

Streptococcus faecalis DS 5 Plasmid pAM β_1 의 *Lactobacillus casei* YIT 9018 로의 전이

허정원 · 김정호 · 김창렬 · 정기철 · 이용규

전남대학교 농과대학

Transfer of Plasmid pAM β_1 of *Streptococcus faecalis* DS 5 to *Lactobacillus casei* YIT 9018

Huh, Jeong-Weon, Jeong-Ho Kim, Chang-Ryaul Kim, Ki-Chul Chung, Yong Kyu Lee*

College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

The broad-host plasmid pAM β_1 of *Streptococcus faecalis* DS 5 which codes for erythromycin resistance and lactose utilization was transferred into *L. casei* M-3 (lac-mutant) by conjugation, but was not transferred by protoplast fusion and protoplast transformation. For conjugal transfer of plasmid pAM β_1 , the method of membrane filter mating was more efficient than that of agar surface mating. The rate of acid production of transconjugant C-1, C-3 was similar to *L. casei* YIT 9018. The proteolytic activity of transconjugant C-3 was increased 20% higher than that of wild type. Plasmid pAM β_1 was detected by all of the transconjugants. The transconjugants expressed lactose utilization and erythromycin resistance.

유가공업을 포함한 발효공업에 있어서 생산효율을 높이기 위한 발효기술도 중요하지만 보다 안정하며 유산균 특유의 우수한 특성을 지닌 종균을 확보하는 것이 무엇보다 중요하다. 최근 활발하게 진행되고 있는 유전공학 기술의 발전에 따라 유전자 재조합을 통하여 산업용 균주개발 또는 새로운 균주를 창출할 수 있는 가능성이 제시되고 있으며(1), 균주육종을 위한 혁신적인 돌파구로서 많은 관심을 보이고 있으나 효율적인 유전자 전이방법이 개발되지 않고 있는 실정이다.

*S. faecalis*의 경우 유당발효능을 code 하며 erythromycin에 내성이 있는 17Mda의 pAM β_1 과 35Mda의 tetracyclin 내성이 있는 pAM α_1 , 그리고 6Mda의 lincomycin 내성의 pAM γ_1 plasmid DNA를 가지고 있음이 Clewell 등(2)에 의해 밝혀졌으며 유전자 표지가 뚜렷하여 많은 연구자에 의해 연구대상이 되어왔다. 또한 다른 균주에 이 유전자를 전이할 수 있음이 알려져 이

plasmid를 이용한 많은 연구가 실시되어졌다(3, 4). 따라서 이들 plasmid의 특이적인 성질을 이용, 이속간의 유전자 전이 체계를 확립하고 이를 이용한 vector를 개발한다면 새로운 균주개발에 유용할 것이라 생각된다.

본 연구에서는 유산균의 새로운 starter 균주와 vector 개발을 위한 기초를 확립하기 위하여 유산균발효 유 제조에 많이 사용되고 있는 *Lactobacillus casei* YIT 9018에 *Streptococcus faecalis* DS 5의 plasmid pAM β_1 DNA를 전이, 도입하고자 유당발효능결손 변이주를 사용한 유전자 전이에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 Table 1과 같다. 균주의 증식용 배지는 TCM broth(5)를 사용하였으며, plasmid DNA를 분리할 때는 glycine을 0.5% 되게 첨가한 TCM broth를 사용하였다. 실험균주는 11% skim milk(w/v)에 배양 후 4°C 보관하면서 TCM broth에 계대배

Key words: Plasmid pAM β_1 , conjugation, transconjugant

*Corresponding author

Table 1. The list of the strains

Strain	Plasmid (Mdal)	Description ^a
<i>Lactobacillus casei</i> YIT 9018	45	Wild type, Lac ⁺ Em ^s
<i>Streptococcus faecalis</i> DS 5	35, 17, 6	Wild type, Lac ⁺ Em ^s Ln ^r Tc ^r
<i>Lactobacillus casei</i> M-3	None	Lac ⁻ isolate of <i>L. casei</i> YIT 9018
<i>Lactobacillus casei</i> C-1	17	Lac ⁺ Em ^r trans-cojugant of M-3 × DS 5
<i>Lactobacillus casei</i> C-2	17	"
<i>Lactobacillus casei</i> C-3	17	"

^a Lac⁺, lactose fermenting; Lac⁻, lactose negative
Em^r, erythromycin resistant; Em^s, erythromycin sensitive
Ln^r, lincomycin resistant; Tc^r, tetracyclin resistant

양하였다. 선별된 Antibiotic resistant 균주는 100 µg/ml erythromycin 이 함유된 TCM broth 에 증식보존하였다.

