

알카리내성 세균의 생리적 특성 및 형질전환

유주현 · 정용준 · 정건섭 · 오두환

연세대학교 공과대학 식품공학과
(1986년 4월 9일 수리)

Physiological properties and transformation of alkaline-tolerant bacteria

Ju Hyun Yu, Yong Joon Chung, Kun Sub Chung and Doo Hwan Oh

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

(Received April 9, 1986)

To develop the potential use as new host strain for gene cloning, alkaline-tolerant isolates from soil were examined for amylase activity, protease activity, antimicrobial activity and transformability by using plasmid pUB 110. Of these strains, one was selected and identified as *Bacillus* sp. YA-14. In the enzymatic properties of *Bacillus* sp. YA-14 the optimal conditions for the reaction of amylase and protease were at pH 8.0 and pH 7.5 respectively. The antimicrobial activity of *Bacillus* sp. YA-14 was also found. For the transformation, *Bacillus* sp. YA-14 was cultured to late logarithmic growth phase at 37°C in modified SPI medium (pH 8.0) containing 0.4% MgSO₄. The presence of pUB 110 plasmid DNA in transformants was confirmed by electrophoresis and stably maintained in the new host.

Bacillus 속 미생물은 여러 종류의 세포의 효소를 분비하여 항생물질 및 생물학적 살충물질 등을 생산하는 것으로 잘 알려져 있다⁽¹⁻³⁾. 특히 이들이 생산하는 효소는 종류가 다양하고 균종에 따라 호열성, 호알카리성, 호산성 등의 특성을 지니고 있어 산업적으로 매우 중요한 위치를 차지하고 있다⁽⁴⁻⁷⁾. 따라서 생산성 향상을 위한 균주의 개량이 변이체 처리 등의 방법을 통해 꾸준히 진행되어 왔다⁽⁸⁾.

근래에는 유전자재조합 기술이 개발되어 이 방법에 의한 우량균주의 개발 및 유전생화학적 연구에 많은 성과를 거두고 있다⁽⁹⁾. 이제까지는 유전자재조합 기술에서 숙주균주로 *Escherichia coli*를 많이 이용하였으나, secretion 문제 및 독성문제가 대두되므로⁽¹⁰⁾ 최근에 들어서는 숙주균주로서 *Bacillus* 속을 이용하여 유용물질을 생산하고 분비해 내려는 시도가 진행되고 있다^(11,12).

본 연구에서는 토양으로부터 알카리내성 미생물을 분리하여 동정하고 그 특성을 검토하였으며 이 미생물에 *Bacillus*속의 일반적인 cloning vehicle로

이용되고 있는 plasmid pUB 110을 도입하여 형질전환시킬 수 있는지를 검토하므로 *Bacillus*속의 host-vector 계에서 새로운 숙주균주로서의 이용가능성을 연구하였다.

실험재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

균주분리는 채집한 토양을 평판희석배양법에 의해 단일 colony를 분리하였다. 사용배지는 기본배지로 nutrient agar를 알카리(pH 10.0)로 조절하여 사용하였으며, 분리된 균주는 사면배양하여 보존하면서 실험에 사용하였다.

분리균주의 amylase 활성은 1% soluble starch가 함유된 배지에서 배양된 colony 위에 Lugol액을 떨어뜨려 생긴 clear zone으로 조사하였고, protease 활성은 10% skim milk가 첨가된 배지에 나타난 clear zone으로 조사하였다. 항균력의 조사는 paper disk method를 사용하였으며 피검균으로는 *B. subtilis* ATCC 6633과 *Sarcina lutea* ATCC 9341

을 사용하였다.

분리균주의 동정은 형태적 및 생리적 특성과 전자현미경 관찰 등을 기초로 하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.)⁽¹³⁾에 준하여 동정하였다.

배양방법 및 조효소액조제

효소생산을 위한 균배양은 nutrient broth를 기본 배지로 사용하였고 amylase 생산을 위해서는 하룻밤 배양한 종배양액을 1% soluble starch가 첨가된 배지에 0.5% (v/v) 되게 접종하여 37°C에서 진탕배양(130 rpm) 하였다. 일정시간 배양한 후 배양액을 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 완전히 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소의 역가측정

Amylase 역가는 Fuwa의 방법⁽¹⁴⁾을 사용하여 측정하였으며, protease 역가는 Hagihara 등의 방법⁽¹⁵⁾을 사용하여 측정하였다.

