

# 젖산균의 Plasmid DNA 분리방법 및 Electroporation에 의한 젖산균의 형질전환에 관한 연구

김 선 기

서울대 유가공학 및 낙농미생물학연구소

## I. 서 론

미생물의 plasmid DNA 존재는 1960년대 초에 buoyant-density 원심분리에 의해 알려졌다<sup>10)</sup>. 젖산균 plasmid의 몇몇 유전형질들이 자연적인 형질전환에 관여하며, 젖당 대사, 단백질 분해효소, bacteriocin 생성, 항생물질 내성, 당 전달과 phage 내성, 아미노산 대사 등에 관여하는 유전형질이 젖산균 plasmid에서 확인되고 있다<sup>19)</sup>.

젖산균의 plasmid DNA는 세포분열 과정에서 자연적으로 손실되기 쉬우며, plasmid의 형질들은 chromosome 유전자보다 불안정하다. 즉, 젖산균의 중요한 기능들이 자연적으로 없어지는 불안정성이 젖산균 스타터의 이용상 중요한 문제로 인식되고 있다<sup>18)</sup>. 젖당 발효능력을 상실한 젖산구균 변이주로부터 유전형질이 plasmid와 관련이 보고된 이래<sup>20)</sup>, 젖산구균의 plasmid와 기능<sup>6)</sup>, 젖산간균에서 plasmid의 존재<sup>4)</sup>, 젖산구균의 plasmid 분리방법<sup>1)</sup>, 젖산간균의 plasmid 분리방법<sup>14)</sup> 등의 연구가 이루어져 왔다.

형질전환은 재조합 DNA기술을 이용해 새로운 균주를 만드는데 필수적인 방법이다. 산업적으로 중요한 젖산균의 유전형질분석 및 재조합 DNA기술의 전제조건은 cloning vector plasmid의 개발이며, 젖산균에 재조합 DNA기술을 이용하기 위해서는 host-vector 체계의 선택이 중요하다<sup>4)</sup>. 형질전환방법에는 protoplast transformation<sup>15)</sup>, cell conjugation<sup>28)</sup>과 protoplast fusion<sup>8)</sup> 등의 방법이 있다. Chassy와 Flickinger<sup>5)</sup>는 electroporation을 통해 형질전환의 빈도를 높였으며, 이 기술은 시간소요가 적고 조작이 간단하며 비용이 적게 들고 plasmid를 갖는 전이균주의 회복에 적절한 방법<sup>16)</sup>이라 하였다. 모든 미생물에서 electroporation으로 plasmid DNA가 다 전이되는 것은 아니며 이러한 기술을 이용한 형질전환에 영향을 미치는 요인들로는 균주간의 다양성, 성장매지와 성장시기, 전이시퀀스 plasmid DNA의 크기와 양, 전압, 완충액의 성분과 농도, pulse length 등의 electroporation 변수, 전이시퀀스 vector와 상주하고 있는 plasmid DNA간의 유사성 및 농도와 크기 등으로 이들에 의해 형질전환의 가능성과 효율이 결정된다<sup>27)</sup>. 이 연구는 젖산균의 효율적인 plasmid DNA 분리방법과 효율적인 형질전환방법을 연구하기 위해 시행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용 균주

사용된 젖산균주와 vector plasmid는 서울대 유가공학 연구실에서 보관 중인 균주와 한국 야쿠르트 중앙연구소에서 분양받아 사용하였으며, vector plasmid는 미국 Illinois대학에서 분양 받아 사용하였다. 돼지 분에서 분리한 젖산균은 수원 부근의 양돈장에서 분리하였으며, 확인된 균주를 사용하였다.

## 2. 배지 및 생장

Lactobacilli는 LCM broth<sup>7)</sup>, lactococci와 enterococci는 GM<sup>17)</sup> broth<sup>26)</sup>, *L. casei* 102S pIL253, pLZ12의 생장에는 erythromycin과 chloramphenicol(7.5 $\mu$ g/ml)을 첨가한 LCM broth를 사용하였으며, 대수생장 말기까지 생장한 세포를 plasmid DNA분리에 사용하였다.

## 3. Plasmid DNA 분리와 검사

Lactobacilli의 plasmid 분리는 Fig. 1, 2와 3에 표시된 방법을 사용하였다. Plasmid DNA의 전기영동은 Sambrook 등<sup>24)</sup>의 방법에 따라 실시하였으며 *L. casei* 102S pIL253과 pLZ12는 *EcoR* I으로 처리하였다.

---

Growth (10 ml. LCM+ 0.5% Glu.)  
 | centrifuge  
 Wash pellet twice with TES buffer  
 | transfer to eppendorf tube.  
 Resuspend pellet in 25% sucrose sol. containing 30mg of  
 lysozyme/ml and 40  $\mu$ g of mutanolysin/ml, to 200  $\mu$ l.  
 | incubate at 37°C for 15 mins.  
 Add 200  $\mu$ l of resuspension solution(25mM Tris, 10mM EDTA  
 | keep 5 mins. at R/T.  
 Add 400  $\mu$ l of alkaline SDS solution(3% SDS, 0.2N NaOH)  
 | mix immediately & keep 5 mins. on ice  
 Add 300  $\mu$ l of ice-cold 5M K-acetate  
 | mix immediately & keep 5 mins.on ice & spin 15 mins at 4°C  
 Transfer supernatant to new eppi. and add equal volume of cold isopropanol  
 | mix well & freeze for 15 mins. & spin at max. speed, 15 mins at 4°C  
 Remove all liquid and resuspend pellet in 320  $\mu$ l of sdH<sub>2</sub>O  
 Add 200  $\mu$ l of 7.5M ammonium acetate containing 0.5mg/ml EtBr.  
 and add 350  $\mu$ l phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)  
 | mix well & Spin at max. speed for 5 mins(4°C)  
 Transfer upper phase to new eppi. and add 1ml of ethanol(-20°C)  
 | mix well & freeze for 30 mins. & spin at max. speed for 15 mins(4°C)  
 Wash pellet in 70% ethanol(-20°C) & remove all liquid & resuspend pellet in TE buffer.  
 |  
 Remove RNA(Treat with RNase at 37°C for 1 hr.)

---

Fig. 1. Improved isolation protocol of lactobacillus plasmids.

## 4. 세포 대 세포 전이법을 이용한 *E. coli*의 형질전환

---

Growth(10 ml. LCM+ 0.5% Glucose)  
 | centrifuge  
 Wash pellet twice with TES buffer and add 100  $\mu$ l of TE buffer  
 | transfer to eppendorf tube  
 Add 50  $\mu$ l of lysozyme/mutanolysin sol.  
 (50mg lysozyme, 40  $\mu$ g mutanolysin/ml in TE buffer)  
 | incubate at 37°C for 30 mins.  
 Add 250  $\mu$ l of \*Guanidium thiocyanate soln.  
 | vortex cell suspension and keep on ice  
 Add 125  $\mu$ l of 7.5M ammonium acetate solution  
 | mix and keep for 10 mins. on ice  
 Add 250  $\mu$ l of phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25:24:1)  
 | spin at max. for 10 mins. & transfer supernatant to new eppendorf tube  
 Add 0.54 volume of cold isopropanol  
 | mix by inversion for 1 min. & spin for 15 mins. at 10,000 rpm.  
 Wash DNA pellet with 70% ethanol  
 | dry DNA pellet on air  
 Resuspend pellet in TE buffer.  
 Remove RNA(Treat with RNase at 37°C. 1 hr.)

---

Fig. 2. Genomic DNA extraction of lactobacillus with guanidium thiocyanate.

---

Growth ( 10 ml. LCM+ 0.5% Glu.)  
 | centrifuge  
 Wash pellet twice with TES buffer  
 | transfer to eppendorf tube.  
 Resuspend pellet in 25% sucrose solution containing 30mg of  
 lysozyme/ml and 40  $\mu$ g of mutanolysin/ml, to a final volume of 200  $\mu$ l.  
 | incubate at 37°C for 15 mins.  
 Add 200  $\mu$ l of resuspension solution(25 mM Tris, 10 mM EDTA)  
 | keep 5 mins. at R/T.  
 Add 400  $\mu$ l of alkaline SDS solution(3% SDS, 0.2N NaOH)  
 | mix immediately & keep 5 mins. on ice  
 Add 300  $\mu$ l of neutralization solution(5M K-acetate)  
 | mix immediately & keep 5 mins.at R/T & spin at max. speed, 15 mins at R/T  
 Transfer supernatant to new eppendorf tube and add 300  $\mu$ l of 6.0M guanidine  
 | mix well by inversion  
 Load the lysate into MPS membrane filter  
 | incubate 1 min. and spin at max. speed for 10 sec.  
 Discard the filtrate and wash in 65% ethanol(-20°C)  
 | spin at max. speed for 10 sec. & respin the empty filter for 30 sec.  
 Transfer the MPS filter to a fresh eppendorf tube  
 Apply 50  $\mu$ l of 65°C TE buffer to the MPS filter  
 | spin at max. speed for 10 sec.  
 Remove RNA(Treat with RNase at 37°C for 1 hr.)

---

Fig. 3. Lactobacillus plasmid isolation protocol with MPS membrane filter.



젖산구균-20분)한 후 같은 방법으로 형질전환 효율을 조사하였다.

