

전통 발효주로부터 glutathione 고함유 효모 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 분리·동정 및 최적 생산조건

박진철 · 옥민 · 차재영 · 조영수*

동아대학교 응용생명공학부 생명공학과

(2003년 9월 16일 접수, 2003년 10월 21일 수리)

본 연구에서는 glutathione(γ -L-glutamyl-cysteinyl-glycine)을 다량으로 함유하는 효모 균주를 전통 발효주로부터 분리하여 glutathione 생산 조건을 검토하였다. 분리된 균주는 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성을 검토한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되어 FF-8로 명명하였다. *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 glutathione 생산 조건은 YM(glucose 1.0%, acid peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%) 배지를 기본으로 하여 최적 온도, 교반속도 및 초기 pH의 조건을 검토하였다. Glutathione 생산은 온도 30°C, 교반속도 100 rpm 및 pH 6.0에서 72시간 동안 진탕 배양하였을 때 가장 높았으며, 이때 glutathione 생산량은 72.0 mg/l이었으며, 건조 균체량은 5.2 g/l이었다.

Key words: 글루타티온, *Saccharomyces cerevisiae*, 효모, 전통발효주

서 론

최근 경제성장과 더불어 풍족한 식생활을 영위하며 평균수명도 날로 증가하고 있으나, 식생활 패턴의 서구화로 인해 비만, 고지혈증, 당뇨병, 고혈압, 동맥경화 등의 만성퇴행성 질환(생활습관병)으로 인한 사망률이 크게 높아져 건강에 대한 관심이 높아지고 있다.¹⁾ 이러한 질환은 식사 내용의 양적, 질적 변화를 기초로 한 에너지의 과잉 섭취와 알코올의 다량 섭취로 인하여 많이 발생함으로써 사회적 문제로 관심이 높아지고 있는 실정이다. 특히 이들 질환에서 공통적으로 나타나는 현상으로서 고지혈증이나 간장에서 지질축적에 의한 지방간, 간경화 및 간암에 이르는 일련의 간장질환으로 전개되고 있다.^{2,3)}

최근, 우리나라에서는 간염 및 간경화증을 비롯한 각종 간장 질환 발병율이 매우 높아 치료효과가 우수한 간장질환 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 간장질환 치료제의 개발은 여러 각도에서 시도할 수 있겠으나 천연물에서부터 간장 보호 작용을 가지는 물질을 찾는 방법이 지름길이라 생각된다.⁴⁾ 따라서 간장질환을 예방, 치료 개선시킬 수 있는 생리활성 성분의 탐색에 관한 연구는 대단히 중요하다. 최근 들어 유용미생물의 대사산물을 이용하여 각종 질환의 개선 또는 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있는 생리활성물질의 탐색에 관한 연구가 활발히 전개되고 있다.⁵⁾ 그 중 하나로 간질환 개선효과가 있는 것으로 알려진 glutathione 고함유 유용미생물 균종(효모)의 탐색과 대량 생산조건의 확립으로 glutathione 고함유 효모 균체 생산에 의한 건강보조식품 개발은 간질환의 개선과 예방 및 치료에 유용한 연구결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.^{6,7)}

Glutathione은 tripeptide(γ -L-glutamyl-cysteinyl-glycine)의 비단

백질성 thiol 화합물로 세포 내에서 산화형(GSSG)과 환원형(GSH)으로 존재하면서^{8,9)} 세포벽의 보호와 세포 증식,^{10,11)} acetaminophen과 같은 독성물질의 해독¹²⁾ 등 생체 내에서 중요한 생리활성을 나타내고 있다. 이와 같이 glutathione은 생체 내에서 여러 가지 생리 및 대사에 관여하고 있기 때문에 부족하게 되면 용혈작용, 중추신경 작용의 영향, 용혈성 빈혈 및 백내장 등의 증상을 나타내기도 한다.¹³⁾ 현재는 의학분야에서 간질환 치료제, 간기능 회복 및 해독작용 등의 질병치료에 널리 사용되고 있으며,¹²⁾ 독성물질의 해독작용에 의한 생체내 산화를 억제시킴으로써 이와 관련한 각종 질환의 유발을 예방할 것으로 생각된다.^{12,14)}

