

Candida sp. 변이주에 의한 Glutathione 생산

김대선 · 유재홍 · 윤성식¹ · 신원철*
강원대학교 발효공학과, ¹연세대학교 낙농학과

Production of Glutathione by *Candida* sp. Mutant

Kim Dae-Sun, Jae-Hong Yu, Sung-Sik Yoon¹ and Won-Cheol Shin*

Department of Fermentation Engineering,

Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Dairy Science, Yonsei University, Wonju 222-701, Korea

Abstract — For the overproduction of glutathione, *Candida* sp. mutant was isolated by the treatment with U.V. light. The highest glutathione production of *Candida* sp. mutant was obtained after shaking culture for 48 hours in the culture medium containing glucose 1.5%(W/V), yeast extract 4.0%(W/V), KH₂PO₄ 0.04%(W/V), biotin 5 µg/ml, and L-cysteine 0.04%(W/V). The optimal pH and temperature for the glutathione production were pH 6.0 and 25°C, respectively. The glutathione production of *Candida* sp. mutant under the optimal culture condition was 175 µg/ml. The purified glutathione was identified to be the same as the authentic glutathione by TLC chromatogram, UV and IR spectrum.

Glutathione은 1921년 Hopkins에 의하여 효모에서 처음 발견되었으며(1) 세포내에 고농도로 존재하는 저분자의 비단백성 thiol 화합물로 밝혀졌다(2). Tietze (3)에 의하면 glutathione은 glutathione reductase에 의하여 대부분이 환원형으로 존재하며 포유동물 뿐만 아니라 동물, 식물 및 미생물에 이르기까지 광범위하게 분포되어 있다고 보고되었다. 이러한 glutathione은 생체내에서 여러가지 생리 및 대사에 관여하고 있으며 의학적으로는 간질환 치료제나 간기능 회복제(4, 5)에 많이 사용되고 있다. 현재 glutathione의 생산은 주로 효모를 이용한 발효법에 의하여 생산되고 있는데(5) 생산성 향상을 위하여 독성물질에 대한 내성균주를 이용하는 방법이 사용되고 있다(6-8).

본 연구는 전보(9)에서 분리된 *Candida* sp.를 사용하여 sodium azide에 대한 내성 돌연변이 균주를 분리하여 변이주의 glutathione 생산성 검토와 분리, 정제를 행하였다.

돌연변이주의 분리

YM(glucose 1.0%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%) 액체배지를 사용하여 30°C에서 36시간 진탕배양시킨 종균 배양액을 YM 액체배지에 1.0%(V/V) 접종하고 24시간 진탕배양하였다. 배양액 6 ml를 원심분리하여 균체를 생리식염수 6 ml에 현탁시킨 후 petri-dish에 넣어 U.V. lamp(10 Watt)로부터 30 cm의 거리에서 6분 동안 U.V.를 조사하였다. 조사한 균액을 sodium azide가 30 µg/ml 첨가된 YM 액체배지에 2.0%(V/V) 접종하였다. 25°C에서 4일간 진탕배양한 후 YM 고체배지에 도말하여 균주의 생육 유무를 확인하였다. 생육한 균을 원균주의 최적배지(fructose 1.0%, yeast extract 4.0%, NaCl 0.04%, thiamine-HCl 5 µg/ml, L-cysteine 0.04%)에 배양한 후 glutathione 농도를 Owens 와 Belcher(10)의 방법으로 측정하여 원균주보다 glutathione 생산성이 높은 변이주를 분리하였다.

재료 및 방법

Key words: *Candida* sp. mutant, glutathione

*Corresponding author

돌연변이주의 glutathione 생산조건

돌연변이주에 의한 glutathione 생산조건 검토는 원균주의 최적배지를 사용하여 시간, 온도 및 pH

조건을 검토하였다. 또한 돌연변이주의 glutathione 생산을 위한 최적 배지조성 검토는 원균주의 최적배지를 기본으로 하여 각종 영양원의 종류와 농도를 구하였다.

Glutathione의 분리 및 정제

Maki와 Imai(11)의 방법에 따라 시료를 5N HCl로 pH 3.0되게 조절하고 강양이온 교환수지(Amberite IR 120, H⁺)에 흡착시켰다. Glutathione이 흡착된 수지를 물로 충분히 세척한 후 0.1N NaOH로 용출하였다. 용출액을 모아 동결농축한 후 50% 되게 ethanol을 가하고 4°C 에서 방치하여 glutathione을 결정형태로 분리하였다.

