

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7644581号  
(P7644581)

(45)発行日 令和7年3月12日(2025.3.12)

(24)登録日 令和7年3月4日(2025.3.4)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	Z N A
C 1 2 N	15/90	(2006.01)	C 1 2 N	15/90	1 0 2 Z
C 1 2 P	7/56	(2006.01)	C 1 2 P	7/56	
C 1 2 N	15/31	(2006.01)	C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	15/53	(2006.01)	C 1 2 N	15/53	

請求項の数 6 (全18頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-170131(P2020-170131)	(73)特許権者	507268341 エスケー イノベーション カンパニー リミテッド 大韓民国 0 3 1 8 8 ソウル ジョンノク ジョン - ロ 2 6
(22)出願日	令和2年10月7日(2020.10.7)	(74)代理人	110000084 弁理士法人アルガ特許事務所
(65)公開番号	特開2021-58184(P2021-58184A)	(72)発明者	チェ・ヨン パク 大韓民国、3 4 1 2 4、デジョン、ユソ ン - グ、エキスボ - ロ、3 2 5
(43)公開日	令和3年4月15日(2021.4.15)	(72)発明者	テ・ヨン リー 大韓民国、3 4 1 2 4、デジョン、ユソ ン - グ、エキスボ - ロ、3 2 5
審査請求日	令和5年9月27日(2023.9.27)	(72)発明者	キ・スン リー 大韓民国、3 4 1 2 4、デジョン、ユソ 最終頁に続く
(31)優先権主張番号	10-2019-0124701		
(32)優先日	令和1年10月8日(2019.10.8)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		
微生物の受託番号	KCTC KCTC 13508BP		

(54)【発明の名称】 乳酸代謝及びアルコール生成の抑制された組み換え耐酸性酵母及びこれを用いた乳酸の製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

韓国生命工学研究院生物資源センターに K C T C 1 3 5 0 8 B P として寄託された耐酸性酵母 Y B C 菌株から乳酸をピルビン酸に転換する酵素をコードする配列番号 1 又は配列番号 2 の塩基配列を有する遺伝子が欠失又は弱化され、

アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子及び / 又はピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子が欠失され、

乳酸脱水素酵素をコードする配列番号 7 の塩基配列を有する遺伝子が導入されている、乳酸生成能を有する、組み換え菌株。

【請求項 2】

前記乳酸脱水素酵素をコードする配列番号 7 の塩基配列を有する遺伝子は前記乳酸をピルビン酸に転換する酵素をコードする配列番号 1 又は配列番号 2 の塩基配列を有する遺伝子と置換して導入され、前記乳酸をピルビン酸に転換する酵素をコードする配列番号 1 又は配列番号 2 の塩基配列を有する遺伝子のプロモーターによって調節されることを特徴とする、請求項 1 に記載の組み換え菌株。

【請求項 3】

( a ) 請求項 1 又は 2 に記載の組み換え菌株を培養して乳酸を生成させる段階と、

( b ) 前記生成された乳酸を取得する段階と、

を含む、乳酸の製造方法。

【請求項 4】

乳酸をピルビン酸に転換する酵素活性を有し、配列番号 3 又は配列番号 4 のアミノ酸配列で表示される、タンパク質をコードする、遺伝子。

【請求項 5】

配列番号 1 又は配列番号 2 で表示されることを特徴とする、請求項 4 に記載の遺伝子。

【請求項 6】

配列番号 5 又は配列番号 6 で表示される塩基配列を有する、乳酸をピルビン酸に転換する酵素をコードする遺伝子のプロモーター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸代謝及びエタノール生産の抑制された組み換え耐酸性酵母及びこれを用いた乳酸の製造方法に関するもので、より詳しくは乳酸消費反応を抑制し乳酸生成能を付与して、乳酸生成能が向上し、エタノール生成が抑制された組み換え耐酸性酵母及びこれを用いた乳酸の製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

伝統的な乳酸生産工程は乳酸菌を用いて生産し、乳酸菌によって生成される乳酸の蓄積による菌株死滅あるいは成長停止を防止するために、多様な形態の Ca 塩 / Mg 塩又はアンモニアのような中和剤を用いて pH を中性 pH である 6 ~ 8 に調整しながら発酵を進める。発酵が終了すれば微生物を分離することになり、塩形態では水からの分離及びラクチドへの転換が難しいから、硫酸を添加して乳酸塩を乳酸に転換させながら Ca 塩は CaSO<sub>4</sub> 形態にして除去することになる。このような過程は、乳酸よりも多くの量の副産物である CaSO<sub>4</sub> が発生し、工程経済性を落とすことになる。

【0003】

ポリ乳酸 (PLA) は、乳酸をラクチドに転換し、これを開環重合することにより製造される生分解性ポリマーであり、その原料である乳酸は発酵によって生産している。PLA は使い捨て食品容器に広範囲に使うことができ、単独あるいは組成物又は共重合体の形態で自動車産業を含む多様な産業的プラスチックとしても使用可能な強度を有している。また、最近では 3D プリンティングにも使われる代表的なポリマーであり、特に 3D プリンターの使用の際に有害ガス発生及び匂い発生が少ない環境に優しいポリマーである。

一方、乳酸は L 型と D 型の光学異性体を有している。L 型を主に生産する乳酸菌の場合にも約 5 ~ 10 % の D 型を一緒に生産する場合が多く、D 型を主に生産する菌株の場合は D 型及び L 型を一緒に生産する形態と D 型とエタノールを一緒に生産する形態として存在するなどの多くの多様性を有している微生物群がある (非特許文献 1)。

【0004】

PLA は、発酵によって乳酸を生産した後、生産された乳酸を精製工程によってラクチドに転換する工程で製造されることが一般的である。ラクチド転換のためには、乳酸を水素化形態に転換する工程が必要であり、一般的な中性発酵のための pH は 6 ~ 7 であるので、多量の硫酸を用いて酸性 pH に転換することになる。この過程で多量の中和塩が発生し、このような中和塩を除去するための工程投資費とともに中和塩の低価値によって経済性が低下する。

一方、自然界で乳酸を生産する乳酸菌 (*Lactobacillus*) の場合、乳酸を商業的に生産するためには、多量の高価栄養分を培地として使わなければならない、このような過量の栄養分成分は後段工程の重合工程又はラクチドを中間体とする場合にはラクチド転換工程に大きな障害を与えるため、高収率、高純度のポリマー又はその前駆体を得るためには、吸着、蒸留、イオン交換のような精製工程コストを必要として、やはり高い生産費の原因となる。このような問題を解決するための方法として、酵母を用いた研究が提示された。酵母の場合、低価の栄養分を使っても円滑に成長 / 発酵を進められることが知られており、酸性に対する耐性も高いと知られている。

