느 하나 또는 이들 모두에 대한 이종 상동체인 것으로, 또 이와 역으로 간주할 수 있다.

[0059] 대조적으로, 상동체(paralog)는 예를 들어 복제에 이은 진화적 분기에 의해 관계된 동족체이며 유사하거나 공통의, 그러나 동일하지는 않은 작용들을 갖는다. 상동체는 예를 들어 동일한 종으로부터 또는 상이한 종으로부터 기원하거나 유래할 수 있다. 예를 들어, 미생물 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 I) 및 용해성 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 II)는 이들이 별개의 반응들을 촉매화하고 동일한 종에서 별개의 작용을 갖는, 공통의 조상으로부터 함께 진화한 2 개의 별개의 효소를 나타내므로 상동체로서 간주될 수 있다. 상동체는 서로 상당한 서열 유사성을 갖는 동일한 종으로부터의 단백질이며, 이는 이들이 동종이거나 또는 공통의 조상으로부터 공 진화를 통해 관계됨을 암시한다. 상동성 단백질 계열의 그룹은 HipA 동족체, 루시페라제 유전자, 펩티다제 등을 포함한다.

[0060] 비-이종 상동성(nonorthologous) 유전자 치환은 상이한 종들에서 기준 유전자 작용을 대체할 수 있는 하나의 종으로부터의 비-이종 상동성 유전자이다. 치환은 예를 들어 상이한 종들에서의 기준 작용에 비해 기원 종들에서 실질적으로 동일하거나 유사한 작용을 수행할 수 있음을 포함한다. 일반적으로 비-이종 상동성 유전자 치환을 상기 기준 작용을 암호화하는 기지 유전자와 구조적으로 관련된 것으로서 식별하겠지만, 구조적으로는 덜 관련되었지만 작용상 유사한 유전자들 및 그들의 상응하는 유전자 산물들은 그럼에도 불구하고 여전히 본 발명에 사용되는 상기 용어의 의미 내에 있을 것이다. 작용 유사성은 예를 들어 치환하고자 하는 작용을 암호화하는 유전자에 비해 비-이종 상동성 유전자 산물의 활성 부위 또는 결합 부위에서 적어도 일부의 구조 유사성을 필요로 한다. 따라서, 비-이종 상동성 유전자는 예를 들어 상동체 또는 관련되지 않은 유전자를 포함한다.

- [0061] 따라서, n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올 생합성 능력을 갖는 본 발명의 비-천연 미생물 유기체의 동정 및 제작에 있어서, 당해 분야의 숙련가들은 대사 변형의 확인이 이중 상동체의 동정 및 포함 또는 불활성화를 포함할 수 있도록 본 발명에 제공된 교시 및 지침을 특정 종들에 적용함을 이해할 것이다. 당해 분야의 숙련가들은 또한 상동체 및/또는 비-이중 상동성 유전자 치환이 유사하거나 또는 실질적으로 유사한 대사 반응을 촉매화하는 효소를 암호화하는 기준 미생물 중에 존재하는 만큼, 이들 진화에 의해 관계된 유전자들을 사용할 수 있다.
- [0062] 이중 상동체, 상동체 및 비-이중 상동성 유전자 치환을 당해 분야의 숙련가들에게 널리 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 2 개의 폴리펩타이드에 대한 핵산 또는 아미노산 서열의 검사는 상기 두 비교된 서열들 간의 서열 일치성 및 유사성을 밝힐 것이다. 상기와 같은 유사성을 근거로, 당해 분야의 숙련가는 상기 유사성이 상기 단백질들이 공통 조상으로부터 진화를 통해 관계됨을 가리킬 만큼 충분히 높은지를 결정할 수 있다. 당해 분야의 숙련가들에게 널리 공지된 연산, 예를 들어 Align, BLAST, Clustal W 등은 원 서열 유사성 또는 일치성을 비교하고 측정하며, 중량 또는 점수를 지정할 수 있는 상기 서열 중 틸의 존재 또는 유의 수준을 또한 측정할 수 있다. 상기와 같은 연산은 또한 당해 분야에 공지되어 있으며 뉴클레오타이드 서열 유사성 또는 일치성의 측정에 유사하게 적용될 수 있다. 관련성을 결정하기에 충분한 유사성에 대한 매개변수들을, 통계학적 유사성을 계산하기 위해 널리 공지된 방법, 또는 랜덤 폴리펩타이드에서 유사한 합치를 발견할 기회, 및 상기 측정된 합치의 유의수준을 근거로 측정한다. 2 개 이상 서열들의 컴퓨터 비교를 또한 경우에 따라 당해 분야의 숙련가들에 의해 가지적으로 최적화할 수 있다. 관련된 유전자 산물들 또는 단백질들은 높은 유사성, 예를 들어 25% 내지 100% 서열 일치성을 가질 것으로 예상될 수 있다. 관련되지 않은 단백질들은, 충분한 크기의 데이터베이스를 스캐닝하는 경우(약 5%), 우연히 발생할 것으로 예상되는 바와 같이 필수적으로 동일한 일치성을 가질 수 있다. 5% 내지 24%의 서열은, 비교된 서열들이 관련 있다는 결론을 내릴 만큼 충분한 상동성을 나타낼 수도, 나타내지 않을 수도 있다. 상기 데이터 세트의 크기가 제공된, 상기와 같은 합치의 유의수준을 측정하기 위한 추가적인 통계학적 분석을 이들 서열의 관련성을 측정하기 위해 수행할 수 있다.
- [0063] 예를 들어 BLAST 연산을 사용하는 2 개 이상 서열의 관련성을 측정하기 위한 예시적인 매개변수들을 하기에 열거할 수 있다. 간단히, 아미노산 서열 정렬을 BLASTP 버전 2.0.8(1999년 1월 5일) 및 하기의 매개변수들을 사용하여 수행할 수 있다: 행렬: 0 BLOSUM62; 간격 개방(gap open): 11; 간격 연장(gap extension): 1; x\_드롭오프: 50; 예상: 10.0; 워드크기: 3; 필터: 온. 핵산 서열 정렬을 BLASTN 버전 2.0.6(1998년 9월 16일) 및 하기의 매개변수들을 사용하여 수행할 수 있다: 합치: 1; 불합치: -2; 간격 개방: 5; 간격 연장: 2; x\_드롭오프: 50; 예상: 10.0; 워드크기: 11; 필터: 오프. 당해 분야의 숙련가들은 상기 매개변수들에 대해 예를 들어 상기 비교의 엄격성을 증가시키거나 감소시키고 2 개 이상 서열의 관련성을 측정하기 위해 변형을 수행할 수 있음을 알 것이다.
- [0064] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖고, 상기 n-프로판올 경로는 프로피온알데하이드 탈하이드로게나제, 프로판올 탈하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오네이트 리덕타제 또는 프로피오닐 포스페이트 리덕타제를 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세틸 테카복실라제 또는 아이소프로판올 탈하이드로게나제를 포함한다.
- [0065] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 미생물 유기체는 아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 아세틸-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 아세틸-CoA 경로는 피루베이트 키나제, 피루베이트 탈하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 또는 포메이트 탈하이드로게나제를 포함한다.
- [0066] 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 프로피오닐-CoA 경로는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 탈하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕

타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 류타제, 메틸말로닐-CoA 에피머라제 또는 메틸말로닐-CoA 데카복실라제를 포함한다. 추가의 태양에서, 상기 프로피오닐-CoA 경로는 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 포함한다.

[0067] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 프로피오닐-CoA 경로는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 쓰레오닌 데아미나제, 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제를 포함한다. 추가의 태양에서, 상기 n-프로판올 경로는 2-옥소부타노에이트 데카복실라제를 포함한다.

[0068] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 프로피오닐-CoA 경로는 아세틸-CoA 카복실라제, 말로닐-CoA 리덕타제, 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제 또는 프로피오닐-CoA 신타제를 포함한다.

[0069] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 프로피오닐-CoA 경로는 락테이트 데하이드로게나제, 락테이트-CoA 트랜스퍼라제, 락틸-CoA 데하이드라타제 또는 아크릴로일-CoA 리덕타제를 포함한다.

[0070] 더욱 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0071] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 미생물 유기체는 아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 아세틸-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 피루베이트 키나제; 및 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 및 포메이트 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0072] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 말레이트 데하이드로게나제; 류마라제; 류마레이트 리덕타제; 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제; 메틸말로닐-CoA 류타제; 및 메틸말로닐-CoA 데카복실라제를 암호화한다. 추가의 태양에서, 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 또한 암호화한다.

[0073] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 쓰레오닌 데아미나제; 및 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제를 암호화한다. 추가의 태양에서, 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 메틸말로닐-CoA 데카복실라제 또는 피루베이트 카복실라제를 추가로 암호화한다. 더욱 또 다른 태양에서, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 2-옥소부타노에이트 데카복실라제를 추가로 암호화한다.

[0074] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 아세틸-CoA 카복실라제; 말로닐-CoA 리덕타제; 말로네이트 세미알데하이드 리덕

타제; 및 프로피오닐-CoA 신타제를 암호화한다.

[0075] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 락테이트 데하이드로게나제; 락테이트-CoA 트랜스퍼라제; 락틸-CoA 데하이드라타제; 및 아크릴로일-CoA 리덕타제를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는다.

[0076] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고, 이때 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 말레이트 데하이드로게나제; 퓨마라제; 퓨마레이트 리덕타제; 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제; 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 데카복실라제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제 및 프로피오닐 포스페이트 리덕타제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0077] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고, 이때 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 쓰레오닌 데아미나제; 및 2-옥소부타노에이트 데카복실라제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다. 추가의 태양에서, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 추가로 암호화한다.

[0078] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고, 이때 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 카복실라제; 말로닐-CoA 리덕타제; 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제; 프로피오닐-CoA 신시타제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소

프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0079] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고, 이때 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 락테이트 데하이드로게나제; 락테이트-CoA 트랜스퍼라제; 락틸-CoA 데하이드라타제; 아크릴로일-CoA 리덕타제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0080] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하며, 상기 n-프로판올 경로는 프로피온알데하이드 데하이드로게나제, 프로판올 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오네이트 리덕타제 또는 프로피오닐 포스페이트 리덕타제를 포함한다.

[0081] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산 세트는 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0082] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 n-프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체는 또한 본 발명에 예시된 바와 같이 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산을 포함하는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는다. 예를 들어 일부 태양에서, 상기 외래 핵산은 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 뮤타제 또는 메틸말로닐-CoA 데카복실라제를 암호화한다. 또 다른 태양에서, 상기 외래 핵산은 메틸말로닐-CoA 에피머라제를 추가로 암호화한다. 또한, 상기 실시태양의 더욱 또 다른 태양에서, 상기 n-프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 가질 수 있으며, 여기에서 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 말레이트 데하이드로게나제; 퓨마라제; 퓨마레이트 리덕타제; 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제; 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 메틸말로닐-CoA 데카복실라제; 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0083] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖고, 상기 14-BDO 경로는 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타

제, 4-하이드록시부티레이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제, 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함한다.

[0084] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖고, 상기 13-BDO 경로는 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 또는 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 포함하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함한다.

[0085] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖고, 상기 MAA 경로는 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제, 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제, 메틸말로닐-CoA 뮤타제, 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제, 메틸말로네이트 리덕타제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성) 또는 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함한다.

[0086] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 미생물 유기체는 아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 아세틸-CoA 경로를 가지며, 상기 아세틸-CoA 경로는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 또는 포메이트 데하이드로게나제를 포함한다.

[0087] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 미생물 유기체는 숙시닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 숙시닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 숙시닐-CoA 경로를 가지며, 상기 숙시닐-CoA 경로는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제를 포함한다. 추가의 태양에서, 상기 숙시닐-CoA 경로는 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 포함한다.

[0088] 하나의 실시태양에서, 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함한다.





및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0100] 하나의 실시태양에서, 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0101] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0102] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0103] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0104] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올

경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0105] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0106] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0107] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0108] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0109] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제;

및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0110] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0111] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0112] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0113] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0114] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며,

호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0115] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0116] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0117] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0118] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0119] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제,

메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0120] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0121] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 에피머라제; 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제 또는 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제; 메틸말로네이트 리덕타제; 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0122] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제 또는 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제; 메틸말로네이트 리덕타제; 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0123] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 에피머라제; 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성); 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0124] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 미생물 유기체는 아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 아세틸-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 피루베이트 키나제; 및 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 또는 포메이트 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0125] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 숙시닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 숙시닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 숙시닐-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 푸마라제, 푸마레이트 리덕

타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 및 숙시닐-CoA 신시타제를 암호화한다. 추가의 태양에서, 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 추가로 암호화한다.

[0126]

하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 푸마라제, 푸마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 피루베이트 카복실라제, 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성), 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 포메이트 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0127]

하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 푸마라제, 푸마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 피루베이트 카복실라제, 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 포메이트 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0128]

하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 푸마라제, 푸마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 피루베이트 카복실라제, 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제, 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 포메이트 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0129]

하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연

미생물 유기체를 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 피루베이트 카복실라제, 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 뮤타제, 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제, 메틸말로네이트 리덕타제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성) 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 포메이트 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0130] 상기 실시태양들 각각의 추가의 태양에서, 상기 외래 핵산은 이중 핵산이다.

[0131] 상기 실시태양들 각각의 추가의 태양에서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 있다.

[0132] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 및 아이소프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비-천연 미생물 유기체는 기질을 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 생성물로 전환하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다: 포스포에놀피루베이트를 옥살로아세테이트로, 옥살로아세테이트를 말레이트로, 말레이트를 퓨마레이트로, 퓨마레이트를 숙시네이트로, 숙시네이트를 숙시닐-CoA로, 숙시닐-CoA를 (R)-메틸말로닐-CoA로, (R)-메틸말로닐-CoA를 (S)-메틸말로닐-CoA로, (S)-메틸말로닐-CoA를 프로피오닐-CoA로, 프로피오닐-CoA를 프로피온알데하이드로, 프로피온알데하이드를 n-프로판올로, 프로피오닐-CoA를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오닐-CoA를 프로피오네이트로, 프로피오네이트를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오네이트를 프로피온알데하이드로, 프로피오닐 포스페이트를 프로피온알데하이드로, 포스포에놀피루베이트를 피루베이트로, 피루베이트를 옥살로아세테이트로, 피루베이트를 아세틸-CoA로, 피루베이트를 아세틸-CoA 및 포메이트로, 포메이트를 CO<sub>2</sub>로, 2-아세틸-CoA 기질을 1 아세토아세틸-CoA 생성물로, 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트로, 아세토아세테이트를 아세톤으로, 아세톤을 아이소프로판올로. 당해 분야의 숙련가는 이들이 단지 예시적이며, 목적하는 생성물을 생성하기에 적합한 본 발명에 개시된 상기 기질-생성물 쌍들 중 임의의 쌍 및 상기 기질에서 생성물로의 전환에 이용 가능한 상기 쌍들에 대한 적합한 활성을 본 발명의 교시를 근거로 당해 분야의 숙련가들이 쉽게 결정할 수 있음을 알 것이다. 따라서, 본 발명은 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 함유하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 효소 또는 단백질은 도 1에 도시된 바와 같이, n-프로판올 및 아이소프로판올 경로의 기질 및 생성물을 전환한다.

[0133] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 및 아이소프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비-천연 미생물 유기체는 기질을 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 생성물로 전환하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다: 포스포에놀피루베이트를 옥살로아세테이트로, 옥살로아세테이트를 쓰레오닌으로, 쓰레오닌을 2-옥소부타노에이트로, 2-옥소부타노에이트를 프로피오닐-CoA로, 프로피오닐-CoA를 프로피온알데하이드로, 프로피온알데하이드를 n-프로판올로, 2-옥소부타노에이트를 프로피온알데하이드로, 프로피오닐-CoA를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오닐-CoA를 프로피오네이트로, 프로피오네이트를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오네이트를 프로피온알데하이드로, 프로피오닐 포스페이트를 프로피온알데하이드로, 포스포에놀피루베이트를 피루베이트로, 피루베이트를 옥살로아세테이트로, 피루베이트를 아세틸-CoA로, 피루베이트를 아세틸-CoA 및 포메이트로, 포메이트를 CO<sub>2</sub>로, 2-아세틸-CoA 기질을 1 아세토아세틸-CoA 생성물로, 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트로, 아세토아세테이트를 아세톤으로, 아세톤을 아이소프로판올로. 당해 분야의 숙련가는 이들이 단지 예시적이며, 목적하는 생성물을 생성하기에 적합한 본 발명에 개시된 상기 기질-생성물 쌍들 중 임의의 쌍 및 상기 기질에서 생성물로의 전환에 이용 가능한 상기 쌍들에 대한 적합한 활성을 본 발명의 교시를 근거로 당해 분야의 숙련가들이 쉽게 결정할 수 있음을 알 것이다. 따라서, 본 발명은 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 함유하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 효소 또는 단백질은 도 2에 도시된 바와 같이, n-프로판올 및 아이소프로판올 경로의 기질 및 생성물을 전환한다.

[0134] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 및 아이소프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비-천연 미생물 유기체는 기질을 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 생성물로 전환하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다: 포스포에놀피루베이트를 피루베이트로, 피루베이트를 아세틸-CoA로, 피루베이트를 아세틸 CoA 및 포메이트로, 포메이트를 CO<sub>2</sub>로, 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로, 말로닐-CoA를 말로네이트 세미알데하이드로, 말로네이트 세미알데하이드를 3-하이드록시프로피오네이트로, 3-하이드록시프로피오네이트를 프로피오닐-CoA로, 프로피오닐-CoA를 프로피온알데하이드로, 프로피온알데하이드를 n-프로판올로, 프로피오닐-CoA를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오닐-CoA를 프로피오네이트로, 프로피오네이트를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오네이트를 프로피온알데하이드로, 프로피오닐 포스페이트를 프로피온알데하이드로, 2-아세틸-CoA 기질을 1 아세토아세틸-CoA 생성물로, 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트로, 아세토아세테이트를 아세톤으로, 아세톤을 아이소프로판올로. 당해 분야의 숙련가는 이들이 단지 예시적이며, 목적하는 생성물을 생성하기에 적합한 본 발명에 개시된 상기 기질-생성물 쌍들 중 임의의 쌍 및 상기 기질에서 생성물로의 전환에 이용 가능한 상기 쌍들에 대한 적합한 활성을 본 발명의 교시를 근거로 당해 분야의 숙련가들이 쉽게 결정할 수 있음을 알 것이다. 따라서, 본 발명은 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 함유하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 효소 또는 단백질은 도 3에 도시된 바와 같이, n-프로판올 및 아이소프로판올 경로의 기질 및 생성물을 전환한다.

[0135] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 및 아이소프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비-천연 미생물 유기체는 기질을 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 생성물로 전환하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다: 피루베이트를 D-락테이트로, D-락테이트를 락토일-CoA로, 락토일-CoA를 아크릴로일-CoA로, 아크릴로일-CoA를 프로피오닐-CoA로, 프로피오닐-CoA를 프로피온알데하이드로, 프로피온알데하이드를 n-프로판올로, 프로피오닐-CoA를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오닐-CoA를 프로피오네이트로, 프로피오네이트를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오네이트를 프로피온알데하이드로, 프로피오닐 포스페이트를 프로피온알데하이드로, 피루베이트를 아세틸-CoA로, 피루베이트를 아세틸-CoA 및 포메이트로, 포메이트를 CO<sub>2</sub>로, 2-아세틸-CoA 기질을 1 아세토아세틸-CoA 생성물로, 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트로, 아세토아세테이트를 아세톤으로, 아세톤을 아이소프로판올로. 당해 분야의 숙련가는 이들이 단지 예시적이며, 목적하는 생성물을 생성하기에 적합한 본 발명에 개시된 상기 기질-생성물 쌍들 중 임의의 쌍 및 상기 기질에서 생성물로의 전환에 이용 가능한 상기 쌍들에 대한 적합한 활성을 본 발명의 교시를 근거로 당해 분야의 숙련가들이 쉽게 결정할 수 있음을 알 것이다. 따라서, 본 발명은 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 함유하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 효소 또는 단백질은 도 4에 도시된 바와 같이, n-프로판올 및 아이소프로판올 경로의 기질 및 생성물을 전환한다.

[0136] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비-천연 미생물 유기체는 기질을 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 생성물로 전환하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다: 프로피오닐-CoA를 프로피온알데하이드로, 프로피온알데하이드를 n-프로판올로, 프로피오닐-CoA를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오닐-CoA를 프로피오네이트로, 프로피오네이트를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오네이트를 프로피온알데하이드로, 및 프로피오닐 포스페이트를 프로피온알데하이드로. 당해 분야의 숙련가는 이들이 단지 예시적이며, 목적하는 생성물을 생성하기에 적합한 본 발명에 개시된 상기 기질-생성물 쌍들 중 임의의 쌍 및 상기 기질에서 생성물로의 전환에 이용 가능한 상기 쌍들에 대한 적합한 활성을 본 발명의 교시를 근거로 당해 분야의 숙련가들이 쉽게 결정할 수 있음을 알 것이다. 따라서, 본 발명은 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 함유하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 효소 또는 단백질은 도 1 내지 4에 도시된 바와 같이, n-프로판올 경로의 기질 및 생성물을 전환한다.

[0137] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 및 아이소프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비-천연 미생물 유기체는 기질을 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 생성물로 전환하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다: 포스포에놀피루베이트를 옥살로아세테이트로, 옥살로아세테이트를 말레이트로, 말레이트를 퓨마레이트로, 퓨마레이트를 숙시네이트로, 숙시네이트를 숙시닐-CoA로, 숙시닐-CoA를 숙시닉 세미알데하이드로, 숙시닉 세미알데하이드를 4-하이드록시부티레이트로, 4-하이드록시부티레이트를 4-하이드록시부티릴-CoA로, 4-하이드록시부티릴-CoA를 4-하이드록시부티르알데하이드로, 4-하이드록시부티르알데하이드를 14-BDO로, 숙시네이트를 숙시닉 세미알데하이드로, 4-하이드록시부티레이트를 4-하이드록시부티르알데하이드로, 4-하이드록시부티레이트를 4-하이드록시부티릴-포스페이

트로, 4-하이드록시부티릴-포스페이트를 4-하이드록시부티릴-CoA로, 4-하이드록시부티릴-포스페이트를 4-하이드록시부티르알데하이드로, 4-하이드록시부티릴-CoA를 14-BDO로, 프로피오닐-CoA를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오닐 포스페이트를 프로피온알데하이드로, 포스포에놀피루베이트를 피루베이트로, 피루베이트를 옥살로아세테이트로, 피루베이트를 아세틸-CoA로, 피루베이트를 아세틸-CoA 및 포메이트로, 포메이트를 CO<sub>2</sub>로, 2-아세틸-CoA 기질을 1 아세토아세틸-CoA 생성물로, 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트로, 아세토아세테이트를 아세톤으로, 아세톤을 아이소프로판올로. 당해 분야의 숙련가는 이들이 단지 예시적이며, 목적하는 생성물을 생성하기에 적합한 본 발명에 개시된 상기 기질-생성물 쌍들 중 임의의 쌍 및 상기 기질에서 생성물로의 전환에 이용 가능한 상기 쌍들에 대한 적합한 활성을 본 발명의 교시를 근거로 당해 분야의 숙련가들이 쉽게 결정할 수 있음을 알 것이다. 따라서, 본 발명은 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 함유하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 효소 또는 단백질은 도 5에 도시된 바와 같이, n-프로판올 및 아이소프로판올 경로의 기질 및 생성물을 전환한다.

[0138]

추가적인 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 및 아이소프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비-천연 미생물 유기체는 기질을 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 생성물로 전환하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다: 포스포에놀피루베이트를 옥살로아세테이트로, 옥살로아세테이트를 말레이트로, 말레이트를 푸마레이트로, 푸마레이트를 숙시네이트로, 숙시네이트를 숙시닐-CoA로, 숙시닐-CoA를 숙시닉 세미알데하이드로, 숙시닉 세미알데하이드를 4-하이드록시부티레이트로, 4-하이드록시부티레이트를 4-하이드록시부티릴-CoA로, 숙시네이트를 숙시닉 세미알데하이드로, 4-하이드록시부티레이트를 4-하이드록시부티릴-포스페이트로, 4-하이드록시부티릴-포스페이트를 4-하이드록시부티릴-CoA로, 4-하이드록시부티릴-CoA를 크로토닐-CoA로, 크로토닐-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 3-하이드록시부티르알데하이드로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 3-하이드록시부티레이트로, 3-하이드록시부티레이트를 3-하이드록시부티르알데하이드로, 3-하이드록시부티르알데하이드를 13-BDO로, 3-하이드록시부티릴-CoA를 13-BDO로, 프로피오닐-CoA를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오닐 포스페이트를 프로피온알데하이드로, 포스포에놀피루베이트를 피루베이트로, 피루베이트를 옥살로아세테이트로, 피루베이트를 아세틸-CoA로, 피루베이트를 아세틸-CoA 및 포메이트로, 포메이트를 CO<sub>2</sub>로, 2-아세틸-CoA 기질을 1 아세토아세틸-CoA 생성물로, 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트로, 아세토아세테이트를 아세톤으로, 아세톤을 아이소프로판올로. 당해 분야의 숙련가는 이들이 단지 예시적이며, 목적하는 생성물을 생성하기에 적합한 본 발명에 개시된 상기 기질-생성물 쌍들 중 임의의 쌍 및 상기 기질에서 생성물로의 전환에 이용 가능한 상기 쌍들에 대한 적합한 활성을 본 발명의 교시를 근거로 당해 분야의 숙련가들이 쉽게 결정할 수 있음을 알 것이다. 따라서, 본 발명은 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 함유하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 효소 또는 단백질은 도 6에 도시된 바와 같이, n-프로판올 및 아이소프로판올 경로의 기질 및 생성물을 전환한다.

[0139]

추가적인 실시태양에서, 본 발명은 MAA 및 아이소프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 상기 비-천연 미생물 유기체는 기질을 하기로 이루어진 그룹 중에서 선택된 생성물로 전환하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함한다: 포스포에놀피루베이트를 옥살로아세테이트로, 옥살로아세테이트를 말레이트로, 말레이트를 푸마레이트로, 푸마레이트를 숙시네이트로, 숙시네이트를 숙시닐-CoA로, 숙시닐-CoA를 숙시닉 세미알데하이드로, 숙시닉 세미알데하이드를 4-하이드록시부티레이트로, 4-하이드록시부티레이트를 4-하이드록시부티릴-CoA로, 숙시네이트를 숙시닉 세미알데하이드로, 4-하이드록시부티레이트를 4-하이드록시부티릴-포스페이트로, 4-하이드록시부티릴 포스페이트를 4-하이드록시부티릴-CoA로, 4-하이드록시부티릴-CoA를 3-하이드록시아이소부티릴-CoA로, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA를 3-하이드록시아이소부티레이트로, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA를 메티아크릴일-CoA로, 메티아크릴일-CoA를 MAA로, 3-하이드록시아이소부티레이트를 MAA로, 숙시닐-CoA를 (R)-메틸말로닐-CoA로, (R)-메틸말로닐-CoA를 (S)-메틸말로닐-CoA로, (S)-메틸말로닐-CoA를 메틸말로네이트 세미알데하이드로, (S)-메틸말로닐-CoA를 3-하이드록시아이소부티레이트로, 메틸말로네이트 세미알데하이드를 3-하이드록시아이소부티레이트로, 프로피오닐-CoA를 프로피오닐 포스페이트로, 프로피오닐 포스페이트를 프로피온알데하이드로, 포스포에놀피루베이트를 피루베이트로, 피루베이트를 옥살로아세테이트로, 피루베이트를 아세틸-CoA로, 피루베이트를 아세틸-CoA 및 포메이트로, 포메이트를 CO<sub>2</sub>로, 2-아세틸-CoA 기질을 1 아세토아세틸-CoA 생성물로, 아세토아세틸-CoA를 아세토아세테이트로, 아세토아세테이트를 아세톤으로, 아세톤을 아이소프로판올로. 당해 분야의 숙련가는 이들이 단지 예시적이며, 목적하는 생성물을 생성하기에 적합한 본 발명에 개시된 상기 기질-생성물 쌍들 중 임의의 쌍 및 상기 기질에서 생성물로의 전환에 이용 가능한 상기 쌍들에 대한 적합한 활성을 본 발명의 교시를 근거로 당해 분야의 숙련가들이 쉽게 결정할 수 있음을 알 것이다. 따라서, 본 발명은 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의

외래 핵산을 함유하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 이때 상기 효소 또는 단백질은 도 7 및 8에 도시된 바와 같이, n-프로판올 및 아이소프로판올 경로의 기질 및 생성물을 전환한다.

[0140] n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올 경로를 함유하는 미생물 유기체로서 본 발명에 일반적으로 개시하였지만, 본 발명은 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로의 중간체를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 또한 제공하는 것으로 생각된다. 예를 들어, 본 발명에 개시된 바와 같이, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로를 도 1 내지 8에 예시한다. 따라서, n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올을 생산하는 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올 경로를 함유하는 미생물 유기체 이외에, 본 발명은 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 또한 제공하며, 이때 상기 미생물 유기체는 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 중간체, 예를 들어 아세톤, 메틸말로닐-CoA, 프로피오닐 포스페이트, 2-옥소부타노에이트, 3-하이드록시프로피오네이트, 락토일-CoA, 4-하이드록시부티레이트, 4-하이드록시부티릴-포스페이트, 크로토닐-CoA, 숙시닐-CoA, 숙시닉 세미알데하이드 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA를 생산한다.

[0141] 도 1 내지 8의 경로를 포함하여, 실시예에 개시되고 도면에 예시된 바와 같이, 본 발명에 개시된 경로들 중 임의의 경로를 사용하여 목적하는 대로 임의의 경로 중간체 또는 생성물을 생산하는 비-천연 미생물 유기체를 생성시킬 수 있는 것으로 생각된다. 본 발명에 개시된 바와 같이, 중간체를 생산하는 상기와 같은 미생물 유기체를, 목적하는 생성물을 생산하는 하부 경로 효소들을 발현하는 또 다른 미생물 유기체와 함께 사용할 수 있다. 그러나, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 중간체를 생산하는 비-천연 미생물 유기체를 사용하여 목적하는 생성물로서 상기 중간체를 생성시킬 수 있는 것으로 생각된다.

[0142] 본 발명을 대사 반응, 반응물 또는 그의 생성물을 일반적으로 언급하거나, 또는 상기 언급된 대사 반응, 반응물 또는 생성물과 관련되거나 이를 촉매화하는 효소 또는 이와 관련된 단백질을 암호화하는 하나 이상의 핵산 또는 유전자를 구체적으로 언급하여 본 발명에서 개시한다. 달리 본 발명에 명확히 나타내지 않는 한, 당해 분야의 숙련가들은 반응에 대한 언급이 또한 상기 반응의 반응물 및 생성물에 대한 언급을 구성함을 알 것이다. 유사하게, 본 발명에서 명확히 나타내지 않는 한, 반응물 또는 생성물에 대한 언급은 또한 상기 반응을 언급하며, 이들 대사 구성성분들 중 임의의 구성성분에 대한 언급은 상기 언급한 반응, 반응물 또는 생성물을 촉매화하는 효소 또는 상기 중에 수반되는 단백질을 암호화하는 유전자 또는 유전자들을 또한 언급한다. 마찬가지로, 대사 생화학, 효소학 및 유전체학의 널리 공지된 분야에 제공된 바와 같이, 본 발명에서 유전자 또는 핵산 암호화에 대한 언급은 상응하는 암호화된 효소 및 상기 효소가 촉매화하는 반응 또는 상기 반응과 관련된 단백질뿐만 아니라 상기 반응의 반응물 및 생성물에 대한 언급을 또한 구성한다.

[0143] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 하나 이상의 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로에 관여하는 효소 또는 단백질 중 하나 이상을 암호화하는 발현 가능한 핵산을 도입시킴으로써 생성시킬 수 있다. 생합성에 대해 선택된 숙주 미생물 유기체에 따라, 특정 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로 중 일부 또는 전부에 대한 핵산을 발현시킬 수 있다. 예를 들어, 선택된 숙주가 목적하는 생합성 경로에 대해 하나 이상의 효소 또는 단백질이 결핍된 경우, 상기 결핍된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대해 발현 가능한 핵산을 후속의 외래 발현을 위해 상기 숙주에 도입시킨다. 한편으로, 상기 선택된 숙주가 일부 경로 유전자들의 내생적인 발현을 나타내지만 다른 것들은 결핍된 경우, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성을 성취하기 위해 상기 결핍 효소(들) 또는 단백질(들)에 대해 암호화 핵산이 필요하다. 따라서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체를, 목적하는 생합성 경로를 획득하기 위해 외래 효소 또는 단백질 활성을 도입시킴으로써 생성시키거나, 또는 하나 이상의 내생적인 효소 또는 단백질과 함께 목적하는 생성물, 예를 들어 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 생산하는 하나 이상의 외래 효소 또는 단백질 활성을 도입시킴으로써 목적하는 생합성 경로를 획득할 수 있다.

[0144] 선택된 숙주 미생물 유기체의 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로 구성성분들에 따라, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 하나 이상의 외부적으로 발현된 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로-암호화 핵산 내지 하나 이상의 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로에 대한 암호화 핵산 전부를 포함할 것이다. 예를 들어, n-프로판올, 아이소

프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성을, 상응하는 암호화 핵산의 외래 발현을 통해 경로 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에 확립시킬 수 있다. n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로의 모든 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에서, 상기 경로 중의 모든 효소 또는 단백질의 외래 발현을 포함할 수 있지만, 상기 숙주가 경로 효소 또는 단백질 중 하나 이상을 함유한다 하더라도 상기 경로의 모든 효소 또는 단백질이 발현될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 도 1에 예시된 바와 같이, n-프로판올 및 아이소프로판올의 생산 경로 중의 모든 효소 또는 단백질, 예를 들어 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 말레이트 데하이드로게나제; 퓨마라제; 퓨마레이트 리덕타제; 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제; 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 에피머라제; 메틸말로닐-CoA 데카복실라제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로판노일트랜스퍼라제 및 프로피오닐 포스페이트 리덕타제, 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세틸레이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제의 외부 발현을 포함할 수 있다.

[0145] 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 발현 가능한 형태로 도입되는 암호화 핵산의 수가 적어도 상기 선택된 숙주 미생물 유기체의 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 결핍에 필적할 것임을 알 것이다. 따라서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 본 발명에 개시된 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로를 구성하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21, 전체 이하 핵산을 가질 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성을 촉진 또는 최적화하거나, 또는 상기 숙주 미생물 유기체에 다른 유용한 작용들을 부여하는 다른 유전자 변형을 또한 포함할 수 있다. 하나의 상기와 같은 다른 작용성은 예를 들어 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 전구체 중 하나 이상, 예를 들어 포스포에놀피루베이트 또는 피루베이트의 합성의 증대를 포함할 수 있다.

[0146] 일반적으로, 숙주 미생물 유기체는 상기 유기체가 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로의 전구체를, 자연적으로 생성된 분자로서 또는 목적하는 전구체의 드 노보 생산을 제공하거나 또는 상기 숙주 미생물 유기체에 의해 자연적으로 생산된 전구체의 증가된 생산을 제공하도록 조작된 생성물로서 생산하도록 선택된다. 예를 들어, 포스포에놀피루베이트 및 피루베이트는 에스케리키아 콜라이와 같은 숙주 유기체에서 자연적으로 생산된다. 숙주 유기체를 본 발명에 개시된 바와 같이, 전구체의 생산을 증가하도록 조작할 수 있다. 또한, 목적하는 전구체를 생산하도록 조작된 미생물 유기체를 숙주 유기체로서 사용하고 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로의 효소 또는 단백질을 발현하도록 추가로 조작할 수 있다.

[0147] 일부 실시태양에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 합성하는 효소적 능력을 함유하는 숙주로부터 생성된다. 상기 특정한 실시태양에서, 예를 들어 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 반응이 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생산을 향하도록 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 생성물의 합성 또는 축적을 증가시키는 것이 유용할 수 있다. 증가된 합성 또는 축적을 예를 들어 상술한 n-프로판올 및/또는 아이소프로판올 경로 효소 또는 단백질 중 하나 이상을 암호화하는 핵산의 과발현에 의해 수행할 수 있다. 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로의 효소 또는 효소들 및/또는 단백질 또는 단백질들의 과발현은 예를 들어 내생적인 유전자 또는 유전자들의 외래 발현을 통해서, 또는 이중 유전자 또는 유전자들의 외래 발현을 통해서 일어날 수 있다. 따라서, 천연 유기체를, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체, 예를 들어 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로 효소 또는 단백질을 암호화하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21, 즉 전체 이하의 핵산의 과발현을 통해 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 생산하는 유기체가 되도록 쉽게 생성시킬 수 있다. 또한, 비-천연 유기체를 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로 효소의 활성을 증가시키는 내생 유전자의 돌연변이에 의해 생성시킬 수 있다.

[0148] 특히 유용한 실시태양에서, 상기 암호화 핵산의 외부 발현을 사용한다. 외부 발현은 상기 발현 및/또는 조절 요소를 상기 숙주 및 용도의 주문에 맞추어 사용자에게 의해 조절되는 목적하는 발현 수준을 성취하는 능력을 부여한다. 그러나, 내생적인 발현은 또한 예를 들어 유도 프로모터 또는 다른 조절 요소에 결합 시 상기 유

전자의 프로모터의 음의 조절 효과기 또는 유도를 제거함으로써 다른 실시태양들에도 사용될 수 있다. 따라서, 천연 유도 프로모터를 갖는 내생 유전자를 적합한 유도체의 제공에 의해 상향 조절하거나, 또는 내생 유전자의 조절 부위를 유도 조절 요소를 통합하도록 조작할 수 있으며, 이에 의해 목적하는 시기에 내생 유전자의 증가된 발현의 조절을 허용할 수 있다. 유사하게, 유도 프로모터를 비-천연 미생물 유기체 내에 도입된 외래 유전자에 대한 조절 요소로서 포함할 수 있다.

[0149]

본 발명의 방법에서, 상기 하나 이상의 외래 핵산 중 어느 것이든 미생물 유기체에 도입시켜 본 발명의 비-천연 미생물 유기체를 생산시킬 수 있는 것으로 생각된다. 상기 핵산을 예를 들어 상기 미생물 유기체에 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올 생합성 경로가 부여되도록 도입시킬 수 있다. 한편으로, 암호화 핵산을 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 능력을 부여하도록 상기 필요한 반응들 중 일부를 촉매화하는 생합성 능력을 갖는 중간 미생물 유기체를 생산하도록 도입시킬 수 있다. 예를 들어, n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올 생합성 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체는 목적하는 효소 또는 단백질, 예를 들어 프로피온알데하이드 데하이드로게나제와 아이소프로판올 데하이드로게나제의 조합, 또는 한편으로 프로피오닐-CoA 신타제와 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 또는 한편으로 락테이트 데하이드로게나제와 아세틸-CoA 티올라제, 또는 한편으로 숙시닐-CoA 리덕타제와 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성), 또는 한편으로 크로토나제와 아세토아세테이트 데카복실라제, 또는 한편으로 4-하이드록시부티레이트 키나제와 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제 또는 한편으로 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성)와 피루베이트 키나제의 조합 등을 암호화하는 2 개 이상의 외래 핵산을 포함할 수 있다. 따라서 생합성 경로의 2 개 이상의 효소 또는 단백질의 임의의 조합을 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에 포함시킬 수 있는 것으로 생각된다. 유사하게, 경우에 따라, 목적하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 상응하는 목적하는 생성물을 생성시키는 한, 생합성 경로의 3 개 이상의 효소 또는 단백질의 임의의 조합, 예를 들어 PEP 카복시키나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제 및 프로판올 데하이드로게나제, 또는 한편으로 피루베이트 키나제, 아세토아세테이트 데카복실라제 및 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 또는 한편으로 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 아이소프로판올 데하이드로게나제, 또는 한편으로 락테이트-CoA 트랜스퍼라제 및 락틸-CoA 데하이드라타제 및 피루베이트 포메이트 라이아제, 또는 한편으로 숙시닐-CoA 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티레이트 리덕타제 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 또는 한편으로 크로토나제, PEP 카복실라제 및 아세토아세테이트 데카복실라제, 또는 한편으로 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 퓨마라제 및 아이소프로판올 데하이드로게나제, 또는 한편으로 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세테이트 데카복실라제 및 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성) 등을 본 발명의 비-천연 미생물 유기체 등에 포함시킬 수 있는 것으로 생각된다. 유사하게, 경우에 따라, 목적하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 상응하는 목적하는 생성물을 생성시키는 한, 본 발명에 개시된 바와 같은 생합성 경로의 4 개 이상의 효소 또는 단백질의 임의의 조합, 예를 들어 피루베이트 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 메틸말로닐-CoA 에피머라제 및 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 또는 한편으로 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아이소프로판올 데하이드로게나제, 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제, 또는 한편으로 아세틸-CoA 카복실라제, 말로닐-CoA 리덕타제, 말로네이트 세미알데하이드 및 아세토아세테이트 데카복실라제, 또는 한편으로 아크틸로일-CoA 리덕타제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세테이트 데카복실라제, 및 아이소프로판올 데하이드로게나제, 또는 한편으로 숙시닐-CoA 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 및 아이소프로판올 데하이드로게나제, 또는 한편으로 숙시네이트 리덕타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제 및 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 또는 한편으로 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 뮤타제 및 4-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에 포함시킬 수 있다.

[0150]

하나보다 많은 외래 핵산이 미생물 유기체 중에 포함되는 경우, 상기 하나보다 많은 외래 핵산은 상기 논의된 바와 같이 기준 암호화 핵산 또는 생합성 활성을 지칭하는 것으로 생각된다. 또한 본 발명에 개시된 바와 같이, 하나보다 많은 외래 핵산을 별도의 핵산 분자 상에서, 다시스트론 핵산 분자 상에서, 또는 이들의 조합 상에서 숙주 미생물 유기체에 도입할 수 있으며, 상기 핵산을 여전히 하나보다 많은 외래 핵산으로서 간주할 수 있는 것으로 생각된다. 예를 들어, 본 발명에서 논의된 바와 같이, 미생물 유기체를 목적하는 경로 효소 또는 단백질을 암호화하는 2 개 이상의 외래 핵산을 발현하도록 조작할 수 있다. 목적하는 활성을 암호화하는 2 개의 외래 핵산을 숙주 미생물 유기체에 도입하는 경우에, 상기 2 개의 외래 핵산을 단일 핵산으로서, 예를 들어 단일 플라스미드 상에, 별도의 플라스미드 상에 도입할 수 있으며, 단일 부위 또는 다수의 부위에

서 상기 숙주 염색체에 통합시킬 수 있고 상기 핵산을 여전히 2 개의 외래 핵산으로서 간주할 수 있는 것으로 생각된다. 유사하게, 2 개 보다 많은 외래 핵산을 임의의 목적하는 조합으로 숙주 유기체 내로, 예를 들어 단일 플라스미드 상에, 별도의 플라스미드 상에 도입할 수 있으며, 단일 부위 또는 다수의 부위에서 상기 숙주 염색체에 통합시킬 수 있고 상기 핵산을 여전히 2 개 이상의 외래 핵산, 예를 들어 3 개의 외래 핵산으로서 간주할 수 있는 것으로 생각된다. 따라서, 기준 외래 핵산 또는 생합성 활성의 수는 암호화 핵산의 수 또는 생합성 활성의 수를 지칭하는 것이지, 숙주 유기체 내로 도입되는 별도의 핵산의 수를 지칭하는 것은 아니다.

[0151] 본 발명에 개시된 바와 같은 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 생합성 이외에, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체 및 방법을 또한 서로 및 다른 경로들에 의해 생성물 생합성을 성취하기 위해 당해 분야에 널리 공지된 다른 미생물 유기체 및 방법들과 다양한 조합으로 사용할 수 있다. 예를 들어 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생산자의 사용 이외에 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 생산하는 한 가지 대안은 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 중간체를 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA로 전환시킬 수 있는 또 다른 미생물 유기체의 첨가를 통해서이다. 한 가지 상기와 같은 과정은 예를 들어 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 중간체를 생산하는 미생물 유기체의 발효를 포함한다. 이어서 상기 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올 경로 중간체를, 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 중간체를 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA로 전환시키는 두 번째 미생물 유기체에 대한 기질로서 사용할 수 있다. 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 중간체를 상기 두 번째 유기체의 또 다른 배양물에 직접 가하거나 또는 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 중간체 생산자의 원래 배양물을 예를 들어 세포 분리에 의해 상기 미생물 유기체에서 고갈시킬 수 있으며, 이어서 상기 두 번째 유기체의 발효 브로쓰에의 후속 첨가를 사용하여 중간 정제 단계 없이 최종 생성물을 생성시킬 수 있다.

[0152] 다른 실시태양에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체 및 방법을 광범위하게 다양한 하위 경로들로 조립하여 예를 들어 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올의 생합성을 성취할 수 있다. 이들 실시태양에서, 본 발명의 목적하는 생성물에 대한 생합성 경로들을 상이한 미생물 유기체들로 분리할 수 있으며, 상기 상이한 미생물 유기체들을 함께 배양하여 최종 생성물을 생산할 수 있다. 상기와 같은 생합성 설계에서, 한 미생물 유기체의 생성물은 상기 최종 생성물이 합성될 때까지 두 번째 미생물 유기체에 대한 기질이다. 예를 들어, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 생합성을, 하나의 경로 중간체의 또 다른 경로 중간체 또는 생성물로의 전환에 대한 생합성 경로를 함유하는 미생물 유기체를 제작함으로써 수행할 수 있다. 한편으로, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 또한 동일한 용기에서 2 개의 유기체를 사용하여 공동 배양 또는 공동 발효를 통해 미생물 유기체들로부터 생합성적으로 생산할 수 있으며, 이때 첫 번째 미생물 유기체는 프로피오닐-CoA, 숙시닐-CoA 및/또는 아세틸-CoA 중간체(들)를 생산하고 두 번째 미생물 유기체는 상기 중간체를 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA로 전환시킨다.

[0153] 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 본 발명의 비-천연 미생물 유기체 및 방법들에 대해서, 다른 미생물 유기체, 하위 경로들을 갖는 다른 비-천연 미생물 유기체들의 공동 배양, 및 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 생성시키는 것으로 당해 분야에 널리 공지된 다른 화학적 및/또는 생화학적 과정들의 조합과 함께 광범위하게 다양한 조합 및 순열들이 존재함을 알 것이다.

[0154] n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 효소 또는 단백질에 대한 암호화 핵산의 공급원은 예를 들어 상기 암호화된 유전자 산물이 기준 반응을 촉매화할 수 있는 임의의 종들을 포함할 수 있다. 상기와 같은 종들은 원핵 및 진핵 유기체 모두, 예를 들어 비 제한적으로 고세균 및 진정세균을 포함한 세균, 및 효모, 식물, 곤충, 동물, 및 인간을 포함한 포유동물을 포함한 진핵생물을 포함한다. 상기와 같은 공급원에 대한 예시적인 종은 예를 들어, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 아세트박터 파스티리안스(*Acetobacter pasteurians*), 애시다누스 브리에를레이(*Acidobacterium brierleyi*), 애시네토박터 배일리(*Acinetobacter baylyi*), 애시네토박터 칼코아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*), 애시네토박터 스페이즈(*Acinetobacter species*) 균주 M-1, 액티노바실러스 숙시노제네스(*Actinobacillus succinogenes*), 아나에로비오스피릴럼 숙시니시프로듀센스(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 아나에로스티페스 카카에(*Anaerostipes caccae*) DSM 14662, 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) ATCC 14579, 바실러스 서브틸리스 서브스페시스

서브틸리스 균주(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str.) 168, 보스 타우루스(*Bos taurus*), 브라디리조뮴 자포니쿰(*Bradyrhizobium japonicum*) USDA110, 카에노라브디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*), 캄필로 박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 클라미도모나스 레인하르트티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 클로로플렉수스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824, 클로스트리듐 베이제링키(*Clostridium beijerinckii*), 클로스트리듐 보툴리눔 씨 균주 에클룬드(*Clostridium botulinum* C str. Eklund), 클로스트리듐 클루이베리(*Clostridium kluyveri*), 클로스트리듐 클루이베리 DSM 555, 클로스트리듐 노비(*Clostridium novyi*)-NT, 클로스트리듐 프로피오니쿰(*Clostridium propionicum*), 클로스트리듐 사카로부틸리쿰(*Clostridium saccharobutylicum*), 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 데설펀브리오 아프리카누스(*Desulfovibrio africanus*), 에리스로박터 스페시스(*Erythrobacter* sp.) NAP1, 에스케리키아 콜라이 K12, 에스케리키아 콜라이 K12 균주 MG1655, 에스케리키아 콜라이 O157:H7, 제오바실러스 씨모글루코시다시우스(*Geobacillus thermoglucosidasius*) M10EXG, 하에모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*), 호모 사피엔스(*Homo sapiens*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*) MGH78578, 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) WCFS1, 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 만헤이미아 숙시니시프로듀센스(*Mannheimia succiniciproducens*), 해양감마 프로테오박테리움 HTCC2080, 메소리조뮴 로티(*Mesorhizobium loti*), 메탈로스파에라 세둘라(*Metallosphaera sedula*), 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*), 무어렐라 씨모아세티카(*Moorella thermoacetica*), 마이코박테리움 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis*), 마이코박테리움 튜베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 오리크톨라구스 쿠니쿨러스(*Oryctolagus cuniculus*), 플라스모디움 오발레(*Plasmodium ovale*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 프로피오니박테리움 애크네스(*Propionibacterium acnes*), 프로피오니박테리움 프레텐레이키 스페시스 셰르마니(*Propionibacterium fredenreichii* sp. *shermanii*), 프로피오니박테리움 프레우텐레이키(*Propionibacterium freudenreichii*), 프로피오니제눔 모데스툼(*Propionigenium modestum*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 아에루기노사 PA01, 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 푸티다 E23, 슈도모나스 푸티다 KT2440, 슈도모나스 스페시스(*Pseudomonas species*), 슈도모나스 스투트제리(*Pseudomonas stutzeri*), 랄스토니아 유티로파(*Ralstonia eutropha*), 랄스토니아 유티로파 H16, 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*), 로도박터 스파에로이데스(*Rhodobacter spaeroides*), 로도페락스 페리레듀센스(*Rhodoferrax ferrireducens*) DSM 15236, 로도스피릴룸 루브룸(*Rhodospirillum rubrum*), 로세이플렉수스 카스텐홀지(*Roseiflexus castenholzii*), 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 심몬드시아 킨시스(*Simmondsia chinensis*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 설포로부스 토크다이(*Sulfolobus tokodaii*), 설포로부스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*), 설포로부스 애시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*), 신티로포박터 푸마록시단스(*Syntrophobacter fumaroxidans*), 씨모코커스 리토탈리스(*Thermococcus litoralis*), 씨모토가 마리티메(*Thermotoga maritime*), 씨무스 씨모필루스(*Thermus thermophilus*), 트리코모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*) G3, 트리파노소마 부르세이(*Trypanosoma brucei*), 베일로넬라 파르블라(*Veillonella parvula*), 예르시니아 프레데리크세나이(*Yersinia frederiksenii*), 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 부티레이트 생산 세균 L2-50, 클로스트리듐 아미노부틸리쿰(*Clostridium aminobutyricum*), 제오바실러스 씨모글루코시다시우스(*Geobacillus thermoglucosidasius*), 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*) BCG, 노카르디아 파르시니카(*Nocardia farcinica*) IFM 10152, 노카르디아 이오웬시스(*Nocardia iowensis*) (스페시스 NRRL 5646), 페니실리움 크로소제눔(*Penicillium chrysogenum*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) ATCC 33277, 슈도모나스 멘도시나(*Pseudomonas mendocina*), 스트렙토마이세스 그리세우스 서브스페시스 그리세우스(*Streptomyces griseus* subsp. *griseus*) NBRC 13350뿐만 아니라 본 발명에 개시된 다른 예시적인 종들을 상응하는 유전자에 대한 미생물 공급원으로서 이용할 수 있다. 그러나, 395 개 미생물 계통 및 다양한 효모, 진균, 식물, 및 포유동물 계통들을 포함하여, 현재 550 초과 종들(이들 중 절반 이상을 NCBI와 같은 공개적인 데이터베이스 상에서 입수할 수 있다)에 대해 입수할 수 있는 완전한 계통 서열과 함께, 관련된 또는 떨어진 종들 중의 하나 이상의 유전자들에 대한 필수적인 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 활성을 암호화하는 유전자들의 동정, 예를 들어 공지된 유전자들의 상동 기관, 이

중 상동체, 상동체 및 비-이중 상동성 유전자 치환, 및 유기체들 간의 유전자 변경의 교환은 통상적이며 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 따라서, 에스케리키아 콜라이와 같은 특정 유기체에 관하여 본 발명에 개시된 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 생합성을 가능하게 하는 대사적 변경을 다른 미생물들, 예를 들어 원핵생물 및 진핵생물 유기체에도 마찬가지로 쉽게 적용할 수 있다. 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 하나의 유기체에서 예시된 대사적 변경을 다른 유기체에도 동등하게 적용할 수 있음을 알 것이다.

