

Leucocin A로 형질전환된 효모의 항균 활성도

이성일 · 이동근 · 이진옥 · 심두희 · 주치연 · 김옥수 · 이상현 · †이재화
신라대학교 공과대학 생명공학과
(접수 : 2004. 6. 17., 게재승인 : 2004. 8. 26.)

Antibacterial Activity of Yeast Transformed with Leucocin A

Sung-Il Lee, Dong-Geun Lee, Jin-Ok Lee, Doo-Hee Shim, Chi-Hun Joo, Ok-Soo Kim,
Sang-Hyeon Lee, and Jae-Hwa Lee†

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea
(Received : 2004. 6. 17., Accepted : 2004. 8. 26.)

The aim of this study was to figure out the antibacterial pattern of leucocin A transformed yeast with culture. Dry cell weight, total secreted protein, and antibacterial activity were increased to 12 hour, after then they showed decrease while protease activity represented the opposite pattern. This implied the production of leucocin A was growth-related. Compared to the result of one hour culture broth, antibacterial activity was about 3.24 fold at 12 hour culture. Maximum growth inhibition rate was 70.57% compared to nontransformed yeast. As the increase of protease in the supernatant, the antibacterial activity was diminished. This study could permit the mass production of bacteriocin to use as antibiotics or food preservatives.

Key Words : *Saccharomyces cerevisiae*, leucocin A, *Bacillus subtilis*, bacteriocin

서 론

인류는 오래전부터 식품의 부패나 변질을 막고 저장성을 향상시키기 위해 끊임없이 다양한 방법을 시도하였다. 현재 식품의 보존성을 높이기 위한 인공 첨가제들은 인체에서의 잔류성과 독성 때문에 문제가 심각히 대두되고 있다. 따라서 이러한 문제들을 해결하고자 많은 연구들이 있었다(1-4).

박테리옌 (bacteriocin)은 많은 그람양성균과 그람음성균에 의해 생산되는 항균 물질로 주로 단백질 또는 단백질과 탄수화물의 복합체로 구성되어 있다(5). 항균범위는 항균물질 생산균주 자신과 계통분류학적으로 유연관계가 높은 균종에 대해 제한적이며, 항생물질과 유사한 특징을 갖고 있다. Gratia가 1925년 대장균에서 미생물의 성장을 억제하는 colicin 단백질을 발견한 후부터(2), 박테리옌에 대한 연구가 많이 진행되어 왔으며 천연의 무독성 방부제로 간주되었다. 박테리옌은 고온과 광범위한 pH에서 안정성을 띄며 무독, 무색, 무취의 성질을 가지고 있어 화학 합성 방부제의 대체 가능한 천연 방부제 및 약품으로의 용도 개발을 기대 할

수 있다(6). 고온 살균 처리가 불가능한 어육 연제품에의 적용(7)과 발암원에 대한 저항성 등(8)이 보고되고 있으며, 기타 여러 가지 작용도 최근 밝혀지고 있다.

산업적으로 가장 주목을 끄는 항균물질인 박테리옌은 주로 유산균 유래로서(9) 그 대표적인 예가 nisin이다(10). 현재 영국에서 독점생산하고 있는 nisin의 경우 치즈, 발효유, 발효주, 통조림 산업 등에 이용되고 있으며 발효육, 사료산업 등에서 응용 가능성을 생각하면 박테리옌은 부가가치가 매우 높은 물질로 생화학적, 유전학적 연구가 보고되었다(9, 11). Leucocin A는 분자량이 작고 소수성이 큰 분자로, 20개 정도의 소수성 아미노산으로 이루어진 transmembrane helix를 분자 내에 가지고 있다(12). 이들은 세포막에 작용하여 transmembrane potential을 파괴함으로써 세포의 에너지 대사와 물질의 이동을 저해하고, 그 결과 세포를 치사 혹은 정체 상태가 되도록 한다(13).

다양한 미생물 특히 유산균을 이용하여 박테리옌을 생산하고 있지만, 유산균에서는 박테리옌 이외의 이물질이 생산되어 식품의 풍미를 변화시킬 수 있다. 또한 대장균 등의 원핵생물을 이용한 생산에서는 박테리옌에 의한 성장저해가 나타난다. 이러한 단점을 극복하고자 이(3)는 진핵생물인 효모 (*S. cerevisiae*)를 박테리옌의 일종인 leucocin A 생산 균주로 제작하였다. 본 연구에서는 형질전환된 효모 (*S. cerevisiae*)를 이용한 leucocin A 생산 과정에서, 시간에 따른

† Corresponding Author : Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Korea
Tel : +82-51-999-5748, Fax : +82-51-999-5636
E-mail : jhalee@silla.ac.kr

효모의 증식정도와 항균활성 등을 측정하고자 하였다.

