명세서

발명의 명칭: 신규한 D형 젖산 생산균주 및 그의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 신규한 D형 젖산 생산균주 및 그의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 L형 젖산 생산균주에서 L형 젖산 탈수소효소(L-LDH)의 활성을 억제하고, D형 젖산 탈수소효소(D-LDH)의 활성을 도입하는 단계를 포함하는 변이된 D형 젖산 생산균주의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 변이된 D형 젖산 생산균주 및 및 상기 균주를 배양하고 배양물로부터 D형 젖산을 회수하는 단계를 포함하는 D형 젖산의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 젖산은 식품 분야, 의약분야, 화장품 분야 등 산업 분야에서 다양하게 이용되고 최근에는 폴리유산의 단량체로 활용되어 그 요구량이 크게 증가하고 있다.

[4] 젖산을 생산하는 방법으로는 전통적인 화학합성법과 탄수화물을 기질로 하는 생물학적 발효법이 있다. 상업적으로는 후자의 방법이 선호되는데, 그 이유는 화학합성법을 이용해 젖산을 제조하는 경우 유가상승에 의한 원가상승 측면이나 환경오염 측면의 문제점 외에도 D형 젖산과 L형 젖산이 50%씩 섞여있는 라세믹(racemic) 혼합물 형태의 비활성인 D형 또는 L형 젖산이 생성된다는 단점 때문이다. 이때에 D형과 L형 젖산의 혼합물 조성비는 조절이 불가능하며, 라세믹 혼합물 형태의 젖산을 원료로 폴리유산을 제조할 경우 용융점이 낮은 무정형의 고분자가 되어 용도 개발 시에도 제한이 많다. 반면에 미생물을 이용한 생물학적 발효법의 경우 사용하는 균주에 따라서 D형 또는 L형의 젖산만을 선택적으로 생산하는 것이 가능하다. 예를 들면, 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 바실러스 속(*Bacillus* sp.), 리조푸스 속(*Rhizopus* sp.), 스트렙토코코스 속(*Streptococcus* sp.), 엔테로코코스 속(*Enterococcus* sp.) 등의 미생물은 L형 젖산을 주로 생산하며, 류코노스톡 속(*Leuconostoc* sp.) 미생물과 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillusvulgaricus*)는 D형 젖산을 주로 생산하는 것으로 알려져 있다. 특히, D형 젖산은 체내에서 대사되지 않는다는 특징이 있어서, 이를 이용하여 의료분야에서 생체적 합성 재료용으로 사용될 뿐 아니라 에스테르화 및 염소화함으로써 광학활성 제초제로서도 사용될 수 있는데, 제초제가 광학활성을 갖는다면 약효가 훨씬 향상되고 적은 살포량으로도 동일한 효과를 나타낸다는 것이 확인되어 D형 젖산의 수요가 증가하고 있다. 뿐만 아니라, sc-폴리유산(stereocomplex-PLA)은 기존의 폴리유산과 비교하여 융점 및 열분해온도가 크게 상승되어 고내열성 플라스틱 원료로 이용 가능하며, 이는 순수한 L형 폴리유산에 순수한 D형 폴리유산이 혼합되어 생산된다. 결과적으로 D형 폴리유산의 단량체로 D형 젖산이 필요하게 되어 이의 수요는

점점 증가하게 된다.

[5] 이러한 광학적으로 순수한 D형의 젖산은 미생물 효소의 광학특이적 기질선택성을 이용한 생물학적 발효법이 바람직하나, 자연계에 존재하는 일반적인 야생형 D형 젖산 생산 미생물은 산업 용도로 사용하기에는 젖산의 광학순도면에서나 생산성 측면에서 아직 불리한 점이 있다. 대표적인 D형 젖산 생산 미생물로 *Lb. plantarum, Lb. pentosus, Lb. fermentum, Lb delbrueckii* 등이 있으나 일반적으로 고생산성과 고수율로 젖산을 생산하지 못하고 있으며 광학불순물로 L형의 젖산을 20~40% 포함하고 있다는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여, EMS(ethyl methanesulfonate) 처리를 한 변이 젖산균을 유도, 선별하여 고농도 포도당 함유 배지에서 고농도 젖산을 생산하는 변이주를 확보하고자 하였다(J. Industrial Microbiol, 11:23-28, 1992). 그 결과 대조구에 비해 약 4.8배 생산성이 향상된 균주를 선별하였으나 균주의 장기간 보관에 따른 활성 감소가 수반되었다. 한편, 변이주를 이용한 균주 개발은 일반적으로 수율 향상주는 생산성이 감소되고 반대로 생산성이 향상되면 수율이 감소되는 경향을 보인다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명자들은 현재까지 산업적으로 안정적인 젖산 발효의 모균주는 L형 젖산 생산을 기반으로 하는 미생물이며 대체로 이들 미생물이 D형 젖산을 생산하는 미생물 보다 젖산 생산성과 수율이 우수하다는 점에 착안하여 고생산성 L형 젖산 생산 미생물로부터 L형 젖산 탈수소효소(L-lactate dehydrogenase, L-LDH)를 코딩하는 유전자를 불활성화시키고, 외래의 D형 젖산 탈수소효소(D-lactate dehydrogenase, D-LDH)를 코딩하는 유전자를 도입한 결과, D형 젖산을 높은 수율로 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 발명의 하나의 목적은 L형 젖산 생산균주에서 L형 젖산 탈수소효소의 활성을 약화 또는 불활성화시키고, D형 젖산 탈수소효소의 활성을 도입 또는 강화시키는 단계를 포함하는 변이된 D형 젖산 생산균주의 제조방법을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조되어 변이된 D형 젖산 생산균주를 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 상기 변이된 D형 젖산 생산균주를 이용하여 D형 젖산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[12]

발명의 효과

[13] 본 발명의 D형 젖산 생산균주는 젖산의 생산성이 우수한 L형 젖산 생산균주를 변이시켜 제작된 것으로서, D형 젖산의 생산성이 우수하므로, D형 젖산을 원료로 사용하는 각종 제품의 생산성을 향상시키는데 널리 활용될 수 있을 것이다.

