

Glutathione 생산균주의 분리 동정 및 생산조건

신원철* · 김대선 · 유재홍 · 유주현¹

강원대학교 공과대학 발효공학과, ¹연세대학교 공과대학 식품공학과

Isolation, Identification and Culture Condition of Microorganism Producing Glutathione

Shin, Won-Cheol*, Dae-Sun Kim, Jae-Hong Yu and Ju-Hyun Yu¹

Department of Fermentation Engineering,

Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract— The strain which produced glutathione was isolated from soil samples. The isolated strain was identified as the genus *Candida* through its morphological, cultural and physiological characteristics. The highest production of glutathione by *Candida* sp. was obtained after cultivation with shaking for 36 hours in the culture medium containing fructose 1.0%, yeast extract 4.0%, NaCl 0.04%, thiamine-HCl 5 µg/ml, and L-cysteine 0.04%. The optimal pH and temperature for the glutathione production were pH 6.0 and 25°C, respectively. The glutathione production by *Candida* sp. under the optimal culture condition was 92 µg/ml.

Glutathione은 tripeptide(γ -L-glutamyl-cysteinyl-glycine)의 비단백성 thiol 화합물로(1) 세포내에서 산화형(GSSG)과 환원형(GSH)이 존재하며(2) 일부 효소들의 보조소(1), 단백질의 thiol기를 환원상태로 유지시켜 주는 기능(3), 세포벽의 보호(4), 세포의 증식(5), epoxide(6) 및 methylglyoxal(7) 등과 같은 독성이 있는 물질을 해독시켜 주며 단백질과 DNA 합성(8), 방사선의 영향으로부터 세포보호(9) 등 생체내에서 중요한 생리활성 기능을 가지고 있다. 이와 같이 glutathione은 생체내에서 여러가지 생리 및 대사에 관여하고 있기 때문에 이것이 부족하게 되면 용혈작용, 중추신경 작용의 영향, 용혈성 빈혈 및 백내장 등의 증상을 나타내며(8) 현재는 의학분야에서 간질환 치료제, 간기능 회복 및 해독작용(2, 10) 등의 질병치료에 널리 사용되고 있다.

따라서 이러한 목적에 사용하기 위한 glutathione의 공업적 생산방법으로는 유기합성법 및 발효법이 이용되고 있는데 유기합성법은 공정이 복잡하여 현재는

대부분이 효모를 이용한 발효법으로 생산되고 있다(10). 효모를 이용한 glutathione의 생산은 glutathione의 전구체(11), ethanol(12) 및 lactic acid(13) 등을 배지에 첨가하는 방법과 돌연변이주를 이용하는 방법(14-16) 및 glutathione 생산균주를 고정화시켜 생산하는 방법(17) 등이 사용되고 있다.

본 연구에서는 여러가지 생리기능과 용도가 있는 glutathione의 공업적 생산을 목적으로 토양으로부터 glutathione 생산균주를 분리하여 균주의 동정과 생산조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

춘천시 근교에서 채취한 토양을 YM(glucose 1.0%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%) 고체배지에 도말한 다음 30°C 에서 2~3일간 배양한 후 생성된 균을 YM 액체배지에서 2일간 진탕배양하고 Ellman(18)의 sulfhydryl group 측정방법에 의하여 glutathione 생산균주를 분리하였다.

분리한 균을 YM 액체배지에 백금이로 1회 접종

Key words: *Candida* sp., glutathione

*Corresponding author

하여 30°C 에서 진탕배양하였다. 배양액을 6,500×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체를 끓는 물에서 파괴한(19) 후 Owens와 Belcher(20)의 방법으로 각 균주의 glutathione 생산능을 측정하였다. 분리한 균 중에서 glutathione 생산능이 가장 좋은 균주를 선별하여 본 실험에 사용하였다.

균주의 동정

Glutathione 생산균주의 동정은 The yeast : A taxonomic study(21), 식품공학 실험II(22) 및 Microbiology : A laboratory manual(23) 등에 수록되어 있는 일반적인 효모동정법에 따라 행하였다.

건조균체량 측정

사면배양한 분리균주를 YM 액체배지에 백금이로 1회 접종하고 30°C 에서 36시간 진탕배양한 후 배양액을 6,500×g에서 10분간 원심분리하였다. 균체를 항량이 될 때까지 건조시킨 후 각각 균체의 무게를 달리하여 취하고 증류수에 현탁한 후 660 nm에서 흡광도를 측정한 표준곡선으로부터 배양액의 건조균체량을 측정하였다.

