

Zymomonas mobilis 플라스미드의 특성연구 및 *E. coli-Zymomonas* 셔틀 벡터 제조

이용억 · 이병재 · 강현삼
(서울대학교 미생물학과)

Characterization of plasmids of *Zymomonas mobilis* and Construction of *E. coli-Zymomonas* shuttle Vector

Lee Young-Eok, Byeong-Jae Lee and Hyen-Sam Kang

Dept. of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University

We have characterized the plasmids of *Zymomonas*, and constructed *E. coli-Zymomonas* shuttle vector. Plasmids have been detected in four strains of *Zymomonas mobilis*. All strains tested had at least one plasmid ranging in size from about 1.7 to 46kb. Antibiotics resistances of *Z. mobilis* were tested to select the host strain. All strains were very sensitive to tetracycline and chloramphenicol. Homology tests between the plasmids in four strains showed that the plasmids of ATCC10988 is highly homologous to those of ZM1, and that there is no homology between plasmids of ZM4 and Agll. The 1.7kb plasmid of ATCC10988, named as pZM886, also has no homology with plasmids of ZM4. A hybrid plasmid, designated to pBZ41, was constructed from pZM886 and pBR322. A restriction map of pBZ41 was established. Replicon of pZM886 didn't operate in *E. coli* and pBR322 seemed not to replicate in *Zymomonas*. pBZ41 was transferred from *E. coli* to *Zymomonas* by conjugal mobilization. The transconjugants were resistant to tetracycline and maintained pBZ41 stably.

에탄올 생산균주인 *Zymomonas mobilis* 는 혐기성 그람 음성균으로서 최근 이 세균에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다(Rogers, et al., 1982; *Z. mobilis* 는 Entner-Doudoroff 경도를 이용하여 포도당 1몰당 1.9몰의 에탄올을 생산할 수 있는바(Swings and DeLey, 1977), 회분배양과 연속배양 모두에서 높은 농도의 포도당을 빠르게 에탄올로 전환시킬 수 있으며 현재 사용되고 있는 효모에 비해 포도당 흡수율과 에탄올 생산율이 높다(Lee et al., 1979; Rogers et al., 1979). 이러한 장점위에 *Zymomonas*는 무핵세포이기 때문에 유전자 조작이 쉬울 것으로 사료된다. 그러나 이런 장점이 있지만 에탄올로 발효시킬 수 있는 당의 범위는 포도당, 과당 및 설탕으로 제한되어 있

다. *Zymomonas*에 대한 유전자도입의 방법으로 conjugal transfer에 의해 R-plasmid(RP1, RP4, R68)들이 *E. coli*에서 부터 도입이 되었다는 보고가 있다(Skotnicki et al., 1980; Eveleigh et al., 1983; Tonomura et al., 1982) 그러나 *Zymomonas*의 플라스미드를 이용한 벡터 개발이 거의 없는 상태이다. 모든 *Z. mobilis* 균주들은 적어도 하나 이상의 플라스미드들을 가지고 있으며 이들의 크기는 대략 1kb에서 50kb사이인 것으로 보고되었다(Skotnicki et al., 1984; Stokes et al., 1983; Dally et al., 1982; Tonomura et al., 1982). 그러나 이들 플라스미드들의 정확한 수와 크기에 대해서는 서로 다르게 보고되었으며 아직까지 이들 플라스미드들의 기능에 대해서는 알려진 바가

었다.

본 실험에서는 *Zymomonas* 에 존재하는 플라스미드들의 특성을 분석하고 이를 벡터로 개발하는 한편, 이 벡터를 *Zymomonas* 로 도입시켰다.

재료 및 방법

균주 및 효소

Zymomonas mobilis strain ATCC 10988, ZM4, Agll, ZM 1 을 사용하였다. 형질 전환에 사용한 숙주로는 *E. coli* HB101 (F^- , hsdS 20 (r_B^- , m_B^-), recA13, ara⁻14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, λ^-) 을 사용하였다. pBR322, pRK290, RP4, pUC9 등은 HB101에 들어있는 것을 사용하였다. *E. coli* E5014는 conjugation을 위해 사용하였다. 각 DNA 제한효소들은 BRL이나 NEB, Takara 등으로 부터 구입하여 사용하였다.

