

Deinococcus radiodurans 유래 DR1558과 PprM에 의한 *Corynebacterium glutamicum*의 라이신 생산 향상 연구

김수미¹, 임상용², 박시재³, 주정찬⁴, 최종일^{1*}

¹전남대학교 생물공학과, 바이오에너지 및 바이오소재 협동과정

²한국원자력연구원 첨단방사선연구소

³이화여자대학교 화학신소재공학과

⁴한국화학연구원 바이오화학센터

Received: August 23, 2017 / Revised: August 25, 2017 / Accepted: August 25, 2017

Enhancement of Lysine Production in Recombinant *Corynebacterium glutamicum* through Expression of *Deinococcus radiodurans* pprM and dr1558 Genes

Su-mi Kim¹, Sangyong Lim², Si Jae Park³, Jeong Chan Joo⁴, and Jong-il Choi^{1*}

¹Department of Biotechnology and Bioengineering, Interdisciplinary Program for Bioenergy & Biomaterials, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

²Research Division for Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongseup 56212, Republic of Korea

³Division of Chemical Engineering and Materials Science, Ewha Womans University, Seoul 03760, Republic of Korea

⁴Center for Bio-based Chemistry, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 34602, Republic of Korea

The expression of *Deinococcus radiodurans* dr1558 and pprM genes was examined for enhanced lysine production in recombinant *Corynebacterium glutamicum*. These genes are known to confer high tolerance to pH and osmotic shock in *Escherichia coli*. *D. radiodurans* dr1558 and pprM genes were expressed in *C. glutamicum* by using 6 synthetic promoters of different strengths, to evaluate the effect of expression efficiency on lysine production. Recombinant *C. glutamicum* expressing DR1558 under the L26 and I64 promoters showed higher lysine production than that expressing DR1558 under other promoters. Similarly, recombinant *C. glutamicum* expressing PprM under same promoters (L26 and I64) showed a higher increase in lysine production compared to that expressing PprM under other promoters. In the absence of CaCO₃ in the medium, the expression of DR1558 or PprM also increased lysine concentration in *C. glutamicum* depending on the promoter used. Together, these results suggest that genes involved in radiation tolerance in *D. radiodurans* can be used to enhance production of amino acids and their derivatives.

Keywords: DR1558, PprM, lysine, *Corynebacterium glutamicum*

*Corynebacterium glutamicum*은 그람 양성균의 통성혐기성이며, 포자를 형성하지 않는 균으로 다양한 글루탐아미드, 라이신과 같은 아미노산뿐만 아니라 비타민, 뉴클레오타이드, 유기산, 바이오 연료(에탄올, 알코올), 디아민, 중합체 등을 생산하는 산업용 균주로 알려져 있다[1-5]. 이와 같은 생태계적, 의학적, 산업적 중요성 때문에 다양한 생체 분자와 화

학물질 생산을 위해 *C. glutamicum*에 대한 연구가 지속적으로 수행되고 있다[4].

미생물은 배양조건에서 다양한 환경적 스트레스에 노출된다. 특히, *C. glutamicum*와 같은 산업 균주는 배양 동안 낮은 pH, 높은 삼투압, 영양 결핍, 산화와 같은 다수의 스트레스에 직면하게 되며 이는 세포의 성장과 생산성에 영향을 미친다[3, 6]. 최근 pH, 온도, 용존 산소량, 삼투압 등 다양한 스트레스에 대한 저항성과 같은 생리적 특성을 변화시켜 미생물의 생산성을 향상시키는 연구가 많이 진행되고 있다[7-9].

