

형질 전환된 *Saccharomyces cerevisiae*의 leucocin A 항균 활성도에 대한 탄소원의 영향

이성일 · 박진용 · 정종근 · 이동근 · 이상현 · 하종명 · 하배진 · 이재화*

신라대학교 공과대학 생명공학과

Received August 31, 2005 / Accepted October 18, 2005

Effects of Carbon Source on Production of Leucocin A from Transformed *Saccharomyces cerevisiae*. Sung-Il Lee, Jin-Yong Park, Jong-Geun Jung, Dong-Geun Lee, Sang-Hyeon Lee, Jong-Myung Ha, Bae-Jin Ha and Jae-Hwa Lee*. *Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, Kwaebop-dong 1-1, Busan 617-736, Republic of Korea* – The aim of this study was to increase production of leucocin A, a kind of bacteriocin, in a transformed variety of *S. cerevisiae*. We investigated optical density, total secreted protein, protease activity, and antibacterial activity for the transformed *S. cerevisiae* in different carbon sources. The production of leucocin A growth-associated, and antibacterial activity, according to carbon source, was in the order of sucrose, glucose, glycerol, and fructose. Antibacterial activity was 10.6% higher in the presence of sucrose than glucose. This is the first report regarding the effect of carbon sources on the production of leucocin A in transformed *S. cerevisiae*, as far as we ascertain. Our results could prove useful in the industrial production of natural preservatives.

Key words – leucocin A, *Saccharomyces cerevisiae*, sucrose, antibacterial activity

인간은 오랜 시간 동안 식품의 저장성을 높이기 위해 음식물의 변질을 막는 다양한 방법들을 시도 해오고 있다. 가열, 동결 및 건조 등과 같은 물리적인 방법 외 미생물의 발효에 의한 방법, 식품의 산성화나 소금이나 설탕에 의한 절임 방법 및 다양한 화학 합성 방부제 첨가 등의 방법들을 사용하고 있다. 화학 합성 방부제의 사용은 자체 독성 때문에 사용량이 제한되고 있고 이용범위가 좁을 뿐만 아니라, 소비자들이 기피하고 있는 실정이다. 따라서 이를 해결하고자 하는 많은 연구들이 있었다[4,9,14,16].

Bacteriocin은 미생물이 생산하는 천연의 항균 물질로서, 무독성 방부제로 사용이 가능하다. Bacteriocin은 단백질 또는 단백질과 탄수화물의 복합체로 구성되어 있기 때문에[6] 인체로 섭취될 시 단백질 가수 분해 효소에 의해서 분해되어 인체에 무해하고 잔류성이 없다는 점에서 천연방부제로서의 효용성이 증대되고 있다[13]. 고온 살균 처리가 불가능한 어육 연제품에의 적용[1]과 발암원에 대한 저항성[2] 등이 보고되고 있으며, 기타 여러 가지 작용도 최근 밝혀지고 있다.

기존 항생제가 2차 대사산물인데 반하여 bacteriocin은 자신의 유전자로부터 직접 생합성(ribosomal translation)되기 때문에 직접적인 유전자 조작에 의해 생물 공학적 응용이 가능하다. Bacteriocin의 분자량은 일반적으로 4~6 kDa로 [1], 소수성(hydrophobicity)이며[2], 20개 정도의 아미노산으로 구성되어 있다. 살균 혹은 정균작용은 주로 상대 균주의 세포막에 이러한 소수성 분자가 작용하여 생리적 기능을 파

괴함으로써 이루어지는 것이 특징이다[3]. 세포막에 bacteriocin이 작용한다는 속성은 bacteriocin의 산업적 응용에 있어서 장점으로 작용될 수 있다. 또한 bacteriocin은 그 자체가 고온에서의 활성을 유지하고[7] 광범위한 pH에서의 안정성과 무독, 무색, 무취의 성질을 가지고 있다.

