

Zymomonas mobilis Plasmid Vector의 숙주세포 내에서의 안정성에 관한 연구

이상기^{1*}·박은숙¹·황덕주¹·박무영²

한국과학기술원 ¹유전공학센터, ²생물공학과

Stabilities of Plasmid Vectors in *Zymomonas mobilis*

Rhee, Sang-Ki^{1*}, Eun-Sook Park¹, Duk-Ju Hwang¹ and Moo-Young Pack²

¹ Genetic Engineering Center, ² Department of Biological Science and Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology P.O. Box 150, Cheongryang, Seoul, Korea

The stabilities of plasmid vectors in *Zymomonas mobilis* were tested in batch and continuous cultures. It was found that the growth of the host *Zymomonas* strain was greatly affected by the size of plasmids as well as the composition of nutrient media: the host cells grew faster when harboring plasmids of smaller sizes and in a non-selective medium. All the *Zymomonas* plasmid vectors containing antibiotics selective markers and *Zymomonas* replication origins could be maintained in a stable manner over 30 generations without being integrated into host chromosomes.

Zymomonas 균주는 기존의 알코올 생성 균주인 효모에 비해 알코올의 생산수율 및 생산성이 높으며 glucose 및 ethanol에 대한 내성도 높을 뿐만 아니라 혐기적 특성을 지니고 있어 1979년 이래 알코올 발효 균주로서 크게 각광을 받아왔다(1). 그러나 이 균주는 탄소원으로서 glucose, fructose 및 sucrose만을 이용 가능하기 때문에 산업적인 유용성이 떨어진다는 단점이 있다(2). 따라서 유전자 재조합 기술을 이용하여 이 균주의 기질 이용도를 넓히려는 시도가 여러 각도로 이루어지고 있으나 아직까지 *Zymomonas* 균주에 대한 유전학적 기초연구가 미진하여 어려움을 겪고 있다. *Zymomonas* 균주를 유전공학적으로 육종하기 위해서는 우선적으로 유용유전자를 도입시키는데 필요한 유전자 운반기구인 plasmid vector의 개발이 이루어져야 한다. 이에 대한 방안으로서 그동안 *Escherichia coli*와 *Pseudomonas aeruginosa*의 R plasmid를 conjuga-

tion에 의해 *Zymomonas*로 전이시켜 plasmid vector를 개발하려는 시도가 많이 이루어졌다(3~5). 이에 따라 지금까지 *Zymomonas-E. coli*의 shuttle vector가 수종 개발되었으나(6~10), 이 plasmid vector들이 숙주세포 내로 전이되었을 때 독립적으로 안정하게 유지될 수 있는지에 대해서는 보고된 바가 거의 없는 상태이다. 이러한 관점에서 본 연구에서는 그동안 저자들에 의해 개발된(10) 수종의 plasmid vector들의 숙주세포 내에서의 안정성을 회분 및 연속배양법을 이용하여 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid vector의 제조

숙주세포로는 natural plasmid의 수가 가장 적고 알코올 생성 효율이 높은 *Zymomonas mobilis* ZM4 (ATCC 31812)를, 각 plasmid들은 이 숙주세포인

