

Bacteriocin 생산 유전자의 Cloning 및 식물병원균에 대한 생물학적 억제

김교창^{1*} · 육창수² · 도대홍²

¹충북대학교 식품공학과, ²농화학과

Molecular Cloning of Bacteriocin Gene and Biological Control of Plant Pathogen

Kim, Kyo-Chang^{1*}, Chang-Su Yuk² and Dae-Hong Do³

¹Department of Food Science and Technology, Chung-Buk National University,
Cheongju 360-763, Korea

²Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chung-Buk National University,
Cheongju 360-763, Korea

A strain of *Erwinia* spp. was selected from the soil for the production of bacteriocin to the root rot plant pathogen. Bacteriocin producing gene was not located on plasmid but on chromosome. Genomic library of *Erwinia* spp. were made by using pLAFR 3 as a vector system for cloning of the gene. It was been cloned and expressed in *E. coli* DH 5⁺. Bacteriocin producing colony was composed of pLAFR 3 vector and 3.0 kb *EcoRI* fragment of *Erwinia* spp. chromosomal DNA. The inserted fragment (3.0 kb) was possessed a *EcoRI* and *BamHI* restriction sites.

Bacteriocin은 세균에 의해서 생산되는 살균성 단백질로서 같은 종 혹은 근연관계에 있는 종에 대해서 치사성을 가지는 단백질로서 (18) Bradly (3)에 의하면 bacteriocin은 trypsin 감수성이고 열안정성인 저분자인 것과 trypsin 저항성이고 열변성인 고분자의 bacteriocin으로 분류하고 있다. Bacteriocin에 관한 보고는 *Agrobacterium radiobacter* (7), *Erwinia carotovora* (24), *Erwinia herbicola* (21), *Erwinia* spp. (5), *Pseudomonase phaeolicola* (23), *Pseudomonas syringae* (8, 20), *Pseudomonase solanacearium* (19) 등에서 보고되었다. 대부분의 식물병원균의 생육을 저해하는 bacteriocin은 열에 민감하고 trypsin에 저항성이거나 또는 두 가지 특성을 모두 가지는 고분자인 것으로 밝혀져 있으며 *Corynebacterium insidiosum* (17), *Pseu-*

domonase syringae 4-A (23) 등은 저분자인 것으로 밝혀져 있다. 일반적으로 식물병원균을 방제하기 위하여 사용하는 화학농약이나 항생제계통은 그 사용범위가 상당히 넓은 반면 인체에 위해하고 저항성을 가진 병원균의 출현율을 증가시키고 있는 실정인에서 최근에는 사용속주 범위는 좁지만 이러한 결점을 보완할 수 있는 생물학적 방제에 관한 관심이 고조되고 있다.

따라서 본 실험은 이러한 연구의 일환으로 배추, 무우 등의 채소에 연부병을 유발하는 *Erwinia herbicola*의 생육을 억제하는 균을 경작지 토양으로부터 선택배지를 이용하여 분리하고 *E. herbicola*에 대해 억제능력이 우수한 몇 가지 균주를 선발하여 억제물질을 생산하는 유전자를 cloning하고 분리된 형질전환 균주 및 삽입 DNA의 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

Key words: Plant pathogen, bacteriocin, *Erwinia* spp., gene cloning.

*Corresponding author

사용균주 및 배지

사용된 *Erwinia* spp. 는 D3 선택배지를 (10) 사용하여 경작지 토양으로부터 분리하였다. 사용된 D3 선택배지는 10g sucrose, 10g arabinose, 5g casein hydrolysate, 7g LiCl, 3g glycine, 5g NaCl, 0.3g MgSO₄·7H₂O, 0.5g SDS, 0.06g acid fuchsin 과 15g agar/l 가 함유된 배지를 사용하였고 배지의 pH 는 8.2로 조정하였다. 분리된 균은 Api 20E kit (2)를 사용하여 *Erwinia* spp. 임을 확인하였다. Vector DNA 는 pLAFR3 를 사용하였고 숙주세포는 *E. coli* DH 5 α 를 사용하였다. *Erwinia* spp. 의 배양은 Kado 등이 사용한 523 배지 (6)를 *E. coli* 속 배양에는 LB 액체배지를 사용하였다.

Bacteriocin 검정

Bacteriocin 생산유무 판정은 Gratia 등 (20)의 Agar spot test 를 실시하였고 이 때 사용된 검정용 한천배지는 10g sucrose, 8g casein hydrolysate, 4g yeast extract, 2g K₂HPO₄, 0.3g MgSO₄·7H₂O, 15g agar/l 를 함유한 배지를 사용하였다. 배지에 *E. herbicola* 배양액을 도말하고 살균된 죽세봉으로 분리한 bacteriocin 생산균주를 spotting 하여 30°C에서 배양하고 *E. herbicola* 의 생육억제 정도를 관찰하였다.

