

김치유산균용 발현벡터 pSJE6c 개발과 이를 이용한 외래 유전자 발현

이강욱¹ · 박지영¹ · 이지연¹ · 이황아¹ · 백창운¹ · 조현덕¹ · 김주연¹ · 권건희² · 천지연³ · 김정환^{1,2*}

¹경상대학교 대학원 응용생명과학부(BK21 program), ²경상대학교 농업생명과학원, ³순천대학교 식품공학과

Development of pSJE6c, an Expression Vector for Kimchi Lactic Acid Bacteria, and Heterologous Gene Expression Using the Vector. Lee, Kang Wook¹, Ji Yeong Park¹, Ji Yeon Lee¹, Hwang A Lee¹, Chang Un Baek¹, Hyeon Deok Jo¹, Joo Yeon Kim¹, Gun-Hee Kwon², Jiyeon Chun³, and Jeong-Hwan Kim^{1,2*}.

¹Division of Applied Life Science (BK21 program), Graduate School, ²Institute of Agriculture & Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea, ³Department of Food Science and Technology, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea – Development of expression vectors is important for the basic and applied researches on kimchi LAB (lactic acid bacteria). An expression vector, pSJE6c was constructed by inserting P6C promoter sequence from *Lactococcus lactis* into pSJE, a shuttle vector for *E. coli* and *Leuconostoc* species. To test the efficiency of pSJE6c, *aga* (α -galactosidase) and *lacZ* (β -galactosidase) genes were expressed in *Lactobacillus brevis* 2.14. Compared to the pSJE, expression levels of both genes were increased, indicating P6C promoter was better than indigenous promoters. Enzyme activities of *L. brevis* cells harboring pSJE6caga (pSJE6c with *aga*) or pSJE6Z (pSJE6c with *lacZ*) were 1.5- 2 fold higher than those with pSJEaga (pSJE with *aga*) or pSJEZ (pSJE with *lacZ*). More RNA transcripts were detected in cells harboring pSJE6c based recombinant plasmid. The results indicated that heterologous gene expressions in kimchi LAB could be improved significantly by use of efficient expression vectors.

Key words : *Lactobacillus brevis*, α -galactosidase, β -galactosidase, expression vectors, promoters

서 론

김치는 우리나라 전통 발효식품으로 예전부터 가정에서 소규모로 만들어 왔으나, 핵가족화, 산업화와 더불어 기업에서 상업적으로 대량 생산하기 시작하면서 공장김치의 생산과 소비는 매년 증가하는 추세이다. 특히 김치의 수출 증대와 세계화에 대한 관심 고조는 김치의 맛과 기능성에 대한 관심과 연구를 증가시키고 있다[5]. 김치품질에서 매우 중요한 역할을 하는 김치유산균들에 대한 관심도 증가하고 있다. 김치유산균에 관한 많은 연구들이 이루어졌지만, 대부분은 균 분리와 동정, 생육특성 및 생화학적 특성 조사 등이고, 분자생물학적 연구나 종균 개발에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다(문헌조사결과, 2009년 6월). 대량 생산되는 김치의 고품질화 및 일정한 품질 유지를 위해서는 종균 사용이 바람직하며 이를 위해서는 김치유산균의 기초연구를 통한 제반 특성들의 이해와 함께 분자생물학적 연구나 유전공학적인 방법을 포함하여 다양한 방법으로 종균을 개량하는 연구들이 필요하리라 생각된다.

식품용 발현벡터나 분비벡터를 이용한 김치유산균주 개량

은 장기적으로 볼 때 우수한 종균 확보뿐만 아니라 식용에 안전한 김치 유산균의 산업적 활용도를 크게 증가시킬 수 있는 방안이다. 즉, 효율적인 외래 유전자 발현을 통해 유산균에서 경제적 가치가 큰 유용물질들을 생산할 수 있다. 또한 개발된 기술들을 김치 제조에 사용한다면 새로운 개념의 고기능성, 고품질 김치 제조도 가능해 질 것이다.

하지만 유전자 재조합 기술을 통한 균주개량 방법에 있어서 GMO에 대한 법적인 허용문제와 국민들의 인식에 의한 거부감 등으로 인해 유전공학의 적용을 통한 균주 개량은 많이 제한되고 어려운 실정이다. 하지만 개량된 종균의 사용은 발효식품에 있어서 새로운 기능성 부여나 안전성 개선에 있어서 매우 효과적일 것이라고 생각된다. 그렇기에 더욱 인체에 안전한 방법들의 개발을 통해 바람직한 특성을 지닌 균주와 기능성 물질을 생산하는 균주를 얻어야 할 것이다. GMO라는 측면에 있어서는 우선 본 연구에서 개발되어진 벡터 자체가 원래부터 김치 유산균에서 분리해낸 플라스미드를 바탕으로 개발된 벡터로서, 외래 유전자 또한 기존의 다른 유익한 균주들이 만들어내는 유익한 단백질을 만들 수 있는 유전자를 도입함으로써 근본적으로 인체 내에 사용 가능한 플라스미드와 유전자의 사용을 통한 식품용 발현벡터로서 인체에서는 안전할 것으로 판단되어 진다. 하지만 본 연구에서 개발한 발현벡터에 사용되는 항생제 내성 유전자와 같은 마커의 사용으로 인해 식품에서의 직접적인 사용은 현

*Corresponding author

Tel: 82-055-751-5481, Fax: 82-055-753-4630

E-mail: jeonghkm@snu.ac.kr

재 불가능한 것으로 판단된다. 이는 항생제 내성 유전자를 대신할 수 있는 마커의 개발 필요성 또한 크다고 할 수 있으며, 항생제 내성 유전자가 아닌 흔히 쉽게 사용 가능한 report gene을 이용하는 등의 식품용 마커를 개발, 선발하고 사용하는 연구가 벡터 개발과 함께 계속되고 있다.