Glutathione 정량

Owens와 Belcher(20)의 방법에 따라 0.2 M 인산염 완충용액(pH 7.1) 2.5 ml, 1.0 mM EDTA 0.8 ml, 0.6 mM DTNB 0.03 ml, glutathione reductase(5 unit)와 시료 0.2 ml를 혼합한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하고 0.2 mM NADPH 용액 0.1 ml를 첨가하여 30°C 에서 5분간 방치한 후에 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. NADPH 용액 첨가 전후의 흡광도 차이를 구하여 작성된 표준곡선으로부터 glutathione을 정량하였다.

Glutathione 생산조건

Glutathione 생산조건 검토는 YM 배지를 사용하여 시간, 온도 및 pH의 조건을 검토하였다. 또한 Glutathione 생산을 위한 최적 배지조성 검토는 YM 배지를 기본으로 하여 각종 영양원의 종류와 농도를 구하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

Glutathione 생산균주의 전자현미경 사진을 Fig. 1

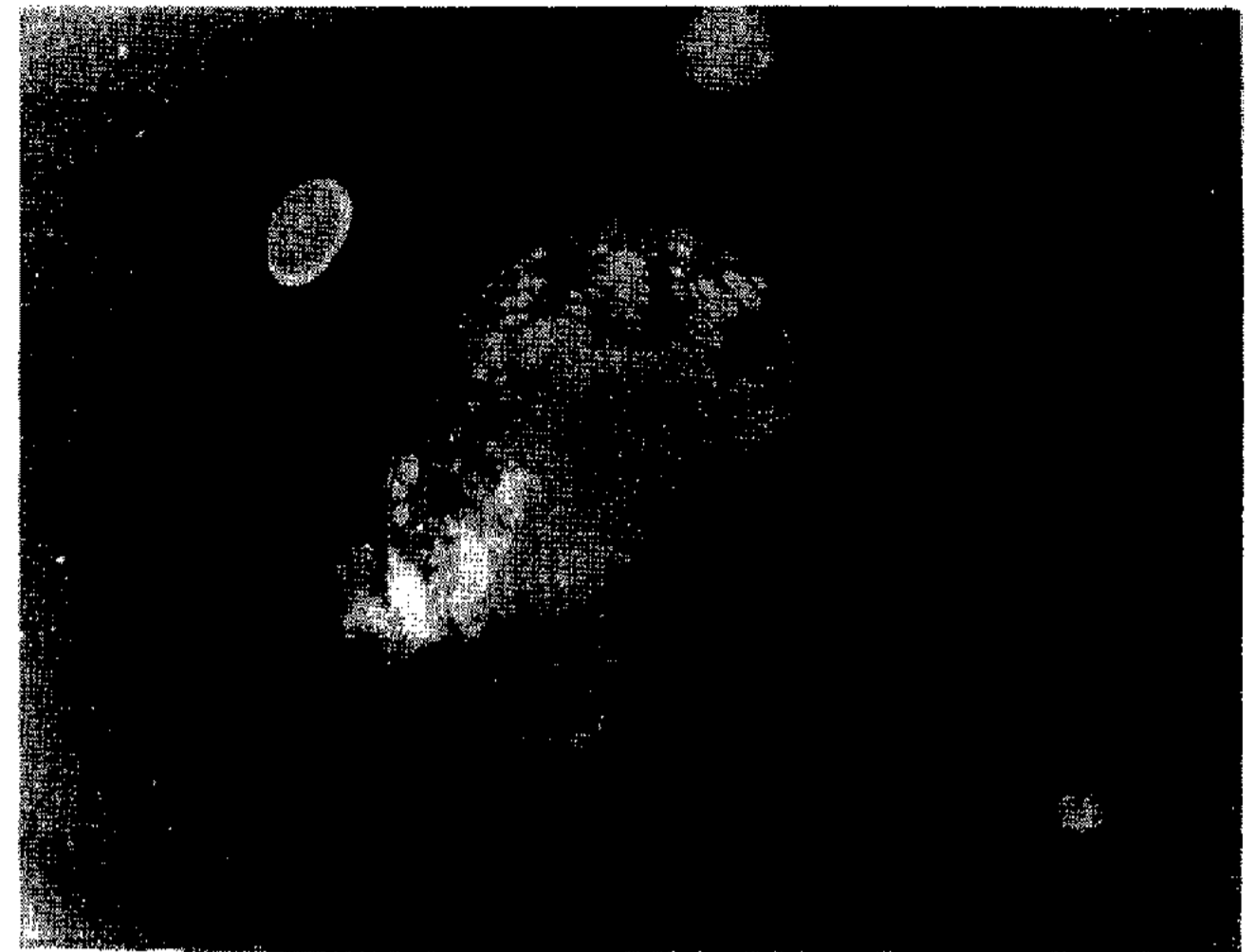


Fig. 1. Electron micrograph of the isolated strain (× 8,000).

TEM: Phosphotungstate negative staining.

Bar represents 1 μm.

에 나타내었으며 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 검토한 결과는 Table 1과 같다.

분리균은 다극성 출아법에 의하여 번식하고 potato-glucose 고체배지에서 *Candida*형의 의균사(pseudo-mycelium)를 형성하고 진균사(true mycelium)는 형성하지 않았다. 또한 질산염 자화성, alcohol 자화성 및 arbutin 가수분해 양성을 나타내었으나 urease 및 starch test는 음성을 나타내었다. 이상과 같은 특성으로부터 분리균주는 *Candida*속으로 판단되었다.

Glutathione의 생산조건

배양시간에 따른 영향 : YM 배지에서 배양시간에 따른 *Candida* sp. 균주의 생육과 glutathione 생산을 검토한 결과, Fig. 2에서와 같이 균체의 생육 및 glutathione 생산은 12시간부터 급격히 증가하여 36시간에서 최대를 나타내었으며 이 후부터 점차적으로 감소하였다.

