

***Escherichia coli*의 Glutamine Synthetase와 Acetate Kinase에 의한 Glutamine 생산**

조 정 일

고려대학교 농화학과

Production of Glutamine by Glutamine Synthetase and Acetate Kinase of *Escherichia coli*

Jung-Il Cho

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

Abstract

The conversion of glutamate by glutamine synthetase is the endergonic reaction that demands ATP as its energy source. In order to supply efficiently ATP that is demanded in the conversion of glutamate to glutamine, the ATP-generating system by acetate kinase partially purified from *Escherichia coli* K-12 was coupled with glutamine synthetase partially purified *E. coli* K-12 Pglb6. The optimum conditions of the coupled reaction were investigated. As the result, the highest conversion of glutamate to glutamine was shown in the reaction mixture containing 100mM glutamate, 100mM NH₄Cl, 50mM acetyl phosphate, 5mM ADP, 40mM MgCl₂, 300mM potassium phosphate buffer(pH 7.5), 5mM MnCl₂. Under this condition, the most effective concentrations of enzyme were 70unit /mℓ glutamine synthetase and 99unit /mℓ acetate kinase. Under the optimum conditions, 98% of 100mM glutamate was converted to glutamine within 6 hours.

Key words : glutamine synthetase, acetate kinase, glutamine production, *E. coli*.

서 론

지난 수십년 동안 미생물학자와 생화학자가 분자생물학과 유전공학의 기술을 응용 및 공업미생물 분야에 도입시킴에 의하여, 아미노산 발효는 미생물학, 생화학 및 화학공학의 결집으로 이루어진 생물공학의 실제적인 결과로 되었다. 비록 단백질의 가수분해와 화학적 합성과 같은 방법들과 경쟁적이긴 하나 현재 대부분의 일반 아미노산의 생산에 있어서 미생물적 방법이나 효소적인 방법이 사용되고 있다. 최근의 연구 동향을 비교하여 보면 효소적 방법에 의한 아미노산 생산이 점점 증가하고 있는 추세이다.

지금까지 미생물 및 효소를 이용하여 아미노산을 생

산하는 방법을 간단히 분류하면 다음과 같다. 1) 야생균주를 이용하는 방법 : glutamic acid, alanine, valine, 2) 벼이주를 이용하는 방법 : lysine, threonine, arginine, citrulline, ornithine, homoserine, tyrosine, tryptophan, phenylalanine, histidine 등, 3) 전구체 첨가에 의한 생산방법 : threonine, isoleucine, tryptophan 등 4) 효소적 방법에 의한 생산방법 : lysine, aspartic acid, alanine, D-P-hydroxyphenylglycine 등이다¹⁾.

Glutamine은 질소대사에 있어서 가장 중요한 화합물의 하나이며, 단백질의 구성성분일 뿐만 아니라 다른 아미노산, purine, pyrimidine nucleotide, pyridine coenzyme 및 복잡한 다당류의 생합성에서 아미노기 공여체이다. 이것은 또한 세균과 식물에 있어서 암모니아 동화작용에 중요한 역할을 한다. 이와 같은 용도를 가진 glutamine을 생산하기 위해서 지금까지

Corresponding author : Jung-Il Cho

시도된 방법으로는 균주를 이용한 직접 발효법과 효소적 방법이 알려져 있다.

직접발효법은 Nakanishi 등^{2,3)}에 의해서 보고되었는데 *Corynebacterium glutamicum* KY9609를 사용하여 glucose로부터 L-glutamine을 생산하였다. 이때 생산 조건으로는 배지중 pH를 약산성으로 유지시키고 고농도의 NH₄⁺과 Zn²⁺를 첨가해 주며 biotin양을 제한하였다. 특히 (NH₄)₂SO₄보다 NH₄Cl이 효과적이었다. 한편 Nabe 등⁴⁾은 *Flavobacterium rigense* (FERMP, No.3566)의 penicillin 내성 변이주를 이용하여 ammonium fumarate가 포함된 배지에서 특히 fumaric acid와 ammonia를 분리해서 첨가하는 경우가 ammonium fumarate를 첨가하는 것 보다 glutamine 생산량이 좋았으며, 최적 농도는 ammonium 이온이 0.9%, fumaric acid가 5.5%였다.

직접발효법에 의한 glutamine생산에 경쟁적인 것으로 효소법에 의한 glutamine 생산이 Tachiki 등^{5,6)}에 의해 소개되었다. 이 방법에서는 glutamine synthetase(L-glutamate: ammonia ligase, EC 6.3.1.2)를 이용하여 L-glutamic acid와 암모니아로부터 glutamine을 생산하는 것으로서 ATP가 필수적으로 공급되어야 한다.

