

Lactococcus lactis subsp. *lactis* ATCC 7962의 nisin 저항성 유전자를 포함하는 plasmid pCS100의 특성규명

송종호 · 이형주¹ · 김정환² · 정대균*

경희대학교 자연과학대학 유전공학과 및 유전공학연구소,
¹서울대학교 농업생명과학대 식품공학과, ²경상대학교 농과대학 식품공학과

Characteristics of the Plasmid pCS100 Containing Nisin Resistant Gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC7962. Song, Jong Hyo, Hyong Joo Lee¹, Jeong Hwan Kim², and Dae Kyun Chung*. Institute and Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon 449-701, ¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, ²Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 669-701, Korea - Nisin-producing and nisin resistant *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC7962 harbored six plasmids. To find a plasmid containing a nisin resistant gene, these plasmids were transformed into *L. lactis* LM 0230 of plasmid-free and nisin sensitive strain. After screening on nisin selection media containing nisin (150 µg/ml), several nisin resistant transformants were obtained and the level of nisin resistance was very similar to that of wild type *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC7962. A 26.5 kb plasmid, named as pCS100, which confers resistance to nisin, was identified in transformants. The pCS100 was digested with *EcoRI* and Southern blot hybridization was done with *nisI* probe to localize the nisin resistant gene. A 4 kb *EcoRI* fragment showed a strong positive signal, and it was cloned into pBluescript for the potential selection marker.

Key words: *Lactococcus lactis*, nisin immunity, nisin resistant gene

유산균은 수천년 동안 발효유제품이나 소채류 제조에 이용되어 온 산업적으로 중요한 균들이다. 최근 유산균의 장내균총의 안정화, 유해세균정착 예방, 장질환등의 치료등의 효과가 입증됨에 따라 사람의 건강을 증진시키기 위하여 식품과 식품첨가물의 건강 기능성 소재로 유산균의 사용이 세계적인 주목을 받고있으며, 상품화 되고있다. 특히, 금세기 초의 Elie Metchnikoff에 의한 발효유의 건강증진에 대한 과학적인 연구이래, 유산균의 항암 작용, 콜레스테롤 조절작용, 면역조절작용, 국소및 전신 면역기능의 항진 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, *Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium bifidum* 등은 신생아나 면역기능이 감소되는 소아의 면역기능 증진을 위하여 첨가제로 이용할 수 있음이 많은 연구에서 밝혀지고 있다[11, 15-17].

최근에는 생명공학기법을 이용하여 새로운 기능성을 가지는 유산균을 개발하려는 연구가 전 세계적으로 활발하게 시작되고 있다. 유산균은 GRAS균(Generally Recognized As Safe)으로 안전성과 함께 단백질을 세포밖으로 분비하는 분비기작을 가지고 있으며, *Bacillus*와는 달리 세포의 단백질 가수분해 효소들의 역가가 낮아 외

래 단백질 생산균으로 유리하다[1]. 따라서, 유산균을 이용하여 효소, 항균제, 백신 등을 장내의 상피세포로 전달하고자 하는 연구가 심도있게 진행되고 있으며, 향후 이와 같이 개발될 유산균의 경제적, 사회적, 의학적가치 등은 매우 대단하다[19].

유산균의 산업적 응용가치를 높이기 위해서는 유전공학기법을 이용한 균주개량이 효과적이며[5], 전 세계적으로 유산균에서의 외래 단백질 대량발현을 위하여 유산균의 high-copy number plasmid와 강한 constitutive promoter, regulated promoter 등이 연구되고 있다[4, 18].

그러나, 유산균 연구에 사용되고 있는 기존의 cloning vector는 대장균 등의 비식품미생물에서 유래된 것이 대부분이고 selection marker로서 식품에 사용할 수 없는 항생제의 내성을 주로 이용하기 때문에 이러한 vector로 형질 전환된 유산균의 식품산업에 적용에는 여러가지 어려움이 있다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 식품에 사용가능한 식품용 cloning vector의 개발이 전 세계적으로 진행되고 있다. 즉, 식품미생물로서 안전성이 입증된 유산균의 plasmid를 기본 vector frame으로 이용하고 식품에 사용 가능한 유산균 유래 selection marker를 이용하는 등 vector의 모든 구성성분을 유산균에서 찾아 새로운 cloning vector를 개발하는 것이다.