배양온도의 영향 : Glutathione 생산에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. Glutathione 생산 및 균체의 생육은 25°C 에서 최대를 나타내었으며 25°C 이상의 온도에서는 급격하게 감소하였다. Shinichiro 등(24)은 *Saccharomyces cerevisiae*의 경우 20~40°C 의 배양온도에서 glutathione 생산이 높다고 보고하였고 Tadayuki 등(15)은 *Candida utilis*의 경우 24°C 에서 glutathione 생산이 높다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 분리된 *Candida* sp. 균주는 *Candida utilis*의 최적 생산온도와 유사한 결과를 나타

Table 1. Morphological, cultural and physiological characteristics of the isolated strain

1. Morphological characteristics			
Shape of cell	Oval		
Cell size	6.4×8.5 μm		
Vegetative reproduction	Multilateral budding		
Ascospore	Not observed		
Pseudomycelium	Present		
True mycelium	Not observed		
2. Cultural characteristics			
Colony on malt extract agar(25°C, 2~3 days);			
Texture	Coherent		
Color	Creamy		
Surface	Smooth		
Elevation	Raised		
Margin	Undulate		
3. Physiological characteristics			
Urease activity	Negative		
Starch test	Negative		
Utilization of nitrate	Positive		
Utilization of alcohol	Positive		
Growth:			
at 20°C	Positive		
at 37°C	Positive		
Splitting of arbutin	Positive		
Fermentation of sugars:			
Glucose	+	Maltose	+
Galactose	+	Raffinose	-
Inulin	+	Sucrose	+
Lactose	+		
Utilization of sugars:			
Cellobiose	-	Glucose	++
Galactose	++	Lactose	-
Mannose	++	Mannitol	++
Inulin	+	Inositol	-
Raffinose	-	Ribose	-
Starch	-	Sucrose	++
Xylose	+		

내었다.

초기 pH의 영향 : Glutathione 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 검토한 결과, Fig. 4에서와 같이 glutathione 생산 및 균체의 생육은 초기 pH가 6에서 최대를 나타내었다. Tadayuki 등(15)은 pH 4.0~6.0에서 glutathione 생산이 바람직하다고 보고하였으며 Kenzo 등(10)은 *Candida krusei*의 경우 pH 6.0에서 glutathione 생산이 높다고 보고하여 분리균주와 비슷한