### 7. Electroporator와 형질전환 효율

Gene Pulser와 ProGenitor II 간의 형질전환 효율을 비교하기 위해 기기 자체의 방식 차이에 의한 것은 제외하고 주어진 여건내에서 가능한 한 같은 조건으로 electroporation을 하였다.

### 8. *L. casei* 102S의 형질전환 효율

다음과 같은 electroporation parameter의 조건을 이용하여 형질전환 효율을 측정하였다.

- 1) 전압 - 5.0, 10.0, 12.5kV
- 2) 생장시기 - O.D  $A_{600}$  = 0.5, 0.8, 1.0, 1.2
- 3) 완충액 - EB, 1.0mM HEPES, TE buffer, 10% glycerol, 2차 증류수
- 4) Plasmid DNA의 농도 - pLZ12의 농도 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 $\mu$ g
- 5) 세포의 보존 온도 및 기간 - 당일 제조한 세포, 제조 후 -20 $^{\circ}$ C에서 1일과 7일 보관한 세포
- 6) Lysozyme 농도 - lysozyme(2,000U/ml)을 37 $^{\circ}$ C에서 0, 10, 20, 30분 처리

## III. 결과 및 고찰

### 1. 젖산균의 plasmid DNA 분리

#### 1) Plasmid DNA의 분리

세 가지 plasmid 분리방법(O'Sullivan과 Klaenhammer<sup>21)</sup>의 방법, 개선된 방법, guanidium thiocyanate 처리방법<sup>22)</sup>을 이용하여 *L. casei* 102S pIL253과 pLZ12를 분리한 결과 세 가지 방법 모두 가능하였다(Fig. 5, 6, 7).

*Streptomyces*에서 추출한 mutanolysin이 lysozyme보다 강력한 세포벽 용해작용을 지닌 것으로 알려지면서 Gram양성균의 plasmid 분리에 많이 이용하게 되었다<sup>29)</sup>. Mutanolysin 처리시 젖산간균 90%이상의 세포벽이 용해되었고, 같은 조건으로 lysozyme을 처리하였을 때 40~70%의 세포벽 용해를 보였으며<sup>13)</sup>, mutanolysin을 사용하는 것보다 더 중요한 것은 처리온도와 시간으로 장시간 처리시 endonuclease 분해가 일어나 plasmid의 감소를 초래한다고 하였다<sup>14)</sup>.

Kanatani 등<sup>12)</sup>은 *L. acidophilus*에 mutanolysin과 lysozyme을 처리하여 plasmid를 분리하였으며, 대수생장 후기나 정체기의 세포는 lysozyme에 대한 저항성이 높고 *L. casei*와 *Ent. mutans*의 경우 대수생장기의 세포가 정체기의 세포보다 용해가 잘 된다고 하였다<sup>3)</sup>. 그러나 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*의 경우 plasmid 분리가 매우 어렵다고 보고되고 있다. 6M guanidium thiocyanate와 membrane filter를 이용하여 세포단백질을 MPS membrane에 흡착시키고 DNA만을 회수하는 방법을 이용하여 *L. casei* 102S pLZ12를 분리한 다음 전기영동으로 plasmid를 확인하였다. Guanidium thiocyanate는 prokaryotic과 eukaryotic cell의 DNA와 RNA 추출에 이용되고 있으며, 단백질 분해능력이 뛰어나 특히 nucleáse 활성이 높은 것이 문제가 될 때 유용하게 사용할 수 있다<sup>22)</sup>. 이 방법을 *E. coli*에 적용하였을 때 효과적으로 이루어졌으나, 젖산균의 경우 세포벽 구성물질, 단백질 등으로 인하여 membrane이

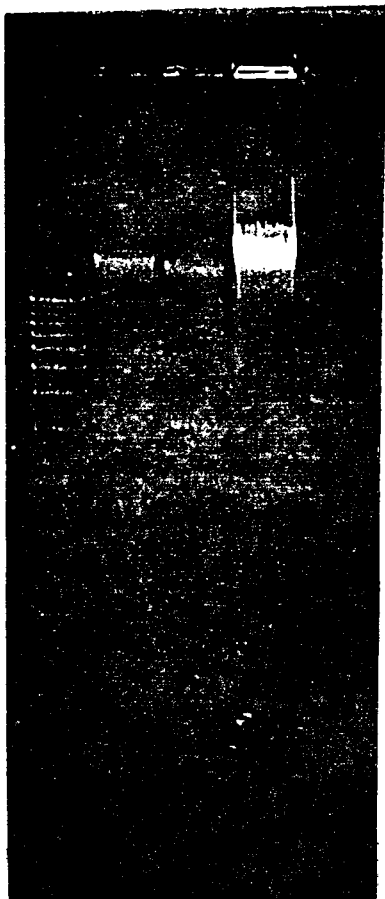


Fig. 5. Isolation of plasmid pIL253.  
 Lane 1. 1 kb DNA ladder(GIBCO, BRL);  
 Lane 2. pIL253 by O'Sullivan & Klaenhammer's method; Lane 3. pIL253 by the modified method; Lane 4. pIL253 by guanidium thiocyanate; Lane 5. pIL253 digested with *EcoRI*.



Fig. 6. Isolation of plasmid pLZ12.  
 Lane 1. 1 kb DNA ladder(GIBCO, BRL);  
 Lane 2. pLZ12 by O'Sullivan & Klaenhammer's method; Lane 3. pLZ12 by the modified method; Lane 4. pLZ12 by guanidium thiocyanate; Lane 5. pLZ12 digested with *EcoRI*.

막히는 경우가 있었다.

## 2) Lactobacilli의 plasmid DNA

Fig. 8, 9, 10은 O'Sullivan과 Klaenhammer의 plasmid 분리방법을 개선한 방법으로 분리한 *L. casei*, *L. acidophilus* 및 기타 lactobacilli의 plasmid의 사진이다. *L. casei* YIT9018, S1, LM1, ATCC7230과 *L. casei* ssp. *rhamnosus* SG1에서 1개씩의 plasmid, *L. acidophilus* IFO3205와 Y502에서 6개,



Fig. 7. Plasmid pLZ12 isolated by MPS membrane.  
Lane 1. plasmid pLZ12;  
Lane 2. 1 kb DNA ladder (GIBCO, BRL).

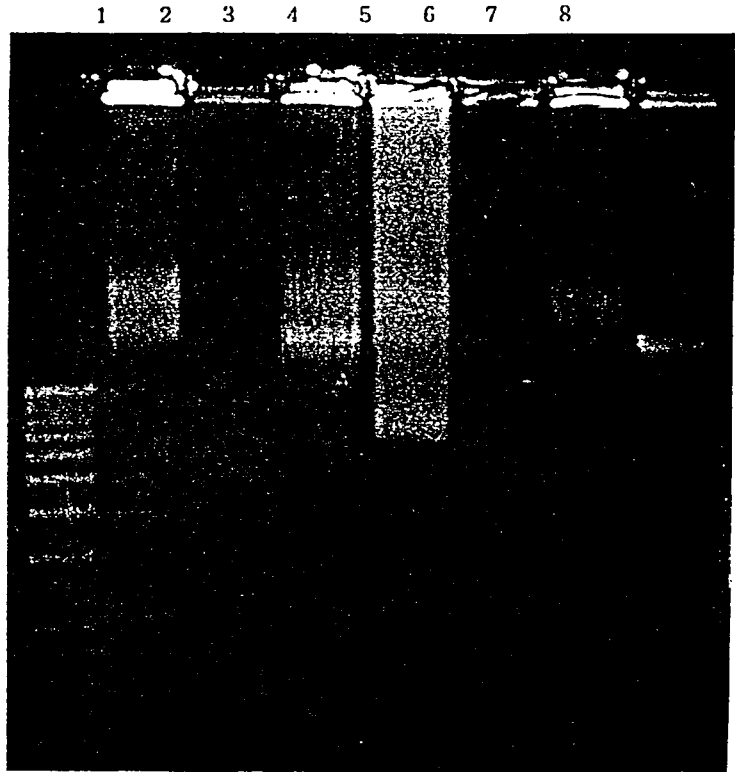


Fig. 8. Plasmids of *L. casei* strains.  
Lane 1. 1 kb DNA ladder(GIBCO, BRL);  
Lane 2. *L. casei* YIT9018; Lane 3. *L. casei* ATCC3533; Lane 4. *L. casei* S1; Lane 5. *L. casei* LM1.; Lane 6. *L. casei* IFO3245; Lane 7. *L. casei* ATCC7230; Lane 8. *L. casei* ssp. *rhamnosus* SG1.

*L. brevis* IFO13109가 2개, *L. plantarum* LP1이 1개, *L. delbruekii* var. *bulgaricus* ATCC33409과 CH3에서 3개와 1개의 plasmid를 확인하였다. 이 연구에서는 *L. casei* 9개 균주중 4개의 균주, *L. acidophilus* 9개 균주 중 2개의 균주, *L. delbruekii* var. *bulgaricus* 3균주중 2개의 균주, *L. plantarum* 2균주중 1균주, *L. brevis* 1균주중 1개의 plasmid를 분리할 수 있었다. 특히 *L. delbruekii* var. *bulgaricus*의 경우 개선된 plasmid 분리방법으로 분리가 가능함을 보여주고 있다.

