

## 박테리오신 Subpeptin JM4-A 혹은 Subpeptin JM4-B를 생산하는 항균 효모의 제작

이옥희 · 장민경 · 이동근 · 김인혜 · 이재화 · 하종명 · 하배진 · 안익용<sup>1</sup> · 조동인<sup>1</sup> · 이상현\*

신라대학교 생명공학과, <sup>1</sup>영남제분주식회사

Received January 16, 2008 / Accepted February 5, 2008

**Establishment of an Antibacterial Yeast That Producing Bacteriocin Subpeptin JM4-A or Subpeptin JM4-B.** Ok-Hee Lee, Min-Kyung Jang, Dong-Geun Lee, In Hae Kim, Jae-Hwa Lee, Jong-Myung Ha, Bae-jin Ha, Ik-Yong Ahn<sup>1</sup>, Dong-In Cho<sup>1</sup> and Sang-Hyeon Lee. Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, San 1-1, Gwaebop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea, <sup>1</sup>Youngnam Flour Mills Co., LTD., Gyo-dong, Yangsan, Kyungnam 626-210, Korea - In order to obtain yeast cells producing a bacteriocin, Subpeptin JM4-A or Subpeptin JM4-B, the 48 bp oligonucleotides corresponding to Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B genes including codon for start and stop were chemically synthesized and cloned into pAUR123, an yeast expression vector. Transformed yeast cells exhibited growth inhibition of *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. This result indicates that yeast cells producing Subpeptin JM4-A or Subpeptin JM4-B possess bacteriocidal properties against both Gram positive *B. subtilis* and Gram negative *E. coli* and *P. aeruginosa* cells. The recombinant yeast strains constructed in this study can be applied in the food preservative or animal foodfeed.

**Key words :** Bacteriocin, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, Subpeptin JM4-A, Subpeptin JM4-B

### 서 론

미생물에 의한 식품의 부패와 식중독의 발생은 식자원의 낭비와 국민보건을 위협할 수도 있다. 최근 일반인의 관심이 웰빙, 유기농, 방부제 무첨가 식품, 천연식품 등에 집중되어 보존료를 비롯한 식품 및 사료 첨가물들을 화학 합성 물질에서 천연물로 대체하려는 연구가 진행되고 있다[9,10].

현재 시판되고 있는 사료에는 동물의 질병 예방치료, 성장 촉진 및 사료효율을 개선하고 양질의 동물성 식품을 공급하기 위하여 항생물질, 합성항균제, 성장호르몬제 등 다양한 동물용 의약품이 사용되고 있다. 이 중 항생물질은 미생물에 의하여 만들어지는 물질로서 세균이나 그 밖의 미생물의 성장과 활동을 억제하거나 그 생명을 파괴시키는 의약품으로 현재는 공업적, 화학적 방법으로 생산되고 있다. 화학적 인공 항생물질이 포함된 사료를 먹인 가축을 인간이 먹을 시 부작용으로 인한 여러 가지 질병이 나타날 수 있다. 또한 항생제의 남용은 내성균 발생과 전파라는 문제점으로 선진국 등은 항생제 사용에 많은 제약을 두는 실정이다. 실제로 유럽연합(EU)은 동물사료에 성장목적의 항생제 첨가를 금지 하였고 [5], 우리나라의 정책도 유럽연합과 비슷하게 추진되고 있다. 따라서 항생물질 대체제의 개발은 중요하다 할 것이다.

세균이 생산하는 항균성 펩타이드인 박테리오신(bacteriocin)은 여러 종의 미생물들이 생산하는 물질로서 일반적으로

박테리오신을 생산하는 미생물과 형태, 계통학적으로 유사한 균종에 대하여 살균 기작을 갖는 물질을 말한다. 박테리오신은 고온에서 활성을 유지하며 광범위한 pH에서 안정하다. 단백질로 구성되어 있기 때문에 무독하고 무색, 무취이며 잔류성이 없다는 점에서 식품 등에서 천연 방부제로서의 사용이 가능하다[2,13]. 항생제는 사람에게 투여 시 부작용이 있다는 단점이 있으나 박테리오신은 인체에 섭취되면 단백질 가수분해 효소에 의해 분해되므로 식품 등의 생물학적 보존제(biopreservative) 및 발효식품의 생물체어제(bioregulator)로서 이용이 증가되고 있다[7,8]. 또한 항생제가 2차대사 산물인 데 반해 박테리오신은 자기의 유전자 산물인 펩타이드가 항균활성을 보인다. 따라서 유전자 분석 및 조작을 통하여 분자적 수준에서 생산량을 최대화 하는 것이 용이하고 분자적 변이를 통하여 더욱 우수한 박테리오신을 합성할 수 있다. 그러므로 박테리오신은 유전자의 발현 및 post-translational modification, 세포의 분비에 관계되는 유전자 혹은 sequence factor를 조작함으로써 대량 생산이 가능하다. 박테리오신에 관한 연구는 20년 전부터 가속화 되어 유럽이나 미국에서는 이미 산업화 적용 단계에 있고 계속해서 우량 균주 확보 및 기술 개발 특히 출원 등 다양한 연구가 진행되고 있다[6].

