

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0051705 (43) 공개일자 2012년05월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/19 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01) C12P 7/56 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01)		(71) 출원인 아사히 가라스 가부시카가이샤 일본 도쿄도 지요다쿠 마루노우치 1초메 5방 1고
(21) 출원번호 10-2012-7004318		(72) 발명자 하마 유코 사망 하라 후토시 일본 1008405 도쿄도 치요다쿠 유라쿠초 1-12-1 아사히 가라스 가부시카가이샤 내 도다 히데끼 일본 1008405 도쿄도 치요다쿠 유라쿠초 1-12-1 아사히 가라스 가부시카가이샤 내
(22) 출원일자(국제) 2010년08월17일 심사청구일자 없음		(74) 대리인 장수길, 이석재
(85) 번역문제출일자 2012년02월20일		
(86) 국제출원번호 PCT/JP2010/063888		
(87) 국제공개번호 WO 2011/021629 국제공개일자 2011년02월24일		
(30) 우선권주장 JP-P-2009-192271 2009년08월21일 일본(JP)		

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **형질 전환체 및 그의 제조 방법, 및 락트산의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은, 스킨조사카로마이세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe)를 숙주로 하고, 락트산 탈수소 효소 유전자가 조합되고, 또한 상기 스킨조사카로마이세스 폼베 숙주의 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군의 일부가 결실 또는 실활되어 있는, 형질 전환체에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

스키조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)를 숙주로 하고, 락트산 탈수소 효소 유전자가 조합되고, 또한 상기 스키타조사카로마이세스 폼베 숙주의 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군의 일부가 결실 또는 실활되어 있는 형질 전환체.

청구항 2

제1항에 있어서, 결실 또는 실활되어 있는 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자가 PDC2 유전자인 형질 전환체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 락트산 탈수소 효소 유전자가 포유 동물의 락트산 탈수소 효소 유전자인 형질 전환체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 락트산 탈수소 효소 유전자가 스키타조사카로마이세스 폼베의 염색체에 조합되어 있는 형질 전환체.

청구항 5

스키조사카로마이세스 폼베를 숙주로 하고, 스키타조사카로마이세스 폼베 내에서 기능하는 프로모터와 터미네이터와 락트산 탈수소 효소 유전자를 포함하는 발현 카세트를 갖는 벡터를 사용하여, 상기 발현 카세트를 상기 숙주에 도입하여 형질 전환체를 얻는 단계 및

상기 숙주로서 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군의 일부가 결실 또는 실활된 숙주를 사용하거나 또는 상기 얻어진 형질 전환체의 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군의 일부를 결실 또는 실활시키는 단계

를 포함하는, 락트산 탈수소 효소 유전자가 조합되고 또한 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군의 일부가 결실 또는 실활되어 있는 형질 전환체의 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 벡터가 스키타조사카로마이세스 폼베의 염색체에 대하여 상동 재조합을 행하게 하는 재조합 부위를 더 갖고, 이 벡터를 사용하여 발현 카세트를 스키타조사카로마이세스 폼베의 염색체에 도입하는, 형질 전환체의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 숙주의 염색체에 있어서의 상동 재조합을 행하게 하는 표적 부위가 트랜스포존 유전자 Tf2인, 형질 전환체의 제조 방법.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자로서 PDC2 유전자를 결실 또는 실활시킨 스키타조사카로마이세스 폼베를 숙주로 하는, 형질 전환체의 제조 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 락트산 탈수소 효소 유전자가 포유 동물의 락트산 탈수소 효소 유전자인, 형질 전환체의 제조 방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 형질 전환체를 배양액 중에서 배양하고, 상기 배양액으로부터 락트

산을 취득하는 락트산의 제조 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 농도 1 내지 50질량%의 글루코오스를 포함하는 배양액을 사용하여 배양을 행하는, 락트산의 제조 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 형질 전환체에 의해 생산되는 락트산에 의해 상기 배양액의 pH가 3.5 이하로 된 후에 재차 배양을 계속하는, 락트산의 제조 방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양액 중의 형질 전환체의 초발 균체 농도를 0.1 내지 50 그램(건조 균체 환산)/리터로 하는, 락트산의 제조 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형질 전환체에 의해 생산된 배양액 중의 락트산을 중화하지 않고 배양을 계속하는, 락트산의 제조 방법.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형질 전환체에 의해 생산된 배양액 중의 락트산을 중화하지 않고, 배양액으로부터 락트산을 분리하는, 락트산의 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 형질 전환체 및 그의 제조 방법, 및 락트산의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 락트산은 식품 용도나, 의료, 화장품 등의 화학 원료 용도에 널리 사용되고 있다. 또한, 락트산을 사용하여 얻어지는 폴리락트산은, 미생물 등에 의해 최종적으로 이산화탄소와 물로까지 분해되는 생분해성 플라스틱으로서 주목받고 있다. 그로 인해, 락트산을 저렴하고 높은 생산성으로 제조하는 것이 필요하다.

[0003] 락트산의 제조 방법으로서, 유산균에 의해 당을 발효시켜 제조하는 생물학적 방법이 알려져 있다. 그러나, 유산균은 내산성이 낮기 때문에, 이 방법으로 높은 생산성을 얻기 위해서는 발효에 의해 생산되는 락트산을 알칼리에 의해 중화하여 락트산염으로 할 필요가 있다. 이러한 알칼리에 의한 중화는, 락트산염으로부터 락트산으로 복귀시키는 공정이 필요해지기 때문에, 제조 공정이 번잡해지고 제조 비용도 높아진다.

[0004] 따라서, 알칼리에 의한 중화를 행하지 않고 락트산을 얻는 방법으로서, 사카로미세스속(屬)의 효모 등의 내산성 미생물을 숙주로 하고, 상기 내산성 미생물에 락트산 탈수소 효소를 코딩하는 유전자를 도입한 형질 전환체를 사용하는 방법(특허문헌 1), 락트산 탈수소 효소를 코딩하는 유전자가 도입되고, 또한 피루브산 탈탄산 효소 1을 코딩하는 유전자를 결실(缺失) 또는 실활(失活)시킨 사카로미세스 세레비시에(출아 효모)를 사용하는 방법(특허문헌 2)이 기재되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 일본 특허 공개 제2001-204464호 공보

(특허문헌 0002) 일본 특허 공개 제2008-48726호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 그러나, 특허문헌 1의 방법은, 20 내지 24시간의 배양 시간에서도 2 내지 5%의 락트산이 얻어지는 정도이며, 생산성이 충분하지 않았다. 또한, 특허문헌 2의 방법은, 락트산을 대량 생산하는 경우에는 알칼리에 의한 중화가 필요해지기 때문에, 공업적인 락트산의 대량 생산에는 적합하지 않았다. 그로 인해, 알칼리에 의한 중화를 행하지 않고, 높은 생산성으로 락트산을 제조할 수 있는 방법이 요망되고 있다.
- [0007] 따라서, 본 발명에서는, 알칼리에 의한 중화를 필요로 하지 않고 높은 생산성으로 락트산을 생산할 수 있는 스킨조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)의 형질 전환체 및 상기 형질 전환체의 제조 방법을 목적으로 한다. 또한, 고농도의 당 존재 하에서의 락트산 생산에 적합하고, 또한 고밀도 발효에도 적합한, 형질 전환체 및 상기 형질 전환체의 제조 방법을 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 상기 형질 전환체를 사용하여, 알칼리에 의한 중화 공정을 행하지 않고 높은 생산성으로 락트산을 제조하는 방법을 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명에 있어서, 락트산이란 생물학적 방법으로 얻어지는 L-락트산을 의미한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 형질 전환체는, 스킨조사카로마이세스 폼베를 숙주로 하고, 락트산 탈수소 효소 유전자가 조합되고, 또한 상기 스킨조사카로마이세스 폼베 숙주의 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군의 일부가 결실 또는 실활되어 있다.
- [0011] 또한, 본 발명의 형질 전환체에 있어서는, 상기 결실 또는 실활되어 있는 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자가 PDC2 유전자인 것이 바람직하다. 상기 락트산 탈수소 효소 유전자는 포유 동물의 락트산 탈수소 효소 유전자인 것이 바람직하다. 또한, 상기 락트산 탈수소 효소 유전자는 스킨조사카로마이세스 폼베의 염색체에 조합되어 있는 것이 바람직하다.
- [0012] 또한, 본 발명의 형질 전환체의 제조 방법은, 스킨조사카로마이세스 폼베를 숙주로 하고, 스킨조사카로마이세스 폼베 내에서 기능하는 프로모터와 터미네이터와 락트산 탈수소 효소 유전자를 포함하는 발현 카세트를 갖는 벡터를 사용하여, 상기 발현 카세트를 상기 숙주에 도입하여 형질 전환체를 얻는 단계 및 상기 숙주로 하여 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군의 일부가 결실 또는 실활된 숙주를 사용하거나 또는 상기 얻어진 형질 전환체의 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군의 일부를 결실 또는 실활시키는 단계를 포함하는, 락트산 탈수소 효소 유전자가 조합되고 또한 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군의 일부가 결실 또는 실활되어 있는 형질 전환체를 제조하는 방법이다.
- [0013] 또한, 상기 벡터는 스킨조사카로마이세스 폼베의 염색체에 대하여 상동 재조합을 행하게 하는 재조합 부위를 더 갖고, 이 벡터를 사용하여 발현 카세트를 스킨조사카로마이세스 폼베의 염색체에 도입하는 것이 바람직하다. 또한, 숙주의 염색체에 있어서의 상동 재조합을 행하게 하는 표적 부위가 트랜스포존 유전자 Tf2인 것이 바람직하다.
- [0014] 또한, 본 발명의 방법에 있어서는, 상기 결실 또는 실활되어 있는 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자가 PDC2 유전자인 것이 바람직하다. 상기 락트산 탈수소 효소 유전자는 포유 동물의 락트산 탈수소 효소 유전자인 것이 바람직하다.
- [0015] 또한, 본 발명은, 상기 형질 전환체를 배양액 중에서 배양하고, 상기 배양액으로부터 락트산을 취득하는 락트산의 제조 방법이다.
- [0016] 또한, 이 락트산의 제조 방법에 있어서, 농도 1 내지 50질량%(2 내지 16질량%가 더 바람직하다)의 글루코오스를 포함하는 배양액을 사용하여 배양을 행하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 형질 전환체에 의해 생산되는 락트산에 의해, 상기 배양액의 pH가 3.5 이하로 된 후에 재차 배양을 계속하는 것이 바람직하다.
- [0017] 또한, 상기 배양액 중의 형질 전환체의 초발 균체 농도를 0.1 내지 50그램(건조 균체 환산)/리터로 하는 것이 바람직하다(또한 0.2 내지 40그램(건조 균체 환산)/리터가 바람직하다). 또한, 상기 형질 전환체에 의해 생산된 배양액 중의 락트산을 중화하지 않고 배양을 계속하는 것이 바람직하고, 또한 배양액 중의 락트산을 중화하지 않고 배양액으로부터 락트산을 분리하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 스키토사카로마이세스 폼베의 형질 전환체는, 알칼리에 의한 중화를 필요로 하지 않고 높은 생산성으로 락트산을 생산할 수 있다. 또한, 고농도의 당, 특히 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스의 존재 하에서의 락트산 생산에 적합하고, 또한 고밀도 배양에도 적합하다. 또한, 본 발명의 형질 전환체의 제조 방법에 의해, 상기 형질 전환체를 간편하게 얻을 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 락트산의 제조 방법은, 알칼리에 의한 중화 공정을 행하지 않고 높은 생산성으로 락트산을 제조할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] [형질 전환체]

[0021] 본 발명의 형질 전환체는, 스키토사카로마이세스 폼베(이하, S.폼베라고도 한다)를 숙주로 하고, 락트산 탈수소 효소 유전자가 조합되고, 또한 S.폼베 숙주의 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군의 일부가 결실 또는 실활되어 있는, 형질 전환체이다.

[0022] <S.폼베>

[0023] 숙주인 S.폼베는, 시조사카로미세스속에 속하는 효모(분열 효모)이며, 다른 효모에 비하여 특히 내산성이 우수한 미생물이다. 본 발명자들은, S.폼베가 사카로미세스 세레비시에 등의 다른 효모에 비해, 고농도의 글루코오스 하에서의 락트산의 생산성이 우수하고, 고밀도 배양(대량의 효모를 사용한 배양)에도 적합한 것을 발견하여, S.폼베의 형질 전환체를 사용함으로써, 지극히 높은 생산성으로 락트산을 제조할 수 있는 것을 발견했다.

[0024] 또한, S.폼베의 염색체의 전체 염기 배열은, 산가 연구소의 데이터베이스 「GeneDB」에 「Schizosaccharomyces pombe Gene DB(<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>)」로서 수록되어, 공개되어 있다. 본 명세서에 기재된 S.폼베의 유전자의 배열 데이터는 상기 데이터베이스로부터 유전자명이나 상기 계통명으로 검색하여, 입수할 수 있다.