Bacteriocin 생산조건 조사

분리선발된 bacteriocin 생산균주의 배양시간에 따른 bacteriocin 생산량을 관찰하기 위하여 상술한 bacteriocin 검정법과 동일한 방법으로 접종하고 84 시간까지 배양하면서 배양시간에 따른 bacteriocin 생산량을 생육저지환의 크기로 비교하였다.

Antibiotics mark selection

Bacteriocin 생산균주의 항생제에 대한 감수성을 Brain 등 (4)의 방법에 따라 실시하였다.

DNA 분리 및 전기영동

분리선발된 균주는 523 배지 (6)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 다음 plasmid DNA 는 Rapid boiling method (22)로 분리하고 chromosomal DNA 는 Spool method (1)로 분리하였다. 전기영동은 0.7% agarose gel로 Tris-borate buffer에서 80 V 전압을 사용해 실시하고 0.5 μ g/ml 의 ethidium bromide 용액으로 DNA 를 염색하여 관찰하였다.

제한효소반응

시료 DNA 의 절단은 Maniatis (14)의 방법을 참고로하여 37°C에서 2 시간 동안 반응시킨 다음 65°C에서 15분간 반응정지시킨 후 agarose gel 을 사용하여 전기영동하고 시료의 digestion 상태를 관찰하였다. 사용된 제한효소는 *EcoRI*, *BglII*, *BamHI*, *Sall*, *SmaI* 으로서 single 및 double digestion 을 실시하였고 사용된 효소 반응용 완충용액은 공급처의 지침에 따라 사용하였다.

Bacteriocin 생산유전자의 cloning

분리선발된 bacteriocin 생산균주의 chromosomal DNA 와 pLAFR 3 vector (4) DNA 를 *EcoRI* endonuclease 로 절단하고 이들 혼합액을 T₄ DNA ligase 를 사용하여 14°C에서 하룻밤 반응시켜 접합시켰다. 접합된 상태를 전기영동을 실시하여 확인한 후 *E. coli* DH 5 α 에 형질전환시키고 12.5 μ g/ml 의 tetracycline 이 함유된 LB 평판한천배지에서 cloned cell 를 선발하고 전기영동 및 agar spot test 를 통하여 접합된 DNA 의 분포양상 및 bacteriocin 생산유무를 확인하였다.

결과 및 고찰

Bacteriocin 생산균주의 분리

Bacteriocin 을 생산하는 *Erwinia* spp. 는 영동, 청주, 조치원 등의 경작지 토양에서 *Erwinia* 선택배지인 D3 배지를 사용해 분리하고 연부병을 유발하는 *E. herbicola* 에 대한 억제능을 검정하였다 (Table 1).

분리된 168 균주들 중 *E. herbicola* 의 생육을 저해하는 bacteriocin 생산균주 15 균주를 Api 20E kit 를 사용하여 동정하여 (결과 생략) *Erwinia* spp. 임을 재확인하고 본 실험의 사용균주로 하였다.

분리균의 항생제 내성 및 bacteriocin 생산량

Table 1. Antibiotics sensitivities of the selected *Erwinia* spp.

Antibiotics (μ g/ml)	Strain No.			
	6	18	24	25
Ampicillin (50)	S	S	R	R
Tetracycline (12.5)	S	S	S	S
Streptomycin (25)	S	S	S	S
Kanamycin (50)	S	S	S	S
Chloramphenicol (50)	S	S	S	S

