

혼합세포를 이용한 Aerated Slurry Bioreactor에서의 *in vitro* Glutathione 생산

고 성 영 · † 구 윤 모

인하대학교 공과대학 생물공학과

(접수 : 1999. 5. 28., 게재승인 : 1999. 6. 24.)

In vitro Glutathione Production using Mixed Cells in an Aerated Slurry Bioreactor

Sung-Young Koh and Yoon-Mo Koo†

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

(Received : 1999. 5. 28., Accepted : 1999. 6. 24.)

Glutathione production was carried out using mixed cells of *E. coli* TG1/pDG7 α and bakers yeast in an Aerated Slurry Bioreactor. Glutathione-producing enzymes were stable for 34 hours, yielding 4.6 mM glutathione in suspension reaction. Glutathione production with high density mixed cells was studied as a function of flow rate in an Aerated Slurry Bioreactor. Glutathione production concentration was higher than that in suspension reaction for 32 hours at the substrate feeding rate of 5.2 mL/hr with cell recycle in continuous Aerated Slurry Bioreactor. It was for 42 hours at 2.6 mL/hr and 22 hours at 5.2 mL/hr without cell recycle. Glutathione productivity was 25.7 mg/g wet cell · hr at the substrate feeding rate of 10.4 mL/hr with cell recycle, but 5.28 mg/g wet cell · hr at 5.2 mL/hr and 1.65 mg/g wet cell · hr at 2.6 mL/hr without cell recycle. Effective production time increased from 25 to 45 hours, by using a surfactant, tween 80. As a purging gas, nitrogen was tested instead of air to avoid a possible oxidizing effect on glutathione-producing enzymes, resulting in the increase of effective production time to 40 hours.

Key Words : Aerated Slurry Bioreactor, Glutathione Production, *E. coli* TG1/pDG7 α

서 론

글루타치온(L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH)은 3 가지 아미노산으로 구성된 물질로 세포계에서 비단백질성 thiol로서 중요한 역할을 한다(1-3). 글루타치온은 동물, 식물, 박테리아에서 발견되었으며 최근에 글루타치온의 효소와 대사작용이 알려지면서 미생물학, 농학, 의학, 약학, 효소학 등 많은 분야에서 연구가 진행되고 있다(4, 5). 동식물 조직, 미생물에 광범위하게 분포되어 있는 글루타치온은 단백질 외에 disulfide와 효소적, 비효소적으로 반응하여 그 SH기를 유지하는 기능, 예를 들면, 과산화수소, 유리반응기와 반응하는 해독기능이 있어, 간질환치료제와 약물, 임신중독의 해독제, 중금속해독제 등으로서 이용되고 있다(6). 또한 글루타치온 유도체인S-lactoylglutathione은 생체내에서 GSH와 methylglyoxal로부터 효소인 glyoxalase I에 의하여 생합성되어 세포증식과 염증반응에 깊은 관계가 있는 물질이라고 알려져 있어, 최근에는 이것을 생물공학기법에 의해 양산하고, 글루타치온의 항염증작용 등을 이용해 화장품과 의약품에 응용하는 연구가 이루어지고 있다. GSH는 주로 간장질환과 방사선

장애, 당뇨병의 치료약으로 사용되고 있지만, 최근에는 항암제로서도 주목되고 있으며 또한 건강식품분야에서의 용도도 증가되고 있다. 이러한 특성을 가지는 GSH의 제조법은 발효법, 효소법, 화학합성법, 추출법으로 대별되는데, 상업적 생산에는 주로 발효법이 사용되고 있다. 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(3, 7), 글루타치온 1 mole 생산에 ATP 1 mole이 사용된다. γ -Glutamylcysteine은 cysteine과 glutamate, 글루타치온은 γ -glutamylcysteine과 glycine으로 이루어진다. 글루타치온은 세포 내에서 산화형 글루타치온(GSSG)과 환원형 글루타치온(GSH)의 두 가지 형태로 존재하며 GSSG와 GSH는 가역적으로 전환된다. 효소를 이용한 글루타치온의 생산시 기질 중 cysteine의 농도가 높으면 두 효소에 대하여 기질저해작용이 일어나고 환원형 글루타치온은 GSH-I을 산물 저해한다(8, 9). 그러나 글루타치온은 GSH-II에 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있다. 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(10). 효소를 이용한 글루타치온 생산에서도 ATP 공급이 중요하며,

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7513, Fax : 032-872-2679
e-mail : ymkoo@inha.ac.kr

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.