【0005】

10

20

30

40

50

酸性でよく育つ酵母（以下、耐酸性酵母）を用いて乳酸を生産する場合、発酵の際に中和剤を用いて培地をpH 6～7に維持する必要がないから、発酵工程が単純になり、さらに後段の中和剤を除去する精製工程が不要になる。また、酵母は代謝に必要な多くの成分を自ら作るから、細菌、特に乳酸菌に比べて栄養水準が低い培地でも培養が可能であるので、多くの後段精製工程を省略することができ、生産コストを大きく低下させることができる。

しかし、酵母を用いる乳酸生産技術に対して前提条件がある。それは、商業化に適用するためには菌株発酵性能の指標である収率、生産性、乳酸の濃度が乳酸菌の性能に類似した水準に高く維持されなければならないという前提条件がある。

酵母を使った耐酸性乳酸製造の技術開発が試みされているが、実際的には発酵に中和反応を伴ってpHを乳酸のpKa値以上である3.7以上に維持して発酵をする場合に高性能の発酵能を現す場合が多いから、実際的な耐酸性技術と表現しにくく、工程での生産コスト節減の効果を得ることも難しい（非特許文献2）。

10

したがって、工程コストを節減することができる耐酸性酵母は、中和剤を使わないか最小量で使いながら発酵液のpHがpKa値以下で発酵を終えなければならない、発酵の3大指標が乳酸菌と類似した水準を達成するときのみ商業的適用の意味がある。

一般的に、グルコースを発酵すれば、酵母はエタノールを主生産物として代謝し、乳酸を生産する場合は非常に稀である。また、高耐酸性を有している微生物から乳酸を生産する菌株を選択する確率が非常に低いから、本発明者らは耐酸性に優れた酵母菌株を選別し、選別された菌株から、遺伝工学的な方法で乳酸生産能を有しながらもエタノール生成能が抑制された菌株を製造しようとした。

20

よって、本発明者らは乳酸生産能を有しながらもエタノール生成能が抑制された耐酸性菌株を製造しようと鋭意努力した結果、耐酸性酵母から乳酸をピルビン酸に転換する反応に関与する遺伝子を除去し、乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子を追加的に導入した組み換え菌株を作製し、前記組み換え菌株を用いて乳酸を製造すると、乳酸生成能が向上し、エタノール生成能が遮断されることを確認して本発明を完成するに至った。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】Ellen I. Garvie, Microbiological Reviews, 106-139, 1980

30

【文献】Michael Sauer et al., Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 27:229-256, 2010

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、乳酸生成能が増加しながらエタノール生成能が減少した組み換え耐酸性酵母を提供することにある。

本発明の他の目的は、前記組み換え耐酸性酵母を用いて乳酸を製造する方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、前記耐酸性酵母由来の乳酸をピルビン酸に転換する酵素活性を有する遺伝子を提供することにある。

40

本発明のさらに他の目的は、乳酸生成能を有する組み換え菌株の製作に使うことができる乳酸によって遺伝子発現を誘導することができるプロモーターを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前記目的を達成するために、本発明は、耐酸性酵母YBC菌株（KCTC13508BP）から乳酸をピルビン酸に転換する酵素をコードする遺伝子が欠失又は弱化され、乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入されている乳酸生成能を有する組み換え菌株を提供する。

また、本発明は、耐酸性酵母YBC菌株（KCTC13508BP）から、乳酸をピル

50

ピン酸に転換する酵素をコードする遺伝子である g 2 9 4 7 遺伝子、アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子である g 4 4 2 3 遺伝子及びピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子である g 3 0 0 2 遺伝子が欠失され、乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入されている乳酸生成能を有する組み換え菌株を提供する。

また、本発明は、( a ) 前記組み換え菌株を培養して乳酸を生成させる段階と、( b ) 前記生成された乳酸を取得する段階とを含む乳酸の製造方法を提供する。

また、本発明は、乳酸をピルビン酸に転換する酵素活性を有し、配列番号 3 又は配列番号 4 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子を提供する。

また、本発明は、乳酸をピルビン酸に転換する酵素活性を有し、配列番号 3 又は配列番号 4 のアミノ酸配列を有するタンパク質を提供する。

10

また、本発明は、配列番号 5 又は配列番号 6 で表示される塩基配列を有する g 2 9 4 7 遺伝子のプロモーターを提供する。

#### 【発明の効果】

##### 【 0 0 0 9 】

本発明による組み換え耐酸性酵母はエタノール生成を抑制して細胞内乳酸がピルビン酸に転換されることを抑制し、LDH 酵素を強く発現して乳酸を高収率で生産することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【 0 0 1 0 】

【図 1】本発明において Y B C 菌株又は Y B C 2 菌株のゲノムから g 2 9 4 7 遺伝子を削除し LDH 遺伝子を挿入するために使用する削除カセットを示した図である。

20

【図 2】Y B C 2 菌株と Y B C 4 菌株の培養結果を示した図である。

【図 3】Y B C 4 菌株の発酵プロファイルを示した図である。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【 0 0 1 1 】

他に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術的及び科学的用語は本発明が属する技術分野で熟練した専門家によって通常的に理解されるものと同じ意味を有する。一般に、本明細書で使用する命名法は当該技術分野でよく知られており、通常に使われるものである。

##### 【 0 0 1 2 】

30

耐酸性酵母は、酸性 pH でも糖を速い速度で消耗し、高い成長率を示し、発酵条件では消耗した糖を産物に転換する特徴を有する。本発明者らはこのような特徴を有する酵母から多くの酵母ライブラリーを介して耐酸性酵母 Y B C 菌株 ( K C T C 1 3 5 0 8 B P ) を選別した。耐酸性酵母 Y B C 菌株 ( K C T C 1 3 5 0 8 B P ) は乳酸濃度が 4 0 g / L ~ 8 0 g / L の条件でも高い成長性及び糖消費速度を示す菌株である。前記耐酸性酵母 Y B C 菌株を対象として乳酸生成能を高め、エタノール生成能を低下させるための代謝回路調節を実施することにより、アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子及びピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子が欠失され、乳酸脱水素酵素遺伝子が導入された Y B C 菌株から、乳酸をピルビン酸に転換する酵素をコードする遺伝子を欠失させて組み換え菌株を作製し、前記組み換え菌株が高い乳酸生成能を有しながらエタノール生成能が抑制されることを確認した。

40

##### 【 0 0 1 3 】

したがって、本発明は、一観点で、耐酸性酵母 Y B C 菌株 ( K C T C 1 3 5 0 8 B P ) において乳酸をピルビン酸に転換する酵素をコードする遺伝子を欠失又は弱化させ、乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子を導入することによって得られる、乳酸生成能を有する組み換え菌株に関するものである。

Y B C 菌株 ( K C T C 1 3 5 0 8 B P ) の乳酸消費反応を抑制するためには 2 種の方法を考慮することができる。一番目は乳酸を外部から細胞内に導入されるトランスポータを捜し、これを除去することであり、二番目は乳酸をピルビン酸に転換する酵素 ( L a c t a t e d e h y d r o g e n a s e ) を捜し、これを除去する方法である。トランスポ

