

호알칼리성 *Bacillus* sp.가 생산하는 Bacteriolytic Enzyme을 이용한 *Bacillus subtilis*의 형질전환

유주현* · 이인숙 · 옥승호 · 박희경 · 염도영 · 배동훈¹

연세대학교 식품공학과, ¹단국대학교 식품공학과

Genetic Transformation of *Bacillus subtilis* by the Bacteriolytic Enzyme from Alkalophilic *Bacillus* sp.

Yu, Ju-Hyun*, In-Sook Lee, Seung-Ho Ohk,
Hee-Kyoung Park, Do-Young Yum and Dong-Hoon Bai¹

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

¹Department of Food Engineering, Dankook University, Chunan 330-180, Korea

Abstract — The extracellular bacteriolytic enzyme from alkalophilic *Bacillus* sp. YJ-451 was endopeptidase which hydrolyzes the peptide bond at the amino group of D-glutamic acid in the peptidoglycan. Protoplast transformation system of *B. subtilis* by the lytic enzyme that differs, in mechanisms, from lysozyme which was used to transformation of *B. subtilis* was investigated. High protoplast yield was obtained from cells cultured in PAB at the late logarithmic growth phase. Protoplasts of *B. subtilis* were obtained at best efficiency by treatment with 5×10^2 U/ml lytic enzyme in the pH 6.5 of SMMP buffer containing 0.5 M sucrose. Cell wall was regenerated efficiently on DM-3 (pH 7.3) medium containing 0.8% agar. Under the best condition for protoplast formation and regeneration, the highest transformation efficiency was achieved with 30% (w/v) PEG (M.W. 6000) treatment for 2 min. The transformation efficiency according to plasmid DNA concentration showed a linear relationship to DNA amounts. The transformation frequency by lytic enzyme was lower than lysozyme, but the regeneration time of the one was more rapid by 30 hr than the other.

*Bacillus*속 미생물은 인체 및 동물체에 비병원성으로 특정한 환경하에서 분화하여 내생포자를 형성하며 항생물질, 산증제 등과 다양한 효소를 세포외로 분비하므로 세포분화과정 및 체계 연구의 모델로서 그리고 유전자 발현을 위한 숙주세포로서 많은 연구가 되어 왔다(1).

B. subtilis 형질전환 방법 중 가장 효율적인 원형질체 형질전환에서 원형질체 형성을 위하여 세포벽 분해효소인 lysozyme이 사용되는데 그 기질은 세균 세포벽의 polysaccharide이다(2). 이후 많은 용균효소들이 동식물 뿐 아니라 여러 종류의 미생물로부터 분리되었는데, 그 작용기작에 따라 glycosidase, N-acetylmuramyl-L-alanine amidase, endopeptidase,

exopeptidase와 같이 분류된다. 세포벽 용해효소는 peptidoglycan에 대한 높은 기질특이성으로 인해 세균의 세포벽 구조를 밝히는데 이용되어 미생물 분류에 많은 발전을 가져왔으며, 미생물의 오염으로부터 식품을 보호하는 식품보존제로 사용될 뿐 아니라(3), dextran 등과 conjugate를 만들어 emulsifier로써 의약품 및 식품에 응용되며(4, 5), 세포내 유용물질을 분리하고 연구하는데 사용되고 있다.

일반적으로 미생물이 생육할 수 없는 극한 조건에서도 생육할 수 있는 미생물중 호알칼리성 미생물은 알칼리성 protease의 생산, cyclodextrin의 생산 및 알칼리성 산업폐수의 처리에 사용되는 등 이용성의 증가로 관심이 높아지고 있다. Yu 등은 pectate lyase, xylanase, cyclodextrin glycosyltransferase, β -xylosidase, β -galactosidase, 등을 생산하는 호알칼리성 *Bacillus* sp.를 알칼리 조건하에서 토양으로부터 분리한

Key words: *Bacillus* sp., lytic enzyme, protoplast transformation

*Corresponding author

바 있으며(6, 7) 이들 중 xylanase, β -xylosidase, pectate lyase 유전자등을 *E. coli* 등에 cloning한 바 있다(8-10). 또한 Yu 등은 토양으로부터 알칼리 조건하에서 생육하는 미생물 중 세포벽 용해효소 생산균주인 호알칼리성 *Bacillus* sp. YJ-451을 분리하였는데 지금까지 보고된 세포벽 용해효소와 물리 화학적으로 새로운 특성을 나타냄을 밝혀 그 생리적 특성과 효소적 특성을 검토하였으며, *E. coli*에 cloning을 하여 그 유전자의 염기서열을 결정하였다(11-13). 새로운 lytic enzyme의 세포벽에 대한 분해산물 분석으로 미생물 세포벽에 대한 작용기작을 조사한 결과, peptidoglycan의 peptide subunit 중 L-alanine과 D-glutamic acid 사이의 peptide 결합을 절단하므로, *Bacillus*속 균주의 원형질체 형질전환에 사용되는 기존의 lysozyme과 그 작용기작이 다름을 밝혔다(14). 지금까지 보고된 세포벽 용해효소들 중 L-alanine과 D-glutamic acid사이의 peptide 결합을 분해하는 효소들은 모두 phage induced enzyme이었는데 본 lytic enzyme은 미생물이 직접 생산한다는 점에서 최초이다. 또한 호알칼리성 *Bacillus*속에서 분리되었고 반응조건 등이 알칼리 조건이라는 면에서 기존의 보고되었던 효소들과는 차이를 보였다.

따라서, 본 연구에서는 lytic enzyme을 이용하여 *Bacillus subtilis*의 protoplast의 형성, 재생에 관한 조건을 검토하고 형질전환을 수행하여 기존의 lysozyme과 작용기작이 다른 새로운 lytic enzyme이 원형질체 형질전환에 사용될 수 있음을 보이고, lytic enzyme의 유전공학적 연구에의 응용성을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

본 연구에 사용된 균주로는 bacteriolytic enzyme을 생산하는 호알칼리성 균주인 *Bacillus* sp. YJ-451(11)과 형질전환체의 host로서 *B. subtilis* DB104(15)를 사용하였으며 pUB110(16)을 plasmid DNA로 사용하였다.

배지 및 완충용액

균주의 보존에는 TBAB (Tryptose blood agar base, Difco)를 사용하였고, lytic enzyme 생산을 위한 배지로는 alkaline medium(11)을 사용하였다. 형질전환을 위한 액체배지는 PAB (Penassay broth = Antibiotic medium 3, Difco)를 사용하였으며, 원형질체의

재생을 위한 기본배지로는 DM-3 재생배지(17)를 사용하였고, 항생물질을 첨가할 경우 kanamycin을 1 mg/ml 농도로 가하여 사용하였다. 원형질체의 형성 및 세척에는 2×SMM 완충용액과 4×PAB를 동량 섞은 SMMP(18) 완충용액을 사용하였다.

Lytic enzyme의 조제

효소생산배지에서 하룻밤 배양한 종배양액을 효소생산배지에 1%(v/v)되도록 접종하여 교반속도 350 rpm 및 통기량 3.5 vvm으로 30°C에서 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상등액을 조효소액으로 사용하여 Jung 등의 방법(11)으로 효소를 분리정제하였다.

