

## 효모에 의한 글루타치온의 생산과 공정 모니터링

<sup>1,3</sup>김 춘 광 · † <sup>2,3</sup>이 종 일

전남대학교 공과대학 <sup>1</sup>물질·생물화학공학과, <sup>2</sup>응용화학공학부, <sup>3</sup>생물공정기술연구소  
(접수 : 2004. 2. 20., 게재승인 : 2004. 6. 18.)

## Production of Glutathione by Yeast and Process Monitoring

Chun-Kwang Kim<sup>1,3</sup> and Jong Il Rhee<sup>2,3†</sup>

<sup>1</sup>Department of Material and Biochemical Engineering,

<sup>2</sup>Faculty of Applied Chemical Engineering,

<sup>3</sup>BioProcess Technology Lab., Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2004. 2. 20., Accepted : 2004. 6. 18.)

In this work the production of glutathione (GSH) by yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the monitoring of the process were studied. In shaking culture the production of GSH was high at initial pH value of 4 and at temperature of 30°C. But when L-cysteine was added to the culture medium at the beginning of the cultivation, the productivity of GSH was low. In case 0.5% (v/v) of L-cysteine, glycine and glutamic acid were introduced to the culture medium in the exponential cell growth phase, high concentration of GSH (about 90 mg/L) was produced in the bioreactor. A fed-batch operation with stepwise glucose feeding strategy allowed to produce 102 mg/L of GSH. The cultivation processes were on-line monitored by a 2-dimensional fluorescence sensor. A few off-line data such as cell growth, cystein concentration, phosphate concentration and GSH productivity could be well correlated to the fluorescence intensity of some combinations of excitation and emission wavelengths.

**Key Words :** L-Cysteine, glutathione, monitoring, *Saccharomyces cerevisiae*, 2-dimensional fluorescence sensor

### 서 론

글루타치온 (L-γ-glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH)은 1929년 Hopkins가 효모로부터 분리하였으며, 생화학적 기작 (mechanism)에 대해 연구가 매우 활발히 이루어지고 있는 생리 활성 물질이다(1). 글루탐산 (glutamate), 시스테인 (cysteine), 글라이신 (glycine) 등의 세 가지 아미노산으로 구성된 트리펩타이드인 글루타치온은 동물, 식물 및 미생물의 세포내에서 0.1~10 mM의 농도로 존재하며(2), 세포의 총 비단백질성 황 성분 (total non-protein sulfur)의 90% 이상을 차지하고 있다(3). 그러나 대부분 환원형 (GSH)으로 존재하고, 산화형 (GSSG)과 이황화물이 혼합된 GSS-단백질 (PrSSG) 및 glutathione reductase (GR)로도 적은 양이 존

재한다(4). 글루타치온은 주로 간장 질환과 방사선장애, 당뇨병의 치료약으로 사용되고 있지만, 최근에는 항암제로서도 주목받고 있으며 건강식품 분야에서도 그 이용이 증가되고 있다(5). 효소 합성법, 생물공학적 방법 및 화학적 합성 방법을 통해 글루타치온을 생산할 수 있는데 화학적 합성법의 경우 비용에 비해 생산량이 적고 생산 공정이 복잡하며 특히 생산물의 분리가 복잡하기 때문에 실질적인 생산이 어려운 상태이다. 최근 효모나 재조합 미생물을 이용한 생물공학적 기법에 의해 글루타치온을 대량으로 생산하는 노력이 활발히 이루어지고 있다(6-10).

효모를 이용한 글루타치온의 생산에는 전구체들 (glutamate, glycine, cysteine)과 에탄올 및 젖산 (lactic acid) 등을 배지에 첨가하는 방법, 돌연변이 균주를 이용하는 방법 과 글루타치온 생산균주를 고정화시켜 생산하는 방법 등이 사용되고 있다(10). 또한, 유전공학 기술의 발달로 재조합된 미생물을 이용하여 글루타치온 생합성 효소를 생산하고 생산된 효소를 이용하여 글루타치온을 생산하는 공정이 개발되었다(9). 이러한 공정에서 ATP 공급이 중요하기 때문에 고가의 ATP를 절약하는 경제적 생산조건을

† Corresponding Author : Faculty of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1847 Fax : +82-62-530-0846

E-mail : jirhee@chonnam.ac.kr

확립하는 ATP 재생산제로 대장균에 존재하는 효소인 acetate kinase를 이용하는 방법, 효모의 해당작용을 이용하는 방법 및 *Cyanobacterium*의 광합성을 이용하는 방법 등이 있다. 한편, 공정의 개선을 통한 글루타치온의 대량 생산에 관한 연구가 이루어지고 있다(7, 9). 즉, 유가식 배양을 통한 글루타치온의 생산은 배양 부피를 감소시킬 수 있고 균체의 밀도를 높여 다른 균주의 오염을 막을 수 있으며 효율적인 기질 공급으로 원료비 및 생산 시설비의 절감을 꾀할 수 있어 글루타치온의 대량 생산에 이용되고 있다.

한편, 생물공정의 효율적인 모니터링 및 제어는 미생물의 성장과 생산성 향상을 위한 필수 요건중의 하나이다. 미생물의 성장 및 대사산물의 생산은 생물공정 내 각종 공정변수, 즉 pH, 용존산소농도와 같은 물리, 화학적 변수 및 전구체의 농도 등에 의해서 영향을 받는다. 또한 효과적인 생물 공정의 제어와 모델링을 위해 각종 공정변수를 온라인 모니터링 하는 것이 필수적이다(11, 12). 본 연구에서와 같이 효모를 이용하여 글루타치온을 생산하는 공정을 개발하기 위해서는 생물 반응기내의 미생물의 성장이나 대사 과정을 온라인 모니터링하는 것은 매우 중요하다. 생물공정을 모니터링하기 위해 각종 기술 (흐름주입분석기술, 순차주입분석기술, 각종 센서 등)이 이용되는데 온라인 및 인시투 모니터링이 가능한 광학센서, 특히 형광센서는 생물공정 내 중요 변수를 모니터링하기 위해 사용되고 있다. 최근, 2차원 형광센서가 개발되어 다파장을 스캐닝하여 생물공정 내에서 생산 및 소비되는 각종 물질, 예를 들면 아미노산 (tryptophan, tyrosine, phenylalanin), 조효소 (NAD(P)H, FAD, FMN) 등의 형광특성을 동시에 모니터링할 수 있다(13).