Glutathione의 확인

Silica gel TLC plate상에 표준 및 정제된 glutathione을 spot하고 ethanol-water-ethyl acetate=3 : 2 : 1(V/V)의 용매계를 사용하여 전개시킨 후 ninhydrin을 분무하여 비교 관찰하였다.

UV spectrum은 glutathione을 증류수에 0.5mg/ml되게 용해시켜 UV/VIS spectrophotometer(Perkin-Elmer 552 S)로 조사하였다.

Glutathione의 IR spectrum은 가압정제법(KBr)으로 IR spectrophotometer(Perkin-Elmer 1430)를 사용하여 조사하였다.

결과 및 고찰

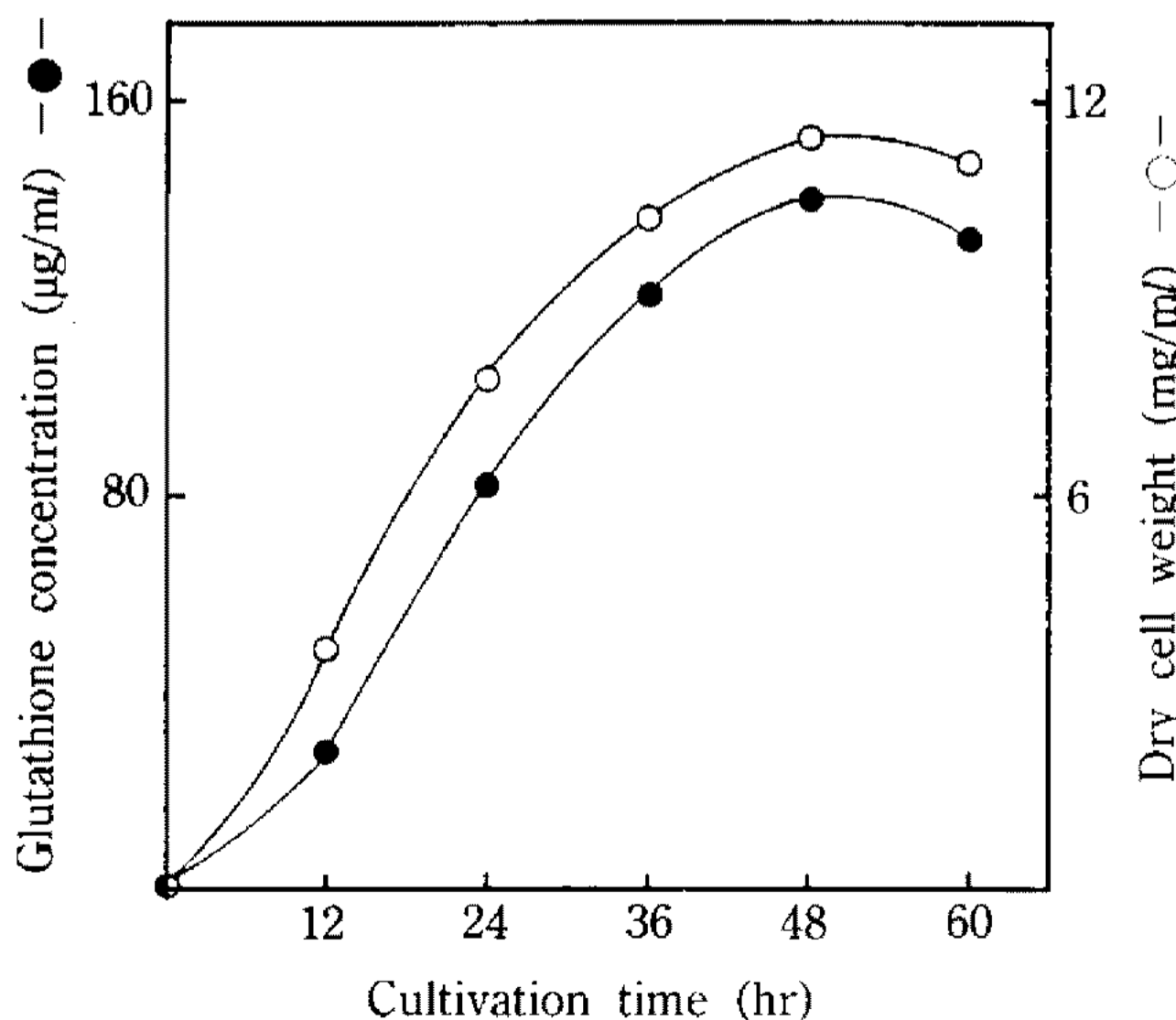


Fig. 1. Profiles of the cell growth and the glutathione production by *Candida* sp. mutant during cultivation.