이를 위하여 현재 식품보존제로 사용되고 있는 유산균

*Corresponding author
Tel. 82-331-201-2465, Fax. 82-331-202-3461
E-mail: dkchung@nms.kyunghee.ac.kr

생산 천연 항생물질인 nisin에 대한 저항성 유전자를 유산균에서 찾아 이를 식품용 cloning vector의 selection marker로 이용할 수 있다.

nisin은 특정 유산균이 생산하는 분자량 3,500 Da의 "lantibiotics"에 속하는 bacteriocin이다[13]. 세계적으로 많은 연구팀들이 nisin 생산과 nisin 저항성에 관해 연구하고 있으며, 유산균의 종류에 따라 nisin 생산과 저항 능력 뿐 아니라, 이에 관련하는 유전자가 chromosome 상, 또는 plasmid상에 각기 다르게 있다는 결과들이 발표되고 있다[3, 7, 9].

nisin은 독성이 없고 장내에서 분비되는 protease와 장내 미생물에 의해 쉽게 분해되며[12], 식품 부패균과 병원균인 *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus* 등 Gram (+)균에 강력한 증식저해효과를 나타내, process cheese, sausage, ham 등 여러 식품등에 보존제로 사용하고 있다[2, 8].

본 연구에서는 유산균의 nisin에 대한 저항성 유전자를 식품용 cloning vector의 selection marker로 이용할 수 있도록 nisin 저항능을 가지고 있는 *L. lactis* ATCC7962의 nisin 저항능력을 조사하였고, 이 균주에서 nisin 저항성 유전자를 가지고 있는 plasmid를 분리하여 nisin저항능을 조사하였다.

L. lactis subsp. *lactis* ATCC7962의 nisin에 대한 저항능력을 측정하기 위하여 M17G media에 nisin(150 µg/ml)을 첨가 한 후 *L. lactis* 7962와 nisin sensitive, plasmid free 균주인 *L. lactis* LM0230을 각각 culture 한 결과 *L. lactis* 7962는 nisin에 대한 저항능력을 보여 잘 자랐으나, *L. lactis* LM0230은 전혀 자라지 못하였다. nisin에 대한 저항능력을 주는 유전자가 plasmid상에 있는지 확인하기 위하여 *L. lactis* 7962의 plasmid DNA를 분리한후 0.7% agarose gel에 전기영동한 결과 68, 45, 28, 26.5, 22, 20 kb로 예상되는 6개의 plasmid를 확인하였다.

L. lactis subsp. *lactis* ATCC7962에서 분리해 낸 6개의 전체 plasmid를 nisin sensitive, plasmid free 균주인 *L. lactis* LM0230에 protoplast 방법[10]을 이용하여 transformation시킨후, 150 µg/ml nisin을 포함하는 M17G agar 배지에 도달한 후 2일 후에 transformants를 얻었다. transformant를 nisin(150 µg/ml)이 포함된 M17G broth에서 배양한 후 O'sullivan과 Klaenhammer의 방법[14]에 의해 plasmid DNA를 분리하여 0.8% agarose gel에서 전기영동한 결과, 26.5 kb plasmid를 확인하였고 이를 pCS100이라 명명하였다. 분리한 pCS100이 nisin에 대한 저항성 유전자를 가지고 있는 nisin resistant plasmid인지 재차 확인하기 위하여 pCS100을 *L. lactis* LM0230에 다시 transformation시켜 pCS100을 가지고 있는 nisin resistant transformant를 얻었다.

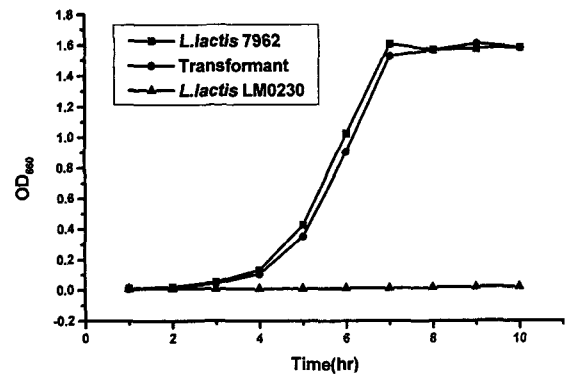


Fig. 1. Growth curve of *L. lactis* subsp. *lactis* 7962, *L. lactis* LM0230 and transformant carrying pCS100 in the presence of nisin (150 µg/ml).