Plasmid DNA 의 분리

Plasmid DNA 의 분리는 배 등(6)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 실험균주를 TCM broth(0.5%, glycine)에서 약 12~15 시간 배양하여 집균하고 20 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 2회 세정하였다. 침된 균체를 protoplast formation buffer(20 mM potassium phosphate buffer, 1 M sucrose, 6 mM CaCl₂, 6 mM MgCl₂, pH 6.8, PFB 로 약함)에 재현탁한 후 여기에 mutanolysin(Dainippon Pharm. Co. Ltd., Japan)을 5~10 µg/ml 되게 가하여 37°C 수조에서 5~10 분간 반응시켰다. 재집균하여 PFB 에 현탁한 후, 1% SDS 용액을 가하여 용균시켜 plasmid DNA 를 분리하였으며 얻어진 DNA 침전을 TE buffer(pH 8.0) 9 ml 에 녹여 CsCl density gradient ultracentrifuge 하여 Maniatis 등(7)이 기술한 일반적인 방법으로 순수정제하였다.

Agarose gel 전기영동

전기영동은 0.6% agarose gel(Sigma Chemical Co. Type II)을 Mergers 등(8)의 방법으로 행하였으며, ethidium bromide 용액(0.5 µg/ml)에서 30 분간 염색 후 Polaroid MP4 land camera(yellow filter, film type 667)로 촬영하였다.

원형질체 형성과 재생

원형질체 형성 및 재생은 허 등(9)의 방법에 따라 행하였다.

원형질체 융합

원형질체 융합은 Hopwood 등(10) 및 백 등(11)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, *L. casei* M-3 변이주(lac⁻)와 *S. faecalis* DS 5 균주를 TCM broth(0.5%, glycine 함유) 10 ml 에 배양하여 형성된 원형질체(3~4 × 10⁸/ml)를 1 ml 로 농축하여 1:1로 혼합한 후 원심분리(Beckman JA20-1 Rotor, 15,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 얻어진 균체를 PFB 에 현탁시키고 30°C로 미리 가온된 40% polyethylene glycol 4,000(Sigma Chemical Co., U.S.A) 용액을 가하여 30°C에서 1 분간 반응시킨 후 즉시 PFB 에 현탁하고 일정량을 취하여 0.004% BCP 를 함유한 재생배지에 중층 도말하여 30°C에서 5~7 일간 배양하였다. 재생된 colony 는 toothpicking에 의하여 erythromycin(50 µg/ml)이 들어있는 선택배지인 LBS agar(BBL, Microbiology System)에 옮겨 37°C에서 3~5 일간 배양한 후 나타난 집락을 분리하여 특성을 검토하였다.

접합(Conjugation)

L. casei M-3 와 *S. faecalis* DS 5 의 접합은 Vescovo 등(12)과 Gibson 등(3)의 방법에 따라 공여주(*S. faecalis* DS 5)와 수용주(*L. casei* M-3) 세포수를 약 10:1(3~5 × 10⁸:4~5 × 10⁹)로 혼합하여 접합에 사용하였다. 공여주와 수용주 혼합액을 20 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 2회 세정한 후 Agar surface mating의 경우 세포혼합액 0.2 ml 를 TCM 배지에 접종하여 37°C에서 24 시간 배양한 후 saline 4 ml 로 접합 plate 를 씻어내어 선택배지인 LBS agar(erythromycin, 100 µg/ml)에 도말하였다.

또한 membrane filter mating의 경우는 공여주와 수용주 세포혼합액 0.2 ml 를 membrane filter(25 mm diameter)에 진공펌프를 사용하여 trapping 한 후 TCM 배지에 filter 를 올려놓고 37°C에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 filter 를 saline 2 ml 가 들어있는 시험관에 넣고 vortex mixer(Philip Harris, England)를 사용하여 잔류된 세포를 씻어낸 후 선택배지에 도말하였다.

