



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월18일

(11) 등록번호 10-2253532

(24) 등록일자 2021년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/81 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01) *C12P 7/56* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/81 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7009348

(22) 출원일자(국제) 2013년09월13일

심사청구일자 2018년07월11일

(85) 번역문제출일자 2015년04월10일

(65) 공개번호 10-2015-0055006

(43) 공개일자 2015년05월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/059828

(87) 국제공개번호 WO 2014/043591

국제공개일자 2014년03월20일

(30) 우선권주장

61/701,293 2012년09월14일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20120225461 A1

WO2012103261 A2

(73) 특허권자

피티티 글로벌 케미컬 퍼블릭 컴퍼니 리미티드

태국, 방콕, 차투차크, 비브하바디 랑시트 로드,
555/1 에너지 콤플렉스, 빌딩 에이, 14-18층

(72) 발명자

요쿰, 알., 로저스

미국, 메사추세츠 02420, 렉싱턴, 4 오차드 레인
들, 수드한슈미국, 메사추세츠 01845, 노쓰 안도버, 5 로얄 크
레스트 드라이브 유닛 # 10

페로, 재니스, 지.

미국, 메사추세츠 02420, 렉싱턴, 20 솔로몬 피어
스 로드

(74) 대리인

허용록

전체 청구항 수 : 총 25 항

심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 낮은 PH에서 발효에 의한 유기산의 제조

(57) 요약

본 발명은 유전적으로 변형된 미생물에서 유기산의 생합성에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 낮은 pH에서 유기산에 특히 내성이고 낮은 pH에서 발효에 의해 유기산을 생산할 수 있는 유전적으로 변형된 미생물을 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12N 9/0006 (2013.01)

C12N 9/0008 (2013.01)

C12N 9/001 (2013.01)

C12N 9/1025 (2013.01)

C12N 9/12 (2013.01)

C12N 9/88 (2013.01)

C12N 9/93 (2013.01)

C12P 7/46 (2013.01)

C12P 7/56 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

포스포에놀 피루베이트로부터 숙시네이트로의 산화성 경로 및 환원성 경로에 필요한 모든 효소들이 세포질 내에 존재하여, 숙시네이트가 혐기성 또는 1분 당 액체 1 리터의 부피 당 0.1 부피 미만의 공기를 갖는 미량호기성 조건 하에서 발효 산물로서 생산되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포로서,

세포질 내의 상기 산화성 경로는 피루베이트 키나아제, 피루베이트 데히드로게나아제, 시트레이트 신타아제, 아코니타아제, 이소시트레이트 데히드로게나아제, α -케토글루타레이트 데히드로게나아제 및 숙시닐-CoA 합성효소를 포함하고,

세포질 내의 상기 환원성 경로는 PEP 카복시키나아제, 말레이트 데히드로게나아제, 푸마라아제, 및 푸마레이트 리덕타아제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

피루베이트 카복실라아제, 포스포에놀 피루베이트 카복실라아제 및 포스포에놀 피루베이트 카복시키나아제를 포함하는 군으로부터 선택된 카복실화 효소를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 효모 세포는 사카로미세스속(*Saccharomyces*), 피키아속(*Pichia*), 한세눌라속(*Hansenula*), 이사첸키아속(*Issatchenkia*), 칸디다속(*Candida*) 또는 클루이베로미세스속(*Kluyveromyces*)으로부터 유래한 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

포스포에놀 피루베이트로부터 숙시네이트로의 산화성 및 환원성 경로에 필요한 세포질의 효소들을 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 효모 유전자들로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

포스포에놀 피루베이트로부터 숙시네이트로의 산화성 및 환원성 경로에 필요한 세포질의 효소들을 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 사카로미세스속(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스속(*Kluyveromyces*), 칸디다속(*Candida*), 피키아속(*Pichia*), 한세눌라속(*Hansenula*) 또는 이사첸키아속(*Issatchenkia*)의 효모로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

포스포에놀 피루베이트로부터 숙시네이트로의 산화성 및 환원성 경로에 필요한 세포질의 효소들을 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 박테리아 유전자들로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

포스포에놀 피루베이트로부터 숙시네이트로의 산화성 및 환원성 경로에 필요한 세포질의 효소들을 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 대장균속(*Escherichia*), 악티노바실러스속(*Actinobacillus*), 만하이미아속

(*Mannheimia*), 또는 바스피아속(*Basfia*)의 박테리아로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

포스포에놀 피루베이트로부터 숙시네이트로의 산화성 및 환원성 경로에 필요한 세포질의 효소들을 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 대장균 유전자들로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 산화성 경로 및 환원성 경로는 글리옥실레이트 셉트(shunt)의 효소의 사용 없이 작동하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 푸마라아제 효소는 철-황 클러스터를 함유하지 않는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 푸마라아제는 대장균 *fumC* 유전자에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 13

삭제

청구항 14

제 1 항에 있어서,

세포질로부터 미토콘드리아 안으로 숙시네이트를 운반하는 디카복실레이트 운반체를 인코딩하는 유전자들 중 적어도 하나의 결실을 더 포함하며,

상기 디카복실레이트 운반체를 인코딩하는 유전자는 *DIC1* 유전자 및 *SFC1* 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 15

삭제

청구항 16

제 1 항의 유전적으로 조작된 효모 세포를 성장시키는 단계, 및

상기 숙시네이트를 수확하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙시네이트를 생산하는 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

제 1 항에 있어서,

상기 유전적으로 조작된 효모 세포는, 상기 유전적으로 조작된 효모 세포의 미토콘드리아 및 세포질 사이에서 환원 당량들의 교환을 촉진하는 단백질을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자를 더 포함하며,

상기 미토콘드리아 및 세포질 사이에서 환원 당량들의 교환을 촉진하는 단백질을 인코딩하는 유전자는 아스파르트레이트-말레이트 셔들을 인코딩하는 유전자, 글리세롤-3-포스페이트 데히드로게나아제 셔들을 인코딩하는 유전자, 및 알콜 데히드로게나아제 셔들을 인코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

제 1 항에 있어서,

환원성 경로에 필요한 상기 효소를 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 효모 균주로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 22

제 1 항에 있어서,

환원성 경로에 필요한 상기 효소를 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 박테리아 균주로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 23

제 1 항에 있어서,

환원성 경로에 필요한 상기 효소를 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 사카로미세스속, 클루이베로미세스속, 피키아속, 한세놀라속 또는 이사첸키아속의 효모 균주로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 24

제 1 항에 있어서,

환원성 경로에 필요한 상기 효소를 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 대장균속, 약티노바실러스속, 만하이미아속, 또는 바스피아속의 박테리아 세포로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 25

제 1 항에 있어서,

환원성 경로에 필요한 상기 효소를 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 대장균의 균주로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 26

제 1항에 있어서, 상기 효모 세포는, PEP로부터 말레이트로의 환원성 경로에 필요한 모든 효소들이 세포질에서 발현되고 말레이트로부터 숙시네이트로의 대사에 필요한 효소들이 세포질에서 발현되지 않는, 포스포에놀 피루베이트 카복실라아제를 포함하는, 클루이베로미세스속, 이사첸키아속, 칸디다속, 피키아속, 또는 한세놀라속으로부터 선택되며,

상기 환원성 경로에 필요한 효소들은 PEP 카복시키나아제(EC 4.1.1.49) 및 말레이트 데히드로게나아제(EC

1.1.1.37)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 27

제 1항에 있어서, 상기 효모 세포는, PEP로부터 푸마레이트로의 환원성 경로에 필요한 모든 효소들이 세포질에서 발현되고 푸마레이트로부터 숙시네이트로의 대사에 필요한 효소들이 세포질에서 발현되지 않는, 포스포에놀 피루베이트 카복실라아제를 포함하는, 클루이베로미세스속, 이사첸키아속, 칸디다속, 피키아속, 또는 한세놀라 속으로부터 선택되며,

상기 환원성 경로에 필요한 효소들은 PEP 카복시키나아제(EC 4.1.1.49), 푸마라아제(EC 4.2.1.2) 및 푸마레이트 리덕타아제(EC 1.3.1.6)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 28

제 26 항의 유전적으로 조작된 효모 세포를 성장시키는 단계; 및

말레이트를 수확하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 말레이트를 생산하는 방법.

청구항 29

제 27 항의 유전적으로 조작된 효모 세포를 성장시키는 단계; 및

푸마레이트를 수확하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 푸마레이트를 생산하는 방법.

청구항 30

제 1 항에 있어서, FAD 리덕타아제에 대해 증가된 활성을 갖는 숙시네이트를 생산하는, 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 31

제 30 항에 있어서,

FAD 리덕타아제를 인코딩하는 하나 이상의 이중 유전자들을 포함하는 것을 특징으로 하는, 유전적으로 조작된 효모 세포.

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 2012년 9월 14일에 출원된 미국 가출원번호 61/701,293의 우선권을 주장한다.

[0002] 본원발명은 재생가능한 탄소 자원을 유용한 화합물로 전환하는 능력을 증가시키기도록 유전자 조작된 생촉매들을 이용하는 재생가능한 화학적 공급원료의 생산 분야에 속한다. 더 구체적으로, 본원발명은 유전적으로 변형된 생촉매들을 이용하는 재생가능한 탄소 자원으로부터 숙신산, 푸마르산, 말산, 및 락트산과 같은 유기산을 제조하기 위한 공정을 제공한다.

배경 기술

[0003] 숙신산(간결성을 위해 본원에서 "숙시네이트"로 지칭될 수도 있음)은 동물 사료, 가소제, 응고제(congealers), 폴리머, 섬유 및 플라스틱을 포함하는 다양한 제품의 제조에서, 특히 폴리부틸 숙시네이트("폴리부틸렌 숙시네이트", "폴리(부틸렌 숙시네이트)" 및 "PBS")로도 알려짐)의 제조에서 아마도 대량의 화학물질로서 이미 사용되거나, 사용될 수 있다. 숙시네이트로부터 제조된 많은 폴리머들은 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 및 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)와 같은 석유로부터 유래된 다른 폴리머들에 비해 훨씬 빠른 속도로 생분해될 수 있다. 따라서, 숙시네이트로부터 제조된 플라스틱들은, 그들이 매립 또는 다른 퇴비화 환경에서 더 신속히 부패될 것이기 때문에 매우 가치가 있다(Kunioka 등, 2009). 이런 특성은, 모노머 서브유닛들이 생물에서 일반적으로 풍부하게 발견되지 않은 석유화학적 유래 화합물들 대신에 생화학적 유래 화합물 또는 그의 화학적 등가물인 많은 다른 폴리머들 및 플라스틱들로 확장된다. 예를 들어, 푸마르산(푸마레이트), 말산(말레이트), 아디프산(아디페이트), L-락트산(L-락테이트), D-락트산(D-락테이트), 및 다른 자연 발생적 유기산으로부터 유래된 폴리머들 모두는 퇴비화 환경에서 많은 석유화학적 유래 폴리머들이 비해 더 쉽게 분해된다. 따라서, 인류를 위하여, 석유화합물들로부터 현재 제조되는 폴리머들 및 플라스틱들을 생화학물질(생물에 의해 제조되고/제조되거나 대사된 화학물질)로부터 제조되는 폴리머들 및 플라스틱들로 교체하는 것이 바람직하다.

[0004] 물론 많은 생화학물질, 예컨대 숙시네이트, 푸마레이트 및 아디페이트가 석유로부터 제조될 수 있고, 실제로 PBS 및 나일론을 제조하기 위해 현재 사용된 공정(2012년)은 석유-유래 모노머를 사용한다. 그러나, 세계의 석유 공급은 유한하기 때문에, 당, 당 폴리머, 글리세롤, 지방산, 이산화탄소, 리그닌, 또는 바이오매스 또는 바이오매스로부터 유래된 폐기물의 임의의 다른 형태와 같은 재생가능한 탄소 자원으로부터 발효에 의해 생화학적 모노머들을 제조하기 위한 물질 및 방법의 개발이 또한 가치있을 것이다. 따라서, 생체재생가능한(biorenewable) 자원으로부터 생분해성 플라스틱을 제조하기 위한 공정을 개발하는 것이 가치있을 것이다.

[0005] 몇몇 공정들은 발효에 의해 유기산을 제조하기 위해 개발되어 왔는데, 예를 들어, 락토바실러스속(*Lactobacillus*), 대장균속(*Escherichia*), 및 바실러스속(*Bacillus*)의 박테리아에 의한 L-락트산의 생산(Grabar 등, 2006; Patel 등, 2006), 사상균 리조퍼스 오리제아(filamentous fungus *Rhizopus oryzae*)에 의한 푸마르산의 생산(Roa Engel 등, 2008), 유전적으로 조작된 대장균(*Escherichia coli*) 또는 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*)에 의한 D-락트산(Wang 등, 2011; Jarboe 등, 2010; Grabar 등, 2006), 유전적으로 조작된 대장균에 의한 뮌콘산(Niu 등, 2002), 사카로미세스속(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스속(*Kluyveromyces*), 칸디다속(*Candida*), 및 이사첸키아속(*Issatchenkia*)의 다양한 유전적으로 조작된 효모종에 의한 L-락트산(Zhang 등, 2011; US 7,049,108, US 7,229,805), 유전적으로 조작된 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 의한 말산(US 2008/0090273), 및 유전적으로 조작된 대장균, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*), 및 야로위아 리폴

리티카(*Yarrowia lipolytica*)에 의한 숙신산 (Zhang 등, 2009a; Zhang 등 2009b; Jantama 등, 2008a; Jantama 등, 2008b; WO 2010/003728; WO 2008/128522; WO 2010/043197; WO 2012/103261; US2012/0015415).

[0006] 박테리아에 기초한 모든 이런 것들을 포함하는 앞서 언급한 많은 공정들은 낮은 pH에서 성장할 수 없는 미생물들을 사용한다. 이 발명에서 사용한 용어 "낮은 pH"는 pH 5.6 이하로 정의된다. 박테리아 생육매와 같은 낮은 pH 비내성 생육매가 숙신산과 같은 유기산의 생산에 사용되는 경우에, 배양 배지의 pH는 산성화 되어가고 배양 배지는 보통 소듐, 포타슘, 암모늄, 마그네슘, 또는 칼슘의 히드록사이드, 카보네이트, 바이카보네이트 또는 그의 혼합물과 같은 염기의 첨가에 의해 pH 약 5.6 내지 약 7.5로 유지된다. 그 결과, 배양 브로스(culture broth) 중에 유기산은 염으로서 존재하고, 대부분의 유기산 분자들은 전하를 띤다. 전하 상태는 장점 및 단점을 보여준다. 장점은 전하를 띤 염이 세포막(들)을 통과하여 다시 세포 안으로 확산되기 쉽지 않다는 점이다. 단점은 유기산의 중합 화학 또는 다른 추가적인 화학적 사용이 보통 유기산의 양성자화된 형태("유리산"으로도 불림)를 요구하여서, 발효에 의해 생산된 염은 유리산 형태를 제공하기 위한 아마도 값비싼 하류 공정을 요구한다. 따라서, 다수의 분자들이 유기산 상태로 있도록 낮은 pH(유기산의 가장 낮은 pKa의 pH와 근접하거나 더 바람직하게는 그보다 낮은 pH)에서 유기산을 생산하는 것이 이로울 것이다. 다른 고려를 배제하더라도, 낮은 pH 발효 브로스는 유리산의 순수한 조제를 제공하기 위한 덜 비싼 공정이며, 이는 훨씬 적은 반대 이온(예, 소듐, 포타슘, 암모늄, 마그네슘, 칼슘)이 분리되어야 하기 때문이다. 그러나, 이런 접근법에 대한 문제점은, 적어도 이론적으로는, 양성자화된 산이 그들의 각각의 염에 비해 더 소수성이어서, 양성자화된 산이 세포막의 소수성 지질 이중층을 통과하여 세포 안으로 다시 확산되어 들어가기 더 용이하다는 점이다(van Maris 등, 2014). 만일 세포 밖으로 유기산을 펌핑하기 위해 에너지가 필요되는 경우에, 원하는 생합성에서 세포의 자원들을 고갈시키는 무익한 사이클이 뒤따른다(van Maris 등, 2004).

[0007] 그럼에도 불구하고, 낮은 pH에서 발효에 의해 유기산을 생산하기 위한 공정이 존재한다. 시트르산은 양성자화된 형태가 모노카복시산 및 디카복시산의 극성에 비해 더 극성일 수 있다는 점에서 특별한 경우임에도 불구하고, 잘 알려지고 오래된 것은 아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 및 관련 종들에 의해 시트르산을 생산하는 공정이다(Papagianni, 2007). 최근에, 공정들은 낮은 pH에서 다양한 효모들에 의해 L-락트산을 제조하기 위해 개발되어 왔고, 이러한 효모들 중 하나는 어떤 것인지 개시되지는 않았지만 상업적으로 사용되어 왔다(Aker 등, Session Abstract 170, Society for Industrial Microbiology Annual Meeting, July 24-28, 2011, New Orleans, LA, USA). 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주는 말레이트를 생산하도록 유전자 조작되었지만, pH는 5에서 유지되었다(Zelle 등, 2008). 더 최근에는, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*), 및 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 균주들은 상대적으로 낮은 pH에서 숙신산을 생산하도록 유전자 조작되었다(WO 2008/128522; WO 2010/043197; US 2012/0040422; WO 2010/003728; WO 2011/023700; WO 2009/101180; WO 2012/038390; WO 2012/103261; 및 US 2012/0015415). 그러나, 언급되고 선행 문헌 특허 출원서에서 공개된, 역가 및 수율은 중성 pH에서 작동하는 박테리아 생산 시스템에 의해 얻어지는 것에 비해 상대적으로 낮아서, 공개된 효모 공정으로부터의 역가 및 수율이 중성 pH 박테리아 공정에 충분히 경쟁적일 수 있도록 높을지는 자명하지 않다(Jantama 등 2008a; Jantama 등, 2008b). 더 나아가, 본원발명에서 개시한 바와 같이, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주에 비해 낮은 pH에서 숙신산 및 L-락트산에 대해 더 내성이 있는 다른 환경 및 썩어가는 버개스(bagasse)로부터 단리된 몇몇 효모 균주가 있다.

[0008] WO 2012/103261은 숙시네이트 또는 말레이트를 생산하도록 유전자 조작된 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 균주를 개시한다. 이러한 균주들은, 많은 다양한 효모 종들의 수집물 중 낮은 pH에서 높은 숙시네이트 농도에 가장 잘 견디는 것으로 선택된 야생형 모체로부터 유도되었다. 특히, 선택된 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 균주는 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 균주에 비해 숙시네이트에 대해 더 내성을 가진다. WO 2012/103261은 숙시네이트를 과다생산하도록 유전자 조작된 클루이베로미세스속(genus *Kluyveromyces*)의 효모들을 개시하지 않는다. 그러나, 본원에서 설명할 것과 같이, 본원의 발명자들은, 희석된 리치-배지(rich medium)에서 성장하는 경우에, 낮은 pH에서 숙시네이트에 대하여 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)에 비해 더 내성을 갖는 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)의 야생형 균주를 발견했다(도 1 참조). 따라서, 종들 내의 다양한 균주들 중에서 낮은 pH에서 유기산에 대한 내성에 관하여 일부 명확한 변이성이 있고, 선별이 이루어지는 정밀한 조건은 이러한 선별의 결과물에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)를 숙시네이트에 대해 가장 내성을 갖는 것으로 식별한 WO 2012/103261에서 숙시네이트에 대한 선별에 대한 선별은 아마도 YPD 배지(탄소원으로서 2% 글루코스가 사용됨), pH 2.5에서 이루어졌지만, 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)의 임의의 알려진 균주와 동일하지 않은 야생형 클루이베로미세스

스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 균주를 숙시네이트에 대해 가장 높은 내성을 갖는 것으로 식별한 본원 하기에서 개시된 선별은 5% 글루코오스와 함께 1/4 강도 YP 배지(2.5 g/l 효모 추출물 + 5 g/l 펩톤) 및 시작 pH 3.3에서 이루어졌다. WO 2012/103261은 PEP 카복시키나아제를 인코딩하는 PCK 유전자의 결실이 숙시네이트 생산에 이롭고, 그 이유는 PEP 카복시키나아제가 글루코네오제닉 효소로 보통 고려되고 결실에 의해 소정 방향의 반대로 작용하기 때문이라고 개시하고 있다. 그러나, 적절히 유전자 조작된 균주에서, 본원 발명자들은 정반대를 제안하는데, 즉 보급 대사 반응(이산화탄소 포함)을 위해 PEP 카복시키나아제를 사용하는 것이 WO 2012/103261에서 청구하는 바와 같이 피루베이트 카복실라아제 또는 PEP 카복실라아제를 사용하는 것에 비해 더 호의적이다. WO 2012/103261의 발명자들은 숙시네이트로의 환원 경로에 대한 환원 당량이 펜토오스 포스페이트 경로를 통해 플럭스를 증가시킴으로서 제공될 수 있다고 제안한다. 이와 대조적으로, 본원 발명자는 숙시네이트 합성을 위한 환원 당량이 TCA 사이클의 산화 및 환원 분점들을 통해 플럭스를 조정하는 것에 의해 가장 잘 제공된다고 제안한다.

[0009] 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 균주는 말레이트 또는 푸마레이트를 생산하도록 유전자 조작된다고 개시되어 있다(WO 2012/103263). 그러나, WO 2012/103263은 말레이트 또는 푸마레이트 생산을 위한 숙주로서 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*)의 사용을 개시하고 있지 않고, 상기 WO 2012/103261과 같이, PEP로부터 옥살로아세테이트(OAA)로의 카복실화 반응을 위해 PEP 카복시키나아제를 사용하는 것에 대항하여 교시한다.

[0010] 어떤 경우에서, WO 2012/103261에서 개시된 숙시네이트 생산 파라미터 및 WO 2012/103263에서 개시된 말레이트 생산 파라미터는 각각 숙시네이트 또는 말레이트의 상업적 생산에 충분히 매력적이지 않아서, 여전히 개선의 여지가 있고, 낮은 pH에서 발효에 의해 숙신산 및 다른 유기산들, 예컨대 푸마르산, L-말산, D-락트산, L-락트산을 생산하기 위한 개선된 공정을 개발할 필요가 여전히 있다.

