

E. coli Glutamine Synthetase 에 의한 Glutamic Acid로부터 Glutamine 으로의 전환

전복환 · 신형순 · 이왕식 · 방원기*

고려대학교 농화학과

Transformation of Glutamic Acid to Glutamine by *E. coli* Glutamine Synthetase

Jeon, Bok-Hwan, Hyung-Soon Shin, Wang-Sik Lee and Won-Gi Bang*

Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Glutamine production from glutamate was carried out using glutamine synthetase from *E. coli* K-12 pglN 6 and baker's yeast, which supplies ATP into the reaction system through alcohol fermentation, simultaneously.

With whole cells of *E. coli* K-12 pglN 6 as an enzyme source of glutamine synthetase, 11.8 g/l of glutamine produced after 18-h incubation (60% yield based on a substrate, glutamate). Using the partially purified glutamine synthetase, 19.8 g/l of glutamine was produced after 5-h incubation. This amount of glutamine was correspond to 90% yield, based on substrate, glutamate.

Glutamine은 질소대사에 있어서 가장 중요한 화합물 중의 하나이며, 위궤양 치료에 이용되고 있다. Glutamine은 단백질의 구성성분일 뿐만 아니라, 그 외의 다른 아미노산, 퓨린 및 피리미딘 뉴클레오타이드, 피리딘 보효소, 그리고, 복합탄수화물 등의 생합성에 있어서 아미노기를 제공하는 물질이다. Glutamine은 또한 세균 및 식물에 있어서 암모니아 동화작용에 중요한 역할을 하고 있다(1, 2).

Glutamine의 미생물에 의한 생산은 다음의 두 가지 방법에 의해 시도되어 왔다. 첫째, 탄수화물로부터 glutamine으로의 직접발효(3-6), 둘째, glutamate로부터 glutamine으로의 효소적 전환(7-10)이다. 최근에는 glutamine의 효소적 생산이 직접발효에 의한 glutamine 생산과 대등한 경쟁을 벌이고 있다(1). 그러나, 효소적 생산에 있어서는 ATP가 반응계에 필연적으로 공급되어야 한다.

$$\text{ATP} + \text{glutamate} + \text{NH}_3 \xrightarrow{\text{Glutamine Synthetase}} \text{ADP} + \text{glutamine} + \text{P}_i$$

이 ATP를 반응계에 공급하기 위하여, 빵효모에 의

한 발효에너지를 이용하여 ADP를 ATP로 전환시켜, 이 때 재생되는 ATP를 반응에 사용한다(7).

본 실험에서는 glutamine synthetase(이하 GS) 활성이 높은 *E. coli* K-12 pglN 6의 생균체 혹은 부분 정제된 GS와 빵효모에 의한 ATP 재생계를 이용하여, glutamate로부터 glutamine으로 전환하는 최적 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용된 균주는 *E. coli* K-12 pglN 6 이었으며, ATP를 반응계에 공급하기 위하여 사용한 빵효모는 오뚜기 건조효모로 조흥화학(주)에서 구입하여 사용하였다.

배 지

균주 보관용 배지는 0.5% yeast extract, 1% trypton, 0.5% NaCl, 2% Agar 및 0.005% Ampicillin

Key words: *E. coli* glutamine synthetase, baker's yeast, ATP regeneration, glutamic acid, glutamine

*Corresponding author

을 지닌 것이었다. 한편 GS 생산배지는 1% K_2SO_4 , 1.35% K_2HPO_4 , 0.47% KH_2PO_4 , 0.25% NaCl, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5% glucose, 0.058% glutamine 및 0.002% ampicillin 을 포함하였으며, 멸균 전에 pH 7.0으로 조절하여 사용하였다.

