

## *Zoogloea ramigera* 115SLR의 생고분자물질 생합성에 관여하는 pyruvyl transferase gene의 cloning 및 염기서열 결정

이 삼 빈\*

계명대학교 자연과학대학 식품가공학과

**Cloning and Sequencing of Pyruvyl Transferase Gene Involved in Exopolysaccharide Biosynthesis of *Zoogloea ramigera* 115SLR.** Sam-Pin Lee\*. Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea – A gene coding for a pyruvyl transferase enzyme involved in exopolysaccharide biosynthesis of *Zoogloea ramigera* 115SLR was isolated and sequenced. A 4.5 kb of *Bam*HI DNA fragment was isolated from chromosomal DNA using a probe derived from ketal pyruvyl transferase gene of *Xanthomonas campestris*. The nucleotide sequence of 2.66 kb *Pst*I/*Hind*III DNA fragment which was homology with a probe revealed the existence of two complete open reading frames (ORF2 and ORF3) and two partial open reading frames (ORF1 and ORF4). The deduced amino acid sequence of ORF3 was homologous to the ketalase (*Gum*L product) of *X. campestris* with 49.5% of similarity and 21.6% of identity. ORF2 on the other hand showed the higher identity with the ketalase (*Exo*V product) of *Rhizobium meliloti* (36%) as well as the ketalase of *X. campestris* (23%) than that of ORF3. A gene product of ORF2 was determined with a bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system in *E. coli*. The molecular weight of protein was 33,500 dalton.

미생물들이 생합성하는 다당류들은 식품, 화장품, 화학 및 의약품등으로 이용되는등 광범위한 응용범위를 갖고 있다(1, 2). 다당류들의 고유한 기능특성들은 이들의 구조적 특성에서 기인된 hydration 정도에 주로 의존한다(1). 다당류의 구조적 성질을 변화시키는 주요한 화학적 방법으로는 methyl, ethyl 그룹 또는 acidic 그룹의 치환 및 sulfation, phosphorylation 방법 등을 사용할 수 있다(1). 이러한 방법에 비해, 유전자 조작에 의한 다당류 구조의 변화는 외부에서 물리, 화학적 처리없이 선택적으로 조절 가능하며, 궁극적으로 미생물로부터 novel 다당류를 생합성할 수 있도록 하는 중요한 수단이 될 수 있다. Sutherland(3)는 유전공학적인 방법과 발효공학의 발전에 힘입어 현재 산업적으로 이용되고 있는 다당류들의 이용능을 향상시킬 수 있다고 보고한 바 있으며, 다당류의 생합성에 관여하는 효소들을 크게 4종류로 분류하였다(4). 미생물이 생합성한 다당류의 기능성을 유전학적 방법으로 향상시키려는 연구의 일환으로, Harding 등(5)은 *X. campestris*의 genomic DNA에서 xanthan gum 생합성에 관여하는 유전자들을 Marzocca 등(6)은 ketal pyruvate transferase 유전자(*Gum*L)를 클로닝하였음을 각각 보고했다. Reuber 등(7)은 *R. meliloti*의 다당류(succinoglycan) 생합성에 관여하는 유전자들의 분리 및 이들의 다당류 생합성에서의 역할들을 보고한 바 있었다. 최근에는 *R. meliloti*의 *exo* 유전자들중 *Exo*V는 세포질에 존재하며

succinoglycan의 pyruvylation에 관여함이 알려졌다(8).

일반적으로 호기적 폐수처리물에서 분리된 *Z. ramigera* 115는 한정 배지에서 배양시 물에 잘녹지 않는 고분자 다당류(capsular polysaccharide)를 생합성하며, 이들의 구조적 특징은 구성 단당류로써 glucose와 galactose 잔기 및 유기산으로서 acetyl, succinyl, pyruvyl 그룹의 치환잔기들로 구성된다(9, 10). 특히 capsular polysaccharide들의 중금속 흡착능력과 활성오니에서 bioflocculation의 기능들은 보고된 바 있다(11, 12). Eason(13, 18)은 *Z. ramigera*로부터 다당류 생합성에 관여하는 유전자의 분리 및 생합성의 조절을 위한 실험에서, 미생물 돌연변이 유발제를 이용하여 capsular polysaccharide에서 물에 녹을 수 있는 slime polysaccharide를 생합성 할 수 있는 일종의 돌연변이 균주(*Z. ramigera* 115SL)를 분리하였으며, 이로부터 항생제 rifampicin에 저항성이 있는 자연발생적인 돌연변이 균주인 *Z. ramigera* 115SLR를 분리한 바 있다.

본인은 *Z. ramigera* 115SLR 균주로 부터 생합성된 다당류의 구조 연구보고에서 *Z. ramigera* 115SLR 다당류는 puruvate 및 acetate와 succinate 잔기를 포함하고 있음을 보고한 바 있다(9). 미생물에서 생합성되는 다당류들은 대부분이 음이온으로 하전된 일종의 acidic exopolysaccharide이다. 이들 다당류들의 side chain의 구성성분은 다당류의 용해도에 크게 영향을 미치며 궁극적으로 다당류용액의 점조성등의 물성(rheological property)에 중요한 역할을 한다. 특히 다당류에 음이온 전하를 부여하는 중요한 잔기로는 pyruvic acid을 들

\*Corresponding author.

