

연구노트

## 효모변이주 *Saccharomyces cerevisiae* Sa590에 의한 glutathione 생성

장혜윤 · 오철환 · 오남순\*  
공주대학교 식품공학과

### Production of Glutathione by the Yeast Mutant *Saccharomyces cerevisiae* Sa59

Hye-Yoon Jang, Chul-Hwan Oh, and Nam-Soon Oh\*

Department of Food Science and Technology, Kongju National University

**Abstract** The glutathione contents of the selected mutants were investigated and found to be 6.1-15.8 mg/g-DCW. The glutathione content positively correlated with the antioxidant activity of the mutant strains ( $R^2=0.488$ ). Furthermore, the glutathione content of the mutant *S. cerevisiae* Sa-59 was approximately 38% greater than that of the wild type strain and, therefore, this mutant strain was selected for glutathione production. The volumetric glutathione content in a shaking culture was increased by about 70% compared to the static culture. In addition, the specific glutathione content was increased by ~19%. The volumetric glutathione content and specific glutathione content were increased by approximately 16% and 66%, respectively, when 0.04% glutamate, 0.04% cysteine and 0.04% glycine were added. Furthermore, the highest antioxidant activity was 0.52 as absorbance unit at 700 nm.

**Keywords:** glutathione, yeast mutant, *Saccharomyces cerevisiae*, antioxidant activity

## 서 론

Glutathione (GSH)은 glutamate, cysteine, glycine 등 세 개의 아미노산으로 구성된 비단백성 thiol 화합물인 tripeptide ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) 물질로 환원형(GSH) 또는 산화형인 G-S-S-G 형태로 존재한다(1,2). Glutathione의 주요 기능은 생체에서 생성되는 활성산소의 제거와 항산화작용으로(3-5), *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* 등의 효모에서 생성되며, 유산균, 세균, 방선균에서도 생성된다고 보고되었다(6-9). Glutathione 생산에 관한 연구는 미생물 발효법과 효소적 방법이 있는데, 발효법은 주로 효모배양으로 glutathione을 균체내에 집적시키는 방법으로, 세포질에서  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase, glutathione 합성효소에 의한 2단계 효소반응에 의해 생합성된다(10). ATP 재생계를 이용한 효소적 방법으로 glutathione 생산법이 확립되었으며(11,12), 재조합 대장균을 이용한 glutathione의 생산(13), glutathione의 추출 및 정제에 관한 연구(14) 등이 수행된 바 있다. 효모인 *S. cerevisiae*는 제빵, 알코올 발효 등 식품의 제조에서 중요한 위치를 차지하고 있는 안전한 미생물이며, 균주에 대한 생화학적 정보와 응용기술이 많이 축적된 미생물이다. 효모를 이용한 glutathione의 효율적인 생산 연구뿐만 아니라, glutathione을 함유한 효모추출물을 이용한 조미식품 개발 등 glutathione의 활용 연구

들이 보고되고 있다(14-16). 이러한 식품소재로의 활용 연구로 말미암아 glutathione에 대한 관심이 증대되리라 생각된다.

본 연구는 기능성 물질인 glutathione이 다량 함유된 *S. cerevisiae*를 획득하여 식품발효에 이용하거나, 배양효모를 직접 식품소재에 활용할 목적으로 수행하였다. Glutathione 축적능이 우수한 효모균주 획득을 목적으로 *S. cerevisiae* 균주를 변이처리 하였으며, 개량된 *S. cerevisiae* 변이주의 glutathione 함유량에 미치는 배지 성분과 배양방법의 효과 및 변이주들의 glutathione 함유량과 환원력과의 상관관계를 비교, 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 미생물

본 실험의 효모 균주로는 민속주에서 분리하여 동정한 *Saccharomyces cerevisiae* CY 균주를 사용하였다.

