[UCI]I804:24011-200000263535

2013년 2월
석사학위논문

Glutamate decarboxylase 생산을 위한 재조합 *E. coli* 의 배양에 관한 연구

조선대학교 대학원
화 학 공 학 과
남 보 미

Glutamate decarboxylase 생산을 위한 재조합 *E. coli* 의 배양에 관한 연구

Study on the fermentation of recombinant *E. coli* for glutamate decarboxylase production

2013 년 2 월 25 일

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

남 보 미

Glutamate decarboxylase 생산을 위한 재조합 *E. coli* 의 배양에 관한 연구

Study on the fermentation of recombinant *E. coli* for glutamate decarboxylase production

지도교수 이 중 헌

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2012 년 10 월

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

남 보 미

남보미의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 김 정 규 교수 (인)

위 원 조선대학교 신 현 재 교수 (인)

위 원 조선대학교 이 중 헌 교수 (인)

2012 년 11 월

조선대학교 대학원

목차

List of Figures iii
List of Tables..... v
ABSTRACT vi
제 1 장 서론..... 1
제 2 장 실험 재료 및 방법 5
1. 시약 및 기기 5
2. 배양조건..... 5
2.1 균주 및 보존 5
2.2 배지조성 6
3. 실험방법..... 8
3.1 배양방법 8
3.2 Glutamate decarboxylase(GAD) 분리 8
4. 분석방법..... 9
4.1 건조 균체량과 질소원 탄소원 측정 9
4.2 GAD activity 측정 13
4.3 High performance liquid chromatography (HPLC)분석 15
4.4 발효 조건 반응 표면 분석 (response surface methodology). 17
제 3 장 실험결과 18
1. 배양 조건 18
1.1 초기 ammonium sulfate 농도에 따른 영향 18
1.2 초기 magnesium sulfate 농도에 따른 영향..... 22
1.3 초기 mono sodium glutamate(MSG)농도에 따른 영향..... 26
1.4 초기 glucose 농도에 따른 영향 30
1.5 유가식 배양 공정의 영향 34

1.6 교반속도에 따른 영향 40
1.7 Aeration rate 에 의한 영향 44
1.8 pH 에 따른 영향 48
1.9 발효 조건 표면 분석 52
2. GABA 의 대량 생산 55
제 4 장 결론 57
참고문헌 59

List of Figures

Figure 1. Schematic diagram of GABA synthesis from glutamate. 1

Figure 2. Amino acid decarboxylation with GAD..... 2

Figure 3. Schematic diagram for *E. coli* fermentation..... 8

Figure 4. Standard curve for the determination dry *E. coli* weight. 10

Figure 5. Standard curve for the determination of ammonium ion concentration..... 11

Figure 6. Standard curve for the determination of glucose concentration.. 12

Figure 7. Simplified diagram of gabase reaction. 13

Figure 8. Standard curve for the determination of GABA concentration.... 14

Figure 9. Simplified diagram of DNFB reaction. 15

Figure 10. Standard curve for the determination of GABA concentration.. 16

Figure 11. Effect of $(NH_4)_2SO_4$ concentration on cell growth; (A) 2 g/L, (B) 4 g/L, and (C) 6 g/L. 19

Figure 12. Effect of $(NH_4)_2SO_4$ concentration on GAD activity and specific GAD activity;(A) 2 g/L, (B) 4 g/L, and (C) 6 g/L..... 20

Figure 13. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on cell growth; (A)0.2 g/L and (B) 0.4g/L. 23

Figure 14. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on GAD activity and specific GAD activity; (A)0.2 g/L and (B) 0.4g/L..... 24

Figure 15. Effect of monosodium glutamate(MSG) on cell growth. 27

Figure 16. Effect of MSG on GAD activity and specific GAD activity..... 28

Figure 17. Effect of glucose concentration on cell growth; (A) 10 g/L, (B) 40 g/L and (C) 60 g/L. 31

Figure 18. Effect of glucose concentration on GAD activity and specific GAD activity; (A) 10 g/L, (B) 40 g/L, and (C) 60 g/L. 32

Figure 19. Effect of glucose(2 M, 100 ml)addition at 8 hr (A) growth curve and (B) GAD activity and specific GAD activity with the fed-batch culture. 35

Figure 20. Effect of glucose (2 M, 100 ml)addition at 18 hr (A) growth curve and (B) GAD activity and specific GAD activity with the fed-batch culture..... 36

Figure 21. Effect of glucose (2 M, 50 ml)addition at 8, 18 hr (A) growth curve and (B) GAD activity and specific GAD activity with the fed-batch culture..... 37

Figure 22. Effect of glucose (2 M, 25 ml)addition (A) growth curve and (B) GAD activity and specific GAD activity with the fed-batch culture. 38

Figure 23. Effect of agitation speed on cell growth; (A) 200 rpm, (B) 300 rpm, and (C) 400 rpm. 41

Figure 24. Effect of agitation speed on GAD activity and specific GAD activity; (A) 200 rpm, (B) 300 rpm, and (C) 400 rpm..... 42

Figure 25. Effect of aeration rate on; (A) 3 vvm, (B) 5 vvm, and (C) 7 vvm. 45

Figure 26. Effect of aeration rateon GAD activity and specific GAD activity; (A) 3 vvm, (B) 5 vvm, and (C) 7 vvm. 46

Figure 27. The cell growth and glucose consumption at pH 5.5..... 49

Figure 28. Change at pH 5.5 on GAD activity and specific GAD activity.... 50

Figure 29. Surface response result of GAD activity according to the change of (A) ammonium sulfate : glucose, (B) ammonium sulfate : aeration rate, and (C) glucose : agitation speed. 53

Figure 30. GABA production form MSG using 50ml enzyme reactor..... 56

List of Tables

Table 1. Medium composition 7

Table 2. Effects of $(NH_4)_2SO_4$ concentration on cell mass, GAD activity, and specific GAD activity 21

Table 3. Effects of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on cell mass, GAD activity, and Specific GAD activity 25

Table 4. Effects of MSG concentration on cell mass, GAD activity, and specific GAD activity 29

Table 5. Effects of glucose concentration on cell mass, GAD activity, and specific GAD activity 33

Table 6. Effects of fed-batch on cell mass, GAD activity, and specific GAD activity 39

Table 7. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on DCW, GAD activity, and Specific GAD activity 43

Table 8. Effects of aeration rate on cell mass, GAD activity, and specific GAD activity 47

Table 9. Effects of pH on cell mass, GAD activity and specific GAD activity 51

Table 10. Estimated regression coefficients for total GAD activity (A) ammonium sulfate : glucose, (B) ammonium sulfate : agitation speed, and (C) glucose : agitation speed) 54

ABSTRACT

Study on the fermentation of recombinant *E. coli* for glutamate decarboxylase(GAD) production

Nam, Bo-Mi
Advisor: Prof. Lee, Jung-Heon, Ph.D.
Department of Chemical Engineering
Graduate School of Chosun University

γ-Aminobutyric acid (GABA) and glutamate are thought to be the most important inhibitory and excitatory amino acid neurotransmitters in the central nervous system (CNS).GABA, a four-carbon non-protein amino acid, acts as the major inhibitory neurotransmitter of the central nervous system. GABA is generated from glutamate by the action of glutamic acid decarboxylase(GAD). GAD has been purified from several brain tissues and it is generally accepted that the diametric protein possesses a relative molecular mass of around 110,000 Da.

In this study, the fermentation technique was applied to produce GAD using recombinant *E. coli*(BL21). The effects of ammonium sulfate, magnesium sulfate, glucose concentration, three different feeding

methods, agitation speed, aeration rate, and pH on the production GAD were investigated in this work also.

The optimal medium composition was glucose 40 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 6 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, yeast extract 1 g/L and monosodium glutamate(MSG) 20 g/L. MSG induced the expression of GAD. GAD activity and specific GAD activity was 248.6 units, 4.2 units/cell mass under optimal culture conditions. The fed-batch fermentation was performed to increase the cell mass (3.7 g/L) and GAD activity (337.3 units). The production of GAD rate was increased with the oxygen with increased agitation speed and aeration. The cell mass, GAD activity and specific GAD activity was 3.9 g/L, 764 units and 5.7 unit/cell mass at 300-350 rpm and 7 vvm, respectively.

Since GAD were fermentation pH-dependent, pH was controlled at pH 5.5 to enhance GAD productivity. With pH-controlled conditions, the cell mass, GAD activity and specific GAD activity was 3.7/L, 834.7 and 6.6 unit/ cell mass, respectively.

Finally a concentration of 1 M of GABA was produced from glucose 10 hr enzyme reaction.

In summary, this fermentation system would be considered to be suitable for the product of GAD at the condition of glucose 40 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 6 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, yeast extract 1 g/L MSG 20 g/L, 300-350 rpm, 7vvm aeration, and pH 5.5.

제 1 장 서론

γ-Aminobutyric acid(GABA)는 자연계에 널리 분포하는 비단백질 구성 아미노산으로 뇌기능을 촉진시키는 등의 생리작용을 하는 중추신경계(CNS, Central Nervous System)에서 중요한 억제 성 신경전달물질 이다. GABA는 glutamate decarboxylase(GAD)의 L-glutamate의 탈 탄산 반응에 의해 CO_2와 함께 생성되며 pyrodoxal-5'-phosphate dependent(PLP) 경로로 합성되는 것으로 알려져 있다.[1-3]

GABA는 신경전달물질 중 아미노산 계 신경전달물질의 대표적 물질이다. 척추에 존재하는 신경전달물질로 뇌 혈류를 개선하며 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사촉진 및 뇌 기억을 증진 시키는 뇌의 영양제로 알려져 신경전달물질 조절을 통해 뇌 혈류개선, 산소공급증가, 뇌세포 대사 촉진으로 인한 신경안정작용 등의 효능을 가진다고 알려져 있으며 이외에도 스트레스해소, 우울증 완화작용, 기억력증진, 불면, 비만, 중풍과 치매 예방에 효과가 있다. 그 외에도 GABA는 성장호르몬의 분비조절, 통증완화, 정신신경 안전작용, 혈압강하작용, ACE 저해 활성 등이 있어 생리학적으로 매우 유익한 물질이다. 이러한 기능들 때문에 GABA는 식품소재, 건강보조식품, 기능성 식품, 약, 음료, 드링크, 김치 등 식품관련 분야에서 많이 적용되고 있다. [4-8]

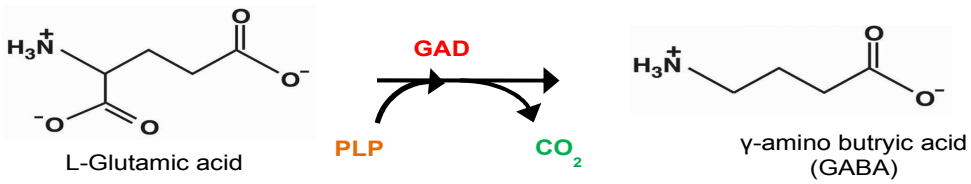


Figure 1. Schematic diagram of GABA synthesis from glutamate.

GAD는 PLP dependent 효소로서 박테리아, 포유동물, 식물과 같이 자연계에서 널리 발견되고 있다. GABA의 생성 기작은 세포내막에서 glutamic acid가 GAD의 효소에 의하여 비가역적으로 탈탄산이 이루어지면서glutamic acid가 antiporter에 의하여 세포안으로 쉽게 들어가게 되며 결과적으로 GABA가 세포 밖으로 유출되어 나온다. [9-10]

GABA의 합성이 필요할 때 cofactor에 의하여 불활성 GAD가 활성화 된다고 알려져 있다. 효소학적 연구에 의하면 GAD 상태에서 apoenzyme과 holoenzyme의 상호전환은 GAD의 촉매작용에 의한 연쇄반응에 의하여 일어나며 매우 잘 조절되고 있으며 여러 group에서 GAD는 뇌조직에서 multiple form으로 존재하고 있다고 밝혀졌다. 보고된 GAD의 분자량은 대개 group마다 다르지만 뇌 조직에서는 적어도 59-67 kDa정도의 2가지 형태가 존재한다고 알려져 있다.

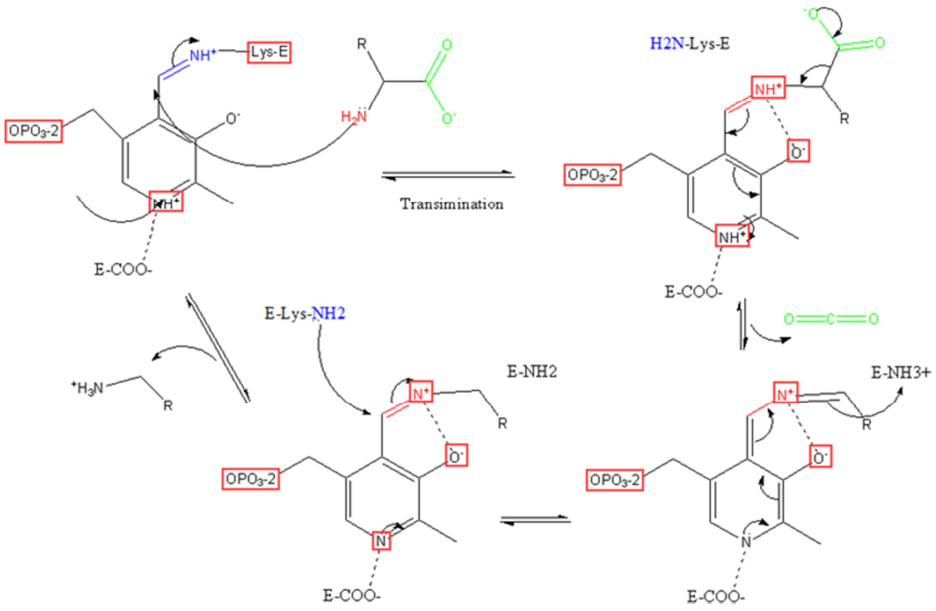


Figure 2. Amino acid decarboxylation with GAD.

GAD의 효소반응은 효소의 active site에 존재하는 lysine 끝단락의 amine 그룹과 pyridoxal 5’-phosphate(PLP)의 carboxyl 그룹이 결합하여 holoenzyme이 형성된다. 이렇게 형성된 holoenzyme은 PLP의 carboxyl그룹과 MSG의 amine그룹이 결합한 뒤 전자가 이동하게 되고 전자의 이동에 의해 decarboxylation이 일어나게 되면서 이산화탄소가 발생하게 되면서 gamma aminobutyric acid를 생산하게 된다. 이러한 반응이 진행되는 동안 H^+ 를 소비하게 되고 효소반응의 pH는 증가하게 된다(figure 2).

