

EMS에 의하여 철 함유 능력이 증진된 효모 돌연변이주의 선별

양승남 · 송형석 · 이종립 · 김해영*
경희대학교 식품생명공학과

Selection of Enhanced Iron Uptake Yeast Mutants by EMS Mutagenesis. Yang, Seung-Nam, Hyung-Seok Song, Jung-Lim Lee, and Hae-Yeong Kim*. Department of Food Biotechnology, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea – Iron required by all organisms is related with diverse biological processes. Most eukaryotes need extra iron to maintain their nutrition balance. However, extra iron supplement gives many problem to solubility in the cells. To increase the bio-availability of iron in cells, yeast was applied to carry the iron with solubility. Selection of yeast mutants with enhanced iron uptake were performed by mutagenesis using the alkylation agent EMS. Eleven mutant strains with enhanced iron uptake were selected by the measurement of iron content with atomic absorption spectrometer. The iron content in mutants was 1.5- to 2.5-fold more than that in wild-type. These mutants could be served as iron-fortified nutrients for food and feed.

Key words: Ethyl methane sulphonate (EMS), iron, mutant, yeast

철은 인체뿐만 아니라 동물에서도 필수 미량 무기 물질로서 생체내의 산소운반, 전자전달 등의 생명유지에 관계되는 중요한 역할을 한다[3, 11]. 생체 내에 철은 동물체에는 약 0.04%가 함유되어 있고, 이중 약 70%는 적혈구중에 포함되어 산소운반기능을 하는 헤모글로빈 형태로 존재하고, 나머지 약 30%는 간, 지라, 골수 등에 존재하면서 산소운반과 생체에너지 획득에 중요한 전자전달계 구성요소인 시토크롬, 카탈라아제 및 옥시다아제 등의 구성성분으로 생체 유지에 필수 요소로 존재한다. 이러한 철은 지구상에서 두 번째로 많이 존재하는 물질이지만 대부분 생체이용률이 저조한 Fe^{3+} 로 존재한다. 때문에 생물체들은 효소를 통하여 Fe^{3+} 를 이용 및 저장할 수 있는 Fe^{2+} 의 형태로 전환한다[14]. 사실상 체 내에서 철의 환원되는 량과 흡수되는 량이 매우 적으므로 이를 극복하기 위하여 과량의 철을 섭취하여 위장장애를 유발하는 경우도 있다. 따라서 철 흡수의 문제를 개선하기 위한 노력으로 시트르산 철(iron citrate), 덱스트란 철(iron dextran), 푸말산 철(iron fumarate) 및 숙신산 철(ferrous succinate) 등의 유기산이나 고분자 전분질과 결합된 형태로 만들거나, 또는 철을 단백질과 킬레이트한 단백질과 같이 비교적 흡수가 용이한 형태의 철이 개발되어 있다. 그러나, 이와 같은 유기 철도 생체내로 흡수되어 위를 통과할 때 산성, 펩신의 작용에 의한 Fe^{2+} 에서 Fe^{3+} 로 원래 형태로 변하게 됨에 따라 흡수율, 이용률 저하 및 위장장애 등의 문제점이 있다[12]. 이러한 철의 흡수의 문제점을 개선하기 위한 방법 가운데 효

모를 이용한 유기 철의 이용에 대한 연구들이 시도되고 있다[7]. *Saccharomyces cerevisiae*는 GRAS에 속하여 식용이 가능하고, 철의 대사과정이 많이 연구가 진행되어 이러한 미생물을 이용하여 효율적으로 유기철의 농도가 높은 효모를 개발하는 것에 많은 관심이 있어왔다[1, 4, 6, 9, 15].

따라서 본 연구에서는 *S. cerevisiae*의 철 함유율을 높이기 위해 EMS(ethyl methane sulphonate)방법을 이용하여 기존의 효모보다 철 저장능력 높은 산업적으로 이용 가능한 돌연변이주를 선별하여, 그 특성을 연구하였다.

실험에 사용한 균주인(Table 1) *Pichia pastoris*는 Invitrogen에서, *S. cerevisiae*는 본 연구실에서 분리한 균주와 표준균주를 Korean Collection for Type Culture(KCTC)로부터 분양받아 사용하였다. 사용 배지는 YM broth와 agar이며 조성은 0.3%(w/v) yeast extract, 0.3%(w/v) malt extract, 1%(w/v) glucose, 0.5%(w/v) peptone, 및 1.5%(w/v) agar이며 배양 온도는 30°C에서 수행하였다. 철 공급원으로는 ferric citrate를 사용하였고 YM 배지에서 효모가 흡광도 600 nm에서 0.4를 나타낼 때 철 공급원에 첨가하였다. 철이 첨가된 배지에서 배양된 균주를 30시간 진탕 배양한 후 600 rpm에서 15분간 원심 분리하여 균체를 포집하였다. 포집된 균체를 증류수로 3회 이상 세척한 다음 60°C에서 하루 동안 건조시켰다. 이후 건조균체량 0.4 g에 nitric acid(Sigma)와 perchloric acid(Sigma)를 2:1(v/v)의 비율로 첨가하여 회화시키고 증류수로 최종 100 ml을 맞추어 회석하였다. 회석이 완료된 시료는 0.45 μ m filter에 걸러내었다. 또한 배지 내에 철이 함유되지 않은 대조구도 위와 같은 방법으로 물질을 추출하였다.

