

신기능 생물소재기술 개발사업

재조합 *E. coli* 혼합균주의 고정화반응기에 의한
글루타치온의 생산공정개발

Process Development for the Production of Glutathione
by the Immobilized Mixed Cell Reactor of
Recombinant *E. coli*

인하대학교

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “재조합 *E. coli* 혼합균주의 고정화반응기에 의한 글루타치온의 생산공정개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

1998 . 9 . 30.

주관연구기관명 : 인하대학교

주관연구책임자 : 구 윤 모

연 구 원 : 김 은 기
“ 김 원 근
“ 윤 승 현
“ 김 현 기
“ 정 주 영
“ 김 정 훈
“ 고 성 영

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 이 세 영

협동연구기관명 : 한국식품개발연구원

협동연구책임자 : 권 대 영

공동연구기관명 : 서도화학

공동연구책임자 : 김 일 환

요 약 문

I. 제 목

재조합 *E. coli* 혼합균주의 고정화반응기에 의한 글루타치온의 생산공정개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 중요한 의약 및 식품원료인 글루타치온(Glutathione, GSH)의 경제성 있는 생산을 위하여, GSH 합성 대장균의 유전형질을 개선하고 이 재조합 대장균을 고농도 배양에 의해 대량 생산하며, 재조합 대장균과 효모의 복합세포반응계를 설계하여 효율적인 생산공정 개발을 목적으로 한다. 이러한 목적에 부합되는 미생물과 반응, 분리공정의 조합과 적절한 미생물반응기개발은 생물공학의 산업화과정에 있어 핵심적인 역할을 하게된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

연구개발은 GSH 생산을 위한 재조합 미생물의 고농도 배양, 배지 최적화, GSH의 전구체로서의 γ -glutamylcystene 생산, GSH 생산, GSH 회수를 중심으로 이루어졌다.

1. 고농도 배양

글루타치온은 생물체내에서 쉽게 발견되는 tripeptide이다. 생체활성물질로서 글루타치온은 단백질과 DNA합성, 물질수송, 효소활성, 물질대사 그리고 세포의 성장에 관련된 생리작용을 수행하는데 있어서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 기존의 글루타치온을 생산하는 방법은 효모로부터 추출이나 화학적 합성방법을 통해 수행되었다. 그러나 몇몇 분리에 대한 문제점으로 새로운 방법이 모색되었다. 최근에는 재조합대장균 내의 효소를 이용하여 글루타치온을 생산하는 연구가 진행중이다. 본 연구에서는 글루타치온 생산 재조합 대장균(*E. coli* TG1/pDG7 α)을 고농도 배양하기 위해 플라스크 배양, 연속 배양, 및 비성장속도 조절에 의한 유가식 배양을 수행

하였다.

2. 배지 최적화

LB 배지에서와 기존의 발효배지에서의 γ -GC 생산을 비교하였을 경우와 GSH 생산에 사용되는 기질인 glutamate, cysteine, glycine을 첨가하여 γ -GC를 합성하는 GSH-I의 활성에 대한 영향을 보았다.

3. γ -Glutamylcystene 생산

본 연구는 γ -glutamylcystene의 고농도, 연속 생산을 위하여 재조합 대장균과 효모를 이용하여 반응물의 농도, 온도, pH, 그리고 고정화하였을 때 재조합 대장균과 효모의 세포량과 비율 등이 γ -glutamylcystene 생산에 미치는 영향에 대하여 연구하였다.

4. 글루타치온 생산

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.

Aerated slurry bioreactor를 이용한 혼합세포의 연속반응을 시도하였으며, 기질의 공급속도에 따른 글루타치온 생산을 관찰하였다. 또한 계면활성제에 의한 글루타치온 생산의 영향을 보았으며, 교반기체의 종류에 따른 글루타치온 생산시간을 연장할 수 있었다. Sequential batch 실험을 수행하여 aerated slurry bioreactor를 운전하기 위한 기초실험을 하였다.

Hollow-fiber를 이용한 글루타치온 생산에서는 ultrafilter와 microfilter를 사용하였다. Hollow-fiber의 경우 단위 부피당 표면적을 극대화시켜 혼합세포에 의한 글루타치온의 생산에 많은 장점을 가지고 있으며, 고농도로 고정화시켜 반응기를 운전할 수 있었다.

고정화 젤을 이용한 경우, agar, Ca-alginate, polyacrylamide를 이용하였으며 회분식 반응기에 의해서 실험을 수행하였으며, 본 연구는 재조합 대장균 TG1/pDG7 α 를 이용한 glutathione의 생산에 있어서 균체 고정화를 위한 담체 선정, 최적 반응

조건, 연속형 고정화 반응기 운전특성에 관한 기초자료 연구에 중점을 두었다.

5. 글루타치온 회수

본 연구에서는 현재 많은 분야에서 연구되고 있는 침전법-전기투석을 이용한 글루타치온(L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH)의 분리와 단백질 분리에 있어 일반적인 액체 크로마토그래피의 일종인 이온교환 크로마토그래피를 이용한 GSH의 분리를 수행하였으며, 단순하고 연속·대규모 운전이 가능한 분리공정을 개발하여 분리비용의 감소를 모색하였다.

IV. 연구개발결과

1. 고농도 배양

플라스크 배양시 초기 포도당의 농도가 20 g/L까지 거의 세포의 성장에는 영향을 미치지 않았고 GSH-I의 활성도에도 큰 영향을 미치지 않았다. 미생물의 성장을 돕기 위해 질소원으로 사용된 yeast extract의 첨가실험에서 1 g/L이상에서는 비성장속도가 크게 증가하지 않았다. 대표적인 발효부산물로 알려진 아세트산에 대한 억제 효과 실험에서는 아세트산의 농도가 5 g/L이상에서 급격하게 비성장속도와 효소의 활성이 감소되었다. 이는 글루타치온 생산 균주가 아세트산에 심한 피해를 받는다는 것을 알 수 있다. 유가식 배양은 비성장속도를 각각 0.1, 0.2, 0.3, 및 0.4 hr⁻¹에서 수행하였다. 최종균체농도는 비성장속도 0.3 hr⁻¹(OD₆₀₀=147), 최종 GSH-I 생성량은 비성장속도 0.1 hr⁻¹(134 unit/L)에서 최고값에 도달하였다. 비성장속도가 0.4 hr⁻¹에서는 과잉 공급된 기질이 배지 내에 축적으로 생성된 아세트산으로 인해 최종균체농도도 급격히 감소하였으며, GSH-I의 생성량도 많이 감소하였다.

2. 배지최적화

GSH-I의 활성에 영향을 받는 글루타치온의 생산성 증가를 위하여 글루타치온 합성에 사용되는 기질(cysteine, glutamic acid, glycine)인 3가지 아미노산의 농도의 변화에 의해서 연구하였다. 세포질량의 억제, 전체 활성의 변화, 생산된 글루타치온의 생산량 등 글루타치온 생산에 있어 중요한 요소들은 3가지 아미노산의 상호작용

에 의해서 얻어졌다. GSH-I의 활성을 증가시키는 최적의 3가지 아미노산의 농도는 개별적으로는 50mM glutamic acid, 5mM cysteine, 150mM glycine이었다. 미생물 생산을 위한 배지에서 25mM glutamic acid, 2.5mM cysteine, 75mM glycine의 조성에서 전체 활성이 최대를 나타내었다. 글루타치온의 생산수율은 기존의 발효배지를 사용했을 때보다 2.6배 증가하였다.

고농도 배양시 균체의 활성이 많이 떨어지므로, 위의 아미노산의 최적농도를 고농도배양에 적용하여 과연 균체의 활성을 높일 수 있는지 알아보았다. 그 결과 기존배지에서의 고농도 배양에서 얻은 균체보다 약 1.5배의 GSH를 생산할 수 있는 균체를 얻을 수 있었다. 또 reversion에 의한 활성의 감소를 줄이기 위해 기존의 기질에서의 Ampicillin 농도를 10배로 증가시켜서 기존 배지에서의 고농도 배양에서 얻은 균체보다 약 2.4배의 GSH를 생산할 수 있는 균체를 얻을 수 있었다.

3. γ -Glutamylcysteine 생산

본 실험에서는 반응계의 조건으로 37°C, pH7.5에서 가장 높은 생산농도를 나타냈다. L-glutamic acid는 60mM, L-cysteine은 20mM, MgCl₂는 20mM일 때 최적의 반응조건이었다. 효모를 사용한 ATP 재생산 공정에서 사용되는 포도당은 0.5M의 농도에서 가장 효율적으로 나타났고 재조합 대장균과 효모의 세포 농도 비율은 1 : 4일 때가 가장 적절한 비율로 나타났다. Alginate를 이용한 고정화 세포반응계에서는 반응속도는 느렸으나 반응계의 안정성은 10% 증가된 것으로 나타났다.

4. 글루타치온 생산

글루타치온 합성용 효소를 생산하는 *E. coli* TG1/pDR7a을 최적 배양하였으며 이때 글루타치온의 생산농도는 31mg GSH/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 5mM에서 cysteine에 대한 글루타치온의 생산수율은 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, 14mM이상의 글루타치온 농도에서는 산물저해 현상이 있는 것으로 나타났다.

Sequential batch의 경우 34시간동안 12 batch동안 글루타치온의 생산농도는 일정

하게 4.6mM을 유지함을 보여서 효소의 안정성을 보여주었다. 혼합세포의 경우 10시간 이후에는 글루타치온 농도가 감소하였다. 이러한 점을 극복하기 위해서 새로운 효모를 1g 씩 글루타치온 생산 중간에 공급하여 글루타치온의 생산 농도가 5mM를 유지하였다. 이러한 점을 착안하여 연속반응기인 aerated slurry bioreactor에서 글루타치온을 연속적으로 생산하는 기초실험이 되었다.

고농도의 혼합세포를 이용한 aerated slurry bioreactor에서 기질의 공급속도가 글루타치온생산에 미치는 영향을 조사하였다. 혼합세포가 유실되는 경우, 글루타치온의 생산농도가 기질공급속도 2.6mL/hr에서는 42시간에서 현탁반응보다 낮아짐을 보였고, 5.2mL/hr에서는 22시간에서 현탁반응보다 낮아짐을 보였다. 회수 및 재사용이 적용된 실험에서는 회수공정이 적용되기 전보다 글루타치온생산이 10시간 더 증가됨을 보였다. 이상의 실험결과에서 유실된 혼합세포를 회수 및 재사용함으로써 적용함으로써 글루타치온 생산시간을 연장시킬 수 있었다. 또한 단위 효소량에 의한 글루타치온의 총생산량은 크게 변하지 않는 것으로 나타났다. 계면활성제(Tween 80)을 사용한 경우, 글루타치온 생산시간을 25시간에서 45시간으로 연장시킨 결과를 얻었다. 글루타치온 생산에서 세포계의 효소가 산소에 의해 영향을 미칠 것으로 판단되어, 공기를 질소로 교체하여서 글루타치온 생산시간을 40시간으로 연장시켰다.

Glutathione 생합성용 에너지 ATP의 생산 및 재생을 위하여 20 mM의 ATP와 함께 효모를 대장균의 4배 중량을 혼합 고정시켜 사용하는 것이 가장 좋은 생산성을 보였다. 연속형 고정화 반응기에 필요한 고정화 담체는 agar gel이 적합한 것으로 나타났으며, 이때의 agar 농도는 100 mg agar/4 mL 등장액이었다. 회분식 현탁반응기, 회분식 고정화 반응기 및 연속형 고정화 반응기의 수율은 각각 59, 28, 20(%)이었으며, 생산성은 각각 0.045, 0.119, 0.218(mmol GSH/g cell · hr)이었다. 연속형 반응기는 ADP 및 glutathione에 의한 산물의 되먹임 저해작용을 감소시킨 것으로 사료되며 0.218 mmol glutathione/g cell · hr로서 비교적 높은 생산성을 보였다.

5. 글루타치온 회수

효소반응에 의한 GSH의 생산에 있어서 중요한 GSH 회수를 위해서 침전과 전기투석을 수행하였다. GSH의 중금속에 대한 킬레이트 특성을 이용하여 수용액상의 GSH를 선택적 침전시키기 위해 구리이온을 사용하였으며, 용해 GSH의 59%를 침전으로 회수하였다. NaOH용액을 사용하여 상등액에 존재하는 미침전 GSH의 양을 줄일 수 있었다. 형성된 구리-GSH침전용액에서 구리를 제거하기 위해 전가투

석을 적용하였다. 전기투석 운전시, NaOH용액을 가하여 pH를 조정하여 GSH는 음전하를 띠도록 하였으며, 구리이온만이 전기장 내에서 양이온교환막을 통하여 음극으로 이동하도록 하였다. 전기투석 운전으로 중간 chamber에서 침전된 GSH의 73%가 회수되었으며, 구리이온의 농도는 3500ppm에서 2ppm으로 감소시킬 수 있었다.

글루타치온 합성효소에 의해 생산된 생산모액 내의 글루타치온을 액체 크로마토그래피를 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. Ideal mixture에서의 GSH 분리결과 72.6%의 회수율을 보였으며, 생산모액에서는 84.4%의 회수율을 각각 보였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 과제를 산업화에 이용할 경우, 저렴한 가격으로 글루타치온을 공급하여 간질환 등의 치료 및 식품첨가제로 사용되어 국민건강 향상에 크게 기여할 것이다. 본 연구에서 시도한 에너지 재순환기법은 자체로 또는 새로이 시도한 polyphosphate kinase를 이용한 기술을 발전시켜 생물공학물질 생산을 위한 생합성에 있어서 표준적인 에너지공급계로 자리매김할 수 있을 것이다. 본과제에서 사용한 여러 가지 형태의 고정화 반응기기술은 이 후 생물공학물질 생산을 위한 생물반응기 설계에 기초를 제공할 것이다. 본 연구결과의 산업화 단계에서는 기업주도의 추가연구를 통하여 공장규모 생산이 가능하도록 추진하고 기업에의 기술이전은 기업화하는데 드는 시간을 단축하기 위하여 참여기업에 우선권을 주어 본 기술을 산업화하도록 활용한다.

S U M M A R Y

I. Title

Process Development for the Production of Glutathione by Immobilized Mixed Cell Reactor of Recombinant *Escherichia coli*

II. Objects of the research

The object of this study is to improve hereditary characteristics of *E. coli* which synthesize glutathione(GSH) and culture recombinant *E. coli* with high cell density culture. It is for the economical production of glutathione which is an important source of various medicines and foods. The design and operation of mixed cell system of recombinant *E. coli* and bakers yeast is the center part of the project for the effective production of glutathione. A successful fulfillment of this project, a combination of enhancing microbial hereditary characteristics, biosynthesis, product recovery, especially the development of proper microbial reactor will set a standard in the process of industrialization of biological materials.

III. Contents and scopes of the research

This study was carried out with main foci on the high cell density culture of recombinant microorganism, media optimization, production of γ -glutamyl-cysteine as a precursor, GSH production, GSH recovery.

1. High Cell Density Culture

Glutathione is a tripeptide which is generally found in the living system. Glutathione plays important biological roles such as the synthesis of proteins and DNA, transport, enzyme activity, metabolism, and protection of cells. Glutathione has been produced by extraction from yeast cells or chemical synthesis. As these methods have several problems, including separation, a novel method using enzyme in recombinant *E. coli* has been tried.

In this study, fed-batch culture by controlling the specific growth rate in addition to the batch in flask and continuous cultures has been conducted for high cell density cultivation of glutathione-producing recombinant *E. coli* TG1/pDG7 α .

2. Media Optimization

The activity of the protein GSH-I which catalyzes production of γ -glutamyl-cysteine in LB media or Rosenberg media was compared with that in media, including GSH-constituting amino acids, cysteine, glutamic acid and glycine. The productivity change of GSH which is affected by GSH-I was studied by varying concentrations of 3 amino acids.

3. γ -Glutamylcysteine Production

The synthesis of γ -glutamylcysteine, the intermediate in GSH synthesis, is a rate-limiting step in GSH production. γ -Glutamylcysteine was synthesized from L-glutamic acid and L-cysteine in the presence of ATP by the reaction catalyzed by γ -glutamylcysteine synthetase. The recombinant *E. coli* carries the plasmid with *gsh I*, which coded for the γ -glutamylcysteine synthetase. The ATP regeneration system used the acetate kinase in *E. coli* and the glycolytic pathway in yeast. In this study, recombinant *E. coli* and yeast were used for the continuous production of γ -glutamylcysteine. The effect of cell contents and complex ratio on the γ -glutamylcysteine production were studied.

4. Glutathione Production

Glutathione is synthesized by a sequential action of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase. Several ATP regeneration systems, such as acetate kinase and glycolysis of yeast, were compared for the glutathione production. Glutathione productions by microbial fermentation and solvent-treated cell were also compared. The optimum conditions, including periodic supply of substrate were sought for the economical production of glutathione.

Aerated slurry bioreactor with solvent-treated mixed cells of recombinant *E. coli* and bakers yeast, was employed for the glutathione production. The

change of flow rate of substrate was tried for the better production of glutathione, with an trial addition of surfactant(tween 80) and replacement of fluidizing gas. Glutathione production in aerated slurry bioreactor was evaluated based upon the production in sequential batch experiment.

Hollow-fiber reactors, using microfilter and ultrafilter, were used as a method of immobilization of cells for glutathione production. Glutathione production with hollow-fiber reactor had several advantages, such as high cell density packing and high surface to volume ratio.

Batch and continuous experimental studies for the glutathione production in the co-immobilized cell reactor were carried out using supporting gels, such as agar, Ca-alginate and polyacrylamide. In this study, selection of supporting gel for cell immobilization, optimum reaction conditions, and operational properties of continuous immobilized reactor were investigated.

5. Glutathione Recovery

Experimental studies for the recovery of glutathione were carried out using precipitation followed by electro dialysis and liquid chromatography, ion-exchange chromatography, in this study. Precipitation-electrodialysis has been used broadly in biological materials recently. Liquid chromatography has been a prevailing method of purifying materials in biotechnology. A separation method for economic glutathione recovery was sought after with emphasis on the continuability and scalability.

IV. Results of the research

1. High Cell Density Culture

The cell growth and the production of GSH-I in the flask culture were not affected by the initial glucose concentration below 20 g/L. The specific growth rate increased with yeast extract, a nitrogen source, in the concentration range below 1 g/L. The cell growth rate and the GSH-I production rate decreased sharply at the initial concentration of acetic acid, a representing by-product in microbial fermentation above 5 g/L. The cell growth and the GSH-I production by recombinant *E. coli* was inhibited by acetic acid.

Fed-batch cultivations were conducted at varying specific growth rate (μ) of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 hr⁻¹. The final cell concentration reached 147(OD₆₀₀) at $\mu=0.3$ hr⁻¹. The final concentration of GSH-I reached 134 unit/L at $\mu=0.1$ hr⁻¹. The final cell concentration decreased drastically at $\mu=0.4$ hr⁻¹, an excessive supply of substrate, due to the accumulation of acetic acid in the medium resulting in the decrease of GSH-I in the system.

2. Media Optimization

Important production parameters, such as, cell mass inhibition, total activity and amount of GSH produced were determined by synergic interactions of constituting amino acids. Concentrations of 3 amino acids for the maximum activity of GSH-I were 50mM glutamate, 5mM cysteine, and 150mM glycine, separately. The maximum total activity was obtained when the cell was cultured in the media, containing 25mM glutamate, 2.5mM cysteine, and 75mM glycine. The production yield of GSH increased about 2.6 times compared with that in the established fermentation media without 3 additional amino acids. Above experimental results of the additional amino acids in flask were applied to the high cell density cultivation(HCDC). The production of GSH by cells cultivated with the media with additional amino acids increased about 1.5 times compared with the case without additional amino acids. The GSH production also increased 2.4 times by increasing the ampicillin concentration 10 times to inhibit the reversion of recombinant cells.

3. γ -Glutamylcysteine Production

An immobilized microbial cell system was developed for the efficient γ -glutamylcysteine production. The optimum reaction was observed at 37°C and pH 7.5 in the substrate solution of 60 mM L-glutamic acid, 20 mM L-cysteine, and 20 mM MgCl₂. In the ATP regeneration system, using yeast, the optimum concentration of glucose was 0.5 M. The optimum ratio of recombinant *E. coli* to yeast was experimentally observed to be 1:4 when immobilized in alginate. Although the immobilized system had slower reaction rate, its reaction stability was increased by 10%.

4. Glutathione Production

The highest specific production yield of 31 mg GSH/g wet cell was obtained with the recombinant *E. coli* (TG1/pDG7 α) which contains two synthetases for GSH production. Bakers yeast was considered to have a better ATP regeneration system economically, although the glutathione production yield was lower than that of acetate kinase. It was also observed that the ATP regeneration system of bakers yeast is 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 experiments of feeding extra cysteine. The product inhibition by glutathione above 14 mM was also observed.

Glutathione producing enzymes were stable for 34 hours, producing 4.6 mM GSH in sequential batch reaction of 12 batches. Glutathione production decreased after 10 hours in the case of mixed cells. Intermittent feedings of 1 g of yeast in the middle of production by mixed cells to keep GSH production above 5 mM. This intermittent feeding of cell triggered the concept of aerated slurry bioreactor for the continuous production of glutathione.

In aerated slurry bioreactor, glutathione production based on suspension reaction was conducted in a continuous mode by the mixed cells of *E. coli* TG1/pKG7 α and bakers yeast. However, mixed cells were washed away as reaction time increased. In order to prevent the loss of cells in effluent, cell recycle using centrifugation was tried. Glutathione production in high density mixed cells was studied as a function of flow rate in aerated slurry bioreactor. Glutathione production concentration was maintained for 32 hours at the feeding flow rate of substrate of 5.2mL/hr with cell recycle, while 42 hours at 2.6.mL/hr and 22 hours at 5.2mL/hr without cell recycle. During these production period, glutathione concentration was kept above that in suspension reaction. The total amount of glutathione produced per unit amount of enzyme was observed not to change much with reaction conditions. With a surfactant, Tween 80, available reaction time increased to 45 hours, which is up 20 hours, compared to the case without surfactant.

Glutathione production with mixed cells immobilized in hollow-fibers was

carried out, yielding glutathione concentration 3.76 mM and 3.71 mM for microfilter and ultrafilter, respectively. This result is better than that of agar gel.

As an energy supply and regeneration system, 20mM ATP and 4 fold(wet wt.) yeast of *E. coli* was observed to give the best glutathione production. Agar gel immobilization, made of 100mg agar and 1g cell in 7.5mL physiological solution, was appropriate for the cell immobilization and glutathione production. The yields and the productivities of the batch reaction in suspended cells, the batch reaction with immobilized cells, and the continuous reaction with immobilized cells were 59, 28, 20%, and 0.045, 0.119, 0.218(mmol GSH/g cell hr), respectively. The relatively high productivity of the continuous immobilized reactor is ascribed to the prevention of the feed-back inhibitions by ADP and glutathione by the continuous removal of the product solution.

5. Glutathione Recovery

Glutathione was recovered by precipitation and electro dialysis with an aqueous solution. Cupric ion was used to selectively precipitate glutathione by chelating characteristic of glutathione to heavy metals and 59% of total dissolved glutathione was precipitated. The amount of unprecipitated glutathione in the supernatant was reduced by NaOH addition. The cupric ion was removed from the Cu-glutathione solution by electro dialysis. During the electro dialysis, sodium hydroxide was added to the dissociated solution to modify pH and have glutathione charged negative, so that only the cupric ion moved to the cathode through cation exchange membrane in the electric field. Electro dialysis recovered 73% of precipitated glutathione and the concentration of cupric ion decreased from 3500ppm to 2ppm in the middle chamber.

Glutathione produced by microbial enzymes was separated by liquid chromatography. In order to select a resin to 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 an ideal mixture 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. Similar chromatographic separation behaviors were observed between the enzymatic product and the ideal solutions. Separation yields of GSH from the ideal solution and enzymatic product solution were 72.6% and 84.4%, respectively.

V. Application plans of the results of the research

With a proper supplemental work, the results of this study will provide a basis for the better economics in industrial production of glutathione. This will result in supplying glutathione in good price, promoting peoples health, related to the liver disease and food additives. The devotion to the national economics by substituting import and ever further, export, considering that domestic glutathione consumption is supplied by import totally.

In the viewpoint of technologies, the energy recycling technique, by itself or with further development, related to polyphosphate kinase, tried in this study will serve as a standard method of supplying energy in the production of biological materials. Various types of immobilized reactor techniques, as prototypes or completed forms, tried in this study will provide bases in designing bioreactors for many kinds of bioreactions.

In the stage of industrialization of this project, the production of glutathione in plant scale will be materialized with additional studies led by industries. For the efficient technology transfer for a quick industrialization, the participating company in this project will be endowed with the right to commercialize the results of this project.

C O N T E N T S

Summary in Korean	2
Summary	8
Contents	15
Contents in Korean	18
Main Text	20
Chapter 1. Introduction	20
Section 1. Objects of Reseach and Development	20
Section 2. Glutathione	22
Section 3. High Cell Density Culture	24
Section 4. γ -Glutamylcysteine Production	25
Section 5. Glutathione Production	26
Section 6. Glutathione Recovery	27
Chapter 2. Current Status of Research and Development	31
Chapter 3. Contents and Results of Research	36
Section 1. High Cell Density Culture	36
1. Materials & methods	39
2. Results & discussion	43
Section 2. Media Optimization	45
1. Materials & methods	45
2. Results & discussion	47
Section 3. γ -Glutamylcysteine Production	49
1. Materials & methods	49

2.	153
Section 3. γ -Glutamylcysteine Production	153
Section 4. Glutathione Production	154
Section 5. Glutathione Recovery	155
Chapter 5. Applic Results & discussion	50
Section 4. Glutathione Production	52
1. Glutathione production with feeding substrate in suspension reaction	53
가. Materials & methods	53
나. Results & discussion	55
2. Glutathione production with sequential batch aerated slurry bioreactor	58
가. Materials & methods	59
나. Results & discussion	61
3. Glutathione production by immobilized cell	67
가. Glutathione production by immobilization of gel	67
(1) Materials & methods	67
(2) Results & discussion	69
나. Glutathione production with hollow-fiber	72
(1) Materials & methods	73
(2) Results & discussion	75
다. Glutathione production with celite & flowerpot beads	76
(1) Materials & methods	76
(2) Results & discussion	78
Section 5. Glutathione Recovery	79
1. GSH precipitation by Cu	79
가. Materials & methods	79
나. Results & discussion	80
2. Electrodialysis	80
가. Materials & methods	80
나. Results & discussion	81
3. Liquid chromatograpy	82

가. Materials & methods	82
나. Results & discussion	83
Chapter 4. Achievements of Research and Development	153
Section 1. High Cell Density Culture	153
Section 2. Media Optimization Plans of the Results of Research	156
Chapter 6. References	157
Consignment Researches	
Consignment Research I	162
Consignment Research II	236

목 차

요약문	2
영문요약문	8
영문목차	15
목차	18
본문	20
제 1 장 서론	20
제 1절 연구개발의 목적 및 필요성	20
제 2절 글루타치온	22
제 3절 고농도 배양	24
제 4절 γ -glutamylcysteine 생산	25
제 5절 글루타치온 생산	26
제 6절 글루타치온 분리	27
제 2 장 국내외 기술개발 현황	31
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	36
제 1절 고농도 배양	36
1. 실험재료 및 방법	39
2. 연구결과	43
제 2절 배지 최적화	45
1. 실험재료 및 방법	45
2. 연구결과	47
제 3절 γ -Glutamylcysteine 생산	49
1. 실험재료 및 방법	49
2. 연구결과	50
제 4절 글루타치온 생산	52
1. 현탁반응에서 기질첨가에 의한 글루타치온 생산	53
가. 실험재료 및 방법	53
나. 연구결과	55
2. Aerated Slurry Bioreactor를 이용한 글루타치온 생산	68
가. 실험재료 및 방법	59
나. 연구결과	61

3. 고정화 세포에 의한 글루타치온 생산	67
가. 고정화 젤에 의한 글루타치온 생산	67
(1) 실험재료 및 방법	67
(2) 연구결과	69
나. Hollow-fiber를 이용한 글루타치온 생산	72
(1) 실험재료 및 방법	73
(2) 연구결과	75
다. Celite와 배양토를 이용한 글루타치온 생산	76
(1) 실험재료 및 방법	78
(2) 연구결과	79
제 5절 글루타치온 회수	79
1. 구리에 의한 GSH의 침전	79
가. 실험재료 및 방법	79
나. 연구결과	80
2. 전기투석	80
가. 실험재료 및 방법	80
나. 연구결과	81
3. 액체 크로마토그래피	82
가. 실험재료 및 방법	82
나. 연구결과	83
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	153
제 1절 고농도 배양	153
제 2절 배지 최적화	153
제 3절 γ -Glutamylcysteine 생산	153
제 4절 글루타치온 생산	154
제 5절 글루타치온 회수	155
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	156
제 6 장 참고문헌	157
위탁과제	
I. 위탁과제 I	162
II. 위탁과제 II	236

본 문

제 1 장 서 론

제 1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

동식물 조직, 미생물에 광범위하게 분포되어 있는 글루타치온(glutathione)은 glutamic acid, cysteine, glycine의 3종류 아미노산으로 이루어진 tripeptide로서 GSH로 약칭하며, 생합성은 L- γ -glutamylcysteine으로부터 glutathione synthetase에 의해 이루어진다. GSH는 단백질 외에 disulfide와 효소적, 비효소적으로 반응하여 그 SH기를 유지하는 기능, 예를 들면, 과산화수소, 유리반응기와 반응하는 해독 기능이 있어, 간질환치료제와 약물, 임신중독의 해독제, 중금속해독제 등으로서 이용되고 있다. 또한 GSH 유도체인 S-lactoylglutathione은 생체내에서 GSH와 methylglyoxal로부터 효소인 glyoxalase I에 의하여 생합성되어 세포증식과 염증반응에 깊은 관계가 있는 물질이라고 알려져 있어, 최근에는 이것을 생물공학기법에 의해 양산하고 이의 항염증작용 등을 이용해 화장품과 의약품에 응용하는 연구가 이루어지고 있다. GSH는 주로 간장질환과 방사선장애, 당뇨병의 치료약으로 사용되고 있지만, 최근에는 항암제로서도 주목되고 있으며 또한 건강식품분야에서의 용도도 증가하리라 기대되고 있다. 이러한 특성을 가지는 GSH의 제조법은 발효법, 효소법, 화학합성법, 추출법으로 대별되는데, 공업적 생산에는 주로 발효법이 사용되고 있다. 발효법에는 GSH의 생합성에 관계하는 두 가지 효소인 γ -glutamylcysteine synthetase(GSH-I), glutathione synthetase(GSH-II)를 각각 coding하는 gsh I, gshII 유전자가 재조합 대장균 또는 효모가 단일균주로서 사용되고 있다.

상기 재조합 대장균에 대하여 효소활성을 높이기 위하여 아미노산을 치환하고, 발현 promoter를 tac promoter로 재조합하고, initiation codon을 site-directed mutagenesis에 의해 치환하여 GSH 합성 형질을 개선한다. 또한 미생물의 고농도 배양의 결과로 얻어지는 재조합 대장균과 ATP의 공급자로서의 효모를 함께 사용하는 독창적인 혼합세포계를 선정, 설계하고 최적조건에 따라 효소반응을 진행시킨

다. 또한, 생성물인 GSH와 원료 아미노산, ATP, glucose 등의 미반응 원료를 분리·회수하는 기술을 개발하고 세포반응기와 병합하여 동시 반응 분리의 효율적인 생산공정을 개발하게 된다.

고농도 배양 (High cell density cultivation) 기술은 재조합 미생물을 배양하여 높은 농도의 recombinant product를 생산하는데 가장 중요한 인자로 들 수 있다. 고농도 배양의 장점이라면 반응기의 용량을 극소화시킬 수 있고, 배양에 이은 downstream processing에 처리분량의 감소로 인하여 분리가 쉬워짐으로 해서 용량당 수율이 증가하여 분리 및 회수공정이 용이하고 발생하는 폐수의 양이 감소하는 등 많은 장점을 가지고 있다. 따라서 recombinant product의 대량생산의 경우에 고농도 배양을 통하여 재조합 미생물을 배양 후 고농도의 product를 생산하는 것은 지극히 중요하다.

본 과제와 가장 특징적인 요소로는 기존의 GSH 생산이 대장균이나 효모의 단일균주에 의해 이루어지는 것에 비하여, 본 연구에서는 GSH 생산과 생산 에너지공급(ATP/ADP)을 분리하여, GSH 생산은 재조합 *E. coli*에서, 에너지공급은 효모에서 담당하는 효과적인 혼합균주반응계를 도입하여 이를 고정화반응기에서 수행하도록 한 점이다. 또한 발효가 아닌 효소반응의 특성으로 인하여 생성물의 분리회수가 쉽고, 더불어 미반응 기질들을 회수, 재 사용할 수 있다는 장점이 있다.

2. 경제·산업적 측면

건강식품이나 약제에 대한 근래의 선호에 힘입어 식품, 제약 등의 분야에서 여러 가지 생리활성물질의 수요가 급증하고 있고, 이에 부응하여 고부가가치의 생물물질들이 생물공학적으로 생산되고 있다. 글루타치온은 간질환치료, 중금속 등에 대한 해독제로 사용되어 실제 국민건강에 기여하는 바가 크다. 현재 글루타치온과 같이 그 수요충족을 전적으로 수입에 의존하고 있는 제품의 경우, 본 과제가 추구하는 유전공학적인 기법에 근거한 국제경쟁력 있는 생산으로 인하여 그 대체효과는 물론이고, 더 나아가 제품 및 공정 수출에 의한 효과는 국가 산업, 경제에 큰 영향을 미칠 것이다. 또한 본 과제의 성공적인 수행으로 자생적 연구 및 개발에 대한 자신감은 다른 산업발전의 활성화에도 기여할 것이다.

3. 사회·문화적 측면

정보산업과 함께 21세기를 선도하는 핵심과학기술의 하나로서 인류복지 및 생존에 크게 이바지할 것으로 기대되는 생물공학은 선진국은 물론이고 국내에서도 산,학,연의 전 분야에 걸쳐 활발한 연구, 개발의 노력이 경주되고 있는 상황에서, 본 과제가 추구하는 기초과학과 응용공학의 학제간 협동연구노력은 학문적인 측면에서, 그리고 사회교육적인 측면에서 의의가 크다. 또한 UR 협상 타결 등에 의한 새로운 국제무역 및 통상절서에 처하여 경쟁력 있는 고유한 국산기술의 확보는 국내 산업계는 물론이고 사회전반에 걸쳐 자긍심의 양양과 더불어 자생적인 국가경제발전에 크게 기여하리라 사료된다.

제 2절 글루타치온

글루타치온(Gluthathione)은 3개의 아미노산인 glutamate, cystein 그리고 glycine이 결합되어 생성되는 트리펩타이드이다. 1921년 Hopkins에 의해 처음으로 분리되어지고 명명되어졌으며 그 구조는 다음과 같다.



Fig. 1. Structure of glutathione
(γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine).

동·식물 조직과 미생물 체내에 광범위하게 분포하는 글루타치온은 대부분 환원형(GSH)으로 존재하고 산화형(GSSR), 혼합된 disulfide, GSS-protein, 혹은 GSSR으로도 존재하며 최근의 연구를 통해서 의학적, 생리학적으로 생체에 중요한 역할을 하는 물질로 밝혀져 그 관심의 대상이 되고 있다. 글루타치온은 생체 내에서 단백질의 sulfhydryl 그룹의 유지와 DNA의 전구물질형성, 자유라디칼과 산화물로

부터 세포질 보호, 외래 물질의 해독 등의 작용과 함께 대사물질의 환원제와 같은 역할도 하는 것으로 알려져 있다. 이런 생리학적으로 중요한 물질인 글루타치온은 생체내의 gsh-I 유전자에 의해 발현되는 γ -glutamylcystein synthetase (GSH-I)와 gsh-II 유전자에 의해 발현되는 glutathione synthetase (GSH-II)의 연속적인 작용에 의해 생합성되는데 그 기작은 다음 그림과 같다.

*E. coli*의 글루타치온 생합성은 1975년 Apontoweil과 Berends에 의해서 연구되어졌고 효소의 성질과 그 생화학적 기작도 밝혀졌다. *E. coli* B의 글루타치온 생합성은 환원형 글루타치온(GSH)이 효소 GSH-I의 활성을 떨어뜨리는 저해작용을 통해 조절됨이 알려졌고 또한 산화형 글루타치온(GSSG)에 의해서는 GSH-II가 저해됨이 밝혀졌다. 그러나 GSH-II의 활성을 떨어뜨리기 위해서는 많은 양의 GSSG를

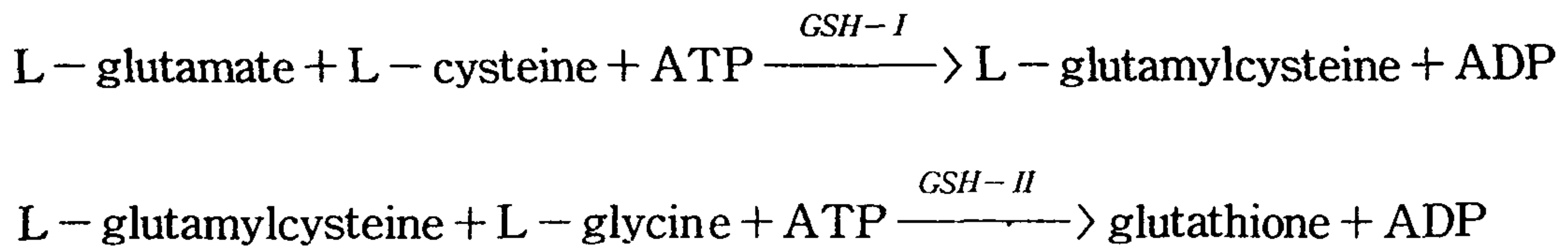


Fig. 2. Biosynthesis of glutathione

필요로 하고 이 양은 실제 세포가 포함하는 글루타치온의 양을 초과한다. 즉, 세포가 생산하는 GSSG는 GSH-II의 활성을 떨어뜨려 저해할 수 있는 충분한 양이 되지 못하므로 GSSG에 의해서는 글루타치온 합성이 조절되지 못한다. 그러므로 *E. coli* B에서의 글루타치온 생합성은 주로 GSH에 의한 GSH-I의 저해작용에 의해 조절됨을 알 수 있다.

일반적인 글루타치온 생산은 효모세포(yeast cell)를 추출하거나 유기적 합성 방법을 통해 생산하는데 그 비용에 비해 생산량이 적고 그 공정이 복잡하며 또한 생산물의 분리문제가 복잡하기 때문에 실질적인 생산은 어려운 상태이다. 이러한 낮은 수득률로 인한 문제해결을 위해 고안된 생산방법이 고농도 배양을 통한 외래단백질의 대량생산이다. 즉, 유전공학으로 재조합 대장균을 고농도 배양함으로써 유용한 외래단백질을 대량 발현하는 것이다. 이러한 방법으로 실질적으로 상용화된 것이 인슐린, 인터페론, 인터루킨 등이 있으며 그 외 많은 유용한 물질들이 재조합 대장균의 고농도 배양을 통해서 발현되고 있다.

제 3절 고농도 배양

유전자조작 기술은 1972년 Berg 등에 의해 이중유전자의 시험관 내 결합 및 세포에 도입시험이 보고된 후 수많은 유전자 기술이 발표되었다. 이런 유전자조작 기술의 발달로 재조합 된 대장균에 의한 외래 단백질의 대량 발현은 유용한 물질을 대량 생산하는 데에 이르게 되었다. 지금까지의 목적으로 해왔던 DNA 분리, 새로운 Vector의 개발, 형질 발현 기술 등이 주로 연구 대상이 되어왔다. 그러나 이러한 외래 단백질을 대량 발현하려고 할 때 문제가 되는 것은 배양 기술이다. 기존의 배양 기술은 회분식 배양으로 이런 회분식 배양은 배지의 조성, 배양기의 조작이 크게 문제가 되지 않지만 최종 균체 농도가 매우 낮으며 또한 외래 단백질의 발현 수준 역시 낮아 그 생산 수율이 낮다는 문제가 있다. 이런 문제를 극복할 수 있는 방법으로 단일 배양기 내에서 고농도의 균체밀도까지 배양하여 원하는 외래 단백질을 대량 발현할 수 있는 배양 기술인 유가식 배양에 그 관심이 집중되었다.

유가식 배양은 배양 부피를 감소시킴과 동시에 균체의 밀도를 높여 다른 균주의 오염을 막을 수 있으며 목적으로하는 외래 단백질을 대량 생산할 수 있으며 효율적인 기질 공급으로 원료비 및 생산시설비의 절감을 꾀할 수 있다.

그러나 이런 유가식 배양으로 재조합 대장균을 배양할 경우 산소의 부족, 비효율적인 기질공급 및 과잉기질 공급으로 인한 세포성장저해 및 재조합 대장균의 빠른 성장으로 생성되는 부산물인 아세트산 축적이 커다란 문제로 대두되고 있다. Bacterial crab tree effect라고하여 잘 알려진 저해성 부산물인 아세트산의 축적은 미생물의 성장을 억제하는 한편 외래 단백질의 발현도 억제한다. 이런 문제점은 배양공학적인 측면에서 기질공급방식이나 공정상의 최적화를 통해서 아세트산의 생성을 억제하는 방법이 있다.

유가식 배양의 기질공급방법으로는 회분식 배양의 기질이 완전히 고갈되었을 때 배지내의 용존산소의 양은 급격히 증가하는 것을 신호로 하여 기질을 공급하여 용존산소의 양을 일정하게 유지시키는 DO stat., 기질의 소모와 함께 미생물에 의해 생성된 유기산으로 pH가 급격히 감소하는 것을 신호로 하여 기질을 공급하여 일정한 수준의 pH를 유지시키는 pH stat., 미생물에 의해 생성되는 부산물인 아세트산을 억제하기 위해 기질인 포도당을 낮은 농도로 유지시키는 포도당농도 조절이 있으며 그 외에도 미생물의 비성장속도를 일정하게 유지시키도록 기질을 공급해주는 비성장속도 조절과 배양기내의 아세트산을 측정하여 그 양에 따라 기질을 공급하는 아세트산 농도 조절 등이 있다.

산업적인 이용에서 재조합 생산물의 중요성은 이들 생산물을 생산해내는 발효공정의 최적화를 통한 단위부피당 산물을 최대로 하는 데에 있다. 유가식 배양은

이런 취지에 가장 부합되는 배양방법인 것이다. 유가식 배양 방법 중에 미생물의 성장속도를 조절하여 저해 부산물인 아세트산의 생성을 최대한 억제하면서 우리가 원하는 산물의 발현을 극대화하는 기술은 최근에 많이 사용하는 고농도 배양방법으로 매우 효율적이다.

비성장속도 조절에 의한 유가식 배양은 미리 계획된 지수증가식으로 기질을 공급하거나 또는 방출기체중의 이산화탄소의 분압을 측정하여 기질공급하는 방법이 있다. Riesenbergr 등은 산소분압을 측정하여 $\mu=0.11$ /hr 로 제한한 결과 110 g/L 의 균체농도를 획득하였고, Yang 은 지수증가적 기질 공급만으로 51 g/L 의 균체농도와 990 U/ml 의 beta-galactosidase를 생산하였다. 윤성관 등은 지수증가적 기질공급과 함께 yeast extract 의 지수증가적 공급으로 BST(bovine somato tropine) 생산시 protease 에 의한 생성물 분해를 억제하였다.

비성장속도 조절의 장점은 첫째, 낮은 비성장속도에서 배양하므로써 저해성 유기산인 아세트산의 축적을 억제할 수 있으며, 둘째, 당농도, 아세트산 농도 및 이산화탄소 분압을 측정하지 않고도 단순한 지수증가적 기질 공급만으로 배양 전반을 제어할 수 있다는 것이다. 그러나 비성장속도가 감소할수록 배양은 장기화되어 전체 생산성의 감소를 초래할 수 있는 문제점도 있다.

제 4절 γ -Glutamylcysteine 생산

γ -Glutamylcysteine은 글루타치온생산의 첫단계로 글루타치온생산의 속도결정 단계이다. 국내에서는 글루타치온 생산연구가 진행되지 않아서 전량을 수입에 의존하고 있는 실정이다. 효소를 이용한 γ -glutamylcysteine생산이므로 외부에서의 ATP를 공급해 주어야한다. 이러한 점을 보완하여 ATP 재생산계를 사용하였는데 acetate kinase와 효모의 glycolytic pathway를 이용하는 방법이다. ATP의 재생산을 위하여 대장균과 효모를 각각 toluene과 acetone으로 처리하여 세포막에 투과성을 높임으로써 반응물과 생성물, 또 ADP와 재생산된 ATP등이 자유롭게 이동할 수 있게 한다. ATP 재생산 공정에는 γ -glutamylcysteine 생산공정에 들어가는 반응물 이외에 필요한 물질을 반응기에 넣어주어야 한다. 대장균 내의 acetate kinase를 이용하는 ATP 재생산 공정에는 acetylphosphate를 넣어주었으며, 효모 내의 glycolytic pathway를 이용하는 공정에는 포도당을 넣어 주어야 하는데 이들의 적절할 농도에 대해서 조사하였다.

본 연구에서는 γ -glutamylcysteine synthetase 생산량을 높인 재조합 대장균 HB101/pGH501을 사용하여 재조합 대장균만을 이용하여 γ -glutamylcysteine 생산

과 ATP 재생산을 동시에 수행하는 단일세포 반응계와, 재조합 대장균에서 γ -glutamylcysteine 생산을 효모에서 ATP 재생산을 수행하는 혼합세포 반응계에서의 γ -glutamylcysteine 생산에 있어서의 적절한 반응물의 농도, 세포의 양, 대장균과 효모의 비율과 생산 안정성에 대하여 연구하였다. 또한 이들 단일세포 반응계와 혼합세포 반응계를 alginate를 이용하여 고정화 하였을 경우 γ -glutamylcysteine의 생산농도와 반응시간 그리고 안정성에 대하여 연구하였다.

제 5절 글루타치온 생산

글루타치온(L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH)은 3가지 아미노산으로 구성된 물질로 세포계에서 비단백질성 thiol로서 중요한 역할을 한다. 글루타치온은 동물, 식물, 박테리아에서 발견되었으며 최근에 글루타치온의 효소와 대사작용이 알려지면서 미생물학, 농학, 의학, 약학, 효소학 등 많은 분야에서 연구가 진행되고 있다. 글루타치온의 기능에는 단백질과 타 분자들에서 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, 조효소의 역할 등이 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, 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 산물저해한다. 그러나 글루타치온은 GSH-II에 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있다. 글루타치온 생산과정에서 ATP에 의해서 형성된 ADP는 GSH-I의 작용을 저해한다.

효소를 이용한 공정에서, 특히 여러 가지 효소를 이용하는 생산에서 ATP는 조효소 및 energy를 공급하는데 필요하며, 초기의 ATP 공급량을 최소화하여 연속적으로 ADP에서 ATP로 전환하는 재생산계의 이용이 중요시되고 있다. 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. Cysteine이 글루타치온으로 100% 전환되지 못하고 cysteinyl-cysteine, glutamyl-2(cysteine) 등 글루타치온의 유사물질로 전환되고 있는 것으로 보인다. 이와 같이 cysteine이 최종 산물로 전환되지 못하고 타 물질로 전환되는 것을 막기 위해서는 기존의 회분식 반응기보다는 주기적으로 cysteine을 공급하는 반응기가 글루타치온 생산에 적합한 것으로 보인다.

본 연구에서는 acetate kinase와 효모의 해당작용을 이용한 ATP 재생산계 등 여러 ATP 재생산계의 효과를 비교 연구하였으며, aerated slurry bioreactor를 이용하여 연속 반응기를 이용한 글루타치온을 생산하였다. 또한 여러 가지 고정화 방법 및 반응기를 사용하여 글루타치온을 생산을 수행하였다.

제 6절 글루타치온 회수

1. 구리침전법과 전기투석

가. 구리침전법

침전의 기본 원리는 수용액상의 용질을 고체로 전화시키는 것으로 단백질 분리시 단백질 표면과 주변 용매의 상호 복잡한 작용이 용해도를 결정하여 불용성 고체형태로 변화시킨다. 침전법은 연속적인 대규모 공정에 적용할 수 있으며, 그 사용 기구 또한 간단한 것이 장점이다.

GSH 합성효소에 의한 생산모액은 GSH의 함량이 낮기 때문에 보다 효율적인 GSH 분리 기술의 개발이 필요하다. GSH 합성효소에 의한 생산모액에는 목적물질인 GSH를 포함하여 미반응기질(glutamate, cysteine, glycine), 중간물질(γ -glutamylcysteine), glucose, ATP 등 다양한 수용성 물질이 용해되어 있기 때문에 GSH의 선택적 분리가 필요하다. GSH 내의 thiol group에 의한 chelate 반응에 의해 수용액상의 GSH가 구리와 침전을 형성하여 선택분리 될 수 있다. 구리염으로 GSH를 분리할 때에는 산화구리의 첨가량이 GSH의 회수율에 크게 영향을 끼치는 것에 착안하여 산화구리의 첨가한계 곡선을 제안하고, 그 첨가량을 계산에 의하여

추정하는 방법이 있으며, 구리염을 침전시킬 때, methanol(0.1~0.3% 첨가), glucose(0.5~5.0% 첨가), ascorbic acid(0.01~0.5% 첨가) 등을 첨가함으로써 침전 형성시의 구리의 산화능을 억제하여 GSH의 손실을 낮출 수 있다는 것이 보고되었다.

나. 전기투석

발효 등에 의해 생산된 발효액(fermentation broth)내의 아미노산 분리에 있어 아미노산의 용해도, 분자크기, 흡착제에 대한 친화도, 전기적 성질 등이 이용될 수 있다. 이온교환막을 사용하는 전기투석은 아미노산의 전기적 특성(charge characteristic)을 이용하여 분리하는 방법으로서, 전기적으로 극성을 띤 이온교환막과 전기적 포텐셜 차이에 의해 수용액으로부터 이온을 분리하는 전기·화학적 공정으로 정의되어진다. 전기투석은 최초로 염수에서 담수를 제조하는데 적용되었으며, 식수의 제조는 현재에도 가장 중요한 공업적 응용분야가 되고 있다. 최근에는 확산투석(diffusion dialysis)과 bipolar막의 사용으로 그 응용분야가 확산되고 있어 각광받는 연구분야 중에 하나이며, 몇 가지 중요 응용분야와 관련공정을 살펴보면 Table 4와 같다. 전기투석에 있어서 주의해 할 점으로는 전기에 의한 발열과 pH인데, 특히 후자인 pH 조건에 유의해야 된다. 수소이온의 이동과 제거로 인해 아미노산 주변의 pH 환경이 변하며, 아미노산의 ionic fraction에 따라 그 이동성도 달라진다.

2. 액체 크로마토그래피

가. 액체 크로마토그래피의 원리

단백질 정제에서의 크로마토그래피는 컬럼(column)법에 의한 액체 크로마토그래피이다. 컬럼 크로마토그래피는 여러 물질의 두 상(相) 사이의 분배계수 차이에 의해 분리하기 때문에 고정상(stationary phase) 주위를 흘러가는 액체(mobile phase) 사이에 물질분배가 수행된다. 컬럼 크로마토그래피에 사용되는 고정상을 충전제라 하는데 이는 100 micron 정도의 다당류이며, 단백질 정제에 사용되는 크로마토그래피를 Table 5에 나타내었는데, 물질이 이동상에서 고정상으로 옮겨지는 차이에 따라 분류한다.

나. 이온교환 크로마토그래피의 원리

컬럼 크로마토그래피 중에서 용질이 주로 정전기적인 힘에 의해 흡착하는 경우 이온교환 크로마토그래피라 한다. 단백질의 경우 양성 다가의 전기력을 띠고 있기 때문에 이온교환 수지를 이용한 흡착의 차이로 물질 분리를 수행이 가능하며, 그 기본적인 원리를 Fig. 39에 나타내었다. 예로서, 이온교환체를 컬럼에 채우고 1N HCl을 충분히 통과시키면 컬럼 전체가 1N HCl과 평형화된다. 여기에 수소이온을 탈착시킬 수 있는 강한 양이온(K^+)이 첨가되면 수소이온을 탈착시키고 수소이온 대신 이온교환기인 $-SO_3^-$ 기에 흡착하게 된다. 흡착된 K^+ 를 얻기 위해서는 초기의 1N HCl을 가하면 이온교환기로부터 탈착되어 유출된다. 또는 NaCl와 같은 고농도의 염을 가하면 빠르게 탈착되어 유출된다. 양이온 교환체와는 반대로, 수용액 중의 음이온을 교환할 수 있는 교환체를 음이온 교환체라하며, 그 해리기는 1차, 2차, 3차, 4차의 아민이다.

다. 아미노산의 등전점(pI)

아미노산의 양이온과 음이온의 총 전하수가 같아 아미노산의 전하가 0이 되는 pH를 아미노산의 등전점(pI)라 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 fraction값을 가지게 된다. 이러한 이온조성의 차이는 전기장에서는 이온교환막을 통한 이온의 이동에 영향을 주며, 이온교환 크로마토그래피에서는 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 Henderson-Hasselbalch식을 적용하여 pH에 따른 아미노산의 ionic fraction을 구할 수 있으며, 그 식은 다음과 같다.

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

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

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

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

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

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 지는데 그 수치가 0이 되는 pH가 아미노산의 pI라 할 수 있다

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 기술개발현황

1) 외국의 경우

글루타치온의 유전자 재조합 기술에 의한 연구 및 생산은 주로 일본의 산학 연구에 의하여 이루어지고 있다. Watanabe등은 변이형 *E. coli* B 균주에 *gsh I* 유전자의 염기 서열에 대한 연구된 부위특이성 돌연변이에 의한 initiation codon의 치환에 의하여 글루타치온의 생산활성을 높이고 있다. Murata등은 글루타치온의 생산에 있어 ATP의 역할 및 그 이용에 대하여 연구하였다. 그 외에도 京都대학의 식량과학연구소가 글루타치온의 생산에 대한 많은 연구를 벌이고 있다.

세계적으로 글루타치온의 선두 생산자는 일본의 협화발효로서 효모를 사용하여 발효법에 의하여 생산하고 세포 내에 축적되는 글루타치온을 전통적인 세포파괴와 추출법을 사용하여 회수하고 있다. 효모의 글루타치온 생산성은 재조합 균주에 비하여 분명히 떨어질 것이고, 글루타치온의 회수도 이와같이 여러 단계에 걸쳐 복잡한 공정을 거치면 제품의 회수율이 저조하고, 더불어 단가 상승요인이 된다.

대부분의 재조합단백질(recombinant protein), 예를 들면 간염백신, 인슐린 등 폴리펩타이드(polypeptide)가 직접적인 product가 된 경우가 대부분이었으나 이제는 대사경로 (metabolic pathway)에 관여하는 중요한 효소를 클로닝, 발현시켜서 최종 product의 수율을 높이는 방법이 목표가 되고있다. 예를들면 Konstantinov등은 페닐알라닌 (phenylalaine) 생산에 관여하는 효소의 유전자를 클로닝하여 페닐알라닌 생산농도를 종전의 10g/l의 수준에서 40g/l의 수준까지 끌어 올리는 좋은결과를 보여주고있다.

2) 국내의 경우

글루타치온 생산 균주 형질 개선에 대한 연구는 1980년대 후반 이세영 교수팀에 의한 *E. coli* K12의 *gsh I* 유전자에 대한 염기서열 결정과 클로닝 시도가 있었고 그 결과 상당량의 활성증가를 보고하였고, 현재 *gsh I, II* 유전자의 효율향상을 위해 유전공학적인 기법을 시도하고 있다. 글루타치온의 전구물질인 TEI-2306이 활성화산소의 제거에 효능이 있다고 보고되고 있다. 이와같이 생활성이 뛰어난 글루타치온의 전구 또는 유도체에 대한 탐색 및 특성 그리고 적용 연구는 효소생화학 전공인 본 위탁연구팀(식품개발연구원)에 의하여 확인된 것이다. 그 이외의 국내

연구는 거의 전무한 실정이었다. 국내에서 재조합 미생물의 고농도 배양 연구는 서울대, 과학원 그리고 유전공학센터에서 일부 연구가 되고 있다. 대부분 유가배양시 공급하는 포도당농도를 조절하는 형태로 연구하고 있으며 최근에는 feed forward 방식으로 좋은결과를 보이고 있다. 특히 생명공학연구소의 생물공학실험실에서는 DO-stat을 변화시켜 pH-stat방법과 병행시켜 포도당을 공급한 결과, 고농도배양과 함께 세포 당단백질수율도 높일 수 있었다.

국내와 국외의 연구개발사례를 비교하면 국외에서는 주로 일본에서 효모를 중심으로 연구와 생산에 주력하고 있으나, 대장균에 대한 연구도 진행되고 있다. 국내에서는 대장균과 효모의 동시사용에 대한 연구가 진행되었다.

본 연구과제에서 수행한 고정화 혼합세포계에 의한 글루타치온의 생산기술은 생합성효소를 생산하기 위한 재조합 *E. coli*와 더불어 글루타치온의 생합성에 필요한 에너지 공급(γ -glutamylcysteine과 glutathione 합성에 각각 1 mol ATP/mol 필요)을 위하여 yeast cell을 혼합하여 사용한 것으로, 실제 글루타치온의 생산에 적용한 것은 세계에서 처음있는 시도이다. 재조합 *E. coli* 설계에 있어서는 최적의 생합성효소 발현과 안정성이 고려되었다. 글루타치온의 생산을 위해서 재조합균주와 yeast의 최적합 혼합균주의 고정화를 위한 각종 고정화기술 및 반응기의 설계와 이의 최적 운전을 통하여 경제적인 글루타치온의 생산을 도모하였다. 본 연구에서 시도된 이러한 재조합 미생물에 의한 GSH 합성 유전형질의 개선과 생산공정개발 연구는 기초과학과 응용공학의 연결이라는 측면에서, 단위기술의 개발과 향상의 의미 이외에, 차후 효율적이고 균형있는 생물공학의 발전을 위하여 적지않은 기여를 했다고 판단된다.

2. 세부 기술사항의 현황

1) 국내외 기술수준 비교표

기술 내용	국 내	국 외
- 부위특이적 돌연변이 기술	완 성 단 계	완 성 단 계
- 재조합 DNA 안정화 기술	개 발 단 계	완 성 단 계
- 재조합 균주의 고농도 배양 기술	초 기 단 계	개 발 단 계
- 혼합 세포계 반응 기술	초 기 단 계	개 발 단 계
- 생물 반응계의 설계 기술	개 발 단 계	완 성 단 계

2) 공정단위별 기술현황

본 연구에서는 유전자재조합된 대장균의 고농도 배양, 효모와의 혼합세포 반응기와 효율적인 회수공정을 사용하여 효율적인 글루타치온의 생산을 시도하였다. 상기의 단위기술 중 부위특이적 돌연변이기술과 재조합 DNA 안정화기술에 대해서는 위탁과제에서 다루게 된다.

재조합 균주의 고농도 배양기술에 있어서는, *E. coli*의 경우 세포의 농도는 배양방법에 따라 10-125g/l까지의 많은 차이를 보이고 있으며 *Bacillus*의 경우 지난 30년간 고농도로 배양했던 최고농도가 30g/l이었으나 최근 포도당 공급방법을 달리 공급해서 100g/l 를 넘는 좋은 결과를 보여 주고 있다. 다른 intracellular 재조합 단백질에 대한 연구도 고농도 배양시 배지의 조성, 배지의 공급 방법, induction 시기, 성장 속도의 변환등의 방향으로 연구하고 있다. 특히 일본의 경우 포도당을 on-line으로 측정하여 일정농도를 유지하는 방법이 나고야대학의 고바야시 교수팀에서 연구되어 재조합 *E. coli* 및 *Bacillus*의 고농도 배양에 사용되었다. 또한 같은 대학의 야마네교수팀은 레이저를 이용하여 직접 cell의 농도를 측정하여 성장속도를 조절하는 방법으로 유가식배양 방법을 개발 중에 있다(개인 서신). DO-STAT 방법과 pH-STAT 방법은 고농도배양에 주로 사용이 되던 방법으로 일본의 히로시마 대학등에서 주로 연구되었으며 최근에는 포도당이 소비되어 DO가 오르는 신호 사이의 시간이 길고 짧음에 따라 미리 예측하여 포도당을 공급하는 소위 modified DO-stat 방법이 제안 연구되었다. 본 연구에서는 재조합 *E. coli* 에 대한 μ -stat 을 사용하는 유가식 배양을 통하여 균체농도 147(OD₆₀₀, 29 g/L 해당)을 얻었다. 이는 다른 균주에 대한 고농도 배양의 100 g/L보다는 낮은 값이지만, 해당 균주로서는 높은 농도이고 특히 μ -stat을 이용한 실험이어서 이 후 μ -stat을 이용해야되는 미생물의 고농도 배양에 있어서 좋은 표준자료가 될 것이다.

본 연구에서 시도한 혼합세포계 반응기술은 글루타치온 생산을 위한 생합성 효소 생산을 위한 재조합 *E. coli*와 에너지를 공급하기 위한 yeast의 혼합세포계를 사용하여 재조합 *E. coli*는 자원의 대부분을 글루타치온의 생산에 사용하고, 에너지 공급은 yeast에서의 포도당의 해당작용에서 얻도록 시도한 것이다. 이러한 설계는 글루타치온의 생산에 있어서는 처음 시도되는 것으로, 외부에서의 ATP 공급을 최소화하여 글루타치온 생산의 경제성 향상에 기여하였고, 이 후 다른 생물물질의 생합성에 기초자료를 제공하였다.

재조합 *E. coli*와 yeast의 혼합세포계를 이용한 효율적인 글루타치온의 생성을 위해서는 우수한 생물 반응기의 설계 및 운전이 필수적이다. 본 연구에서는 전통적인 고정화기술로서 agar, Ca-alginate, polyacrylamide 천연 및 인공의 고분자 gel

에 의한 고정화 외에 microfilter, ultrafilter등을 사용하는 hollow-fiber 기술, celite 등의 다공성 입자를 사용하는 packed column 기술을 시도하였다. 일본의 島根대학 팀에서 남조류에 빛을 쬐어 발생하는 energy를 사용하여 글루타치온을 생산하는 광발효법을 개발했다. 비록 글루타치온이 세포외로 분리되어 분리·정제가 간단하다는 장점이 있으나 광조사기의 효율적인 설계 등에 의하여 대량 생산에는 제약이 있을 것으로 평가된다. 본 과제에서 글루타치온 생산을 위하여 중점적으로 사용한 생물반응기는 aerated slurry bioreactor로서 고농도의 혼합세포를 air에 의하여 부유시켜 생물반응을 수행하도록 설계한 것이다. 이는 고정화 gel에서 발생하는 물질전달 제약을 없애고, 혼합균체의 slurry 상태의 현탁액을 사용함으로써 생물반응기 단위 부피당 균체농도를 최대화하여 글루타치온 생산의 극대화를 시도한 것이다. 연속식으로 운전하여 기질 및 산물저해를 방지하고, 글루타치온의 생산성을 증가시킬 수 있다. 이러한 aerated slurry bioreactor의 개념은 평범한 부유반응기에서 출발하였으나, 세포침강, 원심분리, 막분리 등 효율적인 세포회수기술과 병행하여 사용하면, 높은 생산성을 갖는 우수한 생물반응기의 역할을 할 수 있다.

본 연구과제의 성공적인 수행으로 인하여 항염, 해독, 항암 등 중요한 의학적 특성을 갖는 GSH의 경제성있는 생산공정을 개발하게 된다. 일본에서 GSH의 시장 규모는 원체가격 기준으로 연간 약 70억 엔에 달하며, 일본과 식생활 등의 양식이 유사한 우리나라에서도 그 규모가 증가하고 있다. 이러한 상황에서 장래 국내수요를 충족시키고, 시장개방화의 시대에 있어 필요산물의 생산공정을 국산화한다는 데 있어서 본 과제는 큰 의미를 갖게 된다. 또한 GSH의 경제적인 생산은 항염작용 등으로 인해 화장품, 의약품의 분야에서 관심을 끌고 있는 TEI-2306 (GSH의 전구물질), S-lactoylglutathione(GSH의 유도체)의 생산에도 기여할 수 있을 것이다. 그리고 본 GSH 합성 유전형질의 개선과 생산공정개발의 과제와 같은 연계적 사업은 차후 생물공학의 건설하고 균형있는 발전을 위해 필요하며, 기초과학 실험실에서부터 소비자에게 저렴한 제품을 공급하기 위한 공장생산까지라는 생물공학의 궁극적인 목적을 달성하는 시범사업이 될 것이다.

3. 특허 및 기술도입과의 중복여부에 대한 검토

본 과제서 수행되는 연구는 대장균의 유전자를 재조합시킨 후 효모와 고정화 혼합세포균을 형성하여 glutathione을 생산하는 생물공정으로서 기존의 단일종 미생물에 의한 관련생산기술과는 큰 차이점을 가지고 있다.

국내의 glutathione 수요량은 전량 수입에 의존하고 있어, 관련기술이 도입되어

있지 않다. 현재 국내에 공급되고 있는 glutathione은 일본에서 수입되고 있으며, 이들은 대부분 야생형 효모를 사용한 발효액으로부터 추출에 의해 생산되는 제품으로 용매처리한 재조합 *E. coli*와 yeast의 혼합세포를 사용하는 본 연구와는 중복되는 부분이 많지 않다.

4. 원재료에 대한 검토분석

Glutathione의 생산원료로 쓰이는 glycine, glutamic acid, cysteine 그리고 포도당 등은 대부분 현재 국내생산이 되고 있으며 수입되고 있는 아미노산들도 소량이기 때문에 원재료의 수급상황은 근미래에 걸쳐 큰 변동없이 안정되어 있다.

아미노산의 생산은 전통적으로 발효식품에 대한 기호가 있는 일본이 강세를 보이고 있으나, 원료로 사용되는 아미노산들은 대부분 기본적인 것으로 조미료 등의 생산경험이 풍부한 국내기업에 의하여 충분한 국제경쟁력을 갖추고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 재조합 균주의 고농도 배양

글루타치온(glutathione)은 γ -glutamylcysteinylglycine의 구조를 가지는 트리펩타이드(tripeptide)이며 대부분의 생물체 내에 포함되어 있는 비단백질 티올(thiol)이다. 글루타치온은 단백질 sulfohydryl 그룹의 유지와 DNA의 구성성분인 deoxyribonucleotide 의 전구체 형성, 반응성이 강한 산소화합물이나 자유라디칼로부터의 세포보호, 외부화합물의 독성제거, 대사물의 조효소등 생물학적, 의약적으로 많은 중요한 역할을 한다. 최근의 연구결과에 의하면 간장질환 그 치료제로 효능이 뛰어난 것으로 알려져 있다[1].

글루타치온은 1921년 Hopkins에 의해 처음으로 분리되어지고 명명되어졌다. 미생물중의 글루타치온은 대부분 환원형(GSH)으로 존재하며, 산화형(GSSG), 혼합된 disulfide, GSS-Protein, 및 GSSR으로도 적은 양이 존재한다.

글루타치온 생합성은 γ -glutamylcystein synthetase(GSH-I)와 glutathione synthetase(GSH-II)의 연속적인 작용에 의해서 세포내에서 합성되어지며, GSH-I은 환원형 글루타치온(GSH)에 의해, GSH-II는 산화형 glutathione(GSSG)에 의해 저해됨이 밝혀졌다.

기존의 글루타치온 생산은 효모세포를 추출함으로써 또한 화학적 합성을 통해 이루어진다. 그러나 이들 방법은 분리상의 몇 가지 문제점들로 인하여 글루타치온 생합성 효소를 이용한 생산방법이 폭넓게 연구되어지고 있다. 그러나 글루타치온 합성에 관여하는 효소의 양이 충분하지 못하기 때문에 수득율이 좋지 못하여 실질적인 글루타치온 생산에 이용되지는 못하고 있다.

본 연구에 사용되는 대장균은 글루타치온을 대량생산하기 위해 고안된 재조합 균주으로써 균체농도를 증가시키고 글루타치온 생성에 관여하는 효소의 생산을 극대화하기 위한 배양 방법을 필요로 한다.

유전공학 기술의 발달은 많은 유용한 의약 단백질, 식품효소, 및 아미노산 등의 생산을 용이하게 했다. 그 대표적인 예로써 인간 성장 인슐린 성분(IGF-I), 인터루킨, 아밀레이즈, 트립신 등이 있다[2-6].

유전자 조작의 숙주세포로써 유전자적 구조가 잘 알려진 대장균을 많이 이용한다. 그러나 구조가 복잡하거나 번역 후 수정과정이 필요한 단백질의 경우 재조합 대장

균 시스템이 부적당하다고 알려져 있다. 대장균에서 외래 단백질을 생산할 경우 비용해성 단백질인 inclusion body의 생성과 생물활성을 회복하기 위해 번역후 unfolding이나 refolding의 과정이 필요하며, 비효율적인 분비등이 문제가 되기 때문이다. 그래서 지금까지는 많은 다른 장점에도 불구하고 숙주로서 대장균보다는 효모, 식물 또는 동물세포를 이용해 왔다.

그러나 최근 재조합 DNA 기술 중 단백질의 접힘(folding), 분비, molecular chaperones의 역할 등에 관한 놀랄만한 연구업적으로 숙주세포로서 대장균의 관심이 높아지고 있다.

재조합 대장균을 이용하여 외래 단백질을 대량생산하기 위해서는 높은 균체 농도와 높은 수준의 단백질 발현율을 필요로 한다. 이러한 목적에 부합하는 방법으로 유가식 배양을 들 수 있다.

유가식 배양은 높은 농도의 기질 용액을 조금씩 첨가하면서 미생물을 고농도로 배양하는 방법으로 기질의 과잉공급이나 높은 초기 기질 농도로 인한 catabolite repression, substrate inhibition 등을 억제한다. 또한 효율적인 기질공급으로 원료비, 생산 시설비를 절감, 및 발효시간을 단축하며[7], 외래 단백질 발현과 세포 성장이 반비례 관계에 있어 이들의 상호 경쟁을 최소화하여 단위부피당 목적물질의 생산성을 극대화 할 수 있는 장점이 있다.

그러나 호기적 발효 과정 중 발생하는 산소 용해도의 제한으로 인한 배지내 용존 산소의 고갈과 급격한 미생물 증식으로 인한 기질 소모, 미생물 호흡과 발효장치에 의해 발생하는 발효열 등은 균체의 성장 및 외래 단백질 생산을 억제하며, 이러한 과정 중에 축적되는 발효부산물에 의해 문제점은 더욱 가중된다. 특히 대장균의 고농도 배양 시 생성되는 발효부산물 중 잘 알려진 아세트산은 미생물의 성장과 목적물질의 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[8,9]. 그러므로 이러한 문제점을 해결하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

유가식 배양의 초기단계인 세포 생육 시기에는 부산물인 유기산의 생성을 억제하며 세포의 성장을 유도하는 것이 아주 중요하다. 호기적 조건하에서 과잉의 기질공급으로 인해 유기산을 생성하는 현상을 "Bacterial crabtree effect"라 하여 잘 알려져 있다[10]. 이러한 유기산의 생성은 미생물의 성장과 외래 단백질 생산을 억제하며[10,11], 공정의 전체 수율에 영향을 미치는 주요한 변수로서 이들의 생성원인과 저해기작 및 억제방법에 대한 연구는 일찍부터 광범위하게 논의되어왔다.

이러한 아세트산의 생성기작은 아직 확실하게 밝혀지지 않았지만 다음의 몇 가지 가설이 제안되고 있다. 첫째, TCA 회로의 제한으로 인해 생성된 acetyl CoA의 축적[9], 둘째, 제한된 산소공급과 과잉된 기질공급으로 발생하는 호흡능의 제한[8], 셋

제, NADH₂의 축적으로 인한 전자전달계와 TCA 회로 내의 효소의 억제[8], 넷제, CO₂ 분압의 증가 등이 있다.

아세트산의 저해 기작은 해리되지 않은 아세트산이 세포막을 통과해서 균체내로 들어가서 균체내부의 pH를 저하시켜 세포자체의 독성으로 작용하거나, 세포막을 통과하면서 막전위(proton motive force)에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

따라서 아세트산의 생성 및 축적을 억제하여 발효공정을 최적하려는 노력이 2가지 방향으로 연구중이다. 첫째는 미생물의 성장 속도와 단백질의 생성속도를 증대시킬 수 있는 배지 조성의 최적화이며[12,13], 둘째는 부산물의 생성을 억제하면서 고농도 배양을 수행하는 발효 공정 전략의 최적화[14-16]이다.

고농도 배양 시 사용되는 배지는 제한배지를 사용한다. 제한배지는 환경인자를 보다 정확히 조절하여 부산물의 생성을 억제하며, 미생물의 성장과 단백질의 생성을 유도할 수 있으며, 경제적으로 유리한 장점을 가지고 있다. 이러한 제한 배지를 최적화하여 미생물의 성장 및 외래 단백질의 생산을 증대시킨 연구가 보고되었다 또한 미생물을 고농도로 배양 배양하기 위한 발효전략으로 미생물의 성장시기와 목적물질의 생산시기를 분리하여 2단계로 배양하는 경우도 있다.

회분식 배양 이후의 유가식 배양시 기질의 공급 방법은 발효 부산물인 유기산의 생성억제, 높은 균체 농도 생산, 및 높은 단백질 발현율을 유지시키기 위해 중요한 위치를 차지하고 있다. 현재는 다음과 같은 다양한 기질 공급 방법이 쓰이고 있다.

미리 결정된 feeding profile에 따른 일정배지공급(constant feeding), 선형배지공급(linear feeding), 지수배지공급(exponential feeding)등이 있으며, 공급된 기질의 고갈로 인해 배지내의 용존 산소의 농도가 증가할 때를 지표로 기질을 공급해주는 DO-stat.[6,18,19], 기질의 고갈로 미생물에 의해 생산된 유기산으로 pH가 급격히 감소하는 것을 지표로 기질을 공급하는 pH-stat., 부산물이 생성되지 않는 포도당의 농도를 미리 설정하여 설정값을 유지하면서 기질을 공급하는 포도당 농도 측정 [21-24], 부산물로서 아세트산의 농도를 측정하면서 적당한 속도로 기질을 공급하는 아세트산 농도 측정[20], 미생물의 비성장속도(μ)를 조절하면서 기질을 공급해주는 μ -stat.[25-28] 등이 있다.

아세트산의 생성과 밀접한 관계가 있는 비성장속도는 미생물의 성장 및 외래 단백질 생산에 중요한 인자로서 작용한다. 일반적으로 비성장속도를 0.1~0.3 hr⁻¹로 유지시켜 아세트산의 생성을 억제하여 균체농도를 128~148 g/L까지 생산한 경우가 보고되었다. 또한 Turner등은 $\mu = 0.29$ hr⁻¹에서 연속배양시 외래 단백질인 α -amylase를 가장 많이 생산하였으며, $\mu_{max}(0.65$ hr⁻¹)이상에서는 상당량의 아세트산이 축적되었고, 균체농도와 α -amylase의 생성량은 최고치의 50%이상 감소함을 보

고하였다[26].

이러한 보고로부터 많은 연구자들은 낮은 비생장속도로 배양을 수행할 것을 제안하였으며, 공급기질로써 포도당 대신 글리세롤을 이용하여 아세트산의 생성을 억제 한 연구도 보고되었다[29]. 또한 미리 계획된 지수 증가식 기질 공급을 통하여 비생장속도를 낮게 조절하여 수행된 유가식 배양으로 높은 농도의 균체와 외래 단백질을 얻었다[30].

이러한 비생장속도 조절에 의한 유가식 배양의 장점은 첫째, 낮은 비생장속도에서 배양하므로써 발효부산물의 생성을 억제하며, 둘째, 당농도, 아세트산 농도 및 이산화탄소 분압을 측정하지 않고도 단순히 지수증가식 기질공급만으로 배양 전반을 제어할 수 있다는 데 있다. 그러나 비생장속도가 감소할수록 배양은 장기화되어 전체생산성의 감소를 초래할 수 있는 문제점도 있다[7].

본 연구에서는 유전 공학적으로 재조합된 글루타치온 생산 대장균을 이용하여 초기 당농도 및 아세트산 농도가 균체수율 및 글루타치온 생산에 관계하는 효소인 GSH-I의 발현율에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 서로 다른 비생장속도 조절 유가식 배양을 통해 비생장속도와 균체수율, 아세트산 생성, 및 GSH-I의 발현율에 미치는 영향을 확인하였다. 그리고 본 연구에서는 글루타치온 생산 균주를 대량 생산하기 위한 최적의 비생장속도 및 배양조건을 확립하는데 그 목적이 있다.

1. 실험재료 및 방법

가. 사용균주

본 연구에 사용한 숙주세포는 *E. coli* TG1이며, 플라스미드는 pDG7 α 이다. 재조합된 플라스미드 pDG7 α 는 총길이 9.4Kb이며, pBR322기원의 vector에 *gsh-I*, *gsh-II* 유전자가 삽입되어 있다. Promoter는 *tac* promoter를 사용하였으며 ampicillin 내성 유전자가 존재한다.

나. 배지

본 연구에 사용된 배지는 성장배지로는 LB 배지를 사용하였으며, 플라스크 배양, 회분식 배양, 및 연속식 배양에는 5 g/L의 포도당과 1 g/L의 Yeast Extract를 포함하는 medium R을 사용하였다. 유가식 배양에 사용된 공급 기질은 Resenberg에 의해 이용된 배지를 사용하였다(Table 1).

다. 플라스크 배양

본 연구에 사용된 *E. coli* TG1 균주는 -70°C defreezer에 25% glycerol stock으로 보관하였다. 종균배양(seed culture)은 glycerol stock으로부터 $50\ \mu\text{g/mL}$ ampicillin이 들어있는 10 mL LB 배지에 1% v/v로 접종해 12 시간 동안 rotary shaker에서 배양한 것을 사용하였다. 교반속도는 250 rpm, 온도는 37°C 로 조절하였다. 세포 성장에 포도당 농도가 미치는 영향을 조사하기 위해 medium R에 1부터 50 g/L까지 포도당의 농도를 변화시켜 1.5 시간마다 균체 농도를 측정하였으며, 배양이 끝난 후 배양액을 원심분리하여 GSH-I의 활성도를 측정하였다. 또한 아세트산의 농도에 의한 세포 비성장속도 및 GSH-I의 생성 저해효과를 조사하기 위해 5 g/L의 포도당을 포함하는 배지에 아세트산 농도를 1부터 20 g/L까지 변화시켜 세포의 농도를 측정하였으며, 배양이 끝난 후 GSH-I의 활성도를 측정하였다. 그리고 질소원인 yeast extract의 농도에 의한 세포 성장에 대한 효과를 조사하기 위해 5 g/L의 포도당을 포함하는 배지에 yeast extract를 1부터 20 g/L까지 변화시켜 일정시간마다 균체 농도를 측정하였다.

라. 연속배양

연속배양은 초기 회분식 배양을 하다가 포도당의 농도가 0 g/L가 되는 시점에서 설정된 희석 속도를 유지하기 위해 연동펌프를 이용하여 일정하게 기질농축액을 공급하였으며, 기질의 유입속도와 배양액의 유출 속도가 같도록 조절하였다. 각 실험에는 일정시간 등간격으로 시료를 채취하여 아세트산, 포도당, 및 균체 농도를 측정하였다. 또한 정상상태 이후에 일정량의 시료를 등간격으로 채취하여 GSH-I의 활성도를 측정하였다.

마. 유가식 배양

유가식 배양은 회분식 배양을 하다가 공급된 포도당의 농도가 0 g/L가 되는 시점에서 기질농축액을 미리 설정된 프로그램을 통해 제어되는 펌프를 통해 지수배지공급방법(exponential feeding)으로 공급되었다. 기질 공급 속도는 세포물질수지식에 의해 다음과 같이 유도된다.

$$\frac{d}{dt}(VX) = V\mu X \quad (1)$$

$$\frac{d}{dt}(VS) = FSo - \frac{V\mu X}{Y_{x/s}} \quad (2)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (3)$$

균체의 비성장속도는 일정하게 유지하고(μ 는 상수), $t=0$ 일 때 $V=V_0$, $X=X_0$ 이라 하자. 식(1)을 적분하면,

$$VX = \mu V_0 X_0 \exp(\mu t) \quad (4)$$

식(2)를 계산하면,

$$\frac{dS}{dt} V = F(S_0 - S) - \frac{V\mu X}{Y_{x/s}} \quad (5)$$

만약 배양이후의 포도당 농도가 0 g/L로 계속 유지시킨다면($S=0$), 시간에 따른 포도당의 농도($dS/dt=0$)도 0이 된다. 이런 관계로부터 식(5)를 정리하면,

$$F = \frac{V\mu X}{Y_{x/s} S_0} \quad (6)$$

식(4)를 식(6)에 대입하면,

$$F = \frac{\mu V_0 X_0 \exp(\mu t)}{Y_{x/s} S_0} \quad (7)$$

여기서, μ 는 미생물의 비성장속도(hr^{-1}), S_0 는 공급기질의 기질농도(g/L), X_0 는 미생물의 초기 균체농도(OD_{600}), V_0 는 초기 배양부피(L), $Y_{x/s}$ 는 균체 수율 계수($\text{OD}_{600}/\text{g glucose}$), F 는 기질 공급 속도(L/hr)이다. 위 식을 기본으로 하여 만들어진 프로그램을 통해 계산된 수치는 컴퓨터와 연결된 I/O board를 통해 펌프속도로 환산되어 펌프를 작동시킨다(Fig. 3).

반응조건은 온도는 28°C, 공기 공급 속도 0.5 vvm, pH는 25% 암모니아수를 이용

하여 6.8로 조절하였고, 용존산소의 농도는 포화 용존 산소 농도의 20~40%를 유지시켰으며, 교반속도는 500-1000 rpm으로 하였고, 교반속도가 1000 rpm이상에서는 용존산소의 농도를 유지시켜주기 위해 순수한 산소를 공급하였다.

바. 분석방법

(1) 균체 농도

0.85 % NaCl용액에 배양액을 희석하여 spectrophotometer(UV160-A, Shimadzu, Japan)로 600 nm의 흡광도로 측정하였다.

(2) 포도당 농도 측정

배양액 중 시료를 1 mL 취하여 원심분리기를 이용해 8000 rpm으로 2분간 원심 분리 한 후 그 상등액을 취하여 포도당 분석기(Model 2700, YSI, USA)로 분석하였다.

(3) 아세트산 농도 측정

아세트산 농도는 gas chromatograph(CP9001, Chrompack, Nederland)를 통해 측정하였다. Column은 WCOT Fused Silica type의 CP-Sil-5 CB capillary column을 사용하였으며, Detector 온도 300°C, Injector 온도 250°C, Oven 초기온도 70°C, Oven 최종온도 140°C, Oven 온도 상승 속도는 2 °C/min으로 하였다. 시료는 1 mL 을 취하여 8000 rpm으로 2 분간 원심분리하여 얻은 상등액에 내부 표준용액(propionic acid)과 염산을 넣어 분석하였다.

(4) GSH-I농도 측정

GSH-I의 활성도는 Jackson method을 약간 변형하여 수행하였다[31]. 배양액에서 취한 10 mL의 시료를 5000 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 균체를 초음파 파쇄기로 파쇄하여 세포 내 효소를 얻는다. 준비된 반응 혼합물(Table 2)에 시료 100 μ L를 넣어 최종부피를 2 mL로 만든다. 37°C에서 15분간 반응시킨 후 3.2% sulphosalicylic acid를 첨가하여 반응을 정지시킨다. 이 반응액을 20분간 얼음물에 냉각시킨 후 1.5 mL을 취하여 원심분리하여 균체를 제거하고 4 mL의 glyoxylate solution(Table 2)에 분리된 상등액을 1 mL 첨가하여 60°C에서 5분간 반응시킨다. 반응액을 급속히 냉각시켜 반응을 정지시킨 후 1M potassium-phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 3.8 mM DTNB용액을 넣고 7분 후에 spectrophotometer로 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit의 정의는 단위시간당 1 μ mol의 γ

-glutamyl cysteine을 생산할 수 있는 효소의 양으로 정의한다.

2. 연구결과

가. 초기 포도당의 농도가 균체성장 및 GSH-I 생성양에 미치는 영향

초기 포도당의 농도를 5 g/L에서 20 g/L까지 변화된 상태에서의 최종 미생물의 균체 생성 및 GSH-I의 생성양은 거의 차이가 나지 않았다. 그러나 초기 포도당의 농도가 1 g/L에서는 미생물이 이용할 수 있는 기질이 빨리 고갈되어 균체의 성장이 정지되었으며, 50 g/L이상의 초기 포도당 농도에서는 최종균체농도는 거의 변화가 없지만 GSH-I의 생성양은 약 20 % 감소하였으며, 배지 내에 대사되지 않은 많은 양의 포도당이 존재하였다. 이러한 이유는 초기 기질농도 과잉으로 인한 글루타치온 생성 효소인 GSH-I의 합성을 저해하는 부산물을 생성하는 것으로 사료되며, GC분석을 통해 아세트산의 생성을 확인하였다(Fig. 4).

나. 초기 Yeast Extract 농도가 균체 성장에 미치는 영향

미생물의 성장을 향상시키기 위해 질소원으로 yeast extract를 첨가하여 균체 성장 및 효소의 생성양에 대한 영향을 관찰하였다. 초기 yeast extract 농도가 1 g/L까지는 미생물 비성장속도가 급격히 증가하였지만, 그 이상의 농도에서는 비성장속도가 크게 증가하지 않는 것을 확인하였다. 이것은 이 균주가 가지는 최고의 비성장속도에 도달함에 따라 yeast extract의 증가량에 비해 상대적으로 비성장속도의 증가를 보이지 않는 것으로 사료된다(Fig. 5).

다. 초기 아세트산 농도가 균체 성장과 GSH-I 생성에 미치는 영향

초기 아세트산이 균체 성장 및 GSH-I 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 1 g/L부터 20 g/L까지 변화시키면서 실험을 하였다. 초기 아세트산의 농도가 2 g/L까지는 거의 미생물의 성장에 영향을 주지 않았지만, 5 g/L이상에서는 급격하게 성장이 억제되는 것을 확인하였다. 또한 외래 단백질인 GSH-I의 농도도 5 g/L이상의 아세트산 농도에서는 크게 감소함을 확인하였다. 이것은 여러 보고를 통해, 발효부산물인 아세트산이 미생물의 성장 및 목적물질의 발현을 상당히 억제한다는 것을 입증하는 것이다. 또한 기존의 보고에서 알려진 균체 성장 억제 아세트산 농도가 7 g/L에 비해 5 g/L이하에서도 균체 성장 및 단백질의 발현율이 크게 저하되는 것으로 보아 GSH-I의 생성은 아세트산 농도에 매우 민감한 것으로 사료된다. 이러한 발효부산물의 생성을 억제하기 위한 발효방법의 개발이 필요한 것으로 생각된다(Fig. 6).

라. 연속 배양을 통한 포도당 수율 및 아세트산 생성을 조사

비성장속도 조절을 의한 유가식 배양하기 위한 기초자료를 얻기 위해 연속배양을 통해 미생물 균체 수율 상수 및 아세트산 생성을 조사하였다. Fig. 7과 Fig. 8은 각각 희석율 0.05, 0.15 hr⁻¹에서 연속배양을 수행하여 얻은 포도당 농도, 아세트산 농도, 및 GSH-I의 생성량이다. 각각은 연속배양을 수행한지 3τ ~ 4τ hr 후에 정상상태에 도달한 것을 균체 농도, 포도당의 농도를 측정함으로써 확인할 수 있었다. 또한 정상상태에서의 GSH-I의 생성량도 일정하게 유지됨을 확인할 수 있었다.

각각의 균체 수율 상수는 0.05 hr⁻¹에서 0.85 OD₆₀₀/g glucose였으며, 0.15 hr⁻¹에서 0.90 OD₆₀₀/g glucose였다. 평균적으로 0.88 OD₆₀₀/g glucose를 일정하게 유지했다. 또한 아세트산의 생성은 두 가지 경우에서 거의 보이지 않았다. 서론에서 언급했듯이 미생물의 비성장속도가 0.3 hr⁻¹이하에서 연속배양시 거의 아세트산과 같은 발효 부산물의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다.

마. 비성장 속도조절을 통한 유가식 배양

기본적인 자료를 바탕으로 글루타치온 생산 재조합 대장균을 고농도로 배양하기 위해 서로 다른 비성장속도로 유가식 배양을 수행하였다. 프로그램에 따라 펌프를 통해 공급되는 기질의 양은 일정한 시간마다 균체농도를 측정함으로써 설정된 비성장속도로 유지됨을 확인하였다. 비성장속도는 0.1~0.4 hr⁻¹까지 달리하여 실험을 수행하였다. 비성장속도 0.1hr⁻¹에서 세포의 농도는 132(OD₆₀₀)였으며, 포도당 농도는 거의 고갈되어 0g/L이었다. 또한 아세트산은 배양 중에는 거의 생성되지 않았다(Fig. 9). 비성장속도가 0.2hr⁻¹일 때 세포의 농도는 137(OD₆₀₀)였으며, 포도당 농도는 0g/L였으며 아세트산은 배양 중에는 거의 생산되지 않았다(Fig. 10). 비성장속도가 0.3 hr⁻¹일 때 세포의 농도는 147(OD₆₀₀)로 비성장속도 0.1, 0.2hr⁻¹과 같은 최종 균체 농도를 보였다(Fig. 11). 유가식 배양을 하는 동안의 포도당농도는 거의 0 g/L였으며, 아세트산은 배양 중에는 거의 생성되지 않았다. 이것은 기질고갈상태에서의 미생물이 발효부산물인 아세트산을 기질로써 이용하는 것으로 생각된다.

GSH-I의 생성량은 비성장 속도가 낮을수록 더욱 높아서 각각 130, 120, 100 unit/L였다. 이것은 최종 균체농도는 거의 비슷하게 유지하였지만, 반응후기에 생긴 아세트산에 의해 GSH-I의 생산에 저해를 받은 것으로 생각된다. 또한 비성장속도 0.4 hr⁻¹에서는 균체의 최종 농도도 낮았으며(OD₆₀₀=71), 배양 후기에 배지 내에 매우 많은 양의 포도당이 축적되었다(Fig. 12). 그리고 발효 부산물인 아세트산도 상당히 많은 양이 축적되었으며, 설정된 비성장속도를 유지하지 못하는 것을 확인

하였으며, GSH-I의 생성양도 매우 낮아 28 unit/L였다.

배양후기에 나타난 급격한 균체농도의 감소는 세포용해로 인한 것보다는 성장이 중지된 상태에서 다량의 기질용액의 공급으로 인한 희석효과이었음을 균체농도와 배양액의 부피증가를 고려한 수학적 계산을 통해 확인하였다.

제 2절 배지 최적화

본 연구는 GSH 생산에 있어 기질이 되는 세 가지 아미노산(Glu, Cys, Gly)을 기존 배지에 첨가하여 GSH-I의 활성과 GSH생산을 극대화하고자 하였으며, flask 실험을 통해 GSH를 발효에 의해 대량생산하는 실험에 있어 하나의 기초가 되고자 하였다. 또 기존의 고농도 배양법을 이용하여[32], 이 연구의 실제 응용성을 검토하였다.

1. 실험재료 및 방법

가. 사용균주 및 plasmid

본 연구에 사용된 숙주세포는 *E. coli* TG1이었으며, 플라스미드는 pDG7 α 이었다 [32, 34]. 재조합된 플라스미드 pDG7 α 는 총 길이 9.4Kb이며, pBR322기원의 vector에 *gsh-I*, *gsh-II* 유전자가 삽입되었다. Promoter는 *tac promoter*를 사용하였으며 ampicillin 내성유전자가 존재하였다.

나. 배지 및 배양조건

전 배양은 LB 배지(DIFCO 社)를 사용하였으며, glycerol stock으로부터 50 μ g/mL ampicillin을 함유한 10mL LB 배지에 1% v/v로 접종하였고, rotary shaker에서 배양하였다(250rpm, 37 $^{\circ}$ C, 10시간).

본 배양은 LB 배지와 기존의 fermentation에서 사용된 배지를 사용하였으며[32], 그 조성은 Table 1에 나타내었다. Table 1의 배지를 100mL를 제조하였으며, 1M NaOH를 사용하여 초기 pH를 7로 조정하였다. 여러 농도의 Gly, Cys, Glu(Sigma 社) 용액을 준비하여 각각의 배지에 첨가하였고, rotary shaker에서 배양하였다(250rpm, 37 $^{\circ}$ C, 10시간).

고농도의 균체를 얻기 위해 선택한 배양방법은 기존의 유가식배양이며[32], 2.5 L 발효기(KF 2.5 L, Korea Fermentor, KOREA)에서 작동부피 1.0 L로 수행되었다. 배양조건은 온도는 28 $^{\circ}$ C, 공기 공급은 2 - 5 atm, pH는 25% 암모니아수를 이용하여 6.8로 조절하였고, 교반속도는 400 - 1000 rpm으로 하였다. 공급기질은

Riesenberg에 의해 이용된 배지를 사용하였다[37]. 기질은 미생물의 비성장 속도를 0.2 hr^{-1} 로 유지할 수 있도록 지수배지공급방법(Exponential Feeding)으로 공급되었다. 기질 공급 속도는 세포물질수지식에 의해 다음과 같다[29].

$$F = \frac{\mu V_0 X_0 \exp(\mu t)}{Y_{x/s} S_0} \quad (1)$$

여기서, μ 는 미생물의 비성장속도(hr^{-1}), S_0 는 공급기질의 기질농도(g/L), X_0 는 미생물의 초기 균체농도(OD_{600}/L), V_0 는 초기 배양부피(L), $Y_{x/s}$ 는 균체 수율 계수 ($\text{OD}_{600}/\text{g glucose}$), F 는 기질 공급 속도(L/hr)이다. 본 연구에 사용된 숙주세포 *E. coli* TG1에 대한 균체 수율 계수는 $0.88 \text{ OD}_{600} / \text{g glucose}$ 를 사용하였으므로[32], 실제 기질 공급속도는 아래와 같았다.

$$F = 0.317 \times \text{OD}_{600} \times \exp(0.2t) \text{ (mL / hr)} \quad (2)$$

고농도 배양의 경우 배양시간과 OD_{600} 의 값에 따라 균체의 활성이 달라지므로, 배양시간 30시간에 OD_{600} 의 값은 100내외를 기준으로 했다.