GABA의 생리학적, 신경학적 기능을 이용한 연구 외에도 최근에는 GABA의 아미노기와 카르복실기 사이의 3개의 메틸렌 그룹에 의한 구조적 유연성을 이용한 연구 역시 활발히 진행 중이며 이는 GABA가 쉽게 ring-formation 반응에 의해 링 구조를 가진 2-pyrrolidone을 형성할 수 있으며, 이 2-pyrrolidone은 특정조건하에서 ring opening 반응에 의해 Nylon 4의 단량체로 변환이 가능하다. Nylon 4는 Nylon 6, Nylon 66와 물리적 특성이 유사하고 면에 가까운 성질 때문에 GABA의 산업적 이용가능성은 매우 높다고 할 수 있다. 그러나 식물을 원재료로 하여 GABA의 생산에는 한계가 있으므로 대량 생산하기 위해서는 미생물에 의한 연구가 요구된다. [11-18]

따라서 본 연구에서는 MSG를 첨가하여 고농도의GAD 생산을 위한 적정 배양조건을 확립시켜 GABA 생산의 증가효과를 연구 하였다. 생물공정에 있어서 고농도 배양기술은 생산성을 효과적으로 높이는 기술이고, 생산단가를 낮추는 역할을 한다. 따라서 현재까지 고농도 배양 (high cell-densityculture : HCDC)기술을 개발하기 위하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 대장균을 배양하는데 있어서 고농도 세포 배양기술은 생산성을 증가시키는 방향으로 발전되어 왔으며, 또한 배양부피의 감소, downstream processing 의 강화, 폐기물의 감소, 생산비용의 절감, 그리고 장비 투자의 절감 등의 방향으로 전개되어왔다. 한편 고농도의 세포 배양시 제한된 산소 용해도로 인한 용존 산소의 부족 및 초기 고농도의 기질첨가로 인한 성장저

해 현상, 저해시 부산물의 축적 등은 발효의 문제점으로 지적되고 있다. 특히 대장균배양 시 아세트산의 축적은 최종 균체 농도 및 단백질의 발현에 심각한 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 이러한 문제점을 극복하기 위해 보다 효율적인 기질 공급방법 및 배양 환경의 최적화가 다양하게 시도되어 왔지만, 대장균을 이용한 GAD 및 GABA 생산에서 MSG 1M을 전환하 것이 한계가 있었고, GABA의 생산량도 채 0.1g/L 수준 밖에 되지 않는다. [19-22]

본 연구에서 사용한 *E. coli*는 선택적으로 GAD 생산을 할 수 있도록 재조합 균으로 GABA를 생산할 수 있다. 대량 배양을 위해서는 배지의 조성과 발효조의 조건이 중요함으로 효율적으로 GAD를 얻기 위해 대량 배양의 조건을 확립 하고자 한다.

제 2 장 실험 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 실험에서는 탄소원으로 glucose(DUKSAN)와 질소원으로 $(NH_4)_2SO_4$(DUKSAN), 인산염으로는 KH_2PO_4, K_2HPO_4(DUKSAN)를 사용하였고 미량원소로는 $MgSo_4 \cdot 7H_2O$(DUKSAN)를 사용 하였으며 기타 성분으로는 monosodium glutamate(MSG) (DUKSAN), yeast extract(BD)와 ampicillin(SIGMA)을 이용하였다. 소포제로 antiform(SIGMA)을 사용하였다. 본 배양액을 2 L제조하여 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 발효조로는 5L (biotron Co.)를 사용하였다.

2. 배양조건

2.1 균주 및 보존

본 연구에 사용된 균주는 glutamate decarboxylase(GAD)를 생성하는 *E. coli* BL-21 변이주로 공동연구 중인 광운대학교에서 분양을 받아 사용하였다. 사용된 재조합 균은 300 ml 플라스크에 100 ml 배양액을 만든 후 37℃ 에서 6시간 정도 배양 후 50% glycerol(DUKSAN) 과 동일한 비로 잘 섞은 후 -70℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

2.2 배지조성

본 연구에서 사용된 종배양 배지 조성은 tryptone(BD) 10 g/L, NaCl(DUKSAN)10 g/L, yeast extract 5 g/L 로 LB 배지를 사용하였으며, 본 배양 배지 조성은 glucose 40 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 6 g/L, KH_2PO_4, 3 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L, yeast extract 1 g/L, MSG 20 g/L로 배양액을 만들었다. 배지는 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였으며 pH 조절은 3N NaCl(DUKSAN), 1N HCl(DUKSAN)을 사용하였다. 배지의 조성은 table 1.에 표기하였다.

Table 1. Medium composition

Component	Concentration (g/L)
Glucose	40
$(NH_4)_2SO_4$	6
KH_2PO_4	3
K_2HPO_4	3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
MSG	20
Yeast extract	1

3. 실험방법

3.1 배양방법

본 발효의 5%에 해당하는 플라스크 배지 (LB media)를 100 ml 만들어 진탕 배양기에서 4시간 배양한 후에 1.9 L 본 배지에 접종 하였다. 배양온도 37℃로 하였으며 교반 속도는 조건에 따라 200-400 rpm, aeration rate은 3~7 vvm, pH 는 7.0 과 5.5로 조절 하였다.

3.2 Glutamate decarboxylase(GAD) 분리

본 배양이 끝난 후 배양액을 모두 모아 원심분리기(Mega 17R, Han-il Inc., England)를 이용해 8000 rpm 10분간 원심분리 한다. 침전된 균체를 pH 5.0 sodium citrate buffer를 이용해 sonication (VCX 500, Betatek Inc.)을 20분간 한 후 원심분리기를 이용하여 8000 rpm 10분간 원심분리 하고 상등액을 취한다. 분리한 상등액은 10 ml씩 분주하여 -70 ℃ deepfreezer(DF8517, ilshin Bio Co.)에 보관하여 실험에 사용하였다.

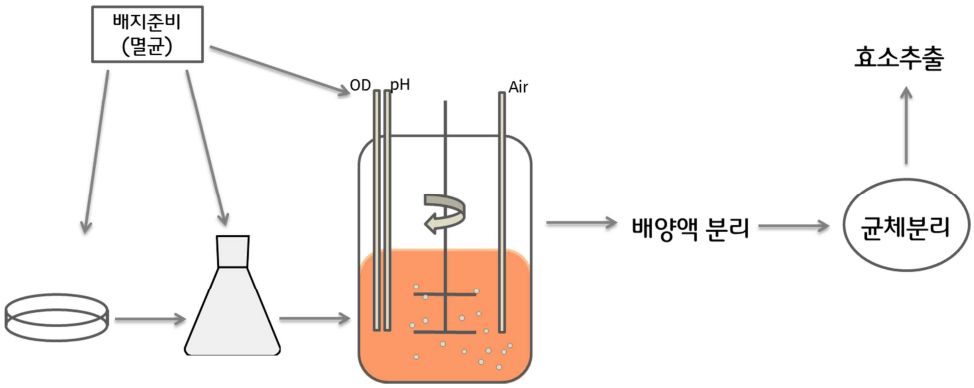


Figure 3. Schematic diagram for *E. coli* fermentation.

4. 분석방법

4.1 건조 균체량과 질소원 탄소원 측정

건조 균체량은 원심분리기를 이용해 8000 rpm 에서 10 분동안 원심분리하여 침전된 균체를 증류수로 세척한 후 60℃ dry oven 에서 24시간 건조시켜 건조 중량을 측정하였으며 건조 균체량과 OD 600 nm 에서 측정한 흡광도값과 균체량과의 상관관계를 고려하여 standard curve를 만들어 사용 하였다. 상관관계 그래프는 figure 4. 에 나타냈다. 암모늄 이온은 indophenol [24]방법으로 분석하였으며, 이 때 사용한 standard curve는 figure 5. 에 나타냈다. Glucose 농도는 dinitrosalicylic acid(DNS) [25] 방법을 이용하여 분석하였다 (figure 6). 분석에 사용된 분광광도계는 모델명: Ultraspec 2100 pro, 제조사: Biochrom Inc., 제조국가: England 를 이용하여 측정하였다.

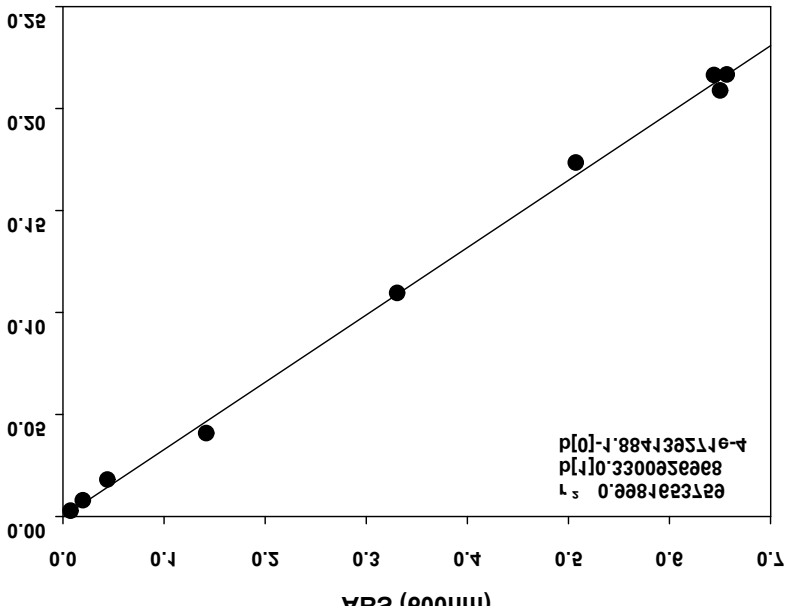


Figure 4. Standard curve for the determination dry *E. coli* weight.

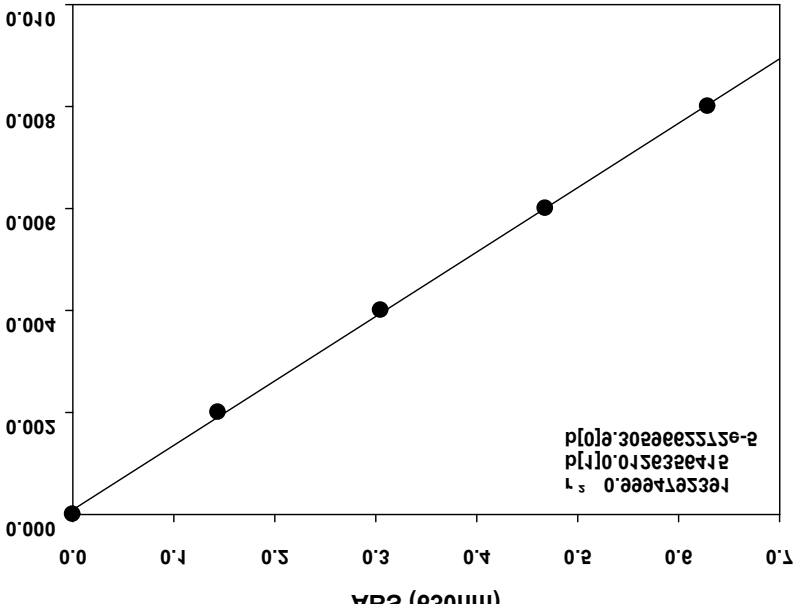


Figure 5. Standard curve for the determination of ammonium ion concentration.

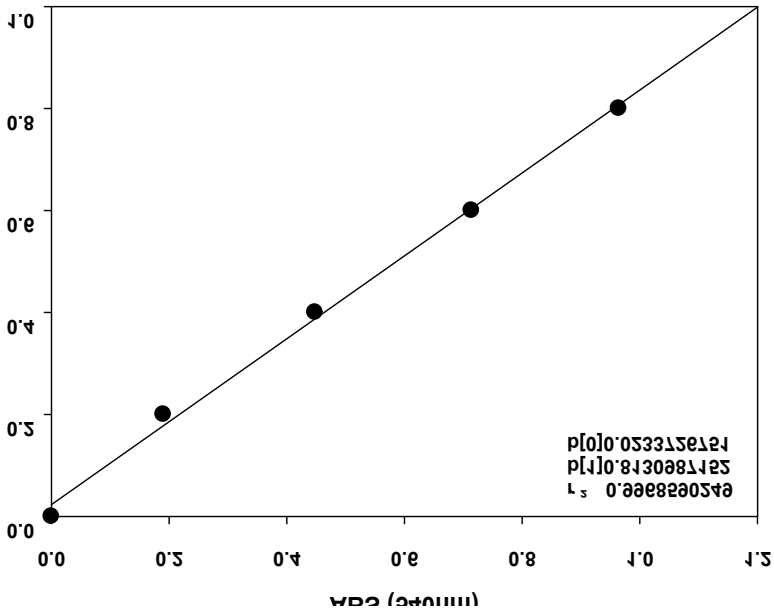


Figure 6. Standard curve for the determination of glucose concentration.

4.2 GAD activity 측정

추출된 효소를 이용해 GABA로 전환을 시키기 위해 GAD 반응을 먼저 한다. 0.1 M monosodium glutamate (MSG)를 0.4 ml, 조효소인 0.005 M PLP 를 0.1 ml, 추출한 GAD 효소를 0.5ml 로 30분 동안 37 ℃로 반응 시킨다. 분석은 gabase[26]법으로 60분간 25 ℃로 반응시킨 후 생성된 NADPH의 농도를 분석하였으며, 생성된 NADPH의 농도를 통해서 GABA농도를 확인하고, 생성된 GABA의 양을 이용해서 GAD의 activity를 분석하였다. 이때 GAD activity는 분당 생성된 GABA의 μM (μM/min)을 1unit 으로 정하였으며 specific GAD activity는 분당 생성된 GABA의 양을 균체량으로 나누어 주었다(unit/cell mass).

$$\text{GABA} + \alpha\text{-Ketoglutarate} \xrightarrow{\text{GABGT}} \text{Succinic Semialdehyde} + \text{Glutamate}$$

$$\text{Succinic Semialdehyde} + \beta\text{-NADP}^{+} \xrightarrow{\text{SSDH}} \text{cinate} + \text{NADPH}$$

Figure 7. Simplified diagram of gabase reaction.

