

## 글루타치온 생산 재조합 대장균의 고농도 배양에 관한 연구

김현기 · 구윤모\*

인하대학교 공과대학 생물공학과  
(1997년 1월 4일 접수, 1997년 6월 9일 채택)

### Studies on the High Cell Density Cultivation of Glutathione-Producing Recombinant *Escherichia coli*

Hyun-Kee Kim and Yoon-Mo Koo\*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
(Received 4 January 1997; accepted 9 June 1997)

#### 요 약

본 연구에서는 재조합된 대장균을 이용하여 글루타치온을 생산하기 위해 필요한 균체의 대량생산에 대한 실험을 수행하였다. 고농도의 균체를 얻기 위해 선택한 배양방법은 유가식배양이며, 기질은 미생물이 가지는 특정비생장속도를 일정하게 유지하면서 공급하였다. 상이한 비생장속도에서 수행된 실험에서 비생장속도  $0.3 \text{ hr}^{-1}$ 에서 미생물의 균체농도는  $147(\text{OD}_{600})$ 으로 가장 높았지만 목적물질인 글루타치온 생합성효소는 비생장속도  $0.1 \text{ hr}^{-1}$ 에서  $130 \text{ unit/L}$ 로 더욱 높았다. 또한 비생장속도  $0.4 \text{ hr}^{-1}$ 에서는 초기부터 포도당이 과량축적되었으며, 축적된 포도당으로 인해 생긴 아세트산으로 미생물의 생장과 목적물질인 글루타치온의 생성이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다. 이것은 글루타치온 생산 재조합 대장균의 임계 비생장속도(critical specific growth rate)이상에서 배양할 경우 과도한 metabolic burden으로 인해 생성된 것으로 사료된다.

**Abstract**—High cell density cultivation of glutathione-producing recombinant *E. coli* TG1/pDG7 $\alpha$  was carried out in a fed-batch mode controlling specific growth rate. The cell growth and the production of GSH-I were not affected by the initial glucose concentration less than  $20 \text{ g/L}$ . The specific growth rate sharply increased for the yeast extract concentration less than  $1 \text{ g/L}$ . The cell growth rate and the GSH-I production rate were lowered significantly at the initial concentration of acetic acid above  $5 \text{ g/L}$ . The cell growth and the GSH-I production were inhibited by acetic acid. The final cell concentration reached its maximum at  $147(\text{OD}_{600})$  with  $\mu=0.3 \text{ hr}^{-1}$ . The final concentration of GSH-I reached  $134 \text{ unit/L}$  with  $\mu=0.1 \text{ hr}^{-1}$ . When the specific growth rate was controlled at  $0.4 \text{ hr}^{-1}$ , the final cell concentration decreased drastically due to the accumulation of acetic acid in the medium, which resulted in the decrease of the concentration of GSH-I.

**Key words**: Fermentation, Fed-Batch, Glutathione, *Escherichia coli*

#### 1. 서 론

글루타치온(glutathione)은  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine의 구조를 가지는 트리펩타이드(tripeptide)이며 대부분의 생물체내에 포함되어 있는 비단백질 티올(thiol)이다. 글루타치온은 단백질 sulfohydryl 그룹의 유지와 DNA의 구성성분인 deoxyribonucleotide의 전구체 형성, 반응성이 강한 산소화합물이나 자유라디칼로부터의 세포보호, 외부 화합물의 독성제거, 대사물의 조절 등 생물학적, 의약적으로 많은 중요한 역할을 한다. 최근의 연구결과에 의하면 간장질환의 치료제로 효능이 뛰어난 것으로 알려져 있다[1].

기존의 글루타치온 생산은 효모세포를 추출함으로써 또한 화학적 합성을 통해 이루어진다. 그러나 이들 방법은 분리상의 문제점들로 인하여 글루타치온 생합성효소를 이용한 생산방법이 폭넓게 연구되

어지고 있다. 그러나 이 방법도 글루타치온 합성에 관여하는 효소의 양이 충분하지 못하기 때문에 수득률이 낮아 실질적인 글루타치온 생산에 이용되지는 못하고 있다.