[0155] 일부 예에서, 예를 들어 대안적인 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로가 관련없는 종들에서 존재하는 경우, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성을, 예를 들어 유사하지만, 동일하지는 않은 대사 반응을 촉매화하는 상기 관련없는 종들로부터의 상동체 또는 상동체들의 외부 발현에 의해 숙주 종에 부여하여 상기 기준 반응을 대체할 수 있다. 대사 네트워크들 간에 어떤 차이가 상이한 유기체들 간에 존재하므로, 당해 분야의 숙련가들은 상이한 유기체들 간의 실제 유전자 사용이 상이할 수 있음을 알 것이다. 그러나, 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 또한 본 발명의 교시 및 방법을 본 발명에 예시된 것들과 동종의 대사 변경을 사용하는 모든 미생물 유기체들에 적용하여 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 합성하는 관심 종의 미생물 유기체를 제작할 수 있다.

[0156] 숙주 미생물 유기체를 예를 들어 세균, 효모, 진균 또는 발효 공정에 적용할 수 있는 임의의 다양한 다른 미생물들 중에서 선택할 수 있으며 상기 비-천연 미생물 유기체를 이들 중에서 생성시킬 수 있다. 예시적인 세균은 에스케리키아 콜라이, 클렙시엘라 옥시토카, 아나에로비오스피릴럼 숙시니시프로듀센스 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 액티노바실러스 숙시노제네스(*Actinobacillus succinogenes*), 만헤이미아 숙시니시프로듀센스, 리조븀 에틀리(*Rhizobium etli*), 바실러스 서브틸리스, 코리네박테리움 글루타미쿰, 글루코노박터 옥시단스, 자이모모나스 모빌리스, 락토코커스 락티스, 락토바실러스 플라타룸, 스트렙토마이세스 코엘리콜로르(*Streptomyces coelicolor*), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 슈도모나스 플루오레센스, 및 슈도모나스 푸티다 중에서 선택된 종을 포함한다. 예시적인 효모 또는 진균은 사카로마이세스 세레비지아에, 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루이베로마이세스 락티스, 클루이베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 아스퍼질러스 니거 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 중에서 선택된 종을 포함한다. 에스케리키아 콜라이가 특히 유용한 숙주 유기체인데, 그 이유는 유전 공학에 적합한 널리 특성화된 미생물 유기체이기 때문이다. 다른 특히 유용한 숙주 유기체는 효모, 예를 들어 사카로마이세스 세레비지아에를 포함한다. 다른 특히 유용한 숙주 유기체는 n-프로판올 및 아이소프로판올의 공동 생산을 위해 충분한 양의 프로피오닐-CoA 및/또는 아세틸-CoA를 자연적으로 생산하는 미생물 유기체를 포함한다. 상기와 같은 유기체의 예로는 비 제한적으로 클로스트리듐 프로피오니쿰, 에스케리키아 콜라이 및 프로피오니박테리움 프레우텐레이키이 서브스페시즈 세르마니이가 있다.

[0157] 비-천연 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA-생산 숙주의 발현 수준을 구성하고 시험하기 위한 방법을 예를 들어 당해 분야에 널리 공지된 제조합체 및 검출 방법에 의해 수행할 수 있다. 상기와 같은 방법들은 예를 들어 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York(2001)] 및 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD(1999)]에 개시되어 있다.

[0158] n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올의 생산을 위한 경로에 관여하는 외래 핵산 서열들을 당해 분야에 널리 공지된 기법들, 예를 들어 비 제한적으로 접합, 일렉트로포레이션, 화학적 변환, 형질도입, 형질감염, 및 초음파 변환을 사용하여 숙주 세포에 안정하게 또는 일시적으로 도입시킬 수 있다. 에스케리키아 콜라이 또는 다른 원핵 세포에서의 외부 발현을 위해서, 상기 유전자의 일부 핵산 서열 또는 진핵생물 핵산의 cDNA는 표적화 신호, 예를 들어 N-말단 미토콘드리아 또는 다른 표적화 신호를 암호화할 수 있으며, 상기 신호를 경우에 따라 원핵생물 숙주 세포로의 형질전환 전에 제거할 수 있다. 예를 들어, 미토콘드리아 리더 서열의 제거로 에스케리키아 콜라이에서의 발현이 증가되었다(Hoffmeister et al., J. Biol. Chem. 280:4329-4338(2005)). 효모 또는 다른 진핵생물 세포에서의 외부 발현을 위해서, 유전자를 리더 서열의 첨가 없이 시토솔에서 발현시키거나, 또는 미토콘드리아 또는 다른 세포 소기관에 표적화하거나, 또는 적합한 표적화 서열, 예를 들어 미토콘드리아 표적화 또는 상기 숙주 세포에 적합한 분비 신호의 첨가에 의해 분비에 대해 표적화할 수 있다. 따라서, 표적화 서열의 제거 또는 포함을 위한 핵산 서열에 대한 적합한 변형을 외래 핵산 서열에 결합시켜 바람직한 성질들을 부여할 수 있을 것으로 생각된다. 더욱 또한, 유전자에 대해 당해 분야에 널리 공지된 기법으로 코돈 최적화를 수행하

여 상기 단백질의 최적화된 발현을 성취할 수 있다.

- [0159] 숙주 유기체 중에서 작용성인 발현 조절 서열에 작동적으로 결합된, 본 발명에 예시된 바와 같은 핵산을 암호화하는 하나 이상의 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로를 포함하는 발현 벡터 또는 벡터들을 제작할 수 있다. 본 발명의 미생물 숙주 유기체에 사용하기에 적용 가능한 발현 벡터는 예를 들어 플라스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜 및 인공 염색체, 예를 들어 숙주 염색체 내로의 안정한 통합을 위해 작동 가능한 벡터 및 선택 서열 또는 마커를 포함한다. 또한, 상기 발현 벡터는 하나 이상의 선택성 마커 유전자 및 적합한 발현 조절 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어 항생제 또는 독소에 대한 내성, 상보성 영양요구성 결핍, 또는 배양 배지 중에 없는 결정적인 영양소를 제공하는 선택성 마커 유전자가 또한 포함될 수 있다. 발현 조절 서열은 당해 분야에 널리 공지된 구성 및 유도 프로모터, 전사 증진인자, 전사 종결자 등을 포함할 수 있다. 2 개 이상의 외래 암호화 핵산을 공동 발현시켜야 하는 경우, 상기 두 핵산을 모두 예를 들어 단일 발현 벡터 또는 별도의 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 단일 벡터 발현의 경우, 상기 암호화 핵산을 하나의 공통 발현 조절 서열에 작동적으로 결합시키거나 또는 상이한 발현 조절 서열, 예를 들어 하나의 유도 프로모터 및 하나의 구성 프로모터에 결합시킬 수 있다. 대사 또는 합성 경로에 관여하는 외래 핵산 서열의 형질전환을 당해 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 확인할 수 있다. 상기와 같은 방법은 예를 들어 핵산 분석, 예를 들어 mRNA의 노던 블롯 또는 폴리머라제 체 반응(PCR) 증폭, 또는 유전자 산물의 발현에 대한 면역블롯팅, 또는 도입된 핵산 서열 또는 그의 상응하는 유전자 산물의 발현을 시험하기 위한 다른 적합한 분석 방법을 포함한다. 당해 분야의 숙련가들은 상기 외래 핵산이 목적하는 생성물을 생산하기에 충분한 양으로 발현됨을 알 것이며, 발현 수준을 당해 분야에 널리 공지되고 본 발명에 개시된 바와 같은 방법을 사용하여 충분한 발현이 획득되도록 최적화할 수 있음을 또한 알 것이다.
- [0160] 방향 진화는 효소의 성질들을 개선 및/또는 변경시키기 위해서 특정 유전자에 표적화된 돌연변이의 도입을 수반하는 강력한 접근법이다. 개선 및/또는 변경된 효소를 다수의 효소 변체들(예를 들어 >10<sup>4</sup>)의 자동화된 선별을 허용하는 민감한 고속 대량 선별 분석의 개발 및 실행을 통해 확인할 수 있다. 반복되는 라운드의 돌연변이 및 선별을 전형적으로 수행하여 최적화된 성질을 갖는 효소를 제공한다. 돌연변이에 대한 유전자 영역을 확인하는데 일조할 수 있는 컴퓨터 연산방식이 또한 개발되었으며 이는 생성 및 선별에 필요한 효소 변체의 수를 현저하게 줄일 수 있다.
- [0161] 다양한 변체 라이브러리를 생성시키는데 유효한 다수의 방향 진화 기술들이 개발되었으며(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); and Sen et al., *Appl Biochem. Biotechnol* 143:212-223(2007)), 이들 방법은 다수의 효소 부류들에 걸쳐 광범위한 성질들의 개발에 성공적으로 적용되었다.
- [0162] 방향 진화 기술에 의해 개선되고/되거나 변경된 효소 특징들은 예를 들어 비-천연 기질 전환의 경우 선택성/특이성; 확고한 고온 처리의 경우 온도 안정성; 보다 낮거나 보다 높은 pH 조건 하에서 생물처리의 경우 pH 안정성; 높은 생성물 역가를 성취할 수 있도록 하기 위한 기질 또는 생성물 허용성; 비-천연 기질을 포함하도록 기질 결합을 확장시키는 결합(K<sub>m</sub>); 생성물, 기질 또는 핵심 중간체에 의한 억제제를 제거하기 위한 억제(K<sub>i</sub>); 목적하는 유출을 성취하기 위해 효소 반응 속도를 증가시키는 활성(kcat); 단백질 수율 및 전체 경로 유출을 증가시키는 발현 수준; 호기성 조건 하에서 공기 민감성 효소의 작용을 위한 산소 안정성; 및 산소의 부재 하에서 호기성 효소의 작용을 위한 혐기성 활성을 포함한다.
- [0163] 하기의 예시적인 방법들이 특정 효소들의 목적하는 성질들을 표적화하기 위한 유전자들의 돌연변이 및 변형을 위해 개발되었다. 이들 중 어느 것이든 사용하여 테카복실라제 효소의 활성을 변경/최적화할 수 있다.
- [0164] EpPCR(Pritchard et al., *J Theor. Biol* 234:497-509(2005))은 Mn<sup>2+</sup> 이온의 첨가에 의해 PCR 반응에서 DNA 폴리머라제의 충실도를 감소시키거나, dNTP 농도를 치우치게 하거나, 또는 다른 조건 변화에 의해 랜덤한 점 돌연변이를 도입시킨다. 돌연변이를 관심 표적 유전자에 국한하기 위한 5 단계 클로닝 공정은 1) 상기 관심 유전자의 실수유발 PCR 증폭; 2) 제한 효소 절단; 3) 목적하는 DNA 단편의 젤 정제; 4) 벡터 내로의 연결; 5) 유전자 변체의 적합한 숙주 내로의 형질전환 및 개선된 실행을 위한 상기 라이브러리의 선별을 수반한다. 상기 방법은 단일 유전자에서 다수의 돌연변이를 동시에 발생시킬 수 있으며, 이는 유용할 수 있다. 다수의 돌연변이체가 EpPCR에 의해 생성될 수 있으며, 따라서 고속 대량 선별 분석 또는 선택 방법(특히 로봇공학 사용)은 바람직한 특성들을 갖는 것들을 확인하는데 유용하다.

- [0165] 실수유발 회전 환 증폭(epRCA)(Fujii et al., *Nucleic Acids Res* 32:e145(2004); and Fujii et al., *Nat. Protoc.* 1:2493-2497(2006))은, 전체 환상 플라스미드가 주형으로서 사용되고 마지막 2 개의 뉴클레오타이드 상에 엑소뉴클레아제 내성 티오포스페이트 결합을 갖는 랜덤한 6-머들을 사용하여 상기 플라스미드를 증폭시킨 다음 세포 내로 형질전환시키고, 여기에서 상기 플라스미드를 직렬 반복부에서 다시 환화시킴을 제외하고, epPCR과 동일한 다수의 요소들을 갖는다. 상기  $Mn^{2+}$  농도를 조절하는 것은 상기 돌연변이율을 다소 변화시킬 수 있다. 상기 기법은 단순한 실수 유발, 단일 단계 방법을 사용하여 3 내지 4 개 돌연변이/kbp를 갖는 플라스미드의 전체 사본을 생성시킨다. 제한효소 절단이나 특정 프라이머들을 필요로 하지 않는다. 또한, 상기 방법을 전형적으로는 키트로서 입수할 수 있다.
- [0166] DNA 또는 패밀리 서플링(Stemmer, *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 91:10747-10751(1994); and Stemmer, *Nature* 370:389-391(1994))은 전형적으로는 Dnase I 또는 EndoV와 같은 뉴클레아제들로 2 개 이상의 변체 유전자를 절단하여 DNA 폴리머라제의 존재 하에서 어닐링 및 연장의 주기에 의해 재조립되어 키메라 유전자들의 라이브러리를 생성시키는 랜덤한 단편들의 풀을 생성시킴을 수반한다. 단편들은 서로 점화(prime)시키며 하나의 사본이 또 다른 사본을 점화(prime)할 때(주형 스위치) 재조합이 발생한다. 상기 방법을 >1kbp DNA 서열과 함께 사용할 수 있다. 단편 재조립에 의해 생성된 돌연변이 재조합체 이외에, 상기 방법은 연장 단계에서 실수 유발 PCR과 유사한 비율로 점 돌연변이를 도입시킨다. 상기 방법을, 항원성을 부여할 수도 있는 유해한 랜덤 중성 돌연변이를 제거하는데 사용할 수 있다.
- [0167] 엇갈린 연장(StEP)(Zhao et al., *Nat. Biotechnol* 16:258-261(1998))은 주형 점화에 이어서 변성 및 어닐링/연장의 매우 짧은 지속(5초 정도로 짧은)의 반복된 주기의 2 단계 PCR을 수반한다. 성장하는 단편들이 상이한 주형에 어닐링하고 추가로 연장되며, 이는 충분한 길이의 서열이 만들어질 때까지 반복된다. 주형 스위칭은 대부분의 생성 단편들이 다수의 어버이를 가짐을 의미한다. 저 충실도 폴리머라제들의 조합(Taq 및 뮤타자임)은 정반대의 돌연변이 스펙트럼으로 인해 실수유발 치우침을 감소시킨다.
- [0168] 랜덤 프라이밍 재조합(RPR)에서 랜덤 서열 프라이머를 사용하여 상기 주형의 상이한 분절들에 상보성인 다수의 짧은 DNA 단편들을 생성시킨다(Shao et al., *Nucleic Acids Res* 26:681-683(1998)). epPCR을 통한 염기 오결합(misincorporation) 및 오점화(mispriming)는 점 돌연변이를 제공한다. 짧은 DNA 단편들은 상동성을 근거로 서로 점화하고 재조합되며 반복된 열순환에 의해 완전한 길이로 재조립된다. 상기 단계에 앞서 주형의 제거는 낮은 어버이 재조합을 보장한다. 상기 방법은 대부분의 다른 방법들처럼 수 회의 반복에 걸쳐 수행되어 독특한 성질들을 진화시킬 수 있다. 이러한 기술은 서열 치우침을 피하며, 유전자 길이와 무관하고, 상기 용도를 위해 매우 적은 어버이 DNA를 필요로 한다.
- [0169] 이형 이중 가닥 재조합에서 선형화된 플라스미드 DNA를 사용하여 이형 이중 가닥을 형성시키며, 이는 불일치 수복에 의해 수복된다(Volkov et al., *Nucleic Acids Res* 27:e18(1999); and Volkov et al., *Methods Enzymol.* 328:456-463(2000)). 상기 불일치 수복 단계는 적어도 어느 정도 돌연변이 유발성이다. 이형 이중 가닥은 선형의 동형 이중 가닥보다 더 효율적으로 형질전환된다. 상기 방법은 큰 유전자 및 전체 오픈론에 적합하다.
- [0170] 일시적인 주형 상의 랜덤 키메라 발생(RACHITT)(Coco et al., *Nat. Biotechnol* 19:354-359(2001))은 Dnase I 단편화 및 ssDNA의 크기 분류를 사용한다. 동종 단편을 폴리머라제의 부재 하에서 상보성 ssDNA 골격에 하이브리드화한다. 임의의 중복되는 하이브리드화되지 않은 단편 단부들을 엑소뉴클레아제에 의해 다듬는다. 단편들 간의 틈을 채우고, 이어서 연결시켜 상기 골격(중폭을 방해하는 U를 함유한다)에 하이브리드화된 완전한 길이의 다양한 가닥들의 풀을 제공한다. 이어서 상기 골격을 파괴하고 PCR 증폭에 의해 상기 다양한 가닥에 상보성인 새로운 가닥으로 대체한다. 상기 방법은 오직 하나의 어버이로부터 나온 하나의 가닥(골격)을 수반하는 반면 상기 점화 단편들은 다른 유전자들로부터 유래하며; 상기 어버이 골격은 대비되게 선택된다. 따라서, 어버이 단편들과의 재 어닐링은 발생하지 않는다. 중복되는 단편들을 엑소뉴클레아제로 다듬는다. 그렇지 않으면, 이는 DNA 서플링 및 StEP와 개념상 유사하다. 따라서, 자매 세포가 없고, 불활성이 거의 없으며, 서플링되지 않은 어버이가 없어야 한다. 이러한 기법은 어버이 유전자가 거의 또는 전혀 생성되지 않으며 표준 DNA 서플링에 비해 다수의 보다 많은 교차들이 생성될 수 있다는 점에서 이점을 갖는다.
- [0171] 절두된 주형 상에서의 재조합 연장(RETT)은 주형의 풀로서 사용된 단일방향 ssDNA 단편들의 존재 하에서 프라이머들로부터 단일방향으로 성장하는 가닥들의 주형 스위칭을 수반한다(Lee et al., *J. Molec. Catalysis* 26:119-129(2003)). DNA 엔도뉴클레아제는 사용되지 않는다. 단일방향 ssDNA는 랜덤 프라이머와 DNA 폴리머라제에 의해 또는 엑소뉴클레아제에 의한 일련의 결실에 의해 제조된다. 단일 방향 ssDNA는 단지 주형이며

프라이머가 아니다. 랜덤 점화 및 엑소뉴클레아제는 DNA 서플링/RACHITT의 효소 절단의 사실로서 서열 치우침을 도입하지 않는다. RETT는 매우 짧은 연장 대신에 통상적인 PCR 조건을 사용하므로 StEP보다 최적화가 더 용이할 수 있다. 재조합은 상기 PCR 단계의 성분으로서 발생한다(직접 서플링이 없다). 상기 방법은 또한 중단의 부재로 인해 StEP보다 더 랜덤할 수 있다.

[0172] 퇴화된 올리고뉴클레오타이드 유전자 서플링(DOGS)에서 퇴화된 프라이머를 사용하여 분자들 간의 재조합을 조절한다(Bergquist and Gibbs, *Methods Mol. Biol.* 352:191-204(2007); Bergquist et al., *Biomol. Eng.* 22:63-72(2005); Gibbs et al., *Gene* 271:13-20(2001)). 이를 사용하여 어버이 유전자를 재생시키는 DNA 서플링과 같은 다른 방법의 의도를 억제할 수 있다. 이 방법을 선택된 유전자 분절의 랜덤 돌연변이(epPCR)와 병행할 수 있다. 이는 어버이 서열의 재형성을 차단하는 좋은 방법일 수 있다. 엔도뉴클레아제는 필요하지 않다. 제조된 분절들의 투입 농도를 조절함으로써, 목적하는 주쇄를 향해 기울일 수 있다. 상기 방법은 제한 효소 절단 없이 관련되지 않은 어버이로부터 DNA 서플링을 허용하며 랜덤한 돌연변이 방법의 선택을 허용한다.

[0173] 하이브리드 효소의 생성을 위한 점증적인 절두(ITCHY)는 관심 유전자 또는 유전자 단편의 1 염기쌍 결실과의 조합적인 라이브러리를 생성시킨다(Ostermeier et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96:3562-3567(1999); and Ostermeier et al., *Nat. Biotechnol.* 17:1205-1209(1999)). 절두를 2 개의 상이한 유전자 조각 상에서 반대 방향으로 도입시킨다. 이들을 함께 연결하고 융합물을 클로닝한다. 상기 기법은 상기 두 어버이 유전자들 간에 상동성을 필요로 하지 않는다. ITCHY를 DNA 서플링과 병행하는 경우, 상기 시스템을 SCRATCHY라 칭한다(하기 참조). 상기 둘의 주요 이점은 어버이 유전자들 간에 상동성이 필요하지 않다는 것이다; 예를 들어 이 콜라이와 인간 유전자 간의 작용성 융합물이 ITCHY를 통해 생성되었다. ITCHY 라이브러리가 제조되면, 모든 가능한 교차가 포착된다.

[0174] 상기 하이브리드 효소의 생산을 위한 티오-중분 절두(THIO-ITCHY)는, 포스포티올레이트 dNTP를 사용하여 절두를 생성시킴을 제외하고 ITCHY와 거의 동일하다(Lutz et al., *Nucleic Acids Res* 29:E16(2001)). ITCHY에 비해, THIO-ITCHY는 최적화하기에 보다 용이하고 보다 많은 재현성과 조절성을 제공할 수 있다.

[0175] SCRATCH는 2 개의 유전자 재조합 방법, 즉 ITCHY와 DNA 서플링을 겸한다. (Lutz et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98:11248-11253(2001)). SCRATCHY는 ITCHY와 DNA 서플링의 최상의 특징들을 겸비한다. 먼저, ITCHY를 사용하여 DNA 상동성-의존적인 방식으로 유전자 단편들 간의 종합적인 일련의 방식을 생성시킨다. 이어서 상기 인위적인 패밀리에 대해 DNA-서플링 단계를 수행하여 교차 수를 증대시킨다. 수치적인 예견을 최적화에 사용할 수 있다. 서열 일치성이 80% 이하인 경우 SCRATCHY가 DNA 서플링보다 더 유효하다.

[0176] 랜덤 표류 돌연변이(RNDM)에서 돌연변이는 epPCR에 이어서 유용한 활성을 보유하는 것들에 대한 선별/선택을 통해 이루어졌다(Bergquist et al., *Biomol. Eng.* 22:63-72(2005)). 이어서, 이들을 DOGS에 사용하여 다수의 활성 돌연변이체들 사이 또는 활성 돌연변이체와 일부 다른 바람직한 어버이 사이의 융합을 갖는 재조합체를 생성시킨다. 중립 돌연변이의 단리를 촉진하도록 디자인하는 목적은 보유된 촉매 활성이 원래의 유전자에서 보다 더 높은 더 낮은 간에 상기 활성을 선별하는 것이다. RNDM은 선별이 배경 이상의 활성을 검출할 수 있는 경우 고속 대량 분석에 사용 가능하다. RNDM을 다양성의 발생에 있어서 DOGS에 대한 전단(front end)으로서 사용하였다. 상기 기법은 서플링 또는 다른 후속 단계들에 앞서 활성에 대한 요구를 부과하며; 중립 표류 라이브러리는 보다 작은 라이브러리로부터 보다 높고/신속한 개선을 생성시키는 것으로 나타났다. epPCR을 사용함이 공개되었다 하더라도, 상기를 다른 대규모 돌연변이 방법들에 적용할 수 있다.

[0177] 서열 포화 돌연변이(SeSaM)는 1) 포스포티오에이트 뉴클레오타이드의 랜덤한 통합 및 절단을 사용하여 랜덤한 길이의 단편들의 풀을 생성시키고; 상기 풀을 주형으로서 사용하여 2) 이노신과 같은 "포변적인" 염기의 존재 하에서 연장시키고; 3) 이노신-함유 보체의 복제가 랜덤한 염기 통합 및 결과적으로 돌연변이를 제공하는 랜덤한 돌연변이 방법이다(Wong et al., *Biotechnol J.* 3:74-82(2008); Wong et al., *Nucleic Acids Res* 32:e26(2004); and Wong et al., *Anal. Biochem.* 341:187-189(2005)). 상기 기법을 사용하는 경우, 간단한 방법을 사용하여 2 내지 3일 이내에 돌연변이체의 큰 라이브러리를 생성시키는 것이 가능할 수 있다. 이는 DNA 폴리머라제의 돌연변이 치우침에 비해 매우 비 방향성이다. 상기 접근법의 차이는 상기 기법을 epPCR에 대해 상보성(또는 대안적)으로 만든다.

[0178] 합성 서플링에서, 중복되는 올리고뉴클레오타이드는 "표적 중의 모든 유전자 다양성"을 암호화하도록 디자인되며 상기 서플링된 자손에 대해 매우 높은 다양성을 허용한다(Ness, et al., *Nat. Biotechnol.* 20:1251-1255(2002)). 상기 기법에서, 상기 단편이 서플링되도록 디자인할 수 있다. 이는 상기 생성되는 자손의 다양성을 증가시키는데 일조한다. 보다 멀리 관련된 서열들을 보다 밀접하게 관련된 서열들에 접근하는 비율로

재조합하기 위해서 서열/코돈 치우침을 디자인할 수 있으며 이는 상기 주형 유전자들을 물리적으로 소유할 것을 요구하지 않는다.

- [0179] 뉴클레오타이드 교환 및 절제 기술 NexT는 dUTP 통합에 이은 유라실 DNA 글리코실라제 및 이어서 피페리딘에 의한 처리의 조합을 활용하여 중점 DNA 단편화를 수행한다(Muller et al., *Nucleic Acids Res* 33:e117(2005)). 상기 유전자를 교정 폴리머라제와 함께 내부 PCR 프라이머 연장을 사용하여 재조합한다. 상기 서플링의 크기는 변하는 dUPT::dTTP 비를 사용하여 직접 조절할 수 있다. 이는 간단한 유라실 통합 및 절단 방법을 사용하는 중점 반응이다. 상기 방법에 다른 뉴클레오타이드 동족체, 예를 들어 8-옥소-구아닌을 사용할 수 있다. 또한, 상기 기법은 매우 짧은 단편(86 pb)으로 잘 작용하며 낮은 오류율을 갖는다. DNA의 화학적 절단은 매우 적은 서플링되지 않은 클론들을 의미한다.
- [0180] 서열 상동성-독립적인 단백질 재조합(SHIPREC)에서 링커를 사용하여 2 개의 먼/관련되지 않은 유전자들 간의 융합을 촉매화하며; 뉴클레아제 처리를 사용하여 상기 둘 사이에 일련의 키메라들을 생성시킨다. 그 결과 이들 융합물의 단일 교차 라이브러리가 생성된다(Sieber et al., *Nat.Biotechnol* 19:456-460(2001)). 이는 제한된 유형의 서플링을 생성시키며; 돌연변이는 별도의 공정이다. 상기 기법은 2 개의 관련되지 않은 어버이 유전자들 각각의 변하는 분획들을 갖는 키메라의 라이브러리를 생성시킬 수 있다. 상동성은 필요하지 않다. SHIPREC을 포유동물 CP450의 N-말단 부위에 융합된 세균 CP450의 헴-결합 도메인으로 시험하였으며; 이는 보다 용해성인 효소에서 포유동물 활성을 생성시켰다.
- [0181] 유전자 부위 포화 돌연변이<sup>TM</sup>(GSSM<sup>TM</sup>)에서 출발 물질은 삽입물이 있는 초나선(supercoiled) dsDNA 플라스미드이며 2 개의 프라이머가 목적하는 돌연변이 부위에서 퇴화된다(Kretz et al., *Methods Enzymol.* 388:3-11(2004)). 프라이머는 관심 돌연변이를 지니며 DNA의 반대 가닥 상의 동일한 서열에 어닐링하고; 상기 프라이머의 가운데에 돌연변이 및 양쪽의 측면에 정확한 서열의 약 20 뉴클레오타이드. 상기 프라이머 중의 서열은 NNN 또는 NNK(암호화) 및 MNN(비 암호화)(N = 모두 4 개, K = G,T, M = A,C)이다. 연장 후에, DpnI를 사용하여 댐-메틸화된 DNA를 절단하여 야생형 주형을 제거한다. 상기 기법은 주어진 유전자 좌(즉 하나의 코돈)에서 모든 가능한 아미노산 치환들을 조사한다. 상기 기법은 년센스 코돈 및 대부분의 가능한 대립유전자들의 동일하거나 거의 동일한 표시 없이 하나의 부위에서 모든 가능한 치환의 발생을 촉매화한다. 상기 표적 효소의 구조, 기전, 또는 도메인에 대한 선행 지식은 필요하지 않다. 서플링 또는 유전자 재조합이 이어지는 경우, 상기 기술은 단일 부위 상향 돌연변이의 모든 가능한 조합들을 함유하는 다양한 재조합체 라이브러리를 생성시킨다. 상기 기술 조합의 유용성은 50 개 이상의 상이한 효소들의 성공적인 진화, 및 또한 주어진 효소에서의 하나보다 많은 성질에 대해 입증되었다.
- [0182] 조합적인 카세트 돌연변이(CCM)는 한정된 부위들을 다수의 가능한 아미노산 서열 변경으로 대체하는 짧은 올리고뉴클레오타이드 카세트의 사용을 포함한다(Reidhaar-Olson et al. *Methods Enzymol.* 208:564-586(1991); and Reidhaar-Olson et al. *Science* 241:53-57(1988)). 2 또는 3 개 부위들에서의 동시 치환이 상기 기법을 사용하여 가능하다. 또한, 상기 방법은 제한된 범위의 부위들에서 대다수의 가능한 서열 변화들을 시험한다. 이는 램다 억제인자 DNA-결합 도메인의 정보 내용을 탐구하는데 사용되었다.
- [0183] 조합적인 복합 카세트 돌연변이(CMCM)는 보다 큰 프로그램의 일부로서 사용됨을 제외하고 CCM과 본질적으로 유사하다, 즉 1) 높은 돌연변이율 내지 2) ID 다발점 및 다발 영역에서 epPCR의 사용 및 이어서 3) CMCM에 의한 연장으로 단백질 서열 공간의 한정된 부위를 포함한다(Reetz, M.T., S. Wilensek, D.Zha, and K.E. Jaeger, 2001, *Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis.* *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591). CCM과 같이, 상기 방법은 표적 부위에 걸쳐 사실상 모든 가능한 변경들을 시험할 수 있다. 랜덤 돌연변이 및 서플링된 유전자를 생성시키는 방법들과 함께 사용되는 경우, 다양한, 서플링된 단백질을 탁월한 생성 수단을 제공한다. 상기 접근법은 효소의 거울상 선택성을 51배까지 성공적으로 증가시켰다.
- [0184] 돌연변이 유발 균주 기법에서 조합적인 *ts* 돌연변이유발 플라스미드는 선택 중에 랜덤한 천연 돌연변이 빈도의 20- 내지 4000-X의 증가를 허용하고 선택이 필요하지 않은 경우 유해 돌연변이의 축적을 방지한다(Selifonova et al., *Appl Environ Microbiol* 67:3645-3649(2001)). 상기 기술은 플라스미드-유래된 mutD5 유전자를 기본으로 하며, 상기 유전자는 DNA 폴리머라제 III의 돌연변이 아단위를 암호화한다. 상기 아단위는 내생적인 DNA 폴리머라제 III에 결합하고 상기 플라스미드를 갖고 있는 균주들 중 임의의 균주에서 폴리머라제 III의 교정 능력을 절충한다. 광범위한 염기 치환 및 프레임이동 돌연변이가 발생한다. 유효한 사용을 위해서, 일단 목적하는 표현형이 성취되면 상기 돌연변이 유발 플라스미드를 제거해야 하며; 이는 온도 민감

성 복제 기원을 통해 수행되고, 이는 41 °C에서 플라스미드 경화를 허용한다. 돌연변이 유발 균주가 상당한 기간 동안 탐구되었음을 알아야 한다(예를 들어 문헌[Low et al., J. Mol. Biol. 260:359-3680(1996)]을 참조 하시오). 상기 기법에서 매우 높은 자발적인 돌연변이율이 관찰된다. 상기 조건적인 성질은 목적하지 않는 배경 돌연변이를 최소화한다. 이러한 기술을 적용 진화와 병행하여 돌연변이 발생률을 증대시키고 목적하는 표현형들을 보다 신속하게 성취할 수 있었다.

[0185] "룩-스루(Look-Through) 돌연변이(LTM)는 선택된 아미노산들의 조합적인 돌연변이들을 평가하고 최적화하는 다차원적 돌연변이 방법이다"(Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A 102:8466-8471(2005)). 각 부위를 모든 가능한 아미노산 변화들로 포화시키는 것보다 오히려, 아미노산 R-그룹 화학의 범위를 포함하도록 9 개의 세트를 선택한다. 부위당 더 적은 변화는 다수의 부위가 상기 유형의 돌연변이를 쉽게 일으키게 한다. 낮은 나노몰에서부터 피코몰까지의 항체의 결합 친화성의 >800 배 증가가 상기 방법을 통해 성취되었다. 이는 랜덤한 조합의 수를 최소화하는데 합리적인 접근법이며 선별할 클론들의 수를 크게 감소시킴으로써 개선된 특성을 찾는 능력을 증가시킬 것이다. 이를 항체 공학, 구체적으로 결합 친화성을 증가시키고/시키거나 해리를 감소시키는데 적용하였다. 상기 기법을 선별 또는 선택과 병행할 수 있다.

[0186] 유전자 재조합은 한번에 다수의 유전자에 적용되거나 또는 단일 유전자의 큰 키메라 라이브러리(다수의 돌연 변이)를 생성시키는데 적용될 수 있는 DNA 서플링 방법이다(베레늄 코포레이션(Verenium Corporation)에 의해 공급된 Tunable GeneReassembly™ (TGR™) 기술). 전형적으로 상기 기술을, 상기 나타낸 서열 공간을 목적하는 개선에 대해 질문하기 위해 초고속 대량 선별과 함께 사용한다. 상기 기법은 상동성과 무관하게 다수의 유전자 재조합을 허용한다. 교차 사건들의 정확한 수 및 위치를 생물정보 분석을 통해 디자인된 단편들을 사용하여 미리 측정할 수 있다. 상기 기술은 실질적으로 어버이 유전자 재형성 없이 낮은 수준의 불활성 유전자와 함께 매우 높은 수준의 다양성을 도출시킨다. GSSM™과 병행 시, 큰 범위의 돌연변이들을 개선된 활성에 대해 시험할 수 있다. 상기 방법은 DNA 서플링의 "블렌딩" 및 "미세 조정"을 허용한다, 예를 들어 코돈 사용을 최적화할 수 있다.

[0187] 인 실리코(In silico) 단백질 디자인 자동화 PDA는 특정한 주름을 갖는 구조적으로 한정된 단백질 주쇄를 고정시키고 상기 주름 및 전체 단백질 에너지학을 안정화할 수 있는 아미노산 치환을 위한 서열 공간을 탐색하는 최적화 연산방식이다(Hayes et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 99:15926-15931(2002)). 상기 기술은 단백질 아미노산 변이에 대한 구조적 허용성을 탐색하기 위해서 인 실리코 구조 기제 엔트로피 예견을 허용한다. 통계 역학을 각 위치에서의 커플링 상호작용을 계산하는데 적용한다, 즉 아미노산 치환에 대한 구조 허용성이 커플링의 척도이다. 최종적으로, 상기 기술은 구조 특징들의 완전성을 유지하면서 단백질 성질의 목적하는 변형들을 제공하도록 디자인된다. 상기 방법은 매우 큰 수의 가능한 서열 변형들( $10^{50}$ )의 필터링을 계산적으로 평가하고 허용한다. 시험하기 위한 서열 변형의 선택은 가장 유리한 열역학에 근거한 예견과 관련되며 외면상 오직 안정성 또는 안정성과 연결된 성질들만이 상기 기술에 의해 유효하게 다루어질 수 있다. 상기 방법은 일부 치료학적 단백질들, 특히 공학용 면역글로불린에 성공적으로 사용되었다. 인 실리코 예견은 대단히 많은 수의 잠재적인 변형들을 시험하는 것을 피한다. 기존 3차원 구조에 근거한 예견이 가설적인 구조에 근거한 예견보다 더 성공할 듯하다. 상기 기술은 다수의 동시적인 돌연변이들, 급격한 수의 증가로 인해 순수하게 실험적인 기술들로는 가능하지 않은 것들의 표적화된 선별을 쉽게 예견할 수 있으며 이를 허용한다.

[0188] 반복하는 포화 돌연변이(ISM)는 1) 효소 개선에 가능한 부위를 선택하기 위한 구조/작용 지식의 사용, 2) 스트라타진 퀵체인지(Stratagene QuikChange)(또는 다른 적합한 수단들)를 사용하는 선택된 부위에서의 포화 돌연변이, 3) 목적하는 성질에 대한 선별/선택, 4) 개선된 클론(들)과 함께, 또 다른 부위에서의 다시 시작 및 연속적인 반복을 수반한다(Reetz et al., Nat. Protoc. 2:281-903(2007); and Reetz et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. 45:7745-7751(2006)). 이는 주어진 위치에서 모든 가능한 치환들이 선별/선택에 대해 수행됨을 보장하는 입증된 방법이다.

[0189] 상기 언급한 돌연변이 방법들 중 임의의 방법을 단독으로 사용하거나 병행할 수 있다. 또한, 상기 방향 진화 방법들 중 어느 하나 또는 조합을 적용 진화 기법들과 함께 사용할 수 있다.

[0190] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-프로판올 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖고, 상기 n-프로판올 경로는 프로피온알데하이드 데하이드로게나제, 프로판올 데하

이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오네이트 리덕타제 또는 프로피오닐 포스페이트 리덕타제를 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함한다.

[0191] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 방법은 아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 아세틸-CoA 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하며, 이때 상기 아세틸-CoA 경로는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도 리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 또는 포메이트 데하이드로게나제를 포함한다.

[0192] 추가의 실시태양에서, 상기 방법은 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하며, 이때 상기 프로피오닐-CoA 경로는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 뮤타제, 메틸말로닐-CoA 에피머라제 또는 메틸말로닐-CoA 데카복실라제를 포함한다. 추가의 태양에서, 상기 프로피오닐-CoA 경로는 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 포함한다.

[0193] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 방법은 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하며, 이때 상기 프로피오닐-CoA 경로는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 쓰레오닌 데아미나제, 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제를 포함한다. 추가의 태양에서, 상기 n-프로판올 경로는 2-옥소부타노에이트 데카복실라제를 포함한다.

[0194] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 방법은 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하며, 이때 상기 프로피오닐-CoA 경로는 아세틸-CoA 카복실라제, 말로닐-CoA 리덕타제, 말로네이트 세미알 데하이드 리덕타제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제를 포함한다.

[0195] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 방법은 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하며, 이때 상기 프로피오닐-CoA 경로는 락테이트 데하이드로게나제, 락테이트-CoA 트랜스퍼라제, 락틸-CoA 데하이드라타제 또는 아크릴로일-CoA 리덕타제를 포함한다.

[0196] 더욱 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-프로판올 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0197] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 방법은 아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 아세틸-CoA 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 피루베이트 키나제; 및 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 및

포메이트 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0198] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 방법은 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 말레이트 데하이드로게나제; 퓨마라제; 퓨마레이트 리덕타제; 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제; 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 및 메틸말로닐-CoA 데카복실라제를 암호화한다. 추가의 태양에서, 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 메틸말로닐-CoA 에피머라제 또는 피루베이트 카복실라제를 추가로 암호화한다.

[0199] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 방법은 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 쓰레오닌 데아미나제; 및 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제를 암호화한다. 추가의 태양에서, 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 메틸말로닐-CoA 데카복실라제 또는 피루베이트 카복실라제를 추가로 암호화한다. 더욱 또 다른 태양에서, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 2-옥소부타노에이트 데카복실라제를 추가로 암호화한다.

[0200] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 방법은 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 아세틸-CoA 카복실라제; 말로닐-CoA 리덕타제; 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제; 및 프로피오닐-CoA 신시타제를 암호화한다.

[0201] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 방법은 락테이트 데하이드로게나제; 락테이트-CoA 트랜스퍼라제; 락틸-CoA 데하이드라타제; 및 아크릴로일-CoA 리덕타제를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함한다.

[0202] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-프로판올 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고, 이때 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 말레이트 데하이드로게나제; 퓨마라제; 퓨마레이트 리덕타제; 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제; 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 데카복실라제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제 및 프로피오닐 포스페이트 리덕타제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0203] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-프로판올 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고, 이때 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 쓰레오닌 데아미나제; 및 2-옥소부타노에이트 데카복실라제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프

로관을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다. 추가의 태양에서, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 추가로 암호화한다.

[0204] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-프로판올 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고, 이때 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 피루베이트 키나제; 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 카복실라제; 말로닐-CoA 리덕타제; 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제; 프로피오닐-CoA 신시타제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0205] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-프로판올 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 포함하고, 이때 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 락테이트 데하이드로게나제; 락테이트-CoA 트랜스퍼라제; 락틸-CoA 데하이드라타제; 아크릴로일-CoA 리덕타제; 및 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제; 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0206] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-프로판올의 제조 방법을 제공하고, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하며, 상기 n-프로판올 경로는 프로피온알데하이드 데하이드로게나제, 프로판올 데하이드로게나제, 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오네이트 리덕타제 또는 프로피오닐 포스페이트 리덕타제를 포함한다.

[0207] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 n-프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 n-프로판올의 제조 방법을 제공하며, 이때 상기 n-프로판올 경로는 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산 세트는 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA:포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피

오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 키나제, 프로피오닐 포스페이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제; 또는 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 또는 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 프로피오닐-CoA 신시타제, 프로피오네이트 리덕타제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0208] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 프로판올의 제조 방법은 또한 본 발명에 예시된 바와 같이 프로피오닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 프로피오닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산을 포함하는 프로피오닐-CoA 경로를 갖는 n-프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함한다. 예를 들어 일부 태양에서, 상기 외래 핵산은 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 뮤타제 또는 메틸말로닐-CoA 데카복실라제를 암호화한다. 또 다른 태양에서, 상기 외래 핵산은 메틸말로닐-CoA 에피머라제를 추가로 암호화한다. 또한, 상기 실시태양의 더욱 또 다른 태양에서, 상기 프로판올의 제조 방법은 n-프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 n-프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖는 n-프로판올 경로를 갖는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하며, 여기에서 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제; 말레이트 데하이드로게나제; 퓨마라제; 퓨마레이트 리덕타제; 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제; 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 메틸말로닐-CoA 데카복실라제; 프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0209] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖고, 상기 14-BDO 경로는 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제, 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함한다.

[0210] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖고, 상기 13-BDO 경로는 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 또는 3-하이드록시부티레이트 리덕타제, 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 포함하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함한다.

[0211] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖고, 상기 MAA 경로는 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제, 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제, 메틸말로닐-CoA 뮤타제, 메틸말로닐-CoA 에피머라제,

메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제, 메틸말로네이트 리덕타제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성) 또는 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 포함하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 포함한다.

[0212] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 미생물 유기체는 아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 아세틸-CoA 경로를 가지며, 상기 아세틸-CoA 경로는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소 및 포메이트 데하이드로게나제를 포함한다.

[0213] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 미생물 유기체는 숙시닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 숙시닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 하나 이상의 외래 핵산을 갖는 숙시닐-CoA 경로를 가지며, 상기 숙시닐-CoA 경로는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 또는 숙시닐-CoA 신시타제를 포함한다. 추가의 태양에서, 상기 숙시닐-CoA 경로는 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 포함한다.

[0214] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0215] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0216] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0217] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

드록시부티레이트 키나제; 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제; 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0218] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 및 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0219] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 및 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성); 및 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0220] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0221] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0222] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로

관올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0223] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제; 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0224] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 및 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0225] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 및 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0226] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0227] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프

로관을 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0228] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0229] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0230] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0231] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0232] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라

타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0233] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0234] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0235] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제; 3-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0236] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0237] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경

로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제; 크로토나제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0238] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0239] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0240] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0241] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시닐-CoA 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세

토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0242]

하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0243]

하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 또는 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0244]

하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4-하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제 또는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0245]

하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 숙시네이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제; 4 하이드록시부티레이트 키나제; 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제; 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제; 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제; 및 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제 또는 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0246]

하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알데하이드-형성); 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프

로관을 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0247] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 메틸말로닐-CoA 류타제; 메틸말로닐-CoA 에피머라제; 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제 또는 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제; 메틸말로네이트 리덕타제; 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0248] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 메틸말로닐-CoA 류타제; 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제 또는 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제; 메틸말로네이트 리덕타제; 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제; 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0249] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 메틸말로닐-CoA 류타제; 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성); 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하며, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 아세틸-CoA 아세틸 티올라제; 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제; 아세토아세테이트 데카복실라제; 및 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0250] 상기 실시태양의 추가의 태양에서, 상기 미생물 유기체는 아세틸-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아세틸-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 아세틸-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 피루베이트 키나제; 및 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제; 또는 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 또는 포메이트 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0251] 또 다른 추가의 실시태양에서, 상기 미생물 유기체는 숙시닐-CoA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 숙시닐-CoA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 3 세트를 갖는 숙시닐-CoA 경로를 가지며, 이때 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제 및 숙시닐-CoA 신시타제를 암호화한다. 추가의 태양에서, 상기 외래 핵산의 제 3 세트는 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 피루베이트 카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 추가로 암호화한다.

[0252] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 14-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 14-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 14-BDO 경로는 14-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 14-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 피루베이트 카복실라제, 메

틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 리덕타제; 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성), 및 4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 포메이트 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0253] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 13-BDO 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 13-BDO 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 13-BDO 경로는 13-BDO를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 13-BDO 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 피루베이트 카복실라제, 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제, 크로토나제, 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티레이트 리덕타제; 및 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 포메이트 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0254] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 피루베이트 카복실라제, 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 리덕타제, 숙시네이트 리덕타제, 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티레이트 키나제, 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제, 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 신시타제, 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 포메이트 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0255] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 MAA 경로 및 아이소프로판올 경로를 갖는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 배양함을 포함하는 MAA 및 아이소프로판올의 제조 방법을 제공하며, 상기 MAA 경로는 MAA를 생산하기에 충분한 양으로 발현된 MAA 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 1 세트를 갖고, 상기 외래 핵산의 제 1 세트는 PEP 카복시키나제, PEP 카복실라제, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 숙시닐-CoA 신시타제, 피루베이트 카복실라제, 메틸말로닐-CoA 카복시트랜

스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 류타제, 메틸말로닐-CoA 에피머라제, 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제, 메틸말로네이트 리덕타제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알데하이드-형성), 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제, 메틸말로닐-CoA 리덕타제(알콜-형성) 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제를 암호화하고, 상기 아이소프로판올 경로는 아이소프로판올을 생산하기에 충분한 양으로 발현된 아이소프로판올 경로 효소를 암호화하는 외래 핵산의 제 2 세트를 포함하고, 상기 외래 핵산의 제 2 세트는 피루베이트 키나제, 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제, 피루베이트 포메이트 라이아제, 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소, 포메이트 데하이드로게나제, 아세틸-CoA 아세틸 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 아세토아세테이트 데카복실라제 또는 아이소프로판올 데하이드로게나제를 암호화한다.

[0256] 상기 실시태양들 각각의 추가의 태양에서, 상기 외래 핵산은 이중 핵산이다.

[0257] 상기 실시태양들 각각의 추가의 태양에서, 상기 조건은 실질적으로 혐기성인 배양 조건을 포함한다.

[0258] 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 생산을 시험하기에 적합한 정제 및/또는 분석을 널리 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 3중 배양물과 같은 적합한 복제물을, 시험하려는 각각의 조작된 균주에 대해 생육시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 조작된 생산 숙주 중의 생성물 및 부산물 형성을 모니터링할 수 있다. 최종 생성물 및 중간체, 및 다른 유기 화합물들을 HPLC(고성능 액체 크로마토그래피), GC-MS(기체 크로마토그래피-질량 분광학) 및 LC-MS(액체 크로마토그래피-질량 분광학) 또는 당해 분야에 널리 공지된 통상적인 과정을 사용하는 다른 적합한 분석 방법에 의해 분석할 수 있다. 발효 브로쓰 중의 생성물의 방출을 또한 배양 상등액을 사용하여 시험할 수 있다. 부산물 및 잔류 글루코스를 예를 들어 글루코스 및 알콜의 경우 굴절률 검출기, 및 유기산의 경우 UV 검출기(Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779(2005))를 사용하는 HPLC, 또는 당해 분야에 널리 공지된 다른 적합한 분석 및 검출 방법에 의해 정량분석할 수 있다. 상기 외래 DNA 서열로부터의 개별적인 효소 또는 단백질 활성을 당해 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 분석할 수 있다. 다양한 알콜을 문헌[Atsumi et al. *Metab Eng*(2007)] 및 [Hanai et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7814-7818(2007)]에 개시된 바와 같은 화염 이온화 검출기를 사용하여 기체 크로마토그래피에 의해 정량분석할 수 있다.