원형질체의 형성 및 재생

원형질체 형성을 위하여 30°C에서 150 rpm으로 OD_{550 nm} = 0.5까지 배양한 50ml PAB 배양액을 원심분리하여 SMMP로 세척한 후 5 ml SMMP 완충용액에 현탁하고 lytic enzyme을 5×10² U/ml 농도로 가하여 37°C에서 90분간 반응시켰다. 원형질체 형성 정도를 위상차 현미경으로 관찰하였고 원형질체수는 혈구계수기(Petroff-Hausser counter, Hausser scientific Co.)를 이용하여 측정하였다. 원형질체의 재생은 형성된 원형질체를 SMMP 완충용액에 적정배수로 희석하여 항생물질을 첨가하지 않은 DM-3 재생배지에 도말하여 재생하였다. 재생빈도는 도말 전의 총 원형질체의 수(A)와 DM-3 재생배지에 도말하여 2일간 배양한 후 나타난 colony수(B)를 측정하고 원형질체를 증류수로 처리하여 도말하여 배양한 후 생성된 colony수(C)를 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Regeneration frequency} = \frac{B-C}{A}$$

A : No. of protoplasts plated

B : No. of colonies regenerated

C : No. of osmotic resistant cells

형질전환 및 빈도

*B. subtilis*의 형질전환은 Cohen 등의 방법(17)을 변형하여 행하였다. 형성된 원형질체를 2,600 g에서 10분간 원심분리한 후 균체를 SMMP 완충용액으로 세척하고 1 ml SMMP 완충용액에 현탁시켜 2×SMM 완충용액을 동량 가한 DNA 용액을 첨가하였다. 40%의 polyethyleneglycol 6000을 50 ml의 2×SMM 완충용액에 녹이고 최종 부피를 100 ml로 한 40% PEG

용액 3 ml를 즉시 가하여 섞어주고 실온에서 2분간 방치한 후 SMMP 완충용액 10 ml를 혼합하여 2,600 g에서 10분간 원심분리하였다. 0.5 ml SMMP 완충용액으로 균체를 현탁시키고 37°C에서 70 rpm으로 90분간 진탕 배양하여 유전자를 발현시킨 후 항생물질이 첨가된 DM-3 재생배지에 도말하였다. 원형질체의 형질전환 빈도는 kanamycin 1 mg/ml를 포함하는 DM-3 재생배지에서 생성된 colony수를 항생물질을 첨가하지 않은 배지에서 생성된 colony수로 나눈 값으로 하였다.

형질전환체로부터 plasmid DNA의 분리 및 확인

Plasmid vector pUB110에 의해 형질전환된 *B. subtilis* DB104의 형질전환체로부터의 plasmid 분리는 Doi 등의 방법(19)에 따라 하였다. 분리한 plasmid는 TAE 완충용액(40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)으로 0.8% 수평 agarose gel 상에서 80~100 V로 3~5시간 전기영동한 후 0.5 µg/ml의 ethidium bromide 용액에서 15~20분간 염색하고 254 nm의 자외선 조명하에 관찰하였다.

결과 및 고찰

원형질체 형성조건

배양배지 중에 glycine을 첨가함으로써 lysozyme 처리시 원형질체가 쉽게 형성되며 방선균등의 원형질체 형성을 위해 배양배지 중 glycine을 첨가하는 방법이 보편적으로 이용되고 있다. Lytic enzyme에 의한 *B. subtilis*의 원형질체 형성시 glycine을 배양배지에 첨가하였을 때의 생육과 원형질체 형성을 조

사하였다. Glycine을 0.5% 첨가한 경우에 첨가하지 않은 경우보다 약 2배의 생육저해 현상을 나타내었고 1.0% 이상 첨가했을 때는 생육이 거의 불가능하였으며(Fig. 1) 원형질체의 형성도 glycine을 0.5% 첨가시 생육저해로 인해 전혀 첨가하지 않은 경우보다 원형질체 형성에 좋지 않았다. 또한 lysozyme과 lytic enzyme을 각각 처리한 경우에 그 작용기작의 차이로 원형질체 형성율은 lysozyme을 처리하였을 때가 다소 높았다.

Lytic enzyme을 이용한 *B. subtilis* 원형질체 형성의 최적 생육시기를 알아보기 위하여 생육시기 별로 균체를 모은 후 lytic enzyme을 처리한 결과 550 nm에서 흡광도가 0.5인 경우 즉, 대수기 말기의 균체가 원형질체 형성율이 가장 좋았으며 정지기 균체의 원형질체 형성율은 다소 감소하는 경향을 보이고 있다(Fig. 2). 이러한 결과는 정지기로 접어들면서 세포벽의 두께가 신장되어 원형질체 형성에 좋지 않은 영향을 미친다는 보고와 일치하고 있다(20).

Lytic enzyme에 의한 원형질체 형성시 세포벽 제거정도에 따라 재생율과 형질전환율이 크게 영향을 받는다(21). 원형질체 형성과 재생 및 형질전환에 가장 효율적인 원형질체를 얻기 위해 lytic enzyme의 농도를 5×10^2 U/ml부터 2×10^3 U/ml까지 변화시켜 세포벽을 분해시킨 후 원형질체 형성정도를 비교한 결과 농도가 증가할수록 원형질체 형성율은 점차 증가하는

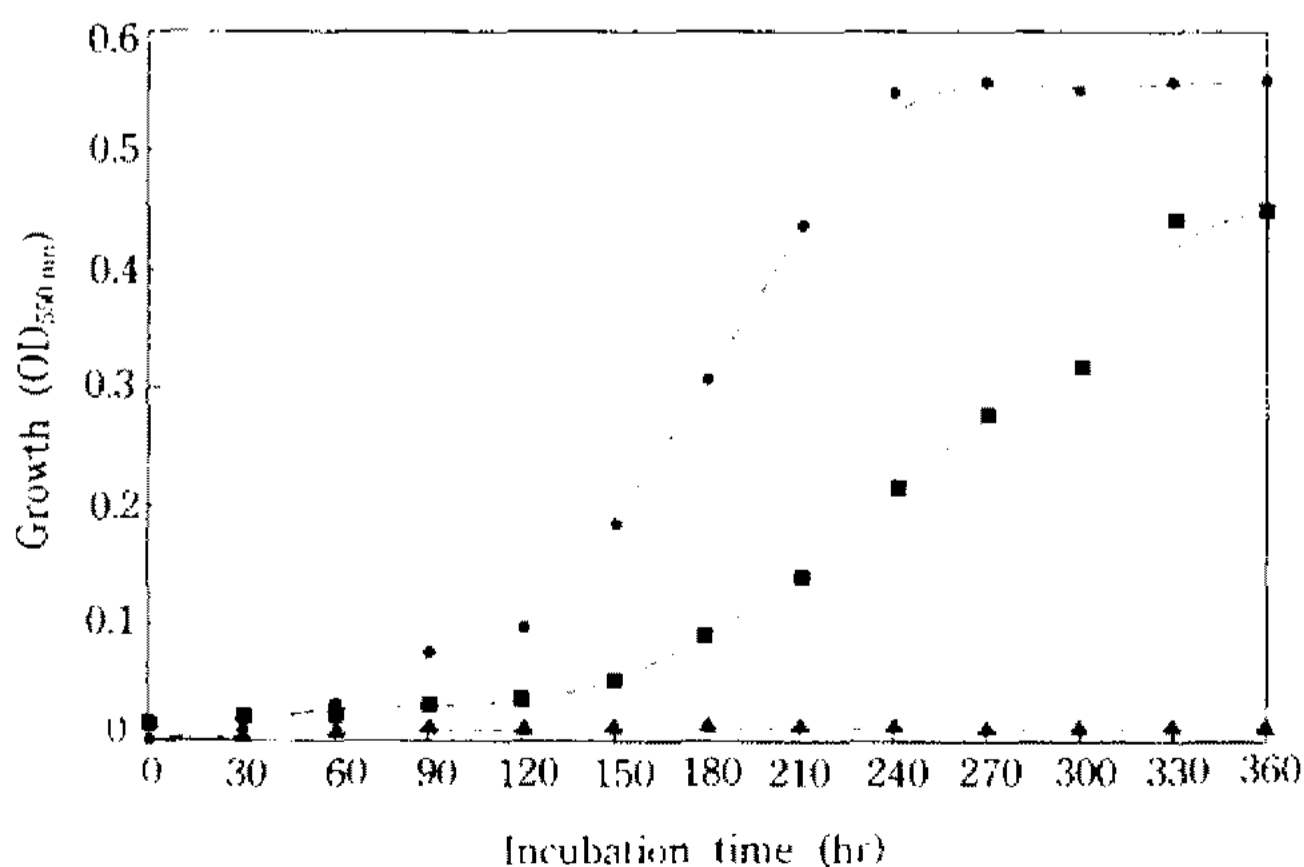


Fig. 1. Time course of glycine addition on growth of *B. subtilis* DB104.