Key words: *Zymomonas mobilis*, plasmid vectors, stability, host cells

* Corresponding author

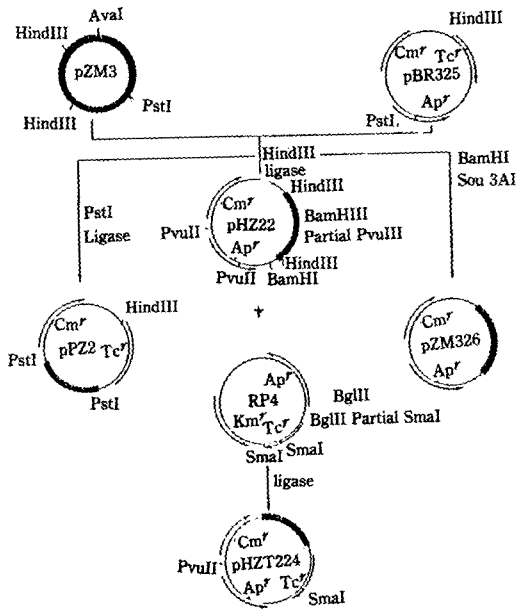


Fig. 1. Construction and structure of plasmids

ZM4에서 복제가 가능하며 적당한 항생제 저항표지를 가질 뿐만 아니라 분자량이 작은 pPZ 2, pHZ 22, pHZT 224, pSZ 326 등을 사용하였다. 각 plasmid의 제조방법과 구조는 Fig.1에 표시하였다. pPZ 2는 *Z. mobilis*의 replication origin의 크기가 3.9 kb, pHZ 22는 2.36 kb, pSZ 326는 0.48 kb이고 공히 chloramphenicol 내성 유전자를 포함하고 있으며 pHZT 224는 pHZ 22와 replication origin의 크기는 같지만 chloramphenicol 외에 tetracycline의 내성 유전자가 포함되어 있다(10).

형질전환에 사용된 균주는 *E. coli* HB 101 (F⁻, hsd 20(r_B, m_B⁻), recA 13, ara-14, proA 2, lacY 1, galK 2, rpsL 20(Sm^r), xyl-5, mtl-1, SupE 44, λ⁻)이었다.

배 지

*Zymomonas*의 배양은 Rich medium (RM) (3)을 사용하였으며 그 조성은 배지 1 l당 glucose 20g, yeast extract 10g, KH₂PO₄ 0.1g 이었다.

Non-selective 배지로는 RM 배지를 그대로 사용하였고 selective 배지로는 non-selective 배지에 30 μg/ml의 chloramphenicol을 가하여 사용하였으며 pH는 2N HCl을 사용해서 6.0으로 조절하였다.

*E. coli*의 배양에는 LB (Luria-Bertanii) 배지를 사용하였다.

배양조건

균주 접종액은 반드시 각 plasmid를 포함하고 있어야 하므로 한천 배지상에서 single colony를 선별하여 chloramphenicol을 포함한 10 ml의 RM broth에 접종한 후 30°C에서 24시간 배양하여 종균으로 사용하였다. 접종균 농도로서는 균체 성장속도 측정을 위해서는 최종 농도의 1%를, 안정성 측정을 위해서는 ml당 100마리 정도를, 연속 배양시에는 최종 농도의 5%를 사용하였다.

발효조로는 Bioflow fermentor (New Brunswick Chemostat, Model 32)를 사용하였고 배양조건은 pH 6.0, 30°C 및 100 rpm 정도의 교반상태로 고정하였으며 회석을 D=0.11 h⁻¹, 배지의 유속은 500 ml/hr로 고정하여 수행하였다.

Plasmid DNA의 분리 및 전기영동

Chloramphenicol로 증폭시키지 않고 바로 추출하였으며 Birnboim 등(12)에 의한 alkaline-SDS 방법을 윤 등(9)에 의해 약간 변형된 방법에 따라 분리하였다. 전기영동은 TBE와 TAE 완충용액을 사용하여 Maniatis 등(13)의 방법에 따라 수행하였다.

분석방법

균체 성장속도의 측정은 550 nm에서 optical density를 측정하는 것과 생균수 측정을 병행하였으며 안정도 측정은 역시 550 nm에서 optical density를 측정한 후 한천을 포함한 non-selective 배지와 selective 배지에 각각 toothpicking 하여 나타난 colony의 수를 비교하여 균주의 성장에 따른 안정도의 변화를 조사하였다. 환원당의 측정은 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법(11)을 이용해서 측정하였다.

결과 및 고찰

Plasmid가 숙주세포의 증식에 미치는 영향

크기가 각각 다른 4종류의 *Zymomonas* vector들을 숙주세포내로 전이시켰을 때 plasmid의 크기나 숙주세포 배양 배지의 조성에 따라 숙주세포의 증식에 어떤 영향을 미치는가를 조사하였다. Table 1에 표시한 대로 plasmid가 존재하지 않는 숙주세포의 증식이 가장 빨랐고 plasmid의 크기가 커질수록 숙주세포의 성장속도는 상대적으로 느려짐을 알 수 있었다.

