

## 재조합 대장균과 효모의 고정화 혼합세포계에 의한 $\gamma$ -Glutamylcysteine 생산

김 원 근 · 구 윤 모  
 인하대학교 공과대학 생물공학과

### Production of $\gamma$ -Glutamylcysteine by Immobilized Mixed Microbial System of Recombinant *E. coli* and Yeast

Won-Geun Kim and Yoon-Mo Koo<sup>†</sup>

Department of Biotechnology, College of Engineering,  
 Inha University, Incheon 402-751, Korea

#### ABSTRACT

$\gamma$ -Glutamylcysteine production by the immobilized microbial system of recombinant *Escherichia coli* and yeast was investigated.  $\gamma$ -Glutamylcysteine was synthesized from L-glutamic acid and L-cysteine in the presence of ATP by the reaction catalyzed by  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. An immobilized microbial cell system was developed for the efficient  $\gamma$ -glutamylcysteine production. Recombinant *Escherichia coli* and yeast were immobilized by alginate. Production of  $\gamma$ -glutamylcysteine was better with the recombinant *Escherichia coli* for both the synthesis of  $\gamma$ -glutamylcysteine and the ATP regeneration than the mixed system of recombinant *Escherichia coli* and yeast. The proper ratio of recombinant *Escherichia coli* to yeast was experimentally observed to be 1:4 in the mixed system. Although the immobilized system had the slower reaction rate, its reaction stability was increased by 10%.

#### 서 론

Glutathione은 동·식물 세포, 그리고 미생물에서 널리 발견되는 세포내 thiol-tripeptide로 해독작용 등 생체 내에서 중요한 기능을 담당하는 생체내 물질로 환원상태(GSH)와 산화상태(GSSG)로 존재하는데 대부분이 환원상태로 존재하고 있다. Glutathione은 두 개의 효소,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase에 의하여 합성되는데 이때에 각각 1 mole의 ATP를 소비하게 된다

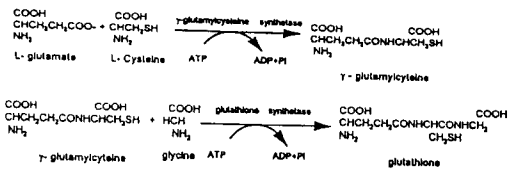


Fig. 1. The pathway of glutathione synthesis.

(Fig. 1).  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase는 GSH에 의하여 feed back 저해를 받고(1, 2) glutathione synthetase는 저해를 받지 않기 때문에  $\gamma$ -

<sup>†</sup> Corresponding Author

glutamylcysteine 합성과정이 속도결정단계가 된다.  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase(4)와 glutathione synthetase(5, 6)를 대량으로 생산하기 위하여 유전자 조각과 plasmid를 이용하여 재조합 미생물을 만드는 연구가 수행되었으나 대부분의 경우 glutathione은 효모에서 추출하거나 화학적 합성 방법을 통하여 생산되었다. 그러나 효모내의 glutathione 함량이 낮고, 또 화학적 합성 방법은 시간이 오래 걸리고 복잡하기 때문에 새로운 glutathione 생산공정으로서 ATP 재생공정을 포함하는 고정화반응계를 이용하려는 연구가 진행되었다(7, 8). ATP의 재생을 위하여 대장균 내의 acetate kinase를 이용하는 방법과 효모의 glycolytic pathway를 이용하는 방법 두 가지를 사용할 수 있는데(9, 10) ATP의 재생을 가능하게 하기 위해서는 대장균과 효모를 각각 toluene과 acetone으로 처리하여 세포막에 투과성을 줌으로써 반응물과 생성물, 또 ADP와 재생된 ATP 등이 자유롭게 이동할 수 있게 한다(11, 12).

