

## *Rhodotorula glutinis*의 Glutathione 生産에 關한 研究

—培養條件 및 抽出精製—

식품제조과

전임강사 성 하 진

### I. 緒 論

Glutathione은 動植物, 微生物中 酵母, 肝臟, 筋肉, 血液, 胚芽 等<sup>1</sup>에 널리 分布되어 있는 tripeptide로써 血液中에는 酸化型, 內臟中에는 還元型<sup>2</sup>으로 存在하며 生體內에서는 補酵素的 역할과 生理學的으로 細胞成分의 보호 및 細胞分裂, 增殖, 肝機能 회복 및 解毒機構에 關여하며 酸化還元機構에 중요한 역할을 하여 각종 肝질환 및 증독증 治療의약으로<sup>2,4</sup> 重要하여 많은 연구자들은 glutathione을 製造하기 爲해 노력하여 왔다.

Glutathione은 처음 1888年 De Rey-Pailhode<sup>5</sup>에 依하여 酵母에 含有된 物質로 알려진 後 Hopkins<sup>6</sup>는 酵母에서 glutathione을 抽出하였고 Quastel 등은<sup>6</sup> glutathione이  $\gamma$ -glutamyl-cysteine인 것을 발표하였고 Hunter 등은<sup>8</sup> tripeptide임을 확인하였으며 Johnson 등<sup>9</sup>이 이 事實을 뒷받침하였다. 또 1930年 Pirie 등<sup>10</sup>은 용매를 이용한 glutathione 抽出法을 발표하였고 Harington<sup>11</sup> 및 Du Vignaud 등<sup>12</sup>은 合成法에 依해서 glutathione을 제조하여  $\gamma$ -glutaminy-l-cysteinyl-glycine임을 결정하였으며 三村 등<sup>13</sup>은 酵母培養液에 硫酸을 添加하여 glutathione 含量을 증가시켰으며 朝井 등<sup>14</sup>은 米糠의 vitamin B<sub>1</sub> 추출액을, 渡邊 등<sup>15</sup>은 抗生物質을 趙 등<sup>16</sup>은 아미노산을 첨가하였으며 그의 연구자<sup>17,18</sup>들에 의해서도 glutathione 含量증가를 위한 노력이 계속되어 왔다. 한편 1951年 Grunert<sup>18</sup>는 熱水抽出法을 Kuninori 등은<sup>20</sup> 2% 소금용액을 이용하여 glutathione을 抽出해 냈으며 그의 Snoke抽出法,<sup>21</sup> Acetone 抽出法, Dryice와 초음파를 이용한 각종 抽出方法<sup>22</sup>이 발표되어 glutathione 수율향상에 큰 進전을 가져오게 되었다.

1950年 Cohn 등<sup>23</sup>의 Dowex column을 이용한 nucleotide 정제법 발표이후 Du Vignaud의 batch式 정제법<sup>24</sup> 외에 이온교환수지,<sup>25</sup> 동화합물에 의한 정제방법 등이<sup>25,26-29</sup> 발표되었다.

본 연구에서도 酵母의 glutathione 含量을 증가시키기 爲한 培養條件과 各種抽出 및 精製條件을 검토하여 수율향상 效果를 얻었기에 그 結果를 보고하고자 한다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 使用菌株

高麗大學校 食品工學科에 보존된 菌株 중 *Rhodotorula glutinis*를 使用하였다.

### 2. 基本培地組成 및 培養方法

基本培地組成은 Table 1과 같으며 배양방법은 기본배지 50ml를 500ml 진탕배양 flask에 分注하여 121°C에서 10분간 가압살균 후 菌을 接種하고 30°C에서 48時間 왕복진탕배양(120 strokes, 진폭 7cm)하였다. 또 배양 시작 후 36시간째 glycine 0.7%, glutamic acid 0.7%, Cysteine 0.7%를 混化하여 배양액에 첨가하였다.

Table 1. Composition of Medium

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

### 3. 乾燥 菌體量

培養液 100ml를 10分間 3,000r.p.m.으로 원심분리한 후 분리된 菌체를 증류수로 1회 0.85% 생리식염수로 洗淨한 후 105°C에서 恒량이 될 때까지 건조시켜 恒량하여 건조菌체량으로 하였다.