배양조건

E. coli K-12 pgl n 6의 전배양은 50 ml의 GS 생성 배지를 함유하는 500 ml 용 삼각플라스크에서 대수 증식기에 이를 때까지 37°C에서 진탕배양하였다(120 strokes/min). 본 배양은 전배양액 10 ml을 1l의 GS 생산배지를 함유하는 5l 용 baffled round flask에 접종하여 초기정지생육기까지 37°C에서 진탕배양하였다. 배양된 세포는 원심분리하여 수확하였으며, sodium-Tris-EDTA (STE) 완충용액 (pH 7.8)으로 세척하여, 사용전까지 -20°C에서 보관하였다. 이 때 사용한 STE 완충용액의 조성은 0.1 M NaCl, 10 mM Tris · HCl (pH=7.8) 및 10 mM EDTA 이었다.

Glutamine 생산조건

Glutamine 생산을 위한 반응액은 200~300 mM glucose, 50~300 mM Na·glutamate, 50~300 mM NH_4Cl , 200~300 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), *E. coli* K-12 pgl n 6 생균체 혹은 부분정제된 GS와 건조효모 혹은 toluene-처리효모를 포함하였으며, 최종 부피는 2 ml 이었다. 이 반응액은 진탕 배양기에서 130 strokes/min 및 37°C에서 반응시켰으며, 끓는 물에 3분간 침지하여 반응을 정지하였다.

효소의 조제

조 효소 : 1.0g의 *E. coli* K-12 pgl n 6를 2 ml의 Imidazole 완충용액(10 mM Imidazole · HCl, pH 7.4, 1.0 mM $MgCl_2$)에 녹이고, 0~4°C에서 10분간 초음파로 처리하였다(1A). 12,000 rpm에서 60분간 원심분리한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

부분정제효소 : Zinc 침전법(11)을 이용하여, GS를 부분정제하였다.

분석방법

반응액 중의 glutamine과 glutamate는 paper chromatography를 수행하여 정량(9)하였다. 단백질은 Lowry 방법(12)을 이용하였으며, glucose는 Dinitrosalicylic acid 방법(13)에 의하여 정량하였다. GS의 활성은 γ -glutamylhydroxamate 생성을 측정함으로써 결정(14)하였으며, 37°C에서 1분간에 1 μ mole의 γ -glutamylhydroxamate가 생성되는 효소

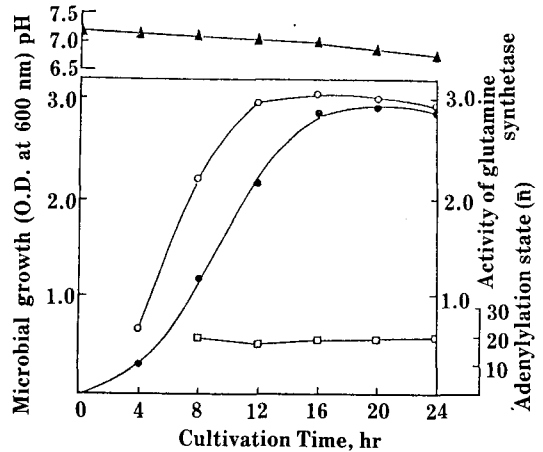


Fig. 1. Changes in enzyme activity during cultivation. Cultivation was carried out with 1l of medium in 5 l baffled round flasks. Enzyme preparation was cell-free extracts.

Symbols: ●-●, microbial growth; ○-○, glutamine synthetase activity; ▲-▲, pH of medium; □-□, state of adenylylation (\bar{n}).

량을 1 unit로 정의하였다. 한편, GS의 adenylylation 정도는 Stadtman 등의 방법(15)에 의하여 측정하였다.