▲, 0% glycine; ■, 0.5% glycine; ▼, 1.0% glycine

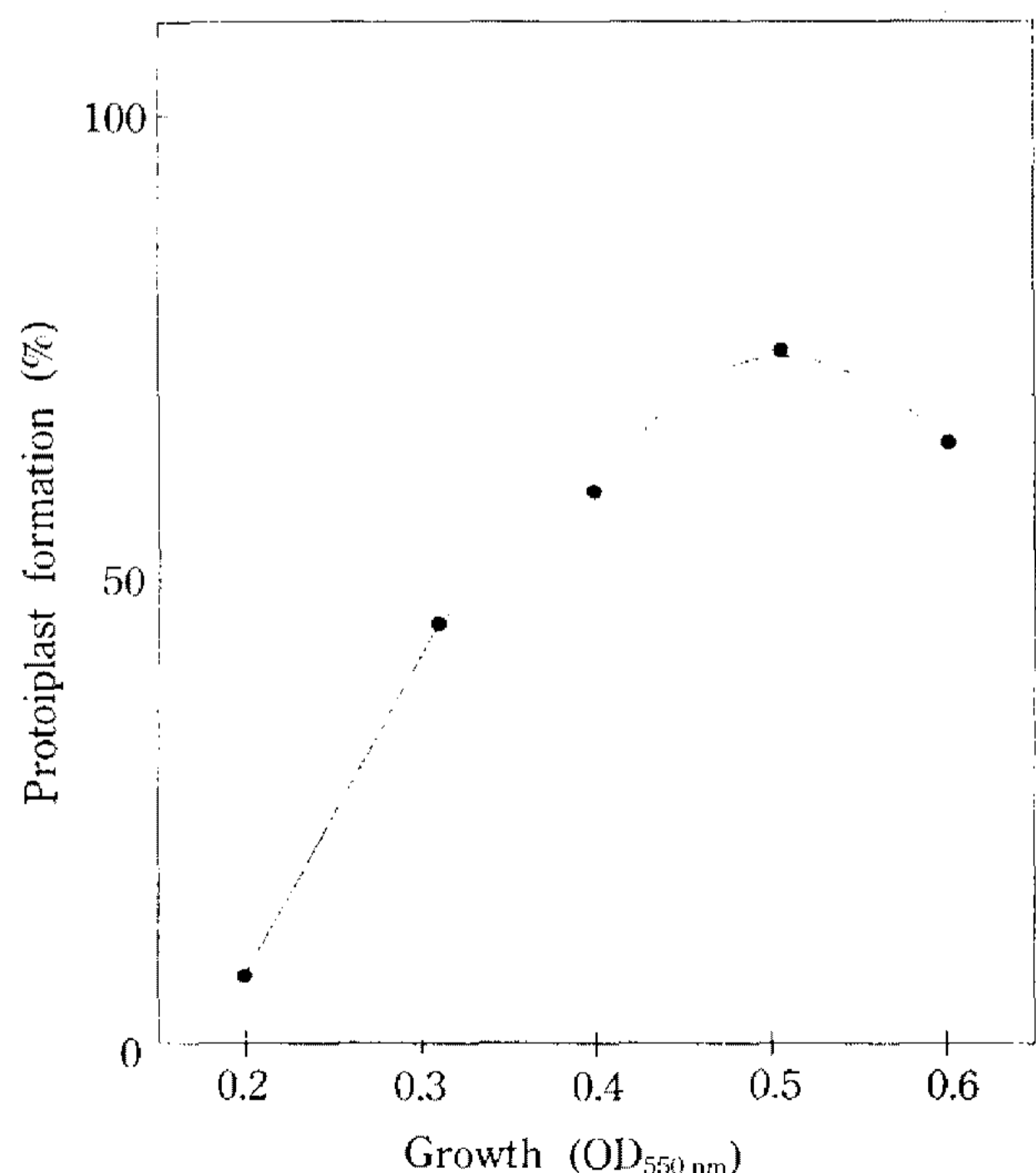


Fig. 2. Effect of growth phase on protoioplast formation. The lytic enzyme concentration was 5×10^2 U/ml.

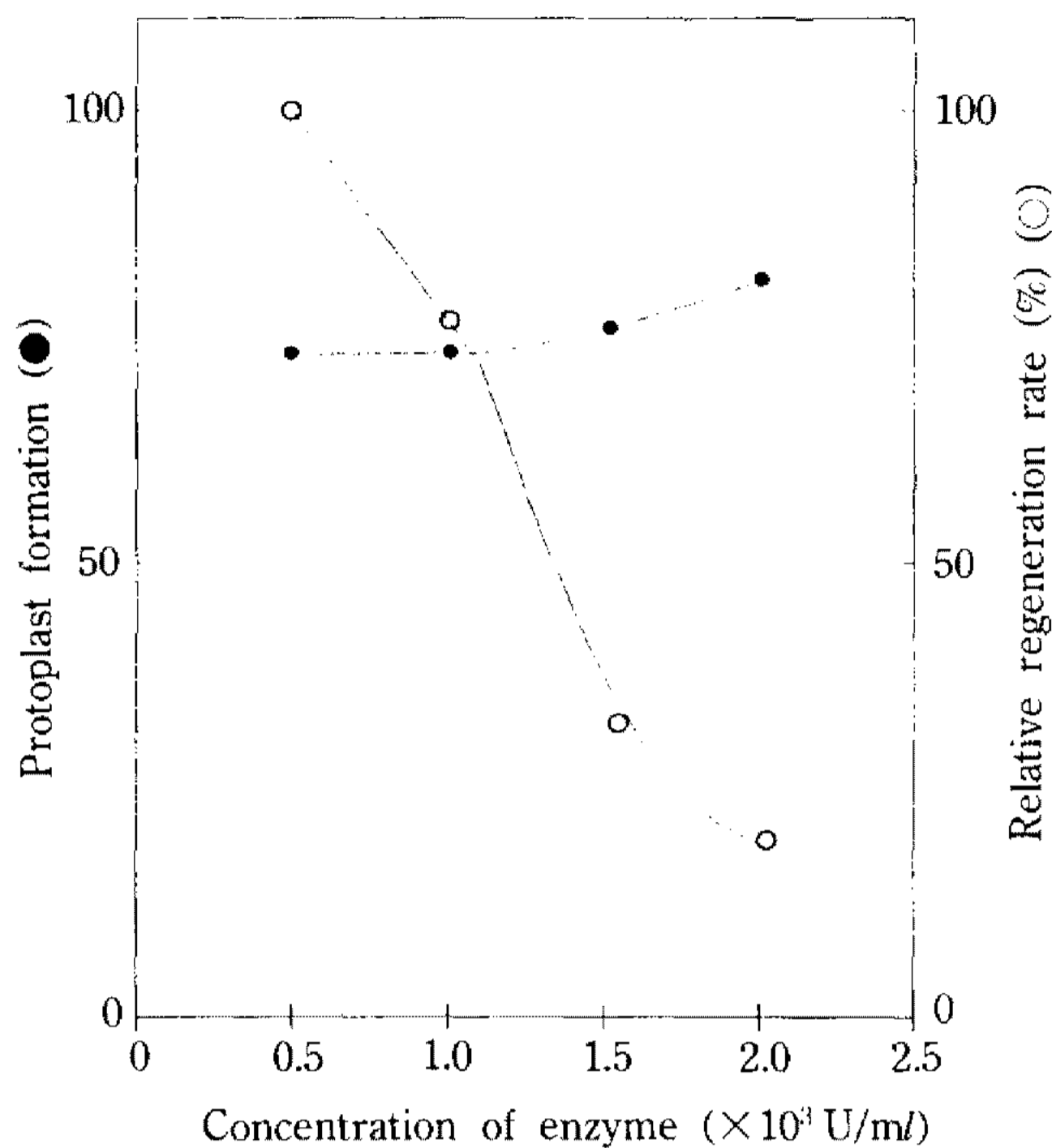


Fig. 3. Effect of lytic enzyme concentration on protoplast formation and regeneration.

