

微生物에 의한 Glutathione 生産에 관한 研究

(제 1 보) 生産菌株의 選定 및 培養

趙 源 大 · 金 赫 一 · 宋 在 徹 · 梁 漢 喆

高麗大學校 農科大學 食品工學科

(1978년 6월 10일 수리)

Studies on the production of Glutathione by Microorganism

Won Dae Cho · Hyuk Ill kim · Jae Chul Song · Han Chul Yang

Department of Food Technology, College of Agriculture

Korea University, Seoul, Korea

(Received June 10, 1978)

Abstract

This study was conducted to investigate the condition of enhancing glutathione content of yeast.

Rhodotorula glutinis in various kind of yeasts produced high content of glutathione and dry cell by cultivating for 48 hours at 30°C and pH 6.0 on reciprocal shaker. In order to enhance the glutathione content, as 0.7% of amino acid was applied into the medium. Glutathione was produced high for 36 hours cultivation. When glutamic acid, cysteine and glycine composing the glutathione were added, glutathione content increased to 219 $\mu\text{g/ml}$. However the control showed to 73 $\mu\text{g/ml}$.

緒 論

Glutathione은 1921年 Hopkins 에 의하여 酵母에서 抽出된 物質로 알려진 후 Quastel 등⁽¹⁾에 의해 γ -glutaminy-cysteine 인 것을 알았고, Hunter 등⁽²⁾의 元素分析結果로 tripeptide 인 것을 확인하였다. 그 후 glutathione은 glycine을 함유한 tripeptide 인 것으로 발표⁽³⁾된 바 있다.

Harington 등⁽⁴⁾ 및 du Nignaud 등⁽⁵⁾은 각각 glutathione을 合成하여 isoglutathione⁽⁶⁾과 구별이 명확한 天然物 構造인 γ -glutaminy-cysteiny-glycine을 결정하였다. 일반적으로 glutathione은 少量(μ moles)으로서도 밀가루등의 반죽의 流體學的 성질에 미치는 영향이 큰 것으로 알려져 있으며, 製빵시 밀가루에 첨가되는 효모의 양이 2~3% 되므로 이때 효모에서 추출되는 glutathione이 역

시 반죽의 물리학적 성질에 중요한 역할을 하게 된다.

Ponte 등⁽⁷⁾은 低溫에서 현탁된 효모가 밀가루의 반죽을 약하게 하거나 또 효모의 발효 활성을 감소시키는 것은 첨가된 효모에서 누출된 glutathione 때문이라고 결론지었다.

Kuninori 등⁽⁸⁾은 2% 소금용액에 활성 건조효모 100g을 현탁시켜 80~90mg의 glutathione을 추출시킨 實驗을 하였고, Villegas 등⁽⁹⁾은 glutathione이 밀가루 반죽에서 伸張性を 증가시키는 반면 彈性은 감소시키고 또 glutathione과 thiol 양이 많으면 빵의 크기가 감소되고 빵의 성질도 손상된다고 보고하였다.

Kuninori 등⁽¹⁰⁾은 밀가루의 반죽에서 SH기 交換을 조사하기 위해 標識 glutathione을 이용하여 glutathione과 다른 SH 시약의 첨가는 밀가루의 유체학적 성질을 약하게 해주며 과량의 glutathione

은 내부 S-S-결합을 분열시켜 gluten 단백질이 분열됨을 설명하였다.

이러한 glutathione은 酵母, 肝臟, 筋肉, 血液 및 胚芽등에서 얻어지며, 보통 효모 균체중에는 glutathione 함량이 0.4~1.2%⁽¹²⁾ 정도로서 이 수량을 증가시키기 위하여 朝井⁽¹³⁾는 米糠의 비타민 B₁ 抽出廢液을 培地에 添加하기도 하였고 抗生物質⁽¹⁴⁾, cysteine, methionine, 砒酸⁽¹⁵⁻²⁰⁾ 등을 첨가하여 glutathione 수량을 증가시키기도 하였다. 본 研究에서도 glutathione을 多量含有한 효모의 檢索과 glutathione의 함량증가를 위한 효모의 培養條件을 檢討하였던 바 몇 가지 새로운 사실을 알았기에 보고한다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

供試된 酵母菌株는 高麗大學校 食品工學科에 保存된 50여종의 균주를 使用하였다.