[14]

도면의 간단한 설명

[15] 도 1은 10종의 야생형 젖산균에서 생산된 D형 젖산과 L형 젖산의 비율을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[16]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[17] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 L형 젖산 생산균주에서 L형 젖산 탈수소효소(L-lactate dehydrogenase, L-LDH)의 활성을 약화 또는 불활성화시키고, D형 젖산 탈수소효소(D-lactate dehydrogenase, D-LDH)의 활성을 도입 또는 강화시켜서 변이된 D형 젖산 생산균주를 제조하는 방법을 제공한다.

[18]

[19] 구체적으로, 본 발명의 변이된 D형 젖산 생산균주의 제조방법은 (a) L형 젖산 생산균주에서 L형 젖산 탈수소효소(L-lactate dehydrogenase, L-LDH)의 활성을 약화 또는 불활성화시켜서, 변이된 젖산 생산균주를 수득하는 단계; (b) 상기 변이된 젖산 생산균주에 D형 젖산 탈수소효소(D-lactate dehydrogenase, D-LDH)의 활성을 도입 또는 강화시키는 단계를 포함한다.

[20] 이때, 상기 L형 젖산 생산균주는 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 만을 단독으로 발현시켜서 L형 젖산을 생산하는 균주 또는 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 동시에 발현시켜서 L형 젖산과 D형 젖산을 함께 생산하는 균주가 될 수 있고; L-LDH의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 방법은 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 위치에서 1개 또는 수 개의 뉴클레오티드를 치환, 결실, 삽입 또는 부가시켜 수행할 수 있으며; D-LDH의 활성을 도입 또는 강화시키는 방법은 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 개량된 활성을 나타내도록 변이된 D-LDH 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 존재하는 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 상류에 개량된 활성을 나타내는 프로모터를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 개량된 활성을 나타내는 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 개량된 활성을 나타내는 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된 개량된 활성을 나타내도록

변이된 D-LDH 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주에 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주에 개량된 활성을 나타내도록 변이된 D-LDH 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주에 개량된 활성을 나타내는 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 도입하는 방법 또는 변이된 젖산 생산균주에 개량된 활성을 나타내는 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된 개량된 활성을 나타내도록 변이된 D-LDH 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 도입하는 방법 등을 사용하여 수행할 수 있다.

[21]

[22] 본 발명의 용어 "젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH)"란, NADH를 이용하여 젖산으로부터 수소를 제거하여 피루브산을 생성하거나 또는 피루브산을 환원시켜서 젖산을 생성하는 반응을 촉매하는 세포질성 효소를 의미한다, 상기 LDH는 약 140kDa의 분자량을 나타내고, L형 젖산을 생성하는 L-LDH(EC 1.1.1.27.), D형 젖산을 생성하는 D-LDH(EC 1.1.1.28.), FMN 및 헴을 함유하는 L-LDH(시토크롬 b2, EC 1.1.2.3) 등으로 분류될 수 있다.

[23]

[24] 본 발명의 용어 "L형 젖산 생산균주"란, L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 자체적으로 발현시키고, 생성된 L-LDH를 이용하여 L형 젖산을 생산하는 균주를 의미하는데, L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드만을 단독으로 발현시켜서 L형 젖산을 생산하는 균주 뿐만 아니라, L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 동시에 발현시켜서 L형 젖산과 D형 젖산을 함께 생산하는 균주를 포함한다. 상기 L형 젖산 생산균주는 L형 젖산을 생산할 수 있는 한 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 펜토수스(*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 파라플란타럼(*Lactobacillus paraplantarum*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 존스니(*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus case*) 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 락토바실러스 람노서스, 락토바실러스 파라카세이, 락토바실러스 카세이 등이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이가 될 수 있다.

[25]

[26] 상기 L형 젖산 생산균주로부터 L-LDH의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 L형

젖산 생산균주에 내재된 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 위치에서 1개 또는 수 개, 바람직하게는 2 내지 20개, 보다 바람직하게는 2 내지 10개, 가장 바람직하게는 2 내지 5개의 뉴클레오티드를 치환, 결실, 삽입 또는 첨가시켜서 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 억제하거나 또는 불활성화된 L-LDH를 생산하는 방법을 사용할 수도 있고, 그 외에도 L형 젖산 생산균주로부터 L-LDH의 활성을 약화 또는 불활성화시키는 결과를 도출할 수 있는 방법이라면 특별히 이에 제한되지 않고 사용될 수 있다.

[27]

[28] 본 발명에서 활성을 약화시키거나 또는 불활성화시키는 대상이 되는 L-LDH는 상기 L형 젖산 생산균주에서 내재적으로 생성되는 L-LDH가 될 수 있으므로 L-LDH의 아미노산 서열 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열은 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이의 LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드서열(서열번호 25) 및 LDH1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드서열(서열번호 26), 락토바실러스 카세이의 LDH1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드서열(서열번호 27) 및 LDH2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드서열(서열번호 28), 락토바실러스 람노서스의 LGG_02523을 코딩하는 폴리뉴클레오티드서열(서열번호 29) 및 LGG_00606 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드서열(서열번호 30) 등이 될 수 있다.

[29]

[30] 본 발명의 용어 "변이된 젖산 생산균주"란, L-LDH의 활성을 약화 또는 불활성화시킨 L형 젖산 생산균주를 의미한다. 상기 변이된 젖산 생산균주는 정상적인 L형 젖산 생산균주에 인위적으로 돌연변이를 유발시켜서 L-LDH의 활성을 약화 또는 불활성화시킨 변이균주가 될 수도 있고, 인위적인 변이를 유발시키지 않고, 천연적으로 발생되는 돌연변이에 의하여 L-LDH의 활성이 약화 또는 불활성화된 변이균주가 될 수도 있다.

[31]

[32] 상기 변이된 젖산 생산균주에 D-LDH의 활성을 도입 또는 강화시키는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 개량된 활성을 나타내도록 변이된 D-LDH 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 존재하는 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 상류에 개량된 활성을 나타내는 프로모터를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 개량된 활성을 나타내는 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 개량된 활성을 나타내는 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된 개량된 활성을 나타내도록 변이된 D-LDH 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주에 D-LDH를

코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주에 개량된 활성을 나타내도록 변이된 D-LDH 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주에 개량된 활성을 나타내는 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 도입하는 방법, 변이된 젖산 생산균주에 개량된 활성을 나타내는 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된 개량된 활성을 나타내도록 변이된 D-LDH 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 도입하는 방법 등을 사용할 수 있다.