본 연구에서는 효모의 일종인 *Saccharomyces cerevisiae*가 글루타치온을 생산하는 최적 조건을 연구하고 생물 반응기를 이용하여 글루타치온의 대량생산 기술을 개발하고자 한다. 또한 2차원 형광센서를 사용하여 글루타치온의 생산에 영향을 줄 수 있는 각종 공정변수를 온라인 모니터링하여 공정개발에 이용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 연구에서 사용한 효모 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 7754)는 미국 ATCC (American Type Cell Collections, USA)에서 구입하였으며, 보관용 균주는 -80°C에서 25% (w/v) glycerol stock으로 보관하였다. 균주의 활성화를 위해 YM (3 g/L yeast extract, 3 g/L malt extract, 5 g/L tryptone, 10 g/L glucose, pH 7) agar 배지 (1.5% agar)를 사용하였으며 종균배양과 전배양에는 YM 배지 (pH 7)를 사용하였다. 본 배양 (main culture)에는 복합 배지인 YM 배지와 최소 배지(9), 10 g/L Glucose, 6 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.33 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.4 g/L KCl, 0.12 g/L NaCl, 2 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/L FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.12 g/L ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.024 g/L MnSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.006 g/L CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.12 g/L CaCl<sub>2</sub>, 3 ml/L Vitamin solution)를 실험 조건에 따라 적절히 수정하여 사용하였다. 특히 최소 배지에는 글루타치온의 전구체로

사용되는 시스테인, 글라이신, 글루탐산을 첨가하여 사용하였다. 배양액 및 반응기는 121°C, 14 psi에서 최소 20분 멸균하였으며, 최소 배지의 탄소원과 가용성 염은 분리하여 멸균한 후 혼합하였다.

### 발효 실험

냉동 보관중인 균주를 전배양을 위해 YM agar 배지에 도말하여 30°C에서 활성화시켰다. 고체 배지에서 활성화된 colony를 진탕배양기 (Jeiotech Co., Korea)에서 30°C, 150 rpm 조건에서 12시간 종균배양 (배양 부피; 50 mL) 한 후, 1% (v/v)를 전배양액 (배양부피: 50 mL)에 접종하였다. 본배양 배지 200 mL에 전배양액 1% (v/v)를 접종하여 진탕 배양기에서 30°C, 150 rpm으로 진탕 배양하였다.

생물반응기에 의한 회분식 배양에는 KoBiotech 사 (Korea)에서 제조한 2.5 L 크기의 반응기를 사용하였으며 반응기내의 본배양 배지 (배양부피: 1.5 L)에 전배양액의 1%를 접종하여 배양하였다. 반응기의 운전조건은 30°C, 400 rpm, pH 5.5, 통기량 1 vvm (aeration volume/medium volume/minute)으로 하였으며, 배양액의 pH 조절에는 1 N HCl 과 14% NH<sub>4</sub>OH를 사용하였다. 발효실험에서 글루코스 농도 및 전구체의 첨가농도에 따른 글루타치온의 생산정도를 알아보았으며 전구체 첨가 방법에 따른 글루타치온 생산량을 조사하였다.

회분식 발효 실험의 결과를 이용하여 유가식 발효 공정에 의한 고농도의 균체 생산 및 글루타치온의 생산성을 조사하였다. 배양배지로는 최소배지를 사용하였으며 글라이신 및 글루탐산의 첨가 농도는 각각 0.5% (v/v)를 발효 초기에 배지에 첨가하였으며 시스테인은 배양 11시간에 첨가하였다. 회분식 배양을 하는 도중 글루코스 농도가 거의 고갈되었을 때, 농축된 글루코스를 계단식과 지수적으로 증가하는 형태로 공급하였으며 비성장 속도는 각각 0.1 1/h과 0.15 1/h로 하고 반응기내 글루코스 농도가 0.5 g/L로 유지되도록 글루코스를 공급하여 글루타치온의 생산을 조사하였다.

### 분석 방법

발효액의 상등액에 남아있는 환원당 농도는 *p*-hydroxybenzoic acid hydrazide를 이용한 비색법으로 측정하였다. 세포내 글루타치온의 농도를 측정하기 위해 얻어진 균체에 glutathione buffer (125 mM sodiumphosphate, 6.3 mM EDTA, pH 7.5)를 1 mL씩 첨가한 후 초음파 분쇄기 (30 W)를 이용하여 파쇄한 후 원심분리 (13000 rpm, 3 min)하여 상등액을 취하였다. 96-well plate의 한 well에 얻어진 시료 50 μL와 반응 혼합물 (1 mM 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 5 mL, 1 mM NADPH; 5 mL, glutathione buffer 5.75 mL, 20 unit glutathione reductase) 150 μL를 반응시킨 후, microplate reader (Victor 1420, Perkin Elmer Co, Finland)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 글루타치온의 농도를 분석하였다. 단백질의 정량은 균체를 파쇄한 후 얻은 상등액을 5~50배 정도로 적절히 희석한 후 Bradford 법(15)에 의해 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 배양액 중의 시스테인 농도는 구리(II) 촉매반응(16)에 의해 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

