

## 박테리오신 OR-7을 생산하는 항균 효모의 제작

이옥희 · 장민경 · 이동근 · 이재화 · 하종명 · 하배진 · 안익용<sup>1</sup> · 조동인<sup>1</sup> · 이상현\*  
신라대학교 생명공학과, <sup>1</sup>영남제분주식회사

**Construction of A Bacteriocidal Yeast Producing Bacteriocin OR-7.** Lee, Ok-Hee, Min-Kyung Jang, Dong-Geun Lee, 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, Busan 617-736, Korea, <sup>1</sup>Youngnam Flour Mills Co., LTD., Kyungnam 626-210, Korea – In order to obtain yeast cells producing a bacteriocin OR-7, the 180 bp polynucleotide corresponding to the OR-7 gene including codons for start and stop was chemically synthesized and cloned into pAUR123, an yeast expression vector. Transformed yeast cells exhibited growth inhibition of *Bacillus subtilis*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. This result indicates that yeast cells producing OR-7 possess bacteriocidal properties against both Gram positive *B. subtilis* and Gram negative *C. jejuni*, *E. coli* and *P. aeruginosa* cells. The recombinant yeast strain constructed in this study can be applied in the food preservative or animal feed.

**Key words:** Bacteriocin, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, OR-7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, yeast

### 서 론

유산균은 장관과 비노생식기의 미생물 생태계의 균형유지와 병원성 세균의 억제에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 종류의 유산균들이 사람 및 가축으로부터 연구되어 왔다[1, 6, 8, 13]. 유산균의 병원성 세균에 대한 생육억제 기작은 유기산에 의한 pH 저하 및 과산화수소의 생성에 의한 것과 유산균이 분비하는 여러 종류의 항균활성 펩타이드인 박테리오신(bacteriocin)의 생산에 의한 것으로 구분할 수 있다[13]. 항생제의 남용은 내성균의 발생 및 전파를 야기하였고, 이런 이유로 항생제 사용에 많은 제약을 두는 실정이다. 이미 유럽연합(EU)은 동물사료에 성장목적으로 하는 항생제 첨가를 금지 하였고[4], 우리나라도 이와 같은 방향으로 정책을 추진하고 있다. 항생물질 대체제 중 하나로 유해세균 억제능을 가진 생균제(probiotics)가 많이 연구되고 있으며, 생균제로서 주로 이용되어온 미생물이 유산균이다[5].

유산균의 가금류 동물임상 실험을 통하여 항균활성 외에 성장 촉진, 산란율 증가, 계란의 질적 향상 등도 보고되어 있지만[14] 유산균의 경우는 산소에 노출되면 생육에 불가능한 혐기성균이 대부분을 차지하기 때문에 균체의 상품화를 위한 대량배양이 용이하지 못한 단점을 가지고 있다. 유전자 재조합이 대량생산 공정에 유용하지만, 외래유전자의

발현에 많이 이용되고 있는 대장균을 포함하는 세균들의 경우는 도입된 박테리오신 유전자 산물의 항균활성 때문에 생산균주로서의 활용이 불가능하다. 따라서 항균활성 펩타이드의 생산을 위해서는 일반적으로 박테리오신에 대한 생육저해활성을 나타내지 않는 진핵생물에 속하는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 숙주로 사용함으로써 이러한 문제점을 해결할 수 있다. 또한, 효모세포로부터 추출한 yeast extract는 현재 세균배양 배지에 첨가하는 영양성분으로서 질소화합물, 당, 무기영양소 및 유기영양소 등을 함유하고 있기 때문에 배양된 효모 균체만으로도 가축사료의 좋은 영양성분으로 활용될 수 있다.

*Lactobacillus salivarius* 균주가 생산하는 항균활성 펩타이드인 OR-7은 그람음성세균인 *Campylobacter jejuni*에 대한 항균활성이 알려져 있다[14]. *C. jejuni*는 소, 면양, 산양, 개, 고양이 및 원숭이 등 포유류 동물의 장관 내에서 증식하며 이들 동물에서 장염 및 식중독을 일으키는 원인균이다[2, 3]. 이 균은 닭, 거위 및 메추라기 등의 가금류가 보균자이며, 이들 보균 동물과의 접촉 또는 오염된 음식을 섭취함으로써 감염된다[7, 16]. 최근, 양계사육의 규모가 대형화됨에 따라 이들 세균성 감염증이 증가하고 있는 추세이다[16].

