

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 9월 20일 (20.09.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/124945 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/70 (2006.01) C12P 13/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12P 7/52 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/001756
- (22) 국제출원일: 2012년 3월 9일 (09.03.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0021962 2011년 3월 11일 (11.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY)** [KR/KR]; 대전시 유성구 장동 100번지, 305-343 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): **박시재 (PARK, Si Jae)** [KR/KR]; 대전시 유성구 어은동 99(44/8) 한빛아파트 127동 307호, 305-755 Daejeon (KR). **이승환 (LEE, Seung Hwan)** [KR/KR]; 대전시 유성구 장대동 305-12 202호, 305-308 Daejeon (KR). **송봉근 (SONG, Bong Keun)** [KR/KR]; 대전시 유성구 신성동 160-1 한울아파트 103동 1203호, 305-707 Daejeon (KR).
- (74) 대리인: **이원희 (LEE, Won Hee)**; 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2차 8층, 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 GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID USING RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI*

(54) 발명의 명칭 : 재조합 대장균을 이용한 감마-아미노부틸산의 제조 방법

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing gamma-aminobutyric acid (GABA) from glucose using recombinant *Escherichia coli* strains, and more particularly, to a method for producing GABA by means of the recombinant *Escherichia coli* strains which have the ability to transform glucose to produce GABA, or by means of the recombinant strains produced by transforming succinylsemialdehyde dehydrogenase (SucD) and GABA 4-aminobutyrate aminotransferase (GabT) into said recombinant *Escherichia coli* strains. The recombinant *Escherichia coli* strains have the ability to transform glucose to produce GABA, and therefore the method of the present invention may be effectively used in techniques for producing GABA.

(57) 요약서: 본 발명은 재조합 대장균 균주를 이용한 글루코스(glucose)로부터 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid; GABA)의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 글루코스로부터 GABA 전환 생산능이 있는 것으로 확인된 재조합 대장균 균주, 또는 상기 균주에 숙시닐세미알데하이드 디하이드로게네이스(succinylsemialdehyde dehydrogenase; SucD) 및 GABA 아미노트랜스퍼레이스(4-aminobutyrate aminotransferase; GabT)를 형질전환하여 제조한 재조합 균주에 의해 글루코스로부터 GABA를 생산하는 방법에 관한 것이며, 상기 재조합 대장균 균주는 글루코스로부터 GABA로의 전환 생산능이 있으므로, 상기 방법은 GABA 생산기술에 유용하게 이용될 수 있다.



WO 2012/124945 A2

명세서

발명의 명칭: 재조합 대장균을 이용한 감마-아미노부틸산의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 재조합 대장균 균주를 이용한 글루코스(glucose)로부터 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid, GABA)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. 나일론 4의 원료물질인 2-피롤리돈은 감마 부티로락톤(gamma butyrolactone)으로부터 생산될 수 있으며 4-아미노부틸산의 탈수고리반응에 의해 생산될 수 있다.

[4]

- [5] 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 개발된 바 있다. 하지만, 효소반응의 경우 고가의 효소를 이용하기 때문에 GABA의 저가의 대량생산공정에는 적합하지 않을 수 있다.

[6]

[7] 효소반응의 문제점을 해결하기 위하여, 락토바실러스 등을 이용하여 바이오매스에서 생산된 글루탐산나트륨을 이용하여 GABA를 고농도로 전환하는 공정이 개발되어 나일론 4의 모노머로 이용될 수 있는 GABA의 경제적인 제조 공정 기술이 개발된 바 있다. 하지만, 글루탐산나트륨으로부터 GABA를 생산하기 위해서는 기질인 글루탐산나트륨을 코리네박테리움 같은 미생물의 발효공정을 통해 슈가로부터 생산하여야 하며, 글루탐산나트륨이 GABA로 전환될 때 이산화탄소가 방출되기 때문에 탄소 수율이 낮아지는 단점이 있다.

[8]

[9] 이에 본 발명자들은 글루코스(glucose)로부터 GABA를 탄소 수율이 낮아지지 않는 경로를 통해 생산하는 공정을 개발하기 위하여 연구한 결과, 숙시닉세미알데하이드(succinic semialdehyde)를 사용하는 경쟁회로가 제거된 대장균 돌연변이 균주에 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl coenzyme A)를 숙시닉세미알데하이드로 전환하고 숙시닉세미알데하이드를 GABA로 전환하는 효소를 대량발현함으로써 글루코스로부터 GABA가 생산됨을 확인하여, 상기 균주는 GABA를 탄소 수율이 낮아지지 않고 글루코스로부터 생산하는데 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11]

본 발명의 목적은 GabD(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 및 YneI(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 숙시닉세미알데하이드 디하이드로게네이스(succinic semialdehyde dehydrogenase; SucD) 효소 및 GABA 아미노트랜스퍼레이스(4-aminobutyrate aminotransferase; GabT) 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 제조된 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 생산용 재조합 대장균 균주를 제공하기 위한 것이다.