Key words: *Zoogloea ramigera*, pyruvyl transferase, gene cloning, gene expression, exopolysaccharide

수 있으며, 예를 들면 *Xanthomonas* sp.의 xanthan gum (14)과 *Rhizobium* sp.의 succinoglycan(15) 다당류는 각각 mannose와 glucose 잔기중에 일부가 pyruvate로서 결합되어 있는 것을 알 수 있다. 그러나 이런 pyruvate의 잔기의 생물학적 역할에 관해서는 아직 밝혀지지 않은 것이 많다.

*Z. ramigera* 115가 생합성하는 다당류는 현재 산업적으로 유용하게 이용되는 xanthan gum과 유사한 물성을 갖는 것으로 보고된 바 있으며(16) xanthan gum 대용으로 이들 다당류의 구조변화에 따른 물성의 변화를 유전학적인 방법으로 연구를 하기 위해서는 먼저 다당류의 생합성에 관여하는 유전자들의 분리가 중요한 단계라고 생각한다. 특히 다당류들의 표면전하를 부여해주는 pyruvic acid의 치환에 관여하는 유전자는 다당류의 물성을 조절할 수 있는 중요한 인자라고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 *Z. ramigera* 115SLR의 다당류 생합성에서 side chain의 glucose 잔기에 pyruvic acid를 치환시키는데 관여하는 ketal pyruvyl transferase 유전자의 분리 및 분석에 관한 연구결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 plasmids

*Z. ramigera* 115SLR(ATCC 25935 변종)와 *E. coli* K38/pGP1-2(17), *E. coli* JM101( $\Delta$ pro-lac) thi supE F' (traD36 proAB lacI lacZ $\Delta$ M15), *E. coli* DH5 $\alpha$ (F<sup>-</sup>  $\phi$ 80d lac $\Delta$ M15(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44  $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA relA1) 및 plasmid pEX0.9, pEX3B와 pT7-7(expression vector)는 MIT 공과대학에서 분양받아 사용했다. Plasmid pUC18과 M13mp19 클로닝 vector와 universal primer는 Pharmacia Biotech(USA)로부터 구입했다. Plasmid pUEX4B와 pTEX 5S는 본 실험에서 제조되어 사용했다. Trypticase soy broth(TSB, BBL)와 LB 배지는 각각 *Z. ramigera* 115 SLR과 *E. coli*의 생육을 위해 사용했으며(19), plasmid의 안정성을 위해서 rifampicin(최종농도 50  $\mu$ g/ml), kanamycin(최종농도 50  $\mu$ g/ml)과 ampicillin(최종농도 50  $\mu$ g/ml) 항생제들이 사용되었다.

### Chromosomal DNA 분리

*Z. ramigera* 115SLR은 200 ml의 TSB 배지에서 배양시키면서 cell의 농도가 OD<sub>600</sub>에서 1.0일 때 7000 rpm에서 원심분리하였다. 얻어진 균체는 80 ml의 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) buffer로 세척하여 lysozyme(2 mg/ml)을 포함하는 22 ml의 Tris-HCl buffer(9 mM Tris-HCl, pH 8.2, 11% PEG 8000)에 현탁시킨 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 형성된 spheroplast들은 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 5 ml TE(pH 8.0)에 녹

였다. 여기에 300  $\mu$ l의 SDS(10%)를 첨가하여 55°C에서 10분간 반응시킨 후 10 ml TE와 150  $\mu$ l의 RNase A(5 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 50  $\mu$ l의 proteinase K(10 mg/ml)를 넣고 45°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응물은 46,000 rpm에서 18시간 동안 CsCl gradient 조건하에서 초원심분리시킨 후 genomic DNA는 tube의 하층부로부터 분획되어 TE buffer에 용해시킨 후 -20°C에 보관하였다(13).

### DNA 재조합

DNA 재조합과 *E. coli*에서 plasmid 등의 분리는 Sambrook 등(20)의 방법에 의하여 실시하였다. 사용된 제한효소들은 Boehringer Mannheim(Germany) 제품들을 구입하여 사용하였으며, 절단된 DNA 단편들은 1% agarose gel에서 TBE buffer를 사용하여 전기영동시켰으며 필요한 DNA 단편들은 QIAGEN DNA 추출 kit(QIAGEN, USA)을 사용하여 gel로부터 분리하였다. *Z. ramigera* 115SLR로부터 genomic library 제조를 위해서, genomic DNA를 *Bam*H1으로 절단하여 1% agarose gel에서 전기영동시킨 후 4.5 kb에 해당하는 DNA 단편들을 gel에서 추출 분리하였다. 이것을 *Bam*H1과 calf alkaline phosphatase로 처리된 pUC18 vector에 ligation시킨 후 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환을 실시하였다.