배지 및 용액

Glucose 20g, Yeast extract 10g을 증류수에 녹여 990ml이 되게 하여 멸균한 후 따로 멸균한 20% KH_2PO_4 를 10ml 첨가하였다 (Rich Medium; RM). 고체배지의 경우는 agar를 1.5% 되게 첨가하였다. RM-tetracycline (RT), RM-chloramphenicol (RC), RM-streptomycin (RS) 배지는 RM배지 멸균 후 온도가 40°C 이하로 되었을 때 tetracycline, chloramphenicol, streptomycin (Sigma)을 최종농도가 각각 15 $\mu g/ml$, 35 $\mu g/ml$, 30 $\mu g/ml$ 되게 첨가하였다. 완충용액 및 기타용액은 Maniatis (1982) 등의 방법에 따라 만들었다.

Plasmid 추출

*E. coli*로 부터의 플라스미드 DNA의 CsCl-EtBr 초원심분리방법으로 하였다 (Clewell, 1972). *Zymomonas*로 부터의 플라스미드 DNA의 추출은 *Zymomonas* 균주를 RM배지 500ml에 30°C에서 $A_{600} = 1.5$ 까지 배양한 다음 원심분리하여 균체를 수확하였다. 4°C에서 균체를 STE buffer (10mM Tris Cl (pH 8.0), 0.1M NaCl, 1mM EDTA)로 세척한 다음 25mg의 lysozyme이 첨가된 50mM glucose, 25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA 용액 10ml에 분산시키고 상온에서 10분간 방치하였다. 새로이 만

든 0.2N NaOH, 1% SDS 용액 20ml을 가하여 섞은 후 얼음에서 10분간 반응시켰다. 3M Potassium acetate, 0.15% glacial acetic acid 용액을 15ml 가하고 세게 섞은 후 얼음에서 10분간 냉각시킨 다음 12,000g에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 Sorvall tube에 옮긴 다음 동량의 phenol-chloroform을 가하여 섞은 다음 12,000g에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 corex tube에 옮기고 isopropanol을 0.6 volume 가하여 상온에서 15분간 방치한 다음 12,000g에서 30분간 원심분리하여 DNA를 회수하였다.

Southern hybridization

Southern hybridization 과정은 Southern (1975) 방법을 수정하여 사용하였다. 즉 변성은 1.5M NaCl, 0.5M NaOH로, 중화과정은 1.5M NaCl, 0.5M Tris (pH 7.4)로 하였고 압착할 때 20×SSC를 사용하였다.

Conjugation 조건

Skotnicki (1980) 등의 방법을 수정하여 사용하였다. Donor와 recipient들을 각각 $A_{600} = 1.0$ 될 때까지 배양한 다음 donor와 recipient 비율이 3:1이 되게 섞었다. 0.45 μm Millipore filter로 균체를 수거하여 세포가 있는 쪽을 위로 하여 여과지를 RM 배지 위에 놓고 30°C에서 4시간 동안 배양하였다. Streptomycin (300 $\mu g/ml$)이 포함된 RM broth에 여과지를 넣고 vortexing하여 세포들을 수거하였다. 30°C에서 2시간 배양한 후 원심분리하여 cell을 수확한 후 streptomycin (300 $\mu g/ml$)이 포함된 소량의 RM broth에 재분산시켜 농축시키고 이를 tetracycline (15 $\mu g/ml$)이 포함된 RM plate에 도말한 다음 30°C에서 3~4일간 배양하였다.

결과 및 고찰

*Zymomonas mobilis*의 native plasmids 분리

*Zymomonas*로 부터 플라스미드 DNA를 추출하기 위하여 알칼리방법 (Birnboim and Doly, 1979)을 사용하였다. *Z. mobilis* ATCC 10988에는 모두 6개의 플라스미드가 존재하였으며, ZM4에는 크기가 비슷한 3개의 큰 플라스미드

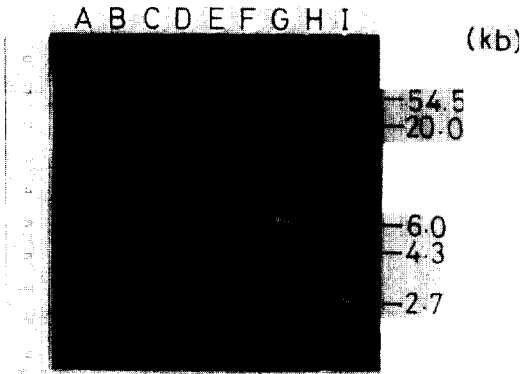


Fig. 1. Plasmids of *Zymomonas mobilis* lane (C) ATCC 10988 (D) ZM4 (E) AgII (F) ZM1 Size standards: (A) RP4 (B) pRK290 (G) pBR325 (H) pBR322 (I) pUC9

가, AgII에는 2 개의 큰 플라스미드와 1 개의 작은 플라스미드가, ZM1에는 1 개의 매우 작은 플라스미드가 존재하였다(Fig. 1). ZM 1에는 플라스미드가 존재하지 않는다는 보고가 있었으나(Skotnicki et al., 1982) 조사결과 약 1.7kb 정도의 작은 플라스미드가 존재함을 확인하였다. 여러 플라스미드들 중 *Z. mobilis* ATCC 10988의 1.7kb 플라스미드를 벡터로 개발하고자 하였으며 이 플라스미드를 pZM886이라 명명하였다.

