(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0088725
(43) 공개일자 2016년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/02 (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 21/02 (2013.01)
C12N 9/93 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0008174
(22) 출원일자 2015년01월16일
심사청구일자 2015년01월16일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이정국
서울특별시 마포구 백범로25길 63 삼성래미안아파트 105동 1504호
김현준
서울특별시 마포구 백범로 35 서강대학교 곤자가국제학사 B1060
오은경
서울특별시 마포구 광성로 35-14, 303호
(74) 대리인
특허법인다나

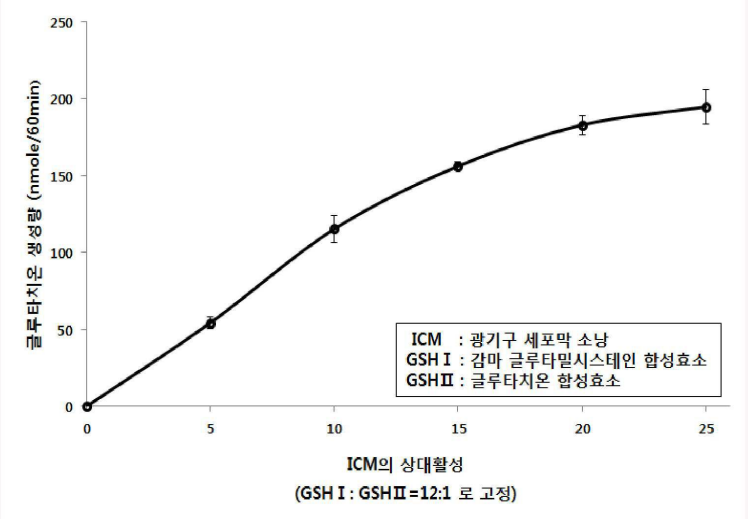
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **광합성 세포막 소낭을 이용한 글루타치온의 지속적 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 광합성 세포막 소낭과 글루타치온 합성을 촉매하는 효소를 조합하여 글루탐산, 시스테인 및 글리신을 반응기질로 하여 글루타치온을 생산하는 방법에 관한 것이다. 글루타치온 합성을 촉매하는 효소를 사용하는 방법에는 감마 글루타밀시스테인과 글루타치온 합성효소를 함께 사용하는 방법, 또는 이기능 글루타치온 합성효소를 사용하는 방법이 있다. 글루타치온의 합성에는 값비싼 아데노신 삼인산을 지속적으로 공급해주어야 하는 문제가 있으나, 본 발명은 아데노신 삼인산의 공급원으로써 광합성 세포막 소낭을 이용하여 추가적인 아데노신 삼인산 투입이 없이 지속적으로 글루타치온을 생산할 수 있으며, 이는 글루타치온 생산 단가 절감에 크게 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12Y 603/02002 (2013.01)
C12Y 603/02003 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 201332018.01
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 미래유망융합기술 파이오니어 사업
연구과제명 광합성 생체소재 활용 플랫폼 구축
기 여 율 1/1
주관기관 서강대학교
연구기간 2014.03.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle)과 감마 글루타밀시스테인 합성효소(γ-glutamylcysteine synthetase, GSHⅠ) 및 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase, GSHⅡ)를 이용한 글루타치온(glutathione)의 생산방법에 있어서, 상기 방법은 광합성 세포막 소낭에 빛을 조사하여 아데노신 이인산(adenosine diphosphate, ADP)과 무기인산(phosphate)으로부터 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 형성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 2

광합성 세포막 소낭(photosynthetic membranve vesicle)과 이기능 글루타치온 합성효소(bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase, GshF)를 이용한 글루타치온(glutathione)의 생산방법에 있어서, 상기 방법은 광합성 세포막 소낭에 빛을 조사하여 아데노신 이인산(adenosine diphosphate, ADP)과 무기인산(phosphate)으로부터 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 형성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 3

다음의 단계를 포함하는 글루타치온(glutathione)의 생산방법 :

a) 광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle)에 빛을 조사하여 아데노신 이인산(adenosine diphosphate, ADP) 및 무기인산(inorganic phosphate)으로부터 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 생성하는 단계;

b) 글루타치온의 합성을 촉매하는 효소가 상기 단계 a)에서 생성된 아데노신 삼인산을 이용하여 글루타치온을 합성하고, 아데노신 이인산 및 무기인산을 형성하는 단계; 및

c) 상기 단계 b)에서 생성된 아데노신 이인산 및 무기인산이 광합성 세포막 소낭의 아데노신 삼인산 생성에 재사용되는 단계.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 광합성 세포막 소낭은 자색 비유황 세균(purple nonsulfur bacteria)으로부터 분리된 광기구 세포막 소낭(chromatophore membrane vesicle) 및 남세균(cyanobacteria) 또는 조류(algae)로부터 분리된 틸라코이드 세포막 소낭(thylakoid membrane vesicle)으로 구성된 군으로부터 선택되는 소낭인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 글루타치온의 합성을 촉매하는 효소는 감마 글루타밀시스테인 합성효소(γ-glutamylcysteine synthetase, GSHⅠ), 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase, GSHⅡ) 및 이기능 글루타치온 합성효소(bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase, GshF)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 글루타치온 생산을 위한 기질(substrate)로서 글루탐산(glutamate), 시스테인(cysteine) 및 글리신(glycine)을 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 감마 글루타밀시스테인 합성효소는 아데노신 삼인산을 아데노신 이인산과 무기인산으로 전환하면서 글루탐산 및 시스테인을 감마 글루타밀시스테인으로 합성하는 과정을 촉매하며, 상기 글루타치온 합성효소는 아데노신 삼인산을 아데노신 이인산과 무기인산으로 전환하면서 감마 글루타밀시스테인 및 글리신을 글루타치온으로 합성하는 과정을 촉매하는 효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 이기능 글루타치온 합성효소는 제 7 항의 감마 글루타밀시스테인 합성효소가 촉매하는 반응 및 글루타치온 합성효소가 촉매하는 반응을 모두 촉매할 수 있는 효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 3 항에 있어서, 상기 단계 b)는 단계 a)에서 생성된 아데노신 삼인산이 아데노신 이인산과 무기인산으로 전환되면서 글루탐산과 시스테인이 감마 글루타밀시스테인 합성효소에 의해서 감마 글루타밀시스테인을 형성하는 단계; 및 상기 형성된 감마 글루타밀시스테인과 글리신이 글루타치온 합성효소에 의해서 글루타치온으로 합성되면서 단계 a)에서 생성된 아데노신 삼인산이 아데노신 이인산과 무기인산으로 전환되는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 3 항에 있어서, 상기 단계 b)는 글루탐산, 시스테인 및 글리신이 이기능 글루타치온 합성효소에 의해 글루타치온으로 합성되면서 단계 a)에서 생성된 아데노신 삼인산이 아데노신 이인산과 무기인산으로 전환되는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 감마 글루타밀시스테인 합성효소 : 글루타치온 합성효소의 상대활성비(relative activity ratio)는 4:1 내지 20:1 사이인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 광합성 세포막 소낭 : 감마 글루타밀시스테인 합성효소 : 글루타치온 합성효소의 상대활성비(relative activity ratio)는 1:12:1 내지 50:12:1 사이인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 광합성 세포막 소낭 : 이기능 글루타치온 합성효소의 상대활성비(relative activity ratio)는 10:1 내지 500:1 사이인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

ⅰ) 광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle); 및

ii) 감마 글루타밀시스테인 합성효소(γ-glutamylcysteine synthetase, GSHⅠ), 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase, GSHⅡ) 및 이기능 글루타치온 합성효소(bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase, GshF)로 구성된 군으로부터 선택되는 글루타치온 합성 촉매 효소;

를 포함하는 글루타치온 생산용 조성물.

청구항 15

ⅰ) 아데노신 삼인산의 공급수단으로서 광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle); 및

ii) 글루타치온 합성반응 촉매수단으로서 감마 글루타밀시스테인 합성효소(γ-glutamylcysteine synthetase, GSHⅠ), 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase, GSHⅡ) 및 이기능 글루타치온 합성효소(bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase, GshF)로 구성된 군으로부터 선택되는 글루타치온 합성 촉매 효소;

를 포함하는 글루타치온 지속 생산용 시스템.

