

이온교환 크로마토그래피를 이용한 Glutathione 분리

김정훈 · 손영종 · 구윤모

인하대학교 공과대학 생물공학과, ¹의과대학 생화학연구소
(접수 : 1997. 10. 9, 게재승인 : 1997. 10. 28)

Separation of Glutathione by Ion Exchange Chromatography

Jung-Hoon Kim, Young-Jong Son¹, and Yoon-Mo Koo[†]

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

¹College of Medicine, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 1997. 10. 9, Accepted : 1997. 10. 28)

Glutathione(L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH) produced by microbial enzymes was separated by a liquid chromatography. In order to select a resin which would bind GSH efficiently, a batch adsorption experiment was carried out with GSH solution and various resins at pH 8.0. GSH bound to Q-sepharose and QAE-sephadex among anion exchange resins, but the latter was found not to be suitable because of the reduction of resin volume at high salt concentration. Preliminary experiments using a standard solution were carried out to separate GSH. GSH and γ -glutamylcysteine were separated from the other constituents by applying step gradient of salt(NaCl) concentration. GSH was successfully separated from γ -glutamylcysteine by applying Tris buffer containing 35mM NaCl. Chromatographic separation behaviors for the enzymatic product was similar to that for the standard solution. Separation yields of GSH from the standard solution and enzymatic product solution were 72.6% and 84.4%, respectively.

key words : glutathione, liquid chromatography, γ -glutamylcysteine, Q-sepharose

서론

Glutathione(L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH)은 세 개의 아미노산(Glu, Cys, Gly)으로 구성된 단순한 tripeptide로서 인체내에서 생성된 유해산소나 유입된 중금속에 대한 해독작용(1), 간암 등에 대한 항암작용(2), 물질 수송과 생합성에서의 조효소와 중간물질, 생체내에서 cysteine의 운반과 공급 등에 관여한다(3, 4). GSH는 간질환치료제와 약물·자가·임신중독의 해독제, 중금속 해독제 등으로 이용되고 있고, 세포증식과 염증반응에 깊은 관계가 있는 물질이라 알려져 있으며, 최근에는 이의 항염증작용 등을 활용하여 화장품과 의약품, 식품첨가물에 응용하는 연구가 이루어지고 있다(5).

GSH는 1920년대에 효모를 이용한 합성이 보고된 이후 효모로부터 추출하는 방법과 함께 유전자조작을 이용한 효소적 합성법이 정립되었으나(6), 생산모액은 GSH의 함량이 낮기 때문에 보다 효율적인 GSH 분리 기술의 개발이 필요하다. 이전에 사용되었던 여러 방법 중 고가 장비의 하나인 HPLC 등을 사용하여

분리하는 방법은 75%의 분리효율을 보이고 있으나(7) 이는 여러 단계의 부가적인 운전이 요하게 된다. 현재 일본에서 효모 발효법에 의해 산업적으로 생산된 모액으로부터 추출법으로 GSH를 생산하고 있는데(5), 이는 구리이온처리 후 전해탈동법에 의한 추출에 의한 분리방법으로(8), 이 기술의 사용에는 특허 도입에 따른 비용증가가 따르게 된다. 양이온 교환수지와 음이온 교환수지를 교대로 사용하여 분리한 실험에서 50% 에탄올침가 후, 73% 회수효율도 보고되고 있다(9). 개선된 구리침전법과 전기투석법을 병행하여 GSH를 분리한 실험에서 구리침전 과정에서 59%의 GSH 회수율을 얻었고, 구리를 제거하기 위한 전기투석에서는 침전 GSH의 73%를 순수분리한 바 있다(10).

칼럼 크로마토그래피 중에서 용질과 bead사이의 정전기적인 힘(electrostatic force)에 의해 흡착하는 경우 이온교환 크로마토그래피라 하며(11), 단백질의 경우 양성 다가의 전기력을 띠고 있기 때문에 이온교환 수지를 이용한 흡착의 차이로 물질 분리를 수행할 수 있다. 아미노산의 양이온과 음이온의 총 전하수가 같아져 아미노산의 전하가 0이 되는 pH를 아미노산의 등전점(pI)이라 한다. 이온교환 크로마토그래피의 특징은 아미노산이 여러 해리상수(pK)의 해리기를 가지고 있기 때문에 환경의 pH에 따라 아미노산은 양이온, 음이온, 그리고 중성의 zwitterion으로 존재하며, pK의 차이로 인해 여러 pH에서 서로 다른 ionic fraction 값을 가지게 된다. 이러한 이온조성의 차이는 전기장에서는 이온교환막을 통한 이온의 이동에 영향을 주며, 이온교환 크로마토그래

