

쉬파리 유래 항균펩티드 Defensin의 생산 증진을 위한 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*의 배양학적 특성

강대욱 · 이준원 · 김민수 · 김보연 · 오원근 · 민태익 · 안종석*
생명공학 연구소

효모 *S. cerevisiae*를 숙주세포로 이용하여 활성형의 항균펩티드를 생산하기 위한 model system으로서 쉬파리 유래 defensin의 합성 유전자를 GAP promoter, mating factor $\alpha 1$ (*MF $\alpha 1$*)의 preprosequence 및 *GAL7* transcription terminator의 조절하에 있는 재조합 plasmid pGMD18을 제작한 후 *S. cerevisiae*에 형질전환하여 growth inhibition zone assay를 통해 항균활성을 보유한 재조합 효모를 선별하였다. 재조합 효모의 성장속도와 defensin의 분비능을 증가시키기 위하여 최적의 배지조성과 배양조건을 결정하였다. 재조합 효모의 defensin 생산을 위한 최적 배양조건을 조사한 결과 0.4% yeast extract, 유기질소원 2% corn steep liquor, 탄소원 2.5% glucose, 0.05% CaCO_3 를 포함한 배지에서 초기 pH 3, 그리고 배양온도 28°C의 경우가 세포성장과 defensin의 항균활성이 가장 우수하였다. 이 조건으로 배양을 수행한 결과 YPD 배지에서 배양한 조건보다 약 2배의 세포성장과 약 4배의 defensin 생산을 확인하였다.

Key words □ defensin, media optimization, *MF $\alpha 1$* preprosequence, production, recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

식물, 곤충, 어류, 양서류, 인간 등에 널리 분포되어 있는 항균 펩티드들은 병원성 미생물에 대한 초기 면역반응을 수행한다고 알려져 있으며, 그 종류는 100여가지 이상이 된다(3). 넓은 범위의 항균 활성을 보이는 항균펩티드군에는 병원균 감염에 반응하여 무척추동물의 hemolymph에 축적되는 cecropins과 양서류의 표피에 분비되는 magainin 등이 있다 이들은 α -helix 구조를 이루고 있으며 20-40개의 아미노산으로 구성된 작은 열기성 peptide이다(2). 또 다른 항균펩티드 종류에는 Cys-rich peptide들이 있고 이런 펩티드들 중 전형적으로 6개의 cysteines를 가지고 3개의 disulfide bridge를 형성하는 것은 Ganz 등에 의해 defensin으로 명명되어 졌다(7).

곤충 defensin은 주로 insect fat body 또는 hemolymph 등에서 병원균에 의해 유도되어 발현되며 일반적으로 분자량이 4 kDa인 펩티드 (34-43 residues)들이다. 구조적으로 고리 모양의 아미노 말단, α -helix 형태의 중간부분, 그리고 β -sheet 형태의 카르복실 말단으로 구성되어 있다 α -helix 부위는 β -sheet 부위와 두개의 disulfide bridge를 형성함으로써 defensin 전체구조의 안정성에 기여한다고 알려져 있다(8). 다양한 유도성의 항균펩티드를 중 특히, 포유동물 골수의 혈액세포에 존재하는 많은 양이온성 및 저분자 항균펩티드와 유사한 아미노산 서열 상동성을 보여주고 있다. Defensin은 그람양성 세균의 세포막에 voltage-dependent channel를 형성함으로써 K^+ 와 다른 이온들을 유출시키는 기능을

보여주고 있다(4) 쉬파리 *Phormia terranova*의 유충에서 처음으로 분리된 2 종류의 defensin은(defensin A and B) 포유동물의 defensin 보다 약간 크며, 또한 6개의 cysteine으로 3개의 disulfide bridge를 형성한다(10).