2. 基本培地組成 및 培養方法

基本培地 組成은 Table 1과 같다. pH는 4% NaOH 용액으로 pH 6.0으로 조절하였다. 배양방법은 기본 배지 50 ml를 500 ml 진탕배양플라스크에 分注하여 121°C에서 10分間 加壓殺菌後 菌을 接種하고 30°C에서 48시간 왕복진탕배양(120 strokes, 진폭 7 cm)하였다.

Table 1. Composition of Medium.

Glucose	6.0%
Urea	0.45%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.45%
KH ₂ PO ₄	0.225%
MgSO ₄	0.075%
CaCl ₂	0.015%
ZnSO ₄	0.015%
FeSO ₄	0.009%
MnSO ₄	0.006%
C. S. L.	0.2%
Molasses	0.2%

3. 乾燥菌體量

培養液 10 ml를 10분간 3000 rpm으로 원심분리 후 분리된 균체를 증류수로 1회 水洗하고 105°C에서 5일간 乾燥秤量하여 건조균체량으로 하였다.

4. 糖定量

糖定量은 Bertland 法에 의해 定量하였다.⁽²⁵⁾

5. Glutathione의 定量

배양액 10 ml를 3000 rpm에서 약 10분간 원심분리 후 분리된 菌體를 0.85% 생리 식염수로 2회 水洗하여 菌體를 10%로 현탁시킨 후 100°C, 10분간 water bath 위에서 glutathione을 抽出한 후 25% metaphosphoric acid 2 ml를 가하고 증류수로 10 ml를 채우고 교반 혼합 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리 후 그 상등액을 試料로 하여 Alloxan 305法^(21~24)에 의해 定量하였다.

Fig. 1은 Merck 製品인 환원형 glutathione을 Alloxan 305法에 의하여 Beckman spectrophotometer로 파장 305 nm에서 optical density를 측정하여 얻은 glutathione 표준곡선이다.

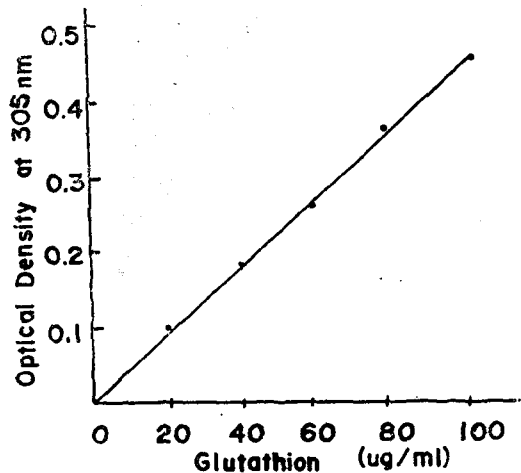


Fig. 1. Standard Curve of Glutathione.

結果 및 考察

1. 酵母의 檢索

Table 2에서 보는 바와 같이 30°C, 48시간, 각종 효모균주를 기본배지에 接種하여 왕복진탕 배양 후 건조 균체량과 glutathion 수량은 測定하였다.

이 結果 *Candida*屬과 *Rhodotorula*屬의 菌株들이 일반적으로 높은 건조균체량을 보였으며 이 중 에서 균체량과 더불어 glutathione 수량이 가장 높

Table 2. Screening Test of Various Yeasts.

Species	D. C. W. (mg/ml)	Glutathione (ug/ml)
<i>Candida macedoniensis</i>	3.5	8
<i>Candida lipolytica</i>	8.0	34
<i>Candida utilis</i>	21.3	25
<i>Candia tenuis</i>	9.5	2
<i>Kloeckera japonica</i>	8.6	33
<i>Debariomyces japonicus</i>	2.0	17
<i>Debariomyces hansenii</i>	6.5	5
<i>Hansenula holstii</i>	9.0	45
<i>Pichia orientalis</i>	4.4	12
<i>Rhodotorula texensis</i> var. <i>minuta</i>	20.3	64
<i>Rhodotorula pallida</i>	4.2	17
<i>Rhodotorula glutinis</i>	21.1	77
<i>Rhodotorula rubra</i>	24.7	63
<i>Spolobolomyces</i> var. <i>polymyza</i>	17.3	17
<i>Spolobolomyces salmonicolor</i>	22.5	60
<i>Saccharomyces sake</i> Kinrei	5.8	12
<i>Saccharomyces bayanus</i>	6.5	23
<i>Schizosaccharomyces</i> <i>octosporus</i>	4.6	25
<i>Torulopsis globosa</i>	1.1	2
<i>Trichosposon behrendii</i>	4.5	21

은 *Rhodotorula glutinis*를 選定하여 본 실험용 균 주로 하였다.