돌연변이주의 분리

Candida sp.를 U.V. 처리에 의해 sodium azide를 30 µg/ml 함유한 YM 배지에서 배양하여 생육하는 균주를 분리하고 glutathione 농도를 측정하여 생산성이 가장 높은 돌연변이주를 분리하였다.

돌연변이주의 glutathione 생산조건

배양시간에 따른 영향: 최적배지에서 배양시간에 따른 변이주의 생육과 glutathione 생산을 검토한 결과, Fig. 1에서와 같이 균체의 생육과 glutathione 생산은 48시간에서 가장 좋았다. 이러한 결과는 glutathione 생산에 있어서 일반적으로 25~50시간 배양

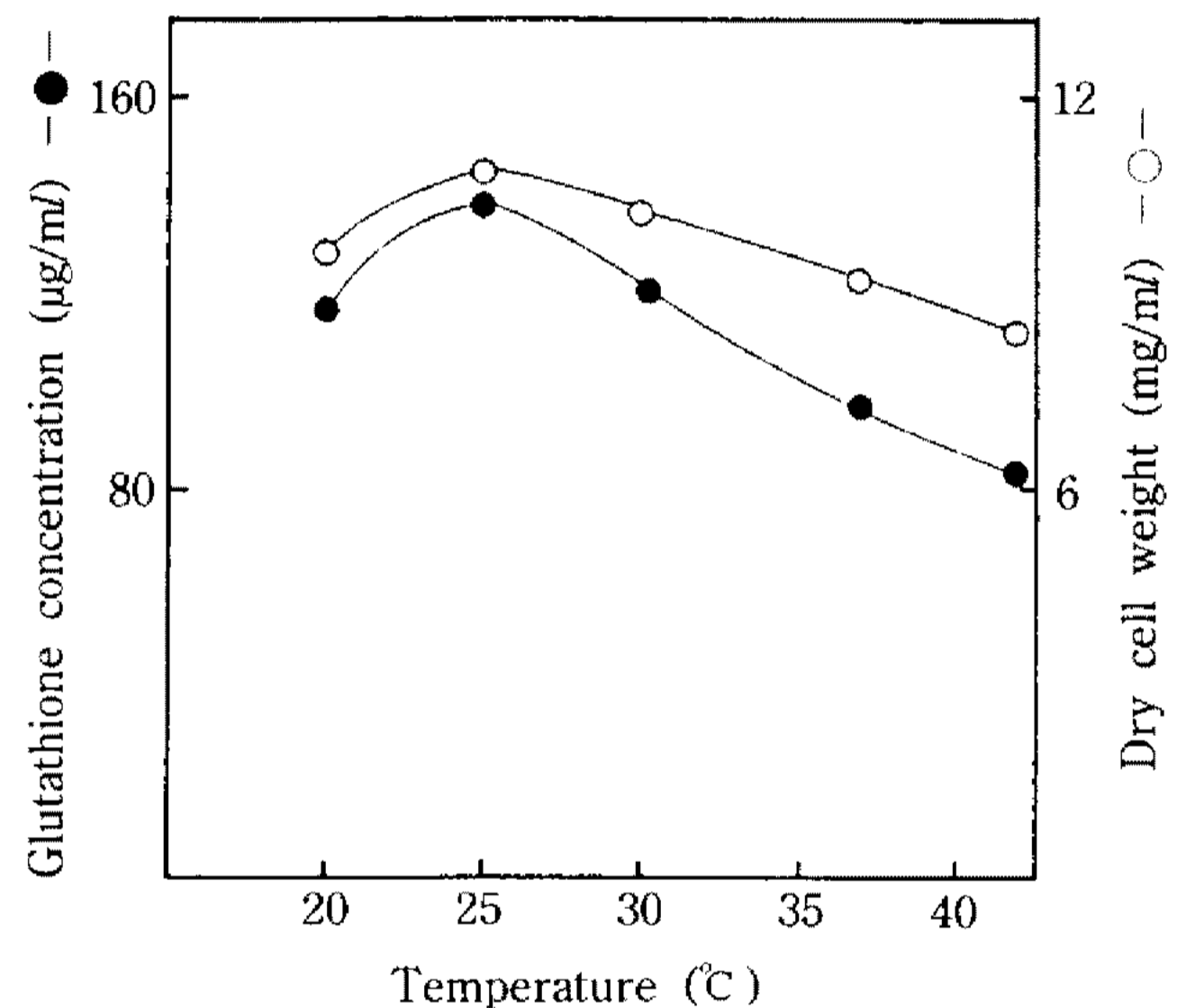


Fig. 2. Effect of temperature on the cell growth and the glutathione production by *Candida* sp. mutant.