균주에서 추출한 물질의 철 함량 측정에는 atomic absorption spectrometer(AAS)(Shimadzu, AA-640, Japan)를 사용하였다[13]. 사용조건은 air-acetylene gas를 이용하였으며, 유속

*Corresponding author
Tel: 82-31-201-2660, Fax: 82-31-204-8116
E-mail: hykim@khu.ac.kr

Table 1. Strains of yeast used in this study.

Strain	Strain source or genotype		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCTC7924	KCTC7928	KCTC7919
	KHU3	KHU9	YPH449
	GS115	KM71	
<i>Pichia pastoris</i>	GS115	KM71	

KCTC: Korean Collection for Type Culture

은 2.2 l/min으로 조정하여 BGC-D2 lamp에서 248 nm 파장으로 분석하였다. 철 표준용액은 Accustandard Inc.(USA)의 제품을 이용하였고 필요에 따라 희석하여 AAS 표준 적정에 이용하였다. 효모 균체내의 철 함량은 건조균체 1 g당 철의 무게로 환산하였으며, 그 밖의 AAS 작동 및 조건은 제조회사의 권장사항에 맞춰 분석하였다.

돌연변이는 EMS(Sigma, USA)를 사용하여 기존에 보고된 방법을 일부 변형하여 다음과 같은 방법으로 수행하였다 [2]. 균주를 YM배지에 배양하여 대수기에 균체수가 2×10^8 /ml이 될 때까지 키우고 이를 세척 후 멸균된 0.1 M 인산 완충액(pH 7.0)에 6×10^7 /ml로 희석하였다. 이중 0.7 ml을 취하여 같은 완충액으로 1.7 ml로 맞추고 나머지는 대조균으로 저장하였다. 이후 돌연변이를 일으키기 위해 1.7 ml 희석 균주에 50 μ l의 EMS를 첨가한 뒤 70%의 치사율로 30°C에서 진탕 배양한 뒤 마지막으로 배양된 일부 200 μ l을 5%(w/v) sodium thiosulfate 용액 8 ml과 섞은 뒤 반응을 종결시켰다. 반응물을 1/1,000으로 희석한 다음 100-200개의 콜로니가 생성되도록 YM agar배지에 도말한 뒤 30°C에서 4-5일간 배양하였다.

KCTC에서 분양받은 균주와 분리균주에서 철 함량을 측정하여 가장 높은 철 함량을 갖는 균주를 선별하고자 하였다. 먼저 돌연변이를 일으키기 전 단계로 각 분양균주로부터 철의 흡수효율이 높은 균주를 선별하기 위해 철이 20 mM 첨가된 것과 철이 들어있지 않은 YM 배지에 효모 균주를 접

종한 뒤 균체내에 있는 철의 농도를 조사하였다(Table 2). 철의 농도는 균체 수용액에서 연소시 발생하는 철 고유의 에너지 준위차를 측정한 다음 철 표준용액과 비교하여 철 농도를 정량하였다. 분석결과 본 연구에서 분리균주인 *S. cerevisiae* KHU3인 경우 151에서 511 μ g/g(건조균체)으로 약 3.3배의 철 흡수율을 보였으며, YPH449 경우 452에서 999 μ g/g으로 1.4배의 차이를 보였다. 또한 KHU9의 경우 521에서 703 μ g/g으로 1.4배의 차이를 나타내었다. *P. pastoris* KM71과 GS115의 경우, 균주내의 철의 함량이 약 400에서 1,700 μ g/g으로 4배 정도의 비슷한 철의 흡수율을 보였다. 그러나, 효모 내에서의 현저한 철 흡수 결과는 *S. cerevisiae* KCTC7924, KCTC7919 및 KCTC7928 표준균주에서 관찰되었다. KCTC7928의 경우 철의 함량이 111에서 5,589 μ g/g으로 50배의 철 흡수 증가를 보였으며, 8개의 균주 중 가장 높은 철 흡수율을 나타내었다. 따라서 최종 EMS 돌연변이를 위해 *S. cerevisiae* KCTC7928을 선별하였다.

