



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0045640
(43) 공개일자 2021년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/52 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/52 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0128926
(22) 출원일자 2019년10월17일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 광평로34길 55, 104동 802호(수서동, 강남대시앙포레아파트)
뉴엔 탄 린
경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 17, 2-2호(서천동, 진영빌라 4동)
(74) 대리인
위병갑

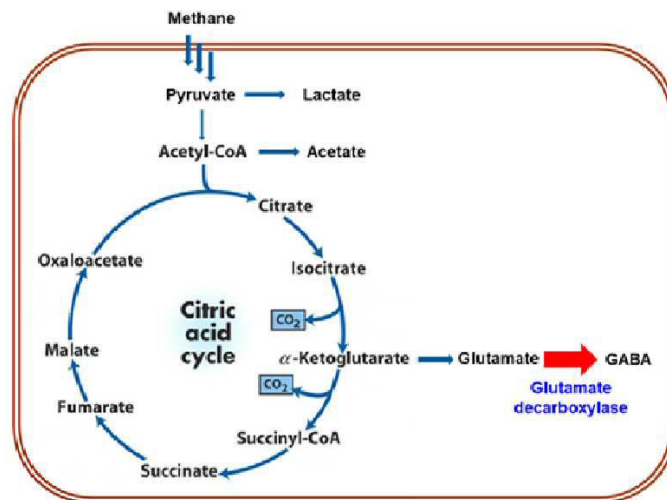
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 메탄자화균을 이용한 감마-부티르산의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 감마 부티르산(GABA) 생성능을 가지는 형질전환된 메탄자화균 및 이를 이용한 GABA의 생산 방법에 대한 것으로, 보다 구체적으로 유일탄소원으로 메탄에서 배양한 감마 부티르산 생성능을 가지는 메탄자화균을 바이오촉매로 이용하여 모노소듐 글루타메이트(MSG)의 존재 하에서 GABA를 생산하는 방법 및 생산에 활용되는 균주로서, 경제성과 효율성이 향상된 GABA 생산 방법으로 산업 전반에 활용 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 13/005 (2013.01)

C12Y 401/01015 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	한국연구재단
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1 가스리파이너리 사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

대장균 유래의 글루타메이트 디카르복실레이즈(glutamate decarboxylase, gadBC), 메틸로모나스 렌타 유래의 글루타메이트 디카르복실레이즈(glutamate decarboxylase, gadB) 또는 대장균 유래의 글루타메이트 디카르복실레이즈 돌연변이체(glutamate decarboxylase, gadBCm) 중 하나의 유전자가 도입 및 과발현되어 GABA(Gamma butyric acid) 생산능을 가지는 것을 특징으로 하는 형질전환된 메탄자화균.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 메탄자화균에 도입된 대장균 유래의 글루타메이트 디카르복실레이즈(glutamate decarboxylase, gadBC)는 서열번호 1, 메틸로모나스 렌타 유래의 글루타메이트 디카르복실레이즈(glutamate decarboxylase, gadB)는 서열번호 2, 대장균 유래의 글루타메이트 디카르복실레이즈 돌연변이체(glutamate decarboxylase, gadBCm)는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환된 메탄자화균.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 메틸로마아크로비움 속 미생물인 것을 특징으로 하는 메탄자화균.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 메틸로마아크로비움 알칼리필리움 20Z(Methylococcus alcaliphilum 20Z)인 것을 특징으로 하는 메탄자화균.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 10 내지 50% v/v의 메탄 존재하에서 배양하는 것을 특징으로 하는 메탄자화균.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 메탄자화균 또는 이의 배양액 및 MSG(Monosodium glutamate)를 포함하는 GABA 생산용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 MSG는 조성물 내에 0.1 내지 10 중량 %로 포함하는 것을 특징으로 하는 GABA 생산용 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 메탄자화균을 MSG가 포함된 배지에서 배양하여, 전환 반응을 유도하는 GABA의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GABA(gamma-butyric acid)의 생성능을 가지는 미생물 및 이를 이용한 GABA의 생산 방법에 대한 것으로, 보다 구체적으로 메탄이 존재하는 조건 하에서 배양된 형질전환 메탄자화균을 이용하여 GABA를 생산하는 방법 및 상기 미생물에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근, 메탄 및 메탄올 등의 C1 화합물은 매력적인 기질로써 많은 관심을 받고 있으며, 이를 이용한 화학물질 및 연료의 바이오전환은 향후 산업에서 큰 변화를 가지고 올 것으로 기대된다. 특히 메탄을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 사용하는 메탄자화균(Methanotrophic bacteria)는 메탄의 생물학적 전환을 위한 유망한 촉매로 평가받고 있다.