본 연구에서는 관련되는 두 개의 효소 중에서 반응속도를 결정하는  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase의 생산량을 높인 재조합 대장균 HB101/pGH501을 사용하여 재조합 대장균만을 이용한 단일세포반응계와 재조합 대장균과 효모를 이용한 혼합세포반응계에서의  $\gamma$ -glutamylcysteine 생산에 있어서의 적절한 반응물의 농도, 세포의 양, 대장균과 효모의 비율과 생산 안정성에 대하여 조사하였다. 또한 이들 단일세포반응계와 혼합세포반응계를 alginate를 이용하여 고정화하였을 경우  $\gamma$ -glutamylcysteine의 생산농도와 안정성에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 실험에 사용한 재조합 대장균 균주는 고려대학교 농화학과에서 분양받은 HB101/pGH501으로  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase를 coding하는 gshI gene 두 개를 pUC8 plasmid에 cloning한 후 균주 세포로 대장균 HB101에 transformaton시킨 재조합 대장균이다. 효모는 90% 이상의 활성을 가지고 있는 건조효모(bakers yeast)를 Sigma(YSC-1, type I)에서 구입하여 사용하였다.

재조합 대장균은 LB 배지에서 배양한 후 바로 toluene으로 처리한 후 사용하였다. LB 배지는 증류수 1L당 bacto-tryptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 10g으로 조성된다. Bacto-tryptone, yeast

extract는 Difco에서 구입하여 사용하였다. 생산배지에 사용된 L-glutamic acid, L-cysteine, acetyl phosphate, ATP, glucose는 Sigma에서 구입하여 사용하였고 potassium phosphate buffer는 pH 7.5로 맞추어 실험하였다.

### Toluene과 Acetone을 이용한 세포처리

반응물과 생성물이 세포 내외로 이동하기 위하여 세포에 투과성을 주는 방법으로 다음과 같이 toluene과 acetone으로 세포를 처리하였다. 재조합 대장균 HB101/pGH501 5g(wet weight)을 10% toluene과 0.5mM L-cysteine이 함유된 5.0mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 100ml에 현탁시킨 후 37°C에서 30분 동안 진탕하면서 처리한다. Toluene으로 처리된 재조합 대장균 HB101/pGH501은 4000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 침전시켜 얻은 후 같은 buffer로 두 번 씻어낸 후 사용한다. 이렇게 얻어진 재조합 대장균 HB101/pGH501은  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase와 acetate kinase의 source로 사용된다.

건조 효모는 0.9% saline solution 10ml에 현탁시킨 후 이 현탁액을 차가운 acetone solution 90ml에 넣고 5분 동안 진탕시켜준다. Acetone으로 처리된 효모는 4000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 침전시킨 후 얻어진다. 이렇게 하여 얻어진 효모는 0.5mM L-cysteine이 함유된 5.0mM potassium phosphate buffer, pH 7.0으로 두 번 씻어낸 후 사용한다. Acetone으로 처리된 효모는 ATP 재생공정에서 glycolytic pathway의 source로 사용된다.

대장균과 효모를 처리하는 용매를 다르게 한 이유는 여러 용매를 처리한 결과 대장균은 toluene으로 효모는 acetone으로 처리하는 것이 가장 효율적으로 나타났기 때문이다.

### Alginate를 이용한 세포고정화

세포를 0.9% saline solution에 현탁시킨 것을 2% sodium alginate solution과 섞은 후 잘 혼합시킨다. 기포의 제거를 위하여 혼합 용액을 4°C의 cold chamber에서 12시간정도 방치하였다. 세포와 alginate의 혼합용액을 syringe를 통하여 0.1M CaCl<sub>2</sub> 용액(4°C)에 떨어뜨리면 직경 1.5mm 정도의 bead가 형성된다. Bead를 0.9% saline solution으로 충분히 씻어준 후 사용하였다.

### $\gamma$ -Glutamylcysteine 분석

$\gamma$ -Glutamylcysteine을 분석하기 위하여 아미노산

분석방법인 OPA 방법을 사용하였다(13). 아미노산과  $\gamma$ -glutamylcysteine의 분석은 HPLC(오름 Tech)를 사용하였다. Column은 Beckman C-18 (250×4.6mm)를 사용하였고 0.05M acetate buffer(pH 6.8)와 methanol을 0~20분 동안 0~80%의 methanol gradient로 0.8ml/min의 속도로 흘려주었다. 농도측정은 fluorescent detector(Gilson)를 이용하여 파장 excitation 345nm, emission 450nm에서 사용하였다.