청구항 16

제 15 항에 따른 시스템에 글루타치온 생산을 위한 기질(substrate)로서 글루탐산(glutamate), 시스테인(cysteine) 및 글리신(glycine)을 첨가하는 단계를 포함하는 글루타치온의 지속 생산방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 광합성 세포막 소낭을 이용하여 글루타치온(glutathione)을 지속적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 글루타치온(glutathione, GSH)은 L-글루탐산(L-glutamate), L-시스테인(L-Cysteine), 글리신(Glycine)이 결합된 물질로서 대부분의 진핵생물(eukaryote) 및 일부 원핵생물(prokaryote)에서 합성된다. 글루타치온은 L-글루탐산, L-시스테인, 글리신을 시작물질로 하여, 감마 글루타밀시스테인 합성효소(γ-glutamylcysteine synthetase, GSHⅠ, EC 6.3.2.2) 및 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase, GSHⅡ, EC 6.3.2.3)가 촉매하는 두 단계의 효소반응에 의해 생합성 된다. 최근에는 상기 두 효소의 반응이 하나의 효소에 의해서 수행되는 새로운 생합성 경로가 밝혀졌고, 이 역할을 하는 효소를 이기능 글루타치온 합성효소(bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase, GshF)라고 한다(Janowiak and Griffith. 2005. J. Biol. Chem. 280: 11829-11839, Vergauwen *et al*. 2006. J. Biol. Chem. 281: 4380-4394).

[0003] 글루타치온은 환원력이 강한 티올기(thiol group)을 보유하고 있어 생체 내에서 글루타치온 과산화효소(GSH peroxidase), 글루타치온 환원효소(GSH reductase), 글루타치온 S-전이효소(GSH S-transferase)와 함께 작용하여 항산화제(antioxidant) 기능을 수행하며, 면역촉진 및 생체이물(xenobiotics)의 무독화(detoxification)에 관여하기도 한다(Pastore *et al*. 2003. Clinica Chimica Acta 333: 19-39). 보통 글루타치온 합성 유전자들은 생존에 필수적이며, 이들 유전자가 결손된 생물체는 산화스트레스(oxidative stress) 및 각종 유해물질에 대한 저항성이 감소된다고 알려져 있다. 또한, 사람의 여러 질병들이 체내 글루타치온 농도 감소와 연관된다는 보고가 있다(Wu *et al*. 2004. J. Nutr. 134: 489-492). 이 때문에 글루타치온은 항산화 작용에 의한 노화방지 및

건강증진을 목적으로 식품, 의약품 및 화장품의 첨가물로 널리 쓰이고 있다.

[0004] 현재까지 알려진 글루타치온을 생산하는 방법에는 유기합성법, 효소를 이용한(enzymatic) 방법, 그리고 발효를 이용한(fermentative) 방법이 있다. 유기합성법은 화학적 방법으로 글루타치온을 합성하는 방법으로 1935년에 개발되어 1950년에 상업화되었다(Harington and Mead. 1935. Biochem. J. 29: 1602-1611, Li *et al.* 2004. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 233-242). 유기합성법으로 합성된 글루타치온은 광학적으로 불활성 상태(optically inactive, racemic)로 얻어지게 되는데, 생물체는 L-글루타치온만을 선택적으로 사용한다. 따라서 유기합성법으로 합성된 글루타치온을 식품, 의약품에 이용하기 위해서는 L-글루타치온을 분리하는 과정이 추가적으로 필요하다.

[0005] 1950년대에 글루타치온의 생합성경로가 발견되면서(Bloch. 1949. J. Biol. Chem. 179: 1245-1254) 생물학적으로 글루타치온을 생산하려는 시도가 시작되었다. 그 중 발효를 이용하여 글루타치온을 생산하는 방법은 현재 상업적으로 가장 많이 쓰이는 방법으로 보통 대장균(*Escherichia coli*) 또는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp.)를 이용한다. 탄소원으로는 포도당 또는 당밀(molasses)을 이용하며, 보통 20-30 시간 동안 발효조건에서 배양 후 글루타치온을 추출해낸다. 여기에 추가적으로, 글루타치온 생산량을 증진시키기 위한 다양한 방법들이 있다. 일례로, L-시스테인을 배지에 첨가하여 글루타치온 생산속도를 증진시키는 방법이 있다(Alfafara *et al.* 1992. Appl. Microbiol. Biotechol. 37: 141-146). 또한, 글루타치온을 합성하는 두 개의 유전자(GSHⅠ,GSHⅡ)를 발효균주 내에서 과발현(overexpress)시켜 글루타치온 생산량을 증진시키려는 노력이 있었으나, 현저한 생산량 증가는 나타나지 않는다고 알려져 있다.

[0006] 생물학적으로 글루타치온을 생산하는 또 하나의 방법은 효소를 이용하는 것이다. 대부분 사용되는 방법은 대장균이나 효모에 계면활성제(surfactant)를 처리하여 물질 투과성을 높인 후 전체세포를 촉매로 사용하여, L-글루탐산, L-시스테인, 글리신 및 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate)을 첨가하여 L-글루타치온을 생산하는 것이다. 또 다른 방법으로서 정제된 감마 글루타밀시스테인 합성효소 및 글루타치온 합성효소를 이용하여 생산하는 방법이 있지만 많이 쓰이는 방법은 아니다. 이러한 효소를 이용한 방법의 장점은 반응이 선택적이며, 발효를 이용한 방법보다 수율이 높다는 것이다. 하지만, 반응에 필요한 아데노신 삼인산의 단가가 높아서 상업화가 어렵다는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 아데노신 삼인산을 재생하는 효소나 세포 자체의 해당과정(glycolysis)을 이용하여 아데노신 삼인산을 공급할 수는 있지만 비용문제를 완전히 해결하지 못하는 상황이다. 따라서 저렴한 비용으로 지속적으로 아데노신 삼인산을 공급할 수 있는 시스템을 갖춘다면, 효소를 이용한 글루타치온 생산 역시 상업화 될 가능성이 높다.

[0007] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 글루타치온은 식품, 의약품 및 화장품의 첨가물로 아주 유용하며, 효소를 이용한 글루타치온의 합성은 반응이 간소화 된다는 장점이 있으나, 효소를 이용할 경우 조효소의 높은 단가가 현실적인 문제가 될 수 있다. 이에 따라 본 발명자들은 글루타치온을 비교적 저렴하게 생산할 수 있는 방법을 찾고자 노력하였다. 그 결과, 광합성 세균 또는 조류의 세포막에 존재하는 소낭을 분리하여 광합성 명반응 수행 기구를 구성하고 이에 글루타치온의 합성을 촉매하는 효소를 조합하여 빛을 조사할 경우 단가가 매우 높은 아데노신 삼인산 등의 추가 투입 없이도 지속적으로 글루타치온을 합성할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 광합성 세포막 소낭과 감마 글루타밀시스테인 합성효소 및 글루타치온 합성효소를 이용한 글루타치온의 생산방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 광합성 세포막 소낭과 이기능 글루타치온 합성효소를 이용한 글루타치온의 생산방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 광합성 세포막 소낭을 포함하는 글루타치온 생산용 조성물을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 아데노신 삼인산의 공급수단으로서 광합성 세포막 소낭을 포함하는 글루타치온 지속 생산용 시스템을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 시스템에 글루타치온 생산을 위한 기질을 첨가하는 단계를 포함하는 글루타치온의 지속 생산방법을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle)과 감마 글루타밀시스테인 합성효소(γ-glutamylcysteine synthetase, GSHⅠ) 및 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase, GSHⅡ)를 이용한 글루타치온(glutathione)의 생산방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 광합성 세포막 소낭(photosynthetic membranve vesicle)과 이기능 글루타치온 합성효소(bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase, GshF)를 이용한 글루타치온(glutathione)의 생산방법을 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 식품, 의약품 및 화장품의 첨가물로 유용한 글루타치온을 지속적으로 생산할 수 있는 방법을 찾고자 노력하였다. 그 결과, 광합성 세균 또는 조류의 세포막에 존재하는 소낭을 분리하여 광합성 명반응 수행 기구를 구성하고 이에 글루타치온의 합성을 촉매하는 효소를 조합하여 빛을 조사할 경우 단가가 매우 높은 아데노신 삼인산 등의 추가 투입 없이도 지속적으로 글루타치온을 합성할 수 있음을 확인하였다.

[0018] 본 명세서에서 사용된 용어 "광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle)"은 빛에너지를 이용하여 광합성을 수행할 수 있는 광합성 세균(photosynthetic bacteria) 또는 조류(algae)에서 소낭(vesicle) 형태로 분리될 수 있으며, 적절한 빛이 조사되는 조건에서 광합성의 명반응을 수행할 수 있는 세포막-단백질 복합체를 의미한다.

[0019] 상기 광합성 세포막 소낭을 형성하는 광합성 세포막(photosynthetic membrane)은 비산소발생 광합성 세균(anoxygenic photosynthetic bacteria)에 존재하는 광기구 세포막(chromatophore membrane, 혹은 intracytoplsmic membrane (ICM))과, 산소발생 광합성 세균(oxygenic photosynthetic bacteria) 또는 조류(algae)에 존재하는 틸라코이드 세포막(thylakoid membrane, TM)을 포함한다.