[33]

[34] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 생산물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[35]

[36] 본 발명에서 사용되는 발현벡터는 숙주 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상적으로 사용되는 발현벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λMBL3, λMBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다.

[37]

[38] 구체적으로, 본 발명의 실시예에서 사용되는 벡터는 그람양성균에서 넓은 범위의 숙주에 사용되는 벡터인 pG+host6이다. 이 벡터의 특징으로는 대장균에서 사용이 가능하기 위한 암피실린 내성 유전자와 대장균용 복제원점, 그람양성균에서 사용이 가능하기 위한 에리트로마이신 내성 유전자와 그람양성균용 복제원점을 가지고 있다는 점이다. 특히 그람양성균용 복제원점은 열민감성 변이가 포함되어 있어 37℃ 이상의 온도에서는 복제가 되지 않으며 이러한 특징은 그람 양성균에서 상동염기서열을 통한 유전자 삽입을 가능하게 한다 (미국 공개특허 20060025190).

[39]

[40] 본 발명의 용어 "형질전환"이란, 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를

포함하는 벡터를 숙주세포에 도입하여 숙주 세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서 발현산물인 mRNA 또는 단백질을 생산하는 일련의 작업을 의미한다. 상기 숙주세포에 도입되는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 한, 어떠한 형태라도 무방하다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는, 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소(상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결 신호, 리보좀 결합부위, 번역 종결신호 등)를 포함하는 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있는데, 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다.

[41]

[42] 본 발명에서 사용되는 D-LDH는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 D형 젖산을 대량으로 생산되는 균주로부터 유래된 것이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 락토바실러스 플란타럼 또는 락토바실러스 델브루에키 등으로부터 유래된 것이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 락토바실러스 델브루에키 유래의 서열번호 31의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드 또는 락토바실러스 플란타럼 유래의 서열번호 32의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드가 될 수 있다. 또한, 상기 서열번호 31 또는 32의 아미노산 서열의 하나 이상의 위치에서의 1개 또는 다수개(단백질의 아미노산 잔기의 입체 구조에 있어서의 위치나 종류에 따라서 상이하지만, 구체적으로는 2 내지 20개, 바람직하게는 2 내지 10개, 보다 바람직하게는 2 내지 5개)의 아미노산이 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위된 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 상기 D-LDH의 활성을 유지 또는 강화시킬 수 있는 한, 서열번호 31 또는 32의 아미노산 서열에 대하여, 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 특히 바람직하게는 97% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 미생물의 종 또는 균주에 따라 상기 폴리펩티드가 갖는 활성을 나타내는 효소의 아미노산 서열에 차이가 있을 수 있기 때문에 특별히 이에 제한되지는 않으며, 상기 아미노산의 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위 등에는 상기 D-LDH의 활성을 함유하는 미생물의 개체 또는 종의 차이에 근거하는 경우 등의 천연적으로 생기는 돌연변이 서열 또는 인위적인 변이 서열까지도 포함할 수 있다.

[43]

[44] 본 발명의 용어 "상동성"이란, 서로 다른 두 아미노산 서열 또는 염기서열 사이의 동일성을 의미하는데, 점수(score), 동일성(identity), 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 BLAST 2.0를 이용하는, 당업자에게 잘 알려진 방법으로 결정될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[45]

[46] 통상적으로 L형 젖산을 생산하는 균주가 D형 젖산을 생산하는 균주보다도

전체적인 젖산의 생산수율이 우수하다고 알려져 있으므로, 본 발명자들은 L형 젖산을 생산하는 균주를 D형 젖산을 생산하는 균주로 변이시킴으로써, D형 젖산의 생산성이 우수한 균주를 제작하고자 하였다. 이를 위하여, 야생형 락토바실러스속 균주의 D형 및 L형 젖산 발효 비율을 비교한 결과, 락토바실러스 파라카세이, 락토바실러스 카세이 및 락토바실러스 람노서스 균주가 젖산의 전체적인 생산성이 우수하고, L형 젖산의 비율이 압도적으로 우수함을 확인하고, 이들의 변이균주를 작제하고자 하였다(도 1). 예를 들어, 락토바실러스 파라카세이에서 유래된 L-LDH 유전자인 ldh 및 ldh1를 결손시키고, 동시에 D-LDH를 삽입 하기 위한 카세트인 δldh1-ldhA(Lb.db)와 δldh-ldhD(Lb.pl)를 각각 제작하고, 이를 열 민감성 벡터인 pG+host6에 도입하여, pG+host6-δldh1-ldhA(Lb.db) 와 pG+host6-δldh-ldhD(Lb.pl)의 2종 벡터를 제작하였다(실시예 3). 이어, 상기 각 벡터를 L-LDH 유전자가 결실된 락토바실러스 파라카세이에 도입하여, L-LDH의 활성이 약화 또는 불활성화되고, D-LDH의 활성이 증강된 형질전환체를 제조하였다(실시예 4). 상기 제조된 형질전환체를 배양하고, 이로부터 생산되는 젖산을 분석한 결과, D형 젖산이 41.6g/L의 농도로 생산되고 L형 젖산은 생산되지 않으며, 상기 생산된 D형 젖산의 생산수율은 공지된 D형 젖산 생산균주에서 생산되는 D형 젖산의 생산수율보다 우수함을 확인하였다(실시예 5).

[47] 따라서, 전체적인 젖산의 생산수율이 우수한 L형 젖산 생산균주에서, L-LDH의 활성을 약화 또는 불활성화시키고, D-LDH의 활성을 도입하거나 또는 증강시킬 경우, 종래의 D형 젖산 생산균주 보다도 우수한 생산수율로 D형 젖산을 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

[48]

[49] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 제조되어, L-LDH의 활성을 나타내는 L형 젖산 생산균주에서, 상기 L-LDH의 활성이 약화 또는 불활성화되고, D-LDH의 활성을 나타내거나 또는 증강되도록 변이된 D형 젖산 생산균주를 제공한다.