### 4. Glutathione 定量

培養液을 3,000r.p.m.에서 약10분간 원심분리한 후 분리된 菌體를 0.85% 생리식염수로 2회 洗淨하여 菌體를 10%로 懸液시켰다. 이 懸液를 95°C에서 5분간 water bath상에서 glutathione을 抽出한 후 25% metaphosphoric acid 2ml 加하고 증류수로 10ml 되게 채우고 교반하여 混液하였다.

이 混液을 3,000r.p.m.에서 10분간 원심분리하여 상등액을 시료로 하여 Alloxan 305 法<sup>30</sup>에 의해 glutathione을 定量하였다.

### 5. Paper chromatography에 의한 Glutathione定性<sup>31,32</sup>

Toyo Filter Paper NO.54 여지를 사용한 하강법에 의하여 n-butanol: acetic acid: water (12:3:5 V/V)의 용매계로 전개한 후 3시간 30°C에서 건조시킨 후 0.2% ninhydrin-acetone

용액을 여지전면에 분무하여 60°C에서 30분간 예비발색한 다음 2% ninhydrin-acetone 용액을 나타난 spot 중심에 분무하여 60°C에서 3분간 발색시켰다.

## 6. 抽出方法

酵母菌體에서 glutathione 抽出方法은 有機酸, 無機酸, 염기성류, Dryice를 利用하는 方法과 熱水, 초음파를 이용하는 方法 등이 있다.

본 연구에서는 다음과 같은 方法을 선정하였다.

1) 熱水抽出法: 培養液 10ml를 원심분리한 후 0.85% 생리식염수로 菌體를 수세한 후 물을 가하여 10% 현탁액을 만들고 95°C에서 5분간 熱水處理하였다.

2) Acetic acid 抽出法: 50%/균체현탁액을 만든 후 40°C에서 1시간 진탕하였다. 이때 현탁액으로 증류수: Acetic acid (1:3) 혼합액을 사용하였다.

3) 초음파 抽出法: 培養液 20ml에 항산화제로 vitamin C를 배양액 ml당 1mg 첨가한 후 20Kc에서 15분간 초음파를 폭사하여 효모균체를 파쇄하였다. 초음파 파쇄기는 Schoeller Schall Ultrasonic Disintegrator(Model TG 125)를 사용하였다.

4) Sulfuric acid 抽出法: 培養液 10ml를 원심분리한 후 0.85% 생리식염수로 효모균체를 수세한 후 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 50% 균체현탁액을 만들고 40°C에서 20분간 진탕하였다.

5) Acetone 抽出法: 培養液 10ml를 원심분리한 후 0.85% 생리식염수로 효모균체를 수세한 후 증류수: Acetone(1:3) 혼합액으로 50% 현탁한 후 40°C에서 1시간 진탕하였다.

6) 초음파와 熱水병용법: 초음파 처리(20Kc, 15분) 후 熱水처리(95°C 15분)하였다.

## 7. 精製方法

酵母菌體의 glutathione 抽出液을 ion 交換수지 및 銅化合物 처리에 의해서 精製하였으며 사용한 수지는 Dowex1-x2(Cl<sup>-</sup>)와 Dowex 50w-x8(H<sup>+</sup>)이었다. 抽出液 농축은 Rotary evaporator(Type 51111)를 사용하였고 모든 분획은 Fraction Collector(ISCO Model 1,200 pup)를 사용하였다.

NAD 溶出用 Buffer는 0.05M Acid-Ammonium acetate(pH=4.5)이며 glutathione 용출 용매는 NaOH Solution, H<sub>2</sub>S 발생장치는 kipp 장치를 사용하였다.

全 精製工程은 다음과 같다.

## PURIFICATION PROCEDURE

STEP 1: CULTURE BROTH

↓  
GSH EXTRACTION

↓ Dowex 1-X2

STEP 2: (NAD+GSH) SOLN.

pH 2.5

Dowex 50W-X8

0.1, 0.3M-NH<sub>4</sub>Cl

0.05M Buffer

(pH 4.5, Acetic acid-  
Ammonium acetate)↓  
NAD EXTRACTION↓ Washing with Water  
Extraction with 1N-NaOH

STEP 3: GSH EXTRACTION

↓ pH 3.0

↓ ADDING CuO (40°C, 10 mins)

↓ CENTRIFUGING

↓ WASHING

↓ SUSPENSION WITH WATER

↓ DECOPPERING

↓ CENTRIFUGING

STEP 4: PURE GSH EXTRACTION

↓ 50% Et-OH

↓ CRUDE GSH CRYSTAL

※ GSH(Glutathione)

## Ⅲ. 結果 및 考察

## 1. Glutathione 표준곡선

환원형 glutathione을 각 농도별로 Alloxan 305법에 의해 파장 305nm에서 Beckmann Spectrophotometer로 Optical Density를 측정하여 glutathione 표준 곡선을 얻었다(Fig.1).