[0011] 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)는 글루코오스를 탄소원으로 하여 호기성 또는 혐기성으로 성장하는 경우에 현저한 양의 숙신산을 자연적으로 생산한다(Oura, 1977; Heerde 및 Radler, 1978; de Klerck, 2010). 사카로미세스(*Saccharomyces*)에서 숙시네이트로의 산화성 및 환원성 생화학적 경로는 잘 알려져 있고(de Klerck, 2010), 효모를 제외한 대장균 및 많은 다른 미생물의 생화학적 경로와 유사하고, 많은 산화성 단계들은 미토콘드리아 또는 프로미토콘드리아(프로토미토킨드리아로도 알려져 있음) 내부에서 대부분 촉매화된다. 숙신산은 트리카복실산 사이클 또는 TCA 사이클로도 알려져 있는 크렙 사이클(Kreb's cycle)에서 중간체이다. 산소가 존재하는 조건 하에서, 대부분의 호기성 미생물들은 TCA 사이클을 산화적으로 진행하며, 이는 먼저 옥살로아세테이트(OAA) 및 아세틸-CoA로 시작하여, 시트레이트, 아코니테이트, 이소시트레이트, 알파-케토글루타레이트, 숙시닐-CoA, 숙시네이트, 푸마레이트, 말레이트를 거쳐서 다시 OAA로 돌아온다. 이 과정에서, NADH, NADPH, 및 FADH₂의 형태에서 환원 당량들이 아세틸-CoA의 1몰 당 2몰의 CO₂와 함께 생산된다. 따라서, 아세틸-CoA의 아세틸 부분은 실제로는 사이클 중에서 CO₂ 및 물로 산화되고, OAA는 재생되는 프라이머 또는 촉매로서 작용한다. 숙시네이트는 중간체이다. 호기성 조건하에서, 환원 당량들은 산소에 의해 최종적으로 산화되어 산화적 인산화에 의해 물 및 ATP를 생산하고, 그 결과 NAD, NADP 및 FAD는 다른 사이클을 위해 재생된다. 그러나, 산소 또는 다른 산화제의 부재하에서는, TCA 사이클은 전술한 산화적 사이클에서 배타적으로 수행될 수 없는데, 그 이유는 세포가 TCA 사이클에 의해 요구되는 NAD, NADP 및 FAD의 양을 재생할 방법이 없기 때문이다. 적어도 세개의 TCA 사이클 중간체, α-케토글루타레이트, 숙시닐-CoA, 및 OAA는 다른 생합성 경로에 대한 생화학적 중간체로서 필요하기 때문에, 최소 배지 중에 호기성 조건 하에서 TCA 사이클의 효소 반응의 대부분은 활성 상태이어야만 한다. 이런 조건 하에서, TCA "사이클"은 두 개의 선형, 비-고리형 포크(forks) 또는 분점(branches)로 분리되는데, 두개의 분점은 전술한 바와 같이 시작하지만 숙시닐-CoA에서 종료하는 산화성 분점 및 OAA로 시작되지만 전술한 바의 반대 방향으로 진행하여 팔레이트 및 푸마레이트를 거쳐 숙시네이트로 종료하는 환원성 분점이다. 이런 제1 분점은 산화성 분점으로 본원에서 언급될 것이고, OAA로부터 숙시네이트로의 경로들 중 하나가 NAD 및 FAD를 재생하기 위하여 환원 당량들을 NADH 및 FADH₂로서 소비하기 때문에, 제2 분점은 TCA 사이클의 환원성 분점으로 본원에서 언급될 것이다.

[0012] 본원발명에서 정의한 바와 같이, 용어 TCA 사이클의 "숙시네이트 생산을 위한 산화성 경로" 또는 "산화성 분점"은 포스포에놀 피루베이트로 시작하여 숙시네이트로 종료하고, 옥살로아세테이트, 아세틸-CoA, 시트레이트, 아코니테이트, 이소시트레이트, 알파-케토글루타레이트, 및 숙시닐-CoA와 같은 중간체를 포함하고, NADH와 같은 환원 당량들의 생산을 수반하는 크렙 사이클의 일부를 지칭한다. 반면에, 본원발명에서 정의한 바와 같이, 용어 TCA 사이클의 "숙시네이트 생산을 위한 환원성 경로" 또는 "환원성 분점"은 옥살로아세테이트로 시작하여 말

레이트 및 푸마레이트를 중간체로서 포함하고 NADH 및 FADH₂와 같은 환원 당량들을 소비하여 숙시네이트로 종료하는 크렙 사이클의 일부를 지칭한다. 야생형 효모 세포에서, 크렙 사이클은 미토콘드리아 내에서 완전히 진행된다. 본원발명은 숙시네이트 생산을 위한 산화성 경로 및 숙시네이트 생산을 위한 환원성 경로가 세포질 내에서 완전히 진행되는 유전적으로 조작된 효모 세포에 관한 것이다.

[0013] 옥살로아세테이트는 포스포에놀피루베이트의 각각의 피루베이트의 카복실화를 통해 효모 세포의 세포질에서 생산된다. 옥살로아세테이트로의 피루베이트의 카복실화는 피루베이트 카복실라아제에 의해 매개되며, 포스포에놀피루베이트의 카복실화는 포스포에놀 피루베이트 카복실라아제 또는 포스포에놀 피루베이트 카복시키나아제 중 어느 하나에 의해 매개된다. 옥살로아세테이트는 세포질로부터 미토콘드리아 안으로 진입하고 크렙 사이클을 개시시킨다.

[0014] 크렙 사이클의 산화성 부분에서 중간체인 이소시트르산으로부터의 탄소도 글리옥실레이트 사이클 안으로 진입하여 그 결과로 세포질에서 글리옥실레이트 및 숙신산의 형성을 가져온다. 글리옥실레이트 사이클은 글리옥실레이트 셉트(glyoxylate shunt)로도 당해 분야에 알려져 있다. 글리옥실레이트 경로는 미토콘드리아 내에서 시트르산 사이클로부터 분리되어 나오고, 세포질에서 최종 산물로서 숙신산의 생산을 가져온다. 글리옥실레이트 경로를 숙신산 경로에 이용하기 위한 노력이 있어왔다. 글리옥실레이트 사이클의 작동을 통해 세포질에서 숙신산을 축적하기 위하여, 하기 세개의 유전자 조작이 달성되어야 한다: (i) 시트르산 사이클로부터의 탄소가 글리옥실레이트 사이클 안으로 다시 보내지도록 적절한 위치에서 시크르산 사이클의 작동을 차단하는 것; (ii) 글리옥실레이트 사이클에서 수반된 효소의 작동을 강화시키는 것; 및 (iii) 유전자 조작을 통해 미토콘드리아 엔벨롭(envelop)에서 디카복실산 운반체를 제거하여 시토솔(cytosol)로부터 미토콘드리아 안으로 숙신산의 재진입을 방지하는 것.

[0015] 본원발명의 목적은 글리옥실레이트 사이클의 개입없이 미토콘드리아의 외부에서 숙신산을 제조하는 것이다. 이는 효모 세포들의 미토콘드리아 내부에서 보통 발견되고 크렙 사이클의 산화성 또는 환원성 부분 중 어느 하나에 관여되는 효소들을 세포질 내에서 발견하는 것에 의해 달성된다.

[0016] 대장균 균주는 혐기성 또는 미량호기성(microaerobic) 조건 하에서 숙시네이트를 생산하도록 유전적으로 조작된다(Jantama 등, 2008a; Jantama 등, 2008b). 이론적으로, 글루코오스로부터 최대한 가장 높은 숙시네이트의 수율을 얻기 위하여, 숙시네이트는 TCA 사이클의 산화성 및 환원성 분점 모두에 의해 합성되어야만 한다(WO 2011/063157). 환원성 경로는 본질적으로 산화성 경로에 비해 글루코오스로부터 더 높은 수율을 보이는데, 그 이유는 환원성 경로가 임의의 탄소 원자를 잃지 않고 PEP 카복시키나아제 반응에서 이산화탄소로부터 탄소 원자를 내포하기 때문이다. 그러나, 환원성 경로는 숙시네이트 당 하나의 NADH 및 하나의 FADH₂를 요구하기 때문에, 그리고 글루코오스로부터 PEP로의 해당 경로가 3-탄소 유닛 당 하나의 NADH만을 생성하기 때문에, 글루코오스로부터 숙시네이트로의 환원성 경로는 산화환원적으로 균형잡히지 않고, 따라서 그 자체가 혐기성으로 작동될 수 없다. 산화성 경로는 3-탄소 유닛(피루베이트) 소모 당 두 개의 NADH 및 하나의 NADPH를 생산한다. 그러므로, 만일 환원 및 산화 경로들 모두가 올바른 비율로 작동하면, 산화환원 당량들(NADH, NADPH, 및 FADH₂)의 생산 및 소모는 산소가 없는 경우에서도 균형잡힐 수 있다.

[0017] 대장균 및 TCA 사이클을 작동시키는 아마 대부분의 또는 모든 다른 미생물들에서, TCA의 조절은 탄소 및 에너지를 보존하도록 거의 진화되어 왔지, 글루코오스로부터 숙시네이트의 수율을 최대화하도록 진화되어 오지는 않았다. 따라서, 정상 발효성(homofermentative)의 숙시네이트 생산을 위해 유전자 조작된 대장균 균주는, 혐기성 또는 미량호기성 조건 하에서 산화환원 균형을 제공하도록 TCA 사이클 중 두개의 분점이 균형잡힌 결과를 아마도 가져오는 "재-진화"(대사 진화로도 칭함)를 겪는다(Jantama 등, 2008a; Jantama 등, 2008b).

[0018] 효모를 이용한 낮은 pH 발효에서 숙신산과 같은 디카복실산을 생산하는 것의 이론적인 장점에도 불구하고, 효모 내에 막결합성 세포 기관의 형태에서 세포 이하의 구획화 때문에, 효모에서 유전자 조작된 숙시네이트 생산은 대장균에서와 같이 간단하지 않다. 우선, 사카로미세스(*Saccharomyces*) 및 아마도 전부가 아니면 대부분의 다른 효모에서, 호기성 조건하에서, TCA 사이클은 미토콘드리아 또는 프로미토콘드리아 내부에서 작동한다(WO 2008/128522, WO 2010/043197). 특정 숙시네이트 운반체의 부재하에서, 미토콘드리아의 내막은 숙시네이트를 통과시키지 않지만(Lee 등, 2011), 푸마레이트 또는 포스페이트 대신에 미토콘드리아 안으로 숙시네이트를 들여오는 알려진 운반체들은 통과시킨다(Lee 등, 2011; Palmieri 등, 1999; Palmieri 등, 2000). 그러나, 미토콘드리아로부터 세포질로 숙시네이트를 분비하는 메커니즘은 알려지지 않았으며, 그 결과 TCA 사이클로부터 생산되거나 분리된 방식으로 생산된 숙시네이트는 미토콘드리아의 외부로 쉽게 분비되지 못하여서 세포 밖으로 분비

되지 못한다. 이와 같이, 말레이트 및 숙시네이트로의 환원성 경로 중에 피부레이트 카복실라아제, 말레이트 데히드로게나아제, 및 푸마라아제와 같은 키 효소가 미토콘드리아 외부인 세포질 내에 존재하고 충분히 활성이 되도록 준비하는 것에 의해, 세포질 내에서 말레이트 및 숙시네이트와 같은 디카복실산의 생합성을 피하는 것이 바람직할 것이라고 선행 문헌으로부터 인식되었다(US 2008/0090273, US 2012/0040422, WO 2010/003728, WO 2011/023700, WO 2009/101180, 및 WO 2012/038390, WO 2008/128522, WO 2010/043197, WO 2009/011974). 그러나, 선행 문헌은, 효모에서 글로코오스로부터(또는 다른 탄소원) 숙시네이트 수율을 최대화하면서 이와 동시에 미토콘드리아로부터 어떻게 숙시네이트를 내보낼지 또는 혐기성이나 미량호기성 조건 하에서 어떻게 산화환원 균형을 달성할지의 문제를 인식하지 않거나 해결하지 않았다.

[0019] 두 개의 미토콘드리아의 막 단백질들은 효모에서 포스페이트 또는 푸마레이트 대신에 미토콘드리아 안으로 숙시네이트를 펌핑한다고 보고된다(Lee 등, 2011; Palmieri 등, 1999; Palmieri 등, 2000). 이와 같이, 본원발명의 바람직한 실시예에서, 숙시네이트를 생산하도록 유전적으로 조작되는 본원발명의 효모들의 신규한 특징들과 조합하여, DIC1(WO 2008/128522) 및 SFC1의 운반체를 인코딩하는 유전자들 중 어느 하나 또는 둘 모두는 효모 균주로부터 삭제될 것이다.

[0020] 숙시네이트 생산을 위한 효모 또는 박테리아 중 어느 하나를 이용하는 선행 문헌들은 환원성 숙시네이트 경로를 공급하기 위하여 환원 당량들(NADH)을 생산하는 글리옥실레이트 선트의 사용에 의존한다(WO 2009/101180, WO 2008/128522, Vemuri 등, 2002; Cox 등, 2006; Zhu 등, 2013). 더 나아가, 글리옥실레이트 선트 효소 이소시트레이트 리아제(lyase) 및 말레이트 신타아제(synthase)는 효모 중에 세포질이기 때문에, 이러한 효소들의 사용은 효모의 세포질에서 숙시네이트 합성에 의존된다(WO 2009/101180, WO 2008/128522). 그러나, 박테리아 또는 효모 중 어느 하나에서 숙시네이트 합성을 위한 글리옥실레이트 선트의 사용은, TCA 사이클의 산화성 분점의 사용에 비해 본질적으로 세포에 대하여 덜 효율적인데, 그 이유는 TCA 사이클의 산화성 분점이 숙시닐-CoA에서 숙시네이트 단계로 ATP 또는 GTP를 생산하지만 글리옥실레이트 선트는 어떤 단계에서도 ATP 또는 GTP를 생산하지 않기 때문이다. 따라서, 글리옥실레이트 선트의 사용은 낭비적이어서, 숙시네이트 및 다른 디카복실산, TCA 사이클 중간체들 및 그의 유도체들의 생합성을 위해 글리옥실레이트 선트의 사용을 피하는 것이 이롭다. 본원 발명자들은 숙시네이트 생산을 위해 작동되는 TCA 사이클의 환원성 및 산화성 분점들 모두를 갖는 것이 중요하다고 인식했고, 효모에서, 세포질에서 작동하는 두 개의 분점들을 갖는 글리옥실레이트 선트 효소의 사용을 회피하는 것이 바람직할 것이라고 인식했다. 이런 관점에서, 이소시트레이트 리아제(예, *ScICL1*, *ScICL2*, *KmICL1*, *IoILC1* 등) 및 말레이트 신타아제(예, *ScMLS1*, *ScMLS2*, *KmMLS1*, *IoMLS1* 등)를 인코딩하는 유전자들은 당해 분야에 잘 알려진 방법에 의해 숙주 효모 균주로부터 삭제될 수 있다.

[0021] 특히, 숙시네이트 생산을 위해 환원 및 산화 경로를 균형잡는 개념이 선행문헌(Jantama 등, 2008b; Abbott 등, 2009)에서 논의되었지만, 선행 문헌들 모두 효모에서 TCA 사이클의 산화 분점의 효소들을 미토콘드리아로부터 세포질로 다시 보내거나, 산화성 숙시네이트 경로의 효소, 예컨대 세포질 내에 미토콘드리아의 다이렉팅 신호 서열(mitochondrial directing signal sequences)을 갖지 않은 박테리아 효소를 직접적으로 도입하는 것에 대해 시사하지 않는다. 실제로, 선행 문헌은 산화성 방향에서 작동하는 TCA 효소의 양성 조절자를 인코딩하는 유전자인 *RTG3*의 결실을 추천하는 것에 의해 효모에서 디카복실산 생산을 위한 TCA 사이클의 산화성 분점의 사용에 대해 교시하고(WO 2009/011974), 환원성 및 산화성 경로를 균형잡는 것에 대해 논의하는 선행 문헌은 산화성 경로로서 TCA 사이클 대신에 글리옥실레이트 선트의 사용을 추천한다(Raab 및 Lang, 2011). 또한, 미토콘드리아 내부 및 외부 모두에서 생산의 조절 및 관련 효소들 모두의 활성은 극도로 복잡하고, 이를 어떻게 적절한 수준으로 유전자 조작할지는 자명하지 않다. 마지막으로, 미토콘드리아의 막은 NAD 및 NADH를 통과시키지 않고, 미토콘드리아의 매트릭스 및 세포질 사이에서 효율적인 산화환원 균형을 어떻게 달성하는지는 자명하지 않다. 미토콘드리아의 막을 가로질러서 환원 당량들을 운반하기에 유용할 수 있는 적어도 세개의 시스템들, 즉 아스파르테이트-말레이트 셔틀, 글리세롤-3-포스페이트 데히드로게나아제 셔틀, 및 알콜 데히드로게나아제 셔틀이 존재한다(Easlon 등, 2008). 그러나, 또한, 숙시네이트 또는 다른 디카복실산의 생합성을 위한 소정의 조건을 만들기 위해서 이러한 셔틀들 중 하나 이상을 어떻게 조작할지는 자명하지 않다. 본원에 개시된 발명은 이러한 문제점들을 인식하고 이러한 문제점들에 대해 해답을 제공한다.

[0022] 선행 문헌의 연구자들은 사카로미세스속(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스속(*Kluyveromyces*), 칸디다속(*Candida*), 토룰롭시스(*Torulopsis*), 자이코사카로미세스(*Zygosaccharomyces*), 및 이사첸키아속(*Issatchenkia*)로부터의 효모들을 포함하여 다양한 효모들에서 L-락테이트 및 D-락테이트를 제조하기 위한 물질들 및 방법들을 개시했다(Zhang 등, 2011; US 6,429,006, US 7,049,108, US 7,326,550, US 7,229,805, 및 US 특허출원 공개 번호 2009/0226989, 2007/0031950). 그러나, 글루코오스로부터 락테이트로의 생합성 경로는 숙시네이트로의 경

로들에 비해 본질적으로 훨씬 간단하다. 글루코오스에서 락테이트로의 경로는 산화환원 균형잡혔고, 미토콘드리아를 수반하지 않아서, 효모에서 락테이트 생합성에 관한 선행 문헌은 어떻게 효모에서 숙시네이트 또는 다른 디카복실산을 가장 잘 생산할 수 있는지에 대해 충분히 교시하지 않는다. 몇몇 선행 문헌들은 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 숙시네이트를 제조하기 위한 방법들 및 물질들을 교시한다. 그러나, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)는 다른 클루이베로미세스속(*Kluyveromyces*), 피키아속(*Pichia*), 한센룰라속(*Hansenula*), 칸디다속(*Candida*), 및 이사첸키아속(*Issatchenkia*)의 일부 효모들만큼 낮은 pH에서 유기산에 대한 내성을 갖지 않아서, 비-사카로미세스(non-*Saccharomyces*) 효모들에서 숙시네이트를 생산할 수 있도록 개선될 것이다. 유기산에 대한 내성 외에도, 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*) 및 이사첸키아(*Issatchenkia*)와 같은 다른 효모들과 사카로미세스(*Saccharomyces*) 사이에 많은 다른 근본적인 차이점들이 존재한다. 그러므로, 선행 문헌의 교시들은 상업적으로 실행가능한 숙시네이트 생산을 위해 어떻게 비-사카로미세스 효모 종들을 과도한 실험 없이 유전자 조작할지에 대해 자명하게 하지 않는다. 예를 들어, 야생형 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)는 *ScPDC1*, *ScPDC5* 및 *ScPDC6*에 의해 인코딩된 피루베이트 데카복실라아제의 적어도 세개의 동중효소(isozymes)를 함유하며, 야생형 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 야생형 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 각각은 *KIPDC1* 및 *KmPDC1*에 의해 각각 인코딩된 오직 하나의 활성 피루베이트 데카복실라아제를 함유한다. 두번째로, 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)에서 유전자 발현의 조절은 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에서의 조절과 꽤 다를 수 있다(Booth 등, 2010; Rusche 및 Rine, 2010). 셋째로, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 대한 디폴트 경우는 이배성이다. 이배체는 안정하며, 오직 굶주린 경우에만 포자를 형성한다. 그러나, 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)에 대한 디폴트 경우는 일배성이다. 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 일배체는 그들이 굶주린 경우에만 교배를 하고, 그 결과의 이배체는 교배가 일어나자마자 일배체로 포자를 형성한다(Booth 등, 2010; Kegel 등, 2006). 넷째로, 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)는 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 비해 훨씬 높은 비-상동의 말단 결합의 수준을 보인다(Kegel 등, 2006; Abdel-Banat 등, 2010). 이런 차이점의 결과는 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 비해 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*)에서 염색체 조작을 수행하는 것이 훨씬 더 어렵다는 것이다. 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 진화 과정에서, 그 속에 대한 난해한 결과를 갖는 전체 게놈의 복제가 존재하지만, 이러한 복제는 클루이베로미세스속(*Kluyveromyces* genus)의 진화 과정에서는 발생하지 않는다. 마지막으로, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 및 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 사이에는 근본적으로 생리학적 차이점이 있다. 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터 *ScSDH1* 유전자(숙시네이트 데히드로게나아제에 필수적인 서브유닛을 인코딩함)의 삭제는 유일한 탄소원으로서 락테이트 상에서 성장하는 것을 막는 반면에, 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)에서 상동 유전자의 삭제는 락테이트 상에서의 성장에 영향을 미치지 않는다(Saliola 등, 2004). 따라서, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 사이에는 아주 많은 근본적인 차이점이 존재하며, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 대한 선행 문헌의 지식 및 교시는 숙시네이트 및 다른 디카복실산의 생산을 위해 비-사카로미세스 효모들을 과도한 실험없이 어떻게 조작하는 것이 좋을지에 대해 충분히 자명하도록 하지 않을 것이다.

[0023] 유전자 조작 및 대사적 진화의 조합은 높은 수준의 숙시네이트를 생산하는 대장균의 균주를 제작하기 위해 사용되어 왔다(Zhang 등, 2009a; Zhang 등, 2009b; Jantama 등, 2008a; Jantama 등, 2008b). 이전 문장에서 과학 문헌들에서 설명된 유기산 생산을 위해 선택된 미생물을 대사적으로 진화시키는 공정은 본원에 참조로서 포함된다.

[0024] 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*), 칸디다 sp.(*Candida* sp.), 토룰롭시스 sp.(*Torulopsis* sp.) 및 자이고사카로미세스(*Zygosaccharomyces*)의 균주들은 L-락트산 및/또는 D-락트산을 생산하도록 유전자 조작되는 것으로 개시되었다(Zhang 등, 2011; US 6,429,006, US 7,049,108, US 7,326,550, US 7,229,805, 및 US 특허출원공개 2009/0226989 및 2007/0031950).

[0025] 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 균주는 L-말레이트를 생산하도록 유전자 조작되는 것으로 개시되었다(US 특허출원공개 2008/0090273 및 국제특허출원공개 W02009/011974). 세포질 내에 피루베이트 카복실라아제, 말레이트 데히드로게나아제 및 푸마라아제를 배치시키기 위한 아이디어도 말레이트 및 숙시네이트를 공동 생산하기 위한 방법으로서 개시되어 있다. 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)의 균

주들은 말레이트 또는 푸마레이트를 생산하도록 유전자 조작되는 것으로 개시되었다(WO2012/103263). 그러나, 이 특허 출원서는 말레이트 또는 푸마레이트 생산을 위한 숙주로서 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*)의 사용을 개시하지 않을 뿐만 아니라, PEP로부터 옥살로아세테이트(OAA)로의 카복실화 반응을 위한 PEP 카복시키나아제의 사용도 개시하지 않는다.

