

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 4월 16일 (16.04.2020)

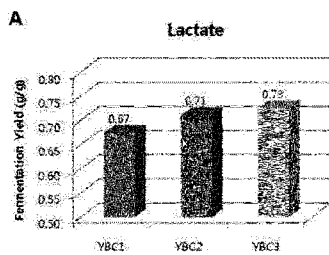


(10) 국제공개번호
WO 2020/075986 A2

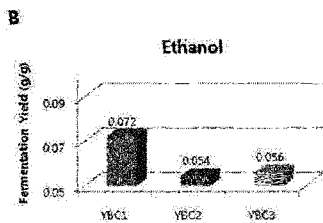
- (51) 국제특허분류: *C12N 15/63* (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) *C12P 7/56* (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/012326
- (22) 국제출원일: 2019년 9월 23일 (23.09.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0119721 2018년 10월 8일 (08.10.2018) KR
- (71) 출원인: 에스케이이노베이션 주식회사 (SK INNOVATION CO., LTD.) [KR/KR]; 03188 서울시 중로구 종로 26, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박재연 (PARK, Jae Yeon); 34124 대전시 유성구 엑스포로 325, Daejeon (KR). 이태영 (LEE, Tae Young); 34124 대전시 유성구 엑스포로 325, Daejeon (KR). 이기성 (LEE, Ki Sung); 34124 대전시 유성구 엑스포로 325, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: RECOMBINANT ACID-RESISTANT YEAST IN WHICH ALCOHOL PRODUCTION IS INHIBITED AND METHOD FOR PRODUCING LACTIC ACID BY USING SAME

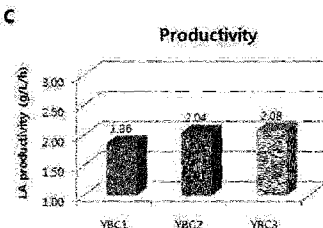
(54) 발명의 명칭: 알코올 생성이 억제된 제조함 내산성 효모 및 이를 이용한 젖산의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to: acid-resistant yeast to which lactic acid productivity is imparted, and in which the conversion of pyruvate into acetaldehyde is inhibited and, consequently, the ethanol production pathway is inhibited; and a method for producing lactic acid by using same.



(57) 요약서: 본 발명은 젖산 생성능이 부여되고, 피루베이트에서 아세트알데하이드로의 전환이 억제되어, 결과적으로 에탄올 생산 경로가 억제된 내산성 효모 및 이를 이용한 젖산의 제조방법에 관한 것이다.



WO 2020/075986 A2

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 알코올 생성이 억제된 재조합 내산성 효모 및 이를 이용한 젖산의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 에탄올 생산이 억제된 내산성 효모를 이용한 젖산의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 젖산 생성능이 부여되고, 피루베이트에서 아세트알데하이드로의 전환이 억제되어, 결과적으로 에탄올 생산 경로가 억제된 내산성 효모 및 이를 이용한 젖산의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] PLA(Polylactic Acid)는 젖산(lactic acid)을 락타이드(lactide)로 전환하고 이를 개환중합하여 만드는 생분해성 폴리머이며, 그 원료인 젖산은 발효를 통하여 생산하고 있다. PLA는 일회용 식품용기에 광범위하게 사용될 수 있으며, 단독 혹은 조성물이나 공중합체의 형태로 자동차 산업을 포함한 다양한 산업적 플라스틱으로도 사용이 가능한 강도를 갖고 있다. 또한 최근에는 3D 프린팅에서도 사용되는 대표적인 폴리머로 특히 3D 프린터 사용시 유해 가스 발생 및 냄새 발생이 적은 친환경 폴리머이다. 이러한 생분해성 폴리머는 최근 세계적인 문제가 되고 있는 폐 플라스틱 및 미세 플라스틱으로 환경과 파괴가 가속화되고 있는 현실을 해결할 수 있는 유망 폴리머로 선진 각국이 도입 확대를 추진 중에 있으며, PLA를 보다 저가로 생산하기 위하여, 단량체인 젖산의 생산성을 향상시키기 위한 노력이 진행되고 있다.
- [4] 전통적인 젖산 생산 공정은 유산균을 이용하여 생산하며, 유산균에 의해 생성되는 젖산의 축적에 의하여, 산에 의한 균주 사멸 혹은 성장 멈춤을 방지하기 위하여 다양한 형태의 Ca염/Mg염이나 암모니아와 같은 중화제를 이용하여 pH를 중성 pH인 6~8 로 맞추면서 발효를 진행하게 된다. 발효가 종료되면 미생물을 분리하게 되며 염(salt) 형태로는 물에서의 분리 및 락타이드 전환이 어렵기 때문에 황산을 첨가하여 락테이트를 젖산으로 전환시키면서 Ca염은 CaSO₄ 형태로 제거하게 된다. 이와 같은 과정은 젖산보다도 많은 양의 부산물인 CaSO₄가 발생하며, 공정 경제성을 떨어뜨리게 된다.
- [5] 한편, 젖산은 L형과 D형의 광학 이성질체를 가지고 있다. L형을 주로 생산하는 유산균의 경우에도 약 5~10%의 D형을 같이 생산하는 경우가 많으며, D형을 주로 생산하는 균주의 경우 D형과 L형을 같이 생산하는 형태와 D형과 에탄올을 같이 생산하는 형태로 존재하는 등 많은 다양성을 갖고 있는 미생물 균이 있다(Ellen I. Garvie, *Microbiological Reviews*, 106-139, 1980).
- [6] 이러한 광학이성질체 젖산 중 D형은 주로 의료용/약물전달용으로만 사용하였으나, PLA에 적용시 D형 락타이드에 의한 결정화율이 높아지면서 열적

특성이 좋아지는 현상이 발견되고, 또한 순수 L형 폴리머와 순수 D형 폴리머를 혼합한 가공조건에 따라 구조적으로 Stereocomplex PLA가 형성될 경우 내열성이 기존의 PLA는 물론 PE/PP 보다 높아지는 새로운 폴리머가 발견되는 등 D형에 의한 결정화도 증가 및 이를 통한 PLA 물성을 강화하는 방법에 대한 연구 및 상업화가 빠르게 진행되고 있으며 PLA의 적용 분야가 확장되고 있다.

- [7] PLA는 발효를 통하여 젖산을 생산한 후, 정제 공정을 거쳐 락타이드로 전환하는 공정이 일반적이다. 락타이드 전환을 위해서는 젖산을 Hydrogenated form으로 전환하는 공정이 필요하며, 일반적인 중성 발효에의 pH는 6~7이기에 다량의 황산을 이용하여 산성 pH로 전환하게 된다. 이 과정에서 다량의 중화염이 발생하게 되며 이러한 중화염을 제거하기 위한 공정 투자비와 함께 중화염의 낮은 가치로 인하여 경제성의 저하가 발생하게 된다.
- [8] 한편, 자연계에서 젖산을 생산하는 *Lactobacillus*의 경우 상업적 수준으로 젖산 생산을 하기 위해서는 많은 양의 고가 영양분(nutrient)을 배지로 사용하여야 하며 이러한 과량의 nutrient 성분은 후단 공정의 중합(polymerization) 공정 혹은 락타이드를 중간체로 하는 경우에는 락타이드 전환 공정에 큰 저해를 주게 되어 고수율, 고순도의 폴리머 또는 그 전구체를 얻기 위해서는 흡착, 증류, 이온교환과 같은 정제 공정 비용이 필요하게 되어 역시 높은 생산 비용의 원인이 된다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 제시된 방법으로 효모(Yeast)를 이용한 연구가 제시되었다. 효모의 경우 저가의 nutrient를 사용하여도 원활히 성장/발효를 진행하는 것으로 알려져 있으며 산성에서의 내성도 높은 것으로 알려져 있다.
- [9] 산성에서 잘 자라는 효모(이하, 내산성 효모)를 이용하여 젖산을 생산할 경우, 발효 시 중화제를 이용하여 배지를 pH 6~7로 유지할 필요가 없기 때문에 발효 공정이 단순해 지고, 또한 후단 중화제를 제거하는 정제 공정이 필요 없어진다. 또한, 효모는 대사에 필요한 많은 성분을 스스로 만들기 때문에 세균 특히 락토바실러스에 대비하여 비교적 영양 수준이 낮은 배지에서도 배양이 가능하여, 많은 후단 정제 공정을 생략할 수 있어, 생산 단가를 크게 낮출 수 있다.
- [10] 그러나 효모를 이용하는 젖산 생산 기술에 대하여 전제 조건이 있는데 그것은 상업화에 적용하기 위해서는 균주 발효 성능 지표인 수율, 생산성, 젖산의 농도가 유산균을 사용한 경우와 유사한 수준으로 높게 유지되어야 한다는 전제 조건이 있다.
- [11] 효모를 사용한 내산성 젖산 기술 개발이 시도되고 있으나, 실제적으로는 발효에서 중화반응을 수반하여 pH를 젖산의 pKa value 이상인 3.7 이상으로 유지하여 발효를 해야만 고성능의 발효능을 보이는 경우가 많아서 실제적인 내산성 기술이라고 표현하기에는 어렵고 공정에서의 생산비 절감 효과를 보기도 어렵다(Michael Sauer et al., *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 27:229-256, 2010).