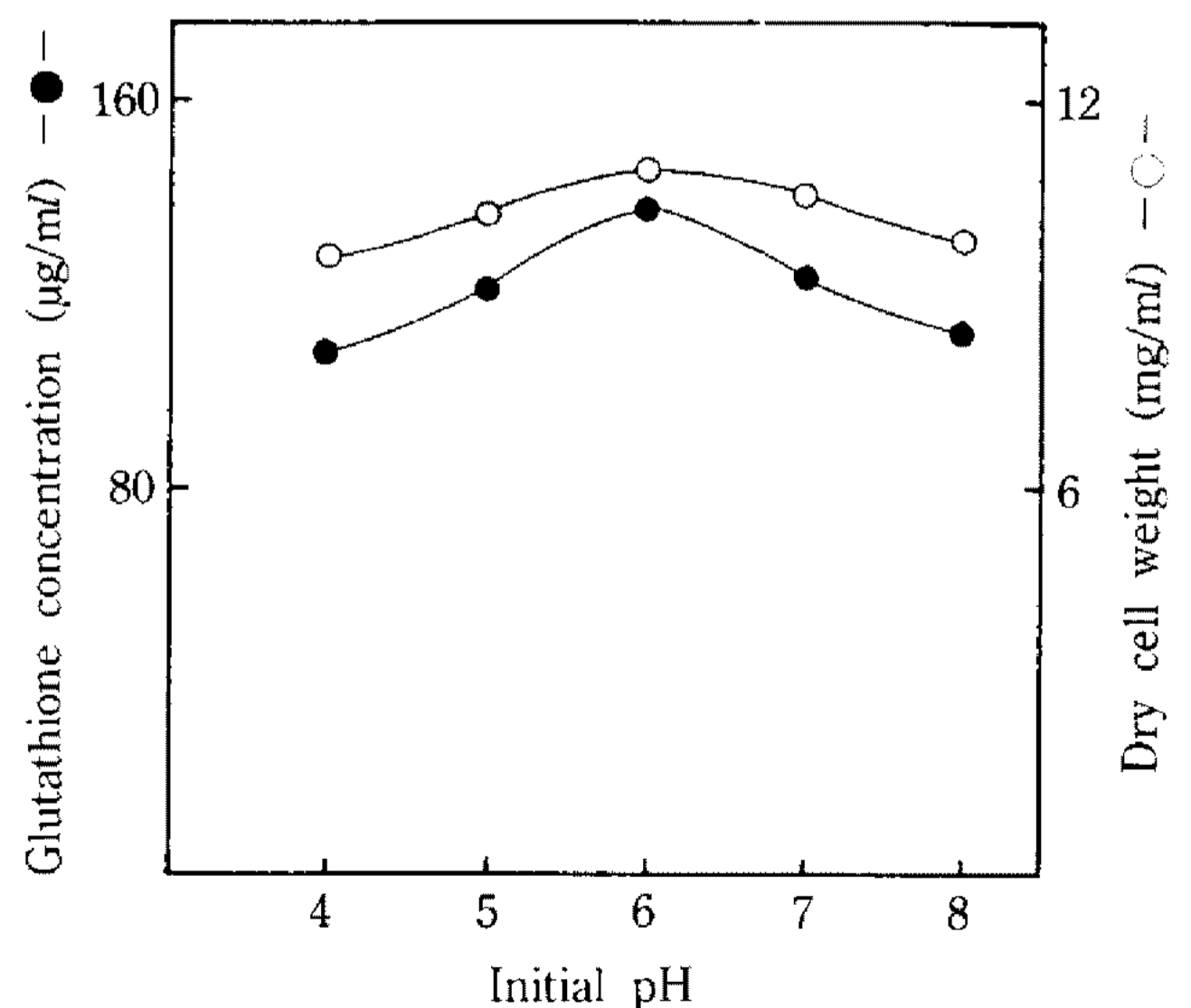


Fig. 3. Effect of initial pH on the cell growth and the glutathione production by *Candida* sp. mutant.

Table 1. Optimal medium compositions for the glutathione production by *Candida* sp. mutant

Medium component	Concentration (W/V)
Glucose	1.5 %
Yeast extract	4.0 %
KH ₂ PO ₄	0.04%
Biotin	5 µg/ml
L-Cysteine	0.04%

시킨다는 보고와(12) 잘 일치하였다.