접합률은 접합체로 나타난 집락수를 접합 plate 에서 나타난 수용주의 수로 나누어 계산하였다.

형질전환(Transformation)

L. casei M-3(lac⁻) 균주의 원형질체를 수용주로 하여 erythromycin(Em) 내성을 나타내는 *S. faecalis* DS 5 plasmid pAM β_1 의 형질전환은 Chang 과 Cohen(13) 및 Kondo 와 McKay(14)의 방법에 따라 실시하였다. 형질전환체는 *S. faecalis* DS 5 plasmid pAM β_1 의 특징인 erythromycin에 저항성을 갖는 colony를 선별재배 배지에서 계측한 후, 유당지시배지에 toothpicking하여 재차 확인하였으며, 그 후 항생제내성과 plasmid의 존재를 확인하였다.

단백질 분해활성

단백질 분해활성은 Folin-Ciocalteu 시약을 이용한 비색법에 의한 Hull(15)의 방법에 따라 측정하였다.

항생제 저항성 시험

배양한 균액 0.25 ml를 5 ml TCM broth에 계대접종 후 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양균액을 멸균한 면봉으로 충분히 적신 다음 TCM 배지에 항생제가 함유된 standard disc(Difco Co.)를 무균적으로 얹어 놓은 후에 37°C에서 15시간 이상 배양하여 disc 주변의 투명대 크기를 측정하였다.

결과 및 고찰

접합에 의한 유전자의 전이

L. casei M-3(lac⁻)를 수용주로 하고 *S. faecalis* DS 5를 공여주로 하여 유당발효능 유전자를 도입하기 위한 접합을 실시하였으며 접합은 agar surface mating 방법과 membrane filter mating 방법을 사용하였다. 이 두 균주의 접합에 있어서 예비실험한 결과 공여주와 수용주의 균수비는 약 10:1이 가장 적당하였으므로 이들의 혼합비율을 3~5×10⁸:4~5×10⁹으로 사용하여 접합방법에 따른 유전자 전이율은 Table 2와 같이 membrane filter를 사용하여 접합하였을 때 유전자 전이율이 6.9×10⁻⁷으로 agar surface mating 방법의 전이율 2.2×10⁻⁸보다 약 30배 전이율이 높았다. 이와 같은 결과는 Vescovo(12)가 보고한 *S. lactis* 균주의 pAM β_1 을 *L. acidophilus*, *L. reuteri*에 전이한 것이나 Romero와 McKay(16)에 의한 *Lactobacillus* spp.에 전이하였을 때와 비슷한 전이율을 보였다. 또한 이 때 얻어진 접합체들에서 공여주의 유전적 특성인 pAM β_1 DNA가 수용주에 도입되었는지 확인하기 위하여 이들 접합체들을 mutanolysin과 SDS로 처리한 후 plasmid DNA를 분

Table 2. Effect of conjugation method on transfer frequency of pAM β_1

Conjugation method	No. of cells (10 ⁻⁸ /ml)		No. of conjugant	Transfer frequency ^a
	Donor	recipient		
Membrane filter mating (millipore, 0.45 μ m)	72	6.1	421	6.9×10 ⁻⁷
Agar surface mating	69	5.8	13	2.2×10 ⁻⁸

^a Frequency of pAM β_1 transfer was shown as the number of transconjugants per recipient.

리하여 전기영동으로 확인한 결과 Fig.1에 나타난 바와 같이 *L. casei* M-3 변이주에 *S. faecalis* DS 5의 3개의 plasmid 중 plasmid pAM β_1 만이 전이됨을 확인할 수 있었다.