재료 및 방법

균주, 배양 배지 및 성장곡선

효모는 YPD 배지 (2% polypeptone, 2% D-glucose, 1% yeast extract)를 사용하여 배양하였다(30°C, 250 rpm). 박테리 오신의 일종인 leucocin A를 생산하도록 형질전환된 효모는 5 mL YPD 배지에 aureobacidin A (Takara)를 최종 농도 0.2 µg/ml가 되게 첨가한 후 배양하였다. 항균활성 조사를 위해 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* (ATCC6633)로 LB 배지 (0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% bacto tryptone)를 사용하여 배양하였다(37°C, 250 rpm). 형질전환된 효모의 성장곡선을 파악하기 위해, 배양하면서 각 시간에 따른 균체량을 광학밀도 (OD₆₀₀)로 측정하였고, 원심분리한 (4°C, 6000 rpm, 3 min) cell pellet을 dry oven (60°C)에서 24시간 이상 건조시킨 후 건조중량 (dry weight)을 측정하였다.

총분비단백질량 (total secreted protein)과 단백질 분해 효소 (protease) 활성 측정

건조중량 측정에서 나온 상층액을 이용하여 총분비 단백질 (Bradford assay, Bio-rad, USA)과 단백질 분해효소 및 항균활성을 구하였다. Protease 활성은 상층액 200 µl와 1% casein (0.2 M Tris-HCl buffer, pH 5.8) 용액 200 µl를 섞은 후 25°C 에서 2시간 반응시켰다. 이후 0.4 M trichloroacetic acid (TCA) 600 µl를 섞어 5분간 반응시키고 원심분리 (6000 rpm, 5 min)하여 상층액의 광학밀도를 측정하였다(OD280).

항균활성 측정

건조중량 측정에서 나온 상층액을 이용하여 고체배지법과 액체배지법으로 항균활성을 측정하였다. 고체배지법은 순화배양한 *B. subtilis*가 도말되어 있는 YPD agar media (aureobacidine 1 µl/ml) 위에 직경 6 mm의 종이 디스크를 올려놓는다. 상층액 20 µl를 디스크에 접종한 후 배양하였고 (30°C, 24시간), *B. subtilis*의 성장저해가 일어나는 거리를 구하였다. 액체배지법은 상층액 300 µl와 멸균된 증류수 300 µl 그리고 3배 농축한 YPD broth 300 µl를 섞은 후 대수증식기에 있는 *B. subtilis*를 40 µl를 접종하였다. 접종 직후와 12시간 배양 후에 광학밀도 (OD₆₀₀)를 측정하여, 배양 전후의 광학밀도 차이를 구하였고, 일정량을 채취하여 YPD 한천배지에서 배양한 후 (30°C, 24시간) 성장한 *B. subtilis* 콜로니를 계수하였다.

결과 및 고찰

형질전환된 균체의 시간에 따른 성장속도

Fig. 1은 leucocin A 유전자로 형질전환된 효모와 형질전환되지 않은 효모가 YPD broth에서 보이는 성장양상을 광학밀도 (OD₆₀₀)로 나타낸 것이다. 형질전환되지 않은 균주의 성장이 조금 우세하였지만, 성장양상과 최대 광학밀도가 유사한 것으로 나타나 leucocin A 유전자가 효모의 성장에 큰 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

Fig. 2A는 형질전환된 효모를 배양하면서 각 시간에 따른 성장 속도와 건조중량을 비교한 결과이다. 광학밀도와 건조중량 모두 12시간까지 증가하였다. 광학밀도로 보면 12시간까지 대수적으로 증식한 후, 정체기와 사멸기로 접어들었다. 하지만 건조중량은 5시간부터는 증가속도가 둔화되었다. 이는 시간에 따른 효모의 생리적 변화에 의한 결과로 사료되었다. Lipase 유전자가 포함된 pW3proROL 벡터로 형질전환된 *S. cerevisiae*의 경우 24시간 이후에 정지기에 접어드는 결과 (14)와 비교하면, 본 연구에서는 일찍 정지기에 접어드는 것을 알 수 있었고 최대 광학밀도 (OD₆₀₀)도 본 연구가 더 높았다. 본 연구에서는 Matsumoto 등(14)과 동일한 포도당 농도를 이용하였지만, polypeptone이 함유된 YPD 배지를 사용한 점과 균주의 차이에 의해 증식속도에 차이가 난 것으로 사료되었다.

