

효모의 ATP 재생산계와 대장균 유래의 재조합 생산효소를 이용한 *in vitro* 글루타치온 생산

고성영 · 구윤모*

인하대학교 공과대학 생물공학과

***In-vitro* Production of Glutathione Using Yeast ATP Regeneration System and Recombinant Synthetic Enzymes from *Escherichia coli*.** Koh, Sung-Young and Yoon-Mo Koo*. Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea - An ATP regeneration system was used for the production of glutathione which was synthesized by a sequential action of γ -glutamyl-cysteine synthetase and glutathione synthetase. The synthetases above were produced in the recombinant *E. coli* (TG1/pDG7) with the highest specific production yield of 31 mg glutathione/g wet cell. Bakers yeast was considered to have economically a better ATP regeneration system although the glutathione production yield was lower than that of acetate kinase. It was also observed that the ATP regeneration system of bakers yeast was superior to that of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858. The yield of glutathione production with bakers yeast was 36% with the ATP concentration of 5 mM. To avoid the cysteine limitation during the early phase of glutathione production, an extra cysteine was added at 2 hours after reaction and the production yield increased 1.91 times. The effectiveness of bakers yeast as an ATP regeneration system was proved by several sets of extra feeding experiments. The product inhibition by glutathione above 14 mM was also observed.

Key words: glutathione production, ATP regeneration system, glutathione synthetase, *E. coli* TG1/pDG7 α .

글루타치온(L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH)은 3가지 아미노산으로 구성된 물질로 세포계에서 비단백질성 thiol로서 중요한 역할을 한다[5, 10, 13]. 글루타치온은 동물, 식물, 박테리아에서 발견되었으며 최근에 글루타치온의 효소와 대사작용이 알려지면서 미생물학, 농학, 의학, 약학, 효소학 등 많은 분야에서 연구가 진행되고 있다[14, 18]. 글루타치온의 기능에는 단백질과 타분자에서 이황화 결합의 환원상태를 유지, DNA의 deoxyribonucleotide 전구체의 합성, free radicals와 반응성있는 산소 중간물질(hydrogen peroxide 등)들의 영향으로부터 세포를 보호, 외부물질의 해독작용, 대사작용에서 환원제로서의 작용[8], 조효소의 역할 등이 있다[13, 14]. 글루타치온의 생합성은 γ -glutamylcysteine을 전구물질로 하며, 이 두 물질은 각각 glutathione synthetase(GSH-II)와 γ -glutamylcysteine synthetase(GSH-I)의 두 효소의 작용에 의해서 생성되며[13, 15], 글루타치온 1 mole 생산에 ATP 1 mole이 사용된다. γ -glutamylcysteine은 cysteine과 glutamate, 글루타치온은 γ -glutamylcysteine과 glycine으로 이루어진다. 글루타치온은 세포 내에서 산화형 글루타치온(GSSG)과 환

원형 글루타치온(GSH)의 두 가지 형태로 존재하며 GSSG와 GSH는 가역적으로 전환된다. 효소를 이용한 글루타치온의 생산시 기질 중 cysteine의 농도가 높으면 두 효소에 대하여 기질저해작용[3]이 일어나고, 환원형 글루타치온은 GSH-I을 산물저해[20]한다. 그러나 글루타치온은 GSH-II에 영향을 주지 않는 것으로 알려져있다. 글루타치온 생산과정에서 ATP에 의해서 형성된 ADP는 GSH-I의 작용을 저해한다.

효소를 이용한 공정에서, 특히 여러가지 효소를 이용하는 생산에서 ATP는 조효소 및 energy를 공급하는데 필요하며, 초기의 ATP 공급량을 최소화하여 연속적으로 ADP에서 ATP로 전환하는 재생산계의 이용이 중요시되고 있다[17]. 효소를 이용한 글루타치온 생산에서도 ATP 공급이 중요하며, 고가의 ATP의 사용을 절약하고, 경제적 생산조건을 확립할 수 있는 ATP 재생산계가 필요하다. 일반적으로, ATP의 재생산계로는 대장균에 존재하는 효소 acetate kinase를 이용하는 방법, 효모의 해당작용을 이용하는 방법, *cyanobacterium*의 광합성을 이용하는 방법 등이 알려져 있다.

글루타치온의 생산에 사용되는 기질 중에서 cysteine은 글루타치온 생산과정에서 불안정성을 보여 주고있다[2]. Cysteine이 글루타치온으로 100% 전환되지 못하고 cysteinyl-cysteine, glutamyl-2(cysteine) 등 글루타치

*Corresponding author
Tel. 82-32-860-7513, Fax. 82-32-875-0827
E-mail: ymkoo@dragon.inha.ac.kr

온의 유사물질로 전환되고 있는 것으로 보인다. 이와 같이 cysteine이 최종 산물로 전환되지 못하고 타 물질로 전환되는 것을 막기 위해서는 기존의 회분식 반응기보다는 주기적으로 cysteine을 공급[1]하는 반응기가 글루타치온 생산에 적합한 것으로 보인다.