Plasmid분리 및 정제

본 실험에 사용한 plasmid는 *B. subtilis* MI 113에 들어있는 pUB 110 (Km^r)을 사용하였으며 plasmid분리는 Guerry 등의 방법⁽¹⁶⁾을 변형하여 사용하였다.

형질전환

Competent cell의 조제는 Anagnostopoulos 등의 방법⁽¹⁷⁾을 변형하여 사용하였다. L-broth에서 배양한 종배양액을 5% (v/v) 되게 MgSO₄ 함량을 0.4%로 높여준 SPI배지⁽¹⁸⁾ (modified SPI배지)에 접종하여 말기대수증식기까지 진탕배양하였다. 여기서 얻어진 competent cell 1 ml에 0.5 µg의 plasmid DNA를 가하여 130 rpm에서 40분간 진탕배양한 후 0.1 ml를 kanamycin이 들어있는 선택배지에 도말하여 12시간 배양한 후 나타난 colony수를 transformant 수로 하였다.

실험결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

토양으로부터 알칼리조건하(pH 10.0)에서 생육하는 미생물을 216주 분리하여 효소생산 및 항균력을 조사한 결과 모든 활성을 동시에 갖는 12주를 분리하고 각각에 plasmid pUB 110을 이용한 형질전환 실험을 행한 결과 분리균주중 YA-14가 형질발현되어 안정하게 plasmid가 유지되었으므로 본 실험의 균주로 선정하였다.

실험균주의 동정을 위해서 형태적으로 관찰한 결과는 간균이며, 운동성이 있고, 통성형기성이며, Gram 양성, 내열성 포자형성 등을 나타내어 *Baci-*



Fig. 1. Transmission electron micrograph of thin section of *Bacillus* sp. YA-14.

The thin section preparation stained with uradyl acetate and lead citrate.

illus 속으로 추정되었다. 전자현미경 관찰에서 포자는 난형으로 세포내 중앙에 위치하고 있었으며 이때 세포가 swelling 되지 않는 것으로 관찰되어(Fig. 1), *Bacillus* 속의 대표적인 미생물인 *Bacillus subtilis*와 유사한 특성을 나타내었으므로 *B. subtilis* MI 113을 대조균으로 사용하여 생리적 특성을 비교 실험하였다. 그 결과 Table 1과 Table 2에서 보는 바와 같이 두 균주가 유사한 생리적 특성을

Table 1. Physiological characteristics.

	Isolated bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> MI 113
Hydrolysis of gelatin	+	+
Hydrolysis of starch	+	+
Hydrolysis of casein	+	+
Catalase test	+	+
Alkali on citrate salt agar	+	+
Reduction nitrate to nitrite	+	+
Indol formation	+	+
Voges-Proskauer test	+	+
Egg yolk reaction	-	-
Hemolysis	-	-
Growth in 5% NaCl	+	+
7% NaCl	+	+
0.001% lysozyme	-	-
Sabouraud dextrose broth	+	+

+ ; positive, - ; negative.

Table 2. Carbohydrate utilization.

Carbohydrate	Isolated bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> MI 113
Arabinose	+	+
Dextrin	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Glucose	+	+
Inositol	+	+
Lactose	-	-
Maltose	+	+
Mannitol	+	+
Rhamnose	-	-
Starch	+	+
Sucrose	+	+
Xylose	+	+

+; utilized, -; not utilized.

지닌 것으로 생각되었다. 그러나 colony의 형태에 있어서 분리균주는 6시간 후부터 점질상태의 colony를 형성하다가 12시간 이후에는 점질성이 감소하면서 동시에 주름진 막을 형성하는 등 전형적인 *B. subtilis*의 colony 형태와는 상이함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 이상의 동정실험 결과를 통하여 일단 *Bacillus* sp. YA-14로 동정 명명하였다.