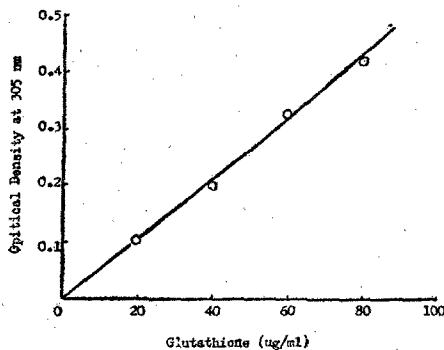


Fig. 1. Standard Curve of Glutathione

Standard curve obtained by the Alloxan "305" method is showing the relationship between optical density and amount of glutathione in the Beckman Spectro-photometer at 305nm. Standard pure glutathione was obtained from Merck.

## 2. 培養條件

## 1) 金屬이온의 影響

酵母菌體의 glutathione 함량증가를 위해 金屬염류를 제외한 기본배지에 각종 금속염류를 넣어 배양한 결과(Table 2) Mg<sup>+2</sup>는

Table 2. The Effect of Various Metal ions in the Culture Media

Metal ion	D.C.W. (mg/ml)	GSH(µg/ml)
None	14.2	143
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	21.3	182
CaCl <sub>2</sub>	18.7	179
ZnSO <sub>4</sub>	19.2	162
FeSO <sub>4</sub>	17.9	145
MnSO <sub>4</sub>	18.3	152
KCl	20.9	136

Each metal was added 0.01% to the basal medium in 500ml baffled flask and cultivated at 30°C on a reciprocal shaker for 48 hours.

182 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ 는 179 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 glutathione 함량을 나타내었으며  $\text{K}^{+2}$ 는 glutathione 함량증가에 무관하였다.

Sasaki 등<sup>33</sup>은  $\text{Zn}^{+2}$  효과를 검토하여 glutathione 함량증가를 하였으나 본실험에서는  $\text{Zn}^{+2}$  효과가 없었다.

최적 농도는  $\text{Mg}^{+2}$ 는 0.05%,  $\text{Ca}^{+2}$ 는 0.01%였고 농도가 증가할수록 glutathione 함량은 감소하는 경향을 나타내었다(Fig.2,3).

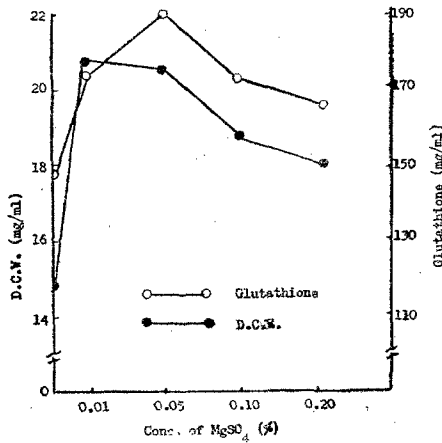


Fig. 2. Effect of Concentrations of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Metal ion was added to the basal medium and cultivated at 30°C on a reciprocal shaker for 48 hours

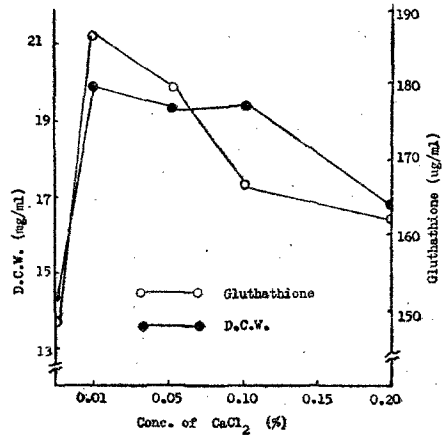


Fig. 3. Effect of Concentrations of  $\text{CaCl}_2$   
Conditions as for Fig.2

### 2) Methionine의 영향

기본배지에 methionine을 각 농도별로 첨가하여 glutathione 함량을 정량한 결과 methionine  $2.5 \times 10^{-3}\text{M}$  첨가시 최대 glutathione 함량을 보였다. 최적농도보다 고농도에서는 glutathione 함량이 감소하였는데 日下 등<sup>34</sup>은 methionine 첨가 경우가 무첨가 경우보다 2배의 glutathione 함량을 나타낸다고 보고한 바 있으며, 趙 등<sup>16</sup>도 배지에 methionine을 단독첨가하여 166 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 glutathione 함량을 나타낸다고 보고하였다.

methionine 첨가시 결과는 Fig.4와 같다.