결과 및 고찰

대장균을 이용한 ATP 재생공정

$\gamma$ -Glutamylcysteine 생산공정에서 조효소 역할을 하는  $MgCl_2$ 와 효소의 안정성과 pH의 유지를 위한 potassium phosphate buffer의 농도에 대하여 실험하였다. 60mM L-glutamic acid, 20mM L-cysteine, 20mM ATP와 여러농도의  $MgCl_2$ 와 potassium phosphate buffer의 2ml 혼합용액이 들어있는 test tube에 toluene으로 처리된 재조합 대장균 200mg (wet weight)을 넣고 37°C에서 2시간 반응시켰다.  $MgCl_2$ 가 20mM일 때와 potassium phosphate buffer가 50mM일 때 최적의 조건으로 가장 많은  $\gamma$ -glutamylcysteine가 생산됨을 볼 수 있었다(Fig. 2).

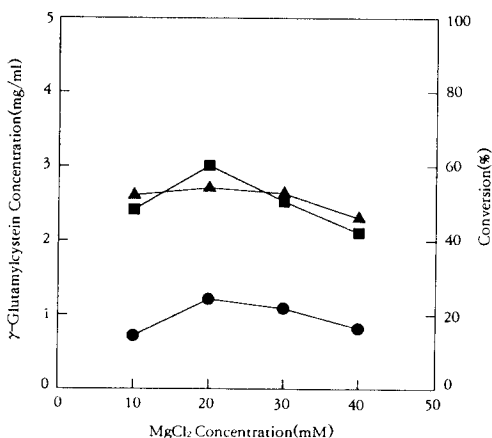


Fig. 2. Effect of concentration of  $MgCl_2$  on the  $\gamma$ -glutamylcysteine production with the concentration of potassium phosphate buffer as a parameter. ●: 25mM, ■: 50mM, ▲: 100mM potassium phosphate buffer.

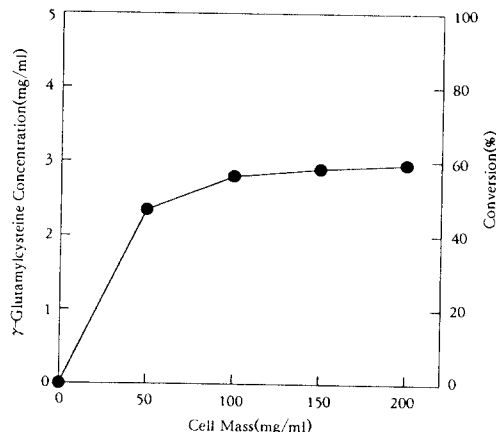


Fig. 3. Effect of concentration of the toluene-treated HB101/pGH501 cell mass on the  $\gamma$ -glutamylcysteine production.

$\gamma$ -Glutamylcysteine 생산공정에 쓰이는 toluene으로 처리된 재조합 대장균의 양은 반응액 1ml당 100mg이면 충분한 것으로 나타났다(Fig. 3). 각 세포마다 발현되는  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase의 양은 일정하다고 보고 세포의 양과 효소의 양은 비례한다고 보았다. 참고로 toluene으로 처리된 재조합 대장균에 의한  $\gamma$ -glutamylcysteine의 생산량은 처리되지 않은 대장균에 의한 생산량에 비해 25% 정도 감소된 것으로 확인되었다.

대장균 내의 acetate kinase를 이용한 ATP 재생공정을 통한  $\gamma$ -glutamylcysteine 생산실험을 수행했다. 먼저 acetyl phosphate의 농도에 따른  $\gamma$ -glutamylcysteine의 생산량을 보기 위하여 60mM L-glutamic acid, 20mM L-cysteine, 20mM  $MgCl_2$ , 1mM ATP, 50mM potassium phosphate buffer와 여러농도의 acetyl phosphate 2ml 혼합용액이 들어있는 test tube에 재조합 대장균 200mg을 넣고 37°C에서 시험하였을 때 acetyl phosphate는 40mM의 농도에서 충분하여 거의 100%의 전환율을 보였다.  $\gamma$ -Glutamylcysteine의 농도가 5mg/ml일 때 L-cysteine이 전부 전환된 것으로 나타났다. ATP 재생공정을 사용하지 않았을 때와 마찬가지로 반응시간이 2시간이 넘으면 생산량이 일정한 것으로 나타났다(Fig. 4).

