



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0043170
(43) 공개일자 2013년04월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12P 7/22 (2006.01) *C12P 7/40* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7002003
- (22) 출원일자(국제) 2011년07월26일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년01월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/045364
- (87) 국제공개번호 WO 2012/018624
국제공개일자 2012년02월09일
- (30) 우선권주장
61/367,792 2010년07월26일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
제노마티카 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 워터리지 씨클 10520
- (72) 발명자
오스터아웃 로빈 이.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 씨클 10520
버가드 앤써니 피.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 씨클 10520
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
유미특허법인

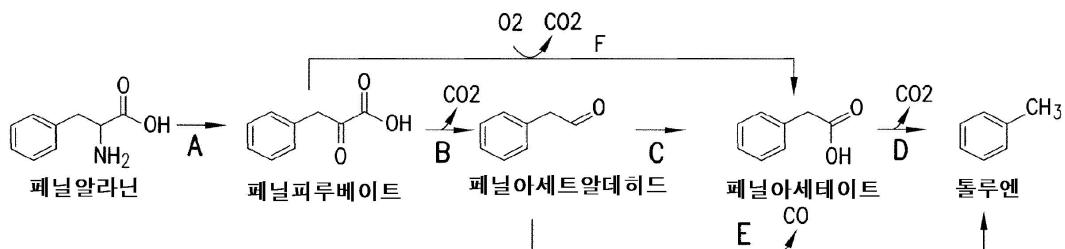
전체 청구항 수 : 총 243 항

(54) 발명의 명칭 방향족 화합물, 2,4-펜타디에노에이트 및 1,3-부타디엔 생합성을 위한 미생물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 톨루エン, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 본 발명 또한 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 생산하기 위한 이러한 유기체 이용 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

파르크야 프리티

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 씨클
10520

버크 마크 제이.

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 워터리지 씨클
10520

(30) 우선권주장

61/368,223 2010년07월27일 미국(US)

61/381,407 2010년09월09일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

톨루엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 톨루엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 톨루엔 경로는 (A) 1) 하나 또는 모두의 페닐알라닌 아미노전이효소 및 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 및 3) 페닐아세트알데히드 탈카보닐효소; (B) 1) 하나 이상의 페닐알라닌 아미노전이효소 및 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 3) 하나 이상의 페닐아세트알데히드 탈수소효소 및 페닐아세트알데히드 산화효소, 및 4) 페닐아세테이트 탈탄산효소; (C) 1) 하나 이상의 페닐알라닌 아미노전이효소 및 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 산화효소, 및 3) 페닐아세테이트 탈탄산효소; 및 (D) 1) 페닐알라닌 아미노전이효소 및/또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 산화효소 및 3) 페닐아세테이트 탈탄산효소에서 선택되는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 3 종의 외인성 핵산은 1) 페닐알라닌 아미노전이효소 또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 3) 페닐아세트알데히드 탈카보닐효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 4 종의 외인성 핵산은 1) 페닐알라닌 아미노전이효소 또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 3) 페닐아세트알데히드 탈수소효소 또는 산화효소, 및 4) 페닐아세테이트 탈탄산효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 9

톨루엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 톨루엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 톨루엔 생산방법으로서, 상기 경로는 톨루엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 톨루엔 경로는 (A) 1) 하나 또는 모두의 페닐알라닌 아미노전이효소 및 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 및 3) 페닐아세트알데히드 탈카보닐효소; (B) 1) 하나 이상의 페닐알라닌 아미노전이효소 및 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민),

2) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 3) 하나 이상의 페닐아세트알데히드 탈수소효소 및 페닐아세트알데히드 산화효소, 및 4) 페닐아세테이트 탈탄산효소; (C) 하나 이상의 페닐알라닌 아미노전이효소 및 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 산화효소, 및 3) 페닐아세테이트 탈탄산효소; 및 (D) 1) 페닐알라닌 아미노전이효소 및/또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 산화효소 및 3) 페닐아세테이트 탈탄산효소에서 선택되는, 톨루엔 생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 3 종의 외인성 핵산은 1) 페닐알라닌 아미노전이효소 또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 및 3) 페닐아세트알데히드 탈카보닐효소를 암호화하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 4 종의 외인성 핵산은 1) 페닐알라닌 아미노전이효소 또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 3) 페닐아세트알데히드 탈수소효소 또는 산화효소, 및 4) 페닐아세테이트 탈탄산효소를 암호화하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 톨루엔 생산방법.

청구항 17

벤젠 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서, 벤젠을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤젠 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 벤젠 경로는 페닐알라닌 벤젠-분해효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 상기 페닐알라닌 벤젠-분해효소인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 21

벤젠을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 벤젠 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 벤젠 생산 방법으로서, 상기 경로는 벤젠을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤젠 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 벤젠 경로는 페닐알라닌 벤젠-분해효소를 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 상기 페닐알라닌 벤젠-분해효소인, 벤젠 생산 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 벤젠 생산 방법.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 25

스티렌 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 스티렌을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 스티렌 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 스티렌 경로는 (A) 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 하나 이상의 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소, 전이효소, 및 가수분해효소, 3) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 4) 아세토페논 환원효소, 및 5) 1-페닐에탄올 탈수효소; 또는 (B) 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로피오닐라제, 3) 벤조일-아세테이트 키나아제, 4) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 5) 아세토페논 환원효소, 및 6) 1-페닐에탄올 탈수효소에서 선택되는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 26

26. 제25항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 28

제25항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 29

제25항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 5 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 5 종의 외인성 핵산은 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 하나의 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소, 전이효소, 및 가수분해효소, 3) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 4) 아세토페논 환원효소, 및 5) 1-페닐에탄올 탈수효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 31

제25항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 6 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 6 종의 외인성 핵산은 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로피오닐라제, 3) 벤조일-아세테이트 키나아제, 4) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 5) 아세토페논 환원효소, 및 6) 1-페닐에탄올 탈수효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 33

제25항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 34

제25항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 35

스티렌을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 스티렌 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 스티렌 생산방법으로서, 상기 경로는 스티렌을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 스티렌 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 스티렌 경로는 (A) 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 하나 이상의 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소, 전이효소, 및 가수분해효소, 3) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 4) 아세토페논 환원효소, 및 5) 1-페닐에탄올 탈수효소; 또는 (B) 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로피오닐라제, 3) 벤조일-아세테이트 키나아제, 4) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 5) 아세토페논 환원효소, 및 6) 1-페닐에탄올 탈수효소에서 선택되는, 스티렌 생산방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 스티렌 생산방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 스티렌 생산방법.

청구항 38

제35항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함하는, 스티렌 생산방법.

청구항 39

제35항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 스티렌 생산방법.

청구항 40

제35항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 5 종의 외인성 핵산을 포함하는, 스티렌 생산방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 5 종의 외인성 핵산은 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소, 전이효소, 및 가수분해효소 중 하나, 3) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 4) 아세토페논 환원효소, 및 5) 1-페닐에탄올 탈수효소를 암호화하는, 스티렌 생산방법.

청구항 42

제35항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 6 종의 외인성 핵산을 포함하는, 스티렌 생산방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 6 종의 외인성 핵산은 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로피오닐라제, 3) 벤조일-아세테이트 키나아제, 4) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 5) 아세토페논 환원효소, 및 6) 1-페닐에탄올 탈수효소를 암호화하는, 스티렌 생산방법.

청구항 44

제35항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 스티렌 생산방법.

청구항 45

1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 1,3-부타디엔 경로는 (A) 1) 트란스, 트란스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (B) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 시스-탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 트란스-탈탄산효소 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (D) 1) 시스, 시스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (E) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; 및 (F) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소에서 선택되는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 두 종의 외인성 핵산은 (A) 1) 트란스, 트란스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (B) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 시스-탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 트란스-탈탄산효소 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; 및 (D) 1) 시스, 시스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소에서 선택되는 세트를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 49

제45항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 50

1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 1,3-부타디엔 생산방법으로서, 상기 경로는 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 1,3-부타디엔 경로는 (A) 1) 트란스, 트란스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (B) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 시스-탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 트란스-탈탄산효소 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (D) 1) 시스, 시스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (E) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; 및 (F) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소에서 선택되는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 두 종의 외인성 핵산은 (A) 1) 트란스, 트란스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (B) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 시스-탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 트란스-탈탄산효소 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; 및 (D) 1) 시스, 시스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소에서 선택되는 세트를 암호화하는, 1,3-부타디엔 생산방법,

청구항 54

제50항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 55

(2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소 및 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하며, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 57

제55항에 있어서, 상기 두 종의 외인성 핵산은 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소 및 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 58

제55항에 있어서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 59

제55항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 혼기성에서 배양되는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 60

벤조에이트 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 벤조에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 벤조에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수소효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및 코리스메이트 분해효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 62

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함

하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 63

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 64

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 5 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 65

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 6 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 66

제60항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 7 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 67

제60항에 있어서 상기 미생물 유기체는 각각이 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 8 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 8 종의 외인성 핵산은 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수소효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및 코리스메이트 분해효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 69

제60항에 있어서, 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소 및 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소를 포함하는 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 70

제60항에 있어서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 71

제60항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 72

벤조에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제60항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 벤조에이트 생산방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 벤조에이트 생산방법.

청구항 74

제72항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 8 종의 외인성 핵산을 포함

하는, 벤조에이트 생산방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 상기 8 종의 외인성 핵산은 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수소효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및 코리스메이트 분해효소를 암호화하는, 벤조에이트 생산방법.

청구항 76

제72항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소 및 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소를 포함하는(2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더욱 포함하는, 벤조에이트 생산방법.

청구항 77

제72항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 벤조에이트 생산방법.

청구항 78

벤젠 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 벤젠을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤젠 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 벤젠 경로는 a) 벤조에이트 탈탄산효소; b) 벤조에이트 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소; c) 벤조에이트 키나아제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소; d) (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 포스포트란스벤조일라제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소; 및 e) (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 벤조일-CoA 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소, f) (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 벤조에이트 탈탄산효소, g) 벤조일-CoA 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소, h) 포스포트란스벤조일라제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소, i) 포스포트란스벤조일라제, 벤조에이트 키나아제, 벤조에이트 탈탄산효소, j) 포스포트란스벤조일라제, 벤조에이트 키나아제, 벤조에이트 환원효소, 벤즈알데히드 탈카보닐효소; k) 포스포트란스벤조일라제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소; 및 l) 벤조일-CoA 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소에서 선택되는 경로 효소들의 세트에서 선택되는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 벤젠 경로는 벤조에이트 탈탄산효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 80

제78항에 있어서, 상기 벤젠 경로는 벤조에이트 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 81

제78항에 있어서, 상기 벤젠 경로는 벤조에이트 키나아제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 82

제78항에 있어서, 상기 벤젠 경로는 (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 포스포트란스벤조일라제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 83

제78항에 있어서, 상기 벤젠 경로는 (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 벤조일-CoA 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 84

제78항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤젠 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 85

제78항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤젠 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 86

제78항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤젠 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 87

제78항에 있어서, 벤조에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 벤조에이트 경로를 더욱 포함하며, 상기 벤조에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및 코리스메이트 분해효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 88

제78항에 있어서, 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소 및 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소를 포함하는 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 89

제78항에 있어서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 90

제78항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 91

벤젠을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제78항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 벤젠 경로는 벤조에이트 탈탄산효소를 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 93

제91항에 있어서, 상기 벤젠 경로는 벤조에이트 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 94

제91항에 있어서, 상기 벤젠 경로는 벤조에이트 키나아제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 95

제91항에 있어서, 상기 벤젠 경로는 (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 포스포트란스벤조일라제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 96

제91항에 있어서, 상기 벤젠 경로는 (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 벤조일-CoA 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 97

제91항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤젠 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 98

제91항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤젠 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 99

제91항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 벤젠 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 100

제91항에 있어서, 벤조에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 벤조에이트 경로를 더욱 포함하며, 상기 벤조에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및 코리스메이트 분해효소를 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 101

제91항에 있어서, 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소 및 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소를 포함하는 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더욱 포함하는, 벤젠 생산 방법.

청구항 102

제91항에 있어서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 벤젠 생산 방법.

청구항 103

제91항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에서 배양되는, 벤젠 생산 방법.

청구항 104

톨루엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 톨루엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 톨루엔 경로는 a) p-톨루에이트 탈탄산효소; b) p-톨루에이트 환원효소 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; c) p-톨루에이트 키나아제, (p-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; d) (p-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 포스포트란스-p-메틸벤조일라제, (p-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; 및 e) (p-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), p-메틸벤조일-CoA 환원효소 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소, f) (p-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), p-톨루에이트 탈탄산효소, g) p-메틸벤조일-CoA 환원효소 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소, h) 포스포트란스-p-메틸벤조일라제, (p-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소, i) 포스포트란스-p-메틸벤조일라제, p-톨루에이트 키나아제, p-톨루에이트 탈탄산효소, j) 포스포트란스-p-메틸벤조일라제, p-톨루에이트 키나아제, p-톨루에이트 환원효소, p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; k) 포스포트란스-p-메틸벤조일라제, (p-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소 (탈인산), 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; 및 l) p-메틸벤조일-CoA 환원효소 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소에서 선택되는 경로 효소들의 세트에서 선택되는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 톨루엔 경로는 *p*-톨루에이트 탈탄산효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 106

제104항에 있어서, 상기 톨루엔 경로는 *p*-톨루에이트 환원효소 및 *p*-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 107

제104항에 있어서, 상기 톨루엔 경로는 c) *p*-톨루에이트 키나아제, (*p*-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 *p*-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 108

제104항에 있어서, 상기 톨루엔 경로는 (*p*-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 포스포트란스-*p*-메틸벤조일라제, (*p*-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 *p*-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 109

제104항에 있어서, 상기 톨루엔 경로는 (*p*-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), *p*-메틸벤조일-CoA 환원효소 및 *p*-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 110

제104항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 111

제104항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 112

제104항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 113

제104항에 있어서, *p*-톨루에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 *p*-톨루에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 *p*-톨루에이트 경로를 더욱 포함하며, 상기 *p*-톨루에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수소효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및 코리스메이트 분해효소를 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 114

제104항에 있어서, DXP 생성효소, DXP 환원이성화효소, 및 2ME4P 탈수효소를 포함하는(2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 115

제104항에 있어서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 116

제104항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 117

톨루엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제104항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 상기 톨루엔 경로는 *p*-톨루에이트 탈탄산효소를 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 119

제117항에 있어서, 상기 톨루엔 경로는 *p*-톨루에이트 환원효소 및 *p*-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 120

제117항에 있어서, 상기 톨루엔 경로는 c) *p*-톨루에이트 키나아제, (*p*-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 *p*-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 121

제117항에 있어서, 상기 톨루엔 경로는 (*p*-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 포스포트란스-*p*-메틸벤조일라제, (*p*-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 *p*-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 122

제117항에 있어서, 상기 톨루엔 경로는 (*p*-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), *p*-메틸벤조일-CoA 환원효소 및 *p*-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소를 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 123

제117항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 124

제117항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 125

제117항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 126

제117항에 있어서, *p*-톨루에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 *p*-톨루에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 *p*-톨루에이트 경로를 더욱 포함하며, 상기 *p*-톨루에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및 코리스메이트 분해효소를 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 127

제117항에 있어서, DXP 생성효소, DXP 환원이성화효소, 및 2ME4P 탈수효소를 포함하는(2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더욱 포함하는, 톨루엔 생산방법.

청구항 128

제117항에 있어서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 톨루엔 생산방법.

청구항 129

제117항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에서 배양되는, 톨루엔 생산방법.

청구항 130

2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 2,4-펜타디에노에이트 경로는 A) i) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, ii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iii) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 iv) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소; B) i) AKP 탈아미노효소, ii) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 iii) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; C) i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-2-환원효소, iii) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 탈수효소, iv) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 v) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; D) i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-4-환원효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소; 및 E) i) AKP 환원효소, ii) 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소에서 선택되는 효소들의 세트를 가지는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 131

제130항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 132

제130항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 133

제132항에 있어서, 상기 3 종의 외인성 핵산은 i) AKP 탈아미노효소, ii) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 iii) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 134

제130항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 135

제134항에 있어서, 상기 4 종의 외인성 핵산은 i) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, ii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iii) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 iv) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 136

제130항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 5 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 137

제136항에 있어서, 상기 5 종의 외인성 핵산은 i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-2-환원효소, iii) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 탈수효소, iv) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 v) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 138

제136항에 있어서, 상기 5 종의 외인성 핵산은 i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-4-환원효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 139

제136항에 있어서, 상기 5 종의 외인성 핵산은 i) AKP 환원효소, ii) 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소를 암호화하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 140

제130항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 141

제130항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 142

제130항에 있어서, 2,4-펜타디에노에이트를 1,3-부타디엔으로 전환시켜 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소를 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 143

제130항에 있어서, 최소한 하나의 AKP 티올라아제, 오르니틴 4,5-아미노뮤타아제, 2,4-디아미노펜타노에이트 4-아미노전이효소 및 2,4-디아미노펜타노에이트 4-탈수소효소를 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 144

2,4-펜타디에노에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 2,4-펜타디에노에이트 생산방법으로서, 상기 경로는 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, , 상기 2,4-펜타디에노에이트 경로는 A) i) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, ii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iii) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 iv) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소; B) i) AKP 탈아미노효소, ii) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 iii) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; C) i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-2-환원효소, iii) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 탈수효소, iv) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 v) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; D) i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-4-환원효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소; 및 E) i) AKP 환원효소, ii) 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소에서 선택되는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 145

제144항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 146

제144항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 147

제144항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 두 종의 외인성

핵산을 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 148

제144항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산을 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 149

제148항에 있어서, 상기 3 종의 외인성 핵산은 i) AKP 탈아미노효소, ii) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 iii) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소를 암호화하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 150

제144항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 151

제150항에 있어서, 상기 4 종의 외인성 핵산은 i) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, ii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 틸수효소, iii) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 iv) 2-히드록시펜테노에이트 틸수효소를 암호화하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 152

제144항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 5 종의 외인성 핵산을 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 153

제152항에 있어서, 상기 5 종의 외인성 핵산은 i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-2-환원효소, iii) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 탈수효소, iv) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 v) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소를 암호화하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 154

제152항에 있어서, 상기 5 종의 외인성 핵산은 i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-4-환원효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소를 암호화하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 155

제152항에 있어서, 상기 5 종의 외인성 핵산은 i) AKP 환원효소, ii) 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소를 암호화하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 156

제144항에 있어서, 2,4-펜타디에노에이트를 1,3-부타디엔로 전환시키기에 충분한 함량으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소를 더욱 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 157

제144항에 있어서, 최소한 하나의 AKP 티올라아제, 오르니틴 4,5-아미노뮤타아제, 2,4-디아미노펜타노에이트 4-아미노전이효소 및 2,4-디아미노펜타노에이트 4-탈수소효소를 더욱 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 158

2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성

핵산을 포함하고, 상기 2,4-펜타디에노에이트 경로는 다음에서 선택되는 효소들의 세트를 가지는, 비-천연 미생물 유기체.

- 1) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 2) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 3) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 4) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 5) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 6) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 7) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 8) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 9) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 10) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 11) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;

- 12) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, , F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 13) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, R. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 14) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, T. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, S. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및
- 15) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, S. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소;
- 16) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, R. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;
- 17) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, T. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, S. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소;
- 18) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, S. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소.
- 19) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, Q. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;
- 20) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, Q. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;
- 21) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소 I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, Q. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;
- 22) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소 I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, Q. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;
- 23) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, Q. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및
- 24) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, Q. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소.

청구항 159

제158항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 160

제158항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 161

제158항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 162

제158항에 있어서, 2,4-펜타디에노에이트를 1,3-부타디엔으로 전환하는 2,4-펜타디엔 탈탄산효소를 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 163

2,4-펜타디에노에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제158항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 164

제163항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 종의 외인성 핵산을 포함하는, ,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 165

제163항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, ,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 166

제163항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 167

1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제162항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 168

제167항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 종의 외인성 핵산을 포함하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 169

제167항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 170

제167항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 171

1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 1,3-부타디엔 경로는 다음에서 선택되는 효소들의 세트를 가지는, 비-천연 미생물 유기체.

1) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, T. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;

2) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;

3) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원

효소, T. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;

4) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;

5) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, T. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;

6) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;

청구항 172

제171항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4 또는 5 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 173

제171항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 174

제171항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 협기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 175

1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제171항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 176

제175항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4 또는 5 종의 외인성 핵산을 포함하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 177

제175항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 178

제175항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 협기성인 배양 배지에 존재하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 179

1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 3-부텐-1-올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 3-부텐-1-올 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 3-부텐-1-올 경로는 다음에서 선택되는 효소들의 세트를 가지는, 비-천연 미생물 유기체.

1) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, U. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;

2) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, V. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;

효소;

18) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, M. 아크릴알-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, U. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;

19) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, M. 아크릴알-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, V. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;

20) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, M. 아크릴알-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, V. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;

청구항 180

제179항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 3-부텐-1-올 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 181

제179항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 182

제179항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에서 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 183

제179항에 있어서, 3-부텐-1-올을 1,3-부타디엔으로 전환하는 3-부텐-1-올 탈수효소를 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 184

3-부텐-1-올을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제179항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 3-부텐-1-올 생산방법.

청구항 185

제184항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 3-부텐-1-올 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 종의 외인성 핵산을 포함하는, 3-부텐-1-올 생산방법.

청구항 186

제184항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 3-부텐-1-올 생산방법.

청구항 187

제184항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에서 존재하는, 3-부텐-1-올 생산방법.

청구항 188

제184항에 있어서, 1,3-부타디엔을 제공하는 3-부텐-1-올의 화학적 탈수를 더욱 포함하는, 3-부텐-1-올 생산방법.

청구항 189

1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제183항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 190

제189항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 종의 외인성 핵산을 포함하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 191

제189항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 192

제189항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 협기성인 배양 배지에 존재하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 193

1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 1,3-부타디엔 경로는 다음에서 선택되는, 비-천연 미생물 유기체.

(A) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;

(B) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소;

(C) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;

(D) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소;

(E) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;

(F) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소;

(G) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 또는 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소; 및

(H) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 또는 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소.

청구항 194

제193항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7

종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 195

제194항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 다음에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

- (A) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;
- (B) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소;
- (C) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;
- (D) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소;
- (E) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;
- (F) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소;
- (G) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 또는 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소; 및
- (H) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 또는 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소.

청구항 196

제193항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 다음을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

- (i) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택되는 환원적 TCA 경로;
- (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소에서 선택되는 환원적 TCA 경로; 또는
- (iii) 최소한 하나의 외인성 핵산은 CO 탈수소효소, H₂ 수소화효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화한다.

청구항 197

제196항에 있어서, 상기 미생물 유기체은 (i) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 페레독신, 및 이들

의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 198

제196항에 있어서, 상기 미생물 유기체은 (ii) 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 199

제196항에 있어서, 상기 미생물 유기체은 (i) ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하고;

상기 미생물 유기체는 (ii) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 5 종의 외인성 핵산을 포함하고; 또는

상기 미생물 유기체는 (iii) CO 탈수소효소 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 200

제193항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 201

제193항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 202

1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제193항 내지 제201항 중 어느 하나의 항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 203

2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 2,4-펜타디에노에이트 경로는 다음에서 선택되는, 비-천연 미생물 유기체.

(A) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소;

(B) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소;

(C) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및

(D) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 또는 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소.

청구항 204

제203항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5 또는 6 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 205

제204항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 다음에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

(A) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소;

(B) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 a 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소;

(C) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및

(D) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 또는 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소.

청구항 206

제203항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 다음을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

(i) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택되는 환원적 TCA 경로;

(ii) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소에서 선택되는 환원적 TCA 경로; 또는

(iii) 최소한 하나의 외인성 핵산은 CO 탈수소효소, H₂ 수소화효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화한다.

청구항 207

제206항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (i) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 페레독신, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 208

제206항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (ii) 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 209

제206항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (i) ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는4 종의 외인성 핵산을 포함하고;

상기 미생물 유기체는 (ii) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는5 종의 외인성 핵산을 포함하고 ; 또는

상기 미생물 유기체는 (iii) CO 탈수소효소 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는,

비-천연 미생물 유기체.

청구항 210

제203항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 211

제203항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 212

2,4-펜타디에노에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제203항 내지 제211항 중 어느 하나의 항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 213

1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 1,3-부타디엔 경로는 다음에서 선택되는, 비-천연 미생물 유기체.

(A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소;

(B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소;

(E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(F) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(G) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소;

(H) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(I) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(J) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소;

(K) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(L) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(M) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소;

(N) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; 및

(O) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소.

청구항 214

제213항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 215

제214항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 다음에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

(A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소;

(B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소;

(E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(F) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

(G) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소;

(H) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;

- (I) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;
- (J) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소;
- (K) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;
- (L) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;
- (M) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소;
- (N) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소;
- (O) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소.

청구항 216

제213항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 다음을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

- (i) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택되는 환원적 TCA 경로;
- (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 페루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀페루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀페루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소에서 선택되는 환원적 TCA 경로; 또는
- (iii) 최소한 하나의 외인성 핵산은 CO 탈수소효소, H₂ 수소화효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화한다.

청구항 217

제216항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (i) 페루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 페레독신, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 218

제216항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (ii) 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 219

제216항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (i) ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하고;

상기 미생물 유기체는 (ii) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 5 종의 외인성 핵산을 포함하고; 또는

상기 미생물 유기체는 (iii) CO 탈수소효소 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 220

제213항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 221

제213항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 협기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 222

1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제213항 내지 제221항 중 어느 하나의 항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

청구항 223

2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 2,4-펜타디에노에이트 경로는 다음에서 선택되는, 비-천연 미생물 유기체.

(A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;

(B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;

(C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;

(D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및

(E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소.

청구항 224

제223항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 또는 6 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 225

제224항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 다음에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

(A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;

(B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;

(C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;

(D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소;

(E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소.

청구항 226

제223항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 다음을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

(i) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택되는 환원적 TCA 경로;

(ii) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소에서 선택되는 환원적 TCA 경로; 또는

(iii) 최소한 하나의 외인성 핵산은 CO 탈수소효소, H₂ 수소화효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화한다.

청구항 227

제226항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (i) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 페레독신, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 228

제226항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (ii) 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 229

제226항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (i) ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하고;

상기 미생물 유기체는 (ii) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 5 종의 외인성 핵산을 포함하고; 또는

상기 미생물 유기체는 (iii) CO 탈수소효소 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 230

제223항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 231

제223항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혼기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 232

2,4-펜타디에노에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제223항 내지 제231항 중 어느 하나의 항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 2,4-펜타디에노에이트 생산방법.

청구항 233

3-부텐-1-올 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체로서 3-부텐-1-올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 3-부텐-1-올 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하며, 상기 3-부텐-1-올 경로는 다음에서 선택되는, 비-천연 미생물 유기체.

- (A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;
- (B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;
- (C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;
- (D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;
- (E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;
- (F) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;
- (G) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;
- (H) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;
- (I) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및
- (J) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소.

청구항 234

제233항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 3-부텐-1-올 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4 또는 5 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 235

제234항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 각각이 다음에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

- (A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;
- (B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;
- (C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;
- (D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;
- (E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;
- (F) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;
- (G) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;
- (H) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;
- (I) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및
- (J) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소.

청구항 236

제233항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 다음을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

- (i) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택되는 환원적 TCA 경로;
- (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수효소, 및 H₂ 수소화효소에서 선택되는 환원적 TCA 경로; 또는
- (iii) 최소한 하나의 외인성 핵산은 CO 탈수효소, H₂ 수소화효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화한다.

청구항 237

제236항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (i) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 페레독신, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 238

제236항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (ii) 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 239

제236항에 있어서, 상기 미생물 유기체는 (i) ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 4 종의 외인성 핵산을 포함하고;

상기 미생물 유기체는 (ii) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 5 종의 외인성 핵산을 포함하고; 또는

상기 미생물 유기체는 (iii) CO 탈수소효소 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 두 종의 외인성 핵산을 포함하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 240

제233항에 있어서, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산인, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 241

제233항에 있어서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는, 비-천연 미생물 유기체.

청구항 242

3-부텐-1-올을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제233항 내지 제241항 중 어느 하나의 항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는, 3-부텐-1-올 생산방법.

청구항 243

3-부텐-1-올을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 제233항 내지 제241항 중 어느 하나의 항의 비-천연 미생물 유기체 배양 단계 및 상기 3-부텐-1-올의 1,3-부타디엔으로의 화학적 전환단계를 포함하는, 1,3-부타디엔 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 포괄적으로 생합성 공정에 관한 것이며, 더욱 상세하게는 틀루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올 또는 1,3-부타디엔 생합성 능력을 가지는 유기체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 틀루엔은 벤젠의 상당한 발암성으로 인하여 벤젠을 대체하는 통상 용매이고 산업적 공급원료이며 TNT, 폴리우레탄폼, 벤즈알데하يد 및 벤조산 제조에 사용된다. 틀루엔은 가솔린 제조 부산물이며 원유에 소량 존재한다.

[0003] 벤젠 또한 기타 화학물을 제조 중간체로 사용된다. 가장 널리 제조되는 유도체는, 중합체 및 플라스틱 제조에 사용되는 스티렌, 쿠멘을 거쳐 수지 및 접착제 제조에 사용되는 페놀, 및 나일론 제조에 사용되는 시클로헥산을 포함한다. 또한 벤젠은 여러 유형의 고무, 윤활제, 염료, 세제, 약물, 폭약, 네이팜 및 농약 제조에 사용된다.

석유산업에서 벤젠은 접촉개질, 툴루엔 수소첨가탈알킬화, 툴루엔 불균화, 및 증기분해을 포함한 다양한 에너지 집약적인 공정에 의해 생산된다.

- [0004] 스티렌은 폴리스티렌 및 수 많은 공중합체의 전구체이다. 스티렌 기반 생성물로는, 아크릴로니트릴 1,3-부타디엔 스티렌 (ABS), 스티렌-1,3-부타디엔 (SBR) 고무, 스티렌-1,3-부타디엔 라텍스, SIS (스티렌-이소프렌-스티렌), S-EB-S (스티렌-에틸렌/부틸렌-스티렌), 스티렌-디비닐벤젠 (S-DVB), 및 불포화 폴리에스테르를 포함한다. 이를 재료는 고무, 플라스틱, 절연체, 유리섬유, 판, 자동차 및 보트 부품, 식품용기, 및 카펫 안감에 사용된다.
- [0005] 스티렌은 대부분 에틸벤젠 접촉 탈수소화로 제조된다. 에틸벤젠은 부피비로 10~15 배의 고온 증기와 기상으로 혼합되고, 고체의 촉매상을 통과한다. 대부분의 에틸벤젠 탈수소화 촉매는 수 퍼센트의 칼륨산화물 또는 탄산칼륨에 의해 촉진되는 산화철(III)에 기반한다. 본 반응에서 증기는 여러 역할을 한다. 흡열반응을 가속시키는 열을 공급하며, 수성가스 전환반응을 통하여 산화철 촉매에 형성되는 코크를 제거한다. 칼륨 촉진제는 이러한 탈탄소 반응을 향상시킨다. 또한 증기는 반응물 및 생성물을 희석시켜, 화학평형 위치를 생성물 쪽으로 이동시킨다. 전형적인 스티렌 공장은 2 또는 3개의 반응기들이 일렬로 구성되고, 진공으로 운전되어 전환율 및 선택도를 향상시킨다. 전형적인 통과-당 전환율은 2개의 반응기에 대하여는 약 65%이고 3 개의 반응기에 대하여는 70~75%이다.
- [0006] 매년 250억 파운드 이상의 1,3-부타디엔 (또는 간단히 부타디엔 또는 BD)이 생산되어 합성 고무 및 ABS 수지와 같은 종합체, 및 헥사메틸렌디아민 및 1,4-부탄디올과 같은 화학물질 제조에 적용된다. 전형적으로 1,3-부타디엔은 납사, 액화 석유 가스, 에탄 또는 천연가스와 같은 석유 공급원료를 에틸렌 및 기타 올레핀으로 전환하는 증기분해 공정의 부산물로 생성된다. 대안적 및/또는 재생 가능한 공급원료로부터 1,3-부타디엔을 제조할 수 있다면 더욱 지속 가능한 제조 공정들 탐구에 큰 이점을 제공할 것이다.
- [0007] 재생 가능하게 1,3-부타디엔을 제조할 수 있는 가능성 있는 하나의 방법은 당 또는 기타 공급원료를 발효하여 디올, 예를들면 1,4-부탄디올 또는 1,3-부탄디올을 제조하고, 이들을 분리, 정제하고 금속-기반 촉매화가 관여되는 제2 단계에서 1,3-부타디엔으로 탈수하는 것이다. 재생 가능한 공급원료로부터 1,3-부타디엔을 직접 발효 제조할 수 있다면 탈수단계가 불필요하고 발효기로부터 1,3-부타디엔 가스 (bp -4.4°C)가 연속하여 방출되어 쉽게 응축되고 회수될 수 있을 것이다. 직접 발효 제조공정 개발로 화석연료-기반 1,3-부타디엔에 대한 필요성이 제거되고 석유화학-유래 1,3-부타디엔에 비하여 비용, 에너지, 및 유해 폐기물 및 방출량을 상당히 줄일 수 있을 것이다.
- [0008] 2,4-펜타디에노에이트는 그 자체가 유용한 치환된 부타디엔이고, 예를들면, 쿠르티우스 전위반응으로 제조되는 1-카르바모일-1,3-부타디엔과 같이 기타 치환된 1,3-부타디엔 유도체에 대한 중요한 중간체이다. 생성된 N-보호화-1,3-부타디엔 유도체는 딜스 알더 반응에 적용되어 치환된 아닐린을 제조할 수 있다. 2,4-펜타디에노에이트는 다양한 종합체 및 공중합체 제조에 사용된다.
- [0009] 테레프탈레이트 (테레프탈산 및 PTA로도 알려짐)는 의류, 수지, 플라스틱 병들 및 가금류 사료 첨가제 제조에도 사용되는 폴리에틸렌 테레프탈레이트 (PET) 중간 전구체이다. 거의 모든 PTA는 Mid Century Process라고 알려진 공기 중 산화를 통하여 파라-자일렌에서 얻어진다. 본 산화공정은 코발트 및/또는 망간염으로 이루어진 촉매와 함께 아세트산 용매에서 고온 중에 수행된다. 파라-자일렌은 석유화학원에서 유래하고 가혹한 납사 접촉개질로 형성된다. 또한 자일렌은 납사 증기 분해기에서 가솔린 스트림 열분해 및 툴루엔 불균화로 얻어진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 재생 가능한 PTA 생성을 위한 비용-효율적 방법들은 지금까지 개발되지 않았다. PTA, 툴루엔 및 기타 방향족 전구체는 일부 세균에 의해 자연에서 분해된다. 그러나, 이러한 분해 경로들은 전형적으로 분해 방향에서 비가역적으로 작동하는 일산소첨가효소가 관여된다. 따라서, 지금까지 알려진 효소들의 특성에 의해 PTA에 대한 생합성 경로들은 극히 제한적이다.
- [0011] PTA에 대한 유망한 전구체는 *p*-메틸벤조에이트로도 알려진 *p*-톨루에이트이다. *P*-톨루에이트는 *p*-자일렌을 PTA로 산화시키는 일부 산업 공정들에서 중간체이다. 또한 고분자 안정제, 농약, 감광화합물, 동물사료보충제 및 기타 유기 화학물질을 위한 중간체이기도 하다. 수용액에서 약한 용해성이고, *p*-톨루에이트는 생리학적 온도에서 고형이며, 융점은 275°C이다. 당 공급원료에서 이러한 화합물을 합성하는 미생물 촉매는 지금까지 기재된 바

없다.

[0012] 따라서, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 1,3-부타디엔, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, 벤젠 및 톨루엔과 같은 화합물들을 상업적 규모로 효과적으로 제조하는 대안적 방법들이 요구된다. 본 발명은 이러한 요구를 만족시키며 또한 관련된 이점들을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 또한 본 발명은 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 제조하기 위하여 이러한 유기체를 이용하는 방법을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2H3M4OP) 경로, p-톨루에이트 경로, 테레프탈레이트 경로, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2H4OP) 경로, 및/또는 벤조에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 또한 본 발명은 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 또는 벤조에이트를 제조하기 위하여 이러한 유기체를 이용하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 페닐알라닌에서 페닐아세테이트를 거쳐 톨루엔으로 전환하는 것을 보인다. 효소들은 A. 페닐알라닌 아미노전이효소 및/또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), B. 페닐피루베이트 탈탄산효소, C. 페닐아세트알데히드 탈수효소 및/또는 산화효소, D. 페닐아세테이트 탈탄산효소, E. 페닐아세트알데히드 탈카보닐효소, 및 F. 페닐피루베이트 산화효소이다.

도 2는 페닐알라닌 벤젠-분해효소에 의한 페닐알라닌에서 벤젠으로의 전환을 보인다.

도 3은 벤조일-CoA에서 스티렌까지의 경로들을 보인다. 효소들은: A. 벤조일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-3-페닐프로파오닐-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, C. 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, D. 아세토페논 환원효소 및 E. 1-페닐에탄올 탈수효소, F. 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로파오닐라제, G. 벤조일-아세테이트 키나아제이다.

도 4는 뮤코네이트 입체이성질체들이 1,3-부타디엔으로 전환하는 것을 보인다. 효소들은 A. 트란스, 트란스-뮤코네이트 탈탄산효소, B. 시스, 트란스-뮤코네이트 시스-탈탄산효소, C. 시스, 트란스-뮤코네이트 트란스-탈탄산효소, D. 시스, 시스-뮤코네이트 탈탄산효소, E. 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소, F. 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소.

도 5는 글리세르알데히드-3-포스페이트 및 피루베이트로부터 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2H3M4OP)로의 예시적 경로의 개략도이다. G3P는 글리세르알데히드-3-포스페이트, DXP는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 및 2ME4P는 C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트이다. 효소들은 (A) DXP 생성효소 (synthase); (B) DXP 환원이성화효소 (reductoisomerase); 및 (C) 2ME4P 탈수효소이다.

도 6은 p-톨루에이트로의 예시적 대안적 시킴산 경로 개략도이다. 효소들은: (A) 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; (B) 3-데히드로퀴네이트 생성효소; (C) 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; (D) 시키메이트 탈수효소; (E) 시키메이트 키나아제; (F) 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; (G) 코리스메이트 생성효소; 및 (H) 코리스메이트 분해효소. 화합물들은: (1) (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트; (2) 2,4-디히드록시-5-메틸-6-[포스포노옥시]메틸]옥산-2-카르복실레이트; (3) 1,3-디히드록시-4-메틸-5-옥소시클로헥산-1-카르복실레이트; (4) 5-히드록시-4-메틸-3-옥소시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; (5) 3,5-디히드록시-4-메틸시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; (6) 5-히드록시-4-메틸-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; (7) 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; (8) 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸시클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트; 및 (9) p-톨루에이트이다.

도 7은 p-톨루에이트에서 테레프탈산 (PTA)으로 전환되는 예시적 경로를 보인다. 반응들 A, B 및 C는 각각 p-톨

루에이트 메틸-일산소첨가효소 환원효소, 4-카르복시벤질 알코올 탈수소효소 및 4-카르복시벤질 알데히드 탈수소효소에 의해 촉매된다. 도시된 화합물들은 (1) *p*-톨루엔산; (2) 4-카르복시벤질 알코올; (3) 4-카르복시벤즈 알데히드 및 (4) 테레프탈산이다.

도 8은 에리트로스-4-포스페이트에서 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트로의 예시적 경로를 보인다. 효소들은: A. 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소, B. (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소이다. 화합물들은: (1) 에리트로스-4-포스페이트, (2) (2,4-디옥소부ток시)포스포네이트 및 (3) (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트이다.

도 9는 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트에서 벤조에이트로의 대안적 시킴산 경로를 보인다. 효소들은: A. 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소, B. 3-데히드로퀴네이트 생성효소, C. 3-데히드로퀴네이트 탈수효소, D. 시키메이트 탈수소효소, E. 시키메이트 키나아제, F. 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소, G. 코리스메이트 생성효소, H. 코리스메이트 분해효소이다. 화합물들은: 1. (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 2. 2,4-디히드록시-6-[포스포노옥시]메틸]옥산-2-카르복실레이트, 3. 1,3-디히드록시-5-옥소시클로헥산-1-카르복실레이트, 4. 5-히드록시-3-옥소시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5. 3,5-디히드록시시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 6. 5-히드록시-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 7. 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 8. 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]시클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트, 9. 벤조에이트이다.

도 10은 벤조에이트 및 벤조일-CoA에서 벤젠으로 전환되는 경로들을 보인다. 효소들은 A. 벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, B. 벤조에이트 환원효소, C. 벤즈알데히드 탈카보닐효소, D. 벤조일-CoA 환원효소, E. 벤조에이트 탈탄산효소, F. 포스포트란스벤조일라제, G. (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소 (탈인산), H. 벤조에이트 키나아제.

도 11은 *p*-톨루에이트 (또는 *p*-톨루엔산으로 칭함) 및 *p*-메틸벤조일-CoA에서 톨루엔으로 전환되는 경로들을 보인다. 효소들은 A. *p*-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, B. *p*-톨루에이트 환원효소, C. *p*-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소, D. *p*-메틸벤조일-CoA 환원효소, E. *p*-톨루에이트 탈탄산효소, F. 포스포트란스-*p*-메틸벤조일라제, G. (*p*-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소 (탈인산), H. *p*-톨루에이트 키나아제.

도 12는 피루베이트에서 2,4-펜타디에노에이트로의 경로들을 보인다. 효소들은 A. 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, B. 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, C. 2-옥소펜타노에이트 환원효소, D. 2-히드록시펜타노에이트 탈수효소, E. 4-히드록시-2-옥소발레레이트 환원효소, F. 2,4-디히드록시펜타노에이트 2-탈수효소, G. 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소 및 H. 2,4-디히드록시펜타노에이트 4-탈수효소이다.

도 13은 알라닌 및 오르니틴에서 2,4-펜타디에노에이트로의 경로를 보인다. 효소들은 A. AKP 티올라아제, B. AKP 탈아미노효소, C. 아세틸아크릴레이트 환원효소, D. 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, E. AKP 아미노 전이효소 및/또는 탈수소효소, F. 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 탈수효소, G. 2,4-디히드록시펜타노에이트 2-탈수효소, H. 2,4-디옥소펜타노에이트 2-환원효소, I. 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 환원효소, J. AKP 환원효소, K. 2,4-디옥소펜타노에이트 4-환원효소, L. 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, M. 오르니틴 4,5-아미노뮤타아제, N. 2,4-디아미노펜타노에이트 4-아미노전이효소 및/또는 4-탈수소효소. AKP는 2-아미노-4-옥소펜타노에이트이다.

도 14는 오르니틴에서 2,4-펜타디에노에이트로의 추가적인 경로들을 보인다. 효소들은 A. 오르니틴 2,3-아미노뮤타아제, B. 3,5-디아미노펜타노에이트 탈아미노효소, C. 5-아미노펜트-2-에노에이트 탈아미노효소, D. 3,5-디아미노펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, E. 3-아미노-5-옥소펜타노에이트 탈아미노효소, F. 5-옥소펜트-2-에노에이트 환원효소, G. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, H. 5-아미노펜트-2-에노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, I. 3-아미노-5-옥소펜타노에이트 환원효소, J. 3-아미노-5-히드록시펜타노에이트 탈아미노효소이다.

도 15는 3-히드록시프로파노일-CoA 및/또는 아크릴일-CoA에서 2,4-펜타디에노에이트로 전환되는 경로들을 보인다. 효소들은 A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, J. 3,5-디히

드록시펜타노에이트 탈수효소, K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, Q. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, R. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 탈수효소, S. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소이다. 3-HP-CoA는 3-히드록시프로파노일-CoA이다.

도 16은 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소에 의해 3-히드록시펜트-4-에노에이트 (3HP4)로부터 부타디엔을 형성하는 것을 보인다.

도 17은 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소 및 3-부텐-1-올 탈수효소에 의해 3,5-디히드록시펜타노에이트로 부터 부타디엔을 형성하는 것을 보인다. 부타디엔을 형성하는 3-부텐-1-올 탈수반응은 화학 촉매에 의해서도 일어날 수 있다.

도 18은 2,4-펜타디에노에이트 수화효소를 통하여 2,4-펜타디에노에이트에서 3-히드록시펜트-4-에노에이트 (3HP4) 중간체가 형성되는 것을 보인다.

도 19는 3-HP-CoA 및/또는 아크릴일-CoA에서 부타디엔, 3-히드록시펜트-4-에노에이트 (3HP4), 2,4-펜타디에노에이트 및 3-부텐-1-올로 전환되는 경로들을 보인다. 효소들은 A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, Q. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, R. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 탈수효소, S. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소, T. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, U. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소, V. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소, W. 3-부텐-1-올 탈수효소 (또는 화학적 전환), X. 2,4-펜타디엔 탈탄산효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소이다. 3-HP-CoA는 3-히드록시프로파노일-CoA이다.

도 20은 숙시닐-CoA에서 3-히드록시펜트-4-에노에이트 (3HP4), 2,4-펜타디에노에이트 및 부타디엔으로의 경로들을 보인다. 효소들은 A. 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소, B. 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, C. 3-옥소아디페이트 탈수효소, D. 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소, E. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, F. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소, G. 3-옥소아디필-CoA 환원효소, H. 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, I. 3-히드록시아디페이트 탈수효소, J. 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소, K. 3-옥소아디페이트 환원효소, L. 2-푸마릴아세테이트 환원효소, M. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소, N. 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소이다.

도 21은 말로닐-CoA 및 아세틸CoA에서 3-부텐-1-올, 부타디엔 및 2,4-펜타디에노에이트 형성 경로들을 도시한 것이다. 식별 기질들로부터 생성물로 변환시키는 효소들은: A. 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소, B. 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원), C. 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데하드 형성), D. 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소, E. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, F. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, G. 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성), H. 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데하드 형성), I. 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데하드 환원), J. 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소, K. 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성), L. 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원), M. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소, N. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소, O. 3-부텐-1-올 탈수효소 (또는 화학적 전환), P. 2,4-펜타디엔 탈탄산효소를 포함한다.

도 22는 기질로서 탄수화물에 CO₂ 고정을 위한 역 TCA 회로를 보인다. 도시된 효소들에 의한 효소적 변환들이 수행된다.

도 23은 합성가스에서 아세틸CoA로의 전환을 위한 일산화탄소 탈수효소 및 수소화효소와 결합된 역 TCA 회로에 대한 경로를 보인다.

도 24는 10 마이크로그램의 ACS90 (레인 1), ACS91 (레인2), Mta98/99 (레인 3 및 4) 세포추출물들, 크기 표준

물질들 (레인 5) 및 대조군 M. 써모아세티카 CODH (Moth_1202/1203) 또는 Mtr (Moth_1197) 단백질들 (50, 150, 250, 350, 450, 500, 750, 900, 및 1000 ng)의 웨스턴 블롯 결과를 보인다.

도 25는 CO 산화 분석 결과들을 보인다. 세포들 (CODH/ACS 오페론을 가지는 M. 써모아세티카 또는 E. coli; ACS90 또는 ACS91 또는 빈 벡터: pZA33S)을 성장시켜 추출물들을 얻었다. 추출물들을 얻은 날 수회에 걸쳐 55 °C에서 동정하였다. 이어 메틸비올로겐 환원은 120초에 걸쳐 578 nm에서 수행되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은, 부분적으로, 툴루엔, 벤젠, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트 및 1,3-부타디엔에 대한 생합성 생성 능력을 가지는 세포 및 유기체 설계 및 제조에 관한 것이다. 툴루엔 및 벤젠 경로는, 도 1 및 2에 나타난 바와 같이, 천연 아미노산 페닐알라닌에서 개시되고, 따라서, 대부분의 유기체는 툴루엔 및 벤젠 생성용 비-천연 유기체 제작을 위한 숙주 역할을 할 수 있다. 페닐알라닌 생성 개선 방법은 본 분야에서 알려져 있다 (Yakandawala et al., *App. Microbiol. Biotech.* 78:283-291 (2008); Lee et al., US 특허 5,008,190).

[0017] 스티렌 경로는 도 3에 표기된 바와 같이 벤조일-CoA 발생 유기체에 의존된다. 벤조일-CoA는 수 많은 생합성 및 분해 경로들의 핵심 대사 중간체이다. 벤조일-CoA는 항생물질, 향 및 방어 신호들과 같은 천연 방향족 생성물의 핵심 전구체이다. 벤조일-CoA 생합성의 생물학적 경로들은 본 분야에서 알려져 있다 (Boatright et al., *Plant Physiol.* 135:1993-2011 (2004); Xiang et al., *J. Bacteriol.* 185:399-404 (2003); Moore et al., *J. Nat. Prod.* 65:1956-1962 (2002)). 또한 벤조일-CoA는 협기성 및 호기성 방향족 화합물 분해 경로들의 공통 중간체이다 (Gescher et al., *J. Bacteriol.* 184:6301-6315 (2002); Philipp et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 212:139-143 (2002); Koch et al., *Eur. J. Biochem.* 205:195-202 (1992)).

[0018] 또한 본 발명은, 부분적으로, 도 4에 도시된 바와 같이 1,3-부타디엔 생성 촉매 효소들 암호화 유전자들을 발현하는 비-천연 미생물에 관한 것이다. 일부 실시예들에서, 뮤코네이트 생성 경로들은 중앙 대사 전구체들로부터 유도된다. 뮤코네이트는 미생물들에서 다양한 방향족 화합물들의 공통 분해산물이다. 여러 생체촉매적인 시스, 시스-뮤코네이트 제조방법들이 개발되었다. 글루코스에서 시킴산 경로 효소들에 의해 뮤코네이트를 생성하는 유전자 변형 *E. coli* 균주들이 Frost lab (U.S. 특허 5,487,987 (1996); Niu et al., *Biotechnol. Prog.*, 18:201-211 (2002))에서 개발되었다. 이들 균주는 유가 발효기 조건 (글루코스로부터 최대 이론 수율22%)에서 48시간 배양하여 36.8 g/L의 시스, 시스-뮤코네이트를 생성할 수 있다. 또한 뮤코네이트는 툴루엔, 벤조산 및 카테콜과 같은 방향족 출발물질로부터 생체촉매적으로 생성된다. 벤조에이트에서 뮤코네이트를 생성하는 균주들은 역가가 13.5 g/L이고 생성률은 5.5 g/L/hr이었다 (Choi et al., *J. Ferment. Bioeng.* 84:70-76 (1997)). 또한 뮤코네이트는 스티렌 단량체 제조공장의 유출액으로부터도 발생될 수 있다 (Wu et al., *Enzyme and Microbiology Technology* 35:598-604 (2004)).

[0019] 또한 본 발명은, 부분적으로, 도 12-15에 도시된 바와 같이 2,4-펜타디에노에이트 생성 촉매 효소들 암호화 유전자들을 발현하는 비-천연 미생물에 관한 것이다. 필수적인 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소를 포함시켜 이들 임의의 경로는 1,3-부타디엔 경로에 제공될 수 있다. 도 12는 3 경로들을 통한 피루베이트의 2,4-펜타디에노에이트로의 전체 전환을 보인다. 도 13은 공통 중간체 2-아미노-4-케토펜타노에이트 (AKP)를 통한 오르니틴 또는 알라닌의 2,4-펜타디에노에이트로의 전체 전환을 보인다. 도 13은 AKP로부터 2,4-펜타디에노에이트에 이르는 6 경로들을 보이며, 이중 3 경로들은 도 12에 보여진 중간체들로 이어진다. 도 14는 오르니틴으로부터 2,4-펜타디에노에이트에 이르는 추가적인 4 경로들을 보인다. 도 15는 3-히드록시프로파노일-CoA (3-HP-CoA) 및 아크릴로일-CoA로부터 2,4-펜타디에노에이트로의 여러 경로들을 보인다.

[0020] 또한 본 발명은, 부분적으로, 도 16-17 및 19-21에 도시된 바와 같이 1,3-부타디엔 생성 촉매 효소들 암호화 유전자들을 발현하는 비-천연 미생물에 관한 것이다. 도 16은 3-히드록시펜트-4-에노에이트 (3HP4)의 1,3-부타디엔 형성을 위한 탈이산화탄소 탈수반응을 보이고, 3HP4는 도 15 및 19에 도시된 경로들로부터 적용될 수 있다. 3HP4는, 자체로 중요하고, 도 15, 19, 및 20 경로들뿐 아니라 중간체 2,4-펜타디에노에이트의 수화를 통하여 도 18에서 도시된다. 비슷하게, 도 17은 도 15, 19, 및 21에 도시된 경로들을 통해 얻을 수 있는 중간체 3,5-디히드록시펜타노에이트의 순차적 이중 탈이산화탄소 탈수반응 및 이탈반응 (추가 탈수)을 보인다.

[0021] 도 19는 3-HP-CoA 및 아크릴일-CoA로부터 1,3-부타디엔 및 1,3-부타디엔 중간체들에 이르는 경로들을 도시한다. 도 20은 숙시닐-CoA로부터 1,3-부타디엔 및 1,3-부타디엔 중간체들에 이르는 경로들을 도시한다. 필수적인 숙시닐-CoA는 중앙 대사 중간체이고, 수율은 이하 더욱 기술되는 환원적TCA 회로를 통하여 개선될 수 있다. 마지막으로, 도 21은 1,3-부타디엔 및 1,3-부타디엔 중간체들에 이르는 경로들을 도시하고, 말로닐-CoA 및 아세틸CoA

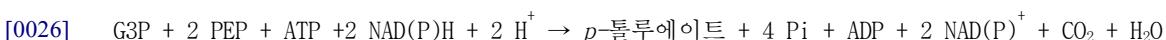
축합으로부터 진행되고, 후자 역시 본원에 기재된 환원적 TCA 경로들을 통한 처리량 증가 이점을 얻을 수 있다.

[0022] 또한 본 발명은 *p*-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, 톨루엔, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 또는 벤젠에 대한 생합성 생성 능력을 가지는 세포 및 유기체 설계 및 제조에 관한 것이다. 본원에 기재된 결과들은 대사 경로들을 설계하고 재조합 변형시켜 에스케리키아 콜라이 및 기타 세포들 또는 유기체에서 *p*-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, 톨루엔, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 또는 벤젠을 생합성할 수 있다는 것을 보인다. *p*-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, 톨루엔, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 또는 벤젠의 생합성적 생성은 설계된 대사 유전자형을 가지는 균주들 제작으로 확인될 수 있다. 또한 이를 대사적으로 변형된 세포 또는 유기체는 적응 진화에 의해 이론적 최대 성장에 가까운 조건들을 포함하여 *p*-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, 톨루엔, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 또는 벤젠 생합성을 더욱 증가시킬 수 있다.

[0023] *E. coli*에서 시키메이트 생합성 경로는 4-히드록시벤조에이트를 포함한 많은 필수 대사물질 생합성으로 이어지는 중요 중간체인 코리스메이트로 에리트로스-4-포스페이트를 전환시킨다. 4-히드록시벤조에이트는 테레프탈산 및 벤젠의 산업적 전구체인 *p*-톨루에이트와 구조적으로 유사하다. 본원에 기재된 바와 같이, 시킴산 경로 효소들은 대안 기질, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2H3M4OP)을 수용하여, 이를 *p*-톨루에이트 또는 톨루엔으로 변환하거나, 대안 기질 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2H4OP)을 수용하여 이를 벤조에이트 또는 벤젠으로 변환하도록 적용된다. 또한, 이소프레노이드 생합성을 위한 비-메발론산 경로로부터 효소들을 이용하여 2H3M4OP 또는 2H4OP 전구체를 합성하기 위한 경로가 이용될 수 있다.

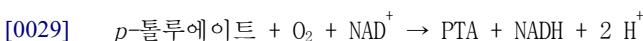
[0024] 탄수화물 공급원료로부터 재생 가능한 *p*-톨루에이트, 테레프탈레이트 (PTA), 톨루엔, 벤조에이트, 또는 벤젠을 생성하는 미생물 변형 방법이 본원에 개시된다. 톨루엔 계열에서, 글리세르알데히드-3-포스페이트 (G3P) 및 피루베이트는 3 효소 단계들에서 2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2H3M4OP)로 전환된다 (참고 실시예 III 및 도 5). 이어 2H3M4OP 중간체는 시킴산 경로의 효소들에 의해 *p*-톨루에이트로 변환된다 (참고 실시예 IV 및 도 6). 더 나아가 *p*-톨루에이트는 미생물에 의해 PTA로 전환된다 (참고 실시예 V 및 도 7). 벤젠 계열에서, 2H4OP는 에리트로스-4-포스페이트의 탈수 및 환원으로 제조된다 (참고 실시예 VI 및 도 8). 이어 2H4OP 중간체는 시킴산 경로의 효소들에 의해 벤조에이트로 변환된다 (참고 실시예 VI 및 도 9). 벤조에이트 및 *p*-톨루에이트는 각각 벤젠 및 톨루엔으로 전환된다 (참고 실시예 VII, 및 도 10 및 11).

[0025] 하기 알짜 반응에 의하면, G3P의 *p*-톨루에이트로의 전환은 하나의 ATP, 두 개의 환원 당량들 (NAD(P)H), 및 2 분자의 포스포에놀피루베이트가 필요하다.



[0027] 글루코스에서 G3P를 합성하기 위하여 추가적인 ATP가 필요하다. 글루코스로부터의 최대 이론 *p*-톨루에이트 수율은 0.67 mol/mol (0.51 g/g)에서 에너지에 요구되는 탄소를 제한 것이다. 합성되는 *p*-톨루에이트 분자 당 2 ATP가 소모된다고 가정하면, 글루코스로부터의 예상 *p*-톨루에이트 수율은 0.62 mol/mol (0.46 g/g) *p*-톨루에이트이다.

[0028] *p*-톨루에이트가 실시예 III에 기재된 효소들에 의해 PTA로 더욱 전환된다면, 글루코스로부터의 예상 PTA 수율은 0.64 mol/mol (0.58 g/g)이다. 본 경우에, *p*-톨루에이트가 PTA로 산화되면 알짜 반응에 따라 추가적인 알짜 환원 당량이 발생된다:



[0030] 상기 경로들의 각 단계를 촉매하는 효소 후보군들이 다음 절에 기재된다. 톨루엔, 벤젠, 스티렌, *p*-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트 또는 1,3-부타디엔 생성을 위한 성공적인 변형 경로들은 충분한 활성 및 특이성을 가지는 적합한 효소들 집합 (set)을 식별, 생산 숙주로 이를 상용 유전자들을 클로닝, 생산 숙주에서 이를 유전자 발현을 최적화, 발효 조건들을 최적화, 및 발효 이후 산물 형성 동정 단계들을 수반한다.

[0031] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "비-천연"이란 본 발명의 미생물 유기체 또는 미생물과 관련하여 사용될

때, 언급 종들의 야생종 균주들을 포함한 언급 종들의 천연 균주에서 통상 발견되지 않는 최소한 하나의 유전자 변경을 가지는 미생물 유기체를 의미하는 것이다. 유전자 변경은, 예를들면, 대사성 폴리펩티드 암호화 발현성 핵산 도입, 기타 핵산 부가, 핵산 결실 및/또는 기타 미생물 유기체의 유전물질에 대한 기능성 파괴에 의한 변형을 포함한다. 이러한 변형은, 예를들면, 언급 종들에 대한 이종, 동종 또는 이종 및 동종 모두의 폴리펩티드에 있어서 암호화 부위들 및 이의 기능성 단편들을 포함한다. 추가적인 변형은, 예를들면, 유전자 또는 오퍼론 발현을 변경시키는 비-암호화 조절 부위들의 변형을 포함한다. 예시적 대사성 폴리펩티드는 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, 톨루엔, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로에 있는 효소들 또는 단백질들을 포함한다.

- [0032] 대사 변형은 천연 상태로부터 변경되는 생화학적 반응을 의미한다. 따라서, 비-천연 미생물은 대사성 폴리펩티드 암호화 핵산, 또는 이의 기능성 단편에 대한 유전자 변형을 가진다. 예시적 대사적 변이들이 본원에 개시된다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"이란, 미생물 유기체와 관련하여 사용되는 경우, 언급 미생물 유기체가 자연 상태에서 발견될 때 최소한 성분이 실질적으로 결여된 유기체를 의미한다. 본 용어는 자연 환경에서 발견될 때의 성분들 일부 또는 전체가 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 또한, 본 용어는 미생물 유기체가 비-천연 환경에서 발견될 때의 성분들이 부분적으로 또는 전체가 제거된 미생물 유기체를 포함한다. 즉, 단리된 미생물 유기체는 유기체가 자연에서 발견되거나 또는 비-천연 환경에서 생장, 보관 또는 유지될 때의 기타 성분들로부터 일부 또는 완전히 단리된다. 단리된 미생물 유기체의 구체적인 예시로는 부분적으로 순수한 미생물, 실질적으로 순수한 미생물 및 비-천연 배지에서 배양된 미생물을 포함한다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "미생물(microbial)", "미생물 유기체" 또는 "미생물(microorganism)"은 고세균, 세균 또는 진핵생물 영역에 속하는 미시 세포로서 존재하는 모든 유기체를 의미한다. 즉, 본 용어는 미시적인 크기를 갖는 원핵 또는 진핵 세포 또는 유기체를 포괄하며, 모든 종의 세균, 고세균 및 진정세균 (eubacteria) 뿐만 아니라 효모 및 진균과 같은 진핵 미생물을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 본 용어는 생화학적 생산을 위해 배양할 수 있는 임의 종의 세포 배양물을 포함한다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "CoA" 또는 "조효소 A"는, 활성 효소 시스템을 만들기 위해 다수 효소 (주효소(apoenzyme))의 활성에 필요한 유기 조인자 또는 보결기(효소의 비단백질 영역)를 의미한다. 조효소 A는 특정 축합 효소에 작용하며, 아세틸 또는 기타 아실기를 전이시키는 작용을 하며, 지방산 합성 및 산화, 피루베이트 산화 및 기타 아세틸화에 관여한다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "(2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트"는 본원에서 2H3M4OP로 약칭되며, 도 5에 표시된 화학 구조식을 가진다. 또한 이러한 화합물은 3-히드록시-2-메틸 부탄알-4-포스페이트로도 기술될 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "(2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트"는 본원에서 2H4OP로 약칭되며, 도 8 (화합물 3)에 표시된 화학 구조식을 가진다. 또한 이러한 화합물은 3-히드록시부탄알-4-포스페이트로도 기술될 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 분자식 $C_8H_7O_2^-$ (참고 도 6, 화합물 9)(IUPAC 명 4-메틸벤조에이트)을 가지는 용어 "p-톨루에이트"는 p-톨루엔산의 이온화 형태이며, p-톨루에이트 및 p-톨루엔산은 상호 교환적으로 사용되어 중성 또는 이온화 형태 및 이의 모든 염 형태의 화합물을 언급한다는 것을 이해하여야 한다. 특정 형태는 pH에 의존한다는 것을 본 분야의 숙련가들은 이해할 것이다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 분자식 $C_7H_6O_2$ (참고 도 9, 화합물 9)을 가지는 용어 "벤조에이트"는 벤조산의 이온화 형태이며, 벤조에이트 및 벤조산은 상호 교환적으로 사용되어 중성 또는 이온화 형태 및 이의 모든 염 형태의 화합물을 언급한다는 것을 이해하여야 한다. 특정 형태는 pH에 의존한다는 것을 본 분야의 숙련가들은 이해할 것이다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 분자식 $C_8H_4O_4^{-2}$ (참고 도 7, 화합물 4)(IUPAC 명 테레프탈레이트)을 가지는 용어 "테레프탈레이트"는 테레프탈산의 이온화 형태이며, p-푸탈산 또는 PTA로도 언급되고, 테레프탈레이트 및 테레프탈산은 상호 교환적으로 사용되어 중성 또는 이온화 형태 및 이의 모든 염 형태의 화합물을 언급한다는 것

을 이해하여야 한다. 특정 형태는 pH에 의존한다는 것을 본 분야의 숙련가들은 이해할 것이다.

[0041] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 "실질적으로 혐기성"은 배양 또는 생장 조건에 대해 사용되는 경우, 산소 함량이 액체 매질내 용해 산소 포화도의 약 10% 미만인 것을 의미한다. 또한, 본 용어는 약 1% 미만의 산소 분위기로 유지되는 액체 또는 고체 배지가 든 밀폐 챔버를 포함하는 의미이다.

[0042] 본원에서 사용되는 "외인성"은 언급된 문자 또는 활성이 숙주 미생물 유기체로 도입되는 것을 의미한다. 문자는, 예컨대, 숙주 염색체 또는 플라스미드와 같은 비-염색체성 유전 물질내로의 삽입에 의해서와 같이, 암호화 핵산을 숙주 유전 물질에 도입함으로써, 도입될 수 있다. 따라서, 본 용어는, 암호화 핵산 발현과 관련하여 사용되는 경우, 발현가능한 형태로 암호화 핵산을 미생물 유기체에 도입하는 것을 의미한다. 생합성 활성에 대해 사용되는 경우, 본 용어는 숙주 참조 유기체에 도입되는 활성을 언급한다. 이러한 원인은, 예컨대 숙주 미생물 유기체로 도입된 후 언급된 활성을 발현하는 동종 또는 이종 암호화 핵산일 수 있다. 따라서, 용어 "내인성"은 숙주에 존재하는 언급된 문자 또는 활성을 의미한다. 마찬가지로, 본 용어는, 암호화 핵산 발현에 대해 사용되는 경우, 미생물 유기체내에 포함된 암호화 핵산 발현을 의미한다. 용어 "이종"은 언급된 종 이외의 원천으로부터 유래된 문자 또는 활성을 지칭하며, "동종"은 숙주 미생물 유기체로부터 유래된 문자 또는 활성을 지칭한다. 따라서, 본 발명의 암호화 핵산의 외인성 발현시 이종 또는 동종의 암호화 핵산 중 어느 하나 또는 양자를 이용할 수 있다.

[0043] 2 이상의 외인성 핵산이 미생물 유기체에 포함되는 경우, 2 이상의 외인성 핵산은 전술한 바와 같이 언급된 암호화 핵산 또는 생합성 활성을 지칭하는 것으로 이해된다. 또한, 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 2 이상의 외인성 핵산은 숙주 미생물 유기체에 별개의 핵산 문자로, 폴리시스트론 핵산 문자로 또는 이의 조합으로 도입될 수 있으며, 여전히 2 이상의 외인성 핵산으로서 간주될 수 있는 것으로 또한 이해된다. 예를들면, 본원에 기술된 바와 같이, 미생물 유기체는 원하는 경로 효소 또는 단백질을 암호화하는 2 이상의 외인성 핵산을 발현하도록 조작될 수 있다. 원하는 활성을 암호화하는 2종의 외인성 핵산이 숙주 미생물 유기체로 도입되는 경우, 상기 2종의 외인성 핵산은 단일 핵산으로서, 예컨대 단일 플라스미드 형태로 또는 분리된 플라스미드 형태로 도입될 수 있으며, 숙주 염색체에서 단일 부위 또는 복수의 부위에 통합될 수 있으며, 여전히 2종의 외인성 핵산으로 간주되는 것으로 이해된다. 마찬가지로, 3개 이상의 외인성 핵산을, 숙주 유기체에 임의의 바람직한 조합으로, 예컨대 단일 플라스미드로, 각각의 개별 플라스미드로 도입할 수 있으며, 숙주 염색체에서 단일 위치 또는 복수 위치로 삽입할 수 있으며, 여전히 2 이상의 외인성 핵산, 예컨대 3종의 외인성 핵산으로 간주되는 것으로 이해된다. 따라서, 언급되는 외인성 핵산 또는 생합성 활성의 개수는 숙주 유기체로 도입되는 개개 핵산의 수를 지칭하는 것이 아니라, 암호화 핵산의 개수 또는 생합성 활성의 개수를 지칭한다.

[0044] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 안정적인 유전자 변경을 포함할 수 있는데, 이는 상기한 변형을 유지하면서 5 세대를 초과하여 배양할 수 있는 미생물을 언급한다. 일반적으로, 안정적인 유전자 변경은 10 세대 보다 길게 지속되는 변형을 포함하며, 특히 안정적인 변형은 약 25 세대 보다 길게 지속될 것이며, 보다 구체적으로는 안정적인 유전학 변형은 무한정을 비롯하여 50 세대 보다 길게 지속될 것이다.

[0045] 본 분야의 숙련가는, 본원에 예시된 대사 변형을 포함하여 유전자 변경은, *E. coli*와 같은 적정 숙주 유기체와 이의 상응하는 대사 반응 또는 원하는 대사 경로에 관여하는 유전자와 같은 바람직한 유전물질에 대해 적합한 원천 (source) 유기체와 관련하여 기술됨을 알 것이다. 그러나, 매우 다양한 유기체의 전체 게놈 서열 분석과 게놈학 분야의 높은 기술 수준을 감안하면, 본 분야의 숙련가는 본원에 기술된 내용 및 설명을 다른 유기체들 모두에도 적용할 수 있음을 쉽게 알 것이다. 예를들면, 본원에 예시된 *E. coli*의 대사 변형은 언급된 종이 아닌 다른 종 유래의 동일 또는 유사 암호화 핵산을 병합시킴으로써 다른 종에도 쉽게 적용할 수 있다. 이러한 유전자 변경으로는, 예컨대 일반적으로 종 상동체의 유전자 변형이 있으며, 구체적으로 오르소로그(ortholog), 파라고그(paralog) 또는 비-오르소로그형 유전자 치환(non-orthologous gene displacement)을 포함한다.

[0046] 오르소로그는 수직 직계(vertical descent) 관계이며, 상이한 유기체들에서 실질적으로 동일하거나 상동한 기능을 담당하는 유전자 또는 유전자들이다. 예를들면, 마우스 에폭사이드 하이드롤라제와 인간 에폭사이드 하이드롤라제는 에폭사이드의 가수분해라는 생물학적 기능상 오르소로그로 간주할 수 있다. 유전자들은, 예컨대 유전자들이 상동적이거나 또는 공통 조상으로부터 진화적으로 관련있는 것으로 표현되기에 충분한 서열 유사성을 공유하는 경우에, 수직 직계 관계이다. 또한, 유전자는, 3차 구조를 공유하지만, 1차 서열 유사성이 확인불가한 수준으로 공통 조상으로부터 진화된 것임을 의미하는 충분한 수준의 서열 유사성을 반드시 가지고 있지 않은 경우에도, 오르소로그로 간주할 수 있다. 오르소로그인 유전자들은 아미노산 서열 유사성이 약 25% 내지 100%인 단백질을 암호화할 수 있다. 25% 미만의 아미노산 유사성을 공유하는 단백질을 코딩하는 유전자들 역시, 이들의

3차원 구조에 유사성이 있다면 수직 직계에 의해 생겨난 것으로 간주할 수 있다. 조직 플라스미노겐 활성자 및 엘라스타제 등의 세린 프로테아제 패밀리 효소의 구성원들은 공통 조상의 수직 직계에서 생겨난 것으로 간주된다.

[0047] 오르소로그는, 예를들면 진화를 통해 구조적으로 또는 전체 활성 측면에서 분화된 유전자 또는 이로 암호화된 유전자 산물을 포함한다. 예를들어, 어떤 종이 2가지 기능을 나타내는 유전자 산물을 암호화하고 있으며 이 기능들이 2번째 종에서는 별개의 유전자로 분리되어 있는 경우, 이를 3종의 유전자와 이의 대응 산물들은 오르소로그로 간주된다. 생화학적 산물의 제조시, 본 분야의 당업자들은, 비-천연 미생물을 구축하기 위해, 도입 또는 파괴할 대사 활성을 가지고 있는 오르소로그형 유전자를 선택해야 함을 알 것이다. 분리가능한 활성들을 나타내는 오르소로그의 예는, 개개 활성이 2종 이상의 종 또는 단일 종에서 개별 유전자 산물로 분리되는 경우이다. 구체적인 예는, 세린 프로테아제의 2가지 활성인 엘라스타제 단백질 분해 활성과 플라스미노겐 단백질 분해 활성이, 플라스미노겐 활성자 및 엘라스타제로서 개별 분자로 분리되는 경우이다. 두 번째 예는, 마이코플라스마 5'-3' 엑소뉴클레아제와 드로소필라 DNA 폴리머라제 III 활성이 분리되는 경우이다. 상기 첫 번째 종 유래의 DNA 폴리머라제는, 2번째 종 유래의 엑소뉴클레아제 또는 폴리머라제 중 어느 하나 또는 이를 둘다에 대해 오르소로그인 것으로 간주할 수 있으며, 그 역도 성립된다.

[0048] 이와는 반대로, 파라로그는 예를 들어 복제와 이후 진화적 분화 관계에 있는 상동체이며, 유사하거나 공통되지만, 기능이 동일하지 않은 것이다. 파라로그는, 예컨대, 동일 종 또는 다른 종으로부터 기원하거나 유래될 수 있다. 예를들면, 마이크로솜 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 I)와 가용성 에폭사이드 하이드롤라제(에폭사이드 하이드롤라제 II)는, 이들이 별개의 반응을 촉매하고, 동일 종에서 다른 기능을 가지고 있는, 공통 조상으로부터 함께 진화된 2개 별개의 효소이기 때문에, 파라로그로 간주될 수 있다. 파라로그는 유의한 서로 서열 유사성을 보이는 동일한 종으로부터 유래된 단백질들이므로, 이들은 상동적이거나 또는 공통 조상으로부터 함께 진화된 관계임을 시사한다. 파라로그 패밀리 그룹으로는 HipA 상동체, 루시퍼라제 유전자, 웹티다제 등이 있다.

[0049] 비-오르소로그 유전자 치환(nonorthologous gene displacement)은 한 종의 비-오르소로그 유전자가 다른 종에서 언급된 유전자의 기능을 치환할 수 있는 것이다. 치환은, 예를 들어 다른 종들에서 언급된 기능과 비교하여, 기원 종에서 실질적으로 동일하거나 유사한 작용을 수행할 수 있음을 포함한다. 일반적으로, 비-오르소로그 유전자 치환은 언급된 기능을 코딩하는 공지된 유전자와 구조적으로 관련있는 것으로 구분할 수 있지만, 구조적으로는 관련성은 낮지만 기능적으로 유사한 유전자 및 이의 유전자 산물은 그럼에도 불구하고 여전히 본 발명에서 사용되는 용어의 의미에 포함될 것이다. 기능 유사성에는, 예를 들어 치환하고자 하는 기능을 코딩하는 유전자에 대해, 비-오르소로그 유전자 산물의 활성부 또는 결합부에 어느 정도 이상의 구조 유사성이 요구된다. 따라서, 비-오르소로그 유전자는 예를 들어 파라로그 또는 비관련 유전자를 포함한다.

[0050] 따라서, 틀루엔, 벤젠, p-틀루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔의 생합성 능력을 가지는 본 발명의 비-천연 미생물 유기체를 동정하고 구축함에 있어, 본 기술 분야의 숙련가들은, 본원에 제공된 교시 및 지침을 특정 종들에 적용하여, 대사 변형 확인에 오르소로그의 동정 및 포함 또는 불활성화가 포함될 수 있음을 인지할 것이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 또한, 파라로그 및/또는 비-오르소로그 유전자 치환이 유사하거나 또는 실질적으로 유사한 대사 반응을 촉매하는 효소를 암호화하는 참조된 미생물에 존재하는 한, 진화적으로 관련성 있는 유전자들을 사용할 수 있다.

[0051] 오르소로그, 파라로그 및 비-오르소로그 유전자 치환은 당해 기술 분야의 당업자에게 널리 공지된 방법으로 결정할 수 있다. 예를들면, 2개의 폴리펩타이드에 대해 핵산 또는 아미노산 서열을 검사하여, 상기 비교되는 서열들 간의 서열 동일성과 유사성을 확인한다. 이러한 유사성을 토대로, 당해 기술 분야의 당업자는 상기 유사성이 상기 단백질들이 공통 조상으로부터 진화된 관계임을 의미할 만큼 충분히 높은지를 결정할 수 있다. 본 분야의 숙련가에게 널리 공지된 알고리즘, 예컨대 Align, BLAST, Clustal W 등으로 미처리(raw) 서열의 유사성 또는 동일성을 비교 및 확인하며, 또한, 웨이트 또는 스코어를 할당할 수 있는 서열내 캡의 존재나 유의 수준을 정할 수 있다. 이러한 알고리즘들은 또한 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 뉴클레오티드 서열 유사성 또는 동일성 결정에 마찬가지로 적용 가능하다. 관계(relatedness)를 정할 만큼 충분한 유사성에 대한 매개변수들은, 널리 공지된 통계학적 유사성 계산법, 또는 랜덤 폴리펩타이드내에서 유사한 매칭을 발견할 확률, 그리고 확인된 매칭의 유의 수준을 근거로 산정된다. 2개 이상 서열들의 컴퓨터 비교는, 또한, 필요한 경우, 본 분야의 당업자에 의해 가시적으로 최적화할 수 있다. 관련 유전자 산물 또는 단백질은 높은 유사성, 예를들면 25% 내지 100%의 서열 동일성을 가지는 것으로 볼 수 있다. 비관련 단백질은, 충분한 크기의 데이터베이스 검색시 우연히 발생할 수

있는 수준과 기본적으로 동일한 동일성(약 5%)을 가질 수 있다. 5% 내지 24%의 서열이, 비교 서열들과 관련성 있다고 판단할 만큼 충분한 상동성을 보이거나 그렇지 않을 수 있다. 데이터 세트의 크기를 제시하는 이러한 매칭 유의 수준을 결정하기 위한 추가적인 통계학적 분석을 수행하여, 이를 서열들의 관련성을 결정할 수 있다.

[0052] BLAST 알고리즘을 이용하여 2종 이상의 서열 관계를 측정하기 위한 매개변수의 예로는, 다음과 같을 수 있다. 간략하게는, 아미노산 서열 정렬은 BLASTP 버전 2.0.8(1999년 1월 5일) 및 하기의 매개변수들을 사용하여 수행 할 수 있다: 매트릭스: 0 BLOSUM62; 캡 오픈(gap open): 11; 캡 연장(gap extension): 1; x_드롭오프: 50; 예상: 10.0; 워드크기: 3; 필터: 온(on). 핵산 서열 정렬은 BLASTN 버전 2.0.6(1998년 9월 16일) 및 하기의 매개변수들을 사용하여 수행할 수 있다: 매치: 1; 미스매치: -2; 캡 오픈: 5; 캡 연장: 2; x_드롭오프: 50; 예상: 10.0; 워드크기: 11; 필터: 오프. 본 문야의 숙련가는, 상기 매개변수들에 대해 예를들면 상기 비교의 업격성을 높이거나 낮추고, 2종 이상 서열의 관계를 정하기 위한 변형을 가할 수 있음을 알 것이다.

[0053] 일부 실시예에서, 본 발명은, 톨루엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 톨루엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 톨루엔 경로는, 도 1의 대안 경로들에 도시된 바와 같이 (A) 1) 하나 또는 양자의 페닐알라닌 아미노전이효소 및 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 및 3) 페닐아세트알데히드 탈카보닐효소; (B) 1) 하나 이상의 페닐알라닌 아미노전이효소 및 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 3) 하나 이상의 페닐아세트알데히드 탈수소효소 및 페닐아세트알데히드 산화효소, 및 4) 페닐아세테이트 탈탄산효소; 및 (C) 하나 이상의 페닐알라닌 아미노전이효소 및 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 페닐피루베이트 산화효소, 및 3) 페닐아세테이트 탈탄산효소에서 선택된다.

[0054] 톨루엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산, 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 3 종의 외인성 핵산, 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산, 또는 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 5종의 외인성 핵산을 포함한다. 3종의 외인성 핵산을 가지는 예시적 비-천연 미생물 유기체는, 1) 페닐알라닌 아미노전이효소 및/또는 산화환원효소 (탈아민), 3) 페닐피루베이트 산화효소, 및 5) 페닐아세테이트 탈탄산효소를 암호화하는 유전자들을 가지는 유기체를 포함한다. 4종의 외인성 핵산을 가지는 예시적 비-천연 유기체는 1) 페닐알라닌 아미노전이효소, 2) 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 3) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 및 4) 페닐아세트알데히드 탈카보닐효소를 암호화하는 외인성 유전자들을 가지는 유기체를 포함한다. 5종의 외인성 핵산을 가지는 예시적 비-천연 미생물 유기체는 1) 페닐알라닌 아미노전이효소, 2) 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 3) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 4) 페닐아세트알데히드 탈수소효소 및/또는 산화효소, 및 5) 페닐아세테이트 탈탄산효소를 암호화하는 유전자들을 가지는 유기체를 포함한다. 따라서, 특정 실시예들에서, 비-천연 미생물 유기체는 전체 톨루엔 경로에서 모든 효소를 암호화하는 모든 유전자를 포함하고, 전체 톨루엔 경로를 가질 수 있다. 일부 실시예들에서 톨루엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 가진다. 일부 실시예들에서, 벤젠 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 협기성인 배양 배지에 있을 수 있다.

[0055] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 벤젠을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤젠 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 벤젠 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 벤젠 경로는 도 2에 도시된 바와 같이 페닐알라닌 벤젠-분해효소를 포함한다. 최소한 하나의 외인성 핵산은 페닐알라닌 벤젠-분해효소 자체 또는 전구체 페닐알라닌 생산에 영향을 주는 핵산일 수 있다. 일부 실시예들에서 벤젠 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 가진다. 일부 실시예들에서, 벤젠 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 협기성인 배양 배지에 있을 수 있다.

[0056] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 스티렌을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 스티렌 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 스티렌 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 스티렌 경로는, 도 3의 대안 경로들에 도시된 바와 같이 (A) 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 하나 이상의 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소, 전이효소, 및 가수분해효소, 3) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 4) 아세토페논 환원효소, 및 5) 1-페닐에탄올 탈수효소; 및 (B) 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로피오닐라제, 3) 벤조일-아세테이트 키나아제, 4) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 5) 아세토페논 환원효소, 및 6) 1-페닐에탄올 탈수효소에서 선택된다.

[0057] 일부 실시예들에서, 스티렌 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산, 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 3종의 외인성 핵산, 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산, 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 5종의 외인성 핵산, 각각이 스티렌 경로 효소

를 암호화하는 6종의 외인성 핵산, 및 기타 등을 포함한다. 5종의 외인성 핵산을 가지는 예시적 비-천연 유기체는 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 하나의 3-옥소-3-페닐프로파오닐-CoA 합성효소, 전이효소, 및 가수분해효소, 3) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 4) 아세토페논 환원효소, 및 5) 1-페닐에탄올 탈수효소를 암호화하는 외인성 유전자들을 가지는 유기체를 포함한다. 6종의 외인성 핵산을 가지는 예시적 비-천연 유기체는 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로파오닐라제, 3) 벤조일-아세테이트 키나아제, 4) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 5) 아세토페논 환원효소, 및 6) 1-페닐에탄올 탈수효소를 암호화하는 외인성 유전자들을 가지는 유기체를 포함한다. 일부 실시예들에서 스티렌 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 가진다. 일부 실시예들에서 스티렌 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 협기성인 배양 배지에 존재한다.

[0058] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 1,3-부타디엔 경로는, 도 4의 대안 경로들에 도시된 바와 같이 (A) 1) 트란스, 트란스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (B) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 시스-탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 트란스-탈탄산효소 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; 및 (D) 1) 시스, 시스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소에서 선택된다.

[0059] 일부 실시예들에서, 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다. 따라서, 2종의 외인성 핵산은 도 4에 도시된 전체 경로들에 해당하는 (A) 1) 트란스, 트란스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (B) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 시스-탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 트란스-탈탄산효소 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; 및 (D) 1) 시스, 시스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소에서 선택되는 집합 (set)을 암호화한다. 일부 실시예들에서, 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 가진다. 일부 실시예들에서, 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 협기성인 배양 배지에 존재한다.

[0060] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는 (A) 도 12의 단계들 A-D에 도시된 바와 같이 1) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, 2) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, 3) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 4) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소, (B) 도 13의 단계들 B-D에 도시된 바와 같이 1) AKP 탈아미노효소, 2) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 3) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, (C) 도 13의 단계들 E, H, F, C, 및 D에 도시된 바와 같이 1) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, 2) 2,4-디옥소펜타노에이트-2-환원효소, 3) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 탈수효소, 4) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 5) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, (D) 도 12의 단계들 B-D와 함께 도 13의 단계들 E 및 K에 도시된 바와 같이 1) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, 2) 2,4-디옥소펜타노에이트-4-환원효소, 3) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, 4) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 5) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소, 및 (E) 도 12의 단계들 B-D와 함께 도 13의 단계들 J 및 L에 도시된 바와 같이 1) AKP 환원효소, 2) 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, 3) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, 4) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 (F) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소에서 선택되는 AKP에서 2,4-펜타디에노에이트로 전환할 수 있는 효소들 집합을 가진다. 일부 실시예들에서, 도 12에 도시된 중간체 4-히드록시-2-옥소발레레이트를 포함하는 도 13의 경로들 역시 도 12에 도시된 2,4-디히드록시펜타노에이트 경로들을 통하여 2,4-펜타디에노에이트를 제공할 수 있다. 예를들면, 4-히드록시-2-옥소발레레이트로부터, 2,4-펜타디에노에이트에 이르는 경로들은 도 12의 단계들 E, H, 및 D 또는 단계들 E, F, 및 G에 있는 효소들을 포함할 수 있다.

[0061] 일부 실시예들에서, 또한 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는, (A) 도 12의 단계들 A, E, F, 및 G에 도시된 바와 같이 1) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, 2) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 환원효소, 3) 2,4-디히드록시펜테노에이트 2-탈수효소, 및 4) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, 및 (B) 도 12의 단계들 A, E, H, 및 D에 도시된 바와 같이 1) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, 2) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 환

원효소, 3) 2,4-디히드록시펜타노에이트 4-탈수효소 및 4) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소에서 선택되는 효소들 집합을 가진다.

[0062] 일부 실시예들에서, 또한 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는, (A) 도 13의 단계들 E, H, I, G, 및 D에 도시된 바와 같이 1) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, 2) 2,4-디옥소펜타노에이트 2-환원효소, 3) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 환원효소, 4) 2,4-디히드록시펜타노에이트 2-탈수효소, 및 5) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, 및 (B) 각각 도 12의 단계들 F 및 G 또는 H 및 D와 함께 도 13의 단계들 E, H, 및 I에 도시된 바와 같이 1) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, 2) 2,4-디옥소펜타노에이트 2-환원효소, 3) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 환원효소, 4) 2,4-디히드록시펜타노에이트-2-탈수효소 및 5) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소 또는 4) 2,4-디히드록시펜타노에이트-4-탈수효소 및 5) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소에서 선택되는 효소들 집합을 가진다. 즉, 2,4-디히드록시펜타노에이트 이중 탈수는 임의 순서로 진행될 수 있다.

[0063] 일부 실시예들에서, 또한 본 발명은, AKP를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 AKP 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, AKP 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. AKP 경로는 도 13의 단계들 M 및 N에 도시된 바와 같이 오르니틴 4,5-아미노뮤타아제 및 2,4-디아미노펜타노에이트 4-아미노전이효소 및/또는 4-탈수효소를 포함한다. 일부 실시예들에서, AKP 경로를 가지는 미생물 유기체는 오르니틴 4,5-아미노뮤타아제 및 2,4-디아미노펜타노에이트 4-아미노전이효소 또는 2,4-디아미노펜타노에이트 4-탈수효소를 암호화하는 2종의 외인성 효소들을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 AKP 경로는 도 13에 표기된 바와 같이 상기 2,4-펜타디에노에이트 임의의 경로들에 부가될 수 있다. 달리, AKP는 도 13의 단계 A에 도시된 바와 같이 AKP 티울라아제 부가에 의해 알라닌으로부터 생성될 수 있고, 도 12와 함께 도 13에 도시되고 본원에 기재된 다양한 2,4-펜타디에노에이트 경로들에 공급될 수 있다.

[0064] 일부 실시예들에서, 또한 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는, (A) 도 14의 단계들 A-C에 도시된 바와 같이 1) 오르니틴 2,3-아미노뮤타아제, 2) 3,5-디아미노펜타노에이트 탈아미노효소, 및 3) 5-아미노펜트-2-에노에이트 탈아미노효소, (B) 도 14의 단계들 A, B, H, F, 및 G에 도시된 바와 같이 1) 오르니틴 2,3-아미노뮤타아제, 2) 3,5-디아미노펜타노에이트 탈아미노효소, 3) 5-아미노펜트-2-에노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, 4) 5-옥소펜트-2-에노에이트 환원효소, 및 5) 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, (C) 도 14의 단계들 A, D, E, F, 및 G에 도시된 바와 같이 1) 오르니틴 2,3-아미노뮤타아제, 2) 3,5-디아미노펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, 3) 3-아미노-5-옥소펜타노에이트 탈아미노효소, 4) 5-옥소펜트-2-에노에이트 환원효소, 및 5) 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, (D) 도 14의 단계들 A, D, I, J, 및 G에 도시된 바와 같이 1) 오르니틴 2,3-아미노뮤타아제, 2) 3,5-디아미노펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, 3) 3-아미노-5-옥소펜타노에이트 환원효소, 및 4) 3-아미노-5-히드록시펜타노에이트 탈아미노효소, 및 5) 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소에서 선택되는 효소들 집합을 포함한다.

[0065] 일부 실시예들에서, 또한 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는 3-HP-CoA 또는 아크릴로일-CoA에서 출발하는 도 15에 도시된 임의의 수 많은 경로들에서 선택되는 효소들 집합을 가진다.

[0066] 3-HP-CoA로부터의 예시적 경로들은 다음과 같은 효소 집합을 포함한다 (A) 도 15의 단계들 A-E에 도시된 바와 같이 1) 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, 2) 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, 3) 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, 4) 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, 및 5) 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, 및 (B) 도 15의 단계들 A, F, I, J, 및 Q에 도시된 바와 같이 1) 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, 2) 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, 3) 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, 4) 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, 및 5) 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소. 본 분야의 숙련가는 3-HP-CoA로부터 경로들 (A) 및 (B)를 형성하는 효소 집합은 도 15의 단계 G에 도시된 바와 같이 가역적 효소들 3,5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, 및 도 15의 단계 H에 도시된 바와 같이 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소를 거쳐 혼용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 3-HP-CoA에서 2,4-펜타디에노에이트 경로는 도 15에 각각 도시된 바와 같이 단계들 A, B, G, J, 및 Q, 또는 단계들 A, B, C, H, 및 Q, 또는 단계들 A, B,

G, J, H, D, 및 E, 또는 단계들 A, F, I, G, C, D, 및 E, 또는 단계들, A, F, I, G, C, H, 및 Q, 또는 단계들 A, F, I, J, H, D, 및 E에 있는 효소들을 포함한다.