### 배지 및 배양

*Saccharomyces cerevisiae* CY 균주는 YM broth (Difco, Detroit, MI, USA) 배지에서 배양하였다. 냉장 보관중인 균주를 YM 사면배지에서 활성화(30°C, 24시간) 시킨 후 다시 YM broth (Difco)에 접종하여 30°C 인큐베이터에서 150 rpm으로 12시간 진탕배양한 것을 종균으로 사용하였다. 본 배양은 YM broth (Difco)에 종균 배양액을 2% 접종하여 종균과 동일한 조건으로 배양하였다. 실험조건에 따라 glucose, 에탄올, L-glutamate, L-cysteine, glycine 등의 첨가농도를 달리하면서 효모의 생육도 및 glutathione 함유량 등을 측정하였다.

### 균주개량 및 선발

Spectrophotometer (V-570, Jasco Co., Tokyo, Japan)를 사용하

\*Corresponding author: Nam-Soon Oh, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan, Chungnam 340-802, Korea  
Tel: 82-41-330-1485  
Fax: 82-41-333-9610  
E-mail: nsogh@kongju.ac.kr  
Received June 27, 2013; revised August 27, 2013;  
accepted September 25, 2013

여 600 nm에서의 흡광도가 약 1.2 정도 될 때까지 *S. cerevisiae* CY 균주를 배양하였다. 배양액 10 mL를 6,000×g (25°C)로 10분간 원심분리 한 후 균체를 회수하고 멸균식염수(0.8% NaCl)로 2회 반복 세척하였다. 효모균주의 개량은 UV (Lamp: VL-4.LC, Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France)를 조사하여 돌연변이 균주를 획득하는 방법으로 수행하였다. 즉, 세척하여 수집한 균체는 멸균식염수에 다시 현탁한 후 약 20 cm 높이에 위치한 UV (254 nm) lamp로 120초(사멸율 99.9%)동안 조사시켰다. 변이처리가 끝난 현탁액은 원심분리하여 균체를 회수한 후 sodium azide (50 mg/L)를 첨가한 YM broth에서 72시간 진탕배양 (30°C, 150 rpm)하였다. 그 후 배양액을 다시 Hamada 등(17)의 방법에 따라서 sodium azide (50 mg/L)가 첨가된 YM 평판배지에 도말하고, 30°C에서 배양하면서 sodium azide에 내성이 있는 변이주를 선발하였다.

### 건조균체량 측정

균주 배양액 10 mL를 25°C에서 6,000×g로 10분간 원심분리하여 균체를 획득한 후 멸균수로 2회 세척하였다. 세척한 균체현탁액은 membrane filter (0.45 µm)로 여과하여 105°C dry oven에서 항량이 되도록 건조하고, desiccator에서 냉각한 후 건조 균체량(dry cell weight)을 측정하였다.

### Glutathione 함유량 및 환원력 측정

Glutathione 함유량과 환원력은 각각 Owens와 Belcher의 방법(18)과 Oyaizu의 방법(19)으로 측정하였다. 먼저 배양액 1 mL를 6,000×g로 3분 간 원심분리하여 획득한 균체를 멸균수로 2회 세척하였다. 세척한 균체는 동량의 멸균수에 현탁한 후 95°C 항온수조에서 15분간 중탕하여 세포벽을 파쇄하고, 다시 17,000×g로 3분간 원심분리하여 얻은 상정액을 glutathione 함유량과 환원력 측정에 사용하였다. Glutathione 함유량은 상징액을 Glutathione Assay Kit (CS0 260-1 KT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 정량하였다. 환원력 측정은 먼저 상징액 1 mL에 0.2 M 인산 buffer (pH 6.6) 2.5 mL와 1% potassium hexacyanoferrate (III) 용액 2.5 mL를 첨가한 후 50°C 항온수조에서 20분간 반응시켰다. 반응 종료 후 10% trichloroacetic acid(TCA) 용액 2.5 mL를 첨가하여 3,000×g로 원심분리하였으며, 상징액 2.5 mL에 증류수 2.5 mL와 0.1% ferric chloride 용액 0.5 mL를 첨가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 방법으로 시료대신 증류수를 이용하여 측정된 값을 대조군으로 사용하였다.

