

박테리오신 leucocin A를 생산하는 *Saccharomyces cerevisiae* 세포의 제작

이 상 현*

신라대학교 생명공학과
마린 바이오 산업화 지원센터

Establishment of a Leucocin A Producing *Sccharomyces cerevisiae* Cell

Sang-Hyeon Lee*

Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Marine Biotechnology Center for Bio-Functional Material Industries, San 1-1, Kwabop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, KOREA

Abstract

In order to establish yeast cells that produce leucocin A, a bacteriocin, the 117 bp leucocin A gene with start and stop codons was synthesized and cloned in pAUR123, a yeast vector. Transformed yeast cells showed antibacterial activity against *Bacillus subtilis*. The leucocin A gene was confirmed by means of PCR methods with plasmid prepared from transformed yeast cells as template and two leucocin A-specific primers. In this results, yeast cells that produce mass amounts of bacteriocin to use as food preservative or antibiotics were established.

Key words – yeast, leucocin A, bacteriocin, *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

제조된 식품을 시중에서 장기간 보존하다보면 부패하기 마련이다. 식품의 보존상의 어려움을 극복하기 위하여 식품 산업업체들이 선택하고 있는 방법으로 식품보존료를 들 수 있는데, 흔히 사용하고 있는 식품보존료로서 안식향산나트륨(sodium benzoate)과 소르빈산칼륨(potassium sorbate)을 들 수 있는데 이들은 탁월한 항균효과를 가지고 있기 때문에 현재 다양한 식품의 보존료로 사용되고 있다. 하지만 이들 물질들은 화학적으로 생산된 보존료이기 때문에, 최근 생활수준의 향상으로 식품에 대하여 이들의 본래의 역할인

영양공급 뿐 만 아니라 그 기능성에도 관심이 고조되고 있는 현재, 소비자들은 점점 화학물질이 첨가되어 있지 않고 천연 원료만으로 제조된 식품을 선호하는 경향이 강해지고 있어 건강보조식품으로서의 기능을 강조하고 있는 식품의 보존료로 쓰기에는 부적합한 것으로 판단된다.

유산균(lactic acid bacteria)은 식품의 발효에 관여하는 중요한 세균이다. 우리조상들은 오래 전부터 야채의 장기보존을 위하여 이를 발효시켜 김치를 만들어 먹었는데, 김치의 발효에 있어서도 *Leuconostoc mesenteroides*라는 유산균이 관여한다. 우유를 원료로 이를 발효하여 저장성과 풍미를 개선한 제품이 유산균음료인 요구르트이다. 이러한 발효식품들의 발효후의 저장성 개선효과의 원인을 조사한 결과, 유산발효에 의한 식품내의 산농도의 증가로 병원성 혹은 부패성 미생물이 생육하기에 부적합한 환경을 만드는 효과와 함께

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-999-5624, FAX : 051-999-5636
E-mail : slee@silla.ac.kr

이들 유산균이 생산하는 항균물질 (antibacterial substance) 에 의한 잡균생육의 저해효과를 확인할 수 있었다[9]. 이들 세균이 생산하는 항균성 물질을 총칭하여 박테리옌 (bacteriocin)이라 한다. 지금까지 다양한 종류의 생물들로부터 많은 종류의 항균성 펩티드들이 발견되었는데, 이들은 다시 이들의 일차구조(아미노산 배열), 합성경향 (리보솜성과 비리보솜성), 합성 후의 수식양상, 입체구조 (선상, 원형, α -나선, β -시트) 등의 특징에 따라 다음의 6종류의 그룹으로 나뉜다. 즉, gramicidins을 포함하는 항생물질 (비리보솜성 합성)[12], nisin을 포함하는 lantibiotics (lantionine을 포함하는 펩티드)[11], 포유동물의 defensin, 개구리의 magainins, 곤충의 cecropins 등을 포함하는 숙주방어펩티드[6], 벌의 독소-melittin을 포함하는 항균활성소유 용혈성 펩티드 [1], 세균성 세포용해제-*Streptococcus aureus* δ -toxin을 포함하는 항균활성소유 용혈성 펩티드[7], lactocins, pediocins 등을 포함하는 박테리옌 (bacteriocin)[10] 등이다.

