



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0155608
(43) 공개일자 2021년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01) C12R 1/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
C12N 9/88 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0073049
(22) 출원일자 2020년06월16일
심사청구일자 2020년06월16일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
서명지
인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 15, 230
4동 1301호 (송도동, 송도더샵마스터뷰)
조의상
인천광역시 남동구 남동대로370번길 122 동보아파트 104동 701호
임효정
경기도 광명시 충현로8번길 5-1 백산빌라 나동 102호
(74) 대리인
차준용

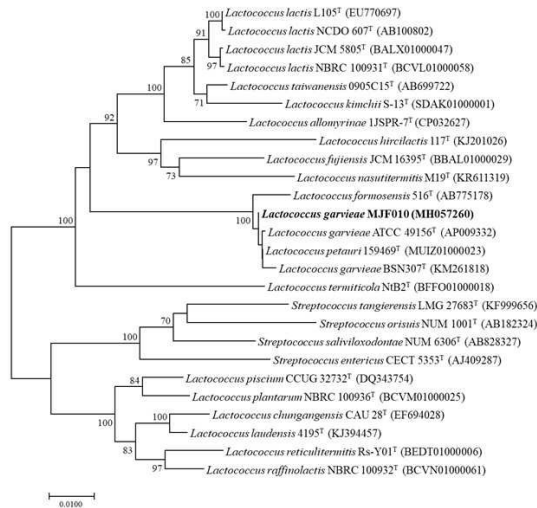
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 락토코커스 갈비에 유래 재조합 글루타메이트 탈탄산효소를 이용한 감마아미노부티르산 생산

(57) 요약

본 발명은 인간의 분변 유래 GABA 생산 균주인 기탁번호 KCCM12722P로 기탁된 *Lactococcus garvieae* MJF010를 제공한다. 본 발명에 따른 *Lactococcus garvieae* MJF010 균주 유래 GAD를 재조합 형질 전환체를 통해 발현시킨 재조합 단백질 rGADLgMJF010는 in vitro에서 MSG로부터 GABA를 생산할 수 있으며 35℃, pH 5.0에서 최적의 GABA 생산 능력을 지닌다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 13/005 (2013.01)

C12Y 401/01015 (2013.01)

C12R 2001/46 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711109877

과제번호 2019R1A2C1006038

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 4,4'-Diaponeurosporene을 생합성하는 기능성 유산균을 활용한 항암 파마바이오틱스 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 인천대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCCM12722P로 기탁된 *Lactococcus garvieae* MJF010 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 인간 분변에서 분리된 *Lactococcus garvieae* MJF010 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 MSG (모노소듐글루타메이트)로부터 GABA를 생산시키는 글루탐산 탈탄산효소(GAD)를 포함하는 *Lactococcus garvieae* MJF010 균주.

청구항 4

상기 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 *Lactococcus garvieae* MJF010 균주로부터 글루탐산 탈탄산효소(GAD) 유전자를 분리하는 단계;

상기 글루탐산 탈탄산효소(GAD) 유전자를 재조합 대장균을 통해 클로닝하는 단계;

상기 글루탐산 탈탄산효소(GAD)를 발현 및 정제하는 단계; 및

상기 글루탐산 탈탄산효소(GAD)를 MSG 기질에 추가하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 GABA 생산방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 GABA 생산방법은 상기 *Lactococcus garvieae* MJF010 균주의 GAD를 재조합 대장균을 통해 발현시킨 후 정제를 거쳐 마련된 재조합 단백질(rGAD_{Lg}MJF010)을 in vitro에서 상기 MSG와 반응하는 것을 특징으로 하는 GABA 생산방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 GABA 생산 방법은 20℃ 이상 50℃ 이하의 온도에서 효소 반응하는 것을 특징으로 하는 GABA 생산방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 GABA 생산 방법은 pH 2.0 이상 pH 8.0 이하에서 효소 반응하는 것을 특징으로 하는 GABA 생산방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 GABA 생산 방법은 금속 이온으로서 CaCl_2 , CuCl_2 , KCl , MgCl_2 , NaCl , ZnCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , MnSO_4 , Na_2SO_4 및 KCl 중 어느 하나 이상을 2 mM 함량으로 첨가하는 것을 특징으로 하는 GABA 생산 방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 GABA 생산 방법은 보조인자(cofactor)로 피리독살-5'-포스페이트(pyridoxal-5'-phosphate)를 0 μM 이상 1000 μM 이하의 함량으로 첨가하는 것을 특징으로 하는 GABA 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간의 분변에서 유래된 락토코커스 갈비에 MJF010 (*Lactococcus garvieae* MJF010)의 글루타메이트 탈탄산효소 유전자를 대장균에 재조합하여 발현시킨 재조합 글루타메이트 탈탄산효소의 감마아미노부티르산(γ -amino butyric acid, 이하 GABA라 함) 생산 최적 조건을 제공하는 것이다.

배경 기술

[0002] 감마아미노부티르산(γ -amino butyric acid, 이하 GABA라 함)는 자연계에 널리 분포하는 비단백질성 아미노산의 일종으로 뇌와 척추에 존재하는 흥분 억제성 신경전달물질이다. GABA는 흥분억제효과, 항경련작용, 이노작용, 항산화작용, 정신집중, 기억력강화 및 혈압강화와 같은 체내 기능을 가지고 있을 뿐만 아니라 노화에 기인된 시력저하를 회복시켜주는 기능을 갖는 것으로 보고되었다. 또한 성장 호르몬의 분비 조절에도 관여하며 통증 완화에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 GABA의 기능이 알려지면서 의약품으로서의 GABA 뿐만 아니라 최근에는 기능성 식품소재로서의 GABA에 대한 관심이 고조되고 있다.

[0003] 현재 GABA는 현미, 녹차, 맥아, 배추 등에 자연적으로 함유되어 있는 것으로 알려졌으나, 그 함량이 낮아 자연 식품으로 섭취하는 양으로는 생리활성을 기대하기 어렵다. 이러한 식물을 원재료로 한 GABA의 생산에는 한계가 있으므로 GABA 대량생산을 위해 미생물을 이용한 많은 연구가 수행되고 있다. 이중 젖산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로서 예로부터 발효 유제품을 중심으로 장류, 김치, 젓갈, 소시지, 의약품 등에 걸쳐 인류생활에 폭넓게 활용되어 내려오고 있다. 젖산균을 스타터(starter)로 하여 만들어진 치즈와 젖산균 발효유에서 GABA가 생산되는 것으로 보고되었다.

