

재조합 *Escherichia coli*를 이용한 gamma-Aminobutyric Acid 전환 반응 최적화

Vo Dinh Le Tam, 홍순호*

Optimization of gamma-Aminobutyric Acid Bioconversion by Recombinant *Escherichia coli*

Tam Dinh Le Vo and Soon Ho Hong*

접수: 2012년 4월 10일 / 게재승인: 2012년 4월 25일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, the effects of pH, temperature, IPTG concentration and substrate (MSG) concentration on gamma-aminobutyric acid (GABA) production in engineered *Escherichia coli* were investigated. Glutamate decarboxylase and glutamate/GABA antiporter were overexpressed in GABA aminotransferase knock-out strain for GABA production. The result of optimization study showed the GABA bioconversion was optimized at pH 3.5, 30°C, 0.5 mM IPTG, 10 g/L MSG. At this condition, 5.23 g/L of final GABA concentration of was achieved from 10 g/L of MSG, which corresponded to a GABA yield of 85.77%.

Keywords: gamma-Aminobutyric acid, *Escherichia coli*, Bioconversion, Optimization

1. 서론

최근 전세계적인 석유수급 불안과 석유자원 고갈우려 등의 요인으로 인하여, 석유화학제품의 가격이 가파르게 상승하고 있다. 석유화학제품의 대안으로서 바이오에너지, 바이오플라스틱 등의 바이오유래 제품을 생산하기 위한 노력이 지속적으로 이루어지고 있다. 바이오플라스틱의 경우 2002년 폴리유산 (poly lactic acid)의 상업화 이후, polyhydroxyalkanoates,

poly (butylene succinate) 등 다양한 바이오플라스틱의 상업화가 활발히 진행 중이다. 나일론 4는 내열성과 기계적 물성이 뛰어나 차세대 나일론고분자로 각광을 받고 있으며, 바이오 유래의 gamma-aminobutyric acid (GABA)를 이용하여 생산가능하다 [1,2].

GABA는 체내에서 신경전달물질 억제효과에 의한 저혈압 및 진통효과가 있다고 알려져, 현재 식품 및 의약품 소재로 활용되고 있다 [1,3-7]. GABA는 글루탐산을 원료로 글루탐산 디카복실라제 (glutamate decarboxylase)에 의해 제조될 수 있으며, GABA의 상업적 중요성으로 인하여 생물학적인 방법으로 GABA를 생산하는 다양한 연구들이 수행되어져 왔다 [1,3,4,8,9].

본 연구에서는 pH, 온도, monosodium glutamate (MSG) 농도, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 농도 등의 외부조건이 GABA 생산에 미치는 영향을 분석하여, GABA 생산조건을 최적화를 수행하였다. 효율적인 GABA 생산을 위하여 글루탐산으로부터 GABA를 생산하는 글루탐산 디카복실라제 (GadB)와 GABA를 외부로 분비하는 글루탐산/GABA 역수송체 (glutamate/GABA antiporter, GadC)를 과량발현시킨 균주를 사용하였다 [1]. 또한 GABA를 succinic semialdehyde로 전환하는 GABA 아미노트랜스페라아제 (GABA aminotransferase, GabT)를 불활성화 하여 생산된 GABA의 분해를 억제하였다 [1].

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양액

본 실험에 사용된 균주 및 플라스미드들은 Table 1에 정리

울산대학교 화학공학부
Department of Chemical Engineering, University of Ulsan, 93
Daehakro, Nam-gu, Ulsan 680-749, Republic of Korea
Tel: +82-52-259-1293, Fax: +82-52-259-1689
e-mail: shhong@ulsan.ac.kr

하였다. 배양을 위하여 Luria-Bertani 배지 (Bacto Tryptone 10 g/L, Bacto yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L)가 사용되었으며, ampicillin 100 mg/L를 추가하였다. 균주는 37°C and 250 rpm에서 배양되었다.