이들 중, *Lactobacillus lactis*와 이들이 생산하는 박테리옌인 nisin은 오랜 기간동안 식품, 특히 유제품의 보존에 응용해 왔다[4,8,11]. Nisin 은 또한 미국의 FDA로부터 식품첨가물로서의 안정성을 인정받았다[2]. 박테리옌의 이러한 유용성 때문에 현재까지 많은 종류의 미생물들로부터 다양한 종류의 박테리옌들이 발견되고 연구되어져 왔다[5]. 식품에 대한 보존력이 뛰어나고 안정성 또한 확인된 이러한 박테리옌을 실제로 식품을 보존하는데 사용하려면 낮은 단가로 대량공급이 가능해야 한다. 하지만 이들 박테리옌 중 제품화되어있는 것은 nisin 한 종류뿐이다. 이러한 nisin조차도 연구를 목적으로 하는 시약급으로 공급되고 있어 매우 고가이기 때문에 식품에 응용하기가 불가능하다. 또한 박테리옌을 생산하는 균주는 대부분이 유산균으로 이를 직접 사용할 경우 박테리옌 이외에 부산물로 생성되는 젖산이 발효산물에 제품에 산미를 부여하기 때문에 제품의 풍미를 변화시키는 악영향을 미친다. 또한 유전공학적 방법으로 박테리옌 유전자를 클로닝하고 이를 이용하여 박테리옌을 생산할 경우, 생산 산물 자체가 항균성을 나타내기 때문에 대장균과 같은 원핵생물을 생산숙주로 사용할 경우 숙주의 성장을 저해하여 대량생산이 힘들어진다.

식품에 응용 가능한 박테리옌은 크게 2 종류로 나눌 수 있는데, nisin과 같이 펩티드가 합성된 후 구성 아미노산

에 수식이 일어나 lantionine이라는 특수한 아미노산을 가지는 lantibiotic과 pediocin과 같이 합성 후 아미노산에 수식이 일어나지 않는 non-lantionine-containing bacteriocin으로 구성되어 진다. 이들 중, lantibiotic은 이를 생산하는 원래의 미생물인 유산균이 아닌 효모에 그 유전자를 도입하여 생산할 경우 합성 후 아미노산의 수식이 일어나지 않아 제 기능을 할 수 없는 펩티드만 생산하게 된다. Leucocin A와 같이 합성된 후 아미노산의 수식을 필요로 하지 않는 bacteriocin은 이들 유전자를 효모에 도입하여 항균활성을 가지는 효모균을 제작하려는 본 실험의 목적에 적합한 대상이다. 또한 leucocin A의 특징과 일차구조 및 유전자의 염기배열에 관해서는 이미 상세히 연구되어 있다[3,5].

본 연구에서는 부패하기 쉬운 식품들의 보존성을 향상시키거나, 내성이 생긴 병원균의 생육저해를 위한 항생제로 사용하기 위해 유전공학적 기법을 동원하여 효모로 하여금 leucocin A를 생산하게 하여 이를 산업적 생산 공정에 적용할 수 있도록 하려한다.

재료 및 방법

시약 및 배지

제한효소, T4 polynucleotide kinase, DNA ligation kit ver. 2, *Taq* DNA polymerase는 Takara Korea (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

유전자 클로닝을 위한 숙주로는 대장균 세포 (*E. coli* DH5 α)를 사용하였다. 대장균은 LB 배지 (1% bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)를 이용하여 37°C에서 배양하였다. 대장균 형질전환체의 선별을 위해서는 LB 배지에 ampicillin이 최종농도가 100 μ g/ml가 되게 첨가하여 사용하였다. 고체배지는 LB 배지에 한천 (agar)을 1.5%가 되도록 첨가하여 제작하였다.

