

## 호알칼리성 *Bacillus* 속 K-17의 형질전환조건

성낙계\* · 정운상 · 고학룡 · 정정희

경상대학교 식품공학과

### Conditions for Transformation of Alkalophilic *Bacillus* sp. K-17

Sung, Nack-Kie\*, Un-Sang Chung, Hack-Ryong Ko and Chung-Hee Chung

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

To investigate the possibility of using alkalophilic *Bacillus* sp. K-17 as a host for molecular cloning, plasmid pUB110 and pBD64 were introduced into alkalophilic *Bacillus* sp. K-17 by protoplast transformation system. Protoplasts of *Bacillus* sp. K-17 were prepared by treatment with 200  $\mu$ g/ml lysozyme in SMM buffer containing 0.4M sucrose. Optimal temperature, pH and culture time for protoplast formation were 40°C, 7.0 and 4hrs, respectively. Cell wall was regenerated efficiently on DM3 medium containing 0.8% agar and 0.5M sodium succinate. Under these conditions for protoplast formation and regeneration, the highest transformation efficiency was obtained with cells incubated for 4hrs, and using 30%(V/V) of 40%(W/V) PEG6,000. In characteristics of transformants, plasmid pUB110 was more stable than plasmid pBD64 in *Bacillus* sp. K-17. Maximum xylanase production of both transformants carrying pUB110 and pBD64, respectively was similar, but under the same conditions, enzyme secretion by transformant carrying pUB110 was earlier than that of transformant carrying pBD64.

최근 유전자조작 기술의 활발한 연구가 진행되면서 *E. coli* 보다는 *Bacillus* 속에 대해 많은 관심을 갖게 되었다. 그 이유로서는 *E. coli*를 이용한 유전자 조작에서 파생되는 독성과 secretion 문제 등이 대두되면서부터이다(1). 특히, *Bacillus* 속은 다양한 세포의 효소의 효소와 항생물질을 생산하며 내생포자를 형성하는 등의 특성이 있어 이를 이용하려는 쪽으로 연구가 전향되고 있다(2, 3). 미생물이 외래의 DNA를 받아들이는 현상에는 transduction, transfection, transformation과 conjugative transfer로 분류할 수 있는데, 최근 recombinant DNA를 이용하여 유용물질의 생산성을 높이는 데는 transformation system을 많이 이용하고 있다. *Bacillus* 속의 형질전환에 대한 연구는 1968년 Mahler(4)가 competent cell에 의한 방법을 연구하였고, 1972년 Cohen 등(5)이 protoplast에 의한 형질전환방법을 보고한 이후 급격히 진행되었다. 1975년 Schrempf

등(6)이 *Streptomyces coelicolor*로부터 closed circular covalently DNA를 분리하면서 현재까지 약 20여가지의 plasmid가 분리되었고, *Staphylococcus aureus*로부터 분리된 plasmid가 *Bacillus subtilis*에서 발현되는 것을 Ehrlich 등(7)과 Gryzan 등(8)이 보고하였다. 현재 *Bacillus* 속의 cloning vector로 이용되고 있는 것은 pUB 110과 pC 194 등의 여러

Table 1. Strain and plasmids used in this work.

Strain and plasmids	Genotype and properties	Source and reference
<i>Bacillus</i> sp. K-17	Hyper-xylanase producing alkalophilic strain	our lab.
pUB110	Km <sup>r</sup> , 4.5kb	Gryczan <i>et al.</i> (9)
pBD64	Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , 4.8kb	Gryczan <i>et al.</i> (9)

Key words: Alkalophilic *Bacillus* sp. K-17, protoplast transformation system

\*Corresponding author

Table 2. Media and buffer used in this work (g/l).