### 3) 抽出條件

酵母菌體에서 glutathione의 최적추출조건을 선정하기 위하여 각종 추출방법을 검토한 결과 열수추출의 경우 glutathione 함량이 198 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 가장 양호하였으며 초음파 추출의 경우도 197 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 열수추출과 비슷한 추출효과를 보였으며 기타 방법은 160~168 $\mu\text{g}/\text{ml}$  범위로 추출수율이 낮았다(Table 3).

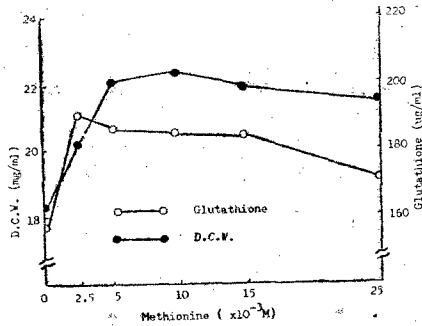


Fig. 4. Effect of Concentrations of Methionine Conditions as for Table 1.

Methionine was added to the basal medium and cultivated at 30°C on a reciprocal shaker 48 hours.

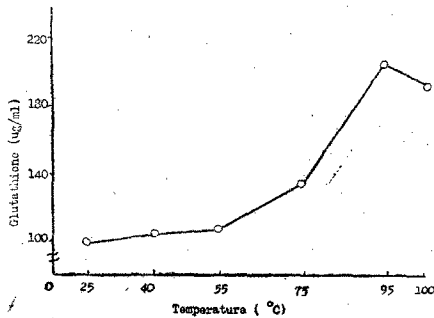


Fig. 5. Change of Concentration of Glutathione in Various Temperatures

Conditions as for boiling water extraction method. Time was fixed at 5 mins.

**Table 3. Comparison of Various Extraction Methods**

Method	GSH ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Ext. Ratio
Boiling Water	198	100
Acetic acid	166	83.8
Ultrasonic	197	99.5
Sulfuric acid	168	84.8
Acetone	160	80.8

Conditions as for each Extraction method.

또 열수 및 초음파 추출의 최적조건을 검토한 결과 열수추출은 95°C에서 15분간 처리시 가장 양호하였다(Fig 5, 6).

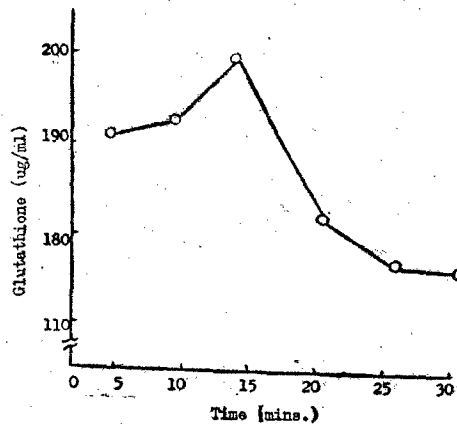


Fig. 6. Change of Concentration of Glutathione in Various Time at 95°C

Conditions as for boiling water extraction method. Temperature was fixed at 95°C

그러나 Chihiro 등<sup>35</sup>은 95°C에서 5분간 열수추출하여 좋은 결과를 얻었다고 보고하였으며 三輪 등<sup>36</sup>은 45°C에서 30분간 열수처리하여 glutathione 추출수율을 높였지만 일반적으로 추출수율이 낮아 178 $\mu\text{g}/\text{ml}$  정도였다.

초음파 추출의 경우 각종 주파수와 시간을 달리하여 추출효과를 검토한 결과 Table. 4와 같이 60Kc에서 15분간 초음파 처리하였을 때 추출수율이 218 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 가장 양호하였다.

Table 4. The Effect of GSH Extraction in Various Cycles

Kc	Treatment(min)	GSH( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
10	5	63
	10	82
	15	127
	20	101
20	5	92
	10	136
	15	197
	20	146
30	5	133
	10	139
	15	187
	20	136
40	5	142
	10	136
	15	203
	20	198
50	5	170
	10	168
	15	208
	20	202
60	5	172
	10	196
	15	218
	20	201
70	5	180
	10	196
	15	198
	20	173

Ultra sonic disintegrator for glutathione extraction was used model TG 125. Amount of glutathione was determined by Alloxan 305 method.

