

내알칼리성 *Bacillus* sp.의 형질전환조건

심 창 환 · 정 용 준*

경민대학 식품영양과, 전주대학교 생명과학부*

Optimal Condition for Transformation of Alkali-tolerant *Bacillus* sp.

Chang-Hwan Shim and Yong-Joon Chung*

Dept. of Food and Nutrition, Kyungmin College, Euijungbu 562-1, Korea

*School of Life Science, Jeonju University, Chonju 560-759, Korea

Abstract

To develop the potential use as new host strain for gene cloning, the optimal conditions for transformation of alkali-tolerant *Bacillus* sp. were examined. The *Bacillus* sp. YA-14 was cultured to late logarithmic growth phase at 37°C in modified SPI medium (pH8.0) containing 0.4% MgSO₄, 0.5mM CaCl₂. 1 ml of competent cell was mixed with 0.5µg of plasmid DNA and incubated with shaking at 37°C for 40 min. The transformation frequency under the optimal condition was 4.53×10⁻⁶ CFU/ml /g plasmid DNA. The presence of 3.0×10⁶ daltons molecular weight pUB110 plasmid DNA in transformants was confirmed by electrophoresis and stably maintained in the new host.

Key words : *Bacillus* sp., transformation.

서 론

Bacillus 속 미생물은 여러 종류의 세포의 효소를 분비하며, 항생물질 및 생물학적 살충물질 등을 생산하는 것으로 잘 알려져 있다.¹⁾ 특히 이들이 생산하는 효소는 종류가 다양하고 균에 따라 내열성, 내알칼리성, 내산성 등의 특성을 지니고 있어, 식품산업에 있어서 산업적으로 매우 중요한 위치를 차지하고 있다.²⁾ 따라서 생산성 향상을 위한 균주의 개량이 변이체 처리 등의 방법을 통해 꾸준히 진행되어 왔으며, 배양 및 효소 정제공정의 효율화를 위한 연구도 활발히 행하여지고 있다.³⁾

근래에는 유전자 재조합 기술이 개발되어 이 방법에 의한 우량균주의 개발 및 유전 생화학적 연구에 많은 성과를 거두고 있다.^{4,5)} 이제까지는 유전자 재조합 기술을 산업에 응용하기 위해서 유전 생화학적으로 많은 연구가 이루어진 *Escherichia coli*를 숙주균주로 주로 사용하여 왔으나, 이에 따라 발생하는 분비문제 및 독성 문제가 대두되므로, 최근에 들어서는 숙주

균주로서 *Bacillus*속의 특성을 이용하여 유용물질을 생산하고 분비해 내리는 시도가 진행되고 있다.⁶⁾ 그러나 *Bacillus* 속 미생물의 host-vector system은 *E. coli*에 비해 크게 발전하지 못하였으며, 주로 이용되고 있는 vector로는 Ehrlich⁷⁾, Gryczan⁸⁾ 등이 개발한 *Staphylococcus aureus* 유래의 몇몇 플라스미드들이 있고, *E. coli*와 *Bacillus subtilis*에 있어서 shuttle vector개발에 관한 연구보고가 있다.⁹⁾

본 연구에서는 알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14¹⁰⁾에 *Bacillus*속의 cloning vehicle로 널리 이용되고 있는 plasmid pUB110¹¹⁾을 도입하여 형질전환의 최적조건을 조사함으로써 *Bacillus* 속 미생물의 host-vector system에 있어서 새로운 숙주균주로서의 이용 가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

1. Plasmid의 분리 및 정제

본 실험에 사용한 plasmid는 *B. subtilis* MI 113 (*arg* 15, *trp* C2, rM-, mM-)에 들어 있는 pUB110

Corresponding author : Yong-Joon Chung

authentic pUB110과 band를 비교함으로써 알 수 있었으며, reference DNA의 band와 비교하여 분자량이 약 3.0×10^6 daltons임을 확인하였고, 이 transformant의 Kanamycin내성은 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 또한 이 transformant는 20세대 계대배양한 후에도 plasmid pUB110이 안정하게 유지됨을 확인하였다.

2. 생육시기의 영향

일반적으로 생육시기가 미생물의 형질전환율에 커다란 영향을 미친다고 알려져 있으므로¹³⁾, *Bacillus* sp. YA-14의 생육시기에 따른 형질전환율을 살펴 보았다.