[0026]

사카로미세스 세레비시예(*Saccharomyces cerevisiae*), 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 및 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)는 숙신산을 과다생산하도록 유전자 조작되는 것이 개시되었다(WO 2008/128522, WO 2010/043197, US 2012/0040422, WO 2010/003728, WO 2011/023700, WO 2009/101180, WO 2012/103261, US 2012/0015415 및 WO 2012/038390). 상기 나열된 출원서들 중 몇몇이 임의의 효모, 균류, 또는 진핵생물에서 숙신산의 생산을 청구하고 있지만, 이러한 임의의 공개문헌들의 개시들 중 어디에도 이러한 넓은 청구항들을 실시가능한 정도로 개시하지 않는다. 더 나아가, 앞서 나열된 출원서들에서 공개된 발효 파라미터들은 상업적 생산에 충분히 상업적으로 매력있지 않다. 이와 같이, 낮은 pH에서 발효에 의해 숙신산을 생산하기 위한 현재 기술로부터 개선할 여지가 있고 필요가 여전히 존재한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0027]

- (특허문헌 0001) 미국특허번호 6,429,006
- (특허문헌 0002) 미국특허번호 6,485,947
- (특허문헌 0003) 미국특허번호 7,049,108
- (특허문헌 0004) 미국특허번호 7,141,410
- (특허문헌 0005) 미국특허번호 7,229,805
- (특허문헌 0006) 미국특허번호 7,326,550
- (특허문헌 0007) 미국특허번호 7,473,540
- (특허문헌 0008) 미국특허번호 7,534,597
- (특허문헌 0009) 미국특허번호 8,071,357
- (특허문헌 0010) 미국특허번호 8,137,953
- (특허문헌 0011) 미국특허출원공개 US 2007/0031950
- (특허문헌 0012) 미국특허출원공개 US 2008/0090273
- (특허문헌 0013) 미국특허출원공개 US 2009/0226989
- (특허문헌 0014) 미국특허출원공개 US 2010/0104771
- (특허문헌 0015) 미국특허출원공개 US 2012/0015415
- (특허문헌 0016) 미국특허출원공개 US 2012/0040422
- (특허문헌 0017) 국제특허출원공개 WO 2008/128522
- (특허문헌 0018) 국제특허출원공개 WO 2009/011974
- (특허문헌 0019) 국제특허출원공개 WO 2009/013159
- (특허문헌 0020) 국제특허출원공개 WO 2009/065777
- (특허문헌 0021) 국제특허출원공개 WO 2009/065778
- (특허문헌 0022) 국제특허출원공개 WO 2009/065779
- (특허문헌 0023) 국제특허출원공개 WO 2009/065780
- (특허문헌 0024) 국제특허출원공개 WO 2009/101180

(특허문헌 0025) 국제특허출원공개 WO 2010/003728
 (특허문헌 0026) 국제특허출원공개 WO 2010/118932
 (특허문헌 0027) 국제특허출원공개 WO 2010/043197
 (특허문헌 0028) 국제특허출원공개 WO 2011/023700
 (특허문헌 0029) 국제특허출원공개 WO 2011/063157
 (특허문헌 0030) 국제특허출원공개 WO 2012/038390
 (특허문헌 0031) 국제특허출원공개 WO 2012/103261
 (특허문헌 0032) 국제특허출원공개 WO 2012/103263

비특허문헌

[0028]

(비특허문헌 0001) Abbott, D. A., Zelle, R. M., Pronk, J. T. and van Maris, A. J. A. (2009) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acid: current status and challenges. *FEMS Yeast Res.* 9, 1123-1136.

(비특허문헌 0002) Abdel-Banat, B. M., Nonklang, S., Hoshida, H., and Akada, R. (2010) Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*, *Yeast* 27, 29-39.

(비특허문헌 0003) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J Mol Biol* 215, 403-410.

(비특허문헌 0004) Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.

(비특허문헌 0005) Anderlund, M., Nissen, T. L., Nielsen, J., Villadsen, J., Rydstrom, J., Hahn-Hagerdal, B., and Kielland-Brandt, M. C. (1999) Expression of the *Escherichia coli* *pntA* and *pntB* genes, encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on product formation during anaerobic glucose fermentation, *Appl Environ Microbiol* 65, 2333-2340.

(비특허문헌 0006) Avalos, J. L., Fink, G. R., and Stephanopoulos, G. (2013) Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat Biotechnol* 31, 335-341.

(비특허문헌 0007) Booth, L. N., Tuch, B. B., and Johnson, A. D. (2010) Intercalation of a new tier of transcription regulation into an ancient circuit, *Nature* 468, 959-963.

(비특허문헌 0008) Camarasa, C., Faucet, V., and Dequin, S. (2007) Role in anaerobiosis of the isoenzymes for *Saccharomyces cerevisiae* fumarate reductase encoded by *OSM1* and *FRD5*, *Yeast* 24, 391-401.

(비특허문헌 0009) Cao, Z., Song, P., Xu, Q., Su, R., and Zhu, G. (2011) Overexpression and biochemical characterization of soluble pyridine nucleotide transhydrogenase from *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol Lett* 320, 9-14.

(비특허문헌 0010) Coves, J., Niviere, V., Eschenbrenner, M., and Fontecave, M. (1993) NADPH-sulfite reductase from *Escherichia coli*. A flavin reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase, *J Biol Chem* 268, 18604-18609.

(비특허문헌 0011) Cox, S. J., Shalel-Levanon, S., Sanchez, A., Lin, H., Peercy, B., Bennett, G. N., and San, K. Y. (2006) Development of a metabolic network design and optimization framework incorporating implementation constraints: a succinate production case study. *Metab Eng* 8, 46-57.

- (비특허문헌 0012) de Klerck, J.-L. (2010) Succinic acid production by wine yeasts, in Departement of Citiculture and Oenology, pp. 1-156, Stellenbosch University.
- (비특허문헌 0013) Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P., and Souciet, J. L. (2004) Genome evolution in yeasts, *Nature* 430, 35-44.
- (비특허문헌 0014) Easlon, E., Tsang, F., Skinner, C, Wang, C, and Lin, S. J. (2008) The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast, *Genes Dev* 22, 931-944.
- (비특허문헌 0015) Eschenbrenner, M., Coves, J., and Fontecave, M. (1995) The flavin reductase activity of the flavoprotein component of sulfite reductase from *Escherichia coli*. A new model for the protein structure, *J Biol Chem* 270, 20550-20555.
- (비특허문헌 0016) Galan, B., Manso, I., Kolb, A., Garcia, J. L., and Prieto, M. A. (2008) The role of FIS protein in the physiological control of the expression of the *Escherichia coli* meta-hpa operon, *Microbiology* 154, 2151-2160.
- (비특허문헌 0017) Grabar, T. B., Zhou, S., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P., and Ingram, L. O. (2006) Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in l(+) and d(-)-lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol Lett* 28, 1527-1535.
- (비특허문헌 0018) Heerde, E., and Radler, F. (1978) Metabolism of the Anaerobic Formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 117, 269-276.
- (비특허문헌 0019) Heinisch, J. J., Buchwald, U., Gottachlich, A., Heppler, N., and Rodicio, R. (2010) A tool kit for molecular genetics of *Kluyveromyces lactis* comprising a congenic strain series and a set of versatile vectors. *FEMS Yeast Res* 10, 333-342.
- (비특허문헌 0020) Hurt, E. C, Allison, D. S., Muller, U., and Schatz, G. (1987) Amino -terminal deletions in the presequence of an imported mitochondrial protein block the targeting function and proteolytic cleavage of the presequence at the carboxy terminus. *J Biol chem.* 262, 1420-1424.
- (비특허문헌 0021) Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C, Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O. (2008a) Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate, *Biotechnol Bioeng* 99, 1140-1153.
- (비특허문헌 0022) Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C, Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A., and Ingram, L. O. (2008b) Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C, *Biotechnol Bioeng* 101, 881-893.
- (비특허문헌 0023) Jarboe, L. R., Zhang, X., Wang, X., Moore, J. C, Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O. (2010) Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology, *JBiomd Biotechnol* 2010, 761042.
- (비특허문헌 0024) Kegel, A., Martinez, P., Carter, S. D., and Astrom, S. U. (2006) Genome wide distribution of illegitimate recombination events in *Kluyveromyces lactis*, *Nucleic Acids Res* 34, 1633-

1645.

(비특허문헌 0025) Kunioka, M., Ninomiya, F., and Funabashi, M. (2009) Biodegradation of poly(butylene succinate) powder in a controlled compost at 58 degrees C evaluated by naturally-occurring carbon 14 amounts in evolved CO(2) based on the ISO 14855-2 method, *Int J Mol Sci* 10, 4267-4283.

(비특허문헌 0026) Lee, Y. J., Burlet, E., Galiano, F., Circu, M. L., Aw, T. Y., Williams, B. J., and Witt, S. N. (2011) Phosphate and succinate use different mechanisms to inhibit sugar-induced cell death in yeast: insight into the Crabtree effect, *J Biol Chem* 286, 2Q261-2Q21 .

(비특허문헌 0027) Lee, K. S., Kim, J. S., Heo, P., Yang, T. J., Sung, Y. J., Cheon, Y., Koo, H. M., Yu, B. J., Seo, J. FL, Jin, Y. S., Park, J. C, and Kweon, D. H. (2012) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* promoters for heterologous gene expression in *Kluyveromyces marxianus*, *Appl Microbiol Biotechnol*.

(비특허문헌 0028) Louie, T. M., Yang, FL, Karnchanaphanurach, P., Xie, X. S., and Xun, L. (2002) FAD is a preferred substrate and an inhibitor of *Escherichia coli* general NAD(P)H: flavin oxidoreductase, *J Biol Chem* 277, 39450-39455.

(비특허문헌 0029) Louie, T. M., Xie, X. S., and Xun, L. (2003) Coordinated production and utilization of FADH2 by NAD(P)H-flavin oxidoreductase and 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase, *Biochemistry* 42, 7509-7517.

(비특허문헌 0030) Nair, N. U. and Zhao, H. M. (2009) Mutagenic inverted repeat assisted genome engineering (MIRAGE). *Nucleic Acids Res* 37, e9.

(비특허문헌 0031) Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria, *Annu Rev Biochem* 76, 723-749.

(비특허문헌 0032) Neves, L., Oliveira, R. and Lucas, C. (2004) Yeast orthologues with glycerol transport and metabolism. *FEMS Yeast Res* 5, 51-62.

(비특허문헌 0033) Niu, W., Draths, K. M., and Frost, J. W. (2002) Benzene-free synthesis of adipic acid, *Biotechnol Prog* 75, 201-211.

(비특허문헌 0034) Nissen, T. L., Anderlund, M., Nielsen, J., Villadsen, J., and Kielland-Brandt, M. C. (2001) Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool, *Yeast* 18, 19-32.

(비특허문헌 0035) Niviere, V., Fieschi, F., Decout, J. L., and Fontecave, M. (1999) The NAD(P)H: flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*. Evidence for a new mode of binding for reduced pyridine nucleotides, *J Biol Chem* 274, 18252-18260.

(비특허문헌 0036) Oura, E. (1977) Reaction products of yeast fermentations, *Process Biochemistry* 12, 19-21.

(비특허문헌 0037) Palmieri, L., Voza, A., Honlinger, A., Dietmeier, K., Palmisano, A., Zara, V., and Palmieri, F. (1999) The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. *Mol Microbiol* 31. 569-577.

(비특허문헌 0038) Palmieri, L., Lasorsa, F. M., Voza, A., Agrimi, G., Fiermonte, G., Runswick, M. J., Walker, J. E., and Palmieri, F. (2000) Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria, *Biochim Biophys Acta* 1459, 363-369.

(비특허문헌 0039) Papagianni, M. (2007) Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling, *Biotechnol Adv* 25, 244-263.

(비특허문헌 0040) Patel, M. A., Ou, M. S., Harbrucker, R., Aldrich, H. C, Buszko, M. L., Ingram, L. O., and Shanmugam, K. T. (2006) Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid, *Appl Environ Microbiol* 72, 3228-

3235.

(비특허문헌 0041) Raab, A. M. and Lang, C. (2011) Oxidative versus reductive succinic acid production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio engineered Bugs* 2, 120 - 123.

(비특허문헌 0042) Raab, A. M., Gebhardt, G., Bolotina, N., Weuster-Botz, D., and Lang, C. (2010) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metabolic Engineering*. 12: 518-525.

(비특허문헌 0043) Raab, A. M., Hlavacek, V., Bolotina, N., and Lang, C. (2011) Shifting the fermentative/oxidative balance in *Saccharomyces cerevisiae* by transcriptional deregulation of the Snfl upstream activating kinase Saklp. *Applied and Environmental Microbiology* : 77: 1981-1989.

(비특허문헌 0044) Roa Engel, C. A., Straathof, A. J., Zijlmans, T. W., van Gulik, W. M., and van der Wielen, L. A. (2008) Fumaric acid production by fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol* 78, 379-389.

(비특허문헌 0045) Robinson, K. M., and Lemire, B. D. (1996) Covalent attachment of FAD to the yeast succinate dehydrogenase flavoprotein requires import into mitochondria, presequence removal, and folding, *J Biol Chem* 271, 4055-4060.

(비특허문헌 0046) Roper, D. I., Fawcett, T., and Cooper, R. A. (1993) The *Escherichia coli* C homoprotocatechuate degradative operon: hpc gene order, direction of transcription and control of expression, *Mol Gen Genet* 237, 241-250.

(비특허문헌 0047) Rusche, L. N., and Rine, J. (2010) Switching the mechanism of mating type switching: a domesticated transposase supplants a domesticated homing endonuclease, *Genes Dev* 24, 10-14.

(비특허문헌 0048) Saliola, M., Bartoccioni, P. C, De Maria, I., Lodi, T., and Falcone, C. (2004) The deletion of the succinate dehydrogenase gene K1SDH1 in *Kluyveromyces lactis* does not lead to respiratory deficiency, *Eukaryot Cell* 3, 589-597.

(비특허문헌 0049) Saliola, M., Sponziello, M., D'Amici, S., Lodi, T., Falcone, C. (2008) Characterization of KIGUT2, a gene of the glycerol-3 -phosphate shuttle, in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 8, 697-705.

(비특허문헌 0050) Shao, Z., Luo, Y., and Zhao, H. (2012) DNA assembler method for construction of zeaxanthin-producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods Mol Biol* 898, 251-262.

(비특허문헌 0051) Stein, I., Peleg, Y., Even-Ram, S., and Pines, O. (1994) The single translation product of the FUM1 gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* 14, 4770-4778.

(비특허문헌 0052) Sun, J., Shao, Z., Zhao, H., Nair, N., Wen, F., and Xu, J. H. (2012) Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol Bioeng* 109, 2082-2092.

(비특허문헌 0053) Tiwari, M. K., Singh, R. K., Lee, J. K., and Zhao, H. (2012) Mechanistic studies on the flavin:NADH reductase (PrnF) from *Pseudomonas fluorescens* involved in arylamine oxygenation, *BioorgMed Chem Lett* 22, 1344-1347.

(비특허문헌 0054) van Maris, A. J., Winkler, A. A., Porro, D., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. (2004) Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export, *Appl Environ Microbiol* 70, 2898-2905.

(비특허문헌 0055) Vemuri, G. N., Eiteman, M. A., and altman, E. (2002) Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*, *App Enivron Microbiol* 68, 1715-1727.

- (비특허문헌 0056) Vogtel, F. N., Wortelkamp, S., Zahedi, R. P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., Kellermann, J., voos, W., Sickmann, A., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2009) global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 139, 428-439.
- (비특허문헌 0057) Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 10, 1793-1808.
- (비특허문헌 0058) Wang, Q., Ingram, L. O., and Shanmugam, K. T. (2011) Evolution of D-lactate dehydrogenase activity from glycerol dehydrogenase and its utility for D-lactate production from lignocellulose, *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 18920-18925.
- (비특허문헌 0059) Xu, G., Liu, L. and Chen, J. (2012) Reconstruction of cytosolic fumaric acid biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 11, 24-34.
- (비특허문헌 0060) Yuzbashev, T. V., Yuzbasheva, E. Y., Laptev, I. A., Sobolevskaya, T. I., Vybornaya, T. V., Larina, A.S., Gvilava, I. T., Antonova, S. V. and Sineoky, S. P. (2011) Is it possible to produce succinic acid at low pH? *Bioengineered Bugs* 2, 115-119.
- (비특허문헌 0061) Zelle, R. M., de Hulster, E., van Winden, W. A., de Waard, P., Dijkema, C., Winkler, A. A., Geertman, J. M., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., and van Maris, A. J. (2008) Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export, *Appl Environ Microbiol* 74, 2766-2777.
- (비특허문헌 0062) Zhang, Q., Zhang, L., Ding, Z., and Shi, G. (2011) Metabolic engineering of wild acid-resistant yeast for L-lactic acid production. *Chin. J. Biotech.* 27, 1024-1031.
- (비특허문헌 0063) Zhang, X., Jantama, K., Moore, J. C., Jarboe, L. R., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O. (2009a) Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 20180-20185.
- (비특허문헌 0064) Zhang, X., Jantama, K., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O. (2009) Reengineering *Escherichia coli* for Succinate Production in Mineral Salts Medium, *Appl Environ Microbiol* 75, 7807-7813.
- (비특허문헌 0065) Zhu, L. W., Li, X. H. M., Liu, J. H., Yuan, Z. P., Chen, T., and Tang, Y. J. (2013) Activation of glyoxylate pathway without the activation of its related gene in succinate -producing engineered *Escherichia coli*, *Meab. Eng* 20C, 9-19.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0029] 본원에 개시된 발명은 재생가능한 탄소원으로부터 시작하여 낮은 pH에서의 발효를 통해 숙신산(숙시네이트), 말산(말레이트), D-락트산, L-락트산(락테이트) 및 푸마르산(푸마레이트)과 같은 유기산을 생산하는 유전적으로 조작된 미생물을 제공한다. 바람직한 실시예에서, 미생물은 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 비해 낮은 pH에서 소정의 유기산에 대해 더 내성을 갖는 야생형 균주의 유도체이다. 더 바람직한 실시예에서, 야생 균주는 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 또는 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 중의 균주이고, 유도체들은 유전적으로 조작된다.
- [0030] 본원발명의 바람직한 실시예에서, 본원발명의 유전적으로 조작된 미생물은 대장균 및 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터 알려진, PEP 카복시키나아제를 포함하는 숙신산 생합성 경로의 적어도 일부로부터 유도된다. 본원발명의 다른 바람직한 실시예에서, 본 발명의 유전적으로 조작된 미생물들의 숙시네이트

생합성 경로에서 적어도 효소들의 서브세트는 미토콘드리아 내부에 위치되는 것 외에 또는 그 대신에 세포질(시토플라즘)에 알려져 있음)에 위치된다. 하나의 세포 이하(subcellular)의 구획에서 산화성 및 환원성 경로의 조합은 두 개의 경로가 산화환원 균형된 방식으로 진행되는 것을 허용한다. 본원발명의 또 다른 실시예에서, 환원성 TCA 경로로부터의 효소들만이 세포질에 위치되고, 이 경우에 환원 당량들은 글리세롤-3-포스페이트 셔틀과 같은 잘 알려진 셔틀 시스템에 의해 미토콘드리아의 안팎으로 교환된다.

[0031] 본원발명의 바람직한 양태에서, 본 발명의 유전적으로 조작된 효모 세포들은 세포질 내에 포스포에놀 피루베이트(PEP)로부터 숙시네이트로의 산화성 및 환원성 경로들 모두에 필요한 모든 효소들을 산화성 및 환원성 경로 모두가 균형된 방식으로 작동하기에 충분한 수준으로 함유하여서, 숙시네이트는 혐기성 또는 미량호기성 조건 하에서 중요한 발효 생성물로서 제조된다. 본원발명의 일 양태에서, 상기 효소들을 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 효모 종들로부터 유래된다. 본원발명의 또 다른 양태에서, 숙시네이트 경로 효소에 대해 인코딩하는 하나 이상의 유전자들은 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)와 같은 효모 및/또는 박테리아로부터 유래된다. 본원발명의 또 다른 양태에서, PEP에서 숙시네이트로의 산화성 및 환원성 경로들을 위해 필요한 효소(PEP 카복시키나아제, 피루베이트 키나아제, 피루베이트 데히드로게나아제, 및 TCA 사이클의 산화성 및/또는 환원성 분점에서 사용된 효소들 모두를 포함함)들 모두를 인코딩하는 유전자들은 박테리아로부터 유래된다. 또 다른 실시예에서, 상기 유전자들의 공급원은 박테리아 대장균 및/또는 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)와 같은 효모이다.

[0032] 본원발명의 또 다른 실시예에서, 숙신산을 생산하는 유전적으로 조작된 효모는 FAD 리덕타아제(reductase)에 대해 증가된 활성을 가진다. 본원발명의 일 양태에서, FAD 리덕타아제의 증가된 활성은 FAD 리덕타아제를 코딩하는 하나 이상의 이종 유전자들을 도입하는 것에 의해 달성된다.

[0033] 본원발명의 또 다른 실시예에서, 락트산의 생산을 위해 유전적으로 조작된 효모 세포가 제공된다. 본원발명의 일 양태에서, 락트산의 생산을 위해 유전적으로 조작된 효모 세포는 락테이트 데히드로게나아제 유전자를 코딩하는 외인성 유전자를 포함한다. 본원발명의 또 다른 양태에서, 락트산의 생산을 위해 유전자 조작된 효모 세포는 피루베이트로부터 D-락테이트의 형성을 촉매화하는 단백질을 코딩하는 외인성 글리세롤 데히드로게나아제 유전자의 개질된 형태를 포함한다.

[0034] 본원발명의 또 다른 실시예에서, 락트산, 말산, 푸마르산, 및 숙신산의 생산을 위해 유전적으로 조작된 효모 세포들은 개별적인 산들의 생산을 더 증가시키도록 대사적 진화의 과정을 겪는다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1. 리치 성장 배지 중에 유기산의 존재 하의 낮은 pH에서 효모 균주의 성장의 비교. 효모 균주 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)(SD108) 및 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)(SD98) 균주는 썩어가는 버게스(rotting bagasse)로부터 단리되었다. 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4742는 표준 실험실 균주이고, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) Ethanol Red는 증류소 균주(distillery strain).

도 2. 효모 질소 염기를 함유하는 최소 성장 배지 중에 유기산의 존재 하의 낮은 pH에서 효모 균주의 성장의 비교. 효모 균주 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)(SD108) 및 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)(SD98) 균주는 썩어가는 버게스(rotting bagasse)로부터 단리되었다. 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4742는 표준 실험실 균주이고, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) Ethanol Red는 증류소 균주(distillery strain).

도 3. 미량호기성 조건 하에서 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 균주 SD541에 의해 락트산의 발효적 생산. 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) SD98 균주는 대장균 락테이트 데히드로게나아제 유전자 *ldh*를 함유하는 플라스미드로 형질전환되어 균주 SD517을 얻었고, 대사 진화를 거쳐서 균주 SD541을 얻었다.

도 4. 포스포에놀 피루베이트로부터 숙시네이트로의 환원성 경로에서 수반된 효소들을 코딩하는 유전자들을 갖는 유전자 카세트(cassette)의 구조. 이 유전자 카세트는 효소 PEP 카복시키나아제, 말레이트 데히드로게나아제, 푸마라아제, 및 푸마레이트 리덕타아제를 코딩한다. 사용된 유전자, 프로모터 및 종결자들은 표 2에 나열된다. *kanMX* 카세트는 *pck* 및 *mdh* 유전자들 사이에서 카세트의 중간 안에 들어가 있다.