본 연구에서는 acetate kinase와 효모의 해당작용을 이용한 ATP 재생산계 등 여러 ATP 재생산계의 효과를 비교 연구하였으며, 세포 배양상과 유기용매로 처리한 세포에서 글루타치온의 생산을 비교하였다. 또한 기질의 주기적 공급에 의한 글루타치온의 최적 생산조건을 연구하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에서 사용된 균주는 *E. coli* TG1/pDG7 [11]로 제조된 플라스미드 pDG7 α 는 총 길이 9.4 kb이며 pBR322기원의 vector에 GSH-I을 생산하는 *gsh I* gene과 GSH-III[21]를 생산하는 *gsh II* gene이 2:1의 비율로 플라스미드에 삽입되어 있다. Promoter는 *tac* promoter를 사용하였으며 ampicillin 내성 유전자가 존재한다. ATP 재생산계로는 Sigma사에서 구입한 빵효모를 사용하였다. 글루타치온 생산에 사용한 cysteine, glutamic acid, glycine, ATP, 5,5'-dithio-(bis 2-nitrobenzoic acid)(DTNB)와 dithioerythritol(DTE)는 Sigma사의 제품을 사용하였으며, MgCl₂·6H₂O는 덕산제약의 제품을 사용하였다.

E. coli TG1/pDG7 α 를 배양하기 위해서 Luria-Bertani medium을 사용하였으며 초기 pH는 7.0으로 하였다. 균체의 접종량은 배지의 1%로 하였으며 seed culture와 main culture를 각각 9시간씩으로 배양하였으며, 교반속도 250 rpm, 37°C에서 배양을 수행하였다.

글루타치온 생산공정 및 방법

재조합 대장균과 빵효모의 세포막을 유기용매로 처리하여 각각의 세포막을 통한 물질전달을 원활하게 하였다 [6, 16]. Seed culture와 main culture에서 각각 9시간씩 균체를 배양한 후, 8000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하여 균체만을 얻는다. 균체 2 g을 0.5 mM cysteine을 녹인 5 mM potassium phosphate buffer 90 mL에 균일하게 혼합한 후 toluene 10 mL 용액을 첨가하여 250 rpm, 37°C에서 30분간 반응하였다. ATP 재생산계인 효모의 경우에도 4 g의 빵효모가 녹아 있는 등장액 20 mL에 acetone 180 mL를 혼합하여 250 rpm, 37°C에서 5분간 반응하였다. 글루타치온 생산은 재조합 대장균과 빵효모의 혼합비율을 1:4로 하여 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60

mM MgCl₂, 400 mM 포도당에서 수행하였으며[22], pH 7.3을 유지하기 위해서 100 mM potassium phosphate buffer를 사용하였다.

또한 세포 배양상에서의 글루타치온 생산을 비교하기 위하여 LB medium에 기질인 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 20 mM glycine을 공급하여 배양상에서 *E. coli* TG1/pDG7 α 에 의해 생산된 글루타치온의 농도를 측정하였다[19]. 배양 후 원심 분리한 균체 0.4 g을 4 mL의 등장액에 넣고 1분 30초 동안 초음파로 세포를 파괴시킨 후, 원심 분리하여 상등액을 여과과정을 거쳐 HPLC로 분석하였다.

분석

글루타치온, cysteine 및 γ -glutamylcysteine의 분석에는 HPLC를 이용하는 DTNB 분석방법을 사용하였다. DTNB(100 mM)와 DTE(200 mM)를 시약으로 사용하여 여과 처리된 시료를 5분간 전처리하여 분석하였다 [4]. DTNB의 경우 난용성이므로 1M potassium phosphate buffer(pH 8)를 사용하였으며 DTE는 증류수에 용해시켜 사용하였다. HPLC(LC-10AD, Shimadzu)는 dual pump를 가지고 있는 solvent delivery module system이며 칼럼은 REXCHROM S5-100-ODS(250×4.6 mm, Regis)를 사용하였으며[7], UV detector(Waters 480, Waters)는 파장 280 nm에서 분석하였다. 분석 전 개용매로는 230 mM ammonium formate solution(pH 5)과 메탄올(HPLC grade, Fisher)을 사용하여 시간에 따른 농도의 변화를 주었으며 전개 용액의 유속은 1.5 mL/min으로 하였다.

결과 및 고찰

글루타치온의 최적 생산 조건

재조합 대장균에 의해서 발현된 효소[9]를 이용하여 글루타치온을 생산하는데 있어서 배양시간에 따른 글루타치온의 생산을 비교하였다. 대장균의 성장과정 중, 시간에 따른 글루타치온 농도를 비교함으로써 글루타치온을 생산하는 효소의 활성을 검토하였다. 성장곡선(Fig. 1)으로부터 대장균은 9시간에서 정지기에 도달함을 알 수 있었다. 결과적으로 대장균 배양 9시간에서 최대의 글루타치온 농도를 나타내어 최대의 효소 활성을 갖는 것으로 판단되었다. 이에 따라 글루타치온의 생산에 사용한 대장균은 seed 및 main culture를 9시간 배양하여 사용하였다.