[†] Corresponding Author : 253 Yonghyundong Namku, Incheon, 402-751

Tel : 032-860-7513, Fax : 032-875-0827

E-mail : ymkoo@dragon.inha.ac.kr

피에서는 흡착제에 대한 성질에 영향을 주게 된다. 용액의 pH가 pI보다 낮을 때는 아미노산은 양전하를 띠게 되어 cationic fraction이 증가하고, pH가 높을 때는 음전하를 띠게 되어 anionic fraction이 증가하게 된다. 아미노산의 pK값과 Handerson-Hasselbalch식을 적용하여 pH에 따른 아미노산의 ionic fraction을 구할 수 있으며, 그 식은 다음과 같다(12).

$$A^{+1} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK} + 10^{2pH - pK_1 + pK_2}}$$

$$A^0 = (10^{pH - pK_1}) \cdot A^{+1}$$

$$A^{-1} = (10^{2pH - pK_1 - pK_2}) \cdot A^{+1}$$

$$A^{-2} = (10^{3pH - pK_1 - pK_2 - pK_3}) \cdot A^{+1}$$

$$z_{avg} = \sum_z zA^z$$

여기서 A^z 는 전체 전하 $z(+1, 0, \text{또는 } -1)$ 을 운반하는 아미노산의 mole fraction을 나타낸다. 또한 z_{avg} 는 일정 pH에서 아미노산의 평균분자전하(average molecular charge)로 정의되며, Ala, Phe과 같은 중성 아미노산의 경우, z_{avg} 는 $A^1 - A^{-1}$ 로, Asp와 같은 산성 아미노산의 경우, $A^1 - A^{-1} - 2A^{-2}$ 로, Lys과 같은 염기성 아미노산의 경우, $2A^{-2} + A^{-1} - A^1$ 로 각각 계산되어 있는데 그 수치가 0이 되는 pH가 아미노산의 pI라 할 수 있다

GSH 생산균주 내에서의 생합성시, 효소에 의한 GSH 생산모형에는 목적물질인 GSH를 포함하여 미반응기질(glutamate, cysteine, glycine), 중간물질(γ -glutamylcysteine), glucose, ATP 등 다양한 수용성 물질이 용해되어 있기 때문에 GSH의 선택적 분리가 필요하다(9, 13). 본 실험은 효소에 의한 생산모형을 GSH와 함께 상기의 미반응기질, 중간물질 등과 혼합된 용액으로 단순화한 표준용액(standard solution)을 제조한 후 이온교환 수지를 이용하여 GSH를 순수분리하고자 하였으며, 이를 토대로 실제 생산모형에서의 GSH 분리를 수행하였다. 단일수지의 사용으로 공정상의 개선과 함께 분리효율을 개선하여 보다 경제적인 GSH 순수분리를 목적으로 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 cysteine, glutamate, glycine, GSH, γ -glutamylcysteine, glucose, ATP, Tris, *o*-PT(*o*-phthaldialdehyde), DTE(dithioerythritol), DTNB(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) 등은 Sigma社에서 구매하였으며, 사용된 수지는 다음과 같다; DE52(DEAE-cellulose, Whatman社), Q-sepharose(Sigma社), QAE-sephadex(Pharmacia社), CM-sepharose(Sigma社), S-sepharose(Sigma社). *Saccharomyces cerevisiae*를 고정화시켜 GSH를 생산하는 Murata의 방법(9, 13)에 의한 생산모형을 실험에 사용하였다.

방법

실험에 사용할 수지의 선택을 위해 회분식 흡착실험을 수행하였다. 시료는 standard solution과 미생물 체내의 효소에 의해

생산된 생산모형을 각각 사용하였다. 선택된 수지를 column에 충전시킨 후, 시료를 수지에 흡착시킨 다음 NaCl을 함유한 완충용액을 용리시켜 GSH와 함께 시료에 용해되어있던 물질들이 GSH와 분리되어 유출되도록 하였다.

