

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 9 월 20 일 (20.09.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/124946 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/70 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C12P 7/40 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/001757
- (22) 국제출원일: 2012 년 3 월 9 일 (09.03.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0021963 2011 년 3 월 11 일 (11.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **한국 화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY)** [KR/KR]; 대전시 유성구 장동 100 번지, 305-343 Daejeon (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **박시재 (PARK, Si Jae)** [KR/KR]; 대전시 유성구 어은동 99(44/8) 한빛아파트 127 동 307 호, 305-755 Daejeon (KR). **이승환 (LEE, Seung Hwan)** [KR/KR]; 대전시 유성구 장대동 305-12 202 호, 305-308 Daejeon (KR). **송봉근 (SONG, Bong Keun)** [KR/KR]; 대전시 유성구 신성동 160-1 한울아파트 103 동 1203 호, 305-707 Daejeon (KR). **제갈중건 (JEGAL, Jong Geon)** [KR/KR]; 대전시 유성구 전민동 엑스포아파트 106 동 1601 호, 305-761 Daejeon (KR).
- (74) 대리인: **이원희 (LEE, Won Hee)**; 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2 차 8 층, 135-080 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING 5-AMINOVALERIC ACID USING RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI*

(54) 발명의 명칭 : 재조합 대장균을 이용한 5-아미노발레르산의 제조 방법

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing 5-aminovaleric acid from lysine using recombinant *Escherichia coli* strains, and more particularly, to a method for producing 5-aminovaleric acid from lysine by means of recombinant strains produced by transforming the recombinant *Escherichia coli* with delta-aminovaleramidase (DavA) and lysine 2-monooxygenase (DavB) genes. The recombinant *Escherichia coli* strains have the ability to transform lysine to produce 5-aminovaleric acid, and therefore the method of the present invention may be effectively used in techniques for the inexpensive mass production of 5-aminovaleric acid.

(57) 요약서: 본 발명은 재조합 대장균 균주를 이용한 라이신(lysine)으로부터 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid)의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 재조합 대장균 균주를 델타-아미노발레라미다아제(delta-aminovaleramidase; DavA) 및 라이신 2-단일산화효소(lysine 2-monooxygenase; DavB) 유전자로 형질전환하여 제조한 재조합 균주에 의해 라이신으로부터 5-아미노발레르산을 생산하는 방법에 관한 것이며, 상기 재조합 대장균 균주는 라이신으로부터 5-아미노발레르산으로의 전환 생산능이 있으므로, 상기 방법은 5-아미노발레르산 저가의 대량 생산기술에 유용하게 이용될 수 있다.



WO 2012/124946 A2

명세서

발명의 명칭: 재조합 대장균을 이용한 5-아미노발레르산의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 재조합 대장균 균주를 이용한 라이신(lysine)으로부터 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid)의 제조 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 최근 전 세계적인 석유수급 불안과 석유자원 고갈에 대한 위기의식으로 최근에 산업 바이오 기술을 이용하여 바이오매스에서 유래한 대체 생산 방법이나 대체 화합물을 생산하기 위한 전 인류적인 노력이 바이오에너지, 바이오플라스틱, 바이오화합물 등의 다양한 분야에서 가시화되고 있다. 바이오매스를 활용하여 생산되는 바이오 플라스틱 시장의 경우 2002년 Natureworks사에 의해 상업화된 폴리유산 (Poly Lactic acid)이 연 14만 톤 규모로 생산되어 최근 시장이 급속히 확대되고 있다. PHA계 바이오플라스틱인 폴리-(3-하이드록시부틸레이트-코-3-하이드록시발레레이트{poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)}(P(3HB-co-3HV))도 Metabolix와 ADM의 합작회사인 Telles에 의해 5만 톤 규모의 공장이 2010년 완공되어 제품이 시판되고 있다. 또한, 듀폰사가 생산하고 있는 바이오매스 기반의 1,3-프로판디올을 이용하여 PTT 고분자 제품이 현재 상용화되어 있다. 이외에도 숙신산 기반의 PBS 등도 활발히 개발되고 있다. 상기 예로 든 바이오매스 유래 고분자의 단점 중의 하나는 낮은 내열성을 들 수 있다. 높은 내열성을 보유한 고분자의 대표적인 예는 나일론이다. 나일론 6과 나일론 6,6이 나일론 시장의 대부분을 차지하고 있지만 최근 생분해성 특성과 내열성을 동시에 지닌 나일론 4에 대한 관심이 높아지고 있다.