항균펩티드는 1980년대부터 본격적으로 연구가 진행된 이래 지금까지 다양한 종류의 항균펩티드가 보고되었다. 항균펩티드의 이용성 및 구조와 기능의 연구를 위해서는, 자연계의 항균펩티드를 생산하는 면역화된 생물체의 제한으로 인해 단백질의 생산 시 유망한 숙주로 인식되어 광범위하게 사용되고 있으며 지금까지 많은 이종단백질이 효모에서 성공적으로 발현되었음이 보고되었다. 효모를 숙주세포로 하여 defensin 유전자의 발현을 시도한 보고는 있으나 발현효율이 낮게 나타났다(12). 따라서 본 연구에서는 효모 *S. cerevisiae*의 분비체를 이용하여 쉬파리에서 유래된 defensin을 항균활성이 있는 활성형의 재조합 defensin 생산계를 구축하고 재조합 효모로부터 defensin의 생산성을 높이기 위한 배지 및 배양조건의 최적화를 시도하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 플라스미드

본 연구에서는 defensin 유전자의 발현 및 분비를 위한 숙주세포로서 *S. cerevisiae* 2805 (α , *ura3-52 pep4::HIS3 Aprb1 Δ his3 can1*)을 사용하였다. 세로이 제작한 플라스미드의 증폭을 위해 *E. coli* DH5 α (*supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)를 사용하였다 pBlueScript KS (+) 벡터는 합성한 defensin 유전자의 염기서열을 확인하는 데

*To whom correspondence should be addressed.
Tel. 042-860-4312, Fax: 042-860-4595
E-mail: jsahn@mail.kribb.re.kr

사용되었다. *Micrococcus luteus* IAM 1056은 재조합 효모가 분비하는 defensin의 항균력을 측정하기 위한 시험균으로 생명공학 연구소 유전자은행 (Korean collection for type cultures, KCTC)에서 분양 받아 사용하였다. *S. cerevisiae* MF α 1 유전자를 함유한 재조합 plasmid Yep70 α 1를(9) MF α 1의 preprosequence 원으로, 대장균과 효모의 shuttle vector이고 *S. cerevisiae*의 GAL7(14) 유전자를 함유한 plasmid pAA7을 defensin 분비 vector 제조의 기본 골격으로 사용하였다.

배지 및 배양방법

대장균의 배양을 위해서는 LB 배지 (1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl) 를 사용하였으며 효모의 배양을 위한 복합배지로는 YPD 배지 (1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose)를 사용하였다. 효모 형질전환체의 1차 선별을 위한 최소배지로 YNBD 배지 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2.0% dextrose, 0.002% L-His, 2.0% agar)를 사용하였다. Defensin 생산을 높이기 위한 최적 배양조건 중 배지에서는 YPD를 기본으로 하고 여기에 유기 질소원, 탄소원, 무기염류 등의 영양소 성분을 농도별로 첨가하여 효과를 조사하였다. 재조합 효모세포는 150 rpm, 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 항균활성을 측정하였다. *M. luteus*는 NB 배지 (1.25% Bacto-heart infusion, 0.5% Bacto-nutrient broth, 0.25% yeast extract) 에서 37°C에서 15시간 배양한 후 항균활성의 측정에 사용하였다. 배양조기 pH 효과를 조사하기 위해 배지의 pH는 2 N HCl 용액과 2N NH₄OH 용액을 사용하여 조절하였다.

효모의 형질전환과 형질전환체의 선별

효모에서 defensin의 발현, 분비를 위한 재조합 플라스미드를 숙주인 효모에 도입하기 위해 Dohmen 등 (6)의 방법으로 효모의 형질전환을 수행하였다. 형질전환체들 중 defensin을 세포외로 분비하는 균주들을 선별하기 위해 모든 형질전환체들을 YNBD 한천배지에 tooth-picking한 후 30°C에서 24 시간 배양하였다. 이 한천배지에 *M. luteus* 배양액 1%를 함유한 0.8% NB top agar 10 ml를 붓고 37°C에서 15시간 배양한 후 *M. luteus*의 성장을 저해하면 생기는 균체 주위의 투명환으로 형질전환체를 선별하였다(11).

항균활성 측정

세포성장은 12시간마다 채취한 배양액을 적당한 배율로 희석하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 정상적으로 항균활성을 측정하기 위해 0.8% top agar와 *M. luteus*가 깔린 플레이트에 well을 만들고 1/2 배씩 연속희석한 배양액 50 μ l을 loading하고 37°C에서 24시간 배양한 후 well 주위에 투명환이 생기는지 관찰하여 arbitrary unit (AU)로 환산하였다 (1).

