글루타치온 대량 생산 효모 세포공장 개발 현황 및 합성생물학적 연구 전망

중앙대학교 생명과학과 유수진, 연지윤, 강현아

1. 글루타치온의 다양한 생리적 기능 및 산업적 활용

글루타치온(glutathione, GSH)은 동물 세포, 식물, 미생물 등에 널리 퍼져있으면서 높은 수준으로(0.2-10mM) 존재하는 한편 세포 내에서 가장 일반적으로 존재하는 유기 황화합물이다[1, 2]. 글리신(glycine), 글루타민(glutamine), 시스테인(cysteine) 세 아미노산들이 결합한 트리펩타이드(tripeptide) 형태이며 체내에서는 환원형 글루타치온(GSH)과 산화형 글루타치온(GSSG) 두 가지 형태로 존재한다. 일반적인 상황에서 산화형 글루타치온 대비 환원형 글루타치온 양의 비율은 거의 98%에 육박하나, 파킨슨 병(Parkinson's disease)이나 알츠하이머(Alzheimer's disease) 등 신경 퇴행성 질환 환자들에게서는 비율이 감소하는 경향이 나타나므로 건강의 직접적인 신호가 되기도 한다[3]. 상대적으로 높은 비율로 존재하는 환원형 글루타치온(GSH)은 인체의 간과 피부 세포에 주로 분포하며 멜라닌 색소 생성을 억제하는 동시에 활성산소를 분해·제거하는 항산화 기능에도 중요한 역할을 한다. 또한 면역 시스템에도 영향을 끼쳐 면역력 증진에 기여할 뿐만 아니라[4] 효소 작용으로 독성물질과 같은 외인성 화합물의 제거에도 관여한다[5]. 이러한 기능과 효과들 덕분에 다양한 방면으로 글루타치온의 상용화가 이루어지고 있다.

체내에서 기본적으로 생성될지라도 노화가 진행될수록 글루타치온 생성량은 점점 감소한다. 항산화, 해독작용에 중요한 역할을 하는 글루타치온 생성량의 감소는 노화의 주범인 활성산소의 축적을 야기하며 노화를 더욱 촉진시키므로 외부에서 글루타치온의 공급 필요성이 대두된다[6, 7]. 이와 같이 다양한 기능을 지닌 글루타치온은 제약, 식품, 화장품 산업 등 다양한 분야에 활용되고 있으며, 주로 미백크림, 주사, 영양제 등의 형태로 이용되어왔다. 최근 국내에서도 한때 백옥주사로 주목을 받은 글루타치온 주사제를 비롯해 글루타치온 함유 생산 효모 균체를 직접 섭취하는 형태의 건강 식품도 다양한 형태로 출시된 만큼 글루타치온 시장은 그 기능과 필요성으로 인해 충분한 성장 가능성을 가지고 있다. 이와 같이 미용과 건강에 대한 관심이 증가됨에 따라 글루타치온에 대한 수요가 증가되고 있음에도 불구하고 글루타치온 대량 생산에 적지 않은 비용이 필요하기 때문에 시장이 크게

활성화되지 못하는 실정이다.

글루타치온은 주로 미생물을 이용한 발효 또는 효소 합성 공정으로 생산 가능한 데 현재 높은 생산 단가로 인해 효소 합성 공정은 아직 상용화가 되어 있지 않은 반면 산업적으로 미생물을 배양하여 균체로부터 추출하는 방법이 널리 이용되고 있다. 미생물 기반 글루타치온 생산성 극대화를 위해 배양 배지의 최적화, 세포내 전환 효율 고도화, 대사공학과 같은 다양한 분야의 연구가 진행되고 있는 데 본 논고에서는 대사공학 기반 글루타치온 대량 생산 효모 균주 개발 현황(표 1)과 새로운 연구 패러다임으로 주목을 받고 있는 합성생물학적 접근 방식의 글루타치온 대량 생산 효모 균주 개발 연구 사례들을 집중적으로 살펴보고자 한다.

표 1. 대사공학과 합성생물학을 통해 개발된 재조합 미생물에 의한 글루타치온 생산

Studied substances/parameters	Strain	Process mode	Biomass (max.)	Glutathione (max.)		Ref.
			(g/L)	(mg/L)	(%)	
GMO strain, precursors: Cys, Glu, Gly	*Pichia pastoris* D18	Fed-batch	98.2	4,150	4.2	[21]
GMO strain	*Hansenula polymorpha* MOXp-GSH2	Fed-batch	72.0	2,257	3.2	[24]
GMO strain, GSH oxidation	*S. cerevisiae* GCIΔGLR1	Batch	n.a.	n.a.	3.9[a]	[15]
GMO strain, GSH oxidation	*S. cerevisiae* GCIΔGLR1 /ERO1	Batch	3.2	119	3.7[a]	[17]
Evolutionary engineering	*S. cerevisiae* A4-19-13	Batch	4.6	270	5.9	[13]
Synthetic biology, three-pathway combination, precursors: Cys, Glu, Gly	*S. cerevisiae* W3031b /FGP	Batch	8.4	317	3.8	[25]
Synthetic biology, mannan-based bioresource	*S. cerevisiae* strain MG	Batch	n.a.[b]	14	n.a.	[26]
GMO strain with bifunctional gshF from *Streptococcus thermophilus*, precursors: Cys, Glu, Gly	*Escherichia coli* BL21 (pUC18-gshF)	Fed-batch	31.9	15,210	47.7	[28]
GMO strain with bifunctional gshF from *S. thermophilus*, DO control, precursors: Cys, Glu, Gly, glucose feeding	*E. coli* JM109 (pTrc99A-gshF)	Fed-batch	28.0	11,300	40.4	[29]
GMO strain with bifunctional gshF from *Actinobacillus succinogenes*, precursors: Cys, Glu, Gly	*E. coli* ZJ12345	Fed-batch	6.8	5,870	86.3	[30]