[4]

- [5] 나일론 4의 원료물질인 2-피롤리돈은 감마 부티로락톤(gamma butyrolactone)으로부터 생산될 수 있으며 4-아미노부틸산의 탈수 고리반응에 의해 생산될 수 있다. 4-아미노부틸산의 경우 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid, GABA)이라고도 하는데, 체내에서는 신경전달물질 억제효과에 의한 저혈압 및 진통효과가 있다고 알려져, 현재 식품 및 의약품 소재로 활용되고 있다(Erlander et al., Neurochem Res. 16: 215-226, 1991). 이러한 GABA는 글루타메이트를 원료로 글루타메이트 디카르복실라아제(Glutamate decarboxylase)에 의해 제조될 수 있는데, 현재까지 다양한 글루타메이트 디카르복실라아제가 보고되어 있으며(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8491-8495, 1990; Protein Expression and Purification 8: 430-438, 1996;

Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(12): 2600-2605, 2002), 글루타메이트 디카르복실라아제를 이용하여 GABA를 생산하는 공정이 개발된바 있다. 나일론 4 이외에 최근에 나일론 5에 관한 관심 또한 높아지고 있다. 나일론 5의 모노머는 현재 라이신으로부터 유래된 다이아민인 카다베린(cadaverine)이 사용되고 있다.

[6]

[7] 이에 본 발명자들은 라이신(lysine)으로부터 유래될 수 있는 나일론 5의 또 다른 모노머로서 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid)을 생산하는 공정을 개발하기 위하여 연구한 결과, 대장균에 L-라이신(L-lysine)을 5-아미노발레르아미드(5-aminovaleramide)로 전환하는 라이신 2-단일산화효소(lysine 2-monooxygenase; DavB) 효소와 5-아미노발레르아미드(5-aminovaleramide)를 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid)로 전환하는 델타-아미노발레라미다아제(delta-aminovalleramidase; DavA) 효소를 증폭한 결과 라이신으로부터 5-아미노발레르산이 생산됨을 확인하여, 상기 제조합 균주는 5-아미노발레르산을 저가로 대량 생산하는데 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 목적은 라이신 2-단일산화효소(lysine 2-monooxygenase; DavB) 효소 및 델타-아미노발레라미다아제(delta-aminovalleramidase; DavA) 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터로 형질전환하여 제조된 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid) 생산용 제조합 대장균 균주를 제공하기 위한 것이다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 DavB 효소 및 DavA 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터로 형질전환하여 제조된 제조합 대장균 균주를 이용하여 글루코스 및 라이신이 포함된 배지로부터 5-아미노발레르산을 생산하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 5-아미노발레르산을 생산하기 위한 본 발명의 제조합 대장균 균주를 제공하기 위한 것이다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[14] 1) 라이신 2-단일산화효소(lysine 2-monooxygenase; DavB) 효소 및 델타-아미노발레라미다아제(delta-aminovalleramidase; DavA) 효소를 코딩하는 유전자를 발현벡터 내로 삽입하여 제조합 벡터를 제조하는 단계; 및

[15] 2) 단계 1)에서 제조한 제조합 벡터를 대장균 균주에 형질전환시켜 제조합 대장균 균주를 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조된

- 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid) 생산용 재조합 대장균 균주를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은
- [17] 1) DavB 효소 및 DavA 효소를 코딩하는 유전자를 발현벡터 내로 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- [18] 2) 단계 1)에서 제조한 재조합 벡터를 대장균 균주에 형질전환시켜 재조합 대장균 균주를 제조하는 단계;
- [19] 3) 단계 2)의 재조합 대장균 균주를 글루코스(glucose) 및 라이신(lysine)을 포함하는 배지에 배양하는 단계; 및
- [20] 4) 단계 3)의 배양액으로부터 5-아미노발레르산을 수득하는 단계를 포함하는 5-아미노발레르산 생산방법을 제공한다.
- [21] 아울러, 본 발명은 5-아미노발레르산을 생산하기 위한, 본 발명의 재조합 대장균 균주를 제공한다.
- [22]
- [23] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [24]
- [25] 1) 라이신 2-단일산화효소(lysine 2-monooxygenase; DavB) 효소 및 델타-아미노발레라미다아제(delta-aminovaleramidase; DavA) 효소를 코딩하는 유전자를 발현벡터 내로 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및
- [26] 2) 단계 1)에서 제조한 재조합 벡터를 대장균 균주에 형질전환시켜 재조합 대장균 균주를 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조된 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid) 생산용 재조합 대장균 균주를 제공한다.
- [27] 상기 DavB는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [28] 상기 DavA는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [29] 상기 대장균 균주는 모든 종류의 대장균 균주가 적용될 수 있으나, BL21 codon plus인 것이 보다 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [30] 또한, 본 발명은
- [31] 1) DavB 효소 및 DavA 효소를 코딩하는 유전자를 발현벡터 내로 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- [32] 2) 단계 1)에서 제조한 재조합 벡터를 대장균 균주에 형질전환시켜 재조합 대장균 균주를 제조하는 단계;
- [33] 3) 단계 2)의 재조합 대장균 균주를 글루코스(glucose) 및 라이신(lysine)이 포함하는 배지에 배양하는 단계; 및
- [34] 4) 단계 3)의 배양액으로부터 5-아미노발레르산을 수득하는 단계를 포함하는 5-아미노발레르산 생산방법을 제공한다.
- [35] 상기 단계 3)의 배지는 대장균 균주의 배양에 이용되는 어떠한 배지도 사용가능하나, LB배지가 보다 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