*Deinococcus radiodurans*는 고선량 전리 방사선, 장기간

*Corresponding author

Tel: +82-62-530-1846, Fax: +82-62-530-1949

E-mail: choiji01@chonnam.ac.kr

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

의 탈습, 자외선, 활성산소, 산화제를 포함한 극심한 스트레스에 저항성이 높은 균으로 잘 알려져 있다[10-13]. 다양한 효소적, 비효소적 항산화 시스템과 다수의 DNA 수선 시스템이 *D. radiodurans*의 높은 저항성에 영향을 주지만, 이러한 고저항성 특징에 대한 정확한 메커니즘은 분명하게 밝혀지지 않았다[14, 15]. 최근, *D. radiodurans* 유래 스트레스 반응성 유전자가 대장균의 스트레스 내성을 향상시킨다는 연구 결과가 보고되었다[16]. *D. radiodurans*에서 유래한 반응 조절자(DR1558)와 저온자극유도 단백질(cold shock protein, CSP) 상동체로서 DNA 손상 반응 조절자(PprM)를 대장균에서 이형발현하여 산화적 스트레스에 대한 저항성이 향상되었다[11, 16]. 미생물 발효가 진행되면 생산물이나 부산물이 축적되면서 배지의 pH나 삼투압 등이 변화되고 이로 인하여 생산 수율은 감소되게 된다. *Corynebacterium*의 경우 라이신의 생산에 따른 삼투압에 대한 반응 연구가 보고되었다[17]. 따라서, 미생물의 산화적 스트레스에 대한 저항성이 증가된다면, 이러한 발효과정에서 발생하는 수율 감소는 억제될 수 있을 것으로 기대된다.

이에 본 연구에서는 상업적으로 중요한 아미노산 중의 하나인 라이신 생산 균주인 *C. glutamicum*에 *D. radiodurans*에서 유래한 저온자극유도 단백질 PprM과 two component regulatory transduction system의 response regulator인 DR1558 유전자를 각각 발현하여 라이신 생합성에 미치는 영향을 평가하였다. 또한, 라이신 생합성에 미치는 유전자의 영향은 유전자의 발현 정도에 크게 의존하기 때문에 본 연구에서는 기존에 보고된 발현 세기가 다른 6개의 항시성 합성 프로모터(P_{L10}, P_{L26}, P_{I16}, P_{I64}, P_{H30}, P_{H36})를 이용하여 유전자 *dr1558*과 *pprM*을 *C. glutamicum*에 이형발현하여 라이신 생산성을 비교하였다.

미생물 및 배양 배지

본 실험에서 사용된 *C. glutamicum* KCTC1857은 KCTC 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, Jeongeup, South Korea)에서 분양 받았으며, 라이신 생산을 위한 숙주로 사용되었다. 항시성 프로모터(P_{L10}, P_{L26}, P_{I16}, P_{I64}, P_{H30}, P_{H36})를 포함한 pCES208GFP 벡터들은 lysine decarboxylase의 발현을 통해 카다베린의 생산에 이용되었다[4, 5]. *D. radiodurans* 균주는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소(ARTI, Korea)에서 분양받았다. 유전자 조작을 위한 대장균은 LB 배지(1 L 당 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl)를 이용하여 37°C에서 배양하였다. *C. glutamicum* KCTC1857는 RG 배지(1 L 당 10 g glucose, 30 g sorbitol, 10 g beef extract, 40 g brain heart infusion)에 접종하여 250 rpm, 30°C에서 24시간 동안 배양하였다.

제조합 *C. glutamicum* 제작

*dr1558*과 *pprM* 유전자는 *D. radiodurans*의 유전체 DNA로부터 각각 DR1558-F (5'-TAA GCA GGA TCC GTG ACT CTG CCT CAA GGA-3'), DR1558-R (5'-TAA GCA GCG GCC GCT CAC AAC TCC ACG CCC TC-3')와 *pprM*-F (5'-TAA GCA GGA TCC GTG TGC CGA GTT TCG ATT-3'), *pprM*-R (5'-TAA GCA GCG GCC GCT TAC CAG CGG TCG TC-3')를 이용하여 증폭되었고 증폭된 유전자는 제한효소 *Bam*HI (Promega, USA)과 *Not*I (Promega)으로 절단하였다. 항시성 프로모터를 포함한 pCES208GFP 플라스미드들을 *Bam*HI과 *Not*I으로 절단한 후, 같은 두 개의 제한효소들로 절단된 *pprM*과 *dr1558* 유전자를 각각 클로닝하였다. 대조군은 GFP가 절단된 pCES-P_{I64} 플라스미드로 설정하였다. 모든 제조합 플라스미드는 논문에서 보고된 방법을 따라서 *C. glutamicum* KCTC1857을 형질전환하는데 이용되었고[4, 5], colony PCR, 이중 제한효소 처리와 DNA sequencing을 통해 서열을 확인하였다.

