

---

碩士學位論文

*Rhizobium fredii* USDA191이 생산하는 균체외  
다당류의 유전자 및 성질

濟州大學校 大學院

食品工學科



鄭 完 錫  
제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1992年 12月

*Rhizobium fredii* USDA191이 생산하는 균체외  
다당류의 유전자 및 성질

指導教授 高 榮 煥

鄭 完 錫

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함.

1992年 12月 日

鄭完錫의 工學 碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

濟州大學校 大學院

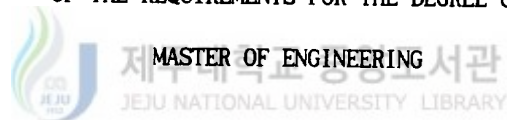
1992年 12月

Properties of Exopolysaccharides from *Rhizobium Fredii* USDA191  
and a Gene Required for Their Synthesis

Wan-Seok Chung

(Supervised by Assistant Professor Young-Hwan Ko)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF



DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1992

# 목 차

Summary.....	1
I. 서론.....	2
II. 재료 및 방법.....	8
1. 균주, DNA 및 배지.....	8
2. 플라스미드(plasmid)의 분리.....	12
3. DNA의 절단.....	14
4. DNA의 연결(ligation).....	14
5. 형질전환(transformation).....	15
6. 형질도입(transduction)과 유전자 융합(gene fusion).....	16
1) 파아지(phage)입자의 준비와 유전자 융합.....	16
2) 형질도입.....	17
7. 아가로스 겔(agarose gel) 전기영동.....	18
8. $\beta$ -galactosidase 활성 측정.....	18
9. 균체의다당류의 분리.....	19
10. 균체의다당류의 건조 및 수율계산.....	20
11. 6탄당(hexose)의 정량.....	20
12. 우론산(uronic acid)의 정량.....	20
13. 총당분석.....	23
14. 점도측정.....	24
15. Ca-겔(gel) 형성능.....	24

III. 결과 및 고찰.....	25
1. <i>R. fredii</i> USDA191의 <i>exo</i> 유전자와 $\beta$ -galactosidase 유전자의 융합.....	25
1) <i>Exo</i> 유전자의 확인.....	25
2) <i>Exo</i> 유전자의 Subcloning.....	28
3) 유전자 융합.....	28
4) 촉진 유전자(promoter)의 활성 측정.....	33
2. <i>R. fredii</i> USDA191이 생산하는 균체외다당류의 성질.....	34
1) 배양시 수율.....	34
2) 다당류의 조성.....	34
3) 다당류의 점성.....	35
4) 다당류의 Ca-겔(gel) 형성능.....	36
IV. 요약.....	39
V. 참고문헌.....	40
사 사.....	46



## Summary

For the utilization of exopolysaccharides produced by *Rhizobium fredii* USDA191, a study on the control mechanism of their synthesis and production, and an analysis of their property and composition are necessary. This study was attempted to investigate transcriptional control mechanism of a gene *exo* required for exopolysaccharide synthesis after its isolation and subcloning into plasmid pBR322. The resulting recombinant plasmid was introduced into *Escherichia coli* PO11734 harboring MudI1734 to induce transcriptional gene fusion between the plasmid and MudI1734. After transduction of *Escherichia coli* JM83 with phage lysate, the desired clone that had *lacZ* structural gene under the control of *exo* promoter was screened and selected.  $\beta$ -galactosidase was synthesized with the help of *exo* promoter whose activity was about 25-fold less than that of the wild type *lacZ* promoter. The exopolysaccharide concentration of rhizobial culture was 5.85g/liter, and the polysaccharide contained 51.7% of hexose and 45.8% of uronic acid. The increase of shearing stress was accompanied with that of viscosity of polysaccharide solution, and the viscosity of 1.0% solution was 45cp. Addition of calcium chloride did not induce gelling of the polysaccharide.

# I. 서론

생물이 생산하는 고분자 물질을 생물고분자(biopolymer)라 하며, 각종 생물은 유전자로서의 핵산 및 효소로서의 단백질등과 같은 특이한 기능을 갖는 생물고분자를 함유하고 있어서 각종 환경에 적응하며 생활을 유지하고 있다. 그러나 물체를 구성하고 있는 고분자 물질 중에는 이와는 다른 다당류, 당지질 및 당단백질등의 생물고분자도 다량 존재하며, 그 동안은 특정한 생물학적 기능이 확인되지 않았던 이유로 등한시 되어 왔으나 점차 이들 물질 중 많은 것을 생물체에 중요 물질로 인식하기에 이르렀다(이, 1991).

산업에 활용되는 다당류는 주로 식물, 동물 및 미생물에 의하여 생합성되는데, 특히 미생물 다당류나 그 유도체는 이미 알려진 식물, 해조류 유래의 천연 다당류 또는 기타 합성고분자와는 달리 독특한 물성과 생리활성을 나타내며, 생분해되므로 공해가 거의 없는 특징을 갖는다. 미생물 다당류에 관한 연구는 1942년 *Leuconostoc mesenteroides*에서 생산된 dextran이 혈장 증량제로 개발되면서 산업화된 이래 현재까지 다양한 미생물이 생산하는 수백 종 이상의 다당류가 발견되었다. Dextran 등 10여종이 산업적으로 생산 이용되고 있으며(윤, 1991; 이, 1991), 그중 일부를 Table 1에 나타내었다.

이들 미생물이 생산하는 다당류는 세가지 형태 즉, 균체내 다당류(intracellular polysaccharide), 세포벽 다당류(structural polysaccharide) 및 균체외 다당류(extracellular polysaccharide, EPS)로 나누어진다. 균체내 다당류는 주로 에너지의 저장 역할을 하며, PHB(poly- $\beta$ -hydroxybutylate)와 글리코겐이 대표적이다.

Table 1. Microbial extracellular polysaccharides

Polysaccharides	Microorganisms	Characteristics
Pullulan	<i>Aureobasidium</i>	high solubility, non toxicity
	<i>pullulans</i>	pseudoplasticity
Curdlan	<i>Alcaligenes</i>	gel formation upon heating
	<i>faecalis</i>	
Dextran	<i>Leuconostoc</i>	plasticity
	<i>mesenteroides</i>	molecular sieve
Alginate	<i>Azotobacter</i>	Ca <sup>++</sup> -gel formation
	<i>vinelandii</i>	
Xanthan	<i>Xanthomonas</i>	high viscosity, pseudoplasticity
	<i>campestris</i>	stable in wide pH range

세포벽 다당류는 세포벽의 구성성분인 그람 음성 세균의 lipopolysaccharide, 효모의  $\beta$ -glucan이나 곰팡이류의  $\alpha$ -glucan 및  $\beta$ -glucan과 같이 세포의 형태를 유지해 주는 다당류이다. 반면 EPS는 세포벽의 일부로서 세포벽 주위에 협막 (capsule)을 형성하거나 세포벽 외부에 점질물(slime)로서 발효중 축적되는 다당류이며, 미생물의 1차 또는 2차 대사산물이다. 따라서 이들은 물 속에서 심하게 흔들거나, 염용액에 담그면 세포벽으로 부터 분리된다. 그러므로 원심 분리에 의해서 균체와 EPS를 분리할 수 있다(Wilkinson, 1958).



상기 다당류 중에서 EPS는 현실적으로 적절한 균주의 선택 및 배양으로 대량 생산이 가능하며 산업적으로 잠재력이 가장 높다(이, 1991).

EPS의 중요성에도 불구하고 여러가지 EPS의 생합성에 관계되는 생화학적 경로는 많이 알려져 있지 않다. 그러나 생합성 경로를 이해하는 것은 생산수율을 향상시키기 위한 생물공학적 방법의 발견 및 공정의 제어, 그리고 최적화를 위해 필요하다. 일부는 세포밖에서 생합성되지만 대부분은 세포내에서 합성되어 진 후 분비되어 세포밖에서 중합되는 것으로 알려져 있다. EPS의 생합성에 관계되는 효소는 다양하며, 생합성 단계 별로 이들 효소들을 구분하면

- 1) Group I : 기질을 최초로 대사하는데 관계하는 효소(예: hexokinase)
- 2) Group II : sugar nucleotide를 전환시키고 합성하는데 관계하는 효소  
(예: UDP-glucose dehydrogenase)
- 3) Group III : 지질 운반체(lipid carrier)에 다당류 분자를 반복하여 결합하게 하는데 관계하는 효소(예: transferase)
- 4) Group IV : 생물고분자 구조를 형성하는데 관계하는 효소  
(예: translocase 또는 polymerase)

등으로 나눌 수 있다(유, 1987). 이와 같이 EPS의 생합성 단계가 단순하지 않다는 것은 이들의 생합성에 관련된 유전자 또한 다양하다는 것을 시사하고 있으며, 이들 유전인자의 유기적인 발현 여부에 따라 합성되는 EPS의 성질에도 변이가 심할 것이라는 것을 예측할 수 있다. 근류균종, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*에서는 EPS 합성을 저해하는 유전인자 *psi*가 발견되었고(Borthakur 등, 1985; 1987), *Rhizobium* sp. NGR234(Gray, 1990)에서는 *exoX*와 *exoY*가 EPS합성을 제어한다는 것이 확인되었으며(Gray, 1990), *Rhizobium meliloti*에서는 *exoX*와 *exoF*(Zhan, 1990) 그리고 *exoR*과 *exoS*(Doherty, 1988)가 발견되어 이에 대한 활

발한 연구가 이루어 지고 있다. 하지만 *Rhizobium fredii*의 EPS 합성유전자에 대한 연구는 아직까지 발표된 바 없다.

