

Trp, Thr Analogue 복합 저항성 *Saccharomyces cerevisiae* 균주 개발

염형준¹ · 이승현¹ · 김선혜¹ · 선남규¹ · 안길환¹ · 이봉덕² · 원미선³ · 송경빈^{1*}

¹충남대학교 식품공학과

²충남대학교 축산학과

³한국생명공학연구원

Isolation of Trp, Thr Overproducing Strain of *Saccharomyces cerevisiae*

Hyoungjun Youm¹, Seunghyun Lee¹, Sunhye Kim¹, Namkyu Sun¹, Gihwan An¹,
Bongduk Lee², Misun Won³ and Kyung Bin Song^{1*}

¹Dept. of Food Science & Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Dept. of Animal Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

Abstract

To isolate a mutant which overproduces threonine and tryptophan, mutants of *Saccharomyces cerevisiae* were screened after UV and EMS mutagenesis. Hydroxynorvaline, a Thr analogue was used for selection of a Thr-overproducing mutant after UV mutagenesis. Among 31 mutants, TC 5-1 was selected as the strain candidate, based on amino acid analysis. TC 5-1 was then treated by EMS mutagenesis for Trp overproduction. Eight mutants were selected using fluorotryptophan for Thr and Trp overproducing strains. Amino acid analysis results showed that TC 6-1 was the best strain since it had the highest amount of Thr and Trp among mutants.

Key words: amino acid analogue, *Saccharomyces cerevisiae*, threonine, tryptophan

서 론

아미노산은 제과업계 등 식품산업에 있어 영양소뿐만 아니라 식품첨가물로 많이 사용되고 있다(1). 최근 아미노산 음료는 국내외에서 출시되고 있으며 특히 Thr과 Trp은 필수 아미노산으로 동물 사료에 있어 부족하기 쉬운 대표적인 아미노산 중에 속한다. 특정 아미노산의 양산을 위한 *Saccharomyces cerevisiae* 등 미생물 균주 개량을 통한 연구가 많이 수행되어 왔다(2). 효모는 단백질과 비타민의 주요 공급원인데 아미노산이 강화된 효모가 영양가를 높이기 위해 시리얼 및 제과 품목 등에 첨가된다(3). 특히 threonine과 tryptophan은 곡류의 제한 아미노산으로서 영양가치, 맛, 기능성 등의 이유로 인하여 제과 분야에서 많이 사용되고 있다. 효모 중 *Saccharomyces cerevisiae*는 빵, 맥주, 포도주 산업 등에서 많이 사용되는 효모이고 제빵업계에서 새로운 효모 균주 개발(3) 및 아미노산 analogue를 이용하거나(4-9) 유전자재조합 기술을 통한 특정 아미노산을 대량 제조하는 효모 균주 개발에 관한 연구(10,11)가 보고되어 왔다.

효모로부터 특정아미노산을 과잉생산하기 위한 방법으로서는 효모를 특정 아미노산의 analogue들에 대하여 저항성을

갖도록 하는 방법이 있다. 이런 방법의 원리는 특정 아미노산에 대한 아미노산 analogue가 포함된 배지에서 미생물을 배양하게 되면 효모는 특정 아미노산을 대신하여 외부 analogue를 사용하여 단백질 대사 등을 수행하게 된다. 이 결과로 효모는 생합성된 효소나 단백질이 제 역할을 수행하지 못하게 되어 사멸하게 된다 (9). 따라서 효모가 특정 analogue에 대한 저항성을 갖는다는 것은 그 analogue에 대응하는 아미노산을 과잉생산한다는 것을 의미하는 것이다.

본 연구에서는 threonine, tryptophan을 overproducing하는 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 개발할 목적으로 threonine, tryptophan analogue에 저항성을 갖는 균주를 선별하고자 하였다. 특히 이미 안전성이 확보된 미생물인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하였으며 mutagenesis 방법 (12)으로는 ultra violet(UV)와 ethyl methane sulfonate (EMS)를 사용하였다.