이때 ATP의 공급을 위해서 효모의 해당계를 이용하여 ADP를 ATP로 전환시켜 생산된 ATP를 반응에 사용하는 방법이다.

이와 같은 반응계에서는 효모에 의한 당의 발효가 Harden-Young equation으로 glucose+2 inorganic phosphate→fructose 1,6-diphosphate(FDP)+2C₂H₅OH+2CO₂에 따라 진행되며 발효에너지는 이 단계에서는 FDP 형태로 저장된다. 그 다음 단계에서 FDP가 ethanol로 전환하면서 ATP가 생산되고 이때 생성된 ATP는 glutamine synthetase에 의해 소모된다. 이와 같은 방법으로 glutamine synthetase가 촉매하는 ATP 요구반응에 ATP를 계속 재생시키는 것이 가능하다. 본 연구에서는 ATP 생성계로서 acetate kinase를 이용하여 glutamine synthetase 효소반응에 도입한 ATP 재생계를 구성하였다(Fig. 1). Glutamine synthetase의 효소원으로는 glutamine synthetase 활성이 강화된 *E. coli*

K-12 *PglN6*로부터 분리·정제하여 사용하였으며, 전환 반응에 요구되는 ATP를 효율적으로 공급하기 위하여 acetate kinase의 ATP 생성계를 도입하였다. Glutamate가 glutamine으로 전환될 때 요구되는 ATP는 ADP로 분해되는데 ADP는 다시 acetate kinase에 의해 ATP로 생성되는 과정이 반복되어 계속적으로 ATP를 공급해 주게 된다. 이와 같은 반응의 최적조건을 구하여 glutamate를 glutamine으로 전환하고자 하였다.

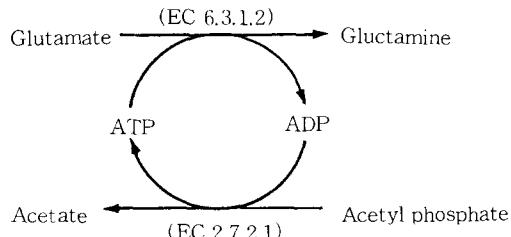


Fig. 1. Principle of the conversion of glutamate to glutamine with ATP generating system.

(EC 6.3.1.2)=Glutamine synthetase

(EC 2.7.2.1)=Acetate kinase

재료 및 방법

1. 사용 균주

Glutamine synthetase의 활성이 높은 균주로서 유전자 조작에 의해 개발된 *E. coli* K-12 *PglN6* (Ap^r, Tc^r)를 경희대학교 김수자 교수님으로부터 분양 받아 glutamine synthetase의 효소원으로 사용하였다.

2. 배지 및 배양

E. coli K-12 *PglN6*를 ampicillin(Ap)과 tetracycline(Tc)이 함유된 LB(Luria-Bertani)배지에 agar를 1.5% 첨가하여 만든 보존용 사면배지에 배양하여 4°C에서 보관하면서 사용하였으며, glutamine synthetase의 생산시에는 L-glutamate를 질소원으로 하는 배지를 사용하였다(Table 1).

Table 1. Composition of glutamine synthetase production medium

Ingredients	Contents(g / ℓ)
K ₂ SO ₄	10.0
K ₂ HPO ₄	13.5
KH ₂ PO ₄	4.7
NaCl	2.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
Glucose	5.0
L-glutamate	0.6

3. 효소원 조제

배양한 후 균체로 부터 glutamine synthetase의 분리 정제는 Streicher⁷⁾와 Woolfolk⁸⁾의 방법을 약간 수정하여 수행하였다. 전 과정은 4°C에서 실시하였다.

제 1 단계(cell-free extract) : 집균한 균체를 10 mM imidazole-HCl(pH7.4), 1mM MgCl₂의 완충용액에 혼탁한 후 20 Kc에서 10분간 sonication하였다. 원심분리한 후 그 상정액을 같은 완충용액에서 16시간 동안 투석하였다.

제 2 단계(streptomycin 침전) : 1단계의 상정액 100mℓ 당 1g의 streptomycin sulfate를 가하여 완전히 녹인 후, 1M acetic acid를 천천히 가하여 pH를 5.85로 조정하였다. 상온에서 15분간 더 저어준 후 원심분리하여 상정액을 취해 같은 완충용액으로 16시간 투석하였다.