효모의 배양에는 YPD 배지 (1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% D-glucose)를 사용하였다. 효모의 발현 플라스미드는 alcohol dehydrogenase promoter (ADH)에 의해 발현이 유도되는 pAUR123 (Takara Korea, Seoul Korea)을 사용하였다. 효모의 형질전환에는 yeast transformation system (Clontech, USA)을 이용한 lithium acetate 법을 사용하였다. 형질전환된 효모의 선별에는 YPD 배지에 aureobacidin A (Takara Korea, Seoul Korea)를 최종농도가 0.2

µg/ml가 되게 첨가한 배지를 사용하였다.

박테리옌 유전자의 합성 및 효모발현 플라스미드의 제작 개시코돈과 종지코돈을 포함하는 117 bp 길이의 leucocin A 유전자를 효모발현 벡터에 삽입하기 위해 leucocin A 유전자의 상류부위와 하류부위에 해당하는 oligo DNA를 각각 합성하였다 (Table 1)[3]. Leucocin A 유전자의 용이한 클로닝을 위하여 leucocin A 유전자의 5' 부위에 해당하는 합성 oligo DNA에는 개시코돈인 ATG와 제한효소 *XhoI* 부위를, 3' 부위에 해당하는 합성 oligo DNA에는 종지코돈인 TAA와 제한효소 *XbaI* 부위를 도입하여 제작하였다 (Table 1). 합성된 두 가닥의 oligo DNA들을 서로 annealing하여 이중쇄 DNA를 만들고 이를 인산화시킨다. 각각 절반씩 제작된 leucocin A를 코드하는 이중쇄 유전자 단편들을 효모 발현 벡터인 pAUR123의 *XhoI* 부위와 *XbaI* 부위에 연결한다. 이렇게 제작된 재조합 DNA를 대장균 (DH5a)에 형질 전환시킨 후, 이로부터 플라스미드 DNA를 분리하고 제한효소를 이용하여 재조합 DNA를 확인하였다. 이렇게 제작된 leucocin A를 발현하는 효모용 플라스미드는 pAUR-LeucoA (7,099 bp)라고 명명하였다.

Leucocin A 유전자를 도입시킨 효모세포의 제조

발현 플라스미드 pAUR-LeucoA를 yeast transformation system (Clontech, USA)을 이용한 lithium acetate 법에 의해

Table 1. DNA and amino acid sequences of leucocin A.

5'-TC GAG ATG AAG TAT TAT GGT AAC GGA GTT CAT TGC ACA AAA AGT	44
3'- C TAC TTC ATA TAT CCA TTG CCT CAA GTA ACG TGT TTT TCA	
Met Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val His Cys Thr Lys Ser	13
GGT TGT TCT GTA AAC TGG-GGA GAA GCC TTT TCA GCT GGA GTA	86
CCA ACA AGA CAT TTG ACC CCT-CTT CGG AAA AGT CGA CCT CAT	
Gly Cys Ser Val Asn Trp Gly Glu Ala Phe Ser Ala Gly Val	28
CAT CGT TTA GCA AAT GGT GGA AAT GGT TTC TGG TAA T	-3' 123
GTA GCA AAT CGT TTA CCA CCT TTA CCA AAG ACC ATT AGA TC-5'	
His Arg Leu Ala Asn Gly Gly Asn Gly Phe Trp Trm	38

To insert the leucocin A gene in a yeast vector, oligonucleotides that covered the 111 bp leucocin A gene were synthesized. *XhoI* and *XbaI* sites were introduced at 5'- and 3'-ends of the gene, respectively. Gaps between nucleotides 62 and 66 denote borders of oligonucleotides that synthesized separately.

