류코노스톡 발현 시스템 개발 연구동향

충북대학교 식품생명공학과 한남수 교수

1. 류코노스톡 및 이의 발현벡터

류코노스톡속은 락트산, 아세트산, 알코올, 이산화탄소, 아세토인 등의 방향족 화합물 및 네 개의 탄소 함유 화합물을 생성하는 이종발효유산균이다. 이는 광범위하게 채소(김치, 사우어크라우트, 피클)와 유발효에 사용되며 구연산 대사 및 디아세틸 배양 유제품의 주된 맛 화합물인 휘발성 화합물을 생산한다. 일반적으로 독소를 생성하지 않으며 호기성 및 혐기성 조건에서 성장하고 GRAS로서 안전성이 인정되기 때문에 식품 생명공학 산업에서 좋은 host로 간주된다.

지금까지 유산균의 다양한 벡터는 락토바실러스와 락토코커스종의 자체 벡터의 복제 원점을 사용함으로써 구축되었다. 그러나 효율적인 유전적 도구 및 기술의 부족으로 대사공학을 이용한 분자생물학, 유전학적 기초 연구, 그리고 산업적 이용을 위한 균주 개량이 충분히 이루어지지 않고 있다(표 1). 따라서 류코노스톡의 식품 및 생물공학적 이용을 위한 항시 발현, 유도 발현, 식품용 벡터 시스템을 구축하고자 한국의 채소 발효식품인 김치에서 분리한 *Leu. citreum* CBNU75와 *Leu. citreum* CB2567 (KACC 91348P)에서 작은 크기의 플라스미드인 pCB18와 pCB42를 선별하였으며 염기 서열과 유전자 구조를 조사하였다.

표 1. 대표적인 유산균에서의 백터관련 연구동향

	Lactococcus	*Lactobacillus*	*Streptococcus*	*Bifidobacterium*	*Leuconostoc*
Plasmid	**++++++++**	**++++++++**	**+++++**	**+++**	**++**
Shuttle vector	**+++++**	**+++++**	**+++**	**++**	**+**
Heterologous protein extression	**+++++**	**+++++**	**+++**	**+**	**+**
Food-grade vector	**+++++**	**+++++**	**+**	**-**	**-**
Intergative food grade vector	**+++++**	**+++++**	**+**	**-**	**-**
Complete genome sequencing	**14 strains**	**143 strains**	**492 starins**	**42 starin**	**10 starins**

플라스미드 pCB18은 G+C 함량은 39.2%, 1,821개의 염기로 이루어져 있고, 하나의 replicase (342 amino acids, 41 kDa)를 갖고 있으며, *Leu. citreum* IH3유래의 pIH01 벡터의 replicase 단백질과 96% 상동성을 보였다 (Eom et al., 2010). 본 벡터의 복제 기작을 알아보기 위해, single-stranded DNA 중간체 생성 여부를 southern blot으로 분석한 결과 rolling circle replication 기작에 의해 복제되는 것으로 판단된다.

플라스미드 pCB42는 G+C 함량은 34.58%, 4,231개의 염기로 이루어져 있고, 6개의 ORF를 함유하고 있으며 이는 1개의 transposase, 1개의 DNA-binding 유전자, 2개의 putative replication 유전자, 2개의 unknown 유전자를 포함하고 있다. 이는 theta-type replication 기작에 의해 복제되는 것으로 보인다 (Eom et al., 2012).

2. *Leuconostoc-E. coli* 셔틀 벡터 pLeuCM, pLeuCM42

Leucostoc에서 외래 유전자를 발현시키기 위해, 분리한 두가지 유산균 벡터를 기반으로 *Leuconostoc-E.coli* 셔틀 벡터를 구축하였다. pCB18와 pUC19에서 파생된 pEK104 벡터를 ligation하여 pLeuCM를 제조하였다(그림 2). pCB18과 다르게 pCB42 벡터는 크기가 커서 *Leuconostoc-E. coli* 셔틀 벡터를 구축하기 전에, replicon minimization를 진행하였다. 이는 위해 6개의 ORF를 단계별로 최소화하면서 복제여부를 분석하면서 크기를 최소화하였고(그림 1)(Eom et al., 2012), 최소화한 벡터 pCBm32는 pEK104벡터와 ligation하여 *Leuconostoc-E. coli* 셔틀 벡터인 pLeuCM42 (그림 3)을 구축하였다.