[0259] 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 당해 분야에 널리 공지된 다양한 방법을 사용하여 상기 배양물 중의 다른 성분들로부터 분리시킬 수 있다. 상기와 같은 분리 방법은 예를 들어 추출 과정뿐만 아니라 연속적인 액체-액체 추출, 투석 증발, 막 여과, 막 분리, 역삼투, 전기투석, 증류, 결정화, 원심분리, 추출 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 및 한외여과를 포함한다. 상기 방법들은 모두 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

[0260] 본 발명에 개시된 비-천연 미생물 유기체들 중 어느 것이든 본 발명의 생합성 산물을 생성 및/또는 분리하도록 배양할 수 있다. 예를 들어, 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생산자를 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 생합성 생산을 위해 배양할 수 있다.

[0261] n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 생산을 위해서, 상기 재조합 균주를 탄소원 및 다른 필수 영양소를 갖는 배지에서 배양한다. 전체 공정의 비용을 줄이기 위해서 상기 발효기 중에 혐기성 조건을 유지시키는 것이 매우 바람직하다. 상기와 같은 조건은 예를 들어 먼저 상기 배지를 질소로 살포하고 이어서 상기 플라스크를 격막 및 크림프(crimp)-뚜껑으로 밀봉하여 획득할 수 있다. 생육이 혐기성 조건 하에서 관찰되지 않는 균주의 경우, 상기 격막에 제한된 통기를 위한 작은 구멍을 뚫어 미세 호기성 조건을 적용시킬 수 있다. 예시적인 혐기성 조건은 앞서 개시되었으며 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예시적인 호기성 및 혐기성 조건들은 예를 들어 2007년 8월 10일자로 출원된, 미국 공보 제 US-2009-0047719 호에 개시되어 있다. 발효를 본 발명에 개시된 바와 같이 배치, 유가 또는 연속 방식으로 수행할 수 있다.

[0262] 경우에 따라, 상기 배지의 pH를 필요에 따라 목적하는 pH에서 유지시키기 위해 염기, 예를 들어 NaOH 또는 다른 염기, 또는 산의 첨가에 의해 목적하는 pH, 특히 중성 pH, 예를 들어 대략 7의 pH에서 유지시킬 수 있다. 생육물을 분광광도계(600 nm)를 사용하여 광학 밀도를 측정함으로써 측정할 수 있고 글루코스 흡수율을 시간 에 따른 탄소원 고갈을 모니터링함으로써 측정할 수 있다.

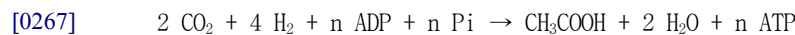
[0263] 상기 생육 배지는 예를 들어 상기 비-천연 미생물에 탄소 원을 공급할 수 있는 임의의 탄수화물 공급원을 포함할 수 있다. 상기와 같은 공급원은 예를 들어 당, 예를 들어 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노오스, 프럭토스, 슈크로스 및 전분을 포함한다. 탄수화물의 다른 공급원으로는 예를 들어 재생 가능한 공급원료 및 바이오매스가 있다. 본 발명의 방법에 공급원료로서 사용될 수 있는 예시적인 유형의 바이오매

스는 셀룰로스 바이오매스, 헤미셀룰로스 바이오매스 및 리그닌 공급원료 또는 공급원료의 부분들을 포함한다. 상기와 같은 바이오매스 공급원료는 예를 들어 탄소 원으로서 유용한 탄수화물 기질, 예를 들어 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노오스, 프럭토스 및 전분을 포함한다. 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 상기 예시된 것들 이외의 재생 가능한 공급원료 및 바이오매스를 또한 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 생산을 위한 본 발명의 미생물 유기체의 발현에 사용할 수 있음을 알 것이다.

[0264] 상기 예시된 바와 같은 재생 가능한 공급 원료 이외에, 본 발명의 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올 미생물 유기체를 그의 탄소 원으로서 합성 가스상에서의 생육을 위해 변형시킬 수 있다. 상기 특정 실시태양에서, 하나 이상의 단백질 또는 효소를 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생산 유기체 중에서 발현시켜 합성 가스 또는 다른 기상 탄소 원의 사용을 위한 대사 경로를 제공한다.

[0265] 합성 가스(또한 합성 기체 또는 생산자 기체로서 공지됨)는 농작물 및 잔사를 포함한, 바이오매스 물질과 같은 탄소성 물질 및 목탄 기화의 주 생성물이다. 합성 가스는 주로 H<sub>2</sub>와 CO의 혼합물이며 임의의 유기 공급원료, 예를 들어 비 제한적으로 석탄, 석유, 천연 가스, 바이오매스 및 폐 유기 물질의 기화로부터 수득될 수 있다. 기화는 일반적으로 높은 연료 대 산소 비 하에서 수행된다. 합성가스는 주로 H<sub>2</sub> 및 CO이지만, CO<sub>2</sub> 및 다른 가스들도 보다 소량으로 또한 포함할 수 있다. 따라서, 합성 가스는 비용 효과적인 기상 탄소원, 예를 들어 CO 및 추가로 CO<sub>2</sub>를 제공한다.

[0266] 우드 정달(Wood-Ljungdah1) 경로는 CO 및 H<sub>2</sub>의 아세틸-CoA 및 다른 산물들, 예를 들어 아세테이트로의 전환을 촉매화한다. CO 및 합성 가스를 사용할 수 있는 유기체들은 또한 일반적으로 상기 우드 정달 경로에 의해 포함되는 동일한 기본적인 효소 및 형질전환 조합을 통해 CO<sub>2</sub> 및 CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 혼합물을 사용하는 능력을 갖는다. 미생물에 의한 CO<sub>2</sub>의 아세테이트로의 H<sub>2</sub>-의존성 전환은, CO가 또한 동일한 유기체에 의해 사용될 수 있고 동일한 경로들이 관련된 것이 밝혀지기 전까지 오랫동안 인정되었다. 다수의 아세토젠(acetogen)이 CO<sub>2</sub>의 존재 하에서 증식하며 필요한 환원 당량을 공급하기 위해서 수소가 존재하는 한 아세테이트와 같은 화합물을 생산하는 것으로 나타났다(예를 들어 문헌[Drake, Acetogenesis, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994)]을 참조하시오). 이를 하기식에 의해 요약할 수 있다:



[0268] 따라서, 상기 우드 정달 경로를 갖는 비-천연 미생물은 아세틸-CoA 및 다른 목적하는 생성물의 생산을 위해서 CO<sub>2</sub> 및 H<sub>2</sub> 혼합물을 또한 사용할 수 있다.

[0269] 상기 우드 정달 경로는 당해 분야에 널리 공지되어 있으며 2 개의 가지로 분리될 수 있는 12 개의 반응들로 이루어진다: (1) 메틸 가지; 및 (2) 카보닐 가지. 상기 메틸 가지는 합성 가스를 메틸-테트라하이드로폴레이트(메틸-THF)로 전환시키는 반면 상기 카보닐 가지는 메틸-THF를 아세틸-CoA로 전환시킨다. 상기 메틸 가지에서의 반응들은 하기의 효소들 또는 단백질들에 의해 차례대로 촉매화된다: 페레독신 옥시도리덕타제, 포메이트 데하이드로게나제, 폼일테트라하이드로폴레이트 신시타제, 메틸테트라하이드로폴레이트 사이클로데하이드라타제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제 및 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제. 상기 카보닐 가지에서의 반응들은 하기의 효소들 또는 단백질들에 의해 차례대로 촉매화된다: 메틸테트라하이드로폴레이트:코리노이드 단백질 메틸트랜스퍼라제(예를 들어 AcsE), 코리노이드 철-황 단백질, 니켈-단백질 조립 단백질(예를 들어 AcsF), 페레독신, 아세틸-CoA 신시타제, 일산화 탄소 데하이드로게나제 및 니켈-단백질 조립 단백질(예를 들어 CooC). n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로를 생성시키는 것에 충분한 수의 암호화 핵산을 도입시키기 위해 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 숙주 유기체 중에 존재하지 않는 상기 우드 정달 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 도입시키는 것에 관하여 동일한 공학 디자인을 또한 수행할 수 있음을 알 것이다. 따라서, 변형된 유기체가 완전한 우드 정달 경로를 함유하도록 하나 이상의 암호화 핵산을 본 발명의 미생물 유기체에 도입시키는 것은 합성가스 사용 능력을 부여할 것이다.

[0270] 또한, 환원적 (역) 트라이카복실산 주기 및/또는 하이드로게나제 활성을 또한 CO, CO<sub>2</sub> 및/또는 H<sub>2</sub>의 아세틸-CoA 및 다른 생성물, 예를 들어 아세테이트로의 전환에 사용할 수 있다. 상기 환원적 TCA 경로를 통해 탄소

를 고정할 수 있는 유기체는 하기의 효소들 중 하나 이상을 사용할 수 있다: ATP 시트레이트-리아아제, 시트레이트 리아아제, 아코니타제, 아이소시트레이트 데하이드로게나제, 알파-케토글루타레이트:페레독신 옥시도리덕타제, 숙시닐-CoA 신시타제, 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제, 푸마레이트 리덕타제, 푸마라제, 말레이트 데하이드로게나제, NAD(P)H:페레독신 옥시도리덕타제, 일산화 탄소 데하이드로게나제, 및 하이드로게나제. 구체적으로, 상기 일산화 탄소 데하이드로게나제 및 하이드로게나제에 의해 CO 및/또는 H<sub>2</sub>로부터 추출된 환원 당량을 사용하여 CO<sub>2</sub>를 상기 환원적 TCA 주기를 통해 아세틸-CoA 또는 아세테이트 내로 고정시킨다. 아세테이트를 아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 아세테이트 키나제/포스포트랜스아세틸라제, 및 아세틸-CoA 신시타제와 같은 효소들에 의해 아세틸-CoA로 전환시킬 수 있다. 아세틸-CoA를 피루베이트:페레독신 옥시도리덕타제 및 글루코스 신생 합성 효소에 의해 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 전구체, 글리세르알데하이드-3-포스페이트, 포스포에놀피루베이트, 및 피루베이트로 전환시킬 수 있다. 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로를 생성시키기에 충분한 수의 암호화 핵산을 도입시키기 위해 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 동일한 조작 디자인을 또한 숙주 유기체 중에 없는 상기 환원적 TCA 경로 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 도입시키는 것에 대해 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 상기 변형된 유기체가 완전한 환원적 TCA 경로를 함유하도록 본 발명의 미생물 유기체에 하나 이상의 암호화 핵산을 도입시키는 것은 합성 가스 이용 능력을 부여할 것이다.

[0271] 따라서, 본 발명의 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 탄소 원, 예를 들어 탄수화물 상에서 생육 시 본 발명의 생합성된 화합물을 분비하는 비-천연 미생물 유기체를 생성시킬 수 있음을 알 것이다. 상기와 같은 화합물은 예를 들어 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 및 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로의 중간 대사 산물들 중 어느 것이든 포함한다. 필요한 것은 상기 필요한 효소 또는 단백질 활성들 중 하나 이상에서 상기 목적하는 화합물 또는 중간체의 생합성을 성취하도록, 예를 들어 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생합성 경로 중 일부 또는 전부를 포함하도록 조작하는 것이다. 따라서, 본 발명은 탄수화물 또는 다른 탄소 원 상에서 생육 시 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 생산하고/하거나 분비하고 탄수화물 또는 다른 탄소 원 상에서 생육 시 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로에 나타난 중간 대사 산물들 중 임의의 것을 생산하고/분비하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 본 발명의 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생산 미생물 유기체는 중간체, 예를 들어 숙시닐-CoA, 프로피오닐-CoA 및/또는 아세틸-CoA로부터 합성을 개시시킬 수 있다.

[0272] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체를, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 생성시키기에 충분한 양의 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 경로 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 외부적으로 발현하도록 본 발명에 예시된 바와 같이 당해 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 제작한다. 본 발명의 미생물을 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 생산하기에 충분한 조건 하에서 배양함이 이해된다. 본 발명에 제공된 교시 및 지침에 따라, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 약 0.1 내지 200 mM 이상의 세포 내 농도를 생성시키는 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 생합성을 성취할 수 있다. 일반적으로, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 세포 내 농도는 약 3 내지 150 mM, 특히 약 5 내지 125 mM 및 보다 특히 약 8 내지 100 mM, 예를 들어 약 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM 또는 그 이상이다. 이들 예시적인 범위 사이 및 그 이상의 세포 내 농도도 또한 본 발명의 비-천연 미생물 유기체로부터 성취될 수 있다.

[0273] 일부 실시태양에서, 배양 조건은 혐기성 또는 실질적으로 혐기성인 생육 또는 유지 조건을 포함한다. 예시적인 혐기성 조건들은 앞서 개시되었으며 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 발효 공정에 예시적인 혐기성 조건은 본 발명에 개시되어 있으며, 예를 들어 2007년 8월 10일자로 출원된 미국 특허 출원 제 2009/0047719 호에 개시되어 있다. 이들 조건 중 어느 것이든 상기 비-천연 미생물 유기체뿐만 아니라 당해 분야에 널리 공지된 다른 혐기성 조건들과 함께 사용될 수 있다. 상기와 같은 혐기성 조건 하에서, 상기 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생산자는 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 5 내지 10 mM 이상의 세포 내 농도뿐만 아니라 본 발명에 예시된 다른 농도들로 합성할 수 있다. 비록 상기 설명이 세포 내 농도를 지칭하지만, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA 생산 미생물 유기체가 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA를 세포 내적으로 및/또는 상기 생성물을 배양 배지 내로 분비할 수 있음이 이해된다.

[0274] 상기 배양 조건은 예를 들어 액체 배양 과정뿐만 아니라 발효 및 다른 대규모 배양 과정을 포함할 수 있다. 본 발명에 개시된 바와 같이, 본 발명의 생합성 생성물의 특히 유용한 수율을 혐기성 또는 실질적으로 혐기성

인 배양 조건 하에서 획득할 수 있다.

- [0275] 본 발명에 개시된 바와 같이, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 생합성을 성취하기 위한 하나의 예시적인 생육 조건은 혐기성 배양 또는 발효 조건을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체를 혐기성 또는 실질적으로 혐기성인 조건 하에서 지속시키거나, 배양하거나 발효시킬 수 있다. 간단히, 혐기성 조건은 산소가 없는 환경을 지칭한다. 실질적으로 혐기성 조건은 예를 들어 배지 중에 용해된 산소 농도가 0 내지 10%의 포화율로 남아 있도록 하는 배양, 배치 발효 또는 연속 발효를 포함한다. 실질적으로 혐기성 조건은 또한 1% 미만의 산소 분위기로 유지된 밀폐된 챔버 내부의 액체 배지 중에서 또는 고체 아가 상에서의 세포의 생육 또는 휴지를 포함한다. 상기 산소의 퍼센트를 예를 들어 상기 배양물에  $N_2/CO_2$  혼합물 또는 다른 적합한 비-산소 기체 또는 기체들을 살포함으로써 유지시킬 수 있다.
- [0276] 본 발명에 개시된 배양 조건을 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올의 제조를 위해 규모 확대하고 연속적으로 키울 수 있다. 예시적인 생육 과정은 예를 들어 유가 발효(fed-batch) 및 배치 분리; 유가 발효 및 연속 분리, 또는 연속 발효 및 연속 분리를 포함한다. 이들 과정은 모두 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 발효 과정은 상업적인 양의 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 생합성적 생산에 특히 유용하다. 일반적으로, 및 비-연속 배양 과정의 경우에서와 같이, n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 연속 및/또는 거의 연속 생산은 본 발명의 비-천연 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올 생산 유기체를, 생육을 지수 생육기에서 유지 및/또는 거의 유지 시키기에 충분한 양분 및 배지에서 배양함을 포함할 것이다. 상기와 같은 조건 하에서 연속 배양은 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 또한, 연속 배양은 1, 2, 3, 4 또는 5 주 또는 그 이상 수 개월 이하를 포함할 수 있다. 한편으로, 본 발명의 유기체를 특정 용도에 적합한 경우, 수 시간 동안 배양할 수 있다. 상기 연속 및/또는 거의 연속 배양 조건이 이들 예시적인 기간들 사이의 모든 시간 간격들을 포함할 수 있음은 물론이다. 본 발명의 미생물 유기체의 배양 시간은 원하는 목적을 위해 충분한 양의 생성물을 생산하기에 충분한 기간 동안인 것으로 또한 여겨진다.
- [0277] 발효 과정은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 간단히, n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올의 생합성적 생산을 위한 발효를 예를 들어 유가 발효 및 배치 분리; 유가 발효 및 연속 분리, 또는 연속 발효 및 연속 분리에 사용할 수 있다. 배치 및 연속 발효 과정의 예들은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.
- [0278] 상당량의 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올의 연속 생산을 위해 본 발명의 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올 생산자를 사용하는 상기 발효 과정 이외에, 상기 n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올 생산자에 또한 상기 생성물을 다른 화합물로 전환시키는 화학적 합성 과정을 동시에 가하거나, 또는 상기 생성물을 상기 발효 배양물로부터 분리시키고 경우에 따라 상기 생성물을 다른 화합물로 전환시키는 화학적 전환을 연속해서 가할 수 있다.
- [0279] 본 발명에 개시된 배양 및 발효 조건 이외에, n-프로판올 및 아이소프로판올, 14-BDO 및 아이소프로판올, 13-BDO 및 아이소프로판올 또는 MAA 및 아이소프로판올의 생합성을 성취하기 위한 생육 조건은 상기 배양 조건에 삼투보호제(osmoprotectant)의 첨가를 포함할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체를 삼투보호제의 존재 하에서 본 발명에 개시된 바와 같이 지속시키거나, 배양하거나 발효시킬 수 있다. 간단히, 삼투보호제는, 삼투물질로서 작용하고 본 발명에 개시된 바와 같은 미생물 유기체가 삼투 응력을 견디는데 일조하는 화합물을 의미한다. 삼투보호제는 비 제한적으로 베타인, 아미노산 및 상기 트레할로스 당을 포함한다. 상기와 같은 삼투보호제의 비 제한적인 예는 글리신 베타인, 프탈린 베타인, 다이메틸설팀, 다이메틸설팀니오프로프리오네이트, 3-다이메틸설팀니오프로프리오네이트, 피페콜산, 다이메틸설팀니오아세테이트, 콜린, L-카르니틴 및 액토인이다. 하나의 태양에서, 상기 삼투보호제는 글리신 베타인이다. 당해 분야의 숙련가는 본 발명에 개시된 미생물 유기체를 삼투 응력으로부터 보호하기에 적합한 삼투보호제의 양 및 유형이, 사용되는 상기 미생물 유기체에 따라 변할 것임을 이해한다. 상기 배양 조건 하에서 삼투보호제의 양은 예를 들어 단지 약 0.1 mM, 단지 약 0.5 mM, 단지 약 1.0 mM, 단지 약 1.5 mM, 단지 약 2.0 mM, 단지 약 2.5 mM, 단지 약 3.0 mM, 단지 약 5.0 mM, 단지 약 7.0 mM, 단지 약 10 mM, 단지 약 50 mM, 단지 약 100 mM, 또는 단지 약 500 mM일 수 있다.

- [0280] 더 양호한 생산자를 생성시키기 위해서, 대사 모델링을 생육 조건의 최적화에 사용할 수 있다. 모델링을 또한 상기 경로의 사용을 추가로 최적화하는 유전자 녹아웃의 디자인에 사용할 수 있다(예를 들어 미국 특허 공보 제 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466 호, 및 미국 특허 제 7,127,379 호를 참조하십시오). 모델링 분석은 상기 대사가 n-프로판올, 아이소프로판올, 14-BDO, 13-BDO 및/또는 MAA의 보다 효율적인 생산을 향해 이동하는 세포 생육에 대한 영향들의 신뢰성 있는 예견을 허용한다.
- [0281] 목적하는 생성물의 생합성에 유리한 대사 변경들을 확인하고 디자인하기 위한 한 가지 계산적인 방법은 OptKnock 계산 체계이다(Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657(2003)). OptKnock은 표적 생성물을 과생산하는 유전적으로 안정한 미생물을 생성시키는 유전자 결실 전략을 제시하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 프로그램이다. 구체적으로, 상기 체계는 목적하는 생화학을 강제로 세포 생육의 필수적인 부산물로 되게 하는 유전자 조작을 제시하기 위해서 미생물의 완전한 대사 및/또는 생화학적 네트워크를 검사한다. 전략적으로 배치된 유전자 결실 또는 다른 작용성 유전자 파괴를 통해 생화학적 생산과 세포 생육을 결합시킴으로써, 생물반응기에서 보다 긴 시간 후에 상기 조작된 균주에 부과된 생육 선택 압력은 강제적인 생육-결합된 생화학적 생산의 결과로서 실행의 개선을 도출시킨다. 마지막으로, 유전자 결실을 제작하는 경우에, OptKnock에 의해 선택된 유전자들이 상기 계층으로부터 완전히 제거되기 때문에 상기 디자인된 균주가 그의 야생형 상태로 되돌아가는 가능성은 무시할만하다. 따라서, 상기 계산적인 방법을, 목적하는 생성물의 생합성을 도출하는 대안 경로를 확인하거나 또는 목적하는 생성물의 생합성을 추가로 최적화하기 위해 비-천연 미생물 유기체와 함께 사용할 수 있다.
- [0282] 간단히, OptKnock는 본 발명에서 세포 대사를 모델링하기 위한 계산 방법 및 시스템을 지칭하는데 사용되는 용어이다. 상기 OptKnock 프로그램은 특정한 구속을 유출 균형 분석(FBA) 모델에 통합시키는 방법 및 모델 체계와 관련된다. 이들 구속은 예를 들어 정량적인 동역학 정보, 정량적인 조절 정보, 및/또는 DNA 미세배열 실험 데이터를 포함한다. OptKnock는 또한 예를 들어 유출 균형 모델로부터 유도된 유출 경계를 엄격히 하고 후속적으로 유전자 첨가 또는 결실의 존재 하에서 대사 네트워크의 실행 한계를 탐침함으로써 다양한 대사 문제들에 대한 해법을 계산한다. OptKnock 계산 체계는 상기 대사 네트워크의 실행 한계의 유효 질문을 가능하게 하는 모델 제형의 제작을 허용하며 상기 생성되는 혼합-정수 선형 프로그래밍 문제를 해결하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 OptKnock로서 지칭되는 대사 모델링 및 시뮬레이션 방법들이 예를 들어 2002년 1월 10일자로 출원된 US 공보 제 2002/0168654 호, 2002년 1월 10일자로 출원된 국제 특허 제 PCT/US02/00660 호, 및 2007년 8월 10일자로 출원된 미국 공보 제 2009/0047719 호에 개시되어 있다.
- [0283] 생성물의 생합성 생산에 유리한 대사 변경을 확인하고 디자인하기 위한 또 다른 계산 방법은 심페니(SimPheny)(등록상표)라 칭하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 시스템이다. 상기 계산 방법 및 시스템은 예를 들어 2002년 6월 14일자로 출원된 미국 공보 제 2003/0233218 호 및 2003년 6월 13일자로 출원된 국제 특허 출원 제 PCT/US03/18838 호에 개시되어 있다. 심페니(등록상표)는 인실리코 네트워크 모델을 생성시키고 생물 시스템의 화학 반응들을 통해 질량, 에너지 또는 충전의 유출을 시뮬레이션하여 상기 시스템 중의 화학 반응들의 임의의 및 모든 가능한 작용기들을 함유하는 해법 공간을 한정하여, 상기 생물 시스템에 대한 일련의 허용되는 활성들을 결정할 수 있는 계산 시스템이다. 이러한 접근법은 상기 해법 공간이 상기 포함된 반응들의 공지된 화학량론 뿐만 아니라 반응 열역학과 같은 구속 및 반응들을 통한 최대 유출과 관련된 용량 구속에 의해 한정되므로 구속-기재 모델링이라 지칭된다. 이들 구속에 의해 한정된 공간은 상기 생물 시스템 또는 그의 생화학적 성분들의 표현형 능력 및 반응을 측정하기 위해 의심될 수 있다.
- [0284] 이러한 계산적 접근법은 생물 시스템들이 가요성이고 많은 상이한 방법들에서 동일한 결과에 도달할 수 있기 때문에 생물학적 실재와 일치한다. 생물 시스템은 모든 살아있는 시스템들이 직면해야 하는 근본적인 구속들에 의해 제한된 진화 기전을 통해 디자인된다. 따라서, 구속 기재 모델링 전략은 이들 일반적인 실재를 포함한다. 더욱이, 구속의 엄격화를 통해 네트워크 모델에 추가의 제한들을 연속적으로 부과하는 능력은 상기 해법 공간의 크기를 감소시키고, 이에 의해 생리학적 실행 또는 표현형을 예견할 수 있는 예견을 향상시킨다.
- [0285] 본 발명의 교시 및 지침에 따라, 당해 분야의 숙련가들은 숙주 미생물 유기체에서의 목적하는 화합물의 생합성을 디자인 및 실행하는데 대사 모델링 및 시뮬레이션에 대한 다양한 계산 체계를 적용할 것이다. 상기와 같은 대사 모델링 및 시뮬레이션 방법은 예를 들어 심페니(등록상표) 및 OptKnock로서 상기 예시된 계산 시스템들을 포함한다. 본 발명의 예시를 위해서, 일부 방법들을 모델링 및 시뮬레이션에 대해 상기 OptKnock 계산 체계와 관련하여 본 발명에 개시한다. 당해 분야의 숙련가들은 상기 대사 변경의 확인, 디자인 및 실행을 OptKnock를 사용하여 당해 분야에 널리 공지된 상기와 같은 다른 대사 모델링 및 시뮬레이션 계산 체계 및 방

법들에 어떻게 적용하는지를 알 것이다.

[0286] 상술한 방법들은 파괴하고자 하는 하나의 대사 반응 세트를 제공할 것이다. 상기 세트 또는 대사 변형 내의 각 반응의 제거 결과 목적하는 생성물이 상기 유기체의 생육 단계 동안 필수적인 산물로서 생성될 수 있다. 상기 반응들은 공지되어 있으므로, 상기 2단 OptKnock 문제에 대한 해법은 또한 상기 반응 세트 내의 각 반응을 촉매화하는 하나 이상의 효소를 암호화하는 관련된 유전자 또는 유전자들을 제공할 것이다. 각 반응에 관여하는 효소들을 암호화하는 일련의 반응 및 그의 상응하는 유전자들의 확인은 일반적으로 자동화된 공정이며, 상기 반응과, 효소와 암호화 유전자들 간의 관계를 갖는 반응 데이터베이스와의 상관성을 통해 수행된다.

[0287] 일단 확인되었으면, 목적하는 생성물의 생산을 성취하기 위해서 파괴해야 하는 반응 세트를 표적 세포 또는 유기체에서 상기 세트 내의 각 대사 반응을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 작용 파괴에 의해 실행한다. 상기 반응의 작용 파괴를 성취하는데 특히 유용한 하나의 수단은 각 암호화 유전자의 결실에 의한 것이다. 그러나, 일부의 경우, 상기 반응을 다른 유전자 이상, 예를 들어 돌연변이, 조절 부위, 예를 들어 프로모터 또는 조절 인자에 대한 시스 결합 부위의 결실에 의해, 또는 임의의 다수의 위치들에서 암호화 서열의 절두에 의해 파괴하는 것이 유리할 수 있다. 상기 후자의 이상(상기 유전자 세트의 전체 미만의 결실을 생성시킨다)은, 예를 들어 생성물의 결합에 대한 신속한 평가를 원하는 경우 또는 격세 유전이 덜 발생할 듯한 경우 유용할 수 있다.

[0288] 목적하는 생성물의 생육-결합된 생합성을 포함한 생합성을 생성시킬 수 있는 대사 변형 또는 파괴하고자 하는 반응들의 추가의 세트를 도출시키는 상술한 2단 OptKnock 문제에 대한 추가의 생산적인 해법들을 확인하기 위해서, 정수 컷이라 칭하는 최적화 방법을 실행시킬 수 있다. 상기 방법은 상기 예시된 OptKnock 문제를 각 반복부에서 정수 컷이라 지칭되는 추가의 구속의 통합에 의해 반복적으로 해결함으로써 진행된다. 정수 컷 구속은 상기 해결 과정이, 임의의 선행 반복 시 확인된 정확하게 동일한 반응 세트를 선택하는 것(생성물 생합성을 생육과 강제로 결합시킨다)을 유효하게 방지한다. 예를 들어 앞서 확인된 생육-결합된 대사 변형이 파괴를 위한 반응 1, 2 및 3을 명시하는 경우, 하기의 구속은 동일한 반응이 후속 해법에 동시에 고려되는 것을 방지한다. 상기 정수 컷 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며 예를 들어 문헌[Burgard et al., Biotechnol. Prog. 17:791-797(2001)]에서 찾을 수 있다. 본 발명에 개시된 모든 방법들을 대사 모델링 및 시뮬레이션에 대한 상기 OptKnock 계산 체계와 함께 이들의 사용에 관하여, 반복적인 계산 분석에서 쓸데없는 반복을 감소시키는 정수 컷 방법을 또한 예를 들어 심페니(등록상표)를 포함하여 당해 분야에 널리 공지된 다른 계산 체계와 함께 적용할 수 있다.

[0289] 본 발명에 예시된 방법들, 예를 들어 표적 생화학적 생성물의 생산을, 확인된 유전자 변경을 갖도록 조작된 세포 또는 유기체의 생육과 강제로 결합시키는 것은 목적하는 생성물을 생합성적으로 생산하는 세포 및 유기체를 제작할 수 있게 한다. 따라서, 본 발명에 개시된 계산 방법은 OptKnock 및 심페니(등록상표) 중에서 선택된 인 실리코 방법에 의해 확인되는 대사 변형의 확인 및 실행을 허용한다. 상기 대사 변형의 세트는 예를 들어 하나 이상의 생합성 경로 효소들의 첨가 및/또는 예를 들어 유전자 결실에 의한 파괴를 포함하여 하나 이상의 대사 반응들의 작용 파괴를 포함할 수 있다.

[0290] 상기 논의된 바와 같이, OptKnock 방법은 긴 생육 선택 기간이 가해지는 경우, 돌연변이 미생물 네트워크가 그의 계산적으로 예견된 최대-생육 표현형을 향해 진화할 수 있다는 전제 하에 개발되었다. 즉 상기 접근법은 선택성 압력 하에서 유기체의 자기 최적화 능력을 활용한다. 상기 OptKnock 체계는 네트워크 화학량론에 근거하여 생화학적 생산과 세포 생육 사이를 강제로 결부시키는 유전자 결실 조합을 총망라하여 열거한다. 최적의 유전자/반응 녹아웃의 확인은 상기 생성 네트워크에 대한 최적 생육 해법이 관심 생화학을 과생산하도록 활성 반응 세트를 선택하는 2단 최적화 문제의 해법을 필요로 한다(Burgard et al., Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003)).

[0291] 에스케리키아 콜라이 대사의 인 실리코 화학량론 모델을 사용하여 앞서 예시되고 예를 들어 미국 특허 공보 제 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466 호, 및 미국 특허 제 7,127,379 호에 개시된 바와 같이 대사 경로에 대한 필수 유전자들을 동정할 수 있다. 본 발명에 개시된 바와 같이, 상기 OptKnock 수학 체계를 정밀한 유전자 결실에 적용하여 목적하는 생성물의 생육-결합된 생산을 도출시킬 수 있다. 더욱이, 상기 2단 OptKnock 문제의 해법은 오직 하나의 결실 세트만을 제공한다. 모든 의미 있는 해법들, 즉 생육-결합된 생산 형성을 도출하는 모든 녹아웃 세트들을 열거하기 위해서, 정수 컷이라 지칭되는 최적화 기법을 실행할 수 있다. 이는 상기 OptKonck 문제를 상기 논의된 바와 같이, 각 반복 시 정수 컷이라 지칭되는 추가의 구속을 결합시켜 반복

적으로 해결함을 수반한다.

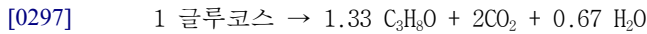
[0292] 본 발명의 다양한 실시태양들의 활성화에 실질적으로 영향을 미치지 않는 변형들이 또한 본 발명에 제공된 본 발명의 정의 내에 있음은 물론이다. 따라서, 하기의 실시예들은 본 발명을 예시하고자 하는 것이지 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0293] **실시예 I**

[0294] **글루코스로부터 n-프로판올 및 아이소프로판올의 공동생산을 위한 경로**

[0295] 본 실시예는 n-프로판올 및 아이소프로판올의 공동생산을 위한 예시적인 경로를 개시한다.

[0296] n-프로판올 및 아이소프로판올 및 관련된 생성물의 공동 생산을 위한 신규의 경로들을 본 발명에서 개시한다. 본 발명은 n-프로판올 및 아이소프로판올의 공동생산을 위한 4 가지 대안적인 방법들을 제공한다. 에스케리키아 콜라이에서 아이소프로판올의 생산은 앞서 개시되었다(Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818(2007)). 간단히, 아세틸 CoA는 아세토아세틸 CoA로 전환되고, 아세토아세테이트로 변형되고, 탈카복실화되어 아세톤을 형성하고 이어서 환원되어 아이소프로판올을 형성한다(도 1 내지 4). 본 발명에 개시된 미생물 유기체 및 방법들은 상기 공지된 경로를 n-프로판올의 4 가지 신규의 합성 경로와 병용한다. 상기 공동생산은 상기 C3 알콜, 즉 n-프로판올 및 아이소프로판올의 생산을 위한 완벽하게 산화환원 균형된 경로를 제공하여, 상기 하나(Hanai) 등에 의해 개시된 바와 같이 아이소프로판올을 오직 아세톤을 통해 생산하는 경우 산소의 요구와 상반되게 혐기성 생산을 허용할 것이다. 본 발명에 개시된 경로들 중 어느 하나를 사용하여 n-프로판올 및 아이소프로판올을 공동생산하는 한 가지 이점은 상기 C3 알콜의 최대 이론 수율이 제공된다는 것이다:



[0298] 더욱 또한, 이들 경로는 모두 양의 순 ATP 수율을 갖는다.

[0299] **아세틸-CoA를 사용하는 아이소프로판올의 생산**

[0300] 아이소프로판올 생산을 도 1 내지 4에 예시된 바와 같이 아세토아세틸-CoA 티올라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 또는 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제에 의한 아세틸-CoA의 전환을 통해 성취한다. 아이소프로판올 생산은 아세토아세틸-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제 활성을 암호화하는 고유 *atoA* 및 *atoD* 유전자의 증가된 발현과 함께, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰으로부터의 2 개의 이중 유전자(각각 아세토아세틸-CoA 티올라제 및 아세토아세테이트 데카복실라제를 암호화하는 *thI* 및 *adc*) 및 클로스트리듐 베이제링키이로부터의 하나의 유전자(2차 알콜 데하이드로게나제를 암호화하는 *adh*)의 발현에 따라서 재조합 에스케리키아 콜라이에 대해 개시되었다(Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818(2007)). 한편으로 상기 아세토아세틸-CoA의 아세토아세테이트로의 전환을, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 또는 아세토아세틸-CoA 신시타제 활성을 갖는 효소에 의해 촉매화할 수 있다.

[0301] 아세토아세틸-CoA 티올라제

[0302] 아세토아세틸-CoA 티올라제(또한 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제로서 공지됨)는 아세틸-CoA의 2 개의 분자를 아세토아세틸-CoA 및 CoA 각각의 하나의 분자로 전환시킨다. 예시적인 아세토아세틸-CoA 티올라제 효소는 에스케리키아 콜라이로부터 *atoB*(Martin et al., Nat. Biotechnol 21:796-802(2003)), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰으로부터의 *thIA* 및 *thIB*(Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818(2007); Winzer et al., J. Mol. Microbiol Biotechnol 2:531-541(2000)), 및 사카로마이세스 세레비지아로부터의 *ERG10*(Hiser et al., J. Biol. Chem. 269:31383-31389(1994))의 유전자 산물을 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 1에 나타낸다.

**표 1**

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
AtoB	NP_416728	16130161	에스케리키아 콜라이
ThIA	NP_349476.1	15896127	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
ThIB	NP_149242.1	15004782	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
ERG10	NP_015297	6325229	사카로마이세스 세레비지아에

[0304]

아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제

[0305]

아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제는 상기 CoA 부분을 CoA 수용체 분자로 운반하면서 아세토아세틸-CoA의 아세토아세테이트로의 전환을 촉매화한다. 다수의 트랜스퍼라제는 광범위한 특이성을 가지며 따라서 다른 것들 중에서도 아세테이트, 숙시네이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 2-메틸아세토아세테이트, 3-케토희사노에이트, 3-케토펜타노에이트, 발레레이트, 크로토네이트, 3-머캅토프로피오네이트, 프로피오네이트, 비닐아세테이트, 부티레이트와 같은 다양한 CoA 수용체들을 사용할 수 있다.

[0306]

아세토아세틸-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제는 아세토아세틸-CoA 및 아세테이트를 아세토아세테이트 및 아세틸-CoA로 전환시킨다. 예시적인 효소는 에스케리키아 콜라이로부터 *atoAD*(Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818(2007)), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰으로부터의 *ctfAB*(Jojima et al., Appl Microbiol Biotechnol 77:1219-1224(2008)), 및 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰으로부터의 *ctfAB*(Kosaka et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007))의 유전자 산물을 포함하며, 이들을 하기 표 2에 나타낸다. 숙시닐-CoA:3-케토산 CoA 트랜스퍼라제(SCOT)는 또한 3-케토아실-CoA, 아세토아세틸-CoA의 3-케토산, 아세토아세테이트로의 전환을 촉매화할 수 있다. 아세토아세틸-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제와 상반되게, SCOT는 아세테이트 대신에 CoA 수용체로서 숙시네이트를 사용한다. 예시적인 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제는 헬리코박터 파이로리(Corthesy-Theulaz et al., J Biol Chem 272:25659-25667(1997)), 바실러스 서브틸리스(Stols et al., Protein Expr Purif 53:396-403(2007)), 및 호모 사피엔스(Fukao et al., Genomics 68:144-151(2000); Tanaka et al., Mol Hum Reprod 8:16-23(2002)) 중에 존재한다. 상기 전환을 가능하게 하는 더욱 또 다른 트랜스퍼라제는 부티릴-CoA:아세토아세테이트 CoA-트랜스퍼라제이다. 예시적인 효소를 푸소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*)(Barker et al., J Bacteriol 152(1):201-7(1982)), 클로스트리듐 SB4(Barker et al., J Biol Chem 253(4):1219-25(1978)), 및 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(Wiesenborn et al., Appl Environ Microbiol 55(2):323-9(1989))에서 발견할 수 있다. 부티릴-CoA:아세토아세테이트 CoA-트랜스퍼라제에 대한 특정 유전자 서열들이 이들 참고문헌들에 제공되지 않았지만, 유전자 *FN0272* 및 *FN0273*이 부티레이트-아세토아세테이트 CoA-트랜스퍼라제로서 주석이 달렸다(Kapatral et al., J Bact 184(7) 2005-2018(2002)). *FN1857* 및 *FN1856*과 같은 푸소박테리움 뉴클레아툼 종의 상동체들도 또한 목적하는 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제 활성을 갖는 듯하다. *FN1857* 및 *FN1856*은 리신 발효와 관련된 다수의 다른 유전자들에 인접하여 위치하며 따라서 아세토아세테이트:부티레이트 CoA 트랜스퍼라제를 거의 확실히 암호화하는 듯하다(Kreimeyer, et al., J Biol Chem 282(10) 7191-7197(2007)). 포르피로모나스 진지발리스 및 써모아나에로박터 텡콘젠시스로부터의 추가의 후보들을 유사한 방식으로 동정할 수 있다(Kreimeyer, et al., J Biol Chem 282(10) 7191-7197(2007)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 2에 나타낸다.

**표 2**

[0307]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>AtoA</i>	NP_416726.1	2492994	에스케리키아 콜라이
<i>AtoD</i>	NP_416725.1	2492990	에스케리키아 콜라이
<i>CtfA</i>	NP_149326.1	15004866	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
<i>CtfB</i>	NP_149327.1	15004867	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
<i>CtfA</i>	AAP42564.1	31075384	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰
<i>CtfB</i>	AAP42565.1	31075385	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	헬리코박터 파이로리
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	헬리코박터 파이로리
<i>ScoA</i>	NP_391778	16080950	바실러스 서브틸리스
<i>ScoB</i>	NP_391777	16080949	바실러스 서브틸리스
<i>OXCT1</i>	NP_000427	4557817	호모 사피엔스
<i>OXCT2</i>	NP_071403	11545841	호모 사피엔스
<i>FN0272</i>	NP_603179.1	19703617	푸소박테리움 뉴클레아툼
<i>FN0273</i>	NP_603180.1	19703618	푸소박테리움 뉴클레아툼
<i>FN1857</i>	NP_602657.1	19705162	푸소박테리움 뉴클레아툼
<i>FN1856</i>	NP_602656.1	19705161	푸소박테리움 뉴클레아툼
PG1066	NP_905281.1	34540802	포르피로모나스 진지발리스 W83

PG1075	NP_905290.1	34540811	포르피로모나스 진지발리스 W83
TTE0720	NP_622378.1	20807207	썬모아나에로박터 텡콘젠시스 MB4
TTE0721	NP_622379.1	20807208	썬모아나에로박터 텡콘젠시스 MB4

[0308] 아세토아세틸-CoA 신시타제

[0309] CoA 신시타제는 또한 아세토아세틸-CoA로부터 CoA 부분의 제거를 촉매화한다. 하나의 후보 효소인 ADP-형성 아세틸-CoA 신시타제(ACD, EC 6.2.1.13)는 ATP의 동반적인 합성과 아실-CoA 에스터의 그의 상응하는 산으로의 전환을 결합시킨다. 광범위한 기질 특이성을 갖는 여러 효소들이 문헌에 개시되었다. AF1211에 의해 암호화된, 알카에오글로부스 풀기두스(*Archaeoglobus fulgidus*)로부터의 ACD I은 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 아이소부티리에이트, 아이소발레레이트, 숙시네이트, 퓨마레이트, 페닐아세테이트, 인돌아세테이트를 포함한 다양한 선형 및 분지쇄 기질들 상에서 작용하는 것으로 나타났다(Musfeldt et al., J Bacteriol 184:636-644(2002)). 할로알칼라 마리스모르투이(*Haloarcula marismortui*)로부터의 효소(숙시닐-CoA 신시타제로서 주석이 달렸다)는 기질로서 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지쇄 산(아이소발레레이트 및 아이소부티레이트)을 수용하며, 순 방향 및 역방향으로 작용하는 것으로 나타났다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004)). 초고온성 크레나카에온인 파이로바쿨룸 아에로필룸(*Pyrobaculum aerophilum*)으로부터의 PAE3250에 의해 암호화된 ACD는, 아세틸-CoA, 아이소부티릴-CoA(바람직한 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응하는 모든 특성화된 ACD 중 가장 광범위한 기질 범위를 나타내었다(상기 Brasen et al.). 알카에오글로부스 풀기두스, 할로알칼라 마리스모르투이 및 파이로바쿨룸 아에로필룸으로부터의 효소들은 모두 클로닝되었으며, 작용상 발현되었고, 에스케리키아 콜라에서 특성화되었다(상기 Musfeldt et al.; 상기 Brasen et al.). 이들 유전자/단백질을 하기 표 3에 나타낸다.

표 3

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
AF1211	NP_070039.1	11498810	알카에오글로부스 풀기두스 DSM 4304
scs	YP_135572.1	55377722	할로알칼라 마리스모르투이 ATCC 43049
PAE3250	NP_560604.1	18313937	피로바쿨룸 아에로필룸 균주 IM2

[0311] 또 다른 후보 CoA 신시타제는 숙시닐-CoA 신시타제이다. 에스케리키아 콜라이의 *sucCD* 유전자는 1 ATP의 동반 소모(생체 내에서 가역적인 반응이다)로 숙시네이트로부터의 숙시닐-CoA의 형성을 자연적으로 촉매화하는 숙시닐-CoA 신시타제 복합체를 형성한다(Buck et al., Biochem. 24:6245-6252(1985)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 4에 나타낸다.

표 4

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이

[0313] 추가의 예시적인 CoA-리가제는, 아직 서열이 특성화되지 않은 래트 다이카복실라제-CoA 리가제(Vamecq et al., Biochemical Journal 230:683-693(1985)), 페니실리움 크리소제눔(*Penicillium chrysogenum*)으로부터의 2 개의 특성화된 페닐아세테이트-CoA 리가제 중 어느 하나(Lamas-Maceiras et al., Biochem. J. 395:147-155(2005); Wang et al., Biochem Biophys Res Commun 360(2):453-458(2007)), 슈도모나스 푸티다로부터의 페닐아세테이트-CoA 리가제(Martinez-Blanco et al., J. Biol. Chem. 265:7084-7090(1990)), 및 바실러스 서브틸리스로부터의 6-카복시헥사노에이트-CoA 리가제(Bower et al., J. Bacteriol. 178(14):4122-4130(1996))를 포함한다. 추가적인 후보 효소는 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)(Hasegawa et al., Biochim Biophys Acta 1779:414-419(2008)) 및 호모 사피엔스(Ohgami et al., Biochem Pharmacol 65:989-994(2003))로부터의 아세토아세틸-CoA 신시타제이며, 상기 효소는 아세토아세테이트의 아세토아세틸-CoA로의 ATP-의존적인 전환을 자연적으로 촉매화한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 5에 나타낸다.

표 5

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
phl	CAJ15517.1	77019264	페니실리움 크리소제눔
phlB	ABS19624.1	152002983	페니실리움 크리소제눔
paaF	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸티다
bioW	NP_390902.2	50812281	바실러스 서브틸리스
AACS	NP_084486.1	21313520	무스 무스쿨루스
AACS	NP_076417.2	31982927	호모 사피엔스

[0315] 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제

[0316] 아세토아세틸-CoA를 또한 CoA 하이드롤라제에 의해 아세토아세테이트로 전환시킬 수 있다. 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제 효소 후보는 아실-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제, 아세틸-CoA 하이드롤라제, 및 다이카복실산 티오에스테라제를 포함한다. 래트 간 미토콘드리아 중의 단쇄 아실-CoA 하이드롤라제가 기질로서 아세토아세틸-CoA를 수용하는 것으로 밝혀졌으나; 상기 효소와 관련된 유전자는 지금까지 동정되지 않았다(Svensson et al., Eur. J. Biochem., 239:526-531(1996)).

[0317] 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제는 발린 분해 도중 3-하이드록시아이소부티릴-CoA의 3-하이드록시아이소부티레이트로의 전환을 효율적으로 촉매화한다(Shimomura et al., J Biol Chem. 269:14248-14253(1994)). 상기 효소를 암호화하는 유전자는 라투스 노르베기쿠스(상기 Shimomura et al.; Shimomura et al., Methods Enzymol. 324:229-240(2000)) 및 호모 사피엔스(상기 Shimomura et al.)의 *hibch*를 포함한다. 상기 호모 사피엔스 효소는 또한 기질로서 3-하이드록시부티릴-CoA 및 3-하이드록시프로피오닐-CoA를 수용한다(상기 Shimomura et al.). 서열 상동성에 의한 후보 효소는 사카로마이세스 세레비지아에의 *hibch* 및 바실러스 세레우스의 *BC\_2292*를 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 6에 나타낸다.

표 6

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	146324906	라투스 노르베기쿠스
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	146324905	호모 사피엔스
<i>hibch</i>	P28817.2	2506374	사카로마이세스 세레비지아에
<i>BC_2292</i>	AP09256	29895975	바실러스 세레우스

[0319] 여러 진핵생물 아세틸-CoA 하이드롤라제(EC 3.1.2.1)가 광범위한 기질 특이성을 가지며 따라서 적합한 후보 효소들을 나타낸다. 예를 들어, 라투스 노르베기쿠스 뇌로부터의 효소(Robinson et al., Res. Commun. 71:959-965(1976))는 부티릴-CoA, 핵사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응할 수 있다. 완두콩 잎의 미토콘드리아로부터의 효소는, 그의 서열이 보고되지는 않았지만, 또한 광범위한 기질 특이성을 가지며, 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 팔미토일-CoA, 올레오일-CoA, 숙시닐-CoA 및 크로토닐-CoA에 대한 활성이 입증되었다(Zeiger et al., Plant. Physiol. 94:20-27(1990)). 사카로마이세스 세레비지아에로부터의 아세틸-CoA 하이드롤라제, *ACH1*은 또 다른 후보 하이드롤라제를 나타낸다(Buu et al., J. Biol. Chem. 278:17203-17209(2003)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 7에 나타낸다.

표 7

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>acot12</i>	NP_570103.1	18543355	라투스 노르베기쿠스
<i>ACH1</i>	NP_009538	6319456	사카로카이세스 세레비지아에

[0321] 또 다른 후보 하이드롤라제는 글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 수베틸-CoA, 세바실-CoA 및 도데칸다이올-CoA에 대한 활성을 나타내는 인간 다이카복실산 티오에스테라제, *acot8*(Westin et al., J Biol. Chem. 280:38125-38132(2005)) 및 광범위한 CoA 티오에스테르를 또한 가수분해할 수 있는 가장 가까운 에스케리키아 콜라이 상동체, *tesB*(Naggert J Biol. Chem. 266:11044-11050(1991))이다. 유사한 효소가 또한 래트 간에서 특성화되었다(Deana et al., Biochem. Int. 26:767-773(1992)). 다른 잠재적인 에스케리키아 콜라이 티오에스테르 하이드

롤라제는 *tesA*(Bonner et al., Chem. 247:3123-3133(1972)), *ybgC*(Kuznetsova et al., FEMS Microbiol Rev 29:263-279(2005); Zhuang et al., FEBS Lett. 516:161-163(2002)), *paaI*(Song et al., J Biol. Chem. 281:11028-11038(2006)) 및 *ybdB*(Leduc et al., J Bacteriol. 189:7112-7126(2007))의 유전자 산물을 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 8에 나타낸다.

표 8

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<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

더욱 또 다른 후보 하이드롤라제는 애시드아미노코쿠스 페르멘탄스(*Acidaminococcus fermentans*)로부터의 글루타코네이트 CoA-트랜스퍼라제이다. 상기 효소는 위치-선택적 돌연변이에 의해, 글루타릴-CoA, 아세틸-CoA 및 3-부테노일-CoA에 대한 활성을 갖는 아실-CoA 하이드롤라제로 형질전환되었다(Mack et al., FEBS. Lett. 405:209-212(1997)). 이는 상기 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제 및 아세토아세틸-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제를 암호화하는 효소가 상기 반응 단계에 대한 후보로서도 또한 작용할 수 있지만 그의 작용을 변화시키기 위해서 특정한 돌연변이를 필요로 할 것임을 암시한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 9에 나타낸다.