초음파 추출의 경우 각종 주파수와 시간을 달리하여 추출효과를 검토한 결과 Table 4 와 같이 60 Kc에서 15분간 초음파 처리하였

을 때 추출수율이 218 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 가장 양호하였다.

따라서 glutathione 최대추출율을 얻기 위하여 최적열수추출법과 초음파추출 방법을 병용처리하여 각각 추출방법보다 양호한 결과를(Table 5) 얻었으며(추출수율 229 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 이를 확인하기 위해 Toyo Filter Paper No. 54 여지를 사용하여 Paper chromatography 를<sup>31~32</sup> 행한 결과(Fig.7) 열수추출법과 초음파추출의 병용법이 단독경우보다 좋다는 사실을 확인하였다.

Table 5. Comparision of Various Extraction Methods

Method	GSH( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Boiling Water(95°C, 15mins)	208
Ultrasonic(60 Kc, 15mins)	218
Boiling Water+Ultrasonic	229

Conditions as for each Extraction method.

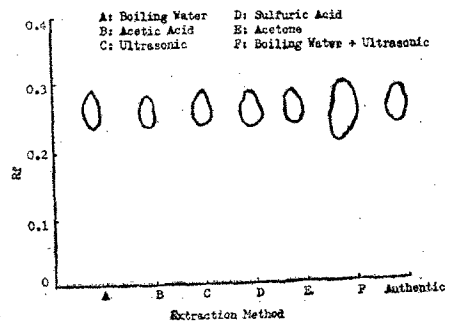


Fig. 7. Paper Chromatography of Glutathione in Various Extraction Methods

Solvent : n-butanol : acetic acid : water (12:3:5 v/v)

Paper: Toyo filter paper No. 54

Spray: 2% ninhydrin-acetone solution

#### 4. 精製條件

최적 추출법에 의한 glutathione 추출액을 사용하여 이온교환수지와<sup>23~25</sup> 동화합물에<sup>26~28</sup> 의하여 다음과 같이 정제하여 조건을 검토하였다.

##### Step I: Glutathione 抽出液

2ℓ 진탕배양 flask에 培地 500ml를 넣고 가압살균(121°C, 10분)한 후 *Rhodotorula glutinis*를 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 배양액을 최적추출방법으로 glutathione을 추출한 액(1ℓ)을 Rotary evaporator로 농축하여 glutathione 농축액(132ml)을 얻었다. 이때 glutathione양은 237mg이다.

##### Step II: NAD와 Glutathione 分離<sup>24,25</sup>

각종 nucleotide 및 色素 등 불순물을 흡착 제거시키기 위하여 농축액을 Dowex1-X2 음이온 교환수지 Column(5×30cm)에 통과시켜 무색의 glutathione과 NAD 함유액(408ml)을 얻었으며 이때 glutathione양은 218.5mg, 정제회수율은 92.2%였다.

이 함유액을 산성(pH=2.5)으로 한 후 Dowex 50W-X8 양이온 교환수지 Column(5×30cm)에 통과시켜 NAD를 수지층에 흡착시킨다. 동시에 glutathione도 Polypeptide의 양성 전해질이므로 등전점 이하의 pH에서 양하전이 증가하므로 수지층에 흡착된다. 이 수지층을 0.1 M NH<sub>4</sub>Cl로 1차 수세 후 0.3 M NH<sub>4</sub>Cl로 충분히 수세한 후 NAD와 glutathione을 分離시키기 위하여 0.05 M buffer로 수지층의 pH를 높이면 수지층의 음하전이 감소하므로 NAD만 용출되어 제거된다.

NAD 용출은 fraction 초기에 대부분이 용출되었으며 NAD 용출 Column chromatography 결과는 Fig.8과 같다.

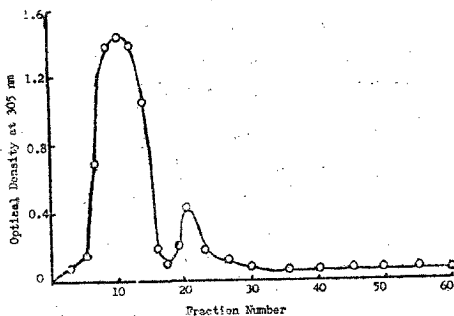


Fig. 8. Column Chromatogram of NAD on Dowex 50W-X8.