결과 및 고찰

Defensin 유전자를 갖는 재조합 플라스미드의 제조

항균펩티드의 분자량이 너무 작아서 이것을 효모에서 직접 발

현시키는 것이 불가능할 것으로 생각되어 MF α 1의 preprosequence를 이용하여 발현된 항균펩티드가 단백질 분해효소 YscF (*KEX2* gene product)에 (13) 의해 가수분해되어 활성적인 형태의 항균펩티드가 세포외로 분비되게 시도하였다 MF α 1의 preprosequence는 PCR로 증폭한후 5'과 3' primer에 함유된 제한 효소 인식부위에 해당하는 *Eco*R1과 *Xba*1을 처리한 후 agarose gel에서 분리하고, 분리한 DNA 단편을 pUC19에 subcloning하여 염기서열을 분석하였다. 이미 보고된 유전자의 염기서열 (5)을 토대로 defensin의 유전자를 세 부위로 나누어 효모의 preferable codon으로 대체하여 oligomer를 합성하였다. 이 합성 유전자를 인산화시키고 annealing 한 후 MF α 1이 삽입되어 있는 pUC19 벡터에 ligation 시켰고 염기서열을 확인하였다. 이 plasmid를 *Eco*R1과 *Sal*1으로 처리하여 MF α 1 preprosequence와 defensin 유전자를 함유한 약 360 bp DNA 단편을 분리하고, pBG18에서 GAP promoter를 분리한 후, 모두를 pAA7 vector에 동시에 ligation해서 최종적으로 선별한 plasmid를 pGMD18이라 명명하였다. 이 plasmid에는 GAP promoter, MF α 1 분비신호인 preprosequence, defensin 구조 유전자, GAL7 terminator 등의 유전자가 차례로 연결되어 있다(Fig. 1).

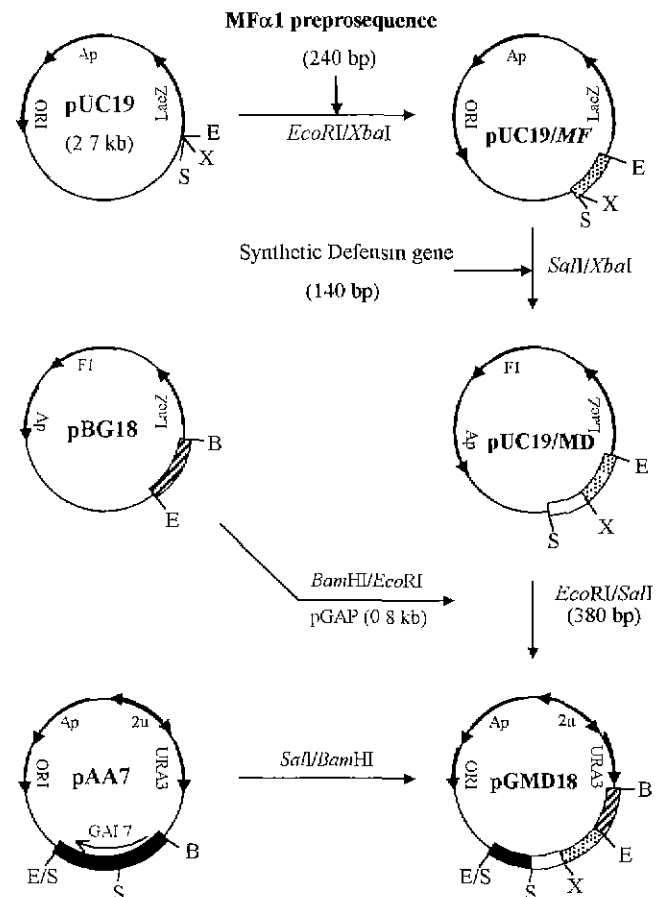


Fig. 1. Construction of a recombinant plasmid pGMD18 for defensin secretion. Abbreviation . Open box, defensin gene. closed box, GAL7 transcription terminator (tGAL7); hatched box. GAP promoter; dotted box. MF α 1 preprosequence; B, BamHI; S, SalI; E, EcoRI; X, XbaI