선별된 철 함량이 높은 효모에서 철 저장능력을 보다 높은 방법으로 EMS를 이용하였다. EMS는 돌연변이제로 가장 일반적으로 사용되고 염기서열에 직접 작용하여 G/C 염기쌍을 A/T 염기쌍으로 바꾸며 위치상으로는 무작위로 작용한다[2]. 따라서 철 흡수율이 우수한 bio-availability가 높은 효모를 선별하기 위해 KCTC7928 균주를 이용 EMS 처리를 하여 철 함유능력을 높은 돌연변이주를 선별하였다. 돌연변이제 처리 후 3시간 동안 치사율이 70%까지 도달하는 하한에 걸리는 시간을 조사하였다. 생존율은 처리 후 45분간까지 90%이상을 유지하였으나 1시간이 지나서 급격히 감소하였으며, 90분 후 목적 치사율에 도달하였다. 기존연구에 의하면 돌연변이나 특정 철 관련 유전자 조작에 의해 철에 대한 내성이 높은 효모균주 일수록 균체내에 철의 함량이 높은 것으로 보고 되어있다[1, 13-15]. 따라서 돌연변이제에 의한 30%의 생존율을 보이는 돌연변이 균주를 철에 대한 내

Table 2. Intracellular iron content of yeasts in this study.

Strains	Iron concentration		Strains	Iron concentration	
	Medium (mM)	Yeast (μ g/g) ^a		Medium (mM)	Yeast (μ g/g)
<i>S. cerevisiae</i>					
KHU3	20	511.3±32	KCTC7924	20	4593.6±326
KHU3	0	151.9±17	KCTC7924	0	487.7±39
KHU9	20	703.3±56	KCTC7919	20	4170.4±274
KHU9	0	520.9±47	KCTC7919	0	407.5±29
YPH449	20	999.2±72	KCTC7928	20	5589.2±471
YPH449	0	452.4±35	KCTC7928	0	111±16
<i>P. pichia</i>					
KM71	20	1544.3±109	GS115	20	1748.4±132
KM71	0	418.5±62	GS115	0	397.5±62

a: Represents iron weight per 1 g dry cell weight

Table 3. Intracellular iron content of selected yeast mutants.

Strains	Iron concentration in medium (mM) ^a		
	0	10	20
Wild type	334±35 ^b	2340±390 ^b	6250±797 ^b
S4-26	441±52	5224±675	14400±1782
S6-13	160±33	3432±423	13750±1526
S9-24	290±42	4937±374	14501±1449
S11-39	310±36	5310±520	15925±2023
S15-27	525±49	5460±616	13176±1646
S22-47	650±74	5350±812	10026±1320
S35-39	666±91	5300±463	9850±1021
S37-49	228±53	4162±523	10076±1293
S40-44	297±30	5555±701	14800±1320
S53-40	245±27	5725±506	13975±1854
S73-42	330±39	4425±365	13275±1673

a: Ferric citrate concentration in YM medium in which yeast cell was cultured.

b: Represents iron weight per 1 g dry cell weight (μg/g).

성능력을 조사하기위해 대조군 KCTC7928과 함께 10-60 mM ferric citrate가 순차적인 농도로 포함된 YM plate에 도말하였다. 대조군 KCTC7928의 경우 40 mM까지 경미한 성장을 보였으나 50 mM에서는 균락의 성장이 보이지 않았다. 그러나 돌연변이시킨 균주의 경우 40 mM 과 50 mM 농도 모두에서 효모의 전형적인 균락의 성장을 보였다. 내성에 대한 결과를 토대로 돌연변이주의 선별은 50 mM ferric citrate농도에서 수행하였으며 5,000개의 콜로니를 선택하여 replica plate를 한 다음 같은 조건으로 반복 계대 도말하여 동일하게 자라는 43개의 콜로니를 선택하였다. 콜로니의 표현형은 다른 철 농도에 비해서 특히 50 mM에서 갈색의 성상을 띄었으며, 이중 상대적으로 콜로니의 균락성장이 큰 11개의 효모 돌연변이주(S4-26, S6-13, S9-34, S11-39, S19-27, S22-47, S35-39, S37-49, S40-44, S-53-40, S73-42)를 다음 실험을 위해 최종 선별하였다.

선별전 대조구 균주와 선별된 11개의 효모 돌연변이주를 0, 10, 20 mM ferric citrate가 들어있는 액체배지에 접종하여 철의 함량을 조사하였다. Table 3에서 알 수 있듯이 대체적으로 배지에 있는 철의 함량이 높을수록 균체내의 철의 함량이 높았다. 이중 5개의 효모 돌연변이주(S4-26, S9-24, S11-39, S40-44, S53-40)가 철 농도 20 mM에서 14,000 μg/g 이상의 높은 철의 함유량을 보였으며, 대조구와 비교 시 10, 20 mM에서 각각 15-20배 및 45-60배의 차이를 보였다. 각각의 효모 돌연변이주간의 철의 함량은 10, 20 mM에서 2-3배의 차이를 보였으며, 이중 S11-39 돌연변이주가 가장 높은 철의 함량을 보였다. *S. cerevisiae*에서 철 흡수는 크게 두 가지 기작(reductive, non-reductive mechanism)에 의해 이