경향을 보였으나 각 농도별 재생율을 비교하였을 때 농도 증가에 따라 재생율이 급격하게 감소하여(Fig. 3) lytic enzyme의 최적 농도는 5×10^2 U/ml로 하였다. Lysozyme의 경우, *Bacillus*(22), *Streptococcus*(23) 등의 세균에는 20~200 μ g/ml 농도가, *Streptomyces* 등의 방선균(23)에는 1~5 μ g/ml 농도가 원형질체 형성의 최적 농도임이 보고되었으며 균주의 속, 종에 따라 lysozyme에 대한 감수성이 서로 다른 것으로 알려져 있다.

원형질체의 형성에 대한 lytic enzyme 반응 온도의 영향을 조사하기 위해 25°C에서 45°C까지 온도를 달리하여 형성된 원형질체 수를 비교하였을 때 37°C에서 원형질체 형성율이 가장 좋았으며(Fig. 4) *B. subtilis*에 lysozyme을 처리하여 원형질체를 형성할 때와 일치하는 결과를 나타내었다.

Lytic enzyme에 의한 원형질체 형성의 반응 최적 pH를 조사하기 위하여 SMMP 완충용액의 pH를 *B. subtilis*의 lysozyme에 의한 원형질체 형성의 반응 최적 pH인 6.5(22)에서 lytic enzyme의 최적 pH인 10.0까지 변화시켰을 때, pH 6.5에서 최고의 원형질체 형성을 보이며 pH 7.0 이상에서는 약간씩 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 본 lytic enzyme은 pH 5~10 범위에서 80% 이상의 활성을 유지하기 때문에 pH 변화에 큰 영향을 받는 것 같지는 않으나 pH가 알칼리로 변화되었을 때 세포 자체의 운동성이 약해지고

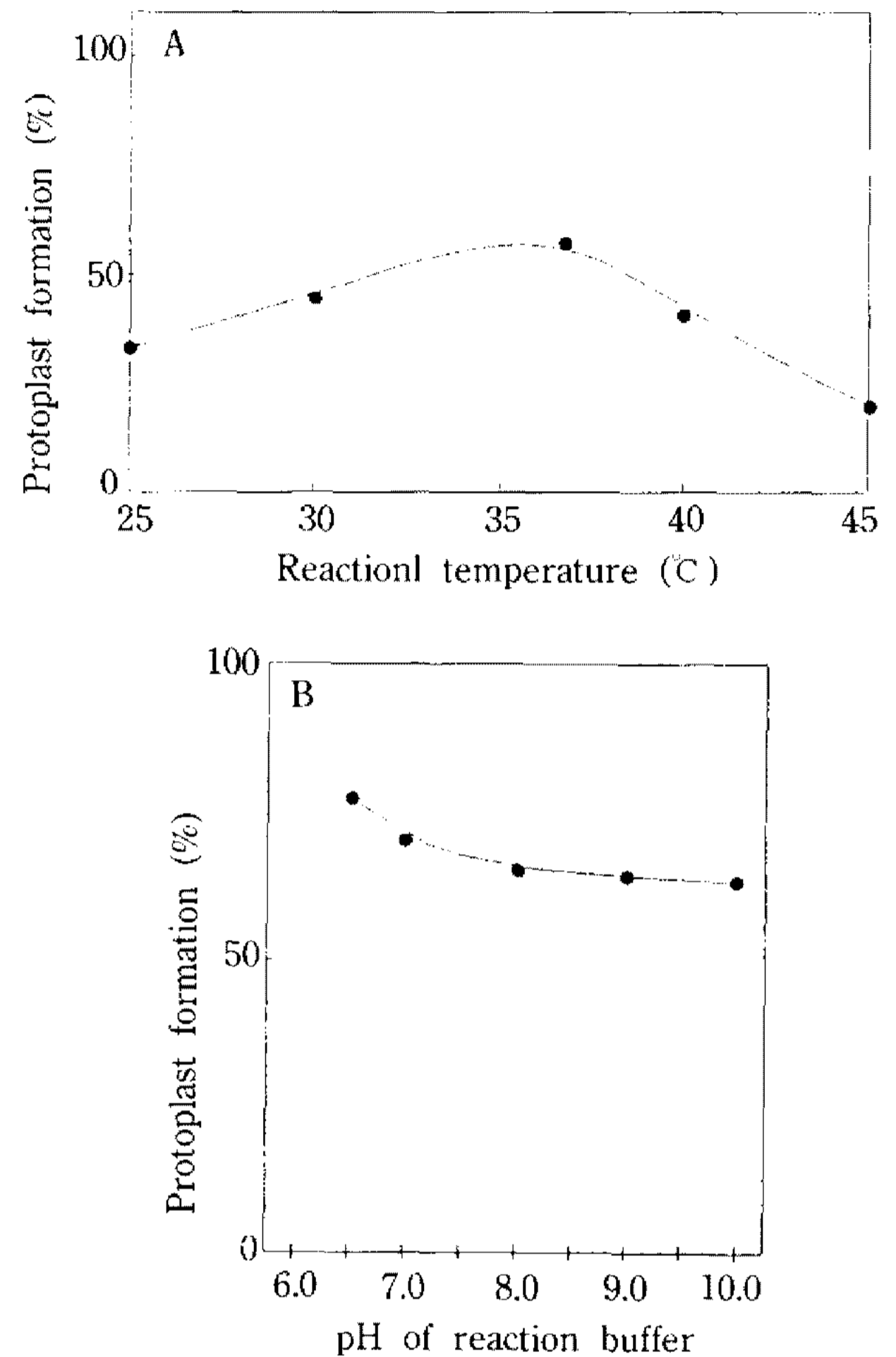


Fig. 4. Effect of enzyme treatment temperature (A) and pH (B) on protoplast formation.

서로 응집해 있는 양상을 보였다.

일반적으로 원형질체의 형성과 재생에 적당한 lytic enzyme 처리 시간은 30분에서 4시간이라고 보고되어 있다(24). 본 lytic enzyme의 경우, 90분까지 처리하였을 때 원형질체 형성율은 점차 증가하여 70% 이상이었으나 재생율은 처리 시간에 따라 서서히 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5). 장시간의 lytic enzyme 처리시 재생율이 감소하는 것은 생성된 원형질체의 안정성과 관련되는데, 세포벽이 거의 완전히 분해되어 재생시 필요한 residual primer까지도 분해되기 때문인 것으로 생각되었다.