다. 분석

균체농도는 0.85% NaCl용액에서 배양액을 희석하여 분광광도계(Shimadzu 社)로 600nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

GSH- I의 활성도는 Jackson method를 변형하여 수행하였다[32]. 배양액에서 취한 50mL의 시료를 8000rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 균체를 초음파 파쇄기(Sonics & Materials 社)로 파쇄하여 세포 내 효소를 얻었다. 준비된 효소반응 시료[32, 34]에 효소액 150 μL 를 가하여 최종부피가 2mL가 되도록 조절하였으며 37°C에서 15분간 효소 반응시킨 후, 3.2% sulphosalicylic acid(Sigma 社)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액을 20분간 얼음물에서 냉각시킨 후, 1.5mL를 취하여 원심분리(10000rpm, 3min)하여 변성되어 침전된 효소를 제거하였고, 4mL glyoxylate(Sigma 社)용액에 상등액을 1mL 첨가하여 60°C에서 5분간 반응시켜 용액중의 Cys을 제거하였다. 반응액을 급속히 냉각시켜 반응을 정지시킨 후, 1M potassium-phosphate buffer(pH 7.0, Sigma 社)에 녹인 3.8mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB, Sigma 社)용액을 첨가하여 6분간 발색반응을 유도하였다. 생성된 γ -GC의 양을 분광광도계를 이용하여 412 nm에서 측정하였다.

GSH의 생산량은 배양액을 8000rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 균체를 0.5mM

의 Cystein이 녹아있는 5mM의 potassium-phosphate buffer(pH 8.0, Sigma 社) 90mL과 10mL의 toluene으로 rotary shaker에서 30분간 처리했다(250rpm, 37°C). 또 yeast는 위의 potassium-phosphate buffer 10mL과 acetone 90mL로 rotary shaker에서 5분간 처리했다(250rpm, 37°C). 처리된 균체와 yeast를 8000rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 후, 위의 potassium-phosphate buffer로 2-3회 세척하여 상온에서 10여분간 건조했다. 건조된 균체와 yeast를 1 : 4의 비율로 취하여, 2mL의 기질(Table 2)과 반응시키며, 1시간마다 sample을 취했다. 그 후 위의 DTNB용액을 첨가하여 6분간 발색반응을 유도하였다. 생성된 GSH의 양은 HPLC(Shimadzu 社)로 측정하였다.

2. 연구결과

가. LB 배지와 기존의 발효배지에서의 γ -GC 생산

복합배지의 일종인 LB배지를 이용하였을 경우와 기존의 발효배지를 이용하여 γ -GC를 생산하였고 그 결과를 Fig. 13에 나타내었다. Yeast extract를 함유한 LB배지의 경우 균체농도와 total activity가 가장 높게 나왔으며, 발효배지에서 사용하던 최소배지 역시 yeast extract를 함유하였을 경우, 균체농도와 total activity가 높았기 때문에 yeast extract의 효과가 중요함을 알 수 있었다.

그러나 복합배지의 경우 발효운전에는 적합하지 않고, yeast extract는 고가이며 그 조성 또한 복합배지의 일종이므로 이를 쓰지 않고도 균체농도와 total activity를 증가시킬 수 있는 방법을 모색하고자 하였다.

나. 아미노산의 첨가

발효에 사용되었던 최소배지(Figure에서는 minimal media로 지칭함)에 GSH 생산에 있어 기질로 작용하는 Glu, Cys, Gly를 첨가하였다. 각각의 아미노산의 농도를 변화시켜 첨가하였을 경우, 균체농도와 total activity의 변화를 Fig. 14에 나타내었다. 균체농도는 그 변화가 일정한 경향성을 보이지 않았으나, total activity의 경우, 일정한 경향성을 보였다. 즉, 일정농도에 비례하여 γ -GC의 생산이 증가하는 경향을 보였으며, 각각의 최적 농도는 50mM Glu, 10mM Cys, 50mM Gly로 나타났다. 도표로는 나타내지 않았으나, Glu의 경우 50mM 이상에서 더 이상 total activity가 증가하지 않았으며, Cys의 경우 5mM에서 최고치를, Gly의 경우 150mM에서 최고치를 나타내었다.

최소배지에 세 가지 아미노산을 각각 첨가하였을 경우, LB배지를 사용하지 않고

도 높은 activity를 나타내었으며, 균체농도는 더 이상 증가시키지 못하였다. 또한 yeast extract는 어느 정도의 양이 필요하리라 사료되었다.

다. 아미노산 농도의 최적화

각각의 아미노산을 첨가하였을 경우 total activity가 증가하였기 때문에, 3 factorial design[35]에 따라 아미노산의 농도를 변화시켜가며 그 영향을 알아보았다 (Table 3). 이전 실험에서 구한 각각의 아미노산의 최적치, 즉 50mM Glu, 5mM Cys, 그리고 150mM Gly을 혼합하여 첨가하여 실험하였다. 각각의 아미노산을 함께 첨가할 경우, 첨가한 아미노산들에 비례하여 total activity가 증가하는 결과를 보이지는 않았다. 또한 각각의 아미노산의 최적량을 첨가하였을 경우, 균체성장에 저해를 보였다. 그러나 각각의 아미노산을 최적치의 절반을 함께 넣은 경우 가장 나은 total activity를 보여서 실제 GSH생산량에서도, LB 배지에서 배양한 균체보다도 최고 30%정도의 향상을 보였다. 이의 결과로 보아 3가지 아미노산 사이에 서로 상호작용이 있을 것으로 예상되었으며, 특히 3가지 아미노산이 total activity에 일종의 상승작용(synergic effect)을 일으킨 것으로 사료된다. 즉, Glu, Cys, Gly이 균체 내의 plasmid에 대한 inducer로서 gene 발현에 어떠한 영향을 준 것으로 예상하고 있다.

라. 고농도 배양

위의 실험 결과를 바탕으로 고농도 배양 시에도 균체의 GSH생산이 상승작용을 일으키는지 알아보았다. 기존의 발효배지(Table 1)에서, 또 그 발효배지에 위의 실험에서 얻은 최적농도의 Glu, Cys, Gly을 첨가한 배지에서 균체를 고농도 배양하여 [32], 각각의 배양액에서 취한 균체의 GSH생산량을 LB배지에서 flask배양을 통해 얻은 균체의 GSH생산량과 비교하였고, Fig. 15에 나타내었다. 아미노산을 첨가하지 않은 경우의 GSH생산량은 LB배지에서의 flask배양시의 생산량의 20%정도였으나, 최적농도의 Glu, Cys, Gly을 첨가한 경우 그 생산량이 36%에 달했다. 하지만 Flask배양에서보다는 GSH의 생산량이 많이 떨어졌는데, 가장 큰 이유중의 하나는 널리 알려져 있듯이 재조합된 플라스미드를 갖는 균체의 경우, reversion이 일어나 균체의 활성이 많이 떨어지기 때문이라 생각된다. 그래서, 그 reversion을 줄이기 위해 기존의 Riesenberg에 의해 이용된 기질에서 ampicillin농도를 변화시켜가며 고농도 배양을 하였고, 그 결과 ampicillin농도를 기존의 10배로 하였을 때(Fig. 36), LB배지에서 flask배양하여 얻은 균체의 GSH생산량의 63%에 다달았다.

제 3절 γ -Glutamylcysteine 생산

1. 실험재료 및 방법

가. 균주 및 배지

본 연구에 사용한 대장균 균주는 고려대학교 농화학과에서 분양받은 HB101/pGH501으로 γ -glutamylcysteine synthetase를 coding하는 *gsh I* gene이 두 개를 pUC8 plasmid에 cloning한 후 숙주세포로 대장균 HB101에 형질전환시킨 재조합 대장균이다. 효모는 90%이상의 활성을 가지고 있는 건조 효모를 구입하여 사용하였다.

재조합 대장균은 LB 배지에서 배양하여 톨루엔으로 처리한 후 아세톤으로 처리한 효모와 혼합하여 γ -glutamylcysteine 생산을 하였다.

나. 톨루엔과 아세톤을 이용한 세포처리

반응물과 생성물이 세포내외로 이동하기 위하여 세포에 투과성을 주는 방법으로 다음과 같이 톨루엔과 아세톤으로 세포를 처리하였다.

재조합 대장균 5g을 10% 톨루엔과 0.5mM L-cysteine이 함유된 5.0mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 100mL에 현탁시킨 후 37°C에서 30분 동안 shaking 하면서 처리한다. 톨루엔으로 처리된 재조합 대장균은 4000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 침전시켜 얻은 후 같은 buffer로 두 번 씻어낸 후 사용한다. 이렇게 얻어진 재조합 대장균은 γ -glutamylcysteine synthetase와 acetate kinase의 source로 사용된다.

건조 효모는 0.85% 등장액 10mL에 현탁시킨 후 이 현탁액을 차가운 아세톤으로 처리된 효모는 4000rpm에서 5분동안 원심분리하여 침전시킨 후 0.5mM L-cysteine이 함유된 5.0mM potassium phosphate buffer, pH 7.0으로 두 번 씻어낸 후 사용한다. 아세톤으로 처리된 효모는 ATP 재생산 공정에서 glycolytic pathway의 source로 사용된다.

다. Alginate를 이용한 세포고정화

세포를 0.85% 등장액에 현탁시킨 것을 2% sodium alginate 용액과 섞은 후 잘 혼합시킨다. 공기방울의 제거를 위하여 혼합용액을 12시간동안 냉장 보관한다. 세포와 alginate의 혼합용액을 주사기를 통하여 0.1M CaCl₂ 용액(4°C)에 떨어뜨리면 직

경 1.5 cm 정도의 beads가 형성된다. Beads를 사용하기 전에 0.85% 등장액으로 충분히 씻어준 후 사용하였다.

라. 분석

(1) 흡광 분석법

시료 0.1mL를 취하여 0.2mM diethylene-triamine-pentaacetic acid(DTPA)와 0.025% lubrol이 포함된 200mM potassium phosphate buffer, pH 7.8, 0.8mL과 잘 섞어준다.

이 용액에 12mM chromogenic reagent 0.05mL를 넣고 잘 섞은 후 30% aqueous sodium hydroxide 용액 0.05mL를 넣고 25°C에서 10분 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 후 400nm에서 흡광도를 측정하여 γ -glutamylcysteine을 정량분석한다.

(2) HPLC를 이용한 방법

γ -Glutamylcysteine을 분석하기 위하여 아미노산 분석방법인 OPA방법을 사용하였다. 아미노산과 γ -glutamylcysteine의 분석은 HPLC(오름 테크)를 사용하였다. Column은 Beckman C-18(250 x 4.6mm)를 사용하였고 0.05M acetate buffer, pH 6.8과 methanol을 사용하였으며, flow rate 0.8mL/min의 속도로 용리시켰다. 농도 측정은 fluorescent detector(Gilson)를 이용하여 파장 excitation 345nm, emission 450nm에서 실시하였다.

2. 연구결과

가. 대장균을 이용한 ATP 재생산 공정

γ -Glutamylcysteine 생산공정에서 보조인자 역할을 하는 $MgCl_2$ 와 potassium phosphate buffer의 농도에 대하여 실험을 하였다. 60mM L-glutamic acid, 20mM L-cysteine, 20mM ATP와 여러 농도의 $MgCl_2$ 와 potassium phosphate buffer의 2mL mixture에 toluene으로 처리된 재조합 대장균 200mg (wet weight)을 넣고 37°C에서 2시간 반응시켰다. $MgCl_2$ 가 20mM일 때와 potassium phosphate buffer가 50mM일 때 많은 γ -glutamylcysteine가 생산됨을 보였다.

γ -Glutamylcysteine 생산공정에 쓰이는 톨루엔으로 처리된 재조합 대장균의 양

은 반응액 1mL당 100mg이면 충분한 것으로 나타났다. 반응이 끝난 후 γ -glutamylcysteine의 농도가 5mg/mL가 되면 cysteine이 100% γ -glutamylcysteine으로 환원된 것이다. 대장균 내의 acetate kinase를 이용한 ATP 재생산 공정을 통한 γ -glutamylcysteine 생산을 실험했다. 먼저 acetyl phosphate의 농도에 따른 γ -glutamylcysteine의 생산량을 보기 위하여 60mM glutamic acid, phosphate buffer와 여러 농도의 acetyl phosphate 2mL mixture에 재조합 대장균 200mg을 넣고 37°C 실험하였을 때 acetyl phosphate는 40mM의 농도에서 cysteine이 거의 100%의 전환율을 보였다.

톨루엔으로 처리된 재조합 대장균의 반응계의 생산 안정성을 살펴보기 위하여 기질을 넣고 37°C에서 2시간동안 반응시켰다. 이 실험이 끝난 후 4000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 대장균만을 취한 후 이 대장균을 사용하여 같은 실험을 반복하였을 때 5번 사용 후 활성이 30%정도 감소함을 보였다.

나. 효모를 이용한 ATP 재생산 공정

재조합 대장균에서 γ -glutamylcysteine을 생산하고 효모내의 해당과정을 통하여 ATP를 재생산하는 공정으로 γ -glutamylcysteine의 생산을 실험하였다. 재조합 대장균 200mg과 여러 농도의 효모를 37°C에서 8시간동안 반응시켰다. 재조합 대장균과 효모를 1:3-4로 하였을 때 γ -glutamylcysteine가 가장 높은 생산성을 보였다. 재조합 대장균과 효모를 1:3으로 하고 glucose의 농도를 0.5M로 하였을 때 8시간의 반응으로 최대의 γ -glutamylcysteine을 얻었다. 실험결과는 재조합 대장균만을 사용하여 γ -glutamylcysteine 생산과 ATP의 재생산을 수행했을 때보다 20% 정도의 생산량이 감소되었음을 보여준다. 이는 재조합 대장균에서 γ -glutamylcysteine를 생산하면서 사용된 ATP가 효모에서 재생산되어 생긴 ATP가 γ -glutamylcysteine 합성되는 곳과 compartmentalization 때문으로 설명된다.

재조합 대장균과 효모의 혼합세포계를 이용하여 γ -glutamylcysteine의 생산과 ATP의 재생산을 동시에 수행하는 공정의 안정성을 살펴보았다. 재조합 대장균 200mg과 아세톤으로 처리된 효모 600mg을 넣고 37°C에서 반응하며 6시간동안 반응시켜 주었다. 반응이 끝난 후 4000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 재조합 대장균과 효모를 얻은 후 이 세포들을 다시 같은 조건하에서 반응시켜 이 혼합 반응계의 안정성을 살펴보았다. 이 경우에 대장균만을 반응계로 사용할 경우보다 낮은 35% 정도의 활성도를 나타내었다.

다. Alginate로 고정화된 대장균의 특성

Alginate를 이용하여 톨루엔으로 처리된 재조합 대장균을 고정화하여 실험하였을 때 γ -glutamylcysteine의 생산성의 변화와 안정성에 대하여 실험하였다. 고정화에 따른 γ -glutamylcysteine 생산의 최적 반응시간을 알아내기 위하여 beads를 만들고 기질을 넣고 5시간 반응을 하였다. 이는 같은 조건하에서 고정화하지 않고 재조합 대장균을 반응시켰을 때보다 반응시간이 2시간 정도 더 걸렸음을 보여 준다. 이러한 결과는 재조합 대장균이 alginate에 의해 반응물의 이동이 저해를 받는 것으로 해석된다. Alginate 용액의 농도를 0.5-3%까지의 bead를 만들어 γ -glutamylcysteine의 생산성을 살펴보았을 때 큰 차이가 없었음을 보였다.

고정화된 재조합 대장균의 안정성을 조사하기 위하여 기질에 고정화된 재조합 대장균 1g을 넣고 37°C에서 4시간동안 반응시켰다. 4시간 후 용액을 제거하고 반응에 사용된 bead를 같은 조건하에서 반응시켰다. 이때의 안정성은 고정화하지 않았을 때보다 증대되어 5번 사용했을 때 15%정도의 활성이 감소하였다.

라. Alginate로 고정화된 대장균과 효모의 혼합 세포계

재조합 대장균과 효모의 혼합 세포 반응계를 alginate로 고정화하였을 경우 γ -glutamylcysteine의 생산이 최대가 되는 세포의 비율은 1:4이고 반응시간은 10시간 정도로 나타났다. 재조합 대장균과 효모의 고정화된 혼합 세포계의 안정성을 조사하기 위하여 10시간 후 반응이 끝난 용액을 제거하고 반응에 사용된 bead를 위와 같은 조건하에서 반응시켰다. 5번 재 사용했을 때 25%의 활성이 감소하였다. 실험 결과는 재조합 대장균만을 고정화했을 경우와 동일하게 반응계의 안정성이 증가되는 것을 알 수 있었다. 반응시간이 전체적으로 4시간 길어졌음에도 안정성이 10% 증가되는 것으로 보아 연속생산에 있어서는 고정화 세포계가 유리함을 알 수 있었다.

제 4절 글루타치온 생산

효소를 이용한 공정에서, 특히 여러 가지 효소를 이용하는 생산에서 ATP는 조효소 및 energy를 공급하는데 필요하며, 초기의 ATP 공급량을 최소화하여 연속적으로 ADP에서 ATP로 전환하는 재생산계의 이용이 중요시되고 있다[36]. 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, 효

모의 해당작용을 이용하는 방법, *cyanobacterium*의 광합성을 이용하는 방법 등이 알려져 있다.

글루타치온의 생산에 사용되는 기질 중에서 cysteine은 글루타치온 생산과정에서 불안정성을 보여 주고있다[37]. Cysteine이 글루타치온으로 100% 전환되지 못하고 cysteinyl-cysteine, glutamyl-2(cysteine) 등 글루타치온의 유사물질로 전환되고 있는 것으로 보인다. 이와 같이 cysteine이 최종 산물로 전환되지 못하고 타 물질로 전환되는 것을 막기 위해서는 기존의 회분식 반응기보다는 주기적으로 cysteine을 공급[38]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. 또한 aerated slurry bioreactor를 이용해서 연속반응기에서의 글루타치온 생산을 수행하였으며, 여러 종류의 고정화 방법을 이용하여 글루타치온 생산을 시도하였다.

1. 현탁반응에서의 기질첨가에 의한 글루타치온생산

가. 실험재료 및 방법

(1) 균주 및 배양조건

본 연구에서 사용된 균주는 *E. coli* TG1/pDG7a[11]로 재조합된 플라스미드 pDG7a는 총 길이 9.4kb이며 pBR322기원의 vector에 GSH-I을 생산하는 *gsh I* gene과 GSH-II[39]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 250rpm, 37°C에서 배양을 수행하였다.

(2) 글루타치온 생산공정 및 방법

재조합 대장균과 빵효모의 세포막을 유기용매로 처리하여 각각의 세포막을 통한 물질전달을 원활하게 하였다[40, 41]. Seed culture와 main culture에서 각각 9시간 씩 균체를 배양한 후, 8000rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하여 균체만을 얻는다. 균체 2g을 0.5mM cysteine을 녹인 5mM potassium phosphate buffer 90mL에 균일하게 혼합한 후 toluene 10mL 용액을 첨가하여 250rpm, 37°C에서 30분간 반응하였다. ATP 재생산체인 효모의 경우에도 4g의 빵효모가 녹아있는 등장액 20mL에 acetone 180mL를 혼합하여 250rpm, 37°C에서 5분간 반응하였다. 글루타치온 생산은 재조합 대장균과 빵효모의 혼합비율을 1:4로 하여 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 400mM 포도당에서 수행하였으며[33], pH 7.3을 유지하기 위해서 100mM potassium phosphate buffer를 사용하였다.

또한 세포 배양상에서의 글루타치온 생산을 비교하기 위하여 LB medium에 기질인 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 20mM glycine을 공급하여 배양상에서 *E. coli* TG1/pDG7a에 의해 생산된 글루타치온의 농도를 측정하였다[42]. 배양 후 원심 분리한 균체 0.4g을 4mL의 등장액에 넣고 1분 30초 동안 초음파로 세포를 파괴시킨 후, 원심 분리하여 상등액을 여과과정을 거쳐 HPLC로 분석하였다.

(3) 분석

글루타치온, cysteine 및 γ -glutamylcysteine의 분석에는 HPLC를 이용하는 DTNB 분석방법을 사용하였다. DTNB(100mM)와 DTE(200mM)를 시약으로 사용하여 여과 처리된 시료를 5분간 전처리하여 분석하였다[43]. 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(250×4.6mm, Regis)를 사용하였으며[44], UV detector(Waters 480, Waters)는 파장 280nm에서 분석하였다. 분석 전개용매로는 230mM ammonium formate solution(pH 5)과 메탄올(HPLC grade, Fisher)을 사용하여 시간에 따른 농도의 변화를 주었으며 전개 용액의 유속은 1.5mL/min으로 하였다.

나. 연구결과

(1) 글루타치온의 최적 생산 조건

재조합 대장균에 의해서 발현된 효소[32]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. 17)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.

(2) 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 해당과정에 의해 ATP가 재생산된다. 포도당의 농도를 100, 200, 400mM로 사용하여 글루타치온의 생산 농도를 측정했을 때 반응 4시간 후에 각각의 글루타치온의 생산농도는 5.88, 5.77, 5.21mM을 나타내었고, 포도당을 공급하지 않은 반응에서는 3.27mM을 나타내었다(Fig. 18). 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.

(3) ATP의 초기 공급농도가 글루타치온 생산에 미치는 영향

ATP의 재생산계로서 빵효모를 사용하였다. 재조합 대장균과 빵효모 및 cysteine, glutamic acid, glycine, $MgCl_2$ 를 넣은 반응계와 빵효모 만 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, 20mM로 하여 실험을 수행하였다. 초기 ATP 농도가 20mM로 유지된 경우는 재조합 대장균과 빵효모의 혼합세포계에 의한 글루타치온 생산농도와 재조합 대장균에 의한 글루타치온 생산농도가 약 12mM로 거의 동일하였는데 이는 글루타치온 생산에 절대적으로 필요한 ATP가 과량으로 반응기에 공급됨으로서 빵효모에 의한 ATP의 재생산 여부를 관찰하기에 부적절했던 것으로 사료되었다. ATP의 초기 공급농도를 10mM로 감소시켰을 때,

혼합세포계의 글루타치온 농도가 재조합 대장균만 사용한 반응계보다 약 2mM 정도 더 생산되었다(Fig. 19). 글루타치온의 농도 2mM은 ATP의 재생산된 농도 4mM에 해당하며, 산물로의 전환율은 51%이었다. ATP 초기 공급 농도가 5mM일 때, 혼합세포계와 대장균만의 반응계에서의 글루타치온 생산에는 큰 차이가 없었으며(Fig. 20), 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 10mM로 하고 2시간 후에 10mM을 추가 공급한 결과, 글루타치온 농도가 4mM 증가되었다(Fig. 21). 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 1mM에 이르렀으나 재조합 대장균만의 반응계에서는 글루타치온 및 γ -glutamylcysteine은 생산되지 않았다. 또한 포도당과 ATP를 넣지 않은 혼합세포계에서는 글루타치온이 생성되지 못함으로써 초기에 빵효모에 존재하는 ATP는 글루타치온 생산에 거의 영향을 미치지 않고 있음을 확인하였다[1]. 또한 Fig. 18에서 포도당 농도가 0mM에서 100mM로 증가함에 따라 글루타치온의 생산농도가 증가함을 볼 때, 반응계 내에 외부에서 공급한 ATP가 없음에도 불구하고 빵효모의 해당 과정에 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.

(4) 기질의 중간 첨가에 의한 글루타치온 생산

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

응 3시간 때 12.21mM로 증가하였다(Fig. 21). Cysteine의 첨가가 없는 생산에서는 반응 2시간 이후에 cysteine이 완전히 소모되어 글루타치온 농도가 증가되지 못하였으며, 다른 두 아미노산은 cysteine보다는 안정성을 유지하면서 용액 내에 존재하는 것으로 사료된다. 또한 빵효모에 의한 ATP 재생산계는 정상적으로 작동되고 있음을 확인할 수 있었다. 두 번째로 ATP만을 제외한 초기 기질을 글루타치온 생산 반응 2시간 때 공급했을 경우, 글루타치온 생산농도는 2시간에서 8.10mM, 3시간에서 12.11mM, 5시간에서 13.21mM로 증가하였다(Fig. 22 a)). 반응 2시간에서 ATP 추가 공급없이 글루타치온의 생산이 증가한 결과로부터 ATP 재생산계가 작동하고 있음을 다시 확인할 수 있었다. 마지막으로 5mM ATP를 포함한 초기 기질을 반응 2시간 때에 공급했을 경우, 반응 2시간에서 5.99mM, 3시간 때 12.37mM, 4시간에서 14.24mM로 증가하였다(Fig. 22 b)). 반응 2시간 후에 5mM ATP를 포함한 모든 기질이 공급되었는데도 글루타치온은 일정 생산 농도이상으로 더 이상 증가하지 않았다. GSH-I은 글루타치온의 농도가 10mM에서 효소 활성이 50%감소하는 것으로 알려졌다[12]. 따라서 글루타치온의 농도가 14mM 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 10mM cysteine을 첨가하여 글루타치온 생산을 관찰하였다. 반응 2시간에서 글루타치온 생산농도는 5.63mM이며, 4시간 때 12.19mM, 6시간에서는 13.86mM로 증가하였다(Fig. 23 a)). 첫 번째 cysteine 추가공급에 의한 글루타치온의 증가된 농도는 6.90mM이고 두 번째의 cysteine 추가공급에 의한 글루타치온의 증가된 농도는 1.67mM로 나타났다. 이 결과로 Fig. 22에서 확인한 고농도(14mM) 이상의 글루타치온에 의한 글루타치온 생산저해로 해석할 수 있다. 초기 5mM의 ATP를 사용하고 빵효모를 사용하지 않은 재조합 대장균에 있어서 2시간에서 cysteine을 공급한 결과, ATP 재생산계를 사용한 혼합세포계에 비해 낮은 글루타치온 생산을 보였다(Fig. 23 b)). 글루타치온 생산농도는 2.2mM로 재생산계를 사용했을 때보다 현저히 낮으며, cysteine 첨가 후에도 글루타치온의 생산농도가 증가하지 않았다.

(5) Acetate Kinase와 빵효모의 ATP 재생산계 비교

빵효모와 acetate kinase의 ATP 재생산 능력을 비교하기 위하여 acetate kinase를 사용한 글루타치온 생산을 수행하였다. ATP 재생산계로 빵효모를 사용한 혼합

세포의 경우 글루타치온의 cysteine에 대한 생산 수율이 80%인데 비하여 acetate kinase의 경우 98%에 이르고 있다(Fig. 24). 이것은 빵효모를 이용한 혼합세포의 경우는 acetate kinase를 이용한 경우보다 보다 혼합세포 사용에 따른 물질전달의 제약으로 반응물의 산물로 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 대량생산 시 경제성의 측면에서 유리할 것으로 판단된다. 빵효모 와 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858의 글루타치온 생산능 비교

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. 25). 기질은 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 400mM 포도당 및 10mM ATP로 하였다. 빵효모를 사용한 혼합세포계는 글루타치온의 최고농도가 11.3mM이었고, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858을 사용한 혼합세포계는 4.4mM이었으며, 재조합 대장균만을 사용한 경우는 9.9mM이었다. 빵효모를 사용한 혼합세포계의 글루타치온 농도는 재조합 대장균만을 사용한 경우보다 1.4mM 증가되었다. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858을 사용한 혼합세포계의 글루타치온 농도는 재조합 대장균만을 사용한 경우보다도 낮았으며, 이는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858 내에 해당과정을 수행하는 효소이외에 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 반응계로부터 회수, 초기 반응 시 cysteine의 급격한 감소 방지 등이 해결되어야 한다.

2. Sequential batch & Aerated Slurry Bioreactor를 이용한 글루타치온생산

본 연구에서는 재조합 대장균과 빵효모의 해당작용을 이용하여 글루타치온 생산을 시도하였으며, 현탁반응에서의 생산에 기초하여 반 연속반응기인 sequential batch를 이용하여 글루타치온을 생산하였고, 연속반응기인 aerated slurry bioreactor를 이용한 글루타치온생산을 연구하였다.

가. 실험재료 및 방법

(1) 균주 및 배양조건

본 연구에서 사용된 균주는 *E. coli* TG1/pDG7a[11]로 재조합된 플라스미드 pDG7a는 총 길이 9.4kb이며 pBR322기원의 vector에 GSH-I을 생산하는 *gsh I* gene과 GSH-II[39]를 생산하는 *gsh II* gene이 2:1의 비율로 플라스미드에 삽입되어 있다. Promoter는 *tac* promoter를 사용하였으며 ampicillin 내성 유전자가 존재한다. ATP 재생산제로는 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 250rpm, 37°C에서 배양을 수행하였다.

(2) 글루타치온 생산공정 및 방법

(가) Sequential batch

재조합 대장균과 빵효모의 세포막을 유기용매로 처리하여 각각의 세포막을 통한 물질전달을 원활하게 하였다[40, 41]. Seed culture와 main culture에서 각각 9시간씩 균체를 배양한 후, 8000rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하여 균체만을 얻는다. 균체 2g을 0.5mM cysteine을 녹인 5mM potassium phosphate buffer 90mL에 균일하게 혼합한 후 toluene 10mL 용액을 첨가하여 250rpm, 37°C에서 30분간 반응하였다. ATP 재생산체인 효모의 경우에도 4g의 빵효모가 녹아있는 등장액 20mL에 acetone 180mL를 혼합하여 250rpm, 37°C에서 5분간 반응하였다. 글루타치온 생산은 재조합 대장균과 빵효모의 혼합비율을 1:4로 하였으며, 대장균은 0.6g, 빵효모의 경우는 2.4g을 사용하였다. 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 400mM 포도당의 기질을 사용하였으며[33], pH 7.3을 유지하기 위해서 100mM potassium phosphate buffer를 사용하였다.

Sequential batch를 이용한 글루타치온 생산은 반응부피가 6mL이었고, 반응온도 37°C, 교반은 rotary 배양기에서 250 rpm으로 연구를 수행하였다. 반응 2시간마다 시료를 채취하여 원심분리기(한일공업사, HMR-160)를 이용하여 혼합세포 3g을 얻

은 후 다시 기질 6mL를 넣고 충분히 혼합하여 반응기에서 생산하였다. 원심분리한 후 상등액 50 μ L를 시료를 채취하여 20배로 희석시킨 후 또 다시 원심분리한다. 원심분리한 상등액을 20 μ L를 취하여 HPLC를 이용하여 cysteine, γ -glutamyl-cysteine 및 글루타치온을 분석하였다.

(나) Aerated slurry bioreactor

Aerated slurry bioreactor에서 재조합 대장균의 세포막을 톨루엔과 5mM potassium phosphate buffer이 1:9로 혼합된 용액으로 처리한다. 또한 빵효모는 아세톤과 등장액이 9:1로 혼합된 용액으로 처리한다. 이것은 유기용매로 처리하여 각각의 세포막을 통한 물질전달을 원활하게 하였다[40, 41]. Seed culture와 main culture에서 각각 9시간씩 균체를 배양한 후, 8000rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하여 균체 만을 얻는다. 균체 2g씩 3개의 flask에 0.5mM cysteine을 녹인 5mM potassium phosphate buffer 90mL에 균일하게 혼합한 후 toluene 10mL씩 용액을 첨가하여 250rpm, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응하였다. ATP 재생산체인 효모의 경우에도 5g씩 2개의 flask를 준비하여 빵효모를 각각 등장액 20mL으로 녹인 후 acetone 180mL를 혼합하여 250rpm, 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하였다. 각각 반응이 끝난 후 원심분리기를 이용하여 4500g에서 10분간 원심분리하여 각각 균체를 얻었다. 글루타치온 생산은 재조합 대장균과 빵효모의 혼합비율을 1:4로 하였으며, 대장균은 4.0g, 빵효모의 경우는 16g을 사용하였다. 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 400mM 포도당의 기질을 사용하였으며[33], pH 7.3을 유지하기 위해서 100mM potassium phosphate buffer를 사용하였다.

Aerated slurry bioreactor 이용한 글루타치온 생산에서 반응부피는 80mL, water jacket를 이용하여 온도를 37 $^{\circ}$ 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 보인다. 이러한 점을 보완하기 위해서 반응기내에 직경이 1.5cm인 관을 장착함으로써 세포의 유출을 최소한으로 줄일 수 있었다. 공기의 공급속도는 100mL/hr이었고, 기질의 공급 속도는 2.6, 5.2, 10.4mL/hr로 하여 실험을 시도하였다. 또한 세포의 회수 및 재사용을 위하여 원심분리기(한일공업사, HMR-160)를 이용하였으며, 4500g에서 5분간 작동하여 매시간 세포를 순환시켰다. 매시간마다 50 μ L를 시료를 채취하여 20배로 희석시킨 후 또 다시 원심분리한다. 원심분리한 상등액을 20 μ L를 취하여 HPLC를 사용한 DTNB 분석방법을 이용하여,

Cysteine, glutathione, γ -glutamylcysteine을 분석하였다.

(3) 분석

글루타치온, cysteine 및 γ -glutamylcysteine의 분석에는 HPLC를 이용하는 DTNB 분석방법을 사용하였다. DTNB(100mM)와 DTE(200mM)를 시약으로 사용하여 여과 처리된 시료를 5분간 전처리하여 분석하였다[43]. 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 Symmetry C18 5 μ m(250 \times 4.6mm, Waters)를 사용하였으며[44], UV detector(Waters 480, Waters)는 파장 280nm에서 분석하였다. 분석 전개용매로는 230mM ammonium formate solution(pH 5)과 메탄올(HPLC grade, Fisher)을 사용하여 시간에 따른 농도의 변화를 주었으며 전개 용액의 유속은 1.5mL/min으로 하였다.

나. 연구결과

(1) Sequential batch에 의한 글루타치온생산

재조합 대장균(0.6g)만을 톨루엔으로 처리하여 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 및 10mM ATP를 이용하였으며 반응시간은 2시간이었다. 2시간 반응 후 원심분리하여 상등액은 시료를 채취한 후 제거하고 균체에 6mL의 새로운 기질을 넣고 반응을 시켰다. 이 실험을 진행한 결과 34시간동안 12 batch동안 글루타치온의 생산농도는 일정하게 4.6mM을 유지함을 보였고, γ -glutamylcysteine는 1.5mM을 유지하였다. 하지만 cysteine의 경우에는 첫 번째 batch인 반응 2시간에 0.5mM로 낮았으나 4번째 batch인 8시간까지는 점점 증가함을 보이다가 다시 점차 감소하여 6번째 batch인 22시간 때에서부터는 일정한 농도를 유지함을 보였다. 이 실험의 결과로 단일세포계인 재조합 대장균에서의 글루타치온 생산은 34시간 12 batch동안 유지됨을 보였으며, 효소의 글루타치온 생산에 안정성을 보여주었다(Fig. 26).

재조합 대장균(0.6g)과 빵효모(2.4g)를 이용한 혼합세포계의 경우, 기질로 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 및 10mM ATP와 400mM 포도당이 사용되었다. 포도당은 혼합세포계에서 중요시되는 ATP 재생산체인 빵효모의 해당과정에 필요하다. 혼합세포의 경우, 글루타치온은 첫 번째 batch인 2시간부터 증가하여 두 번째 batch인 4시간 때에서 8mM의 농도를 나타내었다. 이

2시간부터 증가하여 두 번째 batch인 4시간 때에서 8mM의 농도를 나타내었다. 이 농도는 4시간동안 유지되었으며, 4번째 batch인 8시간 이후부터 감소하기 시작하여 22시간 이후에는 5mM이하로 감소하였다. 24시간이후에서는 1mM 정도를 나타내었다. γ -glutamylcysteine의 경우도 26시간이후에는 생산이 되지 않음을 보여주었다. 또한 cysteine의 농도 변화도 10시간까지는 점차 감소하다가 10시간이후에서 증가함을 보였다(Fig. 27). 이 실험결과에서 혼합세포를 이용한 경우, 10시간이내에 글루타치온 생산에 더 우수함을 보였다. 그러나 10시간 이후에 오히려 단일세포계보다 글루타치온 농도가 낮아짐을 보였다. 이러한 현상은 Fig. 26에서 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 1g 씩 글루타치온 생산 과정 6batch(21시간), 7batch(23시간), 11batch(41시간), 12batch(43시간), 13batch(45시간)에 공급하였다(Fig. 28). 글루타치온 농도는 2시간에서 가장 높았으며, 점차 글루타치온 농도가 감소함을 보였다. 21시간과 23시간에서 새로운 빵효모 1g씩을 추가공급을 했을 경우 글루타치온 농도가 증가함을 보였다. 41시간이후에는 새로운 빵효모를 추가 공급하여도 증가하지 않음을 보이는 것은 재조합 대장균 및 빵효모의 효소의 활성이 감소함을 보여주었다. γ -Glutamylcysteine 농도는 25시간이후에는 모두 글루타치온으로 전환됨을 보였다. Cysteine의 농도도 19시간이후에서 점차 증가함을 보이다가 21시간과 23시간의 새로운 빵효모의 추가 공급이 있는 후 소량 감소함을 보였으며, 이는 cysteine이 γ -glutamylcysteine나 글루타치온으로 전환됨을 보여주었다. 41시간 이후에 점차 증가함을 보이는 것은 cysteine의 γ -glutamylcysteine와 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 5mM 내외에서 유지하였다. Sequential batch 실험은 연속반응기인 aerated slurry bioreactor에서 글루타치온을 연속적으로 생산하는 기초실험이 되었다.

(2) Aerated Slurry Bioreactor

E. coli TG1/pDG7 α 와 빵효모는 혼합세포계로서 *E. coli* TG1/pDG7 α 글루타치온을 생산하고 빵효모는 글루타치온 생산에 필요한 ATP를 재생산하는데 관여한다. 글루타치온을 생산하는 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase는 모두 세포 내에 존재하는 효소이므로 효소적 방법에 의한 생산은 난점이 있다. 본 연구에서는 이러한 세포 내 존재하는 효소를 세포의 파괴와 효소의 정제없이 유기용매를 이용하여 세포막의 물질전달을 세포내외로 원활하게 함으로서 효소를 이용한 글루타치온 생산을 가능하게 하였다. 이러한 장점을 이용하여 현탁상태에 고농도의 재조합 대장균과 빵효모를 aerated slurry bioreactor를 이용하여 글루타치온을 생산을 시도하였다(Fig. 29). 본 실험에서 교반은 stirrer에 의해서 보다는 기체를 이용한 교반을 함으로서 세포 및 효소활성을 유지하였다. 또한 효소는 세포 내에 존재하기 때문에 유실되는 세포를 회수공정을 통하여 재 사용할 수 있었다. 또한 sequential batch에서 재조합 대장균의 활성의 안정성을 실험을 기초로 본 실험을 수행하였다.

(가) 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 4500g에서 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 2.6mL/hr에서는 42시간에서 현탁반응보다 낮아짐을 보였다(Fig. 30). 글루타치온 농도는 반응기 운전 5시간에 8.3mM이었고 6시간에서 10.1mM에 이르렀다. 반응기 운전 20시간이후에서부터 글루타치온 농도가 점차 낮아지고 있음을 보였다. 42시간에서 글루타치온 농도가 4.5mM을 나타냈다. 이 농도는 이 실험의 현탁반응의 농도와 같은 농도이었다. 이 반응기에서는 세포를 회수공정이 없었으므로 시간에 따라 세포가 유출됨을 보였다. 반응 24시간에 유실된 세포량은 5.19g이었으며, 반응기 내에 존재하는 세포량은 13.96이었다. 반응기 운전 48시간에서의 유실된 세포량은 11.47g이었으며, 반응

기내에 존재하는 세포량은 7.58g이었다. 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 5.2mL/hr에서는 22시간에서 현탁반응보다 낮아짐을 보였다(Fig. 31). 글루타치온 농도는 반응기 운전 2시간에 8.6mM에 도달했고 최고 농도는 반응기 운전 9시간에서 13.1mM이었다. 그러나 글루타치온 농도가 급격히 감소함을 보였다. 반응기 운전 22시간이후에는 현탁반응에서의 글루타치온 농도 4.6mM보다 낮았다. 또한 cysteine의 농도 변화가 기질공급속도 2.5mL/hr의 반응기보다 급격히 증가함을 보였다. 이는 반응기 운전시간에 따른 세포의 유실량으로 설명을 할 수 있다. 반응기 운전 24시간에 유실된 세포량은 13.18g이었으며, 반응기내에 존재하는 세포량은 6.10g이었다. 또한 반응기 운전 48시간에서 유실된 세포량은 16.35g이었고, 반응기내에 존재하는 세포량은 2.93g이었다. 이 반응기의 경우는 세포의 유실이 가장 큰 글루타치온 농도 감소의 원인임을 알 수 있다. 결과적으로 기질공급속도를 2배로 증가시켰을 때 반응기 운전시간은 반정도로 감소함을 보였다.

혼합세포계를 이용한 aerated slurry bioreactor에서 기질공급속도가 5.2mL/hr이며, 회수 및 재사용이 적용된 실험에서는 회수공정이 적용되기 전 글루타치온생산의 차이를 조사하였다(Fig. 32). 반응기 운전 4시간에서 6.1mM이었고, 6시간에서 8.0mM에 도달했다. 세포가 유실되는 Fig. 31보다는 글루타치온 농도의 감소가 완만함을 보였다. 32시간에서 현탁반응에서의 글루타치온 농도와 같은 농도를 보였다. Cysteine의 농도도 Fig. 31보다는 완만하게 증가함을 보였다. 글루타치온 생산시간이 세포를 회수하여 재사용하기 전보다 10시간 연장됨을 보였다. 혼합세포계를 이용하며, 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 및 10mM ATP와 400mM 포도당의 기질이 10mL/hr에서 4시간에 글루타치온 농도가 12mM에 이르렀고, 6시간에는 13.8mM에 도달했다. 세포유실이 매우 빠르게 진행되므로 세포를 회수하는 데 어려움이 있다. 20시간이후에 현탁반응에서의 글루타치온 농도인 7.1mM보다 낮아짐을 보였다(Fig. 33).

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 알아보았다. 글루타치온 생산에 sequential batch에서는 새로운 빵효모를 추가공급함으로써 글루타치온 농도

가 유지됨을 보였다(Fig. 34). 혼합세포계를 이용하였으며, 재조합 대장균은 4g이고 빵효모는 16g으로 반응이 시작되었다. 반응기 운전 11시간에 글루타치온이 감소됨을 보였기 때문에 빵효모를 5g을 추가공급하였다. 반응기 운전 21시간에 빵효모의 추가공급하였으나, 글루타치온 농도는 증가되지않고 유지되고 있음을 보였다. 반응기 운전 23시간이후에 글루타치온 농도가 다시 감소하기 시작하였으며, 29시간에 빵효모를 세 번째 5g을 추가공급하여 글루타치온 농도는 유지되지 못하고 점차 감소됨을 보였다. 반응기 운전 25시간에서 현탁반응에서의 글루타치온 농도 4.6mM와 같았다. 오히려 빵효모를 추가공급하지 않았을 때보다 글루타치온 생산 시간이 단축되었다. 이는 빵효모의 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 글루타치온의 생산시간은 단축됨을 보였으며, 결과적으로 단위 효소량에 의한 글루타치온의 총생산량은 크게 변하지 않는 것으로 나타났다. 하지만 Sequential batch의 경우와 달리 새로운 빵효모를 추가공급했을 경우에는 글루타치온 생산시간이 7시간 단축됨을 보였다.

(나) 계면활성제(Tween 80)를 이용한 글루타치온 생산

단일세포계에서 기질은 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 및 10mM ATP이며, 기질공급속도 5.2mL/hr에서 계면활성제가 *E. coli*의 글루타치온 생산시간에 미치는 영향을 실험하였다. 단일세포계에서 재조합 대장균만을 이용한 글루타치온 생산시간은 25시간에 현탁반응보다 낮아짐을 보였다(Fig. 35). 계면활성제는 Tween 80을 사용하였으며, 사용량은 20 μ L를 사용하였다. 계면활성제를 이용한 글루타치온 생산에서 기체공급속도는 100mL/min이었으며, 반응기 운전 6시간에 글루타치온 농도가 5.8mM을 나타내었으며, 반응기 운전시간 30시간까지는 글루타치온 농도가 5-6mM을 보였다. 반응기 운전시간 45시간에서 현탁반응 시 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)을 사용하여 글루타치온 생산시간을 재조합 대장균만을 사용한 경우, 25시간에서 45시간으로 연장시킨 결과를 얻었다(Fig. 36).

(다) 교반 기체가 글루타치온생산에 미치는 영향

Aerated slurry bioreactor의 경우 교반을 기체를 이용하였다. 단일세포계에서 기질은 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 및 10mM ATP이며, 교반기체로 공기를 사용하여 글루타치온 생산하였을 때 글루타치온 생산시간은 25시간동안 지속됨을 보였다(Fig. 35). 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 4.8mM을 나타내었으며, 6시간부터는 30시간까지는 글루타치온 농도가 5-6mM로 안정되었다. 반응기 운전 40시간이후에 현탁반응에서의 글루타치온 농도 4.5mM을 보였다. 단일세포계인 재조합 대장균만을 이용한 글루타치온 생산시간 25시간을 질소를 이용해서 aerated slurry bioreactor를 교반하여 40시간으로 연장시켰다(Fig. 37).

(라) Impeller와 기체에 의한 교반 비교

기체에 의한 교반이 혼합세포계 또는 단일세포계에서 적절한지를 비교연구하기 위해서 aerated slurry bioreactor와 같은 반응기에서 교반을 기체로 하지 않고 impeller를 이용해서 글루타치온을 생산하였다. 현탁반응에서는 rotary shaking을 이용하여 글루타치온을 생산 실험을 하였다. 충분한 교반을 위해서 impeller의 교반속도는 250 rpm으로 하였다. 기질은 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 및 10mM ATP와 400mM 포도당을 사용하였으며, 기질공급 속도는 5.2mL/hr로 하였다. Impeller를 이용한 교반에서의 글루타치온 생산은 반응기 운전 2시간에 6.3mM에 이르렀으며, 반응기 운전시간 10시간이후에 현탁반응에서보다 글루타치온 농도가 낮아짐을 보였다(Fig. 38). 이 실험의 결과로 impeller에 의해서 교반될 경우 혼합세포들이 손상을 입는 것으로 나타났다. 10시간이후에서는 파괴된 세포들이 반응기 바닥에 침강됨을 보였다. 결과적으로, 혼합세포계를 이용한 aerated slurry bioreactor(Fig. 39)에서 가장 적당한 교반방법은 기체를 이용한 방법임을 보였다.

3. 고정화 방법을 이용한 글루타치온 생산

가. 고정화 젤을 이용한 글루타치온 생산

(1) 실험재료 및 방법

(가) 균주 및 시약

Glutathione 생산에 사용된 재조합 대장균주 TG1/pDG7 α 는 고려대 농화학과로부터 제공받았다. 재조합 대장균주 TG1/pDG7 α 는 2개의 γ -glutamylcysteine synthetase(γ -GCS) coding gene, 1개의 glutathione synthetase(GSHS) coding gene을 포함한다. ATP 생산용 효모는 건조빵효모 (*Saccharomyces cerevisiae*, YSC-1, Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. Sodium glutamate, cysteine, glycine 그리고 ATP는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였으며, MgCl₂ · 6H₂O는 덕산제약 제품을 사용하였다. Ca-alginate bead 및 polyacrylamide gel 제조용 시약은 모두 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였으며, agar powder는 Junsei Chemical Co. 제품을 사용하였다. 분석용 시료는 모두 Sigma Chemical Co.의 HPLC 분석 시료 수준 제품을 이용하였다.

(나) 세포 배양 및 처리

재조합 대장균주를 배양하기 위하여 Luria-Bertani medium을 사용하였다. 접종량은 배지에 대하여 1%로 하였으며, seed culture 및 main culture를 250 rpm, 37°C에서 각각 10시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다. Selection marker로서 ampicillin을 50 μ g/mL LB medium의 농도로 접종시 함께 첨가하였다. 본 연구에 사용된 대장균 TG1/pDR7 α 는 glutathione을 세포외로 분비하지 않고 세포 내에 축적시킨다. 따라서 세포를 적절히 파쇄처리하여 기질의 물질전달 및 산물의 세포외 배출을 용이하게 할 필요가 있다. 대장균과 효모는 각각 다른 종류의 유기용매를 사용하여 상이한 조건에서 처리하는 것이 세포의 처리성 및 생산성면에서 좋은 것으로 알려져 있다. 배양된 대장균은 8000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 얻은 균체 약 2.0 g(wet wt.)를 90 ml의 5 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0, 0.5 mM cysteine)에 재현탁시켜 얻은 현탁액에 톨루엔을 10%(v/v)가 되도록 가한 후, 30분간 250 rpm으로 교반시켜 세포를 처리한다. 건조빵효모 4 g을 20 mL의 등장액에 현탁시킨 후, 저온의(4°C) 아세톤을 90%(v/v)가 되도록 가하여 5분간 250 rpm으로 교반하며 처리한다. 상기와 같이 처리한 각 세포현탁액을 8000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 대장균 및 효모를 얻은 후, 각각 5 mM potassium

phosphate buffer(pH 7.0, 0.5 mM cysteine)와 등장액으로 3회 세척하여 glutathione 생산실험에 사용한다.

(다) 세포 고정화

Glutathione 생산용 균체의 고정화를 위한 적절한 담체를 선별하기 위하여 Ca-alginate bead, polyacrylamide gel 그리고 agar gel 등의 담체에 균체를 고정화하여 그 효과를 살펴보았다. Sodium alginate solution(2%)에 대장균과 효모의 혼합균체 1 g(wet wt.)을 가하여 잘 혼합한 후, 주사기를 이용하여 세포가 혼합된 sodium alginate solution을 0.1 M CaCl₂ 수용액에 적하시키면 직경 2-3 mm의 bead가 만들어진다. 성형된 bead를 30분간 0.1 M CaCl₂ 수용액에 침지시켜 bead의 경도를 충분히 증가시킨 후 사용한다. Acryl amid gel에 고정화하기 위하여 균체 1 g(wet wt.)을 4 mL의 등장액에 현탁시킨 후, 그 현탁액에 acryl amide(단량체) 750 mg, N,N'-methylenbisacrylamide(가교제) 40 mg, 5 % β -dimethylamino-propionitrile (중합 촉진제) 0.5 mL, 2.5 % potassium phosphate (중합개시제) 0.5 mL을 hood 내에서 첨가한 후, 30분간 정치하여 경화시킨다. 앞의 과정에서 얻어진 고형물질을 등장액으로 2회 세척한 후, 한 변이 3 mm인 정육면체 형태로 절단하여 실험에 사용한다. 또한 agar gel의 경우, 100 mg의 agar를 등장액 7.5 mL에 현탁시켜 100°C에서 용해시킨 후, 50°C까지 냉각시킨다. 균체 1 g(wet wt.)을 1.25 mL의 등장액에 현탁시켜 얻은 액체를 50°C까지 가열하고, 앞서 준비된 50°C의 agar solution과 혼합하고 그 혼합액을 30분간 실온에서 경화시킨다. 경화가 끝나면 등장액으로 2회 세척한 후, 한 변이 3 mm인 정육면체 형태로 잘라내어 실험에 사용한다.

(라) Glutathione 생산

반응에 필요한 기질의 농도는 기존의 연구를 참고하였으며, 기질은 회분형 반응의 경우 6 mL의 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 용해시켜 사용하였다. 세 가지 아미노산 glutamate, cysteine 및 glycine은 각각 80 mM, 20 mM, 20 mM의 농도로 첨가하였다. cofactor로서 MgCl₂을 20 mM 그리고 ATP 생산 및 재생산을 위하여 400 mM의 glucose와 20 mM의 ATP를 함께 첨가하였다. 현탁반응기 및 고정화 회분반응기로써 30 mL cap vial을 사용하였으며 shaking incubator에서 37°C에서 200 rpm으로 교반하면서 반응시켰다. 연속적 생산을 위해서 길이 85 mm, 내경 14 mm, 부피 약 15 mL의 packed-bed column을 제작하였다. 기질용액은 상향류 방식으로 공급하였으며, 온도유지를 위해 반응기 외부에 water jacket을

부착하였다.

(마) 분석

Cysteine과 γ -glutamylcysteine 및 glutathione의 분석은 HPLC를 이용하였다. Solvent delivery system으로 dual pump system(LC-10AD, Shimadzu Co.)을 사용하였으며, 칼럼은 C18 column(250×4.6 mm, Regis Rexchrom, USA)을 사용하였다. Ammonium formate solution(0.023 M, pH 5.0) 및 methanol(HPLC grade) 등의 2 가지 전개용매를 시간에 따라 농도를 변화시켜 사용하였으며, 용매의 유속은 1.5 mL/min으로 하였다. 시료는 다음과 같이 전처리하였다. 시료 1 mL에 200 mM의 dithioerythritol(DTE) 0.025 mL 및 200 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 0.1 mL(1 M potassium phosphate buffer, pH 8.0)를 첨가하여 시료용액을 발색시킨 후, UV detector(SPD-10A, Shimadzu Co.)를 이용하여 파장 280 nm에서 시료용액의 흡광도를 측정하였다.

(2) 연구결과

(가) 세포 고정화 조건

균체를 고정화하기 위한 담체를 선별하기 위해 세 가지의 담체에 대하여 생산성을 비교하였다(Fig. 40). Ca-alginate bead 경우는 중간 산물인 γ -glutamylcysteine의 생산성은 좋은 반면, glutathione의 생산이 거의 없었으며 미지의 물질이 chromatogram 상에서 관찰되었다. 그 미지의 물질은 glutathione analogue로 사료되나, 그 물질의 생성 기작과 물질명은 명확하지 않다. 또한 polyacrylamide gel의 원료인 acrylamide는 인체독성을 갖고 있어 glutathione 생산용 담체로는 부적합한 것으로 사료된다. 결과적으로 세 가지의 담체 중에서 glutathione 생산성이 좋으면서도 인체에 무해한 agar gel을 선택하였다. Agar gel에 균체를 고정화할 경우 agar의 첨가량이 물질전달 제한을 일으킬 것으로 예상하여 agar의 첨가량을 조절하여 시험한 결과, 적절한 agar농도는 100 mg agar/4 mL 등장액이며 agar 농도가 높아질수록 glutathione 생산이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 agar의 첨가량을 증가시키면 격자의 조밀도가 높아져 격자 내부에서의 물질 전달 제한이 증가하기 때문인 것으로 사료된다. Agar gel에 균체를 고정화하기 위해서는 세포현탁액의 온도를 50°C까지 상승시켜야 한다. 이때 효소 활성을 잃을 가능성의 여부를 살펴보기 위하여 agar gel 고정화 조건과 같이 50°C에서 5분간 가열한 후 시험한 결과, 이러한 온도 상승은 glutathione 생산성에 큰 영향을 미치지

않는 것으로 보인다.

(나) 초기 cysteine 농도치 보정

고정화 담체의 void volume을 측정하여 기질의 초기농도치를 결정하는 것이 고정화 반응기의 수율 및 생산성의 계산에 있어서 중요하다. 따라서 담체의 void volume에 의해 희석되는 초기 cysteine 농도의 보정치를 구하였다. 균체가 없는 agar gel을 cysteine 수용액에 침지하여 일정시간 동안 교반 처리하였다. 이때의 용액상의 cysteine 농도, 초기 agar gel 부피, 반응 후 cysteine 농도 등을 측정하였으며, agar gel의 void volume을 다음 식에 의하여 계산하였다. 단, cysteine이 담체에 흡착되지 않고 확산현상에 의해서만 희석되는 것으로 가정하였다.

$$V_i \cdot C_i = (V_i + V_v) \cdot C_f \quad (1)$$

$$V_v + V_s = V_g \quad (2)$$

$$\varepsilon = V_v / V_g \quad (3)$$

V_i : initial volume of cysteine solution

C_i : initial concentration of cysteine

V_v : void volume of support

C_f : final concentration of cysteine

V_g : total volume of gel

V_s : volume occupied by gel material

실험에 의한 V_i , V_g , V_s , C_i , 및 C_f 는 각각 6.0 mL, 8.5 mL, 5.0 mL, 27 mM 및 17 mM이었으며, 이 자료로부터 계산한 agar gel의 void volume(V_v)은 total agar gel volume(V_g)의 41.5%(ε)인 것으로 나타났다.

(다) Glutathione 생산 조건

Glutathione의 생합성 반응을 위해 반응 시간, 첨가 균체 비율, 기질 농도, pH 완충용액의 종류, 기질 용액의 pH 및 반응 온도 등에 대하여 최적 조건을 조사하였다. 현탁반응 및 고정화 반응시의 적절한 시간은 glutathione 생산성 측면에서 보았을 경우 각각 2.5시간, 4시간으로 사료된다. 이 때 각 반응 형태에 따라 반응평형시간에 차이를 보이는 것은 고정화 반응의 반응속도는 물질 전달 제한에 영향을 받기 때문인 것으로 추측된다. 본 연구에서는 평형이 충분히 이루어진 후의

생산치를 구하기 위하여 각각 4시간, 8시간동안 반응시킨 결과를 이용하였다. 대장균과 효모의 첨가비율을 조절하여 본 실험에서 대장균 대 효모의 비율을 1:4로 할 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었고, 효모균을 사용하지 않는 경우는 glutathione의 생산이 거의 없는 것으로 보아 ATP 재생산이 거의 효모균에 의하여 이루어지고 있는 것으로 해석된다. 일정량의 대장균에 대한 효모의 혼합비율이 증가함에 따라(1:6 이상) 첨가 균체량 역시 증가하여, 반응시 담체가 원래의 형태를 유지하지 못하고 외력에 의해 쉽게 파쇄되었다. 고정화 반응시 물질전달 제한을 완화시키기 위해 기질의 농도를 현탁반응 시의 3배를 첨가하는 것이 생산성 면에서 가장 좋은 결과를 보였으며, 기질농도를 4배 이상으로 하면 glutathione 생산이 감소하는 경향을 보이는데, 이는 기질저해에 의한 것으로 추측된다. 해당계와 같은 ATP 재생산계의 경우, 반응이 진행될수록 기질의 산도가 낮아지게 되며, 결국 기질용액의 농도가 glutathione 생산 관련 효소의 최적 활성 pH 보다 낮아진다. 따라서 기질을 pH 완충용액에 용해시키므로써 이러한 영향을 줄일 수 있을 것으로 판단하여 pH 7.4의 여러 종류의 완충 용액을 실험하였으나, maleic acid buffer가 오히려 glutathione 생산 저해 경향을 보인 것을 제외하고는, 완충액의 종류에 별다른 영향을 받지 않는 것을 보였다. Tris buffer 및 Uni buffer는 각각 Tris(hydroxymethyl)aminomethane, HCl buffer 및 Universal buffer를 뜻한다. Glutathione 생산 시 기질을 pH 완충용액에 용해시켜 만든 기질 용액의 초기 pH는 4.8 정도로 본 효소계의 활성 pH 범위보다 낮은 값이다. 따라서 5 N NaOH를 사용하여 기질용액의 초기 pH를 조절해 가면서 실험하여 보았으며, pH 6.05에서 8.85의 범위가 생산에 적합한 초기 pH인 것으로 해석된다. Glutathione 생산 온도의 실험에서 반응온도의 상승은 생산성에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으며, 42°C 및 47°C에서 반응액 내에서 γ -glutamylcysteine이 검출되지 않는 이유는 일정 온도 이상으로 반응 온도를 상승시키는 것이 glutathione 생산에 있어서는 별 영향을 끼치지 않지만, DTNB 발색반응에 필요한 잔기가 실패되어 검출되지 않는 것으로 추측된다.

(라) 연속형 고정화 반응기 생산특성

회분식 현탁 반응기 및 회분식 고정화 반응기의 실험에서 얻은 자료를 기초로 연속형 반응기를 운전하여 glutathione 생산특성을 살펴보았다. 초기에 기질 용액을 고속으로 공급하여 반응기 내를 기질용액으로 채운 후, 기질용액을 평균유속 3.4 mL/hr(mean residence time, 4.1 hr)로 공급하였으며, 반응온도를 37°C로 유지하였다. 연속형 고정화 반응기에서는 산물용액상에서 중간산물인 γ -glutamylcysteine의

농도가 비교적 낮게 유지되는 경향을 보인다(Fig. 41). 이것은 예상한 바와 같이, 회분식 반응기에 비하여 glutathione과 ADP 등의 산물에 의한 되먹임 저해가 비교적 적어 중간산물의 축적없이 glutathione으로 빠르게 전환된 것으로 사료된다. 4시간까지는 glutathione의 생산이 증가하지만 4시간 이후에 glutathione의 생산이 감소하는 경향을 보이는데, 이는 운전 초기에 gel 표면에 약하게 고정되었던 세포들이 기질 용액상으로 씻겨나와 반응에 참여하지만, 4시간 이후에는 이러한 용액상의 세포들이 반응기 밖으로 유출되기 때문에 점차 glutathione 생산성이 일정해지는 것으로 사료된다. 또한 γ -glutamylcysteine 역시 4시간을 전후로 glutathione과 유사한 경향을 보이나 glutathione 보다 그 감소 경향이 더 큰 이유는 첫째, 씻겨 나와 반응에 참여하던 세포의 유출된 점, 둘째, 반응이 진행됨에 따라 반응 중간물질인 γ -glutamylcysteine이 glutathione으로 전환된 점을 들 수 있다.

(마) Glutathione 생산수율 및 생산성

회분식 현탁 반응기, 회분식 고정화 반응기 및 연속형 고정화 반응기에 관한 실험 자료를 이용하여 반응기 형태에 따른 glutathione 생산 수율 및 생산성을 구하였다. Table 1에서 알 수 있듯이 생산수율은 연속형 고정화 < 회분식 고정화 < 회분식 현탁 순으로 나타났고, glutathione 생산성은 회분식 현탁 < 고정화 회분식 < 고정화 연속식 순으로 나타났다. 이는 연속형 고정화 반응기의 경우, glutathione 생산시 되먹임 저해를 일으키는 산물이 반응기 내에 축적되지 않고 계속적으로 유출되기 때문에 결과적으로 glutathione 생합성 속도가 증가한 것으로 보인다. 연속형 고정화 반응기의 경우, 생산성은 증가한 반면, 수율은 대조군인 회분식 현탁형 반응기보다 낮은 경향을 보였다. 만일 기질의 residence time을 증가시켜 충분한 반응시간을 하도록 한다면 수율 역시 증가시킬 수 있을 것으로 예상되므로, 이를 확인하기 위해 효소 속도론 및 되먹임 저해에 관한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

나. Hollow-fiber를 이용한 글루타치온생산(Fig. 42)

현탁 반응기에서의 cysteine에 대한 글루타치온의 생산 수율은 65%이나, cysteine의 급격한 감소 해결 및 최적의 yeast의 ATP의 재사용계를 이용하여 글루타치온의 생산수율을 80%이상 얻을 수 있을 것으로 사료되며, 현탁반응에서 글루타치온의 최적화 공정을 고정화 반응기를 이용하여 현탁반응에서 글루타치온의 생산량이 유지되는 고정화 반응기의 설계 및 공정을 수행하여, 반응기의 scale-up으로 글루타치온의 대량생산을 시도하였다.

(1) 실험재료 및 방법

(가) 균주 및 배양조건

본 연구에서 사용된 균주는 *E. coli* TG1/pDG7a[11]로 재조합된 플라스미드 pDG7a는 총 길이 9.4kb이며 pBR322기원의 vector에 GSH-I을 생산하는 *gsh I* gene과 GSH-II[39]를 생산하는 *gsh II* gene이 2:1의 비율로 플라스미드에 삽입되어 있다. Promoter는 *tac* promoter를 사용하였으며 ampicillin 내성 유전자가 존재한다. ATP 재생산제로는 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 250rpm, 37°C에서 배양을 수행하였다.

(나) 글루타치온 생산공정 및 방법

Hollow-fiber를 이용한 글루타치온 생산에서 재조합 대장균의 세포막을 톨루엔과 5mM potassium phosphate buffer이 1:9로 혼합된 용액으로 처리한다. 또한 빵효모는 아세톤과 등장액이 9:1로 혼합된 용액으로 처리한다. 이것은 유기용매로 처리하여 각각의 세포막을 통한 물질전달을 원활하게 하였다[40, 41]. Seed culture와 main culture에서 각각 9시간씩 균체를 배양한 후, 8000rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하여 균체만을 얻는다. 균체 2g씩 3개의 flask에 0.5mM cysteine을 녹인 5mM potassium phosphate buffer 90mL에 균일하게 혼합한 후 toluene 10mL씩 용액을 첨가하여 250rpm, 37°C에서 30분간 반응하였다. ATP 재생산체인 효모의 경우에도 5g씩 2개의 flask를 준비하여 빵효모를 각각 등장액 20mL으로 녹인 후 acetone 180mL를 혼합하여 250rpm, 37°C에서 5분간 반응하였다. 각각 반응이 끝난 후 원심분리기를 이용하여 4500g에서 10분간 원심분리하여 각각 균체를 얻었다. 글루타치온 생산은 재조합 대장균과 빵효모의 혼합비율을 1:4로 하였으며, 대장균은 4.0g, 빵효모의 경우는 16g을 사용하였다. 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 400mM 포도당의 기질을 사용하였으며[33], pH 7.3을 유지하기 위해서 100mM potassium phosphate buffer를 사용하였다.

Hollow-fiber를 이용한 글루타치온 생산에서 ultrafilter는 독일의 gambro사의 제품을 사용하였다. Shell side volume은 109mL이고 lumen side volume은 65mL이었다. 또한 ultrafilter의 경우, fiber 수가 8000가닥이었다. *E. coli* 5g과 빵효모 20g을 ultrafilter의 lumen side에 채운 뒤 hollow-fiber를 수평으로 rotary 배양기에서 37°C, 200rpm으로 반응을 시켰다. Ultrafilter 반응기에서 flow rate은 25mL/hr로 유지하였고 기질의 체류시간은 4시간 20분이었다.

Microfilter의 경우, KIST의 지원을 받아서 사용하였으며 shell side volume은 12.3mL이고 lumen side volume은 4.7mL이었다. Microfilter의 경우, fiber 수는 100가닥이었다. *E. coli* 1g과 빵효모 4g을 ultrafilter 반응기와 마찬가지로 lumen side에 채워서 기질공급속도는 4.5mL/hr로 하였다. 기질의 체류시간은 2시간 44분이었다. Microfilter 반응기도 37°C, 200rpm에서 반응을 수행하였다. 기질 reservoir에서 ATP 및 cysteine 등 아미노산들이 수용액상에서 상온에서는 불안정함을 보임으로 냉장을 유지하였다. 또한 dead volume을 없애기 위해서 기질 공급관 및 반응기에 연결된 관을 최소한으로 줄였다. 매시간마다 50 μ L를 시료를 채취하여 20배로 희석시킨 후 또 다시 원심분리한다. 원심분리한 상등액을 20 μ L를 취하여 HPLC를 사용한 DTNB 분석방법을 이용하여, Cysteine, glutathione, γ -glutamylcysteine을 분석하였다.

(다) 분석

글루타치온, cysteine 및 γ -glutamylcysteine의 분석에는 HPLC를 이용하는 DTNB 분석방법을 사용하였다. DTNB(100mM)와 DTE(200mM)를 시약으로 사용하여 여과 처리된 시료를 5분간 전처리하여 분석하였다[43]. 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 Symmetry C18 5 μ m(250 \times 4.6mm, Waters)를 사용하였으며[44], UV detector(Waters 480, Waters)는 파장 280nm에서 분석하였다. 분석 전개용매로는 230mM ammonium formate solution(pH 5)과 메탄올(HPLC grade, Fisher)을 사용하여 시간에 따른 농도의 변화를 주었으며 전개 용액의 유속은 1.5mL/min으로 하였다.

(2) 연구결과

(가) Ultrafilter

Hollow-fiber를 이용한 글루타치온 생산에서는 유기용매로 처리된 재조합대장균과 빵효모를 각각 5g과 20g을 준비한 후 flask에 넣고 충분히 넣고 섞어서 연동펌프를 이용해서 수직으로 세워진 hollow-fiber에 하단부 방향에서 상단부 방향으로 혼합세포를 hollow-fiber에 채운다. Rotary 배양기에 넣고 37°C에서 200rpm으로 반응을 하였다. 기질공급속도가 25mL/hr로 하였고, 체류시간은 4시간 20분이기 때문에 현탁반응에서 2시간에 최고 글루타치온 농도에 도달함을 감안할 때 충분히 반응에 일어났을 것으로 판단된다. Ultrafilter를 사용했을 경우 반응기 운전 1시간에 3.0mM에 도달해서 3-4mM을 유지하였다(Fig. 43). γ -Glutamylcysteine 농도는 1-2mM을 유지하였다. 또한 반응 4시간까지는 cysteine이 감소하다가 4시간 이후부터 점차 증가하므로 재조합 대장균과 빵효모의 효소활성이 감소하는 것으로 보여진다. 기존 실험에서의 결과에 의하면 대장균 내의 효소활성의 감소보다는 빵효모내의 ATP 재생산계를 담당하는 해당과정의 효소활성의 감소가 예상된다.

또한 hollow-fiber(ultrafilter)의 경우 혼합세포를 lumen side에 packing한 후 배양기안에서 수평으로 hollow-fiber를 설치했을 때와 수직으로 장착했을 때의 글루타치온 농도의 차이를 보였다(Fig. 44). 수평으로 설치한 hollow-fiber의 경우, 기질공급속도는 17.7ml/hr였으며, 체류시간은 3시간 6분이었다. 혼합세포인 재조합 대장균과 빵효모는 각각 5g과 20g을 혼합하여 lumen side에 packing하였다. Hollow-fiber 경우 양쪽 면의 shell side에 빈 공간이 있는 관계로 글루타치온 생산에 dead volume을 없애기 위해서 양쪽 면에 agar 45mL로 채워서 실험하였다. 수평으로 장착된 hollow-fiber 경우 글루타치온 농도는 2-3mM을 19시간동안 유지됨을 보였다. 반응 16시간부터는 cysteine이 점차 증가함을 보여 글루타치온 및 γ -glutamylcysteine 전환이 되지 못함을 보였다. γ -Glutamylcysteine는 1-2mM정도 유지하였다. Hollow-fiber를 수직으로 세워서 장착하였을 경우, 글루타치온 농도는 1-2mM정도를 유지하였으며 글루타치온 농도를 유지하지 못하고 점차 감소함을 보였다. Cysteine도 반응 8시간부터 농도가 점차 증가함을 보였다. 수평으로 장착한 hollow-fiber가 수직으로 장착한 경우보다 농도도 높았으며, 글루타치온 생산도 지속적으로 유지하였다.

(나) Microfilter

Hollow-fiber를 이용한 글루타치온 생산에서 KIST에서 제공받은 microfilter를 이

용한 반응기에는 재조합 대장균 1g과 빵효모 4g을 충분히 혼합하여 microfilter 하단부에서 상단부 쪽으로 채운다. Microfilter 반응기에 사용된 기질공급속도는 4.5mL/hr이고 기질의 체류시간은 2시간 44분이다. Rotary 배양기에서 37°C, 200rpm에서 글루타치온 생산을 수행하였다.

Microfilter는 반응 1시간에서 글루타치온 농가 3.8mM을 나타냈으며, 반응시간이 경과함에 따라 점차 감소함을 보였다(Fig. 45). γ -glutamylcysteine은 1mM정도 유지를 하였다. Cysteine은 8-9mM정도를 유지하였다. Microfilter 반응기에서는 기질의 체류시간이 2시간 44분이기 때문에 체류시간이 ultrafilter에 비해서 짧았다. 또한 microfilter의 경우는 membrane pore size가 크지만 혼합세포에 의해서 membrane의 fouling 때문에 물질의 전달에 문제점이 있었다. Microfilter의 경우도 ultrafilter와 마찬가지로 반응시간이 경과함에 따라 글루타치온 농도가 감소함을 보였다.

다. Celite와 배양토를 이용한 글루타치온 생산

(1) 실험재료 및 방법

(가) 균주 및 배양조건

본 연구에서 사용된 균주는 *E. coli* TG1/pDG7a[11]로 재조합된 플라스미드 pDG7a는 총 길이 9.4kb이며 pBR322기원의 vector에 GSH-I을 생산하는 *gsh I* gene과 GSH-II[39]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 배양하였고, 교반속도 250rpm, 37°C에서 배양을 수행하였다.

(나) 배양토 입자를 이용한 글루타치온 생산

배양토 입자는 덕산요업의 제품을 사용하였으며, 1000°C이상에서 백토와 황토를 혼합하여 제조한 다공성 물질로 글루타치온의 고정화 방법의 하나로 실험을 수행하였다. 배양토 입자 자체적으로 다공성이기 때문에 혼합세포와 함께 컬럼에 packing

하였을 경우 배양토 입자와 배양토 입자간에 혼합세포는 위치하고 기질은 배양토 입자의 다공을 통해서 이동함으로써 신속한 고정화로 인하여 재조합 대장균과 빵효모의 효소활성이 유지하는데 장점을 가지고 있을 것으로 판단되었다. 배양토 입자를 이용한 글루타치온 생산에서 재조합 대장균의 세포막을 톨루엔과 5mM potassium phosphate buffer이 1:9로 혼합된 용액으로 처리한다. 또한 빵효모는 아세톤과 등장액이 9:1로 혼합된 용액으로 처리한다. 이것은 유기용매로 처리하여 각각의 세포막을 통한 물질전달을 원활하게 하였다[40, 41]. Seed culture와 main culture에서 각각 9시간씩 균체를 배양한 후, 8000rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하여 균체만을 얻는다. 균체 2g씩 1개의 flask에 0.5mM cysteine을 녹인 5mM potassium phosphate buffer 90mL에 균일하게 혼합한 후 toluene 10mL 씩 용액을 첨가하여 250rpm, 37°C에서 30분간 반응하였다. ATP 재생산체인 효모의 경우에도 5g씩 1개의 flask를 준비하여 빵효모를 각각 등장액 20mL으로 녹인 후 acetone 180mL를 혼합하여 250rpm, 37°C에서 5분간 반응하였다. 각각 반응이 끝난 후 원심분리기를 이용하여 4500g에서 10분간 원심분리하여 각각 균체를 얻었다. 글루타치온 생산은 재조합 대장균과 빵효모의 혼합비율을 1:4로 하였으며, 대장균은 0.8g, 빵효모의 경우는 4.0g을 사용하였다. 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 400mM 포도당의 기질을 사용하였으며[33], pH 7.3을 유지하기 위해서 100mM potassium phosphate buffer를 사용하였다.

(다) Celite를 이용한 글루타치온 생산(Fig. 46)

Celite의 물리적 특성은 색깔은 흰색, 분홍, 회색 등이며, pH는 7.0-10.0의 범위를 종류에 따라 가지고 있다. Celite의 pore 크기는 1.5-22.0 micrometer이며 밀도는 7.0-16 lbs./ft³(마른상태), 16.0-20.5 lbs./ft³(젖은상태)이다. Celite의 화학적 특성은 주성분은 SiO₂가 90% 내외이며 Al₂O₃, Fe₂O₃, P₂O₅, TiO₂등이 1%내외로 혼합되어 여러 종류의 celite를 구성한다. 또한 Celite의 응용성은 농업, 액체에 점도를 증가, paint의 색소, 종이제조, 광택 및 얼룩제거, 고무제품 등에 널리 사용되고 있다. Celite는 다공성을 가지는 조제로서 배양토 입자보다는 매우 미세한 입자로서 세포와 혼합하여 컬럼에 packing을 한 후 고정화된 컬럼을 사용하는 방법으로 글루타치온 생산을 시도하였다. Celite를 이용한 글루타치온 생산에서 재조합 대장균은 seed culture와 main culture에서 각각 9시간씩 균체를 배양한 후, 8000rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하여 균체만을 얻는다. 균체 2g씩 1개의 flask에 0.5mM cysteine을 녹인 5mM potassium phosphate buffer 90mL에 균일하게 혼합한 후 toluene 10mL 씩 용액을 첨가하여 250rpm, 37°C에서 30분간 반응하였다.

ATP 재생산체인 효모의 경우에도 5g씩 1개의 flask를 준비하여 빵효모를 각각 등장액 20mL으로 녹인 후 acetone 180mL를 혼합하여 250rpm, 37°C에서 5분간 반응하였다. 각각 반응이 끝난 후 원심분리기를 이용하여 4500g에서 10분간 원심분리하여 각각 균체를 얻었다. 글루타치온 생산은 재조합 대장균과 빵효모의 혼합비율을 1 : 4로 하였다. Celite, 혼합균체, 증류수의 비율이 2:1:3으로 하였다. 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 400mM 포도당의 기질을 사용하였으며[33], pH 7.3을 유지하기 위해서 100mM potassium phosphate buffer를 사용하였다.

(라) 분석

글루타치온, cysteine 및 γ -glutamylcysteine의 분석에는 HPLC를 이용하는 DTNB 분석방법을 사용하였다. DTNB(100mM)와 DTE(200mM)를 시약으로 사용하여 여과 처리된 시료를 5분간 전처리하여 분석하였다[43]. 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 컬럼은 Symmetry C18 5 μ m(250 \times 4.6mm, Waters)를 사용하였으며[44], UV detector(Waters 480, Waters)는 파장 280nm에서 분석하였다. 분석 전개용매로는 230mM ammonium formate solution(pH 5)과 메탄올(HPLC grade, Fisher)을 사용하여 시간에 따른 농도의 변화를 주었으며 전개 용액의 유속은 1.5mL/min으로 하였다.

(2) 연구결과

(가) 배양토 입자에 의한 글루타치온 생산

배양토 입자의 직경은 약 3mm이었으며, 배양토 입자와 혼합세포를 충분히 혼합하여 컬럼에 장착하였다. 기질공급속도는 1.1mL/hr이었고 컬럼 안에 기질의 반응 부피는 5.2mL이었다. 배양토 입자를 이용한 글루타치온 생산의 반응 온도는 22°C와 37°C에서 수행하였다(Fig. 47). 초기의 배양토 입자와 혼합세포를 packing할 때 증류수로 혼합하였다. 그 결과 반응 3시간까지 cysteine의 농도가 15.5mM까지 점진적으로 증가함을 보였으며 반응 3시간이후에는 일정 농도를 유지하다가 반응 7시간 때에서 다시 2-3mM 정도 증가하였다. 배양토 입자를 이용한 글루타치온 생산에서 반응온도를 37°C로 하였을 때 반응온도 22°C와 큰차이를 보이지 않았다. 하지만 cysteine은 수용액상에서 세포의 효소에 의해서 degradation됨을 보여주었다.

배양토 입자를 이용한 글루타치온 생산의 경우, 유출되는 세포를 막기 위해서 기질의 출구에 $0.45\mu\text{m}$ 를 장착하여 세포의 유실을 막았으나 예상과는 달리 세포가 다량으로 유실됨에 따라 microfilter의 잦은 교체가 필요했다.

(나) Celite를 이용한 글루타치온 생산

Celite는 다공성을 가지는 조제로서 배양토 입자보다는 매우 미세한 입자로서 세포와 혼합하여 컬럼에 packing을 한 후 고정화된 컬럼을 사용하는 방법으로 글루타치온 생산을 시도하였다. Celite를 이용한 글루타치온 생산하는 경우 배양토 입자처럼 microfilter를 기질 출구에 장착할 필요가 없이 celite 자체가 filter역할을 하였다. 배양토 입자를 이용한 글루타치온 생산의 경우, 기질의 공급은 컬럼의 하단부에서 상단부 쪽으로 하였으나, celite는 상단부에서 하단부로 기질을 공급하였다. Celite와 혼합세포를 혼합하여 글루타치온 생산을 한 결과 몇 가지 문제점이 발생하여 글루타치온 생산이 되지를 않았다(Fig. 48). 첫째로 celite가 미세하지만 세포보다 먼저 떨어지는 단점을 가지고 있어서 세포가 celite와 균일하게 packing이 되지를 못했다. Celite와 혼합세포를 컬럼에 packing을 한 후 하단부 쪽 연동펌프(Watson-Marlow)를 사용하여 기질을 뽑아내었다. 그러나 시간이 지남에 따라 세포가 유실되어 celite만 남게 되었다. Celite에는 여러 종류가 있으므로 (예, Filt 등) 아주 미세한 조제를 쓴다면 세포의 유실을 막을 수 있을 뿐만 아니라 celite와 균일한 packing을 할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5절 글루타치온 분리

1. 구리에 의한 GSH의 침전

가. 실험재료 및 방법

구리침전[46, 50]과 전기투석을 이용한 연구에서는 알고 있는 농도의 GSH수용액을 제조하여 GSH분리를 위한 기본실험을 수행하였다. GSH(Sigma社) $3 \times 10^{-2}\text{M}$ 200mL의 용액을 제조하였으며, 구리침전에는 0.1M CuSO_4 (동양화학社)를, 침전부의 해리에서 1N HCl(Sigma社)을, GSH가 양이온을 띠도록 하기 위해 0.5M NaOH(Sigma社)를 각각 제조하였다.

GSH 수용액에 CuSO_4 용액을 가하여, 침전형태의 GSH-complex를 형성한 후, 원심분리(9000rpm, 5분, 4°C)하여 상등액을 제거하는 1차 분리를 수행하였다. 침전부

에 탈이온수를 가하여 초기부피(200mL)로 조절한 후, HCl을 가하여 해리시켰으며, NaOH를 가하여 GSH의 전하가 음전하를 띠도록 조정하였다.

나. 연구결과

수용액 상태로 용해되어 있는 GSH는 황산구리를 가하면 구리이온과 반응하여 침전을 형성하게 된다. 구리이온을 이용한 GSH침전형성 결과를 나타내었으며(Fig. 49), 구리이온과 반응하지 않은 미반응 GSH가 상등액으로 유실되는 것이 관찰되었다. GSH 수용액에 0.1M 황산구리 26ml를 가하면 침전이 형성되기 시작하는데 60%이상이 미반응 GSH로 유실되나 서서히 황산구리를 더 가하여 미반응 GSH의 양을 41%까지 감소시켰다. 과량을 가했을 때는 침전이 더이상 형성되지 않는데, GSH의 전하가 음에서 양으로 바뀌어 구리이온과 반응하지 않기 때문으로 해석된다. 황산구리에 의해 낮아진 pH를 NaOH를 사용하여 높여 염형성, 즉 미반응 GSH의 침전을 유도하여 상등액으로 유실되는 GSH 양을 감소시켰다(Fig. 50). 본 실험의 경우 HPLC loading sample에 0.5M NaOH를 넣어 분석조건에 변화를 주었다. GSH농도 측정에 사용된 기존의 DTNB방법[55]에 있어 detection조건에 변화가 필요함을 나타내었다(Fig. 51-52). Fig. 51에서는 순수한 GSH sample에 대한 NaOH의 영향을 나타내었다. HPLC sample에 0.5M NaOH를 첨가할 때 0.01ml까지는 순수한 GSH의 양의 측정에 있어서는 증가치를 보이지 않지만, 그 이상의 양에서는 오히려 감소된 측정치를 보였다. Fig. 53에서는 실제 sample측정에 대한 NaOH의 영향을 나타내었는데, HPLC 시료에 NaOH의 투여량에 따라 측정치의 심한 변화를 보였다. 즉 sample내에 구리이온이 존재하여 GSH의 thiol기를 점유하고 있다면, GSH가 DTNB에 효과적으로 작용할 수 없기 때문에 실제 sample내에 존재하는 GSH양과 큰 차이를 보이므로 HPLC 분석시 loading sample에 NaOH를 가하여 DTNB 측정법에서의 최적 pH를 형성시켜야 했다. 이는 사용된 NaOH의 OH⁻가 구리-GSH complex에서 구리이온에 대한 이온교환효과를 나타내었기 때문으로 사료된다.

2. 전기투석

가. 실험재료 및 방법

양극 chamber, 음극 chamber, 그리고 중간 chamber로 구성된 아크릴 재질의 전기투석 cell을 구성하였다[51]. 양이온 교환막(CMX, Tokuyama社)을 사용하였으며, 양극은 백금선을, 음극은 stainless steel을 각각 사용하였다. Power supply(Hoefer社)를 사용하여 전기장을 형성하였으며, 연동펌프(Cole-Parmer社)를 각각의

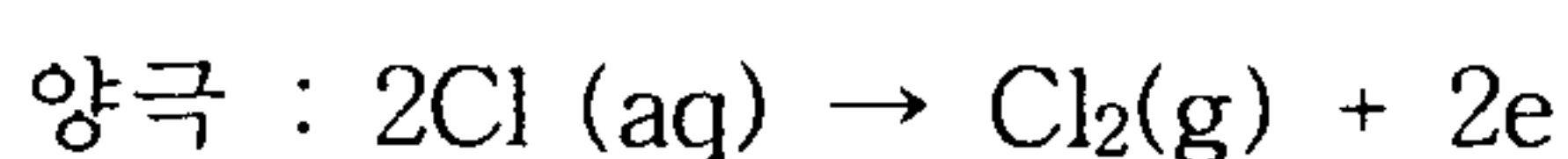
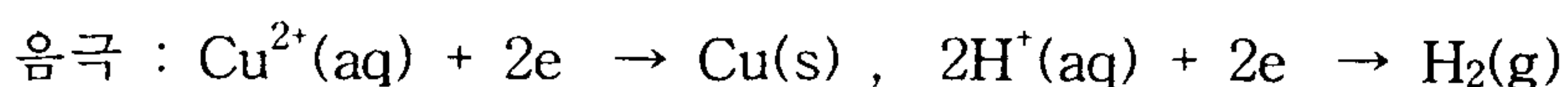
chamber에 장착하였다.

3개의 chamber 중 분리용액은 중간 chamber에 주입하였으며, 양극액과 음극액은 1N HCl용액으로 각각 400mL씩 각각 제조하였다. 양극 chamber의 유효용량은 120mL, 음극은 90mL, 중간 chamber는 200mL였고, 막의 유효면적은 20cm², 음극의 면적은 16cm², 양극의 면적은 0.94cm², 극간 거리는 약 9cm로 장치하였다. 각각의 chamber 내의 용액들은 연동펌프를 사용하여 각각의 용액의 flow rate를 5mL/sec로 조절하여 cell로 유입, 유출되도록 하였다(Fig. 53). 음극과 중간 chamber, 중간 chamber와 양극 사이에는 각각 양이온 교환막을 장치하였다[51, 54]. Sample을 1시간 단위로 취하였고, 구리이온의 효과적인 석출을 위해 3~4시간 단위로 음극판을 교체하였다.

GSH농도는 HPLC 전처리로써 filtering(0.2μm filter, Microgon社)하고 sample 0.5mL에 200mM DTE(Dithioerythritol, Sigma社) 0.0125mL와 100mM DTNB(5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid Sigma社) 0.05mL을 넣어 발색반응시킨 후, UV detector(파장:280nm)를 장착한 HPLC system(LC-10AD, Shimadzu社)에서 측정하였다. 23mM ammonium formate (pH 5.0, Sigma社)와 methanol(Fisher Scientific社)을 완충용액으로 사용하여 gradient를 형성하였으며, column은 C-18 column(Regis社)를 사용하였다[55]. 구리농도분석은 spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu社)를 이용하여 습식법(파장: 484nm)으로 측정하였다[56].

나. 연구결과

구리침전에 의해 1차 분리된 용액을 원심분리한 후, 상등액을 제거한 침전부에 탈이온수를 가하여 초기부피로 조정하였다. 여기에 1N HCl을 가하여 해리시키고 (pH 0.7, 구리이온과 GSH는 양전하로 하전), 전기장 내에서 서로 다른 이동성을 나타내도록 하기 위해 NaOH를 가하여(pH 5.0) GSH는 음전하를 띠도록 하였다. 이 용액을 전기분해 cell에 주입하고 전기장을 걸어주었을 때, GSH와 결합하지 않은 구리이온은 음극쪽으로 이동하여 석출되었으며 중간 chamber의 pH가 낮아지면서 구리-GSH complex가 해리되어 구리이온은 음극에서 지속적으로 석출되면서 수용액 상에서 농도가 감소함이 관찰되었다. 전기장 내에서의 음극과 양극에서의 반응은 다음과 같다.



양전하를 띠는 GSH의 양이 증가하여 음극쪽으로 넘어가는 것을 막기 위해 소량의 0.5M NaOH를 일정한 간격으로 첨가하여 pH가 완만하게 낮아지도록 조절하였다. 음극쪽의 pH가 높아지면 양이온 교환막에서의 염석출로 인해 구리이온의 이동성을 저해하므로 음극액에도 HCl을 가하여 일정수준 이상으로 높아지지 않도록 pH를 약 1.5로 조절하였다.

구리이온의 농도는 중간 chamber에서 4시간과 7시간 사이에서 증가함이 관찰되는데 낮아진 pH로 인해 구리-GSH complex가 해리되기 때문이었다. 이후에는 음극으로 넘어가는 양이 증가함에 따라 중간 chamber내 구리농도가 초기 3500ppm에서 1000ppm로 감소하였으며, 지속적인 운전으로 구리농도는 2ppm까지 줄일 수 있었다(Fig. 54). 양극에서의 구리농도는 중간 chamber에서 이동해 오는 양과 음극과 반응하여 석출, 제거되는 양 사이의 관계가 시간이 지남에 따라 평형을 이루었다. 초기에는 이동해 오는 양이 석출되는 양보다 많기 때문에 증가함을 보이지만, 10시간 이후 완만하게 감소함을 나타내었으며 음극표면에 금속구리 특유의 노란색막이 형성되는 것으로서 석출되는 구리를 육안으로 확인할 수 있었다. 중간 chamber에서 GSH 농도변화는 시간에 따라 증가하며 약 10시간 이후에는 멈추었다. 구리침전 결과 초기 GSH 중 59%가 침전으로 회수되었으며, 상등액에 41%가 존재하였다. 침전으로 회수된 용액을 전기투석계에서 운전한 결과 GSH 분리효율은 73%였으며, 이는 초기 GSH의 43%에 해당한다. 낮아진 pH에 의해 GSH의 전하가 양으로 변해서 음극쪽으로 이동하여 초기 침전회수된 양의 4%가 검출되었다.

중금속에 대한 GSH의 thiol기의 특이적인 킬레이트반응이 분리공정에 있어서 처리용액의 부피를 줄일 수 있는 침전의 형태로 나타났으며, 현재 폐수처리 등 산업적으로 유용하게 쓰이는 전기투석을 이용하여 분리한 결과, GSH분리공정에의 응용이 가능할 것으로 보인다. 나아가 상등액으로 유실되는 미반응 GSH의 회수를 위해 온도와 pH 변화, 염 사용 등 침전 최적화에 대한 실험과 생산공정상에 있어서 recycle의 고려 등이 필요하다고 사료된다.

3. 액체 크로마토그래피(Fig. 55)

가. 실험재료 및 방법

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 Sigma사에서 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 방법에 의한 생산모액을 실험에 사용하였다.

실험에 사용할 수지의 선택을 위해 회분식 흡착실험을 수행하였다. 시료는 ideal mixture과 미생물 체내의 효소에 의해 생산된 생산모액을 각각 사용하였다. 선택된 수지를 column에 충전시킨 후, 시료를 수지에 흡착시킨 다음 NaCl을 함유한 완충용액을 용리시켜 GSH와 함께 시료에 용해되어있던 물질들이 GSH와 분리되어 유출되도록 하였다.

GSH의 측정은 발색시약 중의 *o*-PT를 사용하여 발색시키는 Puri의 방법과 DTE/DTNB로 발색반응 시키는 Tietze와 Dennda의 방법[55]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*-PT시약을 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/DTNB시약을 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 사용하여 분석하였다.

나. 연구결과

(1) 이온교환수지 및 완충용액의 pH 선정

GSH 순수분리에 적합한 이온교환수지를 선정하기 위하여, DE52, Q-sepharose, QAE-sephadex 등의 음이온 교환수지 및 CM-sepharose, S-sepharose 등의 양이온 교환수지를 사용하여 GSH의 부착여부를 검사하였으며, 이때 완충용액으로는 20mM Tris/HCl (pH 8.0)을 사용하였다. 반응이 끝난 수지를 4℃에서 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 2). 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 2에서도 역시 소량의 GSH만이 측정되는 것으로 미루어 보아 GSH가 수지에 결합되는 강도가 매우 약하다고 사료되었다. QAE-sephadex의 경우, GSH의 결합강도는 강한 편이었으나, column 크로마토그래피를 실시하였을 때 고농도의 NaCl이 첨가되면 QAE-sephadex의 부피가 현저히 감소하는 현상을 보였으며 이로 인해 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(Fig. 56).