S: Sensitive, R: Resistant

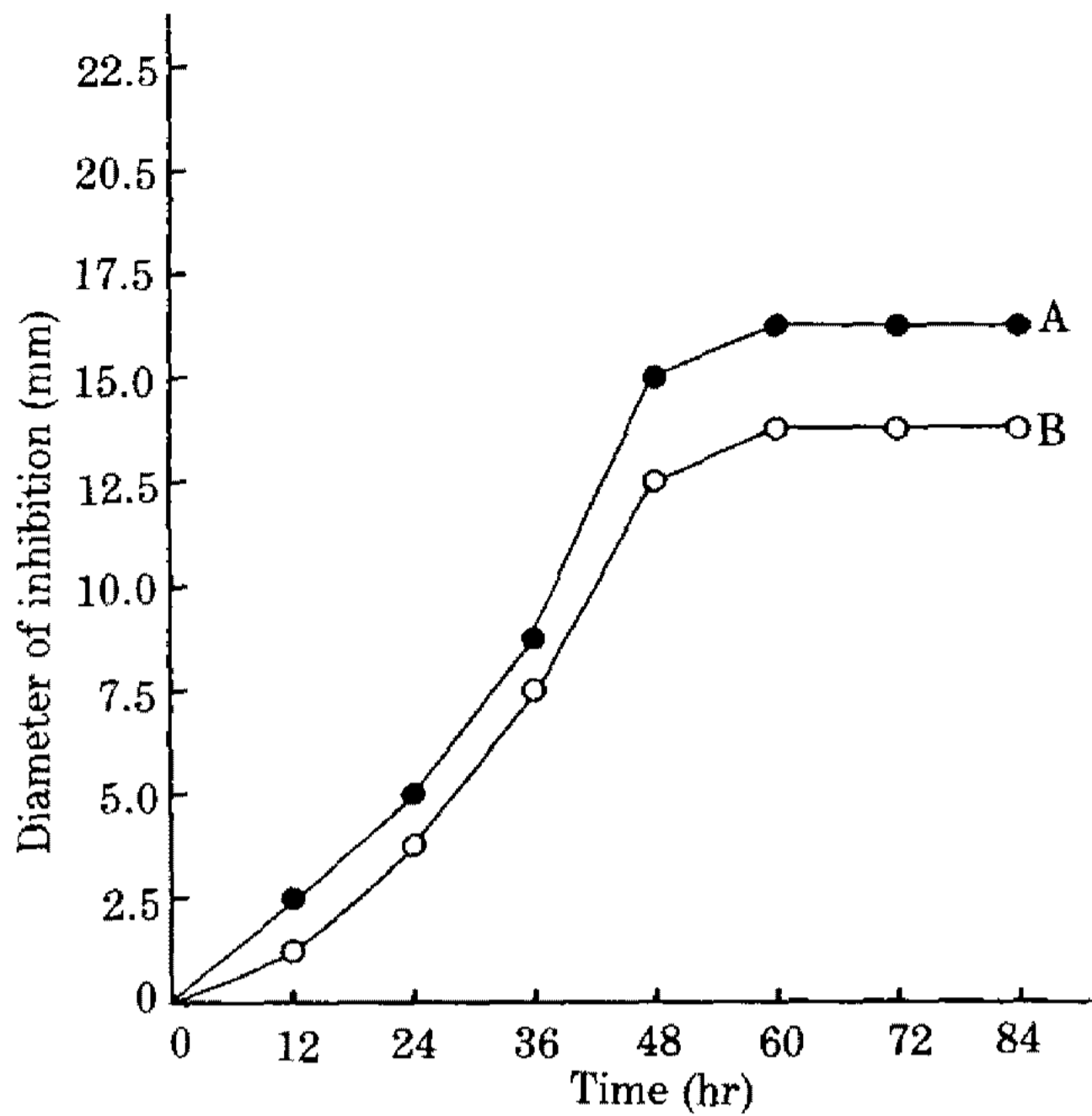


Fig. 1. Time course of the production of bacteriocin by the selected *Erwinia* spp.
A (●); *Erwinia* spp. No. 6, B (○); *Erwinia* spp. No. 25

분리된 bacteriocin 생산균주 중 bacteriocin 생산능력이 우수한 4 균주 (strain No.6, 18, 24, 25)를 선택하여 몇 가지 항생물질에 대한 감수성을 조사한 결과 Table 1 과 같이 분리균의 대부분이 항생물질에 대해 민감한 감수성을 가지고 있었지만 strain No.24, 25는 ampicilline에 내성을 갖고 있었다.

이들 균주 중 6번과 25번 균주에 대한 bacteriocin 축적량과 배양시간과의 관계를 조사한 결과 Fig.1 과 같이 배양시작 48 시간에서 생육저지환의 직경이 6번의 경우 약 15.3mm였고 25번의 경우 약 12.5mm로서 가장 높은 bacteriocin 축적량을 보였으며 배양시작 48 시간 이후에는 더이상 축적량이 증가하지 않았다.

이와 같은 결과는 Dajani(6) 등이 보고한 staphylococcin C55가 24 시간에서 48 시간 배양시 최고의 축적량을 보였다는 보고와 유사하나 *Lactobacillus helveticus* 481(15)의 경우는 사용배지의 pH가 5.5일 때는 11 시간 배양시 최고의 축적량을 보였고 pH가 6.0일 때는 6 시간 배양에서 pH가 7.0일 경우 12 시간 정도에서 각각 최고치를 보이나 그 이후 급격한 감소현상을 보이고 그 역가 또한 매우 낮은 것으로 보고한 바 있다. 또한 Tagg(9) 등은 배지조성과 형태에 따라서 bacteriocin 생성량이 상당히 달라진다고 하였다. 따라서 배양조건의 변화에 따른 bacteriocin 생성량 조사에 관한 문제는 더 세밀한 실험을 해보아야 할 것으로 사