- [12] 따라서 공정 비용의 절감할 수 있는 내산성 효모는 중화제를 사용하지 않거나 최소량으로 사용하면서 발효액의 pH가 pKa value 이하에서 발효를 마칠수 있어야 하며, 발효 3대 지표가 유산균과 유사한 수준을 달성해야만 상업적 적용의 의미가 있다.
- [13] 일반적 효모는 글루코오스를 발효하면 에탄올을 주 생산물로 대사하며, 젖산을 생산하는 경우는 매우 드물다. 또한 높은 내산성을 갖고 있는 미생물에서 젖산을 생산하는 균주를 선택할 확률이 매우 낮기 때문에, 본 발명에서는 내산성이 우수한 효모 균주를 선별하고, 선별된 균주를 유전공학적인 방법으로 젖산 생산능을 갖도록 하였다. 또한 실제로 선정된 내산성 균주 library 에서는 모두 에탄올을 생산하는 균주가 선정이 되었다.
- [14] 젖산의 생산 대사회로는 피루베이트에서 1단계 반응으로 이루어지며 이 단계는 락테이트 디하이드로게나아제 효소에 의하여 발생되며 이후 transport를 통하여 능동/확산으로 세포 밖으로 배출된다. 이러한 젖산을 주 생산물로 발효하기 위해서는 젖산 생산능을 도입함과 동시에 기존 에탄올 생산능을 제거하기 위한 조작도 수반되어야 한다. 일반적으로 효모에서는 피루베이트에서 에탄올로의 전환되는 2단계 반응으로 진행이 되며, 피루베이트에서 아세트알데하이드로 전환하는 PDC 유전자를 제거하고 LDH를 도입하는 방법이 시도되고 있다.
- [15] 그러나 사카로마이세스 세레비지에와 같은 Crab-tree 양성 효모의 경우에는 PDC(pyruvate decarboxylase)를 완전히 차단할 경우 세포의 지질 합성에 필요한 Cytosolic 아세틸-CoA의 공급이 진행되지 않아 성장이 크게 저해가 되며, PDC를 완전 차단하지 않는다면 LDH와 피루베이트라는 동일 기질에 대한 경쟁으로 에탄올 생산을 완전히 차단할 수 없고, 따라서 수율을 유산균 수준으로 높일 수 없는 문제가 발생하게 된다.
- [16] 이에, 본 발명자들은 내산성 효모에서 젖산 생산능을 향상시키고자, 예의 노력한 결과, 상기 내산성 효모에서 알코올 디하이드로게나아제 효소를 결실하면서 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자를 도입하여 젖산 생성능을 향상시킨 재조합 균주에서, 피루베이트 디카르복실라아제를 코딩하는 유전자를 결실시키고, 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자를 추가로 도입한 재조합 균주를 제작하고, 상기 재조합 균주를 이용하여 젖산을 제조하는 경우, 젖산 생성능이 향상되고, 에탄올 생성능이 감소하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [17]
- [18] **발명의 요약**
- [19] 본 발명의 목적은 내산성 효모에서 젖산 생성능이 증가하면서 에탄올 생성능이 감소된 재조합 균주를 제공하는데 있다.
- [20] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 내산성 효모를 이용하여 젖산을 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

- [21] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 내산성 효모 유래의 피루베이트 디카르복실라아제 활성을 가지는 유전자를 제공하는데 있다.
- [22] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 내산성 효모 YBC 균주(KCTC13508BP)에서 피루베이트 디카르복실라아제를 코딩하는 유전자가 결실 또는 약화되고, 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 젖산 생성능을 가지는 재조합 균주를 제공한다.
- [23] 본 발명은 또한, (a) 상기 재조합 균주를 배양하여 젖산을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 젖산을 수득하는 단계를 포함하는 젖산의 제조방법을 제공한다.
- [24] 본 발명은 또한, 피루베이트 디카르복실라아제 활성을 가지고, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [25] 본 발명은 또한, 피루베이트 디카르복실라아제 활성을 가지고, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 제공한다.
- [26] 본 발명은 또한, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 가지는 g3002 유전자의 프로모터를 제공한다.

[27]

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 YBC 균주에서 대상 유전자를 제거하기 위한 카세트(cassette) 구조에 대한 예를 나타낸 것으로, (a)와 (b)는 g4423을 대상으로 대상 유전자의 ORF를 제거하면서 LDH를 도입하는 카세트에 대하여 2종의 선택 마커를 사용하는 경우를 나타내며, (c)는 대상 유전자를 제거하기 위한 카세트의 일예를 나타낸 것이다.
- [29] 도 2는 YBC 균주에서 PDC 유전자 후보가剔아웃된 재조합 균주 Δ g460, Δ g3002-1, Δ g3002-2 및 Δ g6004 균주의 PDC 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 3는 YBC 균주에서 PDC 유전자 후보가剔아웃된 재조합 균주 Δ g3002-1, Δ g3002-2 균주의 성장, 에탄올 생산 수율, 당소모속도 및 에탄올 생산성을 비교한 것이다.
- [31] 도 4는 YBC 균주에서 PDC 유전자 후보가剔아웃된 재조합 균주 Δ g460, Δ g3002-2 및 Δ g6004 균주의 성장 곡선(A) 및 에탄올 생산능(B)을 나타낸 것이다.
- [32] 도 5는 pH 3 Flask 배양 조건에서 재조합 균주 YBC1, YBC2 및 YBC3의 젖산 생산 수율(A), 에탄올 생산수율(B) 및 젖산 생산성(C)을 나타낸 것이다.
- [33] 도 6는 pH 4 Flask 배양 조건에서 재조합 균주 YBC1, YBC2 및 YBC3의 젖산 생산 수율(A), 에탄올 생산수율(B) 및 젖산 생산성(C)을 나타낸 것이다.
- [34] 도 7는 발효기에서 재조합 균주 YBC1 및 YBC2의 글루코오스 소비량(A) 및 젖산 생산능(B)을 나타낸 것이다.
- [35] 도 8은 발효기에서 배양 조건 최적화 후 재조합 균주 YBC2의 글루코오스

소비량 및 젖산 생산능을 나타낸 것이다.

[36]

[37] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예

[38] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[39] 내산성 효모는 산성 pH 에서도 당을 빠른 속도로 소모하며 높은 성장률을 나타내고 발효 조건에서는 소모한 당을 대사산물로 전환하는 특징을 가진다. 본 발명에서는 이러한 특징을 가지는 효모를 여러 효모 라이브러리를 통하여 선별하였으며, 선별된 균주들은 젖산 농도가 40g/L~80g/L인 조건에서도 높은 성장성 및 당소모속도를 보였다. 이러한 선별된 균주를 대상으로 하여 유전 공학을 이용한 대사 회로 조절을 실시하였다.

[40] 대사 회로 조절 방법에 대하여 전술한 바와 같이 지금까지 많은 연구자들은 피루베이트에서 경쟁반응으로 진행되는 피루베이트 디카르복실라아제(pyruvate decarboxylase) 효소를 제거하여 에탄올을 감소하는 연구를 진행하였으며 이에 대하여 Cargill, Toyota, 삼성 등 많은 선행 연구들이 발표된 바 있으나(US7534597, US7141410B2, US9353388B2, JP4692173B2, JP2001-204464A, JP4095889B2, KR1686900B1), PDC의 제거에 의한 에탄올 감소의 효과는 매우 직접적이고 효과가 크나, 효모의 경우 PDC를 완전 제거할 경우, 지방산 생성이 중단되어 세포의 성장이 저해되게 되며 일부의 PDC가 남아 있는 경우에는 에탄올 생성을 완전 차단할 수 없다. 따라서 본 발명자들은 LDH를 강하게 발현하여 피루베이트로부터 락테이트로의 전환력을 높이면서 ADH를 결실하여 에탄올 생성능을 80% 차단한 균주를 개발하였다 (한국특허출원제2018-0044508호, 한국특허출원 제2018-0044509호). 여기에 중간 산물인 아세트 알데하이드의 축적을 방지하고자 추가적으로 PDC 유전자를 결실하고, 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자를 추가로 도입한 재조합 균주를 제작하여, 중간산물 독성은 최소화하면서 Cytosolic 아세틸-CoA의 공급에는 영향이 없이, 에탄올 생성능을 더욱 감소시키면서 젖산 생산능은 더욱 향상시킨 균주를 개발하였다.