[0067] 아크릴로일-CoA로부터의 예시적 경로들은 다음과 같은 효소 집단을 포함한다 (C) 도 15의 단계들 M, O, P, 및 S에 도시된 바와 같이 1) 아크릴로일-CoA 아세틸전이효소, 2) 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, 3) 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, 4) 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소 및 (D) 단계들 M, N, R, 및 E에 도시된 바와 같이 1) 아크릴로일-CoA 아세틸전이효소, 2) 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, 3) 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 탈수효소, 및 4) 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소. 본 분야의 숙련가는 3-HP-CoA로부터의 경로들 (A) 및 (B) 및 아크릴로일-CoA로부터의 (C) 및 (D)를 형성하는 효소 집합은 도 15의 단계 K에 도시된 바와 같이 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소 및 도 15의 단계 L에 도시된 바와 같이 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소의 가역적 효소들을 통하여 혼용될 수 있다 는 것을 이해할 것이다. 따라서, 단계 K는 아크릴로일-CoA로부터 2,4-펜타디에노에이트에 이르는 임의의 열거된 경로들에 부가되어 단계들 K, M, N, R, 및 E 또는 단계들 K, M, O, P, 및 S와 같은 2,4-펜타디에노에이트 경로들을 제공한다. 또한 단계 K는 단계 A에 대한 왕복 대안으로 사용되어 3-HP-CoA로부터 단계들 K, M, 및 L을 거쳐 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA를 제공한다. 따라서, 단계 A의 효소를 이용하는 임의의 상기 경로들은 단계들 K, M, 및 L의 효소들을 대신 이용할 수 있다. 동일한 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 중간체는 도 15의 단계들 K 및 A 또는 M 및 L의 효소들을 통한 경로들에 의해 아크릴로일-CoA로부터 얻어질 수 있다. 따라서, 아크릴로일-CoA는 3-HP-CoA에 의해 접근될 수 있는 열거된 모든 경로들을 접근하기 위하여 적용될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 아크릴로일-CoA에서의 2,4-펜타디에노에이트 경로는 도 15에서 모두 도시된 바와 같이 단계들 K, A, B, C, D, 및 E, 또는 단계들 K, A, F, I, J 및 Q, 또는 단계들 K, A, B, G, J, 및 Q, 또는 단계들 K, A, B, G, J, H, D, 및 E, 또는 단계들 K, A, B, C, H, 및 Q, 또는 단계들 K, A, F, I, G, C, D, 및 E, 또는 단계들 K, A, F, I, G, C, H, Q, 또는 단계들 K, A, F, I, J, H, D 및 E, 또는 단계들 M, L, B, C, D, 및 E, 또는 단계들 M, L, F, I, J 및 Q, 또는 단계들 M, L, B, G, J, 및 Q, 또는 단계들 M, L, B, G, J, H, D, 및 E, 또는 단계들 M, L, B, C, H, 및 Q, 또는 단계들 M, L, F, I, G, C, D, 및 E, 또는 단계들 M, L, F, I, G, C, H, Q, 또는 단계들 M, L, F, I, J, H, D 및 E의 효소들을 포함한다. 마찬가지로, 3-HP-CoA는 단계 L의 효소를 이용하여 중간체 3-옥소펜트-4-에노일-CoA를 거쳐 열거된 아크릴로일-CoA 경로들로 공급될 수 있다. 따라서, 3-HP-CoA에서의 2,4-펜타디에노에이트 경로는 각각이 도 15에 도시된 바와 같이 단계들 A, L, N, R, 및 E 또는 단계들 A, L, O, P, 및 S의 효소들을 포함한다.

[0068] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는 다음에서 선택되는 효소들 집합을 가진다:

[0069] 1) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;

[0070] 2) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;

[0071] 3) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;

[0072] 4) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;

[0073] 5) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, D. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA

탈수효소, E. 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소;

- [0086] 18) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, S. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소.
- [0087] 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 2,4-펜타디에노에이트를 1,3-부타디엔으로 전환하는 2,4-펜타디엔 탈탄산효소를 더욱 포함한다.
- [0088] 일부 실시예들에서, 비-천연 미생물 유기체는 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함한다. 1,3-부타디엔 경로는 다음에서 선택되는 효소들 집합을 가진다:
- [0089] 1) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, T. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;
- [0090] 2) M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;
- [0091] 3) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, T. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;
- [0092] 4) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, M. 아크릴일-CoA 아세틸전이효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;
- [0093] 5) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, N. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, T. 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;
- [0094] 6) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, O. 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, P. 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, Y. 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소;
- [0095] 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 또는 5종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다.
- [0096] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 3-부텐-1-올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 3-부텐-1-올 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 3-부텐-1-올 경로는 다음에서 선택되는 효소들 집합을 가진다:
- [0097] 1) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, U. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;
- [0098] 2) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, F. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, I. 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, V. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;
- [0099] 3) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, U. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소;
- [0100] 4) A. 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, G. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, V. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;

소 및/또는 가수분해효소, J. 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, V. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;

[0116] 20) K. 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소, M. 아크릴알-CoA 아세틸전이효소, L. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, B. 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, C. 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, H. 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, V. 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소;

[0117] 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 각각이 3-부텐-1-올 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 가진다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 3-부텐-1-올을 1,3-부타디엔으로 전환하는 3-부텐-1-올 탈수효소를 더욱 포함한다.

[0118] 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 3종의 외인성 핵산을 포함한다. 예를들면, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 i) AKP 탈아미노효소, ii) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 iii) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소를 암호화하는 3종의 외인성 핵산을 포함하고, 따라서 AKP를 거쳐 2,4-펜타디에노에이트로의 알라닌 또는 오르니틴 접근 경로를 제공한다. 본 분야의 숙련가는 이것이 단지 예시적이고 3종의 외인성 핵산은 도 12-15의 열거된 임의의 경로들에 있는 임의의 2,4-펜타디에노에이트-생산 비-천연 유기체의 기본일 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0119] 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 임의의 4종의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 예를들면, 비-천연 미생물 유기체는 i) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, ii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iii) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 iv) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산을 포함하고, 따라서 도 12에 도시된 바와 같이 피루베이트에서 2,4-펜타디에노에이트에 이르는 전체 경로를 형성한다. 본 분야의 숙련가는 이것이 단지 예시적이고 4종의 외인성 핵산은 도 12-15의 열거된 임의의 경로들에 있는 임의의 2,4-펜타디에노에이트-생산 비-천연 유기체의 기본일 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0120] 또 다른 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 5종의 외인성 핵산을 포함한다. 5종의 외인성 핵산을 가지는 본 발명의 예시적 비-천연 미생물 유기체는 (A) 도 13의 단계들 E, H, F, C, 및 D에 도시된 바와 같이 i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-2-환원효소, iii) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 탈수효소, iv) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 v) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소 또는 (B) 도 12의 단계들 B, C, 및 D와 함께 도 13의 단계들 E 및 K에 도시된 바와 같이 i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-4-환원효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소, 또는 도 12의 단계들 B, C, 및 D와 함께 도 13의 단계들 J 및 L에 도시된 바와 같이 i) AKP 환원효소, ii) 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소를 암호화하는 효소들을 포함한다. 본 분야의 숙련가는 이것이 단지 예시적이고 5종의 외인성 핵산은 도 12-15의 열거된 임의의 경로들에 있는 임의의 2,4-펜타디에노에이트-생산 비-천연 유기체의 기본일 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 일부 실시예들에서 2,4-펜타디에노에이트 경로에 있는 2, 3, 4, 5, 6, 모든 효소들은 외인성 핵산 삽입으로 제공된다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 가진다. 더욱이, 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다.

[0121] 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 2,4-펜타디에노에이트의 1,3-부타디엔으로의 전환에 의해 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소를 포함한다. 따라서, 도 12의 임의의 2,4-펜타디에노에이트 경로는 도 4에서 시스 또는 트란스 2,4-펜타디에노에이트의 1,3-부타디엔으로의 전환에 의해 표시되는 바와 같이 1,3 부타디엔의 추가 생산의 기본을 이룬다.

[0122] 일부 실시예들에서, 본 발명은 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 여기

에서 비-천연 미생물 유기체는 기질에서 산물로 전환하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 예를들면, 톨루엔 경로 (도 1)에서, 이러한 기질에서 산물로는, 페닐알라닌에서 페닐피루베이트, 페닐피루베이트에서 페닐아세트알데히드, 페닐피루베이트에서 페닐아세테이트, 페닐아세트알데히드에서 페닐아세테이트, 페닐아세트알데히드에서 톨루엔, 및 페닐아세테이트에서 톨루엔으로 이루어진 군에서 선택된다. 스티렌 경로 (도 3)에서, 이러한 기질에서 산물은, 벤조일-CoA에서 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA, 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA에서 [(3-옥소-3-페닐프로피오닐)옥시] 포스포네이트, [(3-옥소-3-페닐프로피오닐)옥시] 포스포네이트에서 벤조일-아세테이트, 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA에서 벤조일-아세테이트, 벤조일-아세테이트에서 아세토페논, 아세토페논에서 1-페닐에탄올, 및 1-페닐에탄올에서 스티렌으로 이루어진 군에서 선택된다. 1,3-부타디엔 경로 (도 4)에서, 이러한 기질에서 산물은 트란스, 트란스-뮤코네이트에서 트란스-2,4-펜타디에노에이트, 시스, 트란스-뮤코네이트에서 트란스-2,4-펜타디에노에이트, 시스, 트란스-뮤코네이트에서 시스-2,4-펜타디에노에이트, 시스, 시스-뮤코네이트에서 시스-2,4-펜타디에노에이트, 트란스-2,4-펜타디에노에이트에서 1,3-부타디엔, 및 시스-2,4-펜타디에노에이트에서 1,3-부타디엔로부터 선택된다. 본 분야의 숙련가는 이것이 단지 예시적이고 본원에서 원하는 산물을 생산하기에 적합하고 기질에서 산물로의 전환에 적합한 활성이 적용될 수 있는 개시된 임의의 기질-산물 쌍들은 본원 교시에 따라 본 분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0123] 2,4-펜타디에노에이트 경로에서, 이러한 기질에서 산물은 피루베이트에서 4-히드록시-2-옥소발레레이트, 4-히드록시-2-옥소발레레이트에서 2-옥소펜테노에이트, 2-옥소펜테노에이트에서 2-히드록시펜테노에이트, 2-히드록시펜테노에이트에서 2,4-펜타디에노에이트, AKP에서 아세틸아크릴레이트, 아세틸아크릴레이트에서 4-히드록시펜트-2-에노에이트, 4-히드록시펜트-2-에노에이트에서 2,4-펜타디에노에이트, AKP에서 2,4-디옥소펜타노에이트, 2,4-디옥소펜타노에이트에서 4-히드록시-2-옥소발레레이트, AKP에서 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트, 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트에서 4-히드록시-2-옥소발레레이트, 오르니틴에서 2,4-디아미노펜타노에이트, 2,4-디아미노펜타노에이트에서 AKP, 알라닌에서 AKP, 및 기타 등에서 선택된다.

[0124] 또한 본 발명은, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 가지는 미생물 유기체로 구성되는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 상기 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 탈수효소를 포함한다 (참고 실시예 III 및 도 5, 단계 C). (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 포함하는 비-천연 미생물 유기체는 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 생성효소 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원이성화효소를 더욱 포함할 수 있다 (참고 실시예 III 및 도 5, 단계들 A 및 B). 따라서, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 탈수효소, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 생성효소 및 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원이성화효소를 포함한다.

[0125] 또한 본 발명은, p-톨루에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 p-톨루에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 p-톨루에이트 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 상기 p-톨루에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 또는 코리스메이트 분해효소를 포함한다 (참고 실시예 IV 및 도 6, 단계들 A-H). p-톨루에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더욱 포함할 수 있다 (도 5). (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는, 예를들면, 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 탈수효소, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 생성효소 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원이성화효소를 포함한다 (도 5).

[0126] 추가적으로 본 발명은, 테레프탈레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 테레프탈레이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 테레프탈레이트 경로를 가지는 미생물 유기체로 구성되는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 상기 테레프탈레이트 경로는 p-톨루에이트 메틸-일산소점가효소 환원효소; 4-카르복시벤질 알코올 탈수효소; 또는 4-카르복시벤질 알데히드 탈수효소를 포함한다 (참고 실시예 V 및 도 7). 테레프탈레이트 경로를 가지는 이러한 유기체는 p-톨루에이트 경로를 추가로 포함하고, 여기에서 p-톨루에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 또는 코리스메이트 분해효소를 포함한다 (참고 실시예 IV 및 V 그리고 도 6 및 7). 테레프탈레이트 경로 및 p-톨루에이트 경로를 가지는 이러한 비-천연 미생물유기체는 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부

시)포스포네이트 경로 (참고 실시예 III 및 도 5)를 더욱 포함할 수 있다. (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 예를들면, 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 탈수효소, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 생성효소 또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원이성화효소를 포함할 수 있다 (참고 실시예 III 및 도 5).

[0127] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 톨루엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 톨루엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 톨루엔 경로는 a) p-톨루에이트 탈탄산효소; b) p-톨루에이트 환원효소 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; c) p-톨루에이트 키나아제, (p-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; d) (p-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 포스포트란스-p-메틸벤조일라제, (p-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; 및 e) (p-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), p-메틸벤조일-CoA 환원효소 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소에서 선택되는경로 효소들 집합에서 선택된다.

[0128] 일부 실시예들에서, 본 발명은, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소 및 (2,4-디옥소부톡시) 포스포네이트 환원효소를 포함한다.

[0129] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 벤조에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 벤조에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 벤조에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수소효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및 코리스메이트 분해효소를 포함한다.

[0130] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 벤젠을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤젠 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 벤젠 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 벤젠 경로는 a) 벤조에이트 탈탄산효소; b) 벤조에이트 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소; c) 벤조에이트 키나아제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소; d) (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 포스포트란스벤조일라제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소; 및 e) (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 벤조일-CoA 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소에서 선택되는 경로 효소들 집합에서 선택된다.

[0131] 추가 실시예에서, 본 발명은, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, 톨루엔, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 또는 벤젠 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 여기에서 비-천연 미생물 유기체는 기질에서 산물로 전환하는 효소 또는 단백질을 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 예를들면, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로에서, 기질들 및 생성물은 글리세르알데히드-3-포스페이트 및 피루베이트에서 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트; 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트에서 C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트; 및 C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트에서 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트로 이루어진 군에서 선택된다 (참고 실시예 III 및 도 5). 또 다른 실시예에서, p-톨루에이트 경로는 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트에서 2,4-디히드록시-5-메틸-6-[포스포노옥시]메틸]옥산-2-카르복실레이트; 2,4-디히드록시-5-메틸-6-[포스포노옥시]메틸]옥산-2-카르복실레이트에서 1,3-디히드록시-4-메틸-5-옥소시클로헥산-1-카르복실레이트; 1,3-디히드록시-4-메틸-5-옥소시클로헥산-1-카르복실레이트에서 5-히드록시-4-메틸-3-옥소시클로헥스-1-엔-1-카르복실산; 5-히드록시-4-메틸-3-옥소시클로헥스-1-엔-1-카르복실산에서 3,5-디히드록시-4-메틸시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; 3,5-디히드록시-4-메틸시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트에서 5-히드록시-4-메틸-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; 5-히드록시-4-메틸-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트에서 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트에서 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸시클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트; 및 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸시클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트에서 p-톨루에이트로부터 선택되는 기질들 및 산물을 포함한다 (참고 실시예 IV 및 도 6). 또 다른 실시예에서, 테레프탈레이트 경로는, p-톨루에이트에서 4-카르복시벤질 알코올; 4-카르복시벤질 알코올에서 4-카르복시벤즈알데히드; 및 4-카르복시벤즈알데히드에서 테레

프탈산로부터 선택되는 기질들 및 산물을 포함한다 (참고 실시예 V 및 도 7). 또 다른 실시예에서, 톨루엔 경로는, *p*-톨루에이트에서 톨루엔; *p*-톨루에이트에서 *p*-메틸 벤조일-CoA; *p*-메틸 벤조일-CoA에서 *p*-메틸벤조일옥시포스페이트에서 *p*-메틸벤즈알데히드; *p*-메틸벤조일옥시 포스포네이트에서 *p*-메틸벤즈알데히드; 및 *p*-메틸벤즈알데히드에서 톨루엔로부터 선택되는 기질들 및 산물을 포함한다 (참고 실시예 VII 및 도 11). 또 다른 실시예에서, 2H4OP 경로는, 에리트로스-4-포스페이트에서 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트; 및 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트에서 2H4OP로부터 선택되는 기질들 및 산물을 포함한다 (참고 실시예 VI 및 도 8). 또 다른 실시예에서, 벤조에이트 경로는, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트에서 2,4-디히드록시-6-[(포스포노옥시)메틸]옥산-2-카르복실레이트; 2,4-디히드록시-6-[(포스포노옥시)메틸]옥산-2-카르복실레이트에서 1,3-디히드록시-5-옥소시클로헥산-1-카르복실레이트; 1,3-디히드록시-5-옥소시클로헥산-1-카르복실레이트에서 5-히드록시-3-옥소시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; 5-히드록시-3-옥소시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트에서 3,5-디히드록시시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 3,5-디히드록시시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트에서 5-히드록시-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; 5-히드록시-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트에서 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트; 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트에서 벤조에이트로부터 선택되는 기질들 및 산물을 포함한다 (참고 실시예 VI 및 도 9). 또 다른 실시예에서, 벤젠 경로는, 벤조에이트에서 벤젠; 벤조에이트에서 벤조일-CoA, (벤조일옥시)포스포네이트 또는 벤즈알데히드; 벤조일-CoA에서 (벤조일옥시)포스포네이트 또는 벤즈알데히드; (벤조일옥시)포스포네이트에서 벤즈알데히드; 및 벤즈알데히드에서 벤젠으로부터 선택되는 기질들 및 산물을 포함한다. 본 분야의 숙련가는 이것이 단지 예시적이고 본원에서 원하는 산물을 생산하기에 적합하고 기질에서 산물로의 전환에 적합한 활성이 적용될 수 있는 개시된 임의의 기질-산물 쌍들은 본원 교시에 따라 본 분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0132] 본원에 기재된 바와 같이, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 도 5에 예시된다 (참고 실시예 III). 따라서, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하는 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 가지는 미생물 유기체 외에도, 추가로 본 발명은 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 미생물 유기체는 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 중간체, 예를들면, 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 또는 C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트를 생산한다. 비슷하게, 또한 본 발명은 *p*-톨루에이트를 생산하는 *p*-톨루에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 여기에서 비-천연 미생물 유기체는 *p*-톨루에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 미생물 유기체는 *p*-톨루에이트 경로 중간체, 예를들면, 2,4-디히드록시-5-메틸-6-[(포스포노옥시)메틸]옥산-2-카르복실레이트, 1,3-디히드록시-4-메틸-5-옥소시클로헥산-1-카르복실레이트, 5-히드록시-4-메틸-3-옥소시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 3,5-디히드록시-4-메틸시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5-히드록시-4-메틸-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 또는 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸시클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트를 생산한다. 또한, 본 발명은 태레프탈레이트 경로 효소를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 추가로 제공하며, 여기에서 미생물 유기체는 태레프탈레이트 경로 중간체, 예를들면, 4-카르복시벤질 알코올 또는 4-카르복시벤즈알데히드를 생산한다.

[0133] 비슷하게, 또한 본 발명은 톨루엔을 생산하는 톨루엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 비-천연 미생물 유기체는 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 미생물 유기체는 톨루엔 경로 중간체, 예를들면, *p*-메틸벤조일-CoA, (*p*-메틸벤조일옥시)포스포네이트, 또는 *p*-메틸벤즈알데히드를 생산한다.

[0134] 비슷하게, 또한 본 발명은 벤젠을 생산하는 벤젠 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 비-천연 미생물 유기체는 벤젠 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 미생물 유기체는 벤젠 경로 중간체, 예를들면, 벤조일-CoA, (벤조일옥시)포스포네이트, 및 벤즈알데히드를 생산한다 (도 10).

[0135] 비슷하게, 또한 본 발명은 벤조에이트를 생산하는 벤조에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 비-천연 미생물 유기체는 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 미생물 유기체는 벤조에이트 경로 중간체, 예를들면, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 2,4-디히드록시-6-[(포스포노옥시)메틸]옥산-2-카르복실레이트, 1,3-디히드록시-5-옥소시클로헥산-1-카르복실레이트

이트, 5-히드록시-3-옥소시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 3,5-디히드록시시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5-히드록시-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5-[1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 및 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]시클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트를 생산한다 (도 9).

[0136] 따라서, 본 발명은 효소 또는 단백질을 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 효소 또는 단백질은 도 1-11에 도시된 바와 같이 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로의 기질들 및 산물을 전환한다.

[0137] 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체로 본원이 일반적으로 기재되지만, 본 발명은, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로의 중간체를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 가지는 비-천연 미생물 유기체를 추가로 제공한다는 것을 이해하여야 한다. 예를들면, 본원에 기재된 바와 같이, 톨루엔, 벤젠, 스티렌, 및 1,3-부타디엔 경로들은 도 1-23에서 예시된다. 따라서, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로들은 도 1-23에서 예시된다. 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 추가로 제공하며, 상기 미생물 유기체는 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체 외에도, 본 발명은 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 효소 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 추가로 제공하며, 상기 미생물 유기체는 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 중간체, 예를들면, 폐닐파루베이트, 폐닐아세트알데히드, 폐닐아세테이트, 3-옥소-3-페닐프로파오닐-CoA, [(3-옥소-3-페닐프로파오닐)옥시] 포스포네이트, 벤조일-아세테이트, 아세토페논, 1-페닐에탄올, DXP, 2ME4P, 벤조일-CoA, (벤조일옥시)포스포네이트, 벤즈알데히드, 트란스-2,4-펜타디에노에이트, 및 시스-2,4-펜타디에노에이트, 및 도 6 및 9에 도시된 임의의 시킴산 경로 중간체를 생산한다.

[0138] 도 1-11의 경로들을 포함하여 실시예들에서 기술되고 도면들에서 예시되는 본원에 개시된 임의의 경로들은 필요하다면 임의의 경로 중간체 또는 산물을 생산하는 비-천연 미생물 유기체를 생성하기 위하여 적용될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 본원에 기재된 바와 같이, 중간체를 생산하는 이러한 미생물 유기체는 하류 경로 효소들을 발현하는 다른 미생물 유기체와 조합되어 원하는 산물을 생산할 수 있다. 그러나, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 중간체를 생산하는 비-천연 미생물 유기체는 원하는 산물로서 중간체를 생산하기 위하여 적용될 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0139] 본 발명은, 대사 반응, 반응물 또는 그 산물에 대한 일반적인 참조로, 또는 언급된 대사 반응, 반응물 또는 산물과 연관된 효소, 촉매하는 효소, 또는 연관된 단백질을 암호화하는 하나 이상의 핵산 또는 유전자에 대한 구체적인 참조로 기술된다. 본원에 명확하게 언급되어 있지 않은 한, 본 분야의 숙련가는 반응에 대한 언급이 반응물 및 반응의 산물에 대한 언급으로 이루어진다는 것을 이해할 것이다. 마찬가지로, 본원에서 명확하게 언급되지 않은 한, 반응물 또는 산물에 대한 언급은 또한 반응을 지칭하며, 이들 대사적 구성 요소들 중 임의의 것에 대한 언급 역시 언급된 반응, 반응물 또는 산물을 촉매하는 효소 또는 관여하는 단백질을 암호화하는 유전자 또는 유전자들을 지칭한다. 이와 같이, 대사적 생화학, 효소학 및 계놈학의 잘 알려진 분야에서 본다면, 유전자 또는 암호화 핵산에 대한 본원의 언급이 반응을 촉매하는 효소 또는 관련 단백질을 암호화하는 대응체뿐만 아니라 반응의 반응물 및 산물에 대한 언급으로 구성된다.

[0140] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 하나 이상의 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에

노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로들에 관여하는 하나 이상의 효소들 또는 단백질들을 암호화하는 발현 가능한 핵산을 도입하여 제조된다. 생합성을 위하여 선택된 숙주 미생물 유기체에 따라, 일부 또는 전부의 특정 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로를 위한 핵산이 발현될 수 있다. 예를들면, 선택한 숙주가 원하는 생합성 경로에 대한 하나 이상의 효소 또는 단백질이 결여된 경우, 결여된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대한 발현가능한 핵산을 이후 외인성 발현을 위해 숙주에 도입한다. 달리, 선택한 숙주가 일부 경로 유전자들을 내인성 발현하지만 다른 유전자들은 결여된 경우, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성을 달성하기 위해 결여된 효소(들) 또는 단백질(들)에 대한 암호화 핵산이 요구된다. 따라서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 원하는 생합성 경로를 획득하기 위해 외인성 효소 또는 단백질 활성을 도입함으로써 제조하거나, 또는 원하는 생합성 경로는, 하나 이상의 내인성 효소 또는 단백질과 함께, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔와 같은 원하는 산물을 생산하는, 하나 이상의 외인성 효소 또는 단백질 활성을 도입함으로써, 획득할 수 있다.

[0141] 숙주 미생물 유기체는, 예컨대 세균, 효모, 진균 및 발효 공정에 적용될 수 있는 다양한 미생물로부터 선택할 수 있으며, 비-천연 미생물 유기체는 이들로부터 제조될 수 있다. 예시적인 박테리아로는 에스케리키아 콜라이, 클렙시엘라 옥시토카 (*Klebsiella oxytoca*), 안에어로비오스파릴룸 숙시니시프로두센스 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 액티노바실러스 숙시노케네스 (*Actinobacillus succinogenes*), 만하이미아 숙시니시프로두센스 (*Mannheimia succiniciproducens*), 리조븀 에틀리 (*Rhizobium etli*), 바실러스 섭틸리스, 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 글루코노박터 옥시단스 (*Gluconobacter oxydans*), 자이모모나스 모빌리스 (자이모모나스 모빌리스), 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*), 락토바실러스 플라타툼 (*Lactobacillus plantarum*), 스트렙토마이세스 코엘리콜러 (*Streptomyces coelicolor*), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 (*Clostridium acetobutylicum*), 슈도모나스 플루오레센스 (*Pseudomonas fluorescens*) 및 슈도모나스 푸티타 (*Pseudomonas putida*)로부터 선택되는 종을 포함한다. 효모 또는 진균의 예로는, 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 시조사카로마이세스 품베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 클루베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*), 클루베로마이세스 마르시아누스 (*Kluyveromyces marxianus*), 아스퍼진러스 테레우스 (아스퍼진러스 테레우스), 아스퍼진러스 나이거 (*Aspergillus niger*), 피키아 패스토리스 (*Pichia pastoris*), 리조푸스 아리주스 (*Rhizopus arrhizus*), 리조부스 오리제 (*Rhizobus oryzae*) 등으로부터 선택되는 종을 포함한다. *E. coli*는 유전자 조작에 적합한 잘 특정화된 미생물이기 때문에, 특히 유용한 숙주 미생물이다. 그 외 특히 유용한 숙주 유기체는 사카로마이세스 세레비지애와 같은 효모이다. 임의의 적합한 미생물 숙주 유기체를 사용하여, 원하는 산물을 생산하도록 대사성 및/또는 유전자 변형을 도입할 수 있다는 것으로 이해된다.

[0142] 선택된 숙주 미생물 유기체의 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로 성분들에 따라, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 최소한 하나의 외인성 발현 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로들에 대한 모든 암호화 핵산을 포함한다. 예를들면, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성은 대응되는 암호화 핵산의 외인성 발현을 통해 경로 효소 또는 단백질이 결핍된 숙주에서 확립할 수 있다. 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로의 모든 효소들 또는 단백질들이 결핍된 숙주에서, 상기 경로의 모든 효소 또는 단백질의 외인성 발현을 포함할 수 있지만, 경로의 모든 효소 또는 단백질은 숙주가 하나 이상의 경로 효소 또는 단백질을 포함하더라도 발현시킬 수 있는 것으로 이해된다. 예를들면, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생산 경로에서, 페닐알라닌 아미노전이효소 및/또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 페닐피루베이트 탈

탄산효소, 페닐아세트알데히드 탈수소효소 및/또는 산화효소, 페닐피루베이트 산화효소, 페닐아세테이트 탈탄산효소, 페닐아세트알데히드 탈카보닐효소, 페닐알라닌 벤젠-분해효소, 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 아세토페논 환원효소, 1-페닐에탄올 탈수효소, 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로피오닐라제, 벤조일-아세테이트 키나아제, 트란스, 트란스-뮤코네이트 탈탄산효소, 시스, 트란스-뮤코네이트 시스-탈탄산효소, 시스, 트란스-뮤코네이트 트란스-탈탄산효소, 시스, 시스-뮤코네이트 탈탄산효소, 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소, 및 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소와 같은 모든 효소들 또는 단백질들의 외인성 발현이 포함될 수 있다.

[0143] 예를들면, *p*-톨루에이트 경로에서 모든 효소, 예를들면 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수소효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및 코리스메이트 분해효소가 포함될 수 있다. 또한, 테레프탈레이트 경로에서 모든 효소, 예를들면 *p*-톨루에이트 메틸-일산소첨가효소 환원효소; 4-카르복시벤질 알코올 탈수소효소; 및 4-카르복시벤질 알데히드 탈수소효소가 포함될 수 있다. 또한, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로에서 모든 효소, 예를들면 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 탈수효소, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 생성효소 및 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원이성화효소가 포함될 수 있다. 비슷하게, 톨루엔 경로에서 모든 효소, 예를들면 *p*-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, *p*-톨루에이트 환원효소, *p*-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소, *p*-메틸벤조일-CoA 환원효소, *p*-톨루에이트 탈탄산효소, 포스포트란스-*p*-메틸벤조일라제, (*p*-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소 (탈인산), 및 *p*-톨루에이트 키나아제가 포함될 수 있다.

[0144] 비슷하게, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로에서 모든 효소, 예를들면 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소 및 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소가 포함된다.

[0145] 비슷하게, 벤조에이트 경로에서 모든 효소, 예를들면 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소, 3-데히드로퀴네이트 생성효소, 3-데히드로퀴네이트 탈수효소, 시키메이트 탈수소효소, 시키메이트 키나아제, 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소, 코리스메이트 생성효소, 및 코리스메이트 분해효소가 포함된다.

[0146] 비슷하게, 벤젠 경로에서 모든 효소, 예를들면 벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, 벤조에이트 환원효소, 벤즈알데히드 탈카보닐효소, 벤조일-CoA 환원효소, 벤조에이트 탈탄산효소, 포스포트란스벤조일라제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소 (탈인산), 및 벤조에이트 키나아제가 포함된다.

[0147] 본원에 제공되는 교시 및 지침 하에, 본 분야의 기술자라면, 발현가능한 형태로 도입되는 암호화 핵산의 수는, 적어도, 선택된 숙주 미생물 유기체의 톨루엔, 벤젠, *p*-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 결합성에 대응하다는 것을 이해할 수 있다. 따라서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 본원에 개시된 톨루엔, 벤젠, *p*-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로를 구성하는 효소들 또는 단백질들을 암호화하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8종, 즉, 최대 모든 핵산까지를 가질 수 있다. 일부 실시예들에서, 또한 비-천연 미생물 유기체는 톨루엔, 벤젠, *p*-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성을 촉진하거나 최적화하거나 또는 숙주 미생물 유기체에 기타 유용한 기능을 부여하는 기타 유전자 변형을 포함할 수 있다. 이러한 기타 기능성의 하나로는, 예를들면, 하나 이상의 톨루엔, 벤젠, *p*-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 전구체들 예를들면 페닐알라닌, 페닐피루베이트, 페닐아세트알데히드, 페닐아세테이트, 벤조일-CoA, 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA, [(3-옥소-3-페닐프로피오닐)옥시]포스포네이트, 벤조일 아세테이트, 아세토페논, 1-페닐에탄올, 트란스, 트란스-뮤코네이트, 시스, 트란스-뮤코네이트, 시스, 시스-뮤코네이트, 트란스-2,4-펜타디에노에이트, 시스-2,4-펜타디에노에이트, 4-히드록시-2-옥소발레레이트, 2-옥소펜테노에이트, 2-히드록시펜테노에이트, 2,4-디히드록시펜테노에이트, 4-히드록시펜트-2-에노에이트, 2,4-디아미노펜테노에이트, AKP, 아세틸아크릴레이트, 2,4-디옥소펜테노에이트, 2-히드록시-4-옥소-펜테노에이트, 2-아미노-4-히드록시펜테노에이트, 3,5-디아미노펜테노에이트, 5-아미노펜트-2-에노에이트, 3-아미노-5-옥소펜테노에이트, 5-옥소펜트-2-에노에이트, 5-히드록시펜트-2-에노에이트, 3-아미노-5-히드록시펜테노에이트, 3-HP-CoA, 아크릴로일-CoA, 3-옥소-5-히드록시펜테노일-CoA, 3-옥소-5-히드록시펜테노에이트, 3,5-디히드록시펜테노에이트, 3,5-디히드록시펜테노일-CoA, 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA, 2,4-펜타디에노일CoA, 3-옥소

펜트-4-에노일-CoA, 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA, 3-옥소펜트-4-에노에이트, 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 글리세르알데히드-3-포스페이트, 피루베이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 또는 p-톨루에이트의 합성을 증대하는 것이다. 또한, 본원에 기재된 바와 같이, 단일 유기체에 p-톨루에이트 (도 6), 테레프탈레이트 (도 7) 톨루엔 (도 11) 및 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트 (도 5), 필요하다면, 또는 2H4OP (도 8), 벤조에이트 (도 9) 및 벤젠 (도 10)을 생산하는 경로와 같이 다중 경로들이 포함될 수 있다.

[0148] 일반적으로, 숙주 미생물 유기체는, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로의 전구체를, 자연적으로 생산되는 분자로서 또는 숙주 미생물 유기체에 의해 자연적으로 생산되는 전구체의 생산 증가 또는 원하는 전구체의 데 노보 생산을 제공하는 조작된 산물로서 생산하도록, 선택된다. 예를들면, 시스, 시스-뮤코네이트는 *E. coli*와 같은 숙주 유기체에서 자연적으로 생산된다. 또 다른 예시로써, 글리세르알데히드-3-포스페이트 및 포스포에놀피루베이트는 *E. coli*와 같은 숙주 유기체에서 자연적으로 생산된다. 숙주 유기체는, 본원에 기재된 바와 같이 전구체 생산을 증가시키도록 조작될 수 있다. 또한, 원하는 전구체를 생산하도록 조작된 미생물 유기체는 숙주 유기체로 사용되고 추가로 조작되어 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로의 효소를 또는 단백질들을 발현시킬 수 있다.

[0149] 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 합성할 수 있는 효소적 능력을 가지는 숙주로부터 제조된다. 본 특정 실시예에서, 본 유기체는 예를들면, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생성 방향으로 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 반응들을 진행시키도록 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 산물을 합성 또는 축적하도록 이용될 수 있다. 합성 또는 축적 증가는, 예를들면, 전술한 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 효소를 또는 단백질들 중 하나 이상을 암호화하는 핵산의 과다발현에 의해 달성될 수 있다. 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로 효소들 또는 단백질들을 과다 발현은, 예를들면 내인성 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 또는 이종의 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 이루어질 수 있다. 따라서, 천연 유기체는, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로의 효소 또는 효소들 및/또는 단백질 또는 단백질들의 과다 발현은, 예를들면 내인성 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 또는 이종의 유전자 또는 유전자들의 외인성 발현을 통해, 이루어질 수 있다. 따라서, 천연 유기체는, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 생산하는 본 발명의 비-천연 미생물 유기체로 쉽게 제조될 수 있다. 또한, 비-천연 유기체는 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로의 효소의 활성을 증가시키게 되는, 내인성 유전자의 돌연변이 유발에 의해, 제조할 수 있다.

[0150] 특히 유용한 실시예에서, 암호화 핵산의 외인성 발현을 이용한다. 외인성 발현은 숙주에 발현 및/또는 조절인자를 맞춤식으로 조절하는 능력을 부여하며, 사용자에 의해 조절되는 바람직한 발현 수준을 달성하는 적용성을 부여한다. 그러나, 또한, 내인성 발현은, 다른 실시예들에서, 유도성 프로모터나 다른 조절 인자에 연결되었을 때, 부정적인 조절 작동자의 제거 또는 유전자의 프로모터 도입에 의해서와 같이, 이용될 수 있다. 따라서, 천연적인 유도성 프로모터를 가진 내인성 유전자는, 적정 유도제를 제공함으로써, 상향-조절시킬 수 있으며, 또는 내인성 유전자의 조절 부위를 유도성 조절 인자를 도입함으로써 조작하여, 바람직한 시기에 내인성 유전자의 발현 증가를 조절할 수 있다. 마찬가지로, 유도성 프로모터를 비-천연 미생물 유기체에 도입되는 외인성 유전자에

대한 조절 요소로서 포함시킬 수 있다.

- [0151] 본 발명의 방법에서, 하나 이상의 임의의 외인성 핵산이 미생물 유기체에 도입되어 본 발명의 비-천연 미생물 유기체를 제조할 수 있다는 것을 이해할 수 있다. 예를들면, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로를 미생물 유기체에 부여하기 위하여 핵산이 도입된다. 달리, 암호화 핵산이 도입되어 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 능력을 부여하기 위하여 필요한 일부 반응들을 촉매하는 생합성 능력을 가지는 중간체 미생물 유기체를 제조한다. 예를들면, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는, 툴루엔 경로에서 페닐알라닌 아미노전이효소 및/또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민) 및 페닐피루베이트 탈탄산효소, 페닐알라닌 아미노전이효소 및/또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민) 및 페닐아세트알데히드 탈수소효소 및/또는 산화효소, 페닐알라닌 아미노전이효소 및/또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민) 및 페닐피루베이트 산화효소, 페닐피루베이트 산화효소 및 페닐아세테이트 탈탄산효소, 페닐알라닌 아미노전이효소 및/또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민) 및 페닐아세테이트 탈탄산효소, 페닐알라닌 아미노전이효소 및/또는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민) 및 페닐아세트알데히드 탈수소효소, 페닐피루베이트 탈탄산효소 및 페닐아세테이트 탈탄산효소, 페닐피루베이트 탈탄산효소 및 페닐아세트알데히드 탈카보닐효소, 및 페닐피루베이트 탈탄산효소 및 페닐아세테이트 탈탄산효소의 조합과 같이 원하는 효소들 또는 단백질들을 암호화하는 최소한 2종의 외인성 핵산을 가진다. 비슷하게, 스티렌 경로에서 최소한 2종의 외인성 핵산의 조합은 벤조일-CoA 아세틸전이효소 및 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소, 벤조일-CoA 아세틸전이효소 및 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 벤조일-CoA 아세틸전이효소 및 아세토페논 환원효소, 벤조일-CoA 아세틸전이효소 및 1-페닐에탄올 탈수효소, 벤조일-CoA 아세틸전이효소 및 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로피오닐라제, 벤조일-CoA 아세틸전이효소 및 벤조일-아세테이트 키나아제, 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소 및 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소 및 아세토페논 환원효소, 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소 및 1-페닐에탄올 탈수효소, 및 기타 등을 포함한다.
- [0152] 비슷하게, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로에서, 발현 효소들의 조합은 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 탈수효소 및 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 생성효소, 또는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 탈수효소 및 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원이성화효소의 조합일 수 있다. p-톨루에이트 경로에서, 발현 효소들의 조합은 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소 및 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 키나아제 및 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 시키메이트 키나아제 및 시키메이트 탈수효소, 및 기타 등의 조합일 수 있다. 비슷하게, 테레프탈레이트 경로에서, 발현 효소들의 조합은 p-톨루에이트 메틸-일산소첨가효소 환원효소 및 4-카르복시벤질 알코올 탈수효소; 또는 4-카르복시벤질 알코올 탈수효소 및 4-카르복시벤질 알데히드 탈수효소, 및 기타 등일 수 있다. 따라서, 생합성 경로에서 둘 이상의 효소들 또는 단백질들의 임의의 조합이 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에 포함될 수 있다는 것을 이해할 수 있다.
- [0153] 유사하게, 생합성 경로의 3 이상의 효소 또는 단백질의 임의 조합이, 원하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 원하는 산물의 생산으로 귀결되는 한, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에 포함될 수 있다는 것을 이해할 수 있다. 원하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 원하는 산물의 생산으로 귀결되는 한, 3종의 효소들 조합은, 예를들면, 3-데히드로퀴네이트 생성효소, 시키메이트 탈수효소 및 시키메이트 키나아제; 시키메이트 키나아제, 코리스메이트 생성효소 및 코리스메이트 분해효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소, 코리스메이트 생성효소 및 코리스메이트 분해효소, 및 기타 등을 포함한다.
- [0154] 유사하게, 본원에 기술된 경로에 따라, 생합성 경로의 4, 5, 6, 또는 그 이상의 수의 효소들 또는 단백질들의 임의 조합이, 원하는 생합성 경로의 효소 및/또는 단백질의 조합이 대응되는 원하는 산물의 생산으로 귀결되는 한, 필요에 따라 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에 포함될 수 있다.
- [0155] 본원에 기재된 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 외에도, 또한 본 발명의 비-천연 미생물 유기체 및 방법은 상호 및 본 분야에서 알려진 다른 미

생물 유기체 및 방법과의 다양한 조합으로 다른 경로를 통하여 산물을 생합성을 이를 수 있다. 예를들면, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생산체들 이용 외에 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 생산하는 하나의 대안으로는 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 중간체를 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔으로 전환할 수 있는 다른 미생물 유기체를 부가하는 것이다. 이러한 절차의 하나는, 예를들면, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔으로 전환할 수 있는 다른 미생물 유기체를 부가하는 것이다. 이러한 절차의 하나는, 예를들면, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 중간체를 생산하는 미생물 유기체 발효를 포함한다. 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 중간체는 이후 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 중간체를 톤루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 중간체는 제2 미생물 유기체의 기질로 사용될 수 있다. 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 중간체는 제2 유기체의 다른 배양물에 직접 첨가하거나 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 중간체 생산체들의 원 배양물을 예를들면 세포 분리에 의해 이들 미생물 유기체를 고갈시킨 다음, 발효액에 제2 유기체를 첨가하여, 중간 경제 단계 없이 최종 산물을 생산할 수 있다.

[0156] 다른 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체 및 방법은 다양한 서브경로들로 조합되어 예를들면, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성을 달성할 수 있다. 이들 실시예들에서, 본 발명의 바람직한 산물의 생합성 경로를 여러 미생물 유기체들로 분산시키고, 이러한 여러 미생물 유기체를 공-배양하여 최종 산물을 생산할 수 있다. 이러한 생합성 공정에서, 하나의 미생물 유기체의 산물은 최종 산물이 합성될 때까지 제2 유기체의 기질이다. 예를들면, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔의 생합성은 하나의 경로 중간체를 다른 경로 중간체 또는 산물로 전환할 수 있는 생합성 경로들을 가지는 미생물 유기체를 제작하여 달성된다. 달리, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔은 동일 용기에서 2 유기체들을 이용한 공-배양 또는 공-발효를 통하여 미생물 유기체로부터 생합성적으로 생산될 수 있고, 이때 제1 미생물 유기체는 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 중간체를 생산하고 제2 미생물 유기체는 중간체를 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔로 전환시킨다.

[0157] 본원에 제시된 교시 및 지침으로, 본 기술 분야의 당업자라면, 다른 미생물 유기체와, 서브경로를 가진 다른 비-천연 미생물 유기체의 공-배양과, 및 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 생산하기 위한 본 분야에 잘 공지된 다른 화학 공정 및/또는 생화학 공정의 조합과 더불어, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체 및 방법에 대한 매우 다양한 조합 및 변경이 존재함을 이해할 것이다.

[0158] 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-

옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 효소 또는 단백질에 대한 암호화 핵산의 소스는, 예를들면, 상기 암호화된 유전자 산물이 언급된 반응을 촉매할 수 있는 임의의 종을 포함할 수 있다. 이러한 종으로는, 비제한적으로, 고세균 및 진정세균을 비롯한 세균, 및 효모, 식물, 곤충, 동물 및 인간을 포함한 포유류를 비롯한 진핵생물 등의 원핵 생물 및 진핵 생물 둘다를 포함하나, 이로 한정되지 않는다. 이러한 원천의 예시적 종들은, 예를들면, 이러한 소스의 예시적인 종으로는, 예를들면 에스케리치아 콜라이, 미코박테리움 투베르콜로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*), 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 바실러스 섭틸리스, 시네코시스터스 종, 아라비돕시스 탈리아나 (*Arabidopsis thaliana*), 자이모모나스 모빌리스, 클렙시엘라 옥시토카, 살모넬라 티피무리움, 살모넬라 티피, 락토바쿨루스 콜리노이데스 (*Lactobacillus collinoides*), 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*), 클로스트리듐 파스테우라눔(*Clostridium pasteuranum*), 시트로박터 프레운디이(*Citrobacter freundii*), 클로스트리듐 부티리쿰(*Clostridium butyricum*), 로세부리아 이눌리니보란스, 술폴로부스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 시노리조븀 프레디이(*Sinorhizobium fredii*), 헬리코박터 펠로리(*Helicobacter pylori*), 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*), 헤모필루스 플루엔자 (*Haemophilus influenzae*), 에르위니아 크리산테미(*Erwinia chrysanthemi*), 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 두날리엘라 살리나, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*), 사카로마이세스 세레비자애, 아스페질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 뉴모시스터스 카리니이 (*Pneumocystis carinii*), 스트렙토마이세스 코엘리콜러, 버크홀데리아 (*Burkholderia*), 알칼리게네스(*Alcaligenes*), 슈도모나스, 신고모나스 및 코마모나스 속 유래의 종들, 예를들면, 코마모나스 테스토스테로니(*Comamonas testosteroni*), 뿐만 아니라 본원에 기술되거나 또는 대응되는 유전자에 대한 소스 유기체로서 이용가능한 예시적인 다른 종들을 포함한다. 그러나, 395종의 미생물 계놈 및 다양한 효모, 진균, 식물 및 포유류 계놈을 포함하여, 현재 550종 이상에 대한 이용가능한 완전한 계놈 서열을 이용하여 (NCBI 등의 공공 데이터베이스에 이용가능한 것의 절반 이상), 공지 유전자의 예컨대 상동체, 오르소로그, 파라로그 및 비-오르소로그 유전자 치환, 및 유기체들 간의 유전자 변형의 교환을 포함하여, 관련 또는 비관련 종들에서의 하나 이상의 유전자에 대한 필수적인 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 활성을 암호화하는 유전자의 동정은 일상적이며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 즉, 에스케리키아 콜라이 등의 특정 유기체에 대해, 본원에 기술된 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성은, 예컨대 동일하지 않지만 유사한 언급된 반응을 대체하는 대사 반응을 촉매하는 무관한 종 유래의 파라로그 또는 파라로그들의 외인성 발현에 의해, 숙주 종에 제공될 수 있다. 여러가지 유기체들 간에 대사 네트워크에 대한 일정한 차이가 존재하기 때문에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 상이한 유기체들간의 실제 유전자 용법은 상이할 수 있다. 그러나, 본원에 제시된 교시 및 지침 하에, 본 분야의 숙련가라면, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 합성할 대상 종에서 미생물 유기체를 구축하기 위해, 본 발명의 내용과 방법들을 본원에 예시된 사항에 대한 동족의 대사적 변이를 이용하여 모든 미생물 유기체에 적용할 수 있음을 이해할 것이다.

- [0159] 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로의 대안 경로가 무관한 종에 존재하는 경우 등의 일부 경우에, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성은, 예컨대 동일하지 않지만 유사한 언급된 반응을 대체하는 대사 반응을 촉매하는 무관한 종 유래의 파라로그 또는 파라로그들의 외인성 발현에 의해, 숙주 종에 제공될 수 있다. 여러가지 유기체들 간에 대사 네트워크에 대한 일정한 차이가 존재하기 때문에, 당해 기술 분야의 당업자라면, 상이한 유기체들간의 실제 유전자 용법은 상이할 수 있다. 그러나, 본원에 제시된 교시 및 지침 하에, 본 분야의 숙련가라면, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 합성할 대상 종에서 미생물 유기체를 구축하기 위해, 본 발명의 내용과 방법들을 본원에 예시된 사항에 대한 동족의 대사적 변이를 이용하여 모든 미생물 유기체에 적용할 수 있음을 이해할 것이다.

- [0160] 비-천연 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생산 숙주의 구축 방법 및 발현 수준을 테스트하는 방법은 예를들면 본 기술 분야에 공지된 재조합 및 검출 방법에 의해 수행할 수 있다. 이러한 방법은, 예를들면, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).에 언급된 내용에서 볼 수

있다.

[0161] 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔의 생산 경로에 참여하는 외인성 핵산 서열은, 비제한적인 예로서, 접합, 전기충격, 화학적 형질전환, 형질전이, 형질감염 및 초음파 형질전환 등의 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 기법을 이용하여 숙주 세포로 안정적으로 또는 일시적으로 도입할 수 있다. 에스케리키아 콜라이 또는 다른 원핵 생물 세포에서의 외인성 발현을 위해, 진핵 생물의 핵산의 유전자 또는 cDNA내 일부 핵산 서열은 N-말단 미토콘드리아 신호 또는 다른 타겟 신호와 같은 타겟 신호를 암호화할 수 있으며, 상기 신호는 필요에 따라 원핵 생물 숙주 세포에 형질전환시키기 전에 제거할 수 있다. 예컨대, 미토콘드리아 리더 서열을 제거하면 에스케리키아 콜라이에서의 발현 증가로 이어진다 (Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005)). 효모 또는 다른 진핵 생물 세포에서의 외인성 발현을 위해, 유전자를 리더 서열 부가 없이 세포질에서 발현시키거나, 또는 숙주 세포에 적합한 미토콘드리아 표적 또는 분비 신호 등의 적합한 표적 신호를 부가함으로써, 미토콘드리아 또는 다른 기관으로 또는 분비되도록 타겟화될 수 있다. 즉, 타겟팅 서열을 제거하거나 포함하기 위한 핵산 서열에 대한 적절한 변형은 바람직한 특성 부여를 위해 외인성 핵산 서열에 통합될 수 있는 것으로 이해된다. 아울러, 유전자는 단백질의 최적화된 발현을 달성하기 위해, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 기법으로 코돈 최적화를 수행할 수 있다.

[0162] 발현 벡터 또는 벡터들은, 숙주 유기체에 기능하는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본원에 예시된 바와 같이 하나 이상의 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로 암호화 핵산을 포함하도록 구축할 수 있다. 본 발명의 미생물 숙주 유기체에서 이용하기 위해 적용가능한 발현 벡터는, 예컨대, 플라스미드, 과지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜 및 숙주 염색체내로의 안정적인 삽입을 위해 작동가능한 벡터 및 선택 서열 또는 마커를 포함하는 인공 염색체를 포함한다. 또한, 상기 발현 벡터는 하나 이상의 선택성 마커 유전자와 적합한 발현 조절 서열을 포함할 수 있다. 예를들면 항생제 또는 독소에 대한 내성, 보완적인 영양요구성 결핍, 또는 배양 배지에 없는 주요 영양원의 공급을 제공하는, 선택성 마커 유전자도 포함할 수 있다. 발현 조절 서열은 당해 기술 분야에 널리 공지된 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 전사 인핸서, 전사 종결자 등을 포함할 수 있다. 2 이상의 외인성 코딩 핵산을 공동으로 발현시켜야 하는 경우, 두가지 핵산을 예를 들어 하나의 발현 벡터 또는 개별 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 하나의 벡터에서 발현시키는 경우, 코딩 핵산을 하나의 공통 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결시키거나 또는 하나의 유도성 프로모터 및 하나의 구성적 프로모터와 같은 여러가지 발현 조절 서열에 연결시킬 수 있다. 대사 또는 합성 경로에 관여하는 외인성 핵산 서열의 형질전환은 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법으로 검증할 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어 핵산 분석, 예를 들어 mRNA의 노던 븍팅 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭, 또는 유전자 산물의 발현에 대한 면역블럿팅, 또는 도입된 핵산 서열 또는 이의 상응하는 유전자 산물의 발현을 테스트하기 위한 기타 적합한 분석 방법을 포함한다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 외인성 핵산이 바람직한 산물을 생산하는데 충분한 양으로 발현됨을 알 것이며, 발현 수준을 당해 기술 분야에 널리 공지되고 본원에 개시된 방법을 이용하여 충분한 발현이 이루어지도록 최적화할 수 있음을 또한 알 것이다.

[0163] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 톨루엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 톨루엔 생산 방법을 제공한다. 본 톨루엔 경로는 톨루엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 톨루엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 톨루엔 경로는 도 1에 도시된 대안 경로들에 표기된 바와 같이 (A) 1) 하나 또는 양자의 폐닐알라닌 아미노전이효소 및 폐닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 폐닐피루베이트 탈탄산효소, 및 3) 폐닐아세트알데히드 탈카보닐효소; (B) 1) 하나 이상의 폐닐알라닌 아미노전이효소 및 폐닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 폐닐피루베이트 탈탄산효소, 3) 하나 이상의 폐닐아세트알데히드 탈수소효소 및 폐닐아세트알데히드 산화효소, 및 4) 폐닐아세테이트 탈탄산효소; 및 (C) 1) 하나 이상의 폐닐알라닌 아미노전이효소 및 폐닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 2) 폐닐피루베이트 산화효소, 및 3) 폐닐아세테이트 탈탄산효소에서 선택된다. 일부 실시예들에서, 본 방법은 실질적으로 협기성인 배양 배지에서 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함한다.

[0164] 일부 실시예들에서, 본 발명의 톨루엔 생산 방법은 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산, 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 3종의 외인성 핵산, 각각이 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산, 핵산 각각이 톨루엔 경로를 암호화하는 5종의 외인성, 및 기타 등을 포함하는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다. 4종의 외인성 핵산을 가지는 예시적 유기체는 1) 폐닐알라닌 아미노전이효소, 2) 폐닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 3) 폐닐피루베이트 탈탄산효소, 및 4) 폐닐아세트알데히드 탈카보닐효소를 암호화할 수

있다. 5종의 외인성 핵산을 가지는 예시적 유기체는 1) 페닐알라닌 아미노전이효소, 2) 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민), 3) 페닐피루베이트 탈탄산효소, 4) 페닐아세트알데히드 탈수소효소 및/또는 산화효소, 및 5) 페닐아세테이트 탈탄산효소를 암호화할 수 있다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 틀루엔 생산 방법은 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 가지는 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함한다.

[0165] 일부 실시예들에서, 본 발명은 벤젠 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 벤젠 생산 방법을 제공한다. 벤젠 경로는 벤젠을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 벤젠을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤젠 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 벤젠 경로는 도 2에 도시된 바와 같이 페닐알라닌 벤젠-분해효소를 포함한다. 일부 실시예들에서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 페닐알라닌 벤젠-분해효소 자체이지만, 대안적 실시예들에서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 전구체 대사산물인 페닐알라닌 생산에 영향을 줄 수 있다. 일부 실시예들에서 벤젠 경로의 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산이다. 일부 실시예들에서, 본 발명인 벤젠 생산방법은 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다.

[0166] 일부 실시예들에서, 본 발명은 스티렌 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 스티렌 생산 방법을 제공한다. 스티렌 경로는 스티렌을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 스티렌을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 스티렌 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 스티렌 경로는 도 3에서 대안 경로들로 표시되는 바와 같이 (A) 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 하나 이상의 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소, 전이효소, 및 가수분해효소, 3) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 4) 아세토페논 환원효소, 및 5) 1-페닐에탄올 탈수효소; 및 (B) 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로피오닐라제, 3) 벤조일-아세테이트 키나아제, 4) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 5) 아세토페논 환원효소, 및 6) 1-페닐에탄올 탈수효소에서 선택된다. 일부 실시예들에서, 본 발명인 스티렌 생산방법은 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다.

[0167] 일부 실시예들에서, 본 발명인 스티렌 생산방법은 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산, 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 3종의 외인성 핵산, 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산, 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 5종의 외인성 핵산, 각각이 스티렌 경로 효소를 암호화하는 6종의 외인성 핵산, 및 기타 등을 포함하는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다. 5종의 외인성 핵산을 가지는 예시적 유기체는 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 하나의 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 합성효소, 전이효소, 및 가수분해효소, 3) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 4) 아세토페논 환원효소, 및 5) 1-페닐에탄올 탈수효소를 암호화한다. 6종의 외인성 핵산을 가지는 예시적 유기체는 1) 벤조일-CoA 아세틸전이효소, 2) 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로피오닐라제, 3) 벤조일-아세테이트 키나아제, 4) 벤조일-아세테이트 탈탄산효소, 5) 아세토페논 환원효소, 및 6) 1-페닐에탄올 탈수효소를 암호화한다. 일부 실시예들에서, 본 발명인 스티렌 생산방법은 최소한 하나의 외인성 핵산이 이종 핵산인 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다.

[0168] 일부 실시예들에서, 본 발명은 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 1,3-부타디엔 생산방법을 제공한다. 1,3-부타디엔 경로는 1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 1,3-부타디엔 경로는 도 4의 대안 경로들에 도시된 바와 같이 (A) 1) 트란스, 트란스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (B) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 시스-탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 트란스-탈탄산효소 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; 및 (D) 1) 시스, 시스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소에서 선택된다. 일부 실시예들에서, 1,3-부타디엔 생산 방법은 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재하는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다.

[0169] 일부 실시예들에서, 본 발명의 방법은 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산을 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다. 2종의 외인성 핵산을 가지는 예시적 유기체는 (A) 1) 트란스, 트란스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (B) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 시스-탈탄산효소 및 2) 트란스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 1) 시스, 트란스-뮤코네이트 트란스-탈탄산효소 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; 및 (D) 1) 시스, 시스-뮤코네이트 탈탄산효소 및 2) 시스-2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소에서 선택되는 효소를 집합을 암호화하는 유전자들을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 방법은 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다.

- [0170] 본 발명은 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생산 방법을 추가로 제공하며, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함한다. 이러한 미생물 유기체는 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 가지고, 상기 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 탈수효소를 포함한다 (참고 실시예 III 및 도 5, 단계 C). (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 선택적으로 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 생성효소 및/또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원이성화효소를 더욱 포함한다 (참고 실시예 III 및 도 5, 단계들 A 및 B).
- [0171] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 p-톨루에이트 생산방법을 제공하며, p-톨루에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, p-톨루에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다. p-톨루에이트 경로는 p-톨루에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 p-톨루에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 p-톨루에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수소효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및/또는 코리스메이트 분해효소로 구성된다 (참고 실시예 IV 및 도 6, 단계들 A-H). 또 다른 실시예에서, 본 발명의 방법은 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더욱 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 활용할 수 있다 (참고 실시예 III 및 도 5). 이러한 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 탈수효소, 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 생성효소 및/또는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원이성화효소를 포함한다 (참고 실시예 III 및 도 5).
- [0172] 본 발명은 테레프탈레이트 생산 방법을 더욱 제공하며, 이는 테레프탈레이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 테레프탈레이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다. 이러한 테레프탈레이트 경로는 테레프탈레이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 테레프탈레이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고, 상기 테레프탈레이트 경로는 p-톨루에이트 메틸-일산소첨가효소 환원효소; 4-카르복시벤질 알코올 탈수소효소; 및/또는 4-카르복시벤질 알데히드 탈수소효소로 구성된다. 이러한 미생물 유기체는 p-톨루에이트 경로를 추가로 포함할 수 있고, 이때 p-톨루에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수소효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및/또는 코리스메이트 분해효소로 구성된다 (참고 실시예 IV 및 V 그리고 도 6 및 7). 또 다른 실시예에서, 비-천연 미생물 유기체는 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로를 더욱 포함한다 (참고 실시예 III 및 도 5). 일부 실시예들에서, 본 발명은 톨루엔 생산방법을 제공하며, 이는 톨루엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 톨루엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 톨루엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계로 구성된다. 톨루엔 경로는: a) p-톨루에이트 탈탄산효소; b) p-톨루에이트 환원효소 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; c) p-톨루에이트 키나아제, (p-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; d) (p-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 포스포트란스-p-메틸벤조일라제, (p-메틸벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소; 및 e) (p-메틸벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), p-메틸벤조일-CoA 환원효소 및 p-메틸벤즈알데히드 탈카보닐효소에서 선택되는 경로 효소들 집합에서 선택될 수 있다. 비-천연 미생물 유기체는 톨루엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 배양된다. 특정 실시예에서, 본 발명은 미생물 유기체가 p-톨루에이트, 테레프탈레이트 또는 톨루엔, 및 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로들을 가지는 비-천연 미생물 유기체 및 이용 방법을 제공한다.
- [0173] 일부 실시예들에서, 본 발명은 (2-히드록시-4-옥소부톡시) 포스포네이트 생산방법을 제공하며, 이는 (2-히드록시-4-옥소부톡시) 포스포네이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 (2-히드록시-4-옥소부ток시) 포스포네이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산으로 구성되는 (2-히드록시-4-옥소부톡시) 포스포네이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다. (2-히드록시-4-옥소부톡시) 포스포네이트 경로는 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소 및 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소를 포함할 수 있다.
- [0174] 일부 실시예들에서, 본 발명은 벤조에이트 생산방법을 제공하며, 이는 벤조에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤조에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산으로 구성되는 벤조에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다. 벤조에이트 경로는 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생

성효소; 3-데히드로퀴네이트 생성효소; 3-데히드로퀴네이트 탈수효소; 시키메이트 탈수소효소; 시키메이트 키나아제; 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소; 코리스메이트 생성효소; 및 코리스메이트 분해효소를 포함한다. 본 방법은 벤조에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 비-천연 유기체를 배양하는 단계를 포함한다.

[0175] 일부 실시예들에서, 본 발명은 벤젠 생산 방법을 제공하고, 이는 벤젠을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 벤젠 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산으로 구성되는 벤젠 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다. 벤젠 경로는: a) 벤조에이트 탈탄산효소; b) 벤조에이트 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소; c) 벤조에이트 키나아제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소; d) (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 포스포트란스벤조일라제, (벤조일옥시)포스포네이트 환원효소, 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소; 및 e) (벤조일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소), 벤조일-CoA 환원효소 및 벤즈알데히드 탈카보닐효소에서 선택되는 경로 효소들 집합에서 선택된다. 비-천연 미생물 유기체는 벤젠을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 배양될 수 있다. 특정 실시예에서, 본 발명은 미생물 유기체가 (2-히드록시-4-옥소부톡시) 포스포네이트, 벤조에이트, 및 벤젠 경로들을 가지는 비-천연 미생물 유기체 및 이용 방법이 제공된다.

[0176] 일부 실시예들에서, 본 발명은 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 2,4-펜타디에노에이트 생산방법을 제공한다. 본 경로는 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는 A) i) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, ii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iii) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 iv) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소; B) i) AKP 탈아미노효소, ii) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 iii) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; C) i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-2-환원효소, iii) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 탈수효소, iv) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 v) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; D) i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-4-환원효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소; 및 E) i) AKP 환원효소, ii) 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소에서 선택된다.

[0177] 일부 실시예들에서, 본 발명의 방법은 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 활용한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는 (A) 도 12의 단계들 A, E, F, 및 G에 도시된 바와 같이 1) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, 2) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 환원효소, 3) 2,4-디히드록시펜타노에이트 2-탈수효소, 및 4) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, 및 (B) 도 12의 단계들 A, E, H, 및 D에서 도시된 바와 같이 1) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, 2) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 환원효소, 3) 2,4-디히드록시펜타노에이트 4-탈수효소 및 4) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소에서 선택되는 효소들 집합을 가진다.

[0178] 일부 실시예들에서, 본 발명의 방법은 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 활용한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는 (A) 도 13의 단계들 E, H, I, G, 및 D에 도시된 바와 같이 1) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, 2) 2,4-디옥소펜타노에이트 2-환원효소, 3) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 환원효소, 4) 2,4-디히드록시펜타노에이트 2-탈수효소, 및 5) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, 및 (B) 도 13의 단계들 E, H, 및 I, 및 각각 도 12의 단계들 F 및 G 또는 H 및 D에 각각 도시된 바와 같이 1) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, 2) 2,4-디옥소펜타노에이트 2-환원효소, 3) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 환원효소, 및 4) 2,4-디히드록시펜타노에이트-2-탈수효소 및 5) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소 또는 4) 2,4-디히드록시펜타노에이트-4-탈수효소 및 5) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소에서 선택되는 효소들 집합을 가진다. 즉, 2,4-디히드록시펜타노에이트의 이중 탈수는 임의의 순차로 진행될 수 있다.

[0179] 일부 실시예들에서, 본 발명의 방법은 AKP를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 AKP 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 AKP 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 활용한다. AKP 경로는 도 13의 단계들 M 및 N에 도시된 바와 같이 오르니틴 4,5-아미노뮤타아제 및 2,4-디아미노펜타노에이트 4-아미노전이효소 및/또는 4-탈수소효소를 포함한다. 일부 실시예들에서, AKP 경로를 가지는 미생물 유기체는 오르니틴

4,5-아미노뮤타아제 및 2,4-디아미노펜타노에이트 4-아미노전이효소 또는 2,4-디아미노펜타노에이트 4-탈수소효소를 암호화하는 2종의 외인성 효소들을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 AKP 경로는 도 13에 표기된 전술된 임의의 2,4-펜타디에노에이트 경로들에 부가될 수 있다. 달리, AKP는 도 13의 단계 A에 도시된 바와 같이 AKP 티올라아제 첨가에 의해 알라닌으로부터 형성될 수 있고, 본원에 기재되고 도 12와 함께 도 13에 도시된 다양한 2,4-펜타디에노에이트 경로들에 공급될 수 있다.

[0180] 일부 실시예들에서, 본 발명의 방법은 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 활용한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는 (A) 도 14의 단계들 A-C에 도시된 바와 같이 1) 오르니틴 2,3-아미노뮤타아제, 2) 3,5-디아미노펜타노에이트 탈아미노효소, 및 3) 5-아미노펜트-2-에노에이트 탈아미노효소, (B) 도 14의 단계들 A, B, H, F, 및 G에 도시된 바와 같이 1) 오르니틴 2,3-아미노뮤타아제, 2) 3,5-디아미노펜타노에이트 탈아미노효소, 3) 5-아미노펜트-2-에노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, 4) 5-옥소펜트-2-에노에이트 환원효소, 및 5) 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, (C) 도 14의 단계들 A, D, E, F, 및 G에 도시된 바와 같이 1) 오르니틴 2,3-아미노뮤타아제, 2) 3,5-디아미노펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, 3) 3-아미노-5-옥소펜타노에이트 탈아미노효소, 4) 5-옥소펜트-2-에노에이트 환원효소, 및 5) 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소, (D) 도 14의 단계들 A, D, I, J, 및 G에 도시된 바와 같이 1) 오르니틴 2,3-아미노뮤타아제, 2) 3,5-디아미노펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수소효소, 3) 3-아미노-5-옥소펜타노에이트 환원효소, 및 4) 3-아미노-5-히드록시펜타노에이트 탈아미노효소, 및 5) 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소에서 선택되는 효소들 집합을 가진다.

[0181] 일부 실시예들에서, 본 발명의 방법은 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체를 활용한다. 2,4-펜타디에노에이트 경로는 3-HP-CoA 또는 아크릴로일-CoA에서 출발하는 도 15에 도시된 임의의 수 많은 경로들에서 선택되는 효소들 집합을 가진다.

[0182] 3-HP-CoA로부터의 예시적 경로들은 다음과 같은 효소 집합을 포함한다 (A) 도 15의 단계들 A-E에 도시된 바와 같이 1) 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, 2) 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 환원효소, 3) 3,5-디히드록시펜타노일-CoA 탈수효소, 4) 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 탈수효소, 및 5) 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, 및 (B) 도 15의 단계들 A, F, I, J, 및 Q에 도시된 바와 같이 1) 3-히드록시프로파노일-CoA 아세틸전이효소, 2) 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, 3) 3-옥소-5-히드록시펜타노에이트 환원효소, 4) 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소, 및 5) 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소. 본 분야의 숙련가는 3-HP-CoA로부터 경로들 (A) 및 (B)를 형성하는 효소 집합은 도 15의 단계 G에 도시된 바와 같이 가역적 효소들 3,5-히드록시펜타노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, 및 도 15의 단계 H에 도시된 바와 같이 5-히드록시펜트-2-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소를 거쳐 혼용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 3-HP-CoA에서 2,4-펜타디에노에이트 경로는 도 15에 각각 도시된 바와 같이 단계들 A, B, G, J, 및 Q, 또는 단계들 A, B, C, H, 및 Q, 또는 단계들 A, B, G, J, H, D, 및 E, 또는 단계들 A, F, I, G, C, D, 및 E, 또는 단계들 A, F, I, G, C, H, 및 Q, 또는 단계들 A, F, I, J, H, D, 및 E에 있는 효소들을 포함한다.

[0183] 아크릴로일-CoA로부터의 예시적 경로들은 다음과 같은 효소 집단을 포함한다 (C) 도 15의 단계들 M, O, P, 및 S에 도시된 바와 같이 1) 아크릴로일-CoA 아세틸전이효소, 2) 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소, 3) 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, 4) 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소 및 (D) 단계들 M, N, R, 및 E에 도시된 바와 같이 1) 아크릴로일-CoA 아세틸전이효소, 2) 3-옥소펜트-4-에노일-CoA 환원효소, 3) 3-히드록시펜트-4-에노일-CoA 탈수효소, 및 4) 펜트-2,4-디에노일CoA 합성효소, 전이효소 및/또는 가수분해효소. 본 분야의 숙련가는 3-HP-CoA로부터의 경로들 (A) 및 (B) 및 아크릴로일-CoA로부터의 (C) 및 (D)를 형성하는 효소 집합은 도 15의 단계 K에 도시된 바와 같이 3-히드록시프로파노일-CoA 탈수효소 및 도 15의 단계 L에 도시된 바와 같이 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 탈수효소의 가역적 효소들을 통하여 혼용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 단계 K는 아크릴로일-CoA로부터 2,4-펜타디에노에이트에 이르는 임의의 열거된 경로들에 부가되어 단계들 K, M, N, R, 및 E 또는 단계들 K, M, O, P, 및 S와 같은 2,4-펜타디에노에이트 경로들을 제공한다. 또한 단계 K는 단계 A에 대한 왕복 대안으로 사용되어 3-HP-CoA로부터 단계들 K, M, 및 L을 거쳐 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA를 제공한다. 따라서, 단계 A의 효소를 이용하는 임의의 상기 경로들은 단계들 K, M, 및 L의 효소들을 대신 이용할 수 있다. 동일한 3-옥소-5-히드록시펜타노일-CoA 중간체는 도 15의 단계들 K 및 A 또는 M 및 L의 효소들을 통한 경로들에 의해 아크릴로일-CoA로부터 얻어질 수 있다. 따라서, 아크릴로일

-CoA는 3-HP-CoA에 의해 접근될 수 있는 열거된 모든 경로들을 접근하기 위하여 적용될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 아크릴로일-CoA에서의 2,4-펜타디에노에이트 경로는 도 15에서 모두 도시된 바와 같이 단계들 K, A, B, C, D, 및 E, 또는 단계들 K, A, F, I, J 및 Q, 또는 단계들 K, A, B, G, J, 및 Q, 또는 단계들 K, A, B, G, J, H, D, 및 E, 또는 단계들 K, A, B, C, H, 및 Q, 또는 단계들 K, A, F, I, G, C, D, 및 E, 또는 단계들 K, A, F, I, G, C, H, Q, 또는 단계들 K, A, F, I, J, H, D 및 E, 또는 단계들 M, L, B, C, D, 및 E, 또는 단계들 M, L, F, I, J 및 Q, 또는 단계들 M, L, B, G, J, 및 Q, 또는 단계들 M, L, B, G, J, H, D, 및 E, 또는 단계들 M, L, B, C, H, 및 Q, 또는 단계들 M, L, F, I, G, C, D, 및 E, 또는 단계들 M, L, F, I, G, C, H, Q, 또는 단계들 M, L, F, I, J, H, D 및 E의 효소들을 포함한다. 마찬가지로, 3-HP-CoA는 단계 L의 효소를 이용하여 중간체 3-옥소펜트-4-에노일-CoA를 거쳐 열거된 아크릴로일-CoA 경로들로 공급될 수 있다. 따라서, 3-HP-CoA에서의 2,4-펜타디에노에이트 경로는 각각이 도 15에 도시된 바와 같이 단계들 A, L, N, R, 및 E 또는 단계들 A, L, O, P, 및 S의 효소들을 포함한다.

[0184] 일부 실시예들에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 비-천연 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 3종의 외인성 핵산을 포함한다. 예를들면, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 i) AKP 탈아미노효소, ii) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 iii) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소를 암호화하는 3종의 외인성 핵산을 포함하고, 따라서 AKP를 거쳐 2,4-펜타디에노에이트로의 알라닌 또는 오르니틴 접근 경로를 제공한다. 본 분야의 숙련가는 이것이 단지 예시적이고 3종의 외인성 핵산은 도 12-15의 열거된 임의의 경로들에 있는 임의의 2,4-펜타디에노에이트-생산 비-천연 유기체의 기본일 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0185] 일부 실시예들에서, 본 발명의 방법에서 이용되는 비-천연 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 임의의 4종의 외인성 핵산을 포함할 수 있다. 예를들면, 비-천연 미생물 유기체는 i) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제, ii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iii) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 iv) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산을 포함하고, 따라서 도 12에 도시된 바와 같이 페루베이트에서 2,4-펜타디에노에이트에 이르는 전체 경로를 형성한다. 본 분야의 숙련가는 이것이 단지 예시적이고 4종의 외인성 핵산은 도 12-15의 열거된 임의의 경로들에 있는 임의의 2,4-펜타디에노에이트-생산 비-천연 유기체의 기본일 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0186] 또 다른 실시예들에서, 본 발명의 방법에서 활용되는 비-천연 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 5종의 외인성 핵산을 포함한다. 5종의 외인성 핵산을 가지는 본 발명의 예시적 비-천연 미생물 유기체는 (A) 도 13의 단계들 E, H, F, C, 및 D에 도시된 바와 같이 i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-2-환원효소, iii) 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 탈수효소, iv) 아세틸아크릴레이트 환원효소, 및 v) 4-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소 또는 (B) 도 12의 단계들 B, C, 및 D와 함께 도 13의 단계들 E 및 K에 도시된 바와 같이 i) AKP 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, ii) 2,4-디옥소펜타노에이트-4-환원효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소, 또는 도 12의 단계들 B, C, 및 D와 함께 도 13의 단계들 J 및 L에 도시된 바와 같이 i) AKP 환원효소, ii) 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 아미노전이효소 및/또는 탈수효소, iii) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 탈수효소, iv) 2-옥소펜테노에이트 환원효소, 및 v) 2-히드록시펜테노에이트 탈수효소를 암호화하는 효소들을 포함한다. 본 분야의 숙련가는 이것이 단지 예시적이고 5종의 외인성 핵산은 도 12-15의 열거된 임의의 경로들에 있는 임의의 2,4-펜타디에노에이트-생산 비-천연 유기체의 기본일 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 일부 실시예들에서 2,4-펜타디에노에이트 경로에 있는 2, 3, 4, 5, 6, 모든 효소들은 외인성 핵산 삽입으로 제공된다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 이종 핵산인 최소한 하나의 외인성 핵산을 가진다. 더욱이, 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체를 이용하는 방법은 실질적으로 협기성인 배양 배지를 이용한다.

[0187] 일부 실시예들에서, 본 발명의 방법에 이용되는 비-천연 미생물 유기체는 2,4-펜타디에노에이트의 1,3-부타디엔으로의 전환에 의해 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소를 포함한다. 따라서, 도 12의 임의의 2,4-펜타디에노에이트 경로는 도 4에서 시스 또는 트란스 2,4-펜타디에노에이트의 1,3-부타디엔으로의 전환에 의해 표시되는 바와 같이 1,3 부타디엔의 추가 생산의 기본을 이룬다.

[0188] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 본원에 기재된 상기 경로들에 의한 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 2,4-펜타디에노에이트 생산방법을 제공한다. 일부 이러한 실시예들에서, 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2, 3,

4, 5, 6, 7 또는 8종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 이러한 실시예들에서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산이다. 일부 이러한 실시예들에서 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다.

[0189] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 본원에 기재된 상기 경로들에 의한 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 1,3-부타디엔 생산방법을 제공한다. 일부 이러한 실시예들에서, 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 이러한 실시예들에서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산이다. 일부 이러한 실시예들에서 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다.

[0190] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 3-부텐-1-올을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안, 본원에 기재된 상기 경로들에 의한 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함하는 3-부텐-1-올 생산방법을 제공한다. 일부 이러한 실시예들에서, 미생물 유기체는 각각이 3-부텐-1-올 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 이러한 실시예들에서, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산이다. 일부 이러한 실시예들에서 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다. 일부 이러한 실시예들에서, 본 발명의 방법은 1,3-부타디엔을 제공하기 위한 3-부텐-1-올의 화학적 탈수를 더욱 포함한다.

[0191] 밸효액에서 분리된 순수 3-부텐-1-올 또는 밸효 종결액에서 분리된 3-부텐-1-올 수용액 또는 유기용액에서 출발하여 3-부텐-1-올은 화학적으로 탈수되어 1,3-부타디엔을 형성한다. 또한 이러한 3-부텐-1-올 용액은 탈수 단계 전에, 예를들면 증류에 의해 선택적으로 적절한 공비제 존재에서 농축될 수 있다.

[0192] 탈수 반응은 액상 또는 기상에서 수행될 수 있다. 탈수 반응은 기상 또는 액상 반응에 따라 특성이 달라지는 촉매 존재에서 수행될 수 있다.

[0193] 적정한 탈수 촉매는 산 촉매 및 알카리 촉매를 포함한다. 산 촉매는, 특히 올리고머 형성을 줄이는 경향이 있다. 탈수 촉매는 균일 촉매, 불균일 촉매, 또는 이들의 조합으로 적용된다. 불균일 촉매는 적정한 지지체 재료와 함께 사용된다. 이러한 지지체는 그 자체가 산 또는 알카리성일 수 있어 산 또는 알카리 탈수 촉매를 제공하거나 촉매는 불활성 지지체에 적용될 수 있다.

[0194] 탈수 촉매로 기능하는 적절한 지지체는 천연 또는 합성 규산염 예를들면 모데나이트 (mordenite), 몬트모릴로나이트 (montmorillonite), 산성 제오라이트를 포함하고; 이들 지지체는 1염기, 2염기 또는 다염기성 무기산, 예를들면 인산, 또는 무기산의 산성염, 예를들면 산화물 또는 규산염, 예를들면 Al_2O_3 , TiO_2 으로 코팅되고; 산화물 및 혼합산화물 예를들면 $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 및 $\text{ZnO}\text{-Al}_2\text{O}_3$ 혼종다중산의 혼합산화물을 포함한다. 탈수 촉매 및 지지체 지지체 재료 모두로 기능하는 알카리 재료로는 산화물로서 알카리 금속, 알카리 토금속, 란탄, 란토이드 (lanthoid) 또는 이들의 조합물을 포함한다. 탈수 효과를 내는 추가적인 재료로는 알카리 또는 산성 형태로 사용될 수 있는 이온교환체이다.

[0195] 적합한 균일 탈수 촉매는 무기산, 예를들면 인-함유 산 예를들면 인산을 포함한다. 무기산은 담지 또는 함침으로 지지체 재료에 고정된다.

[0196] 일부 실시예들에서, 탈수 반응은 본 분야에서 알려지 종래 장치, 예를들면 관형 반응기, 열교환기가 가열판으로 구성되는 원통다관식 열교환기 및 반응기에서 기상에서 수행된다. 일부 실시예들에서, 기상 탈수는 분리된 3-부텐-1-올 또는 부텐-1-올 용액을 이용하고, 상기 부텐-1-올은 고정-상 촉매가 있는 반응기에 도입된다. 액상에서의 열 탈수는 200 °C 내지 350 °C, 및 일부 실시예들에서 250 내지 300°C 온도 범위에서 수행될 수 있다.

[0197] 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올 또는 1,3-부타디엔의 생산을 테스트하기 위한 적정 정제 및/또는 분석은 잘 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 테스트할 조작된 각 균주에 대해 3세트 배양물과 같은 적합한 복제물로 증식시킬 수 있다. 예를들면, 상기 조작된 생산 숙주에서의 산물 및 부산물의 생성을 모니터링할 수 있다. 최종 산물 및 중간산물, 및 기타 유기 화합물을 HPLC(고성능 액체 크로마토그래피), GC-MS(기체 크로마토그래피-질량 분광학), LC-MS(액체 크로마토그래피-질량 분광학) 및 본 기술 분야에 널리 공지된 통상적인 과정을 이용하는 그외 적정 분석 방법으로 분석할 수 있다. 밸효액에서 산물의 분비도 배양 상층액을 이용하여 테스트할 수 있다. 부산물 및 잔류 글루코스는, 예컨대 글루코스 및 알코올의 경우 굴절률 검출기, 및 유기산의 경우, UV 검출기(Lin et al., *Biootechnol. Bioeng.* 90:775-779 (2005))를 이용하여 HPLC로, 또는 본 분야에 널리 공지된 그외 적합한 분석 및 검출 방법으로 정량할 수 있다. 상기 외인성 DNA 서열 유래의 각 효소 또는 단백질 활성도 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 분석할 수 있

다. 예를들면, 페닐피루베이트 탈탄산효소 활성을 Weiss et al (Weiss et al., *Biochem*, 27:2197-2205 (1988)에 의해 기술된 조효소로서 알코올 탈수조효소로 연계 광도 분석 (coupled photometric assay)으로 측정된다. NADH- 및 NADPH-의존성 효소들 예를들면 아세토페논 환원효소는 Schlieben et al (Schlieben et al., *J. Mol. Biol.*, 349:801-813 (2005))에 의해 기술된 340 nm에서 분광학적으로 분석된다. 전형적인 탄화수소에 대하여는, Manual on Hydrocarbon Analysis (ASTM Manula Series, A.W. Drews, ed., 6th edition, 1998, American Society for Testing and Materials, Baltimore, Maryland 참고. P-톨루에이트 메틸-일산소침가효소 활성을 정제 효소를 NADH, FeSO₄ 및 p-톨루에이트 기질과 수조내에서 인큐베이션하고, 단백질의 침강에 의해 반응을 정지시키고, 상층액에서 HPLC에 의해 산물을 분석함으로써, 평가할 수 있다 HPLC (Locher et al., *J. Bacteriol.* 173:3741-3748 (1991)).

[0198] 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔은, 본 분야에 잘 알려진 다양한 방법을 이용하여 배양물에서 다른 성분들로부터 분리할 수 있다. 이러한 분리 방법으로는, 예를들면 추출 방법뿐만 아니라, 연속적인 액체-액체 추출, 투석증발(pervaporation), 막 여과, 막 분리, 역삼투압, 전기투석, 중류, 결정화, 원심분리, 추출 여과(extractive filtration), 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 및 한의여과를 비롯한 방법들을 포함한다. 상기 방법들 모두 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다

[0199] 본원에 기술된 임의의 비-천연 미생물 유기체를 배양하여, 본 발명의 생합성 산물을 생산 및/또는 분리할 수 있다. 예를들면, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생산체를, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔의 생합성 생산을 위해 배양할 수 있다.

[0200] 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 생산하기 위해, 재조합 균주를 탄소원과 기타 필수 영양원이 첨가된 배지에서 배양한다. 전체 공정의 비용을 줄이기 위해 발효기에서 혐기성 조건을 유지하는 것이 때로는 매우 바람직할 것이다. 이러한 조건은, 예컨대 배지에 질소를 일차 분사한 다음 격막(septum)과 크림프-캡으로 플라스크를 밀봉함으로써 달성할 수 있다. 혐기 조건에서는 증식이 관찰되지 않는 균주의 경우, 제한된 호기를 위해 격막에 작은 구멍을 뚫어 미세호기 조건을 적용할 수 있다. 혐기 조건의 예들은 종래에 개시되어 있으며, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 호기 조건 및 혐기 조건의 예들은 2007년 8월 10일자 미국 공개 공보 2009/0047719에 기술되어 있다. 발효는 본원에 개시된 바와 같이 배치, 유가 또는 연속적인 방식으로 수행할 수 있다.

[0201] 필요하다면, 배지의 pH는, 배양 배지를 원하는 pH로 유지하기 위해 필요에 따라 NaOH 또는 기타 염기, 또는 산을 첨가함으로써, 바람직한 pH, 특히 pH 약 7과 같은 중성 pH로 유지시킬 수 있다. 증식율은 분광광도계(600 nm)를 이용하여 광학 밀도를 측정함으로써 결정할 수 있으며, 글루코스 흡수율(uptake rate)은 시간에 따른 탄소원 고갈을 모니터링함으로써 결정할 수 있다.

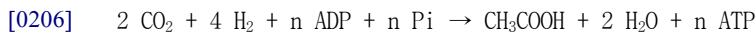
[0202] 배양 배지는, 예를들면 비-천연 미생물에 탄소원을 공급할 수 있는 임의의 탄수화물 소스를 포함할 수 있다. 이러한 소스로는, 예컨대 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스, 프럭토스, 슈크로스 및 스타치와 같은 당을 포함한다. 탄수화물의 다른 소스로는, 예를들면 재생가능한 공급 원료 및 바이오매스를 포함한다. 본 발명의 방법에 공급 원료로서 이용할 수 있는 바이오매스의 예시적인 타입으로는, 셀룰로직 바이오매스, 헤미셀룰로직 바이오매스 및 리그닌 공급원료 또는 공급원료의 일부를 포함한다. 이러한 바이오매스 공급원료로는, 예를들면 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 만노스, 프럭토스 및 스타치와 같은 탄소원으로서 이용가능한 탄수화물 기질을 포함한다. 본원에 제시된 교시 및 지침 하에, 본 분야의 숙련가라면, 상기에 예시된 것 이외의 재생가능한 공급원료 및 바이오매스는 또한 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔의 생산을 위한 본 발명의 미생물 유기체를 배양하는데 사용할 수 있다.

[0203] 상기 예시된 물질과 같이 재생가능한 공급원료 외에도, 본 발명의 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤

조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 미생물 유기체 역시 탄소원으로서 합성가스 상에서 생장하도록 변형될 수 있다. 본 특정 실시예에서, 하나 이상의 단백질 또는 효소는, 합성 가스 또는 다른 가스상 탄소원을 이용하기 위한 대사 경로를 제공하기 위해, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 생산하는 유기체에서 발현시킨다.

[0204] 합성 가스(syngas) 또는 발생로 가스(producer gas)라고도 하는 합성 가스(synthesis gas)는 석탄의 기체화 및 농업 작물 및 잔류물을 포함하여, 바이오매스 물질과 같은 탄소질 물질의 주요 산물이다. 합성 가스는 주로 H₂ 및 CO로 구성된 혼합물이며, 비제한적인 예로, 석탄, 석탄 오일, 천연 가스, 바이오매스 및 폐기물 유기 물질 등의 임의의 유기 공급원의 기체화로부터 수득할 수 있다. 기체화는 일반적으로 높은 연료 대 산소 비율 하에 수행된다. 주로 H₂ 및 CO이지만, 합성 가스는 CO₂ 및 다른 기체를 더 소량으로 포함할 수 있다. 따라서, 합성가스는 CO 및 추가적으로 CO₂ 등의 가스상 탄소의 비용 효율적인 소스를 제공한다.

[0205] Wood-Ljungdahl 경로는 CO와 H₂의 아세틸-CoA 및 아세테이트와 같은 다른 산물로의 변환을 촉매한다. 또한, CO 및 합성가스를 이용할 수 있는 유기체는, 또한, 일반적으로, Wood-Ljungdahl 경로에 포함된 효소 및 변화(transformation)의 동일한 기본 세트를 통해 CO₂ 및 CO₂/H₂ 혼합물을 이용하는 능력을 가진다. 동일 유기체에 의해 CO를 이용할 수 있으며 동일한 경로가 참여한다는 것이 밝혀지기 전까지, 오랜동안 미생물이 이산화탄소를 H₂-의존적인 방식으로 아세테이트로 변환시키는 것으로 알고 있었다. 수소가 필수적인 환원 당량(reducing equivalent)의 공급원으로서 존재하는 한, 다수의 초산 생성균들이 이산화탄소의 존재 하에 증식할 수 있으며 아세테이트와 같은 화합물을 생산하는 것으로 확인되었다(참고 예를들면, Drake, Acetogenesis, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994)). 이를 아래 등식으로 정리할 수 있다:



[0207] 따라서, Wood-Ljungdah 경로를 가지고 있는 비-천연 미생물은 CO₂ 및 H₂ 혼합물을 이용할 수 있을 뿐만 아니라 아세틸-CoA와 다른 원하는 산물을 생산할 수 있다.

[0208] Wood-Ljungdahl 경로는 본 분야에서 잘 알려져 있고 2종의 분자로 나뉘는 12 반응들로 구성된다: (1) 메틸 분지 및 (2) 카르보닐 분지. 메틸 분지는 합성가스를 메틸-테트라히드로폴레이트 (메틸-THF)로 전환시키고 카르보닐 분지는 메틸-THF를 아세틸CoA로 전환시킨다. 메틸 분지 반응들은 다음 효소들 또는 단백질들에 의해 순차적으로 촉매된다: 페레독신 산화환원효소, 포르메이트 탈수소효소, 포르밀테트라히드로폴레이트 합성효소, 메테닐테트라히드로폴레이트 시클로탈수효소, 메틸렌테트라히드로폴레이트 탈수소효소 및 메틸렌테트라히드로폴레이트 환원효소. 카르보닐 분지 반응들은 다음 효소들 또는 단백질들에 의해 순차적으로 촉매된다: 메틸테트라히드로폴레이트: 코리노이드 단백질 메틸전이효소 (예를들면, AcsE), 코리노이드 철-황 단백질, 니켈-단백질 조립 단백질 (예를들면, AcsF), 페레독신, 아세틸CoA 생성효소, 일산화탄소 탈수소효소 및 니켈-단백질 조립 단백질 (예를들면, CooC). 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 형성을 위한 충분한 수의 암호화 핵산을 도입하는 것에 대한 본원에 제공된 내용 및 지침을 따라, 본 분야 기술자는, 숙주 유기체에 존재하지 않는 Wood-Ljungdahl 효소 또는 단백질을 암호화하는 핵산을 적어도 도입하는 측면에 대해, 동일한 조작 설계를 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 변형된 유기체가 Wood-Ljungdahl의 전체 경로를 포함하도록, 하나 이상의 암호화 핵산을 본 발명의 미생물에 도입하여, 합성 가스의 활용 능력을 부여할 것이다.

[0209] 또한, 일산화탄소 탈수소효소 및/또는 수소화효소 활성과 연결된 환원적 (역) 트리카르복실산 회로는, CO, CO₂ 및/또는 H₂에서 아세틸-CoA 및 아세테이트와 같은 다른 산물로의 전환에 이용될 수 있다. 환원적 TCA 경로를 통해 탄소를 고정할 수 있는 유기체는 하나 이상의 다음과 같은 효소를 이용할 수 있다: ATP 시트레이트-분해효소, 시트레이트 분해효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트: 페레독신 산화환원효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마레이트 환원효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 일산화탄소 탈수소효소, 및 수소화효소. 구체적으로, 일산화탄소 탈수소효소 및 수소화효소에 의해 CO 및/또는 H₂로부터 추출된 환원 당량들은 환원적 TCA 회로를 통하여 CO₂를 아세틸CoA 또는 아세테이트에 고정시키는데 활용된다. 아세테이트는 효소들 예를들면

아세틸CoA 전이효소, 아세테이트 키나아제/인산아세틸기전이효소, 및 아세틸CoA 합성효소에 의해 아세틸CoA로 전환된다. 아세틸CoA는 피루베이트:페레독신 산화환원효소 및 글루코스생성 효소들에 의해 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 전구체, 글리세르알데히드-3-포스페이트, 포스포에놀피루베이트, 및 피루베이트로 전환된다. 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로를 만들기 위해 충분한 수의 암호화 핵산을 도입하기 위한 본원에 제시된 교시 및 지침에 따라, 본 분야의 당업자라면, 숙주 유기체에 존재하지 않는 환원적 TCA 경로 효소 또는 단백질을 암호화하는 핵산을 적어도 도입하는 것에 관해서 유사한 조작 설계를 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 변형된 유기체가 환원적TCA 전체 경로를 포함하도록, 하나 이상의 암호화 핵산을 본 발명의 미생물에 도입하여, 합성 가스의 활용 능력을 부여할 것이다.