재료 및 방법

균주 및 amino acid analogue의 선정

본 연구에서 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*

*Corresponding author. E-mail: kbsong@cnu.ac.kr
Phone: 82-42-821-6723, Fax: 82-42-825-2664

X2180 mating type(α)를 사용했고 배지는 SD minimal 배지 (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 0.023% proline, 2% glucose)를 사용하였다. 아미노산 analogue를 선정하기 위해 tryptophan analogue로 알려진 indole, indoleacrylic acid, fluorotryptophan과 threonine analogue로 알려진 serine, hydroxynorvaline에 대한 균주의 저항성을 측정하였다. 예비 실험 결과, tryptophan analogue에서는 fluorotryptophan, threonine analogue에서는 hydroxynorvaline에서 성장 저해가 나타났으므로 본 실험에서는 이 두 analogue를 사용하였다.

Thr analogue의 minimum inhibitory concentration (MIC) 측정

아미노산 analogue에 대한 균주의 sensitivity를 측정하기 위해 disk diffusion test 이용하였다. Thr에 대한 analogue인 hydroxynorvaline의 MIC test는 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 1% 접종한 top agar(0.75%) plate에 paper disk를 올려놓은 후, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM의 hydroxynorvaline 30 μ L로 paper disk를 충분히 적시고 32°C에서 배양한 후 생육 저지대를 관찰함으로써 MIC를 결정하였다.

UV mutagenesis 및 Thr analogue 저항성 균주 screening

아미노산 analogue에 저항성을 갖는 효모 균주의 생성을 위해 본 실험에서는 UV 조사를 이용한 mutation 방법을 사용하였다. UV 조사 조건을 설정하기 위한 생존율 측정을 위해 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 1×10^7 cell/mL의 농도 (OD=0.5)가 되도록 배양한 후 254 nm의 UV 파장에서 50, 100, 200, 500, 1000 J/m²로 조사하였다. UV 조사된 효모 균주는 10 mM hydroxynorvaline이 포함된 배지에 도말하여 생존 균주를 선별하였으며 control로써는 UV가 조사되지 않은 wild type의 효모 균주를 비교하였다. 실험 결과 생육이 가능한 colony를 분리하여 enriched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD-proline 배지에 각각 patch하여 성장속도를 비교하였다. 성장속도의 비교 결과, 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 균주를 선택하여 다음 실험에 이용하였다.

선정된 균주의 Trp analogue에 대한 MIC 측정

균주의 생육 저지대를 측정하기 위해 disk diffusion test를 이용하였다. 선정 균주를 1% 접종한 top agar(0.75%) plate에 paper disk를 올려놓은 후, 0.1 mM, 0.15 mM, 0.2 mM 농도의 fluorotryptophan 30 μ L로 paper disk를 충분히 적시고 32°C에서 배양한 후 생육 저지대를 관찰하여 MIC를 측정하였다.

Trp analogue에 대한 EMS mutagenesis

선정된 TC 5-1 균주를 OD₆₀₀ = 1.0 정도 되도록 배양하고 3,000 rpm에서 15 min간 원심분리한 후 멸균된 3차 증류수로 3번 세척하였다. 최종 세척이 끝나면 3차 증류수로 다시

부유시켜 EMS 5%로 15분간 반응시키고 10% sodium thio-sulfate를 넣어 반응을 정지하였다. 반응이 정지된 실험구를 원심분리하여 상등액을 버리고 3차 증류수로 2번 세척하고 생성된 mutant를 2.0 mM fluorotryptophan analogue 배지에 도말하였다. EMS 처리된 균주는 2.0 mM fluorotryptophan 이 포함된 SD-proline 배지에 도말하여 analogue 저항성 균주를 선별하였다. 본 실험의 대조구로 EMS 처리가 되지 않은 균주를 비교 실험하였다. Analogue가 포함된 배지에서 생육이 가능한 colony를 분리하였으며, 분리된 8개의 colony는 enriched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD-proline 배지에 각각 patch하여 성장속도를 비교하였다. 성장속도의 비교 결과, 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 균주를 선택하였다.

Amino acid analysis

선정된 균주로부터 생성되는 amino acid의 함량을 측정하기 위해 HPLC Pico-tag detection system을 이용하여 분석하였다. 순수한 20개의 아미노산을 이용하여 standard curve를 만들어 Thr, Trp의 retention time을 측정 후 균주의 아미노산 분석 결과와 비교하여 분석하였다. Standard curve는 순수한 아미노산 Asp, Trp, Tyr 0.1%, 나머지 17가지는 1% 농도를 사용하여 작성하였다.