제 3 단계(zinc ion에 의한 침전) : 2단계의 상정액에 2M MgCl₂와 150mM ZnSO₄를 사용하여 Mg²⁺와 Zn²⁺의 최종농도가 각각 50mM과 1.5mM이 되게 한 후 pH를 5.85로 조정한다. 이 혼합액을 4°C에서 하룻밤 동안 정지시킨 후 원심분리하여 상정액을 버리고 침전물을 얻는다. 이 침전물을 제 1단계에서 사용한 완충용액으로 처음 부피의 1/4에 해당하는 완충용액을 가하여 잘 용해시키고, 같은 완충용액에서 16시간 투석하였다. 이상에서 얻은 조효소용액은 -20°C에 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

4. Glutamine synthetase의 활성 측정

Glutamine synthetase의 활성 측정은 1975년 Stadtman 등⁹⁾의 방법에 따라 γ -glutamylhydroxa-

mate가 생성되는 정도를 측정하는 방법으로 수행하였다.

반응 혼합물은 0.03M L-glutamate, 0.02M arsenate, 0.003M MnCl₂, 0.06M hydroxylamine(pH 7.0), 0.4mM ADP, 0.02M imidazole을 포함하고 있으며, 최종 pH는 7.0으로 조정하였다. 반응 혼합액을 10분간 예열한 후 glutamine synthetase를 20μℓ 가하고 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 24% trichloroacetic acid, 6N HCl, 10% FeCl₂·6H₂O를 포함하고 0.02N HCl이 같은 양 포함된 반응 정지액을 0.5mℓ 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 1unit의 정의는 37°C에서 1분 동안 1μmole의 γ -glutamylhydroxamate을 형성하는 효소량으로 하였다. 1μmole의 γ -glutamylhydroxamate는 540nm에서 0.36의 흡광도를 나타내었다.

반응 혼합액(0.5mℓ)은 250mM TEA 완충용액(pH 8.3), 250mM disodium succinate, 25mM MgCl₂, 2.5mM hydroxylamine(pH7.0), 50mM ATP, 50mM sodium acetate를 포함하고 있으며, 이상의 반응 혼합액을 30°C에서 10분간 예열한 후, 효소원을 20μℓ 가하고, 다시 30°C에서 10분간 반응시킨 후, 5%(w/v) trichloroacetic acid와 0.7N HCl이 포함된 10% FeCl₂·7H₂O 용액을 넣어 발색시켰다. 용액을 잘 혼합한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 acetate kinase의 1 unit은 30°C에서 1분간 1μmole의 acetylhydroxamic acid 형성을 촉매하는 효소량으로 정의하였으며, 1μmole의 acetylhydroxamic acid는 540nm에서 0.436의 흡광도를 나타내었다.

5. ATP 재생계를 도입하여 glutamine을 생산하기 위한 반응 혼합액 및 반응 조건

Glutamate로부터 glutamine을 생산하기 위한 표준 반응 혼합액의 조성은 Table 2와 같다.

Table 2의 각 조성물이 2mℓ의 용액에 포함되도록 제조하여 0°C 냉탕안에서 잘 혼합한 후 미리 멸균된 15mℓ screw-cap test tube에 넣고 37°C로 가온하여 예열한다. 다음 glutamine synthetase와 acetate kinase의 효소원을 가하여 잘 밀봉한 후 왕복 진탕하

Table 2. Reaction mixture for glutamine production

Content	Concentration
Glutamate	50~300mM
NH ₄ Cl	50~300mM
Acetyl phosphate	10~60mM
ADP	2.5~10mM
Potassium phosphate buffer (pH 7.5)	100~400mM
MgCl ₂	20~50mM
MnCl ₂	5mM
Glutamine synthetase	35~140 unit
Acetate kinase	24.75~99 unit

여 반응시켰다. 일정한 시간이 경과한 후 tube를 물 속에서 3분간 가열시킴으로 반응을 중지시켰다. 반응 액을 원심분리(2,800rpm, 15min)한 후 상정액을 glutamine 정량에 사용었다.

6. Glutamine 및 glutamic acid의 분석

Glutamine과 glutamic acid의 정성 및 정량 분석은 1973년 Tochikura 등¹⁰⁾의 방법에 따라 paper chromatography법을 사용하였다.

시료 3μℓ를 여과지(Whatman No.2)에 점적한 후 phenol:water(4:1) 용액을 전개 용매로 하여 15cm 까지 전개시켰다. 다음 50℃에서 1시간 동안 예비 건조한 후 0.5% ninhydrin을 함유하는 acetone:ethanol(7:3) 용액을 분무하였다. 다시 50℃에서 30분간 발색시킨 후 발색된 무위를 일정한 크기로 절라 시험관에 넣고 0.005%의 CuSO₄를 함유하는 75% ethanol 용액 5mℓ에 침지하여 추출하였다. 추출액을

500nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조구로는 발색되지 않은 여과지의 추출액을 사용하였으며, 동일한 방법으로 얻은 표준 곡선으로부터 각 아미노산의 양을 계산하였다.