### Southern hybridization

형질전환된 *E. coli* DH5 $\alpha$ 로부터 정확한 클론을 얻기 위해서, pEX0.9의 0.9 kb *Pst*I 단편을 probe로 사용하여 colony hybridization을 실시하였다(20). Plasmid pUEX4B와 pEX3B는 다양한 제한효소들로 절단시킨 후에 1% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel 상의 DNA 단편과 <sup>32</sup>P로 라벨된 marker DNA는 알칼리용액에서 변성시킨 후 1M Tris-buffer로 중화시켰다. Gel 상의 DNA는 nitrocellulose filter에 전이시킨 후 80°C 진공 oven에서 2시간 동안 열처리하여 30 ml의 prehybridization 용액(15 ml; 20x SSC, 6 ml; 50x Denhardt's, 0.3 ml; 0.5M EDTA, pH 8.0, 0.6 ml; 10% SDS, 1 mg salmon DNA)으로 65°C에서 3시간 동안 반응시켰다. Probe들은 pEX0.9의 0.9 kb *Pst*I 단편과 pUEX4B의 4.5 kb *Bam*H1 DNA 단편(1  $\mu$ g)을 사용하여 nick translation 방법으로 만들었다. DNA probe 용액들은 사용전에 100°C에서 5분간 열처리하여 급냉시킨 후에 prehybridization 용액에 첨가되어 16시간 동안 65°C에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 nitrocellulose filter는 65°C 항온수조에서 125 ml의 5x SSC, 0.1% SDS 용액과 2x SSC, 0.1% SDS 및 5x SSC 용액을 연속적으로 이용하여 세척을 시킨 후 nitrocellulose filter는 X-ray film에 노출시켜 -70°C에서 16시간 동안 보관한 후 X-ray film을 현상시켰다.

**염기서열 결정 및 분석**

Plasmid pUEX4B의 4.5 kb DNA 단편중에 2.66 kb에 해당하는 *Pst*I-*Hind*III 단편의 염기서열은 Sanger di-deoxy-mediated chain termination 방법에 의해서 결정하였다(20). 1.5 kb *Hind*III 단편과 2.2 kb *Pst*I 단편은 M13mp19에 클로닝하여 각각 *Kpn*I/*Bam*HI과 *Kpn*I/*Sac*I으로 절단시킨 후 Erase-a-Base™ KIT(Promega, USA)를 이용하여 단계적으로 DNA 단편의 길이를 축소시켰다. 그리고 S1 nucelase로 반응시켜 1% agarose gel에서 DNA 단편의 크기를 확인하였다. 적당한 크기의 DNA를 포함하는 용액은 klenow fragment로 처리한 후 ligation 하여 *E. coli* JM101에 형질전환 시켰으며 2 mM IPTG와 0.65 mM X-gal을 포함하는 H Top(1 g tryptone/0.8 g NaCl in 100 ml) agar plate에서 흰색 plaque들을 선택하였다. DNA 단편들의 염기서열은 Sequenase™ Kit(USB, USA)와 universal primer, 10 μCi [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP를 이용하여 결정 하였으며 완전한 염기서열을 얻을 때까지 반복하였다. 전체 2.66 kb DNA 단편에서 인지될 수 있는 단백질들의 정보는 CODON PREFERENCE program으로 부터 얻었다.