본 연구에서는 천연 항생제가 포함된 기능성 가축사료를 개발하기 위하여 배양이 용이한 효모세포에 박테리오신의 일종인 OR-7의 유전자를 도입하여 항균활성효모를 제작하였고, 이를 SDS-PAGE를 통하여 항균활성 발현 여부를 확인하였다. 그람양성 대표세균인 *Bacillus subtilis* 및 그람음성 대표세균인 *Escherichia coli*에 대한 항균활

\*Corresponding author  
Tel: 051-999-5624, Fax: 051-999-5636  
E-mail: slee@silla.ac.kr

성을 확인하였으며, 그람음성 세균 중 농홍이나 중이염의 원인이 되는 녹농균인 *Pseudomonas aeruginosa*와 식중독균인 *Campylobacter jejuni*에 대한 항균 활성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 배지

제한효소, 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. 형질전환된 효모의 선별에는 YPD 배지에 aureobacidin A (Takara Korea)를 최종농도가 0.2  $\mu$ g/ml가 되게 첨가한 배지를 사용하였다.

### 박테리옌 OR-7의 유전자의 클로닝 및 효모세포의 형질전환

박테리옌 OR-7의 유전자(180 bp)는 문헌고찰을 통해 확보된 아미노산 서열을 토대로 효모의 유전암호 이용성(codon usage)에 적합하게 DNA 염기서열로 바꾼 후 (주)바이오니아(Seoul, Korea)에서 합성하였다(Fig. 1). OR-7 유전자의 용이한 클로닝 및 발현을 위하여 유전자의 5' 말단에 제한효소 *Kpn*I 인식부위와 개시코돈 ATG를 그리고 3' 말단에 종지코돈 TAA와 제한효소 *Xba*I 인식부위를 도입하여 제작하였다(Fig. 1). 제작된 OR-7 유전자 단편을 효모발현 벡터 pAUR123의 *Kpn*I과 *Xba*I 부위에 연결하였다(Fig. 2). 이렇게 제작된 재조합 DNA를 대장균(*E. coli* DH5 $\alpha$ )에 형질전환시킨 후, 플라스미드 DNA를 분리하고 제한효소로 삽입된 180 bp의 OR-7 유전자 단편을 확인하였고 pAUR-OR-7으로 명명하였다. pAUR-OR-7을 이용한 효모세포(*S. cerevisiae* KCTC 7913)의 형질전환은 electroporation(Cell-Porator, Life Technologies, MD, USA)법으로 행하였다. 형질전환된 효모의 선별에는 YPD 배지에 aureobacidin A(Takara, Korea)를 최종농도가 0.2  $\mu$ g/ml가 되게 첨가한 후 30°C에서 3일간 배양하여 형질전환된 효모를 선별하였다.

### 형질전환 효모로부터 플라스미드 DNA의 분리 및 박테리옌 OR-7 유전자 확인

형질전환 효모를 aureobacidin A(Takara, Korea)(최종농도 0.2  $\mu$ g/ml)가 첨가된 YPD 배지 4 ml에 접종하여 30°C에서 하룻밤 동안 배양한 후, 원심분리(14,000  $\times$  g, 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) 200  $\mu$ l를 넣어 균체를 현탁시킨 후, acid-washed glass beads (425-600  $\mu$ m, Sigma, MO, USA) 0.3 g과 phenol/CHCl<sub>3</sub> 용액 200  $\mu$ l를 넣고 2분간 vortex하였다. 4°C에서 원심분리(14,000  $\times$  g, 10분)를 행하여 상층액을 새로운 tube에 옮기고, 여기에 glycogen 1  $\mu$ l, 5 M LiCl 용액 20  $\mu$ l, 차가운 에탄올 500  $\mu$ l를 넣은 후, 원심분리(14,000  $\times$  g, 10분)를 행하여 플라스미드 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 차가운 70% 에탄올로 세정한 후 건조시키고, 멸균 초순수(ddH<sub>2</sub>O) 20  $\mu$ l에 녹였다.