[a] Total glutathione (sum of GSH and GSSG)
[b] The OD_{600} value was 4.2 at the end of fermentation

2. 대사공학 기반의 글루타치온 대량 생산 효모 세포공장 개발

미생물을 숙주로 활용하는 글루타치온 생산의 성공 여부를 결정짓는 가장 핵심적인 요소는 생산 균주이다. 자연적으로 세포내 높은 글루타치온 함량을 보이는 미생물 균주들을 대상으로 추가적인 유전자 재조합 기술 기반의 대사공학 또는 목적지향적 진화공학(evolutionary engineering)을 거쳐 생산 플랫폼 균주로 개발된다. 한편 플랫폼 균주 자체의 최적화와 병행하여 생산 균주의 최적 생리 활성에 맞는 배지 및 배양공정 제어의 최적화도 고려되어야 한다. 1949년 동물 세포에서 글루타치온 생합성 경로가 밝혀짐으로써[8], 효소 또는 생명체를 이용한 글루타치온 생산 방식의 기반이 마련되었다. 글루타치온 생산을 위한 미생물 균주로는 세포내 높은 글루타치온을 함유하며 식품 생산에 안전한 미생물로 인식되는 효모가 널리 이용되어져 왔는데, 특히 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Candida utilis*가 대표적이다[9, 10]. 이 효모 종들의 야생형 균주들의 경우 글루타치온 농도가 건조 중량의 0.1-1% 정도로 이미 상당히 높은 편이며, 저가의 배지에서 고밀도 세포 배양 및 빠른 성장이 가능하다는 장점은 효모를 이용한 발효적 생산이 경쟁력을 갖게 한다.

2.1. 전통효모 *S. cerevsiae* 기반 글루타치온 세포공장 개발

효모에서의 글루타치온 생합성은 황 대사과정으로부터 시작된다. 주로 황 이온의 형태로 세포에 흡수된 황은 황산염물(sulfate)을 거쳐 황화물(sulfide)로 동화(assimilation)되는 과정을 거친다. 생성된 황화물은 시스테인, 호모시스테인과 같은 유기화합물로 동화되며 이들은 메티오닌과 글루타치온 등의 생합성에 직접적으로 사용된다[11]. 글루타치온의 생합성은 시스테인에서 다시 두 단계를 거쳐 이루어진다. 이 과정은 GSH1(γ-glutamylcysteine synthetase, GCS)과 *GSH2*(glutathione synthetase, GS)가 촉매하며, *GSH1*은 시스테인에서 γ-glutamylcysteine (γ-GC)으로 합성되는 과정을, *GSH2*는 γ-GC에서 글루타치온으로 합성되는 과정에 각각 관여한다(그림 1). GSH1의 활성은 최종 생성물인 글루타치온의 양이 많아지게 되면 글루타치온에 의한 되먹임 억제(feedback-inhibition)를 받기 때문에 글루타치온의 최종 생성량은 일정하게 유지된다[12].

최근 오스트리아의 Patzschke 교수 연구팀은 *S. cerevisiae*에서 글루타치온 함량을 높이기 위하여 진화 공학을 이용하여 실험실 규모의 바이오리액터 조건 하에서 거의 6%에 달하는 세포내 글루타치온 농도를 달성했다[13]. 배양액에 글루타치온을 첨가하면 가장 단순한 형태의 알데히드 물질인 아크롤레인에 대한 내성이 증가한다는 이전 연구[14]를 바탕으로 아크롤레인 내성이 증가된 효모 균주를 분리하였다. 여러 단계로 아크롤레인 농도를 높여가면서 150 세대 후 모 균주보다 3.3배 높은 글루타치온 함량을 지닌 균주가 분리되었고, 실험실 규모의 바이오리액터 배양에서 이 균주의 총 글루타치온 함량은 270 mg/L

로 보고되었다. 그러나 글루타치온 고함량 효모 균주의 성장 속도는 모 균주의 성장 속도의 50% 수준으로 감소되어, 세포 내에 글루타치온이 축적될수록 유독성 때문에 성장이 저하되며 글루타치온의 생산성은 제한되었다.