Table 1. Effect of plasmid size and medium composition on growth of *Z. mobilis* host strains.

Plasmids	Size (kb)	Specific growth rate (hr ⁻¹)		Growth ratio μ^-/μ^+
		Selective medium	Non-selective medium	
None	—	—	0.29	—
pSZ 326	6.5	0.26	0.28	1.07
pHZ 22	8.4	0.24	0.26	1.08
pPZ 2	9.9	0.19	0.23	1.21
pHZT 224	10.7	0.18	0.22	1.22

배지를 selective와 non-selective로 구분하여 배양했을 경우 non-selective 배지에서 더욱 빠른 성장을 보였고 plasmid 크기가 증가함에 따라 증식비(μ^-/μ^+)도 증가하는 현상을 보여주었다. 이상의 결과로부터 plasmid의 크기와 배지의 조성이 숙주세포의 증식에 영향을 미침을 알 수 있었다. 이는 *E. coli* (14~16)나 효모(17~18) 경우와 동일한 양상으로서 원래의 세포내에 존재하지 않던 extra plasmid를 숙주세포가 받아들임으로써 이들이 증식 또는 물질대사에 있어서의 부담 요인으로 작용하여 이를 극복하는데 시간이 걸리기 때문인 것으로 사료된다.

회분배양을 통한 각 plasmid의 안정성 조사

제조된 plasmid 각각을 숙주세포로 전이시켰을 때 이들이 숙주세포내에서 어느 정도 안정하게 지속적으로 유지되는가를 1 l 삼각 flask를 이용한 회분배양을 통해 조사하여 vector로서의 유용성을 알아 보았다.

안정성 측정시 1회 배양에서 최소한 30세대 이상을 유지할 수 있도록 균의 접종 농도를 ml당 100마리 정도(15)로 조절하였고 세대수에 따라 전체 세포당 plasmid를 지닌 세포의 분율(F)를 조사하였다. 30세대의 결정은 유전자 재조합된 균주를 이용하여 필요한 유전자 산물을 얻는 과정에서 scale-up 할 경우 일반적으로 통용되는 5단계 과정을 기준으로 삼았다(19). 즉 slant로 부터 20 ml flask, 300 ml flask, 10 l 용적의 발효조, 3000 l pilot 발효조 그리고 100 ton 규모의 생산 발효조를 거치는 각 과정에서 세포가 증식할 때 5~6세대를 거치게 되므로 총 25~30세대까지 안정되게 유지되어야만 산업적 가치

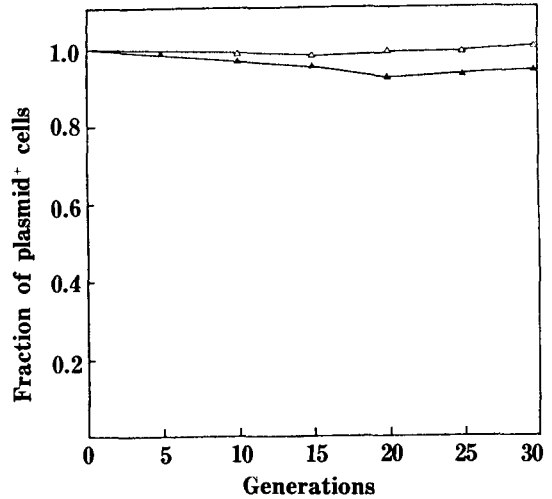


Fig. 2. Stability of plasmid pPZ2
△ selective medium ▲ nonselective medium

를 지니는 것으로 가정하였다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이 *Z. mobilis* 균주의 natural plasmid인 pZM3의 한 부위를 Pst I으로 절단하여 pBR 325와 재조합된 pPZ2는 selective 배지에서 배양한 숙주세포 내에서 30세대 이상을 92%의 안정성을 보이는 것으로 확인되었다. Non-selective 배지에서의 안정성은 selective 배지에서 보다 약간 낮았는데 이는 plasmid 내에 포함된 항생제 내성 유전자가 non-selective 배지에서는 작동할 필요성이 적어 증식이 계속되면서 숙주세포로 부터 분배