따라서 본 연구는 전통 발효주로부터 생리활성 물질인 glutathione을 다량으로 함유하는 식용 가능한 효모 균주를 분리하고, glutathione 최적 생산조건을 확립하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리. Glutathione 고함유 효모 균종을 분리할 목적으로 부산광역시 금정구 금정산성 일대에서 전통 쌀막걸리를 수집하여 시판 YM(glucose 1.0%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%) 고체배지에 도말한 다음 30°C에서 2~3일간 배양한 후 생성된 단일 colony로부터 효모로 추정되는 균주를 1차 분리하였다. 1차 분리된 균주를 YM 액체배지에 각각 접종한 후 30°C에서 2일간 진탕 배양하였다. 배양액을 7,000×g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 회수된 균체에 동일량의 증류수를 가하여 sonicator(F60, Fisher Scientific, USA)로 세포벽을 파괴시킨 것을 시료로 하여 Owens와 Belcher의 방법¹⁵⁾으로 각 균주의 세포내 glutathione 생산능을 측정하였다. 분리한 균주 중에서 glutathione 생산능이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선별하여 본 실험에 사용하였다. 균

*연락처

Phone: 82-51-200-7586; Fax: 82-51-200-7505

E-mail: choys@daunet.donga.ac.kr.

주의 일반적인 계대 배양은 YM 배지를 사용하였다.

균주의 동정. Glutathione 생산 균주의 동정은 서울대학교 유전공학특화 창업보육센터에 입주하고 있는 MicroID Co., Ltd.에 의뢰하여 AIP 20C AUX kit 및 균체 지방산 분석(MIDI, Hewlett-Packard model 6890A gas chromatography)으로 동정하였다. 그리고 이 균주를 2% glutaraldehyde(0.1% MgSO₄ 함유 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2)로 24시간 동안 실온에서 고정시킨 다음 0.1 M cacodylate buffer(pH 7.2)로 2시간 동안 세척하고, 0.2 M cacodylate buffer(pH 7.4)에 1% 농도가 되게 녹인 osmic acid(OsO₄) 용액으로 4°C에서 24시간 동안 처리하여 고정시켰다. 고정된 sample에서 용액을 제거한 뒤에 50, 70, 80, 90 및 95% 에탄올에서 각각 10분간 2회씩 탈수시켰다. 탈수한 뒤에 sample을 임계점 건조기에서 건조하고 platinum coating 한 다음 주사 전자 현미경(SEM, JSM-6700F, JEOL, Tokyo, JAPAN)으로 형태를 관찰하였다.^{16,17)}

건조균체량의 측정. 사면배양한 분리균주를 YM 액체배지에 백금으로 1회 접종하고 30°C에서 72시간 진탕배양한 후 배양액을 7,000×g에서 15분간 원심분리 하였다. 분리된 균체를 증류수로 1회 세척하고 80°C에서 24시간동안 항량이 될 때까지 건조시킨 후 각각 균체의 무게를 달리하여 취하고 증류수에 현탁시킨 후 spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, JAPAN)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정한 표준곡선으로부터 배양액의 건조 균체량을 측정하였다.¹⁸⁾

Glutathione의 정량. Owens와 Belcher의 방법¹⁵⁾에 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 전처리한 시료 0.2 ml를 혼합한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하고 0.2 mM NADPH 용액 0.1 ml를 첨가하여 30°C에서 5분간 방치한 후에 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. NADPH 용액 첨가 전후의 흡광도 차이를 구하여 작성된 표준곡선으로부터 glutathione 함량을 정량하였다.