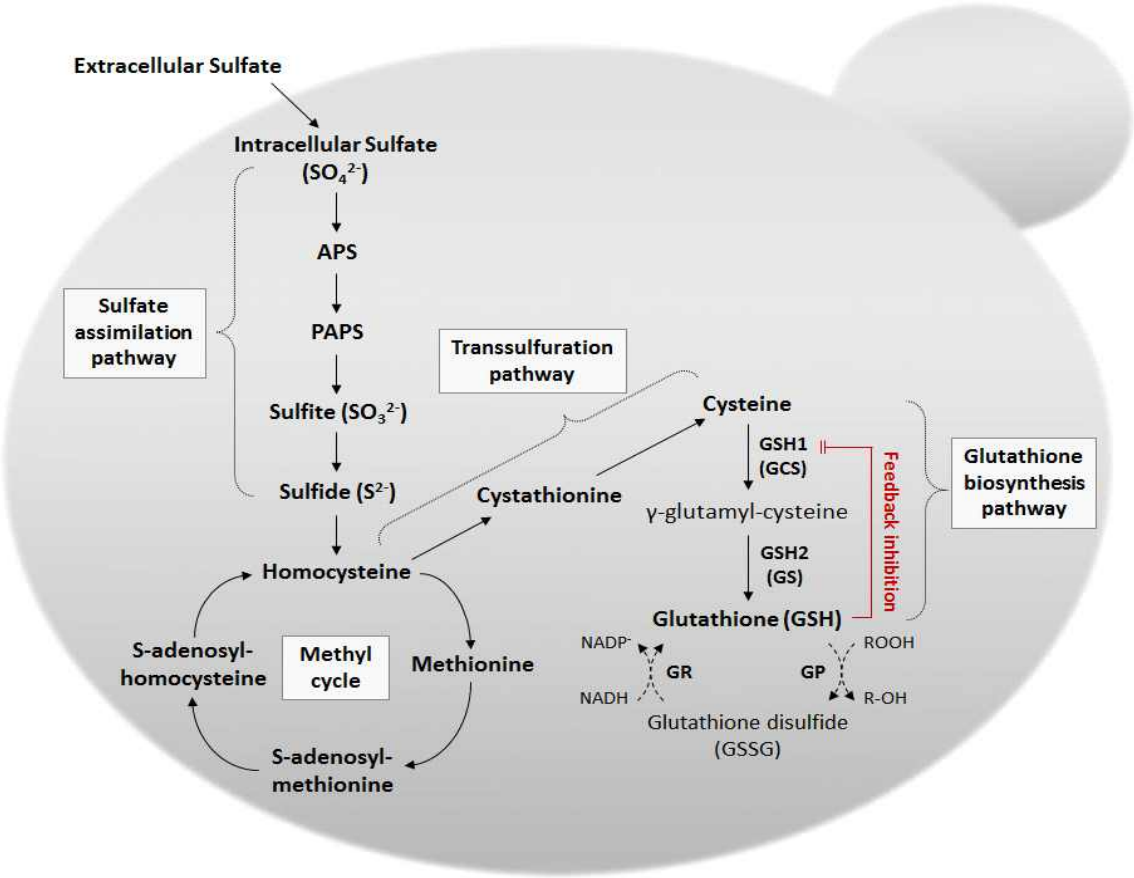

그림 1. *S. cerevisiae* 황 대사 및 글루타치온 생합성 대사 경로. GCS, γ-glutamyl-cysteine synthase; GS, glutathione synthetase; GR, glutathione reductase; GP, glutathione peroxidase

한편으로는 환원형 글루타치온(GSH)을 안정성이 높은 산화형 글루타치온(GSSG)으로 효율적으로 변환하는 연구들도 수행되었다. 환원된 형태의 글루타치온이 다양한 생리적 기능을 하는 활성화된 형태이기 때문에 대부분의 세포내 글루타치온은 글루타치온 재생 시스템(glutathione recycling system)을 통하여 환원된 형태로 존재하지만(그림 2A), 산화형 글루타치온의 높은 안정성 때문에 산업적인 관점에서, 특히 세포 추출 과정 후 저장을 위해서는, 산화형 글루타치온의 생산이 유리하다. 2013년 일본의 Kondo 교수 연구팀은 *S. cerevisiae*를 이용하여 글루타치온 생합성 및 재생 시스템에 관련된 세 단계의 대사공학

을 통해 산화형 글루타치온 발효 방법을 개발하였다[15]. 첫 단계로, 환원형 글루타치온을 산화형으로 전환하는데 관여하는 글루타치온 페록시다아제(glutathione peroxidase, Gpx)의 과발현 균주를 제작하였다. 두 번째 단계로는 이전 연구에서 개발된 GCS/GS를 δ 자리에 다중 삽입시킨 GCI 균주[16]에 *GPX3*를 과발현시키고(GCI/*GPX3*), 마지막 단계로 GSSG/GSH 비율을 높이기 위해 글루타치온 환원효소를 암호화하는 *GLR1* 유전자를 파쇄하였다(GCIΔ*GLR1*/*GPX3*). 그 결과로 최종 제작된 GCIΔ*GLR1*/*GPX3* 균주의 경우 세포내 GSSG 함량은 야생형 모균주보다 7.2배 높았고, 전체적인 GSSG/GSH 비율은 3.9배 증가하였으며 총 글루타치온 함량도 야생형 모균주에 비해 2.5배 증가하였다. 주목할 점은 이러한 글루타치온 함량의 현저한 증가에도 불구하고 어떠한 성장 결함도 보이지 않았다는 것으로 *S. cerevisiae*를 이용한 GSSG 생산 잠재력을 제시하였다. 더 나아가 확보된 GCIΔ*GLR1*/*GPX3* 균주를 대상으로 추가적인 티올(thiol) 산화환원 대사공학을 수행하여 GSSH 생산을 더욱 향상시켰다[17]. 이를 위해 (i) disulfide relay system에 관여하는 미토콘드리아 내막의 플라빈-연결 티올 산화효소를 암호화하는 *ERV1*, (ii) 소포체 내강에서 이황화결합 형성에 관여하는 플라빈-연결 티올 산화효소를 암호화하는 *ERV2*, (iii) 소포체 내의 산화환원 균형을 유지하는데 필수적이며 산화된 단백질의 접힘에 필요한 티올 산화효소를 암호화하는 *ERO1* 유전자를 과발현시키는 전략(그림 2B)을 통하여. *ERV1* 과발현 균주(GCIΔ*GLR1*/*ERV1*)와 *ERO1* 과발현 균주(GCIΔ*GLR1*/*ERO1*)에서 각각 모 균주와 비교하여 각각 2배, 1.4배 높은 세포내 GSSG 함량 증가를 확보하였다.