본 연구에서는 김치유산균인 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LM0230에서 유래한 프로모터 P6C[6]를 발현벡터 제조에 사용하였다. P6C는 강력한 promoter임이 reporter gene을 이용한 서울대의 실험결과 확인되었고, 그 실험 결과를 구체적으로 살펴보면, 대조군으로서 흔히 유산균주의 외래 유전자 발현에 많이 쓰이는 발현벡터인 pMG36e를 프로모터 세기를 비교하기 위해 사용되어졌고, 이는 유산균주에서 강력하게 작동하는 P32라는 프로모터를 가진 벡터로서 P6C와 P32를 비교하였을 때 약 3배정도 높은 프로모터 세기를 나타내었다[6]. 이러한 P6C 프로모터를 이전에 본 연구실에서 개발된 유산균용 서플벡터 pSJE[7]에 도입함으로써 발현 벡터인 pSJE6c를 구축하였다. pSJE6c의 효율성 평가를 위해 유산균에서 유래한 α -galactosidase 유전자(*aga*)[8]와 β -galactosidase 유전자(*lacZ*)[10]를 도입하여 *Lactobacillus brevis* 2.14에서 발현 효율을 조사하였다. 비교를 위해 이들 유전자의 고유 프로모터에 의한 발현 정도와 비교하였다. 이를 위해 각각의 유전자를 지닌 재조합균주들에 대한 효소역가 측정 및 전사체 농도를 조사하였다. 실험결과 pSJE6c는 pSJE 보다 외래유전자 발현에 적합함을 확인하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드, 배양조건

본 연구에 사용한 균주 및 plasmid들을 Table 1에 나타내었다. *Lactobacillus brevis* 2.14 균주는 MRS 배지 (Difco Lab, Detroit, MI, USA)에서 37°C 정치배양하였고, 탄소원으로 glucose, galactose, melibiose, raffinose, sucrose, fructose, lactose(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 각 1%

(w/v) 되게 MRS 배지에 첨가하였다. *E. coli* DH5 α 균주는 Luria-Bertani (LB) 배지에서 37°C 진탕 배양하였다. 플라스미드 pSJE6c 혹은 pSJE를 포함한 균주들의 배양시 erythromycin(Em)을 *E. coli*는 200 μ g/mL 그리고 *L. brevis*는 5 μ g/mL 되게 첨가하였다.

DNA 추출 및 형질전환

*E. coli*와 *L. brevis* 균주의 plasmid DNA 추출은 Qia-genprep spin miniprep kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하였고, DNA 농도는 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 형질전환은 electroporation으로 Gene PulserII (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 장치를 사용하였다. *E. coli* competent cell 제조는 Dower 방법[4]을 사용하였으며, *L. brevis* competent cell은 Berthier 방법 [2]을 일부 변경하여 사용하였다. *L. brevis* 형질전환을 위한 electroporation 조건은 1.5 kV, 200 W, 25 μ F이며, 충격후 1 mL의 MRS 배지를 첨가하여 2 시간 회복 배양한 다음 Em(5 μ g/mL) 첨가 MRS 한천배지에 도말하였다. 37°C에서 2일간 배양후 분리된 균락들을 얻어서 MRS 액체배지 5 mL에 접종, 배양한 후 plasmid를 추출하였다. 제한효소로 절단한 plasmid DNA 들은 agarose gel 전기영동으로 그 크기를 확인하였다.

발현벡터 구축 및 외래 유전자 재조합

발현벡터 구축에 사용한 promoter는 Jeong 등(2006)[6]이 *Lactococcus lactis* LM0230 chromosomal DNA에서 분리한 P6C로서 연구를 통해 강력한 promoter임이 보고되었다. 알려진 염기서열을 바탕으로 상보적인 한 쌍의 oligonucleotides(54-mers, Table 2 참조)를 합성하였다(Embiotech, Seoul, Korea). Oligomer들은 STE 완충용액(10 mM Tris, pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 50 pmol/ μ L 농도로 녹였다. 각 oligomer를 2 μ mol씩 섞은 후에 MJ Mini PCR 기기 (Bio-Rad)를 이용하여 94°C에서 5분 가열후 서서히 냉각하는 방법으로 annealing 시켰다. *Pst*I와 *Bam*HI으로 절단한 후 본 연구실에서 개발한 유산균용 서플벡터인 pSJE에 도입하

Table 1. Bacterial strains and plasmids.

Bacterial strain and plasmid	Relevant characterization	Source or Reference
Strain		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 AflacU169(φ80dlacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Gibco BRL
<i>Lactobacillus brevis</i> 2.14	Sak ⁻ , Imm ⁻ , indicator strain for sakacin A	1
Plasmid		
pSJE	shuttle vector for <i>E. coli</i> and <i>Leuconostoc</i> sp., 6.5 kb, Em ^r	7
pSJE6c	pSJE containing P6C promoter fragment, 6.5 kb, Em ^r	This study
pSJEaga	pSJE containing 2.5 kb <i>aga</i> gene, 9 kb, Em ^r	12
pSJE6caga	pSJE6c containing 2.5 kb <i>aga</i> gene, 9 kb, Em ^r	This study
pSJEZ	pSJE containing 3 kb <i>lacZ</i> gene, 9.6 kb, Em ^r	This study
pSJE6Z	pSJE6c containing 3 kb <i>lacZ</i> gene, 9.5 kb, Em ^r	This study

Table 2. Primer sequences used for the amplification of P6C promoter and model genes.

Primer	Sequences
P6C F	5'-aaactgcagaaatgttgaaaatgctgctgctggtgatattatgggggatcca-3' (54 mer)
P6C R	5'-tggatcccccaataatcaccagcgcagcattttcaaccattctgcagttt-3' (54 mer)
Aga F	5'-cggatcccagtggttaaactgtgttg-3 (27 mer)
Aga R	5'-agcggcccgtgctcagttggttcag-3' (25 mer)
LacZ F	5'-gggatccgattgatttagatgagttc-3' (26 mer)
LacZ R	5'-ggcggcccgtccattttctctatatta-3' (27 mer)

였다. α -galactosidase 유전자(*aga*)와 β -galactosidase 유전자(*lacZ*)는 각각 *Leuconostoc mesenteroides* SY1[8]과 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC7962[10]에서 얻은 chromosomal DNA를 주형으로 그리고 Table 2에 나타낸 primer들을 사용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭후 *Bam*HI과 *Not*I으로 절단하여 pSJE6c에 도입하였다.

α -galactosidase (α -Gal) assays

균주들을 6가지 다른 탄소원(glucose, galactose, melibiose, raffinose, fructose, sucrose)이 각각 1%씩 포함된 MRS 배지에서 배양하면서 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하여 생육곡선을 작성하였다. 6, 12, 24, 36, 및 48시간대 시료들의 효소역가를 측정하였다. α -Gal 효소역가는 Church 방법[3]을 사용하였다. 기질은 p-nitrophenyl- α -galactopyranoside(PNPG)를 사용하였으며, 생성되는 p-nitrophenol(PNP)은 흡광도 OD₄₀₀에서 측정하였다. 효소 1 unit는 1분당 기질인 PNPG를 분해하여 1 nmol PNP을 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