(2) Ideal mixture에서의 GSH 분리

GSH 합성효소에 의해 생산되는 생산모액을 단순화시킨 ideal mixture 0.25mL를 Q-sepharose 수지를 사용하여 음이온 교환수지 크로마토그래피 분리실험을 실시하였다. 실험에서 사용된 ideal mixture의 성분과 조성은 다음과 같았다 ; 10mM cysteine, 10mM glycine, 40mM glutamate, 270mM glucose, 10mM ATP, 5.2mM γ -glutamylcysteine, 10mM GSH. 완충용액(20mM Tris/HCl, pH 8.0)으로 수지에 결합되지 않은 물질을 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 cysteine

과 glycine이, Q2부분에는 glucose와 glutamate, Q4부분에는 GSH와 γ -glutamylcysteine, 그리고 Q5부분에는 ATP가 포함되어 있었다(Fig. 57). 실험 결과로 미루어 보아 ideal mixture에 포함된 물질들 중에서 GSH가 Q-sepharose에 결합되는 것과는 달리, cysteine, glycine, glucose 및 glutamate 등은 Q-sepharose에 친화성이 없기 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, Handerson-Hasselbalch식과 아미노산의 pK를 이용하여 ionic fraction을 구하여 pH 8.0에서 GSH를 포함한 아미노산들의 전기성질을 예상해 보았다(Fig. 58). 용액의 pH가 8.0인 경우, GSH와 Glu만이 anionic fraction이 1이었다. 이는 전체 GSH와 Glu만이 수지에 결합하는 것을 예상할 수 있는데, 실험 결과 Glu는 수지와 결합세기가 약하여 완충용액에 유실되는 것을 보였다. 나머지 아미노산은 그대로 유실되는 결과를 보였는데 이는 예상한 것과 같은 결과였다.

한편 γ -glutamylcysteine은 ideal mixture내 다른 물질들과는 달리, GSH와 거의 동일한 염농도(Q4, Fig. 57)에서 유출되었으므로 이 두 가지 물질을 분리시키고자 하였다. ideal mixture를 Q-sepharose 수지에 흡착시킨 다음, 완충용액에 NaCl을 점차적으로 첨가하여 단계적으로 흘려주었다. 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(Fig. 59).

Fig. 59에서와 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(Fig. 60).

Fig. 59에서와 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, Fig. 60에서와 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 Fig. 59와 비교하여 회수율이 향상되었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아, GSH를 γ -glutamylcysteine과 분리시키면서 회수율을 높이려면 γ -glutamylcysteine을 어느 정도 유출시킨 다음에 NaCl의 농도를 증가시킬 필요가 있었다. 두 개의 GSH peak를 보이는 것은 GSH의 확산에 의한 tailing에 의한 현상으로 판단되었으며, 두 peak 사이에서 소량의 GSH가 수지로부터 계속 이탈된 것으로 예측되었다.

Fig. 61은 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 ideal mixture이었다. 고농도 NaCl(90mM)의 영향으로 GSH가 Q-sepharose부터 유출되는 속도가 증가하였으며, GSH 회수율은 72.6%였다.

GSH 생산효소에 의해 생산되는 생산모액을 단순화시킨 ideal mixture를 사용하여 GSH 분리를 위한 기초실험 결과, 시료를 Q-sepharose에 결합시킨 후, 35mM NaCl을 사용하여 GSH의 분리가 가능하였다.

(3) GSH 합성효소에 의한 생산모액으로부터의 GSH 분리

Ideal mixture에 의한 GSH 정제방법을 실제로 활용할 수 있는지를 확인하기 위하여, Murata의 방법에 따라 효소에 의해 생합성된 GSH 생산용액을 Q-sepharose column에서 Fig. 61에서와 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 조정하면 결과 GSH가 빠르게 유출되었다. ATP는 완충용액의 NaCl농도가 300mM인 부분에서 유출되었으며, γ -glutamylcysteine과 GSH를 각각 9%, 84.4% 회수하였다(Fig. 62). Ideal mixture의 결과와 비교할 때, GSH를 포함한 나머지 물질들이 Q-sepharose 수지에서 동일한 성질을 나타내었기 때문에 생산

모액에서의 GSH의 순수분리에 실제로 활용할 수 있다고 판단되었다. 순수분리된 GSH 분획(fraction 48~53, Fig. 62)들을 혼합한 후, 회수된 GSH량을 측정한 결과, 투여된 시료의 GSH 중 84.4%가 회수되었으며 γ -glutamylcysteine은 전혀 측정되지 않았다.

서론에서 언급한 바와 같이, 효소를 이용한 GSH 생산모액으로 부터의 GSH 정제에는 HPLC를 이용하는 방법[49], 양이온·음이온 교환수지를 병행하는 방법 등이 보고되고 있으나, 이들 방법은 여러 단계의 공정을 거쳐야 함으로써 분리비용의 증가의 요인이 된다. 본 연구에서와 같이 Q-sepharose를 이용할 경우, 여러 전처리 과정이 필요없을 뿐만 아니라 GSH의 회수율도 높다. 또한 정제 과정에서 γ -glutamylcysteine와 ATP를 시료에 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 조정할 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 모의 혼합액내의 농도(10mM)보다는 낮은 상태(2mM 미만)이므로 큰 영향은 없으리라 본다. ATP는 고가의 원료물질로서, 공정의 개선으로 분리, 회수 후 재활용될 수 있으리라 사료된다.

Table 1. Media composition for fermentation.

Composition	Amounts (/L)
Glucose	25.0 g
KH_2PO_4	13.3 g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.2 g
Citric acid	1.7 g
EDTA	8.4 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5 mg
H_3BO_3	3 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13 mg
Fe(III)citrate	100 mg
Thiamine · HCl	4.5 mg
Yeast extract	1 g

Table. 2. Solution composition of GSH production.

Composition	Amount(g/L)
Cysteine	0.0363
Glutamate	0.2029
Glycine	0.033
MgCl ₂	0.0610
Glucose	1.0806
ATP	0.0414

Table. 3. Factorial design for optimizing the concentrations of 3 amino acids(- : none, + : maximum concentration, 0 : half of maximum concentration).

Flask number	Glutamic acid	Cysteine	Glycine
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0

Table 4. Industrial application of electrodialysis and related process.

Application	Membrane and stack design	Status of the art	Key problems
Brackish water dealination	anion-and cation-membranes tortuous-path and sheet-flow stacks	commercial	scaling and costs
Boiler feed-water industrial process water	anion-and cation-exchange membranes	commercial	scaling and costs
Production of table salt	anion-and cation-exchange membranes, sheet-flow stack	commercial	costs
Industrial effluent treatment	anion-and cation-exchange membranes, sheet flow and tortuous path stack	commercial	costs
Food and pharmaceutical industry	anion-and cation-exchange membranes, sheet flow and tortuous path stack	commercial	membrane fouling, product loss
Ultrapure water	filled-cell stack	commercial	process reliability
Water dissociation	bipolar membranes, three cell stack	commercial	performance

Table. 5. Sort of chromatography at protein purification.

Chromatography	Mechanism
Gel chromatography	Molecular sieving
Ion-exchange chromatography	Charge
Hydrophobic interaction chromatography	Hydrophobic interaction
Affinity chromatography	Immobilized ligand
Salting-out chromatography	Solubility
Adsorption chromatography	Hydroxyapatite
hydrogen bond chromatography	Hydrogen bond
Isoelectric chromatography	Isoelectric point

Table 6. Glutathione yields and productivities

Reactor Type	Yield (%)	Productivity (mmol GSH/g cell · hr)
Suspension, Batch	59	0.045
Immobilization, Batch	28	0.119
Immobilization, Continuous	20	0.218

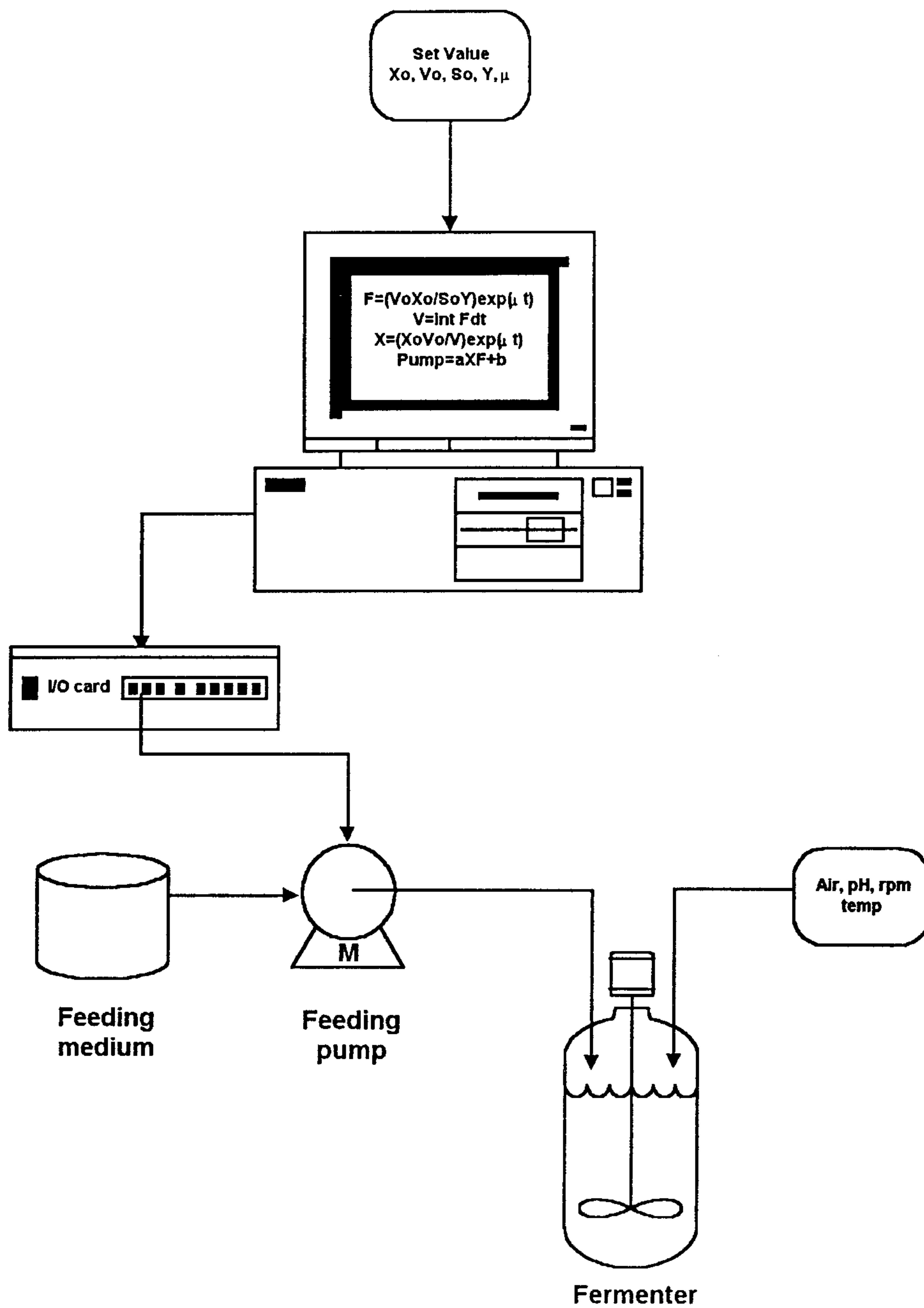


Fig. 3. Schematics of fermentation in fed-batch mode.

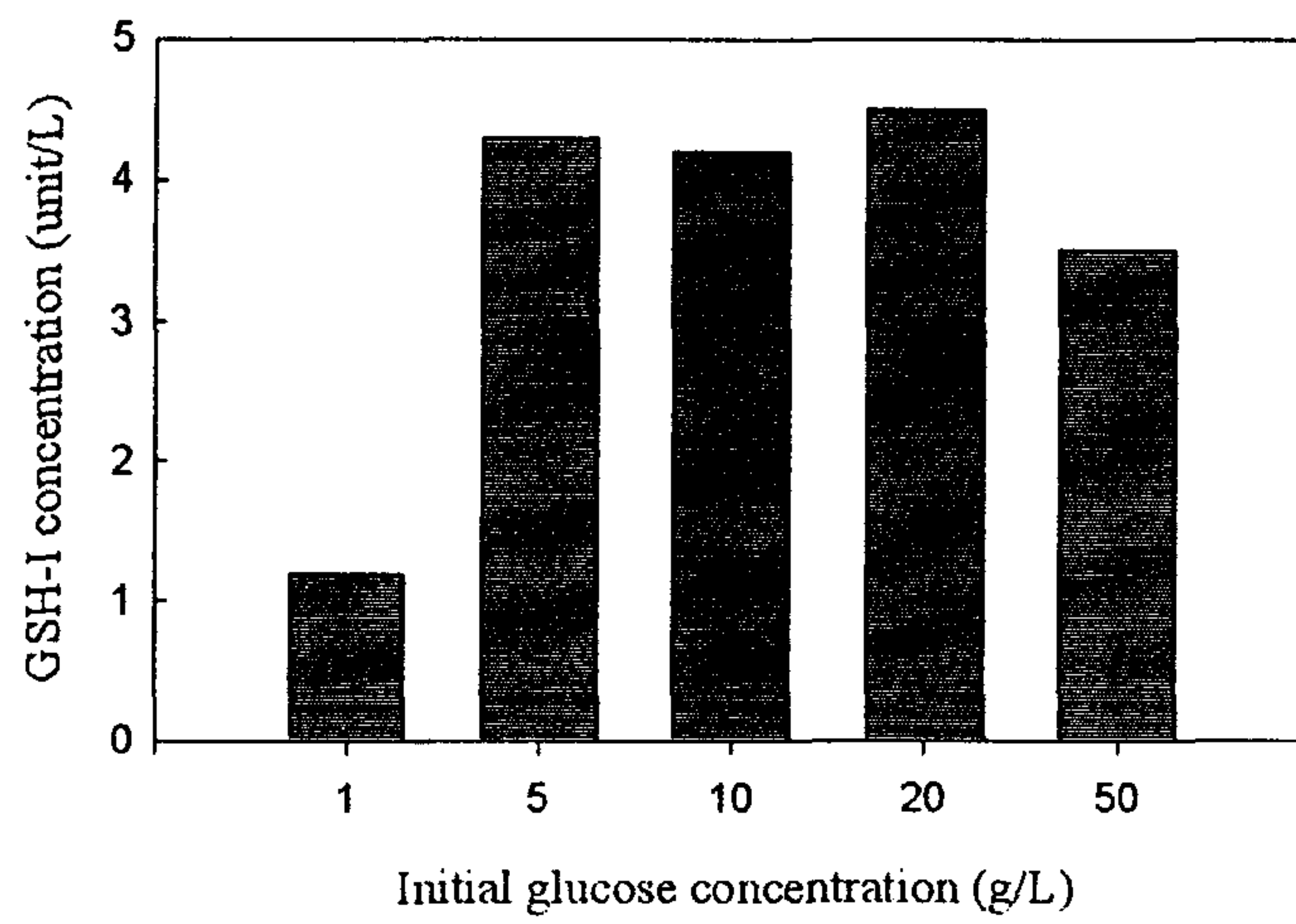
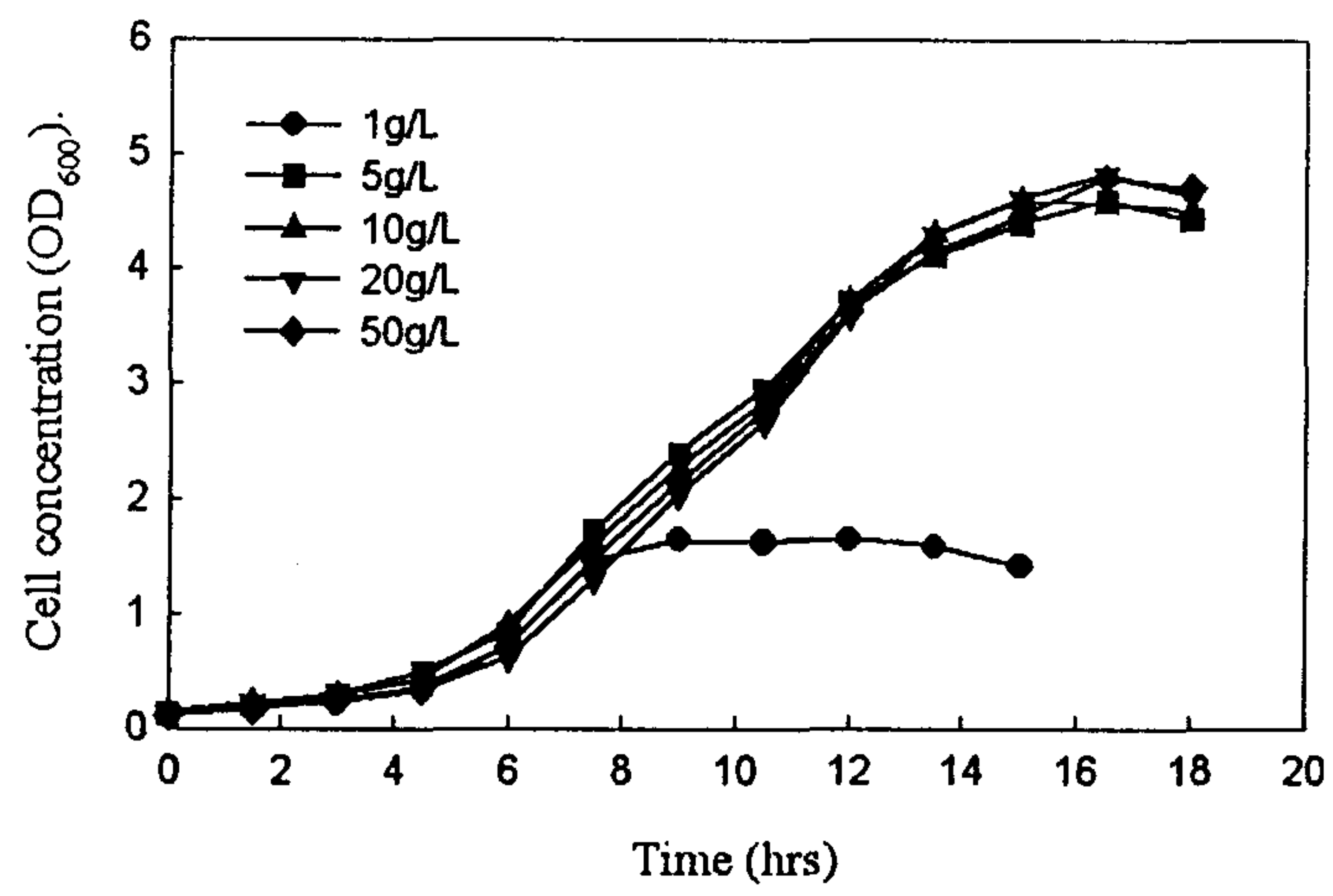


Fig. 4. Effect of initial glucose concentration on the cell growth and GSH-I production.

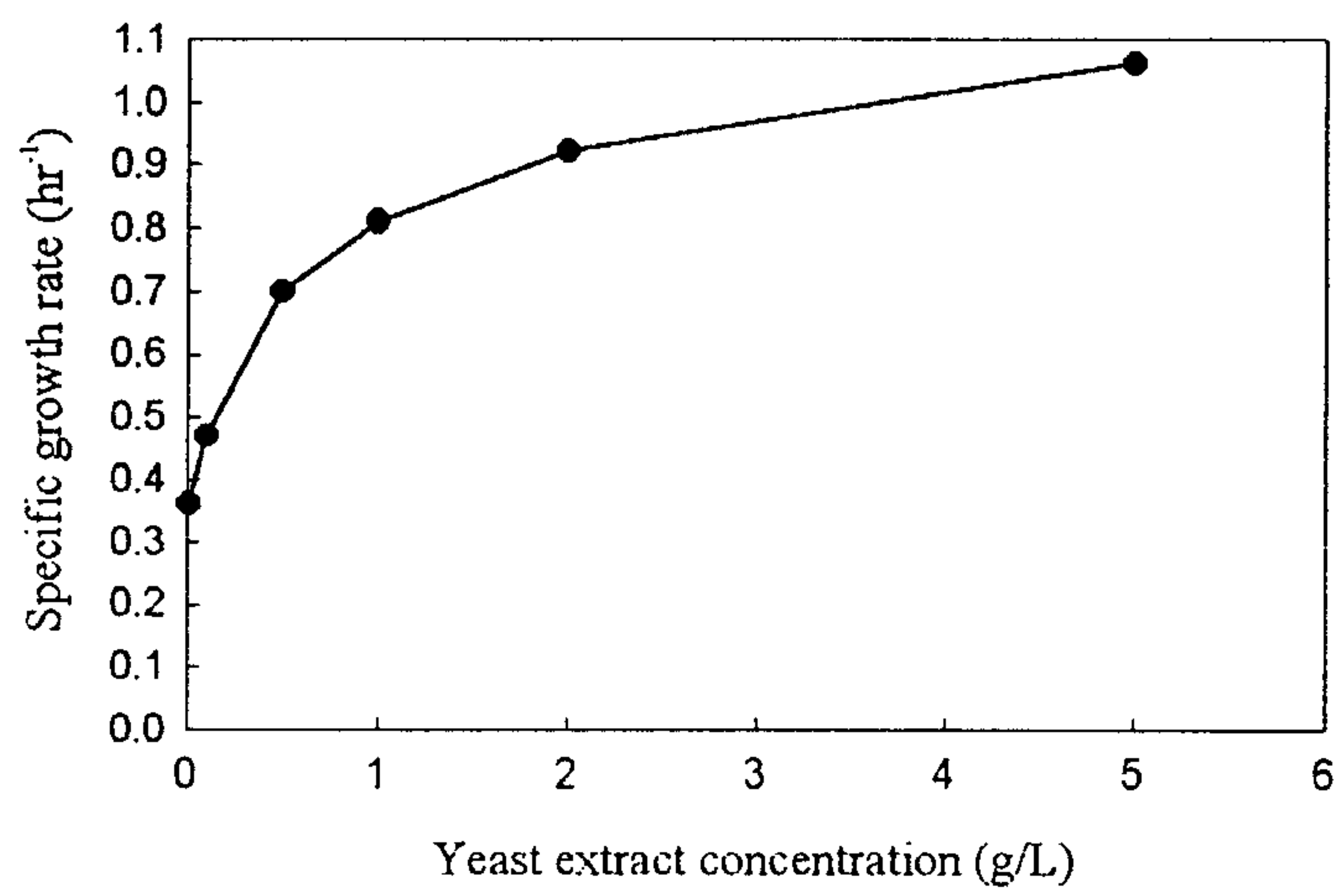
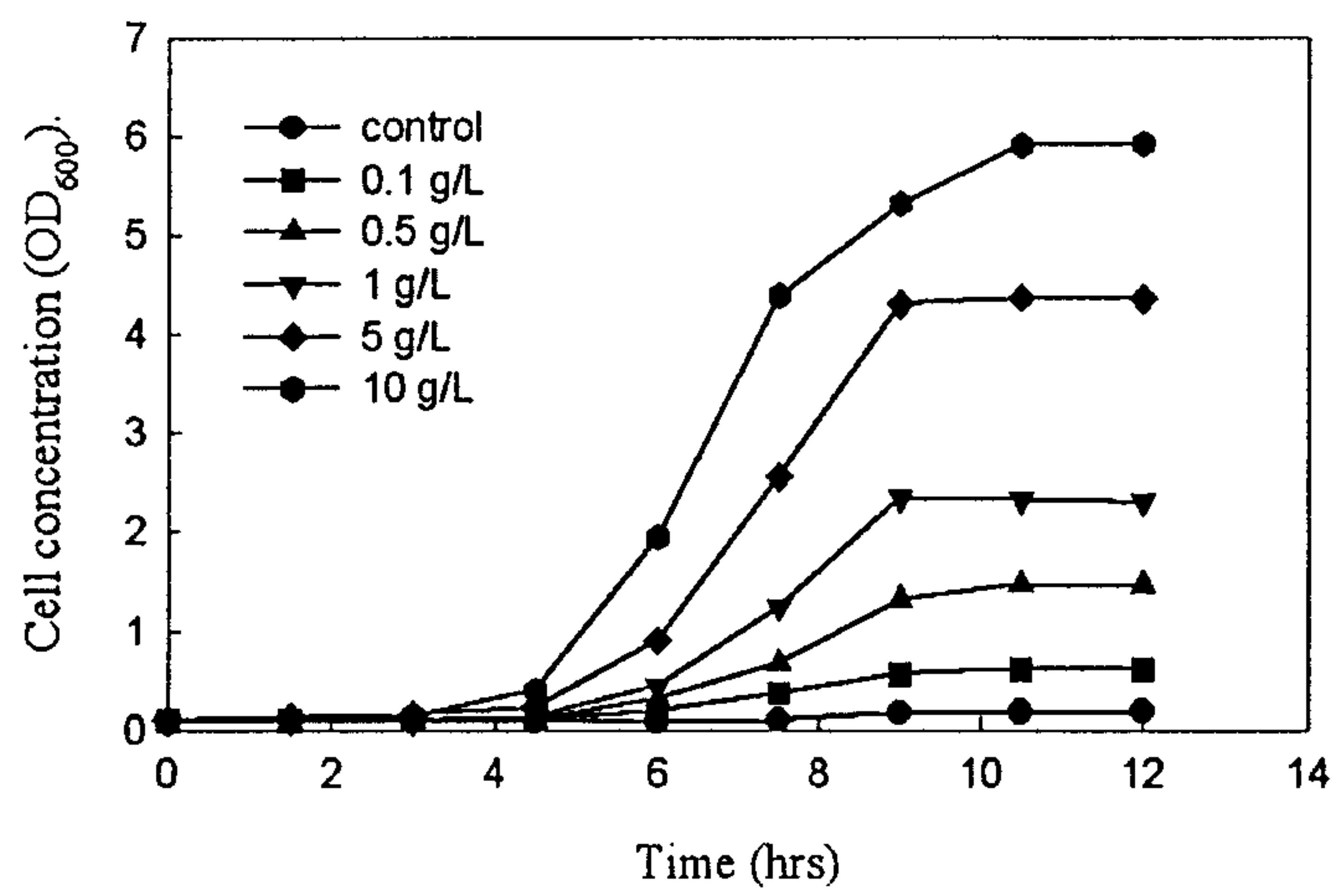


Fig. 5. Effect of yeast extract concentration on the cell growth

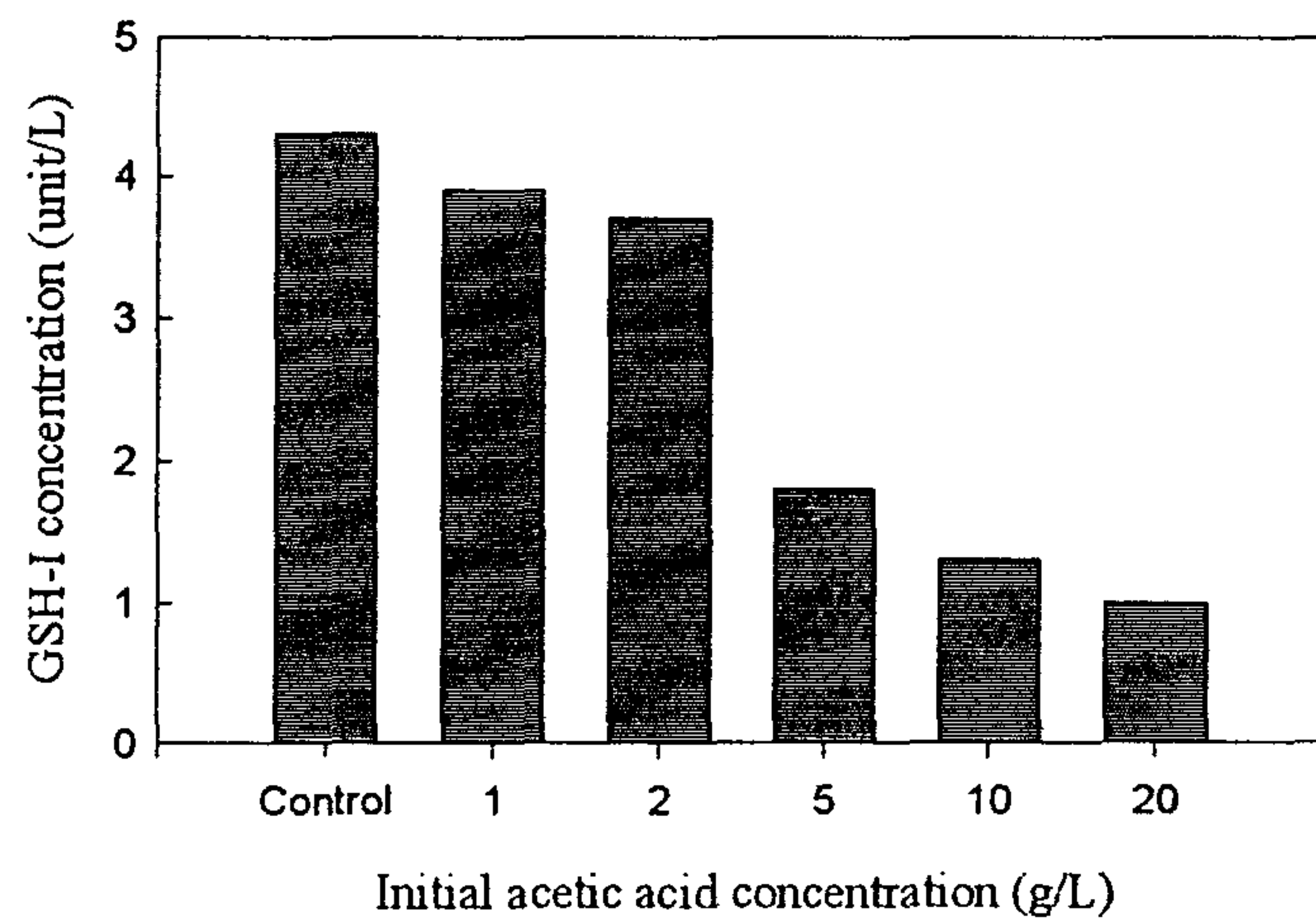
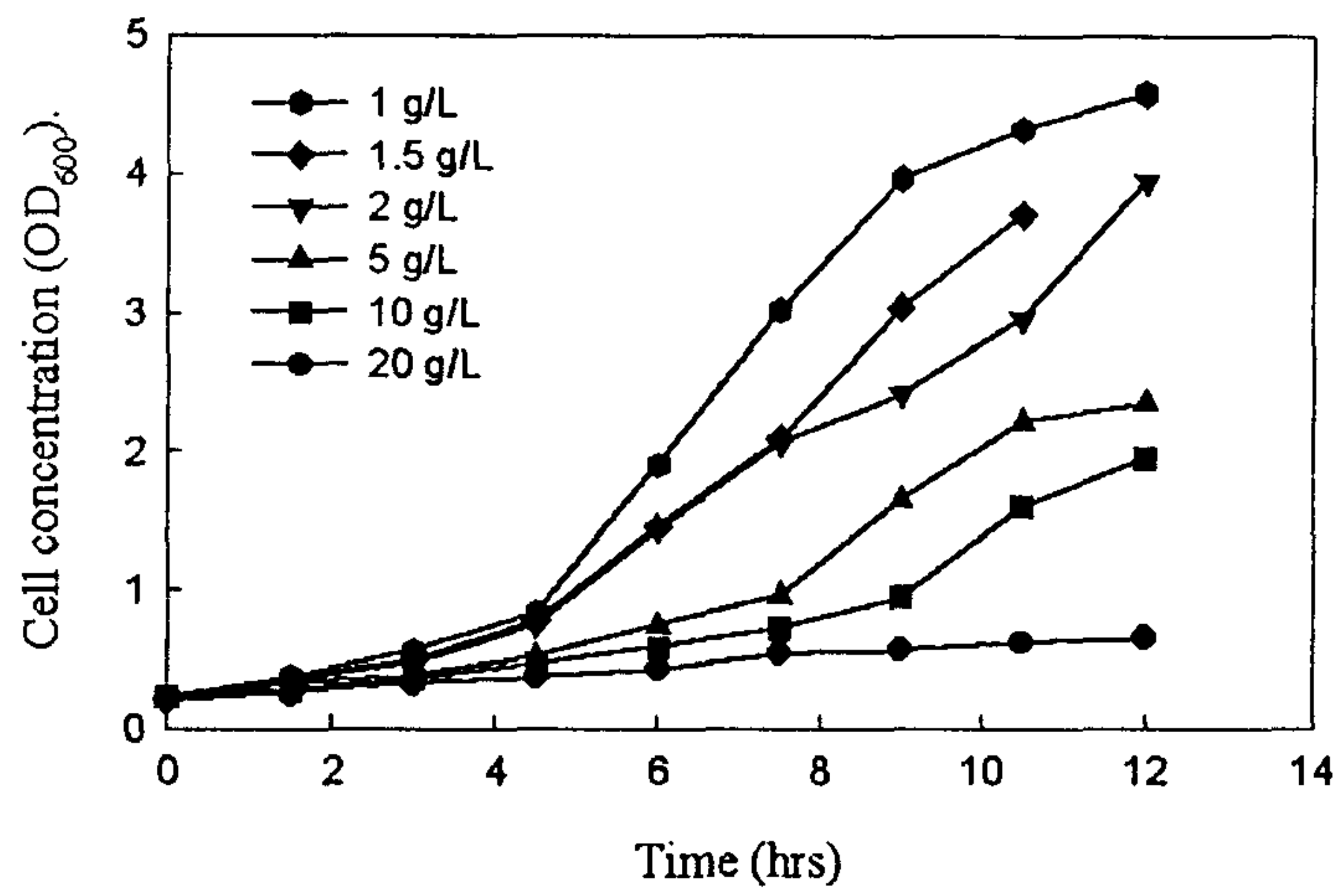


Fig. 6. Effect of initial acetic acid concentration on cell growth and GSH-I activity.

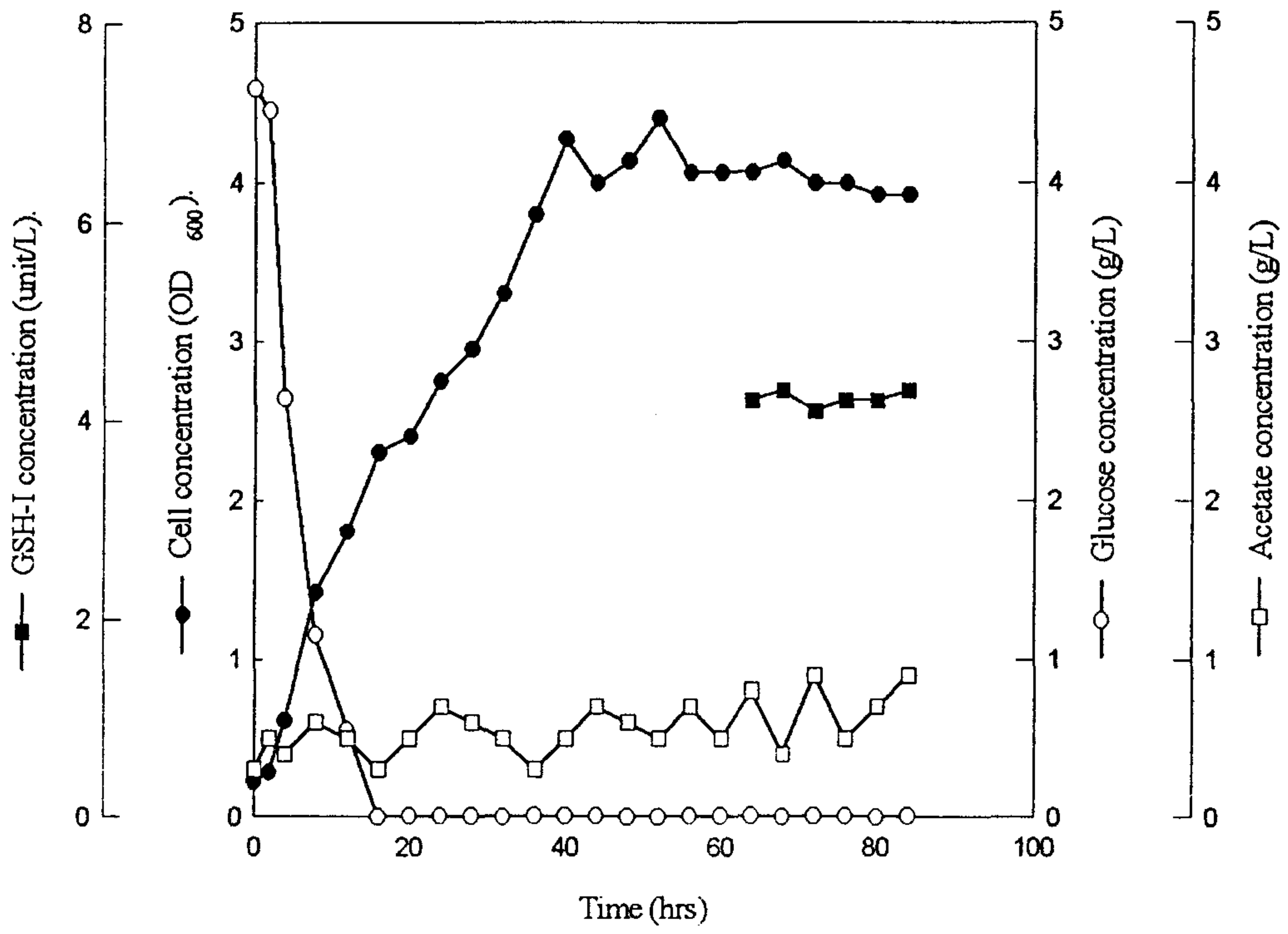


Fig. 7. Continuous culture of *E. coli* TG1/pDG7 α ($\mu=0.05 \text{ hr}^{-1}$).

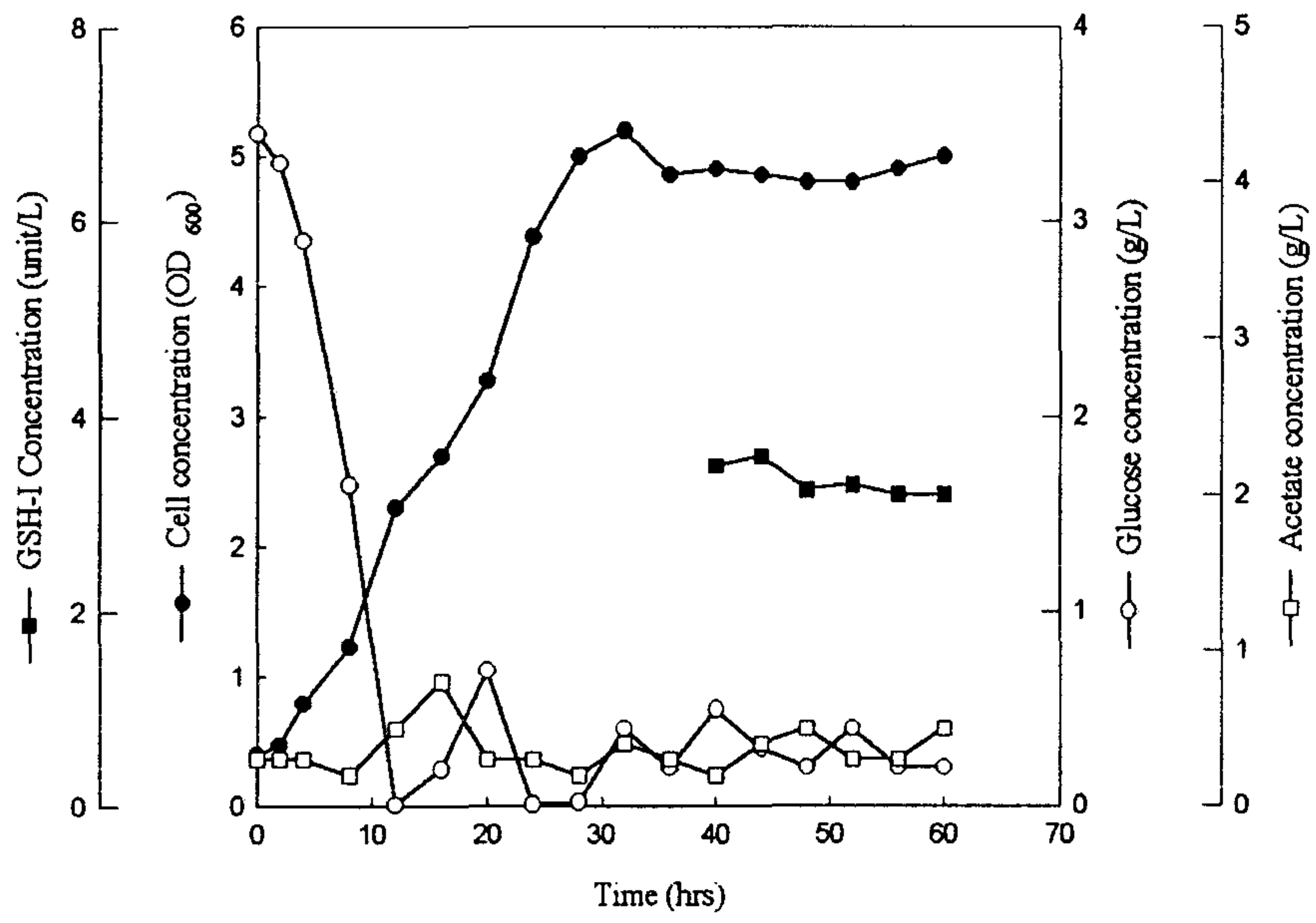


Fig. 8. Continuous culture of *E. coli* TG1/pDG7 α ($\mu=0.15 \text{ hr}^{-1}$).

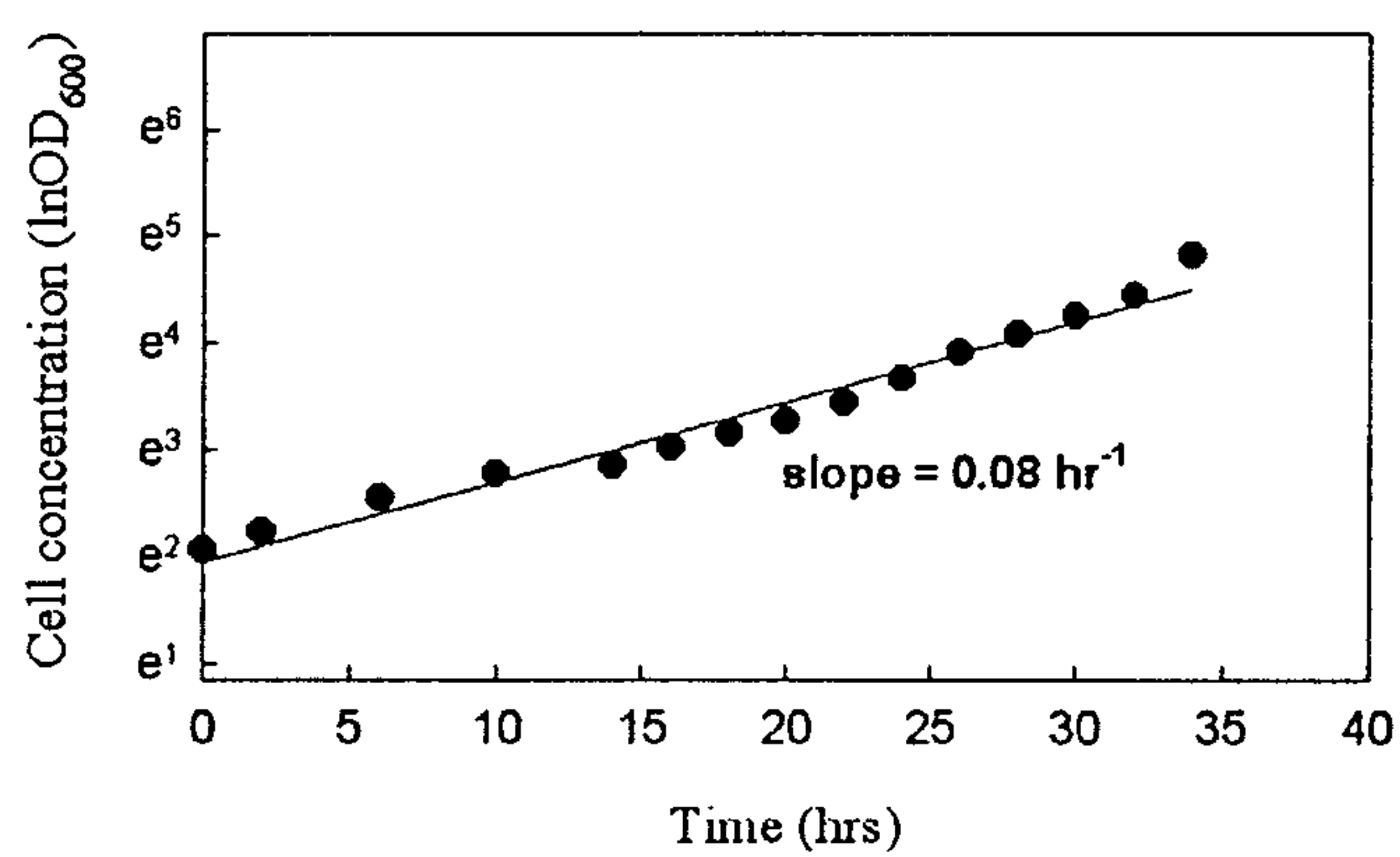
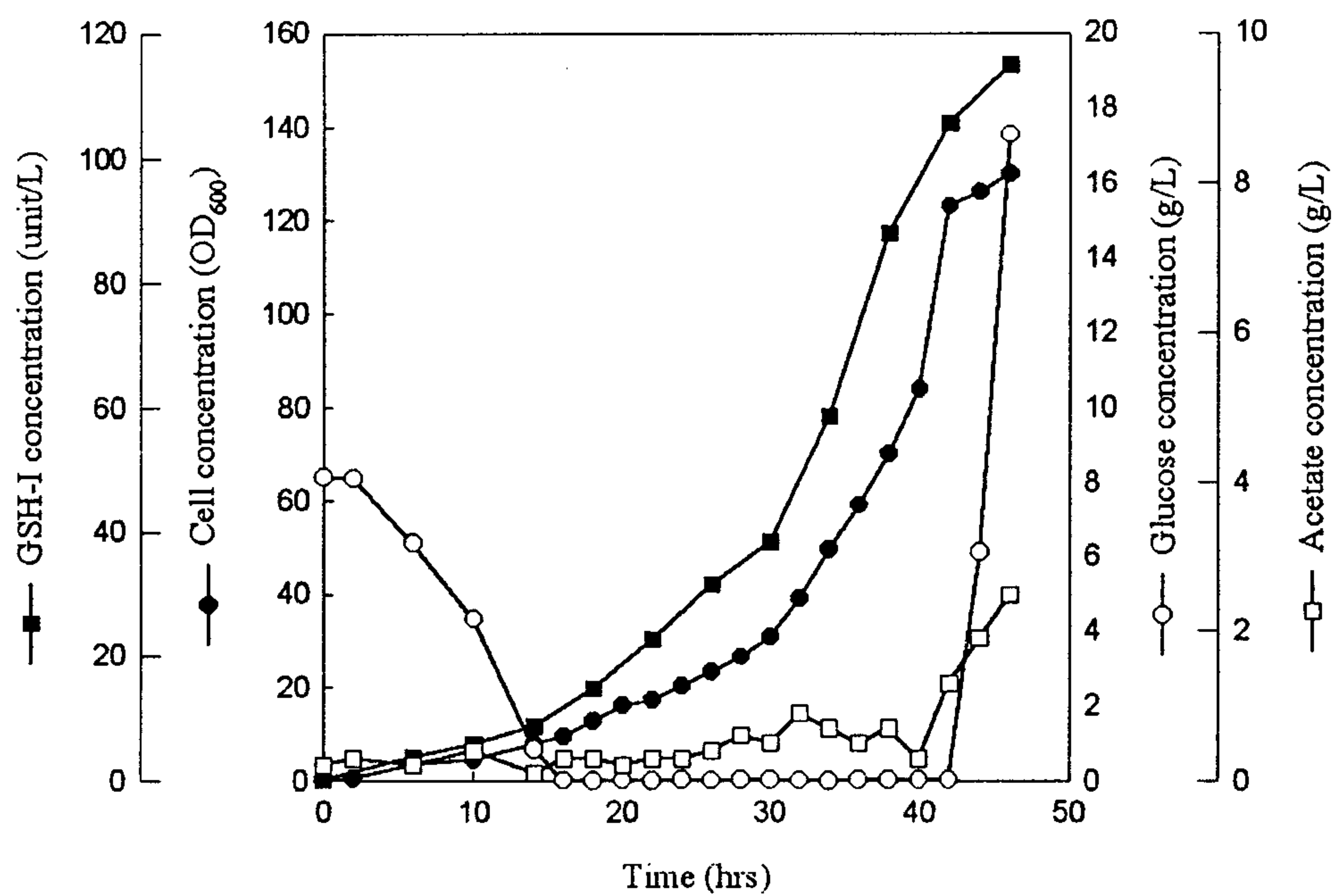


Fig. 9. Fed-batch culture of *E.coli* TG1/pDG7 α ($\mu=0.1 \text{ hr}^{-1}$).

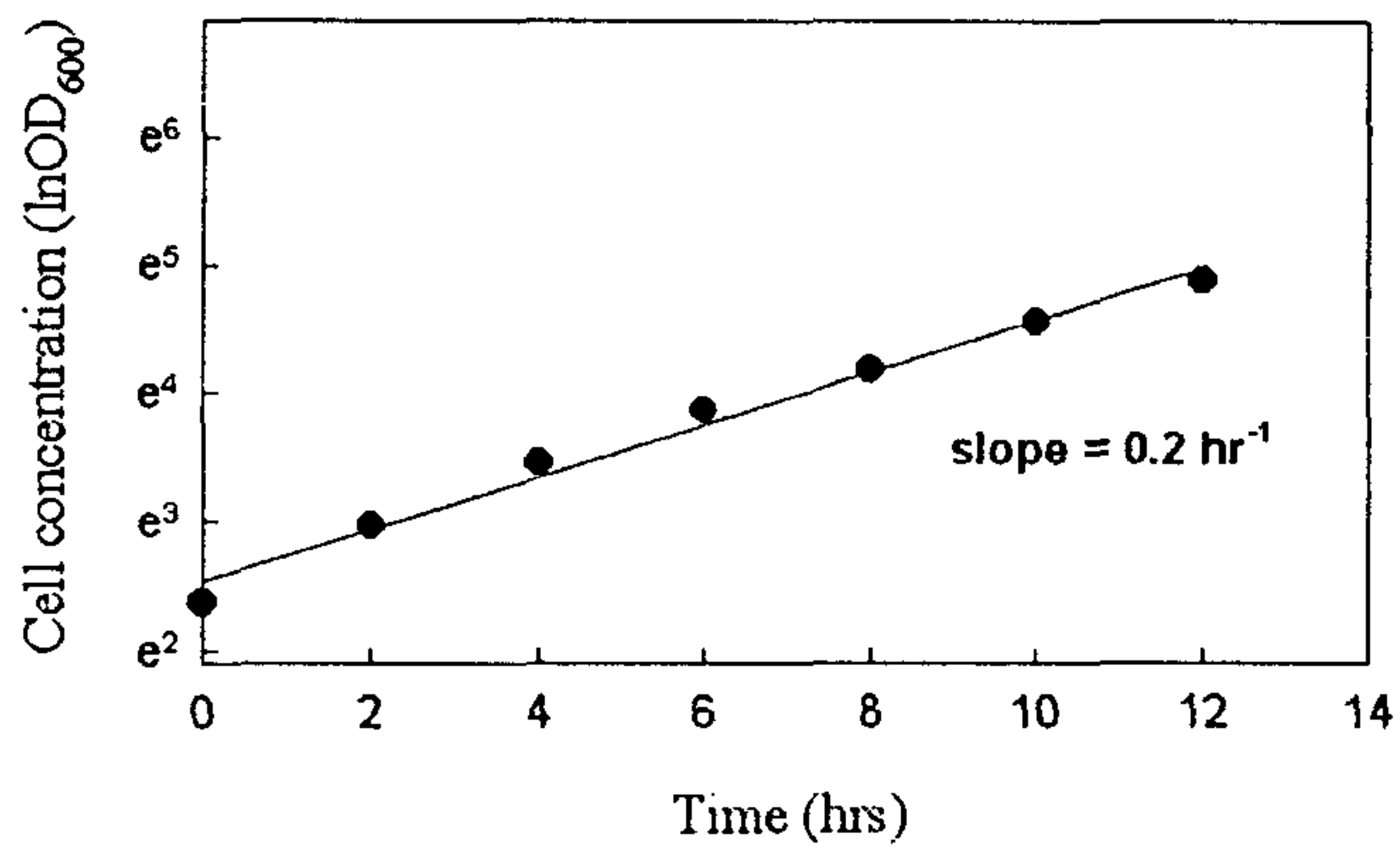
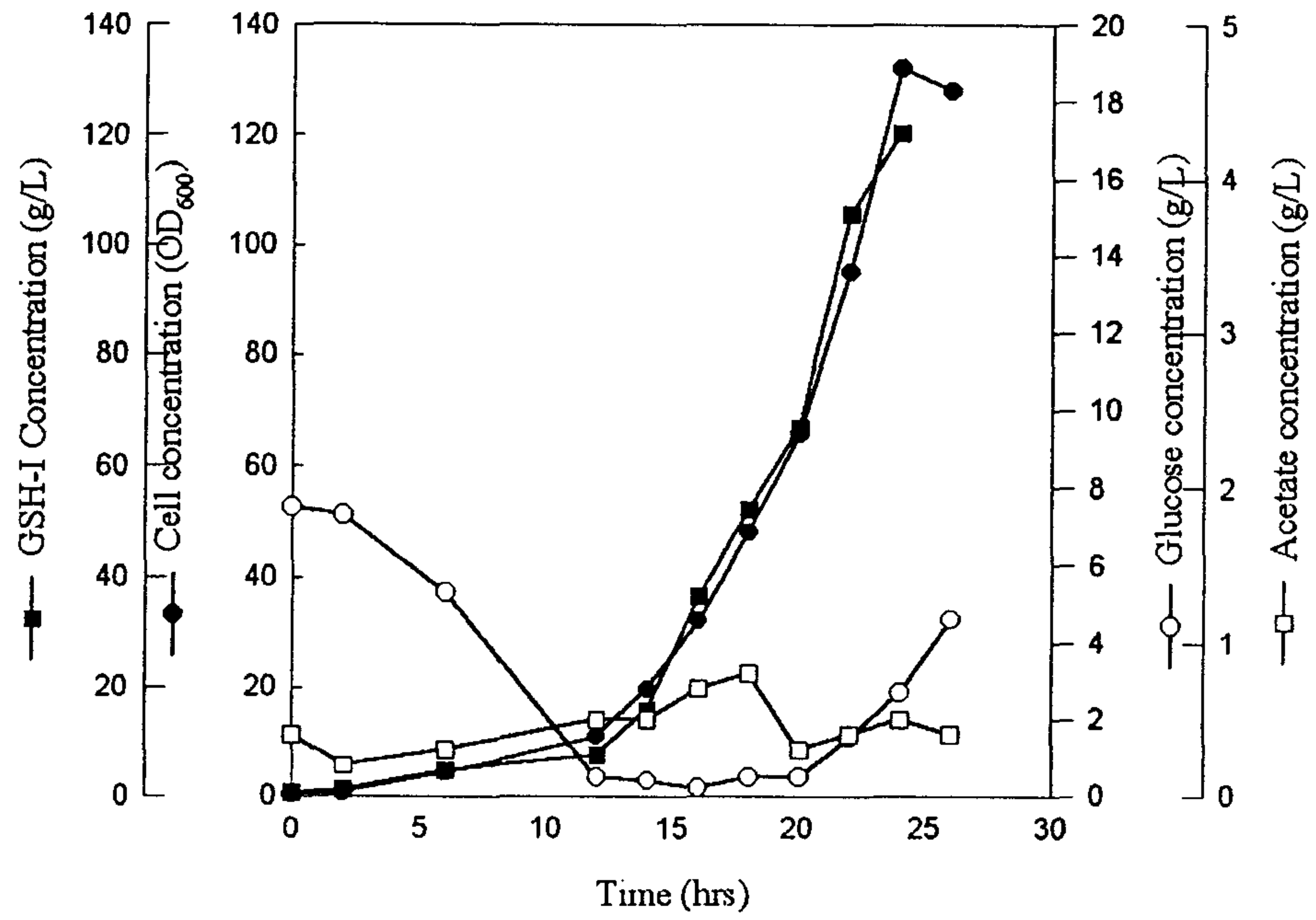


Fig. 10. Fed-batch culture of *E.coli* TG1/pDG7 α ($\mu=0.2 \text{ hr}^{-1}$).

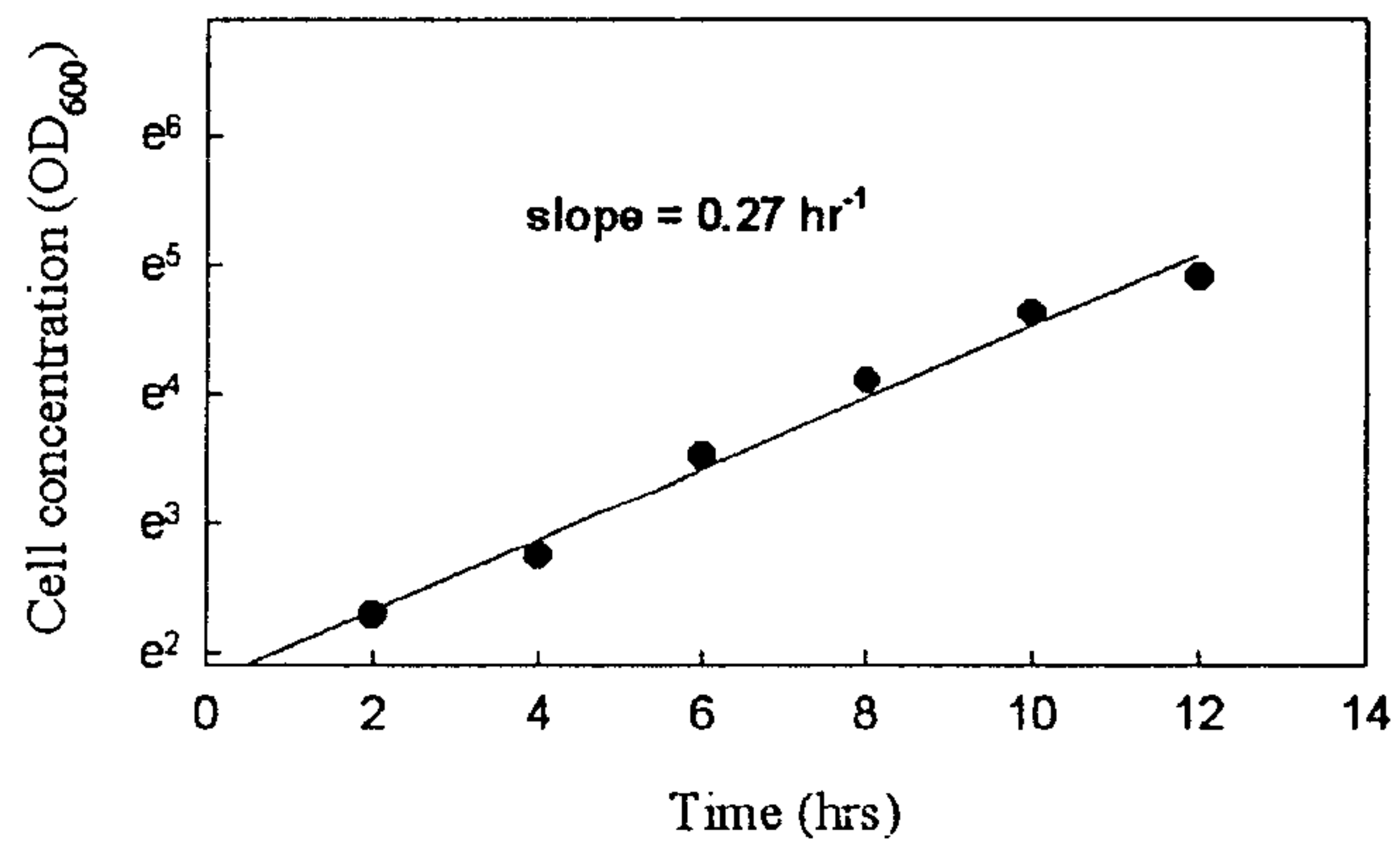
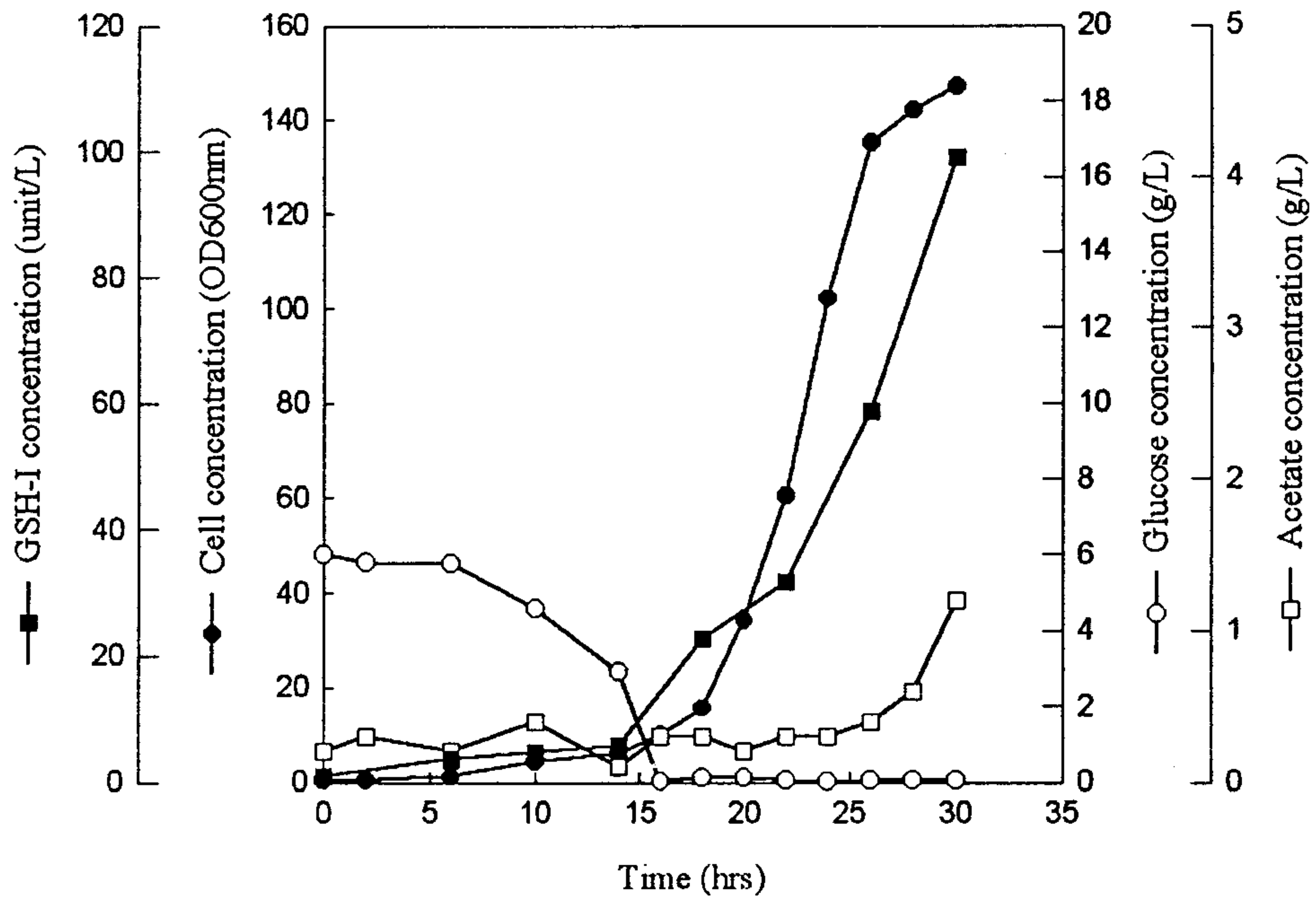


Fig. 11. Fed-batch culture of *E.coli* TG1/pDG7 α ($\mu=0.3 \text{ hr}^{-1}$).

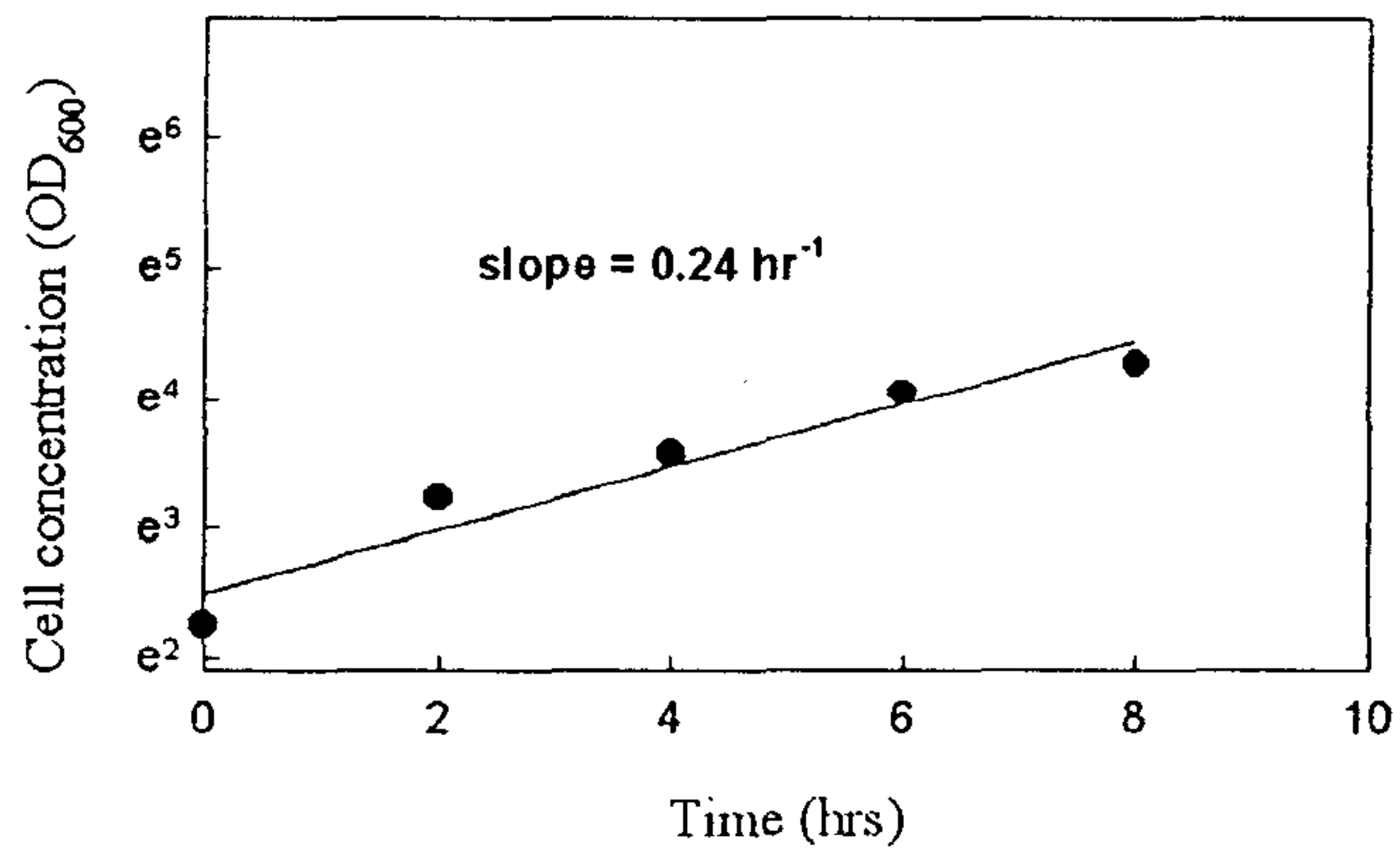
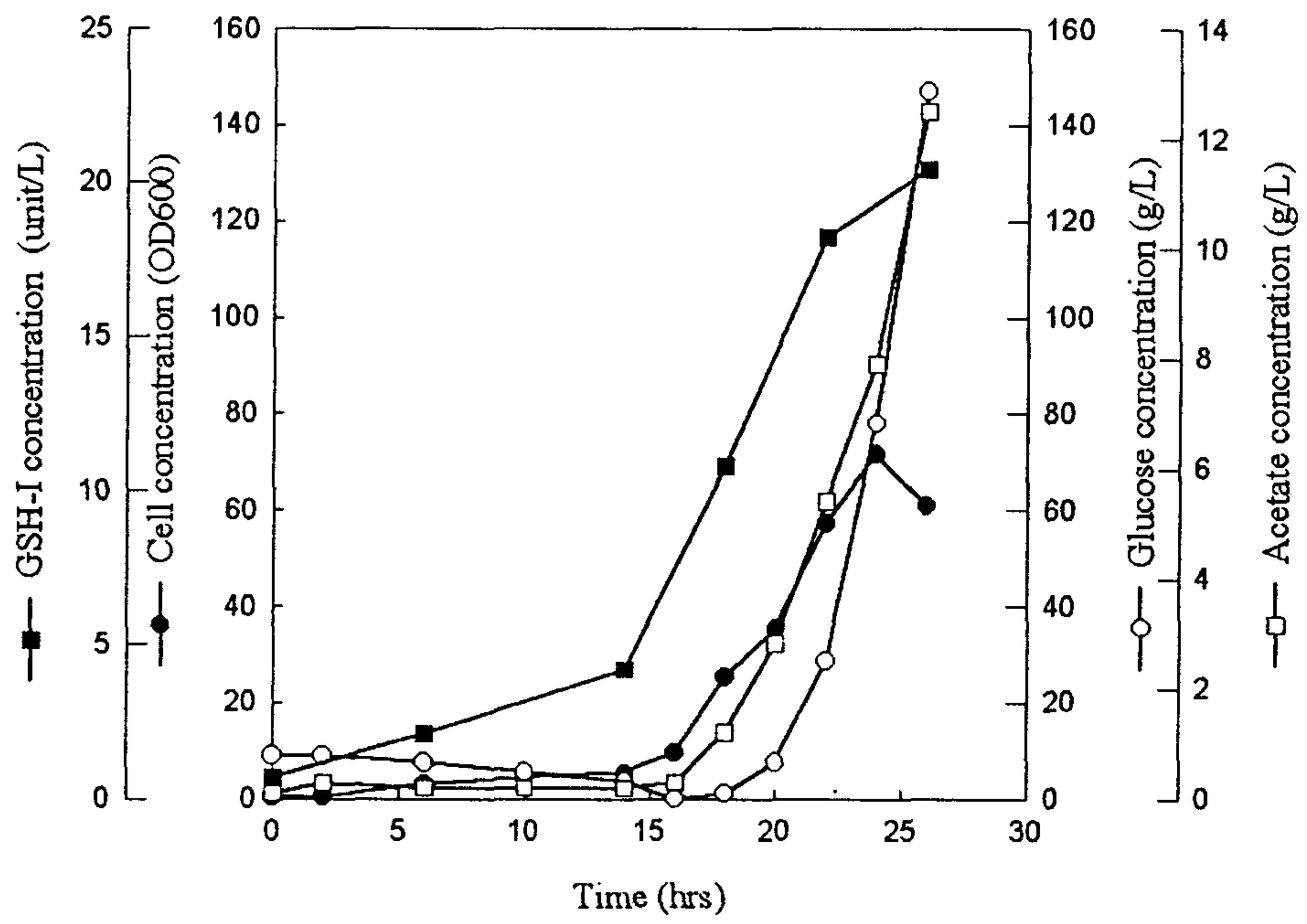


Fig. 12. Fed-batch culture of *E. coli* TG1/pDG7 α ($\mu=0.4 \text{ hr}^{-1}$).

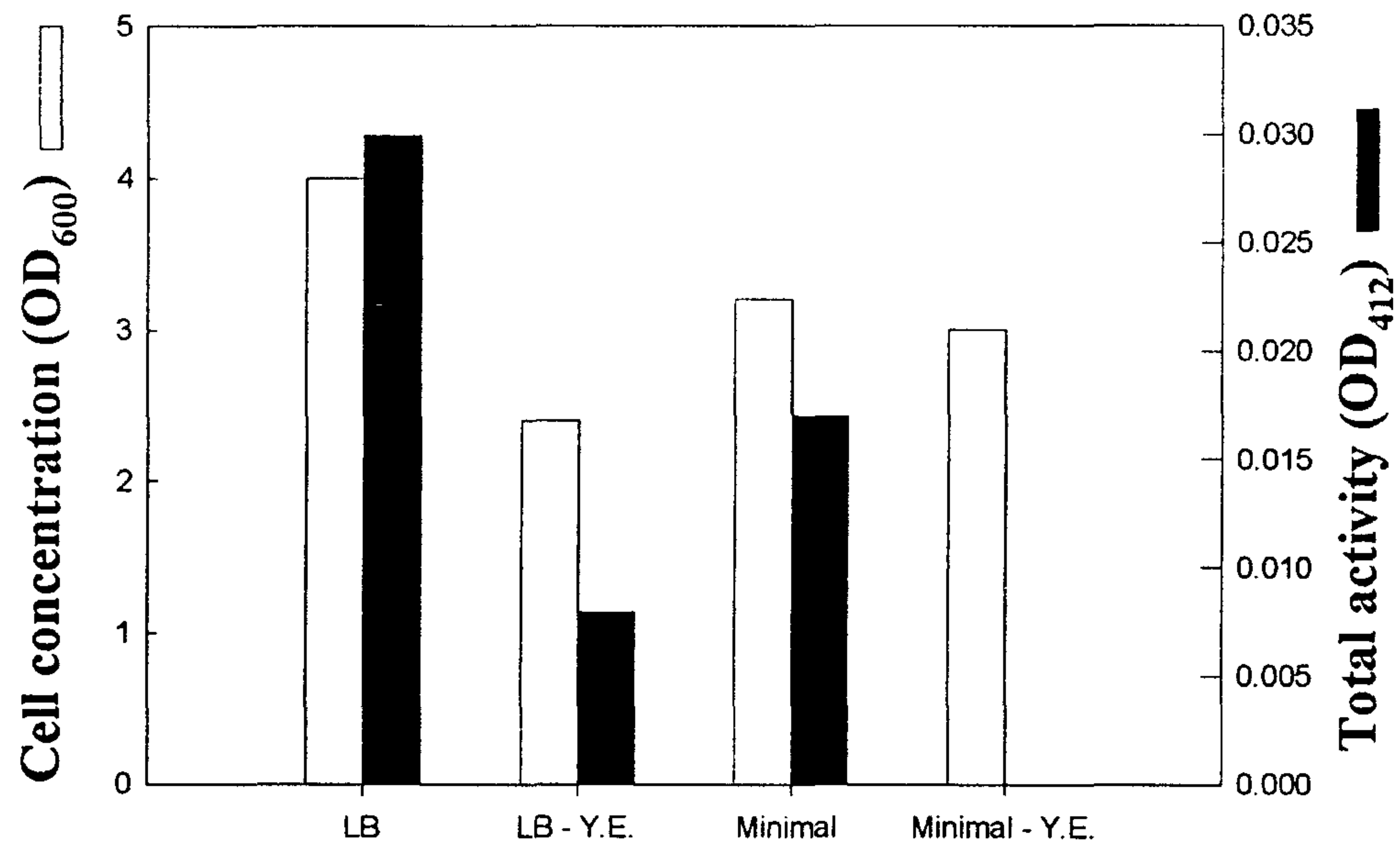


Fig. 13. Effect of LB medium composition in flask culture and established fed-batch fermentation composition on cell growth and total activity.

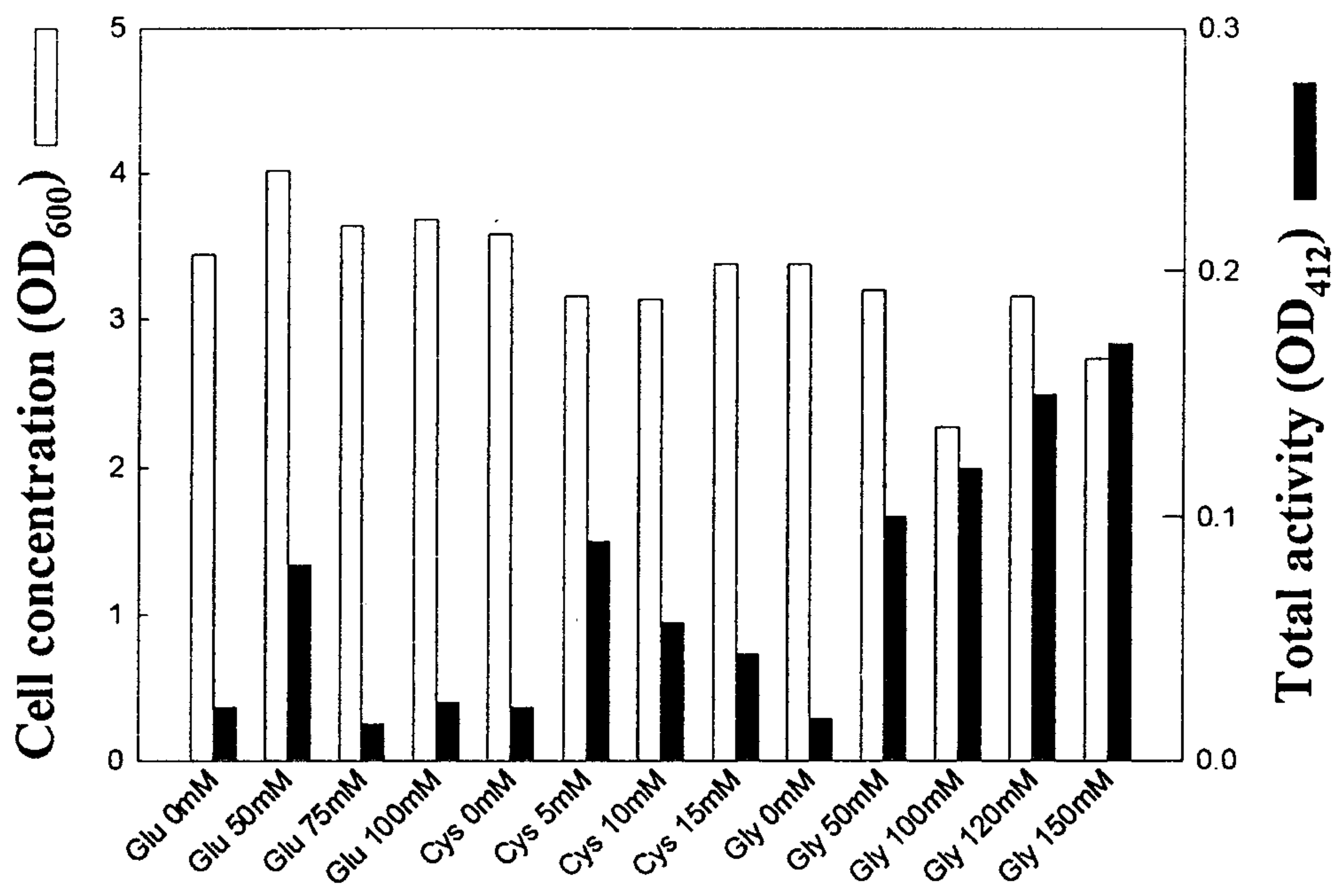


Fig. 14. Effect of 3 amino acids on cell growth and total activity.

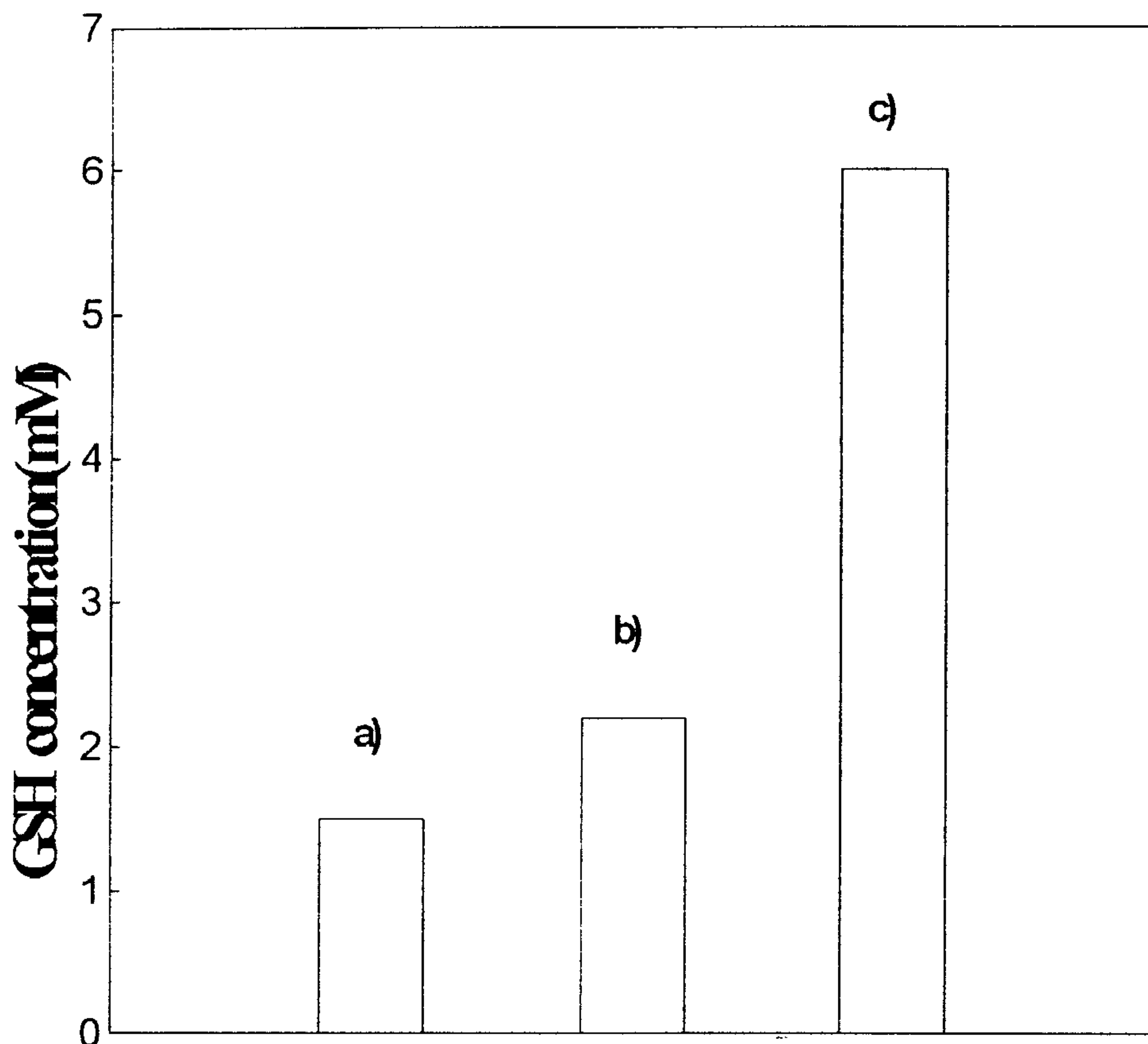


Fig. 15. The amount of GSH produced by *E. coli* TG1. a) HCDC in established fermentation medium, b) HCDC in established fermentation medium + 3 a.a., c) flask culture in LB medium.

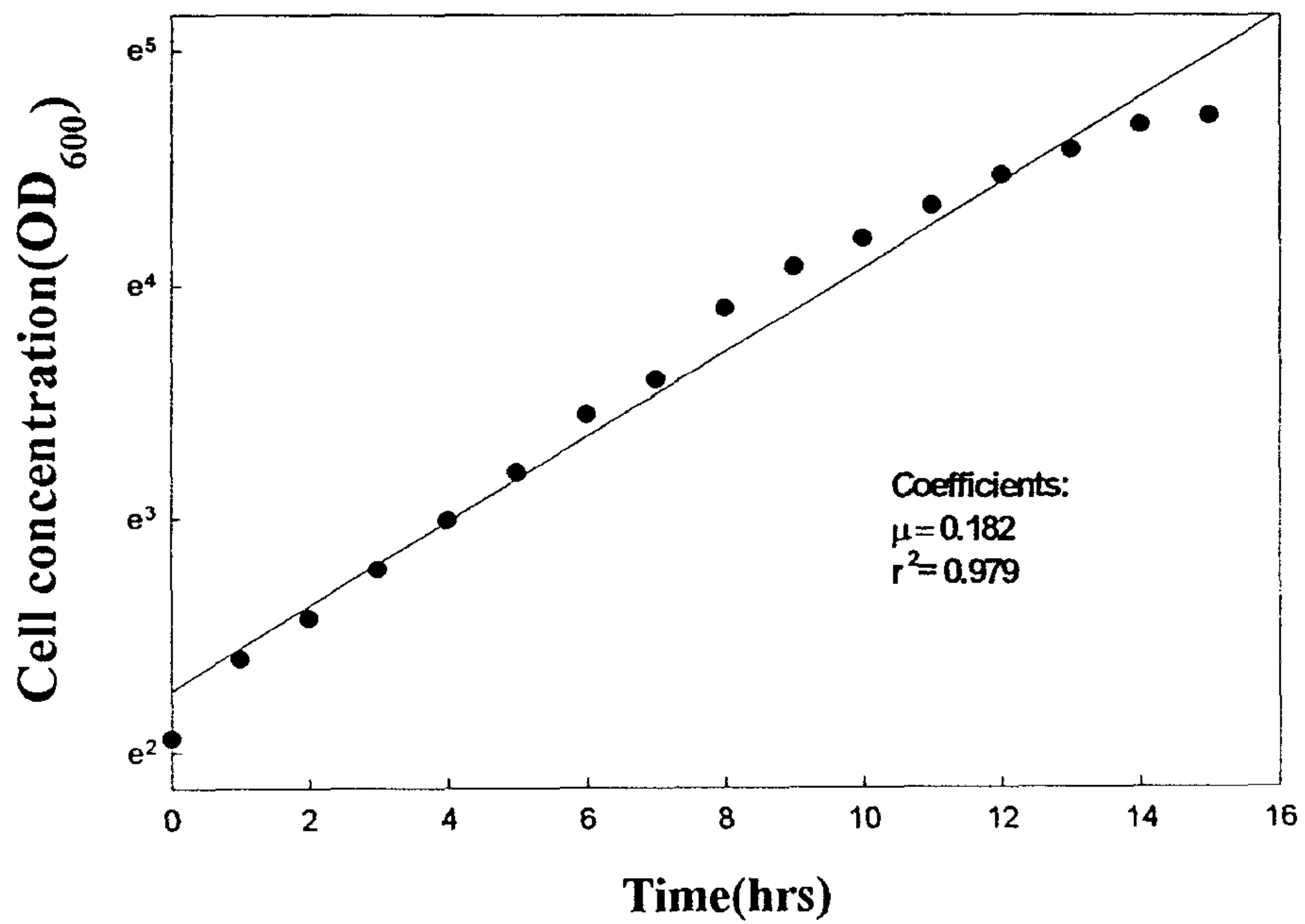
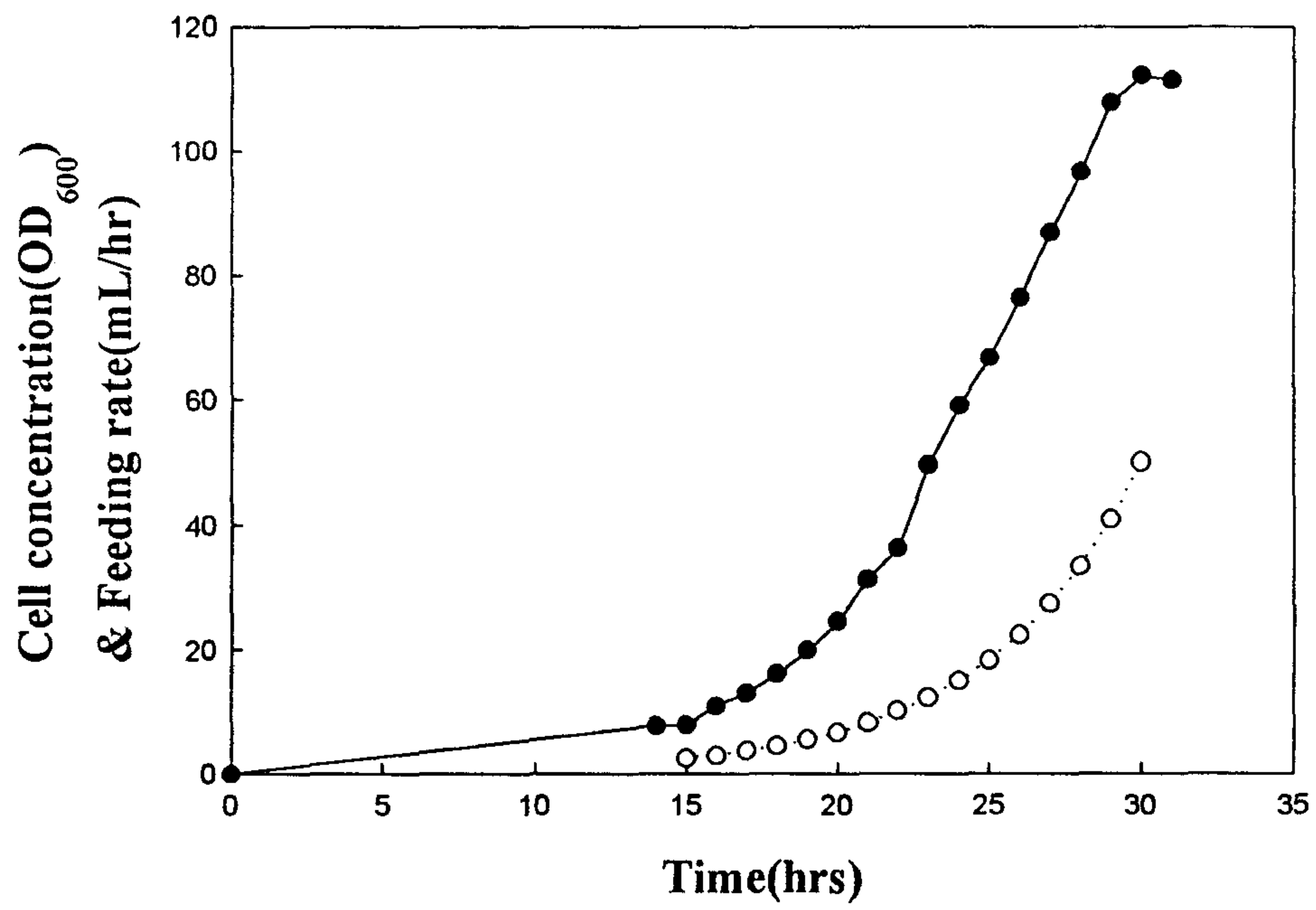


Fig. 16. Fed-batch culture of *E.coli* TG1. Ampicillin in feed; 0.5g/L

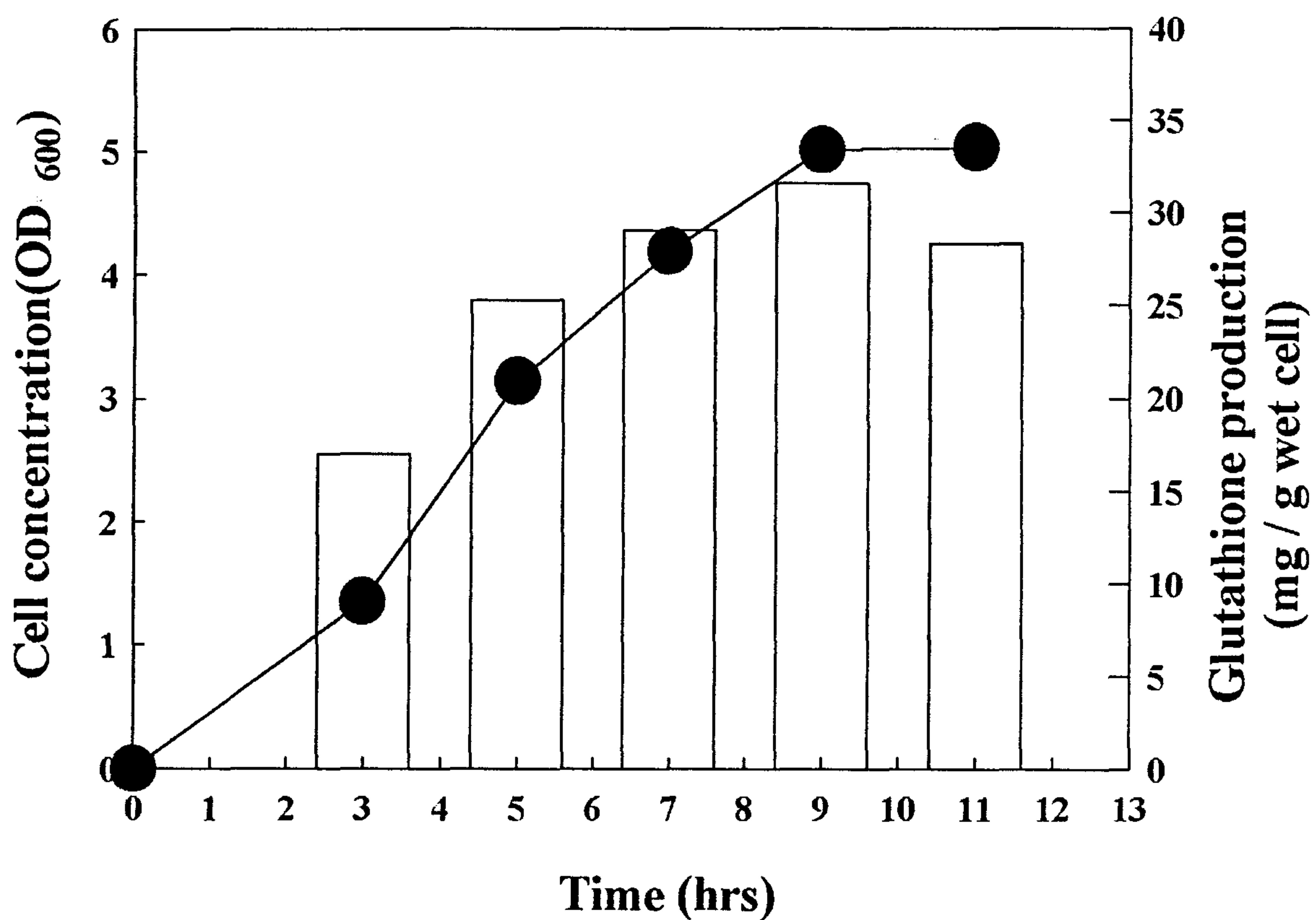


Fig. 17. Time course variation of glutathione and cell concentration in a recombinant *E. coli* culture. ● ; cell density, □ ; glutathione concentration.