최근에 유전공학 기술의 발달로 재조합된 대장균을 이용하여 글루타치온 생합성효소를 생산하게 되었다. 이러한 재조합 대장균을 이용하여 단백질을 대량 생산하기 위해서는 높은 균체농도와 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 시설비 절감 및 발효시간을 단축하며, 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 용존산소의 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 발효 부산물에 의해 문제점은 더욱 가중된다. 특히 대장균의 고농도 배양 시 생성되는 발효부산물 중 잘 알려진 아세트산의 생성은 호기적 조건하에서 과잉의 기질 공급으로 인해 유기산을 생성하는 "Bacterial crabtree effect"라 하여 잘 알려져 있다[3]. 이러한 유기산의 생성은 미생물의 성장과 외래 단백질 생산을 억제하며[3-6], 공정의 전체 수율에 영향을 미치는 주요한 변수로서 이들의 생성원인과 저해기작 및 억제방법에 대한 연구는 일찍부터 광범위하게 논의되어 왔다.

유가식 배양시 발효 부산물인 아세트산의 생성을 억제하고, 높은 균체 농도 생산 및 높은 단백질 발현율을 유지시키기 위해 중요한 것이 기질공급방법의 선택이다. 현재는 잘 알려진 기질공급방식으로는 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.[7-9], 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[10-13], 부산물인 아세트산의 농도를 측정하면서 적당한 속도로 기질을 공급하는 아세트산 농도 측정[14], 미생물의 비성장속도( $\mu$ )를 조절하면서 기질을 공급해주는  $\mu$ -stat.[15-18] 등이 있다.

아세트산의 생성과 밀접한 관계가 있는 비성장속도는 미생물의 성장 및 외래 단백질 생산에 중요한 인자로서 작용한다. 일반적으로 비성장속도를  $0.1-0.3 \text{ hr}^{-1}$ 로 유지시켜 아세트산의 생성을 억제하여 균체농도를 128-148 g/L까지 생산한 경우가 보고되었다[21]. 또한 Turner 등은  $\mu=0.29 \text{ hr}^{-1}$ 에서 연속배양시 외래 단백질인  $\alpha$ -amylase를 가장 많이 생산하였으며,  $\mu_{max}(0.65 \text{ hr}^{-1})$  이상에서는 상당량의 아세트산이 축적되었고, 균체농도와  $\alpha$ -amylase의 생성량은 최고치의 50% 이상 감소함을 보고하였다[16].

이러한 보고로부터 많은 연구자들은 낮은 비성장속도로 배양을 수행할 것을 제안하였으며, 공급기질로써 포도당 대신 글리세롤을 이용하여 아세트산의 생성을 억제한 연구도 보고되었다[19]. 또한 미리 계획된 지수 증가식 기질 공급을 통하여 비성장속도를 낮게 조절하여 수행된 유가식 배양으로 높은 농도의 균체와 외래 단백질을 얻었다[20].

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

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 비성장속도 조절 유가식 배양을 통해 비성장속도와 균체수율, 아세트산 생성 및 GSH-I의 발현율에 미치는 영향을 확인하였다. 그리고 글루타치온 생산 균주를 대량 생산하기 위한 최적의 비성장속도 및 배양조건을 확립하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2-1. 사용균주 및 plasmid

본 연구에 사용한 숙주세포는 *E. coli* TG1이며, 플라스미드는 pDG7 $\alpha$ 이다[22]. 재조합된 플라스미드 pDG7 $\alpha$ 는 총 길이 9.4 Kb이며, pBR322기원의 vector에 GSH-I, GSH-II유전자가 삽입되어 있다. promoter는 tac promoter를 사용하였으며 ampicillin 내성 유전자가 존재한다.

### 2-2. 배지 및 배양조건

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[15]. 유가식 배양에 사용된 공급 기질은 Resenberg에 의해 이용된 배지를 사용하였다[15].

본 연구에 사용된 *E. coli* TG1/pDG7 $\alpha$  균주는  $-70^\circ\text{C}$  deep freezer에 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. Flask 배양은 100 mL medium R에 종균배양액을 1% v/v로 접종해 12 시간 동안 rotary shaker에서 배양하였다. 각각의 배양조건은 교반속도 250 rpm, 온도는  $28^\circ\text{C}$ 로 조절하였으며, 항생제인 ampicillin을 최종농도가 50  $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 첨가하였다. 세포성장에 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 아세트산 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.