[0025] 본 발명에 사용되는 S.폼베는, 내산성을 갖는 것이면 특별히 한정되지 않는다.

[0026] S.폼베는, 공적 혹은 민간의 의탁 기관, 즉 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA), National Collection of Yeast Cultures(NCYC, Norwich, United Kingdom), NITE Biological Resource Center(NBRC, 일본 지바현 기사라즈시), 효모 유전 자원 센터(YGRC, 일본 오사카 시립 대학 대학원 이학 연구과 내) 등으로부터 입수 가능하다.

[0027] <피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자>

[0028] S.폼베에 있어서의 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자(피루브산 탈탄산 효소 유전자, 이하 「PDC 유전자」라고도 한다)군에는, 피루브산 탈탄산 효소 1을 코딩하는 유전자(이하, 「PDC1 유전자」라고 한다), 피루브산 탈탄산 효소 2를 코딩하는 유전자(이하, 「PDC2 유전자」라고 한다), 피루브산 탈탄산 효소 3을 코딩하는 유전자(이하, 「PDC3 유전자」라고 한다), 피루브산 탈탄산 효소 4를 코딩하는 유전자(이하, 「PDC4 유전자」라고 한다)의 4종류가 있다. 그 중에서도, S.폼베에 있어서는, PDC2 유전자와 PDC4 유전자가 주요한 기능을 갖는 PDC 유전자이다. 각 PDC 유전자의 계통명은 이하와 같다.

[0029] PDC1 유전자(Pdc1); SPAC13A11.06

[0030] PDC2 유전자(Pdc2); SPAC1F8.07c

[0031] PDC3 유전자(Pdc3); SPAC186.09

[0032] PDC4 유전자(Pdc4); SPAC3G9.11c

[0033] 상기 PDC 유전자의 배열 데이터는, 상기 S.폼베 유전자 데이터베이스로부터 유전자명이나 계통명으로 검색하여 입수할 수 있다.

[0034] 야생형 S.폼베에서는, 해당계(解糖系)에 의해 글루코오스를 피루브산까지 대사하고, 전술한 PDC 유전자로부터 발현되는 피루브산 탈탄산 효소에 의해 피루브산이 아세트알데히드로 변환되고, 계속하여 상기 아세트알데히드가 알코올 탈수소 효소에 의해 에탄올로 변환됨으로써 에탄올 발효가 행해진다. 또한, 야생형 S.폼베는 기능을 갖는 락트산 탈수소 효소 유전자를 갖고 있지 않는 것보다, 피루브산으로부터 락트산이 생성되는 루트는

존재하지 않는다.

- [0035] 한편, 조합된 락트산 탈수소 효소 유전자로부터 발현되는 락트산 탈수소 효소는, 피루브산을 락트산으로 환원함으로써 락트산을 생산시킨다. 그로 인해, 야생형 S.폼베에 락트산 탈수소 효소 유전자를 조합하여 락트산을 생산할 수 있도록 해도, 그 상태에서는 에탄올 발효와 유산 발효의 양쪽을 행하는 것이기 때문에, 락트산의 생산성이 충분히 높아지지 않는다.
- [0036] 본 발명의 형질 전환체는, 상기 피루브산 탈탄산 효소를 코딩하는 유전자군 중, 일부가 결실 또는 실활된 염색체를 갖는다. 형질 전환체의 PDC 유전자군의 일부가 결실 또는 실활되어 있음으로써, 형질 전환체의 에탄올 발효의 효율이 저하되어, 에탄올로 변환되는 피루브산량이 적어지기 때문에, 락트산의 생산성이 향상된다. 단, PDC 유전자군을 완전히 결실 또는 실활시키면, 에탄올 발효를 전혀 행할 수 없게 되어 생육이 저해되기 때문에, 결실 또는 실활시키는 것은 PDC 유전자군의 일부로 한다.
- [0037] 결실 또는 실활시키는 PDC 유전자는, PDC2 유전자인 것이 특히 바람직하다. PDC2 유전자는, 특히 주요한 기능을 갖는 PDC 유전자이다.
- [0038] 전술한 바와 같이, PDC 유전자를 모두 결실 또는 실활시켜 버리면, 그 형질 전환체는 에탄올 발효를 행할 수 없게 되기 때문에 생육이 저해된다. 그로 인해, PDC 유전자의 결실 또는 실활은, 생육에 필요한 에탄올 발효능을 남기고 충분한 형질 전환체량이 얻어지도록 하면서, 에탄올 발효능을 저하시켜 락트산의 발효 효율을 향상시키도록 행해야 한다. 이 과제에 대하여 본 발명자들이 검토를 행한 결과, PDC2 유전자를 결실 또는 실활시키면 PDC4 유전자가 어느 정도 활성화되어, 충분한 형질 전환체량이 얻어질 정도의 에탄올 발효능과, 높은 발효 효율에 의한 락트산의 생산을 양립할 수 있는 것을 발견하였다.
- [0039] PDC 유전자의 결실이나 실활은, 공지의 방법으로 행할 수 있다. 예를 들어, Latour법(Nucleic Acids Res지, 2006년, 34권, e11페이지, 국제 공개 제2007/063919호 팜플렛 등에 기재)을 사용함으로써 PDC 유전자를 결실시킬 수 있다.
- [0040] 또한, PDC 유전자의 염기 배열의 일부에 결실, 삽입, 치환, 부가를 일으킴으로써, 상기 PDC 유전자를 실활시킬 수도 있다. 이들 결실, 삽입, 치환, 부가에 의한 이변은, 그들 중 어느 1개만을 일으켜도 좋고, 2개 이상을 일으켜도 좋다.
- [0041] PDC 유전자의 일부에 상기 이변을 도입하는 방법은 공지의 방법을 사용할 수 있다.
- [0042] 예를 들어, 이변제를 사용한 돌연변이 분리법(효모 분자 유전학 실험법, 1996년, 학회 출판 센터)이나, PCR(폴리메라아제 연쇄 반응)을 이용한 랜덤 이변법(피씨알 메서드 어플리케이션(PCR Methods Appl.), 1992년, 제2권, p.28-33.) 등을 들 수 있다.
- [0043] 또한, 일부에 이변이 도입된 PDC 유전자는, 온도 감수성의 이변형 피루브산 탈탄산 효소를 발현하는 것이어도 좋다. 온도 감수성의 이변형 피루브산 탈탄산 효소란, 어떤 배양 온도에 있어서는 야생형의 피루브산 탈탄산 효소와 동등한 활성을 나타내지만, 특정한 배양 온도 이상으로 되면 활성의 소실 또는 저하가 보이는 효소이다.
- [0044] 이러한 이변형 피루브산 탈탄산 효소를 발현하는 돌연변이주는, 활성이 제한되지 않는 온도 조건 하에서는 야생형 효모와 동등한 생육 속도를 나타내다가, 활성이 제한되는 특정한 온도 조건 하에서 생육 속도가 현저하게 저하되는 것을 선택함으로써 얻을 수 있다.
- [0045] <숙주>
- [0046] PDC 유전자가 결실 또는 실활된 S.폼베의 변이체는, 본 발명의 형질 전환체를 제조하기 위한 숙주로서 사용할 수 있다. 또한, PDC 유전자 이외에 추가로 PDC 유전자 이외의 특정 유전자를 결실 또는 실활시킨 S.폼베를 숙주로 할 수도 있다. PDC 유전자 이외의 특정 유전자를 결실 또는 실활시킨 S.폼베 숙주로서는, 예를 들어 국제 공개 제2002/101038호 팜플렛, 국제 공개 제2007/015470호 팜플렛 등에 기재되어 있다. 프로테아제 유전자 등을 결실 또는 실활시킴으로써 이중 단백질의 발현 효율을 높일 수 있어, 본 발명에 있어서의 숙주에 적용함으로써 락트산의 생산 효율의 향상을 기대할 수 있다.
- [0047] 또한 숙주로서 사용하는 S.폼베에는, 형질 전환체를 선택하기 위한 마커를 갖는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 어느 유전자가 결락되어 있음으로써 특정한 영양 성분이 생육에 필수적인 숙주를 사용하는 것이 바람직하다. 벡터에 이 결핍되어 있는 유전자(영양 요구성 상보 마커)를 조합하여 됨으로써, 형질 전환체에 있어서는 숙주의 영양 요구성이 소실된다. 이 숙주와 형질 전환체의 영양 요구성의 차이에 따라, 양자

를 구별하여 형질 전환체를 얻을 수 있다.

- [0048] 예를 들어, 오로티딘인산디카복실라아제 유전자(ura4 유전자)가 결실 또는 실활되어 우라실 요구성으로 되어 있는 S.폼베를 숙주로 하고, ura4 유전자(영양 요구성 상보 마커)를 갖는 벡터에 의해 형질 전환한 후, 우라실 요구성이 소실된 것을 선택함으로써, 벡터가 조합된 형질 전환체를 얻을 수 있다. 숙주에 있어서 결락에 의해 영양 요구성이 되는 유전자는, 형질 전환체의 선택에 사용되는 것이면 ura4 유전자에는 한정되지 않고, 이소프로필 말산 데히드로게나제 유전자(leu1 유전자) 등이어도 좋다.
- [0049] 또한, PDC 유전자군이 결실도 실활도 되어 있지 않은 S.폼베를 형질 전환체 제조를 위한 숙주로서 사용할 수도 있다. 이 경우의 숙주로서는 PDC 유전자 이외의 상기와 같은 유전자(영양 요구성 마커나 프로테아제 유전자 등)가 결실 또는 실활되어 있는 것을 사용할 수 있다. 이 숙주를 사용하여 형질 전환체를 제조한 후, 그 형질 전환체의 PDC 유전자군의 일부를 결실 또는 실활시켜, 본 발명의 형질 전환체를 얻을 수 있다.
- [0050] <락트산 탈수소 효소 유전자>
- [0051] 본 발명의 형질 전환체는, 락트산 탈수소 효소 유전자(락트산 탈수소 효소를 코딩하는 유전자, 이하 「LDH 유전자」라고도 한다)를 갖는다. 상기와 같이, S.폼베는 원래 LDH 유전자를 갖고 있지 않다. 따라서, S.폼베 이외의 생물의 LDH 유전자를 유전자 공학적 방법으로 S.폼베에 도입하여 형질 전환체를 얻는다.
- [0052] 본 발명에 있어서의 LDH 유전자는 특별히 한정되지 않고, 예를 들어 비피도박테륨속, 락토박실루스속 등에 속하는 미생물 유래의 LDH 유전자나, 인간 등의 포유 동물 유래의 LDH 유전자를 들 수 있다. 그 중에서도, S.폼베에 의한 락트산 생산의 효율이 우수한 점에서, 포유 동물 유래의 LDH 유전자인 것이 바람직하다. 그 중에서도 인간 유래의 LDH 유전자인 것이 보다 바람직하다(문헌: Tsujibo H, Tiano HF, Li SS-L. Nucleotide sequences of the cDNA and an intronless pseudogene for human lactate dehydrogenase-A isozyme. Eur. J. Biochem. (1985)147, 9-15). 나아가 하기 배열표의 배열 번호 1에 기재된 LDH 유전자인 것이 바람직하다.
- [0053] [형질 전환체의 제조]
- [0054] 본 발명의 형질 전환체는, PDC 유전자군의 일부가 결실 또는 실활된 S.폼베를 숙주로 하고, 이것에 LDH 유전자를 유전자 공학적 방법으로 S.폼베에 도입하여 얻어진다. 또한, PDC 유전자군이 결실도 실활도 되어 있지 않은 S.폼베를 숙주로 하고, 이것에 LDH 유전자를 유전자 공학적 방법으로 S.폼베에 도입하여 형질 전환체를 얻고, 그 후 얻어진 형질 전환체의 PDC 유전자군의 일부를 결실 또는 실활시켜, 본 발명의 형질 전환체를 얻을 수도 있다. 후술하는 실시예에서는, 전자의 방법으로 원하는 형질 전환체를 제조했지만, 후자의 방법으로도 거의 동등한 형질 전환체를 제조할 수 있다. 이하, 전자의 방법을 예로 형질 전환체의 제조 방법을 설명한다.
- [0055] 유전자 공학적 방법으로 숙주에 LDH 유전자를 도입하는 방법으로서의 공지의 방법을 사용할 수 있다. S.폼베를 숙주로 하고 여기에 이중 단백질의 구조 유전자를 도입하는 방법으로서, 예를 들어 일본 특허 공개 평5-15380호 공보, 국제 공개 제95/09914호 팸플릿, 일본 특허 공개 평10-234375호 공보, 일본 특허 공개 제2000-262284호 공보, 일본 특허 공개 제2005-198612호 공보 등에 기재된 방법을 사용할 수 있다.
- [0056] LDH 유전자는 S.폼베의 염색체에 도입하는 것이 바람직하다. 염색체에 LDH 유전자를 도입함으로써 계대(繼代)의 유지 안정성이 우수한 형질 전환체가 얻어진다. 또한, LDH 유전자는 염색체에 복수 도입할 수도 있다. LDH 유전자를 복수 도입함으로써, LDH 유전자의 발현 효율을 높일 수 있고, 나아가서는 락트산의 생산 효율이 향상된다고 생각되어진다. 본 발명의 형질 전환체에 있어서, 염색체에 조합된 LDH 유전자의 수는 1 내지 20이 바람직하고, 특히 1 내지 8이 바람직하다.
- [0057] 염색체에 LDH 유전자를 도입하는 방법으로서의 공지의 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 일본 특허 공개 제2000-262284호 공보에 기재된 방법으로 염색체에 LDH 유전자를 복수 도입할 수 있다. 또한, 이 방법으로 염색체에 LDH 유전자를 1개 도입할 수도 있다. 또한, 후술하는 바와 같이, 염색체의 복수의 개소에 1개 또는 복수의 LDH 유전자를 도입할 수도 있다.
- [0058] LDH 유전자를 S.폼베의 염색체에 도입하는 방법으로서, LDH 유전자를 갖는 발현 카세트와 재조합 부위를 갖는 벡터를 사용하여, 상동 재조합법에 의해 도입하는 방법이 바람직하다. 이하에 이 방법에 사용하는 벡터와 상동 재조합법을 설명한다.
- [0059] <벡터>