효모로부터 플라스미드 DNA를 회수한 후에 OR-7 유전자 단편의 확인은 pAUR123 vector에 특이적인 primer set을 이용한 PCR (polymerase chain reaction) 법으로 행하였다. 회수된 플라스미드 DNA 50 ng과 forward primer pAUR123-F (5'-TCTGCACAATATTTCAAGC-3')와 pAUR123-R (5'-TTCGTTTTAAACCTAAGAGTCAC-3')을 사용하여 PCR 반응을 행하였고 염기서열 분석으로 확인하였다. PCR 반응산물은 12%의 polyacrylamide gel에서 전기영동하여 그 위치를 확인하였다.

### 형질전환 효모의 OR-7 단백질의 생산 확인

형질전환 효모를 aureobacidin A(Takara, Korea)(최종농도 0.2  $\mu$ g/ml)가 첨가된 YPD 배지 4 ml에 접종하여 30°C에서 2일간 배양 후, 4°C에서 원심분리(14,000  $\times$  g, 5분)하여 균체를 회수하였다. 여기에 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) buffer를 첨가하여 재현탁시킨 후, sonication을 행하여 균체를 파쇄한 후, 4°C에서 원심분리(14,000  $\times$  g, 20분)를 행한 후 상층액을 분리하여 세포추출액으로 하였다. SDS-PAGE는 15% polyacrylamide gel을 이용하여 Laemmli의 방법으로 행하였다[9]. 세포추출액을 5분간 끓인 후 gel에 주입하였고 Coomassie brilliant blue R-250(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 염색한 후 관찰하였다.

### 박테리옌 OR-7을 생산하는 형질전환 효모의 항균활성 측정

그람양성 대표세균인 *B. subtilis*(ATCC 6633)와 그람음성 대표세균인 *E. coli*(KCTC 2223)는 LB 배지를 이용하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양(250 rpm)하였다. 또한, *P. aeruginosa* (KCTC 2004)는 Tryptic Soy Broth(Bacton, Dickson and Company, Sparks, MD, USA) 배지를 이용하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양(250 rpm)하였다. 한편, *C. jejuni* (KCTC 5327)는 5% Defibrinated whole sheep blood

(Komed Co. Ltd., Sungnam, Korea)가 첨가된 Columbia Broth(Bacton, Dicknson and Company) 배지를 이용하여 37°C에서 2일간 정치 배양하였다. 사용직전에 100배 희석한 균 회석액을 YPD 고체배지에 도말하였고, *C. jejuni* 회석액은 5% Defibrinated whole sheep blood (Komed Co. Ltd.)가 첨가된 YPD 고체배지에 도말하였다. 배지중앙에 pAUR-OR-7이 도입된 형질전환 효모와 대조균으로 효모의 발현벡터(pAUR123)가 도입된 형질전환 효모의 배양액을 각각 100 µl씩 접종하였다. 이를 30°C에서 1~2일 동안 배양한 후 항균작용에 의해 형성된 생육억제환(clear zone)을 비교·관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 박테리옌 OR-7 유전자의 클로닝 및 형질전환 효모의 제작

OR-7은 유산균의 일종인 *L. salivarius*가 생산하는 아미노산 54개로 구성된 항균 펩타이드로 OR-7 유전자의 일차구조가 이미 보고되어 있고 그 길이가 비교적 짧으며 세균과 효모 사이에 유전암호 이용성에 차이가 있기 때문에 OR-7을 생산하는 *L. salivarius* 균체로부터 유전자를 클로닝하지 않고 OR-7 유전자를 화학합성하였다(Fig. 1).

효모(*S. cerevisiae*)에 pAUR123-OR-7을 도입하고 aureobacidin A를 포함하는 YPD 배지에서 선별하여 OR-7 발현 유전자가 도입된 형질전환 효모를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 형질전환 효모의 효과적인 선별을 위하여 선별 마커로 사용되는 aureobacidin A의 최종농도를 0.1 µg/ml에서 0.5 µg/ml까지 다양하게 사용하여 형질전환 효모 콜로니의 형성 효율을 검토하였다. 그 결과, 이 연구에서는 aureobacidin A의 최종농도가 0.2 µg/ml에서 가장 효과적으로 형질전환 콜

로니를 형성하였다. Aureobacidin A의 최종농도가 너무 낮으면 콜로니 형성은 원활하지만 형질전환되지 않은 야생효모의 콜로니의 형성빈도가 높아지고, 최종농도가 너무 높으면 콜로니 형성이 되지 않거나 형성에 많은 시간을 필요로 한다는 사실을 확인할 수 있었다.