### 환원당함량 측정

환원당 함량은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)법으로 분석하였다. 시료 1 mL에 DNS시약 3 mL를 첨가하여 5분간 중탕으로 반응시키고 냉각한 후 실온에서 10분간 방치한 다음 25 mL가 되도록 증류수를 첨가하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료는 배양액을 25°C에서 6,000×g로 3분간 원심분리하여 획득한 상징액을 필요에 따라 1-50배 희석하여 사용하였으며, 미리 작성한 표준곡선을 이용하여 배양액 중 환원당의 양을 계산하였다.

### 에탄올함량 측정

배양액을 25°C에서 6,000×g로 3분간 원심분리하여 획득한 상징액 1 mL, CaCO<sub>3</sub> 1 g, 증류수 100 mL를 250 mL 환저플라스크에 넣은 후 가열 증류하였으며, 수기에 약 70-80%가 채워지면 가열을 중지하고 증류수를 이용하여 100 mL로 맞추었다. 증류한 시료에서 1 mL를 취하고 0.2 N K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mL, 진한 황산 1 mL와

혼합하여 암실에서 1시간 방치한 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 미리 작성한 표준곡선을 이용하여 에탄올 함량을 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### *Saccharomyces cerevisiae* 변이주의 선발

UV에 의한 *S. cerevisiae* CY 균주의 sodium azide 내성 변이주 61균주를 선발한 후 변이주들의 glutathione 함유량과 항산화 활성과의 상관관계를 나타내었다(Fig. 1). 선발된 변이주들의 전체적인 glutathione 함유량은 6.1-15.8 mg/g이었다. 특히, 변이주 *S. cerevisiae* Sa59의 glutathione 함유량은 15.8 mg/g으로 wild type인 *S. cerevisiae* CY 균주의 glutathione 함유량(10.8 mg/g)에 비해 약 38%로 가장 높은 증가율을 보였으며, 환원력 또한 0.40으로 가장 높았다. 반면, *S. cerevisiae* Sa45 변이주는 glutathione 함유량(6.11 mg/g) 및 환원력이(0.19) 가장 낮았다. Glutathione 함유량과 환원력으로 측정된 항산화활성은 비교적 양호한 양의 상관관계( $R^2=0.488$ )를 보였다. Glutathione 함유량은 항산화활성의 간접적 지표인 전자공여능(EDA, %)과 비례적인 관계가 있다는 보고(16,20)와 유사하게 본 연구에서도 효모의 glutathione 함유량과 환원력은 양의 상관관계를 보였다. 이에 따라 glutathione 함유량과 환원력이 우수한 변이주인 *S. cerevisiae* Sa59 균주를 선발하여 배양조건에 따른 glutathione 함유량에 미치는 효과를 조사하였다.

### 배양조건에 따른 glutathione 생성

*Saccharomyces cerevisiae* Sa59 균주의 생육도( $A_{600\text{nm}}$ )는 정치 및 진탕배양에 상관없이 배양초기 각각 0.374, 0.333에서 배양 12시간째 각각 2.374, 2.656으로 빠른 생육을 보였으며, 배양 24시간 후에는 각각 2.363, 2.797로 진탕배양에서 더 양호한 생육도를 보였다(Fig. 2). 건조균체량 또한 배양 초기에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 배양 18시간 이후 진탕배양한 실험군의 건조균체량이 눈에 띄게 증가하였다(Fig. 3).

Glutathione 함유량은 배양시간의 경과에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 24시간 후 배양방법에 따라 glutathione 함유량이 34.5 mg/L(정치배양), 60.0 mg/L(진탕배양)로 진탕배양이 정치배양에 비해 생산성이 약 70% 증가하였다. 단위균체당 glutathione 함유량은 정치배양과 진탕배양이 각각 13.3, 15.8 mg/g으로 진탕배양 했