***E. coli*에서 ORF2 유전자의 발현**

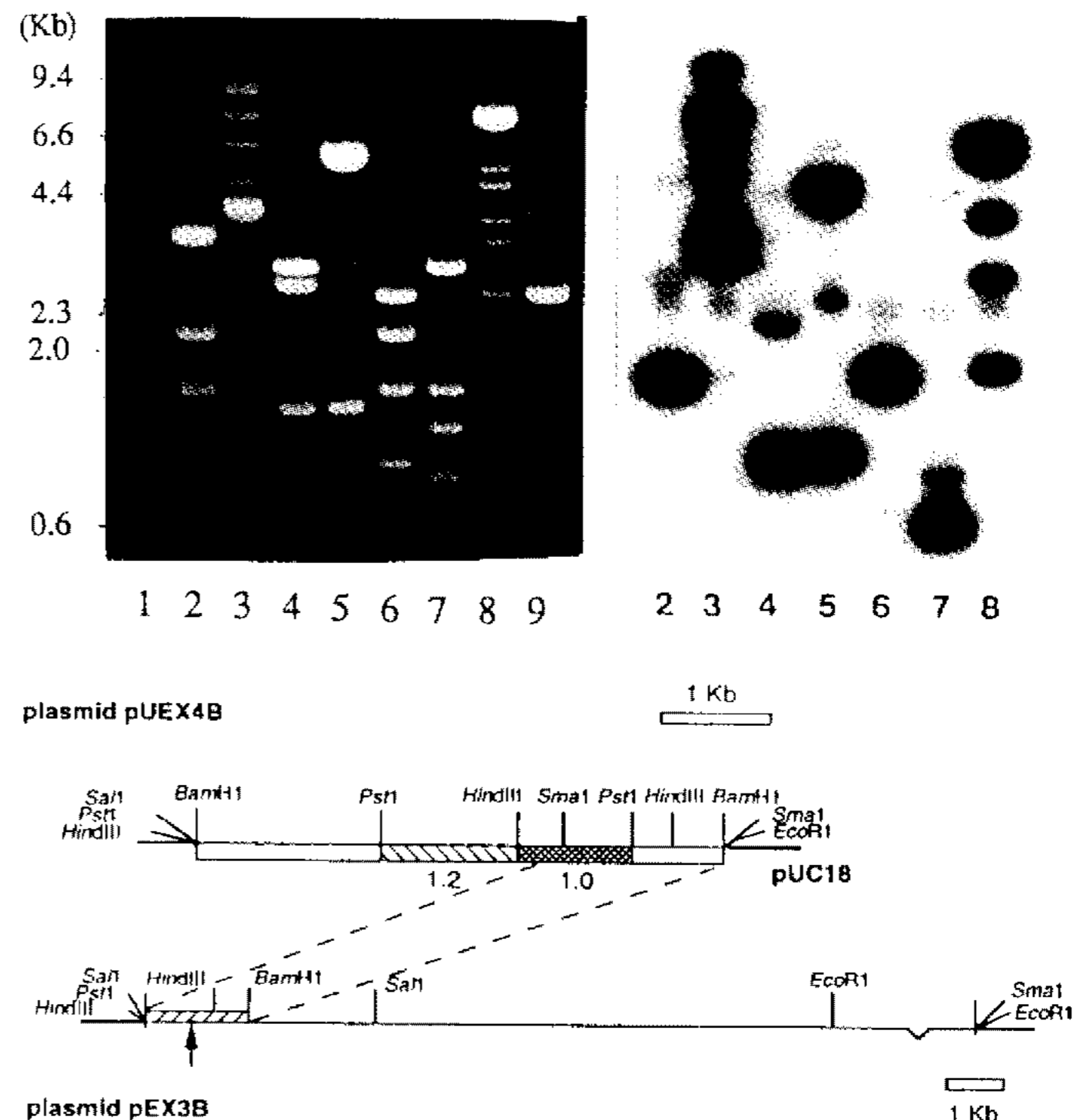
DNA 염기서열이 결정된 2.66 kb *Pst*I-*Hind*III 단편 중에서 ORF2의 유전자로 부터 인지되는 단백질의 크기를 결정하기 위하여 pUEX4B를 *Pvu*II와 *Sma*I으로 절단시킨 후 1.3 kb *Pvu*II-*Sma*I DNA 단편을 1% agarose gel에서 분리하였다. pT7-7 vector는 *Eco*RI으로 절단하여 klenow fragment와 calf alkaline phosphatase 효소로 처리시킨 후 앞에서 분리한 1.3 kb DNA 단편과 blunt end ligation시켜 plasmid pTEX5S를 제조하였다. Plasmid pTEX5S와 pGP1-2를 포함하는 Host *E. coli* K38은 kanamycin(50 μg/ml)과 ampicillin(50 μg/ml)을 포함하는 5 ml의 2x YT 배지에서 30°C에서 16시간 진탕배양시킨 후 새로운 5 ml의 2x YT 배지에 1/20 정도 희석 접종시켜서 30°C에서 A<sub>600</sub>이 0.5가 되도록 배양하였다. 배양액중 350 μl는 살균된 tube에 옮겨서 원심분리하고 1 ml의 M9 minimal 배지를 사용해 세척하였다. 회수된 균체는 20 μg/ml의 thiamine과 0.01%의 18종류 아미노산들(methionine and cysteine 제외)을 포함하는 1 ml의 M9 minimal 배지에 현탁시켰다. 균체 현탁액은 30°C에서 40분간 진탕배양시킨 후 배양온도를 42°C로 상승시켜 15분 동안 계속 진탕 배양하였다. 10 μl의 rifampicin(20 μg/ml in methanol)을 첨가시켜 42°C에서 10분간 배양시킨 후에 1 μl의 <sup>35</sup>S-methionine 을 첨가하고 30°C에서 5분간 배양하였다. 배양액으로부터 원심분리하여 회수된 균체는 65 μl의 SDS와 DTT 를 포함하는 sample buffer에 녹인 후 95°C에서 5분간 가열하여 SDS-PAGE 전기영동하였다(21). Gel은 30분 동안 고정용액(50% methanol/10% acetic acid)에서 침지하고

30분 동안 Amplify™(Amersham, USA)에 담근 후 80°C 진공 gel 건조기에서 2시간 동안 건조 시켰으며 X-ray film에 노출시켜 -70°C 냉동고에 보관한 후 X-ray film을 현상하였다.