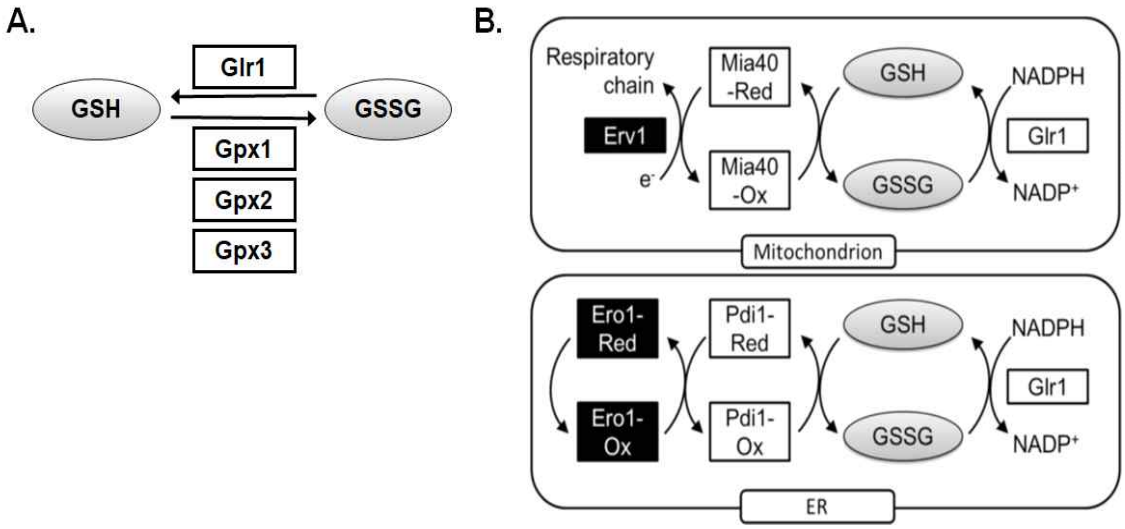

그림 2. (A) *S. cerevisiae*에서 글루타치온 재생 시스템[16] (B) *S. cerevisiae* 미토콘드리아와 소포체에서 글루타치온과 티올 산화 대사[17]

2.2. 비전통 메탄올자화 효모 기반 글루타치온 세포공장 개발

최근에는 고밀도 세포 배양이 용이한 비전통 효모를 대상으로 대사공학을 통해 더 높은 글루타치온 함량을 지닌 생산 균주 개발 연구들이 관심을 받고 있다. 특히 탄소원으로 메탄올을 대사할 수 있는 메탄올자화 효모인 *Pichia pastoris*와 *Hansenula polymorpha*가 대표적인데, 이 효모들은 메탄올 대사 동안 생성되는 유독한 중간물질인 포름알데히드와 과산화수소 등의 해독을 위해 글루타치온에 절대적으로 의존하므로[18], 글루타치온의 풍부한 원천으로 여겨진다. Crabtree 효과로 인해 최소 배지에서 고밀도 세포배양이 어려운 *S. cerevisiae*와 달리, Crabtree-negative인 이들 메탄올자화 효모들은 단순한 최소 배지에서 130 g/L DCW 이상의 고밀도 세포 배양이 가능한 장점을 가지고 있어 이종 단백질 생산에 널리 쓰이는 숙주 균주이며[19, 20], 이는 더 높은 용적의 글루타치온을 생산할 수 있는 잠재력을 제공한다. *P. pastoris GAP1* 프로모터로 발현되는 *S. cerevisiae GSH1*과 *GSH2* 유전자를 숙주 염색체 상의 *HIS4* 유전자 부위로 삽입시켜 개발한 재조합 *P. pastoris* D18 균주는 플라스크 배양에서 모 균주(38 mg/L)에 비해 4.7배 높은 양인 217 mg/L의 글루타치온을 생산하였다[21]. 전구체 아미노산(글루탐산, 시스테인, 글리신)을 첨가하면 글루타치온 수득률이 효과적으로 증가한다는 보고[22, 23]에 따라, 5L 발효조에서 수행된 fed-batch 배양시. 각 아미노산을 15 mmol/L씩 첨가했을 때, 재조합 *P. pastoris* 균주의 글루타치온 수득률과 생산성은 아미노산이 없을 때와 비교하여 각각 451%과 253%로 크게 증가되었다. 특히 배양 시작 후 40-45 시간에 아미노산을 첨가하였을 때, 글루타치온 함량은 1,030 mg/L에서 4,150 mg/L로 급격히 증가하였다. *S. cerevisiae*와 *C. utilis*에 의한 글루타치온 수득률이 800-2,000 mg/L에 이르는 것을 고려했을 때, 고밀도 세포 배양과 아미노산 첨가 전략의 조합은 재조합 *P. pastoris* D18 균주에 의한 글루타치온 생산의 극대화를 이끌었고, 이는 높은 수득률과 상대적으로 낮은 비용으로 글루타치온을 생산할 수 있는 길을 열어주었다.