포도당 농도가 글루타치온 생산에 미치는 영향

포도당은 yeast를 이용한 ATP 재생산계에서 해당과정의 첫 번째 반응물로 작용한다. 효소를 이용한 글루타치온 생산에서 ATP는 초기에 공급을 해주면 yeast의 해

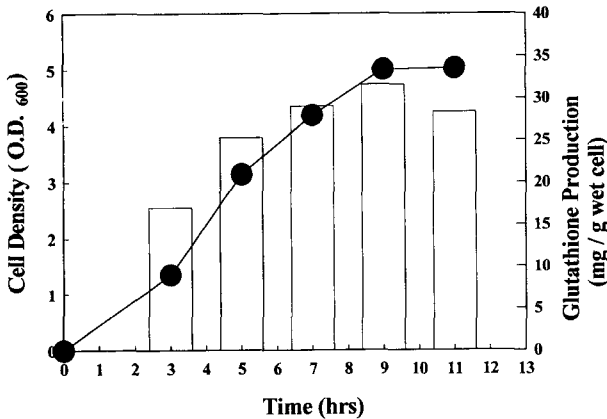


Fig. 1. Time course variation of glutathione and cell concentrations in a recombinant *E. coli* culture. ●, cell density; □, glutathione concentration.

당과정에 의해 ATP가 재생산된다. 포도당의 농도를 100, 200, 400 mM로 사용하여 글루타치온의 생산 농도를 측정했을 때 반응 4시간 후에 각각의 글루타치온의 생산농도는 5.88, 5.77, 5.21 mM을 나타내었고, 포도당을 공급하지 않은 반응에서는 3.27 mM을 나타내었다(Fig. 2). 결과적으로 포도당의 존재 하에서 해당과정이 수행되어 ATP의 재생산이 수행되었고 실험농도 범위에서 포도당 농도에 따라 글루타치온 생산에는 큰 차이를 보이지 않았다. ATP 재생산계는 재생산계를 사용하지 않을 때보다 최대 1.8배의 글루타치온 생산효율을 증가시켰다.

ATP의 초기 공급농도가 글루타치온 생산에 미치는 영향

ATP의 재생산계로서 빵효모를 사용하였다. 재조합 대장균과 빵효모 및 cysteine, glutamic acid, glycine, MgCl₂를 넣은 반응계와 빵효모만 제외한 반응계에서 글루타치온의 생산농도를 비교함으로써 ATP의 재생산계의 효과를 검토하였다. 본 실험에서 사용하는 유기용매 처리된 *E. coli*와 효모는 살아있지 않기 때문에 초기에 ATP의 공급이 필요하며, 초기 공급농도를 5, 10, 20 mM로 하여 실험을 수행하였다. 초기 ATP 농도가 20 mM로 유지된 경우는 재조합 대장균과 빵효모의 혼합세포계에 의한 글루타치온 생산농도와 재조합 대장균에 의한 글루타치온 생산농도가 약 12 mM로 거의 동일하였는데 이는 글루타치온 생산에 절대적으로 필요한 ATP가 과량으로 반응기에 공급됨으로서 빵효모에 의한 ATP의 재생산 여부를 관찰하기에 부적절했던 것으로 사료되었다. ATP의 초기 공급농도를 10 mM로 감소시켰을 때, 혼합세포계의 글루타치온 농도가 재조합 대장균만 사용한 반응계보다 약 2 mM 정도 더 생산되었다(Fig. 3). 글루타치온의 농도 2 mM은 ATP의 재생산된 농도 4 mM

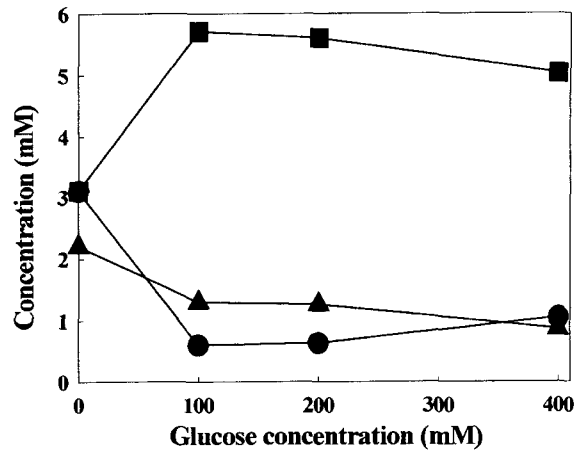


Fig. 2. Effect of glucose concentration on glutathione production. ●, cysteine; ▲, γ-glutamylcysteine; ■, glutathione.

루타치온의 생산농도를 비교함으로써 ATP의 재생산계의 효과를 검토하였다. 본 실험에서 사용하는 유기용매 처리된 *E. coli*와 효모는 살아있지 않기 때문에 초기에 ATP의 공급이 필요하며, 초기 공급농도를 5, 10, 20 mM로 하여 실험을 수행하였다. 초기 ATP 농도가 20 mM로 유지된 경우는 재조합 대장균과 빵효모의 혼합세포계에 의한 글루타치온 생산농도와 재조합 대장균에 의한 글루타치온 생산농도가 약 12 mM로 거의 동일하였는데 이는 글루타치온 생산에 절대적으로 필요한 ATP가 과량으로 반응기에 공급됨으로서 빵효모에 의한 ATP의 재생산 여부를 관찰하기에 부적절했던 것으로 사료되었다. ATP의 초기 공급농도를 10 mM로 감소시켰을 때, 혼합세포계의 글루타치온 농도가 재조합 대장균만 사용한 반응계보다 약 2 mM 정도 더 생산되었다(Fig. 3). 글루타치온의 농도 2 mM은 ATP의 재생산된 농도 4 mM