결과 및 고찰

E. coli K-12 pgl n 6의 생육에 따른 효소활성의 변화

GS 활성이 최대인 상태의 *E. coli* K-12 pgl n 6를 수확하기 위하여 세포 생육에 따른 효소활성의 변화를 검토하였다. Fig.1에서와 같이, GS의 활성은 세포증식과 더불어 증가하였으며 (growth-associated pattern), GS의 최대활성은 16시간 배양시에 얻어졌다. 이 때의 GS 활성은 30.4 units이었으며, Adenylylation 정도(\bar{n})는 약 1.8이었다. \bar{n} 는 GS 1 mol 당 결합되어 있는 adenylyl group의 평균수효를 의미한다. GS의 adenylylation 및 deadenylylation은 *E. coli* GS의 6가지 조절기작 중의 하나이다(2). 또한, Fig.1은 배양기간 중에 GS의 adenylylation 정도에 있어 큰 변화가 없음을 나타내었으며, 배지의 pH는 생육과 더불어 산성화됨을 보여주었다.

E. coli K-12 pgl n 6의 생균체와 ATP 공급을 위하여 가해진 효모에 의한 glutamine의 생산

Fig.2는 효모에 의한 ATP를 반응계에 공급하지

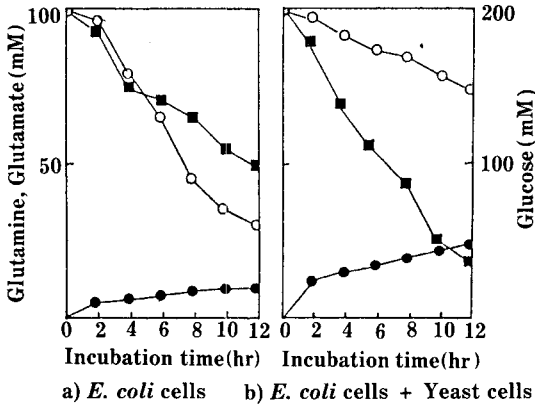


Fig. 2. Comparison of glutamine formation by *E. coli* cells with and without yeast cells.

The reaction mixture contained 200 mM glucose, 100 mM glutamate, 100 mM NH₄Cl, 30 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, and 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5). The concentration of *E. coli* cells was 20 mg/ml (20 mg/ml *E. coli* wet weight was equaled to 5.5 mg protein/ml). Symbols: a) complete system without yeast cells; b) complete system with 20 mg/ml yeast cells; ●-●, glutamine; ○-○, glutamate; ■-■, glucose

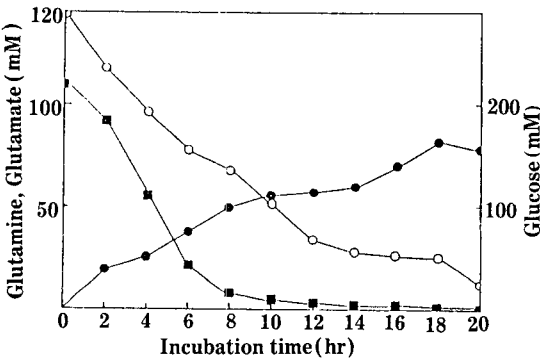


Fig. 3. Glutamine production by using *E. coli* cells and toluol-treated yeast cells.

The reaction mixture contained 220 mM glucose, 130 mM glutamate, 100 mM NH₄Cl, 30 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, and 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5). The concentration of toluol-treated yeast cells was 100 mg/ml and the amount of *E. coli* cells was 22 mg/ml. Symbols: ●-●, glutamine; ○-○, glutamate; ■-■, glucose

않거나(Fig.2a), 공급함(Fig.2b)에 따른 glutamine 생성관계를 보여주고 있다. Fig.2에서 보는 바와 같이, 반응계에 ATP 공급이 이루어지지 않는 경우, 소량의 glutamine 이 생산되지만(9.7 mM), 효모에 의한 ATP 공급이 연속적으로 이루어진 경우 glutamine의 생산량은 거의 두배(22 mM)이었다. 그러나, ATP를 공급하기 위하여 효모가 가해진 경우(Fig.2b)에도 glutamate의 급격한 감소와 gluta-