한편, 또 다른 메탄올자화 효모인 *H. polymorpha*를 이용한 글루타치온 생산 균주 개발 연구도 보고되었다[24]. *H. polymorpha*의 역시 바이오리액터에서 매우 고밀도로 성장하고, 강한 조절 및 구성 프로모터를 가지고 있어 생산물의 높은 수율을 달성한다. 자신의 프로모터로부터 발현되는 *HpGSH2* (*S. cerevisiae GSH1*의 상동유전자)를 2-3 카피를 가진 재조합 균주 *mcGSH2*와, 강한 프로모터인 *MOX* 프로모터에 의해 조절되는 *HpGSH2* 발현카세트를 가지는 또다른 재조합 균주 *MOXp-GSH2*, 그리고 글루타치온과 그 전구체인 시스테인 생합성 대사 전체를 조절하는데 관여하는 *HpMET4* 유전자의 2-3개의 추가적인 카피를 가진 *mcMET4*로 명명되는 재조합 균주가 제작되었고 fed-batch 배양 후 야생형 균주(910 mg/L)와 비교하여, *MOXp-GSH2* 재조합 균주가 가장 높은 세포내 글루타치온 함량(2,257 mg/L)을 보였고, *mcGSH2* 재조합 균주가 1,532 mg/L, *mcMET4* 재조합 균주

가 1,318 mg/L의 글루타치온 함량을 보였다. 무엇보다 다른 효모들에 비해 야생형 자체의 글루타치온 함량이 상당히 높기 때문에 *H. polymorpha*은 글루타치온 생산 숙주로서 개발될 잠재성이 매우 높은 효모 균주로 기대되고 있다.

3. 합성생물학 기반의 글루타치온 생산 고효율 효모균주 개발 연구

합성생물학 기반의 글루타치온 대량 생산 효모 균주 개발에 관한 연구는 이제 막 시작하는 단계이다. 그러나, 오믹스 연구를 기반으로 수행되는 글루타치온 생합성에 관련된 총체적인 대사 경로 및 조절 네트워크를 이해하려는 시스템생물학적 연구 및 급속하게 발전하고 있는 합성생물학적 연구 기법들은 글루타치온 생산 고효율 인공 효모세포 개발 연구에 대한 새로운 패러다임을 형성할 것으로 예상된다.

3.1. 다중 글루타치온 생합성 경로 구축 인공 효모

2015년 중국의 Wang 교수 연구팀에서 다른 생명체에 존재하는 글루타치온 생합성 경로 도입을 통해 세가지 생합성 경로가 조합된 *S. cerevisiae*를 개발힌 연구가 보고되었다(그림 3). 진행생물의 Gsh1과 Gsh2, 또는 원핵생물의 GshA와 GshB에 의해 매개되는 전형적인 글루타치온 생합성 경로(G 경로) 외에, *Actinobacillus pleuropneumoniae*에서 새롭게 발결된 두 기능이 복합되어 있는 효소 γ-glutamylcysteine synthetase/glutathione synthetase (GshF)에 의한 경로(F 경로), 프롤린 생합성 경로의 첫 번째 효소 γ-glutamyl kinase(진핵생물의 Pro1 또는 원핵생물의 ProB)와 Gsh2를 이용한 새로운 인공 글루타치온 생합성 경로(P 경로)가 도입된 효모를 제작하였다[25].

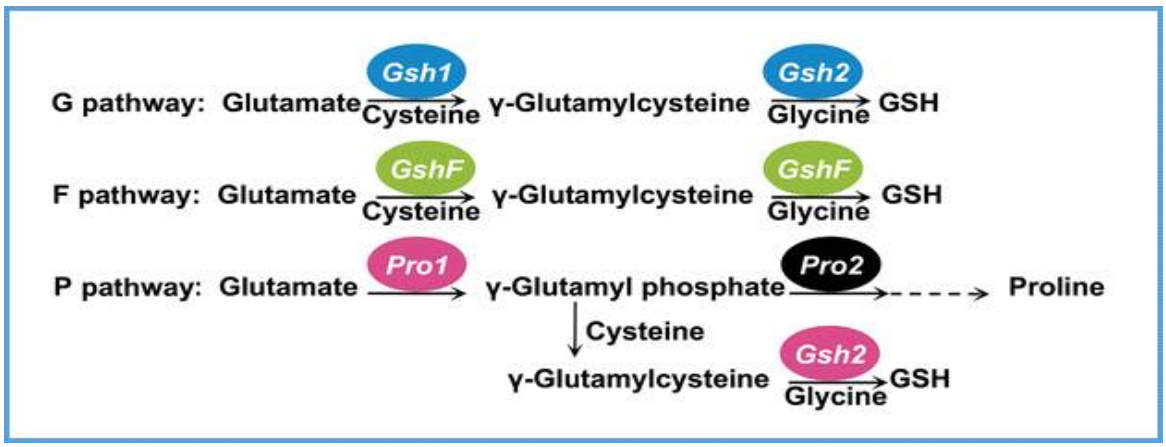

그림 3. 세 가지의 GSH 합성 경로. G 경로, Gsh1과 Gsh2에 의한 GSH 생성. F 경로, Gsh1과 Gsh2 활성을 동시에 가진 GshF에 의한 GSH 생성. P 경로, Pro1와 Gsh2에 의한 γ-glutamyl phosphate를 거친 GSH 생성[25]

세 가지 글루타치온 생합성 경로를 구축하기 위하여, 첫 번째로 코돈 최적화된 *A. pleuropneumoniae gshF* 유전자를 *S. cerevisiae*의 δ DNA 부위에 삽입시켜 W303-1b/F 균주를 제작한 후, Gsh2-Gsh1 융합단백질 유전자 단편이 염색체 상에 통합된 W303-1b/FG 균주를 제작하고, 최종적으로 Pro1-GshB 융합단백질 유전자가 숙주 염색체상에 통합된 W303-1b/FGP 균주가 제작되었다. 10 L batch 발효조에서 24시간 배양 후 W303-1b/FGP 균주는 글루타치온 농도가 272.52 mg/L에 도달했고 2.27% 글루타치온 함량을 보였다. 결과적으로 세 가지 경로 조합에 의한 글루타치온 생산법이 단일 경로에 의한 생산법보다 높은 수율과 전구체 아미노산 전환 효율을 보여주었으며, 이와 같은 합성생물학적 전략은 효모를 이용한 산업적 글루타치온 고생산 균주 개발에 있어 중요한 발전을 이루는 계기를 마련하였다고 평가된다.