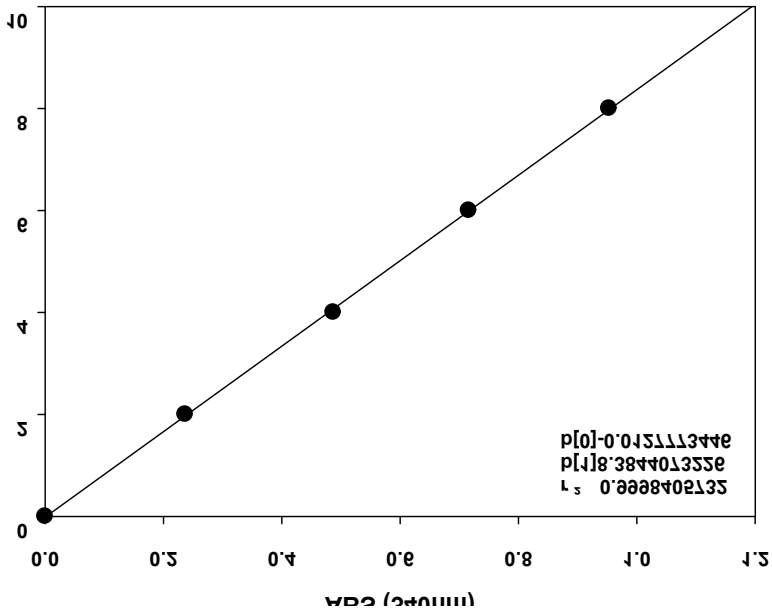


Figure 8. Standard curve for the determination of GABA concentration.

4.3 High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

GAD 반응을 한 후 생성된 GABA에 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzen (DNFB)[27] 로 발색을 시킨 후 HPLC로 측정하였다. 이동상은 (A) 0.05% TFA/water , (B) 0.05% TFA /ACN 을 사용하였다. 분석용 컬럼은 XRerra RP18 (5 ㎕, 4.6 x 100 mm)을 사용하고 UV-detection 400 nm 에서 분석 하였다. 이때, flow rate는 0.7 ml/min 이며 GABA의 표준물질을 만들어 peak의 면적을 이용해 standard curve를 만들었다.

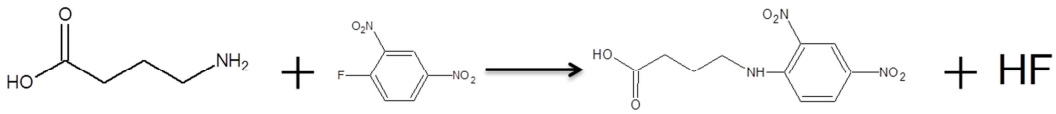


Figure 9. Simplified diagram of DNFB reaction.

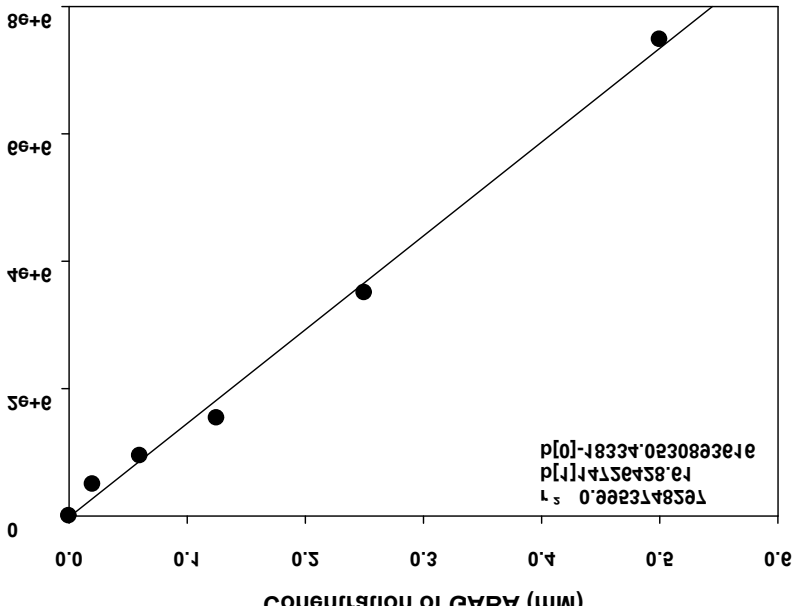


Figure 10. Standard curve for the determination of GABA concentration.

4.4 발효 조건 반응 표면 분석 (response surface methodology)

반응 표면 분석법 (Response surface method, RSM)은 여러 가지 실험 인자들, 즉 독립 변수의 상호작용에 따른 종속 변수의 변화에 대하여 최대 반응치를 나타내는 최적 조건을 찾아내기 위해 이용되는 통계적인 분석 방법이다. 따라서 각 실험의 주된 요인을 찾아내고, 요인들 간의 상호 작용이 있는가를 살펴보면서 반응 값에 미치는 요인들 가운데 어떠한 조합이 최대 반응치를 나타내는 가를 알아내기 위해서는 요인의 수준을 변경하면서 차례로 실험을 반복해야 한다[28-30]. RSM 을 통하여 독립변수들과 종속변수 사이의 함수관계를 데이터로부터 추정하여 독립변수들 값의 변화에 따라 반응량이 어떻게 달라지는 찾을 수 있고, 어떠한 독립변수가 반응량이 최적화 될 것인가를 예측 할 수 있으며, 가장 적은 수의 실험으로 자아 좋은 결과를 주는 실험계획법이 무엇인지를 통계적으로 찾을 수 있다[31].

본 연구에서는 ammonium sulfate와 glucose, 교반속도에 따른 반응 표면 분석을 하였다. 각각의 요인을 가지고 독립변수 (X1, X2)로 하고 배양 결과 생산되는 GAD activity를 종속변수 (Y)로 하였으며, 식 4-4-1의 반응 다항 2차 모형으로 적합하여 Y 값이 달라지는 값을 예측하였다.

$$f=Y_0+aX+bY+cX^2+dY^2 \qquad (4-3-1)$$

실험 결과는 sigma plot을 이용하여 통계적으로 분석하였으며, 분석결과는 각 반응의 조건 별로 실험 결과를 도출하여 예상 실험 조건을 찾았다.

제 3 장 실험결과

1. 배양 조건

1.1 초기 ammonium sulfate 농도에 따른 영향

2 L 발효조 에서 ammonium sulfate$(NH_4)_2SO_4$ 농도에 따른 발효 결과는 Figure 11과 같다. $(NH_4)_2SO_4$의 농도는 2 g/L, 4g/L , 6 g/L 로 나누어 실험을 하였고 나머지 조건은 온도 37 ℃, 200 rpm, 유속은 3 vvm, pH는 7로 한 후 정체 배양 하였다. 그 결과 $(NH_4)_2SO_4$를 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L 넣어 배양한지 24 시간 만에 건조 균체량은 2.1 g/L, 2.1 g/L, 2.3 g/L 로 $(NH_4)_2SO_4$를 6 g/L로 넣어 주었을 때, 건조 균체량이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

$(NH_4)_2SO_4$를 2 g/L, 4g/L, 6 g/L 넣어 배양한 조건의 최대 GAD activity의 값은 각각 159.5 unit, 272.1 unit, 274.8 unit 의로 4 g/L와 6 g/L의 $(NH_4)_2SO_4$에서 비슷하게 나타났고, specific GAD activity는 각각 2.3, 3.7, 3.8 unit/cell mass 로 4 g/L와 6 g/L의 $(NH_4)_2SO_4$에서 비슷하게 측정되었다.

이 실험을 바탕으로 4 g/L와 6 g/L 에서 GAD activity나 specific activity가 비슷하게 나왔지만 균체량은 6 g/L에서 좀더 높게 생산되어. 6 g/L 의 $(NH_4)_2SO_4$가 최적 배지 농도로 생각하고 나머지 실험을 진행 하였다.

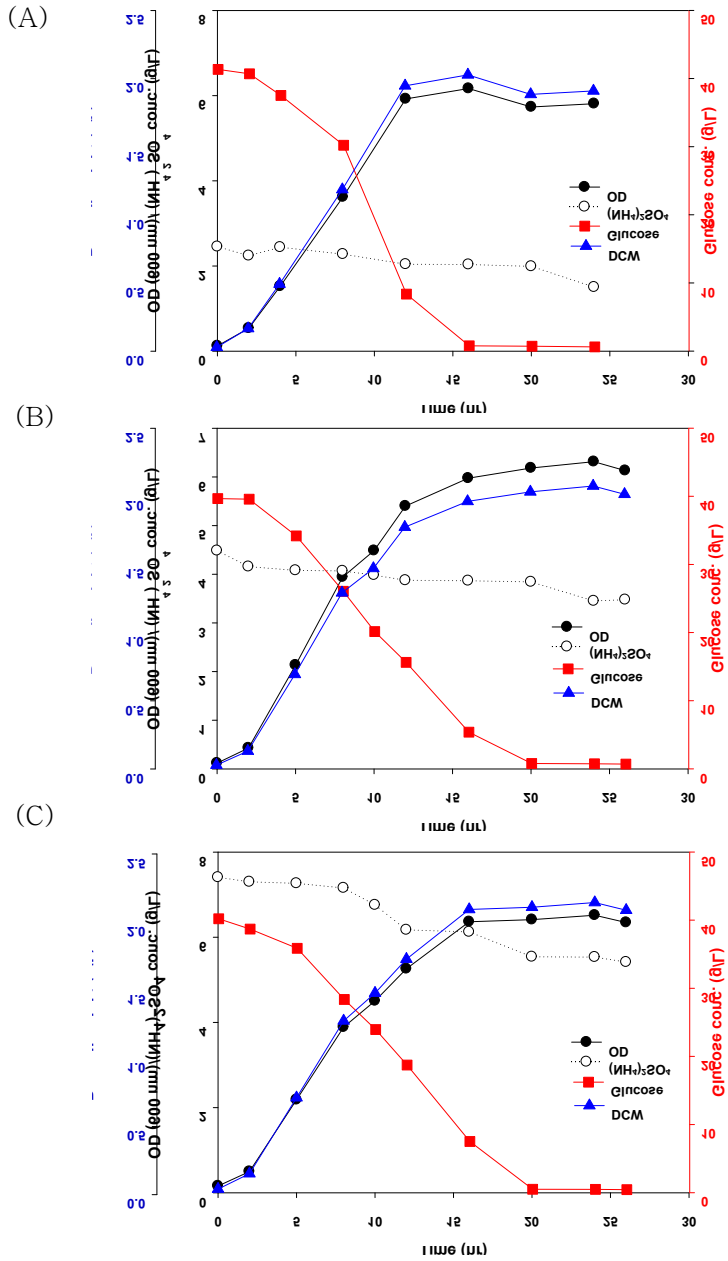


Figure 11. Effect of $(NH_4)_2SO_4$ concentration on cell growth; (A) 2 g/L, (B) 4 g/L, and (C) 6 g/L.

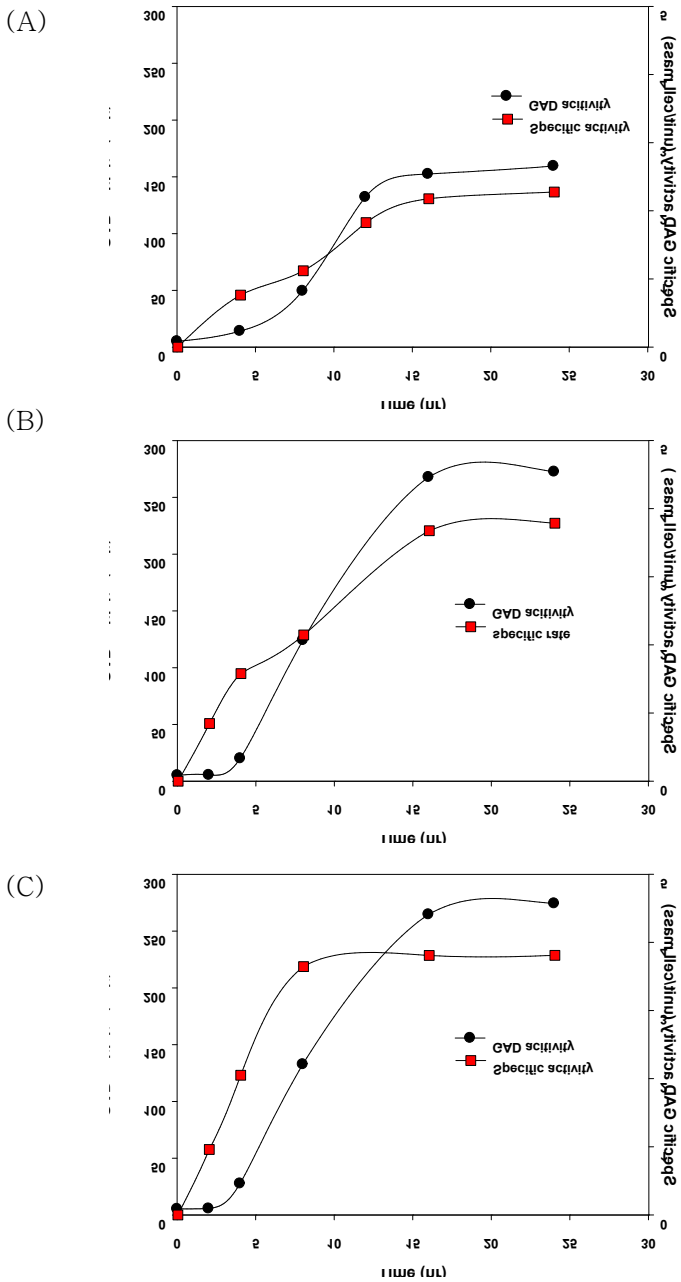


Figure 12. Effect of $(NH_4)_2SO_4$ concentration on GAD activity and specific GAD activity;(A) 2 g/L, (B) 4 g/L, and (C) 6 g/L.