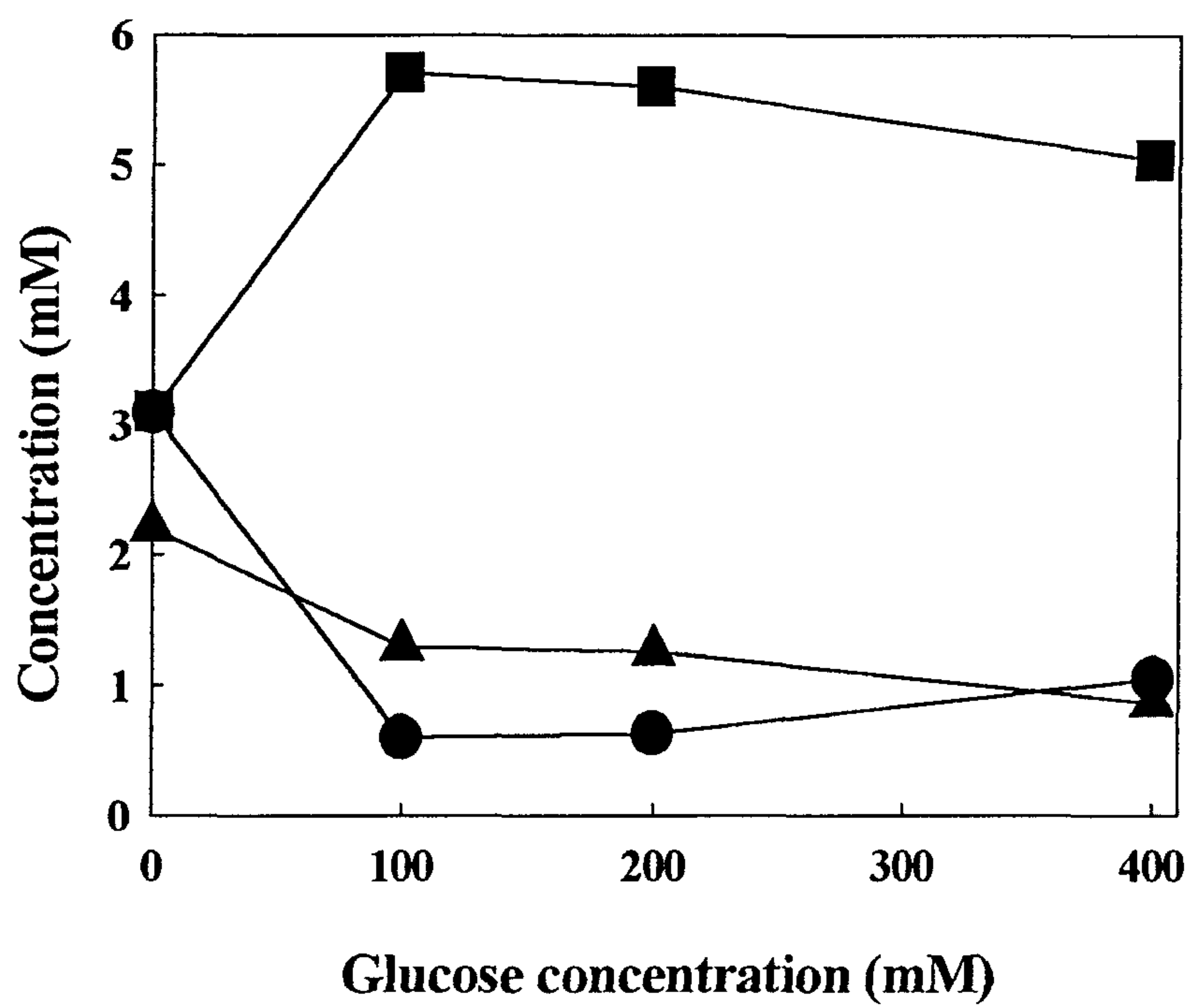


Fig. 18. Effect of glucose concentration on glutathione production.
● ; cysteine, ▲ ; γ - glutamylcysteine, ■ ; glutathione.

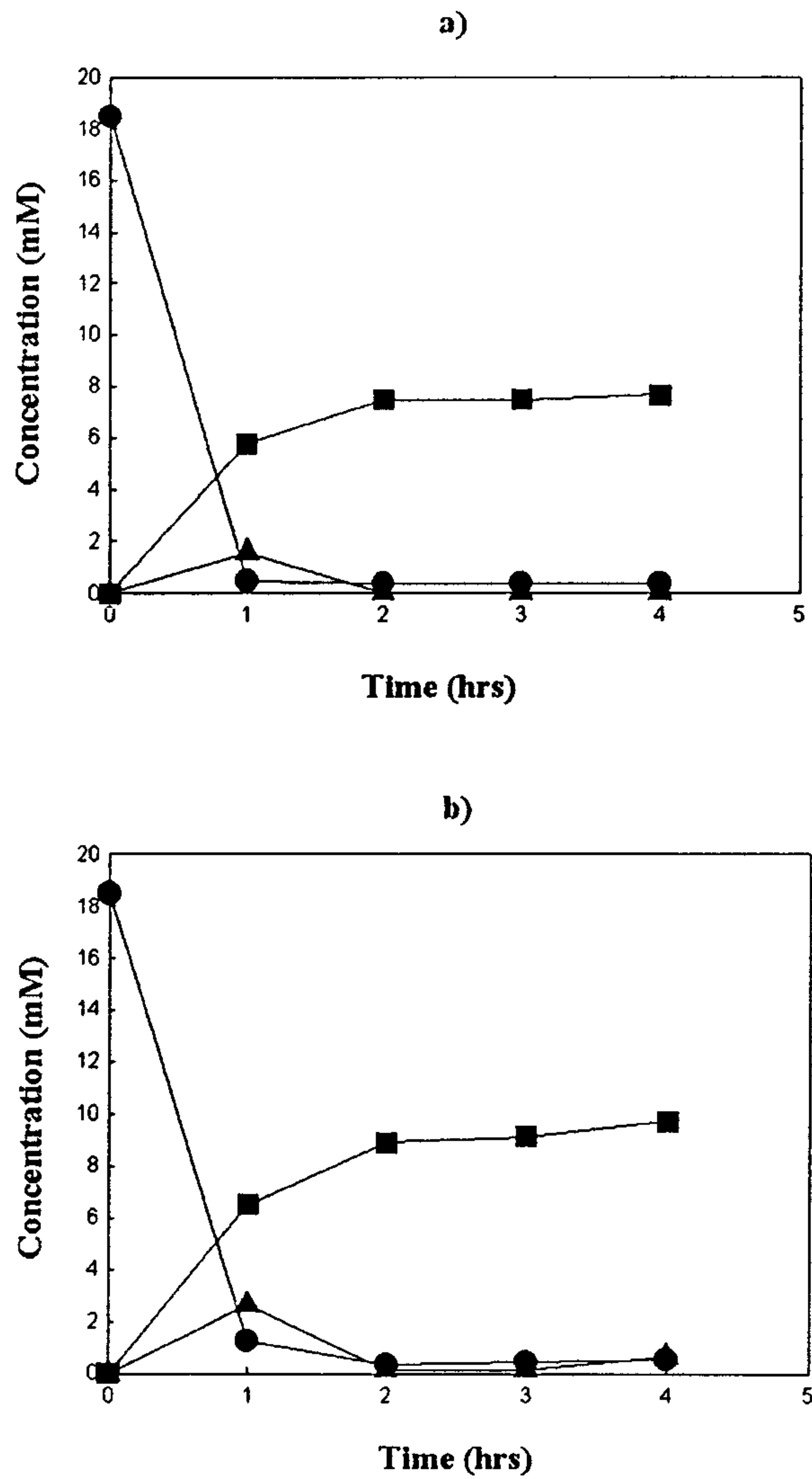


Fig. 19. Glutathione production in a) *E. coli* only and b) mixed cell (*E. coli* + yeast) systems containing 10mM initial ATP. ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamylcysteine, ■ ; glutathione.

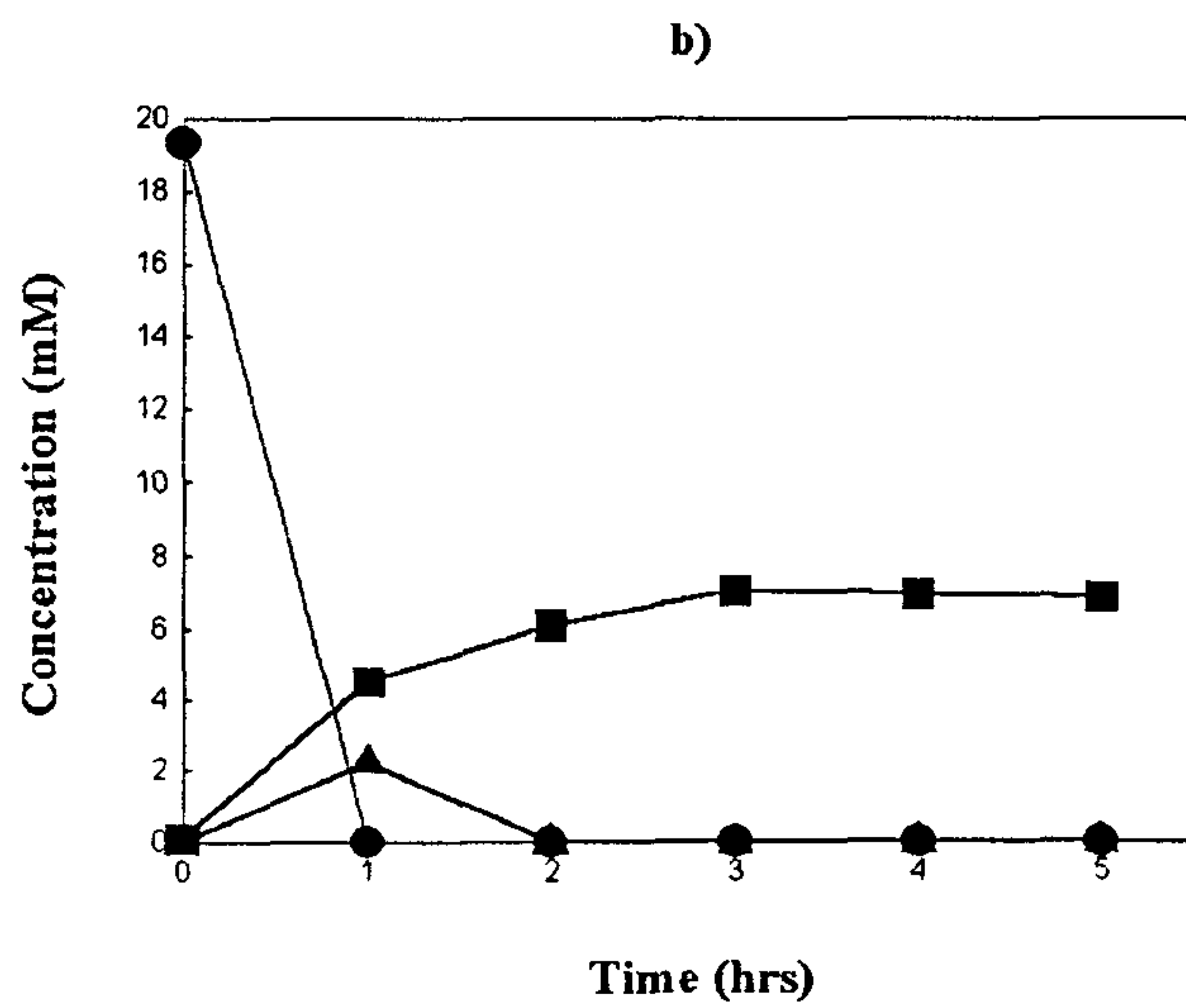
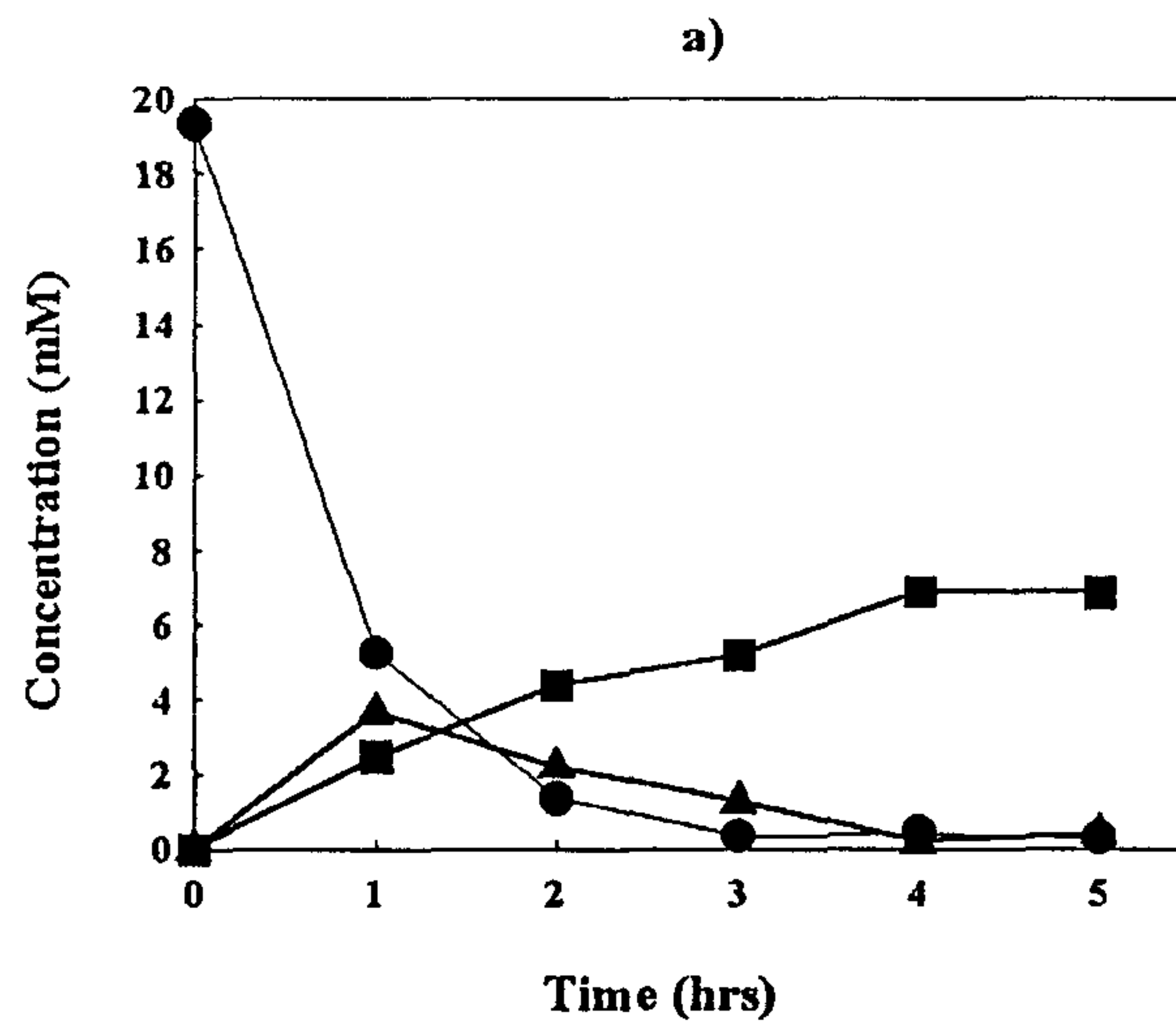


Fig. 20. Glutathione production in a) *E. coli* only and b) mixed cells(*E. coli* + yeast) systems containing 5mM initial ATP. ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamylcysteine, ■ ; glutathione.

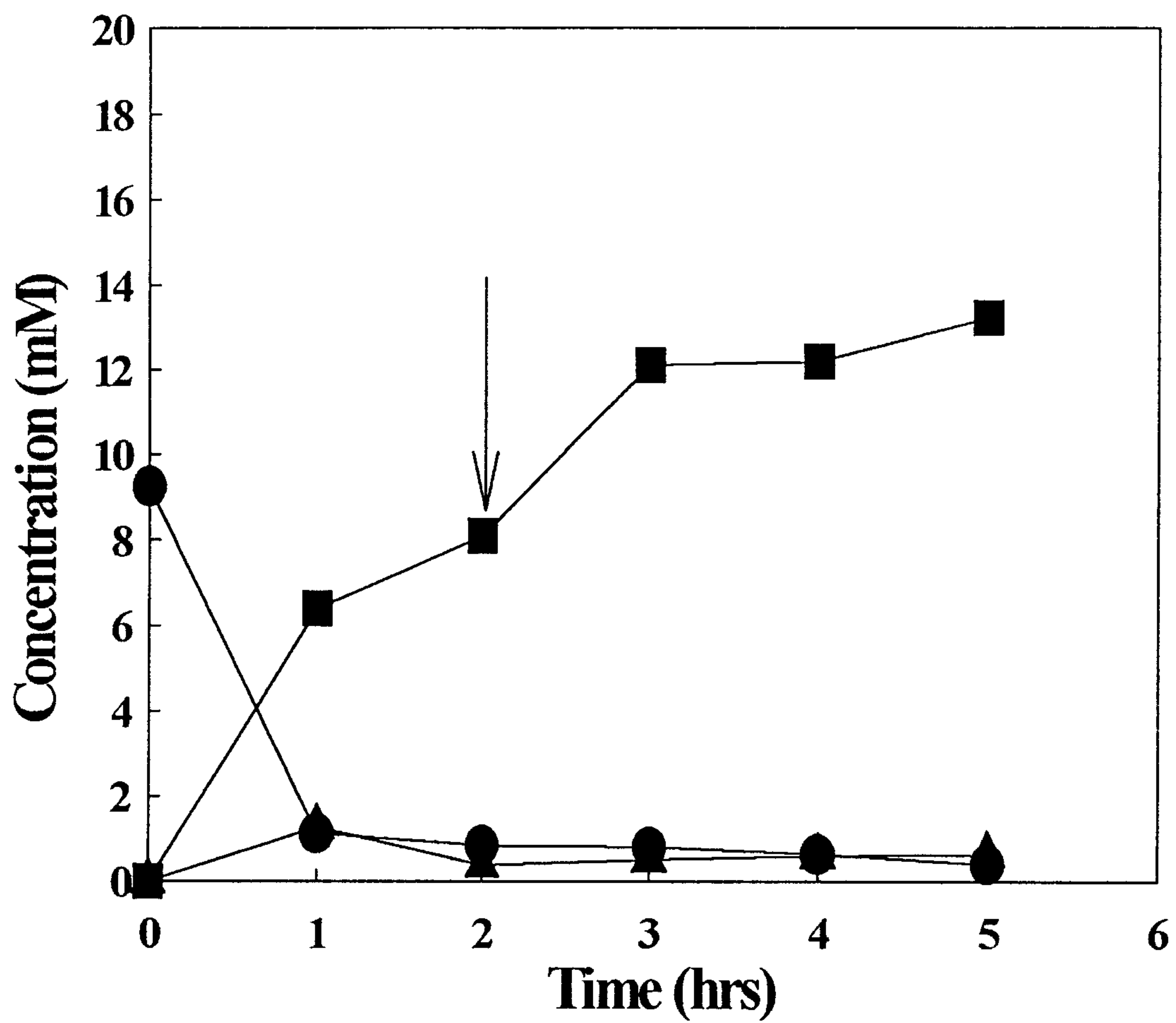


Fig. 21. Glutathione production with an extra feeding of cysteine at 2 hour at 5mM initial ATP. ● ; cysteine, ▲ ; γ - glutamylcysteine, ■ ; glutathione.

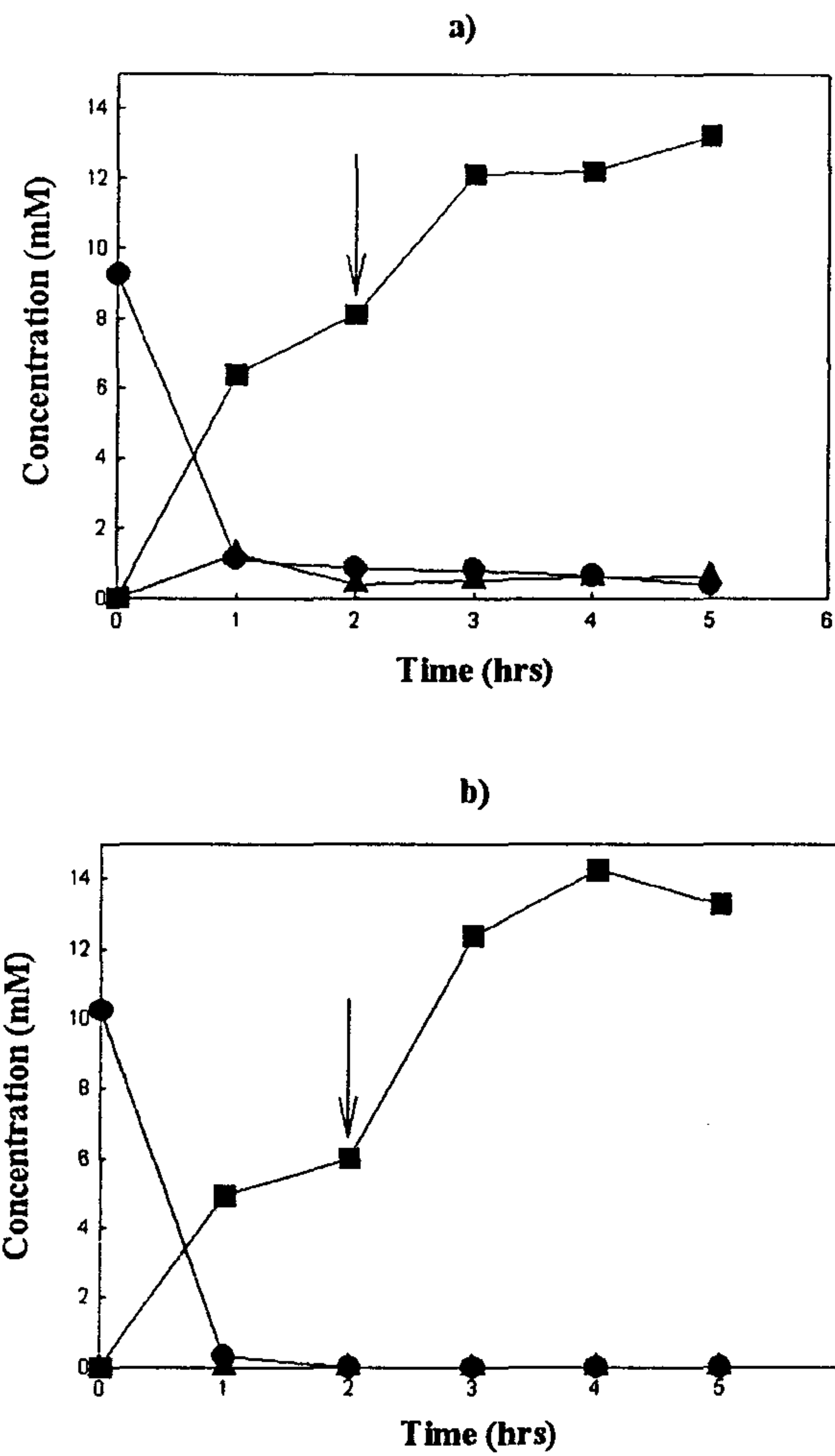


Fig. 22. Glutathione production with intermittent addition of substrates at 2 hour in mixed cell system. a) additional substrates(10mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 400mM glucose) without ATP, b)additional substrates (10mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 60mM MgCl₂, 400mM glucose) with 5mM ATP. ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamylcysteine, ■ ; glutathione.

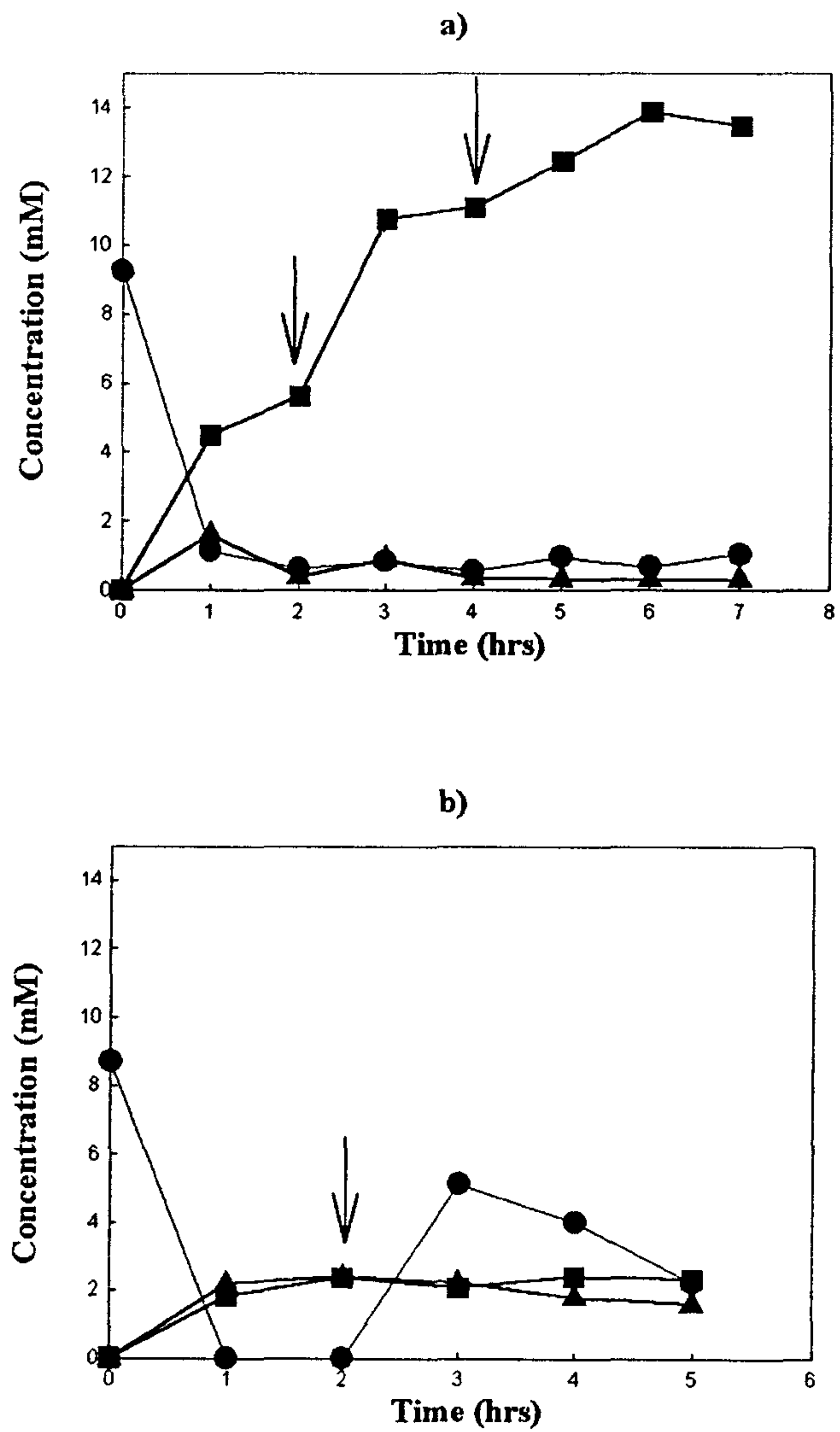


Fig. 23. Glutathione production with intermittent additions of substrates. a) additional cysteine at 2 and 4 hour with mixed cell system, b) additional cysteine at 2 hour in *E. coli* only system. ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamylcysteine, ■ ; glutathione

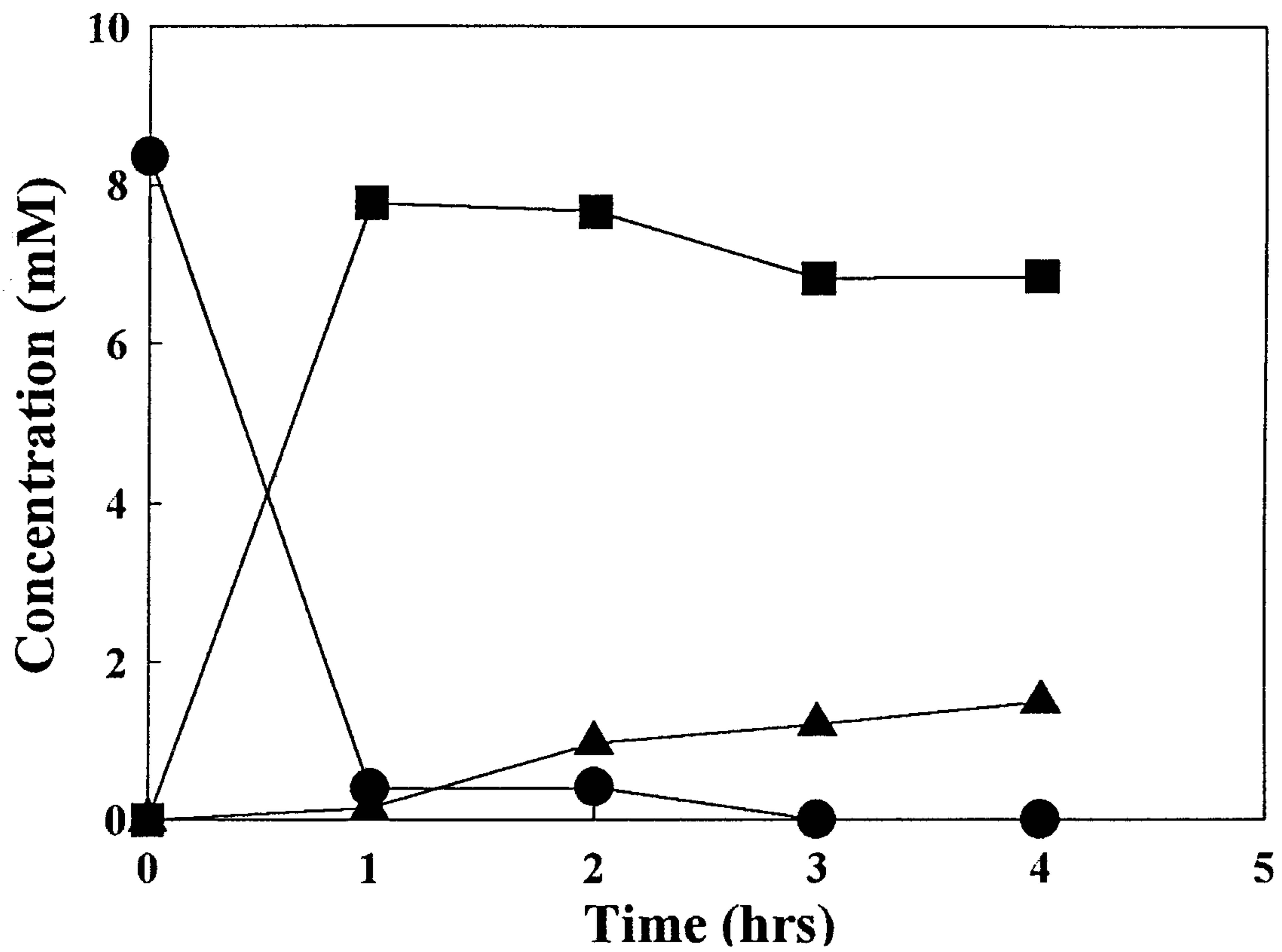


Fig. 24. Glutathione production with acetate kinase with 5mM initial ATP and 10mM acetylphosphate. ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamylcysteine, ■ ; glutathione.

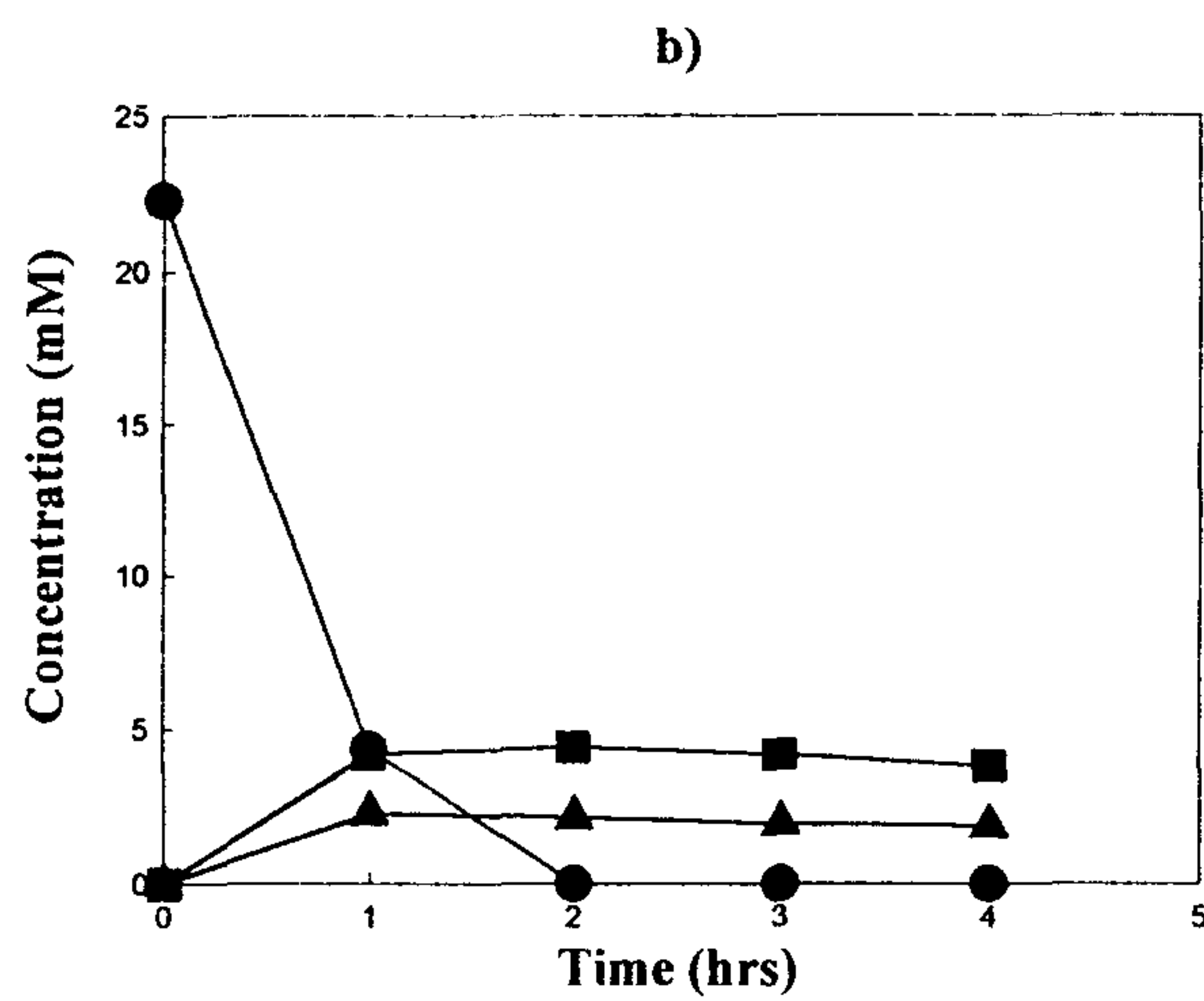
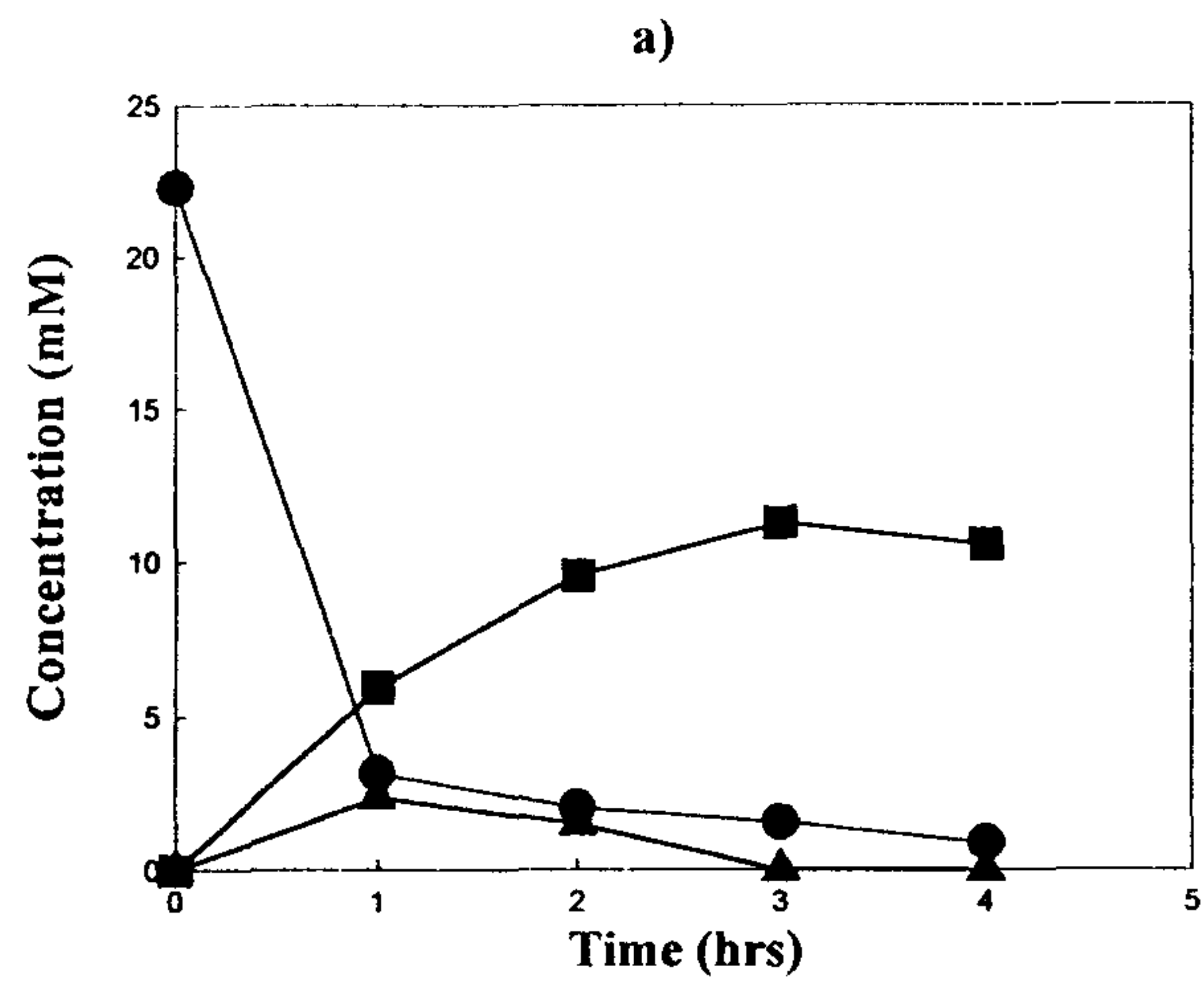


Fig. 25. Glutathione production with two ATP regeneration systems from a) bakers yeast and b) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC2485.
 ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamyl-cysteine, ■ ; glutathione.

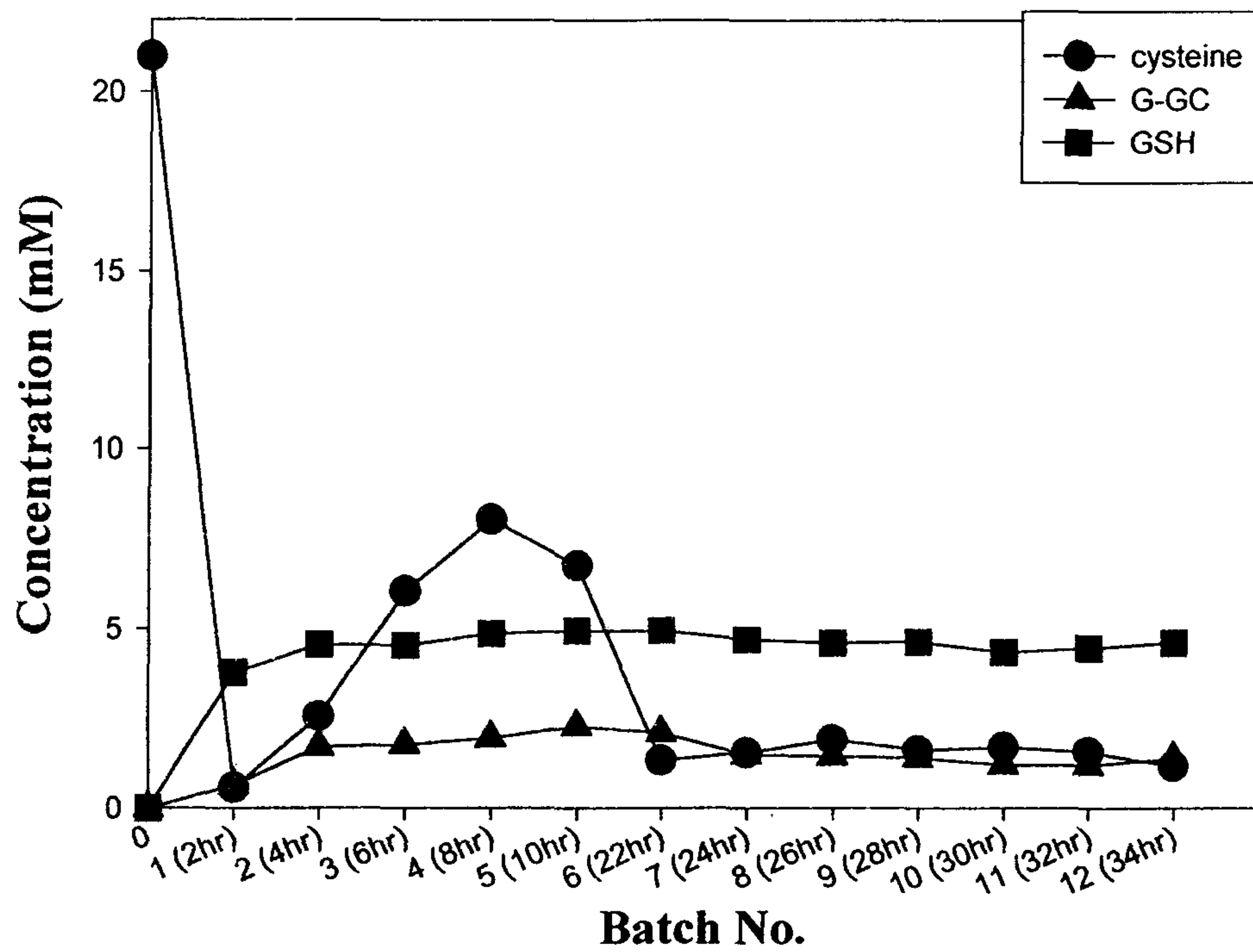


Fig. 26. Glutathione production with sequential batch with *E. coli*.

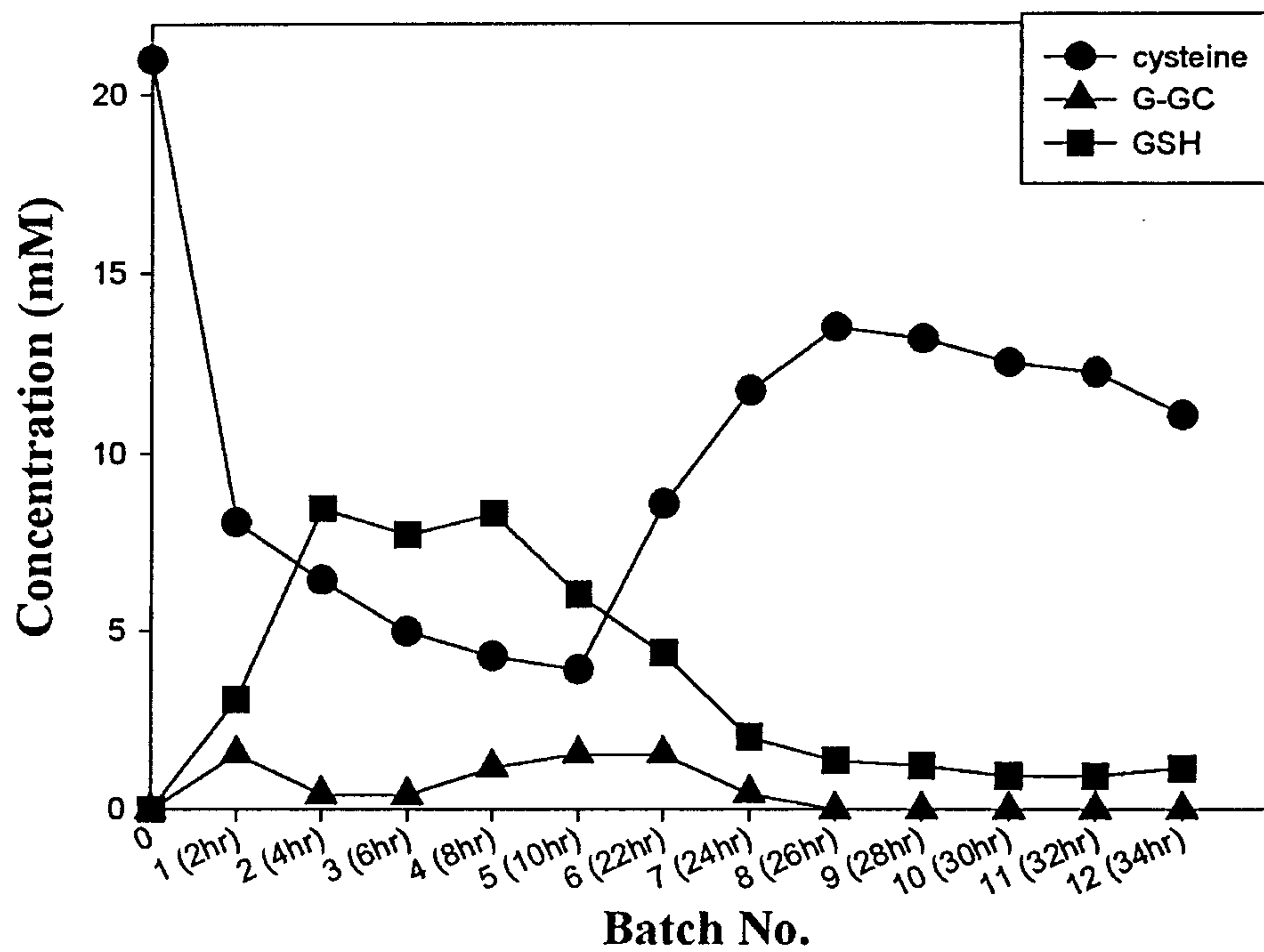


Fig. 27. Glutathione production with sequential batch with mixed cells.

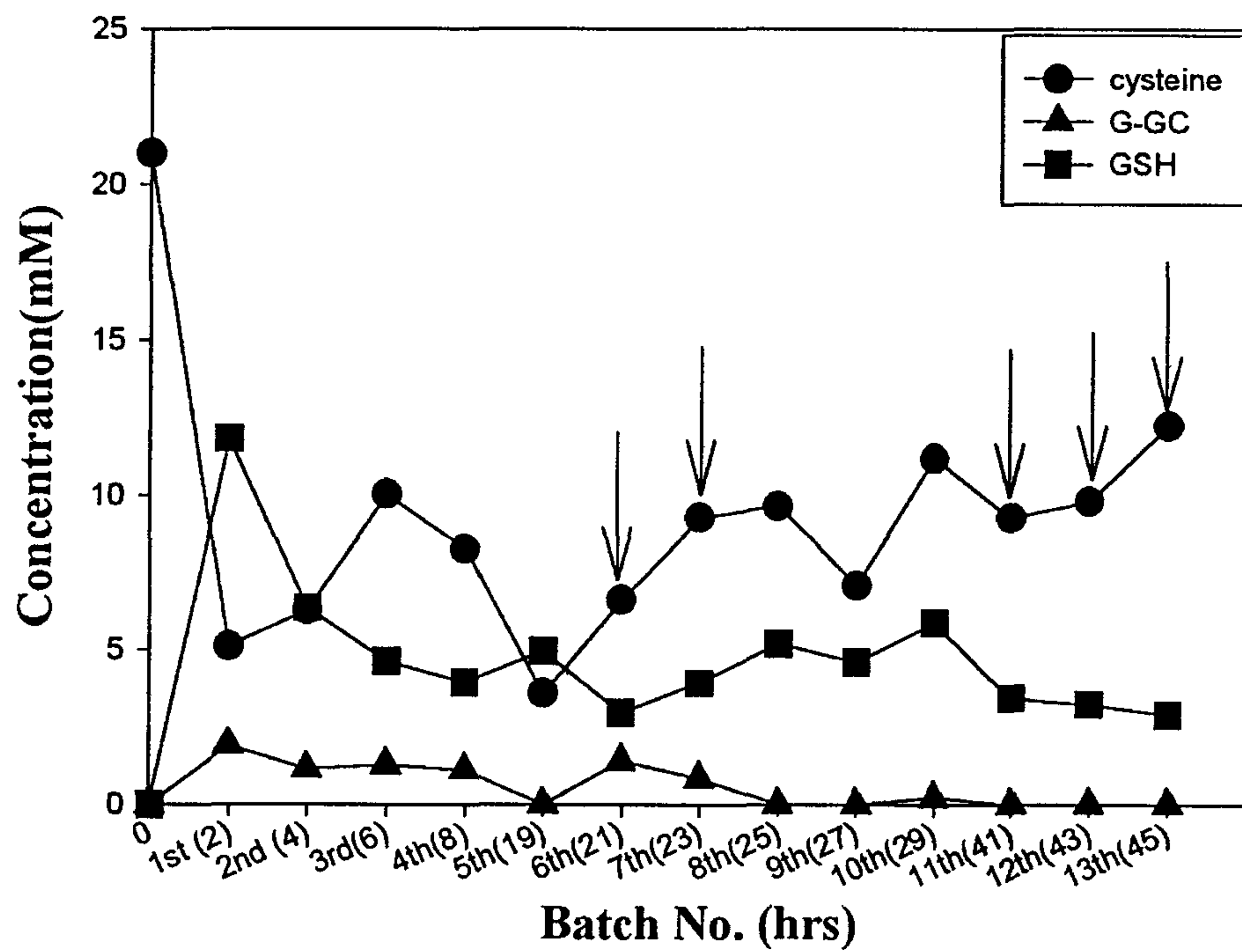


Fig. 28. Glutathione production with feeding fresh yeast in sequential batch with mixed cells.

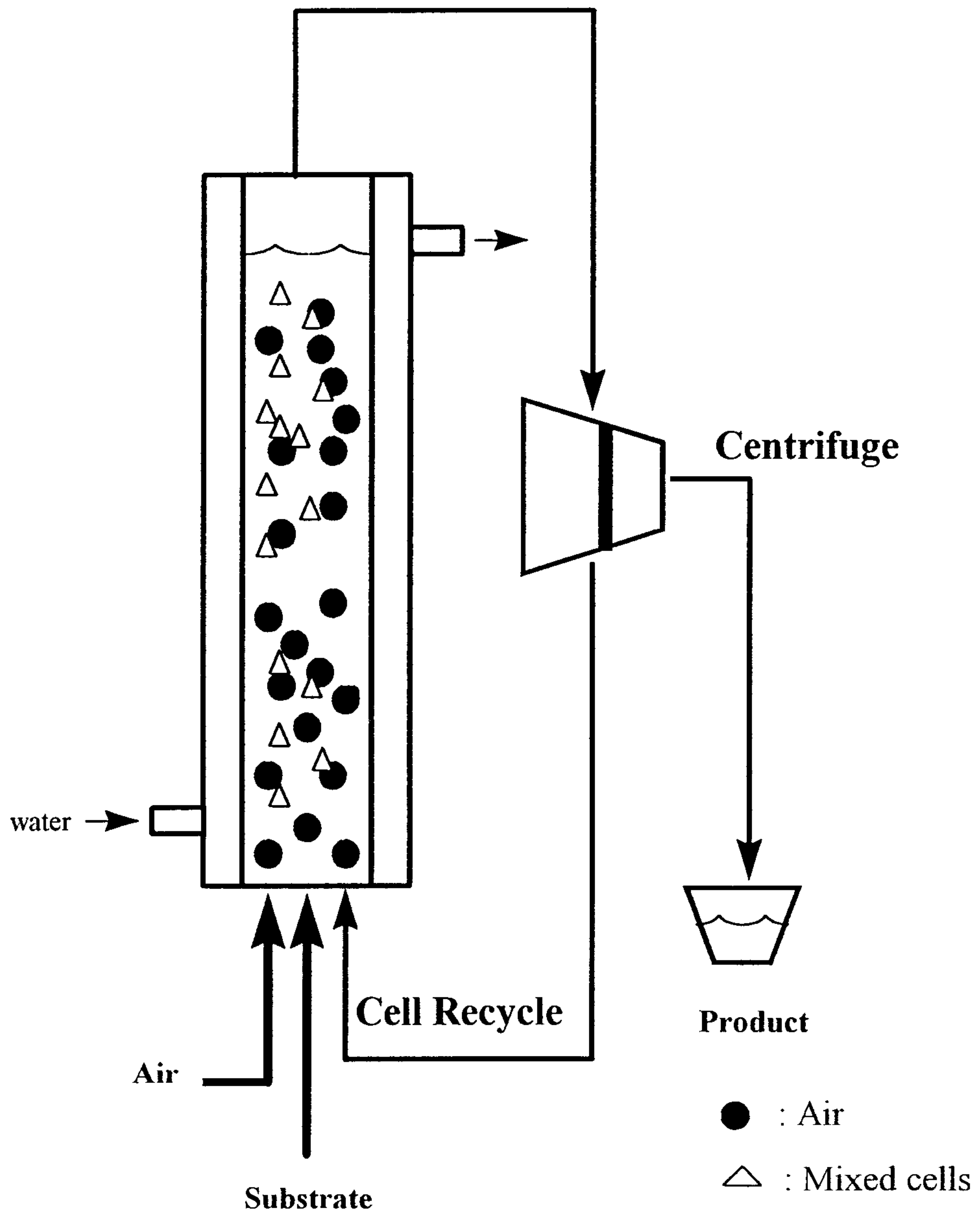


Fig. 29. Schematic drawing of aerated slurry bioreactor.

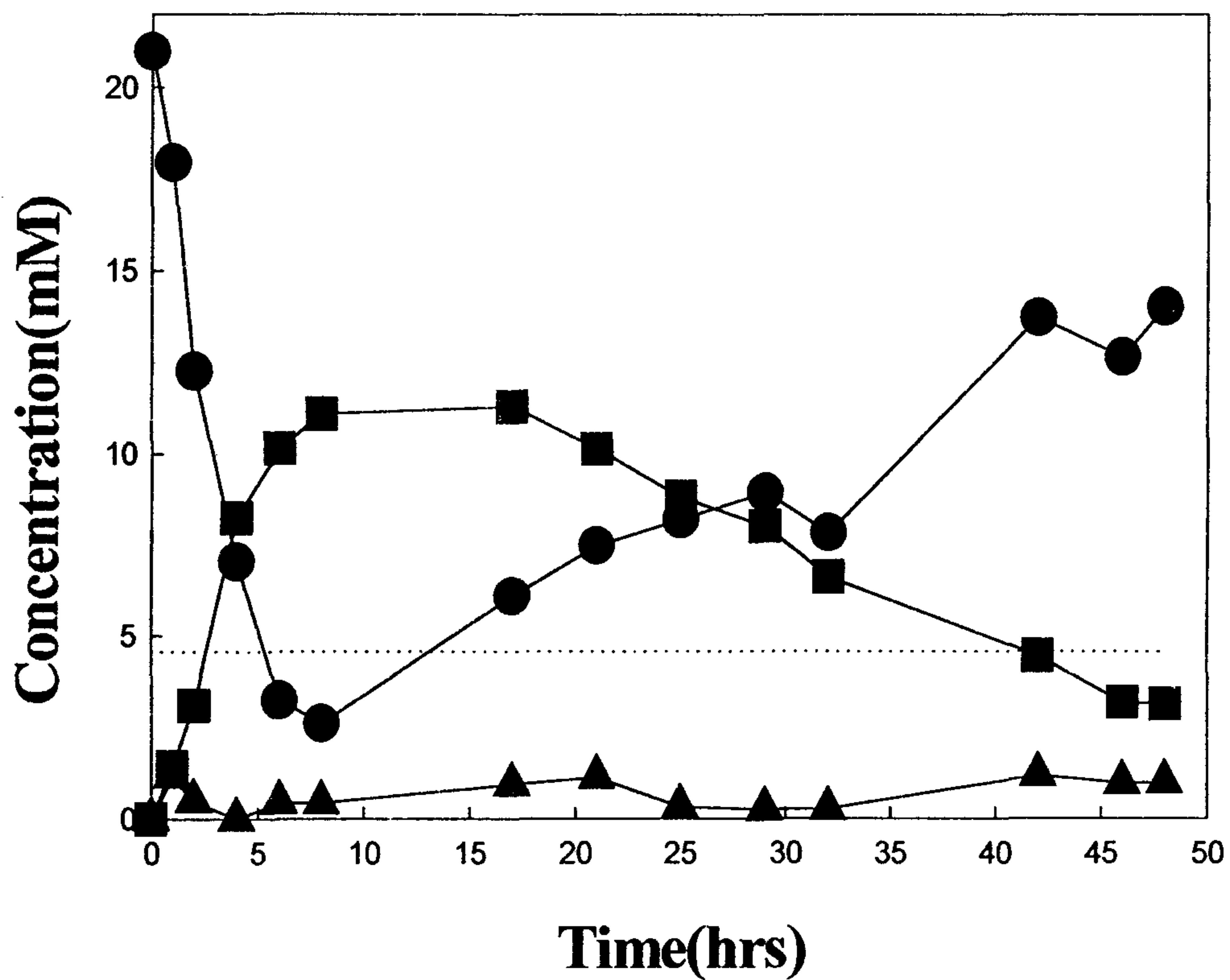


Fig. 30. Glutathione production using solvent-treated mixed cell *in vitro* by aerated slurry bioreactor at feed rate of 2.6mL/hr without recycling mixed cell. ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamylcysteine, ■; glutathione, -----; glutathione production in suspension reaction, substrates : 20mM cysteine, 80mM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

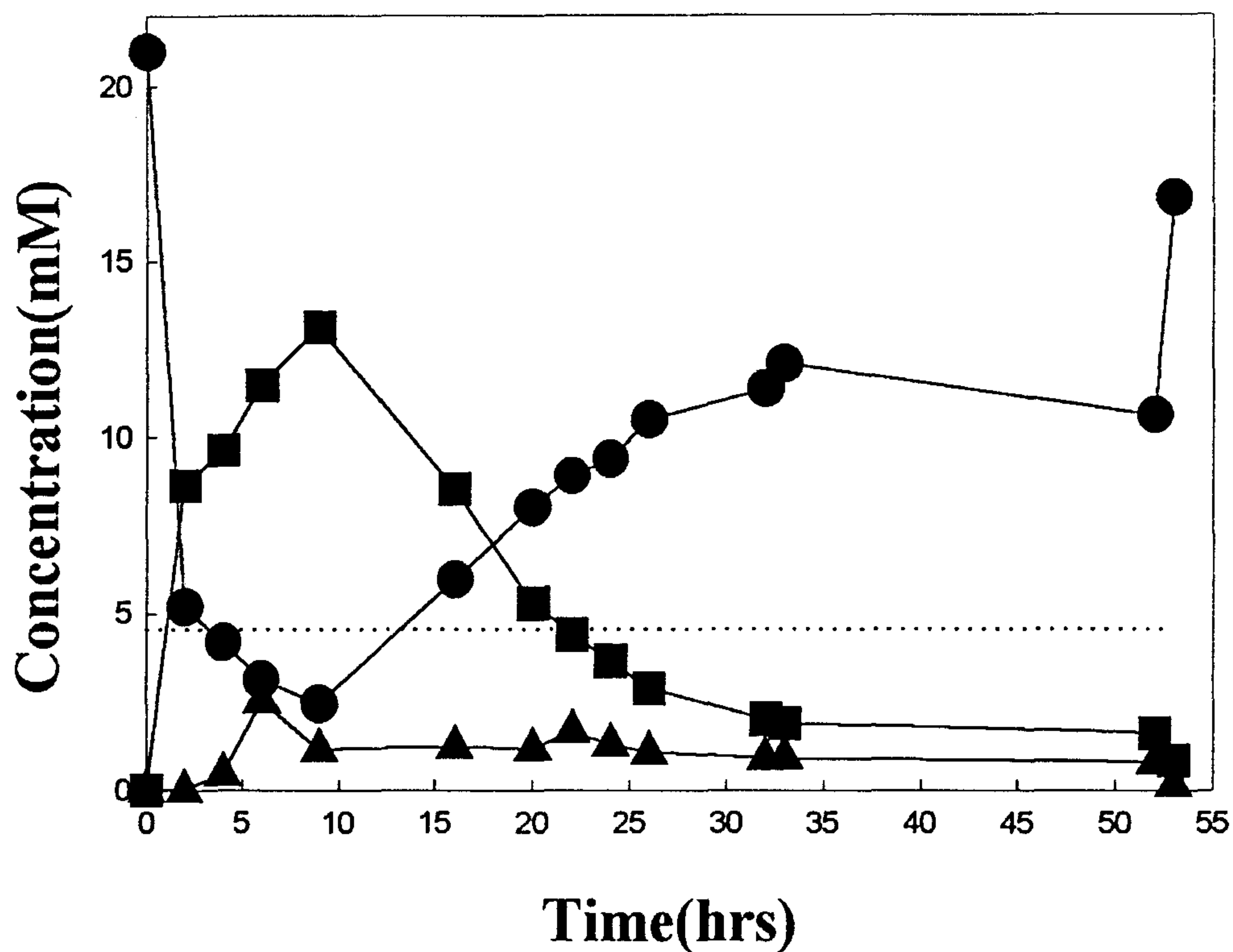


Fig. 31. Glutathione production using solvent-treated mixed cell *in vitro* by aerated slurry bioreactor at feed rate of 5.2mL/hr without recycling mixed cell. ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamylcysteine, ■ ; glutathione, -----; glutathione production in suspension reaction, substrates : 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 20mM MgCl₂, 400mM glucose, 10mM ATP.

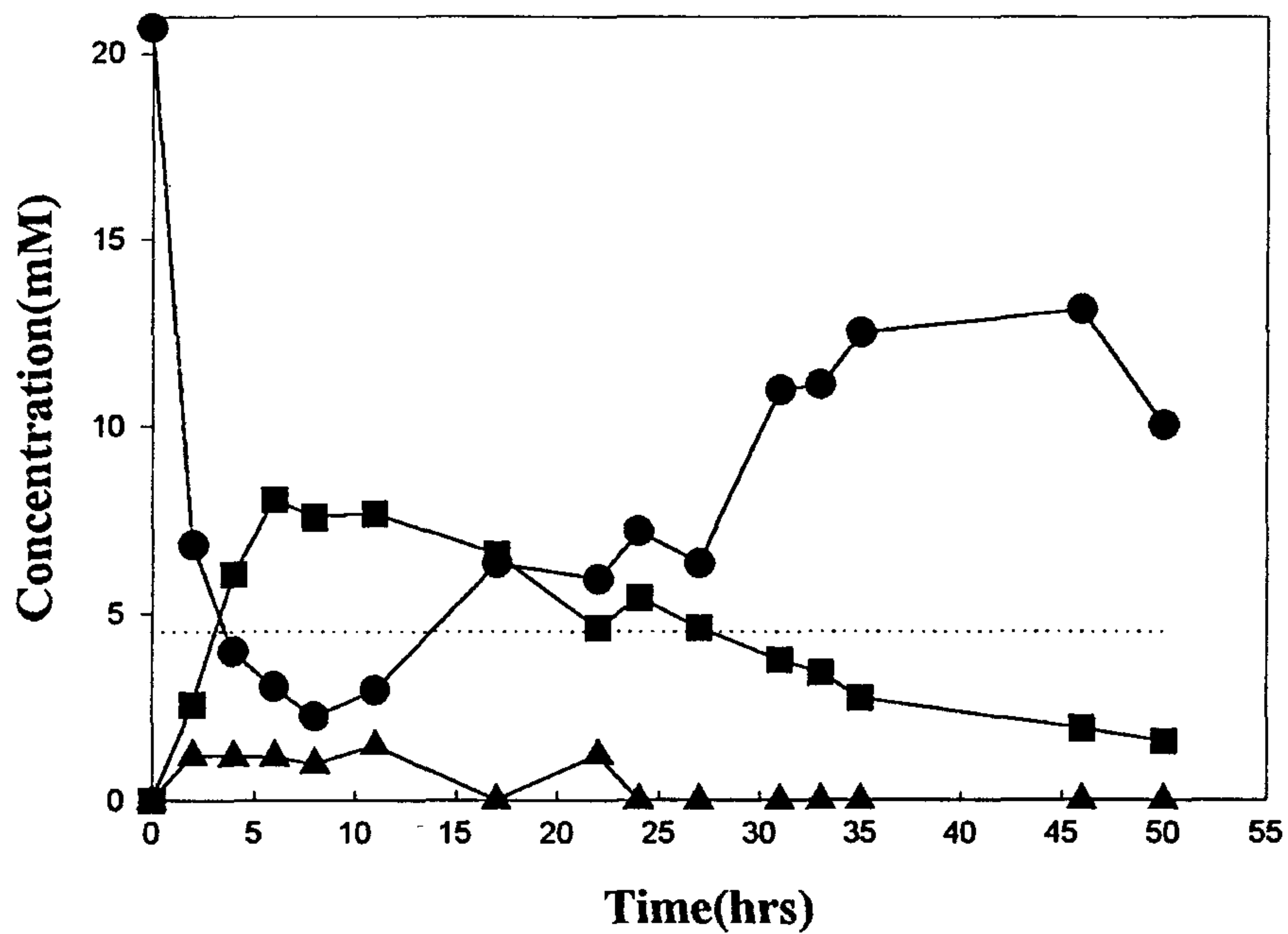


Fig. 32. Glutathione production using solvent-treated mixed cell *in vitro* by aerated slurry bioreactor at Feed rate of 5.2mL/hr with recycling mixed cells. ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamyl-cysteine, ■ ; glutathione, -----; glutathione production in suspension reaction, substrates : 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 20mM MgCl₂, 400mM glucose, 10mM ATP.

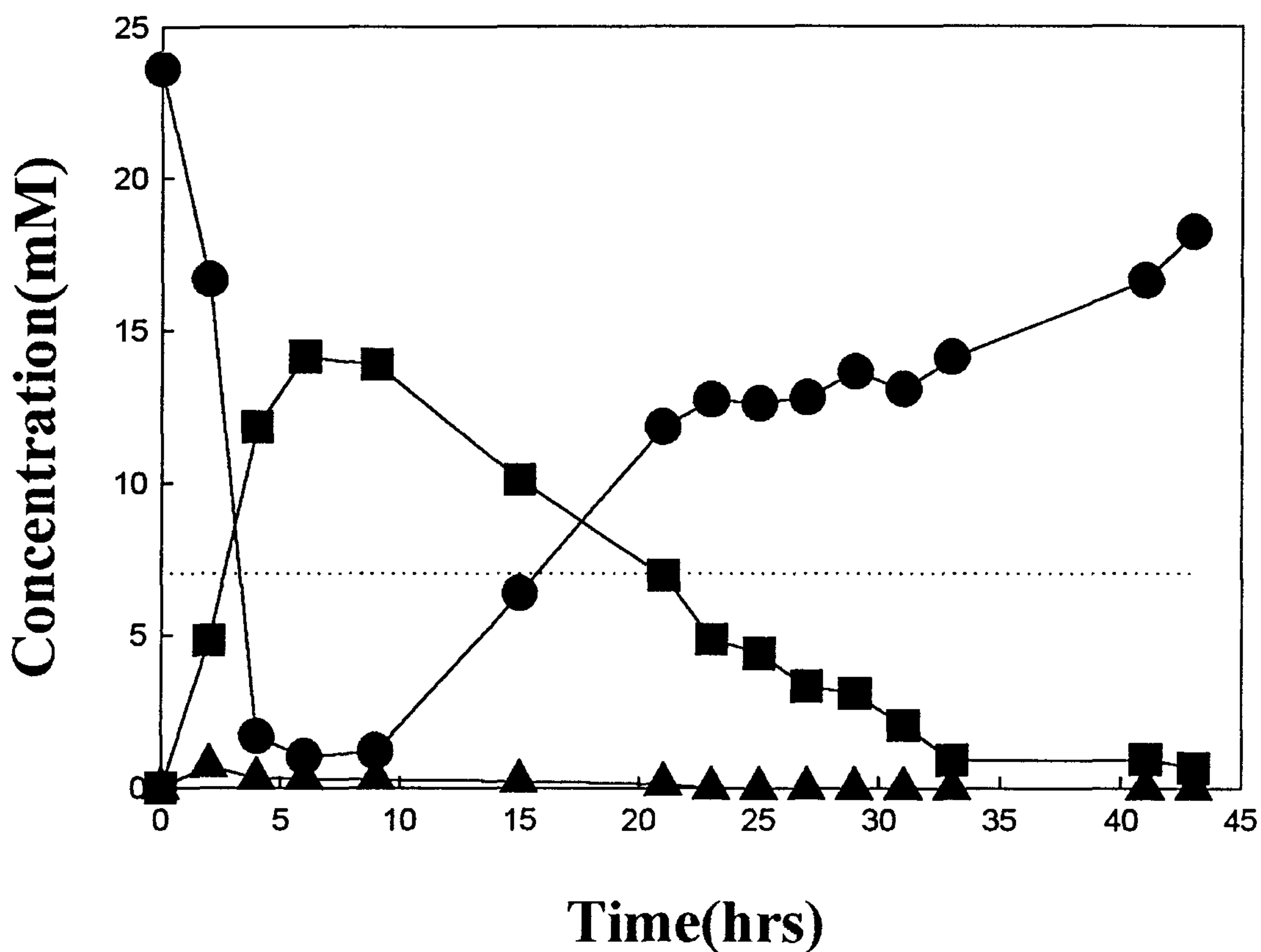


Fig. 33. Glutathione production using solvent-treated mixed cell *in vitro* by aerated slurry bioreactor at feed rate of 10.4mL/hr with recycling mixed cells. ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamylcysteine, ■ ; glutathione, -----; glutathione production in suspension reaction substrates : 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 20mM MgCl₂, 400mM glucose, 10mM ATP.

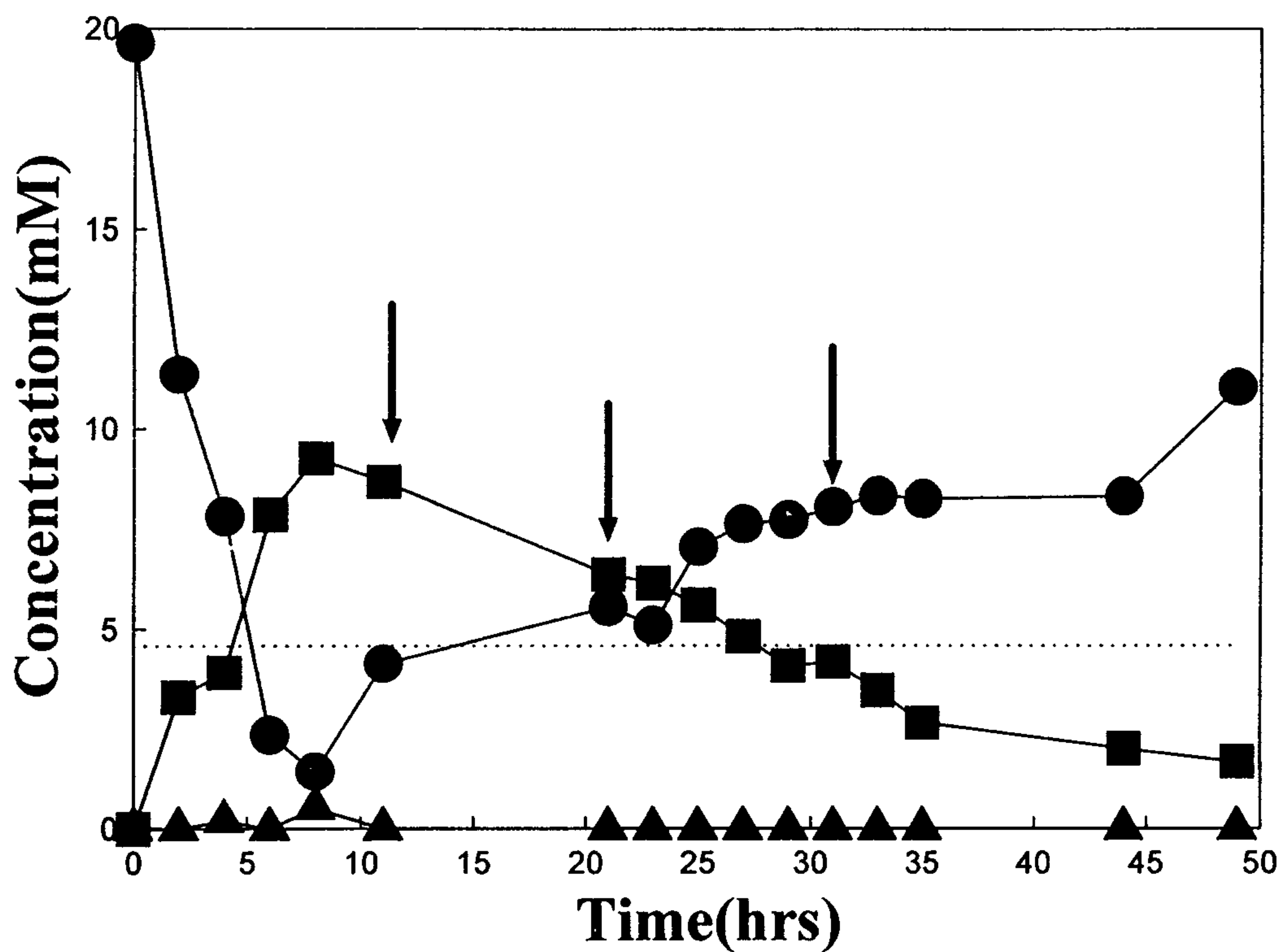


Fig. 34. Glutathione production using solvent-treated mixed cells *in vitro* by aerated slurry bioreactor at Feed rate of 5.2mL/hr with recycling the mixed cell and feeding the fresh yeast. ● ; cysteine, ▲; γ -glutamyl-cysteine, ■ ; glutathione, -----; glutathione production in suspension reactionsubstrates : 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 20mM MgCl₂, 400mM glucose, 10mM ATP.

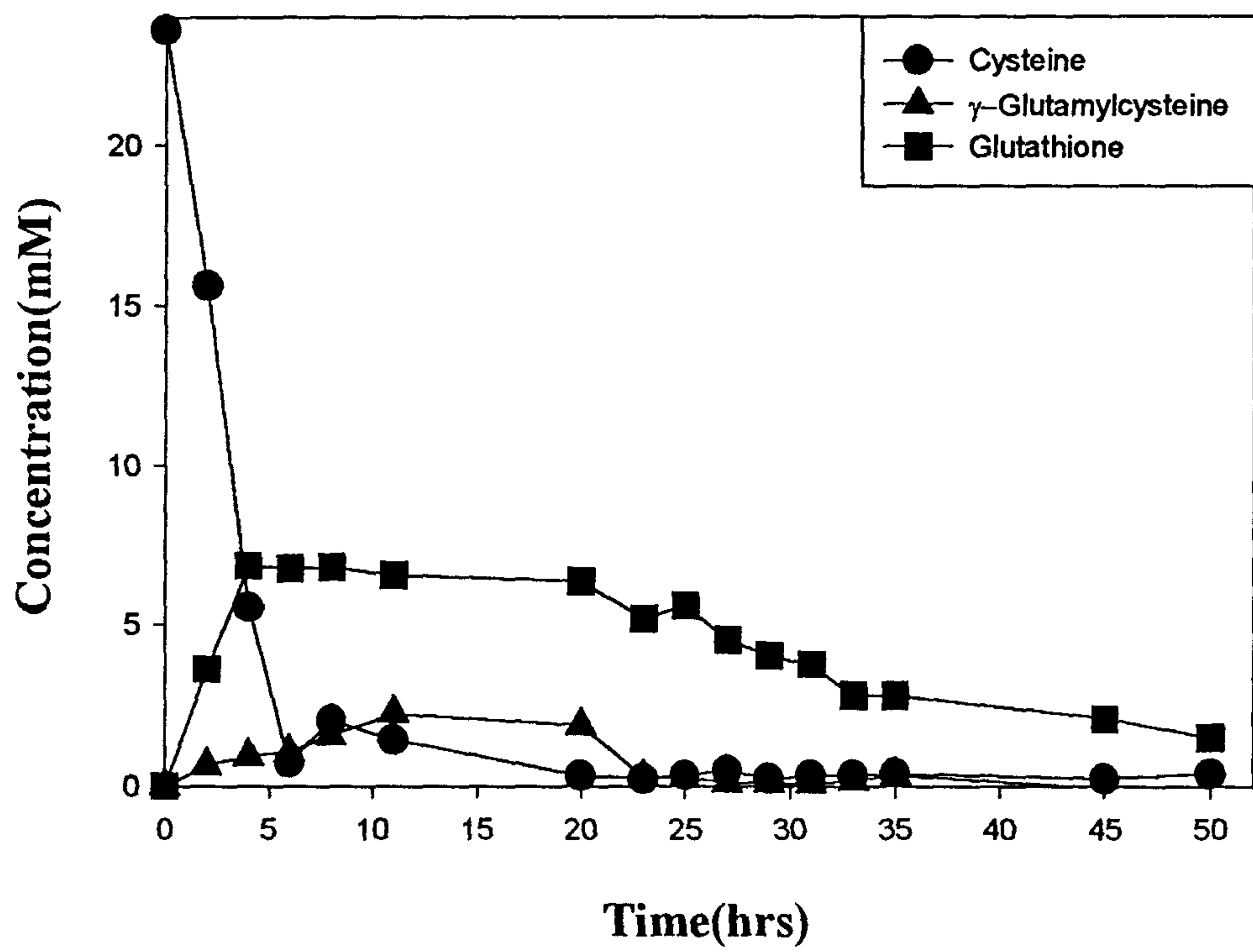


Fig. 35. Glutathione production with aerated slurry bioreactor with *E. coli*.

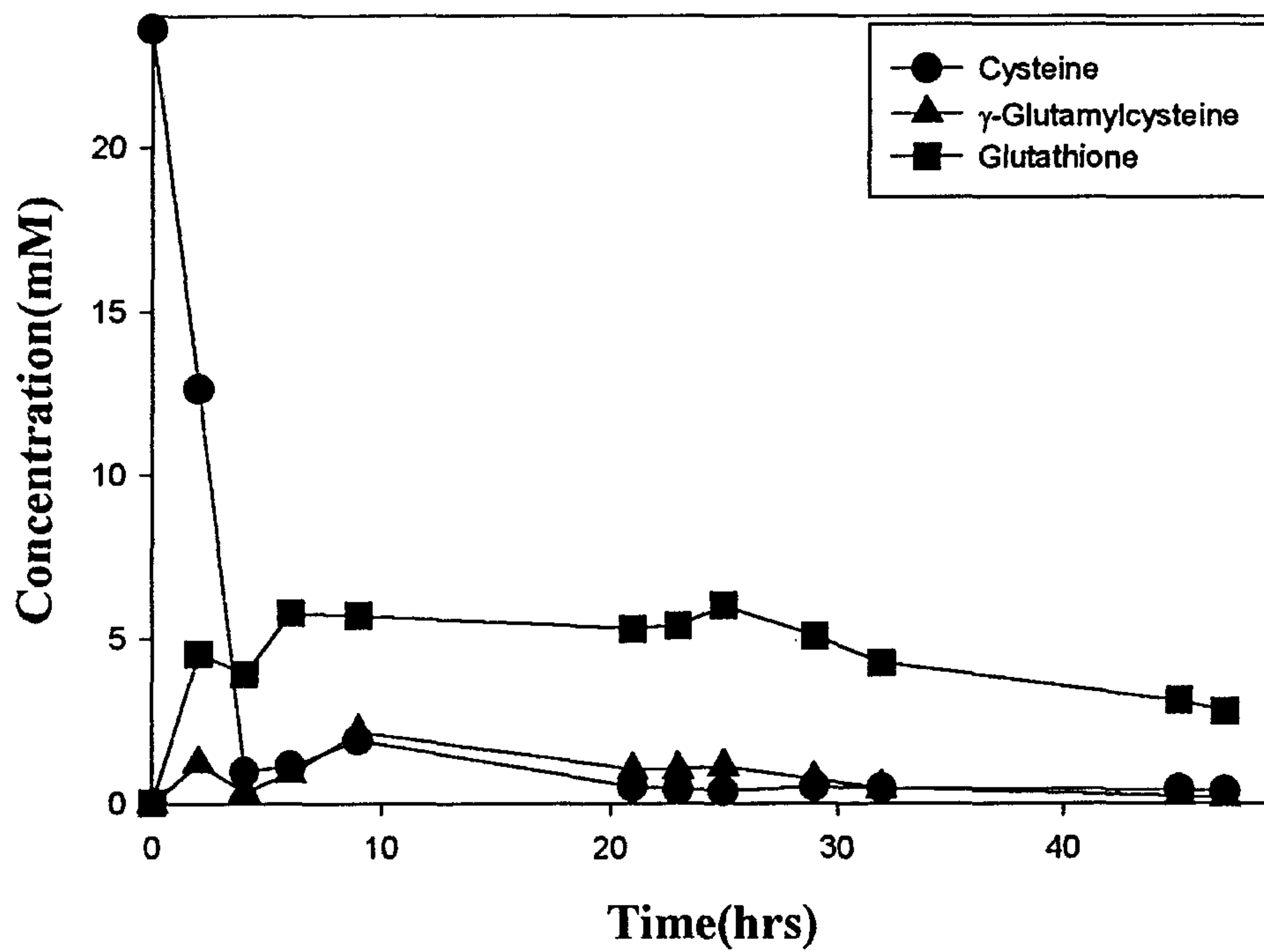


Fig. 36. Effect of tween 80 on glutathione production with aerated slurry bioreactor with *E. coli*.

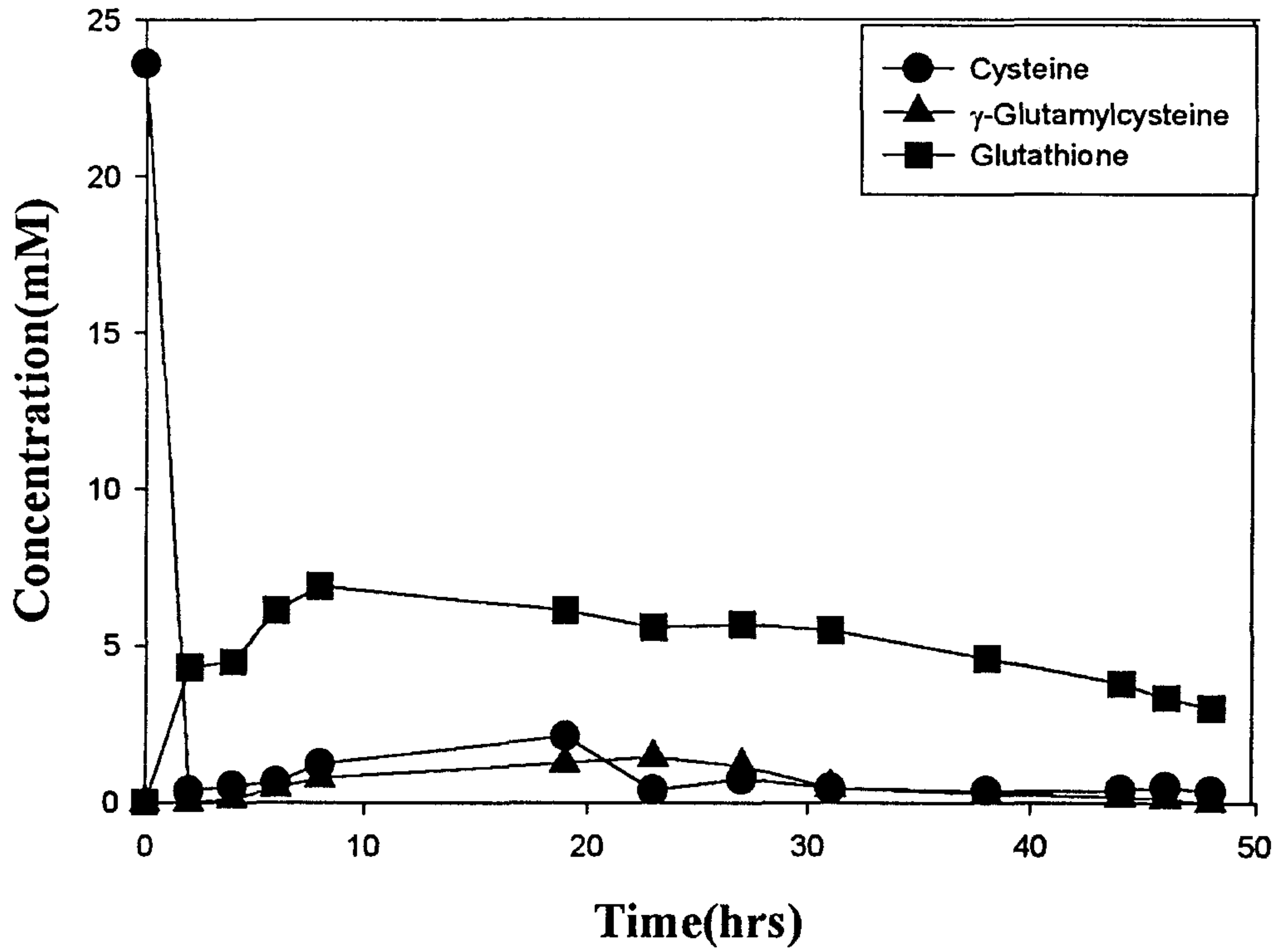


Fig. 37. Glutathione production using nitrogen gas with aerated slurry bioreactor with *E. coli*.

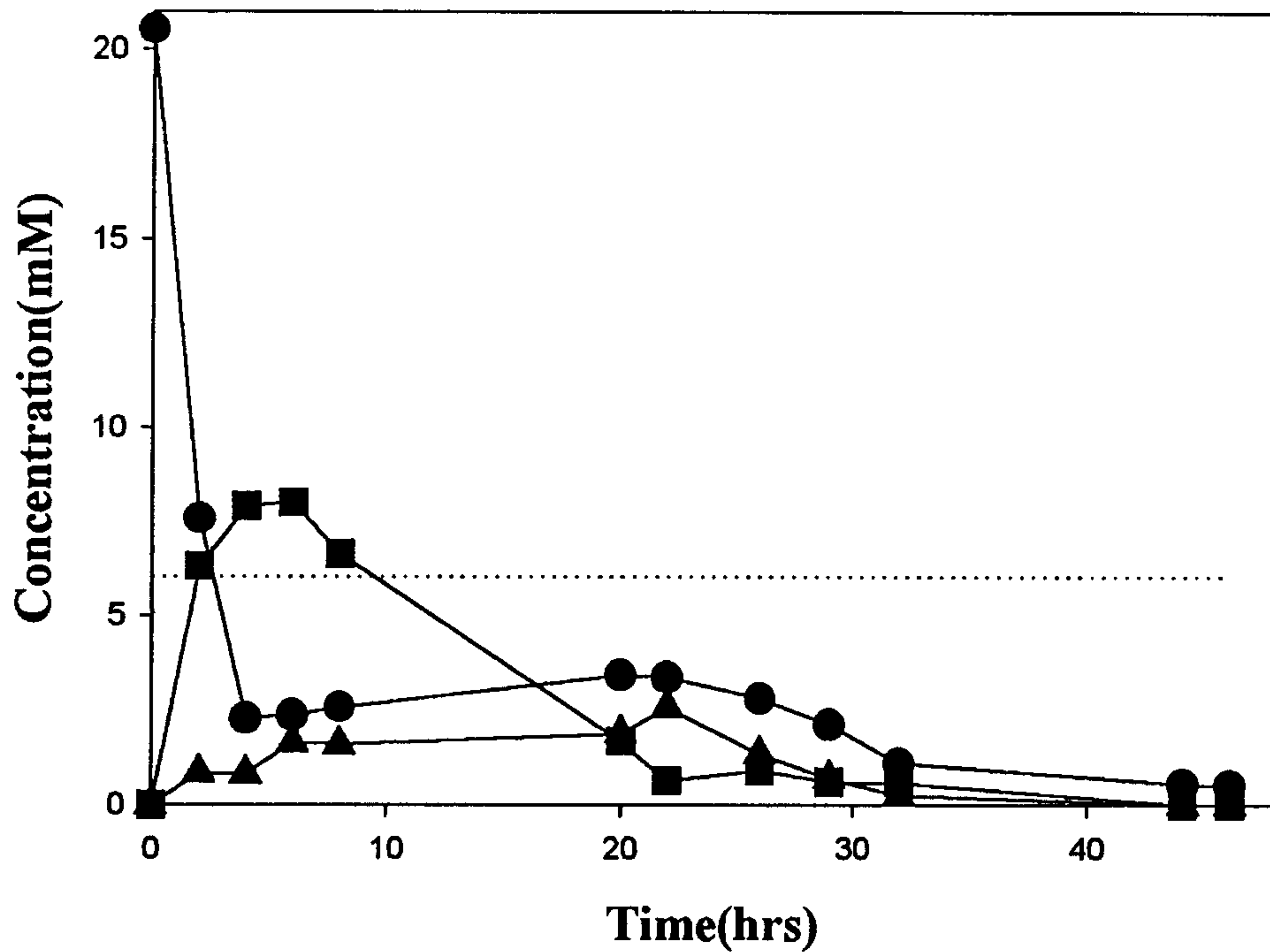


Fig. 38. Glutathione production in aerated slurry bioreactor using impeller. ● ; cysteine, ▲ ; γ -glutamylcysteine, ■ ; glutathione, -----; glutathione production in suspension reaction substrates : 20mM cysteine, 80mM glutamic acid, 30mM glycine, 20mM $MgCl_2$, 400mM glucose, 10mM ATP.

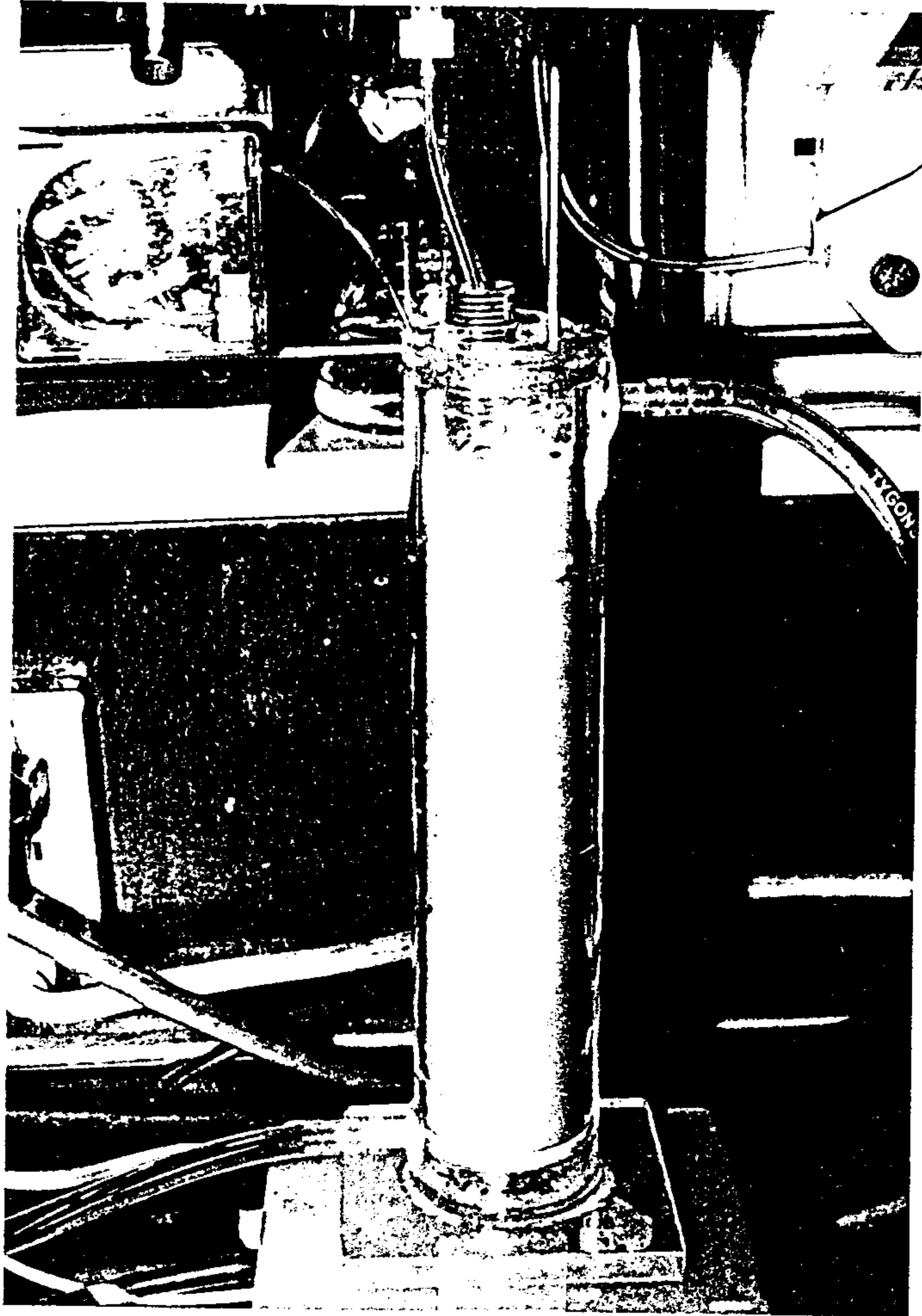


Fig. 39. Picture of Aerated Slurry Bioreactor.