[12]

본 발명의 또 다른 목적은 GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 SucD 효소 및 GabT 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 제조된 재조합 대장균 균주를 이용하여 글루코스(glucose)로부터 감마-아미노부틸산을 생산하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 감마-아미노부틸산 생산용 재조합 대장균 균주를 제공하기 위한 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 이용하여 글루코스로부터 감마-아미노부틸산을 생산하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 감마-아미노부틸산을 생산하기 위한 본 발명의 재조합 대장균 균주를 제공하기 위한 것이다.

[16]

과제 해결 수단

[17] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[18] 1) GabD(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 및 YneI(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계; 및

[19] 2) 단계 1)의 대장균 균주를 숙시닉세미알데하이드 디하이드로게네이스(succinic semialdehyde dehydrogenase; SucD) 효소 및 GABA 아미노트랜스퍼레이스(4-aminobutyrate aminotransferase; GabT) 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조된 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 생산용 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은

[21] 1) GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계;

[22] 2) 단계 1)의 대장균 균주를 SucD 효소 및 GabT 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 재조합 대장균 균주를 제조하는 단계;

[23] 3) 단계 2)의 대장균 균주를 글루코스(glucose)를 포함하는 배지에 배양하는 단계; 및

[24] 4) 단계 3)의 배양액으로부터 감마-아미노부틸산을 수득하는 단계를 포함하는 감마-아미노부틸산 생산방법을 제공한다.

[25] 또한, 본 발명은 GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조된 감마-아미노부틸산 생산용 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은

[27] 1) GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계;

[28] 2) 단계 1)의 대장균 균주를 글루코스를 포함하는 배지에 배양하는 단계; 및

[29] 3) 단계 2)의 배양액으로부터 감마-아미노부틸산을 수득하는 단계를 포함하는 감마-아미노부틸산 생산방법을 제공한다.

- [30] 아울러, 본 발명은 감마-아미노부틸산을 생산하기 위한 본 발명의 재조합 대장균 균주를 제공한다.
- [31]
- [32] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [33]
- [34] 본 발명은
- [35] 1) 숙시닉세미알데하이드(succinic semialdehyde)를 숙신산으로 전환하는 GabD(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 및 YneI(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계; 및
- [36] 2) 단계 1)의 대장균 균주를 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl coenzyme A)를 숙시닉세미알데하이드로 전환하는 숙시닉세미알데하이드 디하이드로게네이즈(succinicsemialdehyde dehydrogenase; SucD) 효소 및 숙시닉세미알데하이드를 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid; GABA)으로 전환하는 GABA 아미노트랜스퍼레이즈(4-aminobutyrate aminotransferase; GabT) 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조된 감마-아미노부틸산 생산용 재조합 대장균 균주를 제공한다.
- [37] 상기 GabD는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [38] 상기 YneI는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [39] 상기 SucD는 서열번호 3으로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [40] 상기 GabT는 서열번호 4로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [41] 상기 대장균 균주는 모든 종류의 대장균 균주가 적용될 수 있으나, XL1-Blue인 것이 보다 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [42]
- [43] 또한, 본 발명은
- [44] 1) GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계;
- [45] 2) 단계 1)의 대장균 균주를 SucD 효소 및 GabT 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 재조합 대장균 균주를 제조하는 단계;
- [46] 3) 단계 2)의 대장균 균주를 글루코스(glucose)를 포함하는 배지에 배양하는 단계; 및
- [47] 4) 단계 3)의 배양액으로부터 감마-아미노부틸산을 수득하는 단계를 포함하는 감마-아미노부틸산 생산방법을 제공한다.