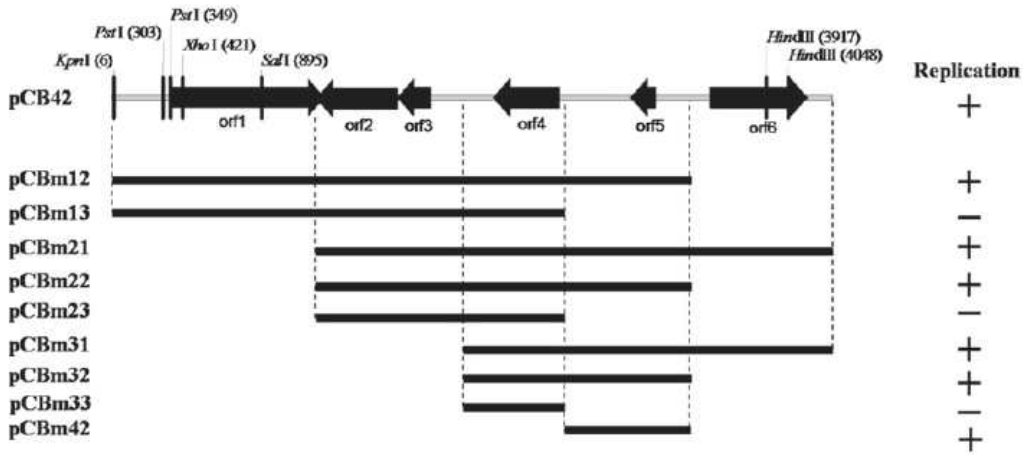

그림 1. pCB42벡터의 replication 부분 최소화 모식도

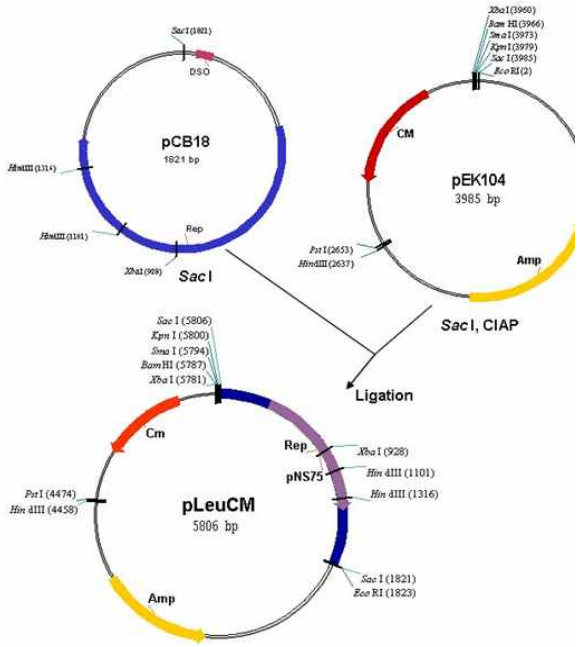

그림 2. pLeuCM 벡터 구축 모식도

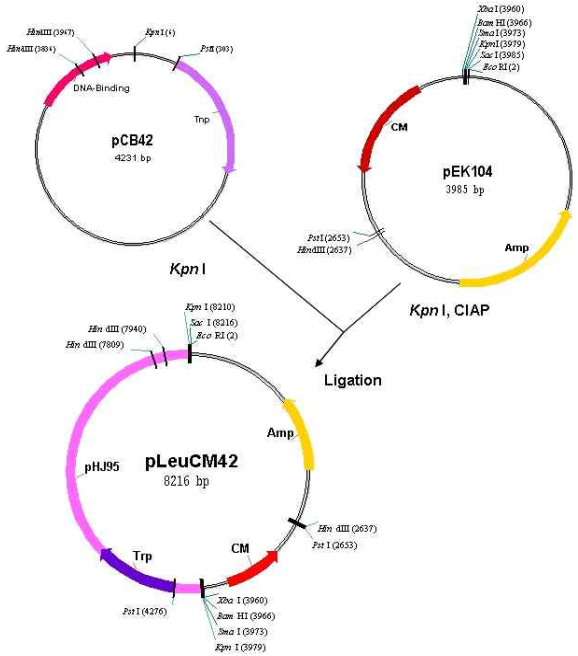

그림 3. pLeuCM42 벡터 구축 모식도

구축된 pLeuCM의 벡터 안정성과 다양한 host에서의 transformation 효율을 분석한 결과, 100세대 이후, 80% 정도의 균주에 벡터를 함유하고 있어 안정적으로 복제됨을 알 수 있었다. 또한, 다양한 유산균에서의 transformation 효율을 분석하였고, *Leu. citreum*, *Leu. mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*. *Lb. reuteri, Streptococcus thermophilus*, *Weissella confusa, Oenococcus oeni*와 같은 다양한 유산균에서 transformation이 가능하였다(Eom et al., 2010).