효모세포 (*Sacchromyces cerevisiae*, ATCC 9763)에 형질전환 시켰다. 형질전환이 이루어진 효모세포는 YPD 배지에 aureobacidin A (최종농도 0.2 µg/ml)가 첨가된 선별배지에 접종하여 30°C에서 3일간 배양하였다.

Leucocin A를 생산하는 형질전환 효모세포의 항균활성 측정

식품의 부패에 관여하는 고초균 (*Bacillus subtilis*, ATCC 6633)을 LB 배지를 이용하여 30°C에서 하룻밤 배양하고 사용직전에 이를 100배로 희석하였다. 이 균의 희석액을 aureobacidin A (최종농도 0.2 µg/ml)를 첨가한 YPD 고체배지에 도말하였다. 여기에 paper disc를 놓고 leucocin A 유전자를 도입한 효모 배양액과 아무런 조작을 가하지 않은 일반 야생효모 배양액을 100 µl 씩을 paper disc에 접종하였다. 이를 30°C에서 하룻밤 동안 배양한 후 항균작용에 의해 형성된 생육억제환(clear zone)을 비교·관찰하였다.

형질전환 효모로부터 플라스미드 DNA의 분리 및 leucocin A 유전자의 확인

형질전환 효모를 aureobacidin A (최종농도 0.2 µg/ml)를 첨가한 YPD 배지 4 ml에 접종하여 30°C에서 하룻밤 동안 배양한 후, 원심분리(14,000 xg, 5분)하여 균체를 회수하였다. 여기에 yeast lysis buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 10 mM tris-HCl (pH 8.0) buffer, 1 mM EDTA)를 200 µl을 넣어 균체를 현탁한 후, acid-washed glass beads (425-600 m, Sigma #G-8772) 0.3 g과 phenol/CHCl₃ 용액 200 µl를 넣고 2분간 vortex하였다. 이것을 원심분리(14,000 xg, 10분)하여 상등액을 새로운 tube에 옮기고, 여기에 glycogen 1 µl, 5 M LiCl 용액 20 µl, 차가운 에탄올 500 µl를 넣은 후, 원심분리(14,000 xg, 10분)하여 플라스미드 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 차가운 70% 에탄올로 세정한 후 건조시키고, 초순수 20 µl에 녹였다.

효모로부터 회수된 플라스미드 DNA의 확인은 leucocin A에 특이적인 primer를 이용한 PCR(polymerase chain reaction) 법으로 행하였다. 회수된 플라스미드 DNA 50 ng 과 leucocin A에 특이적인 primer인 Leuco4-F (23 mer, 5'-CTCGAGAAGTATTATGGTAACGG-3')와 Leuco5-R (26 mer, 5'-GGGCCCTTACCAGAAACCATTTCAC-3')을 각각 10 pmol씩 사용하여 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응산

물은 2%의 agarose gel에 전기영동하여 그 위치를 확인하였다.

결과 및 고찰

Leucocin A 유전자의 합성

Leucocin A 유전자의 일차구조는 이미 보고되어 있지만 이 유전자를 클로닝하려면 leucocin A를 생산하는 *Leuconostoc gelidum* UAL 187 균주를 구입하고 배양한 후 이 균주로부터 추출한 DNA를 주형으로 leucocin A의 유전자 부위를 인식하는 primer DNA를 합성하여 PCR법으로 증폭하거나 Southern hybridization법으로 이 유전자부위를 검출해내어야 한다. 이러한 방법은 매우 번거롭고 힘든 작업이라 할 수 있다. 하지만 다행히도 이 박테리오신은 아미노산 37개로 구성된 짧은 펩티드이기 때문에 이를 DNA로 환산하면 111 bp 정도의 길이에 지나지 않는다. 최근 oligo DNA의 합성기술의 발달로 100 bp 정도의 길이의 DNA는 쉽게 합성이 가능하기 때문에 박테리오신 유전자의 전후 부위를 60 bp 정도씩 나누어서 합성한 후, 이들을 서로 DNA 연결효