*Bacillus subtilis* JM4가 생산하는 항균활성 peptide인 Subpeptin JM4-A는 그람양성 세균인 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* 속 세균들에 대해 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, Subpeptin JM4-B는 그람음성 세균인 *Salmonella*, *Shigella* 속 세균들에 대해 항균활성을 나타내는 것으로 알려

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

저 있다[4,12]. 유전자 재조합이 대량생산 공정에 유용하지만, 박테리옌 유전자 산물의 항균활성 때문에 대장균 등 원핵생물은 생산균주로서의 활용이 불가능하다. 하지만 진핵생물인 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 숙주로 사용하면 원핵생물 숙주에서의 항균활성 펩타이드 생산 문제를 해결할 수 있다. 그리고 효모 추출물(yeast extract)은 질소화합물, 당, 무기영양소 및 유기영양소 등을 함유하고 있으므로 가축 사료의 좋은 영양성분으로도 활용이 가능하다.

본 연구에서는 천연 항생제가 포함된 기능성 가축사료를 개발하기 위하여 배양이 용이한 효모세포에 박테리옌의 일종인 Subpeptin JM4-A 혹은 Subpeptin JM4-B의 유전자를 도입하여 항균활성효모를 제작하였고, 그람양성 대표세균인 *B. subtilis* 및 그람음성세균 세균인 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균활성을 확인하였다.

### 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 $\alpha$ )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 ampicillin을 최종농도가 100  $\mu$ 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.

#### Subpeptin JM4-A 및 Subpeptin JM4-B 유전자의 클로닝 및 효모세포의 형질전환

박테리옌 Subpeptin JM4-A와 Subpeptin JM4-B의 유전자는 문헌고찰[11]을 통해 확보된 DNA 염기서열을 토대로 (Fig. 1) (주)바이오니아(Seoul, Korea)에 의뢰하여 합성하였다. Subpeptin JM4-A와 Subpeptin JM4-B 유전자의 용이한 클로닝 및 발현을 위하여 유전자의 5' 말단에 제한효소 *Xba*I 인식부위와 개시코돈 ATG를, 그리고 3' 말단에 종지코돈 TAA와 제한효소 *Xho*I 인식부위를 도입하여 oligonucleotide들을 화학합성하였다(Fig. 2). 제작된 oligonucleotide들을 annealing하여 이중가닥 DNA로 만든 후, 효모발현 벡터 pAUR123의 *Xho*I과 *Xba*I 부위에 연결하였다. 유전자 클로닝

#### Subpeptin JM4-A (12 amino acids, 36 bp)

GCT GCT AAG GAA ATT GCT TGG ATT TTC CAC GAT AAC  
Ala-Ala-Lys-Glu-Ile-Ala-**Trp**-Ile-Phe-His-Asp-Asn

#### Subpeptin JM4-B (12 amino acids, 36 bp)

GCT GCT AAG GAA ATT GCT CAC ATT TTC CAC GAT AAC  
Ala-Ala-Lys-Glu-Ile-Ala-**His**-Ile-Phe-His-Asp-Asn

Fig. 1. Nucleotide and amino acid sequences of Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B. Different amino acids between Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B were shown in bold letters.

을 위한 숙주로는 대장균 세포(*E. coli* DH5 $\alpha$ )를 사용하였다. 대장균(*E. coli* DH5 $\alpha$ )에서 플라스미드 DNA를 분리하고 제한효소 *Xho*I과 *Xba*I으로 삽입된 48 bp의 Subpeptin JM4-A와 Subpeptin JM4-B 유전자 단편을 확인하였다. 구축된 발현 플라스미드를 각각 pAUR-SubpA과 pAUR-SubpB로 명명하고 효모(*S. cerevisiae* KCTC 7913)의 형질전환은 electro- poration (Cell-Porator, Life technologies, MD, USA)법으로 행하였다. 형질전환된 효모의 선별은 YPD 배지(1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% D-glucose)에 aureobacidin A (Takara Korea, Seoul Korea)를 최종농도가 0.2  $\mu$ g/ml가 되게 첨가한 후 30°C에서 3일간 배양하여 행하였다.