라이신 생산 및 분석

형질전환된 제조합 *C. glutamicum* KCTC1857는 30 mg/l kanamycin이 포함된 2 ml RG 배지에 접종하여 250 rpm, 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액(10% v/v)을 30 mg/l kanamycin이 포함된 20 ml CG (1 L 당 50 g glucose, 15 g yeast extract, 15 g ammonium sulfate, 0.5 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.01 g MnSO₄·H₂O and 0.01 g FeSO₄·7H₂O, 0.6 g CaCO₃, pH 7.0) 액체배지에 접종하여 250 rpm, 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양액은 4°C에서 8,000 ×g으로 10분 동안 원심분리 하여 얻어졌다. 원심분리한 배양액에 포함된 라이신과 포도당의 농도를 측정하기 위해 high performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1260 HPLC series, USA) 분석을 수행하였다.

라이신 농도를 측정하기 위해 사용한 컬럼은 ZORBAX SB-C18 5 μm column (Agilent, 4.6 × 250 mm)이고, 포도당의 농도는 Aminex HPX-87H ion exclusion 300 mm × 7.8 mm column (Bio-rad, USA)을 사용하여 측정하였다. 먼저, 배양액의 라이신을 diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) (Sigma-Aldrich, USA)을 이용하여 유도체화 하기 위해, 배양액 100 μl에 DEEMM 6 μl, 240 mM methanol 200 μl, borate buffer pH 9.0 600 μl, 3차 증류수 94 μl를 첨가하여 70°C에서 2시간 동안 반응시켰다[18]. 그 후, 반응액을 2 μm membrane filter (Advantec, Japan)를 이용하여 여과하였다. 표준 물질로 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 g/l의 라이신 용액을 사용하였다. 이동상 A는 25 mM sodium acetate buffer pH 4.8을, 이동상 B는 acetonitrile을 사용하였고 gradient는 다음

과 같이 설정하였다: 0-2분, 20%; 2-32분, 25%; 32-35분, 60% B. 각 시료는 10 ml씩 주입하였으며 HPLC 조건은 다음과 같이 설정하였다: Flow rate 1.0 ml/min, stop time 36 min, optimum temperature 35°C, UV detection wavelength 284 nm, maximum pressure 400 bar. 포도당 농도 측정을 위한 표준 물질로 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 g/l의 포도당 용액을 사용하였다. 각 시료는 10 ml씩 주입하였으며 5 mM sulfuric acid를 이용한 등용매 용리로 분리되었다. HPLC 조건은 다음과 같이 설정하였다: Flow rate 0.6 ml/min, stop time 20 min, RID optimum temperature 50°C, maximum pressure 400 bar.

실험은 모두 각각 3 반복하여 실험하였으며, 그 평균 값을 나타내었다.

DR1558과 PprM의 발현에 따른 라이신 생산 영향

다양한 세기를 갖는 프로모터 L10, L26, I16, I64, H30, H36하에 *D. radiodurans dr1558*과 *pprM* 유전자를 발현하는 재조합 벡터로 형질전환된 *C. glutamicum*을 플라스크 배양하여 얻어진 라이신의 농도를 측정하였다(Table 1). 플라스크 배양 후에 얻어진 잔여 포도당은 없는 것으로 확인되었다. 실험결과 대조군으로 사용된 I64 프로모터만을 갖는 재조합 *C. glutamicum*에서는 9.83 g/l의 라이신이 생산되었지만, DR1558이 발현된 재조합 *C. glutamicum*에서는 최대 30% 라이신 농도가 증가되었다. DR1558이 L26의 프로모터 하에서 발현된 경우에는 라이신이 12.76 g/l의 농도로 생산되었으며, I64의 프로모터로 발현된 경우에는 라이신이 11.79 g/l로 생산량이 증가되었다. 이러한 라이신 생산량 뿐