Components	PY-xylan	PB	DM3	LB
Bacto-tryptone				10
Bacto-peptone	5	5		
Yeast extract	5	1.5	5	5
Malt extract		1.5		
NaCl		3.5		10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1.32	1.5	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	3.68	3.5	
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2			
Glucose		1	5	
Xylan	5			
Sodium succinate			135.07	
Casamino acid			5	
Bovine albumin			7.3	
Agar	15		8	15
pH	10.3	7.0	7.3	7.4

\*SMM buffer; 0.4M sucrose, 20mM malate and 20mM MgCl<sub>2</sub>

\*SMMP; 4xPB and 2xSMM mixed with the same vol.

plasmid 가 있다. 본 연구에서는 pUB 110 과 pBD 64 를 사용하여 토양으로부터 분리한 우수한 xylan 분해계 효소를 분비하는 호알칼리성 *Bacillus* 속 K-17 균주를 protoplast 형질전환 system 에 따른 형질전환 조건을 검토하였고, 형질전환체의 특성을 조사하여 cloning vector 와 host 로서의 이용 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 plasmids

본 실험에 사용된 균주 및 plasmids 는 Table 1 과 같이 xylan 분해력이 강한 호알칼리성 *Bacillus* 속 K-17 균주를 host 로 사용하였으며 plasmid 로는 pUB 110 과 pBD 64 를 형질전환에 사용하였다.

### 배지 및 용액

배지 및 용액의 조성은 Table 2 와 같이 공시균주의 배양은 PY-xylan 배지를 사용하였고 형질전환시는 PB 배지와 SMMP 용액을 사용하였다. Isozyme 반응시에는 SMM buffer 를 사용하였으며 재배 배지는 DM3 를 사용하였다.

### 배양방법

### Cell harvest from 50ml culture

↓  
Suspend in 5ml of SMMP

↓  
Treatment of lysozyme (200 μg/ml) for 1.5hrs at 45°C

↓  
Wash with 5ml of SMMP (2times)

↓  
Mix the protoplasts suspension with DNA solution

↓  
Add 1.5ml of 40% PEG 6000, immediately for 2min.

↓  
Collect protoplasts (3,000rpm, 20min.) at room temp.

↓  
Resuspend in 1ml of SMMP for 90min. at 30°C

↓  
Select the transformants on DM3 medium

↓  
Fig. 1. Procedures of protoplast transformation.

*Bacillus* 속 K-17 은 PY-xylan 배지에서 45°C로 진탕배양하였고, plasmid 분리를 위한 균주는 37°C, LB 배지(1% bacto tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract, pH 7.4)에 kanamycin (50 μg/ml) 이 나 chloramphenicol (10 μg/ml) 을 첨가하여 15 시간 배양하였으며, 형질전환시 *Bacillus* 속 K-17 은 TBAB (Difco 사) 배지에서 15 시간 전배양하여 다시 PB 배지에 OD 가 0.08 (660 nm) 되게 접종하여 4-5 시간 배양하였다.

### 원형질체 형성 및 재생

원형질체 형성은 *Bacillus* 속 K-17 의 배양액 50 ml 를 원심분리한 후 다시 5ml SMMP 용액으로 현탁시켜 lysozyme (200 μg/ml) 을 첨가하여 1.5 시간 반응시켜 행하였으며, 재생은 형성된 원형질체를 DM3 배지에 도말하여 37°C에서 4 일간 배양하여 재생시켰다. 원형질체 형성율은 protoplast화된 cell 수를 총 cell 수로 나눈 값을 백분율로 나타내었으며, 재생율은 DM3 배지에서 나타난 colony 수에서 protoplast 화되지 않은 cell 수를 뺀 다음 총 cell 수에서 protoplast 화되지 않은 cell 수를 뺀 값을 나눈 후 백분율로 나타내었다.

### Plasmid 의 정제

Plasmid DNA 는 Birnboim 과 Doly 의 방법을 변형하여 분리, 정제하였다(10).