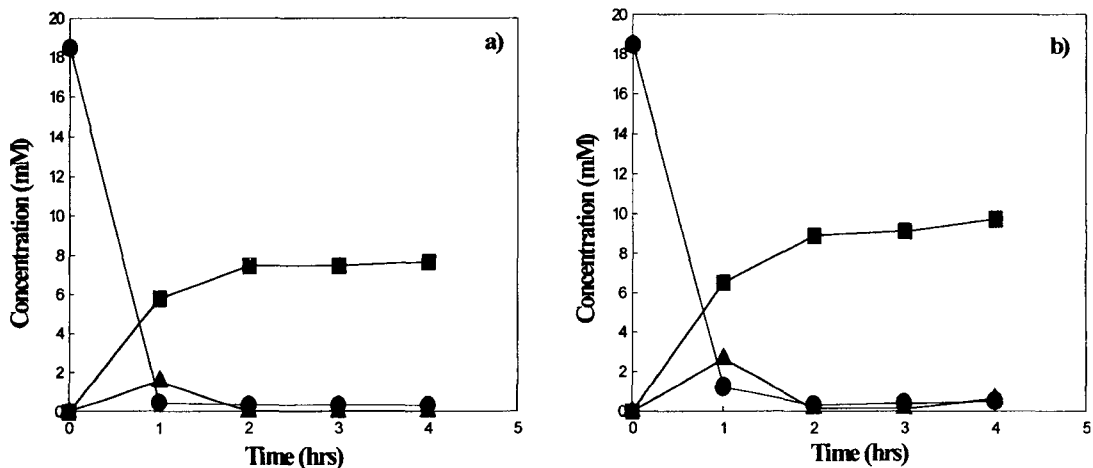


Fig. 3. Glutathione production in a) *E. coli* only and b) mixed cell (*E. coli*+yeast) systems containing 10 mM initial ATP. ●, cysteine; ▲, γ-glutamylcysteine; ■, glutathione.

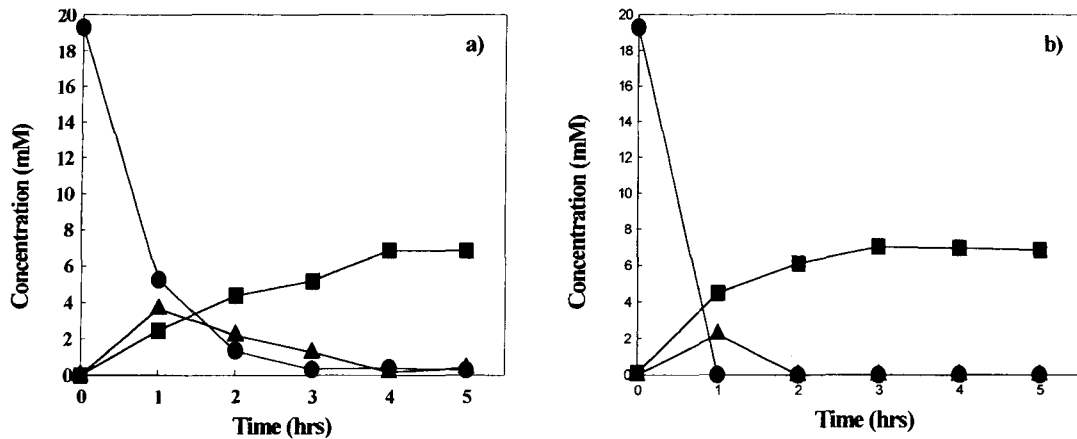


Fig. 4. Glutathione production in a) *E. coli* only and b) mixed cells (*E. coli*+yeast) systems containing 5 mM initial ATP. ●, cysteine; ▲, γ -glutamylcysteine; ■, glutathione.

에 해당하며, 산물로의 전환율은 51%이었다. ATP 초기 공급 농도가 5 mM일 때, 혼합세포계와 대장균만의 반응계에서의 글루타치온 생산에는 큰 차이가 없었으며(Fig. 4), 산물로의 전환율은 41%이었다. 이는 반응 시작 2시간 후에 cysteine이 거의 소모되어 더 이상의 반응이 진행되지 못했기 때문이며, ATP의 농도에 따라 cysteine에 대한 산물로의 전환율이 차이를 보였다. 이를 개선하기 위하여 초기 cysteine을 10 mM로 하고 2시간 후에 10 mM을 추가 공급한 결과, 글루타치온 농도가 4 mM 증가되었다(Fig. 5). 동일한 농도의 cysteine을 사용하여 산물로의 전환율을 41%에서 70%로 증가하였다. 초기에 ATP를 사용하지 않은 혼합세포계와 대장균만을 이용한 반응계에서의 글루타치온 생산 결과, 혼합세포계에서는 글루타치온 생산농도가 1 mM에 이르렀으나 재조합 대장균만의 반응계에서는 글루타치온 및 γ -glutamylcys-