- [48] 상기 단계 3)의 배지는 대장균 균주의 배양에 이용되는 어떠한 배지도 사용가능하나, LB배지가 보다 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [49] 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.
- [50] 상기 단계 4)의 감마-아미노부틸산의 수득은 배양액을 분무 건조하여 저농도의 GABA-함유 분말을 대량으로 얻을 수 있고, 배양액을 감압 증발기를 이용하여 농축한 후 동결건조를 진행하여 고농도의 GABA 수득도 가능하며, 또한 이온교환수지를 이용한 정제방법을 사용한 후 농축 및 건조 공정을 수행하여 고순도의 GABA의 수득할 수 있으나 이에 한정하지 않으며, 상기 GABA는 온도 및 pH의 변화에 크게 영향을 받지 않고, 공정 안정성이 있기 때문에 회수 공정상의 제한이 없다.
- [51] 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, GabD 및 YneI가 결실된 대장균 균주에 숙시닉세미알데하이드를 더욱 축적시키고 GABA로 효율적으로 전환하기 위하여, 대장균 균주를 숙시닐코엔자임 에이(succinyl coenzyme A)를 숙시닉세미알데하이드(succinic semialdehyde)로 전환하는 SucD 효소와 숙시닉세미알데하이드를 GABA로 전환하는 GabT 효소를 코딩하는 유전자를 함유한 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 균주를 글루코스가 포함된 배지에 배양한 결과, GabD 및 YneI가 결실된 대장균 균주와 비교하여 약 2배 이상 유의적으로 상승된 GABA 생산능을 확인하였다(표 2 참조).
- [52] 따라서, 본 발명의 재조합 대장균 균주는 GABA를 탄소 수율이 낮아지지 않고 글루코스로부터 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [53]
- [54] 또한, 본 발명은 GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조된 감마-아미노부틸산 생산용 재조합 대장균 균주를 제공한다.
- [55] 또한, 본 발명은
- [56] 1) GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계;
- [57] 2) 단계 1)의 대장균 균주를 글루코스를 포함하는 배지에 배양하는 단계; 및
- [58] 3) 단계 2)의 배양액으로부터 감마-아미노부틸산을 수득하는 단계를 포함하는 감마-아미노부틸산 생산방법을 제공한다.
- [59] 상기 단계 2)의 배지는 대장균 균주의 배양에 이용되는 어떠한 배지도 사용가능하나, LB배지가 보다 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [60] 상기 단계 2)의 배양은 48 내지 96시간인 것이 바람직하고, 배양온도는 20 내지 40°C인 것이 바람직하고, 37°C인 것이 보다 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [61] 상기 단계 3)의 감마-아미노부틸산의 수득은 배양액을 분무 건조하여 저농도의 GABA-함유 분말을 대량으로 얻을 수 있고, 배양액을 감압 증발기를 이용하여 농축한 후 동결건조를 진행하여 고농도의 GABA 수득도 가능하며, 또한

이온교환수지를 이용한 정제방법을 사용한 후 농축 및 건조 공정을 수행하여 고순도의 GABA의 수득할 수 있으나 이에 한정하지 않으며, 상기 GABA는 온도 및 pH의 변화에 크게 영향을 받지 않고, 공정 안정성이 있기 때문에 회수 공정상의 제한이 없다.

[62] 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, GabD 및 YneI가 결실된 대장균 균주를 글루코스가 첨가된 LB 배지에서 배양한 후, GABA 생산능을 확인한 결과, 유의적인 GABA 전환 생산능을 확인하였다(표 1 참조).

[63] 따라서, 본 발명의 GabD 및 YneI가 결실된 대장균 균주는 GABA를 탄소 수율이 낮아지지 않고 글루코스로부터 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[64]

[65] 또한, 본 발명은 감마-아미노부틸산을 생산하기 위한 본 발명의 제조합 대장균 균주를 제공한다.

[66] 상기 제조합 대장균 균주는 1) 숙시닉세미알데하이드(succinic semialdehyde)를 숙신산으로 전환하는 GabD(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 및 YneI(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계; 및

[67] 2) 단계 1)의 대장균 균주를 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl coenzyme A)를 숙시닉세미알데하이드로 전환하는 숙시닉세미알데하이드 디하이드로게네이즈(succinicsemialdehyde dehydrogenase; SucD) 효소 및 숙시닉세미알데하이드를 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid; GABA)으로 전환하는 GABA 아미노트랜스퍼레이즈(4-aminobutyrate aminotransferase; GabT) 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터로 형질전환하여 제조하는 단계를 포함하는 제조방법, 또는 GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[68]

발명의 효과

[69] 본 발명은 숙시닉세미알데하이드(succinic semialdehyde)를 사용하는 경쟁회로가 제거된 대장균 균주에 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl coenzyme A)를 숙시닉세미알데하이드로 전환하고 숙시닉세미알데하이드를 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid; GABA)으로 전환하는 효소를 대량 발현하는 제조합 대장균 균주에 관한 것으로, 이를 통해 글루코스를 이용한 감마-아미노부틸산 대량 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

[70]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[71] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[72] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기

실시에에 의해 한정되는 것은 아니다.