지금까지 분리된 중요 다당류의 생산균주로는 *Xanthomonas*, *Agrobacterium* (Bergmans 등, 1981), *Azotobacter*(Eklund 등, 1966), *Bacillus*(윤, 1991), *Pseudomonas*(Darzins 등, 1985), *Arthrobacter*, *Methylomonas*, *Chromobacterium*, *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Erwinia*속 등의 세균과, *Hansenular*, *Tremela*, *Torulopsis* 등의 효모, *Aerobasidium*, *Sclerotium*, *Fusarium*속 등의 곰팡이가 있다. 이중 세균에 대해서 가장 널리 연구되었고, 효모도 다당류 생성능이 우수한 것으로 알려져 있다. 곰팡이에 의한 다당류 생성은 세균이나 효모에 비해 잘 알려져 있지 않으나, 항종양 작용, 항지혈증 작용, 항염증 작용 등을 나타내는 다수의 다당류가 알려져 있다(이, 1991).

*Rhizobium*속 세균은 콩과식물의 뿌리에 혹을 형성하고, 그 안에서 대기중의 질소를 환원시키는 능력을 가지고 있다. 이들 세균은 과량의 EPS를 생성한다고 오래 전 부터 알려져 왔다(Bergmans 등, 1981; Robertsen 등, 1981; Finan 등, 1984). *Rhizobium*속 세균이 생산하는 EPS로는 저분자량의 글루칸(glucan)과 고분자량의 산성 다당류 그리고 curdlan이 있다. 많은 연구를 통해서 저분자량의 글루칸은 cyclic  $\beta$ -1,2 결합을 하고 있으며, 17~24의 중합도(degree of polymerization)를 가지는 분자량 2,700~3,900 dalton 정도의 화합물로 판명되었다(Geremia 등, 1987; Iannino와 Ugalde, 1989; Amemura, 1984). *R. japonicum*은 분자량 4,500 dalton 이하와 12,000 dalton의 두 종류의 가지가 달린 글루칸을 생산한다. 이 두 글루칸의 연결은 각각  $\beta$ -1,3와 1,6 결합으로 되어있다. 따라서 이들은 다른 *Rhizobium*속 세균에서 발견된  $\beta$ -1,2-D-glucan과는 구별된다(Jansson 등, 1977).

고분자량의 산성 다당류로는 succinoglycan이 있다(Ghai 등, 1981; Reed 등, 1991; Tolmasky 등, 1982). 그 구조적 특성은 *Rhizobium*속 세균간에 많은 유사성을 보여준다. 대부분은 두개의 D-glucuronosyl과 두개의 D-glucopyranosyl 잔기로 구성된 tetrasaccharide를 주쇄(main chain)로 한 것이다. 예외적으로 *R. trifolii*는 heptasaccharide를, *R. phaseoli*는 trisaccharide를 주쇄로 한 다당류를 생산한다.(Sutherland, 1985).

*R. trifolii*의 균주 중에는 주로 curdlan을 생산하는 것이 있다(Ghai 등, 1981). *R. leguminosarum*과 *R. tripolii*의 세포와 밀접하게 결합된 이 다당류는 상온에서 염으로 처리하거나 끓임으로써 추출될 수 있다. 이 중합체는 물에 녹지 않으나 50~55°C 에서 겔(gel)에서 졸(sol)로 상변화 하는 특성을 갖고 있다. 이 다당류는 C<sub>2</sub>와 C<sub>6</sub>위치에 각각 두 개의 측쇄(side chain)를 동반하고 D-glucosyl 잔기를 갖는 특성을 가진 D-glucose:D-galactose:D-mannose의 몰비(molar ratio)가 1:4:1인 중성 중합체로 판명되었다. 이런 점에서 상기 균주는 succinoglycan과 중성 curdlan을 모두 생산하는 *Agrobacterium*과 비슷한 점이 있다(Iannino와 Ugalde, 1989).

여러 종의 *Rhizobium*으로 부터 생산되는 산성 고분자의 다당류는 4-O-methyl-D-glucuronic acid가 *R. trifolii*에서 분리될 때 알려진 바와 같이 O-methyl sugar 원으로 알려졌다(Bailey 등, 1971; Humphrey, 1959). 최근 몇가지 다른 O-methyl sugar가 *Bradyrhizobium* 속으로 부터 분리되었다(Diebold와 Noel, 1989). 그리고 4-O-methyl-D-galactose를 함유한 다당류도 발견되었다. 생합성 기작은 아직 명확하지 않다. 그들이 특수한 sugar nucleotide로써 다당류 합성의 후기 단계에서 단당류의 수식(modification)에 의해 형성되는지는 확실하지 않으나, 중합과정 이후에 부분적인 수식이 이루어 진다고 추론된다(Sutherland,

1985). 또한 몇몇 종의 *Rhizobium*속 세균에 의해서 생산되는 다당류는 galactose, glucose, glucuronic acid와 acyl기로 되어있고, 어쩌면 acetate도 있을 것 같다는 보고가 있다(Carlson과 Yadav, 1985).

이와 같이 다당류의 구조, 물성, 기능의 상호관계가 밝혀지고, 유전자 조작등에 의한 구조의 수식이 가능하게 되어, 바라는 물성을 지닌 다당류를 얻을 수 있는 생물고분자 공학(biopolymer engineering)의 수준까지 이르게 되었다. 유전자 조작연구는 화학구조나 물성이 다른 새로운 다당류의 생산의 수단으로써 뿐만 아니라, 생물고분자의 수율 및 생산성 증대의 관점에서 필요하다(이, 1991).

$\beta$ -galactosidase는 대장균에서 lactose를 glucose와 galactose로 분해하는 역할을 한다. 이  $\beta$ -galactosidase 구조유전자 *lacZ*는 유전자 발현의 효소적 지표로써 다른 유전자의 촉진 유전자와 조절인자에 쉽게 융합될 수 있다. 이러한 융합을 통해서  $\beta$ -galactosidase를 이용한 생화학적 조작과 유전자 조작을 유전자 발현 연구에 이용할 수 있다. 이는  $\beta$ -galactosidase 유전자로 부터 촉진 유전자와 번역 개시 구역(translation initiation regions)을 제거함으로써 이루어진다.  $\beta$ -galactosidase 유전자는 효소 활성에는 아무런 영향을 주지 않고 번역 개시 구역을 제거할 수 있기 때문에 번역(translational) 융합체를 만들기에 편리하다. 유전자 융합에서  $\beta$ -galactosidase 유전자의 번역 개시 구역은 다른 유전자의 촉진 유전자와 번역 개시 구역에 의해서 대체될 수 있다. 그리고 그들은 다른 유전자로부터의 유전 개시 신호를 수용할 수 있다.(Casadaban 등, 1983).

본 연구에서는 *Rhizobium fredii* USDA191으로부터 EPS를 분리하여 그 물리화학적 특성을 조사하였다. 한편으로는 EPS 합성에 관련된 유전자(*exo*)를 분리, 클로닝(cloning)하여  $\beta$ -galactosidase의 구조 유전자와 *exo* 유전자의 촉진 유전자 간에 유전자 융합을 시도하였다. 이는 EPS의 생합성 경로 및 전사조절기구를 연구하는데 기여할 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 균주, DNA 및 배지

*Escherichia coli* HB101은 pBR322 플라스미드 DNA를 증폭시키기 위한 숙주세포 및 일반적인 형질전환 수용체 세포로 사용하였으며, *E. coli* JM83은 *RecA<sup>+</sup> lacZ<sup>-</sup>* 균주로 세균 파아지의 숙주세포로써 형질도입에 사용하였고, *E. coli* POI1734는 MudI1734와 *Mu*ct $s$  파아지를 함유한 균주로 유전자 융합에 사용하였다. MudI1734는 불완전한 *Mu* 파아지로 일명 Mini-*Mu*라고 불리기도 하며, kanamycin내성 유전자와 촉진 유전자가 없는 *lacZ* 구조유전자를 갖고 있다(Fig. 1).

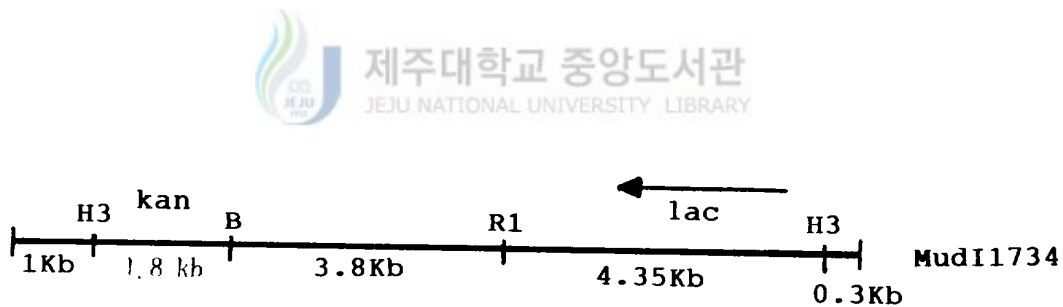


Fig. 1. Restriction enzyme map of mini-*Mu* MudI1734.

R1, EcoRI; B, BamHI; H3, HindII

*Rhizobium fredii* USDA191은 균체의 다당류의 생산에 사용되었으며, *R. fredii* YKL293은 균체의 다당류를 생산할 수 없는 변이주로 *R. fredii* USDA191에 전위 요소(transposon) Tn5가 삽입되어 얻어진 것이다(Ko와 Gayda, 1990). 본 실험에 사용한 *exo* 유전자는 YKL293 균주의 변이부위에 해당하는 것으로, 재조합체 파아지  $\lambda$  NM1149.22E에 클로닝 되어 있다(Fig. 2). 그 크기는 약 3.3 Kb에 상당한다.



Fig.2. Lambda NM1149.22E DNA digested with a restriction enzyme EcoRI.

DNAs were separated on 0.7% agarose gel by electrophoresis.

Lanes A-D, lambda NM1149.22E; lanes I, EcoRI digested lambda

DNA. Bands corresponding 3.3kb are *exo* DNA fragments.