소로 연결하여 이 유전자를 클로닝할 수 있다. 합성된 두 가닥의 oligo DNA를 서로 annealing하여 얻어진 이중쇄 DNA를 효모발현 벡터인 pAUR123의 제한효소 *XhoI-XbaI* 부위에 삽입하여 효모발현 플라스미드를 얻었다 (Fig. 1). 이러한 방법으로 유산균의 일종인 *L. gelidum* UAL 187 유래의 leucocin A 유전자의 합성에 성공하였다. Leucocin A는 모두 117 bp 길이의 염기로 되어 있으며 아미노산 37개로 구성되어 있다 (Table 1).

Leucocin A를 생산하는 형질전환 효모의 제작

효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 YPD 배지 4 ml에 배양한 후, TE로 효모를 세정하여 집균한 후, leucocin A의 효모발현 플라스미드로 형질전환시켰다. 이렇게 제작된 leucocin A를 생산하는 효모는 선별배지인 aureobacidin A (최종농도 0.2 µg/ml)를 포함하는 YPD 배지에서 선별하였다. 그 결과, leucocin A 발현 유전자가 도입된 형질전환 효모를 얻었다. 형질전환 효모의 효과적인 선별을 위하여 선별 마커로 사용되는 aureobacidin A의 최종농도를 0.1 µg/ml에서 0.5 µg/ml까지 다양하게 하여 형질전환 효모 콜로니의 형성

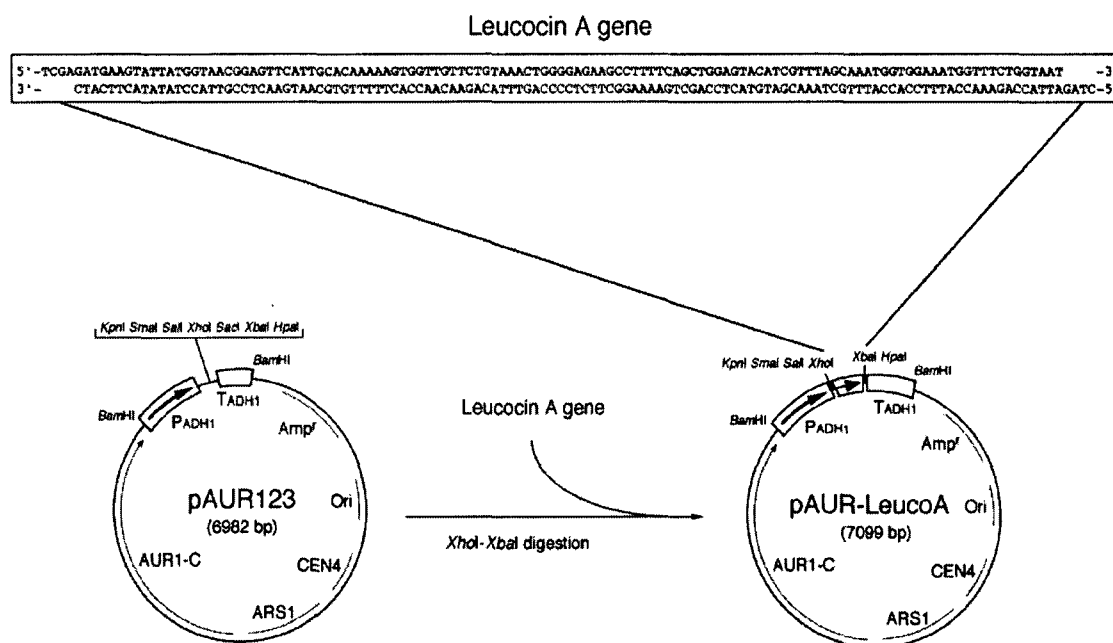


Fig. 1. Construction of the yeast expression plasmid for leucocin A.