공정 모니터링

생물반응기 내의 각종 공정변수들 즉, pH, 용존산소 농도, 배가스 등을 모니터링하기 위해 pH 전극 (pH electrode, METTLER Co., Germany), 용존산소센서 (O<sub>2</sub> sensor, METTLER Co., Germany), O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 가스 분석기 (LOKAS Co., Korea) 등을 사용하였다. 실시간 측정된 자료를 수집하기 위해 데이터 수집보드 (PCI 6024E DAQ board, National instrument Co., USA)를 사용하였으며 LabVIEW (ver. 6.1, National instrument Co., USA)를 이용하여 프로그래밍하였다. 생물반응기 내의 미생물 및 배양액의 형광특성 변화를 모니터링하기 위해 2차원 형광 광도계 (Model F-4500, Hitachi Co., Japan)를 사용하였다. 스테인리스로 제작한 생물 반응기 (KoBiotech Co., 2.5 liter or 7 liter) 측면에는 액체 광학 전도관 (liquid light conductor, Lumatek, GmbH, Germany)을 직접 연결할 수 있는 석영창을 설치하였다. 사용된 2 m-bifurcated 액체 광학 전도관은 250~650 nm 범위에서 50% 이상의 투과도를 가지고 있었다(6). 2 차원 형광센서의 조작 매개변수 값과 발효기와 함께 사용한 형광센서 등의 온라인 모니터링 장치는 Rhee 등(12)의 논문을 참고하였다.

결과 및 고찰

발효조건에 따른 글루타치온 생산

배양액의 pH 값에 따른 글루타치온의 생산량을 조사하기 위하여 복합배지를 본배양 배지로 사용하고 배양액의 초기 pH 값을 4.0, 5.0, 6.0, 7.0으로 조절한 경우와 pH를 조절하지 않은 경우의 *S. cerevisiae* 성장 특성, pH 변화 및 글루타치온 생산량을 조사하였다(Fig. 1a). 글루타치온의 생산량은 15시간에서 18시간 경과 후 가장 높게 나타났으며, 특히 초기 pH가 4.0인 경우에 높은 농도 (40 mg/L 정도)의 글루타치온이 생산되었다.

글루타치온의 합성을 위한 전구체 중 시스테인의 첨가는 글루타치온의 합성에 중요한 역할을 한다. 특히, 배양액에 시스테인을 첨가하는 시간이 글루타치온 합성에 결정적인 요소이므로 시스테인의 첨가 시간을 변화시켜 글루코스 농도 변화 및 글루타치온의 생산성을 조사하였다(Fig. 1b). 시스테인 첨가시간은 배양초기, 배양시작 후 12시간, 24시간, 36시간으로 다르게 하였으며 본배양 배지로는 최소 배지를 사용하였다. 배양초기에 시스테인을 첨가한 경우 균체 성장이 원활하게 이루어지지 않아 24시간까지 글루코스가 완전히 소모되지 않았으며 글루타치온 생산성도 가장 낮게 나타났다. 지수 성장기가 끝날 무렵인 12시간에 시스테인을 첨가했을 때 글루타치온의 생산성이 가장 높았으므로 이후의 실험에서 시스테인 첨가시간은 12시간으로 하였다.

본배양 배지로 복합배양액을 이용하여 배양액의 온도 변화에 따른 *S. cerevisiae*의 성장 및 글루타치온의 생산량을 조사하였다(Fig. 1c). 실험에서 배양 온도를 28℃, 30℃, 35℃로 다르게 하여 발효 특성을 비교하였다. 28℃에서 배양한 경우에는 균체 성장이 느리고 글루타치온의 생산량도 적음을 알 수 있었고 35℃의 경우 균체 성장은 활발히 이루어진 반면, 글루타치온의 생산량은 30℃에서 배양한 경우보다 적음을 알 수 있었다.

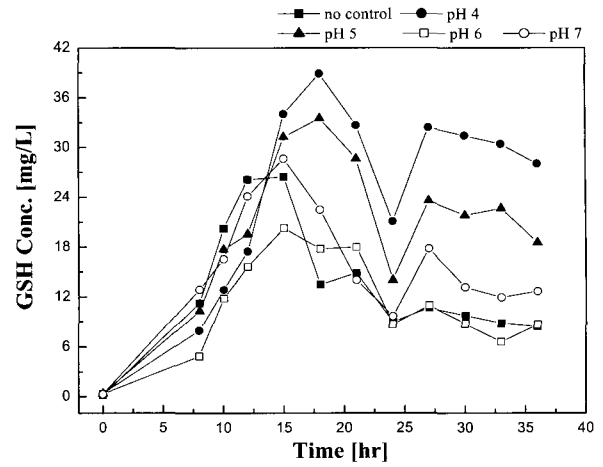


Figure 1a. Effect of initial pH values on glutathione production.

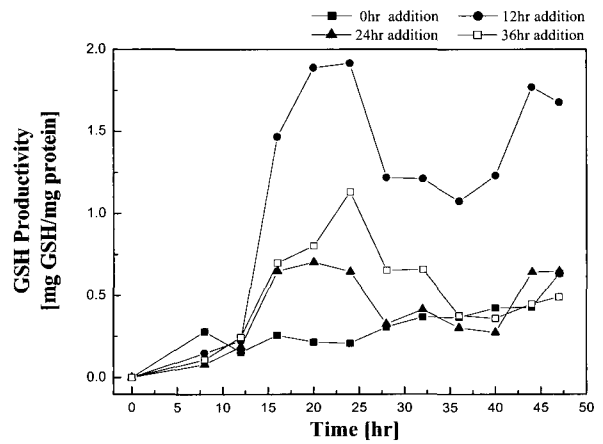


Figure 1b. Time courses of glutathione productivity during cultivation of *S. cerevisiae* with different addition time of cysteine.