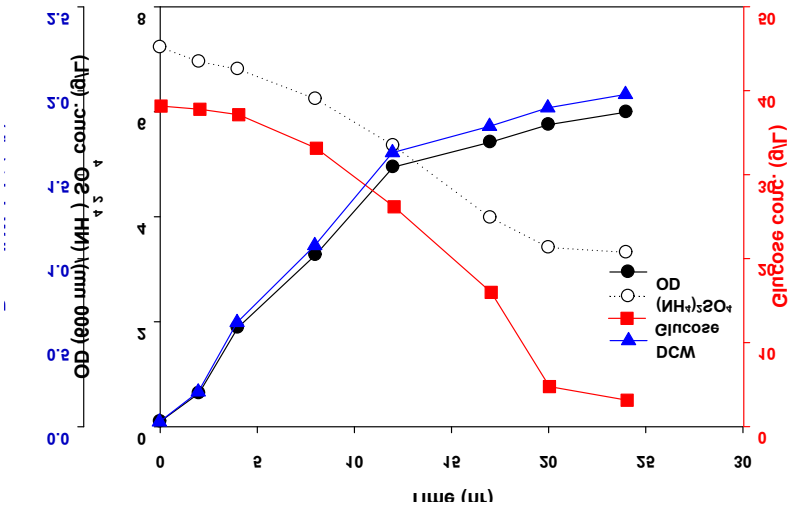
Table 2. Effects of $(NH_4)_2SO_4$ concentration on cell mass, GAD activity, and specific GAD activity

$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
2	2.1	159.5	2.3
4	2.1	272.1	3.7
6	2.3	274.8	3.8

1.2 초기 magnesium sulfate 농도에 따른 영향

미생물의 성장에서 미량원소는 철, 망간, 아연, 코발트, 니켈, 구리 등이 있으며, 이러한 미량원소는 효소의 활성화 인자로 작용하는 경우가 대부분이다. 이러한 효소의 활성이 높아지면 미생물이 필요로 하는 영양소의 전환 및 생성이 증가되고 이러한 이유로 균체량의 증가 결과를 도출할 수 있다. 본 연구에서는 2 L교반발효조 에서 미량원소에 따른 발효 결과를 Figure13에 나타냈다. Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 의 농도는 0.2 g/L와 0.4 g/L 로 나누어 실험을 하였고 나머지 조건은 온도 37 ℃, 200 rpm, 유속은 3 vvm, pH는 7로 한 후 정체 배양 하였다. 그 결과 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.2 g/L, 0.4g/L 넣어 배양한지 24 시간 만에 건조 균체량은 2.1 g/L, 1.9g/L로$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.2g/L로 넣어 주었을 때, 건조 균체량이 좀 더 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.2 g/L, 0.4g/L 넣어 배양한지 24시간 동안의 GAD activity의 값은 각각 274.1 unit, 291.4unit 이고 specific GAD activity는 각각 3.8, 3.9 unit/cell mass 로 0.2 g/L 와 0.4 g/L 의 $MgSO_4$의 초기 농도의 영향은 비슷한 확인 할 수 있었다. 이 실험을 바탕으로 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$의 초기 조건 변화 시 비슷한 activity를보였으나 0.2 g/L 의 건조 균체량이 높아 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$초기 배지 농도를 0.2g/L 나머지 실험을 진행 하였다. 재조합 균주로 부터 생산된 GAD는 균이 배출하는 형태의 효소가 아니고 균의 내부에 존재하기 때문에 균체량의 증가는 GAD의 증가로 이어질 수 있다.

(A)



(B)

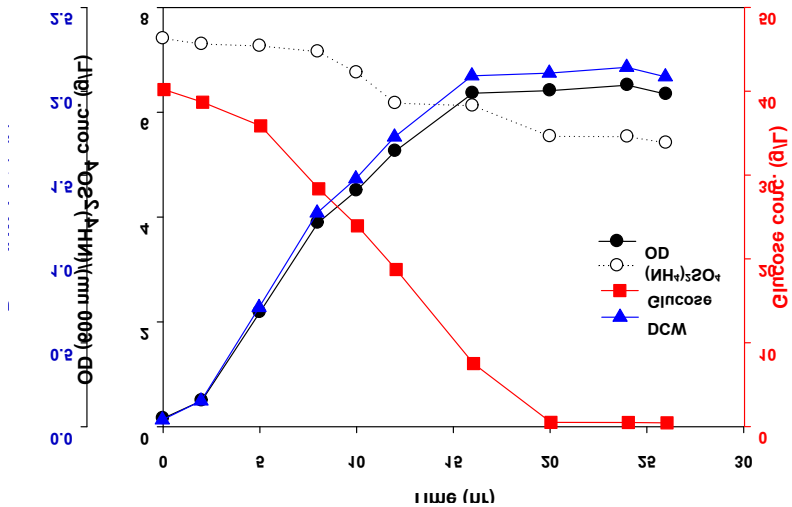
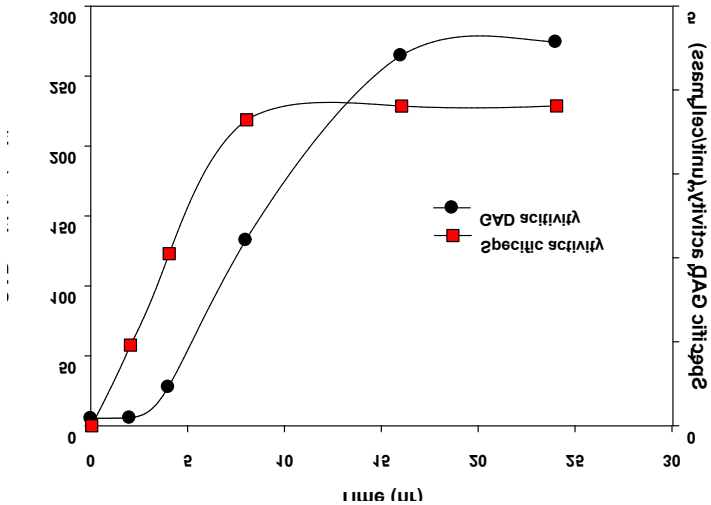


Figure 13. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on cell growth; (A) 0.2 g/L and (B) 0.4g/L.

(A)



(B)

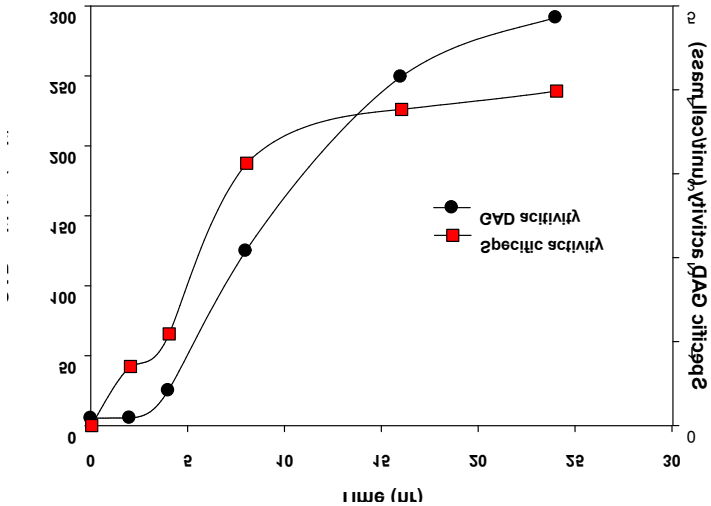


Figure 14. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on GAD activity and specific GAD activity; (A) 0.2 g/L and (B) 0.4g/L.

Table 3. Effects of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on cell mass, GAD activity, and Specific GAD activity

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
0.2	2.1	274.1	3.8
0.4	1.9	291.4	3.9

1.3 초기 mono sodium glutamate(MSG)농도에 따른 영향

GABA 생산의 전구체인 MSG를 첨가하여 GAD 발현을 유도하기 위해 배지에 MSG를 첨가하여 생성된 GAD의 activity를 비교하였다. 먼저 플라스크 상태에서 2 L 조건의 배양 배지 상태로 MSG 농도를 0, 10, 20, 50 g/L 로 변화를 주어 37℃에서 12시간 배양 시켰다. 그 결과 20 g/L 조건에서 가장 높은 GABA가 생산됨을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 2 L발효조에 적용하여 실험 하였다.

그 결과 MSG를 첨가하지 않았던 실험군과 동일하게 탄소원인 glucose는 완전히 소모되는데 20시간이 소요되었으며, 균체량도 동일한 결과를 나타냈다. 그에 따른 성장 곡선은 figure 15. 와 같다. 하지만, GAD activity의 값은 274.8 unit 에서 283.4unit 로 증가하였고 specific GAD activity 또한 3.8 unit/cell mass 에서 4.1 unit/cell mass 로 증가 함을 알 수 있었다. 그에 따른 시간대별 activity는 figure16. 과 같다. 이러한 결과는 배지에 존재하는 MSG를 성장원으로 이용하기 위하여 GAD가 더 많이 발현이 되어 나타난 결과이다. 다른 문헌에 에서도 MSG를 첨가 발효 하였을 때 GAD의 생산이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.[13] GAD를 더 발현하여 MSG를 성장원으로 이용하였으나, 균체량의 증가는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 배지내에 존재하는 glucose의 농도가 과량으로 존재하기 때문에 glucose에 의한 균체 성장이 더욱 용이하기 때문에 MSG에 의한 균체량의 성장이 두드러지게 나타나지 않은 것으로 생각된다.

이 실험을 토대로 MSG를 첨가 함으로써 재조합*E. coli*의 GAD 발현을 유도 하였음을 확인 하였으며, 이 후의 실험은 MSG의 농도를 20 g/L로 고정하여 실험을 진행하였다.

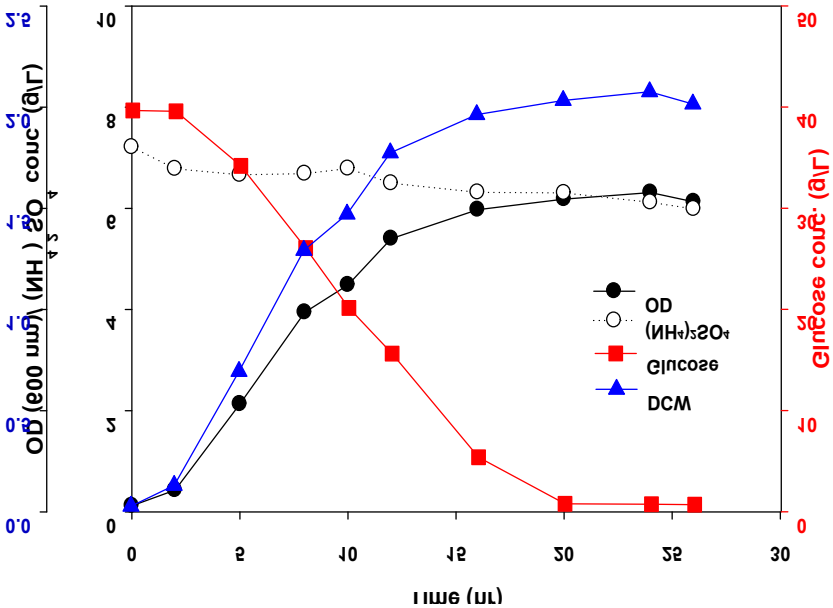


Figure 15. Effect of monosodium glutamate(MSG) on cell growth.

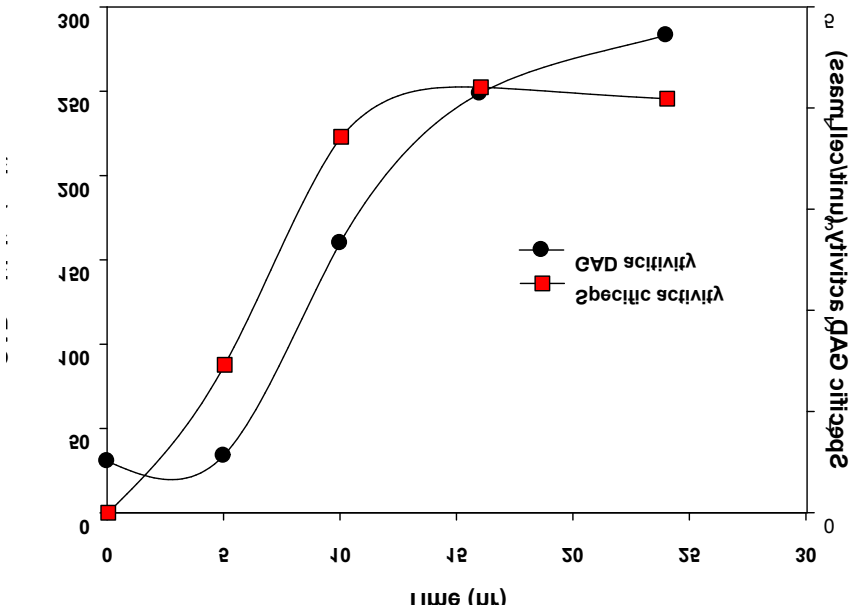


Figure 16. Effect of MSG on GAD activity and specific GAD activity.