Elution buffer: 0.05M Acetic acid-Ammonium Acetate acetate (PH 4.5)

Eluted volume: 5ml/tube

Flow rate: 1ml/min

Volume of resin: 5×30cm

##### Step III: 粗 Glutathione 함유액

glutathione 용출을 위해 수지층을 물로 충분히 수세한 후 0.01N, 0.1N, 1N, 2N-NaOH를 수지층에 통과시켜 glutathione을 용출시키고 수지를 동시에 재생시켜 준다. glutathione 용출은 1N-NaOH 사용시 가장 양호하였으며 Column chromatography 결과는 Fig.9과 같다. 佐伯 등<sup>25</sup>에 의하면 NaOH 용액이 1N보다 낮으면 glutathione 회수율이 저하되고 2N보다 높은 경우에도 glutathione 회수율은 증가하지 않는다고 보고하였으며 高 등<sup>24</sup>도 glutathione의 용출법기



도 보다 강한 염기를 사용하여 glutathione을 용출해야 한다고 보고하였는 바 본 실험에서도 1N-NaOH 사용시 glutathion 용출이 가장 좋았다.

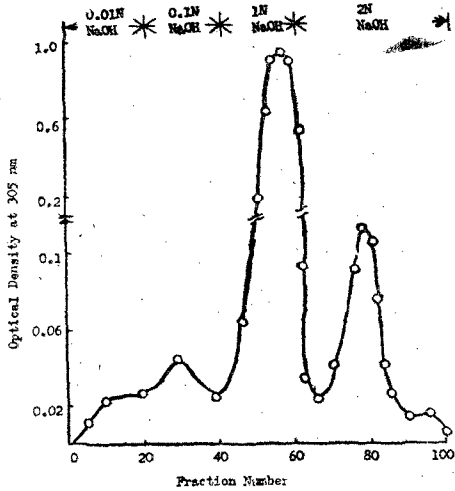


Fig. 9. Column Chromatogram of Glutathione on Dowex 50W-X8

Elution solvent: Various NaOH solutions  
 Eluted volume: 5ml/tube  
 Flow rate: 1ml/min  
 Volume of resin: 5×30cm

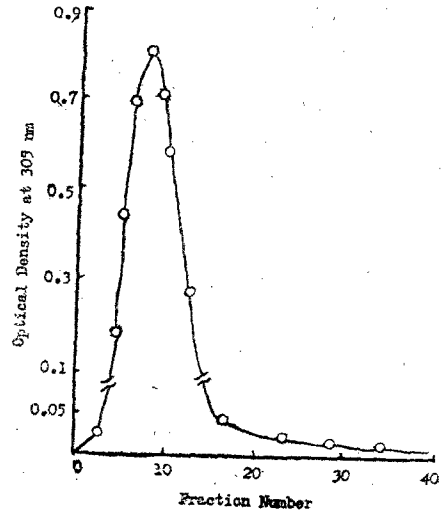


Fig. 10. Column Rechromatogram of Glutathione on Dowex 50-X8

Elution solvent: 1N-NaOH solution  
 Eluted volume: 5ml/tube  
 Flow rate: 1ml/min  
 Volume of resin: 5×30cm

Fig.10은 1N-NaOH 용출부분을 Column Rechromatography 행한 결과로 정제된 단일 peak 부분을 얻었으며 용출 초기에 대부분의 glutathione이 용출되었음을 나타내고 있다.

이 단계의 정제회수율은 74.4%로 glutathione 함량은 176.3mg이었다.

**Step IV: 精製 Glutathione 함유액**

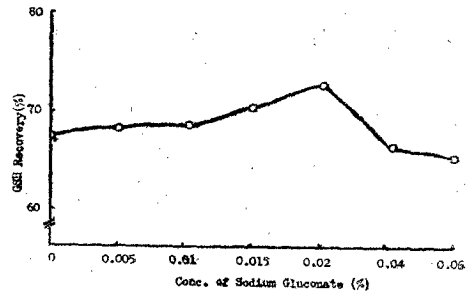
粗 glutathione 함유액에 2價銅化合物 CuO를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시켜 glutathione-Cu염을 형성한 후 실온으로 냉각하여 kipp 장치에 의하여 H<sub>2</sub>S를 접촉시켜 脫銅한 후 원심분리하여 CuS를 제거하고 精製된 glutathione 함유액을 얻었다.<sup>24~26</sup>