[0004] GABA를 이용한 효능 연구 및 그 함량을 높인 식품에 대한 연구는 다양한 측면에서 이루어진 것에 반해, GABA의 생산에 관한 연구는 아직 미비하다. 따라서 GABA와 같은 유용한 물질을 다량 생산할 수 있는 균주의 개발이 매우 시급한 실정이다.

[0005] 글루타메이트 디카복실라아제 (GAD)는 피리독살 5-포스페이트 (PLP)-의존 세포내 효소로서, L-글루타메이트의 GABA로의 비가역적 탈카복시화 반응을 촉매한다. 지금까지 다양한 식물 및 미생물로부터 GAD 효소가 분리되고 그 기능이 규명되어 왔지만 GABA 생산 균주의 분리 및 그 효능에 관한 연구에 비해 여전히 많이 부족한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Lim, HS. et al. Expression and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* HYE1 isolated from kimchi. World J. Microbiol. Biotechnol. 2018, 34-44.

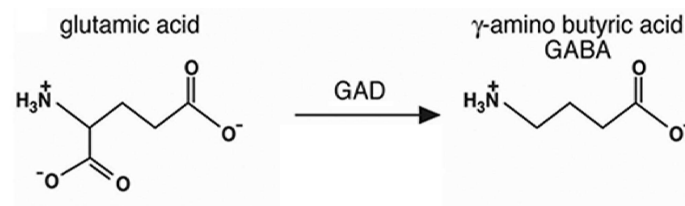
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 인간의 분변 유래 GABA 생산 균주인 *Lactococcus garvieae* MJF010를 개시한다. 또한 상기 균주가 지니는 글루타메이트 탈탄산효소를 재조합 형질 전환체를 통해 발현시켜 GABA 생산 최적 조건을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 분변 유래 GABA 생산 균주 *Lactococcus garvieae* MJF010를 제공한다.
- [0010] 본 발명자들은 상기 균주를 2020년 05월 15일자로 한국중균협회에 수탁번호 KCCM12722P로 기탁하였다.
- [0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 재조합 대장균을 통해 *Lc. garvieae* MJF010 유래 글루타메이트 디카르복실라아제(rGADLgMJF010)를 발현 및 정제하고, in vitro에서 rGADLgMJF010를 MSG(Mono sodium glutamate)와 반응시켜 GABA 생산 최적 조건을 제공한다.
- [0012] 본 명세서에서 사용하는 MSG(Mono sodium glutamate)는 GABA의 전구체이며, GAD(Glutamic acid decarboxylase)에 의하여 MSG가 탈카복시화 되어 GABA로 전환된다. 반응 식은 하기와 같다.



[0013]

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 *Lactococcus garvieae* MJF010 유래 GAD를 재조합 형질 전환체를 통해 발현시킨 재조합 단백질 rGADLgMJF010는 in vitro에서 MSG로부터 GABA를 생산시킬 수 있으며 35℃, pH 5.0에서 최적의 GABA 생산 능력을 지닌다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 16S rRNA 유전자에 기반하여 작성한 계통 발생도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 동정된 인간 분변 유래 미생물의 GABA 생산을 TLC 분석한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 증폭된 *Lactococcus garvieae* MJF010의 GAD 유전자를 아가로오스 겔 전기영동 분석한 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 Ni-NTA 친화적 크로마토그래피가 실시된 rGADLgMJF010의 SDS-PAGE 분석 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 Ni-NTA 친화적 크로마토그래피가 실시된 rGADLgMJF010의 in vitro 반응 진행 후 TLC 분석 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 온도가 rGADLgMJF010 활성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 pH가 rGADLgMJF010 활성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 전 열처리가 rGADLgMJF010 잔존 활성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 시 첨가된 금속이온이 rGAD_{Lg}MJF010 활성화에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 보조인자 PLP의 농도가 *Lc. garvieae* MJF010 유래 GAD의 활성화에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시 예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

실시예

1. 균주의 분리 및 동정

나이가 서로 다른 두 남성의 분변을 0.85% NaCl로 연속 희석한 후 MRS 한천 배지에 접종하여 37℃에서 이틀동안 배양하였다. 균을 순수 분리하기 위해 다른 모양의 균 집락들을 최소 3번 이상 MRS 한천 배지에 스트리킹(streaking) 하였다.

분리된 균주의 16S rRNA 유전자 서열 분석을 위해 HiYield™ Genomic DNA Mini Kit (RBC, Taiwan)를 이용해 각 균주의 게놈 DNA를 추출하였다. 이 후 범용 프라이머(27F, 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' 및 1492R, 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT TC-3')를 사용하여 16S rRNA 유전자를 증폭시켰다.

상기 단편을 Macrogen Co.(Seoul, Korea)에 의해 서열 분석하고 서열 정렬 및 동정은 Basic Local Alignment Search Tool 및 Ezbiocloud에 의하여 수행되었다. 계통수(phylogenetic tree)는 MEGA7 소프트웨어를 사용하여 구축되었다.

2. GABA 생산 균주 분리

위의 동정을 거친 균주 중 GABA 생산 균주를 TLC(Thin Layer Chromatography) 분석을 통해 분리하기 위해 각 균주를 1% MSG를 포함하는 MRS에서 37℃, 48시간 정치 배양 하였다. 배양액을 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 상등액을 TLC 플레이트 (Aluminium Sheets Silica gel plate, Merck)에 점적(spotting)한 후 밀폐된 챔버 안에서 용매를 전개시켰다. TLC 전개용매로서 n-부탄올 : 아세트산 : 증류수의 4:1:4 (v/v/v) 혼합액을 사용하였다. 전개가 끝난 TLC 플레이트는 건조 후 0.2% (w/v) 닌히드린 용액으로 염색시켰다. 염색 및 가열 후 표준물질(MSG, GABA)와 비교하여 GABA 생산하는 균주 *Lactococcus garvieae* MJF010을 분리하였다.