균주의 전처리 과정으로 선택된 균주를 OD₆₀₀가 1.0이 되도록 배양한 후 원심분리를 통해 pellet을 분리하였다. 분리된 pellet은 lysis buffer에 부유시킨 후 동량의 glass beads를 넣어 vortexing하고 원심분리를 통하여 상등액을 취해 intracellular amino acid 함량을 측정하였다. 각각의 시료는 total amino acid 분석을 위해 24시간동안 110°C, constant boiling HCl로 처리 후 분석하였으며, tryptophan의 함량을 분석하기 위한 전처리 과정으로는 methanesulfonic acid를 사용하였다.

HPLC의 이동상으로는 0.14 M sodium acetate buffer(0.5 mL/L TEA, 60 mL/L acetonitrile with titration glacial acetic acid at pH 5.9)를 사용하였으며 용매는 60% acetonitrile을 사용하였다. Column은 Waters Pico-Tag column으로 크기는 3.9 mm \times 300 mm, 입자는 5 μ m이다. Detector는 UV-visible absorbance detector로 파장은 254 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

Thr analogue의 MIC 측정

Thr analogue에 대한 실험 결과 2.5 mM hydroxynorvaline의 농도에서 생육 저지대가 관찰되었다(Fig. 1). 따라서, 본 연구에서는 analogue 저항성 균주의 screening은 wild type의 MIC 농도보다 높은 농도인 10 mM hydroxynorvaline을 이용하였으며 이 농도에서 wild type은 뚜렷한 생육저지대를 나타냈다.

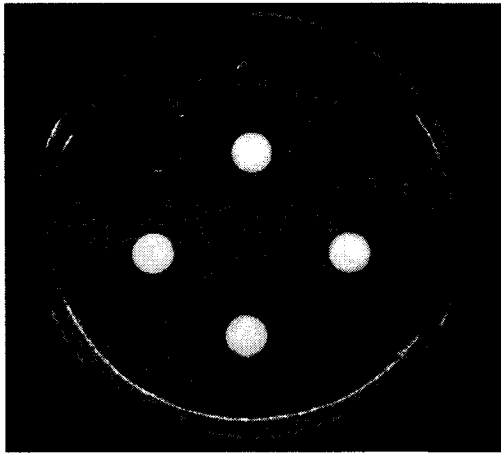


Fig. 1. Sensitivity of wild type yeast cells to hydroxynorvaline.

The wild type yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae* X2180) in log-phase were mixed with 1% agar and poured on the SD minimal plate (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate and 2% glucose) containing 0.023% proline. The discs containing different concentrations (0, 1, 2.5, 5, 10 mM) of hydroxynorvaline were placed on the top agar layer containing yeast cells and growth inhibitions by hydroxynorvaline were examined.

A, control; B, 1 mM; C, 2.5 mM; D, 5 mM.

UV mutagenesis 및 Thr analogue 저항성 균주 screening

UV 조사 생존율을 측정 결과(Fig. 2), UV mutagenesis 조건으로 50%균을 사멸하는 500 J/m^2 로 정하였다. UV 조사에 의해 10 mM hydroxynorvaline이 포함된 배지에서 생육이 가능한 콜로니들을 분리하였고 enriched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD-proline 배지에 각각 patch하여 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 31 균주 중 아미노산 분

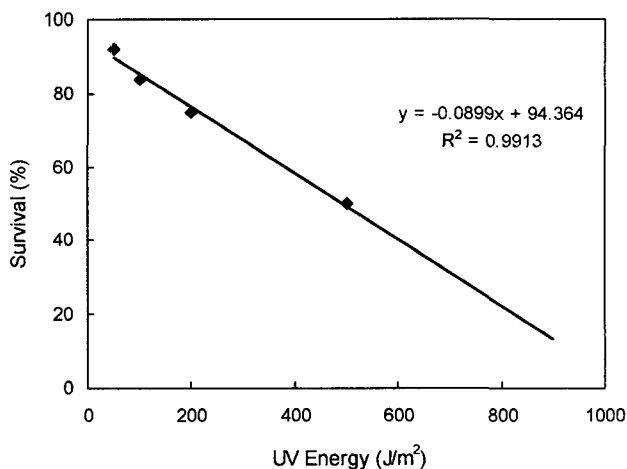


Fig. 2. Survival rate of yeast cells by UV irradiation. The wild type yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae* X2180) in log-phase were irradiated with UV at different levels of energy (50, 100, 200, 500, 1000 J/m^2), and plated onto YPD rich plate (1.0% yeast extract, 0.5% peptone, and 2% glucose). The survival rate was calculated by counting the colonies on the plate.