[41] 본 발명에서는 PDC의 경우 해당과정(glycolysis) 이후 에탄올 생성에서 ADH와 함께 중요한 역할을 하는 2개의 유전자 중 하나로 ADH만큼 강하게 발현되는 유전자이므로, PDC 유전자의 프로모터에 의해 조절되는 상기 재조합 균주에서 LDH가 강하게 발현될 것이고, 또한 PDC 활성의 감소로 인하여, 세포 내 피루베이트 pool이 증가되고, 이로 인해 젖산 생성이 증가되는 것을 확인하였다.

[42] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 내산성 효모 YBC 균주(KCTC13508BP)에서 피루베이트 디카르복실라아제를 코딩하는 유전자가 결실 또는 약화되고, 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 젖산

- 생성능을 가지는 재조합 균주에 관한 것이다.
- [43] 본 발명에 있어서, 상기 피루베이트 디카르복실라아제를 코딩하는 유전자는 g3002 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [44] 본 발명에서는 YBC 균주에서 존재하는 12개 PDC 유전자 후보 중에, YBC 균주에서 결실되었을 때, 가장 크게 PDC 활성이 감소하는 유전자인 g3002 유전자를 주 PDC 유전자(main PDC 유전자)로 선별하였다.
- [45] 상기 g3002 유전자는 YBC 균주의 게놈에서 서로 다른 2군데에 ORF가 존재하는 매우 독특한 구조의 유전자로, 게놈 시퀀스 상에서, 스캐폴드 27(Scaffold 27)의 위치 및 스캐폴드 72(Scaffold 72) 위치에 있는 유전자이며, 게놈 상에서 전후의 ORF가 서로 다른 유전자로 별도의 독립적 유전자다. 상기 2군데의 g3002 유전자는 서로 98.46%의 유전자 수준의 상동성을 가지고 있으며, 2 군데 유전자의 전단부의 프로모터 부분은 서로 매우 다른 서열을 가지고 있어, 서로 다른 기작으로 발현이 조절되는 것으로 추정되며, 상기 두 군데의 유전자 중 하나의 유전자가 주 PDC 유전자로 작동할 것으로 추정되었다.
- [46] 이렇게 매우 유사한 두 유전자가 존재하는 이유는 *S. cerevisiae*에서 알려진 PDC1과 PDC5간의 상호 보완 기작과 유사하게, 하나의 유전자가 소실되거나 작동되지 않을 때 이를 보상(compensation)하는 유전자로 작동하기 위한 진화의 결과일 가능성이 매우 높다. 본 발명에서 72 스캐폴드에 위치한 g3002 유전자를 제거한 경우, 에탄올 생산량 및 글루코오스 소비량과 성장 등 전반적인 표현형에도 영향을 미치는 것으로 나타났다.
- [47] 본 발명의 일 양태에서는 YBC1 균주의 72scaffold에 위치한 g3002 유전자 (이하, g3002-1 유전자로 칭한다)를 제거하며 LDH 유전자를 도입한 재조합 균주 YBC2와 재조합 균주 YBC2에서 다시 27scaffold에 위치한 g3002 유전자 (이하 g3002-2 유전자로 칭한다) 를 제거하면서 LDH 유전자를 도입한 재조합 균주 YBC3를 제작하고, 상기 재조합 균주들을 배양하여, 젖산과 에탄올 생산능 및 젖산 생산성이 향상되는 것을 확인하였다.
- [48] 본 발명에 있어서, 상기 g3002 유전자는 YBC 균주(KCTC13508BP)의 게놈 시퀀스 상에서, 스캐폴드 27 (g3002-2) 위치 및 스캐폴드 72 (g3002-1) 위치에 있는 유전자인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 scaffold 72 위치의 g3002-1 유전자가 결실 또는 약화되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [49] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 균주는 상기 스캐폴드 72 위치의 g3002-1 유전자 및 상기 스캐폴드 27 위치의 g3002-2 유전자 중 하나만 결실되거나 모두 결실되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [50] 본 발명에 있어서, 상기 g3002-1 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 g3002-2 유전자는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [51] 본 발명에 있어서, 상기 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자는

g3002 유전자와 치환하여 도입되어 g3002 유전자의 프로모터에 의하여 조절되는 것을 특징으로 할 수 있다. 각 g3002-1과 g3002-2의 프로모터 region 의 서열을 각각 서열번호 5 및 서열번호 6에 나타내었다.

- [52] 본 발명에 있어서, 상기 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자는 *L. helveticus* 유래 LDH 유전자, *R. oryzae* 유래 LDH 유전자 또는 *L. plantarum* 유래 LDH 유전자인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 *L. plantarum* 유래 LDH 유전자인 것이 바람직하다.
- [53] 본 발명에 있어서, 상기 제조합 균주는 알코올 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자(ADH 유전자)가 추가로 결실되어 있는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 알코올 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자는 g4423 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [54] 본 발명에 있어서, 상기 제조합 균주는 상기 ADH 유전자를 대신하여 LDH 유전자가 추가적으로 도입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [55] 본 발명에 있어서, 상기 g3002 유전자의 결실 또는 약화에 의하여 모균주인 YBC 균주(KCTC13508BP) 보다 에탄올 생성능이 감소되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [56] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, (a) 상기 제조합 균주를 배양하여 젖산을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 젖산을 수득하는 단계를 포함하는 젖산의 제조방법에 관한 것이다.
- [57] 본 발명을 통하여 락테이트 생산이 크게 증가하고 에탄올 생산이 크게 감소한 우수한 내산성 균주를 확보할 수 있다.
- [58] 또 다른 관점에서, 본 발명은 피루베이트 디카르복실라아제 활성을 가지는 단백질을 코딩하고, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열과 90%의 상동성을 가지는 유전자에 관한 것이다.
- [59] 또 다른 관점에서, 본 발명은 피루베이트 디카르복실라아제 활성을 가지고, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하는 유전자에 관한 것이다.
- [60] 본 발명에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [61] 또 다른 관점에서, 본 발명은 피루베이트 디카르복실라아제 활성을 가지고, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 단백질에 관한 것이다.
- [62] 또 다른 관점에서, 본 발명은 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 가지는 g3002 유전자의 프로모터에 관한 것이다.
- [63] 본 발명에 있어서, '내산성 효모'란 유기산의 pKa 값 미만의 pH에서, 배지에 유기산이 함유되지 않은 경우에 비해, 배지에 1M 이상의 유기산(특히, 젖산)이 함유된 경우, 적어도 10%의 바이오매스 소모율 (당소모율 등) 또는 적어도 10%의 비생장률을 유지할 수 있는 효모로 정의한다. 보다 구체적으로, 본

발명에서, '내산성 효모'란 pH 5 이상인 경우에 비해, pH 2~4에서 적어도 10%의 바이오매스 소모율 (당소모율 등) 또는 적어도 10%의 비생장률을 유지할 수 있는 효모로 정의한다.

- [64] 본 발명에 따른 재조합효모는 통상의 방법에 따라 상기 유전자를 숙주 효모의 염색체(chromosome) 상에 삽입시키거나, 상기 유전자를 포함하는 벡터를 숙주 효모에 도입시킴으로써 제조할 수 있다.
- [65] 상기 숙주효모는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주세포가 통상적으로 사용되며, 본 발명의 일 실시예에서는 내산성 효모를 이용하였으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 목적 DNA가 충분히 발현될 수 있는 것이라면 어떠한 종류의 효모라도 무방하다.
- [66] 상기 재조합효모는 임의의 형질전환(transformation) 방법에 따라 제조할 수 있다. "형질전환"이란 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미하며, 일반적인 형질전환 방법에는 전기천공법(electroporation), 초산 리튬-PEG법 등이 있다.
- [67] 또한, 본 발명에서 유전자를 숙주 미생물의 염색체 상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 임의의 유전자 조작방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스벡터, 아데노바이러스벡터, 아데노-연관 바이러스벡터, 헤르페스심플렉스 바이러스벡터, 폭스바이러스벡터, 렌티바이러스벡터, 비바이러스성벡터 등을 이용하는 방법이 있다. "벡터"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물 일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이며 또한 Linearized DNA 또한 효모의 게놈 Integration을 위하여 통상적으로 사용하는 형태이다.
- [68] 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 또는 영양 요구 마커 유전자 (auxotrophic marker gene) 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있도록 하는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation) 할 수 있으며 (Gibson assembly), 필요에 따라서는 원하는 전체의 Sequence 를 합성하여 사용하는 방법도 통상적으로 이용되고 있다.
- [69] 아울러, 상기 유전자는 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때

"작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비리더(leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다.