3. 글루타메이트탈탄산효소(GAD)의 유전자 클로닝 및 분석

Lactococcus garvieae MJF010 균주의 GAD 유전자를 제한효소 자리를 포함하는 프라이머 (GAD- F, 5'- CGC CAT ATG TTA TAT GGA AAA GAA AAT C-3' 및 GAD- R, 5'- CGC GGA TCC TTA ATG TGT AAA TCC -3')를 이용해 PCR 증폭하였다.

주형 DNA (1 μl), 정방향 프라이머 (1 μl), 역방향 프라이머 (1 μl)를 증류된 물 17 μl가 포함된 PCR pre-mixture (Solg™ 2X EF-Taq PCR Smart mix 2)에 첨가하고 반응액을 94℃에서 5분간 반응시킨 후, 94℃에서 45초, 58℃에서 45초, 72℃에서 1분 30초간 반응시키는 변성 (denaturation), 결합 (annealing), 중합 (extension) 사이클을 30회 실시하였다. 이 후 PCR 산물을 1% 아가로오스 겔 전기영동을 실시하여 확인하였다.

4. 글루타메이트탈탄산효소(GAD) 과발현

PCR산물과 pET28a(+)을 *Nde*I과 *Bam*HI로 잘라 회수하여 T4 리가아제로 접합한 후 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켰다. 이렇게 재조합된 대장균을 50 mg/ml 카나마이신 포함 LB 배지 20 mL에서 37℃, 220 rpm 조건으로 18시

간 진탕 배양 하였다. 50 mg/ml 카나마이신 포함 LB 배지 800 mL에 종배양한 재조합 대장균을 1% (v/v) 접종한 후 37 °C, 220 rpm 조건으로 진탕배양 하여 600 nm 흡광도가 0.6 ~ 0.8에 도달할 때쯤 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종 농도 0.4 mmol/L이 되게 첨가하였다. IPTG 접종 후 18 °C, 150 rpm에서 18시간 진탕 배양 한 배양액을 원심분리기 (5000×g, 20분, 4 °C 한 다음, 40 mL Lysis buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L NaCl, 8 mmol/L β -mercaptoethanol, 0.1% triton X-100, 5% glycerol, and 10 mmol/L imidazole, pH 8.0)에 현탁 하여 초음파 파쇄를 한 다음 원심분리 (12,000 rpm, 30분, 4 °C) 하였다.

5. 글루타메이트탈탄산효소(GAD) 정제

재조합 대장균 배양액의 초음파 파쇄 및 원심분리를 통해 얻은 상층액으로 Ni-NTA 친화적 크로마토그래피를 진행하였다. 이를 위해 Ni-NTA agarose (QIAGEN, Hilden, Germany)로 채운 Ni-NTA polypropylene column (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)에 상층액을 흘려주어 Ni-NTA agarose 레진에 rGAD를 결합시켰다. Wash buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L NaCl, 8 mmol/L β -mercaptoethanol, 0.1% triton X-100, 5% glycerol, and 20 mmol/L imidazole, pH 8.0)을 흘려주어 비특적 단백질을 제거하였고, Elution buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L NaCl, 8 mmol/L β -mercaptoethanol, 0.01% triton X-100, 5% glycerol, and 300 mmol/L imidazole, pH 8.0)을 흘려주어 rGAD를 용출시켰다. 용출된 rGAD를 Amicon® ultra-15 Centrifugal Filters (Merck, Darmstadt, Germany)와 10% glycerol 포함 20 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.0)를 이용하여 탈염 및 완충액 교환을 실시하였다.

6. GABase를 이용한 글루타메이트탈탄산효소(GAD) 활성 분석

상기 정제된 rGAD의 활성을 rGAD가 MSG로부터 생산한 GABA의 양으로 분석하기 위해 GABase를 이용하였다. 이를 위하여 정제된 rGAD 용액 (25 μ l)을 10 mM Monosodium L-glutamic acid (MSG), 10 μ M pyridoxal-5'-phosphate (PLP), 70 mM Na₂HPO₄-citric acid buffer (pH 5.0) 혼합 용액 (200 μ l)와 섞은 후 1시간 동안 반응하였다. 이 후 5분 동안 끓여서 반응을 멈춘 후 원심분리 (10,000 rpm, 10분, 10 °C)하여 얻은 상층액 (12 μ l)을 100 mM K₄P₂O₇ 완충액 (pH 8.6) 234 μ l, 10 mM NADP⁺ 42 μ l, 5 unit/ml GABase 5 μ l가 함유된 마이크로 플레이트의 웰에 첨가하였다. 340 nm에서 흡광도 ($A_{340\text{-initial}}$)를 측정하고 100 mM α -케토글루타레이트를 6 μ l 첨가하여 상온에서 60 분 동안 반응시킨 후, 다시 340 nm에서 최종 흡광도 ($A_{340\text{-final}}$)를 측정하였다. 그 후 생산된 GABA의 양은 흡광도 차이 ($A_{340\text{-final}} - A_{340\text{-initial}}$)를 통해 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

실험결과

1. 균주의 분리 및 동정

두 종류의 인간 분변으로부터 23개의 다른 모양의 콜로니를 스크리닝 하였다. 16S rRNA 염기서열 분석을 진행한 결과 *Escherichia coli*, *Streptococcus agalatae*, *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus salivarius*, *Weissella cibaria*, *Leuconostoc lactis*인 것으로 동정되었다. 23개 균주 중 GABA 생산 균주로 이미 보고된 균주들(*Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus salivarius*, *Weissella cibaria* and *Leuconostoc lactis*)만 추려서 TLC 분석을 실시하였다 (도 2). 최종적으로 *Lactococcus garvieae* MJF010만 GABA를 생산한다는 것을 확인하였다. *Lactococcus garvieae* MJF010은 *Lactococcus garvieae* ATCCC 49156와의 similarity가 100% 이었다 (도 1). *Lactococcus garvieae* MJF010의 16S rRNA의 염기서열은 하기 서열번호 1과 같다.