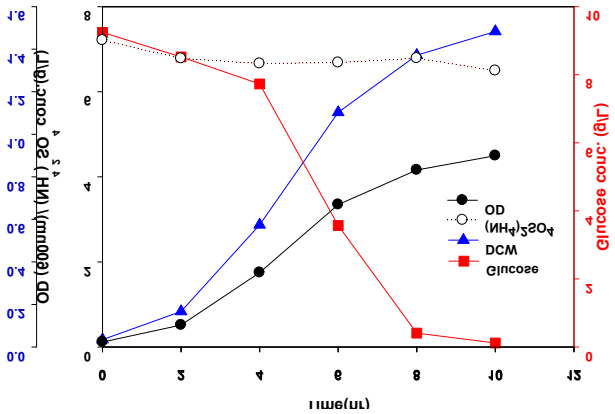
Table 4. Effects of MSG concentration on cell mass, GAD activity, and specific GAD activity

MSG (g/L)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
0	2.1	274.1	3.8
20	2.1	291.4	4.1

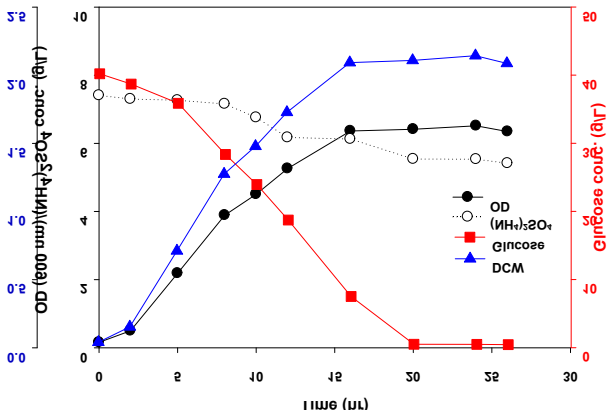
1.4 초기 glucose농도에 따른 영향

Glucose는 균의 성장에 필요한 필수원소 중 탄소원을 공급하기 위한 영양소로 균의 성장에 절대적으로 필요한 원소이다. 이러한 탄소원은 과량으로 존재할 경우 균의 성장을 저해하기도 한다. 또한 균의 종류 및 상태에 따라서 소모되는 경향도 상의하게 변할 수 있다. 본 연구에서 glucose는 기본적으로 *E. coli*의 성장에 사용되는 농도 범위에서 적용되었으며, 2 L교반발효조 에서 glucose 농도에 따른 발효 결과는 figure 17. 과 같다. Glucose의 농도는 10 g/L, 40 g/L와 60 g/L 로 나누어 실험을 하였고 나머지 조건은 온도 37℃, 200 rpm, 유속은 3 vvm, pH는 7고정하여 정체 배양 하였다. 발효시간은 glucose를 모두소비 하는 시점에서 발효를 정지 하고 균을 분리하여 효소를 추출하였다. 그 결과 10g/L시 8시간때 모든 glucose를 소비하며 정체기에 이르렀고 건조 균체량은 1.4 g/L 였다. 40 g/L에서는 20시간에 glucose를 모두 소비 하였고 균체량은 2.1 g/L 였다. 마지막으로 60 g/L 에서는 28시간에 glucose를 거의 소모 하였고 정체기에 접어들어 발효를 중지 하였다. 60 g/L 에서 균체량이 증가 할 것으로 예상 하였으나 초기 고농도의 기질 첨가로 성장 저해 현상이 나타나 건조 균체량은 40 g/L와 같은 2.1 g/L였다. 이때의 activity를 살펴 보면 GAD activity는 각각 76.2 unit, 248.6 unit, 220.0 unit으로 40 g/L 가 가장 높고 specific GAD activity 또한 1.8, 4.2, 3.0 unit/cell mass 으로 40 g/L에서 가장 높게 나타났다. 본 연구에서는 glucose 농도를 40 g/L 일대 최적 탄소원 농도임을 확인 할 수 있었다.

(A)



(B)



(C)

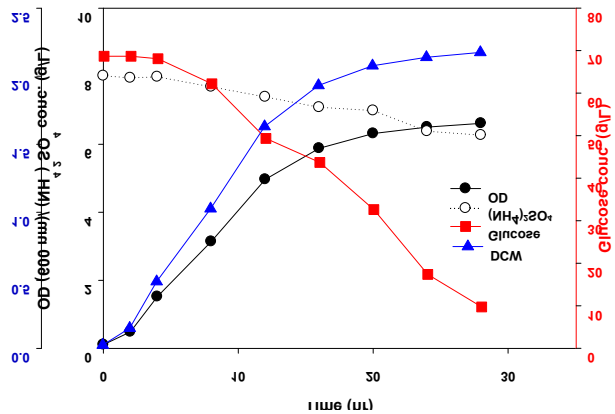
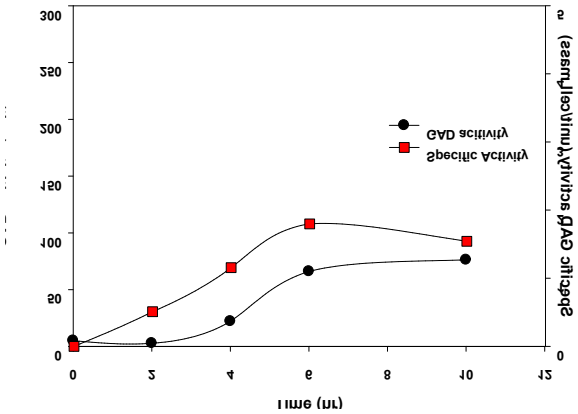
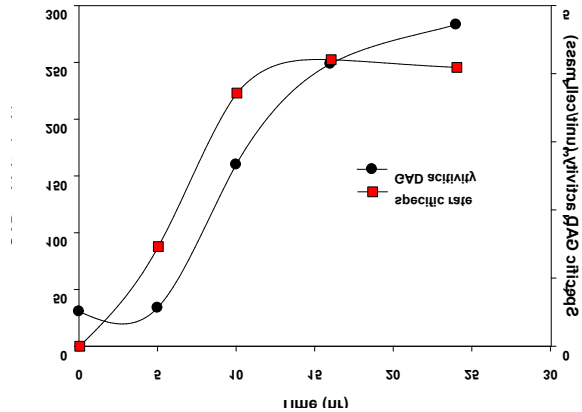


Figure 17. Effect of glucose concentration on cell growth; (A) 10 g/L, (B) 40 g/L and (C) 60 g/L.

(A)



(B)



(C)

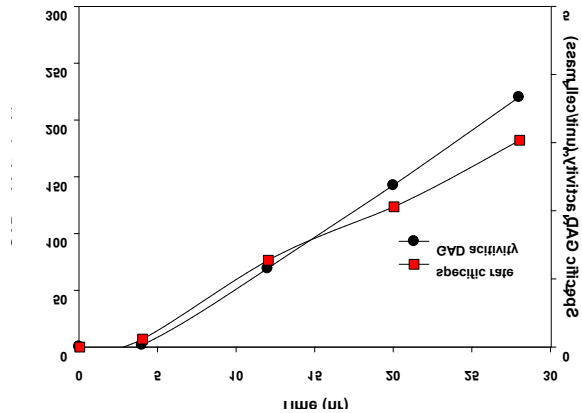


Figure 18. Effect of glucose concentration on GAD activity and specific GAD activity; (A) 10 g/L, (B) 40 g/L, and (C) 60 g/L.

Table 5. Effects of glucose concentration on cell mass, GAD activity, and specific GAD activity

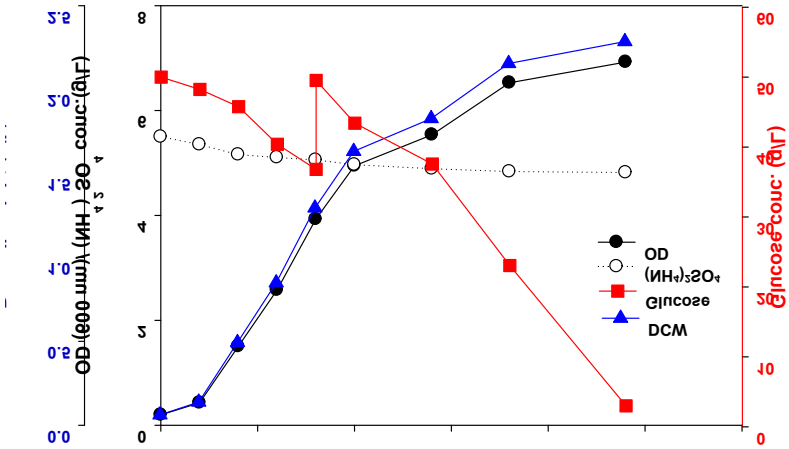
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
10	1.4	76.2	1.8
40	2.1	248.6	4.2
60	2.1	220.0	3.0

1.5 유가식 배양 공정의 영향

균체량을 증가시켜 GAD 생산을 늘리기 위해 유가식 배양 공정을 도입하였다. glucose 농도를 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L 로 초기 조건을 설정 하였다. Glucose 초기 농도 40 g/L으로 하여 지수 성장기 때 초기 glucose 농도 와 같아 질 수 있도록 glucose를 첨가 하여 24시간 배양 하였다.이때 건조 균체량은 2.3 g/L GAD activity는 124.8 unit 이며, specific GAD activity는 1.7 unit/cell mass 로 나타났다(figure 19). 초기 glucose 농도 40 g/L 에서 정체기 때 초기 glucose 농도의 절반으로 기질을 첨가 하여 30시간 동안 배양 하였다. 건조 균체량은 1.9 g/L로 더 감소 되었고 GAD activity specific GAD activity 또한 각각 94.7 unit, 1.5 로 각각 감소 하였다(figure 20) 초기 기질 저해 현상을 막기 위해 20 g/L 와 10 g/L 로 각각 glucose 농도를 감소 시켰다. 초기 glucose 농도 20 g/L 에서 지수 성장기와 정체기 두번에 나누어 기질 첨가를 했을 때 24간 동안 배양결과는 건조균체량이 2.2 g/L GAD activity, specific GAD activity 각각 88.2 unit, 1.6 unit/cell mass 으로 나타났으며(figure 21), 10 g/L에서는 초기 기질 농도가 낮기 때문에 glucose 소비 속도가 빨라져 반복적으로 기질을 첨가 하였다. 그 결과 100시간 동안 발효를 할 수 있었고 건조 균체량은 3.7 g/L GAD activity specific GAD activity 각각 337.3 unit, 3.6 unit/cell mass 으로 가장 높은 값을 얻을 수 있었다(figure 22).

유가식 배양은 정치배양을 했을 때보다 건조 균체량은 증가하였지만, GAD activity 와 specific GAD activity 가 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다. 본 연구에서는 GAD 의 생산과 활성이 중요하기 때문에 유가식배양을 통한 균체량의 증가는 활성을 저해하기 때문에 선정하지 않고 정치배양을 선정하였다.

(A)



(B)

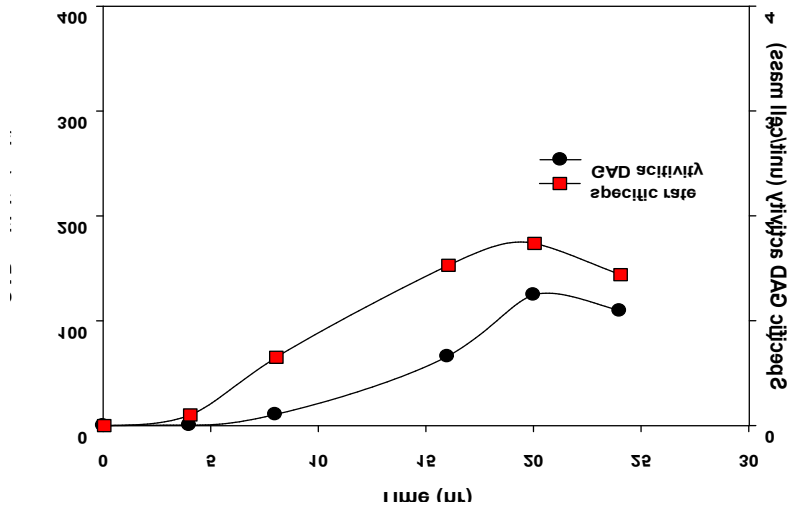
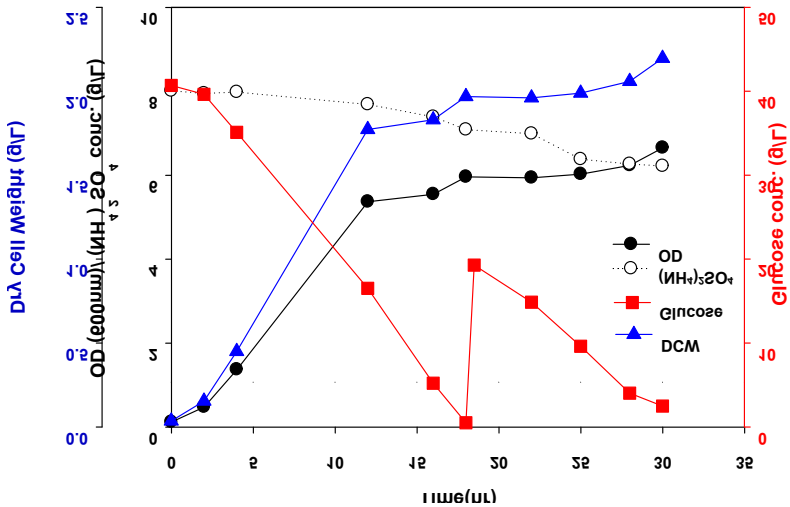


Figure 19. Effect of glucose(2 M, 100 ml)addition at 8 hr (A) growth curve and (B) GAD activity and specific GAD activity with the fed-batch culture.

(A)



(B)

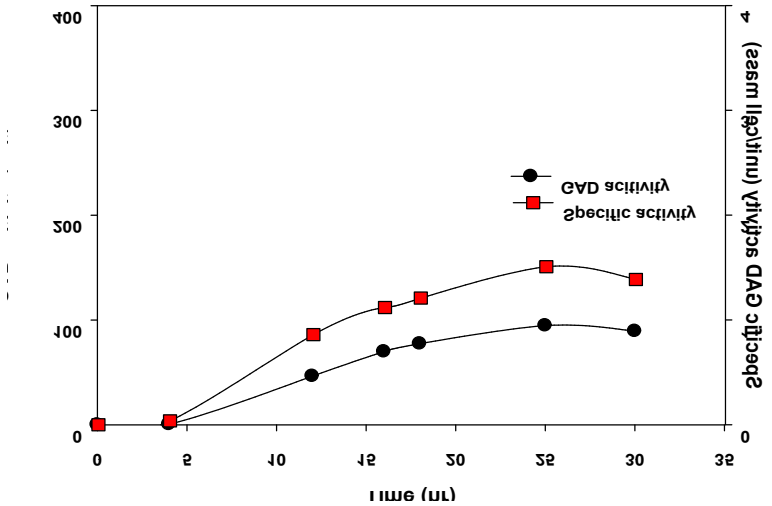
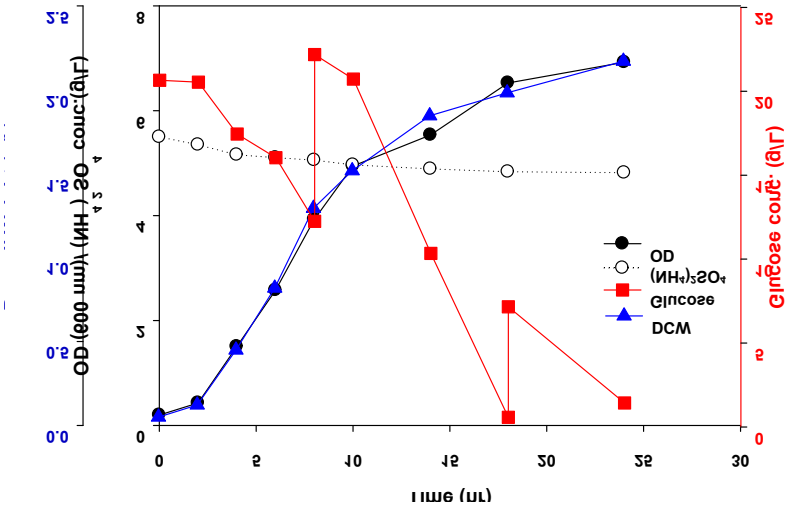


Figure 20. Effect of glucose (2 M, 100 ml) addition at 18 hr (A) growth curve and (B) GAD activity and specific GAD activity with the fed-batch culture.