- [70] 일반적으로 "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.
- [71] 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않고, 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 상태에서, 다른 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택하여 적용할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이고, 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.
- [72] 본 발명에 있어서, 탄소원은 글루코즈, 자일로즈, 아라비노즈, 수크로즈, 프룩토즈, 셀룰로오스, 갈락토오스, 글루코즈 올리고머 및 글리세롤로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [73] 본 발명에 있어서, 배양은 미생물 예를 들어 대장균 등이 더 이상 작용하지 못하도록 (예를 들어, 대사체 생산 불가능) 하는 조건에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 배양은 pH 1.0 내지 6.5, 바람직하게 pH 1.0 내지 6.0, 보다 바람직하게는 2.6 내지 4.0인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [74] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [75]

- [76] 실시예 1: YBC 균주에서 피루베이트 디카르복실레이즈(PDC)를 코딩하는 유전자의 발현율을 확인하여 주 발현 유전자 확인
- [77] 본 발명자들은 다양한 효모 균주에 대한 테스트를 통하여 내산성을 갖는 균주 군을 선별한바 있다(대한민국 특허공개 제2017-0025315호). 상기 선별된 효모 균에 대하여 젖산을 배양 초기에 배지에 첨가하여 미생물의 성장 및 당소모 속도를 확인하면서 내산성이 가장 우수한 균주인 YBC 균주를 선정하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 KCTC13508BP으로 기탁한바 있다.
- [78] 계통분석을 통하여 YBC 균주(KCTC13508BP)는 *S. cerevisiae*와 유사한 균주이며 2배체의 유전자를 갖고 있고 (Diploid), Crab-tree positive 한 특성을 갖고 있다는 것을 확인하였다.
- [79] YBC 균주의 게놈에서 PDC로 어노테이션(annotation)되는 유전자는 복수개로 존재하며, 주요 유전자를 표 1에 나타내었다.

[80]

[81] [표1]

YBC	transcript_id	gene_id	RELIABLE twowayHit Scer	RELIABLE twowayHit Scer Standard	LESS RELIABLE bestHit Scer Standard
g460.t1	PDC1-like	g460			PDC1
g1574.t1	THI3	g1574	YDL080C	THI3	THI3
g2335.t1	PDC2	g2335	YDR081C	PDC2	PDC2
g2550.t1	PDC1-like	g2550			PDC1
g3002.t1	PDC1	g3002	YLR044C	PDC1	PDC1
g3917.t1	PDC6-like	g3917			PDC6
g4072.t1	ARO10	g4072	YDR380W	ARO10	ARO10
g4136.t1	PDC1-like	g4136			PDC1
g4822.t1	PDC5-like	g4822			PDC5
g5237.t1	PDC5-like	g5237			PDC5
g5809.t1	PDC1-like	g5809			PDC1
g6004.t1	PDC1-like	g6004			PDC1

- [82] Genome Full sequencing Data에서 *S. cerevisiae* 및 Bioinformatics 정보를 이용하여 YBC 균주의 게놈에 존재하는 PDC 유전자 후보 12종을 선별하였으며, 이들을 아래와 같이 검토하여 주 PDC 후보를 선별하였다.
- [83] G2335 : PDC2 : PDC의 조효소 역할
- [84] G1574 : THI3 : 조절 단백질
- [85] G4072 : Phehylpyruvate Decarboxylase
- [86] G4136 : 다른 PDC 후보 유전자와 붙어 있는 유전자로 제외함.
- [87] G4822, g5809 및 g3917은 추가 게놈 시퀀싱에서 ORF에서 제외.
- [88] G5237은 250 bp 로 PDC 의 적정 사이즈를 만들 수 없어 제외함.

[89] G460, g2550, g3002 및 g6004: 주 PDC 후보로 잠정 결정함.

[90] 상기 g3002 유전자가 아노테이션에서 PDC1에 가장 가깝게 나타나 이를 기준으로 유사성을 비교한 결과 표 2에 나타난 바와 같이, g460 유전자, g3002 유전자 및 g6004 유전자가 *S. cerevisiae* 의 PDC1 유전자와 유사성이 가장 높게 나타나 이를 우선 타겟으로 선정하여, 상기 타겟 유전자를 YBC 균주의 게놈에서 결실시키는 유전자 조작을 수행하였다.

[91]

[92] [표2]

S. cerevisiae 의 PDC1 유전자와의 타겟 유전자 사이의 상동성

	S. c. PDC1	G3002	G460	G6004	G2550
S. c. PDC1	-	79.2	73.7	73.7	68.32
G3002		-	75.95	76.24	68.61
G460 (서열번호 7)			-	95.63	71.33
G6004 (서열번호 8)				-	70.97
G2550					-

[93] [표3]

각 타겟 유전자 사이의 상동성

	G460	G6004	G3002	G2550
G460	-	95.63	76	71.33
G6004		-	76.3	70.97
G3002			-	68.61
G2550				-

[94] 실시예 2: YBC 균주에서 타겟 PDC 유전자를 제거하여 에탄올 생성 저하 효과 확인

[95] 실시예 1에서 확인된 YBC 균주의 타겟 PCD 유전자를 벗어나시킨 재조합 균주를 제작하고, PDC 유전자 제거가 균주의 성장에 미치는 영향을 확인하였다.

[96] g460 유전자, g3002 유전자 및 g6004 유전자 및 이들의 UTR의 정보를 바탕으로 하여 각 유전자의 ORF가 제거되고 5' 과 3' UTR 및 항생제 마커가 있는 도 1(c)와 유사한 유전자 카세트를 제작하여 Donor DNA로 사용하였다.

[97] g460 유전자의 5'-UTR 및 3'-UTR을 각각 서열번호 7 및 서열번호 8에 나타내었으며, g3002 유전자의 5'-UTR을 서열번호 5 및 서열번호 6에 나타내었고, 3'-UTR을 서열번호 9 및 서열번호 10에 나타내었다. g6004 유전자의 5'-UTR 및 3'-UTR을 각각 서열번호 11 및 서열번호 12에 나타내었다.

[98] Donor DNA의 제작에는 전술한 바와 같이 제한효소를 이용한 클로닝 방법과 Gibson assembly, 유전자 합성을 이용한 방법이 사용되었다. 제작된 Donor DNA를 도입하고 마커유전자에 대응하는 플레이트에서 자란 콜로니에 대하여 각 유전자가 제거된 것을 확인하기 위하여 아래와 같은 ORF용 프라이머를

이용하여 PCR 로 ORF가 제거된 것을 확인하고 $\Delta g460$, $\Delta g3002$ 및 $\Delta g6004$ 균주를 수득하였다. 이때 사용한 프라이머에서 각 유전자의 ORF inside는 각 ORF의 내부의 서열을 이용하여 ORF의 존재 유무를 확인할 수 있으며, ORF outside는 각 유전자의 UTR 부분을 측정하여 결실(Deletion) 이후 크기의 변화를 통하여 ORF가 실제로 제거된 것을 확인할 수 있었다. 또한 해당 균주가 Diploidity를 갖고 있는 것을 고려하여 Allele variation 이 없는 곳은 2개의 Allele를 동시에 확인할 수 있으며 경우에 따라서는 Allele 별로 별도의 Primer를 제작하여 사용하였다.

[99]

[100] g460 ORF inside - fwd: CCAGACAATTGGTTGATATCACC (서열번호 13)

[101] g460 ORF inside(A1) - rev: GTAAAAAGGAACTTAGATGTCTCC(서열번호 14)

[102] g460 ORF inside(A2) - rev: GTAAGAATGAACTTAGATGTCTCC(서열번호 15)

[103] g460 ORF outside -fwd: TGAGGCAGAGTTCGAGAA(서열번호 16)

[104] g460 ORF outside - rev : TAAAACACCCGCACACGA(서열번호 17)

[105] g6004 ORF inside - fwd : CCAGGCAATTAGTTGATATCACT(서열번호 18)

[106] g6004 ORF inside - rev : CATATCTTCGGACAGCTTAC(서열번호 19)

[107] g6004 ORF outside - fwd : GTGCCACATTAAGTCT(서열번호 20)

[108] g6004 ORF outside - rev : CCCGGTACACATTTCTC (서열번호 21)

[109] g3002 ORF inside - fwd : GAAGTCGAAGGTATGAGA(서열번호 22)

[110] g3002 ORF inside- rev : ATAGAGAAGCTGGAACAG(서열번호 23)

[111] g3002-1 ORF outside - fwd : GCAGGATATCAGTTGTTTG(서열번호 24)

[112] g3002-1 ORF outside - rev : CAGAATCTTAGAAAGGAGG (서열번호 25)

[113] g3002-2 ORF outside - fwd : ATGTTAAGCGACCTTTCG(서열번호 26)

[114] g3002-2 ORF outside - rev : GTCGTGTCTAATGTTAGC (서열번호 27)

[115] 상기 수득된 $\Delta g460$, $\Delta g3002$ 및 $\Delta g6004$ 균주를 이용하여 PDC 활성을 측정하였다. 대상 균주의 PDC활성은 잘 알려진 문헌상의 방법을 바탕으로 측정하였다(T. C. Hoppner, H. W. Doelle, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17:152-157, 1983).

