

효모를 이용한 glutathione의 대량 생산 및 공정 모니터링

김춘광^{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 *Saccharomyces cerevisiae* is used for commercial fermentative production. In this study, we have investigated the optimal conditions of production which could increase the GSH productivity and used it to maximize the production of GSH in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation process have been also real time monitored by a 2-dimensional fluorescence sensor.

서론

글루타치온(Glutathione)은 3개의 아미노산인 glutamate, cysteine 그리고 glycine이 결합되어 생성되는 트리펩타이드(tripeptide)이며 대부분의 생물체 내에 포함되어 있는 비 단백질성 티올(thiol) 화합물이다. 글루타치온은 생체 내에서 단백질의 sulfhydryl 그룹의 유지와 DNA의 전구물질 형성, 자유 라디칼과 산화물로부터 세포질 보호, 외래 물질의 해독 작용과 함께 대사물질의 환원제와 같은 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 글루타치온은 주로 간장 질환과 방사선장애, 당뇨병의 치료약으로 사용되고 있지만, 최근에는 항암제로서도 주목되고 있으며 또한 건강식품 분야에서의 용도도 증가되고 있다. 한편 글루타치온의 대량 생산을 위해서는 생물 반응기내의 미생물의 성장이나 대사공정을 온라인 모니터링하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 진탕배양에서 최적 조건을 검토한 후, 그 결과를 바탕으로 생물 반응기를 이용하여 글루타치온을 대량 생산하기 위한 최적 생산 조건을 살펴보았다. 또한 2차원 형광센서를 이용하여 각종 형광 영역에서 형광 특성 변화를 온라인 모니터링하였고 이를 각종 온라인 및 오프라인 데이터와 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754이며 균주의 활성화를 위해 YM(3 g/L yeast extract, 3 g/L malt extract, 5 g/L tryptone, 10 g/L glucose) agar배지를 사용하였으며 종균배양 및 전 배양에는 YM 배지(pH4)를 사용하였다. 본 배양에는 복합배지인 YM 배지와 최소 배지를 실험 조건에 따라 적절히 수정하여 사용하였다. 특히 최소 배지에는 글루타치온의 전구체로 사용되는 cysteine, glycine, glutamic acid를 첨가하여 사용하였다. 배양액 및 반응기는 121 °C, 14 psi 에서 최소 20분 이상 멸균하였으며, 최소 배지의 탄소원과 가용성 염을 분리하여 멸균한 후 혼합하였다.

2. 배양 방법

종균배양은 우선 냉동 보관된 종균을 50 ml YM 배지에서 12시간 배양하여 활성화시킨 후 전 배양액에 1 %(v/v)의 종균 배양액을 접종하였다. 본 배양은 1% (v/v)의 전 배양액을 접종하여 2.5 L 생물 반응기 (30 °C , 1 vvm, 400 rpm , pH 5.6)에서 배양하였다.

3. 생물반응기 배양 및 모니터링

운전조건과 생물반응기 내의 공정변수 즉, pH (pH electrode, METTLER Co.), 용존 산소 농도(O₂ sensor, METTLER Co.) 및 배가스 (O₂/CO₂ gas analyzer, LoKAS Co.)는 모두 Labview software ver. 6.1 (National instrument Co.)를 이용하여 실시간으로 온라인 모니터링 하였다. 또한, 생물반응기 내의 형광 특성 변화를 온라인 모니터링하기위해 2차원 형광분광광도계(Model F-4500, Hitachi Co.)를 사용하였다. 또한 스테인리스 생물반응기(KoBiotech Co., 2.5 L) 측면에는 액체 광학 전도관 (liquid light conductor, Lumatek, Germany)을 직접 연결할수 있는 석영창을 설치하였다.

4. 분석 방법

발효액의 상등액과 생산된 intracellular 글루타치온의 농도는 시료를 glutathione reductase, DTNB (5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)), NADPH와 반응 시킨 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 분

광광도계를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 진탕 배양기를 이용한 글루타치온의 최적 생산 조건 검토

진탕 배양기를 이용하여 배양액 조성에 따른 글루타치온의 생산성을 살펴보기 위해 복합 배양액 및 최소 배양액을 이용하여 글루타치온의 생산성을 살펴보았다. 또한 발효 조건(pH, 온도 및 cysteine 첨가 시간)에 따른 글루타치온의 생산성을 살펴보았다.

2. 생물 반응기를 이용한 글루타치온의 생산

진탕 배양기 실험을 통해 얻은 결과를 이용하여 생물 반응기에서 최소 배양액에 의한 글루타치온의 생산 특성을 살펴보았다. 생물 반응기를 이용한 회분식 배양에서는 기질의 농도, 아미노산의 첨가시간, 아미노산의 농도 변화에 따른 글루타치온의 생산성을 조사하였으며, 기질을 주기적으로 공급하는 유가 배양을 도입하여 글루타치온을 대량 생산하고자 하였다.

3. 글루타치온의 생산 공정 모니터링

글루타치온의 생산성에 영향을 줄 수 있는 각종 공정 변수를 온라인 모니터링하였으며 특히 2차원 형광 센서를 이용하여 *S. cerevisiae*의 형광 특성을 측정하여 온라인 및 오프라인 데이터와 상관관계를 살펴보았다.

요 약

본 연구에서는 효모 *Sacchromyces cerevisiae*가 글루타치온을 생산하는 최적 생산조건을 검토하였고 유가 배양을 통해 글루타치온을 대량 생산하고자 하였다. 또한 2차원 형광센서를 이용하여 글루타치온의 생산성에 영향을 줄 수 있는 각종 공정 변수를 온라인 모니터링하여 글루타치온의 생산성을 증가시키는데 이용하였다.

감 사

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. (1992), "Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 538-540.
2. Norio Teshima, Hideyuki Katsumate, Makoto Kurihara, Tadao Sakai Takuji Kawashima (1999), "Flow-injection determination of copper(II) based on its catalysis on the redox reaction of cysteine with iron(III) in the presence of 1,10-phenanthroline", *Talanta.* **50**, 41-47.
3. Marose, S., C. Lindemann, T. h. Scheper (1998), "Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring", *Biotechnol. Prog.* **14**, 63-74.