결과 및 고찰

1. *E. coli* K-12 Pgln6의 glutamine synthetase 부분 정제

생육의 초기 정지기에서 수확한 균체로부터 glutamine synthetase의 조효소액을 얻기 위해 실험 방법에 기술한 과정에 따라 부분 정제를 수행하였다. 즉, streptomycin sulfate에 의한 침전과 zinc ion에 의한 침전 과정을 수행하여 약 2.65배 정제된 조효소액을 얻을 수 있었으며, 본 실험에서의 정제 단계 및 정제 결과는 Table 3에 나타내었다. 한번 정제된 효소는 -20℃에 보관하면서 필요시마다 꺼내어 0℃에서 농여 사용하였으며 냉동 보관시 3주일 정도 사용하여도 그 활성에는 거의 변화가 없었다.

2. ATP농도 변화에 따른 glutamine 생산

부분 정제된 glutamine synthetase를 사용하고 에너지원으로는 분석용 ATP를 사용하여 glutamine을 생산하였다. 50mM의 glutamate를 기질로 하고 ATP의 농도를 5mM에서 40mM 까지 변화시켜 보았다. 10시간 반응후에 ATP의 농도가 15mM일 때 최대 13mM의 glutamine이 생성되었으며 그 이상의 농도에서는 glutamine 생산이 급격히 감소하였다(Fig. 2).

상기 결과는 glutamine synthetase가 ATP의 농도 15mM 이상에서는 분해된 ADP에 의해 저해를 받

Table 3. Purification of glutamine synthetase from *E. coli* K-12 Pgln6

Purification step	Volume (mℓ)	Total protein (mg)	Specific activity*	Total activity
Cell-free extract	14.4	488.06	16.41	8,009.06
Streptomycin sulfate precipitation	12.0	264.77	22.81	6,039.56
Zinc precipitation	8.24	98.99	43.56	4,312.00

* Specific activity : μmole / min / mg protein

기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 glutamine synthetase를 이용하여 glutamine을 생산하기 위해서는 효율적으로 ADP를 낮은 농도로 유지시켜야하는데 이 때에도 ATP 생성계를 도입하는 것이 glutamine 생산에 효율적으로 생각된다.

3. Glutamine synthetase와 acetate kinase 공액반응에의 최적 조건선정

1) Glutamate 농도 및 ammonium chloride 농도의 영향

Glutamine 생산에 미치는 glutamate와 ammonium chloride의 영향을 조사하기 위하여 반응 혼합액 내의 glutamate와 ammonium chloride 농도를 변화시켰다. Glutamate와 ammonium chloride 를 50mM, 100mM, 200mM 및 300mM와 같이 변화시켰다.

본 실험의 결과는 Fig.3에 나타내었다. Glutamate 와 ammonium chloride가 각각 50mM 와 100mM의 농도이었을 때 6시간 경과 후 최고 전환율 73%를 나타내었으며, 농도를 200mM 및 300mM로 증가시켰을 때는 최고 전환율이 각각 18.75%와 8.6%이었다. 이 와 같이 glutamate와 ammonium chloride가

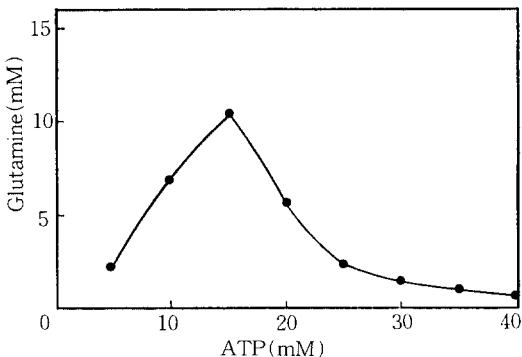


Fig. 2. Glutamine production at different concentrations of ATP.

Reaction mixture contained glutamate 50mM, NH₄Cl 50mM, potassium phosphate buffer(pH7.5) 200mM, MgCl₂ 200mM, MnCl₂ 5mM and 70units /mℓ partially purified glutamine synthetase after reaction 10 hours.