표 9

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>gctA</i>	CAA57199	559392	애시드아미노코쿠스 페르멘탄스
<i>gctB</i>	CAA57200	559393	애시드아미노코쿠스 페르멘탄스

[0325] 아세토아세테이트 데카복실라제

[0326] 아세토아세테이트 데카복실라제는 아세토아세테이트를 이산화 탄소 및 아세톤으로 전환시킨다. 예시적인 아세토아세테이트 데카복실라제 효소는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰으로부터의 *adc*(Petersen and Bennett, Appl Environ. Microbiol 56:3491-3498(1990)) 및 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰으로부터의 *adc*(Kosaka et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007))의 유전자 산물에 의해 암호화된다. 클로스트리듐 베이제링키이로부터의 효소는 서열 유사성으로부터 추론될 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 10에 나타낸다.

표 10

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>Adc</i>	NP_149328.1	15004868	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
<i>Adc</i>	AAP42566.1	31075386	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰
<i>Acd</i>	YP_001310906.1	150018652	클로스트리듐 베이제링키이

[0328] 아이소프로판올 데하이드로게나제

[0329] 상기 아이소프로판올 합성 경로에서 최종 단계는 아세톤의 아이소프로판올로의 환원을 수반한다. 상기 형질 전환을 가능하게 하는 예시적인 알콜 데하이드로게나제 효소는 클로스트리듐 베이제링키이로부터의 *adh*(Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818(2007); Jojima et al., Appl Microbiol Biotechnol 77:1219-1224(2008)) 및 썬모아나에로박터 브록키(*Thermoanaerobacter brockii*)로부터의 *adh*(Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818(2007); Peretz et al., Anaerobe 3:259-270(1997))를 포함한다. 추가적인 특성화된 효소는 알스토포니아 유티로파로부터의 알콜 데하이드로게나제(이전에는 알칼리제네스 유티로푸스(*Alcaligenes eutrophus*))(Steinbuechel and Schlegel et al., Eur. J. Biochem. 141:555-564(1984)) 및 피토모나스(*Phytomonas*) 중(Uttaro and Opperdoes et al., Mol. Biochem. Parasitol. 85:213-219(1997))으로부터

의 알콜 데하이드로게나제를 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 11에 나타낸다.

표 11

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
sadh	CAD36475	21615553	로도코커스 루버
adhA	AAC25556	3288810	파이로코커스 푸리오수스
Adh	P14941.1	113443	썬모아나에로박터 브록키이
Adh	AAA23199.2	60592974	클로스트리듐 베이제링키이

**프로피오닐-CoA를 사용하는 n-프로판올의 생산**

n-프로판올의 생산을 위한 본 발명에 개시된 경로들은 CoA-의존적인 알데하이드 데하이드로게나제에 의한 프로피오닐-CoA의 프로피온알데하이드로의 환원을 사용하며, 이어서 추가로 환원되어 n-프로판올을 형성한다(도 1 내지 4). 상기 전환은 2 개의 상이한 효소: 알데하이드 및 알콜 데하이드로게나제에 의해 또는 이작용성 알데하이드/알콜 데하이드로게나제에 의해 1 단계로 수행된다. 한편으로, 프로피오닐 CoA를 프로피오닐 포스페이트로 전환시키고 이어서 아실 포스페이트 리덕타제에 의해 프로피온알데하이드로 변형시킬 수 있다.

프로피온알데하이드 데하이드로게나제 및 프로판올 데하이드로게나제

프로피오닐-CoA의 프로판올로의 전환은 CoA-의존성 알데하이드 데하이드로게나제 및 알콜 데하이드로게나제 활성 모두를 갖는 이작용성 효소에 의해서 또는 알데하이드 및 알콜 데하이드로게나제 활성을 갖는 2 개의 상이한 효소에 의해서 촉매화된다.

아실-CoA를 알콜로 전환시키는 예시적인 2-단계 옥시도리덕타제는 기질을 변형시키는 것들, 예를 들어 아세틸-CoA를 에탄올로(예를 들어 에스케리키아 콜라이로부터의 *adhE*(Kessler, FEBS. Lett., 281:59-63(1991)) 및 부티릴-CoA를 부탄올로(예를 들어 클로스트리듐 아세트부틸리쿰으로부터의 *adhE2*(Fontaine et al., J. Bacteriol., 184:821-830(2002))로 변형시키는 것들을 포함한다. 아세틸-CoA를 에탄올로 환원시키는 것 이외에, 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 중의 *adhE*에 의해 암호화되는 효소는 분지쇄 화합물 아이소부티르알데하이드를 아이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 입증되었다(Kazahaya, Microbiol., 18:43-55(1972); Koo et al., Biotechnol. Lett., 27:505-510(2005)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 12에 나타낸다.

표 12

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
adhE	NP_415757.1	16129202	에스케리키아 콜라이
adhE2	AAK09379.1	12958626	클로스트리듐 아세트부틸리쿰
adhE	AAV66076.1	55818563	류코노스톡 메센테로이데스

또 다른 예시적인 효소는 말로닐-CoA를 3-HP로 전환시킬 수 있다. 상기 활성을 갖는 NADPH-의존성 효소는 클로로플렉수스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)에서 특성화되었으며, 여기에서 3-하이드록시프로피오네이트 주기에 관여한다(Hugler, J. Bacteriol., 184:2404-2410(2002); Strauss, Eur. J. Biochem., 215:633-643(1993)). 상기 효소는 300 kDa의 질량을 가지며, 매우 기질-특이적이고, 다른 공지된 옥시도리덕타제들과 서열 유사성을 거의 나타내지 않는다(Hugler, J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002)). 다른 유기체들 중에서 상기 특이적인 반응을 촉매화하는 것으로 입증된 효소들은 없으나; 다른 유기체들이 유사한 경로를 가질 수 있다는 생물정보학적 증거가 존재한다(Klatt, Environ. Microbiol., 9:2067-2078(2007)). 로세이플렉수스 카스텐홀지이(*Roseiflexus castenholzii*), 에리쓰로박터(*Erythrobacter*) 스페시즈 *NAP1* 및 해양 감마 프로테오박테리움 HTCC2080을 포함한 다른 유기체들 중의 효소 후보들이 서열 유사성에 의해 추론될 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 13에 나타낸다.

표 13

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
mcr	AAS20429.1	42561982	클로로플렉수스 아우란티아쿠스

Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	로세이플렉수스 카스텐홀지이
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	에리쓰로박터 스페시스 NAP1
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	해양 감마 프로테오박테리움 HTCC2080

[0339] 보다 긴 쇠 아실-CoA 분자들이 알콜-형성 지방 아실-CoA 리덕타제를 암호화하는 호호바(심몬드시아 키넨시스 (*Simmondsia chinensis*)) FAR과 같은 효소들에 의해 환원될 수 있다. 에스케리키아 콜라이에서의 그의 과발 현은 FAR 활성 및 지방 알콜의 축적을 생성시켰다(Metz, Plant Physiology, 122:635-644(2000)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 14에 나타낸다.

표 14

[0340]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
FAR	AAD38039.1	5020215	심몬드시아 키넨시스

[0341] 몇몇 아실-CoA 데하이드로게나제들이 아실-CoA를 그의 상응하는 알데하이드로 환원시킬 수 있다. 상기와 같은 효소를 암호화하는 예시적인 유전자는 지방 아실-CoA 리덕타제를 암호화하는 애시네토박터 칼코아세티쿠스 (*Acinetobacter calcoaceticus*) *acrI*(Reiser, Journal of Bacteriology 179:2969-2975(1997)), 애시네토박터 스페시스 M-1 지방 아실-CoA 리덕타제(Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195(2002)) 및 클로스트리듐 클루이베리 중의 *sucD* 유전자에 의해 암호화되는 CoA- 및 NADP-의존성 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제(Sohling, J. Bacteriol., 178:871-880(1996))를 포함한다. 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)의 *SucD*는 또 다른 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제이다(Takahashi, J. Bacteriol., 182:4704-4710(2000)). *bphG*에 의해 암호화된, 슈도모나스 스페시스 중의 아세트알데하이드 데하이드로게나제를 아실화하는 효소는 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 아이소부티르알데하이드 및 폼알데하이드를 산화하고 아실화하는 것으로 입증된 더욱 또 다른 후보이다(Powlowski, J. Bacteriol., 175:377-385(1993)). 아세틸-CoA의 에탄올로의 환원 이외에, 류코노스톡 메센테로이데스 (*Leuconostoc mesenteroides*) 중의 *adhE*에 의해 암호화된 효소가 분지 쇠 화합물 아이소부티르알데하이드를 아이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 입증되었다(Kazahaya, J. Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55(1972); Koo et al., Biotechnol Lett. 27:505-510(2005)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 15에 나타낸다.

표 15

[0342]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>acrI</i>	YP_047869.1	50086359	애시네토박터 칼코아세티쿠스
<i>acrI</i>	AAC45217	1684886	애시네토박터 배이리이
<i>acrI</i>	BAB85476.1	18857901	애시네토박터 스페시스 균주 M-1
<i>sucD</i>	P38947.1	172046062	클로스트리듐 클루이베리
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	포르피로모나스 진지발리스
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	슈도모나스 스페시스
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	류코노스톡 메센테로이데스

[0343] 아실-CoA를 그의 상응하는 알데하이드로 전환시키는 추가의 효소 유형은 말로닐-CoA를 말로닉 세미알데하이드로 형질전환시키는 말로닐-CoA 리덕타제이다. 말로닐-CoA 리덕타제는 호열호산성 고세균에서 3-하이드록시프로피오네이트 주기를 통한 독립영양성 탄소 고정에 핵심 효소이다(Berg, Science 318:1782-1786(2007); Thauer, Science, 318:1732-1733(2007)). 상기 효소는 보조인자로서 NADPH를 이용하며 메탈로스파에라 (*Metallosphaera*) 및 설포로부스 스페시스(*Sulfolobus spp*)에서 특성화되었다(Alber et al., J. Bacteriol., 188:8551-8559(2006); Hugler, J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002)). 상기 효소는 메탈로스파에라 세둘라 (*Metallosphaera sedula*)에서 *Msed\_0709*에 의해 암호화된다(Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006); Berg, Science 318:1782-1786(2007)). 설포로부스 토크다이(*Sulfolobus tokodai*)로부터의 말로닐-CoA 리덕타제를 암호화하는 유전자가 클로닝되었으며 에스케리키아 콜라이에서 이중 발현되었다(Alber et al., J. Bacteriol 188:8551-8559(2006)). 상기 효소는 또한 메틸말로닐-CoA의 그의 상응하는 알데하이드로의 전환을 촉매화하는 것으로 입증되었다(W02007141208(2007)). 이들 효소의 알데하이드 데하이드로게나제 작용성이 클로로플렉수스 아우란티아쿠스로부터의 이작용성 데하이드로게나제와 유사하지만, 서열 유사성은

거의 없다. 상기 두 말로닐-CoA 리덕타제 효소 후보들은 모두 아스파틸-4-포스페이트의 아스파테이트 세미알데하이드로의 환원 및 동시적인 탈인산화를 촉매화하는 효소인 아스파테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제와 높은 서열 유사성을 갖는다. 추가적인 유전자 후보들을 설포로부스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*) 및 설포로부스 애시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*)를 포함한 다른 유기체들 중의 단백질들에 대한 서열 상동성에 의해 발견할 수 있으며 이들은 하기에 나열되었다. CoA-아실화 알데하이드 데하이드로게나제에 대한 더욱 또 다른 후보는 클로스트리듐 베이제링키로부터의 *ald* 유전자이다(Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980(1999)). 상기 효소는 아세틸-CoA 및 부티릴-CoA를 그들의 상응하는 알데하이드로 환원시키는 것으로 보고되었다. 상기 유전자는 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 에스케리키아 콜라이의 아세트알데하이드 데하이드로게나제를 암호화하는 *eutE*와 매우 유사하다(Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980(1999)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 16에 나타낸다.

표 16

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
MSED_0709	YP_001190808.1	146303492	메탈로스파에라 세들라
mcr	NP_378167.1	15922498	설포로부스 토코다이이
asd-2	NP_343563.1	15898958	설포로부스 솔파타리쿠스
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	설포로부스 애시도칼다리우스
Ald	AAT66436	9473535	클로스트리듐 베이제링키
eutE	AAA80209	687645	살모넬라 티피뮤리움
eutE	P77445	2498347	에스케리키아 콜라이

[0344]

알데하이드의 알콜로의 전환을 촉매화하는 효소(즉 알콜 데하이드로게나제 또는 동등하게 알데하이드 리덕타제)를 암호화하는 예시적인 유전자는 C2-C14의 경우 중간-쇄 알콜 데하이드로게나제를 암호화하는 *alrA*(Tani, Appl. Environ. Microbiol., 66:5231-5235(2000)), 사카로마이세스 세레비지아에로부터의 *ADH2*(Atsumi, Nature, 451:86-89(2008)), C3보다 긴 분자를 선호하는 에스케리키아 콜라이로부터의 *yqhD*(Sulzenbacher et al., Journal of Molecular Biology, 342:489-502(2004)), 및 부티르알데하이드를 부탄올로 전환시키는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰으로부터의 *bdhI* 및 *bdhII*(Walter, Journal of Bacteriology, 174:7149-7158(1992))를 포함한다. *yqhD*의 유전자 산물은 보조 인자로서 NADPH를 사용하는 아세트알데하이드, 말론다이알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인의 환원을 촉매화한다(Perez, J. Biol. Chem., 283:7346-7353(2008)). 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*)로부터의 *ADH1*은 폼알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인을 포함한 다수의 알데하이드에 대해 활성을 갖는 것으로 입증되었다(Kinoshita., Appl. Microbiol. Biotechnol., 22:249-254(1985)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 17에 나타낸다.

표 17

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
alrA	BAB12273.1	9967138	애시네토박터 스페시즈 균주 M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	사카로마이세스 세레비지아에
yqhD	NP_417484.1	16130909	에스케리키아 콜라이
bdh I	NP_349892.1	15896543	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
bdh II	NP_349891.1	15896542	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
adhA	YP_162971.1	56552132	자이모모나스 모빌리스

[0346]

3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제 활성을 나타내는 효소들(EC 1.1.1.61)이 또한 상기 범주 내에 있다. 상기와 같은 효소들은 랄스토니아 유티로파(Barvo, J. Forensic Sci., 49:379-387(2004)), 클로스트리듐 클루이베리(Wolff, Protein Expr. Purif., 6:206-212(1995)) 및 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)(Breitkreuz et al., J. Biol. Chem., 278:41552-41556(2003))에서 특성화되었다. 더욱 또 다른 유전자 후보는 제오바실러스 썬모글루코시다시우스(*Geobacillus thermoglucosidasius*)로부터의 알콜 데하이드로게나제 *adhI*(Jeon et al., J. Biotechnol., 135:127-133(2008))이다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 18에 나타낸다.

[0347]

표 18

[0348]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	4hbd	YP_726053.1	113867564	랄스토니아 유티로파 H16
	4hbd	L21902.1	146348486	클로스트리듐 클루이베리 DSM 555
	4hbd	Q94B07	75249805	아라비도프시스 탈리아나
	adhI	AAR91477.1	40795502	제오바실러스 썬모글루코시다시우스 M10EXG

[0349] 또 다른 예시적인 효소는 3-하이드록시아이소부티레이트의 메틸말로네이트 세미알데하이드로의 가역적인 산화를 촉매화하는 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제이다. 상기 효소는 발린, 류신 및 아이소류신 분해에 관여하며 세균, 진핵생물 및 포유동물에서 동정되었다. 썬무스 썬모필루스(*Thermus thermophilus*) HB8로부터 P84067에 의해 암호화된 효소가 구조적으로 특성화되었다(Lokanath et al., J Mol Biol, 352:905-917(2005)). 상기 인간 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제의 가역성을 동위원소 표지된 기질을 사용하여 입증하였다(Manning, Biochem J 231:481-484(1985)). 상기 효소를 암호화하는 추가의 유전자들은 호모 사피엔스(Hawes et al., Methods Enzymol, 324:218-228(2000)) 및 오리토라구스 쿠니쿨러스(*Oryctolagus cuniculus*)(Hawes et al., Methods Enzymol. 324:218-228(2000)); Chowdhury, Biosci. Biotechnol Biochem., 60:2043-2047(1996)) 중의 *3hidh*, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 중의 *mmsb* 및 슈도모나스 푸티다 중의 *dhat*(Aberhart, J Chem. Soc., 6:1404-1406(1979); Chowdhury, Biosci. Biotechnol Biochem., 60:2043-2047(1996); Chowdhury, Biosci. Biotechnol Biochem., 67:438-441(2003))를 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 19에 나타낸다.

표 19

[0350]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	P84067	P84067	75345323	썬무스 썬모필루스
	mmsb	P28811.1	127211	슈도모나스 아에루기노사
	dhat	Q59477.1	416872	슈도모나스 푸티다
	3hidh	P31937.2	12643395	호모 사피엔스
	3hidh	P32185.1	416872	오리토라구스 쿠니쿨러스

[0351] 프로피오닐-CoA: 포스페이트 프로파노일트랜스퍼라제

[0352] 프로파노일-CoA의 프로파노일 포스페이트로의 전환은 포스페이트 트랜스퍼라제에 의해 촉매화할 수 있다. 상기 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제들(EC 2.3.1.8) 중에서, 바실러스 서브틸리스(Rado, Biochem. Biophys. Acta 321:114-125(1973)), 클로스트리듐 클루이베리(Stadtman, Methods Enzymol 1:596-599(1955)) 및 썬모도가 마리티마(Bock, J Bacteriol. 181:1861-1867(1999))로부터의 효소들을 포함한 여러 효소들이 프로피오닐-CoA에 대해 활성을 갖는 것으로 나타났다. 따라서, 이들 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제를 암호화하는 유전자뿐만 아니라 에스케리키아 콜라이 *pta* 유전자가 상기 단계를 촉매화하는데 사용될 것이다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 20에 나타낸다.

표 20

[0353]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	pta	P39646	730415	바실러스 서브틸리스
	pta	A5N801	146346896	클로스트리듐 클루이베리
	pta	Q9X0L4	6685776	썬모도가 마리티마
	pta	POA9M8	71152910	에스케리키아 콜라이 K12

[0354] 프로피오닐 포스페이트 리덕타제

[0355] 프로파노일 포스페이트의 프로피오날데하이드로의 전환은 프로피오닐 포스페이트 리덕타제에 의해 촉매화된다. 상기와 같은 직접적인 전환은 아직 설명되지 않았지만, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제 및 아스파테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제를 포함한 유사한 변형들이 문헌에 잘 보고되

어 있다. 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제 및 아스파테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제를 암호화하는 하기의 유전자들이 본 단계의 촉매화에 고려될 것이다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 21에 나타낸다.

표 21

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
asd	NP_417891	16131307	에스케리키아 콜라이 K12
gapA	NP_785996	28379104	락토바실러스 플란타륨 WCFS1
gapA	NP_416293	71159358	에스케리키아 콜라이 K12
gapA	NP_347346	15893997	클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824
gapN	NP_350239	15896890	클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824

[0357] 프로피오닐-CoA 하이드롤라제

[0358] 프로피오닐-CoA를 CoA 하이드롤라제, 신시타제 또는 트랜스퍼라제에 의해 프로피오네이트로 전환시킬 수 있다. 프로피오닐-CoA의 프로피오네이트로의 가수분해는 중간체 2-옥소부타노에이트를 통해 진행하는 유기산 분해 경로에서 발생한다. 상기 반응은 아실-CoA 하이드롤라제 효소(EC 3.1.2.18)에 의해 촉매화된다. 프로피오닐-CoA는 래트 간 미토콘드리아에서 발견되는 단쇄 아실-CoA 하이드롤라제의 바람직한 기질이다(Alexson et al., Biochim Biophys. Acta., 1105(1):13-9(1989)). 상기 효소는 특성화되었지만 상기 유전자를 암호화하는 서열은 아직 확인되지 않았다(Garras et al., Biochim. Biophys. Acta., 1255:154-160(1995)). 프로피오닐-CoA에 대한 CoA 하이드롤라제 활성을 나타내는 또 다른 효소가 완두콩 잎의 미토콘드리아에서 발견된다. 상기 효소는, 그의 서열이 보고되지 않았지만, 광범위한 기질 특이성을 가지며, 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 팔미토일-CoA, 올레오일-CoA, 숙시닐-CoA, 및 크로토닐-CoA에 대한 활성이 입증되었다(Zeiger et al., Plant. Physiol. 94:20-27(1990)). 추가적인 프로피오닐-CoA 하이드롤라제 후보는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제, 아세틸-CoA 하이드롤라제, 및 다이카복실산 티오에스테라제를 포함한다.

[0359] 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제는 발린 분해 중에 3-하이드록시아이소부티릴-CoA의 3-하이드록시아이소부티레이트로의 전환을 효율적으로 촉매화한다(Shimomura et al., J. Biol. Chem. 269:14248-14253(1994)). 상기 효소를 암호화하는 유전자는 라투스 노르베기쿠스(상기 Shimomura et al.; Shimomura et al., Methods Enzymol. 324:229-240(2000)) 및 호모 사피엔스(상기 Shimomura et al.)의 *hibch*를 포함한다. 상기 호모 사피엔스 효소는 또한 3-하이드록시부티릴-CoA 및 3-하이드록시프로피오닐-CoA를 기질로서 수용한다(상기 Shimomura et al.). 서열 상동성에 의한 후보 유전자는 사카로마이세스 세레비지아에의 *hibch* 및 바실러스 세레우스의 *BC\_2292*를 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 22에 나타낸다.

표 22

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
hibch	Q5XIE6.2	146324906	라투스 노르베기쿠스
hibch	Q6NVY1.2	146324905	호모 사피엔스
hibch	P28817.2	2506374	사카로마이세스 세레비지아에
BC_2292	AP09256	29895975	바실러스 세레우스

[0361] 여러 진핵생물 아세틸-CoA 하이드롤라제(EC 3.1.2.1)는 광범위한 기질 특이성을 가지며 따라서 적합한 후보 효소를 나타낸다. 예를 들어, 라투스 노르베기쿠스 뇌로부터의 효소(Robinson et al., Res. Commun. 71:959-965(1976))는 부티릴-CoA, 헥사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응할 수 있다. 사카로마이세스 세레비지아에로부터의 아세틸-CoA 하이드롤라제, *ACH1*은 또 다른 후보 하이드롤라제를 나타낸다(Buu et al., J. Biol. Chem. 278:17203-17209(2003)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 23에 나타낸다.

표 23

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
acot12	NP_570103.1	18543355	라투스 노르베기쿠스
ACH1	NP_009538	6319456	사카로마이세스 세레비지아에

[0363] 또 다른 후보 하이드롤라제는 글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 수베틸-CoA, 세바실-CoA 및 도데칸다이올-CoA에 대한 활성을 나타내는 인간 다이카복실산 티오에스테라제, *acot8*(Westin et al., J Biol. Chem. 280:38125-38132(2005)) 및 광범위한 CoA 티오에스터를 또한 가수분해할 수 있는 가장 가까운 에스케리키아 콜라이 상동체, *tesB*(Naggert J Biol. Chem. 266:11044-11050(1991))이다. 유사한 효소가 또한 래트 간에서 특성화되었다(Deana et al., Biochem. Int. 26:767-773(1992)). 다른 잠재적인 에스케리키아 콜라이 티오에스터 하이드롤라제는 *tesA*(Bonner et al., Chem. 247:3123-3133(1972)), *ybgC*(Kuznetsova et al., FEMS Microbiol Rev 29:263-279(2005); Zhuang et al., FEBS Lett. 516:161-163(2002)), *paaI*(Song et al., J Biol. Chem. 281:11028-11038(2006)) 및 *ybdB*(Leduc et al., J Bacteriol. 189:7112-7126(2007))의 유전자 산물을 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 24에 나타낸다.

표 24

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<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

[0365] 더욱 또 다른 후보 하이드롤라제는 애시드아미노코쿠스 페르멘탄스(*Acidaminococcus fermentans*)로부터의 글루타코네이트 CoA-트랜스퍼라제이다. 상기 효소는 위치-선택적 돌연변이에 의해, 글루타릴-CoA, 아세틸-CoA 및 3-부테노일-CoA에 대한 활성을 갖는 아실-CoA 하이드롤라제로 형질전환되었다(Mack et al., FEBS. Lett. 405:209-212(1997)). 이는 상기 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제 및 아세토아세틸-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제를 암호화하는 효소가 상기 반응 단계에 대한 후보로서도 또한 작용할 수 있지만 그의 작용을 변화시키기 위해서 특정한 돌연변이를 필요로 할 것임을 암시한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 25에 나타낸다.

표 25

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>gctA</i>	CAA57199	559392	애시드아미노코쿠스 페르멘탄스
<i>gctB</i>	CAA57200	559393	애시드아미노코쿠스 페르멘탄스

[0367] 프로피오닐-CoA 신시타제

[0368] CoA 신시타제는 또한 프로피오닐-CoA로부터 CoA 부분의 제거를 촉매화할 수 있다. 하나의 후보 효소인 ADP-형성 아세틸-CoA 신시타제(ACD, EC 6.2.1.13)는 ATP의 동반적인 합성과 아세틸-CoA 에스터의 그의 상응하는 산으로의 전환을 결합시킨다. 광범위한 기질 특이성을 갖는 여러 효소들이 문헌에 개시되었다. AF1211에 의해 암호화된, 알카에오글로부스 풀기두스로부터의 ACD I은 아세틸-CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 아이소부티리에이트, 아이소발레레이트, 숙시네이트, 퓨마레이트, 페닐아세테이트, 인돌아세테이트를 포함한 다양한 선형 및 분지쇄 기질들 상에서 작용하는 것으로 나타났다(Musfeldt et al., J Bacteriol 184:636-644(2002)). 할로알칼라 마리스모르투이로부터의 효소(숙시닐-CoA 신시타제로서 주석이 달렸다)는 기질로서 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지쇄 산(아이소발레레이트 및 아이소부티레이트)을 수용하며, 순 방향 및 역방향으로 작용하는 것으로 나타났다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004)). 초고온성 크레나카에온인 파이로바쿨룸 아에로필룸으로부터의 PAE3250에 의해 암호화된 ACD는, 아세틸-CoA, 아이소부티릴-CoA(바람직한 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응하는 모든 특성화된 ACD 중 가장 광범위한 기질 범위를 나타내었다(상기 Brasen et al.). 알카에오글로부스 풀기두스, 할로알칼라 마리스모르투이 및 파이로바쿨룸 아에로필룸으로부터의 효소들은 모두 클로닝되었으며, 작용상 발현되었고, 에스케리키아 콜라이에서 특성화되었다(상기 Musfeldt et al.; 상기 Brasen et al.). 이들 유전자/단백질을 하기 표 26에 나타낸다.

표 26

[0369]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	AF1211	NP_070039.1	11498810	알카에오글로부스 풀기두스 DSM 4304
	scs	YP_135572.1	55377722	할로아쿨라 마리스모르투이 ATCC 43049
	PAE3250	NP_560604.1	18313937	파이로바쿨룸 아에로필룸 균주 IM2

[0370] 또 다른 후보 CoA 신시타제는 숙시닐-CoA 신시타제이다. 에스케리키아 콜라이의 *sucCD* 유전자는 1 ATP의 동반 소모(생체 내에서 가역적인 반응이다)로 숙시네이트로부터의 숙시닐-CoA의 형성을 자연적으로 촉매화하는 숙시닐-CoA 신시타제 복합체를 형성한다(Buck et al., Biochem. 24:6245-6252(1985)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 27에 나타낸다.

표 27

[0371]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
	sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이

[0372] 추가의 예시적인 CoA-리가제는, 아직 서열이 특성화되지 않은 래트 다이카복실라제-CoA 리가제(Vamecq et al., Biochemical Journal 230:683-693(1985)), 페니실리움 크리소제눔으로부터의 2 개의 특성화된 페닐아세테이트-CoA 리가제 중 어느 하나(Lamas-Maceiras et al., Biochem. J. 395:147-155(2005); Wang et al., Biochem Biophys Res Commun 360(2):453-458(2007)), 슈도모나스 푸티다로부터의 페닐아세테이트-CoA 리가제(Martinez-Blanco et al., J. Biol. Chem. 265:7084-7090(1990)), 및 바실러스 서브틸리스로부터의 6-카복시헥사노에이트-CoA 리가제(Bower et al., J. Bacteriol. 178(14):4122-4130(1996))를 포함한다. 추가적인 후보 효소는 무스 무스쿨루스(Hasegawa et al., Biochim Biophys Acta 1779:414-419(2008)) 및 호모 사피엔스(Ohgami et al., Biochem Pharmacol 65:989-994(2003))로부터의 아세토아세틸-CoA 신시타제를 포함하며, 상기 효소는 아세토아세테이트의 아세토아세틸-CoA로의 ATP-의존적인 전환을 자연적으로 촉매화한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 28에 나타낸다.

표 28

[0373]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	phl	CAJ15517.1	77019264	페니실리움 크리소제눔
	phlB	ABS19624.1	152002983	페니실리움 크리소제눔
	paaF	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸티다
	bioW	NP_390902.2	50812281	바실러스 서브틸리스
	AACS	NP_084486.1	21313520	무스 무스쿨루스
	AACS	NP_076417.2	31982927	호모 사피엔스

[0374] 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제

[0375] 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제는 상기 CoA 부분을 CoA 수용체 분자로 운반하면서 프로피오닐-CoA의 프로피오네이트로의 전환을 촉매화한다. 다수의 트랜스퍼라제는 광범위한 특이성을 가지며 따라서 다른 것들 중에서도 아세테이트, 숙시네이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 2-메틸아세토아세테이트, 3-케토헥사노에이트, 3-케토펜타노에이트, 발레레이트, 크로토네이트, 3-머캅토프로피오네이트, 프로피오네이트, 비닐아세테이트, 부티레이트와 같은 다양한 CoA 수용체들을 사용할 수 있다.

[0376] 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 활성을 갖는 여러 유전자들이 동정되었다. 로세부리아 스페시즈(*Roseburia* sp.) A2-183으로부터의 효소는 부티릴-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제 및 프로피오닐-CoA:아세테이트:CoA 트랜스퍼라제 활성을 갖는 것으로 나타났다(Charrier et al., Microbiology 152, 179-185(2006)). 가까운 상동체들이 예를 들어 로세부리아 인테스티날리스(*Roseburia intestinalis*) L1-82, 로세부리아 이눌리노보란스(*Roseburia inulinivorans*) DSM 16841, 유박테리움 렉탈레(*Eubacterium rectale*) ATCC 33656에서 발견될 수 있다. 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제 활성을 갖는 또 다른 효소는 클로스트리듐 프로피오니쿰(*Clostridium propionicum*)에서 발견될 수 있다(Selmer et al., Eur J Biochem 269,372-380(2002)). 상기 효소는 상기 CoA

수용체로서 아세테이트, (R)-락테이트, (S)-락테이트, 아크릴레이트 및 부티레이트를 사용할 수 있다(Selmer et al., Eur J Biochem 269,372-380(2002); Schweiger and Buckel, FEBS Letters, 171(1) 79-84(1984)). 가까운 상동체들이 예를 들어 클로스트리듐 노비이(*Clostridium novyi*) NT, 클로스트리듐 베이제링키이 NCIMB 8052, 및 클로스트리듐 보톨리눔 C 균주 Eklund에서 발견될 수 있다. *Ygff*는 에스케리키아 콜라이에서 프로피오닐 CoA:숙시네이트 CoA 트랜스퍼라제를 암호화한다(Haller et al., Biochemistry, 39(16)4622-4629). 가까운 상동체들이 예를 들어 시트로박터 영가에(*Citrobacter youngae*) ATCC 29220, 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*) 서브스페이즈 아리조나에 세로바(*arizonae serovar*), 및 예르시니아 인테르메디아(*Yersinia intermedia*) ATCC 29909에서 발견될 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 29에 나타낸다.

표 29

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
Ach1	AAX19660.1	60396828	로세부리아 스페이즈 A2-183
ROSINTL182_07121	ZP_04743841.2	257413684	로세부리아 인테스티날리스 L1-82
ROSEINA2194_03642	ZP_03755203.1	225377982	로세부리아 이놀리니보란스 DSM 16841
EUBREC_3075	YP_002938937.1	238925420	유박테리움 렉탈레 ATCC 33656
pct	CAB77207.1	7242549	클로스트리듐 프로피오니쿰
NT01CX_2372	YP_878445.1	118444712	클로스트리듐 노비이 NT
Cbei_4543	YP_001311608.1	150019354	클로스트리듐 베이제링키이 NCIMB 8052
CBC_A0889	ZP_02621218.1	168186583	클로스트리듐 보톨리눔 C 균주 Eklund
ygfH	NP_417395.1	16130821	에스케리키아 콜라이 균주 K-12 하위균주 MG1655
CIT292_04485	ZP_03838384.1	227334728	시트로박터 영가에 ATCC 29220
SARI_04582	YP_001573497.1	161506385	살모넬라 엔테리카 서브스페이즈 아리조나에 세로바
vinte0001_14430	ZP_04635364.1	238791727	예르시니아 인테르메디아 ATCC 29909

[0378] 추가적인 후보 효소는 슈도모나스에서 *pcaI* 및 *pcaJ*에 의해 암호화된 2 단위 효소이며, 3-옥소아디필-CoA/숙시네이트 트랜스퍼라제 활성을 갖는 것으로 나타났다(상기 Kaschabek et al.). 상동성에 근거하여 유사한 효소들이 애시네토박터 스페이즈 ADP1(Kowalchuk et al., Gene 146:23-30(1994)) 및 스트렙토마이세스 코엘리콜라(*Streptomyces coelicolor*) 중에 존재한다. 추가의 예시적인 숙시닐-CoA:3 옥소산-CoA 트랜스퍼라제는 헬리코박터 파이로리(Corthesy-Theulaz et al., J. Biol. Chem. 272:25659-25667(1997)) 및 바실러스 서브틸리스(Stols et al., Protein. Expr. Purif. 53:396-403(2007)) 중에 존재한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 30에 나타낸다.

표 30

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
pcaI	AAN69545.1	24985644	슈도모나스 푸티다
pcaJ	NP_746082.1	26990657	슈도모나스 푸티다
pcaI	YP_046368.1	50084858	애시네토박터 스페이즈 ADP1
pcaJ	AAC37147.1	141776	애시네토박터 스페이즈 ADP1
pcaI	NP_630776.1	21224997	스트렙토마이세스 코엘리콜라
pcaJ	NP_630775.1	21224996	스트렙토마이세스 코엘리콜라
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	헬리코박터 파이로리
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	헬리코박터 파이로리
ScoA	NP_391778	16080950	바실러스 서브틸리스
ScoB	NP_391777	16080949	바실러스 서브틸리스

[0380] 상기 CoA 수용체로서 아세테이트를 사용할 수 있는 CoA 트랜스퍼라제는 에스케리키아 콜라이 *atoA*(알파 아단위) 및 *atoD*(베타 아단위) 유전자에 의해 암호화된 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제이다(Vanderwinkel et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 33:902-908(1968); Korolev et al., Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr. 58:2116-2121(2002)). 상기 효소는 또한 상기 CoA 부분을 아이소부티레이트(Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58:1435-1439(1992)), 발레레이트(상기 Vanderwinkel et al.) 및 부타노에이트(상기 Vanderwinkel et al.)를 포함하여, 다양한 분지 및 선형 아실-CoA 기질로부터의 아세테이트로 운반하는 것으로 나타났다.

유사한 효소들이 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032(Duncan et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:5186-5190(2002)), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(Cary et al., Appl Environ Microbiol. 56:1576-1583(1990)), 및 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰(Kosaka et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007)) 중에 존재한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 31에 나타낸다.

표 31

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
atoA	P76459.1	2492994	에스케리키아 콜라이 K12
atoD	P76458.1	2492990	에스케리키아 콜라이 K12
actA	YP_226809.1	62391407	코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032
cg0592	YP_224801.1	62389399	코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032
ctfA	NP_149326.1	15004866	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
ctfB	NP_149327.1	15004867	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
ctfA	AAP42564.1	31075384	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰
ctfB	AAP42565.1	31075385	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰

상기 효소는 또한 프로피오닐-CoA에 대해 목적하는 활성을 나타낼 수 있다. 추가의 예시적인 트랜스퍼라제 후보는, 각각 숙시닐-CoA, 4-하이드록시부틸-CoA, 및 부틸-CoA 트랜스퍼라제 활성을 나타내는 것으로 입증된 클로스트리듐 클루이베리의 *cat1*, *cat2* 및 *cat3*의 유전자 산물에 의해 촉매화된(상기 Seedorf et al.; Sohling et al., Eur. J Biochem. 212:121-127(1993); Sohling et al., J Bacteriol. 178:871-880(1996)). 유사한 CoA 트랜스퍼라제 활성이 또한 트리코모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*)(van Grinsven et al., J. Biol. Chem. 283:1411-1418(2008)) 및 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*)(Riviere et al., J. Biol. Chem. 279:45337-45346(2004)) 중에 존재한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 32에 나타낸다.

표 32

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

혐기성 세균 애시드아미노코커스 페르멘탄스(*Acidaminococcus fermentans*)로부터의 글루타코네이트-CoA-트랜스퍼라제(EC 2.8.3.12) 효소는 이산 글루타코닐-CoA 및 3-부테노일-CoA와 반응한다(Mack et al., FEBS Lett. 405:209-212(1997)). 상기 효소를 암호화하는 유전자는 *gctA* 및 *gctB*이다. 상기 효소는 글루타릴-CoA, 2-하이드록시글루타릴-CoA, 아디필-CoA 및 아크릴일-CoA를 포함한 다른 CoA 유도체들을 환원시키지만 이들에 의해 검출 가능한 활성을 갖는다(Buckel et al. Eur. J. Biochem. 118:315-321(1981)). 상기 효소는 에스케리키아 콜라이에서 클로닝되고 발현되었다(Mack et al., Eur. J. Biochem. 226:41-51(1994)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 33에 나타낸다.

표 33

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
gctA	CAA57199.1	559392	애시드아미노코커스 페르멘탄스
gctB	CAA57200.1	559393	애시드아미노코커스 페르멘탄스

프로피오네이트 키나제

프로피오네이트 키나제는 프로피오네이트 키나제 활성을 갖는 효소에 의해 프로피오닐 포스페이트로 활성화된다. 부티레이트 키나제(EC 2.7.2.7)는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에서 산성 발생 도중 부틸-포스페이트의 부티레이트로의 가역적인 전환을 수행한다(Cary et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:1576-1583(1990)). 상기 효소는 2 개의 *buk* 유전자 산물 중 어느 하나에 의해 암호화된다(Huang et al., J Mol. Microbiol Biotechnol. 2:33-38(2000)). 상기 효소는 대체 기질로서 프로피오네이트, 아이소부타노에이트 및 발레레이트를 수용하는

것으로 나타났다(Hartmanis, J. Biol. Chem., 262(2):617-21(1987)). 다른 부티레이트 키나제 효소는 클로스트리듐 부티리쿰 및 클로스트리듐 테타노물폼(*Clostridium tetanomorphum*)에서 발견된다(Twarog et al., J Bacteriol. 86:112-117(1963)). 상기 효소는 또한 2차 기질로서 프로피오네이트, 아이소부타노에이트 및 발레레이트를 수용한다. 씨모토가 마리티마로부터의 관련된 효소 아이소부티레이트 키나제가 또한 에스케리키아 콜라이에서 발현되고 결정화되었다(Diao et al., E. Biol. Crystallogr. 59:1100-1102(2003); Diao et al., J Bacteriol. 191:2521-2529(2009)). 아스파토키나제는 아스파테이트의 ATP-의존성 인산화를 촉매화하며 여러 아미노산의 합성에 참여한다. *lysC*에 의해 암호화된, 에스케리키아 콜라이 중의 아스파토키나제 III 효소는 광범위한 기질 범위를 가지며 기질 특이성에 관련된 촉매적 잔기들이 추론되었다(Keng et al., Arch. Biochem. Biophys. 335:73-81(1996)). 에스케리키아 콜라이 중의 2 개의 추가적인 키나제, 아세테이트 키나제 및 감마-글루타미드 키나제가 또한 양호한 후보이다. *ackA*에 의해 암호화된, 상기 에스케리키아 콜라이 아세테이트 키나제(Skarstedt et al., J. Biol. Chem. 251:6775-6783(1976))는 아세테이트 이외에 프로피오네이트를 인산화한다(Hesslinger et al., Mol. Microbiol. 27:477-492(1998)). *proB*에 의해 암호화된, 상기 에스케리키아 콜라이 감마-글루타미드 키나제(Smith et al., J. Bacteriol. 157:545-551(1984))는 글루타메이트의 감마 카보산을 인산화한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 34에 나타낸다.

표 34

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
buk1	NP_349675	15896326	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
buk2	Q97II1	20137415	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
buk2	Q9X278.1	6685256	씨모토가 마리티마
lysC	NP_418448.1	16131850	에스케리키아 콜라이
ackA	NP_416799.1	16130231	에스케리키아 콜라이
proB	NP_414777.1	16128228	에스케리키아 콜라이

[0388] 프로피오네이트 리덕타제

[0390] 프로피오네이트의 프로피오닉 세미알데하이드로의 환원은 카복실산 리덕타제에 의해 촉매화된다. 하기 개시되는 숙시네이트 리덕타제 및 4-하이드록시부티레이트 리덕타제 효소에 대한 예시적인 효소 후보를 또한 여기에서 적용할 수 있다.

[0391] 실시예 II

[0392] 글루코스로부터 아세틸-CoA의 생산 경로

[0393] 실시예 I에 더하여, 글루코스로부터 아세틸-CoA의 생산 경로는 포스포에놀피루베이트(PEP)를 통해 진행된다(도 1 내지 4). 글루코스는 상기 미생물 유기체의 고유 해당 경로에 의해 PEP로 전환된다. PEP는 피루베이트 키나제에 의해 피루베이트로 전환되고 이어서 피루베이트 데하이드로게나제 또는 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제에 의해 아세틸-CoA로 전환된다. 한편으로, 피루베이트는 피루베이트 포메이트 라이아제에 의해 아세틸-CoA와 포메이트로 전환된다. 이어서 포메이트는, NADH를 또한 생산하는 포메이트 데하이드로게나제에 의해 이산화 탄소로 전환된다. 이어서 이들 경로에 의해 생산된 아세틸-CoA는 실시예 I에 개시된 바와 같이 아이소프로판올의 생산에 사용되거나 또는 하기 실시예 V에 개시된 바와 같이 n-프로판올 및 아이소프로판올 모두의 생산에 사용된다(도 3).

[0394] 피루베이트 데하이드로게나제

[0395] 피루베이트에서 아세틸-CoA로의 전환을 촉매화하는 피루베이트 데하이드로게나제 복합체가 광범위하게 연구되어 왔다. 사카로마이세스 세레비지아에 복합체는 E1(PDA1, PDB1), E3(LPD1), 및 단백질 X(PDX1) 성분들과 결합하는 E2(LAT1) 코어로 이루어진다(Pronk, Yeast 12:1607-1633(1996)). 에스케리키아 콜라이 효소에서, 상기 E1 성분 중의 특정 잔기들이 기질 특이성을 맡고 있다(Bisswanger, J Biol Chem. 256:815-822(1981); Bremer, Eur. J Biochem. 8:535-540(1969); Gong et al. J Biol Chem. 275:13645-13653(2000)). 공학적 노력은 혐기성 조건 하에서 에스케리키아 콜라이 PDH 효소 활성을 개선시켰다(Kim, Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771(2007); Kim J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008); Zhou, Biotechnol. Lett. 30:335-342(2008)). 상기 에스케리키아 콜라이 PDH와 대조적으로, 바실러스 서브틸리스 복합체는 혐기성 조건 하에서 활성이며 상기 조건 하에서의 증식을 요한다(Nakano, J. Bacteriol. 179:6749-6755(1997)). 글리세롤 상에서 증식하는 동안 특성화된, 클렙시엘라 뉴모니아에 PDH가 또한 혐기성 조건 하에서 활성이다(Menzel, J. Biotechnol.

56:135-142(1997)). 소 신장으로부터의 상기 효소 복합체의 결정 구조(Zhou, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807(2001)) 및 아조토박터 비넬란디아(*Azotobacter vinelandii*)로부터의 E2 촉매 도메인을 입수할 수 있다(Mattevi et al. Science 255:1544-1550(1992)). 일부 포유동물 PDH 효소 복합체는 또 다른 기질, 예를 들어 2-옥소부타노에이트 상에서 반응할 수 있다(Paxton, J Bacteriol. 179:5684-5692(1997)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 35에 나타낸다.

표 35

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
LAT1	NP_014328	6324258	사카로마이세스 세레비지아에
PDA1	NP_011105	37362644	사카로마이세스 세레비지아에
PDB1	NP_009780	6319698	사카로마이세스 세레비지아에
LPD1	NP_116635	14318501	사카로마이세스 세레비지아에
PDX1	NP_011709	6321632	사카로마이세스 세레비지아에
aceE	NP_414656.1	16128107	에스케리키아 콜라이 균주 K12 기질. MG1655
aceF	NP_414657.1	16128108	에스케리키아 콜라이 균주 K12 기질. MG1655
lpd	NP_414658.1	16128109	에스케리키아 콜라이 균주 K12 기질. MG1655
pdhA	P21881.1	3123238	바실러스 서브틸리스
pdhB	P21882.1	129068	바실러스 서브틸리스
pdhC	P21883.2	129054	바실러스 서브틸리스
pdhD	P21880.1	118672	바실러스 서브틸리스
aceE	YP_001333808.1	152968699	클렙시엘라 뉴모니아 MGH78578
aceF	YP_001333809.1	152968700	클렙시엘라 뉴모니아 MGH78578
lpdA	YP_001333810.1	152968701	클렙시엘라 뉴모니아 MGH78578
Pdha1	NP_001004072.2	124430510	라투스 노르베기쿠스
Pdha2	NP_446446.1	16758900	라투스 노르베기쿠스
Dlat	NP_112287.1	78365255	라투스 노르베기쿠스
Dld	NP_955417.1	40786469	라투스 노르베기쿠스

[0397] 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제

[0398] 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제(PFOR)는 피루베이트의 산화를 촉매화하여 아세틸-CoA를 형성한다. 데설포비브리오 아프리카누스(*Desulfovibrio africanus*)로부터의 PFOR을 클로닝하고 에스케리키아 콜라이에서 발현시켜 활성 재조합 효소를 생성시켰으며 이는 산소의 존재 하에서 수일간 안정하였다(Pieulle, J Bacteriol 179:5684-5692(1997)). 산소 안정성은 PFOR에서 비교적 흔하지 않으며 상기 데설포비브리오 아프리카누스 효소의 폴리펩타이드 쇄 중의 60 잔기 연장에 의해 부여되는 것으로 여겨진다. 무어렐라 썬모아세티카 PFOR이 또한 잘 특성화되어 있으며(Menon, Biochemistry 36:8484-8494(1997)) 심지어 독립영양성 생육 중에 피루베이트 합성 방향으로 높은 활성을 갖는 것으로 입증되었다(Furdui, J Biol Chem. 275:28494-28499(2000)). 더욱이, 에스케리키아 콜라이는 상기 무어렐라 썬모아세티카 PFOR과 51% 일치하는 단백질을 암호화하는 특성화되지 않은 개방 판독 프레임, *ydbK*를 갖는다. 에스케리키아 콜라이에서 피루베이트 옥시도리덕타제 활성에 대한 증거가 개시되었다(Blaschkowski, Eur. J Biochem. 123:563-569(1982)). 여러 추가적인 PFOR 효소가 하기 논평에 개시되어 있다(Ragsdale, Chem. Rev. 103:2333-2346(2003)). 최종적으로, 플라보독신 리덕타제(예를 들어 헬리코박터 파이로리 또는 캄필로박터 제주니로부터의 *fqrB*)(St Maurice et al., J. Bacteriol. 189:4764-4773(2007)) 또는 Rnf-형 단백질(Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:2128-2133(2008); Hermann, J. Bacteriol 190:784-791(2008))은 PFOR에 의해 생성된 환원된 페레독신으로부터 NADH 또는 NADPH를 생성시키는 수단을 제공한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 36에 제공한다.

표 36

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
por	CAA70873.1	1770208	데설포비브리오 아프리카누스
por	YP_428946.1	83588937	무어렐라 썬모아세티카
ydbK	NP_415896.1	16129339	에스케리키아 콜라이

fqrB	NP_207955.1	15645778	헬리코박터 파이로리
fqrB	YP_001482096.1	157414840	캡필로박터 제주니
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

[0400] 피루베이트 포메이트 라이아제

[0401] 피루베이트 포메이트 라이아제는 피루베이트 및 CoA의 아세틸-CoA 및 포메이트로의 전환을 촉매화하는 효소이다. 피루베이트 포메이트 라이아제는 혐기성 산화환원 균형의 조절을 돕는데 사용되는 원핵생물 유기체 중의 통상적인 효소이다. 예시적인 효소들을 에스케리키아 콜라이(Knappe, FEMS. Microbiol Rev. 6:383-398(1990)), 락토코커스 락티스(Melchiorson, Appl Microbiol Biotechnol 58:338-344(2002)), 및 스트렙토코커스 뮤탄스(Takahashi-Abbe, Oral. Microbiol Immunol. 18:293-297(2003))에서 찾을 수 있다. 미토콘드리아 피루베이트 포메이트 라이아제가 또한 진핵생물, 클라미도모나스 레인하르트티이(*Chlamydomonas reinhardtii*)에서 동정되었다(Hemschemeier, Eukaryot. Cell 7:518-526(2008); Atteia, J. Biol. Chem. 281:9909-9918(2008)). 이들 효소/단백질을 하기 표 37에 나타낸다.

표 37

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
pf1B	NP_415423	16128870	에스케리키아 콜라이
pf1	CAA03993	2407931	락토코커스 락티스
pf1	BAA09085	1129082	스트렙토코커스 뮤탄스
PFL1	EDP09457	158283707	클라미도모나스 레인하르트티이

[0403] 포메이트 수소 라이아제

[0404] 포메이트 수소 라이아제 효소를 사용하여 포메이트를 이산화 탄소 및 수소로 전환시킬 수 있다. 예시적인 포메이트 수소 라이아제 효소를 에스케리키아 콜라이에서 찾을 수 있다. 상기 에스케리키아 콜라이 포메이트 수소 라이아제는 하이드로게나제 3 및 포메이트 테하이드로게나제-H로 이루어진다(Maeda, Appl Microbiol Biotechnol 77:879-890(2007)). 상기 효소는 *fh1A*의 유전자 산물에 의해 활성화된다(Maeda, Appl Microbiol Biotechnol 77:879-890(2007)). 미량 원소, 셀레늄, 니켈 및 몰리브데늄을 발효 브로스에 첨가하면 포메이트 수소 라이아제 활성이 증대되는 것으로 나타났다(Soini, Microb. Cell Fact. 7:26(2008)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 38에 나타낸다.