#### Subpeptin JM4-A 및 Subpeptin JM4-B를 생산하는 형질전환 효모의 항균활성 측정

그람양성 대표세균인 고초균(*B. subtilis* ATCC 6633)과 그람음성 장내세균인 대장균(*E. coli* KCTC 2223), 그람음성 녹농균(*P. aeruginosa* KCTC 2004)을 LB 배지를 이용하여 30°C에서 하룻밤 배양하고, 사용직전에 이를 100배로 희석하였다. 균 희석액을 YPD 고체배지에 도말하였고, 여기에 pAUR-SubpA 및 pAUR-SubpB가 도입된 형질전환 효모와 대조균으로 효모의 발현벡터(pAUR123)가 도입된 형질전환 효모의 배양액을 각각 100  $\mu$ l 씩 일정부위에 접종하였다. 이를 30°C에서 하룻밤 동안 배양한 후 항균작용에 의해 형성된 생육 억제환(clear zone)을 비교·관찰하였다.

### 결과 및 고찰

#### Subpeptin JM4-A 및 Subpeptin JM4-B 유전자의 클로닝

Subpeptin JM4-A 및 Subpeptin JM4-B는 *B. subtilis*가 생산하는 아미노산 12개로 구성된 항균 펩타이드로 Subpeptin JM4-A 및 Subpeptin JM4-B 유전자의 일차구조는 이미 보고되어 있고(Fig. 1), 그 길이가 짧아 *B. subtilis* 균체로부터 유전자를 클로닝하지 않고 화학합성하였다(Fig. 2). 합성된 oligonucleotide들을 annealing하여 얻어진 이중가닥 DNA 단편들을 효모발현 vector pAUR123의 제한효소 *Xho*I과 *Xba*I 부위에 삽입하여 효모발현 플라스미드를 구축하였고 이를

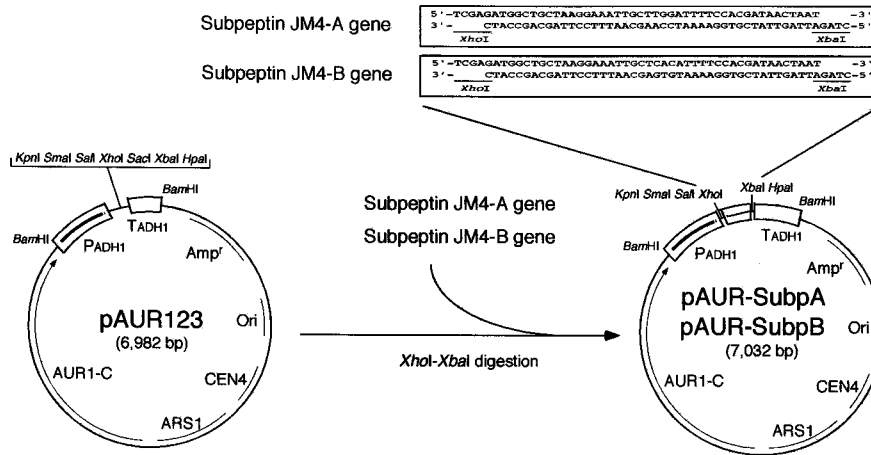


Fig. 2. Construction of the yeast expression plasmids for Subpeptin JM4-A (pAUR-SubpA) and Subpeptin JM4-B (pAUR-SubpB). Oligonucleotides for the Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B genes were chemically synthesized, annealed, and inserted into XhoI and XbaI sites of pAUR123. Nucleotide sequences of the Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B genes were shown at the upper panel. 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* centromere, Amp<sup>r</sup>: *E. coli* ampicillin resistant gene, Ori: *E. coli* replication origin.

각각 pAUR-SubpA와 pAUR-SubpB이라고 명명하였다(Fig. 2).