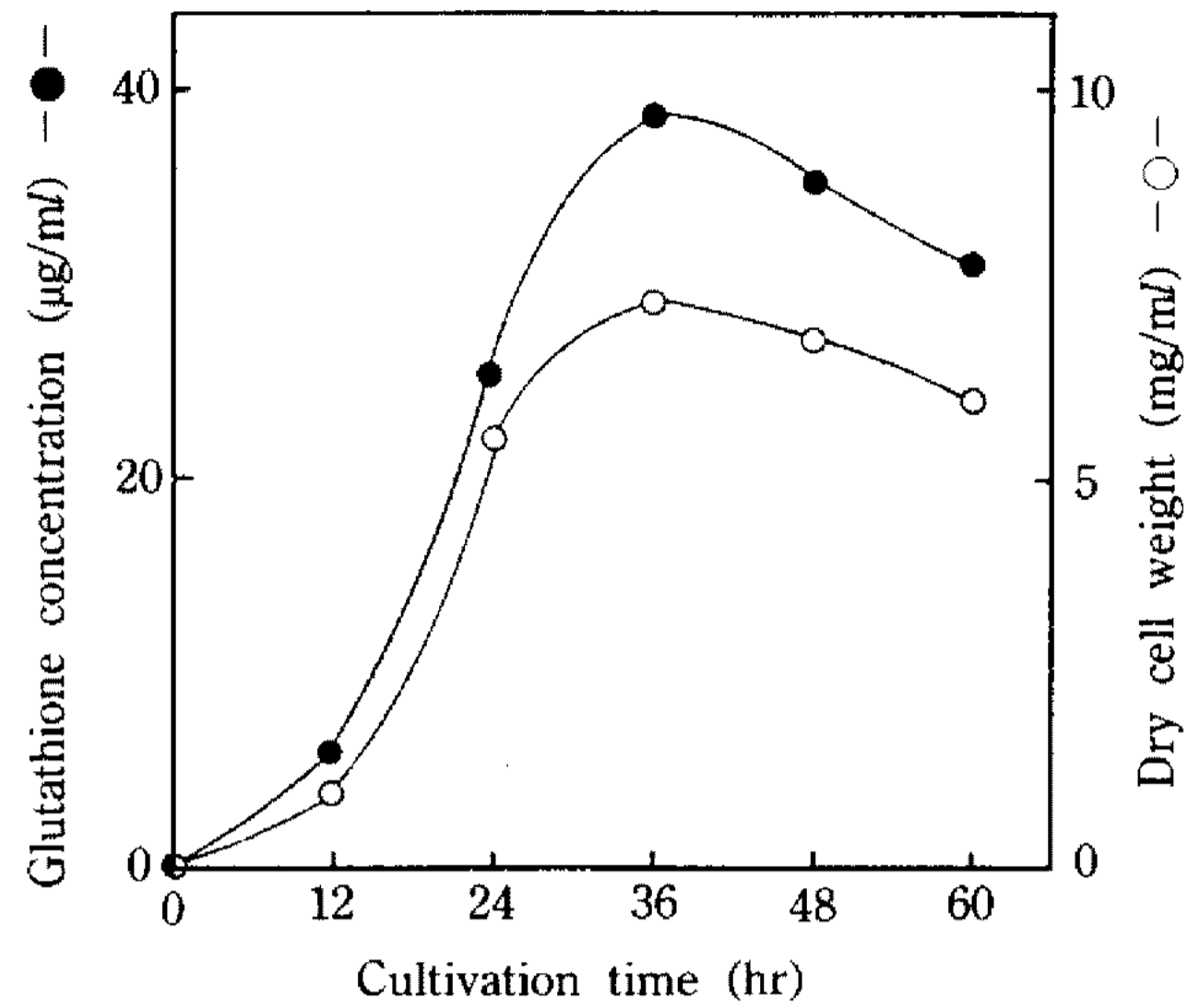


Fig. 2. Profiles of the cell growth and the glutathione production by *Candida* sp. during cultivation.