배양온도의 영향 : 배양온도에 따른 glutathione 생산을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 변이주의 균체생육 및 glutathione 생산은 25°C 에서 최대를 나타내었다. Hino 등(12)은 생산온도와 배양온도와는 5°C 의 차이가 있다고 보고하였으나 본 균주는 생산온도와 배양온도가 일치하였다.

초기 pH의 영향 : Glutathione 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 검토한 결과, Fig. 3에서와 같이 변이주의 균체생육 및 glutathione 생산은 초기 pH 6에서 최대를 나타내어 Hino 등(12)의 결과와 유사하였다.

배지조성 검토 : Glutathione 생산을 위한 각종 배지조성 검토를 행한 결과는 Table 1과 같다. 탄소원으로는 glucose(1.5%)가 가장 좋았으며 질소원으로는 yeast extract(4.0%)가 무기염류로는 KH₂PO₄(0.04%)가 가장 높게 나타났다. 또한 성장촉진인자로는 biotin (5 µg/ml)이 전구체로는 L-cysteine(0.04%)이 glutathione 생산에 가장 좋았다.

전보(9)에서 보고한 원균주는 탄소원으로 fructose, 무기염류로는 NaCl과 성장촉진인자로 thiamine-HCl 을 요구하였으나 변이주는 glutathione 생산에 다른 영양분을 요구하여 두 균주 사이에 커다란 차이가 있다는 것을 알 수 있었다.

본 배양 : 변이주에 의한 glutathione 생산을 원균주의 최적배지와 Table 1의 최적배지를 사용하여 비교 검토한 결과는 Fig. 4와 같다. 최적배지에서 변이주의 균체생육과 glutathione 생산은 48시간 배양에서 최대를 나타내었으며 pH 변화는 6.0에서 6.7로 증가하였다. Glutathione 생산은 175 µg/ml로 원균주보다 약 1.9배 정도 증가하였다. 건조균체 중의 glutathione은 변이주는 13.5 mg/g으로 원균주의 7.4 mg/g보다 약 1.8배 정도 증가하였다.

이상의 결과는 Kawamura 등(6)과 Hino 등(7)의 결과와 비교하여 볼 때 낮은 생산량이었으나 Nanjo 등(13)의 결과보다는 높은 생산량을 나타내었다.