Table 1. List of bacterial strains and plasmids used in this study

Strain, Plasmid	Genotype and/or property	Source
<i>Escherichia coli</i> strain		
XBT	XL1-Blue Δ gabT	[1]
Plasmid		
pHBC	pMAL-p4X containing <i>gadB&gadC</i>	[1]

2.2. 외부조건 영향 분석

제조합 균주는 ampicillin 100 mg/L를 추가한 100 mL의 LB배지에서 배양되었으며, 외부조건이 GABA 생산에 미치는 영향을 분석하였다. pH는 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5로 조절되었으며, 배양온도는 25°C, 30°C, 37°C로 조절되었다. 반응 기질인 MSG의 농도는 10, 20, 50 g/L를 테스트하여보았으며, IPTG의 농도는 0.25, 0.5, 0.75, 1 mM로 변화시켰다. 제조합대장균의 균체농도가 OD600 1.2에 도달하면, 균주를 원심분리하여 다양한 농도의 MSG 및 IPTG를 포함한 새로운 LB배지에 접종한다. 균주는 48시간동안 배양하였으며, 매 12시간마다 생산된 GABA 농도를 분석하였다.

2.3. GABA 분석

GABA 농도분석은 HPLC를 이용하여 이루어졌으며, OptimaPak C18 column (4.6 × 150 mm) (RS tech Corporation, Daejeon, Korea)이 사용되었다. 샘플은 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 후, 상층액 100 μ L를 취한다. 1 M Sodium bicarbonate buffer (pH 9.8) 200 μ L, 80 g/L dansyl chloride/acetonitrile 100 μ L, 증류수 600 μ L를 첨가하여 총 반응액의 부피를 1 mL로 맞춘다. 80°C에서 40분간 반응 후, 20 μ L/mL 초산 100 μ L를 첨가하여 반응을 종결한다. 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 후, 상층액을 0.22 μ m Millipore filter를 이용하여 정제한다.

Eluant A (tetrahydrofuran/methanol/50 mM sodium acetate pH 6.2 (5 : 75 : 420, by vol.))와 eluant B (methanol)의 binary non-linear gradient를 이용하여 샘플분석을 수행하였다. Elution조건은 다음과 같다: equilibration (6 min, 20% B), gradient (20 min, 20-80% B), cleaning (3 min, 100% B). 이동상의 유속은 1 mL/분 이었으며, column의 온도는 30°C로 조절되었다. 샘플분석은 UV 286 nm에서 이루어졌다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 pH, 온도, MSG 농도, IPTG 농도 등의 외부조건이 GABA 생산에 미치는 영향을 분석하였다. 효율적인 GABA의 생산을 위하여 *GadB*와 *GadC*를 과량발현시키고, *GabT*를 불활성화 한 제조합 균주를 사용하였다 [1].

3.1. pH 영향 분석

외부 pH가 GABA 생산에 미치는 영향을 분석하기 위하여 배양액의 pH를 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5로 변화시키면서 GABA 생산능의 변화를 살펴보았다 (Fig. 1). 배양액의 pH가 5인 조건에서는 GABA가 생산되지 않았다. 배양액의 pH가 4.5, 4.0인 조건에서는 36시간 후부터 GABA가 생산되기 시작하였으며, 최종적으로 약 0.4 g/L의 GABA가 생산되었다. pH가 3.0, 2.5인 조건에서는 반응이 시작하면서 GABA의 생산이 시작되었지만, 12시간 이후 GABA의 생산이 중단되어 최종적으로 약 1.6 g/L의 GABA가 생산되었다 (Fig. 1). 배양액의 pH가 3.5인 조건에서는 반응시간동안 지속적인 GABA의 생산이 이루어졌으며, 최종적으로 5.27 g/L의 GABA가 생산되었다. 본 결과를 바탕으로 GABA 생산의 최적 pH는 3.5임을 확인하였다.

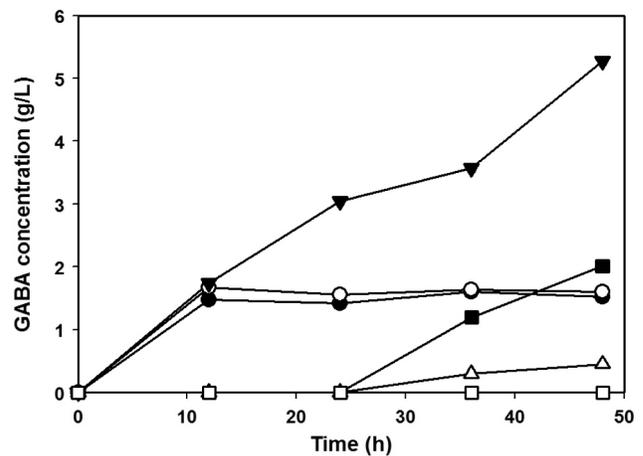


Fig. 1. Time profile of GABA concentration at various pH. pH 2.5 (●); pH 3 (○); pH 3.5 (▼); pH 4 (△); pH 4.5 (■); pH 5 (□).