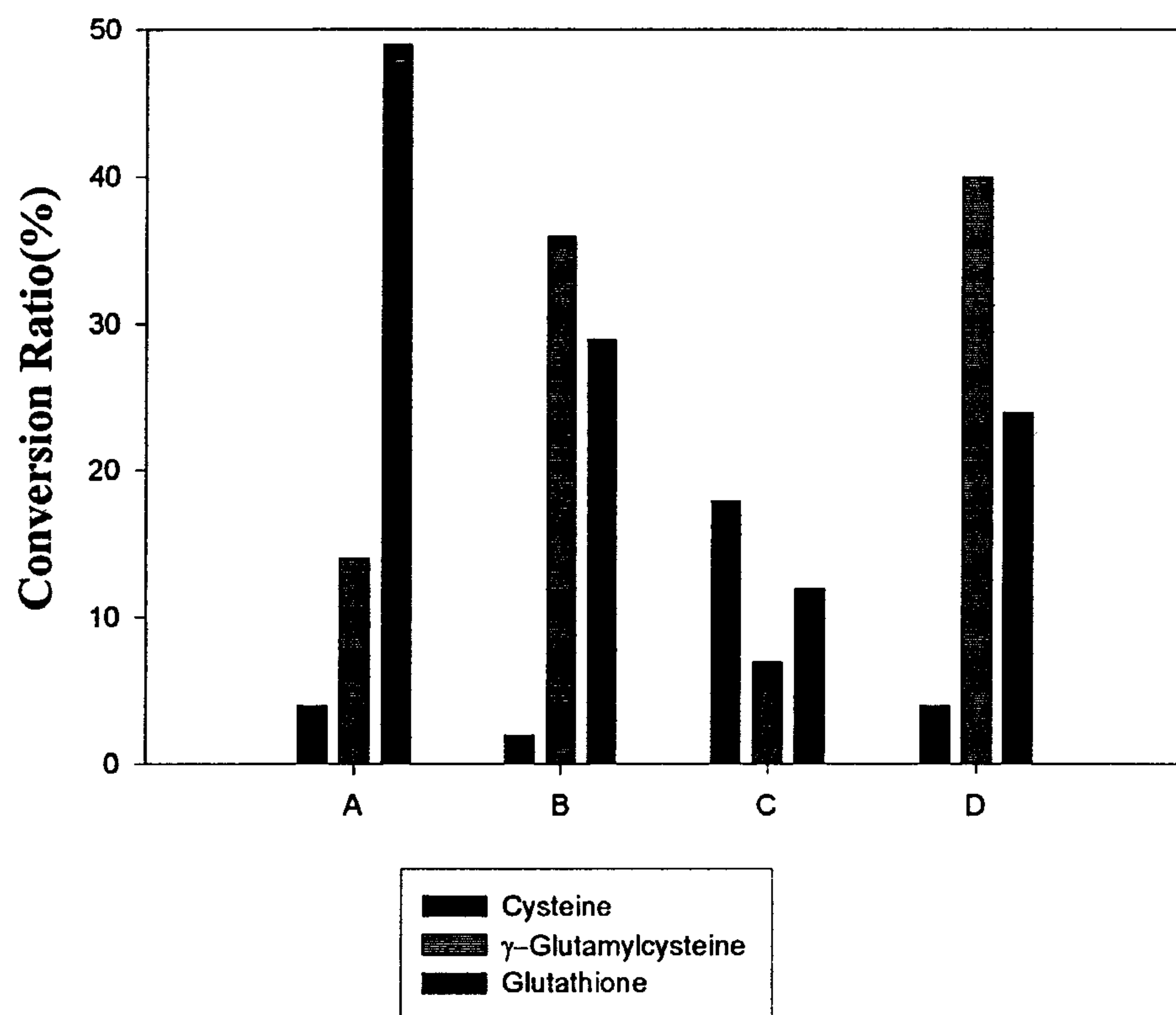


Fig.40. Effect of the immobilizing gel on the glutathione production. A ; suspension, B ; Ca-alginate bead, C ; polyacrylamide gel, D ; agar gel.

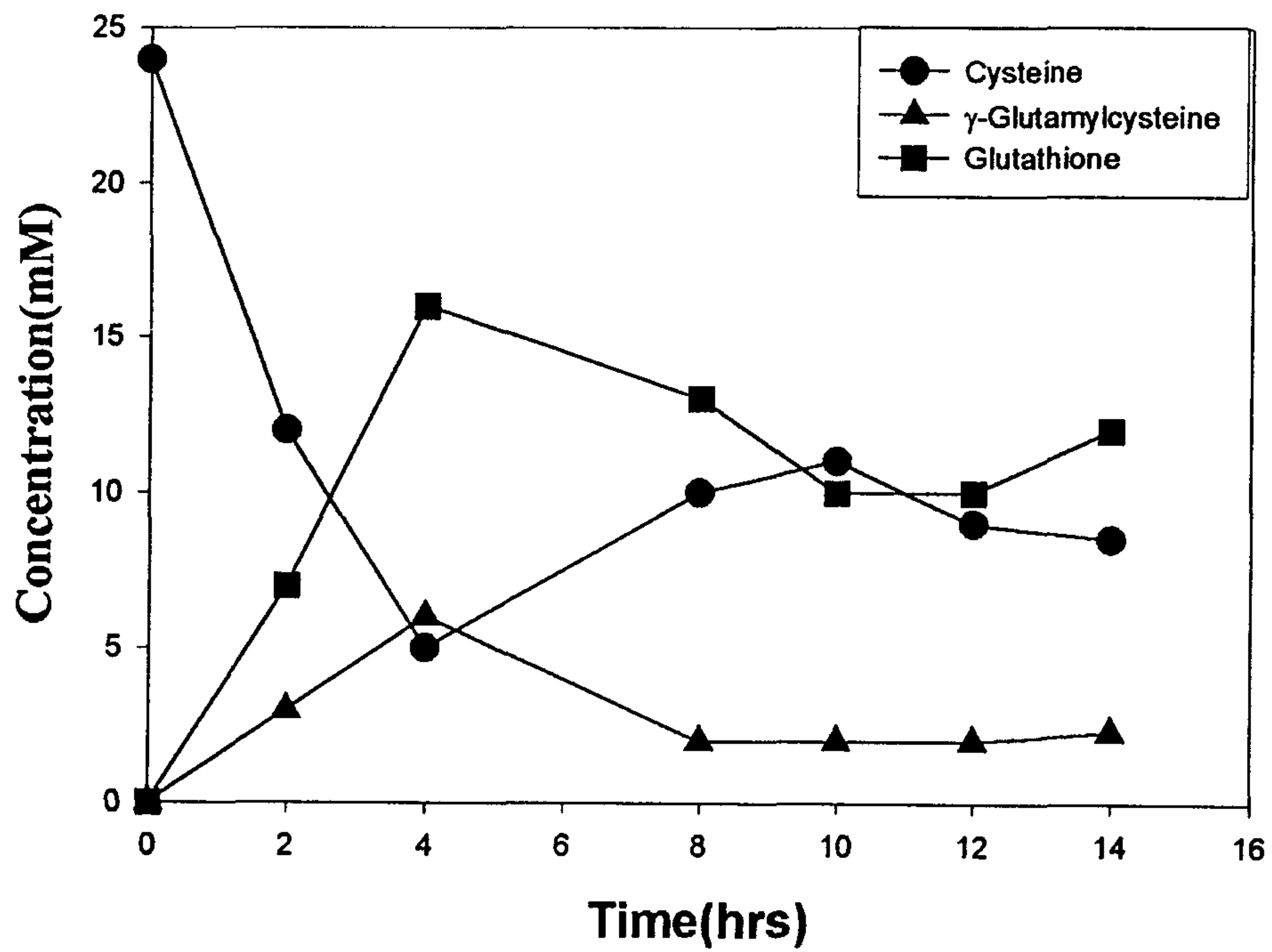


Fig. 41. Glutathione production in the continuous immobilized cell reactor

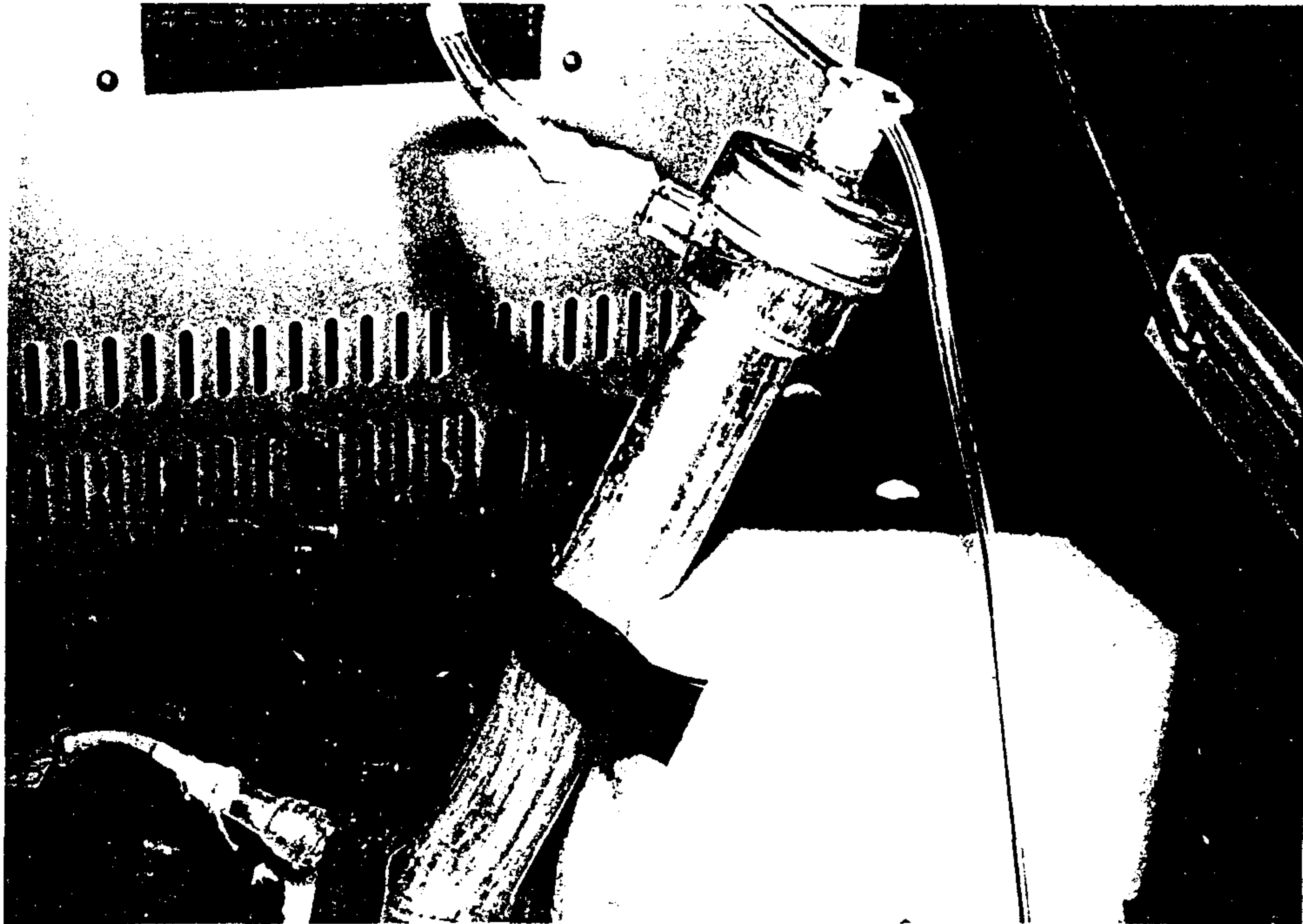


Fig. 42. Picture of Hollw-Fiber Reactor.

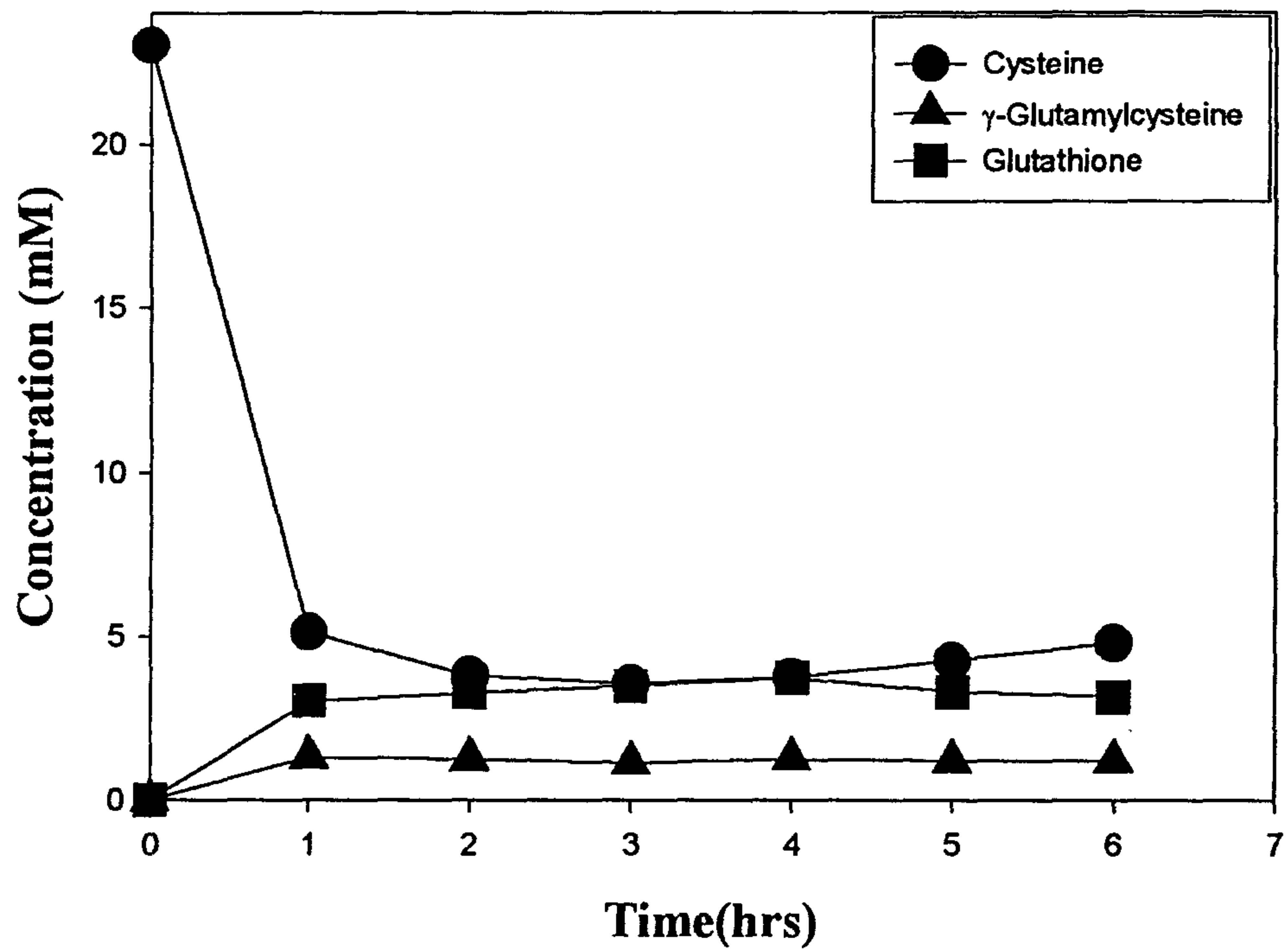


Fig.43. Glutathione production with ultrafilter hollow-fiber.

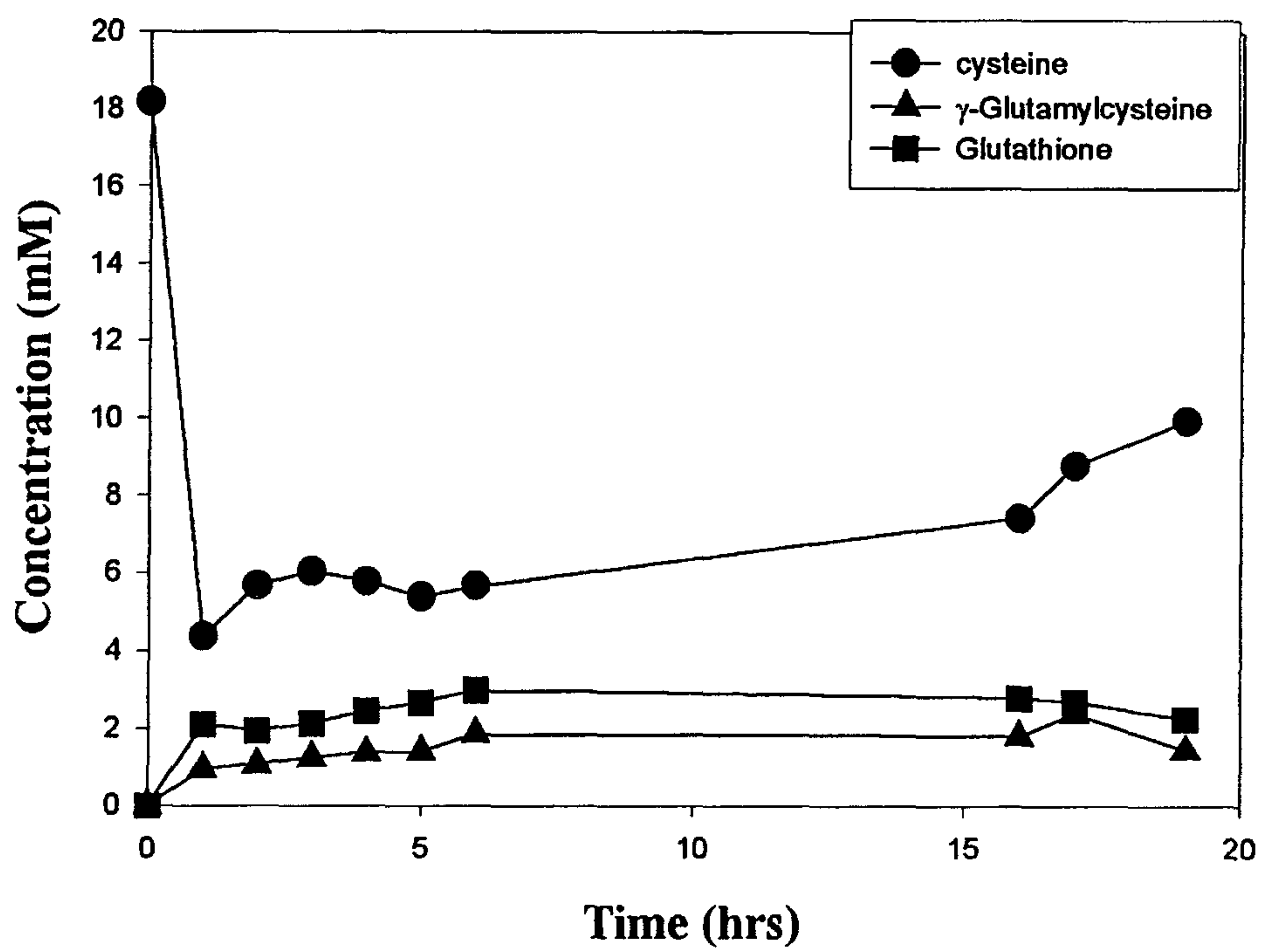


Fig. 44. Glutathione production with ultrafilter hollow-fiber.

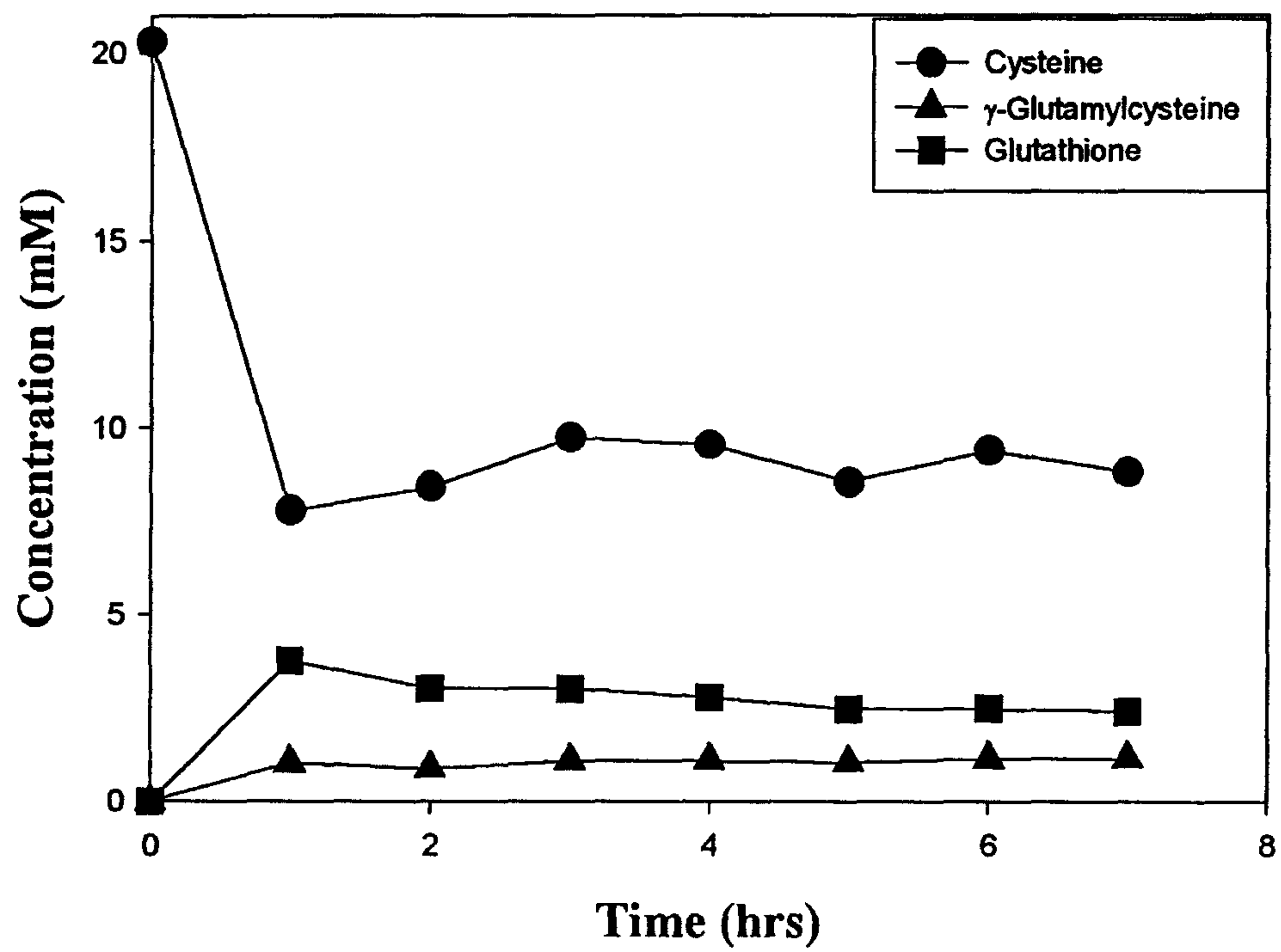


Fig. 45. Glutathione production with Microfilter hollow-fiber.

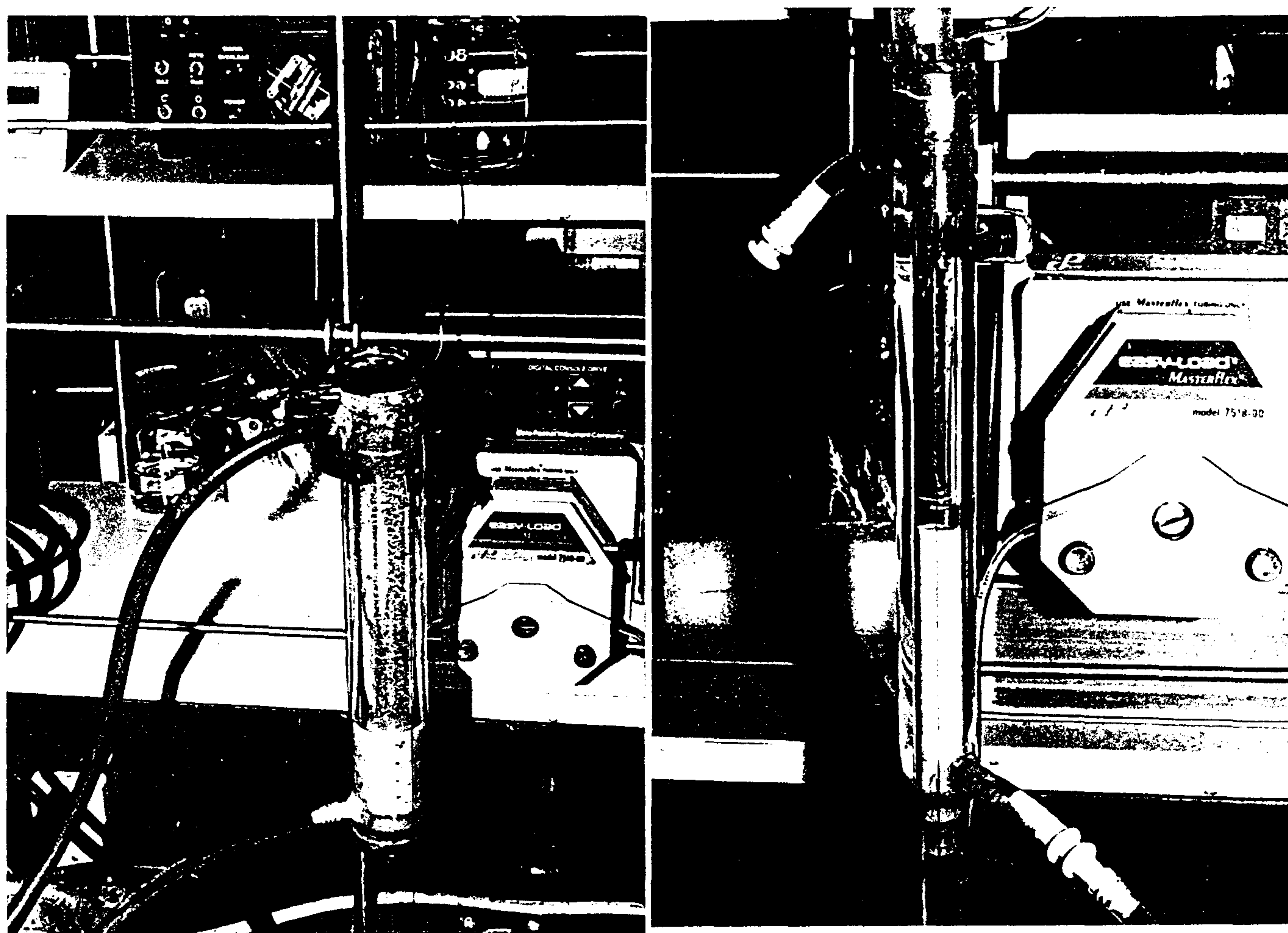


Fig. 46. Picture of glutathione production with celite.

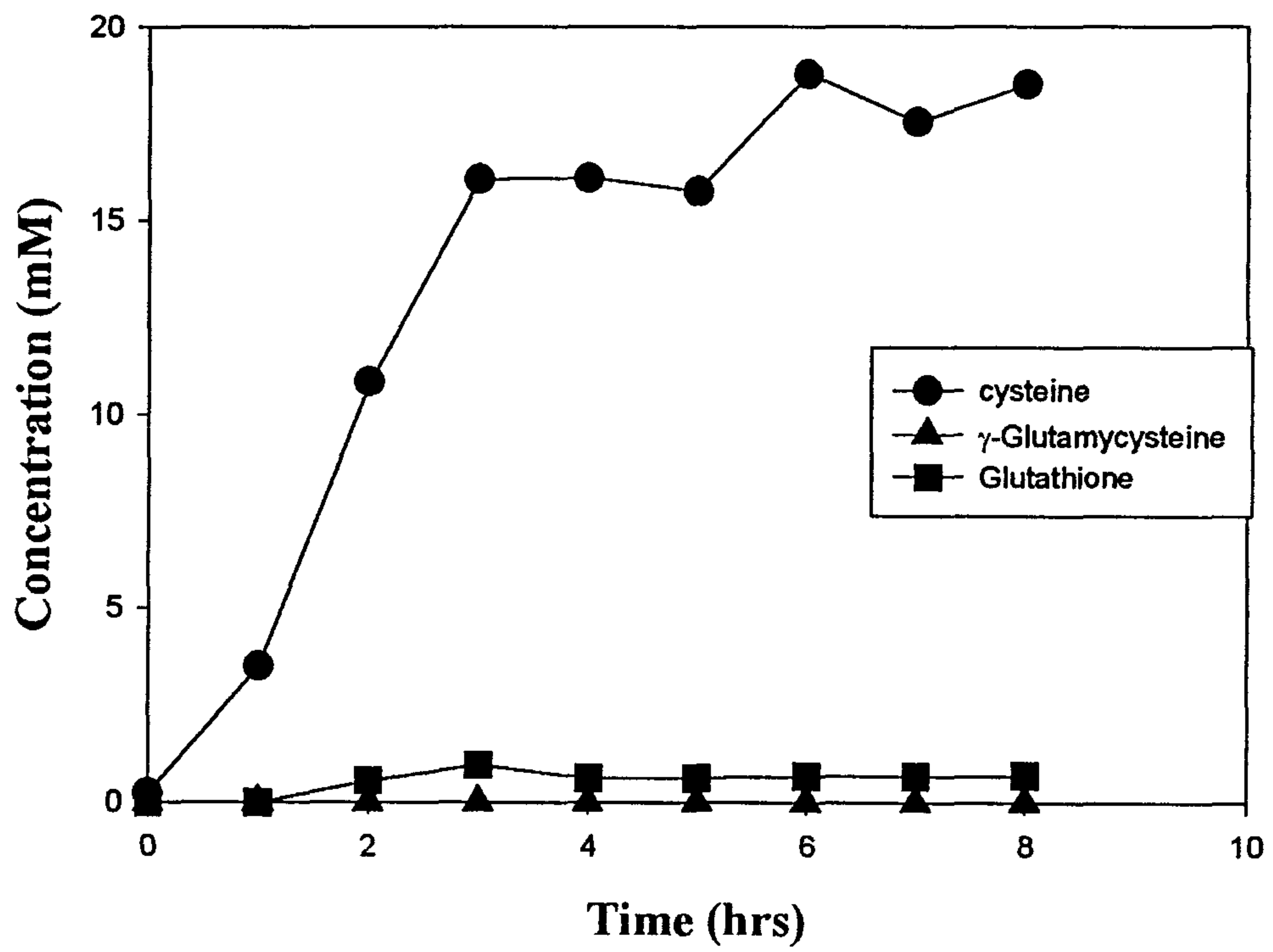


Fig. 47. Glutathione production with flowerpot bead.

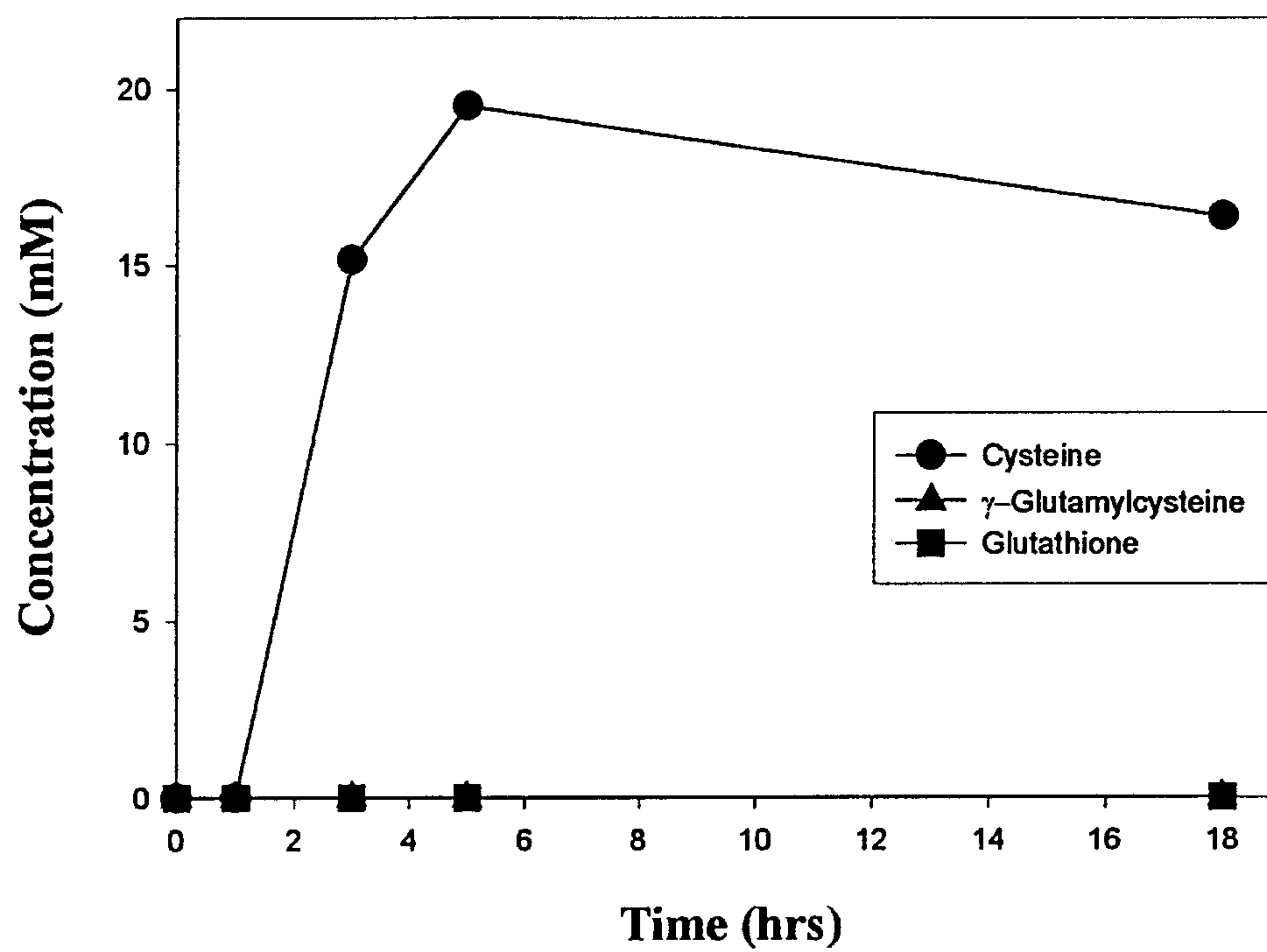


Fig. 48. Glutathione production by mixed cells in celite bed.

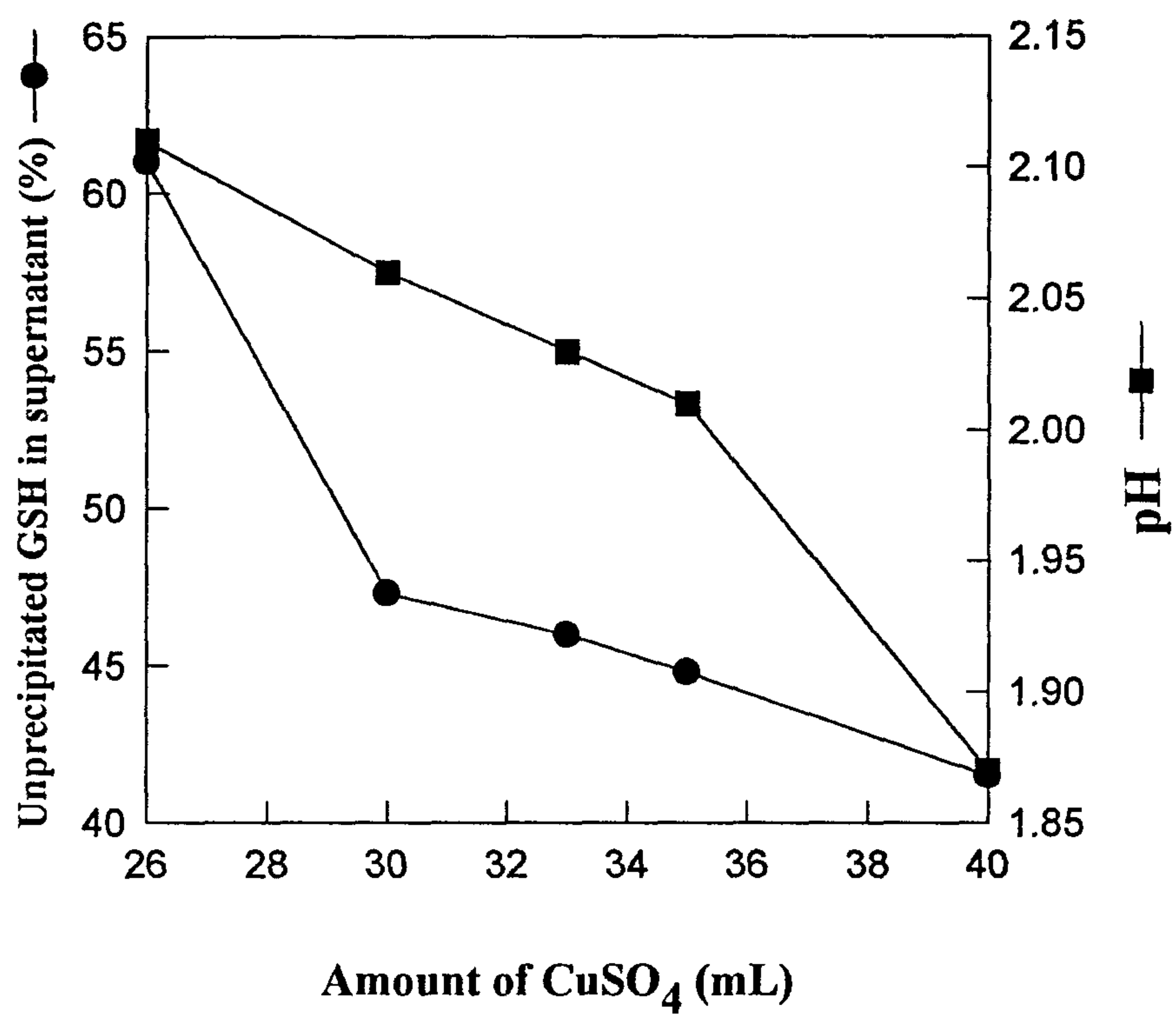


Fig. 49. Effect of CuSO₄ on the precipitation of Cu-GSH complex.

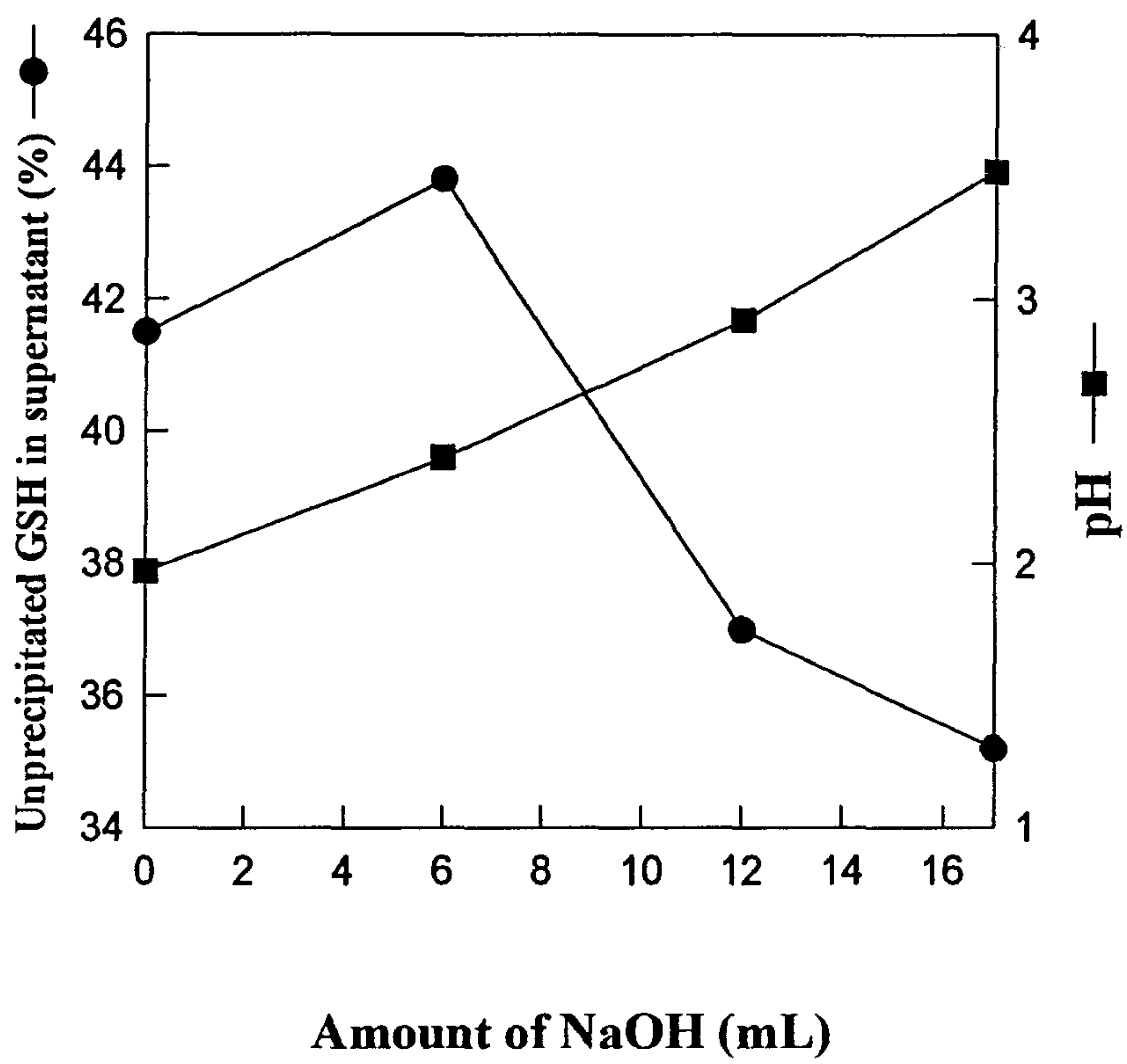


Fig. 50. Effect of NaOH on precipitation of Cu-GSH complex.

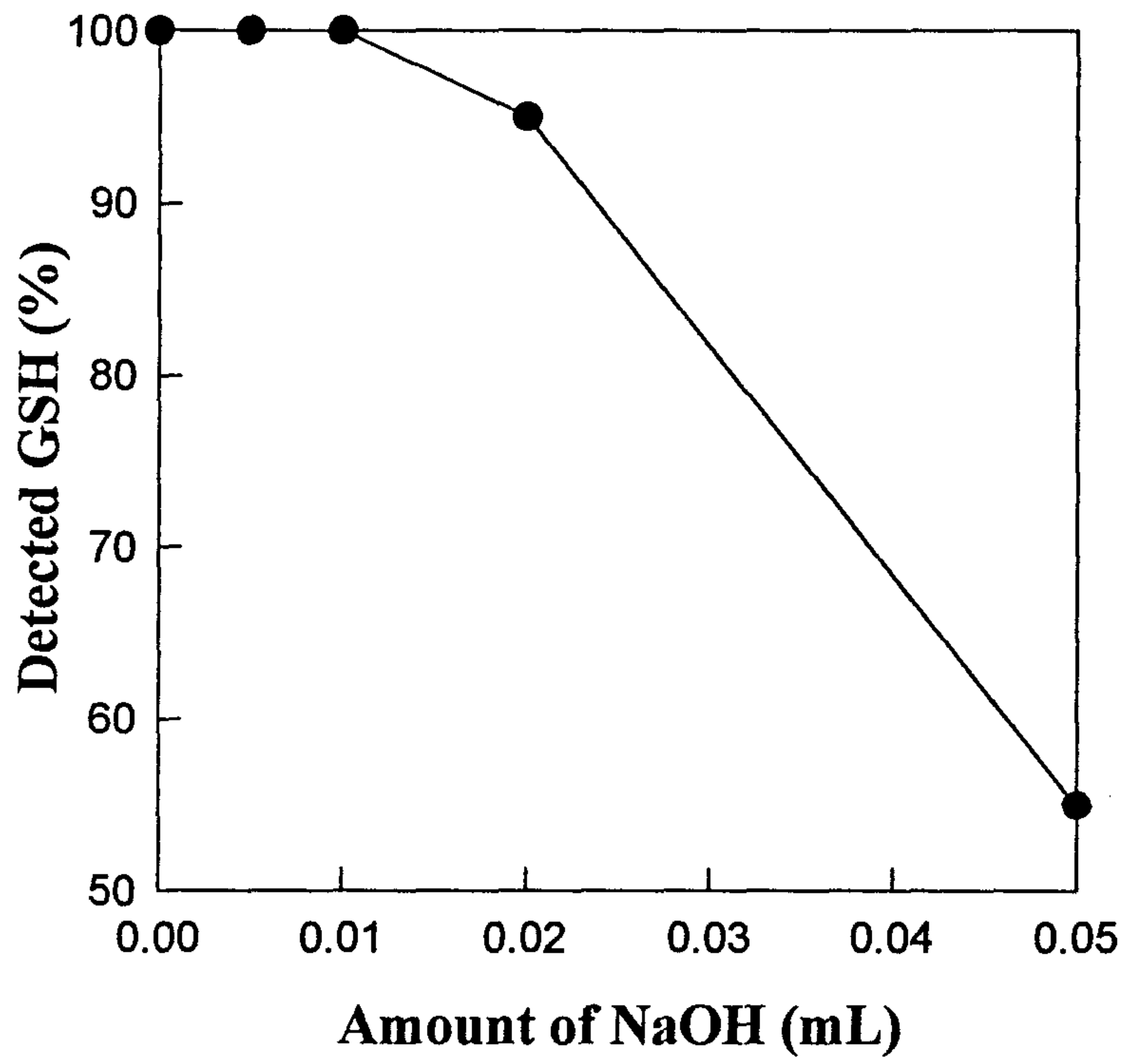


Fig. 51. Effect on NaOH on DTNB method with pure GSH sample.

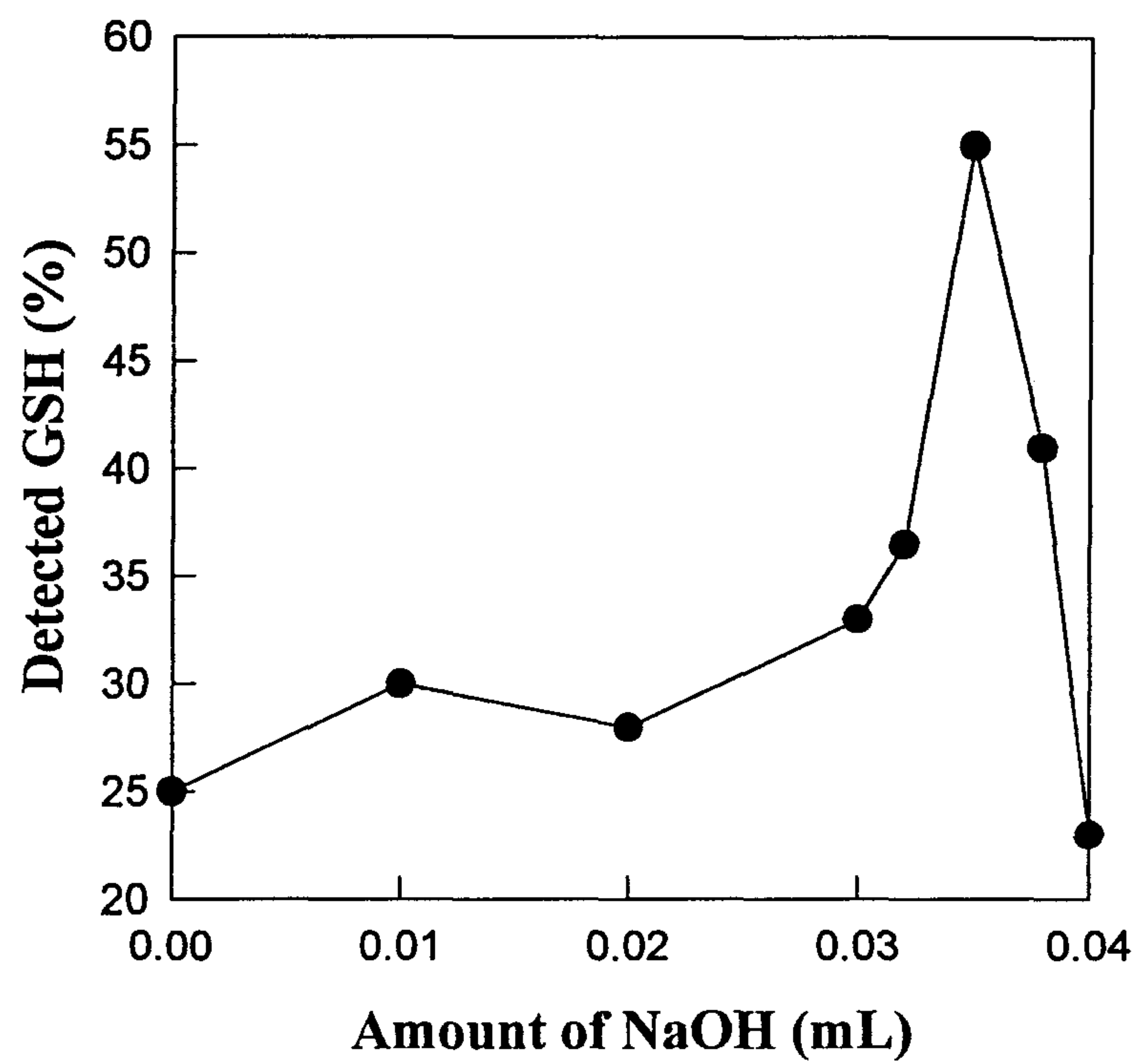


Fig. 52. Effect of NaOH on DTNB method with mixed sample with Cu^{2+} .

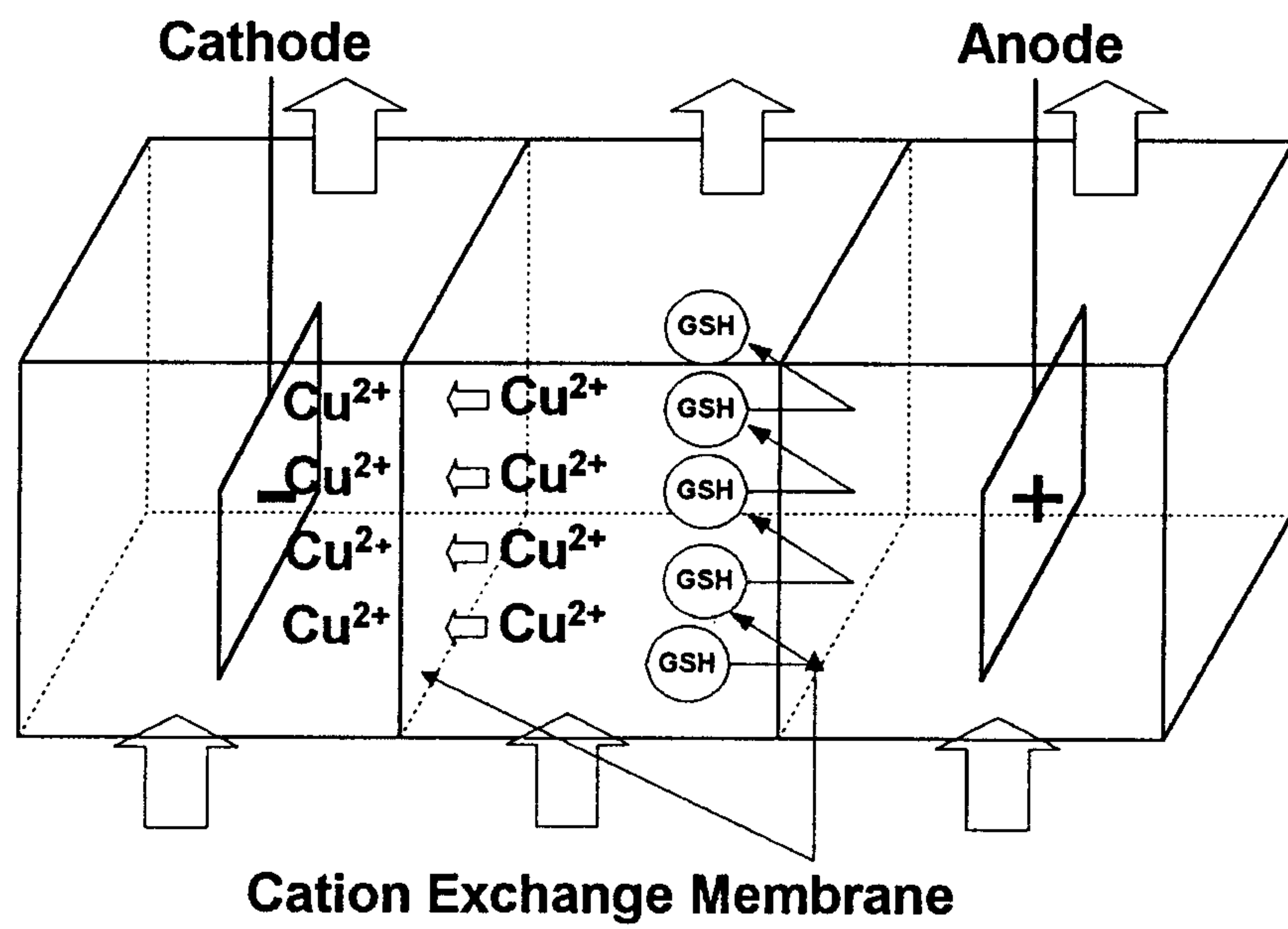


Fig. 53. Schematics of electro dialysis.

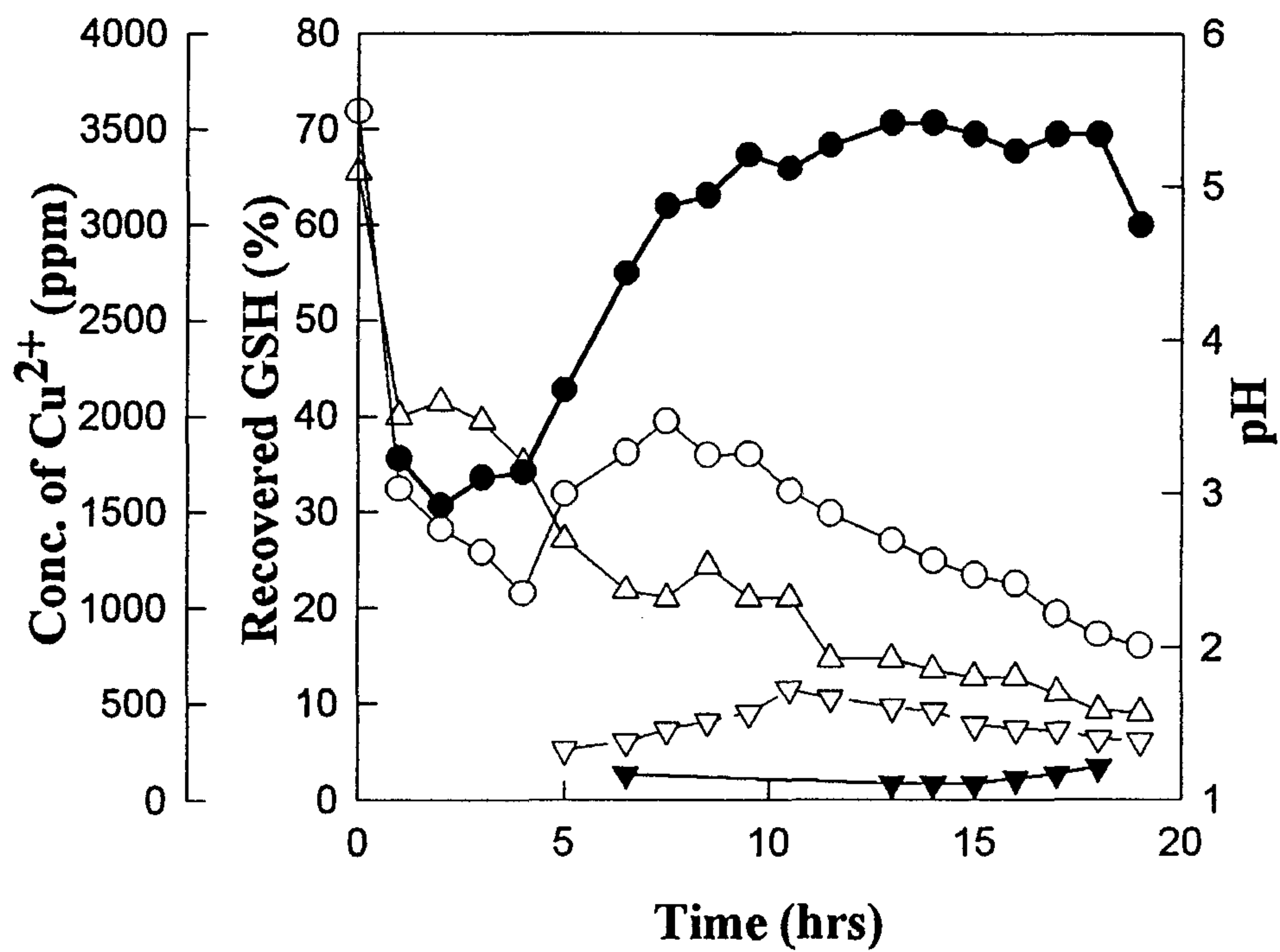


Fig. 54. GSH separation by electro dialysis (Δ : pH in middle chamber, \bullet : GSH in middle chamber, \blacktriangledown : GSH in cathodic chamber, \circ : Cu^{2+} in middle chamber, ∇ : Cu^{2+} in cathodic chamber).

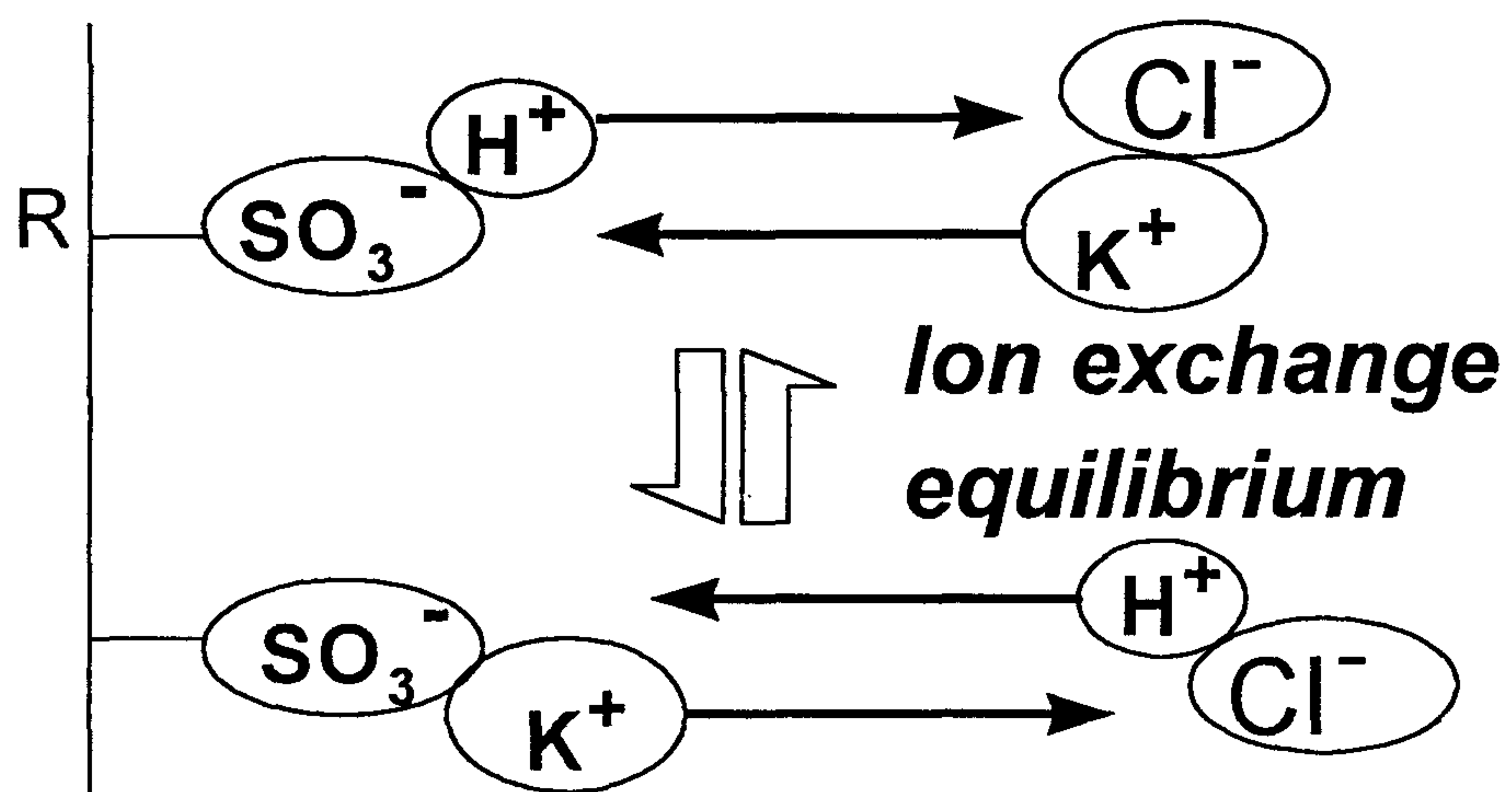


Fig. 55. Mechanism of ion-exchange chromatography.

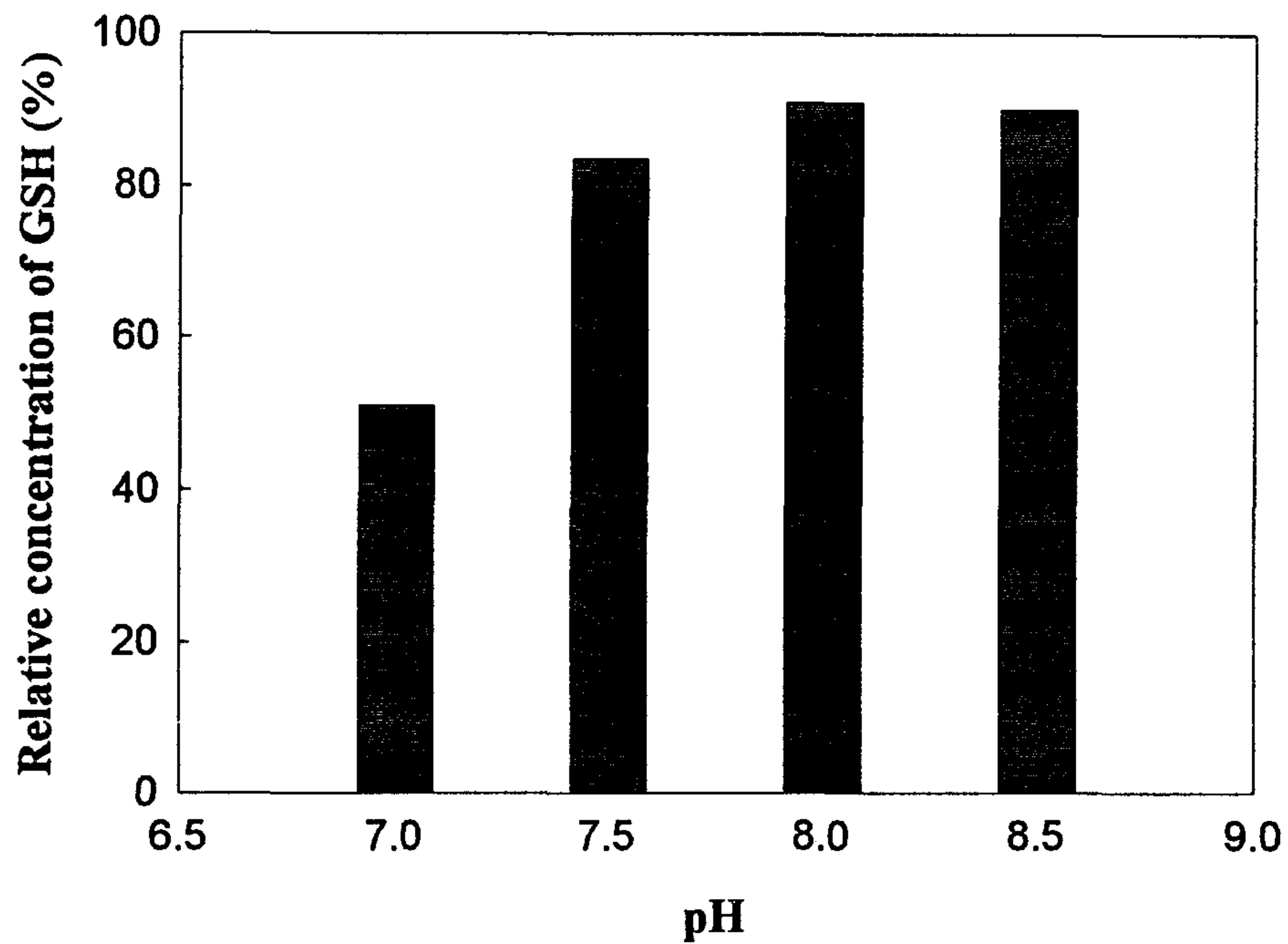


Fig. 56. Effect of pH on the GSH binding capacity of Q-sepharose. Batch adsorption was carried out with GSH solution. GSH solution(10mM, 0.2mL) was applied to the resin which was equilibrated with 20mM Tris / HCl. After washing twice with the buffer, the same buffer containing 1M NaCl was applied to detach GSH from the resin.

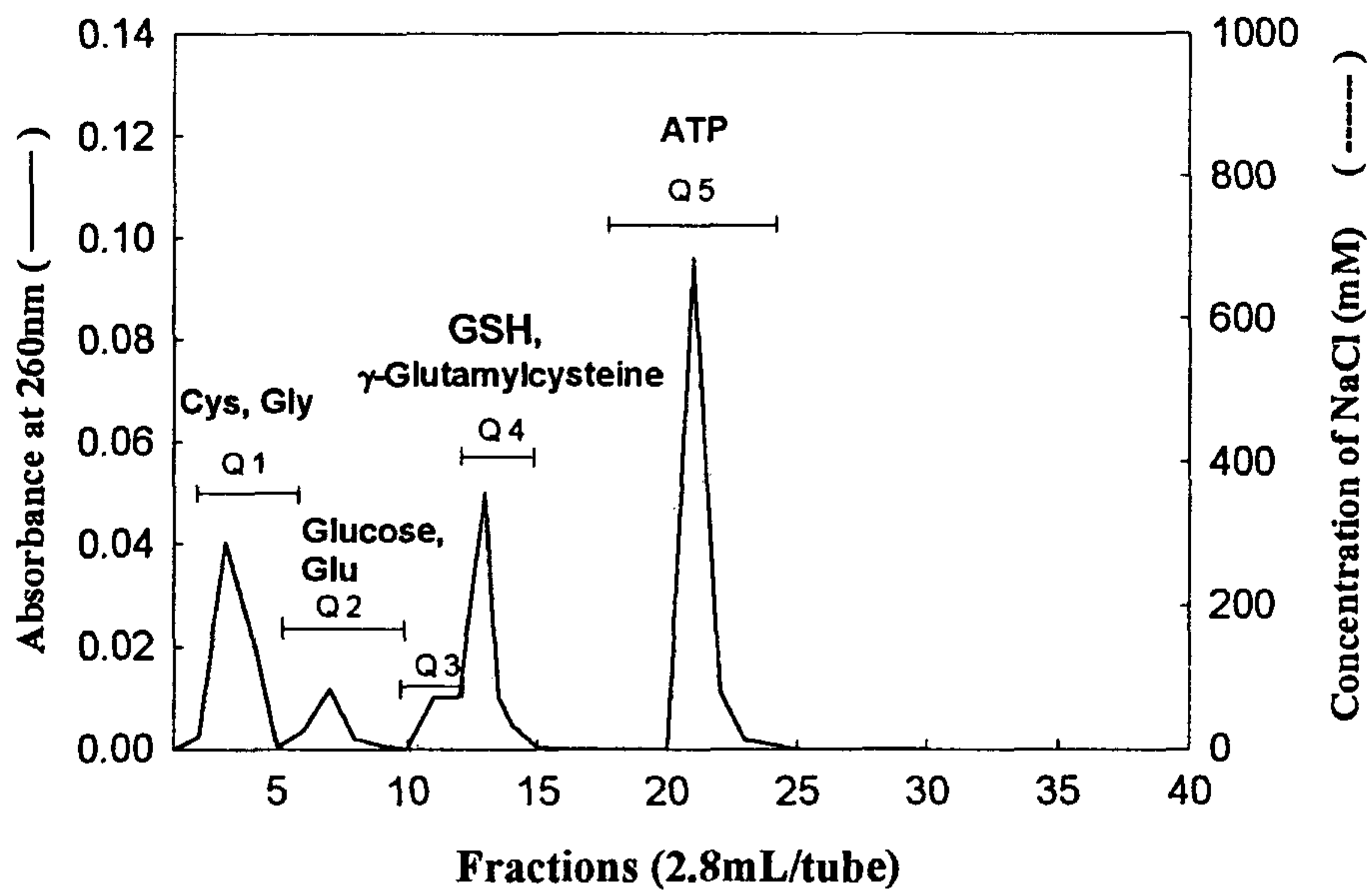


Fig. 57. Elution profile of ideal mixture with Q-sepharose chromatography (0.7×7.0cm). Ideal mixture (0.25mL) was loaded to the resin which was equilibrated with 20mM Tris / HCl, pH 8.0. After the sufficient amount of buffer was added, the linear gradient was applied using the same buffer containing 1M NaCl (50mL + 50mL).

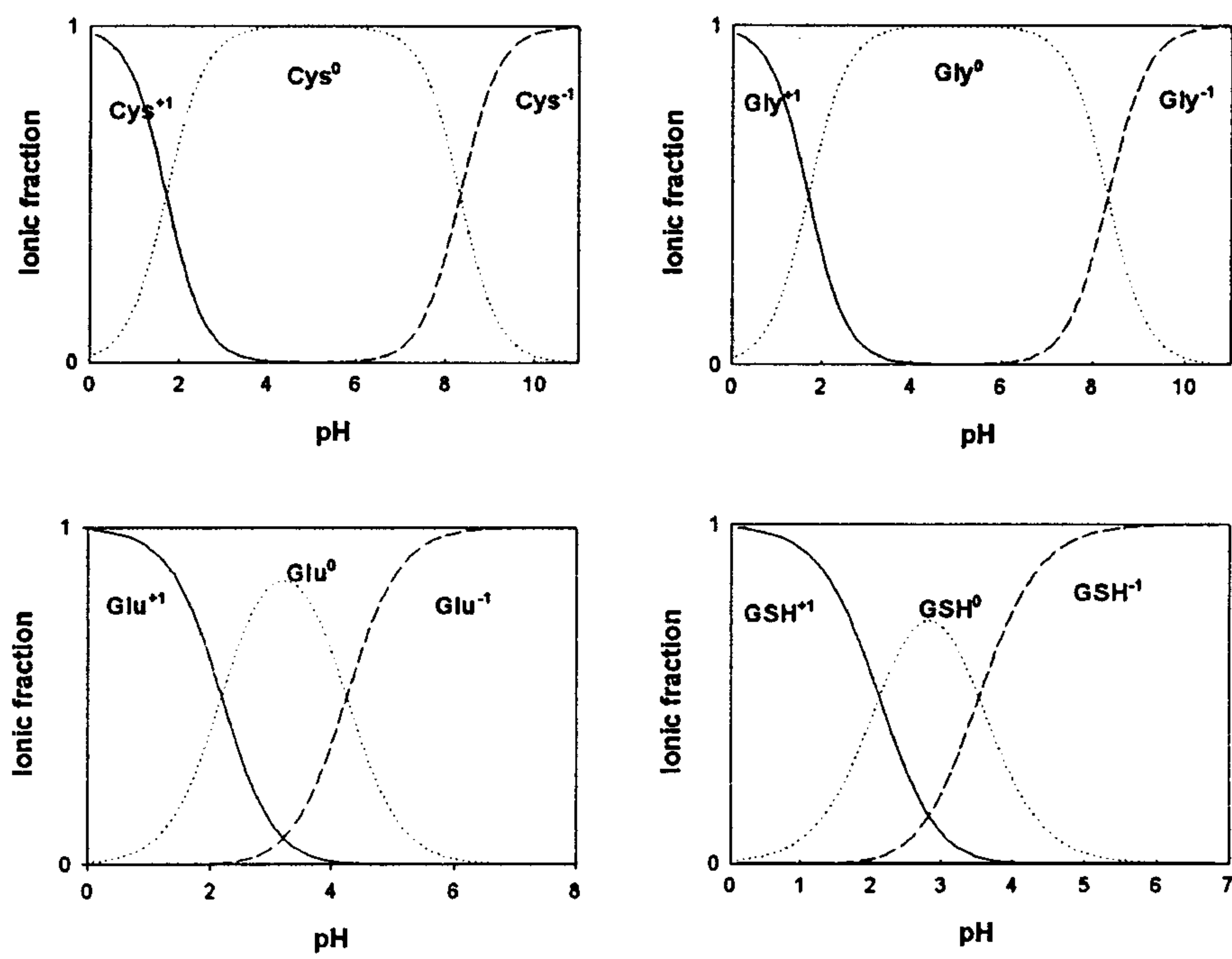


Fig.58. Ionic fraction with various pH.

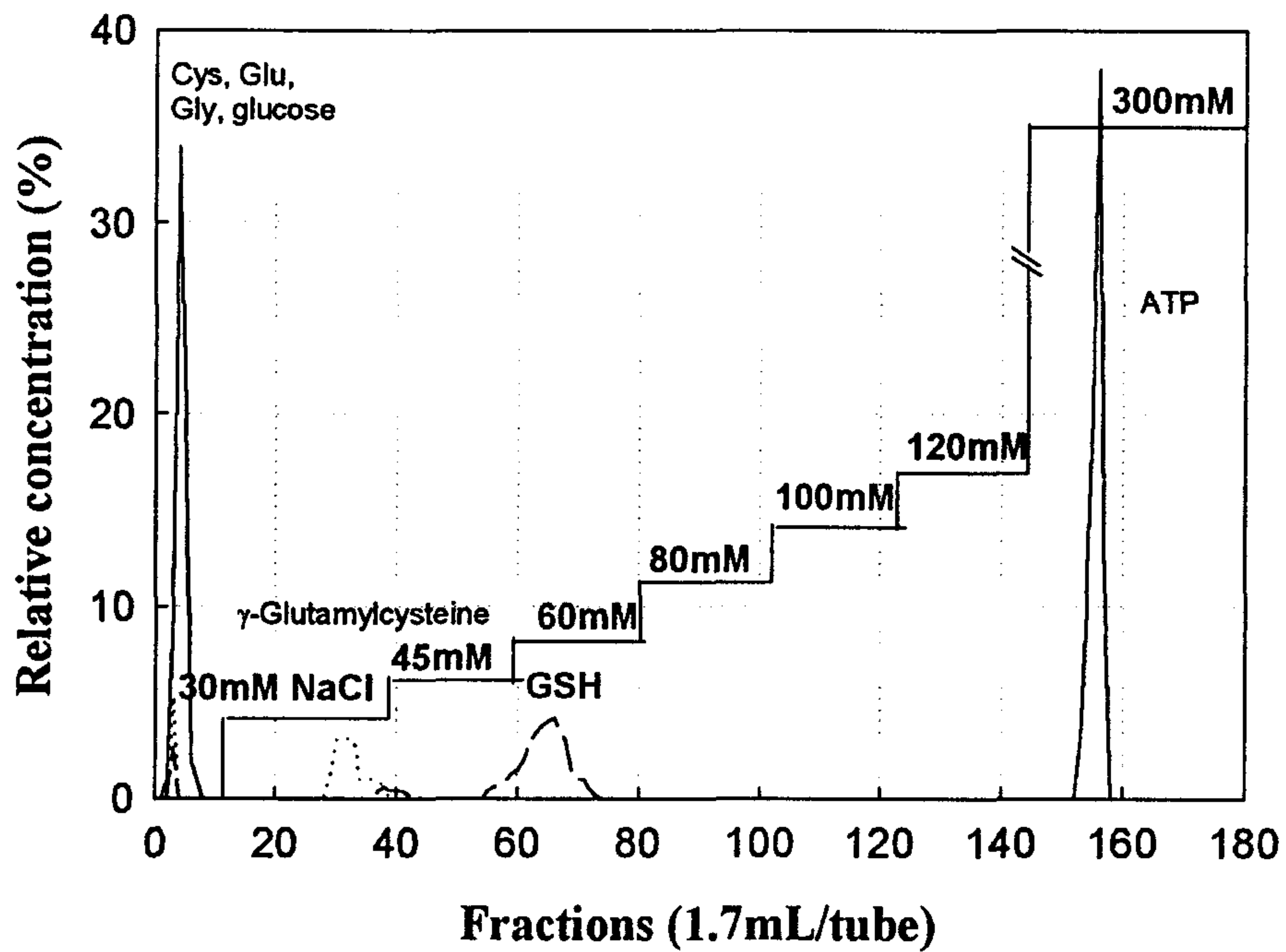


Fig. 59. Elution profile of ideal mixture with Q-sepharose column chromatography (1.1×22cm). After loading ideal mixture to the column, the resin was eluted with 20mM Tris/HCl buffer. Non-binding materials were eluted with the buffer and binding materials were detached from the resin by eluting with the same buffer containing different concentration of NaCl(from 30mM to 300mM, stepwise).

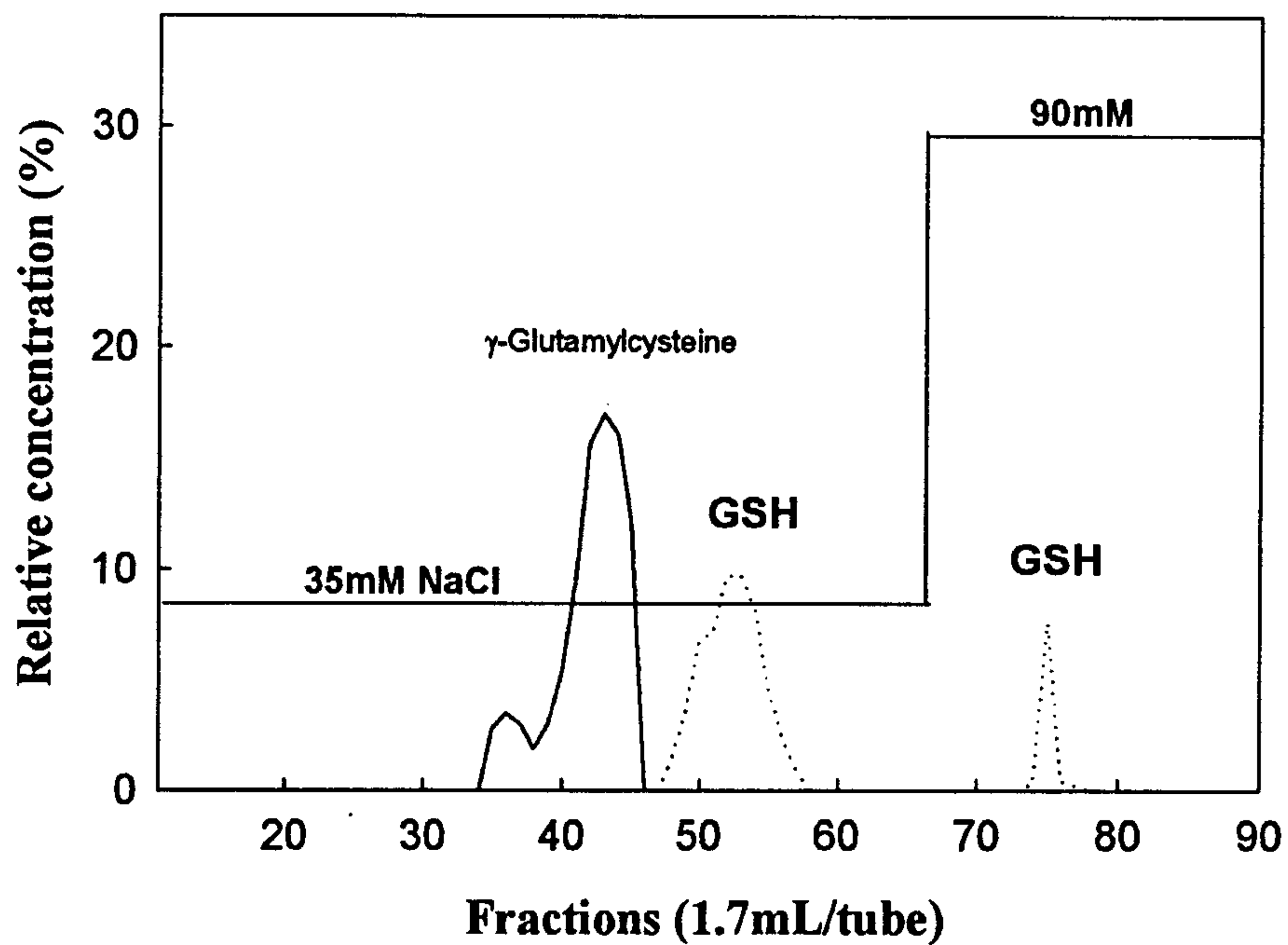


Fig. 60. Elution profile of γ -glutamylcysteine and GSH with Q-sepharose column chromatography (1.1 \times 22cm). After loading the mixture of γ -glutamylcysteine and GSH, sufficient amount of Tris / HCl buffer containing 35mM NaCl was added, followed by the buffer containing 90mM NaCl.

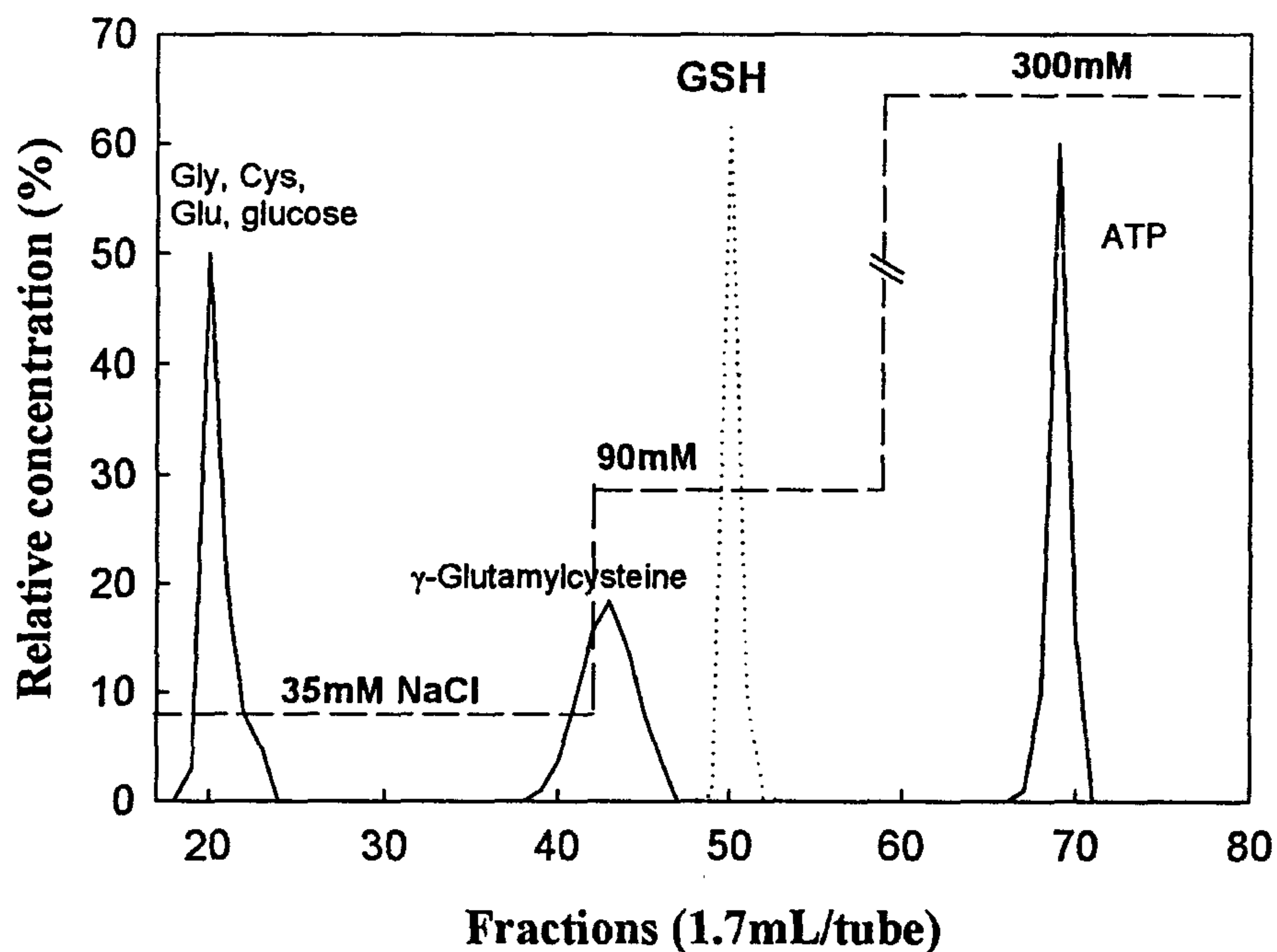


Fig. 61. Elution profile of ideal mixture with Q-sepharose column chromatography (1.1×2.2cm). After loading ideal mixture (0.25mL), Tris / HCl buffer containing 35mM NaCl was added to detach non-binding materials and γ -glutamylcysteine from the resin, followed by the buffer containing 90mM NaCl to detach GSH. To detach strongly binding materials (ATP), the buffer containing 300mM NaCl was used.

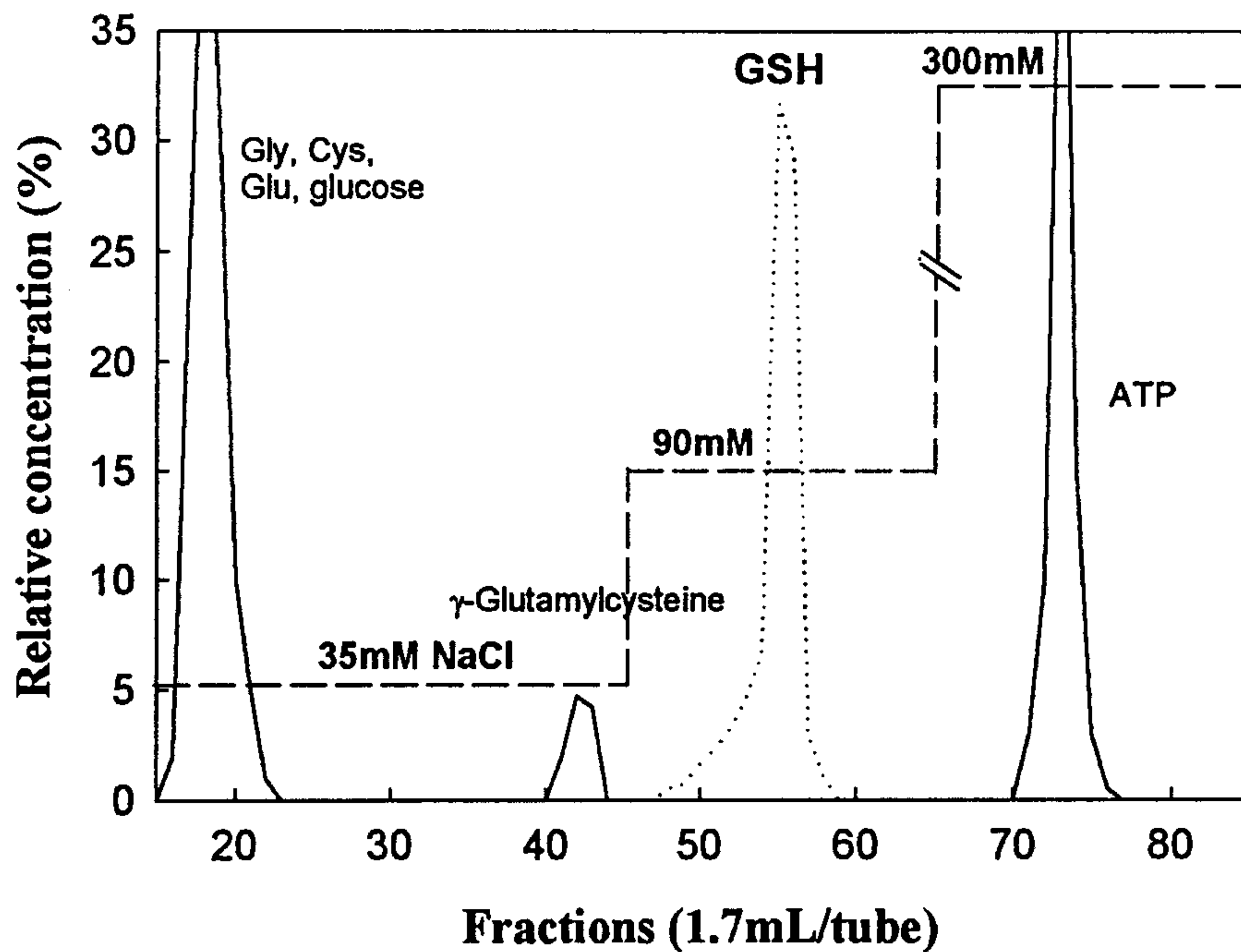


Fig. 62. Elution profile of a product of enzymatic conversion with Q-sepharose column chromatography (1.1 × 22cm). The same method as that of ideal mixture was applied. After loading 0.25mL of product to the column, Tris / HCl buffer containing 35mM NaCl was added to detach non-binding materials and γ -glutamylcysteine from the resin. The same buffers containing 90mM NaCl and 300mM NaCl were added to detach GSH and ATP, respectively.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1절 고농도배양

본 연구에서 사용되는 균체는 재조합 대장균과 빵효모이며, 재조합 대장균은 글루타치온을 대량생산하기 위해서 고농도 배양이 필수적이다. 이러한 점을 감안하여 μ -stat를 적용하여 고농도 배양을 하였으며, 고농도 배양하였을 경우 효소의 활성의 감소됨을 보여 최적화된 배지를 이용하고 기질의 공급농도에 따라서 ampicillin의 농도를 변화하여 공급함으로써 효소의 활성을 높였다. 재조합균주의 고농도 배양 목표를 상회하는 147(OD₆₀₀)의 세포농도를 얻어 글루타치온 생산성 향상에 기여하였다. 세포농도 147(OD₆₀₀)는 다른 균주에 대한 선도적 고농도 배양의 100 g/L보다는 낮은 값이지만, 해당 균주로서는 높은 농도이고 특히 μ -stat을 이용한 실험이어서 이 후 μ -stat을 이용해야되는 미생물의 고농도 배양에 있어서 좋은 표준자료가 될 것이다.

제 2절 배지 최적화

종전의 복합배지를 사용할 경우의 균체의 고농도 배양의 문제점을 보완하기 위하여 Rosenberg배지를 사용하였다. 하지만 균체의 증가함에 따라 효소의 활성이 떨어짐을 보였다. 이러한 점을 보완하기 위해서 Risenberg배지에 글루타치온생산에 사용되는 cysteine, glutamic acid, glycine을 첨가하여 균체량과 효소의 활성을 모두 올릴 수 있었다. 최적의 아미노산 첨가량을 정한 후 3 factorial design에 따라 아미노산의 농도를 변화시켜 영향성을 알아본 후 최적의 아미노산량을 결정하였다. 이러한 새로운 배지를 이용하여 생산된 글루타치온량은 기존의 복합배지보다 30% 증가되었고 이는 혼합세포반응기에서의 글루타치온 생산성 증대에 기여하였다.

기질을 배지에 공급함으로써 효소의 활성을 증가시키고 궁극적으로 산물의 생산량을 증가시킨 결과는 효소를 이용한 물질 생산의 경우에 적용될 수 있을 것이다.

제 3절 γ -Glutamylcysteine 생산

본 연구는 글루타치온 생산의 기초실험으로 혼합세포계에 ATP 재생산계가 효과를 관찰하였으며 단일세포계와 혼합세포계에서의 γ -glutamylcysteine의 생산을 연구하였다. 또한 혼합세포계에서 재조합 대장균과 빵효모의 최적의 혼합비율을 정하였으며, 세포계의 효소의 활성을 시간별로 측정하였다. Alginate를 이용한 고정화

방법에서의 γ -glutamylcysteine의 생산 및 효소의 활성을 측정한 결과 효소의 활성이 현탁반응에서 보다 더욱 안정됨을 보였다.

제 4절 글루타치온 생산

본 연구는 기존에 공업적으로 발효법에 의해서 생산되는 글루타치온 생산방법과는 달리 세포내에 존재하는 효소를 정제하지 않고도 유기용매를 이용하여 세포막의 투과성을 증진시켜 글루타치온을 생산하는 효소적인 방법이다.