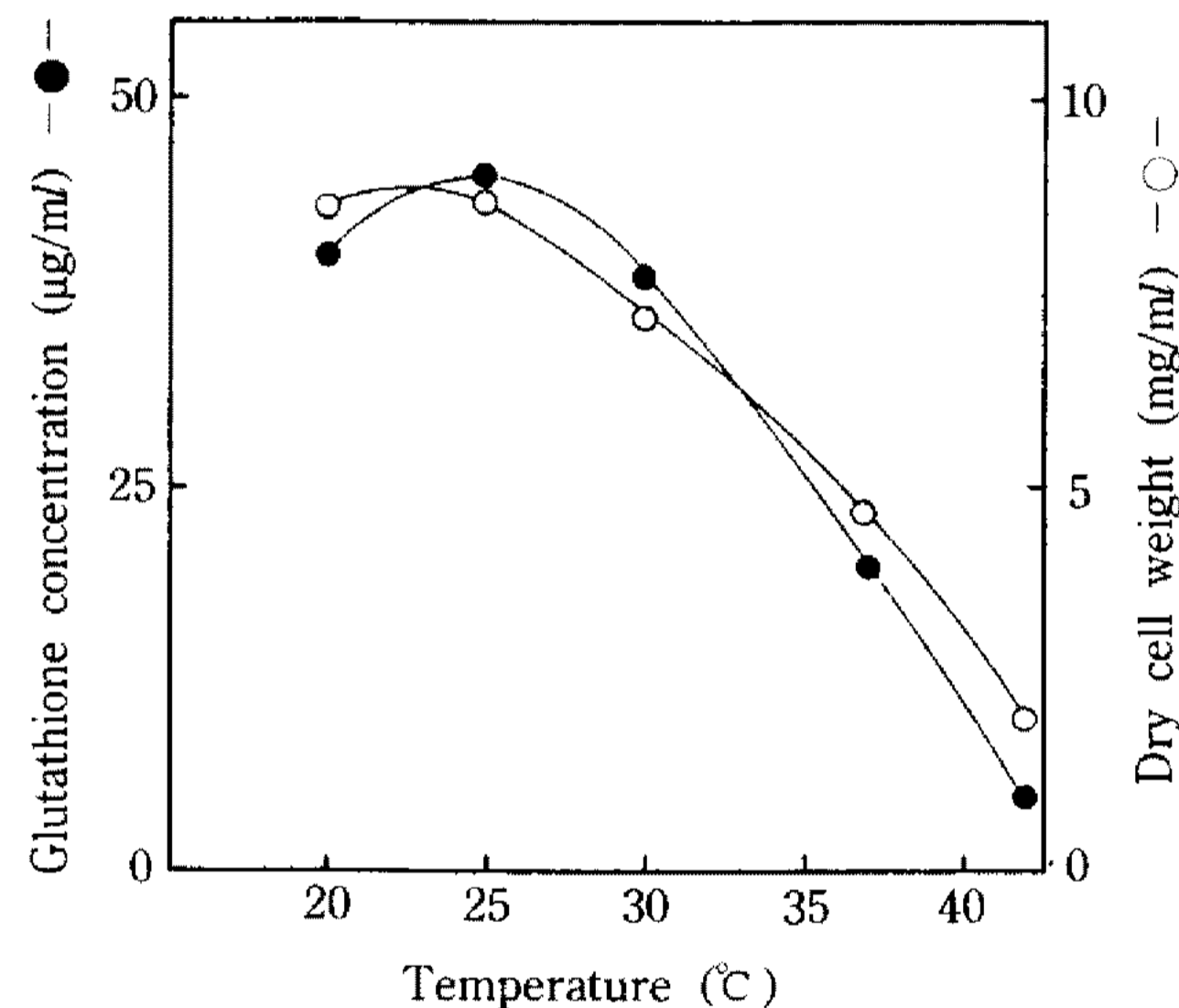


Fig. 3. Effect of temperature on the cell growth and the glutathione production by *Candida* sp.

결과를 보여주었다.

배지조성 검토 : Glutathione 생산을 위한 각종 배지조성 검토를 행한 결과는 Table 2와 같다. 탄소원으로는 fructose(1.0%)가 가장 좋았으며 질소원으로는 yeast extract(4.0%)가 무기염류로는 NaCl(0.04%)이 가장 높게 나타났다. 또한 성장촉진 인자로는 thiamine-HCl(5 μg/ml)이 전구체로는 L-cysteine(0.04%)이 glutathione 생산에 가장 좋았다. 이상의 결과는 Shinichiro 등(24)과 Tadayuki 등(15)의 실험 결과와 잘 일치하였으며 특히 전구체의 경우 L-cysteine이 glutathione 생산에 절대적으로 필요하다고 보고한 Murata와 Tani(17)의 실험 결과와 같은 경향을 나타