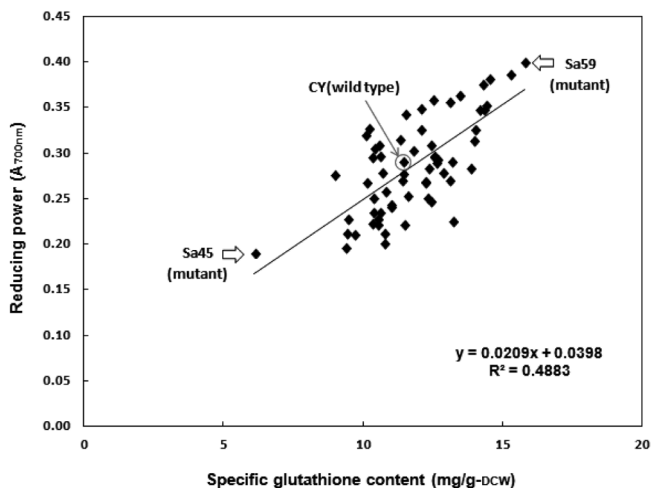


Fig. 1. Correlation of glutathione content and reducing power of *S. cerevisiae* CY mutants.

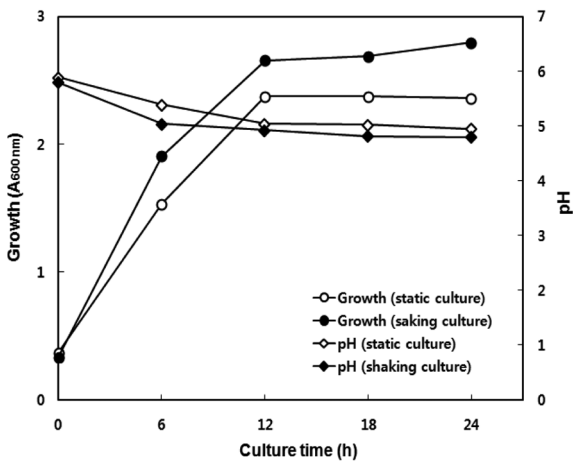


Fig. 2. Growth and pH of Sa59 mutant by static and shaking cultures.

을 때 약 19% 높았다. 이는 진탕배양이 glutathione 생성에 적합하다는 연구보고와 유사한 결과로 진탕배양에 의한 원활한 산소 및 에너지공급 등이 변이주의 생육과 glutathione 함유량 증가에 영향을 미친 것으로 판단된다(21).

탄소원 농도에 따른 glutathione 생성

Glucose 농도가 1, 3, 5%가 되도록 첨가한 YM 배지에서 변이주를 48시간 배양한 후 건조균체량, glutathione 함유량, 환원력 및 에탄올 함량을 조사하였다(Table 1). Glucose 농도가 증가함에 따라 건조균체량은 각각 3.84, 4.18, 4.70 g/L로 증가하였으나, 단위부피 및 단위균체량당 glutathione 함유량은 각각 60.1, 51.4, 44.0 mg/L, 15.7, 12.3, 9.4 mg/g으로 모두 감소하였다. 또한, 환원력도 glucose 농도가 증가함에 따라 각각 0.40, 0.32, 0.30으로 감소하는 경향을 나타냈다. 한편, 에탄올 생성량은 glucose 농도에 따라 각각 0.6, 2.3, 2.7%로 glucose 농도가 높을수록 에탄올 생성량이 높았다. 당농도가 증가함에 따른 glutathione 함유량의 감소는 고농도 당 첨가 시 발효에 의해 생성된 에탄올이 glutathione 생성을 저해하는 데에 기인한 것으로 생각된다(14).

Table 1. Glutathione content and antioxidant ability of Sa59 mutant in the YM medium with different glucose concentrations

Glucose concentration (%)	DCW (g/L)	Glutathione content		Reducing power (A <sub>700nm</sub> )	Ethanol content (% w/v)
		(mg/L)	(mg/g-DCW)		
1	3.84±0.02 <sup>1)</sup>	60.1±0.09	15.7±0.08	0.40±0.01	0.6±0.02
3	4.18±0.02	51.4±0.18	12.3±0.02	0.32±0.01	2.3±0.03
5	4.70±0.03	44.0±0.11	9.4±0.05	0.30±0.01	2.7±0.03

<sup>1)</sup>Values are mean±standard deviation.