### 형질전환 및 빈도

*Bacillus* 속 K-17 의 형질전환은 Fig.1 과 같이 Cohen 의 방법에 따라 행하였으며 형질전환빈도는

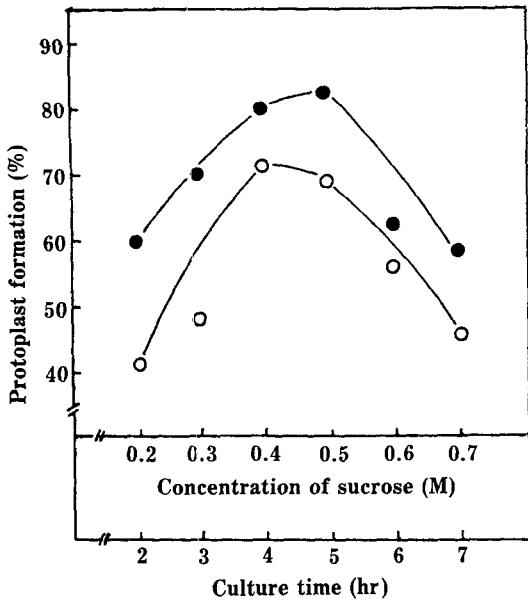


Fig. 2. Effect of sucrose concentration and culture time on the protoplast formation.

○ - ○ ; Concentration of sucrose ● - ● ; Culture time

다음과 같이 나타내었다. Protoplast의 형질전환빈도는 항생제를 포함한 DM3 배지에서의 colony 수를 항생제를 포함하지 않은 DM3 배지에서의 colony 수로 나눈 값으로 나타내었다.

**Xylanase 활성 측정**

Xylanase의 활성은 강의 방법으로 측정하였다(11). 즉, 1% xylan이 함유된 PY-xylan 배지에서 배양된 배양액을 원심분리한 상등액을 조효소로 하여 조효소액 50 μl과 1% (w/v) xylan 용액(50mM phosphate buffer, pH 6.5) 0.5 ml을 혼합하여 60°C 항온조에서 10분간 반응시킨 다음 3.5% DNS (3,5-dinitro salicylic acid) 용액 1 ml를 첨가한 후 5분간 끓이고 냉각시켜 적당히 희석한 다음 510 nm에서 흡광도를 측정하여 환원당을 정량하였다. 활성도 단위(U)는 μM·D-xylose/ml·min로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**Bacillus 속 K-17의 원형질체 형성조건**

Bacillus 속 K-17의 항생물질에 대한 내성을 조사한 결과 kanamycin과 chloramphenicol에는 내성이 없었으므로 plasmid pUB 110과 pBD 64의 recipient cell로서 적당하였다. Protoplast 형성시 사용되는 삼투 안정제로서는 KCl, sorbitol 그리고 sucrose 등

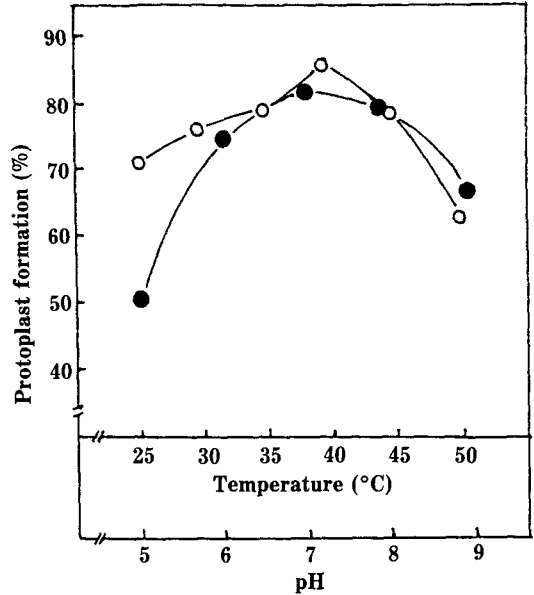


Fig. 3. Effect of temperature and pH on the protoplast formation.

○ - ○ ; Temperature ● - ● ; pH

이 사용되나 이중 sucrose가 용균 효소액중에서 원형질체가 안정되며 균일한 원형질체가 된다는 보고(12)에 따라 sucrose를 삼투 안정제로 선택하여 sucrose의 농도를 0.2-0.7 M로 조절하여 원형질체 형성에 미치는 영향을 조사한 결과 0.4 M sucrose에서 최대의 원형질체 형성을 보여주었다(Fig.2). Bacillus subtilis는 0.5 M(13), Bacillus megaterium은 0.2 M(14) 등으로 다른 Bacillus 속과는 약간의 차이를 보였다.