2. 글루타메이트 탈탄산효소 (GAD)의 유전자 분석

Lactococcus garvieae MJF010의 GAD 유전자를 상기 설명된 조건에서 PCR 증폭 후 아가로오스 겔 전기영동을 실시한 결과 약 1,401 bp의 밴드가 확인되었다 (도 3). 1,401 bp의 *Lactococcus garvieae* MJF010 GAD 유전자는 466개의 아미노산을 지정하며 이 단백질은 56,060 Da로 추정된다.

[0048] **3. 재조합 글루타메이트 탈탄산효소 (rGAD_{LgMJF010})의 발현 및 정제**

[0049] 재조합 글루타메이트 탈탄산효소 (rGAD_{LgMJF010})는 N 말단에 6 x his-tag가 포함된 상태로 *E. coli* BL21(DE3)에서 IPTG 접종에 의해 발현되었다. Ni-NTA affinity chromatography 로 정제한 후 SDS-PAGE 결과 약 56 kDa의 soluble 단백질을 확인하였다 (도 4). 또한 rGAD_{LgMJF010}를 in vitro 상에서 MSG와 반응시킨 후 TLC 분석 결과 GABA 생산능력을 확인하였다 (도 5).

[0051] **4. 온도, pH, 열 변화에 따른 글루타메이트 탈탄산효소의 활성평가**

[0052] 4.1 효소의 최적온도 측정

[0053] rGAD 용액 (25 μ l)을 10 mM Monosodium L-glutamic acid (MSG), 10 μ M pyridoxal-5'-phosphate (PLP), 70 mM Na₂HPO₄-citric acid buffer (pH 5.0) 혼합용액 (200 μ l)와 섞은 후 20 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ C 온도에서 1시간 반응시켰다. 그 결과, 35 $^{\circ}$ C에서의 GABA 생산량이 최대임을 확인하였다. 35 $^{\circ}$ C에서 rGAD의 활성을 100% 기준으로 20 $^{\circ}$ C에서는 약 45%의, 50 $^{\circ}$ C에서는 약 65%의 효소 활성을 확인하였다 (도 6).

[0055] 4.2 효소의 최적 pH 측정

[0056] rGAD 용액 (25 μ l)을 pH 2~8 범위의 반응용액 200 μ l (10 mM Monosodium L-glutamic acid (MSG), 10 μ M pyridoxal-5'-phosphate (PLP), 70 mM Na₂HPO₄-citric acid buffer (pH 2~8))과 섞은 후 35 $^{\circ}$ C 온도에서 1시간 반응시켰다. 그 결과, pH 5에서의 GABA 생산량이 최대임을 확인하였다. pH 5에서 rGAD의 활성을 100% 기준으로 pH 4.5에서는 약 50%의, pH 5.5에서는 약 80%의 효소 활성을 확인하였다. (도 7).

[0058] 4.3 효소의 열 안정성 측정

[0059] rGAD 용액 (25 μ l)을 반응 전에 30 $^{\circ}$ C ~ 50 $^{\circ}$ C 온도에서 0 ~ 7 시간 동안 열처리하였다. 열처리 후 10 mM Monosodium L-glutamic acid (MSG), 10 μ M pyridoxal-5'-phosphate (PLP), 70 mM Na₂HPO₄-citric acid buffer (pH 5.0) 혼합 용액 (200 μ l)와 섞은 후 35 $^{\circ}$ C 온도에서 1시간 반응시켰다. 열처리를 하지 않은 rGAD의 활성을 100% 기준으로 50 $^{\circ}$ C에서 5시간의 열처리 후에는 약 1.5%의, 40 $^{\circ}$ C에서 7시간의 열처리 후에는 약 60%의 활성이 잔존함을 확인하였다. 이 결과로 rGAD는 50 $^{\circ}$ C의 열처리에 활성이 현저하게 감소하는 열안정성이 낮은 단백질이라고 볼 수 있다. (도 8).

[0061] 4.4 금속 이온 첨가에 따른 글루타메이트 탈탄산효소 활성 변화 측정

[0062] 10 mM Monosodium L-glutamic acid (MSG), 10 μ M pyridoxal-5'-phosphate (PLP), 70 mM Na₂HPO₄-citric acid buffer (pH 5.0) 반응 용액에 금속 이온을 2 mM의 농도로 첨가하여 rGAD와 섞은 후 35 $^{\circ}$ C 온도에서 1시간 반응시켰다. 금속 이온을 첨가하지 않은 경우의 효소 활성을 100% 기준으로 정하고 금속 이온이 첨가된 경우의 효소 활성 값을 상대적으로 비교하였다. ANOVA test 결과 유의미한 차이를 보이며 CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂이 rGAD의 활성을 증가시켰다. AgNO₃은 rGAD의 활성을 0.3%로 현저히 감소시켰다. (도 9).

[0063]

[0064] 4.5 보조인자 첨가량에 따른 글루타메이트 탈탄산효소 활성 측정

[0065] 보조인자인 PLP (pyridoxal-5'-phosphate)의 양이 rGAD 활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 10 mM Monosodium L-glutamic acid (MSG), 70 mM Na₂HPO₄-citric acid buffer (pH 5.0) 반응 용액에 PLP를 0~1000 μ M의 농도로 첨가하였다. 이 용액 (200 μ l)과 rGAD 용액 (25 μ l)을 섞은 후 35 $^{\circ}$ C 온도에서 1시간 반응시켰다. 1000 μ M의 PLP를 첨가한 경우의 rGAD활성을 100% 기준으로 정하고 나머지 농도의 PLP를 첨가한 경우와 비교한 결과 rGAD는 PLP를 첨가하지 않아도 PLP를 첨가한 경우와 비슷한 활성을 보였다. rGAD_{LgMJF010}는 세포 내에서 PLP가 붙는 상태로 발현되는 것으로 보인다. (도 10).