[0020] 광기구 세포막 소낭(chromatophore membrane vesicle)은 광기구 세포막에서 유래하며, 광반응 중심체(reaction center), 광흡수체(light-harvesting complex), 아데노신 삼인산 합성효소(ATP synthase) 및 전자전달계(electron transfer chain) 단백질들을 포함하는 세포막-단백질 복합체를 의미한다. 광기구 세포막은 순환적 전자전달(cyclic electron flow)을 통해 형성된 양성자 농도구배(proton motive force)이용하여 아데노신 이인산(adenosine diphosphate)과 무기인산(inorganic phosphate)으로부터 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate)을 형성한다. 또한 광기구 세포막에 존재하는 복합체Ⅰ(complex Ⅰ)과 복합체Ⅱ(complex Ⅱ)를 통한 역전자전달(reverse electron flow)을 통해 산화형 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(nicotiamide adenine dinucleotide oxidzed, NAD^+)로부터 환원형 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(nicotiamide adenine dinucleotide reduced, NADH)를 형성할 수 있다. 이렇게 형성된 환원형 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NADH)는 피리딘 뉴클레오타이드 수소전이효소(pyridine nucleotide transhydrogenase)를 통해 환원형 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(nicotiamide adenine dinucleotide phosphate reduced, NADPH)으로 전환될 수 있다.

[0021] 상기 광기구 세포막 소낭을 분리할 수 있는 비산소발생 광합성 세균은 제한이 없으며, 바람직하게는 자색비유황세균(purple non-sulfur bacteria)으로부터 분리할 수 있으며, 보다 바람직하게는 로도박터 속(*Rhodobacter* sp.), 로도스피릴룸 속(*Rhodospirillum* sp.), 로도수도모나스 속(*Rhodopseudomonas* sp.), 로지오박터 속

(*Roseobacter* sp.), 브래디리조비움 속(*Bradyrhizobium* sp.) 및 루비리박스 속(*Rubrivivax* sp.)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 자색비유황세균으로부터 분리할 수 있다.

[0022] 틸라코이드 세포막 소낭(thylakoid membrane vesicle)은 틸라코이드 세포막(thylakoid membrane)에서 유래하며, 두 종류의 광계(photosystem Ⅰ/Ⅱ)와 아데노신 삼인산 합성효소 및 전자전달계 단백질들을 포함하는 세포막-단백질 복합체를 의미한다. 틸라코이드 세포막은 전자수용체로 산소를 사용하는 전자전달을 통해 환원형 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH)과 양성자 농도구배를 형성한다. 이렇게 형성된 양성자 농도구배는 아데노신 삼인산 합성효소에 의해 아데노신 이인산과 무기인산을 아데노신 삼인산으로 합성하는데 사용된다.

[0023] 상기 틸라코이드 세포막 소낭을 분리할 수 있는 산소발생 광합성 세균 또는 조류는 제한이 없으며, 바람직하게는 남세균(cyanobacteria)으로부터 분리할 수 있고, 보다 바람직하게는 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.), 시네코코쿠스 속(*Synechococcus* sp.), 노스톡 속(*Nostoc* sp.), 아나베나 속(*Anabaena* sp.), 글로이오박터 속(*Gloeobacter* sp.) 및 시아노박테리움 속(*Cyanobacterium* sp.)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 남세균으로부터 분리할 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명은 상기 광합성 세포막 소낭에 빛을 조사하여 아데노신 이인산(adenosine diphosphate, ADP)과 무기인산(inorganic phosphate)으로부터 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 형성하는 단계를 포함한다.

[0025] 본 발명에서는 광합성 세포막 소낭을 아데노신 삼인산의 공급원으로서 이용하는데 글루타치온의 합성을 촉매하는 효소들은 글루타치온을 형성하는 과정에서 아데노신삼인산을 소모하면서 아데노신 이인산 및 무기인산을 형성한다(도 1a 및 도 1b). 이렇게 형성된 아데노신 이인산 및 무기인산은 광합성 조건하에서 광합성 세포막 소낭의 명반응에 의해 아데노신 삼인산으로 재생되어 글루타치온 합성에 관여하는 효소의 반응에 재사용 될 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 사용된 용어 "광합성 조건"은 광합성 세포막 소낭의 명반응을 유도하기 위한 조건을 의미한다. 예를 들어, 광기구 세포막 소낭의 경우 바람직하게는 20-37℃의 온도, 3-300 Watts/m^2의 광도, 350-1000 ㎚ 파장대의 빛이 조사되는 조건 하에서 수행 될 수 있으며 이러한 파장대를 충족하기 위해 백열등을 사용할 수 있다. 또한, 틸라코이드 세포막 소낭의 경우, 바람직하게는 20-37℃의 온도와 5-500 μEinstein/m^2·s(μmole photons/m^2·s)의 광도, 400-700 ㎚ 파장대의 빛에서 수행될 수 있으며 이러한 파장대를 충족하기 위해 형광등을 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 글루타치온(glutathione)의 생산방법을 제공한다: a) 광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle)에 빛을 조사하여 아데노신 이인산(adenosine diphosphate, ADP) 및 무기인산(inorganic phosphate)으로부터 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 생성하는 단계; b) 글루타치온의 합성을 촉매하는 효소가 상기 단계 a)에서 생성된 아데노신 삼인산을 이용하여 글루타치온을 합성하고, 아데노신 이인산 및 무기인산을 형성하는 단계; 및 c) 상기 단계 b)에서 생성된 아데노신 이인산 및 무기인산이 광합성 세포막 소낭의 아데노신 삼인산 생성에 재사용되는 단계.

[0028] 본 명세서에서 사용된 용어 "글루타치온의 합성을 촉매하는 효소"는 아데노신 삼인산을 소모하면서 아데노신 이인산 및 무기인산을 형성하며, 이로부터 글루타치온을 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미하며, 바람직하게는 감마 글루타밀시스테인 합성효소(γ-glutamylcysteine synthetase, GSHⅠ), 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase, GSHⅡ) 및 이기능 글루타치온 합성효소(bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase, GshF)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 효소를 포함한다.

[0029] 상기 글루타치온의 합성을 촉매하는 효소는 글루타치온 생산을 위한 기질(substrate)을 필요로 하며, 바람직하게는 글루탐산(glutamate), 시스테인(cysteine) 및 글리신(glycine)을 기질로 이용한다. 생물체는 L-글루타치온만을 선택적으로 생산 및 사용하는 점을 고려할 때 상기 글루탐산 및 시스테인은 L-글루탐산(L-glutamate) 및 L-시스테인(L-cysteine)을 이용하는 것이 보다 효율적이다.

[0030] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 글루타치온의 합성을 촉매하는 효소 중 감마 글루타밀시스테인 합성효소는 아데노신 삼인산을 아데노신 이인산과 무기인산으로 전환하면서 글루탐산 및 시스테인을 감마 글루타밀시스테인으로 합성하는 과정을 촉매하며, 글루타치온 합성효소는 아데노신 삼인산을 아데노신 이인산과 무기인산으로 전환하면서 감마 글루타밀시스테인 및 글리신을 글루타치온으로 합성하는 과정을 촉매하는 효소인 것이다.

[0031] 즉, 상기 방법에서 단계 b)는 단계 a)에서 생성된 아데노신 삼인산이 아데노신 이인산과 무기인산으로 전환되면서 글루탐산과 시스테인이 감마 글루타밀시스테인 합성효소에 의해서 감마 글루타밀시스테인을 형성하는 단계; 및 상기 형성된 감마 글루타밀시스테인과 글리신이 글루타치온 합성효소에 의해서 글루타치온으로 합성되면서 단계 a)에서 생성된 아데노신 삼인산이 아데노신 이인산과 무기인산으로 전환되는 단계; 를 포함하여 수행될 수 있다(참조: 도 1a, 이하 전체반응 A).

[0032] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 글루타치온의 합성을 촉매하는 효소 중 이기능 글루타치온 합성효소는 감마 글루타밀시스테인 합성효소가 촉매하는 반응 및 글루타치온 합성효소가 촉매하는 반응을 모두 촉매할 수 있는 효소인 것이다.

[0033] 즉, 상기 방법에서 단계 b)는 글루탐산, 시스테인 및 글리신이 이기능 글루타치온 합성효소에 의해 글루타치온으로 합성되면서 단계 a)에서 생성된 아데노신 삼인산이 아데노신 이인산과 무기인산으로 전환되는 단계를 포함하여 수행될 수 있다(참조: 도 1b, 이하 전체반응 B).