[116] 활성측정에 필요한 용액은 다음과 같이 준비하였다.

[117] 1. 200mM Tris-HCl 버퍼, 20% KOH용액으로 pH6.0으로 조정한다.

[118] 2. 15mM Thiamine pyrophosphate (TPP)용액을 제조하여 1ml씩 분주하여 -20°C 냉동 보관한다.

[119] 3. 100mM MgCl₂-dihydrates 용액을 제조하여 4°C 냉장 보관한다.

[120] 4. 1.0M sodium pyruvate 용액을 제조하여 1ml씩 분주하여 -20°C 냉동 보관한다.

[121] 5. 4.0mM β -nicotinamide adenine dinucleotidedisidium salt hydrate ~98% 용액을 제조하여 차광 용기에 1ml씩 분주하여 -20°C 냉동 보관한다.

[122] 6. 200U/ml의 농도로 Alcohol dehydrogenase 용액을 제조하여 1ml 씩 분주하여 -20°C 냉동 보관한다.

- [123] 단백질 효소액은 다음과 같이 준비하였다.
- [124] 1. 50mM Tris-HCl, pH6.5, Lysis buffer 용액을 제조하여 냉장 보관
- [125] 1mM PMSF (100mM PMSF in isopropanol stock을 사용직전에 희석하여 사용) 투입
- [126] 2. YPD 배지에서 효모균을 배양하여 exponential phase에 진입하였을 때, 원심 분리하여 효모균체를 회수.
- [127] 3. 회수된 효모균체를 cold Lysis buffer로 세척하고 동일 용액에 재현탁
- [128] 4. 효모 현탁액 5ml에 냉장 보관된 Acid washed glass beads 2.0g을 투입
- [129] 5. 30초간 총 5회 vortexing 을 수행하였으며, 매 vortexing 사이에 파쇄액을 1분간 ice에 보관하여 저온을 유지
- [130] Glass beads가 제거된 파쇄액을 취하여 초고속원심분리(4°C for 30min at 30,000g)를 통하여 cell debris를 제거하고 상등액을 효소액으로 사용하였다. 효소액 내의 총단백질 정량은 Bovine serum albumin 용액을 표준용액으로 하여 BCA법으로 정량 하였다. 투명 plat bottom 96 well plate에서 아래 표의 위에서 아래 방향으로 시약을 투입하여 총 200 μ l 부피로 30°C에서 5분간 반응하여 15초 간격으로 340nm에서 흡광도 변화 추이를 관찰하였다.

[131]

[132] [표4]

Reagent	Stock	Blank	Sample	Final농도 (mM)
조효소액			10	
ADH	200U/ml	10	10	10
NADH	0.4mM	10	10	0.02
Solution1	194mM	170	160	146
Micro plate Reader에서 10초 shaking & 2분간 유지				
Pyruvate	1M	10	10	50

- [133] 용액 1(Solution 1)은 PDC assay 이전에 제조하여 상온으로 유지하며 아래의 조성으로 혼합하여 사용하였다.

[134]

[135] [표5]

용액 1 (Solution 1)의 조성

	Volume (ml)
200mM Tris-HCl	10
15mM TPP	0.2
100mM MgCl ₂	0.4

- [136] PDC Activity Unit 의 정의는 다음과 같다.

- [137] 1 unit의 PDC activity는 1분동안에 1 μ mol의 NADH를 산화시킬 수 있는 효소 활성으로 정의한다.

- [138] $-dA/dt=[Rate]_{\text{experimental}}-[Rate]_{\text{blank}}$
- [139] $PDC(\text{Unit/ml enzyme})=\{dA/dt \times (V_{\text{total,ml}})\}/(6.22 \times V_{\text{sample,ml}})$
- [140] 본 분석의 경우 Light path length는 0.6cm (96well plate, 0.2ml 부피)이므로
- [141] $PDC(\text{Unit/ml enzyme}) \text{ Activity} = 5.36 \times dA/dt$ 로 계산된다.
- [142] 또한, specific PDC activity는 Unit/mg protein으로 정의되며, 측정된 총단백질 농도를 나누어 구한다.
- [143] $\text{Unit/mg protein} = (\text{Unit/ml enzyme})/(\text{mg protein/ml enzyme})$
- [144] 이와 같은 PDC의 측정 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, $\Delta g3002-1$ 균주에서 PDC 활성이 가장 크게 감소하는 것으로 나타났으며, $\Delta g3002-2$ 균주에서도 활성이 감소하는 것으로 확인되었다.
- [145] 상기 수득된 $\Delta g3002-1$ 균주와 $\Delta g3002-2$ 균주를 40g/L의 글루코오스 농도를 갖는 YP 배지에서 150ml 배양하였으며 30°C, 200rpm 에서 배양하였다.
- [146] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이, 균주 성장에 있어서 $\Delta g3002-2$ 의 녀아웃 균주와 야생형 YBC 균주와의 사이에 약간의 성능 감소 정도만 보였고 큰 차이가 없었으나, 특이하게도 $\Delta g3002-1$ 의 균주는 성장속도와 Glucose 소비 속도 및 Ethanol 수율도 유의미하게 감소하는 것으로 나타나서 기존 *S. cerevisiae*에서 PDC1 이 제거가 되어도 PDC5에 의한 compensation 효과에 의하여 그 제거 효과가 phenotype 에서는 잘 나타나지 않는 것과는 다르게 Compensation 유전자에 의한 보완 작용이 적은 것으로 판단된다.
- [147] 이와 대비하는 실험으로 상기 수득된 $\Delta g460$, $\Delta g3002-2$ 및 $\Delta g6004$ 균주를 40g/L의 글루코오스 농도를 갖는 YP 배지에서 150ml 배양하였으며 30°C, 200rpm 에서 배양하였다.
- [148] 그 결과, 도 4의 A에 나타난 바와 같이, 균주 성장에 있어서 각 PDC 녀아웃 균주와 야생형 YBC 균주와의 사이에 큰 차이가 없었으며, 에탄올 생산도 유의미한 차이가 발생하지는 않는 것을 알 수 있었다.
- [149] 이와 같이 각 유전자가 결실된 균주의 배양 결과 및 효소 활성 분석결과를 종합하여 YBC 균주에서 g3002 유전자가 주 PDC(main PDC) 유전자인 것을 확인하고 특히 g3002-1 유전자가 가장 주된 역할을 하는 것으로 확인되었다.
- [150]
- [151] 실시예 3: PDC 유전자가 제거되고 LDH가 도입된 재조합 균주를 이용한 젖산 생산
- [152] YBC 균주에서 g3002-1 유전자가 주 PDC 유전자인 것으로 확인되었으나, 젖산 생산을 위하여 락테이트 디하이드로게나아제 유전자(LDH 유전자)를 도입시키는 경우, LDH의 발현 강도는 유전자의 앞부분에 있는 프로모터로부터 유래하는 특성이므로 타겟 유전자의 ORF를 제거하면서 LDH 유전자를 도입하여, LDH 발현에 대한 영향을 확인하였다.
- [153] 다만 이때는 타겟 유전자가 제거되는 동시에, LDH가 발현되기에, 이 유전자의 소실에 따른 영향이 같이 나타나서 LDH만의 단독 발현 효과로 판단하기는

어렵다.