[0004] 메탄자화균을 여러 가지 화합물의 생산에 활용하려는 시도가 꾸준히 있어 왔으나, 메탄자화균의 생리학에 대한 전반적인 지식의 부족과 늦은 세포 성장 속도 등으로 인하여 아직까지 산업용 균주로 널리 활용되는데 어려움이 있다. 몇몇 연구를 통해 대사공학적으로 조작된 재조합 메탄자화균(methanotrophs)을 이용한 화합물 및 연료의 생산이 보고된 바 있으나, 역가 및 생산성은 여전히 산업에서 요구되는 수준보다 훨씬 낮아 개선이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 공개특허 제 10-2019-0049575호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 글루타메이트 디카복실레이즈가 과발현된 재조합 메탄자화균 및 이를 메탄 조건 하에서 배양함으로써, 바이오촉매로 활용한 MSG(Monosodium glutamate)로부터 감마 부티르산(gamma-butyric acid, GABA)를 생산하는 방법에 대한 것이다.

[0008] 즉, 본 발명의 목적은 대장균 유래의 글루타메이트 디카복실레이즈(glutamate decarboxylase, gadBC, 서열번호 1), 메틸로모나스 렌타 유래의 글루타메이트 디카복실레이즈(glutamate decarboxylase, gadB, 서열번호 2) 또는 대장균 유래 글루타메이트 디카복실레이즈의 돌연변이 (glutamate decarboxylase, gadBCm, 서열번호 3) 을 야생형 메탄자화균에 과발현시킨 재조합 메탄자화균 및 이를 바이오촉매로 이용하여 MSG로부터 감마 부티르산(gamma-butyric acid, GABA)를 생산 하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은, 상기 형질전환된 메탄자화균을 바이오촉매로 포함하는 GABA 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 형질전환된 메탄자화균을 MSG를 포함한 배지에서 배양하여, GABA를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, 대장균 유래의 글루타메이트 디카복실레이즈 (glutamate decarboxylase, gadBC, 서열번호 1), 메틸로모나스 렌타 유래의 글루타메이트 디카복실레이즈 (glutamate decarboxylase, gadB, 서열번호 2) 또는 대장균 유래 글루타메이트 디카복실레이즈의 돌연변이 (glutamate decarboxylase, gadBCm, 서열번호 3) 중 하나의 유전자를 야생형 메탄자화균에 과발현시킨, 감마 부티르산 (Gamma butyric acid, GABA)의 생산능을 가지는 것을 특징으로 하는 형질 전환된 메탄자화균 (Methanotrophic bacteria)을 제공한다.

- [0013] 또한 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 상기 형질전환된 메탄자화균 및 MSG를 포함하는 GABA 생산용 조성물 및 이를 이용한 GABA의 생산 방법을 제공한다.
- [0015] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0016] 상기 본 발명의 메탄자화균(Methanotroph)은 호기성 환경에서 메탄(혹은 메탄올)을 유일한 탄소원 혹은 영양원으로 사용하는 세균을 말하는 것이다. 본 발명에서는 상기 메탄자화균의 대사 과정에 관여하는 유전자를 조절하여, 감마 부티르산의 생산에 활용하였다. 본 발명에 사용된 상기 메탄자화균은 그 종류에 제한되는 것은 아니나, 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로마이크로비움 속(Methylobacterium), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로퐁더스 속(Methyloprofundus), 메틸로쉴머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methyloamarinum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노븀 속(Methyloamarinovum), 메틸로러브럼 속(Methyloarubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시너스 속(Methylosinus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methyloacidiphilum) 및 메틸아시디마이크로비움 속(Methyloacidimicrobium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 메틸로마이크로비움 속(Methylobacterium)일 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 메틸로마이크로비움 알칼리필리움 20Z(Methylobacterium alcaliphilum 20Z)를 이용하여 GABA 생산능을 가지는 형질전환 균주를 제작하였으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 상기 GABA 생산능을 가지도록 형질전환된 메탄자화균주는 대장균 유래의 대장균 유래의 글루타메이트 디카르복실레이즈(glutamate decarboxylase, gadBC, 서열번호 1), 메틸로모나스 렌타 유래의 글루타메이트 디카르복실레이즈 (glutamate decarboxylase, gadB, 서열번호 2) 또는 대장균 유래 글루타메이트 디카르복실레이즈의 돌연변이 (glutamate decarboxylase, gadBcm, 서열번호 3) 중 선택된 하나의 유전자를 야생형 메탄자화균에 과발현하도록 상기 서열번호 1 내지 3의 염기서열을 포함하는 유전자를 형질전환 벡터를 통해 메탄자화균에 도입시킨 것이다.
- [0020] 글루타메이트 디카르복실레이즈(GAD)는 글루타메이트가 감마-아미노부티레이트(GABA)로 전환되는 비가역적 탈카르복시화 반응을 촉매하는 효소이다. GABA는 동식물에 널리 분포된 물질로서 포유동물의 뇌와 척수에서 억제성 신경전달 물질의 역할을 하며, 다양한 의약적 용도로 활용되고 있다. GAD는 GABA 생성에 관여함으로써, 척추동물의 중추 신경계에서 중요한 역할을 하며, 대장균, 유산균, 이스트 등 다양한 미생물에서 유래될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 대장균 및 메틸로모나스 속 미생물로부터 유래된 GAD 유전자를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 메탄자화균은 기본적으로 메탄 또는 메탄올을 영양원으로 활용하는 것이나, MSG(Monosodium glutamate)를 기질로 활용할 수 있는 대사 과정을 도입함으로써, 상기 물질로부터 활용 가치가 높은 화합물인 GABA를 생성할 수 있도록 하였다.
- [0023] 즉, 본 발명은 메탄에서 배양된 상기 형질 전환 메탄자화균을 바이오 촉매로 이용하여, MSG로부터 GABA를 생산하는 방법에 대한 것이다. 바이오 촉매는 미생물이 발현하는 효소와 대사 과정을 이용하여, 유용 물질을 생산하는 공정에 사용되는 미생물 혹은 미생물 유래 효소를 의미하며, 특히 바이오연료, 식품, 의약품, 사료 등의 생산에 널리 사용될 수 있다. 본 발명에서는, MSG를 GABA로 전환하는 특징을 가지는 형질전환된 메탄자화균을 GABA 생산의 바이오 촉매로 활용하였으며, 기존의 메탄자화균은 MSG로부터 GABA를 생산하는 대사 경로를 전혀 가지고 있지 않으나(표 3 참고), 본 발명의 형질전환된 균주의 경우, MSG를 포함하는 배지에서 배양하였을 때 GABA를 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [0025] 상기 메탄자화균의 배양은 통상적으로 알려진 배양 방법에 따라 배양될 수 있다. 배양에 이용되는 배지는 공지