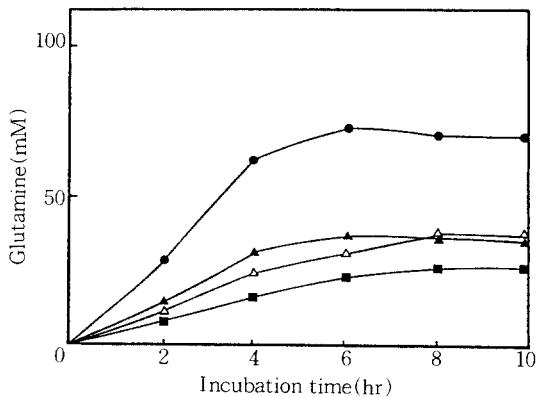


Fig. 3. Glutamine production at different concentrations of glutamate and NH₄Cl.

-▲- : 50mM, -●- : 100mM,
-△- : 200mM, -■- : 300mM

Reaction mixture contained acetyl phosphate 50mM, potassium phosphate buffer(pH7.5) 200mM, MgCl₂ 30mM, MnCl₂ 5mM, ADP 5mM, glutamine synthetase 70units /mℓ, acetate kinase 49.5unit /mℓ 50~300mM each of glutamate and NH₄Cl.

200mM 이상되었을 때 높은 기질 농도에 의해 저해를 받는 것으로 추정되었다. 따라서 이하의 실험에서는 glutamate와 ammonium chloride 농도를 100mM로 정하였다.

2) Acetyl phosphate의 농도의 영향

Glutamine 생산에 미치는 acetyl phosphate 농도의 영향을 조사하기 위하여 반응 혼합액 내 acetyl phosphate의 농도를 0mM, 10mM, 30mM, 50mM, 60mM으로 변화시켰다.

Fig.4에서 보듯이 acetyl phosphate의 농도가 60mM일 때는 acetate kinase가 높은 기질 농도에 의해 저해를 받는 것으로 추정되었다. Acetyl phosphate의 농도가 50mM일 때의 전환율은 최대 73%를 나타내었다.

3) ADP 농도의 영향

Glutamine 생산에 미치는 ADP 농도의 영향을 조사하기 위하여 반응 혼합액 내 ADP 농도를 0mM,

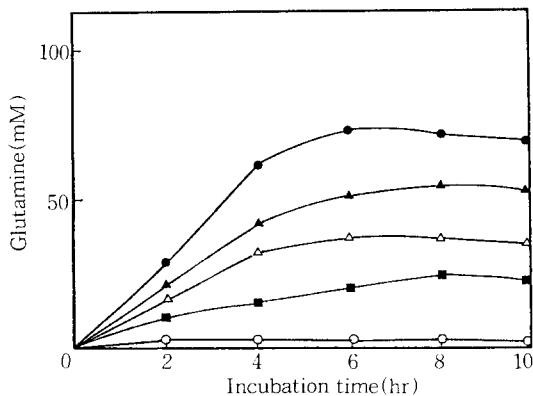


Fig. 4. Glutamine production at different concentrations of acetyl phosphate.

—○— : 0mM, —■— : 10mM, —▲— : 30mM, —●— : 50mM, —△— : 60mM.

Reaction mixture contained glutamate 100mM, NH₄Cl 100mM, potassium phosphate buffer(pH7.5) 200mM, MgCl₂ 30mM, MnCl₂ 5mM, glutamine synthetase 70units /mℓ, acetate kinase 49.5unit /mℓ, ADP 5mM and acetyl phosphate 10~60mM.

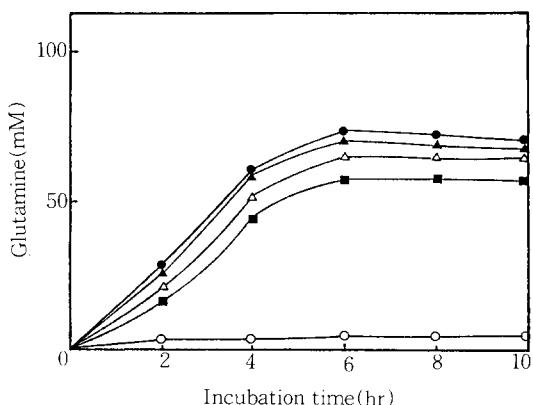


Fig. 5. Glutamine production at different concentrations of ADP.

—○— : 0mM, —△— : 2.5mM, —●— : 5mM, —▲— : 7.5mM, —■— : 10mM.

Reaction mixture contained glutamate 100mM, NH₄Cl 100mM, potassium phosphate buffer(pH7.5) 200mM, acetyl phosphate 50mM, MgCl₂ 30mM, MnCl₂ 5mM, glutamine synthetase 70units /mℓ, acetate kinase 49.5units /mℓ and ADP 2.5~10mM.

2mM, 4mM, 6mM, 8mM, 10mM로 변화시켰다.