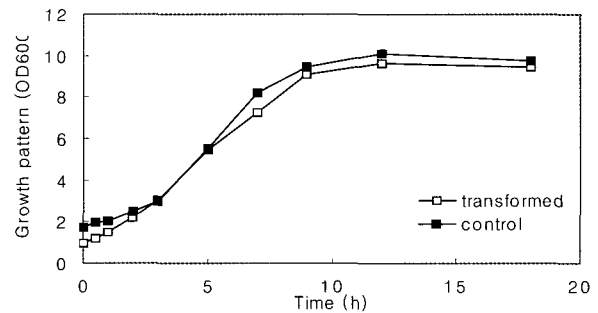


Figure 1. Growth pattern of leucocin A transformed and nontransformed *Saccharomyces cerevisiae* in YPD broth (0.2% aureobacidin A) at 37°C.

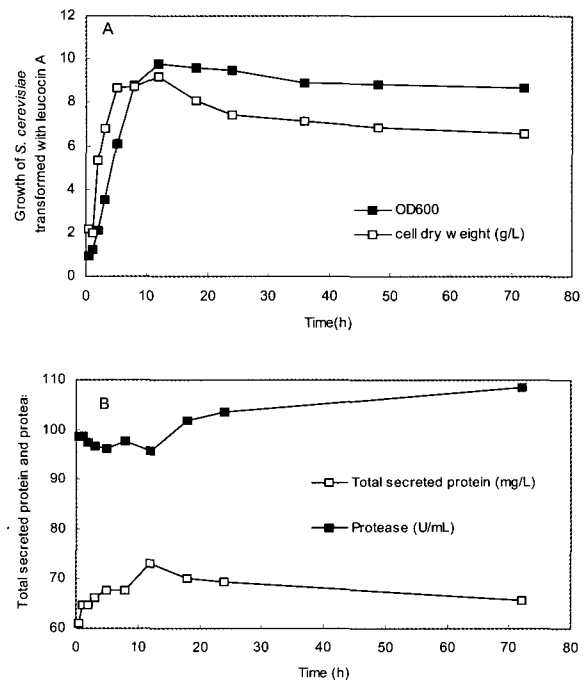


Figure 2. Optical density (OD₆₀₀) and dry cell weight (mg/L) of transformed yeast (Fig. 2A), and patterns of total protein (mg/L) and extracellular protease activity (U/mL) (Fig. 2B) during batch suspension culture in YPD media (0.2% aureobacidin A) at 37°C.

총분비단백질량과 단백질 분해효소

Fig. 2B는 형질전환된 효모가 보이는 시간에 따른 총분비 단백질 량과 단백질분해효소의 양을 측정한 결과이다. 총분비 단백질 량은 Fig. 2A와 같이 12시간까지 계속해서 증가되는 양상을 보였고, 이후에는 감소되는 것으로 나타났다. 최고 값과 초기값의 차이는 약 12.15 mg/L로 나타났고, 8시간과 12시간 사이에 증가폭이 아주 커 건조중량의 양상과 대조를 이루었다(Fig. 2A). 단백질 분해효소의 활성을 측정한 결과는 총분비 단백질과 대조를 이루어 12시간까지 감소하다가, 이후 급속도로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2B). 건조중량 및 광학밀도의 결과와 비교하면, 균체의 성장이 최고조에 이른 12시간까지는 배지의 영양분을 이용하였고, 이후 영양분 고갈에 따른 세포파괴와 살아있는 세포에서의 단백질 분해효소 분비의 양이 증가하는 것으로 사료되었다.

항균 활성 측정

항균활성 측정은 고체배지와 액체배지에서 수행하였다. 고체배지에서의 실험은 고형음식물 등에 투입한 박테리오신의 확산에 중요한 구실을 하며 확산정도는 Arrhenius 식과 연관된다는 보고도 있었다(15). Fig. 3은 형질변환된 효모를 액체 배양하면서 시간별로 원심분리하고, 그 상층액 일정량을 함유한 종이 디스크에서 *B. subtilis*의 성장이 보이는 지점까지의 거리를 측정하는 결과이다. 항균활성은 배양 시간에 따라 증대 되었고, 정지기(Fig. 2A) 이후에 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 광학밀도 등과 같이, 형질전환된 효모를 12시간 배양했을 때 항균활성이 가장 큰 것을 알 수 있었다. 항균활성을 보이는 면적은 배양 12시간 후가 배양 1시간 후의 2.52 배였으며, 상층액의 확산정도가 동일하다고 가정하면 부피로는 3.28배로 계산되었다. 항균활성을 보이는 부피에서 유추하면 배양 12시간 후가 배양 1시간 후에 비해 3배 이상 항균활성이 높은 것을 알 수 있었다.