[50]

[51] 상기 변이된 D형 젖산 생산균주는 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 L형 젖산 생산균주의 염색체 내의 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 위치에 치환되고 과발현된 균주가 될 수 있다. 상기 변이된 D형 젖산 생산균주는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 락토바실러스 카세이의 LDH1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 27) 및 LDH2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 28)가 각각 락토바실러스 델브루에키(*Lactobacillus delbrueckii*) 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 유래의 LDHD(서열번호 32)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치환된 균주; 락토바실러스 람노서스의 LDH(LGG_02523)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 29) 및

LDH(LGG_00606)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 30)가 각각 락토바실러스 델브루에키 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 락토바실러스 플란타럼 유래의 LDHD(서열번호 32)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치환된 균주; 락토바실러스 파라카세이의 LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 25) 및 LDH1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 26)가 각각 락토바실러스 델브루에키 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 락토바실러스 플란타럼 유래의 LDHD(서열번호 32)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치환된 균주 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이의 LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 25) 및 LDH1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 26)가 각각 락토바실러스 델브루에키 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 락토바실러스 플란타럼 유래의 LDHD(서열번호 32)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치환된 균주가 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 *Lactobacillus paracasei* CC02-0095(KCCM11273P)가 될 수 있다.

[52]

[53] 본 발명자들은 락토바실러스 파라카세이, 락토바실러스 카세이 및 락토바실러스 람노서스 균주에 존재하는 각각의 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 결손시키고, 락토바실러스 델브루에키 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 락토바실러스 플란타럼 유래의 LDHD(서열번호 32)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입한 각각의 형질전환체를 이용하여 D형 젖산을 생산하고, D형 젖산의 수율, 생산성, 생성량 등을 비교한 결과, 락토바실러스 파라카세이 유래의 형질전환체(Lb.paracasei ldh::ldhA ldh1::ldhD)가 수율, 생산성 및 D형 젖산의 생성량의 측면에서 가장 높은 수준을 나타냄을 확인하였다.

[54]

[55] 이에, 본 발명자는 수율, 생산성 및 D형 젖산의 생성량의 측면에서 가장 높은 수준을 나타내는 락토바실러스 파라카세이의 LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 25) 및 LDH1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 26)를 각각 락토바실러스 델브루에키 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 락토바실러스 플란타럼 유래의 LDHD(서열번호 32)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치환시킨 형질전환체(Lb.paracasei ldh::ldhA ldh1::ldhD)를 *Lactobacillus paracasei* CC02-0095로 명명하고, 2012년 4월 2일자로 부다페스트조약하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, 이하, "KCCM"으로 약칭함)에 수탁번호 KCCM11273P로 기탁하였다.

[56]

[57] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 (a)

상기 변이된 D형 젖산 생산균주를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및, (b) 상기 배양물로부터 D형 젖산을 회수하는 단계를 포함하는, D형 젖산의 생산방법을 제공한다.

[58]

[59] 본 발명에서 제공하는 변이된 D형 젖산 생산균주는 젖산의 생산성이 우수한 L형 젖산 생산균주를 변이시켜 D형 젖산을 생산하도록 제작되었다. 따라서, 상기 변이된 D형 젖산 생산균주를 배양하면, 상기 배양된 균주에서 생산된 D형 젖산이 균주의 내부 또는 배양액에 축적될 수 있으므로, 상기 배양된 균주의 내부 또는 배양액에 축적된 D형 젖산을 회수함으로써 D형 젖산을 생산할 수 있다.

[60]

[61] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키기 위하여 수행하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 배양은 변이된 D형 젖산 생산균주로부터 D형 젖산을 생산하려는 목적으로 수행되며, 상기 배양을 수행하는 구체적인 방법은 상기 변이된 D형 젖산 생산균주로부터 D형 젖산을 생산할 수 있게 하는 한 특별히 제한되지 않으나, 당업계에 널리 알려져 있는 모든 방법을 이용하여 수행할 수 있고, 바람직하게는 회분식 배양방법, 유가식 배양방법 또는 연속식 배양방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[62]

[63] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족시킴이 바람직하다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘,

황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[64]

[65] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27℃ 내지 37℃, 바람직하게는 30℃ 내지 35℃이다. 배양은 D형 젖산의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적은 보통 10 내지 100 시간에서 달성된다. 대체로 D형 젖산은 배양 배지 중으로 배출되지만, 경우에 따라서는 세포 중에 포함되어 있을 수 있다.

[66]

[67] 아울러, 배양물로부터 D형 젖산을 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 공지된 D형 젖산 회수 방법은 배양물에 존재하는 D형 젖산을 회수할 수 있는 한 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전 등), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 등) 등의 방법을 사용할 수 있다.

[68]

발명의 실시를 위한 형태

[69]

[70] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[71]

[72] **실시예 1: 야생형 락토바실러스속 균주의 D형 및 L형 젖산 발효 비율 확인**

[73]

[74] 50㎖의 GY배지(5% dextrose, 1% yeast extract, 0.05% sodium citrate, 3% $CaCO_3$, 0.02% $MgSO_4$, 0.001% $MnSO_4$, 0.001% $FeSO_4$ 및 0.001% NaCl)에 10종의 야생형 젖산균을 접종하여 37℃에서 40시간 동안 혐기 배양 한 뒤 발효액에 존재하는 D형 젖산과 L형 젖산의 비율을 HPLC 분석하였다(도 1). 도 1은 10종의 야생형 젖산균에서 생산된 D형 젖산과 L형 젖산의 비율을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[75] 통상적으로 L형 젖산을 생산하는 균주가 D형 젖산을 생산하는 균주보다도 전체적인 젖산의 생산수율이 우수하다고 알려져 있으므로, 상기 10종의 균주 중에서 젖산의 전체적인 생산성이 우수하고, L형 젖산의 비율이 압도적으로 많은 균주인 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*) 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)를 선발하고, 상기 선발된 균주를 D형 젖산 생산용 균주로 변이시키고자 하였다.

[76]

[77] **실시예 2: L형 젖산 탈수소효소(L-lactate dehydrogenase, L-LDH) 염기서열 비교**

[78]

[79] 상기 실시예 1에서 선발된 각 균주에 대해 L형 젖산의 과생산을 유발하는 유전자를 결손시키기 위하여, 미국 국립생물정보센터(NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov//www.ncbi.nlm.nih.gov) 에서의 검색을 통해 L-LDH를 코딩하는 각 유전자 간의 유사성을 비교 분석 하였다(표 1).