석 결과에 의해 최종 선정 균주로서 TC 5-1를 결정하였다.

Trp analogue에 대한 MIC 측정

Trp analogue에 대한 선정 균주(TC5-1)의 sensitivity 측정 결과, 0.1 mM fluorotryptophan의 농도에서부터 생육 저지대가 관찰되었다(Fig. 3). 따라서 본 실험에서 tryptophan analogue 저항성 균주의 screening은 MIC 농도보다 높은 농도인 2.0 mM fluorotryptophan을 이용하였으며 이 농도에서 선정 균주 TC 5-1은 뚜렷한 생육 저지대가 나타났다(Fig. 3).

EMS 처리된 Thr mutant의 Trp analogue 저항성 균주 screening

선정된 균주 TC 5-1로부터 ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis를 통해 2차 mutation을 시켜 Trp analogue에 저항성을 갖는 균주를 찾아냄으로써 Thr, Trp을 동시에 over-production하는 최종 복합성 저항 균주를 개발하고자 하였다. 효모의 일반적인 mutagen으로는 EMS, UV 조사, nitrous acid, diethyl sulfate, N-methyl-N'-nitrosoguanidine(MNNG) 등을 들 수 있는데(12), 이 중 효모 mutation에 가장 많이 사용되고 있는 EMS는 alkylating agent로 DNA 염기에 작용하여 mis-pair를 일으켜 point mutation을 일으킨다. EMS 처리를 하게 되면 keto form의 guanine이 O⁶부분에 alkylation되면서 enol form으로 구조가 변화하게 되고 DNA replication 후 cytosine 대신에 thymine이 결합하게 돼 base pair가 바뀌게 된다(Fig. 4)(12). EMS 처리한 TC 5-1 균주를 2.0 mM fluorotryptophan이 포함된 배지에 도말하여 생존 균주를 선별하였으며 EMS 처리되지 않은 parent cell인 TC 5-1을 control로써 비교 실험하였다. 실험 결과, EMS 처리에 의해 2.0 mM fluorotryptophan이 포함된 배지에서 생육이 가능한 colony들을 분리하였으며, 이들을 enri-

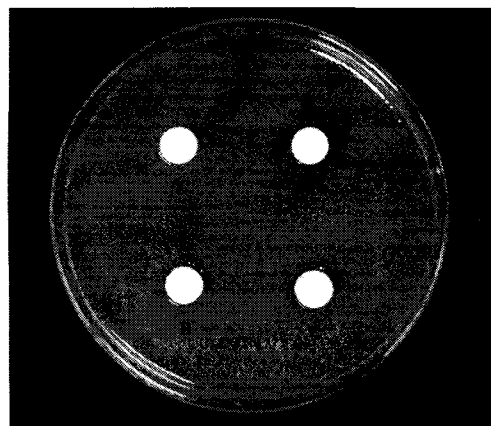


Fig. 3. Resistance of mutant TC 5-1 to fluorotryptophan. *Saccharomyces cerevisiae* mutant TC 5-1 was mixed with 1% agar and overlaid on the SD minimal plate containing 0.023% proline. The discs containing fluorotryptophan were placed on the top of agar layer containing yeast cells. A, control; B, 0.1 mM; C, 0.15 mM; D, 0.2 mM.