플라스미드 pBR322(Fig. 3)는 *exo* 유전자 Subcloning의 운반체(vector) DNA로 사용되었고(Sambrook 등, 1989), 플라스미드 pRK290(Fig. 4)은 *R. fredii*에 *exo* 유전자를 도입하기 위하여 사용하였다(Ditta 등, 1980). pBR322는 숙주 범위가 좁은 반면에, pRK290은 숙주범위가 넓어서 *R. fredii*에서도 복제 유지될 수 있다.

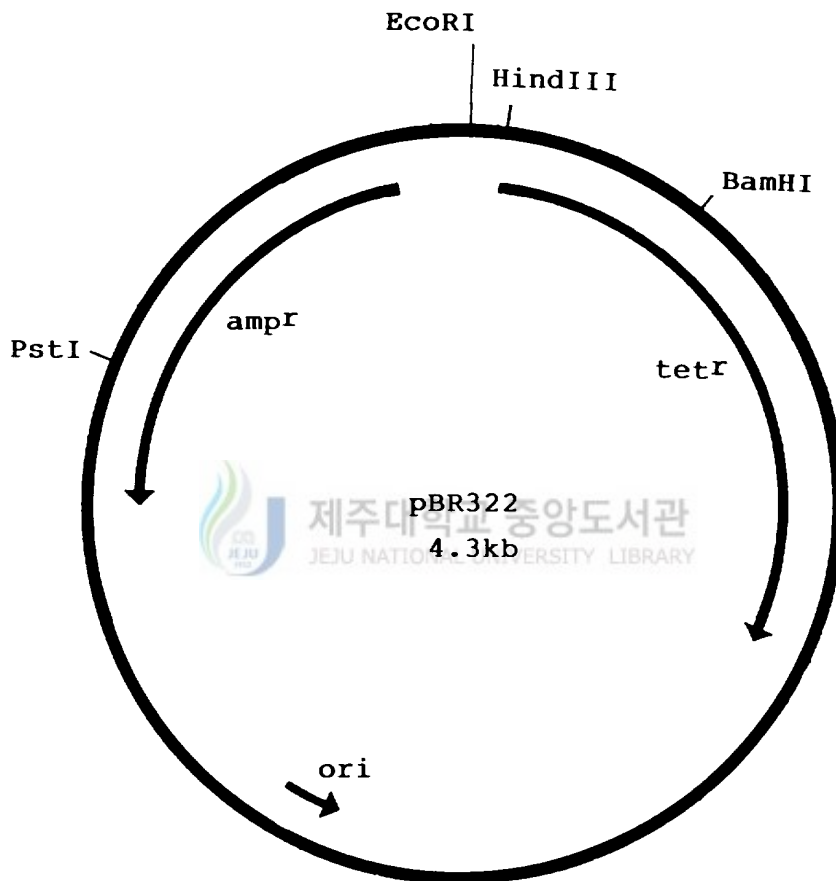


Fig. 3. Restriction enzyme map of plasmid pBR322.

$amp^r$ , ampicillin resistance;  $tet^r$ , tetracycline resistance;  
 $ori$ , origin of replication

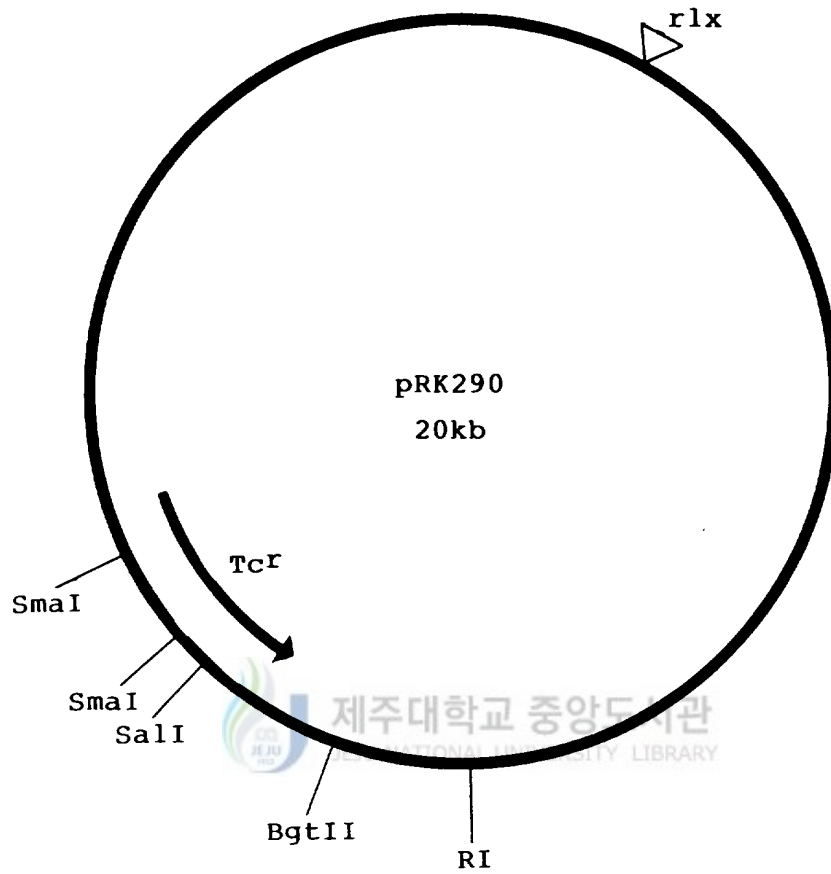


Fig. 4. Restriction enzyme map of plasmid pRK290.

Tc<sup>r</sup>, tetracycline resistance; RI, EcoRI; rlx, relaxed



*E. coli*는 LB(Luria-Bertani)배지를 사용하였으며 1N NaOH를 사용하여 pH를 7.5로 조정시켰다. 항생제로는 Kanamycin(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Tetracyclin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 를 멸균 후 첨가하였다. *R. fredii* 는 Mannitol-Glutamate(MG)배지를 사용하였으며, pH를 6.8로 조절하였다(Robertsen 등, 1981).

각 배지의 조성은 Table 2, 3과 같다.

Table 2. Composition of Luria-Bertani medium

Ingredients	Content
Bacto-trypton	5.0g
Bacto-Yeast extract	2.5g
NaCl	5.0g
Agar	7.5g
H <sub>2</sub> O	500 ml

## 2. 플라스미드(plasmid)의 분리

플라스미드 DNA를 분리할 필요가 있을 경우에는 금탕법에 따랐다(Holmes와

Table 3. Composition of mannitol-glutamate medium

Ingredients	Content	
Mannitol	5g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.01g	
FeCl <sub>3</sub>	0.01g	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05g	
CaCl <sub>2</sub>	0.02g	
Sodium glutamate	0.55g	
Vitamins	Thiamin · HCl	50μg
	Biotin	100μg
Agar	7.5g	
H <sub>2</sub> O	500ml	

Quigley, 1981). 적절한 항생제를 함유한 액체 LB 배지 5ml에 균을 접종하여 37 °C에서 24시간 정도 배양한 후, 4°C 에서 3,000g로 약 10분간 원심 분리하여 배지를 제거하고 집균한 후, 0.35ml 의 STET-2 완충액으로 얼음물에서 현탁하여 20μl의 lysozyme용액을 첨가하여 재빨리 끓는 물에 40초 동안 담근 후, 꺼내서 얼음물에 5분간 담구었다. Pasteur 피펫을 이용하여 Eppendorf 원심 분리관에 옮긴 후, 4°C 12,000g에서 20분 동안 원심 분리하였다. 상등액을 350μl 취하여

새로운 Eppendorf 원심 분리관에 옮기고, 그 상등액에 3M Sodium acetate를 1/10 배 첨가한 후, 원심 분리관 내의 양과 같은 양의 Isopropanol을 가하고, -20°C에서 60분간 방치하여 DNA 침전을 유도하였고, 4°C 12,000g에서 10분간 원심 분리함으로써 침전물을 회수하였다. Isopropanol을 70%의 에탄올로 세척한 다음, DNA 덩어리를 진공 건조하고 Tris-EDTA 완충액에 녹인 후 사용하였다.

### 3. DNA의 절단

DNA를 원하는 모양으로 절단하기 위하여 적절한 제한효소를 선택한 후에 다음과 같이 가수분해시켰다. DNA 10 $\mu$ l에 반응용 완충액 2 $\mu$ l, 제한효소(DNase)1 $\mu$ l, 증류수 7 $\mu$ l를 첨가하여 총량이 20 $\mu$ l가 되게 하였다. 이 혼합물을 잘 섞고 37°C에서 1시간 반응시킨 다음, 68°C의 항온수조에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화 시켰다. DNA 연결 반응에 사용하기 위해서는 페놀, 클로로포름, 그리고 에틸 에테르를 사용하여 DNA를 정제하였고, 전기영동에 의한 분석을 위해서는 4 $\mu$ l의 Loading dye(50% glycerol, 0.25% xylencyanol, 0.25% bromophenol blue 용액)를 첨가하였고, 즉시 사용하지 않을 때는 -20°C에서 냉동보관하였다.

### 4. DNA의 연결(ligation)

DNA 연결효소를 사용함으로써 DNA 분자 간에 또는 분자 내에 5'Phosphate 기와 3'Hydroxyl 기 간에 공유결합을 형성시킬 수 있다.

DNA	40 $\mu$ l
T <sub>4</sub> ligase	10 $\mu$ l
10xligation용 완충액	10 $\mu$ l
증류수	40 $\mu$ l

운반체(vector) DNA와 *exo* 유전자 DNA를 연결하기 위하여 위와 같이 총량이 100  $\mu$ l가 되도록 잘 섞은 다음, 16°C에서 약 12시간 배양하였다. 0.1M ATP를 0.5 $\mu$ l 첨가한 다음, 2~3 시간 다시 배양한 후 65°C 의 항온수조에 5분간 담가 반응을 정지시킨 다음 필요시 까지 -20°C에서 동결 저장하면서 사용하였다.