원형질체융합과 형질전환에 의한 유전자의 전이

L. casei YIT 9018과 *S. faecalis* DS 5의 원형질체를 이용한 융합과 형질전환을 두 균종에 대한 원형질체형성 및 재생의 최적조건을 기초로 하여 실험을 행한 결과 융합과 형질전환에 요인으로 작용하는 재생배지성분, 염의 농도, PEG의 분자량, 농도, 처리시간, DNA의 농도 등을 달리하였을 때 lac⁺, Em^r 성질을 갖는 융합체나 형질전환체를 선별하지 못하였다. 이는 유산구균의 pAM β_1 을 *Lactobacillus* spp.에 형질전환시키지 못하였다고 한 Romero와 McKay(16)의 보고와 같이 이러한 원인은 *L. casei* 원형질체의 재생빈도가 *S. faecalis*보다 상대적으로 훨씬 낮고, 융합률도 매우 낮는데 기인하며 DNase test agar에서 조사한 결과 *Lactobacillus* 균주에서 다량의 DNase를 분비하고 있어 도입된 외부 DNA를 절단 혹은 분해시키므로써 선별할 수 없었던 것으로 생각되며 또한 융합체나 형질전환체를 형성하였다 할지라도 두 균종의 restriction-modification system이 서로 상이하기 때문에 lactose-plasmid(Em^r)가 정상적으로 발현할 수 없었던 것으로 추측된다.

Transconjugant의 특성

재조합체의 특성을 검토하기 위하여 모균주의 재조합된 접합체를 TCM broth에 배양하여 배양시간에 따른 증식속도를 비교한 결과 transconjugant마다 매우 다양한 증식양상을 나타내었다. 이러한 결과는 *L. casei* M-3에 *S. faecalis* DS 5의 plasmid pAM β_1 DNA가 도입