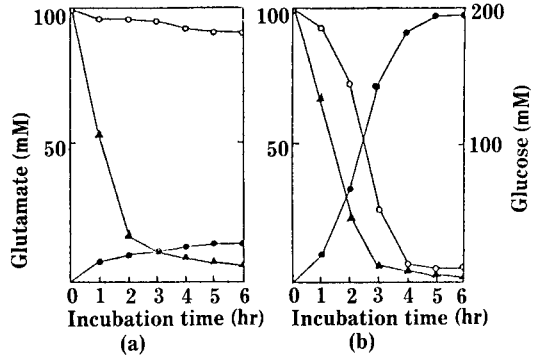


Fig. 4. Comparison of glutamine production with and without glutamine synthetase.

The reaction mixture contained 200 mM glucose, 100 mM glutamate, 100 mM NH₄Cl, 30 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 5.08 units/ml glutamine synthetase, and 40 mg/ml dried yeast cells. Symbols: a) Complete system without glutamine synthetase; b) complete system with glutamine synthetase; ●-●, glutamine synthetase; ○-○, glutamate; ▲-▲, glucose.

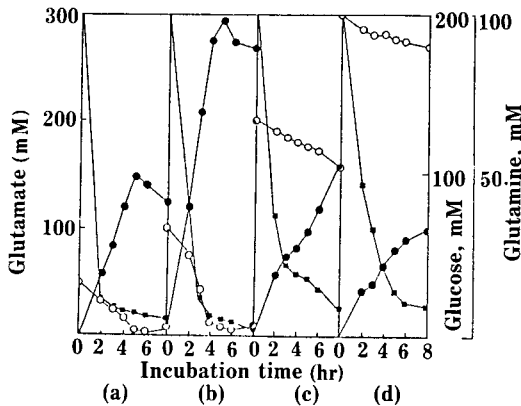
mine의 급격한 증가는 이루어지지 않았다. 이와같은 결과는 두 미생물을 동시에 사용하여도 반응계에 ATP 공급이 제대로 이루어지지 않음을 의미하며, 이는 효모 세포막의 투과성에 기인하는 것으로 추정되었다(16). 따라서, 효모의 세포막의 투과성을 증대시키기 위하여 toluene을 처리한 효모를 사용하여 실험한 결과 Fig.3과 같은 결과가 얻어졌다. Fig.3에서는 glutamate와 glucose량이 급속하게 감소하였으며, 이에 상응하여 glutamine의 생성은 급격한 증가를 나타내었다. 18시간 배양 후, 11.8g/l의 glutamine(glutamate 기준으로 60%의 수율)이 얻어졌다.

부분정제된 *E. coli* K-12 pglN 6 GS에 의한 glutamine의 생산

Glutamine 생산을 위하여 *E. coli* K-12 pglN 6 생균체를 효소원으로 직접 사용하는 경우, adenylyl-transferase에 의한 GS의 adenylylation과 deadenylylation 정도의 변화에 의한 GS의 불활성화가 야기되므로(2), 이러한 문제를 피하여 glutamine을 생산하기 위하여 GS의 정제를 시도하였다. Table 1은 정제과정을 보여주고 있으며, GS는 약 2.54 배 부분정제되었다. 부분정제된 GS와 반응계에 ATP를 공급하는 효모와의 관계가 Fig.4에 요약되어 있다. 즉, 부분정제된 GS가 첨가되지 않았을 경우(Fig.4a), glutamate의 감소가 매우 느렸으며, 6시

Table 1. Purification of glutamine synthetase by zinc-method

Purification step	Volume activity (ml)	Protein fold (mg/ml)	γ -GT (μ mol/ml)	Specific activity (units)	Purification fold (times)
1. Cell-free extracts	18.0	33.89	31212.69	30.7	-
2. Streptomycin sulfate treatment	15.0	25.73	28816.6	37.33	1.21
3. Zinc precipitation	10.3	12.01	28101.4	78.0	2.54