[80]

[81] 표 1

[Table 1]

락토바실러스 파라카세이의 L-LDH 유전자와 유사 유전자의 상동성 비교

락토바실러스 파라카세이의 ldh와의 상동성	락토바실러스 파라카세이의 ldh1과의 상동성
락토바실러스 카세이 *ldh1* 100%	락토바실러스 카세이 *ldh2* 99%
락토바실러스 람노서스 *ldh* (LGG_02523) 91%	락토바실러스 람노서스 *ldh* (LGG_00606) 79%

[82]

[83] 상기 표 1에서 보듯이, 3종 젖산균의 L-LDH를 코딩하는 각 유전자는 서로 매우 유사한 염기서열을 가지고 있으며, 특히 락토바실러스 카세이의 *ldh1*은 주요한 L형 젖산 생산 유전자로 알려져 있다(J. Ind. Microbiotechnol., 2008, 35:579-586). 한편, 락토바실러스 카세이의 *ldh2*는 제2의 L형 젖산 생산 유전자로서 상대적으로 광학적으로 순수한 D형 젖산균을 제작하기 위하여 *ldh1*과 함께 동시결손하였다. 종합하면 총 3종의 모균주에서 각각 락토바실러스 파라카세이의 *ldh*, *ldh1*과 락토바실러스 카세이의 *ldh1*, *ldh2*, 및 락토바실러스 람노서스의 2종의 *ldh*들을 결손 대상 유전자로 선정하였다.

[84]

[85] **실시예 3: L-LDH 결손/D-LDH 삽입 벡터 제작**

[86]

[87] 상기 실시예 2에서 선정한 락토바실러스 파라카세이, 락토바실러스 카세이 및

락토바실러스 람노서스의 L-LDH 유전자 결손을 위한 벡터를 제작하였다. L-LDH의 결손과 동시에 D-LDH를 삽입 하기 위한 카세트를 제작하고자 락토바실러스 파라카세이의 *ldh*과 *ldh1*, 락토바실러스 카세이의 *ldh1*과 *ldh*2, 그리고 락토바실러스 람노서스의 LGG02523과 LGG00606 유전자의 ORF 주변 서열을 상동염기서열로 지정하고 서열번호 1부터 24의 프라이머를 제작하였다(표 2).

[88]

[89] 표 2

[Table 2]
프라이머의 염기서열

서열번호	염기서열(5'-3')	주형
1	atatgcctcgagcgggatttcctaggccaacaatcat	*Lb.paracasei, Lb.casei*
2	ttgcgtaagcaaaaattttagtcatggtgatatcatcctttcttatgtgc	*Lb.paracasei, Lb.casei*
3	gcacataagaaaggatgatatcaccatgactaaaatttttgcttacgcaa	*Lb.delbrueckii*
4	tggttgcttacttatcagtgatcgtgatgattagccaaccttaactggagtttca	*Lb.delbrueckii*
5	tgaaactccagttaaggttggctaatcatcacgatcactgataagtaagcaacca	*Lb.paracasei, Lb.casei*
6	atatgcactagtgcttgttaaggatttgtgtcaagcctt	*Lb.paracasei, Lb.casei*
7	atctctcgagtctgacttacctttcggatcaaaat	*Lb.paracasei, Lb.casei*
8	ctcaaattcctcctcatgaagatct	*Lb.paracasei, Lb.casei*
9	cgtcaagatcttcatgaggaggaatttgagatgaaaattattgcatatgc	*Lb.plantarum*
10	ccgttaagctgagcgcttaacctgacgagcttagtcaaacttaacttgcg	*Lb.plantarum*
11	gctcgtcaggttaagcgctcagctt	*Lb.paracasei, Lb.casei*
12	atatactagtccgttggctgggcattgcgtcattc	*Lb.paracasei, Lb.casei*
13	ccccctcgagctggtaatacatcattaactgccgc	*Lb.rhamnosus*
14	ttgcgtaagcaaaaattttagtcatggtgatatcatcctttcttatgtgc	*Lb.rhamnosus*
15	gcacataagaaaggatgatatcaccatgactaaaatttttgcttacgcaa	*Lb.delbrueckii*
16	ggtttaaaatcagttatggtgaagattagccaaccttaactggagtttca	*Lb.delbrueckii*
17	tgaaactccagttaaggttggctaatcttcaccataactgattttaaacc	*Lb.rhamnosus*
18	tagaactagtttattcagcacttgagtaagtcctt	*Lb.rhamnosus*
19	ccccctcgagaaccaagcgtccaagaatgtttgct	*Lb.rhamnosus*
20	gtacagcatatgcaataattttcatcctaaacccctccttgacaggtagc	*Lb.rhamnosus*

21	gctacctgtcaaggaggggtttaggatgaaaattattgcatatgctgtac	*Lb.plantarum*
22	aaaaatactgacgatgggttgtgttttagtcaaacttaacttgcgtatca	*Lb.plantarum*
23	tgatacgcaagttaagtttgactaaaacacaacccatcgtcagtatttt	*Lb.rhamnosus*
24	tagaactagtcaaccgttgtcgaaagcattgcggt	*Lb.rhamnosus*

[90]

[91] 락토바실러스 파라카세이의 유전체를 주형으로 서열번호 1 및 2의 프라이머와 서열번호 5 및 6의 프라이머를 이용하여 *ldh* 유전자 ORF의 5'영역의 700개 염기서열(ldh.pc_UP_700)과 3'영역의 700개 염기서열(ldh.pc_DOWN_700)을 증폭하였다. 또한, 서열번호 7 및 8의 프라이머와 서열번호 11 및 12의 프라이머를 이용하여 *ldh1* 유전자 ORF의 5'영역의 700개 염기서열(ldh1.pc_UP_700)과 3'영역의 700개 염기서열(ldh1.pc_DOWN_700)을 증폭하였다.

[92] 한편, D-LDH 유전자를 증폭하기 위하여 락토바실러스 델브루에키(*Lactobacillus delbrueckii*)와 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)의 유전체를 주형으로 서열번호 3 및 4와 9 및 10을 이용하여 *ldhA*(Lb.db)와 *ldhD*(Lb.pl)의 DNA 절편을 제작하였다.