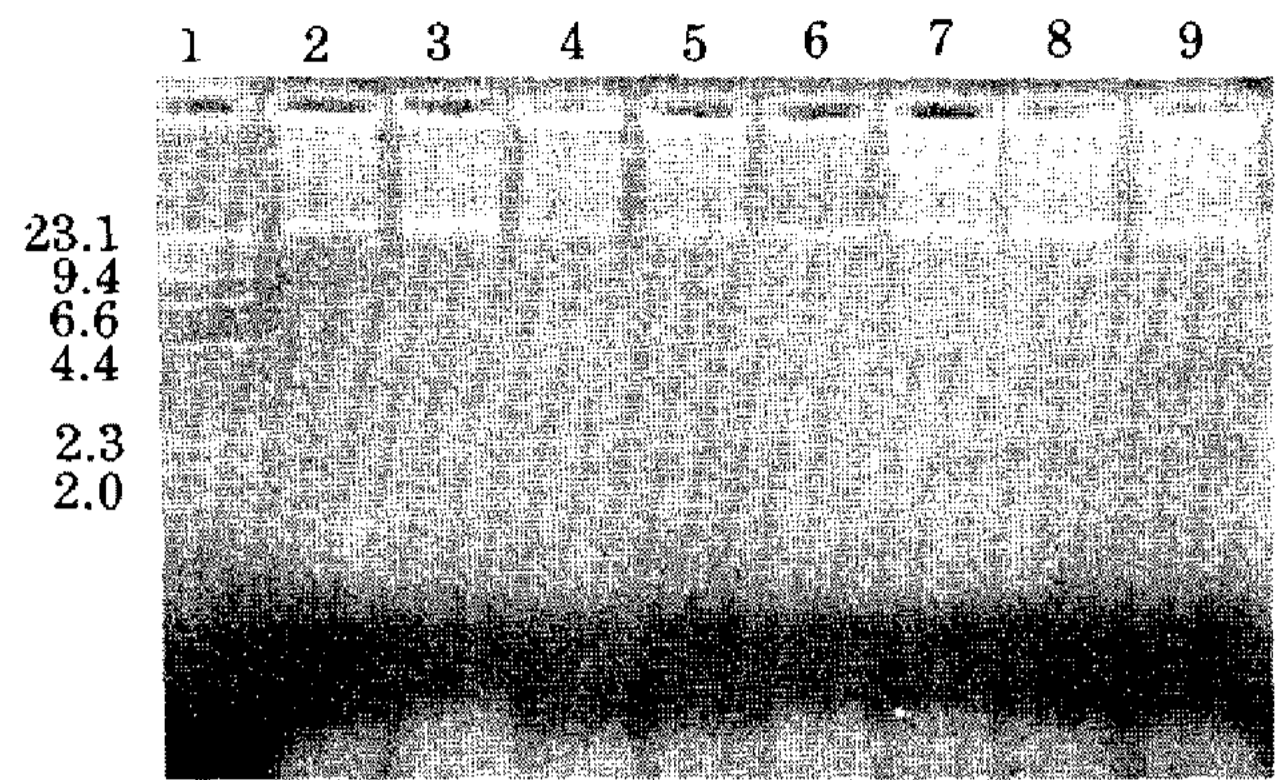


Fig. 2. Plasmid DNA of the bacteriocin producing strain of *Erwinia* spp.
lane: 1; *Hind*III, 2; *E. spp.* No. 5, 3; *E. spp.* No. 6, 4; *E. spp.* No. 13, 5; *E. spp.* No. 18, 6; *E. spp.* No. 21, 7; *E. spp.* No. 24, 8; *E. spp.* No. 25, 9; *E. spp.* No. 37