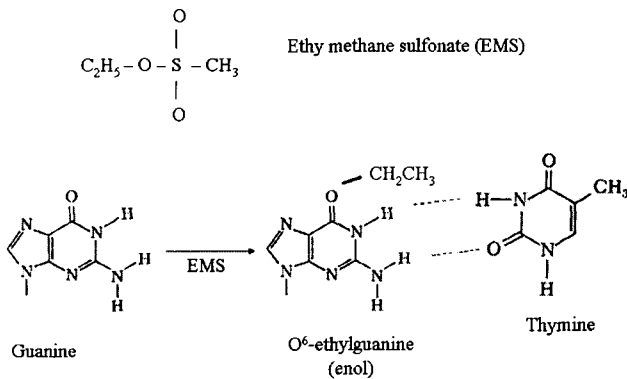


Fig. 4. Structural change of guanine and mis-pair with thymine by EMS treatment.

ched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD-proline 배지에 각각 patch하여 성장속도를 비교하였다. 성장속도의 비교 결과, 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 8개 균주를 선택하여 배양한 후 HPLC를 이용하여 아미노산 분석을 하였다. 본 연구에서 사용한 analogue screening method는 mutant의 특정 아미노산 over-producing 여부를 확인하기 위한 가장 빠르고 편리한 방법으로 analogue가 포함된 배지에서 cell을 키울 때 아미노산 대신 analogue가 단백질 대사에 관여하여 단백질이 제 역할을 수행하지 못하게 됨으로써 미생물이 정상적으로 생육하지 못하게 된다(9). 따라서 analogue가 포함된 배지에서 생육하는 효모의 경우 해당 아미노산을 over-producing하게 된다.

Screening된 mutant의 Trp, Thr 함량 측정

선정된 8개의 복합 저항성 균주로부터 생성되는 아미노산의 함량을 Pico-tag detection method를 이용하여 HPLC로 분석하였다. Analogue plate에서 screening 된 8개의 mutant들은 HPLC로 아미노산 분석을 통해 다시 2차적으로 screening 되었으며 8개의 EMS mutant 중 wild type에 비해 Trp, Thr의 함량이 가장 높은 TC 6-1을 최종 균주로 선정하였다. 복합 저항성 균주로서 개발된 mutant와 wild type의 intracellular에 대한 Trp, Thr의 함량 분석 결과는 Table 1과 같다. Mutagenesis에 의해 선정된 효모 균주는 Thr이 Trp보다 효과적으로 overproduce 함을 알 수 있었다. 본 연구에서는 Thr, Trp 등 필수 아미노산을 overproducing하는 균주를 개발하여 특정 아미노산을 많이 생산하는 균주로부터 이들 아미노산을 추출하지 않고 그대로 건조·가공하여 균체 자체를 이용할 수 있다. 현재까지 복합 저항성 균주는 여러 가지 어려움으로 인해 개발된 적이 없었다. 본 연구에서 처음으로 시도되어 개발된 TC 6-1은 Thr과 Trp이 intracellular에서 4.83, 1.85배 각각 많이 생산되었다(Table 1).

선정된 균주 TC 6-1의 생육특성

미생물의 성장형태는 일반적으로 유도기(lag phase), 대수기(exponential phase), 정상기(stationary phase), 사멸기

Table 1. Amount of Thr, Trp produced by the wild type and mutants (unit: µg/DCWmg)

Cell	Intracellular accumulation in the cell		Ratio of mutant/wild	
	Threonine	Tryptophan	Threonine	Tryptophan
Wild, S7964	0.12	0.07	-	-
TC 6-1	0.58	0.13	4.83	1.85
TC 6-2	0.10	0.03	0.83	0.43
TC 6-3	0.21	0.19	1.75	2.71
TC 6-4	0.12	0.09	1	1.28
TC 6-5	0.33	0.10	2.75	1.43
TC 6-6	0.14	0.16	1.16	2.28
TC 6-7	0.25	0.14	2.08	2
TC 6-8	0.12	0.09	1	1.28

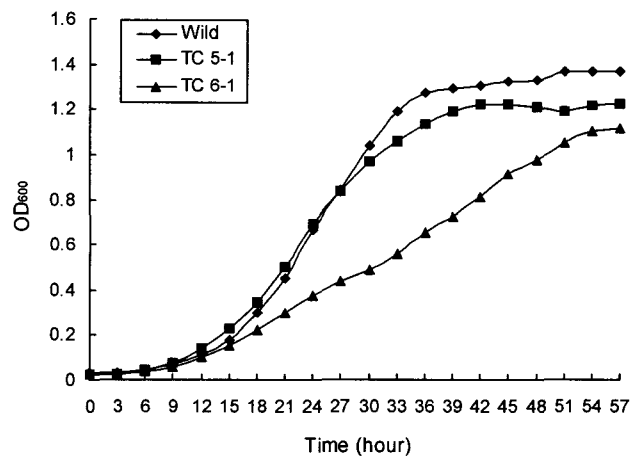


Fig. 5. Growth curve of the wild type strain and the mutants. *Saccharomyces cerevisiae* wild type and mutants were grown in YPD media and the absorbances at 600 nm were determined during culture.