(A)



(B)

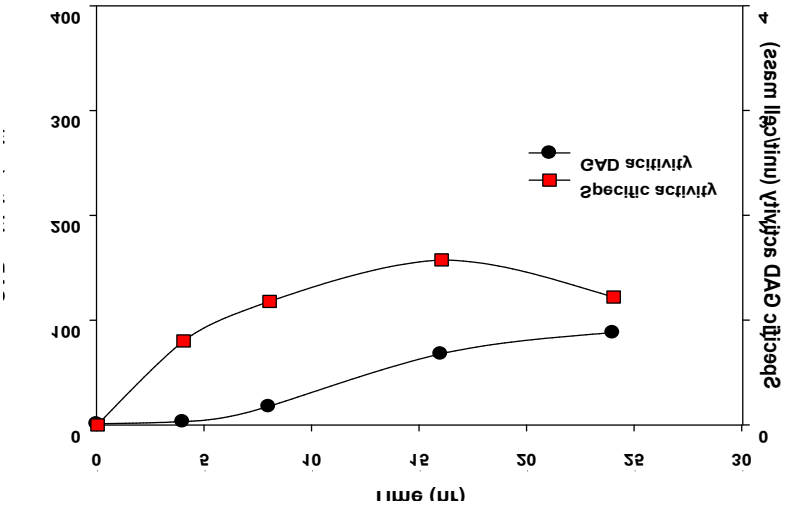
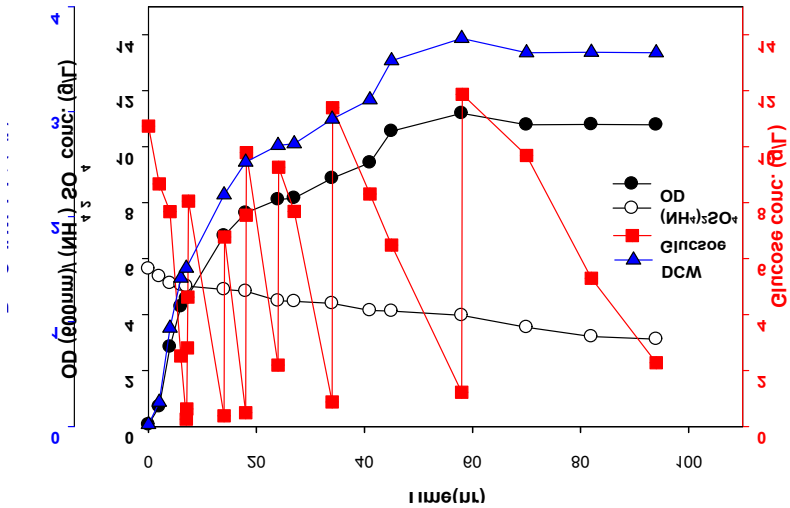


Figure 21. Effect of glucose (2 M, 50 ml)addition at 8, 18 hr (A) growth curve and (B) GAD activity and specific GAD activity with the fed-batch culture.

(A)



(B)

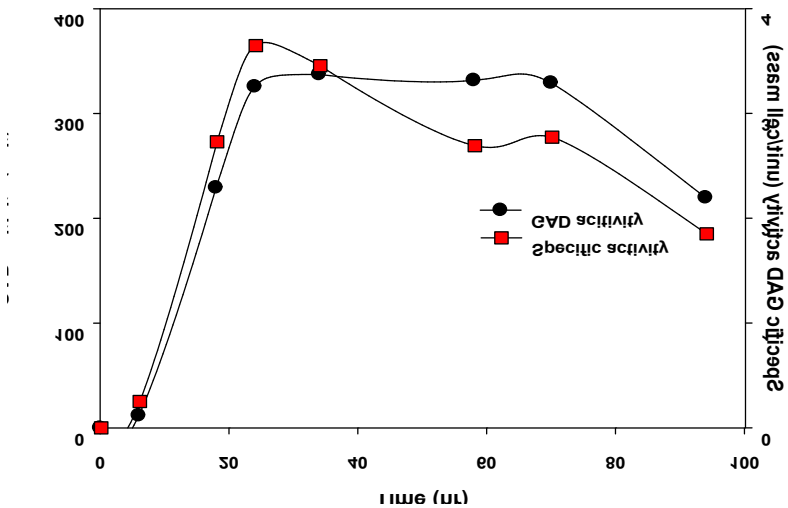


Figure 22. Effect of glucose (2 M, 25 ml) addition (A) growth curve and (B) GAD activity and specific GAD activity with the fed-batch culture.

Table 6. Effects of fed-batch on cell mass, GAD activity, and specific GAD activity

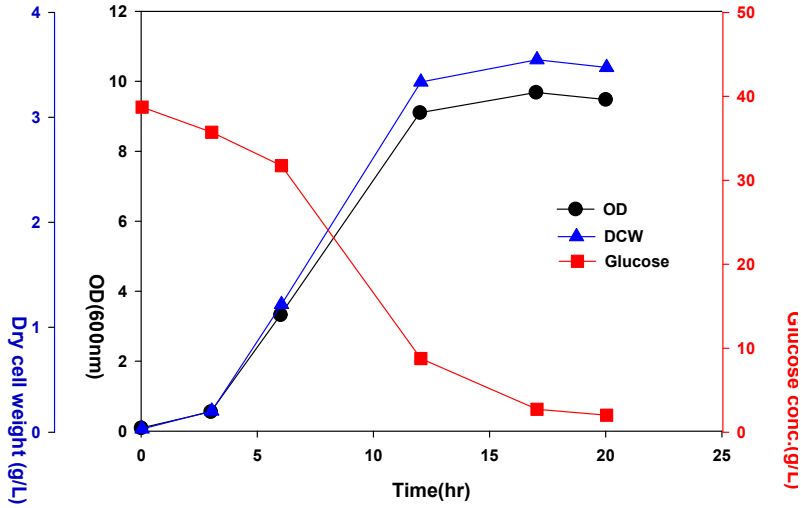
Glucose (g/L)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
40-1	2.3	124.8	1.7
40-2	1.9	94.7	1.5
20	2.2	88.2	1.6
10	3.7	337.3	3.6

1.6 교반속도에 따른 영향

산소 공급이 발효에 미치는 영향이 중요한 것으로 알려져 있다. 배양반응기에서 유입된 공기중의 산소가 균체에 이동할 때는 몇가지 단계를 거치게 되는데 첫번째 단계로, 기포로부터 액중으로의 산소가 이동된 후 균체에 의한 산소의 섭취 단계로 이루어 진다. 이러한 산소 전달 단계에서 기포산소가 액중으로 용해되는 단계를 높이기 위한 방법 즉, 산소이동의 저항을 낮추기 위한 방법으로 반응기 특성에 따라 교반속도를 증가시키거나 aeration rate을 높여 문제를 해결할 수 있다. 이러한 문제점을 가지고 본 연구에서는 교반속도에 대한 영향을 알아보았다. 균 배양조건은 37℃, aeration rate 3 vvm으로 정하고 교반속도를 200-400 rpm 으로 변화를 하여 생성된 재조합 *E. coli*의 균체량과 분리된 GAD의 활성을 측정하였다. 그에 따른 성장곡선은 figure 23나타내었다.

300 rpm과 400 rpm으로 배양시 건조 균체량은 3.5 g/L에서 3.7 g/L로 0.2 g/L증가하였고 GAD activity 는 468.9 unit 과 424.7 unit이고 specific GAD activity는5.4 unit/cell mass 로 200 rpm 보다 2배정도 높게 나타났다. 이러한 결과는 교반속도의 증가로 인하여 산소이동저항값이 낮아지고 낮아진 산소저항만큼 균체량이 증가하여 나타난 결과로 생각된다. 하지만 이러한 교반속도의 증가는 산소저항을 낮추지만, 과도한 전단력으로 인하여 균체의 손상을 야기시킬 수 있다.[38] 또한 기계의 한계성 문제로 인하여 교반속도를 300~350 rpm 정도로 결정하여 나머지 실험에 적용하였다..

(A)



(B)

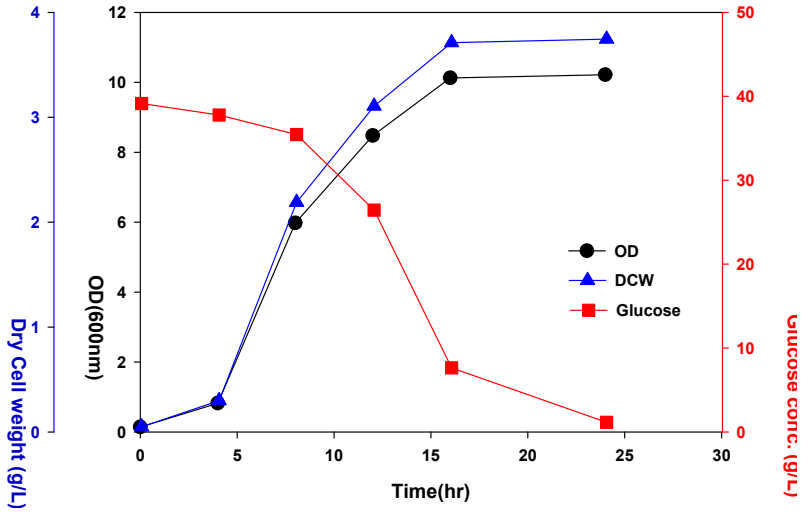
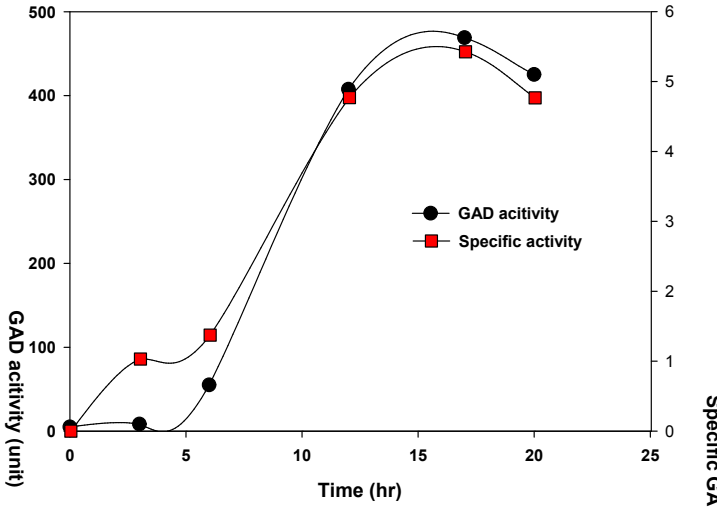


Figure 23. Effect of agitation speed on cell growth; (A) 200 rpm, (B) 300 rpm, and (C) 400 rpm.

(A)



(B)

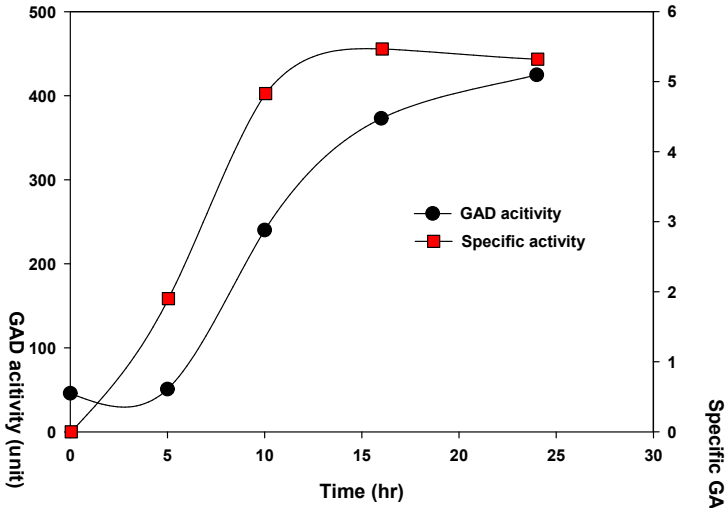


Figure 24. Effect of agitation speed on GAD activity and specific GAD activity; (A) 200 rpm, (B) 300 rpm, and (C) 400 rpm.

Table 7. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on DCW, GAD activity, and Specific GAD activity

Agitation speed (rpm)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
200	2.1	274.1	3.8
300	3.5	468.9	5.4
400	3.7	424.7	5.3

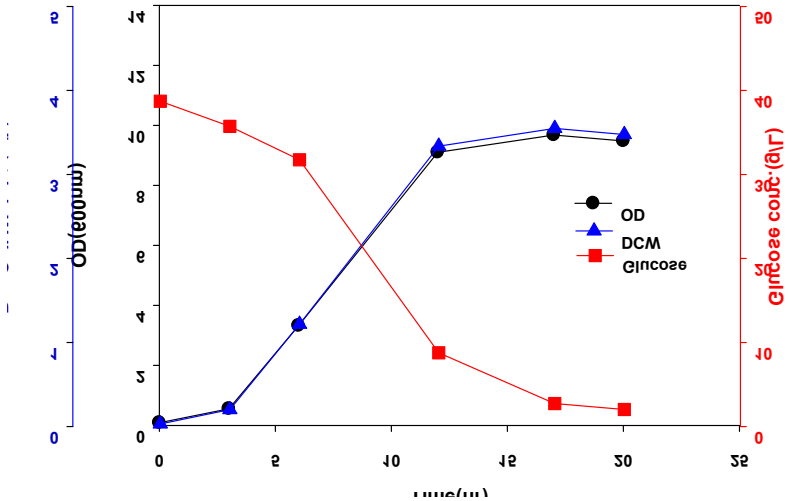
1.7 Aeration rate에 의한 영향

산소전달 속도(oxygen transfer rate)를 증가시키기 위한 방법으로는 교반속도의 증가와 통기량을 높이는 방법이 있다. 이중 전 실험에서 교반속도의 증가를 통한 산소전달 속도의 증가를 실험하였으며, 교반속도 만으로는 산소전달 속도의 증가에 한계가 존재하여 통기량의 증가를 통하여 산소전달 속도를 더욱 증가시켰다. 실험시 사용하는 발효기의 교반기 속도의 한계로 산소의 공급을 더욱 증가하기 위하여 aeration rate을 3, 5, 7 vvm 으로 변화를 주었다. 그에 따른 성장 곡선은 figure 25에 나타내었다.