- [0210] 일부 실시예들에서, 본 발명은 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체가 포함된 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 상기 1,3-부타디엔 경로는: (A) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소; (B) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; (D) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; (E) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (F) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (G) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (H) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (D) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (E) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수소효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수소효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소.

- [0211] 일부 양태들에서, 비-천연 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 종의 외인성 핵산을 포함한다. 예를들면, 미생물 유기체는: (A) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소; (B) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (C) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (D) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (E) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수소효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수소효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소.

시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소; (F) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소; (G) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소; 및 (H) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소에서 선택되는 각각의 효소들을 암호화하는 외인성 핵산을 포함한다.

[0212] 일부 실시예들에서, 본 발명은 상기 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 미생물 유기체는: (i) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하고, ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 환원적 TCA 경로; (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하고, 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 환원적 TCA 경로; 또는 (iii) CO 탈수소효소, H₂ 수소화효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 본 발명의 일부 양태들에서, 미생물 유기체는 (i) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 페레독신, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 본 발명의 일부 양태들에서, 미생물 유기체는 (ii) 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다.

[0213] 일부 실시예들에서, 본 발명은 상기 비-천연 미생물을 제공하며, 상기 미생물 유기체는 (i) ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산을 포함하며; 상기 미생물 유기체는 (ii) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 5종의 외인성 핵산을 포함하며; 또는 상기 미생물 유기체는 (iii) CO 탈수소효소 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다.

[0214] 일부 양태들에서, 본 발명은 상기 비-천연 미생물을 유기체를 제공하며, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산이다. 다른 양태에서, 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에서 존재한다. 일부 실시예들에서, 본 발명은 1,3-부타디엔 생산방법을 제공하며, 이는 1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 본원에 기재된 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함한다.

[0215] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 상기 2,4-펜타디에노에이트 경로는: (A) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; (B) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; (C) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및 (D) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 또는 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소에서 선택된다.

- [0216] 일부 양태들에서, 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5 또는 6종의 외인성 핵산을 포함한다. 예를들면, 미생물 유기체는: (A) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소; 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; (B) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 탈수소효소; 2-푸마릴아세테이트 환원효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; (C) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 3-옥소아디필-CoA 합성효소 또는 3-옥소아디필-CoA 가수분해효소; 3-옥소아디페이트 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 전이효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소; 및 (D) 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소아디필-CoA 환원효소; 3-히드록시아디필-CoA 합성효소 또는 3-히드록시아디필-CoA 가수분해효소; 3-히드록시아디페이트 탈수소효소; 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소; 및 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소에서 선택되는 각각의효소들을 암호화하는 외인성 핵산을 포함한다.
- [0217] 일부 실시예들에서, 본 발명은 상기 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 미생물 유기체는: (i) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하고, ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 환원적 TCA 경로; (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하고, 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 환원적 TCA 경로; 또는 (iii) CO 탈수소효소, H₂ 수소화효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 일부 양태들에서, 미생물 유기체는 (i) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 페레독신, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 일부 양태들에서, 미생물 유기체는 (ii) 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다.
- [0218] 일부 양태들에서, 비-천연 미생물 유기체는 (i) ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산을 포함하며; 상기 미생물 유기체는 (ii) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 5종의 외인성 핵산을 포함하며; 또는 상기 미생물 유기체는 (iii) CO 탈수소효소 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다.
- [0219] 일부 양태들에서, 본 발명은 상기 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산이다. 일부 양태들에서, 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다.
- [0220] 일부 실시예들에서, 본 발명은 2,4-펜타디에노에이트 생산방법을 제공하고, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 본원에 개시된 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0221] 일부 실시예들에서, 본 발명은 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 1,3-부타디엔 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 1,3-부타디엔 경로는: (A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; (C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; (D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA

환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; (F) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실 전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; (G) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 환원효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (H) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (I) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; (J) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (K) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; (L) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; 및 (O) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (N) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; 및 (0) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부тен-1-올 탈수효소에서 선택된다.

[0222]

일부 실시예들에서, 본 발명은 상기 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 미생물 유기체는 각각이 1,3-부타디엔 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7종의 외인성 핵산을 포함한다. 예를들면, 일부 양태들에서, 미생물 유기체는: (A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; (C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; (D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부тен-1-올 탈수효소; (F) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (G) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (H) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 3-부тен-1-올 탈수효소; (I) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 탈수효소; 및 3-부тен-1-올 탈수효소; (J) 말로닐-

CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (K) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; (L) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; (M) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시펜타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 2,4-펜타디엔 탈탄산효소; (N) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소; 및 (O) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; 및 3-부텐-1-올 탈수효소에서 선택되는 각각의 효소들을 암호화하는 외인성 핵산을 포함한다.

[0223] 일부 실시예들에서, 본 발명은 상기 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 미생물 유기체는: (i) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하고, ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 환원적 TCA 경로; (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하고, 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 환원적 TCA 경로; 또는 (iii) CO 탈수소효소, H₂ 수소화효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 일부 양태들에서, 비-천연 미생물 유기체는 (i) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 페레독신, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 일부 양태들에서, 미생물 유기체는 (ii) 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 일부 양태들에서, 미생물 유기체는 (i) ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산을 포함하고; 상기 미생물 유기체는 (ii) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 5종의 외인성 핵산을 포함하고; 또는 상기 미생물 유기체는 (iii) CO 탈수소효소 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산을 더욱 포함한다.

[0224] 일부 양태들에서, 본 발명은 본원에 기재된 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산이다. 일부 양태들에서, 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다

[0225] 일부 실시예들에서, 본 발명은 1,3-부타디엔 생산방법을 제공하며, 1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 본원에 개시된 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함한다.

[0226] 일부 실시예들에서, 본 발명은 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 2,4-펜타디에노에이트 경로를 가지는 미생물 유기체로 구성되는 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 상기 2,4-펜타디에노에이트 경로는: (A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; (B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; (C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; (D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈

수효소; 및 (E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소에서 선택된다.

[0227] 일부 양태들에서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 각각이 2,4-펜타디에노에이트 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4, 5 또는 6종의 외인성 핵산을 포함한다. 예를들면, 미생물 유기체는: (A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; (B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; (C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; (D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소; 및 (E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈수효소에서 선택되는 각각의 효소들을 암호화하는 외인성 핵산을 포함한다.

[0228] 일부 실시예들에서, 본 발명은 상기 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 미생물 유기체는: (i) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하고, ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 환원적 TCA 경로; (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하고, 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 환원적 TCA 경로; 또는 (iii) CO 탈수소효소, H₂ 수소화효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 일부 양태들에서, 비-천연 미생물 유기체는 (i) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 페레독신, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 일부 양태들에서, 미생물 유기체는 (ii) 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다.

[0229] 일부 양태들에서, 미생물 유기체는 (i) ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산을 포함하고; 상기 미생물 유기체는 (ii) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 5종의 외인성 핵산을 포함하고; 또는 상기 미생물 유기체는 (iii) CO 탈수소효소 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산을 더욱 포함한다.

[0230] 일부 양태들에서, 본 발명은 본원에 기재된 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산이다. 일부 양태들에서, 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다

[0231] 일부 실시예들에서, 본 발명은 2,4-펜타디에노에이트 생산방법을 제공하며, 2,4-펜타디에노에이트를 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 상기 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함한다.

[0232] 일부 실시예들에서, 본 발명은, 3-부텐-1-올을 생산하기에 충분한 양으로 발현되는 3-부텐-1-올 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 3-부텐-1-올 경로를 가지는 미생물 유기체를 포함하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 상기 3-부텐-1-올 경로는: (A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; (B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; (C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에

노에이트 탈탄산효소; (D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; (E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; (F) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; (G) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; (H) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; (I) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 (J) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소에서 선택된다.

[0233] 일부 양태들에서, 상기 비-천연 미생물 유기체는 각각이 3-부텐-1-올 경로 효소를 암호화하는 2, 3, 4 또는 5종의 외인성 핵산을 포함한다. 예를들면, 일부 양태들에서, 미생물 유기체는: (A) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; (B) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (알데히드 환원); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; (C) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; (D) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (CoA 환원 및 알코올 형성); 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; (E) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3,5-디옥소펜타노에이트 환원효소 (케톤 환원); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; (F) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 탈수효소; 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소; (G) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알데히드 형성); 3-히드록시-5-옥소펜타노에이트 환원효소; 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; (H) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈수효소; 및 5-히드록시펜트-2-에노에이트 탈탄산효소; 및 (J) 말로닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소; 3-옥소글루타릴-CoA 환원효소 (케톤-환원); 3-히드록시글루타릴-CoA 환원효소 (알코올 형성); 및 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소에서 선택되는 각각의 효소들을 암호화하는 외인성 핵산을 포함한다.

[0234] 일부 실시예들에서, 본 발명은 승기 비-천연 미생물 유기체를 제공하고, 상기 미생물 유기체는 (i) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하고, ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 환원적 TCA 경로; (ii) 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하고, 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수효소, 및 H₂ 수소화효소에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하는 환원적 TCA 경로; 또는 (iii) CO 탈수효소, H₂ 수소화효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 일부 양태들에서, 비-천연 미생물 유기체는 (i) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 페레독신, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 일부 양태들에서, 미생물 유기체는 (ii) 아코니트산수화효소, 이소시트레이트

이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 일부 양태들에서, 비-천연 미생물 유기체는 (i) ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 4종의 외인성 핵산을 포함하고; 상기 미생물 유기체는 (ii) 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, CO 탈수소효소, 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 5종의 외인성 핵산을 포함하고; 또는 상기 미생물 유기체는 (iii) CO 탈수소효소 및 H₂ 수소화효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산을 더욱 포함한다.

- [0235] 일부 양태들에서, 본 발명은 본원에 기재된 비-천연 미생물 유기체를 제공하며, 최소한 하나의 외인성 핵산은 이종 핵산이다. 일부 양태들에서, 비-천연 미생물 유기체는 실질적으로 혐기성인 배양 배지에 존재한다
- [0236] 일부 실시예들에서, 본 발명은 3-부텐-1-올 생산방법을 제공하며, 3-부텐-1-올을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 상기 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0237] 일부 실시예들에서, 본 발명 1,3-부타디엔 생산방법을 제공하며, 이는 3-부텐-1-올을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 3-부텐-1-올을 생산할 수 있는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계, 및 상기 3-부텐-1-올을 1,3-부타디엔으로 화학적으로 전환하는 단계를 포함한다. 3-부텐-1-올을 1,3-부타디엔으로 화학적으로 전환하는 방법은 본 분야에 잘 알려져 있다는 것을 이해하여야 한다.
- [0238] 또한 본 발명은 부분적으로 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로에서 중앙 대사 중간체를 통하여 탄소 유출입을 개선하기 위한 조작된 생합성 경로들에 관한 것이다. 본 발명은 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로에서 다양한 효소적 변환 촉매 효소들을 암호화하는 하나 이상의 외인성 유전자들을 가지는 비-천연 미생물 유기체를 제공한다. 일부 실시예들에서, 이들 효소적 변환은 환원적 트리카르복실산 (RTCA) 회로 일부이며 제한적이지 않지만 탄수화물-기반 탄소 공급원료를 포함한 생산수율을 개선하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0239] 수 많은 조작 경로들에서, 부족한 환원 당량들 또는 환원 당량들 및/또는 탄소를 부산물로 손실하기 때문에 탄수화물 공급원료에 기반한 최대 생산 수율이 실현되기 어렵다. 일부 실시예들에 따르면, 본 발명은 (i) 환원적 TCA 회로를 통한 탄소 고정 개선, 및/또는 (ii) 기상 탄소원 및/또는 합성가스 성분들 예를들면 CO, CO₂, 및/또는 H₂으로부터 추가적인 환원 당량들 가용성으로 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 수율을 증가시킨다. 합성가스 이외에도, 이러한 기상 소스는 제한적이지 않지만 천연적 또는 인공적 대기를 포함한다.
- [0240] CO₂-고정성 환원적 트리카르복실산 (RTCA) 회로는 CO₂ 동화작용의 내인적 통화 경로로 환원 당량들 및 ATP를 이용한다 (도 22). RTCA 회로 1회 작동으로 2몰의 CO₂ 는 1몰의 아세틸CoA, 또는 4몰의 CO₂ 는 1몰의 옥살로아세테이트로 동화된다. 이러한 추가적인 아세틸CoA 가용성은 탄수화물-기반 탄소 공급원료에서 유도되는 생산 분자들의 최대 이론 수율을 개선한다. 예시적 탄수화물은 제한적이지는 않지만 글루코스, 슈크로스, 자일로스, 아라비노스 및 글리세롤을 포함한다.
- [0241] 일부 실시예들에서, 환원적 TCA 회로는, 일산화탄소 탈수소효소 및/또는 수소화효소들과 결합되어, 미생물에 의한 합성가스, CO₂, CO, H₂, 및/또는 기타 기상 탄소원 활용이 가능하도록 적용된다. 합성가스 (syngas)는, 임의의 유기 공급원료, 예를들면 석탄, 석유, 천연가스, 바이오매스, 또는 폐 유기물 기상화를 통해 획득될 수 있고 특히 주로 H₂ 및 CO의 혼합물이며, 때로는 일정량의 CO₂를 포함한다. 수 많은 기상화 공정들이 개발되었고, 대부분의 설계는 부분 산화에 기반하고, 여기에서는 고온 (500-1500°C)에서 유기물의 완전 연소를 회피하도록 제한된 산소를 사용하여 합성가스를 0.5:1-3:1 H₂/CO 혼합물로 얻는다. 석탄 외에도, 많은 유형의 바이오매스를 사용하여 합성가스를 생산하며 재생 가능한 화학물질 및 연료를 위한 생물학적 생산에 대한 저렴하고 융통성 있는 공급 원료를 제공한다. 이산화탄소는 대기로부터 또는, 예를들면, 탱크 실린더로부터 응축 형태로, 또는 고상 CO₂ 승화로 얻어진다. 비슷하게, CO 및 수소 가스는 시약으로 및/또는 임의의 희망 비율로 혼합되어 제공된다. 기타 기상 탄소 형태로는, 예를들면, 메탄을 또는 유사한 휘발성 유기 용제를 포함한다.
- [0242] 합성가스 및/또는 기타 탄소원 성분들은 환원적 TCA 회로 작동을 위한 충분한 CO₂, 환원 당량들, 및 ATP를 제공한다. RTCA 회로 1회 작동으로 2몰의 CO₂ 는 1몰의 아세틸CoA로 동화되고 2 ATP 및 4 환원 당량들이 요구된다.

CO 및/또는 H₂ 는 각각 일산화탄소 탈수소효소 및 수소화효소에 의해 환원 당량들을 제공한다. 환원 당량들은 NADH, NADPH, FADH, 환원 퀴논, 환원 폐레독신, 환원 플라보독신 및 티오레독신 형태로 존재한다. 환원 당량들, 특히 NADH, NADPH, 및 환원 폐레독신은, RTCA 회로 효소들, 예를들면, 말레이트 탈수소효소, 푸마레이트 환원효소, 알파-케토글루타레이트:폐레독신 산화환원효소 (달리 2-옥소글루타레이트:폐레독신 산화환원효소로 알려짐, 알파-케토글루타레이트 생성효소, 또는 2-옥소글루타레이트 생성효소), 피루베이트:폐레독신 산화환원효소 및 이소시트레이트 탈수소효소의 조인자로 작용한다. 이를 환원 당량으로부터 전자들은 달리 이온-기울기 생성 전자전달계를 통하여 수용체 예를들면 산소, 질산염, 산화 금속이온, 양성자, 또는 전극으로 전달된다. ATP 생성효소 또는 유사한 효소에 의해 이온-기울기는 ATP 생성에 사용된다.

[0243] 환원적 TCA 회로는 처음 녹색유황 공합성 세균 *Chlorobium limicola*에서 보고되었다 (Evans et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55:928-934 (1966)). 비슷한 경로들이 일부 원핵생물 (프로테오박테리아, 녹색유황세균 및 호열성 크날 (Knallgas) 세균) 및 황-의존성 고세균에서 특정되었다 (Hugler et al., *J. Bacteriol.* 187:3020-3027 (2005); Hugler et al., *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007)). 일부 경우에, 환원적 및 산화적 (크렙) TCA 회로들이 동일 유기체에 존재한다 (Hugler et al., *supra* (2007); Siebers et al., *J. Bacteriol.* 186:2179-2194 (2004)). 일부 메탄균 및 편성호기성균은 불완전한 산화적 또는 환원적 TCA 회로들을 가지고 생합성 중간체들을 합성하는데 사용한다 (Ekiel et al., *J. Bacteriol.* 162:905-908 (1985); Wood et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 28:335-352 (2004)).

[0244] 환원적 TCA 회로에서 핵심적인 탄소-고정 효소들은 알파-케토글루타레이트:폐레독신 산화환원효소, 피루베이트:폐레독신 산화환원효소 및 이소시트레이트 탈수소효소이다. 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소 또는 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제에 의한 포스포에놀피루베이트에서 옥살로아세테이트로의 전환 또는 말산효소에 의한 피루베이트에서 말레이트로의 전환 과정에서 추가적으로 탄소가 고정된다.

[0245] TCA 회로에서 많은 효소들은 가역적이고 환원적 및 산화적 방향으로 반응들을 촉매한다. 그러나, 일부 TCA 회로 반응들은 생체내에서 비가역적이고 따라서 역 TCA 회로에 필요한 방향들로 이들 반응을 촉매하기 위하여 다른 효소들이 이용된다. 이들 반응은: (1) 시트레이트의 옥살로아세테이트 및 아세틸CoA로의 전환, (2) 푸마레이트의 숙시네이트로의 전환, 및 (3) 숙시닐-CoA의 알파-케토글루타레이트로의 전환. TCA 회로에서, 시트레이트는 옥살로아세테이트 및 아세틸CoA의 축합으로 형성된다. 역 반응, 즉 시트레이트에서 옥살로아세테이트 및 아세틸CoA로 분리되는 반응은, ATP-의존적이고 ATP-시트레이트 분해효소, 또는 시트릴-CoA 합성효소 및 시트릴-CoA 분해효소에 의해 촉매된다. 달리, 시트레이트 분해효소는 아세틸CoA 합성효소, 아세틸CoA 전이효소, 또는 인산아세틸기전이효소 및 아세테이트 키나아제와 연결되어 시트레이트로부터 아세틸CoA 및 옥살로아세테이트를 형성한다. 숙시네이트에서 푸마레이트로의 전환은 숙시네이트 탈수소효소에 의해 촉매되고 역 반응은 푸마레이트 환원효소에 의해 촉매된다. TCA 회로에서 숙시닐-CoA는 알파-케토글루타레이트 탈수소효소 복합체에 의한 알파-케토글루타레이트의 NAD(P)⁺ 의존성 탈탄산반응으로 형성된다. 역반응은 알파-케토글루타레이트:폐레독신 산화환원효소에 의해 촉매된다.

[0246] 1) CO, 2) CO₂ 및 H₂, 3) CO 및 CO₂, 4) CO 및 H₂로 이루어진 합성가스, 및 5) CO, CO₂, 및 H₂로 이루어진 합성가스 또는 기타 기상 탄소원에서 아세틸CoA-유도 산물을 생산할 수 있는 역 트리카르복실산 회로 활용 가능한 유기체는 임의의 다음과 같은 효소 활성들을 포함할 수 있다: ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트:폐레독신 산화환원효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마레이트 환원효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, 아세틸CoA 전이효소, 피루베이트:폐레독신 산화환원효소, NAD(P)H:폐레독신 산화환원효소, 일산화탄소 탈수소효소, 수소화효소, 및 폐레독신 (참고 도 23). 효소들 및 이들 활성들에 필요한 상응 유전자들은 상기된 바와 같다.

[0247] 합성가스 또는 기타 기상 탄소원으로부터의 탄소는 역 TCA 회로 및 이의 요소들을 통하여 고정된다. 구체적으로, 소정의 탄소 가스-활용 경로 요소들 및 아세틸CoA로부터 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔을 형성하는 경로들의 조합으로 외인적으로 공급되거나 내인적으로 CO로부터 공급되는 이산화탄소로 존재하는 탄소를 아세틸CoA로 고정시키는 효율적인 기전을 제공함으로서 이들 산물을 높은 수율로 얻을 수 있다.

[0248] 일부 실시예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에서 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로는 (1) CO, (2) CO₂, (3) H₂, 또는 이들 혼합물의 임의 조합을 활용하여 환원적 TCA 회로 구동에 추가

되거나 감소되어 (involving reduction) 생합성 단계들의 수율을 개선할 수 있다.

- [0249] 일부 실시예들에서 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 최소한 하나의 외인성 핵산은 다음에서 선택된다: ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 아코니트산수화효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소; 및 (1) CO, (2) CO₂, (3) H₂, (4) CO₂ 및 H₂, (5) CO 및 CO₂, (6) CO 및 H₂, 또는 (7) CO, CO₂, 및 H₂ 활용이 가능하도록 충분한 양으로 발현되는 일산화탄소 탈수소효소, 수소화효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 및 페레독신에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 효소.
- [0250] 일부 실시예들에서 본 방법은, 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함하고 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체 배양 단계를 포함한다. 최소한 하나의 외인성 핵산은 ATP-시트레이트 분해효소, 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 아코니트산수화효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 포함한다. 또한, 이러한 유기체는 산물 생산을 위하여 (1) CO, (2) CO₂, (3) H₂, (4) CO₂ 및 H₂, (5) CO 및 CO₂, (6) CO 및 H₂, 또는 (7) CO, CO₂, 및 H₂ 활용이 가능하도록 충분한 양으로 발현되는 일산화탄소 탈수소효소, 수소화효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 및 페레독신에서 선택되는 최소한 하나의 외인성 효소를 포함한다.
- [0251] 일부 실시예들에서 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 아세틸CoA를 통하여 탄소 유출입을 높이기에 충분한 양으로 발현되는 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 더욱 포함한다. 최소한 하나의 외인성 핵산은 ATP-시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 아코니트산수화효소 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소에서 선택된다.
- [0252] 일부 실시예들에서 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 일산화탄소 및/또는 수소 존재에서 환원 당량들 가용성을 높이고, 이에 따라 탄수화물-기반 탄소 공급원료를 통한 산화환원반응-제한 산물 수율을 증가시키기에 충분한 양으로 발현되는 효소를 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 포함한다. 최소한 하나의 외인성 핵산은 일산화탄소 탈수소효소, 수소화효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 및 페레독신에서 선택된다. 일부 실시예들에서, 본 발명은 일산화탄소 또는 수소 존재에서 환원 당량들 가용성을 높이고, 이에 따라 당 또는 기상 탄소원과 같은 탄수화물-기반 탄소 공급원료를 통한 산화환원반응-제한 산물 수율을 증가시키는 방법을 제공하며, 본 방법은 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔을 생산하기 위한 조건에서 충분한 시간 동안 본 비-천연 미생물 유기체를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0253] 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 각각이 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 2종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 각각이 환원적 TCA 경로 효소를 암호화하는 3종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 실시예들에서, 비-천연 미생물 유기체는 ATP-시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 3종의 외인성 핵산을 포함한다. 일부 실시예들에서, 비-천연 미생물 유기체는 시트레이트 분해효소, 푸마레이트 환원효소, 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소를 암호화하는 3종의 외인성 핵산을 포함한다.
- [0254] 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 피루베이트:페레독신 산화환원효소, 아코니트산수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소, 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다.
- [0255] 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 일산화탄소 탈수소효소, 아세틸CoA 생성효소, 페레독신, NAD(P)H:페레독신 산화환원효소 및 이들의 조합에서 선택되는 효소를 암호화하는 외인성 핵산을 더욱 포함한다.
- [0256] 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 (1) CO, (2) CO₂, (3) CO₂ 및 H₂, (4) CO 및 H₂, 또는 (5) CO, CO₂, 및 H₂에서 선택되는 탄소 공급원료를

이용한다. 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 수소를 이용하여 환원 당량들을 생성한다. 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 CO₂를 이용하여 환원 당량들을 생성한다. 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 CO₂ 및 수소 조합을 이용하여 환원 당량들을 생성한다.

- [0257] 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제, 피루베이트 카르복실화효소, 및 말산효소에서 선택되는 효소를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 더욱 포함한다.
- [0258] 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 말레이트 탈수소효소, 푸마라아제, 푸마레이트 환원효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 및 숙시닐-CoA 전이효소에서 선택되는 효소를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 더욱 포함한다..
- [0259] 일부 실시예들에서, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 경로를 가지는 비-천연 미생물 유기체는 시트레이트 분해효소, ATP-시트레이트 분해효소, 시트릴-CoA 합성효소, 시트릴-CoA 분해효소 아코니트산 수화효소, 이소시트레이트 탈수소효소, 숙시닐-CoA 합성효소, 숙시닐-CoA 전이효소, 푸마라아제, 말레이트 탈수소효소, 아세테이트 키나아제, 인산아세틸기전이효소, 아세틸CoA 합성효소, 및 폐레독신을 암호화하는 최소한 하나의 외인성 핵산을 더욱 포함한다.
- [0260] 일부 실시예들에서, 1,3-부타디엔 또는 임의의 1,3-부타디엔 경로 중간체에 존재하는 원자들의 동위원소 분포를 변경시키기 위하여 탄소 공급원료 및 포스페이트, 암모니아, 황산염, 염소 및 기타 할로겐들과 같은 기타 세포 흡수원 (uptake source)이 선택될 수 있다. 상기 열거된 다양한 탄소 공급원료 및 기타 흡수원은 이하 포괄적으로, "흡수원"으로 언급된다. 흡수원은 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 산물 또는 경로 중의 임의의 중간체에 존재하는 임의의 원자들에 대한 동위원소 농축 (enrichment)을 제공한다. 상기 열거된 다양한 탄소 공급원료 및 기타 흡수원은 이하 포괄적으로 "흡수원"으로 언급된다. 흡수원은 산물인 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 또는 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 중간체 예를들면 임의의 지점에서 경로로부터 이탈되어 생성된 임의의 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 불순물에 존재하는 임의의 원자들에 대한 동위원소 농축을 제공한다. 동위원소 농축은 예를들면, 탄소, 수소, 산소, 질소, 황, 인, 염소 또는 기타 할로겐들을 포함한 임의의 목표 원자에 대하여 달성을 수 있다.
- [0261] 일부 실시예들에서, 흡수원은 탄소-12, 탄소-13, 및 탄소-14 비율을 변경하기 위하여 선택된다. 일부 실시예들에서, 흡수원은 산소-16, 산소-17, 및 산소-18 비율을 변경하기 위하여 선택된다. 일부 실시예들에서, 흡수원은 수소, 중수소, 및 삼중수소 비율을 변경하기 위하여 선택된다. 일부 실시예들에서, 흡수원은 질소-14 및 질소-15 비율을 변경하기 위하여 선택된다. 일부 실시예들에서, 흡수원은 황-32, 황-33, 황-34, 및 황-35 비율을 변경하기 위하여 선택된다. 일부 실시예들에서, 흡수원은 인-31, 인-32, 및 인-33 비율을 변경하기 위하여 선택된다. 일부 실시예들에서, 흡수원은 염소-35, 염소-36, 및 염소-37 비율을 변경하기 위하여 선택된다.
- [0262] 일부 실시예들에서, 흡수원의 목표 동원위소 비율은 흡수원의 합성 화학적 농축으로 얻어질 수 있다. 이러한 동위원소 농축 흡수원은 상업적으로 구입되거나 실험실에서 제조할 수 있다. 일부 실시예들에서, 흡수원의 목표 동원위소 비율은 천연에서 흡수원 원천을 선택하여 얻어질 수 있다. 일부 이러한 실시예들에서, 탄소원은, 예를들면, 탄소-14가 상대적으로 결핍된 화석 연료 -유도 탄소원, 또는 석유-유도 대응체 보다 탄소-14 함량이 더 많은 CO₂와 같은 환경 탄소원에서 선택된다.
- [0263] 동위원소 농축은 안정 동위원소 비율 질량분석기 (SIRMS) 및 핵자기공명에 의한 부위-특정 천연 동위원소 분별기 (SNIF-NMR)와 같은 본 분야에 알려진 기술을 이용한 질량 분광학으로 쉽게 평가될 수 있다. 이러한 질량 분광 기술은 액체크로마토그래피 (LC) 및/또는 고성능액체크로마토그래피 (HPLC)와 같은 분리기술과 통합될 수 있다.

- [0264] 일부 실시예들에서, 본 발명은 대기 탄소 흡수원을 반영한 탄소-12, 탄소-13, 및 탄소-14 비율을 가지는 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 또는 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 중간체를 제공한다. 일부 이러한 실시예들에서, 흡수원은 CO_2 이다. 일부 실시예들에서, 본 발명은 석유-기반 탄소 흡수원을 반영한 탄소-12, 탄소-13, 및 탄소-14 비율을 가지는 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 중간체를 제공한다. 일부 실시예들에서, 본 발명은 대기 탄소 흡수원 및 석유-기반 흡수원의 조합으로 얻어지는 탄소-12, 탄소-13, 및 탄소-14 비율을 가지는 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 또는 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 중간체를 제공한다. 이러한 흡수원 조합은 탄소-12, 탄소-13, 및 탄소-14 비율을 변경할 수 있는 하나의 수단이다.
- [0265] 따라서, 본원에서 제공되는 교시 및 지침을 참고하면, 본 분야의 기술자는 탄수화물과 같은 탄소원에서 성장할 때 본 발명의 생합성 화합물들을 분비하는 비-천연 미생물 유기체를 제조할 수 있다는 것을 이해할 수 있다. 이러한 화합물들은, 예를들면, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 및 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로에서의 임의의 중간체 대사물질을 포함한다. 필요한 모든 것은 원하는 화합물 또는 중간체 생합성을 달성하기 위하여, 예를들면, 일부 또는 모든 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생합성 경로들을 포함시키는 것을 비롯하여 하나 이상의 요구되는 효소 또는 단백질 활성들을 조작하는 것이다. 따라서, 본 발명은, 탄수화물 또는 기타 탄소원에서 성장할 때 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 및 탄수화물 또는 기타 탄소원에서 성장할 때 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로에 도시된 임의의 중간체 대사물질을 생산 및/또는 분비하는 비-천연 미생물 유기체를 제공하는 것이다. 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생성 본 발명 미생물 유기체는 중간체, 예를들면, 페닐알라닌, 페닐피루베이트, 페닐아세트알데히드, 페닐아세테이트, 벤조일-CoA, 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA, [(3-옥소-3-페닐프로피오닐)옥시]포스포네이트, 벤조일 아세테이트, 아세토페논, 1-페닐에탄올, 트란스, 트란스-뮤코네이트, 시스, 트란스-뮤코네이트, 시스, 시스-뮤코네이트, 트란스-2,4-펜타디에노에이트, 및 시스-2,4-펜타디에노에이트로부터 합성을 개시할 수 있다. 추가 실시예로써, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 경로 중간체는 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 또는 C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트이다 (참고 실시예 III 및 도 5). p-톨루에이트 경로 중간체는, 예를들면, 2,4-디히드록시-5-메틸-6-[(포스포노옥시)메틸]옥산-2-카르복실레이트, 1,3-디히드록시-4-메틸-5-옥소시클로헥산-1-카르복실레이트, 5-히드록시-4-메틸-3-옥소시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 3,5-디히드록시-4-메틸시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5-히드록시-4-메틸-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 5-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸-3-(포스포노옥시)시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트, 또는 3-[(1-카르복시에트-1-엔-1-일)옥시]-4-메틸시클로헥사-1,5-디엔-1-카르복실레이트이다 (참고 실시예 IV 및 도 6). 테레프탈레이트 중간체는, 예를들면, 4-카르복시벤질 알코올 또는 4-카르복시벤즈알데히드이다 (참고 실시예 V 및 도 7).
- [0266] 본원에 기재된 바와 같이, p-톨루에이트 및 벤조에이트는 비-천연 미생물 유기체의 대상이 될 수 있는 예시적 중간체이다. 이러한 카르복실레이트는 이온화 또는 완전한 양성자화 형태로 발생될 수 있다. 특히 본 이온화 형태는 화합물이 존재하는 pH에 의존한다고 알려져 있으므로 따라서, 접미사 "-에이트" 또는 산 형태는, 상호 교환적으로 사용되어 자유 산 형태뿐 아니라 임의의 탈양성자화 형태를 기술한다. 본 발명에 따라 접근될 수 있는

프로피오네이트 산물은 O-카르복실레이트 및 S-카르복실레이트 에스테르와 같은 에스테르 형태를 포함한다는 것을 이해하여야 한다. O- 및 S-카르복실레이트는 저급, 즉 C1 내지 C6, 알킬의 가지형 또는 선형 사슬 카르복실레이트를 포함한다. 일부 이러한 O- 또는 S-카르복실레이트는, 제한되지 않고, 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, i-프로필, sec-부틸, 및 tert-부틸, 펜틸, 헥실 O- 또는 S-카르복실레이트를 포함하고, 불포화를 더욱 포함하여, 예를들면, 프로페닐, 부테닐, 펜틸, 및 헥세닐 O- 또는 S-카르복실레이트를 제공한다. O-카르복실레이트는 생합성 경로 산물일 수 있다. 생합성 경로들로 얻을 수 있는 예시적 O-카르복실레이트는, 제한되지 않고, 메틸 프로피오네이트, 에틸 프로피오네이트, 및 n-프로필 프로피오네이트를 포함한다. 기타 생합성으로 접근 가능한 O-프로피오네이트는 햅틸, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실, 라우릴, 트리데실, 미리스틸, 펜타데실, 세틸, 팔리톨릴, 헤판데실, 스테아릴, 노나데실, 아라키딜, 헤네이코실, 및 베헤닐 알코올, 이들 중 임의의 하나는 선택적으로 분자 및/또는 불포화를 가지는 알코올과 같은 지방알코올에서 유래되는 중간 내지 장쇄기, 즉 C7-C22, O-프로피오네이트 에스테르를 포함한다. 또한 O-프로피오네이트 에스테르는 자유 카르복실산 산물의 에스테르화 또는 O- 또는 S-프로피오네이트의 에스테르교환반응과 같은 생화학 또는 화학적 공정으로 획득될 수 있다. S-카르복실레이트는 CoA S-에스테르, 시스테이닐 S-에스테르, 알킬티오에스테르, 및 다양한 아릴 및 헤테로아릴 티오에스테르에 의해 예시된다.

[0267] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 양으로 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 효소 또는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 외인성으로 발현하도록, 본원에 예시된 본 기술 분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 구축한다. 본 발명의 미생물 유기체는 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 생산하기에 충분한 조건 하에서 배양하는 것으로 이해된다. 본원에 제시된 교시 및 지침에 따라, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 세포내 농도 약 0.1-200 mM 이상으로 형성되는 생합성을 달성할 수 있다. 일반적으로, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔의 세포내 농도는 약 3-150 mM, 특히 약 5-125 mM, 보다 구체적으로 약 8-100 mM이며, 약 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM 또는 그 이상을 포함한다. 이들 예시적인 범위 각각의 범위 및 상기 수준의 세포내 농도 역시 본 발명의 비-천연 미생물 유기체로부터 달성할 수 있다.

[0268] 일부 실시예들에서, 배양 조건은 혐기성 또는 실질적으로 혐기성 배양 또는 유지 조건을 포함한다. 예시적인 혐기 조건은 종래에 개시되어 있으며, 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 발효 공정에 대한 예시적인 혐기 조건은 본원에 기술되어 있으며, 예컨대 2007년 8월 10일자 미국 공개공보 2009/0047719에 기술되어 있다. 이러한 조건들 중 임의의 조건을 비-천연 미생물 유기체에 이용할 수 있으며, 뿐만 아니라 본 기술 분야에 잘 알려진 다른 혐기 조건을 이용할 수 있다. 이러한 혐기성 도는 실질적으로 혐기성인 조건에서, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생산체들은, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 세포내 농도 5-10 mM 뿐만 아니라 예시된 다른 농도로 합성할 수 있다. 전술한 내용이 세포내 농도를 언급하고 있더라도, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생산 미생물 유기체는 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 세포내에서 생산할 수 있으며, 및/또는 배양 배지로 산물을 분비할 수 있는 것으로 이해된다.

[0269] 본원에 기술된 배양 및 발효 조건 외에도, 툴루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔의 생합성을 달성하기 위한 생장 조건은, 배양 조건에 내삼투압제(osmoprotectant)의 첨가를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 내삼투압제

가 존재하는 조건에서 유지, 증식 및 발효할 수 있다. 간략하게는, 내삼투압제는 삼투 물질(osmolyte)로서 작용하며 본원에 기술된 미생물 유기체를 삼투 스트레스로부터 생존하도록 보조하는 화합물을 지칭한다. 내삼투압제로는, 베타인, 아미노산 및 당 트레할로스를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 이러한 것에 대한 비제한적인 예로는 글리신 베타인, 프랄린 베타인, 디메틸테틴, 디메틸설포니오프로파오네이트, 3-디메틸설포니오-2-메틸프로파오네이트, 피페콜산, 디메틸설포니오아세테이트, 콜린, L-카르니틴 및 엑토인이다. 일 측면에서, 상기 내삼투압제는 글리신 베타인이다. 본 기술 분야의 숙련가라면, 본원에 기술된 미생물 유기체를 삼투 스트레스로부터 보호하기에 적합한 내삼투압제의 양과 타입이 상기 사용되는 미생물 유기체에 따라 결정된다는 것을 알 것이다. 배양 조건에서의 내삼투압제의 양은, 예컨대 약 0.1 mM 이하, 약 0.5 mM 이하, 약 1.0 mM 이하, 약 1.5 mM 이하, 약 2.0 mM 이하, 약 2.5 mM 이하, 약 3.0 mM 이하, 약 5.0 mM 이하, 약 7.0 mM 이하, 약 10 mM 이하, 약 50 mM 이하, 약 100 mM 이하, 또는 약 500 mM 이하일 수 있다.

[0270] 배양 조건은, 예를들면 액체 배양 과정뿐만 아니라 발효 및 그외 대규모 배양 과정을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명의 생합성 산물에 대해 특히 유용한 수율은 협기성 또는 실질적으로 협기성인 배양 조건에서 달성할 수 있다.

[0271] 본원에 기술된 바와 같이, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔의 생합성을 달성하기 위한 예시적 생장 조건은 협기성 배양 또는 발효 조건을 포함한다. 일부 구현예들에서, 본 발명의 비-천연 미생물 유기체는 협기 또는 실질적인 협기 조건에서 유지, 배양 또는 발효 시킬 수 있다. 간략하게는, 협기성 조건은 산소가 없는 환경을 지칭한다. 실질적인 협기성 조건은, 예를들면, 배지내 용해된 산소 농도가 0 내지 10%의 포화율로 존재하는, 배양, 회분식 발효 또는 연속 발효를 포함한다. 실질적인 협기성인 조건은 또한 산소 1% 미만의 분위기로 유지되는 밀폐된 챔버 안에서의 액체 배지내에서 또는 고체 한천 배지 상에서의 세포의 증식 또는 휴지를 포함한다. 상기 산소 비율은, 예컨대 상기 배양물에 N₂/CO₂ 혼합물 또는 그외 적정 산소 이외의 기체 또는 기체들을 살포함으로써 유지할 수 있다.

[0272] 본원에 기술된 배양 조건은 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 생산하기 위한 규모 확대 및 연속 배양일 수 있다. 배양 공정의 예는, 유가 발효 및 회분식 분리; 유가 발효 및 연속 분리, 또는 연속 발효 및 연속 분리를 들 수 있다. 이러한 공정들 모두 본 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 상업적인 양으로 생합성 생산하기에는 발효 공정이 특히 유용하다. 일반적으로, 및 비-연속식 배양 공정을 이용하는 경우와 같이, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔의 연속 및/또는 거의 연속적인 생산은, 본 발명의 비-천연 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생산 유기체를 지수기(exponential phase)로의 증식을 유지 및/또는 거의 유지시키기 위해 충분한 영양분 및 배지에서 배양하는 단계를 포함할 것이다. 이러한 조건에서의 연속 배양은, 예컨대 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 이상의 기간동안의 배양을 포함할 수 있다. 추가적으로, 연속 배양은 1주일, 2주일, 3주일, 4주일 또는 5주일 이상에서 최대 수 개월까지의 장기간을 포함할 수 있다. 다른 예로, 본 발명의 유기체는 특정 용도에 적합하다면 수시간 배양할 수 있다. 상기 연속 및/또는 거의 연속 배양 조건은 이러한 예시된 기간 조건에 포함된 모든 시간 간격을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 아울러, 본 발명의 미생물 유기체의 배양 시간은 원하는 목적을 위해 산물을 충분한 양으로 생산하기에 충분한 기간인 것으로 이해된다.

[0273] 발효 공정은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 간략하게, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔을 생합성 생산하기 위한 발효는, 예컨대 유가 발효 및 배지 분리; 유가 발효 및 연속 분리, 또는 연속 발효 및 연속 분리로 실시할 수 있다. 배지 및 연속 발효 공정의 예는 본 기술 분야에 잘 공지되어 있다.

[0274] 상당량의 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔

을 연속 생산하기 위한 본 발명의 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1을 또는 1,3-부타디엔 생산체를 이용한 상기 발효 공정 외에도, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1을 또는 1,3-부타디엔 생산체는, 또한 예를들면 산물을 다른 화합물로 전환하는 화학 합성 공정에 동시에 투입하거나, 또는 산물을 발효 배양물로부터 분리한 다음 이를 필요에 따라 산물을 다른화합물로 전환하는 화학적 전환 공정을 진행할 수 있다.

[0275] 보다 우수한 생산체를 제조하기 위해, 생장 조건을 최적화하기 위해 대사 모델 연구를 이용할 수 있다. 모델 연구를 통해 또한 경로의 이용성을 추가적으로 최적화하는 유전자 낫아웃을 설계할 수 있다 (예, 참고 미국특허공개번호 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US2002/0168654와 US 2004/0009466, 및 미국특허번호 7,127,379). 모델 분석을 통해 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1을 또는 1,3-부타디엔을 보다 효율적으로 생산하는 방향으로 대사를 이동시키는 세포 생장에 대한 효과들을 신뢰성있게 예전할 수 있다.

[0276] 원하는 산물의 생합성에 유익한 대사 변이를 동정 및 설계하기 위한 한가지 컴퓨터 작업 방식은 OptKnock 전산프래임워크이다(Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)). OptKnock은 표적 산물을 과생산하는 유전적으로 안정한 미생물을 만드는, 유전자 결손 또는 파괴 전략을 제시하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 프로그램이다. 구체적으로, 상기 프래임워크에서는 원하는 생화학물질이 세포 생육의 필수 부산물이 되도록 강제하는 유전자 조작을 제시하기 위해, 미생물의 전체 대사 및/또는 생화학적 네트워크를 조사한다. 전략적으로 배치시킨 유전자 결손 또는 그외 기능성 유전자의 파괴를 통해, 생화학적 생산을 세포 생육과 커플링시킴으로써, 생물반응기에서의 장시간 경과 후 상기 조작된 균주에 부과되는 생육 선택압은 강제적인 생육과 커플링된 생화학적 생산의 결과로서 성능을 개선시킨다. 마지막으로, 유전자 결손의 구축시, OptKnock에서 선택된 유전자들은 게놈에서 완전히 제거되기 때문에, 설계된 균주는 야생형 형태로 되돌아갈 가능성이 거의 없다. 따라서, 상기 컴퓨터를 통한 계산 방법을 이용하여, 원하는 산물의 생합성을 도출하는 대안적인 경로를 동정하거나, 또는 원하는 산물의 생합성을 추가로 최적화하기 위해 비-천연 미생물 유기체와 조합하여 사용할 수 있다.

[0277] 간략하게 설명하면, OptKnock는 본원에서 세포 대사를 모델링하기 위한 계산 방법 및 시스템을 지칭하는 용어이다. OptKnock 프로그램은 특정 제한 (particular constraint)을 플럭스 밸런스 분석(FBA) 모델과 통합시킨 방법 및 모델 프래임워크에 관한 것이다. 이러한 제한으로는, 예컨대 정성적인 동역학 정보(qualitative kinetic information), 정성적인 조절 정보, 및/또는 DNAマイ크로어레이 실험 데이터를 포함한다. 또한, OptKnock는 예를들면 플럭스 밸런스 모델로부터 나오는 플럭스 바운더리를 엄격하게 하고 후속적으로 유전자 추가 또는 결손 시의 대사 네트워크의 성능 한계를 탐지함으로써, 다양한 대사 문제들에 대한 해법을 도출한다. OptKnock 전산프래임워크는 대사 네트워크의 성능 한계의 유효 쿼리를 허용하는 모델 포뮬레이션을 구출할 수 있으며, 수득되는 혼합-정수 선형 계획의 문제점을 해결하는 방법을 제공할 수 있다. 본원에서 OptKnock로 지칭되는 대사 모델링 및 시뮬레이션 방법들은 예를 들어 2002년 1월 10일자로 출원된 미국 공개공보 2002/016854, 2002년 1월 10일자로 출원된 국제 특허 제 PCT/US02/00660, 및 2007년 8월 10일자로 출원된 미국 공개공보 2009/0047719에 개시되어 있다

[0278] 산물의 생합성 생산에 유리한 대사 변이를 동정 및 설계하기 위한 또 다른 계산법은, SimPheny[®]로 칭하는 대사 모델링 및 시뮬레이션 시스템이다. 이 계산법 및 시스템은 예컨대 2002년 6월 14일자로 출원된 미국 공개공보 2003/0233218 및 2003년 6월 13일자로 출원된 국제 특허 출원 PCT/US03/18838에 개시되어 있다. SimPheny[®]는 인 실리코(*in silico*) 네트워크 모델을 만들고 생물 시스템의 화학 반응들을 통해 매스, 에너지 또는 전하의 흐름을 시뮬레이션하여 상기 시스템에서의 화학 반응의 임의의 및 모든 가능한 작용기를 포괄하는 해결 영역을 규정함으로써, 상기 생물 시스템에서 허용되는 다양한 활성들을 결정할 수 있는 전산 시스템이다. 이러한 접근법은 상기 해결 영역이 포함되는 반응들의 공지된 화학량론 뿐만 아니라 반응을 통한 최대 플럭스와 조합된 반응 열역학적 한계 및 용량 한계 등의 한계로 규정되기 때문에, 제한 조건 기반의 모델링(constraints-based modeling)으로 지칭된다. 이러한 제한에 의해 규정되는 영역을 조사하여, 상기 생물 시스템 또는 그것의 생화학적 성분들의 표현형적 역량 및 행태를 결정할 수 있다.

[0279] 이러한 계산법은 생물 시스템들이 유연하고 다수의 다른 방식으로도 동일한 결과에 도달할 수 있기 때문에 생물학적 현실과 일치된다. 생물 시스템은 모든 살아있는 시스템들이 직면해야 하는 기본적인 제약들에 의해 제한되

는 진화 기전을 통해 설계된다. 따라서, 제한 조건 기반의 모델링 전략은 이러한 일반적인 현실을 포괄한다. 더욱이, 제한 조건의 엄격화를 통해 네트워크 모델에 추가적인 제한을 계속적으로 부과하는 능력은 상기 해결 영역의 크기를 줄이게 되고, 그래서 생리학적 성능 또는 표현형을 예견할 수 있는 정확도가 향상된다.

[0280] 본 발명의 교시 및 지침을 감안하여, 본 기술 분야의 당업자는 숙주 미생물 유기체에서 원하는 화합물의 생합성을 설계 및 구현하기 위해 대사 모델링 및 시뮬레이션에 다양한 계산 프래임워크를 적용할 수 있을 것이다. 이러한 대사 모델링 및 시뮬레이션 방법은, 예를 들어 SimPheny® 및 OptKnock로 상기에 데시된 전산 시스템을 포함한다. 본 발명을 예시하기 위해, 모델링 및 시뮬레이션을 위한 OptKnock 계산 프래임워크 체계와 관련하여 일부 방법들을 본원에서 기술한다. 본 분야의 기술자들은, 본 분야에 잘 알려져 있는 임의의 이러한 다른 대사 모델링 및 시뮬레이션 계산 프래임워크 및 방법에, OptKnock를 이용한 대사 변이의 동정, 설계 및 구현을 적용하는 방법을 알 것이다.

[0281] 전술한 방법들은 파괴할 한가지 이상의 대사 반응 세트를 제공할 것이다. 상기 세트 또는 대사 변이의 각 반응의 소거시, 원하는 산물을 유기체가 생성하는 동안에 필수 산물로서 생산할 수 있다. 상기 반응들은 공지되어 있으므로, bilevel OptKnock 문제에 대한 해법은, 또한 상기 반응 세트의 각 반응을 촉매하는 하나 이상의 효소를 암호화하는 관련 유전자 또는 유전자들을 제공해 줄 것이다. 반응 세트, 및 각 반응에 참여하는 효소를 암호화하는 해당 유전자를 동정하는 것은 일반적으로 효소와 코딩 유전자 간의 관련성이 포함된 반응 데이터베이스를 이용한 반응들의 상관 관계를 통해 달성되는 자동화된 과정이다.

[0282] 일단 동정한 후, 원하는 산물을 달성하기 위해 파괴시켜야 하는 반응 세트는, 세트에 포함된 각 대사 반응을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 기능적 파괴에 의해, 타겟 세포 또는 유기체에서 수행한다. 상기 반응의 기능적 파괴를 달성하는데 특히 유용한 한가지 수단은, 각 암호화 유전자의 결손이다. 그러나, 일부 경우에, 예를들면 프로모터 또는 조절 인자에 대한 시스 결합 부위와 같은 조절 영역의 돌연변이, 결손 등의 기타 유전적 이상에 의해, 또는 다수 위치들 중 임의 위치에서의 암호화 서열의 절단(truncation)에 의해, 상기 반응을 파괴하는 것이 유익할 수 있다. 유전자 세트의 전체 결손까지는 아닌 그 미만의 수준의 결손을 발생시키는 상기한 이상은, 예컨대 산물의 커플링의 신속한 평가가 필요할 때 또는 유전자 복원이 이루어질 가능성이 거의 없을 경우에, 유용할 수 있다.

[0283] 추가적인 반응 세트가 파괴되거나 또는 생육과 커플링된 원하는 산물의 생합성이 달성되도록 대사 변이를 유도하는, 전술한 bilevel OptKnock 문제에 대한 추가적인 생산적인 해법을 동정하기 위해, 정수 컷(integer cut)으로 칭해지는 최적화 방법을 실행할 수 있다. 상기 방법은 상기 예시된 OptKnock 문제를 각 반복에서 정수 컷으로 지정되는 추가적인 제한을 통합하여 반복적으로 해결함으로써 진행된다. 정수 컷 제한은, 상기 해결 과정으로, 산물 생합성과 생육을 필수적으로 조합시킨 임의의 이전 반복에서 동정되는 정확하게 동일한 반응 세트가 선택되지 않게 방지한다. 예컨대, 앞서 동정된 생육과 결합된 대사 변이에서 파괴시킬 반응들1, 2 및 3가지가 명시된다면, 하기 제한으로 동일 반응이 후속 해법에서 동시에 고려되지 않도록 한다. 정수 컷 방법은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 예컨대 Burgard et al., Biotechnol. Prog. 17:791-797 (2001)에서 찾아 볼 수 있다. 대사 모델링 및 시뮬레이션을 위해 OptKnock 계산 프래임워크와의 조합 사용에 대한 본원에 기술된 모든 방법들에서와 같이, 반복적인 계산 분석에서 쓸데없는 반복을 줄이는 컷 방법을, 또한, 예컨대, SimPheny® 등의 당해 기술 분야에 널리 공지된 그외 계산 프래임워크와 함께 적용할 수 있다.

[0284] 타겟 생화학 산물의 생산을 동정된 유전자 변이를 가지도록 조작된 세포 또는 유기체의 생육과 필연적으로 커플링시키는 방법을 비롯하여, 본원에 예시된 방법들로, 원하는 산물을 생합성으로 생산하는 세포 및 유기체를 구축할 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 계산법은 OptKnock 및 SimPheny® 중에서 선택되는 인 실리코(*in silico*) 방법으로 확인되는 대사 변이를 동정 및 구현할 수 있다. 대사 변이 세트로는, 예컨대 하나 이상의 생합성 경로 효소들의 부가 및/또는 유전자 결손에 의한 파괴 등의 한가지 이상의 대사 반응의 기능적 파괴를 포함할 수 있다.

[0285] 전술한 바와 같이, OptKnock 방법은 오랜 기간의 생육 선택을 거쳤을 때 미생물 돌연변이 네트워크가 계산적으로 예측되는 최대-증식 표현형을 나타내는 방향으로 진화할 수 있다는 전제에서 개발되었다. 즉, 이러한 방법은 선택압 하에서 유기체의 자기 최적화 능력을 활용한다. OptKnock 프래임워크는 네트워크 화학량론에 근거하여 생화학적 생산과 세포 증식을 강제로 커플링하는 유전자 결손의 조합을 철저하게 조사할 수 있다. 최적 유전자/반응 낫아웃을 확인하는데에는, 형성되는 네트워크에 대한 최적 증식 해법이 대상 생화학적 산물을 과생산하도록, 활성 반응 세트를 선택하는 2단식 최적화 문제의 해법이 요구된다(Burgard et al., Biotechnol. Bioeng.

84:647-657 (2003)).

- [0286] 에스케리키아 콜라이 대사의 인 실리코 화학량론 모델을 채택하여, 기존에 예시되고, 예를 들어 미국 특허 공개 공보 US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 및 US 2004/0009466, 및 미국 특허 7,127,379에 기술된 바와 같이, 대사 경로의 필수 유전자들을 동정할 수 있다. 본 발명에 개시된 바와 같이, OptKnock의 수리적 프레임워크를 적용하여, 원하는 산물을 증식과 조합하여 생산가능하게 하는, 유전자 결손을 정확하게 파악할 수 있다. 나아가, 상기 이단식 OptKnock 문제 해법은 오직 하나의 결손 세트만을 제공한다. 모든 의미 있는 해법들, 즉 증식과 조합되어 생산되게 하는 낫아웃 세트들을 모두 열거하기 위해, 정수 것으로 지칭되는 최적화 기법을 실행할 수 있다. 이는, 전술한 바와 같이, 각 반복에서 정수 것으로 지칭되는 추가적인 제한을 추가하면서 OptKonck 문제를 반복적으로 해결하는 과정을 수반한다.
- [0287] 본원에 기재된 바와 같이, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로의 원하는 활성을 암호화하는 핵산은 숙주 유기체에 도입될 수 있다. 일부 경우에서, 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 생산을 증가시키도록 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 효소 또는 단백질 활성을 변형시키는 것이 바람직하다. 예를들면, 단백질 또는 효소의 활성을 증가시키는 공지된 돌연변이는 암호화 핵산 분자에 도입시킬 수 있다. 아울러, 효소 또는 단백질의 활성을 높이거나 및/또는 저해 활성을 낮추기 위해, 예컨대 네거티브 조절자의 활성을 낮추기 위해, 최적화 방법을 적용할 수 있다.
- [0288] 이러한 최적화 방법의 한가지가 방향성 진화(directed evolution)이다. 방향성 진화는, 효소의 특성을 개선 및/또는 변이시키기 위해, 특정 유전자로 표적화된 돌연변이를 도입하는 과정을 포함하는, 강력한 방법이다. 향상된 및/또는 변이된 효소는 다수의(예를들면, >104) 효소 변이체를 자동으로 스크리닝할 수 있는 민감성 고성능 스크리닝 분석을 개발 및 구현하여 동정할 수 있다. 돌연변이 유발 및 스크리닝의 반복 라운드를 전형적으로 수행하여 효소에 최적화된 특성을 부여할 수 있다. 돌연변이를 유발하기 위한 유전자의 영역들을 동정하는데 도움이 될 수 있는 수리적 알고리즘들도 또한 개발되었고, 제조 및 스크리닝할 필요가 있는 효소 변이체들의 수를 현저하게 줄일 수 있다. 다양한 변이체 라이브러리 제조에 유효한 다수의 방향성 진화 기법들이 개발되었고 (Hibbert et al., Biomol. Eng 22:11-19 (2005); Huisman and Lalonde, In Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries pgs. 717-742 (2007), Patel (ed.), CRC Press; Otten and Quax. Biomol. Eng 22:1-9 (2005); 및 Sen et al., Appl Biochem. Biotechnol 143:212-223 (2007)), 많은 효소 클래스들에서의 매우 다양한 특성을 개선시키기 위해, 이러한 방법들이 성공적으로 적용되었다. 방향적 진화 기법에 의해 향상 및/또는 변이시킨 효소 특징들로는, 예컨대 비천연 기질의 변환을 위해, 선택성/특이성; 확실한 고온 처리를 위해 온도 안정성; 높거나 낮은 pH 조건에서의 생물학적 처리를 위해 pH 안정성; 기질 또는 산물 관용성, 이로써 높은 생산 역가를 달성할 수 있음; 비천연 기질들을 포괄하기 위한 광범위한 기질 결합성 등의, 결합성 (K_m); 산물, 기질 또는 주요 중간산물에 의해 저해를 없애기 위한, 저해성 (K_i); 원하는 플럭스를 달성하기 위해 효소적 반응 속도를 높이기 위한, 활성 (k_{cat}); 단백질 수율 및 전체 경로 플럭스를 높이기 위한, 발현 수준; 초기 조건에서 공기 민감성 효소의 작동을 위한, 산소 안정성; 및 산소가 존재하지 않는 조건에서 초기성 효소의 작동을 위한, 혐기 활성이 있다.
- [0289] 특정 효소의 원하는 특징을 표적하기 위한 유전자의 돌연변이 유발 및 다양화를 위한, 다수의 예시적인 방법들이 개발되었다. 이러한 방법들은 본 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 이러한 방법들 중 임의 방법을 이용하여 톨루엔, 벤젠, p-톨루에이트, 테레프탈레이트, (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부ток시)포스포네이트, (2-히드록시-4-옥소부ток시)포스포네이트, 벤조에이트, 스티렌, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1올 또는 1,3-부타디엔 경로 효소 또는 단백질의 활성을 변형 및/또는 최적화시킬 수 있다. 이러한 방법으로는, 비제한적인 예로서, PCR 반응에서 DNA 중합효소의 필렐리티를 낮춤으로써 랜덤 점 돌연변이를 도입하는 EpPCR (Pritchard et al., J Theor. Biol. 234:497-509 (2005)); 완전한 환형 플라스미드를 주형으로 사용하고 마지막 뉴클레오티드 2개에 엑소뉴클레아제 내성 포스페이트 결합을 구비한 랜덤 6-mer를 이용하여 플라스미드를 증폭시킨 다음 플라스미드를 탠덤 리피트에서 다시 환형화하는 세포로 형질전환시키는 것을 제외하고는, epPCR과는 비슷한, 에러-유발 롤링 서클 증폭(Error-prone Rolling Circle Amplification) (epRCA) (Fujii et al., Nucleic Acids Res. 32:e145 (2004); 및 Fujii et al., Nat. Protoc. 1:2493-2497 (2006)); 전형적으로 Dnase I 또는 Endo V 등의 뉴클레아제

제로 2 이상의 변이체 유전자를 잘라, DNA 중합효소의 존재 하에 어닐링 및 연장 과정으로 이루어진 사이클로 재조립하는 랜덤 단편 풀을 제작함으로써 키메라 유전자 라이브러리를 제조하는, DNA 또는 패밀리 셔플링(Family Shuffling) (Stemmer, Proc Natl Acad Sci USA 91:10747-10751 (1994); 및 Stemmer, Nature 370:389-391 (1994)); 주형을 프라이밍한 후, 변성 및 매우 짧은 시간 동안(약 5초)의 어닐링/연장으로 2단계 PCR 사이클을 반복하는 과정을 수반하는, 스테거드 연장(Staggered Extension) (StEP) (Zhao et al., Nat. Biotechnol. 16:258-261 (1998)); 랜덤 서열 프라이머를 사용하여 주형의 여러 세그먼트에 상보적인 다수의 짧은 DNA 단편을 제조하는, 랜덤 프라이밍 재조합(Random Priming Recombination, RPR) (Shao et al., Nucleic Acids Res 26:681-683 (1998))을 포함한다.

- [0290] 추가적인 방법으로는, 선형화된 플라스미드 DNA를 사용하여 미스매치 복원에 의해 복원되는 혜테로두플렉스를 형성하는, 혜테로두플렉스 재조합(Heteroduplex Recombination) (Volkov et al., Nucleic Acids Res. 27:e18 (1999); 및 Volkov et al., Methods Enzymol. 328:456-463 (2000)); Dnase I 잔편화 및 단일 가닥 ssDNA(ssDNA A)의 크기 분획화를 이용하는, RACHITT (Random Chimeragenesis on Transient Templates) (Coco et al., Nat. Biotechnol. 19:354-359 (2001)); 주형의 풀로서 사용되는 단향성(unidirectional) ssDNA 단편들의 존재 하에 프라이머로부터 단향성으로 자라는 가닥의 주형 스위칭을 수반하는, RETT (Recombined Extension on Truncated templates) (Lee et al., J. Molec. Catalysis 26:119-129 (2003)); 축중(degenerate) 프라이머를 사용하여 분자들 간의 재조합을 조절하는 DOGS (Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling) (Bergquist and Gibbs, Methods Mol. Biol. 352:191-204 (2007); Bergquist et al., Biomol. Eng 22:63-72 (2005); Gibbs et al., Gene 271:13-20 (2001)); 대상 유전자 또는 유전자 단편에서 1 bp가 결손된 조합 라이브러리(combinatorial library)를 만드는, ITCHY(Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes) (Ostermeier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3562-3567 (1999); 및 Ostermeier et al., Nat. Biotechnol. 17:1205-1209 (1999)); 포스포티오에이트 dNTA를 이용하여 절단체(truncation)를 제조하는 것을 제외하고는 ITCHY와 비슷한, THIO-ITCHY(Thio-Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzyme) (Lutz et al., Nucleic Acids Res 29:E16 (2001)); 재조합 유전자, ITCHY 및 DNA 셔플링 방법 2가지가 조합된 SCRATCHY (Lutz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11248-11253 (2001)); epPCR로 제작한 돌연변이를 유지되는 유용 활성을 스크리닝/선별하는, RNDM (Random Drift Mutagenesis) (Bergquist et al., Biomol. Eng. 22:63-72 (2005)); 포스포티오에이트 뉴클레오티드의 랜덤 병합 및 절단을 이용하여 랜덤 길이의 단편들의 풀을 제조하고, 이를 주형으로 사용하여 이노신 등의 "유니버설" 염기들의 존재 하에 연장시키고, 이노신-함유 상보체의 복제로 랜덤 염기 병합이 이루어지고, 결과적으로 돌연변이가 유발되는, 랜덤 돌연변이 유발 방법인, SeSaM (Sequence Saturation Mutagenesis) (Wong et al., Biotechnol. J. 3:74-82 (2008); Wong et al., Nucleic Acids Res. 32:e26 (2004); 및 Wong et al., Anal. Biochem. 341:187-189 (2005)); "타겟에서 모든 유전자 다양성"을 코딩하고 셔플링된 후대(shuffled progeny)에 대해 매우 다양한 다양성을 허용할 수 있도록 설계된 중첩 올리고뉴클레오티드를 사용하는, 합성 셔플링(Synthetic Shuffling) (Ness et al., Nat. Biotechnol. 20:1251-1255 (2002)); dUTP 병합 후 우라실 DNA 글리코실라제로 처리한 다음 피페리딘을 처리하여, 엔드포인트 DNA 발효를 수행하는 조합을 활용하는, 뉴클레오티드 교환 및 절개 기법(Nucleotide Exchange and Excision Technology) NexT (Muller et al., Nucleic Acids Res. 33:e117 (2005))이 있다.

- [0291] 추가적인 방법으로는, 링커를 사용하여 2종의 관련성이 멀거나 관련성이 없는 유전자들 간의 융합을 촉진시키고, 2가지 유전자 간의 다양한 키메라를 제조하여 단일-교차 하이브리드 라이브러리를 형성하는, 서열 상동성-독립적인 단백질 재조합(SHIPREC) (Sieber et al., Nat. Biotechnol. 19:456-460 (2001)); 출발 물질이 삽입체를 포함하는 슈퍼코일형의 이중 가닥 DNA (dsDNA) 플라스미드와 원하는 돌연변이 부위에 대해 축중인 2개의 프라이머를 포함하는, 유전자 부위 포화 돌연변이 유발(Gene Site Saturation Mutagenesis, GSSM™) (Kretz et al., Methods Enzymol. 388:3-11 (2004)); 제한된 영역을 많은 수의 가능성 있는 아미노산 서열 변이로 치환하는 짧은 올리고뉴클레오티드 카세트를 사용하는, 조합 카세트 돌연변이 유발(Combinatorial Cassette Mutagenesis, CCM) (Reidhaar-Olson et al. Methods Enzymol. 208:564-586 (1991); 및 Reidhaar-Olson et al. Science 241:53-57 (1988)); 기본적으로 CCM과 비슷하며, 높은 돌연변이 유발율로 epPCR을 이용하여 핫 스팟과 핫 영역을 동정한 다음 CMCM으로 연장하여 단백질 서열 스페이스의 한정된 영역을 포괄(cover)하는, 조합성 다중 카세트 돌연변이 유발(Combinatorial Multiple Cassette Mutagenesis, CMCM) (Reetz et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. 40:3589-3591 (2001)); DNA 중합효소 III의 돌연변이 서브유닛을 코딩하는 mutD5 유전자를 이용하는 조건부 ts 돌연변이 유발 플라스미드를 사용하여, 선택하는 동안에 랜덤 및 천연 돌연변이 빈도를 20에서 4000 X로 증가시킬 수 있고, 선택이 필요하지 않을 때에 유해한 돌연변이의 축적을 차단할 수 있는, 돌연변이 유발 균주 기법(Mutator Strains technique) (Selifonova et al., Appl. Environ. Microbiol. 67:3645-3649

(2001)); Low et al., J. Mol. Biol. 260:359-3680 (1996))이 있다.

[0292] 추가적인 방법의 예로는, 선택된 아미노산의 조합 돌연변이(combinatorial mutation)를 분석 및 최적화하는 다양한 돌연변이 유발 방법인 LTM (Look-Through Mutagenesis) (Rajpal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:8466-8471 (2005)); 한번에 여러 유전자에 적용할 수 있거나, 또는 단일 유전자의 대규모 키메라(복수의 돌연변이) 라이브러리를 제조할 수 있는 DNA 셔플링 방법인, 유전자 어셈블리 (Tunable GeneReassembly™ (TGR™) Technology supplied by Verenium Corporation), 특정 폴드를 가지고 있는 구조적으로 정의된 단백질 백본을 고정하며, 폴드와 전체 단백질 에너제틱스를 안정화시킬 수 있는 아미노산 치환에 대한 서열 스페이스를 검색하는 최적화 알고리즘이며, 일반적으로 공지된 3차원 구조를 가진 단백질에서 가장 효과적으로 작동하는, PDA (in Silico Protein Design Automation) (Hayes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:15926-15931 (2002)); 및 구조/기능에 대한 지식을 이용하여 효소 개선이 가능한 부위를 선택하는 단계, Stratagene QuikChange (Stratagene; San Diego CA)와 같은 돌연변이 유발 방법을 이용하여 선택한 부위에서의 포화 돌연변이 유발 (saturation mutagenesis)을 수행하는 단계, 원하는 특징을 스크리닝/선별하는 단계, 및 개선된 클론(들)을 이용하여 다른 부위에 대해서도 다시 시작하여 원하는 활성이 달성될 때까지 계속 반복하는 단계를 포함하는, ISM (Iterative Saturation Mutagenesis) (Reetz et al., Nat. Protoc. 2:891-903 (2007); and Reetz et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. 45:7745-7751 (2006))이 있다.

[0293] 돌연변이 유발을 위한 임의의 전술한 방법들은 단독으로 또는 임의 조합하여 사용할 수 있다. 아울러, 방향성 진화 방법들 중 임의의 한가지 방법 또는 조합을 본원에 기술된 적응적인 진화 기법과 더불어 사용할 수 있다.

[0294] 실시예 I

[0295] 벤젠 및 톨루엔 경로들

[0296] 본 실시예는 페닐알라닌에서 톨루엔, 페닐알라닌에서 벤젠 및 벤조일-CoA에서 스티렌로의 경로들을 보인다.

[0297] 페닐알라닌에 대한 효소적 전환 경로들이 도 1에 도시된다. 제1 단계는 페닐알라닌에서 페닐피루베이트로의 전환이고, 아미노전이효소 또는 탈아민 산화환원효소에 의해 수행될 수 있다. 도 1 단계 B에서 페닐피루베이트는 페닐아세트알데히드로 탈탄산된다. 톨루엔은 직접 페닐아세트알데히드로부터 탈카르보닐되어 생성되거나 (도 1, 단계 E), 간접적으로 페닐아세테이트 중간체를 거쳐 생성될 수 있다 (도 1, 단계들 C 및 D). 페닐아세테이트는 페닐아세트알데히드 탈수효소 또는 페닐아세트알데히드 산화효소에 의해 페닐아세테이트로 산화된다 (도 1, 단계 C). 대안 경로는 페닐피루베이트 산화효소에 의한 페닐피루베이트의 페닐아세테이트로의 산화적 탈탄산반응이다 (도 1, 단계F).

[0298] 페닐알라닌에서 벤젠으로의 효소적 전환 일-단계 경로는 도 2에 도시된다. 페닐알라닌 및 물의 벤젠, 피루베이트 및 암모니아로의 전환은 페닐알라닌 벤젠-분해효소 활성을 가지는 효소로 측매된다.

[0299] 벤조일-CoA에서 스티렌으로의 효소 경로들은 도 3에 도시된다. 벤조일-CoA는 수 많은 생합성 및 분해 경로들의 공통 대사 중간체이다. 벤조일-CoA 생합성, 및 분해산물로서의 벤조일-CoA 생성이 포함된 경로들은 본 분야에서 알려져 있다. 제안된 스티렌 경로들에서, 벤조일-CoA 및 아세틸CoA는 먼저 베타-케토티올아제에 의해 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA로 전환된다 (도 3, 단계 A). 이후 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA의 CoA 잔기는 CoA 가수분해효소, 전이효소 또는 생성효소에 의해 방출된다 (도 3, 단계 B). 대안으로, 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA는 포스포트란스-3-옥소-3-페닐프로피오닐라제 및 벤조일-아세테이트 키나아제에 의해 효소 두 단계들에서 벤조일-아세테이트로 전환된다 (도 3, 단계들 F 및 G). 일단 형성된 후, 벤조일-아세테이트는 탈탄산, 환원 및 탈수되어 스티렌을 형성한다 (도 3, 단계들 C, D 및 E).

[0300]

도 1-3에 도시된 변환 과정을 촉매하는 효소들은 EC 번호로 분류되고 (표 1) 이하 기술된다.

번호	작용	단계
1.1.1.a	산화환원효소 (옥소에서 알코올)	3D
1.2.1.a	산화환원효소 (알데히드에서 산)	1C
1.2.3.a	알데히드 산화효소	1C/F
1.4.1.a	산화환원효소 (아민화/탈아민)	1A
2.3.1.a	아실전이효소 (포스페이트기를 CoA로 전달)	3F
2.3.1.b	베타-케토티올라아제	3A
2.6.1.a	아미노전이효소	1A
2.7.2.a	인산전이효소, 카르복실기 수용체 (키나아제)	3G
2.8.3.a	조효소-A 전이효소	3B
3.1.2.a	티올에스테르 가수분해효소 (CoA 특이적)	3B
4.1.1.a	카르복시-분해효소	1B/D, 3C
4.1.99.a	탈카보닐효소	1E
4.1.99.b	분해효소	2
4.2.1.a	하이드로-리아제	3E
6.2.1.a	산-티올 연결효소	3B

[0301]

[0302]

1.1.1.a 산화환원효소 (옥소에서 알코올): 아세토페논에서 1-페닐에탄올로의 환원은 (도 3의 단계 D) 아세토페논 환원효소 활성을 가지는 케톤 환원효소에 의해 촉매된다. 본 활성이 있는 효소들은 수 많은 유기체에서 특정되고, 산물형성은 일반적으로 입체선택적이다. 본 활성을 가지는 예시적 효소는 락토바실러스 브레비스의 R-특이적 단쇄 탈수소효소/환원효소이고, 이는 널리 연구되고, 구조적으로 특정되고 보조기질로서 NADPH보다 NADH을 선호화도록 재-조작되었다 (Schlieben et al., *J. Mol. Biol.* 349:801-813 (2005)). 아세토페논 환원효소 활성을 가지는 추가적인 효소들은 슈도모나스 플루오레센스의 *adhF1* (Hildebrandt et al., *Appl. Microbiol Biotechnol.* 59:483-487 (2002)), 테르무스 테르모필루스 (*Thermus thermophilus*)의 *adh* (Pennacchio et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3949-3958 (2008)) 및 레이프소니아 종 (*Leifsonia* sp.) S749의 *LSADH* (Inoue et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:418-426 (2006))로 암호화된다. S-특이적 효소는 탈질소세균 아로마토레움 아로마티쿰 (*Aromatoleum aromaticum*) *EbN1* (Kniemeyer et al., *Arch. Microbiol.* 176:129-135 (2001))의 에틸벤젠 분해 경로에서 특정되었다. *ped*로 암호화된 본 효소는, 낮은pH (4)에서 환원 방향을 선호하고, 중성 pH에서 산화 방향이 선호된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
LVIS_0347	YP_794544.1	116333017	락토바실러스 브레비스
<i>adhF1</i>	AAL79772.1	18860822	슈도모나스 플루오레센스
<i>adhTt</i>	YP_003977.1	46198310	테르무스 테르모필루스
<i>LSADH</i>	BAD99642.1	67625613	레이프소니아 종 S749
<i>ped</i>	YP_158329.1	56476740	아로마토레움 아로마티쿰 <i>EbN1</i>

[0303]

[0304]

다양한 알코올 탈수소효소들이 케톤을 알코올 작용기로 환원시킨다. 이들 효소는 아세토페논 환원 촉매에도 적합한다. *E. coli*에서 이러한 두 효소들은 말레이트 탈수소효소 (*mdh*) 및 라테이트 탈수소효소 (*IdhA*)에 의해 암호화된다. 랄스토니아 유프로파 (랄스토니아 유프로파)의 라테이트 탈수소효소는 라테이트, 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소글루타레이트를 포함한 다양한 사슬 길이의 2-케토산들에 대한 높은 활성을 보인다 (Steinbuchel et al., *Eur. J. Biochem.* 130:329-334 (1983)). 알파-케토아디페이트의 알파-히드록시아디페이트로의 전환은 래트 및 사람 태반에서 발견되어 보고되는 2-케토아디페이트 환원효소에 의해 촉매된다 (Suda et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 176:610-620 (1976); Suda et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77:586-591 (1977)). 추가적인 산화환원효소는 사람 심장의 미토콘드리아 3-히드록시부티레이트 탈수소효소 (*bdh*)이고 클로닝되고 특정되었다 (Marks et al., *J. Biol. Chem.* 267:15459-15463 (1992)). *C. 베이제린 크키*의 알코올 탈수소효소들 (Ismail et al., *J.Bacteriol.* 175:5097-5105 (1993)) 및 *T. brockii* (Lamed et al., *Biochem. J.* 195:183-190 (1981); Peretz et al., *Biochemistry* 28:6549-6555 (1989))는 아세톤을 이소프로판올로 전환시킨다. 메틸 에틸 케톤 환원효소, 또는 달리, 2-부탄올 탈수소효소는, MEK 환원을 촉매하여 2-

부탄올을 형성한다. 예시적 MEK 환원효소들은 로도코쿠스 루버(로도코쿠스 루버) (Kosjek et al., *Biotechnol Bioeng.* 86:55-62 (2004)) 및 피로코커스 푸리오수스 (van der et al., *Eur. J. Biochem.* 268:3062-3068 (2001))에서 발견된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>Mdh</i>	AAC76268.1	1789632	에스케리키아 콜라이
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	에스케리키아 콜라이
<i>Ldh</i>	YP_725182.1	113866693	랄스토니아 유트로파
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	호모 사피엔스
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	클로스트리디움 베이제린크카 NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	테르모아세로박터 브로크카 HTD4
<i>adhA</i>	AAC25556	3288810	피로코커스 푸리오수스
<i>sadh</i>	CAD36475	21615553	로도코쿠스 루버

[0305]

[0306] 1.2.1.a 산화환원효소 (알데히드에서 산): 페닐아세트알데히드의 페닐아세테이트로의 산화는 EC 분류 1.2.1에 속하는 페닐아세트알데히드 탈수소효소에 의해 촉매된다 (도 1, 단계 C). NAD⁺-의존성 페닐아세트알데히드 탈수소효소들 (EC 1.2.1.39)은 *E. coli*, 슈도모나스 푸티타 및 안티르리눔 마주스 (*Antirrhinum majus*)에서 특정되었다 (Long et al., *Plant J* 59:256-265 (2009); Arias et al., *Environ.Microbiol* 10:413-432 (2008); Ferrandez et al., *FEBS Lett.* 406:23-27 (1997)). 페닐아세트알데히드에 높은 활성을 가지는 NAD⁺-의존성 알데히드 탈수소효소들은 포유류 예를들면 보스 타우루스 (*Bos Taurus*), 라투스 노르베기кус (*Rattus norvegicus*) 및 호모 사피엔스에서 특정되었다 (Klyosov, *Biochemistry* 35:4457-4467 (1996a); Lindahl et al., *J Biol.Chem.* 259:11991-11996 (1984)). 사람의 간장에서 발견되는 2종의 알데히드 탈수소효소들, ALDH-1 및 ALDH-2는, 페닐아세트알데히드에 대한 입증된 활성으로 다양한 지방족, 방향족 및 다환 알데히드들에 대한 광범위한 기질 범위를 가진다 (Klyosov, *Biochemistry* 35:4457-4467 (1996b)). *badh*에 의해 암호화되는 슈도모나스 푸티타의 NADP⁺-의존성 벤즈알데히드 탈수소효소 또한 페닐아세트알데히드에 대한 활성을 보였다 (Yeung et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1784:1248-1255 (2008)). 페닐아세트알데히드에 대한 높은 활성을 가지는 NAD⁺-의 존성 알데히드 탈수소효소들은 또한 포유류 예를들면 보스 타우루스, 라투스 노르베기кус 및 호모 사피엔스에서 특정되었다 (Klyosov, *Biochemistry* 35:4457-4467 (1996a); Lindahl et al., *J Biol.Chem.* 259:11991-11996 (1984)). 사람의 간장에서 발견되는 2종의 알데히드 탈수소효소들, ALDH-1 및 ALDH-2는, 페닐아세트알데히드에 대한 입증된 활성으로 다양한 지방족, 방향족 및 다환 알데히드들에 대한 광범위한 기질 범위를 가진다 (Klyosov, *Biochemistry* 35:4457-4467 (1996b)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>feaB</i>	AAC74467.2	87081896	에스케리키아 콜라이
<i>peaE</i>	ABR57205.1	150014683	슈도모나스 푸티타
<i>BALDH</i>	ACM89738.1	223452696	안티르리눔 마주스
<i>ALDH-2</i>	P05091.2	118504	호모 사피엔스
<i>badh</i>	P39849.1	731175	슈도모나스 푸티타

[0307]

[0308] 1.2.3.a 알데히드 산화효소: O₂-의존성 알데히드 산화효소 효소가 페닐아세트알데히드 또는 페닐피루베이트를 페닐아세테이트로 전환시키는데 적용될 수 있다 (도 1의 단계들 C 및 F). 페닐아세트알데히드 산화효소들은 페닐아세트알데히드, 물 및 O₂ 를 페닐아세테이트 및 과산화수소로 전환시킨다. 예시적 페닐아세트알데히드 산화효소들은 메틸로바실러스 종, 슈도모나스 종, 스트렙토마이세스 모데라투스, 카비아 포르셀루스 및 제아 마이스에서

발견된다 (Koshiba et al., *Plant Physiol.* 110:781-789 (1996)). 제아 마이스의 2종의 플라빈- 및 몰리브덴- 함유 알데히드 산화효소들은 *zmAO-1* 및 *zmAO-2*로 암호화된다 (Sekimoto et al., *J Biol. Chem.* 272:15280-15285 (1997)). 또한 페닐아세트알데히드 산화효소 활성은 아베나 사티바 (*Avena sativa*)의 인돌-3-아세트알데히드 산화효소 (EC 1.2.3.7)에서 입증되지만, 본 활성과 관련된 유전자들은 지금까지 동정되지 않았고 제아 마이스 알데히드 산화효소 유전자들과는 상당한 상동성을 가지 않는다 (Rajagopal, *Physiol. Plant.* 24:272-281 (1971)). 추가적인 페닐아세트알데히드 산화효소는 Z. 마이스 유전자들과 서로 상동성으로 추론되고 하기 제시된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
zmAO-1	NP_001105308.1	162458742	제아 마이스
zmAO-2	BAA23227.1	2589164	제아 마이스
Aox1	O54754.2	20978408	무스 무스쿠루스
ALDO1_ORYSJ	Q7XH05.1	75296231	오리자 사티바
AAO3	BAA82672.1	5672672	아라비돕시스 탈리아나
XDH	DAA24801.1	296482686	보스 타우루스

[0309]

[0310] 페닐피루베이트 산화효소들은 페닐피루베이트 및 O₂를 페닐아세테이트, CO₂ 및 물로 전환한다 (도 1의 단계 F). 아르트로박터 글로비포르미스 (*Arthrobacter globiformis*)로부터의 4-히드록시페닐피루베이트 산화효소 (EC 1.2.3.13)는 티로신 이화작용 과정에서 페닐피루베이트의 페닐아세테이트로의 O₂-의존성 산화를 촉매하는 것으로 보인다 (Blakley, *Can.J Microbiol.* 23:1128-1139 (1977)). 본 효소 활성은 세포추출물들에서 입증되었지만; 본 효소를 암호화하는 유전자는 아직 동정되지 않았다.

[0311]

1.4.1.a 산화환원효소 (탈아민): 페닐알라닌의 페닐피루베이트로의 NAD(P)+-의존성 산화 (도 1의 단계 A)는 페닐알라닌 탈수소효소라고도 칭하는 페닐알라닌 산화환원효소 (탈아민)에 의해 촉매된다. *pdh* 유전자들로 암호화되는 NAD+-의존성 페닐알라닌 탈수소효소들은 바실러스 바디우스, 리시니바실러스 스파이리쿠스 및 테르모아크티노미세스 인테르메디우스에서 특정되었다 (Yamada et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 59:1994-1995 (1995); Takada et al., *J Biochem.* 109:371-376 (1991); Okazaki et al., *Gene* 63:337-341 (1988)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>pdh</i>	BAA08816.1	1228936	바실러스 바디우스
<i>pdh</i>	AAA22646.1	529017	리시니바실러스 스파이리쿠스
<i>pdh</i>	P22823.1	118598	테르모아크티노미세스 인테르메디우스

[0312]

[0313] 2.3.1.a 아실전이효소 (포스포트란스아실라제): 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA를 [(3-옥소-3-페닐프로피오닐)옥시]포스포에이트로 인산화하기 위하여 (도 3의 단계 F) 포스포트란스벤조일라제 활성을 가지는 효소가 필요하다. 이러한 활성을 가지는 효소는 아직까지 특정되지 않았다. 예시적 인산-전달 아실전이효소는 인산아세틸기전이효소 (EC 2.3.1.8) 및 포스포트란스부티릴라제 (EC 2.3.1.19)를 포함한다. *E. coli* 의 *pta* 유전자는 아세틸CoA를 아세틸포스페이트로 가역적 전환시키는 인산아세틸기전이효소를 암호화한다 (Suzuki, *Biochim.Biophys.Acta* 191:559-569 (1969)). 여러 유기체에 있는 인산아세틸기전이효소들 역시 프로피오닐-CoA의 프로피오닐포스페이트로의 전환을 촉매한다. 이러한 효소들은 *E. coli* (Hesslinger et al., *Mol.Microbiol.* 27:477-492 (1998)), 바실러스 섭틸리스 (Rado et al., *Biochim.Biophys.Acta* 321:114-125 (1973)), *Clostridium kluyveri* (Stadtman, 1:596-599 (1955)), 및 테르모토가 마리티마 (Bock et al., *J Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999))의 *pta* 유전자 산물을 포함한다. *C. 아세토부틸리쿰*의 *ptb* 유전자는 부티릴-CoA를 부티릴-포스페이트로 가역적 전환시키는 효소, 포스포트란스부티릴라제를 암호화한다 (Wiesenborn et al., *Appl Environ.Microbiol.* 55:317-322 (1989); Walter et al., *Gene* 134:107-111 (1993)). 추가적인 *ptb* 유전자는 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 발견된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
pta	NP_416800.1	71152910	에스캐리카야 콜라이
pta	P39646	730415	바실러스 섭틸리스
pta	A5N801	146346896	클로스트리디움 클루이베리
pta	Q9X0L4	6685776	테르모토가 마리티마
ptb	NP_349676	34540484	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
ptb	AAR19757.1	38425288	부티레이트-생산 박테리움 L2-50
ptb	CAC07932.1	10046659	바실러스 메가테리움

[0314]

[0315] 2.3.1.b 베타-케토티올라아제. 벤조일-CoA 및 아세틸CoA를 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA로 전환시키기 위하여 (도 3의 단계 A) 베타-케토티올라아제 효소가 필요하다. 이러한 변환은 자연 발생적이지 않은 것으로 알려져 있다. 적정한 베타-케토티올라아제 효소들은 3-옥소아디필-CoA 티올라아제 (EC 2.3.1.174), 3-옥소피멜로일-CoA:글루타릴-CoA 아실전이효소 (EC 2.3.1.16), 3-옥소발레릴-CoA 티올라아제 및 아세토아세틸CoA 티올라아제 (EC 2.1.3.9)를 포함한다.

[0316] 3-옥소아디필-CoA 티올라아제 (EC 2.3.1.174)는 베타-케토아디필-CoA를 숙시닐-CoA 및 아세틸CoA로 전환하고, 방향족 화합물 분해를 위한 베타-케토아디페이트 경로의 핵심 효소이다. 효소는 슈도모나스 푸티타 (Harwood et al., J Bacteriol. 176:6479-6488 (1994)) 및 아시네토박터 칼코아세티쿠스 (Doten et al., J Bacteriol. 169:3168-3174 (1987))와 같은 토양 세균 및 진균에 널리 존재한다. 슈도모나스 균주 B13의 pcaF (Kaschabek et al., J Bacteriol. 184:207-215 (2002)), 슈도모나스 푸티타 U의 phaD (Olivera et al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 95:6419-6424 (1998)), 슈도모나스 플루오레센스 ST의 paaE (Di et al., Arch.Microbiol. 188:117-125 (2007)), 및 E. coli의 paaJ (Nogales et al., Microbiology 153:357-365 (2007))에 의해 암호화되는 유전자 산물 역시 이러한 변환을 촉매한다. 슈도모나스 푸티타로부터의 bkt, 슈도모나스 아이루기노사 PAO1의 pcaF 및 bkt, 버크홀데리아 암비파리아 AMMD 의 bkt, E. coli의 paaJ, 및 P. 푸티타의 phaD를 포함한 여러 베타-케토티올라아제들은 옥소아디필-CoA 형성 방향에서 상당하고도 선택적인 활성을 보인다.

유전자	GI#	유전자은행 등재 #	유기체
paaJ	16129358	NP_415915.1	에스캐리카야 콜라이
pcaF	17736947	AAL02407	슈도모나스 크낙크무씨(B13)
phaD	3253200	AAC24332.1	슈도모나스 푸티타
pcaF	506695	AAA85138.1	슈도모나스 푸티타
pcaF	141777	AAC37148.1	아시네토박터 칼코아세티쿠스
paaE	106636097	ABF82237.1	슈도모나스 플루오레센스
bkt	115360515	YP_777652.1	버크홀데리아 암비파리아 AMMD
bkt	9949744	AAG06977.1	슈도모나스 아이루기노사 PAO1
pcaF	9946065	AAG03617.1	슈도모나스 아이루기노사 PAO1

[0317]

[0318] 3-옥소피멜로일-CoA 티올라아제는 글루타릴-CoA 및 아세틸CoA의 3-옥소피멜로일-CoA로의 축합을 촉매한다 (EC 2.3.1.16). 이러한 변환을 촉매하는 효소는 랄스토니아 유트로파 (공식적으로 알칼리게네스 유트로푸스로 알려짐)의 유전자들 bktB 및 bktC에 의해 암호화된다 (Slater et al., J.Bacteriol. 180:1979-1987 (1998); Haywood et al., FEMS Microbiology Letters 52:91-96 (1988)). BktB 단백질 서열은 알려져 있지만 BktC 단백질 서열은 아직 보고되지 않았다. 로드슈도모나스 팔루스트리스의 pim 오페론 역시 pimB에 의해 암호화되고 벤조일-CoA 분해 과정의 분해 방향에서 이러한 변환을 촉매한다고 예측되는 베타-케토티올라아제를 암호화한다 (Harrison et al., Microbiology 151:727-736 (2005)). S. 아시디트로피쿠스에 있는 베타-케토티올라아제 효소는 bktB와의 서열 상동성으로 동정되었다 (43% 동일성, e값 = 1e-93).

유전자	GI#	유전자은행 등재 #	유기체
bktB	11386745	YP_725948	랄스토니아 유트로파
pimB	39650633	CAE29156	로도슈도모나스 팔루스트리스
syn_02642	85860483	YP_462685.1	신트로푸스 아시디트로피쿠스

[0319]

[0320] 아세틸CoA 및 프로피오닐-CoA로부터 3-옥소발레레이트 형성을 촉매하는 베타-케토티올라아제 효소들은 또한 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 형성을 촉매할 수 있다. 주글로에아 라미게라는 프로피오닐-CoA 및 아세틸CoA로부터 -케토헬레릴-CoA를 형성하는 2종의 케토티올라아제를 가지고 *R. 유트로파*는 이러한 변환을 촉매할 수도 있는 -산화 케토티올라아제를 가진다 (Gruys et al., (1999)). 이들 유전자 또는 이의 번역 단백질들의 서열은 보고되지 않았지만, *R. 유트로파*, *Z. 라미게라*, 또는 기타 유기체에 있는 여러 유전자들은 서열 상동성에 기초하여 *R. 유트로파*의 *bktB*로 식별되고 하기 나열된다.

유전자	GI#	유전자은행 등재 #	유기체
phaA	113867452	YP_725941.1	랄스토니아 유트로파
h16_A1713	113867716	YP_726205.1	랄스토니아 유트로파
pcaF	116694155	YP_728366.1	랄스토니아 유트로파
h16_B1369	116695312	YP_840888.1	랄스토니아 유트로파
h16_A0170	113866201	YP_724690.1	랄스토니아 유트로파
h16_A0462	113866491	YP_724980.1	랄스토니아 유트로파
h16_A1528	113867539	YP_726028.1	랄스토니아 유트로파
h16_B0381	116694334	YP_728545.1	랄스토니아 유트로파
h16_B0662	116694613	YP_728824.1	랄스토니아 유트로파
h16_B0759	116694710	YP_728921.1	랄스토니아 유트로파
h16_B0668	116694619	YP_728830.1	랄스토니아 유트로파
h16_A1720	113867723	YP_726212.1	랄스토니아 유트로파
h16_A1887	113867867	YP_726356.1	랄스토니아 유트로파
phbA	135759	P07097.4	주글로에아 라미게라
bktB	194289475	YP_002005382.1	쿠프리아비두스 타이완엔시스
Rmet_1362	94310304	YP_583514.1	랄스토니아 페탈리두란스
Bphy_0975	186475740	YP_001857210.1	버크홀테리아 피마툼

[0321]

[0322] 추가적인 효소들은 아세틸CoA 2분자를 아세토아세틸CoA로 전환하는 것으로 알려진 베타-케토티올라아제 (EC 2.1.3.9)를 포함한다. 예시적 아세토아세틸CoA 티올라아제 효소들은 *E. coli*의 *atoB* (Martin et al., *Nat.Biotechnol* 21:796-802 (2003)), *C. 아세토부틸리쿰*의 *thlA* 및 *thlB* (Hanai et al., *Appl Environ Microbiol* 73:7814-7818 (2007); Winzer et al., *J.Mol.Microbiol Biotechnol* 2:531-541 (2000)), 및 *S. 세레비지애*의 *ERG10* (Hiser et al., *J.Biol.Chem.* 269:31383-31389 (1994))의 유전자 산물을 포함한다.