Annealed DNA for leucocin A gene was inserted in *XhoI-XbaI* sites of pAUR123 vector. Nucleotide sequence of the leucocin A gene was shown. AUR1-C; *S. cerevisiae* aureobasidin A resistant gene, PADH1; *S. cerevisiae* ADH1 gene promoter, TADH1; *S. cerevisiae* ADH1 gene termination signal, ARS; *S. cerevisiae* replication origin, CEN; *S. cerevisiae* centromire, Amp^r; *E. coli* ampicillin resistant gene, Ori; *E. coli* replication origin.

효율을 검토하였다. 그 결과, 이 연구에서 사용한 효모의 경우는 aureobacdin A의 최종농도가 0.2 µg/ml에서 가장 효과적으로 형질전환 콜로니를 형성하였다. Aureobacdin A의 최종농도가 너무 낮으면 콜로니 형성은 원활하지만 형질전환되지 않은 야생효모의 콜로니의 형성빈도가 높아지고, 최종농도가 너무 높으면 콜로니 형성이 되지 않거나 형성에 많은 시간을 요한다는 사실을 확인할 수 있었다.

형질전환 효모의 leucocin A 생산능의 확인

부패균의 일종인 고초균(*Bacillus subtilis*)을 액체배지에 배양한 후, 이를 aureobacdin A (최종농도 0.2 µg/ml)를 포함하는 YPD 고체배지 전체에 접종하였다. 여기에 야생효모와 형질전환 효모를 일정부위에 접종하여 항균활성에 의해 생성된 생육억제환(clear zone)을 비교·분석한 결과, 플라즈미드가 도입된 효모만이 고초균의 생육을 효과적으로 억제하는 것이 확인되었다 (Fig. 2).

형질전환 효모로부터 분리된 플라스미드로부터 leucocin A 유전자의 확인

형질전환된 효모로부터 leucocin A 유전자를 포함하는 플라스미드 DNA를 분리하였고, 이를 이용하여 leucocin A 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 행한 결과, leucocin A 유전자에 해당하는 약 120 bp의 유전자 단편이 확인되었다 (Fig. 3). 이 결과로 형질전환 효모가 나타내는 고초균에 대한 항균활성이 효모 자체에 의한 항균활성이 아닌 형질전환에 의해 도입된 leucocin A 발현 플라스미드에

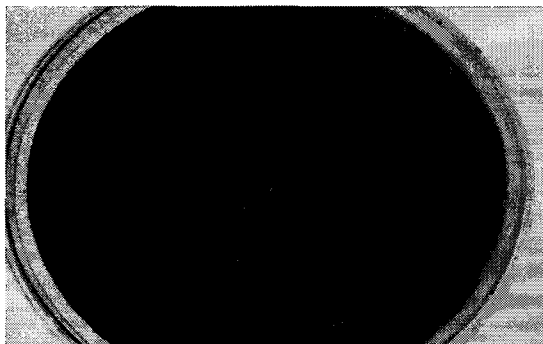


Fig. 2. Confirmation of the antibacterial activity against *B. subtilis*.
A; Yeast transformed by leucocin A expression plasmid.
B; Wild-type yeast.

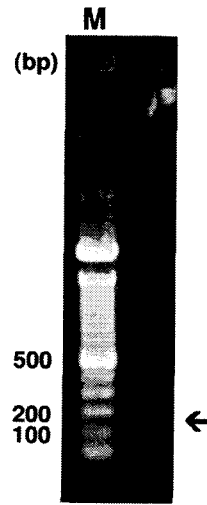


Fig. 3. Confirmation of the leucocin A gene from transformed yeast.
M; size marker, An arrow denotes the 117 bp leucocin A gene which amplified by PCR. 2% agarose gel was used.