효모에서 Defensin 유전자의 발현

Defensin 유전자를 분비하는 박터를 제조하여 효모에 형질전환시킨 후 한천 평판배지에서 growth inhibition zone assay로써 defensin이 발현되어 분비됨을 확인하였으며(Fig. 2) 또한 액체배

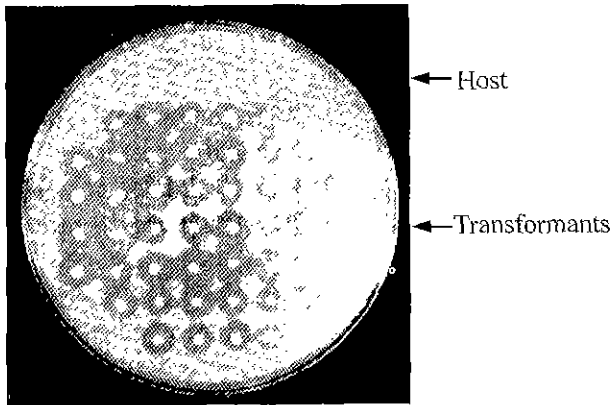


Fig. 2. Secretion of active defensin from *S. cerevisiae* 2805 transformant. Clear zones around colonies indicate the lysis of *M. luteus*, which resulted from secreted defensin

지에 배양한 상등액에도 항균활성이 존재함을 확인하였다.

유기질소원의 영향

여러가지 유기질소원이 세포성장과 defensin 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 최소한 효모가 자랄 수 있는 0.2% yeast extract, 2% glucose의 조성을 가진 배지에 corn steep liquor, soytone, casitone, peptone, tryptone 등의 유기질소원을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5%의 농도로 첨가하여 각 영양원의 효과를 조사하였다. Fig. 3에 보여진 것처럼 세포의 성장과 defensin의 분비가 2% corn steep liquor에서 가장 좋은 것으로 나타났다.

탄소원의 영향

탄소원이 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.2% yeast extract, 2% corn steep liquor의 조성을 가진 배지에 glycerol, sucrose, fructose, glucose, maltose, ethanol 등의 탄소원을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0% 첨가하여 각 탄소원의 효과를 조사하였다. 일반적으로 효모 배양시 탄소원으로써 glucose가 많이 사용되는데 본 실험에 사용한 제조합 효모도 Fig. 4에 보여진 것처럼 세포의 성

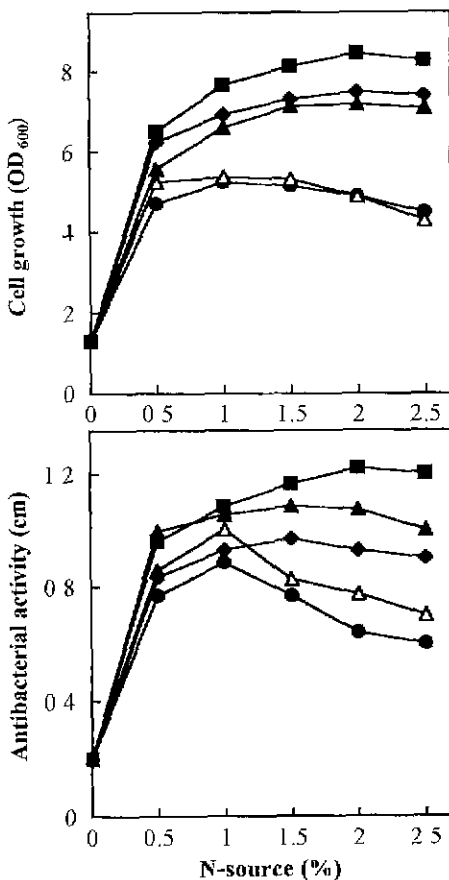


Fig. 3. The effect of nitrogen-source on cell growth and antibacterial activity of *S. cerevisiae* 2805 transformant. Yeast cells were grown for 2 days at 30°C in the media containing 0.2% yeast extract, 2% glucose and each nitrogen source. ■, corn steep liquor; ▲, soytone; ●, casitone; ◆, peptone; △, tryptone