**Fig. 5. Glutamine production by different concentration of glutamate and NH_4Cl .**

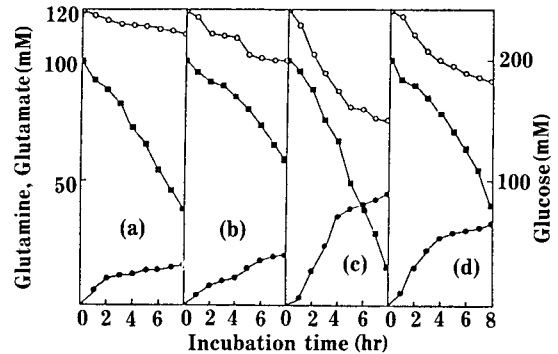
The reaction mixture contained 200 mM glucose, 30 mM MgCl_2 , 5 mM MnCl_2 , 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 5.08 units/ml partially purified glutamine synthetase, and 40 mg/ml dried yeast cells. The concentration of both glutamate and NH_4Cl were: a) 50 mM, b) 100 mM, c) 200 mM, d) 300 mM.

Symbols: ●-●, glutamine; ○-○, glutamate; ■-■, glucose

간 후에 생성된 glutamine은 14.1 mM 이었다. 한편, GS가 첨가된 경우(Fig.4b)에는, 5시간 반응 후에 glutamine 생성량이 96 mM에 이르렀으며 이때의 glutamate의 전환율은 96%이었다.

Glutamine 생산에 미치는 glutamate와 NH_4Cl 농도의 영향

본 실험을 위하여 반응혼합액 내의 glutamate와 NH_4Cl 의 농도를 변화하였으며, 사용한 glutamate와 NH_4Cl 의 농도는 같았다. Fig.5에서 볼 수 있는 바와 같이, glutamate와 NH_4Cl 이 같은 농도로 50 mM 및 100 mM 사용되었을 때에는 glutamate와 glucose 농도가 급속히 감소함과 동시에 glutamine 생성이 급격히 증가하였으나, glutamate와 NH_4Cl 이 같은 농도로 200 mM 및 300 mM 사용되었을 때에는 glucose의 농도는 비교적 급속히 감소하였으

**Fig. 6. Effect of concentrations of glutamine synthetase on glutamine production.**

The reaction mixture contained 200 mM glucose, 120 mM glutamate, 100 mM NH_4Cl , 30 mM MgCl_2 , 5 mM MnCl_2 , and 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5). The concentration of yeast cells was fixed at 20 mg/ml and the concentration of glutamine synthetase was changed as shown in figure: a) 0 unit/ml, b) 2.54 units/ml, c) 5.08 units/ml, d) 10.16 units/ml.

Symbols: ●-●, glutamine; ○-○, glutamate; ■-■, glucose

나, glutamate의 감소는 매우 느렸다. 이 때의 glutamate의 glutamine으로의 최고 전환율은 glutamate와 NH_4Cl 이 각각 50 mM 사용되었을 경우 97%, 100 mM 사용되었을 경우 97%, 200 mM의 경우 27.4%, 300 mM의 경우 11%이었다. 이와 같은 결과는 glutamate와 NH_4Cl 이 200 mM 이상이 되었을 경우 GS가 높은 기질농도에 의해 기질저해 받는 것으로 추정하였다.

