

생물 반응기를 이용한 글루타치온의 생산 및 모니터링

김춘광^{1,3}, 서국화^{1,3}, 손옥재^{1,3}, 이종일^{2,3}

전남대학교, 물질·생물화학공학과¹, 응용화학공학부², 생물공정기술연구실³

Tel (062)530-0847, FAX (062)530-1849

Abstract

High concentration of glutathione(GSH) has been found in some species of yeast, of which *Sacchromyces cerevisiae* is used for commercial fermentative production. In this study, we have investigated optimal concentration of cysteine which could increase the GSH productivity and used it to maximize the production of GSH in fed-batch culture of *Sacchromyces cerevisiae*. Fermentation processes have been also real time monitored by a 2-dimensional fluorescence sensor.

서론

글루타치온은 γ -glutamylcysteinylglycine의 구조를 가지는 tripeptide로 대부분의 생물 체내에 포함되어 있는 비 단백질성 thiol 화합물이다. 글루타치온은 세포 내에서 산화형(GSSG)과 환원형(GSH)이 존재하며, 일부 효소들의 보조소 또는 단백질의 thiol기를 환원 상태로 유지시켜주는 기능을 한다. 특히 글루타치온은 단백질 sulfhydryl 그룹의 유지와 DNA의 구성 성분인 deoxyribonucleotide의 전구체 형성, 반응성이 강한 산소 화합물이나 자유 라디칼로부터의 세포보호, 외부 화합물의 독성 제거 등 생물학적, 의약적으로 중요한 역할을 한다. 글루타치온의 대량 생산을 위해 도입한 유가식 배양은 높은 농도의 기질 용액을 조금씩 첨가하면서 미생물을 고농도로 배양하는 방법으로 효율적인 기질공급으로 원료비, 생산 시설비 절감 및 발효시간을 단축할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 생물 반응기를 이용하여 글루타치온을 생산하는데 있어서 최적 조건을 검토하였다. 또한 기질의 주기적 공급에 의한 글루타치온의 최적 생산 조건을 살펴보았으며 특히 형광 센서를 이용하여 글루타치온의 생산 특성을 모니터링하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754이며 균주 보관용 배지로는 YM agar를 사용하였다. 균주 배양을 위해서 기본 배지로는 5 g/L glucose, 6 g/L (NH₄)₂SO₄, 5.3 g/L K₂HPO₄, 2.4 g/L KCl, 0.12 g/L NaCl, 2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.01 g/L FeSO₄ · 7H₂O, 0.12 g/L ZnSO₄ · 7H₂O, 0.024 g/L MnSO₄ · 6H₂O, 0.006 g/L CuSO₄ · 5H₂O, 0.12 g/L CaCl₂, 3 ml/L Vitamin solution을 적절히 수정하여 사용하였으며, cysteine, glycine, glutamic acid를 첨가하였다.

2. 배양 방법

종균배양은 우선 냉동 보관된 종균을 50 ml YM 배지에서 12시간 배양하여 활성화시킨 후, 본 배양액에 1% (v/v)의 종균 배양액을 접종하여 2.5 L 생물 반응기 (30 °C, 1 vvm, 400rpm, pH 5.6)에서 배양하였다. 초기 당 농도, 글루타치온 전구체의 첨가 시간, cysteine 농도를 달리 하여 수행하였다.

3. 분석 방법

발효액의 상등액과 생산된 intracellular 글루타치온의 농도는 시료를 glutathione reductase, DTNB (5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)), NADPH와 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 분석하였다. 그리고, glutathione productivity를 나타내기위해 측정된 단백질 농도는 Bradford 법을 사용하였다. 또한, 배양액 중의 cysteine 농도는 시료를 copper(II), iron(III), 1,10 - phenanthroline과 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

생물 반응기를 이용하여 *S. cerevisiae*로부터 글루타치온을 생산하는 공정을 모니터링 하였으며, 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 OD₆₀₀, pH, 글루타치온 농도, cysteine 농도를 측정하였다. 그리고 형광분광광도계 (Fluorescence spectro-photometer, Hitachi, F-4500)를 이용하여 *S. cerevisiae*의 형광 특성을 측정하고 생산된 글루타치온과의 상관관계를 살펴보았으며, 초기 당 농도와 cysteine 농도에 따른 *S. cerevisiae*의 성장 정도와 글루타치온 생산성을 살펴보았다. 또한, 기질을 주기적으로 공급하면서 글루타치온의 최대 생산 조건을 검토하였다.

요약

의학 및 해양 수산 분야에서 광범위하게 사용되어지고 있는 글루타치온을 생산하는데 보다 적절한 배양 배지를 찾기 위해 당 농도, cysteine 농도변화에 따른 글루타치온의 생산성을 살펴보았으며 특히 형광 센서를 이용하여 글루타치온의 생산 특성을 모니터링하였다.

감사

본 연구는 광주 · 전남 테크노파크 제 2차 신기술 연구개발 사업의 일환으로 이루어지고 있으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Alfafara, C.G., Miura, K., Shimizu H., Shioya S. and Suga K.-i., "Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*"(1992) *Appl Microbiol Biotechnol.* **37** : 141-146
2. Shimizu, H., Araki, K., Shioya, S. and Suga K.-i., "Optimal Production of Glutathione by Controlling the Specific Growth Rate of Yeast in Fed-Batch Culture"(1991) *Biotechnology and Bioengineering.* **38** : 196-205
3. Hyun-Kee Kim and Yoon-Mo Koo, "Studies on the High Cell Density Cultivation of Glutathione-Producing Recombinant *Escherichia coli*"(1997) *Korean J. Chemical Engineers,* **35** : 526-531

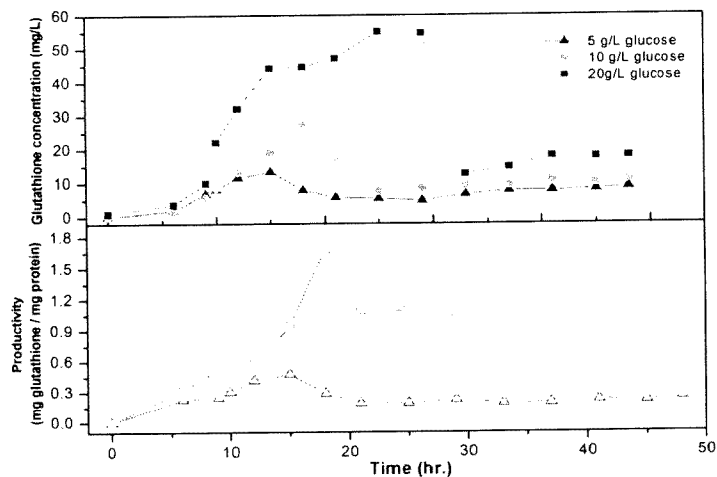


Figure 1. Influence of different glucose concentration on glutathione production