대표적인 bacteriocin인 nisin[7]은 미국의 FDA에 의해 식품 첨가물로서의 안정성을 인정받았고 현재 구미를 비롯한 47개국에서 식품 첨가제로 이용 되고 있다. 그러나 nisin은 매우 고가이기 때문에 식품에 응용하기에는 다소 무리가 있는 것이 사실이다. 또한 bacteriocin을 생산하는 대부분의 박테리옌 균주는 유산균을 사용하여 생산되고 있어서 부산물에 의한 식품의 풍미를 변화시킬 수 있다는 치명적인 약점을 안고 있으며 대장균 등의 원핵생물을 이용하여 생산하는 과정에서 bacteriocin에 의한 숙주의 성장저해가 나타날 수 있다. 이 점에 착안하여 bacteriocin의 일종인 leucocin A 유전자를 효모에서 발현 시켰다[9]. 효모에서 생산되는 bacteriocin은 효모의 성장을 저해 하지 않으면서 세포막에서 분비되게 하였으므로 경제 또한 용이한 것으로 알려져 있다 [10]. 본 연구에서는 미생물 배양 시 carbon source가 단백질 생산에 중요한 요소임에 착안하여[5,8] leucocin A를 분비하는 효모의 생산 수율을 향상시키기 위한 다양한 조건 중 carbon source에 의한 생산 변화를 살펴보았다.

재료 및 방법

균주, 배양 배지 및 성장곡선

균주는 발현 플라스미드 pAUR Leuco A를 lithium acetate법에 의해 효모 세포(*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763)

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5748, Fax : +82-51-999-5636
E-mail : jhalee@silla.ac.kr

에 형질 전환 하여 사용 하였다[9]. 효모의 배양을 위한 배지 조건은 2% polypeptone, 1% yeast extract로 고정한 후, 다양한 탄소원(fructose, glycerol, glucose, sucrose)을 2%로 사용하여 배양하였다(30°C, 250 rpm). Leucocin A를 생산하는 형질 전환된 효모는 전 배양을 aureobacidine A (Takara, Japan)의 최종 농도가 최종농도가 0.2 µl/ml가 되도록 첨가된 5 ml 배지에서 실시하였다. 전배양이 대수 증식기(OD600 7.5에서 8)에 도달했을 때 탄소원이 각각 다른 50 ml에 본 배양 시켰다. 균주가 대수 증식기에 있을 때 subculture 하였다. 시간에 따른 형질 전환된 효모 균주의 성장 양상을 UV spectrophotometer (OD600 nm)을 이용하여 측정 하였고 *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)을 LB 배지(0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% bacto tryptone)에 배양 시켜(30°C, 250 rpm) 항균 활성을 알아보았다.

총 분비 단백질량과 단백질 분해효소 활성 측정

배양 시료를 원심분리(6000 rpm, 5 min)하여 얻은 상층액을 이용하여 총 분비단백질(Bradford assay, Bio-rad, USA)과 단백질 분해효소 및 항균활성을 구하였다. Protease 활성 측정을 위해 상층액 200 µl와 1% casein (0.2 M Tris-HCl buffer, pH 5.8) 용액 200 µl를 섞은 후 25°C에서 2 시간 반응시켰다[12]. 이후 0.4 M trichloroacetic acid (TCA) 600 µl을 섞어 5 분간 반응시키고 원심분리(6000 rpm, 5 min)하여 상층액의 광학밀도를 측정하였다(OD280 nm).

항균활성 측정

배양액 1 ml를 원심분리(4°C, 6000 rpm, 5 min)한 후 cell pellet을 제외한 상층액을 이용하여 항균활성을 측정하였다. 먼저 탄소원을 달리한 시료의 상등액을 이용, 액체 배지에서 항균 활성을 측정 하였다. 상등액 250 µl와 멸균수 450 µl, 4 X배지 250 µl에 *B. subtilis* 50 µl를 접종 한 뒤, 30°C, 250 rpm에서 접종 직후와 접종 후 12시간 배양한 뒤 OD600 nm를 측정하여 배양 전후의 광학밀도 차를 계산하였다.