[0067] **결과 검토**

[0068] 본 발명의 일 실시형태에 따른 *Lactococcus garvieae* MJF010 균주는 인간 분변에서 분리되었고, *Lactococcus garvieae* ATCCC 49156와의 similarity가 100%였다. 이 균주는 MSG로부터 GABA를 생산시키는 GAD 유전자를 지니고 해당 유전자를 대장균에서 이중 발현 및 정제시킨 결과 약 56kDa의 재조합 GAD (rGAD_{Lg}MJF010)을 얻었다. In vitro에서 rGAD_{Lg}MJF010의 최적 GABA 생산 조건은 35℃, pH 5.0 였다. rGAD_{Lg}MJF010는 50℃의 열처리에서 활성이 현저하게 감소하여 열안정성이 낮다. 또한 rGAD_{Lg}MJF010는 CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂에 의해 활성이 증가하고, AgNO₃에 의해 활성이 감소하며 외부 유래 보조인자 PLP의 영향을 받지 않았다.

수탁번호

[0070]

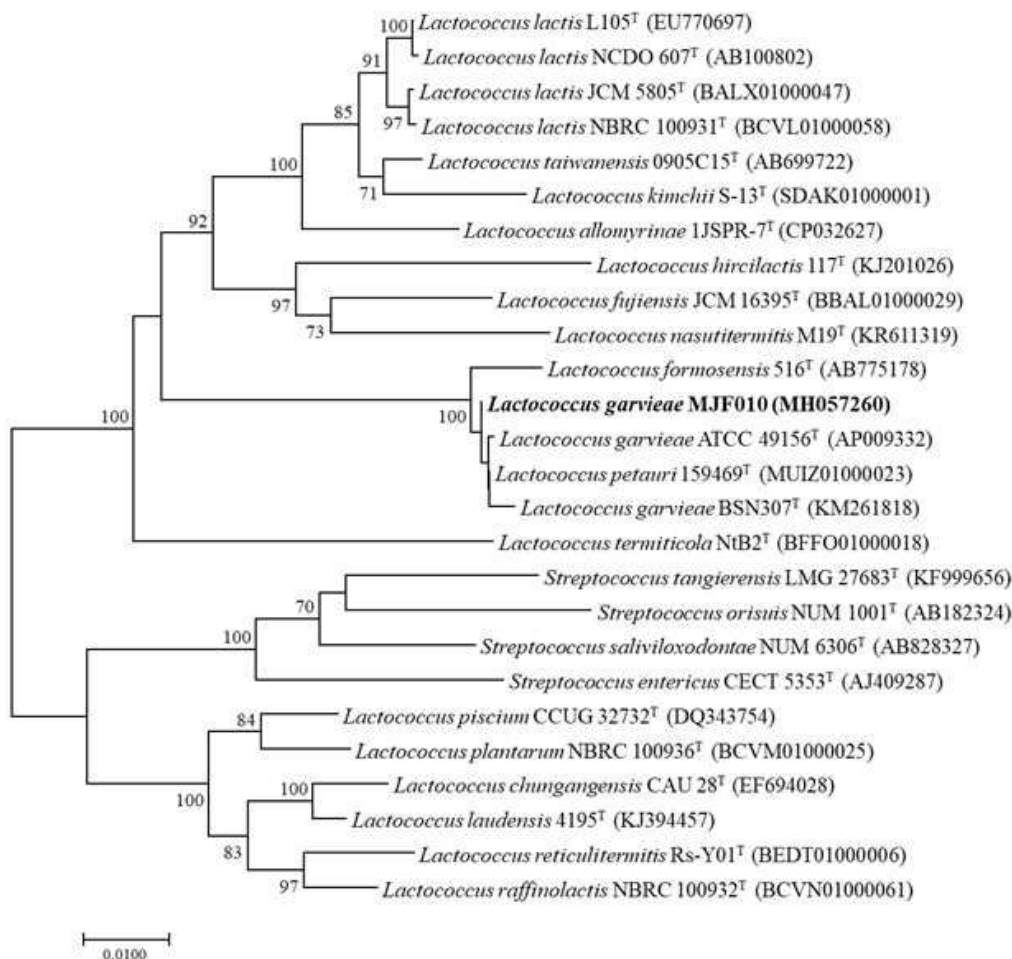
기탁기관명 : 한국미생물보존센터

수탁번호 : KCCM12722P

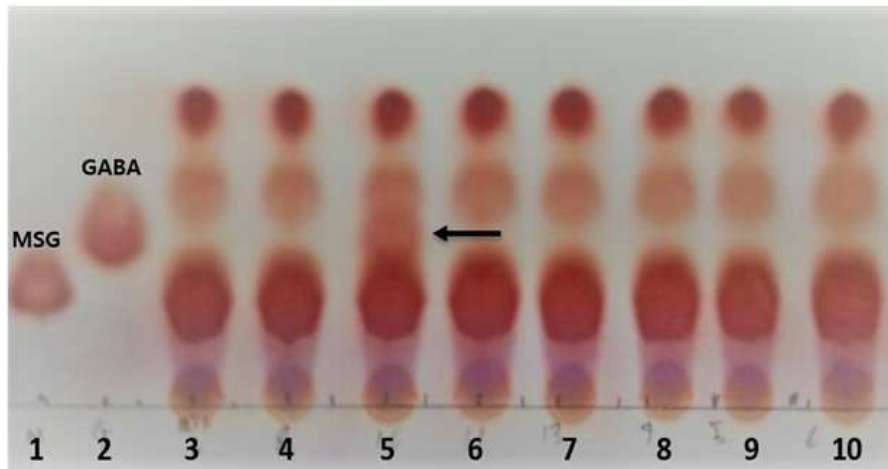
수탁일자 : 20200515

도면

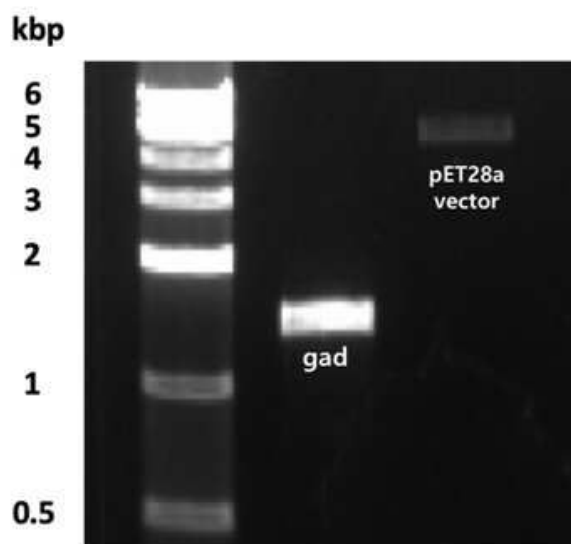
도면1



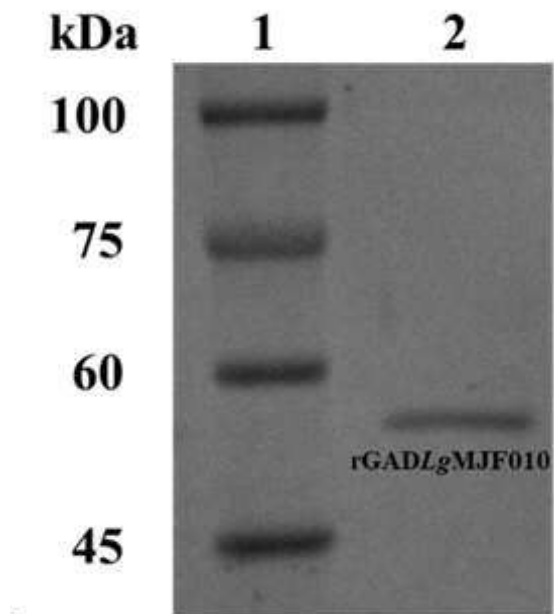
도면2



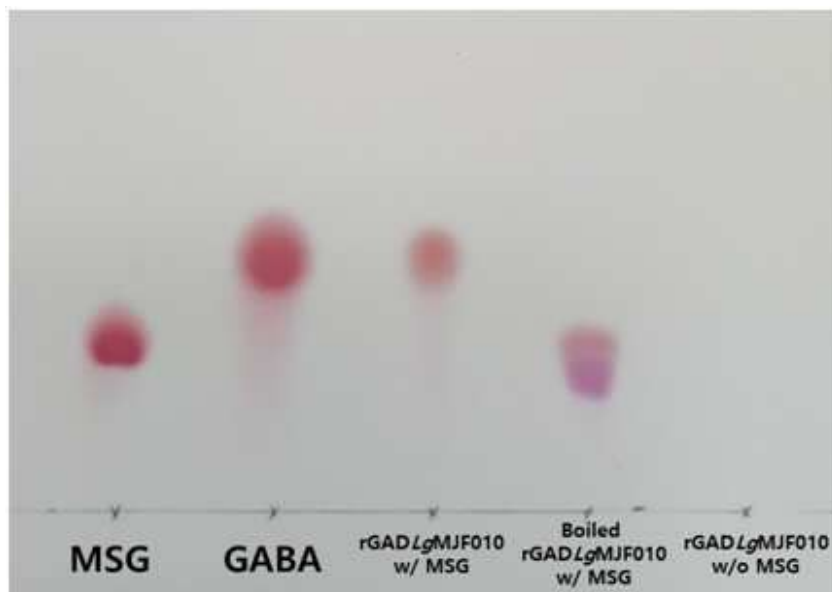
도면3



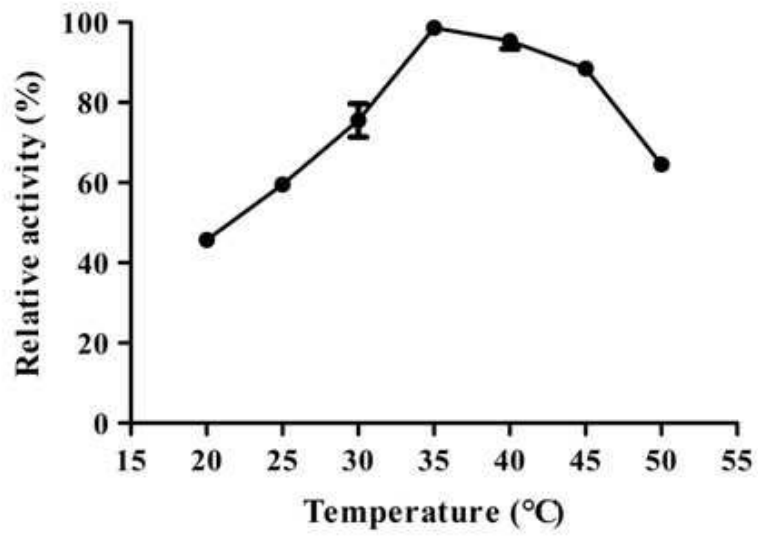
도면4



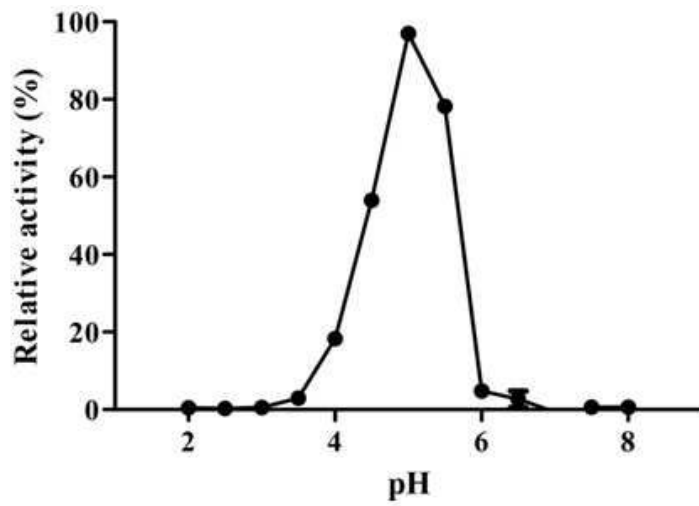
도면5



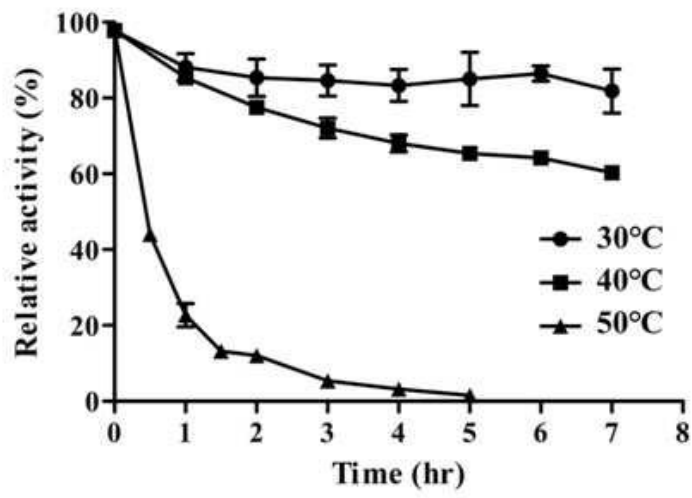
도면6



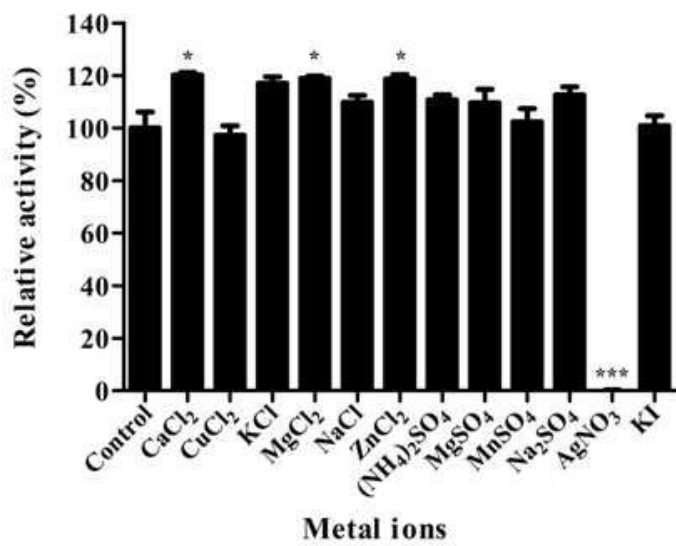
도면7



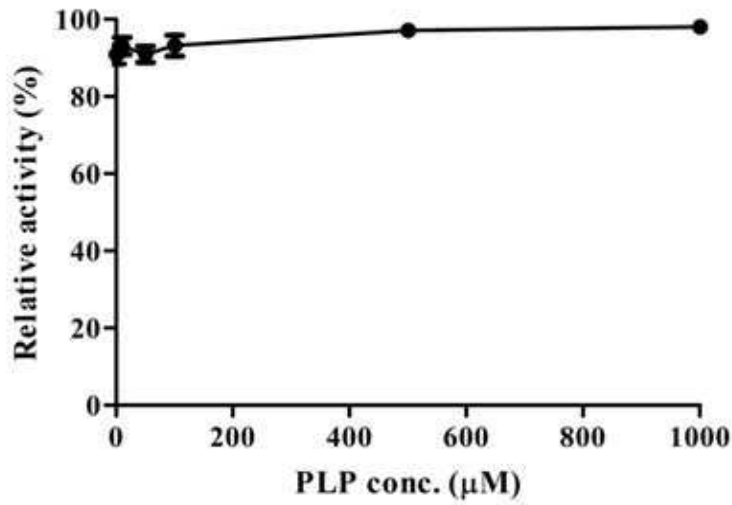
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY
- <120> PRODUCTION OF GABA BY RECOMBINANT GLUTAMATE DECARBOXYLASE FROM