***Z. mobilis*의 항생물질에 대한 내성**

9 가지의 항생물질에 대한 *Z. mobilis*의 최소 발육저지농도(MIC)를 측정하였다(Table 1). *Zymomonas*는 tetracycline에 가장 민감하였으며 rifampicin, chloramphenicol에도 민감도를 나타내었다. 그러나 streptomycin과 ampicillin에는 내성이 매우 강하였다. 이것은 Skotnicki 등(1984), Stokes 등(1983), 그리고 S-

wings and DeLey (1977)들의 결과와 일치하였다. *Zymomonas*의 벡터에 tetracycline이나 chloramphenicol 내성유전자를 도입한다면 플라스미드 벡터가 세포내로 도입되었는지 쉽게 확인할 수 있다.

제한효소에 의한 pZM 886의 분석

여러 제한효소로 pZM886을 절단하여 그 절단양상을 조사한 결과 EcoRI, PvuII, Xmn I은 한개의 절단부위가 존재하였으며 Sau3AI은 6, Taq I은 3, 그밖의 다른 많이 사용되는 몇몇 제한효소에 대한 절단부위는 없는 것으로 나타났다(Fig. 2, Table 2). 하나의 절단부위를 갖는 세가지 효소의 절단부위중 비교적 분석이 용이한 EcoRI 부위를 재조합 부위로 결정하였다.

Southern hybridization

모든 *Zymomonas* 균주에 플라스미드가 존재하므로 pZM886과 동질성(homology)이 없는 플라스미드를 가진 균주를 숙주로 선정하고자 Southern hybridization을 하였다. 숙주균에 pZM886과 동질성이 있는 플라스미드가 존재할 경우 compatibility 문제때문에 플라스미드의 안정도가 떨어질 것으로 예상하였다. 먼저 pZM 886을 EcoRI로 자른 뒤(α -³²P) dATP로 표지시켜 탐침을 만들고 각 *Zymomonas* 균주들의 모든 플라스미드들을 아가로즈젤에 전기영동한 뒤 nitrocellulose (N. C) paper에 압착(blotting)시킨 것과 hybridization시켰다. 그 결과 pZM886은 ATCC10988의 3.8kb 및 2.8kb 플라스미드와 동질성이 있었으며 ZM1의 1.7kb 플라스미드와도 동질성이 있었고 ZM4나 AgII의 플라스미드들과는 동질성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 3). 일반적으로 20kb 이상의 큰 플라스미드들은 N. C. paper에 압착이 잘 되지 않으므로 크

Table 1. Antibiotic resistance of *Z. mobilis* strains

Strain	Minimum inhibitory concentration (μ g/ml) tested of various antibiotics :								
	TC	RP	cm	Sp	Gm	Km	Em	Ap	Sm
ATCC10988	3	10	25	40	75	100	200	250	1000
ZM 4	3	10	25	30	60	50	200	100	1000
Ag 11	2	10	12	30	10	15	150	50	500
ZM 1	2	10	10	15	10	15	80	50	1000

Tc, tetracycline ; Rp, rifampicin ; Cm, chloramphenicol ; Sp, spectinomycin ; Gm, gentamycin ; km, kanamycin ; Em, erythromycin ; Ap, ampicillin ; Sm, streptomycin.