표 2. pLeuCM 벡터가 다양한 유산균에서의 transformation 효율

Organisms	Transformation frequency*
Leuconostoc citreum CB2567	5.1×10^3
L. mesenteroides ATCC8293	1.2×10^4
L. mesenteroides NRRL B-512F	1.7×10^3
Lactococcus lactis KCTC3769	4.1×10^1
Lactobacillus plantarum KCTC3104	6.0×10^2
Lb. reuteri KCTC3594	2.1×10^1
Streptococcus thermophilus KCTC3658	1.4×10^1
Weissella confusa KACC11841	3.1×10^1
Oenococcus oeni KCTC3200	1.7×10^1

*Expressed as chloramphenicol-resistant colonies recovered per microgram of pLeuCM isolated from *E. coli* (average of three independent experiments).

pLeuCM벡터에서의 외래 유전자의 발현여부를 확인하고 자, α-amylase와 β-galactosidase 유전자를 각각 *Lb. amylovorus*와 *Lb. plantarum*의 염색체 DNA에서 분리하여 pLeuCM 셔틀벡터에 클로닝하여 재조합체인 pLeuCMamy와 pLeuCMgal을 구축하였다. 그림 4,5와 같이, 두가지 외래 유전자가 성공적으로 Leuconostoc에서 발현되었다(Eom 2007; Eom et al., 2009).

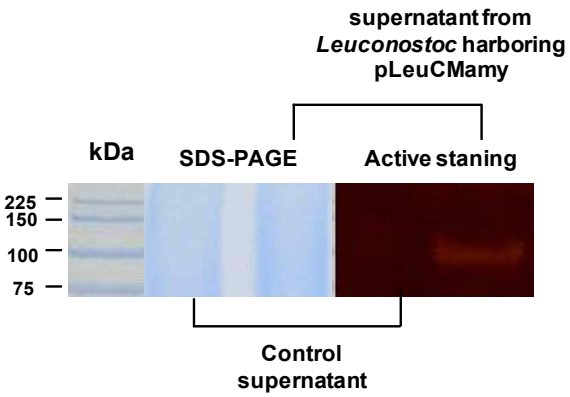

그림 4. pLeuCM과 pLeuCMamy 벡터를 함유한 Leuconostoc균주에서의 amylase 활성 측정

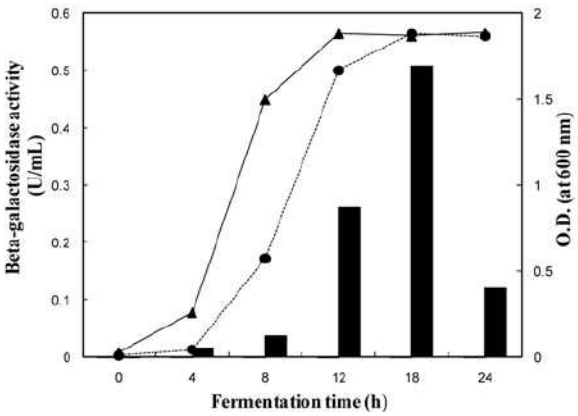

그림 5. pLeuCMgal 벡터를 함유한 Leuconostoc 균주에서의 β-galactosidase 활성 측정

pLeuCM42벡터는 100세대 배양이후 60%정도의 벡터 안정성을 보였다. 또한 다양한 유산균에서의 transformation 효율을 비교분석하였을 때, *Leu. citreum*, *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *St. thermophilus*, *W. confusa*, *O. oeni* 등 여러 속 및 종에서 복제 가능했다(표 3). 이는 pLeuCM와 pLeuCM42가 유산균을 위한 일반적인 유전자 형질전환 도구로써 사용될 수 있는 광범위한 숙주 범위를 가지는 벡터임을 보여준다(Eom et al., 2012).