**결과 및 고찰**

**Pyruvyl transferase 유전자의 클로닝**

*Z. ramigera* 115SLR에서 다당류 생합성에 관여하는 유전자 분리를 위해서 Eason(13)은 genomic DNA를 *Sau*3A로 부분 절단한 후 cosmid pLAFR3를 이용하여 *in vitro*에서 packaging시킨 후 plasmid pEX3B를 제조하였다. 또한 pEX3B에서 0.9 kb *Pst*I 단편은 *X. campestris*의 ketal pyruvyl transferase 유전자(5)와 homology를 갖는 것을 보고했으며, 이 0.9 kb *Pst*I 단편을 pUC8에 클로닝하여 plasmid pEX0.9를 제조하였다(13). 이들의 실험결과를 근거로 하여 0.9 kb *Pst*I 단편을 포함하는 확장된 염기영역을 확보하기 위해서 genomic DNA를 *Bam*H1으로 절단하였다. 1% agarose gel로부터 분리된 4.5 kb *Bam*H1 단편은 pUC18 vector에 ligation시킨 후 *E. coli*에 형질전환시켜 gene library를 만



**Fig. 1. Southern hybridization of plasmid pUEX4B and restriction maps of pUEX4B and pEX3B.**

Top (left): 1% agarose gel electrophoresis, Top (right): autoradiograph of pUEX4B digested with *Pst*I, *Sal*I, *Hind*III, *Sma*I, *Eco*RI/*Pst*I, *Hind*III/*Pst*I and *Sal*I/*Eco*RI (lanes: 2~8, respectively). Lane 1: *Hind*III digest of λ-DNA (size marker), Lane 9: *Bam*H1 digest of pUC18. A 0.9 kb *Pst*I fragment of pEX0.9 was used as a probe. Bottom: restriction maps of pUEX4B and pEX3B (↑: 0.9 kb *Pst*I site)