본 연구의 가장 특징적인 요소로는 기존의 글루타치온의 생산이 회분식 현탁반응(11)과 고정화방법을 이용한 연속적 생산 연구가 수행되었던 결과를 토대로 Aerated Slurry Bioreactor를 이용한 글루타치온 생산 실험에서는 고정화 방법을 사용하지 않으면서 혼합세포를 순환시킴으로써 글루타치온 생산공정의 단축하였으며, 기질의 세포내 효소로의 전달을 증가시켜 연속공정으로 글루타치온 생산 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에서 사용된 균주는 *E. coli* TG1/pDG7a(12, 13)로 재조합된 플라스미드 pDG7a는 총 길이 9.4kb이며 pBR322기원의 vector에 GSH-I를 생산하는 *gsh I* gene과 GSH-II(14)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/pDG7a를 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

Aerated Slurry Bioreactor에서 재조합 대장균의 세포막을 톨루엔과 5 mM potassium phosphate buffer가 1:9(v/v)로 혼합된 용액으로 처리한다. 또한 빵효모는 아세톤과 등장액이 9:1(v/v)로 혼합된 용액으로 처리하였다. 이것은 유기용매로 처리하여 각각의 세포막을 통한 물질전달을 원활하게 하였다(15, 16). Seed culture와 main culture에서 각각 9시간씩 균체를 배양한 후, 8000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하여 균체만을 얻었다. 균체 2 g씩 3개의 flask에 0.5 mM cysteine을 녹인 5 mM potassium phosphate buffer 90 mL에 균일하게 혼합한 후 toluene 10 mL씩 용액을 첨가하여 250 rpm, 37°C에서 30분간 반응하였다. ATP 재생산계인 효모의 경우에도 5g씩 2개의 flask를 준비하여 빵효모를 각각 등장액 20 mL으로 녹인 후 acetone 180 mL를 혼합하여 250 rpm, 37°C에서 5분간 반응하였다. 각각 반응이 끝난 후 원심분리기를 이용하여 4500 rpm에서 10분간 원심분리하여 각각 균체를 얻었다. 글루타치온 생산은 재조합 대장균과 빵효모의 혼합비율을 1:4로 하였으며, 대장균은 4 g, 빵효모의 경우는 16 g을 사용하였다. 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid,

30 mM glycine, 60 mM MgCl₂, 400 mM 포도당의 기질을 사용하였으며(17-19), pH7.3을 유지하기 위해서 100 mM potassium phosphate buffer를 사용하였다.

Aerated Slurry Bioreactor 이용한 글루타치온 생산에서 반응부피는 80 mL, water jacket를 이용하여 온도를 37°C로 하였으며, 반응기내의 교반은 공기 또는 질소를 이용하였다. 기질 reservoir의 경우는 ATP 및 cysteine등 아미노산들이 수용액상에서 상온에서는 불안정함을 보임으로 냉장을 유지하였다. 또한 기질 공급관 및 반응기에 연결된 관을 최소한으로 줄였다. 반응기 내에는 기체에 의해서 교반이 됨으로 혼합세포가 와류형태로 섞임을 보였다. 이러한 점을 보완하기 위해서 반응기내에 직경이 1.5 cm인 관을 장착함으로써 세포의 유출을 최소한으로 줄일 수 있었다. 공기의 공급속도는 100 mL/hr이었고, 기질의 공급 속도는 2.6, 5.2, 10.4 mL/hr로 하여 실험을 시도하였다. 또한 세포의 회수 및 재사용을 위하여 원심분리기(한일공업사, HMR-160)를 이용하였으며, 4500 rpm에서 5분간 작동하여 매시간 세포를 순환시켰다.

분석

매시간마다 50 μL를 시료를 채취하여 20배로 희석시킨 후 또 다시 원심분리하였다. 원심분리한 상등액을 20 μL를 취하여 HPLC를 사용한 DTNB 분석방법을 이용하여, cysteine, glutathione, γ-glutamylcysteine을 분석하였다. 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(20). DTNB의 경우 난용성이므로 1 M potassium phosphate buffer(pH8)를 사용하였으며 DTE는 증류수에 용해시켜 사용하였다. HPLC(LC-10AD, Shimadzu)는 dual pump를 가지고 있는 solvent delivery module system이며 칼럼은 Symmetry C18 5 μm(250×4.6 mm, Waters)를 사용하였으며(21), UV detector(Waters 480, Waters)는 파장 280 nm에서 분석하였다. 분석 전계용매로는 230 mM ammonium formate solution(pH 5)과 메탄올(HPLC grade, Fisher)을 사용하여 시간에 따른 농도의 변화를 주었으며 전계 용액의 유속은 1.5 mL/min으로 하였다.

결과 및 고찰

Sequential Batch에 의한 글루타치온생산

재조합 대장균(0.6 g)만을 톨루엔으로 처리하여 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60 mM MgCl₂, 및 10 mM ATP를 이용하였으며 반응시간은 2시간이었다. 2시간 반응 후 원심분리하여 상등액은 시료를 채취한 후 제거하고 균체에 6 mL의 새로운 기질을 넣고 반응을 시켰다. 이 실험을 진행한 결과 34시간동안 12 batch동안 글루타치온의 생산농도는 일정하게 4.6 mM을 유지함을 보였고, γ-glutamylcysteine는 1.5 mM을 유지하였다. 하지만 cysteine의 경우에는 첫 번째 batch인 반응 2시간에 0.5 mM로 낮았으나 4번째 batch인 8시간까지는 점점 증가함을 보이다가 다시 점차 감소하여 6번째 batch인 22시간 때에서부터는 일정한 농도를 유지함을 보였다. 이 실험의 결과로 단일세포계