의한 것이라는 사실을 확인할 수 있었다. 이 연구의 결과로 부패하기 쉬운 식품들의 보존성을 향상시키거나, 내성이 생긴 병원균의 생육을 저해하기 위한 항생제로 사용할 수 있는 박테리오신을 산업적으로 대량생산할 수 있는 효모세포를 제작하였다. 재조합 DNA 기술을 이용하여 유용 유전자 산물의 효율적인 생산을 위해서는 대상 유전자 산물인 단백질의 특성에 따라 사용하는 숙주(host)를 잘 선택해야 한다. 이 연구의 대상인 leucocin A는 세균의 생육을 억제하는 항균활성을 가지는 단백질이기 때문에 대장균과 같은 세균세포를 생산숙주로 이용할 경우 생산이 불가능한 경우가 많다. 이 연구에서 사용한 생산숙주인 효모의 경우는 박테리오신에 의해 생육 저해를 받는 원핵생물과는 달리 진핵생물이지만 배양이 용이하며 생육속도가 비교적 빠르기 때문에 특수한 유전자 산물을 생산하는데 자주 사용되는 숙주세포이다.

요 약

박테리오신의 일종인 leucocin A를 생산하는 효모의 제작을 위하여 117 bp 길이의 개시코돈과 종지코돈을 포함하는 leucocin A 유전자를 합성하여 효모운반체인 pAUR123에 클로닝하였다. 형질전환된 효모는 부패균의 일종인 고초균

(*Bacillus subtilis*)에 대해 항균활성을 나타냈다. 형질전환 효모로부터 분리한 플라스미드를 주형으로 하고 leucocin A에 특이적인 primer들을 이용하여 PCR 반응을 행한 결과, 효모에 도입된 leucocin A 유전자를 확인할 수 있었다. 이 연구의 결과로 부패하기 쉬운 식품들의 보존성을 향상시키거나, 내성이 생긴 병원균의 생육을 저해하기 위한 항생제로 사용할 수 있는 박테리오신을 산업적으로 생산할 수 있는 효모세포를 제작하였다.

참 고 문 헌

1. Dempsey, C. E. 1990. The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1031**, 143-161.
2. Federal register. 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Regist.* **54**, 11247-11251.
3. Hastings, J. W., M., Saiter, K., Johnson, K. L., Ray, J. C., Vederas and M. E., Stiles. 1994. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* **173**, 7491-7500.
4. Hugenholtz, J. and G. J. C. M., de Veer. 1991. Application of nisin A and Z in dairy technology, p. 440-447, *Nisin and novel lantibiotics*. (Jung, G. and Sahl, H.-G. eds), Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.
5. Jack, R. W., J. R., Tagg and B., Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**, 171-200.
6. Maloy, W. L. and U. P., Kari. 1995. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* **37**, 105-122.
7. Mellor, I. R., D. H., Thomas and M. S. P., Samson. 1988. Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim. Biophys. Acta* **942**, 280-294.
8. Molitor, E. and H.-G., Sahl. 1991. Application of nisin: a literature survey. p. 434-439. *Nisin and novel lantibiotics*. Escon Publishers, Leiden, The Netherlands.
9. Ray, B and M, Daeschel. 1992. Food biopreservatives of microbiological origin. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla; Stiles, M. E. and Hastings, J. W. (1991) Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.* **2**, 247-251.
10. Ray B, R, Schamber and K. W. Miller. 1999. The pediocin AcH precursor is biologically active. *Appl Environ Microbiol.* **65**, 2281-2286.
11. Wiedemann I, E, Breukink, C, van Kraaij, O. P., Kuipers, G., Bierbaum, B., de Kruijff and H. G., Sahl. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem.* **276**, 1772-1779.
12. Zuber, P., M. M., Nakano and M. A., Marahiel. 1992. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. *Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics* (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds) pp. 897-916, American Society for Microbiology, Washington D. C.

(Received June 26, 2003; Accepted October 17, 2003)