된 배지 중 어떤 것이든 선택할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 NMS(nitrate mineral salt) 배지를 사용하였다. 또한, 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 균주 배양 시, 메탄 가스를 주입할 수 있도록 공간을 포함하는 플라스크를 이용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명의 형질전환된 메탄자화균주를 이용하여 GABA를 생산하는 방법으로서, 먼저 탄소원으로 메탄을 주입한 플라스크에서 상기 균주를 진탕배양한 후, 이를 MSG가 포함된 배지에서 추가로 배양하는 단계를 포함하였다. 즉 본 발명의 균주는 메탄을 탄소원으로 소비함과 동시에, MSG를 포함하는 배양 조건에서는 GABA를 생산하는 생산능을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0027] 또한 상기 균주의 배양 결과 생산된 GABA는 통상적인 분리 및 정제 방법에 따라 수득할 수 있다. 상기 균주의 배양물, 균주로부터 추출된 추출물, 상기 추출물의 정제물을 포함할 수 있으며, 이로부터 용매 혹은 크로마토그래피에 의해 분리된 분획물을 모두 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 GABA의 생성능을 가지는 형질전환된 메탄자화균 및 이를 이용한 GABA의 생산 방법에 대한 것으로, 보다 구체적으로 유일 탄소원으로 메탄에서 배양된 상기 형질전환 메탄자화균을 바이오촉매로 이용하여 MSG로부터 GABA를 생산하는 방법 및 생산에 활용되는 상기 형질전환 균주로서, 경제성과 효율성이 향상된 GABA 생산 방법으로 산업 전반에 활용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 *M. alcaliphilum* 20Z에서 GABA를 생산하기 위한 글루타메이트 디카복실레이즈의 과발현을 간략히 도식화한 것이다.

도 2는 글루타메이트 디카복실레이즈가 과발현된 *M. alcaliphilum* 20Z를 바이오촉매로 사용하여 MSG로부터 GABA를 생산하는 반응을 간략히 나타낸 것이다.

도 3은 대장균 유래의 글루타메이트 디카복실레이즈를 pAWP89 벡터에 도입하여 구축된 pAWP89_gadBC (pAGBE)를 나타낸 것이다.

도 4는 메틸로모나스 렌타 유래의 글루타메이트 디카복실레이즈를 pAWP89 벡터에 도입하여 구축된 pAWP89_gadB-lenta (pAGBL)를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0034] <실험 방법>

[0035] (1) 균주의 준비 및 배양 조건

[0036] 본 연구에 사용된 박테리아 균주 및 플라스미드는 표 1에 열거되어 있다. *M. alcaliphilum* 20Z 균주는 NMS 배지에서 배양되었으며, 상기 배지에 1.0 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.0g/L KNO_3 , 15 g/L NaCl, 2ml/L 미량 원소 용액 ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0.5g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L, $\text{F}_2\text{-EDTA}$ 0.75g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L, H_3BO_3 0.03 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, Cu-EDTA 0.4g/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L), 인산 완충액 (KH_2PO_4 54.4g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 143.4 g/L) 2 ml/L 및 4.5 ml/L의 1M NaHCO_3 용액 및 0.5 ml/L의 1M Na_2CO_3 를 멸균 필터를 통해 사용 전에 혼합하였다(Ojala et al., 2011). 액체 배양은 스크류 캡으로 밀봉된 500 ml 삼각 진탕 플라스크에 30% 메탄 가스를 주입하고 30℃에서 배양하였다. 재조합된 균주를 선별하기 위하여, 카나마이신을 최종 농도 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가 하였다.