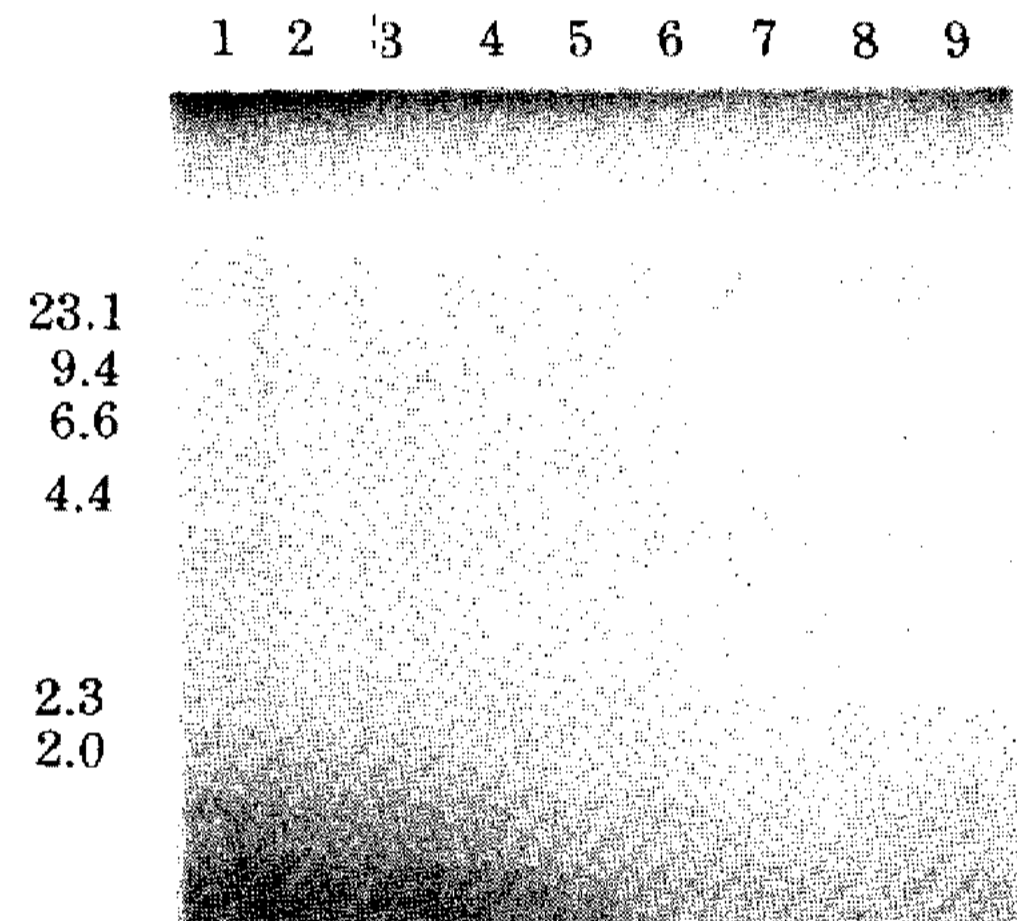


Fig. 3. Plasmid DNA of the mutants cured with acridine orange.

료된다.

Plasmid 분포양상 및 plasmid curing test

Agar spot test로 bacteriocin 생산균주로 확인되어진 균주로부터 plasmid를 분리하고 분포양상을 관찰한 결과는 Fig.2와 같다. Strain No.6, 24, 25 균주들에는 single large plasmid가 존재하고 있었으나 나머지 균주들에서는 확인할 수 없었다. Plasmid DNA 존재가 확인된 균주들은 acridine orange (75 μg/ml)가 함유된 LB 배지에 도말하고 24 시간 배양하였다. 배양된 균집락 중 2-3mm 크기의 균집락을 선택하여 DNA를 추출하고 plasmid 소실양상을 확인한 결과 Fig.3과 같이 3, 7번 및 9번 lane의 변이주에서 plasmid의 소실을 관찰할 수 있었다. 이들 3균주에 대하여 agar spot