Table 2. Glutathione content and antioxidant ability of Sa59 mutant in YM medium containing glutamate, cysteine, and glycine

Amino acids concentration (individual amino acids, %)	DCW (g/L)	Glutathione content		Reducing power (A <sub>700nm</sub> )
		(mg/L)	(mg/g-DCW)	
0	3.80±0.03 <sup>1)</sup>	60.0±0.03	15.8±0.11	0.37±0.01
0.02	3.26±0.04	67.2±0.03	20.6±0.24	0.48±0.02
0.04	2.65±0.03	69.6±0.04	26.3±0.32	0.52±0.02
0.06	1.80±0.02	39.5±0.04	21.9±0.18	0.48±0.01

<sup>1)</sup>Values are mean±standard deviation.

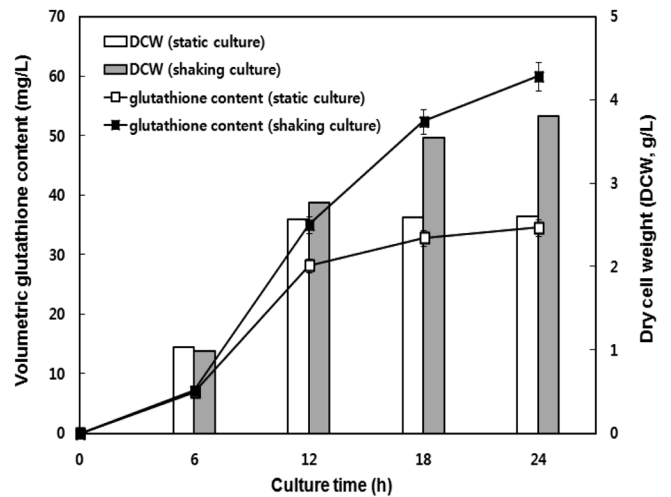


Fig. 3. Time course of glutathione concentrations and the cell growth of Sa59 mutant by static and shaking cultures.

Glutamate, cysteine, glycine 농도에 따른 glutathione 생성

Glutathione을 구성하는 아미노산인 glutamate, cysteine, glycine을 전구체로 첨가하여 변이주의 glutathione 함유량 변화를 측정하였다(Table 2). 세 종류의 아미노산을 각각 0.04% 첨가하였을 때 단위부피 및 단위균체량당 glutathione 함유량이 각각 69.6 mg/L, 26.3 mg/g으로 가장 우수하였으며, 아미노산을 첨가하지 않은 경우보다 각각 약 16%, 66%씩 증가하였다. 그러나 각 아미노산을 0.06% 첨가한 경우 균주의 생육이 크게 억제되었으며 glutathione 함유량 또한 감소하였다. 특히, 단위부피당 glutathione 함유량은 아미노산 무첨가군 보다도 감소되었다. 이러한 결과는 *Rhodotorula glutinis* 균주에서 나타난 결과와 유사한 것으로 생각된다(22).

환원력 또한 첨가된 아미노산의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보였으며, 0.04% 첨가 시 0.52로 최대값을 보였다. 그러나 각 아미노산을 0.06% 씩 첨가한 경우에는 0.04% 첨가한 경우보다 다소 감소하였다. 본 연구결과로부터 비교적 간단한 UV

돌연변이법을 이용하여 glutathione 고함유 *S. cerevisiae* 효모 개량의 가능성을 조사하였으며, 배양방법 개선을 통하여 glutathione 함유율을 높임으로써 발효용 또는 식품소재용 효모균주 개발이 가능할 것으로 생각된다.