도 5. 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 균주 SD565 및 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 균주 SD631에서 숙신산의 발효적 생산. SD565는 피루베이트 데카복실라아제 유전자자리(locus)에서 삽입된 G418 내성 표지 카셋을 갖는다. SD631은 포스포에놀 피루베이트로부터 숙시네이트로의 환원성 경로에서 수반된 효소를 코딩하는 다른 4개의 유전자들과 함께 피루베이트 데카복실라아제 유전자자리에서 삽입된 G418 내성 표지 카셋을 갖는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 정의. 본 특허 출원서에서 사용된, 구절 "예를 들어" 또는 "~같은"은 하나 이상의 방법, 접근법, 해결책, 또는 사안에 대한 조성이 존재한다는 것을 의미하고, 주어진 예는 그 예로 제한되는 것을 의미하지 않는다.
- [0037] 임의의 카복실산 또는 디카복실산은 "숙신산"과 같은 유리산 이름으로 사용하거나, 또는 염, 에스테르, 티오에스테르, 또는 아마이드로서 사용하는 것에 의해 지칭될 수 있고, 이 경우에 이름이 "숙시네이트"로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 암모늄 염은 암모늄 숙시네이트로 명명될 것이고, 에틸 에스테르는 에틸 숙시네이트일 것이다. 세포의 내부의 생리학적 조건 하에서, 세포의 외부의 발효 브로스에서, 유리산 및 염은 모두 어느 정도로 존재할 것이고, 염은 반대이온들의 혼합물을 가져서, 본 발명의 목적에 있어서, 두 가지 유형의 이름들이 모두 양쪽 형태를 지칭할 것이다. 다른 구절에서, "숙신산" 및 "숙시네이트"는 상호 교환적으로 사용될 것이고, 둘 모두 모든 형태의 화합물을 지칭한다. 동일하게 모든 다른 유기산들에 대해서도 적용된다.
- [0038] 명명법에 있어서, 대장균과 같은 박테리아로부터의 유전자 또는 코딩 영역은 이탤릭체로 세 개의 소문자로서 보통 명명되고, 말레이트 데히드로게나아제 또는 푸마라아제 B 각각을 인코딩하는 유전자 예를 들어 "mdh" 또는 "fumB"에서 가끔 대문자가 이어지기도 하며, 유전자에 의해 인코딩된 효소 또는 단백질은 동일한 문자로 명명될 수 있지만, 첫번째 문자는 대문자이고 이탤릭체는 없는데, 예를 들어 말레이트 데히드로게나아제 효소 및 푸마라아제 B 효소 각각을 "Mdh" 또는 "FumB"로 명명한다. 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)와 같은 효모로부터의 유전자 또는 코딩 영역은 보통 세개의 대문자, 가끔 숫자가 이어지고, 모두 이탤릭체로 명명되고, 예를 들어 피루베이트 데카복실라아제를 인코딩하는 유전자에 대해서 "PDC1"로 명명하며, 유전자에 의해 인코딩된 효소 또는 단백질은 동일한 문자로 명명될 수 있지만, 첫번째 문자는 대문자이고 이탤릭체가 아니며 단백질의 경우 소문자 "p"가 이어지고, 예를 들어 피루베이트 데카복실라아제 1은 "Pdc1p"로 명명된다. 효소 또는 단백질은 더 기술적인 이름, 예를 들어 상기 주어진 예에 대해서 말레이트 데히드로게나아제, 푸마라아제 B, 및 피루베이트 데카복실라아제 1로 언급될 수도 있다. 특정 효모 종들로부터 유전자 또는 효소를 언급하는 경우에, 속 및 종의 첫번째 문자를 약칭하는 문자들의 쌍은 유전자 또는 효소의 앞에 위치하여 유전자 또는 효소의 특정 형태를 지정할 수 있다. 예를 들어, ScMDH1은 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터 말레이트 데히드로게나아제 이소자임 1을 지정하며, KmMDH1은 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)로부터의 말레이트 데히드로게나아제 1 이소자임 1을 지명한다. 만일 예를 들어 "DIC1"와 같이 소문자가 특정 종으로부터의 유전자 또는 효소를 지시하는데에 존재하지 않으면, 유전자 이름은 임의의 및 모든 효모 종으로부터의 유전자 또는 효소를 지칭하는 것으로 의미된다. 이러한 지명은 필연적으로 고유한 것이 아니며, 임의의 특정 지명은 특정 DNA 또는 단백질 서열에 제한되지 않는데, 그 이유는 임의의 제시된 종들이 많은 다른 균주들을 가질 수 있고 다른 균주들은 동일한 기능을 수행하는 다른 유전자 또는 효소를 가질 수 있기 때문이다. 또한, 특정 촉매적 활성을 보유하는 효소의 일 예를 인코딩하는 유전자 또는 코딩 영역은, 역사적으로 상이한 근원 또는 유전자가 상이한 종들로부터 유래한 것이기 때문에 몇몇 상이한 이름들을 가질 수 있다.
- [0039] "플라스미드"는 미생물의 염색체 또는 염색체들로부터 분리한 염색체에 비해 실질적으로 작은 환형 또는 선형 DNA 분자를 의미하고, 염색체 또는 염색체들로부터 별도로 복제한다. "플라스미드"는 세포 당 약 하나의 카피 또는 세포 당 하나 초과 카피로 존재할 수 있다.
- [0040] "발현 카셋"은 적어도 프로모터 및 효소 또는 다른 단백질을 코딩하는 영역이나 유전자를 함유하는 염색체 또는 플라스미드의 일부일 수 있는 DNA 서열을 의미하고, 그 결과 코딩 영역은 프로모터에 의해 발현되고, 효소 또는 단백질은 DNA 서열을 함유하는 숙주 세포에 의해 생산된다. "발현 카셋"은 유전적으로 조작된 방법에 의해 적어도 부분적으로 합성 또는 제작될 수 있어서, 코딩 영역은 코딩 영역과 자연적으로 연관되지 않은 프로모터로부터 발현된다. 선택적으로, "발현 카셋"은 코딩 영역과 자연적으로 연관되는 종결자이거나 종결자가 아닐 수 있는 전사 종결자를 함유할 수 있다. "발현 카셋"은 하나 초과 카피의 단백질에 대한 코딩 영역을 함유할 수 있다. 일부 경우에서, 카셋은 DNA 서열의 5' 말단에서 유전자에 기능적으로 결합되는 오직 하나의 프로모터를 가질 것이며, 이 경우에서 이것을 오페론, 또는 합성 오페론으로 부를 수 있다. 다른 경우에서, 하나 초과 카피의 코딩 영

역을 함유하는 발현 카셋은 카셋에서 각각의 코딩 영역에 기능적으로 결합된 상이한 프로모터를 가질 수 있어서, 각각의 코딩 영역은 효모 균주와 같은 숙주 균주 내에서 적절한 수준으로 발현된다.

[0041] 유전자 또는 코딩 영역의 "과다발현"은 동일하거나 유사한 성장 조건 하에서 숙주 미생물의 야생형 형태에서 발견된 수준보다 높은 수준으로 숙주 미생물에서 생산되도록 하는 유전자 또는 코딩 영역에 의해 인코딩된 효소 또는 단백질을 초래하는 것을 의미한다. 이는 예를 들어 하나 이상의 이어지는 방법들에 의해 달성될 수 있다: 1) 더 강력한 프로모터를 도입하고, 2) 더 강력한 리보솜 결합 부위를 도입하고, 3) 종결자 또는 더 강력한 종결자를 도입하고, 4) 코딩 영역 중 하나 이상의 부위에서 코돈의 선택을 향상시키고, 5) mRNA 안정성을 향상시키고, 및 6) 염색체에서 복수의 카피들을 도입하거나 멀티카피 플라스미드 상에서 카셋을 위치시키는 것에 의해, 유전자의 카피 수를 증가시킨다. 과다발현된 유전자로부터 생산된 효소 또는 단백질은 "과다생산"된 것으로 불린다. "과다발현"된 유전자 또는 "과다생산"된 단백질은 자연형 숙주 미생물일 수 있거나, 도너(donor) 유기체로부터 유전자 조작 방법에 의해 숙주 미생물안으로 이식되는 것일 수 있고, 이 경우에서 효소 또는 단백질, 및 효소 또는 단백질을 인코딩하는 유전자 또는 코딩 영역은 "외래" 또는 "이종성"이라 불린다. 외래 또는 이종성 유전자 및 단백질은, 그들이 조작되지 않은 숙주 미생물에 존재하지 않기 때문에 정의상 과다발현 및 과다생산된 것이다.

[0042] 제1 유전자, DNA 서열, 또는 단백질의 "상동체"는 상기 제1 유전자, DNA 서열 또는 단백질의 생물학적 기능과 유사한 생물학적 기능을 수행하는 제2 유전자, DNA 서열, 또는 단백질이고, 서열 비교를 위한 BLAST 컴퓨터 프로그램에 의해 결정된 바에 따르면, (단백질 서열을 비교하거나, 적절한 유전학적 코드를 사용하여 유전자 서열로부터 유래된 단백질 서열을 비교하는 경우) 제1 유전자 또는 단백질과 적어도 25% 서열 상동성을 가지고 (Saliola 등, 2004; Altschul 등, 1997; Altschul 등, 1990), 결실 및 삽입을 허용한다. 사카로미세스 세레비시예(*Saccharomyces cerevisiae*) 유전자 *ScURA3*의 상동체의 예는 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)로부터의 *KmURA3* 유전자일 것이다.

[0043] 제1 유전자, DNA 서열, 또는 단백질의 "유사체"는 상기 제1 유전자, DNA 서열, 또는 단백질의 생물학적 기능과 유사한 생물학적 기능을 수행하는 제2 유전자, DNA 서열, 또는 단백질이지만, 서열 비교를 위한 BLAST 컴퓨터 프로그램에 의해 결정된 바에 따르면, (단백질 서열을 비교하거나, 적절한 유전학적 코드를 사용하여 유전자 서열로부터 유래된 단백질 서열을 비교하는 경우) 상기 제1 유전자, DNA 서열 또는 단백질과 25% 미만의 서열 상동성이 있고(Altschul 등, 1997; Altschul 등, 1990), 결실 및 삽입을 허용한다. 예를 들어, 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)로부터의 푸마라아제 1, K1Fum1p는 대장균으로부터의 FumB의 유사체인데, 이는 그들이 모두 푸마라아제로서 기능하지만 두 개의 효소 또는 그들의 개별적인 유전자들 사이에 현저한 서열 상동성이 없기 때문이다. 당해 분야에 대해 아는 것이 많은 과학자는, 특정 생물학적 기능을 갖는 많은 효소 및 단백질, 예를 들어 푸마라아제 또는 말레이트 데히드로게나아제가 많은 다른 미생물들에서 상동체 또는 유사체 중 어느 하나로서 발견될 수 있다는 것을 알 것이고, 이러한 효소 또는 단백질 과의 멤버들이 약간 또는 실질적으로 다른 구조를 가짐에도 불구하고, 그들이 동일한 기능을 공유하기 때문에, 많은 경우에서, 동일한 과의 다른 멤버들은 현재의 유전자 조작 방법을 이용하여 동일한 생물학적 기능을 수행하도록 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)로부터의 KmFum1p 푸마라아제 및 대장균으로부터의 FumB 푸마라아제 모두는 동일한 반응을 촉매화하여서, 어느 하나는 푸마르산 및 궁극적으로는 숙신산의 생산을 적절한 맥락에서 가져오고, 궁극적으로 어떤 것을 사용할지에 대한 선택은 유사한 발효 조건 하에서 푸마르산 또는 숙신산의 더 높은 역가로 이어지는 것을 선택함으로써 이루어질 수 있다.

[0044] "강력한 구성 프로모터"는 RNA 폴리머라아제에 의해 전사되는 DNA 서열 또는 유전자의 상류(종래의 5' 내지 3' 방향에서 도시되는 경우에 유전자의 5' 측으로부터 상류)에 보통 놓이고, 상기 DNA 서열 또는 유전자가 임의의 적절한 검정 절차에 의해 직접 또는 간접적으로 쉽게 검출되는 수준에서 RNA 폴리머라아제에 의한 전사에 의해 발현되도록 유발하는 DNA 서열이다. 적절한 검정 절차의 예는, 1) 정량적 역전사 효소 + PCR, 2) 인코딩된 효소의 효소 검정, 3) 콤파씨 블루-염색된 단백질 겔(Coomassie Blue-stained protein gel), 또는 4) 상기 전사의 결과로서 간접적으로 생산되는 대사의 측정가능한 생산을 포함하고, 이러한 측정가능한 전사는 전사, 대사물 또는 유도 화학물질의 수준을 특이적으로 조절하는 단백질의 존재 또는 부재와 무관하게 발생한다. "강력한 구성 프로모터"가 아닌 프로모터의 예는 대장균의 P_{lac} 프로모터이거나, *KILAC4* 유전자의 앞에 위치한 프로모터인데, 그 이유는 두개의 유전자 모두 락토오스와 같은 유도자의 부재하에서 음성조절되기 때문이다. 당해 분야에서 잘 알려진 방법을 사용함으로써, "강력한 구성 프로모터"는 원생(native) 프로모터(DNA 서열 또는 유전자로부터 상류에 자연적으로 존재하는 프로모터)를 대체하기 위해 사용되어서, 플라스미드 또는 염색체 중 어느 하나에 배치될 수 있는 발현 카셋을 만들어낼 수 있고, 이는 원생 프로모터로부터의 수준보다 높은 수준에서 조정

의 DNA 서열 또는 유전자의 발현 수준을 제공한다. 강력한 구성 프로모터는 종 또는 속에 대해 특이적일 수 있지만, 종종 박테리아 또는 효모로부터의 강력한 구성 프로모터는 먼 친척인 박테리아 또는 효모 각각에서 잘 기능할 수 있다. 예를 들어, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터의 프로모터는 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 또는 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)에서 잘 기능할 수 있다(Lee 등, 2012). 강력한 구성 프로모터의 예는 해당 경로에서의 효소를 인코딩하는 유전자, 리보솜의 단백질을 인코딩하는 유전자, 및 번역 신장 인자를 인코딩하는 유전자의 발현을 추진시키는 프로모터들이다(Sun 등, 2012).

[0045] "주 발효 산물"은, 물 또는 이산화탄소를 제외한, 임의의 다른 발효 산물에 비해 높은 농도로 생산되는 발효의 산물을 의미한다.

[0046] 본원에서 개시된 플라스미드 및 유전자 카세트, 플라스미드 라이브러리에서 DNA의 클로닝, 제한 효소 소화 및 결찰, PCR 증폭, 효모에서 재조합하는 단계를 포함하는 당해 분야에 잘 알려진 많은 방법들, 및 상업적으로 구입가능한 키트(예, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 이용하는 집슨 방법(Gibson method)로 불리는 방법에 의해 제작되거나 얻어질 수 있다. 소정의 DNA 서열은 GeneArt(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 및 DNA 2.0(Menlo Park, CA, USA)와 같은 이 분야에서 전문적인 영리성 기업에 의해 주문 합성될 수도 있다.

[0047] 하기 예들은 예시적인 것이며, 제한하기 위한 의도가 아니고, 통상의 기술자는 많은 변형물들이 본원발명의 범위 내에서 가능할 것이라고 인식할 것이다.

[0048] 실시예 1

[0049] 글루코오스로부터 말레이트 또는 푸마레이트로의 산화환원-균형 미량호기성 경로를 함유하는 효모 균주의 제작

[0050] 글루코오스로부터 말레이트 또는 푸마레이트로의 환원성 경로는, 해당작용이 3개의 탄소유닛 당 1몰의 NADH를 생산하고 말레이트 데히드로게나아제 단계가 1몰의 NADH를 소비하기 때문에 산화환원 균형된다. 따라서, 다른 고려사항을 차지하고, 세포는 글루코오스로부터 혐기성 조건 하에서 말레이트 또는 푸마레이트를 제조할 수 있을 것이다. 그러나, 세포량(cell mass) 생합성으로부터 과잉의 환원 당량은 엄격한 혐기성 조건하에서 이런것이 발생하는 것을 막는다. 그럼에도 불구하고, 잘 제어된 미량호기성 조건하에서(1분 당 액체 1 리터의 부피 당 0.1 부피 미만의 공기), 세포량으로부터 발생된 과잉의 NADH는 말레이트 및 푸마레이트의 성장 및 생산을 허용하도록 산화될 수 있다. 말레이트 또는 푸마레이트를 미량호기적으로 생산하는 유전자 조작된 균주를 제작하기 위하여, 결실은 푸마레이트 리덕타아제 및 숙시네이트 데히드로게나아제에 필요한 하나 이상의 유전자에서 진행되어서, 세포질 또는 미토콘드리아 중 어느 한 곳에서 푸마레이트가 숙시네이트로 대사되는 것을 방지한다. 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에서, 이러한 유전자는 숙시네이트 데히드로게나아제(Robinson 및 Lemire, 1996)을 인코딩하는 네 개의 서브유닛에 대해 *SDH1*, *SDH2*, *SDH3* 및 *SDH4*로 명명되고, 세포질 및 미토콘드리아의 푸마레이트 리덕타아제 각각을 인코딩하는 유전자들에 대해 *FRD1* 및 *OSM1*으로 명명된다. 야생형 배경에서 *FRD1* 및 *OSM1* 모두의 결실은 FADH₂에서 FAD로의 재산화의 실패에 의해 혐기성 조건 하에서 성장의 결실을 가져온다(Camarasa 등, 2007). 그러나, 미량호기성 조건은 이런 성장 문제를 완화할 것이다.

[0051] 피루베이트(PDC)의 탈카복실화 및 푸마레이트에서 숙시네이트로의 전환을 촉진할 수 있는 효소를 인코딩하는 유전자들의 결실 후, 유전자 발현 카세트는 세포질의 PEP 카복시키나아제, 말레이트 데히드로게나아제의 생산을 부여하는 것이 도입되는데, 선택적으로 만일 푸마레이트가 원하는 생성물이면, 푸마라아제의 생산을 부여하는 것이 도입된다. 예를 들어, *pck*, *mdh*, 및 *fumB* 및/또는 *fumC*, 대장균으로부터의 모든 것들이 사용될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 다른 박테리아로부터의 유전자들은 사용될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 대장균으로부터의 *fumC*는 사용되는데, 그 이유는 FumC 효소가 임의의 철-황 클러스터를 필요로하지 않고, 철 황 클러스터가 효모에서 미토콘드리아 안에서 만들어지기 때문에(Avalos 등, 2013), 세포질의 효소가 철-황 클러스터에 의존하지 않는 것이 바람직하다. 대안으로, 효모 유전자, 예컨대 MDH2 또는 개질된 MDH3(Zelle 등, 2008), 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터의 개질된 FUM1(Stein 등, 1994), 또는 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 또는 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)로부터의 그들의 상동체가 사용될 수 있다. 통상의 기술자는, 말레이트 및 푸마레이트의 생산에서의 차이점이 세포 내에 발현된 푸마라아제를 갖지 않는 경우에 말레이트가 생산될 것이고, 세포 내에 발현된 푸마라아제를 갖는 경우에 푸마레이트가 적어도 일부의 말레이트와 함께 생산될 것이라

는 점에서 차이점이 있다는 것을 알 것이다.

[0052] 발현 카셋의 도입은 염색체 안으로의 비-상동체 또는 바람직하게는 상동체 통합에 의해, 또는 소정의 카셋(들)을 함유하는 복제 플라스미드의 도입에 의해 달성될 수 있다. 염색체 또는 복제 플라스미드 중 어느 하나로 통합을 위해 하나의 인접한 DNA 서열로서 조작될 수 있는 패키지로의, 고유의 프로모터 및 종결자를 각각 갖는 하나보다 많은 유전자의 조립(assembly)은 당해 분야에서 잘 알려져 있다(Shao 등, 2012).

[0053] 전술한 바와 같이 유전자를 삭제하고 말레이트 또는 푸마레이트로의 환원성 경로를 위한 발현 카셋을 도입하는 것이 단일 균주에서 완료된 후, 결과로 유전자 조작된 균주는 더 신속한 성장을 위해 선택되는 대사 진화를 겪는다. 대사 진화는 100 g/l 글루코오스 및 균주에 의해 요구된 임의의 다른 영양분으로 보충된 효모 질소 염기(YNB, Sigma Chemical Company에서 구입가능함, USA)와 같은 화학적 합성 배지에서 수행될 수 있다. 약 pH 2와 pH 5 사이에 세팅된 pH 제어장치를 구비한 미량호기성 발효장치는 진화될 균주가 성장하기 위해 사용되고, 완전히 성장된 발효장치로부터 신선한 발효장치까지의 순차적인 접종은 1부피의 접종원을 약 5부피 이상의 신선한 배지에 첨가하는 것에 의해 적절한 간격(보통 약 20℃ 내지 50℃의 온도에서 약 1일 내지 약 5일의 성장)에서 반복적으로 이루어진다. 산이 생산되기 때문에, pH의 제어는 예컨대 카보네이트 염 또는 암모니아, 소듐, 포타슘, 마그네슘, 또는 칼슘의 히드록시드, 카보네이트 및 비카보네이트 염의 혼합물의 첨가에 의해 달성될 수 있다.

[0054] 실시예 2

[0055] 글루코오스로부터 숙시네이트로의 산화환원-균형 혐기성 경로를 함유하는 효모 균주의 제작

[0056] 글루코오스로부터 혐기성 및 미량호기성 숙시네이트 생합성은 말레이트 또는 푸마레이트에 대한 것보다 더 복잡한데, 그 이유는 숙시네이트로의 환원성 경로가 환원 당량들을 해당과정으로부터 얻어질 수 있는 것 보다 더 많이 소모하기 때문이다. 글루코오스로부터 숙시네이트 생합성의 최대 가능한 수율은 산화환원 당량들의 순 생산 또는 순 소비를 가져오지 않는 비율로 산화성 및 환원성 경로들을 진행하는 것에 의해 얻어질 수 있으며, 이러한 산화환원 당량들은 NADH, NADPH, 및 FADH₂의 형태로 보통 존재하지만, 시스테인, 글루타민, 코엔자임 A-SH 등과 같은 다른 화합물의 형태로도 가능하다. 글루코오스로부터 숙시네이트로의 경로만을 고려하면, 이런 균형은 약 2몰의 글루코오스가 산화성 경로를 통해 대사됨과 동시에 환원성 경로를 통해 약 5몰의 글루코오스가 대사되는 것에 의해 이론적으로 얻어진다. 선행 문헌에서 개시된 물질 및 방법을 사용하는 것에 의해 정확한 균형을 정하는 것은 불가능하지 않으면 어렵다. 또한, 글루코오스로부터 숙시네이트로의 발효공정을 포함하여, 임의의 발효 공정에서는, 세포량을 만드는 것이 필요하고 혐기성 조건 하에서 세포량의 제조는 환원 당량들의 순 생산을 가져온다. 에탄올 및 이산화탄소가 주 발효 산물인, 사카로미세스속(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스속(*Kluyveromyces*), 칸디다속(*Candida*), 및 이사첸키아속(*Issatchenkia*)와 같은 야생형 효모에서, 이러한 과잉의 환원 당량들은 글리세롤을 분비하는 것에 의해 처리된다. 그러나, 글리세롤의 분비는 숙시네이트, 말레이트 또는 푸마레이트로 대신 사용될 수도 있는 탄소를 회생시킨다. 이와 같이, 만일 환원성 대 산화성 경로의 비가 5:2(각각의 경로를 통해 대사된 글루코오스의 몰에 대하여)보다 약간 높은 경우에, 숙시네이트 생산 및 세포량 생산을 포함하는 전체 세포에 대한 산화환원 균형은 달성될 수 있다. 그러나, 다시금, 이런 균형은 선행 문헌에 개시된 물질 및 방법에 의해 달성되기 어렵거나 불가능하다.