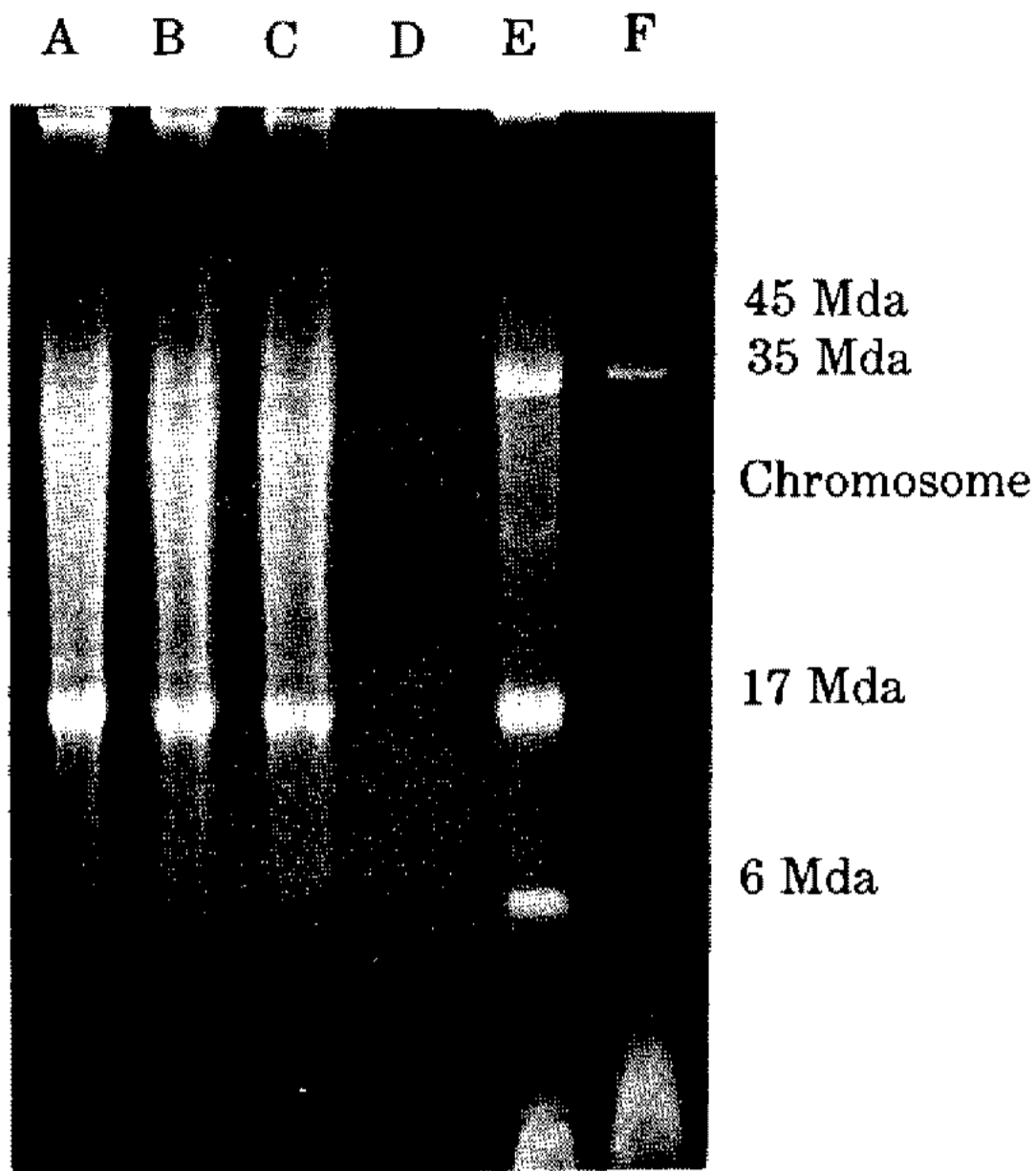


Fig. 1. Agarose gel electrophotograms of plasmid DNA of parent strains and several transconjugants.

A,B,C,: Plasmid of transconjugants C-1, 2, 3
 D:Plasmid of *L. casei* M-3
 E: Plasmid of *S. faecalis* DS 5
 F: Plasmid of *L. casei* YIT 9018

되어 재조합되는 과정에서 일어난 결과로 추측된다.

또한 모균주와 재조합된 접합체를 11% 탈지유 배지에 배양하여 이들 균주에 대한 산생성과 단백질분해 활성을 검토하였다. 산생성의 경우 Fig.2에서 보는 바와 같이 접합체 C-1, C-3의 경우 모균주인 *L. casei* YIT 9018과 거의 비슷한 산생성을 나타냈으며, *L. casei lac⁻* 변이주인 M-3보다는 약 3배의 유산 생성능을 증가시켰다. 반면 접합체 C-2는 *S. faecalis* DS 5보다도 낮은 산생성을 나타냈다. 이와 같은 결과는 산생능이 거의 없는 *L. casei* M-3 변이주에서 *S. faecalis* DS 5의 유당발효능 (*lac⁺*) 유전자를 함유하고 있는 pAM β_1 plasmid DNA가 *L. casei*에서 정상적으로 발현됨을 보여주고 있다.

또한 단백질 분해능의 경우 Fig.3에 나타난 바와 같이 다양한 양상을 보여주었다. 특히, *L. casei* 접합체 C-3의 경우 *L. casei* YIT 9018 균주에 비해 약 20% 정도의 증가를 나타냈으나, C-1, C-2의 경우 낮은 단백질 분해 활성을 나타냈다. 접합체 C-1의 경우 유산 생성능은 다른 접합체에 비해서 높았으나 단백질 분해능은 매우 낮은 것으로 나타나 반드시 유산 생성능과 단백질 분해능의 유전자발현이 일치하지 않는 것으로 생각된다. 그리고 *L. casei* 변이주의 단백질 분해능은 모균주에 비해 약 20% 정도밖에 감소하지 않아 단백질 분해능에 관련된 유전자는 아마도 염색체상에 존재하는 것으로 추정된다. 그러나 접합체 C-3의 경우에 단백질 분해능의 활성도와