3.2. 다양한 탄소원 활용 글루타치온 생산 인공효모

효모를 이용한 산업적 글루타치온 생산의 대부분이 탄소원으로서 포도당을 이용한 발효로 이루어져 왔는데, 최근 보고된 연구에서 조작된 *S. cerevisiae*를 이용하여 만난(mannan)의 직접 발효를 이용한 글루타치온 생산이 보고되었다(그림 4)[26]. 셀룰로오스 분해 능력으로 잘 알려진 그람 양성 세균 *Cellulomonas fimi*의 β-만노시다아제 유전자와 *Bacillus licheniformis*의 β-만난아제 유전자를 효모 세포벽 단백질 유전자 *FLO1*과 융합하여 세포 표면에 과발현시키고 *GSH1*/*GSH2*를 δ 자리에 다중 삽입시킨 재조합 효모 균주 MG를 제작하였다. 인공 효모 균주 MG는 총 글루타치온 생산량은 만노오스와 포도당 배양에서 각각 122 mg/L와 119 mg/L로 비슷하게 나타내 탄소원으로 만노오스를 사용하여 글루타치온 생산 가능성을 보여주었다. 보다 현실적인 만난 화합물로서 β-1,4-연결된 만노오스 백본을 가진 헤미셀룰로오스의 이질적 중합체인 메뚜기콩검(locust bean gum, LBG)을 탄소원으로 이용하여 글루타치온 생산 가능성을 분석한 결과 세포내 글루타치온 함량은 균주 MG가 대조군 균주에 비해 1.6배 높았고, 총 글루타치온 농도는 균주 MG가 14 mg/L로 대조군 균주의 5.3 mg/L에 비해 2.7배 높았다. 이와 같이 가격이 매우 저렴한 LBG로부터의 글루타치온 생산은 산업적 글루타치온 생산에 매우 경제적인 이점을 가진다. 하지만, LBG로부터의 낮은 글루타치온 생산성은 극복해야 할 중요한 문제로 남아있다. 다양한 합성생물학적 인공 대사 경로 도입과 돌연변이 생성 전략 등의 조합을 통해 세포 표면의 만난 분해 효소 발현 균주들이 만난 화합물로부터 산업적 규모로 글루타치온을 양산할 수 있도록 추가적인 노력이 필요하다.

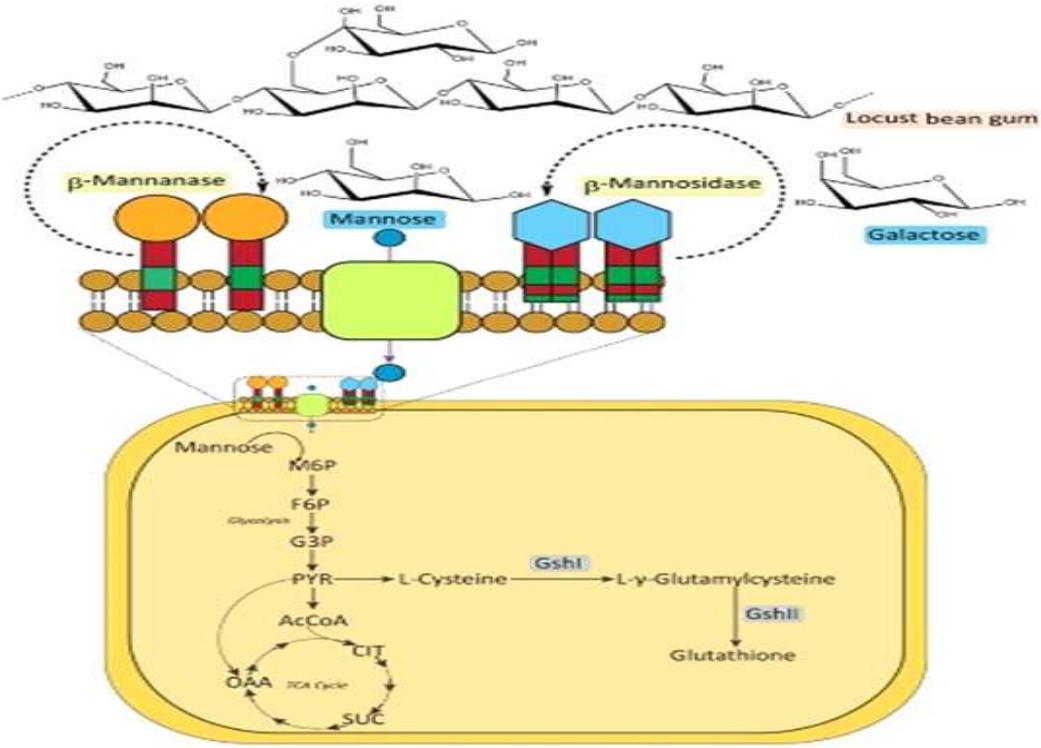

그림 4. 만난(mannan) 화합물을 탄소원으로 이용한 만노오스/만난 분해효소 표면발현 재조합 *S. cerevisiae*에 의한 글루타치온 생산[26]