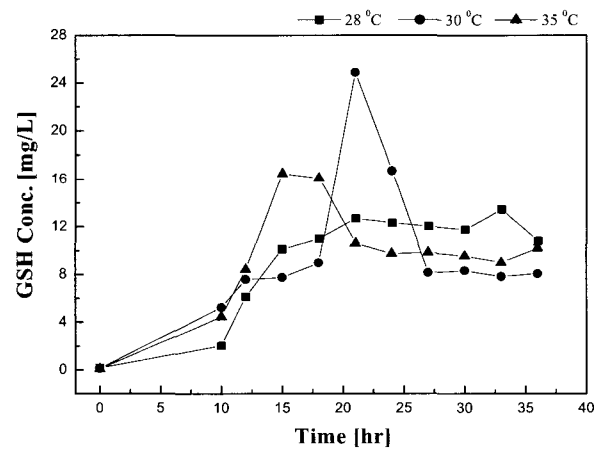


Figure 1c. Effect of temperature on glutathione production.

기질농도에 따른 글루타치온의 생산

기질 농도에 따른 *S. cerevisiae*의 성장 특성 및 글루타치온의 생산량을 알아보기 위해 글루코스 농도를 5 g/L, 10 g/L,

20 g/L로 다르게 하여 실험을 수행하였다(Fig. 2). 배양액으로 최소 배양액을 사용하였으며 배양 초기에 글라이신과 글루탐산을 각각 0.3% (v/v) 첨가하였고 시스테인은 배양 11시간에 0.3% (v/v) 첨가하였다. 기질로써 글루코스를 사용하였을 때 진탕 배양실험에서는 5 g/L일 때 글루타치온 생산성이 최대값을 보였다. 그러나 배양액의 pH 조절이 용이하고 공기 주입 하에서 가동되는 생물 반응기에서는 글루코스의 농도가 높을 때 즉, 20 g/L에서 글루타치온의 농도가 가장 높고 균체 (cell mass)당 글루타치온의 생산성은 글루코스 10 g/L일 때 최대값을 나타내었다.

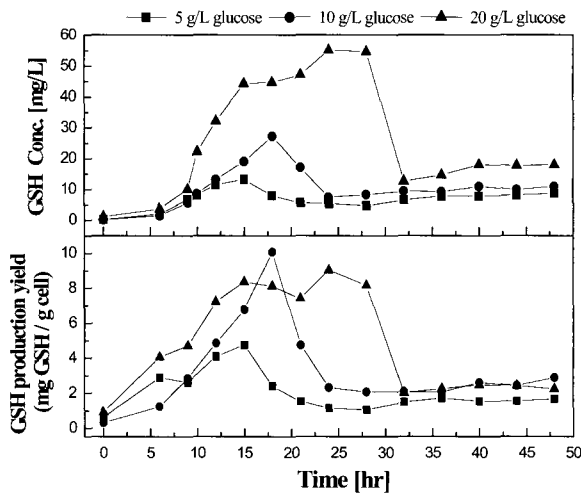


Figure 2. Effects of glucose concentrations on glutathione production and production yield in chemically defined medium.

**전구체에 따른 글루타치온의 생산**

글루타치온 생합성 전구체인 글라이신, 시스테인, 글루탐산을 배양액에 첨가하는 방법에 따른 글루타치온의 생산특성을 연구하였다. 최소배양액에 배양 초기에 글라이신과 글루탐산을 각각 0.3% (v/v) 첨가한 후 배양 11시간에 시스테인을 0.3% (v/v) 추가로 첨가한 경우와 초기에는 아미노산을 첨가하지 않고 11시간에 세 종류의 아미노산을 각각 0.3% (v/v) 첨가하였을 경우의 글루타치온의 생산량 및 생산 수율을 조사하였다(Fig. 3a). 시스테인만을 배양 11시간 즉, 미생물의 지수 성장기에 투입한 경우 높은 농도의 글루타치온이 생성되었지만 균체 당 글루타치온의 생산량은 11시간에 세 종류의 아미노산을 첨가한 경우가 높았다.

또한, 글라이신, 시스테인 및 글루탐산의 첨가 농도에 따른 글루타치온의 생산량 및 생산 수율을 조사하였다(Fig. 3b). 전구체의 첨가농도는 최소 배지에 세 종류의 아미노산 농도를 0.3% (v/v), 0.5% (v/v), 0.7% (v/v)로 달리하여 실험하였으며, 배양 초기에 글라이신과 글루탐산을 첨가한 후 배양 11시간에 시스테인을 추가로 첨가하였다. 세 종류의 아미노산 즉 글라이신, 글루탐산 및 시스테인을 0.3% 및 0.5%로 증가하였을 때 글루타치온의 생산량은 아미노산의 증가에 따라 증가됨을 볼 수 있었다. 그러나 0.7%로 증가시켰을 때 글루타치온의 생산량은 아미노산을 0.5% 첨가했을 때보다 감소하였

다.

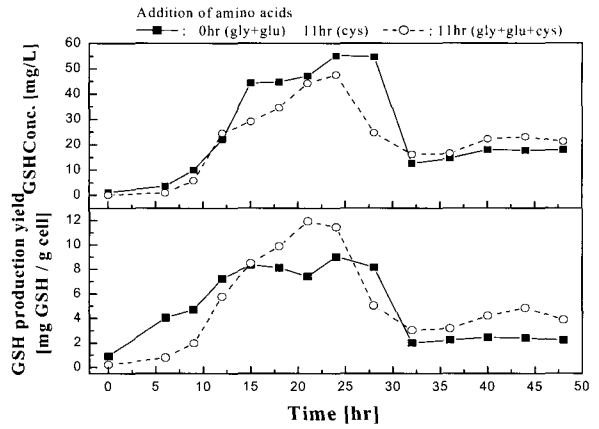


Figure 3a. Effects of addition time of three precursors on glutathione production and production yield in chemically defined medium.