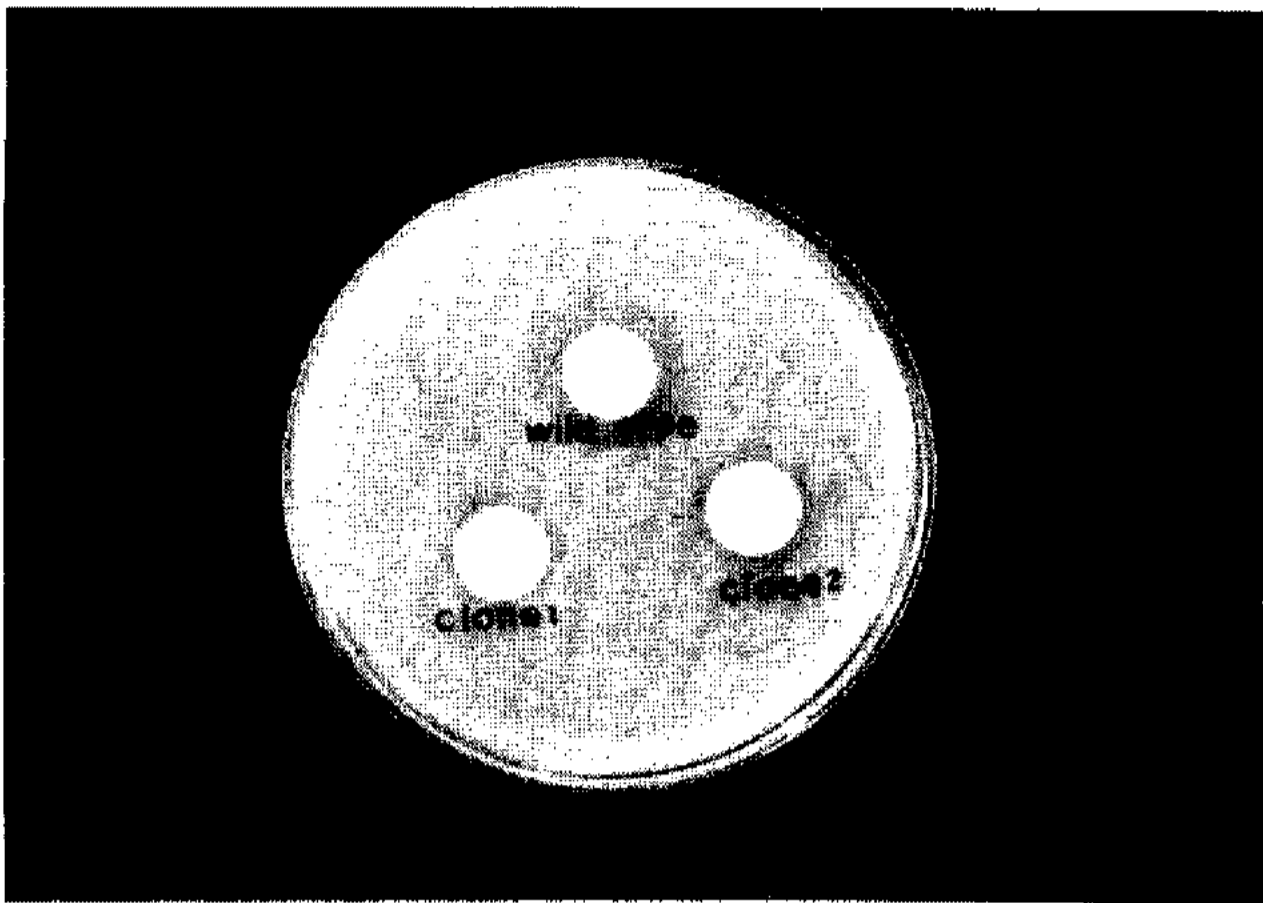


Fig. 4. Agar spot test demonstrating bacteriocin activity as seen by a zone of inhibition.
The indicator microorganism is *Erwinia herbicola*.

test 를 실시한 결과 3 균주 모두 bacteriocin 을 생산하였다. 따라서 bacteriocin 을 생산하는 유전자는 chromosome DNA 내에 존재함을 간접적으로 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과는 *Lactobacillus helveticus* (15)나 *Diplococcus pneumonia* (16)가 생산하는 bacteriocin 유전자가 chromosome 상에 있다는 보고와는 일치하였으나 사과, 포도 및 복숭아 등에 종양을 유발하는 *Agrobacterium tumefaciens*의 성장을 저해시키는 *A. radiobacter*의 agrocin 생성유전자와 *Pediococcus pentosaceus*의 bacteriocin 생성유전자는 plasmid 상에 있다는 보고와는 일치하지 않았다.