루어지고 있으며, 그 중 하나인 reductive 메커니즘은 1 μM 이상의 철 농도 환경에서 surface reductase에 관여하는 *FRE1/FRE2* 유전자 및 plasma membrane으로부터 철 수송에 관여하는 *FTR1/FET3, FET4* 유전자에 의한 단백질에 의해 철이 효모내로 축적된다고 보고되었다[5, 10, 15]. 따라서 EMS의 처리에 의한 효모 돌연변이주는 야생주의 효모와 달리 위에서 언급한 유전자들의 돌연변이에 의한 철 흡수의 증가로 사려된다. 또한, 철이 있는 조건과 없는 조건에서의 효모 돌연변이주의 성장증식 차이를 조사하였다. 기존의 연구에서 대장균 및 효모 등의 배양에 있어 철을 첨가 시 산화작용에 의한 과산화 radical을 형성, 미생물의 세포벽 손상 및 성장을 억제시킨다고 보고되었다[7]. 그러나 본 실험의 결과에 있어 돌연변이주 및 야생주 모두 flask내에서 균체의 포화시간이 1일이 소요되었으며, 선별된 효모 돌연변이주의 경우 성장의 억제는 야생주와 비교시 2-3%로, 시간에 따른 유도기, 대수기, 정지기 모두 보통상태의 YM배지에서 키운 야생주 효모의 성장 곡선과 큰 차이가 없었다(data not shown). 이는 본 연구에서 EMS를 처리하여 선별한 효모 돌연변이주가 철의 흡수율이 높고, 철에 대한 내성을 가지고 있는 산업적으로 이용 가능한 균주 선별을 의미한다. 또한 S11-39 돌연변이 균주는 기존의 *S. cerevisiae* ferritin 유전자의 형질 전환체 균체내의 철 농도인 1,004 μg/g 보다 15배 이상 높은 수치로서[8, 13], 상업적인 이용가치를 높이기 위해 앞으로 발효 공학 측면 및 분자생물학 기법 이용한 해석접근이 이루어져야 할 것으로 사려된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다(03-PJ1-PG3-22000-0008).

REFERENCES

1. Askwith, C., D. Eide, A. H. Van, P. S. Bernard, L. Li, S. Davis-Kaplan, D. M. Sipe, and J. Kaplan. 1994. The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**: 403-410.
2. Cid, V. J., S. Miguel, and N. Cesar. 1994. Characterization of thermosensitive autolytic mutants from diploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**: 559-568.
3. Dallman, P. R. 1986. Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* **6**: 13-40.
4. Dancis, A., R. D. Klausner, A. G. Hinnebusch, and J. G. Barriocanal. 1990. Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2294-2301.
5. Dix, D. R., J. T. Bridgham, M. A. Broderius, C. A. Byersdorfer, and D. J. Eide. 1994. The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*.

- J. Biol. Chem.* **269**: 26092-26099.
6. Georgatsou, E. and D. Alexandraki. 1994. Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 3065-3073.
 7. Halliwell, B. and J. M. Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.
 8. Kim, H. J., H. M. Kim, J. H. Kim, K. S. Ryu, S. M. Park, K. Y. Jahng, M. S. Yang, and D. H. Kim. 2003. Expression of heteropolymeric ferritin improves iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1999-2005.
 9. Lee, J. L., H. S. Song, H. J. Kim, J. H. Park, D. K. Chung, C. S. Park, D. Jeoung, and H. Y. Kim. 2003. Functional expression and production of human H-ferritin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1019-1023.
 10. Lesuisse, E., P. L. Blaiseau, A. Dancis, and J. M. Camadro. 2001. Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **147**: 289-298.
 11. Mascotti, D. P. 1985. Iron nutritional and physiological significance. *Nutr. Rev.* **43**: 195-197.
 12. Randhawa, R. R. and B. L. Kawatra. 1994. Biological evaluation of iron availability from pre-adolescent diets by using anaemic rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* **45**: 315-320.
 13. Shin, Y. M., T. H. Kwon, K. S. Kim, K. S. Chae, D. H. Kim, J. H. Kim, and M. S. Yang. 2001. Enhanced iron uptake of *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of a tadpole ferritin gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1280-1283.
 14. Yun, C. W., M. Bauler, and E. M. Robert. 2001. The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 10218-10223.
 15. Yun, C. W., T. Ferea, J. Rashford, O. Ardon, P. O. Brown, D. Botstein, J. Kaplan, and C. C. Philpott. 2000. Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 10209-10217.

(Received Sep. 9, 2003/Accepted Dec. 9, 2003)