[73]

[74] <실시예 1> **GabD**, **YneI**가 결실된 재조합 대장균을 이용한 **GABA**의 생산확인

[75] <1-1> **GabD** 및 **YneI**가 결실된 재조합 대장균의 제작

[76] 숙시닉세미알데하이드(succinic semialdehyde)를 사용하는 경쟁회로를 제거하기 위하여 *E.coli* XL1-Blue의 염색체에서 숙시닉세미알데하이드를 숙신산으로 전환하는 **GabD**(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 및 **YneI**(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 유전자를 원스텝 불활성화방법(Datsenko and Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 6640-6645, 2000; Jung et al., *Biotechnol. Bioeng.* 105, 161-171, 2010)으로 제거한 *E. coli* X**GabD****YneI** 균주를 제작하였다.

[77]

[78] <1-2> **GABA**의 생산확인

[79] 상기 <1-1>에서 제작한 *E. coli* X**GabD****YneI** 균주를 **GABA** 합성을 위한 숙주세포로 사용하여 **GABA** 생산을 확인하였다. 구체적으로, *E. coli* **GabD****YneI** 균주를 20 g/L의 글루코오스가 포함된 LB 배지(250 ml 플라스크에 100 ml LB배지 포함)에서 30°C에서 250 rpm으로 72시간 동안 진탕 배양한 후 **GABA**를 측정하였다.

[80] 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이 약 24시간 후에 0.2 g/L의 **GABA**가 생산되었으며 96시간 후에 0.3 g/L의 **GABA**가 생산되는 것을 확인하였다(표 1).

[81]

[82] 표 1

[Table 1]

시간(h)	GABA 농도 (g/L)
0 시	0
24 시	0.2
48 시	0.3
72 시	0.3
96 시	0.3

[83]

[84] <실시예 2>**SucD** 및 **GabT** 유전자가 발현하는 재조합 대장균을 이용한 **GABA**의 생산확인

[85] 숙시닉세미알데하이드 디하이드로게네이스(succinicsemialdehyde dehydrogenase; **SucD**), **GABA** 아미노트란스퍼레이스(4-aminobutyrate aminotransferase; **GabT**) 유전자를 발현하는 재조합 *E.coli* X**GabD****YneI**를 배양하여 글루코오스로부터 **GABA** 생산을 확인하기 위하여, *sucD* 및 *gabT* 유전자를

발현하는 벡터를 제작하였다.

- [86] 발현용 벡터 pZE12-MCS는 pTacLac(Lee et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 633-641, 2008)의 MCS(Multi-cloning sites) 및 *Ralstonia eutropha*의 PHA 생합성 유전자 전사 터미네이터를 가지도록 변형시켰다. 구체적으로, *Ralstonia eutropha*의 PHA 생합성 유전자 전사 터미네이터 유전자 단편을 p619C1437-pct540로부터 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머를 이용하여 PCR로 수득하고, 상기 수득한 유전자 단편을 주형으로 하여 서열번호 7 및 서열번호 6의 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-MCS 및 pZA31-MCS는 ESPRESSYS(www.expressys.com)로부터 구입하여 수용하였다.
- [87] pKE31-MCS(EXPRESSYS)의 $P_{LtetO-1}$ 프로모터를 pKE12-MCS를 XhoI/EcoRI으로 절단하여 수득한 $P_{LlacO-1}$ 프로모터로 치환하여 pKA32-MCS를 제조하였다. 상기 pKA32-MCS를 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머를 사용하여 PCR하여, $P_{LlacO-1}$ 프로모터, MCS 및 *R. eutropha*의 PHA 생합성 유전자 전사 터미네이터를 포함하는 유전자 단편을 증폭시켰고, 상기 증폭된 유전자 단편을 pBR1MCS2(Kovach et al. *Gene*, 166, 175-176, 1995)의 SspI 부위에 삽입하여, pKM22-MCS를 제조하였다.
- [88] pKM22-MCS에 *Clostridium kluyveri*로부터 서열번호 10 및 서열번호 11의 프라이머를 사용하여 분리한 *sucD* 유전자를 KpnI/XbaI으로 삽입하여, pKM22*SucD*를 제조하였고, pKM22-*SucD*에 *E. coli*로부터 서열번호 12 및 서열번호 13의 프라이머를 사용하여 분리된 *gabT* 유전자를 EcoRI/KpnI으로 삽입하여, pKM22*GabTSucD*를 제조한 후, *E. coli* *GabDYneI* (pKM22-*GabTSucD*)를 20 g/L의 글루코오스가 포함된 LB 배지(250 ml 플라스크에 100 ml LB배지 포함)에서 30°C에서 250rpm으로 72시간 동안 진탕 배양한 결과 GABA가 생산됨을 확인하였다.
- [89] 그 결과, 표 3에 나타낸 바와 같이, 약 24시간 후에 0.2 g/L의 GABA가 생산되었으며 96시간 후에 0.6 g/L의 GABA가 생산되는 것을 확인하였다(표 3).
- [90]
- [91] 표 2