### 3) Lactococci와 돼지 분에서 분리한 젖산균의 plasmid DNA 분리

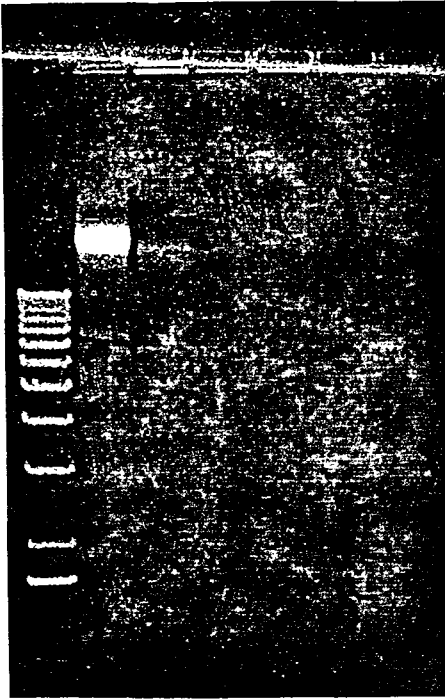


Fig. 9. Plasmids of *L. acidophilus* strains.  
 Lane 1. *L. acidophilus* HY7008; Lane 2. *L. acidophilus* WIESBY; Lane 3. *L. acidophilus* IFO3205; Lane 4. *L. acidophilus* Y502; Lane 5. *L. acidophilus* ATCC2182; Lane 6. *L. acidophilus* ATCC1942; Lane 7. *L. acidophilus* NCFM; Lane 8. *L. acidophilus* ATCC4962.

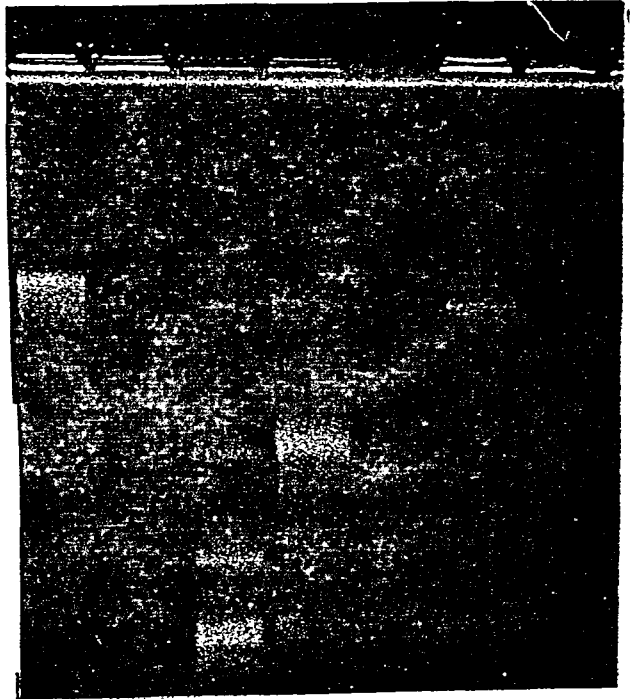


Fig. 10. Plasmids of Lactobacilli strains.  
 Lane 1. 1 kb DNA ladder(GIBCO, BRL); Lane 2. *L. brevis* IFO13109; Lane 3. *L. plantarum* LP1; Lane 4. *L. plantarum* ATCC1048; Lane 5. *L. delbrueckii* ATCC-9469; Lane 6. *L. delbrueckii* var. *bulgaricus* ATCC33409; Lane 7. *L. delbrueckii* var. *bulgaricus* CH3.

Fig. 12는 개선된 방법으로 분리한 *L. lactis* ssp. *lactis* 및 *Ent. faecalis*, *Ent. faecium* 균주의 plasmid로서 lactococci와 enterococci의 plasmid 분리는 lactobacilli와 달리 mutanolysin의 처리없이도 분리가 잘 되었으며, *L. lactis* ssp. *lactis* KCTC2184에서 4개, *Ent. faecalis* ATCC11729에서 2개의 plasmid를 가지고 있음을 확인하였다.

Fig. 13은 돼지 분에서 분리한 젖산균 plasmid의 사진으로서 Sharpe<sup>25)</sup>의 방법에 따라 동정한 결과 *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*으로 동정되었으며, *L. lactis* ssp. *lactis*에서 2개, *L. fermentum*과 *L. plantarum*에서 각각 3개와 2개의 plasmid를 확인하였다.



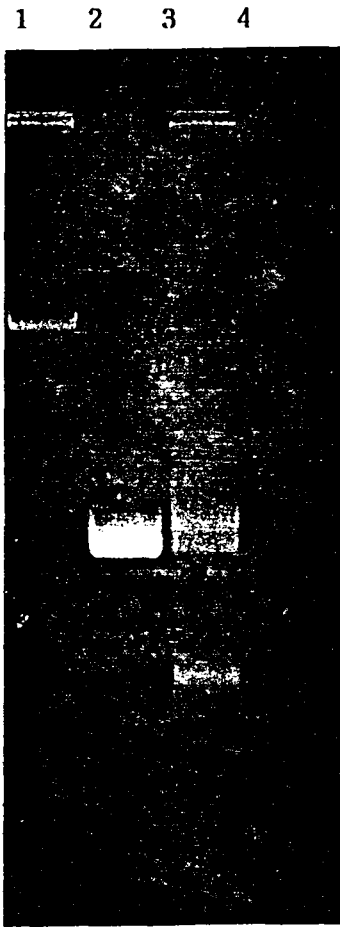


Fig. 11. Plasmids of lactococci and enterococci.

Lane 1. *Ent. faecium* ATCC2202; Lane 2. *Ent. faecalis* ATCC11729; Lane 3. *L. lactis* KCTC-2184; Lane 4. 1 kb DNA ladder(GIBCO, BRL).

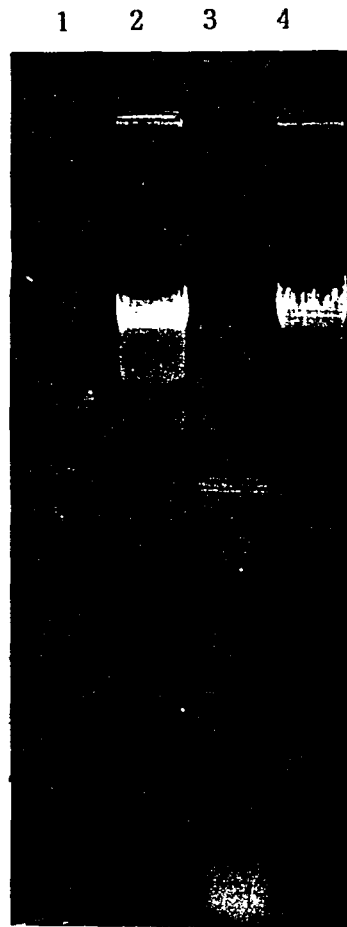


Fig. 12. Plasmids of lactic acid bacteria isolated from pig feces.

Lane 1. 1 kb DNA ladder(GIBCO, BRL); Lane 2. *L. lactis* ssp. *lactis* PR3; Lane 3. *L. plantarum* PA2; Lane 4. *L. fermentum* CG1.

결론적으로 O'Sullivan과 Klaenhammer의 방법을 개선한 젖산균 plasmid DNA의 분리방법은 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, 특히 mutanolysin의 처리가 젖산균의 세포벽을 용해시키는데 상당히 효율적임을 알 수 있었고 기존의 분리방법보다 분리과정이 단순하고 빠른 시간에 분리가 가능하여 시간과 시약을 절약할 수 있었다고 판단된다.

#### 4) 세포 대 세포 전이법을 이용한 *E. coli*의 형질전환

지금까지의 *E. coli*의 형질전환은  $\text{CaCl}_2$ 를 이용하여 competent cell을 만들어 전이시키거나 electroporation을 이용하여 순수 분리된 plasmid를 전이시켰으나, 이 연구에서는 electroporation시 전기적 충격에 의해 세포벽이 열리고 닫힌다는 점에 착안하여 plasmid를 분리하지 않고 1차 pulsing으로 *E. coli* 세포로부터 plasmid 유출을 유도한 다음 2차 pulsing을 하여 plasmid를 전이시키는 방법으로 세포에서 세포로 직접전이의 가능성을 확인하기 위하여 실시하였다. 세포에서 세포로 형질 전환시킨 경우 각각  $3.0 \times 10^3$  와  $5.0 \times 10^3$  cfu의 전이균주를 얻었으며, 순수 plasmid를 전이시킨 경우 각각  $2.6 \times 10^7$  와  $1.0 \times 10^8$  cfu의 전이균주를 얻어 세포 대 세포 형질전환 방법은 plasmid를 분리하지 않고 형질전환이 가능하며 기존의 electroporation 방법보다 훨씬 간단한 형질전환 방법임을 알 수 있었다.