또한, nisin resistant transformant의 nisin에 대한 저항도를 알아보기 위하여 *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962와 nisin resistant transformant, nisin sensitive *L. lactis* LM0230을 overnight 배양후 nisin(150 µg/ml)이 들어 있는 M17G media에 1:100으로 접종하고 1시간 간격으로 OD₆₆₀에서 측정된 결과 *L. lactis* 7962와 transformant는 매우 유사한 성장 곡선을 그리며 매우 잘 자라는 반면에, nisin sensitive *L. lactis* LM0230은 전혀 자라지 못하였다. 이로써 pCS100에 nisin 저항성 유전자가 존재하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

L. lactis subsp. *lactis* ATCC7962와 nisin resistant transformant의 nisin 저항능력을 nisin 농도 150 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml 각각을 첨가한 배지에서 성장곡선을 측정된 결과 매우 비슷한 성장을 보였다(Fig. 2).

이와 같이 26.5 kb nisin resistant plasmid인 pCS100을 가지고 있는 transformant와 wild type *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC7962의 nisin resistance를 비교해 보았을 때, 서로 비슷한 nisin 저항능력을 가진다는 것을 확인함으로써, pCS100에 대단히 강력한 nisin 저항성 유전자가 존재하고 있다고 예상된다. 지금까지 연구 보고된 nisin 저항성 유전자는 nisin에 대한 저항능력이 높지 않아 이를 이용한 vector들은 상대적으로 nisin에 대한 저항성이 낮았고[6], 따라서 nisin을 이용하여 transformant를 selection하기가 어려웠다. 그러므로 nisin resistance가 대단히 높은 유전자를 가지고 있는 pCS100은 향후 그 이용가치성이 매우 높다고 할 수 있다.

pCS100에서 nisin 저항성 유전자를 찾아내기 위하여 pCS100을 *EcoRI* 제한효소로 처리하여 전기영동한 후 기존에 발표된 nisin에 대한 저항성을 주는 유전자 *nisI* gene을 probe로 사용하여[6] Southern blot analysis를 수행하였다. 그 결과 pCS100의 *EcoRI* fragment 중 약 4 kb의 fragment에서 강한 signal을 확인하였다(Fig. 3). 따라서 이 4 kb *EcoRI* fragment가 nisin 저항성 유전자

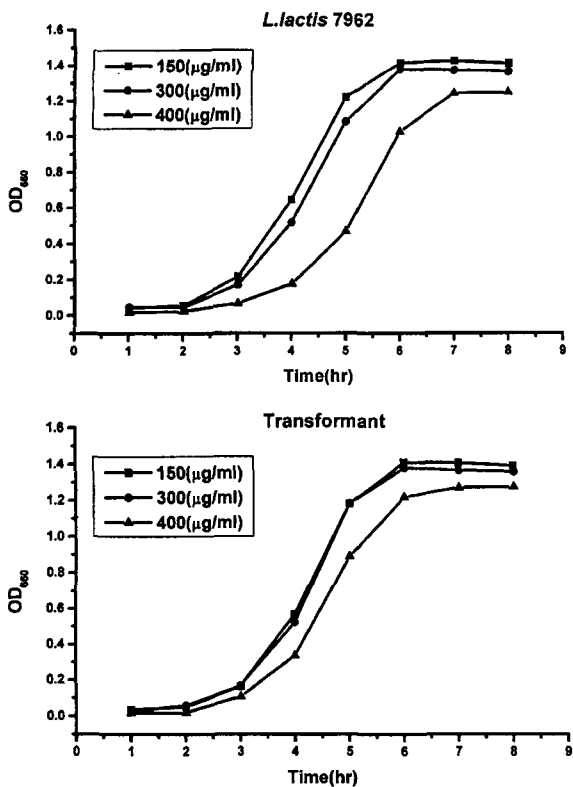


Fig. 2. Growth curve of *L. lactis* subsp. *lactis* 7962 and transformant carrying pCS100 depending on various nisin concentration.

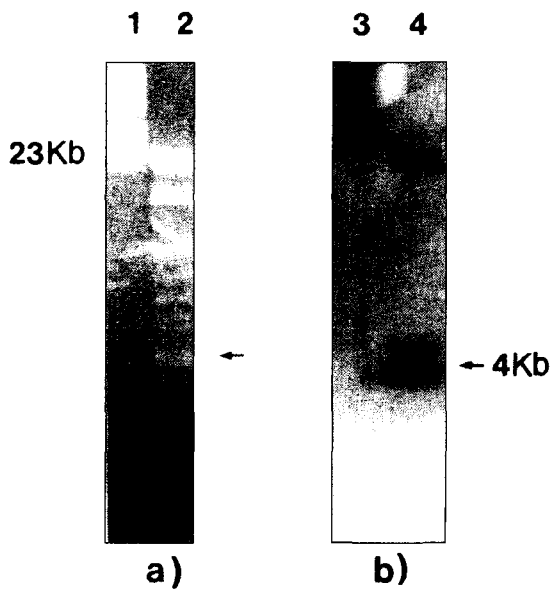


Fig. 3. Southern blot analysis of pCS100 with biotin-labelled *nisI*. a) agarose gel electrophoresis of *EcoRI* digested pCS100, b) Southern blot analysis
Lane 1, 3: intact pCS100
Lane 2, 4: *EcoRI* digested pCS100