L-broth에서 하룻밤 배양한 종배양액을 MSPI배지에 5% (v/v) 되게 접종하여 37°C에서 진탕 배양하면서 30분 간격으로 배양액을 취하여 형질전환실험을 행한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 접종한 후 5시간만에 형질전환율이 최대에 도달하였다. 이때의 O.D.₅₅₀는 $1.2(9.8 \times 10^8 \text{ CPU}/\text{ml})$ 였고, 그 이상의 배양에서는 형질전환율이 현저히 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 초기 대수증식기에서 형질전환율이 높은 *Staphylococcus* 속^{7,8)}이나; 중간 대수증식기에서 형질전환율이 높은 *E. coli*¹³⁾의 경우와 차이를 보여 주었으며, 말기 대수증식기에서 형질전환율이 높은 *Streptococcus*속¹⁴⁾과 비슷한 경향을 보였다. 따라서 *Bacillus* sp. YA-14는 Anagnostopoulos 등¹²⁾의 *B. subtilis* 168을 사용한 형질전환실험에서와 같이 말기 대수증식기로부터 초기 정지기 사이에서 형질전환율이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

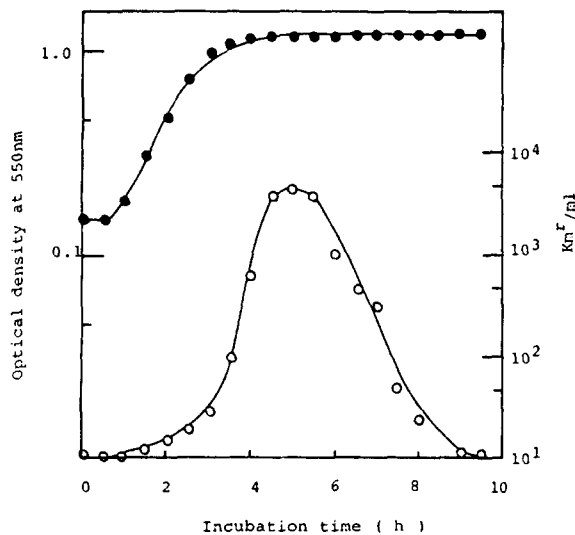


Fig. 1. Competence development in MSPI medium.

3. MgSO₄ 농도의 영향

Mg²⁺ 이온은 세포표면의 endonuclease를 활성화시켜 DNA가 up-take되는 과정을 촉진하므로써 형질전환율을 높여주는 것으로 알려져 있으므로¹²⁾, Mg²⁺이온이 *Bacillus* sp. YA-14의 형질전환율에 미치는 영향을 검토하기 위하여 MSPI배지 조성 중 MgSO₄의 농도를 달리하여 실험을 행하였다. Anagnostopoulos 등¹²⁾의 *B. subtilis* 형질전환실험에서는 최종 농도가 0.02% 되게 MgSO₄를 사용하였는데, 이에 비해, 본 실험에서는 Table 2에서 보는 바와 같이 0.4% 까지 농도를 높여 준 결과, 농도가 증가함에 따라 생균수의 증가와 함께 transformant수도 상당한 증가를 가져왔다. 그러나 0.5%의 경우, 생균수는 가장 높았으나, 그 이상의 농도에서는 생균수가 오히려 감소하는 경향을 보였으며, transformant수도 현저하게 감소하였다.

본 실험 결과에서의 Mg²⁺ 최적농도는 *B. subtilis* 형질전환실험에서 Dooley 등¹⁵⁾이 보고한 5mM(0.123%), Joenje 등¹⁶⁾이 보고한 6mM(0.148%)농도와 차이를 나타내었다. 한편, Hanahan 등¹³⁾은 *E. coli* 형질전환실험에서 생육배지에 10 20mM Mg²⁺ 이온을 첨가하였을 때, 미생물의 생육에는 변화가 없었지만 형질전환율은 Mg²⁺이온이 존재하지 않을 때보다 15~20배 정도 증가한다고 보고하였다.

4. pH의 영향

pH는 세포표면의 전하에 영향을 주어 DNA가 세

Table 2. Effect of MgSO₄ concentration on the transformation of *Bacillus* sp. YA-14

MgSO ₄ concentration (%)	Viable cell count (CFU/ml)	No. of transformants (Kmr/ml)	Transformation frequency (10 ⁻⁶)
0	2.10×10^6	N.D.*	
0.02	2.50×10^7	3.0	0.12
0.05	5.02×10^7	2.0×10^1	0.39
0.1	9.04×10^7	4.5×10^1	0.49
0.2	1.81×10^8	9.0×10^1	0.50
0.3	2.50×10^8	1.6×10^2	0.64
0.4	4.90×10^8	3.6×10^2	0.73
0.5	5.03×10^8	3.5×10^2	0.60
0.6	5.00×10^8	2.7×10^2	0.54
1	9.01×10^7	2.3×10^1	0.25
2	8.32×10^7	N.D.	