5) 전기적 충격과 lysozyme 처리에 의한 젖산균의 생존율

(1) 전기적 충격에 의한 젖산균의 생존

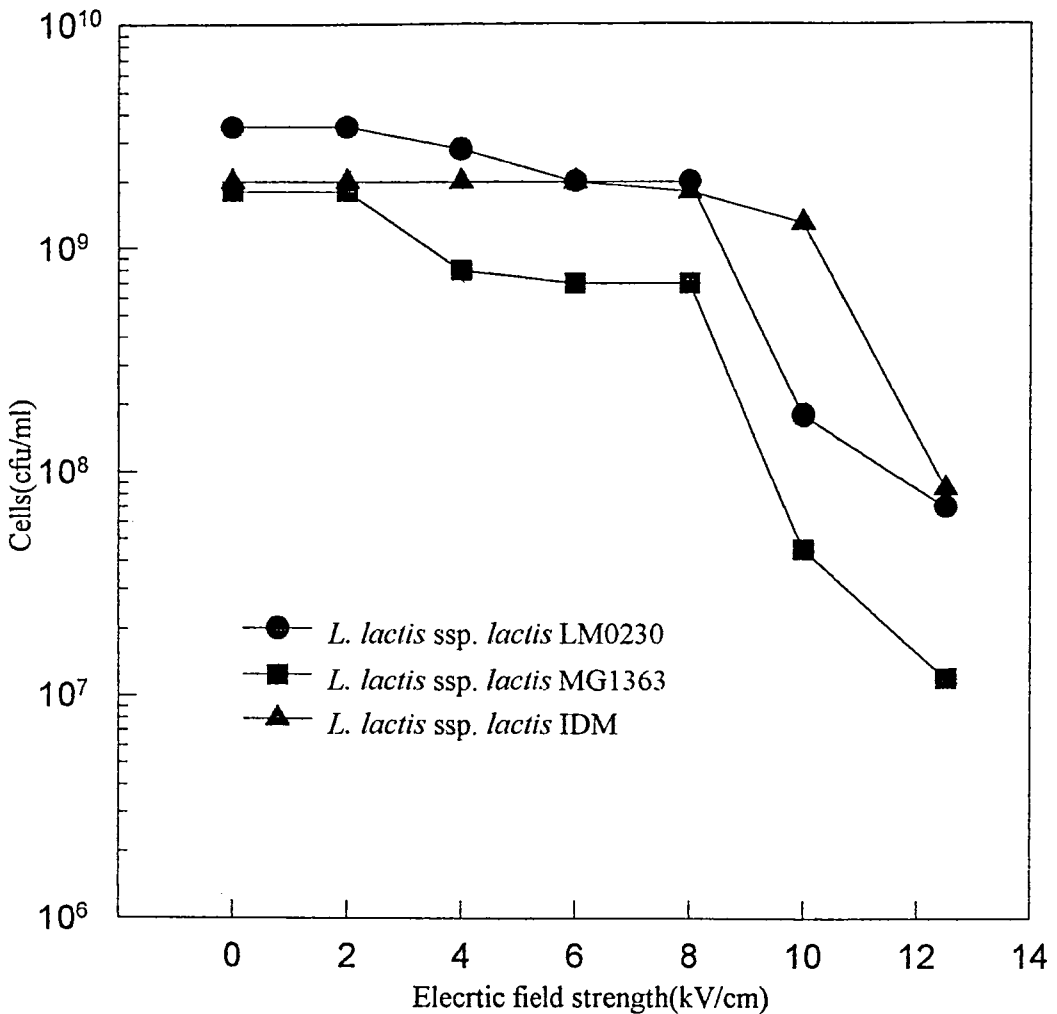


Fig. 13. Survival of Lactococci after electric shocking.

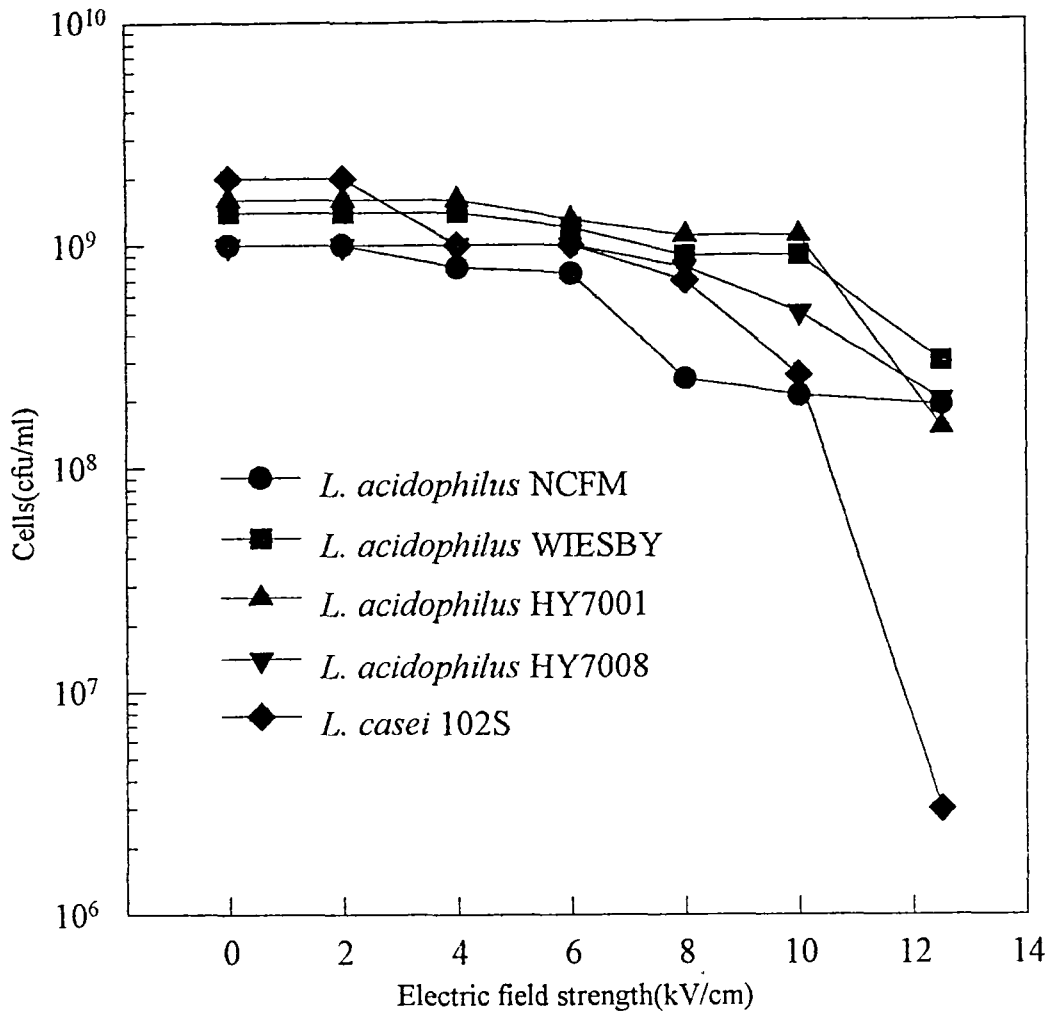


Fig. 14. Survival of Lactobacilli and *L. casei* 102S after electric shocking.

Electroporation시 전기적 충격에 의해 순간적으로 세포벽이 열리지만 동시에 사멸 효과도 있다. 젖산균은 모두 2~8kV의 전기적 충격에 생존하였으며, LM0230과 MG1363은 10kV에서부터 90%가 사멸하기 시작하였고 IDM의 경우 12.5kV에서 90%가 사멸하였다. 발효 유제품에 사용되는 4개의 *L. acidophilus* 균주는 12.5kV에서도 20%미만이 사멸하여 다른 젖산균보다 전기적 충격에 강하였으며, *L. casei* 102S는 10kV에서 7%가 사멸하였으나 12.5kV에서 99%가 사멸하여 각 균주마다 전기적 충격에 따른 차이를 보였다(Fig. 13, 14).

## (2) Lysozyme처리에 의한 젖산균의 생존

Lysozyme 처리시 젖산균의 생존율은 모두 유사한 경향을 보였으며, *L. acidophilus*의 경우 젖산균과 같은 조건으로 lysozyme을 처리했을 때 대부분의 *L. acidophilus*는 젖산균보다 생존율이 높았으