#### 5. 형질전환(transformation)



형질전환 시키고자 하는 수용체 세균을 LB배지에서 A<sub>650</sub>이 0.3~0.4가 되도록 37°C에서 진탕배양한 다음, 배양액을 20~30 분간 얼음물에서 냉각시켰다. 배양액을 4°C 5,000g에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 버리고 균체 침전물을 취했다. 균체를 차가운 0.1M MgCl<sub>2</sub> 5ml에 현탁시킨 다음, 상기와 같이 원심 분리하고, 이어서 차가운 0.1M CaCl<sub>2</sub> 5ml에 재현탁 시켰다. 20분간 얼음물에 담근 다음 위와 같이 원심분리를 반복하였다. 균체를 차가운 0.1M CaCl<sub>2</sub> 0.75ml로 재현탁시켜서 형질전환에 사용하였다. 위 현탁액 0.2ml와 DNA 10 $\mu$ l를 Eppendorf 원심 분리관에 넣고 얼음물 위에서 조심스럽게 섞었다. 균체와 DNA 혼합물을 30분간 얼

음물 위에 넣어서 완벽하게 냉각시킨 후, 재빨리 37°C의 항온수조에 옮겨서 30초 동안 열충격을 가했다. 다시 2분 30초 동안 42°C의 항온수조에 담구었다가 꺼내어 5분간 얼음물에서 냉각시켰다. 그럼으로써 DNA 분자가 균체내로 들어갈 수 있는 기회가 생긴다. 위와 같이 처리된 원심 분리관에 0.8ml의 10% 글리세롤을 함유한 LB용액을 첨가하여 37°C에서 60분 동안 배양하여 형질발현의 기회를 제공한 후, 적절한 고체평판배지에 도말함으로써 형질전환된 세포를 분리하였다.

#### 6. 형질도입(transduction)과 유전자 융합(gene fusion)

원하는 DNA를 목적하는 세균에 도입하기 위해서는, DNA를 우선 세균 파아지 입자 내에 집어넣고 나서 파아지를 세균에 감염시킴으로써 파아지가 갖고 있는 DNA가 수용체 세포 내로 들어가도록 해야한다. 파아지 입자를 만드는 방법과 파아지를 수용체 세포에 도입시키는 방법은 다음과 같다. 파아지 입자를 만드는 과정 중에 유전자 융합이 일어나도록 하였다.

##### 1) 파아지(phage) 입자의 준비와 유전자 융합

*E. coli* PO11734/pJW33을 5ml의 LB 액체 배지에 접종한 후, 30°C에서 약 12시간 배양하였다. 이 배양액 0.05~0.1ml를 취하여 5ml의 새로운 LB 액체 배지에 접종하였다. 30°C에서 초기 대수기까지 진탕 배양하였다. 다음에 온도를 올려서 42°C에서 20분간 진탕 배양하고 나서, 37°C로 온도를 내려 용균될 때 까지 진탕 배양을 계속하였다. 잔존하는 균체를 마져 파괴시키기 위해서 위 부피의 1/100

정도의 클로로포름을 가하여 잘 섞은 다음, 약 5분간 실온에 방치하였다. 이어서 4°C, 10,000g에서 10분간 원심 분리한 후, 상등액을 취하고 1M MgSO<sub>4</sub> 50μl를 첨가한 후 냉장고에 저장하였다(Finan 등, 1984).

## 2) 형질도입

수 많은 파아지 입자 중에서 원하는 재조합체 파아지를 분리하기 위해서 형질도입을 시도하였다. 5ml의 LB 액체 배지에 숙주세포 *E. coli* JM83을 접종한 후, 37°C에서 하룻밤 진탕 배양하였다. 이 배양액에 MgSO<sub>4</sub>가 0.01M이 되도록, 그리고 CaCl<sub>2</sub>는 0.005M이 되도록 첨가하였다. Table 4와 같이 4개의 시험관을 준비하고 숙주세포와 파아지 입자를 함유한 용균액을 섞었다.

Table 4. Transduction experiments

Test Tube No.	Culture of JM83	Lysate of P011734/pJW33
1	0.1ml	0.1ml undiluted lysate
2	0.1ml	0.1ml 10 <sup>-1</sup> dilution
3	0.1ml	0.0ml lysate
4	0.0ml	0.1ml undiluted lysate

이들을 잘 혼합한 후, 30°C에서 20분간 정치배양하였다. 유전자의 발현을 위하여 10ml의 LB 배지를 각 시험관에 첨가한 후, 30°C에서 30분간 진탕 배양하였다. 원심 분리에 의해 세포를 집균한 다음, 0.1ml의 LB 배지에 재현탁 시켰다. X-gal과 kanamycin 그리고 carbenicillin을 함유한 LB 평판 배지에 위의 시료를 평판도말 배양하여 푸른 색을 나타내는 형질도입체를 분리해 내었다.

#### 7. 아가로스 겔(agarose gel) 전기영동

DNA를 분석하기 위해서 아가로스 겔 전기영동법을 사용하였다. 7% 아가로스 겔을 사용하였으며, 완충액은 TBE(Tris-borate-EDTA)를 사용하였다. 전개가 끝난 후 DNA의 검색은 형광물질인 Ethidium bromide를 첨가하여 염색한 후 자외선 하에서 행해졌다.



#### 8. $\beta$ -galactosidase 활성 측정

Miller의 방법(Sambrook 등, 1989)에 준해서 다음과 같이  $\beta$ -galactosidase의 활성을 측정하였다. 균체를 적절한 LB배지에서 약 12시간 배양한 후, 그 배양액의 일부를 취하여 새로운 배지에 접종해서 A<sub>600</sub>이 0.4가 될 때 까지 다시 배양하였다. 위 배양물 0.1ml에 0.9ml Z 완충액과 클로로포름 2방울, 0.1% SDS 1방울을

혼합하고 10초 동안 잘 섞은 다음 28°C에서 안정화시켰다. 거기에 0.2ml의 o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(4mg/ml)를 첨가하고, 노란색이 나타나면 0.5ml의 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 첨가하여 반응을 중지시키고 그때까지 소용된 시간을 측정하였다. 이어서 420nm와 550nm에서의 흡광도를 측정하여 β-galactosidase의 활성을 다음과 같이 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{unit of } \beta\text{-galactosidase Activity} \\ & = 1000 \times \frac{A_{420} - (1.75 \times A_{550})}{t \times 0.1 \times A_{600}} \end{aligned}$$

t=time, min

A<sub>600</sub> : absorbance of cultures at 600nm

A<sub>550</sub>, A<sub>420</sub> : absorbance of reaction samples at 550 and 420 nm



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

## 9. 균체외다당류의 분리

MG 배지에서 *R. fredii* USDA191을 배양한 후 배양액에 동량의 1N NaOH 용액을 가하여 잘섞은 후 1N HCl로 pH가 7.0이 되도록 중화 시켰다. 10,000g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하고, 여기에 2배 량의 에타놀을 가해서 다당류를 침전시켰다. 덩어리져서 석출된 다당류를 취해서 물과 에타놀의 혼합용액(1:2)으로 세척한 다음 실온에서 진공건조시킨 후 분석에 사용하였다.



## 10. 균체의 다당류의 건조 및 수율계산

다당류의 수율 및 배양액중의 농도를 계산하기 위해서, 분리된 다당류를 105℃에서 항량(恒量)이 될 때까지 상압건조시켰다. 그로부터 기질탄소원에 대한 수율 및 배양액 중의 농도를 계산하였다.

## 11. 6탄당(hexose)의 정량

6탄당의 정량은 Anthrone 방법(Morris, 1948)으로 측정하였다. 진한 황산에 Anthrone을 용해시켜 2%가 되도록하여 사용하였다. 6탄당을 100~200 $\mu$ g을 함유하는 용액 2ml를 조심스럽게 4ml의 Anthrone용액과 혼합시키고, 끓은 물에서 16분 동안 가열한 후 실온으로 냉각시켰다. 620nm에서 흡광도를 측정하여 비색법으로 정량하였으며, 당표준물질로는 포도당을 사용하였다(Fig. 5).

## 12. 우론산(uronic acid)의 정량

다당류중의 우론산은 Carbazole시약(Dische, 1962)을 사용하여 다음과 같이 정량하였다. Carbazole시약은 에타놀에 녹여서 0.1%가 되도록하였다. 5~100 $\mu$ g의

Hexuronic acid를 함유한 시료 1ml에 진한황산 6ml를 가한 다음 실온이 될 때까지 흐르는 수돗물에 식혔다. 이어서 반응혼합물을 끓는 물에서 20분간 증탕하고 다시 실온까지 냉각시켰다. 다음에 0.1%의 Carbazole 용액 0.2ml를 첨가하여 실