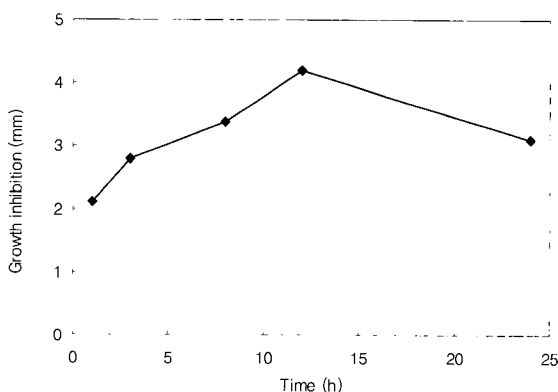


Figure 3. Antibacterial activity against *Bacillus subtilis* on YPD agar media. The length of clear zone from disk, soaked by 20 μ l supernatant of culture broth of leucocin A transformed yeast, was measured on agar media after 24 hour culture of *B. subtilis*.

Fig. 4는 액체배지를 통해 알아본 항균활성으로 형질전환되지 않은 효모 배양액의 상층액과 형질전환된 효모 배양액의 상층액에서 성장한 *B. subtilis*의 광학밀도(Fig. 4A)와 세균

수(Fig. 4B)를 나타낸 것이다. *B. subtilis*의 성장은 형질전환되지 않은 효모의 배양액에서 시료채취시간 동안 큰 차이를 보이지 않았지만, 형질전환된 효모의 배양액에서는 시료채취 시간별로 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다. 항균활성의 정도를 보면 초기에는 9.23%의 항균활성을 보였고, 12시간 배양 후에는 70.57%의 항균활성을 보이는 것으로 나타났다. 고체배지에서의 항균활성과 같이(Fig. 3), 12시간 배양까지 *B. subtilis*에 대한 항균력이 증가하는 것을 알 수 있었고, 이후는 급격하게 항균력이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). Matsumoto 등(14)은 protease의 활성은 조사하지 않았지만, 형질전환된 *S. cerevisiae*가 세포 성장의 정지기에 접어든 이후에도 재조합된 lipase의 분비가 증가했던 것과 대조를 이루는 것을 알 수 있었다.

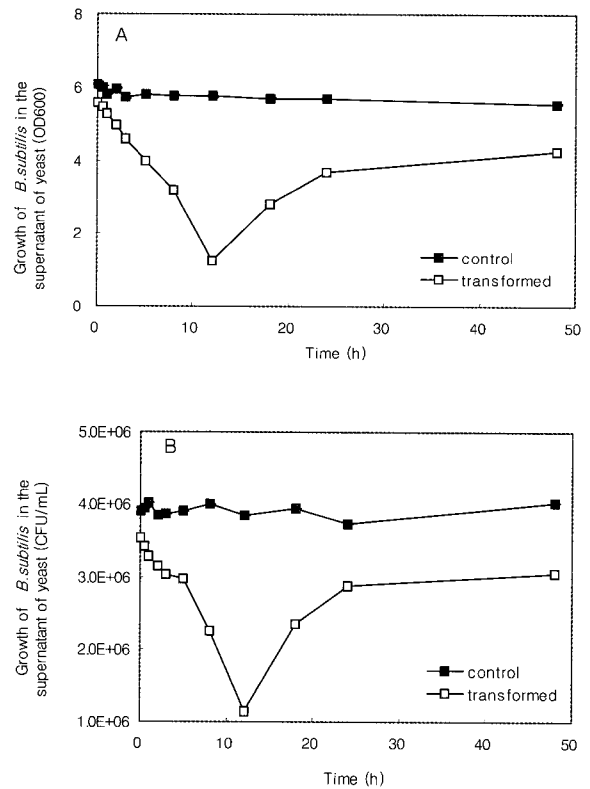


Figure 4. Antibacterial activity against *Bacillus subtilis* in YPD broth. The supernatant of centrifugation was sampled from control and transformed yeast culture broth at each time (X-axis). After culture of *B. subtilis* in the supernatant for 24 hour, OD600 (A) and bacterial concentration (B) were measured.