이때 정제회수율은 49.3%이며 glutathione 함량은 116.9mg으로 Step별 정제회수율이 66.3%로 世古 등<sup>28</sup>의 정제회수율 77.0%보다 낮은 것은 탈동처리<sup>24</sup> 시간이 짧고 중금속염이 glutathione 함유액 속에 포함되어 동염형성을 저해<sup>27</sup>하였기 때문인 것으로 생각되었다. 따라서 정제회수율을 향상시키기 위하여 각종 chelate제를 첨가한 결과(Table 6) sodium gluconate를 0.02% 첨가하였을 때 최종 정제회수율은 57.1%, 단계별 정제회수율은 76.8%로 무첨가보다 15.8%의 수율향상을 보였다(Fig.11)

**Table 6. Recovery of Glutathione in Various Chelating agents**

Kind	Conc. (%)	GSH Recovery (%)
None	—	66.3
E.D.T.A.	0.02	69.8
Phosphoric acid	0.02	68.2
Sodium Gluconate	0.02	76.8

Each chelating agent was added to the crude glutathione solution to removed various heavy metal ions.



**Fig. 11. Recovery of Glutathione in Various Concentrations of Sodium Gluconate**  
Conditions as for Table 6.

**Table 7. Purification of GSH by *Rhodotorula glutinis***

Step	Total Vol. (ml)	Conc. of GSH ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cont. of GSH (mg)	Yield (%)	Step yield (%)
1	1000(132)	237	237	100	
2	408	535.5	218.5	92.2	92.2
3	500	352.6	176.3	74.4	80.6
4	147	795.2	116.9	49.3	66.3
Final	147	921	135.4	57.1	76.8

또 精製 glutathione을 확인하기 위하여 paper chromatography를 행한 결과 Authentic Rf 치<sup>32</sup>와 (Rf치=0.24) 일치하였다. 全 정제공정의 정제수율은 Table 7과 같다.

#### IV. 要 約

酵母의 glutathione 함량증가를 위한 배양조건과 최적추출 및 정제조건을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 효모균체의 glutathione 함량증가를 위한 금속이온으로는  $\text{Mg}^{+2}$ 와  $\text{Ca}^{+2}$ 가 좋았으며  $\text{Mg}^{+2}$ 는 0.05%,  $\text{Ca}^{+2}$ 는 0.01%가 최적농도였다.
2. Methionine을  $2.5 \times 10^{-M}$  농도로 기본배지에 첨가시 가장 좋은 결과를 얻었다.
3. 추출방법은 열수추출(95°C, 15분간), 초음파추출(60Kc, 15분간) 경우 양호하였으며 열수추출과 초음파 추출법을 병용하여 최대 추출수율을 나타내었다.
4. 이온교환수지와 동열처리에 의한 정제법의 정제회수율은 49.3%였으며 chelate제로 Sodium gluconate 0.02% 사용했을 때 57.1%로 15.8% 정제회수율 향상을 나타내었다.