Glutathione 생산조건. 배양시간에 따른 균체의 생육과 glutathione 생산량을 검토하기 위하여 YM 액체배지에 백금으로 1회 접종하고, 30°C에서 24시간 배양한 전배양액을 동일한 배지에 2% 접종하여 30°C에서 진탕배양하면서 12시간 간격으로 배양액을 취해 균체의 생육과 glutathione 생산량을 측정하였다. 또한, YM 배지를 사용하여 온도(20~40°C), 교반조건(0~200 rpm) 및 pH(4~10) 변화에 따른 영향을 검토하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정. 부산광역시 금정구 금정산성 일대에서 수집한 전통 쌀막걸리로부터 1차적으로 분리한 균주 중에서 효모로 추정되며 생육이 비교적 우수한 균주 5주를 선별하여 그 중 glutathione 생산능이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선별하여 본 실험에 사용하였다(Table 1). 최종 선별한 glutathione 생산 균주를 동정하고자 전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과(Fig. 1), 분리된 균주는 타원형으로 크기는 4.5×3.4 μm(장축×단축)로 비교적 일반적 크기의 효모이었으며,¹⁹⁾ 출아흔을 발견할 수 있어 출아법으로 증식함을 알 수 있었다. 한편

Table 1. Measurement of the cell growth and the glutathione production on isolated yeasts from Korean traditional rice wine

Yeast	GSH (mg/l)	DCW (g/l)
FF8-1	49.2	4.05
FF8-2	74.1	4.68
FF8-3	39.8	2.62
FF8-4	38.9	4.02
FF8-5	35.2	4.63

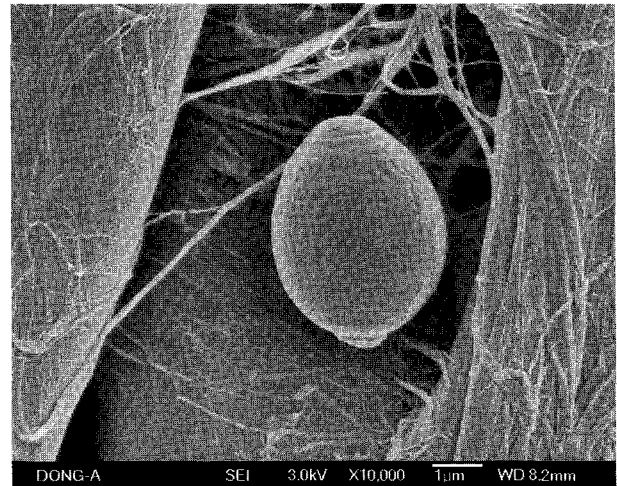


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the isolated *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 (×10,000).

분리균의 생리화학적 특성을 API 20C AUX kit로 동정한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되었으며(Table 2), 균체 지방산 분석으로 세포막의 지방산 조성을 분석한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*로 재확인되어 본 연구자들에 의해 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8로 명명되었다(Table 3).

배양시간에 따른 균체 생육과 glutathione 생산. YM 배지에서 배양시간에 따른 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주의 생육과 glutathione 생산량을 검토한 결과, Fig. 2에서와 같이 균체의 생육은 배양초기부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 72시간에서 최대를 나타내었으며 그 이후부터 점차적으로 감소하는 경향이였다. 이 때 glutathione 생산량은 배양 24시간까지는 균체 생육과 차이를 나타내 보였으나, 36시간부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 72시간째에 최대량을 나타내어 균체의 생육과 동일한 양상을 나타내었다. 이는 Shin 등¹⁸⁾이 분리한 *Candida* sp.에 의한 glutathione 생산에서 배양 36시간에 최대량을 나타내었다는 보고와는 시간적으로는 차이가 있었으나, 균주의 대수성장기가 지난 후 glutathione 생산량이 최대가 되었다는 보고와는 유사한 결과를 나타내었다.