* N.D. ; not detectable

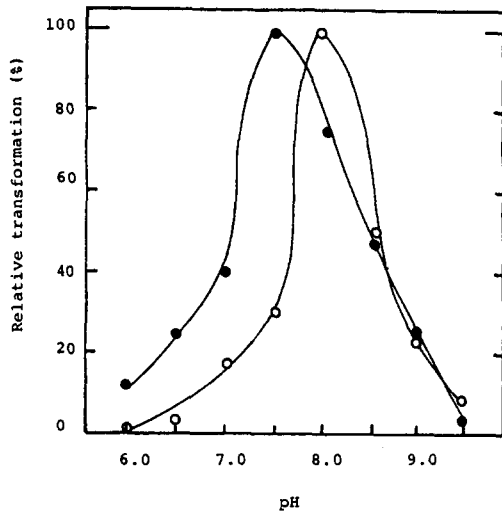


Fig. 2. Effect of pH on the transformation of *Bacillus sp.* YA-14. ● : Relative viability ○ : Relative transformation

포 내로 uptake될 때, ionic interaction에 영향을 준다고 알려져 있으므로¹⁷⁾, 형질전환율에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 MSPI배지의 pH를 달리 조절하여 transformant수를 조사하였다. 그 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 pH는 생균수에 커다란 영향을 주었다. 실험균주의 생육 최적 pH인 7.5에서 가장 높은 생균수를 나타내었다. Transformant의 수는 pH8.0에서 가장 높게 나타나서, 본 연구에서는 생육 최적 pH가 competent cell을 만드는 데 최적 pH와 반드시 일치하지는 않음을 보여 주었다.

5. CaCl₂ 농도의 영향

Ca²⁺ 이온은 대부분의 형질전환실험에서 competent cell을 만드는데 많이 사용하고 있는데, Sadaie 등¹⁸⁾은 *B. subtilis*의 경우에도 형질전환율을 높여 준다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 Ca²⁺이온 농도의 영향을 살펴보기 위하여 MSPI배지에 CaCl₂농도를 달리 첨가하여 transformant 수를 조사한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 0.5 mM농도의 경우, CaCl₂를 첨가하지 않은 경우에 비해 transformant 수는 약 2배 정도 증가하였고, 그 이상의 농도에서는 생균수와 함께 transformant의 수도 현저하게 감소하였다. 이 결과로부터 본 연구에서도 Ca²⁺이온은 형질전환율을 높여주었다.

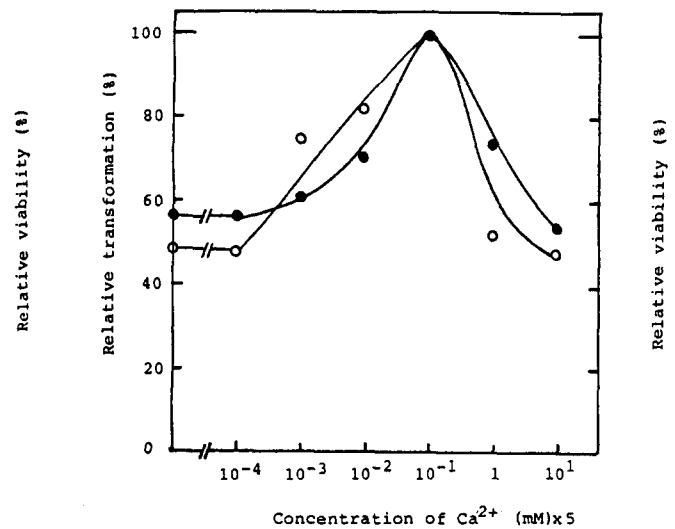


Fig. 3. Effect of Ca²⁺ concentration on the transformation of *Bacillus sp.* YA-14. ● : Relative viability ○ : Relative transformation