상기 실험 결과를 Fig.5에 나타내었다. ADP의 농도가 0mM일 때는 glutamine이 거의 생산되지 않았는데 이는 반응 초기에 acetyl phosphate의 인산기를 받아줄 수용체가 없기 때문인 것으로 추정된다. 또한 ADP의 농도가 6mM일 때 최대 73%의 전환율을 나타내었으며, 7.5mM과 10mM에서는 약간 저해를 받는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 ADP의 농도는 glutamine 생산에 크게 영향을 미치지 않으며, 단지 acetate kinase에 의해 떨어진 acetyl phosphate의 인산기가 ADP와 결합하여 ATP로 전환되는 역할을 하는 것으로 추정된다.

4) Potassium phosphate buffer 농도의 영향

ATP와 ADP가 상호 전환되는 반응액의 무기인산 농도변화에 따른 glutamine 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응 혼합액 내 potassium phosphate buffer의 농도를 100mM, 200mM, 300mM, 400mM로 변화시켰다.

상기의 실험 결과를 Fig.6에 나타내었다. Potassium phosphate buffer의 농도가 300mM일 때 최대 84%의 전환율을 나타내었으며, 400mM일 때는 41%로 낮은 전환율을 나타내었다.

5) Mg²⁺ 농도의 영향

E. coli glutamine synthetase의 활성에 미치는 2가 금속 양이온의 영향에 대해서 많은 연구가 진행되어 있다^{11,12)}. 특히 Mn²⁺은 adenylated subunit의 specific activator이고, Mg²⁺와 Co²⁺는 unadenylated subunit의 activator이다.

본 실험에서는 Mg²⁺가 glutamine 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응 혼합액 내의 MgCl₂의 농도를 0mM에서 50mM까지 변화시켰다.

상기의 실험 결과를 Fig.7에 나타내었다. Mg²⁺농도가 40mM이었을 때 최대의 전환율인 89%를 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 생성량이 급격히 감소하였다.

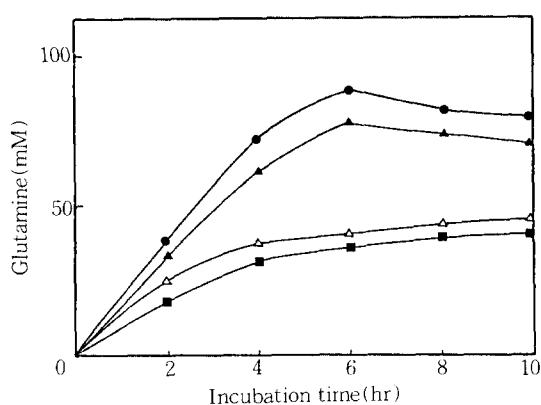


Fig. 6. Glutamine production at different concentrations of potassium phosphate buffer.

—■— : 100mM, —▲— : 200mM,
—●— : 300mM, —△— : 400mM,

Reaction mixture contained glutamate 100mM, NH₄Cl 100mM, acetyl phosphate 50mM, ADP 5mM, MgCl₂ 5mM, MgCl₂ 40mM, glutamine synthetase 70units /mℓ, acetate kinase 49.5units /mℓ and postassium phosphate buffer(pH 7.5) 100~400mM.

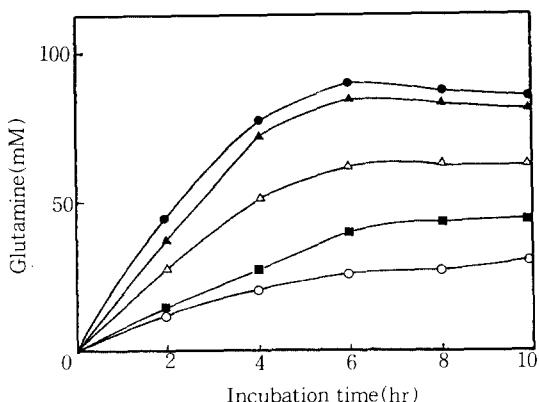


Fig. 7. Glutamine production at different concentrations of Mg²⁺.

—○— : 0mM, —△— : 20mM, —▲— : 30mM, —●— : 40mM, —■— : 50mM

Reaction mixture contained glutamate 100mM, NH₄Cl 100mM, potassium phosphate buffer(pH7.5) 300mM, acetyl phosphate 5mM, ADP 5mM, MnCl₂ 5mM, 70units /mℓ, glutamine synthetase, 49.5units /mℓ acetate kinase and 20~50mM MgCl₂.