[0057] 본 발명자는 전술한 세부 사항들을 인식했고, 이런 문제들을 해결하기 위한 물질 및 방법을 본원에서 제공했다.

[0058] 글루코오스로부터 숙시네이트 생산을 위한 효모를 유전자 조작하는 제1 단계는 원치않은 발효적 경로들이 플럭스(flux)에서 감소되거나 삭제되는 숙주 균주를 제작하는 것이다. 사카로미세스속(*Saccharomyces*), 클루이베로미세스속(*Kluyveromyces*), 칸디다속(*Candida*), 피키아속(*Pichia*), 한세놀라속(*Hansenula*) 및 이사첸키아속(*Issatchenkia*)의 효소에서, 두드러진 발효적 경로는 에탄올 (플러스 이산화탄소) 및 글리세롤로의 경로이다. 에탄올로의 플럭스는 피루베이트 데카복실라아제를 인코딩하는 모든 유전자를 삭제함으로써 감소되거나 차단될 수 있다(EC 4.1.1.1). 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)는 *ScPDC1*, *ScPDC5*, 및 *ScPDC6*과 같은 세 개의 유전자를 갖는다. 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 각각은 오직 하나의 피루베이트 데카복실라아제 유전자, *KIPDC1* 및 *KmpDC1*을 갖는다. 글리세롤로의 플럭스는 글리세롤-3-포스페이트 데히드로게나아제를 인코딩하는 모든 유전자들을 삭제함으로써 감소되거나 차단될 수 있다(EC 1.1.1.8; EC 1.1.99.5; EC 1.1.1.177; EC 1.1.1.94). 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)는 *GUT2*, *GPD1*, 및 *GPD2*와 같은 세 개의 유전자들을 함유한다. 클루이

베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)는 *K1GUT2*(Saliola 등, 2008) 및 *K1GPD1*(Neves 등, 2004)와 같은 두 개의 유전자들을 함유한다. 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)는 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 유전자들에 대해 상동성을 갖고 동일한 기능을 수행하는 유전자들을 함유한다. 만일 글리세롤 생합성 경로가 이런 식으로 차단되면, 세포의 글리세롤 필요량은 상대적으로 소량의 글리세롤을 공급하는 것에 의해 만족될 수 있다. 대안으로, 글리세롤로의 플럭스는 글리세롤-3-포스페이트 포스포타아제를 인코딩하는 모든 유전자들을 삭제하는 것에 의해 감소되거나 차단될 수 있다(EC 3.1.3.21). 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 및 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 각각은 *GPP1*으로 명명된 유전자 또는 그의 상동체를 함유하고, 이런 유전자는 글리세롤로의 플럭스를 감소시키거나 제거하기 위한 목적으로 삭제될 수 있다.

[0059] 바람직한 실시예에서, 글루코오스로부터 숙시네이트로의 환원성 경로 및 산화성 경로 모두에 필요한 효소들 모두를 인코딩하는 유전자들은 클로닝되고 도입되어서, 그들은 강력한 구성 프로모터로부터 모두 발현된다. 또 다른 실시예에서, 환원성 및 산화성 경로들에 대한 필요 효소들 모두는 세포질로 안내된다. 환원성 경로에 필요한 효소들은 PEP 카복시키나아제(EC 4.1.1.49), 말레이트 데히드로게나아제(EC 1.1.1.37), 푸마라아제(EC 4.2.1.2), 및 푸마레이트 리덕타아제(EC 1.3.1.6)을 포함한다. 산화성 경로에 필요한 효소들은 피루베이트 키나아제(EC 2.7.1.40), 피루베이트 데히드로게나아제(EC 1.2.4.1), 시트레이트 신타아제(EC 4.3.1.7 또는 4.3.1.28), 아코니타아제(EC 4.2.1.3), 이소시트레이트 데히드로게나아제(EC 2.7.1.40), α -케토글루타레이트 데히드로게나아제(EC 1.2.4.2) 및 숙시닐-CoA 합성효소(숙시네이트-CoA 리가아제(EC 6.2.1.4 또는 EC 6.2.1.5)로도 알려짐)를 포함한다. 이러한 효소들 중 일부는 기능하기 위하여 하나 초과와 서브유닛을 필요로 하며, 이 경우에, 모든 서브유닛을 인코딩하는 유전자는 클로닝되고 발현될 필요가 있다.

[0060] 필요 유전자들의 클로닝은, 당해 분야에 잘 알려진 많은 임의의 방법들, 예컨대 적절한 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 박테리아의 인공 염색체(bacterial artificial chromosome), 또는 효모의 인공 염색체에서 유전자 라이브러리 제작 후에, DNA 프로브를 이용한 검사 또는 적절한 돌연변이 숙주 세포 예컨대 박테리아 균주 또는 효모 균주에서 기능적 상보성에 의한 선별에 의해 달성될 수 있다. 많은 이러한 유전자들에 대한 DNA 서열, 예를 들어 대장균, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 및 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)로부터의 DNA 서열은 공개되었고 국립생물공학정보센터 웹사이트에서 얻을 수 있다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). 이런 경우에 있어서, 원하는 유전자는 PCR에 의해 증폭되고 클로닝될 수 있고, 적절한 벡터에 클로닝될 수 있다. 미생물로부터 소정의 유전자에 대한 DNA 서열을 얻기 위하여, 또는 아직 공개되지 않은 DNA 서열, 예컨대 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 또는 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)로부터의 DNA 서열을 얻기 위하여, 통상의 기술자는 잘 알려진 방법에 의해 전체 게놈에 대한 DNA 서열을 얻을 수 있고 다른 미생물로부터 알려진 유전자에 대한 상동성에 의해 소정의 유전자를 찾아낼 수 있다(Altschul 등, 1997; Altschul 등, 1990). 그 후, 소정의 유전자는 PCR에 의해 증폭될 수 있고 적절한 발현 벡터 또는 발현 카세트에 클로닝된다.

[0061] 각각의 소정의 유전자가 클로닝된 후에, 세포질외에 세포 이하의 세포 기관에 원생(야생형) 단백질을 안내할 임의의 서열은, 상기 세포 기관 안으로 단백질이 이입되는 것을 실질적으로 방지하도록 삭제되거나 돌연변이화된다. 이를 달성하기 위한 방법은 문헌에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미토콘드리아의 매트릭스(미토콘드리아의 내부 챔버)에 표적화된 단백질의 N-말단 단백질 서열은 삭제되어, 단백질은 다시 세포질로 안내된다. "N-말단 표적 서열"은 매트릭스 표적 서열들(MTSs)로 불리는데, 그 이유는 그들이 N-말단을 내막을 통해 매트릭스 안으로 이동시키기 때문이다. 추가적인 정렬 정보의 부재에서, 그들은 단백질을 매트릭스 안으로 안내한다. 그들은 매우 상세히 연구되었고, 그들의 주요 특징은 10년을 넘게 알려져있었다. 그들은 하나의 소수성 및 하나의 양으로 하전된 면을 갖는 양친매성 나선을 형성할 가능성이 있는 약 10-80개의 아미노산 잔기들로 구성된다. 밀접한 관계의 이중상동체 사이에서도 종종 상당히 다른 초기 구조에서 일치점을 보이지 않는다. 그러나, 이러한 양친매성 나선의 일반적인 특성은 "균류 및 동물들 중에서 폭넓게 보존된다"(Neupert 및 Hermann, 2007). 하나의 구체적인 예는, *ScFUM1* 유전자에 의해 인코딩된 야생형 푸마라아제가 미토콘드리아 및 세포질 모두로 안내되지만, 만일 N-말단 17 아미노산들이 인코딩하는 DNA 서열이 삭제되면 효소 중 어느 것도 미토콘드리아에 발견되지 않는다는 것이다(Stein 등, 1994). 피옥시조말 말레이트 데히드로게나아제를 세포질로 안내하는 것에 대한 예는 *MDH3* 유전자로부터 C-말단 트리펩티드 서열 SKL을 인코딩하는 9개의 염기쌍을 삭제하는 것에 의해 달성되었다.

[0062] 임의의 세포 기관 표적화 서열이 삭제되거나 돌연변이화된 후, 각각의 소정의 효소에 대한 유전자는 구성 프로모터에 기능적으로 결합된다. 바람직한 실시예에서, 소정의 유전자들 각각은 상이한 프로모터에 결합하여서,

유전자 발현 카셋은 배열 중에 임의의 실질적으로 반복된 DNA 서열을 갖지 않고 하나의 배열로 함께 조립될 수 있으며, 그 후 조립된 배열을 도입하기 위한 비히클로서 플라스미드 안으로 또는 의도된 숙주 균주의 염색체 안으로 조립된 배열을 통합하기 더 편리하도록 만들었다. 배열이 조립된 후, 전술한 숙주 균주에 도입된다. 보통 무엇이 미토콘드리아의 효소를 세포질로 재안내하는지의 구체적인 예는 실시예 11에서 주어진다.

[0063] 발현 카셋의 도입은 염색체 안으로의 비-상동체 또는 바람직하게는 상동체 통합에 의해, 또는 소정의 카셋(들)을 함유하는 복제 플라스미드의 도입에 의해 달성될 수 있다. 선택적으로, 발현 카셋의 도입은, 카셋이 원치않은 유전자로 치환되도록 하나 이상의 원치않는 유전자들, 예컨대 *KmPDC1*의 삭제와 병행되어, 두 개의 소정의 단계를 한번에 달성하는 효과를 가져온다. 원치않는 유전자의 프로모터는 배열되어서, 소정의 유전자들 중 하나의 발현을 추진하도록 사용될 수 있다. 예를 들어, *KmPDC1* 유전자 위치에서 대장균 *pck* 유전자의 발현을 추진하도록 설계된 카셋의 통합은 *pck* 오픈리딩프레임이 *KmPDC1* 오픈리딩프레임을 대체하도록 설계될 수 있다. 만일 하나 초과 유전자가 카셋으로부터 발현되면, 배열의 마지막 유전자가 *KmPDC1* 종결자에 기능적으로 결합되도록 배열될 수 있다.

[0064] 전술한 바와 같은 유전자들의 삭제 및 숙시네이트로의 환원성 경로, 바람직하게는 산화성 경로에 대한 발현 카셋을 도입하는 것이 단일 균주에서 완료된 후에, 결과적으로 유전자 조작된 균주는 100 g/l 글루코오스 및 균주에 의해 요구된 임의의 다른 영양분으로 보충된 효모 질소 염기(YNB)와 같은 화학적 합성 배지에서 수행될 수 있다. 약 pH 2와 pH 5.6 사이에 세팅된 pH 제어장치를 구비한 미량호기성 발효장치는 진화된 균주를 성장시키기 위해 사용되고, 완전히 성장된 발효장치로부터 신선한 발효장치까지의 접종은 1부피의 접종원을 약 5부피 이상의 신선한 배지에 첨가하는 것에 의해 이루어진다. 자생 돌연변이는 개체군에서 발생하고, 그의 모체에 비해 더 신속하게 성장하는 임의의 돌연변이가 개체군을 대체할 것이다. 이런 공정은 경제적으로 매력적인 성장 속도가 이런 진화 공정에 의해 얻어질때까지 필요에 따라 반복된다. 산이 생산되기 때문에, pH의 제어는 예컨대 카보네이트 염 또는 암모니아, 소듐, 포타슘, 마그네슘, 또는 칼슘의 히드록시드, 카보네이트 및 비카보네이트 염의 혼합물의 첨가에 의해 달성될 수 있다.

[0065] 실시예 3

[0066] 야생 효모 균주의 분리

[0067] 야생 효모 균주는, 버블러(bubbler)가 장착된(가스 트랩; Homebrew Emporium, Cambridge, MA, USA에서 구입가능) 셰이크 플라스크 내에 5% 자일로오스 및 항생제(클로로암페니콜, 30 mg/l, 및 암피실린, 150 mg/l)를 함유하는 pH 5의 1/4 강도 YP 배지(2.5 g/l 효모 추출물 + 54 g/l 펩톤) 중에 섞여가는 사탕수수 버개스 샘플로부터 그들의 성장을 위해 농축하는 것에 의해 분리되고, 30℃에서 48시간 동안 온화한 셰이킹과 함께 배양했다. 따라서, 결과의 분리체들은 혐기성 또는 만일 엄밀히 혐기성이 아니면 적어도 미량 호기성으로 자일로오스를 활용하고, 낮은 pH에서 성장가능하지에 대해 선별되었는데, 그 이유는 배지가 비완충되고 pH가 배양의 성장 과정에서 자연적으로 감소하기 때문이다. 농축된 배양은 클로르암페니콜 및 암피실린을 포함한 YP + 2% 자일로오스 플레이트 또는 2% 자일로오스 및 클로르암페니콜과 암피실린을 포함한 최소 배지(Difco Yeast Nitrogen Base, 또는 "YNB")상에서 평판 배양했고, 30℃에서 호기적으로 배양했다. 효모 균체들은 동일한 플레이트 상에서 정제된 후, 종들은 rDNA의 큰 유닛의 D1/D2 도메인의 영역의 서열화에 의해 식별되었다. 야생 효모는 발효 시설, 발효 음식, 오염 음식, 흙, 식물, 호수, 강, 바다 등과 같은 다른 적합한 환경으로부터 분리될 수 있다.

[0068] 야생 효모들을 분리하기 위한 다른 접근법은 상기 단락에서 설명된 것과 유사할 것이지만, 숙신산과 같은 유기산을 약 5 내지 60 g/l로 배지에 첨가하고 pH 약 2.5 내지 5.6으로 조절된다. 이런 식으로, 낮은 pH에서 저-유기산에 특히 내성을 갖는 효모는 샘플들로부터 직접적으로 선택되거나 농축될 수 있다. 또한, 강화 배지에서 탄소원은 자일로오스 대신에, 예컨대 글루코오스, 수크로오스, 아라비노오스, 녹말, 메탄올 또는 글리세롤일 수 있다.

[0069] 실시예 4

[0070] 리보솜 RNA를 인코딩하는 유전자들을 서열화하는 것에 의한 야생 효모 균주의 식별

[0071] rDNA의 큰 서브유닛의 D1/D2 도메인은 식별될 효모종의 게놈 DNA로부터 증폭되었다. 효모종은 섞여가는 버개스로부터 얻어졌다. PCR 및 서열화를 위해 사용된 프라이머는 하기 표 1에 나열된다.

- [0072] 프라이머 SD123 및 124를 이용하여 얻어진 SD98 템플레이트 DNA로부터의 PCR 산물은 프라이머 SD123, 124, 125, 126, 129 및 130로 서열화되었다(표 1). 프라이머 SD127 및 128로 얻어진 PCR 산물은 프라이머 SD127 및 128로 서열화되었다. 모든 8개의 서열들은 혼합되어 1725 bp 길이의 연속적인 DNA 서열을 얻었고, 이런 서열은 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 균주 CHY1612 18S 리보솜 RNA 유전자, 부분 서열 (Genbank ID: HQ396523.1)과 100% 동일한 것으로 밝혀졌다.
- [0073] 효모 균주 SD108 게놈 DNA는 프라이머 SD123 및 SD124를 갖는 PCR 산물을 생성하기 위하여 템플레이트로서 사용되었다. 프라이머 SD124 및 SD125로 서열화된 경우에, 이런 PCR 산물은 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 균주 NRRL Y-5396 rDNA와 100% 상동성을 보이는 599 bp의 연속적인 서열을 제공한다(Genbank ID EF550222.1).
- [0074] 실시예 5
- [0075] 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 및 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 종으로부터의 효모는 낮은 pH에서 숙신산에 대하여 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 비해 더 내성을 갖는다
- [0076] 새롭게 단리된 효모 균주 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)(SD98) 및 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)(SD108)는, 30℃ pH 3.3에서 호기성 성장에 대하여 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 표준 실험실 균주(BY4742) 및 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 공업적으로 사용된 증류 균주(Ethanol Red)와 비교되었다.
- [0077] 모든 4개의 효모 균주는 YP + 2% 글루코오스 플레이트로부터 pH 5의 2% 글루코오스를 갖는 액체 YP 배지안으로 접종되었고, 30℃에서 호기성으로 밤새도록 배양되었다. 밤새 OD₆₀₀은 판독되었고 이러한 배양은 다양한 유기산과 함께 0.25 x YP에 3 ml씩 접종하도록 사용되었다. 최종 pH는 3.3이었고, 시작 OD₆₀₀은 0.1이었다. 배양은 46시간 동안 호기성으로 30℃에서 배양되었다. OD₆₀₀은 46시간에 판독되었다. 배양의 최종 pH도 판독되었고, 4개의 모든 배양의 pH는 약 3으로 밝혀졌다(도 1). 유사한 결과는 화학적 합성 미네랄 배지에서 얻어졌다(도 2).
- [0078] 실시예 6
- [0079] 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)의 유전적으로 조작된 균주에서 숙신산의 생산
- [0080] 대장균 또는 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 중 어느 하나로부터의 하기 유전자들은 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)(SD98)의 염색체 상에서 피루베이트 데카복실라아제(*PDC1*) 유전자의 정확한 오픈 리딩 프레임에 대체하는 카셋으로서 함께 통합된다: 대장균으로부터의 *pck* (피루베이트 카복시키나아제를 코딩함); 대장균으로부터의 *mdh* (말레이트 데히드로게나아제를 코딩함); 대장균으로부터의 *fumB* 또는 *fumC* (푸마라아제를 코딩함); *FRD1* (사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터의 푸마레이트 리덕타아제를 코딩함). G418 내성을 코딩하는 *kanMX* 표지(Wach 등, 1994)도 통합 카셋의 일부이다.
- [0081] 앞서 언급한 유전자들은 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)(*Km*) 또는 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)(*Sc*)로부터의 프로모터 및 종결자 서열이 각각 옆에 있고, 적합한 프로모터 및 종결자 서열의 대표예는 하기 표 2에 지시된다.
- [0082] 전술한 카셋은 TCA 사이클의 환원성 암(arm)을 통해 PEP로부터 숙신산으로의 전환을 위해 필요한 모든 효소들을 제공한다. 모든 이러한 효소들은 효모 세포의 세포질(시토솔)에서 발현된다. 카셋은 *KmPDC1* 유전자 위치에서 통합되도록 설계되어, 카셋내의 제1 유전자, *pck*는 *KmPDC1* 프로모터로부터 전사된다.
- [0083] 숙신산으로의 전환의 효율을 더 개선하기 위하여, 상기 유전자들 각각의 발현은 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)의 코돈 편향에 따라 DNA 서열을 변화시키는 것에 의해 더 최적화된다.
- [0084] 또한, 앞서 제공된 예는 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)의 SD108 균주와 같은 다른 산 내성 효모 균주에 적용될 수 있다.

[0085] 실시예 7

[0086] 푸마레이트 리덕타아제 반응을 위한 FADH₂의 제공

[0087] 대장균 및 효모 모두 중에서 숙시네이트로의 환원성 경로의 마지막 단계는, 환원 당량을 공급하는 FADH₂를 보조 인자로 하여 푸마레이트 리덕타아제에 의해 촉매화된다. 전술한 바와 같이, 세포가 혐기성으로 또는 미량호기성으로 숙시네이트를 생산하기 위하여, 세포는 환원성 및 산화성 경로 모두를 혼합해야만한다. 환원성 경로는 환원 당량들을 말레이트 데히드로게나아제 단계에서 NADH로서 그리고 푸마레이트 리덕타아제 단계에서 FADH₂로서 소비하며, 동시에 산화성 경로는 NADH 및 NADPH로서 환원 당량들을 생산한다. 산화환원 균형이 원생 푸마레이트 리덕타아제를 사용하여 달성되기 위하여, 세포는 환원 당량들을 NADH 및 NADPH에서 FAD로 전달할 수 있어야 한다. 숙시네이트 생산을 위해 개발된 대장균 균주, KJ122(Jantama 등, 2008a; Jantama 등, 2008b)는 이런 기능을 수행할 수 있는 효소들을 인코딩하는 적어도 세개의 유전자들을 함유한다. *hpaC* 유전자는 대장균 C, 대장균 W 및 대장균 B에 존재하고(Galen 등, 2008; Roper 등, 1993), *fre* 유전자(*ubiB*로도 알려짐)는 대장균의 대부분 또는 모든 균주에 존재한다(Louie 등, 2002; Louie 등, 2003; Niviere 등, 1999). 이러한 유전자들은 NADH 또는 NADPH로부터 제공된 환원 당량들을 이용하여 FAD를 FADH₂로 재충전하는 기능을 갖는 NAD(P)H-플라빈 옥시도리덕타아제(FAD:NADH 리덕타아제, FAD:NADPH 리덕타아제, 또는 단순히 FAD 리덕타아제로도 불림)를 인코딩한다. 또, 이런 기능을 수행하는 알려진 다른 효소는, FAD의 환원을 위한 기질로서 NADPH를 사용하는 것으로 알려진 *cysJ*에 의해 인코딩된 대장균 셀파이트 리덕타아제의 알파 서브유닛이다(Coves 등, 1993; Eschenbrenner 등, 1995). 그러나, 효모는 이러한 효소를 함유하는 것으로 알려져 있지 않다(Camarasa 등, 2007). 이와 같이, FAD 리덕타아제의 중요한 기능은 숙시네이트를 생산하도록 유전자 조작된 효모 균주에서 *hpaC* 유전자, 또는 *fre* 유전자 또는 유사한 기능을 갖는 상동 또는 유사 유전자를 도입하고 발현하는 것(다른 이종 유전자에 대하여 본원의 다른 곳에서 설명됨)에 의해 공급되는 것이 필요하다. 당량 유전자들은 슈도모나스 플루오레스스(*Pseudomonas fluorescens*)로부터의 *prnF* 유전자(Tiwari 등, 2012), 대장균 W로부터의 *hpaC* 유전자(Galen 등, 2008; Roper 등, 1993), 대장균으로부터의 *fre* 유전자(Louie 등, 2002; Louie 등, 2003; Niviere 등, 1999), 또는 대장균으로부터의 *cysJ* 유전자(Coves 등, 1993; Eschenbrenner 등, 1995). 혐기성 숙시네이트 생산 중에 산화환원 균형을 갖도록 FAD 리덕타아제를 제공하는 원리는 효모에서 뿐만 아니라 높은 수준의 숙시네이트 생산을 위해 유전자 조작된 임의의 다른 미생물에까지 광범위하게 사용될 수 있다. 이러한 유전자들의 공급원은 광범위하게 변화될 수 있고, 유일한 조건은 유전자가 숙시네이트 생산을 위해 유전자 조작된 미생물에서 충분한 FAD 리덕타아제 활성을 제공하는 것이다. FAD:NADH 리덕타아제가 환원 당량들의 도너로서 NADPH를 충분히 사용할 수 없는 경우에, 대장균의 *pntA* 플러스 *pntB* 유전자에 의해 인코딩된 막결합성 효소(EC 1.6.1.2)와 같은 트랜스히드로게나아제를 인코딩하는 하나 이상의 유전자들, 또는 가용성 트랜스히드로게나아제(EC 1.6.1.1)를 인코딩하는 *sth* 유전자(*udhA*로도 알려짐)를 도입하고 발현하는 것도 필요할 수 있다(Cao 등, 2011; Nissen 등, 2001; Anderlund 등, 1999).