50

一タの場合、多くの *monocarboxylase transporter family* が研究されている。このうち、代表的に多く研究された酵母の場合、A dy 2 J e n 1 などが外部から乳酸を移送する役割を担当することが知られている (Ref: Antonio P acheco et al., FEMS Yeast Res. 12 (2012) 375-381)。しかし、本発明のように耐酸性菌株を活用した発酵の場合、このようなトランスポータによる移送とともに外部の低 pH によって乳酸の大部分は、培養条件及び発酵液組成によって違うが、pH 3 では約 80% ~ 90% 程度が乳酸である水素化した形態として存在し、このような乳酸は電荷のない状態で前記トランスポータによる移送ではなくて細胞膜を直接物質移動して細胞の内部に移送されることが知られている (Minoska Valli et al., Appl Environ Microbio., 72:5492, 2006)。また、モノカルボン酸トランスポータの中には細胞の内部から外部に解離した塩を移送する役割をして細胞の酸ストレスを緩和する役割をする場合もあるので、このようなトランスポータの種類によっては乳酸によるストレスをむしろ高めることができる可能性もある。

10

したがって、本発明は、トランスポータの除去によって内部への乳酸輸送を抑制する効果が大きくないと判断し、直接細胞内部の乳酸をピルビン酸に転換する反応を主に担当する酵素を除去した菌株を作製した。

酵母において乳酸をピルビン酸に転換する酵素 / 遺伝子として、L - 乳酸については C Y B 2 遺伝子、D - 乳酸については D L D 1 遺伝子が知られており (Guiard, B., EMBO J., 4:3265, and 1985; Lodi, T., and Ferrero, I., Mol. Gen. Genet., 238:315, 1993)、それぞれミトコンドリア膜で該当する乳酸をピルビン酸に変換する機能を有している。

20

また、L - 乳酸に関連した C Y B 2 を除去する場合、生産された乳酸の消費を抑制して乳酸の発酵収率を高めることができるという報告に基づいて C Y B 2 をターゲット遺伝子として設定した (Aki Ookubo et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 72:3063, 2008)。

#### 【 0 0 1 4 】

本発明の一様態では、Y B C 菌株から主 A D H 遺伝子である g 4 4 2 3 遺伝子を除去し、前記 g 4 4 2 3 の位置にラクトバチルス プランタルム由来の配列番号 2 8 の L D H 遺伝子を導入し、g 3 0 0 2 遺伝子 (以下、g 3 0 0 2 - 1 遺伝子という) を除去し、前記 g 3 0 0 2 遺伝子の位置に L D H 遺伝子を導入した組み換え菌株 Y B C 2 と、組み換え菌株 Y B C 2 からさらに g 2 9 4 7 遺伝子を除去するとともに L D H 遺伝子を導入した組み換え菌株 Y B C 4 とを作製し、前記組み換え菌株を培養した結果、乳酸生成能が向上し、エタノール生産能が減少することを確認した。

30

本発明において、前記乳酸をピルビン酸に転換する酵素をコードする遺伝子は g 2 9 4 7 遺伝子であってもよい。

本発明において、前記 g 2 9 4 7 遺伝子は配列番号 1 又は配列番号 2 の塩基配列を有するものであってもよい。

本発明において、前記組み換え菌株はアルコール脱水素酵素をコードする遺伝子 (A D H 遺伝子) が追加に欠失されていることを特徴としてもよく、前記アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子は g 4 4 2 3 遺伝子であってもよい。

40

本発明において、前記組み換え菌株は前記 A D H 遺伝子の代わりに L D H 遺伝子が追加的に導入されていてもよい。

本発明において、前記組み換え菌株はピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子 (P D C 遺伝子) が追加的に欠失されていることを特徴としてもよく、前記ピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子は g 3 0 0 2 遺伝子であってもよい。

本発明において、前記組み換え菌株は前記 P D C 遺伝子の代わりに L D H 遺伝子が追加的に導入されていてもよい。

本発明において、前記乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子は g 2 9 4 7 遺伝子と置換して導入され、g 2 9 4 7 遺伝子のプロモーターによって調節されてもよい。

本発明において、前記 g 2 9 4 7 遺伝子の欠失又は弱化によって母菌株である Y B C 菌

50

株 ( K C T C 1 3 5 0 8 B P ) より乳酸生成能が増加し、エタノール生成能が減少又は遮断されていてもよい。

本発明において、前記導入される乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子は L . h e l v e t i c u s 由来 L D H 遺伝子、R . o r y z a e 由来 L D H 遺伝子又は L . p l a n t a r u m 由来 L D H 遺伝子であることが好ましく、より好ましくは L . p l a n t a r u m 由来 L D H 遺伝子であることが好ましい。

【 0 0 1 5 】

したがって、本発明は、他の観点で、耐酸性酵母 Y B C 菌株 ( K C T C 1 3 5 0 8 B P ) から乳酸をピルビン酸に転換する酵素をコードする遺伝子である g 2 9 4 7 遺伝子、アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子である g 4 4 2 3 遺伝子及びピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子である g 3 0 0 2 遺伝子を欠失させ、乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子を導入することにより得られる、乳酸生成能を有する組み換え菌株に関するものである。

10

本発明において、前記乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子は、g 2 9 4 7 遺伝子、g 4 4 2 3 遺伝子及び g 3 0 0 2 遺伝子のいずれか一つ以上の遺伝子と置換されて導入され、置換された遺伝子のプロモーターによって調節されてもよい。

【 0 0 1 6 】

本発明の一様態では、Y B C 4 菌株 ( g 4 4 2 3 : : l d h / g 3 0 0 2 - 1 : : l d h / g 2 9 4 7 : : l d h ) が Y B C 2 菌株 ( g 4 4 2 3 : : l d h / g 3 0 0 2 - 1 : : l d h ) に比べて乳酸発酵収率が著しく増加したことを確認した。一方、エタノール発酵収率は Y B C 4 菌株が Y B C 2 菌株に比べて 9 0 % 以上減少し、全ての炭素フラックス ( C a r b o n f l u x ) がエタノールから乳酸に転換されたことが分かった。これから乳酸の収率が理論値の 8 4 % まで高くなったことを確認した ( 表 2 及び図 2 参照 ) 。

20

したがって、本発明は、他の観点で、( a ) 前記組み換え菌株を培養して乳酸を生成させる段階と、( b ) 前記生成された乳酸を取得する段階とを含む乳酸の製造方法に関するものである。

本発明によって乳酸生産性が大きく増加し、エタノール生産が大きく減少した優れた耐酸性菌株を確保することができる。

【 0 0 1 7 】

さらに他の観点で、本発明は、乳酸をピルビン酸に転換する活性を有するタンパク質をコーディングし、配列番号 1 又は配列番号 2 の塩基配列と 9 0 % の相同性を有する遺伝子に関するものである。

30

さらに他の観点で、本発明は、乳酸をピルビン酸に転換する活性を有し、配列番号 3 又は配列番号 4 で表示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子に関するものである。