6) Glutamine synthetase의 농도 변화에 따른 glutamine 생산

반응액 내의 기질 농도는 최대의 전환율을 나타내는 농도로 정하고, 효소의 양의 변화에 따른 glutamine 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 glutamine synthetase의 농도를 35units /mℓ, 70units /mℓ, 140units /mℓ로 변화시켰다.

Fig.8에 나타난 바와 같이 70units /mℓ에서 최대의 전환율을 나타내었고, 효소 농도가 140units /mℓ 일때 충분한 전환율을 나타내지 못했다.

7) Acetate kinase의 농도 변화에 따른 glutamine 생산

상기의 실험 결과에 따른 glutamine synthetase의 농도를 70units /mℓ로 정하고, acetate kinase의 농도를 24.75units /mℓ, 49.5units /mℓ, 99units /mℓ로 변화시켰다.

Fig.9에 나타난 바와 같이 acetate kinase의 농도가 99units /mℓ일 때 최대의 전환율인 97%를 나타

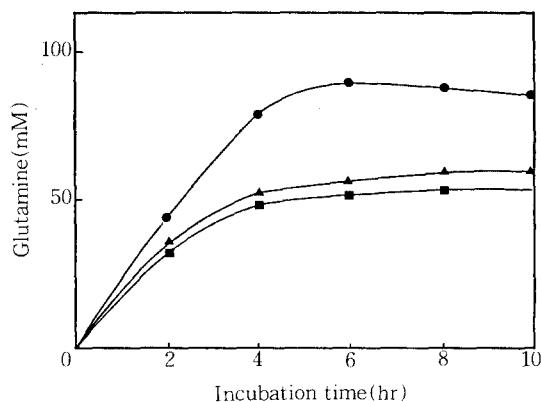


Fig. 8. Glutamine production at different concentrations of glutamine synthetase.

—▲— : 35units/mℓ, —●— : 70units/mℓ,
—■— : 140units/mℓ.

Reaction mixture contained glutamate 100mM, NH₄Cl 100mM, potassium phosphate buffer(pH7.5) 300mM, acetyl phosphate 50mM, ADP 5mM, MgCl₂ 40mM, MgCl₂ 5mM, 49.5units /mℓ acetate kinase and 35~140units /mℓ glutamine synthetase.

내었다. 이는 49.5units / mℓ의 농도에 비해 효소 농도가 두 배인 것을 비교하면 많은 증가는 아니지만 ATP의 공급이 49.5units / mℓ의 acetate kinase 농도에 비해 더 원활히 이루어지기 때문인 것으로 추정된다.

4. 반응 최적 조건하에서 시간경과에 따른 glutamine의 생산

이상의 결과를 토대로 반응혼합액 내의 기질 농도를 최대의 전환율을 나타내는 농도로 정하였다. 그 결과 최적농도는 100mM glutamate, 100mM NH₄Cl, 50mM acetyl phosphate, 5mM ADP, 40mM MgCl₂, 300mM potassium phosphate buffer(pH 7.5), 5mM MnCl₂ 이었다. 효소는 70units / mℓ glutamine synthetase와 99units / mℓ acetate kinase가 최적농도이었다. 상기의 최적조건하에서 36시간 반응시킨 결과 Fig.10에 나타낸 바와 같이 6시간째 최대의 전환율을 나타내었고, 시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였다. 이 때 최대의 전환율은 98%이었으며, 생산량은 14.3g / ℓ이었다.

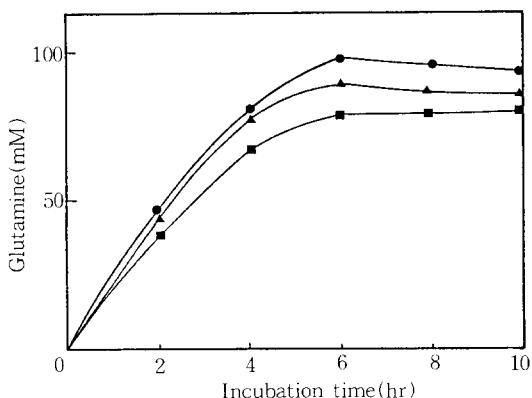


Fig. 9. Glutamine production at different concentrations of acetate kinase.

—■— : 24.75units / mℓ, —▲— : 49.50 units / mℓ, —●— : 99.00units / mℓ.

Reaction mixture contained glutamate 100mM, NH₄Cl 100mM, potassium phosphate buffer(pH7.5) 300mM, acetyl phosphate 50mM, ADP 5mM, MgCl₂ 40mM, MnCl₂ 5mM, 70units / mℓ glutamine synthetase, 24.5~99units / mℓ acetate kinase.