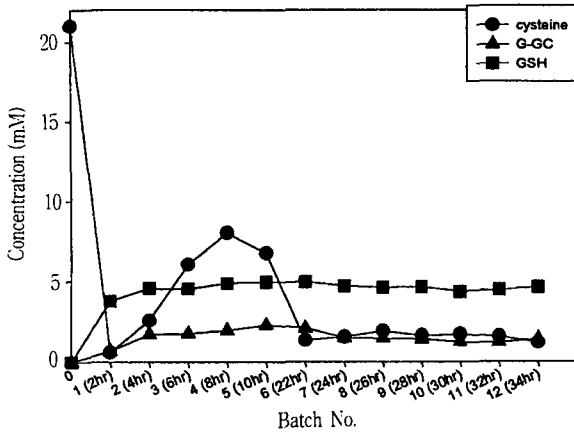


Figure 1. Glutathione production with sequential batch with recombinant *E. coli*.

인 재조합 대장균에서의 글루타치온 생산은 34시간 12 batch동안 유지됨을 보였으며, 효소의 글루타치온 생산에 안정성을 보여주었다(Figure 1).

제조합 대장균(0.6 g)과 빵효모(2.4 g)를 이용한 혼합세포계의 경우, 기질로 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60 mM MgCl₂, 및 10 mM ATP와 400 mM 포도당이 사용되었다. 포도당은 혼합세포계에서 중요시되는 ATP 재생산체인 빵효모의 해당과정에 필요하다. 혼합세포의 경우, 글루타치온은 첫 번째 batch인 2시간부터 증가하여 두 번째 batch인 4시간 때에서 8 mM의 농도를 나타내었다. 이 농도는 4시간동안 유지되었으며, 4번째 batch인 8시간 이후부터 감소하기 시작하여 22시간 이후에는 5 mM이하로 감소하였다. 24시간 이후에는 1 mM 정도를 나타내었다. γ -Glutamylcysteine의 경우도 26시간 이후에는 생산이 되지 않음을 보여주었다. 또한 cysteine의 농도 변화도 10시간까지는 점차 감소하다가 10시간 이후에서 증가함을 보였다(Figure 2). 이 실험결과에서 혼합세포를 이용한 경우, 10시간 이내에 글루타치온 생산에 더 우수함을 보였다. 그러나 10시간 이후에 오히려 단일세포계보다 글루타치온 농도가 낮아짐을 보였다. 이러한 현상은 Figure 1에서 관찰되는 바와 같이 대장균 내에 있는 글루타치온 생산효소는 시간에 안정됨을 보였다. 그리하여 혼합세포계에서의 글루타치온 농도의 감소는 ATP 재생산계에 관여하는 해당과정의 효소의 활성의 문제가 있는 것으로 판단되었다.

혼합세포계의 경우, 글루타치온 농도가 단일세포계와 비교해서 장시간 유지되지 못함을 보였기 때문에 이를 극복하기 위해서 새로운 효모를 1 g 씩 글루타치온 생산 과정 6batch(21시간), 7batch(23시간), 11batch(41시간), 12batch(43시간), 13batch(45시간)에 공급하였다(Figure 3). 글루타치온 농도는 2시간에서 가장 높았으며, 점차 글루타치온 농도가 감소함을 보였다. 21시간과 23시간에서 새로운 빵효모 1 g씩을 추가공급했을 경우 글루타치온 농도가 증가함을 보였다. 41시간 이후에는 새로운 빵효모를 추가 공급하여도 증가하지 않음을 보이는 것은 재조합 대장균 및 빵효모의 효소의 활성이 감소함을 보여주었다. γ -Glutamylcysteine 농도는 25시간 이후에는 모두 글루타치온으로 전환됨을 보였다. Cysteine의 농도도

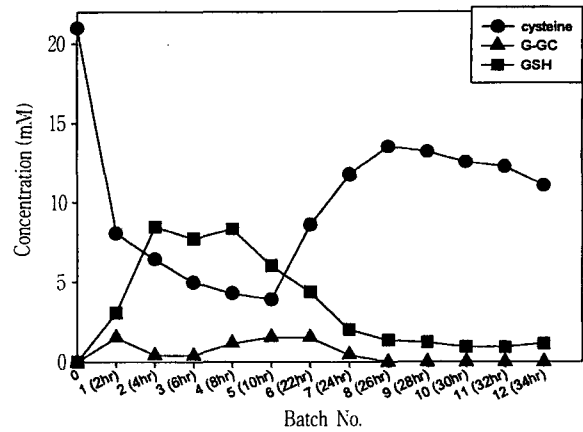


Figure 2. Glutathione production with sequential batch with mixed cells.