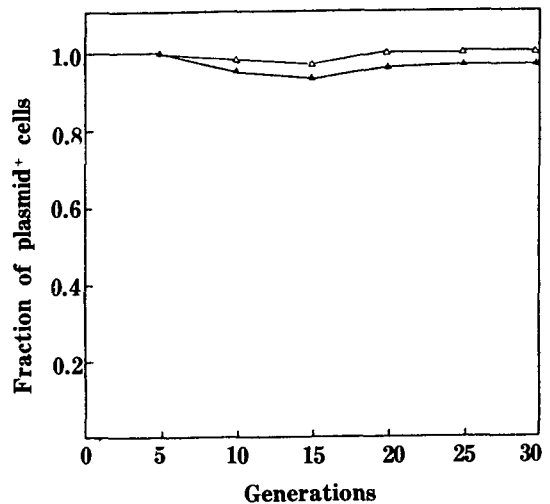


Fig. 3. Stability of plasmid pHZ22
△ selective medium ▲ nonselective medium

(segregation)되어 소실되는 율이 크기 때문인 것으로 사료되었다.

pHZ 22는 pZM 3를 Hind III로 두 부위에서 절단하고 pBR 325는 한 부위에서 절단한 후 재조합시켜 제조된 plasmid로서 chloramphenicol 내성 유전자를 갖고 있다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 숙주세포 내에서의 안정성은 약 93%로서 배지조성의 변화에 따른 차이는 현저하지 않았으나 pPZ 2와 비교할 때 plasmid 크기가 작아서 증식속도가 빠름이 확인되었다.

*Zymomonas*의 natural replicon의 크기를 줄이기 위해 pZM 3를 제한효소 Sau 3A1으로 절단한 것과 Bam HI으로 처리한 pBR 325를 ligation시킨 후 이 재조합 plasmid를 conjugation에 의해 *Z. mobilis* ZM 4로 전이시켜 chloramphenicol과 streptomycin을 포함하는 plate에서 선별한 conjugant 세포로부터 pSZ 326을 얻었다. 이 plasmid에 포함된 natural replicon의 크기는 0.48 kb이며 숙주세포내에서의 안정성은 배지 종류와 관계없이 95% 정도의 높은 안정성을 보였다(Fig. 4). 이와 같은 안정성은 plasmid의 크기가 작고 확실한 natural replicon을 포함하고 있기 때문인 것으로 사료되며 Tonomura 등(8)에 의해 개발된 *Z. mobilis* plasmid와 비교할 때 월등히 높은 것이었다.