### 형질전환 효모로부터 플라스미드 DNA의 분리 및 박테리옌 OR-7 유전자 확인

형질전환된 효모로부터 pAUR123-OR-7 유전자를 포함하는 플라스미드 DNA를 분리하였고, 이를 주형(template)으로 발현 vector에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 행한 결과, pAUR123-OR-7의 유전자에 해당하는 약 180 bp의 유전자 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이 결과로 형질전환 효모가 나타내는 항균활성이 효모 자체에 의한 활성이 아닌 형질전환에 의해 도입된 pAUR123-OR-7의 유전자에 의한 것이라는 사실을 확인할 수 있었다.

### 형질전환 효모의 박테리옌 OR-7의 생산 확인

형질전환된 효모로부터 세포추출액을 제작하고 15% SDS-polyarylamide gel을 이용하여 박테리옌 OR-7의 생산을 확인하였다. 그 결과, pAUR123-OR-7 플라스미드가 형질전환된 효모에서 박테리옌 OR-7의 생산을 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

### 박테리옌 OR-7을 생산하는 형질전환 효모의 항균활성 확인

그람양성 대표세균인 *B. subtilis*와 그람음성 대표세균인 *E. coli*, 녹농균인 *P. aeruginosa*, 식중독균인 *C. jejuni* 등에 대한 형질전환 효모의 항균활성에 의해 생성된 생육억제환(clear zone)을 비교·분석한 결과, pAUR123-OR-7이 도입

5' -GGT ACC ATG AAG ACT TAC TAC GGT ACT AAC	30
<u>KpnI</u> Met Lys Thr Tyr Tyr Gly Thr Asn	8
GGT GTT CAC TGT ACT AAG AAC TCT TTG TGG	60
Gly Val His Cys Thr Lys Asn Ser Leu Trp	18
GGT AAG GTT AGA CTA AAG AAC ATG AAG TAC	90
Gly Lys Val Arg Leu Lys Asn Met Lys Tyr	28
GAT CAA AAC ACT ACT TAC ATG GGT AGA TTG	120
Asp Gln Asn Thr Thr Tyr Met Gly Arg Leu	38
CAA GAT ATT TTG TTG GGT TGG GCT ACT GGT	150
Gln Asp Ile Leu Leu Gly Trp Ala Thr Gly	48
GCT TTC GGT AAG ACT TTC CAC TAA TCT AGA-3'	180
Ala Phe Gly Lys Thr Phe His Trm <u>XbaI</u>	55

**Fig. 1. Nucleotide and amino acid sequences of OR-7.** Nucleotide sequence of OR-7 was designated by converting from OR-7 amino acid sequence according to the yeast codon preference. Restriction sites *KpnI* and *XbaI* were introduced at 5'- and 3'-ends of the gene, respectively.



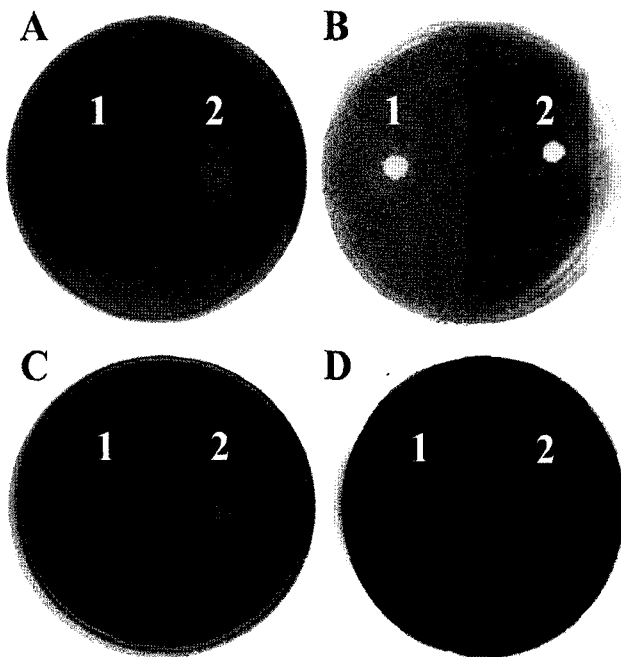


Fig. 5. Identification of the antibacterial activity against. A. *E. coli*, B. *B. subtilis*, C. *P. aeruginosa* and D. *C. jejuni*. 1; *S. cerevisiae* harboring pAUR123, 2; *S. cerevisiae* harboring pAUR123-OR-7.