**Subpeptin JM4-A 및 Subpeptin JM4-B를 생산하는 형질전환 효모의 제작**

효모(*S. cerevisiae*)에 pAUR-SubpA 및 pAUR-SubpB를 도입하고 aureobacidin A를 포함하는 YPD 배지에서 선별하여 Subpeptin JM4-A 및 Subpeptin JM4-B의 발현 유전자가 도입된 형질전환 효모를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 형질전환 효모의 효과적인 선별을 위하여 선별 marker로 사용되는 aureobacidin A의 최종농도를 0.1 µg/ml에서 0.5 µg/ml까지 다양하게 사용하여 형질전환 효모 콜로니의 형성효율을 검토하였다 그 결과, 이 연구에서는 aureobacidin A의 최종농도가 0.2 µg/ml에서 가장 효과적으로 형질전환 콜로니를 형성하였다(data not shown). Aureobacidin A의 최종농도가 너무 낮으면 콜로니 형성은 원활하지만 형질전환되지 않은 야생 효모의 콜로니의 형성빈도가 높아지고, 최종농도가 너무 높으면 콜로니 형성이 되지 않거나 형성에 많은 시간을 요한다는 사실을 확인할 수 있었다.

**형질전환 효모의 항균활성 확인**

그람양성 대표세균인 고초균(*B. subtilis*), 그람음성 대표세균인 대장균(*E. coli*) 및 그람음성 녹농균(*P. aeruginosa*)에 대한 형질전환 효모들의 항균활성을 측정된 결과, pAUR-SubpA 또는 pAUR-SubpB가 도입된 형질전환 효모의 경우는 그람양성 고초균, 그람음성 대장균 및 녹농균 모두에서 생육을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 반면, 효모 발현 vector (pAUR123) 만을 도입한 형질전환 효모의 경우는 이들

세균 모두에서 생육억제를 나타내지 않았다(Fig. 3). 이 결과로 이들 세균 모두에 대해 항균활성을 나타내는 형질전환 효모가 성공적으로 제작되었음을 확인할 수 있었다. 문헌에 따르면 Subpeptin JM4-A는 그람양성 세균들에 대해 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, Subpeptin JM4-B는 그람음성 세균들에 대해 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[4,12]. 실제로 그람양성 세균인 *B. subtilis*에 대해서는 pAUR-SubpA를 생산하는 형질전환 효모가 pAUR-SubpB를 생산하는 형질전환 효모보다 더 넓은 생육억제 환을 나타내는 것이 관찰되었다(Fig. 3A). 또한, 그람음성 세균인 *E. coli*에 대해서는 pAUR-SubpA를 생산하는 형질전환 효모보다 pAUR-SubpB를 생산하는 형질전환 효모가 약간 더 넓은 생육억제 환을 나타내는 것이 관찰되었다(Fig. 3B). 한편, 그람음성 세균인 *P. aeruginosa*에 대해서는 pAUR-SubpA를 생산하는 형질전환 효모와 pAUR-SubpB를 생산하는 형질전환 효모 모두가 비교적 넓은 생육억제 환을 나타내는 것이 관찰되었다(Fig. 3C). 이 연구로 제작된 항균활성 효모를 사료 첨가물로 활용하기 위해서는 효모 배양조건에 따른 항균활성의 영향과 다양한 세균들에 대한 항균활성의 확인 등을 통한 생산 최적조건의 검토가 필요할 것으로 생각된다.

이 연구의 결과로 부패하기 쉬운 식품의 보존성을 향상시킬 수 있는 보존료 대체물질 혹은 가축 사료에서 병원균의 생육을 저해하기 위한 항생제 대체물질로 사용가능한 박테리오신의 산업적 대량생산에 활용할 수 있는 효모세포들을 제작하였다. 박테리오신은 세포표면의 특정 혹은 비특정 수용체에 부착하여 항균작용을 나타내며 1차 표적의 세포질막의 막투과성을 변화시켜 막수송을 방해하거나 proton mo-

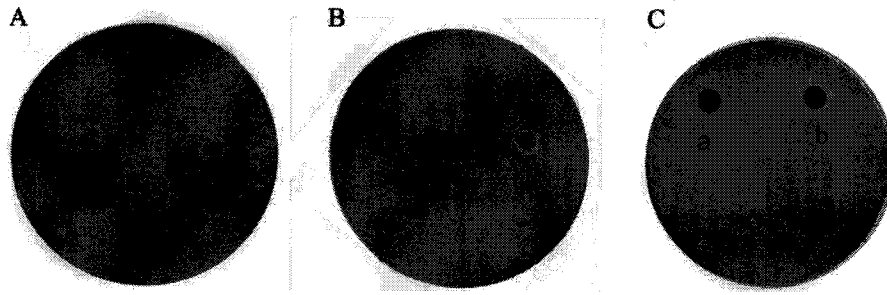


Fig. 3. Identification of the antibacterial activity against (A) *B. subtilis*, (B) *E. coli* and (C) *P. aeruginosa*. a: *S. cerevisiae* harboring pAUR-SubpA, b: *S. cerevisiae* harboring pAUR-SubpB, c: *S. cerevisiae* harboring pAUR123.