원형질체 재생조건

SMMP 완충용액중의 osmotic stabilizer인 sucrose를 0.3 M부터 0.7 M까지 농도를 달리해 본 결과 0.6 M 첨가시 원형질체 형성이 가장 잘 되었으며 재생율은 농도가 높아질수록 점차 감소하는 경향을 보이므로(Fig. 6) 최적 sucrose 농도는 원형질체 형성과 재생이 비교적 우수한 0.5 M 농도로 결정하였다. 이

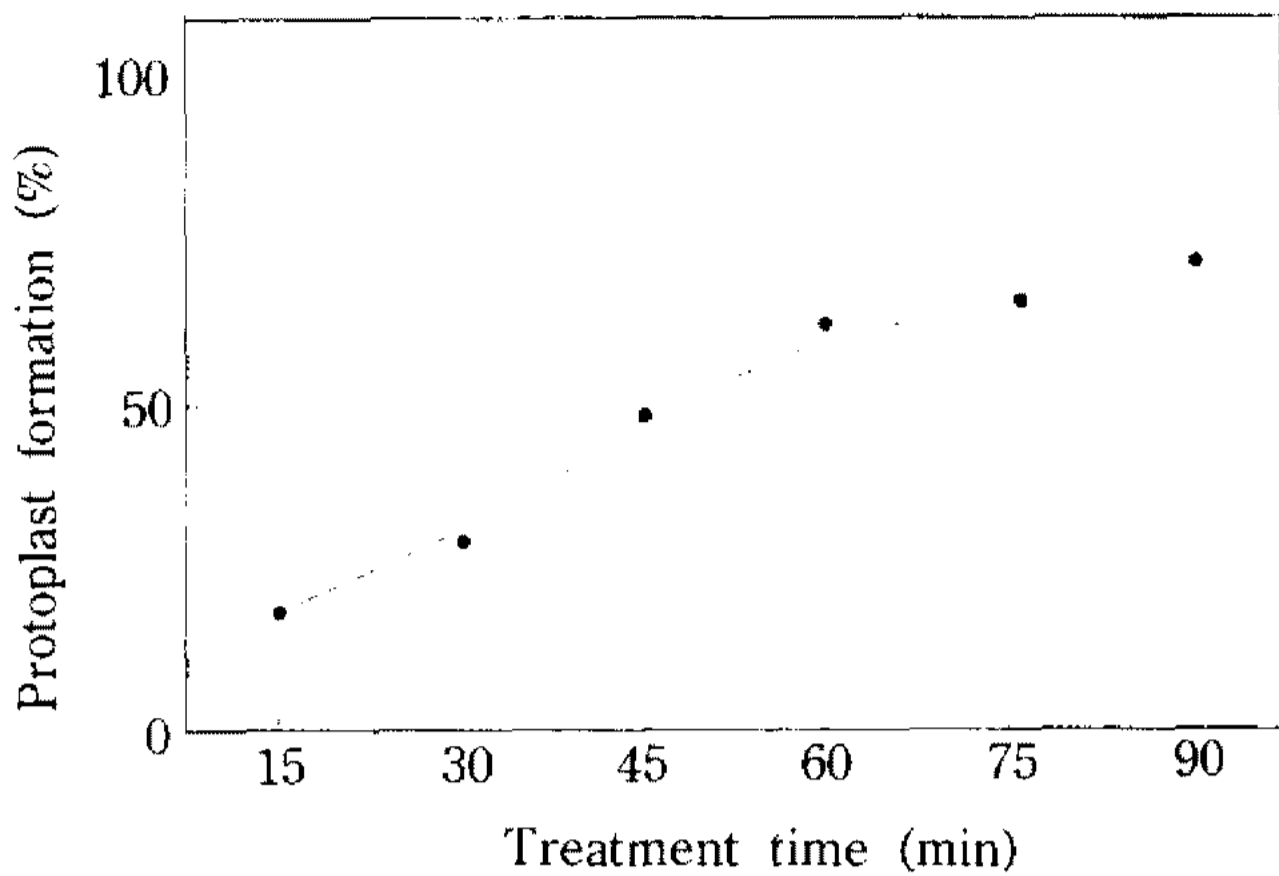


Fig. 5. Effect of reaction time on protoplast formation.

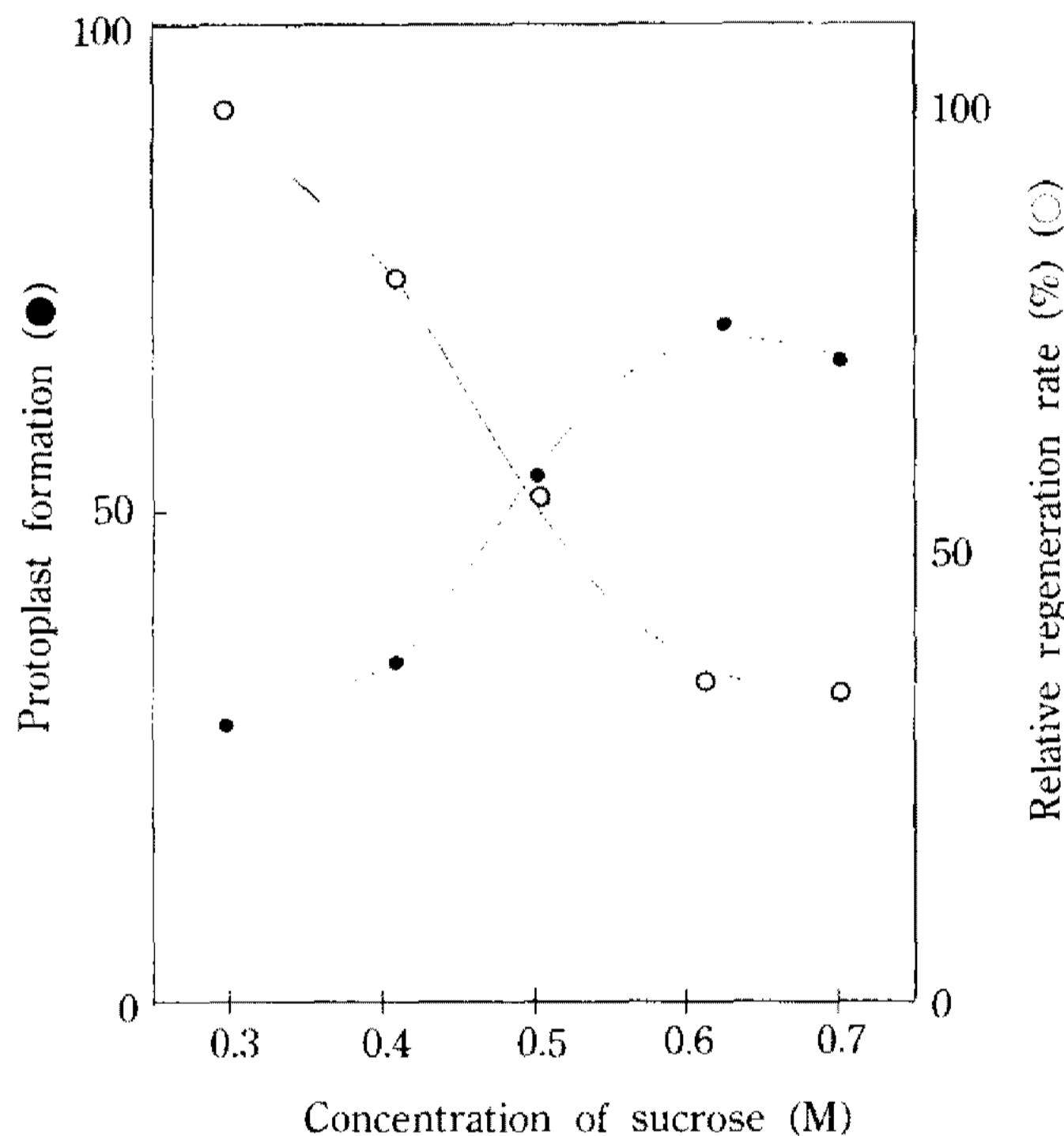


Fig. 6. Effect of sucrose concentration on protoplast formation.

결과는 lysozyme을 이용한 경우 *B. subtilis*의 보고(17)와 일치하였다.