6. NaCl 농도의 영향

Kudo 등¹⁹⁾은 적당한 NaCl농도가 호알칼리성 *Bacillus*속 미생물의 sporulation을 촉진한다고 보고하였고, Weinrauch 등²⁰⁾은 *B. subtilis*에서의 competent의 형성되는 시기는 sporulation 형성과정과 관계가 있는 것으로 보고하였다. 그러므로 본 연구에서는 배지에 NaCl 농도를 달리 첨가하여, NaCl이 형질전환율에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 NaCl을 첨가하지 않은 경우에 비해, NaCl 농도를 증가시키기에 따라 생균수 및 transformant의 수는 급격한 감소를 보였다. NaCl 농도가 증가함에 따른 생균수 및 transformant수의 감소는 배지 내의 염농도 증가에 따른 균자체의 생육저해에서 기인하는 것으로 해석할 수 있다.

7. MSPI 배지에서 MSP 배지로의 전이 효과

Sadaie 등¹⁸⁾은 *B. subtilis* 형질전환 실험에서 SPI 배지에서 금속이온이 첨가된 SPII배지로 전이한 결과, 급격한 효율증가가 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 초기부터 0.5mM CaCl₂가 첨가된 SPI배지와 첨가되지 않은 SPI배지를 사용하여 말기 대수증식기까지 배양한 *Bacillus sp.* YA-14 competent cell의 경우와 CaCl₂가 첨가되지 않은 SPI배지에서 말기 대수증식기까지 배양한 세포를 CaCl₂가 첨가된 SP II배지와 첨가되지 않은 SP II배지에

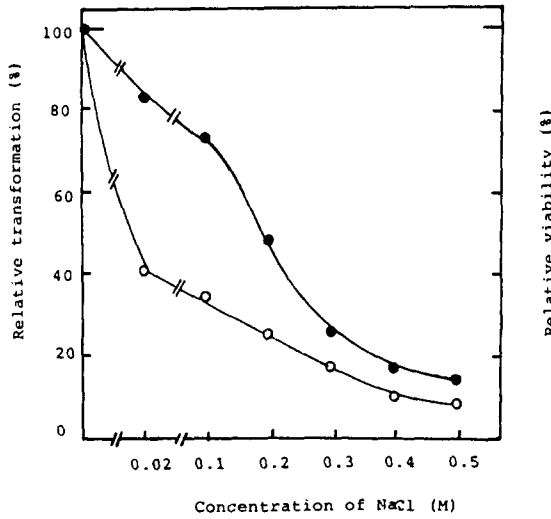


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on the transformation of *Bacillus* sp. YA-14. ● : Relative viability ○ : Relative transformation

10% (v/v) 되게 접종하여 90분간 더 진탕배양한 경우를 비교해 보기 위하여 각각의 competent cell을 가지고 형질전환실험을 행하며 생균수 및 transformant수를 비교조사하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 새로운 SPII배지로의 전이는 오히려 형질전환율을 급격히 감소시켰으며, 초기부터 CaCl₂가 첨가된 MSPI배지만을 사용하였을 경우에 가장 높은 형질전환율을 나타내서 Sadaie 등¹⁸⁾의 보고와 차이를 나타내었다.

8. DNA 첨가 후 배양 시간의 영향

일반적으로 plasmid DNA첨가 후 배양시간이 형질전환효율에 커다란 영향을 준다고 알려져 있으므로 배양시간의 영향을 검토하기 위해, competent cell 1ml에 0.5μg의 plasmid DNA를 가하여 진탕배양하

면서 10분 간격으로 생균수 및 transformant수를 측정 한 결과, plasmid pUB110을 이용한 *Bacillus* sp. YA-14의 형질전환실험에서는 40분 이상에서 transformant의 수는 더 이상 증가하지 않았다(Fig. 5). 일반적으로 *B. subtilis*에서 plasmid DNA는 대부분 30분내에 모두 uptake된다고 보고되어 있는데²¹⁾, 이러한 차이는 균종의 차이에 의한 것으로 생각되었다.