- <130> P20-0050
- <160> 7
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1493
- <212> DNA
- <213> Lactococcus garvieae
- <400> 1

ggctcaggac gaacgccggc ggctgacctt ataatgcaa gtcgagcgat gattaaagat	60
agcttgctat ttttatgaag agcggcgaac gggtgagtaa cgcgtgggaa atctgccgag	120
tagcggggga caacgtttgg aaacgaacgc taataacgca taacaatgag aatcgcatga	180
ttcttattta aaagaagcaa ttgcttcact acttgatgat cccgcgttgt attagctagt	240
tggtagtgtg aaggactacc aaggcgatga tacatagccg acctgagagg gtgatcggcc	300
acactgggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttcggc	360
aatgggggca accctgaccg agcaacgccg cgtgagttaa gaaggttttc gtagctgtaa	420
actctgttgt tagagaagaa cgtaaagtag agtggaaaat tacttaagtg acggtatcta	480
accagaaagg gacggctaac tacgtgccag cagccgcggg aatacgtagg tcccaagcgt	540
tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg caggtggttt ctttaagtctg atgtaaaagg	600

cagtggctca accatttgtt gcattggaaa ctgggagact tgagtgcagg agaggagagt	660
ggaattccat gtgtagcggg gaaatgcgt gatatatgga ggaacaccgg aggcgaaagc	720
ggctctctgg cctgtaactg aactgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga	780
taccctggta gtccacgccg taaacgatga gtgctagctg tagggagcta taagtctct	840
gtagcgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc	900
aaaggaattg acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc	960
gaagaacctt accaggtctt gacatactcg tgctatcctt agagataagg agttccttcg	1020
ggacacggga tacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgcgtgaga tgttgggtta	1080
agtcccgcaa cgagcgcaac ctttattact agttgccatc attaagttgg gcactctagt	1140
gagactgccg gtgataaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgccctta	1200
tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga tggtaacaac agtcgccaac ccgcgagggt	1260
gcgctaattc cttaaaacca ttctcagttc ggattgcagg ctgcaactcg cctgcatgaa	1320
gtcggaatcg ctagtaatcg cggatcagca cgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt	1380
acacaccgcc cgtcacacca cggaagttgg gactacccaa agtaggttgc ctaaccgcaa	1440
ggagggcgct tcctaaggta agaccgatga ctggggtgaa gtcgtaacaa ggt	1493
<210> 2	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer 27F	
<400> 2	
agagtttgat cmtggctcag	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer 1492R	
<400> 3	
ggttaccttg ttacgacttc	20
<210> 4	
<211> 1493	
<212> DNA	