표 3. pLeuCM42 벡터가 다양한 유산균에서의 transformation 효율

Organisms	Transformation frequency[a] (CFU/μg DNA)
Leuconostoc citreum CB2567	9.3×10^2
L. citreum KACC 91035	7.4×10^2
L. mesenteroides ATCC8293	6.3×10^3
Lactococcus lactis KCTC3769	2.4×10^1
Lactobacillus plantarum KCTC3104	1.2×10^2
Lb. reuteri KCTC3594	1.4×10^1
Streptococcus thermophilus KCTC3658	6.0×10^0
Weissella confusa KACC11841	1.3×10^2
Oenococcus oeni KCTC3200	1.0×10^1

[a] Expressed as chloramphenicol-resistant colonies recovered per microgram of pLeuCM42 isolated from *E. coli* (average of 3 independent experiments).

pLeuCM42벡터는 Leuconostoc에서의 L-lactic acid 대량생산과 dextransucrase knock-out 연구에 적용하였다. D-Lactic acid는 발효식품의 발효과정에서 생성되며 과량 섭취시 유아나 대사질환을 가진 환자에게서 산중독을 야기시킬 수 있다. Leuconostoc속은 MRS에서 배양시켰을 때 D-lactic acid를 주산물로 생성하면서 소량의 L-lactic acid를 생성한다. 따라서 L-lactic acid를 대량 생산하는 Leuconostoc균주를 얻기 위해, *Lb. plantarum* 유래의 ldhL 유전자와 *Leu. mesenteroides* pyruvate kinase promoter를 pLeuCM42에 삽입하여 재조합체인 pLC42pkL를 제조하였다. 표 4와 같이, L-lactate dehydrogenase활성과 L-lactic acid 함량은 현저히 증가하였고, D-/L-lactic acid 함량 비례는 감소하였다. 또한, 구축된 균주를 sauerkraut 발효과정에 스타터로 사용했을 때, 같은 효과를 보였다(그림 6)(Jin et al., 2016).

표 4. 야생균주와 각종 형질전환 *Leu. mesenteroides*의 D-/L-lactic acid 생성량 비교

Time (h)	D-/L-Lactate ratio in *L. mesenteroides* harboring				
	No plasmid	pLC18lld	pLC42lld	pLC18pkL	pLC42pkL
0	–	–	–	–	–
3	0.21	0.17	0.56	0.48	0.16
6	1.08	0.98	1.62	0.86	0.76
9	2.54	5.30	3.60	7.34	1.75
12	9.34	8.18	6.60	9.22	2.24
16	12.15	8.80	8.92	10.65	2.63
20	11.18	8.31	10.59	12.41	2.81
24	9.69	9.11	10.61	11.58	3.13

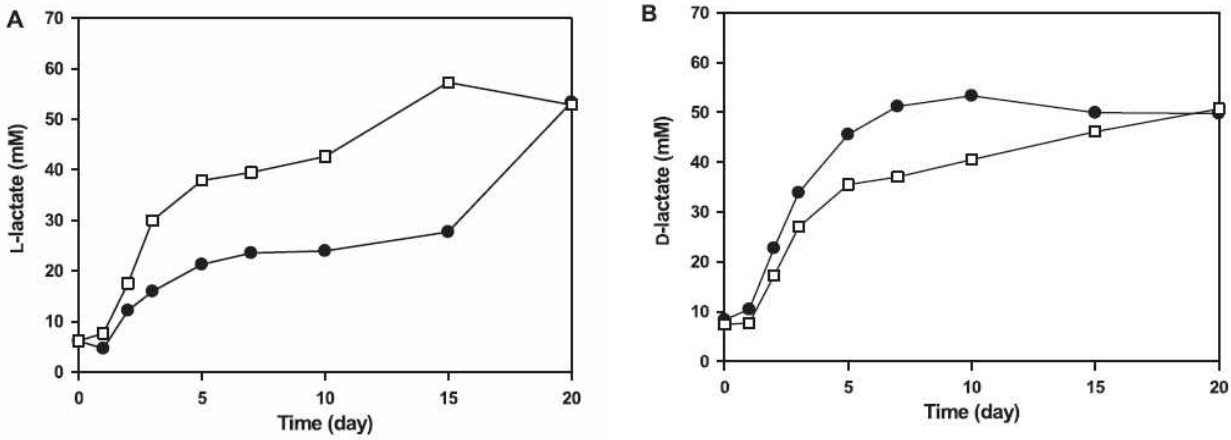

그림 6. Sauerkraut 발효중에 야생균주(●)와 pLC42pkL이 형질전환 된 *Leu. mesenteroides* (○)를 스타터로 사용하였을 때 L-lactic acid (A)와 D-lactic acid (B) 생성량 비교