현탁반응에서 글루타치온의 생산 수율은 77%까지 증가시켰으며, cysteine의 추가 공급을 이용하여 종전의 생산 수율을 유지하면서 고가의 ATP를 20mM에서 5mM로 줄이는 결과를 얻어 대량생산에서 경제적으로 유리한 위치를 점하게 되었다. 또한 기질을 추가 공급함으로써 cysteine의 급격한 감소를 줄일 수 있는 결과를 얻었다. 현탁반응에서의 cysteine의 전환율은 78.6%로 목표량 80%에 근접하는 결과를 얻었다.

Hollow-fiber를 이용한 글루타치온 생산의 경우, 세포를 고정화시 단위부피당 면적을 극대화 할 수 있는 방법으로서 아주 뛰어난 고정화방법이었으며. 결과적으로 재조합 대장균과 빵효모의 혼합세포를 고농도를 고정화 할 수 있는 장점을 가지고 있었다. 또한 세포의 회수 및 재사용의 공정에서 세포와 산물의 분리에 사용될 수도 있다.

Celite를 이용한 글루타치온의 생산에서 조제와 세포를 컬럼에 packing 후 기질을 공급함으로써 세포의 유출을 억제하면서 고농도의 세포를 고정화 할 수 있는 장점을 가지고 있었다. 또한 응집제를 사용할 경우 조제 및 세포의 침강 속도가 증가됨을 보여서 단 시간에 반응기 고정화를 할 수 있는 장점을 가지고 있다.

Agar, Ca-alginate, polyacrylamide를 이용한 고정화에서는 고정화 방법이 쉬운 관계로 쉽게 고정화를 할 수 있었다. 연속반응기를 사용할 경우에도 세포의 유출이 거의 없는 관계로 고정화 방법으로 뛰어난 것을 보여 주었다. 하지만 세포의 고정화를 고농도로 할 수 없는 단점을 가지고 있다. Ca-alginate를 사용한 고정화 혼합세포반응기에서의 글루타치온의 생산농도는 약 400 mg/L로서 연구개발 목표량을 훨씬 상회하는 생산량을 얻을 수 있었다.

Sequential batch를 이용한 경우 본 연구에 사용되는 세포의 효소는 최대 2시간 내에 반응이 종결됨을 보여 주었다. 이러한 점을 감안하여 현탁반응을 연속적으로 수행할 경우 반 연속반응기로서 글루타치온생산량을 증가 시킬 수 있었다. 또한 연속반응기에 적용할 수 있는 기초 실험이 되었다.

Aerated slurry bioreactor의 경우 지금 본 연구에서 사용하고 세포계의 효소들이

모두 세포 내에 존재하기 때문에 고정화를 하였을 경우 물질전달의 문제점이 증가됨을 예상하였다. 이런 점을 보완하기 위하여 현탁반응 형태로 글루타치온을 생산하여 유출되는 세포만을 회수 및 재사용하는 반응기를 설계하여 수행하여 글루타치온을 연속적으로 생산을 수행하였다. 상기의 다양한 고정화 생물반응기들은 다른 유용생물물질의 효율높은 생산을 위한 반응기 설계에 있어 귀중한 모델을 제시할 수 있다.

제 5절 글루타치온 회수

구리 침전과 전기투석을 이용한 GSH의 분리는 대량·연속 공정에의 적용에 가능하리라 판단되었다. 기존의 GSH 분리 특허 중 2개의 chamber(양극 chamber와 음극 chamber)를 사용한 전기투석 운전의 문제점을 제기하였다(3 chamber 이상 사용). 전기투석을 이용한 GSH의 회수율은 73%로 목표치 70%를 달성하였다. 이러한 결과는 글루타치온과 같이 용액의 pH에 따라 대전하가 변하는 생물물질의 회수에 있어 기초자료로 사용될 수 있다.

Q-sepharose를 사용한 크로마토그래피에서는 고가의 기기인 HPLC를 사용하지 않고도 GSH의 분리가 가능하며, 양이온, 음이온 교환수지를 병행하여 사용하는 기존의 GSH 분리, 정제 방법에 비해 공정을 간소화함으로써 생산비용 감소에 의해, 최종 생산물의 가격 경쟁력을 향상시킬 수 있다 사료되었다. 크로마토그래피에 의한 분리시, 미반응 물질, ATP 등 고가의 기질을 재활용으로 생산비용의 감소 할 수 있으리라 판단되었다. 이온교환 크로마토그래피를 이용한 GSH의 회수율은 모델용액과 생산모액의 경우 각각 72.6, 84.4%로 목표치 70%를 넘는 결과를 얻었다. 이러한 결과는 글루타치온과 같이 용액의 pH에 따라 전하가 변하는 단백질 등의 생물물질의 회수에 있어 이온교환 크로마토그래피 적용의 모델을 제시할 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

글루타치온은 의약품으로서의 효능외에 최근에는 글루타치온의 전구체, 유도체의 생리활성이 속속 밝혀지고 있다. 또한 건강식품 등 식품첨가제로서의 응용도 우리와 생활양식이 비슷한 일본에서 활발하게 진행되고 있어 앞으로 그 수요가 크게 증가할 것으로 예측된다. 본 연구의 성공적인 수행으로 국내수요는 물론, 제품 및 공정의 수출에 의한 경제 산업적 효과가 막대하리라 전망한다. 글루타치온 생산을 위한 연구수행의 결과 얻어진 기초과학적, 생산공정적 연구결과는 oligopeptide성의 유사 생물물질의 생산에 적용될 것이고, 직접적으로는 향후 국내외적 수요가 증가할 경우 글루타치온의 산업화를 도모할 것이다.

산학연의 연구개발에 대한 긴밀한 협조체제를 유지함으로써 연구개발의 목표달성을 앞당기기 위하여 1차년도부터 산업체가 직접 연구에 참여하였다. 대장균의 점차적 유전형질 개선이 확인되면 즉시 이에 따른 배양·반응·회수 공정의 도입이 학교와 공동으로 산업체에서 실시되었다. 그 동안의 연구개발의 결과와 연구종료 후 polyphosphate kinase 등에 대한 적절한 추가연구의 결과를 가지고, 적어도 국내수요를 충족시킬 수 있는 양의 GSH가 본 참여업체에 의하여 이루어질 것으로 기대한다. 특히 에너지원으로서의 ATP 사용 대신 polyphosphate kinase를 이용한 에너지 공급기술이 추가연구에 의해 확립된다면 이는 생합성에 있어 에너지 공급이 필요한 다양한 생물물질의 생산에 있어 획기적인 경제성 향상을 가져올 수 있다.

또한 본 연구에서 수행되었던 재조합 균주의 제작, 배지 최적화, 고농도 배양, 고정화 혼합세포 반응기에 의한 글루타치온 생산, 그리고 효율적인 글루타치온 회수 연구는 이외의 생물물질들, 특히 단백질 등의 생산에 공통적으로 사용될 수 있는 분자생물학적, 미생물학적, 생물화학공학 기술로서 향후 여러 가지 유용생물물질의 생산에 두루 적용될 것이다. 특히 본 연구는 분자생물학, 생화학, 그리고 생물화학공학 분야에 종사하는 연구자들이 재조합 균주의 제작에서부터 최종적 회수, 분리에 이르기까지, 즉 생물공학의 upstream과 downstream의 협동연구에 의해 효율적인 생물물질의 생산을 이루었다는 점에 있어 향후 생물산업에 있어 바람직한 연구형태를 제시하였다고 판단한다.

제 6 장 참고문헌

1. Y. S. Nam, Molecular breeding of glutathione producing bacterial strains, Thesis for the degree of doctor, Korea University (1990).
2. K. A. Bauer, A. Ben-Bassat, M. Dawson, V. T. de la Puente, and J. O. Neway, Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **56**, 1296-1302 (1990).
3. L.B. Tsai, M. Mann, F. Morris, C. Rotgers, and D. Fenton, The effect of organic nitrogen and glucose on the production of recombinant human insulin-like growth factor in high-cell-density *Escherichia coli* fermentations, *J. Indust. Microbiol.*, **2**, 181-187 (1987).
4. L. Yee and H. W. Blanch, Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*, *Biotechnol. and Bioeng.*, **41**, 781-790 (1993).
5. X. M. Yang, L. Xu and L. Eppstein, Production of recombinant human interferon- α by *Escherichia coli* using a computer-controlled cultivation process, *J. Biotechnol.*, **23**, 291-301 (1992).
6. D. J. Seo, B. H. Chung, Y. B. Hwang, and Y. H. Park, Glucose-limited fed-batch culture of *Escherichia coli* for production of recombinant human interleukin-2 with the DO-stat method, *J. Ferm. and Bioeng.*, **74**, 196-198 (1992).
7. S. S. Kim, Effects of specific growth rate on the high cell density cultivation of lipase-producing recombinant *Escherichia coli*, Master thesis, Inha University (1995).
8. K. H. Han, Henry C. Lim, and J. A. Hong, Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation, *Biotechnol. and Bioeng.*, **39**, 663-671 (1992).
9. A. Gschaedler, N. Thi Le and J. Boudrant, Glucose and acetate influences on the behavior of the recombinant strain *Escherichia coli* HB 101 (GAPDH), *J. Indust. Microbiol.*, **13**, 225-232 (1994).
10. G. W. Luli, and W. R. Strohl, Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch

- fermentations, *Appl and Environ. Microbiol.*, **56**, 1004-1011 (1990).
11. E. B. Jensen and S. Carlsen, Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*, *Biotechnol. and Bioeng.*, **26**, 1-11 (1990).
 12. L. Yee and H. W. Blanch, Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90, *Biotechnol. and Bioeng.*, **41**, 221-230 (1993).
 13. K. M. Park and K. F. Reardon, Medium optimization for recombinant protein production by *Bacillus subtilis*, *Biotechnol. Lett.*, **18**, 737-740 (1996).
 14. C. Curless, K. Fu, R. Swank, A. Menjares, J. Fieschko, and L. Tsai, Design and evaluation of a two-stage, cyclic, recombinant fermentation process, *Biotechnol. and Bioeng.*, **38**, 1082-1090 (1991).
 15. G. M. O'Connor, F. Sanchez-Riera, and C. L. Cooney, Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations, *Biotechnol. and Bioeng.*, **39**, 293-304 (1992).
 16. K. B. Konstantinov, N. Nishio, T. Seki, and T. Yoshida, Physiologically motivated strategies for control of the fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* for phenylalanine production, *J. Ferm. and Bioeng.*, **71**, 350-355 (1991).
 17. K. B. Konstantinov, N. Nishio, and T. Yoshida, Glucose feeding strategy accounting for the decreasing oxidative capacity of recombinant *Escherichia coli* in fed-batch cultivation for phenylalanine production, *Biotechnol. and Bioeng.*, **70**, 253-260 (1990).
 18. K. B. Konstantinov, M. Kishimoto, T. Seki, and T. Yoshida, A balanced DO-stat and its application to the control of acetic and excretion by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. and Bioeng.*, **36**, 750-758 (1990).
 19. H. Mori, T. Yano, T. Kobayashi, and S. Shimizu, High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-stat, *J. Chemeng. Japan*, **12**, 313-319 (1979).
 20. N. Shimizu, K. Fujimori, N. Nihimura, and Y. Odawara, Fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with inhibitory substance concentration Monitoring, *J. Ferment. Technol.*, **66**, 187-191 (1988).
 21. S. Sakamoto, M. Iijima, H. Matsuzawa, and T. Ohta, Production of thermophilic protease by glucose-controlled fed-batch culture of recombinant

- Escherichia coli*, *J. Ferment. and Bioeng.*, **78**, 304-309 (1994).
22. Z. P. Shi, K. Shimizu, S. Iijima, R. Izumi, K. Matsumoto, and T. Kobayashi, Development of dual on-line analyzer and its application to fed-batch lactic acid fermentation, *J. Ferment. and Bioeng.*, **73**, 22-25 (1992).
 23. Y. S. Park, K. Kai, S. Iijima, and T. Kobayashi, Enhanced β -galactosidase production by high cell density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control, *Biotechnol. and Bioeng.*, **40**, 686-696 (1992).
 24. S. Mizutani, S. Iijima, M. Morikawa, K. Shimizu, and T. Kobayashi, On-line control of glucose concentration using an automatic glucose analyzer, *J. Ferment. Technol.*, **65**, 325-331 (1987).
 25. D. Risenberg, B. Schulz, W.A. Knorre, H.-D. Pohl, D. Korz, E. A. Sanders, A. Rob, and W.-D. Deckwer, High-cell-density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate, *J. Biotechnol.*, **20**, 17-28 (1991).
 26. C. Turner, M. E. Gregory, and M. K. Turner, A study of the effect of specific growth rate and acetate on recombinant protein production of *Escherichia coli* JM109, *Biotechnol. Lett.*, **16**, 891-896 (1994).
 27. S. K. Yoon, W. K. Kang, and T. H. Park, Fed-batch operation of recombinant *Escherichia coli* containing trp promoter with controlled specific growth rate, *Biotechnol. and Bioeng.*, **43**, 995-999 (1994).
 28. T. Paalme, K. Tiisa, A. Kahru, K. Vanatalu, and R. Viliu, Glucose-Limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate, *Biotechnol. and Bioeng.*, **35**, 312-319 (1990).
 29. L. Yee and H. W. Blanch, Recombinant protein expression in high-cell-density fed-batch cultures of *Escherichia coli*, *BIO/TECHNOLOGY*, **10**, 1550-1556 (1992).
 30. S. Y. Lee, High-cell-density culture of *Escherichia coli*, *TIBTECH.*, **14**, 98-105 (1996).
 31. F. Tietze, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione, *Anal. Biochem.*, **27**, 502-522 (1969).
 32. H. K. Kim and Y. M. Koo, Studies on the High Cell Density Cultivation of Glutathione-Producing Recombinant *Escherichia coli*, *HWAHAK KONGHAK*, **35**, 526-531 (1997).

33. S. H. Yoon and Y. M. Koo, Glutathione Production by Co-immobilized Reactor, *Korean J. Biotech. Bioeng.*, 12, 151-158(1997).
34. Y. S. Nam, Molecular Breeding of Glutathione Producing Bacterial Strains, Ph. D. thesis, Korea Univ., Seoul (1990).
35. W. G. Hunter and J. S. Hunter, Statistics for Experiments, Wiley, New York, pp.128-141(1978).
36. K. Murata, K. Tani, J. Kato, and I. Chibata, Glutathione production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells containing an ATP regeneration system. *Eur. J. Appl. Biotechnol.* 11: 72-77(1981).
37. C. G. Alfafara, 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(1991).
38. C. G. Alfafara, K. Miura, H. Shimizu, S. Shioya and K. I. Suga, Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 141-146(1992).
39. C. L. Wang and D. J. Oliver, 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(1996).
40. H. Felix, *Extractive Bioconversions-Bioconversions in Permeabilized Cells*, Pp 259-279. Dekker Press(1991).
41. K. Murakami, H. Wagura, and M. Yoshino, Permeabilization of yeast cells : Application to study on the regulation of AMP deaminase activity *in situ*. *Anal. Biochem.* 105: 407-413(1980).
42. H. Shimizu, K. Araki, S. Shioya, and K. I. Suga, Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 196-205(1991).
43. G. Dennda and M. R. Kula, Assay of the glutathione-synthesizing enzymes by high-performance liquid chromatography. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 8: 459-464(1986).
44. R. L. Heinrikson and S. C. Meredith. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography : Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* 136: 65-74.

45. R. K. Mehra, T. Kim, W. G. Scott, P. Mulchandani, and S. S. Saini, Ag(I)-Binding to Phytochelatins, *J. Inorg. Biochem.*, **61**, 125-142(1996).
46. 磯和義員, グルタチオン, アミノ酸醗酵(相田浩ら 編), pp.437-451(1987).
47. 韓國遺傳工學研究組合, 生物産業製品 100選, pp.44-47, 한국유전 공학연구 조합, 서울(1989).
48. D. P. Jones, Glutathione Distribution in Natural Products : Absorption and Tissue Distribution, *Methods in Enzymology*(L.Packer, eds), Vol. 252, pp.3-13, Academic Press, California(1995).
49. G. L. Newton and R. C. Fahey, 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(1987).
50. R. K. Scopes, Protein purification : principle and practice, 3rd ed., pp.71-101, Springer-Verlag, New York(1993).
51. K. S. Lee and J. Hong Electrokinetic Transport of Amino Acids through a Cation Exchange Membrane, *Journal of Membrane Science*, **75**, pp.107-120(1992).
52. R. D. Noble and S. A. Stern Membrane Separation Technology Principles and Applications, pp.262, Elsevier Science, USA(1995).
53. 양 용근, 효소 단백질 정제법, pp.165-221, 양서각, 서울(1994).
54. 野口貞夫, グルタチオンの精製法, 公開特許公報, 昭52-131527(1977),.
55. G. Dennda and M. R. Kula, Assay of the Glutathione-Synthesizing Enzymes by High-Performance Liquid Chromatography, *Biotechnol. and Appl. Biochem.*, **8**, 459-467(1986).
56. W. H. McBeath, D. B. Preston, and R. A. Canham , Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15th ed., pp.193-194, American Public Health Association, Washington D.C.(1981).

위탁연구과제 I

글루타치온 생산 효소용 *Escherichia coli* 균주개발

위탁연구기관명: 고려대학교
위탁연구책임자: 이 세 영
연 구 원: 곽 준 혁
 남 궁 석
 박 연 홍

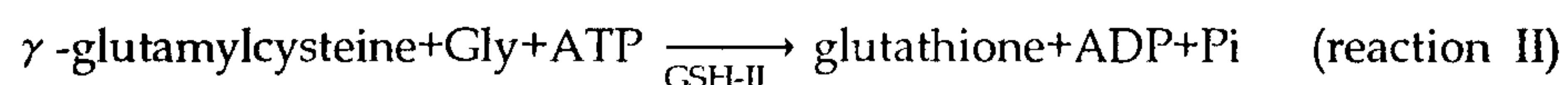
요 약 문

I. 제 목

글루타치온 생산 효소용 *Escherichia coli* 균주 개발

II. 연구개발 목적 및 필요성

글루타치온은 L-glutamate와 L-cysteine 그리고 glycine으로 구성된 tripeptide의 구조 (γ -glutamylcysteinylglycine)를 가지고 있는 물질이다. 글루타치온은 주로 간장 질환 치료 보조제나 당뇨병의 치료제로 사용되고 있다. 최근에는 이 물질이 항암효과가 있다고 알려져 주목받고 있다. 생체내에서 글루타치온의 합성은 γ -glutamylcysteine synthetase과 glutathione synthetase에 의해 이루어지는데 γ -glutamylcysteine synthetase가 L-glutamate와 L-cysteine으로부터 γ -glutamylcysteine의 합성하는 반응을 촉매하고 glutathione synthetase는 이 반응 산물에 glycine을 결합시켜 글루타치온을 합성하는 반응을 촉매한다. 이때 두 분자의 ATP가 에너지원으로 사용된다.



특히 글루타치온 합성에 있어서 속도결정단계로 기능하는 γ -glutamylcysteine synthetase는 ATP의 분해산물인 10 mM의 ADP에 의해서 효소활성이 70%정도 감소하고 최종 반응 산물인 환원형 글루타치온에 의해서도 feedback inhibition 받는 것으로 알려져 있다.

Ⅲ. 연구개발내용 및 범위

1. 변이 γ -glutamylcysteine synthetase의 과발현 및 특성 조사

E. coli tac promoter를 이용하여 γ -glutamylcysteine synthetase를 대장균 내에서 과발현시키기 위하여 *gshI* 유전자를 *tac* promoter를 가지는 pDR540 vector에 클로닝하여 넣었다. 이렇게 재조합된 유전자를 *E. coli*에 형질전환하여 이것의 발현양을 효소 활성 측정법을 이용하여 측정하였다. 그리고 T7 phage promoter를 이용하기 위하여 *gshI* 유전자를 pT7T3 벡터에 도입하여 T7 RNA polymerase가 발현되는 *E. coli* 숙주세포에서 유전자의 발현을 측정하였다. 부위 특이적 돌연변이를 통하여 활성이 증가된 γ -glutamylcysteine synthetase의 특성을 조사하고 효소활성이 증가된 원인을 규명하기 위하고자 과발현된 균주로부터 이들 효소를 정제하였다. 그리고 이들 정제된 효소를 이용하여 효소반응의 기질로 사용되는 L-glutamate, L-cysteine 그리고 ATP에 대한 각각의 K_m 과 k_{cat} 값을 조사하였다. 글루타치온 생산에 이용할 목적으로 효소활성이 증가된 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase를 코딩하는 *gshI*와 *gshII* 유전자가 동시에 발현하는 재조합 plasmid를 구성하였다. 이와 같이 구성된 재조합 plasmid를 *E. coli*에 형질전환하였다. 그리고 이들 형질전환된 세포로부터 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase의 활성을 측정하여 이들 두 유전자가 *E. coli*에서 안정적으로 과발현됨을 확인하였고 이들을 글루타치온 생산에 이용하였다.

2. Polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계 구성

Polyphosphate kinase를 이용한 새로운 ATP 재생계 구성을 위하여 이것을 코딩하는 유전자를 클로닝하는 작업을 수행하였는데, 이에 앞서 *E. coli* 내의 polyphosphate kinase의 활성을 조사하여 polyphosphate와 ADP로부터 ATP가 합성됨을 확인하였다. *E. coli* 염색체로부터 polymerase chain reaction 방법을 이용하여 polyphosphate kinase 유전자를 클로닝하였고 이것의 염기서열을 분석하였다. 그리고 이렇게 확보된 *ppk* 유전자를 multicopy vector에 클로닝하여 *E. coli*에서 발현시켰다. *E. coli*에서 발현된 polyphosphate kinase를 이용하여 ADP와 polyphosphate로부터 ATP를 합성할 수 있는 ATP 재생계를 구성하였다. 그리고 polyphosphate kinase를 이용한 새로운 ATP 재생계를 글루타치온 생산용 bioreactor에 적용하여 글루타치온 생산을 관찰하였다.

IV. 연구개발결과

아미노산의 치환이 효소 반응에 어떤 영향을 주는지 자세히 알기 위하여 이들 효소를 정제하여 반응 속도론적 특성과 물리적 특성을 조사하였다. 효소를 정제하기 전에 효소의 발현을 증가시키고 정제를 용이하게 하기 위하여, 우선 변이 *gshI* 유전자를 강력한 *E. coli tac promoter*를 갖는 plasmid에 서브클로닝하여 이들의 발현을 증가시켰다. 그 결과 효소의 발현이 야생형의 promoter를 사용한 경우보다 5~10배정도 증가되었음이 관찰되었다. 그러나 이 promoter의 발현 유도물질인 IPTG의 첨가가 효소의 발현을 증가시키지는 못 하였다. 변이 γ -glutamylcysteine synthetase 효소를 정제하기 위하여 우선 이들 효소를 가지는 *E. coli* 세포를 배양하여 수확한 다음 이들 세포로부터 조효소액을 얻었다. 이들 조효소액에 0.2 M citrate를 첨가하여 필요하지 않은 단백질을 제거하는 산처리 (acid treatment)를 수행하였는데, 이 때 상등액에서 효소의 활성이 90% 이상 관찰되었다. 그 다음은 MonoQ FPLC column을 이용한 ion exchange chromatography였으며, 마지막 정제의 단계는 ATP-agarose column를 이용한 친화적 chromatography였다. 이상의 단계를 거쳐 정제된 단백질은 약 17-25%의 정제 회수율을 보였으며, 효소의 활성은 조효소액에 비하여 25-45 배정도 증가되었음을 보였다. 최종적으로 얻은 효소의 활성은 각각 야생형이 $31.54 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, Ala494→Val로 치환된 변이주가 $35.04 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, Ser495→Thr로 치환된 변이주가 $30.25 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 였고 Ala494-Ser495→Val-Thr로 치환된 변이주는 $43.67 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 였다. 즉 이 결과는 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이효소가 야생형에 비해서 40% 정도 활성이 증가되었음을 보여주고 있다. 이것을 바탕으로 이 효소의 기질로 이용되는 ATP와 L-cysteine 그리고 L-glutamate 각각에 대한 친화도 (K_m)와 k_{cat} 을 조사하였다. 이들 효소의 ATP에 대한 K_m 값은 야생형이 1.11 mM인데 반하여 Ala494→Val 변이 효소는 0.79 mM, Ser495→Thr 변이효소는 1.29 mM이고 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이 효소는 0.55 mM였다. 그리고 k_{cat} 값은 야생형이 46.03 s^{-1} 으로 나타났다. 그 외의 변이 효소에 대한 k_{cat} 값은 Ala494→Val 이 51.73 s^{-1} 이고 Ser495→Thr은 54.92 s^{-1} 였으며 Ala494-Ser495→Val-Thr은 55.12 s^{-1} 이다. 이 결과로 볼 때 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이효소의 ATP에 대한 친화도가 크게 증가되었음을 보여주고 있다. 그리고 L-Cys에 대한 K_m 값은 야생형 효소가 0.56 mM이고 Ala494→Val 변이 효소는 0.65 mM였다. 그리고 Ser495→Thr 변이효소는 0.85 mM이고 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이 효소는 0.36 mM으로 관찰되었다. L-Cys에 대한 k_{cat} 값은 야생형이 35.68 s^{-1} 으로 나타났다. 그 외의 변이형 효소의 이 기질에 대한 k_{cat} 값은 Ala494→Val 이 42.06 s^{-1} 이고 Ser495→Thr은 35.87 s^{-1} 였으며,

Ala494-Ser495→Val-Thr은 42.06 s⁻¹이었다. L-Cys에 대한 kcat 역시 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이 효소가 야생형에 비해서 크게 증가하였음을 보였다. L-Glu에 대한 Km 값은 야생형 효소가 1.75 mM이고 Ala494→Val 변이 효소는 1.79 mM였으며, Ser495→Thr 변이 효소는 1.95 mM 이고 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이 효소는 1.59 mM 였다. 그리고 이 기질에 대한 kcat 값은 야생형 효소가 29.98 s⁻¹ 으로 나타났다. 그 외의 변이 효소에 대한 kcat 값은 Ala494→Val이 36.26 s⁻¹이고 Ser495→Thr 은 30.17 s⁻¹였으며, Ala494-Ser495→Val-Thr은 43.71 s⁻¹였다. 이들 효소의 환원형 글루타치온에 대한 되먹임 저해는 야생형 효소나 변이 효소나 변화가 없는 것으로 관찰되었다. 이들 효소의 물리적 특성을 알기 위하여 효소의 구조를 circular dichroism (CD)을 이용하여 조사하였다. 야생형의 γ -glutamylcysteine synthetase 보다 Ala494→Val로 바뀐 변이형 γ -glutamylcysteine synthetas의 folding structure가 더 안정화되었음을 보여주었다. 그리고 Ser495→Thr 변이 효소는 야생형에 비하여 folding structure가 상당히 불안정화 되었고 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이 효소는 야생형의 그것과 비슷하였다. 온도 변화에 따른 단백질의 folding structure 변화 역시 CD을 이용하여 관찰하였다. 이 결과를 보면 Ala494→Val 변이 효소의 경우는 folding structure가 80 °C까지 유지되는 되는데 비하여 야생형 효소와 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이 효소는 60 °C 정도까지 그 구조가 유지되는 것으로 관찰되었다. 그리고 Ser495→Thr 변이 효소의 경우는 야생형 보다 낮은 온도에서 folding structure의 변화되는 것으로 관찰되었다. Ala494→Val 치환에 의한 효소의 안정성 증가는 Ala에 비하여 소수성이 큰 Val이 효소 내부의 소수성 결합을 크게 증가시켰기 때문이라고 여겨진다. 위 결과를 종합적으로 판단 하여볼 때 Ala494→Val 치환이 효소의 ATP에 대한 친화도를 증가시키고 이것이 효소의 다른 기질에 대한 친화도를 증가시켜서 효소의 활성이 증가된 것으로 추측된다. 이 때 Ala494→Val로 치환된 변이 효소가 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이 효소 보다 활성이 낮게 나오는 이유는 효소의 folding 구조가 안정화되면 flexibility가 떨어지게 되는데, 이 결과로 효소의 반응성이 떨어진 것으로 생각된다. Ser495→Thr 치환은 효소의 구조를 불안정화 시키지만 활성에는 영향을 주지 않고 Ser495→Phe 치환은 효소의 활성을 없애고 구조를 불안정화 시키는 사실로 미루어 볼 때 이 효소의 Ser495 아미노산이 활성에 관계하는 것으로 추측되어진다.

Polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계를 구성하기전에 이 효소가 polyphosphate를 이용하여 ADP로부터 ATP를 합성하는지 알아보았다. 이를 위하여 *E. coli*를 배양하여 조효소액을 얻은 다음 이것을 polyphosphate kinase 효소원으로 이용하여 ATP 합성능력을 측정하였다. ATP 합성능력은 세포를 파쇄한 파쇄액의 침전물에서 발견되었으며, 상등액에서는 활성이 미미하게 나타났다. 그리고

polyphosphate는 9개의 phosphate가 축합된 것과 6개가 축합된 것을 모두 이용하였는데 ATP 생산량에 큰 차이는 없었다. 이 유전자의 발현을 증가시켜서 polyphosphate kinase의 활성을 증가시키고자 이 효소를 암호화하는 *ppk* 유전자를 PCR를 이용하기 *E. coli* chromosome으로부터 클로닝하였다. PCR 클로닝 벡터에 클로닝된 *ppk* 유전자의 발현 정도를 알아보기 위하여 재조합 균주를 50 mL의 액체 배지에 배양하여 polyphosphate kinase의 활성을 조효소액 상태로 측정하였다. 그리고 효소의 활성을 측정한 결과 숙주 세포에 비하여 10 배 정도 발현이 증가한 것을 확인하였다. Polyphosphate kinase가 글루타치온 생산에 있어서 ATP 생산원으로서의 효율을 알아보기 위하여 글루타치온 생산에 실험을 수행한 결과 이들을 대장균 내에서 안정적으로 발현됨을 효소 활성측정을 통하여 확인하였다. 대장균 내에서 과발현된 polyphosphate kinase가 ADP와 polyphosphate로부터 ATP를 생산함을 확인하였고, 또한 polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계를 이용하여 글루타치온을 생산한 결과 글루타치온이 1.7 mM 정도 생산됨을 확인하였다.

V. 연구개발 결과의 활용계획

본 연구를 통하여 발현이 증가된 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase를 얻었다. 그리고 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 활성 증가 원인을 확인하였다. 이렇게 얻어진 결과는 bioreactor를 이용한 글루타치온의 산업적 생산에 이용될 것이다.

변이효소의 특성을 밝히는 연구를 통하여 효소의반응기작에 대한 이해를 높일 수 있을 것이다. 그리고 이들의 발현을 증가시키기 위하여 사용한 promoter 치환기술은 기타 다른 단백질 및 효소의 과발현에 이용할 것이다.본 연구에서 새롭게 고안된 polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계는 bioreactor에서 글루타치온 생산뿐만 아니라 다른 ATP 요구성 물질생산에 이용될 것이다.

SUMMARY

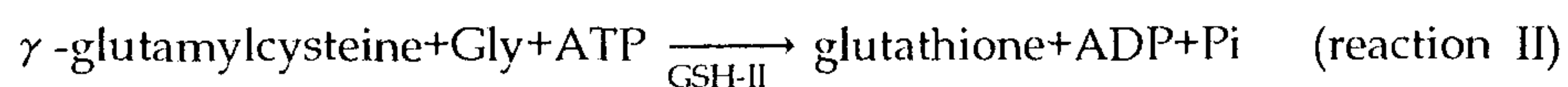
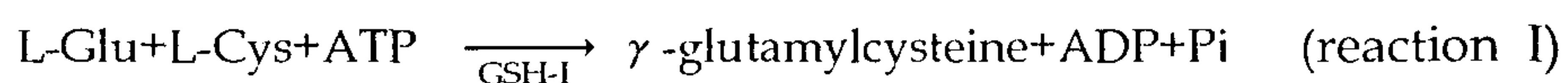
I. Title

Molecular breeding of an *E. coli* strain for enzyme of glutathione production

II. Aims and Significance

Glutathione is a tripeptide compound containing the structure of γ -glutamylcysteinylglycine and important nonprotein thiol group in living system. It shows a widespread occurrence in the intracellular milieu of animal, plant, and microorganism. Almost glutathione in the living cell is reduced form. The glutathione acts as an antioxidant, a protector of cell from reactive oxygen (H_2O_2 or O_3), and a chelator of heavy metals (Meister, 1983).

Glutathione synthesis in the living system is carried out by two enzymatic reactions. The first step of glutathione synthesis is mediated by γ -glutamylcysteine synthetase (EC. 6.3.2.2) which is feedback inhibited by reduced glutathione (Meister, 1983 and Watanabe *et al.*, 1986). The next step is catalyzed by glutathione synthetase (EC. 6.3.2.3.). The reaction equations are following;



Since the synthesis of glutathione is controlled by γ -glutamylcysteine synthetase with feedback inhibition, the glutathione production using

enzymatic method is limited by the activity of γ -glutamylcysteine synthetase

(Nam, 1989)

III. Contents and Area

1. Characterization and expression of mutated γ -glutamylcysteine synthetase

In order to increase expression level of *gshI*, the *gshI* promoter was substituted with strong *E. coli tac* promoter. The recombinant plasmid was transformed with *E. coli* and the expression level was analyzed by enzyme assay. And the *gshI* gene was introduced into pT7T3 vector containing T7 promoter. High level expression of protein allows us to purify easily and is useful for enzymatic synthesis of glutathione for bioreactor system. To investigate the properties of these mutant γ -glutamylcysteine synthetases, these enzymes were purified from *E. coli* cell harboring pDR vector series.

2. Construction of an ATP regeneration system using polyphosphate kinase

In order to construct an ATP regeneration system, the gene for polyphosphate kinase was cloned from *E. coli* chromosome using polymerase chain reaction. The gene was subcloned into plasmid vector and it was expressed in *E. coli*.

IV. Results

For explaining the reason for the activities of mutant were increase, these mutant enzymes were purified and kinetic, and physical properties of the enzymes were examined. Before these enzymes were purified, the mutated *gshI* genes were subcloned into the vector containing strong *tac* promoter. The expression of *gshI* controlled by *tac* promoter was increased 5-10 fold higher than that of *gshI* controlled by original promoter. Addition of IPTG, inducer of *tac* promoter, did not affect expression level of *gshI*.

The mutant γ -glutamylcysteine synthetases as well as the wild type were purified from *E. coli* cells harboring recombinant plasmid containing *gshI* controlled by *tac* promoter. The *E. coli* cell was harvested and disrupted. Acid treatment was performed by addition of 0.2 M citrate, pH5.0 to cell free extract. In this case, most active enzyme fraction stayed in supernatant. The next step was ion-exchange chromatography with Mono Q (5/5 HR) column and the last step was affinity chromatography using ATP-agarose column. The yield of these purified protein reached 17~25% of cell free extract and the purification

folds were 25~45. The activities of purified enzymes were 31.54 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (wild type), 35.04 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (A494V), 30.25 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (S495T), and 43.67 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (A494V-S495T), respectively. The kinetic parameters of these mutants for each substrate (ATP, L-glutamate, L-cysteine) were investigated. The K_m values of γ -glutamylcysteine synthetase for ATP were 1.19 mM (wild type), 0.79 mM (A494V), 1.29 mM (S495T), and 0.55 mM (A494V-S495T). The k_{cat} values for ATP were 4.03 s^{-1} (wild type), 51.73 s^{-1} (A494V), 54.92 s^{-1} (S495T), and 55.12 s^{-1} (A494V-S495T). These results informed that the mutation (A494V-S495T) increased the binding affinity and reaction velocity for ATP. The K_m values for L-cysteine were 0.56 mM (wild), 0.65 mM (A494V), 0.85 mM (S495T) and 0.36 mM (A494V-S495T). The k_{cat} values were 35.68 s^{-1} (wild), 42.06 s^{-1} (A494V), 35.87 s^{-1} (S495T) and 42.06 s^{-1} (A494V-S495T). It indicated that the kinetic properties of A494V-S495T mutant were improved. The kinetic parameters of mutant γ -glutamylcysteine synthetase for L-glutamate were also investigated. Ala494-Ser495 \rightarrow Val-Thr substitution also improved kinetic properties of γ -glutamylcysteine synthetase for L-glutamate. The k_{cat} value of the A494V-S495T was increased up to 1.4 fold than that of wild type. The level of feedback inhibition of these mutant by reduced glutathione was not much different from that of wild type. The folding structures of these mutant were examined by using circular dichroism. Ala494 \rightarrow Val substitution stabilized the protein folding structure and increased heat stability. Ser495 \rightarrow Thr substitution destabilized the protein folding structure and decreased heat stability. The folding structure of A494V-S495T was not changed apparently.

To use ATP regeneration system containing polyphosphate kinase, it was identified that ATP was synthesized from polyphosphate and ADP. The cell free extract containing polyphosphate kinase catalyzed ATP synthesis from ADP and 6-polyphosphate or 9-polyphosphate. The synthetic activity was detected in membrane fraction of the cell. The gene for polyphosphate kinase was cloned from *E. coli* chromosome using PCR method and it was introduced into expression vector. The enzyme activity of the cells harboring cloned *ppk* gene was increased 10 fold as compared with that of host strain. We were able to demonstrate that the polyphosphate-polyphosphate kinase ATP regenerating system could be successfully used for the enzymatic synthesis of glutathione.

V. Applications of the Research Results

The *E. coli* strain which γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase expression increased was obtained from the research. This strain would be useful for industrial glutathione production. And the reasons for increase of specific activity of mutated γ -glutamylcysteine synthetase were identified.

The ATP regeneration system using polyphosphate and polyphosphate kinase could be useful for glutathione production and other ATP requiring bioreactor systems.

CONTENTS

Summary in Korean	163
Summary	168
Contents	172
contents in Korean	175
Main Text	178
Chapter 1. Introduction	178
Chapter 2. Status of Research and Development	182
Chapter 3. Contents and Results of Research	184
Section 1. Contents of Research	184
1. Characterization and over expression of mutated <i>gshI</i>	184
2. Construction of a new ATP regenerating system	185
Section 2. Materials and Methods	186
1. Materials	186
가. Strains and plasmids	186
나. Restriction enzymes	186
다. Reagents	186
2. Methods	186
가. Isolation of plasmid	186
나. Electrophoresis of DNA	187
다. PCR cloning	187
(1) Polymerase chain reaction	187
(2) Ligation	187
라. Transformation	187
마. DNA sequence analysis	187

바.	Oligonucleotide synthesis	188
사.	Assay of γ -glutamylcysteine synthetase	188
아.	Assay of glutathione synthetase and glutathione	188
자.	Purification of γ -glutamylcysteine synthetase	189
(1)	Preparation of cell free extract	189
(2)	Acid treatment	189
(3)	Ion exchange chromatography	189
(4)	Affinity chromatography	189
차.	SDS-PAGE analysis	189
카.	Circular Dichroism	190
Section 3.	Results and Discussion	191
1.	Expression and purification of γ -glutamylcysteine synthetase	191
가.	Cloning of <i>gshI</i> in expression vector	191
(1)	Cloning of <i>gshI</i> to the vector containing T7 promoter	191
(2)	Cloning of <i>gshI</i> to the vector containing <i>tac</i> promoter	191
나.	Purification of γ -glutamylcysteine synthetase	193
(1)	Preparation of cell free extract	193
(2)	Acid treatment	196
(3)	Ion exchange chromatography	196
(4)	Affinity chromatography	196
2.	Characterization of γ -glutamylcysteine synthetase	206
가.	Kinetic properties of γ -glutamylcysteine synthetase	206
(1)	Specific activity of γ -glutamylcysteine synthetase	206
(2)	Kinetic properties of γ -glutamylcysteine synthetase for ATP	206
(3)	Kinetic properties of γ -glutamylcysteine synthetase for L-cysteine	211
(4)	Kinetic properties of γ -glutamylcysteine synthetase for L-glutametamate	211
(5)	Feedback inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase	215
나.	Physical properties of γ -glutamylcysteine synthetase	220
3.	Construction of an ATP regeneration system and glutathione production	220
가.	Cloning of polyphosphate kinase gene	223

(1) Assay of polyphosphate kinase	223
(2) Cloning of <i>ppk</i> from <i>E. coli</i> chromosome	225
(3) DNA sequence analysis of <i>ppk</i>	225
4. Construction of an ATP regeneration system	225
(1) Expression of the polyphosphate kinase in <i>E. coli</i>	225
(2) Construction of the recombinant plasmid containing <i>gshI</i> and <i>gshII</i>	225
(3) Glutathione production by ATP regeneration system using polyphosphate kinase	227
 Chapter 4. Achievement of Research and Development	 230
 Chapter 5. Application of the Results	 231
 Chapter 6. Reference	 232

목 차

요약문	163
영문 요약문	168
영문 목차	172
목차	175
본문	178
제 1 장 서론	178
제 2 장 국내외 기술개발 현황	182
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	184
제 1 절 연구수행 내용	184
가. 글루타치온 합성 효소의 과발현 및 변이효소의 특성조사	184
나. 새로운 ATP 재생계 도입	185
제 2 절 연구재료 및 방법	186
1. 연구재료	186
가. 균주 및 플라스미드	186
나. 제한효소	186
다. 기타 시약	186
2. 연구방법	186
가. Plasmid DNA의 분리	186
나. 핵산의 전기 영동	187
다. PCR cloning	187
(1) Polymerase Chain Reaction	187
(2) Ligation	187
라. 미생물의 형질전환	187
마. DNA 염기 서열 분석	187

바. Oligonucleotide의 합성	188
사. γ -glutamylcysteine synthetase의 효소활성	188
아. Glutathione synthetase의 효소활성 측정과 글루타치온의 정량 ...	188
자. γ -glutamylcysteine synthetase의 정제	189
(1) 조효소액의 제조	189
(2) 산처리	189
(3) Ion exchange chromatography	189
(4) Affinity chromatography	189
차. SDS-PAGE analysis	189
카. γ -glutamylcysteine synthetase의 circular dichroism (CD) 측정	190
제 3 절 연구결과 및 고찰	191
1. 대장균 내에서 γ -glutamylcysteine synthetase의 과발현 및 정제 ...	191
가. <i>gshI</i> 유전자의 발현 vector에 클로닝	191
(1) <i>gshI</i> 유전자의 T7 promoter를 갖는 vector에 클로닝	191
(2) <i>gshI</i> 유전자의 <i>tac</i> promoter를 갖는 vector에 클로닝	191
나. γ -glutamylcysteine synthetase의 정제	193
(1) 조효소액의 제조	193
(2) 산처리	196
(3) 이온 교환 chromatography	196
(4) Affinity chromatography	196
2. 야생형 및 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 물리 화학적 특성	206
가. γ -glutamylcysteine synthetase들의 반응 속도론적 특성	206
(1) 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 비활성 변화	206
(2) ATP에 대한 γ -glutamylcysteine synthetase의 반응속도론적 특성	206
(3) L-cysteine에 대한 γ -glutamylcysteine synthetase의 반응속도론적 특성	211
(4) L-glutamate에 대한 γ -glutamylcysteine synthetase의 반응속도론적 특성	211
(5) 글루타치온에 의한 γ -glutamylcysteine synthetase의 속도저해	215
나. γ -glutamylcysteine synthetase의 물리적 특성	220

3. Polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계 구성과 글루타치온 생산	220
가. Polyphosphate kinase 유전자의 클로닝	223
(1) <i>E. coli</i> 의 polyphosphate kinase 활성 측정	223
(2) <i>E. coli</i> chromosome으로부터 polyphosphate kinase 유전자의 클로닝	225
(3) 클로닝된 polyphosphate kinase 유전자의 염기서열 분석	225
나. Polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계 구성과 글루타치온 생산	225
(1) Polyphosphate kinase의 <i>E. coli</i> 내 발현	225
(2) <i>gshI</i> 과 <i>gshII</i> 유전자를 연결한 재조합 plasmid의 제조	225
(3) Polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계 구성과 글루타치온 생산	227
 제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	230
 제 5 장 연구개발결과의 활용계획	231
 제 6 장 참고 문헌	232

본 문

제 1 장 서론

글루타치온은 L-glutamate, L-cysteine과 glycine으로 이루어진 tripeptide로 (γ -glutamylcysteinglycine) 동물, 식물 및 미생물에 존재하며 생명현상을 유지하는데 중요한 물질이다. 생체내에서의 글루타치온은 산화된 형태인 GSSG보다 환원된 상태인 GSH 형태로 존재하면서 nucleotide 합성시에 환원력을 제공하거나, 단백질이나 기타 작은 화합물의 -SH기를 환원된 상태로 유지시키는 기능을 수행한다 (Meister and Anderson, 1983). 또한 글루타치온은 생체내에 들어온 과산화수소수 같은 독성물질의 중화에도 이용된다 (Stephan and Jamieson, 1997). 의약적으로 글루타치온은 간질환 치료제 및 치료 보조제로 널리 사용되고 왔다 (Meister, 1996). 최근 들어 글루타치온이 방사선 장애 치료나 당뇨병 치료제로도 사용되고 있고 글루타치온의 항암 효과에 대한 연구도 많이 진행되어 암 치료에도 효과가 있다는 것이 밝혀지고 있다. 따라서 글루타치온에 대한 수요는 계속 증가할 것으로 예상된다. 그러나 이 물질의 국내 생산은 거의 전무한 상태이다. 따라서 국내 소비량 전량을 외국에서 수입하고 있는 실정이라 글루타치온의 국내생산이 절실히 요구되고 있다. 글루타치온의 생산하는 방법은 세포내에 글루타치온을 많이 함유하고있는 효모로부터 직접 추출하는 추출법과 유기합성법에 의한 직접합성법 그리고 bioreactor를 이용하여 amino acid로 부터 글루타치온을 합성하는 효소적 합성법 등이 있다 (Nam, 1990). 이들 방법 중에서 효모를 이용한 직접 추출법은 효모자체가 가지고 있는 글루타치온의 양이 제한되어 있기 때문에 산업적 글루타치온 생산시 다량의 산물을 얻는데 문제가 있다. 따라서 bioreactor를 이용한 효소적 합성법이 글루타치온 생산에 적합할 것이다.

글루타치온의 생합성은 두 가지의 효소에 의해 촉매되는 두 단계의 반응에 의해 이루어지게 되는데 (Meister and Anderson, 1984) 첫 번째 단계에 관여하는 효소는 γ -glutamylcysteine synthetase이고 두 번째 단계에 관여하는 효소는 glutathione synthetase이다 (그림 1). γ -Glutamylcysteine synthetase는 L-glutamate와 L-cysteine를 결합시켜 γ -glutamylcysteine를 합성하는 반응을 수행하고 다른 하나의 효소는 γ -glutamylcysteine에 glycine을 결합시키는 반응을 촉매한다. 그리고 γ -glutamylcysteine synthetase가 최종반응 산물인 글루타치온에 의해서 feedback inhibition 받고 이 효소의 반응 속도가 두 번째 효소의 반응속도보다 느리기 때문

에 글루타치온의 합성에 속도결정단계로 기능 한다 (Richman and Meister, 1975; Huang, *et al.*, 1988). 따라서 효소적 합성법을 이용하여 글루타치온을 합성할 경우에는 먼저 이것의 합성에 필요한 효소를 과량으로 발현시켜 bioreactor내에서 반응 속도를 증가시키는 것이 요구된다. 특히 속도결정단계로 기능 하는 효소인 γ -glutamylcysteine synthetase의 활성과 발현을 증가시키는 연구가 요구된다. 본 연구실에서는 1 단계 연구에서 부위 특이적 돌연변이 방법을 통하여 활성이 증가된 γ -glutamylcysteine synthetase를 얻었다. 따라서 본 연구에서는 활성이 증가된 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase를 동시에 과량 발현시키는 연구가 요구되었다. 그리고 활성이 증가된 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 반응성 증가에 대한 원인을 규명하기 위하여 효소 반응에 대한 과학적인 연구가 요구되었다.

그리고 글루타치온 생합성에는 두 분자의 ATP가 에너지원으로 사용된다. 그런데 ATP의 가격이 매우 높기 때문에 지속적인 ATP의 공급은 생산물의 가격을 상승시키는 요인이 된다. 따라서 저렴한 가격으로 ATP를 공급하는 것이 글루타치온 생산에 주요한 점이다. 또한 글루타치온 합성에 속도결정단계로 기능 하는 γ -glutamylcysteine synthetase는 최종 산물인 글루타치온뿐만 아니라 ADP에 의해서도 반응이 저해되는 것으로 알려져 있다 (Nam *et al.*, 1997). 보고에 의하면 10 mM의 ADP 존재시에 효소의 활성이 70%정도 감소한다고 한다. 따라서 ATP의 분해 산물인 ADP의 양도 줄이면서 저렴한 비용

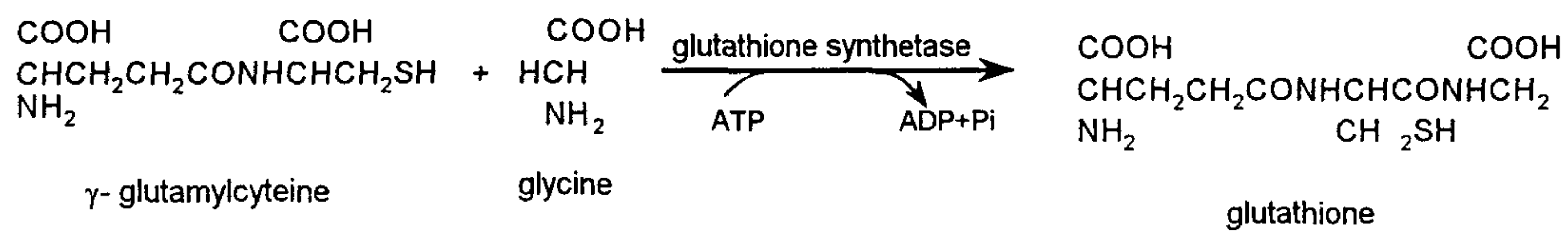
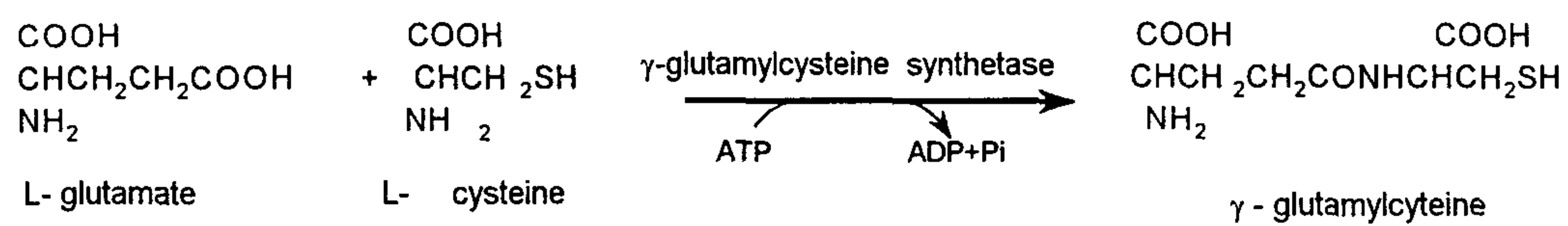


그림 1. 글루타치온의 생합성 경로

으로 ATP를 공급하기 위해서는 ATP 재생계 도입이 요구되었다. 따라서 본 연구에서는 효율적으로 에너지 (ATP)를 재 순환시키기는 위하여 ATP 재생계에 polyphosphate kinase를 도입하는 실험을 수행하였다. Polyphosphate kinase (*ppk*)는 ATP를 ADP로 전환시키면서 polyphosphate에 무기 인산을 하나 더 축합시키는 반응을 촉매하는 효소이다 (Wood and Clark, 1988). 그리고 이 효소는 반응액 중의 ADP 와 polyphosphate의 농도가 높을 경우 역반응을 일으켜 ATP를 합성하는 반응도 수행하는 것으로 알려져 있다 (Ahn and Konberg, 1990). 본 연구에서는 polyphosphate kinase를 ATP 재생계에 이용하기 위하여 이 유전자를 *E. coli*에서 클로닝하였고, 다시 plasmid vector에 클로닝하여 *E. coli*에서 과발현 시켰다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

글루타치온의 산업적 생산은 효소를 이용하여 amino acid로 부터 글루타치온을 생산하는 법과 효모의 세포에서 추출하는 법이 있다 (Nam, 1990). 그러나 효모에서 글루타치온을 추출하는 추출법의 경우에는 효모가 가지고 있는 글루타치온의 농도에 한계가 있기 때문에 높은 생산효율을 기대할 수 없다. 그리고 *E. coli*의 methylglyoxal 저항성 변이주의 경우 야생형보다 글루타치온을 약 50 배 정도 더 많이 생산하는 것으로 알려져 있으나, 이 역시 산업적인 글루타치온의 생산에는 부족하였다고 보고되었다 (Murata *et al.*, 1980). Bioreactor를 이용한 글루타치온의 효소적 생합성법은 amino acid로 부터 글루타치온을 직접 합성하는 것으로 이 경우 고정화된 글루타치온 합성 효소와 ATP 재생계를 같이 사용하게 된다 (Nam, 1990). 글루타치온 합성 효소중 γ -glutamylcysteine synthetase (GSH)의 유전자는 Watanabe 등 (1986)에 의해서 변이형 *E. coli* B (feedback inhibition 저항성 변이주)에서 클로닝되었고 야생형 *E. coli* K12에서는 Nam (1990)에 의해 클로닝되었다. 두 경우 모두 유전자의 크기는 2.1 kb 이고 전이 개시 코돈이 특이하게도 TTG였다. 따라서 이 유전자의 발현을 증가시키기 위하여 이것을 ATG로 치환하였고 그 결과 효소의 발현이 1.5 배 증대되었다고 보고하였다 (Kwak *et al.*, 1998). 변이형과 야생형의 *gshI* 유전자는 1818 bp에서 1822 bp 사이에서 염기서열의 변화가 보이는데 야생형의 경우 염기서열이 5'-GCGTCT-3' (Ala494-Ser495)인데 반하여 변이형은 5'-GGCTTC-3' (Gly-Phe) 였다. 그래서 Ala495를 Gly나 Val 등으로 치환한 변이주를 구성하여 활성의 변화와 feedback inhibition 변화를 관찰하였다 (Nam, *et al.*, 1991; Kwak *et al.*, 1998). 그 중 A494V의 효소활성이 야생형에 비하여 증가하였고 A494G는 효소활성이 약간 감소하였다.

그 외 미생물이나 동·식물에서도 γ -glutamylcysteine synthetase의 유전자가 클로닝되었고 이것에 대한 연구가 진행되었다 (Gumargi *et al.*, 1982; Yan and Meister, 1990; Mutoh *et al.*, 1995). 이들은 모두 ATP를 소모하는 반응을 수행하고 최종 반응산물인 글루타치온에 의해서 활성이 저해 받는다 (Huang, 1996).

글루타치온 합성에 두 번째로 관여하는 glutathione synthetase는 Gushima 등 (1984)에 의해서 *E. coli*에서 클로닝되었다. 이것의 유전자 크기는 약 2.6 kb 이고 amino acid는 316개로 이루어져 분자량이 35 kDa 정도된다. 그리고 이들은 반응 산물인 ADP나 글루타치온에 의한 활성저해를 받지 않는다.

효소적 방법으로 bioreactor에서 글루타치온 생산을 위해서 *gshI* 유전자와 *gshII* 유전자를 동시에 *E. coli*에서 과발현하는 것이 요구된다. *gshI* 유전자 2개를 일렬로

연결하고 다시 *gshII* 유전자를 한 개 연결하여 γ -glutamylcysteine synthetase의 발현을 glutathione synthetase보다 증가시킨 경우가 글루타치온 생산에 적합하였다고 보고하였다 (Nam, 1990). 글루타치온 생산을 위한 bioreactor의 반응조건은 60 mM L-glutamate, 20 mM L-cysteine, 20 mM glycine 그리고 10 mM ATP의 기질의 농도에서 글루타치온의 생산성이 좋다고 보고하였다. 그리고 글루타치온 생산에 ATP 재생계를 이용하였는데 이 경우는 효모를 이용한 경우가 *Brevibacterium aminogenesis*를 이용한 경우가 더 좋다고 보고하였다.

*E. coli*의 polyphosphate kinase는 Ahn과 Kornberg (1990)에 의해서 정제되었다. 이 효소는 polyphosphate를 이용하여 ADP로부터 ATP를 합성하는 효소다. 이 효소의 활성은 세포의 cytosol 보다는 세포막 분획에서 90%이상 발견된다. 이 것을 코딩하는 유전자는 2.2 kDa이고 687개의 amino acid (MW 80 kDa)를 코딩한다. 이들의 활성이 세포의 막에서 발견되기는 하지만 N-말단 부위에 이 효소를 세포막으로 운반하는 signal peptide는 존재하지 않는다 (Akiyama *et al.*, 1992). 이 효소의 활성부위에 대한 연구가 Kumble 등 (1996)에 의해서 진행되었다. 그들은 *E. coli* polyphosphate kinase의 441과 460의 L-histidine을 각기 L-glutamate와 L-alanine로 치환한 경우 효소의 활성이 없어지는 것을 관찰하였다.

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 내용

글루타치온의 합성에 관여하는 두 가지 효소중 γ - glutamylcysteine synthetase가 이것의 합성에 rate limiting step으로 기능하기 때문에 이 효소의 활성을 증가시키는 것이 글루타치온의 생산성을 높이는 길이다. 효소의 활성을 증대시키는 방법은 두가지가 있으 있는데 하나는 효소자체의 비활성을 증가시키는 것이고 다른 하나는 효소의 발현을 증가시켜서 효소의 분자수를 늘여서 활성을 증가시키는 방법이 있다. 이중 효소의 자체 비활성 증된 효소는 부위특이적 돌연 방법을 통해서 1 단계 과제 수행중에 만들었다. 그러므로 2 단계 과제에서는 효소의 발현을 증가시켜서 효소의 활성을 증가시키는 실험을 수행하였다. 여기서는 효소의 발현을 증가시키기 위해서 promoter 치환에 의한 transcription 효율증가를 통하여 이루려 하였다. 그리고 글루타치온 합성의 두 번째 단계에 관여하는 효소인 glutathione synthetase의 발현도 증가시키려고 시도하였다.

글루타치온 합성반응은 앞서도 언급했듯이 2 분자의 ATP가 1 분자의 글루타치온 합성에 소모된다. 따라서 효소 반응을 이용한 글루타치온 생합성에 있어서 이것의 생산효율을 결정하는 가장 중요한 요소 중의 하나가 ATP의 공급이다. 특히 글루타치온 합성의 첫 번째 단계를 담당하는 효소인 γ -glutamylcysteine synthetase가 ATP의 분해 산물인 ADP가 10mM로 존재할 때 약 70%의 활성이 감소한다는 사실이 알려져 있다 (Nam *et al.*, 1991). 따라서 글루타치온 생산에 있어서 ATP의 공급은 ATP 재생계를 이용하는 것이 효과적이라는 사실이 알려져 있다. 따라서 본 연구실에서는 폴리인산과 이것을 기질로 이용하여 ATP를 합성하는 polyphosphate kinase을 이용하여 새로운 형태의 ATP 재생계를 구성하려 하고 글루타치온 생산에 이렇게 구성된 ATP재생계 이용하여 기존의 ATP 재생계와 글루타치온 생산 효율을 비교할 예정이다.

1. 글루타치온 합성 효소의 과발현 및 변이효소의 특성조사

지난 1 단계 과제수행에서 부위 특이적 돌연 변이 방법을 이용하여 효소활성이 증가된 γ -glutamylcysteine synthetase 변이주들을 얻었다. 본 연구에서는 이들 효소들을 과발현 시키기 위하여 *tac* promoter 나 T7 promoter를 가지는 발현 vector에 클로닝하였고, 이들 유전자의 발현 양상을 관찰하였다. 또한 과발현된 대장균주에서 이들 변이 효소를 정제하여 효소의 kinetic 특성과 물리적 특성을 조사하였다. 글루

타치온 생산에 있어서 첫 번째로 기능 하는 γ -glutamylcysteine synthetase가 이것의 합성에 속도 결정 단계로 기능 하므로 이 효소의 활성을 증가시키는 것이 글루타치온 합성에 중요하다고 알려져 있다. 따라서 본 연구실에서는 plasmid에 클로닝된 비활성이 증가된 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase 유전자와 글루타치온 합성의 두 번째 단계에 기능 하는 glutathione synthetase의 발현을 증대시켜 이들 효소의 *E. coli* 내 활성을 증대시켰다.

2. 새로운 ATP 재생계 도입

새로운 ATP 재생계를 구축하기 위하여 폴리인산과 이것을 기질로 이용하여 ATP를 합성하는 polyphosphate kinase의 활성을 *E. coli*에서 확인하였고 이것을 코딩하는 유전자 (*ppk*)를 *E. coli* chromosome에서 PCR를 이용하여 클로닝하였다. 이렇게 클로닝된 *ppk* 유전자를 *E. coli*에서 과량 발현시켜 ATP 재생계를 구성하였고, 이렇게 구성된 ATP 재생계를 글루타치온 생산에 이용하여 기존의 ATP 재생계와 글루타치온 생산 효율을 비교하였다.

제 2 절 연구재료 및 방법

1. 연구재료

가. 균주 및 플라스미드

γ -glutamylcysteine synthetase 및 glutathione synthetase의 발현은 *E. coli* NM522 ($\Delta(lac-pro) thi / F traD36 proAB lacI^f$; Sambrook *et al.*, 1989)를 이용하였다. Polyphosphate kinase 유전자의 클로닝은 야생형의 *E. coli*인 W3110에서 chromosome를 추출하여 수행하였다.

나. 제한효소

γ -glutamylcysteine synthetase의 유전자 재조합에 필요한 제한효소 및 ligase는 Kosco (서울, 대한민국) 제품을 이용하였으며 반응 조건은 공급자의 안내서에 의존하였다. 기타 DNA의 modification에 사용된 효소는 NEB (USA)사 제품을 이용하였다.

다. 기타 시약

효소의 활성측정에 사용된 시약은 Sigma (USA) 사 제품을 이용하였으며 균주의 배양에 사용한 시약은 Difco (USA)에서 구입하였다.

2. 연구방법

가. Plasmid DNA의 분리

모든 plasmid DNA는 boiling method에 따라 분리되었다. 배양된 세포를 10 ml/L의 cold STE buffer(5.6% sucrose, 35mM EDTA, 35mM Tris-HCl, pH 8.0)에 현탁시킨 후 Erlenmeyer flask에 옮겼다. 40mg/L의 lysozyme과 3.5/L의 Triton X-100을 가하여 완전히 섞은 후 이 액체가 막 끓을 때까지 불 위에서 흔들다가 즉시 끓는 물에 침지하고 70초 동안 계속 흔들었다. 세포 파쇄액을 얼음에서 10분 동안 식힌 후 high speed centrifuge (Beckman, model JS-21)로 12,000 rpm에서 1시간 동안 원심 분리하였다. 상등액에 동량의 isopropanol을 가하여 침전시킨 후 TE buffer (10mM Tris-Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 현탁시켰다. 큰 RNA 분자를 제거하기 위하여 최종 농도 2.5M 되게 LiCl을 첨가하고 얼음에서 30분간 방치한 후 12,000rpm에서 20 분간 원심 분리하여 상등액을 새로운 30ml tube로 옮기고 ethanol 침전으로 회수하여 다음에 CsCl gradient에 의해 TLA-100.3(Beckman)으로 초원심분리하거나 PEG8000으로 더 순수 분리하였다.

나. 핵산의 전기 영동

Agarose gel 전기 영동은 TAE buffer (0.04M Tris-HCl, pH 8.3, 0.02 M Na-acetate, 2 mM EDTA)를 사용하여 40 mA에서 통상 1시간 동안 수행하였다. Polyacrylamide gel 전기 영동은 작은 크기의 DNA와 RNA일 때 TBE (0.09 mM Tris-borate, pH 8.3, 4 mM EDTA) buffer를 사용하였다.

다. PCR cloning

(1) Polymerase Chain Reaction

Template DNA 1 μ g, dNTP pmole, pfu DNA polymerase (Clontech, USA) 5U, 각 primer 50 pmole 존재하에서 PCR 반응을 수행하였으며, PCR 조건은 다음과 같다. 94 $^{\circ}$ C 1분 1회와 94 $^{\circ}$ C 1분, 58 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C, 2분 30초 30회 그리고 72 $^{\circ}$ C 10분 1회의 조건으로 반응시켰다.

(2) Ligation

PCR 종료 후 반응액을 1% agarose gel에서 전기영동하여 적절한 크기의 DNA 단편이 증폭되었는지 확인하였다. 증폭된 DNA 단편을 포함하는 gel을 잘라내어 Qiaquick Gel Extraction kit (QIAGEN: 독일)를 사용하여 gel로부터 증폭된 DNA 단편을 elution 하였다. 200 unit 의 T4 DNA ligase 존재 하에서 elution된 DNA 300ng과 T-vector (pCR2.1) 50 ng의 ligation 반응을 16 $^{\circ}$ C에서 18 시간 수행하였다.

기타 ligation은 Zimmerman and Harrison의 (1985) 방법을 참조하였다.

라. 미생물의 형질전환

형질 전환은 Inoue *et al.* (1991) 방법을 변형하여 수행하였다. 대장균을 5ml cap tube에서 600nm 에서 OD값이 0.5 정도 되게 키운 후에 얼음에 급히 냉각시킨다. 이렇게 얼음에 10분 정도 방치한 후에 Transformation 용액 1ml을 넣고 다시 얼음에서 10분간 방치한다. 이것을 낮은 rpm (5000g) 에서 약 5-10 분간 대장균을 침전시킨 다음 DNA(1 μ g 정도)를 넣고 얼음에서 20 - 30분간 방치한 후 42 $^{\circ}$ C에서 30초간 열충격을 준 후 LB배지를 4배 부피만큼 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 정도 배양한 후 항생제를 포함한 LB 고체배지에 도말한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 14-16 시간 정도 배양한다.

마. DNA 염기 서열 분석

DNA의 염기서열 분석은 Applied Biotechnology Institute (ABI; USA) 사의 automatic DNA sequencer를 이용하였다.

바. Oligonucleotide의 합성

실험에 사용된 oligonucleotide는 Genosys (USA)사에서 주문하여 제작하였다.

사. γ -Glutamylcysteine synthetase의 효소활성

γ -Glutamylcysteine synthetase의 효소활성은 Jackson의 방법을 다음과 같이 변형하여 사용하였다. 30 μ mole L-glutamate, 30 μ mole L-cysteine, 30 μ mole ATP, 20 μ mole $MgSO_4$, 200 μ mole KCl, 200 μ mole diethanolamine-HCl buffer (pH 9.15) 및 조효소액의 조성을 가진 반응액 2.0 mL를 37 $^{\circ}C$ 에서 15 분간 반응시킨 후, 3.2% sulphosalicylic acid 3.3 mL을 첨가하여 반응을 중지시키고, 0 $^{\circ}C$ 에서 20 분간 방치하였다. 이를 원심분리하여 그 상등액 1 mL를 glyoxylate 용액 (1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8), 5 mM EDTA, 1 g of ascorbic acid per 1 L, and 3.0 g of glyoxylic acid monophosphate per 1 L) 4 mL를 혼합하여 정확히 60 $^{\circ}C$ 에서 5 분간 반응시키고, 곧 얼음 속에서 식힌 후, 다시 25 $^{\circ}C$ 로 유지시켰다. 이어서 3.8 mM DTNB [5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) in 1 M potassium phosphate buffer, pH 6.8] 0.5 mL를 넣고 7분 후에 412 nm에서 흡광도를 측정하여 반응액 중에 ATP와 L-glutamate을 첨가하지 않은 blank와 비교하여 그 흡광도의 차이를 측정하여 표준곡선에 의해 γ -glutamylcysteine synthetase의 unit를 결정하였다. γ -Glutamylcysteine synthetase 1 unit는 분당 1 μ mole의 γ -glutamylcysteine을 생성하는 효소의 양으로 나타내었다. 단백질 정량은 Lowry (Cooper, 1975)의 방법에 따랐다.

γ -Glutamylcysteine synthetase의 feedback inhibition assay를 위해서는 Richman and Meister (1975)법에 따라 효소반응시 생기는 무기인산의 양을 Fiske and Subbarow (1925)의 방법으로 정량하였다.

아. Glutathione synthetase의 효소활성 측정과 글루타치온의 정량

Glutathione synthetase의 활성은 5 μ mole γ -glutamylcysteine, 10 μ mole glycine, 10 μ mole ATP, 10 μ mole $MgCl_2$ 와 200 μ mole Tris-Cl (pH 7.5) 및 조효소액이 들어 있는 반응액 1 mL를 37 $^{\circ}C$ 에서 15분간 반응 시킨 다음 100 $^{\circ}C$ 에서 3 분간 끓인다. 그리고 여기서 나온 반응물의 상등액을 Tiez (1969) 방법에 따라 글루타치온 농도를 잰다. glutathione synthetase 1 unit는 분당 1 μ mole의 glutathione을 생성하는 효소의 양으로 나타내었다. 단백질 정량은 Lowry (Cooper, 1975)의 방법에 따랐다.

자. γ -Glutamylcysteine synthetase의 정제

(1) 조효소액의 제조

재조합된 γ -glutamylcysteine synthetase plasmid를 포함하는 1 L의 *E. coli*를 37 °C에서 16 시간 배양한 다음 원심분리하여 세포들을 모았다. 이들 세포를 buffer I (25 mM Tris-Cl (pH 7.0), 0.5 mM L-glutamate, 5 mM L-cysteine)에 현탁하여 french presser를 이용하여 파쇄하였다. 이렇게 파쇄된 용액을 원심분리하여 그 상등액을 조효소액으로 이용하였다.

(2) 산처리

조효소액에 0.2 M의 citrate buffer (pH 5.0)를 같은 부피만큼 첨가하여 한시간 정도 상온에서 방치한 다음 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액은 ion exchange chromatography를 위해서 Amico PM10 막을 이용하여 buffer I로 투석하였다.

(3) Ion exchange chromatography

산처리한 효소액을 FPLC용 MonoQ column에 load하여 0.5 mL 부피로 fraction을 받았다. FPLC 조작 조건은 0.5 mL/min의 flow rate으로 KCl 0 에서부터 400 mM 까지 기울기를 주면서 elution 해내었다.

(4) Affinity chromatography

Ion exchange에서 효소의 활성이 나오는 부분을 모아서 affinity chromatography의 대상으로 삼았다. ATP-agarose resin에 단백질을 결합시키고 50 mM imidazol (pH 6.8), 5 mM ATP와 5 mM MnCl₂로 elution 하였다. 이와 같은 방법으로 정제된 단백질을 kinetics 연구와 물리적 특성 연구에 사용하였다

차. SDS-PAGE analysis

세포배양액 500 μ l를 취하여 원심분리한 다음 균체를 lysis buffer (10mM Tris; pH 8.0, 2 mM EDTA, 2%SDS) 100 μ l에 현탁한 다음 5X SDS reducing buffer (250mM Tris · Cl; pH 6.8, 500mM DTT, 10%SDS, 0.5% BPB, 50% Glycerol, 12.5% β -mercaptoethanol) 25 μ l와 잘 섞어서 10분간 끓여 시료를 만들었다. SDS-PAGE의 한 well당 10 μ l를 loading한 다음 gel당 20mA의 전류가 흐르게 조절하면서 전기영동하였다.

카. γ -Glutamylcysteine synthetase의 circular dichroism (CD) 측정

정제된 γ -glutamylcysteine synthetase의 CD는 Jasco spectropolarimetry (Model 701, Hachioji, 일본)를 이용하여 측정하였다. 단백질을 증류수에 용해시킨 후 20 °C에서 1 mm 너비를 가지는 cell을 이용하여 CD spectrum을 측정하였다. CD spectrum은 200 nm에서 250 nm 까지 측정하였으며, 온도에 따른 변화는 30 °C에서 80 °C까지 측정하였다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 대장균 내에서 γ -glutamylcysteine synthetase의 과발현 및 정제

가. *gshI* 유전자의 발현 vector에 클로닝

(1) *gshI* 유전자의 T7 promoter를 갖는 vector에 클로닝

이 유전자를 과발현시키기 위하여 먼저 T7 promoter를 가지는 pT7T3 vector에 클로닝을 하였다. 일반적으로 T7 promoter는 대장균의 promoter 보다 약 4-5배정도 높은 transcription 활성을 가진다고 (Studier *et al.*, 1991) 알려져 있기 때문에 이 vector에 클로닝할 경우 *gshI* 유전자의 발현이 증대될 것으로 기대 하였다. T7 promoter와 *gshI* 유전자를 포함하는 재조합 유전자를 대장균 JM109(DE3)에 형질 전환하여 효소 활성 측정법으로 이 유전자의 발현을 측정하였다. 여기에 사용된 JM109(DE3) 균주는 chromosome에 *lac* promoter의 제어를 받는 T7 RNA polymerase가 삽입되어 있기 때문에 배지에 IPTG를 첨가할 경우 T7 RNA polymerase의 합성이 유도되어서 T7 promoter에 연결되어 있는 유전자를 발현시키게 된다. 그러나 *gshI* 유전자의 경우는 T7 promoter에 의한 발현증가가 나타나지 않았다 (표 1). 자체 promoter를 사용한 야생형 *gshI* 경우에는 0.025 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 인데 반하여 IPTG를 2 mM의 농도로 배지에 첨가한 경우에 효소의 활성이 0.09 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 IPTG를 첨가하지 않았을 경우 (0.023 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) 보다 감소하였다. 이러한 현상은 T7 promoter가 너무 강력하기 때문에 IPTG를 배지에 첨가하는 경우 transcription이 과도하게 일어나게 된다. 그리고 이 경우 mRNA의 안정성에 문제가 생겨서 효소의 발현양이 감소한 것으로 추측된다 (Iost and Dreyfus, 1995; Panaoyt and Troung, 1985).

(2) *gshI* 유전자의 *tac* promoter를 갖는 vector에 클로닝

위에서 보듯이 T7 promoter를 이용하는 경우에 *gshI* 유전자의 발현 증대를 통한 효소의 활성증대가 이루어지지 않았었기 때문에 *gshI* 유전자를 *tac* promoter를 가지는 vector인 pDR540에 클로닝하였다 (deBohr *et al.*, 1983).

표 1. T7 promoter에 의한 γ -glutamylcysteine synthetase의 발현

Strain	IPTG	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Relative activity (%)
pUC8- <i>gsh</i> I	—	0.025	100
T ₇ - <i>gsh</i> I	0 mM	0.023	95
T ₇ - <i>gsh</i> I	2 mM	0.009	36

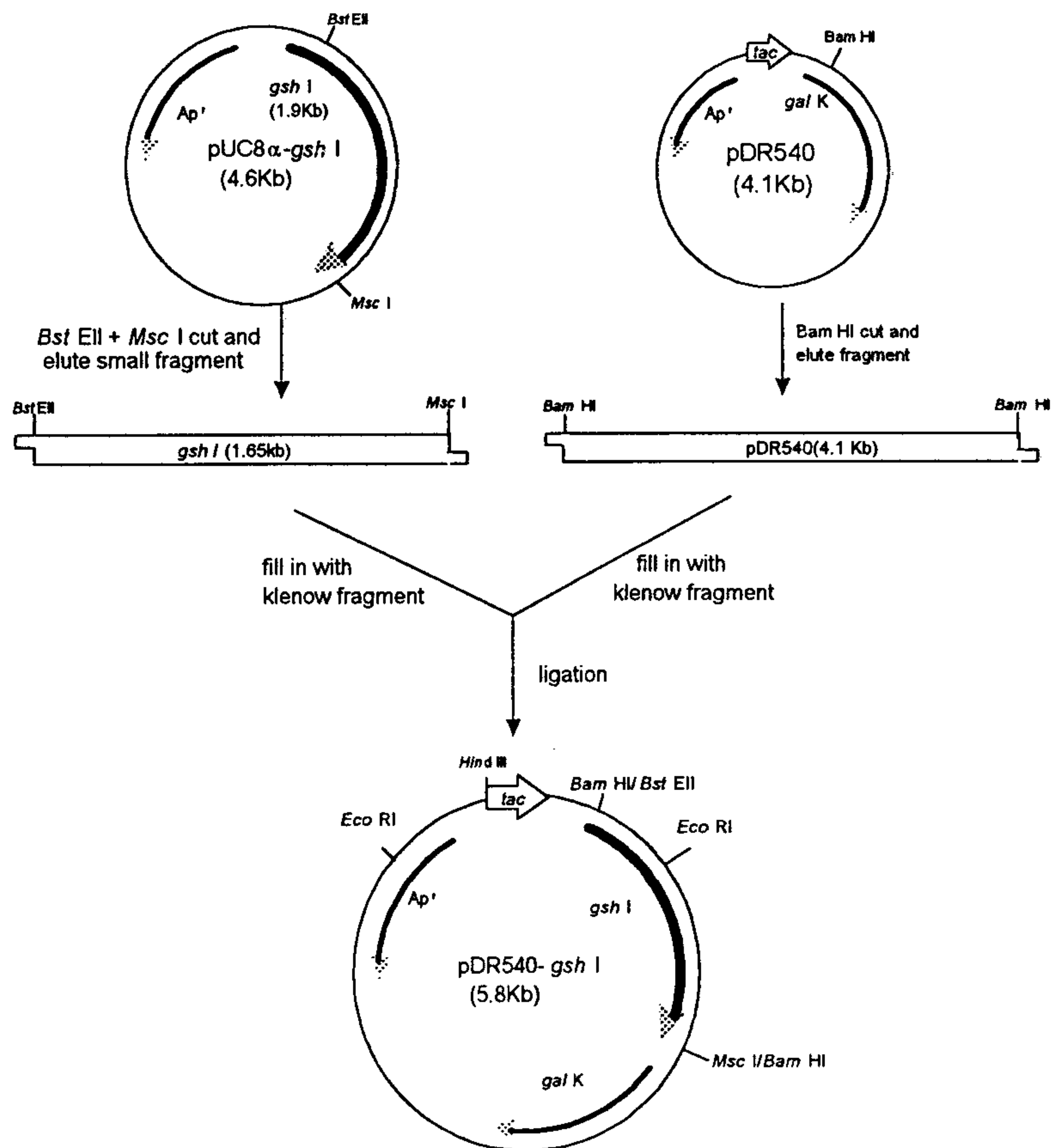


그림 2. *gshI* 유전자의 *tac* promoter를 포함하는 pDR540 vector에 클로닝.

E. coli tac promoter는 *trp* promoter의 -35 부위와 *lac* promoter의 -10 부위를 연결시킨 promoter로 transcription 활성이 강력한 것으로 알려져 있다. *gshI* 유전자를 pDR540 vector에 클로닝하기 위하여 이 유전자를 *BstEII* 와 *MscI* 으로 절단하여 vector의 *BamHI*자리에 삽입하였다 (그림 2.; pRD2010).

이렇게 삽입된 효소의 발현양을 효소활성 측정으로 조사한 (표 3) 결과 야생형의 경우 *tac* promoter를 이용하는 경우가 *gshI* 유전자의 자체 promoter를 이용한 경우보다 유전자의 발현이 약 8배 이상 증가하였다. 그리고 배지에 IPTG를 넣은 경우와 넣지 않은 경우를 비교 하여 보았으며, 두 경우에 효소의 활성 차이가 거의 없었다. 이것은 pDR540 vector의 copy수가 이것을 repress 하는 repressor의 수보다 많기 때문에 이것에 의한 제어가 정확하지 않기 때문인 것으로 생각된다 (Muller-Hill *et al.*, 1968).

이 결과를 바탕으로 γ -glutamylcysteine synthetase의 494 번째나 495 번째 amino acid에 돌연 변이가 일어난 변이 *gshI* 유전자들 역시 pDR540 vector에 클로닝하였고 발현양의 증가를 효소활성측정으로 측정하였다 (pDR2014, pDR2015, pDR2017). 그 결과 이들의 발현이 자체 promoter를 사용한 경우보다 *tac* promoter가 약 5-10 정도 높게 되는 것으로 나타났다. 이렇게 발현 정도에 차이가 나타나는 이유는 *tac* promoter의 활성이 배양조건에 따라 다르고 plasmid의 copy수에 차이가 나기 때문으로 생각된다.

나. γ -glutamylcysteine synthetase의 정제

변이 효소의 특성을 조사하기 위하여 pDG2010-pDG2017 vector를 가지는 균주로부터 단백질 정제를 수행하였다 (그림 3).

(1) 조효소액의 제조

γ -glutamylcysteine synthetase의 조효소액은 *gshI* plasmid를 포함하는 *E. coli* NM522 균주로부터 제조하였다. NM522 균주를 LB broth 1 L에서 14 시간정도 배양한 다음 원심분리를 하여 균들을 모은다. 이렇게 모아진 세포들을 적당한 buffer에 현탁한 다음 french press를 이용하여 파쇄한 후 이들을

표 2. γ -glutamylcysteine synthetase의 비활성

Strain	Characteristics	Specific activity (μ mol/min/mg)	Relative activity (%)
NM522	Host	0.009	
Wild	pGH2010A <i>gshI</i>	0.064	100
	pDR2010 (+IPTG) <i>tac-gshI</i>	0.532	830
	pDR2010 (-IPTG) <i>tac-gshI</i>	0.560	870
A494V	pGH2014A <i>gshI</i>	0.074	100
	pDR2014 <i>tac-gshI</i>	0.774	1040
S495T	pGH2015A <i>gshI</i>	0.080	100
	pDR2015 <i>tac-gshI</i>	0.436	540
A494V- S495T	pGH2017A <i>gshI</i>	0.078	100
	pDR2017 <i>tac-gshI</i>	0.560	720

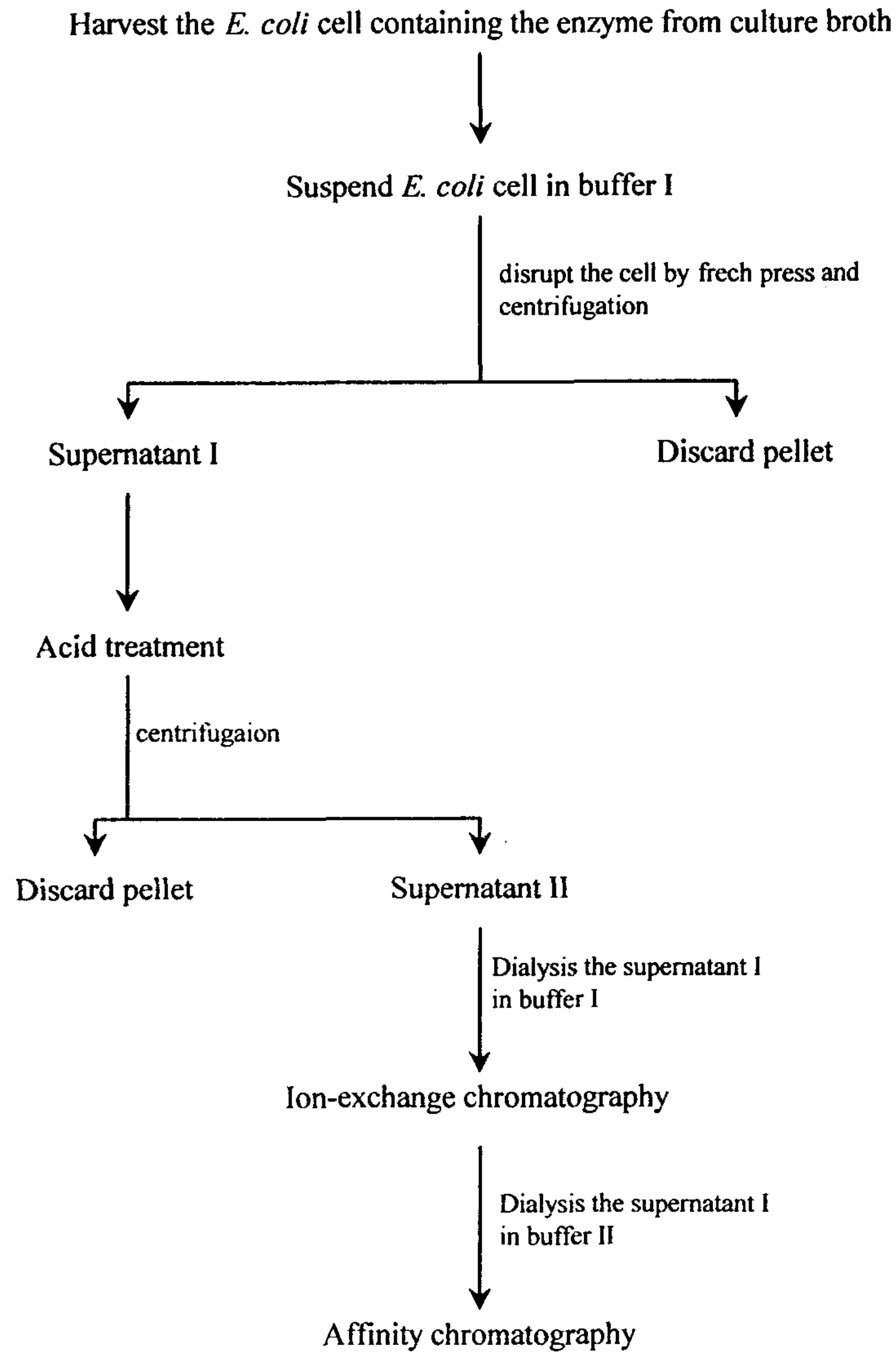


그림 3. γ -Glutamylcysteine synthetase의 정제 순서도

다시 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용한다. 이렇게 제조된 조효소액의 활성은 야생형이 217 unit 이고 다른 변이주는 각각 240 unit (A494V), 280 unit (S495T), 230 unit (A494V-S495T)이다 (표 3, 4, 5, 6). 1 unit의 정의는 1 분 동안 1 μ mol의 γ -glutamylcysteine을 생산해 내는 효소의 양이다.

(2) 산처리

위에서 제조한 조효소액에 pH 5.0의 0.2 M citrate buffer 1 부피를 첨가하여 상온에서 1시간 정도 처리하고 원심분리하였더니 상등액에 대부분의 효소활성이 보였다. 이 효소의 경우 컴퓨터로 예상된 등전점이 pH 5.0 였기 때문에 산처리를 하였으나, 상등액에서 활성이 보이는 것으로 보아 실제 이 효소의 등전점은 더 낮은 것으로 여겨진다. 산 처리한 효소의 활성은 각기 203.5 unit (야생형), 194.0 unit (A494V), 237.5 unit (S495T), 200.4 unit (A494V-S495T) 이었다 (표 3, 4, 5, 6).

(3) 이온 교환 chromatography

이온 교환 chromatography는 Pharmacia 회사의 FPLC chromatography용 MonoQ (5/5) column을 이용하였고 elution할 때 분획의 부피는 0.5 mL로 하였다. 이 column에 40 mg 정도의 효소 용액을 load 하였고 효소용액의 elution은 KCl 용액을 (20 배 column 부피) 0 mM에서부터 400 mM 까지의 기울기에서 받았다 (그림 4, 5, 6, 7). 이온 교환 수지 chromatography중 활성이 나타나는 효소의 분획은 11 번부터 16번 정도까지 였다. 이렇게 얻어진 효소 용액은 affinity chromatography를 하기 위하여 Amicon PM-10을 이용하여 농축하였다.

(4) Affinity chromatography

γ -Glutamylcysteine synthetase는 ATP를 기질로 이용하기 때문에 ATP와 친화도가 있을 것으로 생각되어 ATP agarose column을 정제에 이용하였다. 이 방법을 통하여 얻어진 효소는 SDS-PAGE를 이용하여 분석 해본 결과 단일

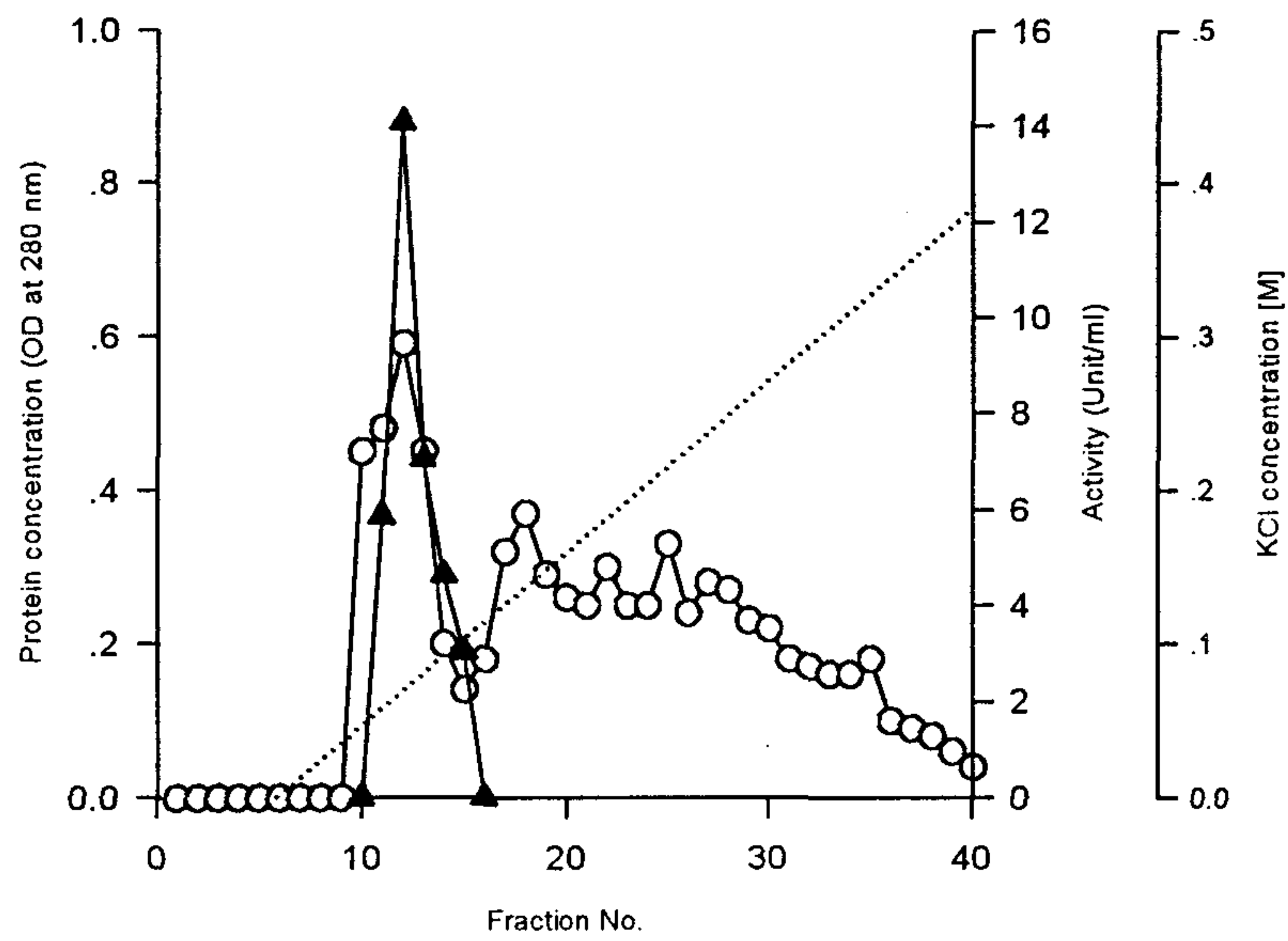


그림 4. 야생형 γ -glutamylcysteine synthetase의 MonoQ 이용한 ion exchange chromatography. 단백질의 농도는 UV280 nm에서 측정하였고 flow rate는 0.5mL/min이고 fraction은 0.5 mL 로 받았다. KCl의 농도 기울기는 0 mM에서 400 mM까지 주었다. 단백질의 농도; ○, 효소의 활성; ▲, KCl의 농도 기울기는 점선으로 나타내었다.