표 38

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
하이드로게나제 3:			
hvcD	NP_417202	16130629	에스케리키아 콜라이
hvcC	NP_417203	16130630	에스케리키아 콜라이
hvcF	NP_417200	16130627	에스케리키아 콜라이
hvcG	NP_417199	16130626	에스케리키아 콜라이
hvcB	NP_417204	16130631	에스케리키아 콜라이
hvcE	NP_417201	16130628	에스케리키아 콜라이
포메이트 테하이드로게나제-H:			
fdhF	NP_418503	16131905	에스케리키아 콜라이
활성화제:			
fh1A	NP_417211	16130638	에스케리키아 콜라이

[0406] 포메이트 수소 라이아제 효소는 또한 초고온성 고세균, 썸모코커스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*) 중에 존재한다(Takacs et al., BMC. Microbiol 8:88(2008)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 39에 나타낸다.

표 39

[0407]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	mhyC	ABW05543	157954626	씨모코커스 리토랄리스
	mhyD	ABW05544	157954627	씨모코커스 리토랄리스
	mhyE	ABW05545	157954628	씨모코커스 리토랄리스
	myhF	ABW05546	157954629	씨모코커스 리토랄리스
	myhG	ABW05547	157954630	씨모코커스 리토랄리스
	myhH	ABW05548	157954631	씨모코커스 리토랄리스
	fdhA	AAB94932	2746736	씨모코커스 리토랄리스
	fdhB	AAB94931	157954625	씨모코커스 리토랄리스

[0408] 추가적인 포메이트 수소 라이아제 시스템이 살모넬라 티피뮤리움, 클렙시엘라 뉴모니아에, 로도스피릴룸 루브룸, 메타노박테리움 포르미시쿰에서 발견되었다(Vardar-Schara, Microbial Biotechnology 1:107-125(2008)).

[0409] 포메이트 데하이드로게나제

[0410] 포메이트 데하이드로게나제 활성은 다른 유기체들 중에서도 에스케리키아 콜라이 및 사카로마이세스 세레비지아에 모두에 존재한다. 사카로마이세스 세레비지아에는 2 개의 포메이트 데하이드로게나제, FDH1 및 FDH2를 함유하며, 이들은 포메이트의 CO<sub>2</sub>로의 산화를 촉매화한다(Overkamp et al., Yeast 19:509-520(2002)). 무어렐라 씨모아세티카에서, Moth\_2312 및 Moth\_2313의 유전자 좌들은 실제로 포메이트 데하이드로게나제의 알파 아단위를 암호화하는데 책임이 있는 하나의 유전자인 반면 베타 아단위는 Moth\_2314에 의해 암호화된다(Pierce et al., Environ. Microbiol(2008); Andreesen, J. Bacteriol. 116:867-873(1973); Li, J. Bacteriol 92:405-412(1966); Yamamoto, J. Biol. Chem. 258:1826-1832(1983)). 포메이트 데하이드로게나제 활성을 암호화하는 또 다른 유전자 세트는 신티로포박터 푸마록시단스(*Syntrophobacter fumaroxidans*) 중의 Sfum\_2703 내지 Sfum\_2706에 의해 암호화된다(Reda, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:10654-10658(2008); de Bok et al., Eur. J. Biochem. 270:2476-2485(2003)). Sfum\_2705 및 Sfum\_2706은 실제로, 그들의 무어렐라 씨모아세티카 대응물과 유사하게, 하나의 유전자이다. 에스케리키아 콜라이는 여러 개의 포메이트 데하이드로게나제를 함유한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 40에 나타낸다.

표 40

[0411]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	FDH1	NP_015033	6324964	사카로마이세스 세레비지아에
	FDH2	Q08987	88909613	사카로마이세스 세레비지아에
	Moth_2312	YP_431142	148283121	무어렐라 씨모아세티카
	Moth_2313	YP_431143	83591134	무어렐라 씨모아세티카
	Moth_2314	YP_431144	83591135	무어렐라 씨모아세티카
	Sfum_2703	YP_846816.1	116750129	신티로포박터 푸마록시단스
	Sfum_2704	YP_846817.1	116750130	신티로포박터 푸마록시단스
	Sfum_2705	YP_846818.1	116750131	신티로포박터 푸마록시단스
	Sfum_2706	YP_846819.1	116750132	신티로포박터 푸마록시단스
	fdnG,H,I	NP_415991-993.1	16129433 16129434 16129435	에스케리키아 콜라이
	fdoG,H,I	NP_418330,29,28.1	16131734 16131733 16131732	에스케리키아 콜라이

[0412] 실시예 III

[0413] 환원적 TCA 주기를 사용하는 글루코스로부터의 프로피오닐-CoA의 생산 경로

[0414] 실시예 I 및 II에 더하여, 프로피오닐-CoA의 생산 경로는 옥살로아세테이트를 통해 진행된다(도 1). PEP는 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제를 통해 옥살로아세테이트로 전환된다. 한편으로, PEP는 먼저 피루베이트 키나제에 의해 피루베이트로 전환되고 이어서 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제 또는 피루베이트 카복

실라제에 의해 옥살로아세테이트로 전환된다. 옥살로아세테이트는 환원적 TCA 주기, 메틸류타제, 데카복실라제, 에피머라제 및 데카복실라제에 의해 프로피오닐-CoA로 전환된다.

[0415] PEP 카복시키나제

[0416] 포스포에놀피루베이트의 옥살로아세테이트로의 순 전환은 산화환원-중성이지만, 상기 전환의 기전은 상기 공동생산 경로의 전체 에너지학에 중요하다. 상기 PEP의 옥살로아세테이트로의 전환에 가장 바람직한 효소는 PEP 카복시키나제로, 이는 PEP를 카복실화하는 동시에 ATP를 형성한다. 그러나, 대부분의 유기체에서, PEP 카복시키나제는 글루코스생성 작용을 하며 1 ATP의 대가로 옥살로아세테이트를 PEP로 전환시킨다. 사카로마이세스 세레비지아에는, 글루코스생성 역할을 하는 공고유 PEP 카복시키나제, *PCK1*을 갖는 하나의 상기와 같은 유기체이다(Valdes-Hevia, FEBS. Lett. 258:313-316(1989)). 에스케리키아 콜라이는, 추정 상 PEP 카복시키나제의 바이카보네이트에 대한 보다 높은  $K_m$ 으로 인해 옥살로아세테이트의 생산에서 PEP 카복시키나제의 역할이 PEP 카복실라제(상기는 ATP를 형성하지 않는다)에 비해 부수적인 것으로 여겨지므로, 또 다른 상기와 같은 유기체이다(Kim, Appl Environ Microbiol 70:1238-1241(2004)). 그럼에도 불구하고, 옥살로아세테이트에 대한 PEP로부터의 고유 에스케리키아 콜라이 PEP 카복시키나제의 활성이 에스케리키아 콜라이 K-12의 *ppc* 돌연변이체에서 최근에 입증되었다(Kwon, Journal of Microbiology and Biotechnology 16:1448-1452(2006)). 이들 균주는 생육 결함을 나타내지 않았으며 높은  $\text{NaHCO}_3$  농도에서 증가된 숙시네이트 생산을 가졌다. 일부 유기체, 특히 혐위 세균에서, PEP 카복시키나제는 PEP로부터의 옥살로아세테이트의 생산 및 ATP 발생에 매우 효율적이다. 에스케리키아 콜라이 내로 클로닝된 PEP 카복시키나제 유전자의 예로는 만헤이미아 숙시니시프로듀센스(Lee, Biotechnol. Bioprocess Eng. 7:95-99(2002)), 아나에로비오스피릴룸 숙시니시프로듀센스(Laivenieks, Appl Environ Microbiol 63:2273-2280(1997)), 및 액티노바실러스 숙시노제네스(Kim, Appl Environ Microbiol 70:1238-1241(2004))로부터의 것들이 있다. 내부 실험들은 또한 하에모필루스 인플루엔자에 의해 암호화된 PEP 카복시키나제 효소가 PEP로부터 옥살로아세테이트를 형성하는데 매우 효율적임을 발견하였다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 41에 나타낸다.

표 41

[0417]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>PCK1</i>	NP_013023	6322950	사카로마이세스 세레비지아에
<i>pck</i>	NP_417862.1	16131280	에스케리키아 콜라이
<i>pckA</i>	YP_089485.1	52426348	만헤이미아 숙시니시프로듀센스
<i>pckA</i>	009460.1	3122621	아나에로비오스피릴룸 숙시니시프로듀센스
<i>pckA</i>	Q6W6X5	75440571	액티노바실러스 숙시노제네스
<i>pckA</i>	P43923.1	1172573	하에모필루스 인플루엔자

[0418] 본 보고서에 나타낸 상기 서열들 및 후속 효소들에 대한 서열들을 사용하여 서열 유사성 검색(예를 들어 BLASTp)을 통해 진뱅크 또는 다른 데이터베이스 중에서 상동성 단백질을 동정할 수 있다. 생성되는 상동성 단백질 및 그의 상응하는 유전자 서열들은 선택된 숙주 유기체로의 형질전환에 추가적인 DNA 서열을 제공한다.

[0419] PEP 카복실라제

[0420] PEP 카복실라제는 PEP로부터 옥살로아세테이트의 형성을 위한 또 다른 효소를 나타낸다. 상기 효소는 옥살로아세테이트의 탈카복실화 시 ATP를 생성시키지 않으므로, 그의 사용은 상기 생산 경로의 최대 ATP 수율을 감소시키며 옥살로아세테이트의 PEP로의 전환에 덜 유리한 대안을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, 1.33 mol/mol의 최대의 이론적인 C3 알콜 수율은, PEP 카복실라제를 PEP를 옥살로아세테이트로 전환시키는데 사용함을 변화시키지 않고 유지할 것이다. 사카로마이세스 세레비지아에는 PEP 카복실라제를 자연적으로 암호화하지 않지만, PEP 카복실라제를 암호화하는 유전자를 갖는 예시적인 유기체는 에스케리키아 콜라이(Kai, Arch. Biochem. Biophys. 414:170-179(2003)), 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스(*Methylobacterium extorquens*) AM1(Arps, J. Bacteriol. 175:3776-3783(1993)), 및 코리네박테리움 글루타미쿰(Eikmanns, Mol. Gen. Genet. 218:330-339(1989))을 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 42에 나타낸다.

표 42

[0421]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	ppc	NP_418391	16131794	에스케리키아 콜라이
	ppcA	AAB58883	28572162	메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스
	ppc	ABB53270	80973080	코리네박테리움 글루타미쿰

[0422] 피루베이트 키나제 및 메틸말로닐-CoA 카복실트랜스퍼라제

[0423] PEP로부터 옥살로아세테이트로의 추가의 에너지 효율적인 경로는 2 개의 효소 활성, 즉 피루베이트 키나제 및 메틸말로닐-CoA 카복실트랜스퍼라제를 필요로 한다. 피루베이트 키나제는 PEP의 피루베이트로의 ATP-발생 전환을 촉매화하며 사카로마이세스 세레비지아에 중의 *PKI*(Burke, J. Biol. Chem. 258:2193-2201(1983)) 및 *PK2*(Boles et al., J. Bacteriol. 179:2987-2993(1997)) 유전자에 의해 암호화된다. 에스케리키아 콜라이에서, 상기 활성은 *pykF* 및 *pykA*의 유전자 산물에 의해 촉매화된다. 메틸말로닐-CoA 카복실트랜스퍼라제는 피루베이트의 옥살로아세테이트로의 전환을 촉매화한다. 중요하게, 상기 반응은 또한 (S)-메틸말로닐-CoA의 프로피오닐-CoA로의 전환을 동시에 촉매화한다(도 1 및 2 참조). 1.3S, 5S 및 12S 아단위를 포함하는 예시적인 메틸말로닐-CoA 카복실트랜스퍼라제를 프로피오니박테리움 프레우텐레이키에서 발견할 수 있다(Thornton et al., J. Bacteriol 175:5301-5308(1993)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 43에 나타낸다.

표 43

[0424]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	PYK1	NP_009362	6319279	사카로마이세스 세레비지아에
	PYK2	NP_014992	6324923	사카로마이세스 세레비지아에
	pykF	NP_416191.1	16129632	에스케리키아 콜라이
	pykA	NP_416368.1	16129807	에스케리키아 콜라이
	1.3S 아단위	P02904	114847	프로피오니박테리움 프레우텐레이키
	5S 아단위	Q70AC7	62901478	프로피오니박테리움 프레우텐레이키
	12S 아단위	Q8GBW6	62901481	프로피오니박테리움 프레우텐레이키

[0425] 피루베이트 키나제 및 피루베이트 카복실라제

[0426] 효소들의 조합은 PEP 카복실라제의 경우와 동일한 화학량론으로 PEP를 옥살로아세테이트로 전환시킬 수 있다. 이들 효소는 피루베이트 키나제, *PKI*(Burke, J. Biol. Chem. 258:2193-2201(1983)) 또는 *PK2*(Boles et al., J. Bacteriol. 179:2987-2993(1997)) 및 피루베이트 카복실라제, *PYCI*(Walker, Biochem. Biophys. Res. Commun. 176:1210-1217(1991)) 또는 *PYC2*(Walker, Biochem. Biophys. Res. Commun. 176:1210-1217(1991))에 의해 암호화된다. 후자의 단백질/유전자를 하기 표 44에 나타낸다.

표 44

[0427]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	PYC1	NP_011453	6321376	사카로마이세스 세레비지아에
	PYC2	NP_009777	6319695	사카로마이세스 세레비지아에
	Pyc	YP_890857.1	118470447	마이코박테리움 스메그마티스

[0428] 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제, 퓨마레이트 리덕타제

[0429] 옥살로아세테이트를, 상기 TCA 주기가 환원적 주기로 실행되는 경우, 말레이트 데하이드로게나제, 퓨마라제 및 퓨마레이트 리덕타제에 의해 숙시네이트로 전환시킬 수 있다. 사카로마이세스 세레비지아에는 3 개의 말레이트 데하이드로게나제 사본, *MDH1*(MaAlister-Henn, J. Bacteriol 169:5157-5166(1987)), *MDH2*(Minard, Mol. Cell. Biol. 11:370-380(1991); Gibson, J. Biol. Chem. 278:25628-25636(2003)), 및 *MDH3*(Steffan, J. Biol. Chem. 267:24708-24715(1992))을 가지며, 이들은 각각 미토콘드리아, 시토솔 및 페록시솜에 집중되어 있다. 사카로마이세스 세레비지아에는 하나의 퓨마라제-암호화 유전자 사본, *FUMI*(그의 산물은 시토솔과 미토콘드리아 모두에 집중되어 있다)을 함유한다(Sass, J. Biol. Chem. 278:45109-45116(2003)). 퓨마레이트 리덕타제는 2 개의 용해성 효소, *FRDS1*(Enomoto, DNA. Res. 3:263-267(1996)) 및 *FRDS2*(Muratsubaki, Arch.

Biochem. Biophys. 352:175-181(1998))에 의해 암호화되며, 이들은 각각 시토솔 및 프로미토콘드리아에 집중되어 있고 글루코스 상에서의 혐기성 생육에 요구된다(Arikawa, Microbiol Lett. 165:111-116(1998)). 에스케리키아 콜라이는 활성 말레이트 데하이드로게나제를 갖는 것으로 공지되어 있다. 상기 에스케리키아 콜라이는 *fumA*, *B* 및 *C*에 의해 암호화된 3 개의 퓨마라제를 가지며, 이들은 각각 상이한 산소 유용성 조건 하에서 활성이다. 에스케리키아 콜라이 중의 퓨마라이트 리덕타제는 4 개의 아단위들로 구성된다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 45에 나타낸다.

표 45

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
MDH1	NP_012838	6322765	사카로마이세스 세레비지아에
MDH2	NP_014515	116006499	사카로마이세스 세레비지아에
MDH3	NP_010205	6320125	사카로마이세스 세레비지아에
FUM1	NP_015061	6324993	사카로마이세스 세레비지아에
FRDS1	P32614	418423	사카로마이세스 세레비지아에
FRDS2	NP_012585	6322511	사카로마이세스 세레비지아에
<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
<i>Mdh</i>	NP_417703.1	16131126	에스케리키아 콜라이
<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

[0431] 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제

[0432] 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제는 상기 CoA 부분을 CoA 수용체 분자로 운반하면서 숙시닐-CoA의 숙시네이트로의 전환을 촉매화한다. 다수의 트랜스퍼라제는 광범위한 특이성을 가지며 따라서 다른 것들 중에서도 아세테이트, 숙시네이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 2-메틸아세토아세테이트, 3-케토희사노에이트, 3-케토펜타노에이트, 발레레이트, 크로토네이트, 3-머캅토프로피오네이트, 프로피오네이트, 비닐아세테이트, 부티레이트와 같은 다양한 CoA 수용체들을 사용할 수 있다.

[0433] 상기 숙시네이트의 숙시닐-CoA로의 전환을 이상적으로는 ATP 또는 GTP의 직접 소비를 필요로 하지 않는 트랜스퍼라제에 의해 수행한다. 이러한 유형의 반응은 다수의 유기체들에서 통상적이다. 추정 상 상기 반응 단계에서 상부 후보 효소는 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제이다. 상기 효소는 3-케토아실-CoA를 3-케토산으로 전환시키면서 숙시네이트를 숙시닐-CoA로 전환시킨다. 예시적인 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제는 헬리코박터 파이로리(Corthesy-Theulaz et al., J. Biol. Chem. 272:25659-25667(1997)), 바실러스 서브틸리스(Stols et al., Protein. Expr. Purif. 53:396-403(2007)), 및 호모 사피엔스(Fukao et al., Genomics, 68:144-151(2000); Tanaka, Mol. Hum. Reprod. 8:16-23(2002)) 중에 존재한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 46에 나타낸다.

표 46

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	헬리코박터 파이로리
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	헬리코박터 파이로리
<i>ScoA</i>	NP_391778	16080950	바실러스 서브틸리스
<i>ScoB</i>	NP_391777	16080949	바실러스 서브틸리스
<i>OXCT1</i>	NP_000427	4557817	호모 사피엔스
<i>OXCT2</i>	NP_071403	11545841	호모 사피엔스

[0435] 숙시네이트의 숙시닐-CoA로의 전환을 또한 숙시닐-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제에 의해 촉매화할 수 있다. 클로스트리듐 클루이베리의 *cat1*의 유전자 산물은 숙시닐-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제 활성을 발휘하는 것으로 나타났다(Sohling, J Bacteriol. 178:871-880(1996)). 또한, 상기 활성은 트리코모나스 바기날리스(van Grinsven et al., J. Biol. Chem. 283:1411-1418(2008)) 및 트리파노소마 브루세이(Riviere et al., J. Biol.

Chem. 279:45337-45346(2004)) 중에 존재한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 47에 나타낸다.

표 47

[0436]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
cat1	P38946.1	729048	클로스트리듐 클루이베리
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	트리코모나스 바기날리스 G3
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	트리파노소마 브루세이

[0437]

더욱 또 다른 가능한 CoA 수용체는 벤질숙시네이트이다. 숙시닐-CoA:(R)-벤질숙시네이트 CoA-트랜스퍼라제는 타우에라 아로마티카(*Thauera aromatica*)와 같은 유기체에서 톨루엔에 대한 혐기성 분해 경로의 일부로서 작용한다(Leuwein and Heider, J. Bact. 183(14):4288-4295(2001)). 상동체들을 아조아르쿠스(*Azoarcus*) 스페시즈 T, 아로마톨레움 아로마티쿰(*Aromatoleum aromaticum*) EbN1, 및 제오박터 메탈리레듀센스(*Geobacter metallireducens*) GS-15에서 발견할 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 48에 나타낸다.

표 48

[0438]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
bbsE	AAF89840	9622535	타우에라 아로마티카
bbsf	AAF89841	9622536	타우에라 아로마티카
bbsE	AAU45405.1	52421824	아조아르쿠스 스페시즈 T
bbsF	AAU45406.1	52421825	아조아르쿠스 스페시즈 T
bbsE	YP_158075.1	56476486	아로마톨레움 아로마티쿰 EbN1
bbsF	YP_158074.1	56476485	아로마톨레움 아로마티쿰 EbN1
Gmet_1521	YP_384480.1	78222733	제오박터 메탈리레듀센스 GS-15
Gmet_1522	YP_384481.1	78222734	제오박터 메탈리레듀센스 GS-15

[0439]

최종적으로, *ygfH*는 에스케리키아 콜라이에서 프로피오닐 CoA:숙시네이트 CoA 트랜스퍼라제를 암호화한다(Haller et al., Biochemistry, 39(16) 4622-4629). 가까운 상동체들이 예를 들어 시트로박터 영가에 ATCC 29220, 살모넬라 엔테리카 서브스페시즈 아리조나에 세로바, 및 예르시니아 인테르메디아 ATCC 29909에서 발견될 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 49에 나타낸다.

표 49

[0440]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
ygfH	NP_417395.1	16130821	에스케리키아 콜라이 균주 K-12 하위균주 MG1655
CIT292_04485	ZP_03838384.1	227334728	시트로박터 영가에 ATCC 29220
SARI_04582	YP_001573497.1	161506385	살모넬라 엔테리카 서브스페시즈 아리조나에 세로바
vinte0001_14430	ZP_04635364.1	238791727	예르시니아 인테르메디아 ATCC 29909

[0441]

숙시닐-CoA 신시타제

[0442]

사카로마이세스 세레비지아에의 *LSC1* 및 *LSC2* 유전자 및 에스케리키아 콜라이의 *sucC* 및 *sucD* 유전자의 산물은 1 ATP의 동반 소모(생체 내에서 가역적인 반응이다)로 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA의 형성을 촉매화하는 숙시닐-CoA 신시타제 복합체를 자연적으로 형성한다(Przybyla-Zawilask et al., Eur. J. Biochem. 258(2):736-743(1998); Buck et al., J. Gen. Microbiol. 132(6):1753-1762(1986)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 50에 나타낸다.

표 50

[0443]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
LSC1	NP_014785	6324716	사카로마이세스 세레비지아에
LSC2	NP_011760	6321683	사카로마이세스 세레비지아에
sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이

sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이
------	------------	---------	------------

[0444] 메틸말로닐-CoA 뮤타제

[0445] 숙시닐-CoA는 메틸말로닐-CoA 뮤타제(MCM)에 의해 (R)-메틸말로닐-CoA로 전환시킬 수 있다. 에스케리키아 콜라이에서, 상기 가역적인 아데노실코발아민-의존성 뮤타제는 3-단계 경로에 참여하여 숙시네이트의 프로피오네이트로의 전환을 이끈다(Haller, Biochemistry 39:4622-9(2000)). MCM은 에스케리키아 콜라이에서 유전자 *scpA*(Haller, Biochemistry 39:4622-9(2000); Bobik, Anal. Bioanal. Chem. 375:344-349(2003)) 및 호모 사피엔스에서 *mutA*(Padovani, Biochemistry 45:9300-9306(2006))에 의해 암호화된다. 여러 다른 유기체들에서 MCM은 알파 및 베타 아단위를 함유하며 2 개의 유전자에 의해 암호화된다. 상기 2-아단위 단백질을 암호화하는 예시적인 유전자 후보는 프로피오니박테리움 프레텐레이키이 스페시즈 웨르마니 *mutA* 및 *mutB*(Korotkova, J Biol Chem. 279:13652-13658(2004)) 및 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 *mcmA* 및 *mcmB*(Korotkova, J Biol Chem. 279:13652-13658(2004))이다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 51에 나타낸다.

표 51

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>scpA</i>	NP_417392.1	16130818	에스케리키아 콜라이 K12
<i>mutA</i>	P22033.3	67469281	호모 사피엔스
<i>mutA</i>	P11652.3	127549	프로피오니박테리움 프레텐레이키이 스페시즈 웨르마니
<i>mutB</i>	P11653.3	127550	프로피오니박테리움 프레텐레이키이 스페시즈 웨르마니
<i>mcmA</i>	Q84FZ1	75486201	메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스
<i>mcmB</i>	Q6TMA2	75493131	메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스

[0447] 상기 에스케리키아 콜라이 *scpA* 유전자 산물에 대한 높은 상동성을 근거로 동정된 추가적인 효소 후보들을 하기 표 52에 나타낸다.

표 52

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>sbm</i>	NP_838397.1	30064226	시겔라 플렉스네리
SARI_04585	ABX24358.1	160867735	살모넬라 엔테리카
YfreA_01000861	ZP_00830776.1	77975240	에르시니아 프레데릭세니

[0449] 상기 메틸말로닐-CoA 뮤타제 촉매 유전자에 인접한 유전자들이 또한 최대 활성에 필요하다는 증거가 추가로 존재한다. 예를 들어, 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스로부터의 *meaB* 유전자가 메틸말로닐-CoA 뮤타제와 복합체를 형성하고, 시험관 내 뮤타제 활성을 자극하며, 가능하게는 상기 뮤타제를 비가역적 불활성화로부터 보호함이 입증되었다(Korotkova, J Biol Chem. 279:13652-13658(2004)). 상기 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 *meaB* 유전자 산물은 염색체상의 *scpA*에 인접한 에스케리키아 콜라이 *argK* 유전자(BLASTp: 45% 일치성, e-값: 4e-67)의 산물과 매우 유사하다. 프로피오니박테리움 프레우텐레이키이 종의 *meaB* 상동체에 대한 서열은 진뱅크에 실려있지 않다. 그러나, 상기 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) KPA171202 유전자 산물, YP\_055310.1은 상기 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 *meaB* 단백질과 51% 일치하며, 그의 유전자가 또한 상기 염색체상의 메틸말로닐-CoA 뮤타제 유전자에 인접해 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 53에 나타낸다.

표 53

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>argK</i>	AAC75955.1	1789285	에스케리키아 콜라이 K12
KPA171202	YP_055310.1	50842083	프로피오니박테리움 아크네스
<i>meaB</i>	2QM8_B	158430328	메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스

[0451] 메틸말로닐-CoA 에피머라제

[0452] 메틸말로닐-CoA 에피머라제(MMCE)는 (R)-메틸말로닐-CoA 및 (S)-메틸말로닐-CoA를 상호전환시키는 효소이다. MMCE는 홀수 지방산 및 아미노산 발린, 아이소류신, 및 메티오닌의 파괴에 필수적인 효소이다. 메틸말로닐-CoA 에피머라제는 바실러스 서브틸리스(*YqjC*)(Haller, Biochemistry. 39:4622-4629(2000)), 호모 사피엔스(*YqjC*)(Fuller, Biochem. J 213:643-650(1983)), 라투스 노르베기쿠스(*Mcee*)(Bobik, J Biol Chem. 276:37194-37198(2001)), 프로피오니박테리움 쉼르마니이(*AF454511*)(Haller, Biochemistry 39:4622-9(2000); McCarthy, Structure 9:637-46(2001); Fuller, Biochem. J 213:643-650(1983)) 및 카에노라브디티스 엘레간스(*mmce*)(Kuhn et al., FEBS J 272:1465-1477(2005))와 같은 유기체들 중에 존재한다. 바실러스 세레우스 중의 추가적인 유전자 후보, *AE016877*은 다른 특성화된 효소들과 높은 서열 상동성을 갖는다. 상기 사용된 메틸말로닐-CoA 데카복실라제 또는 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제가 메틸말로닐-CoA의 (S) 입체이성질체를 필요로 하는 경우 MMCE 활성이 필요하다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 54에 나타낸다.

표 54

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>YqjC</i>	NP_390273	255767522	바실러스 서브틸리스
MCEE	Q96PE7.1	50401130	호모 사피엔스
<i>Mcee_predicted</i>	NP_001099811.1	157821869	라투스 노르베기쿠스
AF454511	AAL57846.1	18042135	프로피오니박테리움 프레텐레이키 스페시즈 쉼르마니
<i>mmce</i>	AAT92095.1	51011368	카에노라브디티스 엘레간스
AE016877	AAPO8811.1	29895524	바실러스 세레우스 ATCC 14579

[0454] 메틸말로닐-CoA 데카복실라제

[0455] 메틸말로닐-CoA 데카복실라제는 에스케리키아 콜라이에서 메틸말로닐-CoA의 프로피오닐-CoA로의 전환을 촉매화하는 비오틴-의존성 효소이다(Benning, Biochemistry. 39:4630-4639(2000); Haller, Biochemistry 39:4622-4629(2000)). 상기 에스케리키아 콜라이 효소의 입체 특이성은 보고되지 않았지만, 프로피오니제눔 모데스툼(*Propionigenium modestum*)(Bott et al., Eur. J. Biochem. 250:590-599(1997)) 및 베일로넬라 파르블라(*Veillonella parvula*)(Huder, J. Biol. Chem. 268:24564-24571(1993)) 중의 상기 효소는 메틸말로닐-CoA의 (S)-입체이성질체의 탈카복실화를 촉매화한다(Hoffmann, FEBS. Lett. 220:121-125(1987)). 상기 프로피오니제눔 모데스툼 및 베일로넬라 파르블라로부터의 효소는 (S)-메틸말로닐-CoA를 탈카복실화할뿐만 아니라 나트륨 이온을 에너지 발생 수단으로서 세포막을 가로질러 운반하는 펌프를 생성시키는 다수의 아단위들로 구성된다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 55에 나타낸다.

표 55

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>YgfG</i>	NP_417394	90111512	에스케리키아 콜라이
<i>mmdA</i>	CAA05137	2706398	프로피오니제눔 모데스툼
<i>mmdD</i>	CAA05138	2706399	프로피오니제눔 모데스툼
<i>mmdC</i>	CAA05139	2706400	프로피오니제눔 모데스툼
<i>mmdB</i>	CAA05140	2706401	프로피오니제눔 모데스툼
<i>mmdA</i>	CAA80872	415915	베일로넬라 파르블라
<i>mmdC</i>	CAA80873	415916	베일로넬라 파르블라
<i>mmdE</i>	CAA80874	415917	베일로넬라 파르블라
<i>mmdD</i>	CAA80875	415918	베일로넬라 파르블라
<i>mmdB</i>	CAA80876	415919	베일로넬라 파르블라

[0457] 실시예 IV

[0458] 쓰레오닌을 통한 글루코스로부터 프로피오닐-CoA의 생산 경로

[0459] 실시예 I 및 II에 더하여, 쓰레오닌을 통한 프로피오닐-CoA의 생산 경로를 도 2에 예시한다. PEP를 실시예 III에 개시된 바와 같이 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제를 통해 옥살로아세테이트로 전환시킨다. 한

편으로, PEP를 실시예 III에 개시된 바와 같이 먼저 피루베이트 키나제에 의해 피루베이트로 전환시키고 이어서 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제 또는 피루베이트 카복실라제에 의해 옥살로아세테이트로 전환시킨다. 옥살로아세테이트를 고 수율을 위해 조작된 고유 쓰레오닌 경로에 의해 쓰레오닌으로 전환시킨다. 이어서 상기 쓰레오닌을 탈아민화시켜 2-옥소부타노에이트를 형성시키고 후속적으로 프로피오닐-CoA로 전환시킨다. 하나의 대안으로, 2-옥소부타노에이트를 데카복실라제에 의해 프로피오날데하이드로 전환시키고, 이어서 이를 프로판올 데하이드로게나제에 의해 n-프로판올로 환원시킨다.

[0460] 쓰레오닌 데아미나제

[0461] 쓰레오닌의 2-옥소부타노에이트(또는 2-케토부티레이트)로의 전환을 쓰레오닌 데아미나제에 의해 수행할 수 있다. 상기는 *ilvA*(Calhoun et al., J. Biol. Chem. 248(10):3511-6(1973)) 및 *tdcB*(Umbarger et al., J. Bacteriol. 73(1):105-12(1957); Datta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(2):393-7(1987))로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 의해 암호화된다. 로도스피릴룸 루브룸은 쓰레오닌 데아미나제를 함유하는 추가의 예시적인 유기체를 나타낸다(Feldberg et al., Eur. J. Biochem. 21(3): 438-46(1971); 미국 특허 제 5,958,745 호). 상기 형질전환을 수행하기 위한 예시적인 효소에 대한 상세한 내용을 하기에 나타낸다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 56에 나타낸다.

표 56

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>ilvA</i>	AAC77492	1790207	에스케리키아 콜라이
<i>tdcB</i>	AAC76152	1789505	에스케리키아 콜라이
<i>Rru_A2877</i>	YP_427961.1	83594209	로도스피릴룸 루브룸
<i>Rru_A0647</i>	YP_425738.1	83591986	로도스피릴룸 루브룸

[0463] 2-옥소부타노에이트 데하이드로게나제

[0464] 2-옥소부타노에이트(2-케토부티레이트)를 피루베이트 포메이트 라이아제 및 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소를 통해 프로피오닐-CoA로 전환시킬 수 있다. 상기 피루베이트 포메이트 라이아제는 *pf1B* 및 *tdcE* 중에서 선택된 유전자에 의해 암호화되는 반면, 상기 피루베이트 포메이트 라이아제 활성화 효소는 *pf1A* 유전자에 의해 암호화된다. 이들 형질전환을 수행하기 위한 예시적인 유전자들에 대한 상세한 내용은 이미 나열되어 있다.

[0465] 한편으로, 2-옥소부타노에이트를 피루베이트 데하이드로게나제, 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제(PFOR), 또는 2-케토산 데하이드로게나제 작용성을 갖는 임의의 다른 효소에 의해 프로피오닐-CoA로 전환시킬 수 있다. 상기와 같은 효소는 또한 피루베이트를 아세틸-CoA로 전환시킬 수 있다. 예시적인 피루베이트 데하이드로게나제 효소는 예를 들어 에스케리키아 콜라이(Bisswanger, H., J. Biol. Chem. 256:815-822(1981); Bremer, J. Eur. J. Biochem. 8:535-540(1969); Gong et al., J. Biol. Chem. 275:13645-13653(2000)), 바실러스 서브틸리스(Nakano et al., J. Bacteriol. 179:6749-6755(1997)), 클렙시엘라 뉴모니아(Menzel et al., J. Biotechnol. 56:135-142(1997)), 라투스 노르베기쿠스(Paxton et al., Biochem. J. 234:295-303(1986)) 중에 존재한다. 예시적인 유전자 정보를 하기에 제공한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 57에 나타낸다.

표 57

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>aceE</i>	NP_414656.1	16128107	에스케리키아 콜라이 균주 K12 하위균주 MG1655
<i>aceF</i>	NP_414687.1	16128108	에스케리키아 콜라이 균주 K12 하위균주 MG1655
<i>lpd</i>	NP_414658.1	16128109	에스케리키아 콜라이 균주 K12 하위균주 MG1655
<i>pdhA</i>	P21881.1	3123238	바실러스 서브틸리스
<i>pdhB</i>	P21882.1	129068	바실러스 서브틸리스
<i>pdhC</i>	P21883.2	129054	바실러스 서브틸리스
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	바실러스 서브틸리스
<i>aceE</i>	YP_001333808.1	152968699	클렙시엘라 뉴모니아 MGH78578
<i>aceF</i>	YP_001333809.1	152968700	클렙시엘라 뉴모니아 MGH78578

lpdA	YP_001333810.1	152968701	클렙시엘라 뉴모니아 MGH78578
Pdha1	NP_001004072.2	124430510	라투스 노르베기쿠스
Pdha2	NP_446446.1	16758900	라투스 노르베기쿠스
Dlat	NP_112287.1	78365255	라투스 노르베기쿠스
Dld	NP_955417.1	40786469	라투스 노르베기쿠스

[0467] 예시적인 PFOR 효소는 예를 들어 클로닝되고 에스케리키아 콜라이에서 발현되어 활성 재조합 효소(산소의 존재 하에서 수일간 안정하였다)를 생성시키는 데설포비브리오 아프리카누스로부터의 효소를 포함한다(Pieulle et al., J Bacteriol 179:5684-5692(1997)). 산소 안정성은 PFOR에서 비교적 흔하지 않으며 상기 데설포비브리오 아프리카누스 효소의 폴리펩타이드 쇠 중의 60 잔기 연장에 의해 부여되는 것으로 여겨진다. 무어렐라 썬모아세티카 PFOR이 또한 잘 특성화되어 있으며(Menon et al., Biochemistry 36:8484-8494(1997)) 독립영양성 생육 중에 피루베이트 합성 방향으로 높은 활성을 갖는 것으로 입증되었다(Furdui et al. J Biol Chem. 275:28494-28499(2000)). 더욱이, 에스케리키아 콜라이는 상기 무어렐라 썬모아세티카 PFOR과 51% 일치하는 단백질을 암호화하는, 특성화되지 않은 개방 판독 프레임, *ydbK*를 갖는다. 에스케리키아 콜라이에서 피루베이트 옥시도리덕타제 활성에 대한 증거가 개시되었다(Blaschkowski et al., Eur. J Biochem. 123:563-569(1982)). 이들 예시적인 PFOR 효소의 단백질 서열을 하기에 나타낸 바와 같이 하기의 진뱅크 수납 및/또는 GI 번호에 의해 확인할 수 있다. 여러 추가적인 PFOR 효소가 개시되었다(Ragsdale, Chem. Rev. 103:2333-2346(2003)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 58에 나타낸다.

표 58

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
Por	CAA70873.1	1770208	데설포비브리오 아프리카누스
Por	YP_428946.1	83588937	무어렐라 썬모아세티카
YdbK	NP_415896.1	16129339	에스케리키아 콜라이

[0469] 프로피오닐-CoA의 추가적인 생산 경로가 미국 특허 제 5,958,745 호에 개시되어 있으며 상기 특허는 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다. 하나의 상기와 같은 경로는 피루베이트 옥시다제에 의한 2-케토부티레이트의 프로피오네이트로의 전환, 및 아실-CoA 신시타제를 통한 프로피오네이트의 프로피오닐-CoA로의 전환을 포함한다.

[0470] 2-옥소부타노에이트 데카복실라제

[0471] 케토산 데카복실라제는 2-옥소부타노에이트의 프로피온알데하이드로의 전환을 촉매화할 수 있다. 여러 2-케토산 데카복실라제들이 동정되었다. 상기 단계에 대한 효소 후보는 피루베이트 데카복실라제(EC 4.1.1.1), 벤조일포메이트 데카복실라제(4.1.1.7), 알파-케토글루타레이트 데카복실라제(EC 4.1.1.71), 분지 쇠 알파-케토산 데카복실라제(4.1.1.72), 및 인돌피루베이트 데카복실라제(EC 4.1.1.74)이다. 이들 데카복실라제 부류는 NADH-의존성이며, 이들은 보조 인자로서 티아민 다이포스페이트를 사용하고, 상기 기질과 효소-결합된 보조 인자와의 상호작용은 효소 활성화에 대한 속도 제한 단계인 것으로 생각된다(Hubner, Eur. J Biochem. 92:175-181(1978)). 피루베이트 데카복실라제 및 벤조일포메이트 데카복실라제는 다양한 케토산에 대해 광범위한 기질 범위를 가지며 구조상 상세히 특성화되었다. 보다 적은 알파-케토글루타레이트 및 분지 쇠 알파-케토산 데카복실라제가 실험적으로 특성화되었지만; 이들 효소는 또한 다양한 케토산 기질들을 탈카복실화하는 것으로 보인다.

[0472] 피루베이트 데카복실라제(PDC)(또한 케토산 데카복실라제로 지칭됨)는 알콜 발효의 핵심 효소이며, 피루베이트의 아세트알데하이드로의 탈카복실화를 촉매화한다. 상기 사카로마이세스 세레비지아에로부터의 효소는 2-케토부티레이트, 2-케토발레레이트, 3-하이드록시피루베이트 및 2-페닐피루베이트를 포함하여 지방족 2-케토산에 대해 광범위한 기질 범위를 갖는다(22). *pdC*에 의해 암호화된, 자이모모나스 모빌리스로부터의 PDC는 상이한 기질들에 대한 친화성을 변경시키는 지시된 공학 연구의 주제였다(Siegert et al., Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005)). 상기 사카로마이세스 세레비지아에로부터의 PDC가 또한 광범위하게 연구되었으며, 변경된 활성에 대해 조작되었고, 에스케리키아 콜라이에서 작용적으로 발현되었다(Li, Biochemistry. 38:10004-10012(1999); ter Schure, Appl. Environ. Microbiol. 64:1303-1307(1998); Killenberg-Jabs, Eur. J. Biochem. 268:1698-1704(2001)). 상기 효소의 결정 구조를 입수할 수 있다(Killenberg-Jabs, Eur. J. Biochem. 268:1698-1704(2001)). 다른 잘-특성화된 PDC 후보는 아세트박터 파스티리안스(Chandra, Arch.

Microbiol. 176:443-451(2001)) 및 클루이베로마이세스 락티스(Krieger, Eur. J. Biochem. 269:3256-3263(2002))로부터의 효소를 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 59에 나타낸다.

표 59

단백질	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
pdc	P06672.1	118391	사이모모나스 모빌리스
pdcl	P06169	30923172	사카로마이세스 세레비지아에
pdc	Q8L388	20385191	아세트박터 파스퇴리안스
pdcl	Q12629	52788279	클루이베로마이세스 락티스

[0473]

PDC와 같이, 벤조일포메이트 데카복실라제는 광범위한 기질 범위를 가지며 효소 공학 연구의 표적이었다. 상기 슈도모나스 푸티다로부터의 효소가 광범위하게 연구되었으며 상기 효소의 결정 구조를 입수할 수 있다 (Polovnikova et al., Biochemistry 42:1820-1830(2003); Hasson et al., Biochemistry 37:9918-9930(1998)). 상기 슈도모나스 푸티다 효소의 활성 부위 중 2 개 잔기의 위치 선택적 돌연변이는 천연 및 비-천연 기질의 친화성(Km)을 변경시켰다(Siegert et al., Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005)). 상기 효소의 성질들은 지시된 공학에 의해 추가로 변경되었다(Lingen et al., ChemBiochem. 4:721-726(2003); Lingen, Protein Eng 15:583-593(2002)). *mdlC*에 의해 암호화된, 슈도모나스 아에루기노사로부터의 효소가 또한 실험적으로 특성화되었다(Barrowman, FEMS Microbiology Letters 34:57-60(1986)). 슈도모나스 스투트제리, 슈도모나스 플루오레센스 및 다른 유기체들로부터의 추가적인 유전자 후보들이 서열 상동성에 의해 추리되거나 또는 슈도모나스 푸티다에서 개발된 생육 선택 시스템을 사용하여 동정될 수 있다(Henning et al., Appl. Environ. Microbiol., 72:7510-7517(2006)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 60에 나타낸다.

[0474]

표 60

단백질	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
mdlC	P20906.2	3915757	슈도모나스 푸티다
mdlC	Q9HUR2.1	81539678	슈도모나스 아에루기노사
dpgB	ABN80423.1	126202187	슈도모나스 스투트제리
ilvB-1	YP_260581.1	70730840	슈도모나스 플루오레센스

[0475]

2-옥소산을 탈카복실화할 수 있는 세 번째 효소는 알파-케토글루타레이트 데카복실라제(KGD)이다. 상기 부류 효소의 기질 범위는 지금까지 연구되지 않았다. 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)로부터의 KDC(Tian, Proc Natl Acad Sci USA, 102:10670-10675(2005))가 게노마티카(Genomastica)에서 클로닝되었고 에스케리키아 콜라이에서 작용적으로 발현되었다. 그러나, 상기는 크고(약 130 kD) GC-풍부이기 때문에 균주 공학에 이상적인 후보는 아니다. KDC 효소 활성은 브라디리조븀 자포니쿰(*Bradyrhizobium japonicum*) 및 메소리조븀 로티(*Mesorhizobium loti*)를 포함한 리조비아의 몇몇 종들에서 검출되었다(Green, J. Bacteriol., 182:2838-2844(2000)). 상기 KDC-암호화 유전자(들)가 이들 유기체에서 단리되지 않았지만, 게놈 서열을 입수할 수 있으며 각 게놈 중의 여러 유전자들이 추정적인 KDC로서 주석이 달린다. 유글레나 그라실리스(*Euglena gracilis*)로부터의 KDC가 또한 특성화되었으나 상기 활성과 관련된 유전자는 지금까지 동정되지 않았다(Shigeoka et al., Arch. Biochem. Biophys., 288:22-28(1991)). 상기 N-말단으로부터 시작하여 처음 20 개 아미노산이 서열화되었다 MTYKAPVKDVKFLDKVFKV(Shigeoka, Arch. Biochem. Biophys., 288:22-28(1991)). 상기 유전자는 KDC 활성에 대해 상기 N-말단 서열을 함유하는 유전자들을 시험함으로써 동정될 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 61에 나타낸다.

[0476]

표 61

단백질	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
kgd	O50463.4	160395583	마이코박테리움 투베르쿨로시스
kgd	NP_767092.1	27375563	브라디리조븀 자포니쿰 USDA110
kgd	NP_105204.1	13473636	메소리조븀 로티

[0477]

상기 단계를 촉매화하기 위한 네 번째 효소는 분지쇄 알파-케토산 데카복실라제(BCKA)이다. 상기 부류의 효

[0478]

소들은 쇠 길이가 탄소수 3 내지 6으로 변하는 다양한 화합물들 상에서 작용하는 것으로 입증되었다(Oku, J. Biol. Chem., 263:18386-18396(1988); Smit et al., Appl Environ Microbiol 71:303-311(2005)). 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 중의 효소가 2-옥소부타노에이트, 2-옥소헥사노에이트, 2-옥소펜타노에이트, 3-메틸-2-옥소부타노에이트, 4-메틸-2-옥소부타노에이트 및 아이소카프로에이트를 포함한 다양한 분지 및 선형 기질들 상에서 특성화되었다(Smit et al., Appl Environ Microbiol 71:303-311(2005)). 상기 효소는 구조적으로 특성화되었다(Berthold et al., D. Biol. Crystallogr., 63:1217-1224(2007)). 상기 락토코커스 락티스 효소와 자이모모나스 모빌루스의 피루베이트 데카복실라제 간의 서열 정렬은 상기 촉매 및 기질 인식 잔기가 거의 동일함을 가리키며(Siegert et al., Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005)), 따라서 상기 효소는 지정된 공학에 유망한 후보일 것이다. BCKA에 의한 알파-케토글루타레이트의 탈카복실화가 바실러스 서브틸리스에서 검출되었으나; 상기 활성은 다른 분지 쇠 기질(Oku, J Biol Chem. 263:18386-18396(1988))에 대한 활성에 비해 낮았으며(5%) 상기 효소를 암호화하는 유전자는 지금까지 동정되지 않았다. 추가의 BCKA 유전자들이 상기 락토코커스 락티스 단백질 서열에 대한 상동성에 의해 동정될 수 있다. 상기 효소에 대한 고 득점 BLASTp 적중 중 다수는 인돌피루베이트 데카복실라제(EC 4.1.1.74)로서 주석이 달린다. 인돌피루베이트 데카복실라제(IPDA)는 식물 및 식물 세균에서 인돌피루베이트의 인돌아세트알데하이드로의 탈카복실화를 촉매화하는 효소이다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 62에 나타낸다.

표 62

[0479]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	kdcA	AAS49166.1	44921617	락토코커스 락티스

[0480] 호모 사피엔스 및 보스 타우루스(*Bos taurus*)로부터의 미토콘드리아 분지 쇠 케토산 데하이드로게나제 복합체의 E1 아단위로부터 유래된 재조합 분지 쇠 알파-케토산 데카복실라제 효소가 클로닝되었으며 에스케리키아 콜라이에서 작용적으로 발현되었다(Wynn, J. Biol. Chem. 267:12400-12403(1992); Davie, J. Biol. Chem. 267:16601-16606(1992); Wynn et al., J. Biol. Chem. 267:1881-1887(1992)). 이들 연구에서, 저자들은 샤페론인 GroEL 및 GroES의 공동 발현이 상기 데카복실라제의 비 활성을 500 배까지 증대시킴을 발견하였다(Wynn, J. Biol. Chem. 267:12400-12403(1992)). 이들 효소는 2 개의 알파 및 2 개의 베타 아단위로 구성된다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 63에 나타낸다.

표 63

[0481]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	BCKDHB	NP_898871.1	34101272	호모 사피엔스
	BCKDHA	NP_000700.1	11386135	호모 사피엔스
	BCKDHB	P21839	115502434	보스 타우루스
	BCKDHA	P11178	129030	보스 타우루스

[0482] 실시예 V

[0483] 말로닐-CoA를 통한 글루코스로부터 프로피오닐-CoA의 생산 경로

[0484] 실시예 I 및 II에 더하여, 말로닐-CoA를 통한 프로피오닐-CoA의 생산 경로를 도 3에 예시한다. 아세틸 CoA는 카복실화되어 말로닐-CoA를 형성한다. 이어서 상기는 말로네이트 세미알데하이드로 환원되고, 후속적으로 3-하이드록시프로피오네이트(3HP)로 변형된다. 3HP는 프로피오닐-CoA 신타제를 통해 프로피오닐-CoA로 전환된다.

[0485] 아세틸-CoA 카복실라제

[0486] 다중 아단위 아세틸-CoA 카복실라제 복합체(ACC)(세균 중에서 광범위하게 보존된다)는 아세틸-CoA 및 바이카보네이트에 의한 말로닐-CoA의 ATP-의존성 형성을 촉매화한다. 상기 반응은 지방산 생합성에서 첫 번째 현신적인 단계로서 작용하며, 상기 효소는 에스케리키아 콜라이(Freiberg et al., J. Biol. Chem. 279:26066-26073(2004)), 효모(Zhang, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:5910-5915(2004)), 바실러스 서브틸리스(Freiberg et al., J. Biol. Chem. 279:26066-26073(2004)), 및 다른 유기체들(Barber, Biochim. Biophys. Acta 1733:1-28(2005))에서 항생제 및 억제제의 개발을 위한 노력으로 표적화되었다. 에스케리키아 콜라이 및 다수의 다른 세균에서, ACC는 *accA*, *accB*, *accC* 및 *accD*에 의해 암호화된 4 개의 아단위들로 구성된다

(Choi-Rhee, J. Biol. Chem. 278:30806-30812(2003)). 2 개의 아단위, *accB* 및 *accC*의 발현은 *accB*의 유전자 산물에 의해 자동 조절된다(James, J. Biol. Chem. 279:2520-2527(2004)). 효모에서, 상기 효소는 2 개의 유전자, *hfa1* 및 *acc1*에 의해 암호화된다. 비오틴:아포 단백질 리가제를 암호화하는 유전자 *pb11*이 효소 작용에 필요하다.

[0487]

상기 고세균 분류 그룹 설포로발레스(*Sulfolobales*)의 영양요구성 구성원들은 상기 3-하이드록시프로피오네이트 주기와 관련하여 높은 수준의 아세틸-CoA 카복실라제 활성을 나타낸다(Chuakrut, J. Bacteriol. 185:938-947(2003); Hugler, Eur. J. Biochem. 270:736-744(2003)). 메탈로스페에라 세둘라에서, 상기 아실-CoA 카복실라제 전효소는 3 개의 유전자, *Msed\_0148*(비오틴/리포일 부착), *Msed\_0147*(비오틴 카복실라제), 및 *Msed\_1375*(카복실 트랜스퍼라제)에 의해 암호화된 아단위들로 구성된 다량체이다. 상기 효소가 정제되고 특성화되었으며, 아세틸-CoA 및 프로피오닐-CoA와 반응하는 이작용성인 것으로 밝혀졌다(Hugler, Eur. J. Biochem. 270:736-744(2003)). 3 개의 유전자에 의해 암호화된, 애시다누스 브리에를레이(*Acidanus brierleyi*)로부터의 이작용성 고세균 아세틸-CoA 카복실라제 효소가 에스케리키아 콜라이 중에서 클로닝되고 특성화되었다(Chuakrut, J. Bacteriol. 185:938-947(2003)). 상기 애시다누스 브리에를레이 아실-CoA 카복실라제 유전자 및 이웃에 인접한 영역들의 서열이 일본의 DNA 데이터뱅크(DDBJ)에 수납 번호 제 AB088419 호로 제출되었다. 이들 고세균 효소가 높은 활성을 나타내지만, 최적 온도는 65 °C임에 주목해야 한다(Chuakrut, J. Bacteriol. 185:938-947(2003)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 64에 나타낸다.