- [36] 상기 단계 3)의 배양은 48 내지 96시간인 것이 바람직하고, 배양온도는 20 내지 40°C인 것이 바람직하고, 37°C인 것이 보다 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [37] 상기 단계 4)의 5-아미노발레르산 수득은 배양액을 분무 건조하여 저농도의 5-아미노발레르산-함유 분말을 대량으로 얻을 수 있고, 배양액을 감압 증발기를 이용하여 농축한 후 동결건조를 진행하여 고농도의 5-아미노발레르산 수득도 가능하며, 또한 이온교환수지를 이용한 정제방법을 사용한 후 농축 및 건조 공정을 수행하여 고순도의 5-아미노발레르산의 수득할 수 있으나 이에 한정하지 않으며, 상기 5-아미노발레르산은 온도 및 pH의 변화에 크게 영향을 받지 않고, 공정 안정성이 있기 때문에 회수 공정상의 제한이 없다.
- [38] 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 대장균 균주를 라이신 2-단일산화효소(lysine 2-monooxygenase; DavB) 효소와 5-아미노발레르아미드(5-aminovaleramide)를 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid)로 전환하는 델타-아미노발레라미다아제(delta-aminovaleramidase; DavA) 효소를 코딩하는 유전자를 함유한 재조합 벡터로 형질전환하여 형질전환된 대장균 균주를 라이신이 포함된 배지에서 배양한 후 5-아미노발레르산 전환 생산능을 확인한 결과, 5-아미노발레르산의 유의적인 전환 생산능을 확인하였다(표 2 참조).
- [39] 따라서, 본 발명의 재조합 대장균 균주는 5-아미노발레르산을 저가로 대량 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [40]
- [41] 또한, 본 발명은 5-아미노발레르산을 생산하기 위한, 본 발명의 재조합 대장균 균주를 제공한다.
- [42] 상기 재조합 대장균 균주는,
- [43] 1) 라이신 2-단일산화효소(lysine 2-monooxygenase; DavB) 효소 및 델타-아미노발레라미다아제(delta-aminovaleramidase; DavA) 효소를 코딩하는 유전자를 발현벡터 내로 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및
- [44] 2) 단계 1)에서 제조한 재조합 벡터를 대장균 균주에 형질전환시켜 재조합 대장균 균주를 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[45]

발명의 효과

- [46] 본 발명은 L-라이신(L-lysine)을 5-아미노발레르아미드(5-aminovaleramide)로 전환하는 라이신 2-단일산화효소(lysine 2-monooxygenase; DavB) 효소와 5-아미노발레르아미드(5-aminovaleramide)를 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid)로 전환하는 델타-아미노발레라미다아제(delta-aminovaleramidase; DavA) 효소가 증폭된 재조합 대장균 균주에 관한 것으로, 상기 재조합 대장균 균주를 라이신이 함유된 배지에서 배양할 경우 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid)을

대량생산 할 수 있으므로 5-아미노발레르산 대량생산 산업화기술개발에 유용하게 이용될 수 있다.

[47]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[48] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[49] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[50]

[51] <실시예 1> DavA 및 DavB 유전자 발현을 위한 발현 벡터의 제조

[52] L-라이신(L-lysine)을 5-아미노발레르아미드(5-aminovaleramide)로 전환하는 라이신 2-단일산화효소(lysine 2-monooxygenase; DavB) 효소와 5-아미노발레르아미드(5-aminovaleramide)를 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid)로 전환하는 델타-아미노발레라미다아제(delta-aminovaleramidase; DavA) 효소를 증폭한 재조합 *E.coli* BL21 codon plus를 배양하여 라이신으로부터 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid) 생산능을 확인하기 위하여, DavA, DavB 유전자를 발현하는 벡터를 제작하였다.

[53] 발현용 벡터 pZE12-MCS는 pTacLac(Lee et al. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 79, 633-641, 2008)의 MCS(Muti-cloning sites) 및 *Ralstonia eutropha*의 PHA 생합성 유전자 전사 터미네이터를 가지도록 변형시켰다.