3.2. 온도 영향 분석

외부 온도가 GABA 생산에 미치는 영향을 분석하기 위하여 온도를 25, 30, 37°C로 변화시키면서 GABA 생산능의 변화를 살펴보았다 (Fig. 2). 배양액의 온도가 37°C인 조건에서는 GABA가 생산되지 않았다. 배양액의 온도가 25°C인 조건에서는 24시간 후부터 GABA가 생산되기 시작하였으나, 생산 속도가 상대적으로 낮아서 최종적으로 약 2.11 g/L의 GABA가 생산되었다. 배양액의 온도가 30°C인 조건에서 가장 높은 농도의 GABA의 생산이 이루어졌으며, 최종적으로 5.29 g/L의 GABA가 생산되었다. 본 결과를 바탕으로 GABA 생산의 최적 온도는 30°C임을 확인하였다.

3.3. MSG농도 영향 분석

GABA 생산반응의 기질인 MSG의 농도가 GABA 생산에 미치는 영향을 분석하기 위하여 MSG 농도를 0, 10, 20, 50 g/L로 변화시키면서 GABA 생산능의 변화를 살펴보았다 (Fig. 3). 배양액에 MSG를 첨가하지 않은 경우, GABA 생산이 이루어지지 않았다. 10, 20, 50 g/L의 MSG를 배양액에 첨가하였을 경우, 각각 5.17, 7.2, 10.35 g/L의 GABA가 최종적으로 생산되었다. 높은 농도의 MSG를 첨가하면 최종 GABA의

농도가 높아지는 결과를 얻었다. GABA yield를 비교하여 보면 10, 20, 50 g/L의 MSG를 배양액에 첨가하였을 경우, 각각 84.79, 59.04, 33.95%의 최종 GABA yield를 얻었다. 즉, MSG의 농도를 높이면 최종 GABA 농도는 높아지지만, GABA yield는 낮아짐을 확인하였다.

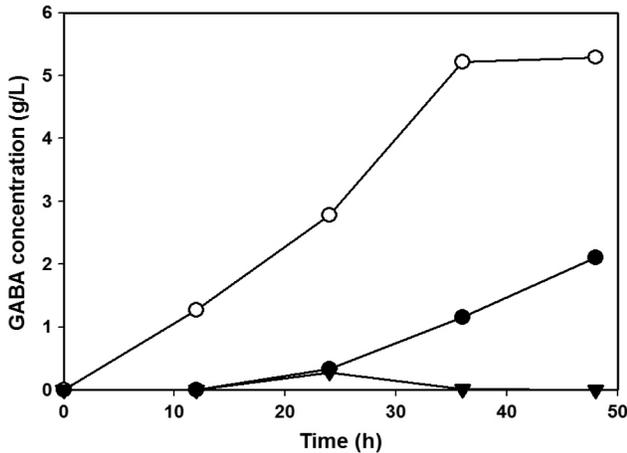


Fig. 2. Time profile of GABA concentration at various culture temperature. 25C (●); 30C (○); 37C (▼).

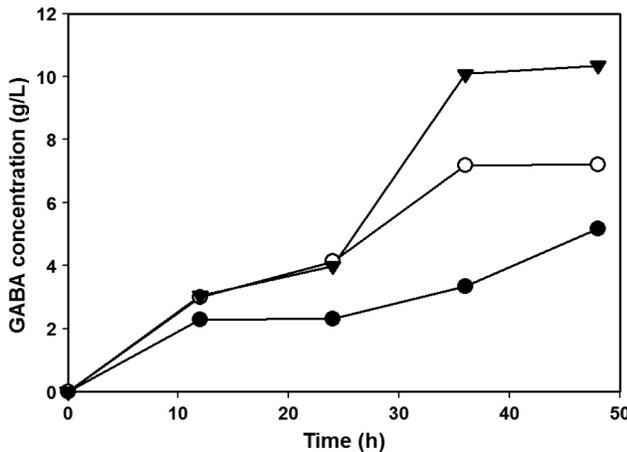


Fig. 3. Time profile of GABA concentration at various MSG concentration. MSG 10 g/L (●); MSG 20 g/L (○); MSG 50 g/L (▼).