표 64

[0488]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>accA</i>	NP_414727	16128178	에스케리키아 콜라이 K12 균주 MG1655
<i>accB</i>	NP_417721	16131143	에스케리키아 콜라이 K12 균주 MG1655
<i>accC</i>	NP_417722	16131144	에스케리키아 콜라이 K12 균주 MG1655
<i>accD</i>	NP_416819	16130251	에스케리키아 콜라이 K12 균주 MG1655
<i>accA</i>	NP_390798.1	16079972	바실러스 서브틸리스 서브스페시즈 서브틸리스 균주 168
<i>accB</i>	NP_390315.1	16079491	바실러스 서브틸리스 서브스페시즈 서브틸리스 균주 168
<i>accC</i>	NP_390314.1	16079490	바실러스 서브틸리스 서브스페시즈 서브틸리스 균주 168
<i>accD</i>	NP_390799.1	16079973	바실러스 서브틸리스 서브스페시즈 서브틸리스 균주 168
<i>bp11</i>	NP_010140.1	6320060	사카로마이세스 세레비지아에
<i>hfa1</i>	NP_013934.1	6323863	사카로마이세스 세레비지아에
<i>acc1</i>	NP_014413.1	6324343	사카로마이세스 세레비지아에
<i>accB Msed_0148</i>	Q8J2Z3	74499802	메탈로스페에라 세둘라
<i>accC Msed_0147</i>	Q8J2Z4	74499032	메탈로스페에라 세둘라
<i>pccB Msed_1375</i>	Q8J2Z5	74499033	메탈로스페에라 세둘라
<i>accB</i>	BAC55868.1	27877098	애시다누스 브리에를레이
<i>accC</i>	BAC55867.1	27877097	애시다누스 브리에를레이
<i>pccB</i>	BAC55869.1	27877099	애시다누스 브리에를레이

[0489]

말로닐-CoA 리덕타제 및 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제

[0490]

말로닐-CoA의 3-HP로의 환원을 알데하이드 데하이드로게나제 및 알콜 데하이드로게나제 작용기를 갖는 이작용성 말로닐-CoA 리덕타제에 의해 수행할 수 있다. 상기 활성을 갖는 NADPH-의존성 효소가 클로로플렉수스 아우란티아쿠스에서 특성화되었으며 여기에서 상기 3-하이드록시프로피오네이트 주기에 참여한다(Hugler, J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002); Strauss, Eur. J. Biochem. 215:633-643(1993)). 상기 효소(300 kDa의 질량을 갖는다)는 고도로 기질 특이성이며 다른 공지된 옥시도리덕타제들과 서열 유사성을 거의 나타내지 않는다(Hugler, J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002)). 상기 특정한 반응을 촉매화하는 다른 유기체들 중의 효소는 입증되지 않았으나; 다른 유기체들이 유사한 경로를 가질 수도 있다는 생물정보학이 존재한다(Klatt, Environ. Microbiol. 9:2067-2078(2007)). 로세이플렉수스 카스텐홀지이, 에리스로박터 스페시즈 NAP1 및 해양 감마 프로테오박테리움 HTCC2080을 포함한 다른 유기체들 중의 효소 후보들을 서열 유사성에 의해 추론할 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 65에 나타낸다.

표 65

[0491]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	mcr	AAS20429.1	42561982	클로로플렉투스 아우란티아쿠스
	Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	로세이플렉투스 카스텐홀지이
	NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	에리쓰로박터 스페이즈 NAP1
	MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	해양 감마 프로테오박테리움 HTCC 2080

[0492] 한편으로, 말로닐-CoA의 3-HP로의 환원을 2 개의 별도의 효소들, CoA-아실화 알데하이드 데하이드로게나제 및 1차 알콜 데하이드로게나제에 의해 촉매화할 수 있다. 상기 경로에 의해, 말로닐-CoA를 먼저 말로네이트-세미알데하이드 데하이드로게나제 또는 말로닐-CoA 리덕타제에 의해 말로네이트 세미알데하이드(MSA)로 환원시킨다. MSA는 후속적으로 3-HP-데하이드로게나제에 의해 3-HP로 전환된다.

[0493] 말로닐-CoA 리덕타제는 호열호산성 고세균에서 3-하이드록시프로피오네이트 주기를 통한 독립영양성 탄소 고정에 핵심 효소이다(Berg, Science. 318:1782-1786(2007); Thauer, Science, 318:1732-1733(2007)). 상기 효소는 보조 인자로서 NADPH를 이용하며 메탈로스파에라(*Metallosphaera*) 및 설포로부스 스페이즈(*Sulfolobus spp*)에서 특성화되었다(Alber et al., J. Bacteriol., 188:8551-8559(2006); Hugler, J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002)). 상기 메탈로스파에라 세둘라에서 *Msed\_0709*에 의해 암호화된 효소는 말로닐-CoA를 말로닉 세미알데하이드로 전환시키고 관심 방향으로 작용하는 것으로 공지되어 있다(Alber et al., J. Bacteriol., 188:8551-8559(2006); Berg, Science. 318:1782-1786(2007)). 설포로부스 토크다이어(*Sulfolobus tokodaii*)로부터의 말로닐-CoA 리덕타제를 암호화하는 유전자가 클로닝되었으며 에스케리키아 콜라이에서 이종 발현되었다(Alber et al., J. Bacteriol., 188:8551-8559(2006)). 이들 효소의 알데하이드 데하이드로게나제 작용성이 클로로플렉투스 아우란티아쿠스로부터의 이작용성 데하이드로게나제와 유사하지만, 서열 유사성은 거의 없다. 상기 두 말로닐-CoA 리덕타제 효소 후보들은 모두 아스파틸-4-포스페이트의 아스파테이트 세미알데하이드로의 환원 및 동시적인 탈인산화를 촉매화하는 효소인 아스파테이트-세미알데하이드 데하이드로게나제와 높은 서열 유사성을 갖는다. 추가적인 유전자 후보들을 설포로부스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*) 및 설포로부스 애시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*)를 포함한 다른 유기체들 중의 단백질들에 대한 서열 상동성에 의해 발견할 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 66에 나타낸다.

표 66

[0494]	단백질	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	MSED_0709	YP_001190808.1	146303492	메탈로스파에라 세둘라
	mcr	NP_378167.1	15922498	설포로부스 토크다이어
	asd-2	NP_343563.1	15898958	설포로부스 솔파타리쿠스
	Saci_2370	YP_256941.1	70608071	설포로부스 애시도칼다리우스

[0495] 말로닉 세미알데하이드의 3-HP로의 후속 전환을 3-HP 데하이드로게나제 활성을 갖는 효소에 의해 수행할 수 있다. 3 개의 효소가 상기 전환을 촉매화하는 것으로 공지되어 있다: NADH-의존성 3-하이드록시프로피오네이트 데하이드로게나제, NADPH-의존성 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제, 및 NADH-의존성 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제. NADH-의존성 3-하이드록시프로피오네이트 데하이드로게나제는 세균 및 식물 중의 프로피오네이트로부터 베타-알라닌 생합성 경로에 관여하는 것으로 생각된다(Rathinasabapathi, Journal of Plant Pathology 159:671-674(2002); Stadtman, A. J. Am. Chem. Soc. 77:5765-5766(1955)). 상기 효소는 지금까지 어떠한 유기체 중의 유전자와도 관련되지 않았다. NADPH-의존성 말로네이트 세미알데하이드 리덕타제는 독립영양 CO<sub>2</sub>-고정 세균에서의 역 반응을 촉매화한다. 상기 효소 활성이 메탈로스파에라 세둘라에서 검출되었지만, 상기 유전자의 정체는 알려지지 않고 있다(Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006)).

[0496] 여러 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제 효소들이 또한 말로닉 세미알데하이드를 3-HP로 전환시키는 것으로 나타났다. 상기 활성을 나타내는 3 개의 유전자 후보는 슈도모나스 아에루기노사 PA01(Gokam et al., 미국 특허 제 7,393,676 호(2008))으로부터의 *mmsB*, 슈도모나스 푸티다 KT2440(Liao et al., 미국 특허 공보 2005/0221466(2005))으로부터의 *mmsB* 및 슈도모나스 푸티다 E23(Chowdhury, Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047(1996))으로부터의 *mmsB*이다. 슈도모나스 푸티다 E23으로부터의 단백질이 에스케리키

아 콜라이에서 특성화되고 작용적으로 발현되었으나; 3-HP에 대한 그의 활성은 비교적 낮았다(Chowdhury, Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047(1996)). 알칼리제네스 파에칼리스(*Alcaligenes faecalis*) M3A에서 3-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 활성을 갖는 효소가 또한 동정되었다(Liao, 미국 특허 공보 2005-0221466(2005); Liao, 미국 특허 공보 2005-0221466(2005)). 로도박터 스파에로이데스(*Rhodobacter spaeroides*)를 포함한 다른 유기체로부터의 추가적인 유전자 후보들을 서열 유사성에 의해 추리할 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 67에 나타낸다.

표 67

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
mmsB	AAA25892.1	151363	슈도모나스 아에루기노사
mmsB	NP_252259.1	15598765	슈도모나스 아에루기노사 PA01
mmsB	NP_746775.1	26991350	슈도모나스 푸티다 KT2440
mmsB	JC7926	60729613	슈도모나스 푸티다 E23
orfB1	AAL26884	16588720	로도박터 스파에로이데스

4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제 활성을 나타내는 효소들(EC 1.1.1.61)이 또한, 상기 화학적 변형이 매우 유사하므로, 말로닉 세미알데하이드를 3-HP로 전환시킬 수 있다. 상기와 같은 효소들은 랄스토니아 유티트로파(*Ralstonia eutropha*)(Bravo, J. Forensic Sci., 49:379-387(2004)), 클로스트리듐 클루이베리(Wolff, Protein Expr. Purif., 6:206-212(1995)) 및 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)(Breitkreuz et al., J. Biol. Chem., 278:41552-41556(2003))에서 특성화되었다. 말로닉 세미알데하이드에 대한 상기 효소의 활성은 지금까지 실험적으로 입증되지 않았다. 그러나, 이들 효소는 게노마티카의 다른 내부 프로젝트에서 연구되었으므로, 이들을 3-HP 데하이드로게나제 활성에 대해 쉽게 시험할 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 68에 나타낸다.

표 68

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
4hbd	YP_726053.1	113867564	랄스토니아 유티트로파 H16
4hbd	L21902.1	146348486	클로스트리듐 클루이베리 DSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	아라비도프시스 탈리아나

[0500] 프로피오닐-CoA 신타제

[0501] 3-하이드록시프로피오네이트(3HP)의 프로피오닐-CoA로의 전환을 프로피오닐-CoA 신타제에 의해 수행한다. 이 단계는 클로로플렉수스 아우란티아쿠스에서 201 kDa의 단일 융합 단백질에 의해 촉매화되는 것으로 공지되어 있다(Alber, J Biol. Chem. 277:12137-12143(2000)). 상기 단백질은 CoA 리가제, 에노일-CoA 하이드라타제 및 에노일-CoA 리덕타제로 구성된다. 상기 효소는 거의 동중성으로 30 배 정제되었으며 500 내지 800 kDa의 매우 큰 고유 분자 질량을 갖는다. 호열호산성 메탈로스파에라 세둘라(및 상기 설포로바세아에(*Sulfolobaceae*)과의 구성원들)에서, 상기 작용은 3 개의 상이한 효소, 3HP를 그의 CoA 에스터로 활성화하는 3-하이드록시프로피오닐-CoA 신시타제, 3-HP-CoA를 아크릴로일-CoA로 전환시킨 다음 환원시켜 프로피오닐-CoA를 형성하는 3-하이드록시프로피오닐-CoA 데하이드라타제에 의해 촉매화된다. 3-HP-CoA 신시타제가 보고되었다(Alber, J Bacteriol. 190:1383-1389(2008)). 상기 단백질을 암호화하는 유전자가 서열화되었으며 상동성 단백질을 암호화하는 유전자가 설포로부스 토코다이의의 게놈에서 동정되었고; 유사한 유전자들이 설포로부스 솔파타리쿠스 및 설포로부스 애시도칼다리우스에서 발견되었다. 상기 유전자는 에스케리키아 콜라이에서 이중 발현되었다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 69에 나타낸다.

표 69

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
Msed_1456	YP_001191537	146304221	메탈로스파에라 세둘라
ST0783	NP_376686	15921017	설포로부스 토코다이이
acsA-10	NP_344510	15899905	설포로부스 솔파타리쿠스
Saci_1184	YP_255824	70606954	설포로부스 애시도칼다리우스
pcs	AAL47820	29126583	클로로플렉수스 아우란티아쿠스

[0503] 최근에, 3-하이드록시프로피오닐-CoA 데하이드라타제 및 아크릴로일-CoA 리덕타제가 메탈로스파에라 세둘라로부터 정제되었으며(Teufel, J Bacteriol. 191:4572-4581(2009)), 상기 암호화 유전자는 메탈로스파에라 세둘라의 게놈 및 상기 설포로발레스의 다른 구성원들로부터 동정되었고, 재조합 효소가 작용의 증거로서 생산되었다. 3-하이드록시프로피오닐-CoA 데하이드라타제 및 아크릴로일-CoA 리덕타제를 암호화하는 유전자들은 상기 메탈로스파에라 또는 설포로부스 게놈상에 군생하지 않는다는 결론이 내려졌다. 이들 2 개의 유기체 중의 프로피오닐-CoA 신타제의 각 도메인의 비교는 상기 3-HP의 프로피오닐-CoA로의 전환을 촉매화하는 효소(들)가 이들 두 문(phylum)에서 독립적으로 진화되었음을 밝혀냈다. 상기 메탈로스파에라 세둘라로부터의 3-HP-CoA 데하이드라타제에 대한 진뱅크 수납 및/또는 GI 번호를 하기 표 70에 나타낸다.

표 70

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
Msed_2001	YP_001192065.1	146304749	메탈로스파에라 세둘라

[0505] 상기 아크릴로일-CoA 리덕타제에 대한 진뱅크 ID를 하기 표 71에 나타낸다.

표 71

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
Msed_1426	YP_001191508.1	146304192	메탈로스파에라 세둘라
ST0480	NP_376364	15920695	설포로부스 토코다이이

[0507] 이들 2 개의 효소를 암호화하는 다른 유전자 후보들을 서열 상동성 검색에 의해 획득할 수 있다.

[0508] 실시예 VI

[0509] 락테이트를 통한 글루코스로부터 프로피오닐-CoA의 생산 경로

[0510] 실시예 I 및 II에 더하여, 락테이트를 통한 프로피오닐-CoA의 생산 경로를 도 4에 예시한다. 이 경로는 상기 프로피오닐-CoA의 형성에 대한 더욱 또 다른 산화환원 균형 경로를 나타낸다. 피루베이트는 환원되어 락테이트를 형성하고 이는 이어서 활성화되어 락토일-CoA를 형성한다. 상기 락토일-CoA는 탈수되어 아크릴로일-CoA를 형성하고 이어서 환원되어 프로피오닐-CoA를 생성시킨다.

[0511] 락테이트 데하이드로게나제

[0512] 피루베이트의 락테이트로의 전환은 락테이트 데하이드로게나제(EC 1.1.1.27)에 의해 촉매화된다. 다수의 락테이트 데하이드로게나제가 상세히 개시되었다(Garvie, Microbiol Rev 44:106-139(1980)). 에스케리키아 콜라이의 발효성 락테이트 데하이드로게나제는 피루베이트를 락테이트로 전환시키기 위해 과발현된 첫 번째 후보일 것이다(Bunch, Microbiology 143(Pt 1), 187-195(1997)). 다른 락테이트 데하이드로게나제 후보, 예를 들어 락테이트의 형성에 유리한, 피루베이트에 대해 낮은 Km을 갖는 것들, 예를 들어 락토바실러스 카제이(Gordon, Eur. J Biochem. 67:543-555(1976)), 플라스모뎀 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*)(Brown et al., Biochemistry 43:6219-6229(2004)), 및 씨모토가 마리티메(Auerbach et al, Structure. 6:769-781(1998))로부터의 락테이트 데하이드로게나제가 상기 단계에 사용될 것이다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 72에 나타낸다.

표 72

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
ldh	P52643	1730102	에스케리키아 콜라이
ldh	P00343	126063	락토바실러스 카제이
ldh	Q6JH32	74911026	플라스모뎀 오발레
ldh	P16115	547837	씨모토가 마리티마

[0514] 락테이트-CoA 트랜스퍼라제

[0515] 락테이트의 락토일-CoA로의 활성화는 프로피오네이트 CoA-트랜스퍼라제(EC 2.8.3.1)와 관련된 락테이트-CoA 트랜스퍼라제 활성화에 의해 촉매화될 수 있다. 클로스트리듐 프로피오니쿰은 특징적인 중간체로서 아크릴로일-CoA를 갖는 선택 경로를 통해 알라닌을 발효시킨다. 이 경로에서, 락테이트는 조효소 A 공여체로서 프로피오닐-CoA 또는 아세틸-CoA를 사용하는 효소 프로피오네이트:아세틸-CoA CoA-트랜스퍼라제(EC 2.8.3.1, 또는 프로피오네이트 CoA-트랜스퍼라제)에 의해 락토일-CoA로 활성화된다(Schweiger, FEBS Lett. 171:79-84(1984)). 상기 효소는 아크릴레이트, 프로피오네이트 및 부티레이트를 포함한 모노카복실산에 대해 다소 넓은 기질 특이성을 나타내는 반면 다이카복실산은 사용되지 않았다. 상기 효소를 암호화하는 유전자가 클로닝되었다(Selmer, Eur. J Biochem. 269:372-380(2002)). 다른 프로피오네이트 CoA-트랜스퍼라제가 상기 단계에 대한 후보일 수 있으며 클로스트리듐 프로피오니쿰 프로피오네이트 CoA-트랜스퍼라제의 상동체를 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 73에 나타낸다.

표 73

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
pct	Q9L3F7	75416255	클로스트리듐 프로피오니쿰
pct	YP_002270763.1	209397911	에스케리키아 콜라이 O157:H7
pct	Q220N6	122479931	로도페락스 페리레듀센스 DSM 15236
pct	Q46MA6	123621528	랄스토니아 유티로파

[0517] 락토일-CoA 데하이드라타제

[0518] 락토일-CoA의 아크릴로일-CoA로의 탈수는 락토일-CoA 데하이드라타제(EC 4.2.1.54)에 의해 촉매화된다. 클로스트리듐 프로피오니쿰은 특징적인 중간체로서 아크릴로일-CoA를 갖는 선택 경로를 통해 알라닌을 발효시킨다(Schweiger, FEBS Lett. 171:79-84(1984)). 이 경로에서, 락토일-CoA는 락토일-CoA 데하이드라타제에 의해 아크릴로일-CoA로 탈수된다(Hofmeister, Eur. J Biochem. 206:547-552(1992)). 프로피오네이트 CoA-트랜스퍼라제의 클로닝은 또한 상기 경로에 필요한 락토일-CoA 데하이드라타제의 하나의 아단위를 암호화하는 듯한 제 2 ORF(*lcdB*)를 동정하였다. 상기 *lcdB*는 2-하이드록시글루타릴-CoA 데하이드라타제 β 아단위와 유사하다. *lcdB*의 상동체들을 이 단계에서 그들의 활성화에 대해 시험할 것이다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 74에 나타낸다.

표 74

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
CBC_A0885	ZP_02621214	168186579	클로스트리듐 보톨리눔 C 균주 Eklund
CBC_A0886	ZP_02621215	168186580	클로스트리듐 보톨리눔 C 균주 Eklund
hgdB	YP_878441	118444181	클로스트리듐 노비이-NT
hgdA	YP_878442	118444701	클로스트리듐 노비이-NT

[0520] 아크릴로일-CoA 리덕타제

[0521] 아크릴로일-CoA의 프로피오닐-CoA로의 전환은 아크릴로일-CoA 리덕타제에 의해 촉매화된다. 알라닌-발효 클로스트리듐 프로피오니쿰에서, 아크릴로일-CoA 리덕타제는 아크릴로일-CoA로부터 프로피오닐-CoA의 비가역적인 NADH-의존적인 형성을 촉매화한다. 상기 효소가 정제되었으며 상기 효소의 아단위의 N-말단이 결정되었다(Hetzel et al., Eur. J Biochem. 270:902-910(2003)). 상기 이량체성 프로피오닐-CoA 데하이드로게나제 아단위의 N-말단은 여러 클로스트리디아 및 관련된 혐기성 생물로부터의 부티릴-CoA 데하이드로게나제의 N-말단과 유사하다(55% 이하의 서열 일치성). 상기 β 및 γ 아단위의 N-말단은 각각 메가스파에라 엘스테니이(*Megasphaera elsdenii*)로부터의 전자 전달 플라보단백질(ETF)의 A 및 B 아단위의 N-말단과 40% 및 35% 서열 일치성을 공유하고, 다른 혐기성 생물로부터의 추정적인 ETF의 경우와 60% 이하로 공유한다. 상기 클로스트리듐 프로피오니쿰의 완전한 게놈 서열을 입수할 수 없기 때문에, 상기 프로피오닐-CoA 데하이드로게나제 아단위 "MDFKLTKTQVLQQLWFAEFAGIGKPIAE"(서열식별번호)의 N-말단을 유사성 검색에 사용하였으며 이 단계에서 하기의 상기 프로피오닐-CoA 데하이드로게나제의 활성화에 대한 상동체들을 생성시켰다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 75에 나타낸다.

표 75

[0522]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	bcdA	CAQ53135	188027001	클로스트리듐 사카로부틸리쿰
	Cbei_2035	ABR34203	149903370	클로스트리듐 베이제링키이
	ANACAC_00471	EDR98937	167654808	아나에로스티페스 카카에 DSM 14662

[0523] 추가로, 삼작용성 프로피오닐-CoA 신타제(*pcs*) 유전자가 광영양성 녹색 비-황 진정세균 클로로플렉수스 아우란티아쿠스로부터 동정되었다(Alber, J Biol. Chem. 277:12137-12143(2002)). 상기 프로피오닐-CoA 신타제는 CoA 리가제, 에노일-CoA 하이드라타제, 및 에노일-CoA 리덕타제로 이루어진 201 kDa의 천연 용합 단백질이다. 상기 효소는 3-하이드록시프로피오네이트로부터 3-하이드록시프로피오닐-CoA에서 아크틸로일-CoA, 이어서 프로피오닐-CoA로의 전환을 촉매화한다. 상기 효소는 그의 에노일-CoA 리덕타제 활성화에 전적으로 또는 부분적으로 사용될 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 76에 나타낸다.

표 76

[0524]	유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
	<i>pcs</i>	AAL47820	29126583	클로로플렉수스 아우란티아쿠스

[0525] 실시예 VII

[0526] 글루코스로부터 1,4-부탄다이올(1,4-BDO) 및 아이소프로판올의 공동 생산 경로

[0527] 본 실시예는 1,4-부탄다이올(1,4-BDO) 및 아이소프로판올의 공동 생산을 위한 예시적인 경로를 개시한다.

[0528] 1,4-부탄다이올(1,4-BDO) 및 아이소프로판올 및 관련된 생성물의 공동 생산을 위한 신규의 경로를 본 발명에 개시한다. 도 5의 1,4-부탄다이올(1,4-BDO) 및 아이소프로판올 공동 생산 경로에서, 중심 대사 중간체들을 먼저 숙시닐-CoA로 이끈다. 숙시닐-CoA의 형성을 위해서, 포스포에놀피루베이트(PEP)를 PEP 카복시키나제 또는 PEP 카복실라제를 통해 옥살로아세테이트로 전환시킨다. 한편으로, PEP를 먼저 피루베이트 키나제에 의해 피루베이트로 전환시키고 이어서 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제 또는 피루베이트 카복실라제에 의해 옥살로아세테이트로 전환시킨다. 이어서 옥살로아세테이트를 환원적 TCA 주기에 의해 숙시닐-CoA로 전환시킨다. 이어서 숙시닐-CoA를 CoA-의존성 알데하이드 데하이드로게나제에 의해 숙시닉 세미알데하이드로 전환시킨다. 한편으로, 숙시네이트를 숙시네이트 리덕타제에 의해 숙시닉 세미알데하이드로 전환시킬 수 있다. 이어서, 숙시닉 세미알데하이드를 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제에 의해 4-하이드록시부티레이트로 환원시킨다. 4-HB의 그의 아실-CoA로의 활성화를 CoA 트랜스퍼라제 또는 신시타제에 의해 촉매화한다. 한편으로, 4-HB를 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제에 의해 4-하이드록시부티릴-포스페이트로 전환시키고 후속적으로 4-HB-CoA로 변형시킬 수 있다. 이어서 4-HB-CoA를 이작용성 CoA-의존성 알데하이드/알콜 데하이드로게나제에 의해서 또는 알데하이드 및 알콜 데하이드로게나제 활성을 갖는 2 개의 별도의 효소들에 의해서 14-BDO로 전환시킨다. 상기 4-HB-CoA 중간체를 우회하는 더욱 또 다른 대안은 카복실산 리덕타제에 의한 4-HB의 4-하이드록시부티릴알데하이드로의 직접적인 환원이다. 4-하이드록시부티릴알데하이드를 알콜 데하이드로게나제에 의해 14-BDO로 후속적으로 환원시킨다. 상기 CoA 중간체를 우회하는 더욱 또 다른 경로는 포스페이트 리덕타제에 의한 4-하이드록시부티릴-포스페이트의 4-하이드록시부티릴알데하이드로의 환원이다. 아이소프로판올의 생산 경로는 상기 실시예 I 및 II에 개시한 바와 같이 진행된다.

[0529] 14-BDO 및 아이소프로판올 생산 유기체의 최대 이론 수율은 하기식에 따라, 소비된 글루코스 몰당 0.77 몰의 아이소프로판올 및 0.46 몰의 14-BDO이다(0.26 g/g IPA 및 0.23 g/g 14-BDO):



[0531] 실시예 VIII

[0532] 글루코스로부터 1,3-부탄다이올(1,3-BDO) 및 아이소프로판올의 공동 생산 경로

[0533] 본 실시예는 1,3-부탄다이올(13-BDO) 및 아이소프로판올의 공동 생산을 위한 예시적인 경로를 개시한다.

[0534] 1,3-부탄다이올(13-BDO) 및 아이소프로판올 및 관련된 생성물의 공동 생산을 위한 신규의 경로를 본 발명에 개시한다. 도 6에 도시된 1,3-부탄다이올(13-BDO) 및 아이소프로판올로의 공동 생산 경로는 또한 실시예 VI

에 개시된 바와 같이 형성된, 4-하이드록시부티릴-CoA를 통해 진행된다. 상기 경로에서, 4-하이드록시부티릴-CoA는 탈수되고 이성화되어 크로토닐-CoA를 형성한다. 상기 탈수 및 비닐이성화 반응은 이작용성 효소, 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제에 의해 촉매화된다. 이어서 크로토닐-CoA는 3-하이드록시부티릴-CoA로 수화된다. 상기 CoA 부분의 제거 및 동반되는 환원은 3-하이드록시부티르알데하이드를 제공한다. 최종적으로 상기 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제에 의한 상기 알데하이드의 환원은 13-BDO를 제공한다. 한편으로, 3-하이드록시부티릴-CoA는 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)에 의해 13-BDO로 직접 전환될 수 있다. 여러 가지 다른 대안 경로들이 이 경로에 가능하다. 숙시네이트를 카복실산 리덕타제에 의해 숙시닉 세미알데하이드로 전환시켜, 숙시닐-CoA의 형성을 우회할 수 있다. 4-HB를 키나제에 의해 4-HB-포스페이트로 인산화하고, 이어서 후속적으로 4-HB-CoA로 전환시킬 수 있다. 최종적으로 3-하이드록시부티릴-CoA는 CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신시타제에 의해 탈아실화되고, 이어서 후속적으로 카복실산 리덕타제에 의해 3-하이드록시부티르알데하이드로 환원될 수 있다.

[0535] 아이소프로판올의 생산 경로는 상기 실시예 I 및 II에 개시한 바와 같이 진행된다.

[0536] 13-BDO 및 아이소프로판올 생산 유기체의 최대 이론 수율은 하기식에 따라, 소비된 글루코스 몰당 0.77 몰의 아이소프로판올 및 0.46 몰의 13-BDO이다(0.26 g/g IPA 및 0.23 g/g 13-BDO):

[0537]  $13 \text{ 글루코스} \rightarrow 10 \text{ IPA} + 6 \text{ 13-BDO} + 24 \text{ CO}_2 + 8 \text{ H}_2\text{O}$

[0538] **실시예 IX**

[0539] **글루코스로부터 메틸아크릴산(MAA) 및 아이소프로판올의 공동 생산 경로**

[0540] 본 실시예는 메틸아크릴산(MAA) 및 아이소프로판올의 공동 생산을 위한 예시적인 경로를 개시한다.

[0541] 메틸아크릴산(MAA) 및 아이소프로판올 및 관련된 생성물의 공동 생산을 위한 신규의 경로를 본 발명에 개시한다. 메틸아크릴산(MAA)에 대한 2 개의 공동생산 경로를 도 7 및 8에 도시한다. 도 7에 도시된 경로는 앞서 개시한 바와 같이 형성된 4-하이드록시부티릴-CoA를 통해 진행된다. 4-하이드록시부티릴-CoA는 메틸 뮤타제에 의해 3-하이드록시아이소부티릴-CoA로 전환된다. 이어서 3-하이드록시아이소부티릴-CoA의 CoA 부분은 CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제 또는 신시타제에 의해 제거된다. 최종적으로, 상기 3-하이드록시 그룹의 탈수는 MAA를 제공한다. 상기 경로에서 핵심 단계들 중 다수는 또 다른 경로에 의해 우회될 수 있다. 예를 들어 숙시네이트를 숙시네이트 리덕타제에 의해 숙시닉 세미알데하이드로 직접 전환시켜, 숙시닐-CoA의 형성을 우회할 수 있다. 상기 4-HB의 4-HB-CoA로의 전환은 효소 4-하이드록시부티레이트 키나제 및 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제를 통해, 중간체 4-하이드록시부티릴포스페이트를 통해 진행될 수 있다. 3-HIBCOA는 중간체 메틸아크릴일-CoA를 통해 MAA로 전환될 수 있다. 아이소프로판올의 생산 경로는 상기 실시예 I 및 II에 개시한 바와 같이 진행된다.

[0542] 도 8에 도시된 또 다른 MAA 공동생산 경로에서, 숙시닐-CoA는 환원적 TCA 주기를 통해 형성되고, 이어서 메틸 말로닐-CoA 뮤타제에 의해 메틸말로닐-CoA로 전환될 수 있다. 메틸말로닐-CoA의 (R)-입체 이성질체를 (S) 형태로 전환시키는데 에피머라제가 필요할 수도 있다. 이어서 CoA-의존성 알데하이드 데하이드로게나제는 메틸 말로닐-CoA를 메틸말로네이트 세미알데하이드로 전환시킨다. 상기 알데하이드의 3-하이드록시아이소부티레이트로의 환원에 이어서 탈수에 의해 MAA를 제공한다. 한편으로, 메틸말로닐-CoA는 알콜-형성 CoA 리덕타제에 의해 3-하이드록시아이소부티레이트로 전환된다. 더욱 또 다른 대안 경로에서, 메틸말로닐-CoA는 CoA 하이드롤라제, 트랜스퍼라제 또는 신시타제에 의해 메틸말로네이트로 전환된다. 메틸말로네이트는 후속적으로 카복실산 리덕타제에 의해 메틸말로네이트 세미알데하이드로 전환된다. 메틸말로네이트 세미알데하이드는 앞서 개시된 바와 같이 MAA로 전환된다. 아이소프로판올의 생산 경로는 상기 실시예 I 및 II에 개시한 바와 같이 진행된다.

[0543] 상기 두 MAA 생산 경로는 하기식에 따라, 사용된 글루코스 몰당 0.67 몰의 각각의 아이소프로판올 및 MAA 수율을 성취한다(0.22 g/g 아이소프로판올 및 0.32 g/g MAA):

[0544]  $3 \text{ 글루코스} \rightarrow 2 \text{ IPA} + 2 \text{ MAA} + 4 \text{ CO}_2 + 4 \text{ H}_2\text{O}$

[0545] **실시예 X**

[0546] **아이소프로판올 및 1,4-부탄다이올(1,4-BDO), 1,3-부탄다이올(1,3-BDO) 또는 메틸아크릴산(MAA)의 생산을 위한 효소 분류 시스템**

[0547] 본 실시예는 1,4-부탄다이올(1,4-BDO), 1,3-부탄다이올(1,3-BDO) 또는 메틸아크릴산(MAA)의 생산을 위한 실시

에 VII 및 IX에 개시된 예시적인 경로에 대한 효소 분류 시스템을 개시한다. 아세틸-CoA로부터 아이소프로판올의 생산에 대한 예시적인 효소는 실시예 I에 개시되어 있으며, 글루코스로부터 아세틸-CoA의 생산에 대한 예시적인 효소는 실시예 II에 개시되어 있다.

[0548] PEP 카복시키나제

[0549] 포스포에놀피루베이트의 옥살로아세테이트로의 순 전환은 산화환원-중성이지만, 상기 전환의 기전은 상기 공동생산 경로의 전체 에너지학에 중요하다. 상기 PEP의 옥살로아세테이트로의 전환에 가장 바람직한 효소는, PEP를 카복실화하면서 동시에 ATP를 형성하는 PEP 카복시키나제이다. 그러나 대부분의 유기체에서, PEP 카복시키나제는 글루코스 신생합성 작용을 하며 1 ATP의 대가로 옥살로아세테이트를 PEP로 전환시킨다. 사카로마이세스 세레비지아에는, 글루코스 신생합성 역할을 하는 고유 PEP 카복시키나제, *PCK1*을 갖는 하나의 상기와 같은 유기체이다(Valdes-Hevia, FEBS. Lett. 258:313-316(1989)). 에스케리키아 콜라이는, 추정 상 PEP 카복시키나제의 바이카보네이트에 대한 보다 높은  $K_m$ 으로 인해 옥살로아세테이트의 생산에서 PEP 카복시키나제의 역할이 PEP 카복실라제(상기는 ATP를 형성하지 않는다)에 비해 부수적인 것으로 여겨지므로, 또 다른 상기와 같은 유기체이다(Kim et al., Appl Environ Microbiol 70:1238-1241(2004)). 그럼에도 불구하고, 옥살로아세테이트에 대한 PEP로부터의 고유 에스케리키아 콜라이 PEP 카복시키나제의 활성이 에스케리키아 콜라이 K-12의 *ppc* 돌연변이체에서 최근에 입증되었다(Kwon et al., Journal of Microbiology and Biotechnology 16:1448-1452(2006)). 이들 균주는 생육 결함을 나타내지 않았으며 높은  $\text{NaHCO}_3$  농도에서 증가된 숙시네이트 생산을 가졌다. 일부 유기체, 특히 혐위 세균에서, PEP 카복시키나제는 PEP로부터의 옥살로아세테이트의 생산 및 ATP 발생에 매우 효율적이다. 에스케리키아 콜라이 내로 클로닝된 PEP 카복시키나제 유전자의 예로는 만헤이미아 숙시니시프로듀센스(Lee et al., Biotechnol. Bioprocess Eng. 7:95-99(2002)), 아나에로비오스피릴룸 숙시니시프로듀센스(Laivenieks et al., Appl Environ Microbiol 63:2273-2280(1997)), 및 액티노바실러스 숙시노제네스(Kim et al., Appl Environ Microbiol 70:1238-1241(2004))로부터의 것들이 있다. 내부 실험들은 또한 하에모필루스 인플루엔자에 의해 암호화된 PEP 카복시키나제 효소가 PEP로부터 옥살로아세테이트를 형성하는데 매우 효율적임을 발견하였다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 77에 나타낸다.

표 77

[0550]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
PCK1	NP_013023	6322950	사카로마이세스 세레비지아에
pck	NP_417862.1	16131280	에스케리키아 콜라이
pckA	YP_089485.1	52426348	만헤이미아 숙시니시프로듀센스
pckA	O09460.1	3122621	아나에로비오스피릴룸 숙시니시프로듀센스
pckA	Q6W6X5	75440571	액티노바실러스 숙시노제네스
pckA	P43923.1	1172573	하에모필루스 인플루엔자

[0551]

본 보고서에 나타낸 상기 서열들 및 후속 효소들에 대한 서열들을 사용하여 서열 유사성 검색(예를 들어 BLASTp)을 통해 진뱅크 또는 다른 데이터베이스 중에서 상동성 단백질들을 동정하였다. 생성되는 상동성 단백질 및 그의 상응하는 유전자 서열들은 우리의 선택된 숙주 유기체로의 형질전환에 추가적인 DNA 서열을 제공한다.

[0552] PEP 카복실라제

[0553] PEP 카복실라제는 PEP로부터 옥살로아세테이트의 형성을 위한 또 다른 효소를 나타낸다. 사카로마이세스 세레비지아에는 PEP 카복실라제를 자연적으로 암호화하지 않지만, PEP 카복실라제를 암호화하는 유전자를 갖는 예시적인 유기체는 에스케리키아 콜라이(Kai et al., Arch. BioChem. Biophys. 414:170-179(2003)), 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 AM1(Arps et al., J. Bacteriol. 175:3776-3783(1993)), 및 코리네박테리움 글루타미쿰(Eikmanns et al., Mol. Gen. Genet. 218:330-339(1989))을 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 78에 나타낸다.

표 78

[0554]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
ppc	NP_418391	16131794	에스케리키아 콜라이

ppcA	AAB58883	28572162	메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스
ppc	ABB53270	80973080	코리네박테리움 글루타미쿰

[0555] 피루베이트 키나제 및 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제

[0556] PEP로부터 옥살로아세테이트로의 추가의 에너지 효율적인 경로는 2 개의 효소 활성, 즉 피루베이트 키나제 및 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 필요로 한다. 피루베이트 키나제는 PEP의 피루베이트로의 ATP-발생 전환을 촉매화하며 사카로마이세스 세레비지아에 중의 *PKY1*(Burke et al., J. Biol. Chem. 258:2193-2201(1983)) 및 *PKY2*(Boles et al., J. Bacteriol. 179:2987-2993(1997)) 유전자에 의해 암호화된다. 에스케리키아 콜라이에서, 상기 활성은 *pykF* 및 *pykA*의 유전자 산물에 의해 촉매화된다. 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제는 피루베이트의 옥살로아세테이트로의 전환을 촉매화한다. 중요하게, 상기 반응은 또한 (S)-메틸말로닐-CoA의 프로피오닐-CoA로의 전환을 동시에 촉매화한다(도 1 및 2 참조). 1.3S, 5S 및 12S 아단위를 포함하는 예시적인 메틸말로닐-CoA 카복시트랜스퍼라제를 프로피오니박테리움 프레우텐레이키아에서 발견할 수 있다(Thornton et al., J. Bacteriol 175:5301-5308(1993)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 79에 나타낸다.

표 79

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
PKY1	NP_009362	6319279	사카로마이세스 세레비지아에
PKY2	NP_014992	6324923	사카로마이세스 세레비지아에
pykF	NP_416191.1	16129632	에스케리키아 콜라이
pykA	NP_416368.1	16129807	에스케리키아 콜라이
1.3S 아단위	P02904	114847	프로피오니박테리움 프레우텐레이키아
5S 아단위	Q70AC7	62901478	프로피오니박테리움 프레우텐레이키아
12S 아단위	Q8GBW6	62901481	프로피오니박테리움 프레우텐레이키아

[0558] 피루베이트 키나제 및 피루베이트 카복실라제

[0559] 효소들의 조합은 PEP 카복실라제의 경우와 동일한 화학량론으로 PEP를 옥살로아세테이트로 전환시킬 수 있다. 이들 효소는 피루베이트 키나제, *PKY1*(Burke et al., J. Biol. Chem. 258:2193-2201(1983)) 또는 *PKY2*(Boles et al., J. Bacteriol. 179:2987-2993(1997)) 및 피루베이트 카복실라제, *PYC1*(Walker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 176:1210-1217(1991)) 또는 *PYC2*(224)에 의해 암호화된다. 피루베이트 카복실라제 작용에 대한 일부 후보들을 하기 표 80에 나타낸다.

표 80

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
PYC1	NP_011453	6321376	사카로마이세스 세레비지아에
PYC2	NP_009777	6319695	사카로마이세스 세레비지아에
Pyc	YP_890857.1	118470447	마이코박테리움 스메그마티스

[0561] 말레이트 데하이드로게나제, 푸마라제, 푸마레이트 리덕타제

[0562] 옥살로아세테이트를, 상기 TCA 주기가 환원적 주기로 실행되는 경우, 말레이트 데하이드로게나제, 푸마라제 및 푸마레이트 리덕타제에 의해 숙시네이트로 전환시킬 수 있다. 사카로마이세스 세레비지아에는 3 개의 말레이트 데하이드로게나제 사본, *MDH1*(MaAlister-Henn et al., J. Bacteriol 169:5157-5166(1987)), *MDH2*(Minard et al., Mol. Cell. Biol. 11:370-380(1991); Gibson, J. Biol. Chem. 278:25628-25636(2003)), 및 *MDH3*(Steffan et al., J. Biol. Chem. 267:24708-24715(1992))을 가지며, 이들은 각각 미토콘드리아, 시토솔 및 페록시솜에 집중되어 있다. 사카로마이세스 세레비지아에는 하나의 푸마라제-암호화 유전자 사본, *FUM1*(그의 산물은 시토솔과 미토콘드리아 모두에 집중되어 있다)을 함유한다(Sass et al., J. Biol. Chem. 278:45109-45116(2003)). 푸마레이트 리덕타제는 2 개의 용해성 효소, *FRDS1*(Enomoto et al., DNA. Res. 3:263-267(1996)) 및 *FRDS2*(Muratsubaki et al., Arch. Biochem. Biophys. 352:175-181(1998))에 의해 암호화되며, 이들은 각각 시토솔 및 프로미토콘드리아에 집중되어 있고 글루코스 상에서의 혐기성 생육에 요구된다(Arikawa et al., Microbiol Lett. 165:111-116(1998)). 에스케리키아 콜라이는 활성 말레이트 데하이드로게

나제를 갖는 것으로 공지되어 있다. 상기 에스케리키아 콜라이는 *fumA*, *B* 및 *C*에 의해 암호화된 3 개의 퓨마라제를 가지며, 이들은 각각 상이한 산소 유용성 조건 하에서 활성화이다. 에스케리키아 콜라이 중의 퓨마라이트 리덕타제는 4 개의 아단위들로 구성된다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 81에 나타낸다.

표 81

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
MDH1	NP_012838	6322765	사카로마이세스 세레비지아에
MDH2	NP_014515	116006499	사카로마이세스 세레비지아에
MDH3	NP_010205	6320125	사카로마이세스 세레비지아에
FUM1	NP_015061	6324993	사카로마이세스 세레비지아에
FRDS1	P32614	418423	사카로마이세스 세레비지아에
FRDS2	NP_012585	6322511	사카로마이세스 세레비지아에
<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
<i>Mdh</i>	NP_417703.1	16131126	에스케리키아 콜라이
<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

[0564] 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제

[0565] 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제는 상기 CoA 부분을 CoA 수용체 분자로 운반하면서 숙시닐-CoA의 숙시네이트로의 전환을 촉매화한다. 다수의 트랜스퍼라제는 광범위한 특이성을 가지며 따라서 다른 것들 중에서도 아세테이트, 숙시네이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 2-메틸아세트아세테이트, 3-케토희사노에이트, 3-케토펜타노에이트, 발레레이트, 크로토네이트, 3-머캅토프로피오네이트, 프로피오네이트, 비닐아세테이트, 부티레이트와 같은 다양한 CoA 수용체들을 사용할 수 있다.

[0566] 상기 숙시네이트의 숙시닐-CoA로의 전환을 이상적으로는 ATP 또는 GTP의 직접 소비를 필요로 하지 않는 트랜스퍼라제에 의해 수행한다. 이러한 유형의 반응은 다수의 유기체들에서 통상적이다. 추정 상 상기 반응 단계에서 상부 후보 효소는 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제이다. 상기 효소는 3-케토아실-CoA를 3-케토산으로 전환시키면서 숙시네이트를 숙시닐-CoA로 전환시킨다. 예시적인 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 트랜스퍼라제는 헬리코박터 파이로리(Corthesy-Theulaz et al., J. Biol. Chem. 272:25659-25667(1997)), 바실러스 서브틸리스(Stols et al., Protein. Expr. Purif. 53:396-403(2007)), 및 호모 사피엔스(Fukao et al., Genomics, 68:144-151(2000); Tanaka et al., Mol. Hum. Reprod. 8:16-23(2002)) 중에 존재한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 82에 나타낸다.

표 82

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	헬리코박터 파이로리
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	헬리코박터 파이로리
<i>ScoA</i>	NP_391778	16080950	바실러스 서브틸리스
<i>ScoB</i>	NP_391777	16080949	바실러스 서브틸리스
<i>OXCT1</i>	NP_000427	4557817	호모 사피엔스
<i>OXCT2</i>	NP_071403	11545841	호모 사피엔스

[0567] 숙시네이트의 숙시닐-CoA로의 전환을 또한 숙시닐-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제에 의해 촉매화할 수 있다. 클로스트리움 클루이베리의 *cat1*의 유전자 산물은 숙시닐-CoA:아세틸-CoA 트랜스퍼라제 활성을 발휘하는 것으로 나타났다(Sohling et al., J Bacteriol. 178:871-880(1996)). 또한, 상기 활성은 트리코모나스 바기날리스(van Grinsven et al., J. Biol. Chem. 283:1411-1418(2008)) 및 트리파노소마 브루세이(Riviere et al., J. Biol. Chem. 279:45337-45346(2004)) 중에 존재한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 83에 나타낸다.

표 83

[0569]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
cat1	P38946.1	729048	클로스트리듐 클루이베리
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	트리코모나스 바기날리스 G3
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	트리파노소마 브루세이

[0570]

더욱 또 다른 가능한 CoA 수용체는 벤질숙시네이트이다. 숙시닐-CoA:(R)-벤질숙시네이트 CoA-트랜스퍼라제는 타우에라 아로마티카와 같은 유기체에서 톨루엔에 대한 혐기성 분해 경로의 일부로서 작용한다(Leuwein and Heider, J. Bact. 183(14)4288-4295(2001)). 상동체들을 아조아르쿠스 스페이즈 T, 아로마톨레움 아로마티쿰 Ebn1, 및 제오박터 메탈리레두센스 GS-15에서 발견할 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 84에 나타낸다.

표 84

[0571]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
bbsE	AAF89840	9622535	타우에라 아로마티카
bbsf	AAF89841	9622536	타우에라 아로마티카
bbsE	AAU45405.1	52421824	아조아르쿠스 스페이즈 T
bbsF	AAU45406.1	52421825	아조아르쿠스 스페이즈 T
bbsE	YP_158075.1	56476486	아로마톨레움 아로마티쿰 Ebn1
bbsF	YP_158074.1	56476485	아로마톨레움 아로마티쿰 Ebn1
Gmet_1521	YP_384480.1	78222733	제오박터 메탈리레두센스 GS-15
Gmet_1522	YP_384481.1	78222734	제오박터 메탈리레두센스 GS-15

[0572]

최종적으로, *ygfH*는 에스케리키아 콜라이에서 프로피오닐 CoA:숙시네이트 CoA 트랜스퍼라제를 암호화한다(Haller et al., Biochemistry, 39(16) 4622-4629). 가까운 상동체들이 예를 들어 시트로박터 영가에 ATCC 29220, 살모넬라 엔테리카 서브스페이즈 아리조나에 세로바, 및 예르시니아 인테르메디아 ATCC 29909에서 발견될 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 85에 나타낸다.

표 85

[0573]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
ygfH	NP_417395.1	16130821	에스케리키아 콜라이 균주 K-12 하위균주 MG1655
CIT292_04485	ZP_03838384.1	227334728	시트로박터 영가에 ATCC 29220
SARI_04582	YP_001573497.1	161506385	살모넬라 엔테리카 서브스페이즈 아리조나에 세로바
yinte0001_14430	ZP_04635364.1	238791727	예르시니아 인테르메디아 ATCC 29909

[0574]

숙시닐-CoA 신시타제

[0575]

사카로마이세스 세레비지아에의 *LSC1* 및 *LSC2* 유전자 및 에스케리키아 콜라이의 *sucC* 및 *sucD* 유전자의 산물은 1 ATP의 동반 소모(생체 내에서 가역적인 반응이다)로 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA의 형성을 촉매화하는 숙시닐-CoA 신시타제 복합체를 자연적으로 형성한다(Bravo et al., J. Forensic Sci. 49:379-387(2004)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 86에 나타낸다.

표 86

[0576]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
LSC1	NP_014785	6324716	사카로마이세스 세레비지아에
LSC2	NP_011760	6321683	사카로마이세스 세레비지아에
sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이

[0577] 피루베이트 포메이트 라이아제

[0578] 피루베이트 포메이트 라이아제는 피루베이트 및 CoA의 아세틸-CoA 및 포메이트로의 전환을 촉매화하는 효소이다. 피루베이트 포메이트 라이아제는 혐기성 산화환원 균형의 조절을 돕는데 사용되는 원핵생물 유기체 중의 통상적인 효소이다. 예시적인 효소들을 에스케리키아 콜라이(Knappe et al., FEMS. Microbiol Rev. 6:383-398(1990)), 락토코커스 락티스(Melchiorsen et al., Appl Microbiol Biotechnol 58:338-344(2002)), 및 스트렙토코커스 뮤탄스(Takahashi-Abbe et al., Oral. Microbiol Immunol. 18:293-297(2003))에서 찾을 수 있다. 미토콘드리아 피루베이트 포메이트 라이아제가 또한 진핵생물, 클라미도모나스 레인하르트티에서 동정되었다(Hemschemeier et al., Eukaryot. Cell 7:518-526(2008); Atteia et al., J. Biol. Chem. 281:9909-9918(2008)). 이들 효소/단백질을 하기 표 87에 나타낸다.