유전자	GI#	유전자은행 등재 #	유기체
atoB	16130161	NP_416728	에스케리키아 콜라이
thlA	15896127	NP_349476.1	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
thlB	15004782	NP_149242.1	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
ERG10	6325229	NP_015297	사카로마이세스 세레비자애

[0323]

[0324] 2.6.1.a 아미노전이효소: 페닐알라닌을 페닐피루베이트로 전환하기 위하여 (도 1의 단계 A) EC 분류2.6.1에 있는 페닐알라닌 아미노전이효소 또는 아미노전달효소가 필요하다. 페닐아세테이트 아미노전이효소, 방향족 아미노산 아미노전이효소, 트립토판 아미노전이효소, 아스파르테이트 아미노전이효소, 분지 사슬 아미노산 아미노전이효소 및 기타를 포함한 다양한 효소들이 이러한 변환을 촉매한다. *E. coli*에서 페닐알라닌 아미노전이효소 활성을 가지는 효소들은 *tyrB*, *ilvE* 및 *aspC*에 의해 암호화된다 (Lee-Peng et al., *J Bacteriol.* 139:339-345 (1979); Powell et al., *Eur.J Biochem.* 87:391-400 (1978)). 기타 유기체에서 페닐알라닌 아미노전이효소 활성을 가지는 예시적 효소들은 *ARO9*로 암호화되는 *S. 세레비자애*의 방향족 아미노산 아미노전이효소 (Iraqui et al., *Mol.Gen.Genet.* 257:238-248 (1998)) 및 *TAA1*에 의해 암호화되는 아라비돕시스 탈리아나의 트립토판 아미노전이효소 (Tao et al., *CeII* 133:164-176 (2008))를 포함한다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>tyrB</i>	AAC77024.1	1790488	에스케리키아 콜라이
<i>ilvE</i>	AAT48207.1	48994963	에스케리키아 콜라이
<i>aspC</i>	NP_415448.1	16128895	에스케리키아 콜라이
<i>ARO9</i>	NP_012005.1	6321929	사카로마이세스 세레비자애
<i>TAA1</i>	NP_177213.1	15223183	아라비돕시스 탈리아나

[0325]

[0326] 2.7.2.a 인산전이효소: 하나의 ATP가 동시에 가수분해되면서 EC 분류 2.7.2에 속하는 인산전이효소들은 카르복실산을 포스폰산으로 전환한다. 도 3의 단계 G에서, [(3-옥소-3-페닐프로페오닐)옥시]포스포네이트 및 ADP를 벤조일-아세테이트 및 ATP로 전환하기 위하여 인산전이효소가 요구된다. 정확히 이러한 활성을 가지는 효소는 아직 특정되지 않았다. 예시적 효소들은 부티레이트 키나아제 (EC 2.7.2.7), 이소부티레이트 키나아제 (EC 2.7.2.14), 아스파르토키나아제 (EC 2.7.2.4), 아세테이트 키나아제 (EC 2.7.2.1) 및 감마-글루타밀 키나아제 (EC 2.7.2.11)를 포함한다. 아스파르토키나아제는 아스파르테이트의 ATP-의존성 인산화반응을 촉매하고 여러 아미노산 합성에 참여한다. *E. coli*에 있는, *lysC*로 암호화되는 아스파르토키나아제 III 효소는, 방향족 화합물 아스파르트산 1-벤질 에스테르를 포함한 넓은 기질 범위를 가지고, 기질 특이성 관련 촉매 잔기들이 상세히 설명되었다 (Keng et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 335:73-81 (1996)). *E. coli*에 있는 2종의 추가적인 키나아제는 아세테이트 키나아제 및 감마-글루타밀 키나아제를 포함한다. *ackA*에 의해 암호화되는 *E. coli* 아세테이트 키나아제는 (Skarstedt et al., *J.Biol.Chem.* 251:6775-6783 (1976)), 아세테이트와 더불어 프로페오네이트를 인산화한다 (Hesslinger et al., *Mol.Microbiol* 27:477-492 (1998)). *proB*에 의해 암호화되는 *E. coli* 감마-글루타밀 키나아제는 (Smith et al., *J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984)), 글루타메이트의 감마 탄산기를 인산화한다. 부티레이트 키나아제는 *C. 아세토부틸리쿰* (Cary et al., *Appl.Environ.Microbiol* 56:1576-1583 (1990))의 산성 발생 과정에서 부티릴-포스페이트의 부티레이트로의 가역적 전환을 수행한다. 본 효소는 2종의 *buk* 유전자 산물 중 하나에 의해 암호화된다 (Huang et al., *J Mol.Microbiol Biotechnol* 2:33-38 (2000)). 기타 부티레이트 키나아제 효소들은 *C. 부틸리쿰* 및 *C. 테타노모르퓸* (TWAROG et al., *J Bacteriol.* 86:112-117 (1963))에서 발견된다. 관련 효소인, 테르모토가 마리티마의 이소부티레이트 키나아제는 *E. coli*에서 발현되고 결정화되었다 (Diao et al., *J Bacteriol.* 191:2521-2529 (2009); Diao et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 59:1100-1102 (2003)).

유전자	GI#	유전자은행 등재 #	유기체
lysC	16131850	NP_418448.1	에스케리키아 콜라이
ackA	16130231	NP_416799.1	에스케리키아 콜라이
proB	16128228	NP_414777.1	에스케리키아 콜라이
buk1	15896326	NP_349675	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
buk2	20137415	Q97II1	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
buk2	6685256	Q9X278.1	페르모토가 마리타마

[0327]

[0328] 2.8.3.a CoA 전이효소: CoA 전이효소는 한 분자에서 다른 분자로의 CoA 잔기의 가역적 전달을 촉매한다. 도 3의 단계 B는 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA 전이효소 활성을 가지는 효소에 의해 촉매된다. 이러한 변환에서, CoA는 CoA 수용체 예를들면 아세테이트, 숙시네이트 또는 기타로 전달되어, 벤조일-아세테이트는 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA로부터 형성된다. 비슷한 기질들과 반응하는 예시적 CoA 전이효소들은 신나모일-CoA 전이효소 (EC 2.8.3.17) 및 벤질숙시닐-CoA 전이효소를 포함한다. 클로스트리디움 스포로제네스 *fldA*에 의해 암호화되는 신나모일-CoA 전이효소는, 신나모일-CoA에서 다양한 방향족 산 기질들 예를들면 페닐아세테이트, 3-페닐프로피오네이트 및 4-페닐부티레이트로 CoA 잔기를 전달한다 (Dickert et al., *Eur.J.Biochem.* 267:3874-3884 (2000)). 벤질숙시닐-CoA 전이효소는 숙시네이트 또는 말레이트를 CoA 수용체로 활용하여, 벤질숙시닐-CoA로부터 벤질숙시네이트를 형성한다. *bbsEF*로 암호화되는 본 효소는 탈질세균 타우에라 아로마티카의 역방향에서 특정되었다 (Leutwein et al., *J.Bacteriol.* 183:4288-4295 (2001)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>fldA</i>	AAL18808.1		클로스트리디움 스포로제네스
<i>bbsE</i>	AAF89840.1	9622535	타우에라 아로마티카
<i>bbsF</i>	AAF89841.1	9622536	타우에라 아로마티카

[0329]

[0330] 다양한 기질 범위를 가지는 추가적인 CoA 전이효소들은 숙시닐-CoA 전이효소, 4-히드록시부티릴-CoA 전이효소, 부티릴-CoA 전이효소, 글루타코닐-CoA 전이효소 및 아세토아세틸CoA 전이효소를 포함한다. 클로스트리디움 클루이베리 의 *cat1*, *cat2*, 및 *cat3* 유전자 산물은 각각 숙시닐-CoA, 4-히드록시부티릴-CoA, 및 부티릴-CoA 전이효소 활성을 보이는 것으로 밝혀졌다 (Seedorf et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105:2128-2133 (2008); Sohling et al., *J.Bacteriol.* 178:871-880 (1996)). 유사한 CoA 전이효소 활성들은 또한 트리코모나스 바기날리스 (van Grinsven et al., *J.Biol.Chem.* 283:1411-1418 (2008)) 및 트리파노소마 브루세이 (Riviere et al., *J.Biol.Chem.* 279:45337-45346 (2004))에 존재한다. 혐기성 세균 아시다미노코쿠스 페르멘타스의 글루타코닐-CoA-전이효소 (EC 2.8.3.12)는 글루타코닐-CoA 및 3-부테노일-CoA (Mack et al., *Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994))와 반응한다. 본 효소 암호화 유전자들은 *gctA* 및 *gctB*이다. 이러한 효소는 글루타릴-CoA, 2-히드록시글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 크로토닐-CoA 및 아크릴일-CoA를 포함한 여러 대안 기질들과 감소되지만 검출 가능한 활성을 보인다 (Buckel et al., *Eur.J.Biochem.* 118:315-321 (1981)). 본 효소는 클로닝되고 *E. coli*에서 발현되었다 (Mack et al., *Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). 글루타코네이트 CoA-전이효소 활성은 또한 클로스트리디움 스포로스파이로이데스 및 클로스트리디움 심비오눔에서 발견되었다. 아세토아세틸CoA 전이효소는 아세틸CoA를 CoA 주제로 활용한다. 본 효소는 *E. coli atoA* (알파 서브단위) 및 *atoD* (베타 서브단위) 유전자들로 암호화된다 (Korolev et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)). 본 효소는 광폭의 기질 범위를 가지고 (Sramek et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 171:14-26 (1975)) CoA 잔기를 아세틸CoA에서 다양한 기질들, 예를들면 이소부티레이트 (Matthies et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 58:1435-1439 (1992)), 발레레이트 및 부타노에이트 (Vanderwinkel et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968))로 전달하는 것으로 밝혀졌다. 유사한 효소들은 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 (Duncan et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 68:5186-5190 (2002)), 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (Cary et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 56:1576-1583 (1990); Wiesenborn et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 55:323-329 (1989)), 및 클로스트리디움 사카로퍼부틸아세토니쿰

(Kosaka et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 71:58-68 (2007))에 존재한다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
cat1	P38946.1	729048	클로스트리디움 클루이베리
cat2	P38942.2	172046066	클로스트리디움 클루이베리
cat3	EDK35586.1	146349050	클로스트리디움 클루이베리
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	트리코모나스 바기날리스 G3
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	트리파노소마 브루세이
gctA	CAA57199.1	559392	아시다미노코쿠스 페르멘坦스
gctB	CAA57200.1	559393	아시다미노코쿠스 페르멘坦스
gctA	ACJ24333.1	212292816	클로스트리디움 심비오슘
gctB	ACJ24326.1	212292808	클로스트리디움 심비오슘
atoA	P76459.1	2492994	에스캐리키아 콜라이 K12
atoD	P76458.1	2492990	에스캐리키아 콜라이 K12
actA	YP_226809.1	62391407	코리네박테리움 글루타미쿰
cg0592	YP_224801.1	62389399	코리네박테리움 글루타미쿰
ctfA	NP_149326.1	15004866	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
ctfB	NP_149327.1	15004867	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
ctfA	AAP42564.1	31075384	클로스트리디움 사카로페부틸아세토니쿰
ctfB	AAP42565.1	31075385	클로스트리디움 사카로페부틸아세토니쿰

[0331]

[0332] 3.1.2.a CoA 가수분해효소: 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA는 EC 분류 3.1.2에 속하는 CoA 가수분해효소 또는 티오에스테라제에 의해 해당 산으로 가수분해된다 (도 3의 단계 B). 방향족 기질들을 가수분해하는 예시적 CoA 티오에스테르는 벤조일-CoA 가수분해효소, 4-히드록시벤조일-CoA 가수분해효소 (EC 3.1.2.23) 및 페닐아세틸CoA 가수분해효소 (EC 3.1.2.25)를 포함한다. 아조아르쿠스 예반시 유전자 *orf1*는 벤조일-CoA 가수분해효소 활성을 가지고 벤조에이트 대사작용에 참여하는 효소를 암호화한다 (Ismail, *Arch.Microbiol* 190:451-460 (2008)). 본 효소는, *E. coli*에서 이종 발현될 때, 다수의 대안 기질들에 활성을 보였다. 추가적인 벤조일-CoA 가수분해효소들은 서열 유사성으로 마그네토스피릴룸 마그네토타크티쿰 벤조네이트 분해 유전자군, 얀나시아 종 CCS1 및 사기틀라 스텔라타 E-37에서 동정되었다 (Ismail, *Arch.Microbiol* 190:451-460 (2008)). 슈도모나스 종 CBS3의 4-히드록시벤조일-CoA 가수분해효소는 대안 기질들 벤조일-CoA 및 p-메틸벤조일-CoA에 활성을 보이고, *E. coli*에서 이종 발현되고 특정되었다 (Song et al., *Bioorg.Chem.* 35:1-10 (2007)). 아릴-CoA 가수분해효소 활성을 가지는 추가적인 효소들은 미코박테리움 투베르콜로시스 의 팔미토일-CoA 가수분해효소 (Wang et al., *Chem.Biol.* 14:543-551 (2007)) 및 *entH*로 암호화되는 *E. coli*의 아실-CoA 가수분해효소 (Guo et al., *Biochemistry* 48:1712-1722 (2009))를 포함한다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>orf1</i>	AAN39365.1	23664428	아조아르쿠스 애반시
<i>Magn03011230</i>	ZP_00207794	46200680	마그네토스파릴룸 마그네토타크티쿰
<i>Jann_0674</i>	YP_508616	89053165	얀나시아 종 CCS1
<i>SSE37_24444</i>	ZP_01745221	126729407	사기풀라스텔라타
<i>EF569604.1:4745..5170</i>	ABQ44580.1	146761194	슈도모나스 종 CBS3
<i>Rv0098</i>	NP_214612.1	15607240	미코박테리움 투페르콜로시스
<i>entH</i>	AAC73698.1	1786813	에스케리키아 콜라이

[0333]

[0334] 넓은 기질 범위를 가지는 여러 추가적인 CoA 가수분해효소는 벤조일-CoA 및/또는 p-메틸벤조일-CoA 가수분해에 적합하다. 예를들면, 라투스 노르베기쿠스 뇌의 *acot12*로 암호화되는 효소는 (Robinson et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:959-965 (1976)) 부티릴-CoA, 헥사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응한다. *acot8*로 암호화되는 사람의 디카르복실산 티오에스테라제는 글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 수베릴-CoA, 세바실-CoA, 및 도데칸디오일-CoA에 활성을 보인다 (Westin et al., *J. Biol. Chem.* 280:38125-38132 (2005)). 본 효소에 가장 가까운 *E. coli* 상동체, *tesB*, 역시 CoA 티올에스테르 범위를 가수분해할 수 있다 (Naggert et al., *J. Biol. Chem.* 266:11044-11050 (1991)). 또한 유사한 효소가 래트 간에서 특정되었다 (Deana R., *Biochem. Int.* 26:767-773 (1992)). *E. coli*에서 가수분해효소 활성을 가지는 추가적인 효소들은 *ybgC*, *paaI*, 및 *ybdB* (Kuznetsova, et al., *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29(2):263-279; Song et al., *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(16):11028-38)을 포함한다.

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

[0335]

[0336] 4.1.1a. 카르복시-분해효소: 도 1-3의 여러 변환들을 촉매하기 위하여는 EC 분류 4.1.1에 속하는 탈탄산효소들이 필요하다. 페닐피루베이트의 페닐아세트알데히드로의 전환 (도 1의 단계 B)은 케토-산 탈탄산효소에 의해 촉매된다. 페닐아세테이트의 톨루엔으로의 탈탄산반응 (도 1의 단계 D)은 페닐아세테이트 탈탄산효소 활성을 가지는 효소로 촉매된다. 탈탄산 벤조일-아세테이트를 아세토페논으로 탈탄산하기 위하여 (도 7, 단계 C) 3-옥소산 탈탄산효소가 요구된다. 탈탄산효소 (카르복시 분해효소라고도 알려짐)는 카르복실산기를 가지는 유기 화합물 또는 세포 대사산물로부터 이산화탄소 탈리를 촉매한다. 탈탄산효소는 자연에서 일반적이며 많은 경우 조인자들과 결합이 필요하지 않지만 조인자로서 피리독살 포스페이트 또는 피루베이트를 필요로 한다. 50종 이상의 탈탄산효소들이 보고되었고 생화학적 및/또는 분석적 방법으로 특정되었다.

[0337]

페닐아세테이트의 톨루엔으로의 탈탄산반응 (도 1의 단계 D)을 촉매하기 위하여 페닐아세테이트 탈탄산효소가 필요하다. 이러한 활성을 지금까지 특정된 탈탄산효소들에서 발견되지 않았다. 유사한 반응을 촉매하는 효소는 4-히드록시페닐아세테이트 탈탄산효소이고 (EC 4.1.1.83), 천연적으로 4-히드록시페닐아세테이트를 p-크레졸로 탈탄산시킨다. 클로스트리디움 디피실레 및 클로스트리디움스카톨로게네스에서 특정된 4-히드록시페닐아세테이

트 탈탄산효소들은 두 개의 서브단위들로 구성되고 특이적 활성화 효소에 의한 활성이 요구된다 (Yu et al., *Biochemistry* 45:9584-9592 (2006); Andrei et al., *Eur.J Biochem.* 271:2225-2230 (2004)). 이들 효소는, *C. 스카톨로게네스 csdABC* 및 *C. 디피실레 hpdABC*으로 암호화되고, *E. coli*에서 이종 발현되었다. 다른 적정 효소는 엔테로박ter 클로아사이 아릴말로네이트 탈탄산효소 (EC 4.1.1.76)이고, 구조적 관련 기질, 2-페닐프로피오네이트에 활성을 가진다 (Yatake et al., *Appl.Microbiol Biotechnol.* 78:793-799 (2008)). 본 효소의 서열은 Yatake et al. 공개문헌에서 입수될 수 있지만; 본 효소는 지금까지 유전자은행 등재번호가 부여되지 않았다. 보르데렐라 브론키셉티카로부터의 관련 효소 (98% 아미노산 동일성)는 *AMDA_BORBR*에 의해 암호화되고 최근 결정화되었다 (Kuettner et al., *J Mol.Biol.* 377:386-394 (2008)).

유전자	유전자은행 등재 #	GI#	유기체
<i>csdA</i>	ABB05048.1	77863917	클로스트리디움 스카톨로게네스
<i>csdB</i>	ABB05046.1	77863915	클로스트리디움 스카톨로게네스
<i>csdC</i>	ABB05047.1	77863916	클로스트리디움 스카톨로게네스
<i>hpdA</i>	CAD65891.1	28300943	클로스트리디움 디피실레
<i>hpdB</i>	CAD65889.1	28300939	클로스트리디움 디피실레
<i>hpdC</i>	CAD65890.1	28300941	클로스트리디움 디피실레
<i>AMDA_BORBR</i>	Q05115.1	728844	보르데렐라 브론키셉티카

[0338]

[0339] 페닐피루베이트의 페닐아세트알데히드로의 전환 (도 1의 단계 B)는 페닐피루베이트 탈탄산효소 활성을 가지는 효소에 의해 촉매된다. 페닐피루베이트 탈탄산효소 (EC 4.1.1.43), 피루베이트 탈탄산효소 (EC 4.1.1.1), 분지 사슬 알파-케토산 탈탄산효소 (EC 4.1.1.72) 및 벤질포르메이트 탈탄산효소 (EC 4.1.1.7)를 포함한 여러 케토-산 탈탄산효소들이 페닐피루베이트에 대한 활성을 보였다. 예시적 페닐피루베이트 탈탄산효소는 아조스퍼릴룸 브라실렌세 *ipdC* 유전자에 의해 암호화된다 (Spaepen et al., *J Bacteriol.* 189:7626-7633 (2007)). 페닐피루베이트는 본 효소의 선호 기질이다. 유전자들 *PDC1*, *PDC5*, *PDC6* 및 *ARO10*에 의해 암호화되는 사카로마이세스 세레비지애 효소들 역시 페닐피루베이트 탈탄산효소 활성을 보인다 (Dickinson et al., *J Biol.Chem.* 278:8028-8034 (2003)). 페닐피루베이트 탈탄산효소 활성을 가지는 기타 효소들로는 지고삭카로마이세스 비스포루스의 피루베이트 탈수소효소 효소 (Neuser et al., *Biol.Chem.* 381:349-353 (2000)), 미코박테리움 투베르콜로시스 *H37Rv* 및 락토코커스 락티스의 분지 사슬 2-옥소산 탈탄산효소들 (Gocke et al., *Adv.Synth.Catal.* 349:1425-1435 (2007); Werther et al., *J Biol.Chem.* 283:5344-5354 (2008)), 및 슈도모나스 푸티타의 벤질포르메이트 탈탄산효소 효소 (Siegert et al., *단백질 Eng Des Sel* 18:345-357 (2005))가 포함된다. 또 다른 적정 효소는 지모모나스 모빌루스의 피루베이트 탈탄산효소이고, 본 효소는 광폭의 기질 범위를 가지고 기질 특이성 변경 연구의 대상이었다 (Siegert et al., *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>ipdC</i>	P51852.1	1706320	아조스퍼릴룸 브라실렌세
<i>PDC1</i>	P06169.7	30923172	사카로마이세스 세레비지애
<i>PDC5</i>	P16467.4	1352225	사카로마이세스 세레비지애
<i>PDC6</i>	P26263.3	118389	사카로마이세스 세레비지애
<i>ARO10</i>	Q06408.1	50400299	사카로마이세스 세레비지애
<i>pdc1</i>	CAB65554.1	6689662	지고삭카로마이세스 비스포루스
<i>Rv0853c</i>	NP_215368.1	15607993	미코박테리움 투베르콜로시스 <i>H37Rv</i>
<i>kdcA</i>	AAS49166.1	44921617	락토코커스 락티스
<i>mdlC</i>	P20906.2	3915757	슈도모나스 푸티타
<i>pdc</i>	P06672.1	118391	자이모모나스 모빌리스

[0340]

[0341] 벤조일-아세테이트의 아세토페논으로의 탈탄산반응 (도 3의 단계 C)은 벤조일-아세테이트 탈탄산효소 활성을 가지는 효소로 촉매된다. 본 활성을 가지는 ATP-의존성 효소인, 아세토페논 카르복실화효소는 아로마토레이스 아로마티쿰 *EbNI*의 에틸벤젠 분해 과정에서 역 (탄산화) 방향에 작용한다 (Rabus et al., *Arch.Microbiol.* 178:506-516 (2002)). 본 효소는 *apc1-5*로 암호화되는 5개의 서브단위들로 구성되고 탄산화 방향에서 ATP-의존성 (AMP 형성)이다. 서열 상동성을 기초로 유사한 효소들이 아조토박터 비넬란디 및 브로박터 크실라노필루스에서 발견된다.

유전자	유전자은행 등재 #	GI#	유기체
<i>apc1</i>	YP_158351.1	56476762	아로마토레이스 아로마티쿰 <i>EbNI</i>
<i>apc2</i>	YP_158350.1	56476761	아로마토레이스 아로마티쿰 <i>EbNI</i>
<i>apc3</i>	YP_158349.1	56476760	아로마토레이스 아로마티쿰 <i>EbNI</i>
<i>apc4</i>	YP_158348.1	56476759	아로마토레이스 아로마티쿰 <i>EbNI</i>
<i>apc5</i>	YP_158347.1	56476758	아로마토레이스 아로마티쿰 <i>EbNI</i>
<i>apc1</i>	YP_002798345.1	226943272	아조토박터 비넬란디
<i>apc2</i>	ACO77369.1	226718198	아조토박터 비넬란디
<i>apc3</i>	YP_002798343.1	226943270	아조토박터 비넬란디
<i>apc4</i>	YP_002798342.1	226943269	아조토박터 비넬란디
<i>apc1</i>	YP_644617.1	108804680	루브로박터 크실라노필루스
<i>apc2</i>	YP_644616.1	108804679	루브로박터 크실라노필루스
<i>apc3</i>	YP_644615.1	108804678	루브로박터 크실라노필루스
<i>apc4</i>	YP_644614.1	108804677	루브로박터 크실라노필루스
<i>apc5</i>	YP_644613.1	108804676	루브로박터 크실라노필루스

[0342]

[0343] 달리, 3-옥소산 탈탄산효소는 벤조일-아세테이트를 아세토페논으로 전환시킨다. 예시적 3-옥소산 탈탄산효소는 아세토아세테이트 탈탄산효소 (EC 4.1.1.4)이고, 천연적으로 아세토아세테이트를 아세톤 및 CO₂로 전환시킨다. *adc*에 의해 암호화되는 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 유래의 효소는 광폭의 기질 범위를 가지고 벤조일-아세테이트의 아세토페논으로의 소망 탈탄산반응을 촉매하는 것으로 보여진다 (Rozzel et al., *J.Am.Chem.Soc.* 106:4937-4941 (1984); Benner et al., *J.Am.Chem.Soc.* 103:993-994 (1981); Autor et al., *J Biol.Chem.* 245:5214-5222 (1970)). 관련 아세토아세테이트 탈탄산효소는 클로스트리디움 베이제린크키에서 특정되었다 (Ravagnani et al., *Mol.Microbiol* 37:1172-1185 (2000)). 무세포 추출물들에서 특정된, 바실러스 폴리믹사로부터의 아세토아세테이트 탈탄산효소 역시 3-케토산에 대한 넓은 기질 특이성을 가지고 3-옥소펜타노에이트를 탈탄산화한다 (Matiasek et al., *Curr.Microbiol* 42:276-281 (2001)). 본 효소 암호화 유전자는 아직 동정되지 않았고 *B.* 폴리믹사 유전체 서열은 아직 입수될 수 없다. 다른 *adc*가 클로스트리디움 사카로페부틸아세토니쿰에서 발견된다 (Kosaka, et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 71:58-68 (2007)). 클로스트리디움 보툴리눔 및 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 FZB42을 포함하는 기타 유기체에 있는 추가적인 유전자들은 서열 상동성으로 추론될 수 있다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>Adc</i>	NP_149328.1	15004868	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>Adc</i>	AAP42566.1	31075386	클로스트리디움 사카로페부틸아세토니쿰
<i>Adc</i>	YP_001310906.1	150018652	클로스트리디움 베이제린크키
<i>CLL_A2135</i>	YP_001886324.1	187933144	클로스트리디움 보툴리눔
<i>RBAM_030030</i>	YP_001422565.1	154687404	바실러스 아밀로리퀴파시엔스

[0344]

[0345] 4.1.99.a 탈카보닐효소: 페닐아세트알데히드를 툴루엔으로 전환하기 위하여 (도 1의 단계 E) 탈카보닐효소가 필요하다. 탈카보닐효소들은 식물, 포유류, 곤충 및 세균에서 알칸 생합성 최종 단계를 촉매한다 (Dennis et al.,

Arch.Biochem.Biophys. 287:268-275 (1991)). 비-산화적 탈카보닐효소는 CO의 동시적 방출과 함께 알데히드를 알칸으로 변환시키고, 산화적 탈탄산효소는 NADPH 및 O₂ 를 조인자들로 활용하고 CO₂, 물 및 NADP⁺를 방출하는 시토크롬 P450 효소들이다. 예시적 탈카보닐효소들은 옥타데카날 탈카보닐효소 (EC 4.1.99.5), 스테롤 불포화효소 및 지방 알데히드 탈카보닐효소를 포함한다. 조류 보트리코쿠스 브라우니에서 코발트-포르피린 함유 탈카보닐효소가 정제되고 특정되었다; 그러나, 지금까지 어떠한 유전자도 본 활성과 연관되지 않았다 (Dennis et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:5306-5310 (1992)). 피숨 사티봄에서 구리-함유 탈카보닐효소 역시 정제되고 특정되었다 (Schneider-Belhaddad et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 377:341-349 (2000)). 아라비돕시스 탈리아나의 *CER1* 유전자는 왁스질 결정 (epicuticular wax) 형성에 관여하는 지방산 탈카보닐효소를 암호화한다 (US 6,437,218). 추가적인 지방산 탈카보닐효소는 메디카고 트룬카톨라, 비터스 비니페라 및 오리자 사티바 (US 특허출원 2009/0061493)에서 발견된다.

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

[0346]

[0347] 산화적 탈카보닐효소들은 무스카 도메스티카 및 드로소필라 멜라노가스테르의 *CYP4G2v1* 및 *CYP4G1* 유전자 산물에 의해 암호화된다 (미국특허출원 2010/0136595). 산화적 탈카보닐효소 활성을 가지는 추가적인 효소들은 다른 유기체, 예를들면 마마스트라 브라씨카이, 헬리코베르파 제아 및 아실토시폰 피숨에서, 서열 상동성으로 동정된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>CYP4G2v1</i>	ABV48808.1	157382740	무스카 도메스티카
<i>CYP4G1</i>	NP_525031.1	17933498	드로소필라 멜라노가스테르
<i>CYP4G25</i>	BAD81026.1	56710314	안데라이아 암마마이
<i>CYP4M6</i>	AAM54722.1	21552585	헬리코베르파 제아
<i>LOC100164072</i>	XP_001944205.1	193650239	아실토시폰 피숨

[0348]

[0349] 4.1.99.b 분해효소: 도_2에서 페닐알라닌을 벤젠으로 전환시키는 것은 페닐알라닌 벤젠-분해효소 활성을 가지는 효소로 촉매된다. 요구되는 새로운 활성은 피루베이트 및 암모니아 방출을 동반하며 티로신 및 페놀을 가역적으로 상호 전환하는 티로신 페놀-분해효소 (EC 4.1.99.2)의 것과 유사하다. 판토에아 아글로메란스 (이전에는 엘위니아 헤르비콜라)에서 유래하고, *tuta*로 암호화되는 효소가 디히드록시페닐알라닌을 포함한 일정 범위의 치환유도체와 반응한다 (Foor et al., *Appl.Environ.Microbiol* 59:3070-3075 (1993)). 이러한 효소가 *E. coli*에서 이종 발현되었고 카테콜, 피루베이트 및 암모니아에서 디히드록시페닐알라닌 합성에 활용되었다. 추가적인 티로신 페놀-분해효소들은 시트로박터 인테르메디우스 (Nagasawa et al., *Eur.J Biochem.* 117:33-40 (1981)), 시트로박터 프레운다이 (Phillips et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1647:167-172 (2003)) 및 심비오박테리움 테르모필룸 (Hirahara et al., *Appl.Microbiol Biotechnol.* 39:341-346 (1993))에서 발견된다. 시트로박터 프레운다이 효소는 구조가 특정되었고 기질 결합에 관여하는 잔기가 동정되었다 (Milic et al., *J Biol.Chem.* 283:29206-29214 (2008)). 페닐알라닌은 임의의 특정 티로신 페놀-분해효소 효소의 천연 기질이 아니고; 오히려 일부 효소들 저해제로 작용하는 것으로 보인다. 방향성 진화 및 기타 본 분야에서 잘 알려진 단백질 공학 방법이 이러한 활성을 획득하고 성능 개선에 필요한 것으로 보인다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
tutA	AAA66390.1	806897	판토에아 아글로메란스
tpl	ABI75028.1	114451977	시트로박터 프레운다이
tpl	BAA00763.1	216675	시트로박터 인테르메디우스
tpl	YP_076671.1	51893980	심비오박테리움 테르모필룸

[0350]

[0351] 유사한 반응 촉매 효소는 트립토판분해효소라고도 불리고 트립토판 및 물을 인돌 및 피루베이트로 전환하는 트립토판 인돌-분해효소 (EC 4.1.99.1)이다. 예시적 트립토판 인돌-분해효소들은 *E. coli*의 *tnaA*, 심비오박테리움 테르모필룸의 *tna1* 및 엔테로박터 아이제네스의 *ttaA* (Kogan et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 60:2073-2075 (2004); Kawasaki et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 59:1938-1943 (1995); Suzuki et al., *Agric.Biol.Chem.* 55:3059-3066 (1991)) 유전자 산물을 포함한다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>ttaA</i>	NP_418164.4	90111643	에스케리키아 콜라이
<i>tna1</i>	BAA24688.1	2842554	심비오박테리움 테르모필룸
<i>ttaA</i>	Q59342.1	2501228	엔테로박터 아이제네스

[0352]

[0353] 4.2.1.a 탈수효소: 도 3의 단계 E는 1-페닐에탄올을 스티렌으로 전환하는 탈수효소 (EC 4.1.2.-)를 이용한다. 본 반응을 촉매하는 예시적 효소들은 푸마라아제 (EC 4.2.1.2), 시트라말레이트 수화효소 (EC 4.2.1.34) 및 디메틸말레이트 수화효소 (EC 4.2.1.85)를 포함한다. 푸마라아제 효소들은 자연적으로 말레이트의 푸마레이트로의 가역적 탈수를 촉매한다. 푸마라아제 효소들에 대한 기질로서 1-페닐에탄올 적합성은 아직까지 문헌에 기재되지 않았지만, 본 효소에 대한 풍부한 구조적 정보가 가능하고 연구자들은 본 효소를 조작하여 활성, 저해성 및 국소화를 변경시켰다 (Weaver, 61:1395-1401 (2005)). *E. coli*는 3종의 푸마라아제를 가진다: 생장 조건에 따라 조절되는 FumA, FumB, 및 FumC. FumB는 산소 민감성이고 협기성 조건에서만 활성이다. FumA는 미세협기성 조건에서 활성이고, FumC는 호기성 생장 과정에서 활성인 유일한 효소이다 (Tseng et al., 183:461-467 (2001); Woods et al., 954:14-26 (1988); Guest et al., *J Gen Microbiol* 131:2971-2984 (1985)). 추가적인 효소들이 카필로박터 제주니 (Smith et al., *Int.J Biochem.Cell Biol* 31:961-975 (1999)), 테르무스 테르모필루스 (Mizobata et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 355:49-55 (1998)) 및 라투스 노르베기쿠스 (Kobayashi et al., 89:1923-1931 (1981))에서 발견된다. 높은 서열 상동성을 가지는 유사한 효소들은 아라비돕시스 탈리아나의 *fum1* 및 코리네박테리움 글루타미쿰의 *fumC*를 포함한다. 웰로토마쿠룸 테르모프로파오니쿰 유래 *mmcBC* 푸마라아제는 2개의 서브단위들을 가지는 또 다른 분류의 푸마라아제이다 (Shimoyama et al., 270:207-213 (2007)). 시트라말레이트 하이드로리아제는 천연적으로 2-메틸말레이트를 메사코네이트로 탈수한다. 본 효소는 메타노칼도코쿠스 잔나스키에서 2-옥소부타노에이트로의 피루베이트 경로 관점에서 연구되었고, 넓은 기질 특이성을 보였다 (Drevland et al., *J Bacteriol.* 189:4391-4400 (2007)). 또한 본 효소 활성은 클로스트리디움 테타노모르풀, 몰가넬라 모르가니, 시트로박터 아말로나티쿠스에서 검출되었고 글루타메이트 분해에 참여하는 것으로 생각되었다 (Kato and Asano, *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997)). *M. 잔나스키* 단백질 서열은 이들 유기체에 있는 유전자들과 상당한 상동성을 보이지 않는다. 디메틸말레이트 수화효소는 디메틸말레이트를 수화하여 (2R,3S)-2,3-디메틸말레이트를 형성하는 아코니트산수화효소과에 속하는 가역적인 Fe²⁺-의존성 및 산소-민감성 효소이다. 본 효소는 애우박테리움 바르케리에 있는 *dmdAB*에 의해 암호화된다 (Alhapel et al., *supra*; Kollmann-Koch et al., *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* 365:847-857 (1984)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
fumA	NP_416129.1	16129570	에스케리카야 콜라이
fumB	NP_418546.1	16131948	에스케리카야 콜라이
fumC	NP_416128.1	16129569	에스케리카야 콜라이
fumC	O69294	9789756	캄팔로박터 제주니
fumC	P84127	75427690	테르모스 테르모필루스
fumH	P14408	120605	라투스 노르메기쿠스
fumI	P93033	39931311	아라비듬시스 탈리아나
fumC	Q8NRN8	39931596	코리네박테리움 글루타미쿰
mmcB	YP_001211906	147677691	웰로토마쿠룸 테르모프로피오니쿰
mmcC	YP_001211907	147677692	웰로토마쿠룸 테르모프로피오니쿰
leuD	Q58673.1	3122345	페타노칼도코쿠스 잡나스키
dmdA	ABC88408	86278276	에우박테리움 바르캐리
dmdB	ABC88409.1	86278277	에우박테리움 바르캐리

[0354]

[0355] 6.2.1.a 산-티올 연결효소: 3-옥소-3-페닐프로피오닐-CoA의 벤조일-아세테이트로의 전환 (도 3의 단계 B)은 EC 분류 6.2.1에 있는 CoA 합성효소 또는 산-티올 연결효소에 의해 촉매된다. 이러한 변환을 정확히 촉매하는 ATP-형성 CoA 합성효소는 아직까지 특정되지 않았지만; 넓은 기질 특이성을 가지는 여러 효소들이 문헌에 기재되어 있다. 아르카이오클로부스 폴기두스 유래의, AF1211에 의해 암호화되는 ADP-형성 아세틸CoA 합성효소 (ACD, EC 6.2.1.13)는 이소부티레이트, 이소펜타노에이트, 및 푸마레이트를 포함한 다양한 선형 및 분지 사슬 기질들에 작용하였다 (Musfeldt et al., *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 아르카이오클로부스 폴기두스 유래인, AF1983에 의해 암호화되는 제2 가역적 ACD 역시 방향족 화합물들 폐닐아세테이트 및 인돌아세테이트에 대한 높은 활성으로 광폭의 기질 범위를 가졌다 (Musfeldt et al., *supra*). 할로알콜라 마리스몰투이 유래로 숙시닐-CoA 합성효소로 주석이 붙은 효소는 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지 사슬 산 (이소발레레이트 및 이소부티레이트)를 기질들로서 수용하고 정 및 역 방향에서 작용하였다 (Brasen et al., *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004)). 초고온성 고세균 피로박쿨룸 아이로필룸에서의 PAE3250로 암호화되는 ACD는 모든 특정된 ACD 중에서 가장 넓은 기질 범위를 보였고, 아세틸CoA, 이소부티릴-CoA (선호 기질) 및 폐닐아세틸CoA와 반응하였다 (Brasen and Schonheit, *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004)). 방향성 진화 또는 공학 방법이 적용되어 이러한 효소가 숙주 유기체 생리 온도에서 작용하도록 변형할 수 있다. *A. 폴기두스*, *H. 마리스몰투이* 및 *P. 아이로필룸* 으로부터의 효소들은 모두 클로닝되었고, 기능적으로 발현되었고, *E. coli*에서 특정되었다 (Brasen and Schonheit, *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004); Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 추가적인 효소는 *E. coli*에서 sucCD로 암호화되고, 이것은 하나의 ATP 동시적 소모와 함께 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA 형성을 천연적으로 촉매하고, 이러한 반응은 생체내에서 가역적이다 (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). 슈도모나스 푸터타 유래 아실 CoA 리가제는 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산, 헥산산, 헵탄산, 및 옥탄산을 포함한 여러 지방족 기질들 및 방향족 화합물들 예를들면 폐닐아세트산 및 페녹시아세트산에 작용하였다 (Fernandez-Valverde et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). 관련 효소인, 리조비움 레구미노사룸 유래 말로닐 CoA 합성효소 (6.3.4.9)는 여러 이염기산, 즉, 에틸-, 프로필-, 알릴-, 이소프로필-, 디메틸-, 시클로프로필-, 시클로프로필메틸렌-, 시클로부틸-, 및 벤질-말로네이트를 해당 모노티오 에스테르로 전환할 수 있다 (Pohl et al., *J.Am.Chem.Soc.* 123:5822-5823 (2001)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
AFI211	NP_070039.1	11498810	아르카이오글로부스 풀기두스
AFI983	NP_070807.1	11499565	아르카이오글로부스 풀기두스
scs	YP_135572.1	55377722	할로알쿨라 마리스몰투이
PAE3250	NP_560604.1	18313937	파로박클룸 아이로필룸 str. IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리카야 콜라이
sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리카야 콜라이
paaF	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸터타
matB	AAC83455.1	3982573	리조비움 래구미노사류

[0356]

실시예 II

뮤코네이트 이성질체에서 1,3-부타디엔으로의 경로들

[0359] 본 실시예는 뮤코네이트 이성질체로부터 1,3-부타디엔으로의 경로들을 보인다.

[0360] 도 4는 탈탄산효소들에 의한 뮤코네이트 이성질체에서 1,3-부타디엔으로의 전환을 보인다. 시스, 시스-뮤코네이트, 시스, 트란스-뮤코네이트 또는 트란스, 트란스-뮤코네이트는 먼저 시스-2,4-펜타디에노에이트 또는 트란스-2,4-펜타디에노에이트로 탈탄산된다 (도 4의 단계들 A, B, C 및 D). 이어 2,4-펜타디에노에이트는 탈탄산되어 1,3-부타디엔 (도 4의 단계들 E, F)을 형성한다.

[0361] 임의의 뮤코네이트 이성질체 탈탄산반응이라도 1,3-부타디엔 경로의 일부일 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 시스, 시스-뮤코네이트의 생물학적 생산은 본 분야에서 잘 알려져 있다 (Draths and Frost. J Am Chem Soc. 116:399-400 (1994); Niu et al. Biotechnol Prog. 18:201-211 (2002); Bang and Choi. J Ferm Bioeng. 79(4):381-383 (1995)). 뮤코네이트 이성질체들은 EC 분류 5.2.1에 속하는 뮤코네이트 이성화효소들에 의해 상호 전환될 수 있다.

[0362] 2,4-펜타디에노에이트의 어떠한 이성질체도 탈탄산반응으로 1,3-부타디엔을 형성할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 달리 2,4-펜타디에노에이트 이성질체는 뮤코네이트가 아닌 출발물질로부터 형성될 수 있다 (예를들면, 펜트-2-에노에이트 또는 펜트-4-에노에이트 탈수소화를 통한 제2 이중결합 도입; 가수분해효소, 합성효소, 또는 전이효소를 이용하여 2,4-펜타디에노일CoA에서 CoA제거, 각각 알데히드 또는 알데히드/알코올 탈수소효소를 통한 2,4-펜타디엔알 또는 2,4-펜타디엔올 탈수소화). 2,4-펜타디에노에이트 이성질체들은 EC 분류: 5.2.1의 이성화효소들로 상호 전환될 수 있다.

[0363] 많은 탈탄산효소들이 특정되었고 구조적으로 유사한 기질들을 뮤코네이트 또는 2,4-펜타디에노에이트 이성질체로 탈탄산하는 것을 보였다. 예시적 효소들은 소르브산 탈탄산효소, 아코니테이트 탈탄산효소 (EC 4.1.1.16), 4-옥살로크로토네이트 탈탄산효소 (EC 4.1.1.77), 신나메이트 탈탄산효소 및 폐룰산 탈탄산효소를 포함한다. 이를 효소는 도 4에 도시된 바와 같이 뮤코네이트 및/또는 2,4-펜타디에노에이트를 탈탄산하기 위하여 본 발명에서 적용될 수 있다.

[0364] 밀접하게 관련된 기능을 가지는 하나의 탈탄산효소 효소는 소르브산 탈탄산효소이고 소르브산을 1,3-펜타디엔으로 전환한다. 아스페질러스 나이거에 의한 소르브산 탈탄산반응은 3개의 유전자가 필요하다: padA1, ohbA1, 및 sdrA (Plumridge et al. Fung. Genet. Bio, 47:683-692 (2010)). PadA1는 페닐아크릴산 탈탄산효소으로 주석이 붙여지고, ohbA1는 후보 4-히드록시벤조산 탈탄산효소이고, 및 sdrA는 소르브산 탈탄산효소 조절자이다. 여러 진균종 및 효모종을 포함한 다른 종들 역시 소르브산을 탈탄산하는 것으로 보였다 (Kinderlerler and Hatton, Food Addit Contam., 7(5):657-69 (1990); Casas et al., Int J Food Micro., 94(1):93-96 (2004); Pinches and Apps, Int. J. Food Microbiol. 116: 182-185 (2007)). 예를들면, 아스페르길루스 오리자이 및 네오사르토리아 피스케리는 소르브산을 탈탄산하였고 padA1, ohbA1, 및 sdrA와 밀접한 상동성을 가진다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
padA1	XP_001390532.1	145235767	아스페질러스 나이거
ohbA1	XP_001390534.1	145235771	아스페질러스 나이거
sdrA	XP_001390533.1	145235769	아스페질러스 나이거
padA1	XP_001818651.1	169768362	아스페르길루스 오리자이
ohbA1	XP_001818650.1	169768360	아스페르길루스 오리자이
sdrA	XP_001818649.1	169768358	아스페르길루스 오리자이
padA1	XP_001261423.1	119482790	네오사르토리아 피스케리
ohbA1	XP_001261424.1	119482792	네오사르토리아 피스케리
sdrA	XP_001261422.1	119482788	네오사르토리아 피스케리

[0365]

[0366] 아코니테이트 탈탄산효소는 본 발명에서 유용한 또 다른 효소이다. 본 효소는 칸디다 균주 및 사상균 아스페질러스 테레우스에서도 이타코네이트 생합성 최종 단계를 촉매한다 (Bonnarme et al., *J Bacteriol.* 177:3573-3578 (1995); Willke and Vorlop, *Appl Microbiol Biotechnol* 56:289-295 (2001)) 아코니테이트 탈탄산효소는 아스페질러스 테레우스에서 정제되고 특정되었다. (Dwiarti et al., *J. Biosci. Bioeng.* 94(1): 29-33 (2002)) 시스-아코니트산 탈탄산효소 (CAD)에 대한 유전자 및 단백질 서열은 하기 표에 나열된 여러 밀접한 상동체와 함께 이전에 발표되었다 (EP 2017344 A1; WO 2009/014437 A1).

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
CAD	XP_001209273	115385453	아스페질러스 테레우스
	XP_001217495	115402837	아스페질러스 테레우스
	XP_001209946	115386810	아스페질러스 테레우스
	BAE66063	83775944	아스페르길루스 오리자이
	XP_001393934	145242722	아스페질러스 나이거
	XP_391316	46139251	김배렐라 제아이
	XP_001389415	145230213	아스페질러스 나이거
	XP_001383451	126133853	파키아 스티퍼티스
	YP_891060	118473159	미오박테리움 스페그마터스
	NP_961187	41408351	미오박테리움 아비움 아종 프라투베르쿠로시스
	YP_880968	118466464	미오박테리움 아비움
	ZP_01648681	119882410	살리니스포라 아레니콜라

[0367]

[0368] 4-옥살로크로네이트 탈탄산효소는 4-옥살로크로토네이트의 2-옥소펜타노에이트로의 탈탄산반응을 촉매한다. 본 효소는 수 많은 유기체에서 단리되고 특정되었다. 본 효소를 암호화하는 유전자는 슈도모나스 종 (균주 600)의 *dmpH* 및 *dmpE* (Shingler et al., 174:711-724 (1992)), 슈도모나스 푸티타 유래의 *xyIII* 및 *xyIV* (Kato et al., *Arch. Microbiol.* 168:457-463 (1997); Stanley et al., *Biochemistry* 39:3514 (2000); Lian et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116:10403-10411 (1994)) 및 랄스토니아 유트로파 *JMP134* 유래의 *Reut_B5691* 및 *Reut_B5692*을

포함한다 (Hughes et al., 158:79-83 (1984)). 슈도모나스 종 (균주 600) 유래 효소를 암호화하는 유전자들은 클로닝되어 *E. coli*에서 발현되었다 (Shingler et al., 174:711-724 (1992)).

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>dmpH</i>	CAA43228.1	45685	슈도모나스 종 CF600
<i>dmpE</i>	CAA43225.1	45682	슈도모나스 종 CF600
<i>xylII</i>	YP_709328.1	111116444	슈도모나스 푸터타
<i>xylIII</i>	YP_709353.1	111116469	슈도모나스 푸터타
<i>Reut_B5691</i>	YP_299880.1	73539513	랄스토니아 유트로파 JMP134
<i>Reut_B5692</i>	YP_299881.1	73539514	랄스토니아 유트로파 JMP134

[0369]

[0370] 마지막으로, 신나메이트 (페닐아크릴레이트) 및 치환된 신나메이트 유도체를 이들 해당 스티렌 유도체로 전환하는 탈탄산효소들이 특정되었다. 이들 효소는 다양한 유기체에서 공통적이며 클로닝되고 *E. coli*에서 발현된 이들 효소를 암호화하는 특정 유전자들은 다음을 포함한다: 사카로미세스 세레비사이 유래 *pad 1* (Clausen et al., 유전자 142:107-112 (1994)), 락토바실러스 플란타룸 유래 *pdc* (Barthelmebs et al., 67:1063-1069 (2001); Qi et al., Metab Eng 9:268-276 (2007); Rodriguez et al., J.Agric.Food Chem. 56:3068-3072 (2008)), 클렙시엘라 옥시토카 (*pad*) (Uchiyama et al., Biosci.Biotechnol.Biochem. 72:116-123 (2008); Hashidoko et al., Biosci.Biotech.Biochem. 58:217-218 (1994)), 페디코쿠스 펜토사세우스 유래 *pofK* (Barthelmebs et al., 67:1063-1069 (2001)), 및 바실러스 섭틸리스 및 바실러스 푸밀루스 유래 *padC* (Shingler et al., 174:711-724 (1992)). 슈도모나스 플루오레센스의 폐룰산 탈탄산효소 역시 정제되고 특정되었다 (Huang et al., J.Bacteriol. 176:5912-5918 (1994)). 본 분류에 속하는 효소들은 안정하고 외인성 또는 내인성 결합 조인자들을 필요로 하지 않고, 따라서 이러한 효소들은 생물변화에 이상적이다 (Sariaslani, Annu.Rev.Microbiol. 61:51-69 (2007)).

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>pad1</i>	BAG32372.1	188496949	사카로미세스 세레비사이
<i>pdc</i>	AAC45282.1	1762616	락토바실러스 플란타룸
<i>pofK (pad)</i>	BAF65031.1	149941607	클렙시엘라 옥시토카
<i>padC</i>	AAC46254.1	2394282	바실러스 섭틸리스
<i>pad</i>	CAC16793.1	11322457	페디코쿠스 펜토사세우스
<i>pad</i>	CAC18719.1	11691810	바실러스 푸밀루스

[0371]

[0372] 상기 나열된 각각의 탈탄산효소는 도 4에 도시된 희망 변환들에 대한 잠재적 적정 효소를 나타낸다. 효소의 희망 활성 또는 생성률이 원하는 전환들 (예를들면, 뮤코네이트에서 2,4-펜타디에노에이트, 2,4-펜타디에노에이트에서 부타디엔)에서 관찰되지 않는다면, 탈탄산효소들은 공지 단백질 공학방법으로 개발되어 필요한 성능을 달성할 수 있다. 중요한 것은, 키메라 효소들을 이용하여 탈탄산효소C-말단 영역이 기질 특이성 원인이라는 것을 밝혔다 (Barthelmebs, L.; Divies, C.; Cavin, J.-F. 2001. Expression in *Escherichia coli* of Native and Chimeric Phenolic Acid Decarboxylases with Modified Enzymatic Activities and Method for Screening Recombinant *E. coli* Strains Expressing These Enzymes, Appl. Environ. Microbiol. 67, 1063-1069.). 따라서, 뮤코네이트 또는 2,4-펜타디에노에이트와의 활성을 획득하기 위하여 탈탄산효소 특이성을 넓히기 위한 방향성 진화 실험들은 이를 효소 C-말단 영역에 집중될 수 있다.

[0373]

도 4 변환을 촉매하기 위하여 필요한 일부 탈탄산효소은 뮤코네이트 또는 2,4-펜타디에노에이트 특정 이성질체에 더 높은 활성을 보인다. 이성화효소들은 뮤코네이트 및 2,4-펜타디에노에이트의 덜 바람직한 이성질체를 탈탄산 반응을 위한 더욱 바람직한 이성질체로 전환시키기 위하여 적용될 수 있다. 유사한 변환을 촉매하고 따라서 본 발명에 적합한 효소들을 나타내는 예시적 이성화효소들은 말레이에이트 시스-트란스 이성화효소 (EC 5.2.1.1), 말레이아세톤 시스-트란스 이성화효소 (EC 5.2.1.2) 및 지방산 시스-트란스 이성화효소를 포함한다. 말레이에이트 시스-트란스 이성화효소는 푸마레이트를 말레이에이트로 전환한다. 본 효소는 알칼리케네스 파이칼리스 유래 *maiA* 유전자에 의해 암호화된다 (Hatakeyama, et al., 1997, Gene Cloning and Characterization of Maleate cis-trans Isomerase from *Alcaligenes faecalis*, Biochem. Biophys. Research Comm. 239, 74-79). 서열 상동성으

로 확인되는 유사한 유전자들은 케오바실러스 스테아로테르모필루스, 랄스토니아 퍼크캐터 12D, 및 랄스토니아 유트로파 H16 유래 것들을 포함한다. 추가적인 말레이트 시스-트란스 이성화효소들은 ref 에서 아미노산 서열들이 서열 ID의 1 내지 4로 제공되는 효소들에 의해 암호화된다 (Mukouyama et al., US 특허 6,133,014). 말레일아세톤 시스, 트란스-이성화효소는 4-말레일-아세토아세테이트를 4-푸마릴-아세티아세테이트로 전환, 시스의 트란스 전환을 촉매한다. 본 효소는 슈도모나스 아이루기노사 (Fernandez-Canon et al., *J Biol. Chem.* 273:329-337 (1998)) 및 비브리오 콜레라 (Seltzer, *J Biol. Chem.* 248:215-222 (1973)) 의 *maiA*로 암호화된다. 유사한 효소는 서열 상동성에서 *E. coli* O157에서 동정되었다. *cti* 유전자 산물은 시스-불포화 지방산 (UFA)의 트란스-UFA로의 전환을 촉매한다. 본 효소는 *P. 푸터다*에서 특정되었다 (Junker et al., *J Bacteriol.* 181:5693-5700 (1999)). 유사한 효소들이 세와넬라 종 MR-4 및 비브리오 콜레라에서 발견된다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>maiA</i>	BAA23002.1	2575787	알칼리제네스 파이칼리스
<i>maiA</i>	BAA96747.1	8570038	셀라티아 마르세스센스
<i>maiA</i>	BAA77296	4760466	케오바실러스 스테아로테르모필루스
<i>Rpic12DDRAFT_0600</i>	ZP_02009633	153888491	랄스토니아 퍼크캐터 12D
<i>maiA</i>	YP_725437	113866948	랄스토니아 유트로파 H16
<i>maiA</i>	NP_250697	15597203	슈도모나스 아이루기노사
<i>maiA</i>	NP_230991	15641359	비브리오 콜레라
<i>maiA</i>	EDU73766	189355347	에스케리키아 콜라이 O157
<i>cti</i>	AAD41252	5257178	슈도모나스 푸터다
<i>cti</i>	YP_732637	113968844	세와넬라 종 MR-4
<i>cti</i>	ZP_04395785	229506276	비브리오 콜레라

[0374]

실시예 III

[0375] (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 생산을 위한 예시적 경로

[0376] 본 실시예는 테레프탈산 (PTA) 전구체 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2H3M4OP) 생산을 위한 예시적 경로를 기재한다.

[0377] p-톨루에이트 및 PTA 경로들에 대한 전구체는 2H3M4OP이다. 본 화합물은 도 5에 도시된 3 효소 단계들에서 중앙 대사물질 글리세르알데히드-3-포스페이트 (G3P) 및 피루베이트로부터 유도된다. 처음 2 단계들은 이소프레노이드 생합성을 위해 메틸에리트리톨 포스페이트 (비-메발로네이트) 경로를 활용하는 *E. coli* 및 기타 유기체에 천연적인 것이다. DXP 생성효소에 의해 피루베이트 및 G3P는 먼저 축합되어 1-데옥시-D-자일룰로스 5-포스페이트 (DXP)를 형성한다. 이어 환원 및 탄소 골격 재배열은 DXP 환원형 성화효소에 의해 촉매된다. 마지막으로, 새로운 디올 탈수효소는 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트를 p-톨루에이트 전구체 2H3M4OP로 전환한다.[0378] A. 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 (DXP) 생성효소, 피루베이트 및 G3P는 DXP 생성효소 (EC 2.2.1.7)에 의해 축합되어 DXP를 형성한다. 본 효소는 이소프레노이드 생합성 비-메발론산 경로에서 제1 단계를 촉매한다. 알짜산화환원 변화는 없지만 본 효소는 티아민 디포스페이트를 조인자로서 요구하며, 또한 환원형 FAD를 요구한다. *E. coli* 효소의 결정 구조가 입수될 수 있다 (Xiang et al., *J. Biol. Chem.* 282:2676-2682 (2007)). 기타 효소들은 클로닝되었고 M. 투베르콜로시스 (Bailey et al., *Glycobiology* 12:813-820 (2002) 및 아그로박테리움 투페멕시엔스 (Lee et al., *J. Biotechnol.* 128:555-566 (2007))에서 특정되었다. B. 섭틸리스 및 시네코시스 티스 종 PCC 6803 유래 DXP 생성효소들이 *E. coli*로 클로닝되었다 (Harker and Bramley, *FEBS Lett.* 448:115-119 (1999)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>dxs</i>	AAC73523.1	1786622	에스케리키아 콜라이
<i>dxs</i>	P0A554.1	61222979	M. 투베르콜로시스
<i>dxs11</i>	AAP56243.1	37903541	아그로박테리움 투페택시엔스
<i>dxs</i>	P54523.1	1731052	바실러스 섭틸리스
<i>sll1945</i>	BAA17089.1	1652165	시네코시스템스 종 PCC 6803

[0380]

[0381] B. 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 환원이성화효소 (EC 1.1.1.267). 1-데옥시-D-자일룰로스-5-포스페이트 (DXP)의 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트로의 NAD(P)H-의존성 환원 및 재배열은 이소프레노이드 생합성 비-메발론산 경로 제2 단계에서 DXP 환원이성화효소 (DXR, EC 1.1.1.267)에 의해 촉매된다. NADPH-의존성 *E. coli* 효소는 *dxr*로 암호화된다 (Takahashi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9879-9884 (1998)). 아라비돕시스 탈리아나 유래 재조합 효소는 기능적으로 *E. coli*에서 발현되었다 (Carretero-Paulet et al., *Plant Physiol.* 129:1581-1591 (2002)). 자이모모나스 모빌리스 및 미코박테리움 투베르콜로시스 유래 DXR 효소들은 특정되었고 결정 구조를 이용할 수 있다 (Grolle et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 191:131-137 (2000)); Henriksson et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62:807-813 (2006)). 대부분의 특정 DXR 효소들은 엄격한 NADPH 의존성이지만, *A. thaliana* 및 *M. 투베르콜로시스* 유래 효소들은 낮은 수준으로 NADH와 반응한다 (Argyrou and Blanchard, *Biochemistry* 43:4375-4384 (2004)); Rohdich et al., *FEBS J.* 273:4446-4458 (2006)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>dxr</i>	AAC73284.1	1786369	에스케리키아 콜라이
<i>dxr</i>	AAF73140.1	8131928	아라비소프시스 탈리아나
<i>dxr</i>	CAB60758.1	6434139	자이모모나스 모빌리스
<i>dxr</i>	NP_217386.2	57117032	미코박테리움 투베르콜로시스

[0382]

[0383] C. 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트 탈수효소. 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트를 *p*-톨루에이트 전구체로 전환하기 위하여 디올 탈수효소가 요구된다 (Altmiller and Wagner, *Arch. Biochem. Biophys.* 138:160-170 (1970)). 본 변환은 실험적으로 입증되지 않았지만, 디히드록시-산 탈수효소 (EC 4.2.1.9), 프로판디올 탈수효소 (EC 4.2.1.28), 글리세롤 탈수효소 (EC 4.2.1.30) 및 미오-아노시토스 탈수효소 (EC 4.2.1.44)를 포함한 여러 효소들이 유사한 변환을 촉매한다.

[0384]

2차 디올 2,3-부탄디올을 2-부타논으로 전환할 수 있는 디올 탈수효소 또는 프로판디올 탈수효소들 (EC 4.2.1.28)이 본 변환을 위한 우수한 후부이다. 아데노실코발라민-의존성 디올 탈수효소는 알파, 베타 및 감마 서브단위들을 함유하고, 이를 모두 효소 기능에 필수적이다. 예시적 유전자 후보들은 클렙시엘라 뉴모니아 (Tobimatsu et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:1774-1777 (1998); Toraya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480 (1976)), 살모넬라 티피무리움 (Bobik et al., *J. Bacteriol.* 179:6633-6639 (1997)), 클렙시엘라 옥시토카 (Tobimatsu et al., *J. Biol. Chem.* 270:7142-7148 (1995)) 및 락토바실러스 콜리노이데스 (Sauvageot et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 209:69-74 (2002))에서 발견된다. 기타 유기체에서 디올 탈수효소 유전자 후보 단리 방법은 본 분야에 잘 알려져 있다 (참고, 예를들면, 미국특허번호 5,686,276).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
pddA	BAA08099.1	868006	클렙시엘라 옥시토카
pddB	BAA08100.1	868007	클렙시엘라 옥시토카
pddC	BAA08101.1	868008	클렙시엘라 옥시토카
pduC	AAB84102.1	2587029	살모넬라 티페무리움
pduD	AAB84103.1	2587030	살모넬라 티페무리움
pduE	AAB84104.1	2587031	살모넬라 티페무리움
pduC	CAC82541.1	18857678	락토바쿨루스 콜리노이테스
pduD	CAC82542.1	18857679	락토바쿨루스 콜리노이테스
pduE	CAD01091.1	18857680	락토바쿨루스 콜리노이테스
pddA	AAC98384.1	4063702	클렙시엘라 뉴모니애
pddB	AAC98385.1	4063703	클렙시엘라 뉴모니애
pddC	AAC98386.1	4063704	클렙시엘라 뉴모니애

[0385]

[0386] 클리세를 탈수효소 패밀리 효소들 (EC 4.2.1.30) 역시 2-C-메틸-D-에리트리톨-4-포스페이트를 탈수하기 위하여 사용된다. 예시적 유전자 후보는 클렙시엘라 뉴모니애의 *gldABC* 및 *dhaB123* (WO 2008/137403) 및 (Toraya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480 (1976)), 클로스트리듐 파스테우라눔의 *dhabCE* (Macis et al., *FEMS Microbiol Lett.* 164:21-28 (1998)) 및 시트로박터 프레운디이의 *dhaBCE* (Seyfried et al., *J. Bacteriol.* 178:5793-5796 (1996))에 의해 암호화된다. 80- 내지 336-배 보강 활성을 가지는 *K. 뉴모니애* 유래의 B12-의존성 디올 탈수효소 변이체는 베타 서브단위의 2개의 잔기들에 돌연변이를 도입하여 최근 조작되었다 (Qi et al., *J. Biotechnol.* 144:43-50 (2009)). 에러-유발 PCR을 이용하여 불활성 반응이 감소된 디올 탈수효소들을 DuPont 사에서 개발하였다 (WO 2004/056963).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>gldA</i>	AAB96343.1	1778022	클렙시엘라 뉴모니애
<i>gldB</i>	AAB96344.1	1778023	클렙시엘라 뉴모니애
<i>gldC</i>	AAB96345.1	1778024	클렙시엘라 뉴모니애
<i>dhaB1</i>	ABR78884.1	150956854	클렙시엘라 뉴모니애
<i>dhaB2</i>	ABR78883.1	150956853	클렙시엘라 뉴모니애
<i>dhaB3</i>	ABR78882.1	150956852	클렙시엘라 뉴모니애
<i>dhaB</i>	AAC27922.1	3360389	클로스트리듐 파스테우라눔
<i>dhaC</i>	AAC27923.1	3360390	클로스트리듐 파스테우라눔
<i>dhaE</i>	AAC27924.1	3360391	클로스트리듐 파스테우라눔
<i>dhaB</i>	P45514.1	1169287	시트로박터 프레온디이
<i>dhaC</i>	AAB48851.1	1229154	시트로박터 프레온디이
<i>dhaE</i>	AAB48852.1	1229155	시트로박터 프레온디이

[0387]

[0388] B12-의존성 디올 탈수효소가 활용된다면, 상응되는 재활성화 인자들의 이종 발현이 추천된다. B12-의존성 디올 탈수효소는 기질들 및 일부 하류 생성물에 의한기전-기반 자살 활성화가 수행된다. 불활성 코발라민과의 밀접한 조합에 의해 야기되는 불활성화는 ATP-의존성 과정에서 디올 탈수효소 재활성화 인자들에 의해 부분적으로 극복

될 수 있다. B12 조인자 재생은 추가적인 ATP가 필요하다. 디올 탈수효소 재생 인자들은 두-서브단위 단백질들이다. 예시적 후보는 클렙시엘라 옥시토카 (Mori et al., *J. Biol. Chem.* 272:32034-32041 (1997)), 살모넬라 티피무리움 (Bobik et al., *J. Bacteriol.* 179:6633-6639 (1997); Chen et al., *J. Bacteriol.* 176:5474-5482 (1994)), 락토바실러스 콜리노이테스 (Sauvageot et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 209:69-74 (2002)), 및 클렙시엘라 뉴모니아 (WO 2008/137403)에서 발견된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>ddrA</i>	AAC15871.1	3115376	클렙시엘라 옥시토카
<i>ddrB</i>	AAC15872.1	3115377	클렙시엘라 옥시토카
<i>pduG</i>	AAL20947.1	16420573	살모넬라 티피무리움
<i>pduH</i>	AAL20948.1	16420574	살모넬라 티피무리움
<i>pduG</i>	YP_002236779	206579698	클렙시엘라 뉴모니아
<i>pduH</i>	YP_002236778	206579863	클렙시엘라 뉴모니아
<i>pduG</i>	CAD01092	29335724	락토바실러스 콜리노이테스
<i>pduH</i>	CAD01093	29335725	락토바실러스 콜리노이테스

[0389]

[0390] B12-독립적 디올 탈수효소들은 조인자로서 S-아데노실메티오닌 (SAM)을 활용하고, 염격한 혐기성 조건에서 기능하고, 특이적인 활성화 효소에 의한 활성화가 필요하다 (Frey et al., *Chem. Rev.* 103:2129-2148 (2003)). *dhaB1* 및 *dhaB2*에 의해 암호화되는 클로스트리듐 부티리쿰의 글리세롤 탈수효소 및 상응되는 활성화 인자가 잘 특정화되었다 (O'Brien et al., *Biochemistry* 43:4635-4645 (2004); Raynaud et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100:5010-5015 (2003)). 본 효소는 *E. coli* 의 1,3-프로판디올 과다생산 균주에서 최근 이용되었고 매우 높은 산물 역가를 달성할 수 있었다 (Tang et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1628-1634 (2009)). 로세부리아 이눌리나보란스 유래 추가적인 B12-독립적 디올 탈수효소 효소 및 활성화 인자는 2,3-부탄디올을 2-부타논으로 전환하는 것을 촉매하였다 (미국공개 2009/09155870).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>dhaB1</i>	AAM54728.1	27461255	클로스트리듐 부티리쿰
<i>dhaB2</i>	AAM54729.1	27461256	클로스트리듐 부티리쿰
<i>rdhtA</i>	ABC25539.1	83596382	로세부리아 이눌리나보란스
<i>rdhtB</i>	ABC25540.1	83596383	로세부리아 이눌리나보란스

[0391]

[0392] 디히드록시-산 탈수효소 (DHAD, EC 4.2.1.9)는 분지 사슬 아미노산 생합성에 참여하는 B12-독립적 효소이다. 원래 역할은, 2,3-디히드록시-3-메틸발레레이트를 2-케토-3-메틸-발레레이트, 이소루신 전구체로 전환하는 것이다. 발린 생합성에서, 본 효소는 2,3-디히드록시-이소발레레이트의 2-옥소이소발레레이트로의 탈수를 촉매한다. 솔풀로부스 솔파타리쿠스 유래 DHAD는 광폭의 기질 범위를 가지며, *E. coli* 에서 발현되는 재조합 효소의 활성은 다양한 알돈산들에서 입증되었다 (Kim and Lee, *J. Biochem.* 139:591-596 (2006)). *S. 솔파타리쿠스* 효소는 많은 디올 탈수효소들과는 달리 산소를 허용한다. *iIVD*로 암호화되는 *E. coli* 효소는 산소에 민감하고, 철-황 클러스터를 불활성화한다 (Flint et al., *J. Biol. Chem.* 268:14732-14742 (1993)). 유사한 효소들이 뉴로스포라 크라사 (Altmiller and Wagner, *Arch. Biochem. Biophys.* 138:160-170 (1970)) 및 살모넬라 티피무리움 (Armstrong et al., *Biochim. Biophys. Acta* 498:282-293 (1977))에서 특정되었다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>ilvD</i>	NP_344419.1	15899814	술풀로부스 솔파타리кус
<i>ilvD</i>	AAT48208.1	48994964	에스케리카야 콜라이
<i>ilvD</i>	NP_462795.1	16767180	살모넬라 티피무리움
<i>ilvD</i>	XP_958280.1	85090149	뉴로스포라 크라사

[0393] 디올 탈수효소 미오-이노소세-2-탈수효소 (EC 4.2.1.44)는 또 다른 예시적 후보이다. 미오-이노소세는 인접 알코올기들을 가지는 6-원 고리이다. 미오-이노소세-2-탈수효소 기능성을 암호화하는 정제 효소가 미오-이노시톨 분해 측면에서 클렙시엘라 아이로게네스에서 연구되었지만 (Berman and Magasanik, *J. Biol. Chem.* 241:800-806 (1966)), 지금까지 유전자와 연관되지 않았다. 시노리조븀 프레디아의 미오-이노소세-2-탈수효소가 클로닝 되었고 *E. coli*에서 기능적으로 발현되었다 (Yoshida et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:2957-2964 (2006)). *iolE*로 암호화되는 *B. 썹틸리스* 유래 유사한 효소 역시 연구되었다 (Yoshida et al., *Microbiology* 150:571-580 (2004)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>iolE</i>	P42416.1	1176989	바실러스 썹틸리스
<i>iolE</i>	AAX24114.1	60549621	시노리조븀 프레디아

[0394]

[0395] 실시예 IV

[0396] 시김산 경로 효소들에 의한 (2-히드록시-3-메틸-4-옥소부톡시)포스포네이트로부터 p-톨루에이트 합성을 위한 예시적 경로

[0397] 본 실시예는 시김산 경로 효소들을 이용하여 p-톨루에이트를 합성하는 예시적 경로들을 기술한다.

[0398] p-톨루에이트의 화학적 구조는 p-히드록시벤조에이트, 전자전달체 유비퀴논 전구체와 아주 비슷하다. 4-히드록시벤조에이트는 세균, 식물 및 진균에서 발견되는 시김산 경로 효소들에 의해 중앙 대사 전구체로부터 합성된다. 시김산 경로는 D-에리트로스-4-포스페이트 (E4P) 및 포스포에놀피루베이트 (PEP)를 코리스메이트로 변환하는 7 효소 단계들로 구성된다. 경로 효소들은 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 (DAHP) 생성효소, 데히드로퀴네이트 (DHQ) 생성효소, DHQ 탈수효소, 시키메이트 탈수효소, 시키메이트 키나아제, 5-에놀피루빌시키메이트-3-포스페이트 (EPSP) 생성효소 및 코리스메이트 생성효소를 포함한다. 경로 제1 단계에서, 에리트로스-4-포스페이트 및 포스포에놀피루베이트는 DAHP 생성효소에 의해 결합되어 3-데옥시-D-아라비노-헵톨로소네이트-7-포스페이트를 형성한다. 본 화합물을 이후 탈인산, 탈수 및 환원되어 시키메이트를 형성한다. 시키메이트는 3 효소를 작용으로 코리스메이트로 전환된다: 시키메이트 키나아제, 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소 및 코리스메이트 생성효소. 코리스메이트의 4-히드록시벤조에이트로의 연속적 전환은 코리스메이트 분해효소에 의해 촉매된다.

[0399] p-톨루에이트 합성은 도 6에 도시된 방식과 유사하게 진행된다. 경로는 PEP 및 2H3M4OP, E4P의 3-히드록실기 대신 메틸기를 가지는 E4P와 유사한 화합물로부터 출발한다. E4P의 히드록실기는 시김산 경로 반응들의 화학에 직접 참여하지 않고, 따라서 메틸-치환된 2H3M4OP 전구체는 대안 기질로 기대된다. 방향성 또는 적응 진화가 적용되어 기질들로서 2H3M4OP 및 하류 유도체에 대한 선호도를 향상시킨다. 이러한 방법은 본 분야에 잘 알려져 있다.

[0400] 시김산 경로 효소들을 통한 유출입 효율 개선을 위한 균주 조작 전략들도 본원에서 적용 가능하다. 경로 전구체 PEP 가용성은 글루코스 수송시스템 변경을 통하여 증가될 수 있다 (Yi et al., *Biotechnol. Prog.* 19:1450-1459 (2003)). 4-히드록시벤조에이트-파다생산 균주들은 3-데옥시-D-아리비노헵톨로손산-7-포스페이트 생성효소의 피드백-불응성 동질효소의 파다발현에 의해 시김산 경로를 통한 유출입 개선을 위하여 조작되었다 (Barker and Frost, *Biotechnol. Bioeng.* 76:376-390 (2001)). 또한, 시김산 경로 효소들 및 코리스메이트 분해효소 발현 수준을 개선시켰다. 유사한 전략들이 p-톨루에이트 파다생산을 위하여 균주에 적용될 수 있다.

[0401] A. 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 생성효소 (EC 2.5.1.54). 에리트로스-4-포스페이트 및 포스포에놀피루베이트의 축합은 2-데히드로-3-데옥시포스포헵토네이트 (DAHP) 생성효소 (EC 2.5.1.54)에 의해 촉매된다. 본 효소의 3 동질효소들은 *E. coli* 유전체에서 aroG, aroF 및 aroH로 암호화되고 각각 페닐알라닌, 티로신 및 트립토

판에 의해 피드백이 저해된다. 최소 배지에서 배양된 야생종 세포들에서, aroG, aroF 및 aroH 유전자 산물은 DAHP 생성효소 활성에 각각 80%, 20% 및 1% 기여하였다 (Hudson and Davidson, *J. Mol. Biol.* 180:1023-1051 (1984)). AroG 의 2 잔기들은 페닐알라닌에 의한 저해를 완화시키는 것으로 밝혀졌다 (Kikuchi et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 63:761-762 (1997)). 티로신에 의한 AroF의 피드백 저해는 단일 염기-쌍 변경에 의해 제거되었다 (Weaver and Herrmann, *J. Bacteriol.* 172:6581-6584 (1990)). 티로신-불용성 DAHP 생성효소는 *E. coli*의 4-히드록시벤조에이트-파다생산 균주에서 과발현되었다 (Barker and Frost, *Biotechnol. Bioeng.* 76:376-390 (2001)). aroG 유전자 산물은 다양한 대안적 4- 및 5-탄소 길이의 기질들을 수용하는 것으로 보였다 (Shefalyan et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120(43):11027-11032 (1998); Williamson et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15:2339-2342 (2005)). 본 효소는 (3S)-2-데옥시에리트로스-4-포스페이트, 에리트로스-4-포스페이트와 유사하지만 2-위치에 알코올이 결여된 기질과 효과적으로 반응한다 (Williamson et al., supra 2005). 헬리코박터 필로리 및 피로코커스 푸리오수스 유래 효소들 역시 이러한 대안적 기질을 수용하고 (Schofield et al., *Biochemistry* 44:11950-11962 (2005)); Webby et al., *Biochem. J.* 390:223-230, 2005)) *E. coli*에서 발현되었다. 야생형 *E. coli* AroG 효소와 7개의 아미노산들이 다른 DAHP 생성효소의 진화 변이체는 Kcat/KM \circ 60-배 개선되었다 (Ran and Frost, *J. Am. Chem. Soc.* 129:6130-6139 (2007)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
aroG	AAC73841.1	1786969	에스케리키아 콜라이
aroF	AAC75650.1	1788953	에스케리키아 콜라이
aroH	AAC74774.1	1787996	에스케리키아 콜라이
aroF	Q9ZMU5	81555637	헬리코박터 필로리
PF1690	NP_579419.1	18978062	피로코커스 푸리오수스

[0402]

[0403] B. 3-데히드로퀴네이트 생성효소 (EC 4.2.3.4). 도 2에 도시된 바와 같은 기질 (2)(2,4-디히드록시-5-메틸-6-[포스포노옥시]메틸]옥산-2-카르복실레이트)의 기질 (3)(1,3-디히드록시-4-메틸시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트)으로의 탈인산화반응은 3-데히드로퀴네이트 생성효소에 의한 3-데옥시-아라비노-헵톨로네이트-7-포스페이트의 탈인산화반응과 유사하다. 본 효소는 *E. coli* (Mehdi et al., *Methods Enzymol.* 142:306-314 (1987), *B. 섭틸리스* (Hasan and Nester, *J. Biol. Chem.* 253:4999-5004 (1978)) 및 미코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv (de Mendonca et al., *J. Bacteriol.* 189:6246-6252 (2007))에서 특정되었다. *E. coli* 효소는 L-티로신에 의해 억제된다 (Barker and Frost, *Biotechnol. Bioeng.* 76:376-390 2001)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
aroB	AAC76414.1	1789791	에스케리키아 콜라이
aroB	NP_390151.1	16079327	바실러스 섭틸리스
aroB	CAB06200.1	1781064	미코박테리움 투베르쿨로시스

[0404]

[0405] C. 3-데히드로퀴네이트 탈수효소 (EC 4.2.1.10). 3-데히드로퀴나제 (DHQase)라고도 칭하는 3-데히드로퀴네이트 탈수효소는 도 2의 p-톨루에이트 경로 단계 C와 유사하게 자연적으로 3-데히드로퀴네이트의 3-데히드로시키메이트로의 탈수를 촉매한다. DHQase 효소들은 기전, 입체화학 및 서열 상동성에 따라 두 부류로 나뉜다 (Gourley et al., *Nat. Struct. Biol.* 6:521-525. (1999)). 일반적으로 유형1 효소들은 생합성에 관여하고, 유형 2 효소들은 역 (분해) 방향에서 작용한다. *E. coli* (Kinghorn et al., 유전자 14:73-80. 1981)), 살모넬라 티피 (Kinghorn et al., supra 1981; Servos et al., *J. Gen. Microbiol.* 137:147-152 (1991)) 및 *B. 섭틸리스* (Warburg et al., 유전자 32:57-66 1984)) 유래 유형 1 효소들은 클로닝되었고 특정되었다. 예시적 유형 II 3-데히드로퀴네이트 탈수효소들은 미코박테리움 투베르쿨로시스, 스트렙토마이세스 코엘리콜러 (Evans et al., *FEBS Lett.* 530:24-30 (2002)) 및 헬리코박터 필로리 (Lee et al., *Proteins* 51:616-7 (2003))에서 발견된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>aroD</i>	AAC74763.1	1787984	에스케리키아 콜라이
<i>aroD</i>	P24670.2	17433709	살모넬라 티피
<i>aroC</i>	NP_390189.1	16079365	바실러스 셱틸리스
<i>aroD</i>	P0A4Z6.2	61219243	미코박테리움 투베르콜로시스
<i>aroQ</i>	P15474.3	8039781	스트렙토마이세스 코엘리콜라
<i>aroQ</i>	Q48255.2	2492957	헬리코박터 필로리

[0406]

[0407] D. 시카메이트 탈수소효소 (EC 1.1.1.25). 시카메이트 탈수소효소는 도 2의 단계 D와 유사하게 3-데히드로시카메이트의 시카메이트로의 NAD(P)H 의존성 환원을 촉매한다. *E. coli* 유전체는 다른 조인자 특이성을 가지는 두 종의 시카메이트 탈수소효소 파라로그를 암호화한다. *aroE*에 의해 암호화되는 효소는 NADPH 특이적이고, *ydiB* 유전자 산물은 퀴네이트/시카메이트 탈수소효소로 NADH (선호) 또는 NADPH를 조인자로 활용한다 (Michel et al., *J. Biol. Chem.* 278:19463-19472 (2003)). 미코박테리움 투베르콜로시스 (Zhang et al., *J. Biochem. Mol. Biol.* 38:624-631 (2005)), 헤모필루스 플루엔자 (Ye et al., *J. Bacteriol.* 185:4144-4151 (2003)) 및 헬리코박터 필로리 (Han et al., *FEBS J.* 273:4682-4692 (2006)) 유래 NADPH-의존성 효소들은 *E. coli*에서 기능적으로 발현되었다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>aroE</i>	AAC76306.1	1789675	에스케리키아 콜라이
<i>ydiB</i>	AAC74762.1	1787983	에스케리키아 콜라이
<i>aroE</i>	NP_217068.1	15609689	미코박테리움 투베르콜로시스
<i>aroE</i>	P43876.1	1168510	헤모필루스 플루엔자
<i>aroE</i>	AAW22052.1	56684731	헬리코박터 필로리

[0408]

[0409] E. 시카메이트 키나아제 (EC 2.7.1.71). 시카메이트 키나아제는 도 2의 단계 E와 유사하게 시카메이트의 3-히드록실기 ATP-의존성 인산화반응을 촉매한다. 두 가지 시카메이트 키나아제 효소들은 *E. coli*에서 *aroK* (SK1) 및 *aroL* (SK2)에 의해 암호화된다 (DeFeyter and Pittard, *J. Bacteriol.* 165:331-333 (1986); Lobner-Olesen and Marinus, *J. Bacteriol.* 174:525-529 (1992)). *aroL*에 의해 암호화되는 SK2의 Km은 SK1의 것보다 100-배 더 낮고, 이것은 본 효소가 방향족 생합성을 담당하는 것을 의미한다 (DeFeyter et al., *supra* 1986). 미코박테리움 투베르콜로시스 (Gu et al., *J. Mol. Biol.* 319:779-789 (2002)); Oliveira et al., *Protein Expr. Purif.* 22:430-435 (2001)(doi:10.1006/prep.2001.1457, doi:S1046-5928(01)91457-3, pii), 헬리코박터 필로리 (Cheng et al., *J. Bacteriol.* 187:8156-8163 (2005)) 및 에르위니아 크리산테미 (Krell et al., *Protein Sci.* 10:1137-1149 (2001)) 유래의 추가적인 시카메이트 키나아제 효소들은 *E. coli*에서 클로닝되었다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
aroK	YP_026215.2	90111581	에스케리키아 콜라이
aroL	NP_414922.1	16128373	에스케리키아 콜라이
aroK	CAB06199.1	1781063	미코박테리움 투베르콜로시스
aroK	NP_206956.1	15644786	헬리코박터 필로리
SK	CAA32883.1	42966	에르위니아 크리산데마

[0410]

[0411] F. 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소 (EC 2.5.1.19). 5-에놀피루빌시키메이트-3-포스페이트 생성효소 (EPSPS)라고도 알려진 3-포스포시키메이트-2-카르복시비닐전이효소는 포스포에놀피루베이트의 에놀피루빌 잔기의 시키메이트-3-포스페이트의 5-히드록실로의 전이를 촉매한다. 본 효소는 *E. coli*에서 *aroA*로 암호화된다 (Anderson et al., *Biochemistry* 27:1604-1610 (1988)). 미코박테리움 투베르콜로시스 (Oliveira et al., 단백질 *Expr. Purif.* 22:430-435 (2001)), 두날리엘라 살리나 (Yi et al., *J. Microbiol.* 45:153-157 (2007)) 및 스타필로코커스 아우레우스 (Priestman et al., *FEBS Lett.* 579:728-732 (2005)) 유래의 EPSPS 효소들은 클로닝되었고 *E. coli*에서 기능적으로 발현되었다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
aroA	AAC73994.1	1787137	에스케리키아 콜라이
aroA	AAA25356.1	149928	미코박테리움 투베르콜로시스
aroA	AAA71897.1	152956	스타필로코커스 아우레우스
aroA	ABM68632.1	122937807	두날리엘라 살리나

[0412]

[0413] G. 코리스메이트 생성효소 (EC 4.2.3.5). 코리스메이트 생성효소는 시킴산 경로에서 7번째 효소이고, 5-에놀피루빌시키메이트-3-포스페이트의 코리스메이트로의 변환을 촉매한다. 효소 알짜 반응은 산화환원 변화를 포함하지 않지만 본 효소는 환원형 플라빈 모노뉴클레오티드 (FMN)를 조인자로서 요구한다. 식물 및 세균에서 발견되는 효소와는 달리, 진균에서의 코리스메이트 생성효소 역시 NADPH를 소비하면서 FMN를 환원시킬 수 있다 (Macheroux et al., *Planta* 207:325-334 (1999)). 대표적인 단기능성 효소들은 *E. coli* (White et al., *Biochem. J.* 251:313-322 (1988)) 및 스트렙토코커스 뉴모니애 (Maclean and Ali, *Structure* 11:1499-1511 (2003)(doi:S0969212603002648, pii)의 *aroC*에 의해 암호화된다. 2 기능성 진균 효소들은 뉴로스포라 크라사 (Kitzing et al., *J. Biol. Chem.* 276:42658-42666 (2001)) 및 사카로마이세스 세레비지애 (Jones et al., *Mol. Microbiol.* 5:2143-2152 (1991))에서 발견된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
aroC	NP_416832.1	16130264	에스케리키아 콜라이
aroC	ACH47980.1	197205483	스트렙토코커스 뉴모니애
U25818.1:19..1317	AAC49056.1	976375	뉴로스포라 크라사
ARO2	CAA42745.1	3387	사카로마이세스 세레비지애

[0414]

[0415] H. 코리스메이트 분해효소 (EC 4.1.3.40). 코리스메이트 분해효소는 유비퀴논 생합성에서 제1 예정된 단계를 촉매한다: 코리스메이트로부터 피루베이트 제거로 4-히드록시벤조에이트 형성. 본 효소 반응은 4-히드록시벤조에이트 산물 서방에 의해 속도가 제한되고 (Gallagher et al., 단백질들 44:304-311 (2001)), 이것이 4-히드록시벤조에이트를 하류 막-결합 효소들로 전달하는 역할이라고 판단된다. *E. coli* 코리스메이트 분해효소는 클로닝

되고 특정화되었고 결정화되었다 (Gallagher et al., *supra* 2001; Siebert et al., *FEBS Lett.* 307:347-350 (1992)). 구조적 연구를 통하여 G90 잔기는 산물 저해에 기여한다고 보여진다 (Smith et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 445:72-80 (2006)). 2개의 표면-활성 시스테인 잔기들의 변형은 단백질 응집을 감소시켰다 (Holden et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1594:160-167 (2002)). 미코박테리움 투베르콜로시스 코리스메이트 분해효소의 재조합 형태는 클로닝되었고 *E. coli*에서 특정되었다 (Stadthagen et al., *J. Biol. Chem.* 280:40699-40706 (2005)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>ubiC</i>	AAC77009.2	87082361	에스케리키아 콜라이
<i>Rv2949c</i>	NP_217465.1	15610086	미코박테리움 투베르콜로시스

[0416]

[0417] B-F. 다기능성 AROM 단백질 대부분의 세균에서, 시킴산 경로 효소들은 분리된 폴리펩티드에 의해 암호화된다. 미생물 진핵생물에서, 5 종의 효소 기능들은 5 기능성의 슈퍼유전자에 의해 암호화되는 다중 기능성 단백질에 의해 촉매된다 (Campbell et al., *Int. J. Parasitol.* 34:5-13 (2004)). 다기능성 AROM 단백질 복합체는 두 2의 반응들 B-F와 유사한 반응들을 촉매한다. AROM 단백질 복합체는 아스페질러스 니돌란스, 뉴로스포라 크라사, 사카로마이세스 세레비자애 및 뉴모시스티스 카리나이를 포함하는 진균에서 특정되었다 (Banerji et al., *J. Gen. Microbiol.* 139:2901-2914 (1993); Charles et al., *Nucleic Acids Res.* 14:2201-2213 (1986); Coggins et al., *Methods Enzymol.* 142:325-341 (1987); Duncan, K., *Biochem. J.* 246:375-386 (1987)). AROM의 여러 성분들은 개별 폴리펩티드로 독립적으로 기능하는 것으로 보였다. 예를들면, 데히드로퀴네이트 생성효소 (DHQ S)는 AROM의 아미노-말단 도메인을 형성하고, *E. coli* 내로 클로닝 될 때 독립적으로 기능한다 (Moore et al., *Biochem. J.* 301 (Pt 1):297-304 (1994)). 아스페질러스 니돌란스 유래 AROM 성분의 여러 결정 구조들은 촉매 기전에 대한 통찰을 제공한다 (Carpenter et al., *Nature* 394:299-302 (1998)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>AROM</i>	P07547.3	238054389	아스페질러스 니돌란스
<i>AROM</i>	P08566.1	114166	사카로마이세스 세레비자애
<i>AROM</i>	P07547.3	238054389	아스페질러스 니돌란스
<i>AROM</i>	Q12659.1	2492977	뉴모시스티스 카리나이

[0418]

실시예 V

p-톨루에이트의 테레프탈산으로의 효소적 변환을 위한 예시적 경로

[0421] 본 실시예는 p-톨루에이트의 테레프탈산 (PTA) 전환에 대한 예시적 경로들을 기술한다.

[0422] 도 3에 도시된 바와 같이 2 효소 단계들에서 P-톨루에이트는 메틸기의 산으로의 산화를 통하여 PTA로 더욱 변환된다. 본 경로는 p-톨루에이트 메틸-일산소첨가효소 환원효소, 4-카르복시벤질 알코올 탈수소효소 및 4-카르복시벤질 알데히드 탈수소효소로 이루어진다. 제1 단계에서, p-톨루에이트 메틸-일산소첨가효소는 O₂ 존재에서 p-톨루에이트를 4-카르복시벤질 알코올로 산화한다. 기질로서 4-톨루엔 술포네이트와도 반응하는 코마모나스 테스토스테로니 효소 (*tsaBM*)는 정제되고 특정되었다 (Locher et al., *J. Bacteriol.* 173:3741-3748 (1991)). 4-카르복시벤질 알코올은 4-카르복시벤질 알코올 탈수소효소 (*tsaC*)에 의해 연속하여 알데히드로 전환된다. 알데히드에서 산으로의 변환은 4-카르복시벤즈알데히드 탈수소효소 (*tsaD*)에 의해 촉매된다. 이들 반응을 촉매하는 효소들은 코마모나스 테스토스테로니 T-2, p-톨루에이트를 유일 탄소 및 에너지원으로 활용할 수 있는 유기체에서 발견된다 (Junker et al., *J. Bacteriol.* 179:919-927 (1997)). p-톨루에이트를 PTA로 변환할 수 있는 추가적인 유전자들은 서열 상동성에 의해, 특히 버크홀데리아, 알칼리케네스, 슈도모나스, 싱고모나스 및 코마모나스 속들의 프로테오박테리아에서 발견된다 (미국특허번호 6,187,569 및 미국공개 2003/0170836). 코마모나스 테스토스테로니 효소들과 연관된 유전자은행 식별자는 다음에 나열된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>tsaB</i>	AAC44805.1	1790868	코마모나스 테스토스테로니
<i>tsaM</i>	AAC44804.1	1790867	코마모나스 테스토스테로니
<i>tsaC</i>	AAC44807.1	1790870	코마모나스 테스토스테로니
<i>tsaD</i>	AAC44808.1	1790871	코마모나스 테스토스테로니

[0423]

[0424] 실시예 VI

[0425] 2H4OP로부터 벤조에이트 합성

[0426] 본 실시예는 시킴산 경로 효소들 (도 9)에 의한 2H4OP로부터 벤조에이트 합성 및 벤조에이트 경로 전구체 2H4OP 생산을 위한 예시적 경로 (도 8)를 보인다.