Toluene으로 처리된 재조합 대장균의 반응계의 생산 안정성을 살펴보기 위하여 2ml의 60mM L-glutamic acid, 20mM L-cysteine, 20mM  $MgCl_2$ ,

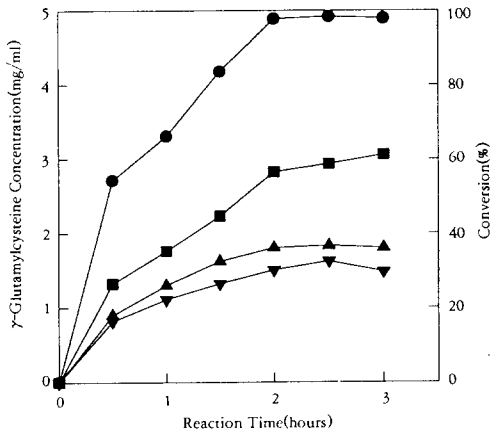


Fig. 4. Effect of the acetyl phosphate concentration on the  $\gamma$ -glutamylcysteine production by the toluene-treated HB101/pGH501 cells; ▼: 10mM, ▲: 20mM, ■: 30mM, ●: 40mM acetyl phosphate.

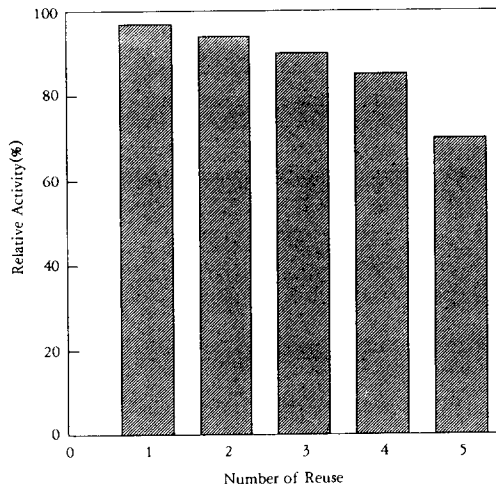


Fig. 5. Stability of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthesizing activity of the toluene-treated HB101/pGH501 cells.

1mM ATP, 40mM acetyl phosphate, 50mM potassium phosphate buffer가 들어있는 test tube에 toluene으로 처리된 재조합 대장균 200mg을 넣고 37°C에서 2시간 동안 진탕반응시켰다. 반응 후 4000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 대장균만을 취한 후 이 대장균을 사용하여 같은 실험을 반복하였을 때 5번 재사용 후 activity가 30% 정도 감소함

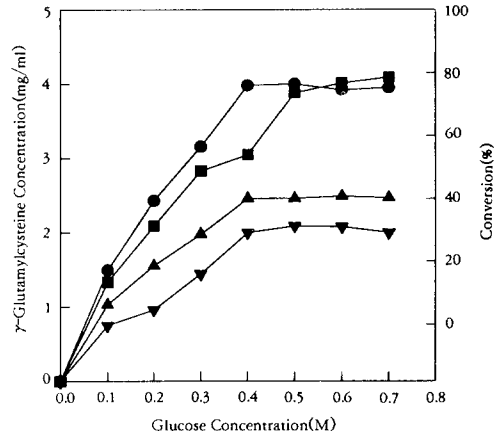


Fig. 6. Effect of the glucose concentration on the  $\gamma$ -glutamylcysteine production with 100mg/ml toluene-treated HB101/pGH501 with the acetone-treated yeast concentration as a parameter, ▼: 100mg/ml, ▲: 200mg/ml, ■: 300mg/ml, ●: 400mg/ml acetone-treated yeast cell.

을 알 수 있었다(Fig. 5).

이러한 activity의 감소는  $\gamma$ -glutamylcysteine 생산 효소인  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase나, ATP 재생공정에 필요한 효소들의 활성의 감소와 함께 용매처리된 세포들을 원심분리하는 과정에서 효소의 손실로도 해석 할 수 있다.