[0034] 본 발명에서는 광합성 세포막 소낭 및 각 효소들 간의 상대량을 표현하기 위해 효소 활성(enzyme activity)을 이용하였다. 본 명세서에서 용어 "효소 활성"(이하 활성)은 특정한 양의 효소가 단위시간당 생성할 수 있는 산물의 양을 의미(μmole product/min)하며, 실제 활성이 있는 효소의 양을 반영한다. "상대활성"은 광기구 세포막 소낭 및 효소간의 실제 활성비(activity ratio)를 간단한 정수비로 나타냈을 때, 해당 효소 또는 광기구 세포막 소낭의 비율값을 의미한다. 전체반응 A에서 감마 글루타밀시스테인 합성효소 : 글루타치온 합성효소의 상대활성비(relative activity ratio)는 제한되지 않지만, 바람직하게는 1:1 내지 100:1, 보다 바람직하게는 4:1 내지 20:1, 가장 바람직하게는 8:1 내지 16:1인 것이다. 또한, 광합성 세포막 소낭 : 감마 글루타밀시스테인 합성효소 : 글루타치온 합성효소의 상대활성비에는 제한을 두지 않지만, 바람직하게는 1:12:1 내지 100:12:1, 보다 바람직하게는 1:12:1 내지 50:12:1, 가장 바람직하게는 1:12:1 내지 25:12:1인 것이다. 마지막으로, 광합성 세포막 소낭 : 이기능 글루타치온 합성효소의 상대활성비 역시 제한이 없으며, 바람직하게는 1:1 내지 1000:1, 보다 바람직하게는 10:1 내지 500:1, 가장 바람직하게는 40:1 내지 200:1인 것이다. 상기 상대활성비를 벗어난다 하여 글루타치온의 생성이 불가능한 것은 아니나, 전체적인 글루타치온의 수율 및 생산비용 등을 고려할 때 상기 비율에 따르는 것이 보다 효율적이다.

[0035] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 전체반응 A 또는 전체반응 B를 무산소조건(anaerobic condition)에서 수행하는 것이다. 이로써 광합성 세포막 소낭의 활성을 극대화하며, 생산물인 글루타치온의 산화(oxidation)을 방지할 수 있다.

[0036] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 i) 광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle); 및 ii) 감마 글루타밀시스테인 합성효소(γ-glutamylcysteine synthetase, GSHⅠ), 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase, GSHⅡ) 및 이기능 글루타치온 합성효소(bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase, GshF)로 구성된 군으로부터 선택되는 글루타치온 합성 촉매 효소; 를 포함하는 글루타치온 생산용 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명은 조성물의 형태로 제품화될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 적당한 용기(유리병, 플라스틱 용기 등)에 담겨 유통되어, 글루타치온 생산에 활용될 수 있다. 글루타치온 생산하고자 하는 자는 상기 광합성 세포막 소낭 및 글루타치온의 합성을 촉매하는 효소가 포함된 조성물에 광원을 조사하여 글루타치온을 지속적으로 생산할 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 i) 아데노신 삼인산의 공급수단으로서 광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle); 및 ii) 글루타치온 합성반응 촉매수단으로서 감마 글루타밀시스테인 합성효소(γ-glutamylcysteine synthetase, GSHⅠ), 글루타치온 합성효소(glutathione synthetase, GSHⅡ) 및 이기

능 글루타치온 합성효소(bifunctional ɣ-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase, GshF)로 구성된 군으로부터 선택되는 글루타치온 합성 촉매 효소; 를 포함하는 글루타치온 지속 생산용 시스템을 제공한다.

[0039] 본 명세서에서 용어 "글루타치온 지속 생산용 시스템"은 아데노신 삼인산의 최초 투입 또는 아데노신 이인산과 무기인산의 최초 투입 이외에 추가적인 투입을 반드시 필요로 하지는 않는 시스템으로써, 글루탐산, 시스테인 및 글리신만을 첨가하여도 글루타치온을 지속적으로 생산할 수 있는 시스템을 의미하며, 이는 반응기, 키트, 장치, 설비 등을 포함한다.

[0040] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 시스템에 글루타치온 생산을 위한 기질(substrate)로서 글루탐산(glutamate), 시스테인(cysteine) 및 글리신(glycine)을 첨가하는 단계를 포함하는 글루타치온의 지속 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0041] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0042] (ⅰ) 본 발명은 광합성 세포막 소낭, 감마 글루타밀시스테인 합성효소 및 글루타치온 합성효소를 이용한 글루타치온의 생산방법을 제공한다.

[0043] (ii) 또한, 본 발명은 광합성 세포막 소낭, 이기능 글루타치온 합성효소를 이용한 글루타치온의 생산방법을 제공한다.

[0044] (iii) 본 발명은 감마 글루타밀시스테인 합성효소, 글루타치온 합성효소, 이기능 글루타치온 합성효소가 글루타치온을 합성할 때 소모되는 아데노신 삼인산을 공급하는 수단으로서 광합성 세포막 소낭을 이용하여, 빛이 조사되는 조건에서 아데노신 삼인산을 지속적으로 공급함으로써 아데노신 삼인산의 추가적인 투입에 들어가는 비용을 절감할 수 있는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1a는 전체반응 A로서, 광기구 세포막 소낭, 감마 글루타밀시스테인 합성효소 및 글루타치온 합성효소를 이용하여 글루타치온을 합성하는 방법의 반응 모식도이다. 도 1b는 전체반응 B로서 광기구 세포막 소낭 및 이기능 글루타치온 합성효소를 이용하여 글루타치온을 합성하는 방법의 반응 모식도이다.

도 2는 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(SDS PAGE)을 수행하여, 정제된 감마 글루타밀시스테인 합성효소, 글루타치온 합성효소 및 이기능 글루타치온 합성효소를 확인한 것이다.

도 3은 감마 글루타밀시스테인 합성효소의 활성을 아데노신 이인산 형성을 검출하는 방법을 이용하여 측정한 예시이다.

도 4는 글루타치온 합성효소의 활성을 아데노신 이인산 형성을 검출하는 방법을 이용하여 측정한 예시이다.

도 5는 글루타치온 합성효소의 상대활성(relative activity)을 1로 고정시키고 감마 글루타밀시스테인 합성효소의 상대활성에 따른 글루타치온의 생성량을 확인한 것이다.

도 6은 감마 글루타밀시스테인 합성효소의 상대활성:글루타치온 합성효소의 상대활성비를 12:1로 고정시키고, 광기구 세포막 소낭의 상대활성에 따른 글루타치온 생성량을 확인한 것이다.

도 7은 L-글루탐산, L-시스테인, 글리신, 아데노신 삼인산이 포함된 반응액에서 이기능 글루타치온 합성효소의 글루타치온 생성 활성을 측정한 예시이다.

도 8은 이기능 글루타치온 합성효소의 상대활성을 1로 고정시키고, 광기구 세포막 소낭의 상대활성에 따른 글루타치온 생성량을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0047] **실시예**