[0427] p-톨루에이트와 같이, 벤조에이트의 화학 구조는 p-히드록시벤조에이트, 실시예 IV에서 상기된 시킴산 경로 산물과 유사하다. 본 실시예에서 시킴산 경로 효소들이 활용되어 도 9에 도시된 경로에 의해 경로 전구체 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2H4OP)로부터 벤조에이트가 합성된다. 벤조에이트 형성에 사용되는 2H4OP 및 대안 기질들에 대한 시킴산 경로 효소들의 재활성은 선택적으로 방향성 또는 적응 진화에 의해 최적화되어 2H4OP 및 하류 유도체에 대한 기질들로서의 선호도를 개선시킨다. 이러한 방법은 본 분야에서 잘 알려져 있고 본원에 기재된다.

[0428] 벤조에이트 경로 전구체 (2-히드록시-4-옥소부톡시)포스포네이트 (2H4OP) 합성을 위한 예시적 및 새로운 경로가 도 8에 도시된다. 본 경로에서, 2효소 단계들에서 2H4OP는 중앙 대사산물 에리트로스-4-포스페이트로부터 유도된다. 제1 단계에서, 디올 탈수효소는 에리트로스-4-포스페이트를 (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 (24DBP)로 변환시킨다. 24DBP 환원효소 활성을 가지는 산화환원효소에 의해 24DBP의 2-케토기는 연속하여 2H4OP의 알코올로 환원된다. 도 8의 단계들 A 및 B에 대한 예시적 효소들은 하기된다.

[0429] A. 에리트로스-4-포스페이트 탈수효소: EC 분류 4.2.1에 속하는 디올 탈수효소들이 활용되어 에리트로스-4-포스페이트를 24DBP로 전환한다 (도 4, 단계 A). 이러한 변환을 촉매하는 효소들은 예시되지 않았지만, 여러 효소들이 유사한 변환들을 촉매하며, 디히드록시-산 탈수효소 (EC 4.2.1.9), 프로판디올 탈수효소 (EC 4.2.1.28), 글리세롤 탈수효소 (EC 4.2.1.30) 및 미오-이노시토스 탈수효소 (EC 4.2.1.44)가 포함된다. 예시적 디올 탈수효소들은 실시예 III에서 상기된다.

[0430] 2차 디올 2,3-부탄디올을 2-부타논으로 전환할 수 있는 디올 탈수효소 또는 프로판디올 탈수효소들 (EC 4.2.1.28)은 본 변환에 사용될 수 있다. 아데노실코발라민- 또는 B12-의존성 디올 탈수효소는 알파, 베타 및 감마 서브단위들을 포함하며, 이들 모두는 효소 작용에 사용된다. 예시적 유전자들은 클렙시엘라 뉴모니아 (Tobimatsu et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:1774-1777 (1998); Toraya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480 (1976)), 살모넬라 티피무리움 (Bobik et al., *J. Bacteriol.* 179:6633-6639 (1997)), 클렙시엘라 옥시토카 (Tobimatsu et al., *J. Biol. Chem.* 270:7142-7148 (1995)) 및 락토바실러스 콜리노이데스 (Sauvageot et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 209:69-74 (2002))에서 발견된다. 기타 유기체에 있는 디올 탈수효소 유전자들 분리 방법은 본원에 전체가 참조로 포함되는 미국특허번호 5,686,276에 예시된 바와 같이 본 분야에 잘 알려져 있다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
pddA	BAA08099.1	868006	클렙시엘라 옥시토카
pddB	BAA08100.1	868007	클렙시엘라 옥시토카
pddC	BAA08101.1	868008	클렙시엘라 옥시토카
pduC	AAB84102.1	2587029	살모넬라 티피무리움
pduD	AAB84103.1	2587030	살모넬라 티피무리움
pduE	AAB84104.1	2587031	살모넬라 티피무리움
pduC	CAC82541.1	18857678	락토바쿨루스 콜리노이테스
pduD	CAC82542.1	18857679	락토바쿨루스 콜리노이테스
pduE	CAD01091.1	18857680	락토바쿨루스 콜리노이테스
pddA	AAC98384.1	4063702	클렙시엘라 뉴모니애
pddB	AAC98385.1	4063703	클렙시엘라 뉴모니애
pddC	AAC98386.1	4063704	클렙시엘라 뉴모니애

[0431]

[0432] 글리세를 탈수효소 패밀리에 있는 효소들 (EC 4.2.1.30) 역시 에리트로스-4-포스페이트를 탈수하는데 사용될 수 있다. 예시적 유전자들은 클렙시엘라 뉴모니애의 gldABC 및 dhaB123 (WO 2008/137403) 및 (Toraya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:475-480 (1976)), 클로스트리듐 파스테우라눔 dhaBCE (Macis et al., *FEMS Microbiol Lett.* 164:21-28 (1998)) 및 시트로박터 프레운디아의 dhabCE (Seyfried et al., *J. Bacteriol.* 178:5793-5796 (1996))를 포함한다. 2개의 베타 서브단위 잔기들에 돌연변이를 도입하여 80- 내지 336-배 개선된 활성을 가지는 *K. 뉴모니애* 유래 B12-의존성 디올 탈수효소 변이체가 최근 조작되었다 (Qi et al., *J. Biotechnol.* 144:43-50 (2009)). 에러-유발 PCR을 이용하여 불활성 반응이 감소된 디올 탈수효소들을 DuPont 사에서 개발하였다 (WO 2004/056963).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
gldA	AAB96343.1	1778022	클렙시엘라 뉴모니애
gldB	AAB96344.1	1778023	클렙시엘라 뉴모니애
gldC	AAB96345.1	1778024	클렙시엘라 뉴모니애
dhaB1	ABR78884.1	150956854	클렙시엘라 뉴모니애
dhaB2	ABR78883.1	150956853	클렙시엘라 뉴모니애
dhaB3	ABR78882.1	150956852	클렙시엘라 뉴모니애
dhaB	AAC27922.1	3360389	클로스트리듐 파스테우라눔
dhaC	AAC27923.1	3360390	클로스트리듐 파스테우라눔
dhaE	AAC27924.1	3360391	클로스트리듐 파스테우라눔
dhaB	P45514.1	1169287	시트로박터 프레운디아
dhaC	AAB48851.1	1229154	시트로박터 프레운디아
dhaE	AAB48852.1	1229155	시트로박터 프레운디아

[0433]

[0434] B12-의존성 디올 탈수효소가 활용되면, 상응하는 재활성화 인자의 이종 발현이 유용하다. B12-의존성 디올 탈수효소는 기질들 및 일부 하류 생성물에 의한 기전-기반 자살 활성화가 수행된다. 불활성 코발라민과의 밀접한 조합에 의해 야기되는 불활성화는 ATP-의존성 과정에서 디올 탈수효소 재활성화 인자들에 의해 부분적으로 극복될 수 있다. B12 조인자 재생은 ATP-의존적이다. 예시적 후보는 클렙시엘라 옥시토카 (Mori et al., *J. Biol. Chem.* 272:32034-32041 (1997)), 살모넬라 티피무리움 (Bobik et al., *J. Bacteriol.* 179:6633-6639 (1997); Chen et al., *J. Bacteriol.* 176:5474-5482 (1994)), 락토바실러스 콜리노이테스 (Sauvageot et al., *FEMS*

Microbiol. Lett. 209:69-74 (2002)), 및 클렙시엘라 뉴모니아 (WO 2008/137403)에서 발견된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>ddrA</i>	AAC15871.1	3115376	클렙시엘라 옥시토카
<i>ddrB</i>	AAC15872.1	3115377	클렙시엘라 옥시토카
<i>pduG</i>	AAL20947.1	16420573	살모넬라 티피무리움
<i>pduH</i>	AAL20948.1	16420574	살모넬라 티피무리움
<i>pduG</i>	YP_002236779	206579698	클렙시엘라 뉴모니아
<i>pduH</i>	YP_002236778	206579863	클렙시엘라 뉴모니아
<i>pduG</i>	CAD01092	29335724	락토바실러스 콜리노이테스
<i>pduH</i>	CAD01093	29335725	락토바실러스 콜리노이테스

[0435]

[0436] B12-독립적 디올 탈수효소들은 조인자로서 S-아데노실메티오닌 (SAM)을 활용하고, 염격한 협기성 조건에서 기능하고, 특이적인 활성화 효소에 의한 활성화가 필요하다 (Frey et al., *Chem. Rev.* 103:2129-2148 (2003)). *dhaB1* 및 *dhaB2*에 의해 암호화되는 클로스트리듐 부티리쿰의 글리세롤 탈수효소 및 상응되는 활성화 인자가 잘 특정화되었다 (O'Brien et al., *Biochemistry* 43:4635-4645 (2004); Raynaud et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:5010-5015 (2003)). 본 효소는 *E. coli* 의 1,3-프로판디올 과다생산 균주에서 최근 이용되었고 매우 높은 산물 역할을 달성할 수 있었다 (Tang et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1628-1634 (2009)). 로세부리아 이눌리나보란스 유래 추가적인 B12-독립적 디올 탈수효소 효소 및 활성화 인자는 2,3-부탄디올을 2-부타논으로 전환하는 것을 촉매하였다 (미국공개 2009/09155870).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>dhaB1</i>	AAM54728.1	27461255	클로스트리듐 부티리쿰
<i>dhaB2</i>	AAM54729.1	27461256	클로스트리듐 부티리쿰
<i>rdhtA</i>	ABC25539.1	83596382	로세부리아 이눌리나보란스
<i>rdhtB</i>	ABC25540.1	83596383	로세부리아 이눌리나보란스

[0437]

[0438] 디하드록시-산 탈수효소 (DHAD, EC 4.2.1.9)는 분지 사슬 아미노산 생합성에 참여하는 B12-독립적 효소이다. 원래 역할은, 2,3-디하드록시-3-메틸발레레이트를 2-케토-3-메틸-발레레이트, 이소루신 전구체로 전환하는 것이다. 발린 생합성에서, 본 효소는 2,3-디하드록시-이소발레레이트의 2-옥소이소발레레이트로의 탈수를 촉매한다. 술플로부스 솔파타리кус 유래 DHAD는 광폭의 기질 범위를 가지며, *E. coli* 에서 발현되는 재조합 효소의 활성은 다양한 알돈산들에서 입증되었다 (Kim and Lee, *J. Biochem.* 139:591-596 (2006)). *S. 솔파타리кус* 효소는 많은 디올 탈수효소들과는 달리 산소를 허용한다. *ilvD*로 암호화되는 *E. coli* 효소는 산소에 민감하고, 철-황 클러스터를 불활성화한다 (Flint et al., *J. Biol. Chem.* 268:14732-14742 (1993)). 유사한 효소들이 뉴로스포라 크라사 (Altmiller and Wagner, *Arch. Biochem. Biophys.* 138:160-170 (1970)) 및 살모넬라 티피무리움 (Armstrong et al., *Biochim. Biophys. Acta* 498:282-293 (1977))에서 특정되었다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>ilvD</i>	NP_344419.1	15899814	술플로부스 솔파타리кус
<i>ilvD</i>	AAT48208.1	48994964	에스캐리키아 콜라이
<i>ilvD</i>	NP_462795.1	16767180	살모넬라 티피무리움
<i>ilvD</i>	XP_958280.1	85090149	뉴로스포라 크라사

[0439]

디올 탈수효소 미오-이노소세-2-탈수효소 (EC 4.2.1.44)는 또 다른 예시적 후보이다. 미오-이노소세는 인접 알코올기들을 가지는 6-원 고리이다. 미오-이노소세-2-탈수효소 기능성을 암호화하는 정제 효소가 미오-이노시톨 분해 측면에서 클렙시엘라 아이로게네스에서 연구되었지만 (Berman and Magasanik, *J. Biol. Chem.* 241:800-806 (1966)), 지금까지 유전자와 연관되지 않았다. 시노리조븀 프레더이의 미오-이노소세-2-탈수효소가 클로닝되었고 *E. coli* 에서 기능적으로 발현되었다 (Yoshida et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:2957-2964 (2006)). *iolE*로 암호화되는 *B. 섭틸리스* 유래 유사한 효소 역시 연구되었다 (Yoshida et al., *Microbiology* 150:571-580 (2004)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>iolE</i>	P42416.1	1176989	바실러스 섭틸리스
<i>iolE</i>	AAX24114.1	60549621	시노리조류 프레디아

[0440]

[0441] B. (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소: (2,4-디옥소부톡시)포스포네이트 환원효소 활성을 가지는 효소는 24DBP를 2H4OP로 전환시키는데 사용된다. 본 화합물은 알코올 탈수소효소들에 대한 알려진 기질은 아니지만, EC 분류 1.1.1에 속하는 여러 효소들은 유사한 반응들을 촉매한다. 인산화기질들의 케톤들을 환원하는 예시적 효소들은 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소 (EC 1.1.1.8), 3-포스포글리세레이트 탈수소효소 (EC 1.1.1.95) 및 에리트로네이트-4-포스페이트 탈수소효소 (EC 1.1.1.290)를 포함한다. 글리세롤-3-포스페이트 탈수소효소는 디히드록시아세틸-포스페이트의 글리세롤-3-포스페이트로의 NAD(P)H-의존성 환원을 촉매한다. 본 효소는 *E. coli* 의 *gpsA*에 의해 암호화된다 (Kito et al., *J Biol. Chem.* 244:3316-3323 (1969)). 3-포스포글리세레이트 탈수소효소는 *E. coli*을 포함한 여러 유기체에서의 세린 생합성 제1 단계를 촉매하며, 유전자 *serA*에 의해 암호화된다 (Tobey et al., *J Biol. Chem.* 261:12179-12183 (1986)). 에리트로네이트-4-포스페이트 탈수소효소 (EC 1.1.1.290)는 2-옥소-3-히드록시-4-포스포부타노에이트의 에리트로네이트-4-포스페이트로의 가역적 환원을 촉매한다. 본 효소는, *E. coli*의 *pdxB*에 의해 암호화되고, 통상 피리독살 5'-포스페이트 생합성에서 역방향으로 작용한다 (Schoenlein et al., *J Bacteriol.* 171:6084-6092 (1989)). 슈도모나스 아이루기노사의 *pdxB*에 의해 암호화되는 유사한 효소는 특정되었고 *E. coli*에서 이종 발현되었다 (Ha et al., *Acta Crystallogr. Sect.F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62:139-141 (2006)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>gpsA</i>	AAC76632.1	1790037	에스캐리키아 콜라이
<i>serA</i>	AAC75950.1	1789279	에스캐리키아 콜라이
<i>pdxB</i>	AAC75380.1	1788660	에스캐리키아 콜라이
<i>pdxB</i>	AAG04764.1	9947319	슈도모나스 아이루기노사

[0442]

[0443] 다양한 알코올 탈수소효소들이 케톤을 알코올 작용기로 환원시킨다. *E. coli*에서 이러한 두 효소들은 말레이트 탈수소효소 (*mdh*) 및 락테이트 탈수소효소 (*ldhA*)에 의해 암호화된다. 랄스토니아 유트로파 (랄스토니아 유트로파)의 락테이트 탈수소효소는 락테이트, 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소글루타레이트를 포함한 다양한 사슬 길이의 2-케토산들에 대한 높은 활성을 보인다 (Steinbuchel et al., *Eur. J. Biochem.* 130:329-334 (1983)). 알파-케토아디페이트의 알파-히드록시아디페이트로의 전환은 래트 및 사람 태반에서 발견되어 보고되는 2-케토아디페이트 환원효소에 의해 촉매된다 (Suda et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 176:610-620 (1976); Suda et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77:586-591 (1977)). 추가적인 산화환원효소는 사람 심장의 미토콘드리아 3-히드록시부티레이트 탈수소효소 (*bdh*)이고 클로닝되고 특정되었다 (Marks et al., *J. Biol. Chem.* 267:15459-15463 (1992)). *C. 베이제린크카*의 알코올 탈수소효소들 (Ismaiel et al., *J. Bacteriol.* 175:5097-5105 (1993)) 및 *T. 브로크카* (Lamed et al., *Biochem. J.* 195:183-190 (1981); Peretz et al., *Biochemistry* 28:6549-6555 (1989))는 아세톤을 이소프로판올로 전환시킨다. 메틸 에틸 케톤 환원효소, 또는 달리, 2-부탄올 탈수소효소는, MEK 환원을 촉매하여 2-부탄올을 형성한다. 예시적 MEK 환원효소들은 로도코쿠스 루버(로도코쿠스 루버) (Kosjek et al., *Biotechnol Bioeng.* 86:55-62 (2004)) 및 퍼로코커스 푸리오수스 (van der et al., *Eur. J. Biochem.* 268:3062-3068 (2001))에서 발견된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>mdh</i>	AAC76268.1	1789632	에스캐리카야 콜라이
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	에스캐리카야 콜라이
<i>ldh</i>	YP_725182.1	113866693	랄스토니아 유트로파
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	호모 사파인스
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	클로스트리디움 베이제린크카 NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	테르보아내로박터 브로크카 HTD4
<i>adhA</i>	AAC25556	3288810	페로코커스 푸리오수스
<i>sadh</i>	CAD36475	21615553	로도코쿠스 루버

[0444]

[0445] Matsuyama et al. ((1995))에 기재된 바와 같이 무엇보다도 바실러스, 브레비박테리움, 칸디다, 및 클렙시엘라 속들에 속하는 유기체를 포함하여 많은 유기체들이 4-히드록시-2-부탄디올로의 환원을 촉매한다. 변이된 로도코쿠스 폐닐아세트알데히드 환원효소 (Sar268) 및 레이포니아 알코올 탈수소효소 역시 고수율로 이러한 변환을 촉매하는 것으로 확인되었다 (Itoh et al., *Appl.Microbiol Biotechnol.* 75:1249-1256 (2007)).

[0446]

호모세린 탈수소효소 (EC 1.1.1.13)는 아스파르테이트 세미알데히드의 호모세린으로의 NAD(P)H-의존성 환원을 촉매한다. *E. coli* 를 포함한 많은 유기체에서 호모세린 탈수소효소는 2 기능성 효소이고, 아스파르테이트의 아스파탈-4-포스페이트로의 ATP-의존성 전환도 촉매한다 (Starnes et al., *Biochemistry* 11:677-687 (1972)). 기능적 도메인들은 촉매적으로 독립적이고 링커 영역에 의해 연결되고 (Sibilli et al., *J Biol.Chem.* 256:10228-10230 (1981)) 양 도메인들은 트레오닌에 의한 알로오스테리 억제를 받는다. *E. coli* 효소의 호모세린 탈수소효소 도메인은 *thrA*에 의해 암호화되고, 아스파르테이트 키나아제 도메인으로부터 분리되고, 특정화되고, 높은 촉매활성 및 트레오닌에 의한 억제 감소를 보였다 (James et al., *Biochemistry* 41:3720-3725 (2002)). 이것은 예를들면, 락토바실러스 플란타룸 (Cahyanto et al., *Microbiology* 152:105-112 (2006)) 및 아라비돕시스 탈리아나의 *hom1*을 포함한 다른 2 기능성 트레오닌 키나아제들에도 적용된다. *S. 세레비지애*의 *hom6* (Jacques et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1544:28-41 (2001)) 및 락토바실러스 플란타룸의 *hom2* (Cahyanto et al., *Microbiology* 152:105-112 (2006))에 의해 암호화되는 단기능성 호모세린 탈수소효소들은 *E. coli*에서 기능적으로 발현되었고 특정되었다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>thrA</i>	AAC73113.1	1786183	에스캐리카야 콜라이 K12
<i>akthr2</i>	O81852	75100442	아라비돕시스 탈리아나
<i>hom6</i>	CAA89671	1015880	사카로마이세스 세레비지애
<i>hom1</i>	CAD64819	28271914	락토바실러스 플란타룸
<i>hom2</i>	CAD63186	28270285	락토바실러스 플란타룸

[0447]

실시예 VII

[0448] 벤젠 및 툴루엔 경로들

[0449] 본 실시예는 벤조에이트 및 벤조일-CoA에서 벤젠, 및 *p*-톨루에이트 및 *p*-메틸벤조일-CoA에서 툴루엔으로의 경로들을 보인다.

[0450]

벤조에이트 또는 벤조일-CoA에서 벤젠에 대한 효소 생산 경로들이 도 10에 도시된다. 벤조에이트 및 벤조일-CoA는 다양한 방향족 분해 경로들에 공통적인 천연 발생적 대사 중간체들이다. 또한 벤조에이트는 본원에 기술된 대안적 시킴산 경로에 의해서도 생산된다. 벤조에이트 및/또는 벤조일-CoA에서 벤젠으로의 여러 경로들이 도 10에 도시된다. 먼저, 벤젠은 벤조에이트에서 탈탄산반응을 통하여 직접 생산된다 (도 10, 경로 E). 대안으로, 산잔기는 벤조산 환원효소에 의해 직접적으로 (도 10, 경로 B) 또는 벤조일-CoA 및/또는 (벤조일옥시)포스포네이트 중간체들을 통하여 간접적으로 (도 10, 경로 A 및 D, 경로 B, 경로 H 및 G, 또는 경로 A, F, 및 G) 알데히드로 환원된다. 벤즈알데히드는 연속하여 탈카르보닐화되어 벤젠을 형성한다 (도 10, 경로 C).

[0452] *p*-톨루에이트 및/또는 *p*-메틸벤조일-CoA로부터 톨루엔을 효소적으로 생산하는 유사 경로들이 도 11에 도시된다. *p*-톨루에이트는 본원에 기재된 바와 같이 대안적 시킴산 경로에 의해 생산된다. *p*-톨루에이트 (*p*-메틸벤조에이트로도 알려짐) 및/또는 *p*-메틸벤조일-CoA를 톨루엔으로 전환시키는 경로들은 상기된 벤조에이트 또는 벤조일-CoA의 벤젠 변환과 유사하다. 도 10 및 11에 도시된 변환들을 촉매하는 효소들은 EC 번호로 분류되고 하기 더욱 기술된다.

번호	작용	도면-경로
1.2.1.b	산화환원효소 (아실-CoA에서 알데하이드)	6/7-D
1.2.1.d	산화환원효소 (인산화/탈인산)	6/7-G
1.2.1.e	산화환원효소 (산에서 알데하이드)	6/7-B
2.3.1.a	아실전이효소 (인산기를 CoA로 전달; 포스포트란스아실라제)	6/7-F
2.7.2.a	인산전이효소, 카르복실기 수용체 (키나아제)	6/7-H
2.8.3.a	조효소-A 전이효소	6/7-A
3.1.2.a	티올에스테르 가수분해효소 (CoA 특이적인)	6/7-A
4.1.1.a	카르복시-분해효소	6/7-E
4.1.99.a	탈카보닐효소	6/7-C
6.2.1.a	산-티올 연결효소	6/7-A

[0453]

[0454] 1.2.1.b 산화환원효소 (아실-CoA에서 알데하이드): 벤조일-CoA 환원효소 활성을 가지는 효소는 벤조일-CoA를 벤즈알데하이드로 전환하기 위하여 사용된다 (도 10 경로 D). 비슷하게, *p*-메틸벤조일-CoA를 *p*-메틸벤즈알데하이드 (*p*-톨루알데하이드라고도 칭함)로 환원시키는 것은 *p*-메틸벤조일-CoA 환원효소 활성을 가지는 효소로 촉매된다 (도 11, 경로 D). 이들 활성을 가지는 효소들이 특정되지 않았지만, 유사한 반응을 촉매하는 효소는 신나모일-CoA 환원효소 (EC 1.2.1.44)이다. 본 효소는 신나모일-CoA 및 치환된 방향족 유도체 예를들면 쿠마로일-CoA 및 폐롤로일-CoA의 NAD(P)H-의존성 환원을 촉매한다. 본 효소는 아라비돕시스 탈리아나 (*Lauvergeat et al., Phytochemistry* 57:1187-1195 (2001)), 트리티쿰 아이스티븀 (*Ma, J Exp.Bot.* 58:2011-2021 (2007)) 및 파니쿰 비르가툼 (*Escamilla-Trevino et al., New Phytol.* 185:143-155 (2010))를 포함한 유기체에서 특정되었다. *A. 탈리아나* 및 *P. 비르가툼* 유래 효소들은 특정되고 *E. coli*에서 이종 발현되었다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>TACCR1</i>	ABE01883.1	90902167	트리티쿰 아이스티븀
<i>AtCCR1</i>	AAU45042.1	52355804	아라비돕시스 탈리아나
<i>AtCCR2</i>	AAG53687.1	12407990	아라비돕시스 탈리아나
<i>PvCCR1</i>	ACZ74580.1	270315096	파니쿰 비르가툼
<i>PvCCR2</i>	ACZ74585.1	270315106	파니쿰 비르가툼

[0455]

[0456] 여러 기타 잘-특정된 아실-CoA 환원효소들은 아실-CoA를 상응되는 알데하이드로 환원한다. 예시적 효소들은 지방산 아실-CoA 환원효소 (EC 1.2.1.50), 숙시닐-CoA 환원효소 (EC 1.2.1.76), 아세틸CoA 환원효소 (EC 1.2.1.10) 및 부티릴-CoA 환원효소를 포함한다. 예시적 지방산 아실-CoA 환원효소들은 아시네토박터 칼코아세티쿠스 (*Reiser et al., 179:2969-2975 (1997)*) 및 아시네토박터 종 *M-1* (*Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192-1195 (2002))의 *acr1*에 의해 암호화된다. 숙시닐-CoA 환원효소 활성을 가지는 효소들은 클로스트리디움 클루이베리의 *sucD* (*Sohling et al., J Bacteriol.* 178:871-880 (1996a); *Sohling et al., 178:871-80 (1996)*) 및 *P. 긴기발리스*의 *sucD* (*Takahashi et al., J.Bacteriol.* 182:4704-4710 (2000))에 의해 암호화된다. 추가적인 숙시닐-CoA 환원효소들은 호열성 고세균 예를들면 메탈로스파이라 세돌라 (*Berg et al., Science.* 318:1782-1786 (2007)) 및 테르모프로테우스 뉴트로필루스 (*Ramos-Vera et al., J Bacteriol.* 191:4286-4297 (2009))의 3-히드록시프로페오네이트/4-히드록시부티레이트 회로에 관여한다. *Msed_0709*로 암호화되는 *M. 세돌라* CoA 환원효소는 NADPH-의존성이고 또한 말로닐-CoA 환원효소 활성을 가진다. *T. 뉴트로필루스* 효소는 NADPH 및

NADH 모두에 대하여 활성이다. 슈도모나스 종에서, *bphG*에 의해 암호화되는 아실화 아세트알데히드 탈수소효소는 아세트알데히드, 프로피온알데히드, 부틸알데히드, 이소부틸알데히드 및 포름알데히드를 이들의 상응되는 CoA-에스테르로 산화하고 아실화한다는 것이 입증되었다 (Pawlowski et al., 175:377-385 (1993)). 아세틸CoA를 에탄올로 환원하는 것 외에도, 레우코노스토크 메센테로이데스의 *adhE*에 의해 암호화되는 효소는 분지 사슬화합물 이소부틸알데히드를 이소부티릴-CoA로 산화한다고 확인되었다 (Koo et al., *Biotechnol Lett.* 27:505-510 (2005)). 용매생산성 (solventogenic) 유기체 예를들면 클로스트리디움 사카로퍼부틸아세토니쿰 (Kosaka et al., *Biosci Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007))에서 부틸알데히드 탈수소효소는 유사한 반응, 부티릴-CoA의 부틸알데히드로의 전환을 촉매한다. 클로스트리디움 베이제린크키 의 *ald*에 의해 암호화되는 아실-CoA 환원효소는 아세틸CoA 및 부티릴-CoA를 이들 상응되는 알데히드들로 환원한다고 확인되었다 (Toth et al., *Appl Environ Microbiol* 65:4973-4980 (1999)). 본 효소는 살모넬라 티퍼무리움 및 *E. coli*의 *eutE*에 의해 암호화되는 CoA-의존성 아세트알데히드 탈수소효소들과 높은 서열 상동성을 보인다 (Toth et al., *Appl Environ Microbiol* 65:4973-4980 (1999)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>acrI</i>	YP_047869.1	50086359	아시네토박ter 칼코아세티쿠스
<i>acrI</i>	AAC45217	1684886	아시네토박ter 바일리아
<i>acrI</i>	BAB85476.1	18857901	아시네토박ter 종 균주 M-1
<i>MSED_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	메탈로스파이라 세돌라
<i>Theu_0421</i>	ACB39369.1	170934108	테르모프로테우스 뉴트로필루스
<i>sucD</i>	P38947.1	172046062	클로스트리디움 클루이페리
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	포르파로모나스 간기발리스
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	슈도모나스 sp
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	레우코노스토크 메센테로이데스
<i>bld</i>	AAP42563.1	31075383	클로스트리디움 사카로퍼부틸아세토니쿰
<i>ald</i>	AAT66436	9473535	클로스트리디움 베이제린크키
<i>eutE</i>	AAA80209	687645	살모넬라 티퍼무리움
<i>eutE</i>	P77445	2498347	에스케리키아 콜라아이

[0457]

[0458]

추가적인 CoA 환원효소 효소는 말로닐-CoA 환원효소이고 이것은 말로닐-CoA를 말론 세미알데히드로 변환시킨다. 말로닐-CoA 환원효소는 호열호산성 고세균에서 3-히드록시프로파오네이트 회로를 통한 독립영양체 탄소 고정에 있어 핵심 효소이다 (Berg et al., 318:1782-1786 (2007); Thauer, 318:1732-1733 (2007)). 본 효소는 NADPH를 조인자로서 활용하고 메탈로스파이라 및 술플로부스 종에서 특정되었다 (Alber et al., 188:8551-8559 (2006); Hugler et al., 184:2404-2410 (2002)). 본 효소는 메탈로스파이라 세돌라에서 *Msed_0709*에 의해 암호화된다 (Alber et al., 188:8551-8559 (2006); Berg et al., 318:1782-1786 (2007)). 술플로부스 토코다아이 유래 말로닐-CoA 환원효소를 암호화하는 유전자는 클로닝되었고 *E. coli*에서 이종 발현되었다 (Alber et al., 188:8551-8559 (2006)). 또한 본 효소는 메틸말로닐-CoA의 상응되는 알데히드로의 전환을 촉매한다고 확인되었다 (WO/2007/141208). 양자의 말로닐-CoA 환원효소 효소 후보들은 아스파르테이트-세미알데히드 탈수소효소, 아스파탈-4-포스페이트의 아스파르테이트 세미알데히드로의 환원 및 동시적 탈인산화반응을 촉매하는 효소와 높은 서열 유사성을 가진다. 추가적인 유전자들은 술플로부스 술플라리쿠스 및 술플로부스 아시도칼다리우스를 포함한 기타 유기체에서 단백질들과의 서열 상동성을 통하여 발견될 수 있다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
MSED_0709	YP_001190808.1	146303492	메탈로스파이라 세풀라
mcr	NP_378167.1	15922498	술풀로부스 토코다이
asd-2	NP_343563.1	15898958	술풀로부스 솔파타리쿠스
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	술풀로부스 아시도칼다리우스

[0459]

[0460] 1.2.1.d 산화환원효소 (인산화/탈인산) (10/11 G): (벤조일옥시)포스포네이트의 벤즈알데히드로의 환원 (도 10 경로 G) 및 (*p*-메틸벤조일옥시) 포스포네이트의 *p*-메틸벤즈알데히드로의 환원 (도 11 경로 G)은 포스포네이트 환원효소 활성들을 가지는 효소들에 의해 촉매된다. 이러한 전환을 촉매하는 효소들은 아직 확인되지 않았지만, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소 (EC 1.2.1.12), 아스파르테이트-세미알데히드 탈수소효소 (EC 1.2.1.11) 아세틸글루타밀포스페이트 환원효소 (EC 1.2.1.38) 및 글루타메이트-5-세미알데히드 탈수소효소 (EC 1.2.1.)에 의해 촉매되는 유사한 변환들은 잘 정리되어 있다. 아스파르테이트 세미알데히드 탈수소효소 (ASD, EC 1.2.1.11)는 4-아스파탈 포스페이트의 아스파르테이트-4-세미알데히드로의 NADPH-의존성 환원을 촉매한다. ASD는 아미노산 생합성에 참여하고 최근에는 항생제 표적으로써 연구되었다 (Hadfield et al., *Biochemistry* 40:14475-14483 (2001)). *E. coli* ASD 구조가 풀렸고 (Hadfield et al., *J Mol.Biol.* 289:991-1002 (1999)) 본 효소는 대안 기질 베타-3-메틸아스파탈 포스페이트를 수용하는 것으로 보인다 (Shames et al., *J Biol.Chem.* 259:15331-15339 (1984)). 헤모필루스 플루엔자 효소는 활성 부위에서의 기질 결합 친화도 변형을 위한 효소 조작 연구 대상이었다 (Blanco et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 60:1388-1395 (2004)). 기타 ASD 유전자들/효소들은 미코박테리움 투베르콜로시스 (Shafiani et al., *J Appl Microbiol* 98:832-838 (2005)), 메타노코쿠스 잔나스키 (Faehnle et al., *J Mol.Biol.* 353:1055-1068 (2005)), 및 전염성 미생물 비브리오 콜레라 및 헬리코박터 필로리 (Moore et al., *Protein Expr.Purif.* 25:189-194 (2002))에서 발견된다. 관련 효소는 아세틸글루타밀포스페이트 환원효소 (EC 1.2.1.38), 자연적으로 아세틸글루타밀포스페이트를 아세틸글루타메이트-5-세미알데히드로 환원시키는 효소이고, *S. 세레비지야* (Pauwels et al., *Eur.J Biochem.* 270:1014-1024 (2003)), *B. 썹틸리스* (O'Reilly et al., *Microbiology* 140 (Pt 5):1023-1025 (1994)), *E. coli* (Parsot et al., *Gene*. 68:275-283 (1988)), 및 기타 유기체에서 발견된다. *E. coli* 의 추가적인 포스페이트 환원효소들은 *gapA*에 의해 암호화되는 글리세르알데히드 3-포스페이트 탈수소효소 (Branlant et al., *Eur.J.Biochem.* 150:61-66 (1985)) 및 *proA*에 의해 암호화되는 글루타메이트-5-세미알데히드 탈수소효소 (Smith et al., *J.Bacteriol.* 157:545-551 (1984b))를 포함한다. 살모넬라 티피무리움 (Mahan et al., *J Bacteriol.* 156:1249-1262 (1983)) 및 캄필로박터 제주니 (Louie et al., *Mol.Gen.Genet.* 240:29-35 (1993)) 유래의 글루타메이트-5-세미알데히드 탈수소효소들을 암호화하는 유전자들은 클로닝되고 *E. coli*에서 발현되었다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
asd	NP_417891.1	16131307	에스캐리키아 콜라이
asd	YP_248335.1	68249223	해모필루스 플루엔자
asd	AAB49996	1899206	미코박테리움 투베르콜로시스
VC2036	NP_231670	15642038	비브리오 콜레라
asd	YP_002301787.1	210135348	헬리코박터 페로리
ARG5,6	NP_010992.1	6320913	사카로마이세스 세레비지애
argC	NP_389001.1	16078184	바실러스 섭틸리스
argC	NP_418393.1	16131796	에스캐리키아 콜라이
gapA	P0A9B2.2	71159358	에스캐리키아 콜라이
proA	NP_414778.1	16128229	에스캐리키아 콜라이
proA	NP_459319.1	16763704	살모넬라 티퍼무리움
proA	P53000.2	9087222	캄필로박터 제주니

[0461]

[0462] 1.2.1.e 산화환원효소 (산에서 알데히드): 벤조에이트가 벤즈알데히드로 또는 *p*-톨루에이트가 *p*-메틸벤즈알데히드로 직접 전환되는 경로 (도 10 및 11의 경로 B)는 카르복실산 환원효소에 의해 촉매된다. 예시적 효소들은 카르복실산 환원효소, 알파-아미노아디페이트 환원효소 및 레티노산 환원효소를 포함한다. 카르복실산 환원효소 (CAR)는 카르복실산들의 이에 상응되는 알데히드들로의 마그네슘, ATP 및 NADPH-의존성 환원을 촉매한다 (Venkitasubramanian et al., *J Biol. Chem.* 282:478-485 (2007)). 본 효소의 천연 기질은 벤조에이트이며 본 효소는 *p*-톨루에이트를 포함한 방향족 기질들을 넓게 수용한다 (Venkitasubramanian et al., *Biocatalysis in Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. CRC press (2006)). 노카르디아 이오웬시스 유래의 car로 암호화되는 본 효소는 클로닝되고 *E. coli*에서 기능적으로 발현되었다 (Venkitasubramanian et al., *J Biol. Chem.* 282:478-485 (2007)). CAR는 불활성 아포-효소를 활성 홀로-효소로 전환하는 포스포판테테인 전이효소에 의한 (PPTase) 번역-후 활성화를 요구한다 (Hansen et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2765-2774 (2009)). 특이적인 PPTase를 암호화하는 npt 유전자 발현으로 본 효소의 활성이 개선되었다. 스트렙토마이세스 그리세우스에서 발견되는 유사한 효소는 griC 및 griD 유전자들에 의해 암호화된다. 본 효소는 griC 또는 griD 결실이 세포외 3-아세틸아미노-4-히드록시벤조산, 3-아미노-4-히드록시벤조산 대사작용의 분리산물 축적을 일으키므로 3-아미노-4-히드록시벤조산을 3-아미노-4-히드록시벤즈알데히드로 전환하는 것으로 보였다 (Suzuki, et al., *J. Antibiot.* 60(6):380-387 (2007)). 노카르디아 이오웬시스 npt 유전자와의 서열 상동성으로 예측되듯이 *S. 그리세우스* PPTase는 SGR_665에 의해 암호화되는 것으로 보인다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
car	AAR91681.1	40796035	노카르디아 이오웬시스
npt	ABI83656.1	114848891	노카르디아 이오웬시스
griC	YP_001825755.1	182438036	스트렙토마이세스 그리세우스
griD	YP_001825756.1	182438037	스트렙토마이세스 그리세우스
SGR_665	YP_001822177.1	182434458	스트렙토마이세스 그리세우스

[0463]

[0464] 유사한 특성을 가지는 효소인 알파-아미노아디페이트 환원효소 (AAR, EC 1.2.1.31)는 일부 진균 종들에서 리신 생합성 경로들에 관여한다. 본 효소는 천연적으로 알파-아미노아디페이트를 알파-아미노아디페이트 세미알데히드로 환원시킨다. 카르복실기가 먼저 아데닐레이트의 ATP-의존적 형성을 통하여 활성되고 이것은 이후 NAD(P)H로 환원되어 알데히드 및 AMP를 생성한다. CAR과 유사하게, 본 효소는 마그네슘을 활용하고 PPTase에 의해 활성

된다. AAR에 대한 효소 및 상응되는 PPTase는 사카로마이세스 세레비자애 (Morris et al., 유전자 98:141-145 (1991)), 칸디다 알비칸스 (Guo et al., *Mol. Genet. Genomics* 269:271-279 (2003)), 및 시조사카로마이세스 품베 (Ford et al., *Curr. Genet.* 28:131-137 (1995))에서 발견된다. *S. 품베* 유래 AAR은 *E. coli*에서 발현될 때 상당한 활성을 보였다 (Guo et al., *효모* 21:1279-1288 (2004)). 페니실리움 크리소케눔 유래 AAR은 S-카르복시메틸-L-시스테인을 대안 기질로 수용하지만, 아디페이트, L-글루타메이트 또는 디아미노페메레이트와 반응하지 않았다 (Hijarrubia et al., *J Biol. Chem.* 278:8250-8256 (2003)). *P. 크리소케눔* PPTase를 암호화하는 유전자는 지금까지 동정되지 않았고 서열 대비 상동성 검색으로 고-신뢰성의 히트가 확인되지 않았다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
LYS2	AAA34747.1	171867	사카로마이세스 세레비자애
LYS5	P50113.1	1708896	사카로마이세스 세레비자애
LYS2	AAC02241.1	2853226	칸디다 알비칸스
LYS5	AAO26020.1	28136195	칸디다 알비칸스
Lys1p	P40976.3	13124791	시조사카로마이세스 품베
Lys7p	Q10474.1	1723561	시조사카로마이세스 품베
Lys2	CAA74300.1	3282044	페니실리움 크리소케눔

[0465]

[0466] 2.3.1.a 아실전이효소 (포스포트란스아실라제): 포스포트란스벤조일라제 활성을 가지는 효소는 벤조일-CoA 및 (벤조일옥시)포스포네이트 상호 전환에 사용된다 (도 10의 경로 F). 포스포트란스-p-메틸벤조일라제 활성을 가지는 유사한 효소는 p-메틸벤조일-CoA 및 (p-메틸벤조일옥시) 포스포네이트를 상호 전환시킨다 (도 11의 경로 F). 예시적 인산-전달 아실전이효소들은 인산아세틸기전이효소 (EC 2.3.1.8) 및 포스포트란스부티릴라제 (EC 2.3.1.19)를 포함한다. *E. coli* 유래의 *pta* 유전자는 아세틸CoA를 아세틸포스페이트로 가역적 전환시키는 인산아세틸기전이효소를 암호화한다 (Suzuki, *Biochim. Biophys. Acta* 191:559-569 (1969)). 또한 본 효소는 프로피오닐-CoA 프로피오닐포스페이트를 전환한다 (Hesslinger et al., *Mol. Microbiol* 27:477-492 (1998)). 프로피오닐-CoA에 대한 활성을 보이는 기타 포스페이트 아세틸전이효소들은 바실러스 셉틸리스 (Rado et al., *Biochim. Biophys. Acta* 321:114-125 (1973)), 클로스트리디움 클루이베리 (Stadtman, 1:596-599 (1955)), 및 테르모토가 마리티마 (Bock et al., *J Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999))에서 발견된다. 비슷하게, *C. 아세토부틸리쿰* 유래의 *ptb* 유전자는 포스포트란스부티릴라제, 부티릴-CoA를 부티릴-포스페이트로 가역적 전환시키는 효소를 암호화한다 (Wiesenborn et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 55:317-322 (1989); Walter et al., 유전자 134:107-111 (1993)). 추가적인 *ptb* 유전자들은 부티레이트-생산 박테리움 L2-50 (Louis et al., *J. Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004)) 및 바실러스 메가테리움 (Vazquez et al., *Curr. Microbiol.* 42:345-349 (2001))에서 발견된다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>pta</i>	NP_416800.1	71152910	에스캐리키아 콜라이
<i>pta</i>	P39646	730415	바실러스 셉틸리스
<i>pta</i>	A5N801	146346896	클로스트리디움 클루이베리
<i>pta</i>	Q9X0L4	6685776	테르모토가 마리티마
<i>ptb</i>	NP_349676	34540484	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>ptb</i>	AAR19757.1	38425288	부티레이트-생산 박테리움 L2- 50
<i>ptb</i>	CAC07932.1	10046659	바실러스 메가테리움

[0467]

[0468] 2.7.2.a 인산전이효소, 카르복실기 수용체 (키나아제): 키나아제 또는 인산전이효소들은 하나의 ATP의 동시적 가수분해로 카르복실산들을 포스폰산으로 변환시킨다. 이러한 효소는 벤조에이트를 (벤조일옥시)포스포네이트로 (도 10, 경로 H) 및 p-톨루에이트를 (p-메틸벤조일옥시)포스포네이트로로 전환시킨다 (도 11, 경로 H). 이러한 정확한 변환들은 지금까지 보이지 않는다. 예시적 효소들은 부티레이트 키나아제 (EC 2.7.2.7), 이소부티레이트 키나아제 (EC 2.7.2.14), 아스파르토키나아제 (EC 2.7.2.4), 아세테이트 키나아제 (EC 2.7.2.1) 및 감마-글루

타밀 키나아제 (EC 2.7.2.11)를 포함한다. 부티레이트 키나아제는 클로스트리디알 종 산생성단계에서 부티릴-포스페이트의 부티레이트로의 가역적 전환을 촉매한다 (Cary et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1576-1583 (1990)). 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 효소는 두 종의 *buk* 유전자 산물 중 하나에 의해 암호화된다 (Huang et al., *J Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2:33-38 (2000)). 기타 부티레이트 키나아제 효소들은 *C. 부틸리쿰* 및 *C. 테타노모르퓸* (TWAROG et al., *J Bacteriol.* 86:112-117 (1963))에서 발견된다. 관련 효소, 테르모토가 마리터마 유래의 이소부티레이트 키나아제는 *E. coli*에서 발현되었고 결정화되었다 (Diao et al., *J Bacteriol.* 191:2521-2529 (2009); Diao et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59:1100-1102 (2003)). 아스파르토키나아제는 아스파르테이트의 ATP-의존성 인산화반응을 촉매하고 여러 아미노산들 합성을 관여한다. *E. coli*의 아스파르토키나아제 III 효소는 *lysC*로 암호화되고 광폭의 기질 범위를 가지며 기질 특이성에 관여되는 촉매적 잔기들이 평가되었다 (Keng et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 335:73-81 (1996)). *E. coli*의 두 종의 추가적인 키나아제들은 아세테이트 키나아제 및 감마-글루타밀 키나아제이다. *E. coli* 아세테이트 키나아제는 *ackA*에 의해 암호화되고 (Skarstedt et al., *J. Biol. Chem.* 251:6775-6783 (1976)), 아세테이트뿐 아니라 프로페오네이트를 인산화시킨다 (Hesslinger et al., *Mol. Microbiol.* 27:477-492 (1998)). *E. coli* 감마-글루타밀 키나아제는 *proB*로 암호화되고 (Smith et al., *J. Bacteriol.* 157:545-551 (1984a)) 글루타메이트의 감마 탄산기를 인산화시킨다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>buk1</i>	NP_349675	15896326	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>buk2</i>	Q97II1	20137415	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>buk2</i>	Q9X278.1	6685256	테르모토가 마리터마
<i>lysC</i>	NP_418448.1	16131850	에스캐리키아 폴라이
<i>ackA</i>	NP_416799.1	16130231	에스캐리키아 폴라이
<i>proB</i>	NP_414777.1	16128228	에스캐리키아 폴라이

[0469]

[0470] 2.8.3.a CoA 전이효소 (10/11 A): CoA 전이효소들은 하나의 분자에서 다른 분자로의 CoA 전달에 대한 가역적 전달을 촉매한다. 도 10의 경로 A는 벤조일-CoA 전이효소 활성을 가지는 효소에 의해 촉매된다. 본 변환에서, 벤조일-CoA는, CoA 주계 예를들면 아세틸CoA, 숙시닐-CoA 또는 기타로부터 CoA기 전달에 의해 벤조에이트로부터 형성된다. *p*-메틸벤조일-CoA 전이효소는 도 11의 경로 A에서 *p*-톨루에이트로부터의 유사한 반응을 촉매한다. 유사한 기질들과 반응하는 예시적 CoA 전이효소들은 신나모일-CoA 전이효소 (EC 2.8.3.17) 및 벤질숙시닐-CoA 전이효소를 포함한다. 신나모일-CoA 전이효소는, 클로스트리디움 스포로제네스의 *fldA*에 의해 암호화되고, 신나모일-CoA로부터 다양한 방향족 산 기질들 예를들면 페닐아세테이트, 3-페닐프로페오네이트 및 4-페닐부티레이트로 CoA 전기를 전달한다 (Dickert et al., *Eur. J. Biochem.* 267:3874-3884 (2000)). 벤질숙시닐-CoA 전이효소는 숙시닐-CoA 또는 말레일-CoA를 CoA 주계로 활용하면서, 벤질숙시네이트로부터 벤질숙시닐-CoA를 형성한다. 본 효소는 탈질세균 타우에라 아로마티카에서 특정되었고, 여기에서 이것은 *bbsEF*에 의해 암호화된다 (Leutwein et al., *J. Bacteriol.* 183:4288-4295 (2001)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>fldA</i>	AAL18808.1	16417587	클로스트리디움 스포로제네스
<i>bbsE</i>	AAF89840.1	9622535	타우에라 아로마티카
<i>bbsF</i>	AAF89841.1	9622536	타우에라 아로마티카

[0471]

[0472] 다양한 기질 범위를 가지는 추가적인 CoA 전이효소들은 숙시닐-CoA 전이효소, 4-히드록시부티릴-CoA 전이효소, 부티릴-CoA 전이효소, 글루타코닐-CoA 전이효소 및 아세토아세틸CoA 전이효소를 포함한다. 클로스트리디움 클루이베리의 *cat1*, *cat2*, 및 *cat3* 유전자 산물은 각각 숙시닐-CoA, 4-히드록시부티릴-CoA, 및 부티릴-CoA 전이효소 활성을 보이는 것으로 밝혀졌다 (Seedorf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:2128-2133 (2008); Sohling et al., *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996b)). 유사한 CoA 전이효소 활성을 역시 트리코모나스 바기날리스 (van Grinsven et al., *J. Biol. Chem.* 283:1411-1418 (2008)) 및 트리파노소마 브루세이 (Riviere et al.,

J.Biol.Chem. 279:45337-45346 (2004)에 존재한다. 혐기성 박테리움 아시다미노코쿠스 페르멘坦스 유래의 글루타코닐-CoA-전이효소 (EC 2.8.3.12)는 글루타코닐-CoA 및 3-부테노일-CoA와 반응한다 (Mack et al., *Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). 본 효소를 암호화하는 유전자들은 *gctA* 및 *gctB*이다. 본 효소는 기타 CoA 유도체 예를들면 글루타릴-CoA, 2-히드록시글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 크로토닐-CoA 및 아크릴일-CoA에 대한 낮지만 검출될 수 있는 활성을 가진다 (Buckel et al., *Eur.J.Biochem.* 118:315-321 (1981)). 본 효소는 클로닝 되었고 *E. coli*에서 발현되었다 (Mack et al., *Eur.J.Biochem.* 226:41-51 (1994)). 또한 글루타코네이트 CoA-전이효소 활성이 클로스트리디움 스포로스파이로이데스 및 클로스트리디움 심비오솜에서 검출되었다. 아세토아세틸CoA 전이효소는 아세틸CoA를 CoA 주제로 활용한다. 본 효소는 *E. coli atoA* (알파 서브단위) 및 *atoD* (베타 서브단위) 유전자들로 암호화된다 (Korolev et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 33:902-908 (1968)). 본 효소는 광폭의 기질 범위를 가지고 (Sramek et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 171:14-26 (1975)) 아세틸CoA로부터 다양한 기질들, 예를들면 이소부티레이트 (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))로 CoA 잔기를 전달하는 것으로 밝혀졌다. 유사한 효소들은 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 (Duncan et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 68:5186-5190 (2002)), 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (Cary et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 56:1576-1583 (1990); Wiesenborn et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 55:323-329 (1989)), 및 클로스트리디움 사카로페부틸아세토니쿰 (Kosaka et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 71:58-68 (2007))에 존재한다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>cat1</i>	P38946.1	729048	클로스트리디움 클루이배리
<i>cat2</i>	P38942.2	172046066	클로스트리디움 클루이배리
<i>cat3</i>	EDK35586.1	146349050	클로스트리디움 클루이배리
<i>TVAG_395550</i>	XP_001330176	123975034	트리코보나스 바기날리스 G3
<i>Tb11.02.0290</i>	XP_828352	71754875	트리파노소마 브루세이
<i>gctA</i>	CAA57199.1	559392	아시다미노코쿠스 페르멘坦스
<i>gctB</i>	CAA57200.1	559393	아시다미노코쿠스 페르멘坦스
<i>gctA</i>	ACJ24333.1	212292816	클로스트리디움 심비오솜
<i>gctB</i>	ACJ24326.1	212292808	클로스트리디움 심비오솜
<i>atoA</i>	P76459.1	2492994	에스캐리키아 콜라이 K12
<i>atoD</i>	P76458.1	2492990	에스캐리키아 콜라이 K12
<i>actA</i>	YP_226809.1	62391407	코리네박테리움 글루타미쿰
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	62389399	코리네박테리움 글루타미쿰
<i>ctfA</i>	NP_149326.1	15004866	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>ctfB</i>	NP_149327.1	15004867	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>ctfA</i>	AAP42564.1	31075384	클로스트리디움 사카로페부틸아세토니쿰
<i>ctfB</i>	AAP42565.1	31075385	클로스트리디움 사카로페부틸아세토니쿰

[0473]

[0474] 3.1.2.a CoA 가수분해효소 (10/11 A): 벤조일-CoA 및 *p*-메틸벤조일-CoA는 EC 분류 3.1.2에 속하는 CoA 가수분해효소 또는 티오에스테라제에 의해 이들의 상응되는 산들로 가수분해된다 (도 10 및 11의 경로 A). 벤조일-CoA 및/또는 유사한 기질들을 가수분해하는 예시적 CoA 티오에스테르는 4-히드록시벤조일-CoA 가수분해효소 (EC 3.1.2.23) 및 페닐글리وك랄-CoA 가수분해효소 (EC 3.1.2.25)를 포함한다. 아조아르쿠스 에반시 유전자 *orf1*는 벤조에이트 대사작용에 참여하는 벤조일-CoA 가수분해효소 활성을 가지는 효소를 암호화한다 (Ismail, *Arch.Microbiol.* 190:451-460 (2008)). 본 효소는, *E. coli*에서 이종 발현될 때, 다수의 대안적인 기질들에 활성을 보였다. 추가적인 벤조일-CoA 가수분해효소들이 서열 유사성에 의해 마그네토스피릴룸 마그네토타크티쿰, 앤나시아 종 CCS1 및 사기틀라 스텔라타 E-37의 벤조네이트 분해 유전자 클러스터에서 동정되었다 (Ismail, *Arch.Microbiol.* 190:451-460 (2008)). 슈도모나스 종 CBS3의 4-히드록시벤조일-CoA 가수분해효소는 벤조일-CoA 및 *p*-메틸벤조일-CoA를 기질들로 수용하고 *E. coli*에서 이종 발현되고 특정되었다 (Song et al., *Bioorg.Chem.*

35:1-10 (2007)). 벤조일-CoA 가수분해효소 활성을 보이는 추가적인 효소들은 미코박테리움 투베르콜로시스의 팔미토일-CoA 가수분해효소 (Wang et al., *Chem.Biol.* 14:543-551 (2007)) 및 *entH*에 의해 암호화되는 *E. coli* 아실-CoA 가수분해효소 (Guo et al., *Biochemistry* 48:1712-1722 (2009))를 포함한다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>orf1</i>	AAN39365.1	23664428	아조아르쿠스 애반시
<i>Magn03011230</i>	ZP_00207794	46200680	마그네토스파릴룸 마그네토타크티쿰
<i>Jann_0674</i>	YP_508616	89053165	안나시아 종 CCS1
<i>SSE37_24444</i>	ZP_01745221	126729407	사기톨라스텔라타
EF569604.1:4745..5170	ABQ44580.1	146761194	슈도모나스 종 CBS3
<i>Rv0098</i>	NP_214612.1	15607240	미코박테리움 투베르콜로시스
<i>entH</i>	AAC73698.1	1786813	에스캐리키아 콜라이

[0475]

[0476] 넓은 기질 범위를 가지는 여러 CoA 가수분해효소들은 벤조일-CoA 및/또는 *p*-메틸벤조일-CoA를 가수분해하기에 적합한 효소들이다. 예를들면, 라투스 노르베기кус 뇌에서 유래하는 *acot12*에 의해 암호화되는 효소는 (Robinson et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 71:959-965 (1976)) 부티릴-CoA, 헥사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응한다. 인간의 *acot8*에 의해 암호화되는 디카르복실산 티오에스테라제는 글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 수베릴-CoA, 세바실-CoA, 및 도데칸디오일-CoA에 대한 활성을 보인다 (Westin et al., *J.Biol.Chem.* 280:38125-38132 (2005)). 본 효소에 가장 가까운 *E. coli* 상동체, *tesB*, 역시 CoA 티올에스테르를 가수분해한다 (Naggert et al., *J Biol Chem* 266:11044-11050 (1991)). 유사한 효소는 래트 간에서도 특정되었다 (Deana R., *Biochem Int* 26:767-773 (1992)).

유전자	GI#	유전자은행 등재 #	유기체
<i>acot12</i>	18543355	NP_570103.1	라투스 노르베기кус
<i>tesB</i>	16128437	NP_414986	에스캐리키아 콜라이
<i>acot8</i>	3191970	CAA15502	호모 사피엔스
<i>acot8</i>	51036669	NP_570112	라투스 노르베기кус
<i>tesA</i>	16128478	NP_415027	에스캐리키아 콜라이
<i>ybgC</i>	16128711	NP_415264	에스캐리키아 콜라이
<i>paaI</i>	16129357	NP_415914	에스캐리키아 콜라이
<i>ybdB</i>	16128580	NP_415129	에스캐리키아 콜라이

[0477]

[0478] 4.1.1a. 카르복시-분해효소 (6/7 E): EC 분류 4.1.1의 탈탄산효소들은 벤조에이트를 벤젠으로 (도 10의 경로 E) 및 *p*-톨루에이트를 톨루엔으로 (도 11의 경로 E) 전환시키는데 사용된다. 이를 또는 유사한 기질들과 반응하는 예시적 효소들은 벤젠 카르복실화효소, 바닐레이트 탈탄산효소, 신나메이트 탈탄산효소, 아미노벤조에이트 탈탄산효소 및 다양한 히드록시벤조에이트 탈탄산효소를 포함한다. 활용되는 조인자들에 따라서 탈탄산효소들은 산화성 또는 비-산화성일 수 있다 (Lupa et al., *Genomics* 86:342-351 (2005a)). 벤조에이트 카르복실화효소 활성을 가질 것이라 예상되는 효소는 클로스트리아 박테리움 보강 배양 클론 BF에서 동정되었다 (Abu et al., *Environ.Microbiol* (2010)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
abcA	ADJ94002.1	300245889	클로스트리아 박테리움 보강 배양 클론 BF
abcD	ADJ94001.1	300245887	클로스트리아 박테리움 보강 배양 클론 BF

[0479]

[0480] 히드록실화 방향족 화합물 예를들면 4-히드록시벤조에이트, 2,3-디히드록시벤조에이트, 3,4-디히드록시벤조에이트, 2,6-디히드록시벤조에이트 및 4,5-디히드록시프탈레이트에 활성을 보이는 다수의 특정 탈탄산효소들 역시 대안 기질들 예를들면 *p*-톨루에이트 또는 벤조에이트에 활성을 보인다. 예시적 히드록시벤조에이트 탈탄산효소 (*Nakazawa et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 36:264-269 (1978)), 아스퍼지러스 나이거의 2,3-디히드록시벤조에이트 탈탄산효소 (*Kamath et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145:586-595 (1987)) 및 *E. coli*의 3-옥타프레닐-4-히드록시벤조에이트 탈탄산효소 (*Zhang et al.*, *J Bacteriol.* 182:6243-6246 (2000))를 포함한다. 예시적 4-히드록시벤조에이트 탈탄산효소들은 세디멘티박터 히드록시벤조이쿠스 (종래 클로스트리디움 히드록시벤조이쿰)의 *shdB* 및 *ubiD* 와 엔테로박터 클로아사이 *P240* 의 *ubiD* (*Matsui et al.*, *Arch. Microbiol.* 186:21-29 (2006a); *He et al.*, *Eur. J Biochem.* 229:77-82 (1995))에 의해 암호화된다. *ubiD*에 의해 암호화되는 파울타티비 아니아로베, 엔테로박터 클로아사이 유래4-히드록시벤조에이트 탈탄산효소는 다중 기질들에 대한 활성이 실험되었고 4-히드록시벤조산 및 4-아미노벤조산에 의해 유도되는 것으로 밝혀졌다 (*Matsui et al.*, *Arch. Microbiol.* 186:21-29 (2006b)). 바실러스 섭틸리스 *bsdBCD* 유전자들은 가역적 비-산화적 4-히드록시벤조에이트/바닐레이트 탈탄산효소를 암호화한다 (*Lupa et al.*, *Can. J. Microbiol.* 54:75-81 (2008)). 본 효소는 *E. coli*에서 이종 발현되었다. 유사한 탈탄산효소들은 여러 기타 유기체 (*Lupa et al.*, *Genomics* 86:342-351 (2005b)) 및 하기 나열된 이들의 일부 유전자들에서 암시되었다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>phtD</i>	Q59727.1	3914354	코마모나스 테스토스테로니
<i>dhbD</i>	CAK48106.1	134075758	아스퍼지러스 나이거
<i>ubiD</i>	NP_418285.1	16131689	에스캐리키아 콜라이
<i>shdB</i>	AAY67851.1	67462198	세디멘티박터 히드록시벤조이쿠스
<i>shdB</i>	AAY67850.1	67462197	세디멘티박터 히드록시벤조이쿠스
<i>ubiD</i>	AAD50377.1	5739200	세디멘티박터 히드록시벤조이쿠스
<i>ubiD</i>	BAE97712.1	110331749	엔테로박터 클로아사이 <i>P240</i>
<i>bsdB</i>	CAB12157.1	2632649	바실러스 섭틸리스
<i>bsdC</i>	CAB12158.1	2632650	바실러스 섭틸리스
<i>bsdD</i>	CAB12159.1	2632651	바실러스 섭틸리스
STM292	NP_461842.1	16766227	살모넬라 티페무리움 LT2
STM2922	NP_461843.1	16766228	살모넬라 티페무리움 LT2
STM2923	NP_461844.1	16766229	살모넬라 티페무리움 LT2
<i>kpdB</i>	YP_002236894.1	206580833	클렙시엘라 뉴모나이 342
<i>kpdC</i>	YP_002236895.1	206576360	클렙시엘라 뉴모나이 342
<i>kpdD</i>	YP_002236896.1	206579343	클렙시엘라 뉴모나이 342
<i>pad1</i>	NP_311620.1	15832847	에스캐리키아 콜라이 O157
<i>yclC</i>	NP_311619.1	15832846	에스캐리키아 콜라이 O157
<i>yclD</i>	NP_311618.1	15832845	에스캐리키아 콜라이 O157

[0481]

[0482] 추가적인 탈탄산효소 분류는 신나메이트 (페닐아크릴레이트) 및 치환된 신나메이트 유도체의 탈탄산반응을 촉매

하는 것으로 특정된다. 이들 효소는 다양한 유기체에서 공통적이고 *E. coli*에서 발현된이들 효소를 암호화하는 특이적인 유전자들은 사카로미세스 세레비사이 유래의 *pad 1* (Clausen et al., 유전자 142:107-112 (1994)), 락토바실러스 플란타룸 유래 *pdc* (Barthelmebs et al., 67:1063-1069 (2001); Qi et al., *Metab Eng* 9:268-276 (2007); Rodriguez et al., *J.Agric.Food Chem.* 56:3068-3072 (2008)), 클렙시엘라 옥시토카 (Uchiyama et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 72:116-123 (2008); Hashidoko et al., *Biosci.Biotech.Biochem.* 58:217-218 (1994)), 페디코쿠스 펜토사세우스 (Barthelmebs et al., 67:1063-1069 (2001)) 유래 *pofK* (*pad*), 및 바실러스 섭틸리스 및 바실러스 푸밀루스 유래 *padC* (Shingler et al., 174:711-724 (1992))를 포함한다. 슈도모나스 플루오레센스 유래의 폐롤산 탈탄산효소 역시 정제되었고 특정되었다 (Huang et al., *J.Bacteriol.* 176:5912-5918 (1994)). 본 분에 속하는 효소들은 안정적으로 보여지며 외적 또는 내적 결합 조인자들이 필요하지 않고, 따라서 이들 효소는 생물변환에 적정하다 (Sariaslani, *Annu.Rev.Microbiol.* 61:51-69 (2007)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>pad1</i>	AAB64980.1	1165293	사카로미세스 세레비사이
<i>pdc</i>	AAC45282.1	1762616	락토바실러스 플란타룸
<i>pad</i>	BAF65031.1	149941608	클렙시엘라 옥시토카
<i>padC</i>	NP_391320.1	16080493	바실러스 섭틸리스
<i>pad</i>	YP_804027.1	116492292	페디코쿠스 펜토사세우스
<i>pad</i>	CAC18719.1	11691810	바실러스 푸밀루스

[0483]

[0484] 4.1.99.a 탈카보닐효소: 탈카보닐효소는 벤즈알데히드를 벤젠으로 (도 10의 경로 C) 및 *p*-메틸벤즈알데히드를 틀루엔으로 (도 11의 경로 C) 전환시키는데 사용된다. 탈카보닐효소들은 식물, 포유류, 곤충 및 세균에서 알칸 생합성 최종 단계를 촉매한다 (Dennis et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 287:268-275 (1991)). 비-산화적 탈카보닐효소들은 CO를 동시에 방출시키면서 알데히드를 알칸으로 변환한다. 예시적 탈카보닐효소들은 옥타데카날 탈카보닐효소 (EC 4.1.99.5), 스테롤 불포화효소 및 지방 알데히드 탈카보닐효소를 포함한다. 아라비돕시스 탈리아나의 CER1 유전자는 왁스질 결정 형성에 관여하는 지방산 탈카보닐효소를 암호화한다 (US 6,437,218). 추가적인 지방산 탈카보닐효소들은 페디카고 트룬카톨라, 비티스 비니페라 및 오리자 사티바 (미국특허출원 2009/0061493)에서 발견된다. 코발트-포르파린 함유 탈카보닐효소는 정제되고 조류 보트리코쿠스 브라우니에서 특정되었지만; 유전자는 지금까지 본 활성과 연관되지 않았다 (Dennis et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:5306-5310 (1992)). 피술 사티붐 유래 구리-함유 탈카보닐효소 역시 정제되었고 특정되었지만, 아직 유전자와 연계되지 않았다 (Schneider-Belhaddad et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 377:341-349 (2000)).

유전자	유전자은행 등록번호	GI 번호	유기체
<i>CER1</i>	NP_850932	145361948	아라비돕시스 탈리아나
<i>MtrDRAFT_AC153128g2v2</i>	ABN07985	124359969	페디카고 트룬카톨라
<i>VITISV_029045</i>	CAN60676	147781102	비티스 비니페라
OSJNBa0004N05.14	CAE03390.2	38345317	오리자 사티바

[0485]

[0486] 대안으로, 산화적 탈카보닐효소는 알데히드를 알칸으로 전환한다. 산화적 탈카보닐효소들은 NADPH 및 O₂를 조인자들로 활용하고 CO₂, 물 및 NADP⁺를 방출하는 시토크롬 P450 효소들이다. 본 활성은 무스카 도메스티카 및 드로소필라 멜라노가스테르의 CYP4G2v1 및 CYP4G1 유전자 산물에서 입증되었다 (미국특허출원 2010/0136595). 산화적 탈카보닐효소 활성을 가지는 추가적인 효소들은 서열 상동성에 의해 기타 유기체 예를들면 마페스트라 브라씨카이, 헬리코베르파 제아 및 아실토시폰 피술에서 발견되었다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
CYP4G2v1	ABV48808.1	157382740	무스카 도페스티카
CYP4G1	NP_525031.1	17933498	트로소필라 래노가스테르
CYP4G25	BAD81026.1	56710314	안데라이아 아마마이
CYP4M6	AAM54722.1	21552585	헬리코베르파 제아
LOC100164072	XP_001944205.1	193650239	아실토시폰 피슘

[0487]

[0488] 6.2.1.a 산-티올 연결효소 (8A, 11B): 벤조에이트에서 벤조일-CoA 또는 *p*-톨루에이트에서 *p*-메틸벤조일-CoA (도 10 및 11의 경로 A)로의 ATP-의존성 활성화는 CoA 합성효소 또는 산-티올 연결효소에 의해 촉매된다. AMP-형성 CoA 리가제들은 방향족 산들을 이들의 상응되는 CoA 유도체로 활성시키고, 이때 ADP-형성 CoA 리가제들은 일반적으로 가역적이다. 타우에라 아로마티카 및 아조아르쿠스 종 균주 CIB 유래의 예시적 AMP-형성 벤조일-CoA 리가제들이 특정되었다 (Lopez Barragan et al., *J Bacteriol.* 186:5762-5774 (2004); Schuhle et al., *J.Bacteriol.* 185:4920-4929 (2003)). 대안으로, 구조적으로 유사한 기질들과 반응하는 AMP-형성 CoA 리가제들은 벤조에이트 또는 *p*-톨루에이트에 활성을 가진다. 로도슈도모나스 팔루스트리스 유래인, *alA*에 의해 암호화되는 AMP-형성 시클로헥산카르복실레이트 CoA-리가제는 잘 특정되었고, 활성 부위 변경은 효소의 기질 특이성에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다 (Samanta et al., *Mol.Microbiol* 55:1151-1159 (2005)). 또한 본 효소는 혼기성 벤젠 고리 분해 과정에서 시클로헥스-1-엔-1-카르복실레이트 CoA-리가제로 기능한다 (Egland et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:6484-6489 (1997)). 추가적인 예시적 CoA 리가제들은 *P.* 크리소게눔 유래의 두 특정화 페닐아세테이트-CoA 리가제들 (Lamas-Maceiras et al., *Biochem.J* 395:147-155 (2006); Wang et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 360:453-458 (2007)); Wang et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 360:453-458 (2007)), 슈도모나스 푸터타 유래의 페닐아세테이트-CoA 리가제 (Martinez-Blanco et al., *J Biol.Chem.* 265:7084-7090 (1990)), 및 바실러스 섭틸리스 유래의 6-카르복시헥사노에이트-CoA 리가제 (Bower et al., *J Bacteriol.* 178:4122-4130 (1996))를 포함한다.

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>bclA</i>	Q8GQN9.1	75526585	타우에라 아로마티카
<i>bzdA</i>	AAQ08820.1	45649073	아조아르쿠스 종 균주 CIB
<i>alA</i>	AAC23919	2190573	로도슈도모나스 팔루스트리스
<i>phl</i>	CAJ15517.1	77019264	페니실리움 크리소게눔
<i>phlB</i>	ABS19624.1	152002983	페니실리움 크리소게눔
<i>paaF</i>	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸터타
<i>bioW</i>	NP_390902.2	50812281	바실러스 섭틸리스

[0489]

[0490] 이러한 정확한 변환들을 촉매하는 ADP-형성 CoA 리가제들은 아직 특정되지 않았지만; 넓은 기질 특이성을 가지는 여러 효소들이 문현에 기재되어 있다. 아르카이오클로부스 풀기두스 유래의, AF1211로 암호화되는 ADP-형성 아세틸CoA 합성효소 (ACD, EC 6.2.1.13)는 다양한 선형 및 분지 사슬 기질들 예를들면 이소부티레이트, 이소펜타노에이트, 및 푸마레이트에 작용하는 것으로 보인다 (Musfeldt et al., *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 아르카이오클로부스 풀기두스 유래의, AF1983로 암호화되는 제2 가역적 ACD 역시 방향족 화합물들 페닐아세테이트 및 인돌아세테이트에 높은 활성으로 넓은 기질 범위를 가지는 것으로 나타난다 (Musfeldt et al., *supra*). 숙시닐-CoA 합성효소라고도 부르는 할로알콜라 마리스몰투이 유래 효소는 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지 사슬 산들 (이소발레이트 및 이소부티레이트)을 기질들로서 수용하고, 정 및 역방향에서 작용하는 것으로 보인다 (Brasen et al., *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004)). 초고온성 고세균 퍼로박쿨룸 아이로필룸 유래의 PAE3250에 의해 암호화되는 ACD는 모든 특정된 ACD에서 가장 넓은 기질 범위를 보였고, 아세틸CoA, 이소부티릴-CoA (선호 기질) 및 페닐아세틸CoA와 반응하였다 (Brasen and Schonheit, *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004)). 숙주 유기체의 생리 온도에서 작용하도록 방향성 진화 또는 조작으로 본 효소를 변경시킬 수 있다. *A.* 풀기두스, *H.* 마리스몰투이 및 *P.* 아이로필룸 유래 효소들은 모두 클로닝되었고, 기능적으로 발현 및 *E. coli*에서 특정되었다 (Brasen and Schonheit, *Arch.Microbiol* 182:277-287 (2004); Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 추가적인 효소는 *E. coli*의 *sucCD*에 의해 암호화되었고, 이것은 자연적으로

하나의 ATP 소비를 수반하면서 생체내 가역 반응인 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA 형성을 촉매한다 (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). 슈도모나스 푸티타 유래 아실 CoA 리가제는 아세트산, 프로피온산, 부틸산, 발레르산, 헥산산, 헬탄산, 및 옥탄산을 포함한 여러 지방족 기질들 및 방향족 화합물들 예를들면 폐닐 아세트산 및 폐녹시아세트산에 작용하는 것으로 나타난다 (Fernandez-Valverde et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). 관련 효소인, 리조비움 래구미노사룸 유래 말로닐 CoA 합성효소 (6.3.4.9)는 여러 이염기산들, 즉, 에틸-, 프로필-, 알릴-, 이소프로필-, 디메틸-, 시클로프로필-, 시클로프로필메틸렌-, 시클로부틸-, 및 벤질-말로네이트를 이들의 상응되는 모노티오에스테르로 전환한다 (Pohl et al., *J. Am. Chem. Soc.* 123:5822-5823 (2001)).

유전자	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
AF1211	NP_070039.1	11498810	아르카이오글로부스 풀기두스
AF1983	NP_070807.1	11499565	아르카이오글로부스 풀기두스
scs	YP_135572.1	55377722	알로알콜라 미리스몰 투이
PAE3250	NP_560604.1	18313937	파로박클룸 아이로필룸 str. IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리카야 콜라이
sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리카야 콜라이
paaF	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸티타
matB	AAC83455.1	3982573	리조비움 래구미노사룸

[0491]

[0492] 실시예 VIII

[0493] 피루베이트, 오르니틴 및 알라닌에서 2,4-펜타디에노에이트로의 경로들

[0494] 본 실시예는 피루베이트, 오르니틴 및 알라닌에서 2,4-펜타디에노에이트로의 경로들을 보인다.

[0495] 도 12는 피루베이트에서 2,4-펜타디에노에이트로의 전환을 보인다. 본 전환은 4 효소적 단계들로 달성된다. 피루베이트 및 아세트알데히드가 4-히드록시-2-케토발레레이트 알돌리아제에 의해 먼저 4-히드록시-2-옥소발레레이트로 축합된다 (도 12, 단계 A). 다음 4-히드록시-2-옥소발레레이트 산물은 2-옥소펜테노에이트로 탈수된다 (도 12의 단계 B). 연속하여 2-옥소펜테노에이트 환원 및 탈수를 거쳐 2,4-펜타디에노에이트가 형성된다 (도 12의 단계들 C/D).

[0496] 도 13은 알라닌 또는 오르니틴에서 2,4-펜타디에노에이트에 이르는 경로들을 보인다. 도 13의 단계 A에서, 알라닌 및 아세틸CoA는 AKP 티올라아제에 의해 결합되어 AKP를 형성한다. 일 경로에서, AKP는 아세틸아크릴레이트로 탈아민된다 (단계 B). 아세틸아크릴레이트의 4-옥소기는 환원되고 탈수되어 2,4-펜타디에노에이트를 형성한다 (단계들 C/D). 대안적 경로에서, AKP는 아미노전이효소 또는 탈수소효소에 의해 2,4-디옥소펜타노에이트로 전환된다 (단계 E). 2,4-디옥소펜타노에이트의 2- 또는 4-옥소기 환원으로 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 (단계 H) 또는 4-히드록시-2-옥소발레레이트 (단계 K)를 각각 형성한다. 4-히드록시-2-옥소발레레이트는 대안으로 AKP를 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트로 환원하고 (단계 J) 이어 아미노전이 또는 산화적 탈아민 (단계 L)에 의해 형성된다. 일단 형성되면, 4-히드록시-2-옥소발레레이트는 도 12에 도시된 3 효소 단계들에서 2,4-펜타디에노에이트로 전환된다 (도 12, 단계들 B/C/D). 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 중간체는 아세틸아크릴레이트로 탈수되고 (단계 F) 이어 환원 및 탈수된다 (단계들 C/D).

[0497] 도 13에 도시된 AKP로부터의 경로들에 대한 대안적 진입 포인트는 오르니틴이다. 오르니틴 아미노뮤타아제는 먼저 오르니틴을 2,4-디아미노펜타노에이트로 전환한다 (단계 M). 2,4-디아미노펜타노에이트 중간체는 아미노전이 또는 산화적 탈아민에 의해 AKP로 전환된다 (단계 N).

[0498] 알라닌 또는 오르니틴의 D- 또는 L- 입체이성질체는 도 13에 도시된 2,4-펜타디에노에이트 경로로의 전구체 또는 중간체로 작용할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 알라닌 또는 오르니틴의 D- 또는 L- 입체이성질체는 알라닌 라세미화효소 또는 오르니틴 라세미화효소에 의해 상호 쉽게 전환된다.

[0499] 도 5 및 6에 도시된 변환들을 촉매하는 효소들은 EC 번호 (표 2)에 따라 분류되고 더욱 하기된다.

번호	작용	단계
1.1.1.a	산화환원효소 (옥소에서 알코올)	1C, 2C/H/K/J
1.4.1.a	산화환원효소 (아민화/탈아민)	2E/L/N
2.6.1.a	아미노전이효소	2E/L/N
4.1.3.a	분해효소	1A
4.2.1.a	하이드로-리아제	1B/D, 2D/F
4.3.1.a	암모니아-분해효소	2B
5.1.1.a	D/L 라세미화효소	2A/M
5.4.3.a	아미노뮤타아제	2M
기타	AKP 티올라아제	2A

[0500]

[0501] 1.1.1.a 산화환원효소 (옥소에서 알코올): 도 5 및 6에서 다수의 변환들은 케톤의 알코올로의 환원을 포함한다. 도 12의 단계 C에서, 2-옥소펜테노에이트는 2-히드록시펜테노에이트로 환원된다. 유사한 변환은 케토-산 2,4-디옥소펜타노에이트의 상응되는 히드록시-산, 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 (도 13의 단계 H)로의 환원이다. 도 13의 단계들 C, J 및 K는 AKP의 4-옥소기, 2,4-디옥소펜타노에이트 및 아세틸아크릴레이트의 이들의 상응되는 알코올들로의 환원을 수반하다. 이를 변환은 EC 분류 1.1.1에 속하는 산화환원효소들에 의해 촉매된다.

[0502] 여러 예시적 알코올 탈수효소들은 케톤을 알코올 작용기로 전환한다. *E. coli* 유래의 이러한 두 효소들은 말레이트 탈수효소 (*mdh*) 및 락테이트 탈수효소 (*ldhA*)에 의해 암호화된다. 또한, 랄스토니아 유트로파 유래의 락테이트 탈수효소는 다양한 사슬 길이들을 가지는 2-케토산 예를 들면 락테이트, 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소글루타레이트에 대하여 높은 활성을 보였다 (Steinbuchel et al., *Eur.J.Biochem.* 130:329-334 (1983)). 알파-케토아디페이트의 알파-히드록시아디페이트로의 전환은 래트 및 사람 태반에서 발견되어 보고되는 2-케토아디페이트 환원효소에 의해 촉매된다 (Suda et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 176:610-620 (1976); Suda et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77:586-591 (1977)). 추가적인 산화환원효소는 사람 심장의 미토콘드리아 3-히드록시부티레이트 탈수효소 (*bdh*)이고 클로닝되고 특정되었다 (Marks et al., *J. Biol. Chem.* 267:15459-15463 (1992)). *C. 베이제린크카*의 알코올 탈수효소들 (Ismaiel et al., *J. Bacteriol.* 175:5097-5105 (1993)) 및 *T. 브로크카* (Lamed et al., *Biochem. J.* 195:183-190 (1981); Peretz et al., *Biochemistry* 28:6549-6555 (1989))는 아세톤을 이소프로판올로 전환시킨다. 메틸 에틸 케톤 환원효소, 또는 달리, 2-부탄을 탈수효소는, MEK 환원을 촉매하여 2-부탄올을 형성한다. 예시적 MEK 환원효소들은 로도코쿠스 루버 (Kosjek et al., *Biotechnol Bioeng.* 86:55-62 (2004)) 및 피로코커스 푸리오수스 (van der et al., *Eur. J. Biochem.* 268:3062-3068 (2001))에서 발견된다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>mdh</i>	AAC76268.1	1789632	에스케리키아 콜라이
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	에스케리키아 콜라이
<i>ldh</i>	YP_725182.1	113866693	랄스토니아 유트로파
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	호모 사피엔스
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	클로스트리디움 베이제린크카 NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	테로모아네로박터 브로크카 HTD4
<i>sadh</i>	CAD36475	21615553	로도코쿠스 루버
<i>adhA</i>	AAC25556	3288810	피로코커스 푸리오수스

[0503]

[0504]

1.4.1.a 산화환원효소 (탈아민): EC 분류 1.4.1에 속하는 효소들은 수용체로서 NAD+, NADP+ 또는 FAD와 함께 아미노기들의 산화적 탈아민화를 촉매한다. 이러한 효소는 AKP의 2,4-디옥소펜타노에이트로의 (도 13, 단계 E), 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트의 4-히드록시-2-옥소발레레이트로의 (도 13, 단계 L) 및 2,4-디아미노펜타노에이트의 AKP (도 13, 단계 N)로의 산화적 탈아민을 촉매하기 위하여 필요하다. 2,4-디아미노펜타노에이트의 AKP로의 전환 (도 13, 단계 N)은 2,4-디아미노펜타노에이트 탈수소효소 (EC 1.4.1.12)로 촉매된다. 오르니틴의 협기성 발효를 수행하는 유기체들에서, 예를들면 클로스트리디움 스티크클란디의 *ord* 유전자 산물인 2,4-디아미노펜타노에이트 탈수소효소들이 특정되었다 (Fonknechten, *J.Bacteriol.* In Press: (2009)). 추가적인 2,4-디아미노펜타노에이트 탈수소효소 유전자 후보는 기타 유기체에서 *ord* 유전자 산물과의 서열 유사성으로 추정될 수 있다. 관련 효소, 3,5-디아미노헥사노에이트 탈수소효소 (EC 1.4.1.11)는, 3,5-디아미노헥사노에이트의 5-아미노-3-옥소헥사노에이트로의 산화적 탈아민화를 촉매한다. 본 효소를 암호화하는 유전자 *kdd*는 최근 푸소박테리움 누클레아툼에서 확인되었다 (Kreimeyer et al., *J Biol.Chem.* 282:7191-7197 (2007)). 본 효소는 리신 발효 기타 유기체에서 정체되고 특정되었지만 이를 효소와 관련된 유전자들은 지금까지 동정되지 않았다 (Baker et al., *J Biol.Chem.* 247:7724-7734 (1972); Baker et al., *Biochemistry* 13:292-299 (1974)). 맥소코쿠스 잔투스, 포르파로모나스 긴기발리스 *W83* 및 기타 서열화 유기체에서 후보들이 서열 상동성으로 추론될 수 있다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>ord</i>	CAQ42978.1	226885213	클로스트리디움 스티크클란디
<i>Hore_21120</i>	YP_002509852.1	220932944	할로테르모트릭스 오레니
<i>CD0442</i>	YP_001086913.1	126698016	클로스트리디움 디파실레
<i>kdd</i>	AAL93966.1	19713113	푸소박테리움 누클레아툼
<i>mxan_4391</i>	ABF87267.1	108462082	맥소코쿠스 잔투스
<i>pg_1069</i>	AAQ66183.1	34397119	포르파로모나스 긴기발리스

[0505]

[0506]

기질들 AKP 및 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 (도 13의 단계들 E 및 L)은 알파-아미노 산들과 유사하고 아미노산 탈수소효소들 예를들면 글루타메이트 탈수소효소 (EC 1.4.1.2), 류신 탈수소효소 (EC 1.4.1.9), 및 아스파르테이트 탈수소효소 (EC 1.4.1.21)에 대한 대안 기질들로 역할할 수 있다. 글루타메이트 탈수소효소는 글루타메이트의 2-옥소글루타레이트로의 가역적 NAD(P)+ 의존성 전환을 촉매한다. 예시적 효소들은 에스케리키아 콜라이의 *gdhA* (McPherson et al., *Nucleic Acids Res.* 11:5257-5266 (1983); Korber et al., *J.Mol.Biol.* 234:1270-1273 (1993)), 테르모토가 마리티마의 *gdh* (Kort et al., *Extremophiles* 1:52-60 (1997); Lebbink et al., *J.Mol.Biol.* 280:287-296 (1998); Lebbink et al., *J.Mol.Biol.* 289:357-369 (1999)), 및 할로박테리움 살리나툼의 *gdhA1* (Ingoldsby et al., *Gene* 349:237-244 (2005))에 의해 암호화된다. 추가적인 글루타메이트 탈수소효소들은 바실러스 섭틸리스 (Khan et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 69:1861-1870 (2005)), 니토키아나 타바쿰 (Purnell et al., *Planta* 222:167-180 (2005)), 오리자 사티바 (Abiko et al., *Plant Cell Physiol.* 46:1724-1734 (2005)), 할로페락스 메디텔라네이 (Diaz et al., *Extremophiles* 10:105-115 (2006)) 및 할로박테리움 살리나툼 (Hayden et al., *FEMS Microbiol Lett.* 211:37-41 (2002))에서 특정되었다. 니토키아나 타바쿰 효소는 *gdh1* 및 *gdh2*에 의해 암호화되는 알파 및 베타 서브단위들로 구성된다 (Purnell et al., *Planta* 222:167-180 (2005)). 예시적 류신 탈수소효소는 바실러스 세레우스의 *ldh*에 의해 암호화된다. 본 효소는 광범위한 기질들 예를들면 류신, 이소루신, 발린, 및 2-아미노부타노에이트와 반응한다 (Stoyan et al., *J.Biotechnol.* 54:77-80 (1997); Ansorge et al., *Biotechnol Bioeng.* 68:557-562 (2000)). 테르모토가 마리티마 유래의, *nadX*로 암호화되는 아스파르테이트 탈수소효소는 NAD 생합성에 관여한다 (Yang et al., *J.Biol.Chem.* 278:8804-8808 (2003)).

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
gdhA	P00370	118547	에스캐리카아 콜라이
gdh	P96110.4	6226595	테르모토가 마리티마
gdhA1	NP_279651.1	15789827	할로박테리움 살리나룸
rocG	NP_391659.1	16080831	바실러스 셉틸리스
gdh1	AAR11534.1	38146335	나토카이아나 타바쿰
gdh2	AAR11535.1	38146337	나토카이아나 타바쿰
GDH	Q852M0	75243660	오리자 사티마
GDH	Q977U6	74499858	할로페릭스 매디텔라네이
GDH	P29051	118549	할로박테리움 살리나룸
GDH2	NP_010066.1	6319986	사카로마이세스 세레비지아
ldh	P0A393	61222614	바실러스 세레우스
nadX	NP_229443.1	15644391	테르모토가 마리티마

[0507]

[0508] 2.6.1.a 아미노전이효소: AKP의 2,4-디옥소펜타노에이트로의 (단계 E), 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트의 4-히드록시-2-옥소발레레이트로의 (단계 L) 및 2,4-디아미노펜타노에이트의 AKP로의 (단계 N) 전환을 포함한 도 13에서 여러 변환들은 아미노전이효소 또는 아미노전달효소들에 의해 촉매된다. 여러 아미노전이효소들은 아미노산들 및 유도체를 이들의 상응되는 2-옥소산들로 전환한다. 이러한 효소들은 도 13의 단계들 E 및 L에 표시된 변환들을 촉매하기에 특히 적합하다 (즉 AKP 아미노전이효소 및 2-아미노-4-히드록시펜타노에이트 아미노전이효소). 이들 변환을 위한 적합한 아미노산 아미노전이효소 선택은 기질 입체화학에 따라 달라질 수 있다. 기질이 D-배열이면, D-아미노산 아미노전이효소 (EC 2.6.1.21)가 활용되고, L-입체이성질체는 L-아미노산 아미노전이효소 예를들면 아스파르테이트 아미노전이효소 (EC 2.6.1.1)의 선호 기질이다. 아스파르테이트 아미노전이효소는 천연적으로 옥소기를 옥살로아세테이트에서 글루타메이트로 전달하여, 알파-케토글루타레이트 및 아스파르테이트를 형성한다. 아스파르테이트 아미노전이효소 활성은, 예를들면, 에스캐리카아 콜라이의 *aspC* (Yagi et al., 100:81-84 (1979); Yagi et al., 113:83-89 (1985)), 사카로마이세스 세레비지아 유래의 *AAT2* (Yagi et al., 92:35-43 (1982)) 및 아라비듐시스 탈리아나 유래의 *ASP5* (Kwok et al., 55:595-604 (2004); de la et al., 46:414-425 (2006); Wilkie et al., 단백질 *Expr.Purif.* 12:381-389 (1998))의 유전자 산물에 의해 촉매된다. 라투스 노르베기쿠스 유래의 효소는 대안 기질들 예를들면 2-아미노헥산이산 및 2,4-디아미노부틸산 아미노기를 전달하는 것으로 밝혀졌다 (Recasens et al., *Biochemistry* 19:4583-4589 (1980)). 기타 L-아미노-산 기질들에 작용하는 아미노전이효소들 역시 이러한 변환을 촉매할 수 있다. 발린 아미노전이효소는 발린 및 피루베이트의 2-케토이소발레레이트 및 알라닌으로의 전환을 촉매한다. *E. coli* 유전자, *avtA*는 유사한 효소를 암호화하며 (Whalen et al., *J.Bacteriol.* 150:739-746 (1982)), 또한 아미노 주체가 확인되지는 않았지만 α-케토부티레이트의 아미노전이를 촉매하여 α-아미노부티레이트를 생성한다 (Whalen et al., *J.Bacteriol.* 158:571-574 (1984)). 기타 효소 후보는 알파-아미노아디페이트 아미노전이효소 (EC 2.6.1.39)이고, 본 효소는 일부 유기체에서 리신 생합성 및 분해에 참여한다. 본 효소는 2-아미노아디페이트 및 2-옥소아디페이트를 상호 전환하고, 알파-케토글루타레이트를 아미노 수용체로 이용한다. 유전자 후보는 호모 사피언스 (Okuno et al., 효소 단백질 47:136-148 (1993)) 및 테르무스 테르모필루스 (Miyazaki et al., *Microbiology* 150:2327-2334 (2004))에서 발견된다. *lysN*에 의해 암호화되는 테르무스 테르모필루스 효소는 옥살로아세테이트, 2-옥소이소카프로에이트, 2-옥소이소발레레이트, 및 2-옥소-3-메틸발레레이트를 포함하는 여러 대안 기질들에 대하여 활성이다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
aspC	NP_415448.1	16128895	에스케리키아 콜라이
AAT2	P23542.3	1703040	사카로마이세스 세레비자에
ASPS	P46248.2	20532373	아라비롭시스 탈리아나
got2	P00507	112987	라투스 노르베가쿠스
avtA	YP_026231.1	49176374	에스케리키아 콜라이
lysN	BAC76939.1	31096548	테르무스 테르모필루스
AadAT-II	Q8N5Z0.2	46395904	호모 사파인스

[0509]

[0510] 기질이 D-임체이성질체로 존재하면, 아미노 전이는 D-아미노산 아미노전이효소 및 D-알라닌 아미노전이효소 (DAAT)라고도 알려진 D-아미노전이효소 (EC 2.6.1.21)에 의해 촉매된다. 효소의 본 분류는 종-특이적인 넓은 기질 특이성을 가지는 것으로 알려져 있다. 바실러스 종 YM-1 유래인 *dat*로 암호화되는 D-아미노전이효소가 클로닝되고 서열이 규정되었고 (Tanizawa et al., *J Biol.Chem.* 264:2450-2454 (1989)) 결정 구조도 알려졌다 (Peisach et al., *Biochemistry* 37:4958-4967 (1998)). 또한 본 효소는 기질 특이성 변경을 위하여 조작되었다 (Gutierrez et al., *Eur.J Biochem.* 267:7218-7223 (2000); Gutierrez et al., *단백질 Eng* 11:53-58 (1998)). 추가적인 유전자 후보들은 바실러스 리케니포르미스 ATCC 10716 (Taylor et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1350:38-40 (1997)), 스타필로코쿠스 하이몰리티쿠스 (Pucci et al., *J Bacteriol.* 177:336-342 (1995)) 및 바실러스 섭틸리스 (Martinez-Carrion et al., *J Biol.Chem.* 240:3538-3546 (1965))에서 발견된다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>dat</i>	P19938	118222	바실러스 종 YM-1
<i>dat</i>	P54692	1706292	바실러스 리케니포르미스 ATCC 10716
<i>dat</i>	P54694	1706294	스타필로코쿠스 하이몰리티쿠스
<i>dat</i>	O07597.1	3121979	바실러스 섭틸리스

[0511]

[0512] 2,4-디아미노펜타노에이트의 AKP로의 전환 (도 13의 단계 N)은 2,4-디아미노펜타노에이트 아미노전이효소 활성을 가지는 효소에 의해 촉매된다. 본 활성이 아직까지 효소들에서 특정되지 않았지만, 여러 효소들이 유사한 변환, 2,4-디아미노부타노에이트의 아스파르테이트-4-세미알데히드로의 전환을 촉매한다. 예시적 효소 후보들은 베타-알라닌 아미노전이효소 (EC 2.6.1.18), 디아미노부티레이트 아미노전이효소 (EC 2.6.1.46 및 EC 2.6.1.76) 및 감마-아미노부티레이트 (GABA) 아미노전이효소 (EC 2.6.1.19)를 포함한다. 예시적 디아미노부티레이트 아미노전이효소는 아시네토박터 바우마니 및 하이모필루스 인플루엔자에서의 *dat* 유전자 산물로 암호화된다 (Ikai et al., *J Bacteriol.* 179:5118-5125 (1997); Ikai et al., *Biol Pharm.Bull.* 21:170-173 (1998)). 천연 기질, 2,4-디아미노부티레이트이외에도, *A. 바우마니* DAT는 리신, 4-아미노부티레이트 및 오르니틴의 말단 아민들을 전달한다. 추가적인 디아미노부티레이트 아미노전이효소 유전자 후보들은 마리노코쿠스 할로필루스 및 할로바실러스 다바넨시스의 *ectB* 유전자 산물 (*Zhao et al., Curr Microbiol* 53:183-188 (2006); Louis et al., *Microbiology* 143 (Pt 4):1141-1149 (1997)) 및 슈도모나스 아이루기노사의 *pvdH* 유전자 산물 (Vandenende et al., *J Bacteriol.* 186:5596-5602 (2004))을 포함한다. 알파-케토글루타레이트를 아미노 수용체로 활용하는 디아미노부티레이트 아미노전이효소들은 EC 분류 2.6.1.76에 포함된다. 이러한 효소들은 아시네토박터 바우마니에서 발견된다.