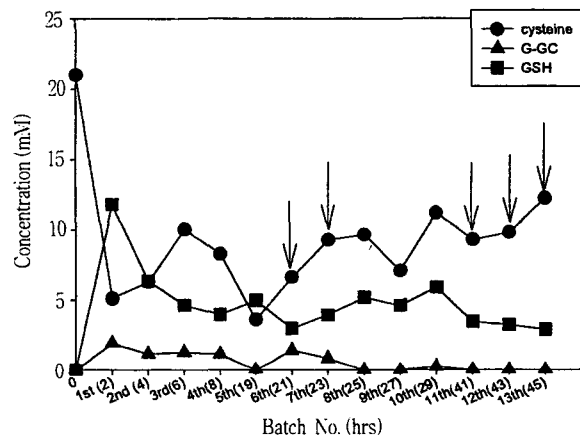


Figure 3. Glutathione production with feeding fresh yeast in sequential batch with mixed cells.

19시간 이후에서 점차 증가함을 보이다가 21시간과 23시간의 새로운 빵효모의 추가 공급이 있을 후 소량 감소함을 보였으며, 이는 cysteine이 γ -glutamylcysteine나 글루타치온으로 전환됨을 보여주었다. 41시간 이후에 점차 증가함을 보이는 것은 cysteine의 γ -glutamyl-cysteine와 글루타치온으로의 전환율이 떨어짐을 보였다. 이상의 결과로 혼합세포계는 10시간 이내에서는 단일세포계보다 글루타치온 농도가 높았으나, 10시간 이후에는 오히려 글루타치온 농도가 낮았다. 이러한 점을 보완하기 위해서 혼합세포계에서의 Sequential batch에 반응 중간에 새로운 빵효모를 추가 공급함으로써 글루타치온 농도를 5 mM 내외에서 유지할 수 있었다. Sequential batch 실험은 연속반응기인 Aerated Slurry Bioreactor에서 글루타치온 생산에 기초실험이 되었다.

Aerated Slurry Bioreactor를 이용한 글루타치온생산

E.coli TG1/pDG7 α 와 빵효모는 혼합세포계로서 *E. coli* TG1/pDG7 α 글루타치온을 생산하고 빵효모는 글루타치온 생산에 필요한 ATP를 재생산하는데 관여를 한다. 글루타치온을 생산하는 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase는 모두 세포 내에 존재하는 효소이므로 효소적 방법에 의한 생산은 난점이 있다. 본 연구에서는 이러한 세포

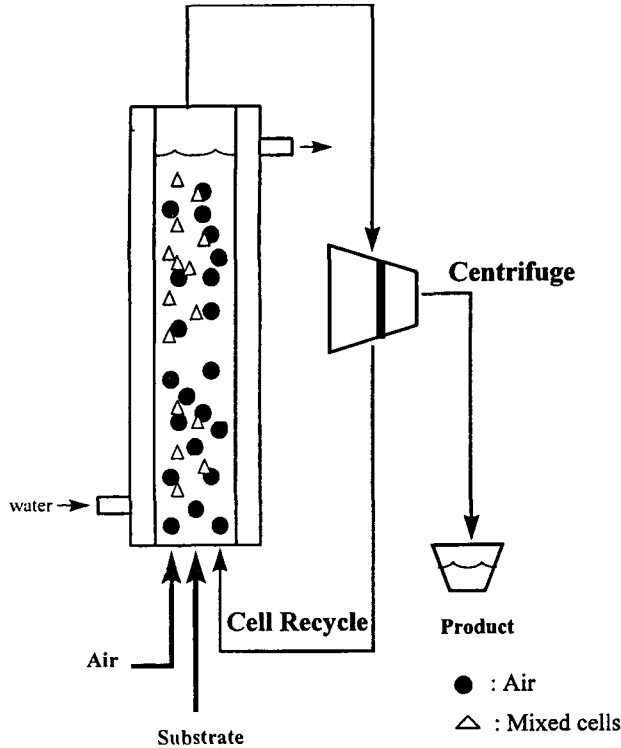


Figure 4. Schematic drawing of aerated slurry bioreactor.

내 존재하는 효소를 세포의 파괴와 효소의 정제없이 유기용매를 이용하여 세포막의 물질전달을 세포내외로 원활하게 함으로써 효소를 이용한 글루타치온 생산을 가능하게 하였다. 이러한 장점을 이용하여 현탁상태에 고농도의 재조합 대장균과 빵효모를 Aerated Slurry Bioreactor를 이용하여 글루타치온을 생산을 시도하였다(Figure 4). 본 실험에서 교반은 stirrer에 의해서 보다는 기체를 이용한 교반을 함으로써 세포 및 효소활성을 유지하였다. 또한 효소는 세포 내에 존재하기 때문에 유실되는 세포를 회수공정을 통하여 재사용할 수 있었다. 또한 sequential batch에서 재조합 대장균의 효소활성 실험을 기초로 본 실험을 수행하였다.