[93] 그런 다음, 상기 증폭된 DNA 절편인 ldh.pc_UP_700, ldh.pc_DOWN_700 및 *ldhA*(Lb.db)를 서열번호 1 및 6의 프라이머를 이용한 오버랩 PCR 수행하여 *ldh* ORF 주변과 상동 염기서열을 가지며 가운데에는 D-락테이트 디히드로게나제가 위치하는 δldh.pc-ldhA(Lb.db)의 카세트를 제작하였다. 또한, *ldh1* 유전자에 대하여도 동일한 과정을 진행하여 δldh1.pc-ldhD(Lb.pl) 카세트를 제작하였다. 이때, 각각의 카세트는 5' 말단에 XhoI, 3' 말단에 SpeI 제한효소 영역을 포함하도록 디자인하였다.

[94] 락토바실러스 카세이의 *ldh1* 및 *ldh2* 유전자는 락토바실러스 파라카세이의 *ldh* 및 *ldh1* 유전자와 각각 높은 유사성을 지니고 있어 동일한 프라이머를 사용하였다. 락토바실러스 카세이의 유전체를 주형으로 서열번호 1 및 2의 프라이머와 서열번호 5 및 6의 프라이머를 이용하여 (ldh1.ca_UP_700)과 3'영역의 700개 염기서열(ldh1.ca_DOWN_700)을 증폭하였다. 또한, 서열번호 7 및 8의 프라이머와 서열번호 11 및 12의 프라이머를 이용하여 *ldh2* 유전자 ORF의 5'영역의 700개 염기서열(ldh2.ca_UP_700)과 3'영역의 700개 염기서열(ldh2.ca_DOWN_700)을 증폭하였다.

[95] 그런 다음, ldh1.ca_UP_700, ldh1.ca_DOWN_700 및 *ldhA*(Lb.db)를 서열번호 1 및 6의 프라이머를 이용한 오버랩 PCR 수행하여 *ldh1* ORF 주변과 상동 염기서열을

가지며 가운데에는 D-락테이트 디히드로게나제가 위치하는 δldh1.ca-ldhA(Lb.db)의 카세트를 제작하였다. 또한, *ldh2* 유전자에 대하여도 동일한 과정을 진행하여 δldh2.ca-ldhD(Lb.pl) 카세트를 제작하였다.

[96] 락토바실러스 람노서스의 유전체를 주형으로 서열번호 13 및 14의 프라이머와 서열번호 17 및 18의 프라이머를 이용하여 LGG_02523 유전자 ORF의 5'영역의 700개 염기서열(LGG_02523_UP_700)과 3'영역의 700개 염기서열(LGG_02523 _DOWN_700)을 증폭하였다. 또한, 서열번호 19 및 20의 프라이머와 서열번호 23 및 24의 프라이머를 이용하여 LGG_00606 유전자 ORF의 5'영역의 700개 염기서열(LGG_00606_UP_700)과 3'영역의 700개 염기서열(LGG_00606_DOWN_700)을 증폭하였다.

[97] 한편, D-LDH 유전자를 증폭하기 위하여 락토바실러스 델브루에키와 락토바실러스 플란타럼의 유전체를 주형으로 서열번호 15 및 16와 21 및 22를 이용하여 *ldhA*(Lb.db)와 *ldhD*(Lb.pl)의 DNA 절편을 제작하였다.

[98] 그런 다음, 상기 증폭된 DNA 절편인 LGG_02523_UP_700, LGG_02523 _DOWN_700 및 *ldhA*(Lb.db)를 서열번호 13 및 18의 프라이머를 이용한 오버랩 PCR 수행하여 LGG_02523 ORF 주변과 상동 염기서열을 가지며 가운데에는 D-락테이트 디히드로게나제가 위치하는 δLGG_02523-ldhA(Lb.db)의 카세트를 제작하였다. 또한, LGG_00606 유전자에 대하여도 동일한 과정을 진행하여 δLGG_00606-ldhD(Lb.pl) 카세트를 제작하였다. 이때, 각각의 카세트는 5' 말단에 XhoI, 3' 말단에 SpeI 제한효소 영역을 포함하도록 디자인하였다.

[99] 이어, 암피실린과 에리트로마이신 내성유전자를 가지고 있어 대장균-유산균의 셔틀벡터로 사용되며 락토바실러스에서는 42℃에서 증폭되지 않는 특징을 가지는 열 민감성 벡터인 pG+host6에 XhoI, SpeI 제한효소 영역을 이용하여 상기 제작한 6종의 카세트를 각각 클로닝하여 pG+host6-δldh.pc-ldhA(Lb.db) 와 pG+host6-δldh1.pc-ldhD(Lb.pl), pG+host6-δldh1.ca-ldhA(Lb.db) 와 pG+host6-δldh2.ca-ldhD(Lb.pl), pG+host6-δLGG_02523-ldhA(Lb.db) 와 pG+host6-δLGG_00606-ldhD(Lb.pl)의 6종 벡터를 제작하였다.

[100]

[101] **실시예 4: 형질전환체의 제조**

[102]

[103] MRS 고체 배지에서 하루 배양한 락토바실러스 파라카세이, 락토바실러스 카세이 또는 락토바실러스 람노서스 균주를 10㎖ MRS배지에 접종하여 1일간 37℃에서 정치 배양하였다. 50㎖ 튜브에 50㎖의 MRS를 넣은 뒤 1일 배양한 균체를 500㎕ 접종하여 3시간 30분 동안 37℃에서 정치 배양하고, OD600=0.8이 되는 시점에서 배양물을 ice bath에서 5분동안 방치하였다. 그런 다음, 상기 배양물을 원심 분리하여 배지를 제거하여 균체를 수득하고, 이를 세척용 완충액(5mM sodium phosphate, 1mM $MgCl_2$, pH.7.4)으로 2회 세척하였다. 이어, 상기 균주에 25㎕의 0.5M 수크로스 용액을 가하고, 현탁시킨 다음, 50㎕씩

분주하였다. 분주된 균주에 상기 실시예 3에서 제작한 각각의 벡터를 200ng씩 가하고, 1800v, 25F 및 200Ω의 조건으로 전기천공법을 수행하였다. 그런 다음, 상기 균주를 500㎕의 MRS 배지에서 37℃에서 2시간 동안 배양하고, 10㎍/㎖의 에리트로마이신이 포함된 고체 MRS 배지(MRSE)에 도말하여 3일간 30℃에서 배양하여 콜로니를 수득하였다.