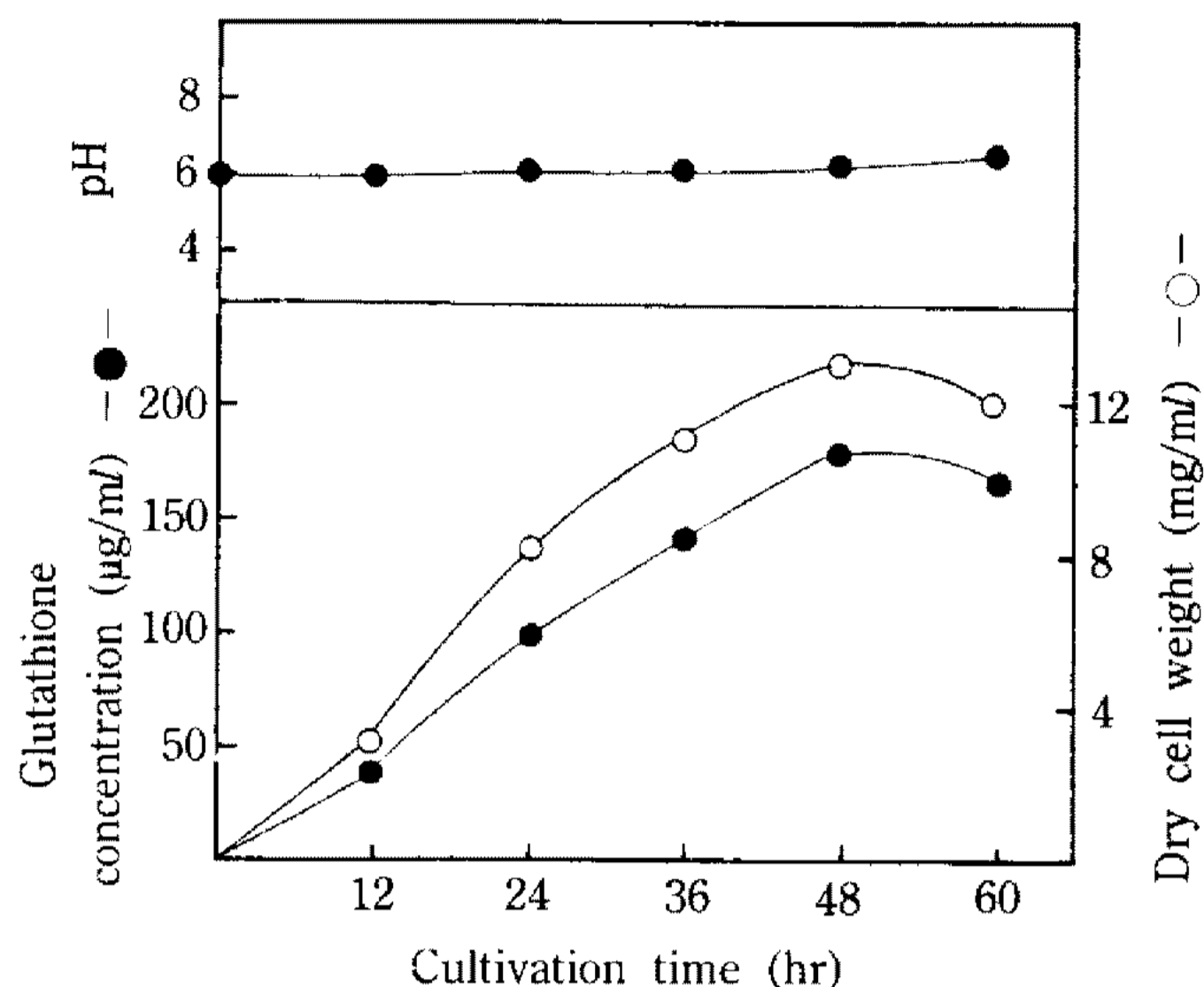


Fig. 4. Time course of the cell growth and the glutathione production by *Candida* sp. mutant.



Fig. 5. Comparison of authentic glutathione and purified glutathione from *Candida* sp. mutant by thin layer chromatography.

Solvent: Ethanol-Water-Ethyl acetate (3:2:1, v/v)
 A: Authentic glutathione, B: Purified glutathione

Glutathione의 분리 및 정제

Candida sp. mutant를 배양시킨 2 liter의 배양액 으로부터 Amberite IR-120 column chromatography 를 행하고 동결농축한 후 50%되게 ethanol을 가하여 glutathione 168 mg을 얻었으며 배양액으로부터의 회

수율은 약 46%이었다.

Glutathione의 확인

정제된 glutathione을 표준 glutathione과 함께 TLC를 행한 결과, Fig. 5에서와 같이 표준 glutathione과 0.65의 동일한 R_f 값을 나타내었다.

정제된 glutathione을 증류수에 용해시킨 후 UV spectrum을 조사한 결과, Fig. 6에서와 같이 표준 glutathione과 같이 206 nm에서 같은 흡수대를 나타내