[0088] 실시예 8

[0089] 산 내성 효모에 의한 D-락테이트 생산

[0090] 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*)로부터의 글리세롤 데히드로게나아제는 피루베이트로부터 D-락테이트를 생산하는 신규 활성을 갖도록 진화되는 능력을 갖는 것으로 최근에 밝혀졌다(Wang 등, 2011). 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*)에서 글리세롤 데히드로게나아제(EC 1.1.1.6)를 인코딩하는 유전자는 *gldA*로 명명되고, 진화된 형태는 *gldA101*로 명명된다. 효모는 에탄올 생산에서 기능하는 하나 이상의 유전자들(예를 들어, *ScPDC1*, *ScPDC5*, 및 *ScPDC6*, 또는 *KmPDC1*, 또는 *IoPDC1*)을 삭제하고 *gldA101* 유전자 또는 그의 상동체 또는 유사체를 발현하는 발현 카셋을 도입하는 것에 의해 에탄올 생산자로부터 D-락테이트 생산자로 전환될 수 있다. 이후에, 결과로 얻은 효모 균주는 D-락테이트의 성장 및 생산성을 높이기 위하여 전술한 바와 같이 대사 진화를 겪을 수 있다. 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*)의 *gldA*에 상동성인 많은 유전자들은 기본 파라미터를 구비한 BLAST 검색을 이용하여 공용 데이터베이스에서 찾을 수 있고(Altschul 등, 1990; Altschul 등, 1997), 전술한 바와 같이 진화될 수 있다(Wang 등, 2011). 전술한 바와 같이 낮은 pH에 특히 내성을 갖는 효모 균주는, 이런 접근법을 사용하는 D-락테이트를 생산하기 위한 숙주 균주로서 바람직하다.

- [0091] 실시예9
- [0092] 산 내성 효모에 의한 D-락테이트의 생산
- [0093] 실시예 9에 대한 대안으로, 효모는, 에탄올 생산에서 기능하는 하나 이상의 유전자들(예를 들어, *ScPDC1*, *ScPDC5*, 및 *ScPDC6*, 또는 *KmPDC1*, 또는 *IoPDC1*)을 삭제한 뒤 D-락테이트 데히드로게나아제(피루베이트 플러스 NADH로부터 D-락테이트 플러스 NAD로의 전환을 촉진하는 효소; EC 1.1.1.28)를 인코딩하는 대장균의 *ldhA* 유전자를 발현하는 발현 카세트, 또는 그의 상동체 또는 유사체를 도입함으로써 에탄올 생산자로부터 D-락테이트 생산자로 전환될 수 있다. 이후에, 결과로 얻은 효모 균주는 성장, 생산률, 및 고 농도의 D-락테이트에 대한 내성을 증가시키기 위하여 전술한 바와 같은 대사 진화를 겪을 수 있다. 대장균의 *ldhA*에 상동인 많은 유전자들은 디폴트 파라미터를 갖는 BLAST 검색을 이용하여 공용 데이터베이스에서 찾을 수 있고(Altschul 등, 1990; Altschul 등, 1997), 전술한 바와 같이 진화시킬 수 있다(Jantama 등, 2008). 전술한 바와 같은, 낮은 pH에 특히 내성인 효모 균주는 이런 접근법을 사용하여 D-락테이트를 생산하기 위한 숙주 균주로서 바람직하다.
- [0094] 일 실시예에서, 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 균주 SD98의 *PDC1* 유전자로부터의 오픈리딩프레임은 대장균 C의 *ldhA* 유전자로부터의 오픈리딩프레임에 의해 염색체에서 정밀하게 대체되었고, *PDC1* 종결자는 그 자리에 두었다. 종결자로부터 하류에서, *kanMX* 카세트(Wach 등, 1994)이 도입되었고, 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)로의 상동성 재조합을 위한 상동체를 제공하기 위하여 *PDC1* 종결자의 바로 하류에 자연적으로 존재하는 DNA 서열이 이어진다. 이런 카세트를 함유하도록 제작된 플라스미드는 pSD57로 명명되었다(서열번호 1). 선형 DNA 단편은 프라이머 SD336 및 SD343을 사용하는 PCR에 의해 상기 플라스미드로부터 생산되었고, 200 mg/L 항생제 G418(Geneticin으로도 불림)으로의 선별을 이용하여 SD98을 형질변환하는데에 사용되어 새로운 균주 단리체를 제공한다. 올바른 소정의 유전자 치환은 동일한 프라이머들을 사용하는 진단적 PCR에 의해 단리체들의 서브세트에서 확인되었다. 항생제 G418을 함유하는 플레이트 상의 몇몇 단리체들이 다시 선조점종(restreaking)된 후, D-락테이트를 생산하지만 에탄올은 생산하지 않는 단리체가 얻어졌다. 진단적 PCR에 의해 확인된 이런 동형의 이배체 단리체는 SD517로 명명되었다.
- [0095] SD517은 100 g/L 글루코오스를 함유하고 10 µg/L의 바이오틴, 1 mg/L 니아신, 및 1 mg/L의 티아민 히드로클로라이드로 보충된 합성 배지(Difco Yeast Nitrogen Base)를 사용하는 37°C의 소규모 미량호기성 발효장치를 270 RPM로 교반하면서 성장되었다. pH는 5.0으로 설정되었고, 필요에 따라 2 M KOH의 첨가에 의해 제어된다. 15 g/l의 D-락테이트는 192시간에 생산되었다.
- [0096] 단일 군체는 192시간에 발효장치로부터 단리되었고, SD517-1-2로 명명했다. 이런 새로운 균주는 유사한 발효장치에서 192 시간에 30 g/l의 D-락테이트를 생산했고, 이는 균주가 신속한 성장, 더 많은 D-락테이트의 생산 및/또는 D-락테이트에 대한 더 나은 내성을 위해 진화되었다는 것을 나타낸다. 이런 발효의 종료 후 단리된 단일 군체는 SD517-D1으로 명명했다.
- [0097] 상기 문단에서 설명된 공정은 SD517-D1으로 명명된 새로운 군체-단리된 균주를 이용하고 에르고스테롤(최종농도 20 mg/L) 및 Tween 80 (최종농도 0.05%)을 배지에 첨가하는 차이를 제외하고 동일하게 다시 반복되었다. SD517-D1은 168시간에 38 g/L의 D-락테이트를 생산했다. pH는 최종 pH 3.5가 되도록 2 M KOH로 제어했다. 실제 최종 pH는 3.9였다. 다시, 더 높은 역가는 추가적인 진화가 발생할 수 있다는 것을 나타내었으며, 또, 단일 군체는 발효의 종료로부터 보존되고, SD541로 명명되었다.
- [0098] 앞선 문단에서 설명된 발효 공정은 공기가 15 ml/분(0.05 부피/부피/분 또는 VVM)으로 공급되는 것을 제외하고는 동일하게 반복되었다. 48시간에서, 49 g/l의 D-락테이트는 생산되었고(도 3 참조), pH는 3.8이 되었다. 단일 군체는 48시간에서 발효장치로부터 단리되었고 SD542로 명명되었다. 또한, 더 높은 역가는 추가적인 진화가 발생할 수 있다는 것을 나타냈다.
- [0099] 실시예 10
- [0100] 산 내성 효모에 의한 숙시네이트의 생산
- [0101] 유전자 카세트는 PEP(포스포에놀 피루베이트)로부터 숙시네이트로의 환원성 TCA 경로를 제공하기에 충분한 4개의 효소들의 생산물, 즉 PEP 카복시키나아제(EC 4.1.1.49), 말레이트 데히드로게나아제(EC 1.1.1.37), 푸마라아제(EC 4.2.1.2), 및 푸마레이트 리덕타아제(EC 1.3.1.6)을 인코딩하도록 제작되었다. 사용된 유전자들, 프로모터

들 및 종결자들은 표 2에 나열된다. *kanMX* 카셋은 두개의 유전자들 사이에서 카셋의 가운데 안에 들어가 있다. 카셋의 구조는 도 4에 도시된다. 카셋은 pSD59fumC로 명명된 플라스미드(서열번호 2) 안에 들어가 있다. 선형 DNA 단편은 프라이머 SD390 및 SD392를 이용하는 PCR에 의해 템플레이트로서 이런 플라스미드로부터 생산되었다. 선형 DNA 단편은 200 mg/L에서 항생제 G418 내성에 대해 선별하는 균주 SD98로 형질전환되었다. 항생제 G418을 함유하는 플레이트 상에 몇몇 단리체들을 다시 선조접중(restreaking)한 후, 상동 염색체 중 *PDC1* 유전자 위치에서 정확히 통합된 숙시네이트 생합성 카셋을 함유한 동형접합성 이배체 단리체는 진단적 PCR에 의해 식별되었고, SD631로 명명했다. 항생제 G418에 대한 내성을 인코딩하는 *kanMX* 카셋만을 *PDC1* 위치에서 함유한 동형접합성 이배체 대조군 균주는 제작되었고, SD565로 명명했다. SD565는 유전자 조작된 숙시네이트 유전자 카셋을 함유하지 않았다.

[0102] SD565 및 SD631은 100 g/L 글루코오스를 함유하고, 10 µg/L의 바이오틴, 1 mg/L 니아신, 및 1 mg/L의 티아민 히드로클로라이드로 보충된 합성 배지(Difco Yeast Nitrogen Base)를 이용하는 37°C의 200 ml 발효장치에서 미량호기성으로 성장시켰다. pH는 5.0이 되도록 하였고, 그 후에 2 M 암모늄 비카보네이트를 사용하여 pH 5.0에서 유지되었다. 공기는 15 ml/분으로 공급되었고, 이산화탄소는 6 ml/분으로 공급되었다. 교반은 270 RPM으로 유지시켰다. 144 시간에서, SD631은 4.7 g/L의 숙시네이트를 생산했고, SD565는 0.5 g/L만 생산했으며, 이는 SD631에서 유전자 카셋이 설계된 바와 같이 기능했다는 것을 나타낸다(도 5 참조).

[0103] SD631은 하기 설명될 실시예 11과 같은 TCA 사이클의 산화성 및 환원성 분점 모두에서 필요한 모든 효소들을 세포질 내에 함유하도록 더 유전자 조작될 수 있다. 균주 SD631 및 그의 유도체는, 대장균 숙시네이트 생산자로 설명된 접종원을 계대 소 발효장치(successive small fermentors)에서 전달하는 것에 의해 더 높은 숙시네이트 역가, 생산율, 및 숙시네이트에 대한 내성을 생산하도록 진화될 수 있다(Jantama 등, 2008). pH 세팅은 낮은 pH에서 숙시네이트를 생산하고 축적할 수 있는 균주를 선택하기 위하여 진화 과정에서 낮춰질 수 있다.

[0104] 실시예 11

[0105] 미토콘드리아의 효소로부터 세포질로의 방향 변경

[0106] 효모에서, 미토콘드리아에서 자연적으로 발생하는 효소는 세포질에서 번역된 폴리펩티드의 N-말단 상의 신호 서열에 의해 미토콘드리아로 향한다(Vogtle 등, 2009). 신호 서열을 인코딩하는 DNA를 삭제하는 것에 의한 이런 신호 서열의 삭제는 효소가 세포질에 위치하는 결과를 가져온다(Hurt 등, 1987). 일반화에 의하여, 세포질로부터 미토콘드리아로 자연적으로 향하는 임의의 주어진 효소가 신호 서열을 삭제함으로써 세포질에 남아있도록 유전자 조작될 수 있다는 것이 당해 분야에 잘 알려져 있다. 한 구체적 예시가 여기에 주어진다. 미토콘드리아의 이소시트레이트 데히드로게나아제(TCA 사이클 중 산화성 분점의 효소들 중 하나)를 인코딩하는 *IDH1* 유전자의 초기 번역 산물의 아미노 말단 서열은 MLNRTIAKRTLATAAQAER이다. 미토콘드리아 내에서 상응하는 성숙 이소시트레이트 데히드로게나아제의 아미노산 서열은 LATAAQAER이다. 따라서, DNA 서열 CTTAACAGACAATTGCTAAGAGAACT의 삭제는 MLATAAQAER...의 아미노 말단으로 시작하는 초기 번역 산물로 짧아진 폴리펩티드를 가져올 것이며, 이런 폴리펩티드는 미토콘드리아의 신호 서열을 갖지 않기 때문에 세포질 내에 남아 있을 것이다. 이런 방법의 일반화에 의해, TCA 사이클 중 환원성 또는 산화성 분점들의 임의의 효소들은 세포질로 다시 향할 수 있다. 산화성 경로에 필요한 미토콘드리아 효소들은 피루베이트 데히드로게나아제(EC 1.2.4.1), 시트레이트 신타아제(EC 4.3.1.7 또는 4.3.1.28), 아코니타아제(EC 4.2.1.3), 이소시트레이트 데히드로게나아제(EC 2.7.1.40), α-케토글루타레이트 데히드로게나아제(EC 1.2.4.2) 및 숙시네이트-CoA 리가아제로도 불리는 숙시닐-CoA 신테타아제(EC 6.2.1.4 또는 EC 6.2.1.5).를 포함한다. 이러한 효소들의 일부는 기능하기 위한 하나 초과 서브유닛을 필요로 하며, 그 경우에, 모든 서브유닛을 인코딩하는 유전자들은 클로닝되고 발현될 필요가 있다. 이러한 효소들 및 서브유닛들을 인코딩하는 유전자들은 ScPDA1, ScPDB1, ScPDX1, ScLPD1, ScCIT1, ScCm, ScACO1, ScIDH1, ScKGD1, ScKGD1, ScLSC1, ScLSC1, 및 클루이베로미세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 및 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)와 같은 다른 효모들로부터의 관련된 상동체 및 유사체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0107] 다른 접근법은 대장균 반추 박테리아(악티노바실러스, 만하이미아, 바스피아 등) 또는 다른 박테리아와 같은 박테리아로부터의 효소들 및 유전자들을 활용하는 것이다. 박테리아는 미토콘드리아를 갖고 있지 않기 때문에, 그의 이중 효소들 및 서브유닛들은 효모에서 세포질 중에서 발현되고 남아 있을 것이다. 소정의 효소가 효모 미토콘드리아의 계놈에서 자연적으로 인코딩되는 경우에, 바람직한 접근법은 그 경우에 대하여 박테리아 유전자

및 효소를 사용하는 것인데, 그 이유는 미토콘드리아의 신호 서열이 원생 단백질에 존재하지 않을 것이어서 이를 다시 세포질로 보내는 것이 더 어려울 것이기 때문이다.

[0108] 본원에 개시된 발명은 낮은 pH에서 유기산에 대하여 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 비해 더 내성인 특성을 갖는 임의의 적합한 효모 균주에서 실행될 수 있다. 예를 들어, 칸디다 마그놀리아(*Candida magnolia*)는 적합한 숙주 균주일 것이다(Zhang 등, 2011).

표 1

표 1 서열 정보		
서열 번호	프라이머/플라스미드 명칭	서열/내용
1	SD123	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
2	SD124	5'-CGCCAGTTCTGCTTACC-3'
3	SD125	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
4	SD126	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
5	SD127	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
6	SD128	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
7	SD129	5'-CTTGTTTCGCTATCGGTCTC-3'
8	SD130	5'-GAGACCGATAGCGAACAAG-3'
9	SD336	CACCAGTAAAACATACGCATACACATACAC
10	SD343	AAGCTTGTGTATATGCCAAATAAAGTAAAA
11	SD390	CAATGCGAATAGCACCAGTGAGAGCACCAG
12	SD392	AACAAGACCAAACATCCCCTCCGAAGAA
13	pSD 57	pSD57, 락테이트 데히드로게나아제 발현 카셋을 균주 SD98 안으로 통합함과 동시에 <i>PDC1</i> 코딩 영역을 삭제하기 위한 선형 DNA 단편을 공급하도록 설계된 플라스미드
14	pSD59	pSD59fumC, 숙시네이트로의 환원성 경로에 필요한 4개의 유전자들을 함유하는 카셋을 균주 SD98 안으로 통합함과 동시에 <i>PDC1</i> 코딩 영역을 삭제하기 위한 선형 DNA 단편을 공급하도록 설계된 플라스미드

[0109]

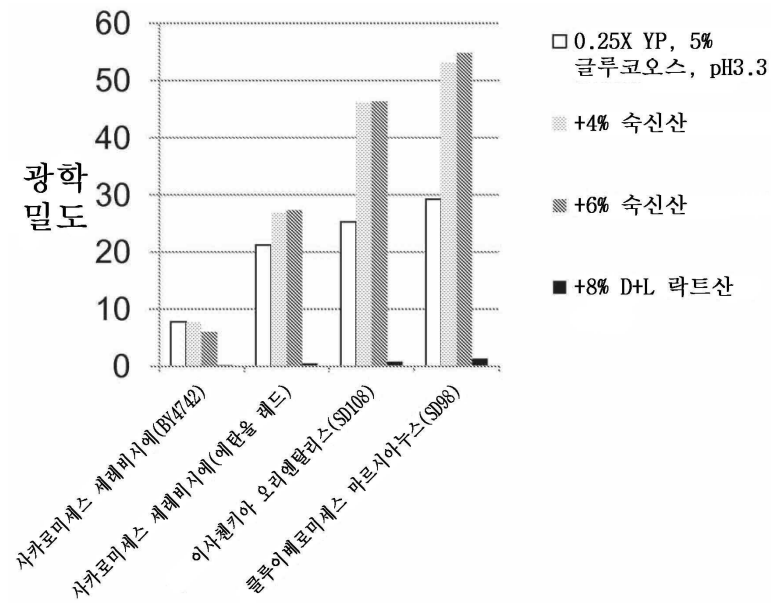
표 2

표 2. SD631의 숙시네이트 생산 카셋에 사용된 유전자			
유전자(코딩영역)	공급원	사용된 프로모터	사용된 종결자
<i>pck</i> (PEP 카복시키나아제)	대장균 <i>C</i>	<i>KmPDC1</i>	<i>ScTEF1</i>
<i>mdh</i> (말레이트 데히드로게나아제)	대장균 <i>C</i>	<i>ScTPII</i>	<i>ScTPII</i>
<i>fumC</i> (푸마라아제)	대장균 <i>C</i>	<i>ScGPM1</i>	<i>ScGPM1</i>
<i>FRD1</i> (푸마라이트 리덕타아제)	사카로미세스 세레비시에	<i>ScTEF1</i>	<i>KmPDC1</i>

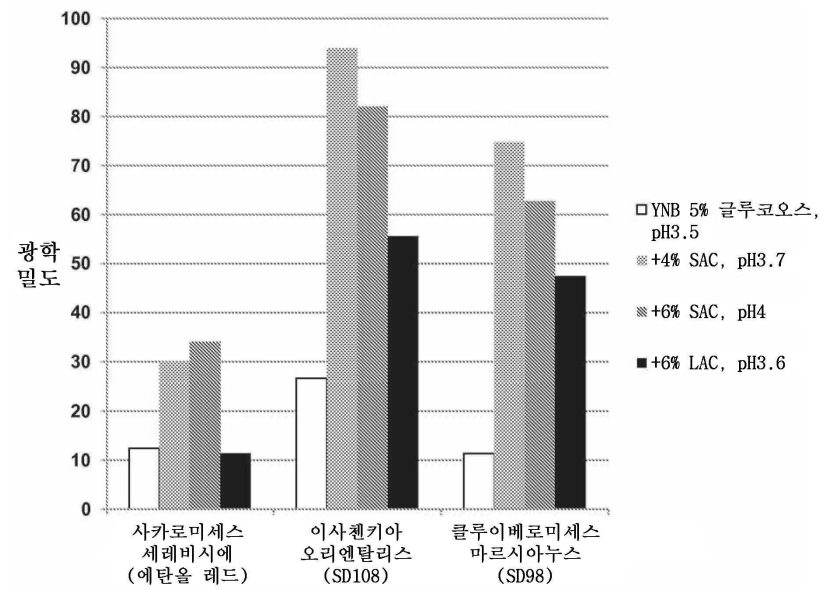
[0110]

도면

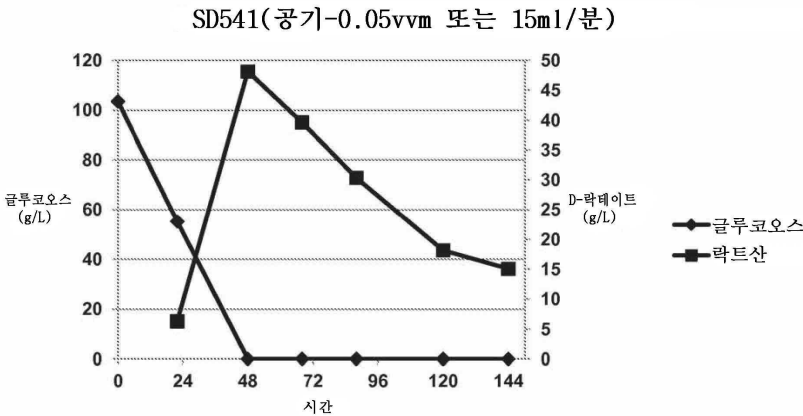
도면1



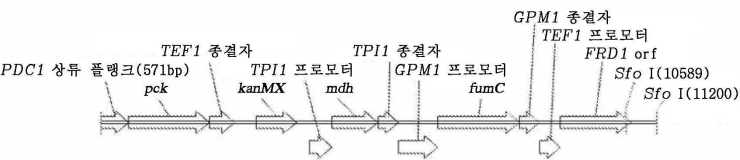
도면2



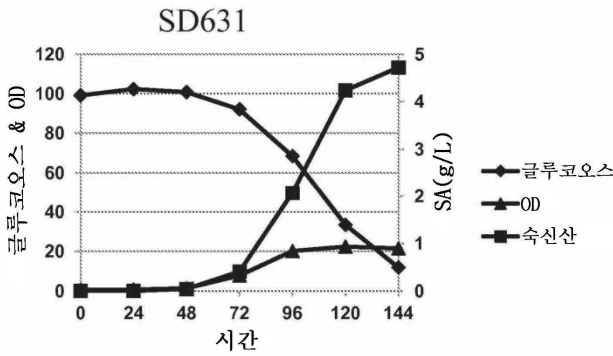
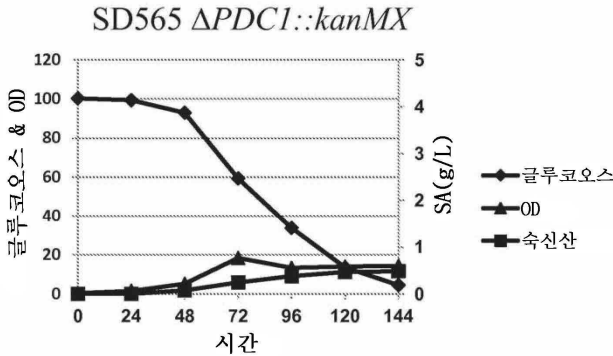
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Myriant Corporation
Yocum, R. Rogers

Dole, Sudhanshu

Pero, Janice G.