Bacteriocin 생산유전자 cloning

Bacteriocin 생산능이 우수한 6번과 25번 균주에서 chromosomal DNA 를 분리하고 *EcoRI* 제한효소로 절

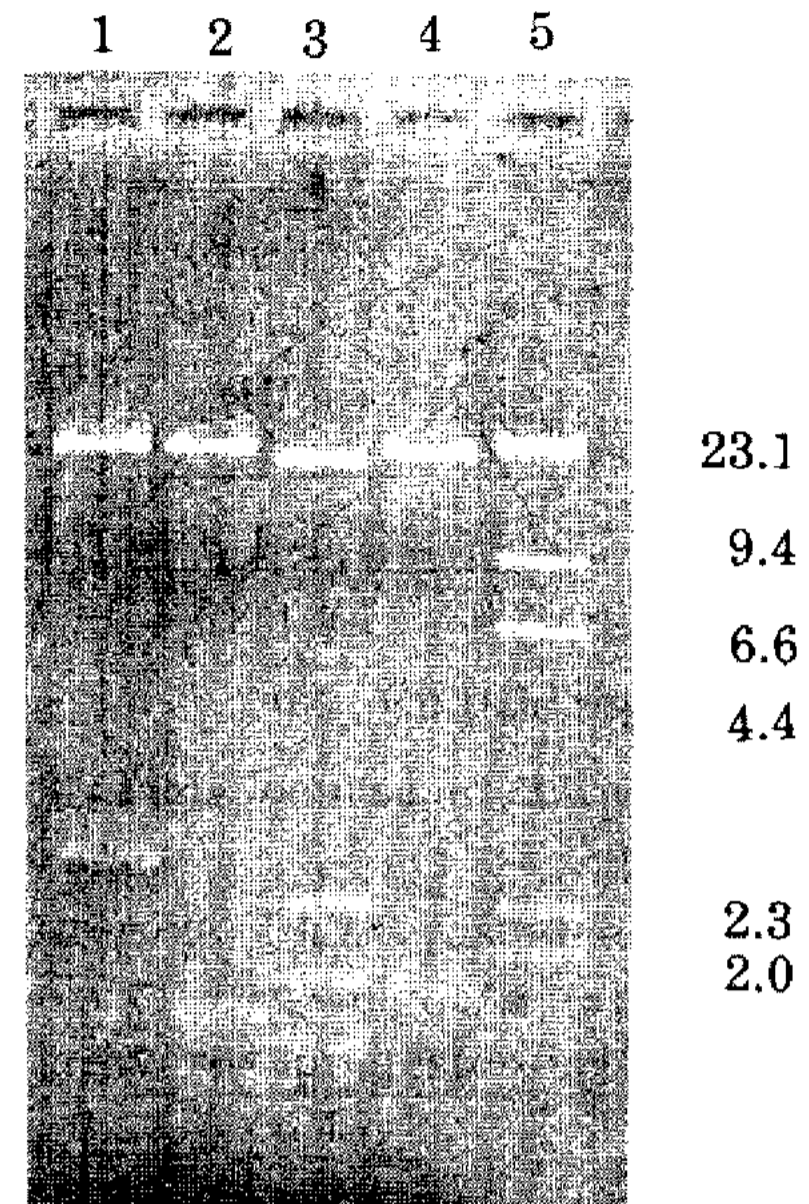


Fig. 5. Restriction fragments of the CH 49 clone DNA. lane: 1; *EcoRI*, 2; *EcoRI* & *BamHI*, 3; *EcoRI* & *BglII*, 4; *BglII*, 5; *HindIII*

단한 다음 pLAFR DH 3 vector의 *EcoRI* site 에 접합시켰다. 이 때 절단된 vector DNA의 poly-vector 형성을 막기 위하여 CIAP 를 처리한 후 사용하였으며 ligation test 를 통하여 접합을 확인하고 숙주균주인 *E. coli* DH 5 α 의 competent cell 에 형질전환시키고 12.5 μ g/ml의 tetracycline 이 함유된 LB 한천평판배지에 도말하여 배양하였다. 선발된 clone 들의 bacteriocin 생산유무를 agar spot test 를 통하여 확인해 본 결과 Fig.4 에서처럼 2개의 clone 을 얻을 수 있었다.

형질전환된 두 clone 중 bacteriocin 생산이 우수한 CH 49 clone 의 plasmid DNA 를 추출한 후 *EcoRI*, *BamHI*, *Sall*, *BglII* 제한효소로 절단하고 agarose 로 전기영동한 결과는 Fig.5 와 같다.

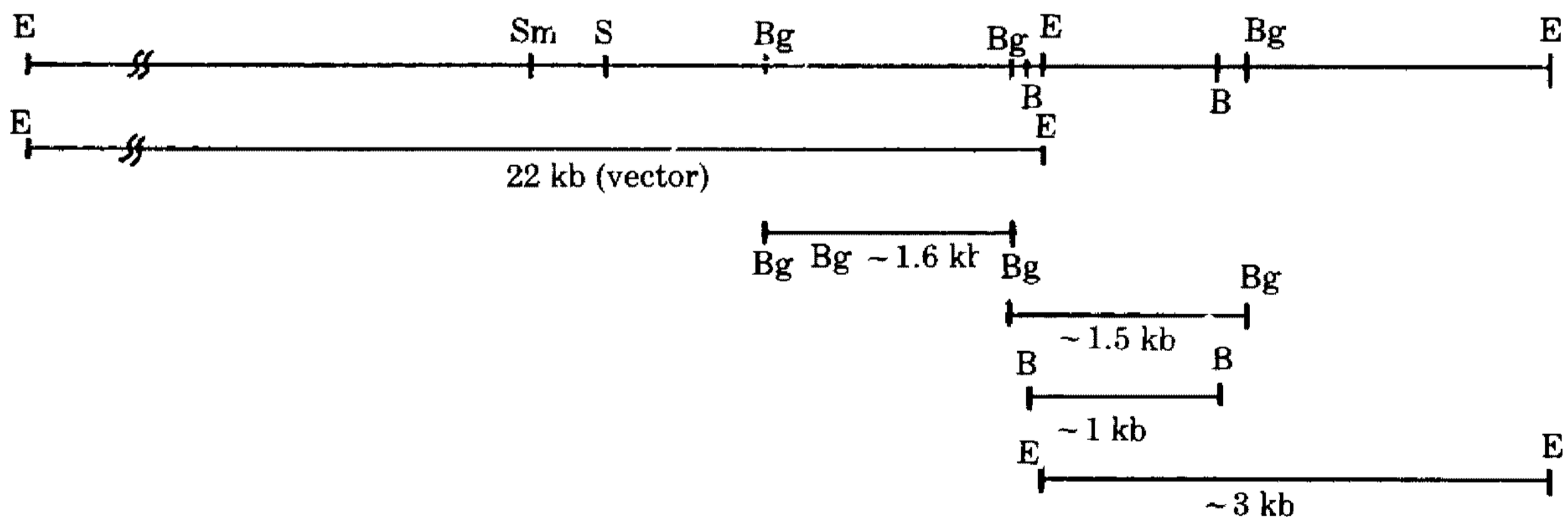


Fig. 6. Restriction map of the CH 49 clone DNA.
E; *EcoRI*, Bg; *BglII*, B; *BamHI*, S; *Sall*, Sm; *SmaI*

Fig.5의 lane 1에서 CH 49 plasmid를 *EcoRI*으로 절단한 결과 약 3.0kb의 fragment를 확인할 수 있었으며 이 삽입된 3.0kb의 fragment의 endonuclease site를 확인하기 위하여 single digestion과 double digestion를 실시한 결과 삽입된 fragment 내에 *BamHI*과 *BglIII*의 site가 한 개씩 있었다(Fig.5). 이들 결과를 종합하여 CH 49 clone의 제한효소 지도작성 결과를 Fig.6에 나타내었다.