분석

GSH의 측정은 발색시약 중의 *o*-PT를 사용하여 발색시키는 Puri의 방법(13)과 DTE/DTNB로 발색반응 시키는 Tietze(14)와 Dennda의 방법(15)을 병행하여 실시하였다. 시료에 *o*-PT를 첨가하여 발색반응시킨 후, 50mM sodium acetate trihydrate(pH 6.8) 및 methanol(Fisher Scientific社)을 완충용액으로 사용하는 HPLC system(LC-10AD, Shimadzu社)에서 형광광도계(Ex λ : 340, Em : 450, GBC社)로 측정하였으며, 분석에 사용된 column은 C18 column(Regis社)이었다. *o*-PT 시약을 이용한 방법은 glutamate와 glycine의 측정에도 이용되었다. DTE/DTNB 방법은 시료를 DTE/DTNB로 발색반응 시킨 후, 23mM ammonium formate (pH 5.0, Sigma社)와 methanol을 완충용액으로 사용하는 HPLC system에서 분광광도계(파장: 280nm, Waters社)로 분석하였으며 C18 column을 사용하였다. DTE/DTNB 시약을 이용한 방법은 cysteine, γ -glutamylcysteine의 측정에도 이용되었다.

Glucose는 Benedict 용액(Fluka社)을 시료에 첨가한 후 열처리로 발색시켜 검정하였으며, ATP는 Adams의 방법에 따라 ATP 분석 kit(Sigma社)를 사용(16)하여 분석하였다.

결과 및 고찰

이온교환수지 및 완충용액의 pH 선정

GSH 순수분리에 적합한 이온교환수지를 선정하기 위하여, DE52, Q-sepharose, QAE-sephadex 등의 음이온 교환수지는 20mM Tris/HCl (pH 8.0)에서, CM-sepharose, S-sepharose 등의 양이온 교환수지는 20mM Mes/NaOH (pH 6.5)에서 GSH의 부착여부를 검사하였다. GSH(10mM) 수용액 0.25mL를 각각의 수지와 혼합 후, 교반시켜 수지와 GSH의 결합반응을 유도하였다. 반응이 끝난 수지를 4°C에서 원심분리(500rpm, 5min)하여 수지와 결합되지 않는 상등액(용액 1)을 회수하였고, 침전된 수지는 완충용액으로 2회 세척한 후, 1.0M의 NaCl이 함유된 완충용액을 첨가하여 실온에서 10분간 방치하여 각 수지와 결합된 물질들을 분리시킨 다음 원심분리하여 회수하였다(용액 2). 상기의 과정을 거쳐 각 수지로부터 회수된 용액 1 및 용액 2에 함유된 GSH를 측정하여 각 수지에 GSH가 결합되는지를 검사하였다(Table 1). GSH와 결합하는 수지는 DE52, Q-sepharose와 QAE-sephadex였으며, 나머지 수지(양이온 교환수지)의 경우, 용액 1에서 대부분의 GSH가 측정되었기 때문에 GSH가 결합되지 않는다고 판단하였다. DE52의 경우, 용액 1에서 초기 GSH의 9%가 측정되었으며, 용액 2에서도 초기 GSH의 12%만이 측정되었고, Q-sepharose, QAE-sephadex의 경우, 용액 1에서는 GSH가 거의 측정되지 않았으며, 용액 2에서 약 90%의 GSH를 보였다.

GSH가 결합되는 수지들 중에서 DE52의 경우에는 상등액에서 9%의 GSH가 측정되었기 때문에 상당량의 GSH가 수지에 결합되기는 하지만 수지의 세척과정을 거친 후 회수한 용액 2에

서도 역시 소량의 GSH만이 측정되었다. 이는 DEAE-계 흡착제가 부분적으로 양전하화(protonated)되는 성질로 인해(11), GSH가 수지에 결합되는 강도가 매우 약하기 때문으로 세척과정 중 유실되는 것으로 사료되었다. QAE-sephadex의 경우, GSH의 결합강도는 강한 편이었으나, column 크로마토그래피를 실시하였을 때 고농도의 NaCl이 첨가되면 QAE-sephadex의 부피가 현저히 감소하는 현상을 보였으며 이로 인해 flow rate가 급격히 감소하는 현상을 나타내었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 GSH 정제에는 Q-sepharose가 가장 적합하다고 판단되었다.

Q-sepharose의 pH 변화에 따른 GSH 흡착능을 실험한 결과, pH 8.0 미만은 용액 1에서 수지와 반응하지 않는 GSH가 검정되었고, pH 8.0에서 91%의 흡착능을 보였으나, pH 8.0 이상에서 그 이상의 흡착능을 보이지 않았기 때문에 Q-sepharose는 pH 8.0에서 사용하였다(Figure 1).

Table 1. Affinities of GSH to several ion-exchange resins.