Aeration rate을 5 vvm 으로 배양시 건조 균체량은 3.5 g/L로 증가하였고 GAD activity 와 specific GAD activity는 468.9 unit과 5.4 unit/cell mass 로 200 rpm 보다 2배가량 증가 하였고 7 vvm 으로 배양시 건조 균체량은 3.9 g/L GAD activity 와 specific GAD activity는 764.3 unit 과 5.7 unit/cell mass 로 3배 가량 증가 하였다. 이러한 결과는 호기성 균인 *E. coli*에서 나타나는 경향성과 동일한 결과이며, 산소전달 속도의 증가가 균체량 증진과 관계가 있는 다른 연구결과와도 일치하는 결과이다.[38]

이로부터 본 연구에서는 교반속도와 aeration rate에 의한 영향을 알아보았고 본 연구에 사용된 재조합 대장균은 최적 배양 조건은 정치배양이고 다량의 air를 수요함을 알 수 있었다.

(A)



(B)

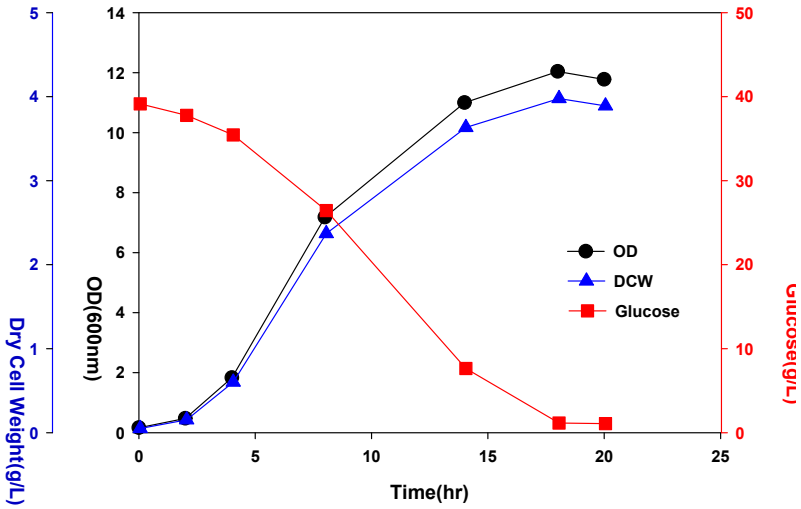
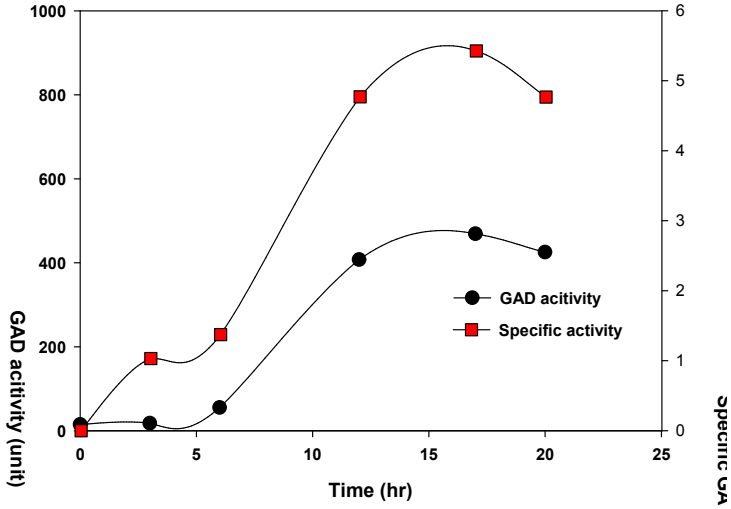


Figure 25. Effect of aeration rate on; (A) 3 vvm, (B) 5 vvm, and (C) 7 vvm.

(A)



(B)

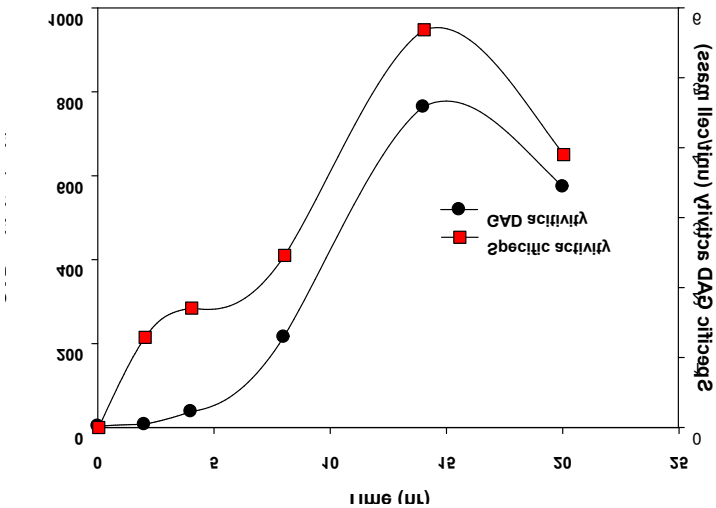


Figure 26. Effect of aeration rateon GAD activity and specific GAD activity; (A) 3 vvm, (B) 5 vvm, and (C) 7 vvm.

Table 8. Effects of aeration rate on cell mass, GAD activity, and specific GAD activity

Aeration rate (vvm)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
3	2.1	274.1	3.8
5	3.5	468.9	5.4
7	3.9	764.3	5.7

1.8 pH 에 따른 영향

재조합 *E. coli*는 대부분 pH 7 조건에서 성장이 활발하며, 균체량 증가도 높다. 하지만 생성된 GAD의 안정성 및 최적의 pH는 5.5로 알려져 있다. 이러한 조건을 확인하기 위하여 배양 pH에 따른 균체량의 변화와 생성된 GAD의 활성분석이 필요하다.

GAD의 최적 pH 는 5.5로 *E. coli* 에서 GAD 발현을 유도하기 위해 발효조의 초기pH를 5.5로 하였다. 온도는 37℃, 교반 속도는 300 rpm, aeration rate은 7 vvm으로 하였고 20시간 동안 배양 하였다. 그에 따른 성장곡선은 figure27에 나타내었다.

그 결과 초기 pH 를 5.5 로 배양했을 때 건조 균체량은 3.7 g/L 로 앞의 실험과 비슷하였으나 균체량 대비 GAD activity 와 specific GAD activity 는 834.7 unit 과 6.6 unit/cell mass 로 aeration rate 조건 7 vvm 보다 2 배가량 증가 함으로써 pH 변화로 *E. coli* 내에서 GAD 발현이 유도 되었음을 알 수 있었다. 다른 연구에서 또한 pH 4 에서는 균체가 자라기 힘든 조건이었고, pH 7 에서 보다 pH 5-5.5 부분에서 GAD 생산이 더 좋은 것을 확인 할 수 있었다[33].

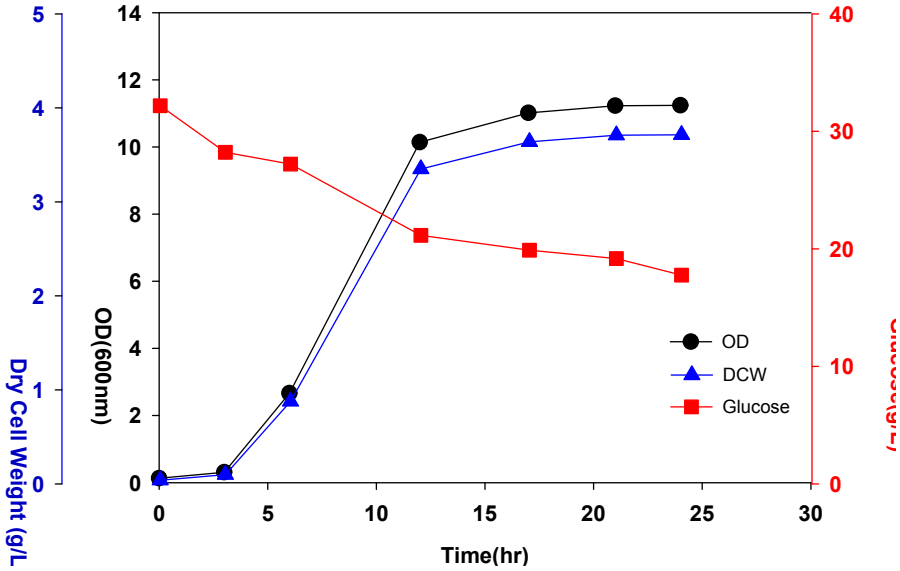


Figure 27. The cell growth and glucose consumption at pH 5.5.

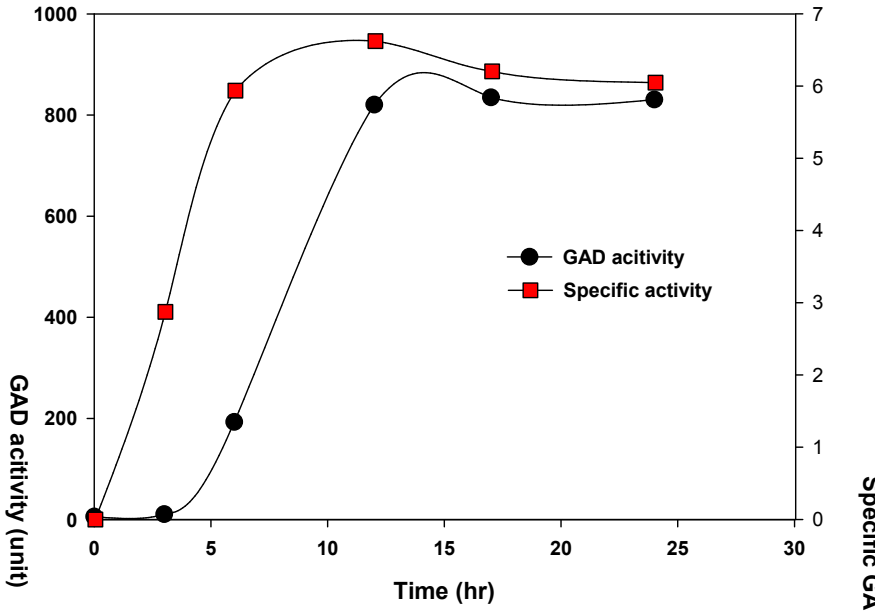


Figure 28. Change at pH 5.5 on GAD activity and specific GAD activity.

Table 9. Effects of pH on cell mass, GAD activity and specific GAD activity

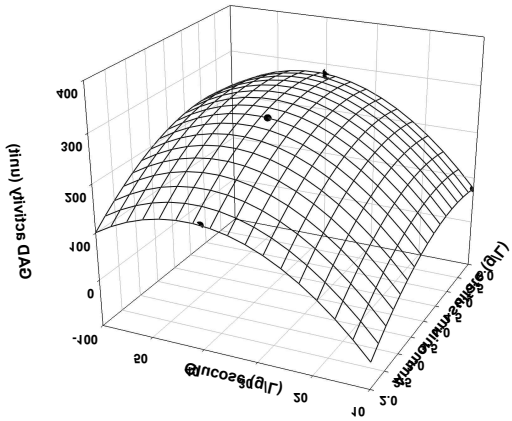
Fermentation pH	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
5.5	3.7	834.7	6.6
7	3.9	764.3	5.7

1.9 발효 조건 표면 분석

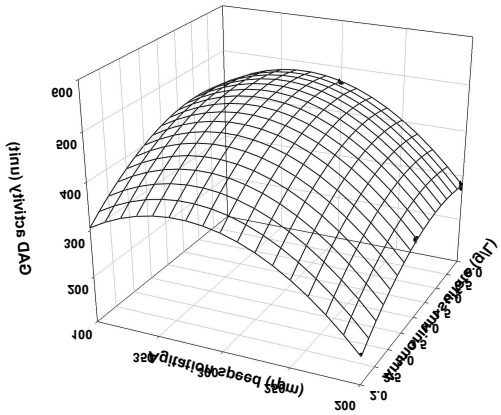
본 연구에서 배지의 조성중의 $(NH_4)_2SO_4$ 와 glucose 발효 조건의 교반속도에 대하여 GAD activity를 능선분석을 수행하여 반응표면을 살펴 보았다. $(NH_4)_2SO_4$ 와 glucose의 농도에 따른 GAD activity의 반응표면은 점차 증가하다가 glucose 40 g/L 에서 감소하며 $(NH_4)_2SO_4$ 가 4 −6 g/L 에서 가장 높은 값을 나타내었다. Agitation speed와 $(NH_4)_2SO_4$ 관계에서도 300 rpm 과 $(NH_4)_2SO_4$ 가 4 −6 g/L 에서는 가장 높은 반응 표면을 보이고 있다. 그리고 glucose와 agitation speed의 경우 에서도 glucose 40 g/L와 300 rpm 부분에서 가장 높은 표면 값을 나타냈었다(figure 29).

본 실험값으로 얻어진 반응표면분석(RSM)을 통해 실험실 조건으로 최적의 배양 상태를 고정하여 균체의 성장률과 높은GAD activity를 얻기 위한 실험을 시행하였다.

(A)



(B)



(C)

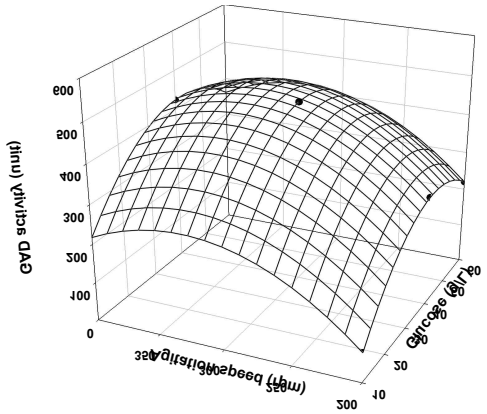


Figure 29. Surface response result of GAD activity according to the change of (A) ammonium sulfate : glucose, (B) ammonium sulfate : aeration rate, and (C) glucose : agitation speed.