원형질체 형성에 미치는 생육시기의 영향을 조사하기 위해 전배양액(1%)을 PB에 접종하여 각 생육 시간별로 lysozyme을 처리한 결과, 원형질체 형성율은 접종 후 4-5시간에서 최대를 나타내었다(Fig.2). 이런 결과는 배양시간이 연장됨에 따라 세포벽의 두께가 신장되어 원형질체 형성에 악영향을 미친다는 보고와 일치하였다(5, 15, 16).

Lysozyme 반응온도가 원형질체 형성에 미치는 영향을 조사하기 위해 25°C에서 50°C의 범위에서 lysozyme을 처리하여 반응시킨 결과, 40°C에서 80%의 원형질체 형성율을 보여주었다(Fig.3).

pH가 원형질체 형성에 미치는 영향을 조사하기 위해 SMM buffer를 NaOH로 pH를 5에서 9로 조절하여 실험한 결과 pH 7.0에서 최대의 원형질체 형성율을 나타내었다(Fig.3).

4시간 배양한 균체를 원심분리하여 SMM buffer

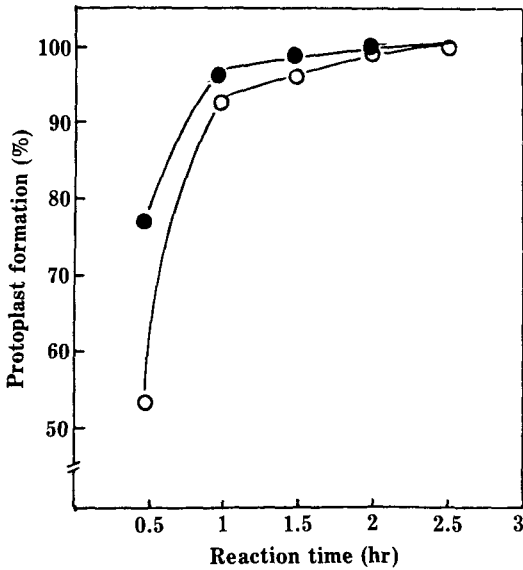


Fig. 4. Effect of reaction time and lysozyme concentration on the protoplast formation.  
○-○; 100 µg/ml ●-● 200 µg/ml

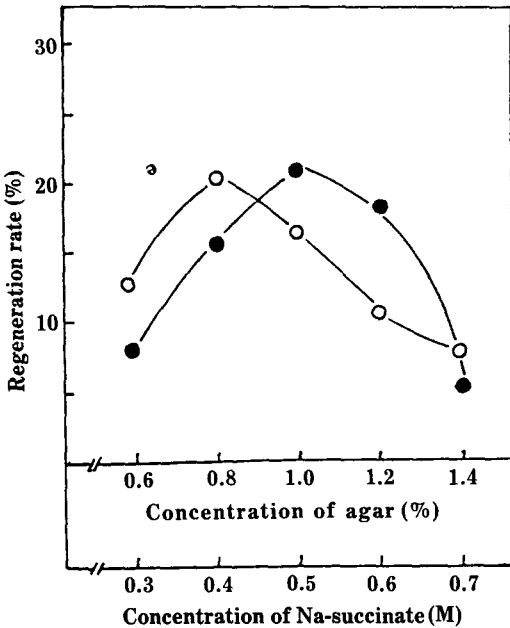


Fig. 5. Effect of agar and Na-succinate concentration on the regeneration  
○-○; Concentration of agar  
●-●; Concentration of Na-succinate

를 pH7.0으로 조절한 다음 균체를 현탁하고 lysozyme을 100 µg/ml, 200 µg/ml 처리하였다. 40°C에서 30분 간격으로 원형질체 형성율을 조사한