#### 효모를 이용한 ATP 재생공정

재조합 대장균에서  $\gamma$ -glutamylcysteine을 생산하고 효모내의 glycolytic pathway를 통하여 ATP를 재생하는 공정으로  $\gamma$ -glutamylcysteine의 생산을 시험하였다. 여기서 사용된 재조합 대장균과 효모는 각각 toluene과 acetone으로 처리된 세포들이다. 60mM L-glutamic acid, 20mM L-cysteine, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM potassium phosphate buffer와 다양한 농도의 glucose 2ml 혼합용액이 들어있는 test tube에 재조합 대장균 200mg과 여러농도의 효모를 37°C에서 8시간 동안 진탕반응시켰다. 재조합 대장균과 효모를 1:3이나 1:4 정도의 비로 혼합하여 반응시켰을 때  $\gamma$ -glutamylcysteine가 높은 생산성을 보였고 효모 내에서 ATP를 재생하는데 쓰이는 glucose의 농도는 0.5M일 때가 가장 효율적으로 나타났다(Fig. 6). 대장균에서도 glucose를 사용하여

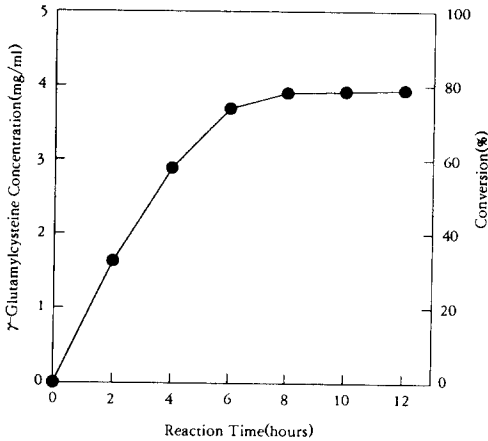


Fig. 7. Time course of  $\gamma$ -glutamylcysteine production by toluenetreated HB101/pGH501 cells with acetone-treated yeast cells.

ATP 재생을 할 수 있으나 많은 단계를 거치게 되므로 단계가 적은 효모에서 ATP를 재생하는 것이 더 효율적이다.

재조합 대장균과 효모의 비를 1:3으로 하고 glucose의 농도를 0.5M로 하였을 때 8시간의 반응으로 최대의  $\gamma$ -glutamylcysteine을 얻었다(Fig. 7). 이 실험결과는 재조합 대장균만을 사용하여  $\gamma$ -glutamylcysteine 생산과 동시에 ATP 재생을 수행했을 때보다 20% 정도의 생산량이 감소되었음을 보여 준다. 이는 재조합 대장균에서 생산된 ATP에 비하여 효모에서 재생된 ATP가  $\gamma$ -glutamylcysteine synthesizing site에서 compartmentalization으로 설명되는 반응비효율성에 기인하는 것으로 해석된다.

재조합 대장균과 효모의 혼합세포계를 이용하여  $\gamma$ -glutamylcysteine의 생산과 ATP의 재생을 동시에 수행하는 공정의 안정성을 살펴보기 위하여 2ml의 60mM L-glutamic acid, 20mM L-cysteine, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5M glucose, 50mM potassium phosphate buffer의 혼합용액이 들어있는 test tube에 toluene으로 처리된 재조합 대장균 200mg과 acetone으로 처리된 효모 600mg을 넣고 37°C에서 진탕하며 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 재조합 대장균과 효모를 얻은 후 이 세포들을 다시 같은 조건 하에서 반응시켜 이 혼합 반응계의 안정성을 살펴 보았다. 이 경우에 대장균만을 반응계로 사용할 경우보다 높은 35% 정도의 activity가 감소됨을