9. DNA농도의 영향

Plasmid DNA의 농도가 형질전환율에 커다란 영향을 미친다고 알려져 있으므로, competent cell 1ml에 plasmid 농도를 달리하여 첨가해 본 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 1μg까지는 transformant의 수가 직선적으로 증가하였으나, 1μg 이상의 농도에서는 큰 차이를 보이지 않았다. Imanaka 등²¹⁾은 *B. subtilis* 형질전환 실험에서 competent cell 1ml

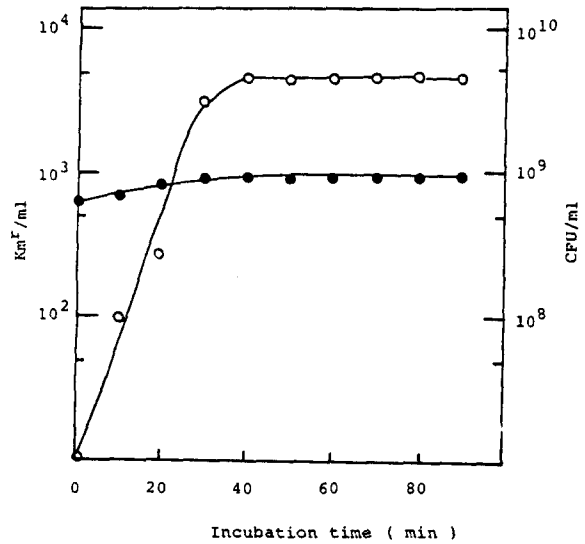


Fig. 5. Effect of incubation time after addition of plasmid DNA in MSPI medium. ● : CFU/ml ○ : Km^r/ml

Table 3. Dependence of competence development on the transfer of late logarithmic phase cell into MSP II medium

Medium	Viable cell count (CFU/ml)	No. of transformants (Km ^r /ml)	Transformation frequency (10 ⁻⁶)
MSPI	5.4 × 10 ⁸	2.25 × 10 ³	4.14
MSPI (+CaCl ₂)*	9.8 × 10 ⁸	4.45 × 10 ³	4.53
MSPI → MSP II (-CaCl ₂)	7.2 × 10 ⁸	9.00 × 10 ¹	0.12
MSPI → MSP II (+CaCl ₂)*	9.0 × 10 ⁸	1.50 × 10 ¹	0.47

* MSPI and MSPII medium supplemented with 0.5mM CaCl₂.

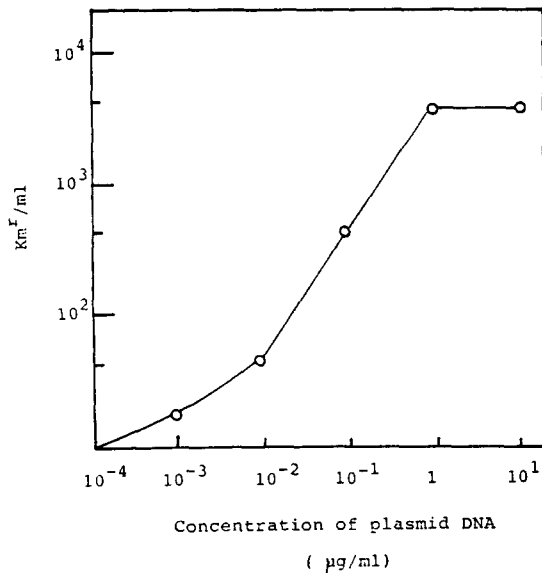


Fig. 6. Effect of plasmid DNA concentration on the transformation of *Bacillus* sp. YA-14.

당 0.5 1.0µg의 plasmid DNA를 사용하는 것이 적당하다고 보고하였다. 본 연구에서도 *Bacillus* sp. YA-14 competent cell 1ml 당 pUB110 0.5 1.0µg의 농도를 사용할 경우, 높은 형질전환율을 나타내었다.

결과적으로 앞에서 검토한 최적조건하에서의 형질전환효율은 4.53×10^{-6} CFU/ml/µg plasmid DNA이었으며, 이는 Imanaka 등²¹⁾이 보고한 *B. subtilis* MI113을 숙주균주로서 사용하여 pUB110을 도입한 경우에 비해서 약간 낮은 효율을 보여 주었으나, *B. stearothermophilus* 유래의 plasmid를 사용하여 *B. subtilis* MI113에 형질전환한 경우와 비슷한 효율을 얻었다.

B. subtilis 이외의 몇몇 bacilli에서는 competent cell 형질전환방법을 이용할 경우, 효율이 낮으므로, protoplast 형질전환방법²²⁾을 이용하여 pUB110을 도입한 예가 보고되어져 있는데, 본 실험균주는 competent cell 형질전환방법에 의해서도 비교적 높은 형질전환율을 얻을 수 있었다.

요 약

새로운 *Bacillus* sp.의 숙주균주로서 가능성을 조사하기 위해 알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14의 형질전환최적조건을 검토한 결과 다음의 결과를 얻었다.