결과 및 토의

형질 전환체의 시간에 따른 성장속도

Fig. 1은 탄소원에 따른 재조합 효모의 성장 속도를 비교한 결과이다. 광학밀도는 4가지 탄소원을 유지하는 배지의 모두에서 15 시간까지 증가하였는데 이는 15 시간까지 대수적으로 증식한 후, 서서히 정체기와 사멸기로 접어드는 것으로 사료 된다. Fig. 1은 탄소원에 따른 세포증식을 확인한 것으로 sucrose>glycerol>glucose>fructose 순으로 세포 증식이 높을 것으로 확인되었다. 특히 sucrose가 포함된 배지에서 배양 15 시간 경과 시 세포밀도는 glucose를 유지하는 배지에서 배양한 경우에 비해 18% 높게 측정되었다. Lipase 유전자가 포함된 pWI3proROL 벡터로 형질전환된 *S. cer-*

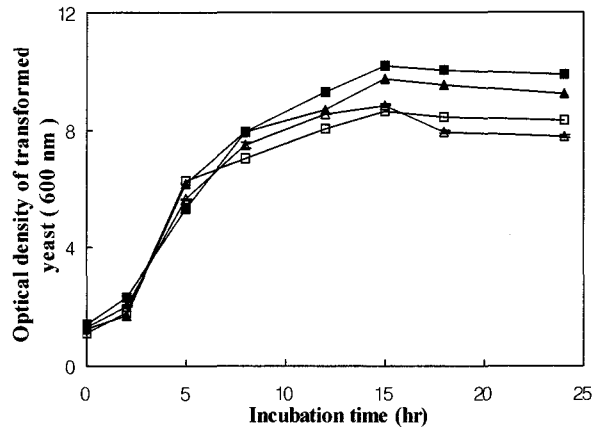


Fig. 1. Effects of different carbon source on cell growth (OD 600 nm) during batch suspension culture. The symbols represent cell growth curves cultured in medium containing 20 g/l fructose (Δ), 20 g/l glucose (□), 20 g/l glycerol (▲) and 20 g/l sucrose (■).

*visiae*의 경우 24 시간 이후에 정지기에 접어 든 결과[11]와 비교하면, 본 연구에서는 일찍 정지기에 접어드는 것을 알 수 있었고 최대 광학밀도 (OD600 nm)도 본 연구가 더 높았다. 본 연구에서는 Matsumoto 등[11]과는 다른 다양한 탄소농도를 이용, polypeptone이 함유된 배지를 사용한 점과 균주의 차이에 의해 증식속도에 차이가 난 것으로 사료되었다.

탄소원에 따른 형질 전환체의 총 분비 단백질 및 단백질분해효소 분비율 측정

Fig. 2A는 leucocin A 형질 전환체를 탄소원에 따른 총 분비 단백질량을 나타낸 것으로, glycerol을 제외한 탄소원에서 배양하는 경우 배양 15 시간에 총 분비 단백질량(total secreted protein)이 최대로 측정되었다. 총 분비 단백질량은 sucrose에서 배양하는 경우가 가장 높았고 fructose에 배양하는 경우 가장 낮게 확인되었다. Sucrose에서 배양한 경우 glucose에 배양한 경우에 비하여 총 분비 단백질량이 약 7.9% 증가하였다.

Fig. 2B는 leucocin A 형질 전환체의 탄소원에 따른 단백질분해효소 분비율을 나타낸 것으로 sucrose를 사용한 경우 배양 초기부터 완만하게 감소하여 15 시간에 가장 낮은 단백질 분해효소 분비율을 보였고 15 시간 이후 전체적으로 완만하게 상승 하였다. Fructose와 glycerol, 그리고 glucose를 사용한 경우는 0 시간부터 12 시간 까지 비슷하게 진행되었고 15 시간을 기점으로 이들 모두가 급격히 감소했지만 특히 glycerol을 사용한 경우는 단백질 분해 효소 분비율이 급감하였으며[15], 18 시간 이후부터 glycerol과 fructose를 사용한 경우에 비슷하게 진행 되었다. 그러나 glucose를 사용한 경우 15 시간 까지 계속적으로 감소되다 15 시간 이후 급격히 상승 하는 것을 볼 수 있었다. 탄소원으로써 glucose