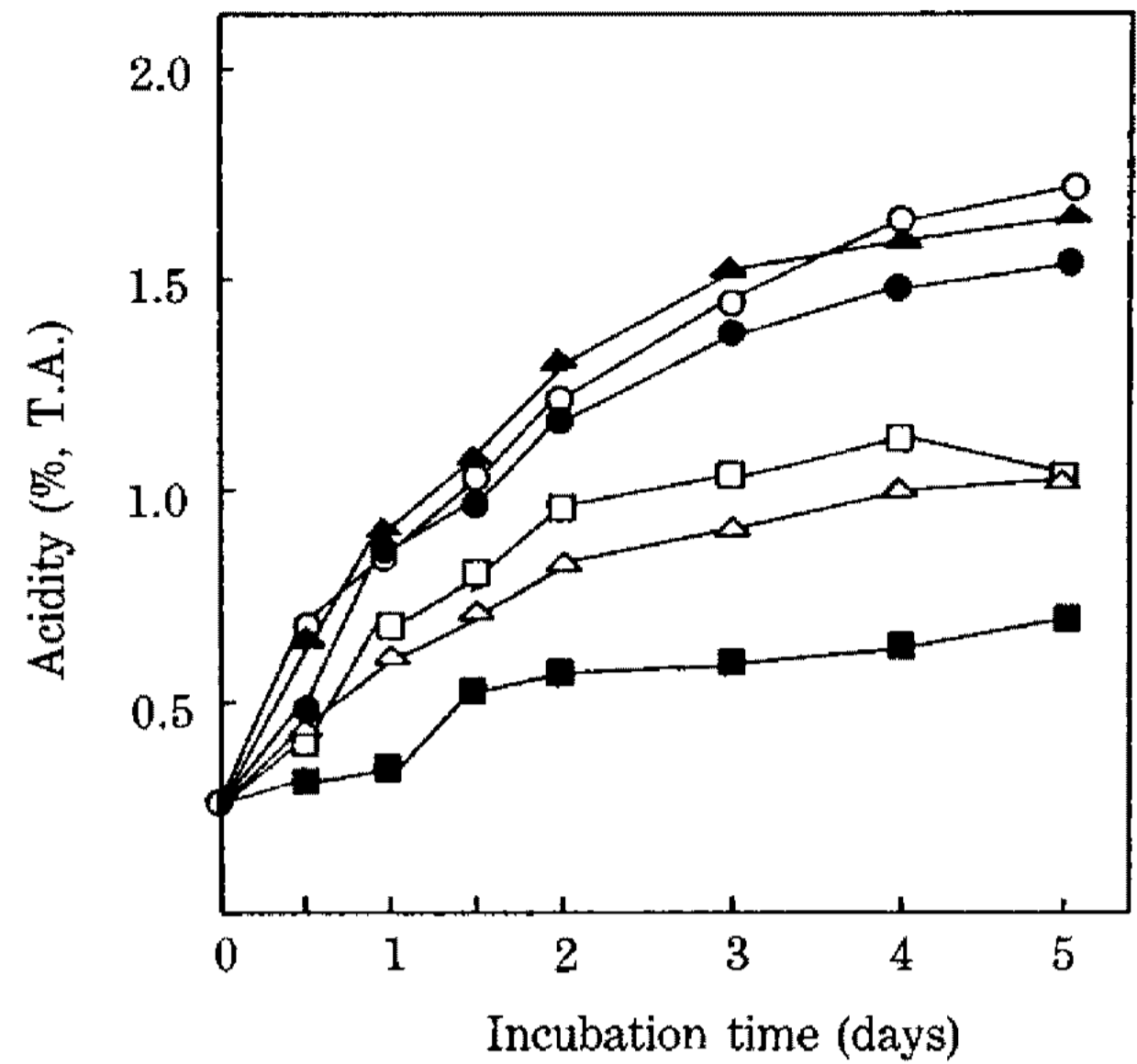


Fig. 2. Production of acidity in 11% reconstituted skim milk by lactic acid bacteria at 37°C.

○—○ : *L. casei* YIT 9018
 □—□ : *S. faecalis* DS 5
 □—□ : *L. casei* M-3
 ▲—▲ : Transconjugant C-1
 △—△ : Transconjugant C-2
 ●—● : Transconjugant C-3