3.4. IPTG농도 영향 분석

단백질 발현유도제인 IPTG의 농도가 GABA 생산에 미치는 영향을 분석하기 위하여 IPTG 농도를 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mM로 변화시키면서 GABA 생산능의 변화를 살펴보았다 (Fig. 4). IPTG를 첨가하지 않은 조건에서도 약 2.14 g/L의 GABA가 최종적으로 생산되었다. 이는 단백질 발현시스템의 불완전 조절에 의한 기저수준발현 (basal level expression)에 기인한 것으로 사료된다. IPTG의 농도를 0.25, 0.75, 1 mM로 변화시켜보았을 경우, 최종 GABA농도의 특이적인 변화를 관찰하지 못하였다. IPTG 농도가 0.5 mM인 조건에서, 최고 농도의 GABA (5.18 g/L)가 생산되었다. 본 결과를 바탕으로 GABA 생산의 최적 IPTG 농도는 0.5 mM임을 확인하였다.

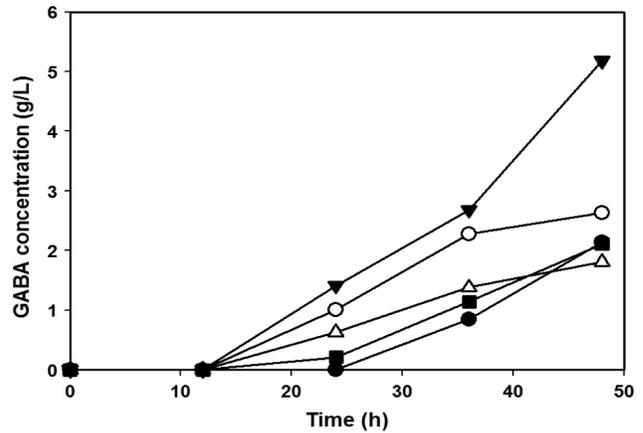


Fig. 4. Time profile of GABA concentration at various induction levels. IPTG 0 g/L (●); IPTG 0.25 g/L (○); IPTG 0.5 g/L (▼); IPTG 0.75 g/L (△); IPTG 1 g/L (■).

4. 결론

본 연구에서는 GABA 생산반응을 최적화하기 위하여 pH, 온도, MSG 농도, IPTG 농도 등의 외부조건을 변화시키면서, 이들 외부조건이 GABA 생산에 미치는 영향을 분석하였다. 실험결과 pH 3.5, 30°C, 0.5 mM IPTG, 10 g/L MSG 조건이 GABA 생산에 최적임을 확인하였다. 위 조건에서 5.23 g/L의 GABA가 최종적으로 생산되었으며, 이는 이론수율의 85.77%에 이르는 높은 수준이다.

감사

본 연구는 2012년도 울산대학교 연구비의 지원으로 이루어졌습니다.

References

- Vo, D. L. T., T. W. Kim, and S. H. Hong (2012) Effects of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter on the bioconversion of GABA in engineered *Escherichia coli*. *Bioproc. Biosystems Eng.* 35: 645-650.
- Saskiawan, I. (2008) Biosynthesis of polyamide 4, a biobased and biodegradable polymer. *Microbiol. Indones.* 2: 119-123.
- Kim, S. H., B. H. Shin, Y. H. Kim, S. W. Nam, and S. J. Jeon (2007) Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus brevis* BH2. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12: 707-712.
- Park, K. B. and S. H. Oh (2006) Enhancement of gamma-aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnol. Lett.* 28: 1459-1463.
- Park, K. B. and S. H. Oh (2004) Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum*. *J. Food Sci. Nutri.* 9: 324-329.
- Oh, S. H. and C. H. Oh (2003) Brown rice extracts with enhanced

- levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci. Biotechnol.* 12: 248-252.
7. Oh, C. H. and S. H. Oh (2004) Effect of germinated brown rice extract with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. *J. Med. Food* 7: 19-23.
 8. Kook, M. C., K., M. J. Seo, C. I. Cheigh, S. J. Lee, Y. R. Pyun, and H. Park (2010) Enhancement of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus sakei* B2-16 expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 53: 816-820.
 9. Park, K. B., G. E. Ji, M. S. Park, and S. H. Oh (2005) Expression of rice glutamate decarboxylase in *Bifidobacterium longum* enhances γ -aminobutyric acid production. *Biotechnol. Lett.* 27: 1681-1684.