(death phase)의 4단계로 나뉘어 지는데, 이 중 미생물이 폭발적으로 증식하여 개체가 빠르게 증가하는 대수기에서 1차 대사 산물인 Thr, Trp이 가장 활발히 생성되는 것으로 생각된다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 wild type인 S7964는 36 hr, mutant TC 5-1은 42 hr, 복합 저항성 균주인 TC 6-1은 54 hr만에 정지기에 도달했다. UV와 EMS에 의해 효모가 mutation되면서 점차 대수기가 길어졌는데 이로 인하여 cell의 내부에 Thr, Trp을 accumulation할 수 있는 시간이 더 길어졌기 때문에 사료되며 wild type에 비해 TC 6-1은 Thr, Trp이 각각 4.83, 1.85배 높은 intracellular accumulation이 이루어졌음을 알 수 있었다.

요 약

Thr, Trp을 overproduce하는 효모 균주를 분리하기 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 UV와 EMS로 mutagenesis 한 후 screen하였다. Thr analogue인 hydroxynorvaline이 UV mutagenesis 후 Thr overproducing 하기 위해 사용되었다. 31 mutant 중 아미노산 분석 결과에 의해 TC 5-1이 선정되었고 다시 Trp overproducing 위해 EMS mutagenesis 하

였다. 8개의 mutant가 flurotryptophan을 이용하여 Thr, Trp을 overproduce하는 mutant로 선정되었다. 아미노산결과에 의해 그 중 TC 6-1이 최종 효모 균주로 선정되었다.

감사의 글

본 연구는 농림기술관리센터의 연구비 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문헌

1. Farfan MJ, Calderon IL. 2000. Enrichment of threonine content in *Saccharomyces cerevisiae* by pathway engineering. *Enzyme Microbial Technol* 26: 763-770.
2. Riccardi G, Sora S, Ciferri O. 1981. Production of amino acid by analog-resistant mutants of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J Bacteriol* 147: 1002-1007.
3. Rincon AM, Benitez T. 2001. Improved organoleptic and nutritive properties of bakery products supplemented with amino acid overproducing *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *J Agric Food Chem* 49: 1861-1866.
4. Martinez-Force E, Benitez T. 1992. Selection of amino-acid overproducer yeast mutants. *Curr Genet* 21: 191-196.
5. Martinez-Force E, Benitez T. 1992. Changes in yeast amino acid pool with respiratory versus fermentative metabolism. *Biotech Bioeng* 40: 643-649.
6. Moller A. 1994. L-Tryptophan production from anthranilic acid by amino acid auxotrophic mutants of *Candida utilis*. *Process Biochem* 29: 521-527.
7. Suzzi G, Pomano P, Polsinelli M. 1998. Isolation and characterization of mutants resistant to amino acid analogues obtained from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *W J Microbiol Biotechnol* 14: 243-246.
8. Gasent-Ramirez JM, Benitez T. 1998. Lysine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast isolated in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 63: 4800-4806.
9. Ramos C, Calderon IL. 1992. Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl Environ Microbiol* 58: 1677-1682.
10. Delgado MA, Guerrero JA, Conde J. 1982. Genetic and biochemical study of threonine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2: 731-736.
11. Farfan MJ, Aparicio L, Calderon IL. 1999. Threonine overproduction in yeast strains carrying the HOM3-R2 mutant allele under the control of different inducible promoters. *Appl Environ Microbiol* 65: 110-116.
12. Lawrence CW. 1991. Classical mutagenesis techniques. *Methods in Enzymol* 194: 273-281.

(2004년 3월 23일 접수; 2004년 6월 2일 채택)