- [0060] 벡터는, LDH 유전자를 갖는 발현 카세트와 재조합 부위를 갖는다.
- [0061] 발현 카세트란, 락트산 탈수소 효소를 발현하기 위하여 필요한 DNA의 조합이며, LDH 유전자와 S.폼베 내에서 기능하는 프로모터와 S.폼베 내에서 기능하는 터미네이터를 포함한다. 또한, 5'-비번역 영역, 3'-비번역 영역 중 어느 1개 이상이 포함되어 있어도 좋다. 또한, 상기 영양 요구성 상보 마커가 포함되어 있어도 좋다. 바람직한 발현 카세트는, LDH 유전자, 프로모터, 터미네이터, 5'-비번역 영역, 3'-비번역 영역, 영양 요구성 상보 마커를 포함하는 발현 카세트이다. 발현 카세트에는 복수의 LDH 유전자가 존재하고 있어도 좋다. 발현 카세트 중의 LDH 유전자의 수는 1 내지 8이 바람직하고, 1 내지 5가 보다 바람직하다.
- [0062] S.폼베 내에서 기능하는 프로모터와 터미네이터는, 본 발명의 형질 전환체에 의해 락트산이 축적되어 산성으로 되어도(pH 6 이하로 되어도), 형질 전환체 내에서 기능하여 락트산 탈수소 효소의 발현을 유지할 수 있는 것이면 된다. S.폼베 내에서 기능하는 프로모터로서는, S.폼베가 원래 갖는 프로모터(전사 개시 활성이 높은 것이 바람직하다)나 S.폼베가 원래 갖지 않는 프로모터(바이러스 유래의 프로모터 등)를 사용할 수 있다. 또한, 프로모터는 벡터 내에 2종 이상 존재하고 있어도 좋다.
- [0063] S.폼베가 원래 갖는 프로모터로서는, 예를 들어 알코올데히드로게나제 유전자 프로모터, 티아민의 대사에 관여하는 nmt1 유전자 프로모터, 글루코오스의 대사에 관여하는 프록토오스-1,6-비스포스파타아제 유전자 프로모터, 카타볼라이트 억제에 관여하는 인베르타제 유전자의 프로모터(국제 공개 제99/23223호 팸플릿 참조), 열쇼크 단백질 유전자 프로모터(국제 공개 제2007/26617호 팸플릿 참조) 등을 들 수 있다.
- [0064] S.폼베가 원래 갖지 않는 프로모터로서는, 예를 들어 일본 특허 공개 평5-15380호 공보, 일본 특허 공개 평7-163373호 공보, 일본 특허 공개 평10-234375호 공보에 기재되어 있는 동물 세포 바이러스 유래의 프로모터를 들 수 있고, hCMV 프로모터, SV40 프로모터가 바람직하다.
- [0065] S.폼베 내에서 기능하는 터미네이터로서는, S.폼베가 원래 갖는 터미네이터나 S.폼베가 원래 갖지 않는 터미네이터를 사용할 수 있다. 또한, 터미네이터는 벡터 내에 2종 이상 존재하고 있어도 좋다.
- [0066] 터미네이터로서는, 예를 들어 일본 특허 공개 평5-15380호 공보, 일본 특허 공개 평7-163373호 공보, 일본 특허 공개 평10-234375호 공보에 기재되어 있는 인간 유래의 터미네이터를 들 수 있고, 인간 리포코틴 I의 터미네이터가 바람직하다.
- [0067] 벡터의 재조합 부위는, S.폼베의 염색체에 있어서의 상동 재조합의 표적 부위에 대하여 상동 재조합을 행하게 할 수 있는 염기 배열을 갖는 부위이다. 또한, 표적 부위는, S.폼베의 염색체 내에서 발현 카세트를 조합하는 표적이 되는 부위이다. 표적 부위는, 벡터의 재조합 부위를 상기 표적 부위에 대하여 상동 재조합을 행하게 하는 염기 배열로 함으로써 자유롭게 설정할 수 있다.
- [0068] 상기 재조합 부위의 염기 배열과 표적 부위의 염기 배열의 상동성은 70% 이상으로 하는 것이 필요하다. 또한, 재조합 부위의 염기 배열과 표적 부위의 염기 배열의 상동성은, 상동 재조합이 일어나기 쉬워지는 점에서, 90% 이상으로 하는 것이 바람직하고, 95% 이상인 것이 보다 바람직하다. 이러한 재조합 부위를 갖는 벡터를 사용함으로써, 발현 카세트가 상동 재조합에 의해 표적 부위에 조합된다.
- [0069] 재조합 부위의 길이(염기수)는, 20 내지 2000bp인 것이 바람직하다. 재조합 부위의 길이가 20bp 이상이면, 상동 재조합이 일어나기 쉬워진다. 또한, 재조합 부위의 길이가 2000bp 이하이면 벡터가 지나치게 길어져 상동 재조합이 일어나기 어려워지는 것을 방지하기 쉽다. 재조합 부위의 길이는 100bp 이상인 것이 보다 바람직하고, 200bp 이상인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 재조합 부위의 길이는 800bp 이하인 것이 보다 바람직하고, 400bp 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0070] 벡터는, 상기 발현 카세트와 재조합 부위 이외에 다른 DNA 영역을 가져도 된다. 예를 들어, 대장균 내에서의 복제를 위하여 필요한 「ori」라고 불리는 복제 개시 영역이나 항생 물질 내성 유전자(네오마이신 내성 유전자 등)를 들 수 있다. 이들은 대장균을 사용하여 벡터를 구축하는 경우에 통상 필요해지는 유전자이다. 단, 상기 복제 개시 영역은 후술하는 바와 같이 벡터를 숙주의 염색체에 조합할 때에는 제거되는 것이 바람직하다.
- [0071] 벡터는, 환상 DNA 구조 또는 선상 DNA 구조를 갖는 벡터이며, S.폼베의 세포에 도입할 때에는 선상 DNA 구조에서 도입하는 것이 바람직하다. 즉, 통상 사용되는 플라스미드 DNA와 같은 환상 DNA 구조를 갖는 벡터인 경우에는, 제한 효소에 의해 벡터를 선상으로 절개한 후에 S.폼베의 세포에 도입하는 것이 바람직하다.
- [0072] 이 경우, 환상 DNA 구조를 갖는 벡터를 절개하는 위치는, 재조합 부위 내로 한다. 이에 의해, 절개된 벡터의

양단부에 각각 재조합 부위가 부분적으로 존재하는 것이 되어, 상동 재조합에 의해 벡터 전체가 염색체의 표적 부위에 조합된다.

- [0073] 벡터는, 양단부 각각에 재조합 부위의 일부가 존재하는 선상 DNA 구조로 할 수 있으면, 환상 DNA 구조를 갖는 벡터를 절개하는 방법 이외의 방법으로 구축해도 좋다.
- [0074] 벡터로서는, 예를 들어 pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pUC18, pUC19 등의 대장균 유래의 플라스미드를 적절하게 사용할 수 있다.
- [0075] 이 경우, 상동 재조합에 사용할 때의 플라스미드 벡터는, 대장균 내에서의 복제를 위하여 필요한 「ori」라고 불리는 복제 개시 영역이 제거되어 있는 것이 바람직하다. 이에 의해, 상술한 벡터를 염색체에 조합할 때에, 그 조합 효율을 향상시킬 수 있다.
- [0076] 복제 개시 영역이 제거된 벡터의 구축 방법은 특별히 한정되지 않지만, 일본 특허 공개 제2000-262284호 공보에 기재되어 있는 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 즉, 재조합 부위 내의 절단 개소에 복제 개시 영역이 삽입된 전구체 벡터를 구축해 두고, 전술한 바와 같이 선상 DNA 구조로 하는 동시에 복제 개시 영역이 잘라내어지도록 하는 방법이 바람직하다. 이에 의해, 간편하게 복제 개시 영역이 제거된 벡터를 얻을 수 있다.
- [0077] 또한, 일본 특허 공개 평5-15380호 공보, 일본 특허 공개 평7-163373호 공보, 국제 공개 제96/23890호 팜플릿, 일본 특허 공개 평10-234375호 공보 등에 기재된 발현 벡터나 그 구축 방법을 적용하여, 발현 카세트 및 재조합 부위를 갖는 전구체 벡터를 구축하고, 또한 통상의 유전자 공학적 방법으로 상기 전구체 벡터로부터 복제 개시 영역을 제거하여 상동 재조합에 사용하는 벡터를 얻는 방법이어도 좋다.
- [0078] <표적 부위>
- [0079] 벡터를 조합하는 표적 부위는, S.폼베의 염색체 중의 1개소에만 존재하고 있어도 좋고, 2개소 이상에 존재하고 있어도 좋다. 표적 부위가 2개소 이상 존재하고 있는 경우, S.폼베의 염색체에 조합되는 벡터를 2개소 이상으로 할 수 있다. 또한, 발현 카세트 중의 LDH 유전자를 복수로 한 경우에는, 표적 부위의 1개소에 복수의 LDH 유전자를 조합할 수 있다. 또한, 2종 이상의 표적 부위에, 각각의 표적 부위에 대응하는 재조합 부위를 갖는 2종 이상의 벡터를 사용하여, 발현 카세트를 조합할 수도 있다. 이들 방법으로, S.폼베의 염색체에 복수의 LDH 유전자를 조합할 수 있고, 이에 의해 락트산 탈수소 효소의 발현량을 증대시켜, 락트산의 생산성을 향상시킬 수 있다.
- [0080] 1개소의 표적 부위에 발현 카세트를 조합하는 경우, 예를 들어 일본 특허 공개 제2000-262284호 공보에 기재된 방법을 사용할 수 있다. 다른 조합 부위를 갖는 2종 이상의 벡터를 사용하여, 다른 표적 부위에 각각 벡터를 조합할 수 있다. 그러나, 염색체의 2개소 이상으로 벡터를 조합하는 경우, 이 방법은 번잡하다.
- [0081] 염색체 중에 복수 개소 존재하는 서로 실질적으로 동일한 염기 배열 부분을 표적 부위로 하여, 이 복수 개소의 표적 부위에 각각 벡터를 조합할 수 있으면, 1종류의 벡터를 사용하여 염색체의 2개소 이상으로 벡터를 조합할 수 있다. 서로 실질적으로 동일한 염기 배열이란, 염기 배열의 상동성이 90% 이상인 것을 의미한다. 표적 부위끼리의 상동성은 95% 이상인 것이 바람직하다. 또한, 서로 실질적으로 동일한 염기 배열의 길이는, 상기 벡터의 재조합 부위를 포함하는 길이이며, 1000bp 이상인 것이 바람직하다. 1개소의 표적 부위에 복수의 LDH 유전자가 조합되어 있는 경우에 비교하여 LDH 유전자의 조합수가 동일해도, 복수 존재하는 표적 부위에 LDH 유전자가 분산되어 조합되어 있는 경우에는, 형질 전환체가 증식할 때에 LDH 유전자가 염색체로부터 한번에 탈락하는 일이 적어져, 형질 전환체의 계대에 있어서의 유지 안정성이 향상된다.
- [0082] 염색체 중에 복수 개소 존재하는 표적 부위로서는, 트랜스포존 유전자 Tf2가 바람직하다. Tf2는, S.폼베의 3개(1배체)의 염색체 각각에 함께 13개소 존재하는 트랜스포존 유전자이며, 길이(염기수)는 약 4900bp이며, 그들의 유전자간에 있어서의 염기 배열 상동성은 99.7%인 것이 알려져 있다(하기 문헌 참조).
- [0083] Nathan J. Bowen et al, "Retrotransposons and Their Recognition of pol II Promoters: A Comprehensive Survey of the Transposable Elements From the Complete Genome Sequence of Schizosaccharomyces pombe", Genome Res. 2003 13: 1984-1997
- [0084] 염색체에 13개소 존재하는 Tf2의 1개소에만 벡터를 조합할 수 있다. 이 경우, 2개 이상의 LDH 유전자를 갖는 벡터를 조합함으로써, 2개 이상의 LDH 유전자를 갖는 형질 전환체를 얻을 수 있다. 또한, Tf2의 2개소 이상으로 벡터를 조합함으로써, 2개 이상의 LDH 유전자를 갖는 형질 전환체를 얻을 수 있다. 이 경우, 2개 이상의 LDH 유전자를 갖는 벡터를 조합함으로써, 많은 LDH 유전자를 갖는 형질 전환체를 더 얻을 수 있다. Tf2의

13개소 모두에 벡터가 조합되면, 형질 전환체의 생존이나 증식에 대한 부하가 지나치게 커질 우려가 있다. 바람직하게는, 13개소의 Tf2의 8개소 이하로 벡터가 조합되는 것이 바람직하고, 5개소 이하로 벡터가 조합되는 것이 보다 바람직하다.