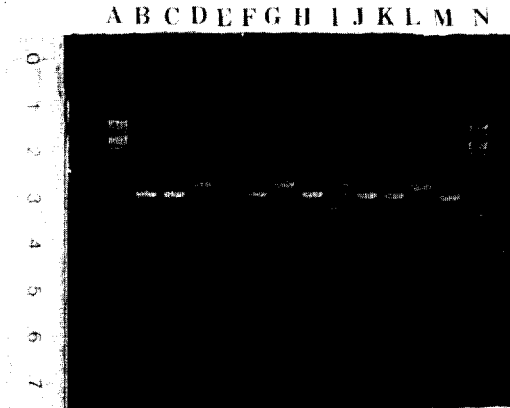


Fig. 2. Restriction enzyme analysis of pZM886 lane (A), (N) λ -Hind III + EcoRI (B) Sall (C) Pst I (D) EcoRI (E) Sau3A (F) Bal I (G) Pvu II (H) BamHI (I) Taq I (J) Hind III (K) Sma I (L) XmnI (M) uncut (control)

기가 큰 플라스미드들과의 동질성을 조사하기 위하여 각 *Zymomonas* 균주의 모든 플라스미드들을 EcoRI로 각각 절단한 뒤 같은 방법으로 압착하여 hybridization시켰다. 그결과 pZM886은 ATCC10988의 큰 플라스미드들과도 동질성이 있었으며 ZM4나 Agll의 플라스미드들과는 동질성이 없었다(Fig. 4). pZM886의 ATCC10988의 거의 모든 플라스미드들과 동질성이 있다는 것은 이 플라스미드가 ATCC10988의 큰 플라스미드로 부터 떨어져나온 것이거나 다른 플라스미드들이 pZM886의 dimer나 tetramer등일 가능성이 있는 것으로 추측된다. 후자의 경우는 Drainas (1983) 등도 전자현미경으로 측정한 플라스미드들의 크기를 바탕으로 예상한 바 있으나 확실하지 않다. ZM1은 원래 ATCC10988에서 유래된 것이므로 (Skotnicki et al., 1982) pZM886이 ZM1의 1.7kb 플라스

Table 2. Determination of restriction endonuclease sites of pZM886

Enzyme	No. of sites	Enzyme	No. of sites
Eco RI	1	Pst I	0
Pvu II	1	Hind III	0
Xmn I	1	Bal I	0
Taq I	3	Bam HI	0
Sau 3A	6	Sma I	0
Sal I	0		

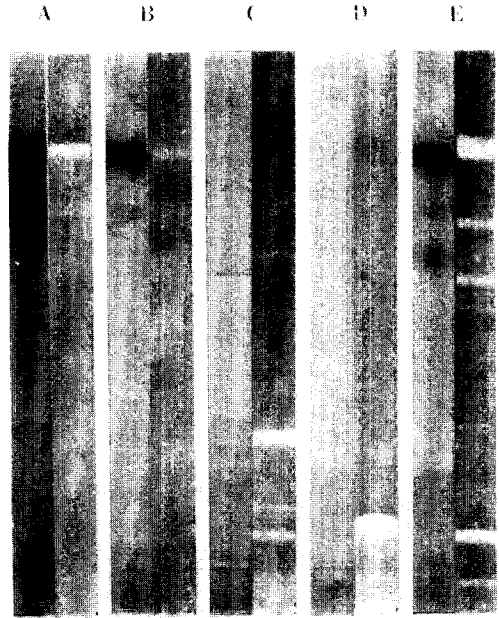


Fig. 3. Southern hybridization of ³²P-labelled pZM886 DNA to plasmids from *Z. mobilis* strains (A) ATCC 10988 (B) ZM4 (C) Agll (D) ZM1 (E) pZM886 (control)

미드와 동질성이 있다는 것은 예상된 결과였으나 동질성정도는 약했다. *Zymomonas mobilis*의 플라스미드의 종류에 대한 보고와 마찬가지로 *Zymomonas*의 플라스미드들간의 동질성에 대해서도 보고가 있었지만 (Skotnicki et al., 1984; Stokes et al., 1983) 역시 일치하지 않았다. ZM4는 Lee (1979) 등에 의해서 보고된 것과 같이 에탄올 생산력이 가장 뛰어난 균주이며 pZM886라도 동질성을 나타내지 않았으므로 ZM4를 숙주균으로 결정하였다.

pZM886과 pBR322의 재조합(pBZ41의 제조)
pBR322는 conjugation시 recipient로 mobilization되어 전달되게 하는 bom (basis of mobility) site를 가지고 있으며 (Clark and Warren, 1979; Comai et al., 1983), tetracycline marker를 가지고 있으므로 *E. coli*와의 shuttle vector를 제조하는데 유용하다. pBR322의 EcoRI site에 pZM886 전체를 클로닝하였다. pBR322의 EcoRI site에는 항생제 내성유전자가 없으므로 항생물질을 이용한 선별대신, 형질전환체들을 cracking하여 확인하였다. 예상되는 재조합 플라스미드의 크기가 6.1kb이