## 요 약

Glutathione 생성능이 우수한 효모균주의 획득을 목적으로 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 변이처리 하였다. 선발된 변이주들의 전체적인 glutathione 함유량은 6.1-15.8 mg/g이었으며, glutathione 함유량과 항산화활성은 비교적 양호한 양의 상관관계( $R^2 = 0.488$ )를 보였다. 특히, 변이주 *S. cerevisiae* Sa59의 glutathione 함유량이 wild type에 비해 약 38% 증가되었으며, 환원력 또한 0.40으로 가장 높아 glutathione 생성을 위한 변이주로 선발하였다. 배양방법에 따른 glutathione의 부피당 생산성은 진탕배양이 정지배양에 비해 약 70% 증가하였으며, 단위균체량당 glutathione 함유량 또한 진탕배양 했을 때 약 19% 증가하였다. Glucose 농도가 증가함에 따라 건조균체량과 발효에 의한 에탄올 함량은 증가하였으나, glutathione 함유량과 환원력은 감소하는 경향을 나타냈다. Glutamate, cysteine 및 glycine을 각각 0.04% 첨가하였을 때 단위부피 및 단위균체량당 glutathione 함유량이 각각 16%, 66% 증가하였으며, 환원력 또한 0.52로 가장 우수하였다.

## References

- Hopkins FG. On glutathione: A reinvestigation. *J. Biol. Chem.* 84: 269-320 (1929)
- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27: 502-522 (1969)
- Grant CM, Maclver FH, Dawes IW. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 29: 511-515 (1996)
- Cha JY, Kim HS, Kang SC, Cho YS. Alcoholic hepatotoxicity suppression in alcohol fed rats by glutathione-enriched yeast FF-8 strain. *Food Sci. Biotechnol.* 18: 1411-1416 (2009)
- Penninckx M. A short review on the role of glutathione in the response of yeast to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Tech.* 26: 737-742 (2000)
- Li Y, Wei G, Chen J. Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biot.* 66: 233-242 (2004)
- Fernandes L, Steele JL. Glutathione content of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 76: 1233-1242 (1993)
- Fahey RC, Brown WC, Adams WB, Worsham MB. Occurrence of glutathione in bacteria. *J. Bacteriol.* 133: 1126-1129 (1978)
- Johnson T, Newton GL, Fahey RC, Rawat M. Unusual production of glutathione in actinobacteria. *Arch. Microbiol.* 191: 89-93 (2009)
- Suzuki T, Yokoyama A, Tsuji T, Ikeshima E, Nakashima K, Ikushima S, Kobayashi C, Yoshida S. Identification and characterization of genes involved in glutathione production in yeast. *J. Biosci. Bioeng.* 112: 107-113 (2011)
- Miwa N. Glutathione. JP Patent 51,144,789 (1976)
- Miyamoto I, Miwa N. Production of glutathione by immobilized glutathione synthetase. JP Patent 52,051,089 (1977)
- Gushima H, Miya T, Murata K, Kimura A. Construction of glutathione-producing strains of *Escherichia coli* B by recombinant DNA techniques. *J. Appl. Biochem.* 5: 43-52 (1983)
- Kim SU, Yang CI, Min SH, Rhee SH, Kim YB. A study on the extraction and purification of glutathione from yeast. *J. Korean Pharm. Sci.* 8: 1-10 (1978)
- Koh SY, Koo YM. *In vitro* production of glutathione using yeast ATP regeneration system and recombinant synthetic enzymes from *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 213-220 (1998)
- Bae IY, Koo SH, Yoo HJ, Kim JM, Bae HA, Jeon EJ, Oh E, Lee DH, Hur BS, Lee HG. Development of a flavor enriched yeast extract with a high glutathione content. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 549-553 (2010)
- Hamada S, Tanaka H, Sakato K. Process for producing glutathione. EP Patent 0079241 A2 (1982)
- Owens CWI, Belcher RV. A colorimetric micro method for the determination of glutathione. *Biochem. J.* 94: 705-711 (1965)
- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315 (1986)
- Lee CH, Cha JY, Jun BS, Lee HJ, Lee YC, Choi YL, Cho YS. The antioxidative activity of glutathione enriched extract from *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 *in vitro* model system. *J. Life Sci.* 15: 819-825 (2005)
- Park JC, Ok M, Cha JY, Cho YS. Isolation and identification of the high glutathione producing *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 from Korean traditional rice wine and optimal producing conditions. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 46: 348-352 (2003)
- Cho WD, Kim HI, Song JC, Yang HC. Studies on the production of glutathione by microorganism. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 6: 75-80 (1978)