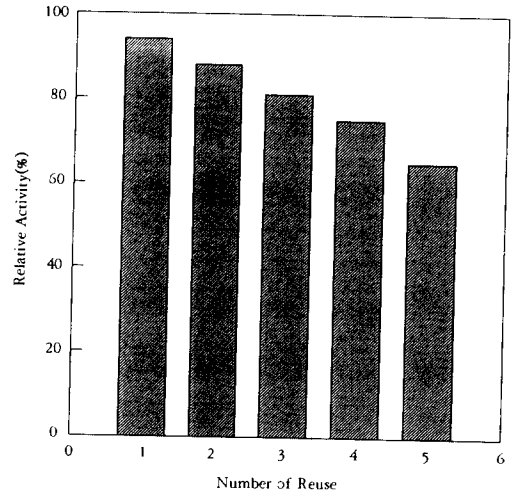


Fig. 8. Stability of  $\gamma$ -glutamylcysteine production system with toluenetreated HB101/pGH501 cells and acetone-treated yeast cells.

보였다(Fig. 8).

#### Alginate로 고정화된 대장균의 특성

Alginate를 이용하여 toluene으로 처리된 재조합 대장균을 고정화하여  $\gamma$ -glutamylcysteine의 생산성의 변화와 안정성에 대하여 실험하였다. 고정화 세포계의 경우 물질전달등의 제약이 있으나 연속공정 등 생산경제성의 측면에서 현탁반응에 비해 유리할 것으로 사료된다. 고정화에 따른  $\gamma$ -glutamylcysteine 생산의 최적 반응시간을 알아내기 위하여 2% alginate solution 5ml에 재조합 대장균 700mg을 넣고 bead를 만든 후 10ml의 60mM L-glutamic acid, 20mM L-cystein, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 40mM acetyl phosphate, 50mM potassium phosphate buffer가 들어있는 100ml flask에 넣고 37°C에서 진탕하며 반응시켰을 때 반응완료시간이 5시간 정도로 나타났다. 이는 같은 조건 하에서 고정화하지 않은 재조합 대장균을 사용하였을 때보다 반응시간이 3시간 정도 더 걸렸음을 보여준다. 이러한 결과는 alginate에 의해 반응물 및 생성물의 이동이 저해를 받는 것으로 해석된다(Fig. 9).

0.5~3%까지의 alginate solution을 사용하여 bead를 만들어  $\gamma$ -glutamylcysteine의 생산성을 살펴 보았을 때 큰 차이가 없었으므로 모든 실험에서 2% alginate solution을 세포의 고정화에 사용하였다. Alginate bead에 고정화되는 재조합 대장균의

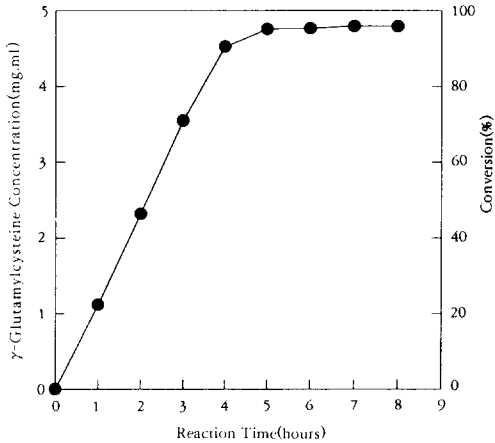


Fig. 9. Time course of  $\gamma$ -glutamylcysteine production by toluene-treated HB101/pGH501 cells immobilized by alginate.

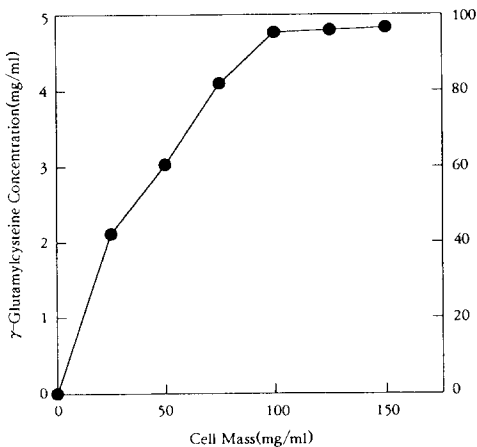


Fig. 10. Effect of the concentration of toluene-treated HB101/pGH501 cells immobilized by alginate on  $\gamma$ -glutamylcysteine production.