Fig. 4. Southern hybridization of ³²P-labelled pZM886 to EcoRI digests of *Z. mobilis* plasmids (A) ATCC 10988-EcoRI (B) ZM4-EcoRI (C) Agll-EcoRI (D) ZM1-EcoRI (E) pZM886-EcoRI (control)

므로 6kb인 pBR 325를 size standard로 하여 함께 전기영동하여 거의 같은 크기의 플라스미드를 가진 클론을 선별하였다. 선별된 재조합 플라스미드를 EcoRI으로 절단하여 pBR322와 pZM 886의 linear form이 나옴을 확인하였다 (Fig. 5). 이렇게 만들어진 재조합 플라스미드를 pBZ 41이라고 명명하였다.

재조합 플라스미드의 제한효소지도 작성

pBR 322와 pZM886에 단일절단부위로 존재하는 몇가지 제한효소를 이용하여 pBZ41의 제한효소지도를 작성하였다. 먼저 이들 제한효소들로 pBZ41을 단일 또는 이중 절단시킨 뒤 전기영동하여 폴라로이드 사진을 찍고 Southern (1979)의 계산방법에 의해 제한효소지도를 작성하였다 (Fig. 6). 이동거리 측정시의 약간의 오차는 알려진 pBR322의 제한효소 지도를 중심으로 보완하였다.

***E. coli* 내에서의 pZM886의 복제**

pZM886이 *E. coli*내에서 복제할 수 있는 지를 알아보기 위해 제한효소 XmnI을 사용하여

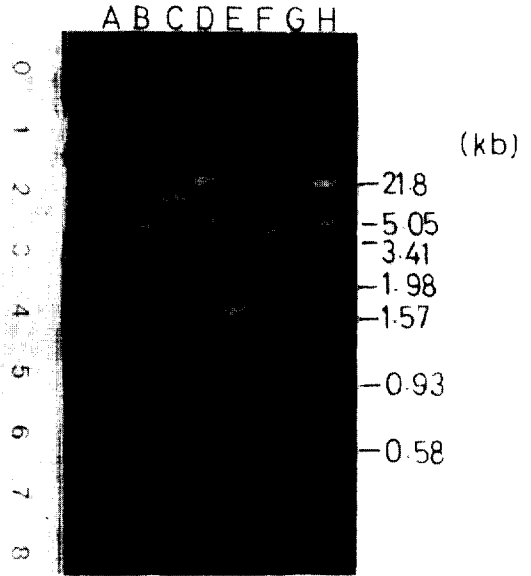


Fig. 5. Restriction endonuclease analysis of pZM886-pBR322 hybrid plasmid (pBZ41) lane (A) pZM886 (B) pBR322 (C) pBZ41 (D) λ-Hind III + EcoRI. (E) pZM886-EcoRI (F) pBR322-EcoRI (G) pBZ41-EcoRI (H) λ-Hind III + EcoRI.

pBZ41로부터 pBR322의 복제시발점을 제거하였다 (Fig. 7). pBZ41을 XmnI으로 절단하였을 때 생기는 세개의 절편 중 pBR322의 origin이 포함된 약 1.5kb크기의 절편을 제외한 나머

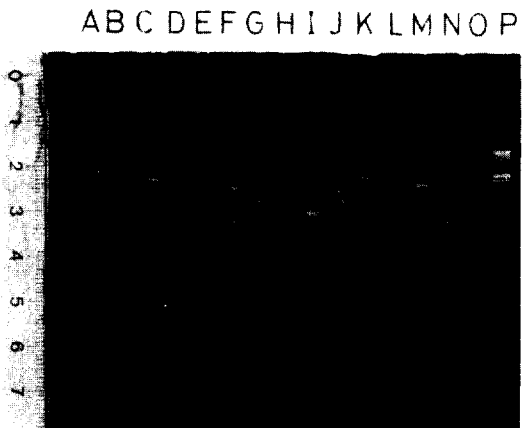


Fig. 6. Restriction enzyme analysis and physical map of pBZ41 lane (A) EcoRI (B) Ball (C) PvuII (D) PstI (E) XmnI (F) EcoRI + PvuII (H) EcoRI + PstI (I) EcoRI + XmnI (J) Ball + PstI (K) Ball + PstI (L) Ball + XmnI (M) PvuII + PstI (N) PvuII + XmnI (O) PstI + XmnI (P) λ-HindIII + EcoRI