Lytic enzyme에 의한 *B. subtilis*의 원형질체 재생시 DM-3 배지의 최적 pH를 알아보기 위하여 DM-3 배지의 pH를 6.5부터 8.0까지 달리하여 재생빈도를 비교해 본 결과 pH 7.3까지 증가하다가 서서히 감소하는 경향을 나타내어(Table 1) lysozyme에 의한 *B. subtilis*의 원형질체 재생의 pH와 일치하는 결과를 보였다.

재생배지 중의 agar 농도는 원형질체의 안정성 및 재생에 큰 영향을 미치므로 원형질체의 재생시 DM-3 재생배지중의 agar 농도의 영향을 조사한 결과 0.8%

Table 1. Effect of medium pH on regeneration

| pH | No. of regenerated cells (CFU/ml) ¹ | Regeneration freq. (CFU/ml) ¹ |
|-----|--|--|
| 6.5 | 7.3×10^5 | 6.03×10^{-3} |
| 7.0 | 7.6×10^5 | 6.28×10^{-3} |
| 7.3 | 9.5×10^5 | 8.93×10^{-3} |
| 7.5 | 1.08×10^6 | 7.85×10^{-3} |
| 8.0 | 8.1×10^5 | 6.69×10^{-3} |

1.21×10^8 /ml protoplasts were plated
CFU¹: colony forming unit

Table 2. Effect of agar percent of regeneration medium on regeneration

| Agar percent (%) | No. of regenerated cells (CFU/ml) ¹ | Regeneration freq. (CFU/ml) ¹ |
|------------------|--|--|
| 0.6 | 4.39×10^6 | 3.20×10^{-2} |
| 0.8 | 4.86×10^6 | 3.55×10^{-2} |
| 1.2 | 3.18×10^6 | 2.32×10^{-2} |
| 1.5 | 3.42×10^6 | 2.50×10^{-2} |
| 2.0 | 3.83×10^6 | 3.52×10^{-2} |

1.37×10^8 /ml protoplasts were plated
CFU¹: colony forming unit

agar 농도에서 최고의 재생율을 나타내었다(Table 2). Lysozyme에 의한 원형질체 형성시 대부분의 *Bacillus*속 균주는 0.8% agar 농도에서 최고의 재생율을 나타낸다는 보고(17, 20)와 일치하였다.

형질전환 조건

일반적으로 형질전환 최적화 실험에 사용되는 PEG 1000, 2000, 4000, 6000을 각각 40%(w/v)의 농도로 형질전환을 유도한 후 형질전환 빈도를 비교한 결과 PEG 분자량 증가에 따라 형질전환 빈도가 서서히 증가하는 양상을 보이며 PEG 6000에서 가장 좋은 형질전환 빈도를 나타내었다(Table 3). *B. brevis*의 경우 PEG 4000보다 PEG 6000을 사용시 최고의 형질전환 빈도를 얻었다는 결과(25)와 일치하나, PEG 400 이상에서 polymer size는 크게 중요하지는 않다고 보고되어 있다(26). 원형질체의 형질전환에서 PEG에 의해 형질전환이 유도되는 기작은 확실히 밝혀져 있지 않으나, PEG의 존재가 세포막이 DNA 투과를 용이하도록 하며, 원형질체내로 DNA 도입이 촉진되도록 형태학적인 변화를 유도한다고 보고되어 있다(27, 28).

PEG 6000의 농도가 형질전환율에 미치는 영향을

검토하기 위해 PEG 6000의 농도별로 형질전환을 수행한 결과, 0%(w/v)부터 형질전환 빈도가 점차 증가하다가 30%(w/v) 첨가하였을 때 가장 높은 형질전환 빈도를 나타내었는데(Fig. 7) *B. subtilis*(25), *Streptococcus lactis*(27), *Streptomyces*(28)와는 다소 다른 결과를 나타내었다.

PEG의 유도에 의한 plasmid DNA의 원형질체 내로의 도입시 DNA와 원형질체의 접촉시간이 형질전환율에 미치는 영향을 알아보기 위해 30%(w/v) PEG 6000을 2분간 반응시킬 때까지 형질전환 빈도가 서서히 증가하였고 그 이상을 반응시켰을 때는 형질전환 빈도의 증감이 거의 없었다(Fig. 7). 일반적으로 PEG에 오랫동안 노출되는 경우 원형질체의 안정성이 감소하므로(26) PEG에 의한 DNA의 접촉시간은 2분으로 하였다.

Table 3. Effect of M.W. of PEG on the transformation frequency

| M.W. of PEG | Transformation efficiency | Transformation frequency |
|-------------|---------------------------|--------------------------|
| None | 1.25×10^3 | 7.22×10^{-6} |
| 1000 | 3.48×10^3 | 2.01×10^{-5} |
| 2000 | 5.97×10^3 | 3.45×10^{-5} |
| 4000 | 9.61×10^3 | 5.55×10^{-5} |
| 6000 | 1.24×10^4 | 7.17×10^{-5} |

The total viable cell count in each transformation mixture was 4.33×10^7 .

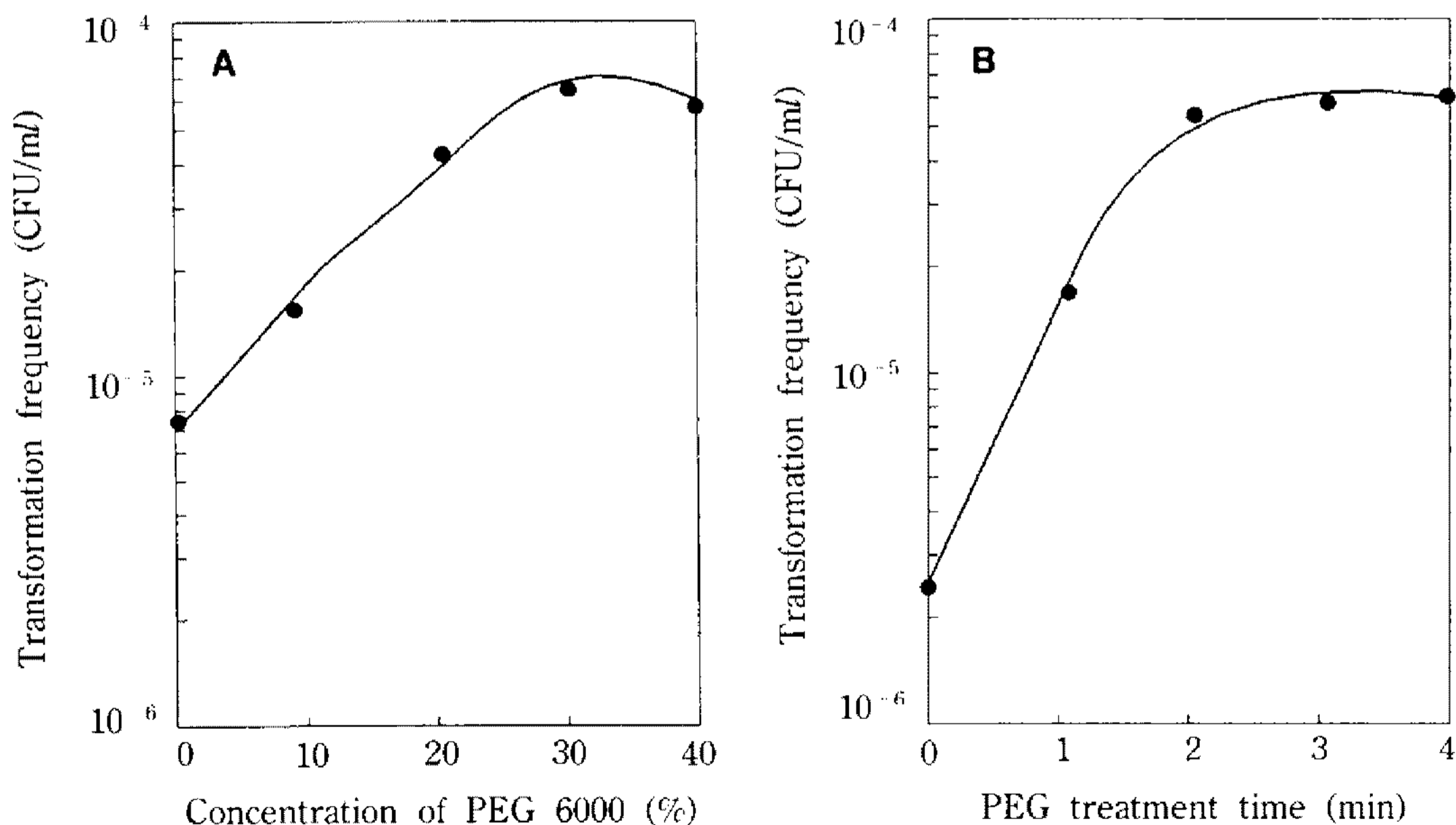


Fig. 7. Effect of PEG concentration and PEG treatment time on plasmid transformation.