- [154] 대상 균주는 Wild type 균주가 아닌 기존의 Wild type 에 주 ADH(alcohol dehydrogenase) 유전자를 제거하면서 LDH 유전자를 도입한 균주 (YBC1) 를 대상으로 하였다.
- [155] YBC 균주에 도입할 LDH 유전자의 후보 유전자를 문헌을 통하여 선별하였으며 (N. Ishida et. al., *Appl. Environ. Micobiol.*, 1964-1970, 2005; M. Sauer et al., *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 27:1, 229-256, 2010), 최종적으로 서열번호 4로 표시되는 *L. plantarum* 유래 LDH 유전자를 선택하여 도입하였다. 상기 YBC1 균주는 YBC 균주의 주 ADH 유전자인 g4423 유전자를 제거하고 상기 g4423 위치에 락토바실러스 플랜타룸 유래의 서열번호 28의 LDH 유전자를 도입한 균주로, g4423 및 이들의 UTR의 정보를 바탕으로 하여 각 유전자의 ORF가 제거되고 5' 과 3' UTR 및 항생제 마커가 있는 도 1(a) 및 1(b)의 유전자 카세트를 제작하여 Donor DNA로 사용하였다. g4423의 각 allele 에 대하여 상응하는 5' UTR은 서열번호 29 및 서열번호 30에 나타내었고, 3' UTR은 서열번호 31 및 서열번호 32에 나타내었다. Donor DNA의 제작에는 전술한 바와 같이 제한효소를 이용한 클로닝 방법과 Gibson assembly, 유전자 합성을 이용한 방법이 사용되었다. g4423의 ORF 자리에 서열번호 28의 LDH를 합성한 뒤 도입하여 Donor DNA를 제작하고 이를 YBC에 도입하여 제조합 균주 YBC1을 제작하였다.
- [156] 아울러, g3002 유전자는 YBC 균주의 게놈에서 서로 다른 2군데에 ORF가 존재하는 매우 독특한 구조의 유전자로, 게놈 시퀀싱 결과에서, 스캐폴드 27 및 스캐폴드 72 위치에 있는 유전자이다. 상기 2군데의 g3002 유전자는 서로 98.46%의 유전자 수준의 상동성을 가지고 있지만, 2 군데 유전자의 전단부의 프로모터 부분은 서로 매우 다른 서열을 가지고 있어, 서로 다른 기작으로 발현이 조절되는 것으로 추정되며, 상기 두 군데의 유전자 중 하나의 유전자가 주 PDC 유전자로 작동할 것으로 추정되었다.
- [157] 이렇게 매우 유사한 두 유전자가 존재하는 이유는 *S. cerevisiae*에서 알려진 PDC1과 PDC5간의 상호 보완 기작과 유사하게, 하나의 유전자가 소실되거나 작동되지 않을 때 이를 보상(compensation)하는 유전자로 작동하기 위한 진화의 결과일 가능성도 높기 때문에, YBC1 균주의 g3002-1 유전자 (스캐폴드 상 72 에 위치한 유전자) 를 제거하며 서열번호 4의 LDH 유전자를 도입한 제조합 균주 YBC2와 제조합 균주 YBC2에서 다시 g3002-2 (스캐폴드 상 27 에 위치한 유전자) 유전자를 제거하면서 LDH 유전자를 도입한 제조합 균주 YBC3를 제작하고, 상기 제조합 균주들을 배양하여, 젖산과 에탄올 생산능 및 젖산 생산성을 확인하였다.
- [158] 특히 이러한 g3002 의 유전자의 치환을 확인하기 위하여 상기의 YBC1 의 g4423 유전자 (ADH)의 자리에 LDH를 도입하는 방법과 유사하게 g3002-1 및 g3002-2의 UTR을 이용하여 제작하였다. 단, 당해 유전자의 치환에서는 과정의

단순화를 위하여 allele variation을 고려하지 않고 하나의 allele를 대상으로 하여 Donor cassette를 제작하였으나, allele 별로 제작도 가능하다. 또한 유전자 치환에 사용하는 프라이머에 대해서도 상기의 결실균주 제작에 사용한 프라이머 이외에 다음과 같이 g3002-1 및 g3002-2의 UTR과 LDH를 같이 확인할 수 있는 프라이머쌍을 별도로 사용하여 유전자 치환 확인의 정확도를 높였다.

[159] g3002-1 UTR-LDH-fwd : GCAGGATATCAGTTGTTTG(서열번호 33)

[160] g3002-1 UTR-LDH-rev : AATACCTTGTTGAGCCATAG(서열번호 34)

[161] g3002-2 UTR-LDH-fwd : ATGTTAAGCGACCTTTCG(서열번호 35)

[162] g3002-2 UTR-LDH-rev : ACCATCACCAACCAAAACAA(서열번호 36)

[163] 상기 재조합 균주에 대하여 접종 OD는 0.5, 배지는 YP 배지(20g/L Peptone, 10g/L Yeast extract)에 Glucose 6%를 사용하여 100ml의 Flask culture로 30°C, 175 rpm 조건 4시간 배양 후 125rpm 조건에서 배양하였다.

[164] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, YBC1 균주에 비하여 g3002 유전자가 결실되고, LDH 유전자가 추가로 삽입된 YBC2 및 YBC3 균주에서 젖산 생성량이 증가되는 것을 확인하였으며, 에탄올 생성량은 YBC2 및 YBC3 균주가 YBC1 균주에 비하여 감소한 것을 확인하였다. 젖산의 생산성(productivity)은 YBC2 균주가 가장 높으나 균주간 큰 차이가 있지는 않은 것으로 확인되었다.

[165] 아울러, 부분 중화를 통하여 pH를 조정하였을 때의 성능 비교를 위하여 기존 젖산 발효에서 사용하는 CaCO₃를 소량 첨가 하였다. 첨가량은 CaCO₃를 글루코오스 투입량 대비 30% 수준에서 첨가를 하여 최종 pH가 4 수준이 되도록 조절하였으며 자세한 배양 조건은 다음과 같다. 상기 재조합 균주들은 접종 OD 값은 2, 배지는 YP 배지(20g/L Peptone, 10g/L Yeast extract)에 Glucose 9%, CaCO₃ 3%를 사용하였으며 100ml의 Flask culture로 30°C, 150 rpm 에서 배양하였다.

[166] 그 결과, 도 6에서 나타난 바와 같이, YBC1 균주에 비하여 g3002 유전자가 결실되고, LDH 유전자가 추가로 삽입된 YBC2 및 YBC3 균주에서 젖산 생성량이 pH 4 조건에서도 증가되는 것을 확인하였으며, 에탄올 생성량 또한 YBC2 및 YBC3 균주가 YBC1 균주에 비하여 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 또한 접종 OD 및 부분 중화의 효과로 생산성(productivity)이 도 5의 결과 대비 도 6에서 증가를 하는 것을 확인할 수 있었다.

[167] PDC의 경우 해당과정(glycolysis) 이후 에탄올 생성에서 ADH와 함께 중요한 역할을 하는 2개의 유전자 중 하나로 ADH 만큼 강하게 발현되는 유전자이므로, PDC 유전자의 프로모터에 의해 조절되는 YBC2 균주 및 YBC3 균주에서 LDH가 강하게 발현할 것으로 판단하였으며, 또한 PDC 활성의 감소로 인하여, 세포 내 피루베이트 pool이 증가되고, 이로 인해 젖산 생성이 증가되는 것으로 판단된다.

[168] 본 실시예에서 주목할 만한 사실은 에탄올 수율의 감소 대비 젖산 수율 증가에 대한 것이다. 도 5의 YBC1과 YBC2를 기준으로 볼 때 에탄올 수율은 0.093g/g에서 0.075g/g로 0.018g/g 감소하였다. 에탄올과 젖산의 분자량을 고려하면 이는 $0.018 \times 90 / 46 = 0.035$ 의 젖산 수율 증가로 연결될 것으로 예상하여

0.62g/g 의 수율이 증가될 것으로 예상되었으나, 실제로는 0.67g/g의 수율 증가가 있었으며 이는 글리세롤 및 아세테이트와 같은 다른 부산물들의 수율 감소가 젖산 수율 증가로 반영된 것으로 에탄올 생성 차단 이외에 젖산의 추가 발현에 따른 NADH Balance 회복과 이에 따른 글리세롤의 생산량 감소 및 젖산생산 플러스(Flux)의 강화로 인한 수율 증가로 인한 것으로 판단되며, g3002의 프로모터가 LDH 유전자를 잘 발현하고, 이로부터 LDH 효소가 강화되었음을 알 수 있다.

[169] 이를 기준으로 상기도 5의 배양 결과를 판단할 때 g3002는 젖산 생성능에서 큰 수율 증가 (pH 조절 없이 0.59g/L -> 0.67 g/L)를 확인하여, PDC 활성의 감소와 함께 LDH의 발현으로 인한 수율 증가 및 성능 증가가 있었음을 알 수 있었다.

[170]

[171] 실시예 4: pH 4에서의 재조합 균주의 젖산 생성능 확인

[172] 산성 조건에서의 젖산 생성능을 확인하기 위하여, 배양액을 pH 4로 조절한 후, YBC1 균주와 YBC2 균주의 발효를 통한 젖산 생성능 향상을 확인하였다.

[173] YBC1 균주는 Hestrin and Schramme 배지(Glucose 120g/L, Peptone 5g/L, Yeast extract 5g/L, citric acid 1.15 g/L, K₂HPO₄ 2.7g/L, MgSO₄·7H₂O 1g/L)를 사용하여, 1L 부피로 발효기에서 120g/L의 당농도로 배양하였다. 배양 온도는 30°C 이고 0.2 vvm으로 공기를 공급하면서 NaOH로 pH 4로 조절하였으며 350~450 rpm 수준을 유지하였다.

[174] YBC2 균주는 Hestrin and Schramme 배지를 사용하여 1L 부피로 발효기에서 120g/L 의 당농도로 배양하였으며, 배양 온도는 30°C 이고 0.1 vvm 으로 공기를 공급하면서 CaCO₃를 3.6% 투입하여 pH 4로 조절하였으며 400 rpm 수준을 유지하였다.

[175] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 동일 조건에서 YBC1 균주와 비교하였을 때, YBC2 균주의 젖산 생성능이 크게 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[176]

[177] 실시예 5: YBC2 균주의 발효성능 최적화

[178] YBC2 균주의 젖산 발효성능을 향상시키기 위하여, 배양조건 최적화를 수행하였다.