Resin	Relative amount of GSH (%)				
	CM-sepharose	S-sepharose	DE52	Q-sepharose	QAE-sephadex
Fraction 1	100%	100%	9%	-	-
Fraction 2	-	-	12%	91%	90%

Buffer for anion exchange resin (first 2 resins) : 20mM Mes/NaOH (pH 6.5)

Buffer for cation exchange resin (last 3 resins) : 20mM Tris/HCl (pH 8.0)

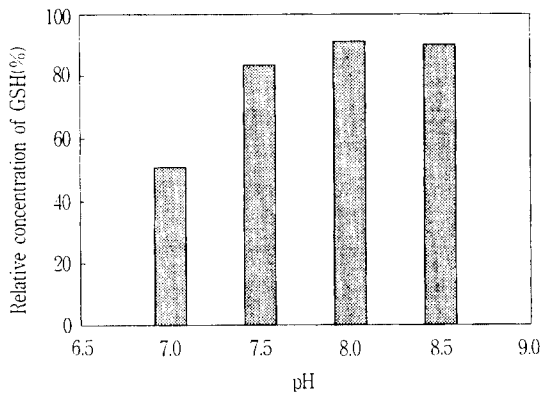


Figure 1. Effect of pH on the GSH binding capacity of Q-sepharose.

Standard solution에서의 GSH 분리

GSH 합성효소에 의해 생산되는 생산모액을 단순화시킨 standard solution 0.25mL를 Q-sepharose 수지를 사용하여 음이온 교환수지 크로마토그래피 분리실험을 실시하였다. 실험에서 사용된 standard solution의 성분과 조성은 다음과 같았다 : 10mM cysteine, 10mM glycine, 40mM glutamate, 270mM glucose, 10mM ATP, 5.2mM γ -glutamylcysteine, 10mM GSH. 시료 0.25mL을 column에 유입시킨 후, 대기압하에서 완충용액(20mM Tris/HCl, pH 8.0)으로 수지에 결합되지 않은 물질

을 유출시킨 다음, 완충용액에 NaCl을 첨가시킨 용액을 함께 사용하는 농도구배법으로 수지에 결합된 물질들을 유출시켰으며 각 분획의 흡광치를 파장 260nm에서 측정하였다. 초기 완충용액으로 유출시킨 분획들에서 2개의 peak(Q1, Q2), 그리고 NaCl 농도구배로 유출시킨 분획들에서 3개의 peak(Q3, Q4, Q5)이 검정되었다. 이 분획들에 함유된 물질들을 분석한 결과, Q1부분에는 cysteine과 glycine이, Q2부분에는 glucose와 glutamate, Q4부분에는 GSH와 γ -glutamylcysteine, 그리고 Q5부분에는 ATP가 포함되어 있었다(Figure 2). 실험 결과로 미루어 보아 standard solution에 포함된 물질들 중에서 GSH가 Q-sepharose에 결합되는 것과는 달리, cysteine, glycine, glucose 및 glutamate 등은 Q-sepharose에 친화성이 없거나 약하기 때문에 GSH와 쉽게 분리가 가능하며, 또 GSH는 NaCl 농도가 200mM 이하에서 유출되는 데 비해 ATP는 수지에 대한 친화성이 훨씬 강하여 NaCl 농도가 약 300mM에서 유출되었으므로 GSH와 분리가 어렵지 않다고 판단되었다.

한편 γ -glutamylcysteine은 standard solution내 다른 물질들과는 달리, GSH와 거의 동일한 염농도(Q4, Figure 2)에서 유출되었으므로 이 두 가지 물질을 분리시키고자 하였다. standard solution를 Q-sepharose 수지에 흡착시킨 다음, 완충용액에 NaCl을 점차적으로 첨가하여 단계적으로 흘려주었다. 수지를 원형유리 column에 1.1×22cm의 용량으로 채운 후 연동펌프를 사용하여 용액이 1.5mL/min으로 유입, 유출되도록 조절하였으며, 이하 실험에서의 반응기 용량과 용액의 흐름속도를 동일하게 실험하였다. 초기 완충용액부에서는 cysteine, glycine, glucose 및 glutamate 등 수지에 결합되지 않는 물질들이 유출되었고, 완충용액의 NaCl농도가 30mM인 부분에서는 γ -glutamylcysteine이 유출되었으며, GSH가 소량(1%미만) 유출되었다. GSH는 완충용액의 NaCl 농도가 45mM인 용액을 흘려준 부분과 60mM NaCl인 부분에 걸쳐 유출되어 γ -glutamylcysteine과 서로 분리되었으며, 회수된 γ -glutamylcysteine의 양은 17.3%였고 GSH의 회수율은 25%였다(Figure 3).