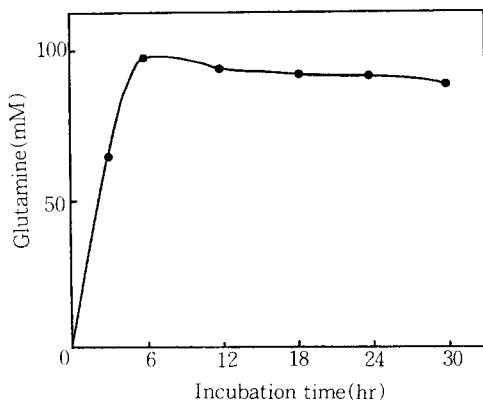


Fig. 10. Time course of glutamine production at optimal condition.

Reaction mixture contained 100mM glutamate, 100mM NH₄Cl, 50mM acetyl phosphate, 5mM ADP, 40mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 300mM potassium phosphate buffer(pH7.5), 70units / mℓ glutamine synthetase and 99units / mℓ acetate kinase.

요약

Glutamate로부터 glutamine으로 전환하는 효소인 glutamine synthetase는 cofactor로서 ATP를 요구하는 endergonic reaction이므로, glutamine 전환반응에 요구되는 ATP의 효율적인 공급을 위해서 acetate kinase에 의한 ATP 생성계를 도입하였다. Glutamine synthetase의 효소원으로 사용된 미생물은 glutamine synthetase의 활성이 강화된 *E. coli* K-12 *pgln6*를 사용하였으며, acetate kinase는 *E. coli* K-12로 부터 부분 정제하여 사용하였다. Acetate kinase에 의한 ATP 생성계를 도입한 glutamine 전환반응의 최적조건은 100mM glutamate, 100mM NH₄Cl, 50mM acetyl phosphate, 5mM ADP, 40mM MgCl₂, 300mM potassium phosphate buffer(pH7.5), 5mM MnCl₂, 70units / mℓ glutamine synthetase, 99units / mℓ acetate kinase이었으며, 상기의 최적조건하에서 6시간째 98%의 최대 전환율을 나타내었고 이때 생산량은 14.3g / ℓ이었다.

참고문헌

1. Alda, K. : Biotechnology of Amino acid Production, *Prog. Ind. Microbial.*, **24**, 4(1986).
2. Nakanishi, T. : Effects of inorganic ions on the conversion of L-glutamic acid fermentation to L-glutamine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*, *J. Ferment. Technol.*, **53**, 551(1979).
3. Nakanishi, T. : Roles of ammonium and chloride ions in the conversion of L-glutamic acid fermentation to L-glutamine and N-acetyl-L-glutamine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*, *J. Ferment. Technol.*, **56**, 179(1979).
4. Nabe, K., Ujimaru, T., Yamada, S. and Chibata, I.: Influence of nutritional conditions on production of L-glutamine by *Flavobacterium rigense*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 159(1981).
5. Tachiki, T., Matsumoto, H., Yano, T. and Tochikura, T. : Glutamine production by coupling with energy transfer : Employing yeast cell-free extract and *Gluconobacter glutamicus* synthetase, *Agric. Biol. Chem.*, **45**(5), 705(1981).
6. Tachiki, T. and Tochikura, T. : Glutamine, *Biotechnology of amino acid production*, progress in industrial microbiology, **24**, 21(1986).
7. Streicher, S.L. and Tyler, B. : Purification of glutamine synthetase from a variety of bacteria, *J. Bacter.*, **142**(1980).
8. Woolfolk, C.A., Shapiro, B. and Stadtman, E.R. : Regulation of glutamine synthetase I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 177(1966).
9. Stadtman, E.R. and Shapiro, B.H. : Glutamine synthetase, *Methods in Enzymology*, **17A** 910(1975).
10. Tochikura, T., Tachiki, T., Nakakama, K., Baich, A. and Cheldelin, V.H. : Occurrence of transaminations with pyruvate and α -ketoglutarate in *Acetobacter suboxydans*, *Agri. Biol. Chem.*, **37**, 1161(1973).
11. Hunt, J.B., Smyrniosis, P.Z., Ginsberg, A. and Stadtman, E.R. : Metal ion requirement by glutamine synthetase of *Escherichia coli* in catalysis of glutamyl transfer, *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 102(1975).
12. Ginsberg, A., Yeh, J., Hennig and Denton M. D., : Some effect of adenylylations on the biosynthetic properties of the glutamine synthetase from *Escherichia coli*, *Biochem.*, **9**, 633(1970).

(1993년 8월 6일 수리)