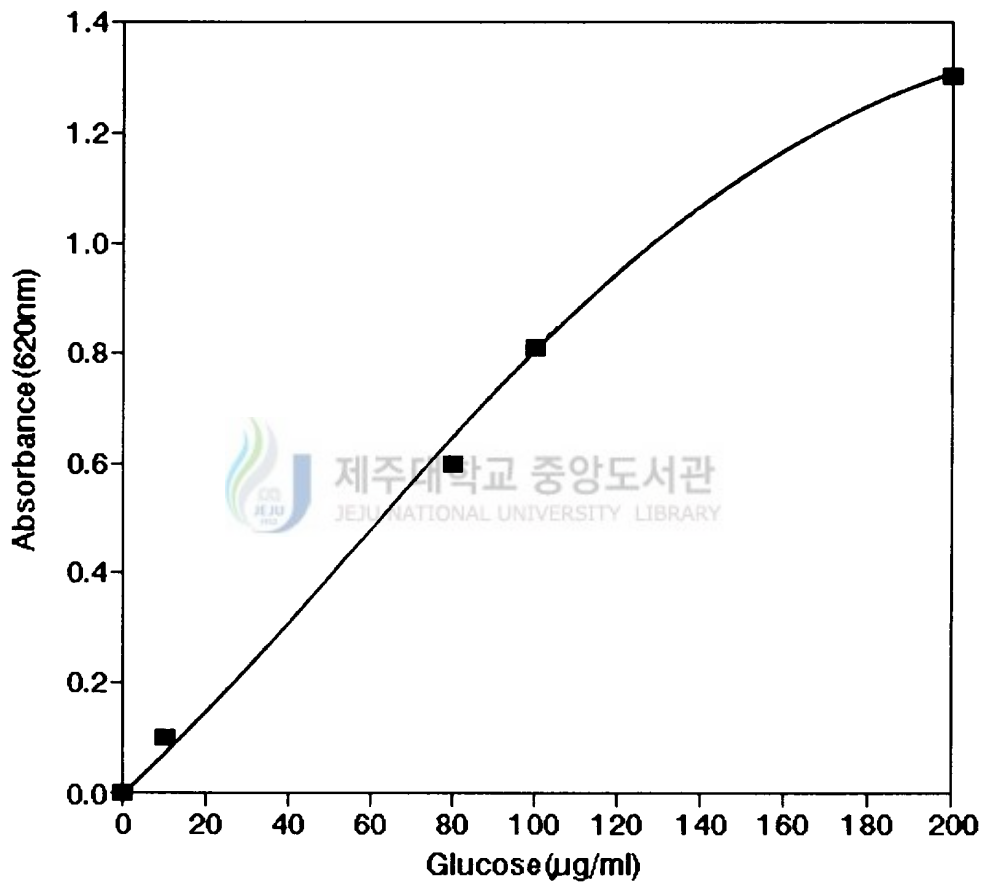


Fig. 5. Standard curve of glucose by anthrone method

온에서 2시간 동안 발색시켰다. Hexuronic acid 용액에서 나타난 진홍색을 535nm에서 흡광도를 측정함으로써 비색법으로 정량하였다. 당 표준물질로는 Galacturonic acid를 사용하였고, 시료중에 들어있는 6탄당의 간섭현상을 제거해 주기 위해서 포도당을 표준물질로 해서 실측치에서 감해주었다(Fig. 6).

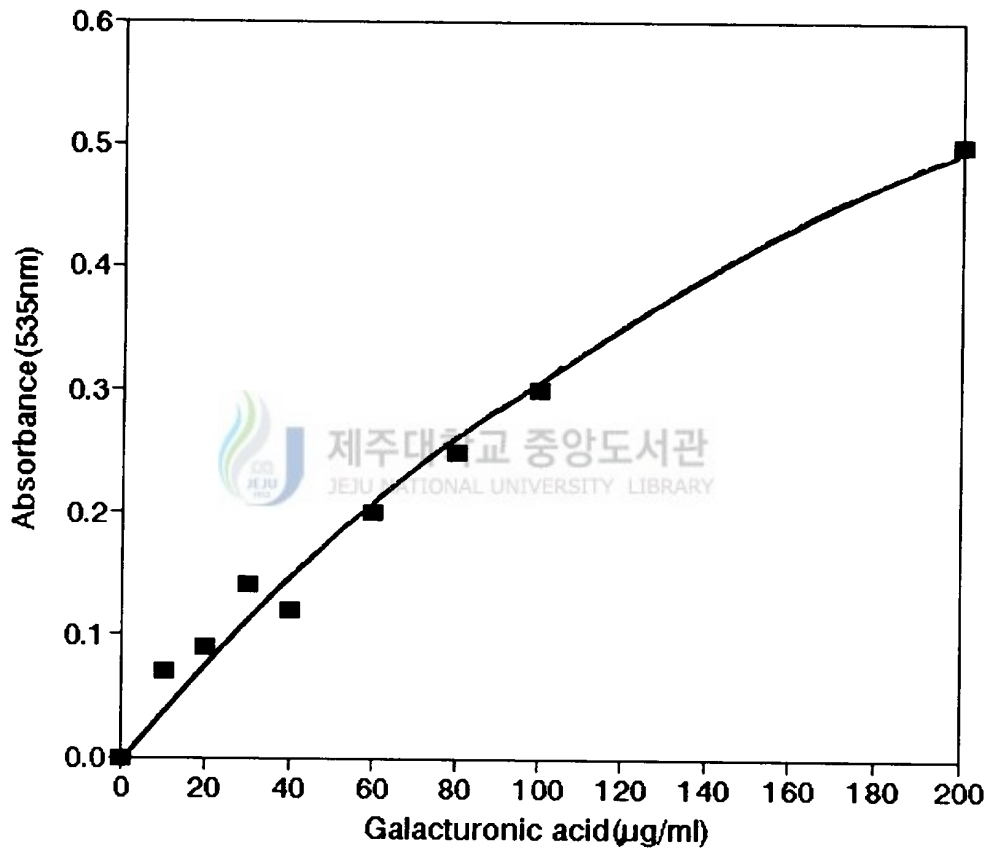


Fig. 6. Standard curve of galacturonic acid by carbazole method

### 13. 총당분석

시료 다당류중의 총당함량은 페놀-황산법(Hodge와 Hofreiter, 1962)에 준해서 실시하였다. 당을 10-70 $\mu$ g을 함유하는 액상의 용액 1ml를 1ml의 5% 페놀용액과 잘 혼합한다. 거기에 5ml의 진한 황산을 잘 섞이도록 첨가한다. 실온에서 30분 동안 발색시킨 후 나타난 등황색의 흡광도를 490nm에서 측정함으로써 비색정량하였다. 당표준물질로는 포도당을 사용하였다(Fig. 7).

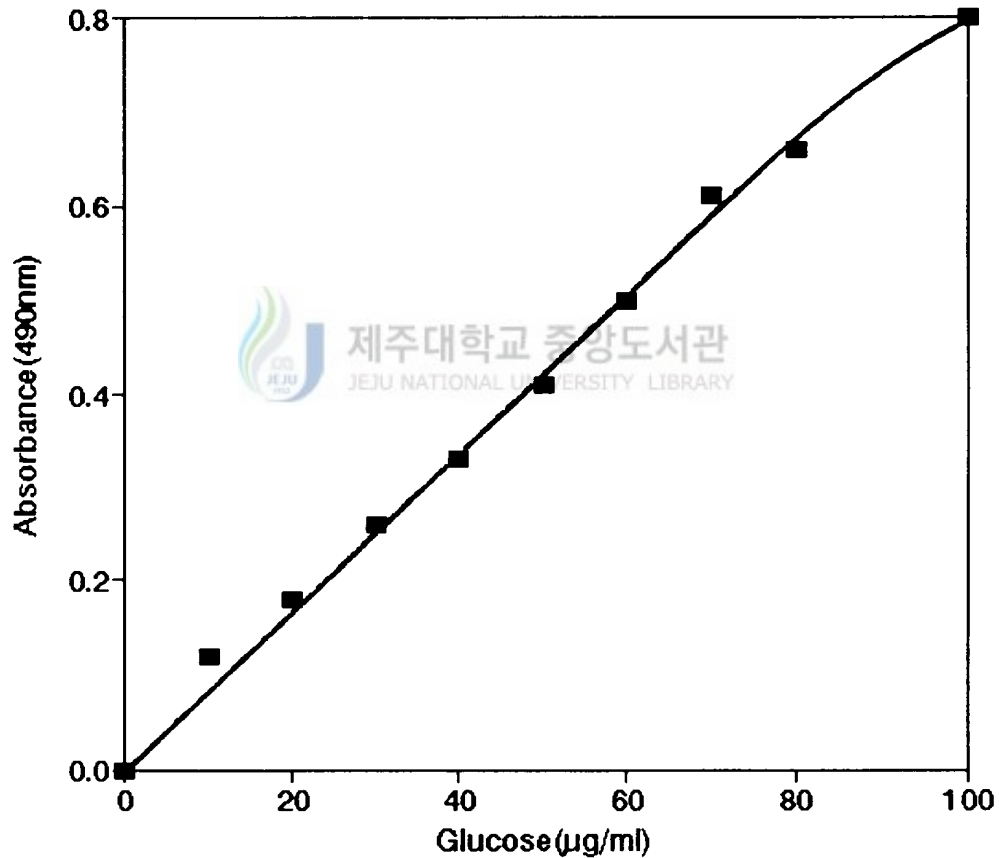


Fig. 7. Standard curve of glucose by phenol-sulfuric acid method

#### 14. 점도측정

다당류의 농도를 변화시켜 가면서 그에 따른 점도의 변화를 Ostwald 점도계 (Witeg, West Germany)를 사용하여 측정하였고, 회전 점도계(Tokimec, Inc., Japan)를 사용하여 회전속도에 따른 점도의 변화도 측정하였다.

#### 15. Ca-겔(gel) 형성능

다당류가  $Ca^{++}$ 에 의해서 겔화되는지의 여부를 확인하기 위하여 다음과 같이 분석하였다. 적절한 농도의 당용액을 1.0ml씩 원심 분리관에 취하고, 농도가 다른  $CaCl_2$  용액을 0.1ml씩 각각의 시험관에 가해서 잘 섞은 후 12,000g에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 취해서 전술한 페놀-황산법에 따라 당농도를 비교 분석하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. *R. fredii* USDA191의 *exo* 유전자와 $\beta$ -galactosidase 유전자의 융합

균체의 다당류를 다량으로 생산분비하는 *R. fredii* USDA191에 의한 다당류 생합성 기작을 연구하기 위한 일환으로, 다당류 합성에 필수적인 유전자 *exo*가 클로닝되었고, 이 유전자의 전사조절 기작에 관한 연구를 수행하기 위하여 *exo* 유전자의 촉진 유전자와 촉진 유전자가 없는 *lacZ* 구조 유전자를 융합시키고자 하였다. 그렇게 되면,  $\beta$ -galactosidase의 활성을 측정함으로써 *exo* 유전자의 전사여부를 간접적으로 판별할 수 있기 때문이다.