표 1

Strain or plasmid	Characteristics	Reference or source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 *?80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYAargF) U169, hsdR17(rK-mK+), λ -	Solgent
<i>M. alcaliphilum</i> 20Z	Wild type strain 20Z	DMSZ
20Z-pAGBE	WT strain 20Z harboring vector pAGBE	This study
20Z-pAGBL	WT strain 20Z harboring vector pAGBL	This study
20Z-pAGBEm	WT strain 20Z harboring vector pAGBEm	This study
Plasmids		
pAWP89	pAWP78 containing dTomato driven by pTac promoter	Puri AW et al. (<i>Appl Environ Microbiol</i> 2015, 81 (5):1775-1781)
pAGBE	pAWP89 carrying gadBC from <i>Escherichia coli</i> driven by Tac promoter	This study
pAGBL	pAWP89 carrying gadB from <i>Methylobacterium lenta</i> driven by Tac promoter	This study
pAGBEm	pAWP89 carrying gadBC mutant driven by Tac promoter	This study

(2) 박테리아의 형질 전환을 위한 플라스미드의 구축

본 발명에서 사용된 모든 플라스미드는 Gibson 어셈블리(영국, NEB)를 사용하여 제작하였다. 프라이머는 게놈 컴파일러 소프트웨어에서, Primer-3를 이용하여 설계하였고, 마크로젠(한국)에 의해 합성되었다(표 2). 플라스미드 pAGDE는 표 2에 기재된 서열번호 4 및 5의 프라이머를 이용하여 *E. coli* K12 균주 W3110의 gDNA로부터 글루타메이트 디카르복실레이즈(Glutamate decarboxylase, GAD)를 증폭시키고 겹친 어셈블리 방법에 따라 결합시킴으로써 구축되었다. 플라스미드 pAGDL은 서열번호 6 및 7의 프라이머를 이용하여 메틸로모나스 렌타 gDNA로부터 글루타메이트 디카르복실레이즈(Glutamate decarboxylase, GAD)를 증폭시키고 겹친 어셈블리 방법에 따라 결합시킴으로써 구축하였다. 플라스미드 pAGBEm은 서열번호 8 및 9의 프라이머를 이용하여 동일한 방법으로 구축하였다.

표 2

Primer	서열번호	Sequence 5' -3'
FWD_gadBC	4	TATTCACACAGGAAACAGCTATGGATAAGAAGCAAGTAACGG
REV_gadBC	5	ACGCATCTTCCCGACAACCTAAGTCAATACGACAGCAAGCA
FWD_gadB-lenta	6	TTCACACAGGAAACAGCTAACAACAGGAGATATCATGC
REV_gadB-lenta	7	GCATCTTCCCGACAACCTATTAACAAATACCATGAGCGC
FWD_gadBm	8	TTCACACAGGAAACAGCTATGGATAAGAAGCAAGTAACG
REV_gadBm	9	GCATCTTCCCGACAACCTATTAGTGATCGCTGAGATATTTT

(3) MSG의 플라스크 배양을 통한 GABA 합성의 전체 세포 반응

위에서 구축된 재조합 벡터 pAGBE, pAGBL, pAGBEm를 야생형 *M. alcaliphilum* 20Z에 형질전환하여 재조합 균주 20Z-pAGBE, 20Z-pAGBL 및 20Z-pAGBEm를 얻었다. 이를 30 °C 에서 24 시간 배양 한 후, 5000g, 4°C에서 5분동안 원심 분리하여 세포를 수확하였다. 원심분리를 통해 회수된 세포는 세포밀도가 OD₆₀₀에서 2가 되도록 50mM 아세트산 나트륨 완충액 (pH 4.8)으로 재현탁한 후 10g/L의 MSG를 첨가하였다. 30°C, 200rpm에서 진탕반응을 수행하였다. GABA 및 MSG의 농도는 Lü Y, Zhang et al. (*Analytical Letters* 2010, 43(17):2663-2671.)에서 설명한 방법으로 측정되었다.