[0513]

[0513] 슈도모나스 플루오레센스의 베타-알라닌 아미노전이효소 역시 2,4-디아미노부티레이트를 기질로서 수용한다 (Hayaishi et al., *J Biol Chem* 236:781-790 (1961)); 그러나, 본 활성은 지금까지 유전자와 연관되지 않았다. 감마-아미노부티레이트 아미노전이효소는 자연적으로 숙신산 세미알데히드 및 글루타메이트를 4-아미노부티레이트 및 알파-케토글루타레이트로 상호 전환한다. 일반적으로, GABA 아미노전이효소들은 넓은 범위의 대안 기질들과 반응한다 (Schulz et al., 56:1-6 (1990); Liu et al., 43:10896-10905 (2004)). *E. coli*에 있는 두 종의 GABA 아미노전달효소들은 *gabT* (Bartsch et al., *J Bacteriol.* 172:7035-7042 (1990)) 및 *puuE* (Kurihara et al., *J.Biol.Chem.* 280:4602-4608 (2005))에 의해 암호화된다. *gabT* 유전자 산물은 넓은 기질 특이성을 가

지는 것으로 밝혀졌다 (Schulz et al., 56:1-6 (1990); Liu et al., 43:10896-10905 (2004)). 무스 무스쿠루스 및 수스 스크로파에 있는 GABA 아미노전이효소들은 많은 범위의 대안 기질들과 반응하는 것으로 보였다 (Cooper, *Methods Enzymol.* 113:80-82 (1985)).

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
dat	P56744.1	6685373	아시네토박터 바우마니
dat	P44951.1	1175339	해모필루스 플루엔자
ectB	AAB57634.1	2098609	마리노코쿠스 할로필루스
ectB	AAZ57191.1	71979940	할로바실러스 디바넨시스
pwdH	AAG05801.1	9948457	슈도모나스 아이루기노사
gabT	NP_417148.1	16130576	에스케리키아 콜라이
puuE	NP_415818.1	16129263	에스케리키아 콜라이
Abat	NP_766549.2	37202121	무스 무스쿠루스
gabT	YP_257332.1	70733692	슈도모나스 플루오레센스
Abat	NP_999428.1	47523600	수스 스크로파

[0514]

[0515] 4.1.3.a 분해효소: 피루베이트 및 아세트알데히드의 4-히드록시-2-옥소발레레이트로의 축합은 (도 12의 단계 A) 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제 (EC 4.1.3.39)에 의해 촉매된다. 본 효소는 페놀, 크레졸 및 카테콜 분해 경로들에 참여한다. *mhpE*에 의해 암호화되는 *E. coli* 효소는 수용체로서 아세트알데히드에 매우 특이적이지만 대안 기질들 2-케토부티레이트 또는 페닐피루베이트를 주제들로서 수용한다 (Pollard et al., *Appl Environ Microbiol* 64:4093-4094 (1998)). 유사한 효소들은 슈도모나스 푸터타의 *cmtG* 및 *todH* 유전자들에 의해 암호화된다 (Lau et al., 유전자 146:7-13 (1994); Eaton, *J Bacteriol.* 178:1351-1362 (1996)). 슈도모나스 CF600에서, 본 효소는 *dmpFG*에 의해 암호화되는 2 기능성 알돌라아제-탈수소효소 이종이량체의 일부이다 (Manjasetty et al., *Acta Crystallogr.D.Biol Crystallogr.* 57:582-585 (2001)). 탈수소효소 기능성으로 아세트알데히드 및 아세틸CoA는 상호 전환되어, 일부 세포들에 독소인 아세트알데히드의 세포 농도를 감소시키는 이점을 제공한다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>mhpE</i>	AAC73455.1	1786548	에스케리키아 콜라이
<i>cmtG</i>	AAB62295.1	1263190	슈도모나스 푸터타
<i>todH</i>	AAA61944.1	485740	슈도모나스 푸터타
<i>dmpG</i>	CAA43227.1	45684	슈도모나스 종 CF600
<i>dmpF</i>	CAA43226.1	45683	슈도모나스 종 CF600

[0516]

[0517] 4.2.1.a 탈수효소: 4-히드록시-2-옥소발레레이트의 2-옥소펜테노에이트로의 탈수 (도 12의 단계 B)는 4-히드록시-2-옥소발레레이트 수화효소 (EC 4.2.1.80)에 의해 촉매된다. 4-히드록시펜트-2-에노에이트를 2,4-펜타디에노에이트로 탈수시키는 과정을 촉매하는 유사한 효소가 필요하다 (도 13의 단계 D). 4-히드록시-2-옥소발레레이트 수화효소는 방향족 분해 경로들에 참여하고 전형적으로 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제 활성을 가지는 효소를 암호화하는 유전자로 공동-전사된다. 예시적 유전자 산물들은 *E. coli* 의 *mhpD* (Ferrandez et al., *J Bacteriol.* 179:2573-2581 (1997); Pollard et al., *Eur J Biochem.* 251:98-106 (1998)), 슈도모나스 푸터타의 *todG* 및 *cmtF* (Lau et al., 유전자 146:7-13 (1994); Eaton, *J Bacteriol.* 178:1351-1362 (1996)), 코마모나스 종 CNB-1 의 *cnbE* (Ma et al., *Appl Environ Microbiol* 73:4477-4483 (2007)) 및 베크홀데리아 제노보란스의 *mhpD* (Wang et al., *FEBS J* 272:966-974 (2005))에 의해 암호화된다. 밀접하게 관련된 효소, 2-옥소헵타-4-엔-1,7-디오에이트 수화효소는 4-히드록시페닐아세트산 분해에 참여하고, 여기에서 마그네슘을 조인자로 이용하여 2-옥소-헵트-4-엔-1,7-디오에이트 (OHED)를 2-옥소-4-히드록시-헵타-1,7-디오에이트로 전환한다 (Burks et al., *J Am Chem Soc.* 120: (1998)). OHED 수화효소 후보들은 *E. coli C* (Roper et al., 유전자 156:47-51 (1995); Izumi et al., *J Mol Biol.* 370:899-911 (2007)) 및 *E. coli W*에서 동정되고 특정되었다 (Prieto et al., *J Bacteriol.* 178:111-120 (1996)). 서열 비교를 통하여 넓은 세균, 식물 및 동물 범위에서

상동체를 보인다. 매우 유사한 서열들을 가지는 효소들은 무엇보다도 클렙시엘라 뉴모니아 (91% 상동성, e값 = 2e-138) 및 살모넬라 엔테리카 (91% 상동성, e값 = 4e-138)에 함유된다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>mhpD</i>	AAC73453.2	87081722	에스케리키아 콜라이
<i>cmtF</i>	AAB62293.1	1263188	슈도모나스 푸터타
<i>todG</i>	AAA61942.1	485738	슈도모나스 푸터타
<i>cnbE</i>	YP_001967714.1	190572008	코마보나스 종 CNB-1
<i>mhpD</i>	Q13VU0	123358582	비크홀테리아 제노보란스
<i>hpcG</i>	CAA57202.1	556840	에스케리키아 콜라이 C
<i>hpaH</i>	CAA86044.1	757830	에스케리키아 콜라이 W
<i>hpaH</i>	ABR80130.1	150958100	클렙시엘라 뉴모니아
<i>Sari_01896</i>	ABX21779.1	160865156	살모넬라 엔테리카

[0518]

[0519] 2-히드록시펜테노에이트 (도 12, 단계 D) 또는 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트 탈수 촉매(도 13, 단계 F)를 위한 효소 후보들은 푸마라아제 (EC 4.2.1.2), 시트라말레이트 수화효소 (EC 4.2.1.34) 및 디메틸말레이트 수화효소 (EC 4.2.1.85)를 포함한다. 푸마라아제 효소들은 천연적으로 말레이트의 푸마레이트로의 가역적 탈수를 촉매한다. 기질들로서 2-히드록시펜테노에이트 또는 2-히드록시-4-옥소펜타노에이트와의 푸마라아제 반응 능력이 문헌에는 기록되어 있지 않지만, 본 효소에 대한 풍부한 구조적 정보를 이용할 수 있고 다른 연구자들은 활성, 저해 및 국소화 변경을 위하여 효소를 성공적으로 조작하였다 (Weaver, 61:1395-1401 (2005)). *E. coli* 은 3 개의 푸마라아제들을 가진다: 생장 조건들에 의해 모두가 조절되는 FumA, FumB, 및 FumC. FumB는 산소 민감성이며 혐기성 조건에서만 활성이다. FumA는 미세협기성 조건에서 활성이고, FumC는 호기성 배양에서 활성인 효소이다 (Tseng et al., 183:461-467 (2001); Woods et al., 954:14-26 (1988); Guest et al., J Gen Microbiol 131:2971-2984 (1985)). 추가적인 효소 후보들은 캄필로박ter 제주니 (Smith et al., Int.J Biochem.Cell Biol 31:961-975 (1999)), 테르무스 테르모필루스 (Mizobata et al., Arch.Biochem.Biophys. 355:49-55 (1998)) 및 라투스 노르베기쿠스 (Kobayashi et al., 89:1923-1931 (1981))에서 발견된다. 높은 서열 상동성을 가지는 유사한 효소들은 아라비돕시스 탈리아나 유래의 *fum1* 및 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 *fumC*를 포함한다. 펠로토마쿠룸 테르모프로파오니쿰 유래의 *mmcBC* 푸마라아제는 두 개의 서브단위들을 가지는 다른 분류의 푸마라아제이다 (Shimoyama et al., 270:207-213 (2007)). 시트라말레이트 하이드로리아제는 천연적으로 2-메틸말레이트를 메사코네이트로 탈수시킨다. 본 효소는 2-옥소부타노에이트로의 피루베이트 경로 관점에서 베타노칼도코쿠스 잔나스키 에서 연구되었고, 여기에서 넓은 기질 특이성을 가지는 것으로 밝혀졌다 (Drevland et al., J Bacteriol. 189:4391-4400 (2007)). 또한 본 효소 활성은 클로스트리디움 테타노모르퓸, 몰가넬라 모르가니, 시트로박ter 아말로나티쿠스 에서 검출되고 여기에서 글루타메이트 분해에 관여한다고 생각된다 (Kato et al., Arch.Microbiol 168:457-463 (1997)). *M. 잔나스키* 단백질 서열은 이들 유기체의 유전자들과 유의한 상동성을 가지지 않는다. 디메틸말레이트 수화효소는 디메틸말레이트를 수화하여 (2R,3S)-2,3-디메틸말레이트를 형성하는 아코나트산수화효소 패밀리에서 가역적 Fe²⁺-의존성 및 산소-민감성 효소이다. 본 효소는 애우박테리움 바르케리 의 *dmdAB* 로 암호화된다 (Alhapel et al., supra; Kollmann-Koch et al., Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem. 365:847-857 (1984)).

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
fumA	NP_416129.1	16129570	에스케리키아 콜라이
fumB	NP_418546.1	16131948	에스케리키아 콜라이
fumC	NP_416128.1	16129569	에스케리키아 콜라이
fumC	O69294	9789756	캄필로박터 제주니
fumC	P84127	75427690	테르무스 테르모필루스
fumH	P14408	120605	라투스 노르베기кус
fumI	P93033	39931311	아라비돕시스 텔리아나
fumC	Q8NRM8	39931596	코리네박테리움 글루타미쿰
mmcB	YP_001211906	147677691	펠로토마쿠룸 테르모프로파오니쿰
mmcC	YP_001211907	147677692	펠로토마쿠룸 테르모프로파오니쿰
leuD	Q58673.1	3122345	베타노칼도코쿠스 잔나스카
dmdA	ABC88408	86278276	에우박테리움 바르케리
dmdB	ABC88409.1	86278277	에우박테리움 바르케리

[0520]

[0521] 4.3.1.a 암모니아-분해효소: 도 13의 단계 B에서 2-아미노-4-옥소펜타노에이트 (AKP)의 아세틸아크릴레이트로의 탈아민을 촉매하기 위하여 암모니아 분해효소 효소가 필요하다. 이렇게 정확한 변환을 촉매하는 효소는 동정되지 않았다. 그러나 AKP는 아스파르테이트, 아스파르타제 (EC 4.3.1.1.) 의 본래 기질과 구조적으로 유사하다. 아스파르타제는 미생물에서 광범위한 효소이고, 상당히 특정되었다 (Viola, 74:295-341 (2000)). *E. coli* 효소는 아스파르테이트페닐메틸에스테르, 아스파라긴, 벤질-아스파르테이트 및 말레이트를 포함한 다양한 대안 기질들과 반응하는 것으로 밝혀졌다 (Ma et al., 672:60-65 (1992)). 또한, 본 효소에 방향성 진화를 적용하여 기질 특이성을 변경시켰다 (Asano et al., 22:95-101 (2005)). *aspA*에 의해 암호화되는 *E. coli* 아스파르타제의 결정 구조가 알려졌다 (Shi et al., 36:9136-9144 (1997)). 또한 아스파르타제 기능성을 가지는 효소들은 해모필루스 플루엔자 (Sjostrom et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1324:182-190 (1997)), 슈도모나스 플루오레센스 (Takagi et al., *J.Biochem.* 96:545-552 (1984)), 바실러스 섭틸리스 (Sjostrom et al., 1324:182-190 (1997)) 및 셀라티아 마르세스센스 (Takagi et al., 161:1-6 (1985))에서 특정되었다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
aspA	NP_418562	90111690	에스케리키아 콜라이 K12 sub 종 MG1655
aspA	P44324.1	1168534	해모필루스 플루엔자
aspA	P07346.1	114273	슈도모나스 플루오레센스
ansB	P26899.1	251757243	바실러스 섭틸리스
aspA	P33109.1	416661	셀라티아 마르세스센스

[0522]

[0523] AKP의 탈아민을 촉매하는 다른 효소 후보는 3-메틸아스파르타제 (EC 4.3.1.2)이다. 본 효소는, 베타-메틸아스파르타제 및 3-메틸아스파르테이트 암모니아-분해효소라고도 알려져 있고, 자연적으로는 트레오-3-메틸아스파라테이트의 메사코네이트로의 탈아민화를 촉매한다. 클로스트리디움 테타노모르퓸 유래의 3-메틸아스파르타제는 클로닝되고, *E. coli*에서 기능적으로 발현되고 결정화되었다 (Asuncion et al., 57:731-733 (2001); Asuncion et al., *J Biol Chem.* 277:8306-8311 (2002); Botting et al., 27:2953-2955 (1988); Goda et al., 31:10747-10756 (1992)). 시트로박터 아말로나티쿠스에서, 본 효소는 BAA28709로 암호화된다 (Kato and Asano, *Arch.Microbiol* 168:457-463 (1997)). 단백질 서열은 유전자은행과 같은 공적 데이터베이스에 나열되지 않았지만 3-메틸아스파르타제 역시 *E. coli* YG1002로부터 결정화되었다 (Asano et al., *FEMS Microbiol Lett.* 118:255-258 (1994)). *C. 테타니*의 CTC_02563 및 에스케리키아 콜라이 O157:H7의 ECs0761를 포함한 추가적인 후보 유전자들을 동정하기 위하여 서열 상동성이 이용될 수 있다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
mal	AAB24070.1	259429	클로스트리디움 테타노모르포
BAA28709	BAA28709.1	3184397	시트로박터 아말로나티코스
CTC_02563	NP_783085.1	28212141	클로스트리디움 테타니
ECs0761	BAB34184.1	13360220	에스케리키아 콜라이 O157:H7

[0524]

5.1.1.a 라세미화효소: EC 분류 5.1.1에 속하는 라세미화효소 효소들은 D- 및 L- 아미노산들을 이성화한다. D-알라닌 및/또는 D-오르니틴의 생물학적 가용능을 높이고 따라서 알라닌의 AKP로의 전환 (도 13, 단계 A) 또는 오르니틴의 2,4-디아미노펜타노에이트 전환 (도 13, 단계 M)을 개선하기 위하여 이러한 효소가 요구된다. 알라닌 라세미화효소 (EC 5.1.1.1) 및 오르니틴 라세미화효소 (EC 5.1.1.12) 활성을 가지는 효소들이 특정되었다. 알라닌 라세미화효소는 알라닌의 L 및 D 입체이성질체들을 상호 전환한다. 에스케리키아 콜라이는 *alr* 및 *dadX*에 의해 암호화되는 두 종의 알라닌 아미노뮤타아제 효소들을 가진다 (Lilley et al., 유전자 129:9-16 (1993); Wild et al., *Mol Gen Genet.* 198:315-322 (1985)). *E. coli*에서 발현될 때 엔테로코쿠스 갈리나룸의 *vanT* 유전자 역시 알라닌 라세미화효소 활성을 보였다 (Arias et al., *Microbiology* 146 (Pt 7):1727-1734 (2000)). 추가적인 알라닌 라세미화효소 효소 후보들은 바실러스 섭틸리스 및 미코박테리움 투베르콜로시스에서 특정되었다 (Pierce et al., *FEMS Microbiol Lett.* 283:69-74 (2008); Strych et al., *FEMS Microbiol Lett.* 196:93-98 (2001)). D-오르니틴 및 L-오르니틴의 상호 전환은 오르니틴 라세미화효소에 의해 촉매된다. *C. 스티크클란디*의 *orr* 유전자 산물에 의해 암호화되는 효소는 정제되고 특정되었다 (Fonknechten, *J.Bacteriol.* In Press: (2009)). 추가적인 오르니틴 라세미화효소 유전자 후보들은 클로스트리디움 디피실레 및 푸소박테리움 페리오돈티쿰과 같은 유기체에서 서열 유사성으로 확인될 수 있다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>alr</i>	NP_418477.1	16131879	에스케리키아 콜라이
<i>dadX</i>	AAC74274.1	1787439	에스케리키아 콜라이
<i>vanT</i>	Q9X3P3.1	20140922	엔테로코쿠스 갈리나룸
<i>yncD</i>	NP_389646.1	16078827	바실러스 섭틸리스
<i>alr</i>	NP_338056.1	15843019	미코박테리움 투베르콜로시스 CDC1551
<i>alr</i>	NP_217940.1	15610559	미코박테리움 투베르콜로시스 <i>H37Rv</i>
<i>orr</i>	CAQ42981.1	226885219	클로스트리디움 스티크클란디
<i>CdifA_020200002638</i>	ZP_05349631.1	255305459	클로스트리디움 디피실레
<i>FUSPEROL_00295</i>	ZP_06025693.1	262066081	푸소박테리움 페리오돈티쿰

[0526]

5.4.3.a 아미노뮤타아제: 오르니틴 아미노뮤타아제 (EC 5.4.3.5)는 오르니틴의 2,4-디아미노펜타노에이트로의 전환을 촉매한다 (도 13, 단계 M). 클로스트리디움 스티크클란디의 *oraSE*로 암호화되는 본 활성을 가지는 B12-의준성 효소는 클로닝되고, 서열이 정해지고 *E. coli*에서 발현되었다 (Chen et al., *J.Biol.Chem.* 276:44744-44750 (2001)). 본 효소는 바람직하게는 오르니틴의 D-입체이성질체와 반응한다 (Fonknechten, *J.Bacteriol.* In Press: (2009)). 오르니틴 아미노뮤타아제 효소들은 지금까지 다른 유기체에서 특정되지 않았다. 알칼리필루스 오лем란디 및 클로스트리디움 디피실레 와 같은 유기체에서 유사한 효소들이 서열 유사성으로 동정될 수 있다. 리신 아미노뮤타아제는 두 유사한 변환들을 촉매한다: 리신과 2,5-디아미노헥사노에이트와의 상호 전환 (EC 5.4.3.4), 및 3,6-디아미노헥사노에이트와 3,5-디아미노헥사노에이트와의 상호 전환 (EC 5.4.3.3). 본 효소는 아세테이트 및 부티레이트로의 리신 발효에 참여하고 클로스트리디움 스티크클란디 (Berkovitch et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:15870-15875 (2004)) 및 포르피로모나스 긴기발리스 (Tang et al., *Biochemistry* 41:8767-8776 (2002))에서 특정되었다.

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
oraE	AAK72502.1	17223685	클로스트리디움 스티크클란더
oraS	AAK72501.1	17223684	클로스트리디움 스티크클란더
oraE (Clos_1695)	YP_001513231.1	158320724	알칼리필루스 오랩란더
oraS (Clos_1696)	YP_001513232.1	158320725	알칼리필루스 오랩란더
oraE	ZP_05349629.1	255305457	클로스트리디움 디피실레
oraS	ZP_05349628.1	255305456	클로스트리디움 디피실레
kamD	AAC79717.1	3928904	클로스트리디움 스티크클란더
kamE	AAC79718.1	3928905	클로스트리디움 스티크클란더
kamD	NP_905288.1	34540809	포르파로모나스 긴기발리스 W83
kamE	NP_905289.1	34540810	포르파로모나스 긴기발리스 W83

[0528]

[0529] 기타: 2-아미노-4-옥소펜타노에이트 (AKP)는 알라닌 및 아세틸CoA로부터 AKP 티올라아제에 의해 형성된다 (도 13의 단계 A). AKP 티올라아제 (AKPT, EC 번호 없음)는 클로스트리디움 스티크클란더에서 오르니틴 분해에 참여하는 피리독살 포스페이트-의존성 효소이다 (Jeng et al., *Biochemistry* 13:2898-2903 (1974); Kenkliess et al., *Microbiology* 145 (Pt 4):819-826 (1999)). AKPT의 알파 및 베타 서브단위들 (*ort-2* (*ortA*) 및 *ort-3* (*ortB*))을 암호화하는 유전자 클러스터는 최근에 기재되었고 본 효소의 생화학적 특성들이 특정되었다 (Fonknechten, *J.Bacteriol.* In Press: (2009)). 본 효소는 양 방향에서 작용할 수 있고 알라닌의 D- 이성질체와 반응한다. 효소 조작 또는 방향성 진화로 본 효소는 기질로서 L-알라닌과 작용하여 주요 기질에 대한 추가적인 경로 융통성을 제공한다. 대안으로, 알라닌 라세미화효소의 공동-발현으로 기질 가용성을 높일 수 있다. 높은 서열 상동성을 가지는 효소들은 클로스트리디움 디피실레, 알칼리필루스 메탈리레디케네스 QYF, 테르모아나이로박ter 종 X514, 및 테르모아나이로박ter 템콘센시스 MB4에서 발견된다 (Fonknechten, *J.Bacteriol.* In Press: (2009)).

유전자	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>ortA</i>	CAQ42979.1	226885215	클로스트리디움 스티크클란더
<i>ortB</i>	CAQ42980.1 GI:	226885217	클로스트리디움 스티크클란더
<i>ortA</i>	YP_001086914.1	126698017	클로스트리디움 디피실레 630
<i>ortB</i>	YP_001086915.1	126698018	클로스트리디움 디피실레 630
<i>Amet_2368</i>	YP_001320181.1	150390132	알칼리필루스 메탈리레디케네스 QYF
<i>Amet_2369</i>	YP_001320182.1	150390133	알칼리필루스 메탈리레디케네스 QYF
<i>Teth514_1478</i>	YP_001663101.1	167040116	테르모아나이로박ter 종 X514
<i>Teth514_1479</i>	YP_001663102.1	167040117	테르모아나이로박ter 종 X514
<i>TTE1235</i>	NP_622858.1	20807687	테르모아나이로박ter 템콘센시스 MB4
<i>thrC</i>	NP_622859.1	20807688	테르모아나이로박ter 템콘센시스 MB4

[0530]

[0531] 실시예 IX

[0532] 합성가스로부터 환원 당량들을 추출하기 위한 예시적 수소화효소 및 CO 탈수소효소 및 예시적 환원적 TCA 회로 효소들

[0533] 본 발명의 비-천연 미생물 유기체에서 유용한 환원적 TCA 회로 효소들은 하나 이상의 ATP-시트레이트 분해효소

및 3 종의 CO₂-고정 효소들: 이소시트레이트 탈수소효소, 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소, 피루베이트:페레독신 산화환원효소를 포함한다. ATP-시트레이트 분해효소 또는 시트레이트 분해효소 및 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소가 존재한다는 것은 유기체에 활성적인 환원적 TCA 회로가 존재한다는 것을 의미한다. 환원적 TCA 회로 각각의 단계에서 효소들을 하기한다.

[0534] ATP-시트레이트 분해효소 (ACL, EC 2.3.3.8)는, ATP 시트레이트 생성효소라고도 불리며, 시트레이트를 옥살로아세테이트 및 아세틸CoA로 ATP-의존적 절단을 촉매한다. ACL은 녹색유황세균 클로로비움 리미콜라 및 클로로비움 테페둠에서 연구된 RTCA 회로의 효소이다. 클로로비움 리미콜라 유래의 알파(4)-베타(4) 이가동의(heteromeric) 효소는 클로닝되고 *E. coli*에서 특정되었다 (Kanao et al., *Eur. J. Biochem.* 269:3409-3416 (2002). *aclAB*에 의해 암호화되는 *C. 리미콜라* 효소는 비가역적이고 효소 활성은 ADP/ATP 비율로 조절된다. 클로로비움 테페둠 유래의 재조합 ACL 역시 *E. coli*에서 발현되었고 촉매 기전에서 알파 및 베타 서브단위들 역할을 평가하기 위하여 전효소는 시험관내에서 재구축되었다 (Kim and Tabita, *J. Bacteriol.* 188:6544-6552 (2006). 또한 ACL 효소들은 발레아리움 리토트로피倨, 술푸리히드로제네비움 습텔라네움 및 세균문 (phylum) 아퀴피카이의 다른 멤버에서도 확인되었다 (Hugler et al., *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007)). 본 활성은 일부 진균에서도 보고되었다. 예시적 유기체는 솔다리아 마크로스포라 (*Nowrouzian et al.*, *Curr. Genet.* 37:189-93 (2000), 아스퍼길러스 니둘란스, 알로위아 리폴리티카 (*Hynes and Murray, Eukaryotic Cell*, July: 1039-1048, (2010) 및 아스퍼길러스 나이거 (*Meijer et al. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:1275-1280 (2009)을 포함한다. 기타 후보들은 서열 상동성에 기반하여 발견될 수 있다. 이를 효소와 관련된 정보는 아래에 표로 작성된다:

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>aclA</i>	BAB21376.1	12407237	클로로비움 리미콜라
<i>aclB</i>	BAB21375.1	12407235	클로로비움 리미콜라
<i>aclA</i>	AAM72321.1	21647054	클로로비움 테페둠
<i>aclB</i>	AAM72322.1	21647055	클로로비움 테페둠
<i>aclA</i>	ABI50076.1	114054981	발레아리움 리토트로피倨
<i>aclB</i>	ABI50075.1	114054980	발레아리움 리토트로피倨
<i>aclA</i>	ABI50085.1	114055040	술푸리히드로제네비움 습텔라네움
<i>aclB</i>	ABI50084.1	114055039	술푸리히드로제네비움 습텔라네움
<i>aclA</i>	AAX76834.1	62199504	술푸리보나스 테니트리피칸스
<i>aclB</i>	AAX76835.1	62199506	술푸리보나스 테니트리피칸스
<i>acl1</i>	XP_504787.1	50554757	알로위아 리폴리티카
<i>acl2</i>	XP_503231.1	50551515	알로위아 리폴리티카
<i>SPBC1703.07</i>	NP_596202.1	19112994	시조사카로마이세스 품배
<i>SPAC22A12.16</i>	NP_593246.1	19114158	시조사카로마이세스 품배
<i>acl1</i>	CAB76165.1	7160185	솔다리아 마크로스포라
<i>acl2</i>	CAB76164.1	7160184	솔다리아 마크로스포라
<i>aclA</i>	CBF86850.1	259487849	아스퍼길러스 니둘란스
<i>aclB</i>	CBF86848	259487848	아스퍼길러스 니둘란스

[0535]

[0536] 일부 유기체에서 시트레이트가 옥살로아세테이트 및 아세틸CoA로 전환되는 것은 시트릴-CoA 중간체를 통하여 진행되고 두 종의 개별 효소들, 시트릴-CoA 합성효소 (EC 6.2.1.18) 및 시트릴-CoA 분해효소 (EC 4.1.3.34)에 의해 촉매된다 (Aoshima, M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:249-255 (2007). 시트릴-CoA 합성효소는 시트레이트의 시트릴-CoA로의 활성화를 촉매한다. 히드로제노박터 테르모필루스 효소는 각각 *ccsA* 및 *ccsB*에 의해 암호화되는 대형 및 소형 서브단위들로 구성된다 (Aoshima et al., *Mol. Microbiol.* 52:751-761 (2004)). 마퀴페스 아이올리쿠스의 시트릴-CoA 합성효소는 *sucC1* 및 *sucD1*로 암호화되는 알파 및 베타 서브단위로 구성된다

(Hugler et al., *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007)). 시트릴-CoA 분해효소는 시트릴-CoA를 옥살로아세테이트 및 아세틸CoA로 절단한다. 본 효소는 히드로게노박터 테르모필루스의 *ccl* (Aoshima et al., *Mol. Microbiol.* 52:763-770 (2004)) 및 마퀴페스 아이올리쿠스의 *aq_150* (Hugler et al., *supra* (2007))에 의해 암호화되는 동종삼량체이다. 시트레이트를 옥살로아세테이트 및 시트릴-CoA로 전환하는 본 기전의 유전자들은 최근 클로로비옴 테페둠에서도 보고되었다 (Eisen et al., *PNAS* 99(14): 9509-14 (2002)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>ccsA</i>	BAD17844.1	46849514	히드로게노박터 테르모필루스
<i>ccsB</i>	BAD17846.1	46849517	히드로게노박터 테르모필루스
<i>sucC1</i>	AAC07285	2983723	마퀴페스 아이올리쿠스
<i>sucD1</i>	AAC07686	2984152	마퀴페스 아이올리쿠스
<i>ccl</i>	BAD17841.1	46849510	히드로게노박터 테르모필루스
<i>aq_150</i>	AAC06486	2982866	마퀴페스 아이올리쿠스
<i>CT0380</i>	NP_661284	21673219	클로로비옴 테페둠
<i>CT0269</i>	NP_661173.1	21673108	클로로비옴 테페둠
<i>CT1834</i>	AAM73055.1	21647851	클로로비옴 테페둠

[0537]

[0538] 말레이트 탈수소효소 (EC 1.1.1.37)에 의해 옥살로아세테이트는 말레이트로 전환되며, 본 효소는 정방향 및 역 방향 모두에서 작용한다. *S. 세레비지애*는 말레이트 탈수소효소의 3 사본들, *MDH1* (McAlister-Henn and Thompson, *J. Bacteriol.* 169:5157-5166 (1987)), *MDH2* (Minard and McAlister-Henn, *Mol. Cell. Biol.* 11:370-380 (1991); Gibson and McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 278:25628-25636 (2003)), 및 *MDH3* (Steffan and McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 267:24708-24715 (1992))을 가지며, 각각 미토콘드리아, 세포기질, 및 퍼옥시좀에 국소화된다. *E. coli*는 *mdh*에 의해 암호화되는 활성 말레이트 탈수소효소를 가지는 것으로 알려져 있다.

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

[0539]

[0540] 푸마레이트 수화효소 (EC 4.2.1.2)는 푸마레이트의 말레이트로의 가역적 수화를 촉매한다. *fumA*, *fumB* 및 *fumC*에 의해 암호화되는 *E. coli*의 3 종의 푸마라아제들은 다른 산소이용율 조건에서 조절된다. FumB는 산소 민감성이고 혐기성 조건에서 활성이다. FumA는 미세혐기성 조건에서 활성이고, FumC는 호기성 생장 조건들에서 활성이다 (Tseng et al., *J. Bacteriol.* 183:461-467 (2001); Woods et al., *Biochim. Biophys. Acta* 954:14-26 (1988); Guest et al., *J. Gen. Microbiol.* 131:2971-2984 (1985)). *S. 세레비지애*는 1 사본의 푸마라아제-암호화 유전자, *FUM1*을 가지며 산물은 세포기질 및 미토콘드리아에 국소화된다 (Sass et al., *J. Biol. Chem.* 278:45109-45116 (2003)). 추가적인 푸마라아제 효소들은 캄펠로박터 제주니 (Smith et al., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31:961-975 (1999)), 테르무스 테르모필루스 (Mizobata et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 355:49-55 (1998)) 및 라투스 노르베기쿠스 (Kobayashi et al., *J. Biochem.* 89:1923-1931 (1981))에서 발견된다. 높은 서열 상동성을 가지는 유사한 효소들은 아라비돕시스 탈리아나 유래의 *fum1* 및 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 *fumC*를 포함한다. 펠로토마쿰 테르모프로파오니쿰 유래의 *MmcBC* 푸마라아제는 2개의 서브단위들을 가지는 다른 분류의 푸마라아제이다 (Shimoyama et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 270:207-213 (2007)).

<u>단백질</u>	<u>유전자은행 ID</u>	<u>GI 번호</u>	<u>유기체</u>
<i>fumA</i>	NP_416129.1	16129570	에스케리키아 콜라이
<i>fumB</i>	NP_418546.1	16131948	에스케리키아 콜라이
<i>fumC</i>	NP_416128.1	16129569	에스케리키아 콜라이
<i>FUMI</i>	NP_015061	6324993	사카로마이세스 세레비지아
<i>fumC</i>	Q8NRN8.1	39931596	코리네박테리움 글루타미쿰
<i>fumC</i>	O69294.1	9789756	캄팔로박테 제주나
<i>fumC</i>	P84127	75427690	테르무스 테르모필루스
<i>fumH</i>	P14408.1	120605	라투스 노르메기쿠스
<i>MmcB</i>	YP_001211906	147677691	웰로토마쿠룸 테르모프로파오니쿰
<i>MmcC</i>	YP_001211907	147677692	웰로토마쿠룸 테르모프로파오니쿰

[0541]

[0542] 푸마레이트 환원효소는 푸마레이트의 숙시네이트로의 환원을 촉매한다. *E. coli*의 푸마레이트 환원효소는 *frdABCD*에 의해 암호화되는 4개의 서브단위들로 구성되고, 막-결합되고 협기성 조건에서 활성이다. 본 반응을 위한 전자 주계는 메나퀴논이고 본 반응에서 생성된 2개의 양성자들은 양성자 구배에 기여하지 않는다 (Iverson et al., *Science* 284:1961-1966 (1999)). 효모 유전체는 FRDS1 (Enomoto et al., *DNA Res.* 3:263-267 (1996)) 및 FRDS2 (Muratsubaki et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 352:175-181 (1998))에 의해 암호화되는 2 용해성 푸마레이트 환원효소 동질효소들을 암호화하며, 이들은 각각 세포기질 및 프로미토콘드리아에 국소화되고, 글루코스 협기성 생장 과정에 사용된다 (Arikawa et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 165:111-116 (1998)).

<u>단백질</u>	<u>유전자은행 ID</u>	<u>GI 번호</u>	<u>유기체</u>
<i>FRDS1</i>	P32614	418423	사카로마이세스 세레비지아
<i>FRDS2</i>	NP_012585	6322511	사카로마이세스 세레비지아
<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

[0543]

[0544] 숙시네이트의 숙시닐-CoA로의 ATP-의존성 아실화는 숙시닐-CoA 합성효소 (EC 6.2.1.5)에 의해 촉매된다. *S. 세레비지아*의 *LSC1* 및 *LSC2* 유전자 및 *E. coli*의 *sucC* 및 *sucD* 유전자 산물은 천연적으로 숙시닐-CoA 합성효소 복합체를 형성하고 이것은 동시적인 하나의 ATP 소비로 생체내 가역적 반응인 숙시네이트의 숙시닐-CoA 형성을 촉매한다 (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). 이를 단백질을 하기에 나타낸다:

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

[0545]

- [0546] 알파-케토글루타레이트:페레독신 산화환원효소 (EC 1.2.7.3)는, 2-옥소글루타레이트 생성효소 또는 2-옥소글루타레이트:페레독신 산화환원효소 (OFOR)로 알려져 있고, 2 개의 페레독신 환원 당량들을 소비하면서 CO₂ 및 숙시닐-CoA로부터 알파-케토글루타레이트를 형성한다. OFOR 및 피루베이트:페레독신 산화환원효소 (PFOR)는 티아민 피로포스페이트, CoA 및 철-황 클러스터들을 조인자들로 및 페레독신, 플라보독신 및 FAD를 전자전달체들로 활용하는 2-옥소산:페레독신 (플라보독신) 산화환원효소들의 다양한 패밀리의 멤버들이다 (*Adams et al.*, 고세균. *Adv. 단백질 Chem.* 48:101-180 (1996)). 본 분류의 효소들은 가역적이고 탄소를 RTCA 회로에 의해 고정시키는 유기체 예를들면 헤드로게노박터 테르모필루스, 테슬포박터 헤드로게노필루스 및 클로로비움 종에서 탄산화 방향으로 작용한다 (*Shiba et al.* 1985; *Evans et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55:92934 (1966); Buchanan, 1971). *korAB*에 의해 암호화되는 *H. 테르모빌루스* 유래의 두-서브유닛 효소는 클로닝되고 *E. coli*에서 발현되었다 (*Yun et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 282:589-594 (2001)). 동일 유기체 유래로 숙시닐-CoA에 대한 엄격한 기질 특이성을 가지는 *forDABGE*에 의해 암호화되는 5 서브유닛 OFOR는 최근에 동정되었고 *E. coli*에서 발현되었다 (*Yun et al.* 2002). 두 *H. 테르모빌루스* OFOR 효소들 모두 CO₂ 고정 운동학이 특정되었다 (*Yamamoto et al.*, Extremophiles 14:79-85 (2010)). 클로로비움 티오술파토필루스 유래의 CO₂-고정 OFOR는 정제되고 특정되었지만 본 효소를 암호화하는 유전자들은 지금까지 분석되지 않았다. 클로로비움 종의 효소 후보들은 서열 유사성 *H. 테르모빌루스* 유전자들과의 서열 유사성으로 추론될 수 있다. 예를들면, 클로로비움 리미콜라 유전체는 두 개의 유사한 단백질들을 암호화한다. 초산생성균 예를들면 무렐라 씨모아세티카는 두 종의 OFOR 효소들을 암호화할 것이라고 예측된다. *Moth_0034*에 의해 암호화되는 본 효소는 CO₂-동화 방향으로 작용할 것이라 예상된다. 본 효소와 연관되는 유전자들 *Moth_0034*는 지금까지 실험적으로 확인되지 않았지만 알려진 OFOR 효소들와의 서열 유사성으로 추정될 수 있다.
- [0547] 생리적 조건에서 탈탄산반응 방향으로 작용하는 OFOR 효소들은 또한 역방향을 촉매할 수 있다. 호열호산성 고세균 술풀로부스 종 균주 7 유래의 ST2300에 의해 암호화되는 OFOR는 상당한 연구가 이루어졌다 (*Zhang et al.* 1996). 플라스미드-기반 발현 시스템은 *E. coli*에서 본 단백질을 효율적으로 발현하기 위하여 발생되었고 (*Fukuda et al.*, Eur. J. Biochem. 268:5639-5646 (2001)) 기질 특이성에 관여하는 잔기들이 결정되었다 (*Fukuda and Wakagi, Biochim. Biophys. Acta* 1597:74-80 (2002)). 아이로피룸 페르닉스 str. K1 유래로 *Ape1472/Ape1473*에 의해 암호화되는 OFOR는 최근 *E. coli* 내로 클로닝되고, 특정되고 2-옥소글루타레이트 및 넓은 범위의 2-옥소산들과 반응하는 것으로 확인되었다 (*Nishizawa et al.*, FEBS Lett. 579:2319-2322 (2005)). 다른 예시적 OFOR은 헬리코박터 필로리의 *oorDABC*에 의해 암호화된다 (*Hughes et al.* 1998). 알파-케토글루타레이트에 특이적인 효소는 타우에라 아로마티카에서 보고되었다 (*Dorner and Boll, J. Bacteriol.* 184 (14), 3975-83 (2002)). 유사한 효소는 로도스파릴룸 루브룸에서 서열 상동성에 의해 발견되었다. 두 서브유닛 효소 역시 클로로비움 테페둠에서 동정되었다 (*Eisen et al.*, PNAS 99(14): 9509-14 (2002)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
korA	BAB21494	12583691	히드로제노박터 테르모필루스
korB	BAB21495	12583692	히드로제노박터 테르모필루스
forD	BAB62132.1	14970994	히드로제노박터 테르모필루스
forA	BAB62133.1	14970995	히드로제노박터 테르모필루스
forB	BAB62134.1	14970996	히드로제노박터 테르모필루스
forG	BAB62135.1	14970997	히드로제노박터 테르모필루스
forE	BAB62136.1	14970998	히드로제노박터 테르모필루스
Clim_0204	ACD89303.1	189339900	클로로비옴 리미콜라
Clim_0205	ACD89302.1	189339899	클로로비옴 리미콜라
Clim_1123	ACD90192.1	189340789	클로로비옴 리미콜라
Clim_1124	ACD90193.1	189340790	클로로비옴 리미콜라
Moth_1984	YP_430825.1	83590816	무엘라 씨보아세티카
Moth_1985	YP_430826.1	83590817	무엘라 씨보아세티카
Moth_0034	YP_428917.1	83588908	무엘라 씨보아세티카
ST2300	NP_378302.1	15922633	술풀로부스 종 균주 7
Apel472	BAA80470.1	5105156	아이로파룸 페르너스
Apel473	BAA80471.2	116062794	아이로파룸 페르너스
oorD	NP_207383.1	15645213	헬리코박터 필로리

[0548]

oorA	NP_207384.1	15645214	헬리코박터 필로리
oorB	NP_207385.1	15645215	헬리코박터 필로리
oorC	NP_207386.1	15645216	헬리코박터 필로리
CT0163	NP_661069.1	21673004	클로로비옴 테페듐
CT0162	NP_661068.1	21673003	클로로비옴 테페듐
korA	CAA12243.2	19571179	타우에라 아로마티카
korB	CAD27440.1	19571178	타우에라 아로마티카
Rru_A2721	YP_427805.1	83594053	로도스파릴룸 루브룸
Rru_A2722	YP_427806.1	83594054	로도스파릴룸 루브룸

[0549]

[0550] 이소시트레이트 털수소효소는 NAD(P)⁺ 환원과 연결된 이소시트레이트의 2-옥소글루타레이트로의 가역적 탈탄산반응을 촉매한다. 사카로마이세스 세레비자에 및 에스케리키아 콜라이의 IDH 효소들은 각각 *IDP1* 및 *icd*에 의해 암호화된다 (Haselbeck and McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 266:2339-2345 (1991); Nimmo, H.G., *Biochem. J.* 234:317-332 (1986)). 환원적 TCA 회로에서 역반응, 2-옥소글루타레이트의 이소시트레이트로의 환원적 탄산화는 클로로비옴 리미콜라 유래의 NADPH-의존성 CO₂-고정 IDH에 의해 선호되고 기능적으로 *E. coli*에서 발현되었다 (Kanao et al., *Eur. J. Biochem.* 269:1926-1931 (2002)). 일부 기타 하기 나열된 후보들과 함께 95% 서열 동일성을 가지는 유사한 효소가 *C. 테페듐* 유전체에서 발견된다.

<u>단백질</u>	<u>유전자은행 ID</u>	<u>GI 번호</u>	<u>유기체</u>
<i>Icd</i>	ACI84720.1	209772816	에스캐리카야 콜라이
<i>IDP1</i>	AAA34703.1	171749	사카로마이세스 세레비지애
<i>Idh</i>	BAC00856.1	21396513	클로로비움 리미콜라
<i>Icd</i>	AAM71597.1	21646271	클로로비움 테페듐
<i>icd</i>	NP_952516.1	39996565	<i>Geobacter</i> 흉 reducens
<i>icd</i>	YP_393560.	78777245	슬프리모나스 테니트리피칸스

[0551]

[0552] *H. 테르모빌루스*에서 2-옥소글루타레이트의 이소시트레이트로의 환원적 탄산화는 두 효소들에 의해 촉매된다: 2-옥소글루타레이트 카르복실화효소 및 옥살로숙시네이트 환원효소. 2-옥소글루타레이트 카르복실화효소 (EC 6.4.1.7)는 알파-케토글루타레이트의 옥살로숙시네이트로의 ATP-의존성 탄산화를 촉매한다 (Aoshima and Igarashi, *Mol. Microbiol.* 62:748-759 (2006)). 본 효소는 두 서브단위들로 이루어진 대형 복합체이다. 효소 기능을 위한 대형 (A) 서브유닛의 비오틴화가 요구된다 (Aoshima et al., *Mol. Microbiol.* 51:791-798 (2004)). 옥살로숙시네이트 환원효소 (EC 1.1.1.-)는 옥살로숙시네이트의 D-트레오-이소시트레이트로의 NAD-의 존성 전환을 촉매한다. 본 효소는 *H. 테르모빌루스*의 *icd*에 의해 암호화되는 동종이량체이다. 기타 유기체의 이소시트레이트 탈수소효소들은 달리 본 효소의 운동학 매개변수는 본 효소가 생체내에서 환원적 탄산화 방향으로만 작용한다는 것을 보인다 (Aoshima and Igarashi, *J. Bacteriol.* 190:2050-2055 (2008)). Based on 서열 상동성에 기반하여, 유전자 후보들 역시 티오바실러스 테니트리피칸스 및 테르모크리니스 알부스에서 발견되었다.

<u>단백질</u>	<u>유전자은행 ID</u>	<u>GI 번호</u>	<u>유기체</u>
<i>cflA</i>	BAF34932.1	116234991	히드로개노박터 테르모필루스
<i>cifB</i>	BAF34931.1	116234990	히드로개노박터 테르모필루스
<i>Icd</i>	BAD02487.1	38602676	히드로개노박터 테르모필루스
<i>Tbd_1556</i>	YP_315314	74317574	티오바실러스 테니트리피칸스
<i>Tbd_1555</i>	YP_315313	74317573	티오바실러스 테니트리피칸스
<i>Tbd_0854</i>	YP_314612	74316872	티오바실러스 테니트리피칸스
<i>Thal_0268</i>	YP_003473030	289548042	테르모크리니스 알부스
<i>Thal_0267</i>	YP_003473029	289548041	테르모크리니스 알부스
<i>Thal_0646</i>	YP_003473406	289548418	테르모크리니스 알부스

[0553]

[0554] 아코니트산수화효소 (EC 4.2.1.3)는 중간체 시스-아코니테이트를 통하여 시트레이트 및 이소-시트레이트의 가역적 이성질화를 촉매하는 철-황-함유 단백질이다. 두 아코니트산수화효소들은 *E. coli* 유전체에서 *acnA* 및 *acnB*에 의해 암호화된다. AcnB는 주요 분해효소이고, AcnA는 더욱 안정하고 산화적 또는 산 스트레스 조건에서 활성인 것으로 보인다 (Cunningham et al., *Microbiology* 143 (Pt 12):3795-3805 (1997)). 살모넬라 티피무리움에서 아코니트산수화효소의 두 동질효소들은 *acnA* 및 *acnB*에 의해 암호화된다 (Horswill and Escalante-Semerena, *Biochemistry* 40:4703-4713 (2001)). *S. 세레비지애* 아코니트산수화효소는 *ACO1*에 의해 암호화되고, TCA 회로에 참여하는 미토콘드리아 (Gangloff et al., *Mol. Cell. Biol.* 10:3551-3561 (1990)) 및 글리옥실레이트 대체경로에 참여하는 세포기질 (Regev-Rudzki et al., *Mol. Biol. Cell.* 16:4163-4171 (2005))에 국소화된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
acnA	AAC7438.1	1787531	에스케리키아 콜라이
acnB	AAC73229.1	2367097	에스케리키아 콜라이
acnA	NP_460671.1	16765056	살모넬라 티페무리움
HP0779	NP_207572.1	15645398	헬리코박터 필로리 26695
H16_B0568	CAJ95365.1	113529018	랄스토니아 유트로파
DesfrDRAFT_3783	ZP_07335307.1	303249064	테슬포비브리오 프록토소보란스JJ
Suden_1040 (acnB)	ABB44318.1	78497778	술푸리모나스 데니트리피칸스
Hydth_0755	ADO45152.1	308751669	히드로제노박터 테르모필루스
CT0543 (acn)	AAM71785.1	21646475	클로로비움 테페둠
Clim_2436	YP_001944436.1	189347907	클로로비움 리미콜라
Clim_0515	ACD89607.1	189340204	클로로비움 리미콜라
acnB	NP_459163.1	16763548	살모넬라 티페무리움
ACO1	AAA34389.1	170982	사카로마이세스 세라비자애

[0555]

[0556] 피루베이트: 폐레독신 산화환원효소 (PFOR)는 피루베이트의 가역적 산화를 촉매하여 아세틸CoA를 형성한다. 테슬포비브리오 아프리카누스 유래의 PFOR는 클로닝되어 *E. coli*에서 발현되어 산소 존재에서 수일 동안 안정한 활성 재조합 효소가 제작되었다 (Pieulle et al., *J. Bacteriol.* 179:5684-5692 (1997)). 산소 안정성은 PFOR들에서 상대적으로 공통적이지 않고 *D. 아프리카누스* 효소의 폴리펩ти드 사슬에서 60 잔기 연장에 의해 부여되는 것으로 보인다. 본 효소에서 두 시스테인 잔기들은 이황화 결합을 형성하고 이것으로 인하여 산소 형태의 불활성화로부터 보호된다. 산소 존재에서 이러한 이황화 결합 및 안정성은 다른 테슬포비브리오 종들에서도 발견된다 (Vita et al., *Biochemistry*, 47: 957-64 (2008)). *M. 써모아세티카* PFOR는 또한 잘 특정되고 (Menon and Ragsdale, *Biochemistry* 36:8484-8494 (1997)) 독립영양체 생장 과정에서 피루베이트 합성 방향으로 높은 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다 (Furdui and Ragsdale, *J. Biol. Chem.* 275:28494-28499 (2000)). 또한, *E. coli*는 *M. 써모아세티카* PFOR와 51% 동일한 단백질을 암호화하는 미특정 전사해독틀 *ydbK*를 가진다. *E. coli*에서 피루베이트 산화환원효소 활성에 대한 증거가 기재되었다 (Blaschkowski et al., *Eur. J. Biochem.* 123:563-569 (1982)). PFOR는 또한 로도박터 카풀라타스 (Yakunin and Hallenbeck, *Biochimica et Biophysica Acta* 1409 (1998) 39-49 (1998)) 및 콜로보옴 테페둠 (Eisen et al., *PNAS* 99(14): 9509-14 (2002))을 포함한 다른 유기체에서도 기재된다. *H. 테르모빌루스* 유래의 *porEDABG*에 의해 암호화되는 5 서브유닛 PFOR는 *E. coli* 내로 클로닝되어 탈탄사 및 CO₂-동화 방향 모두에서 기능을 보였다 (Ikeda et al. 2006; Yamamoto et al., *Extremophiles* 14:79-85 (2010)). 도한 상동체는 *C. 카르복시디보란스* *P7*에 존재한다. 여러 추가적인 PFOR 효소들은 다음 리뷰에 기재된다 (Ragsdale, S.W., *Chem. Rev.* 103:2333-2346 (2003)). 마지막으로, 플라보독신 환원효소 (예를들면, 헬리코박터 필로리 또는 캄필로박터 제주니 유래의 *fqrB*) (St Maurice et al., *J. Bacteriol.* 189:4764-4773 (2007)) 또는 Rnf-유형의 단백질들 (Seedorf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:2128-2133 (2008); and Herrmann, *J. Bacteriol.* 190:784-791 (2008))은 PFOR에 의해 생성된 환원 폐레독신으로부터 NADH 또는 NADPH를 생성하는 수단을 제공한다. 이들 단백질은 하기된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
DesfDRAFT_0121	ZP_07331646.1	303245362	태슬포비브리오 프록토소보란스JJ
Por	CAA70873.1	1770208	태슬포비브리오 아프리카누스
por	YP_012236.1	46581428	태슬포비브리오 불가리스 str. 헬렌보로우
Dde_3237	ABB40031.1	78220682	태슬포비브리오 태슬포리칸스 G20
Ddes_0298	YP_002478891.1	220903579	태슬포비브리오 태슬포리칸스 아종 태슬포리칸스 str. ATCC 27774
Por	YP_428946.1	83588937	무렐라 셰모아세티카
YdbK	NP_415896.1	16129339	에스케리키아 콜라이
nifJ (CT1628)	NP_662511.1	21674446	클로로비움 태피듐
CJE1649	YP_179630.1	57238499	캄필로박터 제주니
nifJ	ADE85473.1	294476085	로도박터 캡슐라투스
porE	BAA95603.1	7768912	히드로개노박터 테르모필루스
porD	BAA95604.1	7768913	히드로개노박터 테르모필루스
porA	BAA95605.1	7768914	히드로개노박터 테르모필루스
porB	BAA95606.1	776891	히드로개노박터 테르모필루스
porG	BAA95607.1	7768916	히드로개노박터 테르모필루스
FqrB	YP_001482096.1	157414840	캄필로박터 제주니
HP1164	NP_207955.1	15645778	헬리코박터 필로리
RnfC	EDK33306.1	146346770	클로스트리디움 클루이베리
RnfD	EDK33307.1	146346771	클로스트리디움 클루이베리
RnfG	EDK33308.1	146346772	클로스트리디움 클루이베리
RnfE	EDK33309.1	146346773	클로스트리디움 클루이베리
RnfA	EDK33310.1	146346774	클로스트리디움 클루이베리
RnfB	EDK33311.1	146346775	클로스트리디움 클루이베리

[0557]

[0558] 피루베이트의 아세틸CoA로의 전환은 여러 다른 효소들 또는 이들의 조합에 의해 촉매될 수 있다. 예를들면, 피루베이트 탈수소효소는 NAD 분자의 NADH로의 동시적 환원으로 피루베이트를 아세틸CoA로 변환한다. 다중-효소 복합체는 일련의 부분 반응들을 촉매하여 피루베이트의 아실화 산화적 탈탄산반응을 진행시킬 수 있다. 본 효소는 3 서브단위들로 구성된다: 피루베이트 탈탄산효소 (E1), 디히드로리포아미드 아실전이효소 (E2) 및 디히드로리포아미드 탈수소효소 (E3). 본 효소는 자연에서 여러 유기체, 예를들면 *E. coli* 및 *S. 세레비지*에 존재한다. *E. coli* 효소에서, E1 성분에서의 특이적인 잔기들이 기질 특이성을 담당한다 (Bisswanger, H., J. Biol. Chem. 256:815-82 (1981); Bremer, J., Eur. J. Biochem. 8:535-540 (1969); Gong et al., J. Biol. Chem. 275:13645-13653 (2000)). 효소 조작 노력으로 혐기성 조건에서 *E. coli* PDH 효소 활성을 개선시켰다 (Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Zhou et al., Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). *E. coli* PDH와는 달리, *B. 썸틸리스* 복합체는 혐기성 조건에서 활성이고 생장을 위하여 요구된다 (Nakano et al., J. Bacteriol. 179:6749-6755 (1997)). 글리세롤에서 생장 과정 중 특정되는 클렙시엘라 뉴모니에 PDH 역시 혐기성 조건에서 활성이다 (5). 소 신장에서 얻어진 효소 복합체 결정 구조 (18) 및 아조토박터 비넬란디 유래 E2 촉매 도메인이 가용된다 (4). 본 전환을 촉매하는 또 다른 효소는 피루베이트 포르메이트 분해효소이다. 본 효소는 피루베이트 및 CoA의 아세틸CoA 및 포르메이트로의 전환을 촉매한다. 피루베이트 포르메이트 분해효소는 원핵 유기체에서 공통 효소이고 혐기성 산화환원 균형을 조절하는데 조력하도록 사용된다. 예시적 효소들은 *pfIB*에 의해 암호화되는 에스케리키아 콜라이 (Knappe and Sawers, FEMS.Microbiol Rev. 6:383-398 (1990)), 락토코커스 락티스 (Melchiorsen et al., Appl Microbiol Biotechnol 58:338-344 (2002)), 및 스트렙토코쿠스 무탄스 (Takahashi-Abbe et al., Oral.Microbiol Immunol. 18:293-297 (2003))에서 발견된다. *E. coli*는 *tdcE*에 의해 암호화되는 추가적인 피

루베이트 포르메이트 분해효소를 가지며, 이것은 피루베이트 또는 2-옥소부타노에이트를 각각 아세틸CoA 또는 프로피오닐-CoA로 전환시키는 것을 촉매한다 (Hesslinger et al., Mol. Microbiol 27:477-492 (1998)). *E. coli* 유래의 *pflB* 및 *tdcE* 모두 *pflA*에 의해 암호화되는 피루베이트 포르메이트 분해효소 활성화 효소의 존재를 필요로 한다. 또한, *E. coli*의 *yfiD*에 의해 암호화되는 짧은 단백질은 산소-절단 피루베이트 포르메이트 분해효소와 연관되고 활성을 부여한다 (Vey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:16137-16141 (2008). WO/2008/080124에 기재된 바와 같이 부탄을 생산을 위한 세포기질성 아세틸CoA 증가 수단으로 *E. coli* 유래의 *pflA* 및 *pflB*은 *S. 세레비지애*에서 발현되었다. 각각 *pfl* 및 *act*에 의해 암호화되는 추가적인 피루베이트 포르메이트 분해효소 및 활성화 효소 후보는 클로스트리디움 파스테우리아눔에서 발견된다 (Weidner et al., J Bacteriol. 178:2440-2444 (1996)).

[0559] 또한, 피루베이트를 아세틸CoA로 전환하기 위하여 상이한 효소들이 조합하여 사용될 수 있다. 예를들면, *S. 세레비지애*에서, 아세틸CoA는 세포기질에서 얻어지며, 먼저 피루베이트이 탈탄산되어 아세트알데히드를 형성하고; 이것은 아세트알데히드 탈수소효소에 의해 아세테이트로 산화되고 이어 아세틸CoA 합성효소에 의해 아세틸CoA로 활성화된다. 아세틸CoA 합성효소는, *E. coli* (Kumari et al., J. Bacteriol. 177:2878-2886 (1995)), 살모넬라 엔테리카 (Starai et al., Microbiology 151:3793-3801 (2005); Starai et al., J. Biol. Chem. 280:26200-26205 (2005)), 및 무렐라 씨모아세티카 (상기됨)를 포함한 여러 다른 유기체의 본래 효소이다. 달리, 아세테이트는 아세테이트 키나아제 및 인산아세틸기전이효소에 의해 활성되어 아세틸CoA를 형성한다. 아세테이트 키나아제는 ATP 분자를 이용하여 먼저 아세테이트를 아세틸포스페이트로 전환한다. 인산아세틸기전이효소에 의해 하나의 인산염을 방출시키고 아세틸포스페이트 및 CoA는 아세틸CoA로 전환된다. 아세테이트 키나아제 및 인산아세틸기전이효소 모두는 여러 클로스트리아 및 메타노사르키나 테르모필라에서 잘 연구된 효소들이다.

[0560] 피루베이트를 아세틸CoA로 전환하는 또 다른 방법은 피루베이트 산화효소를 통하는 것이다. 피루베이트 산화효소는 유비퀴온을 전자 수용체로 이용하여 피루베이트를 아세테이트로 전환한다. *E. coli*에서, 본 활성은 *poxB*에 의해 암호화된다. *PoxB*는 *S. 세레비지애* 및 자이모모나스 모빌리스의 피루베이트 탈탄산효소와 유사성을 가진다. 본 효소는 티아민 피로포스페이트 조인자 (Koland and Gennis, Biochemistry 21:4438-4442 (1982)); O'Brien et al., Biochemistry 16:3105-3109 (1977); O'Brien and Gennis, J. Biol. Chem. 255:3302-3307 (1980)) 및 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 (FAD) 조인자를 가진다. 이후 아세테이트는 전술된 바와 같이 아세틸CoA 합성효소 또는 아세테이트 키나아제 및 인산아세틸기전이효소에 의해 아세틸CoA로 전환된다. 이들 일부 효소들은 또한 아세틸CoA에서 피루베이트로의 역반응을 촉매하기도 한다.

[0561] NADH 또는 NADPH 형태의 환원 당량들을 이용하는 효소들에서, 환원 폐레독신으로부터 전자들을 전달함으로써 이들 환원성 전달체가 생성된다. 두 효소들, 폐레독신:NAD⁺ 산화환원효소 (EC 1.18.1.3) 및 폐레독신:NADP⁺ 산화환원효소 (FNR, EC 1.18.1.2)은 환원 폐레독신에서 NAD(P)⁺로의 가역적 전자 전달을 촉매한다. 폐레독신:NADP⁺ 산화환원효소 (FNR, EC 1.18.1.2)는 NADPH에서 저-전위 수용체들 예를들면 폐레독신 또는 플라보독신으로의 가역적 전자 전달을 촉진하는 FAD 조인자와 비-공유적으로 결합된다 (Blaschkowski et al., Eur. J. Biochem. 123:563-569 (1982); Fujii et al., 1977). HP1164 (*fqrB*)에 의해 암호화되는 헬리코박터 필로리 FNR는, 피루베이트:폐레독신 산화환원효소 (PFOR)의 활성과 연결되어 피루베이트-의존적으로 NADPH를 생산한다 (St et al. 2007). 유사한 효소가 캄필로박터 제주니에서 발견된다 (St et al. 2007). 폐레독신:NADP⁺ 산화환원효소 효소는 *E. coli* 유전체에서 *fpr*에 의해 암호화된다 (Bianchi et al. 1993). 폐레독신:NAD⁺ 산화환원효소는 환원 폐레독신을 활용하여 NAD⁺로부터 NADH를 생성한다. *E. Coli*를 포함한 여러 유기체들에서, 본 효소는 다기능성 2산소화효소 복합체의 일 성분이다. *E. Coli*의 폐레독신:NAD⁺ 산화환원효소는 *hcad*에 의해 암호화되고, 방향족 산 활용에 관여하는 3-페닐프로파이트 2산소화효소시스템의 일 요소이다 (Diaz et al. 1998). NADH:폐레독신 환원효소 활성은 히드로제노박터 테르모필루스 균주 TK-6의 세포추출물들에서 검출되었지만, 본 활성을 가진 유전자는 아직 밝혀지지 않았다 (Yoon et al. 2006). 마지막으로, 에너지-절약형 (energy-conserving) 막-연관 Rnf-유형의 단백질들 (Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:2128-2133 (2008); Herrmann et al., J. Bacteriol. 190:784-791 (2008))은 환원 폐레독신으로부터 NADH 또는 NADPH를 생성하는 수단을 제공한다. 추가적인 폐레독신:NAD(P)+ 산화환원효소들은 클로스트리디움 카르복시다보란스 P7에서 보고되었다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HP1164	NP_207955.1	15645778	헬리코박터 필로리
RPA3954	CAE29395.1	39650872	로도슈도모나스 팔루스트리스
fpr	BAH29712.1	225320633	히드로게노박ter 테르모필루스
yumC	NP_391091.2	255767736	바실러스 썹틸리스
CJE0663	AAW35824.1	57167045	캄필로박ter 제주니
fpr	P28861.4	399486	에스케리키아 콜라이
hcaD	AAC75595.1	1788892	에스케리키아 콜라이
LOC100282643	NP_001149023.1	226497434	제아 마이스
RnfC	EDK33306.1	146346770	클로스트리디움 클루이베리
RnfD	EDK33307.1	146346771	클로스트리디움 클루이베리
RnfG	EDK33308.1	146346772	클로스트리디움 클루이베리
RnfE	EDK33309.1	146346773	클로스트리디움 클루이베리
RnfA	EDK33310.1	146346774	클로스트리디움 클루이베리
RnfB	EDK33311.1	146346775	클로스트리디움 클루이베리
CcarbDRAFT_2639	ZP_05392639.1	255525707	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_2638	ZP_05392638.1	255525706	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_2636	ZP_05392636.1	255525704	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_5060	ZP_05395060.1	255528241	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_2450	ZP_05392450.1	255525514	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_1084	ZP_05391084.1	255524124	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7

[0562]

[0563] 폐레독신들은 낮은 환원 전위를 가지는 세포내 전자전달체로 기능하는 하나 이상의 철-황 클러스터들을 함유하는 작은 산성 단백질들이다. 환원 폐레독신들은 Fe-의존성 효소들 예를들면 폐레독신-NADP⁺ 산화환원효소, 피루베이트:폐레독신 산화환원효소 (PFOR) 및 2-옥소글루타레이트:폐레독신 산화환원효소 (OFOR)에 전자들을 준다. *H. 테르모빌루스* 유전자 fdx1 는 각각 OFOR 및 PFOR에 의한 2-옥소글루타레이트 및 피루베이트의 가역적 탄산화에 요구되는 [4Fe-4S]-유형의 폐레독신을 암호화한다 (Yamamoto et al., *Extremophiles* 14:79-85 (2010)). 솔풀로부스 솔파타리кус 2-옥소산:폐레독신 환원효소와 연결되는 폐레독신은 단량체성 디클러스터 [3Fe-4S][4Fe-4S] 유형의 폐레독신이다 (Park et al. 2006). 본 단백질과 연관된 유전자는 아직 완전히 서열이 규정되지 않았지만, N-말단 도메인은 *S. 아시도칼다리우스* 유래 zfx 폐레독신과 93%의 상동성을 공유한다. *E. coli* 유전체는 미지의 생리적 기능의 용해성 폐레독신 fdx 을 암호화한다. 일부 자료에 의하면 이러한 단백질은 철-황 클러스터 조립 작용을 한다고 표시된다 (Takahashi and Nakamura, 1999). 추가적인 폐레독신 단백질들은 헬리코박터 필로리 (Mukhopadhyay et al. 2003) 및 캄필로박ter 제주니 (van Vliet et al. 2001)에서 특정되었다. 클로스트리디움 파스테우리아눔 유래의 2Fe-2S 폐레독신이 클로닝되었고 *E. coli*에서 발현되었다 (Fujinaga and Meyer, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 192(3): (1993)). 초산생성균 예를들면 무렐라 씨모아세티카, 클로스트리디움 카르복시디보란스 P7 및 로도스피릴룸 루브룸 은 하기 표에 나열된 여러 폐레독신들을 암호화 하는 것으로 예측된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fdx1</i>	BAE02673.1	68163284	히드로제노박터 테르모필루스
M11214.1	AAA83524.1	144806	클로스트리디움 파스테우리아눔
<i>Zfx</i>	AAY79867.1	68566938	술풀로부스 <i>acidocalarius</i>
<i>Fdx</i>	AAC75578.1	1788874	에스캐리키아 콜라이
<i>hp_0277</i>	AAD07340.1	2313367	헬리코박터 월로리
<i>fdxA</i>	CAL34484.1	112359698	캄필로박터 세주니
<i>Moth_0061</i>	ABC18400.1	83571848	무엘라 씨모아세티카
<i>Moth_1200</i>	ABC19514.1	83572962	무엘라 씨모아세티카
<i>Moth_1888</i>	ABC20188.1	83573636	무엘라 씨모아세티카
<i>Moth_2112</i>	ABC20404.1	83573852	무엘라 씨모아세티카
<i>Moth_1037</i>	ABC19351.1	83572799	무엘라 씨모아세티카
CcarbDRAFT_4383	ZP_05394383.1	255527515	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_2958	ZP_05392958.1	255526034	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_2281	ZP_05392281.1	255525342	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_5296	ZP_05395295.1	255528511	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_1615	ZP_05391615.1	255524662	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_1304	ZP_05391304.1	255524347	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
cooF	AAG29808.1	11095245	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
fdxN	CAA35699.1	46143	로도박터 캡슐라투스
Rru_A2264	ABC23064.1	83576513	로도스파릴룸 루브룸
Rru_A1916	ABC22716.1	83576165	로도스파릴룸 루브룸
Rru_A2026	ABC22826.1	83576275	로도스파릴룸 루브룸
cooF	AAC45122.1	1498747	로도스파릴룸 루브룸
fdxN	AAA26460.1	152605	로도스파릴룸 루브룸

[0564]

Alvin_2884	ADC63789.1	288897953	알로크로마티움 비노슘 DSM 180
fdx	YP_002801146.1	226946073	아조토박터 비넬란디 DJ
CKL_3790	YP_001397146.1	153956381	클로스트리디움 클루이베리 DSM 555
fer1	NP_949965.1	39937689	로도슈도모나스 팔루스트리스 CGA009
fdx	CAA12251.1	3724172	타우에라 아로마티카
CHY_2405	YP_361202.1	78044690	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
fer	YP_359966.1	78045103	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
fer	AAC83945.1	1146198	바실러스 셱틸리스
fdx1	NP_249053.1	15595559	슈도모나스 아이루기노사 PA01
yfhL	AP_003148.1	89109368	에스캐리키아 콜라이 K-12

[0565]

[0566] 숙시닐-CoA 전이효소는 숙시닐-CoA의 숙시네이트로의 전환을 촉매하면서 CoA 잔기를 CoA 수용체 분자로 전달한다. 많은 전이효소들은 넓은 특이성을 가지며 다양한 CoA 수용체들 무엇보다도 아세테이트, 프로페

오네이트, 부티레이트, 2-메틸아세토아세테이트, 3-케토헥사노에이트, 3-케토펜타노에이트, 발레레이트, 크로토네이트, 3-메르캅토프로피오네이트, 프로피오네이트, 비닐아세테이트, 및 부티레이트를 활용한다.

[0567] 숙시네이트의 숙시닐-CoA로의 전환은 ATP 또는 GTP의 직접 소비가 필요하지 않은 전이효소에 의해 수행된다. 본 유형의 반응은 다수의 유기체에서 공통적이다. 숙시네이트의 숙시닐-CoA로의 전환은 숙시닐-CoA:아세틸CoA 전이효소에 의해서도 촉매된다. 클로스트리디움 클루이베리의 *cat1*의 유전자 산물은 숙시닐-CoA:아세틸CoA 전이효소 활성을 보이는 것으로 밝혀졌다 (Sohling and Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)). 또한, 본 활성은 트리코모나스 바기날리스 (van Grinsven et al. 2008) 및 트리파노소마 브루세이 (Riviere et al. 2004)에 존재한다. 아세토박터 아세티 유래의, *aarC*에 의해 암호화되는 숙시닐-CoA:아세테이트 CoA-전이효소는 변이체 TCA 회로에서 숙시닐-CoA 합성효소를 대체한다 (Mullins et al. 2008). 유사한 숙시닐-CoA 전이효소 활성들은 또한 트리코모나스 바기날리스 (van Grinsven et al. 2008), 트리파노소마 브루세이 (Riviere et al. 2004) 및 클로스트리디움 클루이베리 (Sohling and Gottschalk, 1996c)에서도 존재한다. 슈도모나스 푸티타에 있는 *pcaI* 및 *pcaJ*에 의해 암호화되는 베타-케토아디페이트:숙시닐-CoA 전이효소는 또 다른 후보이다 (Kaschabek et al. 2002). 상술된 단백질들이 하기된다.

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

[0568]

[0569] 숙시네이트를 숙시닐-CoA로 전환하면서 3-케토아실-CoA를 3-케토산으로 전환하는 추가적인 예시적 전이효소는 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 전이효소 (EC 2.8.3.5)이다. 예시적인 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 전이효소들은 헬리코박터 필로리 (Corthesy-Theulaz et al. 1997), 바실러스 섭틸리스, 및 호모 사파인스 (Fukao et al. 2000; Tanaka et al. 2002)에 존재한다. 전술된 단백질들이 하기된다.

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

[0570]

[0571] 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 전이효소에 의한 숙시네이트의 숙시닐-CoA로의 전환은 3-케토아실-CoA 예를들면 아세토아세틸CoA의 3-케토산 예를들면 아세토아세테이트로의 동시 전환이 필요하다. 3-케토산의 3-케토아실-CoA로의 회귀 전환은 아세토아세틸CoA:아세테이트:CoA 전이효소에 의해 촉매된다. 아세토아세틸CoA:아세테이트:CoA 전이효소는 아세토아세틸CoA 및 아세테이트를 아세토아세테이트 및 아세틸CoA, 또는 역으로 전환한다. 예시적 효소들은 유전자 산물 *E. coli* 유래의 *atoAD* (Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814-7818 (2007), C. 아

세토부틸리콤 유래의 *ctfAB* (Jojima et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1219-1224 (2008), 및 클로스트리디움 사카로페부틸아세토나콤 유래의 *ctfAB* (Kosaka et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 71:58-68 (2007)) 유전자 산물을 포함하고 아래에 제시된다.

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

[0572]

[0573] 또 다른 잠재적 CoA 수용체는 벤질숙시네이트이다. 숙시닐-CoA:(R)-벤질숙시네이트 CoA-전이효소는 유기체 예를 들면 타우에라 아로마티카에서 틀루엔에 대한 협기성 분해 경로 일부에서 작용한다 (Leutwein and Heider, *J. Bact.* 183(14) 4288-4295 (2001)). 상동체는 아조아르쿠스 종 T, 아로마토레움 아로마티쿰 EbN1, 및 계오박터 메탈리레두센스 GS-15에서 발견된다. 전술된 단백질들이 하기된다.

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

[0574]

[0575] 또한, *ygfH* 는 *E. coli* 에 있는 프로피오닐 CoA:숙시네이트 CoA 전이효소를 암호화한다 (Haller et al., *Biochemistry*, 39(16) 4622-4629). 가까운 상동체는 예를들면, 시트로박터 요운가이 ATCC 29220, 살모넬라 엔테리카 아종 아리조나이 세로발, 및 예르시니아 인테르메디아 ATCC 29909에서 발견된다. 전술된 단백질들이 하기된다.

<u>단백질</u>	<u>유전자은행 ID</u>	<u>GI 번호</u>	<u>유기체</u>
<i>ygfH</i>	NP_417395.1	16130821	에스케리키아 콜라이 str. K-12 substr. MG1655
<i>CIT292_04485</i>	ZP_03838384.1	227334728	시트로박터 요운가이 ATCC 29220
<i>SARI_04582</i>	YP_001573497.1	161506385	살모넬라 엔테리카 아종 아리조나이 세로발
<i>yinte0001_14430</i>	ZP_04635364.1	238791727	에르시니아 인테르메디아 ATCC 29909

[0576]

[0577] 시트레이트 분해효소 (EC 4.1.3.6)는 일련의 반응들을 촉매하여 시트레이트를 아세테이트 및 옥살로아세테이트로 절단한다. 본 효소는 협기성 조건에서 활성이고 3 서브단위들로 구성된다: 아실-운반체 단백질 (ACP, 감마), ACP 전이효소 (알파), 및 아실 분해효소 (베타). 효소 활성화는 아세틸CoA와 구조가 유사한 특이적 보결기, 2'-(5"-포스포리보실)-3'-데포스포-CoA의 공유결합 및 아세틸화를 이용한다. 아실화는 CitC, 시트레이트 분해효소 합성효소에 의해 촉매된다. 두 종의 추가적인 단백질들, CitG 및 CitX는 주효소를 활성 전효소로 전환하는데 사용된다 (Schneider et al., *Biochemistry* 39:9438-9450 (2000)). 야생형 *E. coli* 는 시트레이트 분해효소 활성을 가지지 않지만; 몰리브덴 조인자 합성이 결여된 변이체들은 활성 시트레이트 분해효소를 가진다 (Clark, *FEMS Microbiol. Lett.* 55:245-249 (1990)). *E. coli* 효소는 citEFD 에 의해 암호화되고 시트레이트 분해효소 합성효소는 citC로 암호화된다 (Nilekani and SivaRaman, *Biochemistry* 22:4657-4663 (1983)). 레우코노스토크 메센테로이데스 시트레이트 분해효소는 클로닝, 특정되었고, *E. coli* 에서 발현되었다 (Bekal et al., *J. Bacteriol.* 180:647-654 (1998)). 시트레이트 분해효소들은 또한 시트레이트를 탄소 및 에너지원으로 활용하는 장내세균, 예를들면 살모넬라 티퍼무리움 및 클렙시엘라 뉴모니에에서 확인되었다 (Bott, *Arch. Microbiol.* 167: 78-88 (1997); Bott and Dimroth, *Mol. Microbiol.* 14:347-356 (1994)). 전술된 단백질들은 아래에 나열된다.

<u>단백질</u>	<u>유전자은행 ID</u>	<u>GI 번호</u>	<u>유기체</u>
<i>citF</i>	AAC73716.1	1786832	에스케리키아 콜라이
<i>Cite</i>	AAC73717.2	87081764	에스케리키아 콜라이
<i>citD</i>	AAC73718.1	1786834	에스케리키아 콜라이
<i>citC</i>	AAC73719.2	87081765	에스케리키아 콜라이
<i>citG</i>	AAC73714.1	1786830	에스케리키아 콜라이
<i>citX</i>	AAC73715.1	1786831	에스케리키아 콜라이
<i>citF</i>	CAA71633.1	2842397	레우코노스토크 메센테로이데스
<i>Cite</i>	CAA71632.1	2842396	레우코노스토크 메센테로이데스
<i>citD</i>	CAA71635.1	2842395	레우코노스토크 메센테로이데스
<i>citC</i>	CAA71636.1	3413797	레우코노스토크 메센테로이데스
<i>citG</i>	CAA71634.1	2842398	레우코노스토크 메센테로이데스
<i>citX</i>	CAA71634.1	2842398	레우코노스토크 메센테로이데스
<i>citF</i>	NP_459613.1	16763998	살모넬라 티퍼무리움
<i>cite</i>	AAL19573.1	16419133	살모넬라 티퍼무리움
<i>citD</i>	NP_459064.1	16763449	살모넬라 티퍼무리움

[0578]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
citC	NP_459616.1	16764001	살모넬라 티페무리움
citG	NP_459611.1	16763996	살모넬라 티페무리움
citX	NP_459612.1	16763997	살모넬라 티페무리움
citF	CAA56217.1	565619	클렙시엘라 뉴모니에
cite	CAA56216.1	565618	클렙시엘라 뉴모니에
citD	CAA56215.1	565617	클렙시엘라 뉴모니에
citC	BAH6541.1	238774045	클렙시엘라 뉴모니에
citG	CAA56218.1	565620	클렙시엘라 뉴모니에
citX	AAL60463.1	18140907	클렙시엘라 뉴모니에

[0579]

[0580] 아세테이트 키나아제 (EC 2.7.2.1)는 아세테이트의 아세틸포스페이트로의 가역적 ATP-의존성 인산화반응을 촉매한다. 예시적 아세테이트 키나아제 효소들은 *E. coli*, 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 및 메타노사르키나 테르모필라를 포함한 많은 유기체에서 특정되었다 (Ingram-Smith et al., *J. Bacteriol.* 187:2386-2394 (2005); Fox and Roseman, *J. Biol. Chem.* 261:13487-13497 (1986); Winzer et al., *Microbiology* 143 (Pt 10):3279-3286 (1997)). 또한 아세테이트 키나아제 활성은 *E. coli purT*의 유전자 산물에서 입증되었다 (Marolewski et al., *Biochemistry* 33:2531-2537 (1994)). 일부 부티레이트 키나아제 효소들 (EC 2.7.2.7) 역시, 예를들면 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 유래의 *buk1* 및 *buk2*, 기질로서 아세테이트를 수용한다 (Hartmanis, M.G., *J. Biol. Chem.* 262:617-621 (1987)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
ackA	NP_416799.1	16130231	에스캐리키아 콜라이
Ack	AAB18301.1	1491790	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
Ack	AAA72042.1	349834	메타노사르키나 테르모필라
purT	AAC74919.1	1788155	에스캐리키아 콜라이
buk1	NP_349675	15896326	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
buk2	Q97II1	20137415	클로스트리디움 아세토부틸리쿰

[0581]

[0582] 아세틸포스페이트로부터 아세틸CoA 형성은 인산아세틸기전이효소 (EC 2.3.1.8)에 의해 촉매된다. *E. coli* 유래의 *pta* 유전자는 아세틸CoA를 아세틸포스페이트로 가역적 전환시키는 효소를 암호화한다 (Suzuki, T., *Biochim. Biophys. Acta* 191:559-569 (1969)). 추가적인 아세틸전이효소들은 바실러스 섭틸리스 (Rado and Hoch, *Biochim. Biophys. Acta* 321:114-125 (1973), 클로스트리디움 클루이베리 (Stadtman, E., *Methods Enzymol.* 1:5896-599 (1955), 및 테르모토가 마리티마 (Bock et al., *J. Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999))에서 특정되었다. 본 반응 역시 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 유래의 *ptb* 유전자 산물을 포함한 일부 포스포트란스부틸라제 효소들 (EC 2.3.1.19)에 의해 촉매된다 (Wiesenborn et al., *App. Environ. Microbiol.* 55:317-322 (1989); Walter et al., 유전자 134:107-111 (1993)). 추가적인 *ptb* 유전자들은 부티레이트-생산 박테리움 L2-50 (Louis et al., *J. Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004) 및 바실러스 메가테리움 (Vazquez et al., *Curr. Microbiol.* 42:345-349 (2001)에서 발견된다.

<u>단백질</u>	<u>유전자은행 ID</u>	<u>GI 번호</u>	<u>유기체</u>
Pta	NP_416800.1	71152910	에스케리키아 콜라이
Pta	P39646	730415	바실러스 썬틸리스
Pta	A5N801	146346896	클로스트리디움 클루이베리
Pta	Q9X0L4	6685776	테르모토가 마리티마
Ptb	NP_349676	34540484	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
Ptb	AAR19757.1	38425288	부티레이트-생산 박테리움 L2-50
Ptb	CAC07932.1	10046659	바실러스 매가테리움

[0583]

[0584] 아세테이트의 아세틸CoA로의 아실화는 아세틸CoA 합성효소 활성을 가지는 효소들에 의해 촉매된다. 본 반응을 촉매하는 두 효소들은 AMP-형성 아세틸CoA 합성효소 (EC 6.2.1.1) 및 ADP-형성 아세틸CoA 합성효소 (EC 6.2.1.13)이다. AMP-형성 아세틸CoA 합성효소 (ACS)는 아세테이트를 아세틸CoA로 활성화하는 주요 효소이다. 예시적 ACS 효소들은 *E. coli* (Brown et al., *J. Gen. Microbiol.* 102:327-336 (1977)), 랄스토니아 유트로파 (Priefert and Steinbuchel, *J. Bacteriol.* 174:6590-6599 (1992)), 메타노테르모박터 테르마우토트로피쿠스 (Ingram-Smith and Smith, *Archaea* 2:95-107 (2007)), 살모넬라 엔테리카 (Gulick et al., *Biochemistry* 42:2866-2873 (2003)) 및 사카로마이세스 세레비지애 (Jogl and Tong, *Biochemistry* 43:1425-1431 (2004))에서 발견된다. ADP-형성 아세틸CoA 합성효소들은 일반적으로 광폭의 기질 범위를 가지는 가역적 효소들이다 (Musfeldt and Schonheit, *J. Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). ADP-형성 아세틸CoA 합성효소들의 두 동질효소들은 아르카이오클로부스 풀기두스 유전체에서 AF1211 및 AF1983로 암호화된다 (Musfeldt and Schonheit, *supra* (2002)). 할로알콜라 마리스몰투이 유래의 효소(숙시닐-CoA 합성효소로 주석됨) 역시 아세테이트를 기질로 수용하고 효소의 가역성이 입증되었다 (Brasen and Schonheit, *Arch. Microbiol.* 182:277-287 (2004)). 초고온성 고세균 퍼로박콜룸 아이로필룸 유래의 PAE3250 에 의해 암호화되는 ACD는 모든 특정된 ACD 중에서 가장 넓은 기질 범위를 보였고, 아세테이트, 이소부티릴-CoA (선흐 기질) 및 페닐아세틸CoA와 반응하였다 (Brasen and Schonheit, *supra* (2004)). 방향성 진화 또는 조작이 이루어져 본 효소가 숙주 유기체의 생리적 온도에서 작용하도록 변형될 수 있다. *A. 풀기두스*, *H. 마리스몰투이* 및 *P. 아이로필룸* 유래의 효소들 모두는 클로닝되고, 기능적으로 발현되고 *E. coli* 에서 특정되었다 (Brasen and Schonheit, *supra* (2004); Musfeldt and Schonheit, *supra* (2002)). 추가적인 후보들은 *E. coli*의 succCD 에 의해 암호화되는 숙시닐-CoA 합성효소 (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)) 및 슈도모나스 푸티타 유래의 아실-CoA 리가제 (Fernandez-Valverde et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993))를 포함한다. 전술된 단백질들이 아래 나열된다.

<u>단백질</u>	<u>유전자은행 ID</u>	<u>GI 번호</u>	<u>유기체</u>
<i>acs</i>	AAC77039.1	1790505	에스케리카이 콜라이
<i>acoE</i>	AAA21945.1	141890	랄스토나야 유트로파
<i>acsI</i>	ABC87079.1	86169671	메타노테르모박터 테르마우토트로피쿠스
<i>acsI</i>	AAL23099.1	16422835	살모넬라 엔테리카
<i>ACS1</i>	Q01574.2	257050994	사카로마이세스 세레비지아
<i>AF1211</i>	NP_070039.1	11498810	아르카이오클로부스 풀기두스
<i>AF1983</i>	NP_070807.1	11499565	아르카이오클로부스 풀기두스
<i>scs</i>	YP_135572.1	55377722	할로알콜라 마리스몰루이
<i>PAE3250</i>	NP_560604.1	18313937	파로박클립 아이로필립 str. IM2
<i>sucC</i>	NP_415256.1	16128703	에스케리카이 콜라이
<i>sucD</i>	AAC73823.1	1786949	에스케리카이 콜라이
<i>paaF</i>	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸터타

[0585]

[0586] 아세틸CoA의 말로닐-CoA로의 전환은 아세틸CoA 카르복실화효소 효소에 의해 수행된다. 이들 효소는 다중 서브단위들을 가진다. 이러한 효소들 중 세 종은 하기한다.

유전자	유기체	등재번호	GI 번호
accA	에스케리키아 콜라이 K-12	AAC73296.1	1786382
accB	에스케리키아 콜라이 K-12	AAC76287.1	1789653
accC	에스케리키아 콜라이 K-12	AAC76288.1	1789654
accD	에스케리키아 콜라이 K-12	AAC75376.1	1788655
accA	살모넬라 엔테리카	CAD08690.1	16501513
accB	살모넬라 엔테리카	CAD07894.1	16504441
accC	살모넬라 엔테리카	CAD07895.1	16504442
accD	살모넬라 엔테리카	CAD07598.1	16503590
YMR207C	사카로마이세스 세레비지애	NP_013934.1	6323863
YNR016C	사카로마이세스 세레비지애	NP_014413.1	6324343
YGR037C	사카로마이세스 세레비지애	NP_011551.1	6321474
YKL182W	사카로마이세스 세레비지애	NP_012739.1	6322666
YPL231W	사카로마이세스 세레비지애	NP_015093.1	6325025

[0587]

[0588] 환원적 발효 생성물 예를들면 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔을 합성하는 미생물 세포들의 기질 당 C-mol 생성 수율은 탄수화물 공급원료에서 부족한 환원 당량들에 의해 제한된다. 환원 당량들, 또는 전자들은 합성가스 성분들 예를들면 각각 일산화탄소 탈수소효소 (CODH) 및 수소화효소를 이용한 CO 및 H₂로부터 추출될 수 있다. 이후 환원 당량들은 수용체들 예를들면 산화형 페레독신, 산화형 퀴논, 산화형 시토크롬, NAD(P)+, 물, 또는 과산화수소를 통하여 환원형 페레독신, 환원형 퀴논, 환원형 시토크롬, NAD(P)H, H₂, 또는 물을 각각 형성한다. 환원 페레독신 및 NAD(P)H는 다양한 Wood-Ljungdahl 경로 및 환원적 TCA 회로 효소들에서 산화환원 (redox) 운반체들 역할을 하므로 특히 유용하다.