만 아니라 소모된 탄소원으로 부티의 전화율도 증대되었다. 대조군의 경우 탄소원당 라이신의 전환효율은 0.196 g 라이신/g 포도당이었지만, DR1885이 L26의 프로모터로 발현된 경우에는 전환효율은 0.26 g 라이신/g 포도당으로 증가하였다. 하지만, DR1558이 I16의 프로모터 하에서 발현된 경우에는 라이신 농도가 9.24 g/l로 얻어져서 대조군과 큰 차이는 없었다. 또한, L10의 프로모터 하에서 발현된 경우에는 라이신 농도가 10.77 g/l로 얻어져 라이신 농도의 증가가 다른 종류의 프로모터보다 상대적으로 낮은 값을 보였다. L-glutamate decarboxylase를 발현하여 *C. glutamicum*에서 gamma-aminobutyrate (GABA)의 생산에 관한 이전이 연구에서는 H36, I16, L26의 순으로 높은 GABA 생산을 보였다 [19]. 본 연구에서 사용된 6개의 합성 프로모터들의 발현세기는 *Corynebacterium*에서 H30, H36는 상대적으로 높고, I16, I64은 중간 정도의 세기, 그리고 L10, L26는 상대적으로 낮은 프로모터의 세기는 갖는 것으로 알려져 있다[4]. 본 실험에서 확인된 가장 라이신 함량을 증가시킨 프로모터는 L26과 I64으로 보고된 프로모터 세기만으로 비교한다면 H36 보다는 낮은 것으로 알려져 있다. 하지만, 프로모터 세기에 따른 단백질 발현 정도와 단백질 발현 양에 따른 대사 산물의 생산 영향은 경우에 따라 다른 결과를 보인다. 따라서, 본 연구에서와 같이 다양한 세기의 프로모터를 갖는 재조합 벡터를 제작하여 영향을 평가하는 것이 필요하다.

저온자극유도 단백질인 PprM이 발현된 경우도 DR1558의 경우와 유사한 경향을 보였다. DR1558의 발현에서 높은 라이신 수율을 보인 I64와 L26 프로모터 하에서 PprM이 발현될 경우에 다른 종류의 프로모터보다 높은 라이신 수율 증대가 확인되어, 최대 12.65 g/l의 라이신이 생산되었다. DR1558의 발현에서 라이신의 수율 증가가 상대적으로 낮거나 대조군과 유사한 I16과 L10 프로모터 하에서 PprM이 발현될 경우 라이신의 농도 증가는 이루어지지 않았다. 이러한 실험 결과 *C. glutamicum*에 의한 라이신의 발효에서 *D. radiodurans*에서 유래한 PprM이나 DR1558 단백질의 발현은 라이신의 생산 수율의 증대시켜 주었으며, 그 영향은 프로모터에 따라 달라진다는 것을 확인하였다. 본 실험에서는 플라스크 배양과정에서 배지의 pH의 조절을 위하여 CaCO₃가 첨가되었다. Razak 등은 *Corynebacteriu, glutamicum*을 이용한 라이신 생산에서 CaCO₃는 pH 조절을 위하여 배지에 반드시 첨가되어야 한다고 보고하였다[20]. 이러한 조절 성분이 없는 경우에 DR1558이나 PprM 단백질의 발현의 영향을 확인하기 위하여 CaCO₃가 첨가되지 않은 배지에서 발효를 진행하였다.

Table 2에 초기 배지의 pH는 7로 조절하고 CaCO₃가 첨가되지 않은 배지에서의 DR1558과 PprM의 발현에 따른 라이신 생산 변화 비교 결과를 정리하였다. CaCO₃가 배지에

Table 1. Concentration of the lysine after growth of recombinant *C. glutamicum* KCTC1857 at 30 °C with CaCO₃ for 48 h.

Promoter/gene	Lysine (g/l)
I ₆₄	9.83 ± 0.53 ^a
H ₃₀ /DR1558	11.62 ± 0.25
H ₃₆ /DR1558	11.35 ± 0.38
I ₁₆ /DR1558	9.24 ± 1.81
I ₆₄ /DR1558	11.79 ± 0.50
L ₁₀ /DR1558	10.77 ± 0.14
L ₂₆ /DR1558	12.76 ± 1.07
H ₃₀ /PprM	11.25 ± 1.39
H ₃₆ /PprM	10.86 ± 0.85
I ₁₆ /PprM	8.24 ± 1.85
I ₆₄ /PprM	12.49 ± 1.16
L ₁₀ /PprM	7.79 ± 0.91
L ₂₆ /PprM	12.65 ± 0.46

^aValues represent the mean ± SD of three independent replicates.