를 포함할 것으로 추정되었다. 향후 이 유전자에 대한 자세한 연구를 수행하기 위하여 pBluescript KSII의 *EcoRI*

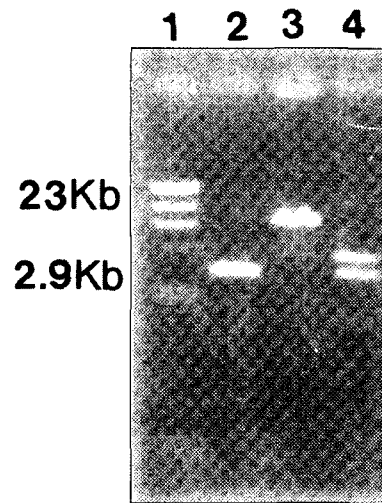


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of pCS201 which is a pBluescript KSII containing 4 kb *EcoRI* fragment of pCS100.
Lane 1: DNA marker digested with *HindIII*
Lane 2: pBluescript KSII digested with *EcoRI*
Lane 3: pCS201 digested with *EcoRI*
Lane 4: pCS201 digested with *EcoRI* and *BamHI*

site에 pCS100의 4 kb *EcoRI* fragment를 ligation시킨 후 *E. coli* DH-5 α 에 transformation하였고 X-gal, IPTG 그리고 Ampicillin(50 μ g/ml)이 포함된 LB plate에서 transformant를 얻어 plasmid를 분리한 결과 성공적으로 pCS100의 4 kb *EcoRI* fragment가 subcloning되었음을 확인하였고 이를 pCS201로 명명하였다(Fig. 4).

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 특정연구과제(과제번호: 94-1400-01-01-3) 및 서울대학교 농업생명소재 연구센터 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Bojovic, B., G. Djordjevic, and L. Topisirovic. 1991. Improved vector for promoter screening in lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 385-388.
2. Broughton, J. D. 1990. Nisin and its use as a food preservative. *Food Technology* **44**: 100-112.
3. Buchman, G. W., S. Banerjee, and J. N. Hansen. 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263**: 16260-16266.
4. de Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers, and W. M. de Vos. 1996. Controlled gene expression systems for *L. lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3662-3667.
5. de Vos, W. M. 1987. Gene cloning and expression in

- lactic streptococci. *FEMS Micro. Reviews* **46**: 281–295.
6. Engelke, G., Z. Gutowski-Eckel, P. Kiesau, K. Siegers, M. Hammelmann, and K. D. Entian. 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F 3. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 814–825.
 7. Fuchs, P. G., J. Zajdel, and W. T. Dobrzanski. 1975. Possible plasmid nature of the determinant for production of the antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* **88**: 189–192.
 8. Hurst, A. 1981 Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* **27**: 85–123.
 9. Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie* **70**: 337–349.
 10. Kok, J., J. M. B. M. van der Vossen, and G. Venema. 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic *Streptococci* which also replicates in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 726–731.
 11. Lee, Y. K. and S. Salminen. 1995. The coming of probiotics. *Trends Food Sci. Tech.* **6**: 241–245.
 12. Liu, W. and J. N. Hansen. 1984. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 2551–2558.
 13. Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Anton. Leewenhoek* **70**: 113–128.
 14. O'sullivan, D. J. and T. R. Klaenhammer. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Latobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2730–2733.
 15. Salminen, S., E. Isolauri, and E. Salminen. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful stains and future challenges. *Anton. Leewenhoek* **70**: 347–358.
 16. Salminen, S., E. Isolauri, and T. Onnela. 1995. Gut microflora in health and disease. *Chemotherapy* **41**: 5–15.
 17. Scheffrin, E., F. Rochat, H. Link-Amster, J. Aeschlimann, and A. Donnet-Hugues. 1995. Immunomodulation of food cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **78**: 491–497.
 18. van de Guchte, M., J. Kodde, J. M. B. M. van der Vossen, J. Kok, and G. Venema. 1990. Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: Synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2606–2611.
 19. Wells, J. M., P. W. Wilson, P. M. Norton, M. Gasson, and R. W. F. LePage. 1993. A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3954–3959.

(Received August 17, 1998)