4. 글루타치온 생산 인공효모 개발 연구에 대한 현안 및 전망

본 논고에서는 효모 세포를 이용한 대사 공학과 합성생물학 접근 방법으로 다양한 생리적 기능을 지닌 글루타치온 생산 효모 균주 개발에 관한 최신 연구들을 살펴보았다. 야생형 균주에 비해 현저히 생산성이 증진된 연구 사례들이 보고되고 있지만 아직도 해결해야 할 문제점들이 남아있다. 기존 연구에서 글루타치온 생합성 경로 증폭을 위한 전략으로 GCS와 GS 활성을 높이기 위해 이들 유전자를 과발현시키는 전략을 활용해 왔지만, 축적된 글루타치온에 의한 GCS 활성의 되먹임 억제는 높은 생산성을 제한하는 애로 사항으로 지적되어왔다. 또한 GCS와 GS 활성의 불균형으로 인해 축적된 γ-glutamylcysteine (γ-GC)은 글루타치온 생산성뿐만 아니라 분리 정제 효율성을 감소시키는 문제를 야기한다. 상기의 문제점들은 위에 기술한 최근 연구들에서처럼 효모 유래의 *GSH1*/*GSH2* 유전자를 GCS와 GS 기능을 모두 지닌 *gshF*와 같은 박테리아 유래의 이중 기능 유전자로 교체시킴으로서 해결될 것으로 기대된다. 특히 이들 효소는 글루타치온에 의한 되먹임 억제 조절과 산화환원 조절을 받지 않는 장점을 부가적으로 지니고 있다. 또한 최근의 합성생물학적 기법을 활용

한 인공효모 균주 개발 연구에서 입증한 바와 같이 이들 이중 기능을 지닌 박테리아 유래 단백질 도메인을 모사하여 효모 유래의 단백질들을 flexible linker로 연결한 융합단백질로 발현시킴으로써 세포내 γ-GC의 축적을 방지하고 낮은 수준으로 유지시킴으로써 효율적인 연속 반응을 통한 글루타치온 생산성을 향상시킬 수 있을 것이다.

한편, 미생물 발효공정에서 글루타치온 생산성을 높이기 위해 전구체 아미노산인 시스테인, 글루탐산, 글리신이 풍부하게 공급하는 현재의 발효 공정은 생산 단가가 높아져서 경제성이 떨어지게 된다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 글루타치온 전구체 생합성과 관련되는 황 동화 경로에 관여하는 유전자들을 과발현시키는 대사공학적 접근이 시도되고 있으나, 여러 개의 유전자들을 모두 함께 숙주에 도입 및 과발현시켜야 하는 문제점이 있다. 이를 해결하기 위하여, 전통효모를 대상으로 밝혀진 황 대사 경로의 조절 기전에 관한 많은 정보를 기반으로, 재조립된 핵심 전사인자를 통한 인공 조절 네트워크를 구축하고 제어하는 기술 개발을 통해 전체적인 글루타치온 전구체 생합성 경로를 활성화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 더불어, 글루타치온 대량 생산 균주로서 최근 각광받고 있는 일부 비전통 효모들의 경우, 전통 효모에는 존재하지 않는 OAS (*O*-acetylserine) 경로를 가지고 있어 시스테인 생합성 경로가 더욱 활성화되어 있음이 밝혀짐에 따라[27], 인공 OAH (*O*-acetylhomocysteine) 및 OAS 경로가 조립된 인공 효모 제작을 통해 글루타치온 생합성 전구체 대사 흐름을 증폭시킬 수 있을 것으로 기대된다.

최근에는 대장균을 숙주로 이용한 글루타치온 대량 생산 연구도 활발히 연구되고 있으며 상당한 생산성 증가가 보고되고 있다(표1). 축적된 글루타치온에 의해 저해받지 않는 이중 기능의 다양한 GCS를 발현시키고 글루타치온의 주요 전구체인 시스테인 생합성 경로를 증폭시키기 위해 다양한 유전자 조작을 거친 일부 재조합 대장균 균주들의 경우 아미노산 전구체를 투입해 주는 발효공정에서의 생산성은 재조합 효모 균주보다 높게 보고되었다[28-30]. 그러나 *E.coli* 자체가 가지고 있는 내독소(endotoxin)가 문제를 일으킬 수 있어 소비자들이 안전성이 검증되지 않은 박테리아 유래의 글루타치온이 식품이나 미용제품, 더욱이 의료용으로 사용되는 것에 대한 거부감이 있다[31]. 따라서 GRAS 균주인 효모가 글루타치온 생산 균주로서 갖는 장점이 될 수 있으며, 다양한 탄소원을 활용할 수 있는 비전통 효모 균주들은 경제성 측면에서 또 다른 장점이 있다. 특히, GRAS 등급의 글루타치온 대량 생산 재조합 효모 균주들은 별다른 분리정제 공정 없이 재조합 효모 자체를 기능성 식품 및 사료첨가제로 개발 활용할 수 있는 가능성도 높다. 합성생물학의 선두마차로서 다양한 분야의 산업균주로서 그 중요성이 더욱 부각되고 있는 효모가 글루타치온 시장에서 황금알을 낳은 존재로 자리매김하게 될 것을 기대해 본다.

4. 참고문헌

[1] Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. The Journal of biological chemistry. 1988;263:17205-8.