배양온도에 따른 glutathione의 생산조건. *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 온도 변화에 의한 균체의 생육 및 glutathione 생산량을 검토하기 위해 YM 배지를 20, 25, 30, 35 및 40°C에서 각각 72시간 진탕 배양한 결과는 Fig. 3과 같다. 균체의 생육과 glutathione 생산량은 30°C에서 최대 함량을 나타내었으며 30°C 이상의 온도에서는 glutathione 생산량이 급격하게 감소하였다. Shinichiro 등²⁰⁾은 *Saccharomyces cerevisiae*

Table 2. Physiological characteristics of the isolated *Saccharomyces cerevisiae* FF-8¹⁾

Carbon source	Assimilation
Control	- ²⁾
Glucose	+
Glycerol	-
2-Keto-gluconate	-
L-Arabinose	-
D-Xylose	-
Adonitol	-
Xylitol	-
Galactose	+
Inositol	-
D-Sorbitol	-
α -Methyl-D-glucoside	-
N-Acetyl-glucosamine	-
Cellobiose	-
Lactose	-
Maltose	+
Sucrose	+
Trehalose	-
Melezitose	-
Raffinose	+
Hyphae/Pseudohyphae	-

¹⁾used with API 20C AUX kit

²⁾+: positive, -: negative

Table 3. Composition of cellular fatty acid of the isolated *Saccharomyces cerevisiae* FF-8

Fatty acid composition	FF-8
C _{14:0}	1.5
C _{16:1} cis 9(w7)	53.3
C _{16:0}	14.5
C _{18:1} cis 9(w9)	28.0
C _{18:0}	2.7
ID	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (0.423)

의 경우 20~40°C의 배양온도에서 glutathione 생산량이 높다고 보고하였고, Tadayuki 등²¹⁾은 *Candida utilis*의 경우 24°C에서 glutathione 생산량이 높다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 분리된 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*의 최적 생산온도와 유사한 결과를 나타내었다.

교반속도에 따른 glutathione의 생산조건. *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 교반속도에 따른 균체의 생육 및 glutathione 생산량을 검토하기 위해 YM 배지를 사용하여 30°C에서 0, 50, 100, 150 및 200 rpm으로 각각 72시간 배양한 결과는 Fig. 4와 같다. 균체의 생육은 shaking rate가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였지만, glutathione 생산량은 교반속도 100 rpm에서 최대량을 나타내었으며 그 이상의 교반속도에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 진탕함으로써 균체가 응집되지 않고 분산되어 기질과 작용하는 반응면적이 넓어지고 호기성균주로서 산소의 이용성 증대로 균체의 생육은 증가되지만, 과도한 진탕은 오히려 glutathione 생산을 저해하는 것으로 생각되어진다.

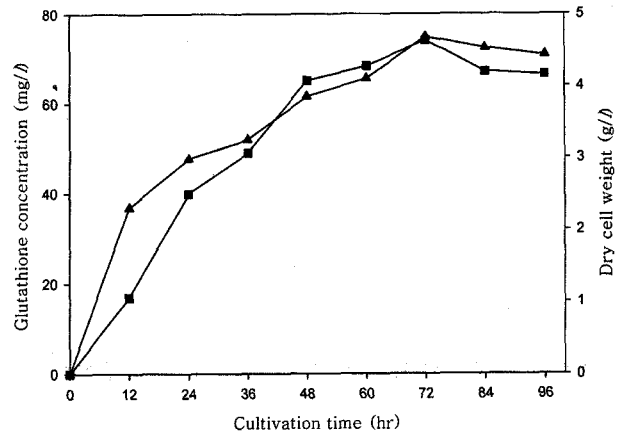


Fig. 2. Profiles of the cell growth and the glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 during cultivation. (-■-: Glutathione, -▲-: Dry cell weight)

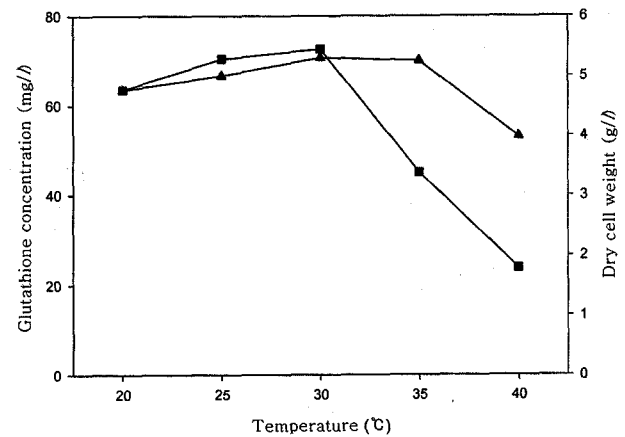


Fig. 3. Effect of temperature on the cell growth and the glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8. (-■-: Glutathione, -▲-: Dry cell weight)