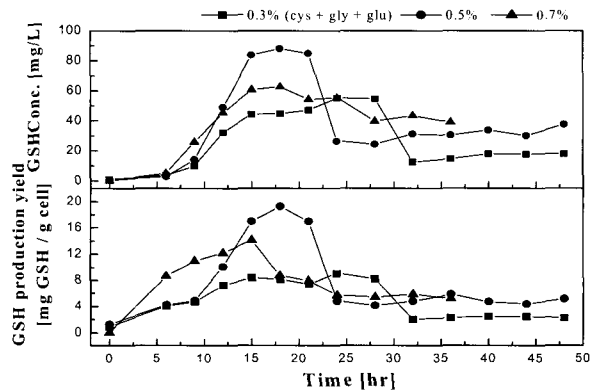


Figure 3b. Effects of concentrations of three precursors on glutathione production and production yield in chemically defined medium.

**유기배양에 의한 글루타치온 생산**

생물반응기를 이용한 회분식 발효 실험의 결과를 이용하여 유기식 발효 공정에 의해 고농도의 균체와 글루타치온의 생산량을 증대시키고자 하였다. 배양 배지로는 최소 배지를 사용하였으며 시스테인과 글라이신 및 글루탐산의 첨가 농도는 회분식 배양결과를 사용하여 각각 0.5% (v/v)를 배지에 첨가하였으며 시스테인은 배양 11시간에 첨가하였다.

우선, 회분식 배양을 하는 도중 글루코스 농도가 거의 고갈되었을 때, 농축된 글루코스를 계단식으로 공급하여 글루타치온의 생산 특성을 알아보았다(Fig. 4a). 즉, 비성장 속도 (specific cell growth rate)는 0.1 (1/hr)로 하였으며 반응기내 글루코스 농도가 0.5 g/L로 유지되도록 글루코스를 공급하였는데 글루타치온의 생산량은 24시간을 전후하여 약 102 mg/L 정도로 최대 값을 보였으며, 균체 당 글루타치온 양은 약 18 mg/g cell이었다(Fig. 4b).

그림 4c에는 배가스 중의 산소 농도와 이산화탄소 농도의 온라인 모니터링 결과를 나타내었다. 배양 6시간부터 산소 소모량 및 이산화탄소 생성량이 급격히 증가하다가 10시간을 전후하여 감소하였다. 기질이 첨가되는 11시간 이후부터는

산소 소모량 및 이산화탄소 생성량이 글루코스 공급 형태와 유사한 계단식 형태로 변화하였다.

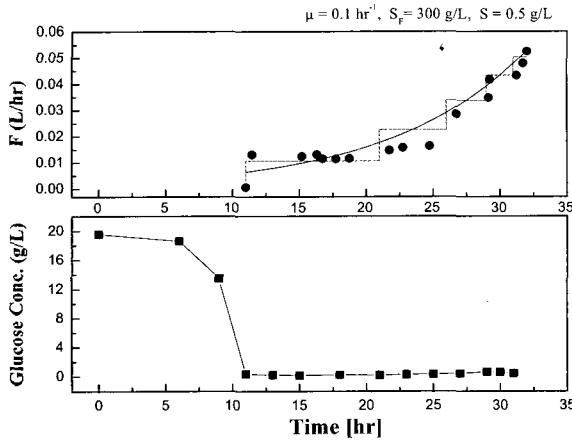


Figure 4a. Fed-batch culture of *S. cerevisiae* with stepwise glucose feeding strategy. Symbols represent real feeding rates of concentrated glucose.

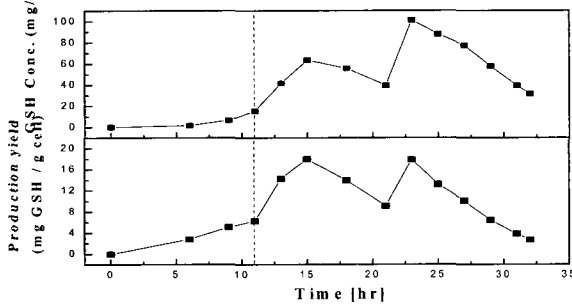


Figure 4b. Time course of glutathione concentration and production yield during cultivation of *S. cerevisiae* with stepwise glucose feeding strategy.

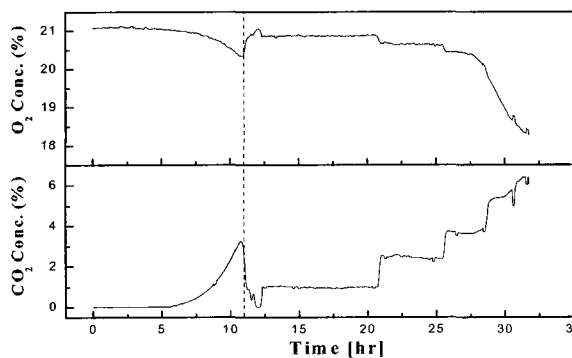


Figure 4c. On-line monitoring data of carbon dioxide concentration and oxygen concentration in the exhaust gas during cultivation of *S. cerevisiae* with stepwise glucose feeding strategy.

한편, 반응기내 글루코스 농도가 거의 고갈 된 시점에서 글루코스를 지속적으로 증가하는 형태로 공급하였을 때 균체의 성장 및 글루타치온 생산에 관하여 연구하였다(Fig. 5a). 주입유량은 비성장 속도는 0.15로 하였으며 반응기내 글루코스 농도가 0.5 g/L로 유지되도록 계산하여 농축된 글루코스

를 공급하였다. 글루타치온은 약 33.5 mg/L 정도 생산되었으며, 균체당 글루타치온은 5 mg/g cell이었다(Fig. 5b). 낮은 글루타치온의 생산량은 발효과정 중 글루코스가 완전히 소비되지 않은 상태에서 글루코스가 공급되었으며 반응기내에 존재하는 글루코스가 글루타치온의 생산에 저해작용을 했을 것으로 사료된다. 글루타치온은 글루코스가 완전히 소비된 상태에서 에탄올이 소비되면서 생산된다는 연구 결과가 있다(2).