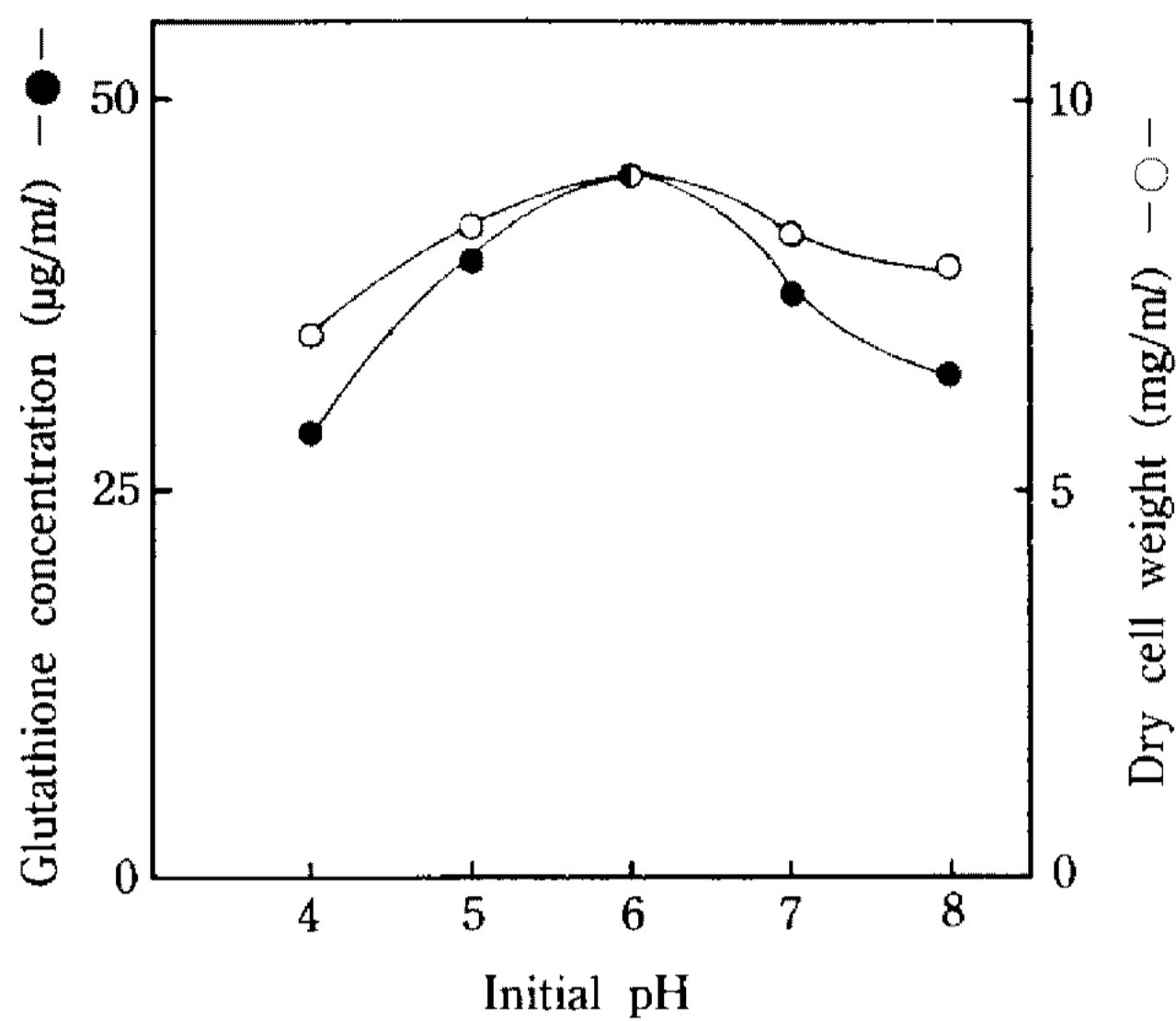


Fig. 4. Effect of initial pH on the cell growth and the glutathione production by *Candida* sp.