●, PEG concentration; ■, PEG treatment time

Lytic enzyme에 의한 원형질체 형질전환시, covalently closed circular form의 plasmid DNA 농도에 따른 원형질체 형질전환율을 조사한 결과 DNA 농도의 증가에 따라 형질전환율도 비례적으로 증가하는 경향을 보이고 있으며(17, 21, 25, 26), 이는 competent cell로 형질전환시키는 경우 일정량 이상의 DNA 농도를 첨가할 때 오히려 형질전환 빈도가 감소한다는 보고(29)와 차이를 나타내었다.

Lytic enzyme과 lysozyme에 의한 형질전환의 비교

Lytic enzyme에 의한 *B. subtilis*의 원형질체 형성과 재생 및 형질전환의 최적 조건에 따라 형질전환을 수행하여 lysozyme에 의한 *B. subtilis*의 형질전환과 비교하기 위해 DNA 농도별로 형질전환을 수행한 결과 lysozyme에 의한 형질전환 빈도가 다소 높았는데 이는 lytic enzyme과 lysozyme의 작용기작의 근본적인 차이에 의한 것으로 생각되었다. 세균 세포벽의 망상구조에서 lysozyme의 작용부위는 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamin 사이의 결합으로 세포벽을 거의 완전히 분해하는데, lytic enzyme은 여러 접의 망상 구조를 이루고 있는 세포벽층의 peptidoglycan peptide subunit의 L-alanine과 D-glutamic acid 사이의 결합을 분해하여 세포벽을 한 겹씩 벗겨내는 작용을 하여 불완전한 원형질체를 형성하므로 DNA의 도입율이 lysozyme을 처리한 경우보다 상대적으로 낮다고 생각되었다. 따라서 원형

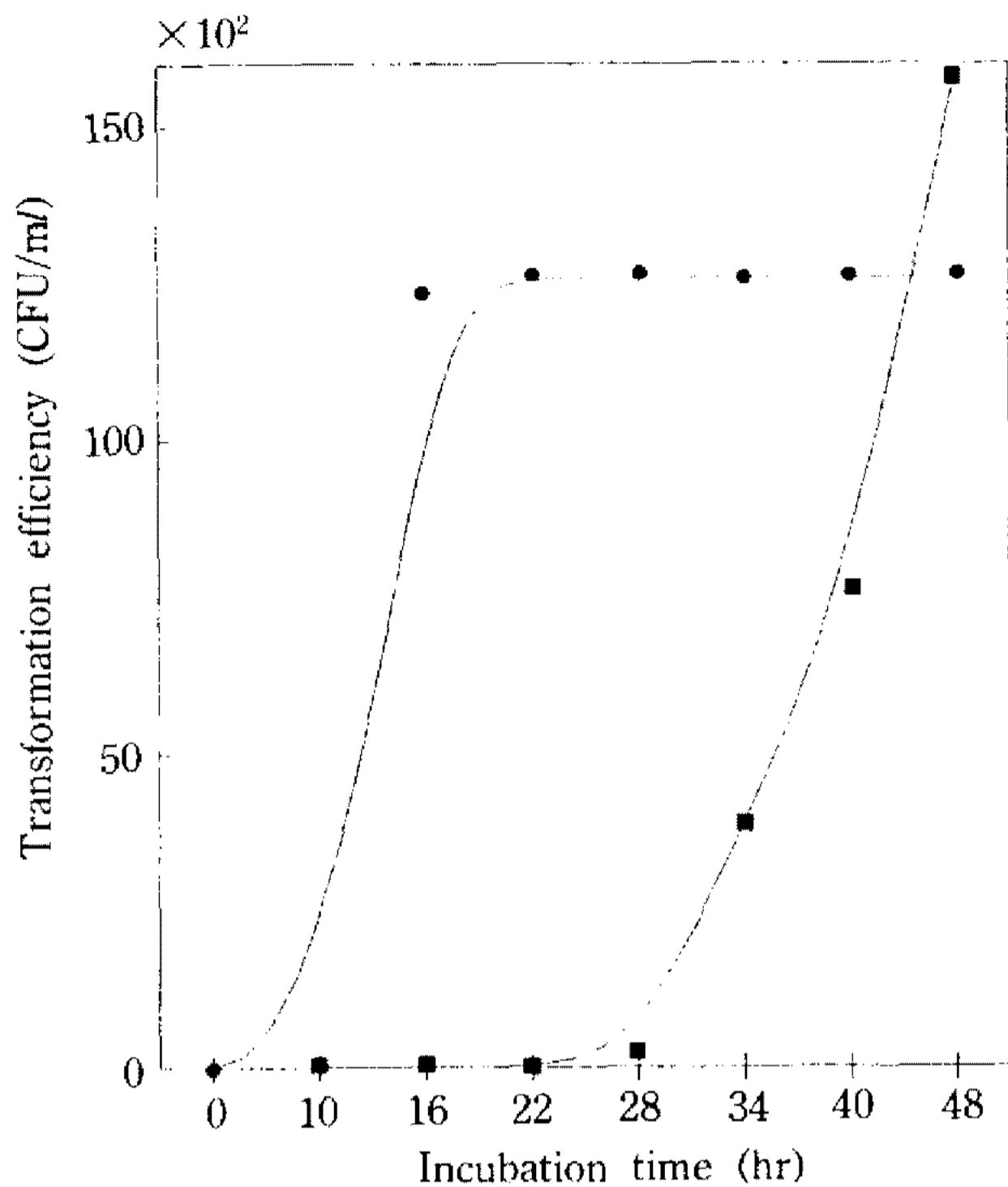


Fig. 8. Comparison of regeneration time on regeneration by treatment of lytic enzyme and lysozyme.

■, Lytic enzyme; ●, lysozyme

질체의 형성을 및 형질전환율은 lysozyme에 의한 형질전환보다 낮은 경향을 나타내나 재생은 더 용이할 것으로 생각되어 각각의 형질전환체가 재생되는 시간을 조사하였다. pUB110 1 µg을 최적 조건으로 형질전환하여 각 시간별로 형질전환체의 수를 비교한 결과(Fig. 8) lytic enzyme에 의한 형질전환시 배양후 약 16시간만에 colony가 생성되기 시작하여 그 이후부터는 colony수의 증가는 거의 없이 colony 크기가 증가하였다. 반면, lysozyme에 의한 형질전환시 배양 28시간이 지나면서 colony가 생성되기 시작하여 48시간 배양까지 colony수와 크기가 증가하였다. 이 결과는 lysozyme과 lytic enzyme의 작용기작의 차이에 의한 것으로 lysozyme을 이용한 형질전환체 재생시 요구되던 배양시간을 lytic enzyme을 사용하여 크게 단축할 수 있음을 보여주고 있다. Lytic enzyme의 형질전환율($1.26 \times 10^4/\mu\text{g}$)이 lysozyme의 형질전환율($1.58 \times 10^4/\mu\text{g}$)보다 다소 낮으나 형질전환체 출현 시간이 약 30시간 가량 빠르므로 신속히 형질전환체를 얻고자 하는 경우에 유리하다고 생각되었다.