tive force에 영향을 미쳐 에너지 생산과 단백질이나 핵산의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다[3]. 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 Subpeptin JM4-A 및 Subpeptin JM4-B는 세균의 생육을 억제하는 항균 활성을 가지는 단백질이기 때문에 대장균과 같은 세균세포를 생산숙주로 이용할 경우 생산이 불가능한 경우가 많다. 이 연구에서 사용한 생산숙주인 효모의 경우는 박테리옌에 의해 생육 저해를 받는 원핵생물과는 다른 진핵생물이지만 배양이 용이하며 생육속도가 비교적 빠르기 때문에 특수한 유전자 산물을 생산하는데 자주 사용되는 숙주세포이다.

요 약

박테리옌의 일종인 *Bacillus subtilis*의 Subpeptin JM4-A 및 Subpeptin JM4-B를 생산하는 효모의 제작을 위하여 48 bp 길이의 개시코돈과 종지코돈을 포함하는 Subpeptin JM4-A 및 Subpeptin JM4-B의 유전자를 합성하여 효모 발현 vector pAUR123에 클로닝하였다. 이렇게 제작된 재조합 DNA로 효모세포를 형질전환시켜 Subpeptin JM4-A와 Subpeptin JM4-B를 생산하는 형질전환 효모세포를 제작하였다. 형질전환 효모는 그람양성 대표세균인 고초균(*B. subtilis*)과 그람음성 장내세균인 대장균(*E. coli*)에 대해 항균활성을 나타냈다. 또한 농흉이나 중이염의 원인이 되는 녹농균(*P. aeruginosa*)에 대해서도 항균활성을 나타냈다. 이 연구의 결과로 부패하기 쉬운 식품들의 보존성을 향상시키기 위한 보존제 대체물질 또는 가축 사료에서 병원균의 생육을 저해하기 위한 항생제 대체물질로 사용할 수 있는 박테리옌을 산업적으로 생산할 수 있는 효모세포를 제작하였다.

References

1. Animal Health Products Handbook. 2001. Korea Animal Health Products Association.

2. Antonio, G., H. Abriouel, R. L. López and N. B. Omar. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 51-70.

3. Atrih, A., N. Rekhif, M. Michel and G. Lefebvre. 1993. Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strain isolated from different foods. *Microbios* **75**, 117-123.

4. Butzler, J. P. 1984. *Campylobacter* infection in man and animal. pp. 1-246, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.

5. Dixon, B. 2000. Antibiotics as growth promoters: Risks and alternatives. *ASM news.* **66**, 264-265.

6. Flynn, S., D. van Sinderen, G. M. Thornton, H. Holo, I. F. Nes and J. K. Collins. 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology* **148**, 973-984.

7. Friedman, C. R., J. Neimann, H. C. Wegener and R. V. Tauxe. 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, pp. 121-138. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (eds.), *Campylobacter*, 2nd eds. American Society for Microbiology, Washington D. C.

8. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. *Bacteriology* **66**, 265-378.

9. Kim, H. Y., Y. J. Lee, K. H. Hong, Y. K. Kwon, J. Y. Lee and S. H. Kim. 1999. Studies on the development of natural preservatives from natural products. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 1667-1678.

10. Park, J. H., N. S. Han, J. Y. Yoo, D. J. Kwon, H. K. Shin and Y. J. Koo. 1993. Screening of the foodstuffs influencing the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Clostridium perfringens*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **25**, 582-588.

11. Shimei, W., J. Zhong and L. Huan. 2006. Genetics of subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B production by *Bacillus subtilis* JM4. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **344**, 1147-1154.

12. White, P. L., A. R. Bakers and W. O. James. 1997. Strategies to control *Salmonella* and *Campylobacter* in raw poultry products. *Rev. Sci. Tech.* **16**, 525-541.

13. Young, K. D., M. Koo and C. R. Ryoo. 2002. Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in Kimchi and its characteristics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 96-105.