本発明において、前記遺伝子は配列番号 1 又は配列番号 2 の塩基配列で表示されるものであってもよい。

【 0 0 1 8 】

さらに他の観点で、本発明は、乳酸をピルビン酸に転換する活性を有し、配列番号 3 又は配列番号 4 で表示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に関するものである。

40

さらに他の観点で、本発明は、配列番号 5 又は配列番号 6 で表示される塩基配列を有する g 2 9 4 7 遺伝子のプロモーターに関するものである。

本発明の g 2 9 4 7 遺伝子 ( C Y B 2 ) のプロモーターは、本発明による組み換え酵母において乳酸を生成する菌株で自ら発現を誘導して L D H 遺伝子を発現させることができ、これは高濃度グルコースの条件で培養初期に強く発現し、一般的な該当過程条件で強く発現するプロモーターとは違う性格のプロモーターで培養後期に L D H 遺伝子を発現させて細胞の乳酸生成能を持続的に維持させることができる特性を有するプロモーターであり、高効率の乳酸生産菌株の製作のための有用性が高い。

【 0 0 1 9 】

50

本発明において、‘耐酸性酵母’とは、有機酸のpKa値未満のpHで、培地に有機酸が含有されていない場合に比べ、培地に1M以上の有機酸（特に、乳酸）が含有された場合、少なくとも10%のバイオマス消耗率（糖消耗率など）又は少なくとも10%の比生長率を維持することができる酵母と定義する。より具体的に、本発明で、‘耐酸性酵母’とは、pH5以上の場合に比べ、pH2~4で少なくとも10%のバイオマス消耗率（糖消耗率など）又は少なくとも10%の比成長率を維持することができる酵母と定義する。

本発明による組み換え酵母は、通常の方法によって前記遺伝子を宿主酵母の染色体上に挿入させるか、前記遺伝子を含むベクターを宿主酵母に導入させることによって製造することができる。

前記宿主酵母は、DNAの導入効率が高く、導入されたDNAの発現効率が高い宿主細胞が通常的に使われ、本発明の一実施例では耐酸性酵母を用いたが、これに限定されるものではなく、目的DNAが十分に発現することができるものであればどの種類の酵母でもよい。

前記組み換え酵母は、任意の形質転換方法によって製造することができる。“形質転換”とは、DNAを宿主に導入して、DNAが染色体の因子として又は染色体統合完成によって複製可能にし、外部のDNAを細胞内に導入して人為的に遺伝的な変化を引き起こす現象を意味し、一般的な形質転換方法には、電気穿孔法、酢酸リチウム-PEG法などがある。

#### 【0020】

また、本発明で遺伝子を宿主微生物の染色体上に挿入する方法としては、通常知られた任意の遺伝子操作方法を使うことができる。一例として、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ポキスウイルスベクター、レンチウイルスベクター、非ウイルス性ベクターなどを用いる方法がある。“ベクター”は適した宿主内でDNAを発現させることができる適合した調節配列に作動可能に連結されたDNA配列を含むDNA製造物を意味する。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子又は簡単に潜在的ゲノム挿入物であることができる。適当な宿主に形質転換されれば、ベクターは宿主ゲノムと無関係に複製し機能することができるか、又は一部の場合にゲノム自体に統合されることができる。プラスミドが現在ベクターの最も通常的に使われる形態であり、また線形化DNAも酵母のゲノム統合のために通常的に使用する形態である。

典型的なプラスミドベクターは、(a)宿主細胞当たりプラスミドベクターを含むように複製が効率的になるようにする複製開始点、(b)プラスミドベクターに形質転換された宿主細胞がスクリーニングされるようにする抗生剤耐性遺伝子又は栄養要求性マーカー遺伝子、及び(c)外来DNA切片が挿入されるようにする制限酵素切断部位を含む構造を有している。適切な制限酵素切断部位が存在しなくても、通常の方法による合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーを使えば、ベクターと外来DNAを容易にライゲーションすることができ(Gibson assembly)、必要によっては所望の全体配列を合成して使用方法も通常的に用いられている。

#### 【0021】

また、前記遺伝子は、他の核酸配列と機能的関係で配置されるとき、“作動可能に連結(operably linked)”される。これは、適切な分子(例えば、転写活性化タンパク質)が調節配列(等)に結合されるとき遺伝子発現ができるようにする方式で連結された遺伝子及び調節配列(等)であることができる。例えば、前配列又は分泌リーダーに対するDNAはポリペプチドの分泌に関与する前タンパク質として発現する場合、ポリペプチドに対するDNAに作動可能に連結され、プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼす場合、コーディング配列に作動可能に連結されるか；リボソーム結合部位は、配列の転写に影響を及ぼす場合、コーディング配列に作動可能に連結されるか；又はリボソーム結合部位は、翻訳を容易にするように配置される場合、コーディング配列に作動可能に連結される。

一般的に、“作動可能に連結された”とは、連結されたDNA配列が接触し、また分泌リ

10

20

30

40

50

ーダーが接触し、リーディングフレーム内に存在することを意味する。しかし、エンハンサーは接触する必要がない。これらの配列の連結は便利な制限酵素部位でライゲーション（結紮）によって遂行される。そのような部位が存在しない場合、通常の方法による合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーを使う。

もちろん、全てのベクターが本発明のDNA配列を発現するのに同等な機能を発揮せず、同様に全ての宿主が同じ発現システムに対して同じ機能を発揮しない。しかし、当業者であれば過度な実験的負担なしに、本発明の範囲を逸脱しない範囲内で、互いに異なる種々のベクター、発現調節配列及び宿主の中で適切に選択して適用することができる。例えば、ベクターを選択する際には宿主を考慮しなければならない。これは、ベクターがその内部で複製されなければならないからであり、ベクターの複製数、複製数を調節することができる能力及び当該ベクターによってコードされる他のタンパク質、例えば抗生剤マーカ-の発現も考慮しなければならない。

10

#### 【0022】

本発明において、炭素源は、グルコース、キシロース、アラビノース、スクロース、フルクトース、セルロース、ガラクトース、グルコースオリゴマー及びグリセロールからなる群から選択された1種以上とすることができるが、これに限定されるものではない。

本発明において、培養は、微生物、例えば大腸菌などがそれ以上作用することができないように（例えば、代謝体生産不可）する条件で行うことができる。例えば、培養は、pH 1.0 ~ 6.5、好ましくpH 1.0 ~ 6.0、より好ましくは2.6 ~ 4.0であることを特徴とすることができるが、これに限定されるものではない。

20

#### 【実施例】

#### 【0023】

以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明する。これらの実施例はもっぱら本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されるものと解釈されないことは当該分野で通常の知識を有する者にとって明らかである。

#### 【0024】

実施例1：耐酸性酵母菌株YBCのゲノム内の乳酸消費遺伝子分析

本発明者らは、多様な酵母菌株に対するテストによって耐酸性を有する菌株を選別し、酵母菌の培養初期に乳酸を培地に添加し、微生物の成長及び糖消費速度を確認しながら耐酸性が最も優れた菌株であるYBC菌株を選定し、韓国生命工学研究院生物資源センターにKCTC13508BPとして寄託した。