연속배양과 유가식 배양은 2.5 L 발효기(KF 2.5 L, Korea Fermenter, Korea)에서 작동부피 1.0 L로 수행되었으며 그 배양조건은 온도는  $28^\circ\text{C}$ , 공기 공급 속도 0.5 vvm, pH는 25% 암모니아수를 이용하여 6.8로 조절하였고, 용존산소의 농도는 포화 용존산소 농도의 20-40%를 유지시켰으며, 교반속도는 500-1000 rpm으로 하였고, 교반속도가 1000 rpm 이상에서는 용존산소의 농도를 유지시켜 주기 위해 순수한 산소를 공급하였다. 또한 연속배양은 초기 회분식 배양을 하다가 포도당의 농도가 0 g/L가 되는 시점에서 설정된 회식 속도를 일정하게 유지하기 위해 연동펌프를 이용하여 기질농축액을 공급하였다. 각 실험에는 일정시간 등간격으로 시료를 채취하여 아세트산, 포도당 및 균체 농도를 측정하였다. 또한 정상상태 이후에 일정량의 시료를 등간격으로 채취하여 GSH-I의 활성도를 측정하였다.

유가식 배양은 기질농축액을 미리 설정된 프로그램에 의해 제어되는 펌프를 통해 지수배지공급방법(exponential feeding)으로 공급되었다. 기질 공급 속도는 세포물질수지식에 의해 다음과 같다[19].

$$F = \frac{\mu V_o X_o \exp(\mu t)}{Y_{xs} S_o} \quad (1)$$

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

### 2-3. 분석방법

균체농도는 0.85% NaCl용액에 배양액을 희석하여 spectrophotometer(UV160-A, Shimadzu, Japan)로 600 nm의 흡광도로 측정하였다. 포도당의 농도는 배양액 중 시료를 1 mL 취하여 원심분리기를 이용해 8000 rpm으로 2분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 포도당 분석기(Model 2700, YSI, USA)로 분석하였다.

아세트산 농도는 gas chromatography(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 mL을 취하여 8000 rpm으로 2분간 원심분리하여 얻은 상등액에 내부 표준용액(propionic acid)과 염산을 넣어 분석하였다.

GSH-I의 활성도는 Jackson method를 약간 변형하여 수행하였다 [2]. 배양액에서 취한 10 mL의 시료를 5000 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 균체를 초음파 파쇄기로 파쇄하여 세포내 효소를 얻는다. 준비된 반응 혼합물[1]에 시료 100  $\mu$ 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 solution에 분리된 상등액을 1 mL 첨가하여 60 °C에서 5분간 반응시킨다. 반응액을 급속히 냉각시켜 반응을 정지시킨 후 1 M potassium-phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 3.8 mM DTNB용액을 넣고 7분 후에 spectrophotometer로 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 단위시간당 1  $\mu$ mol의  $\gamma$ -glutamyl cysteine을 생산할 수 있는 효소의 양으로 정의한다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. 초기 포도당의 농도가 균체생산 및 GSH-I 생성량에 미치는 영향

초기 포도당의 농도를 5 g/L에서 20 g/L까지 변화된 상태에서의 GSH-I의 생성량을 Fig. 1에 나타내었다. Data로는 보이지 않았지만 최종 미생물의 균체농도는 거의 차이가 나지 않았다. GSH-I의 생성량도 거의 차이가 없었다. 그러나 초기 포도당의 농도가 1 g/L에서는 미생물이 이용할 수 있는 기질이 빨리 고갈되어 균체의 성장이 정지되었다. 초기 포도당 농도가 50 g/L이상에서는 최종 균체농도가 거의 변화가 없었지만 GSH-I의 생성량은 약 20% 감소하였으며, 배

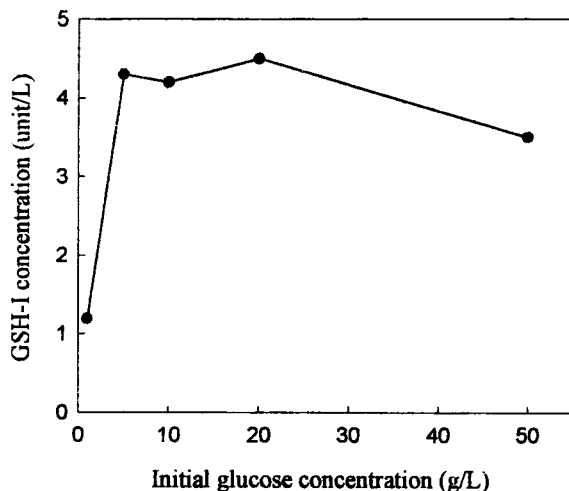


Fig. 1. Effect of initial glucose concentration on the GSH-I production.