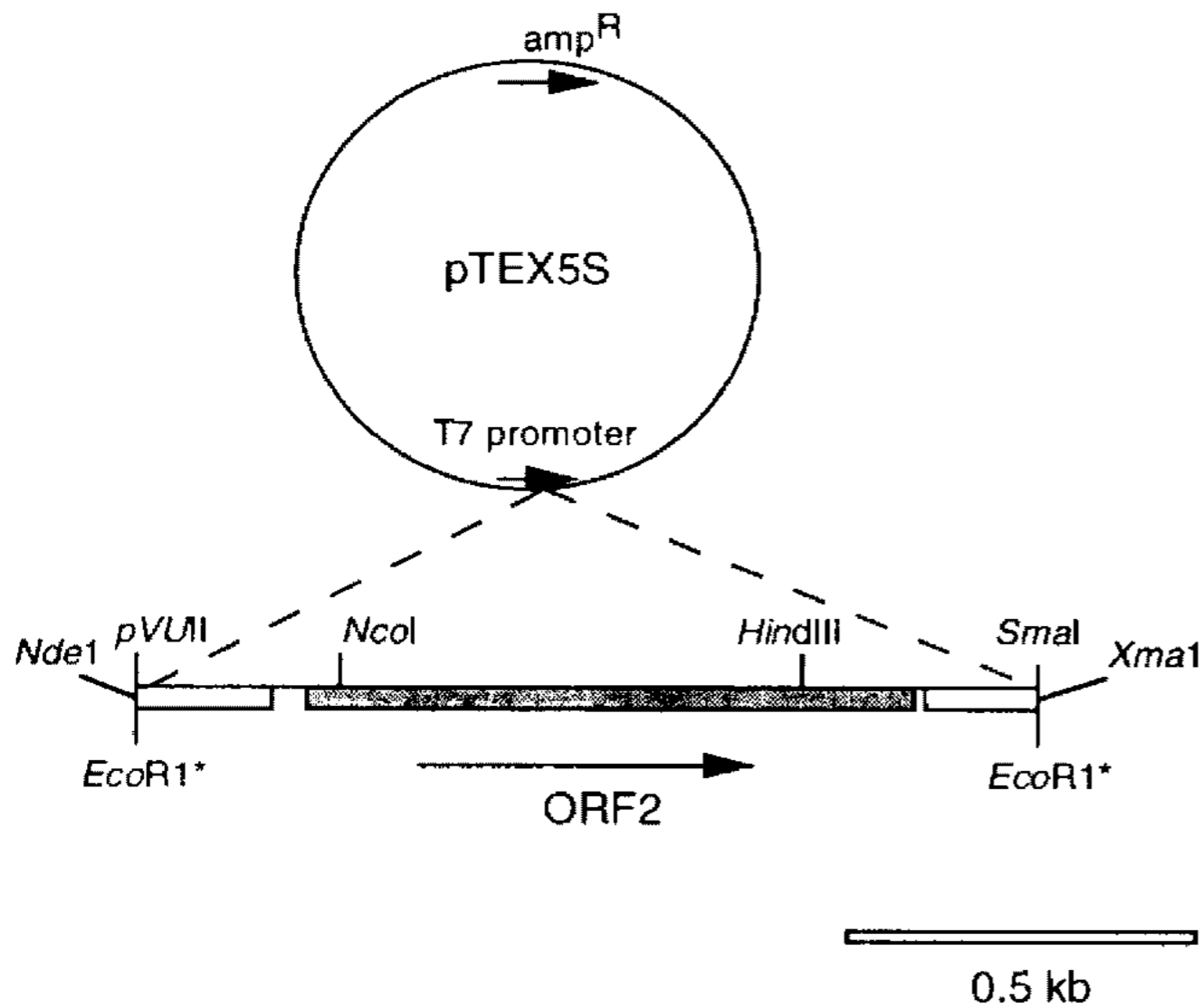


Fig. 4. Structure of pTEX5S.

Gene is inserted into the cloning site of *EcoRI* (bases 72). The T7 RNA polymerase promoter and ribosomal binding site are located between bases 142~164 and bases 93~98.

동질성을 비교하였다. Glucksmann 등(23)은 *ExoV* 유전자와 *GumL* 유전자들의 아미노산 서열 비교에서 23.7%의 동질성이 있음을 보고한 바 있었다. ORF3의 아미노산 서열과 *X. campestris*의 *GumL*과의 아미노산 서열상으로는 21.6%라는 비교적 높은 동질성을 보여 주었으며 49.5%의 유사성을 나타냈다(Fig. 3).

ORF3는 *X. campestris*의 *GumL* 유전자를 포함하는 0.9 kb *PstI* 단편으로 만들어진 probe와 강한 homology를 보였던 점으로 미루어 ORF3로부터 인지되는 단백질이 *GumL* 유전자로부터 인지되는 ketal pyruvyl transferase임을 예측할 수 있었다. 더 흥미있는 것은 ORF3의 upstream에 존재하는 ORF2가 *GumL*과 *ExoV*로부터의 아미노산 서열과 비교할 때 더 높은 동질성을 보여주었다. Fig. 3은 이들의 아미노산 서열의 동질성 비교를 나타내는 결과로서 *ExoV*와는 36.1%의 동질성과 57.9%의 유사성을 보였으며 또한 *GumL*과는 23.2%의 동질성과 52.6%의 유사성을 보여 주었다. 이는 ORF3보다 더 높은 동질성을 보여줄 뿐만 아니라 아미노산 서열의 전체적 부분에서 동질성을 나타냄으로 ORF2가 *Z. ramigera* 115SLR에서 생합성되는 다당류의 잔기에 pyruvate 치환에 관여하는 ketal pyruvyl transferase 유전자로서 판단된다.

#### T7 RNA polymerase를 이용한 ORF2 유전자의 발현

ORF2로부터 유도된 아미노산의 서열이 *ExoV*와 *GumL*과 높은 동질성을 나타낸 점을 고려해서 이것으로부터 전사되는 단백질의 크기를 결정하기 위하여