[0589]

합성가스 성분들로부터 레독스 (redox)를 추출하기 위하여 사용되는 효소들 및 사용되는 유전자들이 이하 기재된다. CODH는 전자들 소비 또는 획득으로 CO 및 CO₂의 상호 전환을 촉매하는 가역적 효소이다. ACS/CODH 복합체에서 CODH의 자연적인 생리 역할은, 아세틸CoA 생성효소에 의해 아세틸CoA로 포함시키기 위하여 CO₂를 CO로 전환시키는 것이다. 그럼에도 불구하고, 이를 효소의 가역적 특성으로 인하여 이러한 CODH 효소들은 CO로부터 환원 당량들을 추출하는데 적정하다. ACS 부재에서 이러한 CODH 효소들을 발현시키면 자연적인 생리 역할의 반대 방향에서 작용될 수 있다 (즉, CO 산화).

[0590]

M. 씨모아세티카, *C. 히드로케노포르만스*, *C. 카르복시디보란스 P7*, 및 여러 기타 유기체에서, 추가적인 CODH 암호화 유전자들은 ACS/CODH 오페론 외부에 위치한다. 이를 효소는 일산화탄소의 이산화탄소로의 전환으로부터 전자들 (또는 환원 당량들)을 추출하는 수단을 제공한다. *M. 씨모아세티카* 유전자 (유전자은행 등재 Number: YP_430813)는 자체적으로 오페론에서 발현되며 "꽝-퐁" 반응에서 페레독신과 같은 외부 조절자에 CO로부터 전자

들을 전달하는 것으로 보인다. 환원형 조절자는 이후 다른 환원형 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NAD(P)H) 운반체 또는 페레독신-의존성 세포 공정들과 결합된다 (Ragsdale, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 129-136 (2008)). *C. 히드로개노포르만스 CODH-II* 및 CooF, 인접 단백질을 암호화하는 유전자들은 클로닝되고, 서열이 규정되었다 (Gonzalez and Robb, *FEMS Microbiol Lett.* 191:243-247 (2000)). CODH-II의 세포질 성분들은 동화작용을 암시하는 NADPH 형성을 촉매하는 것으로 보였지만 형성된 복합체는 막-결합되었다 (Svetlichnyi et al., *J Bacteriol.* 183:5134-5144 (2001)). CODH-II 결정 구조 역시 입수될 수 있다 (Dobbek et al., *Science* 293:1281-1285 (2001)). 유사한 ACS-무 CODH 효소들은 *게오박터 메탈리레두센스 GS-15*, *클로로비움 파이오박테로이데스 DSM 266*, *클로스트리디움 셀룰롤리티쿰 H10*, *테슬포비브리오 테슬푸리칸스 아종 테슬푸리칸스 str. ATCC 27774*, *펠로박터 카르비놀리쿠스 DSM 2380*, 및 *캄필로박터 쿠르부스 525.92*를 포함한 다양한 유기체에서 발견될 수 있다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
CODH (후보)	YP_430813	83590804	무렐라 썬모아세티카
CODH-II (CooS-II)	YP_358957	78044574	카르복시도테르무스 히드로개노포르만스
CooF	YP_358958	78045112	카르복시도테르무스 히드로개노포르만스
CODH (후보)	ZP_05390164.1	255523193	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_0341	ZP_05390341.1	255523371	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_1756	ZP_05391756.1	255524806	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CcarbDRAFT_2944	ZP_05392944.1	255526020	클로스트리디움 카르복시디보란스 P7
CODH	YP_384856.1	78223109	게오박터 메탈리레두센스 GS-15
Cpha266_0148 (시토크롬 c)	YP_910642.1	119355998	클로로비움 파이오박테로이데스 DSM 266
Cpha266_0149 (CODH)	YP_910643.1	119355999	클로로비움 파이오박테로이데스 DSM 266
Ccel_0438	YP_002504800.1	220927891	클로스트리디움 셀룰롤리티쿰 H10
Ddes_0382 (CODH)	YP_002478973.1	220903661	테슬포비브리오 테슬푸리칸스 아종 테슬푸리칸스 str. ATCC 27774
Ddes_0381 (CooC)	YP_002478972.1	220903660	테슬포비브리오 테슬푸리칸스 아종 테슬푸리칸스 str. ATCC 27774
Pcar_0057 (CODH)	YP_355490.1	7791767	펠로박터 카르비놀리쿠스 DSM 2380
Pcar_0058 (CooC)	YP_355491.1	7791766	펠로박터 카르비놀리쿠스 DSM 2380

[0591]

Pcar_0058 (HypA)	YP_355492.1	7791765	펠로박터 카르비놀리쿠스 DSM 2380
CooS (CODH)	YP_001407343.1	154175407	캄필로박터 쿠르부스 525.92

[0592]

[0593] 일부 경우에서, 수소화효소 암호화 유전자들은 CODH에 인접하게 위치한다. 로도스퍼릴룸 루브룸에서, 암호화된 CODH/수소화효소 단백질들은 막-결합 효소 복합체를 형성하고 이는 CO 및 H₂O로부터 CO₂ 및 H₂로 전환되면서 양성자 구배 형태로 에너지가 생성되는 부위로 알려졌다 (Fox et al., *J Bacteriol.* 178:6200-6208 (1996)). *C. 히드로개노포르만스*의 CODH-I 및 인접 유전자들은 *R. 루브룸* CODH/수소화효소 유전자 클러스터와의 유사성에 기반하여 유사한 기능적 역할을 촉매하는 것으로 제안되었다 (Wu et al., *PLoS Genet.* 1:e65 (2005)). *C. 히드*

로제노포르만스 CODH-I는 또한 전극과 연결될 때 상당한 CO 산화 및 CO₂ 환원 활성들을 보였다 (Parkin et al., *J Am. Chem. Soc.* 129:10328-10329 (2007)). 예시적 CODH 및 수소화효소 유전자들의 단백질 서열들은 다음 유전자은행 등재 번호들로 확인된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
CODH-I (CooS-I)	YP_360644	780434/8	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
CooF	YP_360645	78044791	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
HypA	YP_360646	78044340	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
CooH	YP_360647	78043871	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
CooU	YP_360648	78044023	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
CooX	YP_360649	78043124	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
CooL	YP_360650	78043938	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
CooK	YP_360651	78044700	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
CooM	YP_360652	78043942	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
CooC	YP_360654.1	78043296	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
CooA-1	YP_360655.1	78044021	카르복시도테르무스 히드로제노포르만스
CooL	AAC45118	1515468	로도스파릴룸 루브룸
CooX	AAC45119	1515469	로도스파릴룸 루브룸
CooU	AAC45120	1515470	로도스파릴룸 루브룸
CooH	AAC45121	1498746	로도스파릴룸 루브룸

[0594]

CooF	AAC45122	1498747	로도스파릴룸 루브룸
CODH (CooS)	AAC45123	1498748	로도스파릴룸 루브룸
CooC	AAC45124	1498749	로도스파릴룸 루브룸
CooT	AAC45125	1498750	로도스파릴룸 루브룸
CooJ	AAC45126	1498751	로도스파릴룸 루브룸

[0595]

[0596] 4 수소화효소들까지를 암호화하는 다중 유전자들은 *E. coli* 및 기타 장내세균에 본래 존재한다 (Sawers, G., *Antonie Van Leeuwenhoek* 66:57-88 (1994); Sawers et al., *J Bacteriol.* 164:1324-1331 (1985); Sawers and Boxer, *Eur.J Biochem.* 156:265-275 (1986); Sawers et al., *J Bacteriol.* 168:398-404 (1986)). 효소 활성 다중성으로, *E. coli* 또는 기타 숙주 유기체는 충분한 수소화효소 활성을 제공하여 진입하는 분자 수소를 절단 시켜 해당 수용체를 환원시킨다. *E. coli*는 각각 *hyaABCDEF* 및 *hybOABCDEFG* 유전자 클러스터들에 의해 암호화되는 두 종의 흡수 수소화효소들, Hyd-1 및 Hyd-2을 가진다 (Lukey et al., How *E. coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions, *J Biol Chem* published online Nov 16, 2009). Hyd-1은 내산소성이고, 비가역적으로 *hyaC* 시토크롬을 통하여 퀴논 환원과 연결된다. Hyd-2는 O₂ 민감성이고, 가역적으로, 전자들을 주변세포질 폐레독신 *hybA*으로 전달하고, 이것은 다시 *hybB* 내재 막단백질을 통하여 퀴논을 환원시킨다. 환원된 퀴논은 환원적 대체 TCA 회로에서 푸마레이트 환원효소를 위한 전자들 공급원으로 역할한다. 환원 폐레독신들은 효소들 예를들면 NAD(P)H: 폐레독신 산화환원효소들에 의해 사용되어 NADPH 또는 NADH를 생성시킨다. 이들은 달리 피루베이트 폐레독신 산화환원효소, AKG 폐레독신 산화환원효소, 및 5,10-메틸렌-H4폴레이트

환원효소와 같은 반응들을 위한 전자 주계로 사용될 수 있다.

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

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

[0597]

[0598] *E. coli* 의 수소-분해효소시스템들은 수소화효소 3, 폐레독신을 수용체로 이용하는 막-결합 효소 복합체, 및 역시 폐레독신 수용체를 이용하는 수소화효소 4를 포함한다. 수소화효소 3 및 4는 각각 *hyc* 및 *hyf* 유전자 클러스터들에 의해 암호화된다. 수소화효소 3은 가역적 효소로 밝혀졌다 (Maeda et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 76(5):1035-42 (2007)). *E. coli* 에서 수소화효소 활성 역시 *hyp* 유전자들 발현에 의존되고, 이들의 상응 단백질들은 수소화효소 복합체 조립에 관여된다 (Jacobi et al., *Arch.Microbiol* 158:444-451 (1992); Rangarajan et al., *J. Bacteriol.* 190:1447-1458 (2008)).

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

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HyfA	NP_416976	90111444	[에스캐리키아 콜라이]
HyfB	NP_416977	16130407	[에스캐리키아 콜라이]
HyfC	NP_416978	90111445	[에스캐리키아 콜라이]
HyfD	NP_416979	16130409	[에스캐리키아 콜라이]
HyfE	NP_416980	16130410	[에스캐리키아 콜라이]
HyfF	NP_416981	16130411	[에스캐리키아 콜라이]
HyfG	NP_416982	16130412	[에스캐리키아 콜라이]
HyfH	NP_416983	16130413	[에스캐리키아 콜라이]
HyfI	NP_416984	16130414	[에스캐리키아 콜라이]

HyfJ	NP_416985	90111446	[에스캐리키아 콜라이]
HyfR	NP_416986	90111447	[에스캐리키아 콜라이]

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
HypA	NP_417206	16130633	[에스캐리키아 콜라이]
HypB	NP_417207	16130634	[에스캐리키아 콜라이]
HypC	NP_417208	16130635	[에스캐리키아 콜라이]
HypD	NP_417209	16130636	[에스캐리키아 콜라이]
HypE	NP_417210	226524740	[에스캐리키아 콜라이]
HypF	NP_417192	16130619	[에스캐리키아 콜라이]

[0599]

[0600]

[0601] *M. 씨모아세티카* 수소화효소들은 충분한 내인성 수소화효소 활성이 부족한 숙주에 대하여 적합하다. *M. 씨모아세티카*는 CO₂를 유일한 탄소원으로 성장하며 이는 환원 당량들이 H₂로부터 추출되어 Wood-Ljungdahl 경로를 통하여 아세틸CoA 합성이 가능하다는 것을 의미한다 (Drake, H. L., *J. Bacteriol.* 150:702-709 (1982); Drake and Daniel, *Res. Microbiol.* 155:869-883 (2004); Kellum and Drake, *J. Bacteriol.* 160:466-469 (1984)) (참고 도 22). *M. 씨모아세티카*는 *E. coli* 유래의 여러 *hyp*, *hyc*, 및 *hyf* 유전자들과 상동성을 가진다. 이들 유전자에 의해 암호화되는 단백질 서열들은 다음 유전자은행 등재 번호들로 확인된다.

[0602] 유전자들인 *E. coli* hyp 유전자들과 상동성인 *M. 썬모아세티카*의 단백질들이 아래 나열된다.

<u>단백질</u>	<u>유전자은행 ID</u>	<u>GI 번호</u>	<u>유기체</u>
Moth_2175	YP_431007	83590998	무엘라 썬모아세티카
Moth_2176	YP_431008	83590999	무엘라 썬모아세티카
Moth_2177	YP_431009	83591000	무엘라 썬모아세티카
Moth_2178	YP_431010	83591001	무엘라 썬모아세티카
Moth_2179	YP_431011	83591002	무엘라 썬모아세티카
Moth_2180	YP_431012	83591003	무엘라 썬모아세티카
Moth_2181	YP_431013	83591004	무엘라 썬모아세티카

[0603]

[0604] *E. coli* 수소화효소 3 및/또는 4 단백질들과 상동성인 *M. 썬모아세티카* 단백질들이 아래 표에 나열된다.

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

[0605]

[0606] 또한, 수소화효소 기능성을 암호화하는 여러 유전자 클러스터들이 *M. 썬모아세티카*에 존재하고 이들의 해당 단백질 서열들이 아래에 제공된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
Moth_0439	YP_429313	83589304	무엘라 씨묘아세티카
Moth_0440	YP_429314	83589305	무엘라 씨묘아세티카
Moth_0441	YP_429315	83589306	무엘라 씨묘아세티카
Moth_0442	YP_429316	83589307	무엘라 씨묘아세티카
Moth_0809	YP_429670	83589661	무엘라 씨묘아세티카
Moth_0810	YP_429671	83589662	무엘라 씨묘아세티카
Moth_0811	YP_429672	83589663	무엘라 씨묘아세티카
Moth_0812	YP_429673	83589664	무엘라 씨묘아세티카
Moth_0814	YP_429674	83589665	무엘라 씨묘아세티카
Moth_0815	YP_429675	83589666	무엘라 씨묘아세티카
Moth_0816	YP_429676	83589667	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1193	YP_430050	83590041	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1194	YP_430051	83590042	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1195	YP_430052	83590043	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1196	YP_430053	83590044	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1717	YP_430562	83590553	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1718	YP_430563	83590554	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1719	YP_430564	83590555	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1883	YP_430726	83590717	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1884	YP_430727	83590718	무엘라 씨묘아세티카

[0607]

Moth_1885	YP_430728	83590719	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1886	YP_430729	83590720	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1887	YP_430730	83590721	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1888	YP_430731	83590722	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1452	YP_430305	83590296	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1453	YP_430306	83590297	무엘라 씨묘아세티카
Moth_1454	YP_430307	83590298	무엘라 씨묘아세티카

[0608]

[0609] 랄스토니아 유트로파 H16은 마지막 전자 수용체로서 산소를 가지고 수소를 에너지원으로 이용한다. 이것의 막-결합 흡수 [NiFe]-수소화효소는 "'O₂-내성" 수소화효소이고 (Cracknell, et al. Proc Nat Acad Sci, 106(49) 20681-20686 (2009)) 이것은 주변세포질-지향적이고 b-유형의 시토크롬을 통하여 호흡사슬과 연결된다 (Schink and Schlegel, *Biochim. Biophys. Acta*, 567, 315-324 (1979); Bernhard et al., *Eur. J. Biochem.* 248, 179-186 (1997)). 또한 *R.* 유트로파 역시 *Hox* 오페론에 의해 암호화되는 O₂-내성의 수소화효소를 가지며 이것은 세포질 성분으로 수소를 소비하면서 직접 NAD⁺를 환원시킨다 (Schneider and Schlegel, *Biochim. Biophys. Acta* 452, 66-80 (1976); Burgdorf, *J. Bact.* 187(9) 3122-3132(2005)). 용해성 수소화효소들은 여러 기타 유기체 예를들면 게오박터 솔푸르래두센스 (Coppi, *Microbiology* 151, 1239-1254 (2005)), 시네코시스터스 str. PCC 6803 (Germer, *J. Biol. Chem.*, 284(52), 36462-36472 (2009)), 및 티오캅사 로세오페르시키나 (Rakhely, *Appl. Environ. Microbiol.* 70(2) 722-728 (2004))에도 존재한다. 시네코시스터스 효소는 수소로부터 NADPH를 생성할 수 있다. 시네코시스터스 str. PCC 6803 유래의 *Hox* 오페론 및 노스토크 종 PCC 7120 유래의 *Hyp* 오페론에 의해 암호화되는 부 유전자들의 과다발현으로 *Hox* 유전자들 단독 발현과 비교하여 수소화효소 활성이 증가된다 (Germer, *J. Biol. Chem.* 284(52), 36462-36472 (2009)).

<u>단백질</u>	<u>유전자은행 ID</u>	<u>GI 번호</u>	<u>유기체</u>
HoxF	NP_942727.1	38637753	랄스토나야 유트로파 <i>H16</i>
HoxU	NP_942728.1	38637754	랄스토나야 유트로파 <i>H16</i>
HoxY	NP_942729.1	38637755	랄스토나야 유트로파 <i>H16</i>
HoxH	NP_942730.1	38637756	랄스토나야 유트로파 <i>H16</i>
HoxW	NP_942731.1	38637757	랄스토나야 유트로파 <i>H16</i>
HoxI	NP_942732.1	38637758	랄스토나야 유트로파 <i>H16</i>
HoxE	NP_953767.1	39997816	개오박테리아 솔포르라두센스

[0610]

HoxF	NP_953766.1	39997815	제오박터 술푸르레드센스
HoxU	NP_953765.1	39997814	제오박터 술푸르레드센스
HoxY	NP_953764.1	39997813	제오박터 술푸르레드센스
HoxH	NP_953763.1	39997812	제오박터 술푸르레드센스
GSU2717	NP_953762.1	39997811	제오박터 술푸르레드센스
HoxE	NP_441418.1	16330690	시네코시즈티즈 str. PCC 6803
HoxF	NP_441417.1	16330689	시네코시즈티즈 str. PCC 6803
Unknown function	NP_441416.1	16330688	시네코시즈티즈 str. PCC 6803
HoxU	NP_441415.1	16330687	시네코시즈티즈 str. PCC 6803
HoxY	NP_441414.1	16330686	시네코시즈티즈 str. PCC 6803
미 확인 가능	NP_441413.1	16330685	시네코시즈티즈 str. PCC 6803
미 확인 가능	NP_441412.1	16330684	시네코시즈티즈 str. PCC 6803
HoxH	NP_441411.1	16330683	시네코시즈티즈 str. PCC 6803

[0611]

HypF	NP_484737.1	17228189	노스토크종 PCC 7120
HypC	NP_484738.1	17228190	노스토크종 PCC 7120
HypD	NP_484739.1	17228191	노스토크종 PCC 7120
미확인 기능	NP_484740.1	17228192	노스토크종 PCC 7120
HypE	NP_484741.1	17228193	노스토크종 PCC 7120
HypA	NP_484742.1	17228194	노스토크종 PCC 7120
HypB	NP_484743.1	17228195	노스토크종 PCC 7120

Hox1E	AAP50519.1	37787351	터오캡사 로세오페르시기나
Hox1F	AAP50520.1	37787352	터오캡사 로세오페르시기나
Hox1U	AAP50521.1	37787353	터오캡사 로세오페르시기나
Hox1Y	AAP50522.1	37787354	터오캡사 로세오페르시기나
Hox1H	AAP50523.1	37787355	터오캡사 로세오페르시기나

[0612]

[0613] TCA 회로 중간체, 옥살로아세테이트 또는 말레이트를 형성하기 위하여 피루베이트 또는 포스포에놀피루베이트에 이산화탄소를 고정시키기 위하여 사용되는 여러 효소들 및 상응 유전자들이 하기된다.

[0614] 포스포에놀피루베이트의 옥살로아세테이트로의 탄산화는 포스포에놀피루베이트 카르복실화효소에 의해 촉매된다. 예시적 PEP 카르복실화효소들은 *E. coli*에서 *ppc* (Kai et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 414:170-179 (2003)), 메틸로박테리움 엑토르캔스 *AM1*의 *ppcA* (Arps et al., *J. Bacteriol.* 175:3776-3783 (1993)), 및 코리네박테리움 글루타미쿰의 *ppc* (Eikmanns et al., *Mol. Gen. Genet.* 218:330-339 (1989))에 의해 암호화된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>Ppc</i>	NP_418391	16131794	에스제리키야 쿨라이
<i>ppcA</i>	AAB58883	28572162	메틸로박테리움 엑토르캔스
<i>Ppc</i>	ABB53270	80973080	코리네박테리움 글루타미쿰

[0615]

[0616] 포스포에놀피루베이트를 옥살로아세테이트로 전환시키는 대안적 효소는 PEP 카르복시키나아제이고, 이것은 동시에 ATP를 형성하고 PEP를 탄산화한다. 대부분의 유기체에서 PEP 카르복시키나아제는 글루코스 생성 기능을 가지고 하나의 ATP 소비로 옥살로아세테이트를 PEP로 전환한다. *S. cerevisiae*는 이러한 유기체의 하나이며 본래의 PEP 카르복시키나아제, *PCK1*는 글루코스 생성 역할을 담당한다 (Valdes-Havia et al., *FEBS Lett.* 258:313-316 (1989)). *E. coli*는 이러한 유기체 중 하나이며, 옥살로아세테이트를 생성하는 PEP 카르복시키나아제 역할은 아마도 PEP 카르복시키나아제의 중탄산염에 대한 더 높은 K_m 으로 인하여 PEP 카르복실화효소와 비교하여 작다고 보인다 (Kim et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1238-1241 (2004)). 그럼에도 불구하고, PEP 유래의 본래 *E. coli* PEP 카르복시키나아제의 옥살로아세테이트에 대한 활성은 최근 *E. coli* K-12 *ppc* 변이체들에서 확인되었다 (Kwon et al., *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:1448-1452 (2006)). 이들 균주는 성장 결함을 보이지 않았고 높은 NaHCO_3 농도에서 속시네이트 생산이 증가되었다. *E. coli*의 변이 균주들은 *Pck*를 주요 CO_2 -고정 효소로 채

택하고 이후 적응 진화된다 (Zhang et al. 2009). 일부 유기체, 특히 반추위 세균에서, PEP 카르복시키나아제는 PEP로부터 옥살로아세테이트를 생성하고 ATP 발생에 있어서 아주 효율적이다. *E. coli*에서 클로닝된 PEP 카르복시키나아제 유전자들의 예시로는 만하이미아 숙시니시프로두센스 (Lee et al., *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7:95-99 (2002)), 안에어로비오스피릴룸 숙시니시프로두센스 (Laivenieks et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2273-2280 (1997)), 및 액티노바실러스 숙시노게네스 (Kim et al. *supra*) 유래의 것들을 포함한다. encoded by 하이모필루스 인플루엔자에 의해 암호화되는 PEP 카르복시키나아제 효소는 PEP로부터 옥살로아세테이트를 형성하는 것에 효과적이다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
PCK1	NP_013023	6322950	사카로마이세스 세레비자에
pck	NP_417862.1	16131280	에스케리카야 퀄라이
pckA	YP_089485.1	52426348	만하이미아 숙시니시프로두센스
pckA	O09460.1	3122621	안에어로비오스피릴룸 숙시니시프로두센스
pckA	Q6W6X5	75440571	액티노바실러스 숙시노게네스
pckA	P43923.1	1172573	하이모필루스 인플루엔자

[0617]

[0618] 피루베이트 카르복실화효소 (EC 6.4.1.1)는 하나의 ATP를 소비하면서 피루베이트를 옥살로아세테이트로 직접 전환한다. 피루베이트 카르복실화효소들은 사카로마이세스 세레비자에의 PYC1 (Walker et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:1210-1217 (1991) 및 PYC2 (Walker et al., *supra*), 및 미코박테리움 스메그마티스의 pyc (Mukhopadhyay and Purwantini, *Biochim. Biophys. Acta* 1475:191-206 (2000))에 의해 암호화된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
PYC1	NP_011453	6321376	사카로마이세스 세레비자에
PYC2	NP_009777	6319695	사카로마이세스 세레비자에
Pyc	YP_890857.1	118470447	미코박테리움 스메그마티스

[0619]

[0620] 말산효소가 하나의 환원 당량을 소비하면서 CO₂ 및 피루베이트를 말레이트로 전환시키는데 적용될 수 있다. 이러한 목적의 말산효소들은 제한되지 않지만, 말산효소 (NAD-의존성) 및 말산효소 (NADP-의존성)를 포함한다. 예를 들면, *E. coli* 말산효소들 중 하나 (Takeo, *J. Biochem.* 66:379-387 (1969)) 또는 더 높은 활성을 가지는 유사한 효소가 발현되어 피루베이트 및 CO₂를 말레이트로 전환할 수 있다. PEP와는 반대로 탄소를 피루베이트로 고정시킴으로서, 말산효소는 PEP의 고-에너지 포스페이트 결합이 피루베이트 키나아제에 의해 보존되도록 하고 이에 따라 ATP는 피루베이트 형성 또는 글루코스 수송을 위한 인산전이효소시스템에 의해 발생된다. 말산효소는 전형적으로 말레이트로부터 피루베이트 형성 방향으로 작용하는 것으로 가정되지만, maeA에 의해 암호화되는 NAD-의존성 효소의 과다발현으로 *E. coli*에서 숙시네이트 생산이 증가되고 탄소-고정 방향으로 작용함으로써 협기성 조건에서 치사 Dpf1-DldhA 표현형을 회복시키는 것으로 밝혀졌다 (Stols and Donnelly, *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7) 2695-2701 (1997)). *E. coli*에서 아스카리스 수육 유래 말산효소 (Stols et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65(1), 153-158 (1997)) 과다발현으로 유사한 현상이 관찰되었다. maeB에 의해 암호화되는 제2 *E. coli* 말산효소는 NADP-의존성이고 또한 옥살로아세테이트 및 기타 알파-케토산을 탈탄산한다 (Iwakura et al., *J. Biochem.* 85(5):1355-65 (1979)).

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

[0621]

[0622] TCA 회로의 환원적 대체경로를 통하여 옥살로아세테이트 (formed from, 예를들면, PEP 카르복실화효소, PEP 카르복시키나아제, 또는 피루베이트 카르복실화효소로부터) 또는 말레이트 (예를들면, 말산효소 또는 말레이트 탈수효소로부터)를 숙시닐-CoA로 전환시키는 효소들은 말레이트 탈수효소, 푸마레이트 탈수효소 (푸마라아제), 푸마레이트 환원효소, 및 숙시닐-CoA 전이효소이다. 이들 각각의 효소들에 대한 유전자들은 본원에서 상기되었다.

[0623] 숙시닐-CoA에서 다양한 산물로의 경로들을 미생물 내로 조작하기 위한 효소들, 유전자들 및 방법들은 본 분야에서 알려져 있다. 본원에 기재된 바와 같이, CO 및/또는 H₂로부터 획득되는 추가적인 환원 당량들은 탄수화물-기반 공급원료를 활용할 때 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔 수율을 개선시킨다. 예를들면, 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔은 도 20에 예시된 경로들을 통하여 숙시닐-CoA로부터 생성될 수 있다. 숙시닐-CoA의 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올, 또는 1,3-부타디엔로의 전환을 위한 예시적 효소들은 숙시닐-CoA:아세틸CoA 아실전이효소, 3-옥소아디필-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, 3-옥소아디페이트 탈수효소, 2-푸마릴아세테이트 탈탄산효소, 3-옥소펜트-4-에노에이트 환원효소, 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈수효소, 3-옥소아디필-CoA 환원효소, 3-히드록시아디필-CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소, 3-히드록시아디페이트 탈수효소, 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트 탈탄산효소, 3-옥소아디페이트 환원효소, 2-푸마릴아세테이트 환원효소, 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소, 2,4-펜타디에노에이트 탈탄산효소를 포함한다.

[0624] 해당과정 중간체들로부터 다양한 생성물로의 경로들을 미생물 내로 조작하는 효소들, 유전자들 및 방법은 본 분야에 알려져 있다. 본원에 기재된 바와 같이, CO 및 H₂로부터 얻어진 추가적인 환원 당량들은 탄수화물에서 이들 모든 산물의 수율을 개선시킨다.

실시예 X

[0626] CO 취급 방법 및 혐기성 배양

[0627] 본 실시예는 CO 취급에 적용된 방법 및 혐기성 배양을 설명한다.

[0628] A. 분석용 소량 CO 취급 및소규모 배양. CO는 무취, 무색 및 무미의 독성 가스이다. 따라서, CO를 활용하는 배양 및 분석에는 특별한 취급이 요구되었다. 소규모 회분식 배양에서 CO 산화, 아세틸CoA 합성, 미오글로빈을 이용한 CO 농도, 및 CO 내성(tolerance)/활용을 포함한 여러 분석들은 강제 급배기 시설 (fume hood) 내에서 분배되고 취급되는 소량의 CO 가스가 필요하였다. 생화학적 분석물들은 생화학적 동정 배지 또는 완충액에 대한 매우 소량의 (<2 mL) CO 포화 및 이후 분석이 필요하다. 모든 CO 취급 단계들은 적당한 높이의 새시가 설치되고 송풍기가 작동되는 강제 급배기 시설에서 수행되었다; CO는 압축가스 실린더 및 슈랭크 라인과 연결된 조절기에서 분배되었다. 조절기는 여러 큐벳들 또는 바이알들 각각에 동일 농도의 CO가 분배되도록 한다. 슈랭크 라인은 입구측에 산소 스크러버 출구측에 유압식 기포발생기 및 벤트가 설치되었다. 분석 큐벳들은 혐기성으로 CO를 함유하고 있었다. 따라서, 분석 큐벳들을 고무 마개로 밀봉하였고 시약들을 기밀성 니들 및 시린지로 첨가하거나 제거하였다. 다음으로, 단단히 밀봉된 혈청병에서 소량의 (~50 mL) 배양물을 포화 CO에서 증식시켰다. 생화학적 분석물들과 같이, CO-포화 미생물 배양물을 슈랭크 라인이 설치된 강제 급배기 시설에서 평형화시켰다. 강제 급배기 시설 밖에서 안정하게 취급하기 위하여 생화학적 분석물들 및 미생물 배양물들을 운반의 용이한 소형 밀폐용기들 안에 두었다. 압축 CO 탱크는 강제 급배기 시설 옆에 설치하였다.

[0629] 전형적으로, 슈랭크 라인은 CO를 큐벳들에 분배하고 배출하기 위하여 사용되었다. 큐벳들 입구의 고무 마개들에 19 또는 20 케이지의 1회용 시린지 니들로 천공하고 이것으로 배출하였다. 오일 기포발생기는 CO 탱크 및 산소 스크러버와 함께 사용되었다. 유리 또는 수정제 분광광도계 큐벳들은 상부에 등근 구멍이 형성되고 여기에 Kontes 마개 슬리브, Sz7 774250-0007가 장착되었다. CO 검출기 유닛은 강제 급배기 시설 가까이 배치되었다.

[0630] B. 대규모 배양물에 공급되는 대량의 CO 취급. 발효 생산에서 있어서 공급원료로 합성가스를 모방한 CO 또는 CO

및 H₂ 혼합물에 발효 배양물들이 공급된다. 따라서, 1 리터 내지 수 리터의 세포들은 CO 가스가 첨가되어 배지 중 용해 CO 농도가 증가한다. 이러한 환경에서, 상당히 대규모의 연속적으로 투입되는 CO 가스가 배양물에 부가된다. 여러 시점들에서, 배양물이 추출되거나 시료를 채취한다. 달리, 발효기 일부인 일체 연속 유동 원심 분리기로 세포들이 추출된다.

[0631] 발효 과정들은 협기성 조건에서 진행된다. 일부 경우에, 호흡 환경을 제공하기 위하여 산소 또는 공기를 발효기에 투입하여 적당한 산소 포화도를 확보하는 것은 비경제적이다. 또한, 협기성 발효 과정에서 발생한 환원력은 호흡보다는 산물 형성에 요구될 수 있다. 또한, 다양한 경로들에서 많은 효소들은 차이가 있지만 산소-민감성이다. *M. 씨모아세티카* 와 같은 초산생성균들은 절대적인 협기성 미생물들이고 Wood-Ljungdahl 경로에 있는 효소들은 분자성 산소에 의한 비가역적 불활성화에 매우 민감하다. 산소-내성의 초산생성균들이 있지만, Wood-Ljungdahl 경로에 있는 효소들은 대부분이 폐쇄독신의 핵심 성분인 금속-효소들이고, 조절에 의해 에너지 획득을 최대로 하기 위하여 Wood-Ljungdahl 경로로부터 대사작용을 이탈시키므로 산소와 양립할 수 없다. 동시에, 배양물 내의 세포들은 대규모 세포 생장에서 극단적인 조치에 대한 필요성을 완화시키는 산소 소거자들로 기능한다.

[0632] C. 협기 챔버 및 조건. 예시적 협기 챔버들은 상업적으로 입수될 수 있다 (참고, 예를들면, Vacuum Atmospheres Company, Hawthorne CA; MBraun, Newburyport MA). 조건에는 O₂ 농도 1 ppm 또는 이하 및 1 atm 순수 N₂를 포함하였다. 일 실시예에서, 3 산소 스크러버들/촉매 재생기들이 사용되었고, 챔버에는 O₂ 전극을 포함하였다 (예를들면 Teledyne; City of Industry CA). 내부 챔버 문을 개방하기 전거의 모든 항목들 및 시약들은 챔버 에어로크에서 4회 순환되었다. 챔버에 도입하기 전에 >5mL 이상의 시약들은 순수 N₂ 와 함께 살포되었다. 글로브는 2 회/년 교체되고 촉매 용기는 챔버가 산소 수준 변화에 대하여부진한 반응을 보일 때 주기적으로 재생되었다. 챔버 압력은 솔레노이드에 의한 일-방향 밸브들로 제어되었다. 이러한 특징부들로 인하여 챔버 압력은 주변보다 고압으로 설정되어 매우 작은 관들을 퍼지 밸브를 통하여 이동시킬 수 있다.

[0633] 협기성 챔버는 일관적으로 매우 낮고 고도의 산소 민감한 협기성 조건에 필요한 O₂ 수준을 달성하였다. 그러나, 세포들 증식 및 취급에는 통상 이러한 예비 조치가 필요하지 않다. 대안적 협기성 챔버 구성에서, 믹스에 일부 수소 가스가 필요한 촉매로써 백금 또는 팔라듐이 사용될 수 있다. 솔레노이드 밸브 대신, 압력 방출은 기포발생기로 제어될 수 있다. 장치-기반 O₂ 감시 대신, 검사지가 사용될 수 있다.

[0634] D. 협기성 미생물학. 소구모 배양물은 CO 취급에서 상기한 바와 같이 다루었다. 특히, 혈청 또는 배지병들에는 두꺼운 고무 마개들을 끼우고 알루미늄 크림프로 병을 밀폐한다. 배지, 예를들면 테리픽 (Terrific) 브로스는 통상의 방법으로 제조하여 적합한 크기의 혈청병에 배분한다. 병들을 완만한 기포발생으로 30분 동안 질소를 살포한다. 이를 통하여 배지에서 대부분의 산소를 제거하고 이후, 각 병에 고무 마개 (예를들면 Bellco 20 mm 격막 마개; Bellco, Vineland, NJ) 를 끼우고 크림프-밀폐한다 (Bellco 20 mm). 이후 배지병들을 느린 (액상) 배기 사이클로 고압멸균한다. 최소한 때로 니들로 마개를 관통시켜 고압멸균 중 배기한다; 고압멸균기에서 꺼낸 후 니들은 즉시 제거되어야 한다. 멸균 배지는 나머지 배지 성분들, 예를들면 완충액 또는 항생제가 시린지 및 니들을 통하여 첨가된다. 환원제 첨가 전에, 병들을 30 - 60 분 동안 질소 (또는 사용에 따라 CO)와 평형시킨다. 환원제 예를들면 100 x 150 mM 황화나트륨, 200 mM 시스테인-HCl를 첨가한다. 황화나트륨을 건조 비이커 내에서 계량하고 시스테인을 혈청병 내에서 계량하여, 둘 모두를 협기성 챔버로 옮기고, 황화나트륨을 무산소수에 녹이고, 이후 이것을 혈청병 내의 시스테인에 첨가한다. 황화나트륨 용액이 시스테인과 접촉하여 황화수소 가스를 발생하면 즉시 마개를 덮는다. 배양물에 주입할 때, 시린지 필터를 사용하여 용액을 멸균한다. B12 (10 mM 시아노코발라민), 염화니켈 (NiCl₂, 40 mM 스톡용액)을 무산소수로 챔버에서 제조하고 고압멸균 처리 또는 배양물 내로 주입 전 시린지 필터를 사용하는 최종 농도 20 microM), 및 황산암모늄제일철 (필요한 최종 농도는 100 mM-100-1000x 스톡용액을 무산소수로 챔버에서 제조하고 고압멸균 처리 또는 배양물 내로 주입 전 시린지 필터를 사용)와 같은 기타 성분들이 시린지 니들을 통하여 첨가된다. 협기성 조건에서 더욱 신속하게 증식시키기 위하여, 1 리터 병들에 협기성에서 증식된 전-배양물 50 mL를 접종하였다. 벡터에 pA1-1ac01 프로모터를 도입하는 것은 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 최종 농도 0.2 mM로 첨가하고 약 3 시간 동안 수행하여 이루어졌다.

[0635] 대규모 배양물은 기포를 발생시키면서 연속적인 가스 주입으로 더 큰 병들에서 증식될 수 있다. 배지 첨가 후 금속성 기포발생기가 있는 고무 마개를 병에 배치하고 나머지를 설정하기 전에 질소를 30 분 이상 살포한다. 멸균 필터가 주입 가스를 멸균하고 병들 위에 있는 호스들은 작은 C 클램프로 압착될 수 있도록 각각의 병을 모아

둔다. 배지 및 세포들을 자석 교반 막대로 교반한다. 모든 배지 성분들 및 세포들이 첨가되면, 계속하여 질소를 살포하면서 실온 배양기에서 병들을 배양한다.

[0636] **실시예 XI**

[0637] **CO 산화 (CODH) 분석**

[0638] 본 실시예는 CO 산화 (CO 탈수소효소; CODH) 측정을 위한 분석 방법을 기술한다.

[0639] 무렐라 씨모아세티카의 7 유전자 CODH/ACS 오페론이 *E. coli* 발현 벡터들에 클로닝되었다. 본래의 ~10 kbp DNA 단편을 클로닝하였고, 본 영역의 일부 유전자들은 자체 내인성 프로모터들로부터 발현되고 모두가 내인성 리보솜 결합 부위들을 가지는 것으로 보인다. CODH 활성을 정량적으로 측정하여 이들 클론들에 대한 CO 산화를 분석하였다. 비활성 (specific activity)을 평가하기 위하여 *M. 씨모아세티카* 유전자 산물에 대한 항혈청이 웨스턴 블로트에 사용되었다. *M. 씨모아세티카*는 그람 양성이고, 리보솜 결합 부위 요소들은 *E. coli*에서 잘 작동하리라고 예상된다. 더욱 상세히 하기되는 본 활성은 *M. 씨모아세티카* 비활성의 ~1/50 정도로 평가되었다. *M. 씨모아세티카* 효소들은 55°C 근처에서 최적이기 때문에 재조합 *E. coli* 세포들의 CODH 활성이 제한될 수 있다. 따라서, 중온이고 명백하게 무손상의 CODH/ACS 오페론 및 Wood-Ljungdahl 경로를 가지는 무렐라 근친인, 데슬피토박테리움 하프니엔세의 중온 CODH/ACS 경로가 유리할 수 있다. 가능한 숙주 유기체로서의 초산생성균들은, 제한적이지는 않지만, 로도스피릴룸 루브룸, 무렐라 씨모아세티카 및 데슬피토박테리움 하프니엔세를 포함한다.

[0640] CO 산화는 CODH/ACS 분석들에서 가장 민감하고 가장 강력하다. 이. 콜라이-기반 합성가스 이용시스템은 궁극적으로 특히 최적 활성을 위하여 클로스티리알 (즉, 무렐라) 시스템들 정도의 혐기성일 필요가 있는 것으로 보인다. CODH 개선은 가능하지만 궁극적으로 수중 CO 가스 용해도 때문에 제한될 것이다.

[0641] 먼저, 각각의 유전자들을 발현 벡터들 내로 클로닝하였다. 서브단위들/1 복합체를 위한 조합 발현 유닛들이 생성되었다. 단백질 수준에서 *E. coli* 발현이 결정되었다. 조합된 *M. 씨모아세티카* CODH/ACS 오페론 및 개별 발현 클론들 모두가 제작되었다.

[0642] CO 산화 분석. 본 분석은 간단하고, 믿을 수 있고 보다 다목적의 Wood-Ljungdahl 경로 내의 효소 활성들 분석들 중 하나이고 CODH를 테스트한다 (Seravalli et al., *Biochemistry* 43:3944-3955 (2004)). 전형적인 *M. 씨모아세티카* CODH 비활성은 55°C에서 500 U 또는 25°C에서 ~60U이다. 본 분석은 CO 존재에서 메틸 비올로겐의 환원을 이용한다. 이것은 마개로 덮인 혐기성, 유리 큐벳들에서 578 nm에서 측정된다.

[0643] 더욱 상세하게는, 먼저 탈이온수로 4회 아세톤으로 1회 세척한 고무 마개가 있는 유리 큐벳들이 준비되었다. 소량의 진공 그리스를 고무 가스켓 상부에 발랐다. 큐벳에 CO를 불어넣고, 22 Ga. 니들 플러스 배기 (exhaust) 니들로 10분 건조시켰다. 반응 완충액 (50 mM Hepes, pH 8.5, 2mM 디티오프레이톨 (DTT) 0.98 mL를 100%CO 배기 니들이 있는 22 Ga. 니들을 사용하여 첨가하였다. 메틸 비올로겐 (CH_3 비올로겐) 스톡용액은 수중 1 M 이었다. 각각의 분석에는 20 mM 최종 농도로 20 마이크로리터를 사용하였다. 메틸 비올로겐이 첨가되면, 18 Ga. 니들 (부분)을 자켓으로 사용하여 해밀톤 시린지로 용이하게 CH_3 비올로겐을 회수하였다. 4 -5 분취액들을 취하여 시린지 세척 및 가스 평형시키기 위하여 버렸다. 소량의 디티온산나트륨 (0.1 M 스톡)을 첨가하여 CH_3 비올로겐을 약간 환원한 CH_3 비올로겐 스톡용액을 만들었다. 온도는 가열된 01is 분광광도계 (Bogart GA)에서 55°C로 맞추었다. 바탕 반응 (CH_3 비올로겐 + 완충액)을 먼저 수행하여 CH_3 비올로겐 환원 기준율을 측정하였다. ACS90 및 ACS91 (각각 제1 cooC를 가진 및 가지지 않은 *M. 씨모아세티카*의 CODH-ACS 오페론)의 조질 *E. coli* 세포추출물을 10 마이크로리터의 추출물을 한번에 첨가, 혼합 및 분석하였다. 환원된 CH_3 비올로겐은 보라색이 된다. 분석 결과를 표 I에 나타낸다.

표 1

표 I. 조질 추출물의 CO 산화 활성들.

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

[0644]

[0645] Mta98/Mta99 는 *M. 썬모아세티카* 유래의 에탄올 메틸전이효소 유전자들을 발현하는 *E. coli* MG1655 균주들이고, 따라서, *M. 썬모아세티카* CODH 오페론을 가지는 ACS90 ACS91 *E. coli* 균주들에 대한 음성 대조군이다.

[0646] 세포 단백질의~ 1%가 CODH인 경우, 이들 수치는 순수한 *M. 썬모아세티카* CODH의 500 U/mg 활성보다 약100X 낮을 것이다. 웨스턴 블롯에 따른 실제 평가는 세포 단백질의0.5%이고, 따라서 활성은 *M. 썬모아세티카* CODH보다 약 50X 낮다. 그럼에도 불구하고, 본 실험은 재조합 *E. coli* CO 산화 활성을 보이며 음성 대조군의 경우 훨씬 낮았다. 음성 대조군에서 보이는 낮은 수준의 CO 산화 (CH_3 비올로겐 환원)는 *E. coli* 가 CH_3 비올로겐을 환원시키는 능력에 한계가 있을 수 있음을 의미한다.

[0647] CODH 및 Mtr 단백질들의 최종 농도를 평가하기 위하여, CO 산화, ACS, 메틸전이효소, 및 코리노이드 Fe-S 분석에 사용된 동일 세포추출물들에 대하여 SDS-PAGE 이후 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 사용된 항혈청은 정제된 *M. 썬모아세티카* CODH-ACS 및 Mtr 단백질들에 대한 다클론성이고 알칼리 포스파타제-결합된 염소-항-토끼 2차 항체를 이용하여 가시화되었다. 웨스턴 블롯이 수행되고 결과를 도 24에 나타낸다. ACS90 및 ACS91에서의 CODH 함량은 대조군 레인과 비교하여 50 ng로 확인되었다. 2 CODH 서브단위들 및 메틸전이효소를 포함한 CODH-ACS 오페론 유전자들 발현은 웨스턴 블롯 분석으로 확인되었다. 따라서, 재조합 *E. coli* 세포들은 7 유전자 오페론의 다중 성분들을 발현한다. 또한, 메틸전이효소 및 코리노이드 철-황 단백질 양자 모두 동일한 재조합 *E. coli* 세포들에서 활성이었다. 이들 단백질은 동일 세포들 내로 클로닝되는 동일 오페론의 일부이다.

[0648] 무렐라 썬모아세티카 세포 추출물들을 이용하여 양성 대조군에 대하여 CO 산화 분석들을 반복하였다. 이. 콜라 이 ACS90 및 ACS91의 CODH 활성은 측정될 수 있었지만, *M. 썬모아세티카* 대조군 보다 약130 - 150 X보다 낮다. 분석 결과는 도 25에 나타난다. 간단히, 세포들 (CODH/ACS 오페론; ACS90 또는 ACS91 또는 빈 벡터: pZA33S을 가지는 *M. 썬모아세티카* 또는 *E. coli*)을 배양하고 상기와 같이 추출물들을 얻었다. 추출물들을 얻은 날 여러 시간대에서 55°C에서 상기와 같이 분석하였다. 메틸비올로겐의 환원은 120 초에 걸쳐 578 nm에서 측정되었다.

[0649] 이러한 결과는 CO 산화 (CODH) 분석 및 결과들을 설명한다. 재조합 *E. coli* 세포들은메틸 비올로겐 환원 분석에 따라 측정되는 바와 같이 CO 산화 활성을 발현하였다.

[0650] 실시예 XII

[0651] *E. coli* CO 내성 실험 및 CO 농도 분석 (미오글로빈 분석)

[0652] 본 실시예는 고농도 CO에 대한 *E. coli* 내성을 기술한다.

[0653] 이. 콜라이가 CO 포화량 존재 조건에서 혐기 증식할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 상기 소량의 혐기성 미생물학에 기재된 바와 같이 테리피 브로스 배지 (및 환원성 용액, NiCl_2 , $\text{Fe(II)}\text{NH}_4\text{SO}_4$, 시아노코발라민, IPTG, 및 클로람페니콜) 50 ml가 든 120 ml 혈청병들에 배양물을 준비하였다. 이들 병의 절반은 30분 동안 질소 가스와 평형시키고 절반은 30분 동안 CO 가스와 평형을 이루었다. 빈 벡터 (pZA33)를 대조군으로 이용하였고, pZA33 빈 벡터 및 ACS90 및 ACS91가 포함된 배양물을 N_2 및 CO 모두에서 실험하였다. 36 시간 동안 37°C 에서 진탕하면서 (250 rpm) 배양하였다. 36 시간 종료 후, 플라스크를 검사하여 모두에서 고도의 증식이 확인되었다. 관찰된 증식은 긴 지체기를 가지고 밤새 이루어졌다.

[0654] 모든 배양물이 CO 존재에서 증식된 것으로 보이므로, 최종 CO 농도를 확인하였다. 이것은 CO에 노출될 때 미오글로빈의 분광학적 이동 분석으로 이루어졌다. 디티온산나트륨으로 환원되는 미오글로빈은 435 nm에서 흡광 피크를 가진다; 본 피크는 CO로 423 nm로 이동된다. 파장이 낮고 300 nm 부터 전체 스펙트럼을 기록하여야 하므로, 수정 큐벳들이 사용되어야 한다. CO 농도는 표준곡선에 대하여 측정되고 CO의 최대 수용해도= 20°C 및 1 atm에서 970 마이크로몰에 대한 헨리 법칙 상수에 따라 달라진다.

[0655] CO 농도의 미오글로빈 테스트를 위하여, 큐벳들은 물로 10X, 아세톤으로 1X 세척하고, CODH 분석물을 마개로 닫았다. N_2 를 ~10 분 동안 큐벳들에 불어넣었다. 1 ml의 혐기성 완충액 (HEPES, pH 8.0, 2mM DTT)을 해밀톤 시린지로 블랭크 (CO로 평형화되지 않음)에 첨가하였다. 10 마이크로리터의 미오글로빈 (~1 mM-가변 가능, 단지 상당량이 필요) 및 1 마이크로리터의 디티온산염 (20 mM 스톡)이 첨가되었다. 1 마이크로리터 증분되는 CO 포화 완충액으로 CO 표준곡선을 그렸다. 피크 높이 및 이동이 각 증분마다 기록되었다. 테스트 배양물들은 pZA33-CO, ACS90-CO, 및 ACS91-CO였다. 이들 각각을 동일 큐벳에 1 마이크로리터 증분 첨가하였다. 실험 도중에 제2 큐벳을 준비하여 사용하였다. 결과를 표 II에 나타낸다.

[0656]

표 2

표 II. 일산화탄소 농도, 36 hrs.

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

[0657]

[0658] 표 II에 나타난 결과들은 균주를 CO 존재 또는 부재에서 배양하던지 간에 증식되었다는 것을 보인다. 이들 결과는 *E. coli* 가 혐기 조건에서 CO 노출을 허용하고 CODH-ACS 오페론 발현 *E. coli* 세포들은 CO 일부를 대사할 수 있다는 것을 의미한다.

[0659] 이들 결과는 CODH/ACS 발현 여부와 무관하게, *E. coli* 세포들은 CO 포화량 존재에서 증식할 수 있음을 보인다. 또한, 이들은 CO 대신 질소에서 대조군으로서 동일하게 잘 증식하였다. 본 실험은 *E. coli* 의 실험실 균주들이 정상 대기압에서 수행되는 합성가스 프로젝트에서 얻어질 수 있는 수준의 CO에 민감하지 않다는 것을 보였다. 또한, 예비 실험에 의하면 CODH/ACS 발현 재조합 *E. coli* 세포들은 실제로 이산화탄소로의 산화로 추정되는 일부 CO 소비가 있었다.

[0660] 실시예 XIII

[0661] 1,3-부타디엔 및 3-부텐-1-올 형성을 위한 3-히드록시산 탈탄산효소들

3-히드록시산 탈탄산효소들은 3-히드록시산들의 알켄 유도체로의 ATP-작동 탈탄산반응을 촉매한다. 3-히드록시산 탈탄산효소들은 이소부틸렌, 프로필렌 및 에틸렌 형성을 촉매한다고 최근 기술되었다 (WO 2010/001078 및 Gogerty and Bobik, Appl. Environ. Microbiol., p. 8004-8010, Vol. 76, No. 24 (2010)). 본원은 도 16에 도시된 3-히드록시펜트-4-에노에이트 (3HP4)의 1,3-부타디엔으로의 전환, 및 도 17에 도시된 3,5-디히드록시펜타노에이트의 3-부텐-1-올로의 전환을 촉매하는 유사한 효소들의 용용을 제안한다. 3-부텐-1-올 산물은 이후 화학적 탈수 또는 3-부텐-1-올 탈수효소를 통한 생물학적 탈수로 부타디엔으로 전환될 수 있다.

3-히드록시펜트-4-에노에이트의 부타디엔으로의 전환은 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소에 의해 수행된다. 비슷하게, 3,5-디히드록시펜타노에이트의 3-부텐-1-올으로의 전환은 3,5-디히드록시펜타노에이트 탈탄산효소에 의해 수행된다. 이러한 효소들은 메발로네이트 피로포스페이트 탈탄산효소 또는 디포스포메발로네이트 탈탄산효소와 유사성이 있다. 하나의 잠재적 3-히드록시펜트-4-에노에이트 탈탄산효소는 사카로마이세스 세레비지에 메발로네이트 디포스페이트 탈탄산효소 (ScMDD 또는 ERG19)이고 3-히드록시-3-메틸부티레이트 (3-HMB)를 이소부텐으로 전환시키는 것으로 확인되었다 (Gogerty and Bobik, 2010, Appl. Environ. Microbiol., p. 8004-8010, Vol. 76, No. 24). 두 종의 개선된 본 효소 변이체들, ScMDD1 (I145F) 및 ScMDD2 (R74H)는 야생종 Histag된 (tagged) 효소에 비해 19-배 및 38-배 증가된 것으로 밝혀졌다. ERG19 및 추가적인 효소 후보들은 아래에 제공된다.

효소	GI	등록번호	유기체
ERG19	6324371	NP_014441.1	사카로마이세스 세레비지에 S288C
CAWG_01359	238879484	EEQ43122.1	칸디다 알비칸스 WO-1
ANI_1_332184	145256805	XP_001401521.1	아스페舅舅스 나이지 CBS 513.88
MVD	4505289	NP_002452.1	호모 사파언스
Ahos_1490	332797171	YP_004458671.1	아시디아누스 호스피탈리스 W1
SSO2989	15899699	NP_344304.1	술풀로부스 술파타리쿠스 P2
UNLARM2_0386	255513677	EET89942.1	칸디나투스 미크랄카이움 아시디필룸 ARMAN-2
mvaD	146329706	YP_001209416.1	디겔로박터 노도수스 VCS1703A
MPTP_0700	332686202	YP_004455976.1	멜리쏘코쿠스 플루토니우스 ATCC 35311
RKLH11_3963	254513287	ZP_05125352.1	로도박테라세아이 박테리움 KLH11

[0664]

[0665] 실시예 XIV

[0666] 3-부텐-1-올의 부타디엔으로의 화학적 탈수

알코올들은 적합한 조건에서 저정한 탈수촉매로 반응에 의해 올레핀으로 전환될 수 있다. 알코올 예를들면 부탄올 및 펜탄올을 올레핀으로 전환시키는 전형적인 탈수 촉매는 다양한 산 처리 또는 무처리 알루미나 (예를들면, γ-알루미나) 및 실리카 촉매 및 클레이 예를들면 제올라이트 (예를들면, β-형 제올라이트, ZSM-5 또는 Y-형 제올라이트, β-제올라이트 촉매, 불소-처리된 클레이 촉매, 기타 등), 술폰산 수지 (예를들면, Amberlyst®

15와 같은 술폰화 스틸렌계 수지), 장산들 예를들면 인산 및 황산, 루이스 산들 즉 삼불화붕소 및 삼염화알루미늄, 및 많은 상이한 유형의 금속염들 예를들면 금속산화물 (예를들면, 지르코늄산화물 또는 티타늄 이산화물) 및 금속 염화물 (예를들면, Latshaw B E, Dehydration of Isobutanol to Isobutylene in a Slurry Reactor, Department of Energy Topical Report, February 1994)을 포함한다.

[0668] 탈수 반응들은 많은 상이한 반응기 형태에서 불균일 및 균일 촉매시스템들 모두에서 기상 및 액상으로 수행될 수 있다. 전형적으로, 사용 촉매는 반응에 의해 발생되는 물에 안정적이다. 물은 통상 반응 구역으로부터 생성물과 함께 제거된다. 형성 알켄(들)은 기상 또는 액상으로 반응기에서 배출되고 (예를들면, 반응기 조건에 따라) 하류 정제 공정에서 회수 또는 반응기에서 본원에 기재된 바와 같이 기타 화합물들로 더욱 전환된다 (예를들면 부타디엔 또는 이소프렌). 탈수반응으로 생긴 물은 미반응 알코올 및 알켄 생성물 (들)과 함께 반응기에서 배출되고 중류 또는 상분리로 분리된다. 탈수단계에서 물이 대량으로 생성되므로, 사용되는 탈수촉매는 일반적으로 물에 견디고 기질 및 생성물로부터 물을 제공하는 공정은 탈수단계로 구성되는 임의의 공정 일부일 수 있다. 이러한 이유로, 습식 (즉, 중량비로 약 95% 또는 98% 물까지) 알코올을 탈수반응 기질로 사용하여 물을 탈수반응으로 생기는 물과 함께 제거할 수 있다 (예를들면, 미국특허번호들 4,698,452 및 4,873,392에 기재된 바와 같이 제올라이트 촉매를 사용). 또한, 중성 알루미나 및 제올라이트는 이들 촉매의 산 상태보다도 일반적으로 더욱 고온 및 고압에서 알코올을 알켄으로 탈수한다.

[0669] 3-부텐-1-올을 부타디엔으로 탈수하는 것은 본 분야에 잘 알려져 있다 (Gustav. Egloff and George. Hull, Chem. Rev., 1945, 36 (1), pp 63-141). 예를들면, 3-부텐-1-올은 1,4-부탄디올을 1,3-부타디엔으로 탈수하는 중간체로 형성된다 (Sato, et al, Catalysis Communications, 5 (8), 2004, p. 397-400).

[0670] 실시예 XV

[0671] 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올 및 1,3-부타디엔으로의 경로들

[0672] 본 실시예는 2,4-펜타디에노에이트, 3-부텐-1-올 및 1,3-부타디엔 경로들을 설명한다. 중간체들인 3HP4, 3,5-디히드록시펜타노에이트 및 3-부텐-1-올으로의 새로운 경로들이 도 18-21에 도시된다. 3HP4로의 경로들이 도 18, 19 및 20 (신규)에 도시된다. 3,5-디히드록시펜타노에이트 및 3-부텐-1-올경로들이 도 19 및 21 (신규)에 도시된다. 부타디엔 전구체 2,4-펜타디에노에이트에 대한 추가적인 경로들이 도 19, 20 및 21 (신규)에 도시된다.

[0673] 2,4-펜타디에노에이트로의 여러 경로들이 초기 실시예들 (참고 예를들면, 도 4, 12, 13 14 및 15)에 개시된다. 도 18 (신규)에 도시된 바와 같이 2,4-펜타디에노에이트이 수화되면 3-히드록시펜트-4-에노에이트이 생성된다. 이어 3-히드록시펜트-4-에노에이트는 상기된 바와 같이 3-히드록시산 탈탄산효소에 의해 부타디엔으로 탈탄산된다.

[0674] 아크릴일-CoA 및 3-HP-CoA의 2,4-펜타디에노에이트로의 추가적인 경로들이 도 19에 도시된다. 또한 3HP4, 3-부텐-1-올 및 부타디엔으로의 경로들도 도시된다.

[0675] 아크릴일-CoA로부터 3HP4로의 경로들은 다음을 포함한다: 단계들 M/O/P, 단계들 M/N/T

[0676] 3-HP-CoA로부터 3HP4로의 경로들은 다음을 포함한다: 단계들 A/L/O/P, 단계들 A/L/N/T

[0677] 숙시닐-CoA로부터 3HP4 및 24PD로의 경로들은 도 20에 도시된다. 숙시닐-CoA 및 아세틸CoA는 먼저 3-옥소아디필-CoA 티올라아제에 의해 결합되어 3-옥소아디필-CoA를 형성한다 (단계 A). 일 경로에서 3-옥소아디필-CoA의 3-옥소기는 환원되어 3-히드록시아디필-CoA를 형성한다 (단계 G). 이후 CoA 잔기는 CoA 가수분해효소, 합성효소 또는 전이효소에 의해 산기로 전환된다. 이후 3-히드록시아디페이트는 산화되어 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트를 형성한다 (단계 I). 이후 본 산물은 탈탄산되어 3HP4를 형성한다. 대안 경로에서, 3-옥소아디필-CoA는 단계 B에서 CoA 전이효소, 합성효소 또는 가수분해효소에 의해 3-옥소아디페이트로 전환된다. 이어 3-옥소아디페이트는 3-히드록시아디페이트로 환원되고 (단계 K), 이것은 전술된 바와 같이 3HP4로 전환된다. 대안으로, 단계 C에서 3-옥소아디페이트는 2-푸마릴아세테이트로 전환된다. 이어 2-푸마릴아세테이트의 3-옥소기는 3-히드록시헥스-4-에네디오에이트로 환원되고, 이것은 3HP4로 탈탄산된다. 또 다른 실시예에서, 2-푸마릴아세테이트는 탈탄산되어 3-옥소펜트-4-에노에이트를 형성하고 (단계 D), 이것은 이어 3HP4로 환원된다 (단계 E). 이어 3HP4는 일 단계로 3HP4 탈탄산효소에 의한 탈탄산반응에 의해 (단계 M), 또는 두 단계로 2,4-펜타디엔으로 탈수 이어 탈탄산반응에 의해 부타디엔으로 전환된다 (단계들 F, N).

[0678] 말로닐-CoA 및 아세틸CoA로부터 3-부텐-1-올, 부타디엔 및 2,4-펜타디에노에이트로의 경로들이 도 21에 도시된다. 이를 경로에서, 말로닐-CoA 및 아세틸CoA는 티올라아제에 의해 결합되어 3-옥소글루타릴-CoA를 형성한다. 본

중간체는 이어 여러 대안 경로들에 의해 3,5-디히드록시펜타노에이트로 전환된다 (단계들 B/C/D, 단계들 B/G, 단계들 H/I/J, 단계들 H/L/D, K/J). 일단 형성되면, 3,5-디히드록시펜타노에이트는 3-히드록시산 탈탄산효소에 의해 탈탄산되어 3-부텐-1-올을 형성한다 (단계 M). 이어 3-부텐-1-올 탈수소효소 또는 화학적 촉매에 의한 탈수로 부타디엔을 생성한다 (단계 O). 대안으로, 단계 E에 도시된 바와 같이 3,5-디히드록시펜타노에이트는 5-히드록시펜트-2-에노에이트로 탈수된다. 본 중간체는 이어 3-부텐-1-올로 탈탄산되거나 (단계 N) 2,4-펜타디에노에이트로 더욱 탈수된다 (단계 F).

[0679] 도 18-21에 도시된 변환들을 촉매하는 효소들은 EC 번호 (표 1)로 분류되고 하기된다.

번호	작용	단계
1.1.1.a	산화환원효소 (옥소에서 알코올)	19 I,B,N,P 20 G,K,L,E 21 B, D, J, I,L
1.1.1.c	산화환원효소 (2 단계, 아실-CoA에서 알코올)	21 G,K

[0680]

1.2.1.b	산화환원효소 (아실-CoA에서 알데히드)	21 C,H
1.3.1.a	산화환원효소 (알켄에서 알칸)	20 I,C
2.3.1.b	베타-케토티올라아제	19A,M 20A,21A
2.8.3.a	조효소-A 전이효소	19F,O,G,T,E, H 20 B,H
3.1.2.a	티올에스테르 가수분해효소 (CoA 특이적인)	19F,O,G,T,E, H 20 B,H
4.1.1.a	카르복시-분해효소	19 U,Y,V,X 20 D,J,M,N 21 M,N,P
4.2.1.a	하이드로-리아제	19 S,K,L,R,D,C,J,Q,W 20 F 21 E,F,O
6.2.1.a	산-티올 연결효소	19F,O,G,T,E, H 20 B,H

[0681]

[0682] 도 19-21에 도시된 여러 반응들은 알코올 탈수소효소들에 의해 촉매된다. 이들 반응은 도 19의 단계들 B, I, N 및 P, 도 20의 단계들 E, G, K 및 L 그리고 도 21의 단계들 B, D, I, J 및 L을 포함한다.

[0683]

알데히드의 알코올로의 환원을 촉매하는 효소들 (즉, 알코올 탈수소효소 또는 균등적인 알데히드 환원효소)을 암호화하는 예시적 유전자들은 C2-C14에 대한 중간-사슬 알코올 탈수소효소 암호화 *alrA* (Tani et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5231-5235 (2000)), *E. coli* 유래의 *yqhD* 및 *fucO* (Sulzenbacher et al., 342:489-502 (2004)), 및 부틸알데히드를 부탄올로 전환하는 *C. 아세토부틸리쿰* 유래의 *bdh I* 및 *bdh II* (Walter et al., 174:7149-7158 (1992))를 포함한다. *YqhD*는 NADPH를 조인자로 이용하여 C(3)을 초과하는 사슬 길이들이 선호되는 광범위한 알데히드 환원을 촉매한다 (Sulzenbacher et al., 342:489-502 (2004); Perez et al., *J Biol. Chem.* 283:7346-7353 (2008)). 자이모모나스 모빌리스*E* 유래의 *adhA* 유전자 산물은 포름알데히드, 아세트알데히드, 프로파온알데히드, 부틸알데히드, 및 아크릴레이인을 포함한 다수의 알데히드들에 대하여 활성을 가지는 것으로 확인되었다 (Kinoshita et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:249-254 (1985)). 추가적인 알데히드 환원효소 후보들은 *C. 사카로퍼부틸아세토니쿰*의 *bdh* 및 *C. 베이제린크키*의 *Cbei_1722*, *Cbei_2181* 및 *Cbei_2421*에 의해 암호화된다. *사카로마이세스 세레비자애*에 있는추가적인 알데히드 환원효소 유전자 후보들은 알데히드 환원효소들 GRE3, ALD2-6 및 HFD1, 글리옥실레이트 환원효소들 GOR1 및 YPL113C 및 글리세롤 탈수소효소 GCY1를 포함한다 (WO 2011/022651A1; Atsumi et al., *Nature* 451:86-89 (2008)). 메틸글리옥살의 아세톨 또는 락트알데히드로의 환원을 촉매하는 전술된 효소 후보들 역시 적정한 락트알데히드 환원효소 후보이다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
alrA	BAB12273.1	9967138	아시네토박터 종 균주 M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	사카로마이세스 세레비자에
yqhD	NP_417484.1	16130909	에스케리키아 폴라이
fucO	NP_417279.1	16130706	에스케리키아 폴라이
bdh I	NP_349892.1	15896543	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
bdh II	NP_349891.1	15896542	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
adhA	YP_162971.1	56552132	자이모모나스 모빌리스
bdh	BAF45463.1	124221917	클로스트리디움 사카로피부틸아세토나쿰
Cbei_1722	YP_001308850	150016596	클로스트리디움 베이제린크카
Cbei_2181	YP_001309304	150017050	클로스트리디움 베이제린크카
Cbei_2421	YP_001309535	150017281	클로스트리디움 베이제린크카
GRE3	P38715.1	731691	사카로마이세스 세레비자에
ALD2	CAA89806.1	825575	사카로마이세스 세레비자에
ALD3	NP_013892.1	6323821	사카로마이세스 세레비자에
ALD4	NP_015019.1	6324950	사카로마이세스 세레비자에
ALD5	NP_010996.2	330443526	사카로마이세스 세레비자에
ALD6	ABX39192.1	160415767	사카로마이세스 세레비자에
HFD1	Q04458.1	2494079	사카로마이세스 세레비자에
GOR1	NP_014125.1	6324055	사카로마이세스 세레비자에
YPL113C	AAB68248.1	1163100	사카로마이세스 세레비자에
GCY1	CAA99318.1	1420317	사카로마이세스 세레비자에

[0684]

[0685] 4-히드록시부티레이트 탈수효소 활성을 보이는 효소들 (EC 1.1.1.61) 역시 본 분류에 속한다. 이러한 효소들은 랄스토니아 유트로파 (Bravo et al., *J Forens Sci*, 49:379-387 (2004)), 클로스트리디움 클루이베리 (Wolff et al., 단백질 *Expr.Purif.* 6:206-212 (1995)) 및 아라비돕시스 탈리아나 (Breitkreuz et al., *J Biol Chem*, 278:41552-41556 (2003))에서 특정되었다. *A. 탈리아나* 효소는 클로닝되었고 효모에서 특정되었 (Breitkreuz et al., *J.Biol.Chem.* 278:41552-41556 (2003)). 또 다른 유전자는 게오바실러스 테르모글루코시 다시우스 유래의 알코올 탈수효소 *adhI*이다 (Jeon et al., *J Biotechnol* 135:127-133 (2008)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
4hbd	YP_726053.1	113867564	랄스토니아 유트로파 H16
4hbd	L21902.1	146348486	클로스트리디움 클루이베리 DSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	아라비돕시스 탈리아나
adhI	AAR91477.1	40795502	게오바실러스 테르모글루코시 다시우스

[0686]

[0687] 또 다른 예시적 알데하يد 환원효소는 메틸말로네이트 세미알데하يد 환원효소이며, 3-히드록시이소부티레이트 탈수효소로도 부른다 (EC 1.1.1.31). 본 효소는 발린, 류신 및 이소루신 분해에 참여하고 세균, 진핵생물, 및 포유류에서 동정되었다. 테르무스 테르모필루스 HB8 유래의 P84067에 의해 암호화되는 본 효소는 구조가 특정되었다 (Lokanath et al., *J Mol Biol*, 352:905-17 (2005)). 동위원소-표지 기질을 이용하여 인간 3-히드록시이소부티레이트 탈수효소의 가역성이 확인되었다 (Manning et al., *Biochem J*, 231:481-4 (1985)). 본 효소를 암호화하는 추가적인 유전자들은 호모 사페언스 (Hawes et al., *Methods Enzymol*, 324:218-228 (2000)) 및 아리크토라구스 쿠니쿠루스 (Hawes et al., *supra*; Chowdhury et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 60:2043-2047 (1996))의 *3hidh*, 슈도모나스 아이루기노사 및 슈도모나스 푸티타의 *mmsB*, 및 슈도모나스 푸티타의 *dhat* (Aberhart et al., *J Chem.Soc.[Perkin 1]* 6:1404-1406 (1979); Chowdhury et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 60:2043-2047 (1996); Chowdhury et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 67:438-441 (2003))을 포함한

다. 슈도모나스 아이루기노사 유래의 *mmsB* (Gokarn et al., US 특허 739676, (2008)) 및 슈도모나스 푸티타 유래의 *mmsB*을 포함한 여러 3-히드록시이소부티레이트 탈수소효소들은 환원 방향에서 특정되었다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>P84067</i>	P84067	75345323	테르무스 테르모필루스
<i>3hidh</i>	P31937.2	12643395	호모 사파언스
<i>3hidh</i>	P32185.1	416872	아리크토리구스 쿠니쿠루스
<i>mmsB</i>	NP_746775.1	26991350	슈도모나스 푸티타
<i>mmsB</i>	P28811.1	127211	슈도모나스 아이루기노사
<i>dhat</i>	Q59477.1	2842618	슈도모나스 푸티타

[0688]

[0689] 케톤을 히드록실 작용기로 환원시키는 여러 예시적 알코올 탈수소효소들이 존재한다. *E. coli* 유래의 이러한 두 종의 효소들은 말레이트 탈수소효소 (*mdh*) 및 락테이트 탈수소효소 (*ldhA*)에 의해 암호화된다. 또한, 랄스토니아 유트로파 유래의 락테이트 탈수소효소는 락테이트, 2-옥소부티레이트, 2-옥소펜타노에이트 및 2-옥소글루타레이트를 포함한 다양한 길이의 사슬을 가지는 2-케토산에 대한 높은 활성을 보였다 (Steinbuchel et al., *Eur.J.Biochem.* 130:329-334 (1983)). 알파-케토아디페이트의 알파-히드록시아디페이트로의 전환은 래트 및 사람의 태반에서 발견되는 2-케토아디페이트 환원효소에 의해 촉매된다 (Suda et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 176:610-620 (1976); Suda et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 77:586-591 (1977)). 추가적인 산화환원효소는 사람의 심장에서 유래하는 미토콘드리아 3-히드록시부티레이트 탈수소효소 (*bdh*)이고 이것은 클로닝되었고 특정되었다 (Marks et al., *J.Biol.Chem.* 267:15459-15463 (1992)). *C. 베이제린크카* (Ismail et al., *J.Bacteriol.* 175:5097-5105 (1993)) 및 *T. 브로크카*의 알코올 탈수소효소들은 (Lamed et al., *Biochem.J.* 195:183-190 (1981); Peretz et al., *Biochemistry*. 28:6549-6555 (1989)) 아세톤을 이소프로판올로 전환한다. 메틸 에틸 케톤 환원효소는 MEK의 2-부탄올로의 환원을 촉매한다. 예시적 MEK 환원효소들은 로도코쿠스 루버 (Kosjek et al., *Biotechnol Bioeng.* 86:55-62 (2004)) 및 피로코커스 푸리오수스 (van der et al., *Eur.J.Biochem.* 268:3062-3068 (2001))에서 발견된다.

단백질	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>mdh</i>	AAC76268.1	1789632	에스캐리카야 콜라이
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	에스캐리카야 콜라이
<i>ldh</i>	YP_725182.1	113866693	랄스토니아 유트로파
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	호모 사파언스
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	클로스트리디움 베이제린크카 NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	테르모아세로박ter 브로크카 HTD4
<i>sadh</i>	CAD36475	21615553	로도코쿠스 루버
<i>adhA</i>	AAC25556	3288810	피로코커스 푸리오수스

[0690]

[0691] Matsuyama et al. ((1995))에 기재된 바와 같이 무엇보다도 바실러스, 브레비박테리움, 간디다, 및 클렙시엘라 속을 포함하는 다수의 유기체들은 4-히드록시-2-부탄논의 1,3-부탄디올으로의 환원을 촉매한다. 변이된 로도코쿠스 페닐아세트알데히드 환원효소 (Sar268) 및 레이포니아 알코올 탈수소효소 역시 이러한 변환을 본 수율로 촉매한다고 밝혀졌다 (Itoh et al., *Appl.Microbiol Biotechnol.* 75:1249-1256 (2007)).

[0692]

3-옥소아실-CoA 기질들을 해당 3-히드록시아실-CoA 산물로 환원하는 알코올 탈수소효소들은 도 19-21에 도시된 경로들과 연관된다. 3-옥소아실-CoA 탈수소효소들 (EC 1.1.1.35)은 3-옥소아실-CoA 분자들을 3-히드록시아실-CoA 분자들로 전환하며 때로는 지방산 베타-산화 또는 페닐아세테이트 이화작용에 관여된다. 예를들면, *E. coli*의 두 종의 지방산 산화 복합체들, *fadB* 및 *fadJ*에 의해 암호화되는 서브단위들은 3-히드록시아실-CoA 탈수소효소들로 작용한다 (Binstock et al., *Methods Enzymol.* 71 Pt C:403-411 (1981)). *E. coli*에서 페닐아세테이트 분해 오피론의 다른 유전자들와 *paaH*의 근접성 (Nogales et al., 153:357-365 (2007)) 및 *paaH* 변이체들은 페닐아세테이트에서 증식될 수 없다는 사실로 (Ismail et al., *Eur.J.Biochem.* 270:3047-3054 (2003)), *E. coli* *paaH* 유전자 역시 3-히드록시아실-CoA 탈수소효소를 암호화할 것으로 예상된다. 클로스트리아 여러 종들에

서 부티레이트로의 아세틸CoA 발효 경로에 참여하는 아세토아세틸CoA 환원효소는 상세히 연구되었다 (Jones et al., *Microbiol Rev.* 50:484-524 (1986)). 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 유래의, *hbd*에 의해 암호화되는 본 효소는 클로닝되었고 *E. coli*에서 기능적으로 발현되었다 (Youngleson et al., *J Bacteriol.* 171:6800-6807 (1989)). 아세토아세틸CoA를 3-히드록시부티릴-CoA로 환원시키는 것으로 밝혀진 또 다른 유전자들은 주글로에아라미게라 유래의 *phbB* (Ploux et al., *Eur.J Biochem.* 174:177-182 (1988)) 및 로도박터 스파이로이데스 유래의 *phaB*이다 (Alber et al., *Mol.Microbiol* 61:297-309 (2006)). 앞의 유전자는 NADPH-의존성이고, 뉴클레오티드 서열이 밝혀졌고 (Peoples et al., *Mol.Microbiol* 3:349-357 (1989)) 유전자는 *E. coli*에서 발현되었다. 본 유전자에 대한 기질 특이성 연구는 기질로서 아세토아세틸CoA 외에도 3-옥소프로파오닐-CoA를 수용할 수 있다고 결론을 내렸다 (Ploux et al., *Eur.J Biochem.* 174:177-182 (1988)). 추가적인 유전자들은 파라코쿠스 데니트리피칸스의 *phaB*, 클로스트리디움 클루이베리의 *Hbd1* (C-말단 도메인) 및 *Hbd2* (N-말단 도메인) (Hillmer and Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 3334:12-23 (1974)) 및 보스 타우루스의 *HSD17B10* (Wakil et al., *J Biol.Chem.* 207:631-638 (1954))을 포함한다. 파라코쿠스 데니트리피칸스 유래의 효소는 *E. coli*에서 기능적으로 발현되고 특정되었다 (Yabutani et al., *FEMS Microbiol Lett.* 133:85-90 (1995)). 다수의 유사한 효소들은 클로스트리아의 다른 종들 및 메탈로스파이라 세균에서 발견되었다 (Berg et al., *Science*. 318:1782-1786 (2007)). 칸디다 트로피칼리스 유래의 효소는 페옥시솜 지방산 베타-산화 다기능성 효소 타입 2 (MFE-2)의 성분이다. 본 단백질의 탈수소효소 B 도메인은 아세토아세틸CoA에 촉매적으로 활성이다. 본 도메인은 *E. coli*에서 기능적으로 발현되었고, 결정 구조가 입수될 수 있고, 촉매 기전이 잘 이해된다 (Ylianttila et al., *Biochem Biophys Res Commun* 324:25-30 (2004); Ylianttila et al., *J Mol Biol* 358:1286-1295 (2006)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>sadB</i>	P21177.2	119811	에스케리키아 콜라이
<i>sadJ</i>	P77399.1	3334437	에스케리키아 콜라이
<i>paaH</i>	NP_415913.1	16129356	에스케리키아 콜라이
<i>Hbd2</i>	EDK34807.1	146348271	클로스트리디움 클루이베리
<i>Hbd1</i>	EDK32512.1	146345976	클로스트리디움 클루이베리
<i>HSD17B10</i>	O02691.3	3183024	보스 타우루스
<i>phbB</i>	P23238.1	130017	주글로에아라미게라
<i>phaB</i>	YP_353825.1	77464321	로도박터 스파이로이데스
<i>phaB</i>	BAA08358	675524	파라코쿠스 데니트리피칸스
<i>Hbd</i>	NP_349314.1	15895965	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>Hbd</i>	AAM14586.1	20162442	클로스트리디움 베이제링크카
<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	146304189	메탈로스파이라 세균
<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	146303184	메탈로스파이라 세균
<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	146303174	메탈로스파이라 세균

<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	146304741	메탈로스파이라 세균
<i>Fox2</i>	Q02207	399508	칸디다 트로피칼리스

[0693]

[0694] 2 기능성 산화환원효소들은 아실-CoA를 상응되는 알코올로 전환한다. 3-히드록시글루타릴-CoA를 3,5-디히드록시펜타노에이트로 (도 21, 단계 G) 및 3-옥소글루타릴-CoA를 5-히드록시-3-옥소펜타노에이트로 전환 (도 21, 단계 K)하기 위하여 이러한 활성을 가지는 효소들이 요구된다.

[0695] 아실-CoA를 알코올로 전환하는 예시적인 2 기능성 산화환원효소들은 기질들 예를들면 아세틸CoA를 에탄올로 (예를들면, *E. coli* 유래의 *adhE* (Kessler et al., *FEBS.Lett.* 281:59-63 (1991))) 및 부티릴-CoA를 부탄올 (예를들면 *C. 아세토부틸리쿰* 유래의 *adhE2* (Fontaine et al., *J.Bacteriol.* 184:821-830 (2002)))로 변환하는 것들을 포함한다. *bdh* I 및 *bdh* II에 의해 암호화되는 *C. 아세토부틸리쿰* 효소들은 (Walter, et al., *J. Bacteriol.* 174:7149-7158 (1992)), 아세틸CoA 및 부티릴-CoA를 에탄올 및 부탄올로 각각 환원시킨다. 아세틸CoA를 에탄올로 환원시키는 것 외에도, 래우코노스토크 메센테로이데스의 *adhE*에 의해 암호화되는 효소는 분자 사슬 화합물 이소부틸알데히드를 이소부티릴-CoA로 산화시키는 것으로 밝혀졌다 (Kazahaya et al.,

J. Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55 (1972); Koo et al., *Biotechnol Lett*, 27:505-510 (2005)). 또 다른 예시적 효소는 말로닐-CoA를 3-HP로 전환시킨다. 이러한 활성을 가지는 NADPH-의존성 효소는 클로로플렉수스 아우란티카쿠스에서 특정되었고 여기에서 3-히드록시프로파오네이트 회로에 참여한다 (Hugler et al., *J Bacteriol*, 184:2404-2410 (2002); Strauss et al., *Eur J Biochem*, 215:633-643 (1993)). 300 kDa의 본 효소는 상당히 기질-특이적이고 기타 알려진 산화환원효소들과는 서열 유사성이 거의 없다 (Hugler et al., *supra*). 다른 유기체들의 어떠한 효소들도 이러한 특이적인 반응을 촉매하지 않는 것으로 보이나; 다른 유기체들도 유사한 경로들을 가질 것이라는 생물정보학적 증거는 있다 (Klatt et al., *Env Microbiol*, 9:2067-2078 (2007)). 로세이플렉수스 카스텐홀지, 에리트로박터 종 *NAP1* 및 마린 감마 프로테오박테리움 HTCC2080을 포함한 다른 유기체에서 효소 후보들은 서열 유사성으로 추론될 수 있다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	에스캐리카야 콜라이
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	레우코노스토크 메센테로이데스
<i>mcr</i>	AAS20429.1	42561982	클로로플렉수스 아우란티카쿠스
<i>Rcas_2929</i>	YP_001433009.1	156742880	로세이플렉수스 카스텐홀지
<i>NAP1_02720</i>	ZP_01039179.1	85708113	에리트로박터 종 <i>NAP1</i>
<i>MGP2080_00535</i>	ZP_01626393.1	119504313	마린 감마 프로테오박테리움 HTCC2080

[0696]

[0697] 더 긴 사슬의 아실-CoA 분자들은 효소들 예를들면 알코올-형성 지방산 아실-CoA 환원효소를 암호화하는 호호바(심몬드시아 키넨시스) FAR에 의해 해당 알코올들로 환원된다. *E. coli* 내에서 과다발현으로 FAR 활성 및 지방산 알코올 축적을 보였다 (Metz et al., *Plant Physiol*, 122:635-644 (2000)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
FAR	AAD38039.1	5020215	심몬드시아 키넨시스

[0698]

[0699] 이들 단계를 촉매하는 다른 후보는 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 환원효소 (또는 HMG-CoA 환원효소)이다. 본 효소는 천연적으로 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA의 CoA기를 알코올로 환원시켜 메발로네이트를 형성한다. 3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 환원효소를 암호화하는 술풀로부스 솔파타리쿠스의 *hmgA* 유전자는 클로닝, 서열화 및 *E. coli*에서 발현되었다 (Bochar et al., *J Bacteriol*, 179:3632-3638 (1997)). *S. 세레비지애* 또한 두 종의 HMG-CoA 환원효소들을 가진다 (Basson et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:5563-5567 (1986)). 본 유전자는 또한 아라비돈시스 탈리아나로부터 단리되었고 *S. 세레비지애*의 HMG-CoA 환원효소 활성을 보완하는 것을 확인되었다 (Learned et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:2779-2783 (1989)).

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

[0700]

[0701] 1.2.1 패밀리에 속하는 아실-CoA 환원효소들은 아실-CoA를 상응되는 알데히드로 환원한다. 이러한 전환이 도 21의 단계들 C 및 H에서 요구된다. 여러 아실-CoA 탈수소효소들이 공개 문헌에 기술되고 이들 단계에서 적정한 후보이다. 이들을 하기한다.

[0702]

예시적인 아실-CoA 환원효소들은 지방산 아실-CoA 환원효소, 숙시닐-CoA 환원효소 (EC 1.2.1.76), 아세틸CoA 환원효소 및 부티릴-CoA 환원효소를 포함한다. 예시적 지방산 아실-CoA 환원효소들은 아시네토박터 칼코아세티쿠스 (Reiser, *Journal of Bacteriology* 179:2969-2975 (1997)) 및 아시네토박터 종 M-1 (Ishige et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192-1195 (2002))의 *acr1*에 의해 암호화된다. 숙시닐-CoA 환원효소 활성을 가지는 효소들은 클로스트리디움 클루이베리 의 *sucD* (Sohling, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996)) 및 *P. 긴기발리스*의 *sucD* (Takahashi, *J. Bacteriol.* 182:4704-4710 (2000))에 의해 암호화된다. 추가적인 숙시닐-CoA 환원효소들은 메탈로스파이라 세둘라 (Berg et al., *Science* 318:1782-1786 (2007)) 및 테르모프로테우스 뉴트로필루스 (Ramos-Vera et al., *J. Bacteriol.* 191:4286-4297 (2009))를 포함한 호열성 고세균의 3-히드록시프로파오네이트/4-히드록시부티레이트 회로에 참여한다. *Msed_0709*에 의해 암호화되는 *M. 세둘라* 효소는 엄격한 NADPH-의존성이며 또한 말로닐-CoA 환원효소 활성을 가진다. *T. 뉴트로필루스* 효소는 NADPH 및 NADH 모두에 대하여 활성이다. 슈도모나스 종의 *bphG*에 의해 암호화되는 아실화 아세트알데히드 탈수소효소는, 아세트알데히드, 프로페온알데히드, 부틸알데히드, 이소부틸알데히드 및 포름알데히드를 산화하고 아실화하는 것으로 확인되므로 또 다른 효소이다 (Pawlowski, *J. Bacteriol.* 175:377-385 (1993)). 아세틸CoA를 에탄올로 환원하는 것 외에도, 퀘우코노스토크 메센테로이데스의 *adhE*에 의해 암호화되는 효소는 분자 사슬 화합물인 이소부틸알데히드를 이소부티릴-CoA로 산화하는 것으로 확인되었다 (Kazahaya, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43-55 (1972); and Koo et al., *Biotechnol Lett.* 27:505-510 (2005)). 부틸알데히드 탈수소효소는 유사한 반응인 용매생산성 유기체 예를들면 클로스트리디움 사카로퍼부틸아세토니쿰에서 부티릴-CoA의 부틸알데히드로의 전환을 촉매한다 (Kosaka et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71:58-68 (2007)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>acr1</i>	YP_047869.1	50086359	아시네토박터 칼코아세티쿠스
<i>acr1</i>	AAC45217	1684886	아시네토박터 바일리아
<i>acr1</i>	BAB85476.1	18857901	아시네토박터 종 균주 M-1
<i>MSED_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	메탈로스파이라 세둘라
<i>Tneu_0421</i>	ACB39369.1	170934108	테르모프로테우스 뉴트로필루스
<i>sucD</i>	P38947.1	172046062	클로스트리디움 클루이베리
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	포르파로모나스 긴기발리스
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	슈도모나스 sp
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	퀘우코노스토크 메센테로이데스
<i>Bld</i>	AAP42563.1	31075383	클로스트리디움 사카로퍼부틸아세토니쿰

[0703]

[0704] 아실-CoA를 상응되는 알데히드로 전환하는 추가적인 효소 타입은 말로닐-CoA 환원효소이고 이는 말로닐-CoA를 말론 세미알데히드로 변환시킨다. 말로닐-CoA 환원효소는 호열호산성 고세균의 3-히드록시프로파오네이트 회로를 통한 독립영양체 탄소 고정에 핵심적인 효소이다 (Berg, *Science* 318:1782-1786 (2007); and Thauer, *Science* 318:1732-1733 (2007)). 본 효소는 NADPH를 조인자로 활용하고 메탈로스파이라 및 술폴로부스 종에서 특정되었다 (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); and Hugler, *J. Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002)). 본 효소는 메탈로스파이라 세둘라의 *Msed_0709*에 의해 암호화된다 (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006); and Berg, *Science* 318:1782-1786 (2007)). 술폴로부스 토코다이 유래의 말로닐-CoA 환원효소를 암호화하는 유전자는 클로닝되었고 *E. coli*에서 이종 발현되었다 (Alber et al., *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006)). 또한 본 효소는 메틸말로닐-CoA의 상응되는 알데히드로의 전환을 촉매하는 것으로 확인되었다 (WO2007141208 (2007)). 이들 효소의 알데히드 탈수소효소 기능성은 클로로플렉수스 아우란티카쿠스 유래의 2 기능성 탈수소효소와 유사하지만, 서열 유사성은 거의 없다. 말로닐-CoA 환원효소 후보들 모두는 아스파тир-4-포스페이트의 아스파르테이트 세미알데히드로의 환원 및 동시적 탈인산화반응을 촉매하는 효소인 아스파르테이트-세미알데히드 탈수소효소와 높은 서열 유사성을 가진다. 추가적인 유전자 후보는 술폴로부스 솔파타리쿠스 및 술폴로부스 아시도칼다리우스를 포함하는 다른 유기체의 단백질들과의 서열 상동성으로 발견될 수 있고 아래에 나열되었다. CoA-아실화 알데히드 탈수소효소에 대한 또 다른 후보는 클로스트리디움 베이제린크키 유래의 *ald* 유전자이다 (Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999)). 본 효소는 아세틸CoA 및 부티릴-

CoA를 상응되는 알데히드들로 환원하는 것으로 보고되었다. 본 유전자는 살모넬라 티페무리움 및 *E. coli*의 아세트알데히드 탈수소효소를 암호화하는 *eutE*와 매우 유사하다 (Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	메탈로스파이라 세툴라
<i>Mcr</i>	NP_378167.1	15922498	술풀로부스 토코다이
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	15898958	술풀로부스 솔파타리쿠스
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	70608071	술풀로부스 아시도칼다리우스
<i>Ald</i>	AAT66436	49473535	클로스트리디움 베이체린크카
<i>eutE</i>	AAA80209	687645	살모넬라 티페무리움
<i>eutE</i>	P77445	2498347	에스케리카야 콜라이

[0705]

[0706] 일부가 가역적인 2-에노에이트 환원효소들은 광범위한 α , β -불포화 카르복실산들 및 알데히드들의 NAD(P)H-의 존성 환원을 촉매하는 것으로 알려져 있다 (Rohdich et al., *J Biol. Chem.* 276:5779-5787 (2001)). 이들 효소는 도 20의 단계들 I 및 C에 도시된 변환들을 수행하는 적정 후보이다. 여러 실시예들이 하기된다.