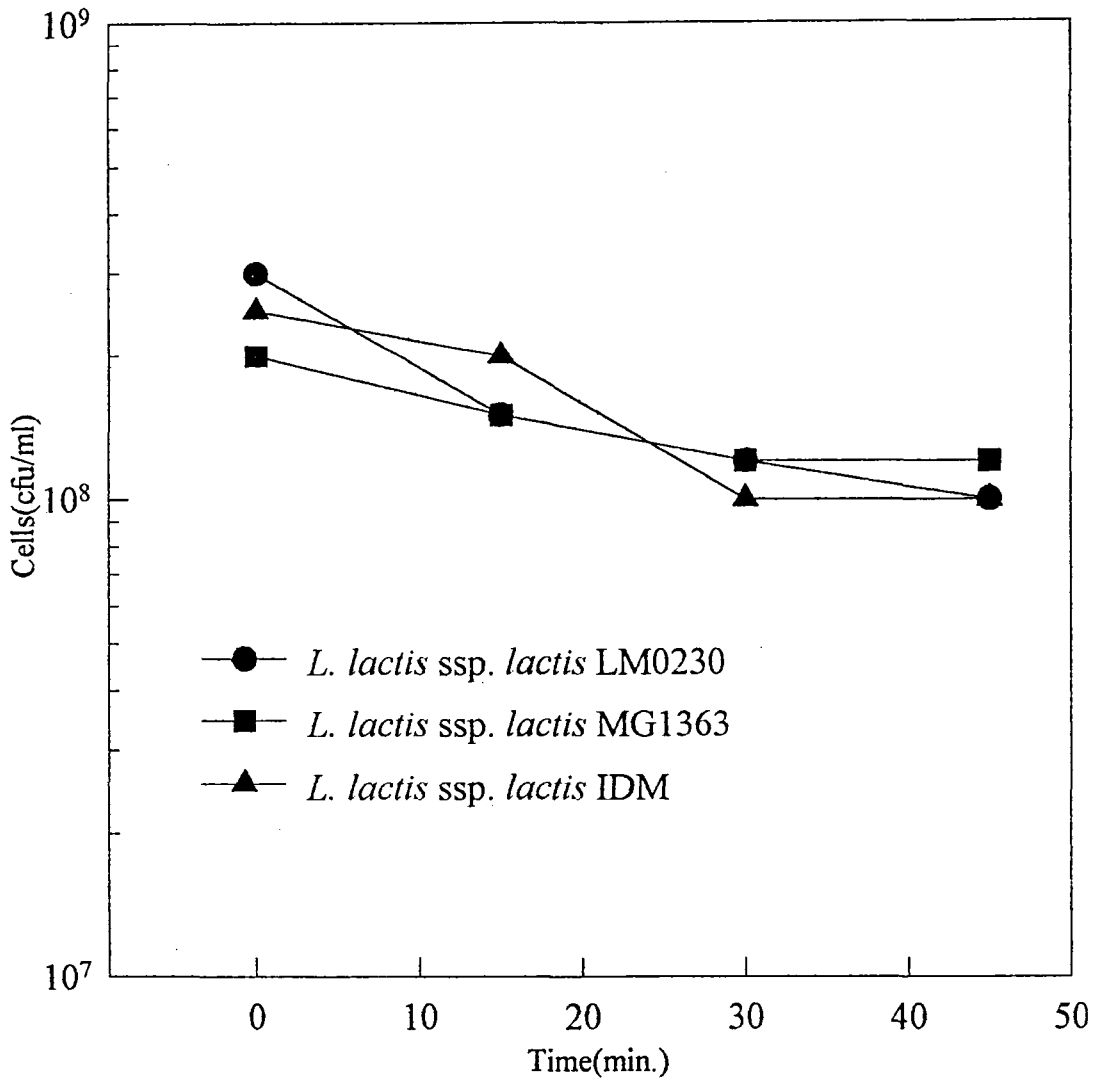


Fig. 15. Survival of Lactococci after lysozyme treatment.

나, *L. acidophilus* HY7001만은 생존율이 더 떨어지는 것으로 나타났다. *L. casei* 102S는 45분간의 처리 후에도 100%의 생존율을 보여 저항성이 매우 높았다(Fig. 15, 16).

#### 6) *L. lactis* ssp. *lactis*의 형질 전환

*L. lactis* ssp. *lactis*에 pLZ12를 6.0kV와 12.5kV/cm에서 electroporation을 실시한 결과 12.5kV에서의 형질전환 효율은 6.0kV에 비해 각각 0.45%, 15.6%, 1.7%의 형질전환 효율을 보여(Table 1), *L. lactis* ssp. *lactis* LM0230에 pMU1328을 전이시킬 때 lysozyme을 처리한 결과 처리 안한 것보다 300~1,000배나 형질전환 효율이 증가하였다는 보고<sup>23)</sup>와 일치하는 경향을 보였다.

Harlander<sup>9)</sup>는 *L. lactis* ssp. *lactis*에 plasmid pSA3를 전이시킬 때 낮은 전압(6kV/cm)이 효과적이

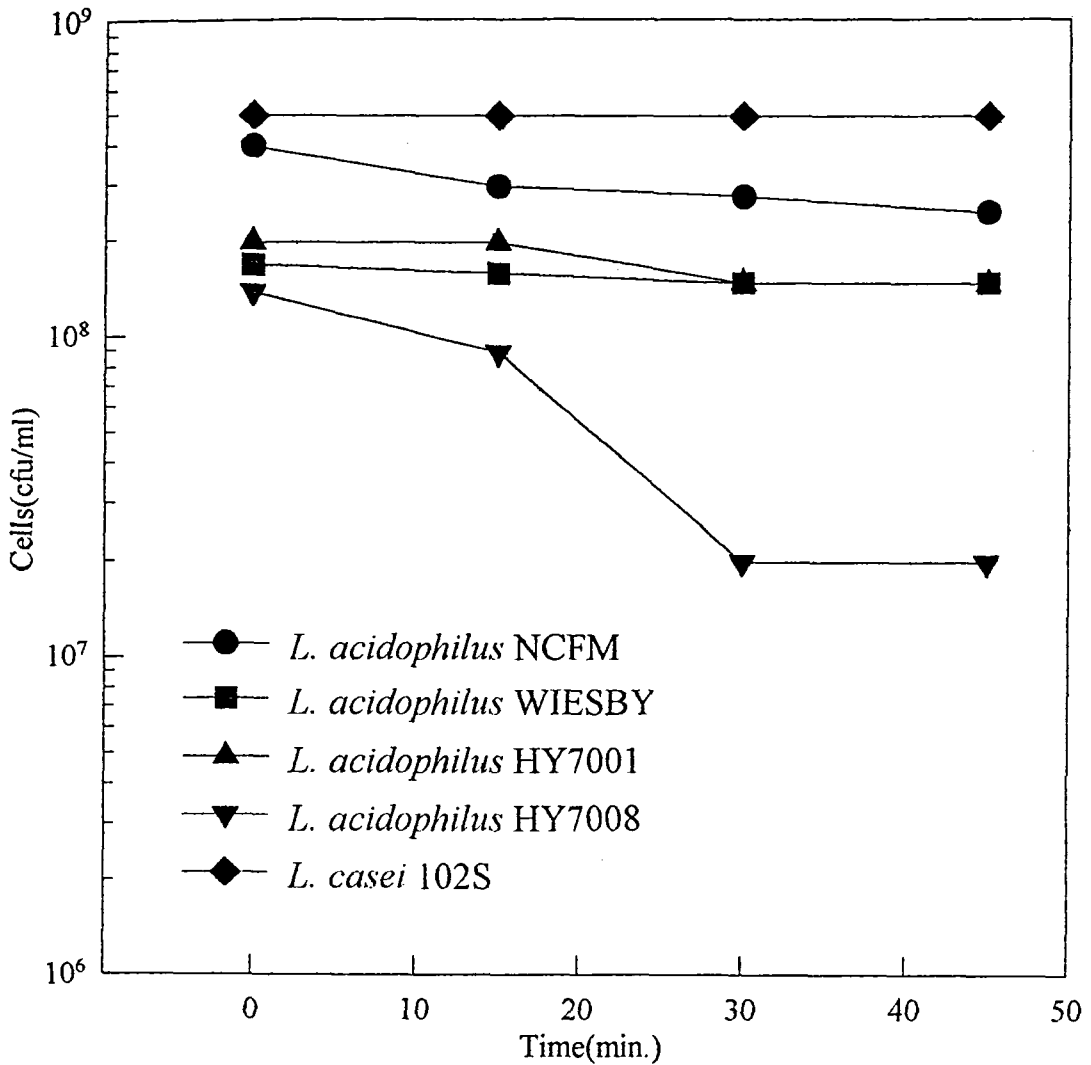


Fig. 16. Survival of Lactobacilli and *L. casei* 102S after lysozyme treatment.

Table 1. Electrotransformation of *L. lactis* ssp. *lactis* with pLZ12 by the electroporation

Strains	Electrotransformants / $\mu\text{g}$ of pLZ12		
	6.0 kV / cm		12.5kV / cm
	lysozyme treated	not treated	not treated
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LM0230	$1.2 \times 10^5$ cfu	$8.0 \times 10^4$ cfu	$3.6 \times 10^2$ cfu
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> MG1363	$5.2 \times 10^5$ cfu	$3.2 \times 10^3$ cfu	$5.0 \times 10^2$ cfu
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> IDM	$3.8 \times 10^3$ cfu	$3.6 \times 10^3$ cfu	$6.0 \times 10^1$ cfu

Table 2. Electrotransformation of *L. acidophilus* with pLZ12 by the electroporation

Strains	Electrotransformants / $\mu\text{g}$ of pLZ12		
	6.0 kV / cm		12.5 kV / cm
	lysozyme treated	not treated	not treated
<i>L. acidophilus</i> NCFM	$5.6 \times 10^2 \text{cfu}$	$7.2 \times 10^1 \text{cfu}$	none
<i>L. acidophilus</i> WIESBY	$3.7 \times 10^3 \text{cfu}$	$2.0 \times 10^2 \text{cfu}$	none
<i>L. acidophilus</i> HY7008	$3.2 \times 10^1 \text{cfu}$	$3.0 \times 10^1 \text{cfu}$	$3.0 \times 10^0 \text{cfu}$
<i>L. acidophilus</i> HY7001	$4.0 \times 10^3 \text{cfu}$	$8.0 \times 10^0 \text{cfu}$	$5.0 \times 10^0 \text{cfu}$

라고 하였으나, *L. lactis* ssp. *lactis* LM0230에 pLM2001, pGB301, pSA3, pAM120을 전이시켰을 때 17.0kV에서 420~1,100cfu의 전이균주를 얻었다는 보고<sup>17)</sup>, *L. lactis* ssp. *cremoris* BC101에 plasmid pIL253 전이시 2.5kV, 5kV보다 12.5kV에서 더 많은 전이균주를 얻었다는 보고<sup>11)</sup> 등과는 차이를 보였다.