(1) 기질공급속도에 의한 글루타치온 생산 영향

본 연구에서는 *E. coli* TG1/pDG7 α 와 빵효모를 이용한 현탁반응에서의 글루타치온 생산과 sequential batch에 기초하여 연속반응기에서의 생산을 시도하였다. Aerated Slurry Bioreactor의 경우 혼합세포가 유출액으로 유실됨을 관찰하였다. 이러한 혼합세포의 유실을 막기 위해서 원심분리기(한일공업사, HMR-160)를 4500 rpm에서 5분간 사용하여, 세포의 회수 및 재사용을 시도하였다. Aerated Slurry Bioreactor에서 기질의 공급속도 및 기체의 공급속도가 글루타치온 생산에 중요한 요소로 판단되었다. 그리하여 고농도의 혼합세포를 이용한 Aerated Slurry Bioreactor에서 기질의 공급속도가 글루타치온생산에 미치는 영향을 조사하였다. 혼합세포가 유실되는 경우, 글루타치온의 생산농도가 기질공급속도 2.6 mL/hr에서는 42시간에서 현탁반응보다 낮아짐을 보였다(Figure 5). 글루타치온 생산은 6.60 mg/hr이었으며, 생산성은 1.65 mg/g

wet cell · hr이었다. 글루타치온 농도는 반응기 운전 5시간에 8.3 mM이었고 6시간에서 10.1 mM에 이르렀다. 반응기 운전 20시간이후에서부터 글루타치온 농도가 점차 낮아지고 있음을 보였다. 42시간에서 글루타치온 농도가 4.5 mM이었으며, 이 농도는 현탁반응의 농도와 같았다. 이 반응기에서는 세포를 회수공정이 없었으므로 시간에 따라 세포가 유출됨을 보였다. 반응 24시간에 유실된 세포량은 5.19 g이었으며, 반응기 내에 존재하는 세포량은 13.96 g이었다. 반응기 운전 48시간에서의 유실된 세포량은 11.47 g이었으며, 반응기내에 존재하는 세포량은 7.58 g이었다. 결과적으로 20시간 이후에 글루타치온 농도의 감소는 세포의 유실의 영향이라고 사료되며, 또한 sequential batch에서와 같이 재조합 대장균과 빵효모의 효소활성 때문에 글루타치온 농도가 감소된 것으로 보였다. 재조합 대장균과 빵효모를 이용한 혼합세포계에서 기질공급속도가 5.2 mL/hr에서는 22시간에서 현탁반응보다 낮아짐을 보였다(Figure 6). 글루타치온 농도는 반응기 운전 2시간에 8.6 mM에 도달했고 최고 농도는 반응기 운전 9시간에서 13.1 mM이었다. 그러나 글루타치온 농도가 급격히 감소함을 보였다. 반응기 운전 22시간이후에는 현탁반응에서의 글루타치온 농도 4.6 mM보다 낮았다. 또한 cysteine의 농도 변화가 기질공급속도 2.5 mL/hr의 반응기보다 급격히 증가함을 보였다. 이는 반응기 운전시간에 따른 세포의 유실량으로 설명을 할 수 있다. 반응기 운전 24시간에 유실된 세포량은 13.18 g이었으며, 반응기내에 존재하는 세포량은 6.10 g이었다. 또한 반응기 운전 48시간에서 유실된 세포량은 16.35 g이었고, 반응기내에 존재하는 세포량은 2.93g이었다. 이 반응기의 경우는 세포의 유실이 가장 큰 글루타치온 농도 감소의 원인임을 알 수 있었다. 결과적으로 기질공급속도를 2배로 증가시켰을 때 반응기 운전시간은 반정도로 감소함을 보였다. 혼합세포계를 이용한 Aerated Slurry Bioreactor에서 기질공급속도가 5.2 mL/hr이며, 회수 및 재사용이 적용된 실험에서는 회수공정이 적용되기 전 글루타치온 생산의 차이를 조사하였다(Figure 7). 반응기 운전 4시간에서 6.1 mM이었고, 6시간에서 8.0 mM에 도달했다. 세포가 유실되는 Figure 6보다는 글루타치온 농도의 감소가 완만함을 보였다. 32시간에서 현탁반응에서의 글루타치온 농도와 같은 농도를 보였다. Cysteine의 농도도 Figure 6보다는 완만하게 증가함을 보였다. 글루타치온 생산시간이 세포를 회수하여 재사용하기 전보다 10시간 연장됨을 보였다. 글루타치온의 생산성은 3.82 mg/g wet cell · hr이었다. 혼합세포계를 이용하며, 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60 mM MgCl₂, 및 10 mM ATP와 400 mM 포도당의 기질이 10.4 mL/hr에서 4시간에 글루타치온 농도가 12 mM에 이르렀고, 6시간에는 13.8 mM에 도달했다. 세포유실이 매우 빠르게 진행되므로 세포를 회수하는 데 어려움이 있다. 20시간 이후에 현탁반응에서의 글루타치온 농도인 7.1 mM보다 낮아짐을 보였다. 글루타치온 생산성은 25.75 mg/g wet cell · hr이었다(Figure 8). Aerated Slurry Bioreactor에서 혼합세포를 회수 및 재사용함으로써 글루타치온 생산시간을 연장시켰다. Aerated Slurry Bioreactor에 반응기 운전 중간에 새로운 빵효모를 추가 공급함으로써 반응기 운전시간에 따른 글루타치온 농도 감소가 세포의 유실 또는 빵효모의 해당과정 효소활성의 감소가 원인인지