## 요 약

박테리오신의 일종인 OR-7을 생산하는 효모의 제작을 위하여 180 bp 길이의 개시코돈과 종지코돈을 포함하는 OR-7의 유전자를 합성하여 효모 발현 vector pAUR123에 클로닝하여 재조합 DNA를 작성하였다. 재조합 DNA로 형질전환된 효모가 박테리오신 OR-7 생산유전자를 가지고 있음을 효모로부터 분리된 플라스미드를 이용한 PCR로 확인하였고, OR-7의 생산은 SDS-PAGE로 확인하였다. 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*)과 식중독균(*C. jejuni*)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 박테리오신을 산업적으로 생산할 수 있는 효모세포를 제작하였다.

## 참고문헌

- Ahn, Y. T., K. L. Lim, J. C. Ryu, D. K. Kang, J. S. Ham, Y. H. Jang, and H. U. Kim. 2002. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **15**: 1790-1797.
- Butzler, J. P. 1984. *Campylobacter* infection in man and animal. pp. 1-246, CRC press Inc. Bocaaton, Florida.
- Cox, N. A., C. L. Hofacre, J. S. Bailey, R. J. Buhr, J. L. Wilson, K. L. Hiatt, L. J. Richard, M. T. Musgrove, D. E. Cosyby, J. D. Tankson, Y. L. Vizzer, P. F. Cray, L. E. Vaughn, P. S. Holt, and D. V. Bourassa. 2005. Presence of *Campylobacter jejuni* in various organs one hour, one day, and one week following oral or intracloacal inoculations of broiler chicks. *Avian Dis.* **49**: 155-158.
- Dixon, B. 2000. Antibiotics as growth promoters. Risks and alternatives. *ASM News.* **66**: 264-265.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. *Bacteriol.* **66**: 265-378.
- Ham, J. S., H. S. Kim, K. H. Hong, K. G. Kim, S. G. Jeong, H. S. Chae, J. N. Ahn, D. K. Kang, and H. U. Kim. 2003. Inhibitory activity of lactic acid bacteria against hazardous microbes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **16**: 1550-1554.
- Jacobs-Reitsma, W. F. 1997. Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet. Q.* **19**: 113-117.
- Kim, P. I., M. Y. Jung, Y. H. Chang, S. Kim, S. J. Kim, and Y. H. Park. 2007. Probiotics properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strain isolated from porcine gastrointestinal tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 1103-1111.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, O. H., M.-K. Jang, J.-H. Lee, I.-Y. Ahn, D.-I. Cho, and S.-H. Lee. 2007. Establishment of a bacteriocidal yeast that producing bacteriocin Subpeptin JM4-A or Subpeptin JM4-B. *J. Life Sci.* **18**: 287-290.
- Lee, S. H. 2003. Establishment of a leucocin A producing *Saccharomyces cerevisiae* cell. *J. Life Sci.* **13**: 712-717.
- Nigutová, K., L. Serencová, M. Píknová, P. Javorský and P. Pristaš. 2008. Heterologous expression of functionally active enterolysin A, class III bacteriocin from *Enterococcus faecalis*, in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **60**: 20-24.
- Park, H. S., J. H. Lee, and T. B. Uhm. 1999. Probiotics properties of *Lactobacillus salivarius* isolated from piglet intestines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 830-836.
- Robledo, B. and C. Torres. 2000. Bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* of animal origin. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3908-3909.
- Stern, N. J., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. V. Perelygn, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. D. Pokhilenko, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch, and B. S. Seal. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3111-3116.
- 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.

(Received Dec. 19, 2007/Accepted Mar. 14, 2008)