[0046] (4) 분석 방법

[0047] 세포성장은 Beckman 분광 광도계로 600nm에서 광학 밀도를 측정하여 모니터링하였다. GABA 농도는 360 nm에서 UV 분광 광도계 검출기와 함께 Symmetry C18 컬럼 (5 μ m, Waters Corporation, Massachusetts, USA)을 사용하여 고성능액체 크로마토 그래피 (HPLC; Jasco Corporation, Japan)에 의해 분석되었다. GABA는 이전에 설명된 방법을 사용하여 2,4-디니트로플루오로 디니트로벤젠 (FDNB; Sigma, St. Louis, MO)에 의해 컬럼 전 유도체화되었다 (Lü Y, Zhang *et al.* (*Analytical Letters* 2010, 43(17):2663-2671.)). 유도체화 반응은 10ml 플라스크에 1ml의 표준 GABA 또는 샘플, 1ml의 0.5M NaHCO₃ (pH=9.0) 및 1ml의 FDNB (아세트 니트릴 중 1 %)를 함유한다. 혼합물을 5초동안 혼합하고 60℃에서 1 시간 동안 암실에서 배양하였다. 플라스크를 실온으로 냉각시키고 포스페이트 완충제 (0.02 M, pH = 7)를 플라스크의 스케일 라인에 첨가 하였다. 생성된 혼합물을 PVDF 시린지 필터 0.2 μ m (Whatman, Maidstone, UK)를 통해 여과하고 HPLC에 주입 하였다. 이동상 A의 조성은 아세트니트릴 : H₂O = 1 : 1이고, 이동상 B는 인산 완충용액 (0.02M, pH=7)이었다. 컬럼 온도는 35℃로 유지되었다. 사용전, 이동상은 0.8 ml/min : 0-20 분, 용매 A의 비율 16% ~ 100% ; 20-26 분, 용매 A의 100%에서 16%; 26-30 분, 용매 A 16%로 유지, 용매 A 16%와 용매 B 84%의 로 평형화시켰다. 컬럼은 다음 샘플 실행 전에 20분 이상 컨디셔닝되었다.

[0049] 실험예 1. GAD-발현 *M. alcaliphilum* 20Z 균주를 이용한 GABA 생산

[0050] *M. alcaliphilum* 20Z의 최적 성장 pH는 8~9인 반면, 야생형 GAD 단백질과 돌연변이된 GAD의 최적 pH는 각각 4, 4-7로 알려져 있다. 본 발명자들은 GAD가 발현된 *M. alcaliphilum* 20Z가 낮은 pH에서도 성장할 수 있다고 가정하고 먼저 GAD가 발현된 *M. alcaliphilum* 20Z를 pH 5 내지 7에서 배양하여 재조합 균주의 성장 능력을 점검하였다.

[0051] 상기 재조합 벡터 pAGBE, pAGBL 및 pAGBE_m를 각각 형질 전환시킨 재조합 균주 20Z-pAGBE, 20Z-pAGBL 및 20Z-pAGBE_m는 pH 7이하에서는 세포 성장이 관찰되지 않았을 뿐만 아니라, GABA가 생산되지 않았다.

[0052] 상기 결과로부터, 이에 재조합 균주 20Z-pAGBE, 20Z-pAGBL, 20Z-pAGBE_m는 모두 GAD를 발현시킬 수 있음을 가정하고, 이들을 모두 바이오 촉매로 사용하고자 하였다.

[0054] 실험예 2. GAD-발현된 재조합 균주 *M. alcaliphilum* 20Z의 바이오촉매로서의 용도

[0055] 재조합 균주 20Z-pAGBE, 20Z-pAGBL, 20Z-pAGBE_m를 각각 24시간동안 배양하여 OD₆₀₀=0.9까지 성장시켰다. 배양액을 원심 분리하여 세포를 수득하고 세포밀도가 OD₆₀₀=2가 되도록 50mM 아세테이트 완충액에 재현탁시킨 후, 10g/L MSG 및 1 mM의 피리독살 5'-포스페이트 (PLP)를 첨가하여 30℃, 200rpm, 12시간동안 GABA 생산 반응을 수행하였다. GABA의 생산량은 사용한 재조합 바이오촉매에 따라 차이를 나타으며, 20Z-pAGBE는 9.67 mg/L의 GABA를 생산하여 MSG로부터 가장 많은 GABA를 생산한 반면, 균주 20Z-pAGBL은 6.24 mg/L로 가장 적은 양의 GABA를 생성하였다 (표 3).

표 3

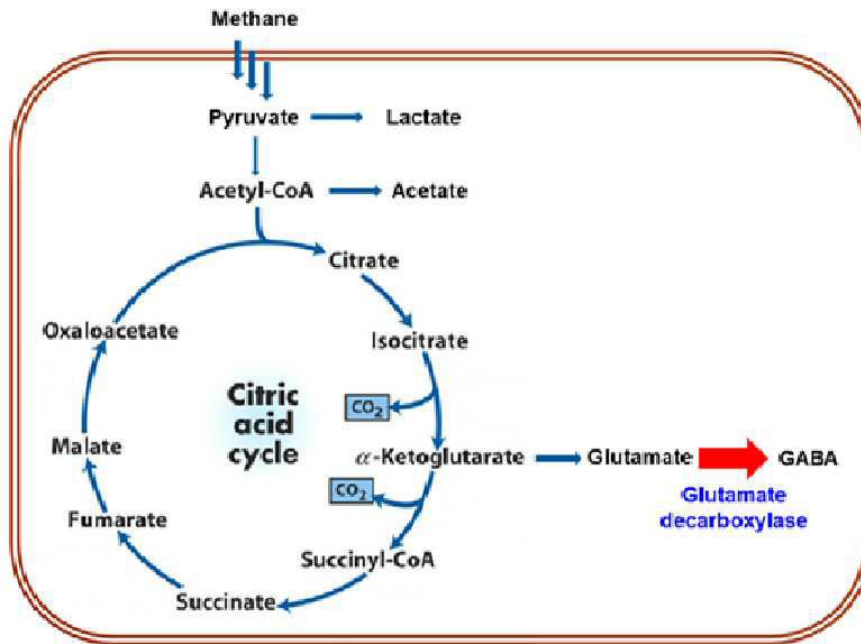
Strains	Initial MSG (g/L)	OD ₆₀₀	GABA mg/L
WT strain	10	2	0
20Z-pAGBE	10	2	9.67
20Z-pAGBL	10	2	6.24
20Z-pAGBE _m	10	2	9.2