β -galactosidase (β -Gal) assays

균주들을 다른 탄소원(glucose, galactose, lactose, raffinose, sucrose)이 각각 1%씩 포함된 MRS 배지에서 배양한 후 β -Gal 효소역가를 Miller의 방법[12]에 준해 측정하였다. 각각의 시간대별(6, 12, 24, 36, 48시간) 배양액 1 mL을 원심분리하여 균체를 회수하여 3차 증류수로 1회 세척한 후, 1 mL Z-buffer(Na₂HPO₄ 7H₂O 1.61 g, NaH₂PO₄ H₂O 0.55 g, KCl 0.075 g, MgSO₄ 7H₂O 0.0246 g, β -mercaptoethanol 0.27 mL, pH 7.0, 100 mL 최종부피)에 현탁하였다. 0.01 mm zirconia-silica bead를 1/5 정도 넣고, Mini-bead beater-8 (Biospec products, Bartlesville, OK, USA)를 이용하여 세포벽을 파쇄(1분씩 2회)한 후, 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 28°C에서 5분 방치 후, 기질인 O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG) 용액 200 μ L(ONPG 4 mg/mL, K₂HPO₄ 1.05 g, KH₂PO₄ 0.45 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, Na₃Citrate 2H₂O 0.05 g, 100 mL의 최종부피) 넣고 28°C에서 노란색이 나타날 때까지 반응하였다. 그리고 500 μ L 1 M Na₂CO₃로 반응을 중지시킨 후, 원심분리하였다. 흡광도 OD₄₂₀과 OD₅₅₀에서 측정하여 β -Gal unit를 다음의 식에 따라 계산하였다

[14].

$$\beta\text{-Gal unit} = 1,000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / T \times \text{OD}_{600}$$

t: 노란색으로 변할 때까지의 시간(min)

Slot blot hybridization

L. brevis 균주를 각각의 탄소원이 1% 포함된 MRS 배지에서 OD₆₀₀ 0.8~1.0까지 배양한 후 세포를 회수하여 Trizol-bead법으로 RNA를 추출하였다[8]. RNA는 260과 280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 구하였다. RNA 10 μ g씩을 slot blot 장치 SE646(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Uppsala Sweden)를 이용하여 hybond-XL nylon membrane에 고정화시켰다. 유전자 발현에 사용한 *aga*와 *lacZ* PCR 증폭산물을 probe로 사용하였으며, Amersham Alkphos Direct Labeling and Detection System(Amersham Bioscience)을 이용하여 labeling과 detection을 실시하였다. Hybridization 과정은 ULTRaHYB(Ambion, Austin, TX, USA)를 이용하여 42°C에서 1시간의 prehybridization과 12시간의 hybridization을 실시하였다.

결과 및 고찰

발현벡터의 구축

이미 보고된 P6C promoter sequence를 바탕으로 상보적인 염기서열로 이루어진 한 쌍의 oligonucleotides(Table 2)들을 제조하고 이들을 94°C에서 annealing을 실시하였다. 그 결과 양 끝에 *Pst*I과 *Bam*HI 제한효소 자리를 지닌 54 bp 크기의 P6C promoter DNA 단편을 얻었다. 이를 유산균용 서플렉터인 pSJE의 multiple cloning site중 *Pst*I과 *Bam*HI에 도입하여 유전자 발현에 필요한 promoter를 지닌 발현벡터 pSJE6c를 구축하였다(Fig. 1). pSJE6c에는 선택표지로서 항생제 erythromycin 내성 유전자가 있고, 전체 크기는 6.5 kb이다. pSJE6c는 *Leuconostoc* 속, *Lactobacillus* 속 뿐만 아니라 대장균에서도 복제가 가능하다[7]. pSJE는 theta type으로 복제가 되는 plasmid로서 비교적 안정하다. 배지에 항생제 Em이 없이도 13일 배양할 경우 여전히 3.1% 해당하는 균주들은 plasmid를 지니고 있어서 상당히 안정하다[12]. 이는 RCR(rolling circle replication) 방식으로 복제되는 다

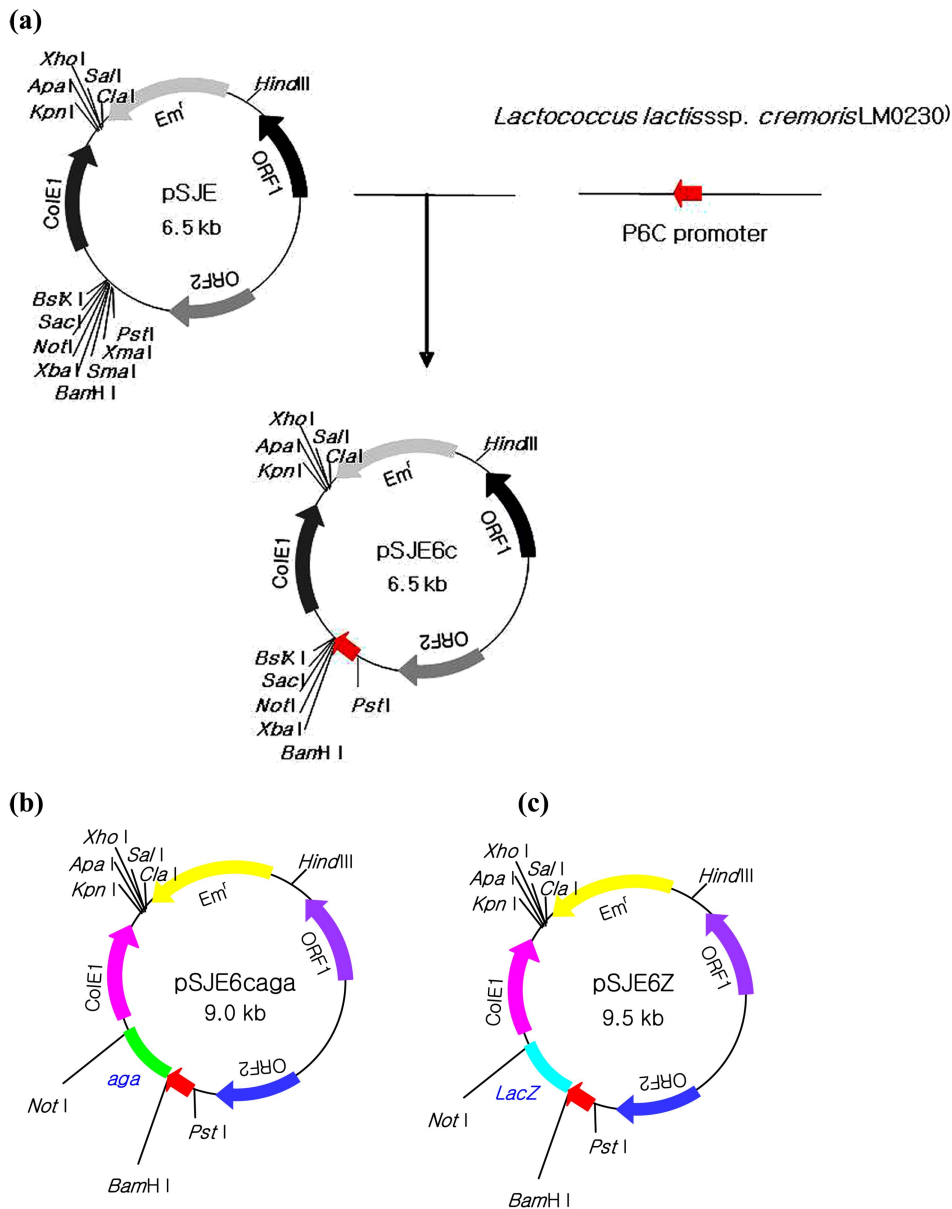


Fig. 1. Construction of an expression vector, pSJE6c. (a), pSJE6c; (b), pSJE6caga; and (c), pSJE6Z.