2. 各種 아미노산의 添加效果에 따른 *Rhodotorula glutinis*의 Glutathione 含量變化

Glutathione의 構成아미노산인 glutamic acid, cysteine, glycine의 시간별에 따른 첨가 효과를 보기 위하여 배양초기, 배양 후 12시간, 24시간, 36시간 때에 각 아미노산을 약 0.5%씩 첨가하여 배양하였다.

그 결과 Table 3과 같이 배양 후 36시간째 각 아미노산을 첨가한 것이 가장 높은 glutathione 含量을 나타내었다.

Glutamic acid, cysteine, glycine의 농도별에 따른 glutathione의 含量변화를 보기 위하여 각 아미노산의 濃度를 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 1.0%, 2.0%, 5.0%로 하여 배양시작 후 36시간 때 첨가한 결과 Table 4와 같이 첨가농도 각 0.7%에서 높은 菌體量과 가장 높은 glutathione 含量을 보였다.

Table 3. Effect of Feeding Time of Amino Acids on Glutathione Contents.

Amino acids	Feeding Time(hr)	D. C. W (mg/ml)	Contents of GSH(mg/ml)
Glutamic acid	0	17.7	0.092
	12	17.0	0.080
	24	18.4	0.084
	36	18.0	0.106
Cysteine	0	15.1	0.055
	12	14.5	0.048
	24	15.8	0.071
	36	16.0	0.132
Glycine	0	19.7	0.089
	12	20.2	0.084
	24	20.0	0.090
	36	19.2	0.095
Glutamic acid + Cysteine	0	18.2	0.060
	12	18.9	0.060
	24	19.4	0.126
	36	20.5	0.140
Cysteine + Glycine	0	19.1	0.095
	12	18.4	0.087
	24	19.5	0.093
	36	21.0	0.135
Glycine + Glutamic acid	0	22.1	0.085
	12	21.8	0.080
	24	22.4	0.076
	36	23.4	0.103
Glutamic acid + Cysteine Glycine	0	18.3	0.083
	12	19.2	0.073
	24	19.7	0.123
	36	21.3	0.193
None	—	18.3	66

(Concentration. of amino acid; 0.5%)

Glutamic acid, cysteine, glycine을 최저첨가 濃度인 0.7%로 조절하여 단독 및 두 종류 이상 組合하여 첨가한 결과, Table 5와 같았다.

Glutamic acid, cysteine, glycine 등의 3종을 각 0.7%로 組合하여 첨가 하였을 때 219 μg/ml으로 무첨가 배지의 73 μg/ml에 비해 약 3배의 첨가효과를 보였다.

Fig. 2는 glutamic acid, cysteine, glycine을 배양 시작 후 36시간 때 첨가하여 배양한 것과 시간별

Table 4. Effect of Various Concentrations on the Production of Glutathione.

Amino acid	Conc. (%)	D. C. W. (mg/ml)	Glutathione (ug/ml)
Glutamic acid	0.1	14.4	88
	0.3	15.0	104
	0.5	16.0	109
	0.7	16.5	116
	1.0	16.2	112
	2.0	17.5	106
	5.0	18.5	90
Cysteine	0.1	14.8	142
	0.3	14.9	144
	0.5	15.3	148
	0.7	15.1	154
	1.0	16.1	142
	2.0	16.9	140
	5.0	19.4	122
Glycine	0.1	14.6	71
	0.3	14.3	84
	0.5	15.2	86
	0.7	15.4	95
	1.0	15.5	92
	2.0	16.3	76
5.0	15.0	70	
None		16.1	72

로 배양할 때의 glutathione 含量, 菌體量, pH, 糖 소비의 경시적인 변화를 본 것이다.

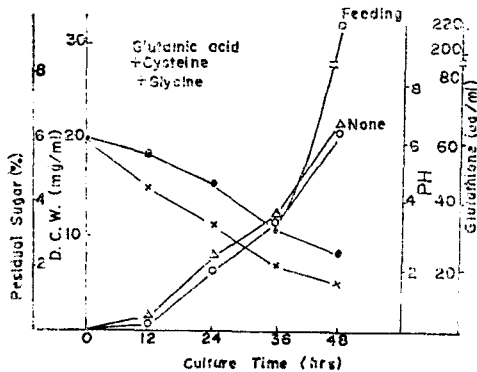


Fig. 2. Time Course of Production of Glutathione. ○—○: Glutathione, △—△: Dry cell weight ●—●: pH, X—X: Residual sugar

Table 5. Effect of Optimum Concentration on the Production of Glutathione.