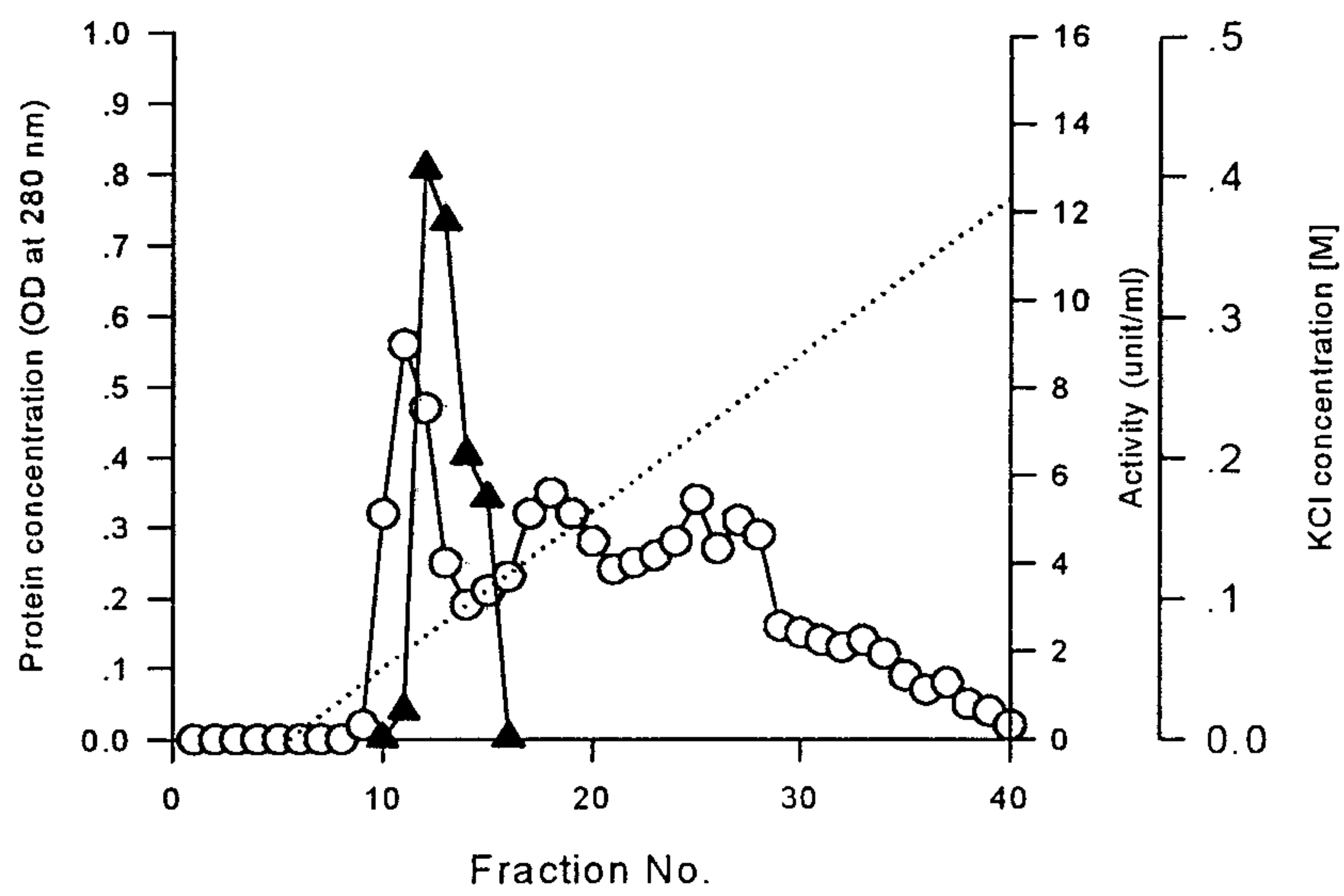


그림 5. 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase (A494V)의 MonoQ 이용한 ion exchange chromatography. 단백질의 농도는 UV280 nm에서 측정하였고 flow rate는 0.5mL/min이고 fraction은 0.5 mL 로 받았다. KCl의 농도 기울기는 0 mM에서 400 mM까지 주었다. 단백질의 농도; O, 효소의 활성; ▲, KCl의 농도 기울기는 점선으로 나타내었다.

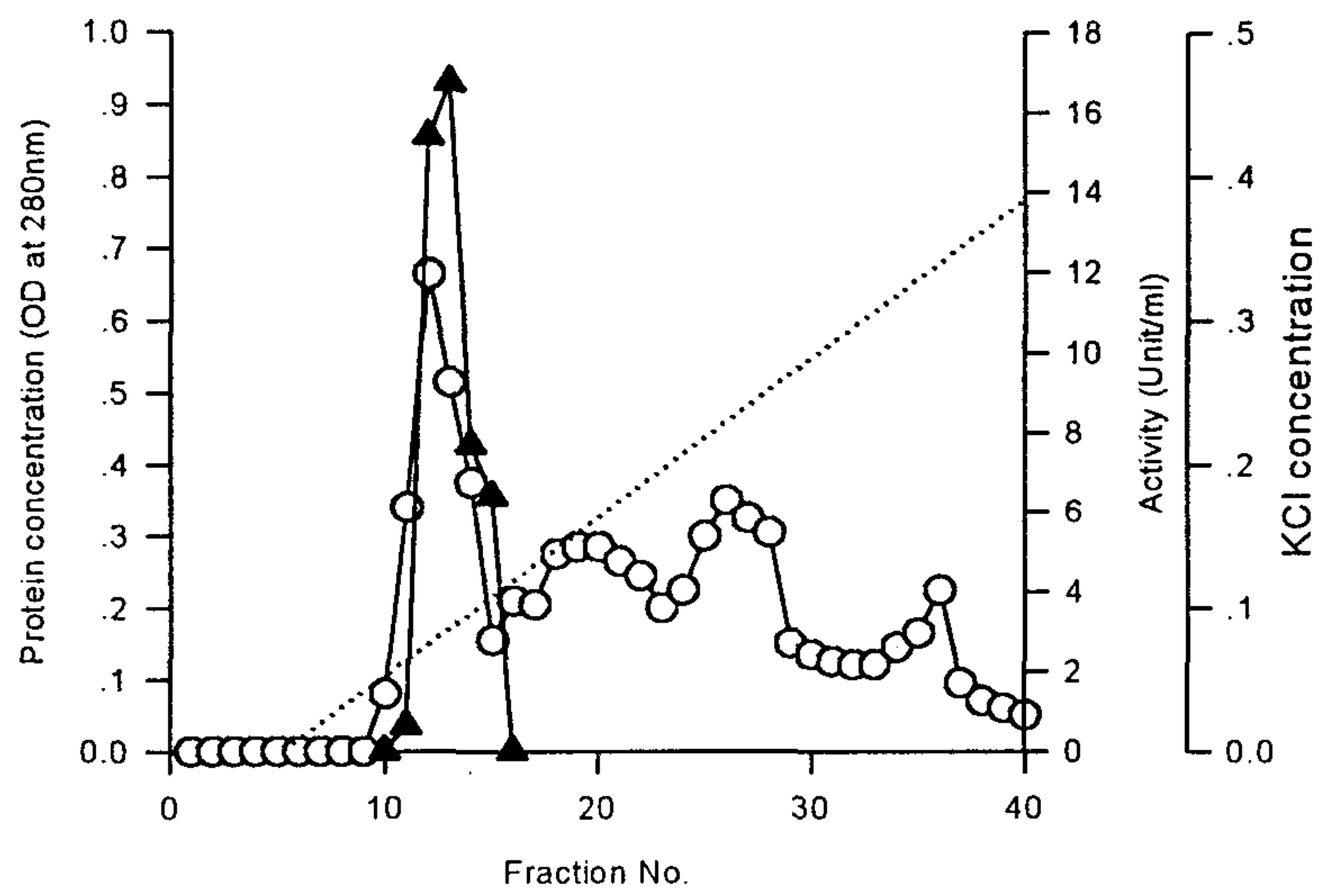


그림 6. 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase (S495T)의 MonoQ 이용한 ion exchange chromatography. 단백질의 농도는 UV280 nm에서 측정하였고 flow rate 는 0.5mL/min이고 fraction은 0.5 mL 로 받았다. KCl의 농도 기울기는 0 mM에서 400 mM까지 주었다. 단백질의 농도; ○, 효소의 활성; ▲, KCl의 농도 기울기는 점 선으로 나타내었다.

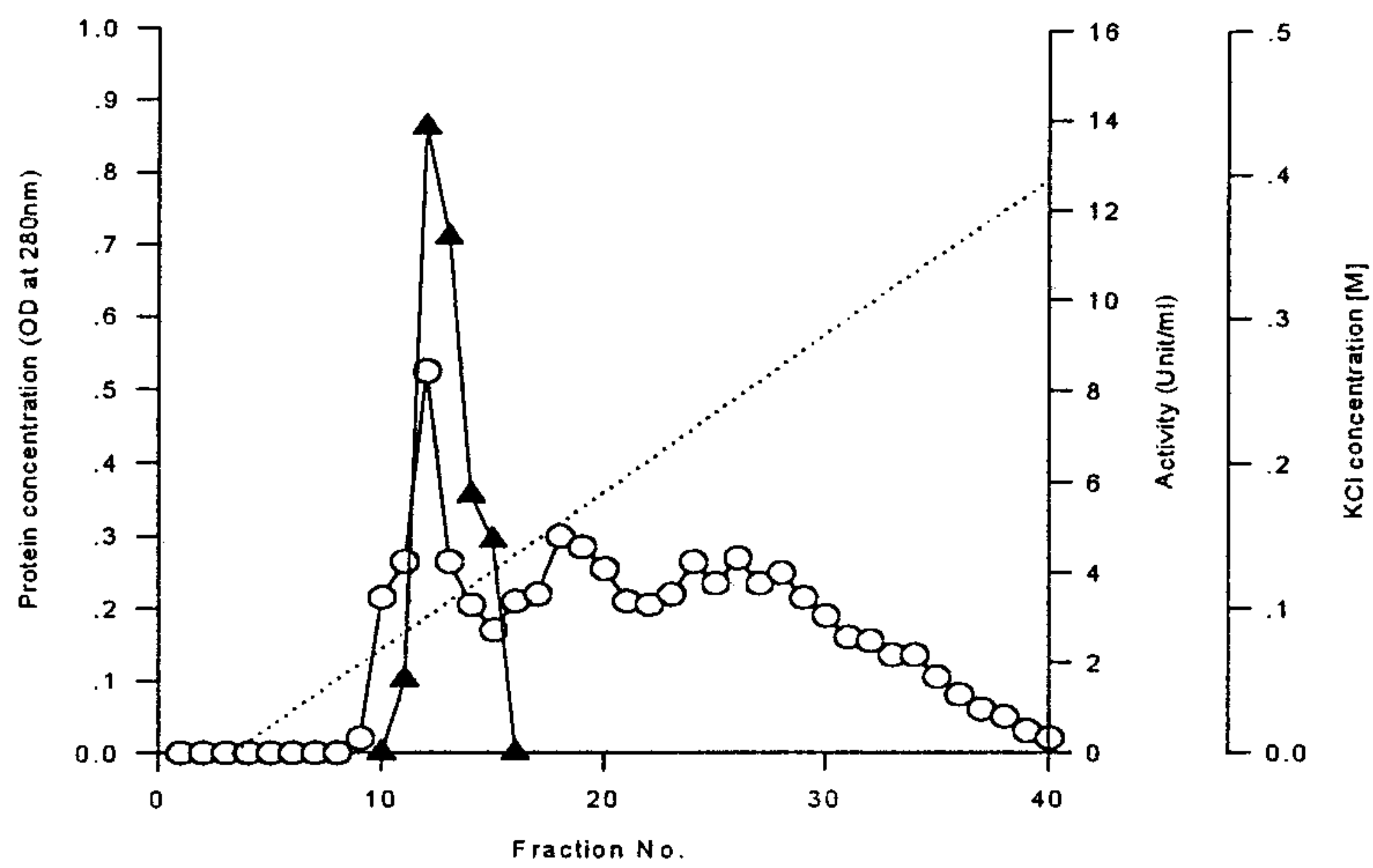


그림 7. 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase (A494V-S495T)의 MonoQ 이용한 ion exchange chromatography. 단백질의 농도는 UV280 nm에서 측정하였고 flow rate는 0.5mL/min이고 fraction은 0.5 mL 로 받았다. KCl의 농도 기울기는 0 mM 에서 400 mM까지 주었다. 단백질의농도; ○, 효소의 활성; ▲, KCl의 농도 기울기는 점선으로 나타내었다.

표 3. 야생형의 γ -glutamylcysteine synthetase 정제.

Step	Total protein (mg)	Volume (mL)	Total unit* (μ mol/min)	Specific activity**2 (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell free extract	253.0	13	217.9	0.85	1	100.0
Acid treatment	39.1	12	203.5	5.20	6	93.4
Mono Q FPLC	5.1	2	70.4	13.26	16	32.3
ATP-affinity	1.7	5	53.6	31.54	36	24.0

*; 1 unit 의 효소활성은 37°C에서 1 μ mol 의 γ -glutamylcysteine 을 1분 동안 합성할 수 있는 양으로 정하였다.

**; 비활성은 효소 1 mg 당의 unit로 나타내었다.

효소의 활성은 재료 및 방법에 기술한 바에 따라 측정하였다.

표 4. 변이형의 γ -glutamylcysteine synthetase 정제 (Ala494→Val).

Step	Total protein (mg)	Volume (mL)	Total unit* (μ mol/min)	Specific activity** (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell free extract	252.0	12	240.0	0.95	1	100.0
Acid treatment	42.9	13	194.3	3.62	5	81.0
Mono Q FPLC	3.8	2	63.3	16.68	18	26.3
ATP-affinity	1.3	5	41.9	35.04	35	17.5

*; 1 unit 의 효소활성은 37°C에서 1 μ mol 의 γ -glutamylcysteine 을 1분 동안 합성할 수 있는 양으로 정하였다.

**; 비활성은 효소 1 mg 당의 unit로 나타내었다.

효소의 활성은 재료 및 방법에 기술한 바에 따라 측정하였다.

표 5. 변이형의 γ -glutamylcysteine synthetase 정제 (Ser495→Thr).

Step	Total protein (mg)	Volume (mL)	Total unit* (μ mol/min)	Specific activity** (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell free extract	235.0	13	280.0	1.20	1	100.0
Acid treatment	40.3	12	237.5	5.88	5	84.4
Mono Q FPLC	4.8	2	77.8	16.35	13	32.8
ATP-affinity	1.9	5	57.5	30.26	25	20.5

*; 1 unit 의 효소활성은 37°C에서 1 μ mol 의 γ -glutamylcysteine 을 1분 동안 합성할 수 있는 양으로 정하였다.

**; 비활성은 효소 1 mg 당의 unit로 나타내었다.

효소의 활성은 재료 및 방법에 기술한 바에 따라 측정하였다.

표 6. 변이형의 γ -glutamylcysteine synthetase 정제 (Ala494-Ser495→Val-Thr).

Step	Total protein (mg)	Volume (mL)	Total unit* (μ mol/min)	Specific activity** (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell free extract	243.0	12	230.0	0.95	1	100.0
Acid treatment	46.2	13	200.4	4.34	5	87.1
FPLC Mono Q	4.8	2	82.4	17.7	18	29.0
ATP-affinity	1.1	5	48.0	43.67	46	20.9

*; 1 unit 의 효소활성은 37°C에서 1 μ mol 의 γ -glutamylcysteine 을 1분 동안 합성할 수 있는 양으로 정하였다.

**; 비활성은 효소 1 mg 당의 unit로 나타내었다.

효소의 활성은 재료 및 방법에 기술한 바에 따라 측정하였다.

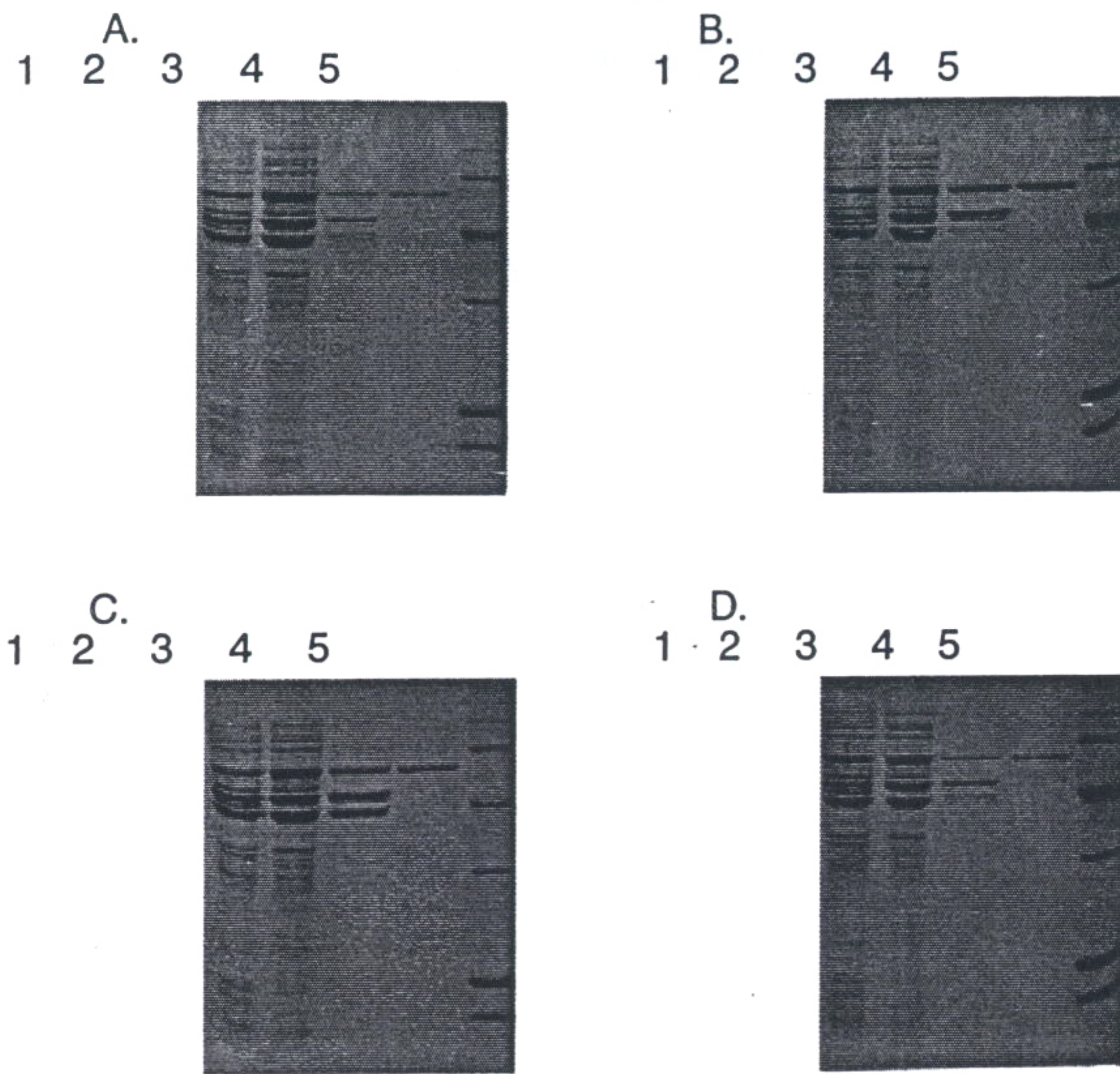


그림 8. 정제단계별 γ -glutamylcysteine synthetase의 SDS-PAGE. Lane 1; 조효소액, lane 2; 산처리, lane 3; ion-exchange chromatography, lane 4; 친화적 chromatography, lane 5; molecular weight size marker. Molecular size maker is myosin (Mw 200,000), phosphorylase B (97,000), bovine serum albumin (Mw 68,000), carbonic anhydrase (Mw 29,000), β -lactoglobulin (Mw 18,400), lysozyme (Mw 14,300). A; 야생형, B; A494V, C; S495T, D; A494V- S495T.

단백질임을 확인할 수 있었다 (그림 8). 그리고 이렇게 정제된 야생형과 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase들을 효소의 물리 화학적 특성 분석에 이용하였다.

2. 야생형 및 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 물리 화학적 특성

γ -glutamylcysteine synthetase의 494와 495번째 amino acid가 변이된 효소의 변화된 특성을 밝히기 위하여 이들의 기질에 대한 친화도의 변화를 조사하였고 구조의 변이는 circular dichroism (CD)을 이용하여 분석하였다.

가. γ -glutamylcysteine synthetase들의 반응 속도론적 특성

(1) 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 비활성 변화

정제된 효소의 비활성을 DTNB 방법을 측정하였는데, 비활성 측정시의 기질의 농도는 10 mM ATP, 40 mM L-glutamate, 10 mM L-cysteine로 하였다 (표 7). 이 상태에서 효소의 활성을 측정한 결과 야생형의 경우 31.54 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 이었고 변이형의 경우에는 각기 35.04 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (A494V), 30.25 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{m}$ (S495T), 43.67 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (A494V-S495T)였다. 이 결과를 보면 (A494V-S495T) 변이주가 야생형에 비하여 40%정도의 효소의 비활성이 증가된 것으로 밝혀졌다. 그리고 (S495T)의 경우는 야생형과 거의 비슷한 정도의 비활성을 보였다.

(2) ATP에 대한 γ -glutamylcysteine synthetase의 반응속도론적 특성

변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 ATP에 대한 K_m 값 및 k_{cat} 값 변화를 조사 하기 위하여 이들 효소의 초기 반응 속도를 ATP의 농도를 변화시키면서 (0 mM, 0.2 mM, 0.4 mM, 0.8 mM, 1.2 mM, 2.0 mM, 4.0 mM) 측정하였고 여기서 얻은 값을 이용하여 Michaelis-Menten plot과 double reciprocal plot을 구성하였다 (그림 9, 10). 그림 9에서 보듯이 효소의 활성은 ATP 농도가 1.2 mM 정도에서 최고점에 다 다른 것을 알 수 있다. 야생형의 γ -glutamylcysteine synthetase의 경우 ATP에 대한 K_m 값은 1.11 mM

표 7. 정제된 γ -glutamylcysteine synthetases의 비활성.

Strain	Characteristics	Specific activity (μ mol/min/mg)	Relative activity (%)
Wild	Ala494-Ser495	31.54 ± 2.35	100
A494V	Val494-Ser495	35.04 ± 2.72	111
S495T	Ala494-Thr495	30.25 ± 1.25	96
A494V-S495T	Val494-Thr495	43.67 ± 2.50	139

비활성은 효소 1 mg 당의 unit로 나타내었고 효소의 활성은 재료 및 방법에 기술한 바에 따라 측정하였다.

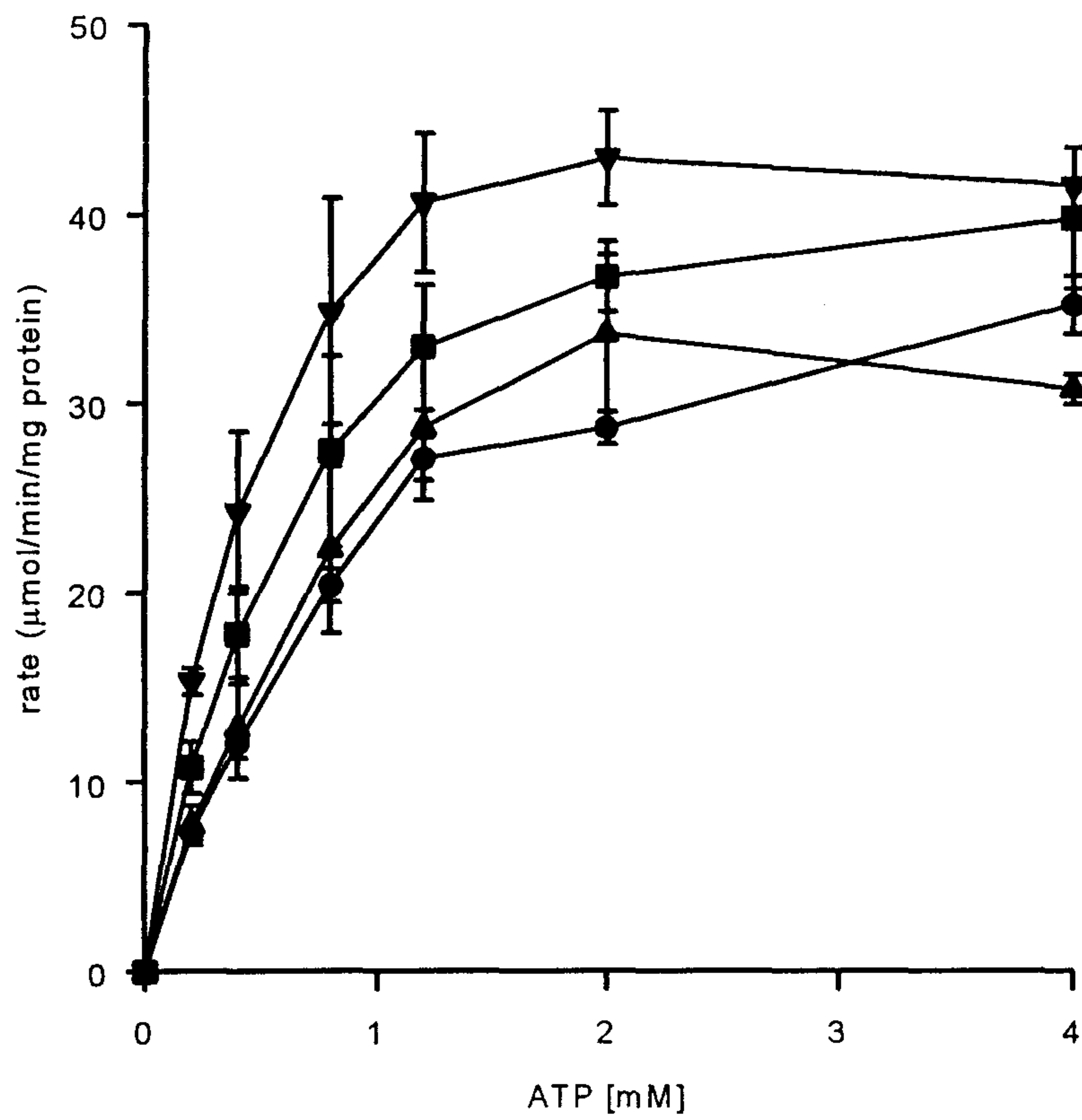


그림 9. ATP에 대한 야생형과 변이형 γ -glutamylcysteine synthetases의 기질 농도 변화에 따른 반응속도 . 야생형: ●, A494V: ▲, S495T : ■ , A494V-S495T : ▼.

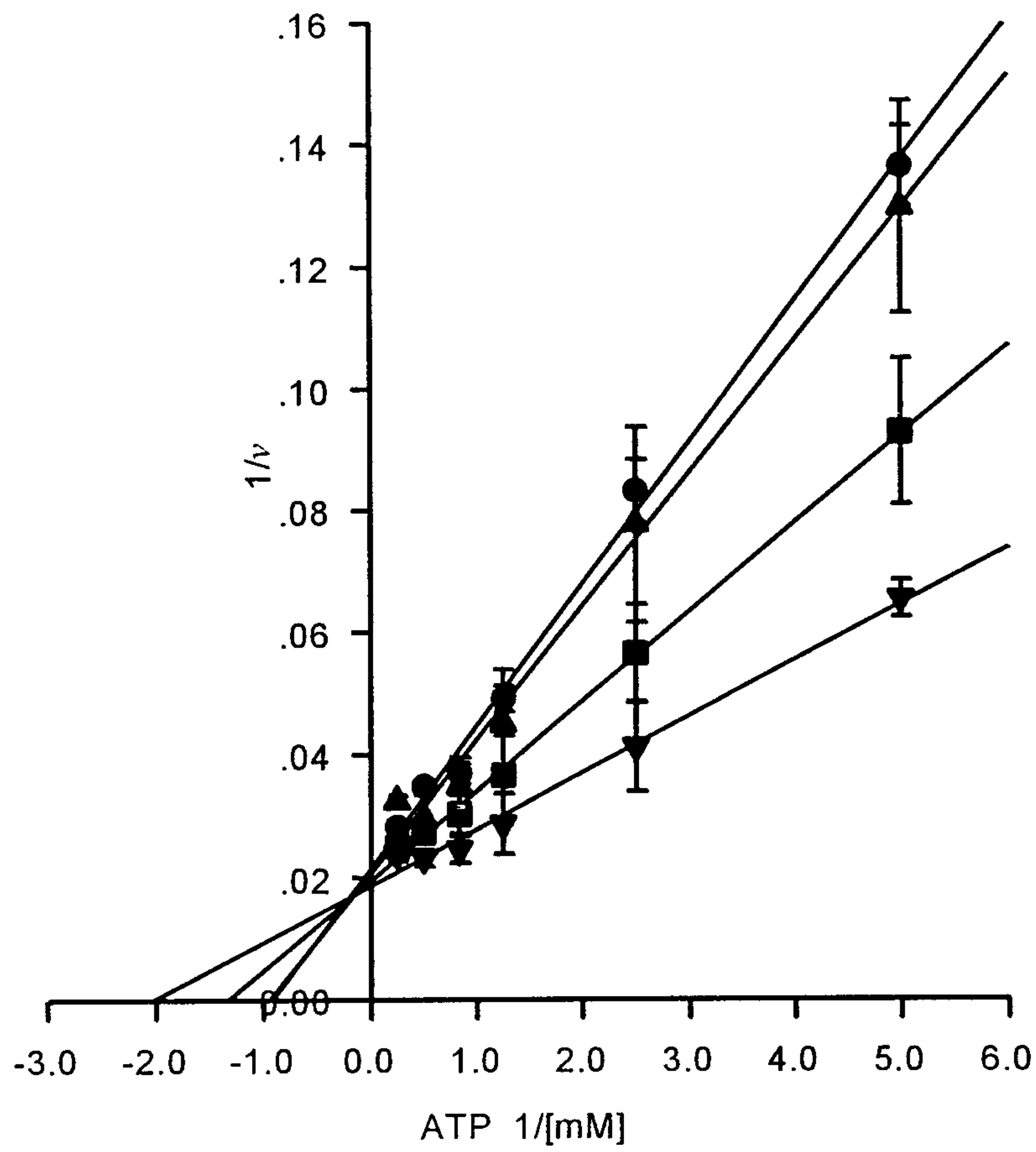


그림 10. 야생형과 변이형 γ -glutamylcysteine synthetases 의 ATP에 대한 double reciprocal plot. 야생형: ●, A494V: ▲, S495T : ■, A494V-S495T : ▼.

표 8. 변이형 γ -glutamylcysteine synthetases의 ATP에 대한 반응속도론적 특성

	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Wild (Ala494-Ser495)	1.11	46.03	41.5
Mutant (Ala494→Val)	0.79	51.73	65.5
Mutant (Ser495→Thr)	1.29	54.92	42.6
Mutant (Ala494-Ser495→Val-Thr)	0.55	55.12	100.2

이었고 kcat은 46.03 s⁻¹이었다 (표 8). 변이주의 경우에는 Km 값이 각각 0.79 mM (A494V) mM (S495T), 0.55 mM (A494V-S495T)으로 나타났고 kcat 값은 51.73 s⁻¹ (A494V), 51.92 s⁻¹ (S495T), 55.12 s⁻¹ (A494V-S495T)이었다. 이 결과를 토대로 보면 γ -glutamylcysteine synthetase의 494 와 495 amino acid가 Ala-Ser에서 Val-Thr로 치환된 변이주의 ATP에 대한 친화도와 반응 속도가 증가한 것을 알 수 있다. 그리고 catalytic power 값도 야생형보다 이 변이주가 2배 이상 증가된 것을 보였다 (표 8).

(3) L-Cysteine에 대한 γ -glutamylcysteine synthetase의 반응속도론적 특성

L-Cysteine에 대한 Km 값과 kcat값 변화를 알기 위하여 여러 가지 L-cysteine 농도에서 (0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 10 mM) 초기 반응속도를 측정하였다. 그리고 이것을 바탕으로 얻은 Michaelis-Menten plot과 double reciprocal plot은 그림 11 과 12에 보였다. 이것을 이용하여 얻은 야생형 γ -glutamylcysteine synthetase의 Km 값과 kcat 값은 각기 0.56 mM과 35.68 s⁻¹이었다 (표 9). 그리고 변이주의 Km 값은 A494V와 S495T가 각각 0.65 mM과 0.85 mM 인데 이것은 야생형 보다 L-cysteine에 대한 친화도가 떨어졌음을 의미한다. 그러나 변이주 A494V-S495T의 경우에는 0.36 mM로 야생형보다 친화도가 증가했다. 반응 속도의 경우에는 A494V와 A494V-S495T 변이주가 42.06 s⁻¹과 42.06 s⁻¹으로 야생형보다 20%정도 증가했으나 S495T 변이주는 35.86 s⁻¹로 야생형과 거의 비슷한 것으로 나타났다.

(4) L-Glutamate에 대한 γ -glutamylcysteine synthetase의 반응속도론적 특성

효소의 L-glutamate에 대한 Km 값과 kcat값 변화를 알기 위하여 여러 가지 L-glutamate 농도에서 (0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 12 mM, 20 mM, 40 mM) 초기 반응속도를 측정하였다. 그리고 이것을 바탕으로 얻은

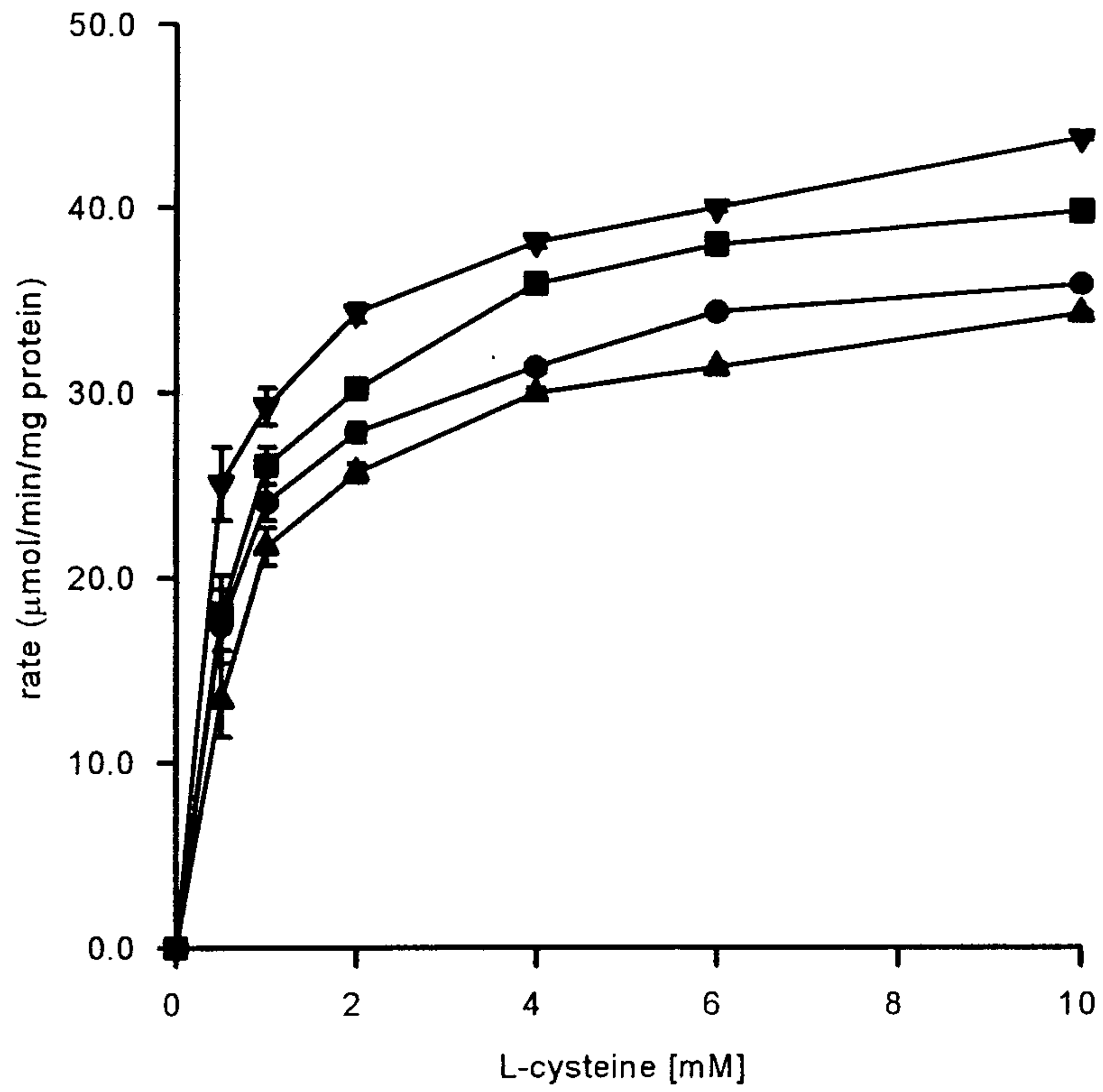


표 11. L-cystene에 대한 야생형과 변이형 γ -glutamylcysteine synthetases의 기질 농도변화에 따른 반응속도 변화. 야생형: ●, A494V: ▲, S495T : ■, A494V-S495T : ▼.

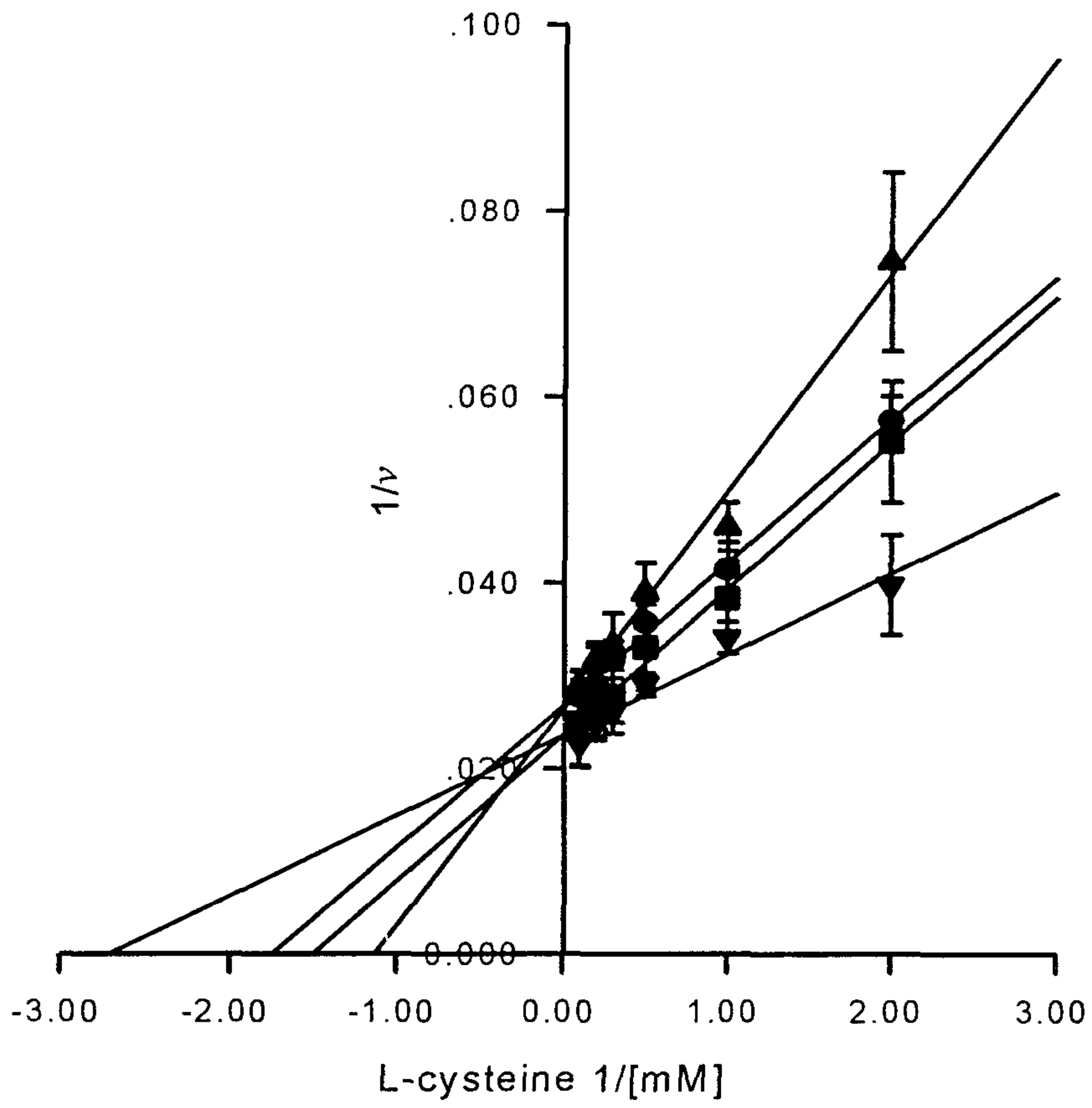


그림 12. 야생형과 변이형 γ -glutamylcysteine synthetases의 L-cysteine에 대한 double reciprocal plot. 야생형: \bullet , A494V: \blacktriangle , S495T: \blacksquare , A494V-S495T: \blacktriangledown .

표 9. 변이형 γ -glutamylcysteine synthetases의 L-cysteine에 대한 반응속도론적 특성

	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Wild(Ala494-Ser495)	0.56	35.68	63.7
Mutant (Ala494→Val)	0.65	42.06	64.7
Mutant (Ser495→Thr)	0.85	35.87	42.2
Mutant (Ala494-Ser495→Val-Thr)	0.36	42.06	116.8

Michaelis-Menten plot과 double reciprocal plot을 얻었다 (그림 13, 14). 그림에서 보듯이 효소의 반응속도는 L-glutamate 농도가 20 mM 정도에서 최고점에 다다른 것을 알 수 있다. 야생형 γ -glutamylcysteine synthetase의 K_m 값과 k_{cat} 값은 1.75 mM과 29.38 s⁻¹이었다 (표 10). 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 k_{cat} 값은 36.26 s⁻¹ (A494V), 30.17 s⁻¹ (S495T), 43.71 s⁻¹ (A494V-S495T)이었다. K_m 값의 경우는 A494V-S495T이 1.59 mM로 가장 낮다. 여기서 보듯이 A494V-S495T 변이주가 야생형에 비하여 L-glutamate에 대한 반응성이 좋은 것을 알 수 있다.

야생형과 세 가지 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 세 가지 기질에 대한 친화도와 반응 속도를 조사 해본 결과 세 가지 변이주중 A494V-S495T가 반응성이 가장 좋은 것으로 나타났다. 그리고 이렇게 반응성이 가장 좋은 이유는 A494V-S495T가 다른 변이주보다 기질에 대한 친화도가 가장 좋고 이에 따른 반응 속도도 증가했기 때문이라고 생각된다.

(5) 글루타치온에 의한 γ -glutamylcysteine synthetase의 속도저해

γ -glutamylcysteine synthetase는 글루타치온에 의해서 feedback inhibition 받고 이것에 의해서 글루타치온의 생산 속도가 결정된다. 정제된 γ -glutamylcysteine synthetase의 글루타치온에 의한 feedback inhibition 정도를 알기 위하여 글루타치온의 농도를 변화시키면서 (0 mM, 2 mM, 6 mM, 10 mM) 효소의 반응속도를 측정하였다 (그림 15). 그 결과 글루타치온에 의한 feedback inhibition은 야생형이나 변이형이나 큰 차이가 나타나지 않았다. 이들은 10 mM 글루타치온이 있는 조건에서 효소의 활성이 글루타치온이 없을 때보다 40%정도 감소하였다. 따라서 γ -glutamylcysteine synthetase의 494-495 번째 amino acid는 효소의 feedback inhibition과 큰 관련이 없는 것으로 생각된다.

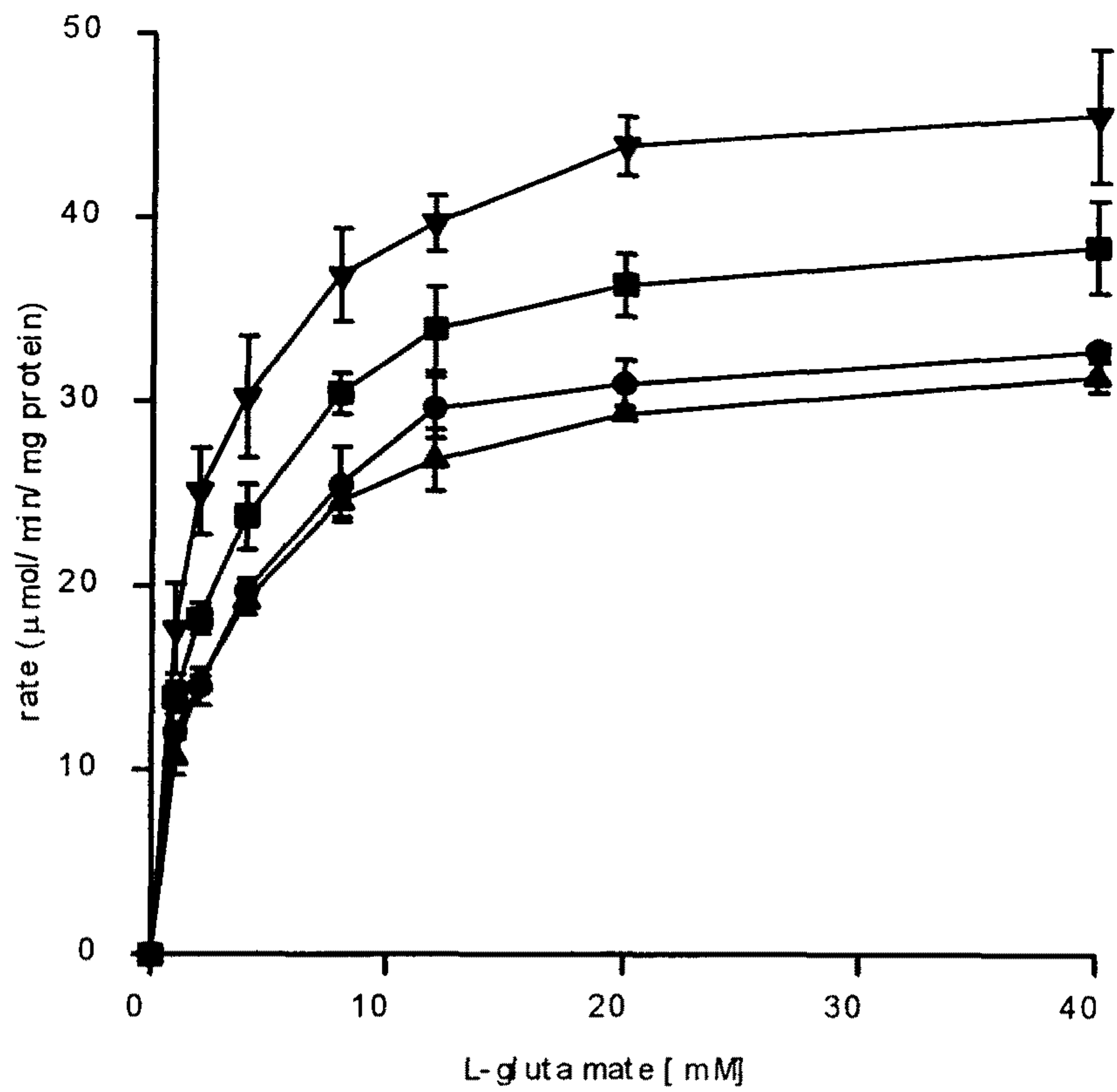


표 13. L-glutamate에 대한 야생형과 변이형 γ -glutamylcysteine synthetases의 기질 농도 변화에 따른 반응속도 변화. 야생형: ●, A494V: ▲, S495T, A494V-S495T: ▼.

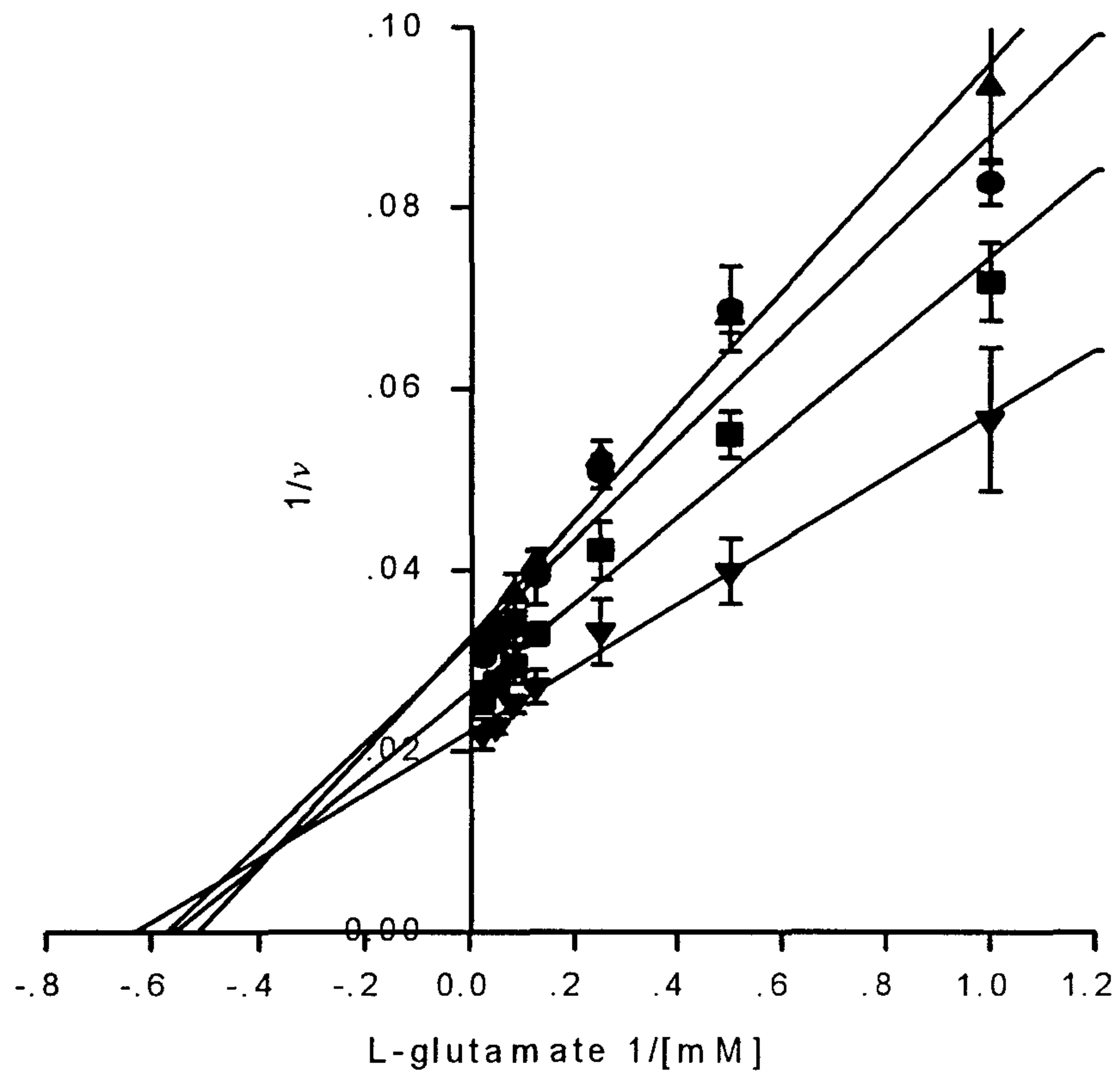


그림 14. 야생형과 변이형 γ -glutamylcysteine synthetases의 L-glutamate에 대한 double reciprocal plot. 야생형: ●, A494V: ▲, S495T: ■, A494V-S495T: ▼.

표 10. 변이형 γ -glutamylcysteine synthetases의 L-glutamate에 대한 반응속도론적 특성

	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Wild(Ala494-Ser495)	1.75	29.98	17.1
Mutant (Ala494→Val)	1.79	36.26	20.3
Mutant (Ser495→Thr)	1.95	30.17	15.5
Mutant (Ala494-Ser495→Val-Thr)	1.59	43.71	27.5

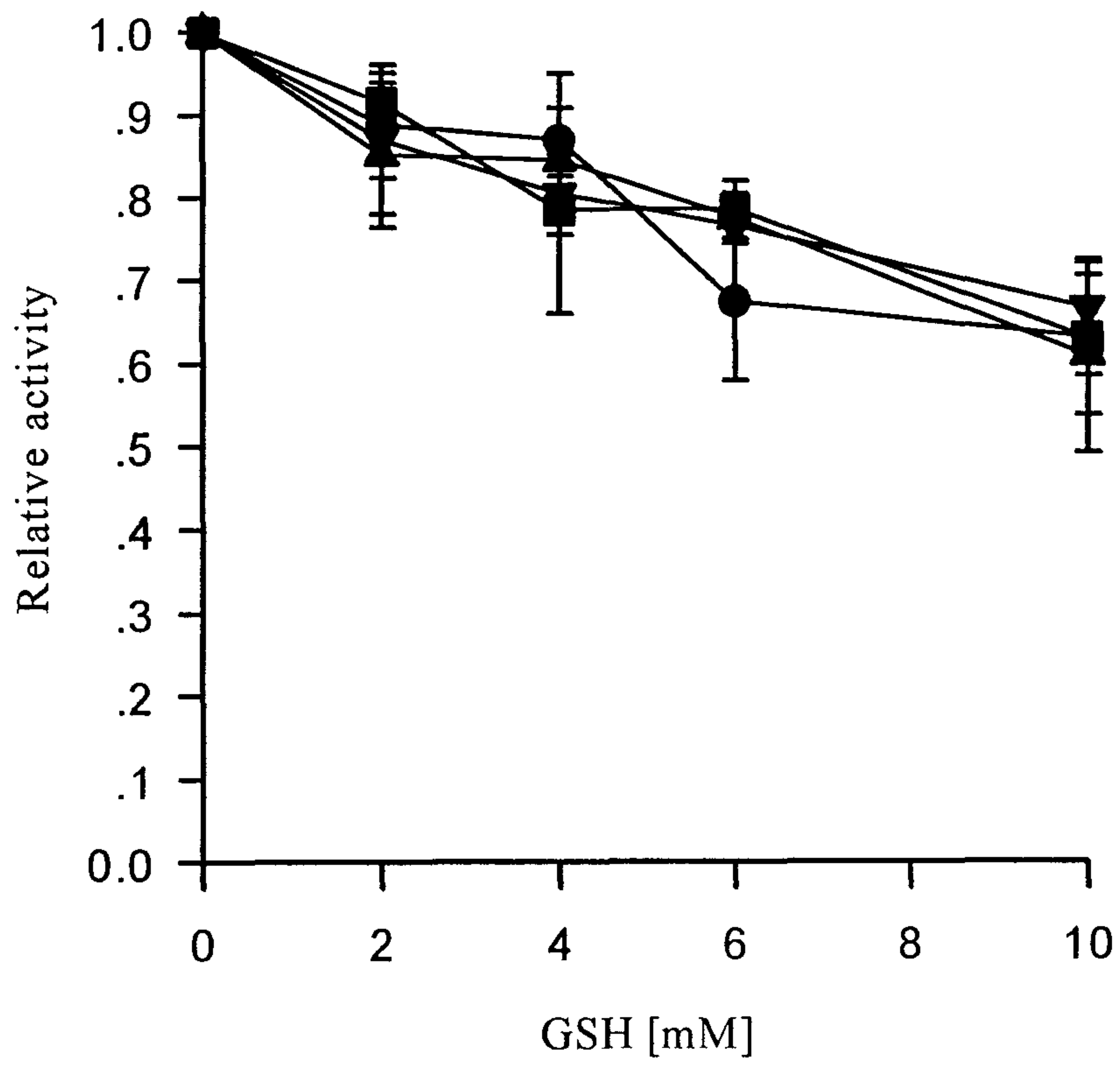


그림 15. 글루타치온 농도 변화에 따른 야생형과 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 활성 저해. 야생형 ; ●, A494V; ■, S495T; ▲, A494V-S495T; ▼.

나. γ -glutamylcysteine synthetase의 물리적 특성

변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 물리적 특성을 알기 위하여 효소의 구조를 circular dichroism (CD)을 이용하여 조사하였다. 야생형의 γ -glutamylcysteine synthetase는 $[\theta]_{220}$, pH7.0 (molecular ellipticity at 220 nm) 값이 약 4.0×10^{-6} 정도 나오는데 비하여 Ala494→Val은 $[\theta]_{220}$ 값이 8.0×10^{-6} 정도였으며 이는 Ala494→Val의 folding structure가 야생형 효소에 비하여 안정화되었음을 보여주는 것이다 (그림 16). 그리고 Ser495→Thr 변이 효소의 $[\theta]_{220}$ 값은 2.0×10^{-6} 정도로 야생형에 비하여 folding structure가 상당히 불안정화 되었음을 보여주는 것이고, 이것은 Ser495→Phe 변이효소 ($[\theta]_{220}$ 값이 2.7×10^{-6}) 에 비하여 더 불안정화 되었음을 보여주는 것이다. 그리고 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이 효소의 $[\theta]_{220}$ 값 (3.9×10^{-6})은 야생형의 그것과 비슷한데 이것은 이 변이 효소의 folding structure가 야생형 효소와 비슷함을 나타내는 것이다. 온도 변화에 따른 단백질의 folding structure 변화 역시 CD을 이용하여 관찰하였다 (그림 17). 이 결과를 보면 Ala494→Val 변이효소의 경우는 folding structure가 80 °C까지 유지되는 되는데 비하여 야생형 효소와 Ala494-Ser495→Val-Thr 변이 효소는 60 °C 정도까지 그 구조가 유지되는 것으로 관찰되었다. 그리고 Ser495→Thr 변이 효소의 경우는 야생형 보다 낮은 온도에서 folding structure의 변화되는 것으로 관찰되었다. Ala494→Val 치환에 의한 효소의 안정성 증가는 Ala에 비하여 소수성이 큰 Val이 효소 내부의 소수성 결합을 크게 증가시켰기 때문이라고 여겨진다.

3. Polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계 구성과 글루타치온 생산

세 종류의 amino acid 로 부터 글루타치온을 합성하기 위하여서는 두 분자의 ATP가 소모된다. 그런데 ATP의 가격이 비싸기 때문에 글루타치온 합성용 bioreactor에 직접 ATP를 공급하면은 생산 원가가 상승하게되므로 ATP의 공급은 재생계를 이용하는 것이 유리하다. ATP 재생계를 구성 하기 위하여 polyphosphate kinase를 재생계에 도입하려고 하였다. 이 효소는 ADP의P-말단에 polyphosphate의 말단 phosphate를 전달하여 ADP로 부터 ATP를 생산하는 반응을 촉매하는 효소이다.

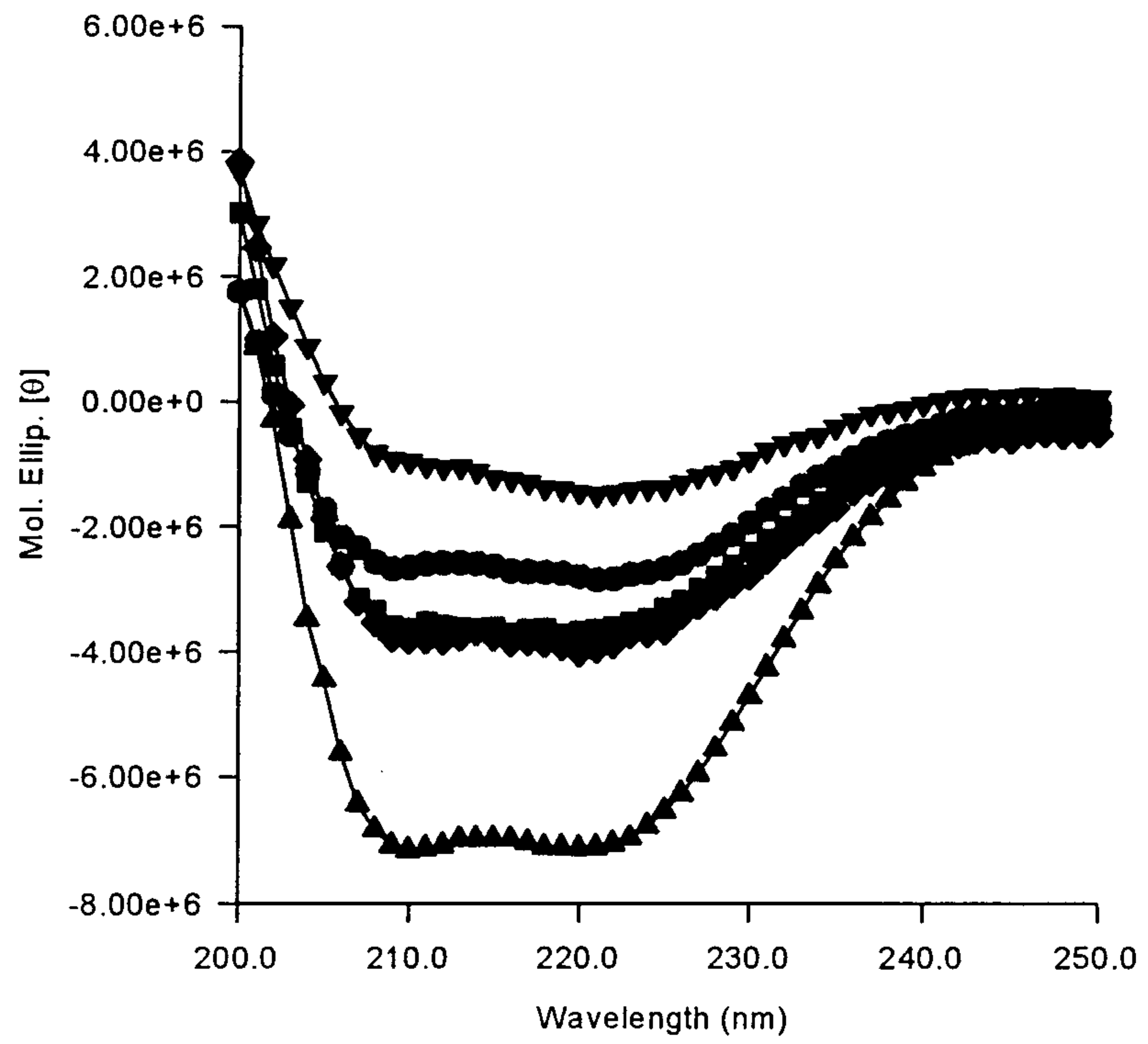


그림 16. 야생형과 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 circular dichroism(CD) spectra. 야생형: ■, A494V: ▲, S495F: ●, S495T: ▼, A494V-S495T: ◆.

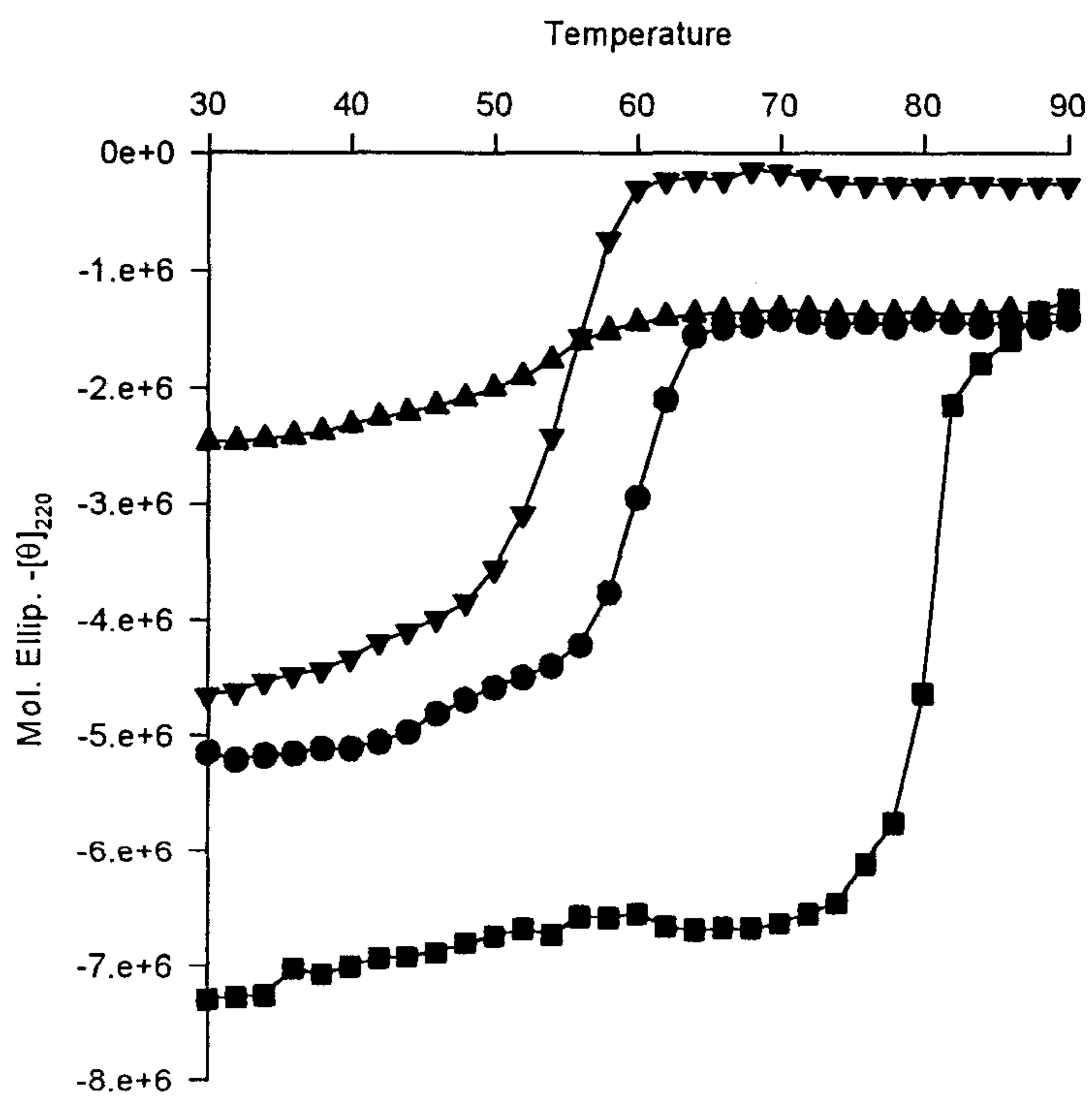


그림 17. 온도 변화에 따른 야생형과 변이형 γ -glutamylcysteine synthetase의 CD spectra. 야생형: ●, A494V: ■, S495T: ▲, A494V-S495T: ▼

가. Polyphosphate kinase 유전자의 클로닝

(1) *E. coli*의 polyphosphate kinase 활성 측정

Polyphosphate kinase는 여러 가지 생물에 존재하는 효소로 아려있는데 그 중에서도 *E. coli*의 polyphosphate kinase가 ATP를 합성하는 능력이 뛰어난 것으로 보고되었다 (Wood and Clark, 1988). 실제로 *E. coli* polyphosphate kinase가 ADP에 대한 친화도가 높고 ATP에 대한 친화도는 낮으며 ATP를 합성하는 반응속도가 이것을 분해하는 속도보다 빠른 것으로 알려져 있다. 그래서 *E. coli* 유래의 polyphosphate kinase를 ATP 재생계 구성에 효소원으로 사용하기로 하였다.

Polyphosphate kinase 유전자 (*ppk*) 을 클로닝하기 전에 *E. coli*에 이러한 효소의 활성이 있는지 알아보기 위하여 *E. coli*를 배양하여 이것의 조효소액을 얻은 다음, 이것을 polyphosphate kinase의 효소원으로 이용하여 ATP 합성 능력을 측정하였다 (표 11). ATP의 합성능력은 세포를 파쇄한 파쇄액의 침전물에서 나타났으며 상등액에서는 ATP 합성 활성이 미미하게 나타났다. 그리고 polyphosphate의 축합도에 따른 ATP 합성 속도를 비교하기 위하여 6-polyphosphate와 9-polyphosphate를 기질로 이용하여 효소의 활성을 측정하였다. 그 결과 두 기질의 축합도 차이에 의한 반응속도의 차이는 나타나지 않았다. 일반적으로 는 polyphosphate kinase는 polyphosphate의 chain 길이가 길수록 반응속도가 증가한다고 알려져 있다 (Wood and Clark, 1988). 그러나 본 실험에서는 이러한 차이가 나타나지 않았는데 그 이유는 6-polyphosphate와 9-polyphosphate는 실제로 축합도의 큰 차이가 나지 않기 때문인 것 같다.

표 11. *E. coli* polyphosphate kinase에 의한 ATP 생산.

chacteristic	polyphosphate	ADP	ATP생산 ($\mu\text{M}/\text{mL}$) ^a	ATP 생산량 ($\mu\text{M}/\text{cell culture mL}$)
NM522(pellet)	6-phosphate	1 mM	0.14	0.03
NM522(supernatant)	6-phosphate	1 mM	0.02	0.004
NM522(pellet)	9-phosphate	1 mM	0.13	0.03
NM522/ <i>gsh</i> I, II(pellet)	9-phosphate	1 mM	0.09	0.02

a: 각 반응은 37°C에서 수행하였으며, ATP 생산량은반응시간 30분동안 ADP를 ATP로 전환시킨 양이다.

(2) *E. coli* chromosome으로부터 polyphosphate kinase 유전자의 클로닝

Polymerase chain reaction (PCR) 방법을 이용하여 *E. coli*의 polyphosphate kinase 유전자를 클로닝하기 위하여 기존에 알려진 *E. coli ppk* 염기서열을 이용하여 두 종류의 oligonucleotide를 합성하였다. 그리고 이렇게 합성한 oligonucleotide를 이용하여 PCR를 수행하였고 여기서 나온 DNA fragment를 적당한 클로닝 벡터에 삽입하였다.

(3) 클로닝된 polyphosphate kinase 유전자의 염기서열 분석

PCR를 통하여 얻은 *ppk*의 염기서열을 automatic DNA sequencer를 이용하여 분석하였다. 그 결과 본 실험실에서 클로닝한 유전자가 기존에 발표된 유전자와 염기서열이 동일한 것으로 나타났다.

나. Polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계 구성과 글루타치온 생산

Polyphosphate kinase를 이용하여 ATP 재생계를 구성하고 이를 이용하여 글루타치온 생합성을 하기 위하여 *ppk* 유전자를 *E. coli*내에서 발현시키는 실험을 하였다. 그리고 글루타치온 합성에 요구되는 두 가지 효소가 *E. coli*내에서 동시에 발현할 수 있게 이들 두 유전자를 하나의 벡터에 클로닝하였다.

(1) Polyphosphate kinase의 *E. coli*내 발현

PCR를 통하여 클로닝된 *ppk*를 포함하는 재조합 plasmid를 *E. coli*에 형질전환하여 이들의 발현정도를 측정하였다. 벡터에 클로닝된 *ppk*를 가지는 세포의 경우 숙주 세포에 비하여 효소활성이 10 배이상 증가하였다 (표 12).

(2) *gshI*과 *gshII* 유전자를 연결한 재조합 plasmid의 제조

글루타치온을 생산하는데는 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase, 두 가지의 효가 요구되므로 *gshI* 유전자와 *gshII* 유전자를 동시에 발현시키기 위하여 pDR2017 plasmid에 *gshII* 유전자를 같은 방향으로 연결한 plasmid를 구성하였다 (pDG-I,II). 이 plasmid에서 발현되는 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase의 활성을 측정한 결과 두 효소 모두 단독으로 발현시킬 때보다 효소의 활성이 7-25 % 가량 감소하였다 (표 13). 이 plasmid에서는 *gshI* 과 *gshII* 유전자가 모두 *tac* promoter에 의해서 발현이 조절 받게 된다. 실제로 *gshI*과 반대 방향으로 클로닝된 *gshII* 유전자의 경우는 효소활성을 측정할 수 없었다 (data not shown).

표 12. 재조합 polyphosphate kinase에 의한 ATP 생산.

strain	ADP	ATP 생산(μ M/ml)	ATP 생산량/ culture cell 1ml
NM522	1 mM	0.13	0.03
pCK101	1 mM	0.08	0.12
pCK201	1 mM	0.19	0.29
pCK202	1 mM	0.21	0.31

a: 효소반응을 시키지 않고 0 time에서 ATP의 양을 측정한다

(3) Polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계 구성과 글루타치온 생산
Polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계를 글루타치온 생산에 직접 이용하여 글루타치온의 생산성을 일반적인 ATP 재생계인 acetyl-phosphate system과 비교하여 보았다. acetyl-phosphate를 이용한 재생계에서는 글루타치온의 생산량이 1.5 mM/2mL (표 14) 이었다. 그리고 polyphosphate만 반응계에 넣고 polyphosphate kinase를 첨가하지 않은 반응계에서는 글루타치온의 생산량이 아주 적었다. 그러나 polyphosphate kinase와 polyphosphate 모두를 넣은 반응계에서는 1.73 mM/2ml의 글루타치온이 생산된 것을 알 수 있다. 여기서 보듯이 polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생계가 글루타치온 생산을 위한 bioreactor에 이용 가능할 것이다.

표 13. γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase의 비활성

strain	Characteristic	γ -glutamylcysteine synthetase (μ mol/min/mg)	Relative activity (%)	glutathione synthetase (μ mol/min/mg)	Relative activity (%)
pDR- <i>gshI</i>	<i>tac-gshI</i>	0.78	100.0	0.006	6.8
pUC- <i>gshII</i>		0.01	1.3	0.087	100.0
pDG-I,II	<i>tac-gshI</i> 유전자 뒤에 <i>gshII</i> 를 연결	0.55	75.3	0.081	93.1
17-II	두유전자 사이 의 space를 제 거함	1.09	139.7	0.018	20.6

표 14. Polyphosphate kinase ATP 재생계를 이용한 글루타치온 생산

Strain	IPTG	Specific activity (μ mol/min/mg)	Relative activity (%)
pUC8- <i>gsh</i> I	—	0.025	100
T ₇ - <i>gsh</i> I	0mM	0.023	95
T ₇ - <i>gsh</i> I	2mM	0.009	36

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

본 연구의 목표는 bioreactor를 이용한 효소법으로 글루타치온을 생산할 목적으로 생산에 요구되는 효소의 활성 증대와 생산에 필요한 효소를 *E. coli*에서 발현시키는 것이 목적이다. 그리고 이를 위하여 글루타치온 합성에 중요한 효소인 γ -glutamylcysteine synthetase의 활성증대와 *gshI*과 *gshII* 유전자의 발현증대를 목표로 하였다. 글루타치온의 합성에는 ATP가 많이 소모되므로 새로운 ATP 재생계를 구성하는 것을 목표로 하였다.

부위 특이적 돌연 변이를 통하여 활성이 증대된 효소의 물리화학적 특성을 확인하는 실험을 수행하여 비활성이 증대한 γ -glutamylcysteine synthetase의 K_m 과 V_{max} 값 및 물리적 특성을 조사하였고 이것을 야생형 효소와 비교하였다. 글루타치온 합성 효소에 필요한 효소를 *E. coli* 내 과발현시키기 위하여 *E. coli tac* promotor를 글루타치온 합성에 rate limiting step으로 기능 하는 γ -glutamylcysteine synthetase 유전자와 연결시켜 이 것의 발현을 증가시켰다. 그리고 이렇게 γ -glutamylcysteine synthetase 유전자를 과발현시키는 균주를 이용하여 효소의 정제에 이용하여 돌연변이주의 특성 확인에 이용하였다. 그리고 *gshI* 유전자가 클로닝된 vector에 glutathione synthetase 유전자를 클로닝하여 이들 두 유전자가 동시에 발현하는 벡터를 구성하고 이를 *E. coli*에서 안정적으로 발현시켰고 이것을 글루타치온 생산에 이용하였다.

Polyphosphate kinase를 이용한 새로운 ATP 재생계 구성을 위하여 *E. coli* chromosome 으로부터 *ppk* 유전자를 클로닝하였고, 이것을 *E. coli* 내에서 발현시켜서 새로운 ATP 재생계를 구축하였다. 그리고 이렇게 구축한 새로운 ATP 재생계를 글루타치온 생산에 이용하여 글루타치온이 생산됨을 확인하였고 이것이 기존에 비해 효율이 뛰어난을 확인하였다.

전체적으로 본 과제가 목표로 했던 내용을 완수하였다고 자체 판단된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

위에서 개발된 글루타치온 생산 효소용 균주는 글루타치온 생산에 필요한 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase를 *E. coli*내에 동시에 과발현시킨 것으로 이렇게 외부유전자를 과발현시키는 유전공학적 기법은 다른 외래유전자의 *E. coli*내 과발현에 응용할 것이다. 그리고 이렇게 개발된 *E. coli* 균주는 bioreactor를 이용한 글루타치온 생산에 이용할 예정이다. 그리고 polyphosphate kinase를 이용하여 새롭게 개발된 ATP regenerating system은 글루타치온 생산용 bioreactor에 적용할 것이다. 이와 같이 새롭게 고안된 글루타치온 생산용 bioreactor는 ATP 재생에 들어가는 비용이 기존의 것에 비하여 저렴하기 때문에 (polyphosphate는 yeast를 이용한 ATP 재생계에 사용되는 glucose보다 가격이 저렴하다) 글루타치온 생산비용을 낮출 수 있을 것이다.

*E. coli*에서 polyphosphate kinase유전자를 클로닝하기 위하여 PCR법을 사용하였는데 이런 PCR를 이용한 유전자의 클로닝 기술은 *E. coli*뿐만 아니라 다른 균주에서 다른 유전자를 클로닝하는데 활용할 것이다.

부위 특이적 돌연변이 방법을 통하여 효소의 비활성이 증가된 γ -glutamylcysteine synthetase의 화학 반응 속도론적 특성을 파악하여 활성 증가원인을 밝힘으로서 효소의 활성과 단백질의 구조에 관한 이해를 증진시켰다. 그리고 부위 특이적 돌연변이 방법이 효소의 구조와 반응기작 이해에 도움을 주기 때문에 앞으로도 이런 기술은 효소의 반응기작 연구에 계속 응용될 것이다.

새롭게 개발된 ATP regenerating system은 bioreactor를 이용한 글루타치온 생산뿐만 아니라 다른 ATP를 소모하는 물질생산에도 이용될 수 있을 것이다.

제 6 장 참고 문헌

Ahn, K. and A. Kornberg, 1990, Polyphosphate kinase from *E. coli*, *J. Bio. Chem.* 265, 11734-11739

Akiyama, M., E. Crooke, and A. Kornberg, 1992, The polyphosphate kinase gene of *E. coli*, *J. Bio. Chem.* 267, 22556-22561

de Boer, H. A., A. Hui, L. J. Comstock, E. Wong, and M. Vasser, 1983, Portable SD region: a system for a systematic study of defined alterations of nucleotide sequence within *Escherichia coli* ribosome binding site, *DNA* 2, 231~235

Boutvet, D. and J. G. Belase, 1992, Control of RNase E mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *Escherichia coli*, *Nature* 360, 488~491

Cooper, T. A., 1975, *Tools of Biochemistry*, Wiley

Fiske, C. H. and Y. P. Subbarow, 1925, The colorimetric determination of phosphorus, *J. Biol. Chem.* 66, 375-400

Gumagai, H. R., Nagayma, and T. Tachigura, 1982, γ -Glutamylcysteine synthetase from *Proteus mirabilis*, *Agric. Biol. Chem.* 46, 1301-1309

Gushima, H., S. Yamada, E. Soeda, M. Yokoda, M. Kondo, and A. Kimura, 1984, Complete nucleotide sequence of the *E. coli* glutathione synthetase, *Nucl. Acid. Res.* 12, 9299-9307

Huang, C. S., W. R. Moore, and A. Meister, 1988, On the active thiol of γ -glutamylcysteine synthetase: relationship to catalysis, inhibition, and regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2464-2468

Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama, 1990, High efficient transformation of

Escherichia coli with plasmid, *Gene* 96, 23-28

Iost, I and M. Dreyfus, 1995, The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depend upon the simultaneity of its synthesis and translation, *EMBO J.* 14,3252~3261

Jackson, C. R., 1969, Studies in the enzymology of glutathione metabolism in human erythrocytes, *Biochem. J.* 111, 309-313

Kumble, K. D., Ahn, K. and A. Kornberg, 1996, Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *E. coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14391-14395

Kwak, J. H. Y. S. Nam, and S. Y, Lee, 1998, Site directed mutagenesis of γ -glutamylcysteine synthetase from *Escherichia coli* K-12, *J. Biochemistry and Molecular Biology* 31, 254-257

Meister, A. and M. E. Anderson, 1983, Glutathione, *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711-760

Meister, A., 1996, Glutathione metabolism, *Methods in Enzymology* 251, 3-6

Muller-Hill, B., L. Crapo, and W. Gilbert, 1968, Mutation makes more *lac* repressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 1259-1264

Murata, K., K. Tani, J. Kato, and I. Chibata, 1980, Excretion of glutathione by methylglyoxal resistant *E. coli*, *J. Gen. Microbiol.* 120, 545-547

Mutoh, N. C. W. Nakagawa, and Y. Hayashi, 1995, Molecular cloning and nucleotide sequencing of the γ -glutamylcysteine synthetase gene of the fission yeast *Schizosaromyces pombe*, *J. Biochem.* 117, 283~288

Nam, Y. S., 1990, Molecular breeding of glutathione producing bacterial strains. Thesis for the degree of Doctor, Korea Univ. in Seoul, Korea

Nam, Y. S., J. S. Kim, J. H. Kwak, Y. I. Park, and S. Y. Lee, 1991, Amino acid substitution of *E.coli* γ -glutamylcysteine synthetase, *Kor. J. Microbiol.* 29, 278-283

Otache, Y. and S. Yabuchi, 1991, Molecular cloning of the γ -glutamylcysteine synthetase gene of *Sacharomyces cerevisiae*, *Yeast* 7, 953~961

Panayotatos, N. and K. Troung, 1985, Cleavage within an RNaseIII site can control and protein synthesis in vivo, *Nucleic Acids Res.* 7, 2227~2233

Richman, P. G., and A. Meister, 1975, Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione, *J. Biol. Chem.*, 250, 4, 1422-1426

Sambrook, J., E. F. Fritch, and T. Maniatis, 1989, Molecular cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press in Long Island, USA

Seeling, G. F. and A. Meister, 1984, γ -Glutamylcysteine synthetase, *J. Biol. Chem.* 259, 3534~3538

Seeling, G. F. and A. Meister, 1985, Glutathione biosynthesis, in *Methods Enzymology* 113, 484-498

Stephan, D. W. and D. J. Jamieson, 1997, Amino acid dependant regulation of *Sacharomyces cerevisiae* GSH-I gene by hydrogen peroxide, *Mol. Microbiol.* 23, 203~210

Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff, 1991, Use of T7 RNA ploymerase to direct expression of cloned gene, in *Methods Enzymolology* 188, 60~72

Watanabe, K., Y. Yamata, K. Murata, and A. Kimura, 1986, The nucleotide sequence of gene for γ -glutamylcysteine synthetase of *Escherichia coli*, *Nucleic Acids. Res.* 14, 4393 -4400

Wood, H. and J. E. Clark, 1988, Biological aspect of inorganic polyphosphates, *Ann. Rev. Biochem.* 57, 235-267

Yan, N. and A. Meister, 1990, Amino acid sequence of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase, *J. Biol. Chem.* 265, 1588~1593

Zimmerman, S. B., and B. Harrison, 1985, Molecular crowding accelerates the cohesion of DNA fragment with complimentary termi, *Nucleic Acids Res.* 13, 2241-2249

위탁연구과제 II

글루타치온 생산효소와 그 변이효소의 반응 kinetics 연구

연구기관명 : 한국식품개발연구원

연구책임자 : 권대영(선임연구원)

참여연구원 : 양혜정(연구원)

요 약 문

I. 제 목

글루타치온 생산효소와 그 변이효소의 반응 kinetics 연구

II. 연구의 목적 및 필요성

Glutamylcysteine synthetase (*gsh 1*) 효소를 wild type과 mutant type에 대하여 *E. coli*에서 생산하고 발효에 의하여 대량 생산으로 연구가 진행되어 왔으나 실제로 단순히 wild type과 mutant type에 대한 효소활성도만 비교하였지 효소의 구조와 또는 효소의 구조 변화와 연관지어서 연구하지는 않았다. 따라서 모든 효소를 단백질 공학에 의하여 mutant 효소를 만들었을 때, 생산된 효소의 구조와 구조안정성에 대하여 반드시 연구하고 wild type과 mutant type의 구조변화와 함께 효소의 반응활성도 변화 즉 k_{cat}/K_M 의 변화를 비교하는 것은 매우 중요하고 필수적이라고 생각한다. 이렇게 할 때 어느 위치를 point mutation시킬 것인가의 정보를 알 수 있고 방향제시를 할 수 있다고 본다. 이러한 중요성에 비하여 *gsh1* 효소는 mutant type의 효소까지 개발되었으나 아직도 wild type의 2차구조에 대한 정보가 없다. 따라서 본 연구에서는 *gsh1* 효소의 folding conformation을 아는 것은 매우 중요하다고 본다.

III. 연구개발의 내용과 범위

단백질공학의 발달과 유전공학의 발달로 효소의 activity를 증가시키는 연구를 site directed mutagenesis 등의 기술을 이용하여 원래 효소에서의 기능을 증진시키는 연구가 발달되었다. 그러나 이러한 연구는 개발된 효소의 구조 변화 연구와 효소의 kinetics 연구의 뒷받침 없이는 mutagenesis의 방향이라든지 어느 위치를 바꿀지에 대하여 정확한 정보를 알 수 없다.

따라서 본 연구에서는 이들 연구의 시발로서 *gsh1* 효소와 이들의 site directed mutagenesis 시킨 mutants 효소를 분리정제하여 효소의 구조적인 특성을 조사하고 구조안정성을 조사하고자 한다. 즉 *gsh1* 효소를 *E. coli*에서 wild type과 mutant type으로 초순수 분리하고, SDS-electrophoresis에서 순수도를 확인한 후 spectropolarimeter에서 *gsh1*의 2차구조와 구조 안정성을 pH 및 온도에 대하여 확인하였다.

IV. 연구개발결과

먼저 *E. coli*와 site directed mutagenesis 시킨 mutants *E. coli*를 플라스크 배양한 다음 cell을 깬 다음 *gsh1* 효소를 ammonium sulfate 처리하여 fractionation한 다음 ultrafiltration하여 추출하였다. 이 *gsh1*을 순수분리하기 위하여 DEAE-Trisacryl 컬럼과 Sephadex G-100 컬럼 chromatography를 처리하여 순수분리하였다. *gsh1*의 활성도를 추적하기 위하여 그 때마다 *gsh1*의 활성도를 측정하였다. 이를 순수 분리한 후 Phast system 의 SDS-electrophoresis로 *gsh1*의 순수도를 단일 띠크로 확인하였다.

이와같은 방법으로 순수분리한 wild type과 mutant type의 *gsh1* 효소에 대하여 UV 및 CD (spectropolarimeter)에 의하여 구조를 분석한 결과 wild type의 *gsh1*은 BSA (bovine serum albumin)와 같은 전형적인 단백질의 2차 구조 특성을 나타내고 있었다. 다만 정확한 순도와 CD spectrum을 갖고 있지 못하기 때문에 정확한 α -helix, β -sheet 및 random coil의 분석은 할 수 없었으나 안정된 구조안정성을 보여 주고 있었다. 이 단백질도 pH나 열에는 약하여 분명한 구조 안정성의 차이와 구조가 pH와 온도에 따라 변화함을 보여주고 있었다. Mutants type 중 A494V, A494T는 wild type 보다 강한 helix 구조를 보여주고 있으나 S495F와 같은 경우는 folding 구조가 많이 파괴된 것으로 나타났다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서의 연구결과 *gsh1* 효소의 여러 가지 mutant type까지 확대연구가 필수적이며 효소의 어느 부분을 mutation 시켰을 때 나타나는 효소반응 kinetics의 변화와 folding 구조 변화를 추적하면 앞으로 더 중요한 정보를 얻을 수 있으며 단백질의 folding structure와 *gsh1* 효소의 활성도와 관계도 규명이 가능할 것으로 본다. 또한 새로운 mutant type의 효소를 개발 및 생산하는데 방향을 제시할 것으로 보아 보다 강력한 새로운 *gsh1* mutant를 생산할 수 있을 것으로 본다. 앞으로 folding이 잘된 mutant에 대하여 결정구조를 얻은 다음 x-ray crystallography 등을 이용한 3차구조의 변화를 연구하면 많은 구조적인 정보를 얻을 수 있을 것으로 본다.

Summary

I. Title

Purification, structure characterization and kinetic studies of glutamylcystein synthetase I (*gshI*) and their mutants from *E. coli*.

II. The purpose and importance of the research

Glutamylcysteine synthetase (*gsh I*) and their mutant *gshI*s were the enzyme which produced γ - glutamylcysteine from L-glutamate and L-cysteine. Many mutant type and wild type *gshI* enzymes were produced by site directed mutagenesis technique and their reaction kinetics such as k_{cat}/K_M were studied and compared with wild type *gshI*. However, it is necessary to study the conformational structure of wild type *gshI* or structural conformation changes between mutant type for understanding the reaction mechanism. Without structural information, we cannot get the informations for the direction of point mutation and mutation position. With the fully understanding the structural information, we can design the new protein engineered enzymes. In this work, firstly using *gsh I* wild type enzyme and their mutant enzymes the protein folding conformational structure and their structural stabilities were studied by determining circular dichroism properties and structure comparison were conducted.

III. The contents and range of the research

To get the information of structure and to understand the reaction mechanism for producing new designed *gshI* enzyme, in addition to reaction kinetics protein folding conformation and folding stability was studied using wild type and their mutants of *gshI* enzyme. Before structural study, high purified enzyme of *gshI* was achieved by two step column chromatography and electrophoresis. Enzyme structure was studied using spectropolarimeter to investigated folding structure conformation and structural change of protein against to heat and acid and base.

IV. Results and discussion

After extracting the *gshI* and mutants *gshI* from *E. coli* enzyme was purified by many steps; fractionation with ammonium sulfate, ultrafiltration, DEAE-Trisacryl and Sephadex G-100 column chromatography. During the each purification step, *gshI* enzyme activity was observed. The purity of enzyme was checked with SDS-electrophoresis, and molecular weight was known as 40,000 daltons.

Using this purified wild type of and mutants type *gshI*, structure of folding conformation was studied by spectropolarimeter, CD spectrum showed that the folding structure of *gshI* is typical α -helix structure, however, secondary structure composition of α -helix, β -sheet and random coil cannot be known because we can not know the exact concentration of CD loading protein. The folding structure of protein is slight stable in low pH and high pH, and high temperature, while enzyme activity is very sensitive in high temperature and acid and base. Clearly heat and acid and base, however, changed the conformational structure of purified *gshI*. For the mutants of *gshI*, same works were done and their structure were compared.

It is necessary to extend the conformational study of folding structure to the mutant types of *gshI* enzymes by the side chain and hydrophobicity and compare to relationship between enzyme activities and folding structures. In future reaction mechanisms, such as binding site of substrate and reaction catalytic site, structural changes during the binding and catalytic reaction, and transition state binding, can be studied with the help of this work after getting the crystals of enzyme and determining the structures for all enzyme.. And new enzymes also can be designed with the structural study.

C O N T E N T S

Summary in Korean	237
Summary	239
Contents	241
Contents in Korean	242
Main Text	243
Chapter 1. Introduction	243
Section 1. Necessity of Reseach and Development	243
Section 2. Object of Reseach and Development	244
Chapter 2. Status of Research and Development	245
Chapter 3. Contents and Results of Research and Development	246
Section 1. Contents of Results of Research	246
Section 2. Methods of Results of Research	246
1. Materials	246
2. Methods	246
Section 3. Resuts of Results of Research	252
Chapter 4. Achievement of Research and Development	274
Chapter 5. Application of the Results	275
Chapter 6. Reference	276

목 차

요약문	237
영문요약문	239
영문목차	241
목차	242
본론	243
제 1 장 서론	243
제 1절 연구개발의 필요성	243
제 2절 연구개발의 목적	244
제 2 장 국내외 기술개발 현황	245
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	246
제 1절 연구개발의 내용 및 범위	246
제 2절 연구개발의 방법	246
1. 실험재료	246
2. 실험방법	246
제 3절 연구개발의 결과	252
제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	274
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	275
제 6 장 참고문헌	276

본 문

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 필요성

글루타치온 생산효소 중의 하나인 glutamylcysteine synthetase (*gsh 1*) 효소를 발효공학기술에 의하여 대량생산이 가능하게 되었다. 단백질공학의 발달과 유전공학의 발달로 효소의 activity를 증가시키는 연구를 site directed mutagenesis 등의 기술을 이용하여 원래 효소에서의 기능을 증진시키는 연구가 발달되었다. 여기에는 *gsh1* 효소의 효소활성도와 특이성을 개선하는 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 즉 wild type의 *gsh1*과 이 효소의 mutant type을 site directed mutagenesis 기술에 의하여 *E. coli*에서 생산하여 분리하고 있으나 여러가지 문제점 때문에 단순히 wild type과 mutant type에 대한 효소활성도만 비교하였지 효소의 구조와 또는 효소의 구조 변화와 연관지어서 연구하지는 않았다. (Nam, 1990) 실제로 고려대학교 이세영교수 팀 (Lee, 1995)에서는 여러가지 *gsh1* 효소를 유전공학에 의하여 여러가지 mutant type을 *E. coli*에서 생산하여 각각 이들 효소의 효소반응 kinetics에 대한 연구를 진행하고 있다. 그러나 이들 효소의 구조면에서의 차이등에 관하여는 연구가 병행되고 있지 못하다. 반면에 미국 Cornell 대학교에서는 rat kidney에서의 *gsh1*에 대하여는 상당한 수준까지 CD (circular dichroism spectroscopy)에 의하여 구조분석이 진행되고 있다. (Edinger et al, 1995).

따라서 모든 효소를 단백질공학에 의하여 mutant 효소를 만들었을 때, 생산된 효소의 구조와 구조안정성에 대하여 반드시 연구하고 wild type과 mutant type과 구조변화와 함께 효소의 반응활성도 변화 즉 k_{cat}/K_M 의 변화를 비교하는 것은 매우 중요하고 필수적이라고 생각한다. 이와같이 구조변화 연구를 병행할 때 효소 반응기작 (mechanism)을 이해할 수 있고 따라서 어느 위치를 point mutation시킬 것인가의 정보를 알 수 있고 또한 mutation의 방향제시를 할 수 있다고 본다. (Voet & Voet, 1995) 이러한 중요성에 비하여 *gsh1* 효소는 mutant type의 효소까지 개발되었으나 아직도 wild type의 2차 구조에 대한 정보가 없다. 여러 효소에 대하여 단백질공학의 발달과 유전공학

의 발달로 효소의 activity를 증가시키는 연구를 site directed mutagenesis 등의 기술을 이용하여 원래 효소에서 기능을 증진시키는 연구가 발달되었다. 그러나 이러한 연구는 개발된 효소의 구조변화 연구와 효소의 kinetics 연구의 뒷받침 없이는 mutagenesis의 방향이라든지 어느 위치를 바꿀지에 대하여 정확한 정보를 알 수 없다.