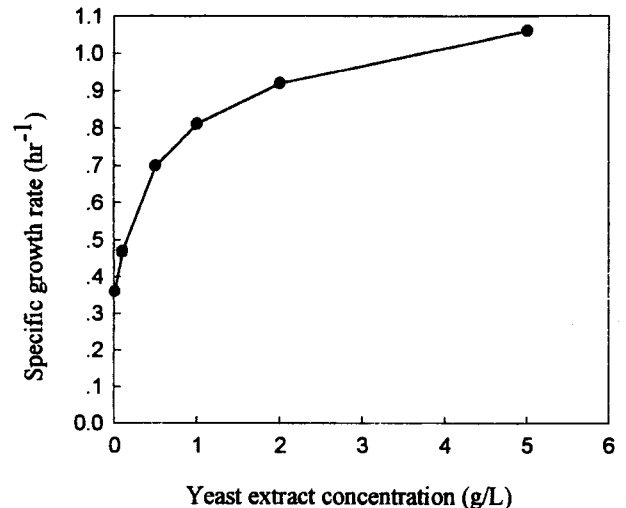


Fig. 2. Effect of yeast extract concentration on the cell growth.

지내에 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.

### 3-2. 초기 Yeast Extract 농도가 균체성장에 미치는 영향

미생물의 성장을 향상시키기 위해 질소원으로 yeast extract를 첨가하여 균체성장 및 효소의 생성량에 대한 영향을 Fig. 2에 나타내었다. 초기 yeast extract의 농도가 1 g/L까지는 미생물 비성장속도가 급격히 증가하였지만, 그 이상의 농도에서는 비성장속도가 크게 증가하지 않는 것을 확인하였다. 이것은 이 균주가 갖는 최고의 비성장속도에 도달함에 따라 yeast extract의 증가량에 비해 상대적으로 비성장속도의 증가를 보이지 않는 것으로 사료된다.

### 3-3. 초기 아세트산 농도가 균체성장 및 GSH-I 생성에 미치는 영향

초기 아세트산이 균체성장 및 GSH-I 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 1부터 20 g/L까지 변화시키면서 실험을 하였다. 초기 아세트산의 농도가 2 g/L까지는 거의 미생물의 성장에 영향을 주지 않았지만, 5 g/L이상에서는 상대적으로 급격하게 성장이 억제되는 것을 확인하였다. 또한 외래 단백질인 GSH-I의 농도도 5 g/L이상의 아세트산 농도에서는 상대적으로 크게 감소함을 확인하였다(Fig. 3). 이것은 발효부산물인 아세트산이 미생물의 성장 및 목적물질의 발현을 상당히 억제한다는 것을 입증하는 것이다. 또한 기존의 보고[3]에서 알려진 균체성장을 억제하는 아세트산의 농도가 7 g/L인데 비해 5 g/L이하에서도 균체성장 및 단백질의 발현율이 현저히 저하되는 것으로 보아 GSH-I의 생성은 아세트산에 매우 민감한 것으로 사료된다. 이러한 발효부산물의 생성을 억제하기 위한 발효방법의 개발이 필요한 것으로 생각된다.

### 3-4. 연속 배양을 통한 포도당 수율 및 아세트산 생성률 조사

비성장속도 조절을 의한 유가식 배양을 하기 위한 기초자료를 얻기 위해 연속배양을 통해 미생물 균체 수율 상승 및 아세트산 생성을 조사하였다. Fig. 4와 5는 각각 희석률 0.05, 0.15 hr<sup>-1</sup>에서 연속배양을 수행하여 얻은 포도당 농도, 아세트산 농도 및 GSH-I의 생성량이다. 각각은 연속배양을 수행한 후 반응기내에 유입된 배양액의 평균 체류시간의 3-4배가 지난 후 정상상태에 도달한 것을 균체농도,