*S. cerevisiae*에서 박테리오신의 일종인 plantaricin 423의 생산을 유도한 논문이 있었고(16), 이(3)는 생체 내에서 합성된 후 아미노산 수식이 필요없는 leucocin A 유전자들, pAUR123 벡터를 이용하여 효모에 도입하여 항균활성을 가지는 효모를 제작하였다. 본 연구에서는 형질전환된 효모의 성장양상에 따른 항균활성을 측정하였다. 이 결과를 바탕으로 식품의 보존성 향상이나 병원균 생육 억제에 위한 항생제 등, 향후 산업적 생산공정에의 적용이 가능할 것이며, 생산성 향상 등의 실험을 통하여 파광생산도 가능할 것으로

사료된다.

요 약

박테리오신의 일종인 leucocin A로 형질전환된 효모가 보이는, *B. subtilis*에 대한 항균 활성을 파악하기 위하여 형질 전환되지 않은 효모와 형질전환된 효모를 배양하면서 시간별로 채취하여 광학밀도, 건조중량, 총단백질량, 단백질 분해효소 그리고 항균활성을 측정하였다. Leucocin A의 항균활성은 성장양상과 비례하였다. 배양초기에 비해 12시간 배양 후에 항균활성이 3배 이상 증가하는 것으로 나타났고, 이때 *B. subtilis*의 성장이 70.57% 감소하는 것으로 나타났다. 정지기 이후에는 항균활성이 급속히 감소하였는데, 이는 항균활성을 보이는 leucocin A가 단백질이고, 단백질 분해효소가 정지기 이후 증가한 것에 의한 것으로 사료되었다. 이 연구는 향후 식품산업 등에 사용할 수 있는 bacteriocin의 산업적 생산에 필요한 기초자료를 제공할 수 있을 것이다.

감 사

이진옥, 심두희, 김옥수 이상 3명 학생은 Brain busan 21과 석·박사 인력 양성 사업에서 인건비 지원을 받아 수행되어 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Tagg, G. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker (1976), Bacteriocin of Gram-positive bacteria, *Bacteriol. Rev.* **40**, 722-756.
2. Riley, M. A. and J. E. Wertz (2002), Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives, *Biochimie* **84**, 357-364.
3. Lee, S.-H. (2003). Establishment of a Leucocin A producing *Saccharomyces cerevisiae* cell, *Kor. J. Life Sci.* **13**, 712-717.
4. 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.
5. Davis, D. B., R. Dulbecco, N. H. Eisen, and S. H. Ginberg (1990), *Microbiology*, 4th ed. Lippincott company, Philadelphia, PA, 589-594.
6. Reid, G. and J. Burton (2002), Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria, *Microbes Infect.* **4**, 319-324.
7. Kim, H.-J., N.-K. Lee, S.-M. Cho, K.-T. Kim, and H.-D. Paik (1999), Inhibition of spoilage and pathogenic Bacteria lacticin NK24,a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* NK24 from fermented fish food. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 1035-1043.
8. Chen, J., D. M. Stevenson, and P. J. Weimer (2004), Albusin B, a Bacteriocin from the ruminal bacterium *ruminococcus albus* 7 that inhibits growth of *ruminococcus flavefaciens*, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3167-3170.
9. Klaenhammer, T. R. (1988), Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochimie* **70**, 337-349.
10. Delves-Broughton, J. (1990), Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**, 100-117.
11. Ralph, W. J., J. R. Tagg, and K. Bibek (1995) Bacteriocins of gram positive bacteria, *Micobiol. Rev.* **59**, 171-200.
12. Hastings, J. W., M. Saitoer, K. Jhonson, 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.
13. Jack R. W., J. R. Tagg, and B. Bay (1995), Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**, 171-200.
14. 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-Ezym.* **17**, 143-149.
15. Sebti, I., D. Blanc, A. Carnet-Ripoche, R. Saurel, and V. Coma (2004), Experimental study and modeling of nisin diffusion in agarose gels, *J. Food Eng.* **63**, 185 -190.
16. Van Reenen, C. A., M. L. Chikindas, W. H. Van Zyl, and L. M. T. Dicks (2003), Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*, *Int. J. Food Microbiol.* **81**. 29- 40.