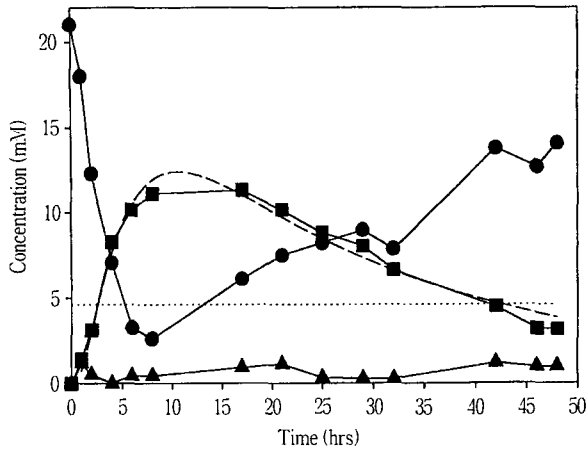


Figure 5. Glutathione production using solvent-treated mixed cell *in vitro* by Aerated Slurry Bioreactor at feed rate of 2.6 mL/hr without recycling mixed cell. ●; cysteine, ▲; γ -glutamylcysteine, ■; glutathione, - - - - -; glutathione production in suspension reaction, - - - - -; nonlinear regression, substrates: 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 20 mM MgCl₂, 400 mM glucose, 10 mM ATP.

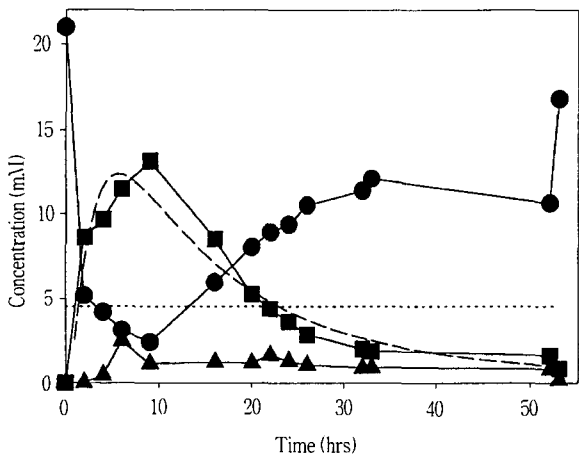


Figure 6. Glutathione production using solvent-treated mixed cell *in vitro* by Aerated Slurry Bioreactor at feed rate of 5.2 mL/hr without recycling mixed cell. ●; cysteine, ▲; γ -glutamylcysteine, ■; glutathione; glutathione production in suspension reaction; nonlinear regression, substrates: 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 20 mM MgCl₂, 400 mM glucose, 10 mM ATP.

알아보았다. Figure 3에서 글루타치온 생산에 sequential batch에서는 새로운 배양모를 추가공급함으로써 글루타치온 농도가 유지됨을 보였다. 혼합세포계를 이용하였으며, 제조합 배양균은 4 g이고 배양모는 16 g으로 반응이 시작되었다. 반응기 운전 11시간에 글루타치온이 감소됨을 보였기 때문에 배양모를 5 g을 추가공급하였다. 반응기 운전 21시간에 배양모의 추가공급하였으나, 글루타치온 농도는 증가되지 않고 유지되고 있음을 보였다. 반응기 운전 23시간이후에 글루타치온 농도가 다시 감소하기 시작하였으며, 29시간에 배양모를

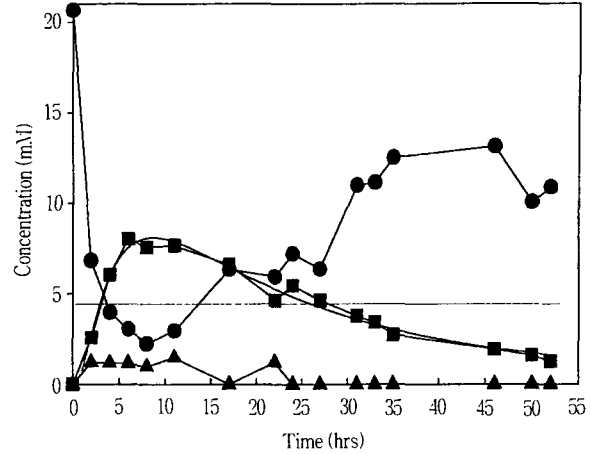


Figure 7. Glutathione production using solvent-treated mixed cell *in vitro* by Aerated Slurry Bioreactor at feed rate of 5.2 mL/hr with recycling mixed cells. ●; cysteine, ▲; γ -glutamylcysteine, ■; glutathione; glutathione production in suspension reaction; nonlinear regression, substrates: 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 20 mM MgCl₂, 400 mM glucose, 10 mM ATP.