[0048] **실시예 1: 광기구 세포막 소낭의 분리**

[0049] 광기구 세포막 소낭(chromatophore membrane vesicle)은 대한민국 특허 출원 제10-2014-0151907호에 명시된 방법을 이용하여 분리하였다. 광기구 세포막 소낭의 분리를 위해 사용된 균주는 자색 비유황 세균의 일종인 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphearoides* 2.4.1, ATCC BAA-808, Cohen-Bazire *et al*. 1956. J. Cell. Comp. Physiol. 49: 25-68)를 이용하였다. 상기 균주를 배양할 때는 시스트롬 최소배지(Sistrom. 1962. J. Gen. Microbiol. 28: 607-616, 표 1)를 사용하였다. 배양 방법은 먼저 5 ㎖ 의 배지가 들어있는 시험관에 균주를 접종한 후, 30℃, 250 rpm 에서 진탕배양하였다. 660 ㎚에서의 흡광도가 2.0 정도 되었을 때, 18 ㎖ 용량의 스크류 캡(screw cap) 시험관에 초기 흡광도가 0.05가 되도록 계대배양한 후, 산소의 유입을 차단하기 위해 스크류 캡 시험관에 배지를 가득 채우고 밀봉하였다. 배양은 광합성 조건에서 수행하였으며, 온도가 30℃로 유지되는 배양기(incubator)에 백열등에 의해 15 Watts/m^2의 광도로 빛이 조사되는 조건 하에서 18시간 동안 혐기배양 하였다. 260 ㎖의 투명한 유리병을 준비하여, 18 ㎖ 스크류 캡 시험관에서 배양한 균주를 8 ㎖ 넣은 후, 나머지 용량을 배지로 가득 채우고 밀봉하여 30℃의 온도, 15 Watts/m^2의 광도의 백열등 앞에서 18시간 동안 혐기배양 하였다. 이후 광기구 세포막의 분리 과정은 모두 혐기상자(anaerobic chamber, model 10, Coy laboratory product)에서 수행되었다. 혐기상자 안의 기체 조성은 질소 90%, 이산화탄소 5%, 수소 5%로 구성된다. 260 ㎖에서 배양한 로도박터 스페로이데스 균주를 7000 g, 4℃로 10분간 원심분리한 후 상층액(supernatant)을 버리고, 균체(cell pellet)를 얻었다. 균체는 인산 버퍼(phosphate buffer, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, pH 7.6)를 4 ㎖ 넣고 용해(resuspension)시킨 후 프로테아제 억제제 혼합액(protease inhibitor cocktail, Roche)을 제조사의 지침에 따라 첨가하였다. 이 후의 과정에서는 모든 시료를 얼음에 두고 온도를 낮게 유지하면서 진행되었다. 다음 과정은 세포를 파쇄하기 위해 초음파파쇄기(sonicator, model VCX130, Sonics & Materials)를 이용하여, 100% 증폭(amplification)으로 2분간 초음파를 조사한 후 2분간 얼음물에서 냉각시키는 과정을 3회 반복하였다. 초음파를 조사할 때는 과열을 방지하기 위해 균체를 얼음물로 냉각하면서 수행되었다. 파쇄한 균체는 6,000 g, 4℃에서 10분간 원심분리한 후 그 상층액만을 수득하여, 초고속원심분리기(Optima XE-90, Beckman Coulter)를 이용하여 4℃, 200,000 g에서 1시간 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후, 서당 밀도구배 원심분리(sucrose-density gradient ultracentrifugation)를 위해 광기구 세포막 소낭을 포함하는 침전물(pellet)을 1 ㎖의 인산 버퍼로 용해시켰다. 서당 밀도구배는 13.5 ㎖ 용량의 초고속원심분리용 용기의 맨 아래 층부터, 60%(w/v, 인산 버퍼로 용해) 서당용액 8 ㎖, 40% 서당용액 1 ㎖, 20% 서당용액 1 ㎖ 로 이루어지며, 가장 위층에 1 ㎖의 광기구 세포막 소낭 침전물을 올린 후, 200,000 g 에서 4시간 동안 초고속원심분리를 하였다. 광기구 세포막 소낭은 20% 서당용액 층과 40% 서당용액 층 사이에 위치하게 되며, 적갈색의 층으로 나타난다. 광기구 세포막 소낭을 포함하는 적갈색의 층을 분리한 후 같은 부피의 인산 버퍼를 첨가하여 희석하였고, 추가로 일반 오염균의 증식을 방지하기 위해 카나마이신(kanamycin)을 100 ㎍/㎖의 농도로 첨가한 후, 프로테아제 억제제 혼합액을 제조사의 지침에 맞게 첨가한 뒤, 무산소(anaerobic) 상태로 밀봉하여 4℃에서 보관하였다.

표 1

[0050] 로도박터 스페로이데스 배양용 시스트롬 최소배지 조성

첨가물	최종농도
KH_2PO_4	20 mM
NaCl	8.5 mM
$(NH_4)_2SO_4$	3.78 mM
L-Glutamic acid	0.67 mM
L-Aspartic acid	0.25 mM
Succinic acid	34 mM

Nitrilotriacetic acid	1.05 mM
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.2 mM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.23 mM
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	7 μM
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0.16 μM
EDTA	4.7 μM
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	38 μM
$MnSO_4 \cdot H_2O$	9.1 μM
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.6 μM
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.85 μM
H_3BO_3	1.8 μM
니코틴산	8.1 μM
티아민염산염	1.5 μM
Biotin	41 nM

[0051] **실시예 2: 글루타치온 합성에 관여하는 효소를 암호화 하는 유전자 확보**

[0052] 전체반응 A(도 1a)의 감마 글루타밀시스테인 합성효소와 글루타치온 합성효소를 암호화(coding)하는 유전자, 및 전체 반응 B(도 1b)의 이기능 글루타치온 합성효소를 클로닝(cloning)하기 위해 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 감마 글루타밀시스테인 합성효소의 경우 전방 프라이머(forward primer)로 서열번호 1을, 후방 프라이머(reverse primer)로 서열번호 2를 사용하였고, 글루타치온 합성효소의 경우, 전방 프라이머로 서열번호 3을, 후방 프라이머로 서열번호 4를 사용하여, 각각 대장균(*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655)의 염색체 DNA (chromosomal DNA)를 주형(template)으로 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 이기능 글루타치온 합성효소는 전방 프라이머로 서열번호 5를, 후방 프라이머로 서열번호 6을 사용하여, 스트렙토코커스 아갈락티아(*Streptococcus Agalactiae* str. 2603V/R, ATCC BAA-611)의 염색체 DNA (chromosomal DNA)를 주형(template)으로 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 이렇게 중합효소 연쇄반응으로 확보한 유전자 절편(fragment)의 양쪽 말단에는 제한효소 *Bsa*I 의 인식 서열 및 IBA 사에서 권장하는 추가서열을 삽입하여 이를 IBA사에서 제공하는 발현벡터(expression vector)인 pASK-IBA7plus(감마 글루타밀시스테인 합성효소, 이기능 글루타치온 합성효소) 및 pASK-IBA3plus(글루타치온 합성효소)에 접합하였다. 결과적으로 N-말단에 스트렙태그(strep-tag)가 접합된 감마 글루타밀시스테인 합성효소 및 이기능 글루타치온 합성효소와, C-말단에 스트렙태그(strep-tag)가 접합된 글루타치온 합성효소를 발현시키는 구조물을 완성하였다.

표 2

[0053] 감마 글루타밀시스테인 합성효소 유전자 서열 확보용 프라이머

서열번호	방향	서열
1	gshA-F	5'-AAAAAAGGTCTCTGCGCTTGATCCCGGACGTATCACA-3'
2	gshA-R	5'-AAAAAAGGTCTCTTATCATCAGGCGTGTTTTTCCAGCC-3'

표 3

[0054] 글루타치온 합성효소 유전자 서열 확보용 프라이머

서열번호	방향	서열
3	gshB-F	5'-AAAAAAGGTCTCTAATGATCAAGCTCGGCATCGT-3'
4	gshB-R	5'-AAAAAAGGTCTCTGCGCTCTGCTGCTGTAAACGTGCTT-3'

표 4

[0055] 이기능 글루타치온 합성효소 유전자 서열 확보용 프라이머

서열번호	방향	서열
5	gshF-F	5'-AAAAAAGGTCTCAGCGCATGATTATCGATCGACTGTTAC -3'
6	gshF-R	5'-AAAAAAGGTCTCGTATCATTATAATTCTGGGAACAGTTTAG-3'

[0056] **실시예 3: 글루타치온 합성 반응을 촉매하는 효소의 정제**

[0057] 본 실시예에서는 실시예 2에서 제작한 발현벡터 구조물로 대장균 균주 BL21(DE3)을 형질전환(transformation)하여 감마 글루타밀시스테인 합성효소와 글루타치온 합성효소 및 이기능 글루타치온 합성효소를 각각 과발현하는 형질전환 균주를 획득하였다. 상기 세 효소 정제 시 동일한 방법을 사용한다. 먼저 시험관에 50 ㎍/㎖의 앰피실린(ampicillin) 포함하는 LB(Luria-Bertani) 배지 5 ㎖를 넣고, 형질전환 균주를 접종하여 250 rpm, 37℃에서 12시간 동안 진탕배양한다. 시험관에서 진탕배양한 균주를 50 ㎍/㎖의 앰피실린이 포함된 500 ㎖ LB 배지가 담긴 1L 플라스크(flask)에 접종하였다. 접종 시 600 ㎚의 최초흡광도가 0.05가 되도록 한 후 250 rpm, 37℃에서 진탕배양하다가 흡광도가 0.4에 도달하면 무수테트라사이클린(anhydrotetracylcine)을 0.2 ㎍/㎖ 농도로 첨가하였다. 250 rpm, 30℃에서 약 12시간 동안 진탕배양 후 4,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 균체(pellet)를 획득하였다. 균체를 10 ㎖의 버퍼W(100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 용해한 후 프로테아제 억제제 혼합액(Roche)을 제조사의 권장량만큼 첨가하였고, 균체를 파쇄하기 위해 초음파 파쇄기(Branson sonifier 250)를 이용하였다. 초음파파쇄는 아웃풋(output) 3의 강도로 5분간 파쇄한 후 5분간 얼음물에서 냉각하는 과정을 3회 반복하였다. 파쇄 후 6,000 g에서 10분간 원심분리하여 수용성 효소가 포함된 상층액을 분리하여 스트렙 태그를 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)로 효소를 정제하였다. 스트렙 태그 친화성 크로마토그래피는 제조사(IBA)에서 권장하는 방법을 사용하였다. 최종적으로 정제한 효소들은 10%의 SDS 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(SDS polyacrylamide gel electrophoresis)으로 확인하였다(도 2). 예상 분자량은 감마 글루타밀시스테인 합성효소가 약 58 kDa(Watanabe *et al*. 1986. Nucleic Acids Res. 14: 4393), 글루타치온 합성효소가 약 35 kDa(Gushima *et al*. 1984. Nucleic Acids Res. 12: 9299), 이기능 글루타치온 합성효소가 약 85 kDa(Janowiak and Griffith. 2005. J. Biol. Chem. 280: 11829-11839)이었다.