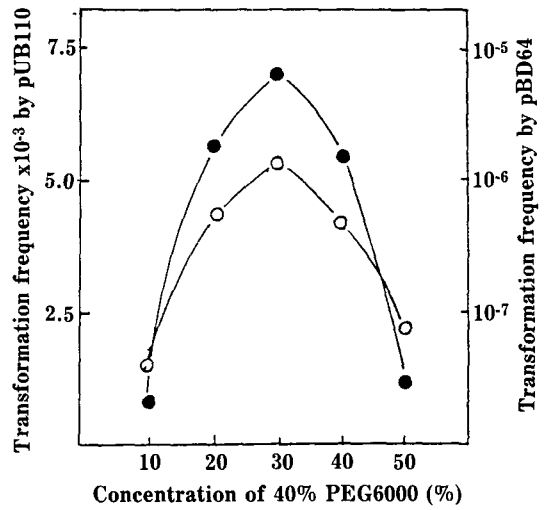


Fig. 6. Effect of 40% PEG6000 concentration on the transformation of *Bacillus* sp. K-17 by pUB110 and pBD64.  
○-○; Transformation frequency by pUB110  
●-●; Transformation frequency by pBD64

결과 Fig.4에서 보는 바와 같이 100 µg/ml에서는 2시간 후에 200 µg/ml는 1.5시간 후에 100% 원형질체 형성율을 보였는데 이는 균종에 따라 다소 차이는 있으나(17-19) *Bacillus subtilis*에서의 보고(15, 20, 21)와 거의 일치하였다.

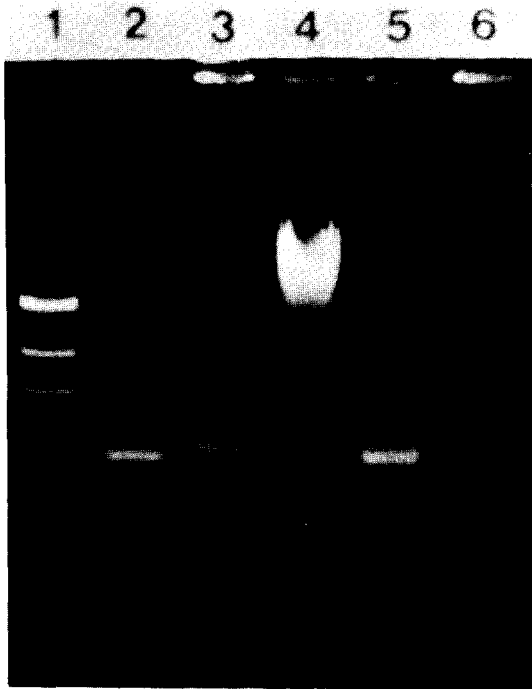
**원형질체 재생조건**

Agar의 농도는 원형질체의 정상세포로의 재생과 형질전환체의 안정성에 큰 영향을 미치므로 재생용 기본배지에 포함된 agar 농도가 재생에 미치는 영향을 조사하기 위하여 agar 농도를 0.6에서 1.4%로 하여 재생배지(DM3)를 만든 다음 원형질체를 도말하였을 때, 0.8% agar 농도에서 최고의 재생율을 보여주었으며 거의 모든 *Bacillus* 속의 보고와 일치하였다(Fig.5)(15, 17, 20, 21).

재생용 배지에 첨가된 삼투 안정제인 sodium succinate의 농도가 재생에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Na-succinate의 농도를 달리한 재생용 배지에서 재생율은 Fig.5에서처럼 0.5M의 Na-succinate 농도에서 최고의 재생율을 나타내었는데 이것은 *Bacillus subtilis*와 역시 일치하였다(13).