[0058] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될

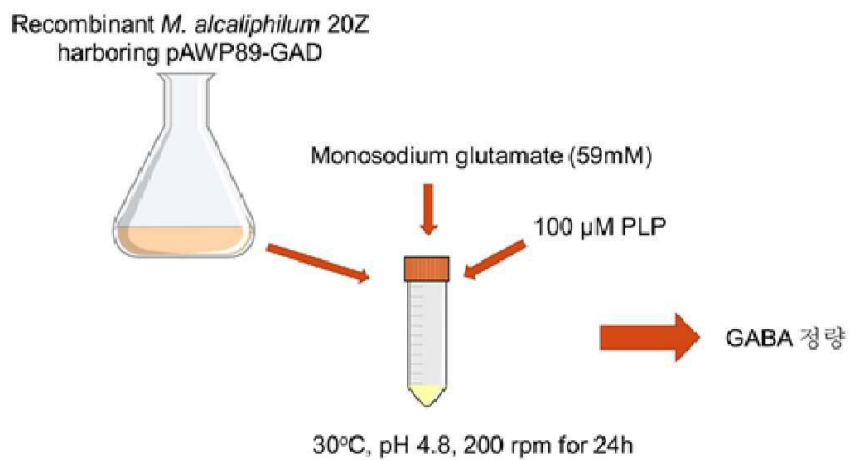
수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

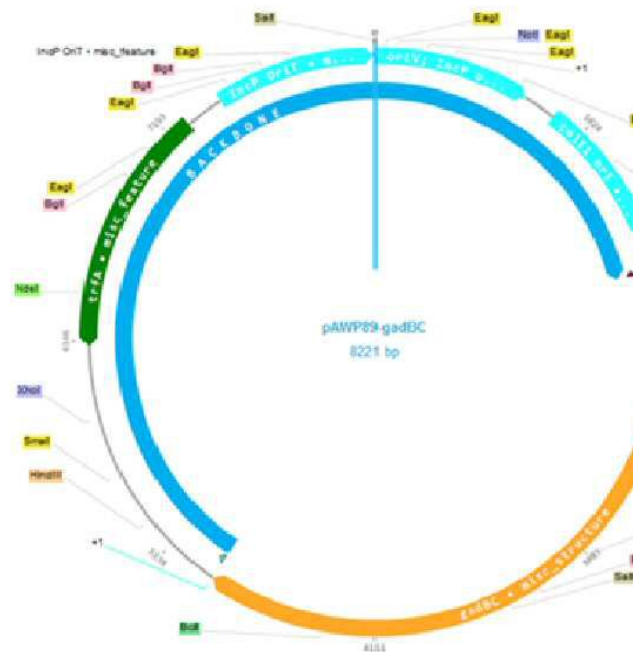
도면1



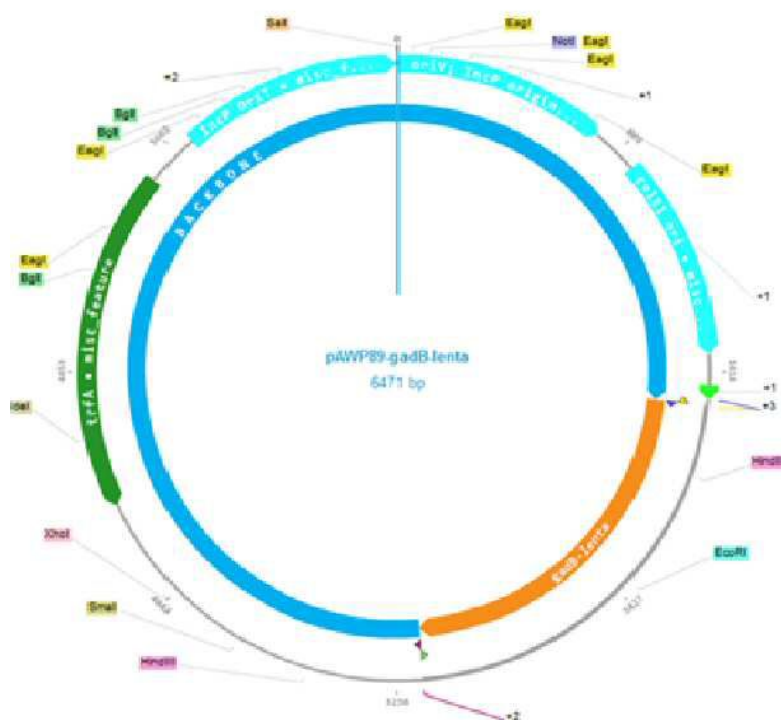
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation kyoung hee University
- <120> Method for producing gamma-butyric acid using methanotrophic bacteria