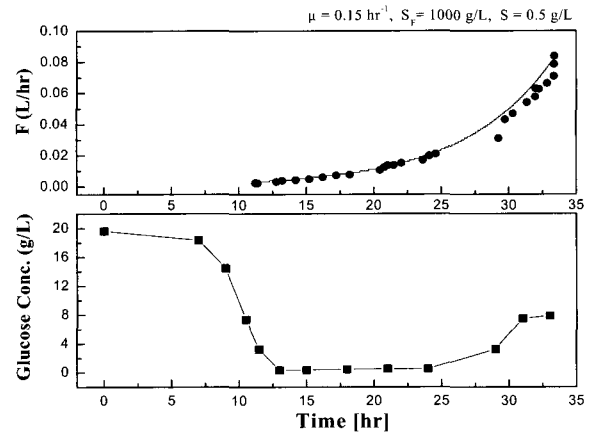


Figure 5a. Fed-batch culture of *S. cerevisiae* with exponential glucose feeding strategy. Symbols represent real feeding rates of concentrated glucose.

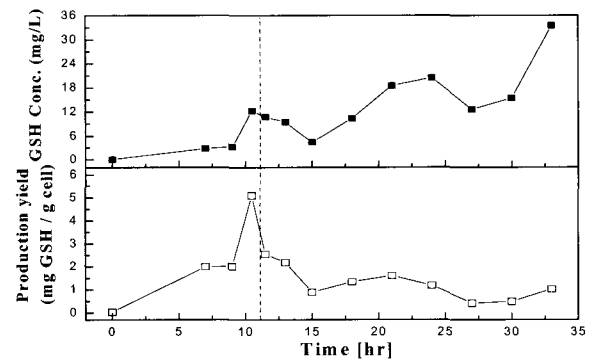


Figure 5b. Time course of glutathione concentrations and production yield during cultivation of *S. cerevisiae* with exponential glucose feeding strategy.

### 2차원 형광센서에 의한 공정 모니터링

2차원 형광 센서를 이용하여 생물반응기 내의 글루타치온 생산 공정에서 미생물 및 배양액의 형광특성 변화를 모니터링 하였다. 특히, 배양 조건에 따른 형광 특성 변화를 알아보고 각종 공정 변수와 형광 스펙트럼과의 상관관계를 조사하였다.

생물 공정에서 나타나는 형광 세기는 광범위한 파장영역에서 나타나며 측정 파장별로 형광의 간섭과 겹침 현상이 일어나기 쉽다. 또한 발효액의 pH, 용존산소, 교반속도 및 거품 그리고 세포의 종류와 성장 정도 등 각종 물리, 화학적인 조건에 따라 형광 영역 및 세기가 변화한다(6, 11, 12). 형광 스펙트럼은 세포의 성장에 따라 생성되는 각종 조효소 (e.g. NAD(P)H)와 아미노산 등 단백질의 농도에 따라 변화하게 된

다. Fig. 6에는 최소 배지에서 초기 글루코스 농도가 20 g/L 일 때, 배양초기 (0 시간)와 배양 12시간에서 각각의 형광 스펙트럼과 두 스펙트럼의 차이를 나타내었다. 세포 성장에 따라 아미노산과 단백질 영역에서 형광 세기가 증가하였다. 특히 배양 11시간에 첨가한 시스테인 영향 때문에 트립토판과 같은 아미노산의 형광 영역이 강하게 나타남을 볼 수 있다.

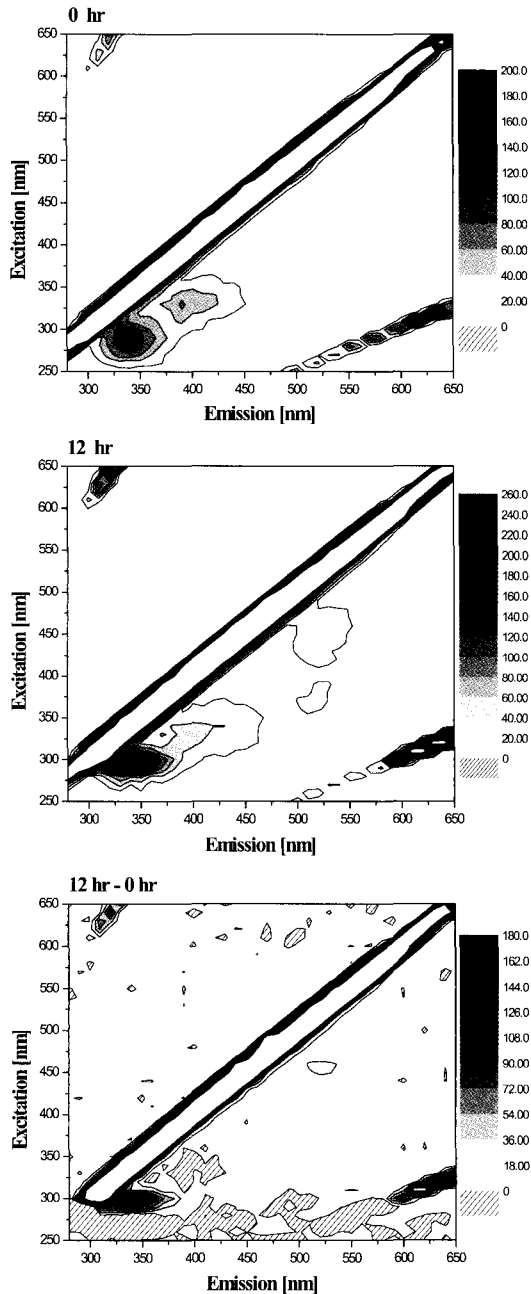


Figure 6. 2-D fluorescence spectra of *S. cerevisiae* with 20 g/L glucose at 0 and 12 hr and subtraction of two spectra (12hr-0hr).