Figure 3에서와 같이 GSH의 회수율이 낮은 문제점을 개선하기 위하여 완충용액의 염농도를 변경시켜 γ -glutamylcysteine과 GSH의 완전분리와 함께 GSH의 회수율을 높이기 위한 실험을 하였으며, 이에 사용한 시료는 GSH와 γ -glutamylcysteine의 혼합액이었다. 시료를 Q-sepharose에 흡착시킨 다음, 완충용액을 15mL, 완충용액에 35mM NaCl을 첨가한 용액을 90mL를 차례로 흘려주었고, 이후 90mM NaCl을 첨가한 완충용액을 흘려주었다. 완충용액내의 NaCl 농도가 35mM 일 때 γ -glutamylcysteine 및 GSH가 모두 유출되었으나 그 유출속도의 차이로 인하여 완전히 분리되었고, γ -glutamylcysteine의 회수율은 투여된 시료의 93.5%, 그리고 GSH의 회수율은 55%였으며, 일부(7.5%)의 GSH는 완충용액의 NaCl 농도가 90mM 일 때 유출되었다(Figure 4).

Figure 3에서와 같이, 상기의 완충용액을 사용한 Q-sepharose 크로마토그래피에서 γ -glutamylcysteine과 GSH는 NaCl 농도가 30mM일 때부터 수지로부터 이탈되었으나, 이탈되는 속도가 매우 느려 결과적으로 많은 양이 유실되는 결과를 보였다. 한편, Figure 4에서와 같이, NaCl 농도가 35mM일 경우에는 γ -glutamylcysteine 분획은 GSH 분획과 중복되지 않고, 대부분의 γ -glutamylcysteine이 GSH에 앞서 완전히 분리되어 유출되지만 GSH는 유출속도가 매우 느리기 때문에 Figure 3과 비교하여 회수율이 향상되었다.

이와 같은 결과로 미루어 보아, GSH를 γ -glutamylcysteine과

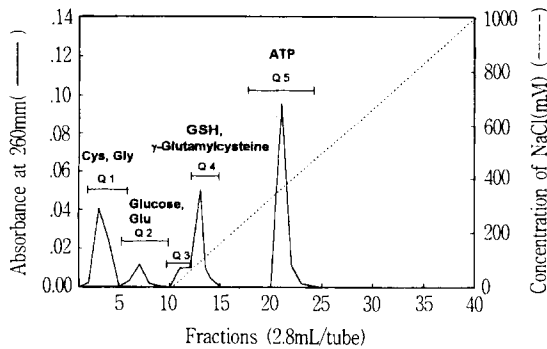


Figure 2. Elution profile of standard solution with Q-sepharose chromatography (0.7×7.0cm). Linear gradient of NaCl was applied using Tris / HCl buffer and the same buffer containing 1M NaCl(50mL + 50mL).

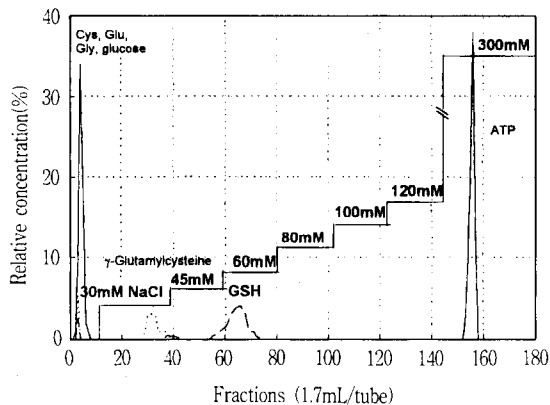


Figure 3. Elution profile of standard solution with Q-sepharose column chromatography (1.1×22cm). Step gradient of NaCl was applied to detect adsorbed materials from Q-sepharose.

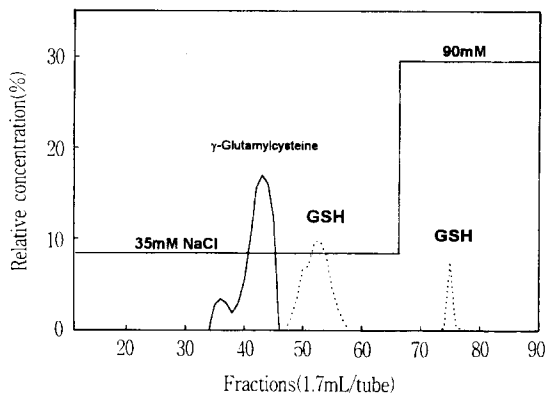


Figure 4. Elution profile of γ -glutamylcysteine and GSH with Q-sepharose column chromatography (1.1×22cm).