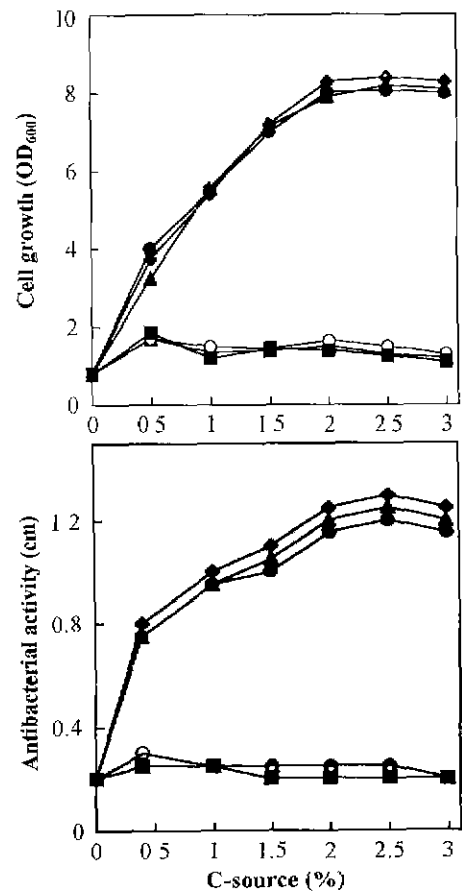


Fig. 4. The effect of carbon-source on cell growth and antibacterial activity of *S. cerevisiae* 2805 transformant. Yeast cells were grown for 2 days at 30°C in the media containing 0.2% yeast extract, 2% corn steep liquor, and each carbon source. ■, glycerol; ▲, sucrose; ●, fructose; ◆, glucose; △, maltose; ○, ethanol

장과 defensin의 분비가 2.5% glucose에서 가장 좋은 것으로 나타났다. 이당류인 sucrose는 낮은 항균활성을 보였으며 maltose는 전혀 항균활성을 보이지 않았다. 또한, 세포 성장에 필요한 대사 과정 중 TCA cycle에서 이용되지 못하는 ethanol과 glycerol에서는 항균활성을 보이지 않았으며 효모의 세포 성장도 극히 미약함을 볼 수 있었다.

무기염류의 영향

위에서 결정된 탄소원과 질소원의 조성에 무기염류의 효과를 조사하기 위해 NH_4CO_3 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCO_3 , KH_2PO_4 등을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1%의 농도로 첨가하여 배양하면서 세포 성장과 defensin의 분비를 관찰한 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 0.05% CaCO_3 에서 defensin의 분비가 가장 높았다. 이 결과는 무기염류를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 세포 성장이 별 차이가 없으므로 보아 Ca^+ 이온이 defensin의 안정성에 영향을 주는 것으로 사료된다. 인산염이 첨가된 경우는 항균활성이 낮았으며, 0.5% 이상의 높은 농도의 암모늄 이온이 첨가된 경우에는 효모 세포 성장과 항균활성이 급격히 감

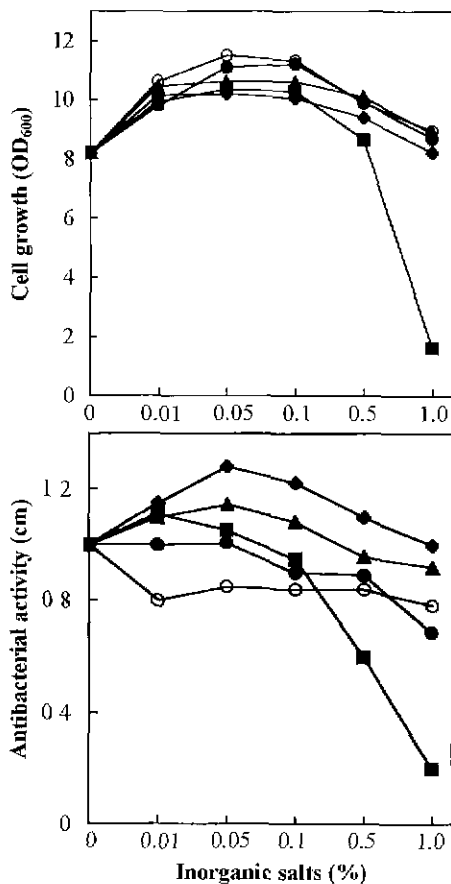


Fig. 5. The effect of inorganic salts on cell growth and antibacterial activity of *S. cerevisiae* 2805 transformant. Yeast cells were grown for 2 days at 30°C in the media containing 0.2% yeast extract, 2% corn steep liquor, 2.5% glucose and each inorganic salt. ■, NH_4CO_3 ; ▲, K_2SO_4 ; ●, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; ◆, CaCO_3 ; ○, KH_2PO_4 .