<213> Lactococcus garvieae

<400> 4

ggctcaggac gaacgccggc ggctgccta atacatgcaa gtcgagcgat gattaaagat	60
agcttgctat tttatgaag agcggcgaac gggtagtaa cgcgtgggaa atctgccgag	120
tagcggggga caacgtttgg aaacgaacgc taataccgca taacaatgag aatcgcatga	180
ttcttattta aaagaagcaa ttgcttcact acttgatgat cccgcgttgt attagctagt	240
tggtagtgtg aaggactacc aaggcgatga tacatagccg acctgagagg gtgatcggcc	300
acactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttcggc	360
aatgggggca acctgaccg agcaacgccg cgtgagtga gaaggttttc ggatcgtaaa	420
actctgttgt tagagaagaa cgtaagtag agtggaaaat tacttaagt acggtatcta	480
accagaaagg gacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tcccaagcgt	540
tgtccggatt taitgggcgt aaagcgagcg caggtggttt cttaaagtctg atgtaaaagg	600
cagtggctca accatttgtt gcattggaac ctgggagact tgagtgcagg agaggagagt	660
ggaattccat gtgtagcgtt gaaatgcgta gatatatgga ggaacaccgg aggcgaaagc	720
ggctctctgg ccgtgaactg acactgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga	780
tacctggta gtccacgccg taaacgatga gtgctagctg tagggagcta taagttctct	840
gtagcgagc taacgatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc	900
aaaggaattg acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc	960
gaagaacctt accaggtctt gacatactcg tctatcctt agagataagg agttccttcg	1020
ggacacggga tacaggttgt gcatggttgt cgtcagctcg tgcgtgaga tgttgggtta	1080
agtccgcaa cgagcgcaac ccttattact agttgccatc attaagttgg gcactctagt	1140
gagactgccg gtgataaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcgc atgccctta	1200
tgacctgggc tacacactg ctacaatgga tggtaaacg agtcgccaac ccgcgagggt	1260
gcgctaattc cttaaaacca ttctcagttc ggattgcagg ctgcaactcg cctgcatgaa	1320
gtcggaatcg ctagtaatcg cggatcagca cgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt	1380
acacaccgcc cgtcacacca cggaagttgg gactaccaa agtaggttgc ctaaccgcaa	1440
ggaggcgct tcctaaggta agaccgatga ctggggtgaa gtcgtaacaa ggt	1493

<210> 5

<211> 466

<212> PRT

<213> Lactococcus garvieae

<400> 5

Met Leu Tyr Gly Lys Glu Asn Arg Asp Glu Ala Glu Phe Leu Glu Pro

1 5 10 15

Ile Phe Gly Ser Glu Ser Glu Gln Val Asp Leu Pro Lys Tyr Lys Leu

20 25 30

Gly Arg Glu Ser Ile Glu Pro Arg Val Ala Tyr Gln Leu Val Gln Asp

35 40 45

Glu Met Leu Asp Glu Gly Asn Ala Arg Leu Asn Leu Ala Thr Phe Cys

50 55 60

Gln Thr Tyr Met Glu Pro Glu Ala Val Lys Leu Met Ser Gln Thr Leu

65 70 75 80

Glu Lys Asn Ala Ile Asp Lys Ser Glu Tyr Pro Arg Thr Thr Glu Ile

85 90 95

Glu Asn Arg Cys Val Asn Met Ile Ala Asp Leu Trp Asn Ala Ser Glu

100 105 110

Asn Glu Gln Phe Met Gly Thr Ser Thr Ile Gly Ser Ser Glu Ala Cys

115 120 125

Met Leu Gly Gly Met Ala Met Lys Phe Ser Trp Arg Lys Arg Ala Glu

130 135 140

Lys Leu Gly Leu Asp Ile Asn Ala Lys Lys Pro Asn Leu Val Ile Ser

145 150 155 160

Ser Gly Tyr Gln Val Cys Trp Glu Lys Phe Cys Val Tyr Trp Asp Ile

165 170 175

Glu Met Arg Glu Val Pro Met Asp Glu Asn His Met Ser Ile Asn Leu

180 185 190

Asp Lys Val Met Asp Tyr Val Asp Glu Tyr Thr Ile Gly Ile Val Gly

195 200 205

Ile Met Gly Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Tyr Asp Asp Ile Lys Ala Leu

210 215 220

Asp Lys Leu Val Glu Glu His Asn Lys His Thr Asp Tyr Lys Val Tyr

225 230 235 240

Ile His Val Asp Ala Ala Ser Gly Gly Leu Tyr Ala Pro Phe Val Glu
245 250 255

Pro His Leu Lys Trp Asp Phe Arg Leu Lys Asn Val Ile Ser Ile Asn
260 265 270

Thr Ser Gly His Lys Tyr Gly Leu Val Tyr Pro Gly Val Gly Trp Val
275 280 285

Leu Trp Arg Asp Lys Lys Tyr Leu Pro Glu Glu Leu Ile Phe Lys Val
290 295 300

Ser Tyr Leu Gly Gly Glu Leu Pro Thr Met Ala Ile Asn Phe Ser His
305 310 315 320

Ser Ala Ala Gln Leu Ile Gly Gln Tyr Tyr Asn Phe Val Arg Tyr Gly
325 330 335

Phe Asp Gly Tyr Lys Ala Ile His Glu Arg Thr His Lys Val Ala Met
340 345 350

Tyr Leu Ala Lys Ala Ile Glu Lys Thr Gly Leu Phe Glu Ile Val Asn
355 360 365

Asp Gly Ser Gln Leu Pro Ile Val Cys Tyr Lys Leu Arg Glu Asp Ile
370 375 380

Asn Cys Asp Trp Asp Leu Tyr Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Met Lys
385 390 395 400

Gly Trp Gln Val Pro Ala Tyr Pro Leu Pro Lys Asn Leu Glu Asp Asn
405 410 415

Ile Ile Gln Arg Ile Val Ile Arg Ala Asp Phe Gly Met Asn Met Ala
420 425 430

Tyr Asn Tyr Val Gln Asp Met Gln Glu Ala Ile Glu Phe Leu Asn Lys
435 440 445

Ala His Leu Lys Tyr His Asn Asn Pro Lys Asn Lys Val Tyr Gly Phe
450 455 460

Thr His
465

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer GAD-F

<400> 6

cgccatatgt tatatggaaa agaaaatc 28

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer GAD-R

<400> 7

agagtttgat cmtggctcag 20