[0085] <형질 전환 방법>

[0086] S.폼베 숙주를 상동 재조합법으로 형질 전환하는 방법으로서, 공지의 상동 재조합법을 사용할 수 있다. 본 발명의 형질 전환 방법으로서, 상술한 PDC 유전자군의 일부가 결실 또는 실활된 S.폼베를 숙주로 하고, 그 염색체에 상술한 벡터를 사용하여, 발현 카세트를 상동 재조합에 의해 조합하는 방법이 바람직하다. 이 재조합 방법에 의하면, 본 발명의 형질 전환체를 간편하게 제조할 수 있다.

[0087] 본 발명의 형질 전환법에서는, 통상 상동 재조합을 행한 후, 얻어진 형질 전환체를 선택한다. 선택하는 방법으로서, 예를 들어 이하에 기재한 방법을 들 수 있다. 상기 영양 요구성 마커에 의해 형질 전환체를 선택할 수 있는 배지에 의해 스크리닝하고, 얻어진 콜로니로부터 복수를 선택한다. 이어서, 그들을 따로따로 액체 배양한 후, 각각의 배양액에 있어서의 이종 단백질의 발현량을 조사하여, 이종 단백질의 발현량이 보다 많은 형질 전환체를 선택한다. 또한, 그들 선택한 형질 전환체에 대하여 펄스 필드 겔 전기 영동법에 의한 게놈 해석을 행함으로써, 염색체에 조합된 벡터의 수나 발현 카세트의 수를 조사할 수 있다.

[0088] 염색체에 조합되는 벡터의 수는 조합 조건 등을 조정함으로써 어느 정도는 조정 가능하지만, 벡터의 크기(염기수)나 구조에 따라 조합 효율이나 조합수도 변화된다고 생각되어진다.

[0089] S.폼베의 염색체에 복수의 LDH 유전자를 조합함으로써 락트산 탈수소 효소의 발현량을 증대시켜, 락트산의 생산성을 향상시킬 수 있다고 생각되어진다. 그러나, 본 발명의 목적은 락트산의 생산 효율이 높은 형질 전환체를 얻는 데 있고, 간단히 발현 카세트의 총 수가 보다 많은 형질 전환체를 얻는 것을 목적으로 하는 것은 아니다. 일반적으로는 발현 카세트의 수가 많을수록 락트산 탈수소 효소의 발현 효율이 높아지고, 나아가서는 락트산의 생산 효율이 높아진다고 예상된다. 그러나, 발현 카세트의 수가 지나치게 많으면 세포의 생존이나 증식에 대한 부하가 증대하고, 나아가서는 락트산 생산 효율이 저하되는 것도 생각되어진다. 또한, 벡터가 커지면, 염색체에 조합되는 확률이 저하되어, 조합되는 벡터수를 많게 하는 것이 곤란해지고, 나아가서는 형질 전환체를 얻는 것 자체가 곤란해진다고 생각된다.

[0090] [락트산의 제조 방법]

[0091] 본 발명의 락트산의 제조 방법은, 상기 본 발명의 형질 전환체를 배양액 중에서 배양하고, 상기 배양액으로부터 락트산을 취득하는 락트산의 제조 방법이다.

[0092] 본 발명의 형질 전환체를 당을 포함하는 배양액 중에서 배양함으로써, 해당계에 의해 상기 당으로부터 얻어지는 피루브산이 락트산 탈수소 효소에 의해 환원되어 락트산이 생산되고, 배양액에 출산된 락트산을 배양액으로부터 취득함으로써 락트산을 제조할 수 있다.

[0093] 락트산의 제조에 사용하는 배양액으로서, 당을 함유하는 공지의 효모 배양 배지를 사용할 수 있고, S.폼베가 자화(資化)할 수 있는 질소원, 무기염류 등을 더 함유하고, S.폼베의 배양을 효율적으로 행할 수 있는 것이면 된다. 배양액으로서, 천연 배지를 사용해도 좋고, 합성 배지를 사용해도 좋다.

[0094] 탄소원인 당으로서, 예를 들어 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등의 당을 들 수 있다. 질소원으로서, 예를 들어 암모니아, 염화암모늄, 아세트산 암모늄 등의 무기산 또는 무기산의 암모늄염, 펩톤, 카자미노산, 이스트 엑기스 등을 들 수 있다. 무기염류로서, 예를 들어 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 나아가, 프로테오리피드 등의 발효 촉진 인자 등을 포함시킬 수 있다.

[0095] 본 발명의 락트산의 제조 방법에서는, 당으로서 특히 글루코오스를 함유하는 배양액을 사용하는 것이 바람직하다. 배양 초기의 배양액(100질량%) 중의 글루코오스 농도는 1질량% 이상이 바람직하고, 1 내지 50질량%가 보다 바람직하고, 2 내지 16질량%가 더욱 바람직하다. 배양에 의해 글루코오스 농도가 저하되는 것보다, 필요에 따라 글루코오스를 첨가하여 배양을 계속하는 것이 바람직하다. 배양 중기의 글루코오스 농도는 1질량% 이하로 되어도 좋다. 또한, 락트산을 분리하면서 배양액을 순환시켜 연속적으로 배양을 행하는 경우에는 상기 글루코오스 농도를 유지하는 것이 바람직하다. 글루코오스 농도를 2질량% 이상으로 함으로써, 락트산의 생산성이 보다 향상된다. 또한, 배양액 중의 글루코오스를 16질량% 이하로 함으로써, 락트산의 생산 효율이 보다 향상된다.

- [0096] 또한, 락트산 제조의 생산성을 높게 하기 위해, 고밀도 배양을 행하는 것이 바람직하다. 고밀도 배양에서는, 배양액 중의 형질 전환체의 초발 균체 농도를 건조 균체 중량 환산값으로 표현하여 0.1 내지 50그램/리터로 하는 것이 바람직하다. 배양액 중의 형질 전환체의 초발 균체 농도를 건조 균체 중량 환산값으로 표현하여 0.2 내지 40그램/리터로 하는 것이 보다 바람직하다. 초발 균체 농도를 높게 함으로써 단시간으로 높은 생산성을 달성할 수 있다. 또한, 초발 균체 농도가 너무 지나치게 높으면 균체의 응집이나 정제 효율의 저하 등의 문제가 발생할 우려가 있다.
- [0097] 또한, 후술하는 실시예 등에서 기재하는 균체 농도는, 닛본 분꼬우사제 가시자의 분광기 V550에 의해 측정된 파장 660nm의 광의 흡광도(OD660)로부터 환산한 값이다. 660nm에 있어서의 OD=1은, 분열 효모 건조 중량의 0.2g, 습중량의 0.8g에 상당한다.
- [0098] 배양에는 공지의 효모 배양 방법을 사용할 수 있고, 예를 들어 진탕 배양, 교반 배양 등에 의해 행할 수 있다.
- [0099] 또한, 배양 온도는 23 내지 37℃인 것이 바람직하다. 또한, 배양 시간은 적절히 결정할 수 있다.
- [0100] 또한, 배양은 회분 배양이어도 좋고, 연속 배양이어도 좋다. 예를 들어, 회분 배양으로 배양을 행한 후, 균체를 배양액으로부터 분리하여, 락트산을 포함하는 배양액을 취득할 수 있다. 또한, 연속 배양법에서는, 예를 들어 배양 중인 배양조로부터 배양액의 일부를 뽑아 내고, 뽑아 낸 배양액으로부터 락트산을 분리함과 함께, 배양 상청을 회수하여, 상기 배양 상청에 글루코오스나 새로운 배양액을 첨가하여 배양조로 복귀시키는 것을 반복하여, 연속적으로 배양하는 방법을 들 수 있다. 연속 배양을 행함으로써, 락트산의 생산성이 보다 향상된다.
- [0101] 본 발명의 형질 전환체를 사용한 락트산의 제조 방법에서는, 락트산의 축적에 의해 저 pH(pH 2 내지 4 정도)로 되어도 중화를 행하지 않고 락트산을 생산할 수 있다. 그로 인해, 배양액의 pH가 4 이하로 된 후에도, 재차 배양을 계속하는 연속 배양에 의해 락트산을 제조할 수 있다. 배양 종기의 pH나 연속 배양에 있어서의 pH는 1 내지 4가 바람직하고, 특히 1.5 내지 3.5가 바람직하다. 락트산의 생산성을 높게 하기 위해, 배양액의 pH가 3.5 이하로 된 후에 재차 배양을 계속하는 것이 바람직하다. 본 발명의 형질 전환체는 내산성이 우수한 것에 의해, 형질 전환체에 의해 생산된 배양액 중의 락트산을 중화하지 않고 배양을 계속할 수 있다.
- [0102] 배양액으로부터의 락트산의 취득은, 공지의 방법을 사용할 수 있다. 특히, 배양액 중의 락트산을 중화하지 않고, 배양액과 락트산을 분리하여, 락트산을 취득하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 배양 종료 후의 배양액으로부터 원심 분리에 의해 균체를 분리하여, pH 1 이하로 한 후에 디에틸에테르나 아세트산에틸 등에 의해 추출하는 방법, 이온 교환 수지에 흡착시켜 세정한 후에 용출시키는 방법, 활성탄을 사용하여 불순물을 제거하는 방법, 산 촉매의 존재 하에서 알코올과 반응시킨 후에 증류하는 방법, 분리막을 사용하여 분리하는 방법을 들 수 있다. 또한, 경우에 따라서는 배양액 중의 락트산을 중화한 후 배양액과 락트산염을 분리하여, 락트산을 취득할 수도 있다. 예를 들어, 배양액 중의 락트산을 칼슘염 또는 리튬염으로 변환하여, 이 중화염을 정출하는 방법으로 락트산을 취득할 수도 있다.
- [0103] 이상 설명한 본 발명의 락트산의 제조 방법은, 특히 내산성이 우수한 S.폼베를 숙주로 하는 형질 전환체를 사용하기 때문에, 알칼리에 의한 중화를 행하지 않아도 높은 생산성으로 간편하게 락트산을 제조할 수 있다. 또한, PDC 유전자군의 일부가 결실 또는 실활되어 있음으로써 에탄올 발효의 효율이 저하되어 있기 때문에, 락트산의 대(對)당 수율(소비된 당의 양에 대한 락트산의 생산량의 비율)이 향상된다. 본 발명에 있어서는, 락트산의 대당 수율을 50질량% 이상으로 하는 것을 용이하게 할 수 있다. 경우에 따라, 락트산의 대당 수율은 70질량% 이상이나 달한다. 또한, 본 발명의 락트산의 제조 방법은, 고농도의 글루코오스 존재 하 및 고농도의 형질 전환체에 의한 고밀도 배양에도 적합하다.
- [0104] **실시예**
- [0105] 이하, 실시예 및 비교예를 기재하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 단, 본 발명은 이하의 기재에 의해서는 한정되지 않는다. 또한, 본 실시예에서는 특별히 기재하지 않는 한 「%」는 「질량%」를 의미한다.
- [0106] [예 1]
- [0107] <S.폼베 유전자 삭제주의 제작>
- [0108] S.폼베의 우라실 요구성주(ARC010, 유전자형: h⁻ leu1-32 ura4-D18, 동경 대학 대학원 이학계 연구과 부속 유전자 실험 시설?이이노 유우이치 교수로부터 공여)를 Latour법(Nucleic Acids Res.지, 2006년, 34권, e11페이지

지, 국제 공개 제2007/063919호 팜플릿에 기재)에 따라 형질 전환하고, 피루브산 탈탄산 효소(PDC) 유전자 및 알코올 탈수소 효소(ADH) 유전자를 삭제한 삭제주를 제작했다.