teine은 생산되지 않았다. 또한 포도당과 ATP를 넣지 않은 혼합세포계에서는 글루타치온이 생성되지 못함으로써 초기에 빵효모에 존재하는 ATP는 글루타치온 생산에 거의 영향을 미치지 않고 있음을 확인하였다[12]. 또한 Fig. 2에서 포도당 농도가 0 mM에서 100 mM로 증가함에 따라 글루타치온의 생산농도가 증가함을 볼 때, 반응계 내에 외부에서 공급한 ATP가 없음에도 불구하고 빵효모의 해당과정의 의한 ATP의 생산이 진행되었음을 알 수 있었다. 이 실험결과에 의하여 cysteine의 급격한 소모가 글루타치온 생산에 제약을 주지만 빵효모에 의해서 ATP가 재생산되는 것을 알 수 있었다.

기질의 중간 첨가에 의한 글루타치온 생산

Cysteine은 글루타치온생산에서 매우 빠른 시간에 소모됨을 볼 수 있었다. 초기 cysteine 농도(50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM)와 글루타치온의 생산과 관계없이 cysteine은 반응 2시간안에 거의 소모가 됨을 보였다. 이러한 cysteine 소모의 결점을 보완하고 기질의 중간 첨가의 영향을 보기 위하여 3가지의 실험군으로 나누어서 실험을 수행하였으며 초기 ATP 농도는 5 mM로 하였다. 첫 번째는 글루타치온 생산반응 시작 후 2시간에서 10 mM의 cysteine만을 공급하였고, 두 번째는 ATP만을 제외한 기질(10 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60 mM MgCl₂, 400 mM 포도당)을 공급하였고, 세 번째는 5 mM의 ATP를 포함한 기질(10 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60 mM MgCl₂, 400 mM 포도당)을 공급하였다. 초기 기질 중 cysteine은 10 mM로 하였다. 첫 번째의 2시간 후 cysteine만을 첨가하는 경우는 반응 2시간에서 글루타치온 농도가 8.10 mM에서 반응 3시간 때 12.21 mM로 증가하였다(Fig. 5). Cysteine의 첨가가 없는 생산에서는 반응 2시간 이후에 cysteine이 완전히 소모되

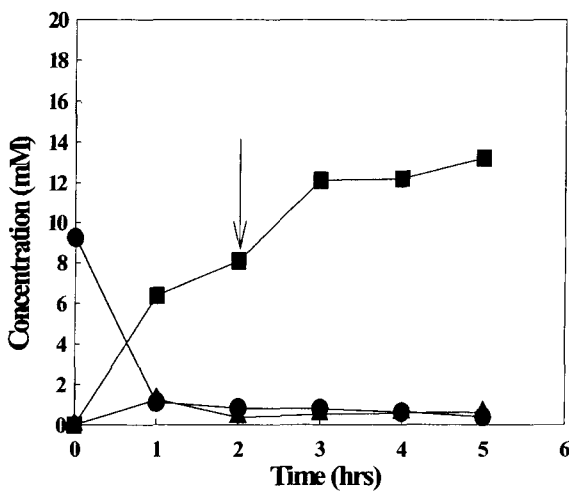


Fig. 5. Glutathione production with an extra feeding of cysteine at 2 hour at 5 mM initial ATP. ●, cysteine; ▲, γ -glutamylcysteine; ■, glutathione.

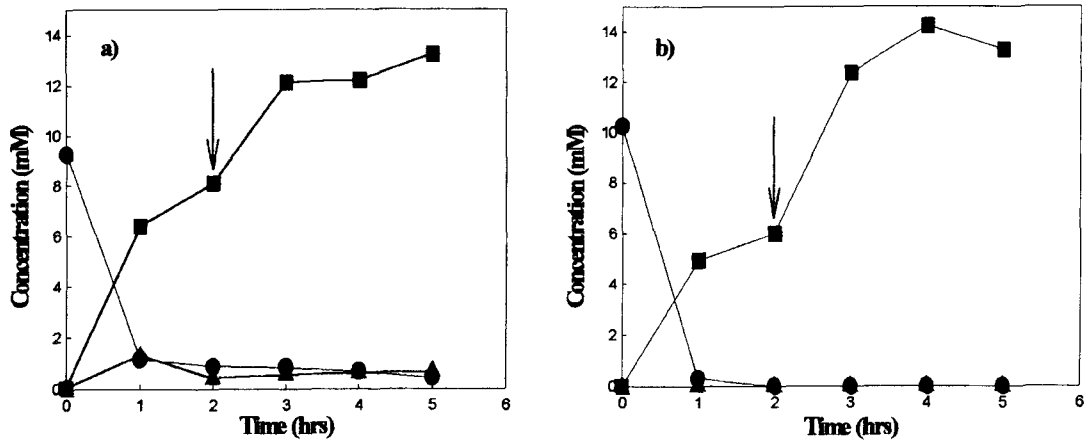


Fig. 6. Glutathione production with intermittent addition of substrates at 2 hour in mixed cell system. a) additional substrates (10 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60 mM MgCl₂, 400 mM glucose) without ATP, b) additional substrates (10 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60 mM MgCl₂, 400 mM glucose) with 5 mM ATP. ●, cysteine; ▲, γ -glutamylcysteine; ■, glutathione.