#### 7) *Lactobacillus acidophilus*의 형질 전환

*L. acidophilus* 균주에 6.0kV에서 plasmid pLZ12를 전이시켰을 때 *L. lactis* ssp. *lactis* 균주보다 형질 전환효율이 낮았으며, 12.5kV에서 전이시켰을 때 *L. acidophilus* WIESBY와 NCFM은 전이가 이루어지지 않았고 나머지 균주도 형질전환 효율이 낮았다(Table 2).

Luchansky 등<sup>16)</sup>은 *L. acidophilus* ADH에 pGK12를 PEB buffer에 세척한 후 6.25, 5.0, 3.75kV에서 electroporation한 결과 각각  $3.8 \times 10^4$ ,  $3.2 \times 10^4$ ,  $1.1 \times 10^4 \text{cfu}$ 의 전이균주를 얻었으며, 2.5kV에서는 전이가 이루어지지 않았다고 하였다. 이들은 6.25kV의 전기충격시 *L. acidophilus* ADH의 생존율은 1~30%라 하였으나 이 실험에서는 *L. acidophilus* 균주 대부분이 6.0kV에서 75~100%, 12.5kV에서 10~21%의 생존율을 보여 차이를 보였다.

*L. acidophilus* 균주에 lysozyme 처리 후 6.0kV로 같은 조건에서 electroporation을 실시한 결과 lysozyme을 처리하지 않은 것보다 형질전환효율이 모두 향상되었으며, 특히 *L. acidophilus* HY7001은  $8.0 \times 10^0$ 에서  $4.0 \times 10^3 \text{cfu}$ 로 증가하였다. 이 실험 결과로 볼 때 lactococci에서와 같이 lactobacilli도 lysozyme 처리에 의해 형질전환 효율이 향상되는 것으로 판단된다.

#### 8) Electroporator에 의한 영향

Gene Pulser와 Progenitor II 간의 작동기작 차이에 의한 형질전환 효율의 차이는 Table 3과 같다. Gene Pulser와 Progenitor II를 이용하여 6.0kV, 200Ohms에서 2차 증류수를 완충액으로 사용하여 pLZ12를 젖산구균과 젖산간균에 전이시켰을 때 Progenitor II가 형질전환 효율이 낮았으며, *L. acidophilus* Wiesby와 Ncfm은 Progenitor II에서 전이가 일어나지 않았으나 Gene Pulser에서는 전이가 일어나 두 electroporator간에 차이를 보였다. Gene Pulser의 경우 12.5kV에서 전기충격시 염 농도에 상당히 민감하여 젖산균 세포의 세척시 염 세척이 제대로 이루어지지 않으면 방전현상이 쉽게 일어나는데 이는 Gene Pulser를 사용하여 12.5 kV에서 pulsing 할 때 방전현상이 잘 일어나기 때문에 10kV으로 낮추어 사용했다는 보고<sup>11)</sup>에서도 알 수 있었으며, 이에 비해 Progenitor II는 16.7kV의

Table 3. Electrotransformation efficiency of lactic acid bacteria using two electroporators

Strains	Electrotransformants( / $\mu$ g of pLZ12)	
	Gene pulser	Progenitor II
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LM0230	$8.0 \times 10^4$ cfu	$2.0 \times 10^1$ cfu
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> MG1363	$3.2 \times 10^3$ cfu	$1.5 \times 10^1$ cfu
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> IDM	$3.6 \times 10^3$ cfu	$1.5 \times 10^1$ cfu
<i>L. acidophilus</i> NCFM	$7.2 \times 10^1$ cfu	none
<i>L. acidophilus</i> WIESBY	$2.0 \times 10^2$ cfu	none
<i>L. acidophilus</i> HY7008	$3.0 \times 10^1$ cfu	$3.0 \times 10^0$ cfu
<i>L. acidophilus</i> HY7001	$8.0 \times 10^0$ cfu	$2.0 \times 10^0$ cfu

높은 전압을 줄 수 있음에도 불구하고 방전현상이 잘 일어나지 않았다. 이외에도 capacitance 범위와 저항도 Progenitor II의 경우는 조절할 수가 없도록 되어 있으며, time constance도 Gene Pulser는 pulsing 조건에 따라 자동조절되나 Progenitor II는 수동으로 조절하게 되어 있는 등 많은 차이를 보였다.

#### 9) *L. casei* 102S의 형질 전환

*L. casei* 102S에 plasmid pLZ12를 전이시 10kV에서(Fig. 17), 대수생장 말기의 세포에서(Fig. 18) 최대 형질전환 효율을 얻었다. Plasmid pLZ12의 농도를 0.5~3.0 $\mu$ g으로 electroporation을 실시하였을 때 plasmid 농도와 형질전환 효율은 비례함을 보였으며(Fig. 19), 완충액의 경우, 10% glycerol, EB(electroporation buffer)와 2차 증류수의 순으로 형질전환 효율을 얻었으며, 1.0mM HEPES, TE buffer를 사용하였을 때에는 전이균주를 얻을 수 없었다(Table 4).

*L. casei* 102S는 12.5kV에서 생존율이 0.15%로서 이 상태에서도 전이가 이루어졌으며, 이상의 결과로 볼 때 electroporation 조건이나 전이시키고자 하는 plasmid DNA의 종류, 숙주균주, 완충액의 선택 등에 따라 전이의 차이가 심함을 알 수 있었다. *L. casei* 102S에 lysozyme 처리 후 electroporation을 실시한 결과 형질전환 효율에 영향을 별로 주지 않은 것으로 나타나 다른 젖산균주와 차이를 보였다(Table 5).

Table 6은 *L. casei* 102S 세포를 만든 후 10% glycerol과 EB에 녹여 -20 $^{\circ}$ C에서 냉동보관 후 electroporation을 실시한 결과로서 *L. casei* 102S 세포를 냉동 보관시 세포손상이 일어나 형질전환 효율에 영향을 미침을 알 수 있었다. 이는 *L. plantarum*에 pGK12를 전이시 세포의 냉동과 해동을 반복할 경우 형질전환 효율이 감소하였다는 보고<sup>2)</sup>와 *L. lactis* ssp. *lactis*에 pGB301을 전이하였을 때  $3.84 \times 10^3$  cfu에서 -20 $^{\circ}$ C 냉동보관 30일 후에는  $1 \times 10^2$  cfu로 감소하였으나 -60 $^{\circ}$ C 냉동보관시 30일 후에  $5.36 \times 10^3$  cfu로 오히려 증가하였다는 보고<sup>17)</sup>로 볼 때 세포는 -60~-80 $^{\circ}$ C의 deep freezer에서 보관하는 것이 필수적이라고 판단된다.

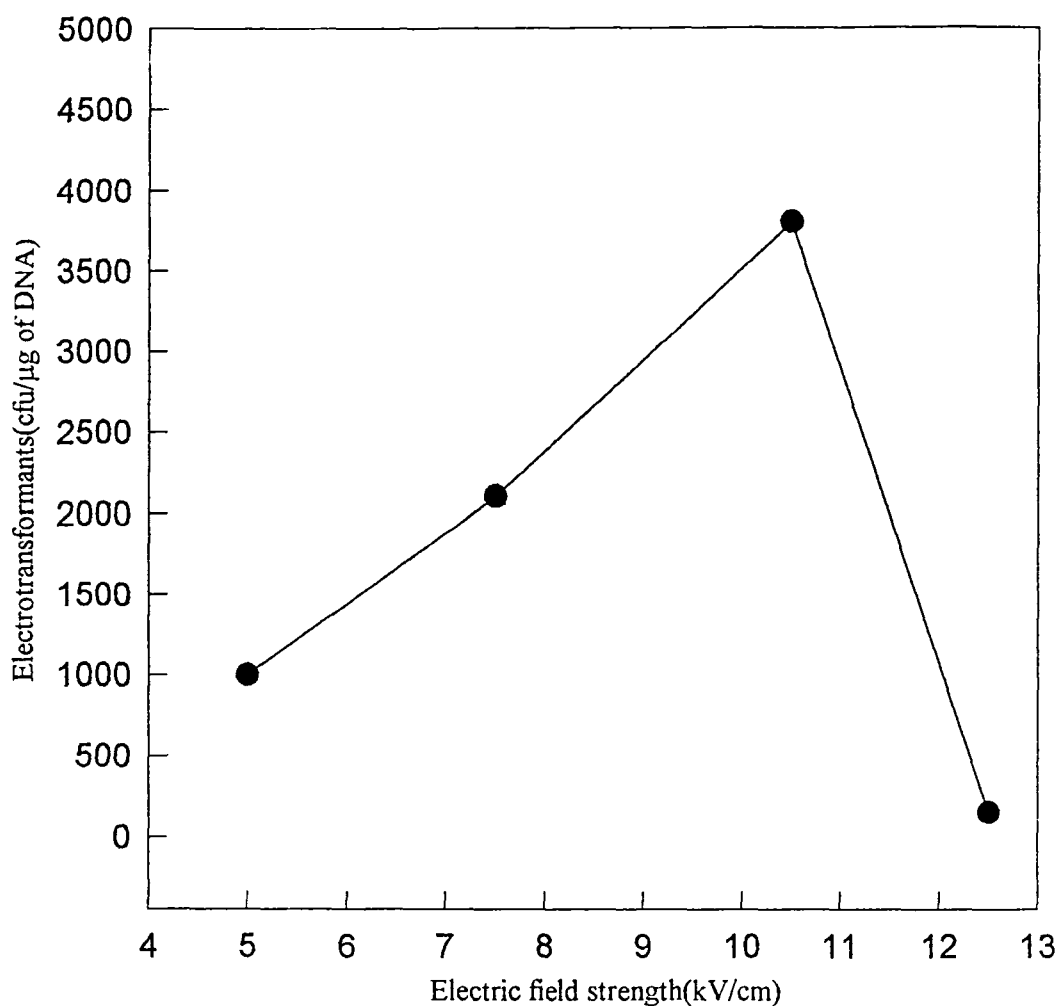


Fig. 17. Electrotransformation efficiency of *L. casei* 102S with pLZ12 at various electric field strength.