- [0109] 삭제 단편의 제작에는, S.폼베의 ARC032주(유전자형: h⁻, 동경 대학 대학원 이학계 연구과 부속 유전자 실험 시설?이이노 유우이치 교수로부터 공여)로부터 DNeasy(키아젠사제)에 의해 제조한 전체 게놈 DNA를 주형으로 하고, 삭제하는 유전자마다 각각 다음에 나타내는 배열의 8종의 합성 올리고 DNA(오페론사제)를 사용했다.
- [0110] (1) pdc1(계통명: SPAC13A11.06) 삭제 단편의 제작을 위한 올리고 DNA
- [0111] UF: 5'-AGGCAAATCGTGAACCTCGG-3'(하기 배열표의 배열 번호 2)
- [0112] UR: 5'-GCCAATTCCTCTCAATAGCCCGAACGTTCCGTCTCG-3'(하기 배열표의 배열 번호 3)
- [0113] OF: 5'-GCTATTGAGAGTGAATTGGC-3'(하기 배열표의 배열 번호 4)
- [0114] OR: 5'-AGTGGGATTTGTAGCTAAGCTACTGGTTCCACATTGTTTG-3'(하기 배열표의 배열 번호 5)
- [0115] DF: 5'-AAGTTTCGTCAATATCACAAGCTCGAGACGGAACGTTCCG-3'(하기 배열표의 배열 번호 6)
- [0116] DR: 5'-TTACAATGCTGAGTGTGTATTCC-3'(하기 배열표의 배열 번호 7)
- [0117] FF: 5'-TGAACCTCGGTTGAAAAATGTCG-3'(하기 배열표의 배열 번호 8)
- [0118] FR: 5'-TGAGTGTGTATTCTTTTCGC-3'(하기 배열표의 배열 번호 9).
- [0119] (2) pdc2(계통명: SPAC1F8.07c) 삭제 단편의 제작을 위한 올리고 DNA
- [0120] UF: 5'-CTCTCCAGCTCCATCCATAAG-3'(하기 배열표의 배열 번호 10)
- [0121] UR: 5'-GACACAACCTCTACCAAAAAGCCTTTCTGCCCATGTTTCTGTC-3'(하기 배열표의 배열 번호 11)
- [0122] OF: 5'-GCTTTTTGGTAGGAAGTTGTGTC-3'(하기 배열표의 배열 번호 12)
- [0123] OR: 5'-AGTGGGATTTGTAGCTAAGCTGTATCCATTTAGCCGTTTG-3'(하기 배열표의 배열 번호 13)
- [0124] DF: 5'-AAGTTTCGTCAATATCACAAGCTGACAGAAAACATGGGCAGAAAG-3'(하기 배열표의 배열 번호 14)
- [0125] DR: 5'-GTTCTTAGAAAAAGCAACTTTGG-3'(하기 배열표의 배열 번호 15)
- [0126] FF: 5'-CATAAGCTTGCCACCACTTC-3'(하기 배열표의 배열 번호 16)
- [0127] FR: 5'-GAAAAAGCAACTTTGGTATTCTGC-3'(하기 배열표의 배열 번호 17).
- [0128] (3) pdc3(계통명: SPAC186.09) 삭제 단편의 제작을 위한 올리고 DNA
- [0129] UF: 5'-AAGGCATATTCGTTGATTAACCC-3'(하기 배열표의 배열 번호 18)
- [0130] UR: 5'-GGTGAAAGGTTTGTGCAATCCGTCAACTCATGATATTTCTTTATGG-3'(하기 배열표의 배열 번호 19)
- [0131] OF: 5'-GATTGCACAAACCTTTCCACC-3'(하기 배열표의 배열 번호 20)
- [0132] OR: 5'-AGTGGGATTTGTAGCTAAGCTCATCCACATCTGTAATAATCACG-3'(하기 배열표의 배열 번호 21)
- [0133] DF: 5'-AAGTTTCGTCAATATCACAAGCTCCATAAAGAAATATCATGAGTTGACG-3'(하기 배열표의 배열 번호 22)
- [0134] DR: 5'-TTTGAGAAGAAAAATTTATGTCCAGC-3'(하기 배열표의 배열 번호 23)
- [0135] FF: 5'-CCATTTAGCAGTATAAGGGTCG-3'(하기 배열표의 배열 번호 24)
- [0136] FR: 5'-AAGTAAAAATGTGAAAGCAATGTAGG-3'(하기 배열표의 배열 번호 25).
- [0137] (4) pdc4(계통명: SPAC3G9.11c) 삭제 단편의 제작을 위한 올리고 DNA
- [0138] UF: 5'-ACACACAAACACTTCCATTCC-3'(하기 배열표의 배열 번호 26)
- [0139] UR: 5'-CCTAACAAAAGCATCATTTGAGAAGACGAATGAAATGACAGCAAC-3'(하기 배열표의 배열 번호 27)
- [0140] OF: 5'-TTCTCAAATGATGCTTTTGTAGG-3'(하기 배열표의 배열 번호 28)
- [0141] OR: 5'-AGTGGGATTTGTAGCTAAGCTCTGGACAAGTCTACCTTGGAG-3'(하기 배열표의 배열 번호 29)

- [0142] DF: 5'-AAGTTTCGTCAATATCACAAGCTGTTGCTGTCATTTTCATTGTC-3'(하기 배열표의 배열 번호 30)
- [0143] DR: 5'-GATACAGGAGTACAACAAACAC-3'(하기 배열표의 배열 번호 31)
- [0144] FF: 5'-TCTCCATCCCTCCTCCC-3'(하기 배열표의 배열 번호 32)
- [0145] FR: 5'-ACGCTACTTAACAAGACAAGC-3'(하기 배열표의 배열 번호 33).
- [0146] (5) adh1(계통명: SPCC13B11.01) 삭제 단편의 제작을 위한 올리고 DNA
- [0147] UF: 5'-TCATTCCTCGATATTCAGTTC-3'(하기 배열표의 배열 번호 34)
- [0148] UR: 5'-GCCAGTGGGATTGTAGTACTCTGATCGGCATTTTTTGG-3'(하기 배열표의 배열 번호 35)
- [0149] OF: 5'-GTTTCGTCAATATCACAAGCTTCCCCAACCTCCCATTTCTCTCC-3'(하기 배열표의 배열 번호 36)
- [0150] OR: 5'-CTACGATCAGAAGAAGATCAATGAGACGCGGAAGGGGAGCGCC-3'(하기 배열표의 배열 번호 37)
- [0151] DF: 5'-GGCGCTCCCTTCCGCGTCTCATTGATCTTCTCTGATCGTAG-3'(하기 배열표의 배열 번호 38)
- [0152] DR: 5'-ATGCATTTCACTCTATTCCTC-3'(하기 배열표의 배열 번호 39)
- [0153] FF: 5'-GCTATAGTTAAGTGTAAGAC-3'(하기 배열표의 배열 번호 40)
- [0154] FR: 5'-TTGTCCACCACTCATTCG-3'(하기 배열표의 배열 번호 41).
- [0155] (6) adh4(계통명: SPAC5H10.06c) 삭제 단편의 제작을 위한 올리고 DNA
- [0156] UF: 5'-ATCGTCGTCGATGCTGATTGG-3'(하기 배열표의 배열 번호 42)
- [0157] UR: 5'-GCCAGTGGGATTGTAGCTCAGCAGTCATTCTCATTCG-3'(하기 배열표의 배열 번호 43)
- [0158] OF: 5'-CGTCAATATCACAAGCTTGTCTCCCTTCTATTGGGATTGC-3'(하기 배열표의 배열 번호 44)
- [0159] OR: 5'-GATTACCTGCAATCATGTTTCCGGCTTTTGTGAAACCTGCC-3'(하기 배열표의 배열 번호 45)
- [0160] DF: 5'-GGCAGGTTTCACAAAAGCCGGAACATGATTGCAGGTAATC-3'(하기 배열표의 배열 번호 46)
- [0161] DR: 5'-GGAGAATGATGTATTGGTAAATAAC-3'(하기 배열표의 배열 번호 47)
- [0162] FF: 5'-CCTTGGGAATGAGCGAATTC-3'(하기 배열표의 배열 번호 48)
- [0163] FR: 5'-GGGTTGTGAAGAGCATACTG-3'(하기 배열표의 배열 번호 49).
- [0164] (7) adhX(계통명: SPBC1773.06c) 삭제 단편의 제작을 위한 올리고 DNA
- [0165] UF: 5'-GAAGGAGATTATGTGAAACAAGTTGAAATC-3'(하기 배열표의 배열 번호 50)
- [0166] UR: 5'-AGCTTAGCTACAAATCCCACTCTGAGGGTAGTGTCTTGCTACAAAATCT-3'(하기 배열표의 배열 번호 51)
- [0167] OF: 5'-AAGTTTCGTCAATATCACAAGCTCATGACGGAAGATCCGAGAAATCCGTTT-3'(하기 배열표의 배열 번호 52)
- [0168] OR: 5'-CAAAGCCATGCTTTAATGTTAAAGTGAAT-3'(하기 배열표의 배열 번호 53)
- [0169] DF: 5'-ATTCACTTTAACATTAAGCATGGCTTTGATCGATTGAG ATTTTGTAGCAAGAACACT-3'(하기 배열표의 배열 번호 54)
- [0170] DR: 5'-GGAAATGGTTCATGTGGACTGGGTTTTATT-3'(하기 배열표의 배열 번호 55)
- [0171] FF: 5'-CCTGCTCTTAAATGACGAATGGTGTAGGC-3'(하기 배열표의 배열 번호 56)
- [0172] FR: 5'-ATATAGTGCGATATGGATGAAGGAGAAGAG-3'(하기 배열표의 배열 번호 57).
- [0173] (8) akrY(계통명: SPAC977.14c) 삭제 단편의 제작을 위한 올리고 DNA
- [0174] UF: 5'-ATCATAACTTACTATATCGTGAAGAAGAGA-3'(하기 배열표의 배열 번호 58)
- [0175] UR: 5'-AGCTTAGCTACAAATCCCACTTAGAATGAGTAATTCAACTTCTTAAACCAC-3'(하기 배열표의 배열 번호 59)
- [0176] OF: 5'-AAGTTTCGTCAATATCACAAGCTTTAGCTTAAAGTAATAAGCTTCTATGTGA-3'(하기 배열표의 배열 번호 60)
- [0177] OR: 5'-TGAAGACATTTTATAAACTTAAATAAAAA-3'(하기 배열표의 배열 번호 61)

- [0178] DF: 5'-TTTTTATTTAAGTTTATAAAATGCTTCAGAAATTTAAATCTGTGGTTTAAGAAGTTGA-3'(하기 배열표의 배열 번호 62)
- [0179] DR: 5'-ACTTTGTTTATTGTAGAAAGTCGAGCTTGA-3'(하기 배열표의 배열 번호 63)
- [0180] FF: 5'-CAAAAGACAGGGGTCGGATTGATTCCTTGG-3'(하기 배열표의 배열 번호 64)
- [0181] FR: 5'-TGTGCTGTTTTTCAAGTGGTCATGCGTTAC-3'(하기 배열표의 배열 번호 65).
- [0182] 삭제하는 유전자마다, UF와 UR에서 UP 영역을, OF와 OR에서 OL 영역을, DF와 DR에서 DN 영역을 각각 KOD-Dash(도요보사제)를 사용한 PCR법에 의해 제작한 뒤, 또한 그들을 주형으로 하고, 각각 FF와 FR를 사용한 마찬가지로의 PCR법에 의해 전체 길이의 삭제 단편을 제작했다. 전체 길이의 삭제 단편 제작 시에는, 하기 2개의 합성 올리고 DNA(오페론사제)를 사용하여, ARC032주로부터 마찬가지로 제조한 전체 게놈 DNA를 주형으로 하고, 마찬가지로의 PCR법에 의해 제조한 ura4 영역 단편도 주형으로 하여 함께 사용했다.
- [0183] 5'-AGCTTAGCTACAAATCCCACT-3'(하기 배열표의 배열 번호 66)
- [0184] 5'-AGCTTGATATTTGACGAAACTT-3'(하기 배열표의 배열 번호 67)
- [0185] 제작된 각삭제 단편을 사용하여 제작한 삭제주의 주명, 삭제한 유전자를 표 1에 나타낸다.