큰 plasmid들과 비교시 매우 안정적이다. 이러한 점은 식품용 벡터 개발에 있어서 큰 장점이 될 수있다. 즉 식품용 벡터에는 Erythromycin과 같은 항생제 내성유전자를 사용할 수 없고 따라서 항생제에 의한 재조합균주 선발도 불가능하다. 때문에 본질적으로 보다 안정한 plasmid가 그렇지 못한 종류들보다 유리할 것이기 때문이다.

발현벡터 구축 및 *L. brevis* 2.14로의 도입

구축된 발현벡터인 pSJE6c와 원 벡터인 pSJE의 외래유전자 발현 효율 비교를 위하여 두 종류의 외래 유전자를 이들에 각각 도입하였다. 먼저 α-galactosidase 유전자(aga)를 시험하였다. Table 2의 aga 증폭용 primer 한 쌍을 이용하여

PCR로 2.5 kb를 증폭하였다. 증폭물의 양 끝은 각각 BamHI 과 NotI 제한효소 자리를 가지며 이들 효소로 처리한 후 pSJE6c의 동일 제한효소 자리들에 도입하였다. 그 결과 9 kb 크기의 pSJE6caga를 얻었다(Fig. 1-b).

β-galactosidase 유전자인 lacZ 역시 Table 2의 lacZ primer를 이용하여 증폭하였다. 3 kb 크기의 증폭물 말단에는 각각 BamHI과 NotI 제한효소 자리가 있다. 제한효소 처리 후 pSJE6c에 도입하여 9.5 kb 크기의 pSJE6Z를 얻었다 (Fig. 1-c). pSJE6c에 도입한 유전자들은 고유 promoter가 없지만 비교 목적으로 pSJE에 도입시킨 aga와 lacZ 유전자들은 원래 promoter를 포함시켜서 증폭하였다[11]. 외래 유전자를 포함한 재조합 플라스미드들은 *L. brevis* 2.14 균주내

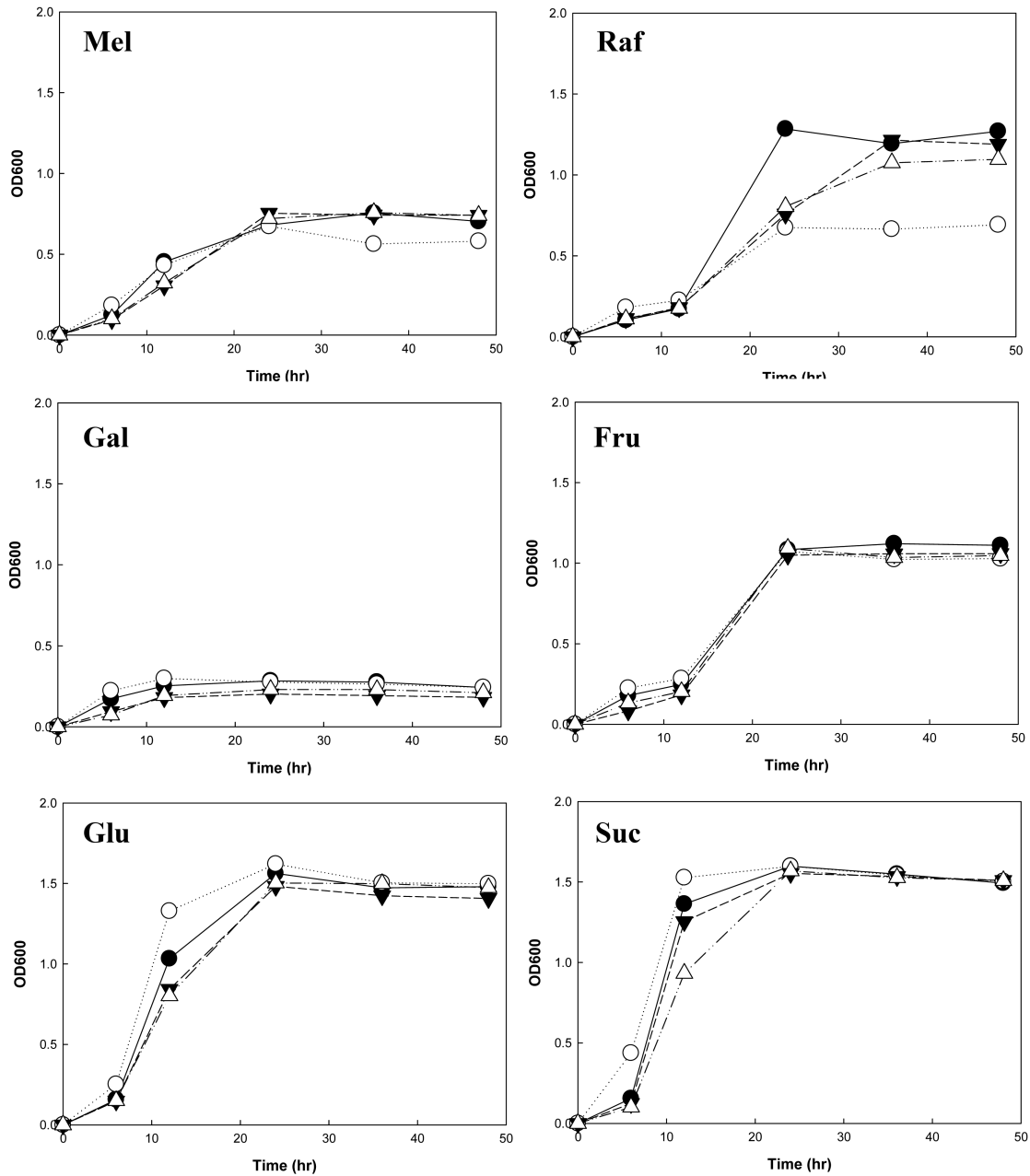


Fig. 2. Growth of *L. brevis* 2.14 TFs (*aga*). *L. brevis* 2.14 was grown on MRS media containing different carbon sources (1%, w/v). ●, *L. brevis* 2.14 [pSJE]; ○, *L. brevis* 2.14 [pSJEaga]; ▼, *L. brevis* 2.14 [pSJE6c]; △, *L. brevis* 2.14 [pSJE6caga].

로 electroporation 방법으로 도입시켰다. *L. brevis* 형질전환 효율은 plasmid DNA 1 µg 당 10² 형질전환체 정도로 통상 10⁶⁻⁷ 형질전환체인 대장균에 비해 효율은 낮았다.