표 87

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
pf1B	NP_415423	16128870	에스케리키아 콜라이
pf1	CAA03993	2407931	락토코커스 락티스
pf1	BAA09085	1129082	스트렙토코커스 뮤탄스
PFL1	EDP09457	158283707	클라미도모나스 레인하르트티

[0580] 포메이트 수소 라이아제

[0581] 포메이트 수소 라이아제 효소를 사용하여 포메이트를 이산화 탄소 및 수소로 전환시킬 수 있다. 예시적인 포메이트 수소 라이아제 효소를 에스케리키아 콜라이에서 찾을 수 있다. 상기 에스케리키아 콜라이 포메이트 수소 라이아제는 하이드로게나제 3 및 포메이트 데하이드로게나제-H로 이루어진다(Maeda et al., Appl Microbiol Biotechnol 77:879-890(2007)). 상기 효소는 *fh1A*의 유전자 산물에 의해 활성화된다(Maeda et al., Appl Microbiol Biotechnol 77:879-890(2007)). 미량 원소, 셀레늄, 니켈 및 몰리브데늄을 발효 브로스에 첨가하면 포메이트 수소 라이아제 활성이 증대되는 것으로 나타났다(Soini et al., Microb. Cell Fact. 7:26(2008)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 88에 나타낸다.

표 88

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
하이드로게나제 3:			
hycD	NP_417202	16130629	에스케리키아 콜라이
hycC	NP_417203	16130630	에스케리키아 콜라이
hycF	NP_417200	16130627	에스케리키아 콜라이
hycG	NP_417199	16130626	에스케리키아 콜라이
hycB	NP_417204	16130631	에스케리키아 콜라이
hycE	NP_417201	16130628	에스케리키아 콜라이
포메이트 데하이드로게나제-H:			
fdhF	NP_418503	16131905	에스케리키아 콜라이
활성화제:			
fh1A	NP_417211	16130638	에스케리키아 콜라이

[0583] 포메이트 수소 라이아제 효소는 또한 초고온성 고세균, 썬모코커스 리토랄리스 중에 존재한다(Takacs et al., BMC. Microbiol 8:88(2008)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 89에 나타낸다.

표 89

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
mhyC	ABW05543	157954626	썬모코커스 리토랄리스
mhyD	ABW05544	157954627	썬모코커스 리토랄리스
mhyE	ABW05545	157954628	썬모코커스 리토랄리스
myhF	ABW05546	157954629	썬모코커스 리토랄리스
mvhG	ABW05547	157954630	썬모코커스 리토랄리스
mvhH	ABW05548	157954631	썬모코커스 리토랄리스

fdhA	AAB94932	2746736	써모코커스 리토랄리스
fdhB	AAB94931	157954625	써모코커스 리토랄리스

[0585] 추가적인 포메이트 수소 라이아제 시스템이 살모넬라 티피뮤리움, 클렙시엘라 뉴모니아에, 로도스피릴룸 루브룸, 메타노박테리움 포르미시쿰에서 발견되었다(Vardar-Schara et al., Microbial Biotechnology 1:107-125).

[0586] 포메이트 데하이드로게나제

[0587] 포메이트 데하이드로게나제 활성은 다른 유기체들 중에서도 에스케리키아 콜라이 및 사카로마이세스 세레비지아에 모두에 존재한다. 사카로마이세스 세레비지아에는 2 개의 포메이트 데하이드로게나제, *FDH1* 및 *FDH2*를 함유하며, 이들은 포메이트의 CO<sub>2</sub>로의 산화를 촉매화한다(Overkamp et al., Yeast 19:509-520(2002)). 무어렐라 써모아세티카에서, Moth\_2312 및 Moth\_2313의 유전자 좌들은 실제로 포메이트 데하이드로게나제의 알파 아단위를 암호화하는데 책임이 있는 하나의 유전자인 반면 베타 아단위는 Moth\_2314에 의해 암호화된다(Pierce et al., Environ. Microbiol(2008); Andreesen et al., J. Bacteriol. 116:867-873(1973); Li et al., J. Bacteriol 92:405-412(1966); Yamamoto et al., J. Biol. Chem. 258:1826-1832(1983)). 포메이트 데하이드로게나제 활성을 암호화하는 또 다른 유전자 세트는 신티로포박터 푸마룩시단스 중의 Sfum\_2703 내지 Sfum\_2706에 의해 암호화된다(Reda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:10654-10658(2008); de Bok et al., Eur. J. Biochem. 270:2476-2485(2003)). Sfum\_2705 및 Sfum\_2706은 실제로, 그들의 무어렐라 써모아세티카 대응물과 유사하게, 하나의 유전자이다. 에스케리키아 콜라이는 여러 개의 포메이트 데하이드로게나제를 함유한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 90에 나타낸다.

표 90

[0588]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
FDH1	NP_015033	6324964	사카로마이세스 세레비지아에
FDH2	Q08987	88909613	사카로마이세스 세레비지아에
Moth_2312	YP_431142	148283121	무어렐라 써모아세티카
Moth_2313	YP_431143	83591134	무어렐라 써모아세티카
Moth_2314	YP_431144	83591135	무어렐라 써모아세티카
Sfum_2703	YP_846816.1	116750129	신티로포박터 푸마룩시단스
Sfum_2704	YP_846817.1	116750130	신티로포박터 푸마룩시단스
Sfum_2705	YP_846818.1	116750131	신티로포박터 푸마룩시단스
Sfum_2706	YP_846819.1	116750132	신티로포박터 푸마룩시단스
fdnG,H,I	NP_415991-993.1	16129433 16129434 16129435	에스케리키아 콜라이
fdoG,H,I	NP_418330,29,28.1	16131734 16131733 16131732	에스케리키아 콜라이

[0589] 피루베이트 데하이드로게나제

[0590] 피루베이트에서 아세틸-CoA로의 전환을 촉매화하는 피루베이트 데하이드로게나제가 광범위하게 연구되어 왔다. 사카로마이세스 세레비지아에 복합체는 E1(*PDA1*, *PDB1*), E3(*LPD1*), 및 단백질 X(*PDX1*) 성분들과 결합하는 E2(*LATI*) 코어로 이루어진다(Pronk et al., Yeast 12:1607-1633(1996)). 에스케리키아 콜라이 효소에서, 상기 E1 성분 중의 특정 잔기들이 기질 특이성을 맡고 있다(Bisswanger, J Biol Chem. 256:815-822(1981); Bremer, J Biochem. 8:535-540(1969); Gong et al. J Biol Chem. 275:13645-13653(2000)). 공학적 노력은 혐기성 조건 하에서 에스케리키아 콜라이 PDH 효소 활성을 개선시켰다(Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771(2007); Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008); Zhou et al., Biotechnol. Lett. 30:335-342(2008)). 상기 에스케리키아 콜라이 PDH와 대조적으로, 바실러스 서브틸리스 복합체는 혐기성 조건 하에서 활성이며 상기 조건 하에서의 증식에 요구된다(Nakano et al., J. Bacteriol. 179:6749-6755(1997)). 글리세롤 상에서 증식하는 동안 특성화된, 클렙시엘라 뉴모니아에 PDH가 또한 혐기성 조건 하에서 활성이다(Menzel et al., J. Biotechnol. 56:135-142(1997)). 소 신장으로부터의 상기 효소 복합체의 결정 구조(Zhou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807(2001)) 및 아조토박터 비넬란디어로

부터의 E2 촉매 도메인을 입수할 수 있다(Mattevi et al. Science 255:1544-1550(1992)). 일부 포유동물 PDH 효소 복합체는 또 다른 기질, 예를 들어 2-옥소부타노에이트 상에서 반응할 수 있다(Paxton et al., Biochem. J. 234:295-303(1986)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 91에 나타낸다.

표 91

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
LAT1	NP_014328	6324258	사카로마이세스 세레비지아에
PDA1	NP_011105	37362644	사카로마이세스 세레비지아에
PDB1	NP_009780	6319698	사카로마이세스 세레비지아에
LPD1	NP_116635	14318501	사카로마이세스 세레비지아에
PDX1	NP_011709	6321632	사카로마이세스 세레비지아에
aceE	NP_414656.1	16128107	에스케리키아 콜라이 균주 K12 기질. MG1655
aceF	NP_414657.1	16128108	에스케리키아 콜라이 균주 K12 기질. MG1655
lpd	NP_414658.1	16128109	에스케리키아 콜라이 균주 K12 기질. MG1655
pdhA	P21881.1	3123238	바실러스 서브틸리스
pdhB	P21882.1	129068	바실러스 서브틸리스
pdhC	P21883.2	129054	바실러스 서브틸리스
pdhD	P21880.1	118672	바실러스 서브틸리스
aceE	YP_001333808.1	152968699	클렙시엘라 뉴모니아 MGH78578
aceF	YP_001333809.1	152968700	클렙시엘라 뉴모니아 MGH78578
lpdA	YP_001333810.1	152968701	클렙시엘라 뉴모니아 MGH78578
Pdha1	NP_001004072.2	124430510	라투스 노르베기쿠스
Pdha2	NP_446446.1	16758900	라투스 노르베기쿠스
Dlat	NP_112287.1	78365255	라투스 노르베기쿠스
Dld	NP_955417.1	40786469	라투스 노르베기쿠스

[0592] 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제

[0593] 피루베이트 페레독신 옥시도리덕타제(PFOR)는 피루베이트의 산화를 촉매화하여 아세틸-CoA를 형성한다. 데실포비브리오 아프리카누스로부터의 PFOR을 클로닝하고 에스케리키아 콜라이에서 발현시켜 활성 재조합 효소를 생성시켰으며 이는 산소의 존재 하에서 수일간 안정하였다(Pieulle et al., J Bacteriol 179:5684-5692(1997)). 산소 안정성은 PFOR에서 비교적 흔하지 않으며 상기 데실포비브리오 아프리카누스 효소의 폴리펩타이드 쇠 중의 60 잔기 연장에 의해 부여되는 것으로 여겨진다. 무어렐라 써모아세티카 PFOR이 또한 잘 특성화되어 있으며(Menon et al., Biochemistry 36:8484-8494(1997)) 심지어 독립영양성 생육 중에 피루베이트 합성 방향으로 높은 활성을 갖는 것으로 입증되었다(Furdui et al., J Biol Chem. 275:28494-28499(2000)). 더욱이, 에스케리키아 콜라이는 상기 무어렐라 써모아세티카 PFOR과 51% 일치하는 단백질을 암호화하는 특성화되지 않은 개방 판독 프레임, *ydbK*를 갖는다. 에스케리키아 콜라이에서 피루베이트 옥시도리덕타제 활성에 대한 증거가 개시되었다(Blaschkowski et al., Eur. J Biochem. 123:563-569(1982)). 여러 추가적인 PFOR 효소가 하기 논평에 개시되어 있다(Ragsdale, Chem. Rev. 103:2333-2346(2003)). 최종적으로, 플라보독신 리덕타제(예를 들어 헬리코박터 파이로리 또는 캄필로박터 제주니로부터의 *fqrB*)(St Maurice et al., J. Bacteriol. 189:4764-4773(2007)) 또는 Rnf-형 단백질(Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:2128-2133(2008); Hermann et al., J. Bacteriol 190:784-791(2008))은 PFOR에 의해 생성된 환원된 페레독신으로부터 NADH 또는 NADPH를 생성시키는 수단을 제공한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 92에 제공한다.

표 92

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
por	CAA70873.1	1770208	데실포비브리오 아프리카누스
por	YP_428946.1	83588937	무어렐라 써모아세티카
ydbK	NP_415896.1	16129339	에스케리키아 콜라이
fqrB	NP_207955.1	15645778	헬리코박터 파이로리

fqrB	YP_001482096.1	157414840	캠필로박터 제주니
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

[0595] 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제(CoA-의존성)

[0596] 숙시닉 세미알데하이드 데하이드로게나제(CoA-의존성)(또한 숙시닐-CoA 리덕타제로서도 지칭됨)는 숙시닐-CoA를 그의 상응하는 알데하이드로 환원시키는 CoA- 및 NAD(P)H-의존성 옥시도리덕타제이다. 예시적인 효소는 클로스트리듐 클루이베리 중의 *sucD* 유전자(Sohling et al., J. Bacteriol., 178:871-880(1996); Sohling et al., J. Bacteriol., 178:871-880(1996)) 및 포르피로모나스 진지발리스의 *SucD* 유전자(Takahashi et al., J. Bacteriol., 182:4704-4710(2000))에 의해 암호화된다. 유사한 반응을 촉매화하는 다른 효소들은 애시네토박터 칼코아세티쿠스(Reiser et al., Journal of Bacteriology 179:2969-2975(1997)) 및 애시네토박터 스페시스 M-1(Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195(2002))의 지방 아실-CoA 리덕타제, 및 슈도모나스 스페시스 중의 아실화 아세트알데하이드 데하이드로게나제(상기 효소는 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 아이소부티르알데하이드 및 폼알데하이드를 산화하고 아실화하는 것으로 입증되었다)(Powlowski et al., J. Bacteriol., 175:377-385(1993))이다. 아세틸-CoA의 에탄올로의 환원 이외에, 류코노스톡 메센테로이테스 중의 *adhE*에 의해 암호화되는 효소가 분지쇄 화합물 아이소부티르알데하이드를 아이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 입증되었다(Koo et al., Biotechnol Lett. 27:505-510(2005)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 93에 나타낸다.

표 93

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>sucD</i>	P38947.1	172046062	클로스트리듐 클루이베리
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	포르피로모나스 진지발리스
<i>acr1</i>	YP_047869.1	50086359	애시네토박터 칼코아세티쿠스
<i>acr1</i>	AAC45217	1684886	애시네토박터 배이리이
<i>acr1</i>	BAB85476.1	18857901	애시네토박터 스페시스 균주 M-1
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	슈도모나스 스페시스
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	류코노스톡 메센테로이테스

[0598] 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제

[0599] 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제는 숙시닉 세미알데하이드의 4-HB로의 NAD(P)H 의존성 환원을 촉매화한다. 상기 활성을 나타내는 효소들은 랄스토니아 유티로파(Bravo et al., J. Forensic Sci., 49:379-387(2004)), 클로스트리듐 클루이베리(Wolff et al., Protein Expr. Purif., 6:206-212(1995)) 및 아라비도프시스 탈리아나(Breitkreuz et al., J. Biol. Chem., 278:41552-41556(2003))에서 발견된다. 더욱 또 다른 유전자는 제오바실러스 썬모글루코시다시우스(*Geobacillus thermoglucosidasius*)(Jeon et al., J Biotechnol 135:127-133(2008))로부터의 알콜 데하이드로게나제이다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 94에 나타낸다.

표 94

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>4hbd</i>	YP_726053.1	113867564	랄스토니아 유티로파 H16
<i>4hbd</i>	EDK35022.1	146348486	클로스트리듐 클루이베리
<i>4hbd</i>	Q94B07	75249805	아라비도프시스 탈리아나
<i>adhI</i>	AAR91477.1	40795502	제오바실러스 썬모글루코시다시우스

[0601] 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제

[0602] 4-HB의 4-하이드록시부티릴-CoA로의 전환은 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 활성을 갖는 효소에 의해

촉매화된다. 후보 효소는 각각 숙시닐-CoA, 4-하이드록시부티릴-CoA, 및 부티릴-CoA 트랜스퍼라제 활성을 나타내는 것으로 입증된 클로스트리듐 클루이베리의 *cat1*, *cat2* 및 *cat3*의 유전자 산물을 포함한다(Gerhardt et al., Arch. Microbiol 174:189-199(2000); Arikawa et al., Microbiol Lett. 165:111-116(1998); Sohling et al., J Bacteriol. 178:871-880(1996)). 유사한 CoA 트랜스퍼라제 활성이 또한 트리코모나스 바기날리스(van Grinsven et al., J. Biol. Chem. 283:1411-1418(2008)) 및 트리파노소마 브루세이(Riviere et al., J. Biol. Chem. 279:45337-45346(2004)) 중에 존재한다. 에스케리키아 콜라이의 *atoA* 및 *atoD* 유전자는 넓은 기질 범위를 갖는 아세트아세틸-CoA 트랜스퍼라제를 암호화한다(Sramek et al., Arch. BioChem. Biophys. 171:14-26(1975)). 상기 효소는 아세틸-CoA의 CoA 부분을 아이소부티레이트(Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58:1435-1439(1992)), 발레레이트(Vanderwinkel et al., BioChem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908(1968)) 및 부타노에이트(Vanderwinkel et al., BioChem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908(1968))를 포함하여, 다양한 분지 및 선형 기질로 운반하는 것으로 나타났다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 95에 나타낸다.

표 95

유전자	진뱅크 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
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	트리코모나스 바기날리스 G3
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	트리파노소마 브루세이
<i>atoA</i>	P76459.1	2492994	에스케리키아 콜라이
<i>atoD</i>	P76458.1	2492990	에스케리키아 콜라이

[0603]

[0604] 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제

[0605]

4-HB의 4-하이드록시부티릴-CoA로의 전환은 또한 CoA 산-티올 리가제(또한 CoA 신시타제로서 공지됨)에 의해 촉매화될 수 있다. 상기 정확한 변형을 촉매화하는 효소는 지금까지 특성화되지 않았으나; 광범위한 기질 특이성을 갖는 여러 효소들이 문헌에 개시되었다. 예시적인 후보는 1 ATP의 동반 소비로 숙시네이트로부터의 숙시닐-CoA의 형성(생체 내에서 가역적인 반응이다)을 자연적으로 촉매화하는, 에스케리키아 콜라이 중의 *sucCD*에 의해 암호화된 효소이다(Buck et al., Biochemistry 24:6245-6252(1985)). 추가의 CoA-리가제 후보는 페니실리움 크로소제눔으로부터의 ADP-형성 페닐아세테이트-CoA 리가제(Lamas-Maceiras et al., BioChem. J 395:147-155(2006)); Wang et al., BioChem. Biophys. Res. Commun. 360:453-458(2007)) 및 슈도모나스 멘도시나(*Pseudomonas mendocina*)로부터의 피멜로일-CoA 리가제를 포함한다. 상기 에스케리키아 콜라이 내로 클로닝된, 슈도모나스 멘도시나로부터의 AMP-형성 효소는 또 다른 기질 헥산다이오에이트 및 노난다이오에이트를 수용하는 것으로 입증되었다(Binieda et al., BioChem. J 340(Pt3):793-801(1999)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 96에 나타낸다. 아세트아세틸-CoA 신시타제, 숙시닐-CoA 신시타제, 프로피오닐-CoA 신시타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 신시타제 및 메트아크릴일-CoA 신시타제에 대해 동정된 CoA 신시타제 효소 후보들을 또한 여기에 적용할 수 있다.

표 96

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>sucC</i>	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
<i>sucD</i>	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이
<i>phl</i>	CAJ15517.1	77019264	페니실리움 크로소제눔
<i>pauA</i>	NP_249708.1	15596214	슈도모나스 멘도시나

[0606]

[0607] 4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성)

[0608]

4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제는 4-하이드록시부티릴-CoA의 4-하이드록시부티르알데하이드로의 NAD(P)H 의 존성 환원을 촉매화한다. 상기 활성을 나타내는 효소는 클로스트리듐 클루이베리 중의 *sucD* 유전자(Sohling et al., J. Bacteriol., 178:871-880(1996); Sohling et al., J. Bacteriol., 178:871-880(1996)) 및 포르피로모나스 진지발리스의 *SucD* 유전자(Takahashi et al., J. Bacteriol., 182:4704-4710(2000))에 의해 암호화

된 숙시네이트 세미알데하이드 데하이드로게나제 효소를 포함한다. 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰과 같은 용매생성 유기체 중에서 발견된 부티르알데하이드 데하이드로게나제 효소(Kosaka et al., Biosci. Biotechnol BioChem. 71:58-68(2007))는 유사한 반응, 즉 부티릴-CoA의 부티르알데하이드로의 전환을 촉매화한다. *bphG*에 의해 암호화되는, 슈도모나스 스페시즈 중의 아세트알데하이드 데하이드로게나제를 아실화하는 효소는 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 아이소부티르알데하이드 및 폼알데하이드를 산화하고 아실화하는 것으로 입증된 더욱 또 다른 후보이다(Powlowski et al., J. Bacteriol., 175:377-385(1993)). 애시네토박터 칼코아세티쿠스(Reiser et al., Journal of Bacteriology 179:2969-2975(1997)) 및 애시네토박터 스페시즈 M-1(Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195(2002))의 지방 아실-CoA 리덕타제가 유사한 반응들을 촉매화한다. 아세틸-CoA의 에탄올로의 환원 이외에, 류코노스톡 메센테로이데스 중의 *adhE*에 의해 암호화되는 효소가 분지쇄 화합물 아이소부티르알데하이드를 아이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 입증되었다(Koo et al., Biotechnol Lett. 27:505-510(2005)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 97에 나타낸다.

표 97

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
sucD	P38947.1	172046062	클로스트리듐 클루이베리
sucD	NP_904963.1	34540484	포르피로모나스 진지발리스
bld	AAP42563.1	31075383	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰
bphG	BAA03892.1	425213	슈도모나스 스페시즈
acr1	YP_047869.1	50086359	애시네토박터 칼코아세티쿠스
acr1	AAC45217	1684886	애시네토박터 배이리이
acr1	BAB85476.1	18857901	애시네토박터 스페시즈 균주 M-1
adhE	AAV66076.1	55818563	류코노스톡 메센테로이데스

[0609]

4-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제

[0610]

4-하이드록시부티르알데하이드의 14-BDO로의 전환은 알콜 데하이드로게나제에 의해 촉매화된다. 에스케리키아 콜라이 중의 여러 고유 데하이드로게나제, 예를 들어 *yqhD*(Sulzenbacher et al., Journal of Molecular Biology 342:489-502(2004))는 넓은 기질 특이성을 나타내며 또한 상기 반응을 촉매화할 수 있다. 상기 *yqhD*의 유전자 산물은 보조 인자로서 NADPH를 사용하는 아세트알데하이드, 말론다이알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인의 환원을 촉매화한다(Perez et al., J. Biol. Chem., 283:7346-7353(2008); Perez, J. Biol. Chem., 283:7346-7353(2008)). 알데하이드의 알콜로의 전환을 촉매화하는 추가적인 효소 후보는 C2-C14의 경우 중간-쇄 알콜 데하이드로게나제를 암호화하는 *alrA*(Tani et al., Appl. Environ. Microbiol., 66:5231-5235(2000)), 사카로마이세스 세레비지아로부터의 ADH2(Atsumi et al., Nature, 451:86-89(2008)), 및 부티르알데하이드를 부탄올로 전환시키는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰으로부터의 *bdhI* 및 *bdhII*(Walter et al., Journal of Bacteriology, 174:7149-7158(1992))를 포함한다. 자이모모나스 모빌리스로부터의 *adhA* 유전자는 폼알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인을 포함한 다수의 알데하이드에 대해 활성을 갖는 것으로 입증되었다(Kinoshita et al., Appl. Microbiol. Biotechnol, 22:249-254(1985)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 98에 나타낸다.

[0611]

표 98

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
yqhD	NP_417484.1	16130909	에스케리키아 콜라이
alrA	BAB12273.1	9967138	애시네토박터 스페시즈 M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	사카로마이세스 세레비지아
bdh I	NP_349892.1	15896543	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
bdh II	NP_349891.1	15896542	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
adhA	YP_162971.1	56552132	자이모모나스 모빌리스

[0612]

4-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)

[0613]

4-하이드록시부티릴-CoA의 14-BDO로의 전환은 또한 알데하이드 데하이드로게나제 및 알콜 데하이드로게나제 능력을 갖는 이작용성 옥시도리덕타제에 의해 촉매화될 수 있다. 예를 들어, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰으

[0614]

로부터의 *adheE2* 유전자 산물은 부티릴-부티릴-CoA를 부탄올로 전환시킨다(Fontaine et al., J. Bacteriol., 184:821-830(2002)). 상기 효소는 또한 기질로서 4-하이드록시부티릴-CoA를 수용한다. 추가의 이작용성 알콜-형성 리덕타제 효소는 류코노스톡 메센테로이데스 중의 *adhE*(Kazahaya et al., Microbiol., 18:43-55(1972); Koo et al., Biotechnol. Lett., 27:505-510(2005)) 및 심몬디아 키넨시스로부터의 FAR(Metz et al., Plant Physiology 122:635-644(2000))의 유전자 산물을 포함한다. 또 다른 예시적인 효소는 *mcr*에 의해 암호화된 클로로플렉수스 아우란티아쿠스 중의 NADPH-의존성 말로닐-CoA 리덕타제이다(Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002); Strauss et al., Eur. J. BioChem. 215:633-643(1993)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 99에 나타낸다.

표 99

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	류코노스톡 메센테로이데스
FAR	AAD38039.1	5020215	심몬디아 키넨시스
<i>mcr</i>	AAS20429.1	42561982	클로로플렉수스 아우란티아쿠스

[0615] 4-하이드록시부티레이트 포스포트랜스퍼라제(aka.키나제)

[0617] 4-하이드록시부티레이트 포스포트랜스퍼라제(또한 4-하이드록시부티레이트 키나제로서도 공지됨)는 1 ATP의 동반 가수분해로 4-HB를 4-하이드록시부티릴 포스페이트로 변형시킨다. 이들 변형을 촉매화하는 후보 효소는 부티레이트 키나제, 아스파토키나제, 아세테이트 키나제 및 gaMAA-글루타밀 키나제를 포함한다. 부티레이트 키나제(EC 2.7.2.7) 효소는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에서 산성 발생 도중 부티릴-포스페이트의 부티레이트로의 가역적인 전환을 수행한다(Cary et al., Appl. Environ. Microbiol 56:1576-1583(1990)). 상기 효소는 2 개의 *buk* 유전자 산물 중 어느 하나에 의해 암호화된다(Huang et al., J Mol. Microbiol Biotechnol 2:33-38(2000)). 다른 부티레이트 키나제 효소는 클로스트리듐 부티리쿰 및 클로스트리듐 테타노몰룸에서 발견된다(TWAROG et al., J Bacteriol. 86:112-117(1963)). 씨모토가 마리티마로부터의 관련된 효소 아이소부티레이트 키나제가 또한 에스케리키아 콜라이에서 발견되고 결정화되었다(Diao et al., E. Biol. Crystallogr. 59:1100-1102(2003); Diao et al., J Bacteriol. 191:2521-2529(2009)). 아스파토키나제는 아스파테이트의 ATP-의존성 인산화를 촉매화하며 여러 아미노산의 합성에 참여한다. *lysC*에 의해 암호화된, 에스케리키아 콜라이 중의 아스파토키나제 III 효소는 광범위한 기질 범위를 가지며 기질 특이성에 관련된 촉매적 잔기들이 추론되었다(Keng et al., Arch. Biochem. Biophys. 335:73-81(1996)). 에스케리키아 콜라이 중의 2 개의 추가적인 키나제, 아세테이트 키나제 및 gaMAA-글루타밀 키나제가 또한 양호한 후보이다. *ackA*에 의해 암호화된, 상기 에스케리키아 콜라이 아세테이트 키나제(Skarstedt et al., J. Biol. Chem. 251:6775-6783(1976))는 아세테이트 이외에 프로피오네이트를 인산화한다(Hesslinger et al., Mol. Microbiol 27:477-492(1998)). *proB*에 의해 암호화된, 상기 에스케리키아 콜라이 gaMAA-글루타밀 키나제(Smith et al., J. Bacteriol. 157:545-551(1984))는 글루타메이트의 gaMAA 카복실 그룹을 인산화한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 100에 나타낸다.

표 100

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>buk1</i>	NP_349675	15896326	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
<i>buk2</i>	Q97111	20137415	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
<i>buk2</i>	Q9X278.1	6685256	씨모토가 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

[0619] 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제

[0620] 포스포트랜스-4-하이드록시부티릴라제는 4-하이드록시부티릴-포스페이트의 포스페이트 부분을 CoA 부분과 교환하여, 4-하이드록시부티릴-CoA를 형성한다. 상기 변형을 위한 후보 효소는 부티릴-CoA를 부티릴-포스페이트로 가역적으로 전환시키는 효소인 포스포트랜스부티릴라제(EC 2.3.1.19)이다. 상기 효소는 클로스트리듐

아세트부틸리쿰(Walter et al., Gene 134:107-111(1993); Wiesenborn et al., Appl Environ. Microbiol 55:317-322(1989)), 부티레이트-생산 세균 L2-50(Louis et al., J. Bacteriol. 186:2099-2106(2004)) 및 바실러스 메가테리움(Vazquez et al, Curr. Microbiol 42:345-349(2001))에서 발견되는 *ptb* 유전자들에 의해 암호화된다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 101에 나타낸다.

**표 101**

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>ptb</i>	NP_349676	34540484	클로스트리듐 아세트부틸리쿰
<i>ptb</i>	AAR19757.1	38425288	부티레이트-생산 세균 L2-50
<i>ptb</i>	CAC07932.1	10046659	바실러스 메가테리움

**[0622]** 4-하이드록시부티릴-포스페이트 리덕타제

**[0623]** 4-하이드록시부티릴-포스페이트의 그의 상응하는 알데하이드로의 환원은 포스페이트 리덕타제에 의해 촉매화된다. 상기 반응은 공지된 효소들에 의해서 촉매화되는 것이 아니고, 유사한 반응이 아스파테이트 세미알데하이드 데하이드로게나제(ASD, EC 1.2.1.11): 4-아스파틸 포스페이트의 아스파테이트-4-세미알데하이드로의 NADPH-의존성 환원에 의해 촉매화된다. ASD는 아미노산 생합성에 참여하며 최근에 항균 표적으로서 연구되었다(Hadfield et al., Biochemistry 40:14475-14483(2001)). 상기 에스케리키아 콜라이 ASD 구조가 풀렸으며(Hadfield et al., J Mol. Biol. 289:991-1002(1999)), 상기 효소는 또 다른 기질인 베타-3-메틸아스파틸 포스페이트를 수용하는 것으로 나타났다(Shames et al., J Biol. Chem. 259:15331-15339(1984)). 상기 하에모필루스 인플루엔자에 효소는 활성 부위에서 기질 결합 친화성을 변경시키기 위한 효소 공학 연구의 주제였다(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 후보가 마이코박테리움 튜베르쿨로시스(Shafiani et al., J Appl Microbiol 98:832-838(2005)), 메타노코쿠스 잔나쉬이(*Methanococcus jannaschii*)(Faehnle et al., J Mol. Biol. 353:1055-1068(2005)), 및 감염성 미생물 비브리오 콜레라(*Vibrio cholera*) 및 헬리코박터 파이로리(Moore et al., Protein Expr. Purif. 25:189-194(2002))에서 발견된다. 관련된 효소 후보는 사카로마이세스 세레비지아에(Pauwels et al., Eur. J Biochem. 270:1014-1024(2003)), 바실러스 서브틸리스(O'Reilly and Devine, Microbiology 140(Pt 5):1023-1025(1994)) 및 다른 유기체에서 발견되는, 아세틸글루타미닐포스페이트를 아세틸글루타메이트-5-세미알데하이드로 자연적으로 환원시키는 효소인 아세틸글루타미닐포스페이트 리덕타제(EC 1.2.1.38)이다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 102에 나타낸다.

**표 102**

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>asd</i>	NP_417891.1	16131307	에스케리키아 콜라이
<i>asd</i>	YP_248335.1	68249223	하에모필루스 인플루엔자에
<i>asd</i>	AAB49996	1899206	마이코박테리움 튜베르쿨로시스
VC2036	NP_231670	15642038	비브리오 콜레라
<i>asd</i>	YP_002301787.1	210135348	헬리코박터 파이로리
ARG5_6	NP_010992.1	6320913	사카로마이세스 세레비지아에
<i>argC</i>	NP_389001.1	16078184	바실러스 서브틸리스

**[0625]** 다른 예시적인 포스페이트 리덕타제 효소는 글리세르알데하이드-3-포스페이트를 D-글리세레이트 1,3-비스포스페이트로 전환시키는 글리세르알데하이드 3-포스페이트 데하이드로게나제(예를 들어 에스케리키아 콜라이 *gapA*(Branlant et al., Eur. J. Biochem. 150:61-66(1985))), N-아세틸-L-글루타메이트-5-세미알데하이드를 N-아세틸-L-글루타미-5-포스페이트로 전환시키는 N-아세틸-감마-글루타미-포스페이트 리덕타제(예를 들어 에스케리키아 콜라이 *argC*(Parsot et al. Gene, 68:275-283(1988))), 및 L-글루타메이트-5-세미알데하이드를 L-글루타미-5-포스페이트로 전환시키는 글루타메이트-5-세미알데하이드 데하이드로게나제(예를 들어 에스케리키아 콜라이 *proA*(Smith et al., J. Bacteriol., 157:545-551(1984)))를 포함한다. 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)(Mahan et al., J. Bacteriol., 156:1249-1262(1983)) 및 캄필로박터 제주니(Louie et al., Mol. Gen. Genet., 240:29-35(1993))로부터의 글루타메이트-5-세미알데하이드 데하이드로게나제 효소를 암호화하는 유전자를 에스케리키아 콜라이에 클로닝하고 발현시켰다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 103

에 나타낸다.

표 103

[0626]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
gapA	POA9B2.2	71159358	에스케리키아 콜라이
argC	NP_418393.1	16131796	에스케리키아 콜라이
proA	NP_414778.1	16128229	에스케리키아 콜라이
proA	NP_459319.1	16763704	삼모넬라 티피뮤리움
proA	P53000.2	9087222	감필로박터 제주니

[0627]

숙시네이트 리덕타제 및 4-하이드록시부티레이트 리덕타제

[0628]

숙시네이트의 숙시닉 세미알데하이드 또는 4-HB의 4-하이드록시부티르알데하이드로의 직접 환원은 카복실산 리덕타제에 의해 촉매화될 수 있다. 아릴-알데하이드 데하이드로게나제로서 동등하게 공지된, 노카르디아 이오웬시스(*Nocardia iowensis*)의 카복실산 리덕타제는 카복실산의 그의 상응하는 알데하이드로의 마그네슘, ATP 및 NADPH-의존성 환원을 촉매화하며(Venkitasubramanian et al., J Biol. Chem. 282:478-485(2007)) 4-하이드록시부티레이트의 4-하이드록시부탄알로의 전환을 촉매화할 수 있다. *car*에 의해 암호화된 상기 효소를 에스케리키아 콜라이에서 클로닝하고 작용상 발현시켰다(Venkitasubramanian et al., J Biol. Chem. 282:478-485(2007)). 상기 *npt* 유전자 산물의 발현은 전사 후 변형을 통해 상기 효소의 활성을 개선시켰다. 상기 *npt* 유전자는 불활성 아포-효소를 활성 전효소로 전환시키는 특정한 포스포판테제인 트랜스퍼라제(PPTase)를 암호화한다. 상기 효소의 천연 기질은 바닐산이며 상기 효소는 방향족 및 지방족 기질의 광범위한 수용을 나타낸다(Venkitasubramanian et al., "Biocatalytic Reduction of Carboxylic Acids: Mechanism and Applications" Chapter 15 in Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries, ed. R.N. Patel, CRC Press LLC, Boca Raton, FL.(2006)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 104에 나타낸다.

표 104

[0629]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>car</i>	AAR91681.1	40796035	노카르디아 이오웬시스(스페이스 NRRL 5646)
<i>npt</i>	ABI83656.1	114848891	노카르디아 이오웬시스(스페이스 NRRL 5646)

[0630]

추가적인 *car* 및 *npt* 유전자를 서열 상동성을 근거로 동정할 수 있다. 이들 유전자에 의해 암호화된 단백질들의 비 제한적인 예를 표 105에 나타낸다.

표 105

[0631]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>fadD9</i>	YP_978699.1	121638475	마이코박테리움 보비스 BCG
<i>BCG_2812c</i>	YP_978898.1	121638674	마이코박테리움 보비스 BCG
<i>nfa20150</i>	YP_118225.1	54023983	노카르디아 파르시니카 IFM 10152
<i>nfa40540</i>	YP_120266.1	54026024	노카르디아 파르시니카 IFM 10152
<i>SGR_6790</i>	YP_001828302.1	182440583	스트렙토마이세스 그리세우스 서브스페시즈 그리세우스 NBRC 13350
<i>SGR_665</i>	YP_001822177.1	182434458	스트렙토마이세스 그리세우스 서브스페시즈 그리세우스 NBRC 13350
<i>MSMEG_2956</i>	YP_887275.1	YP_887275.1	마이코박테리움 스메그마티스 MC2 155
<i>MSMEG_5739</i>	YP_889972.1	118469671	마이코박테리움 스메그마티스 MC2 155
<i>MSMEG_2648</i>	YP_886985.1	118471293	마이코박테리움 스메그마티스 MC2 155
<i>MAP1040c</i>	NP_959974.1	41407138	마이코박테리움 아비움 서브스페시즈 파라투베르쿨로시스 K-10
<i>MAP2899c</i>	NP_961833.1	41408997	마이코박테리움 아비움 서브스페시즈 파라투베르쿨로시스 K-10
<i>MMAR_2117</i>	YP_001850422.1	183982131	마이코박테리움 마리눔 M
<i>MMAR_2936</i>	YP_001851230.1	183982939	마이코박테리움 마리눔 M

MMAR_1916	YP_001850220.1	183981929	마이코박테리움 마리눔 M
TpauDRAFT_33060	ZP_04027864.1	227980601	추카무렐라 파우로메타볼라 DSM 20162
TpauDRAFT_20920	ZP_04026660.1	227979396	추카무렐라 파우로메타볼라 DSM 20162
CPCC7001_1320	ZP_05045132.1	254431429	시아노블 PCC7001
DDBDRAFT_0187729	XP_636931.1	66806417	딕티오스텔류스 디스코이데움 AX4

[0632] 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*)에서 발견되는 추가적인 효소 후보는 *grIC* 및 *grID* 유전자에 의해 암호화된다. 상기 효소는 *grIC* 또는 *grID*의 결실로서 3-아미노-4-하이드록시벤조산을 3-아미노-4-하이드록시벤즈알데하이드로 전환시켜 3-아미노-4-하이드록시벤조산 대사의 단락 생성물인 세포 외 3-아세틸 아미노-4-하이드록시벤조산이 축적되게 하는 것으로 여겨진다(Suzuki, et al., J. Antibiot. 60(6):380-387(2007)). 노카르디아 이오웬시스 *npt*와 서열이 유사한 효소인 SGR\_665와 *grIC* 및 *grID*의 동시 발현이 유리할 수도 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 106에 나타낸다.

표 106

[0633]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>grIC</i>	YP_001825755.1	182438036	스트렙토마이세스 그리세우스 서브스페시즈 그리세우스 NBRC 13350
<i>grID</i>	YP_001825756.1	182438037	스트렙토마이세스 그리세우스 서브스페시즈 그리세우스 NBRC 13350

[0634] 유사한 특성을 갖는 효소인, 알파-아미노아디페이트 리덕타제(AAR, EC 1.2.1.31)는 일부 진균 종들에서 리신 생합성 경로에 관여한다. 상기 효소는 알파-아미노아디페이트를 알파-아미노아디페이트 세미알데하이드로 자연적으로 환원시킨다. 상기 카복실 그룹을 먼저 아데닐레이트의 ATP-의존적인 형성을 통해 활성화시키고 이어서 NAD(P)H에 의해 환원시켜 알데하이드 및 AMP를 제공한다. CAR과 같이, 상기 효소는 마그네슘을 사용하며 PPTase에 의한 활성화를 필요로 한다. AAR 및 그의 상응하는 PPTase에 대한 효소 후보는 사카로마이세스 세레비지아에(Morris et al., Gene 98:141-145(1991)), 칸디다 알비칸스(Guo et al., Mol. Genet. Genomics 269:271-279(2003)), 및 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)(Ford et al, Curr. Genet. 28:131-137(1995))에서 발견된다. 상기 시조사카로마이세스 폼베로부터의 AAR은 에스케리키아 콜라이에서 발현 시 현저한 활성을 나타내었다(Guo et al., Yeast 21:1279-1288(2004)). 페니실리움 크리소제눔으로부터의 AAR은 또 다른 기질로서 S-카복시메틸-L-시스테인을 수용하지만, 아디페이트, L-글루타메이트 또는 다이아미노피멜레이트와는 반응하지 않았다(Hijarrubia et al., J Biol. Chem 278:8250-8256(2003)). 상기 페니실리움 크리소제눔 PPTase를 암호화하는 유전자는 지금까지 동정되지 않았으며 서열 비교 상동성 탐색에 의해 높은 신뢰의 적중이 확인되지 않았다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 107에 나타낸다.

표 107

[0635]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
LYS2	AAA34747.1	171867	사카로마이세스 세레비지아에
LYS5	P50113.1	1708896	사카로마이세스 세레비지아에
LYS2	AAC02241.1	2853226	칸디다 알비칸스
LYS5	AA026020.1	28136195	칸디다 알비칸스
<i>Lys1p</i>	P40976.3	13124791	시조사카로마이세스 폼베
<i>Lys7p</i>	Q10474.1	1723561	시조사카로마이세스 폼베
<i>Lys2</i>	CAA74300.1	3282044	페니실리움 크리소제눔

[0636] 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제

[0637] 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제는 4-하이드록시부티릴-CoA의 크로토닐-CoA로의 가역적인 전환을 촉매화한다. 상기 효소는 이중 결합을 3,4 번 위치로부터 2,3 번 위치로 이동시키는, 고유의 비닐아세틸-CoA Δ-아이소머라제 활성을 갖는다(Scherf et al., Eur. J. Biochem., 215:421-429(1993); Scherf et al., Arch. Microbiol., 161:239-245(1994)). 클로스트리움 클루이베리 및 클로스티리움 아미노부티리쿰으로부터의 4-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제 효소들이 정제되고, 특성화되고, N-말단에서 서열화되었다(Scherf et al., Eur. J. Biochem., 215:421-429(1993); Scherf et al., Arch. Microbiol., 161:239-245(1994)). *abfD*에

의해 암호화된, 상기 클로스트리듐 클루이베리가 에스케리키아 콜라이에서 클로닝되고, 서열화되고 발현되었다(Gerhardt et al., Arch. Microbiol 174:189-199(2000)). 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) ATCC 33277로부터의 *abfD* 유전자 산물은 상기 클로스트리듐 유전자 산물과 서열 상동성에 의해 밀접하게 관련된다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 108에 나타낸다.

**표 108**

단백질	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
abfD	YP_001396399.1	153955634	클로스트리듐 클루이베리
abfD	P55792	84028213	클로스트리듐 아미노부티리쿰
abfD	YP_001928843	188994591	포르피로모나스 진지발리스

**크로토나제**

3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드라타제(EC 4.2.1.55)(또한 크로토나제라 칭함)는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA를 가역적으로 탈수시켜 크로토닐-CoA를 형성하는 에노일-CoA 하이드라타제이다. 크로토나제 효소는 일부 유기체, 특히 클로스트리듐 중에서 n-부탄올 형성에 필요하며, 설포로부스, 애시디아누스, 및 메탈로스파에라 속의 호열호산성 고세균에서 3-하이드록시프로피오네이트/4-하이드록시부티레이트 주기의 한 단계를 또한 포함한다. 크로토나제 효소를 암호화하는 예시적인 유전자를 클로스트리듐 아세토부티리쿰(Atsumi et al. Metab Eng.; 29(2007); Boynton et al. Journal of Bacteriology 178:3015-3024(1996)), 클로스트리듐 클루이베리(Hillmer et al., FEBS Lett. 21:351-354(1972)), 및 메탈로스파에라 세둘라(Berg et al., Science. 318:1782-1786(2007))(이 경우 유전자의 서열은 공지되어 있지 않다)에서 발견할 수 있다. *ech*에 의해 암호화된, 슈도모나스 푸티다의 에노일-CoA 하이드라타제는 크로토닐-CoA의 3-하이드록시부티릴-CoA로의 전환을 촉매화한다(Roberts et al., Arch. Microbiol 117:99-108(1978)). 추가적인 에노일-CoA 하이드라타제 후보는 슈도모나스 푸티다의 *phaA* 및 *phaB*, 및 슈도모나스 플루오레센스로부터의 *paaA* 및 *paaB*이다(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95:6419-6424(1998)). 마지막으로, 다수의 에스케리키아 콜라이 유전자들이 *maoC*(Park et al., J. Bacteriol., 185:5391-5398(2003)), *paaF*(Park et al., Biotechnol Bioeng., 86:681-686(2004); Park et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 113-116:335-346(2004); Ismail et al., Eur. J. Biochem., 270:3047-3054(2003)) 및 *paaG*(Ismail et al., Eur. J. Biochem., 270:3047-3054(2003); Park et al., Biotechnol Bioeng., 86:681-686(2004); Park et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 113-116:335-346(2004))를 포함한 에노일-CoA 하이드라타제 작용기들을 나타내는 것으로 입증되었다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 109에 나타낸다.

**표 109**

단백질	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
crt	NP349318.1	15895969	클로스트리듐 아세토부티리쿰
crtI	YP_001393856	153953091	클로스트리듐 클루이베리 DSM 555
ech	NP_745498.1	26990073	슈도모나스 푸티다
phaA	ABF82233.1	26990002	슈도모나스 푸티다
phaB	ABF82234.1	26990001	슈도모나스 푸티다
paaA	NP_745427.1	106636093	슈도모나스 플루오레센스
paaB	NP_745426.1	106636094	슈도모나스 플루오레센스
maoC	NP_415905.1	16129348	에스케리키아 콜라이
paaF	NP_415911.1	16129354	에스케리키아 콜라이
paaG	NP_415912.1	16129355	에스케리키아 콜라이

**3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알데하이드-형성)**

3-하이드록시부티릴-CoA 데하이드로게나제는 3-하이드록시부티릴-CoA의 3-하이드록시부티르알데하이드로의 NAD(P)H 의존성 환원을 촉매화한다. 상기 변형을 촉매화하는 효소는 지금까지 동정되지 않았다. 예시적인 CoA-아실화 알데하이드 데하이드로게나제는 클로스트리듐 베이제링키이로부터의 *aId* 유전자이다(Toth et al., Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980(1999)). 상기 효소는 아세틸-CoA 및 부티릴-CoA를 그들의 상응하는 알데하이드로 환원시키는 것으로 보고되었다. 아실-CoA를 그의 상응하는 알데하이드로 전환시키는 또 다른 효소는 말로닐-CoA를 말로닉 세미알데하이드로 형질전환시키는 말로닐-CoA 리덕타제이다. 말로닐-CoA 리덕타

제는 호열호산성 고세균에서 3-하이드록시프로피오네이트 주기를 통한 독립영양성 탄소 고정에 핵심 효소이다 (Berg et al., Science 318:1782-1786(2007); Thauer, Science, 318:1732-1733(2007)). 상기 효소는 보조인자로서 NADPH를 이용하며 메탈로스파에라 및 설포로부스 스페시즈에서 특성화되었다(Alber et al., J. Bacteriol., 188:8551-8559(2006); Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002)). 상기 효소는 메탈로스파에라 세둘라에서 *Msed\_0709*에 의해 암호화된다(Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006); Berg et al., Science 318:1782-1786(2007)). 설포로부스 토코다이이로부터의 말로닐-CoA 리덕타제를 암호화하는 유전자가 클로닝되었으며 에스케리키아 콜라이에서 이종 발현되었다(Alber et al., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006)). 상기 효소는 또한 메틸말로닐-CoA의 그의 상응하는 알데하이드로의 전환을 촉매화하는 것으로 입증되었다(WO2007141208). 상기 개시된, 4-하이드록시부티릴-CoA를 4-하이드록시부티르알데하이드로 전환시키기 위한 알데하이드 데하이드로게나제 효소 후보를 또한 여기에 적용할 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 110에 나타낸다.

표 110

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
Ald	AAT66436	49473535	클로스트리듐 베이제링키이
MSED_0709	YP_001190808.1	146303492	메탈로스파에라 세둘라
mcr	NP_378167.1	15922498	설포로부스 토코다이이

[0645] 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제

[0646] 3-하이드록시부티르알데하이드를 1,3-부탄다이올로 전환시키기 위해서 3-하이드록시부티르알데하이드 리덕타제 활성을 갖는 효소가 필요하다. 알데하이드의 알콜로의 전환을 촉매화하는 효소(즉 알콜 데하이드로게나제 또는 동등하게 알데하이드 리덕타제)를 암호화하는 예시적인 유전자는 C2-C14의 경우 중간-쇄 알콜 데하이드로게나제를 암호화하는 *alrA*(Tani et al., Appl. Environ. Microbiol., 66:5231-5235(2000)), 사카로마이세스 세레비지아에로부터의 *ADH2*(Atsumi et al., Nature, 451:86-89(2008)), C(3)보다 긴 분자를 선호하는 에스케리키아 콜라이로부터의 *yqhD*(Sulzenbacher et al., Journal of Molecular Biology, 342:489-502(2004)), 및 부티르알데하이드를 부탄올로 전환시키는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰으로부터의 *bdhI* 및 *bdhII*(Walter et al., Journal of Bacteriology, 174:7149-7158(1992))를 포함한다. *yqhD*의 유전자 산물은 보조 인자로서 NADPH를 사용하는 아세트알데하이드, 말론다이알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인의 환원을 촉매화한다(Perez et al., J. Biol. Chem., 283:7346-7353(2008)). 자이모모나스 모빌리스로부터의 *adhA* 유전자 산물은 폼알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온알데하이드, 부티르알데하이드, 및 아크롤레인을 포함한 다수의 알데하이드에 대해 활성을 갖는 것으로 입증되었다(Kinoshita., Appl. Microbiol. Biotechnol, 22:249-254(1985)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 111에 나타낸다.

표 111

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
alrA	BAB12273.1	9967138	애시네토박터 스페시즈 M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	사카로마이세스 세레비지아에
yqhD	NP_417484.1	16130909	에스케리키아 콜라이
bdh I	NP_349892.1	15896543	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
bdh II	NP_349891.1	15896542	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
adhA	YP_162971.1	56552132	자이모모나스 모빌리스

[0648] 추가적인 후보는 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 및 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제 효소를 포함한다. 4-하이드록시부티레이트 데하이드로게나제 효소는 4-하이드록시부티르알데하이드를 4-HB로 자연적으로 전환시키며 발스토니아 유티로파(Bravo et al., J. Forensic Sci., 49:379-387(2004)), 클로스트리듐 클루이베리(Wolff et al., Protein Expr. Purif., 6:206-212(1995)) 및 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)(Breitkreuz et al., J. Biol. Chem., 278:41552-41556(2003))에서 특성화되었다. 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드로게나제 효소 후보는 슈도모나스 아에루기노사 PAO1로부터의 *mmsB*(Gokam et al., United States patent 7393676(2008)), 슈도모나스 푸티다 KT2440으로부터의 *mmsB*(118) 및 슈도모나스 푸티다 E23으로부터의 *mmsB*(Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol. BioChem. 60:2043-

2047(1996))를 포함한다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 112에 나타낸다.