균주의 물리화학적 성질

① 생육에 미치는 pH의 영향

생육최적 pH와 알카리생육 조건하에서의 내성을 검토하기 위하여 각각의 pH로 조절한 BNB배지(0.1M phosphate buffered nutrient broth)에 하룻

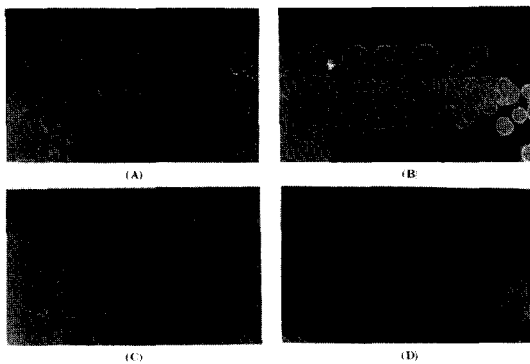


Fig. 2. Morphological characteristics of *Bacillus* sp. YA-14(A, B) and *Bacillus subtilis* MI 113 (C, D).

A, C; incubated for 12 hrs.
B, D; incubated for 24 hrs.

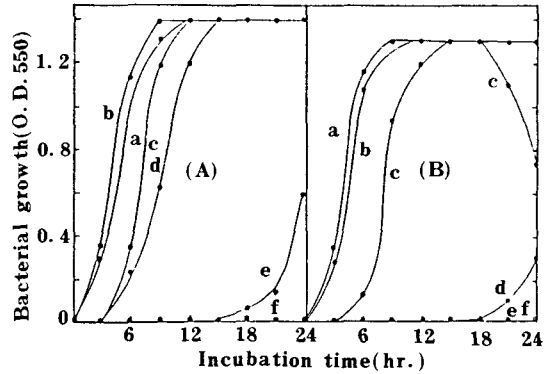


Fig. 3. Effect of pH on growth of *Bacillus* sp. YA-14(A) and *Bacillus subtilis* MI 113 (B).

a; pH 7.0, b; pH 7.5, c; pH 10.0,
d; pH 10.3, e; pH 10.5, f; pH 11.0

밤 배양한 *Bacillus* sp. YA-14와 *B. subtilis* MI 113 종배양액을 각각 0.05% (v/v)와 0.1% (v/v) 되게 접종한 후 균체생육(OD₅₅₀)을 측정된 결과 *Bacillus* sp. YA-14는 약알카리(pH 7.5)에서 생육이 가장 좋았고 *B. subtilis* MI 113은 pH 7.5에서 최적으로 모두 9시간만에 정상기에 도달하였다(Fig.3). 알카리내성 미생물에 관한 연구는 1922년 Meek 등⁽¹⁸⁾의 보고를 시작으로 세균 뿐만아니라 효모 및 곰팡이에 관해서도 보고되어 있으며 특히 Kushner 등⁽¹⁹⁾은 pH 10.3까지 생육하는 *B. cereus*를, Chislett 등⁽²⁰⁾은 pH 10.8까지도 생육하는 *B. circulans*를 분리하여 알카리내성 세균으로 정의한 바 있다. 본 실험의 결과에서 *Bacillus* sp. YA-14는 생육최적 pH

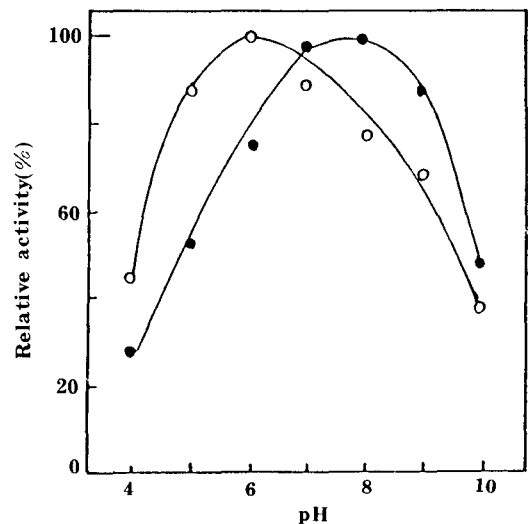


Fig. 4. Effect of pH on amylase activity.

● ; *Bacillus* sp. YA-14
○ ; *Bacillus subtilis* MI 113

보다 더 알카리 조건으로 갈수록 생육이 느려지는 하지만 pH 10.3에서 정상적으로 생육할 수 있다는 점에서 이들이 보고한 알카리내성 세균과 비슷한 특성을 나타내었다.