pHZ 22에 tetracycline 내성 유전자를 cloning하기 위해 이 plasmid를 Bam HI으로 절단한 후 Pvu II로

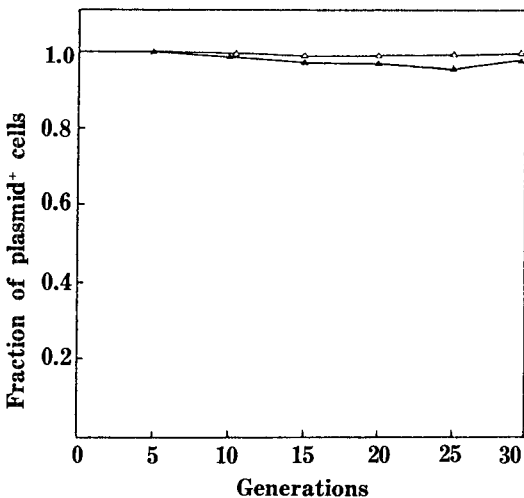


Fig. 4. Stability of plasmid pSZ326
 △ selective medium ▲ nonselective medium

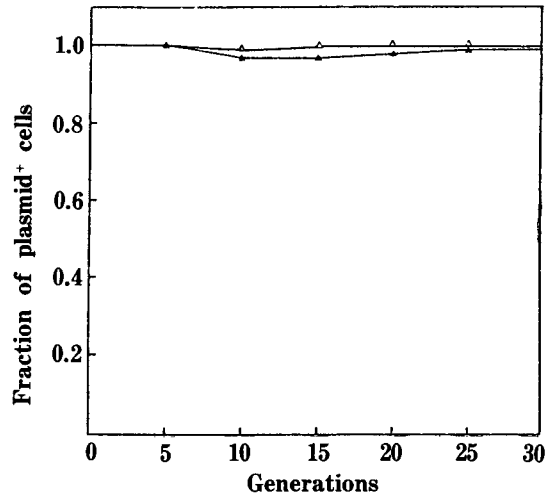


Fig. 5. Stability of plasmid pHZT224
 △ selective medium ▲ nonselective medium

다시 부분절단하여 Bgl II와 Sam I으로 절단된 RP 4로부터 cohesive-blunt end ligation을 통해 새로운 plasmid pHZT 224를 제조하였다. 이 plasmid의 숙주세포 내에서의 안정성은 97%로서 plasmid 크기의 증가(10.7 kb)로 인해 증식은 느렸지만 가장 양호한 안정성을 나타내었다(Fig. 5).

연속배양을 통한 plasmid의 안정성 조사

이상의 실험결과 본 연구에서 사용한 4종의 *Zymomonas* vector는 숙주세포 내에서 segregation 되지 않고 안정하게 유지됨을 알 수 있었으나 회분 배양 실험의 경우 지속적으로 변하는 배양조건 및 환경에 사용 균주가 노출됨에 따라 실험결과의 정확

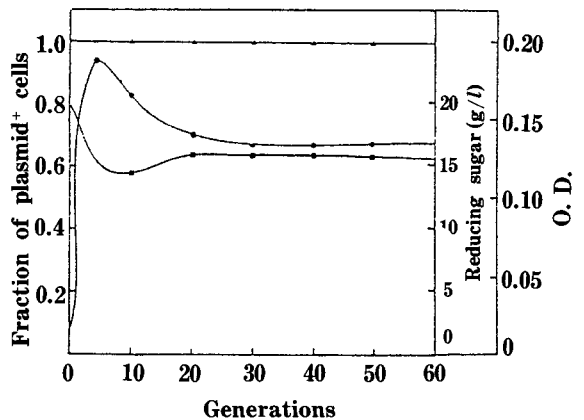


Fig. 6. Stability of plasmid pHZT224 in chemostat
 ▲ fraction of plasmid+ cells ■ reducing sugar ● O. D.

한 해석이 어려우므로 연속배양법을 이용하여 시간 요인을 제거시킨 후 실제 숙주세포 내에서의 plasmid의 안정성을 조사하였다. 사용된 plasmid는 pHZT 224로서 희석율 $D=0.11 \text{ hr}^{-1}$ 에서 연속배양을 실시하면서 plasmid의 안정성, 세포농도, 환원당 농도를 측정된 결과를 Fig. 6에 표시하였다. 배양 초기에는 회분배양으로 시작하여 배양 15시간 후부터 배지를 공급한 결과 약 20세대 후 정상상태에 도달하였으며 안정성의 경우 거의 100%로 유지됨을 알 수 있었다.