분리시키면서 회수율을 높이려면 γ -glutamylcysteine을 어느 정도 유출시킨 다음에 NaCl의 농도를 증가시킬 필요가 있었다. 두 개의 GSH peak를 보이는 것은 GSH의 tailing에 의한 현상

으로 판단되었으며, 두 peak 사이에서 소량의 GSH가 수지로부터 계속 이탈된 것으로 예측되었다.

Figure 5는 앞에서와 동일한 방법으로 시료를 수지에 흡착시킨 다음 35mM NaCl이 포함된 완충용액으로 γ -glutamylcysteine의 유출을 유도한 후, γ -glutamylcysteine이 유출되기 시작하였을 때 NaCl의 농도를 증가시켜 실시한 결과이며, 이 때 사용한 시료는 0.25mL의 standard solution이었다. 고농도 NaCl(90mM)의 영향으로 GSH가 Q-sepharose부터 유출되는 속도가 증가하였으며, GSH 회수율은 72.6%였다.

GSH 생산효소에 의해 생산되는 생산모액을 단순화시킨 standard solution를 사용하여 GSH 분리를 위한 기초실험 결과, 시료를 Q-sepharose에 결합시킨 후, 35mM NaCl을 사용하여 GSH의 분리가 가능하였다. Figure 6은 서론에서 언급한 Handerson-Hasselbalch식과 아미노산과 GSH의 pK를 이용하여 각각의 ionic fraction을 구한 것이다. 용액의 pH가 8.0일 경우, GSH와 Glu의 anionic fraction이 1이다. 따라서 GSH와 Glu만이 흡착제인 Q-sepharose에 완전히 흡착할 것으로 예상되었으나, GSH만이 완전히 흡착하는 결과를 보였다. Glu는 초반에 유출되는 것으로 보아 Q-sepharose에 대한 Glu의 흡착력이 매우 약한 것으로 사료되었다. Cys, Gly은 수용액의 pH가 8.0일 때 대부분이 전하가 0인 zwitterion형태로 존재하리라 예상되었으며, Q-sepharose에 완전히 흡착하지 않고 초반에 유출되는 결과를 나타내었다. γ -Glutamylcysteine(Glu-Cys)와 GSH(Glu-Cys-Gly)와의 구조적인 차이는 Gly이다. 수용액상에서 Gly은 전기적으로 중성을 띠기 때문에 γ -glutamylcysteine과 GSH의 전기적인 차이가 크지 않아 NaCl의 농도구배형성시 동일한 이탈 형태를 보이나, 계단식으로 일정한 NaCl의 농도구배를 형성하였을 경우 분리가 가능한데, 이는 γ -glutamylcysteine과 GSH의 이온 세기의 차이로 인한 이탈 속도의 차이로 인해 서로 분리되는 것으로 사료되었다(Figure 2~Figure 5).

GSH 생산효소에 의한 생산모액으로부터의 GSH 분리

Standard solution에 의한 GSH 정제방법을 실제로 활용할 수 있는지를 확인하기 위하여, Murata의 방법에 따라 효소에 의해 생합성된 GSH 생산용액(9, 13)을 Q-sepharose column에서 Figure 5에서와 동일한 방법에 의해 GSH 분리실험을 수행하였다. Q-sepharose column에 0.25mL의 생산모액을 흡착시킨 후, NaCl농도가 35mM인 완충용액을 흘려주었을 때, Q-sepharose에 흡착되지 않은 cysteine, glycine, glutamate, glucose이 빠르게 유출되었고, γ -glutamylcysteine은 동일한 NaCl 농도에서 유출되기 시작하였으며, γ -glutamylcysteine이 완전히 유출된 후 NaCl농도를 90mM로 조정된 결과 GSH가 빠르게 유출되었다. ATP는 완충용액의 NaCl농도가 300mM인 부분에서 유출되었으며, γ -glutamylcysteine과 GSH를 각각 9%, 84.4% 회수하였다(Figure 7). Standard solution의 결과와 비교할 때, GSH를 포함한 나머지 물질들이 Q-sepharose 수지에서 동일한 성질을 나타내었기 때문에 생산모액에서의 GSH의 순수분리에 실제로 활용할 수 있다고 판단되었다. 순수분리된 GSH 분획(fraction 48~53, Figure 7)들을 혼합한 후, 회수된 GSH량을 측정된 결과, 투여된 시료의 GSH 중 84.4%가 회수되었으며 γ -glutamylcysteine은 전혀 측정되지 않았다.