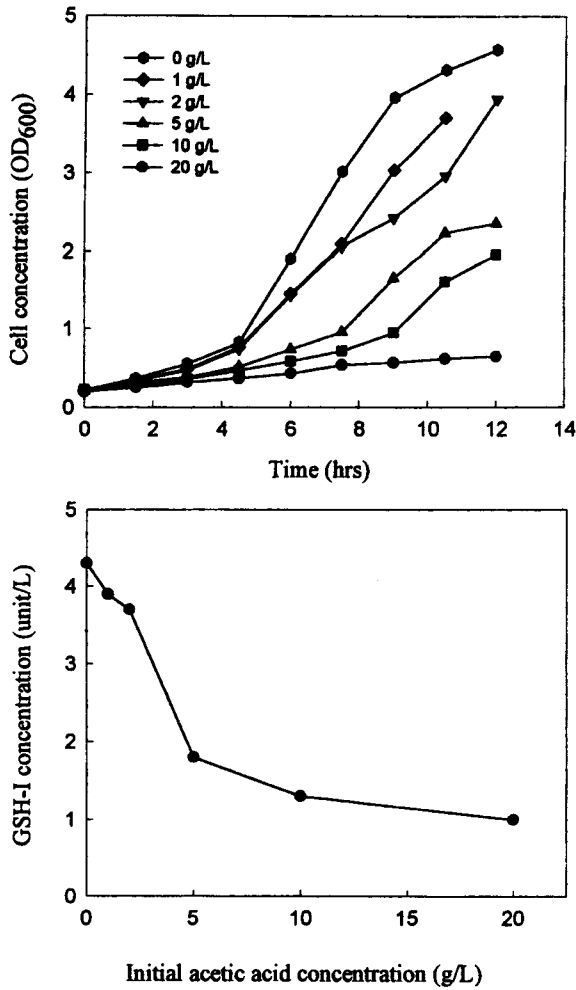


Fig. 3. Effect of initial acetic acid concentration on the cell growth and GSH-I activity.

포도당의 농도를 측정함으로써 확인할 수 있었다. 또한 정상상태에서의 GSH-I의 생성량도 일정하게 유지됨을 확인할 수 있었다.

각각의 균체 수율 상수는  $0.05 \text{ hr}^{-1}$ 에서  $0.85 \text{ OD}_{600}/\text{g}$  glucose였으며,  $0.15 \text{ hr}^{-1}$ 에서  $0.90 \text{ OD}_{600}/\text{g}$  glucose였다. 평균적으로  $0.88 \text{ OD}_{600}/\text{g}$  glucose를 일정하게 유지했다. 또 아세트산의 생성은 두 가지 경우에서 거의 보이지 않았다. 서론에서 언급했듯이 미생물의 비성장속도가  $0.3 \text{ hr}^{-1}$  이하에서 연속배양시 거의 아세트산과 같은 발효부산

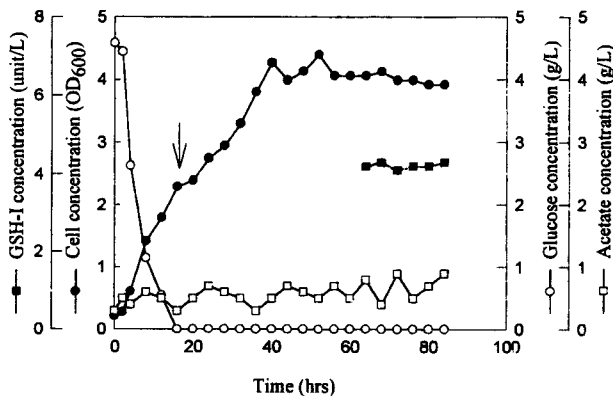


Fig. 4. Continuous culture of *E. coli* TG1/pDG7 $\alpha$ ( $\mu=0.05 \text{ hr}^{-1}$ ). Arrow indicates the feeding point.

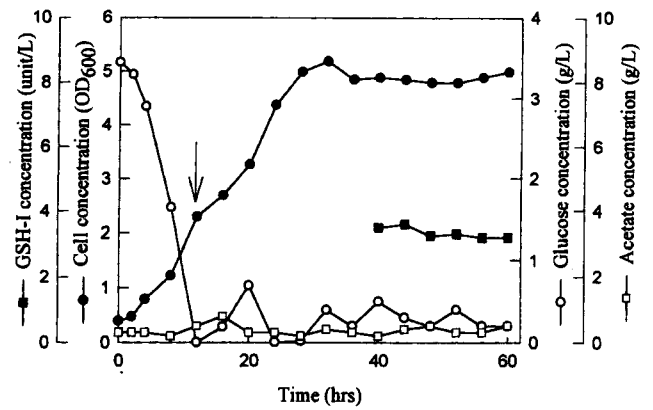


Fig. 5. Continuous culture of *E. coli* TG1/pDG7 $\alpha$ ( $\mu=0.15 \text{ hr}^{-1}$ ). Arrow indicates the feeding point.