양에 따른  $\gamma$ -glutamylcysteine의 생산량의 변화는 고정화하지 않고 실험한 결과와 마찬가지로 반응액 1ml당 100mg의 양이 적절한 것으로 나타났다(Fig. 10).

고정화된 재조합 대장균의 안정성을 조사하기 위하여 10ml의 60mM L-glutamic acid, 20mM L-cysteine, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 40mM acetyl phosphate, 50mM potassium phosphate buffer가

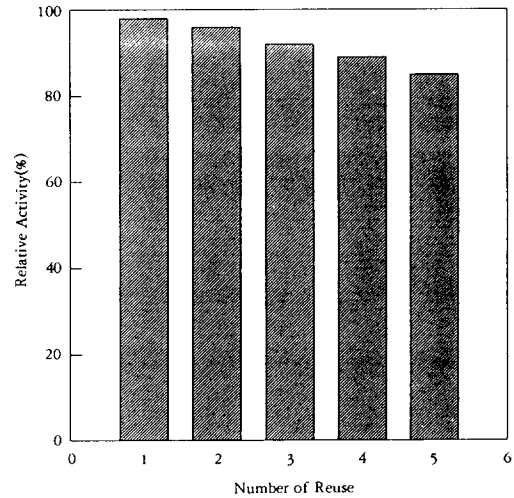


Fig. 11. Stability of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthesizing activity of the toluene-treated HB101/pGH501 cells immobilized by alginate.

들어있는 100ml flask에 고정화된 재조합 대장균 1g을 넣고 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 4시간 후 용액을 제거하고 반응에 사용된 bead를 같은 조건 하에서 반응시켰다. 이 때의 안정성은 고정화하지 않았을 때보다 증대되어 5번 재사용 했을 때 15% 정도의 activity만이 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 11).

Alginate로 고정화된 대장균과 효모의 혼합세포계 재조합 대장균과 효모의 혼합 세포반응계를 alginate로 고정화하였을 경우  $\gamma$ -glutamylcysteine의 생산이 최대가 되는 세포의 비율은 1:4이고 반응 시간은 10시간 정도로 나타났다(Fig. 12).

Alginate로 고정화하였을 경우와 그렇지 않았을 경우를 비교하면  $\gamma$ -glutamylcysteine이 최대로 생산되는 시간이 약 4시간 정도 더 걸린 것으로 보아 반응물들의 이동도 문제가 되지만 대장균과 효모간의 ATP 이동에도 문제가 있다고 보여진다. 재조합 대장균과 효모가 고정화된 혼합 세포계의 안정성을 조사하기 위하여 10ml의 60mM L-glutamic acid, 20mM L-cysteine, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5M glucose, 50mM potassium phosphate buffer가 들어 있는 100ml flask에 2% alginate solution 10ml에 고정화된 재조합 대장균(1g)과 효모(4g)를 넣고 37°C에서 10시간 동안 진탕하며 반응시켰다. 10시간 후 반응이 끝난 용액을 제거하고 반응에 사용된 bead

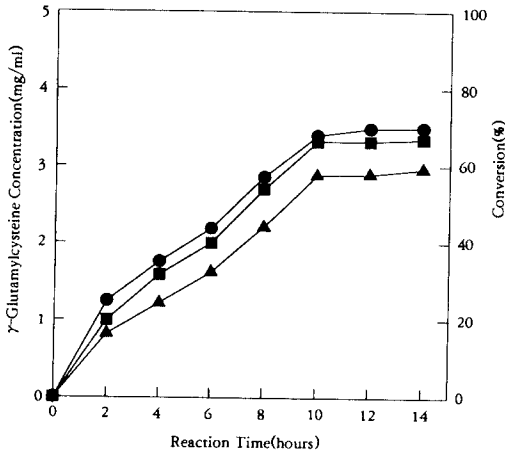


Fig. 12. Time course of  $\gamma$ -glutamylcysteine production with the acetone-treated yeast cells and toluene-treated HB101/pGH501 cells co-immobilized by alginate with the concentration of acetone-treated yeast cells as a parameter;  $\blacktriangle$ : 2g,  $\blacksquare$ : 3g,  $\bullet$ : 4g acetone-treated yeast cells.