[0058] **실시예 4: 빛의 조사에 의한 광기구 세포막 소낭의 아데노신 삼인산 생성 활성 측정**

[0059] 광기구 세포막 소낭의 정량 및 활성측정은 대한민국 특허 출원 제10-2014-0151907호에 명시된 방법을 이용하였다. 광기구 세포막 소낭은 박테리오클로로필 에이(bacteriochlorophyll *a*, bch *a*) 농도를 이용하여 정량하였으며, 아데노신 삼인산(ATP) 생성 활성 측정 시 0.25-0.5 ㎍ bch *a*/㎖의 농도로 광기구 세포막 소낭을 사용하였다. 반응은 10 mM 인산나트륨(Na_2HPO_4), 2mM 인산칼륨(KH_2PO_4), 10 mM 염화마그네슘($MgCl_2$), 0.4 mM 아데노신 이인산으로 구성된 버퍼에 광기구 세포막 소낭을 적당량 투입한 후 30℃, 15 Watts/㎡의 백열등이 조사되는 무산소(anaerobic)조건에서 시간별로 생성되는 아데노신 삼인산의 양을 아데노신 삼인산 검출 키트(Sigma-Aldrich)를 이용하여 측정하였다. 광기구 세포막 소낭의 활성은 단위 시간당 생성된 아데노신 삼인산의 양(nmole ATP/min)으로 표현하였다.

[0060] **실시예 5: 감마 글루타밀시스테인 합성효소와 글루타치온 합성효소의 효소활성 측정**

[0061] 본 실시예에서는 실시예 3에서 정제한 감마 글루타밀시스테인 합성효소 및 글루타치온 합성효소의 효소활성(enzyme activity)을 측정하기 위해 아데노신 이인산 형성을 측정하는 방법(Seelig and Meister. 1985. Methods in Enzymol. 113: 379-390)을 사용하였다. 활성측정 시 사용한 반응버퍼는 0.1 mM 트리스(Tris-Cl, pH 7.6), 10 mM 염화마그네슘($MgCl_2$), 0.8 mM 아데노신 삼인산(ATP), 2 mM 인산 에놀 피루브산(phosphoenolpyruvate), 0.2 mM 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오티드(NADH), 14.3 Unit/㎖ 피루브산 인산화효소(pyruvate kinase), 14.3 Unit/㎖ 젖산 탈수소효소(lactic dehydrogenase)로 구성된다. 감마 글루타밀시스테인 합성효소의 활성을 측정할 경우 상기 반응버퍼에 10 mM의 L-글루탐산(L-glutamate)과 10 mM의 L-시스테인(L-cysteine)을 첨가해 주었고, 글루타치온 합성효소의 활성을 측정할 경우 상기 반응버퍼에 10 mM 글리신(glycine), 1 mM 감마 글루타밀시스테인(ɣ-glutamylcysteine)을 첨가하였다. 반응온도는 30℃로 하였다. 감마 글루타밀시스테인 합성효소와 글루타치온 합성효소의 효소반응이 일어날 경우 아데노신 이인산이 생성되며, 이와 동시에 아데노신 이인산과 동일한 당량의 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오티드(NADH)가 산화된

형태(NAD^+)로 전환된다. 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오티드는 340 nm에서 흡광성을 보이는 반면 산화된 형태는 흡광성이 없으므로, 시간에 따른 340 nm에서의 흡광도 감소를 측정함으로써 두 효소의 활성을 알 수 있다. 도 3은 감마 글루타밀 합성효소의 활성을 측정한 예시이고, 도 4는 글루타치온 합성효소의 활성을 측정한 예시이다. 효소 활성 계산 시 340 nm에서 몰흡광계수(6220 $M^{-1}cm^{-1}$)를 이용하여 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NADH)의 농도 변화량을 구하였고, 1 당량의 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드가 소모될 때 각 효소의 산물이 1 당량 생성된다고 가정하였다. 이렇게 계산된 단위시간당 생성된 산물의 수(nmole product/min)를 효소활성이라고 표현하였다.

[0062] **실시예 6: 감마 글루타밀시스테인 합성효소와 글루타치온 합성효소에 의한 글루타치온 생성 확인**

[0063] 본 실시예에서는 감마 글루타밀시스테인 합성효소와 글루타치온 합성효소에 의해 L-글루탐산, L-시스테인, 글리신 및 아데노신 삼인산으로부터 글루타치온이 형성되는 것을 확인하였다. 사용한 반응 버퍼는 10 mM 인산나트륨(Na_2HPO_4), 2mM 인산칼륨(KH_2PO_4), 10 mM 염화마그네슘($MgCl_2$), 0.8 mM 아데노신 삼인산(ATP), 10 mM L-글루탐산, 10 mM L-시스테인, 10 mM 글리신으로 구성하였고, 생성된 글루타치온의 산화를 방지하기 위해 30℃, 무산소조건(anaerobic)에서 반응을 진행하였다. 글루타치온의 검출은 글루타치온 검출키트(GSH-Glo™ Glutathione Assay, Promega)를 이용하였다. 각 효소는 실시예 5의 방법으로 활성을 측정한 후, 활성을 기반으로 정량하였다. 도 5는 글루타치온 합성효소의 상대활성을 고정시키고, 그에 따른 감마 글루타밀시스테인 합성효소의 상대활성을 변화시키면서 글루타치온이 생성되는 양을 측정한 것이다. 결과적으로 두 효소에 의해 글루타치온이 형성되는 것을 확인하였고, 글루타치온 생산량이 최대가 되는 두 효소간의 최소 활성비(activity ratio, 도 5의 GSHⅠ:GSHⅡ)는 약 12:1 이었다. 따라서, 하기의 실시예에서는 감마 글루타밀시스테인 합성효소와 글루타치온 합성효소의 비를 12:1로 사용하였다.

[0064] **실시예 7: 빛이 조사되는 조건에서 광기구 세포막 소낭, 감마 글루타밀시스테인 합성효소 및 글루타치온 합성효소에 의한 글루타치온 생성 확인**

[0065] 본 실시예에서는 광기구 세포막 소낭, 감마 글루타밀시스테인 합성효소, 글루타치온 합성효소에 의해 아데노신 삼인산(ATP)이 없고, 빛이 조사되는 조건에서 글루타치온의 생성을 확인하였다. 사용한 반응 버퍼는 10 mM 인산나트륨(Na_2HPO_4), 2mM 인산칼륨(KH_2PO_4), 10 mM 염화마그네슘($MgCl_2$), 0.4 mM 아데노신 이인산(ADP), 10 mM L-글루탐산, 10 mM L-시스테인, 10 mM 글리신을 포함하며, 30℃, 무산소조건에서 반응을 진행하였다. 광원(light source)로는 15 Watts/㎡의 광도의 백열등을 사용하였다. 도 6은 감마 글루타밀시스테인 합성효소:글루타치온 합성효소의 상대활성을 12:1로 고정시키고, 광기구 세포막 소낭의 상대활성을 변화시키면서 글루타치온의 생성량을 확인한 것이다. 광기구 세포막 소낭의 양이 증가할수록 글루타치온의 생성량(또는 생성속도)이 증가함을 확인하였고, 광기구 세포막 소낭의 상대활성이 25 이상일 때 글루타치온의 생성량이 최대에 근접하였다.