생물공정 내 미생물의 성장 및 글루타치온 생산 특성을 생물 반응기에 직접 연결한 2차원 형광센서를 이용하여 비 침투 방식으로 온라인 모니터링 하였다. 형광 데이터의 모니터링은 매 5.6분마다 이루어졌으며 (측정시간 1.6분 포함) 각 파장별 형광 세기의 변화는 생물 반응기내의 각종 공정 변수

와 상관되었다. 초기 글루코스의 농도가 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L인 최소 배지를 이용한 배양 실험에서는 280 nm(ex)/340 nm(em)에서 형광세기의 변화가 글루타치온의 생산성과 좋은 상관성을 보였다(Fig. 7). Fig. 8에는 기질을 지속적으로 공급하는 유가 배양 실험에서 450 nm(ex)/530 nm(em)에서 형광 세기의 변화가 균체 농도와 좋은 상관성을 보임을 나타내었으며 배가스 중의 이산화탄소 발생량이 470 nm(ex)/590 nm(em) 형광 영역에서 형광 세기의 변화와 잘 일치함을 볼 수 있었다. 그리고, 트립토판, 페닐알라닌 등 아미노산 형광 영역인 300 nm(ex)/330 nm(em)에서 형광 세기의 변화는 시스테인 농도변화와 잘 일치하였으며, 320 nm(ex)/390 nm(em)에서 형광 세기의 변화는 인산 농도와 좋은 상관성을 보였다 (Fig. 9). 이와 같이 발효공정에 각종 화합물의 첨가로 인해 발생하는 각 형광 파장 영역에서 형광 세기의 변화는 균체 성장 및 세포 대사 과정 등을 추정할 수 있는 지표가 될 수 있다.

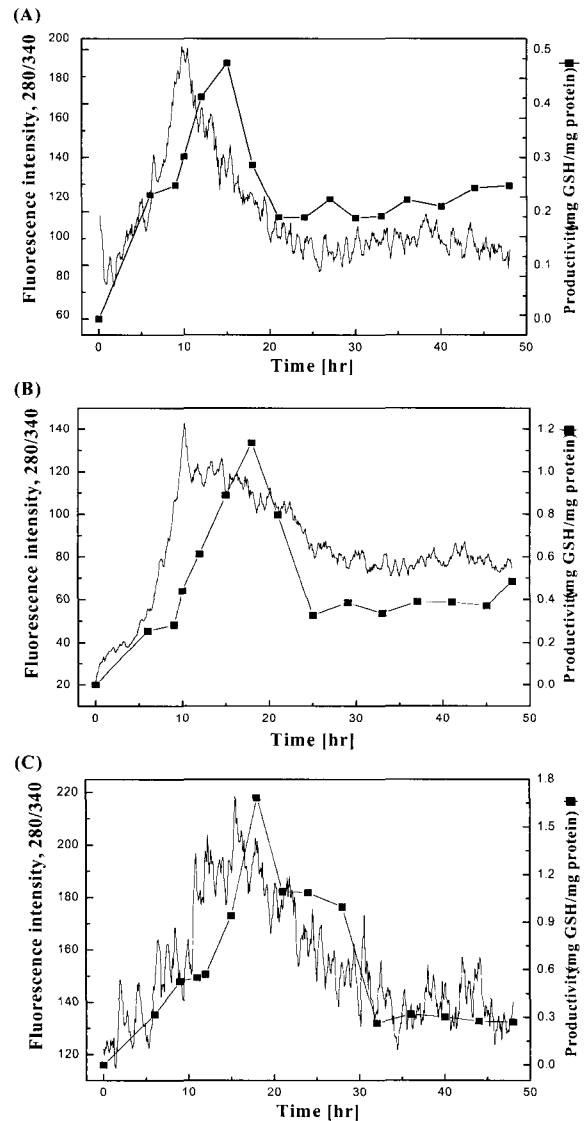
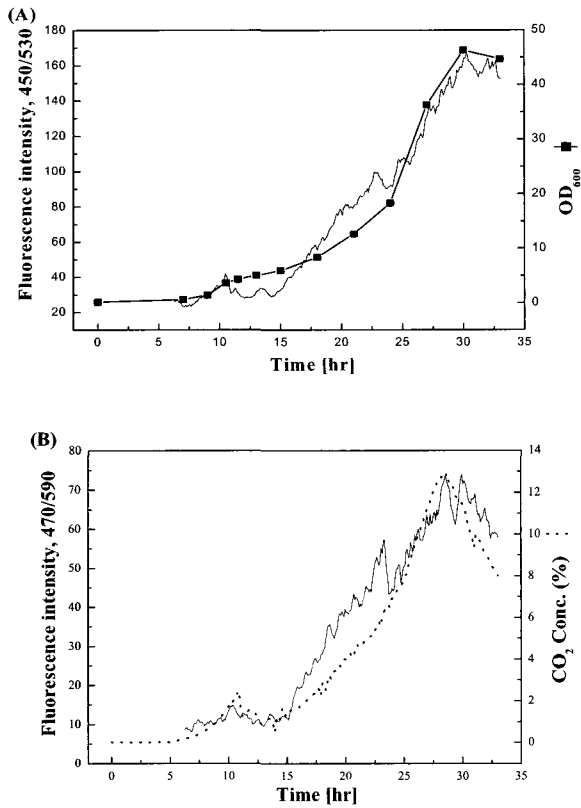


Figure 7. Correlation between on-line monitored fluorescence data and off-line data (GSH productivity) during cultivation (A) with 5 g/L glucose, (B) with 10 g/L glucose and (C) with 20 g/L glucose.