**형질전환조건**

40%(w/v) PEG 6,000을 DNA 첨가 직후 5ml SMMP의 원형질체 현탁액에 첨가한 농도가 형질전환에 미치는 영향을 조사한 결과, pUB 110과 pBD



**Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of pUB110 and pBD64 plasmid DNA obtained from the transformants.**  
 Lane 1: λ DNA Hind III digest  
 Lane 2: Standard pUB110  
 Lane 3: Standard pBD64  
 Lane 4: *Bacillus* sp. K17  
 Lane 5: Transformants by pUB110  
 Lane 6: Transformants by pBD64

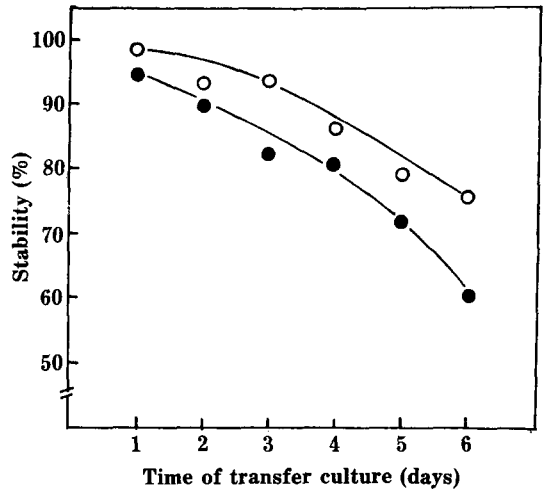
64는 30% (v/v) 농도에서 최고의 형질전환 빈도를 나타내었다(Fig.6). 이때 PEG는 cell이 DNA를 수용하는데 inducer로서 작용하여 plasmid DNA의 형질전환율을 증가시키는 것으로 사료된다(22).

PB 배지에서 *Bacillus* 속 K-17의 생육시간이 형질전환에 미치는 영향은 pUB 110은 4시간, pBD 64는 5시간 배양했을 때 최고의 형질전환 빈도를 나타내었는데 이것은 대수증식기 초기 때 포자의 혼입이 최저인 것으로 생각된다.

*Bacillus* 속 K-17의 원형질체에 DNA를 여러 농도별로 첨가하여 형질전환시켜 본 결과 DNA의 농도가 증가할수록 형질전환체 수도 상대적으로 증가하였는데, 이는 competent cell로 형질전환시킬 때 DNA 농도가 일정량 이상 첨가시 오히려 형질전환 빈도가 떨어진다는 보고와는 차이가 있었다.

**형질전환체의 특성**

형질전환체에서 분리한 plasmid를 0.8% agarose



**Fig. 8. Plasmid stability in *Bacillus* sp. K-17 transformants.**

- - ○ ; *Bacillus* sp. K-17 (pUB110)
- - ● ; *Bacillus* sp. K-17 (pBD64)

$$\text{Stability} = \frac{\text{Colony number on selective medium}}{\text{Colony number on complete medium}} \times 100$$

gel에서 전기영동하여 검색하였다(Fig.7).

pUB 110과 pBD 64에 의한 형질전환체를 비선택배지에서 24시간 간격으로 계대배양하면서 그 때마다 pUB 110의 형질전환체는 kanamycin, pBD 64는 chloramphenicol이 함유된 선택배지와 비선택배지에 각각 도말하였다. 이때 생육하는 colony 수를 백분율로 하여 plasmid의 안정성을 나타내었다. Fig.8에서 보는 바와 같이 pUB 110이 pBD 64보다 *Bacillus* 속 K-17에서 더 안정하였다.

pUB 110과 pBD 64를 포함하고 있는 *Bacillus* 속 K-17의 xylanase 활성을 비교한 결과, pUB 110의 경우는 2.5일, pBD 64는 3일만에 최고의 활성을 나타내었다. 이것은 plasmid를 함유한 cell은 plasmid에 의해 효소분비가 지연되는 것으로 생각된다(23). 형질전환체(pUB 110)는 *Bacillus* 속 K-17의 2일과 비교할 때, 효소분비시간은 다소 지연되는 현상을 보이나 효소활성도에서는 큰 차이를 보이지 않으므로 알칼리성 *Bacillus* 속 K-17의 cloning vector로서 유용하리라 생각되며, 특히 xylanase 유전자 또는 cellulase 유전자가 cloning되면 효소활성이 더욱 증가될 것으로 사료된다.