물의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다.

### 3-5. 비성장속도조절을 통한 유가식 배양

기본적인 자료를 바탕으로 글루타치온 생산 재조합 대장균을 고농도로 배양하기 위해 서로 다른 비성장속도로 유가식 배양을 수행하였다. 프로그램에 따라 펌프를 통해 공급하는 기질의 양은 일정한 시간마다 균체농도를 측정함으로써 설정된 비성장속도로 유지됨을 확인하였다. 비성장속도는  $0.1-0.4 \text{ hr}^{-1}$ 까지 달리하여 수행한 결과 비성장속도  $0.1-0.3 \text{ hr}^{-1}$ 까지는 각각 132, 137, 147( $\text{OD}_{600}$ )로 거의 같은 최종 균체농도를 보였다. 유가식 배양을 하는 동안의 포도당농도는 거의  $0 \text{ g/L}$ 였다. 그러나 배양후반부에 급격한 균체농도의 증가에 의한 산소의 급격한 고갈로 공급된 포도당이 미생물에 의해 완전히 소모되지 못하고 배지내에 축적되었다. 또한 아세트산도 배양 전반에

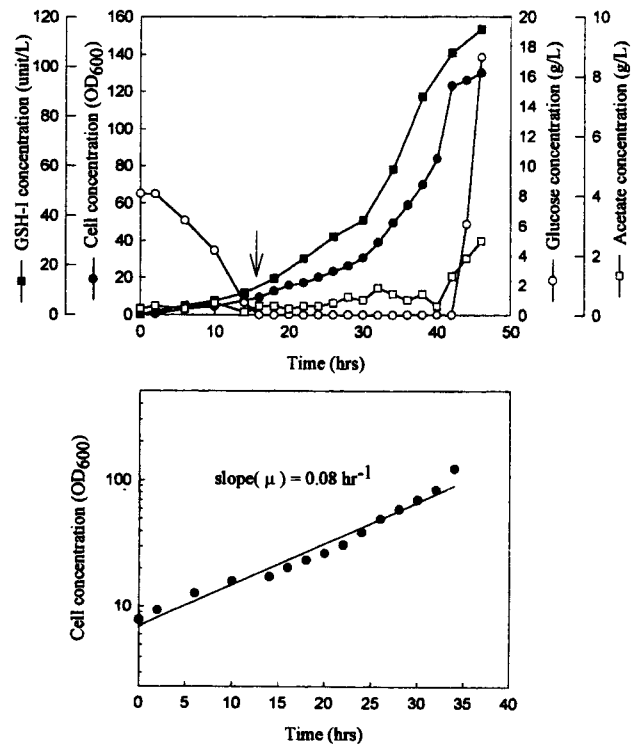


Fig. 6. Fed-batch culture of *E. coli* TG1/pDG7 $\alpha$ ( $\mu=0.1 \text{ hr}^{-1}$ ). Arrow indicates the feeding point.