#### 1) *Exo* 유전자의 확인

클로닝된 3.3Kb에 상당하는 *exo* 유전자가 과연 *R. fredii*에서 유래한 야생형 유전자인지 확인하기 위하여, 3.3Kb EcoRI 조각을 플라스미드 pRK290과 공유결합시킨 후 *E. coli* HB101을 형질전환시키고, Tetracycline 내성 균주들을 분리해 내었다. 이들 균주로부터 플라스미드 DNA를 분리하고 제한효소 EcoRI으로 절단한 후 아가로스 겔 전기영동에 의하여 3.3Kb EcoRI 단편을 함유한 형질전환체를 찾아내었다. pEC293(Fig. 8)은 이렇게 해서 얻어진 재조합체로 약 20Kb에 상당하는 pRK290 운반체(vector) DNA 조각과 3.3Kb에 상당하는 *exo* 유전자 조각을 갖고 있음을 알 수 있다. 플라스미드 pEC293을 다당류 결핍변이주 YKL293에 도입하기 위하여, HB101(pEC293)과 YKL293간의 접합에 Helper cell로 HB101(pRK2013)을

이용하는 Triparental mating이 실시되었다. 이들 세포의 혼합물을 Nalidixic acid, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline을 함유한 한천배지 상에서 배양하여 자라는 콜로니를 검색한 결과 균체외다당류 합성능이 야생형과 별다른 차이점이 없음을 확인할 수 있었다.(Fig. 9). 즉, YKL293균주의 체외다당류 결핍성이 3.3Kb EcoRI DNA 조각에 의하여 복구되었다.

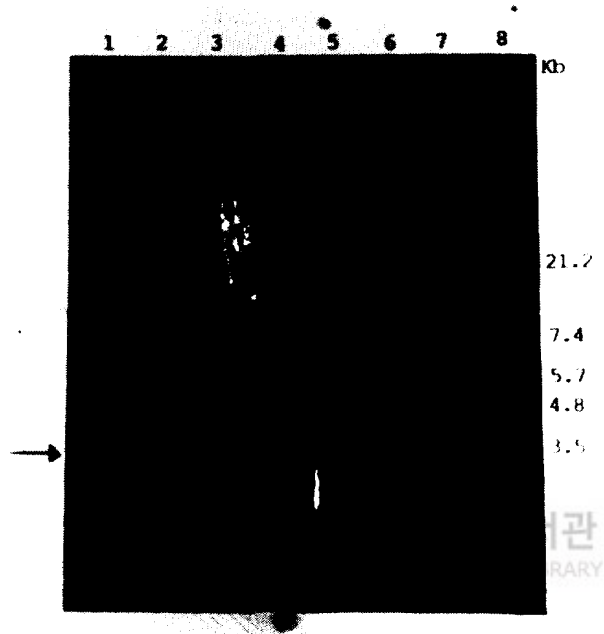


Fig. 8. Recombinant plasmid pEC293 DNA.

DNAs were separated on 0.7% agarose gel.

lanes 3/8, lambda DNA cut with EcoRI; lane 1, pRK290 cut with EcoRI;

lane 2, lambda NM1149.22E DNA cut with EcoRI; lane 4/6, pEC293 cut

with EcoRI; lane 4/6, pEC293 cut with EcoRI; lanes 5/7, pEC293

uncut. Arrow head indicates the position of 3.3 Kb DNA fragment generated by EcoRI digestion.



Fig. 9. Complementation of exopolysaccharide deficiency in *R. fredii* by recombinant plasmid pEC293.

Bacterial cells were grown in MG agar medium for 3 days at 27°C.

A, YKL999, wt; B, YKL293, *exo*<sup>-</sup> mutant; C, YKL293/pEC293



## 2) *Exo* 유전자의 Subcloning

$\lambda$  NM1149.22E에 클로닝 되어있는 3.3Kb에 해당하는 *exo* 유전자(Fig. 2)를 EcoRI으로 잘라내어 동일효소로 절단된 pBR322에 연결 시킨후, *E. coli* PO11734를 형질전환시켜 Kanamycin과 Carbenicillin에 내성인 균주들을 분리하였다. 그중 *exo* 유전자와의 재조합체 pBR322를 함유한 균주를 검색하기 위하여 각개의 균주로 부터 플라스미드 DNA를 분리하고, 제한효소 EcoRI으로 절단한 다음 아가로스 겔 상에 전기영동시킨 결과는 Fig.10.과 같다. 재조합체 플라스미드 pJW33은 EcoRI으로 절단됐을 때 운반체 DNA pBR322에 해당하는 4.3 Kb DNA 조각과 *exo* 유전자의 3.3 Kb DNA 조각으로 나누어짐을 알 수 있다.

## 3) 유전자 융합

*exo* 유전자의 촉진 유전자  $\beta$ -galactosidase의 구조 유전자 사이에 전사수준 유전자 융합(transcriptional gene fusion)을 유도하기 위한 실험 결과는 다음과 같다. 재조합체 pJW33을 함유한 *E. coli* PO11734를 가열 배양하여 파이지 입자들의 복제를 유도해서 얻어진 용균액을 사용하여 *E. coli* JM83를 형질도입시켰다. 한천 고체배지에서 배양했을 때, Kanamycin과 Carbenicillin에 내성인 균주들을 고르고, 그 중에서 X-gal을 분해시켜 파란색을 나타내는 콜로니를 선택했다(Fig. 11). 상기 푸른색을 나타내는  $\beta$ -galactosidase를 생성하는 균주에서 원하는 바대로 *exo* 유전자의 촉진 유전자 아래 바르게 유전자 융합이 일어났는지를 확인하기 위해서, 이 균주를 배양한 후 플라스미드 DNA를 분리하여 적절한 제한효소로 절단하고 전기영동을 실시해서 확인한 결과(Fig. 12) pJM21은 *exo* 유전자 내의 미확인 촉진 유전자 부위에 MudI1734가 융합된 재조합체 DNA로 나타났다. 상기 전기영동 사진을 근거로하여 이 유전자 융합체 DNA의 제한효소 지도를 작성

하면 Fig. 13의 제한효소지도와 같다.



Fig. 10. Recombinant plasmid pJW33 DNA.

DNAs were separated on 0.7% agarose gel.

lane A, EcoRI digested; lane B, undigested; lane C, lambda DNA standard



Fig. 11. Degradation of X-gal on agar plates by transductants.

Bacterial cells were grown in LB containing IPTG and X-gal.

Blue color develops when X-gal is degraded.

A, *E. coli* LE392; B, *E. coli* JM83; C, *E. coli* JM83/pUM21

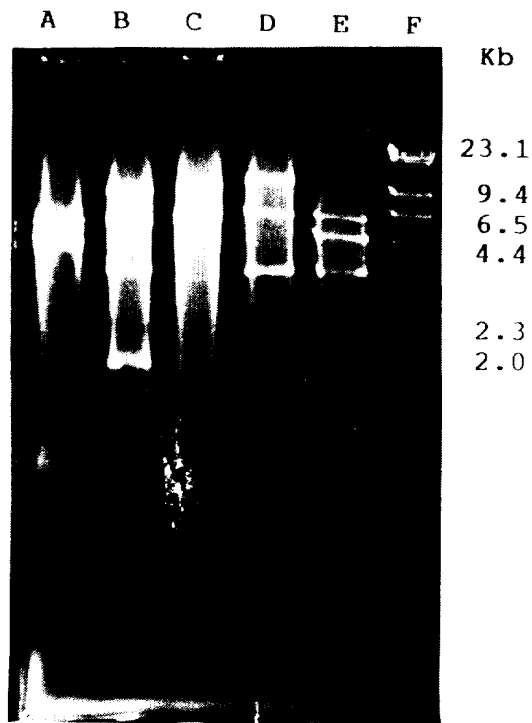


Fig. 12. Restriction analysis of plM21 on agarose gel.

Plasmid DNAs were digested with several restriction enzymes and then separated on 0.7% agarose gel.

lane A, double digested with EcoRI/BamHI; lane B, double digested with BamHI/HindIII; lane C, digested with BamHI; lane D, digested with HindIII; lane E, double digested with EcoRI and HindIII; lane F, lambda DNA standard digested with HindIII