Glutamine 생산에 미치는 GS 농도와 효모농도의 영향

Fig.6의 (a), (b), (c)에서 보는 바와 같이, GS 농도 증가에 따라 glutamine 생성이 증가되는 추세를 보이고 있으며, Fig.6(d)에서는 GS량이 Fig.6(c)에 비해 2배로 증가되었음에도 불구하고 glutamine 생성이 증가되지 않았음을 알 수 있었다. 따라서,

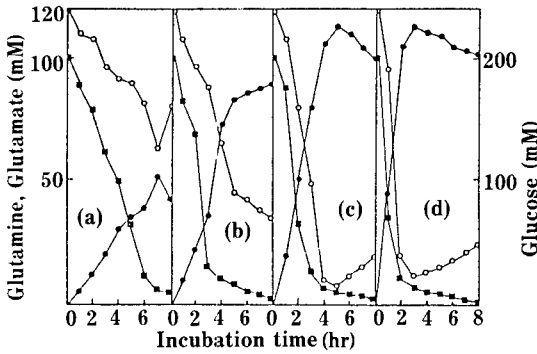


Fig. 7. Effect of concentrations of yeast cells on glutamine production.
 The reaction mixture contained 200 mM glucose, 120 mM glutamate, 100 mM NH₄Cl, 30 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, and 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5). The concentration of glutamine synthetase was fixed at 5.08 units/ml and the amount of yeast cells was changed as shown in figure: a) 20 mg/ml, b) 30 mg/ml c) 40 mg/ml d) 60 mg/ml
 Symbols: ●-●, glutamine; ○-○, glutamate; ■-■, glucose

Fig.6(c)의 조건에 단지 효모량만을 변화시켜 Fig.7과 같은 결과를 얻게 되었다. 즉, 효모량이 20 mg/ml에서 40 mg/ml까지 증가됨에 따라 glutamine 생성도 현격히 증가하였으나, 효모량 60 mg/ml에서는 glutamine 생성이 더이상 증가하지 않았다. 이와같은 결과는 glutamate로부터 glutamine을 생성하는데 사용되는 GS가 ATP를 절대적으로 필요로 하며, 사용한 GS와 ATP를 공급하는 효모량의 적당한 비율이 이루어져야 함을 시사하였다. 효모 40 mg/ml을 사용하였을 때, glutamine 최대 생성량은 113mM이었다. 이 값은 l당 16g의 glutamine 생성량을 의미하며, 이 때의 glutamate 전환율은 96%이었다. 이와같은 결과로, 5.08 units/ml의 GS를 사용할 때, 반응계에 충분한 ATP를 공급하기 위하여 사용할 효모의 양은 40 mg/ml로 측정하였다.

Glutamine 생산에 미치는 Mg⁺⁺이온의 영향

E. coli GS의 활성화에 2가 금속이온이 미치는 영향에 대해서는 다수의 연구가 진행되었다(2, 17, 18). 특히 Mg⁺⁺는 unadenylylated GS의 활성을 위하여 요구되는 것으로 알려져 있다(2). Fig.8은 Mg⁺⁺농도가 glutamine 생산에 미치는 영향을 보여주고 있다. 즉 Mg⁺⁺농도가 증가함에 따라 glutamine 생산이 증가하는 경향을 보여 주었으며, Mg⁺⁺농도가 30 mM이었을 경우, glutamine 생성량은 96mM이었으며, glutamate의 전환율은 96%이었다. 이와같은 수치는 l당 glutamine이 14.1g인 것을 의미한다.

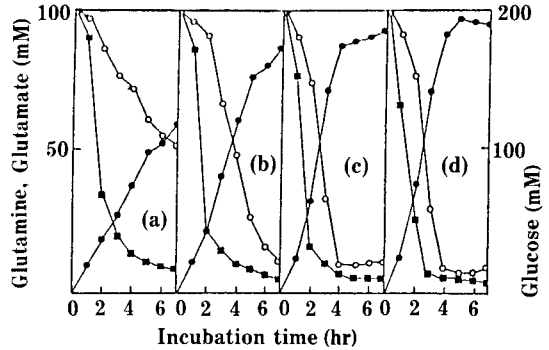


Fig. 8. Effect of Mg⁺⁺ on production of glutamine.
 The reaction mixture contained 200 mM glucose, 100 mM glutamate, 100 mM NH₄Cl, 5 mM, MnCl₂, 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 5.08 units/ml glutamine synthetase, and 40 mg/ml dried yeast cells. The concentrations of Mg⁺⁺ were shown in figure: a) 0 mM, b) 5 mM, c) 15 mM, d) 30 mM.
 Symbols: ●-●, glutamine; ○-○, glutamate; ■-■, glucose