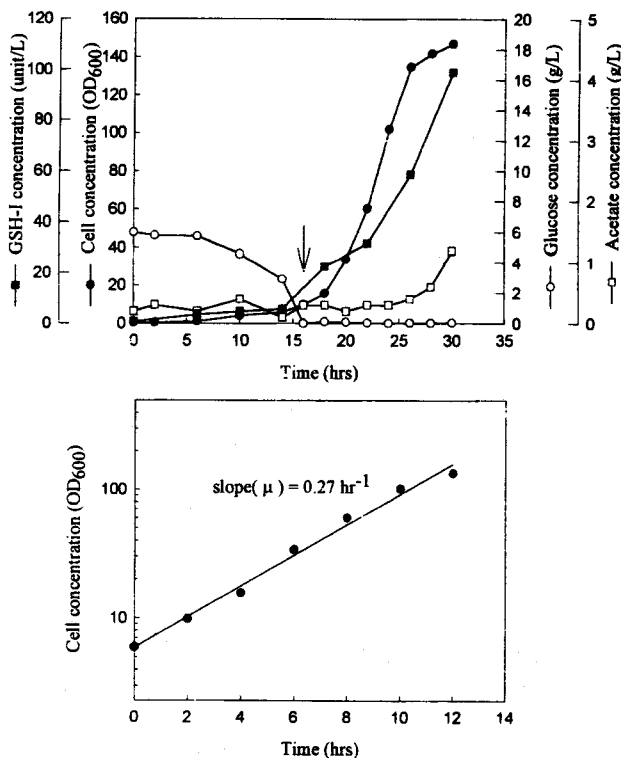


Fig. 7. Fed-batch culture of *E. coli* TG1/pDG7 $\alpha$  ( $\mu=0.3 \text{ hr}^{-1}$ ). Arrow indicates the feeding point.

결쳐 거의 생성되지 않았지만, 배양후반부의 산소의 고갈과 포도당의 축적에 의해 다소 배지내에 축적되었다(Fig. 6, 7).

GSH-I의 생성량은 비성장속도가 낮을수록 더욱 높아서 130, 120, 100 unit/L였다. 이것은 최종 균체농도는 거의 비슷하게 유지하였지만, 반응후기에 생긴 아세트산에 의해 GSH-I의 생산에 저해를 받은 것으로 생각된다. 또한 비성장속도  $0.4 \text{ hr}^{-1}$ 에서는 균체의 최종농도도 낮았으며( $\text{OD}_{600}=71$ ), 배양후기에 배지내에 매우 많은 양의 포도당이 축적되었다. 그리고 발효 부산물인 아세트산도 상당히 많은 양이 축적되었으며, 설정된 비성장속도를 유지하지 못하는 것을 확인하였으며, GSH-I의 생성량도 매우 낮아 28 unit/L였다(Fig. 8).

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

#### 4. 결 론

재조합 대장균을 이용하여 글루타치온을 대량생산하기 위해 필요한 균체생성의 배양조건 및 유가식 배양을 통한 균체의 고농도 배양 실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

- (1) 초기 포도당 농도의 균체성장 및 GSH-I의 생성에 관한 실험에서 균체생장은 50 g/L까지 거의 영향을 받지 않았지만, 50 g/L 이상에서는 GSH-I의 생성량은 25 % 정도 감소하였다.
- (2) 초기 yeast extract의 농도에 관한 실험에서는 1 g/L 이상에서는 미생물의 균체생장이 크게 증가하지 않았다.
- (3) 초기 아세트산의 농도에 따른 균체성장 및 GSH-I의 생성에 관한 실험에서는 초기 농도가 5 g/L 이상에서는 균체생장과 GSH-I의

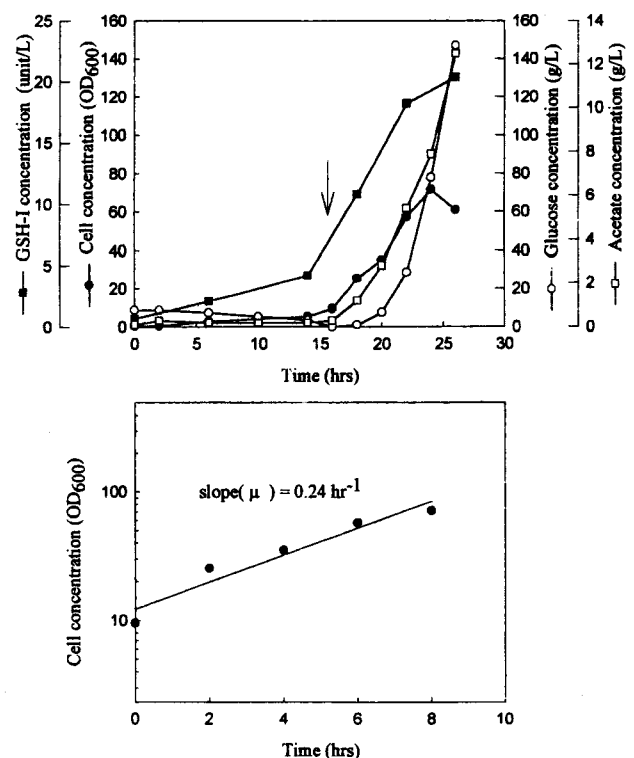


Fig. 8. Fed-batch culture of *E. coli* TG1/pDG7 $\alpha$  ( $\mu=0.4 \text{ hr}^{-1}$ ). Arrow indicates the feeding point.