Plasmid의 분리 확인

이와 같이 높은 plasmid의 안정성이 숙주세포의 염색체내에 plasmid가 삽입되었거나 *Zymomonas* 균주의 항생제에 대한 흡수 system이 결여(2, 20)됨에 따라 본 실험에서 selective pressure로 사용한 chloramphenicol에 대한 적응성에 기인한 것인지의 여부를 조사하기 위해 배양 도중의 균주를 채취하여 chloramphenicol로 증폭하지 않은 상태로 plasmid를 분리하여 전기영동 하였다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 pHZT 224는 *Z. mobilis* ZM 4 모균에서 분리한 plasmid와 동일한 band를 나타냈으며 control로 잡은 기타 plasmid와도 거의 비슷한 band를 나타내어

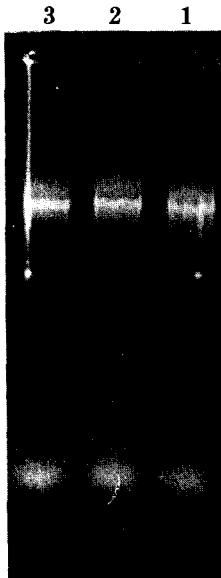


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of plasmids from *Z. mobilis* ATCC31812.

Lanes 1; pHZT224 (control), 2; pHZT224 (cultures) 3; pPZ2 (control)

본 연구에서 개발한 plasmid들은 숙주세포 내에서 독립적으로 안정하게 유지될 수 있음을 최종 확인하였다.

요 약

고효율 에타놀 생성 균주인 *Zymomonas mobilis*의 plasmid vector가 숙주세포 내에서 안정하게 유지되는지의 여부를 회분 및 연속배양 방법을 통하여 조사하였다. *Z. mobilis* 숙주세포는 전이된 plasmid의 크기와 배지의 조성에 따라 증식속도에 영향을 받을 수 있었고 작은 크기의 plasmid를 비 선택성(non-selective) 배지에서 배양한 경우 더 빠른 성장을 보였다. 또한 사용한 4종류의 plasmid vector 모두 숙주세포 내에서 30세대 이상에 걸쳐 93% 이상의 높은 안정성을 나타내면서 독립적으로 증식함이 확인되었다.

참고문헌

1. Rogers, P.L., K.J. Lee and D.E. Tribe: *Proc. Biochem.*, **15**, 7 (1980)
2. Swing, J. and J. Deley: *Bacteriol. Rev.*, **41**, 1 (1977)
3. Skotnicki, M.L., K.J. Lee, D.E. Tribe and P.L. Rogers: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 7 (1980)
4. Dally, E.L., H.W. Stokes and D.E. Eveleigh: *Biotech. Lett.*, **4**, 91 (1982)
5. Carey, V.C., S.K. Walia and L.O. Ingram: *Appl. Environ. Microbiol.* **4b**, 1163 (1983)
6. Browne, G.M., M.L. Skotnicki, A.E. Goodman and P.L. Rogers: *Plasmid*, **12**, 211 (1984)
7. Lee, Y.E., B.J. Lee and H.S. Kang: *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 56 (1985)
8. Tonomura, K., T. Okamoto, M. Yasui and H. Yanase: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 805 (1986)
9. Yoon, K.H. and M.Y. Pack: *Biotechnol. Lett.*, **9**, 163 (1987)
10. Hwang, D.J., S.K. Rhee and M.Y. Pack: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 319 (1987)
11. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
12. Birboim, H.C. and J. Doly: *Nucleic Acid Res.*, **9**, 2989 (1979)
13. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 382 (1982)
14. Helling, R.B., T. Kinney and J. Adams: *J. Gen. Microbiol.*, **123**, 129 (1981)

15. Imanaka, T., H. Tsunekawa and S. Aiba: *J. Gen. Microbiol.*, **118**, 253 (1980)
16. Jones, S.A. and J. Melling: *FEMS Microbiol. Lett.*, **22**, 239 (1984)
17. Lee, G.M., K.B. Song, S.K. Rhee and M.H. Han: *Biotechnol. Lett.* **8**, 385 (1986)
18. Parkev, C. and D. Dibiasio: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 215 (1987)
19. Imanaka, T. and S. Aiba: *Annals New York Acad. Sci.* **369**, 1 (1981)
20. Belaich, J.P. and J.C. Senez: *J. Bacteriol.* **89**, 5 (1965)

(Received August 12, 1987)