최적조건에서의 glutamine 생산

이상의 실험결과 glutamine을 생산하기 위한 최적 반응액은 150 mM Na·glutamate, 150 mM NH₄Cl, 200 mM glucose, 30 mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 300 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)이었으며, 이때 사용한 효모와 GS의 양은 각각 40 mg/ml 및 10.16 units/ml이었다.

상기 조건하에서 37°C에서 5시간 반응후에 생성된 glutamine량은 19.8g/l이었으며, 이 때 glutamate의 전환율은 90%이었다.

요 약

E. coli K-12 pgl₆가 지니는 glutamine synthetase와 반응계에 ATP공급을 위하여 빵효모를 동시에 이용하여 glutamate로부터 glutamine의 생산이 수행되었다. Glutamine synthetase의 효소원으로서 *E. coli* K-12 pgl₆ 생균체를 사용하였을 때, 18시간 배양 후에 11.8g/l의 glutamine이 생산되었다(기질인 glutamate 기준으로 60%의 수율). 부분정제된 glutamine synthetase를 이용하여, 5시간 후에 19.8g/l의 glutamine이 생산되었다. 이 양은 glutamate 기준으로 90% 수율에 해당되는 것이다.

사 사

본 연구에 사용한 *E. coli* K-12 pgl₆를 제공해

주신 미국 NIH, NHLBI 의 이서구 박사님께 깊은 감사
사를 드립니다.

참고문헌

1. Aida, K.: Biotechnology of amino acid production, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, **24**, 121 (1986).
2. Stadtman, E.R. and A. Ginsburg: *The Enzyme*, **10**, 755 (1974).
3. Nakanish, T.: *J. Ferment. Technol.*, **53**, 551 (1975).
4. Nakanish, T.: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 179 (1978).
5. Nabe, K.T. Ugimaru, N. Izuo, S. Yamada and I. Chibata: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 19 (1980).
6. Nabe, K.T. Ugimaru, S. Yamada and I. Chibata: *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 159 (1981).
7. Tachiki, T., H. Matsumoto, T. Yano and T. Tochikura: *Agr. Biol. Chem.*, **45**, 705 (1981).
8. Tachiki, T., H. Suzuki, T. Yano, H. Kumagai and T. Tochikura: Third Congress on Biotechnology, **3**, Munchen, 313 (1984).
9. Tochikura, T., T. Tachiki, K. Nakahama, A. Baich and V.H. Cheldelin: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1161 (1973).
10. Tachiki, T., H. Suzuki, S. Wakisaka, T. Yano and T. Tochikura: *J. Gen. Microbiol.*, **29**, 355 (1983).
11. Miller, R.E., E. Shelton and E.R. Stadtman: *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 155 (1974).
12. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
13. Miller, G.L., R. Blum, W.E. Glunon and A.L. Burton: *Anal. Biochem.*, **2**, 129 (1960).
14. Wolfolk, C.A., B. Shapiro and E.R. Stadtman: *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 117 (1966).
15. Stadtman, E.R., P.Z. Smyrniotis, J.N. Davis and M.E. Wittenberger: *Anal. Biochem.*, **95**, 275 (1979).
16. 左右田健次, 竹之内英一, 田中英彦: *醱酵工學*, **59**(1), 59 (1981).
17. Segal, A. and E.R. Stadtman: *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 356 (1972).
18. Hunt, J.B., P.Z. Smyrniotis, A. Ginsburg and E.R. Steadtman: *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 102 (1975).

(Received June 15, 1989)