어 글루타치온 농도가 증가되지 못하였으며, 다른 두 아미노산은 cysteine보다는 안정성을 유지하면서 용액내에 존재하는 것으로 사료된다. 또한 빵효모에 의한 ATP 재생산계는 정상적으로 작동되고 있음을 확인할 수 있었다. 두 번째로 ATP만을 제외한 초기 기질을 글루타치온 생산 반응 2시간때 공급했을 경우, 글루타치온 생산농도는 2시간에서 8.10 mM, 3시간에서 12.11 mM, 5시간에서 13.21 mM로 증가하였다(Fig. 6a). 반응 2시간에서 ATP 추가 공급없이 글루타치온의 생산이 증가한 결과로부터 ATP 재생산계가 작동하고 있음을 다시 확인할 수 있었다. 마지막으로 5 mM ATP를 포함한 초기 기질을 반응 2시간때에 공급했을 경우, 반응 2시간에서 5.99 mM, 3시간때 12.37 mM, 4시간에서 14.24 mM로 증가하였다(Fig. 6b). 반응 2시간 후에 5 mM ATP를 포함한

모든 기질이 공급되었는데도 글루타치온은 일정 생산 농도이상으로 더 이상 증가하지 않았다. GSH-I은 글루타치온의 농도가 10 mM에서 효소 활성이 50% 감소하는 것으로 알려졌으며, ADP, AMP, adenosine에 의해서도 저해를 받는 것으로 알려졌다[12]. 따라서 글루타치온의 농도가 14 mM 이상에서 글루타치온 생산기작이 글루타치온에 의해 산물저해를 받는 것으로 사료된다. 상기의 실험 결과에 의하여 cysteine의 소모와 산물저해가 글루타치온 생산에 영향을 주며, ATP 재생산계는 지속적으로 작동하고 있음을 알았다.

반응 2시간에 cysteine을 공급한 것에 더하여 반응 4시간에 각각 10 mM cysteine을 첨가하여 글루타치온 생산을 관찰하였다. 반응 2시간에서 글루타치온 생산농도는 5.63 mM이며, 4시간 때 12.19 mM, 6시간에서는

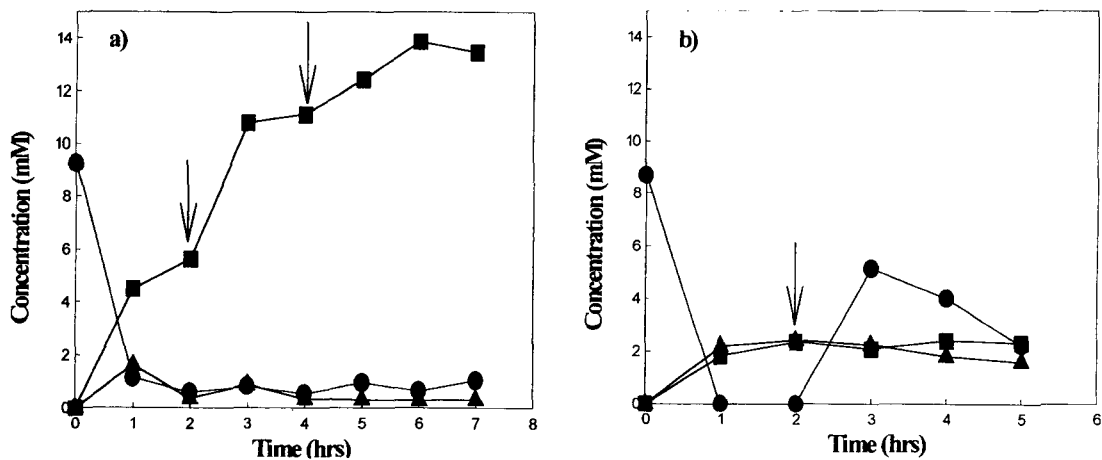


Fig. 7. Glutathione production with intermittent additions of substrates. a) additional cysteine at 2 and 4 hour in mixed cell system, b) additional cysteine at 2 hour in *E. coli* only system. ●, cysteine; ▲, γ -glutamylcysteine; ■, glutathione.

13.86 mM로 증가하였다(Fig. 7a). 첫 번째 cysteine 추가공급에 의한 글루타치온의 증가된 농도는 6.90 mM이고 두 번째의 cysteine 추가공급에 의한 글루타치온의 증가된 농도는 1.67 mM로 나타났다. 이 결과로 Fig. 6에서 확인한 고농도(14 mM) 이상의 글루타치온에 의한 글루타치온 생산저해로 해석할 수 있다. 초기 5 mM의 ATP를 사용하고 빵효모를 사용하지 않은 재조합 대장균에 있어서 2시간에서 cysteine을 공급한 결과, ATP 재생산계를 사용한 혼합세포계에 비해 낮은 글루타치온 생산을 보였다(Fig. 7b). 글루타치온 생산농도는 2.2 mM로 재생산계를 사용했을 때 보다 현저히 낮으며, cysteine 첨가 후에도 글루타치온의 생산농도가 증가하지 않았다.