농도가 급격히 감소함을 관찰하였다.

(4) 비성장속도의 조절에 의한 연속배양에서는 0.05,  $0.15 \text{ hr}^{-1}$  두 가지 경우에서 배양 후반부에 약간의 아세트산이 생성되는 것을 관찰하였으며, 균체 수율 상수( $Y_{xs}$ )는  $0.88 \text{ OD}_{600}/\text{g glucose}$ 를 일정하게 유지되었다.

(5) 비성장속도의 조절에 의한 유가식 배양에서는 비성장속도  $0.3 \text{ hr}^{-1}$  이하에서는 아세트산의 축적이나 포도당의 축적이 관찰되지 않았으며, 최종 균체농도는 거의 같았다. 비성장속도  $0.4 \text{ hr}^{-1}$  이상에서는 배지내에 많은 양의 포도당과 아세트산이 축적되었고, 최종 균체농도와 GSH-I의 농도는 크게 감소하였다.

#### 감 사

본 연구는 과기처의 선도기술개발사업에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 *E. coli* TG1(*sup E hsdΔ 5 thiΔ lac pro AB*)균주와 pDG7 $\alpha$  plasmid를 공여해 주신 고려대 이세영 교수님께 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Nam, Y. S.: Ph. D. Dissertation, Korea Univ., Seoul, Korea(1990).
2. Tietze, F.: *Anal. Biochem.*, **27**, 502(1969).
3. Luli, G. W. and Strohl, W. R.: *Appl. and Environ. Microbiol.*, **56**, 1004(1990).
4. Han, K. H., Lim, H. C. and Hong, J. A.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **39**, 663(1992).
5. Gschaedler, A. and Boudrant, J.: *J. Indust. Microbiol.*, **13**, 225 (1994).

6. Jensen, E.B. and Carlsen, S.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **26**, 1 (1990).
7. Seo, D.J., Chung, B.H., Hwang, Y.B. and Park, Y.H.: *J. Ferment. and Bioeng.*, **74**, 196(1990).
8. Konstantinov, K.B., Kishimoto, M., Seki, T. and Yoshida, T.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **36**, 750(1990).
9. Mori, H., Yano, T., Kobayashi, T. and Shimizu, S.: *J. Chemeng. Japan*, **12**, 313(1979).
10. Sakamoto, S., Iijima, M., Matsuzawa, H. and Ohta, T.: *J. Ferment. and Bioeng.*, **78**, 304(1994).
11. Shi, Z., Shimizu, K., Iijima, S., Izumi, R., Matsumoto, K. and Kobayashi, T.: *J. Ferment. and Bioeng.*, **73**, 22(1992).
12. Park, Y.S., Kai, K., Iijima, S. and Kobayashi, T.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **40**, 686(1992).
13. Mizutani, S., Iijima, S., Morikawa, M., Shimizu, K. and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Technol.*, **65**, 325(1987).
14. Shimizu, N., Fujimori, K., Nihimura, N. and Odawara, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 187(1988).
15. Risenberg, D., Schulz, B., Knorre, W.A., Pohl, H.D., Korz, D., Sanders, E.A., Rob, A. and Deckwer, W.D.: *J. Biotechnol.*, **20**, 17(1991).
16. Turner, C., Gregory, M.E. and Turner, M.K.: *Biotechnol. Lett.*, **16**, 891(1994).
17. Yoon, S.K., Kang, W.K. and Park, T.H.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **43**, 995(1994).
18. Paalme, T., Tiisa, K., Kahru, A., Vanatalu, K. and Viliu, R.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **35**, 312(1990).
19. Yee, L. and Blanch, H.W.: *BIO/TECHNOLOGY*, **10**, 1550(1992).
20. Lee, S.Y.: *TIBTECH.*, **14**, 98(1996).
21. Curless, L.E. and Pope, J.: *Biotechnol. Prog.*, **10**, 467(1994).
22. Kwak, J.H.: MS. D. Dissertation, Korea Univ., Seoul, Korea (1992).