Table 10. Estimated regression coefficients for total GAD activity (A) ammonium sulfate : glucose, (B) ammonium sulfate : agitation speed, and (C) glucose : agitation speed)

(A)	Coefficient	Std. Error	t	P
y_0	−407.43	28.8597	−14.1176	0.045
a	136.3775	15.1448	9.0049	0.0704
b	16.4325	0.7346	22.3683	0.0284
c	−13.3213	1.8366	7.2533	0.0872
d	−0.1936	0.0105	−18.3633	0.0346
(B)	Coefficient	Std. Error	t	P
y_0	−1143.75	65.4082	−17.4863	0.0364
a	136.3775	15.1448	9.0049	0.0704
b	7.7633	0.4357	17.8163	0.0357
c	−13.3212	1.8366	−7.2533	0.0872
d	−0.0117	0.0007	−15.9563	0.0398
(C)	Coefficient	Std. Error	t	P
y_0	−1.22E+03	3.89E+02	−3.1341	0.0885
a	2.10E+01	4.15E+00	5.07E+00	0.0368
b	7.85E+00	2.99E+00	2.63E+00	0.1194
c	−2.50E−01	6.37E−02	−3.92E+00	0.0592
d	−1.23E−02	5.00E−03	−2.46E+00	0.1333

2. GABA의 대량 생산

본 연구를 토대로 재조합 대장균으로부터 활성이 좋은 GAD를 생산하여 GABA를 대량 생산 하였다. 앞서 실험에서 확립시킨 발효 조선으로 GAD의 생산성을 증진시킨 뒤, 생산된 GAD를 이용한 고농도의 monosodium glutamate(MSG) 를 전환하는 공정의 확립이 필요하였다. 효소반응에서는 고농도의 기질을 전환시킬 때, 기질저해 및 생성물 저해가 일어나게 된다. 따라서 본 연구에서는 활성을 증진시킨 GAD를 이용하여 고농도의 MSG를 전환하기 위하여 효소반응 조건을 확립하였다.

최근 보고된 바에 의하면 GABA를 생산하는 유산균 발효 제법을 이용한 경우 GABA의 함량이 250-700 mg/100 g 의 함량을 보이는 [1] 본 연구를 통해 얻은 GAD 효소로 10 시간에 1 M의 MSG를 1 M의 GABA로 전환하는데 성공하였다. 4 g/L 의 균체량으로 고농도의 GABA를 생산해 낼 수 있음을 확인 하였다. 또한 자동화 공정의 도입을 위하여 자동 조절장치에 의한 생산 가능성을 확인하였다.

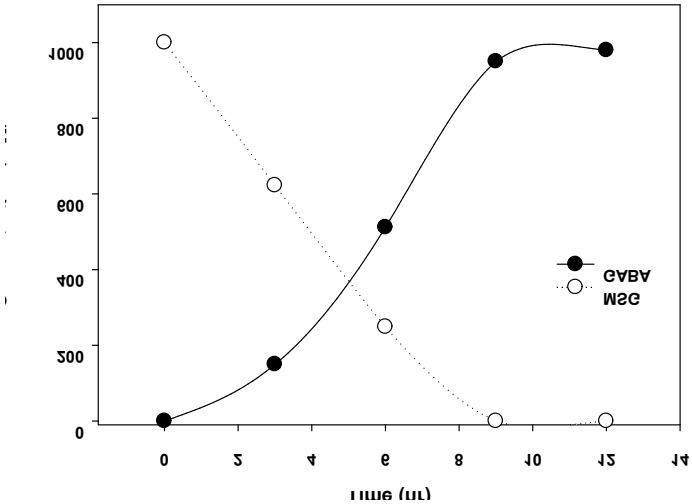


Figure 30. GABA production form MSG using 50 ml enzyme reactor.

제 4 장 결론

본 연구에서는 재조합 대장균을 이용하여 GAD효소를 최대로 생산을 하기 위해 성장 조건을 연구하는 실험을 진행하였다. 건조 균체량이 높고 GAD activity가 높은 균주를 생산하기 위해서는 배양에 영향을 미칠 수 있는 인자로서 배지의 영향으로는 질소원, 탄소원, 미량원소가 있고 발효조의 영향으로는 교반속도, aeration rate, pH와 같은 것 들이 발효의 중요한 요인들이다. 이와 같은 요소들을 조절하여 발효를 하였다.

배지의 조성은 glucose 40 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 6 g/L, KH_2PO_4, 3 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L, yeast extract 1 g/L, MSG 20 g/L 사용하였을 때 가장 건조 균체량은 2.1 g/L, GAD activity는 248.6 unit, specific GAD activity는 4.2 unit/cell mass 로 가장 높은 값을 나타내었다.

건조 균체량을 증가 시키기 위해서 균체의 성장이 최고인 시점에 초기농도의 glucose공급하는 fed-batch를 시행하였다. 그 결과 초기 glucose 농도를 낮춰 기질의 저해를 막고 소비되는 즉시 glucose를 공급해주었더니 건조 균체량은 3.7 g/L, GAD activity는 337.3 unit으로 증가 하였지만 specific GAD는 3.6 unit/cell mass 으로 감소 하였다. 균체량과 GAD activity는 증가하였지만 100시간이라는 오랜 발효 시간으로 효율이 떨어짐을 확인 할 수 있었다. 다른 문헌에 의하면 유가식 배양은 건조 균체량의 공급해준 탄소원 대비로 증가하는 것을 확일 할 수 있었다. 균체량의 10배 정도 차이가 나는 것을 보였지만 균체량 생산대비 GABA의 생산량은 본 연구에서 배양된 GAD 효소로 전환시킨 GABA의 양보다 50배가량 차이가 나타나는 것을 알 수 있었다.[5]

빠른 시간 내에 고농도의 GAD를 생산하기 위해 교반속도와 Aeration rate을 증가 시킨 결과 건조 균체량은 3.9 g/L GAD activity는 764.3 unit, specific GAD activity는 5.7 unit/cell mass 로 2배 가량 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 앞서 배지 조성 실험에서 균체량이 증가하지 못한 이유는 산소원의 고갈로 인해 acetic acid 와 lactic acid 등으로 전환된 것으로 나타났다.

GAD의 최적 pH 는 5.5로 *E. coli*에서 GAD 발현을 유도하기 위해 발효조의 초

기 pH를 5.5 로 하였다. 그 결과 건조 균체량은 위의 실험들과 비슷한 3.7 g/L 로 나타났지만 GAD activity와 specific GAD activity는 834.7 unit 과 6.6 unit/cell mass 으로 가장 높게 생성됨을 알 수 있었다. 이를 통해 pH를 최적 조건으로 맞춰 주게 됨으로써 재조합 *E. coli* 안에서 GAD 가 좀더 선택적으로 생산이 됨을 확인 할 수 있었다. 다른 문헌에서도 pH5 로 선택적 배양을 했을 시 가장 높은 GABA의 생산 량을 보였지만 본 연구에서 생산된 GAD로 GABA 로 전환 시킨 양보다 적음을 알 수 있었다.

앞서 발효의 조건을 모두 확립 시킨 후 균체에서 GAD를 추출한 후에 1 M의 MSG 를 전환하는 scale-up test(50 ml, 100 ml)를 해보았다. 그 결과 본 연구에서 생산해 낸 GAD 효소가 1 M의 MSG 10시간 동안 1 M GABA로 전환 되는 것을 확인 하였다.

본 연구에서 재조합 균을 사용하여 선택적으로 활성이 높은GAD를 생산하여 적은 양의 균체량으로도 높은 GABA의 양을 생산 함을 확인 할 수 있었다.

참고문헌

1. T. J. Kang, S. H. Oh (2007), "Product and application of GABA" *biowave*. 9(14)

2. D. Guijin Zhang, Alan W. Bown(1997), "The rapid determination of γ-Aminobutyric acid" Phytochemistry. 44(6) : 1007-1009

3. F. Amenta, C. Cavallotti, M. C. Mione and S. L. Erdo (1986), "Segmental distribution and gestational changesof GABA-transaminase activity in the rat oviduct" *J. Reproduction and Fertility* 78, -593-599

4. S. H. Oh (2007), "Effects and application of germinated brown rice with enhanced levels of GABA" *food SciInd* 40 : 41-46

5. D. S. Kim (2009) Study on the condition of fermentation in lactic acid bacteria for the production of γ-aminobutyric acid (2009)

6. S. D. Lim, K. S. Kim (2009), "Effects and utilization of GABA" *Korean J dairy SciTechnol27 : 45-51*

7. R. Hao, J. C. Schmit (1993), "Cloning of the gene for glutamate decarboxyase and tis expression during condiation on Neurosporacrassa" *Biochem. J .* 293 : 735-738

8. J. S. Chang,B. S. Lee, Y. G.Kim (1992), "Changes in γ-aminobutyricacid(GABA) and the main constituents by a treatmentconditions and of anaerobically treated green tea leaves" *Korean J Food SciTechnol* 24:315-31

9. B. Nicolas, F. Hillel (2004), "GABA in plant: just a metabolite" *Trends in plant science* 9: 110-11

10. J. S. Barry, W. B. Alan, D. M. Michael (1999), "Metabolism and function of gamma-aminobutyricacid" *Trends in plant science* 4: 446-452

11. S. H. Oh, K. B. Park(2005), "Production and characterization of GABA yogurt" *Food sci. Biotechnol.* 14, 518-522.

12. R. J. Whborski, R.W. Bond, D. I. Gorrloed (1990), "Chatacterization of a DNA coding for rat Glutamic acid decarbowylase" *Mol. Brain Res.* 8: 193-198

13. S. H. Hong (2011), "Studies on production and expression system of biotechnologically relevant Recombinant *E.coli*. Ulsan Unuversity.

14. Guijin Zhang and Alan W. Bown (1997), "The rapid determination of γ-Aminobutyric acid" *Phytochemistry*. 44(6):1007-1009

15. E. Adeghate, A. S. Ponery(2002), "GABA in the endocrine pancreas : cellular localization and functions in normal and diabetic rats" *Tissue and cell*, 34:1-6

16. Rossana Coda, Carlo Giuseppe Rizzello, Marco Gobbetti (2010), "Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ-aminobutyric acid (GABA)" *International Journal of Food Microbiology*137: 236-245

17. S. H. Oh, C. H. Oh. (2003), "Brown rice extracts with enhancedlevels of GABA stimulate immune cells" *Food sci.Biotechnol.* 12, 248-252

18. K. B. Park, S. H. Oh. (2006), "Cloning, sequencing andexpression of a novel glutamate decarboxylase gene froma newly isolated lactic acid bacterium, Lactobacillus brevisOPK-3" *Bioresource Technology* 1-8.

19. R. Babu, S. Swaminathan (2000), "Production of interferon-a in high cell density culture of recombinant *E.coli* and its single step purification from refolded inculusion body proteins" *MicrobiolBiorechnol* 53 : 655-660

20. A. H. Koyama, T. Arakawab, A. Adachia (1999), “comparison of an antiviral activity of recombinant consensus interferon with recombinant interferon α-2b” *Microbes and Inferction* 13 : 1073-1077

21. J. K. Kim (2007), “Optimization of fed-batch fermentation bas on pH-stat for production of interferon-α1 in recombination E. coli” *Inha university*

22. B. S. Kim, S. C. Lee (2004), “High cell density fed-batch cultivation of *E.coli* using exponential feeding combined with pH-stat” *Biosyst Eng.* 26 : 147-150

23. B. R. Kim (2012), “ Optimization of microalgae culture condition for biodiesel production” *Chosun university*

24. F. Srience, B. Arnold, J. E. Bailey (1984), “characterization of intracellular accumulation of poly-p-hydroxybutyrate(PHB) in individual cell of Alcaligeneseutropnus H16 by flow cytometry. *Biotechnol bioeng.*26 : 982-987

25. G. L. Miller (1959), “Use of dinitrosalicylic acid feagent for determination of reducing sugar” *Anal. Chem* 31 : 426-428

26. R. H. D. Lambrecht, G. slegers, G. Mannens, A. Claeys (1986), “Adsorption of charged suvstrates and products on an enzyme reactor prepared by glutaaldehyde coupling on alkylamine derivatives of Ti-coated porous silica veads” *Enzyme Microb. Tecnol.* 9 : 225-228

27. M. G. Gioia, P. Andreatta, S. Bosechetti, R. Gatti (2007), “Development and walidation of a liguid chromatographic method for the determination of branched-chain amino acids on new dosage forms” *J.Pharmaceurical and Biomedical analysis* 45 :456-464

28. G. A. Liu, X. L. Wnag (2006), “Optimization of critical medium components using reponse surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by *Agaricusblazei*” *ApplmicrobiolBiotechnol.* 74(1) : 78-83

29. L. P. Ooijkaas, E. C. Wilcinson, J. Tramper, R. M. Buitelaar (1999), "Medium optimization for spore production of coniotthyriumminitans using statistically-based experimental designs" *BiotechnolBioeng.* 64(1) :92-100

30. R. H. Myers (1992), "Response surpace methodology" Allun and *Bacon Inc.* 127-139

31. G. Han (2012), "Optimization of enzyme reaction condition for compound K production form ginseng extract by using RSM" *Chonbuk national unversity*

32. J. Y. Kim, M. Y. Lee, G. E.Ji, J. S. Lee, K. T. Hwang (2009), "Production of γ-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by Lactobacillus brevis GABA 100" *International Journal of Food Microbiology*130 : 12-16

33. Michel Ledoux, FranoisLamy(1986), "Determination of proteins and sulfobetaine with the folin-phenol reagent" *Analytical Biochemistry*, 157(1), 28-31

34. G. W. Lee, J. B. Kim, J. H. Lee (2008), "Development of magnetically separable polyanilinenanofibers for enzyme immobilization and recovery" *Enzyme and Microbial Technology*, 42:466-472

35. A.S. Maria Chong, X.S. Zhao, Angeline T. Kustedjo, S.Z. Qiao (2004), "Functionalization of large-pore mesoporoussilicas with orgaosilanes by direct synthesis" *Microporous and Mesoporous Materials*, 72: 33-42

36. J. Hong, P. J. Gong, J. H. Yu, D. M. Xu, H. W Sun, S. Yao(2006), "Conjugation of α-chymotrypsin on a polymeric hydrophilic nanolayercovering magnetic nanoparticles" *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* 42,:99-105

37. J. Hong, D. Xu, P. Gong, H. Sun, Li. D S. Yao (2007), "Covalent binding of -chymotrypsin on the magnetic nanogels covered by amino groups" *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 45 : 84-90

38. J. G. Yi, S. Y. Moon, Y. J. Kim, C. S. Shin, Y. M Koo (2007), "Effect of oxygen supply on production of interferon α-1 by recombinant *E. coli* in fed batch fermentation" *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35(3) : 226-230