Leuconosotc을 물김치와 같은 발효식품의 스타터로 이용할 때, 점질물(dextran)생성이 또한 문제가 되고 있다. 따라서 dextran을 생성하지 않는 mutant를 스타터로 이용하기 위해 *Leu. citreum* CB2567균주 chromosome에 있는 dextransucrase를 homologous recombination기술을 이용하여 knock-out시켰다. Dextransucrase유전자가 불활성화 된 균주와 야생균주의 생육속도, 주요 대사산물 생성량 등은 큰 차이를 보이지 않았고 dextran을 생성하지 않았다(Jin et al., 201).

표 4에서는 두가지 *Leuconostoc-E. coli* shuttle 벡터의 특성을 요약하였다.

표 4. pLeuCM와 pLeuCM42의 특성

Characteristics	pLeuCM	pLeuCM42
Size	5.8 kb	8.3 kb
Replication type	Rolling circle replication	Theta-type replication
Copy number	Low	High
Plasmid stability	High	High
Host-range	*Leu. citreum*, *Leu. mesenteroides*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *St. thermophilus*, *W. confusa*, *O. oeni*	

3. Leuconostoc 항시발현벡터

재조합 Leuconostoc을 단백질, 효소와 같은 다양한 물질들을 효율적으로 생산할 수 있는 세포공장으로 이용하기 위해 항시발현벡터를 구축하였다. 먼저, *Leu. mesenteroides* ATCC 8293이 주 탄소원으로 사용하는 glucose와 sucrose배지에서의 항시발현유전자를 transcriptome 데이터를 이용하여 분석하였고, 그중에서 상위 6개의 항시발현유전자의 promoter를 β-galactosidase 유전자에 fusion하여 활성이 가장 높은

promoter(P710)를 선발하였다. 또한, Leuconostoc에서의 항시발현벡터인 pCB4170을 구축하였다(Cho 2015).

하지만, 항시발현벡터인 pCB4170의 copy number가 여전히 낮은 수준을 보이기 때문에 기존의 벡터의 replicase 유전자의 랜덤 돌연변이를 유발하여 sfGFP (super folding GFP)를 reporter 유전자로 하여 높은 copy number를 보이는 mutant를 FACS 기반 고속 선발하였다(그림 7). pCB4170의 replicase 유전자의 4690번째 sequence가 C에서 T로 변이된 벡터를 pCB4270으로 명명하였다. pCB4270의 copy number는 기존벡터의 것에 비해 30배 정도 높았다(그림 8). 고밀도 복제 벡터인 pCB4270은 세가지 단백질(sfGFP, glutathione-s-transferase, α-amylase)발현으로 효율을 증명하였다(Son et al., 2016). 본 발현벡터는 Leuconostoc에서 높은 수준의 유전자 발현을 위한 유용한 도구가 될 것으로 기대된다.