표 1

유전자 삭제주 의 주명	삭제한 유전자 ()안은 유전자의 계통명
I G F 5 4 1	p d c 4 (S P A C 3 G 9. 1 1 c)
I G F 5 4 2	p d c 1 (S P A C 1 3 A 1 1. 0 6)
I G F 5 4 3	p d c 2 (S P A C 1 F 8. 0 7 c)
I G F 5 4 4	p d c 3 (S P A C 1 8 6. 0 9)
I G F 5 3 5	a d h 1 (S P C C 1 3 B 1 1. 0 1)
I G F 5 4 5	a d h 4 (S P A C 5 H 1 0. 0 6 c)
I G F 5 5 0	a d h X (S P B C 1 7 7 3. 0 6 c)
I G F 5 4 6	a k r Y (S P A C 9 7 7. 1 4 c)

- [0186]
- [0187] [예 2]
- [0188] <S.폼베 락트산 탈수소 효소 생산주의 제작>
- [0189] S.폼베의 우라실 요구성주(ARC010) 및 예 1에서 제작한 S.폼베의 유전자 삭제주 각각을, 락트산 탈수소 효소 유전자 발현 카세트를 유지한 단좌 조합형 재조합 벡터 pXLT-HsLDH의 제한 효소 BsiWI 소화물로, Bahler 등의 방법(Yeast지, 1998년, 14권, 943-951페이지)에 따라 형질 전환했다.
- [0190] pXLT-HsLDH는, 이하에 기재하는 공정으로 제작했다. 즉, 우선 분열 효모용 조합형 벡터 pXL4(Idiris 이외, Yeast지, 2006년, 23권, 83-99페이지)를 제한 효소로 이중 소화하여 얻어진 단편을 말단 평활화한 후 라이게이션하여 얻어진 분열 효모용 발현 벡터 pXL1(delta-neo)을, 재차 제한 효소에 의해 이중 소화하여 얻어진 단편을 말단 평활화한 후, ARC010주 게놈으로부터 클로닝한 top2 유전자 단편을 삽입하여, 배열표의 배열 번호 68에 그 배열(5'→3', 환상)을 나타내는 pXLT(5558 염기쌍)를 제작했다.
- [0191] 다음에, 오카야마 벡터(문헌: Okayama, H. and Berg, P.: A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells.Mol.Cell.Biol. 3(1983) 280-289.)에 조합된 인간 선유아 세포 cDNA 라이브러리를 주형으로 하고, 5'-말단측에 제한 효소 NcoI 인식 배열을, 3'-말단측에 제한 효소 SalI 인식 배열을 부가한 하기 프라이머 세트,
- [0192] 5'-GTCCATGGCAACTCTAAAGGATCAG-3'(No.4620)(하기 배열표의 배열 번호 69),
- [0193] 5'-CAGTCGACTTAAATTCAGCTCCTTTTG-3'(No.4621)(하기 배열표의 배열 번호 70)
- [0194] 를 사용하여, 문헌(Tsujibo 이외, Eur.J.Biochem.지, 1985년, 147권, 9-15페이지)에 기재된 인간 L-락트산 탈수소 효소 구조 유전자(HsLDH-ORF)를 코딩하는 유전자 단편을, PCR에 의해 증폭했다. 얻어진 증폭 단편을, 제한 효소 NcoI 및 SalI를 사용한 이중 소화 후, 일본 특허 공개 제2000-262284호 공보에 기재된 멀티 클로닝 벡터 pTL2M5의 AfIII-SalI 사이에 조합하여, LDH 발현 벡터 pTL2HsLDH를 제작했다. 재차 pTL2HsLDH로부터 발현 카세트를 제한 효소 SpeI 및 Bst1107I를 사용한 이중 소화에 의해 잘라내고, pXLT에 조합하여, pXLT-

HsLDH를 제작했다.

<배양 시험>

얻어진 각 형질 전환체를 YPD12 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 12%)에 식균하고, 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm의 조건 하에서 4.5시간 배양했다. 이때의 배양액 중의 락트산 농도를 BioFlow(오지 게 이소꾸 기끼제)를 사용하여 측정했다. 또한 동일한 조건 하에서 합계 20시간 배양을 계속했다. 20시간 배양 후의 배양액 중의 락트산 농도를 마찬가지로 측정했다.

표 2에, 형질 전환체 주명, 숙주 주명, 4.5시간 배양 후의 락트산 농도, 20시간 배양 후의 락트산 농도를 나타낸다.

표 2

형질 전환체 주명	숙주 주명	4.5시간 후의 락트산 농도 (g/L)	20시간 후의 락트산 농도 (g/L)
ASP2832	ARC010	9.9	16.3
ASP2837	IGF541	8.1	13.7
ASP2838	IGF542	46.1	88.1
ASP2839	IGF543	52.2	9.7
ASP2840	IGF544	8.2	13.8
ASP2833	IGF535	63.1	15.0
ASP2834	IGF545	8.7	14.2
ASP2835	IGF550	10.1	15.2
ASP2836	IGF546	0.0	10.0

[예 3]

<S.폼베 락트산 탈수소 효소 고 생산주의 제작>

예 1에서 제작한 IGF543주(h⁻ leu1-32 ura4-D18 pdc2-D23)는 생육 속도가 느린 것이었으므로, 그 생육 속도를 회복하기 위해, IGF543주를 YES 플레이트(이스트 엑기스 0.5%/글루코오스 3%/SP 서플먼트)에 스트리크하고 25℃에서 배양하여, 얻어진 콜로니를 YPD 배지(이스트 엑기스 1%/펩톤 2%/글루코오스 2%)에 이어 식균하여 25℃에서 배양하고, 충분히 생육한 배양액을 사용하여 글리세롤 스톱을 제작하여, -80℃에서 보존했다. 상기 작업을 적절한 생육 속도가 얻어질 때까지 반복하여, 생육 속도가 회복된 주를 제작했다(명칭은 IGF543을 계승).

pTL2HsLDH(예 2)를 제한 효소 SpeI 및 Bst1107I로 이중 소화하고, 얻어진 단편(hCMV 프로모터/LDH-ORF/LPI 터미네이터)을, 하기의 공정으로 제작한 Tf2 다좌 조합형 벡터 pTf2MCS-ura4의 제한 효소 NheI-KpnI(말단 평활화) 인식 배열 사이에 삽입하여, 조합형 L-락트산 탈수소 효소 유전자 발현 벡터 pTL2HsLDH-Tf2를 제작했다.

pTf2MCS-ura4의 제작 공정은 다음과 같다. 즉, 세포로부터의 전체 게놈 DNA 추출 키트(퀴아젠사제 DNeasy)를 사용하여, S.폼베의 전체 게놈 DNA를 정제하고, 그 중 1μg을 주형으로 하여, 5' 말단측에 제한 효소 BsiWI의 인식 배열(CGTACG)을 도입한 하기 프라이머 페어,

5'-AAGGCCTCGTACGTGAAAGCAAGAGCAAAACGA-3'(하기 배열표의 배열 번호 71),

5'-AAGGCCTCGTACGTGCTTTGTCCGCTTGTAGC-3'(하기 배열표의 배열 번호 72)

를 사용하여, PCR법에 의해, S.폼베의 Tf2-2(GeneDB 수체의 계통명 SPAC 167.08 유전자)의 DNA 단편(약 3950 염기쌍)을 증폭시켰다. 증폭 DNA 단편의 양쪽 말단을 제한 효소 BsiWI에 의해 처리하고, 아가로오스겔 전기영동에 의해 분리/정제하여, 인서트 단편으로서 제조했다.

이어서, 염색체 조합용 벡터 pXL4(Iridis 이외, Yeast지, 23권, 83-99페이지, 2006년)를 동일한 제한 효소 BsiWI에 의해 소화하고, 암피실린 내성 유전자(ApR)와 대장균의 복제 기점(pBR322 ori)을 포함하는 영역(약 2130 염기쌍)을 얻었다. 그 DNA 단편을 추가로 탈인산화 효소(다카라 바이오사제 CIAP)로 탈인산화 처리하고, 아가로오스겔 전기영동에 의해 분리/정제하여, 벡터 단편으로서 제조했다.

상기 인서트 단편과 벡터 단편을, 라이게이션 키트(다카라 바이오사제 DNA Ligation Kit ver.2)를 사용하여 연결한 후, 대장균 DH5(도요보사제)를 형질 전환하여, 재조합 플라스미드 pTf2-2(6071 염기쌍)를 제작했다.

- [0209] 상기 구축 벡터 pTf2-2의 0.1 μg을 주형으로 하고, 하기 프라이머 페어,
- [0210] 5'-GGGGTACCAAGCTTCTAGAGTCGACTCCGGTGCTACGACACTTT-3'(5' 말단에 제한 효소 KpnI, HindIII, XbaI, SalI의 인식 배열을 갖는다)(하기 배열표의 배열 번호 73),
- [0211] 5'-GGGGTACCAGGCCTCTCGAGGCTAGCCATTTCCAGCGTACATCCT-3'(5' 말단에 제한 효소 KpnI, StuI, XhoI, NheI의 인식 배열을 갖는다)(하기 배열표의 배열 번호 74)
- [0212] 를 사용하여, PCR법에 의해 전체 길이를 증폭시켜, 6060 염기쌍의 단편을 얻었다. 그 양쪽 말단을 KpnI에 의해 소화하고, 아가로오스겔 전기 영동에 의해 분리·정제된 뒤, 라이게이션 키트를 사용하여 자기 환상화하고, 트랜스포존 유전자 Tf2-2 배열의 내부에 멀티 클로닝 사이트(MCS)를 더 갖는 6058 염기쌍의 벡터 pTf2(MCS)를 제작했다.
- [0213] 상기 구축 벡터 pTf2(MCS)를 제한 효소 KpnI 및 NheI를 사용하여 이중 소화하고, 6040 염기쌍의 단편을 아가로오스겔 전기 영동에 의해 분리·정제했다. 또한 S.폼베의 우라실 요구성 마커 ura4(GeneDB 수재의 계통명 SPCC 330.05c, 오로티딘-5'-인산탈탄산 효소 유전자)의 양단부에 PCR법을 사용하여 제한 효소 KpnI 및 NheI의 인식 배열을 부가한 단편을 제작하고, 제한 효소 KpnI 및 NheI를 사용하여 이중 소화하고, 2206 염기쌍의 단편을 아가로오스겔 전기 영동에 의해 분리·정제했다. 이들 2개의 단편을 라이게이션 키트를 사용하여 연결하고, 트랜스포존 유전자 Tf2-2 배열의 내부에 멀티 클로닝 사이트(MCS)를 더 갖는 8246기쌍의 벡터 pTf2(MCS)-ura4를 제작했다.
- [0214] 상기에서 제작한 벡터를 사용하여, 오카자키 등의 방법(Okazaki 이외, Nucleic Acids Res.지, 1990년, 18권, 6485-6489페이지)에 의해 IGF543주(생육 속도 회복주)를 형질 전환하여, 선택 배지 MMA+Leu 플레이트에 도포했다. 얻어진 다수의 싱글 콜로니를 YPD16(이스트 엑기스 1%/펩톤 2%/글루코오스 16%) 배지에 식균하여 32℃에서 72시간 배양 후, 배양 상청만을 시료로 하고, BF-4 및 BF-5(오지 게이스꾸 기끼)를 사용하여, 글루코오스, 에탄올, L-락트산 농도 및 배지의 pH의 측정을 행했다. 그 결과를 바탕으로, 이들 중에서 다시 L-락트산 생산성이 높은 것을 선발하여, YPD12(이스트 엑기스 1%/펩톤 2%/글루코오스 12%) 배지에서 더 배양(20시간, 44시간, 66.5시간, 80시간, 176시간)한 후, 마찬가지로 배양 상청 중의 글루코오스, 에탄올, L-락트산 농도 및 배지의 pH를 측정하여, L-락트산의 생산성이 가장 높은 주를 선발, ASP2782(유전자형: h⁻ leu1-32 ura4-D18 pdc2-D23 Tf2 <HsLDH-ORF/ura4+)>라고 명명했다.
- [0215] 마찬가지로 공정에서 ARC010주의 형질 전환체도 제작하여, ASP2767주로 했다.
- [0216] [예 4](참고예)
- [0217] <S.폼베 락트산 탈수소 효소 고 생산주를 사용한 경시적 배양 시험>
- [0218] 예 3에서 얻어진 형질 전환체 ASP2767주를 YPD6 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 6%)에 식균하여, 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm의 조건 하에서 24시간 배양을 행했다. 배양 종료 후, 원심 분리(2000g, 10분)에 의해 균체를 회수했다. 계속하여 5ml의 YPD12L 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 12%, 프로테오리피드 1%)에 상기 회수 균체를 5.2그램(건조 균체 환산)/리터의 농도(OD660이 26)로 되도록 접종하고, 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm의 조건 하에서 24시간 배양을 행하여, 배양액 중의 에탄올, 락트산 농도 및 pH를 경시적으로 측정했다. 결과를 표 3에 나타낸다.
- [0219] 락트산 탈수소 효소 유전자를 도입한 S.폼베를 사용하면, 락트산이 축적되어 배양액의 pH가 2.9 이하로 되는 4시간 내지 7시간 동안에, pH가 2.8로부터 2.5로 더 저하되고, 또한 락트산의 농도가 상승하여, pH 3 이하의 산성 조건 하에서도 알칼리에 의한 중화를 행하지 않고 락트산 생산이 가능했다.