[104]

[105] **실시예 5: D-ldh 삽입 균주 제작**

[106]

[107] 상기 실시예 4에서 수득한 콜로니 중에서, 락토바실러스 파라카세이로부터 유래된 형질전환체(락토바실러스 델브루에키 유래 *ldhA*를 포함한 플라스미드 pG+host6-δldh1-ldhA가 도입된 락토바실러스 균주)로 부터 수득한 콜로니의 일부를 10㎍/㎖의 에리트로마이신이 포함된 1㎖의 액체 MRS 배지에 접종하여 42℃에서 1일간 정치 배양하여 1차 crossover를 유도하였다. 상기 배양물 100㎕를 고체 MRSE 배지에 도말하여 7일 배양 후 콜로니를 취해 고체 MRSE 배지에 계대한 뒤 42℃에서 2일 배양하여 균체를 확보하였다. 1㎖의 MRS를 분주한 1.5㎖ 튜브에 확보한 콜로니를 각각 접종하여 37℃에서 1일간 정치 배양하여 2차 crossover를 유도하였다. 37℃에서 배양한 균체의 일부를 취해 콜로니 PCR을 수행하여 *ldh1*의 영역에 *ldhA*(Lb.db) 유전자가 삽입된 것을 확인하고 고체 MRS 배지에서 단독 콜로니를 선별하였다. 개별의 단독 콜로니에 대해 *ldh* 유전자 결손과 D-락테이트 디히드로게나제의 삽입 확인 PCR을 재차 수행하여 ldh1::ldhA(Lb.db) 균주를 최종적으로 제작하였다. 이 균주를 모균주로 하여 같은 방법으로 *ldh*를 결손하고 *ldhD*(Lb.pl)를 삽입하여 L-락테이트 디히드로게나제 2종이 결손된 최종 D형 젖산 생산 균주를 제작하였다.

[108]

[109] 한편, 락토바실러스 카세이와 락토바실러스 람노서스에 대해서도 동일한 과정으로 각 균주에서 2종의 L-락테이트 디히드로게나제를 결손하여 D형 젖산 생산 균주를 제작하였다.

[110]

[111] **비교예 1: 신규 재조합 D형 락토바실러스의 젖산 발효 시험**

[112]

[113] 본 발명을 통해 신규 제작한 재조합 D형 락토바실러스를 본 발명자들이 보유하고 있는 기존의 통상적인 재조합 D형 젖산 생산 균주인 *Lb. plantarum* 기반의 2종 균주와 발효 성적을 비교하였다. 여기서 *Lb.plantarum*을 모균주로 하는 D형 젖산 생성균주라 함은 자체 L형 젖산 탈수소효소 2종 중에서 1종 또는 2종 모두를 결손한 균주로서 Okano등이 발표한 논문(Appl. Environ. Microbiol. (2009)462~467)과 유사한 접근으로 제작된 균주이다. 본 균주는 L형 젖산 탈수소효소에서 *ldhL1* 또는 *ldhL2*가 결손된 유전자형을 가지고 있으며 2종의 균주 모두 광학순도 99% 이상 D형의 젖산을 생산하는 균주이다.

[114] 구체적인 비교 실험에 있어서, 락토바실러스 플란타럼 기반의 2종의 D형 젖산 생산 균주와 신규 제작한 3종의 재조합 락토바실러스 균주들을 고체 MRS 배지에서 1일 배양하였고 얻어진 세포들을 1루프 취해 액체 MRS에 접종하여 37℃에서 1일 더 배양하였다. 총 5종의 재조합 락토바실러스 균주들을 250㎖ baffle 플라스크에서 25㎖ GY 액체 배지에 초기 세포 농도가 600 nm에서 0.1의 광학밀도가 되도록 접종하였다. 배양 온도는 37℃, 교반 조건 100 rpm의 배양기에서 실험을 수행하였으며 총 배양시간은 42시간이다. 시료 배양액은 최초 접종 시점과 최종 발효 시점에서 각각 채취하였고 적정량을 원심분리한 후 상등액을 취하여 HPLC 분석하였다. 분석 결과, 초기 포도당 농도는 53 g/l였다. 분석된 데이터는 2회 반복하여 평균값으로 나타내었고 그 결과는 하기 표 3에 요약하였다. 모든 시료에서 생성된 젖산은 광학적으로 순수한 D형의 젖산인 것으로 효소적 정량을 통해 분석되었다 (Lactic acid, R-Biopharm, 독일).

[115]

[116] 표 3

[Table 3]

각 균주의 젖산 생산성 비교

균주	수율(%)	생산성(g/l·h)	소모당(g/l)	L형 젖산(g/l)	D형 젖산(g/l)
Lb.plantarum ΔldhL1	81	0.81	42	0	34
Lb.plantarum ΔldhL1 ΔldhL2	75	0.69	39	0	29
Lb.paracasei ldh::ldhA ldh1::ldhD	93	1.2	53	0	49
Lb.casei ldh1::ldhA ldh2::ldhD	89	1.1	53	0	47
Lb.rhamnosus LGG_02523::ldhA LGG_00606::ldhD	85	0.99	49	0	42

[117]

[118] 상기 표 3에서 보듯이, 종래에 알려진 자체 L형 젖산 탈수소효소 2종 중에서 1종 또는 2종 모두를 결손한 균주(Lb.plantarum ΔldhL1 및 Lb.plantarum ΔldhL1 ΔldhL2) 보다는 본 발명에서 신규 제작한 3종의 재조합 락토바실러스 균주가 수율, 생산성 및 D형 젖산의 생성량의 측면에서 높은 수준을 나타냄을 확인하였다. 특히, 락토바실러스 파라카세이로부터 유래된 형질전환체(Lb.paracasei ldh::ldhA ldh1::ldhD)의 경우에는 수율, 생산성 및 D형 젖산의 생성량의 측면에서 가장 높은 수준을 나타냄을 확인하였다.