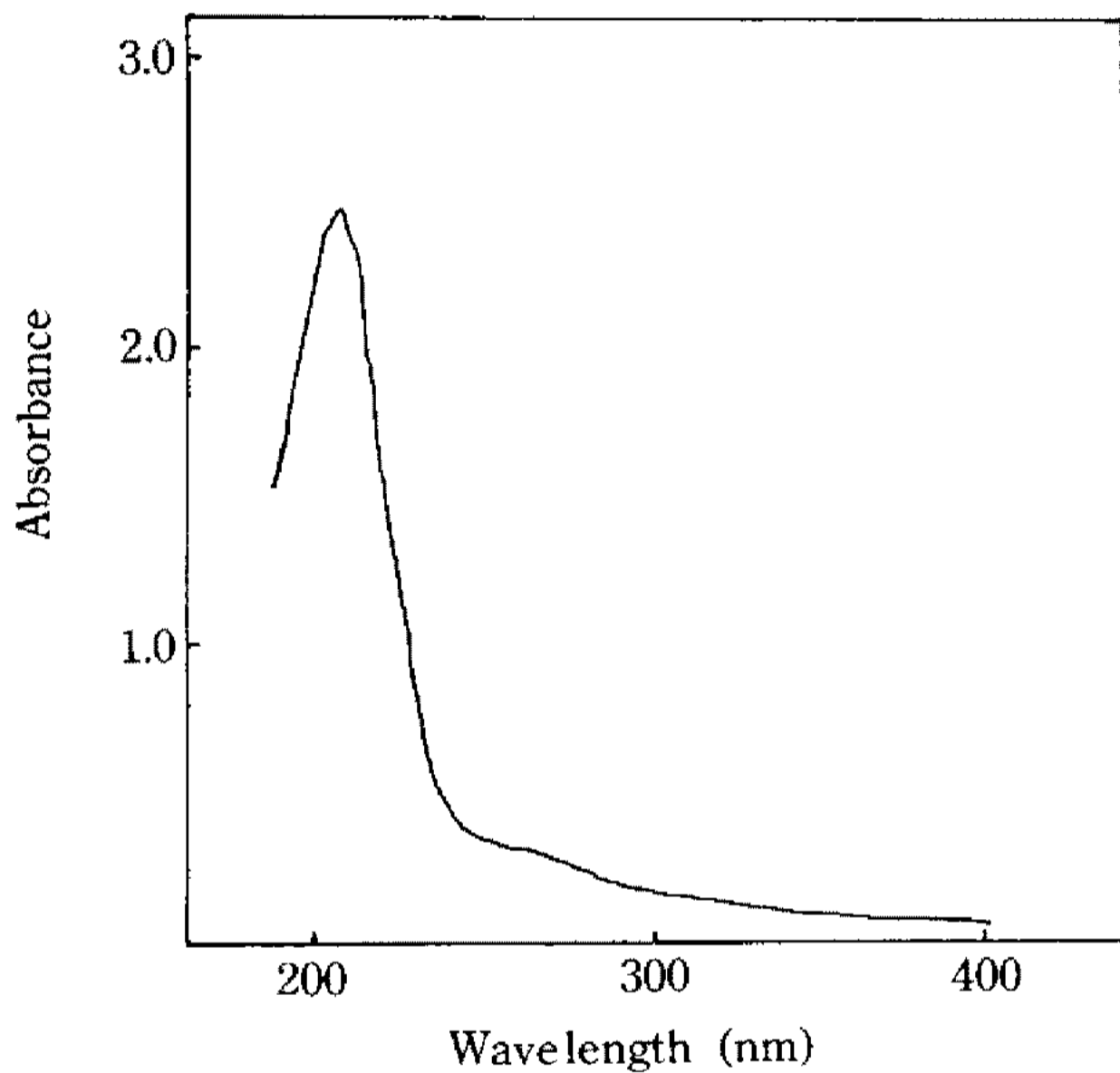


Fig. 6. UV spectrum of purified glutathione.

었다. 또한 표준 glutathione과 정제된 glutathione의 IR spectrum은 Fig. 7과 같다. 표준 glutathione에서 나타난 주요 peak가 변이주에서 분리, 정제한 glutathione에서도 유사하게 나타나서 glutathione과 같은 물질임을 확인할 수 있었다.

요 약

Glutathione 생산균주를 돌연변이시켜 변이주의 생산 최적조건 및 glutathione의 분리, 정제를 행하였다. Glutathione 생산을 위한 *Candida* sp. mutant의 배지조성은 glucose 1.5%, yeast extract 4.0%, KH_2PO_4 0.04%, biotin 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 L-cysteine 0.04%이었으며 온도는 25°C, pH 6.0에서 48시간 배양하였을 때 glutathione 생산이 가장 좋았다. Glutathione 생산을 위한 최적배지에서 *Candida* sp. mutant 균주에 의한 glutathione 생산량은 175 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 원균주보다 1.9배 정도 증가하였다. 표준 glutathione과 정제된 glutathione의 TLC, UV 및 IR spectrum을 비교하여 본 결과 동일한 구조를 가지고 있는 것으로 판단되었다.

감사의 말

본 연구는 1992년도 강원대학교 기성회 연구비에 의하여 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