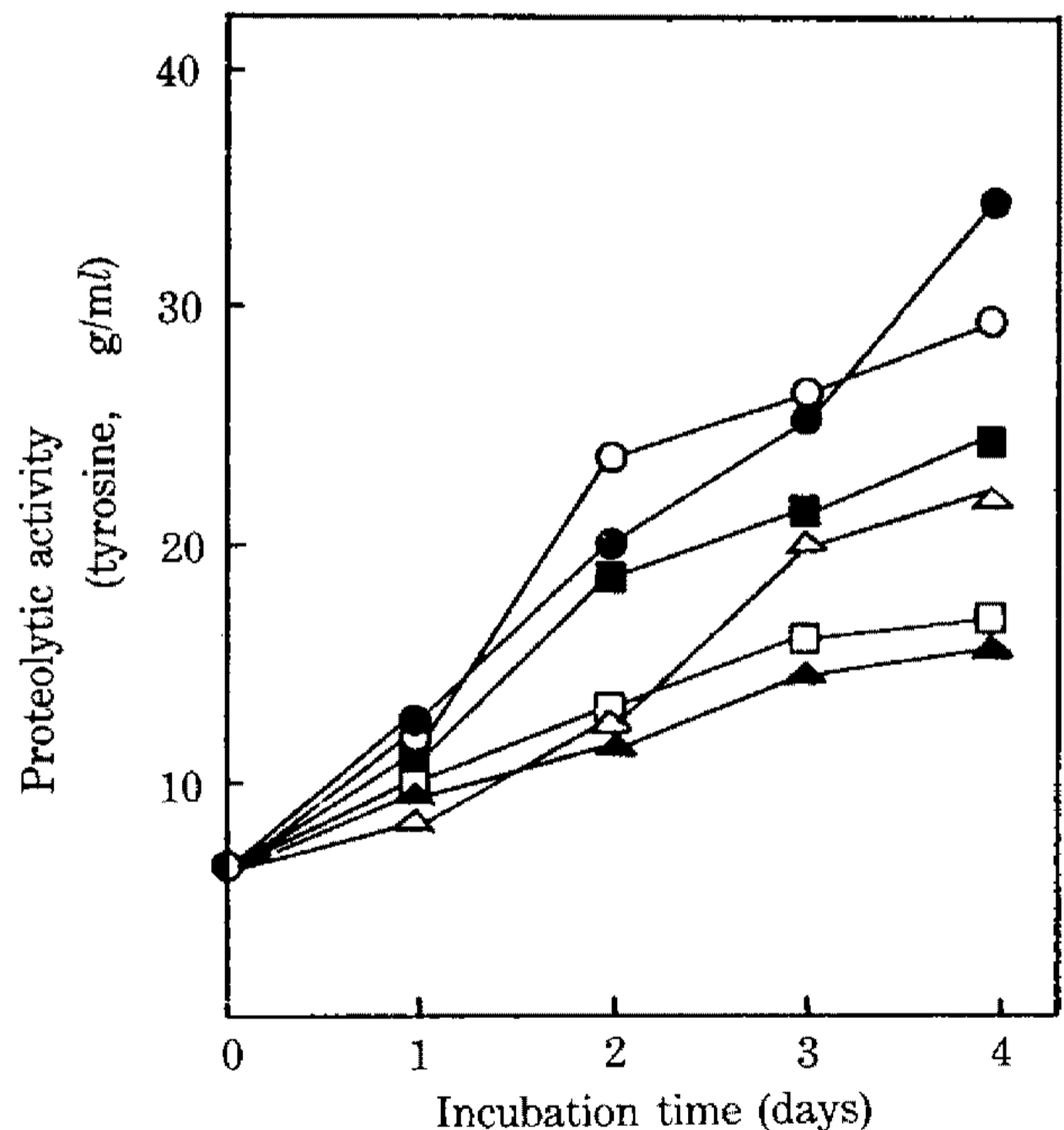


Fig. 3. Proteolytic activity of parent strains and transconjugants in 11% reconstituted skim milk at 37°C.

○—○ : *L. casei* YIT 9018
 □—□ : *S. faecalis* DS 5
 ■—■ : *L. casei* M-3
 ▲—▲ : Transconjugant C-1
 △—△ : Transconjugant C-2
 ●—● : Transconjugant C-3

Table 3. Stability of transconjugants

Strains	Stability (%)	
	Em ^r colony	Lac ⁺ colony
<i>S. faecalis</i> DS 5	100	100
Transconjugant C-1	100	100
Transconjugant C-2	99	96
Transconjugant C-3	26	43

*All strains were cultured in 11% skim milk at 37°C for 3days.

산생능이 높은 이유는 염색체 DNA 상의 단백질 분해능에 관련된 유전자와 pAM β_1 plasmid와의 상승효과에 기인하는 것으로 생각된다.