[119]

[120] 이에, 본 발명자는 수율, 생산성 및 D형 젖산의 생성량의 측면에서 가장 높은 수준을 나타내는 락토바실러스 파라카세이의 *ldh*(서열번호 25) 및 *ldh1*(서열번호

26)를 각각 락토바실러스 델브루에키 유래의 *ldhA*(서열번호 31)를 코딩하는 유전자 및 락토바실러스 플란타럼 유래의 *ldhD*(서열번호 32)를 코딩하는 유전자로 치환시킨 형질전환체(Lb.paracasei ldh::ldhA ldh1::ldhD)를 *Lactobacillus paracasei* CC02-0095로 명명하고, 2012년 4월 2일자로 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, 이하, "KCCM"으로 약칭함)에 수탁번호 KCCM11273P로 기탁하였다.

[121]

[122] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위와 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[123]

국 제 양 식

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 씨제이 제일제당 주식회사,
서울시 중구 쌍림동 292번지,
씨제이 제일제당 센터

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: ***Lactobacillus paracasei*** CC02-0095	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM11273P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: □ 과학적 성질의 설명 □ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 ■ 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2012년 4월 2일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 361-221 유림빌딩 (우편번호 361-221)	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2012. 4. 2.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2012 년 4월 24일

변리사 손

[124]

[125]

청구범위

[청구항 1] L형 젖산 탈수소효소(L-lactate dehydrogenase, L-LDH)의 활성이 약화 또는 불활성화되고, D형 젖산 탈수소효소(D-lactate dehydrogenase, D-LDH)의 활성이 증강되도록 변이된 D형 젖산 생산용 균주.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화된 것인 균주.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) 유래의 *ldh*(서열번호 25) 및 *ldh1*(서열번호 26), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*) 유래의 *ldh1*(서열번호 27) 및 *ldh2*(서열번호 28), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 유래의 *ldh* (LGG_02523)(서열번호 29) 및 *ldh*(LGG_00606)(서열번호 30)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 균주.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 것인 균주.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 또는 락토바실러스 델브루에키(*Lactobacillus delbrueckii*)로부터 유래된 것인 균주.

[청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 락토바실러스 델브루에키 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 락토바실러스 플란타럼 유래의 LDHD(서열번호 32)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드인 것인 균주.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
1개 이상의 외래 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 염색체 내의 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 위치에 치환되고 과발현되는 것인 균주.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
변이전 균주가 L-형 젖산을 대량으로 생산하는 균주인 균주.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
생산용 균주가 락토바실러스 속 유래의 균주인 균주.

[청구항 10] 제8항에 있어서,
락토바실러스 카세이의 LDH1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 27) 및 LDH2를 코딩하는

폴리뉴클레오티드(서열번호 28)가 각각 락토바실러스 델브루에키(*Lactobacillus delbrueckii*) 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 유래의 LDHD(서열번호 32)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치환된 것인 균주.

[청구항 11] 제8항에 있어서,
락토바실러스 파라카세이의 LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 25) 및 LDH1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 26)가 각각 락토바실러스 델브루에키 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 락토바실러스 플란타럼 유래의 LDHD(서열번호 32)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치환된 것인 균주.

[청구항 12] 제8항에 있어서,
락토바실러스 람노서스의 LDH(LGG_02523)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 29) 및 LDH(LGG_00606)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 30)가 각각 락토바실러스 델브루에키 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 락토바실러스 플란타럼 유래의 LDHD(서열번호 32)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 치환된 것인 균주.

[청구항 13] 제12항에 있어서,
Lactobacillus paracasei CC02-0095(수탁번호: KCCM11273P)인 것인 균주.

[청구항 14] (a) L형 젖산 생산균주에서 L형 젖산 탈수소효소(L-lactate dehydrogenase, L-LDH)의 활성을 약화 또는 불활성화시켜서, 변이된 젖산 생산균주를 수득하는 단계;
(b) 상기 변이된 젖산 생산균주에 D형 젖산 탈수소효소(D-lactate dehydrogenase, D-LDH)의 활성을 도입 또는 강화시키는 단계를 포함하는 변이된 D형 젖산 생산균주의 제조방법.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 L형 젖산 생산균주는 락토바실러스 속 유래의 균주인 것인 방법.

[청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 L형 젖산 생산균주는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 펜토수스(*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 파라플란타럼(*Lactobacillus paraplantarum*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*),

락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 존스니(*Lactobacillus johnsonii*) 및 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus case*)로 구성된 군으로부터 선택되는 균주인 것인 방법.

[청구항 17] 제14항에 있어서,
상기 L-LDH 활성의 약화 또는 불활성화는 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 치환, 결실, 삽입 또는 부가에 의해 수행되는 것인 방법.

[청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 L-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) 유래의 *ldh*(서열번호 25) 및 *ldh1*(서열번호 26), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*) 유래의 *ldh1*(서열번호 27) 및 *ldh2*(서열번호 28), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 유래의 *ldh* (LGG_02523)(서열번호 29) 및 *ldh*(LGG_00606)(서열번호 30)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

[청구항 19] 제14항에 있어서,
D-LDH 활성의 도입 또는 강화는 변이된 젖산 생산균주의 염색체에 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 방법에 의해 수행되는 것인 방법.

[청구항 20] 제14항에 있어서,
D-LDH 활성의 도입 또는 강화는 변이된 젖산 생산균주에 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 도입하는 방법에 의해 수행되는 것인 방법.

[청구항 21] 제19항 또는 제20항에 있어서,
상기 D-LDH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 락토바실러스 델브루에키 유래의 LDHA(서열번호 31)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 락토바실러스 플란타럼 유래의 서열번호 32의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드인 것인 방법.

[청구항 22] (a) 제 1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 변이된 D형 젖산 생산균주를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및,
(b) 상기 배양물로부터 D형 젖산을 회수하는 단계를 포함하는, D형 젖산의 생산방법.

[청구항 23] 제22항에 있어서,
상기 변이된 D형 젖산 생산균주는 *Lactobacillus paracasei* CC02-0095(KCCM11273P)인 것인 방법.

[청구항 24] 제22항에 있어서,

상기 D형 젖산의 회수는 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해, 크로마토그래피 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법에 의해 수행되는 것인 방법.