소하는 것을 볼 수 있었다.

Yeast extract의 영향

최적의 배지 조성에서 yeast extract 영향을 조사하였다. 2% corn steep liquor, 2.5% glucose, 0.05% CaCO_3 로 구성된 배지에 yeast extract를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%의 농도로 첨가하여 비교 실험한 결과 0.4% yeast extract에서 가장 좋은 세포 성장과 defensin 분비를 얻을 수 있었다(Fig. 6).

배양초기 pH의 영향

위에서 결정된 최적의 배지 조성에서 세포의 성장과 defensin의

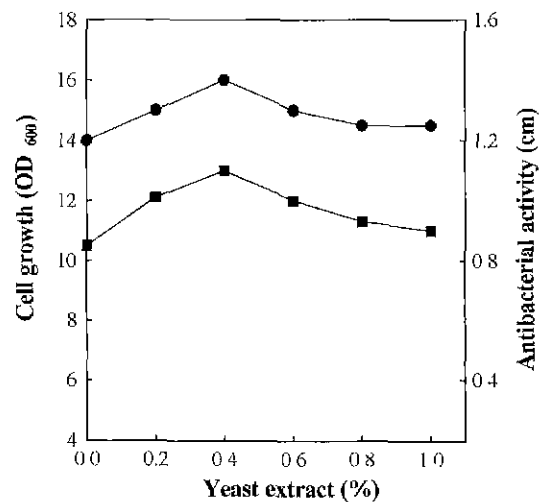


Fig. 6. The effect of yeast extract on cell growth and antibacterial activity of *S. cerevisiae* 2805 transformant. *S. cerevisiae* 2805 cells were grown for 2 days at 30°C in 2% corn steep liquor, 2.5% glucose, and 0.05% CaCO_3 . ■, cell growth; ●, antibacterial activity.

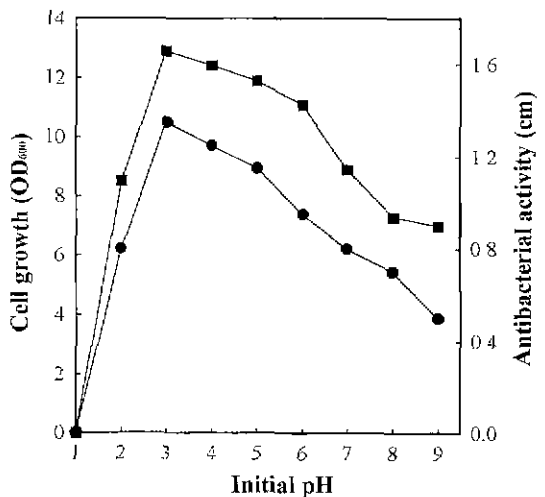


Fig. 7. The effect of initial pH on cell growth and antibacterial activity of *S. cerevisiae* 2805 transformant. *S. cerevisiae* 2805 cells were grown for 2 days at 30°C in 0.4% yeast extract, 2% corn steep liquor, 2.5% glucose, and 0.05% CaCO_3 . ■, cell growth; ●, antibacterial activity.

분비에 가장 좋은 배양초기 pH를 얻기 위하여 1에서 9까지 변화시킨 결과 pH 3에서 가장 좋은 세포성장과 defensin 분비를 보여 주었다 (Fig. 7). 많은 미생물들은 pH 7 근처에서 가장 좋은 성장을 보여주고 있으나, *S. cerevisiae* 2805는 낮은 pH에서 세포성장이 좋으며 재조합 효모세포도 pH 3에서 가장 좋은 성장을 보여 주었다.