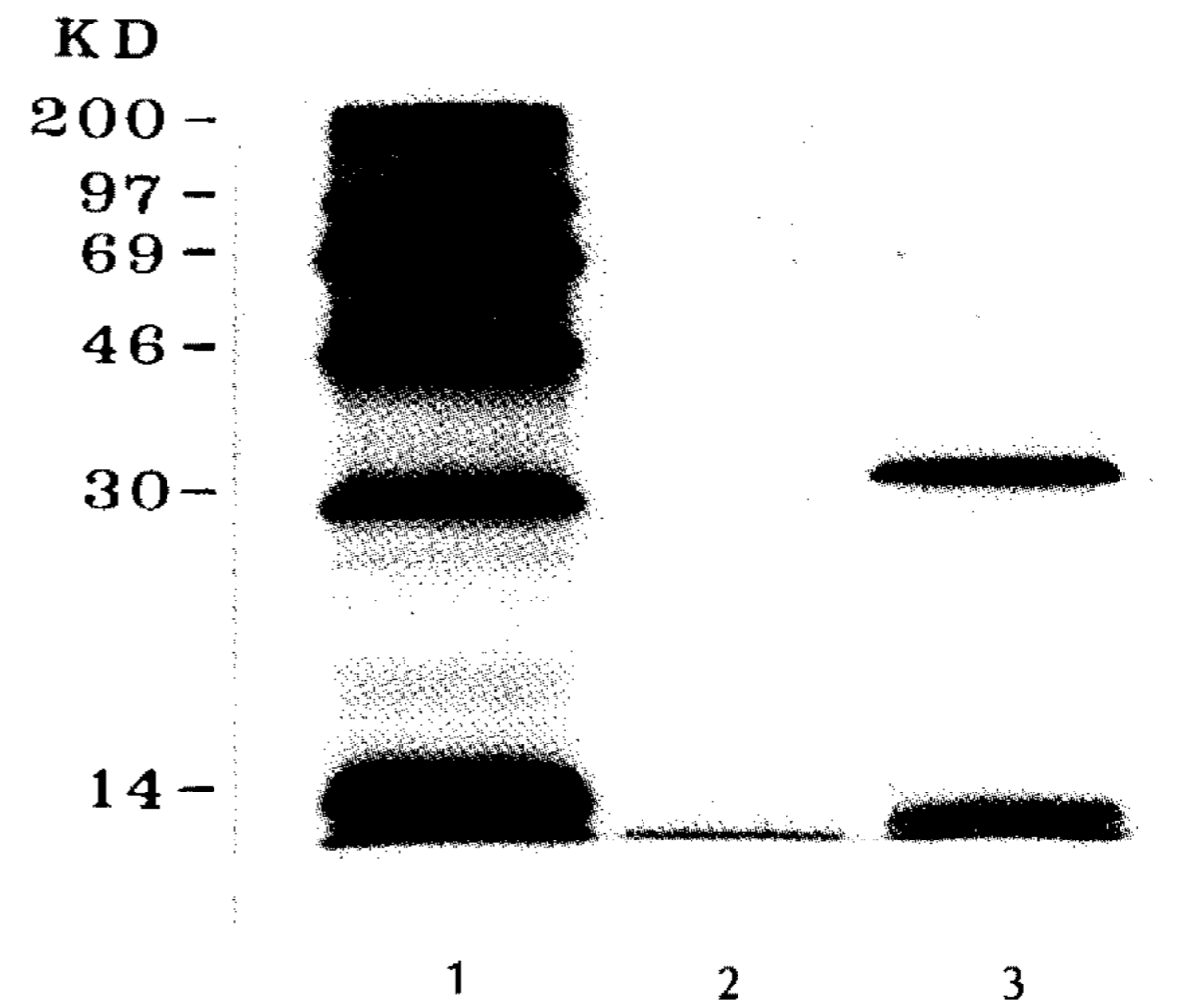


Fig. 5. Analysis of plasmid-encoded protein by T7 RNA polymerase.

Samples were loaded onto a 12% polyacrylamide gel. Plasmid pTEX5S and pT7-7 vector were transcribed using T7 RNA polymerase/promoter and translated *in vitro* in the presence of 35S methionine. Lane 1: marker proteins ( $^{14}\text{C}$  methylated proteins: myosin 200 kDa, phosphorylase-b 97 kDa, bovine serum albumin 69 kDa, ovalbumin 46 kDa, carbonic anhydrase 30 kDa, lysozyme 14.3 kDa). Lane 2: pT7-7 vector, Lane 3: pTEX5S

*PvuII*와 *SmaI* 제한효소를 사용하여 ORF2를 포함하는 1.34 kb DNA 단편을 분리한 후 pT7-7 vector에 도입시켜 T7 RNA polymerase/promoter에 의해서 vector 내에 클로닝된 유전자로부터 선택적으로 polypeptide가 생합성 되도록 하였다. 분리된 1.34 kb DNA 단편 (*PvuII* : 220~225 bp ; *SmaI* : 1455~1560 bp, Fig. 2)은 완전한 ORF2 영역 및 240 bp의 upstream과 175 bp의 downstream 영역을 포함하였으며, 여러 transformant로부터 정확한 orientation을 갖는 클론을 얻어서 plasmid pTEX5S로 정했다(Fig. 4). Fig. 5는 pT7-7과 pTEX5S로부터 얻어진 autoradiograph로서, 기준으로서 사용된 pT7-7 vector의 유전자 발현 양상과 비교할 때 pTEX5S는 33.5 kDa에 해당하는 polypeptide를 생합성을 보여주고 있었다. 이것으로부터 결정된 1.34 kb DNA 단편중에 존재하는 ORF2 영역안에는 염기서열의 종결 코돈이 없었으며, ORF2(903 bp)로부터 예측된 단백질 분자량과 동일한 크기의 polypeptide를 갖는 것을 확인할 수 있었다.

#### 요 약

다당류와 탄수화물이 식품 및 의약품 등에 이용의 증대로 중요한 관심의 대상이 되고 있으나, 미생물이 생합성하는 다당류들의 연구 및 생합성에 관여하는 유전자들의 확보를 통한 유전학적인 연구는 미비한 상태이다. 미생물들로부터 유용한 novel 다당류의 생합성을