<120> Production of Organic Acids By Fermentation At Low pH

<130> MC2013-03PCT

<150> US 61/701,293

<151> 2012-09-14

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer SD123

<400> 1

ggaagtaaaa gtcgtaacaa gg

22

<210> 2

<211> 17

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer SD124

<400> 2

cgccagttct gcttacc

17

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer SD125

<400> 3

gcataatcaat aagcggagga aaag

24

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer SD126

<400> 4	
ggtccgtgtt tcaagacgg	19
<210> 5	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer SD127	
<400> 5	
tccgtaggtg aacctgcgg	19
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer SD128	
<400> 6	
tcctccgctt attgatatgc	20
<210> 7	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer SD129	
<400> 7	
cttggtcgct atcggtctc	19
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer SD130	
<400> 8	
gagaccgata gcgaacaag	19
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer SD336

<400> 9

caccagtaaa acatacgcat acacatacac 30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer SD343

<400> 10

aagcttgtgt atatgcaaaa taaagtaaaa 30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer SD390

<400> 11

caatgcgaat agcaccagtg agagcaccag 30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer SD392

<400> 12

aacaagacca aactcatccc ctccgaagaa 30

<210> 13

<211> 10036

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plasmid pSD57

<400> 13

cccgggaatc tcggtcgtaa tgatttttat aatgacgaaa aaaaaaaaaat tggaaagaaa 60

aagctttaat gcggtagttt atcacagtta aattgctaac gcagtcaggc accgtgtatg 120

aaatctaaca atgcgctcat cgtcatcctc ggacacgtca ccctggatgc ttaggcata 180
 ggcttggta tggcggtact gccgggctc ttgcgggata tegtccattc cgacagcatc 240
 gccagtact atggcgtgct gctagcgcta tatgcgttga tgcaatttct atgcgcaccc 300
 gtcttcggag cactgtccga ccgctttggc cgcgcgccag tctgctcgc ttgctactt 360
 ggagccacta tcgactacgc gatcatggcg accacaccg tctgtggat cctctacgcc 420
 ggacgcatcg tggccggcat caccggcgcc acaggtgcgg ttgctggcgc ctatatcgcc 480

 gacatcaccg atggggaaga tcgggctcgc cacttcgggc tcatgagcgc ttgtttcggc 540
 gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttgg gcgccatctc ctgcatgca 600
 ccattccttg cggcggcggg gctcaacggc ctcaacctac tactgggctg cttcctaag 660
 caggagtgcg ataagggaga gcgtcgaccg atgcccttga gagccttcaa ccagtcagc 720
 tccttcgggt gggcgcgggg catgactatc gtgccgcac ttatgactgt cttctttatc 780
 atgcaactcg taggacaggg gccggcagcg ccttgggtca ttttcggcga ggaccgctt 840
 cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg cttgcggtat tcggaatctt gcacgccctc 900

 gctcaagcct tegtactgg tcccgccacc aaacgtttcg gcgagaagca ggccattatc 960
 gccggcatgg cggccgacgc gctgggctac gtcttgctgg cgttcgcgac gcgaggtgg 1020
 atggccttcc ccattatgat tcttctcgt tccggcggca tcgggatgcc cgcgttcag 1080
 gccatgctgt ccaggcagg agatgacgac catcaggga agcttcaagg atcgctcgcg 1140
 gctcttacca gcctaacttc gatcactgga ccgctgatcg tcacggcgat ttatgccgc 1200
 tcggcgagca catggaacgg gttggcatgg attgtaggcg ccgccctata cttgtctgc 1260
 ctccccgcgt tgcgtcgcgg tgcatggagc cgggccacct cgacctgaat ggaagccggc 1320

 ggacactcgc taacggattc accactcaa gaattggagc caatcaattc ttgcggagaa 1380
 ctgtgaatgc gcaaaccaac ctttggcaga acatatccat cgcgtccgcc atctccagca 1440
 gccgcacgcg gcgcatctcg ggacagcgtt ggctctggcc acgggtgcgc atgatcgtgc 1500
 tcctgtcgtt gaggaccgg ctagctggc ggggttgct tactggttag cagaatgaat 1560
 caccgatacg cgagcgaacg tgaagcgact gctgctgcaa aacgtctgcg acctgagcaa 1620
 caacatgaat ggtcttcggt ttccgtgttt cgtaaagtct ggaaacgcgg aagtcagcgc 1680
 cctgcacat tatgttcgg atctgcatcg caggatgctg ctggctaccc tgtggaacac 1740

 ctacatctgt attaacgaag cgctggcatt gacctgagt gatTTTTTctc tggTcccgcc 1800
 gcatccatac cgccagtgt ttacctcac aacgttccag taaccgggca tgttcatcat 1860
 cagtaacccg tatcgtgagc atcctctctc gtttcatcgg tatcattacc cccatgaaca 1920
 gaaattcccc cttacacgga ggcatcaagt gaccaaacag gaaaaaacg cccttaacat 1980

ggccccgttt atcagaagcc agacattaac gcttctggag aaactcaacg agctggacgc 2040
ggatgaacag gcagacatct gtgaatcgct tcacgaccac gctgatgagc ttaccgcag 2100
ctgcctcgcg cgtttcggtg atgacggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac 2160

ggtcacagct tgctgtgaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc 2220
gggtgttggc ggggtgtcggg gcgcagccat gaccagtcga cgtagcgata gcggagtgt 2280
tactggctta actatgcggc atcagagcag attgtactga gactgcacca tatgcggtgt 2340
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg 2400
ctcactgact cgtcgcgtc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactaaag 2460
gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 2520
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 2580

cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca 2640
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtcgcgtc tcctgttcgg 2700
acctgcccgc ttaccggata cctgtccgcc ttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 2760
catagctcac gctgtaggt 2820
gtgcacgaac cccccgtca gcccagccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag 2880
tccaaccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc 2940
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 3000

actagaagga cagtatttgg tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 3060
gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgtggta gcggtggttt tttgtttgc 3120
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 3180
gggtctgacg ctcatgtgaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggatc gagattatca 3240
aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt 3300
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgctta tcagtgaggc acctatctca 3360
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 3420

atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgtca 3480
ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgg 3540
cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt 3600
agttccag ttaatatgtt gcgcaacgtt gttgccattg ctgcaggcat cgtgggtca 3660
cgctcgtcgt ttggtatggc ttcatcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 3720
tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga 3780

agtaagttgg ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 3840

gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga 3900

gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caacacggga taataccgcg 3960

ccacatagca gaactttaaa agtgcctatc attggaacac gttcttcggg gcgaaaactc 4020

tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga 4080

tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat 4140

gccgcaaaaa agggaaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt 4200

caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 4260

atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 4320

gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat caccaggccc 4380

tttcgtcttc aagaattctg aaccagtcct aaaacgagta aataggaccg gcaattcttc 4440

aagcaataaa caggaatacc aattattaaa agataactta gtcagatcgt acaataaagc 4500

tttgaagaaa aatgcgcctt attcaatctt tgctataaaa aatggcccaa aatctcacat 4560

tggaagacat ttgatgacct catttctttc aatgaagggc ctaacggagt tgactaatgt 4620

tgtgggaaat tggagcgata agcgtgcttc tgccgtggcc aggacaacgt atactcatca 4680

gataacagca atacctgac actacttcgc actagtttct cggtactatg catatgatcc 4740

aatatcaaag gaaatgatag cattgaagga tgagactaat ccaattgagg agtggcagca 4800

tatagaacag ctaaagggtg gtgctgaagg aagcatagca taccgccat ggaatgggat 4860

aatatcacag gaggtactag actacctttc atcctacata aatagacgca tataagtacg 4920

catttaagca taacacgca ctatgccgtt cttctcatgt atatatatat acaggcaaca 4980

cgcagatata ggtgcgacct gaacagttag ctgtatgtgc gcagctcgcg ttgcattttc 5040

ggaagcgctc gttttcgga acgctttgaa gttcctattc cgaagttcct attctctaga 5100

aagtatagga acttcagagc gcttttgaaa accaaaagcg ctctgaagac gcactttcaa 5160

aaaacaaaa acgcaccgga ctgtaacgag ctactaaaat attgcgaata ccgcttccac 5220

aaacattgct caaaagtatc tctttgctat atatctctgt gctatatccc tatataacct 5280

acccatccac ctttcgctcc ttgaacttgc atctaaactc gacctctaca ttttttatgt 5340

ttatctctag tattactctt tagacaaaaa aattgtagta agaactattc atagagtga 5400

tcgaaaacaa tacgaaaatg taaacatttc ctatacgtag tatatagaga caaaatagaa 5460

gaaaccgttc ataattttct gaccaatgaa gaatcatcaa cgctatcact ttctgttcac 5520

aaagtatcgc caatccacat cggtatagaa tataatcggg gatgccttta tcttgaaaaa 5580
 atgcaccgcg agcttcgcta gtaatcagta aacgcgggaa gtggagtcag gcttttttta 5640
 tggaagagaa aatagacacc aaagtagcct tcttctaacc ttaacggacc tacagtgcaa 5700
 aaagttatca agagactgca ttatagagcg cacaaaggag aaaaaaagta atctaagatg 5760
 ctttgtaga aaaatagcgc tctcgggatg catTTTTgtga gaacaaaaaa gaagtataga 5820
 ttctttgttg gtaaaatagc gctctcgctg tgcatttctg ttctgtaaaa atgcagctca 5880
 gattctttgt ttgaaaaatt agcgctctcg cgttgcatTT ttgttttaca aaaatgaagc 5940

 acagattctt cgttggtaaa atagcgcttt cgcgttgcat ttctgttctg taaaaatgca 6000
 gctcagattc ttgtttgaa aaattagcgc tctcgcgttg catTTTTgtt ctacaaaatg 6060
 aagcacagat gcttcgttaa caaagatatg ctattgaagt gcaagatgga aacgcagaaa 6120
 atgaaccggg gatgcgacgt gcaagattac ctatgcaata gatgcaatag ttcttccagg 6180
 aaccgaaata catacattgt ctccgtaaaa gcgctagact atatattatt atacaggttc 6240
 aaataacta tctgtttcag ggaaaactcc caggttcgga tgttcaaaat tcaatgatgg 6300
 gtaacaagta cgatcgtaaa tctgtaaaac agtttgcgg atattaggct gtatctcttc 6360

 aaagcgtatt cgaatatcat tgagaagctg cagcgtcaca tcggataata atgatggcag 6420
 ccattgtaga agtgccTTTT gcatttctag tctctttctc ggtctagcta gttttactac 6480
 atcgcaaga tagaatctta gatcacactg cttttgctga gctggatcaa tagagtaaca 6540
 aaagagtggT aaggcctcgt taaaggacaa ggacctgagc ggaagtgtat cgtacagtag 6600
 acggagtata ctagtatagt ctatagtccg tggaattctc atgtttgaca gcttatcatc 6660
 gataagcttt tcaattcaat tcatcatttt ttttttattc tttttttga ttctcggtttc 6720
 tttgaaattt ttttgattcg gtaatctccg aacagaagga agaacgaagg aaggagcaca 6780

 gacttagatt ggtatatata cgcatatgta gtgttgaaga aacatgaaat tgcccagtat 6840
 tcttaaccba actgcacaga acaaaaacct gcaggcacca gtaaaacata cgcatacaca 6900
 tacacacata gagcaagcaa gcaggttagc aaccaggaaa ggctgccagt gactgctact 6960
 ggggtgctaa gaaccgtagg gcggattatt gttgcggtgg ttggttgcgg gtggttatgc 7020
 gatggtacgg tgcagaatcg tacggtgttg gttatggaat tagtatgggt atgtgatatg 7080
 tggtaatatg tgatattggg ttattgtgat ttggaatact gaatatcgaa tatgggatat 7140
 ggaatatggc catggcatgg tatggtatgg gatgggagta ttctatttta tttatttta 7200

 ttctggttcc tgcgtttagg gtaggtagg aagaaggtga gtgcttttgt atataagtgg 7260
 agtgtctgga tcagttttgt ggattgtgaa tgttgttagt ttcccttta atgtatattt 7320
 gtattatttg cttttgagta ctcaataacc aagcacaact actagtttta aaggatccat 7380

cctcttaaac agtacaatcg caaagaaaag ctccacaccc aaaccaaata attgcaatga	7440
aactcgccgt ttatagcaca aaacagtacg acaagaagta cctgcaacag gtgaacgagt	7500
cctttggctt tgagctggaa ttttttgact ttctgctgac ggaaaaaacc gctaaaactg	7560
ccaatggctg cgaagcggtg tgtattttcg taaacgatga cggcagccgc ccggtgctgg	7620
aagagctgaa aaagcacggc gttaaatata tcgccctgcg ctgtgccggt ttcaataacg	7680
tcgaccttga cgcggcaaaa gaactggggc tgaaagtagt ccgtgttcca gcctatgac	7740
cagaggccgt tgctgaacac gccatcggtg tgatgatgac gctgaaccgc cgtattcacc	7800
gcgcgtatca gcgtaccgt gatgctaact tctctctgga aggtctgacc ggctttacta	7860
tgtatggcaa aacggcaggc gttatcggtg ccggtaaaat ccggtgtggc atgctgcgca	7920
ttctgaaagg ttttggtatg cgtctgctgg cgttcgatcc gtatccaagt gcagcggcgc	7980
tggaaactcg tgtggagtat gtcgatctgc caacctgtt ctctgaatca gacgttatct	8040
ctctgcactg cccgctgaca ccggaact atcatctgtt gaacgaagcc gccttcgaac	8100
agatgaaaaa tggcgtgatg atcgtcaata ccagtcgcgg tgcatgtatt gattctcagg	8160
cagcaattga agcgtgaaa aatcagaaaa ttggttcgtt gggatatggac gtgtatgaga	8220
acgaacgcga tctattcttt gaagataaat ccaacgacgt gatccaggat gacgtattcc	8280
gtcgctgtc tgcctgccac aacgtgctgt ttaccgggca ccaggcatc ctgacagcag	8340
aagctctgac cagtatttct cagactacgc tgcaaaactt aagcaatctg gaaaaaggcg	8400
aaacctgccc gaacgaactg gtttaacgta cgctgcaggt cgacggatcc ccgggttaat	8460
taaggcgcgc cagatctgtt tagcttgctt cgtccccgcc gggtcaccgc gccagcgaca	8520
tggaggccca gaataccctc cttgacagtc ttgacgtgcg cagctcaggg gcatgatgtg	8580
actgtcgccc gtacatttag cccatacatc cccatgtata atcatttgca tccatacatt	8640
ttgatggccg cacggcgcga agcaaaaatt acggctctc gctgcagacc tgcgagcagg	8700
gaaacgtcc cctcacagac gcgttgaatt gtccccacgc cgcgcccctg tagagaaata	8760
taaaagggtg ggatttgcca ctgaggttct tctttcatat acttcctttt aaaatcttgc	8820
taggatacag ttctcacatc acatccgaac ataacaacc atgggttaagg aaaagactca	8880
cgtttcgagg ccgcgattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt ataaatgggc	8940
tcgcgataat gtcgggcaat caggctgcac aatctatcga ttgtatggga agcccgatgc	9000
gccagagtgt tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgtta cagatgagat	9060
ggtcagacta aactggctga cggaatttat gcctcttccg accatcaagc attttatccg	9120
tactctgat gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc ggcaaaacag cattccaggt	9180
attagaagaa tatcctgatt caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag tgttcctgcg	9240

ccggttgcat tcgattcctg tttgtaattg tccttttaac agcgatcgcg tatttcgtct 9300

cgctcaggcg caatcacgaa tgaataacgg tttggttgat gcgagtgatt ttgatgacga 9360

gcgtaatggc tggcctgttg aacaagtctg gaaagaaatg cataagcttt tgccattctc 9420

accggattca gtcgtcactc atggtgattt ctacttgat aaccttattt ttgacgaggg 9480

gaaattaata ggttgatttg atgttggacg agtcggaatc gcagaccgat accaggatct 9540

tgccatccta tggaactgcc tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac ggctttttca 9600

aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag tttcatttga tgctcgatga 9660

gtttttctaa tcagtactga caataaaaag attcttgttt tcaagaactt gtcatttgta 9720

tagttttttt atattgtagt tgttctattt taatcaaatg ttagcgtgat ttatatTTTT 9780

tttcgcctcg acatcatctg cccagatgcg aagttaagtg cgcagaaagt aatatcatgc 9840

gtcaatcgta tgtgaatgct ggctgctata ctgctgtcga ttcgatacta acgccgccat 9900

ccagtgtcga aaacgagctc gaattcatcg atagaggagagg aggataaaga gataaattac 9960

gattttggat tttaatgatt ttataaacia caacaaccaa ccagcctttt actttatttg 10020

gcataataac aagctt 10036

<210> 14

<211> 18144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plasmid pSD59

<400> 14

cgcggtgcat aaacacggcg gcttctacct cggtagcatc ggcggtccgg cggcggtact 60

ggcgcagcag agcatcaagc atctggagtg cgtcgcttat ccggagctgg gtatggaagc 120

tatctggaaa atcgaagtag aagatttccc ggcggtttatc ctggtcgatg acaaaggtaa 180

cgactttctc cagcaaatcg tcaacaaaca gtgcgcgaac tgcactaagt aagtctgaag 240

aatgaatgat ttgatgattt ctttttccct ccatttttct tactgaatat atcaatgata 300

tagacttgta tagtttatta tttcaaatta agtagctata tatagtcaag ataacgtttg 360

tttgacacga ttacattatt cgtcgacatc ttttttcagc ctgtcgtggt agcaatttga 420

ggagtattat taattgaata ggttcatttt gcgctcgcat aaacagtttt cgtcagggac 480

agtatgttgg aatgagtggg aattaatggt gacatgacat gttatagcaa taaccttgat 540

gtttacatcg tagtttaatg tacacccgcg gaattcgttc aagtaggagt gcaccaattg 600

caaagggaaa agctgaatgg gcagttcgaa tagtacttaa gattccaca caccatagct 660

tcaaaatgtt tctactcctt ttttactcct ccagattttc tggactccg cgcacgccc	720
taccacttca aaacacccaa gcacagcata ctaaatttcc cctctttcct cctctagggt	780
gtcgttaatt acccgtaact aaggtttgga aaagaaaaa gagaccgcct cgtttctttt	840
tcttcgtcga aaaaggcaat aaaaattttt atcacgtttc ttttcttga aaatttttt	900
ttttgatatt tttctcttcc gatgacctcc catgatatt taagttaata aacggtcttc	960
aatctctcaa gtttcagttt catttttctt gttctattac aactttttt acttcttgct	1020
cattagaaag aaagcatagc aatctaactt aagttttaat taaaaaatgt ctctctctcc	1080
cgttggtgtt attggaaccg gtttgcccg gctggctgct gccaatgaat tggtaacaa	1140
gtataacatc cctgtaacca tcctcgaaaa ggcttctctg atcggtgga actctatcaa	1200
ggcctccagt ggtattaacg gtgcttgac cgagactcaa cgtcacttcc acatcgagga	1260
ctccccacgc ttatttgaag atgacaccat caagtctgct aaaggtaaag gtgtccaaga	1320
attaatggct aagttggcca atgattctcc cctggctatt gaatggtga aaaacgaatt	1380
tgatttgaaa ttggacctat tggctcaatt gggtgccac tctgtggcaa gaactcacag	1440
atcgtctggg aagttgcctc caggtttcga aattgtttct gccttatcta acaatttgaa	1500
gaaattagct gagactaac cagagttagt taagattaac ttagacagta aagtcgtaga	1560
catcatgaa aaggatggct ccatttctgc ttagtgtac gaggacaaga atggcgaaaa	1620
gcacatgggt agtgctaacg atgtcgtttt ttgttctgga gggtttggt tttctaagga	1680
aatgcttaaa gaatacgac ccgaactggt gaacttgcca acaacaaacg ggcaacaaac	1740
aactggtgat ggtcaaaggc ttctgcagaa gttaggcgct gatctgattg acatggacca	1800
aattcaagtt catccaactg ggttcattga tccaaatgac cgtagctcaa gctggaaatt	1860
cttggtgcc gaatccttaa gaggtcttgg tggatccta ttaaaccta ttaccgtag	1920
aagatttgct aacgaattga ccacaagaga ttagtcact gcagctattc aaaaggtttg	1980
tcctcaagag gataacagag cactattggt tatggcgaa aaaatgtaca cagatttgaa	2040
gaataattta gatatttaca tgttcaagaa actgttacag aaattgacat tatctcaagt	2100
tgtttctgaa tataatttac caatcactgt cgccaatta tgcgaggaat tgcaaacata	2160
ctcttcttc actaccaagg ctgatccgtt gggacgtacc gttattctca acgaatttg	2220
ctctgacgtt actccagaaa ctgtggtttt tattggtgaa gtaacaccgg ttgtccattt	2280
caccatgggt ggtgctagaa tcaatgtcaa ggctcaagtc attggcaaga acgacgaaag	2340
gctactaaaa ggcctgtacg cgcccggtga agtttctggc ggtgttcatt gcgccaatag	2400
gtgggtggt tcaagtttgt tagaatgcgt tgtctttggg agaaccgcag ctgaatctat	2460

tgccaatgac cgcaagtaaa gagggagagg ataaagagat aaattacgat ttggatttt	2520
aatgatttta taaacaacaa caaccaacca gccttttact ttatttggca tatacacaag	2580
cttactccat ttcatlgatt atctatgtgt atatatataa gtgatgtata acaattatta	2640
ttatacatag ataatatttt tatgatatgt tttttctgag ttttgatatt atttattaca	2700
agttacaagt tacaagttac aagttaccag gaagaattaa ataaaggtaa attgggggaa	2760
atataagcgt atgggcatag atatatatat atatatataa gagaacaata agctaggggc	2820
aatagggat taattacaca atccatccga agatcttttc ataataccat ttcattgtctt	2880
ttccatgggc ctgatataa gcggctcttt cctcgtctag caatttgcct tcttcttct	2940
ccaaatcgac tggttctttg aaggagacga gatcgacttc ttcggagggg atgagtttgg	3000
tcttgttgcc gccctatacc ttgtctgcct ccccgcttg cgtcgcggtg catggagccg	3060
ggccacctcg acctgaatgg aagccggcgg cactcgtta acggattcac cactccaaga	3120
attggagcca atcaattctt gcggagaact gtgaatgcgc aaaccaaccc ttggcagaac	3180
atatccatcg cgtccgcat ctccagcagc cgcacgcggc gcatctcggg cagcgttggg	3240
tcctggccac ggggtgcgat gatcgtgtc ctgtcgttga ggacccggt aggctggcgg	3300
ggttgcctta ctggttagca gaatgaatca ccgatacgcg agcgaacgtg aagcgactgc	3360
tgctgcaaaa cgtctgcgac ctgagcaaca acatgaatgg tcttcggttt ccgtgtttcg	3420
taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgccc tgcaccatta tgttccggat ctgcatcgca	3480
ggatgtgtct ggctaccctg tggaaacacct acatctgtat taacgaagcg ctggcattga	3540
ccctgagtga tttttctctg gtcccgccgc atccataccg ccagtgttt accctcaca	3600
cgttccagta accgggcatg ttcatcatca gtaaccgta tcgtgagcat cctctctcgt	3660
ttcatcggt tcatcacc ccatgaacaga aattccccct tacacggagg catcaagtga	3720
ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg cccgctttat cagaagccag acattaacgc	3780
ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg atgaacaggc agacatctgt gaatcgcttc	3840
acgaccacgc tgatgagctt taccgcagct gcctcgcgct tttcgggtgat gacggtgaaa	3900
acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga	3960
gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc gcagccatga	4020
cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat	4080
tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata	4140
ccgcatcagg cgtcttccg cttcctcgt cactgactcg ctgcgtcgg tcgttcggct	4200