형질전환체들의 α-Gal 효소역가

pSJE6caga나 pSJEaga를 지닌 형질전환체를 탄소원이 다른 MRS 배지에 접종하여 37°C에서 배양하여 얻은 생육곡선들을 Fig. 3에 나타내었다. Glucose와 sucrose 배지에서는 빠르게 생육하나 melibiose, raffinose, fructose 배지에서는 완만하게 생육하였고 특히 galactose 배지에서는 생육이 원

할하지 않았다. 이는 *L. brevis* 2.14의 경우 galactose를 이용할 수 있는 대사경로 부재로 인한 것이거나, 또는 세포 내로 galactose를 옮겨주는 수송체 부족 또는 이상으로 인한 것이 아닐까 추정된다. α-Gal 효소역가 측정결과를 보면(Fig. 4), α-Gal 효소의 기질인 raffinose와 melibiose에서 생육한 세포들이 높은 효소 역가를 나타내었고, 다음으로 galactose, fructose, glucose, sucrose 순으로 나타났다. Raffinose에서 12시간 배양 시 가장 높은 효소역가(58.64 U/mg protein)를 나타내었고, melibiose는 24시간 배양 시 높은 효소역가(43.17 U/mg protein)를 나타내었다. 하지만 배양시간이 길

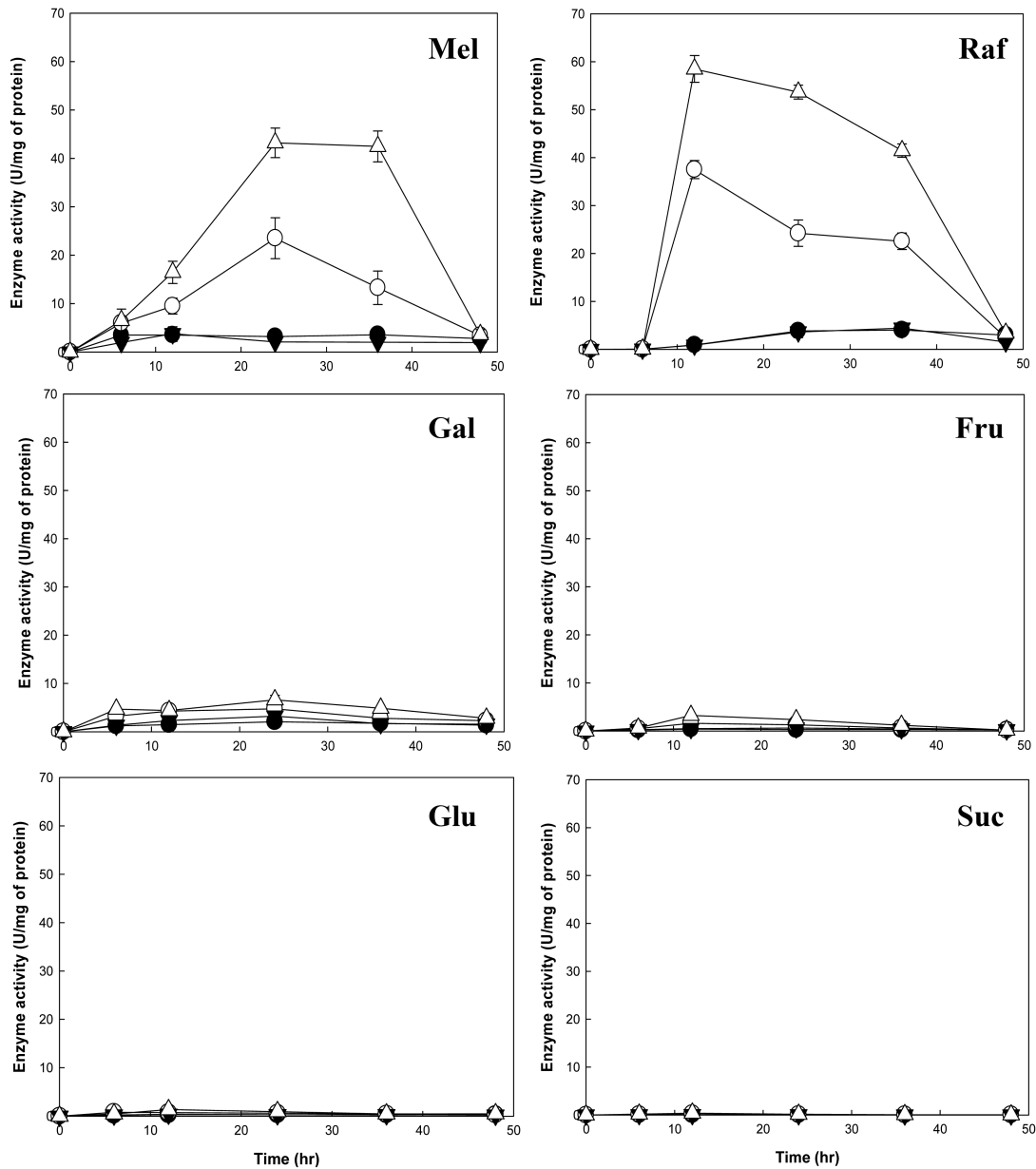


Fig. 3 α -Gal activities of *L. brevis* 2.14 TFs. *L. brevis* 2.14 was grown on MRS media containing different carbon sources (1%, w/v). ●, *L. brevis* 2.14 [pSJE]; ○, *L. brevis* 2.14 [pSJEaga]; ▼, *L. brevis* 2.14 [pSJE6c]; △, *L. brevis* 2.14 [pSJE6caga].

어지면서 효소역가는 점점 줄어들어서 48시간에는 각각 3.43 U/mg protein과 3.66 U/mg protein을 나타내었다. 나머지 탄소원 별 효소역가를 보면, galactose에서는 24시간(6.67 U/mg protein), fructose 24시간(3.21 U/mg protein), glucose 12시간(1.37 U/mg protein), 그리고 sucrose는 24시간(0.38 U/mg protein) 배양시 역가가 가장 높았다. 한편 Fig 3의 결과를 살펴보았을 때, pSJE6caga를 지닌 균주는 pSJEaga를 지닌 균주와 비교할 때 효소역가가 1.5 내지 2배 정도 더 높았고 이는 6가지 탄소원 모두에서 확인할 수 있었다. 이 결과는 *aga* 고유 promoter보다는 P6C promoter가 *aga* 유전자 발현에 더욱 적합함을 보여주는 결과로서 강력한

promoter를 지닌 발현벡터 구축의 필요성을 확인시켜준다.