② 효소의 활성에 미치는 pH의 영향

0.1 M citrate-phosphate 완충용액 (pH 3~8) 과 0.1 M Tris 완충용액 (pH 8~10)을 사용하여 기질용액의 pH를 조절하여 각각 amylase 및 protease 활성을 측정한 결과를 Fig. 4 와 Fig. 5 에 나타내었다. *B. subtilis* MI 113의 amylase는 최적 pH가 6 으로 일반적인 *Bacillus* 속의 amylase와 비슷하였으나 *Bacillus* sp. YA-14의 경우는 최적 pH가 8.0 으로 Robyt 등¹²⁾이 보고한 알카리성 amylase와 비슷한 특성을 나타내었다. Protease 활성은 두 균주 모두 pH 7.5에서 가장 높은 활성을 나타내었고 그 이상이나 이하의 pH에서는 모두 활성이 감소하였는데 *Bacillus* sp. YA-14의 protease 활성이 *B. subtilis* MI 113보다 서서히 감소함을 보였다.

③ 효소의 활성에 미치는 온도의 영향

각각의 최적 pH로 조절한 기질용액을 사용하여 각 온도별로 활성을 측정한 결과 *Bacillus* sp. YA-14의 amylase와 protease는 *B. subtilis* MI 113 보다 약간 더 높은 최적 활성온도를 나타내었다.

④ 항균력의 조사

일반적으로 항생물질은 방선균 및 곰팡이에 의해서 주로 생산되지만, *Bacillus* 속 세균도 peptide 계통의 항생물질을 생산하는 것으로 알려져 있다²²⁾. 따라서 본 연구에서 항균력을 조사하여 본 결과, 피

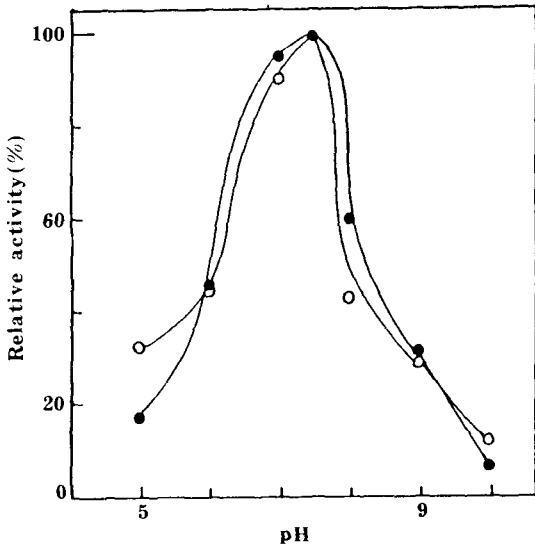


Fig. 5. Effect of pH on protease activity.

● ; *Bacillus* sp. YA-14
○ ; *Bacillus subtilis* MI 113

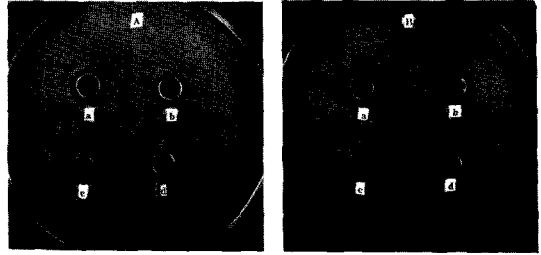


Fig. 6. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. YA-14(a, b) and *Bacillus subtilis* MI 113 (c, d).

a, c; incubated for 6 hrs.
b, d; incubated for 12 hrs.

* Indicator strain

A; *Bacillus subtilis* ATCC 6633
B; *Sarcina lutea* ATCC 9341.

검균으로 *B. subtilis* ATCC 6633과 *Sarcina lutea* ATCC 9341을 사용하였을 경우, *Bacillus* sp. YA-14만이 항균력을 나타내었다(Fig. 6).

형질전환

앞서 검토한 바와 같이 *Bacillus* sp. YA-14는 *B. subtilis*와 물리화학적 성질이 다른 알카리내성 세균이었으므로 이 균주가 plasmid pUB 110의 숙주균 주로 사용될 수 있는지 그 가능성을 검토하기 위하여 형질전환 실험을 행하였다.