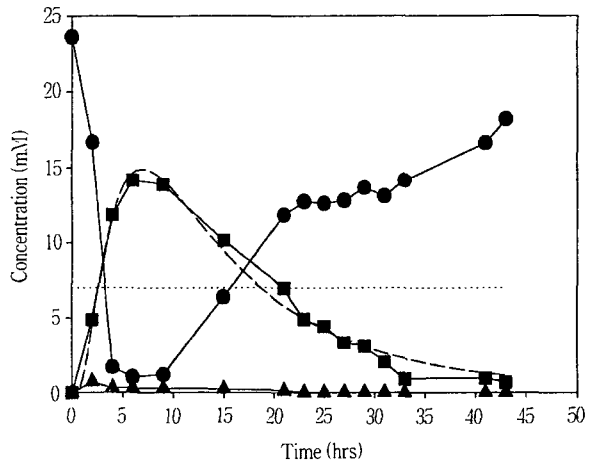


Figure 8. Glutathione production using solvent-treated mixed cell *in vitro* by Aerated Slurry Bioreactor at feed rate of 10.4 mL/hr with recycling mixed cells. ●; cysteine, ▲; γ -glutamylcysteine, ■; glutathione; glutathione production in suspension reaction; nonlinear regression, substrates: 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 20 mM MgCl₂, 400 mM glucose, 10 mM ATP.

세 번째 5 g을 추가공급하여 글루타치온 농도는 유지되지 못하고 점차 감소됨을 보였다. 반응기 운전 25시간에서 현탁반응에서의 글루타치온 농도 4.6 mM와 같았다(Figure 9). 오히려 배양모를 추가공급하지 않았을 때보다 글루타치온 생산 시간이 단축되었다. 이는 배양모의 양이 반응기내에 많아지면서 기질의 전달에 문제점이 있는 것으로 사료된다.

이상의 실험결과에서 유실된 혼합세포를 회수 및 재사용함으로써 적용함으로써 글루타치온 생산시간을 10시간 연장시킬 수 있었다. 또한 기질공급속도를 증가시킴에 따라 글루타

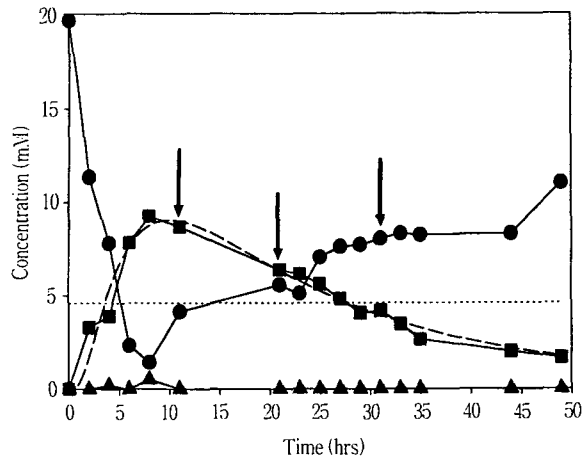


Figure 9. Glutathione production using solvent-treated mixed cells *in vitro* by Aerated Slurry Bioreactor at feed rate of 5.2 mL/hr with recycling mixed cells and additional feedings of fresh yeast. ●; cysteine, ▲; γ -glutamylcysteine, ■; glutathione, - - - -; glutathione production in suspension reaction, — — —; nonlinear regression, substrates: 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 20 mM $MgCl_2$, 400 mM glucose, 10 mM ATP.

치은의 생산시간은 단축됨을 보였으며, 결과적으로 단위 효소량에 의한 글루타치온의 총생산량은 변화하지 않는 것으로 나타났다. 하지만 sequential batch의 경우와 달리 새로운 빵효모를 추가 공급했을 경우에는 글루타치온 생산시간이 7시간 단축됨을 보였다.

(2) 계면활성제(Tween 80)를 이용한 글루타치온 생산

단일세포계에서 기질은 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60 mM $MgCl_2$, 및 10 mM ATP이며, 기질공급속도 5.2 mL/hr에서 계면활성제가 *E. coli*의 글루타치온 생산시간에 미치는 영향을 실험하였다. 단일세포계에서 재조합 대장균만을 이용한 글루타치온 생산시간은 25시간에 현탁반응보다 낮아짐을 보였다. 계면활성제는 Tween 80을 사용하였으며, 사용량은 20 μ L를 사용하였다. 계면활성제를 이용한 글루타치온 생산에서 기체공급속도는 100 mL/min이었으며, 반응기 운전 6시간에 글루타치온 농도가 5.8 mM을 나타내었으며, 반응기 운전시간 30시간까지는 글루타치온 농도가 5-6 mM을 보였다. 반응기 운전시간 45시간에서 현탁반응시 글루타치온 농도와 같았다. 이는 단일세포계인 재조합 대장균만을 이용한 Aerated Slurry Bioreactor 경우, 세포 내의 효소들이 교반 등에 의해서 효소의 활성이 떨어짐을 보였다. 이러한 점을 보완하는 계면활성제를 이용하여 세포 및 효소를 보호하였으며, 글루타치온 생산효소 및 ATP 재생산계의 해당과정 효소활성도 장시간 유지할 수 있을 것으로 본다. 계면활성제(Tween 80)를 사용하여 글루타치온 생산시간을 재조합 대장균만을 사용한 경우, 25시간에서 45시간으로 연장시켰다(Table 1).

(3) 교반 기체가 글루타치온생산에 미치는 영향

Aerated Slurry Bioreactor의 경우 교반을 기체를 이용하였

Table 1. Comparison of glutathione production concentration and time.