30

系統分析によって、YBC菌株(KCTC13508BP)は*S. cerevisiae*と類似した菌株であり、2倍体の遺伝子を有しており、Crab-tree positive特性があることを確認した。

Genome Full sequencing Dataにおいて、*S. cerevisiae*及びBioinformatics情報を用いてYBC菌株のゲノムに存在するL-乳酸をピルビン酸に転換する酵素をコードする遺伝子であるCYB2でannotationされた遺伝子としてg2947とg3864を確認した。

*S. cerevisiae*のCYB2遺伝子に対し、タンパク質ドメイン分析(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)を遂行すれば、*S. cerevisiae*のCYB2遺伝子はCytochrome b5 family、heme-binding domain profile、FMN-dependent alpha-hydroxy acid dehydrogenase domain profileの特性を有している。g2947遺伝子に対して同じ分析を遂行した結果、Cytochrome b5 family、heme-binding domain profile、FMN-dependent alpha-hydroxy acid dehydrogenase domain profileのように*S. cerevisiae*のCYB2遺伝子と同じ特性を示し、g3864遺伝子の場合にはheme-binding domain profileがないことが示され、CYB2特性を有しにくいことが判断された。また、*S. cerevisiae*のゲノム上でCYB2遺伝子付近のORFを分析した結果、CMP2-I

40

50

MD4 - SPC2 - CYB2 - YML054c - AのORFが順次配置されており、g2947があるYBC菌株のscaffold 41にもこれと同じ部位があるので、このようなORFが保存された領域として存在する可能性も示した。よって、g2947遺伝子（配列番号1と配列番号2）及びそのタンパク質（配列番号3と配列番号4）を除去することができる削除カセットを作製した。

また、本実施例では、これを削除（欠失）のみさせるカセットとともにg2947の固有プロモーターを用いて、乳酸を生成させる酵素であるL. plantarum由来乳酸脱水素酵素（LDH）遺伝子を発現することができるカセットと一緒にデザインした（図1）。削除カセットは図1に示し、該当制限酵素部位又は抗生剤耐性遺伝子の選択及び抗生剤耐性遺伝子の除去方式は関連業界によく知られた方式であり、多様に変形して使うことができる。

10

#### 【0025】

実施例2：乳酸消耗遺伝子が除去された組み換え耐酸性酵母菌株の作製

CYB2遺伝子であると予想されるg2947遺伝子をゲノムから除去するための対象耐酸性酵母菌株は野生型菌株ではない既存の野生型に主ADH（アルコール脱水素酵素）遺伝子を除去するとともにLDH遺伝子を導入したYBC1菌株から追加的にg3002-1遺伝子（PDC遺伝子）を除去するときにLDHが発現した菌株であり、エタノール8生成能が封鎖され、乳酸を高効率で生産するYBC2菌株である。前記YBC2菌株からg2947遺伝子を除去しながら（Diploid菌株でAllele1及びAllele2を全部除去）2copyのL. plantarum由来LDH遺伝子が発現するようにした菌株（YBC4）を作製し、当該菌株の遺伝子型を確認するために、下記の表1のプライマーを作製した後、当該菌株のゲノムDNAから確認した。

20

#### 【0026】

前記菌株の作製方法は次のとおりである。

前記YBC1菌株はYBC菌株の主ADH遺伝子であるg4423遺伝子を除去し、前記g4423の位置にラクトバチルス プランタルム由来の配列番号7のLDH遺伝子を導入した菌株であり、g4423及びこれらのUTRの情報に基づいて各遺伝子のORFを除去し、5'及び3'UTR及び抗生剤マーカがある遺伝子カセットを作製してドナー（Donor）DNAとして使った。g4423の各alleleに対し、相応する5'UTRは配列番号8及び配列番号9で示し、3'UTRは配列番号10及び配列番号11に示した。ドナー（Donor）DNAの作製には、前述したように制限酵素を用いたクローニング方法とGibson assembly、遺伝子合成を用いた方法を使用した。g4423のORF部位に配列番号7のLDHを合成してから導入してドナーDNAを作製し、これをYBCに導入して組み換え菌株YBC1を作製した。

30

また、g3002-1遺伝子はYBC菌株のゲノムにおいてスカフォールド72位置にある遺伝子であり、PDC遺伝子として作動する遺伝子である。YBC1菌株のg3002-1遺伝子（スカフォールド72に位置する遺伝子）を除去し、配列番号7のLDH遺伝子を導入して組み換え菌株YBC2を作製した。

特に、このようなg3002の遺伝子を置換するためにUTRを用いて作製した。前記のYBC1のg4423遺伝子（ADH）部位にLDHを導入する方法と同様に、g3002-1のUTRを用いて作製した。ただ、当該遺伝子の置換では、過程の単純化のためにallele variationを考慮せず、一つのalleleを対象としてドナーカセットを作製したが、allele別に作製も可能である。また、遺伝子置換に使用するプライマーに対しても、前記の欠失菌株作製に使用したプライマー以外に次のようにg3002-1のUTRとLDHと一緒に確認することができるプライマー対を別に使用して遺伝子置換確認の正確度を高めた。

40

g3002-1 UTR-LDH-fw d: GCAGGATATCAGTTGTTTG  
（配列番号12）

g3002-1 UTR-LDH-rev: AATACCTTGTTGAGCCATA  
G（配列番号13）

50

【0027】

前記菌株の作製方法は次のようである。

前記YBC4菌株は、YBC2菌株のCYB2遺伝子であるg2947遺伝子を除去し、前記g2947位置にラクトバチルス プラントルム由来の配列番号7のLDH遺伝子を導入した菌株であり、g2947遺伝子はYBC菌株のゲノムにおいてスカフォールド41位置にある遺伝子である。g2947及びこれらのUTRの情報を基にして、各遺伝子のORFが除去され、5'及び3'UTR及び抗生剤マーカがある遺伝子カセットを作製してドナー(Donor)DNAとして使った。g2947の各alleleに対し、相応する5'UTRは配列番号5及び配列番号6で示し、3'UTRは配列番号14及び配列番号15で示した。ドナーDNAの製作には、前述したように制限酵素を用いたクローニング方法とGibson assembly、遺伝子合成を用いた方法を使った。

10

ただ、当該遺伝子の置換では過程の単純化のためにallele variationを考慮せずの一つのalleleを対象としてドナーカセットを作製したが、allele別に作製も可能である。また、遺伝子置換に使用するプライマーに対しても前記の欠失菌株の製作に使用したプライマー以外に、次の表1のようにg2947のUTRとLDHと一緒に確認することができるプライマー対を別に使用して遺伝子置換確認の正確度を高めた。