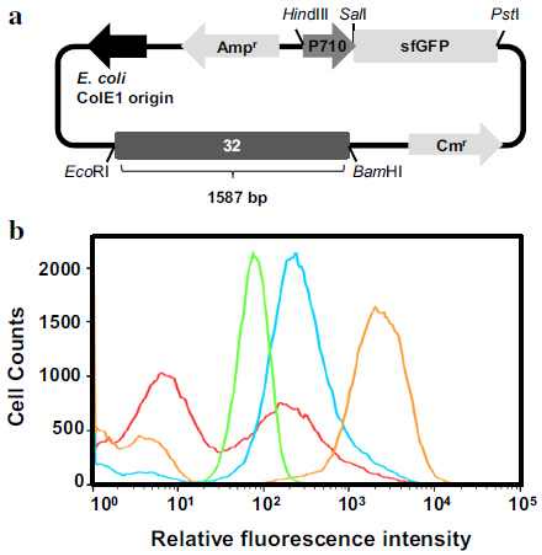

그림 7. FACE기반으로 한 high-copy 벡터 구축

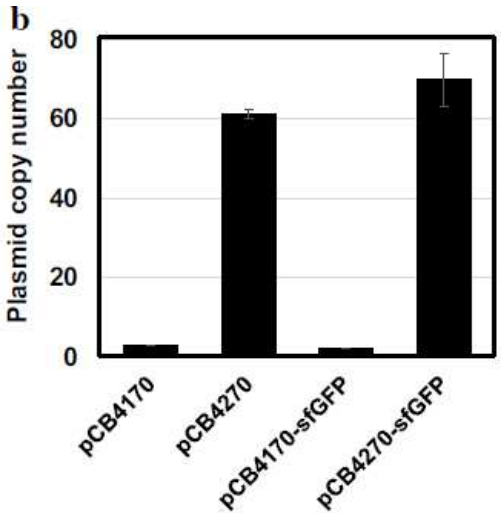

그림 8. *Leu. citreum* CB2567에서의 pCB4170과 pCB4270 재조합체의 copy number 비교

4. Leuconostoc 유도발현시스템

유산균에서 동형-이형 유전자를 발현하기 위한 발현벡터에는 복제될 유전자의 전사를 조절하기 위해서 적절한 프로모터가 존재한다. 만일 발현 벡터의 프로모터 strength가 강하고 유전자 발현이 매우 높으면, 생성된 단백질은 세포질(cytoplasm)안에 축적되고 생물학적 활성이 없는 inclusion bodies를 생성하게 된다. 또한 몇몇의 단백질의 경우 고농도로 생성이 되면 오히려 세포에 독성을 나타낸다. 그로 인해 발현수준을 적절히 조절할 수 있는 유도 프로모터가 필요하다. Leuconostoc균주가 sucrose배지에서의 transcriptome과 secretome 데이터 분석으로 sucrose PTS (Leum_0288)와

levansucrase(Leum_1409, Leum 1411) 유전자가 sucrose에 의해 조절되는 것을 알 수 있었다. 세가지 유전자의 promoter 서열을 β-galactosidase유전자에 fusion하여 유도발현벡터를 구축하였고 *Leu. citreum* CBNU2567에 도입하여 발현시켜 각각 glucose와 sucrose가 첨가된 MRS배지에서의 효소활성을 측정하였다. 그 결과, 두가지 유도발현벡터(pEK32P1409Gal과 pEK32P1411Gal)가 sucrose 배지에서 β-galactosidase가 유도 발현됨을 보였다(Cho 2015).

5. Leuconostoc food-grade 발현벡터

프로바이오틱 박테리아는 담즙산에 대한 내성뿐만 아니라 항생제 내성이 필요하다. *Leu. citreum*은 다양한 발효 식품에서 우점종이지만 프로바이오틱으로 간주되기에는 산내성과 담즙산 내성이 너무 부족하다. 따라서 담즙산 가수분해효소 유전자(bsh)를 selection marker로 사용하여 담즙산 내성을 가진 *Leu. citreum* 균주를 제조하고자 *Lb. plantarum*유래의 bile salt hydrolase유전자를 pCB4170에 클로닝하여 food-grade 발현벡터인 pCB4170BSH를 구축하였다(그림 9). 이를 *Leu. citreum* CB2567에 형질전환하였을 때, 0.3%의 glycodeoxycholic and sodium salt(GDCA)에서 내성을 보였다(그림 10)(Cho et al., 2015).