Amino acid	D. C. W. (mg/ml)	Glutathione (ug/ml)
Glutamic acid	22.5	100
Cysteine	21.0	188
Glycine	22.2	80
Glutamic acid + Cysteine	21.3	204
Glutamic acid + Glycine	23.0	122
Cysteine + glycine	21.4	189
Glutamic acid + Cysteine + Glycine	22.8	219
None	22.2	73

(Concentration. of amino acid; 0.7%)

Table 6. Effect of Amino acid on the Production of Glutathione.

Amino acid	D. C. W. (mg/ml)	Glutathione (ug/ml)
L-Asparaging	22.6	114
DL-α-Alanine	22.0	115
B-Alanine	23.0	134
L-Arginine	23.1	154
L-Aspartic acid	20.3	77
L-Histidine	20.5	124
DL-Isoleucine	22.5	148
L-Leucine	20.8	108
L-Methionine	22.7	166
L-tryptophane	21.7	72
L-Vllin	20.4	118
L-Glutamic acid	22.5	100
L-Cysteine	21.0	188
Glycine	22.2	80
None	21.5	76

(Concentration. of amino acid; 0.7%)

배양시간이 경과함에 따라 glutathione 含量은 증가하였고 菌體量도 증가하였다. pH는 6.0에서 2.2로 감소되었으며 糖소비도 6%에서 1.7%까지 감소되었다.

Glutathione의 구성아미노산과 다른 각종 아미노산의 첨가 효과를 본 결과 Table 6과 같다.

Arginine, methionine, cysteine, glutathione이 각 높은 함량을 보였다.

Table 7. Effect of Amino Acid on the Production of Glutathione.

Amino acid	D. C. W. (mg/ml)	Glutathione ($\mu\text{g/ml}$)
Cysteine	0.1	180
Methionine	21.3	154
Arginine	22.2	142
Cysteine + Methionine	21.5	202
Cysteine + Arginine	21.2	192
Methionine + Arginine	21.0	169
Cysteine + Methionine + Arginine	21.8	210
None	22.1	72

(Concentration of amino acid; 0.7%, Feeding time; 36hrs)

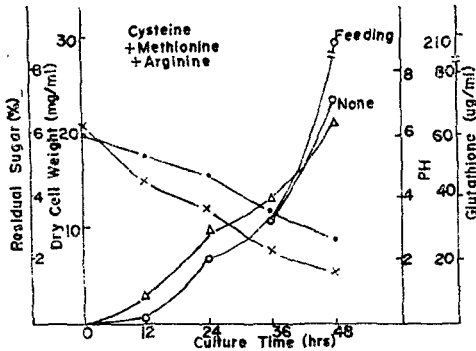


Fig. 3. Time Course of Production of Glutathione.
 ○—○ : Glutathione, △—△ : Dry cell weight ●—● : pH, X—X : Residual sugar

이 3종의 아미노산을 단독 및 3종이상 조합하여 첨가한 결과가 Table 7로서 arginine, methionine, cysteine의 3종을 조합하여 첨가한 것이 210 $\mu\text{g/ml}$ 으로 무첨가배지 72 $\mu\text{g/ml}$ 에 비해 약 3배의 첨가효과를 나타내고 있다.

Fig. 3은 거의 3종 아미노산을 배양시작 후 36시간 때 첨가한 것과 시간별로 배양하였을 때의 glutathione 함량, 菌株量, pH, 糖소비의 경시적인 변화를 본 결과이다. 배양시간의 경과에 따라 glutathione 함량이 증가하였고 균체량도 증가하였다. 반면에 6.0에서 2.4배로 감소되었으며 糖소비도 6%에서 1.9%로 감소를 보였다.

3. 培養時間에 따른 paper chromatography에 의한 glutathione의 含量變化

지금까지 실험한 결과, glutathione의 확인 실험

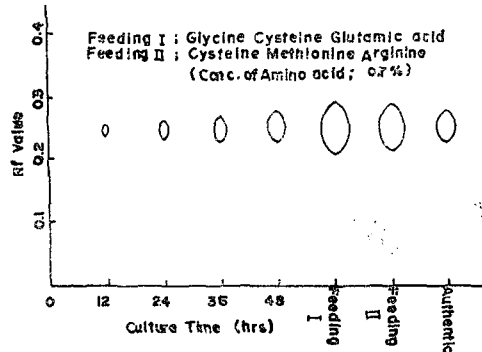


Fig. 4. Paper Chromatography of Glutathione in Various Culture Times.