gcggcgagcg gtatcagctc actcaaagcg ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga 4260
taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaagcg 4320
cgcggttgctg gcgtttttcc ataggtccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 4380
ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg 4440
aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt 4500
tctcccttcg ggaagcgtag cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg 4560
gtaggctggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg 4620

cgcttatacc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact 4680
ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggatg gtaggcgggtg ctacagagtt 4740
cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct 4800
gctgaagcca gttaccttg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 4860
cgctggtagc gggtgtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 4920
tcaagaagat cttttagctt tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg 4980
ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta 5040

aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctctg acagttacca 5100
atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc 5160
ctgactcccc gtctgttaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc 5220
tgcaatgata ccgcgagacc cagctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc 5280
agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat 5340
taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttccgaggtt aatagtttgc gcaacgttgt 5400
tgccattgct gcaggcatcg tgggtgcacg ctgctgctt ggtaggtt cattcagctc 5460

cggttcccaa cgatcaagcg gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag 5520
ctccttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt 5580
tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac 5640
tggtaggtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg 5700
cccggcgta acacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat 5760
tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc 5820
gatgtaacce actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc 5880

tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa 5940
atgttgaata ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg 6000
tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg 6060

cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac 6120
 ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtcttcaa gaattctgaa ccagtcctaa 6180
 aacgagtaaa taggaccggc aattcttcaa gcaataaaca ggaataccaa ttattaaaag 6240
 ataacttagt cagatcgtac aataaagctt tgaagaaaaa tgcgccttat tcaatctttg 6300

 ctataaaaaa tggcccaaaa tctcacattg gaagacattt gatgacctca tttctttcaa 6360
 tgaagggcct aacggagtig actaatgttg tgggaaattg gagcgataag cgtgcttctg 6420
 ccgtggccag gacaacglat actcatcaga taacagcaat acctgatcac tacttcgcac 6480
 tagtttctcg gtactatgca tatgatccaa tatcaaagga aatgatagca ttgaaggatg 6540
 agactaatcc aattgaggag tggcagcata tagaacagct aaagggtagt gctgaaggaa 6600
 gcatacgata ccccgcatgg aatgggataa tatcacagga ggtactagac tacctttcat 6660
 cctacataaa tagacgcata taagtacgca ttttaagcata aacacgcact atgccgttct 6720

 tctcatgtat atatataac aggcaacacg cagatatagg tgcgacgtga acagtgagct 6780
 glatgtgcgc agctcgcgtt gcattttcgg aagcgcctgt tttcggaac gctttgaagt 6840
 tcctattccg aagtccctat tctctagaaa gtataggaac ttcagagcgc ttttgaaaac 6900
 caaaagcgct ctgaagacgc actttcaaaa aaccaaaaac gcaccggact gtaacgagct 6960
 actaaaatat tgcaataacc gcttcacaaa acattgctca aaagtatctc tttgctatat 7020
 atctctgtgc tatatcccta tataacctac ccatccacct ttcgctcctt gaacttgcac 7080
 ctaaactcga cctctacatt ttttatgttt atctctagta ttactcttta gacaaaaaaa 7140

 ttgtagtaag aactattcat agagtgaatc gaaaacaata cgaaaatgta aacatttcct 7200
 atacgtagta tatagagaca aaatagaaga aaccgttcat aattttctga ccaatgaaga 7260
 atcatcaacg ctatcacttt ctgttcacaa agtatgcgca atccacatcg gtatagaata 7320
 taatcgggga tgcctttatc ttgaaaaaat gcacccgcag cttcgctagt aatcagtaaa 7380
 cgcggaagt ggagtcaggc tttttttatg gaagagaaaa tagacaccaa agtagccttc 7440
 ttctaacctt aacggaccta cagtgcacaa agttatcaag agactgcatt atagagcgca 7500
 caaaggagaa aaaaagtaat ctaagatgct ttgttagaaa aatagcgctc tcgggatgca 7560

 tttttgtaga acaaaaaaga agtatagatt ctttgttggg aaaatagcgc tctcgcgttg 7620
 catttctgtt ctgtaaaaat gcagctcaga tttcttgttt gaaaaattag cgctctcgcg 7680
 ttgcattttt gttttacaaa aatgaagcac agattcttcg ttggtaaaaat agcgctttcg 7740
 cgttgcattt ctgttctgta aaaatgcagc tcagattctt tgtttgaaaa attagcgctc 7800
 tcgctgtgca tttttgttct acaaaaatgaa gcacagatgc ttcgttaaca aagatatgct 7860
 attgaagtgc aagatggaaa cgcagaaaaat gaaccgggga tgcgacgtgc aagattacct 7920

atgcaataga tgcaatagtt tctccaggaa ccgaaataca tacattgtct tccgtaaagc	7980
gctagactat atattattat acaggttcaa atatactatc tgtttcaggg aaaactccca	8040
ggttcggatg ttcaaaattc aatgatgggt aacaagtacg atcgtaaadc tgtaaaacag	8100
tttgtcggat attaggctgt atctcctcaa agcgtattcg aatatcattg agaagctgca	8160
gcgtcacatc ggataataat gatggcagcc attgtagaag tgccttttgc atttctagtc	8220
tctttctcgg tctagctagt ttactacat cgcgaagata gaatcttaga tcacactgcc	8280
tttgctgagc tggatcaata gagtaacaaa agagtggtaa ggcctcgta aaggacaagg	8340
acctgagcgg aagtgtatcg tacagtagac ggagtatact agtatagtct atagtccgtg	8400
gaattctcat gtttgacagc ttatcatcga taagcttttc aattcaattc atcatttttt	8460
ttttattctt tttttgatt tcggtttctt tgaaattttt ttgattcggg aatctccgaa	8520
cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga cttagattgg tatatatacg catatgtagt	8580
gttgaagaaa catgaaattg cccagtattc ttaaccaac tgcacagAAC aaaaactgc	8640
aggaaacgaa gataaatcat gtcgaaagct acatataagg aacgtgctgc tactcatcct	8700
agtctgttg ctgccaagct atttaatac atgcacgaaa agcaaacaaa cttgtgtgct	8760
tcattggatg ttcgtaccac caaggaatta ctggagttag ttgaagcatt aggtcccaaa	8820
atttgtttac taaaaacaca tgtggataac ttgactgatt tttccatgga gggcacagtt	8880
aagccgctaa aggcatatc cgccaagtac aattttttac tcttcgaaga cagaaaattt	8940
gctgacattg gtaatacagt caaattgcag tactctgcgg gtgtatacag aatagcagaa	9000
tgggcagaca ttacgaatgc acacggtgtg gtgggccag gtattgttag cggtttgaag	9060
caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct agaggccttt tgatgttagc agaattgtca	9120
tgcaagggt ccctatctac tggagaatat actaagggtg ctgttgacat tgcgaagagc	9180
gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct caaagagaca tgggtggaag agatgaaggt	9240
tacgattggt tgattatgac acccggtgtg ggttttagatg acaagggaga cgcattgggt	9300
caacagtata gaacctgga tgatgtgtc tctacaggat ctgacattat tattgttgga	9360
agaggactat ttgcaaaggg aagggatgct aaggtagagg gtgaacgtta cagaaaagca	9420
ggctgggaag catatttgag aagatgcggc cagcaaaact aaaaaactgt attataagta	9480
aatgcatgta tactaaactc acaaattaga gttcaattt aattatatca gttattacc	9540
gggaatctcg gtcgtaatga tttttataat gacgaaaaa aaaaaattgg aaagaaaaag	9600
ctttaatgcg gtagtttatc acagttaaatt tgctaacgca gtcaggcacc gtgtatgaaa	9660

tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcaccc tggatgctgt aggcataggc	9720
ttggttatgc cggtaactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga cagcatcgcc	9780
agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg cgcacccgtt	9840
ctcggagcac tgiccgaccg ctttggccgc cgcccagtcg tgctcgcttc gctacttga	9900
gccactatcg actacgcgat catggcgacc acacccgtcc tgtggatcct ctacgccgga	9960
cgcacgtgg ccggcatcac cggcccaatg cgaatagcac cagtgagagc accagtaaaa	10020
gcatacgcat acacatacac acatagagca agcaagcagg ctagcaacca ggaaaggctg	10080
ccagtactg ctactgggtg tctaagaacc gtagggcgga ttattgttgc ggtggttgg	10140
tgcgggtgtg tatgcgatgg tacggtgcag aatcgtagcg tgttgggtta tggattagt	10200
atgggtatgt gatatgtgt aatatgtgat attgggttat tgtgatttgg aatactgaat	10260
atcgaatatg ggatatggaa tatggctatg gcatggtatg gtatgggatg ggagtattct	10320
atattatattt attctggttc ctgcgttttag gtagggtag gaagaaggtag agtgcttttg	10380
tatataagtg gagtgcctgg atcagttttg tggattgtga atgttagttt ccccttaat	10440
gtatatattgt attatttgc tttgagtact caataaccaa gcacaactac tagttttaaa	10500
ggatccatcc tcttaaacag tacaatcgc aaagaaaagc tccacacca aaccaatgcg	10560
cgttaacaat ggtttgaccg cgcaagaact cgaggcttat ggtatcagt acgtacatga	10620
tatcgtttac aaccaagct acgacctgct gtatcaggaa gagctcgatc cgagcctgac	10680
aggttatgag cgcggggtgt taactaatct ggggtccgtt gccgtcgata ccgggatctt	10740
caccggtcgt tcacaaaag ataagtatat cgtccgtgac gataccactc gcgatacttt	10800
ctggtgggca gacaaaggca aaggtaagaa cgacaacaaa cctctctctc cggaaacctg	10860
gcagcatctg aaaggcctgg tgaccaggca gctttccggc aaacgtctgt tcgttgcga	10920
cgctttctgt ggtgcgaacc cggatactcg tctttccgtc cgtttcatca ccgaagtggc	10980
ctggcaggcg cattttgcga aaaacatgtt tattcgcccg agcgatgaag aactggcagg	11040
tttcaaacca gactttatcg ttatgaacgg cggaagtgc actaacccgc agtggaaaga	11100
acagggtctc aactccgaaa acttcgtggc gtttaacctg accgagcgca tgcagctgat	11160
tggcggcacc tggtaaggcg gcgaaatgaa gaaagggatg ttctcgatga tgaactacct	11220
gctgccgctg aaaggatatg cttctatgca ctgctccgcc aacgttgggt agaaaggcga	11280
tgttgcggtg ttcttcggcc ttccggcac cggtaaaacc accctttcca ccgaccgaa	11340
acgtcgctg attggcgatg acgaacacgg ctgggacgat gacggcgtgt ttaacttga	11400
aggcggtctg tacgcaaaaa ctatcaagct gtcgaaagaa gcggaacctg aaatctacaa	11460
cgctatccgt cgtgatgcgt tgctggaaaa cgtcacctg cgtgaagatg gcactatcga	11520

ctttgatgat gggtcaaaaa ccgagaacac ccgcgtttct tatccgatct atcacatcga	11580
taacattgtt aagccggitt ccaaagcggg ccacgcgact aaggttatct tctgactgc	11640
tgatgctttc ggctgtttgc cgccggtttc tcgctgact gccgatcaaa cccagtatca	11700
cttcctctct ggcttcaccg ccaaactggc cggtagtgag cgtggcatca ccgaaccgac	11760
gccaaccttc tccgtttgct tcggcgccgc attcctgtcg ctgcaccga ctcagtacgc	11820
agaagtgtcg gtgaaacgta tgcaggcggc gggcgcgag gcttatctgg ttaacactgg	11880
ctggaacggc actggcaaac gtatctcgat taaagatacc cgcgccatta tcgacgcat	11940
cctcaacggt tcgctggata atgcagaaac ctctactctg ccgatgttta acctggcgat	12000
cccaaccgaa ctgccgggag tagacacgaa gattctcgat ccgcgtaaca cctacgcttc	12060
tccggaacag tggcaggaaa aagccgaaac cctggcgaaa ctgtttatcg acaacttcga	12120
taaatacacc gacaccctg cgggtgccgc gctggtagcg gctgggtccga aactgtaagg	12180
agattgataa gacttttcta gttgcatac ttttatattt aaatcttacc tattagttaa	12240
ttttttgtaa ttatcctta tatatagtct ggttattcta aaatatcatt tcagtatcta	12300
aaaattcccc tctttttcta gttatatctt aacaggcgac agtccaaatg ttgatttacc	12360
ccagtccgat tcacagggt tgtgaagcat tttgtcaatg gtcgaaatca catcagtaat	12420
agtgcctctt acttgctca tagaatttct ttctcttaac gtcaccgttt ggtcttttat	12480
agtttcgaaa tctatggtag taccaaatgg tgttccaat tcacgtttac gggcgatttt	12540
tttaccatt gaagtattgg aatcgtcaat tttaaagtat atctctcttt tacgtaaagc	12600
ctgcgagatc ctcttaagta tagcggggaa gccatcgta ttcgatatg tcgtaacaaa	12660
tactttgatc ggcgctatct gtaatggaaa cgtacgctgc aggtcgacgg atccccgggt	12720
taattaagge gcgccagatc tgttttagctt gcctcgtccc cgccgggtca cccggccagc	12780
gacatggagg ccagaatac cctccttgac agtcttgacg tgcgcagctc aggggcatga	12840
tgtgactgtc gcccgatcat ttagcccata catcccatg tataatcatt tgcattcata	12900
cattttgatg gccgcacggc gcgaagcaaa aattacggct cctcgtgca gacctgcgag	12960
cagggaaacg ctccctcac agacgcgttg aattgtcccc acgccgcgc cctgtagaga	13020
aataaaaaag gttaggattt gccactgagg ttcttctttc atatacttcc ttttaaaatc	13080
ttgctaggat acagtctca catcacatcc gaacataaac aaccatgggt aaggaaaaga	13140
ctcacgtttc gaggccgca ttaaattcca acatggatgc tgatttatat ggggtataaat	13200
gggctcgcga taatgtcggg caatcagggt cgacaatcta tcgattgtat gggaagcccc	13260
atgcgccaga gttgtttctg aaacatggca aaggtagcgt tgccaatgat gttacagatg	13320
agatgggtcag actaaactgg ctgacggaat ttatgcctct tccgaccatc aagcatttta	13380

tccgtactcc tgatgatgca tggttactca ccactgcat ccccgcaaa acagattcc	13440
aggtattaga agaatacct gattcagggtg aaaatatgt tgatgcatg gcagtgttc	13500
tgcgcgggtt gcattcgatt cctgtttgta attgtccttt taacagcgat cgcgtatttc	13560
gtctcgtca ggcgcaatca cgaatgaata acggtttggt tgatgcatg gattttgatg	13620
acgagcgtaa tggctggcct gttgaacaag tctggaaaga aatgcataag cttttgcat	13680
tctcaccgga ttcagtcgtc actcatgggtg atttctcact tgataacctt atttttgacg	13740
aggggaaatt aataggttgt attgatgttg gacgagtcgg aatcgagac cgataccagg	13800
atcttgccat cctatggaac tgccctgggtg agttttctcc ttcattacag aaacggcttt	13860
ttcaaaaata tggatattgat aatcctgata tgaataaatt gcagtttcat ttgatgctcg	13920
atgagttttt ctaatcagta ctgacaataa aaagattctt gttttcaaga acttgctatt	13980
tgtatagttt ttttatattg tagttgttct attttaatca aatgttagcg tgatttata	14040
tttttttcgc ctgacatca tctgccaga tgcgaagtta agtgcgcaga aagtaatc	14100
atgctcaat cgtatgtgaa tgctggctgc tatactgctg tgcattcgat actaacgccg	14160
ccatccagtg tcgaaaacga gctcgaattc atcgatcctt cgagattata tctaggaacc	14220
catcaggttg gtggaagatt acccgttcta agacttttca gcttctctta ttgatgttac	14280
acctggacac ccttttctg gcattcagtt tttaatcttc agtggcatgt gagattctcc	14340
gaaattaatt aaagcaatca cacaattctc tcggatacca cctcgggtga aactgacagg	14400
tggtttgtta cgcattgtaa tgcaaggag cctatatacc tttggctcgg ctgctgtaac	14460
agggaatata aagggcagca taatttagga gtttagtgaa cttgcaacat ttactatttt	14520
cccttcttac gtaaatatth tcttttttaa tctaaatca atcttttca attttttgtt	14580
tgtattcttt tcttgcttaa atctataact acaaaaaaca catacataa ctaaaaatga	14640
aagtcgcagt cctcggcgct gctggcggta ttggccaggc gcttgcaacta ctgttaaaaa	14700
cccaactgcc ttcaggttca gaactctctc tgatgatat cgctccagtg actcccgggtg	14760
tggctgtcga tctgagccat atccctactg ctgtgaaaat caaagggttt tctggtgaag	14820
atgcgactcc ggcgctggaa ggcgcagatg tctttcttat ctctgcaggc gtagcgcgta	14880
aaccgggtat ggatcgttcc gacctgttta acgttaacgc cggcatcgtg aaaaacctgg	14940
tacagcaagt tgcgaaaacc tgcccgaag cgtgcattgg tattatcact aaccgggtta	15000
acaccacagt tgcaattgct gctgaagtgc tgaaaaaagc cgggttttat gacaaaaaca	15060
aactgttcgg cgttaccacg ctggatatca ttcgttccaa cacctttgtt gcggaactga	15120

aaggcaaca gccaggcgaa gttgaagtgc cggttattgg cggtcactct ggtgttacca	15180
ttctgccgct gctgtcacag gttcctggcg ttagttttac cgagcaggaa gtggctgac	15240
tgaccaaacg catccagaac gcgggtactg aagtggttga agcgaaggcc ggtggcgggt	15300
ctgcaacctt gtctatgggc caggcagctg cacgttttgg tctgtctctg gttcgtgcac	15360
tgcagggcga acaaggcggt gtcgaatgtg cctacgttga aggcgacggt cagtacgcc	15420
gtttcttctc tcaaccgctg ctgctgggta aaaacggcgt ggaagagcgt aaatctatcg	15480
gtaccctgag cgcatttgaa cagaacgcgc tggaaggatg gctggatacg ctgaagaaag	15540
atatcgccct gggcgaagag ttcgtaata agtaagatta atataattat ataaaaatat	15600
tatcttcttt tctttatct tagtgttatg taaaataaat tgatgactac ggaaagcttt	15660
tttatattgt ttctttttca ttctgagcca cttaaatttc gtgaatgttc ttgtaaggga	15720
cggtagatctt acaagtata caacaaaaag caaggcgctt tttctaataa aaagaagaaa	15780
agcatttaac aattgaacac ctctatatca acgaagaata ttactttgtc tctaaatcct	15840
tgtaaaatgt gtacgatctc tatatgggtt actcataagt gtaccgaaga ctgcattgaa	15900
agtttatgtt ttttactgg aggcgtcatt ttccggttga gaagatgttc ttatccaaat	15960
ttcaactgtt atatagaaga gcaaaaatgc ttgcatttag tcgtgcaatg tatgacttta	16020
agattttgtg gcaggaagaa aaggagaaat cttctaacga taaacccttg aaaaactggg	16080
tagactacgc tatgttgagt tgctacgcag gctgcacaat tacacagaa tgctcccgc	16140
taggatttaa ggctaaggga cgtgcaatgc agacgacaga tctaatgac cgtgtcggtg	16200
aagtgttcgc caaacttttc ggttaacaca tgcagtgatg cacgcgcgat ggtgctaagt	16260
tacatatata tatatatata gccatagtga tgtctaagta acctttatgg tatatttctt	16320
aatgtggaaa gatactagcg cgcgcacca cacacaagct tcgtcttttc ttgaagaaaa	16380
gaggaagctc gctaaatggg attccacttt cgtttccctg ccagctgatg gaaaaaggtt	16440
agtgaacga tgaagaataa aaagagagat ccactgaggt gaaatttcag ctgacagcga	16500
gtttcatgat cgtgatgaac aatggtaacg agttgtggct gttgccaggg aggggtggtc	16560
tcaactttta atgtatggcc aaatcgctac ttgggtttgt tatataacaa agaagaaata	16620
atgaactgat tcttttctc cttcttgtcc ttctttaatt ctgttgtaat taccttctt	16680
tgtaattttt ttgttaatta ttcttcttaa taatccaaac aaacacacat attacaataa	16740
tgaatacagt acgcagcgaa aaagattcga tgggggcgat tgatgtcccg gcagataagc	16800
tgtggggcgc acaaaactca cgctcgtgag agcatttccg catttcgacg gagaaaatgc	16860
ccacctcact gattcatgcg ctggcgctaa ccaagcgcg agcggcaaaa gttaatgaag	16920
atttaggctt gttgtctgaa gagaaagcga gcgccattcg gcaggcggcg gatgaagtac	16980

tggcaggaca gcatgacgac gaattcccgc tggctatctg gcagaccggc tccggcacgc	17040
aaagtaacat gaacatgaac gaagtgtctg ctaaccgggc cagtgaatta ctccggcgcg	17100
tgcgcgggat ggaacgtaaa gttcaccta acgacgacgt gaacaaaagc caaagttcca	17160
acgatgtctt tccgacggcg atgcacgttg cggcgtctgt ggcgtgcgc aagcaactca	17220
ttccgcagct taaaacctg acacagacgc tgagtgaata atcgctgca ttgcccata	17280
tcgtcaaaat cggtcgaacc cacttgagg acgccacgcc gctaactg gggcaggaga	17340
tttccggctg ggtagcgatg ctcgagtata atctcaaca tatcgaatac agcctgcctc	17400
acgtagcgga actggctctt ggccgtacag cggtaggtac tggactaaat acccatccg	17460
agtatgcgcg tcgcgtagca gatgaactgg cagtcattac ctgtgcaccg ttgtttaccg	17520
cgccgaacaa atttgaagcg ctggcgacct gtgatgtctt ggttcaggcg cacggcgct	17580
tgaagggtt ggctgcgtca ctgatgaaaa tcgccaatga tgtccgtgg ctggcctctg	17640
gccccgcgtg cggaatttgt gaaatctcaa tcccggaaaa tgagccgggc agctcaatca	17700
tgccggggaa agtgaatcca acacagtgtg aggcattaac catgctctgc tgtcaggta	17760
tggggaacga cgtggcgatc aacatggggg gcgcttcgg taactttgaa ctgaacgtct	17820
tccgtccaat ggtgatccac aatttcctgc aatcggtgcg cttgttgga gatggcatgg	17880
aaagttttaa caaacactgc gcagtgggta ttgaaccgaa tcgtgagcga atcaatcaat	17940
tactcaatga atcgctgatg ctggtgactg cgcttaacac ccacatttgt tatgacaaag	18000
ccgcggagat cgccaaaaa gcgcataaag aagggtgac cttaaaagct gcggcccttg	18060
cgctggggta tcttagcgaa gccgagtttg acagctgggt acggccagaa cagatggteg	18120
gcagtatgaa agccgggcgt taaa	18144