형질전환체들의 β -Gal 효소역가

lacZ 유전자를 지닌 형질전환체들을 lactose를 포함한 5종의 탄소원을 포함한 MRS 배지에서 배양한 후 생육곡선을 얻었고(Fig. 4), β -Gal 효소역가를 배양 6, 12, 24, 36 및 48시간대에 측정하였다(Fig. 5). 다른 탄소원 배지에서 생육 정도를 확인한 결과, 앞의 *aga* 형질전환체들의 생육과 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 즉 glucose, raffinose, sucrose 배지에서 빨리 생육하였다. 한편 lactose에서는 완만히 생육하여서 24시간 배양 시 정지기에 도달함을 확인할 수 있었

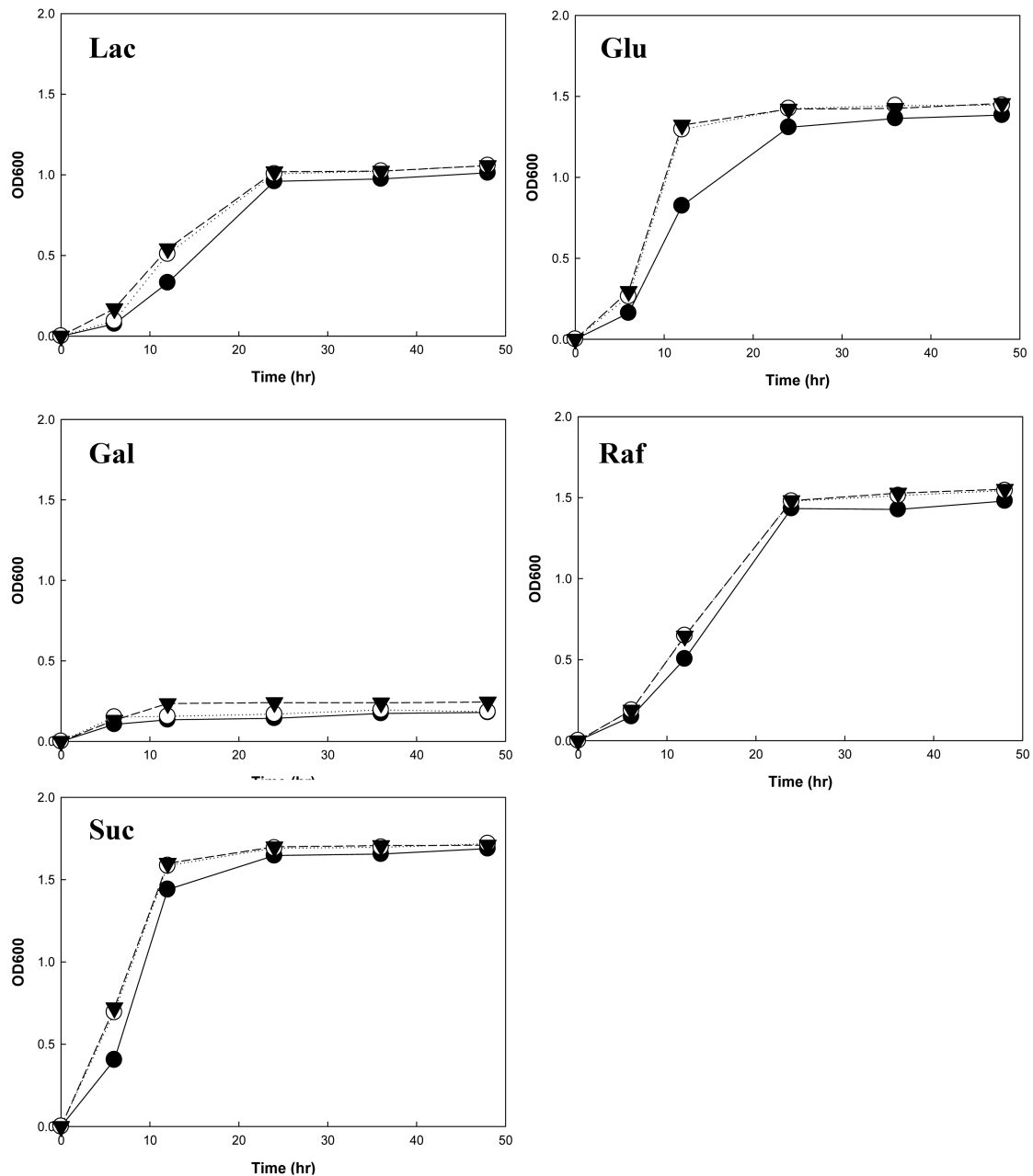


Fig. 4 Growth of *L. brevis* 2.14 TFs (*lacZ*). *L. brevis* 2.14 was grown on MRS media containing different carbon sources (1%, w/v). ●, *L. brevis* 2.14 [pSJE6c]; ○, *L. brevis* 2.14 [pSJEZ]; ▼, *L. brevis* 2.14 [pSJE6Z].

다. 한편 β -Gal 역가 측정 결과를 보면 lactose 배지에서 12시간 배양 시 가장 높은 효소역가(2896.84 units)를 나타내었고, 36시간에도 1872.2 units로 높게 유지되나 이후 감소하여 48시간에는 464.78 units로 떨어졌다. 다음으로 glucose, galactose, raffinose, 및 sucrose 배지순으로 역가가 나타났다. Glucose 배지에서는 12시간 배양 시 1320.74 units로 가장 높은 역가를 나타내다가, 24시간부터는 149 units로 현저히 떨어짐을 확인할 수 있었다. Galactose 배지의 경우, 12시간 배양 시 1124.85 units로 가장 높은 역가를 나타내었고 glucose와 마찬가지로 24시간 이후로 역가가 떨어짐을 확인

하였다. Raffinose와 sucrose의 경우, 6~24시간 배양 시 150~300 units, 36~48시간 배양 시는 1~50 units로 모든 시간대에서 전체적으로 낮은 역가를 나타내었다. 그리고 역시 *lacZ* 유전자가 고유 프로모터에 의해 발현되는 pSJEZ 보다는 P6C promoter에 의한 유전자 발현이 일어나는 pSJE6Z를 지닌 균주들의 역가가 훨씬 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 이 결과는 P6C promoter 도입에 의해 비단 *aga* 뿐만 아니라 다른 유전자 발현도 증가됨을 보여주는 결과이다. 이로 미루어 pSJE6c는 *Lactobacillus brevis*와 다른 유산균주들에서 여러 외래유전자들의 발현에 유용한 발현벡터임을