① 생육시기의 영향

L-broth에서 하룻밤 배양한 종배양액을 MSPI배지에 5% (v/v) 되게 접종한 후 37°C에서 진탕배양하면서 30분 간격으로 배양액을 취하여 형질전환 실험을 행한 결과, Fig. 7에서 보는 바와 같이 접

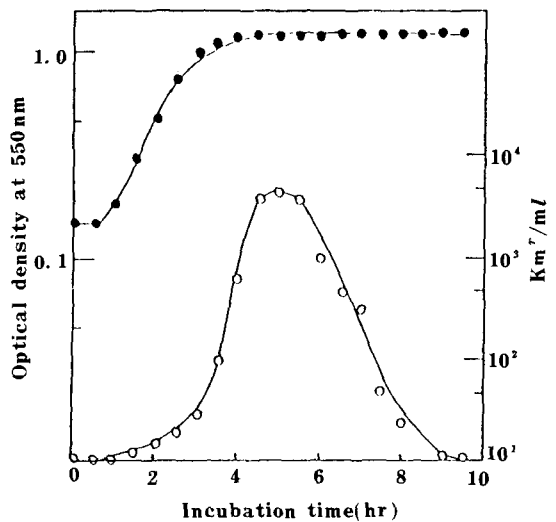


Fig. 7. Competence development in MSPI medium.

● ; O. D.
○ ; Km^r/ml

Table 3. Effect of MgSO₄ concentration on the transformation of *Bacillus* sp. YA-14.

MgSO ₄ concentration (%)	No. of viable cell (CFU/ml)	No. of transformants (Km ^r /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 ²	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	0.69
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.

중 후 5 시간만의 세포에서 competent 가 최대에 도달하였다.

② MgSO₄ 농도의 영향

Mg²⁺ 이온은 세포표면의 endonuclease를 활성화시켜 DNA가 uptake 되는 과정을 촉진하여 형질전환 효율을 높여주는 것으로 알려져 있으므로⁽²³⁾ M-SPI배지중의 MgSO₄ 농도를 달리하여 본 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 0.4%까지 농도를 높여 줌에 따라 생균수의 증가와 함께 transformant 수도 상당한 증가를 가져왔다.

③ pH의 영향

pH는 세포표면의 전하에 영향을 주어 DNA가 세포내로 uptake 될 때 ionic interaction에 영향을 준다고 알려져 있으므로⁽²⁴⁾ M-SPI배지의 pH를 달리하여 본 결과, pH 7.5에서 가장 높은 생균수를 나타냈고 transformant수는 pH 8.0에서 가장 많았다.

④ Transformant의 확인

형질전환 실험에서 얻은 transformant를 확인하기 위하여 pUB 110의 내성 maker인 kanamycin내성을 비교 조사한 결과, 숙주로 사용한 원균주인 *Bacillus* sp. YA-14는 5 µg/ml에서 생육저해를 나타내었으나, transformant는 100 µg/ml에서도 내성을 보였으며 transformant내에 pUB 110 plasmid가 존재함을 전기영동을 통해 확인하였다(Fig. 8). 또한 이 transformant는 20세대간 계대배양한 후에도 plasmid가 안정하게 유지되어 형질발현됨을 확인하였다.

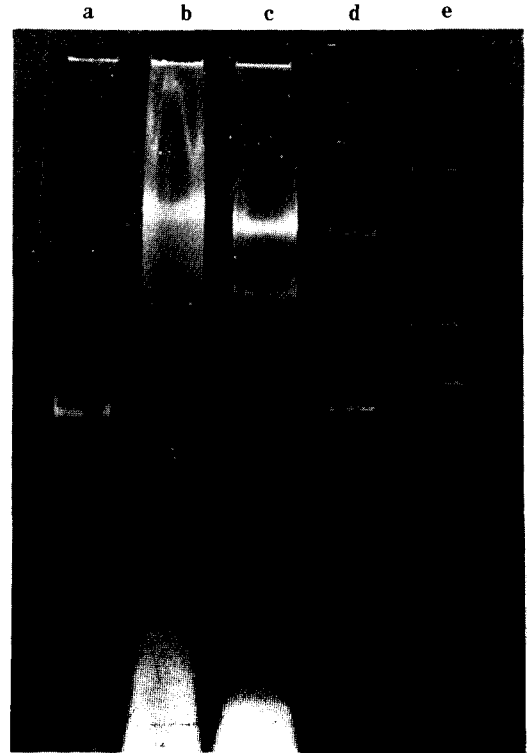


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of pUB 110 plasmid DNA obtained from the transformants.

lane a; standard pBR322
 lane b; *Bacillus* sp. YA-14
 lane c; transformant
 lane d; standard pUB 110
 lane e; reference DNA from *Escherichia coli* V 517.