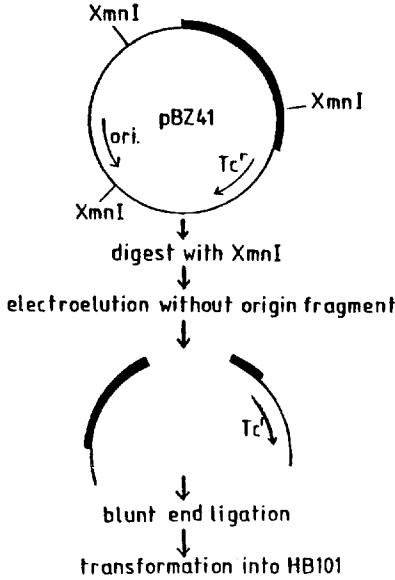


Fig. 7. Construction of pBR-origin deleted plasmid

지 두 절편을 blunt end ligation시켜 *E. coli* HB101에 형질전환시켰다. 총 1 μ g의 ligated DNA를 형질전환시켰으며 대조실험으로 pBR 322를 따로 형질전환시켜 LT배지에 도말하였다. 그 결과 pBR 322를 형질전환시켜 배지에서는 형질전환체들이 나왔으나 pBR 322의 복제시발점을 제거한 플라스미드를 형질전환시킨 배지에서는 형질전환체가 나타나지 않았다. 따라서 pZM886의 복제시발점은 *E. coli* 내에서 작용하지 않는다고 결론지었다.

Zymomonas mobilis로의 재조합 플라스미드의 도입

외부 DNA를 *Zymomonas*로 도입시키는 방법에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없으며 다만 *Zymomonas*가 *E. coli*나 *Pseudomonas*와 conjugation할 수 있다는 보고가 있었다(Walia et al., 1984; Skotnicki et al., 1980). *E. coli*에서 흔히 사용되는 형질전환방법들을 적용시켜 본 결과 효과가 없었고 원형질체를 이용한 형질전환방법도 효과가 없었다. 따라서 conjugation 방법으로 재조합 플라스미드를 *Zymomonas*로 도입시키고자 하였다. 최근에 CaCl₂를 이용한 형질전환방법이 개발되었다는 보고가 있으나 conjugation 방법은 크기가 큰 플라스미드도 옮길 수 있다는 장점이 있다(Brown

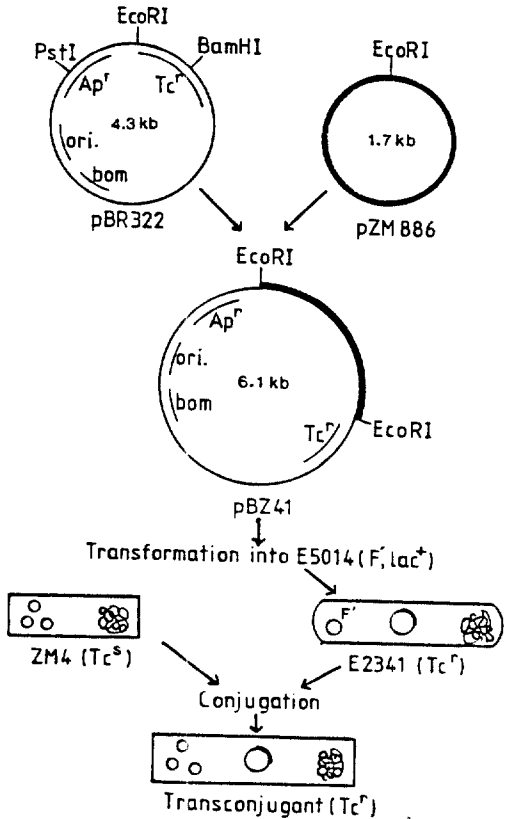


Fig. 8. Strategy for transfer of pBZ41 into *Z. mobilis*

et al., 1984).

Donor strain의 제조; pZM886 및 pBR 322는 non-self transmissible plasmid이므로 이들을 재조합하여 만든 pBZ41만으로는 conjugation이 되지 않는다. 따라서 donor strain을 만들기 위해 F' plasmid를 가지고 있는 *E. coli* E5014에 pBZ41을 형질전환시켜 F'와 pBZ41을 함께 가지고 있는 균주를 선별하고 이를 E 2341이라고 명명하였다(Fig. 8). pBZ41에는 conjugation시 recipient로 mobilization되어 들어가게 하는 bom site가 존재하므로 E 2341과 ZM 4를 conjugation시킬 때 pBZ41이 ZM 4로 mobilization될 것으로 예상하였다.