제 2 절 연구개발의 목표

본 연구에서는 *gsh1* 효소의 folding conformation을 먼저 아는 것은 매우 중요하다고 본다. 여기서는 *gsh1* 효소를 *E. coli*에서 초 순수 분리한 다음 *gsh1* 효소(wild type)와 sitedirected mutagenesis에 의하여 *gsh1*의 아미노산 중 point mutation 시킨 *eE. coli*에서 발현시킨 mutants type *gsh1* 효소들의 folding conformation의 확인 및 열과 pH에 대하여 안정성 조사하였다. 이와 같은 연구를 통하여 본 연구의 최종 연구개발 목표인 최고의 *gsh1* 효소를 개발하여 글루타치온을 대량생산하는 발판을 마련하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

지금까지 글루타치온의 생산은 야생형 효모를 이용한 발효에 의하고 있다. 그러나 야생형의 효모는 대장균에 비하여 유전 공학적 기법을 이용한 생물공학 제품의 생산성 증대에 어려움이 있어 근래에 들어 대부분의 유망한 생물공학 제품들은 유전공학 기법에 의하여 개선된 유전형질을 갖는 대장균에 의하여 생산하려는 움직임이 있고 앞으로도 이와같은 추세에는 변화가 없을 것으로 보인다. 그러나 국내에서 유전공학기술에 의한 글루타치온 생산에의 이용은 그 기술 자체가 거의 전무한 상태이고, 외국에 있어서도 그 실현성은 아직 미비한 실정이다. 세계적으로는 특히 일본에서 京都대학과의 공동연구로 협화 발효, 조일맥주등에서 각각 글루타치온 생합성용 유전자를 대장균에, 그리고 효모에 재조합시켜 균주의 개발과 생산을 연구중이다. 국내에서는 고려 대학교 이세영 교수팀에 의하여 1980년대 후반부터 *E. coli* K12의 *gsh1* 유전자에 대한 염기서열 결정과 클로닝 연구가 시작되어 글루타치온 생성 효소 유전자의 클로닝과 염기서열 결정을 결정하였고 이를 바탕으로 부위 특이적 돌연변이 방법을 이용하여 활성이 증대된 글루타치온 합성 유전자를 개발하였고 이 글루타치온 생산효소의 변이효소간에 효소활동 변화도 분석되고 있다. 다만 이들 효소의 1차구조는 잘 알려져 있으나 disulfide결합위치를 포함하여 2차구조와 wild type 및 mutant type간에 구조변화간의 차이는 많이 알려져 있지 않다. 뿐만 아니라 아직까지 어느 부위가 active site인지 어느 부위가 기질결합에 관여하는지에 대하여도 정확하게 알려져 있지 않았다. 본 연구팀(한국식품개발연구원)에서는 다행이도 단백질의 1차구조분석 실험을 수행한바 있으며 단백질의 folding에 의한 연구를 BPTI folding intermediate를 합성하여 folding에 관여하는 힘 등의 연구를 체계적으로 한바 있다.

앞으로 이 분야에 대해 선진국에서는 본격적으로 연구가 진행될 것으로 보이며 신 물질을 찾는 연구도 중요하지만 기존효소의 대량생산 방법연구나, 기존효소의 여러 가지 펩타이드 변이효소를 만들어 보다 강력한 신기능 효소를 개발하는 것도 가능성이 높고 빠른 방법이다. 강력하고 값싼 글루타치온을 개발할 경우 국내의 신물질 창출 기술의 제고는 물론 경제적으로 수입 대체효과를 가져오고, 제품 및 공정 수출에 의한 국가 경제 산업에 막대한 영향을 미칠 것으로 보인다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절. 연구개발의 내용과 범위

단백질공학의 발달과 유전공학의 발달로 효소의 activity를 증가시키는 연구를 site directed mutagenesis 등의 기술을 이용하여 원래 효소에서의 기능을 증진시키는 연구가 발달되었다. 그러나 이러한 연구는 개발된 효소의 구조 변화 연구와 효소의 kinetics 연구의 뒷받침 없이는 mutagenesis의 방향이라든지 어느 위치를 바꿀지에 대하여 정확한 정보를 알 수 없다.

따라서 본 연구에서는 이들 연구의 시발로서 *gshI* 효소를 분리정제하여 효소의 구조적인 특성을 조사하고 구조안정성을 조사하고자 한다. 즉 *gshI* 효소를 *E. coli*에서 wild type으로 초순수 분리하고, SDS-electrophoresis에서 순수도를 확인한 후 spectropolarimeter에서 *gshI*의 2차구조와 구조 안정성을 pH 및 온도에 대하여 확인하였다.

제2절 연구개발 방법

1. 실험재료

글루타치온 생산 균주 *E. coli* GS 903 (*gshI*⁻, MG^r)와 mutants enzyme을 생산하기 위한 여러 가지 변이주인 *E. coli*는 공동연구자인 고려대학교 이세영 교수님 실험실에서 공급받았다. LB 배지는 10g/l의 bacto-tryptone (Difco Detroit, MI), 5g/l의 yeast extract 및 10g/l sodium chloride의 배율로 직접 혼합하여 만들어 사용하였다. DTNB (dithionitrobenzoic acid), L-glutamate, EDTA, L-cysteine, ATP, glyoxylic acid monohydrate, diethanolamine-HCl, DTT(dithiothreitol), DEAE-Triacryl plus LS와 Sephadex G-100은 Sigma 사 (St. Louis, MO)에서 구입하였다. 또한 γ -glutamylcysteine은 Kohjin Co. (Japan)에서 구입하였다.

2. 실험방법

가. 글루타치온 생산 균주 배양

gshI 생산 균주인 *E. coli*와 *E. coli* 변이를 500mL LB 배지 플라스크에 접종한 후 37°C reciprocal shaker를 이용하여 20시간 정도 log phase 후반 부분

까지 가도록 배양시킨 다음 원심분리하여 cell을 분리한후 300 mL의 25.0 mM의 Tris-HCl (pH 7.4)에 다시 녹였다. 이 완충용액 (Buffer I) 에는 0.5 mM의 L-glutamate, 0.5 mM L-cysteine 및 1.0 mM의 MgSO₄ 7H₂O 이 용해되어 있다. 이를 세포벽을 분쇄하기 위하여 초음파분쇄기 (sonic dismembrator, Fishers Co.)로 sonication시켰다. 이를 다시 17,000 x g 로 20 분 동안 원심분리한 후 cell debris는 버리고 상정액을 *gsh1* (γ -glutamyl-cysteine synthetase) 효소의 원액으로 사용하였다. (Nam, 1990)

나. *gsh1*의 효소활성 분석

*gsh1*의 효소활성도는 Jackson (1969)의 방법에 따라 DTNB (dithionitrobenzoic acid) 법을 준용하였다. 2 mL의 L-glutamate 30 μ mol, L-cysteine 30 μ mol, ATP 30 μ mol, MgSO₄ 7H₂O, KCl 200 μ mol 및 200 μ mol 의 diethanolamine-HCl의 기질용액에 효소용액 0.5 mL을 넣어 이를 37°C에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 후에 반응용액에 3.3 mL의 3.2% 의 sulphosalicylic acid의 차가운 용액 (0-4°C)을 넣어 효소반응을 중지 시켰다. 반응후 반응혼합물에 남은 cysteine은 Ball의 방법 (1966)에 의하여 제거하였다. 즉 반응혼합물을 어름에 20분동안 세워둔 다음 낮은 온도에서 1,000 x g 에서 20분동안 원심분리한 다음 상정액 1 mL을 5mM의 EDTA, 1.0 g/L ascorbic acid, 3.0 g/L의 glyoxylic acid monohydrate가 들어 있는 potassium phosphate buffer (pH 6.8) 4 mL 튜브에 넣었다. 이렇게 하여 cysteine을 제거한 후 이 튜브를 60°C에서 5분동안 incubation한 후 바로 어름으로 냉각시킨 후 25°C로 일정하게 유지한 후 각각의 튜브에 있는 용액에 3.8 mM DTNB 를 포함하고 있는 0.5 mL 의 1.0 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)을 처리하여 7분후 412 nm에서 흡광도를 측정하므로 *gsh1* 효소의 activity를 측정하였다.

다. *gsh1* 효소의 초 순수 분리

(1) *gsh1* 효소의 추출 및 정제

투석(dialysis)

gsh1 효소원액을 Buffer I 용액 10 리터내에서 투석막 (dialysis membrane) (Spectrapor 20,000, Los Angeles, CA)을 사용하여 작은 물질을 제거하였다.

Ammonium sulfate 분획

투석후 추출물 340 mL에 대하여 고체 ammonium sulfate를 30 % 포화되도록 첨가한 다음 하루저녁 정도 방치한 다음 원심분리한 후 상정액을 모아 똑같은 방법으로 60 % 포화 ammonium sulfate 용액으로 처리한 후 원심분리하여 침전물을 모아서 240 mL의 Buffer 용액에 다시 녹였다. (Nam, 1990) 이 용액을 다시 20 리터의 Buffer I 용액에서 48 시간 동안 투석시켰다. 이 투석시킨 용액 240 mL을 다시 ammonium sulfate 포화용액 35 - 60 %로 조절하면서 펠렛을 얻었다. 약 45 % ammonium sulfate 포화용액에서 펠렛이 제일 많이 생겼다. 이를 원심분리기로 분리한 다음 45 mL의 Buffer I에 녹인 후 10리터의 Buffer I에서 48시간 두번 투석시켜 정제하였다.

열처리

투석시킨 효소용액을 45°C에서 자석교반기로 회전시키면서 dialyzate의 온도가 45°C 도달한 후 5분동안 처리한다. 이 때 열에 침전된 펠렛은 원심분리기로 침전시켜 버린다. 이 용액을 다음 컬럼 chromatography에 의한 분리 원액으로 사용하였다.

(2) Column chromatography에 의하여 *gshI*의 분리

DEAE-Trisacryl column chromatography

효소용액 100 mL을 Buffer I에 녹인 후 DEAE-Triacryl column (3.5 x 38 cm) chromatography에 의하여 순수분리를 시도하였다. 먼저 컬럼을 Buffer I 용액으로 씻은 다음 효소용액을 컬럼에 loading한 후 Buffer I 용액으로 KCl 농도 0.0 M에서 0.5 M까지 linear gradient를 걸어주면서 각각 분획을 모았다. 이 때 flow rate는 시간당 80 mL으로 흘러 주었다. 이 때 단백질의 양은 280 nm에서 흡광도를 측정함으로써 추적하였다. 동시에 효소활성도도 앞서 기술한 방법대로 각각의 분액 (fraction)별로 측정하였다. 여기서 활성도가 있는 분액은 다시 투석시켜 염을 제거한 다음 동결건조하여 농축하였다.

1차 Sephadex G-100 column chromatography

앞서 분리한 효소 파우더를 Buffer I에 녹인 다음 (20mL) Buffer I으

로 평형시켜진 Sephadex G-100 column (1.6 x 118 cm)에 loading하여 더욱 순수분리하였다. 이 때 eluent로는 Buffer I을 사용하였으며 흘려주는 속도는 10 mL/hr이었다. 효소활성도가 있는 분액을 모아 ultrafiltration 을 Amicon Centriprep-30을 사용하여 5 mL까지 농축하였다. (Nam, 1990)

2차 Sephadex G-100 column chromatography

농축한 5 mL 정도의 용액을 같은 Sephadex G-100컬럼에 다시 loading하여 초 순수 분리 하였다. 역시 Buffer I 용액을 6 mL/hr정도로 흘려 보내서 효소활성도를 나타내는 분액을 모아 dialysis처리로 염을 제거하였다.

Ion-exchange HPLC column

동결건조한 효소를 buffer I 용액에 녹여 ion exchange column (Protein wax, Vydac)을 이용하여 순수분리하였다. A용액으로는 buffer I을, B용액은 0.5M NaCl용액을 사용하였고 분리된 fraction을 모아 투석하여 염을 제거하고, 각각의 fraction의 효소활성을 측정하여 활성을 보이는 fraction 분획하였다.

Reverse phase HPLC column

Ion exchange HPLC column으로 분리한 fraction 중 활성을 보이는 fraction을 reverse phase column(Vydac C₄ column)을 이용하여 초순수분리를 시도하였다. A용액으로는 0.11% TFA in water를, B용액으로는 0.09% TFA(trifluoroacetic acid) in acetonitrile을 이용하여 분리하였으며 얻어진 fraction의 효소활성을 측정하고 동결건조하여 단백질의 구조등의 연구에 순수 효소로 사용하였다.

(3) SDS-PAGE electrophoresis로 단일 단백질 확인

먼저 효소 단백질 시료 용액에 SDS (sodium dodecyl sulfate) 2.5 % (Creighton, 1983)와 환원제인 2-mercaptoethanol 5 % 또는 DDT (dithiothreitol) 1 % 를 처리한 후 100°C에서 5분동안 열처리 한 후 필요에 따라 Bromophenol blue 0.01 % 처리한 후 원심분리하여 비수용성 물질을 제거 하였다. 전처리한 시료를 Phast Electrophoresis System (Pharmacia. Upsala,

Sweden)을 이용하여 SDS-PAGE electrophoresis를 통하여 분리순도를 측정하였다. 염색방법은 PhastGel을 이용하여 Coomassie staining을 이용하였다. 표준 단백질 (SDS marker protein)으로는 bovine serum albumin (MW 66,000), egg albumin (MW 45,000), carbonic anhydrase (MW 29,000), trypsin inhibitor (MW 20,100) 그리고 α -lactalbumin (MW 14,200)을 사용하였다. 최적 분리전개 조건은 표 1과 같았다. 그리고 표2와 같은 방법으로 Coomassie staining과 세척까지 수행하였다. (Phast System Catalog)

표 1. Optimized method for SDS-PAGE with PhastGel gradient 8-25 to program into the separation method file of PhastSystem.

SAMPLE	APPL	DOWN	AT	2.1	1	
Vh						
SAMPLE	APPL	UP	AT	2.1	10	
Vh						
SEP	2.1	250 V	10.0 mA	3.0 W	15°C	65 Vh
SEP	2.2	50 V	0.1 mA	0.5 W	15°C	0 Vh

표 2. Coomassie staining method for SDS-PAGE with PhastGel electrophoresis media to program into the development method file of PhastSystem.

Step number	Solution	IN-port	OUT-port	Time	Temperature
1	Stain	4	0	8 min	50°C
2	Wash/Destain	2	0(or 5)	5 min	50°C
3	Wash/Destain	2	0(or 5)	8 min	50°C
4	Wash/Destain	2	0(or 5)	10 min	50°C
5	Preserving solution	9	0	5 min	50°C

Where staining solution contains 0.1% PhastGel Blue R solution in 30% methanol and 10% acetic acids, destaining solution contains 30% methanol + 10% acetic acid in distilled water (3:1:6), while preserving solutions has 10 % glycerol + 10% acetic acid in distilled water (1:1:8)

라. *gsh1* 효소의 conformation 확인 및 열안정성 조사

(1) CD에 의하여 conformation 확인

분리한 단백질의 conformation을 확인하기 위하여 CD (circular dichroism

experiment) 분석은 Jasco 710 spectropolarimeter (Tokyo, Japan)를 사용하였다. 사용한 cell은 1 mm path length cell을 사용하였으며, 단백질은 표준 CD Buffer인 20 mM Na₂SO₄ 및 10 mM Na₂HPO₄ (pH 6.0)을 사용하였다. CD 스펙트럼등 모든 단백질용액을 포함한 CD 스펙트럼에서 buffer만의 CD spectrum을 뺀 것으로 항상 blank를 계상하여 나타냈다. 그리고 모든 CD 실험을 하기전에 시료를 Speed Vac (Ilshin, Korea)를 이용하여 degassing하였다. (Oas & Kim, 1988) 스펙트럼 측정에 사용한 파장은 250 nm에서 190 nm로 far UV range이다. 동시에 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 pH 별 UV spectrum의 변화도 조사하였다. CD 스펙트럼으로 2차구조 분석은 Yang (19)의 방법으로 분석하였다.

(2) *gshI* 효소의 열안정성 및 pH 안정성 연구

각각의 pH에 따라 CD spectrum을 조사하고자 강산의 HCl과 KOH로 pH를 조정하였으며 시료의 pH는 pH paper (Sigma Co.)로 측정하였다. 또한 단백질의 folding에 대하여 열안정성을 조사하기 위하여 10 mm path length cell을 이용하여 222 nm에서 온도별 ellipticity를 조사하였으며 아울러 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C에서 CD spectra도 조사하였다. 이 때 온도 조절은 Jasco PTC 343 Peltier temperature controller(Jasco, Japan)를 사용하였다.

제3절 연구개발결과

먼저 *E. coli*를 플라스크 log phase 이후까지 배양한 다음 원심분리후 Buffer I에 cell을 녹여 sonic dismembrator (medium tip, 60%) 깬 다음 원심분리하여 상징액으로 부터 *gshI* 효소를 ammonium sulfate 처리하여 fractionation한 다음 ultrafiltration하여 추출농축하였다. 이 *gshI*을 순수분리하기 위하여 DEAE-Trisacryl 컬럼과 Sephadex G-100 컬럼 chromatography를 통과하여 순수분리하였다. 순수한 분리를 위하여 DEAE-Trisacryl column을 이용하여 분리한 결과 6-7개의 peak (그림 1)로 분리되었고 이들 중 활성을 보인 peak만을 분획하여 다시 Sephadex G-100 칼럼으로 분리하였다. 그

결과 앞의 큰 peak와 뒤의 작은 peak로 분리되었고 각각의 효소활성을 측정한 결과 앞의 peak에서 상대적으로 높은 활성을 보였다. 그림 1은 DEAE-Triacryl column chromatography로 분리하였을 때 각각의 fraction 별로 A₂₈₀의 흡광도와 *gshI*의 활성도를 나타냈다. Nam (1990)의 논문과 큰 차이는 나타나지 않았으나 효소활성도가 상대적으로 낮았다. 이를 더욱 순수분리하기 위하여 효소활성도를 나타내는 이들 fraction을 농축한 다음 Sephadex G-100 컬럼으로 분리한 결과 (그림 2) 단일 피크로 나타났지만 역시 *gshI* 효소활성도는 그리 증가되지 못했다. 본실험에서 효소활성도를 유지시키는 것이 상당히 쉽지 않은 것으로 판단된다. 아무튼 Nam (1990)의 논문에 나타나는 바와 같이 정확한 specific activity와 purification fold 등도 다시 실험할 필요가 있을 것으로 본다. 앞으로는 처음 부터 재검토하여 정확한 실험이 필요할 것으로 본다. 이와 같이 컬럼크로마토그래피에 의하여 순수 분리한 후 disulfide 결합을 먼저 환원시킨 다음 PhastGel system 의 SDS-electrophoresis로 분석하여 *gshI*의 순수도를 단일 피크임을 확인하였으며, 분자량도 58,000 dalton 정도로 추정하였다. 이는 Nam (1990)과 Watanabe et al (1986)의 결과 보고된 60,000 dalton과 거의 일치하는 것으로 본다.

좀더 순수한 분리를 위하여 DEAE-Trisacyl column에서와 Sephadex G-100 칼럼에서의 fraction을 모아 동결건조한 후 ion exchange HPLC column (Protein wax, Vydac)을 이용하여 순수분리를 시도하였다(그림 3). 그 결과 1개의 peak로 분리되고 반응활성도도 높아 이 fraction이 단일 물질일 가능성이 높다고 생각되었으나 SDS-PAGE를 통한 결과 단일 물질로 확인되지 않았다. 따라서 reverse phase HPLC column(Vydac C₄ column)을 이용하여 초순수분리를 시도한 결과 앞에서 분리된 1개의 fraction은 적어도 2개 이상의 peak를 나타냈다(그림 4). 그러나 이들 분해된 각각의 peak를 받아서 효소활성도를 측정한 결과 거의 효소활성을 나타내지 않았다. 이는 유기용매에 의하여 단백질이 unfolding 되기 때문에 당연히 효소활성도는 나타나지 않은 것으로 본다. 그러나 ion exchange HPLC column으로 분리된 fraction을 유기용매를 제거한 후 동결건조하여 refolding 등 단백질의 구조등의 연구에 순수효소로 사용하였다.

이와같은 방법으로 순수분리한 wild type의 *gshI* 효소와 mutant type의 *gshI* 효소는 효소의 활성도의 차이 뿐만아니라 효소활성도의 차이에 따른 단백질의 구조에 있어서의 차이도 분명히 있을 것이 분명하므로 wild type과 mutant type의 구조 특히 folding구조와 구조 안정성을 아는 것은 매우 중요

하다. 따라서 본 연구에서는 먼저 순수분리한 wild type의 *gsh1*에 대하여 먼저 UV 스펙트럼 (Freifelder, 1982)을 조사함으로써 pH에 따라 단백질의 3차 구조 변형가능성을 조사하였다. (data not shown). 다만 기대했던 280 nm에서의 UV 흡광도는 크게 변하지 않고 210 nm에서의 흡광도가 pH에 따라 크게 차이가 남을 알 수 있었다. 이는 tryptophane이라든지 phenylalanine이 unfolding 되더라도 밖으로 나오는 양이 적거나 전체적으로 tryptophane, phenylalanine, tyrosine의 양이 적을 경우 나타나는 현상이나 아무튼 단백질의 특성을 보여주고 있다. 그러나 이 UV spectrum으로는 정확한 구조적인 특성을 말해주지 못하고 있다. 따라서 spectropolarimeter를 이용하여 CD (circular dichroism) 스펙트럼을 분석하였다. (Brahms & Brahms, 1982) CD에 의하여 구조를 분석한 결과 204 nm 및 220 nm에서 최소값을 갖고 있는 것으로 보아 안정된 α -helix를 갖고 있으며 이는 BSA (bovine serum albumin)와 같은 α -helix 전형적인 단백질의 2차구조 특성을 나타내고 있으며 안정된 구조를 나타내고 있었다.(그림 5) 다만 정확한 농도를 알 수 없기 때문에 mean residue ellipticity를 표시하지 못하고 observed ellipticity로 나타냈으며, 아울러 *gsh1*의 정확한 CD spectrum을 갖고 있지 못하기 때문에 정확한 2차구조 즉 α -helix, β -sheet 및 random coil의 양의 분석은 할 수 없었다. (Sreerama & Woody, 1993) 따라서 분리한 *gsh1*를 CD 분석할 때 정확한 농도를 구하기 위하여 *gsh1*을 완전히 unfolding시킨 다음 free tryptophane molar extinction coefficient (tyrosine과 phenylalanine과의 중복을 피하기 위하여 300 nm에서 흡광도가 유리)과 unfolding된 것의 molecular absorbancy를 비교한 정확한 spectrum 분석 (tryptophane이 *gsh1*에는 2개가 있음)을 통하여 농도를 구하여야 한다.(Edeloch, 1967)

그림 5는 *gsh1*의 wild type과 mutant type의 *gsh1* (A494V, S495F)에 대하여 folding 구조를 보여주고 있다. 494 아미노산의 alanine을 valine으로 교체할 때 정말 dramatic하게도 구조의 안정성을 보여주고 있으며, 아울러 이렇게 교체할 때 효소활성도는 가장 높게 나타났다(고려대 결과와 표8 참조). 동시에 *E. coli*에서도 가장 낮은 *gsh1* activity를 나타내는 S495F은 분리 전 효소활성이 매우 낮게 나타났고 구조안정성에서도 매우 낮은 안정성을 보여주고 있다(그림 5). 이 결과는 단백질의 구조안정도가 효소활성과의 직접적인 관련이 있다고 최초의 직접적인 증거가 된다.

이 *gsh1* 단백질은 pH나 열에는 비교적 약하여 분명한 구조 안정성의 차이와 구조가 pH와 온도에 따라 변화함을 보여주고 있었다.(그림 7과 그림 9)

그림 7에서 보는 바와 같이 pH 6정도에서 가장 많은 folding 구조를 나타내고 있다. 즉 중성에서 약간 산 쪽에서 최대 folding conformation을 갖고 있다. 낮은 산쪽에서는 비교적 folding 구조를 많이 갖고 있어서 pH 3에서는 거의 약한 folding 구조를 갖고 있으며 마찬가지로 알칼리 쪽으로 갈 수록 folding 구조가 훨씬 불안정하여 pH 11정도에서는 적은 folding 구조를 갖고 있다. 보통의 단백질의 경우 folding구조와 unfolding구조간에 CD가 가장 차이가 많이 나는 파장 220 nm (Creighton, 1983; Kwon, 1994)에서의 θ (observed ellipticity)를 각각의 pH에 따라 그림 7에 나타냈다. 이 결과는 Nam (1990)의 결과와 약간 차이가 난다. pH에 따른 효소활성도 변화는 pH 8.0 에서 최대를 나타내고 산쪽이나 알칼리쪽에서 같은 정도로 효소활성도가 줄어든다. 그러나 CD 스펙트럼에서는 pH 6.0 또는 pH 7.0 (pH에서는 정확한 pH를 맞출 수 없어서 측정하지 못하였슴)에서 최대 folding 구조를 나타내고 있다. 아무튼 이와같이 구조변화와 활성도 변화 연구를 따로 따로 연구할 것이 아니라 이에 대한 정확한 연구, 즉 *gsh1* 의 효소활성도 변화와 구조 변화가 병행되어야 할 것으로 본다.

단백질공학적으로 site directed point mutation 시켜서 만든 glutathionine synthetase 1효소 (*gsh1*)의 wild type과 mutant type(A494V와 S495F)의 pH에 대한 안정성과 효소활성도를 비교한 결과 활성도가 높은 mutant(A494V)는 pH에 대하여 훨씬 안정된 구조를 보이고 있다. 또한 활성도가 wild type보다 현저히 작은 mutant(S495F)는 상대적으로 불안정한 구조를 형성하고 있다.

아울러 wild type에 대하여 온도에 따라 folding 구조의 변화를 조사하였다 (그림 6과 그림8). 그림 6에서는 각각의 온도에서 far UV 영역에서 CD 스펙트럼을 나타낸 것이며, 그림 8-9은 CD 스펙트럼 중에서 온도와 pH에 따라 가장 차이가 많이 나는 222 nm에서 온도에 따른 θ (ellipticity) 변화를 나타낸 것이다. 그림 6에서 본 바와 같이 온도에 따라 folding 단백질 구조가 변하고 있다. 특히 온도가 40°C까지는 거의 unfolding되지 않고 있다가 온도가 50°C에서 unfolding되기 시작하여 60°C에서 급격하게 unfolding 되는 것을 볼 수 있다. 그러나 folding %는 아직도 상당량 유지되는 것으로 본다. Random coil을 기준으로 볼 때 약 60% 이상 folding 구조를 유지하는 것으로 보인다. (효소 구조가 60°C 에서 어느정도 folding 구조를 유지하는지 알아볼려면 8 M의 urea나 6M의 guanidine hydrochloride 를 처리하여 CD 스펙트럼을 측정하여야 하나, 단백질 양이 충분치 못하여 측정하지 못하고 대략적으로 추정한다.

folding 양임) 심지어 80 °C에서도 상당량의 folding 구조를 형성하고 있다. 이러한 결과는 Nam (1990)의 결과와 거의 일치한다고 볼 수 있다. 그의 결과에 따르면 효소활성도는 45 °C까지 거의 유지되다가 50°C에서 급격히 효소활성도가 떨어짐을 볼 수 있다. 온도가 60°C가 되면 효소활성도는 거의 나타나지 않았다. 다만 구조 변화 그림에서는 transition은 효소활성도 결과와 비슷하여 거의 40°C이나 온도가 올라갈 수록 unfolding되나 60°C에서 완전히 unfolding되는 것이 아니라 60% 이상 유지하고 있다. 그러나 효소활성도는 구조변화에 민감하여 조금만 unfolding 되어도 효소활성도는 거의 유지되지 않는 것으로 본다. 이러한 경우의 효소와 기질과 결합할 때나 촉매작용이 효소의 구조와 매우 민감함을 고려할 때 충분히 가능한 이야기이다. *gsh1* 효소의 온도에 의한 구조안정성과 효소활성도의 비교

Wild type과 mutant type(A494V와 S495F)의 온도에 대한 안정성과 효소활성도를 비교한 결과도 역시 활성도가 높은 mutant (A494V)는 높은 온도(약 80°C)에서도 많은 folding 구조를 형성하고 있으며 동시에 안정된 구조를 보이고 있으나 mutant (S495F) *gsh1*은 거의 folding 구조를 형성하고 있지 않으며 매우 불안정한 구조를 형성하고 있으며 온도에 따른 영향이 크지않고 거의 불안정한 상태였다. Wild type는 중간정도의 구조 안정성을 보여주고 있다. 이 효소의 melting curve를 그림 8-9에 나타냈다. 그림 8의 결과에서 보다시피 40°C에서 최초로 unfolding transition이 약간 일어나나 70°C에서 본격적으로 일어나서 역시 80°C에서 거의 unfolding transition이 완료되는 것을 보여주고 있다.

아울러 이 곡선의 1차미분 (Kwon and Kim, 1994) 을 통하여 T_m 을 구하여도 75°C정도에서 나타났다. 이상과 같은 결과를 종합하여 볼 때 *gsh1* 단백질은 구조는 상당히 안정하나, 구조변화에 효소활성도는 매우 민감함을 알 수 있다. 그러나 이 부분도 좀 더 자세한 연구가 필요할 것으로 본다.

이러한 결과에 따라 효소의 어느 부분을 mutation 시켰을 때 나타나는 효소반응 kinetics의 변화와 folding 구조 변화를 추적하면 중요한 정보를 얻을 수 있으며 단백질의 folding structure와 *gsh1*효소의 활성도와와의 관계도 규명이 가능할 것으로 본다. 또한 새로운 mutant type 효소의 개발및 생산하는 데 방향을 제시할 것으로 보아 보다 강력한 새로운 *gsh1* mutant를 생산할 수 있을 것으로 본다.

이번에는 A494V의 연구결과를 토대로 494아미노산의 alanine대신 side chain길이가 다른 다른 aliphatic acid즉 leucine, threonine으로 치환한 mutant

enzyme에 대하여 구조 안정성과 반응 활성도를 측정하였다. 먼저 A494T과 A494V의 *E. coli*에서 반응활성도를 측정하였는데 A494T는 A494L와 같은 activity를 나타내고 있었지만 A494L은 *E.coli*에서부터 전혀 반응활성도를 나타내지 않았다. 이 이유에 대하여는 아무런 정보도 얻지 못하였지만 site directed mutagenesis시킨후 발현과정에서 문제가 있는 것으로 사료된다. 따라서 분리과정중 A494L의 경우는 활성도를 추적할 수 없었다.

그림 9.는 A494T의 pH와 온도에 따른 구조 안정성을 나타냈다. 먼저 분리된 A494T는 A494V과 같은 CD pattern을 보여주고 비슷한 효소활성도도 나타냈다.

온도에 대한 영향은 A494V은 60°C까지는 거의 변하지 않다가 80°C에서 갑자기 unfolding되었지만 A494T는 40°C에서부터 아주 서서히 unfolding되면서 100°C로 올라가도 계속해서 unfolding되는 것으로 보인다. T_m 은 A494V와 같이 약 75°C정도로 추정된다.

그림 9의 결과는 전반적으로 folding구조는 A494T이 A494V보다 folding 안정성은 약간 떨어지는 것으로 보인다. 동시에 그림 9는 A494T의 pH안정성을 보여주고 있다. A494V과 비슷한 형상을 보여주고 있지만 pH 7.0(최적 pH)근방에서 구조가 매우 갑자기 변함을 보여주고 있다. 그러나 최적 안정 pH는 7임을 보여주고 있다.

그림 10은 반응활성도를 측정할 수 없지만 A494L로 추정되는 fraction의 pH에 대한 구조안정성은 A494T와 비교하였다. 그 결과 A494L는 전혀 folding구조를 보여주고 있지 못하며 pH에 대한 영향도 전혀 받지 않는 것으로 보아 *E. coli*발현단계에서 문제가 있다는 것을 다시 한번 보여주고 있다.

따라서 A494V과 A494T을 wild type과 S495F와 반응동력학 상수(reaction Kinetic Constants, K_m 및 K_{cat})을 구하기 위하여 Michaelis-Menten곡선과 이를 근거로 double-reciprocal plot인 Lineweaver-Burk plot은 각각의 기질인 cystein과 glutamine에 대하여 그려보았다.(그림11, 12 for A494L 및 그림 13, 14 for A494T). Michaelis-Menten 곡선은 전형적인 모습을 보여주고 있다. 이들 곡선을 통하여 작성한 반응동력학 상수는 표 3에 나타냈다. *gshI* 효소의 wild type과 mutant type의 반응 kinetics의 비교한 결과는 다음과 같다. Gel filtration과 ion exchange chromatography로 정제한 세종류의 효소를 (wild type과 mutant type(A494V와 S495F))를 각각 반응상수(K_m 과 V_{max})를 구하여 구조와의 관계를 검토한 결과 (표 3), 대체적으로 V_{max} 보다 K_m 값이 변

화가 있는 것으로 보아 494 Alanine과 495 Serine은 catalytic site와 직접관련이 없는 것으로 볼 수 있고, 오히려 binding site에 영향을 주어 binding affinity에 영향을 미침을 알 수 있다. 또한 initial velocity에 대한 영향을 표 3과 같이 크지 않음에도 불구하고 앞서 pH 또는 온도에 따른 효소활성도차이가 큰 것은 catalytic site와 binding site에 직접적으로 구조가 영향을 미치기 보다는 전체적인 구조의 안정성의 차이에 따라 나타나는 현상이라고 볼 수 있다. 실제로 A495V는 상당한 시간(7-10분)까지 initial velocity의 linearity를 유지하고 있는 반면에 S495F는 같은 농도의 기질에서도 곧바로(1분 2분이내) linearity가 상실됨을 보여주고 있다.

표 3에서 보여준바와 같이 A494V와 A494T는 wild type에 비하여 V_{max} 값 (K_{cat})은 크게 증가하지 않았지만 K_m 즉 기질과의 반응 affinity는 크게 증가시켜주고 있음을 보여주고 있다.

본 연구의 결과는 point mutation에 의한 아미노산 교체가 단백질의 안정화를 불러왔고 안정된 folding구조는 *gsh1*의 효소가 기질을 끌어들이는 affinity를 증가시켜주는 결과를 초래하였다고 볼 수 있다. 특히 A494V는 A494T에 비하여 K_m 이 더욱 감소되어 이를 뒷받침해주고 있다.

본 연구의 결과는 단백질의 구조안정이 바로 반응활성도 즉 affinity에 직접적으로 영향을 미친다는 것으로써 매우 의미있는 결과라고 볼 수 있다.

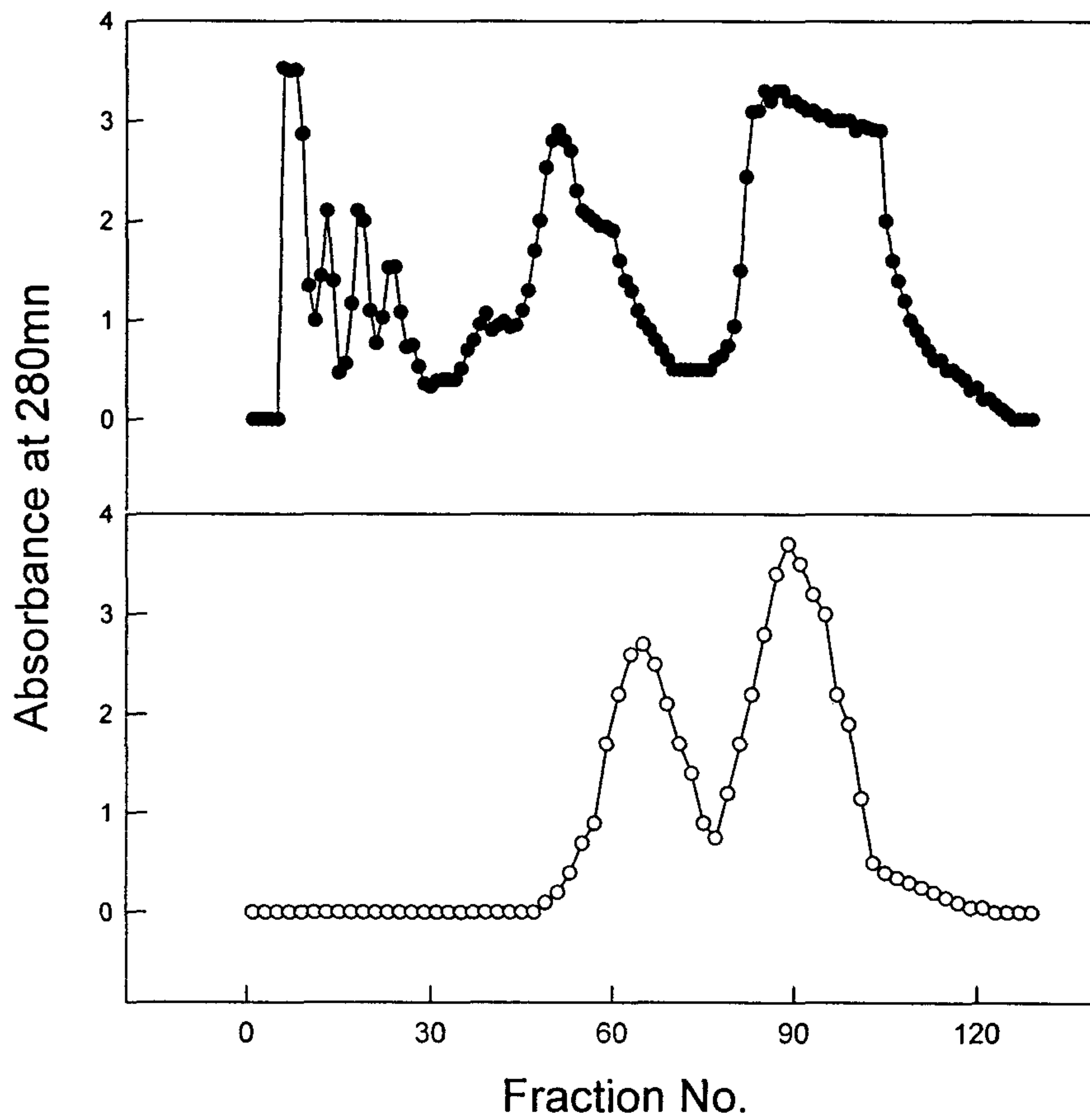


Fig. 1. Ion-exchange column chromatogram of mutant gshI
with DEAE-Trisacryl (● : A494T, ○ : A494L)

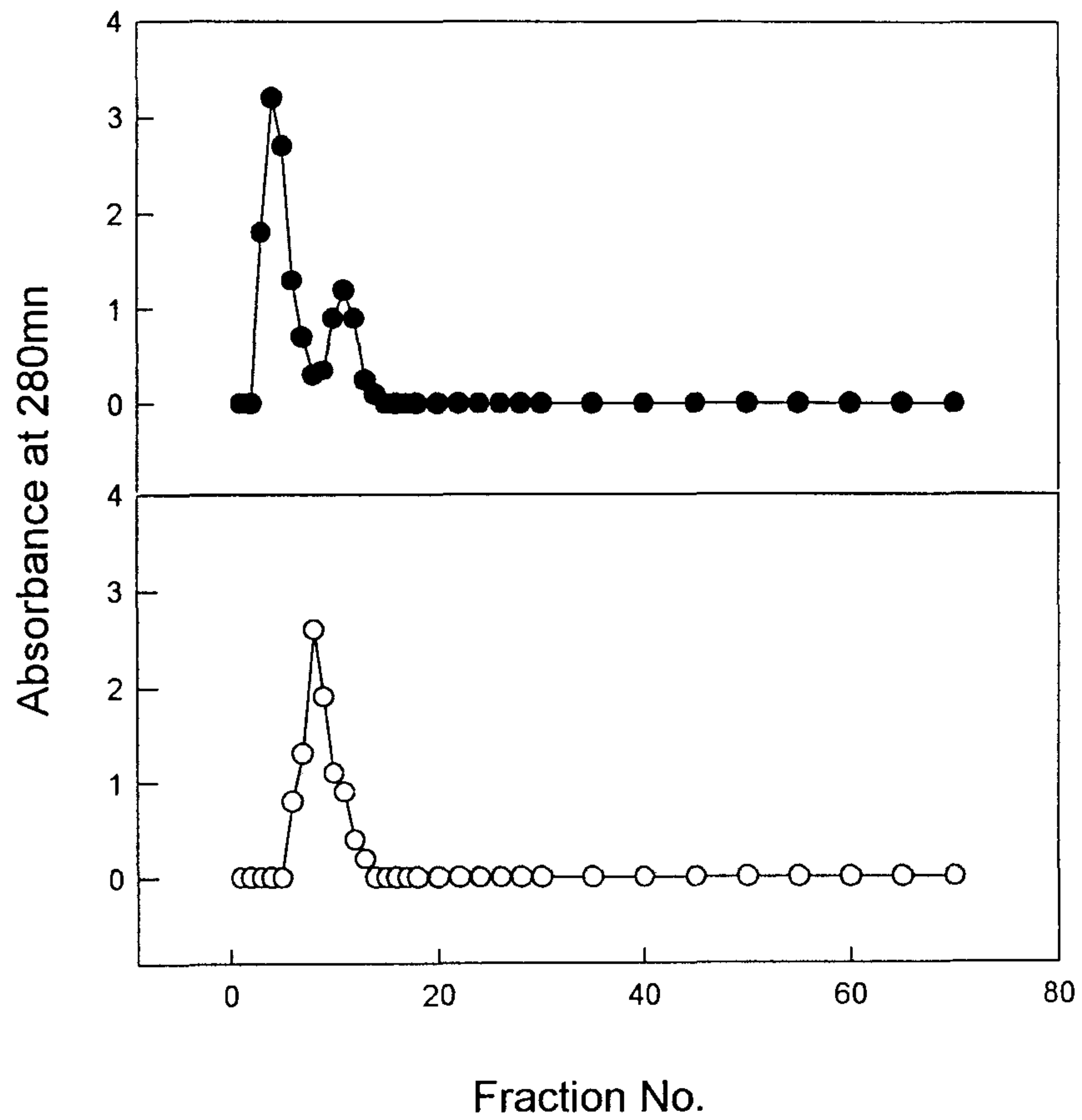


Fig. 2. Gel filtration of mutant gsh1 with sephadex G-100

(● ; A494T, ○ ; A494L).

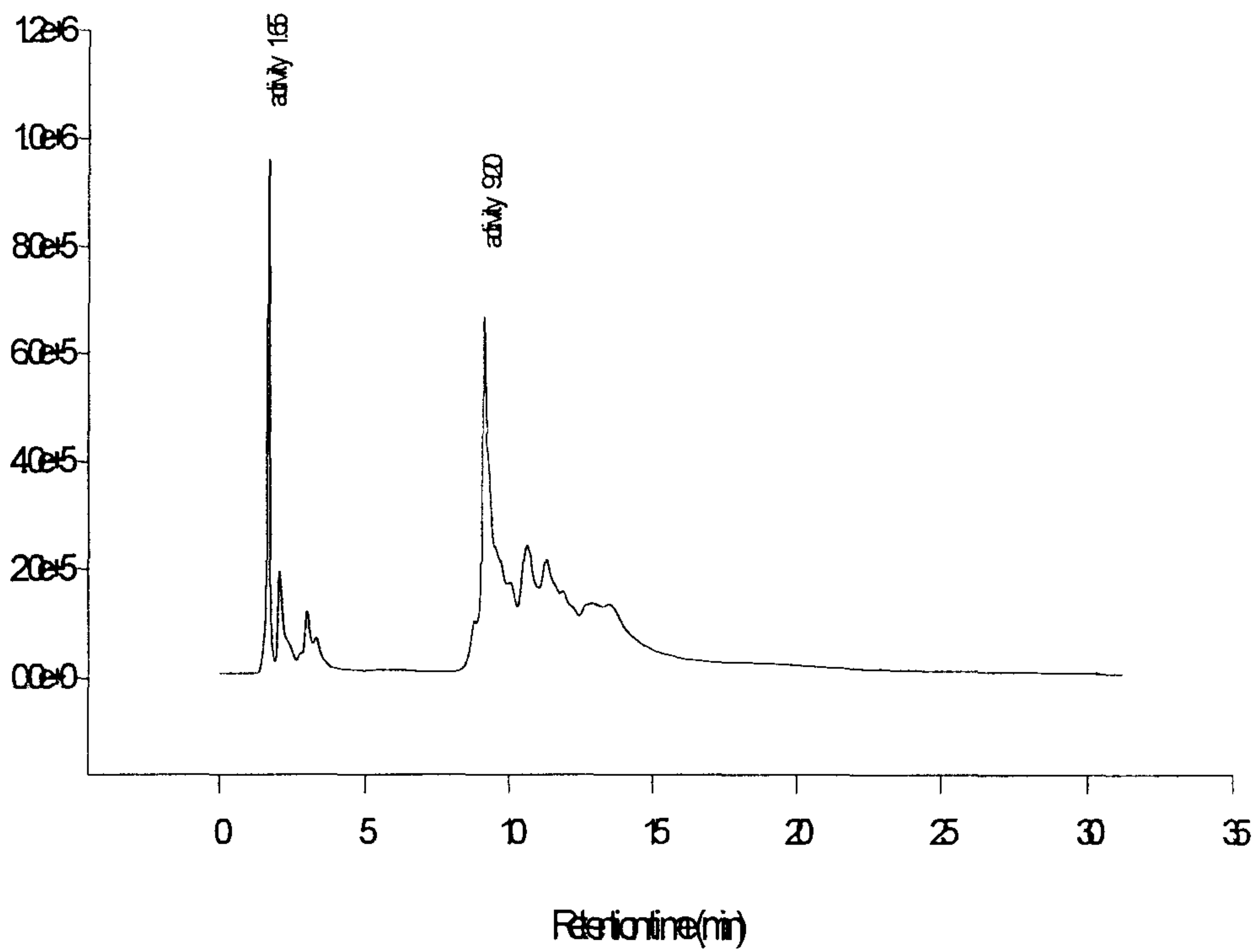


Fig. 3. HPLC purification of A494T mutant gsh1 which was purified with ion-exchange HPLC column (Protein wax, Vydac).

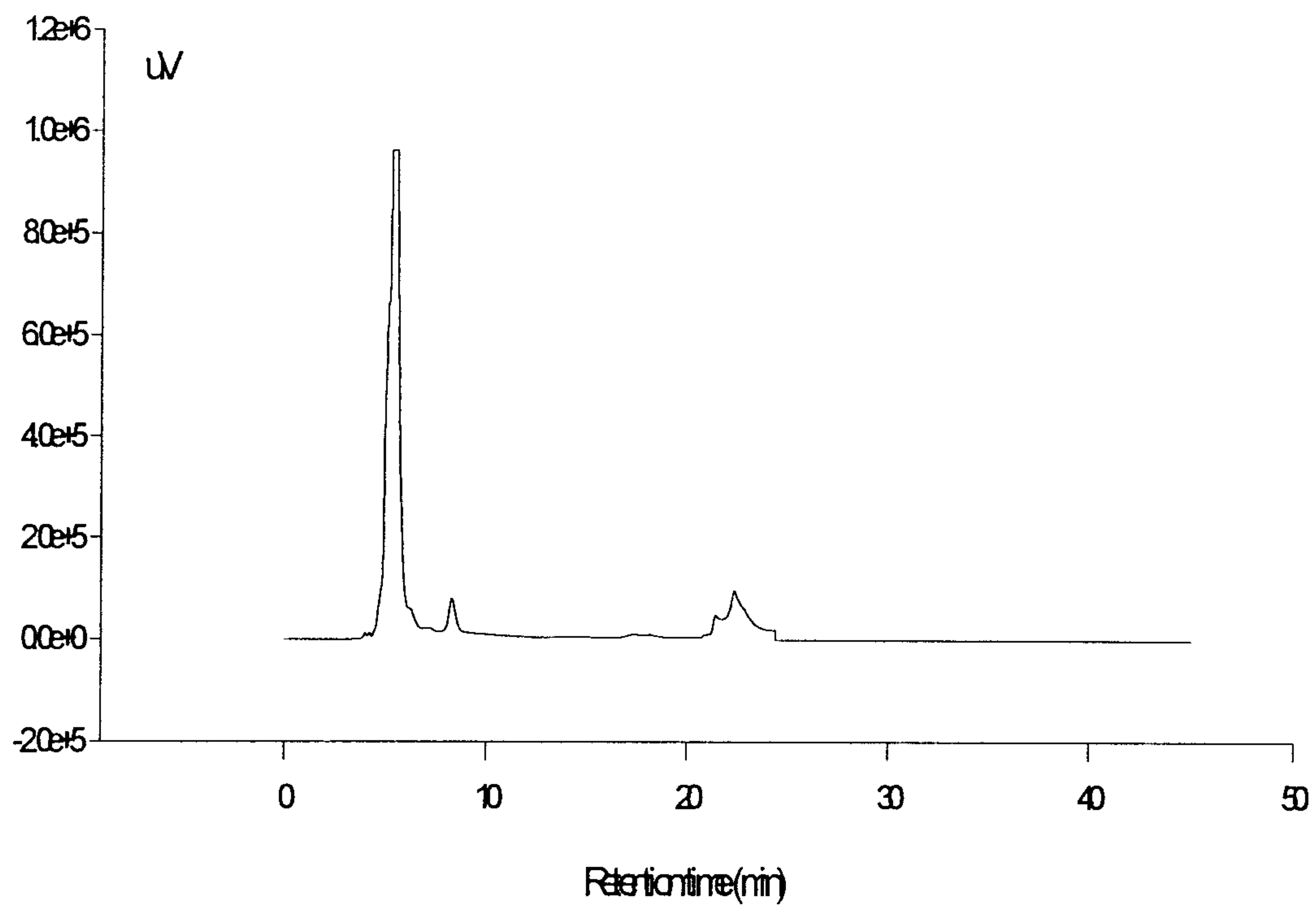


Fig. 4. HPLC purification of A494T mutant gsh1 which was purified with reverse phase column (Vydac C₄ column).

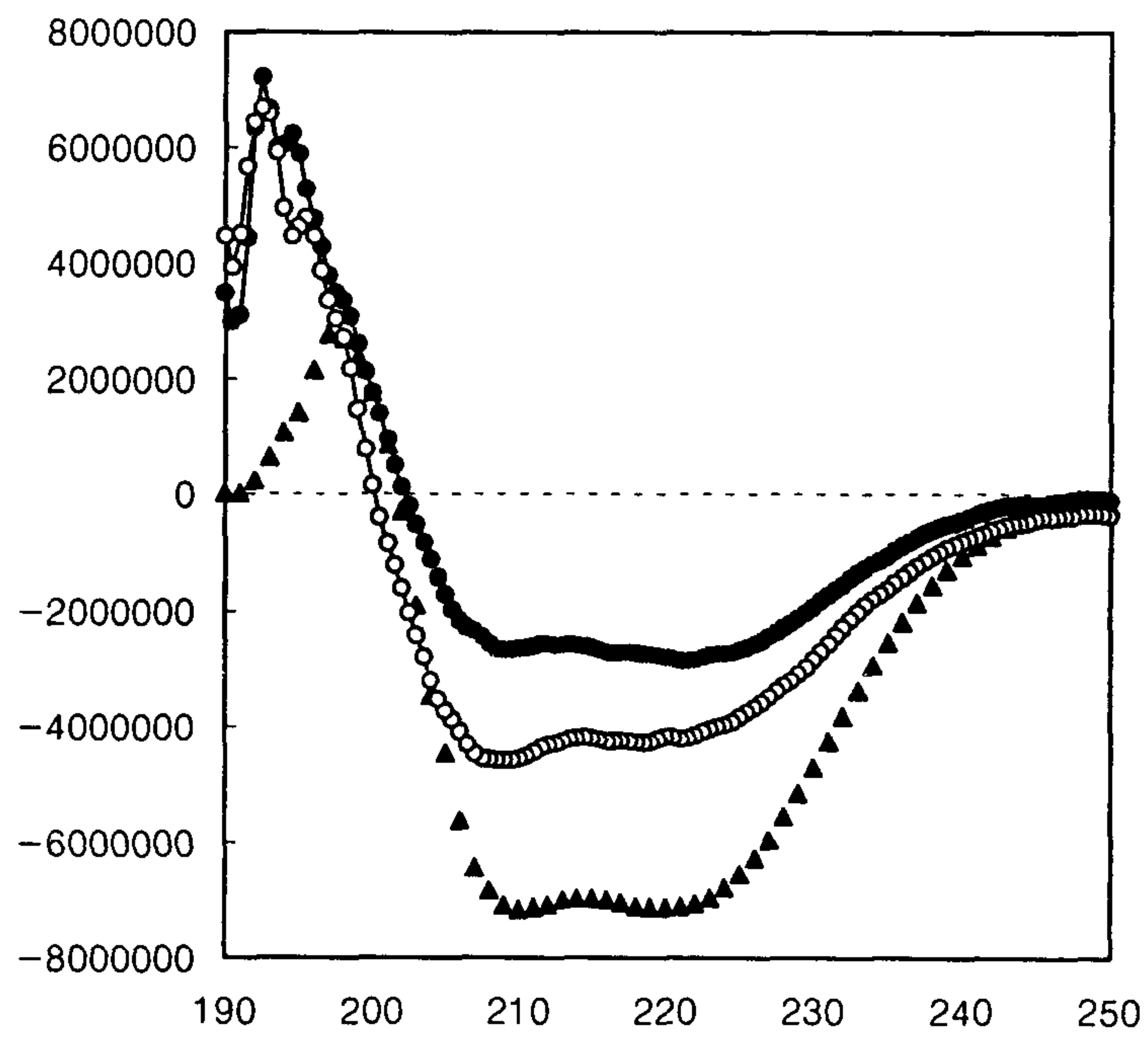


Fig. 5. Circular dichroism spectrum of mutant gsh1 was purified with ion-exchange HPLC column.

●; A494V, ○; Wild type, ▲; S495F

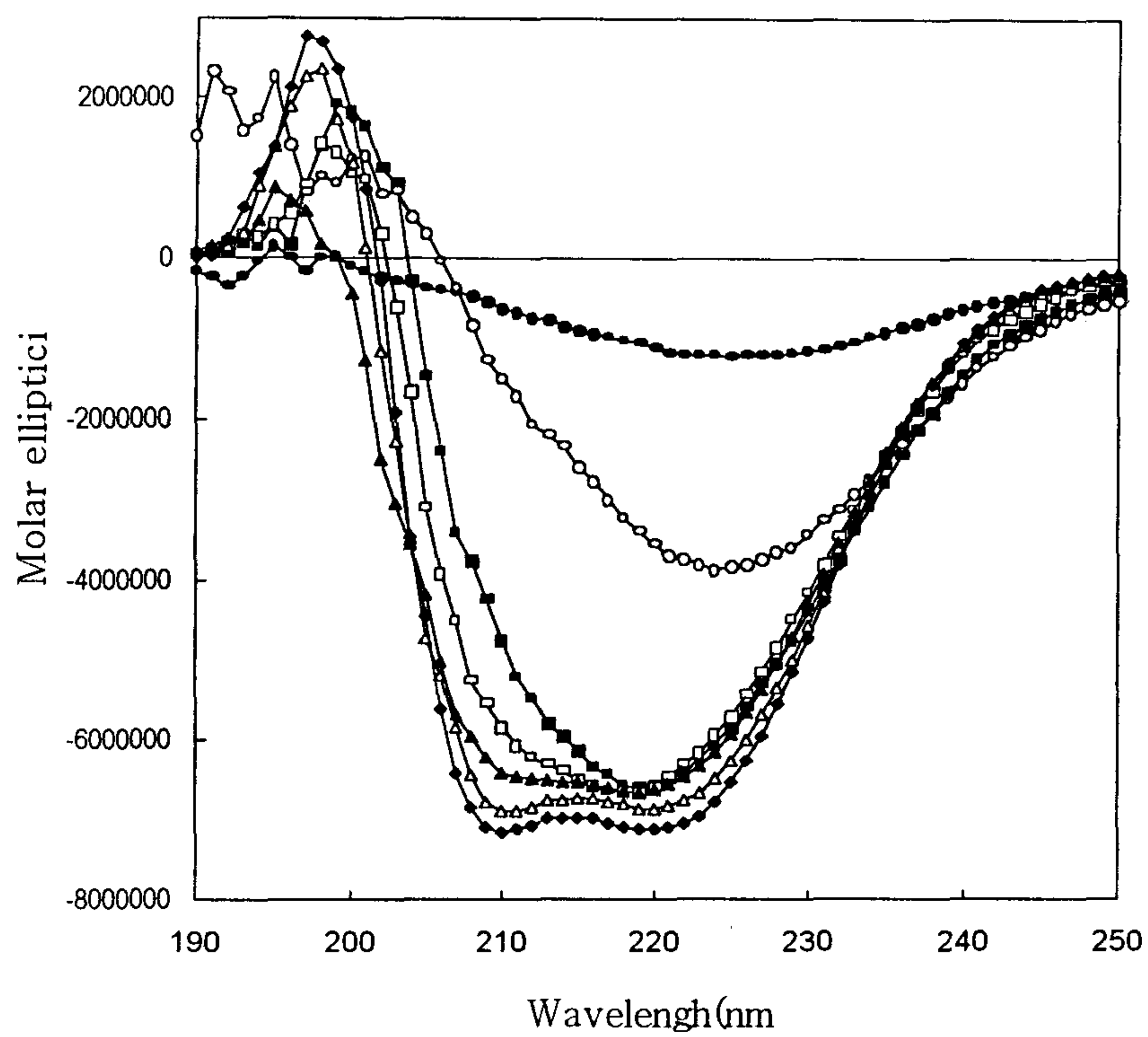


Fig. 6. Change of circular dichroism spectrum of gsh1 on various temperature.

◆; 4°C, △; 10°C, ▲; 30°C, □; 40°C, ■; 50°C, ○; 70°C, ●; 80°C

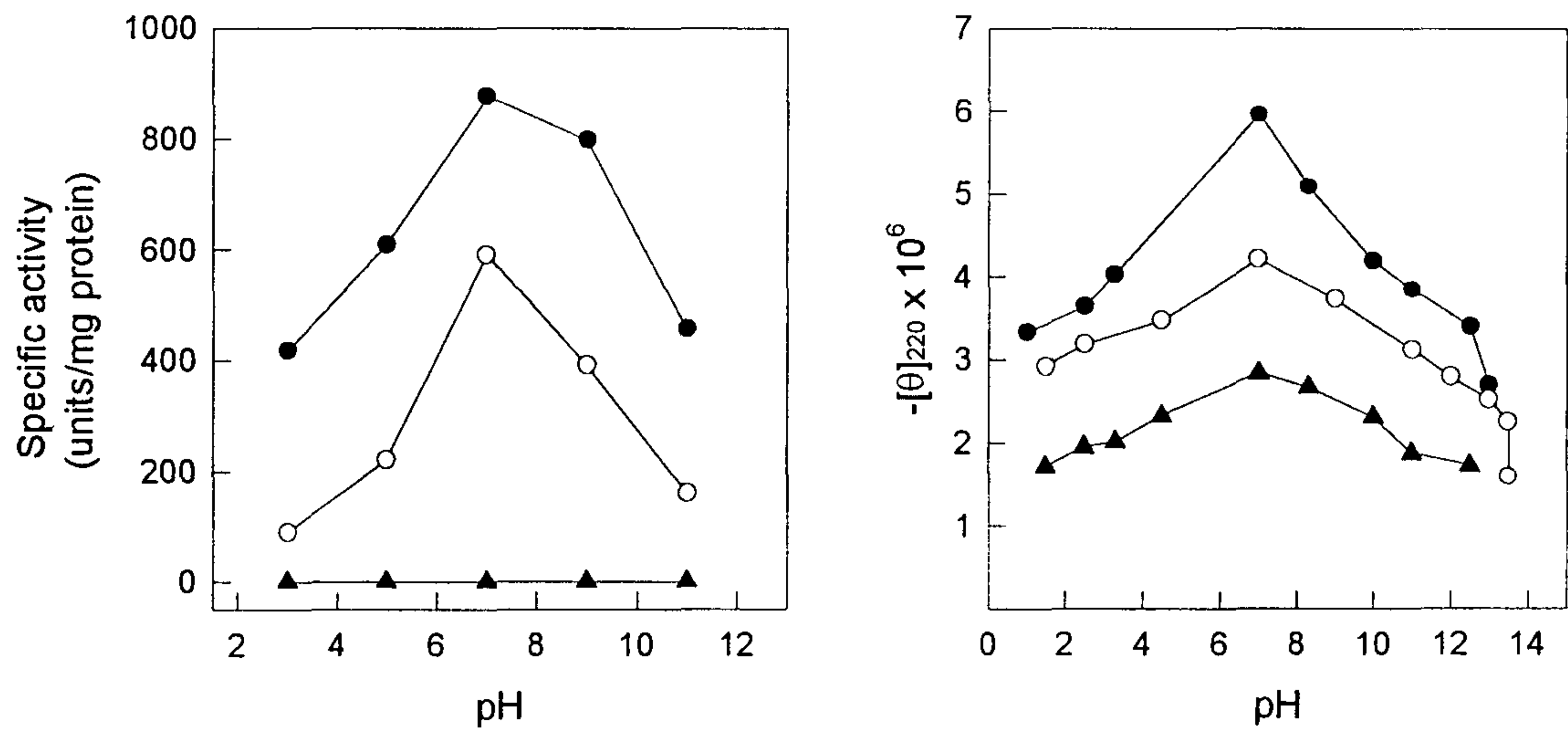


Fig. 7. Effect of pH on the enzyme activity and conformational structure of gsh1. ●; A494V, ○; Wild type, ▲; S495F

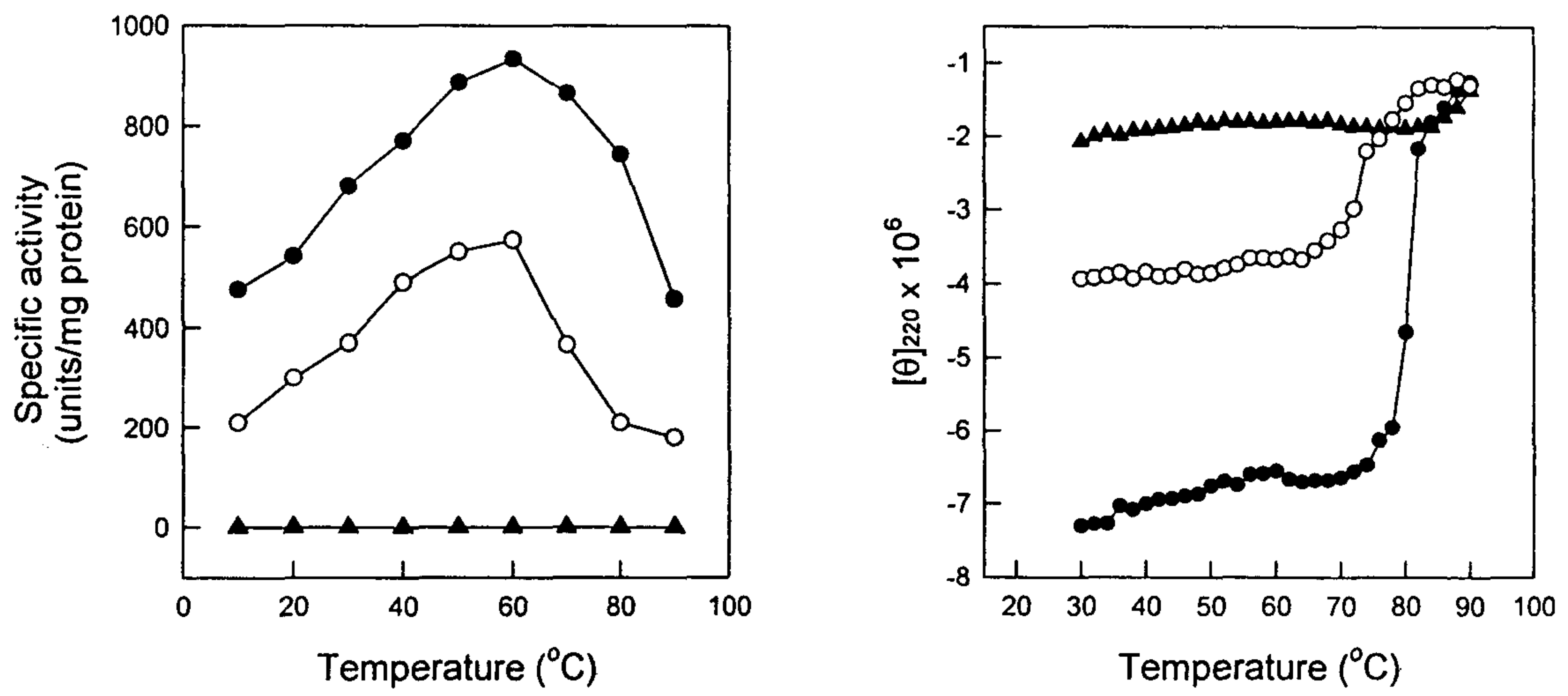


Fig. 8. Effect of temperature on the enzyme activity and conformational structure of gsh1.

●: A494V, ○: Wild type, ▲: S495F

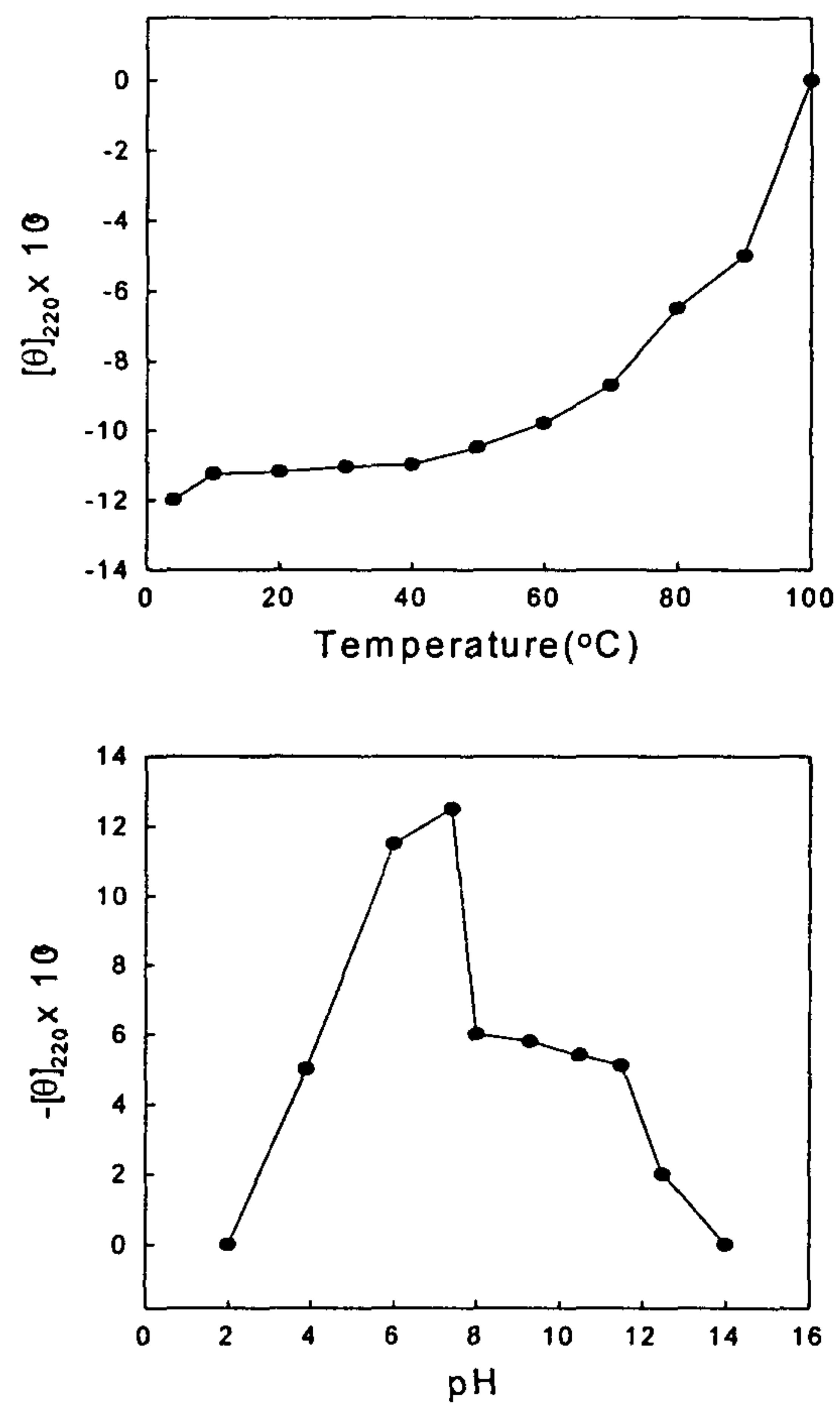


Fig. 9. Effect of temperature and pH on the conformational structure of A494T mutant gsh1.

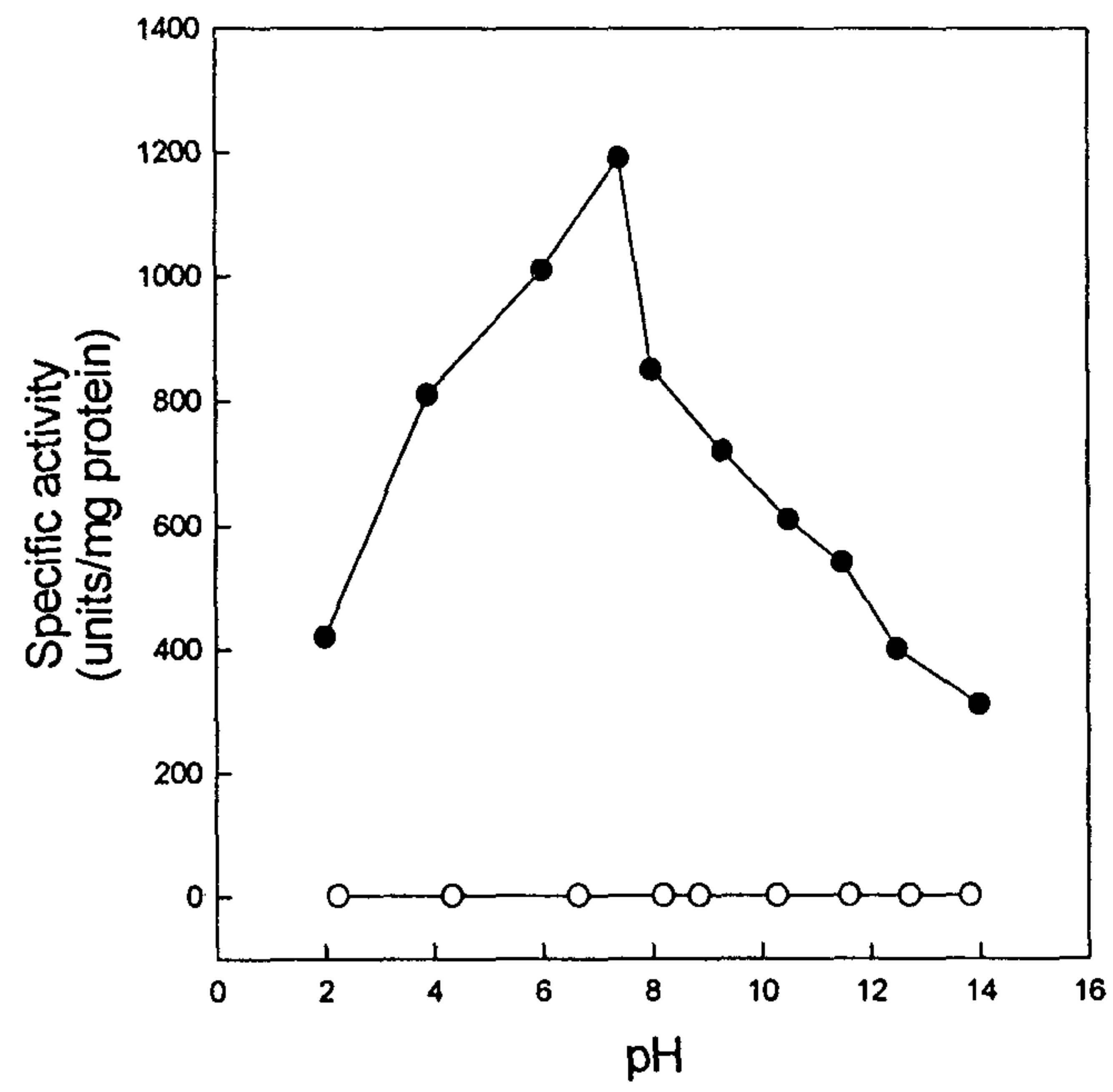


Fig. 10. Effect of pH on the enzyme activity of mutant gsh1

● ; A494T, ○ ; A494L

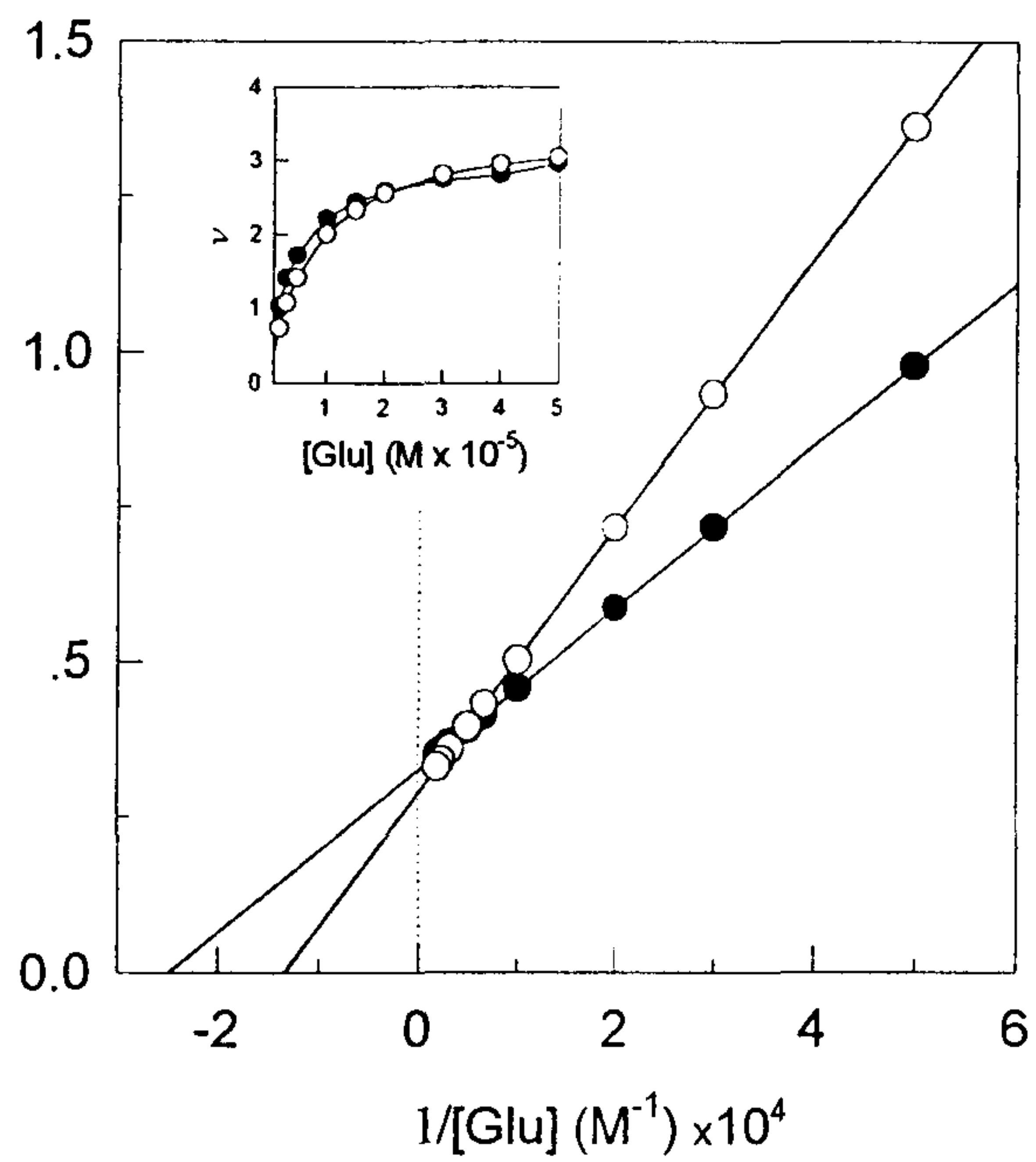


Fig. 11. The Lineweaver-Burk plot *gsh1* in terms of different L-glutamate at $40 \mu\text{mol}$ L-cysteine. (The-Henri-Michaelis-Menten curve was shown inside the plot)

●; A494V, ○; Wild type

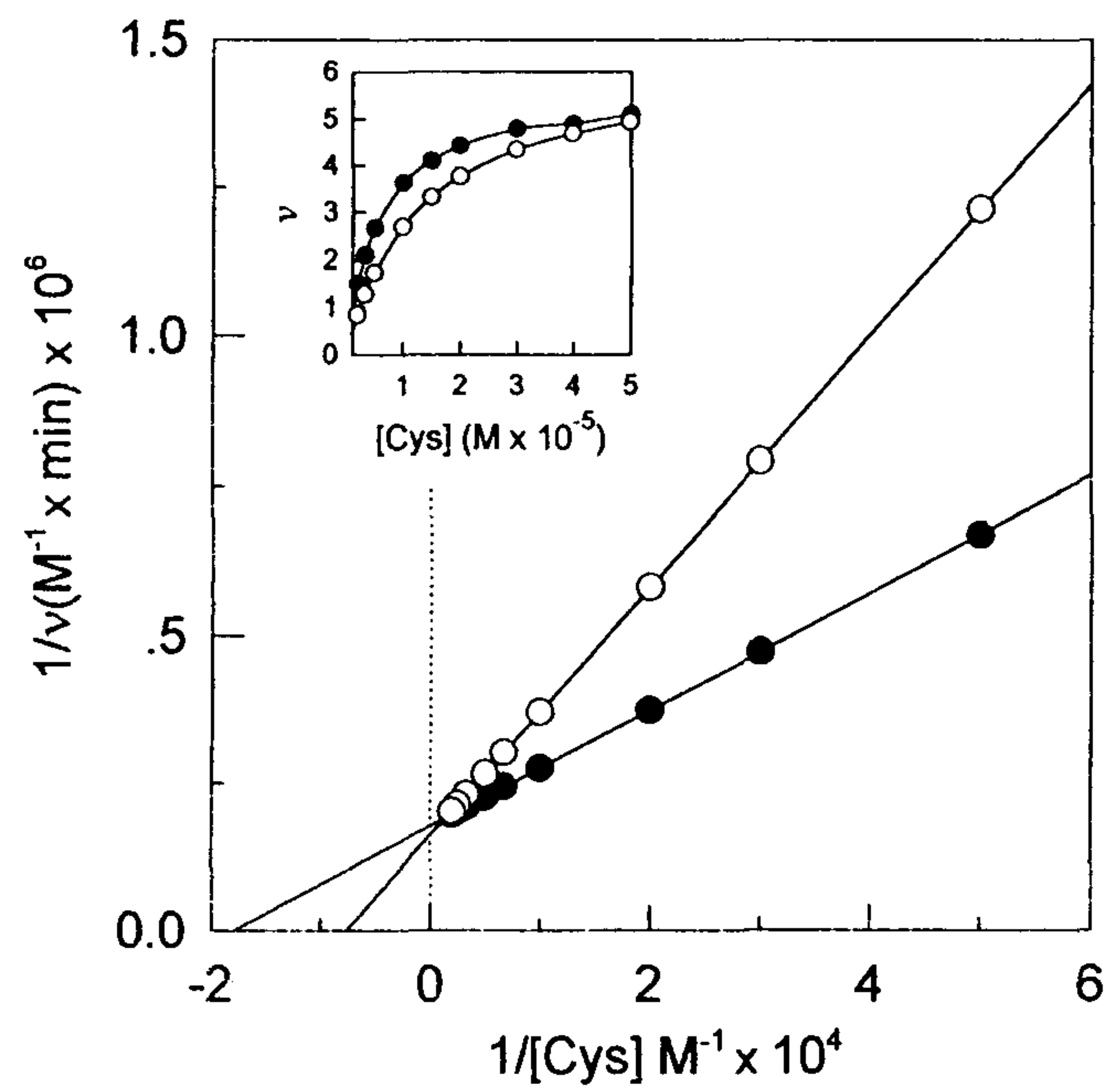


Fig. 12. The Lineweaver-Burk plot gsh1 in terms of different L-cysteine at 40 μ mol L-glutamate.

●: A494V, ○: Wild type

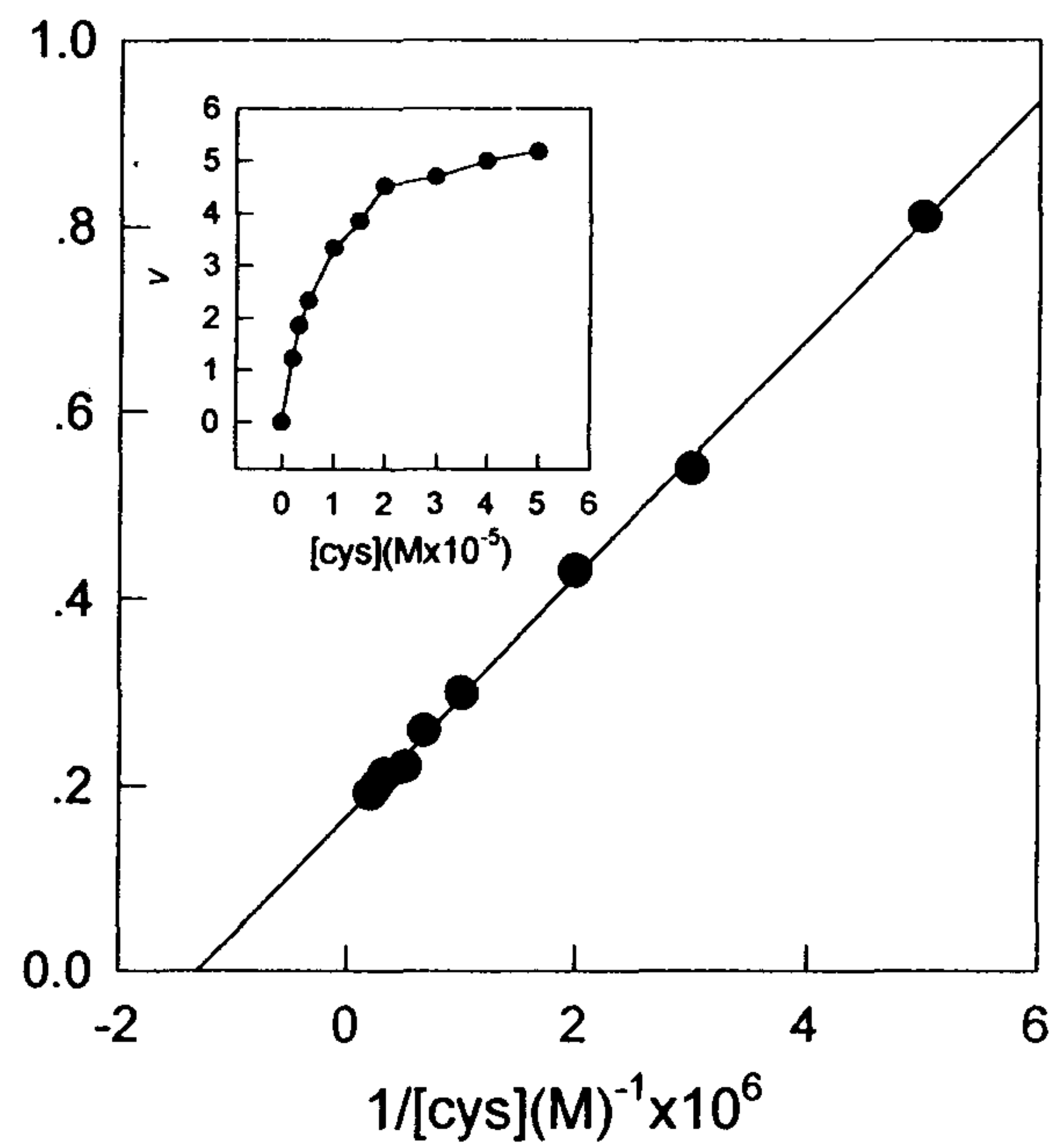


Fig. 13. The Lineweaver-Burk plot A494T gsh1 in terms of different L-cysteine at $40 \mu\text{mol}$ L-glutamate.

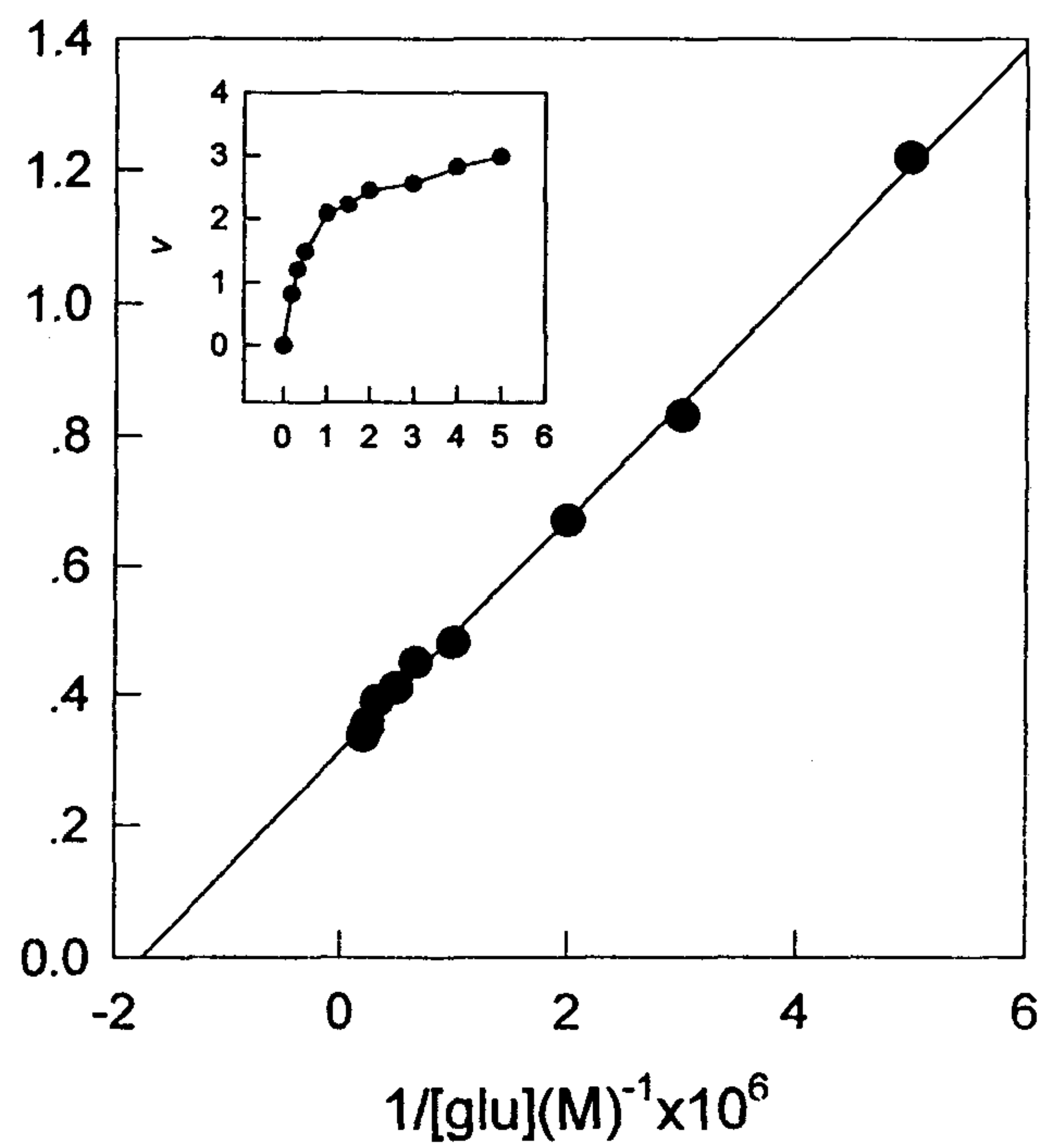


Fig. 14. The Lineweaver-Burk plot A494T gsh1 in terms of different L-glutamate at $40 \mu\text{mol}$ L-cysteine.

Table 3. Comparison of conformational structure and biological function of wild type and mutant gsh1(A494V, A494T and S495F)

Strains	Conformational structure		Biological function					
	T_m (°C)	$-\left[\theta\right]_{220, \text{pH}7}$ (mdeg cm ² min ⁻¹)	at 40mM glutamate			at 40mM cystein		
			$K_{M,C}$	$V_{\text{max},C}$	$(V_{\text{max}}/K_M)_C$	$K_{M,E}$	$V_{\text{max},E}$	$(V_{\text{max}}/K_M)_E$
			(mM)	(μMmin^{-1})	(10^{-4}min^{-1})	(mM)	(μMmin^{-1})	(10^{-4}min^{-1})
A494V	80	7.13×10^6	4.03	3.1	7.69	5.59	5.7	10.20
A494T	80	4.90×10^6	5.72	3.2	5.59	7.68	6.0	7.81
Wild	70	4.17×10^6	7.52	3.5	4.65	12.99	6.2	4.77
S495F		2.80×10^6						

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

자체적으로 판단할 때 전체적인 연구개발 목표 달성은 80%이상 달성하였다고 볼 수 있다. 다만 side chain길이에 따라 hydrophobicity를 증가시키면서 구조 안정성과 반응활성도를 볼려고 했지만 alanine 494를 leucine으로 치환할 때 *E. coli* 자체내에서 expression이 안되어 side chain길이에 따른 열역학적 접근은 할 수 없었음을 아쉽게 생각한다. 또한 다량의 효소가 정제되어 crystal이 만들어진다면 가능한한 3차구조 분석까지 시도할 예정이었으나 3차구조 분석은 할 수 없었다.

문제점으로는 *gshI*의 순수분리시킬 수 있는 기술 개발이 더욱 필요하고, 기존 분리 방법으로 초 순수분리가 어려움이 인정된다. 따라서 당 연구원이 보유하고 있는 FPLC 사용하여 초순수분리하는 연구 필요하다고 본다. 초 순수분리가 가능할 때 정확한 구조 정보를 얻을 수 있으며 여러가지 해석이 가능하다고 본다. 아울러 *gshI*에는 SH-기가 몇개 있는 데 이 SH-기가 어느것 들끼리 disulfide 결합을 하는 연구 필요하며 이를 통해 구조 안정을 도모할 것으로 본다. 더 나아가서는 효소와 기질과 결합위치 및 촉매 반응위치도 확인할 것으로 본다. 아울러 Nam(1990)의 결과와 약간 차이가 나는 부분도 좀 더 자세한 연구가 필요할 것으로 본다.

하지만 본 연구 결과는 단백질효소중 한 아미노산이라도 교체하면 단백질의 구조안정성이 변화하여 이는 곧 바로 효소활성도에 크게 관여한다는 사실을 밝혀냄으로써 단백질 공학에 크게 기여했다고 본다. 앞으로 이러한 효소 구조와 반응활성도 같은 연구결과는 새로운 효소를 디자인하고 mutant효소를 개발하고 생산하는데 방향을 제시하였다고 본다.

제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획

본 연구에서 개발한 단백질의 site directed mutagenesis에 의하여 효소를 point mutation 시킨 뒤 이 단백질을 발현시켜 이를 전제하여 구조 안정성과 반응활성도를 비교연구하고 이를 토대로 본 총괄연구과제의 bioreactor에서 glutathionine을 생산할 때 반응조건등 중요한 정보를 활용할 예정이다. 현재 단백질의 효소활성도를 증가시킬 때 대부분 active site의 catalysis activity (K_{cat})만 증가시키려고 노력하지만 오히려 단백질의 구조 안정성을 도모하는 mutation을 통해 K_m 을 감소시켜 기질의 effective concentration (C_{eff})을 증가시키는 것이 더 효과적으로 판단된다. 이러한 연구결과는 단백질공학연구에 매우 고무적인 결과라고 본다. 또한 직접 binding site를 mutation시키는 연구가 필요할 것으로 본다.

본 연구결과는 K' 감소보다 구조안정에 의한 반응활성도 증가가 나타난다고 볼 수 있다. 이러한 효소안정기술은 앞으로 단백질공학연구에 크게 활용될것으로 본다.

제 6 장. 참고문헌

- Ball, C.R. (1966), *Biochem. Pharmacol.* 15, 809-816
- Brahms, S., and J. Brahms (1980), *J. Mol. Biol.* 138, 149-178
- Creighton, T.E. (1983) *Proteins; Structures and Molecular Properties*,
Freeman, New York
- Edeloch, H. (1967), *Biochemistry* 6, 1948-1954
- Edinger, J.W., C.S. Huang and A. Meister (1995), Interaction of
cystamine with rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase, Poster
991, Abstract, ASBMB/DBC-ACS, San Francisco, CA, May 21-25
- Freifelder, D.M. (1982), *Physical Biochemistry; Application to
Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed. freeman, New York
- Jackson, C.R. (1969), *Biochem. J.* 111, 309-313
- Kwon, D.Y. (1994), *Eur. J. Biochem.* 223, 631-636
- Kwon, D.Y. and P.S. Kim (1994), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58,
400-405
- Lee, S.Y. (1995), Personal communications
- Nam, Y.S. (1990) *Molecular Breeding of Glutathione Producing
Bacterial Strains*, Ph.D. Thesis, Korea University, Seoul
- Oas, T.G., and P.S. Kim (1988), *Nature*, 336, 42-48
- Sreerama, N., and R.W. Woody (1993), *Anal. Biochem.* 209, 32-44
- Voet, D., and J.G. Voet (1995), *Biochemistry*, 2nd ed, John Wiley &
Sons, New York
- Watanabe, K., K. Murata, and A. Kimura (1986), *Agric. Biol. Chem.*
51, 1111-1114