[179] 배양 최적화는 주로 초기 OD 및 산소 공급 속도에 대한 조건 변화를 위주로 실시를 하였으며 그 중 가장 성능이 좋았던 2개의 결과를 도 8 에 나타내었다.

[180] 도 8의 A 조건은 YBC2 균주에 대하여 배지는 YP 배지(20g/L Peptone, 10g/L Yeast extract)에 1L 부피로 발효기에서 120g/L의 당농도로 배양을 하였다. 배양 온도는 30°C 이고 0.025~0.05 vvm 으로 공기를 공급하면서 CaCO₃를 3.6%를 3회로 나누어 발효시간 5시간, 13시간 및 23시간에 투입하여, pH 4로 조절하였으며 300~400 rpm 수준을 유지하였다.

[181] 도 8의 B 조건은 YBC2 균주에 대하여 배지는 YP 배지(20g/L Peptone, 10g/L Yeast extract)에 1L 부피로 발효기에서 120g/L의 당농도로 배양을 하였다. 배양

온도는 30°C 이고 0.05 vvm으로 공기를 공급하면서 CaCO₃를 3.6%를 투입하여 pH 4로 조절하였으며 400 rpm 을 유지하였다.

[182] 그 결과, 도 8 및 표 4에 나타난 바와 같이, 도 8A의 조건에서 배양하였을 때 수율이 가장 높은 것을 확인하였으나 생산성 및 젖산 농도는 도 8B의 조건이 가장 좋은 것으로 확인되었다.

[183]

[184] [표6]

	Lactic acid (g/L)	Yield (g/g)	생산성 (g/L/hr)	배양 조건
YBC2 (도 8A)	79.3	0.73	1.44	0.025~0.5vvm, CaCO ₃ 3회분할투입, 300~400rpm
YBC2 (도 8B)	84.5	0.68	2.06	0.5vvm, CaCO ₃ 단일 투입, 400 rpm

[185] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[186]

산업상 이용가능성

[187] 본 발명에 따른 제조합 내산성 효모는 에탄올 생성을 억제하여, 세포 내 피루베이트 pool이 증가되고, LDH 효소를 강하게 발현하여, 젖산을 높은 수율로 생산할 수 있다.

[188]

[189] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[190]

서열목록 Free Text

[191] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

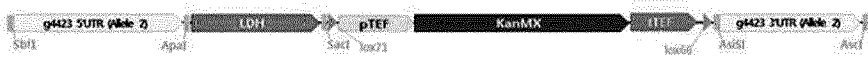
- [청구항 1] 내산성 효모 YBC 균주(KCTC13508BP)에서 피루베이트 디카르복실라아제를 코딩하는 유전자가 결실 또는 약화되고, 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 젖산 생성능을 가지는 재조합 균주.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 피루베이트 디카르복실라아제를 코딩하는 유전자는 g3002 유전자인 것을 특징으로 하는 재조합 균주.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 g3002 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 알코올 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 추가로 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 알코올 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자는 g4423 유전자인 것을 특징으로 하는 재조합 균주.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 락테이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자는 g3002 유전자와 치환하여 도입되어 g3002 유전자의 프로모터에 의하여 조절되는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 g3002 유전자의 결실 또는 약화에 의하여 모균주인 YBC 균주(KCTC13508BP) 보다 에탄올 생성능이 감소되는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.
- [청구항 8] 다음을 단계를 포함하는 젖산의 제조방법;
 (a) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 재조합 균주를 배양하여 젖산을 생성시키는 단계; 및
 (b) 상기 생성된 젖산을 수득하는 단계.
- [청구항 9] 피루베이트 디카르복실라아제 활성을 가지고, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하는 유전자.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 유전자.
- [청구항 11] 피루베이트 디카르복실라아제 활성을 가지고, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 단백질.
- [청구항 12] 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 가지는 g3002 유전자 프로모터.

[도 1]

(a)



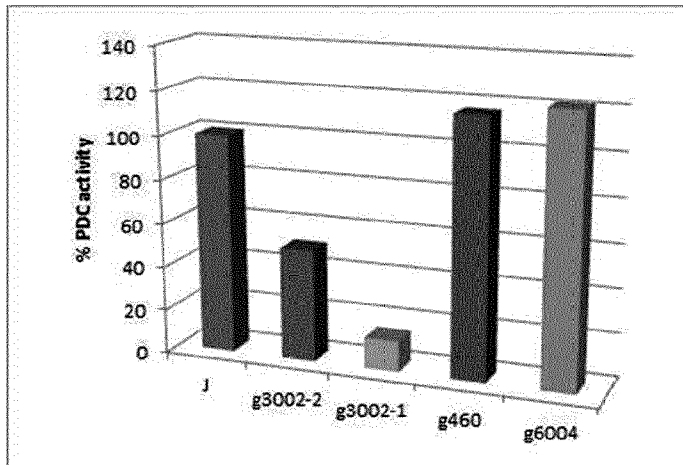
(b)



(c)



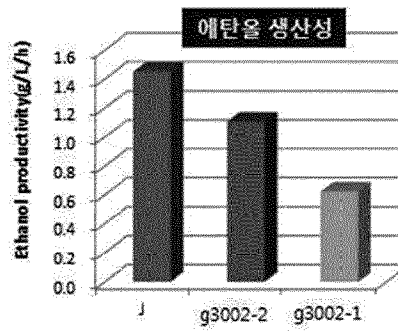
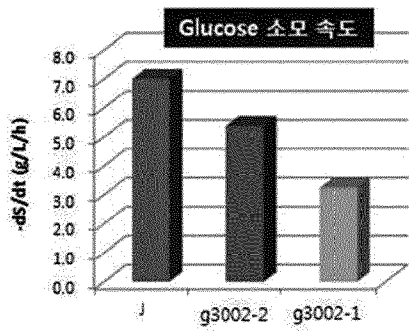
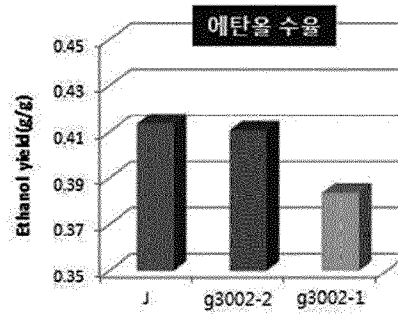
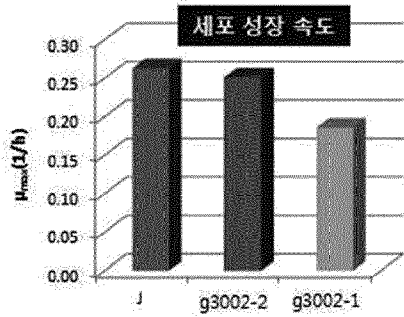
[도 2]



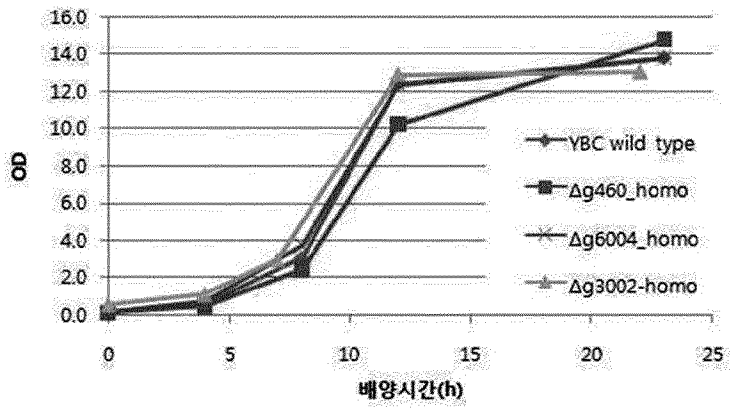
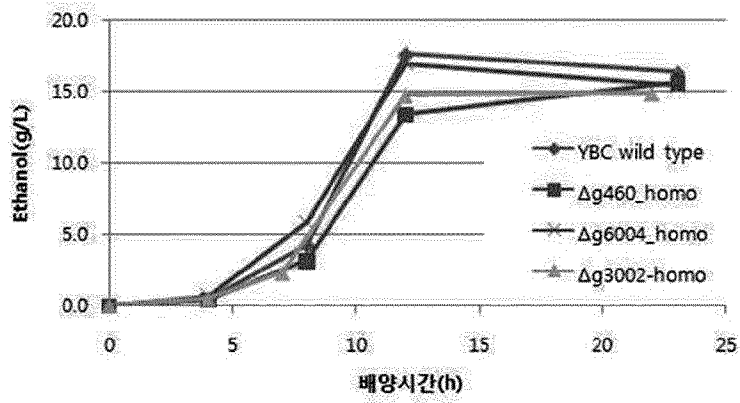
[도3]