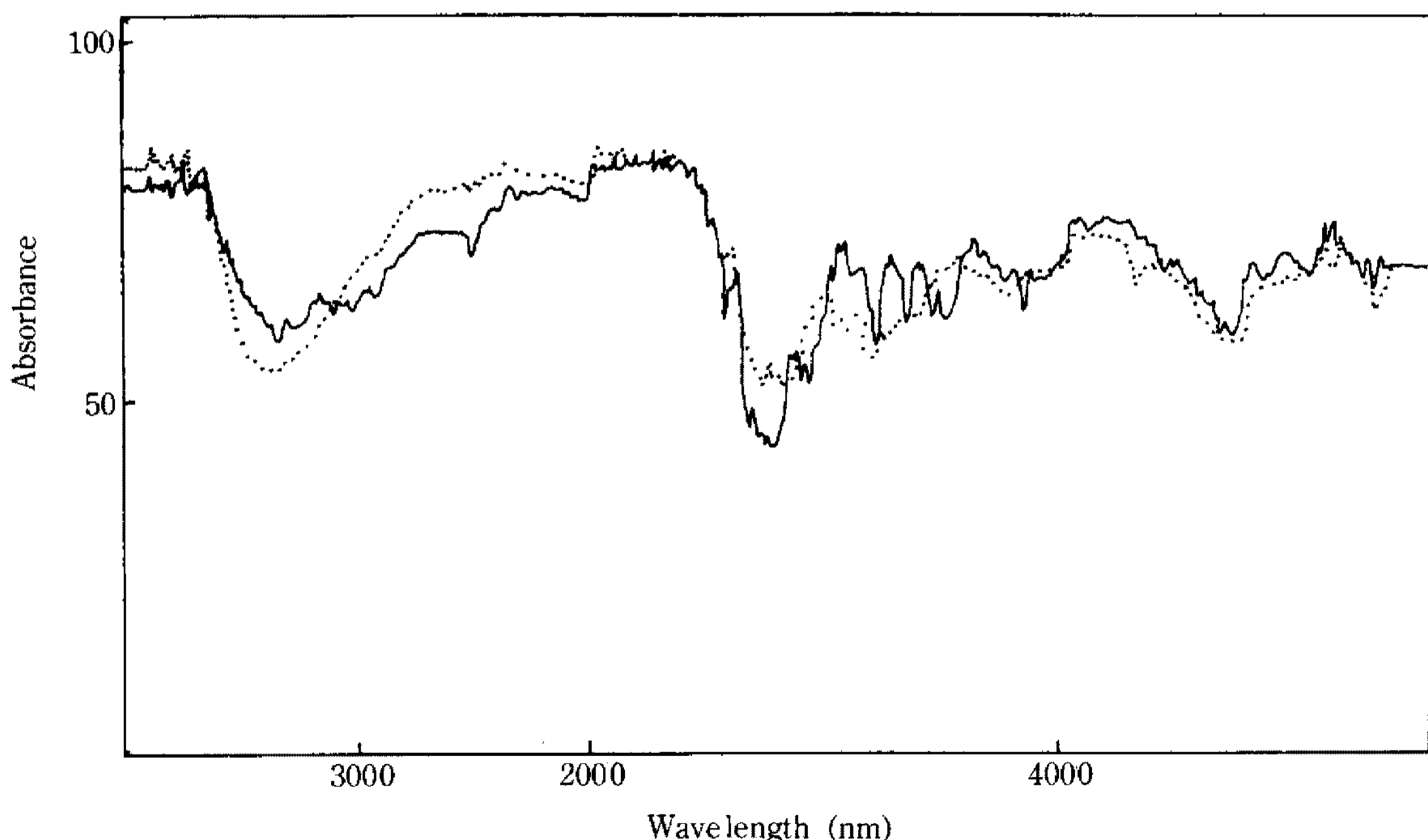


Fig. 7. IR spectrum of authentic and purified glutathione. Authentic glutathione: ---, Purified glutathione: -

참고문헌

1. Dixon, M. and E.C. Webb. 1979. Enzymes, Pp. 486-487. 3th ed. Academic Press, New York.
2. Murata, K. and A. Kimura. 1986. Relationship between glutathione contents and generation times in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1055-1056.
3. Tietze, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* **27**: 502-522.
4. Hino, T., Y. Kobayashi, M. Nishida and Y. Senoo. 1986. Purification of glutathione and γ -glutamylcysteine from cultured microorganisms. Japan Patent 61-282397.
5. Yokozeki, K., H. Takeuchi and Y. Hirose. 1985. Glutathione. Japan Patent 60-160894.
6. Kawamura, M., S. Hamada and K. Sakado. 1985. Glutathione by fermentation. Japan Patent 60-248199.
7. Hino, T., H. Maekawa, J. Ito and M. Harada. 1986. Production of glutathione with *Candida utilis* mutans. Japan Patent 61-31081.
8. Murata, K., K. Tani, J. Kato and I. Chibata. 1980. Excretion of glutathione by methylglyoxal-resistant *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 545-547.
9. 신원철, 김대선, 유재홍, 유주현. 1993. Glutathione 생산균주의 분리 동정 및 생산조건. *한국산업미생물학회지*. **21**: 1-5.
10. Owens, C.W.I. and R.V. Belcher. 1965. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem. J.* **94**: 705-711.
11. Maki, H. and S. Imai. 1986. Purification of glutathione by strongly acidic cation-exchange resin. Japan Patent 61-27999.
12. Hino, T., M. Harada, H. Maekawa and J. Ito. 1985. Production of high-glutathione-containing yeast cells. Japan Patent 60-156379.
13. Nanjo, H., K. Yamashita, S. Kunihiro, K. Asahi and K. Watanabe. 1986. Glutathione production by yeast. Japan Patent 61-52299.

(Received June 19, 1993)