[54] 구체적으로, 랄스토니아 유트로파(*Ralstonia eutropha*)의 PHA 생합성 유전자 전사 터미네이터 유전자 단편을 p619C1437-pct540로부터 하기 표 1에서 나타난 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머를 이용하여 PCR로 수득하고, 상기 수득한 유전자 단편을 주형으로 하여 하기 표 1에서 나타난 서열번호 5 및 서열번호 4의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 RBS, pTacLac MCS 및 *R. eutropha*의 PHA 생합성 유전자 전사 터미네이터를 수득하였다. 상기 PCR 산물을 MfeI 및 AvrII를 처리하여 절단하고, EcoRI/AvrII로 절단된 pZE12-MCS에 삽입하여, pKE12-MCS를 제조하였다. 플라스미드 pZE12-MCS는 ESPRESSYS(www.expressys.com)로부터 구입하여 수용하였다. pKE12-MCS에 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 DavA 유전자를 EcoRI/KpnI으로 삽입하여, pKE12DavA를 제조하였고, pKE12DavA에 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 DavB 유전자를 KpnI/BamHI으로 삽입하여, pKE12DavAB를 제조하였다.

[55]

[56] 표 1

[Table 1]

	프라이머 서열(Primer sequence)	표적 유전자(Target gene)
서열번호: 3	gagtcgacctgcaggcatgcaagcttcctgccggcctg gttcaacc	<i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator
서열번호: 4	cctagg gcctcgccccgcgagggcc	
서열번호: 5	caattgattaaagaggagaaagaattcgagctcggtacc cggggatcctctagagtcgacctgcaggcatgcaagctt	RBS and MCS for pKE12-MCS

[57]

[58] <실시예 2> 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid) 생산능 확인

[59] 상기 <실시예 1>에서 제작한 *E. coli* BL21 codon plus(pKE12DavAB)를 이용하여 5-아미노발레르산 생산능을 확인하기 위하여, *E. coli* BL21 codon plus를 LB배지 및 글루코스 10 g/L와 라이신 10 g/L가 함유된 LB 및 MR 배지에서 배양하였다. MR 배지는(pH 6.9) 1리터당 다음과 같은 조성으로 구성되어 있다. 6.67 g KH_2PO_4 , 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.8 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.8g citric acid, 5 ml trace metal solution. Trace metal solution은 1리터당 다음과 같은 조성으로 구성되어 있다(0.5 M HCl), 10 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g CaCl_2 , 2.2g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

[60] 그 결과, 표 2에 나타낸 바와 같이, 라이신으로부터 5-아미노발레르산이 유의적으로 생산되는 것을 확인하였다.

[61]

[62]

[2]

Time(hr)	pKE12avAB/BL21 codon plus					
	LB		LB+Glucose10g/l		MR+Glucose10g/l	
	lysine (g/l)	5-Aminovaleric acid (g/l)	lysine (g/l)	5-Aminovaleric acid (g/l)	lysine (g/l)	5-Aminovaleric acid (g/l)
1	11.7	0.4	10.5	0.5	6.6	0.1
24	9.5	1.4	8.5	0.3	2.7	0.0
48	7.4	3.5	3.9	0.5	4.2	0.9
72	0.0	5.9	3.0	0.8	1.5	1.0
96	0.0 (OD ₆₀₀ =3.9)	5.3	2.0 (OD ₆₀₀ =6.9)	0.9	2.1 (OD ₆₀₀ =6.9)	3.1

[63]

[64]

청구범위

- [청구항 1] 1) 라이신 2-단일산화효소(lysine 2-monooxygenase; DavB) 효소 및 델타-아미노발레라미다아제(delta-aminovaleramidase; DavA) 효소를 코딩하는 유전자를 발현백터 내로 삽입하여 재조합 백터를 제조하는 단계; 및
- 2) 단계 1)에서 제조한 재조합 백터를 대장균 균주에 형질전환시켜 재조합 대장균 균주를 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조된 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid) 생산용 재조합 대장균 균주.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 DavB는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 5-아미노발레르산 생산용 재조합 대장균 균주.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 DavA는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 5-아미노발레르산 생산용 재조합 대장균 균주.
- [청구항 4] 1) DavB 효소 및 DavA 효소를 코딩하는 유전자를 발현백터 내로 삽입하여 재조합 백터를 제조하는 단계;
- 2) 단계 1)에서 제조한 재조합 백터를 대장균 균주에 형질전환시켜 재조합 대장균 균주를 제조하는 단계;
- 3) 단계 2)의 재조합 대장균 균주를 글루코스(glucose) 및 라이신(lysine)이 포함하는 배지에 배양하는 단계; 및
- 4) 단계 3)의 배양액으로부터 5-아미노발레르산을 수득하는 단계를 포함하는 5-아미노발레르산 생산방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 단계 3)의 배양은 48 내지 96시간 동안 30 내지 40°C에서 실시하는 것을 특징으로 하는 5-아미노발레르산 생산방법.
- [청구항 6] 5-아미노발레르산을 생산하기 위한, 제 1항의 재조합 대장균 균주.