표 3

배양 시간 (hr)	에탄올 농도 (g/L)	락트산 농도 (g/L)	p H
1	4. 0	2. 9	3. 7
2	7. 8	6. 7	3. 2
4	16. 0	21. 5	2. 8
7	28. 0	44. 7	2. 5
24	28. 5	37. 7	2. 5

[0220]

[0221] [예 5](참고예)

[0222] <S.폼베 락트산 탈수소 효소 고 생산주를 사용한 고밀도 배양 시험>

[0223] 예 3에서 얻어진 형질 전환체 ASP2767을 YPD6 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 6%)에 식균 하여, 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm의 조건 하에서 24시간 배양을 행했다. 배양 종료 후, 원심 분리(2000g, 10분)에 의해 균체를 회수했다. 계속하여 5ml의 YPD12L 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 12%, 프로테오리피드 1%)에 상기 균체를 0.4, 5.2, 18.2, 31.8, 48.0그램(건조 균체 환산)/리터의 농도(각각 OD660이 2, 26, 91, 159, 240)로 되도록 접종하여, 각각, 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm의 조건 하에서 배양을 행하고, 종료 후, 배양액 중의 글루코오스, 에탄올 및 락트산 농도를 측정했다. 결과, 및 그 측정 결과로부터 계산한, 락트산의 대당 수율과 생산 속도를 표 4에 나타낸다.

표 4

초발 농도 (g/L)	배양 시간 (hr)	글루코오스 농도 (g/L)	에탄올 농도 (g/L)	락트산 농도 (g/L)	락트산의 대당 수율 (%)	락트산의 생산 속도 (g/L/hr)
0.4	24	0.0	26.7	34.1	26.5	1.4
5.2	7	0.4	28.0	44.7	34.8	6.4
18.2	4	0.8	24.1	61.1	47.7	15.3
31.8	2	28.7	18.8	48.0	47.9	24.0
48.0	2	6.8	21.9	62.7	51.3	31.3

[0224]

[0225] [예 6]

[0226] <S.폼베 락트산 탈수소 효소 고 생산주(pdc2 삭제주)를 사용한 고밀도 배양 시험>

[0227] 예 3에서 얻어진 형질 전환체 ASP2782를 YPD6 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 6%)에 식균 하여 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm의 조건 하에서 24시간 배양을 행했다. 배양 종료 후, 원심 분리(2000g, 10분)에 의해 균체를 회수했다. 계속하여 5ml의 YPD12L 발효 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 12%, 프로테오리피드 1%)에 상기 균체를 0.2, 3.8, 15.0, 23.8, 31.6, 46.8그램(건조 균체 환산)/리터의 농도(각각 OD660이 1, 19, 75, 119, 158, 234)로 되도록 접종하여, 각각, 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm으로 배양을 행하고, 종료 후, 배양액 중의 글루코오스, 에탄올 및 락트산 농도를 측정했다. 결과, 및 그 측정 결과로부터 계산한 락트산의 대당 수율과 생산 속도를 표 5에 나타낸다.

표 5

초발 농도 (g/L)	배양 시간 (hr)	글루코오스 농도 (g/L)	에탄올 농도 (g/L)	락트산 농도 (g/L)	락트산의 대당 수율 (%)	락트산의 생산 속도 (g/L/hr)
0.2	23	15.1	22.1	39.9	37.4	1.7
3.8	23	0.2	20.7	58.1	47.8	2.5
15.0	7	36.7	9.2	62.4	70.3	8.9
23.8	6	17.2	10.2	79.7	73.6	13.3
31.6	6	12.1	11.5	87.5	79.7	14.6
46.8	6	5.7	10.4	95.2	82.0	15.9

[0228]

[0229] PDC2를 결실시킨 ASP2782주를 사용함으로써, 높은 대당 수율로 락트산을 생산할 수 있었다. 또한, 초발 균 농도가 15.0그램(건조 균체 환산)/리터 이상의 예가 나타난 바와 같이, 고밀도 배양을 행함으로써 대당 수율이 대폭 상승하는 것을 알았다. 이 대당 수율의 상승으로부터, PDC2를 결실시킨 S.폼베에 락트산 탈수소 효소 유전자를 도입한 형질 전환체는, 고도로 최적화된 고발현계를 구비하고 있는 것을 알았다.

[0230] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, PDC2를 결실시키지 않는 형질 전환체 ASP2767을 사용한 예 5에서는, 이 예 6에 비하여 대당 수율이 낮아, 가장 수율이 높은 것이어도 50% 정도이었다. 이것은, PDC2가 결실되어 있지 않기 때문에, 유산 발효와 동시에 에탄올 발효가 행해지기 때문이라고 생각되어진다.

[0231] [예 7]

[0232] <S.폼베 락트산 탈수소 효소 고 생산주(pdc2 삭제주)를 사용한 고밀도 반복 배양 시험>

[0233] 예 3에서 얻어진 형질 전환체 ASP2782를 YPD6 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 6%)에 식균 하여 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm의 조건 하에서 24시간 배양을 행했다. 배양 종료 후, 원심 분리(2000g, 10분)에 의해 균체를 회수했다. 계속하여 5ml의 YPD12L 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 12%, 프로테오리피드 1%)에 상기 균체를 30그램(건조 균체 환산)/리터 정도의 농도로 되도록 접종하고, 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm의 조건 하에서 배양을 행하여, 배양액 중의 락트산과 에탄올의 농도를 측정했다. 배양 종료 후, 원심 분리(2000g, 10분)에 의해 배양 상청 및 균체를 회수했다. 회수된 균체를 다시 동일한 액체 배지 외에 배양을 행했다. 또한 이 일련의 조작을 6회 행했다. 합계 7회의 배양에 있어서의 각 접종 농도와 배양 시간, 배양 종료 시의 글루코오스, 에탄올 및 락트산 농도의 측정 결과, 및 그 측정 결과로부터 계산한 락트산의 대당 수율을 표 6에 나타낸다.

[0234] ASP2782주를 사용한 연속 배양에서는, 횟수를 거듭해도 락트산의 대당 수율이 고도로 유지되고 있어, 알칼리에 의한 중화를 행하지 않고, 락트산을 안정되고 높은 생산성으로 생성되는 것이 확인되었다.

표 6

	초반 균체 농도 (g/L)	배양 시간 (hr)	글루코오스 농도 (g/L)	에탄올 농도 (g/L)	락트산 농도 (g/L)	락트산의 대당 수율 (%)
1회째	38.6	23	0.7	11.5	97.2	81.2
2회째	35.8	6	0.0	18.1	93.1	72.4
3회째	29.2	42	0.0	14.5	86.5	75.2
4회째	31.2	72	0.0	21.4	86.1	67.3
5회째	28.6	24	0.0	19.3	84.6	69.1
6회째	30.4	24	0.0	19.3	83.7	68.8
7회째	30.6	24	4.1	19.3	83.3	68.8

[0235]

[0236] [예 8]

[0237] <배지의 최소화>

[0238] 예 3에서 얻어진 형질 전환체 ASP2782를 YPD6 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 6%)에 식균 하여 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm의 조건 하에서 24시간 배양을 행했다. 배양 종료 후, 원심 분리(2000g, 10분)에 의해 균체를 회수했다. 계속하여 5ml의 YPD12L 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 12%, 프로테오리피드 1%) 또는 D12 액체 배지(글루코오스 12%)에 상기 균체를 44.0그램(건조 균체 환산)/리터가 되도록 접종하고, 온도 32℃, 진탕 속도 100rpm의 조건 하에서 배양을 행하여, 락트산과 에탄올의 농도를 경시적으로 측정했다. 2개의 배지에 있어서의 배양 시간, 배양액 중의 글루코오스 농도, 에탄올 농도, 락트산 농도 및 그 측정 결과로부터 계산한 락트산의 대당 수율을 표 7에 나타낸다.

표 7

배지	배양 시간 (hr)	글루코오스 농도 (g/L)	에탄올 농도 (g/L)	락트산 농도 (g/L)	락트산의 대당 수율 (%)
YPD12L	6.0	0.4	13.7	96.3	78.2
YPD12L	22.0	0.0	17.5	81.0	70.3
D12	3.0	50.9	5.5	53.1	83.2
D12	4.5	30.4	7.5	71.2	82.9
D12	6.0	17.0	9.2	85.7	82.6

[0239]

[0240] [예 9]

[0241] <S.폼베 락트산 탈수소 효소 고 생산주를 사용한 락트산 생산 결과>

[0242] ASP2767주를 5ml의 YPD24L 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 24%, 프로테오리피드 1%)에 균체 농도가 0.2그램(건조 균체 환산)/리터가 되도록 접종하여 32℃에서 47시간 배양을 행했다. 배양 종료 후의 락트산 생산량은 124.2g/L이었다. ASP2767주를 5ml의 YPD12LA 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 12%, 프로테오리피드 1%, CSL-AST 1%)에 균체 농도가 74.6그램(건조 균체 환산)/리터가 되도록 접종

하여 32℃에서 1시간 발효를 행했다. 발효 종료 후의 락트산 생산량은 58.6g/L, 생산 속도는 58.6g/h이었다.

[0243] ASP2782주를 5ml의 YPD12L 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 12%, 프로테오리피드 1%)에 균체 농도가 31.6그램(건조 균체 환산)/리터가 되도록 접종하여 32℃에서 9시간 발효를 행했다. 발효 종료 후의 락트산 생산량은 99.2g/L, 대당 수율은 83%이었다. ASP2782주를 5ml의 YPD12 액체 배지(이스트 엑기스 1%, 펩톤 2%, 글루코오스 12%)에 균체 농도가 44.0그램(건조 균체 환산)/리터가 되도록 접종하여 32℃에서 6시간 발효를 행했다. 발효 종료 후의 락트산 생산량은 85.7g/L, 대당 수율은 88%이었다.

[0244] 이상의 결과로부터, pdc2 유전자가 삭제된 ASP2782주 쪽이, 삭제되어 있지 않은 ASP2767주보다 우수한 생산성을 갖는 것이 나타났다.

[0245] 본 발명을 상세하게, 또한 특정한 실시 형태를 참조하여 설명했지만, 본 발명의 정신과 범위를 이탈하지 않고, 여러 변형이나 수정을 가할 수 있는 것은, 당업자에게 있어서 명확하다.

[0246] 본 출원은, 2009년 8월 21일 출원의 일본 특허 출원 제2009-192271호에 기초하는 것이고, 그 내용은 여기에 참조로 하여 도입된다. 또한, 본 명세서 중에 기재된 문헌의 내용은, 여기에 참조로 하여 도입된다.

[0247] **산업상 이용가능성**

[0248] 본 발명의 형질 전환체 및 그것을 사용한 락트산의 제조 방법은, 저pH에서도 알칼리에 의한 중화를 행하지 않고 높은 생산성으로 락트산을 생산할 수 있기 때문에, 락트산의 공업적인 제조 방법으로서 적절하게 사용할 수 있다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Asahi Glass Company, Limited

<120> Transformant and method for production thereof, and method for production of lactic acid

<130> F20100123

<150> JP2009-192271

<151> 2009-08-21

<160> 74

<210> 1

<211> 999

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggcaactc taaaggatca gctgatttat aatcttctaa aggaagaaca gacccccag 60

aataagatta cagtgtgtgg gggttggtgct gttggcatgg cctgtgcat cagtatctta 120

atgaaggact tggcagatga acttgctctt gttgatgtca tcgaagacaa attgaaggga 180

gagatgatgg atctccaaca tggcagcctt ttccttagaa caccaagat tgtctctggc 240

aaagactata atgtaactgc aaactccaag ctggtcatta tcacggctgg ggcacgtcag 300

caagaggag aaagccgtct taatttggtc cagcgtaacg tgaacatctt taaattcatc 360

attcctaattg ttgtaaaata cagcccgaac tgcaagttgc ttattgtttc aaatccagtg 420

gatatcttga cctacgtggc ttggaagata agtggttttc ccaaaaaccg tgttattgga 480
agcggttgca atctggattc agcccgattc cgttacctaa tgggggaaag gctgggagtt 540

cacccattaa gctgtcatgg gtgggtcctt ggggaacatg gagattccag tgtgcctgta 600
tggagtggaa tgaatgttgc tgggtgtctct ctgaagactc tgcaccaga tttagggact 660
gataaagata aggaacagtg gaaagagggt cacaagcagg tggttgagag tgcttatgag 720
gtgatcaaac tcaaaggcta cacatcctgg gctattggac tctctgtagc agatttggca 780
gagagtataa tgaagaatct taggcgggtg caccagttt ccaccatgat taagggtctt 840
tacggaataa aggatgatgt ctctcttagt gttccttgca ttttgggaca gaatggaatc 900
tcagaccttg tgaaggtagc tctgacttct gaggaagagg cccgtttgaa gaagagtgca 960

gatacacttt gggggatcca aaaggagctg caattttaa 999

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

aggcaaactg tgaactcgg 19

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gccaatcca ctctcaatag cccgaacgtt ccgtctcg 38