Marco J. Van Belkum(13) 등은 *Lactobacillus lactis* 및 *cremoris* 9 B-4 균주의 bacteriocin 생산유전자가 plasmid 상에 있음을 확인하고 그 유전자를 cloning하여 1.8kb 단편과 1.5kb 단편이 삽입되어 bacteriocin을 생성하는 형질전환체를 얻었으나 1.8kb 단편이 삽입된 형질전환체는 그 역가가 매우 낮으며 이들 두 clone들의 특성도 다른 것으로 보고한 바 있다. 본 실험에서 얻어진 두 개의 형질전환체에 대해서도 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각되며 이들을 probe로 이용한 bacteriocin 생산균주의 선발 및 연부병의 방제 등에도 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

요 약

본 실험에서는 채소 등에서 연부병을 유발시키는 원인균의 일종인 *Erwinia herbicola*의 생육을 저해시키는 bacteriocin 생산균주를 경작지로부터 분리하여 몇 가지 특성을 조사하였다. 분리균주가 생산하는 bacteriocin은 배양 48시간에서 가장 많은 축적량을 보였고 bacteriocin 생산유전자는 chromosome 상에 있음을 확인하였다. 또한 *Erwinia*속의 chromosomal DNA를 분리하여 *EcoRI*으로 절단하고 pLAFR3 vector의 *EcoRI* site에 cloning하여 bacteriocin을 생성하는 형질전환체, 두 개체를 얻었다. 이들 중 bacteriocin 생산능이 우수한 CH 49 clone의 제한효소 지도를 작성하였다. Vector 내에 삽입된 3.0kb insert 내에 *BamHI*과 *BglIII* site가 각각 한 개씩 있음을 밝혔다.

사 사

본 연구는 1988년도 문교부 학술연구조성비(유전공

학 연구)로 이루어졌음.

참고문헌

1. Anthony, G.D. and L.C. Savio: *Focus*, **7**, 1 (1985).
2. Api 20E Kit manual.
3. Bradly, D.E.: *Bacteriol. Rev.*, **31**, 230 (1967).
4. Brian, S., K. Doug Noel, and N. Carolyn: *J. Bacteriol.*, **169**, 5789 (1987).
5. Chatterce, A.K.: *J. of Bacteriol.*, **122**, 576 (1972).
6. Dajani, A.S. and L.W. Wannamaker: *J. of Bacteriol.*, **97**, 985 (1969).
7. Gartia, A.: *J. of Bacteriol.*, **140**, 1053 (1946).
8. Haag, W.L. and A.K. Vidaver: *Antimicrod. Agents Chemother.*, **6**, 76 (1974).
9. John R., T. Adnan, S. Dajani and L.W. Wannamaker: *Bacteriological Rev.*, **40**, 772 (1976).
10. Kado, C.I. and M.G. Heskett: *Phytopathol.*, **60**, 969 (1970).
11. Kerr, A.: *Physiol. Plant Pathol.*, **4**, 37 (1974).
12. Deaschel, M.A. and T.R. Klaenhammer: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1538 (1985).
13. Van Belkum, M.J., B.J. Hayema, A. Geis, J. Kok and G. Venema: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1187 (1989).
14. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning*; Cold Spring Harber, (1984).
15. Joerger, M.C. and T.R. Klaenhammer: *J. of Bacteriol.*, **167**, 439 (1986).
16. Mindich, L.: *J. Bacteriol.*, **92**, 1090 (1966).
17. Nelson, G. and G. Semeniuk: *Phytopathology*, **54**, 330 (1964).
18. Nomura, M.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **21**, 257 (1967).
19. Peilin, X. and S. Luis: *J. of Bacteriol.*, **170**, 617 (1988).
20. Peter, B., R.C. Lindgren and N.J. Peet: *J. of Bacteriol.*, **168**, 512 (1986).
21. Riggle, J.H. and K.J. Klos: *Can. J. of Bot.*, **50**, 1077 (1972).
22. Thomas, M. and K.M. Williams: *Biotechnology*, **4**, 310 (1986).
23. Vidaver, A.K., M.L. Mathys, M.E. Thomas and M.L. Schuster: *J. Microbiol.*, **18**, 705 (1972).
24. Wills, J.W., J.K. Engwall and A.K. Chatterce: *Molecular Plant Pathol.*, **77**, 1199 (1987).

(Received January 5, 1990)