Acetate Kinase와 빵효모의 ATP 재생산계 비교

빵효모와 acetate kinase의 ATP 재생산 능력을 비교하기 위하여 acetate kinase를 사용한 글루타치온 생산을 수행하였다. ATP 재생산계로 빵효모를 사용한 혼합세포의 경우 글루타치온의 cysteine에 대한 생산 수율이 80%인데 비하여 acetate kinase의 경우 98%에 이르고 있다(Fig. 8). 이것은 빵효모를 이용한 혼합세포의 경우는 acetate kinase를 이용한 경우보다 보다 혼합세포 사용에 따른 물질전달의 제약으로 반응물의 산물로의 전환을 방해한 것으로 사료된다. 본 연구에서 acetate kinase를 이용한 ATP의 재생산계가 빵효모를 이용한 경우에 비해 우수한 것으로 나타났으나, acetylphosphate가 고가인점(23,640\$/KG)을 감안하면 빵효모를 사용하는 ATP 재생산계가 대량생산시 경제성의 측면에서 유리한 것으로 판단된다.

빵효모와 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858의 글루타치온 생산능 비교

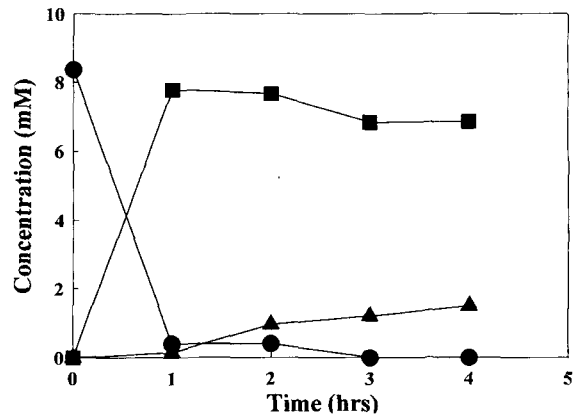


Fig. 8. Glutathione production with acetate kinase with 5 mM initial ATP and 10 mM acetylphosphate.
●, cysteine; ▲, γ-glutamylcysteine; ■, glutathione.

Sigma에서 구입한 빵효모와 ethanol을 생산하는 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858의 ATP 재생산성을 비교한 결과, 빵효모에 의한 ATP 재생산계가 더 우수한 ATP 재생산성을 갖고 있는 것으로 나타났다(Fig. 9). 기질은 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60 mM MgCl₂, 400 mM 포도당 및 10 mM ATP로 하였다. 빵효모를 사용한 혼합세포계는 글루타치온의 최고농도가 11.3 mM이었고, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858을 사용한 혼합세포계는 4.4 mM이었으며, 재조합 대장균만을 사용한 경우는 9.9 mM이었다. 빵효모를 사용한 혼합세포계의 글루타치온 농도는 재조합 대장균만을 사용한 경우보다 1.4 mM 증가되었다. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858을 사용한 혼합세포계의 글루타치온 농도는 재조합 대장균만을 사용한 경우보다도 낮았으며, 이는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858 내에 해당과정을 수행하는 효소이외에

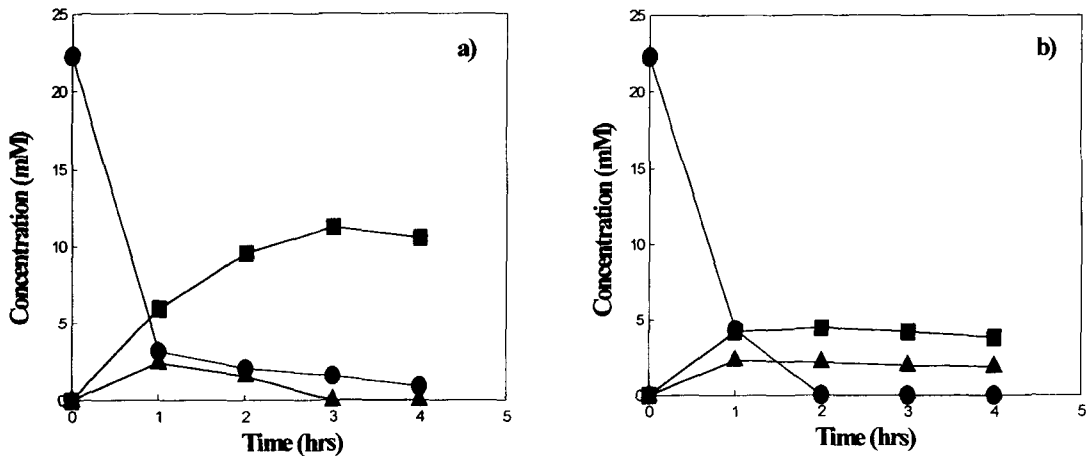


Fig. 9. Glutathione production with two ATP regeneration systems from a) bakers yeast and b) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC2485.
●, cysteine; ▲, γ-glutamylcysteine; ■, glutathione.