Table 4. Electrotransformation of lactococci with pLZ12 in some buffers

Buffer	Electrotransformation /μg of pLZ12
10% Glycerol	$3.8 \times 10^3$ cfu
EB	$5.0 \times 10^2$ cfu
dd H <sub>2</sub> O	$1.5 \times 10^2$ cfu
TE	none
1 mM HEPES	none

Table 5. Electrotransformation of *L. casei* 102S with pLZ12 after lysozyme treatment

Time	Electrotransformation /μg of pLZ12
0 min.	$3.8 \times 10^3$ cfu
10 min.	$3.0 \times 10^3$ cfu
20 min.	$3.0 \times 10^3$ cfu
30 min.	$3.4 \times 10^3$ cfu



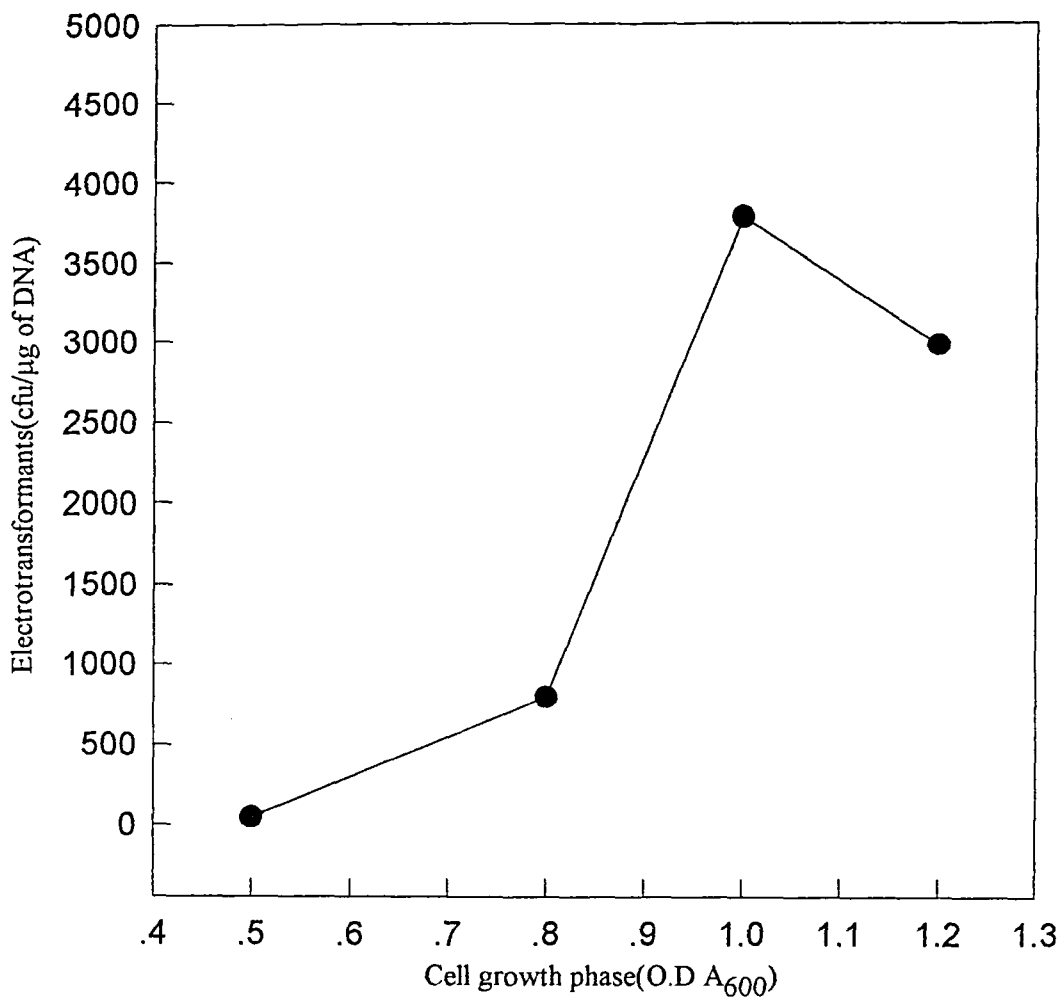


Fig. 18. Electrotransformation efficiency of *L. casei* 102S with pLZ12 at different growth phase.

Table 6. Effect of storage and suspension buffer on electrotransformation efficiency of *L. casei* 102S cells

Days stored	10% glycerol	EB
0	$3.8 \times 10^3$ cfu	$5.0 \times 10^2$ cfu
1	$2.0 \times 10^2$ cfu	$2.0 \times 10^1$ cfu
7	$1.2 \times 10^2$ cfu	$1.0 \times 10^1$ cfu

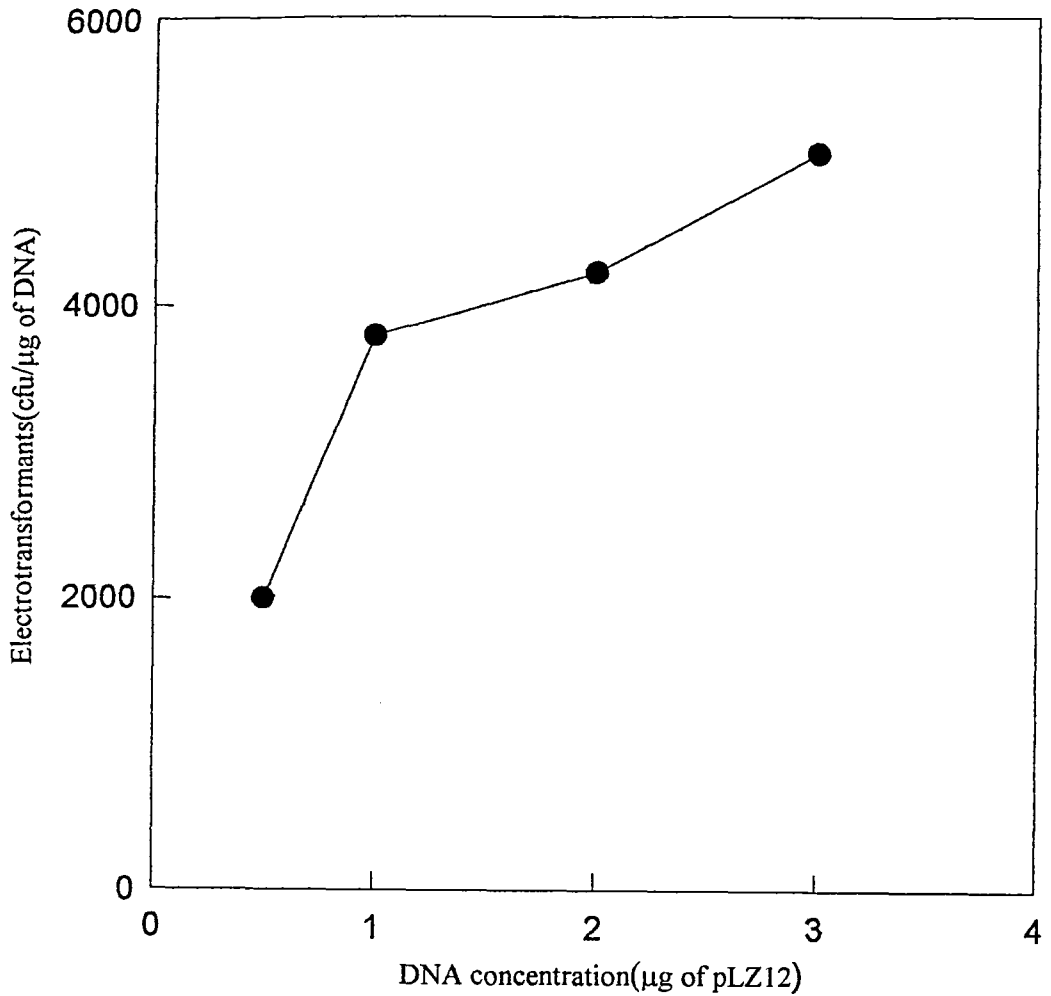


Fig. 19. Electrotransformation efficiency of *L. casei* 102S with pLZ12 at various plasmid DNA concentration.