[2] Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chemico-Biological Interactions. 1998;111:1-14.

[3] Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. Journal of amino acids. 2012;2012:736837.

[4] Owen JB, Butterfield DA. Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. In: Bross P, Gregersen N, editors. Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and Aging: Concepts and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 269-77.

[5] Hazelton GA, Lang CA. Glutathione contents of tissues in the aging mouse. The Biochemical journal. 1980;188:25-30.

[6] Lang CA, Naryshkin S, Schneider DL, Mills BJ, Lindeman RD. Low blood glutathione levels in healthy aging adults. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1992;120:720-5.

[7] Sipes IG, Wiersma DA, Armstrong DJ. The role of glutathione in the toxicity of xenobiotic compounds: metabolic activation of 1,2-dibromoethane by glutathione. Advances in experimental medicine and biology. 1986;197:457-67.

[8] Bloch K. The synthesis of glutathione in isolated liver. The Journal of biological chemistry. 1949;179:1245-54.

[9] Bachhawat A, Ganguli D, Kaur J, Kasturia N, Thakur A, Kaur H, et al. Glutathione Production in Yeast. In: Satyanarayana T, Kunze G, editors. Yeast biotechnology: diversity and applications. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009. p. 259–80.

[10] Li Y, Wei G, Chen J. Glutathione: a review on biotechnological production. Applied microbiology and biotechnology. 2004;66:233-42.

[11] Saito K. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. Plant physiology. 2004;136:2443-50.

[12] Richman PG, Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. The Journal of biological chemistry. 1975;250:1422-6.

[13] Patzschke A, Steiger MG, Holz C, Lang C, Mattanovich D, Sauer M. Enhanced glutathione production by evolutionary engineering of Saccharomyces cerevisiae strains. Biotechnology journal. 2015;10:1719-26.

[14] Vollenweider S, Evers S, Zurbriggen K, Lacroix C. Unraveling the hydroxypropionaldehyde (HPA) system: an active antimicrobial agent against human pathogens. Journal of agricultural and food chemistry. 2010;58:10315-22.

[15] Kiriyama K, Hara KY, Kondo A. Oxidized glutathione fermentation using

Saccharomyces cerevisiae engineered for glutathione metabolism. Applied microbiology and biotechnology. 2013;97:7399-404.

[16] Hara KY, Kiriyama K, Inagaki A, Nakayama H, Kondo A. Improvement of glutathione production by metabolic engineering the sulfate assimilation pathway of Saccharomyces cerevisiae. Applied microbiology and biotechnology. 2012;94:1313-9.

[17] Hara KY, Aoki N, Kobayashi J, Kiriyama K, Nishida K, Araki M, et al. Improvement of oxidized glutathione fermentation by thiol redox metabolism engineering in Saccharomyces cerevisiae. Applied microbiology and biotechnology. 2015;99:9771-8.

[18] Mendoza-Cozatl D, Loza-Tavera H, Hernandez-Navarro A, Moreno-Sanchez R. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. FEMS microbiology reviews. 2005;29:653-71.

[19] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. FEMS microbiology reviews. 2000;24:45-66.

[20] Shay LK, Hunt HR, Wegner GH. High-Productivity Fermentation Process for Cultivating Industrial Microorganisms. J Ind Microbiol. 1987;2:79-85.

[21] Fei L, Wang Y, Chen S. Improved glutathione production by gene expression in Pichia pastoris. Bioprocess and biosystems engineering. 2009;32:729-35.

[22] Cha JY, Park JC, Jeon BS, Lee YC, Cho YS. Optimal fermentation conditions for enhanced glutathione production by Saccharomyces cerevisiae FF-8. J Microbiol. 2004;42:51-5.

[23] Wen SH, Zhang T, Tan TW. Optimization of the amino acid composition in glutathione fermentation. Process Biochem. 2005;40:3474-9.

[24] Ubiyvovk VM, Ananin VM, Malyshev AY, Kang HA, Sibirny AA. Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast Hansenula polymorpha DL-1. BMC biotechnology. 2011;11:8.

[25] Tang L, Wang W, Zhou W, Cheng K, Yang Y, Liu M, et al. Three-pathway combination for glutathione biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. Microb Cell Fact. 2015;14:139.

[26] Prima A, Hara KY, Djohan AC, Kashiwagi N, Kahar P, Ishii J, et al. Glutathione production from mannan-based bioresource by mannanase/mannosidase expressing Saccharomyces cerevisiae. Bioresour Technol. 2017.

[27] Sohn MJ, Yoo SJ, Oh DB, Kwon O, Lee SY, Sibirny AA, et al. Novel cysteine-centered sulfur metabolic pathway in the thermotolerant methylotrophic yeast Hansenula polymorpha. PloS one. 2014;9:e100725.

[28] Wang C, Zhang J, Wu H, Li Z, Ye Q. Heterologous gshF gene expression in various vector systems in Escherichia coli for enhanced glutathione production. Journal of Biotechnology. 2015;214:63-8.

[29] Wang D, Wang C, Wu H, Li Z, Ye Q. Glutathione production by recombinant

Escherichia coli expressing bifunctional glutathione synthetase. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2016;43:45-53.

[30] Zhang J, Quan C, Wang C, Wu H, Li Z, Ye Q. Systematic manipulation of glutathione metabolism in Escherichia coli for improved glutathione production. Microbial Cell Factories. 2016;15:38.

[31] Schmacht M, Lorenz E, Senz M. Microbial production of glutathione. World journal of microbiology & biotechnology. 2017;33:106.