Table 2. Concentration of the lysine after growth of recombinant *C. glutamicum* KCTC1857 at 30 °C without CaCO₃ for 48 h.

Promoter/gene	Lysine (g/l)
I ₆₄	3.06 ± 0.05 ^a
H ₃₀ /DR1558	3.48 ± 0.27
H ₃₆ /DR1558	4.13 ± 0.64
I ₁₆ /DR1558	3.02 ± 0.09
I ₆₄ /DR1558	2.88 ± 0.10
L ₁₀ /DR1558	3.23 ± 0.24
L ₂₆ /DR1558	2.91 ± 0.14
H ₃₀ /PprM	3.45 ± 1.02
H ₃₆ /PprM	3.55 ± 0.97
I ₁₆ /PprM	2.42 ± 0.81
I ₆₄ /PprM	2.96 ± 0.09
L ₁₀ /PprM	3.00 ± 0.09
L ₂₆ /PprM	2.98 ± 0.17

^aValues represent the mean ± SD of three independent replicates.

첨가되었을 경우, 48시간 배양 후에 배지의 pH는 8 정도로 확인되어졌다. 하지만, CaCO₃가 배지에 첨가되지 않을 경우, 배지의 pH가 7 근처로 유지되지 못하고, 배지의 pH가 배양이 진행됨에 따라 낮아지게 된다. CaCO₃가 첨가되지 않을 경우 48시간 배양 후에 배지의 pH는 4-5 근처로 낮아졌으며, CaCO₃가 첨가되지 않을 경우 48시간 배양 후에 라이신의 농도는 첨가한 배지에서 보다 낮은 값을 가졌다. 대조군으로 사용된 I64 프로모터만 있는 재조합 *C. glutamicum*의 경우 약 3.06 g/l의 라이신이 생산되었다. 48시간 후에 남아 있는 포도당의 농도도 26.59 g/l로 포도당이 배양 중 제대로 소모되지 못하였다. H30과 H36 프로모터 하에서 DR1558이 발현된 경우에는 대조군 보다 높은 3.48 g/l와 4.13 g/l의 라이신 농도가 각각 얻어졌다. 이러한 결과는 PprM의 발현에 따른 라이신의 생산 영향에서도 확인되었다. H30과 H36 프로모터 하에서 PprM이 발현된 경우에는 대조군 보다 높은 3.43 g/l와 3.55 g/l의 라이신 농도가 각각 얻어졌다. H30과 H36는 이전의 CaCO₃가 첨가된 실험에서 높은 라이신 수율 증대를 보인 L26과 I64보다는 낮은 프로모터 세기를 갖는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 *D. radiodurans*에서 방사선에 내성에 기여하는 유전자 *dr1558*과 *pprM*을 이용하여 라이신 생산균주인 *C. glutamicum* 재조합 균주를 제작하여 발현하여, 그 영향을 확인하였다. 본 연구 결과로부터 방사선 대응 또는 스트레스 관련 유전자의 발현이 생산 균주의 환경변화의 대응성을 향상시켜 라이신 등의 목적산물의 생산수율 증대에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다. 최근에 *C. glutamicum* KCTC1857 균주를 이용하여 나일론 5의 모노머인 5-

aminovaleric acid (5AVA)를 역새로부터 유래된 발효당을 이용하여 생산한 연구가 발표되었다[21]. 본 연구결과를 다양한 균주시스템에 활용한다면, 다양한 바이오매스로부터 유래된 발효당으로부터 바이오 유래 케미칼, 폴리머, 연료 등을 효율적으로 생산할 수 있을 것으로 기대된다[22].

Acknowledgments

This research was supported by Golden Seed Project, Ministry of Oceans and Fisheries (213008-05-1-SB910), by a the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIP) (No. NRF-2015R1A2A2A01004733) and by the Nuclear R&D program of the Ministry of Science, ICT and Future Planning.