[0066] **실시예 8: 이기능 글루타치온 합성효소의 글루타치온 생성 활성 측정**

[0067] 본 실시예에서는 L-글루탐산, L-시스테인, 글리신 및 아데노신 삼인산이 포함된 반응액에서 이기능 글루타치온 합성효소가 글루타치온을 생성하는 것을 확인하였다. 반응액의 조성은 10 mM 인산나트륨(Na_2HPO_4), 2mM 인산칼륨(KH_2PO_4), 10 mM 염화마그네슘($MgCl_2$), 100 mM L-글루탐산, 10 mM L-시스테인, 25 mM 글리신, 0.8 mM 아데노신 삼인산(ATP)으로 구성하였고, 30℃에서 반응을 수행하였다. 도 7은 각각 다른 양의 이기능 글루타치온 합성효소를 포함하는 반응액에서 시간에 따른 글루타치온 생성량을 측정하여, 이기능 글루타치온 합성효소의 활성(nmole glutathione/min)을 결정한 것이다. 이기능 글루타치온 합성효소의 반응은 초반에 유도기(lag phase)가 존재하기 때문에, 활성을 계산할 때에는 선형(linear) 구간의 반응속도로 계산한다.

[0068] **실시예 9: 빛이 조사되는 조건에서 광기구 세포막 소낭과 이기능 글루타치온 합성효소에 의한 글루타치온 생성 확인**

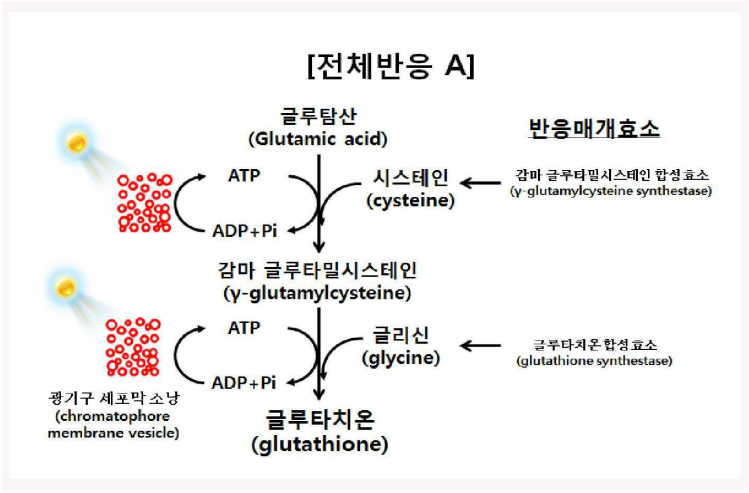
[0069] 본 실시예에서는 아데노신 삼인산 대신 아데노신 이인산을 첨가 후 빛이 조사되는 조건에서 광기구 세포막 소낭

과 이기능 글루타치온 합성효소를 함께 사용하여 L-글루탐산, L-시스테인, 글리신으로부터 글루타치온이 생성됨을 확인하였다. 반응액은 상기 실시예 8의 반응액에서 0.8 mM의 아데노신 삼인산 대신 0.4 mM의 아데노신 이인산을 첨가해 준 것을 사용하였다. 반응은 15 Watts/㎡의 광도의 백열등이 조사되는 30℃의 무산소조건에서 수행되었다. 도 8은 이기능 글루타치온 합성효소의 상대활성을 1로 고정시키고 광기구 세포막 소낭의 활성에 따른 글루타치온의 생성량을 측정한 것이며, 광기구 세포막 소낭의 양이 증가할수록 글루타치온의 생성량이 증가함을 확인하였다.

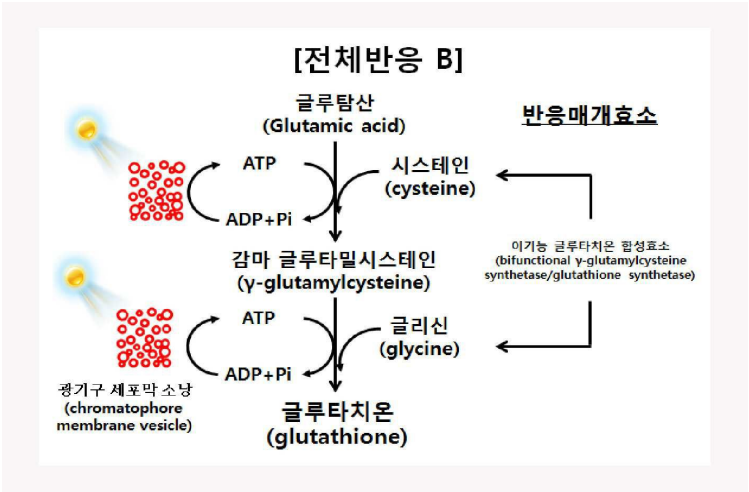
[0070] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

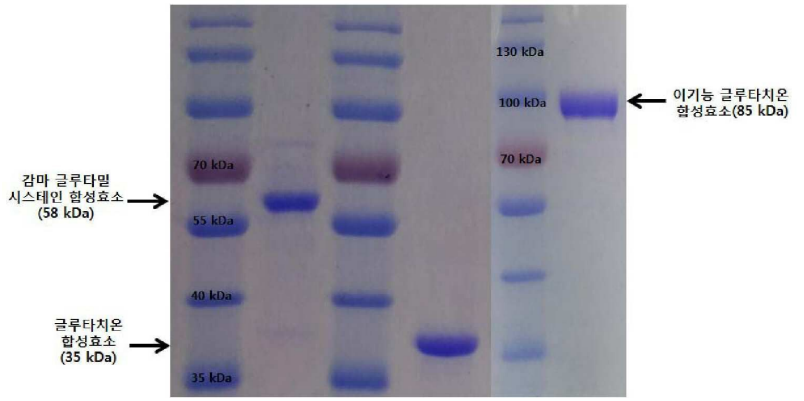
도면1a



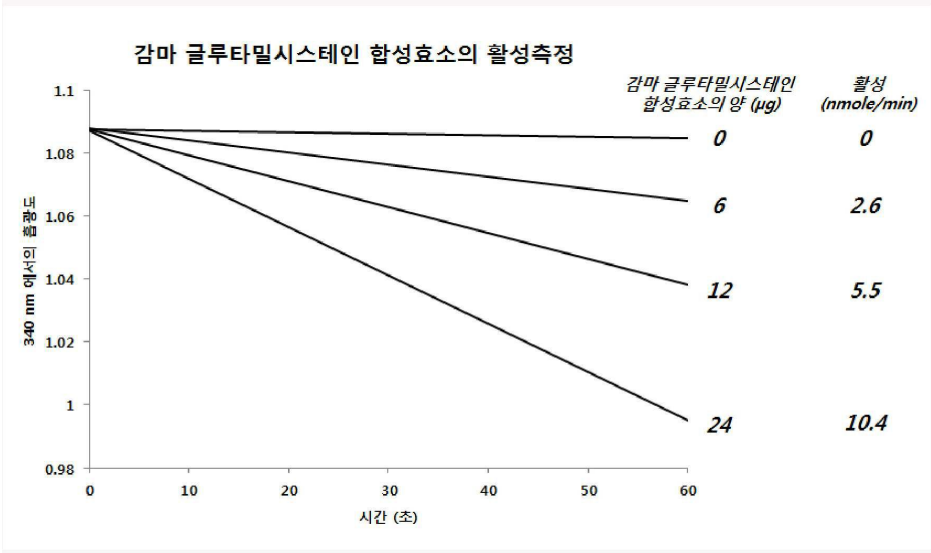
도면1b



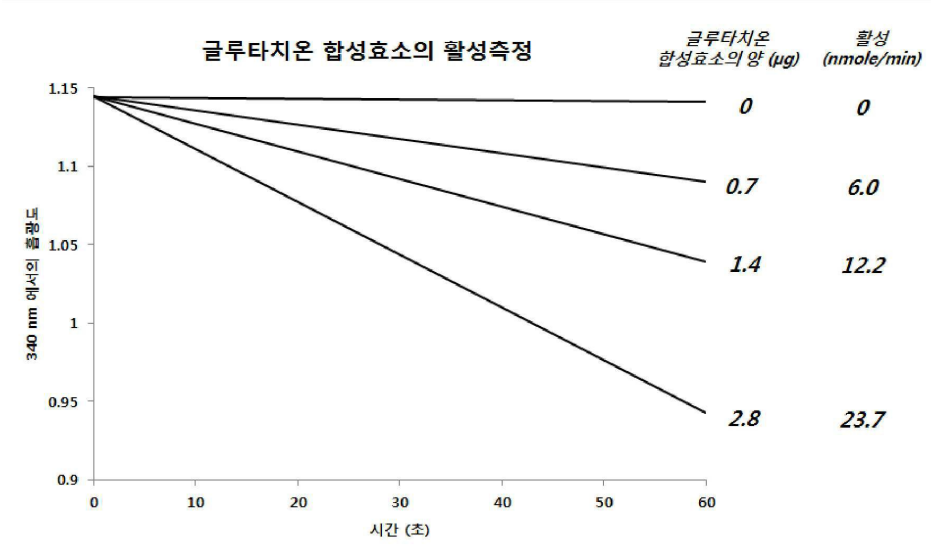
도면2


130 kDa
100 kDa
70 kDa
이기능 글루타치온
합성효소(85 kDa)
감마 글루타밀
시스테인 합성효소
(58 kDa)
70 kDa
55 kDa
40 kDa
글루타치온
합성효소
(35 kDa)
35 kDa