#### IV. 요약

젖산균의 유전자 연구를 촉진하기 위해 간단하고 신속한 plasmid DNA의 분리방법과 electro-  
poration을 이용하여 vector plasmid의 간단하고 신속한 전이방법을 얻기 위해 젖산균의 형질전환에  
영향하는 요인에 대하여 연구하였으며 연구결과는 다음과 같다.

1. O'Sullivan과 Klaenhammer의 방법을 개선하여 젖산균 plasmid DNA의 분리에 좋은 결과를 얻을  
수 있는 신속하고 쉬운 방법을 고안하였으며, genomic DNA 분리에 이용되는 guanidium thio-  
cyanate 처리방법을 plasmid의 분리에 적용할 수 있었다.

2. *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbruekii* var. *bulgaricus*, *L. brevis*와 *L. plantarum* 균주에서 plasmid를 확인하였으며, 돼지 분에서 분리된 *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. fermentum*과 *L. plantarum*에서도 plasmid를 분리 확인하였다.
3. Lactococci의 plasmid분리는 lactobacilli와는 달리 mutanolysin의 처리없이도 잘 되었으며, *L. lactis* ssp. *lactis*와 *Ent. faecalis*에서 plasmid를 확인하였다.
4. *E. coli* plasmid 분리에 이용되는 MPS membrane filter 방법으로 젖산균 plasmid pLZ12의 분리가 가능하였으나, 세포파편이 filter를 막아 사용에 어려움이 있는 것으로 확인되었다.
5. Plasmid 분리없이 electroporation을 이용한 세포 대 세포 전이법으로 간편하고 빠르게 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 *E. coli* JM109의 plasmid pBS19, pBR322를 전이시켰다.
6. *L. lactis* ssp. *lactis* 균주들은 10kV에서부터 각각 90%가 사멸하였으며, *L. acidophilus* 균주들은 12.5kV까지 20%미만이 사멸하였으며, *L. casei* 102S는 10kV에서 7%, 12.5kV에서 99%가 사멸하여 각 균주마다 전기적 충격에 대한 저항성에 차이를 보였다.
7. *L. lactis* ssp. *lactis* 균주에 lysozyme 처리시 30~80%의 생존율을 보였으며, 대부분의 *L. acidophilus* 균주의 경우 약 70%의 생존율을 보였다. *L. casei* 102S의 경우는 45분간 처리 시에도 100%의 생존율을 보였다.
8. *L. lactis* ssp. *lactis* 균주에 pLZ12를 6.0kV에서 전이시킨 결과 12.5kV에서 보다 형질전환 효율이 훨씬 높았으며 lysozyme 처리에 의해 형질전환 효율이 증가되었다.
9. *L. acidophilus* 균주에 pLZ12를 전이시 6.0kV에서는 전이가 모두 이루어졌으나, 12.5kV에서는 *L. acidophilus* WIESBY와 NCFM에서 전이가 이루어지지 않았으며, lysozyme 처리 후 pLZ12를 전이시켰을 때 12kV보다 6.0kV에서 형질전환 효율이 증가되었다.
10. Gene Pulser와 Progenitor II를 사용하여 pLZ12를 *L. lactis* ssp. *lactis* 균주에 전이하였을 때 Gene Pulser에 비해 Progenitor II의 형질전환 효율이 현저히 떨어졌다. *L. acidophilus* HY7008과 HY7001은 두 기기 모두 형질전환이 이루어졌으나, *L. acidophilus* WIESBY와 NCFM은 Progenitor II에서 전이가 일어나지 않았으며, Gene Pulser에서 전이균주를 얻어 두 electroporator간에 형질전환 효율의 차이를 보였다.
11. *L. casei* 102S에 pLZ12를 electroporation시 낮은 전압에서 형질전환 효율이 비교적 좋았으며, 배양 시기를 달리하여 전이시켰을 때 대수성장 말기의 세포가 형질전환 효율이 좋았다.
12. *L. casei* 102S세포를 각각 10% glycerol, EB, 2차 증류수 등에 녹여 electroporation을 실시하였을 때 각각  $3.8 \times 10^3$ ,  $5.0 \times 10^2$ ,  $1.5 \times 10^2$ cfu의 형질전환 효율을 보였으며, 1.0mM HEPES, TE buffer를 사용하였을 때에는 전이가 이루어지지 않았다.
13. Plasmid pLZ12의 농도를 달리하여 electroporation을 하였을 때 형질전환 효율이 농도에 비례하여 증가하였다.
14. *L. casei* 102S에 대수성장 말기의 세포를 채취하여 10% glycerol, 200 Ohms, 25  $\mu$ FD, 10kV/cm로 plasmid pLZ12를 electroporation할 때 최대 형질전환 효율인  $3.8 \times 10^3$ cfu를 얻었으며, lysozyme 처리가 다른 젖산균과는 달리 형질전환 효율을 증가시키지 못하였다.
15. *L. casei* 102S 세포를 10% glycerol과 EB에 녹여 -20 $^{\circ}$ C에서 냉동시킨 다음 1일과 7일 후의 세포를 electroporation한 결과 냉동시 세포에 손상을 주는 것으로 인식되었다.

## VI. 인용문헌

1. Anderson, D., and L. L. McKay. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic acid streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 549-552.
2. Bringel, F., and J.-C. Hubert. 1990. Optimized transformation by electroporation of *L. plantarum* strains with plasmid vectors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:664-670.
3. Chassy, B. M., and A. Giuffrida. 1980. A method for the lysis of Gram positive aspoogenous bacteria with lysozyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:153-158.
4. Chassy, B. M., E. Gibson, and A. Giuffrida. 1976. Evidence for extrachromosomal elements in lactobacilli. *J. Bacteriol.* 127:1576-1578.
5. Chassy, B. M., and J. L. Flickinger. 1987. Transformation of *L. casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. letters* 44:173-177.
6. Cords, B. R., L. L. McKay, and P. Guerry. 1974. Extrachromosomal elements in group N streptococci. *J. Bacteriol.* 117:11490-1152.
7. Efthymiou, C., and C. A. Hansen. 1962. An antigenic analysis of *L. acidophilus*. *J. Infectious Disease* 110:258-267.
8. Gasson, M. J. 1980. Production, regeneration and fusion of protoplasts in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 9:99-102.
9. Harlander, S. K. 1987. Transformation of *Str. lactis* by electroporation. *In Streptococcal genetics.* ASM pp. 229-233.
10. Helinski, D. R., and D. B. Clewell. 1971. Circular DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 40:899-942.
11. Holo, H., and I. F. Nes. 1989. High-Frequency transformation, by electroporation, of *L. lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119-3123.
12. Kanatani, K., K. Yosida., T. Tahara., H. Miura., M. Sakamoto, and M. Oshimura. 1991. Isolation and characterization of plasmid DNA in *L. acidophilus*. *Agric. Biol. Chem.* 55:2051-2056.
13. Klaenhammer, T. R. 1984. A general method for plasmid DNA isolation *Lactobacilli*. *Current Microbiol.* 10:23-28.
14. Klaenhammer, T. R., L. L. McKay, and K. A. Baldwin. 1978. Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:592-600.
15. Lin, J. H.-C., and D. C. Savage. 1986. Genetic transformation of rifamycin resistance in *L. acidophilus*. *J. General Microbiol.* 132: 2107-2111.
16. Luchansky, J. B., P. M. Muriana, and T. R. Klaenhammer. 1988. Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, and *Propionibacterium*. *Molecular Microbiol.* 2:637-646.

17. McIntyre, D. A., and S. K. Harlander. 1989. Improved electroporation efficiency of intact *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* cells grown in defined media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2621-2626.
18. McKay, L. L. 1983. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 49:259-274.
19. McKay, L. L., and K. A. Baldwin. 1982. Characterization and transfer ability of plasmids among group N streptococci. *In Microbiology-1982.* pp. 210-212.
20. McKay, L. L., K. A. Baldwin, and E. A. Zottla. 1972. Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* 23:1090-1096.
21. O'Sullivan, D. J., and T. R. Klaenhammer. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2730-2733.
22. Pitcher, D. G., N. A. Saunders, and R. J. Owen. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiol.* 8:151-156.
23. Powell, I. B., M. G. Achen., A. J. Hillier, and B. E. Davidson. 1988. A simple and rapid method for genetic transformation of Lactic streptococci by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655-660.
24. Sambrook, J., E. T. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *In Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York. Vol. 1.
25. Sharpe, M. E. 1979. Identification of lactic acid bacteria. *In Identification methods for microbiologists.* Skinner, F. A., and D. W. Lovelock. Ed. Academic Press. London. pp. 233-259.
26. Terzaghi, B. E., and W. E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 29:807-813.
27. Trevors, J. T., B. M. Chassy., W. J. Dower, and H. P. Blaschek. 1992. Electroporation of bacteria by plasmid DNA. *In Guide to electroporation and electrofusion.* Chang, D. C., *et al.* Ed. Academic Press. London. pp 265-290.
28. Vescovo, M., L. Morelli., V. Bottazzi, and M. J. Gasson. 1983. Conjugal transfer of broad-host-range plasmid pAM $\beta$ 1 into enteric species of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:753-756.
29. Yokogawa, K., S. Kawata., T. Takemura, and Y. Yoshimura. 1975. Purification and properties of lytic enzymes from *Streptomyces globisporus* 1829. *Agric. Biol. Chem.* 39:1533-1543.