요 약

새로운 알카리내성 숙주균주를 개발하기 위하여 토양으로부터 알카리조건하에서 생육하는 미생물을 분리하고 이들중에서 amylase활성과 protease활성 및 항균력을 동시에 가지며 plasmid pUB 110이 형질전환 되어 이 plasmid가 안정하게 유지되는 균주를 선정하여 알카리내성 *Bacillus* sp. YA-14로 동정하였다.

분리균주의 amylase와 protease는 각각 pH 8.0과 pH 7.5에서 가장 활성이 높았으며 피검균으로 사용한 *B. subtilis*와 *Sarcina lutea*에 항균력을 나타내었다. 분리균주의 형질전환에는 0.4% MgSO₄가 함유된 modified SPI배지(MSPI, pH 8.0)를 사용하였으며 말기대수증식기의 균체가 적당하였다. Transformant는 20세대 계대배양 후에도 pUB-110 pl-

asmid가 안정하게 유지되어 형질발현되었다. 이 결과로부터 분리균주는 *Bacillus* 속의 host-vector 계에서 새로운 알카리내성 숙주균주로서 이용할 수 있는 가능성을 보여주었다.

참고문헌

1. Priest, F.G.: *Microbiol. Rev.*, **41**, 711 (1977)
2. Katz, E. and A.L. Demain: *Bacteriol. Rev.*, **41**, 449 (1979)
3. Stahly, D.P., D.W. Dingman, L.A. Bulla and A.I. Aronson: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 581 (1978)
4. Horikoshi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1407 (1971)
5. Horikoshi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1783 (1971)
6. Erickson, M.B.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **24**, 257 (1978)
7. Uchino, F.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 7 (1982)
8. Yoneda, Y. and B. Maruo: *J. Bacteriol.*, **124**, 48 (1975)
9. Yoneda, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 274 (1980)
10. Curtiss, R.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **30**, 507 (1976)
11. Palva, I.P., Lehtovaara, L. Kääriäinen, M. Sibakov, K. Cantell, C.H. Schein, K. Kashiwagi and C. Weissmann: *Gene*, **22**, 229 (1983)
12. Hardy, K., S. Stahl and H. Küpper: *Nature*, **293**, 481 (1981)
13. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins, 8th ed., p. 529, Baltimore (1974)
14. Fuwa, H.: *J. Biochem.*, **41**, 583 (1954)
15. Hagihara, B., H. Matsubara, M. Nakai and K. Okunuki: *J. Biochem.* **45**, 185 (1958)
16. Guerry, P., D.J. LeBlanc and S. Falkow: *J. Bacteriol.*, **116** 1064 (1973)
17. Anagnostopoulos, C. and J. Spizizen: *J. Bacteriol.*, **81**, 741 (1961)
18. Meek, C.S. and C.B. Lipman: *J. Gen. Physiol.*, **5**, 195 (1922)
19. Kushner, D.J. and T.A. Lisson: *J. Gen. Microbiol.*, **21**, 96 (1959)
20. Chislett, M.E. and D.J. Kushner: *J. Gen. Microbiol.*, **24**, 187 (1961)
21. Robyt, J. and R.T. Ackerman: *Arch. Biochem. Biophys.* **145**, 105 (1971)
22. Hopwood, D.A. and M.J. Merrick: *Bacteriol. Rev.*, **41**, 595 (1977)
23. Smith, H.O. and D.B. Danner: *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 41 (1981)
24. Verkleij, A.T., B. De Kruyff, P.H.J.Th. Ververgaert, J.F. Tocanne and L.L.M. Van Deenen: *Biochem. Biophys. Acta.*, 339, 432 (1974)