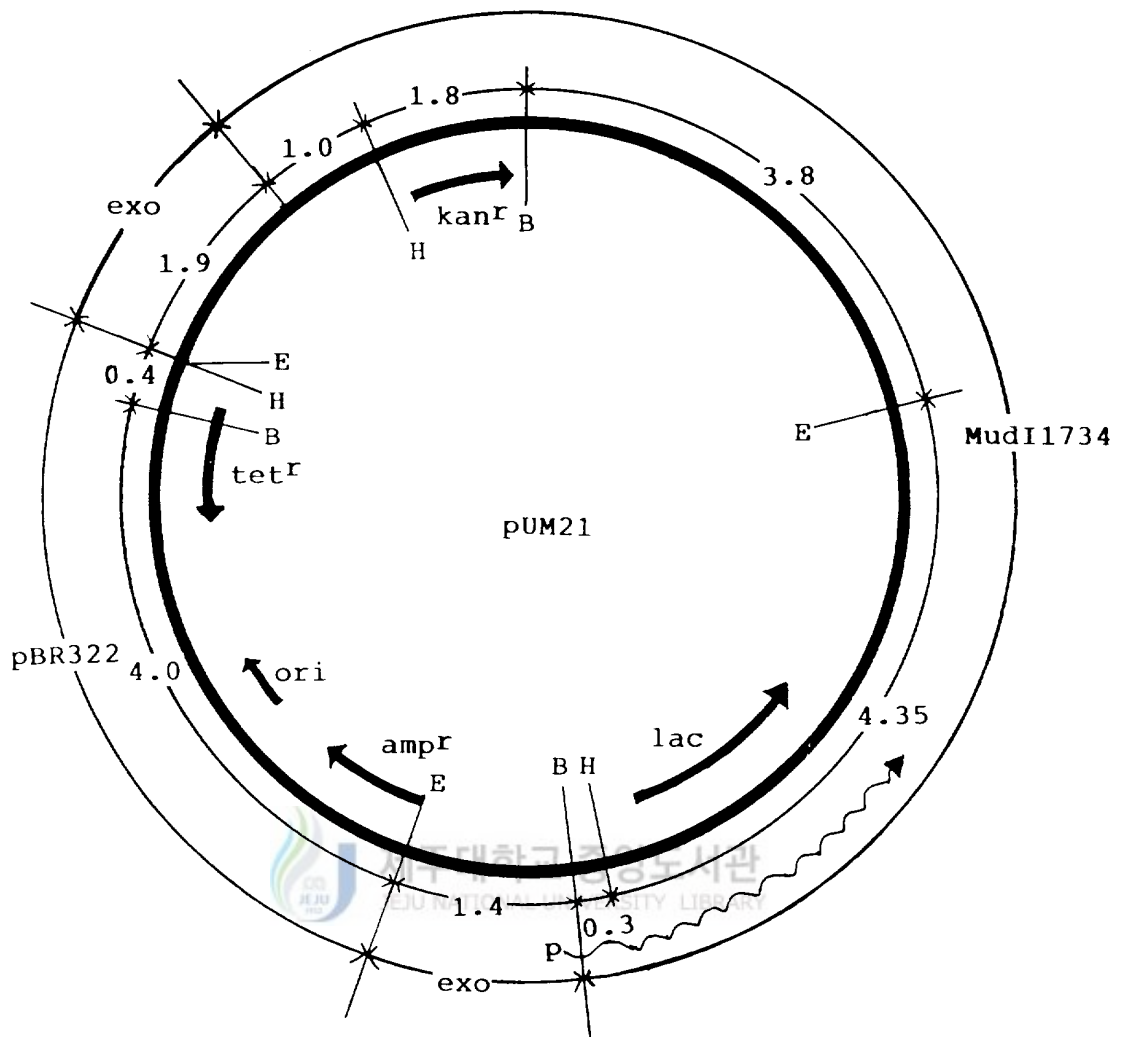


Fig. 13. Restriction enzyme map of plasmid pUM21

This map was derived from restriction analysis as shown in Fig.9.

kan<sup>r</sup>, kanamycin resistance: lac, lac gene: amp<sup>r</sup>, ampicillin  
 resistance: ori, origin of replication: tet<sup>r</sup>, tetracycline  
 resistance: E, EcoRI: H, HindIII: B, BamHI: P, promoter

#### 4) 촉진유전자(promoter)의 활성 측정

*exo* 유전자의 촉진 유전자가 어느 정도의 활성을 나타내는지 확인하기 위해서  $\beta$ -galactosidase의 역가를 측정한 결과 다음과 같다( Table 5). *E. coli* JM83는 *lacZ*유전자가 결실된 숙주세포이고, LE392는 야생형 *lacZ*유전자를 갖고 있어서 양성 대조구로 사용되었다. 형질전환체 *E. coli* JM83/pUM21의  $\beta$ -galactosidase 역가는 JM83에 비해서 7~10배 이상으로 나타났고, LE392에 비해서는 25배 정도 낮은 것으로 나타났다. 이는 *R. fredii*에서 유래된 *exo* 유전자의 촉진 유전자가 원래의 *lacZ* 촉진 유전자에 비해서 일단은 활성이 낮은 것으로 보인다. 그러나 *exo* 유전자의 촉진 유전자가 최소한 *E. coli*에서는 활성을 나타내는 것으로 나타났으므로 이 유전자 융합체를 이용해서 *R. fredii*의 균체의 다당류 합성 및 조절 기작을 밝히는데 도움이 되리라고 생각된다. *R. fredii* USDA191 자체에 내재하는  $\beta$ -galactosidase는 없으므로, pUM21에 들어 있는 유전자 융합체를 *R. fredii*에 옮긴다면 보다 더 유용한 다당류 합성에 관한 정보를 얻을 수 있다. Table 5에 나타난 결과를 놓고 볼 때 유도물질인 IPTG는 LE392에서는  $\beta$ -galactosidase의 합성을 증가시키지만, *E. coli* JM83/pUM21에서는 효과가 없는 것으로 나타나, 두

Table 5.  $\beta$ -galactosidase activity of several strains

Strains	<i>E. coli</i> JM83		<i>E. coli</i> LE392		<i>E. coli</i> JM83/pUM21		<i>R. fredii</i> YKL293	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Activity	9	6	1590	844	64	60	0	0

균주의 촉진 유전자 간에 차이점이 있을 수 있다는 것을 시사하고 있다.

세포수준에서 *Rhizobium* 속에 의한 EPS 생성능은 탄소원, 질소원등의 배지조성(Sutherland, 1985)과 산소분압(Tully와 Terry, 1985)에 의하여 영향을 받는다는 사실이 밝혀졌다. 그러나 EPS 합성 유전인자의 발현이 주위환경에 의해서 어떻게 조절되는지 밝혀지지 않고 있다. 이런 조절기작을 찾아내는데 이 연구 결과 얻어진 유전자 융합체가 유용하게 쓰일 것이다.

## 2. *R. fredii* USDA191이 생산하는 균체외 다당류의 성질

### 1) 배양시의 수율

미생물을 배양하여 다당류를 생산하고자 할 때 최종 배양액의 당농도는 현실적으로 매우 중요한 의미를 갖는다. *R. fredii*를 MG배지에서 배양한 후 배양액으로부터 다당류를 분리 정제하여 건조중량을 계산하고 당농도를 계산한 결과 최종 배양액의 당농도는 약 5.85g/l였다. 원료 탄소원에 대한 수율은 Mannitol을 기준으로 0.585였다.

### 2) 다당류의 조성

분리, 정제된 다당류의 화학적 조성을 밝히기 위한 시도로 6탄당과 우론산을 각각 비색 정량한 결과 Table 6에 나타낸 바와 같이 약 51.7%의 6탄당과 45.8%의 우론산을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 페놀-황산법에 의해서 총당을 정량한 결과는 건조량의 약 60%만이 감지되었다. 따라서 Table 6의 결과를 해석하는데

있어서 주의할 점은 *R. fredii*가 생산하는 균체외다당류의 구성분의 다양성과 비색법에 의한 당 정량시 표준 물질로 사용한 당간에 정확한 비례관계가 성립하지 않는 점이다. 따라서 보다 정확한 다당류의 조성을 파악하기 위해서는 HPLC나 GC와 같은 방법등 보다 좋은 분석 방법을 사용해야 될 것으로 판단된다.

Table 6. Composition of exopolysaccharides produced by *R. fredii*

Components	Hexose	Uronic acid	Total sugar
Percentage	51.7	45.8	60



### 3) 다당류의 점성

점성은 분자량이나 형태등에 의해서 좌우되는 것으로, *Rhizobium*속 세균이 생산하는 다당류의 분자량을 Alginate, Xanthan gum, Dextran과 비교할 수 있다. 본 실험에서는 수용액에서의 물성에 초점을 맞추어 전단응력(Table 7)과 농도(Table 8)의 변화에 따른 점성의 변화를 측정하였다. 전단응력의 변화에 따라 점도가 증가하는 Dilatant 유체의 성질을 나타낼 것으로 보이며, Table 8에 나와 있는 바처럼 농도의 변화에 따라 점도가 급격히 감소하는 성질을 갖고 있었다. Table 9에는 다른 다당류와의 점도를 비교하고 있다. 근류균이 생산하는 다당류의 점도가 1% 용액을 기준으로 약 45cp인데 비해서 다른 다당류의 점도는 상대적



으로 매우 높아서 분자량이 작을 것으로 생각된다. 실질적으로 점도와 분자량의 관계로 부터 Table 9의 결과를 이용하여 본 연구에 사용된 다당류의 분자량을 계산해 낼 수도 있다.

Table 7. Viscosity of exopolysaccharide solution

Shearing stress(rpm)	12	30	60
Viscosity(cp)*	2.5	3.0	4.7

\*Viscosity was measured at 15°C using rotational viscometer.

Exopolysaccharide concentration was  $1.2 \times 10^{-3}\%$ .

#### 4) 다당류의 Ca-겔(gel) 형성능

당 농도 약  $70\mu\text{g}/\mu\text{l}$  수준의 수용액에 일정량의  $\text{CaCl}_2$  용액을 가하면서 겔 형성 여부를 측정 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 최종  $\text{CaCl}_2$  농도를 0.0%에서 1.0% 까지 변화시켜 보았으나, Table 10에 나타낸 바와 같이 다당류 겔 형성을 탐지할 수 없었다. 즉  $\text{Ca}^{++}$  의 매개로 다당류분자간에 이온결합이 형성되어 침전되는 현상이 관찰되지 않았다. 다당류의 농도 및  $\text{CaCl}_2$  농도를 Table 10에 나와 있는 것과 다른 수준으로 바꾸었을 때도 마찬가지로의 결과를 얻었으며, 육안 검사에서도 겔 형성이 관찰되지 않았다.

Table 8. Effects of exopolysaccharide concentration on viscosity at 25°C

Concentration (%)X10 <sup>3</sup>	1000.000	100.000	60.000	30.000	15.000	7.500	3.750	1.875
Viscosity(cp)	45.51*	7.55*	5.07	3.07	1.72	1.37	1.18	1.09

Viscosity was measured at 25°C with an Ostwald viscometer.

\* Viscosity was calculated using the formula(Barrow, 1973),  $K=AP^B$  where K, viscosity(cp); P, concentration(g/l); A & B, constants.