서론에서 언급한 바와 같이, 효소를 이용한 GSH 생산모액으

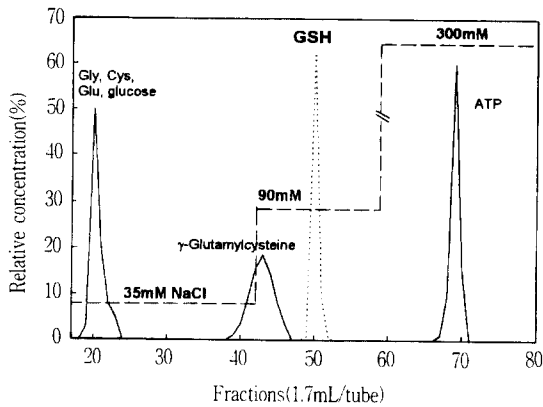


Figure 5. Elution profile of standard solution with Q-sepharose column chromatography (1.1×2.2cm).

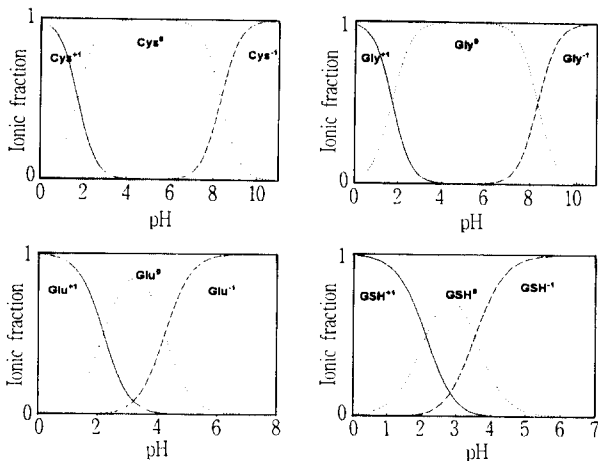


Figure 6. Ionic fraction at various pH.

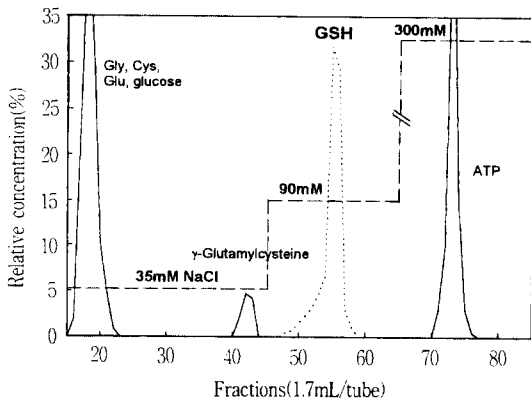


Figure 7. Elution profile of a product of enzymatic conversion with Q-sepharose column chromatography (1.1×2.2cm).

로부터의 GSH 정제에는 구리이온 처리(8) 및 HPLC를 이용하는 방법(7) 등이 보고되고 있으나, 이들 방법들은 첨가된 구리이온을 다시 제거하거나 또는 이온교환수지를 사용하는 등 전처리 과정을 거쳐야 한다. 본 연구에서와 같이 Q-sepharose를 이용할 경우, 전처리과정이 필요없을 뿐만 아니라 GSH의 회수율도 높다. 또한 정제 과정에서 γ -glutamylcysteine와 ATP를 시료

에 함유된 다른 물질들과 쉽게 분리할 수 있기 때문에 재활용할 수 있는 가능성도 크다고 생각된다. 본 연구는 소량의 시료와 소량의 Q-sepharose column을 사용하여 실시한 결과이나, 보다 많은 양의 시료일 경우에도 적용할 수 있으리라 보며 이온교환수지에 시료를 흡착시킨 후 염농도를 적절히 조절할 경우에는 회분식 흡착법을 이용한 GSH의 대량정제도 가능하리라고 사료된다. Q-sepharose에 결합하는 ATP에 의해 단위부피당 GSH의 처리율이 낮아질 수 있다. 시료 내의 ATP 제거는 여타의 양이온 교환수지와 음이온 교환수지로는 시료에서의 분리가 불가능하나, 효소에 의해 생산된 생산모액내의 ATP는 모의혼합액내의 농도(10mM)보다는 낮은 상태(2mM 미만)이므로 큰 영향은 없으리라 본다. ATP는 고가의 원료물질로서, 공정의 개선으로 분리, 회수 후 재활용될 수 있으리라 사료된다.