위해서는 무엇보다도 생합성에 관여된 유전자들의 클로닝 및 분석이 필요하다. 이 연구에서 *Z. ramigera* 115SLR 균주로 부터 다당류의 생합성에 관여하는 유전자 중에서 다당류의 side 잔기로 존재하는 glucose 잔기에 pyruvate를 치환시키는 역할을 하는 ketal pyruvyl transferase는 다당류의 물성(rheological properties)에 미치는 중요한 영향 때문에 이 효소를 인지하는 유전자의 분리는 탄수화물 및 다당류의 생합성 연구에 큰 기여를 할 수 있다고 본다. 먼저 xanthan gum을 생합성하는 *X. campestris*의 ketal pyruvyl transferase 유전자를 probe로 사용하여 *Z. ramigera* 115SLR의 genomic DNA에서 염기서열의 동질성을 갖는 4.5 kb *Bam*H1 DNA 단편을 분리하였다. 이 중에서 2.6 kb *Pst*1/*Hind*III 단편은 사용한 probe와 강한 염기서열의 동질성을 보여주는 영역으로서 M13mp19 vector와 universal primer를 이용하는 기준방법으로 염기서열을 결정하였다. 이로부터 단백질을 인지할 수 있는 2개의 완전한 ORF와 2개의 불완전한 ORF를 확인할 수 있었다. 이 중에서 완전한 ORF를 갖는 두 개의 영역(2 and 3)의 염기서열의 결정과 아미노산 서열상의 동질성 분석을 통해서 ORF3는 아미노산 서열상에서 *X. campestris*의 *Gum*L과 21.6%의 동질성을 보였다. 특히 ORF2는 *Gum*L과 23.2%, *Exo*V과는 37.4%의 높은 동질성을 나타내었으며, 아미노산 서열의 동질성이 전체적인 부분에서 나타남으로서 *Z. ramigera* 115SLR의 다당류 생합성에서 관여하는 pyruvyl transferase를 인지함을 판단할 수 있었다. ORF2에 존재하는 유전자로 부터 전사되는 단백질의 분자량 크기를 확인하기 위해서 T7 RNA polymerase/promoter를 이용한 *in vitro* transcription/translation을 실시한 결과 ORF2로 부터 33.5 kDa에 해당하는 polypeptide를 확인할 수 있었다.

### 감사의 말

본 연구는 1995년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어 졌음.

### 참고문헌

1. Whistler, R.L. 1993. Industrial gums, Pp. 1-20. In R.L. Whistler and J.N. Bemiller (eds), *Introduction to industrial gums*, Academic press, INC.
2. Margaritis, A. and G.W. Pace. 1985. *Comprehensive biotechnology: Microbial polysaccharides*, 3: 1005-1044.
3. Sutherland, I.W. 1990. The properties and potential of microbial exopolysaccharides. *Chimicaoggi* 4: 9-14.
4. Sutherland, I.W. 1979. Microbial polysaccharides: control of synthesis and acylation. In G.W. Berkeley and Gooday and D.C. Ellwood (eds), *Microbial polysaccharides and polysaccharases*, R.C.W., Academic Press, Lo-

- ndon.
5. Harding, N.E., J.M. Cleary, D.K. Cabanas, I.G. Rosen and K.S. Kang. 1987. Genetic and physical analysis of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* 169: 2854-2861.
6. Marzocca, M.P., N.E. Harding, E.A. Petroni, J.M. Cleary and L. Ielpi. 1991. Location and cloning of the ketal pyruvate transferase gene of *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* 173: 7519-7524.
7. Reuber, T.L. and G.C. Walker. 1993. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* 74: 269-280.
8. Leigh, J.A. and G.C. Walker. 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *TIG* 10: 63-67.
9. Troyano, E., S-P Lee, C. Rha and A.J. Sinskey. 1996. Presence of acetate and succinate groups in the exopolysaccharide from *Zoogloea ramigera* 115. *Carbohydrate Polymers* (accepted).
10. Friedman, B.A. and P.D. Dugan. 1968. Identification of *Zoogloea* species and the relationship to zoogloeal matrix and floc formation. *J. Bacteriol.* 95: 1903-1909.
11. Dugan, P.R. 1975. Bioflocculation and the accumulation of chemicals by floc-forming organisms. Report EPS-660/2-75-032. Cincinnati, Ohio. U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development.
12. Norberg, A.B. and H. Persson. 1984. Accumulation of heavy-metal ion by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 239-246.
13. Easson, D.D. 1987. A recombinant DNA approach to the design and synthesis of novel polysaccharides. MIT, Ph. D. Thesis.
14. Thorne, L., L. Tansey, and T.J. Pollock. 1987. Clustering of mutations blocking synthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* 169: 3593-3600.
15. Glacebrook, J. and G.C. Walker. 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* 56: 661-672.
16. Stauffer, K.R., J.G. Leeder and S.S. Wang. 1980. Characterization of Zoogla-115, an exocellular glycan of *Zoogloea ramigera* 115. *J. Food Sci.* 45: 946-952.
17. Tabor, S. and C.C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1074-1078.
18. Easson, D.D., A.J. Sinskey, and O.P. Peoples. 1987. Isolation of *Zoogloea ramigera* I-16-M exopolysaccharide biosynthetic genes and evidence for instability within this region. *J. Bacteriol.* 169: 4518-4524.
19. Norberg, A.B. and S.O. Enfors. 1982. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. *Appl. Env. Microbiol.* 44: 1231-1237.
20. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

21. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
22. Glucksmann, M.A., T.L. Reuber, and G.C. Walker. 1993. Genes needed for the modification, polymeriza-

tion, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**: 7045-7055.

(Received 30 April 1996)