【0028】

【表1】

g2947導入確認用プライマーセット

20

名前	該当配列
G2947ORF確認用プライマー	CTAGTTGTGGTTCCTTGTAT (配列番号16) GAAAATAAATCCGATGGTGC (配列番号17)
G2947ORF確認用プライマー2 <sup>nd</sup> set	TGTTTGACTGTTCGATATGG (配列番号18) GAAAATAAATCCGATGGTGC (配列番号19)
G2947UTR確認用プライマー	TGTTTGACTGTTCGATATGG (配列番号20) GAAGATTGAAAGGGTCAGT (配列番号21)
G2947LDH導入確認用プライマー	GACTAATCACCCAACTCTCA (配列番号22) ATCGCCGAGGTACTAGAG (配列番号23)

30

【0029】

前記作製した組み換え菌株の遺伝型は次の通りである。

YBC2 : g4423 : : ldh / g3002 - 1 : : ldh

YBC4 : g4423 : : ldh / g3002 - 1 : : ldh / g2947 : : ldh

40

【0030】

実施例3 : YBC2菌株からCYB2遺伝子が欠失されLDHが導入された組み換えYBC菌株において乳酸生成及びエタノール生成阻害効果の確認

実施例2で作製した組み換え菌株YBC2とYBC4に対し、接種ODは0.5にし、YP培地(20g/Lペプトン、10g/L酵母エキス)にグルコース6%を使い、100mlのフラスコで、30、175rpmの条件で4時間培養した後、125rpmの条件で培養した。

【0031】

50

【表 2】

## YBC 2とYBC 4の培養結果

	収率 (g/g)						生産性 (g/L/hr)	pH
	乳酸	エタノール	グリセロール	酢酸	ピルビン酸	コハク酸		
YBC 2	0.66	0.083	0.03	0.002	0.002	0.01	1.31	2.74
YBC 4	0.84	0.004	0.03	0	0.002	0.005	1.55	2.59

10

## 【0032】

その結果、表 2 及び図 2 に示したように、YBC 4 菌株は YBC 2 菌株に比べて乳酸発酵収率が著しく増加した。一方、エタノール発酵収率は YBC 4 菌株が YBC 2 菌株に比べて 90% 以上減少して全ての炭素フラックスがエタノールから乳酸に転換されたことが分かり、これから乳酸の収率が理論値の 84% まで高くなったことが分かる。一般的に、中性発酵において、乳酸の収率は菌株成長に消費される炭素を除けば約 90% から 94% までの高収率を示すことができる。しかし、耐酸性菌株では、外部から細胞膜を介して拡散する非解離形態の乳酸流れがあり、内部生成乳酸と外部から流入する乳酸によるストレスを減少させるために、外部にトランスポーターによる輸送が必要である。このような輸送において、外部乳酸濃度が低濃度の場合には単純パーミアーズ形態の輸送が可能である。この場合には ATP の消費が不要であるが、外部乳酸の濃度が高くなれば、濃度勾配に逆行して乳酸を輸送するためにエネルギーが必要であり、この過程で ATP を消費することになる (Antonius J. A. van Maris et al., *Metabolic Engineering* 6: 245, 2004)。このような ATP の消費は不可避に追加の炭素損失を引き起こすことになり、現在まで中和剤を使わないか最小限に使用して pH 3 以下で 50 g/L の高濃度の乳酸を生産しながら収率 0.8 以上を示した結果は本発明が唯一である。

20

## 【0033】

g 2947 の本来の役割である乳酸消費に対し、培養終了後にグルコースがないときに乳酸が消費されるかを確認した結果、YBC 2 菌株は既存の結果と同様に徐々に乳酸がなくなることが分かったが、g 2947 遺伝子が欠失された YBC 4 菌株は乳酸の低減が観察されなかったため、g 2947 遺伝子は CYB 2 遺伝子であることを確認することができた。

30

## 【0034】

YBC 4 菌株の性能において最も著しいことは乳酸の収率増加とともにエタノール生成の完全遮断にある。その間に報告された CYB 2 遺伝子の除去効果に対して、生成された乳酸が発酵後半にグルコース濃度が低くなっても消費されてなくなることで乳酸の一部の収率が増加するという報告があり、収率の増加も pKa 以上の pH では示していないが pH 3.5 でのみ 19.3% から 28.6% に増加する傾向を示した (Aki Ookubo et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72:3063, 2008)。しかし、本実施例は、乳酸の消費遮断とともに高い乳酸生成収率を示す菌株 (YBC 2) の追加によってドラマチックな増加とともにエタノール生成が完全に遮断された結果を示した。この理由については次のように説明することができる。一番目は、CYB 2 遺伝子がミトコンドリア膜で乳酸をピルビン酸に転換させながら追加のピルビン酸を供給することができ、このピルビン酸はエタノールに転換可能であるので、これから生成されるエタノールは CYB 2 遺伝子を除去して抑制することができる。特に、当該菌株の遺伝子型では主 ADH と主 PDC のみ除去した状態であるから、ミトコンドリアで役割する ADH3 を含む補助 ADH と補助 PDC によって少量のエタノールが生成されると思われる。二番目は、CYB 2 の位置に導入された LDH の追加発現によって YBC 菌内部の LDH が強化し、これからピルビン酸から乳酸になる経路は、ピルビン酸からエタノールになる経路が既に弱くなった状態で、よ

40

50

り選択的であり、エタノールの収率が減少したと思われる。これらの両効果が一緒に発生してエタノール生成が完全に遮断されることができると判断される。

【0035】

実施例4：野生型YBC菌株からCYB2遺伝子が欠失されLDHが導入された組み換えYBC菌株において乳酸生成及びエタノール生成阻害効果の確認

実施例3の結果によってg2947遺伝子除去及びLDH発現による乳酸生成能の増加とエタノール生成能の低下を確認したが、母菌株として使用したYBC2菌株がADCとPDC遺伝子が欠失された菌株であるので、前記結果はg2947遺伝子以外の遺伝子の除去による複合効果によって生じたものである。

したがって、野生型菌株であるYBC菌株からg2947遺伝子のみ除去しながらLDHを発現した菌株を作製し、その乳酸生成能及びエタノール生成阻害を確認した。組み換え菌株の作製に使用したカセット及び遺伝型確認のために使用したプライマーは図1及び表1に示したものを使用し、実施例2に示した方法で製作した。

YBC菌株からg2947遺伝子が除去され、LDHが挿入された菌株はYBC\_\_aと名付け、遺伝型は次の通りである。

YBC\_\_a : g2947 : : ldh

前記組み換え菌株を、接種OD値を0.5程度にし、mYP培地(5g/Lペプトン、4g/L酵母エキス、5g/LKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2g/LMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.15g/Lウラシル)にグルコース6%を使い、500mlフラスコに50ml培養体積で、30、125rpmで培養した。