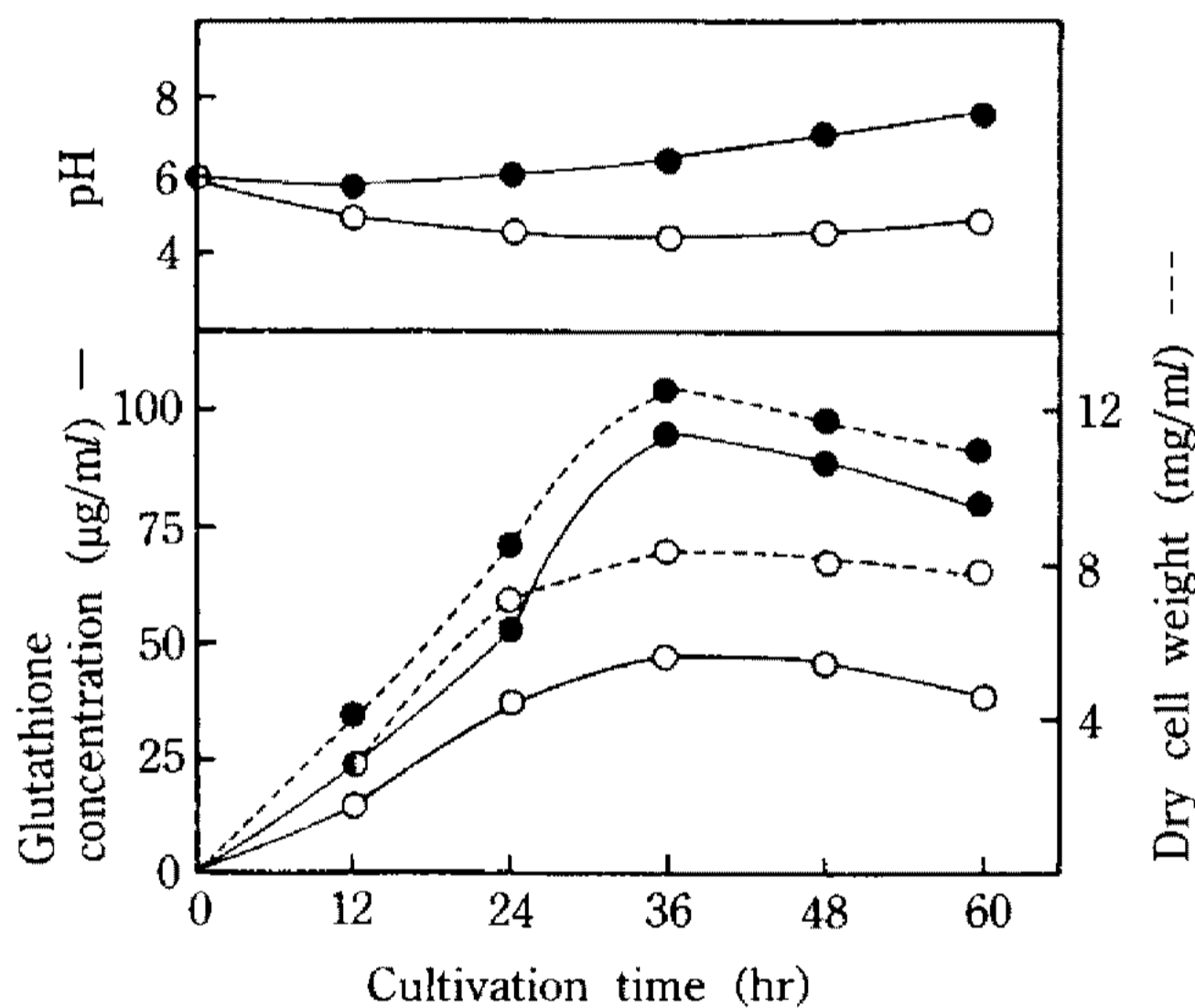


Fig. 5. Time courses of the cell growth and the glutathione production by *Candida* sp.

○: YM medium, ●: Optimal medium

내었다.

본배양: *Candida* sp. 균주에 의한 glutathione 생산을 YM 액체배지와 Table 2의 최적배지를 사용하여 비교 검토한 결과는 Fig. 5와 같다. 최적배지 및 YM 배지 모두 36시간에서 균체의 생육 및 glutathione 생산이 최대를 나타내었다. 최적배지를 사용하였을 때 pH 변화는 6.0에서 7.63으로 증가하였으나 YM 배지에서는 6.0에서 4.7로 감소되었다. Glutathione 생산은 YM 배지보다 최적배지에서 배양하였을 때 36 µg/ml에서 92 µg/ml로 약 2.5배, 건조균체 중의 glutathione은 5.1 mg/g에서 7.4 mg/g으로 약 1.4배 정도

Table 2. Optimal medium compositions for the glutathione production by *Candida* sp.