재조합된 접합체들에 있어서 plasmid pAM β_1 의 안정성을 비교하기 위하여 11% skimmilk(w/v)에서 72시간 배양한 후 pAM β_1 의 특성인 Em 저항성과 유당발효능을 조사하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 접합체 C-1과 C-2는 비교적 안정성을 유지하고 있으나 접합체 C-3의 경우에는 재조합 plasmid의 안정성이 급격히 떨어짐을 보여주고 있다. 이러한 원인은 *L. casei*에서 plasmid DNA 유지에 필요한 에너지 결핍 등에 기인하는 것으로 생각된다. 그리고 접합체 C-1과 C-2의 경우에 비교적 안정된 상태를 유지하는 것은 접합에 의해 도입된 plasmid pAM β_1 이 replicon이나 copy 수를 조절하는 유전자에 변형이 일어났을 것으로 추정된다. 그러므로 유전자 전이에 의한 균주개발을 위해서는 재조합 plasmid가 안정적으로 유지되면서 원하는 발현을 극대화시키는 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 유산균발효유 제조에 많이 사용되는 *Lactobacillus casei* YIT 9018에 광범위 숙주영역을 갖고 있는 *Streptococcus faecalis* DS5의 plasmid pAM β_1 DNA를 이용하여 전이, 도입하고자 유당발효능결손 변이주를 이용하여 원형질체융합, 접합, 형질전환을 검토하였던 바 얻어진 결과는 다음과 같다.

*L. casei*와 *S. faecalis* 균주의 conjugation은 membrane filter mating(Milipore, 0.45 μ m, front side)의 경우 6.9×10^7 으로 가장 높은 전이율을 나타냈으며 protoplast fusion이나 transformation에 의해서는 fusant나 transformant를 선별할 수 없었다. 그러나 transconjugant들에서 plasmid pAM β_1 DNA의 유전적 특

성인 유당발효능과 erythromycin에 대한 저항성이 모두 정상적으로 발현되었다. 또한 transconjugant C-1, C-3의 경우 모균주와 비슷한 산생능력을 가지고 있었으며, 단백질분해활성에 있어 transconjugant C-3는 모균주에 비해 약 20%의 증가를 보였으며 transconjugant C-1과 C-2의 경우 99~100%의 높은 안정성을 가진 반면 C-3는 매우 불안정하였다.

감사의 말

이 논문은 1988년도 전남대학교 학술연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Gasson, M.J.: *Antonie Van Leeuwenhoek*. **49**, 275 (1983).
- Clewell, D.B., Y. Yagi, G.M. Dunny and S.K. Schultz: *J. Bacteriol.* **117**, 283 (1974).
- Gibson, E.M., N.H. Chace, S.B. London and J. London: *J. Bacteriol.* **137**, 614 (1979).
- Morelli, L., P.S. Cocconcell, V. Bottazzi, G. Damiani, L. Ferretti and V. Sgaramella: *Plasmid*. **17**, 73 (1987).
- Tomochika, K., M. Funabshi, A. Nagata, T. Fuji and Y. Kanemasa: *J. Bacteriol.* **37**, 777 (1982).
- 배형석, 백영진, 김영기, 유 민, 박무영: 한국산업미생물학회지 **13**, 289(1985).
- Maniatis, T.E., F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning, A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.
- Mergers, J.A., D. Sánchez, L.P. Elwell and S. Falkow: *J. Bacteriol.* **127**, 1529-1537.
- 허정원, 김정호, 백영진, 정기철, 이용규: 한국축산학회지(인쇄 중).
- Hopwood, D.A., H.M. Wright and J. Bibb: *Nature*. **268**, 171 (1977).
- 백영진, 유 민, 김영기, 배형석, 김현욱: 한국산업미생물학회지 **14**, 265(1986).
- Vescovo, M., L. Morelli, V. Bottazzi and M.J. Gasson: *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 753 (1983).
- Chang, S. and S.N. Cohen: *Mol. Gen. Genet.* **168**, 111 (1979).
- Kondo, J.K. and L.L. McKay: *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1213 (1982).
- Hull, A.E.: *J. Dairy Sci.* **30**, 881 (1947).
- Romero, D.A. and L.L. McKay: *J. Food Protec.* **48**, 1028 (1985).

(Received May 18, 1990)