Conjugation; conjugation 방법에는 크게 filter mating과 liquid mating의 두 가지 방법이 있는데 실험 결과 filter mating 방법이 더 효율적이다. 전체적인 filter mating 방법은 Skotnicki (1980) 등의 방법을 따랐으나 transconjugant의 선별이 쉽게 수정 보완하였다. Donor와

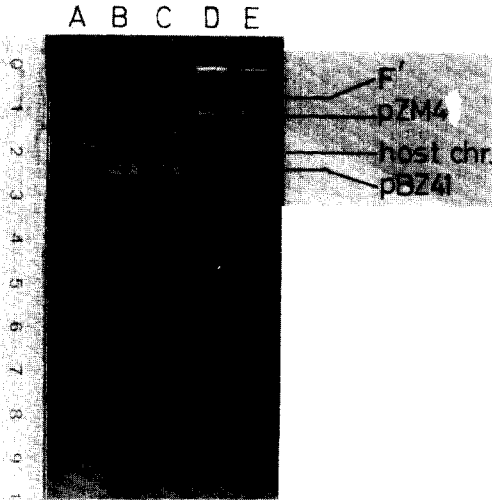


Fig. 9. Agarose gel electrophoresis of plasmids from transconjugant obtained by mating ZM4 and E2341.

(A) E5014 (F') (B) pBZ 41 (C) E2341 (donor)
(D) ZM4 (recipient) (E) a transconjugant

recipient의 비율은 3:1이 가장 효율적이었으며 filter 후 고체배지 위에서의 배양시간은 4시간 일 때 가장 빈도가 높았다. Donor인 E2341은 streptomycin에 민감하고 ZM4는 streptomycin에 내성을 가지므로 세척에 사용한 RM broth에 streptomycin을 300 μ g/ml 되게 첨가하여 2시간 정도 배양시키므로서 donor cell의 수를 감소시켰다. Transconjugant를 선별하는 배지로는 RM배지에 tetracycline을 15 μ g/ml 되게 첨가한 RT배지를 사용하였는데 tetracycline과 streptomycin을 함께 첨가했을 경우에는 transconjugant가 전혀 나타나지 않았다.

transconjugant의 확인 ; *E. coli*와 *Zymomonas*는 콜로니의 모양과 크기로 쉽게 구분이

되므로 (Skotnicki et al., 1980) RT배지에 자란 콜로니들을 육안으로 식별하여 transconjugant들을 선별하였다. Mobilization 빈도는 대략 4×10^{-7} 정도였다. Broad host range의 R-plasmid들을 *E. coli*로부터 *Zymomonas*로 conjugation하여 옮길 경우 conjugation 빈도는 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 정도로 매우 높은 것으로 보고되었는데 (Skotnicki et al., 1980) 이는 self-transmissible plasmid를 사용한 경우이고, nonself-transmissible plasmid의 bom site를 이용한 경우의 mobilization 빈도는 이보다 훨씬 낮은 것으로 보고되었다 (Comai et al., 1983). 이렇게 하여 선별된 콜로니를 mini preparation 하여 전기영동한 결과 pBZ41이 *Zymomonas mobilis* ZM4로 들어갔음을 확인하였다 (Fig. 9). 액체배지에서 여러 세대동안 배양한 후에 cracking을 해 본 결과 pBZ41이 존재하는 것으로 보아 pBZ41은 *Zymomonas*에서 매우 안정하게 유지되는 것으로 생각된다. 동일한 세균양을 동일한 방법으로 cracking하였을 때 *E. coli*에서의 pBZ41은 그 양이 매우 많은데 비해 transconjugant에서의 pBZ41은 그 양이 적었다.

그러므로 *Zymomonas*내에서는 pBR322의 복제시발점이 작용하지 않고 대신 pZM886의 복제시발점만 작용하여 복제수가 줄어들었기 때문이 아닌가 사료된다.

Tetracycline 저항성 유전자가 *Zymomonas*에서 발현이 되는 것으로 보아 *E. coli*에서 발현이 되는 다른 유전자도 발현될 것으로 추측된다. pBZ41에 외부 DNA를 클로닝할 효소부위는 PstI 부위가 가장 적합하나 다른 효소부위도 더 첨가시켜서 개량할 필요가 있다.