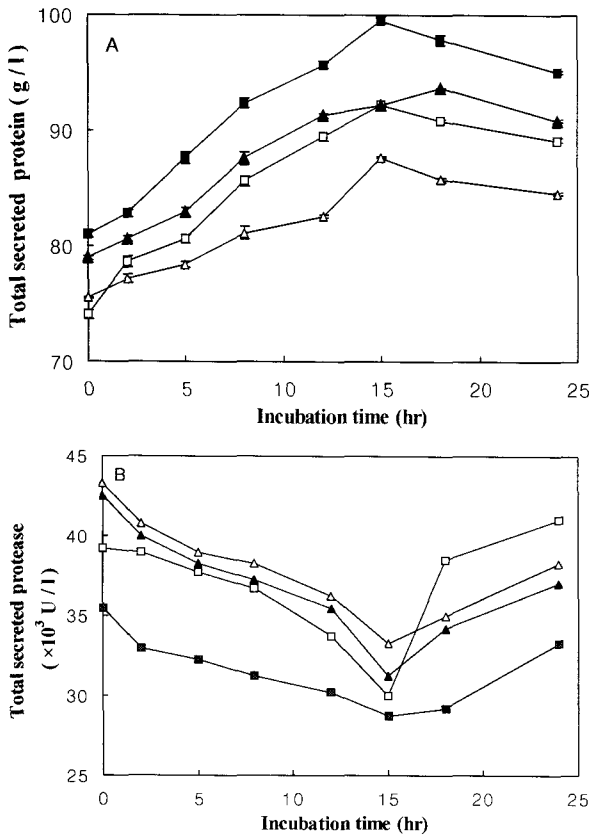


Fig. 2. Effects of different carbon sources on total secreted protein (TSP) (A) and protease activity (B) during batch suspension culture. The symbols represent tsps and protease cultured times in medium containing 20 g/l fructose (△), 20 g/l glucose (□), 20 g/l glycerol (▲) and 20 g/l sucrose (■).

를 사용한 경우 단백질 분해 효소 분비율의 급격한 상승은 Lee[10] 등의 논문과 같은 결과를 가졌다. 따라서 이 결과는 leucocin A 형질 전환체의 다양한 탄소원 사용 시 총 분비 단백질이 증가하고 동시에 단백질분해효소 분비의 감소를 의미했다. Lee[10] 등의 결과에서도 총 분비 단백질의 증가와 동시에 단백질 분해 효소 분비율의 감소와 같이 유사한 형태가 나타났다. 이는 균체의 성장이 최고조에 이른 15 시간까지는 배지의 영양분을 이용하였고, 이후 영양분 고갈에 따른 세포파괴와 살아있는 세포에서의 단백질 분해효소 분비의 양이 증가하는 것으로 사료된다.

항균 활성 측정

Leucocin A 형질전환체를 다양한 탄소원에서(fructose, glycerol, glucose, sucrose) 배양한 후 배양시간 별로 수집된 배양액의 항균 활성(antibacterial activity)을 측정하기 위하여 *B. subtilis*를 대상으로 성장정도를 광학밀도로 측정하였다(30°C, 250 rpm, 12 h).

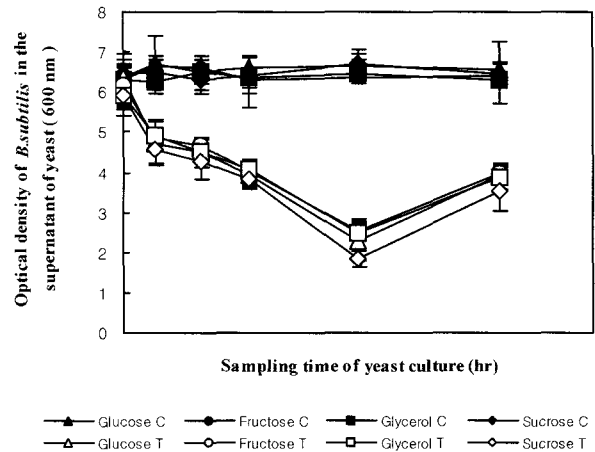


Fig. 3. Antibacterial activity of *S. cerevisiae* during culture in different carbon sources. Values in the x-axis represent the time of yeast culture. Optical densities of *B. subtilis* were measured both before and after 12 hours' culture in fresh medium containing the supernatant of yeast culture at each sampling time, and the differences are plotted in Figure 3. C and T at the end of legends means transformed (T) or control (C) yeast.