을 하기 위해 다음과 같이 paper chromatography에 의해 glutathione을 분리하였다. (26, 27)

Paper chromatography는 n-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 2 v/v)의 전개제로 8시간동안 Toyo filter paper No. 54에서 전개시켰다. 이 paper를 3~4시간 30°C에서 건조시킨 후 0.2% ninhydrin-acetone 용액을 여지 全面에 분무하여 60°C에서 3분간 예비 발색시킨 다음 2% ninhydrin-acetone 용액이 나타난 spot 中心에 분무하여 60°C에서 3분간 본 발색시켰다. 이들 전개에서 얻어진 chromatography의 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 각 배양시간별에 따른 glutathione 抽出液을 표준물질과 함께 전개시킨 결과 glutathione의 Rf 값인 0.24(27)와 일치하였으며 배양시간이 경과함에 따라 glutathione의 含量이 증가하고 있다. 여기서도 아미노산을 첨가한 배지가 무첨가배지 보다 glutathione 含量이 높은 것을 알 수 있다.

要 約

酵母의 菌體生産에 관한 研究中 glutathione 含量이 多量 蓄積되는 酵母를 檢索한 結果, *Rhodotorula glutinis* 菌株가 높은 菌體量과 glutathione을 含有하였다.

이 菌株에 대한 培養時間에 따른 glutathione의 含量증가를 檢討한 結果 pH 6.0, 30°C에서 왕복진탕배양으로 48시간 배양하였을 때 가장 좋은 결과를 보였다.

Glutathione 含量 증가를 보기 위해 基本培地에

아미노산을 添加하여 glutathione 含量을 測定한 結果, 冬아미노산의 최적농도는 0.7%, 최적 시기는 배양 후 36시간째 였다.

Glutathione 의 構成아미노산인 glutamic acid, cysteine, glycine 을 組合하여 添加할 때 219 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 무첨가 배지의 73 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 비해 약 3 배의 증가를 보였다.

參考文獻

- 1) Quastel J.H, and Stewart, C.P. : *Biochem. J.*, **17**, 586 (1923).
- 2) Hunter G. and Eagles, B.A. : *J. Biol. Chem.*, **72**, 147 (1927).
- 3) Hopkins F.G. : *J. Biol. Chem.*, **84**, 269 (1929).
- 4) Harington C.R. and Mead, T.H. : *Biochem. J.*, **29**, 1602 (1935).
- 5) du Vigneaud, V., and Miler, G.L. : *J. Biol. Chem.*, **116**, 469 (1936).
- 6) du Vigneaud, V., Loring, H.S. and Miller, G.L. : *J. Biol. Chem.*, **118**, 391 (1937).
- 7) Ponte J.G., Glass, R.L., and Geddes, W. F. : *Cereal Chem.*, **37**, 263 (1960).
- 8) Kuninori To, Yagi, M. and Matsumoto, H. : *J. Ferment. Technol.*, **46**, 196 (1968).
- 9) Kuninori T. and Sullivan, B. : *Cereal Chem.*, **45**, 486 (1968).
- 11) Sullivan B. and Howe, M. : *J. Amer. Chem. Soc.*, **59**, 2742 (1937).
- 12) 橋谷義考 : 酵母學, 291 (1967).
- 13) 朝井勇宜 : 日農化會誌, **19**, 275 (1943).
- 14) 渡邊清 : 日本特許 48—40987 (1973).
- 15) 大岡忠昭 : 日本特許 48—44488 (1973).
- 16) 三村春男 : 日本特許 48—92579 (1973).
- 17) 大岡忠昭 : 日本特許 48—61689 (1973).
- 18) 日下部均 : 特許 48—44487 (1973).
- 19) 山口芳雄 : 日釀誌, **7**, 63 (1949).
- 20) 三村春男 : 日本特許 49—14686 (1974).
- 21) Patterson J.W. and Lazarow, A. : *Methods of Biochemical Analysis* **2**, 259 (1961).
- 22) Grunert R.R. and phillips, P.H. : *Arch. Biochem. & Biophysics*, **30**, 217 (1951).
- 23) Owens, C.W.I. and Belcher, R.V. : *Biochem. J.*, **94**, 705 (1965).
- 24) Kay W.W. and Murfitt, K.C. : *Biochem. J.*, **74**, 203 (1960).
- 25) 鄭東孝 : 最新食品分析法(三中堂), 120 (1976).
- 26) 柴田材治 : Paper chromatography 의 實際, 22 (1966)
- 27) Zweig G. and Sherma, J. : *Handbook of Chromatography*, **1**, 297 (1972).