Reactor condition	Glutathione production concentration(mM)	Glutathione production time(hrs)
Suspension reaction	4.5	25
ASB using surfactant	5-6	45
ASB using nitrogen	5-6	40

다. 단일세포계에서 기질은 20 mM cysteine, 80 mM glutamic acid, 30 mM glycine, 60 mM $MgCl_2$, 및 10 mM ATP이며, 교반기체로 공기를 사용하여 글루타치온을 생산하였을 때 글루타치온 생산시간은 25시간동안 지속됨을 보였다. 공기의 경우 산소가 포함되어서 세포계의 효소에 산화에 영향을 미칠 것으로 판단되어 공기를 질소로 교체하여서 이러한 세포 내 효소의 손상을 최소화 할 수 있을 것으로 판단되었다. 반응기 운전 2시간에 글루타치온 농도는 4.8 mM를 나타내었으며, 6시간부터는 30시간까지는 글루타치온 농도가 5-6 mM로 안정되었다. 반응기 운전 40시간이후에 현탁반응에서의 글루타치온 농도4.5 mM를 보였다. 단일세포계인 재조합 대장균만을 이용한 글루타치온 생산시간 25시간을 질소를 이용해서 Aerated Slurry Bioreactor를 교반하여 40시간으로 연장시켰다(Table 1).

요 약

E. coli TG1/pDG7 α 와 빵효모의 혼합세포계에 의한 글루타치온 생산을 Aerated Slurry Bioreactor에서 수행하였다. 글루타치온 생산 효소는 34시간 동안 안정성을 보였으며, 글루타치온 수율은 4.6 mM을 유지함을 보였다. 고농도의 혼합세포를 이용한 Aerated Slurry Bioreactor에서 기질의 공급속도가 글루타치온 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 세포가 회수되어 기질공급속도 5.2 mL/hr에서 글루타치온의 생산농도는 32시간에서 현탁반응보다 낮아짐을 보였고, 반면 세포가 회수되지 않은 기질공급속도 5.2 mL/hr에서는 22시간 동안 유지되었고 2.6 mL/hr에서는 42시간 동안 유지되었다. 글루타치온의 생산성은 기질공급속도가 10.4 mL/hr에서 25.7 mg/g wet cell \cdot hr이었으나, 2.6 mL/hr에서는 1.65 mg/g wet cell \cdot hr이었고 5.2 mL/hr에서는 5.28 mg/g wet cell \cdot hr이었다. 계면활성제(Tween 80)를 사용한 경우, 글루타치온 생산시간을 25시간에서 45시간으로 연장되었다. 글루타치온 생산이 산소가 세포계의 효소에 산소에 의해 영향을 미칠 것으로 판단되었고, 공기를 질소로 교체하여 글루타치온 생산시간을 40시간으로 연장시켰다.

감 사

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

참 고 문 헌

1. Fahey, R. C., S. Brody, and S. D. Mickolajczyk. 1975.

- Change in the glutathione thiol-di sulfide status of *Neurospora crassa* conidia during germination and aging. *J. Bacteriol.* 121: 144-151.
2. Kimura, A. and Y. Inoue. 1996. Production of glutathione and its related compound. *Proceeding of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry, Seoul, Korea*.
 3. Meister, A. and M. E. Anderson. 1980. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
 4. Murata, K. and A. Kimura. 1982. Some properties glutathione biosynthesis-deficient mutants of *Escherichia coli* B. *J. Microbiol.* 12 (8): 1047-1052.
 5. 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.
 6. Meister, A. 1985. *Glutamate, Glutamine, Glutathione and Related Compounds*, Pp 379-399. Academic Press INC., New York.
 7. Anderson, M. E. and A. Meister. 1983. Transport and direct utilization of γ -glutamylcysteine for glutathione synthesis. *Biochem.* 80: 707-711.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Alfafara, C. G., A. Kanda, H. Shimizu, T. Shioi, S. Shioya and K. I. Suga. Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 538-540.
 11. 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.
 12. Kwak, J. H. 1992. *Characterization of γ -glutamylcysteine Synthetase Gen from Escherichia coli K12*. MS. D. Dissertation Korea Univ., Seoul, Korea.
 13. Meister, A. 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220: 472-476.
 14. Wang, C. L. and D. J. Oliver. 1996. Cloning of the cDNA and genomic clones for glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana* and complementation of a *gsh2* mutant in fusion yeast. *Pharm. Molecular Biology* 31: 1091-1104.
 15. Felix, H. 1991. *Extractive Bioconversions-Bioconversions in Permeabilized Cells*, Pp 259-279. Dekker Press.
 16. 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.
 17. Yoon, S. H. and Y. M. Koo. 1997. Glutathione production by co-immobilized cell reactor. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 12(2):151-158.
 18. Koh, S. Y. and Y. M. Koo. 1998. *In-vitro* Production of Glutathione using Yesat ATP Regeneration System and Recombinant Synthetic Enzymes from *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26(3): 213-220.
 19. 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. Dennda, G. and M. R. Kula. 1986. Assay of the glutathione-synthesizing enzymes by high-performance liquid chromatography. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 8: 459-464.
 21. 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.