**요 약**

Cloning을 위한 host와 vector의 이용 가능성을

타진하기 위해 호알칼리성 *Bacillus* 속 K-17을 host 로, pUB 110 과 pBD 64를 vector로 사용하여 *Bacillus* 속 K-17의 protoplast 형질전환조건을 검토 하였다. 원형질체의 형성은 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 lysozyme 을 처리하였으며, 원형질체 형성의 최적 온도, pH 및 배양시간은 각각 40°C, 7.0 및 4시간으로 나타났다. 원형질체는 DM3 재생배지에서 재생시켰으며 0.8% agar, 0.5 M sodium succinate 농도에서 가장 재생이 좋았다. 형질전환시 PEG의 농도는 40% (w/v) PEG 6,000 30% (v/v)가 최적으로 나타났다. 형질전환체의 특성을 조사한 결과, plasmid 안정성은 pUB 110 이 pBD 64 보다 더 안정하였으며, 최대 효소활성은 비슷하였지만 효소 분비시간은 pUB 110 은 2.5일, pBD 64의 경우는 3일로 *Bacillus* 속 K-17의 2일에 비해 약간 지연되었다.

## 사 사

본 연구는 1986년도 한국과학재단의 목적기초 연구비에 의해 수행된 결과의 일부이며, 귀 재단의 연구비 지원에 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Curtiss, R.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **30**, 507 (1976)
2. Priest, F.G.: *Microbiol. Rev.*, **41**, 711 (1977)
3. Kate, E. and A.L. Demin: *Microbiol. Rev.*, **41**, 449 (1977)
4. Mahler, I.: Procedure for *B. subtilis* transformation, Method in Enzymology, Vol. XII, 846-850 (1968)
5. Cohen, S.N. and Chang, S.: *Molec. Gen. Genet.* **168**, 111-115 (1979)
6. Schrampf, M., M. Buiard, D.A. Hopwood and W. Goebel: *J. Bacteriol.*, **121**, 416 (1975)
7. Ehrlich, S.D.: *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 1680 (1979)
8. Gryzan, T.J., S. Contente and D. Dubrau: *J. Bacteriol.*, **134**, 318 (1978)
9. Gryzan, T., A.G. Shivakumar and D. Dubrau: *J. Bacteriol.*, **141**, 246-253 (1980)
10. Birnboim, H.C. and J. Doly: *Nucleic Acids Res. T.*, 1513 (1979)
11. Kang, I.S., *Ph. D. thesis, Gyeongsang Natl. University, Chinju, Korea*, (1986)
12. Gabor, M.H. and R.D. Hotchkiss: *J. Bacteriol.*, **137**, 1346 (1979)
13. Shcaefleer, P., B. Cami and R. D. Hotchkiss: **73**, 2151 (1976)
14. Foder, K., G. Hamdlezy and L. Alfoldi: *ibid.*, **121**, 390 (1975)
15. Frehel, C., A.M. Lheriter., R.C. Sanchez. and Schaeetter, P.: *J. Bacteriol.*, **173**, 1354 (1979)
16. Foder, K., and L. Alfold: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **73**, 2147 (1976)
17. Gotz, F., S. Ahrne. and M. Lindberg: *J. Bacteriol.*, **145**, 74 (1981)
18. Kaneko, H. and K. Sakaguchi.: *Agri. Baiology*, **43**, 1007 (1979)
19. Pallerori, N.J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1965 (1983)
20. Kano, M., M. Sasatsu. and H. Hamashima.: *Microbiol Letters*, **5**, 44 (1978)
21. Wyrlic, P.B. and H.J. Rogers.: *J. Bacteriol.*, **116**, 456 (1973)
22. Levi-Meyrueis, C., K. Foder. and P. Schaeetter.: *Molec. Gen. Genet.*, **179**, 589 (1980)
23. Canosi, U., A. Iglesias and T.A. Trautner: *Molec. Gen. Gent.*, **181**, 434 (1981)

(Received April 1, 1989)