온도의 영향

Defensin을 발현하거나 세포 외로 분비하는데 관련된 효소들, 그리고 host의 최적 배양온도에 따라 활성이 달라질 수 있으므로

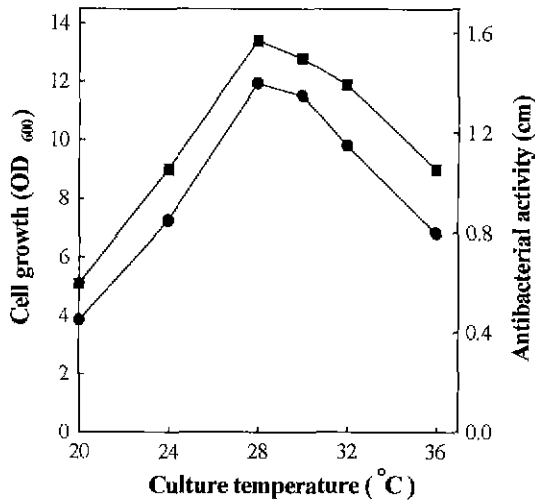


Fig. 8. The effect of growth temperature on cell growth and antibacterial activity of *S. cerevisiae* 2805 transformant. Yeast cells were grown for 2 days in 0.4% yeast extract, 2% corn steep liquor, 2.5% glucose, 0.05% CaCO₃ and initial pH 3. ■, cell growth; ●, antibacterial activity.

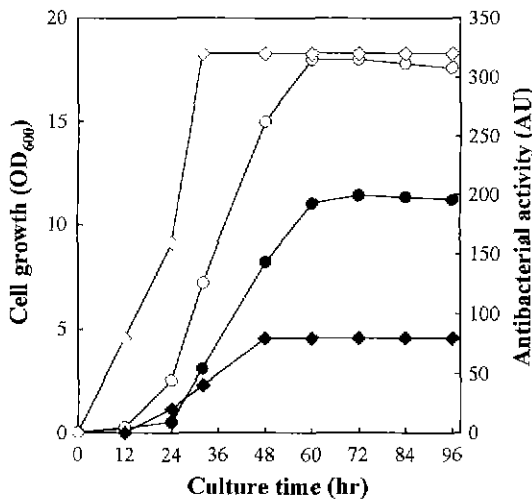


Fig. 9. Comparison of cell growth and antibacterial activity of *S. cerevisiae* 2805 transformant between in YPD and in the optimized medium. YPD (1% yeast extract, 2% glucose, 2% peptone): ●, cell growth; ◆, antibacterial activity. YCDC (0.4% yeast extract, 2.5% glucose, 2% corn steep liquor, 0.05% CaCO₃, initial pH 3, 28°C): ○, cell growth; ◇, antibacterial activity

위에 결정한 최적 배양조성과 초기 pH에서 최적 배양온도를 결정하였다. Fig 8의 그림에서 보듯이 대략 24~30°C 사이에서 세포성장과 항균활성이 좋았고 28°C의 배양온도에서 세포성장과 항균활성이 가장 좋았으며 30°C 이후로는 급격하게 감소되었다. 이러한 결과는 배양상등액의 항균활성은 효모세포의 성장과 밀접한 관련이 있음을 나타낸다.

최적 조건하에서 Defensin의 생산

이상의 실험에서 재조합 효모가 defensin 생산을 위한 최적 조건을 조사한 결과 0.4% yeast extract, 2% corn steep liquor, 2.5% glucose, 0.05% CaCO₃, 배양초기 pH 3, 그리고 배양온도 28°C의 결과를 얻었다. 일반적으로 효모세포 배양에서 사용되는 YPD 배지와 본 연구에서 결정한 최적 배양조건에 대하여 시간 별로 세포성장과 defensin 생산을 비교하여 Fig. 9에 나타내었다. 그 결과 YPD에 비해 약 2배의 세포성장과 약 4배의 defensin 분비를 확인할 수 있었다.