[0707]

최근 공개된 *C. 클루이베리* 유전체 서열에서, 에노에이트 환원효소들에 대한9 암호화 서열들이 보고되었고, 이 중 하나는 특정되었다 (Seedorf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:2128-2133 (2008)). *C. 티로부틸리쿰* 및 *M. 테르모아세티쿰* 유래의 *enr* 유전자들이 클로닝, 서열화되어 서로 59% 상동성을 보였다. 앞의 유전자는 또한 *C. 클루이베리*에서 특정된 유전자와 약75% 유사한 것으로 보인다 (Giesel et al., *J Biol. Chem.* 135:51-57 (1983)). 이러한 서열 결과로부터 *enr*은 *E. coli*의 디엔오일 CoA 환원효소 (*fadH*)와 매우 유사하다는 것이 보고되었다 (Rohdich et al., *J Biol. Chem.* 276:5779-5787 (2001)). *C. 테르모아세티쿰* *enr* 유전자는 또한 *E. coli*에서 촉매적 활성 형태로 발현되었다 (Rohdich et al., *J Biol. Chem.* 276:5779-5787 (2001)). 본 효소는 넓은 범위의 알파, 베타-불포화 카르보닐 화합물들에 대하여 활성을 보인다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>enr</i>	ACA54153.1	169405742	클로스트리디움 보톨리눔 A3 str
<i>enr</i>	CAA71086.1	2765041	클로스트리디움 티로부틸리쿰
<i>enr</i>	CAA76083.1	3402834	클로스트리디움 클루이베리
<i>enr</i>	YP_430895.1	83590886	무엘라 씨모아세티카
<i>fadH</i>	NP_417552.1	16130976	에스케리카야 콜라이

[0708]

[0709] 2-에노에이트 환원효소의 다른 후보는 말레일아세테이트 환원효소 (MAR, EC 1.3.1.32)이고, 본 효소는 2-말레일 아세테이트 (4-옥소헥스-2-에네디오에이트)를 3-옥소아디페이트로 환원시키는 촉매로 작용한다. MAR 효소들은 친연적으로 방향족 분해 경로들에 참여한다 (Kaschabek et al., *J Bacteriol.* 175:6075-6081 (1993); Kaschabek et al., *J Bacteriol.* 177:320-325 (1995); Camara et al., *J Bacteriol.* (2009); Huang et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7238-7245 (2006)). 본 효소 활성을 분석되었고 슈도모나스 종 균주 B13에 서 특정되었고 (Kaschabek et al., *J Bacteriol.* 175:6075-6081 (1993); Kaschabek et al., *J Bacteriol.* 177:320-325 (1995)), 암호화 유전자는 클로닝되고 서열이 정해졌다 (Kasberg et al., *J Bacteriol.* 179:3801-3803 (1997)). 추가적인 MAR 유전자 후보는 슈도모나스 종 균주 B13 유래의 *cicE* 유전자 (Kasberg et al., *J Bacteriol.* 179:3801-3803 (1997)), 로도코쿠스 오퍼쿠스 유래의 *macA* 유전자 (Seibert et al., *J Bacteriol.* 180:3503-3508 (1998)), 랄스토니아 유트로파 유래의 *macA* 유전자 (Seibert et al., *J Bacteriol.* 180:3503-3508 (1998)), 랄스토니아 유트로파 유래의 *tfdFII* 유전자 (Seibert et al., *J Bacteriol.* 175:6745-6754 (1993)) 및 코리네박테리움 글루타미쿰의 *NCgl1112*를 포함한다 (Huang et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7238-7245 (2006)). *ccdB*에 의해 암호화되는 슈도모나스 레이네케이 MT1의 MAR는 최근 동정되었다 (Camara et al., *J Bacteriol.* (2009)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
clcE	3913241	O30847.1	슈도모나스 종 균주 B13
macA	7387876	O84992.1	로도코쿠스 오파쿠스
macA	5916089	AAD55886	쿠프리아비누스 네카토르
tfdFII	1747424	AAC44727.1	랄스토니아 유트로파 JMP134
NCgl1112	19552383	NP_600385	코리네박테리움 글루타마콤
ccuD	134133940	ABO61029.1	슈도모나스 래이네케이 MTI

[0710]

[0711] 도 19-21 단계 A 및 도 19 단계 M은 3-히드록시프로피오닐-CoA, 아크릴알-CoA, 숙시닐-CoA 또는 말로닐-CoA 및 아세틸CoA와의 축합이 필요하다. 여러 α -케토티올라아제 효소들이 공개 문헌에 기재되고 이들 단계의 대표적인 적정 후보이다. 이들을 하기한다.

[0712]

예를들면, 3-옥소아디필-CoA 티올라아제는 상기 단계들에 적합한 일종의 베타-케토티올라아제 효소이다. 3-옥소아디필-CoA 티올라아제 (EC 2.3.1.174)는 자연적으로 베타-케토아디필-CoA를 숙시닐-CoA 및 아세틸CoA로 전환하며 방향족 화합물 분해를 위한 베타-케토아디페이트 경로의 핵심 효소이다. 본 효소는 토양 세균 및 진균 예를들면 슈도모나스 푸터타 (Harwood et al., *J Bacteriol.* 176:6479-6488 (1994)) 및 아시네토박터 칼코아세티쿠스 (Doten et al., *J Bacteriol.* 169:3168-3174 (1987))에 널리 분포되어 있다. 슈도모나스 균주 B13의 *pcaF* (Kaschabek et al., *J Bacteriol.* 184:207-215 (2002)), 슈도모나스 푸터타 U의 *phaD* (Olivera et al., *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 95:6419-6424 (1998)), 슈도모나스 플루오레센스 ST의 *paaE* (Di et al., *Arch.Microbiol.* 188:117-125 (2007)), 및 *E. coli* 유래의 *paaJ* (Nogales et al., *미생물학* 153:357-365 (2007))에 의해 암호화되는 유전자 산물 역시 이러한 변환을 촉매한다. 슈도모나스 푸터타 유래의 *bkt*, 슈도모나스 아이루기노사 PAO1 유래의 *pcaF* 및 *bkt*, 버크홀데리아 암비파리아 AMMD 유래의 *bkt*, *E. coli* 유래의 *paaJ*, 및 *P. 푸터타* 유래의 *phaD*를 포함한 여러 베타-케토티올라아제들은 옥소아디필-CoA 형성 방향에서 상당하고도 선택적인 활성을 보인다.

단백질	GI#	유전자은행 등재#	유기체
<i>paaJ</i>	16129358	NP_415915.1	에스케리키아 콜라이
<i>pcaF</i>	17736947	AAL02407	슈도모나스 크낙크무찌(B13)
<i>phaD</i>	3253200	AAC24332.1	슈도모나스 푸터타
<i>pcaF</i>	506695	AAA85138.1	슈도모나스 푸터타
<i>pcaF</i>	141777	AAC37148.1	아시네토박터 칼코아세티쿠스
<i>paaE</i>	106636097	ABF82237.1	슈도모나스 플루오레센스
<i>bkt</i>	115360515	YP_777652.1	버크홀데리아 암비파리아 AMMD
<i>bkt</i>	9949744	AAG06977.1	슈도모나스 아이루기노사 PAO1
<i>pcaF</i>	9946065	AAG03617.1	슈도모나스 아이루기노사 PAO1

[0713]

[0714] 옥소페넬로일-CoA:글루타릴-CoA 아실전이효소, 베타-케토티올라아제 (EC 2.3.1.16)에 의해 글루타릴-CoA 및 아세틸CoA는 축합되어 3-옥소페넬로일-CoA를 형성한다. 유전자들 *bktB* 및 *bktC*에 의해 암호화되는 이러한 변환을 촉매하는 효소는 랄스토니아 유트로파 (전에는 알칼리게네스 유트로푸스로 알려짐)에서 발견된다 (Slater et al., *J.Bacteriol.* 180:1979-1987 (1998); Haywood et al., 52:91-96 (1988)). BktB 단백질 서열이 알려져 있지만; BktC 단백질 서열은 보고되지 않았다. 로도슈도모나스 팔루스트리스의 *pim* 오페론 역시 *pimB*에 의해 암호화되는 베타-케토티올라아제를 암호화하며, 벤조일-CoA 분해 과정에서 분해 방향인 이러한 변환을 촉매할 것이라 예상된다 (Harrison et al., 151:727-736 (2005)). *S. 아시디트로피쿠스*의 베타-케토티올라아제 효

소 후보는 *bktB* 와의 서열 상동성으로 확인되었다 (43% 상동성, e값 = 1e-93).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>bktB</i>	YP_725948	11386745	랄스토니아 유트로파
<i>pimB</i>	CAE29156	39650633	로도슈도모나스 팔루스트리스
<i>syn_02642</i>	YP_462685.1	85860483	신트로푸스 아시디트로피쿠스

[0715]

[0716] 아세틸CoA 및 프로피오닐-CoA로부터 베타-케토발레레이트 형성을 촉매하는 베타-케토티올라아제 효소들 역시 아세틸CoA 및 3-히드록시프로피오닐-CoA, 아크릴알-CoA, 숙시닐-CoA, 또는 말로닐-CoA와의 축합을 촉매할 수 있다. 주글로에아 라미게라 는 두 종의 케토티올라아제들을 가지며 프로피오닐-CoA 및 아세틸CoA로부터 -케토발레릴-CoA를 형성하고 *R. 유트로파* 는 -산화 케토티올라아제를 가지며 이것 역시 본 변환을 촉매할 수 있다 (Gruys et al., US 특허 5,958,745 (1999)). 이들 유전자 또는 번역 단백질들 서열들은 보고되지 않았지만, *R. 유트로파*, *Z. 라미게라*, 또는 기타 유기체에서 여러 후보들이 *R. 유트로파* 유래의 *bktB* 와의 서열 상동성에 기반하여 동정될 수 있다. 이들은 다음을 포함한다:

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>phaA</i>	YP_725941.1	113867452	랄스토니아 유트로파
<i>h16_A1713</i>	YP_726205.1	113867716	랄스토니아 유트로파
<i>pcaF</i>	YP_728366.1	116694155	랄스토니아 유트로파
<i>h16_B1369</i>	YP_840888.1	116695312	랄스토니아 유트로파
<i>h16_A0170</i>	YP_724690.1	113866201	랄스토니아 유트로파
<i>h16_A0462</i>	YP_724980.1	113866491	랄스토니아 유트로파
<i>h16_A1528</i>	YP_726028.1	113867539	랄스토니아 유트로파
<i>h16_B0381</i>	YP_728545.1	116694334	랄스토니아 유트로파
<i>h16_B0662</i>	YP_728824.1	116694613	랄스토니아 유트로파
<i>h16_B0759</i>	YP_728921.1	116694710	랄스토니아 유트로파
<i>h16_B0668</i>	YP_728830.1	116694619	랄스토니아 유트로파
<i>h16_A1720</i>	YP_726212.1	113867723	랄스토니아 유트로파
<i>h16_A1887</i>	YP_726356.1	113867867	랄스토니아 유트로파
<i>phbA</i>	P07097.4	135759	주글로에아 라미게라
<i>bktB</i>	YP_002005382.1	194289475	쿠프리아비두스 타이완엔시스
<i>Rmet_1362</i>	YP_583514.1	94310304	랄스토니아 메탈리두란스
<i>Bphy_0975</i>	YP_001857210.1	186475740	버크홀테리아 피마툼

[0717]

[0718] 추가적인 후보로는 베타-케토티올라아제들이 포함되며, 이들은 2 분자들의 아세틸CoA를 아세토아세틸CoA로 전환하는 것을 알려져 있다 (EC 2.1.3.9). 예시적 아세토아세틸CoA 티올라아제 효소들은 *E. coli* 유래의 *atoB* (Martin et al., *Nat.Biotechnol* 21:796-802 (2003)), *C. 아세토부틸리쿰* 유래의 *thlA* 및 *thlB* (Hanai et al., *Appl Environ Microbiol* 73:7814-7818 (2007); Winzer et al., *J.Mol.Microbiol Biotechnol* 2:531-541 (2000)), 및 *S. 세레비지애* 유래의 *ERG10* (Hiser et al., *J.Biol.Chem.* 269:31383-31389 (1994)) 유전자 산물을 포함한다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>atoB</i>	NP_416728	16130161	에스케리키아 콜라이
<i>ihlA</i>	NP_349476.1	15896127	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>ihlB</i>	NP_149242.1	15004782	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
<i>ERG10</i>	NP_015297	6325229	사카로마이세스 세레비자에

[0719]

[0720] 2.8.3 패밀리에 속하는 효소들은 하나의 분자에서 다른 분자로 CoA 잔기의 가역적 전달을 촉매한다. 이러한 변환은 도 19의 단계들 F, O, G, T, H, 및 E 및 도 20의 단계들 B 및 H에서 요구된다. 여러 CoA 전이효소들이 공개 문헌에 기록되고 이들 단계들에 대한 적정한 후보로 대표된다. 이들이 하기된다.

[0721] 많은 전이효소들은 넓은 특이성을 가지고 따라서 무엇보다도 아세테이트, 숙시네이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 2-메틸아세토아세테이트, 3-케토헥사노에이트, 3-케토펜타노에이트, 발레레이트, 크로토네이트, 3-메르캅토프로피오네이트, 프로피오네이트, 비닐아세테이트, 부티레이트와 같이 다양한 CoA 수용체들을 활용한다. 예를 들면, 로세부리아 종 A2-183 유래의 효소는 부티릴-CoA:아세테이트:CoA 전이효소 및 프로피오닐-CoA:아세테이트:CoA 전이효소 활성을 가지는 것으로 확인되었다 (Charrier et al., 미생물학 152, 179-185 (2006)). 가까운 상동체는, 예를들면, 로세부리아 인테스티날리스 L1-82, 로세부리아 이눌리니보란스 DSM 16841, 유박테리움 래탈레 ATCC 33656에서 발견된다. 프로피오닐-CoA 전이효소 활성을 가지는 다른 효소는 클로스트리디움 프로피오나눔에서 발견된다 (Selmer et al., Eur J Biochem 269, 372-380 (2002)). 본 효소는 아세테이트, (R)-락테이트, (S)-락테이트, 아크릴레이트, 및 부티레이트를 CoA 수용체로 활용한다 (Selmer et al., Eur J Biochem 269, 372-380 (2002); Schweiger and Buckel, FEBS Letters, 171(1) 79-84 (1984)). 가까운 상동체는 예를들면, 클로스트리디움 노비아 NT, 클로스트리디움 베이제린크키 NCIMB 8052, 및 클로스트리디움 보툴리눔 C str. 애클룬드에서 발견된다. YgfH는 *E. coli*에서 프로피오닐 CoA:숙시네이트 CoA 전이효소를 암호화한다 (Haller et al., Biochemistry, 39(16) 4622-4629). 가까운 상동체는, 예를들면, 시트로박터 요운가이 ATCC 29220, 살모넬라 엔테리카 아종 아리조나이 세로발, 및 예르시니아 인테르메디아 ATCC 29909에서 발견된다. 이들 단백질들은 하기된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>Achl</i>	AAX19660.1	60396828	로세부리아 종 A2-183
<i>ROSINTL182_07121</i>	ZP_04743841.2	257413684	로세부리아 인테스티날리스 L1-82
<i>ROSEINA2194_0364_2</i>	ZP_03755203.1	225377982	로세부리아 이눌리니보란스
<i>EUBREC_3075</i>	YP_002938937.1	238925420	유박테리움 래탈레 ATCC 33656
<i>Pct</i>	CAB77207.1	7242549	클로스트리디움 프로피오나눔
<i>NT01CX_2372</i>	YP_878445.1	118444712	클로스트리디움 노비아 NT
<i>Cbei_4543</i>	YP_001311608.1	150019354	클로스트리디움 베이제린크키
<i>CBC_A0889</i>	ZP_02621218.1	168186583	클로스트리디움 보툴리눔 C str. 애클룬드
<i>ygfH</i>	NP_417395.1	16130821	에스케리키아 콜라이
<i>CIT292_04485</i>	ZP_03838384.1	227334728	시트로박터 요운가이 ATCC 29220
<i>SARI_04582</i>	YP_001573497.1	161506385	살모넬라 엔테리카 아종 아리조나이 세로발
<i>yinte0001_14430</i>	ZP_04635364.1	238791727	예르시니아 인테르메디아 ATCC 29909

[0722]

[0723] 추가적인 후보 효소는 슈도모나스의 *pcaI* 및 *pcaJ*에 의해 암호화되는 2-단위 효소이며, 이것은 3-옥소아디필-

CoA/숙시네이트 전이효소 활성을 보인다 (Kaschabek et al., *supra*). 상동성에 기반한 유사한 효소들은 아시네토박터 종 ADP1 (Kowalchuk et al., 유전자 146:23-30 (1994)) 및 스트렙토마이세스 코엘리콜러에 존재한다. 추가적인 예시적 숙시닐-CoA:3:옥소산-CoA 전이효소들은 헬리코박터 필로리 (Corthesy-Theulaz et al., *J.Biol.Chem.* 272:25659-25667 (1997)) 및 바실러스 섭틸리스 (Stols et al., *단백질.Expr.Purif.* 53:396-403 (2007))에 존재한다. 이를 단백질들을 하기한다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
pcaI	AAN69545.1	24985644	슈도모나스 푸티타
pcaJ	NP_746082.1	26990657	슈도모나스 푸티타
pcaI	YP_046368.1	50084858	아시네토박터 종 ADP1
pcaJ	AAC37147.1	141776	아시네토박터 종 ADP1
pcaI	NP_630776.1	21224997	스트렙토마이세스 코엘리콜러
pcaJ	NP_630775.1	21224996	스트렙토마이세스 코엘리콜러
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	헬리코박터 필로리
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	헬리코박터 필로리
ScoA	NP_391778	16080950	바실러스 섭틸리스
ScoB	NP_391777	16080949	바실러스 섭틸리스

[0724]

[0725] 아세테이트를 CoA 수용체로 활용할 수 있는 CoA 전이효소는 아세토아세틸CoA 전이효소이고, *E. coli atoA* (알파서브단위) 및 *atoD* (베타 서브단위) 유전자들로 암호화된다 (Vanderwinkel et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 33:902-908 (1968); Korolev et al., *Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002)). 본 효소는 또한 다양한 분자화 및 선형 아실-CoA 기질들, 예를들면 이소부티레이트 (Matthies et al., *Appl Environ Microbiol* 58:1435-1439 (1992)), 발레레이트 (Vanderwinkel et al., *supra*) 및 부타노에이트 (Vanderwinkel et al., *supra*)로부터 CoA 잔기를 아세테이트로 전환시키는 것으로 밝혀졌다. 유사한 효소들은 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 (Duncan et al., *Appl Environ Microbiol* 68:5186-5190 (2002)), 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (Cary et al., *Appl Environ Microbiol* 56:1576-1583 (1990)), 및 클로스트리디움 사카로페부틸아세토니쿰 (Kosaka et al., *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 71:58-68 (2007))에 존재한다. 이를 단백질들이 하기된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
atoA	P76459.1	2492994	에스캐리키아 콜라이 K12
atoD	P76458.1	2492990	에스캐리키아 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	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
ctfB	NP_149327.1	15004867	클로스트리디움 아세토부틸리쿰
ctfA	AAP42564.1	31075384	클로스트리디움 사카로페부틸아세토니쿰
ctfB	AAP42565.1	31075385	클로스트리디움 사카로페부틸아세토니쿰

[0726]

[0727] 추가적인 예시적 전이효소 후보들은 각각 숙시닐-CoA, 4-히드록시부티릴-CoA, 및 부티릴-CoA 전이효소 활성을 보이는 것으로 확인되는 클로스트리디움 클루이베리의 *cat1*, *cat2*, 및 *cat3*의 유전자 산물에 의해 촉매화된다 (Seedorf et al., *supra*; Sohling et al., *Eur.J Biochem.* 212:121-127 (1993); Sohling et al., *J Bacteriol.* 178:871-880 (1996)). 유사한 CoA 전이효소 활성들은 또한 트리코모나스 바기날리스 (van Grinsven et al., *J.Biol.Chem.* 283:1411-1418 (2008)) 및 트리파노소마 브루세이 (Riviere et al., *J.Biol.Chem.* 279:45337-45346 (2004))에 존재한다. 이를 단백질들이 하기된다.

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

[0728]

[0729] 협기성 박테리움 아시다미노코쿠스 페르멘坦스 유래의 글루타코네이트-CoA-전이효소 (EC 2.8.3.12)는 이염기산 글루타코닐-CoA 및 3-부테노일-CoA와 반응한다 (Mack et al., *FEBS Lett.* 405:209-212 (1997)). 본 효소를 암호화하는 유전자들은 *gctA* 및 *gctB*이다. 본 효소는 기타 CoA 유도체 예를들면 글루타릴-CoA, 2-히드록시글루타릴-CoA, 아디필-CoA 및 아크릴일-CoA와 낮기는 하지만 겹출될 수 있는 활성을 가진다 (Buckel et al., *Eur. J. Biochem.* 118:315-321 (1981)). 본 효소는 클로닝되었고 *E. coli*에서 발현되었다 (Mack et al., *Eur. J. Biochem.* 226:41-51 (1994)). 이를 단백질들이 하기된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>gctA</i>	CAA57199.1	559392	아시다미노코쿠스 페르멘坦스
<i>gctB</i>	CAA57200.1	559393	아시다미노코쿠스 페르멘坦스

[0730]

[0731] 3.1.2 패밀리에 속하는 효소들은 아실-CoA 분자들을 이들의 상응되는 산들로 가수분해한다. 이러한 변환은 도 19의 단계들 F, O, G, T, H, 및 E 그리고of 도 20의 단계들 B 및H에서 필요한다. 여러 이러한 효소들이 문헌에 기재되어 있고 이를 단계들에 대한 적정 후보가 된다.

[0732]

예를들면, 라투스 노르베기쿠스 뇌 유래 *acot12*에 의해 암호화되는 효소는 (Robinson et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:959-965 (1976)) 부티릴-CoA, 헥사노일-CoA 및 말로닐-CoA와 반응한다. *acot8*에 의해 암호화되는 인간의 디카르복실산 티오에스테라제는 글루타릴-CoA, 아디필-CoA, 수베릴-CoA, 세바실-CoA, 및 도데칸디오일-CoA에 대한 활성을 보인다 (Westin et al., *J. Biol. Chem.* 280:38125-38132 (2005)). 본 효소에 가장 가까운 *E. coli* 상동체, *tesB* 역시 여러 CoA 티올에스테르를 가수순해할 수 있다 (Naggert et al., *J. Biol. Chem.* 266:11044-11050 (1991)). 유사한 효소는 또한 래트 간에서 특정되었다 (Deana R., *Biochem. Int.* 26:767-773 (1992)). 가수분해효소 활성을 가지는 *E. coli*에서의 추가적인 효소들은 *ybgC*, *paaI*, 및 *ybdB* (Kuznetsova, et al., *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29(2):263-279; Song et al., *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(16):11028-38)을 포함한다. 서열은 아직 보고되지 않았지만, 완두 잎의 미토콘드리아 유래 효소는 넓은 기질 특이성을 가지고, 아세틸CoA, 프로피오닐-CoA, 부티릴-CoA, 팔미토일-CoA, 올레오일-CoA, 숙시닐-CoA, 및 크로토닐-CoA에 대한 활성을 보였다 (Zeiher et al., *Plant. Physiol.* 94:20-27 (1990)). *S. 세레비지애* 유래의 아세틸CoA 가수분해효소, *ACH1*, 는 또 다른 가수분해효소 후보이다 (Buu et al., *J. Biol. Chem.* 278:17203-17209 (2003)).

단백질	유전자은행 등재#	GI#	유기체
acot12	NP_570103.1	18543355	라투스 노르베기쿠스
tesB	NP_414986	16128437	에스캐리키아 콜라이
acot8	CAA15502	3191970	호모 사피엔스
acot8	NP_570112	51036669	라투스 노르베기쿠스
tesA	NP_415027	16128478	에스캐리키아 콜라이
ybgC	NP_415264	16128711	에스캐리키아 콜라이
paaI	NP_415914	16129357	에스캐리키아 콜라이
ybdB	NP_415129	16128580	에스캐리키아 콜라이
ACH1	NP_009538	6319456	사카로마이세스 세레비자애

[0733]

[0734] 또 다른 가수분해효소 후보는 아시다미노코쿠스 페르멘坦스 유래의 글루타코네이트 CoA-전이효소이다. 본 효소는 아실-CoA 가수분해효소로의 위치-선택적 돌연변이에 의해 변환되고 글루타릴-CoA, 아세틸CoA 및 3-부테노일-CoA에 대한 활성을 가진다 (Mack et al., FEBS.Lett. 405:209-212 (1997)). 이러한 결과는 숙시닐-CoA:3-케토산-CoA 전이효소 및 아세토아세틸CoA:아세틸CoA 전이효소를 암호화하는 효소들은 또한 본 반응 단계에 대한 후보로 기능할 수 있지만 기능을 변화시키는 소정의 돌연변이가 필요하다는 것을 암시한다.

단백질	유전자은행 등재#	GI#	유기체
gctA	CAA57199	559392	아시다미노코쿠스 페르멘坦스
gctB	CAA57200	559393	아시다미노코쿠스 페르멘坦스

[0735]

[0736] 추가적인 가수분해효소들로는 3-히드록시이소부티릴-CoA 가수분해효소가 포함되며 이는 발린 분해 과정에서 3-히드록시이소부티릴-CoA를 3-히드록시이소부티레이트로 효율적으로 전환시키는 촉매로 기재되어 있다 (Shimomura et al., J Biol Chem. 269:14248-14253 (1994)). 본 효소를 암호화하는 유전자들은 라투스 노르베기쿠스 (Shimomura et al., Methods Enzymol. 324:229-240 (2000)) 및 호모 사피엔스 (Shimomura et al., supra) 의 *hibch*를 포함한다. 유사한 유전자 후보들은 또한 서열 상동성으로 확인될 수 있고, 예를들면 사카로마이세스 세레비자애의 *hibch* 및 바실러스 세레우스의 BC_2292를 포함한다.

단백질	유전자은행 등재#	GI#	유기체
<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	146324906	라투스 노르베기쿠스
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	146324905	호모 사피엔스
<i>hibch</i>	P28817.2	2506374	사카로마이세스 세레비자애
BC_2292	AP09256	29895975	바실러스 세레우스

[0737]

[0738] EC 분류 4.1.1에 속하는 탈탄산효소들이 도 19의 단계들 U,Y,V, 및 X, 도 20의 단계들 D,J,M, 및 N, 및 도 21의 단계들 M,N, 및 P를 촉매하는데 필요하다. 후보 탈탄산효소들은 본원에서 전술되었다.

[0739]

이중결합 수화반응은 4.2.1 패밀리 효소들에 속하는 수화효소들에 의해 촉매된다. 물을 제거하고 이중결합을 형성하는 반응은 4.2.1 패밀리 효소들에 속하는 탈수효소들에 의해 촉매된다. 수화효소들은 때로는 가역적이고 또한 탈수반응을 촉매한다. 탈수효소들은 때로는 가역적이고 역시 수화반응을 촉매한다. 주어진 기질에 대한 물의 첨가 또는 제거반응이 도 19 단계들 S, K, L, R, D, C, J, Q, 및 W, 도 20 단계 F, 및 도 21 단계들 E, F, 및 O에서 필요하다. 여러 수화효소 및 탈수효소가 문헌에 기록되고 이를 단계들을 위한 적정 후보로 대표된다.

[0740]

예를들면, 많은 탈수효소들은 물의 알파, 베타-제거를 촉매하며, 이 반응은 전자-반게 카르보닐, 카르복실레이트, 또는 CoA-티올 에스테르기에 의한 알파-수소 활성화 및 베타-위치로부터 히드록실기 제거가 관여된다 (Buckel et al., J Bacteriol. 117:1248-60 (1974); Martins et al., PNAS 101:15645-9 (2004)). 예시적 효소들은 2-(히드록시메틸)글루타레이트 탈수효소 (EC 4.2.1.-), 푸마라아제 (EC 4.2.1.2), 3-데히드로퀴네이트 탈수효소 (EC 4.2.1.10), 시클로헥사논 수화효소 (EC 4.2.1.-) 및 2-케토-4-펜테노에이트 탈수효소 (EC 4.2.1.80), 시트라말레이트 하이드로리아제 및 디메틸말레이트 수화효소를 포함한다.

[0741]

2-(히드록시메틸)글루타레이트 탈수효소는 [4Fe-4S]-함유 효소이고 2-(히드록시메틸)글루타레이트를 2-메틸렌-

글루타레이트로 탈수시키고, 애우박테리움 바르케리 (전에는 클로스트리디움 바르케리)에서 니코티네이트 이화작용에서 역할이 연구되었다 (Alhapel et al., *Proc Natl Acad Sci* 103:12341-6 (2006)). 높은 서열 상동성을 가지는 유사한 효소들은 박테로이데스 카필로수스, 아나이로트룬쿠스 콜리호미니스, 및 나트라나이로비우스 테르모필리우스에서 발견된다. 이를 효소는 [4Fe-4S]-함유 세균성 세린 탈수효소들 (예를들면, *tdcG*, *sdhB*, 및 *sdaA*에 의해 암호화되는 *E. coli* 효소들)의 알파 및 베타 서브단위들과 상동성이다. *E. coli*에서 유사한 기능을 가지는 효소는 디메틸말레이트 수화효소이고, 디메틸말레이트를 탈수시켜 (2R,3S)-2,3-디메틸말레이트를 형성하는 아코니트산수화효소 패밀리에 속하는 가역적 Fe²⁺-의존성이며 산소-민감성 효소이다. 본 효소는 *dmdAB*에 의해 암호화된다 (Alhapel et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12341-6 (2006); Kollmann-Koch et al., *Hoppe Seylers Z. Physiol Chem.* 365:847-857 (1984)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>hmd</i>	ABC88407.1	86278275	애우박테리움 바르케리
<i>BACCAP_02294</i>	ZP_02036683.1	154498305	박테로이데스 카필로수스
<i>ANACOL_02527</i>	ZP_02443222.1	167771169	아나이로트룬쿠스 콜리호미니스
<i>NtherDRAFT_2368</i>	ZP_02852366.1	169192667	나트라나이로비우스 테르모필루스
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	애우박테리움 바르케리
<i>dmdB</i>	ABC88409	86278277	애우박테리움 바르케리

[0742]

푸마레이트 수화효소 (EC 4.2.1.2) 효소들은 자연적으로 푸마레이트에서 말레이트로의 가역적 수화를 촉매한다. 기질로서 3-옥소부탄올과 반응하는 푸마레이트 수화효소 성능은 문헌에 기재되지 않았지만, 본 효소에 대한 풍부한 구조적 정보가 있고 기타 연구자들은 본 효소에 대한 활성 및 국소화를 성공적으로 변경시켰다 (Weaver, 61:1395-1401 (2005)). *E. coli*는 3 종의 푸마라아제들을 가진다: 생장 조건들에 따라 조절되는 FumA, FumB, 및 FumC. FumB는 산소 민감성이고 혐기성 조건에서만 활성이다. FumA는 미세협기성 조건에서 활성이고, FumC는 호기성 증식에서만 활성인 효소이다 (Tseng et al., *J Bacteriol.* 183:461-467 (2001); Woods et al., 95:14-26 (1988); Guest et al., *J Gen Microbiol* 131:2971-2984 (1985)). 추가적인 효소 후보들은 캄필로박터 제주니 (Smith et al., *Int.J Biochem.Cell Biol* 31:961-975 (1999)), 테르무스 테르모필루스 (Mizobata et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 355:49-55 (1998)) 및 라투스 노르베기쿠스 (Kobayashi et al., *J. Biochem.* 89:1923-1931 (1981))에서 발견된다. 높은 서열 상동성을 가지는 유사한 효소들은 아라비돕시스 탈리아나 유래의 *fum1* 및 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 *fumC*를 포함한다. 펠로토마쿠룸 테르모프로파오니쿰 유래의 *MmcBC* 푸마라아제는 두 서브단위들을 가지는 또 다른 분류의 푸마라아제이다 (Shimoyama et al., *FEMS Microbiol Lett.* 270:207-213 (2007)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>fumA</i>	NP_416129.1	16129570	애스캐리키아 콜라이
<i>fumB</i>	NP_418546.1	16131948	애스캐리키아 콜라이
<i>fumC</i>	NP_416128.1	16129569	애스캐리키아 콜라이
<i>fumC</i>	O69294	9789756	캄필로박터 제주니
<i>fumC</i>	P84127	75427690	테르무스 테르모필루스
<i>fumH</i>	P14408	120605	라투스 노르베기쿠스
<i>fumI</i>	P93033	39931311	아라비돕시스 탈리아나
<i>fumC</i>	Q8NRM8	39931596	코리네박테리움 글루타미쿰
<i>MmcB</i>	YP_001211906	147677691	펠로토마쿠룸 테르모프로파오니쿰
<i>MmcC</i>	YP_001211907	147677692	펠로토마쿠룸 테르모프로파오니쿰

[0744]

4-히드록시-2-옥소발레레이트의 2-옥소펜테노에이트로의 탈수반응은 4-히드록시-2-옥소발레레이트 수화효소 (EC 4.2.1.80)에 의해 촉매된다. 본 효소는 방향족 분해 경로들에 참여하며 전형적으로 4-히드록시-2-옥소발레레이트 알돌라아제 활성으로 가지는 효소를 암호화하는 유전자와 공동-전사된다. 예시적 유전자 산물은 *E. coli*의

mhpD (Ferrandez et al., *J Bacteriol.* 179:2573-2581 (1997); Pollard et al., *Eur J Biochem.* 251:98-106 (1998)), 슈도모나스 푸터타 의 *todG* 및 *cmtF* (Lau et al., 유전자 146:7-13 (1994); Eaton, *J Bacteriol.* 178:1351-1362 (1996)), 코마모나스 종 CNB-1 의 *cnbE* (Ma et al., *Appl Environ Microbiol* 73:4477-4483 (2007)) 및 베크홀테리아 제노보란스 의 *mhpD* (Wang et al., *FEBS J* 272:966-974 (2005))에 의해 암호화된다. 가까운 관계의 효소, 2-옥소헵타-4-엔-1,7-디오에이트 수화효소는, 4-히드록시페닐아세트산 분해에 관여하고, 여기에서 이것은 마그네슘을 조인자로 이용하여 2-옥소-헵트-4-엔-1,7-디오에이트 (OHED)을 2-옥소-4-히드록시-헵타-1,7-디오에이트로 전환한다 (Burks et al., *J Am Chem Soc.* 120: (1998)). OHED 수화효소 효소 후보는 동정되고 *E. coli C* (Roper et al., 유전자 156:47-51 (1995); Izumi et al., *J Mol Biol.* 370:899-911 (2007)) 및 *E. coli W* (Prieto et al., *J Bacteriol.* 178:111-120 (1996))에서 특정되었다. 서열 비교로 세균, 식물 및 동물에서 광범위하게 상동체를 보인다. 상당히 유사한 서열들을 가지는 효소들은 무엇보다도 클렙시엘라 뉴모니아 (91% 상동성, e값 = 2e-138) 및 살모넬라 엔테리카 (91% 상동성, e값 = 4e-138)에 포함된다.

단백질	유전자은행 등재번호	GI 번호	유기체
<i>mhpD</i>	AAC73453.2	87081722	에스캐리키아 콜라이
<i>cmtF</i>	AAB62293.1	1263188	슈도모나스 푸터타
<i>todG</i>	AAA61942.1	485738	슈도모나스 푸터타
<i>cnbE</i>	YP_001967714.1	190572008	코마모나스 종 CNB-1
<i>mhpD</i>	Q13VU0	123358582	베크홀테리아 제노보란스
<i>hpcG</i>	CAA57202.1	556840	에스캐리키아 콜라이 C
<i>hpaH</i>	CAA86044.1	757830	에스캐리키아 콜라이 W
<i>hpaH</i>	ABR80130.1	150958100	클렙시엘라 뉴모니아
<i>Sari_01896</i>	ABX21779.1	160865156	살모넬라 엔테리카

[0746]

[0747] 또 다른 효소 후보는 시트라말레이트 하이드로리아제 (EC 4.2.1.34)이고, 본 효소는 천연적으로 2-메틸말레이트를 메사코네이트로 탈수한다. 본 효소는 2-옥소부타노에이트로의 피루베이트 경로 관점에서 메타노칼도코쿠스 잔나스키에서 연구되었고, 여기에서 이것은 넓은 기질 특이성을 보였다 (Drevland et al., *J Bacteriol.* 189:4391-4400 (2007)). 본 효소 활성은 또한 클로스트리디움 테타노모르퓸, 몰가넬라 모르가니, 시트로박터 아말로나티쿠스에서 발견되고 여기에서 글루타메이트 분해에 참여하는 것으로 생각된다 (Kato et al., *Arch Microbiol* 168:457-463 (1997)). *M. 잔나스키* 단백질 서열은 이들 유기체의 유전자들과 유의한 상동성을 공유하지 않는다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
<i>leuD</i>	Q58673.1	3122345	메타노칼도코쿠스 잔나스키

[0748]

[0749] 디메틸말레이트 수화효소 (EC 4.2.1.85)는 디메틸말레이트를 수화하여 (2R,3S)-2,3-디메틸말레이트를 형성하는 아코니트산수화효소 패밀리에 속하는 가역적 Fe^{2+} -의존성이고 산소-민감성 효소이다. 본 효소는 에우박테리움 바르케리 유래의 *dmdAB*에 의해 암호화된다 (Alhapel et al., *supra*; Kollmann-Koch et al., *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 365:847-857 (1984)).

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

[0750]

[0751] 올레에이트 수화효소들은 WO2011076691에서 제안되는 추가적인 적정 후보이다. 이들은 도 19 단계 W 및 도 21 단계 O에서 특히 유용하다. 예시들로 다음 단백질들이 포함된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
OhyA	ACT54545.1	254031735	일리자베트킹기아 페낭고셉티카
HMPREF0841_1446	ZP_07461147.1	306827879	스트렙토코쿠스 피오제네스 ATCC 10782
P700755_13397	ZP_01252267.1	91215295	사이クロ플렉수스 토르퀴스 ATCC 700755
RPB_2430	YP_486046.1	86749550	로도슈도모나스 팔루스트리스

[0752]

[0753] 에노일-CoA 수화효소들 (EC 4.2.1.17)은 다양한 3-히드록시아실-CoA 기질들의 탈수를 촉매한다 (Roberts et al., *Arch.Microbiol* 117:99-108 (1978); Agnihotri et al., *Bioorg.Med.Chem.* 11:9-20 (2003); Conrad et al., *J Bacteriol.* 118:103-111 (1974)). *ech*에 의해 암호화되는 *슈도모나스 푸터타*의 에노일-CoA 수화효소는 3-히드록시부티릴-CoA의 크로토닐-CoA로의 전환을 촉매한다 (Roberts et al., *Arch.Microbiol* 117:99-108 (1978)). 본 변환은 또한 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 *crt* 유전자 산물, *C. 클루이버리*, 및 기타 클로스티리알 유기체 *crt1* 유전자 산물에 의해 촉매된다 (Atsumi et al., *Metab Eng* 10:305-311 (2008); Boynton et al., *J Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996); Hillmer et al., *FEBS Lett.* 21:351-354 (1972)). 추가적인 에노일-CoA 수화효소 후보는 *P. 푸터타*의 *phaA* 및 *phaB*, 및 *P. 플루오레센스*의 *paaA* 및 *paaB*이다 (Olivera et al., *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998)). *로도슈도모나스 팔루스트리스*의 *pimF* 유전자 산물은 피멜로일-CoA 분해에 관여하는 에노일-CoA 수화효소를 암호화한다고 예측된다 (Harrison et al., *Microbiology* 151:727-736 (2005)). 마지막으로, *maoC* (Park et al., *J Bacteriol.* 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et al., *Eur.J Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park et al., *Appl.Biochem.Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park et al., *Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004)) 및 *paaG* (Ismail et al., *Eur.J Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park and Lee, *Appl.Biochem.Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park and Yup, *Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004))을 포함하는 다수의 *에스케리키아 콜라이* 유전자들은 에노일-CoA 수화효소 기능성을 보였다.

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

[0754]

[0755] 달리, *fadA* 및 *fadB*의 *E. coli* 유전자 산물은 에노일-CoA 수화효소 활성을 보이고 지방산 산화에 참여하는 다중 효소 복합체를 암호화한다 (Yang et al., *Biochemistry* 30:6788-6795 (1991); Yang, *J Bacteriol.* 173:7405-7406 (1991); Nakahigashi et al., *Nucleic Acids Res.* 18:4937 (1990)). *fadR*에 의해 암호화되는 음성 조절자를 제거하여 *fadB* 유전자 산물을 활성화할 수 있다 (Sato et al., *J Biosci.Bioeng* 103:38-44 (2007)). *fadI* 및 *fadJ* 유전자들은 유사한 기능을 암호화하고 자연적으로 혐기성 조건에서 발현된다 (Campbell et al., *Mol.Microbiol* 47:793-805 (2003)).

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

[0756]

[0757] 아실-CoA 기질들의 이들 산 산물로의 전환은 6.2.1 패밀리 효소들에 속하는 CoA 산-티올 연결효소 또는 CoA 합성효소에 의해 촉매되며, 이들 중 여럿은 가역적이다. 도 19-20에 도시된 여러 반응들은 산-티올 연결효소들에 의해 촉매된다. 이들 반응은 도 19의 단계들 F, O, G, T, H, 및 E 및 도 20의 단계들 B 및 H를 포함한다. CoA 산-티올 연결효소 또는 CoA 합성효소 활성들을 촉매하는 여러 효소들은 문헌에 기재되고 이들 단계들에 대한 적정 후보를 대표한다.

[0758]

예를들면, ADP-형성 아세틸CoA 합성효소 (ACD, EC 6.2.1.13)는 아실-CoA 에스테르의 상응되는 산으로의 전환 및 동시적 ATP 합성을 조합하는 효소이다. 아르카이오글로부스 풀기두스 유래의, AF1211에 의해 암호화되는 ACD I는, 이소부티레이트, 이소펜타노에이트, 및 푸마레이트를 포함하는 다양한 선형 및 분지 사슬 기질들에 작용하는 것으로 밝혀졌다 (Musfeldt et al., *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 아르카이오글로부스 풀기두스 유래의, AF1983에 의해 암호화되는 제2의 가역적 ACD 역시 환형 화합물들 폐닐아세테이트 및 인돌아세테이트에 높은 활성을 가지는 넓은 기질 범위를 가지는 것으로 밝혀졌다 (Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 할로알콜라 마리스몰투이 유래의 효소 (숙시닐-CoA 합성효소로도 칭함)는 기질로서 프로피오네이트, 부티레이트, 및 분지 사슬 산들 (이소발레레이트 및 이소부티레이트)을 수용하고, 정방향 및 역방향에서 작용하는 것으로 확인되었다 (Brasen et al., *Arch Microbiol* 182:277-287 (2004)). PAE3250에 의해 암호화되는 초고온성 고세균 퍼로박콜룸 아이로필룸 유래의 ACD는 특정된 모든 ACD들 중에서 가장 넓은 기질 범위를 보였고, 아세틸CoA, 이소부티릴-CoA (선호 기질) 및 폐닐아세틸CoA와 반응하였다 (Brasen et al, *supra*). 방향성 진화 또는 조작이 활용되어 숙주 유기체의 생리적 온도에서 작용하도록 본 효소를 변형시킬 수 있다. *A. 풀기두스*, *H. 마리스몰투이* 및 *P. 아이로필룸* 유래의 효소들은 모두 클로닝되었고, 기능적으로 발현되었고 *E. coli*에서 특정되었다 (Brasen and Schonheit, *supra*; Musfeldt and Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). 추가적인 후보는 *E. coli*의 *sucCD* 및 사카로마이세스 세레비지애의 *LSC1* 및 *LSC2* 유전자들에 의해 암호화되는 숙시닐-CoA 합성효소이다. 이들 효소는 하나의 ATP를 소비하면서 숙시네이트로부터 숙시닐-CoA 형성을 촉매하며, 본 반응은 가역적 생체내 반응이다 (Buck et al., *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985)). 슈도모나스 푸티타 유래의 아실 CoA 리가제는 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산, 헥산산, 햅탄산, 및 옥탄산을 포함한 여러 지방족 기질들 및 방향족 화합물들 예를들면 폐닐아세트산 및 폐녹시아세트산에 작용하였다 (Fernandez-Valverde et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). 관련 효소인, 리조비움 레구미노사름 유래 말로닐 CoA 합성효소 (6.3.4.9)는 여러 이염기산, 즉, 에틸-, 프로필-, 알릴-, 이소프로필-, 디메틸-, 시클로프로필-, 시클로프로필메틸렌-, 시클로부틸-, 및 벤질-말로네이트를 해당 모노티오 에스테르로 전환할 수 있다 (Pohl et al., *J. Am. Chem. Soc.* 123:5822-5823 (2001)).

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
AFI211	NP_070039.1	11498810	아르카이오클로부스 풀기두스
AFI983	NP_070807.1	11499565	아르카이오클로부스 풀기두스
Scs	YP_135572.1	55377722	할로알콜라 마리스몰투이
PAE3250	NP_560604.1	18313937	파로박콜룸 아이로필룸 str. IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	에스케리키아 콜라이
sucD	AAC73823.1	1786949	에스케리키아 콜라이
LSC1	NP_014785	6324716	사카로마이세스 세레비자에
LSC2	NP_011760	6321683	사카로마이세스 세레비자에
paaF	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸터타
matB	AAC83455.1	3982573	리조비움 레구미노사루

[0759]

[0760] 이들 단계에 대한 다른 후보 효소는 6-카르복시헥사노에이트-CoA 리가제이며, 피멜로일-CoA 리가제 (EC 6.2.1.14)라고도 알려져 있고, 그람 양성 세균의 비오틴 생합성 과정에서 천연적으로 피메레이트를 피멜로일-CoA로 활성시킨다. *E. coli* 내에서 클로닝되는 슈도모나스 멘도시나 유래의 본 효소는 대안 기질들 헥산디오에이트 및 노난디오에이트를 수용하는 것으로 확인되었다 (Binieda et al., *Biochem.J* 340 (Pt 3):793-801 (1999)). 다른 후보들은 바실러스 섭틸리스 (Bower et al., *J Bacteriol.* 178:4122-4130 (1996)) 및 리시니바실러스 스파이리쿠스 (전에는 바실러스 스파이리쿠스) (Ploux et al., *Biochem.J* 287 (Pt 3):685-690 (1992))에서 발견된다.

단백질	유전자은행 ID	GI 번호	유기체
bioW	NP_390902.2	50812281	바실러스 섭틸리스
bioW	CAA10043.1	3850837	슈도모나스 멘도시나
bioW	P22822.1	115012	바실러스 스파이리쿠스

[0761]

[0762] 추가적인 CoA-리가제들은 서열이 아직 특정되지 않은 래트 디카르복실레이트-CoA 리가제 (Vamecq et al., *Biochem.J* 230:683-693 (1985)), *P. 크리소케놈* 유래의 두 종의 특정된 페닐아세테이트-CoA 리가제들 중 하나 (Lamas-Maceiras et al., *Biochem.J* 395:147-155 (2006); Wang et al., 360:453-458 (2007)), 슈도모나스 푸터타 유래의 페닐아세테이트-CoA 리가제 (Martinez-Blanco et al., *J Biol Chem* 265:7084-7090 (1990)) 및 바실러스 섭틸리스 유래의 6-카르복시헥사노에이트-CoA 리가제 (Bower et al. *J Bacteriol* 178(14):4122-4130 (1996))를 포함한다. 무스 무스쿠루스 (Hasegawa et al., *Biochim Biophys Acta* 1779:414-419 (2008)) 및 호모사피언스 (Ohgami et al., *Biochem Pharmacol.* 65:989-994 (2003)) 유래의 아세토아세틸CoA 합성효소들은 자연적으로 아세토아세테이트의 아세토아세틸CoA로의 ATP-의존성 전환을 촉매한다.

단백질	등재 번호	GI 번호	유기체
phl	CAJ15517.1	77019264	페니실리움 크리소케놈
phlB	ABS19624.1	152002983	페니실리움 크리소케놈
paaF	AAC24333.2	22711873	슈도모나스 푸터타
bioW	NP_390902.2	50812281	바실러스 섭틸리스
AACS	NP_084486.1	21313520	무스 무스쿠루스
AACS	NP_076417.2	31982927	호모 사피언스

[0763]

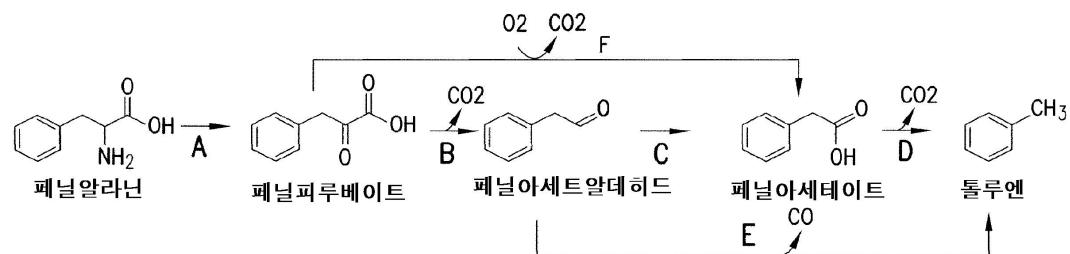
[0764] 다른 분류에 속하는 효소들과 같이, EC 분류 6.2.1에 속하는 소정의 효소들은 넓은 기질 특이성을 가지는 것으

로 확인되었다. 슈도모나스 푸티타 유래의 아실 CoA 리가제는 아세트산, 프로파온산, 부티르산, 발레르산, 헥산산, 햅탄산, 및 옥탄산을 포함한 여러 지방족 기질들 및 방향족 화합물들 예를들면 페닐아세트산 및 페녹시아세트산에 작용하였다 (Fernandez-Valverde et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993)). 관련 효소인, 리조비움 트리폴리 유래 말로닐 CoA 합성효소 (6.3.4.9)는 여러 이염기산, 즉, 에틸-, 프로필-, 알릴-, 이소프로필-, 디메틸-, 시클로프로필-, 시클로프로필메틸렌-, 시클로부틸-, 및 벤질-말로네이트를 해당 모노티오 에스테르로 전환할 수 있다 (Pohl et al., *J. Am. Chem. Soc.* 123:5822-5823 (2001))

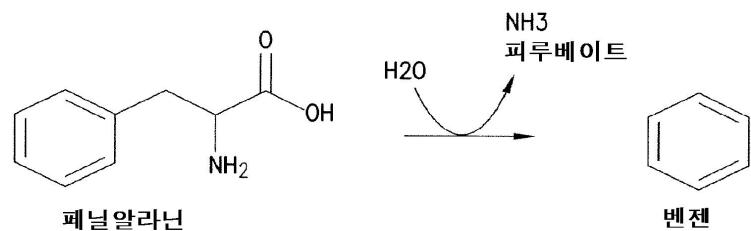
[0765] 본 명세서 전체에 다양한 문헌들이 참조된다. 유전자은행 및 GI 번호 공개물을 비롯하여, 이들 공개 문헌의 내용은 그 전체가 본 발명이 속하는 기술 분야의 상황을 보다 충분히 설명하기 위해 본 명세서에 원용에 의해 포함된다. 본 발명은 전술한 실시예를 참조하여 언급되지만, 본 발명의 사상으로부터 이탈되지 않으면서 다양한 변형이 이루어질 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

도면

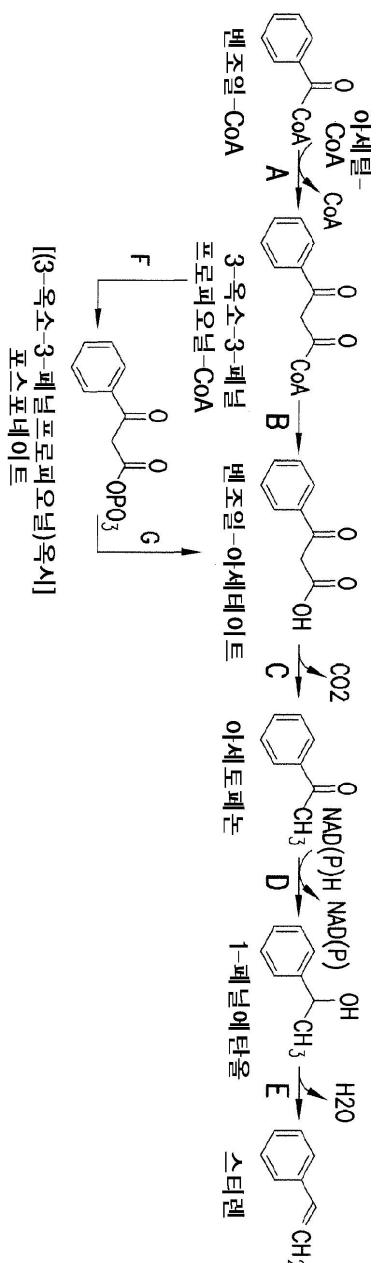
도면1



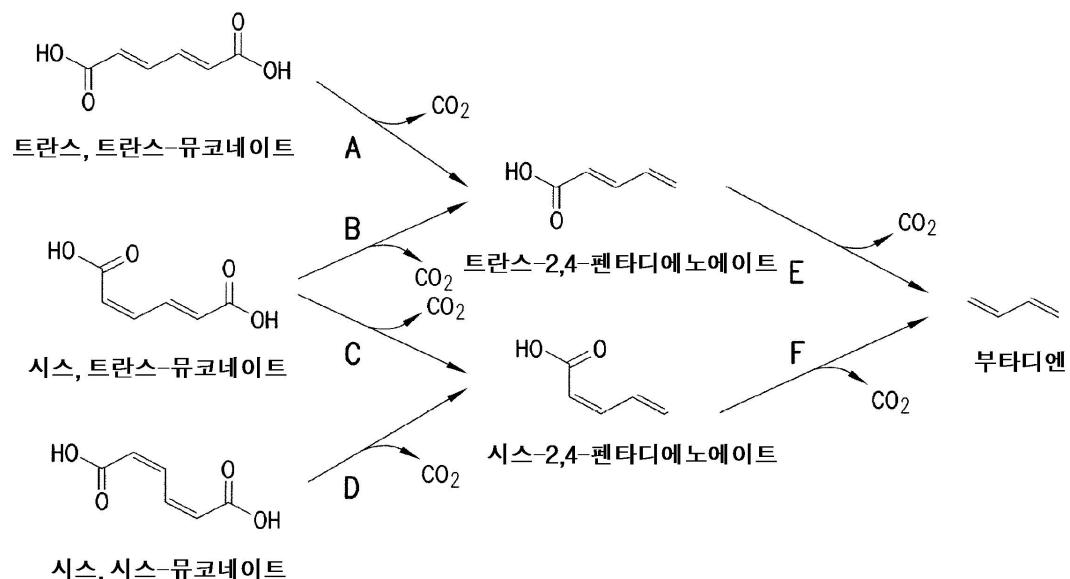
도면2



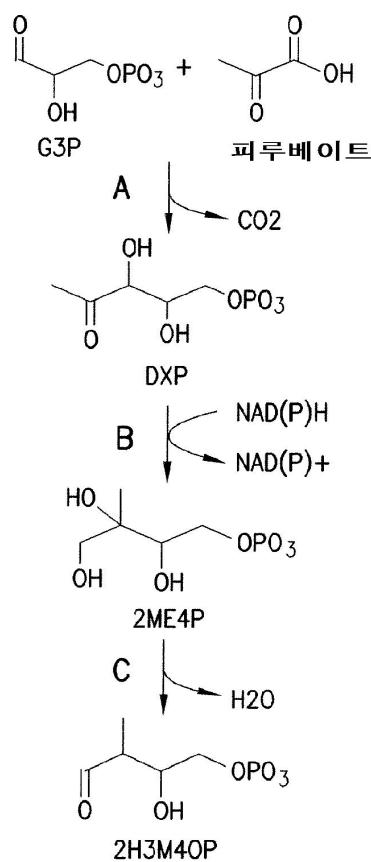
도면3



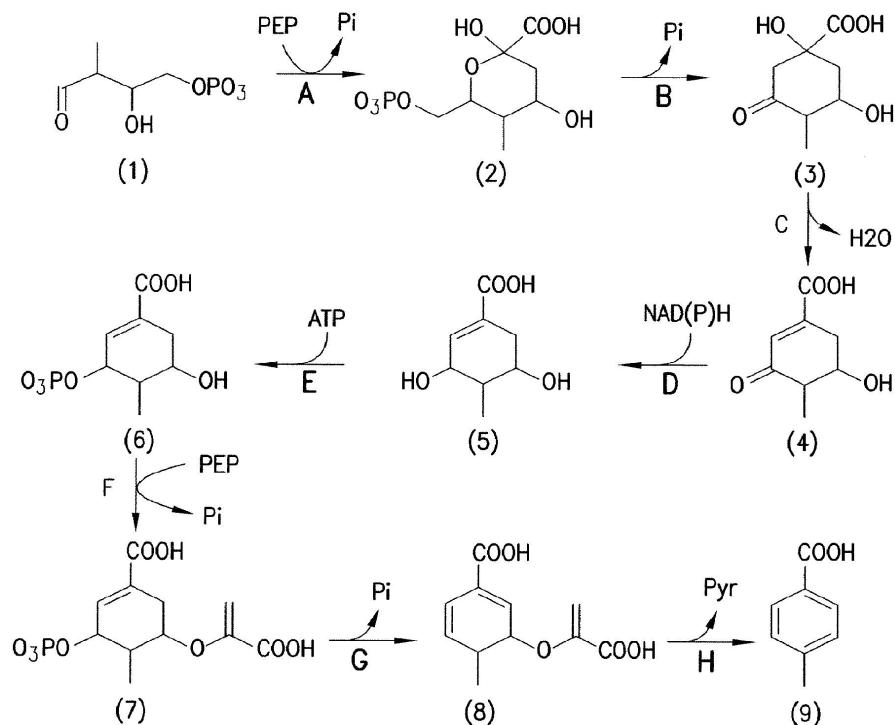
도면4



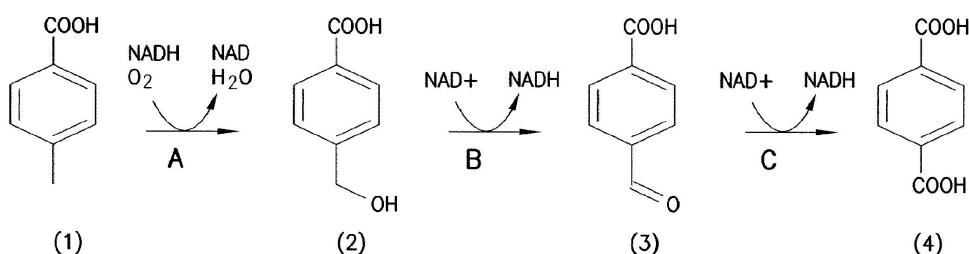
도면5



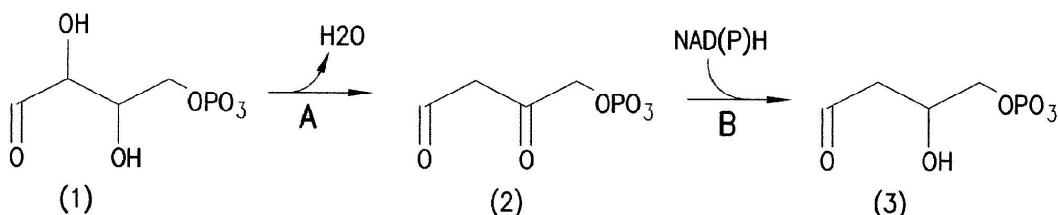
도면6



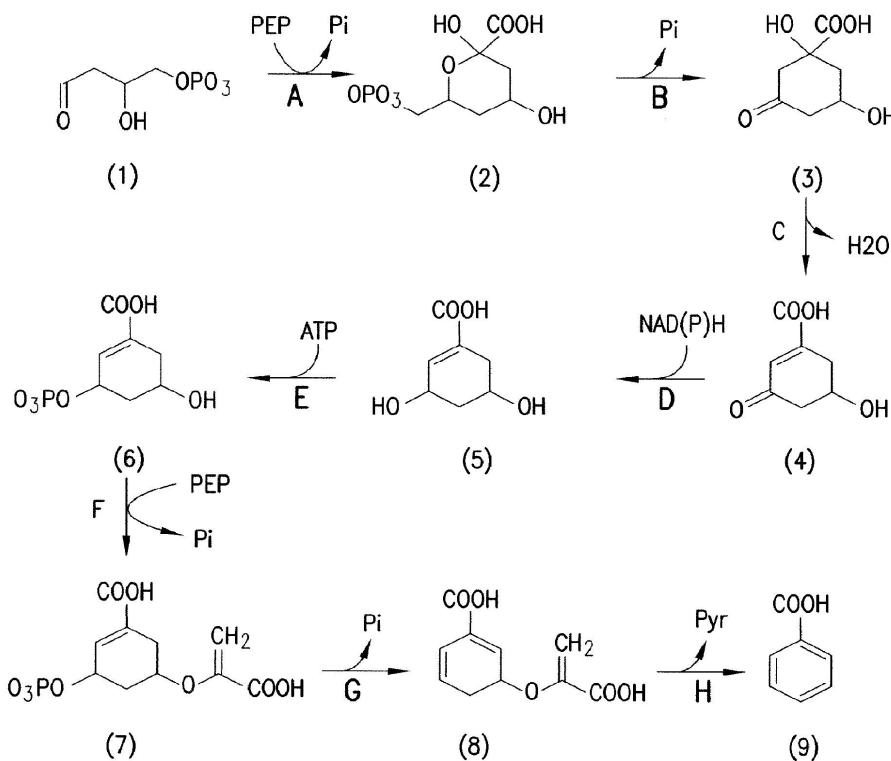
도면7



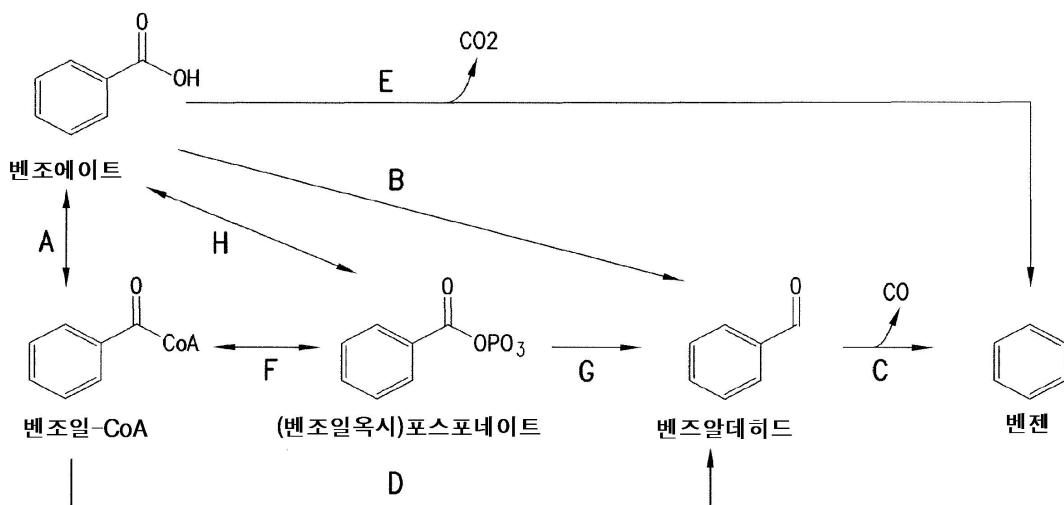
도면8



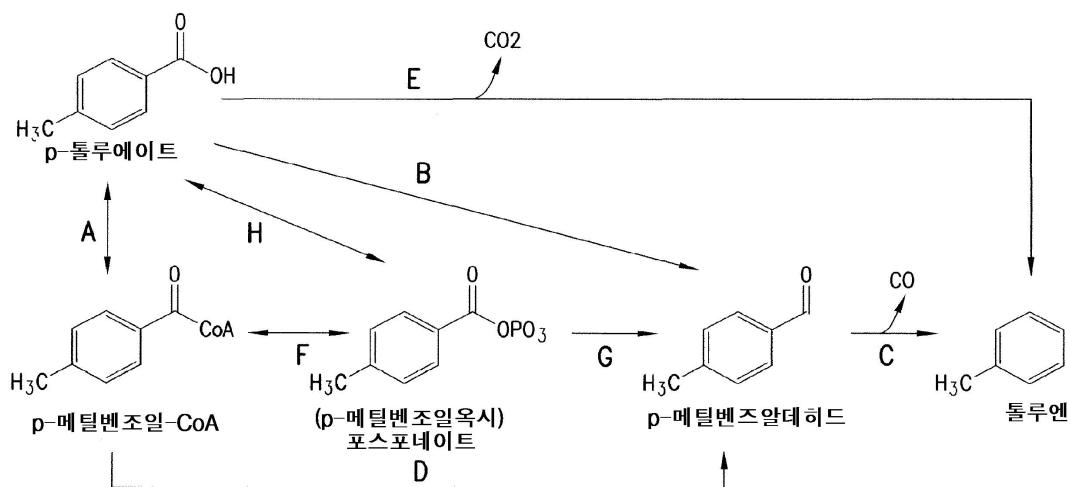
도면9



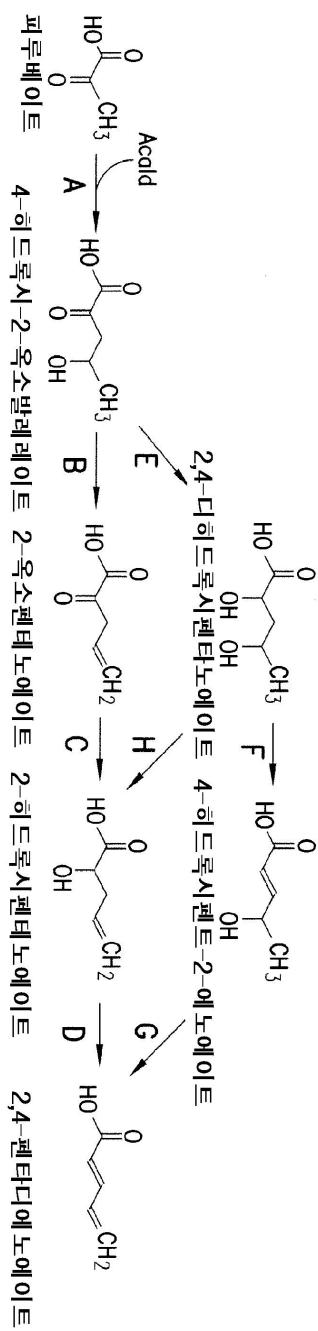
도면10



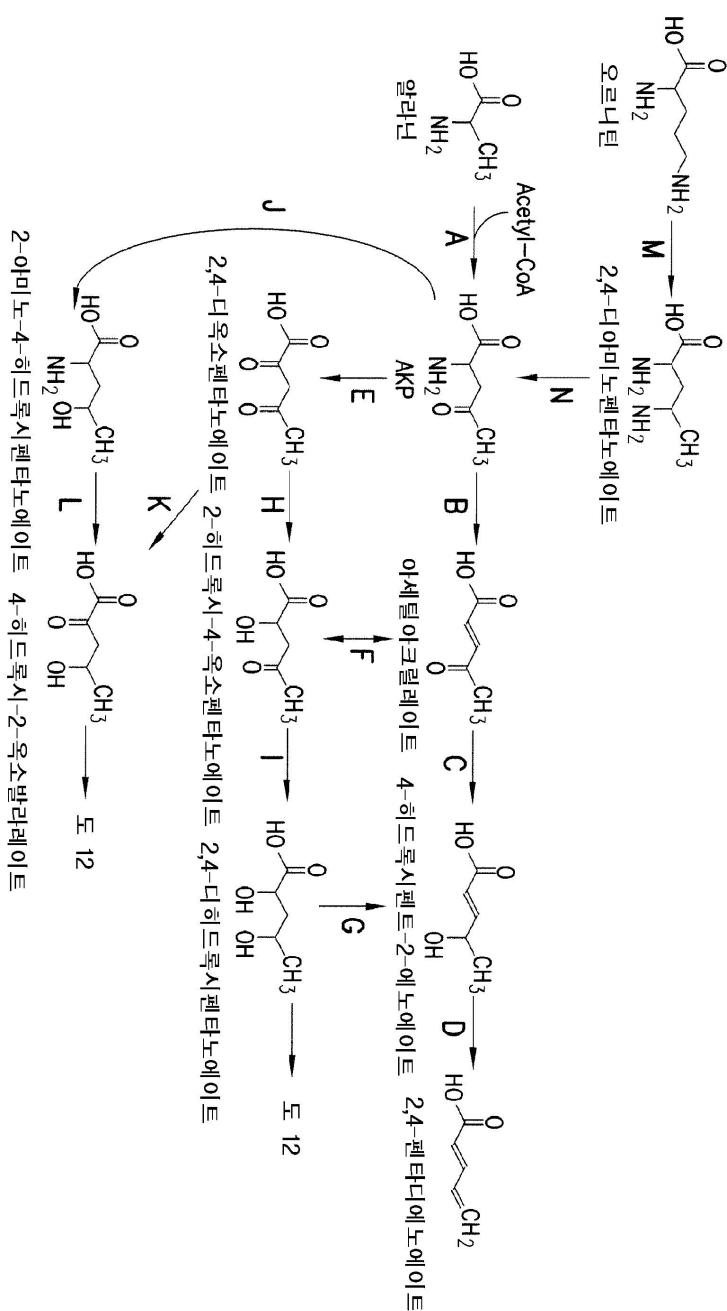
도면11



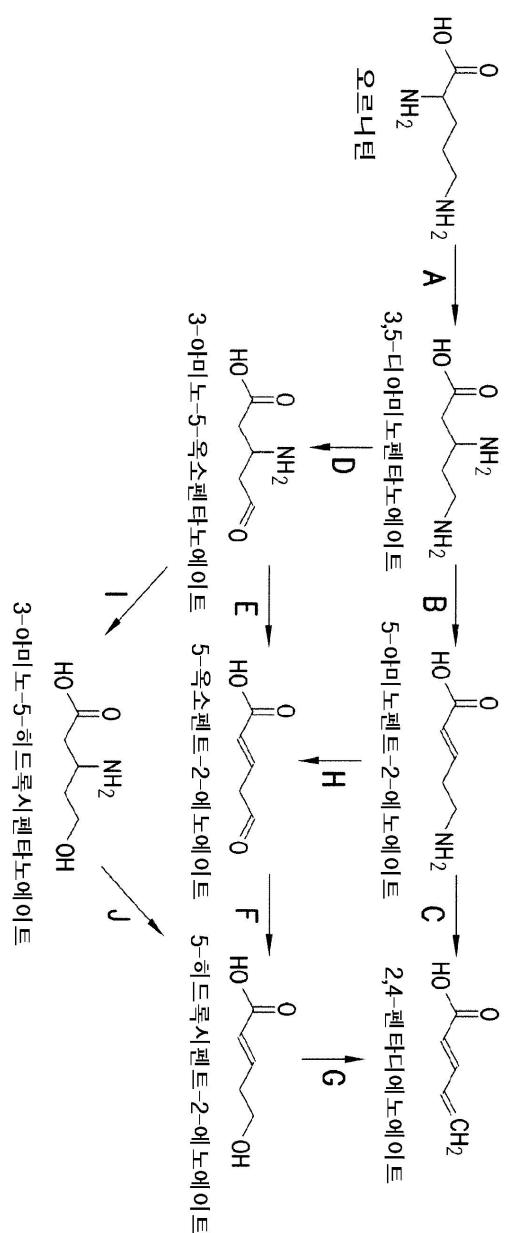
도면12



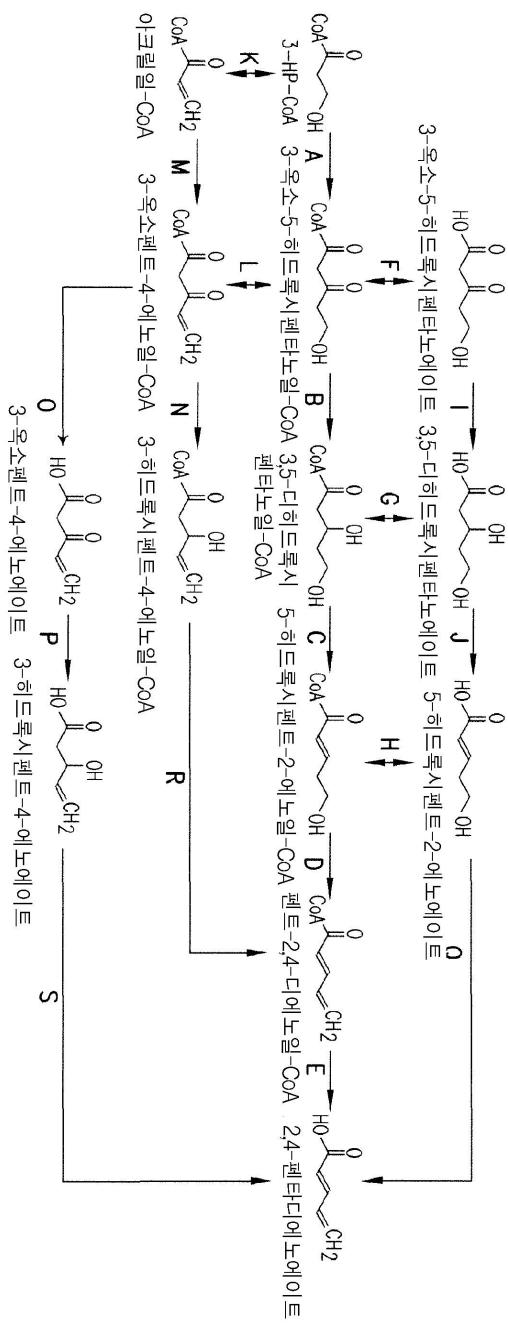
도면13



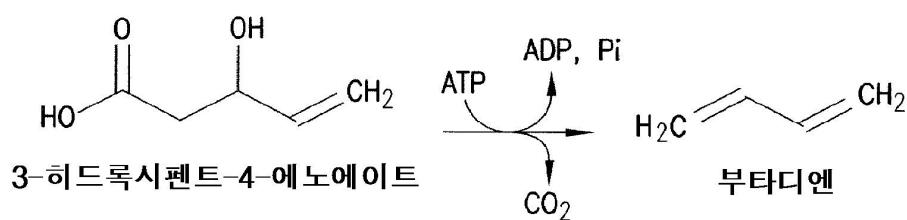
도면14



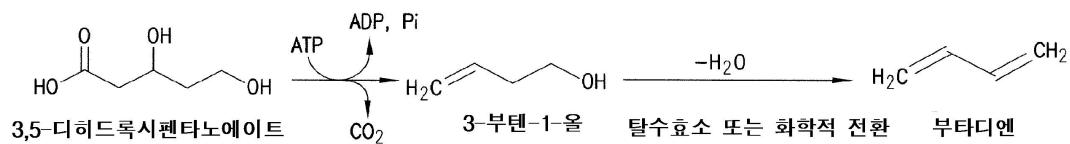
도면15



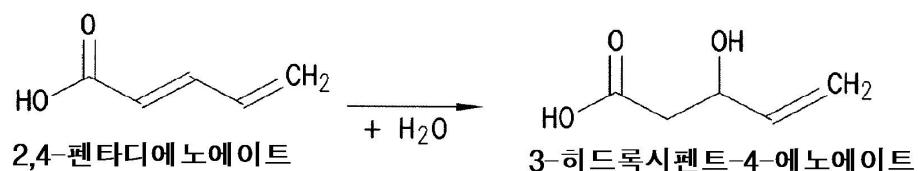
도면16



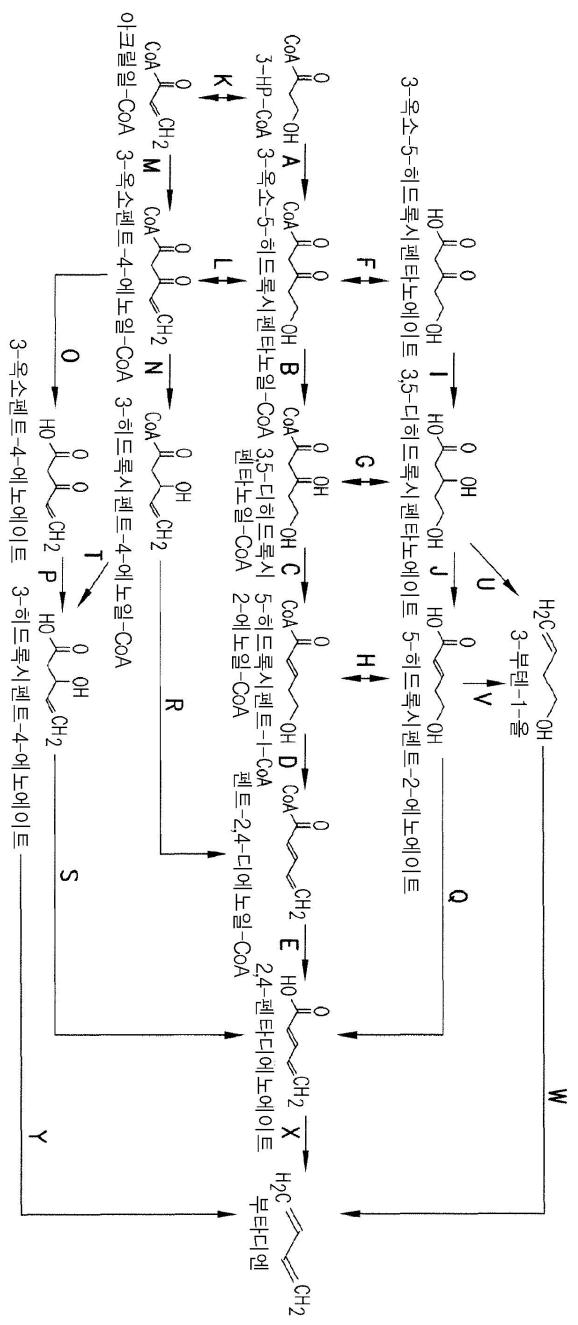
도면17



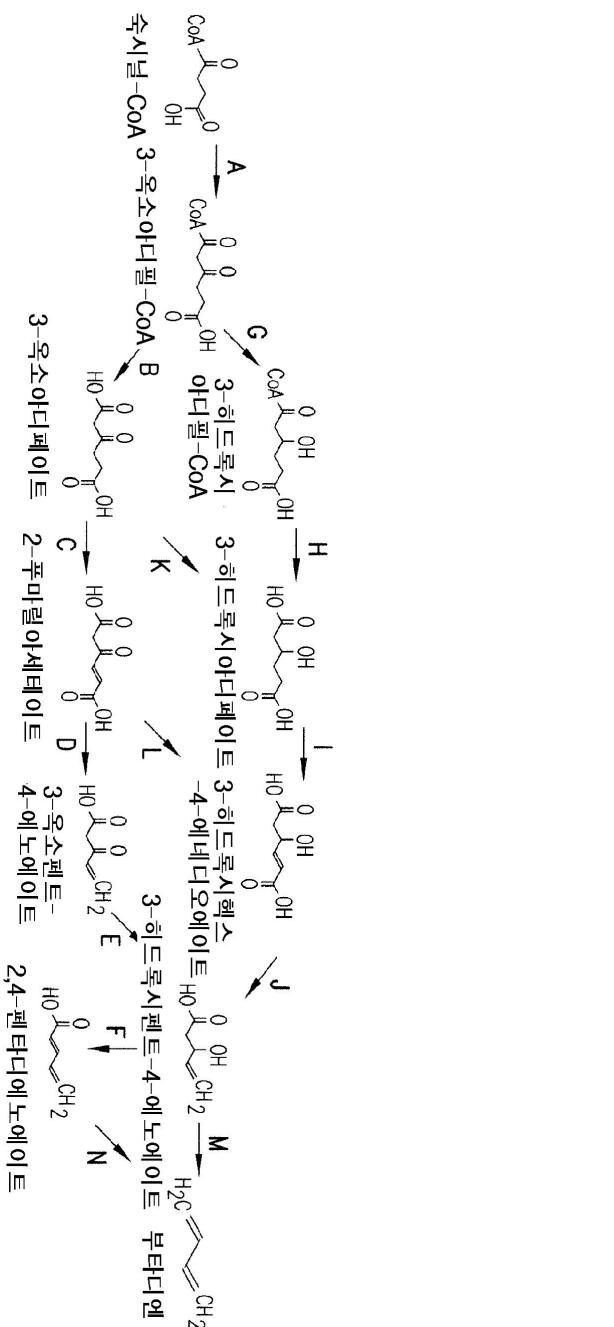
도면18



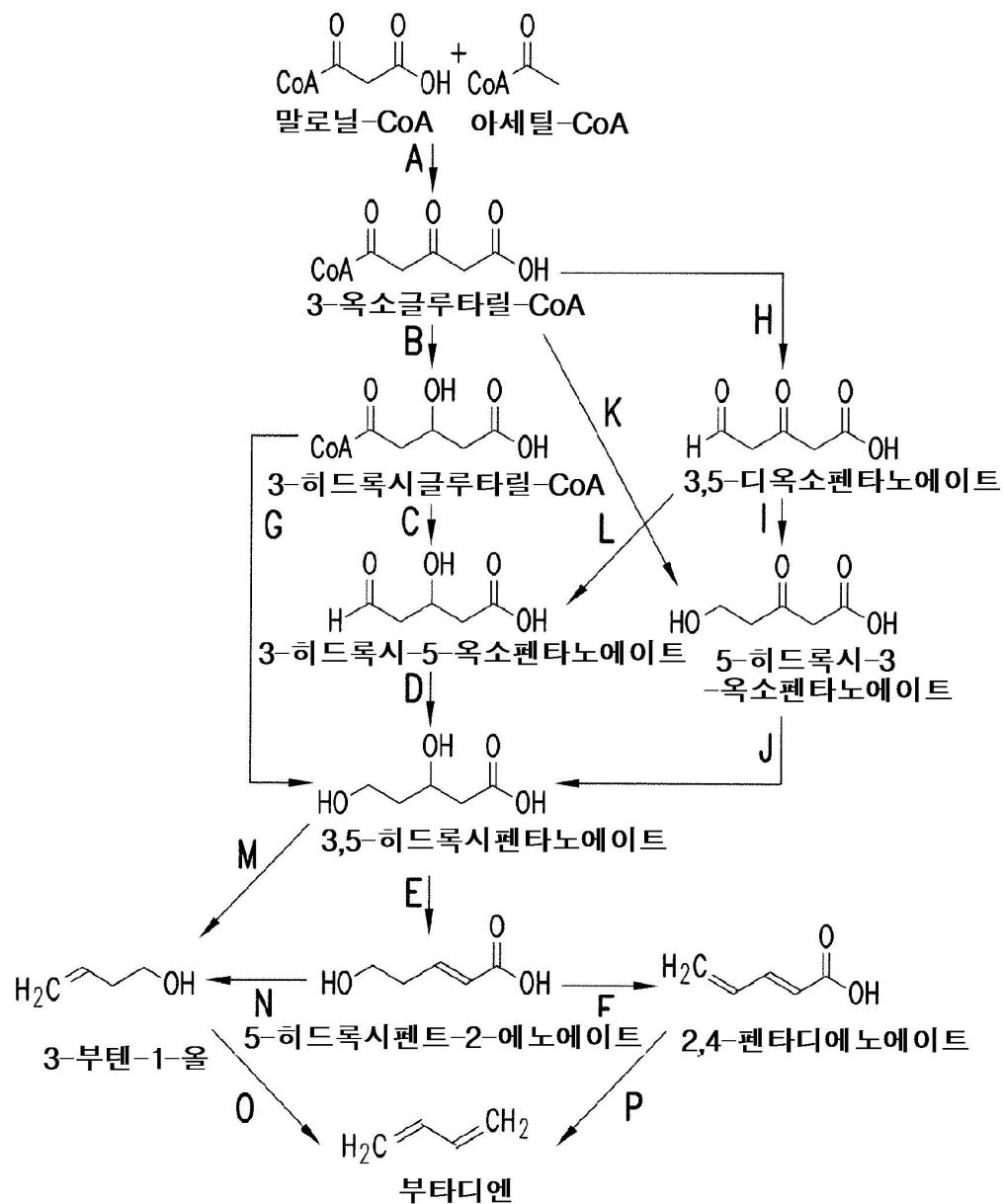
도면19



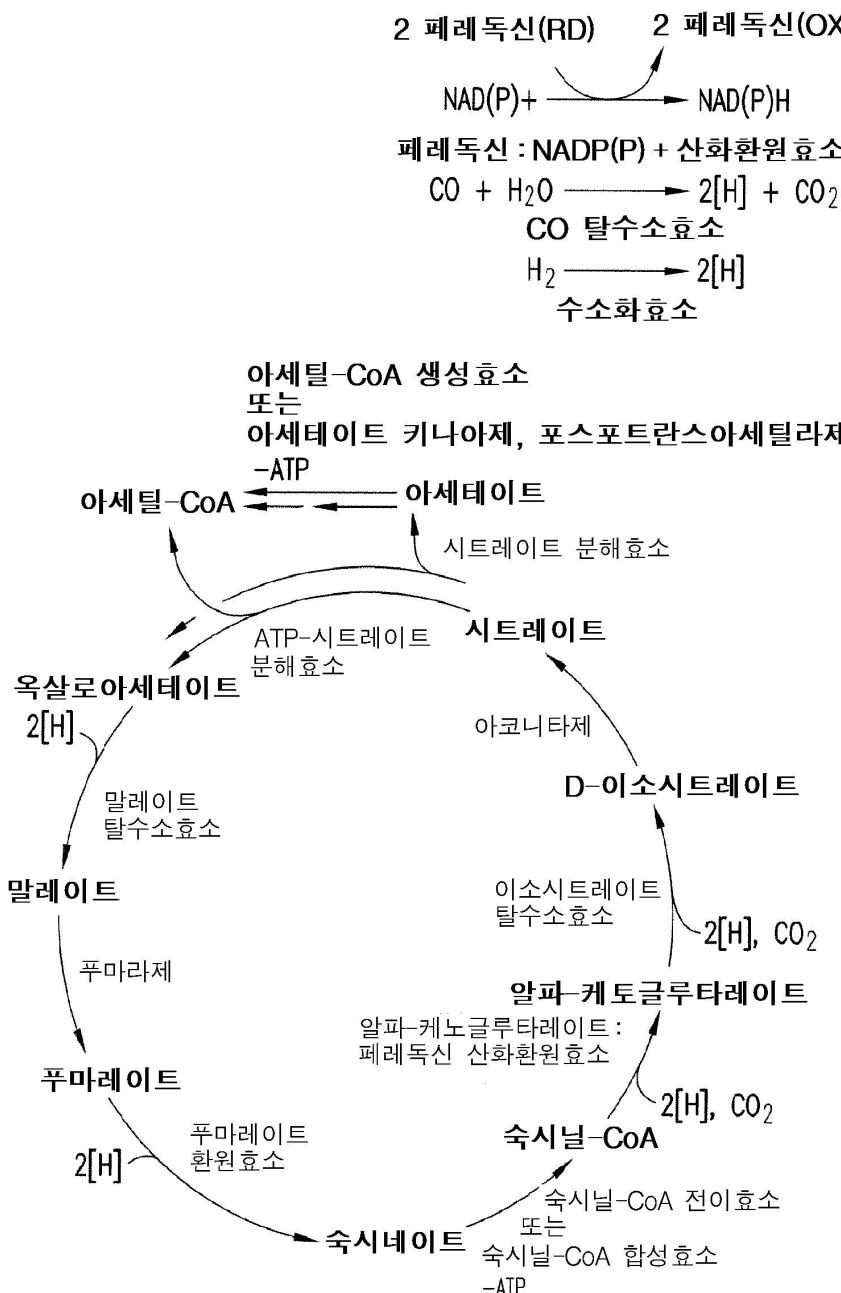
도면20



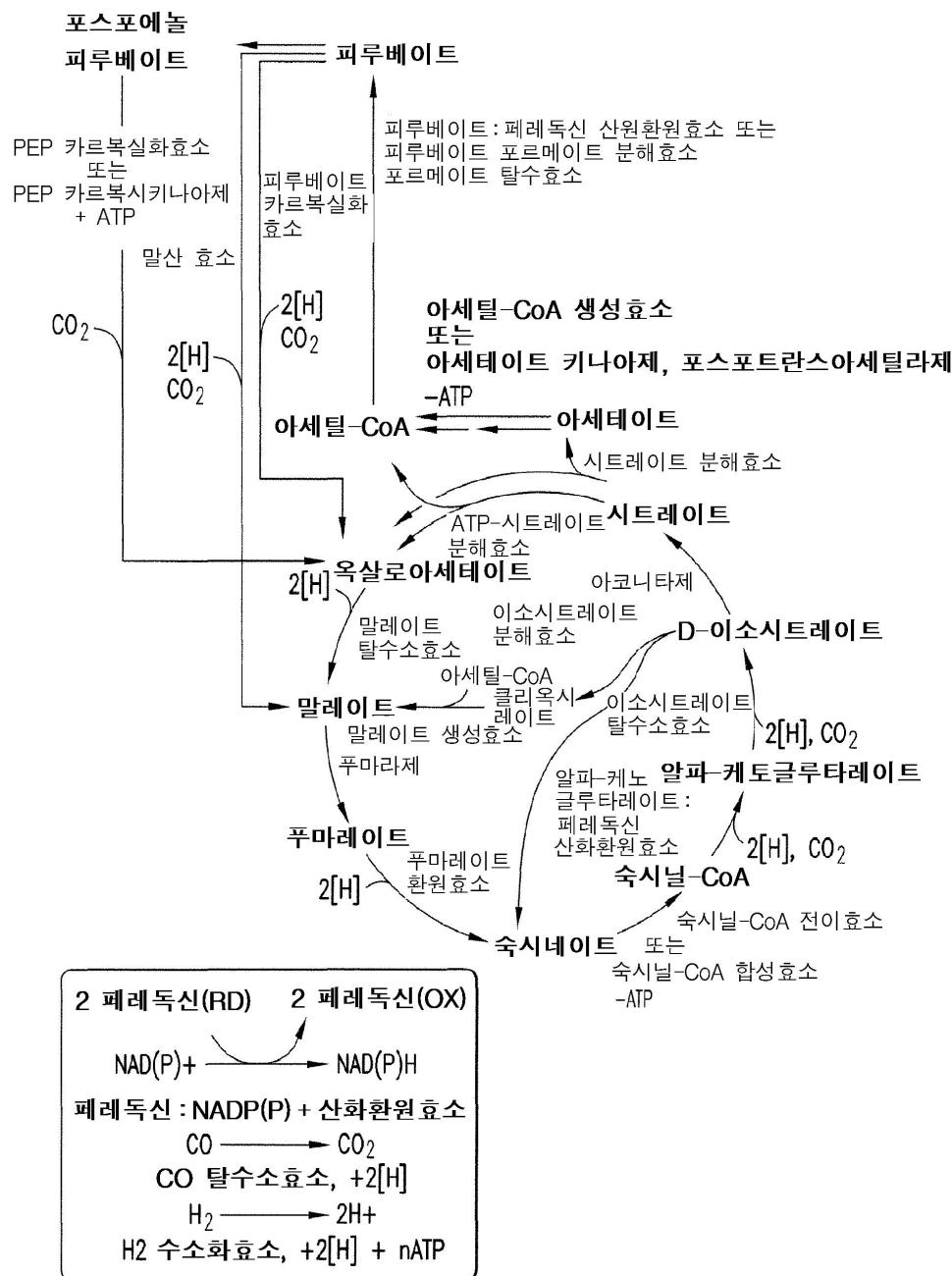
도면21



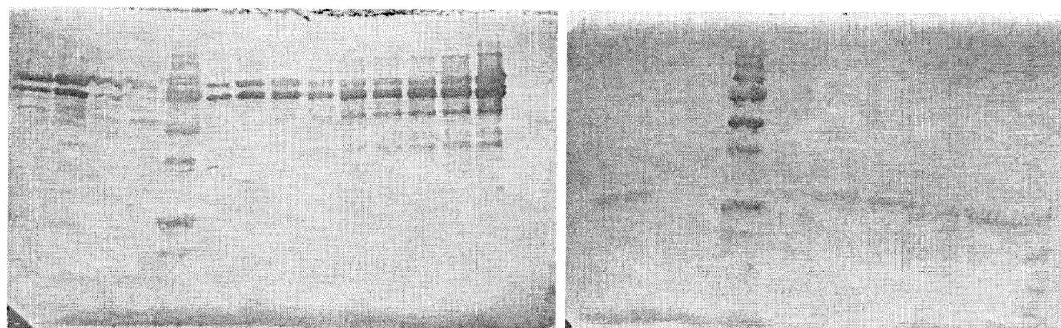
도면22



도면23



도면24



도면25