## 參 考 文 獻

1. Sullivan, B. and Howe, M.: The Isolation of Glutathione from Wheat germ, *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 2742 (1937)
2. 武井厚: Glutathione 水溶液의 安定化方法, 日本特許 47—25312 (1972)
3. 村上増雄: Glutathione 誘導體의 製造法, 日本特許 47—36724 (1972)
4. 小林隆光: 還元型 Glutathione의 製造, 日本特許 46—33988 (1971)
5. Mooz, E.D. and Wigglesworth, L.: Evidence for the  $\gamma$ -Glutamyle in Yeast, *Biochem. and Biophysical Research Communications*, **68**, 1066 (1976)
6. Hopkins, F.G.: On Glutathione, *J. Biol. Chem.*, **84**, 268 (1929)
7. Quastel, J.H. and Stewart, C.P.: Constitution of Glutathione, *Biochem. J.*, **17**, 586 (1923)
8. Hunter, G. and Eagles, B. A.: Glutathione,; A Critical Stud, II *J. Biol. Chem.*, **72**, 147 (1927)
9. Johnson, J.M. and Voegtlin C.: On Glutathione, *J. Biol. Chem.*, **75**, 703 (1927)
10. Pirie, N.W.: The Preparation of Glutathione from Yeast and Liver, *Biochem J.*, **24**, 44 (1930)
11. Harington, C.R. and Mead, T.H.: Synthesis of Glutathion *Biochem. J.*, **29**, 1602 (1935)
12. Du Vigneaud, V. and Miller, G.L.: A Synthesis of Glutathione, *J. Biol. Chem.*, **116**, 469 (1936)
13. 三村精男: 高 L-Glutathione 含有酵母菌體의 製造法, 日本特許 49—14680 (1974)
14. 朝井勇宜: 米糠에서 Vitamin B<sub>1</sub>을 抽出한 廢液을 原料로 한 酵母의 培養과 Glutathione 含量에 關하여, 日農化, **19**, 275 (1943)
15. 渡邊清: 酵母菌體의 Glutathione 增加法, 日本特許 48—40987 (1973)
16. Cho, W.D., H.I. Kim, J.C. Song and H.C. Yang: Studies on the Production of Glutathione by Microorganism, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **6**, 75 (1978)
17. 大岡忠昭: 醱酵法에 依한 Glutathione 製造法, 日本特許 48—44488 (1973)
18. 三村精男 외 3名: L-Glutathione 高含有酵母의 製造方法, 日本特許 48—92579 (1973)
19. Grunert, R.R. and Phillips, P.H.: A Modification of the Nitroprusside Method of Analysis for Glutathione, *Arch. Biochem. and Biophysics*, **30**, 217 (1951)
20. Kuninori, T., Yagi, M. and Matsumoto, H.: Glutathione leached from Yeast Cells, *J. Ferment. Technol.*, **46**, 196 (1968)
21. Snoke, J.E. and Bloch, K.: Studies on the Mechanism of Action Glutathione Synthetase, *J. Biol. Chem.*, **213**, 825 (1955)
22. 三輪萬治: Glutathione 抽出法, 日本特許 42—17757 (1967)
23. Cohn, W.E. and Carter, C.E.: Purification Method, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4273 (1950)
24. 高崎洋三: Glutathione 構製造, 日本特許 51—1414 (1976)
25. 佐伯敬道: 酵母에서 NAD와 Glutathione 分離精製하는 方法, 日本特許 51—28716 (1976)
26. 上崎勇一: 酵母菌體에서 Glutathione 含有液을 製造하는 方法, 日本特許 51—144788 (1976)
27. 阿部仁之助: Glutathione 銅鹽形成阻害物質의 除去法, 日本特許 48—5918 (1973)
28. 世古洋康: Glutathione 製造法, 日本特許 46—33937 (1971)
29. Dalby, G. and Benjamin T. Rauber: Processing for Making Glutathione, *U.S. Patent* 3281407 (1966)

30. Patterson, J.W. and Lazroov, A.: Determination of Glutathione, *Methods of Biochemical Analysis. Vol. II* (D. Glick, 3rd ed.) 259 (1961)
31. 柴田林治: *Paper Chromatography* 實際, **22** (1966)
32. Zeig, G. and Sherma, J.: *Handbook of Chromatography. Vol. I*, 297 (1972)
33. Sasaki, H. and Okumura, S.: Glutathione, 48—19793 (1973)
34. 日下部均: Gluathione 製造法, 日本特許 48—44487 (1973)
35. Chihiro, A., Hosoki, Y. and Shimada, K.: Glutathione extraction from Yeast, 日本特許 45—04755 (1970)
36. 三輪萬治 外 3名: Glutathione 抽出法, 日本特許 42—17757 (1967)

## Studies on the Production of Glutathione by *Rhodotorula glutinis*

### —Cultural Condition of Extracriion and Purification of Glutathione—

Ha-Chin Sung

Dept. of Food Technology, Sewon Health Junior College

#### >Abstract<

Results obtained from a series of experiments on cultural conditions of *Rhodotorula glutinis* for glutathione production, on extraction methods, and on purification of glutathione were as follows.

To maximize the glutathione content in the cell mass of *R. glutinis*, addition of Mg ion by 0.05% and Ca ion 0.01% to the basal medium was favorable.

The optimal concentration of methionine added to the medium was approximately  $2.5 \times 10^{-3}$  M.

Boiling water extraction at 95°C for 15 minutes and ultrasonic extraction at 60 kc for 15 minutes were favorable method of extraction. Highest yield was obtained when extracted with ultrasonic treatment and subsequent boiling water treatment.

The final recovery rate after purification was increased from 49.3% to 57.1% by addition of sodium gluconate at a 0.02% level.