[Table 2]

	프라이머 서열(Primer sequence)	표적 유전자(Target gene)
서열번호 5	gagtcgacctgcaggcatgcaagcttctgccg gcctgggtcaacc	<i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator
서열번호 6	cctagg gcctcgccccgcgagggcc	
서열번호 7	caattgattaaagaggagaaagaattcgagctc ggtaccggggatcctctagagtcgacctgcag gcatgcaagctt	RBS and MCS for pKE12-MCS
서열번호 8	aatattaattgtgagcggataacaat	P _{LacO-1} promoter, MCS, and <i>R.</i> <i>eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator for pKM22-MCS
서열번호 9	aatattgcctcgccccgcgagggcc	
서열번호 10	ggtacctttcacacaggaacaatgagtaatgaa gtatctat	<i>C. kluyveri</i> DSM555 <i>sucD</i> gene
서열번호 11	tctagattatcccatatttctcat	
서열번호 12	gaattcatgaacagcaataaagagtt	<i>E. coli</i> <i>gabT</i> gene
서열번호 13	ggtaccttactgcttcgcctcatcaaaacactggc	

[92]

[93] 표 3

[Table 3]

시간(h)	GABA 농도 (g/L)
0 시	0
24 시	0.2
48 시	0.5
72 시	0.5
96 시	0.6

[94]

[95]

청구범위

- [청구항 1] 1) GabD(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 및 YneI(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계; 및
2) 단계 1)의 대장균 균주를 숙시닉세미알데하이드 디하이드로게네이스(succinicsemialdehyde dehydrogenase; SucD) 효소 및 GABA 아미노트랜스퍼레이스(4-aminobutyrate aminotransferase; GabT) 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조된 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 생산용 재조합 대장균 균주.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 단계 1)의 GabD는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 감마-아미노부틸산 생산용 재조합 대장균 균주.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 단계 1)의 YneI는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 감마-아미노부틸산 생산용 재조합 대장균 균주.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 단계 2)의 SucD는 서열번호 3으로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 감마-아미노부틸산 생산용 재조합 대장균 균주.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 단계 2)의 GabT는 서열번호 4로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 감마-아미노부틸산 생산용 재조합 대장균 균주.
- [청구항 6] 1) GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계;
2) 단계 1)의 대장균 균주를 SucD 효소 및 GabT 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 재조합 대장균 균주를 제조하는 단계;
3) 단계 2)의 대장균 균주를 글루코스(glucose)를 포함하는 배지에 배양하는 단계; 및
4) 단계 3)의 배양액으로부터 감마-아미노부틸산을 수득하는 단계를 포함하는 감마-아미노부틸산 생산방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 단계 3)의 배양은 48 내지 96시간 동안 30 내지 40°C에서 실시하는 것을 특징으로 하는 감마-아미노부틸산 생산방법.
- [청구항 8] GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조된

- 감마-아미노부틸산 생산용 제조합 대장균 균주.
- [청구항 9] 1) GabD 및 YneI 효소를 코딩하는 유전자가 제거된 대장균 균주를 제조하는 단계;
2) 단계 1)의 대장균 균주를 글루코스를 포함하는 배지에 배양하는 단계; 및
3) 단계 2)의 배양액으로부터 감마-아미노부틸산을 수득하는 단계를 포함하는 감마-아미노부틸산 생산방법.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서, 단계 2)의 배양은 48 내지 96시간 동안 30 내지 40°C에서 실시하는 것을 특징으로 하는 감마-아미노부틸산 생산방법.
- [청구항 11] 감마-아미노부틸산을 생산하기 위한, 제 1항의 제조합 대장균 균주.
- [청구항 12] 감마-아미노부틸산을 생산하기 위한, 제 8항의 제조합 대장균 균주.