ATP가 사용되는 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과로 글루타치온의 생산에 있어 ATP의 공급이 중요하며, 빵효모를 사용한 ATP 재생산계는 글루타치온 생산에 중요한 역할을 하고 있음을 확인할 수 있었다. 혼합세포계에 의한 글루타치온의 생산이 경제성을 갖기 위해서는 cysteine의 전환율이 증가되어야 하며 이를 위해서는 산물 저해작용이 있는 글루타치온의 반응계로부터의 회수, 초기 반응시 cysteine의 급격한 감소 방지 등이 해결되어야 한다. 또한 반응 조건 최적화를 통한 ATP 공급량의 감소도 중요한 선결과제로 남아있다.

요 약

글루타치온 생산에 필요한 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase 효소의 활성을 위한 ATP 재생산계에 대하여 연구하였다. 글루타치온 합성용 효소를 생산하는 *E. coli* TG1/pDR7 α 의 최적 배양하였으며 이때 글루타치온의 생산농도는 31 mg/g wet cell이었다. 빵효모를 이용한 글루타치온의 생산수율은 acetate kinase보다 낮았으나, 경제성의 면에서는 더 우수할 것으로 판단된다. ATP 재생산계로 빵효모가 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858보다 더 우수함을 보였다. ATP 농도 5 mM에서 cysteine에 대한 글루타치온의 생산 수율은 36%이었다. Cysteine의 소모에 의한 글루타치온 생산 제약을 피하기 위하여 cysteine을 반응 2시간에 추가 공급함으로써 글루타치온 생산수율을 1.91배 증가시켰다. 다양한 기질 추가 실험 결과에 의해 빵효모에 의한 ATP 재생산계가 유효하고, 14 mM이상의 글루타치온 농도에서는 산물저해 현상이 있는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처, 선도기술개발사업 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사한다.

참고문헌

- Alfafara, C. G., K. Miura, H. Shimizu, S. Shioya, and K. I. Suga. 1992. Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 141–146.
- Alfafara, C. G., T. Shioi, A. Kanda, H. Shimizu, S. Shioya, and K. I. Suga. Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 538–540.
- Anderson, M. E. and A. Meister. 1983. Transport and direct utilization of γ -glutamylcysteine for glutathione synthesis. *Biochem.* **80**: 707–711.
- Dennda, G. and M. R. Kula. 1986. Assay of the glutathione-synthesizing enzymes by high-performance liquid chromatography. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**: 459–464.
- Fahey, R. C., S. Brody, and S. D. Mickolajczyk. 1975. Change in the glutathione thiol-disulfide status of *Neurospora crassa* conidia during germination and aging. *J. Bacteriol.* **121**: 144–151.
- Felix, H. 1991. *Extractive Bioconversions-Bioconversions in Permeabilized Cells*, pp. 259–279. Dekker Press.
- Heinrikson, R. L. and S. C. Meredith. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* **136**: 65–74.
- Kamei, A. 1993. Glutathione levels of the human crystalline lens in aging and its antioxidant effect against the oxidation of lens proteins. *Biol. Pharm. Bull.* **169**: 870–875.
- Kim, H. K. and Y. M. Koo. 1997. Studies on the high cell density cultivation of glutathione-producing recombinant *Escherichia coli*. *J. Kor. Inst. Chem. Eng.* **35**(4): 526–531.
- Kimura, A. and Y. Inoue. 1996. Production of glutathione and its related compound. *Proceeding of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry*.
- Kwak, J. H. 1992. *Characterization of γ -glutamylcysteine synthetase gene from Escherichia coli K12*. MS. D. Dissertation. Korea Univ., Seoul, Korea.
- Nam, Y. S. 1990. *Molecular Breeding of Glutathione Producing Bacterial Strains*. Ph. D. Dissertation. Korea Univ., Seoul, Korea.
- Meister, A. and M. E. Anderson. 1980. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 711–760.
- Meister, A. 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* **220**: 472–476.
- Meister, A. 1985. *Glutamate, Glutamine, Glutathione and Related Compounds*, pp. 379–399. Academic Press INC., New York.
- Murakami, K., H. Wagura, and M. Yoshino. 1980. Permeabilization of yeast cells: Application to study on the regulation of AMP deaminase activity *in situ*. *Anal. Biochem.* **105**: 407–413.
- Murata, K., K. Tani, J. Kato, and I. Chibata. 1981. Glutathione production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells containing an ATP regeneration system. *Eur. J. Appl. Biotechnol.* **11**: 72–77.
- Murata, K. and A. Kimura. 1982. Some properties glutathione biosynthesis-deficient mutants of *Escherichia coli* B. *J. Microbiol.* **128**: 1047–1052.
- Shimizu, H., K. Araki, S. Shioya, and K. I. Suga. 1991. Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 196–205.

20. Stephen, D. W. S. and D. J. Jamleson. 1997. Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene by hydrogen peroxide. *Molecular Microbiol.* **23**(2): 203–210.
21. Wang, C. L. and D. J. Oliver. 1996. Cloning of the cDNA and genomic clones for glutathione synthetase from *Arabiaopsis thaliana* and complementation of a *gsh2* mutant in fusion yeast. *Pharm. Molecular Biology* **31**: 1091–1104.
22. Yoon, S. H and Y. M. Koo. 1997. Glutathione production by co-immobilized cell reactor. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**(2): 151–158.

(Received January 23, 1998)