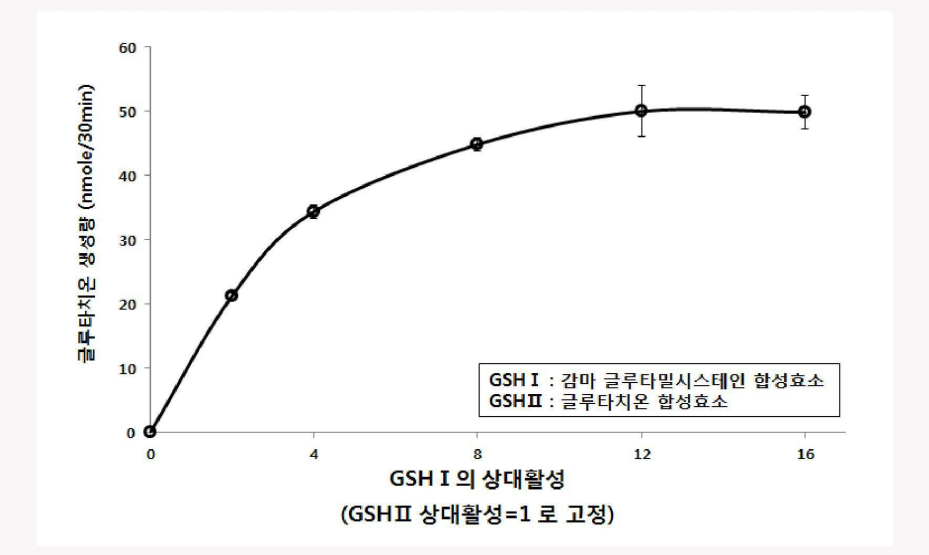
도면3


감마 글루타밀시스테인 합성효소의 활성측정
감마 글루타밀시스테인 합성효소의 양 (μg)
활성 (nmole/min)
0 0
6 2.6
12 5.5
24 10.4
340 nm 에서의 흡광도
1.1
1.08
1.06
1.04
1.02
1
0.98
0
10
20
30
40
50
60
시간 (초)

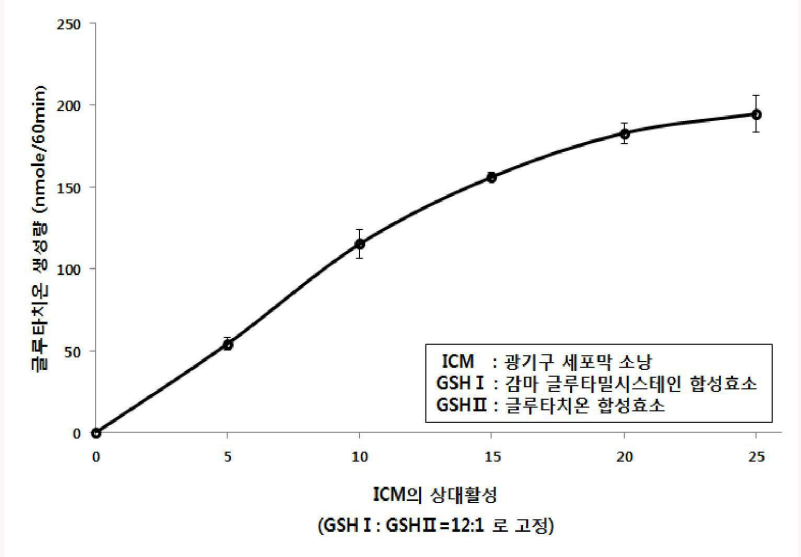
도면4


글루타치온 합성효소의 활성측정
글루타치온 합성효소의 양 (μg)
활성 (nmole/min)
0 0
0.7 6.0
1.4 12.2
2.8 23.7
340 nm 에서의 흡광도
1.15
1.1
1.05
1
0.95
0.9
0
10
20
30
40
50
60
시간 (초)

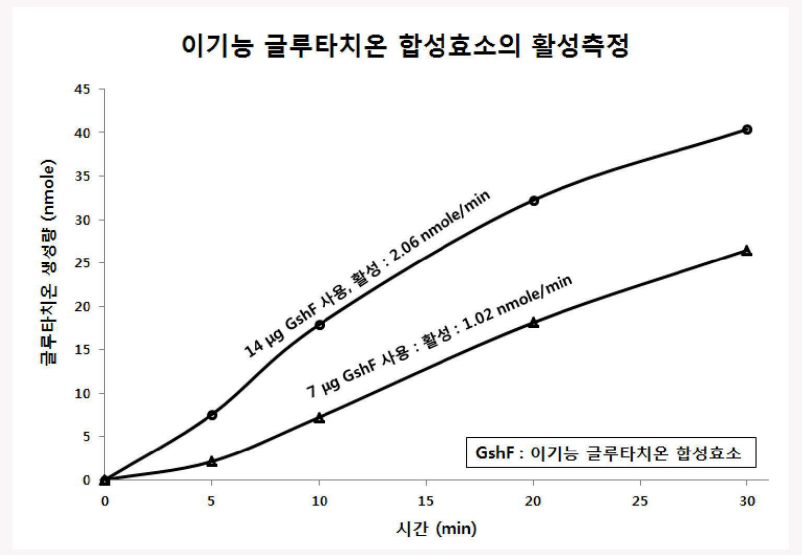
도면5


글루타치온 생성량 (nmole/30min)
60
50
40
30
20
10
0
0
4
8
12
16
GSH I : 감마 글루타밀시스테인 합성효소
GSHII : 글루타치온 합성효소
GSH I 의 상대활성
(GSHII 상대활성=1 로 고정)

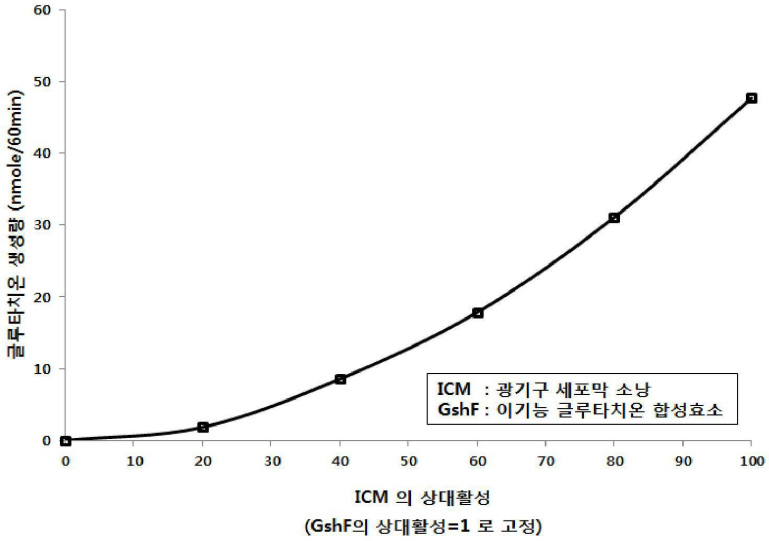
도면6


글루타치온 생성량 (nmole/60min)
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
ICM : 광기구 세포막 소낭
GSH I : 감마 글루타밀시스테인 합성효소
GSHII : 글루타치온 합성효소
ICM의 상대활성
(GSH I : GSHII=12:1 로 고정)

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> A method for continuous production of glutathione by photosynthetic membrane vesicle

<130> PN15003

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gamma-glutamylcysteine synthetase forward primer (gshA-F)

<400> 1

aaaaaaggtc tctgcgcttg atcccggacg tatcaca 37

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gamma-glutamylcysteine synthetase reverse primer (gshA-R)

<400> 2

aaaaaaggtc tcttatcatc aggcgtgttt ttccagcc 38

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glutathione synthetase forward primer (gshB-F)

<400> 3

aaaaaaggtc tctaatgatc aagctcggca tcgt 34

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glutathione synthetase reverse primer (gshB-R)

<400> 4

aaaaaaggtc tctgcgctct gctgctgtaa acgtgctt 38

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bifunctional gamma-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase forward primer (gshF-F)

<400> 5

aaaaaaggtc tcagcgcatg attatcgatc gactgttac 39

<210> 6

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bifunctional gamma-glutamylcysteine synthetase/glutathione

synthetase reverse primer (gshF-R)

<400> 6

aaaaaaggtc tcgtatcatt ataattctgg gaacagttta g 41