효모는 이종단백질의 생산뿐만 아니라 여러 첨가제로 널리 이용되고 있다. 항균펩티드를 생산하는 재조합 효모를 육종함으로써 현재 널리 이용되고 있는 항생제의 부작용인 체내 잔류 및 내성균주의 출현 등과 같은 단점을 극복할 새로운 유형의, 잔류성이 없는 무공해 항균펩티드의 생산원으로 뿐만 아니라 항생제를 대체할 수 있는 새로운 개념의 사료 첨가제로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부에서 지원하는 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- 1 Barefoot, S.F. and T.R. Klaenhammer 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1808-1815.
- 2 Bevins, C.L. and M. Zasloff. 1990. Peptides from frog skin. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 395-414.
- 3 Boman, H.G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 61-92.
- 4 Cociancich, S., A. Ghazi, C. Hetru, J.A. Hoffmann, and L. Lettlier. 1993. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* 268, 19239-19245
- 5 Dimarcq, J.L., D. Zachary, J.A. Hoffmann, D. Hoffmann, and J.M. Reichhart. 1990. Insect immunity expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and diptericin, in *Phormia terranova*. *EMBO. J.* 9, 2507-2515.
- 6 Dohmen, R.J., A.W. Strasser, C.B. Honer, and C.P. Hollenberg. 1991. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast.* 7, 691-692.
- 7 Ganz, T., M.E. Selsted, D. Szklarek, S.S.L. Harwig, K. Daher, D.F. Bainton, and R.I. Lehrer. 1983. Defensins, Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76, 571-576.

8. Hanzawa, H., I. Shimada., T. Kuzuhara., H. Komano., D. Kohda., F. Inagaki., S. Natori, and Y. Arata 1990. ¹H nuclear magnetic resonance of the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin. *FEBS Lett* 269, 413-420.
9. Kutjan, J. and I. Herskowitz. 1982. Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell* 30, 933-943.
10. Lambert, J., E. Keppi., J.L. Dimareq., C. Wicker., J.M. Reichhart., B. Dunbar., P. Lepage., A. van Dorsselaer., J.A. Hoffmann, J. Fothergill, and D. Hoffmann 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 262-266.
11. Lehuier, R.L., M. Rosenman., S.S. Harwig., R. Jackson, and P. Eisenhauer 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol Methods*. 137, 167-173.
12. Reichhart, J.M., I. Petit., M. Legrain., J.L. Dimareq., E. Keppi., J.P. Lccocq., J.A. Hoffmann, and T. Achstetter. 1992. Expression and secretion in yeast of active insect defensin, an inducible antibacterial peptide from the fleshfly *Phormia terranova*. *Invert Repro Dev* 21, 15-24.
13. Seeboth, P.G., R.A. Warren, and J. Heim. 1992. *In-vitro* cleavage of a fusion protein bound to cellulose using the soluble yscF₁ (*Kex2*) variant. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 37, 621-625.
14. Tajima, M., Y. Nogi, and T. Fukasawa 1985. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL7* gene. *Yeast*. 1, 67-77.

(Received August 14, 2000/Accepted September 5, 2000)

ABSTRACT : Cultural Characteristics of a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for the Improved Production of a Antibacterial Peptide Defensin of Fleshfly

Dae-Ook Kang, Jun-Won Lee, Min-Soo Kim, Bo-Yeon Kim, Won-Keun Oh, Tae-Ick Mheen, and Jong-Seog Ahn*(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, PO Box 115 Yusong, Taejon 305-600, Korea)

A defensin is an inducible antibacterial peptide from a fleshfly and contains 40 residues basic peptide with six cysteines. For the construction of recombinant *S. cerevisiae* expressing defensin, the structural gene coding for active defensin was chemically synthesized and fused in frame to *GAP* promoter, *MFα1* preprosequence and the *GAL7* transcription terminator, generating a recombinant plasmid pGMD18. *S. cerevisiae* 2805 cells were transformed to uracil prototroph by the pGMD18 and the transformed cells showing antibacterial activity against *M. luteus* IAM1056 were selected by growth inhibition zone assay. The optimal culture conditions for the improvement of the defensin production of a selected transformant were investigated. The optimized medium containing 0.4% yeast extract, 2% corn steep liquor, 2.5% glucose and 0.05% CaCO₃ could be determined and the optimum temperature and initial pH could be determined as 28°C and pH 3, respectively. The optimized conditions revealed the twofold increase in the cell growth and the fourfold in the antibacterial activity, compared with the YPD medium.