B. subtilis DB104(pUB110)로부터 Doi 등의 방법 (19)으로 plasmid DNA를 신속분리한 결과 4.5 Kb pUB110 고유의 band를 가짐을 확인하였다. Lytic enzyme 처리후 2번의 세척에도 불구하고 원형질체에

소량 남아 있을 수 있는 lytic enzyme에 의해 plasmid DNA가 inactivation이나 modification이 될 수 있으므로 제한효소 처리를 하여 원래의 DNA와 동일한 DNA가 존재하는지 조사하기위해 제한효소 *EcoRII*의 인식부위가 하나 존재하는 4.5 Kb pUB110과 형질전환체로부터 분리한 DNA를 *EcoRII*으로 절단하여 크기를 비교하여 본 결과 *EcoRII*으로 절단된 4.5 Kb의 pUB110과 같은 위치에서 band를 확인하여 lytic enzyme에 의한 형질전환시 plasmid DNA는 lytic enzyme에 대해 안정함을 알 수 있었다(data not shown).

요 약

호알칼리성 *Bacillus* sp. YJ-451이 생산하는 bacteriolytic enzyme은 *Bacillus subtilis* 원형질체 형질전환에 사용되고 있는 세포벽 용해효소 lysozyme과 그 작용기작이 서로 다른 endopeptidase로 peptidoglycan peptide subunit의 L-alanine과 D-glutamic acid 사이를 절단한다. 이 lytic enzyme을 이용하여 *B. subtilis*의 원형질체 형질전환에 대한 조건을 검토하였다. 대수기 말기까지 생육시킨 균체에 lytic enzyme을 5×10^2 U/ml 농도로 37°C에서 pH 6.5로 90분간 처리하였을 때 원형질체 형성이 가장 잘 되었다. 원형질체 형성을 위한 완충용액내의 osmotic stabilizer인 sucrose는 0.5 M 농도가 가장 적당하였으며 0.8% agar가 첨가된 pH 7.3의 DM-3 재생배지에서 37°C로 재생시켰을 때 재생율이 가장 높았다. 형질전환 빈도는 30% (w/v) PEG 6000으로 2분간 처리하였을 때 최고의 형질전환 빈도를 나타내었다. *B. subtilis* 형질전환에 사용된 pUB110의 농도에 따른 형질전환율은 직선적으로 비례하는 양상을 보였으며, lytic enzyme을 사용하여 형질전환하였을 경우 lysozyme을 사용한 경우보다 형질전환 빈도는 다소 낮았으나 재생시간은 약 30시간 이상 빠르게 일어나 신속한 형질전환에 유리하였다.

참고문헌

1. Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* **41**: 711-753.
2. Salton, M.R.J. 1957. The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **21**: 82-91.
3. Hayashi, K., T. Kasumi, N. Kubo, and N. Tsumura. 1981. Purification and Characterization of

- the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agr. Biol. Chem.* **45**: 2289-2300.
4. Nakamura, S., A. Kato, and K. Kobayashi. 1990. Novel bifunctional lysozyme-dextran conjugate that acts on both gram-negative and gram-positive bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 3057-3059.
 5. Kato, A., Y. sasaki, R. Furuka, and K. Kobayashi. 1990. Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures high frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by plasmid DNA. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 107-112.
 6. Yu, J.H., Y.J. Chung, and K. S. Cuung, and D. H. Oh. 1986. Physiological properties and transformation of alkalophilic *Bacillus* sp. in *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 239-244.
 7. Yu, J.H., I.S. Kong, S.U. Kim, and J.M. Kim. 1987. Molecular cloning of CMCase gene from an alkalophilic *Bacillus* sp. in *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 29-33.
 8. Yu, J.H., Y.J. Chung, and J.S. Lee. 1989. Isolation and characterization of cyclodextrin glycosyl transferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 148-153.
 9. Park, D.C., J.M. Kim, Y.J. Chung, I.S. Kong, D.H. Bai, and Yu, J.H. 1989. Cloning and expression of β -xylosidase gene from alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 574-579.
 10. Yu, J.H., Y.S. Park, J.M. Kim, I.S. Kong, and Y.J. Chung. 1988. Cloning of pectate lyase gene of alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14 and its expression in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 316-319.
 11. Jung, M.H., I.S. Kong, D.H. Bai, and J.H. Yu. 1991. Purification and characterization of a bacteriolytic enzyme from alkalophilic *Bacillus* sp.. *J. Microbiol. Biotech.* **2**: 102-110.
 12. Yu, J.H., M.H. Jung, H.K. Park, and D.H. Bai. 1992. Cloning and expression in *E. coli* of a bacteriolytic enzyme gene from *Bacillus* sp.. *J. Microbiol. Biotech.* **2**: 161-165.
 13. Jung, M.H., S.H. Ohk, D.Y. Yum, I.S. Kong, D.H. Bai, and J.H. Yu. 1993. Nucleotide sequence of a bacteriolytic enzyme gene from alkalophilic *Bacillus* sp.. *J. Microbiol. Biotech.* **3**: 73-77.
 14. 김옥성. 1991. 호알칼리성 *Bacillus* sp.이 생산하는 용균효소에 의한 *E. coli* 세 포벽 용해에 관한 연구. 석사학위 논문. 연세대학교 대학원, 서울.
 15. Kawamura, F. and R.H. Doi. 1984. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J. Bacteriol.* **160**: 442-444.
 16. Gryczan, T.J., S. Contente, and D. Dubnau. 1978. Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **134**: 318-329.
 17. Cohen, S.N. and S. Chang. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 111-115.
 18. Dubnau, D. and R. Davidoff-Abelson. 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **56**: 209-221.
 19. Doi, R.H., T.I. Zaghoul, and F. Kawamura. 1985. Transformed coupling in *Bacillus subtilis* of a heterologous *Bacillus subtilis*-*Escherichia coli* gene fusion. *J. Bacteriol.* **164**: 550-555.
 20. Frehel, C., A-M. Lheritier, C Sanchez-Rivas, and P. Schaeffer. 1979. Electron microscopic study of *Bacillus subtilis* protoplast fusion. *J. Bacteriol.* **137**: 1354-1361.
 21. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi. 1982. Transformation of *Bacillus* protoplast by plasmid pTP4 DNA. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1617-1621.
 22. Fodar, K. and L. Alf Idi. 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**: 2147.
 23. Okamoto, T., Y. Fujita, and R. Irie. 1983. Fusion of protoplasts of *Streptococcus lactis*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2675-2676.
 24. Baltz, R.H. and P. Matsushima. 1981. Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* **127**: 137-146.
 25. Yakahashi, W., H. Yamagata, K. Yamaguchi, and N. Tsukagoshi. 1983. Genetic transformation of *Bacillus brevis* 47 protein-screening bacterium, by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **156**: 1130-1134.
 26. Gabor, M.H. and R. D. Hotchkiss. 1979. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplast. *J. Bacteriol.* **137**: 1346-1353.
 27. Kondo, J.K. and L.L. McKay. 1984. Plasmid Transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: Optimization and use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 252-259.
 28. Bibb, M.J., J.M. Ward, and D.A. Hopwood. 1978. Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature* **274**: 398-400.
 29. Reiersen A., R. Landén, A.L. vgren, G. Dalhammer, and H.G. Boman. 1987. Transformation of vegetable cells of *Bacillus thuringiensis* by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **169**: 1147-1152.

(Received August 3, 1993)