적 요

*Zymomonas mobilis*로부터 플라스미드를 분리하여 그 특성을 조사하고 *E. coli*와 *Zymomonas*양쪽에서 모두 복제하는 서플렉터를 제조하였다. *Zymomonas mobilis*의 4 균주로부터 native plasmid를 분리해 본 결과 모든 *Zymomonas* 균주들은 적어도 하나 이상의 플라스미드를 가지고 있었으며 그 크기는 1.7kb에서 46kb 사이였다. 숙주 균주를 선정하고자 *Zymomonas*의 각종 항생물질에 대한 약제내성을 조사한 결과 특히 tetracycline과 chloramphenicol에 아주 민감한 것으로 나타났다. *Zymomonas*의 플라스미드들간의 염기배열의 유사성을 조사한 결과 ATCC 10988과 ZM 1의 플라스미드들간에는 염기배열의 유사성이 있었고 ZM 4와 AgII은 유사성이 없었다. 클로닝벡터로 개발하고자 하는 ATCC 10988의 1.7kb 플라스미드를 pZM886이라 명명하고 이 pZM886을 pBR322와 재조합시

켜서 pBZ41이라 명명하였다. pBZ41의 제한효소지도도를 작성하였다. pBZ41을 이용하여 조사한 결과 *Zymomonas*의 replicon은 *E. coli*에서 작동되지 않았으며 pBR322는 또한 *Zymomonas*내에서 복제되지 않는 것으로 추정되었다. pBZ41을 conjugal mobilization 방법으로 *E. coli*에서 *Zymomonas*로 옮겼을때 Conjugation된 *Zymomonas*들은 모두 tetracycline에 저항성을 나타내었으며 안정하게 플라스미드를 유지시켰다.

사 사

실험을 도와준 최신건군에게도 감사를 포함
니다.

REFERENCES

1. Birnboim, A.C., and J. Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
2. Brown, G.M., M.L. Skotnicki, A.E. Goodman and P.L. Rogers, 1984. Transformation of *Zymomonas mobilis* by a hybrid plasmid. *Plasmid* 12:211-214.
3. Clark, A.J., and G.J. Warren, 1979. Conjugal transmission of plasmids. *Ann. Rev. Genet.* 13:99-125.
4. Clewell, D.B. 1972. Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.* 110:667-676.
5. Comai, L., C. Schilling-Cordaro, A. Mergia, and C.M. Houck, 1983. A new technique for genetic engineering of *Agrobacterium Ti* plasmid. *Plasmid*. 10:21-30.
6. Dally, E.L., H.W. Stokes, and D.E. Eveleigh, 1982. A genetic comparison of strains of *Zymomonas mobilis* by analysis of plasmid DNA. *Biotechnol. Lett.* 4:91-96.
7. Drainas, C. 1983. Electronmicroscopic analysis of *Zymomonas mobilis*, strain ATCC10988 plasmid DNA. *Biotechnol. Lett.* 6:37-42.
8. Eveleigh, D.E., H.W. Stokes, and E.L. Dally, 1983. Recombinant DNA approaches for enhancing the ethanol productivity of *Zymomonas mobilis*. In *organic chemicals from biomass*. Ed. Donald, L.W. p.69-91.
9. Lee, K.J., D.E. Tribe, and P.L. Rogers, 1979. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations. *Biotechnol. Lett.* 1:421-426.
10. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York. Cold Spring Harbor.
11. Rogers, P.L., K.J. Lee, M.L. Skotnicki, and D.E. Tribe, 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. In *advances in biochemical engineering* Ed. Fiechter, A. p37-84. Springer-Verlag.
12. Rogers, P.L., K.J. Lee, and D.E. Tribe, 1979. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. *Biotechnol. Lett.* 1:176-180.
13. Skotnicki, M.L., D.E. Tribe, and P.L. Rogers, 1980. R-plasmid transfer in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:7-12.
14. Skotnicki, M.L., G.M. Browne, and P.L. Rogers, 1984. Antibacterial activity of different *Zymomonas mobilis* strains. *Microbios* 39:187-192.
15. Skotnicki, M.L., K.J. Lee, D.E. Tribe, and P.L. Rogers, 1982. Genetic alteration of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. In *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals. Basic life science series*. Vol. 19 p271-290. Plenum, New York.
16. Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.* 98:503-513.
17. Stokes, H.W., E.L. Dally, M.D. Yablunsky, and D.E. Eveleigh 1983. Comparison of plasmids in strains of *Zymomonas mobilis*. *Plasmid* 9:138-146.
18. Swings, J., and J. Delay, 1977. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* 41:1-46.
19. Tonomura, K., N. Kurose, S. Konishi, and H. Kawasaki, 1982. Occurrence of plasmids in *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.* 46: 2851-2853.

(Received, March 1, 1985)