표 112

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
4hbd	YP_726053.1	113867564	랄스토니아 유트로파 H16
4hbd	L21902.1	146348486	클로스트리듐 클루이베리 DSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	아라비도프시스 탈리아나
mmsB	NP_252259.1	15598765	슈도모나스 아에루기노사 PA01
mmsB	NP_746775.1	26991350	슈도모나스 푸티다 KT2440
mmsB	JC7926	60729613	슈도모나스 푸티다 E23

[0650] 3-하이드록시부티릴-CoA 리덕타제(알콜-형성)

[0651] 3-하이드록시부티릴-CoA의 1,3-부탄다이올로의 직접적인 전환에 이작용성 옥시도리덕타제가 필요하다. 아실-CoA를 알콜로 전환시키는 예시적인 효소는 기질을 변형시키는 것들, 예를 들어 아세틸-CoA를 에탄올로(예를 들어 에스케리키아 콜라이로부터의 *adhE*(Kessler et al., FEBS. Lett., 281-59-63(1991)), 부티릴-CoA를 부탄올로(예를 들어 클로스트리듐 아세토부틸리쿰으로부터의 *adhE2*(Fontaine et al., J. Bacteriol., 184:821-830(2002)))로, 및 4-하이드록시부티릴-CoA를 1,4-부탄다이올로(선행 섹션의 후보들을 참조하시오) 변형시키는 것들을 포함한다. 호호바(심몬디아 키넨시스) FAR은 알콜 형성 지방 아실-CoA 리덕타제를 암호화한다. 상기 유전자는 에스케리키아 콜라이에서 클로닝되고 과발현되어, FAR 활성 및 지방 알콜의 축적을 생성시켰다(Metz et al., Plant Physiology 122:635-644(2000)). 또 다른 예시적인 효소는 말로닐-CoA를 3-하이드록시프로피오네이트로 전환시킨다. 상기 활성을 갖는 NADPH-의존성 효소가 클로로플렉수스 아우란티아쿠스(여기에서 상기 효소는 3-하이드록시프로피오네이트 주기에 관련한다)에서 특성화되었다(Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002); Strauss et al., Eur. J. BioChem. 215:633-643(1993)). 상기 효소는 300 kDa의 질량을 가지며, 매우 기질-특이성이고, 다른 공지된 옥시도리덕타제들과 서열 유사성을 거의 나타내지 않는다(Hugler et al., J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 113에 나타낸다.

표 113

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	에스케리키아 콜라이
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	류코노스톡 메센테로이테스
FAR	AAD38039.1	5020215	심몬디아 키넨시스
<i>mcr</i>	AAS20429.1	42561982	클로로플렉수스 아우란티아쿠스

[0653] 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제

[0654] 3-하이드록시부티릴-CoA의 3-하이드록시부티레이트(3-HB)로의 전환은 CoA 트랜스퍼라제, 하이드롤라제 또는 신시타제에 의해 촉매화된다. 상기 특정 변형을 촉매화하는 CoA 트랜스퍼라제 효소는 지금까지 동정되지 않았다. 에스케리키아 콜라이 효소 아실-CoA:아세테이트-CoA 트랜스퍼라제(또한 아세테이트-CoA 트랜스퍼라제(EC 2.8.3.8)로서 공지됨)가, 상기 CoA 부분을 아이소부티레이트(Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58:1435-1439(1992)), 발레레이트(Vanderwinkel et al., BioChem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968)) 및 부타노에이트(Vanderwinkel et al., BioChem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968))를 포함하여, 다양한 분지 및 선형 아실-CoA 기질로부터의 아세테이트로 운반하는 것으로 나타났다. 상기 효소는 에스케리키아 콜라이 스페이즈 K12 중의 *atoA*(알파 아단위) 및 *atoD*(베타 아단위)(Korolev et al., D Biol Crystallogr. 58:2116-2121(2002); Vanderwinkel et al., BioChem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968)) 및 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 중의 *actA* 및 *cg0592*(Duncan et al., Appl Environ Microbiol 68:5186-5190(2002))에 의해 암호화된다. 유사한 효소들이 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032(Eikmanns et al., Mol. Gen. Genet. 218:330-339(1989)), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(Cary et al., Appl Environ Microbiol 56:1576-1583(1990); Wiesenborn et al., Appl. Environ. Microbiol 55:323-329(1989)), 및 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰(Kosaka et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007)) 중에 존재한다. 이들

유전자/단백질을 하기 표 114에 나타낸다.

표 114

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
atoA	P76459.1	2492994	에스케리키아 콜라이 K12
atoD	P76458.1	2492990	에스케리키아 콜라이 K12
actA	YP_226809.1	62391407	코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032
cg0592	YP_224801.1	62389399	코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032
ctfA	NP_149326.1	15004866	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
ctfB	NP_149327	15004867	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
ctfA	AAP42564.1	31075384	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰
ctfB	AAP42565.1	31075385	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰

[0656] 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 및 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제에 대해 개시된 CoA 트랜스퍼라제 효소 후보들을 또한 여기에 적용할 수 있다.

[0657] 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제

[0658] 3-하이드록시부티릴-CoA는 또한 CoA 신시타제(또한 리가제 또는 신타제로서 공지됨)에 의해 3-HB로 전환될 수 있다. 후보 ATP 신시타제는 ATP의 동반적인 합성과 아세틸-CoA 에스터의 그의 상응하는 산으로의 전환을 결합시키는 효소인 ADP-형성 아세틸-CoA 신시타제(ACD, EC 6.2.1.13)이다. 상기 효소는 기질로서 3-하이드록시부티릴-CoA와 반응함이 입증되지 않았지만, 광범위한 기질 특이성을 갖는 여러 효소들이 문헌에 개시되었다. AF1211에 의해 암호화된, 알카에오글로부스 풀기두스로부터의 ACD I은 아이소부티레이트, 아이소펜타노에이트 및 퓨마레이트를 포함한 다양한 선형 및 분지쇄 기질들 상에서 작용하는 것으로 나타났다(Musfeldt et al., J bacteriol 184:636-644(2002)). AF1983에 의해 암호화된, 알카에오글로부스 풀기두스 중의 두 번째 가역적인 ACD가 또한 환상 화합물 페닐아세테이트 및 인돌아세테이트에 대해 높은 활성을 갖는 광범위한 기질 범위를 갖는 것으로 나타났다(Musfeldt et al., J bacteriol 184:636-644(2002)). 할로알칼라 마리스모르투이로부터의 효소(숙시닐-CoA 신시타제로서 주석이 달렸다)는 기질로서 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지쇄 산(아이소발레이트 및 아이소부티레이트)을 수용하며, 순 방향 및 역방향으로 작용하는 것으로 나타났다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004)). 초고온성 크레나카에온인 파이로바쿨룸 아에로필룸으로부터의 PAE3250에 의해 암호화된 ACD는, 아세틸-CoA, 아이소부티릴-CoA(바람직한 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응하는 모든 특성화된 ACD 중 가장 광범위한 기질 범위를 나타내었다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004)). 그러나, 상기 효소가 숙주 유기체의 생리 온도에서 작용하기 위해서는 방향 진화 또는 공학이 필요할 수도 있다. 알카에오글로부스 풀기두스, 할로알칼라 마리스모르투이 및 파이로바쿨룸 아에로필룸으로부터의 효소들은 모두 클로닝되었으며, 작용상 발현되었고, 에스케리키아 콜라이에서 특성화되었다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004); Musfeldt et al., J bacteriol 184:636-644(2002)). 추가의 후보는 에스케리키아 콜라이 중의 *sucCD*에 의해 암호화된 효소이며, 1 ATP의 동반 소비(생체 내에서 가역적인 반응이다)로 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA의 형성을 자연적으로 촉매화한다(Buck et al., BioChemistry 24:6245-6252(1984)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 115에 나타낸다.

표 115

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
AF1211	NP_070039.1	11498810	알카에오글로부스 풀기두스 DSM 4304
AF1983	NP_070807.1	11499565	알카에오글로부스 풀기두스 DSM 4304
scs	YP_135572.1	55377722	할로알칼라 마리스모르투이 ATCC 43049
PAE3250	NP_560604.1	18313937	피로바쿨룸 아에로필룸 str IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이

[0660] 프로피오닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 신시타제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 메트아크릴일-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 및 숙시닐-CoA 신시타

제에 대해 개시된 CoA 신시타제 효소 후보들을 또한 여기에 적용할 수 있다.

[0661] 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제

[0662] 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제는 3-하이드록시아이소부티릴-CoA의 3-HB로의 전환을 촉매화하는 데 필요하다. 상기 효소 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제(EC 3.1.2.4)는 관련된 변형: 3-하이드록시아이소부티릴-CoA의 가수분해를 촉매화한다. 상기 호모 사피엔스로부터의 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제는 또한 기질로서 3-하이드록시부티릴-CoA를 수용한다(Shimomura et al., Methods Enzymol. 324:229-240(2000)). 상기 효소는 또한 라투스 노르베기쿠스에서 특성화되었다(Shimomura et al., J Biol Chem. 269:14248-14253(1994); Shimomura et al., Methods Enzymol. 324:229-240(2000)). 서열 상동성에 의한 후보 효소는 사카로마이세스 세레비지아에의 *hibch* 및 바실러스 세레우스의 *BC\_2292*를 포함한다. 이들 단백질은 하기 표 116에 나타낸다. 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 메틸말로닐-CoA 신하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제, 및 3-하이드록시아이소부티릴-CoA에 대해 동정된 추가의 CoA 하이드롤라제 효소 후보들을 또한 여기에 적용할 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 116에 나타낸다.

표 116

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	146324906	라투스 노르베기쿠스
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	146324905	호모 사피엔스
<i>hibch</i>	P28817.2	2506374	사카로마이세스 세레비지아에
<i>BC_2292</i>	AP09256	29895975	바실러스 세레우스

[0664] 3-하이드록시부티레이트 리덕타제

[0665] 3-하이드록시부티레이트의 3-하이드록시부티르알데하이드로의 환원은 카복실산 리덕타제에 의해 촉매화된다. 숙시네이트 리덕타제 및 4-하이드록시부티레이트 리덕타제 효소에 대한 예시적인 효소 후보를 또한 여기에 적용할 수 있다.

[0666] 4-하이드록시부티릴-CoA 뮤타제

[0667] 4HB-CoA의 3-하이드록시아이소부티릴-CoA로의 전환은 메틸뮤타제에 의해 촉매화된다. 상기와 같은 전환은 아직 실험적으로 설명되지 않았다. 그러나, 유사한 반응들을 촉매화하는 2 개의 메틸뮤타제(즉 아이소부티릴-CoA 뮤타제 및 메틸말로닐-CoA 뮤타제)는 이들의 상응하는 기질의 구조 유사성이 제공된 유망한 후보이다.

[0668] 메틸말로닐-CoA 뮤타제(MCM)는 숙시닐-CoA를 메틸말로닐-CoA로 자연적으로 전환시키는 코발아민-의존성 효소이다. 에스케리키아 콜라이에서, 상기 가역적인 아데노실코발아민-의존성 뮤타제는 3-단계 경로에 참여하여 숙시네이트의 프로피오네이트로의 전환을 이끈다(Haller et al., Biochemistry 39:4622-9(2000)). MCM은 에스케리키아 콜라이에서 유전자 *scpA*(Haller et al., Biochemistry 39:4622-4629(2000); Bobik et al., Anal. Bioanal. Chem. 375:344-349(2003)) 및 호모 사피엔스에서 *mutA*(Padovani et al., Biochemistry 45:9300-9306(2006))에 의해 암호화된다. 여러 다른 유기체들에서 MCM은 알파 및 베타 아단위를 함유하며 2 개의 유전자에 의해 암호화된다. 상기 2-아단위 단백질을 암호화하는 예시적인 유전자 후보는 프로피오니박테리움 프레텐레이키이 스페시즈 웨르마니 *mutA* 및 *mutB*(Korotkova et al., J Biol Chem. 279:13652-13658(2004)) 및 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 *mcmA* 및 *mcmB*(Korotkova et al., J Biol Chem. 279:13652-13658(2004))이다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 117에 나타낸다.

표 117

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>scpA</i>	NP_417392.1	16130818	에스케리키아 콜라이 K12
<i>mutA</i>	P22033.3	67469281	호모 사피엔스
<i>mutA</i>	P11652.3	127549	프로피오니박테리움 프레텐레이키이 스페시즈 웨르마니
<i>mutB</i>	P11653.3	127550	프로피오니박테리움 프레텐레이키이 스페시즈 웨르마니
<i>mcmA</i>	Q84FZ1	75486201	메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스
<i>mcmB</i>	Q6TMA2	75493131	메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스

[0670] 상기 에스케리키아 콜라이 *spcA* 유전자 산물에 대한 높은 상동성을 근거로 동정된 추가적인 효소 후보들을 하기 표 118에 나타낸다.

표 118

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
sbm	NP_838397.1	30064226	시겔라 플렉스네리
SARI_04585	ABX24358.1	160867735	살모넬라 엔테리카
YfreA_01000861	ZP_00830776.1	77975240	예르시니아 프레테릭세니

[0672] 상기 메틸말로닐-CoA 뮤타제 촉매 유전자에 인접한 유전자들이 또한 최대 활성에 필요하다는 증거가 추가로 존재한다. 예를 들어, 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스로부터의 *meaB* 유전자가 메틸말로닐-CoA 뮤타제와 복합체를 형성하고, 시험관 내 뮤타제 활성을 자극하며, 가능하게는 상기 뮤타제를 비가역적 불활성화로부터 보호함이 입증되었다(Korotkova et al., J Biol Chem. 279:13652-13658(2004)). 상기 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 *meaB* 유전자 산물은 염색체상의 *scpA*에 인접한 에스케리키아 콜라이 *argK* 유전자(BLASTp: 45% 일치성, e-값: 4e-67)의 산물과 매우 유사하다. 프로피오니박테리움 프레우덴레이키이 종의 *meaB* 상동체에 대한 서열은 진뱅크에 실려있지 않다. 그러나, PPA0597 유전자 좌에서 상기 프로피오니박테리움 아크네스 KPA171202 유전자 산물은 상기 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 *meaB* 단백질과 51% 일치하며, 그의 유전자가 또한 상기 염색체상의 메틸말로닐-CoA 뮤타제 유전자에 인접해 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 119에 나타낸다.

표 119

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
argK	AAC75955.1	1789285	에스케리키아 콜라이 K12
PPA0597	YP_055310.1	50842083	프로피오니박테리움 아크네스
KPA171202	2QM8_B	158430328	메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스

[0674] 한편으로, 아이소부티릴-CoA 뮤타제(ICM)는 상기 제안된 변형을 촉매화할 수 있었다. ICM은 부티릴-CoA의 탄소 주쇄를 아이소부티릴-CoA로 가역적으로 재배열하는 MCM 패밀리 중의 코발아민-의존성 메틸뮤타제이다(문헌[Ratnatilleke, J Biol Chem. 274:31679-31685(1999)]의 도 7B). 메틸리봄 페트롤레이필룸(*Methylibium petroleiphilum*) 종의 신규의 ICM에 대한 최근의 연구는 선행 연구와 함께, 활성 부위 부근의 단일 아미노산 변화는 상기 효소의 기질 특이성을 변경시킨다는 증거를 제공한다(Ratnatilleke et al., J Biol Chem. 274:31679-31685(1999); Rohwerder et al., Appl Environ Microbiol 72:4128-4135(2006)). 이는 고유 효소가 4HB-CoA의 3HB-CoA로의 전환을 촉매화할 수 없는 경우, 상기 효소가 합리적인 공학을 겪을 수 있음을 의미한다. 동중이량체성 효소를 암호화하는 예시적인 ICM 유전자는 스트렙토마이세스 코엘리콜라(*Streptomyces coelicolor*) A3 종의 *icmA*(2) 및 메틸리봄 페트롤레이필룸 PM1 종의 *Mpe\_B0541*(Ratnatilleke et al., J Biol Chem. 274:31679-31685(1999); Rohwerder et al., Appl Environ Microbiol 72:4128-4135(2006))을 포함한다. 이중이량체성 효소를 암호화하는 유전자는 스트렙토마이세스 신나모넨시스 종의 *icm* 및 *icmB*를 포함한다(Ratnatilleke et al., J Biol Chem. 274:31679-31685(1999); Vrijbloed et al., J Bacteriol. 181:5600-5605(1999); Zerbe-Burkhardt et al., J Biol Chem. 273:6508-6517(1998)). 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*) MA-4680 종의 *icmA* 및 *icmB* 유전자에 의해 암호화된 효소는 공지된 ICM에 대해 높은 서열 유사성을 나타낸다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 120에 나타낸다.

표 120

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
icmA	CAB40912.1	4585853	스트렙토마이세스 코엘리콜라 A3(2)
Mpe_B0541	YP_001023546.1	124263076	메틸리봄 페트롤레이필룸 PM1
icm	AAC08713.1	3002492	스트렙토마이세스 신나모넨시스
icmB	CAB59633.1	6137077	스트렙토마이세스 신나모넨시스
icmA	NP_824008.1	29829374	스트렙토마이세스 아베르미틸리스
icmB	NP_824637.1	29830003	스트렙토마이세스 아베르미틸리스

[0676] 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제

[0677] 본 경로의 다음 단계는 CoA 트랜스퍼라제에 의한 3-하이드록시아이소부티릴-CoA의 3-하이드록시아이소부티레이트(3-HIB)로의 전환을 수반한다. 상기 특정 변형을 촉매화하는 효소는 지금까지 동정되지 않았다. 에스케리키아 콜라이 효소 아실-CoA:아세테이트-CoA 트랜스퍼라제(또한 아세테이트-CoA 트랜스퍼라제(EC 2.8.3.8)로서 공지됨)가, 상기 CoA 부분을 아이소부티레이트(Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58:1435-1439(1992)), 발레레이트(Vanderwinkel et al., BioChem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968)) 및 부타노에이트(Vanderwinkel et al., BioChem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968))를 포함하여, 다양한 분지 및 선형 아실-CoA 기질로부터의 아세테이트로 운반하는 것으로 나타났다. 상기 효소는 에스케리키아 콜라이 스펜시즈 K12 중의 *atoA*(알파 아단위) 및 *atoD*(베타 아단위)(Korolev et al., D Biol Crystallogr. 58:2116-2121(2002); Vanderwinkel et al., BioChem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968)) 및 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 중의 *actA* 및 *cg0592*(Duncan et al., Appl Environ Microbiol 68:5186-5190(2002))에 의해 암호화된다. 유사한 효소들이 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032(Eikmanns et al., Mol. Gen. Genet. 218:330-339(1989)), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(Cary et al., Appl Environ Microbiol 56:1576-1583(1990); Wiesenborn et al., Appl. Environ. Microbiol 55:323-329(1989)), 및 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰(Kosaka et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007)) 중에 존재한다. 앞서 개시된, 하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 효소 후보를 또한 여기에 적용할 수 있다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 121에 나타낸다.

표 121

[0678]

유전자	진뱅크 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 글루타미쿰 ATCC 13032
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	62389399	코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032
<i>ctfA</i>	NP_149326.1	15004866	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
<i>ctfB</i>	NP_149327	15004867	클로스트리듐 아세토부틸리쿰
<i>ctfA</i>	AAP42564.1	31075384	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰
<i>ctfB</i>	AAP42565.1	31075385	클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰

[0679] 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제

[0680] 3-하이드록시아이소부티릴-CoA는 또한 CoA 신시타제(또한 리가제 또는 신시타제로서 공지됨)에 의해 3-HIB로 전환될 수 있다. 후보 ATP 신시타제는 ATP의 동반적인 합성과 아세틸-CoA 에스터의 그의 상응하는 산으로의 전환을 결합시키는 효소인 ADP-형성 아세틸-CoA 신시타제(ACD, EC 6.2.1.13)이다. 상기 효소는 기질로서 3-하이드록시아이소부티릴-CoA와 반응함이 입증되지 않았지만, 광범위한 기질 특이성을 갖는 여러 효소들이 문헌에 개시되었다. AF1211에 의해 암호화된, 알카에오글로부스 풀기두스로부터의 ACD I은 아이소부티레이트, 아이소펜타노에이트 및 퓨마레이트를 포함한 다양한 선형 및 분지쇄 기질들 상에서 작용하는 것으로 나타났다(Musfeldt et al., J bacteriol 184:636-644(2002)). AF1983에 의해 암호화된, 알카에오글로부스 풀기두스 중의 두 번째 가역적인 ACD가 또한 환상 화합물 페닐아세테이트 및 인돌아세테이트에 대해 높은 활성을 갖는 광범위한 기질 범위를 갖는 것으로 나타났다(Musfeldt et al., J bacteriol 184:636-644(2002)). 할로알콜라 마리스모르투이로부터의 효소(숙시닐-CoA 신시타제로서 주석이 달렸다)는 기질로서 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지쇄 산(아이소발레레이트 및 아이소부티레이트)을 수용하며, 순 방향 및 역방향으로 작용하는 것으로 나타났다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004)). 초고온성 크레나카에온인 파이로바쿨룸 아에로필룸으로부터의 *PAE3250*에 의해 암호화된 ACD는, 아세틸-CoA, 아이소부티릴-CoA(바람직한 기질) 및 페닐아세틸-CoA와 반응하는 모든 특성화된 ACD 중 가장 광범위한 기질 범위를 나타내었다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004)). 그러나, 상기 효소가 숙주 유기체의 생리 온도에서 작용하기 위해서는 방향진화 또는 공학이 필요할 수도 있다. 알카에오글로부스 풀기두스, 할로알콜라 마리스모르투이 및 파이로바쿨룸 아에로필룸으로부터의 효소들은 모두 클로닝되었으며, 작용상 발현되었고, 에스케리키아 콜라이에서 특성화되었다(Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287(2004); Musfeldt et al., J bacteriol 184:636-644(2002)). 추가의 후보는 에스케리키아 콜라이 중의 *sucCD*에 의해 암호화된 효소이며, 1 ATP의 동반 소비

(생체 내에서 가역적인 반응이다)로 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA의 형성을 자연적으로 촉매화한다(Buck et al., BioChemistry 24:6245-6252(1984)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 122에 나타낸다.

표 122

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
AF1211	NP_070039.1	11498810	알카에오글로부스 풀기두스 DSM 4304
AF1983	NP_070807.1	11499565	알카에오글로부스 풀기두스 DSM 4304
scs	YP_135572.1	55377722	할로아콜라 마리스모르투이 ATCC 43049
PAE3250	NP_560604.1	18313937	피로바쿨룸 아에로필름 str IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이

[0682] 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제

[0683] 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제는 발린 분해 도중 3-하이드록시아이소부티릴-CoA의 3-HIB로의 전환을 효율적으로 촉매화한다(Shimomura et al., J Biol Chem. 269:14248-14253(1994)). 상기 효소를 암호화하는 유전자는 앞서 개시되었다. 앞서 개시된, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제 및 프로피오닐-CoA 유전자 후보를 또한 여기에 적용할 수 있다.

[0684] 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제

[0685] 3-하이드록시아이소부티레이트의 메틸아크릴산으로의 탈수는 3-하이드록시아이소부티레이트 데하이드라타제 활성을 갖는 효소에 의해 촉매화된다. 상기 특정한 효소 형질전환에 대한 직접적인 증거는 확인되지 않았다. 그러나, 대부분의 데하이드라타제는 카보닐, 카복실레이트, 또는 CoA-티올 에스터 그룹의 전자 회수 및 베타-위치로부터의 하이드록실 그룹의 제거에 의한 알파-수소의 활성화를 포함하는 물의 알파, 베타-제거를 촉매화한다(Buckel et al., J Bacteriol. 117:1248-1260(1974); Martins, et al., Proc Natl Acad Sci USA 101:15645-9(2004)). 이는 상기 메틸아크릴산 경로의 최종 단계에 대해 제안된 형질전환의 바로 그 유형이다. 상기 제안된 형질전환은 유박테리움 발케리(*Eubacterium barkeri*)의 2-(하이드록시메틸)글루타레이트 데하이드라타제와 대단히 유사하다(도 3A). 상기 효소는 니코티네이트 이화작용과 관련하여 연구되었으며 *hmd*에 의해 암호화된다(Alhapel et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:12341-6(2006)). 유박테리움 발케리 중의 유사한 작용성을 갖는 효소는 다이메틸말리에이트를 수화시켜 (2R,3S)-2,3-다이메틸말리에이트를 형성하는 아코니타제 패밀리 중의 가역적인 Fe<sup>2+</sup>-의존성 및 산소-민감성 효소인 다이메틸말리에이트 하이드라타제이다. 상기 효소는 *dmdAB*에 의해 암호화된다(Alhapel et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:12341-6(2006); Kollmann-Koch et al., Hoppe Seylers. Z. Physiol Chem. 365:847-857(1984)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 123에 나타낸다.

표 123

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
<i>hmd</i>	ABC88407.1	86278275	유박테리움 발케리
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	유박테리움 발케리
<i>dmdB</i>	ABC88409.1	86278277	유박테리움 발케리

[0687] 추가적인 효소 후보는 시트라말레이트로부터 물의 알파, 베타 제거를 촉매화하여 메사코네이트를 형성시키는 가역적인 하이드롤라제인 2-메틸말리에이트 데하이드라타제(또한 시트라말레이트 하이드롤라제라 칭함)이다. 상기 효소는 2-옥소부타노에이트로의 피루베이트 경로와 관련하여 메타노칼도코커스 잔나쉬이(*Methanocaldococcus jannaschii*)에서 연구되었으며, 여기에서 상기 효소는 광범위한 기질 특이성을 갖는 것으로 입증되었다(Drevland et al., J Bacteriol. 189:4391-4400(2007)). 상기 효소 활성은 또한 클로스트리듐 테타노몰폼, 모르가넬라 모르가니이(*Morganella morganii*), 시트로박터 아말로나티쿠스(*Citrobacter amalonaticus*)에서 검출되었으며, 여기에서 상기 효소는 글루타메이트 분해에 관여하는 것으로 여겨진다(Kato et al, Arch. Microbiol 168:457-463(1997)). 상기 메타노칼도코커스 잔나쉬이 단백질 서열은 이들 유기체 중의 유전자들에 대해 현저한 상동성을 갖지 않는다. 이들 효소/단백질을 하기 표 124에 나타낸다.

표 124

[0688]

유전자	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
leuD	Q58673.1	3122345	메타노칼도코쿠스 잔나쉬이

[0689]

말레이트의 퓨마레이트로의 탈수를 자연적으로 촉매화하는 퓨마레이트 하이드라타제 효소는 추가적인 후보 세트를 나타낸다. 기질로서 3-하이드록시아이소부티레이트 상에서 반응하는 퓨마레이트 하이드라타제의 능력은 개시되지 않았지만, 상기 효소에 대한 풍부한 구조 정보를 입수할 수 있으며 다른 연구자들은 활성, 억제 및 국소화를 변경시키기 위해 상기 효소를 성공적으로 조작하였다(Weaver, D Biol Crystallogr. 61:1395-1401(2005)). 에스케리키아 콜라이는 생육 조건에 의해 조절되는 3 개의 퓨마라제, 즉 FumA, FumB 및 FumC를 갖는다. FumB는 산소 민감성이며 오직 혐기성 조건 하에서 활성이다. FumA는 미세혐기성 조건 하에서 활성이고, FumC는 호기성 생육 시 유일한 활성 효소이다(Guest et al., J Gen Microbiol 131:2971-2984(1985); Tseng et al., J. Bacteriol., 183:461-467(2001); Woods et al., Biochem. Biophys. Acta., 954:14-26(1988)). 추가의 효소 후보들이 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*)(Smith et al., Int. J. Biochem. Cell Biol., 31:961-975(1999)), 썬무스 썬모필루스(Mizobata et al., Arch. Biochem. Biophys., 355:49-55(1998)) 및 라투스 노르베기쿠스(Kobayashi et al., J. Biochem., 89:1923-1931(1981))에서 발견된다. 펠로토마쿨룸 썬모프로피오니쿰(*Pelotomaculum thermopropionicum*)으로부터의 MmcBC는 2 개의 아단위를 갖는 또 다른 부류의 퓨마라제이다(Shimoyama et al., FEMS Microbiol. Lett., 270:207-213(2007)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 125에 나타낸다.

표 125

[0690]

단백질	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
fumA	POAC33	81175318	에스케리키아 콜라이 K12
fumB	P14407	33112655	에스케리키아 콜라이 K12
fumC	P05042.1	120601	에스케리키아 콜라이 K12
fumC	O69294.1	9789756	캄필로박터 제주니
fumC	P84127	75427690	썬무스 썬모필루스
fumH	P14408.1	120605	라투스 노르베기쿠스
MmcB	YP_001211906	147677691	펠로토마쿨룸 썬모프로피오니쿰
MmcC	YP_001211907	147677692	펠로토마쿨룸 썬모프로피오니쿰

[0691]

3-하이드록시아이소부티릴-CoA 데하이드라타제

[0692]

CoA 데하이드라타제에 의한 3-하이드록시아이소부티릴-CoA의 탈수는 메트아크릴일-CoA를 제공한다. 에노일-CoA 하이드라타제(EC 4.2.1.17)는 3-하이드록시아실-CoA 기질의 탈수를 촉매화한다(Roberts et al., Arch. Microbiol., 117:99-108(1978); Agnihotri and Liu., J. Bacteriol. 188:8551-8559(2003); Conrad et al., J. Bacteriol. 118:103-111(1974)). 소 간에서 발견된 에노일-CoA 하이드라타제(ECH)는 메트아크릴일-CoA, 2- 및 3-메틸-크로토노일-CoA, 아크릴로일-CoA 및 1-카복시사이클로헥센오일-CoA를 포함한 다양한 기질들을 수용한다(Agnihotri et al., Bioorg. Med. Chem., 11:9-20(2003)). 재조합 소 간 ECH 효소는 에스케리키아 콜라이에서 과 발현되었으며 유사한 촉매 성질을 갖는 것으로 밝혀졌다(Dakoji et al., J Am Chem Soc., 123:9749(2001)). ech에 의해 암호화된, 슈도모나스 푸티다의 에노일-CoA 하이드라타제는 3-하이드록시부티릴-CoA의 크로토노일-CoA로의 전환을 촉매화한다(Roberts et al., Arch. Microbiol 117:99-108(1978)). 추가적인 에노일-CoA 하이드라타제 후보는 슈도모나스 푸티다의 phaA 및 phaB, 및 슈도모나스 플루오레센스로부터의 paaA 및 paaB이다(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95:6419-6424(1998)). 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rhodopseudomonas palustris*) 중의 pimF의 유전자 산물이 피멜로일-CoA 분해에 관여하는 에노일-CoA 하이드라타제를 암호화하는 것으로 예견된다(Harrison and Harwood, Microbiology 151:727-736(2005)). 마지막으로, 다수의 에스케리키아 콜라이 유전자들이 maoc(Park and Lee, J. Bacteriol., 185:5391-5398(2003)), paaf(Ismail et al., 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)) 및 paaG(Ismail et al., 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 포함한 에노일-CoA 하이드라타

제 작용기들을 나타내는 것으로 입증되었다. 이들 유전자/단백질을 하기 표 126에 나타낸다.

표 126

단백질	진뱅크 ID	GI 번호	유기체
ECHS1	NP_001020377.2	70778822	보스 타우루스
ech	NP_745498.1	26990073	슈도모나스 푸티다
paaA	NP_745427.1	26990002	슈도모나스 푸티다
paaB	NP_745426.1	26990001	슈도모나스 푸티다
phaA	ABF82233.1	106636093	슈도모나스 플루오레센스
phaB	ABF82234.1	106636094	슈도모나스 플루오레센스
pimF	CAE29158	39650635	로도슈도모나스 팔루스트리스
macC	NP_415905.1	16129348	에스케리키아 콜라이
paaF	NP_415911.1	16129354	에스케리키아 콜라이
paaG	NP_415912.1	16129355	에스케리키아 콜라이

[0693] 상기 반응을 촉매화하는 또 다른 예시적인 효소 후보는 크로토나제이다. 상기 효소에 대한 유전자 후보들을 상기에 개시한다. 한편으로, *fadA* 및 *fadB*의 에스케리키아 콜라이 유전자 산물들이 에노일-CoA 하이드라타제 활성을 나타내는 지방산 산화에 관여하는 다중효소 복합체를 암호화한다(Nakahigashi and Inokuchi, Nucleic Acids Res. 18:4937(1990); Yang et al., J. Bacteriol. 173:7405-7406(1991); Yang et al., Biochemistry 30:6788-6795(1991)). *fadR*에 의해 암호화되는 음성 조절 인자의 녹아웃을 사용하여 상기 *fadB* 유전자 산물을 활성화시킬 수 있다(Sato et al., J Biosci. Bioeng 103:38-44(2007)). 상기 *fadI* 및 *fadJ* 유전자는 유사한 작용들을 암호화하며 혐기성 조건 하에서 자연적으로 발현된다(Campbell et al., Mol. Microbiol 47:793-805(2003)). 이들 유전자/단백질을 하기 표 127에 나타낸다.

표 127

단백질	진뱅크 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

[0694] 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제

[0695] 메트아크릴일-CoA의 MAA로의 전환은 CoA 트랜스퍼라제, 신시타제 또는 하이드롤라제에 의해 촉매화된다. 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제 및 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제에 대해 개시된 CoA 하이드롤라제 유전자 후보를 또한 여기에 적용할 수 있다.

[0696] 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제

[0697] 메트아크릴일-CoA의 MAA로의 전환은 CoA 트랜스퍼라제, 신시타제 또는 하이드롤라제에 의해 촉매화된다. 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 및 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제에 대해 개시된 CoA 트랜스퍼라제 유전자 후보를 여기에 적용할 수 있다.

[0700] 메트아크릴일-CoA 신시타제

[0701] 메트아크릴일-CoA의 MAA로의 전환은 CoA 트랜스퍼라제, 신시타제 또는 하이드롤라제에 의해 촉매화된다. 프로피오닐-CoA 신시타제, 메틸말로닐-CoA 신시타제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 및 숙시닐-CoA 신시타제에 대해 개시된 CoA 신시타제 유전자 후보를 여기에 적용할 수 있다.

[0702] 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제

[0703] 메틸말로닐-CoA는 메틸말로닐-CoA 하이드롤라제(EC 3.1.2.17)에 의해 메틸말로네이트로 전환된다. 라투스 노

르베기쿠스로부터 단리된 상기 효소는 또한 또 다른 기질로서 말로닐-CoA 및 프로피오닐-CoA 상에서 활성이다 (Kovachy et al., J. Biol. Chem., 258:11415-11421(1983)). 상기 효소와 관련된 유전자는 공지되어 있지 않다. 선행 섹션에 개시된 프로피오닐-CoA 하이드롤라제, 메트아크릴일-CoA 하이드롤라제, 아세토아세틸-CoA 하이드롤라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 하이드롤라제 및 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 하이드롤라제에 대해 개시된 CoA 하이드롤라제 유전자 후보를 여기에 적용할 수 있다.

[0704] 메틸말로닐-CoA 트랜스퍼라제

[0705] 한편으로, 메틸말로닐-CoA는 CoA 트랜스퍼라제에 의해 메틸말로네이트로 전환된다. 프로피오닐-CoA 트랜스퍼라제, 메트아크릴일-CoA 트랜스퍼라제, 아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 트랜스퍼라제, 4-하이드록시부티릴-CoA 트랜스퍼라제 및 숙시닐-CoA 트랜스퍼라제에 대해 개시된 CoA 트랜스퍼라제 유전자 후보를 또한 여기에 적용할 수 있다.

[0706] 메틸말로닐-CoA 신시타제

[0707] 메틸말로닐-CoA로부터 메틸말로네이트를 형성하는 더욱 또 다른 효소는 메틸말로닐-CoA 신시타제이다. 프로피오닐-CoA 신시타제, 메트아크릴일-CoA 신시타제, 아세토아세틸-CoA 신시타제, 3-하이드록시부티릴-CoA 신시타제, 3-하이드록시아이소부티릴-CoA 신시타제, 4-하이드록시부티릴-CoA 신시타제 및 숙시닐-CoA 신시타제에 대해 개시된 CoA 신시타제 유전자 후보를 여기에 적용할 수 있다.

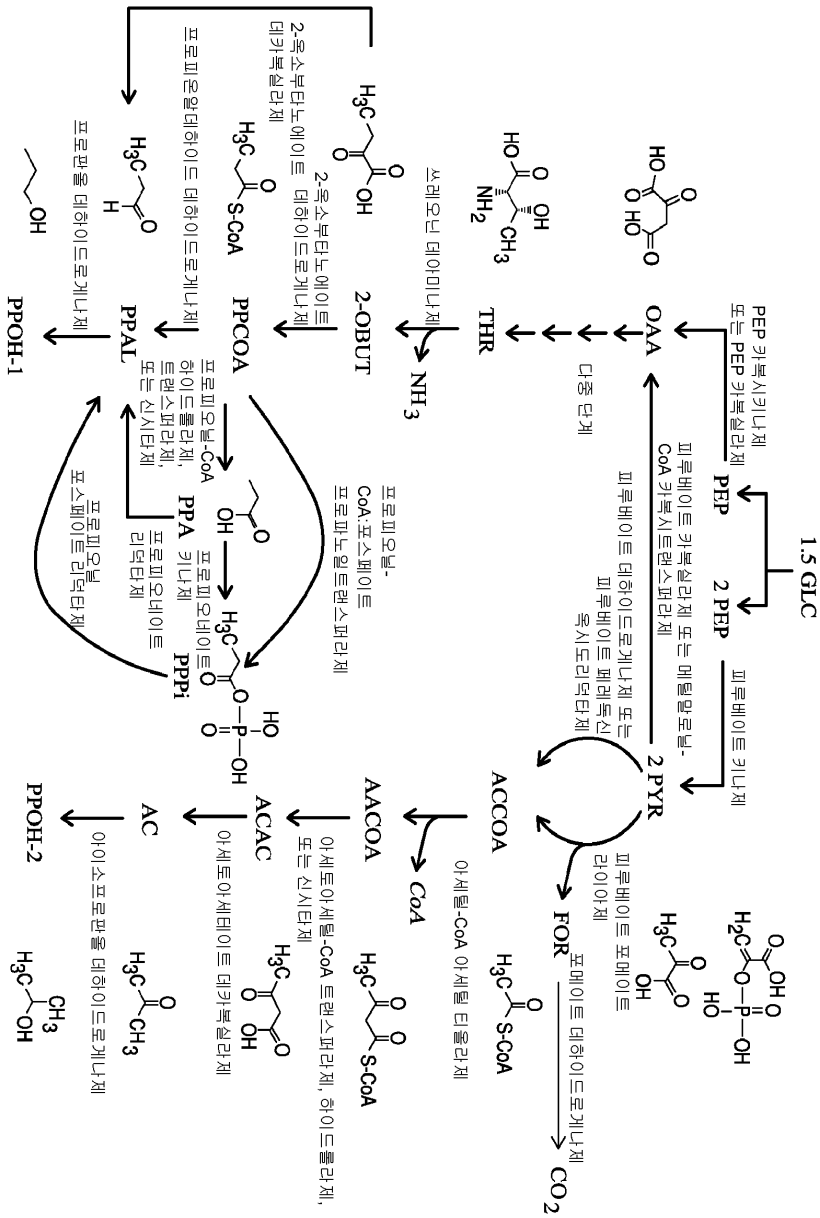
[0708] 메틸말로네이트 리덕타제

[0709] 메틸말로네이트의 메틸말로네이트 세미알데하이드로의 환원은 카복실산 리덕타제에 의해 촉매화된다. 숙시네이트 리덕타제 및 4-하이드록시부티레이트 리덕타제 효소에 대해 예시적인 효소 후보를 또한 여기에 적용할 수 있다.

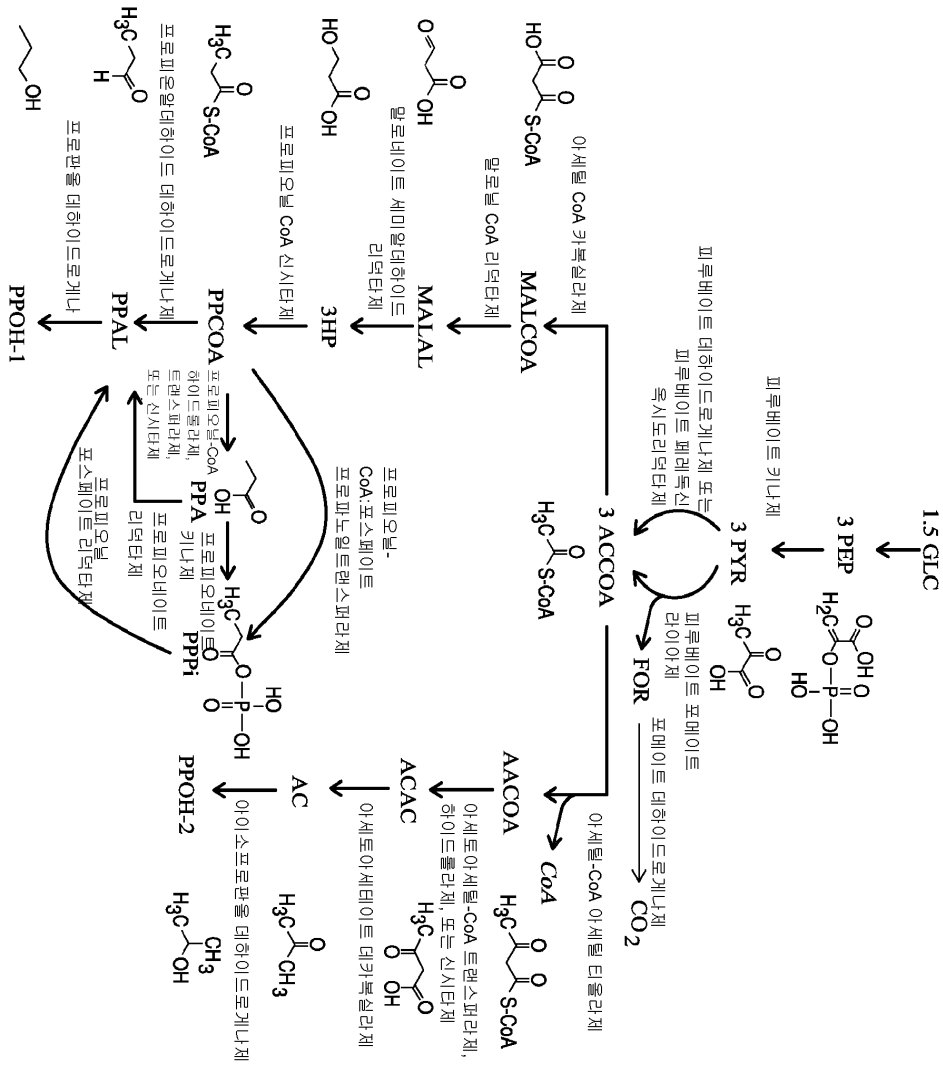
[0710] 본 출원 전체를 통해 다양한 공보들을 참조하였다. 이들 공보는 본 발명이 속하는 분야의 기술의 발달 상태를 보다 충분히 개시하기 위해서, 진뱅크 및 GI 번호 공개를 포함하여, 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다. 본 발명을 상기 제공된 실시예들을 참고로 개시하였지만, 본 발명의 진의로부터 이탈됨 없이 다양한 변경들을 수행할 수 있음은 물론이다.



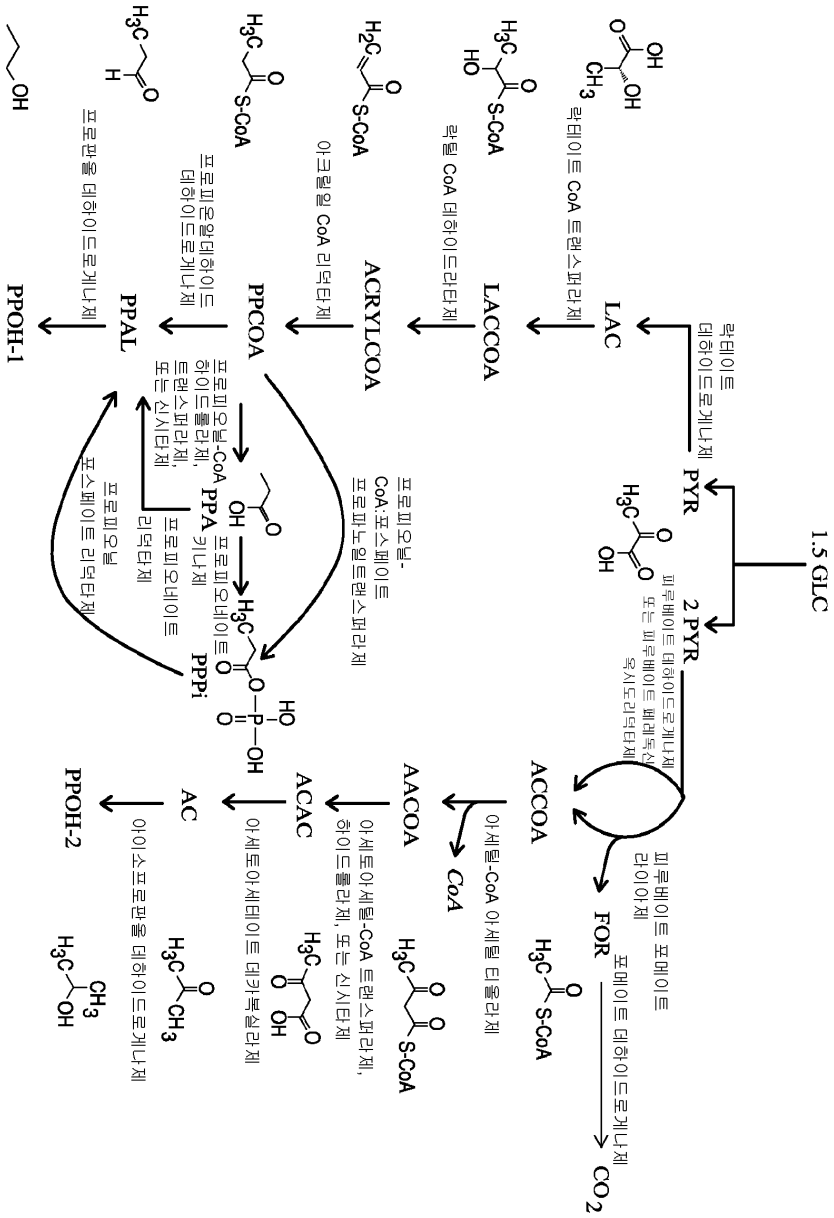
도면2



도면3



도면4

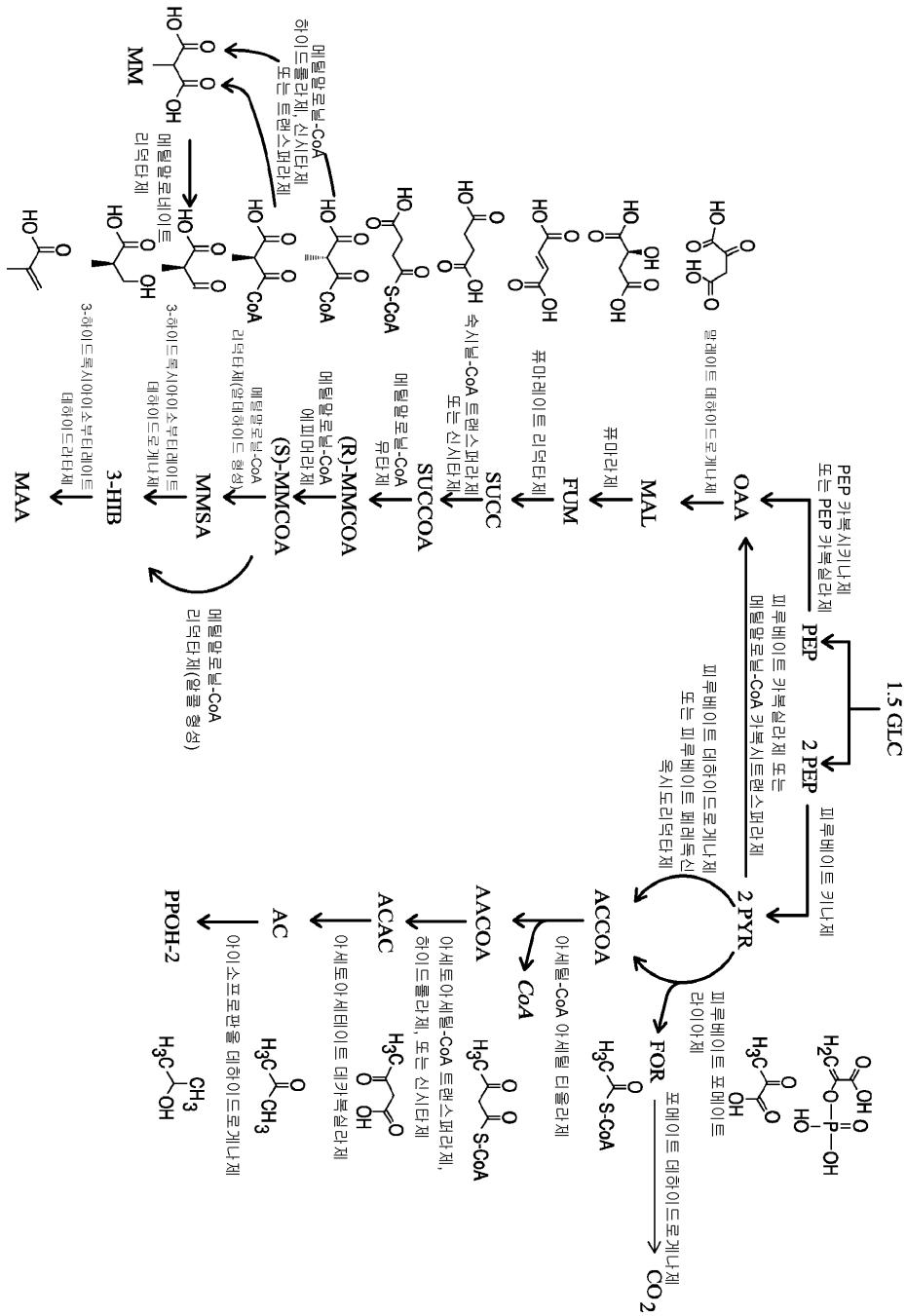








도면8



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENOMATICA, INC.

<120> MICROORGANISMS AND METHODS FOR THE CO-PRODUCTION OF ISOPROPRANOL WITH PRIMARY ALCOHOLS, DIOLS AND ACIDS

<130> 066662-0335

<140> PCT/US2010/048318

<141> 2010-09-09

<150> US 61/240,959

<151> 2009-09-09

<150> US 61/254,650

<151> 2009-10-23

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> *Euglena gracilis*

<400> 1

Met Thr Tyr Lys Ala Pro Val Lys Asp Val Lys Phe Leu Leu Asp Lys

1                    5                    10                    15

Val Phe Lys Val

20

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> *Clostridium propionicum*

<400> 2

Met Asp Phe Lys Leu Thr Lys Thr Gln Val Leu Gln Gln Trp Leu Phe

1                    5                    10                    15

Ala Glu Phe Ala Gly Ile Gly Ile Lys Pro Ile Ala Glu

20

25