<130> PN1910-476

<160> 9

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1401

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

atggataaga agcaagtaac ggatttaagg tcggaactac tgcattcacg ttttggtgcg 60

aagtctatctt ccactatcgc agaatacaaa cgttttccgc tgcacgaaat gcgcgacgat 120

gtcgcattcc agattatcaa tgacgaatta tatcttgatg gcaacgctcg tcagaacctg 180

gccactttct gccagacctg ggacgacgaa aatgtccaca aattgatgga tttatccatt 240

aacaaaaact ggatcgacaa agaagaatat ccgcaatccg cagccatcga cctgcgttgc 300

gtaaataatgg ttgccgatct gtggcatgcg cctgcgccga aaaatggtca ggccgttggc 360

accaacacca ttggttcttc cgaggcctgt atgctcggcg ggatggcgat gaaatggcgt 420

tggcgcaagc gtatggaagc tgcaggcaaa ccaacggata aaccaaact ggtgtcgggt 480

ccggtacaaa tctgctggca taaattcgcc cgctactggg atgtggagct gcgtgagatc 540

cctatgcgcc ccggtcagtt gtttatggac ccgaaacgca tgattgaagc ctgtgacgaa 600

aacaccatcg gcgtggtgcc gactttcggc gtgacctaca ctggtaacta tgagttccca 660

caaccgctgc acgatgcgt ggataaattc caggccgata ccggtatcga catcgacatg 720

cacatcgacg ctgccagcgg tggcttctctg gcaccgttcg tcgccccgga tatcgtctgg 780

gacttccgcc tgccgcgtgt gaaatcgatc agtgcctcag gccataaatt cggctctggct 840

ccgctgggct gcggctgggt tatctggcgt gacgaagaag cgctgccga ggaactgggtg 900

ttcaacgttg actacctggg tggtaaatt ggtacttttg ccatcaactt ctcccggcg 960

gcgggtcagg taattgcaca gtactatgaa ttctgcgcc tcggtcgtga aggctatacc 1020

aaagtacaga acgcctctta ccaggttgcc gcttatctgg cggaatgaaat cgccaaactg 1080

gggccgtatg agttcatctg tacgggtcgc ccggacgaag gcatcccggc ggtttgcttc 1140

aaactgaaag atggtgaaga tccgggatac accctgtatg acctctctga acgtctgcgt 1200

ctgcgcggct ggcaggttcc ggccttcact ctgcggcgtg aagccaccga catcgtggtg 1260

atgcgcatta tgtgtcgtcg cggcttcgaa atggactttg ctgaactgtt gctggaagac 1320

tacaaagcct ccctgaaata tctcagcgt caccgaaac tgcagggtat tgcccaacag 1380

aacagcttta aacataacctg a

1401

<210> 2

<211> 1440

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> gadB gene sequence from Methylomonas lenta