요 약

미생물 효소에 의해 생산된 생산모액 내의 글루타치온(L- γ -glutamyl-L-cysteinyglycine, GSH)을 액체크로마토그래피를 이용하여 분리하였다. GSH와 결합하는 수지를 선택하기 위해 여러 수지와 GSH 수용액을 사용하여 회분식 흡착실험을 한 결과, pH 8.0에서 음이온 교환수지인 Q-sepharose와 QAE-sephadex에 GSH가 결합하였으나, QAE-sephadex는 수지와 결합된 GSH를 이탈시키기 위해 사용된 salt에 의해 부피가 줄어들어 부적합하였다. GSH 분리를 위한 기초실험을 위하여 GSH, cysteine, glutamate, glycine, γ -glutamylcysteine, ATP, glucose의 혼합액에서 GSH와 γ -glutamylcysteine를 다른 물질로부터 1차 분리할 수 있었다. NaCl의 농도를 조절하여 두 물질이 중첩되는 현상을 제거하여 분리하고자 하였으며, GSH의 tailing현상을 줄이도록 노력하였다. NaCl(35mM)을 용해시킨 Tris buffer를 사용함으로써 두 물질의 분리가 가능하였고, 생산모액을 사용하여 실험한 결과, 혼합 시료와 유사한 분리결과를 얻을 수 있었다. Standard solution에서의 GSH 분리결과 72.6%의 회수율을 보였으며, 생산모액에서는 84.4%의 회수율을 각각 보였다.

감 사

본 연구는 과학기술처, 선도기술개발사업(08-02-09)에 의해 지원되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Mehra, R. K., T. Kim, W. G. Scott, P. Mulchandani, and S. S. Saini (1996), Ag(I)-Binding to Phytochelatins, J. Inorg. Biochem., 61, 125-142.
2. Sakato, K. and H. Tanaka (1992), Advanced Control of Glutathione Fermentation Process, Biotechnol. and Bioeng., 40, 904-912.
3. Jones, D. P. (1995), Glutathione Distribution in Natural Products : Absorption and Tissue Distribution, Methods in Enzymology(L. Packer, eds), Vol. 252, pp. 3-13, Academic Press, California.
4. Meister, A. (1995), Glutathione Metabolism, Methods in

- Enzymology(L. Parker, eds), Vol. 251, pp. 3-7, Academic Press, California.
5. 韓國遺傳工學研究組合 (1989), 生物産業製品 100選, pp.44-47, 한국유전공학연구조합, 서울.
 6. 磯和義員 (1986), グルタチオン, アミノ酸醗酵(相田浩ら編), pp. 437-451. 學會出版センター.
 7. Newton, G. L. and R. C. Fahey (1987), Purification of Thiols from Biological Samples, Methods in Enzymology(W. B. Jakoby and O. W. Griffith, eds), Vol. 143, pp. 96-109, Academic press, Florida.
 8. 野口貞夫 (1977), グルタチオンの精製法, 公開特許公報, 昭52-131527.
 9. Murata, K., K. Tani, J. Kato, and I. Chibata (1981), Glutathione Production by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells Containing an ATP Regeneration System, European J. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 11, 72-77.
 10. Kim, J. H., S. H. Yoon, and Y. M. Koo (1997), Separation of Glutathione by Precipitation. and Electrodialysis, Korean J. Biotechnol. Bioeng., 12(2), 255-259.
 11. R. K. Scopes (1993), Protein purification : Principle and Practice, 3rd. ed., pp. 71-101, .135-136, Springer-Verlag, New York.
 12. Lee, K. S. and J. Hong (1992), Electrokinetic Transport of Amino Acids through a Cation Exchange Membrane, J. Membr. Science, 75, pp.107-120.
 13. Yoon, S. H. (1997), Glutathione Production by Co-immobilized Cell Reactor, MS thesis, Inha Univ., Inchon.
 14. Gitler, C., B. Zarmi, and E. Kalef (1995), Use of Cationic Detergents to Enhance Reactivity of Protein Sulphydyls. Methods in Enzymology(L. Packer eds), Vol. 251, pp. 366-375, Academic Press, California.
 15. Tietze, F. (1969), Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione, Anal. Biochem., 27, 502-522.
 16. Dennda, G. and M. R. Kula (1986), Assay of the Glutathione-Synthesizing Enzymes by High-Performance Liquid Chromatography, Biotechnol. and Appl. Biochem., 8, 459-467.
 17. Adams, H (1963), Adenosine 5'-Triphosphate Determination with Phosphoglycerate Kinase. Methods of Enzymatic Analysis(H.U. Bergmeyer, eds), pp.539-543, Academic Press, New York.