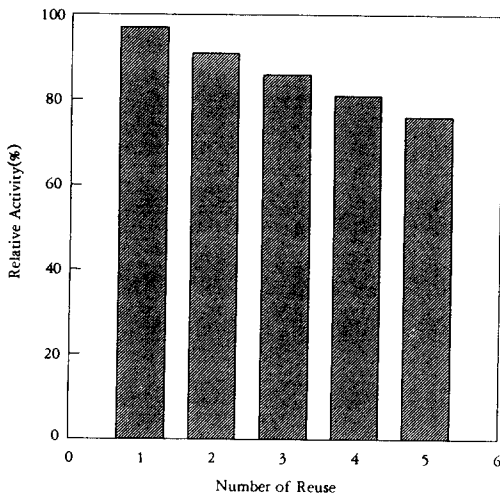


Fig. 13. Stability of the  $\gamma$ -glutamylcysteine producing system with toluene-treated HB101/pGH501 cells and acetone-treated yeast cells co-immobilized by alginate.

번 재사용했을 때 25%의 activity가 감소됨을 보였다. 이는 재조합 대장균만을 고정화했을 경우와 마찬가지로 안정성이 증가되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 13). 반응 시간이 전체적으로 길어졌음에도 안정성이 증가되는 것으로 보아 연속생산에 있어서는 고정화세포계가 유리함을 알 수 있었다.

### 요 약

$\gamma$ -Glutamylcysteine 생산에 있어서 재조합 대장균 HB101/pGH501만을 이용한 단일세포반응계가 재조합 대장균과 효모를 이용한 혼합세포반응계보다 반응시간이 짧고 생산농도가 높은 것으로 나타났다. 그러나 생산경제성 측면에서 ATP 재생공정을 위하여 혼합세포반응계를 사용하였다. 재조합 대장균과 효모를 이용한 혼합세포반응계에서 대장균과 효모의 비율은 1:4가 적합함을 보였고, ATP 재생공정에 사용되는 glucose는 0.5M의 농도에서 가장 효율적으로 나타났다. 재조합 대장균과 효모를 alginate를 이용하여 고정화하여 반응계로 사용하였을 경우 반응에 필요한 시간이 길어지고 생산농도도 감소되거나 반응계의 안정성은 10% 정도 증가됨을 알 수 있었다. 실험결과 alginate로 고정화된 혼합세포반응계를 사용하여  $\gamma$ -glutamylcysteine를 연속 생산할 수 있음을 확인하였다.

### 감 사

본 연구는 1994년도 선도기술개발과제 (과학기술처)의 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. K. Murata and A. Kimura (1982), *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1047.
2. K. Watanabe, K. Murata and A. Kimura (1986), *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1925.
3. H. Gushima, T. Miya, K. Murata and A. Kimura (1983), *J. Appl. Biochem.*, **5**, 210.
4. Y. Ohtake, K. Watanabe, H. Tazuka, T. Ogata, S. Yabbauchi, K. Murata and A. Kimura (1988), *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2753.
5. K. Murata, T. Miya, H. Gushima and A. Kimura (1983), *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1381.
6. M. Kato, Kobayashi, K. Murata, Nishioka and

를 위와 같은 조건 하에서 반응에 재사용하였다. 5

- J. Oda (1989), *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3071.
7. K. Mutata, K. Tani, J. Kato and I. Chibata (1979), *J. Appl. Biochem.*, **1**, 283.
  8. K. Mutata, K. Tani, J. Kato and I. Chibata (1980), *Biochimie.*, **62**, 347.
  9. Bruce K. Hamilton., Clark, Michael C. Archer and K. Colton (1976), *AIChE.*, **22**, 1079-1090.
  10. Bruce K. Hamilton, Clark Archer and K. Colton (1977), *AIChE.*, **23**, 1-10.
  11. K. Murata, K. Tani, J. Kato and I. Chibata (1980), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 11.
  12. K. Murata, K. Tani, J. Kato and I. Chibata (1981), *Enz. Microb. Technol.*, **3**, 233.
  13. C. K. Lim, HPLC of Small Molecules (1986), IRL PRESS.