References

1. Woo HM, Park JB. 2014. Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **180**: 43-51.
2. Lee JK. 2010. Carbon metabolism and its global regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 349-361.
3. Lee JY, Seo J, Kim ES, Lee HS, Kim P. 2013. Adaptive evolution of *Corynebacterium glutamicum* resistant to oxidative stress and its global gene expression profiling. *Biotechnol. Lett.* **35**: 709-717.
4. Yim SS, An SJ, Kang M, Lee J, Jeong KJ. 2013. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioeng.* **110**: 2959-2969.
5. Oh YH, Choi JW, Kim EY, Park K, Song BK, Jeong KJ, et al. 2015. Construction of synthetic promoter-based expression cassettes for the production of cadaverine in recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **176**: 2065-2075.
6. Si M, Wang J, Xiao X, Guan J, Zhang Y, Ding W, et al. 2015. Ohr protects *Corynebacterium glutamicum* against organic hydroperoxide induced oxidative stress. *PLoS One.* **10**: e0131634.
7. Zhang Y, Zhu Y, Zhu Y, Li Y. 2009. The importance of engineering physiological functionality into microbes. *Trends. Biotechnol.* **27**: 664-672.
8. Fu RY, Bongers RS, Van Swam II, Chen J, Molenaar D, Kleerebezem M, et al. 2006. Introducing glutathione biosynthetic capability into *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 improves the oxidative-stress resistance of the host. *Metab. Eng.* **8**: 662-671.
9. Zhang J, Fu RY, Hugenholtz J, Li Y, Chen J. 2007. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5268-5275.
10. Krisko A, Radman M. 2013. Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Boil.* **5**: a012765.
11. Appukuttan D, Singh H, Park SH, Jung JH, Jeong S, Seo HS, et al.

2016. Engineering synthetic multistress tolerance in *Escherichia coli* by using a deinococcal response regulator, DR1558. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 1154-1166.
12. Ohba H, Satoh K, Sghaier H, Yanagisawa T, Narumi I. 2009. Identification of PprM: a modulator of the PprI-dependent DNA damage response in *Deinococcus radiodurans*. *Extremophiles* **13**: 471-479.
 13. Slade D, Radman M. 2011. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**: 133-191.
 14. Ishino Y, Narumi I. 2015. DNA repair in hyperthermophilic and hyperthermoresistant microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* **25**: 103-112.
 15. Munteanu AC, Uivarosi V, Andries A. 2015. Recent progress in understanding the molecular mechanisms of radioresistance in *Deinococcus*. *Extremophiles*. **19**: 707-719.
 16. Park SH, Singh H, Appukuttan D, Jeong S, Choi YJ, Jung JH, et al. 2016. PprM, a cold shock domain-containing protein from *Deinococcus radiodurans*, confers oxidative stress tolerance to *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **7**: 2124.
 17. Varela CA, Baez ME, Agosin E. 2004. Osmotic Stress Response: Quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a Lysine-Overproducing Strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4222-4229.
 18. Kim YH, Kim HJ, Shin JH, Bhatia SK, Seo HM, Kim YG, et al. 2015. Application of diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) derivatization for monitoring of lysine decarboxylase activity. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **115**: 151-154.
 19. Choi JW, Yim SS, Lee SH, Kang TJ, Park SJ, Jeong KJ. 2015. Enhanced production of gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by expressing glutamate decarboxylase active in expanded pH range. *Microb. Cell Fact.* **14**: 21.
 20. Razak MA, Viswanath B. 2015. Optimization of fermentation upstream parameters and immobilization of *Corynebacterium glutamicum* MH 20-22 B cells to enhance the production of l-lysine. *3 Biotech* **5**: 531-540.
 21. Joo JC, Oh YH, Yu JH, Hyun SM, Khang TU, Kang KH, et al. 2017. Production of 5-aminovaleric acid in recombinant *Corynebacterium glutamicum* strains from a *Miscanthus* hydrolysate solution prepared by a newly developed *Miscanthus* hydrolysis process. *Bioresour. Technol.* DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.131.
 22. Oh YH, Eom IY, Joo JC, Yu JH, Song BK, Lee SH, et al. 2015. Recent advances in development of biomass pretreatment technologies used in biorefinery for the production of bio-based fuels, chemicals and polymers. *Korean J. Chem. Eng.* **32**: 1945-1959.