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

gctattgaga gtggaattgg c 21

<210> 5

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5	
agtgggattt gtagctaagc tactggtttc cacattgttt gg	42
<210> 6	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 6	
aagtttcgtc aatatcaca gctcgagacg gaacgttcgg	40
<210> 7	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 7	
ttacaatgct gagtgtgtat tcc	23
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 8	
tgaactcggg tgaaaaatgt cg	22
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 9	
tgagtgtgta ttcctttttc gc	22
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 10	
ctctccagct ccatccataa g	21
<210> 11	
<211> 45	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<400> 11

gacacaactt cctacaaaa agcctttctg cccatgtttt ctgtc 45

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

gctttttggg aggaagttgt gtc 23

<210> 13

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

agtgggattt gtagctaagc tgtatccatt tcagccgttt gtg 43

<210> 14

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

aagtttcgtc aatatcaca gctgacagaa aacatgggca gaaag 45

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<400> 15

gttccttaga aaaagcaact ttgg 24

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

cataagcttg ccaccacttc 20

<210> 17

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 17
 gaaaaagcaa ctttgtatt ctgc 24
 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 18

 aaggcatatt cgttgattaa ccc 23
 <210> 19
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 19
 ggtggaaagg tttgtgcaat cgtcaactc atgatatttc tttatgg 47
 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 20
 gattgcacaa acctttccac c 21
 <210> 21
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 21
 agtgggattt gtagctaagc tcatcccaca tctgtaataa tcacg 45

 <210> 22
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 22

aagtttcgtc aatatcaca gctccataaa gaaatatcat gagttgacg	49
<210> 23	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 23	
tttgagaaga aaattttatg tccagc	26
<210> 24	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 24	
ccatttagca gtataagggt cg	22
<210> 25	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 25	
aagtaaaaat gtgaaagcaa tgtagg	26
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 26	
acacacaaac acttccattc c	21
<210> 27	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 27	
cctaacaaaa gcatcatttg agaagacgaa tgaaatgaca gcaac	45
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<400> 28

ttctcaaatg atgcttttgt tagg

24

<210> 29

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 29

agtgggattt gtagctaagc tctggacaag tctaccttgg ag

42

<210> 30

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 30

aagtttcgtc aatatcaca gctgttgctg tcatttcatt cgtc

44

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

gatacaggag tacaacaaaa cac

23

<210> 32

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

tctccatecc tcctccc

17

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

acgtactta aacaagacaa gc

22

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

tcattcctcg atattcagtt c

21

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 35

gccagtgagg tttgtagcta ctctgatcgg catTTTTTgg

40

<210> 36

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

gtttcgtcaa taccacaagc ttccccaacc tccatttcc tcc

43

<210> 37

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 37

ctacgatcag aagaagatca atgagacgcg gaaggggagc gcc

43

<210> 38

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 38

ggcgctcccc ttccgcgtct cattgatctt cttctgatcg tag

43

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 39

atgcatttca ctctattcct c

21

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 40
 gctatagtta agtgaagac 20
 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 41
 ttgtccacac cactcattcg 20
 <210> 42
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 42
 atcgtcgtcg atgctgattg g 21
 <210> 43
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 43
 gccagtgggga ttgttagctc agcagtcatt ctcattccg 39
 <210> 44
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 44
 cgtaatatc acaagcttgt ctccccttct attgggattt gc 42
 <210> 45
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 45

gattacctgc aatcatgttt ccggcctttt gtgaaacctg cc	42
<210> 46	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 46	
ggcaggtttc acaaaaggcc ggaaacatga ttgcaggtaa tc	42
<210> 47	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 47	
ggagaatgat gtattggtaa ataac	25
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 48	
ccttggaat gagcgaattc	20
<210> 49	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 49	
gggttgtaag gagcatactg	20
<210> 50	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 50	
gaaggagatt atgtgaaaca agttgaaatc	30
<210> 51	
<211> 51	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<400> 51

agcttagcta caaatccac tctgaggga gtgttcttgc tacaaaaatc t 51

<210> 52

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 52

aagtttcgtc aatatcaca gctcatgacg gaagattccg agaaattccg ttt 53

<210> 53

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 53

caaagccatg cttttaatgt taaagtgaat 30

<210> 54

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 54

attcacttta acattaaaag catggctttg atcgattgag atttttgtag caagaacact 60

<210> 55

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 55

ggaaatggtt catgtggact gggttttatt 30

<210> 56

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 56

cctgctctta aaatgacgaa tgggttaggc 30

<210> 57

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 57
 atatagtgcg atatggatga aggagaagag 30
 <210> 58
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 58
 atcataactt actatatcgt gaagaagaga 30
 <210> 59
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 59
 agcttagcta caaatccac ttagaatgag taattcaact tcttaaacca c 51
 <210> 60
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 60
 aagtttcgtc aatatcaca gctttagctt aaaagtaata agcttctatg tga 53
 <210> 61
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 61
 tgaagacatt ttataaaact taaataaaaa 30
 <210> 62
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 62
 tttttattta agttttataa aatgtcttca gaaatttaaa tctgtggttt aagaagtga 60

<210> 63
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 63
 actttgttta ttgtagaaag tcgagcttga 30
 <210> 64
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 64
 caaaagacag gggtcggatt gattccttgg 30
 <210> 65
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 65
 tgtgctgttt ttcaagtggc catgcgttac 30
 <210> 66
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 66
 agcttagcta caaatccac t 21
 <210> 67
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 67
 agcttgtgat attgacgaaa ctt 23
 <210> 68
 <211> 5558
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 68

actagtgaat tcgagtaigt gtacgagttg tctttaaac cacagaggta gaatgtatat	60
ataaaattaa taagctaagt gtaatactta aaaaatacat taattggaac tcgtatccta	120
ccatttaciaa tgitcatcca attttttcag attgtactgt aaatagcggt tgaaaacacc	180
aaatttitaga agctaatac tctcatcata atcgtctaca tctcatcgt tatcgacgat	240
aaaagaatca tcttgcattg tgggttcatt catgctatca aacgagggat caacgtaaat	300
aggtgttttc actgtagccg ctgctcttct ggttggcctc tttctaactg gagaatctga	360
atcttctggt ggctctgcgt tagtcgaact agcttttggg gttgaactac tacctggaat	420
aataaaatca tcatcgctat cttcagggtg ttgtttcttt accgagcttg cttttttccc	480
tttattcttc gcagaagcct tcgtggatgt tatggtggaa ggtttcaaac tgctaggcaa	540
caaatcatct tcatcgctg aagaaaatat ggtagtagca actggtttat tagtctttct	600
tcctcttcca gacgccgagg ctgctatttt tttagcgggt tttttactac ctgcgtcttc	660
agagtcaaca gattgacttc tttttcttga ttttccacta tcaactgctat ccaatcccgg	720
gctcttagat atgcgatttt cttcaactga taagccatga gagttatcct ctgtcttgac	780
aatgtttatg tcagatgatt tctcagggtc tttagacgct gcgaactcaa gtaaagtgtg	840
ttgttttcca ttgttttag atggtttgga ttctgtgcta gcttctttt taacagcagt	900
acttgaggag gatccggcaa tagccctggg ttctctagta ccagtggtat tacctcgagg	960
cttcttttcc gttcgattta caaaatctct tgaggattgc tcttcttcta acatttctct	1020
ctgaatatca tccataacct tattccaagc atgctcaaat gcacccaaat catgaagcca	1080
caattcttta ggagtttttt taatcaaagc atccagttcg gccattactt cgtccttttt	1140
cttgagaagt tccacatacc gttcataggt caaagaccat aaaggcattg aaagaaggta	1200
attgtaggca tctgaatcct cgtcttgcca aacatcacca gattgttctt cttcagcaag	1260
agcattttca acttctaact caaccaaagc ccttttcttt ggtttactga taggttgaaa	1320
cttcttttcc ttcagctcca caatgagatc ctttttcttc tttttgaaa ctacaagctc	1380
cccctctata atcatatgaa taaaccgcgc ttgatttgaa aatctatcaa accttttttc	1440
caattcatta accatatgct ctttacgtct ctggtatgtc cttaaagcta cttcgtaaaa	1500
ctcggtcaaa atatcttcaa cactgtcata cttcttgatc cgtccagatg catcaaaagc	1560
aatcatatta ctggttgctt gactacgcga cagtttaaac ttaacttcca aggattcatt	1620
taatgcttct ttcattgccg cttcggttaag cgtgacatta aagtgaacat ttccttcacc	1680
gtgatggctt tcatagtcca cgatgaattt acgaattttt tccgtaccaa caagaccagc	1740
ctccagatac tcttcattc gtacgtggct taactatgcg gcacagagc agattgtact	1800

gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat 1860

caggcgtctt tccgtttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg 1920

agcggtatca gtcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 1980

aggaaagaac atgcatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 2040

cgttgctggc gtttttccat aggtcccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgt 2100

caagtacagag gtggcgaac cgcacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa 2160

gtccctcgt gcgtctcct gttccgacc tgccgcttac cggataacctg tccgccttc 2220

tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gtcacgctg taggtatctc agttcgggtg 2280

aggctgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cggtcagccc gaccgtgcg 2340

ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 2400

cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcggtgct acagagtct 2460

tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgtctgc 2520

tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 2580

ctggtagcgg tggttttttt gtttcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 2640

aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgtca gtggaacgaa aactcacgtt 2700

aagggtttt ggcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctatgcctt ttaaattaaa 2760

aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat 2820

gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct 2880

gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc cccagtgtg 2940

caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 3000

ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta 3060

attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg 3120

ccattgctgc aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg 3180

gttccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct 3240

ccttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta 3300

tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg 3360

gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc 3420

cggcgtcaac acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg 3480

gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga 3540

tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 3600

ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat 3660
 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttatgtc 3720
 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca 3780
 catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct 3840
 ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtcttcaaga attgttgttc gtacggcggc 3900
 ttcgatagct tcagcctcct taggagcatt caaaccataa cgaaggagaa gggaagcaga 3960

 taaaattgta ccaacaggat taacaatgcc ctfgccagcg atatcgggag cgctaccgtg 4020
 aatgggctca accaaacaat gaaccttttc tttctgatttt cctaccacac cggaaaggga 4080
 ggcaagaggc aaaaggccca agctaccagg aatgacagaa gcctcatctg aaataatgtc 4140
 accaaacaag ttgtcagtca aaacaacacc gttaagtgtc cgagggtctc tgacaaaag 4200
 catggctcgc gagtcaatga gctggttttt taaggtaagg tgaggatatt cctcctaaa 4260
 aatcttagct acagtcttgc gccaaagacg agaagttgcc aaaacattag ctttgtcgag 4320
 taatgtgacg ggagcaggag gggttgaagt ttcagctaac caagcagcca aacgagcaat 4380

 acgagaaact tcttccaaac tgtaaggcca agtgtccata gcataacccg atccgttgtc 4440
 ctcaagtgcg tcaccaaagt aacaacctcc agtaagtctc cgtacaacac aaaaatcgac 4500
 accttcaacg atttcaggct tcaaagggtc gtacttgact aaagacttgc tggcaaagtt 4560
 gcaaggctga aggttggccc aaacacccat actcttacga agcttcaata aaccttgctc 4620
 aggacgacaa ttgggggttg tccattcagg accaccaacg gcacccaaaa gaacaccgtc 4680
 agcttccaaa caagccttca cagtctcgtc agtcaaaggg gttccatagg catcaataga 4740
 ggcacctcca atcttgtgtt cttcaaacctc gagttttaac tcaggtegtc tcttctcaac 4800

 gactttcaaa acctccaagg cagaagcaac aatttcaggg ccaatatggt ctcttggtaa 4860
 gacgacgatt ttctttgcac acatgttgtt gaagaagttt tgttgtgaaa tggtttcgtg 4920
 aaagtttcag acctaccgc aaaaatgcct ggtttcggga aactcaacac tgttgcaatt 4980
 tttatactac agattgggat atcgataata ttgcgtaaaa aatccttttt ttaaaaagct 5040
 tgtttacagt aacgtaaatg accagaaatc agatgaaaat cacaagaaag caaataattc 5100
 acgttaaatc ctgatatgtt tgattttgtg atgaaatcat ggatgttcat aggaattgtt 5160
 gaaattgcgc ttttttaacg aaatatacaa gtatcctgga gcttacttaa ttaattaatg 5220

 aatctttgtt tctagatatt aaaatagtag cctcaattat cagcgcttcc tacgttagta 5280
 aacgaaattt ttaatgtcaa aaaaatgttt aatagacagt acgaatatgc attataatgt 5340
 tcataaataa tttgagtatg tgtacgagtt gtctttaaac ccacagaggt agaattgata 5400
 tataaaatta ataagctaag tgtaatactt aaaaaataca ttaattggaa ctctgtatcct 5460

accatttaca atgttcatcc aattttttca gattgtactg taaatagcgt ttgaaaacac 5520

caaatttttag aagctaatca ctctcatcat aatcgtct 5558

<210> 69

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 69

gtccatggca actctaaagg atcag 25

<210> 70

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 70

cagtcgactt aaaattgcag ctccttttg 29

<210> 71

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 71

aaggcctcgt acgtgaaagc aagagcaaaa cga 33

<210> 72

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 72

aaggcctcgt acgtgctttg tccgcttgta gc 32

<210> 73

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 73

ggggtaccaa gcttctagag tcgactcgg tgctacgaca cttt 44

<210> 74

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 74

ggggtaccag gcctctcgag gctagccatt tccagcgtac atcct

45