Table 9. Comparison of viscosity in solutions

Polysaccharide	Viscosity(cp) of 1% solution
Rhizobial exopolysaccharide	45.51
Pullulan	100
Xanthan	1800
Gellan	200
<i>M. mucosa</i> * polysaccharide	500
<i>M. organophilum</i> ** polysaccharide	18000

\* *Methylomonas*, \*\* *Methylobacterium*

Table 10. Ca-gel forming ability of rhizobial exopolysaccharides

CaCl <sub>2</sub> concentration(%)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Polysaccharides in supernatant (%)*	100.0	102.6	96.5	98.3	103.5	103.5
Gel forming ability	-	-	-	-	-	-

\* The concentrations of polysaccharides left in the supernatant were determined after centrifugation, and compared with those when CaCl<sub>2</sub> was not added.

## N. 요약

*Rhizobium fredii* USDA191이 생산하는 균체의 다당류를 이용하기 위해서는 그 합성 및 생산 조절기작에 대한 연구와 성질에 대한 분석이 필요하다. *R. fredii*의 다당류 합성 유전자(*exo*)를 분리하여 그 유전자의 전사조절기작에 대한 연구를 시도하였다. 클로닝된 *exo* 유전자를 pBR322 플라스미드에 옮긴 다음, Mud11734와의 유전자 융합을 시도하여 *lacZ* 구조유전자가 *exo* 유전자의 촉진 유전자 영향 아래 전사되도록 하였다. *R. fredii*에서 유래한 *exo* 유전자의 촉진 유전자는 *Escherichia coli*에서 활성을 나타내는 것으로 나타났으며,  $\beta$ -galactosidase의 역가로 볼 때 야생형 *lacZ*의 촉진 유전자보다는 활성이 25배 정도 낮은 것으로 나타났다. *R. fredii*의 배양액중 당농도는 5.85g/l였고, 다당류의 조성 및 물성을 분석한 결과 51.7%의 6탄당과 45.8%의 우론산을 함유하고 있었다. 다당류 수용액의 점도는 전단응력과 더불어 증가하였고, 1.0% 수용액은 약 45 cp의 점도를 갖고 있었다. 1.0% 수준까지 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여도 다당류는 겔을 형성하지 않았다.

## V. 참고 문헌

- Amemura, A. 1984. Synthesis of (1→2)- $\beta$ -D-glucan by cell-free extract of *Agrobacterium radiobacter* IFO 12665b1 and *Rhizobium phaseoli* AHU 1133. *Agric. Biol. Chem.*, 48. 1809-1817.
- Bailey, R. W., R. M. Greenwood, and A. Craig. 1971. Extracellular polysaccharides of *Rhizobium* strains associated with lotus species. *J. Gen. Microbiol.*, 65. 315-324.
- Barrow, G. M. 1973. Physical chemistry, third edition. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd. p.747-749.
- Bergmans, H. E. N., I. M. van Die, and W. P. M. Hoekstra. 1981. Transformation in *Escherichia coli*: Stages in process. *J. Bacteriol.* 146. 564-570.
- Borthakur, D., J. A. Downie, A. W. B. Johnston and J. W. Lamb. 1985. *psi*, a plasmid-linked *Rhizobium phaseoli* gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 200. 278-282.
- Borthakur, D. and A. W. B. Johnston. 1987. Sequence of *psi*, a gene on the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli* which inhibits exopolysaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by *psr*, another gene on the symbiotic plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 207. 149-154.

- Carlson, R. W. and M. Yadav, 1985. Isolation and partial characterization of the extracellular polysaccharides and lipopolysaccharides from fast-growing *Rhizobium japonicum* USDA205 and its *nod*<sup>-</sup> mutant, HC205, which lacks the symbiotic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 50. 1219-1224.
- Casadaban, M. J., A. Martinez-Arias, S. K. Shapira, and J. Chou, 1983.  $\beta$ -galactosidase gene fusion for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods in Enzymology*, 100. 293-308.
- Darzins, A., S. K. Wang, R. I. Vanags, and A. M. Chakrabarty, 1985. Clustering of mutations affecting alginic acid biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 164(2). 516-524.
- Diebold, R. and K. D. Noel, 1989. *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: Biochemical and genetic analyses and symbiotic behavior on tree hosts. *J. Bacteriol.*, 171(9). 4821-4830.
- Dische, Z. 1962. Color reactions of hexuronic acids in *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Vol. 1, pp. 497-499. ed. by Roy L. Whistler, M.L. Wolfrom, James N. Bemiller, and F. Shafizadeh, Academic Press, Inc. New York.
- Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski, 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77. 7347-7351.
- Doherty, D., J. A. Leigh, J. Glazebrook, and G. C. Walker, 1988. *Rhizobium*

- meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic Calcofluor-binding exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 170. 4249-4256.
- Eklund, C., L. M. Pope, and O. Wyss. 1966. Notes: Relationship of encapsulation and encystment in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.*, 92(6). 1828-1830.
- Finan, T. M., E. Hartwig, K. Lemieux, K. Bergman, G. C. Walker, and E. R. Signer. 1984. General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 159(1). 120-124.
- Geremia, R. A., S. Cavaignac, A. Zorreguieta, N. Toro, J. Olivares, and R. A. Ugalde. 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective Pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)glucan. *J. Bacteriol.* 169(2). 880-884.
- Ghai, S. K., M. Hisamatsu, A. Amemura, and T. Harada. 1981. Production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.*, 122. 33-40.
- Gray, J.X., M. A. Djordjevic, and B. C. Rolfe. 1990. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. *J. Bacteriol.* 172. 193-203.
- Hodge, J.E. and B.T. Hofreiter. 1962. Determination of reducing sugars in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 1. pp. 388-389, ed. by Roy L. Whistler, M.L. Wolfrom, James N. Bemiller, and F.

- Shafizadeh. Academic Press, Inc. New York.
- Holmes, D. S. and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. biochem.*, 114. 193-197.
- Humphrey, B. A. 1959. Occurrence of 4-O-methyl glucuronic acid in *Rhizobium gums*. *Nature*, 184. 1802.
- Iannino, N. I. and R. A. Ugalde. 1989. Biochemical characterization of avirulent *Agrobacterium tumefaciens chvA* mutants: Synthesis and excretion of  $\beta$ -(1-2)glucan. *J. Bacteriol.* 171(5). 2842-2849.
- Jansson, P. E., L. Kenne, B. Lindberg, H. Ljunggren, J. Lönngrén, U. Rudén, and S. Svensson. 1977. Demonstration of an octasaccharide repeating unit in the extracellular polysaccharide of *Rhizobium meliloti* by sequential degradation. *J. Am. Chem. Sci.*, 99(11). 3812-3815.
- Ko, Y. H. and R. Gayda. 1990. Nodule formation in soybeans by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium fredii* USDA191. *J. Gen. Microbiol.*, 136. 105-113.
- 이 신영. 1991. 식품 관련 polysaccharide의 개발 동향. *The Microorganisms and industry*, 18(1). 33-40.
- Morris, D.L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science*. 107. 254-255.
- Reed, J. W., M. Capage, G. and C. Walker. 1991. *Rhizobium meliloti* *exoG* and *exoJ* mutations affect the *exoX*-*exoY* system for modulation of exopolysaccharide production. *J. Bacteriol.*, 173. 3776-3788.



- Robertson, B. K., P. Aman, A. G. Darvill, M. McNeil, and P. Albersheim. 1981. Host-symbiont interaction<sup>1</sup>: V. The structure of acidic extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminisarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.*, 67. 389-400.
- Sambrook, J. E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Vol.3. 17.34-17.35. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Sharma, S. C. 1981. Gum and hydrocollids in oil-water emulsions. *Food Technol.*, 35(1). 59-67.
- Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharide. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39. 243-270.
- Tolmasky, M. E., R. J. Staneloni, and L. F. Leloir. 1982. Lipid-bound saccharides in *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.*, 257. 6751-6757.
- Tully, R.E. and M.E. Terry. 1985. Decreased exopolysaccharide synthesis by anaerobic and symbiotic cells of *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol.* 79. 445-450.
- Wilkinson, J. F. 1958. The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 22. 46-73.
- 유 영제. 1987. Biopolymer. 유전 공학. 가을호, 58-65.
- 윤 병대. 1991. *Bacillus* sp. 세균이 생산하는 extracellular polysaccharide. *The Microorganisms and Industry*, 18(1). 41-46.

---

Zhan, H. and J.A. Leigh. 1990. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 172. 5254-5259.



## 사 사

본 연구논문을 위해서 실험계획에서부터 논문완성에 이르기까지 아낌없이 지도하여 주신 고 영환 지도교수님께 대한 감사를 어떤 글로 표현해야 할지 모르겠습니다. 그리고 논문심사 과정에서 수정, 보완에 열과 성을 다해 주신 강 영주 교수님, 김 재하 교수님께 깊은 감사를 드리며, 뵈 때마다 항상 조언과 격려의 말씀을 주신 송 대진 교수님, 하 진환 교수님, 임 상빈 교수님, 아울러 해외에서 연수 중이신 김 수현 교수님께도 감사를 드립니다.

또한 항상 내일처럼 도와주신 오 명철 선생님, 김 병주 선생님, 김 호선 선생님, 강 정환, 오 창경 학생께도 감사를 드리며, 아낌없는 성원을 보내 주신 대학원 학우, 선, 후배님, 특히 생물공학 실험실 후배님들께도 감사를 드립니다.

그리고 멀리서 항상 저를 위해 기도하시는 부모님, 형님들, 누님과 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다. 가족의 기도 덕분에 힘을 얻을 수 있었다는 것을 꼭 전해 드리고 싶습니다.

끝으로 논문완성에 대한 기쁨에 앞서 연구 과정 중 나의 마음자세에 대해서 많은 아쉬움이 남습니다. 다음에 주어진 기회가 있다면 아쉬움 없이 더욱 좋은 결과를 이룩할 것을 다짐해 봅니다.