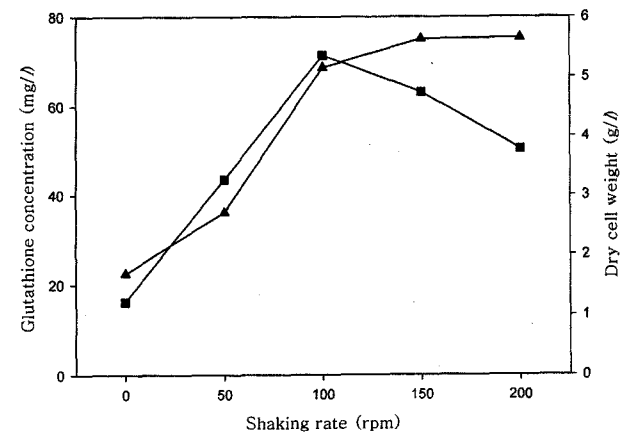


Fig. 4. Effect of shaking rates on the cell growth and the glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8. (-■-: Glutathione, -▲-: Dry cell weight)

초기 pH에 따른 glutathione의 생산조건. *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 초기 pH에 의한 균체의 생육 및 glutathione 생산량을 검토하기 위해 YM 배지의 pH를 4~10으로 조정하여

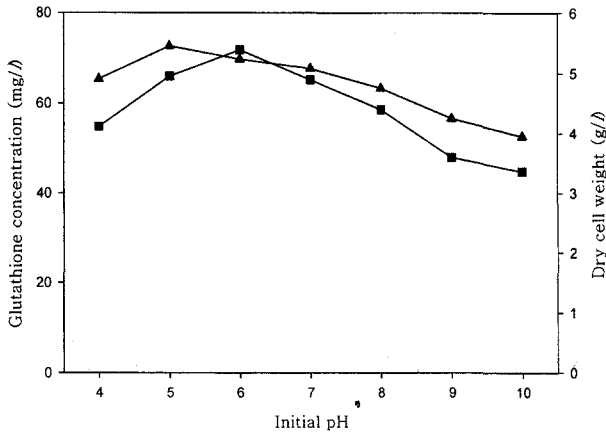


Fig. 5. Effect of initial pH on the cell growth and the glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8. (■ -: Glutathione, -▲ -: Dry cell weight)

30°C에서 교반속도 100 rpm으로 72시간 배양한 결과는 Fig. 5와 같다. 균체의 생육은 초기 pH가 5에서 최대값을 나타내었고, glutathione 생산량은 초기 pH가 6에서 최대량을 나타내었다. Kenzo 등²²⁾은 *Candida krusei*의 경우 pH 6에서 glutathione 생산량이 높다고 보고하였으며, Tadayuki 등²¹⁾도 pH 6에서 glutathione 생산량이 높다고 보고하여 본 연구에서 분리하여 사용한 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 균주와 유사한 결과를 나타내었다.

이상의 연구 결과로부터 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 glutathione 생산 조건은 YM 배지의 초기 pH를 6으로 조정하고 온도 30°C에서 교반속도 100 rpm으로 72시간 배양하였을 때 glutathione 생산량은 72.0 mg/l이었으며, 건조 균체량은 5.2 g/ml로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 탄소원, 질소원, 무기염류 및 아미노산의 종류별로 *Saccharomyces cerevisiae* FF-8의 glutathione 생산량에 미치는 영향을 검토하여 최대 생산량을 얻을 수 있는 최적조건을 위한 실험이 앞으로 좀더 구체적으로 이루어져야겠다고 생각되어진다.