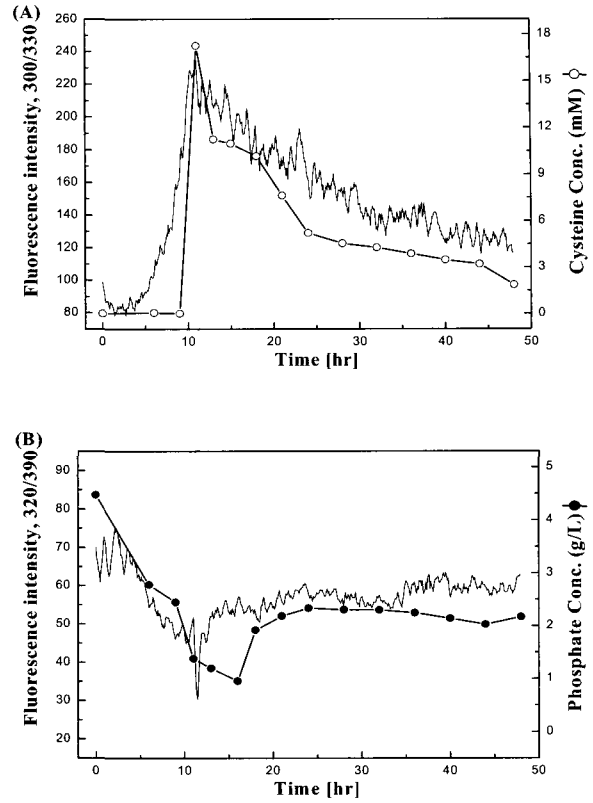


**Figure 8.** Correlation between on-line monitored fluorescence data and off-line data in a cultivation process with exponential glucose feeding strategy.

**요 약**

본 연구에서는 글루타치온의 생산 공정을 개발하기 위해 효모의 성장특성, 글루타치온의 생산성 및 공정 모니터링에 관하여 조사하였다. 초기 pH가 4인 경우 40 mg/L 정도의 높은 글루타치온이 생산되었으며 배양온도에 따른 글루타치온의 생산은 30°C에서 가장 높게 나타났다. 그리고 최소 배지에 첨가한 시스테인은 배양 12시간에 넣었을 때 글루타치온의 생산성이 높게 나타났다. 생물 반응기를 이용한 회분식 배양에서 기질 농도에 따른 *S. cerevisiae* 성장 특성 및 글루타치온 생산은 글루코스 농도 20 g/L에서 글루타치온 생산량이 55 mg/L로 가장 높았다. 최소 배양액에 배양 초기에 0.5% (v/v) 글라이신과 글루탐산을 각각 첨가하고 배양 11시간에 시스테인을 0.5% (v/v) 추가로 첨가한 경우에 글루타치온의 생산량이 많았다. 회분식 배양 후 기질을 첨가하는 유가식 발효 공정에서는 반응기내 글루코스 농도가 0.5 g/L 이하로 유지되도록 글루코스를 계단식으로 공급하였을 때 글루타치온은 약 102 mg/L로 높은 생산량을 나타내었다.

2차원 형광 센서를 이용하여 글루타치온 생산 공정의 온라인 모니터링은 배양액의 배지 조성이나 성장 특성 등 배양기내의 환경 변화에 따라 형광 영역 및 세기가 다르게 나타났으며 실시간 모니터링 된 형광 데이터는 기질 및 생산물 그



**Figure 9.** Correlation between on-line monitored fluorescence data and off-line data in a cultivation process with addition of precursors (cysteine, glycine, glutamic acid) at 12 hr.

리고 균체 성장 등의 각종 공정 변수와 좋은 상관성을 보였다. 따라서 2차원 형광 센서에 의한 모니터링은 글루타치온 대량 생산을 위한 실시간 모니터링에 매우 효과적이라 할 수 있다.

**감 사**

본 연구는 2001년도 (재)광주.전남테크노파크 신기술연구 개발 사업 (과제번호 01-B-3-003)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**REFERENCES**

- Colowick, S. P. and N. O. Kaplan (1985), *Methods in Enzymology*, p113 Academic press, Sandiego.
- 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. Bioengin.* **38**, 196-205.
- Meister, A. (1969), Glutathione, *Annual Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
- Emanuela, C. and P. Mauro (2002), Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes, *J. chromatography B* **781**, 181-206.
- Alfara, C. G., K. Miura, H. Shimizu, S. Shioya and K. I.

- Suga, (1992) Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 538-540.
6. Cho, W. D., H. I. Kim, J. C. Song, and H. C. Yang (1978), Studies on the production of Glutathione by Microorganism, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 75-80.
  7. Alfafara, C. G., K. Miura, H. Shimizu, S. Shioya, and K. I. Suga (1992), Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 141-146.
  8. Shin, W. C., D. S. Kim, J. H. Yu, and J. H. Yu (1993), Isolation, Identification and Culture Condition of Microorganism Producing Glutathione, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1-5
  9. Li, Y., J. Chen, Y. Y. Mao, S. Y. Lun, and Y. M. Koo (1998), Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*, *Process Biochem.* **33**, 709-1998.
  10. Liu, C. H., C. F. Hwang, and C. C. Liao (1999), Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Process Biochem.* **34**, 17-23.
  11. Marose, S., C. Lindemann, and T. Scheper (1998), Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring, *Biotechnol. Prog.* **14**, 63-74.
  12. Rhee, J. I., S. Y. Chung, and K. H. Seo (2001), Monitoring of biological processes by 2-dimensional fluorescence sensor, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 493-499.
  13. Skibsted, E., C. Lindemann, C. Roca, and L. Olsson (2001), On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration, *J. Biotechnol.* **88**, 47-57.
  14. Alfafara, C. G., K. Miura, H. Shimizu, S. Shioya, and K. I. Suga (1992), Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 141-146.
  15. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
  16. Teshima, N., H. Katsumata, M. Kurihara, T. Sakai, and T. 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.