에탄올 발효 Profile 비교

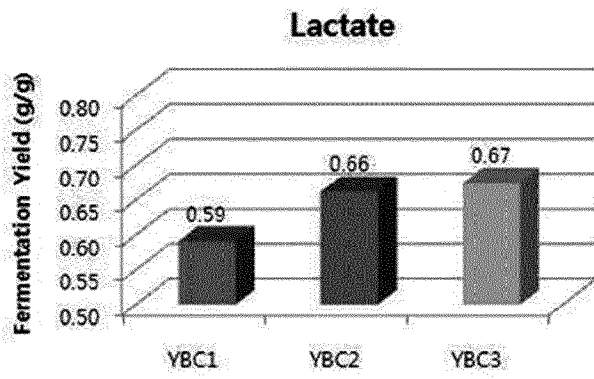
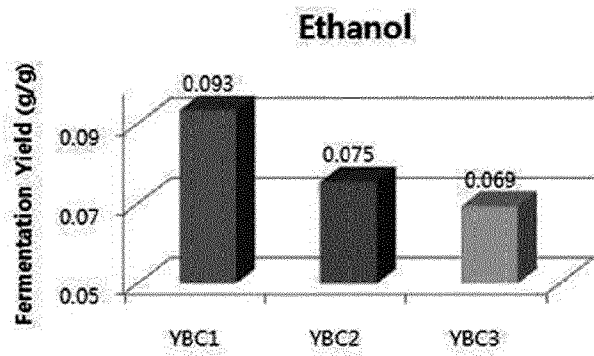
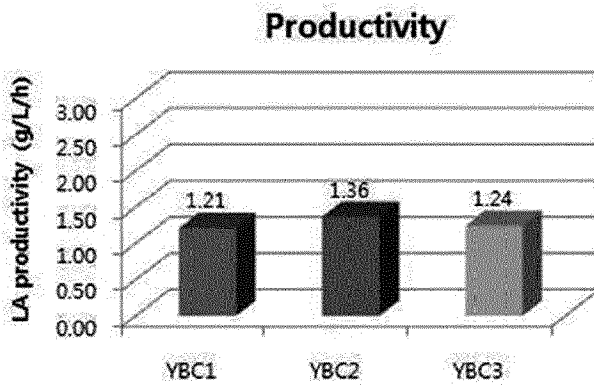
Strains	μ_{max}	$Y_{EtOH/glc}$	Glucose 소모속도	Productivity
J	0.26	0.41	7.01	1.45
$\Delta g3002-2$	0.25	0.41	5.38	1.11
$\Delta g3002-1$	0.19	0.38	3.25	0.62



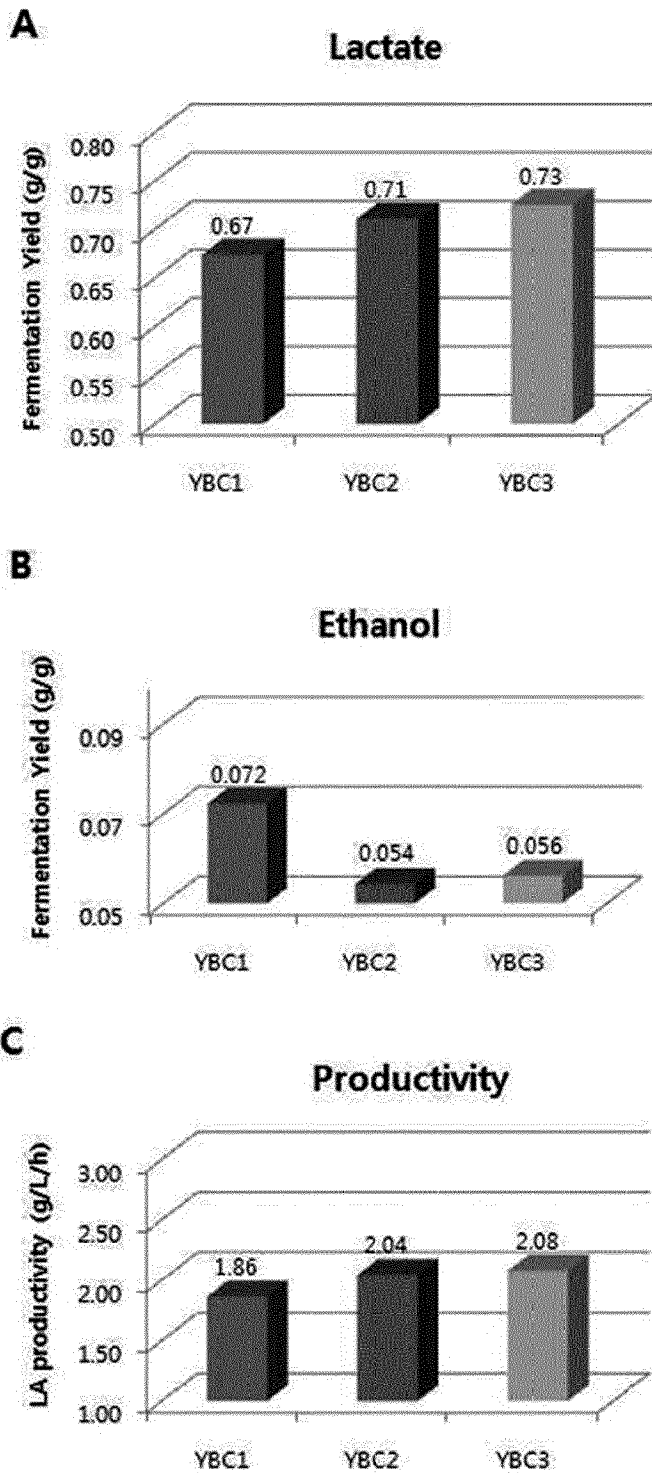
[도4]

A**B**

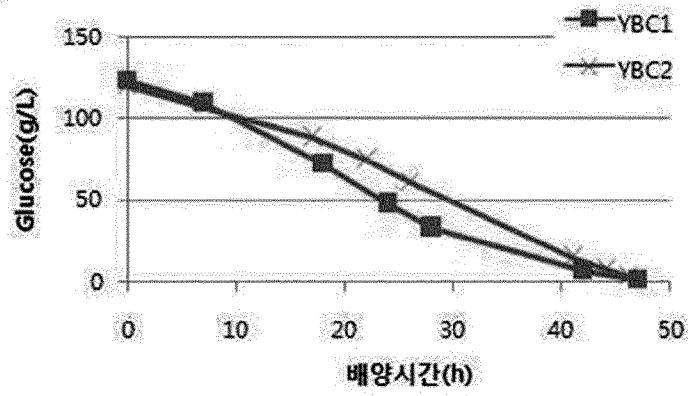
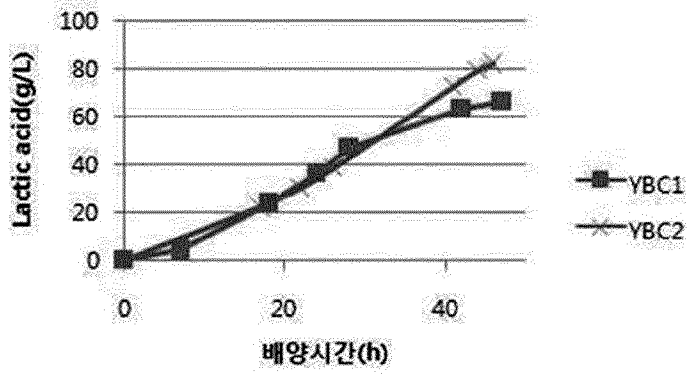
[도5]

A**B****C**

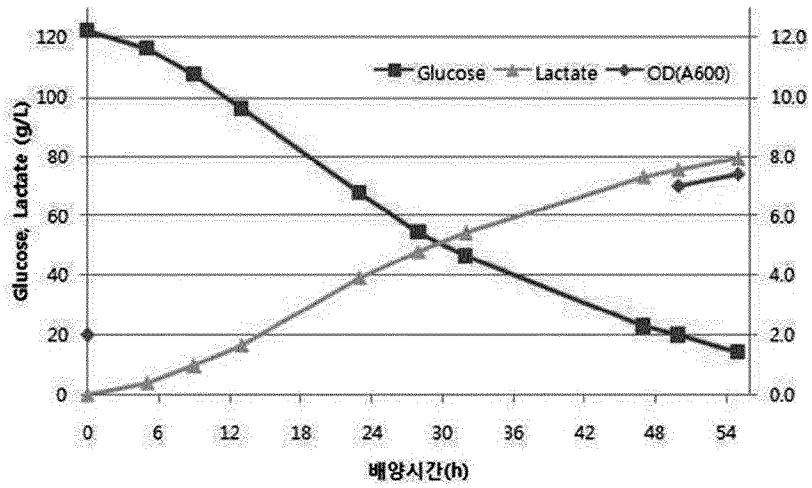
[도6]



[도7]

A**B**

[도8]

A**B**