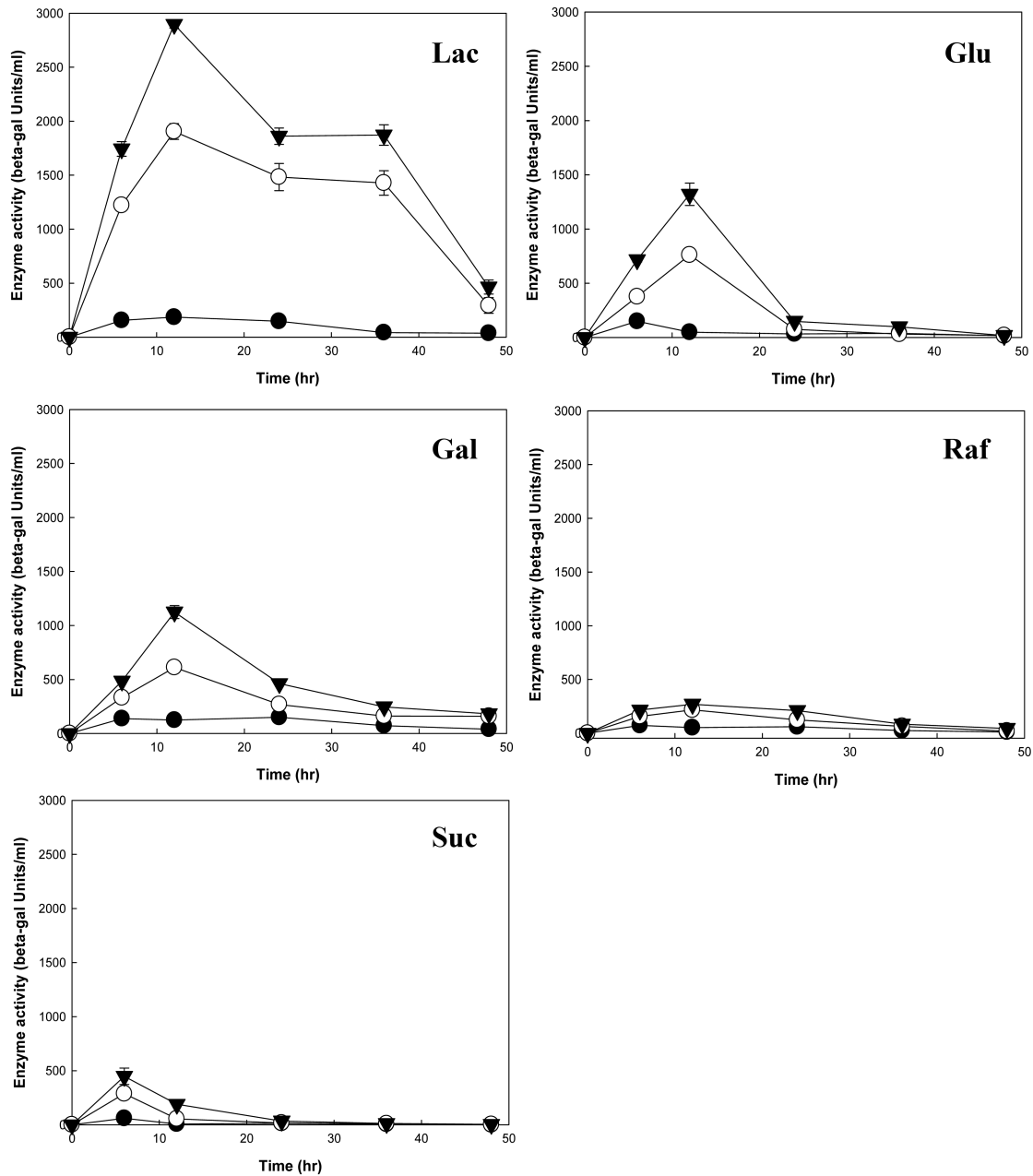


Fig. 5 β -Gal activities of *L. brevis* 2.14 TFs (*lacZ*). *L. brevis* 2.14 was grown on MRS media containing different carbon sources (1%, w/v). ●, *L. brevis* 2.14 [pSJE6c]; ○, *L. brevis* 2.14 [pSJEZ]; ▼, *L. brevis* 2.14 [pSJE6Z].

확인할 수 있었다.

Slot blot을 통한 전사체 확인

L. brevis 2.14 재조합 균주들에서 *aga*와 *lacZ* 전사체 생성 정도를 확인하기 위하여 slot blot을 실시하였다. *L. brevis* 2.14[pSJE6caga]와 *L. brevis* 2.14[pSJEaga]의 경우, 모든 탄소원에서 전사가 일어남을 확인할 수 있었으나 반면 대조구인 *L. brevis* 2.14[pSJE]의 경우에는 시그널이 검출되지 않았다(Fig. 6-a). 한편 전사체 농도는 탄소원에 따라 차이가 나는 것을 확인할 수 있었고 raffinose 배양시 가장 강한 시

그널을 나타내어서 전사체 농도가 가장 높음을 알 수 있었다. Raffinose 다음으로 melibiose, galactose, fructose 순으로 나타났다으며 한편 glucose와 sucrose에서는 시그널이 약해서 전사 정도가 미미함을 알 수 있었다.

이는 *L. brevis* 2.14에서 탄소대사물저해(Carbon Catabolite Repression) 현상이 일어나는 것을 보여준다[8]. 한편 *aga* 고유 프로모터를 지닌 *L. brevis* 2.14[pSJEaga] 보다는 *L. brevis* 2.14[pSJE6caga]에서 큰 차이는 아니지만 약간 더 높은 수준의 전사체 농도를 보여주었다. 이는 P6C에 의해 더 많은 전사가 일어나고 그 결과로 α -Gal 역가도 증가함을 보

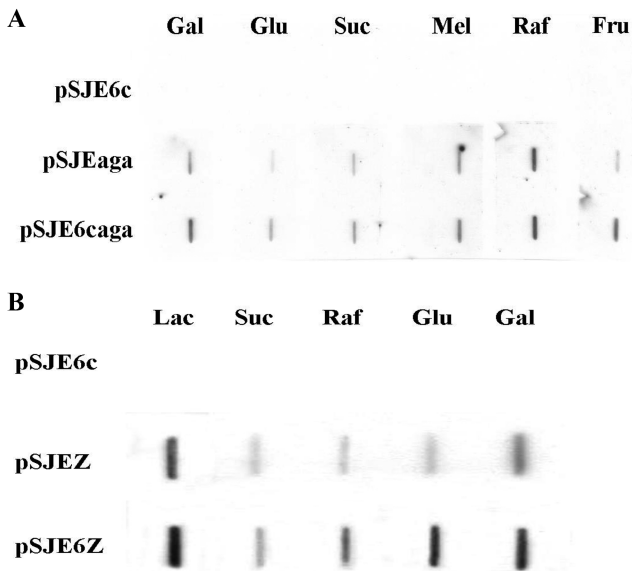


Fig. 6 Slot-blot hybridization of RNAs extracted from *L. brevis* 2.14 TFs. **A**, RNAs were extracted from cells harboring pSJE6c, pSJEaga, or pSJE6caga. Cells were grown on MRS media containing different carbon sources (1%, w/v). RNA was prepared and 10 μ g each was applied onto a nylon membrane in a slot blot apparatus. Gal, galactose; Glu, glucose; Suc, sucrose; Mel, melibiose, Raf, raffinose; Fru, fructose. **B**, RNAs were extracted from cells harboring pSJE6c, pSJEZ, or pSJE6Z. 10 μ g of each RNA sample was applied onto a nylon membrane in a slot blot apparatus. Lac, lactose. *aga* and *lacZ* probes were prepared by PCR using the same primers (Table 2).