Fig. 3은 leucocin A 형질전환체와 대조균의 배양 시간 별로 수집된 배양액의 상등액이 포함된 배지에서의 *B. subtilis* 성장 저해를 나타낸 것이다. Leucocin A 형질 전환체가 대조균에 비하여 성장이 현저히 억제 되었다는 것을 알 수 있었고[10], 탄소원 모두 15 시간에 가장 높은 항균 활성을 나타내었다. 또한 sucrose과 glucose에서 각각 2 시간 배양 하였을 때 29.6%와 29%의 성장저해로 항균 활성이 관찰 되었고 15 시간 경과 시에는 각각 72.6%와 65.5%의 성장저해로 항균 활성이 관찰 되어 sucrose를 탄소원으로 사용하였을 경우 항균 활성이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

요 약

*B. subtilis*에 대한 항균 활성을 파악하기 위하여 bacteriocin의 일종인 leucocin A로 형질전환된 효모를 배양 시간 별로 채취하여 광학밀도, 총 분비 단백질량, 단백질 분해효소 그리고 항균활성을 측정했다. Sucrose>glycerol>glucose >fructose 순으로 세포 증식이 높게 확인 되었고, glycerol을 제외한 탄소원에서 총분비 단백질은 배양 15 시간 까지 증가되었다. Leucocin A의 항균활성(antibacterial activity)은 성장양상, 총 분비 단백질과 비례 하였으며 배양 15 시간에 glucose와 sucrose에서 배양한 상등액이 *B. subtilis* 성장을 각각 65.5%, 72.6% 감소하는 것으로 나타났다. 정지기 이후에는 항균활성이 급속히 감소하였는데, 이는 항균활성을 보이는 leucocin A가 단백질이고, 단백질 분해효소가 정지기

이후 증가한 것에 의한 것으로 사료된다. 본 연구는 향후 식품산업뿐만 아니라 항생제 생산 등에 사용되기 위한 산업적 기초 자료로써 이용 될 것이다.

참고 문헌

- An, Cheol., 1993. Molecular genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Bioindustry* **6**, 12-23.
- An, Cheol., and M. E. Stiles. 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2503-2510.
- Anonymous. 1986. International acceptance of Nisin as a food additive. Aplin and Barrett Ltd.
- Cleveland, J., T. J. Montville., I. F. Nes, and M. L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 1-20.
- Calado, C. R. C., C. Almeida., J. M. S. Cabral., and L. P. Fonseca. 2003. Development of a fed-batch cultivation strategy for the enhanced production and secretion of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 strain. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 141-148.
- Davis, D. B., R. Dulbecco, N. H. Eisen, and S. H. Ginberg. 1990. *Microbiology*. 4 th ed. Lippincott company. Philadelphia. PA. 589-594.
- Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and it's uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**, 100-117.
- Seo, H. P., C. H. Chung., S. K. Kim., R. A. Gross., D. L. Kaplan., and J. W. Lee. 2004. Mass production of pullulan with optimized concentration of carbon and nitrogen sources by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 in a 100-L bioreactor with the inner pressure. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 237-242.
- Lee, S.-H. 2003. Establishment of a leucocin A producing *Saccharomyces cerevisiae* cell. *J. Life Sci.* **13**, 712-717.
- Lee, S. I., D. G. Lee., J. O. Lee., D. H. Shim., C. H. Joo., O. S. Kim., S. H. Lee, and J. H. Lee. 2004. Antibacterial activity of yeast transformed with leucocin A. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **04**, 291-295.
- Matsumoto, T., S. Takahashi, M., Ueda, A., Tanaka, H., Fukuda, and A. Kondo. 2002. Preparation of high activity yeast whole cell biocatalysts by optimization of intracellular production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase. *J. Mol. Catal. B-Ezzym* **17**, 143-149.
- Battaglino, R. A., M. Huergo, A. M. R. Pilosof, and G. Bartholoma. 1991. Culture requirement for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 292-296.
- Reid, G., and J. Burton. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* **4**, 319-324.
- Riley, M. A and J. E. Wertz. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie.* **84**, 357-364.
- S, K. Yalçın, and Z. Y. Özbas. 2004. Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. *Process Biochem.* **39**, 1285-1291.
- Tagg, G. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamarker. 1976. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**, 722-756.