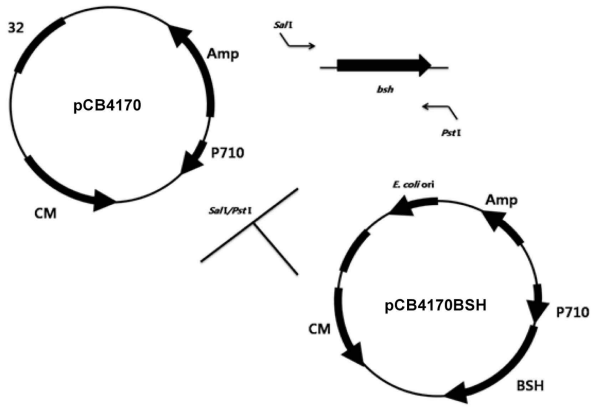

그림 9. pCB4170BSH 재조합체 구축 모식도

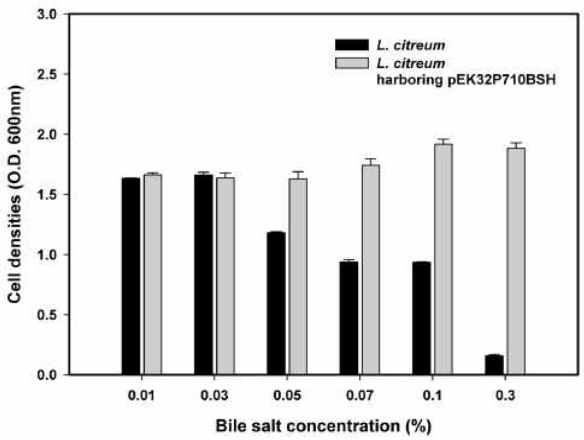

그림 10. 다양한 담즙염 농도에서의 야생 타입 *Leu. citreum* CB2567과 pCB4170BSH가 형질전환 된 유산균의 생육비교

6. 기대 효과

류코노스톡 속은 한국의 전통음식인 김치에서 우점종으로 잘 자라는 유산균으로 식물성 환경에 적응한 균이다. 유가공식품이 고칼로리와 고지방으로 인해 점차 시장이 정체되는 반면, 식물과 곡물을 이용한 발효식품의 시장이 장차 확대될 것으로 전망된다. 이와 함께 류코노스톡 속 유산균은 주된 종균으로 이용될 것이며, 다양한 미생물 특성과 기능성을 보이

는 균주의 개발이 필요할 것이다. 또한, 장내 미생물이 인체 건강에 미치는 영향을 고려할 때 장차 metabolic engineering of gastrointestinal microbiome(장내균총 대사공학) 기술 개발에도 이용될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Hyun-Ju Eom. Heterologous Gene Expression in Leuconostoc spp. via Leuconostoc-E. coli Vector Development and Transposon-mediated Gene Integration. 2007.

2. Qing Jin. Metabolic Engineering of Leuconostoc spp. for Biotechnological Application: Overexpression of L-Lactate Dehydrogenase Gene and Knock-out of Dextransucrase Gene. 2009.

3. Qing Jin, Jee Yun Jung, Yu Jin Kim, Hyun-Ju Eom, So-Young Kim, Tae-Jip Kim, Nam Soo Han. Production of l-lactate in Leuconostoc citreum via heterologous expression of l-lactate dehydrogenase gene. Journal of Biotechnology. 2009, 144:160-164.

4. Hyun-Ju Eom, Jin-Seok Moon, Eun-Young Seo, Nam Soo Han. Heterologous expression and secretion of Lactobacillus amylovorus α-amylase in Leuconostoc citreum. Biotechnology Letter. 2009, 31:1783-1788.

5. Hyun-Ju Eom, Seung Kee Cho, Myeong Soo Park, Geun Eog Ji, and Nam Soo Han. Characterization of Leuconostoc citreum Plasmid pCB18 and Development of Broad Host Range Shuttle Vector for Lactic Acid Bacteria. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2010, 15:946-952.

6. Hyun-Ju Eom, Jin-Seok Moon, Seung Kee Cho, Jeong Hwan Kim, and Nam Soo Han. Construction of theta-type shuttle vector for Leuconostoc and other lactic acid bacteria using pCB42 isolated from kimchi. Plasmid. 2012, 67:35-43.

7. Seung Kee Cho. Development of Food-grade Vector for Constitutive and Inducible Gene Expression in Leuconostoc citreum. 2015.

8. Seung Kee Cho, Soo Jin Lee, So-Yeon Shin, Jin Seok Moon, Ling Li, Wooha Joo, Dae-Kyung Kang, and Nam Soo Han. Development of Bile Salt-Resistant Leuconostoc citreum by Expression of Bile Salt Hydrolase Gene. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015, 25:2100-2105.

9. Yeon Jeong Son, Ae Jin Ryu, Ling Li, Nam Soo Han and Ki Jun Jeong. Development of a high-copy plasmid for enhanced production of recombinant proteins in Leuconostoc citreum. Microbial Cell Factories. 2016, 15:12.

10. Qing Jin, Ling Li, Jin Seok Moon, Seung Kee Cho, Yu Jin Kim, Soo Jin Lee, and Nam Soo Han. Reduction of D-lactate content in sauerkraut using starter cultures of recombinant Leuconostoc mesenteroides expressing the ldhL gene. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2016, 121:479-483.

11. Qing Jin, Ling Li, Yu Jin Kim, and Nam Soo Han. Construction of a dextran-free Leuconostoc citreum mutant by targeted disruption of the dextransucrase gene. Journal of Applied Microbiology. 2014, 117:1104-1112.