여주는 결과이다. 또한 *LacZ* 형질전환체인 *L. brevis* 2.14 [pSJEZ]와 *L. brevis* 2.14[pSJE6Z]에서도 *L. brevis* 2.14 [pSJE6c]와는 달리 전사가 일어남을 확인할 수 있었다(Fig. 6-b). Lactose 배지에서 가장 고 농도의 전사체가 검출되었고, 다음으로 glucose와 galactose에서 검출되었다. 반면에 raffinose나 sucrose 배지에서는 다른 탄소원들보다 상대적으로 낮은 전사체 농도가 검출되었다. 이는 효소역가 측정 결과와도 비슷한 결과이다. 또한 P6C 프로모터를 지닌 균주가 자체 프로모터를 지닌 균주보다 조금 더 강한 시그널을 보임을 확인할 수 있었고 이는 *aga* 에서와 마찬가지로였다.

이상 결과들로 볼 때 *Leuconostoc* - *E. coli* shuttle vector 인 pSJE에 *Lactococcus lactis* 유래의 강력한 promoter인 P6C를 도입한 pSJE6c는 외래유전자 발현에 보다 적합한 발현벡터임이 입증되었다. pSJE6c는 앞으로 김치유산균을 숙주로 한 외래유전자 발현실험에서 매우 유용하게 사용될 것으로 전망된다.

요 약

본 연구실에서 개발한, 김치에서 분리한 *Leu. mesenteroides* SY2 유래 pFMBL1 을 바탕으로 구축한 셔틀벡터인, pSJE [7]를 외래유전자 발현에 적합하게 개량한 발현벡터를 구축

하였다. *Lactococcus lactis* LM0230에서 분리한 프로모터 P6C를 pSJE에 도입하였다. P6C 염기서열을 지닌 oligonucleotide 쌍을 따로 제조한 후 annealing을 통해 짧은 DNA 단편을 얻어서 제한효소 처리후 pSJE에 도입하여 pSJE6c를 구축하였다. pSJE6c 효능 검증을 위해서 외래 유전자인 *aga* 와 *lacZ*를 각각 pSJE6c에 도입하였다. P6C 프로모터와 비교를 위해 고유 프로모터를 지닌 유전자들도 각각 pSJE에 도입하였다. 재조합 plasmid들을 electroporation 방법으로 *Lactobacillus brevis* 2.14 균주에 도입하고 재조합균주들의 생육곡선과 효소역가 그리고 slot blot으로 전사체 농도를 측정하였다. 결과를 보면 pSJE6c에 클로닝 된 유전자들이 pSJE상의 유전자보다 효소역가들이 약 1.5배에서 2배 정도로 높았다. 전사체 농도 측정 결과도 pSJE6c 들에서 더 많은 전사체가 생성됨을 보여주었다. 이상 결과들은 효율적인 발현벡터들의 사용을 통해서 김치유산균에서 외래유전자 발현 효율을 높일 수 있음을 보여준다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 한국학술진흥재단(기초연구지원기초과학, 과제번호 F00121)의 지원으로 연구되었습니다. 이강욱, 박지영, 이지연, 이황아, 백창운, 조현덕은 2단계 BK21 사업의 지원을 받았습니다. 지원들에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Axelsson, L., A. Holck, S.-E. Birkland, T. Aukrust, and H. Blom. 1993. Cloning and nucleotide sequence of a gene from *Lactobacillus sake* Lb706 necessary for sakacin A production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2868-2875.
2. Berthier, F., M. Zagorec, M. Champomier-Verges, S. D. Ehrlich, and F. Morel-Deville. 1996. Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation. *Microbiology (Reading)* **142**: 1273-1279.
3. Church, F. C., S. P. Meyers, and V. R. Srinivasan. 1980. Isolation and characterization of genes of alpha-galactosidase from *Pichia guilliermondii*. p. 339-348. In L. A. Underkofler and M. L. Wulf (eds.), *Developments in Industrial Microbiology*, Vol. 21. Lubrecht & Cramer
4. Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.
5. Han, E. Y. and Y. H. Kye. 2005. Market status of kimchi and management strategy. *Proceeding of 2005 General Meeting of Korea Distribution Association.* **11**: 105-121.
6. Jeong, D. W., Y. C. Choi, J. M. Lee, J. H. Kim, J. H. Lee, K. H. Kim, and H. J. Lee. 2006. Isolation and characterization of promoters from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LM0230. *Food Microbiol.* **23**: 82-89.

7. Jeong, S.-J., J.-Y. Park, H. J. Lee, and J. H. Kim. 2007. Characterization of pFMBL1, a small cryptic plasmid isolated from *Leuconostoc mesenteroides* SY2. *Plasmid*. **57**: 314-323.
8. Kim, J. H., J.-Y. Park, S.-J. Jeong, J. Chun, J. H. Lee, D. K. Chung, and J. H. Kim. 2005. Characterization of the α -galactosidase gene from *Leuconostoc mesenteroides* SY1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 800-808.
9. Labrie, S., C. Bart, C. vadeboncoeur, and S. Moineau. 2005. Use of an α -galactosidase gene as a food-grade selection marker for *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* **88**: 2341-2347.
10. Lee, J. M., D. K. Chung, J. H. Park, W. K. Lee, H. C. Chang, J. H. Kim, and H. J. Lee. 1997. Cloning and nucleotide sequence of the β -galactosidase gene from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC7962. *Biotechnol. Lett.* **19**: 179-183.
11. Lee, K. W., J. Y. Park, J.-Y. Park, J. Y. Chun, and J. H. Kim. 2008. Expression of α -galactosidase gene from *Leuconostoc mesenteroides* SY1 in *Lactobacillus brevis* 2.14. *Food Sci. Biotechnol.* **17**: 1115-1118.
12. Lee, K. W., J. Y. Park, G. M. Kim, G.- H. Kwon, J.-Y. Park, M.- R. Lee, J. Chun, and J. H. Kim. 2008. Expression of α -amylase gene from *Bacillus licheniformis* in *Lactobacillus brevis* 2.14. *J. Food Sci. Nutr.* **13**: 190-195.
13. Miller, J. M. 2007. Experiments in molecular genetics. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
14. Park, R. J., J. M. Lee, H. C. Chang, D. K. Chung, J.-H. Lee, H. J. Lee, and J. H. Kim. 2000. Expression of β -Galactosidase gene of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC7962 in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MG1363. *J. Food Sci. Nutr.* **5**: 153-159.

(Received July 27, 2009/Accepted Oct. 7, 2009)