Medium component	Concentration (w/v)
Fructose	1.0%
Yeast extract	4.0%
NaCl	0.04%
Thiamine-HCl	5 µg/ml
L-Cysteine	0.04%

증가하였다.

요 약

춘천시 근교의 토양으로부터 glutathione 생산균주를 분리, 동정하고 glutathione 생산 최적조건을 검토하였다. 분리된 균주는 동정을 행한 결과 *Candida* sp.로 판단되었다. Glutathione 생산을 위한 *Candida* sp.의 배지조성은 fructose 1.0%, yeast extract 4.0%, NaCl 0.04%, thiamine-HCl 5 µg/ml 및 L-cysteine 0.04%이었으며 온도는 25°C, pH 6.0에서 36시간 배양하였을 때 glutathione 생산이 가장 좋았다. Glutathione 생산을 위한 최적배지에서 *Candida* sp. 균주에 의한 glutathione 생산량은 92 µg/ml로 YM 배지보다 약 2.5배 정도 증가하였다.

감사의 말

본 연구는 강원대학교 기성회 연구비에 의하여 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Murata, K. and A. Kimura. 1986. Relationship between glutathione contents and generation times in *Saccaromyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1055-1056.
2. Tadayuki, H. and K. Yuhihar. 1986. 글타치온 및 γ -글타밀시스테인의精製法. Japan Patent 61-282397.
3. Fahey, R.C., S. Brody and D. Mikolajczyk. 1975. Changes in the glutathione thiol-disulfide status of *Neurospora crassa* conidia during germination and aging. *J. Bacteriol.* **121**: 144-151.
4. Murata, K. and A. Kimura. 1982. Some properties of glutathione biosynthesis-deficient mutants of *Escherichia coli* B. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1047-

- 1052.
5. Fahey, R.C. and G.I. Newton. 1983. *Eutamoeba histolytica*: A Eukaryote without glutathione metabolism. *Science* **224**: 70-72.
 6. Jakoby, W.B. 1982. *Metabolic Basis of Detoxification*, Academic press.
 7. Rhee, H.I., K. Murata and A. Kimura. 1987. Molecular cloning of the *Pseudomonas putida* glyoxylase I gene in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**: 831-836.
 8. Meister, A. and M.E. Anderson. 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 711-760.
 9. Yamada, Y., Y. Tani and T. Kamihara. 1984. Production of extracellular glutathione by *Candida tropicalis* PK 233. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 3275-3278.
 10. Kenzo, Y., T. Hirashi and H. Yoshiteru. 1985. グルタチオンの製造法. Japan Patent 60-160894.
 11. Morineau, G., M. Azoulay and F. Frappier. 1989. Reaction of o-phthalaldehyde with amino acids and glutathione. *J. Chromato.* **467**: 209-216.
 12. Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. 1984. グルタチオンの製造法. Japan Patent 59-34899.
 13. Kan, H and N. Koji. 1985. グルタチオン生産性酵母の培養方法. Japan Patent 60-244284.
 14. Michio, K., K. Sempura, H. Shinichiro and S. Kuniaki. 1985. グルタチオンの製造法. Japan Patent 60-248199.
 15. Tadayuki, M., M. Hirokazu, I. Junick and H. Mokichi. 1986. 變異珠. Japan Patent 61-31081.
 16. Murata, k., K. Tani, J. Kato and I. Chibata. 1980. Excretion of glutathione by methylglyoxal-resistant *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 545-547.
 17. Murata, K. and K. Tani. 1981. Glutathione production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells containing an ATP regeneration system. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 72-77.
 18. Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70-77.
 19. Sawa, Y., H. Shindo, S. Nishimura and H. Ochiai. 1986. Photosynthetic glutathione production using intact cyanobacterial cells. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1361-1363.
 20. Owens, C.W.I. and R.V. Belcher. 1965. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem. J.* **94**: 705-711.
 21. Kreger-Van Rij, N.J.W. 1984. *The Yeast-A Taxonomic Study*, 3th ed. Elsevier Science Publisher, B.V. Amsterdam.
 22. 유주현, 양응, 양한철, 정동효. 1981. 식품공학실험 II, 탐구당.
 23. Cappuccino, J.G. and N. Sherman. 1975. *Microbiology-A Laboratory Manual*, Benjamin and Cummings, California.
 24. Shinichiro, H., T. Hisao and S. Kuniaki. 1982. Process for producing glutathione. *Eur. Patent Application* 0079241.

(Received December 28, 1992)