<400> 2

atgctttcaa aaaaaacgac tgccagacac aaacattcca gactgcacgc gcgtaccggc 60

ggactaaccg ctccaagca cgcgcttgac ctagaagaac gaagccctag aaatgcttac 120

gaattagtgc atgacgaaat gttcttcgat gctaaccgc gtctgaatat ggcttcgttt 180

gtgactactt ggatggagcc tgaagctagt caattgatga tggaaagctt agacaaaaac 240

ctgatcgata aaccgatcta cccgcaaacc ctggagattc agaatcgttg tgtttctatt 300

attgccgaat tatttcatgc gggcgaagac gccgcgggaa cggcgaccgt cggttcatcc 360

gaagctattc acctagccgg cctagtaatg aaatggaatt ggaaaaaatg gtatcagact 420

aagtatggca aagacgccgc tctaaaacc aatatgatta tgggttcgaa cgtgcaggtt 480

tgttgaaaa aattcgacg ctactttgaa gttgatttaa tcgaaatacc gcttaccag 540

gaaaatcggc tggatgaaga ggcggcaata gccagggttg atgataatac catcggtgtg 600

gtcggtatatt taggcaacac ttatagtga gaattcgacg acattaaaca attagataca 660

ttaatcgatc agaataataa agaataaac cgagaagtac cgctgcatgt cgatgcagcc 720

agtggcggcg gcgtggcacc atttaccgc gagcacaag atatagtctg ggattttcgt 780

ttaaaatggg ttaattcgat taatatgtcg ggacataaat atggtctggt ttatcccggt 840

atcggtggg ctatttgaa atcgaaggcc agcattccaa aagatttgat tttcgatgtg 900

gattatttag gcgaatctca agaagacttc ggactgaact tttccgcgg cgcgggacaa 960

atcatcgctc aatactataa tttcgtcaga tacggacaca agggttattc gagaataatg 1020

aataacctta tggatttata tagcgaaata aagccaaaga tcgtagcaat aaaaaatcaa 1080

gacggcgta aatgttcga tttagtttca catgacaaag gcttaccgtt aatttgtatt 1140

tcagttacaa aagcagccac tgaccttggc tataccatgg cagccataac tcaccgctca 1200

agagaaaaag gtigggtatt accggtttat ccaatgtcgg cacctaagga aggtttgacc 1260

gtcatgcga tggactttaa gcaaggtttt aattccgaaa tgggcgataa actggtggac 1320

gatattactt gggcggtgaa tgaaattatg caagaaagaa aacaattgag tctttcgcat 1380

ggcgctcatg gtatttgtta acaattgagt ctttcgcatg gcgctcatgg tatttgttaa 1440

1440

<210> 3

<211> 1356

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> gadBC mutant gene sequence from E.coli

<400> 3

atggataaga agcaagtaac ggatttaagg tcggaactac tcgattcacg ttttggtgcg	60
aagtctatatt ccaactatcgc agaatacaaaa cgttttccgc tgcacgaaat gcgcgacgat	120
gtcgcattcc agattatcaa tgacgaatta tatcttgatg gcaacgctcg tcagaacctg	180
gccactttct gccagacctg ggacgacgaa aatgtccaca aattgatgga tttatccatt	240
aacaaaaact ggatcgacaa agaacagtat ccgcaatccg cagccatcga cctgcgttgc	300
gtaaatatgg ttgccgatct gtggcatgcg cctgcgccga aaaatggtca ggccgttggc	360
accaacacca ttggtttctc cgaggcctgt atgctcggcg ggatggcgat gaaatggcgt	420
tggcgcaagc gtatggaagc tgcaggcaaa ccaacggata aaccaaact ggtgtgcggt	480
ccggtacaaa tctgctggca taaattcgcc cgctactggg atgtggagct gcgtgagatc	540
cctatgcgcc ccggtcagtt gtttatggac ccgaaacgca tgattgaagc ctgtgacgaa	600
aacaccatcg gcgtgggtgcc gactttcggc gtgacctaca ctggtlaacta tgagttccca	660
caaccgctgc acgatgcgt ggataaattc caggccgata ccggtatcga catcgacatg	720
cacatcgacg ctgccagcgg tggcttcctg gcaccgttcg tcgccccgga tatcgtctgg	780
gacttcgcc tcgccgctgt gaaatcgatc agtgcctcag gccataaatt cggctctggct	840
ccgctgggct gcggctgggt tatctggcgt gacgaagaag cgctgccga ggaactggtg	900
ttcaacgttg actacctggg tggtaaaatt ggtacttttg ccatcaactt ctcccgccg	960
gcgggtcagg taattgcaca gtactatgaa ttctgcgcc tcggtcgtga aggctatacc	1020
aaagtacaga acgcctctta ccaggttgcc gcttatctgg cggatgaaat cgccaaactg	1080
gggccgtatg agttcatctg tacgggtcgc ccggacgaag gcatcccggc ggtttgcttc	1140
aaactgaaag atggtgaaga tccgggatac accctgtatg acctctctga acgtctgcgt	1200
ctgcgcggct ggcaggttcc ggccttcact ctcgcggtg aagccaccga catcgtggtg	1260
atgcgcatta tgtgtcgtcg cggcttcgaa atggactttg ctgaactgtt gctggaagac	1320
tacaaagcct cctgaaata tctcagcgat cactaa	1356

<210> 4

<211> 42
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> gadBC FWD primer from E.coli
 <400> 4
 tattcacaca ggaacagct atggataaga agcaagtaac gg 42
 <210> 5
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> gadBC REV primer from E.coli
 <400> 5
 acgcatttc ccgacaacta agtcaatacg acagcaagca 40
 <210> 6
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> gadB FWD primer from Methylomonas lenta
 <400> 6
 ttcacacagg aaacagctaa caacaggaga tatcatgc 38
 <210> 7
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> gadB REV primer from Methylomonas lenta
 <400> 7
 gcattctccc gacaactatt aacaataacc atgagcgc 38
 <210>
 > 8
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> gadBC mutant gene FWD primer from E.coli
 <400> 8

ttcacacagg aaacagctat ggataagaag caagtaacg

39

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> gadBC mutant gene REV primer from E.coli

<400> 9

gcacatctccc gacaactatt agtgatcgct gagatatttc

40