감사의 글

이 논문은 2003학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제)지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Annual report on the cause of death statistics. (2001) National Statistical Office, Republic of Korea.
- Mezey, E. (1980) Alcoholic liver disease: Roles of alcohol and malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 2709-2714
- Cha, J. Y., Mameda, Y., Oogami, K., Yamamoto, K. and Yanagita, T. (1998) Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 508-513.
- Cha, J. Y., Cho, Y. S., Kim, I., Anno, T., Rahman, S. M. and

- Yanagita, T. (2001) Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* **56**, 349-358.
- Reddy, B. S. and Rivenson, A. (1993) Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline, a food mutagen. *Cancer Res.* **53**, 3914-3918.
- Hino, T., Kobayashi, Y., Nishida, M. and Senoo, Y. (1986) Purification of glutathione and γ -glutamylcysteine from cultured microorganisms. Japan Patent 61-282397.
- Yokozecki, K., Takeuchi, H. and Hirose, Y. (1985) Gutathione. Japan Patent 60-160894.
- Murata, K. and Kimura, A. (1986) Relationship between glutathione contents and generation times in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 1055-1056.
- Kim, W. G. and Koo, Y. M. (1995) Production of γ -glutamylcysteine by immobilized mixed microbial system of recombinant *Escherichia coli* and yeast. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 249-256.
- Murata, K. and Kimura, A. (1982) Some properties of glutathione biosynthesis-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Brit. J. Gen. Microbiol.* **128**, 1047-1052.
- Fahey, R. C. and Newton, G. J. (1983) *Eutamoeba histolytica*: A eukaryote without glutathione metabolism. *Science* **224**, 70-72.
- Sugimura, Y. and Yamamoto, K. (1998) The protective effect of glutathione-enriched yeast extract on acetaminophen-induced liver damage in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **51**, 189-193.
- Meister, A. and Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
- Shin, J. K. (1997) Effect of bromobenzene pretreatment on the hepatic glutathione content and glutathione S-transferase activity in bromobenzene treated rats. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **23**, 83-88.
- Owens, C. W. I. and Belcher, R. V. (1965) A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem. J.* **94**, 705-711.
- Lee, Y. S., Yoo, J. S., Chung, S. Y., Park, C. S. and Choi, Y. L. (2003) Microbial immobilization, characterization and isolation of nitrogen oxidizing bacteria. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 7-11.
- APHA, AWWA, WEF. (1992) In *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (18th ed.) Washington D.C.
- Shin, W. C., Kim, D. S., Yu, J. H. and Yu, J. H. (1993) Isolation, identification and culture condition of microorganism producing glutathione. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1-5.
- Kim, J. W., Jin, I. and Seu, J. W. (1995) Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* F38-1, a thermotolerant yeast for fuel alcohol production at higher temperature. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 617-623.
- Shinichiro, H., Hisao, T. and Kuniaki, S. (1982) Process for producing glutathione. Eur. Patent Application 0079241.
- Tadayuki, M., Hirokazu, M., Junick, I. and Mokichi, H. (1986) Henikabu. Japan Patent 61-31081.
- Kenzo, Y., Hirashi, T. and Yoshiteru, H. (1985) Glutathione no seizouho. Japan Patent 60-160894.

Isolation and Identification of the High-Glutathione Producing *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 from Korean Traditional Rice Wine and Optimal Producing Conditions

Jin-Chul Park, Min Ok, Jae-Young Cha and Young-Su Cho* (*Department of Biotechnology, Faculty of Applied Bioscience, Dong-A University, 604-714 Busan, Korea*)

Abstract: In this study, strain of high-producing intracellular glutathione was isolated from Korean traditional rice wine. The isolated strain was identified as *Saccharomyces cerevisiae* based on the morphological, physiological and biochemical characteristics, and was designated as FF-8. The optimal condition for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 was obtained after cultivation with shaking for 72 hours in the YM medium. The optimal temperature, shaking rate and initial pH for the glutathione production were 30°C, 100 rpm and pH 6.0, respectively. The dry cell weight and glutathione concentration produced by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 were 5.2 g/l and 72.0 mg/l, respectively, under the optimal culture condition.

Key words: glutathione, *Saccharomyces cerevisiae*, yeast, korean traditional rice wine

*Corresponding author