また、さらに乳酸による誘導効果を観察するために、初期乳酸濃度を11.5g/Lで培養初期に培養液に注入してから培養した。

【0036】

【表3】

YBC\_\_a菌株の乳酸とエタノールの収率

	収率 (g/g)	
	乳酸	エタノール
野生型	0	0.44
YBC__a	0.02	0.37
YBC__a、初期乳酸添加	0.09	0.35

【0037】

表3に示したように、YBC\_\_a菌株の場合、野生型菌株の一般的なエタノール収率である0.43~0.45g/gに比べて収率が低くなり、CYB2遺伝子除去によるエタノール収率減少効果を確認することができた。また、おもしろいことに、CYB2遺伝子の位置に導入されたLDH遺伝子のみでは乳酸をほとんど生産することができないことが分かり、これはCYB2のプロモーターが一般的な発酵条件であるグルコースの存在の下で乳酸がなければ発現することができないことを示し、また乳酸が生成されなかったにもかかわらず生成されるエタノールの減少効果があることを示す結果である。CYB2遺伝子の発現誘導効果を確認するために培養初期の培養液に乳酸を添加する場合、この乳酸が細胞の内部に物質移動又は活性移動し、この細胞内乳酸によってCYB2プロモーターが反応し、CYB2位置に置換されたLDH遺伝子を発現させて乳酸の収率が増加し、追加エタノールの収率が減少することを確認することができた。

【0038】

CYB2プロモーターは乳酸を生成する菌株で自ら発現を誘導してLDH遺伝子を発現させることができる。これは、高濃度グルコースの条件で培養初期に強く発現し、一般的な該当過程条件で強く発現するプロモーターとは違う性格のプロモーターであり、培養後

10

20

30

40

50

期にLDH遺伝子を発現させて細胞の乳酸生成能を持続的に維持させることができる特性を有するプロモーターであり、高効率の乳酸生産菌株の製作に有用性が高い。g 2 9 4 7 遺伝子のプロモーター部位は配列番号5と配列番号6で示した。

【0039】

CYB2除去効果は、先行文献と比較する場合、本発明の効果の優秀性がより明らかであり、以前の研究では低いpHでだけ一部の乳酸収率の増加があったという報告が記述されたが、本発明のようにエタノール低減に対する明示はない(Aki Ookubo et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 72:3063, 2008)。Natureworksの特許WO2007117282号及びUS8,137,953B号では、I.orientalisから乳酸を生成する菌株を作製し、この菌株のCYB2を除去した菌株を開発した。ここで、CYB2除去前、pH3で0.35g/L/hrの速度、56g/Lの濃度69%の収率の乳酸を生産する菌株が、CYB2除去の後、0.43g/L/hrの速度、66g/L濃度67%収率で乳酸を生産した。乳酸の生産濃度は増加したが収率はむしろ減少する結果を示し、副産物としてグリセロールも増加する結果を示した。また、三星総合技術院のUS9,353,388B号の特許では、乳酸を生産する微生物を作製し、CYB2遺伝子を除去するか(該当特許の表3のSP1002性能評価)、除去と同時にLDH遺伝子を発現する微生物を作製した(該当特許の表4のsp1003とsp1002にJen1及びA dy 2過発現効果参照)。ここで、乳酸の生産濃度が大きく増加する効果を確認した。しかし、前記特許でもエタノールの完全遮断効果についての明示はないので、本発明のYBC菌株でのCYB2遺伝子除去及びLDH遺伝子発現による効果は非常に優秀であると言える。

10

20

【0040】

実施例5：YBC1菌株からCYB2遺伝子を除去するときにLDHを発現する菌株の作製及び性能評価

前記YBC4の結果は、YBC菌株から主ADH(g4423)及び主PDC(g3002-1)が除去された菌株からg2947遺伝子を除去し、LDH遺伝子を追加的に挿入して乳酸生成及びエタノール生成能阻害を確認したものである。ここで、ADH遺伝子とg2947遺伝子のみの複合効果について確認するための組み換え菌株を作製し、発酵能を確認した。

ADH(g4423)及びg2947を除去し、LDH遺伝子を挿入した組み換え菌株は、実施例2で使用したカセット及びプライマーセットを使用して実施例2と同様な方法で作製した。

30

作製された組み換え菌株はYBC\_\_bと名付け、遺伝型はつぎの通りである。

YBC\_\_b : g4423 : : ldh / g2947 : : ldh

前記組み換え菌株を、接種OD値は0.5程度にし、mYP培地(5g/Lペプトン、4g/L酵母エキス、5g/LKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2g/LMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.15g/Lウラシル)にグルコース10%を使い、500mlのフラスコに60ml培養体積で30、150rpmで培養した。この培養は初期グルコース濃度が高いから生成される乳酸によるpH低下が高くて成長阻害が予想されるので、40%CaCO<sub>3</sub>溶液を2回にかけて1mlずつ注入して最終pHをpH3程度に調節した。また、比較のためにYBC4菌株を同一条件で培養した。

40

【0041】

## 【表 4】

YBC\_\_b 菌株の乳酸及びエタノール収率の比較

	収率 (g/g)		
	乳酸	エタノール	グリセロール
YBC__b	0.73	0.023	0.06
YBC1	0.59	0.093	0.045
YBC4	0.81	0.002	0.04

10

## 【0042】

その結果、表 4 に示したように、YBC\_\_b 菌株は、エタノール生成が遮断された YBC4 菌株に比べ、エタノールを生成し、乳酸収率が落ちることが分かる。これは、YBC\_\_b 菌株の主 PDC (g3002-1) が活性状態であるからピルビン酸で LDH と PDC が互いに競争する状態であり、これからエタノールが生成されると判断される。しかし、YBC1 (g4423::ldh) 菌株のエタノール収率が 0.07~0.1 g/g 程度であることを考慮すれば、YBC\_\_b 菌株のエタノール収率は著しく低くて (0.023 g/g)、g2947 遺伝子欠失による効果は依然として確認することができる。

## 【0043】

実施例 6 : YBC2 菌株から CYB2 遺伝子のみ除去した菌株の作製及び性能評価

前記 YBC4 菌株の結果は主 ADH (g4423) 及び主 PDC (g3002-1) が除去された菌株に対して g2947 遺伝子の除去及び LDH の挿入による乳酸生成能の増加及びエタノール生成能遮断を確認したものであり、ここで LDH の発現を除いた効果を確認するために、YBC2 菌株から g2947 遺伝子のみ除去した組み換え菌株を作製し、その発酵能を確認した。

組み換え菌株は、実施例 2 で使用したカセット及びプライマーセットを使用して実施例 2 と同様な方法で作製した。LDH 発現がないから、表 1 の 'G2947LDH 導入確認用プライマー' は使わなかった。

作製された組み換え菌株は YBC\_\_c と名付け、遺伝型は次の通りである。

YBC\_\_c : g4423::ldh / g3002-1::ldh / 2947

前記組み換え菌株を、接種 OD 値は 0.5 程度にし、mYP 培地 (5 g/L ペプトン、4 g/L 酵母エキス、5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.15 g/L ウラシル) にグルコース 10% を使い、500 ml フラスコに 60 ml 培養体積で 30、150 rpm で培養した。この培養は、初期グルコース濃度が高いから、生成される乳酸による pH 低下が大きくて成長阻害が予想されるので、40%  $\text{CaCO}_3$  溶液を 2 回にかけて 1 ml ずつ注入して最終 pH を pH3 程度に調節した。また、比較のために YBC4 菌株を同一条件で培養した。