형질전환배지로서 0.4% MgSO₄, 0.5mM CaCl₂가 함유된 modified SPI배지 (pH 8.0)를 사용하였으며, 말기 대수증식기의 균체가 최적이었다. 또한 competent cell 1ml에 plasmid DNA 0.5 g을 첨가하여 40분간 진탕배양하는 것이 형질전환에 가장 좋았으며, 이러한 최적조건하에서 형질전환율은 4.53×10^{-6} CFU/ml/µg DNA이었다. 전기영동실험을 통하여 transformant 내에 분자량 3.0×10^6 daltons의 pUB110 plasmid DNA가 도입되었음을 확인하였고, 20세대 계대배양 후에도 안정하였다. 이로부터 알칼리내성 *Bacillus* sp. YA-14는 *Bacillus*속 미생물의 host-vector system에서 새로운 숙주균주로서 이용가능성을 보여 주었다.

참고문헌

- Priest, F.G. : Extracellular enzymes, American Society for Microbiology, Washington, D. C., p. 54~62 (1984).
- Horikoshi, K. and Akiba, T. : Alkalophilic Microorganisms ; Springer-Verlag, New York (1982).
- Arbige, M.V. and Pitcher, W.H. : Industrial enzymology : A look towards the future, Trends Biotechnol., 22, 201~207 (1985).
- Henner, D.J. and Hoch, J.A. : The *Bacillus subtilis* chromosome, *Microbiol. Rev.*, 44, 57~82 (1980).
- Hoch, J.A. : Genetic analysis in *Bacillus subtilis*, *Methods Enzymol.*, 204, 305~320 (1991).
- Palva, I., Lehtovaara, P., Kaariainen, L., Sibakov, M., Cantell, K., Schein, C.H., Kashiwagi, K. and Weissmann, C. : Secretion of interferon by *Bacillus subtilis*, *Gene*, 22, 229~235 (1983).
- Ehrlich, S.D. : Replication and expression of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 1680~1682 (1977).
- Gryczan, T.J., Contente, S. and Dubnu, D. : Molecular cloning of heterologous chromosomal DNA by recombination between a plasmid vector and a homologous resident plasmid in *Bacillus subtilis*, *Mol. Gen. Genet.*, 177, 459~467 (1980).
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Poyart-Salmeron, C. and Coulvalin, P. : Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a *LacZ* gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to gram positive bacteria, *Gene*, 102, 99~104 (1991).
- Yu, J.H., Chung, Y.J., Chung, K.S. and Oh, D.H. : Physiological properties and transformation of alkali-tolerant bacteria, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 14, 239~244 (1986).
- Boe, L., Gros, M.F., te Riele, H., Ehlich, S. and Gruss, A. : Replication origins of single stranded DNA plasmid pUB110, *J. Bacteriol.*, 171, 3366~3372

- (1989).
12. Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J. : Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **81**, 741~746 (1961).
 13. Hanahan, D. : Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.*, **166**, 557~580 (1983).
 14. Clewell, D.B., Yagi, Y., Dunny, G.M. and Schultz, S.K. : Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis* : identification of a plasmid determining erythromycin resistance, *J. Bacteriol.*, **117**, 283~289 (1974).
 15. Dooley, D.C., Hadden, C.T. and Nester, E.W. : Macromolecular synthesis in *Bacillus subtilis* during development of the competent state, *J. Bacteriol.*, **108**, 668~679 (1971).
 16. Joenje, H. and Venema, G. : Different nuclease activities in competent and non-competent cells of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **122**, 25~33 (1975).
 17. Dubnau, D. : Genetic competence in *Bacillus subtilis*, *Microbiol. Rev.*, **55**, 395~424 (1991).
 18. Sadaie, Y. and Kada, T. : Formation of competent *Bacillus subtilis* cells, *J. Bacteriol.*, **153**, 813~821 (1983).
 19. Kudo, T. and Horikoshi, K. : The environmental factors affecting sporulation of an alkalophilic *Bacillus* species, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2613~2614 (1979).
 20. Weinrauch, Y., Penchev, R., Dubnau, E., Smith, I. and Dubnau, D. : A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems, *Genes Dev.*, **4**, 860~872 (1990).
 21. Imanaka, T., Fujii, M. and Aiba, S. : Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids, *J. Bacteriol.*, **146**, 1091~1097 (1981).
 22. Chang, S. and Cohen, S.N. : High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA, *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111~115 (1979).

(1999년 4월 17일 접수)