## 【0044】

## 【表 5】

YBC\_\_c 菌株の乳酸及びエタノール生産収率の確認

	収率 (g/g)		
	乳酸	エタノール	グリセロール
YBC__c	0.73	0.044	0.05
YBC4	0.81	0.002	0.04

40

## 【0045】

50

その結果、表 5 に示したように、YBC 4 菌株と比較するとき、YBC\_\_c 菌株はLDHの未発現によるエタノールと乳酸の収率影響は同一であり、表 1 のYBC 2 と比較するときには、g 2 9 4 7 遺伝子の除去による効果もずっと確認可能であった。

【0046】

実施例 7：YBC 4 菌株の初期接種濃度による生産性増加効果の確認

一般的に、発酵で初期接種濃度を高める場合、収率及び生産性の増加を予想することができる。YBC 4 菌株にも同一方法を適用してその効果を確認した。

YBC 4 の同一種菌培養で蒸留水と混合して接種ODを0.5から2まで変化させた。mYP培地(5g/Lペプトン、4g/L酵母エキス、5g/LKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2g/LMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.15g/Lウラシル)にグルコース8.7%を使い、500mlフラスコに55.5ml培養体積で30、150rpmで培養した。

【0047】

【表6】

初期接種濃度によるYBC 4 菌株の収率及び生産性の比較

	収率 (g/g)			生産性 (g/L/hr)	pH
	乳酸	エタノール	グリセロール		
OD 0.5	0.81	0.009	0.04	1.83	2.6
OD 1	0.81	0.012	0.04	2.06	2.6
OD 1.5	0.81	0.008	0.04	2.09	2.6
OD 2	0.80	0.007	0.04	2.13	2.6

【0048】

その結果、表 6 に示したように、初期接種OD値の増加による生産性増加を確認することができたが、収率の変化はほとんどなかった。これは、最終ODが10程度に到達するために消費される炭素の比が前記の初期ODの差によって大きな変動がないと思われる。

前記培養結果を、既存に報告されたpH 3以下の耐酸性酵母の乳酸生産結果の中で最も優れた代表的な二つの結果と比較して表 7 に示した。

【0049】

【表7】

YBC 4 菌株と先行特許の耐酸性酵母の乳酸生産収率及び生産性の比較

	乳酸収率 (g/g)	生産性 (g/L/hr)	乳酸濃度 (g/L)	pH
US 2009/0053782A1号	0.80	1.68	70	3
WO 2005/052174A2号	0.79	0.73	53.8	2.75
実施例 7	0.81	2.1	70	2.6

(US 2009/0053782A号は濃度明示性能を基準とし、WO 2005/052174Aは注入量当たり収率を基準として示す)

【0050】

表 7 に示したように、YBC 4 菌株の乳酸生産性が最も高いことが分かる。

【0051】

実施例 8：YBC 4 菌株の発酵性能の評価

YBC4 菌株をフラスコ培養ではないバイオリアクターで培養して乳酸発酵性能を確認した。

接種ODを1にし、mYP培地(5g/Lペプトン、4g/L酵母エキス、5g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.15g/Lウラシル)にグルコース12%を使って培養を始め、 $\text{CaCO}_3$  溶液を間欠的に注入してpHをpH3程度に維持するようにした。2.5L培養液に30、450rpm、Air0.1vvmで注入して培養した。

その結果、図3に示したように、YBC4 菌株はバイオリアクター内で短時間に全てのグルコースを消費しながら乳酸を生産することを確認することができ、最終pH3.3で乳酸収率が0.8(g/g)、生産性2.0g/L/hr、生産乳酸濃度98.1g/Lを示した。また、今後初期OD及び培養条件の改善によって性能の追加改善も可能であると思われる。

10

#### 【0052】

以上で本発明の特定部分を詳細に説明したが、当該分野の通常の知識を有する者にとってこのような具体的技術はただ好ましい実施態様であり、これによって本発明の範囲が制限されるものではない点は明らかであろう。よって、本発明の実質的な範囲は添付する特許請求の範囲とそれらの等価物によって定義されると言える。

20

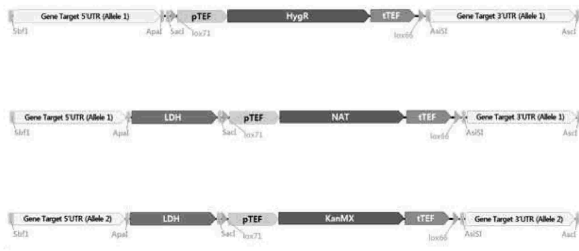
30

40

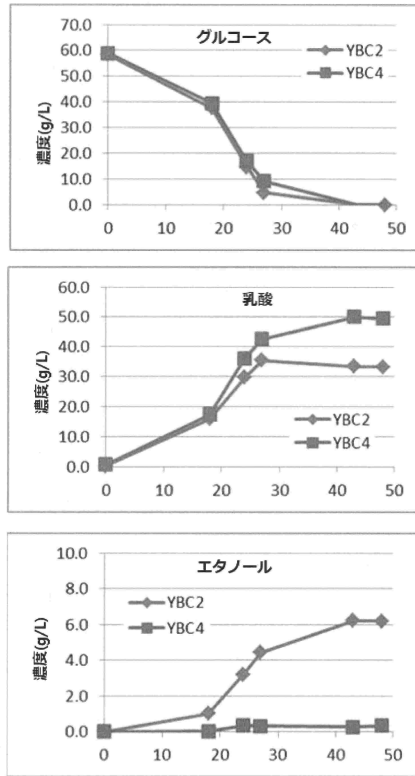
50

【 図面 】

【 図 1 】



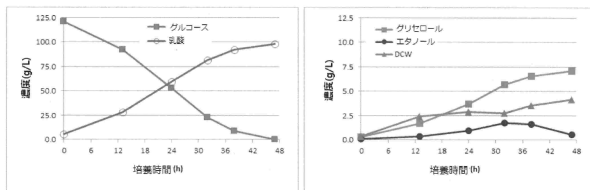
【 図 2 】



10

20

【 図 3 】



30

【 配列表 】

0007644581000001.app

40

50

---

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I  
C 1 2 N 15/113(2010.01) C 1 2 N 15/113 Z

ン - グ、エキスポ - ロ、3 2 5

審査官 團野 克也

(56)参考文献 欧州特許出願公開第 0 2 8 7 3 7 2 5 ( E P , A 1 )  
米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 3 3 3 8 0 ( U S , A 1 )  
米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 0 2 4 4 8 4 ( U S , A 1 )

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)  
I P C C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
D B 名 B I O S I S / M E D L I N E  
/ E M B A S E / C A P l u s ( S T N )