

호알카리성 *Bacillus* sp. AL-8의 알카리성 아밀라제 유전자의 대장균에의 클로닝과 발현된 아밀라제의 특징

배 무*·황재원·박신혜

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

Molecular Cloning and Expression of Alkaline Amylase Gene of Alkaliphic *Bacillus* sp. AL-8 and Enzyme Properties in *E. coli*

Bae, Moo*, Jaeweon Hwang, and Shinhye Park

Department of Biology, College of Natural Science, Ewha Womans University,
Seoul 120, Korea

The gene coding for alkaline amylase of alkaliphilic *Bacillus* sp. AL-8 was cloned and expressed in *Escherichia coli* which was lack of amylase activity. For the cloning of the alkaline amylase gene, the chromosomal DNA and plasmid vector pBR322 were cleaved at the site of EcoRI and the gene was cloned. The selection of the transformants carrying the amylase gene was based on the their antibiotics resistance and amylase activity of the transformants. The recombinant plasmids pJW8 and pJW200 containing 5.8Kb and 3.0Kb EcoRI inserts respectively were proved to carry the alkaline amylase gene. Alkaline amylase expressed in *E. coli* was characterized. The enzyme was proved to be stable at the range of alkaline pH.

대부분의 미생물들이 잘 자라는 일반환경과는 달리 극단환경에서 잘 자라는 미생물의 연구가 활발하며 그 중 알카리성 세균 *Bacillus pasteurii*가 pH11에서 잘 자라고 *B. alkalophilus*는 pH8.6에서 pH10까지 잘 자란다고 보고되었다(1). 알카리성 세균에 의해 생성된 많은 효소가 알려졌고 이 효소들은 최적 pH와 pH 안정성에 알카리성적 성질을 나타낸다(2-6). 알카리성 세균이 생성하는 효소들은 산업적, 공업적으로 유용한데 이중 amylase는 발효공업, 양조공업, 섬유공업 등에 이용되고 있으며 amylase를 유전자조작에 의해 생산을 증가시키거나 균의 효소성질을 변화시켜 공정과정에 적합하게 변화시킴으로써 효과적으로 이용할 수 있다(7). 극단환경에서도 활성을 가지는 유전자의 정상세포에서의 발현가능성을 알아보기 위해 알카리성 *Bacillus* 속의 알카리성 amylase 유전자를 pBR 322를 vector로 사용하여 *E. coli*에 cloning시켜 발현된 효소의 성질을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주와 배지

알카리 조건하에서 잘 자라고 알카리 amylase 활성이 높은 *Bacillus* sp. AL-8(8)을 알카리성 amylase 유전자 자원균주로 사용하였다. *E. coli* HB 101(Amy⁻)이 클로닝 숙주를 이용하였고 LB배지(0.5% yeast extract, 1% bacto tryptone, 1% NaCl, pH7.0)를 *E. coli* 배양을 위해 사용하였다. *Bacillus* sp. AL-8을 배양하기 위한 배지는 1% soluble starch, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 1% K₂ HPO₄이며 1% sodium carbonate 로 pH10.3에 맞추었다.

DNA의 추출

Bacillus sp. AL-8을 30°C에서 대수증식까지(23hr) 알카리성 배지로 진탕 배양한 후 집균하였다. chromosomal DNA는 Rodriguez의 방법(9)으로 추출하였다. Plasmid pBR 322는 *E. coli* RD 103으로 부터 boiling phenol/chloroform법을 이용 분리하였으며 Maniatis *et al*(10)과 Holmes & Quigley(11)를 참고로 하였다.

Key word: Alkaliphilic bacteria alkaline amylase gene.
*Corresponding author.

클로닝 과정

pBR 322와 chromosomal DNA를 제한 효소 EcoRI로 잘랐다. EcoRI로 잘린 DNA(0.5mg pBR 322와 1.5mg chromosomal DNA)를 100 μ l의 66 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)와 6.6 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol에서 10 units/ml T4 DNA ligase로 12°C에서 12시간 동안 ligation시켰다. Ligated DNA를 *E. coli*에의 형질전환을 위해 사용하였고, *E. coli* HB 101을 숙주세포로 한 형질전환은 Mandel & Higa의 방법(12)을 사용하였다.

Restriction fragments의 분석

Restriction fragments는 Sealey와 Southern의 방법(13)을 이용하여 agarose gel(1%) 전기영동으로 분석하였고 Hind III로 자른 λ -DNA를 분자량 marker로 사용하였다.

Amylase-positive 콜로니의 선별

형질전환된 균은 ampicillin(50 mg/ml)를 첨가한 LB plate에서 1차 선별하였다. Amylase 활성을 발현하는 콜로니는 1% soluble starch를 포함한 LB plate에서 재선별하였다. 1차 선별된 콜로니들을 LB (ampicillin, tetracycline starch 함유: Ap, Te, St)배지 5 ml에 30°C에서 2일간 진탕 배양한 후 원심분리로 집균하고 lysozyme용액(30 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 7.6의 buffer에 10 mg/ml로 lysozyme 녹임) 0.2 ml를 넣고 37°C에서 1시간 반응시켜 세포벽을 파괴시켰다. Lysate를 LB (Ap, Tc, St) plate 위에 cup-method로 접종하여 30°C에서 1-2일 배양한 후 0.01% 요오드 용액을 뿌려 투명대가 형성되는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니 중에서 amylase 활성이 높은 것을 2차 선별하였다.

E. coli 세포에서 amylase의 분포

형질전환된 *E. coli*에서 생성된 amylase의 분포는 Tsukagoshi *et al*의 방법(14)을 이용하여 알아보았다. *E. coli*를 37°C에서 24시간 배양한 후 10 ml를 원심분리(10,000 rpm으로 10분)하여 상등액(세포외 amylase)과 세포로 분리하였다. 세포를 10 ml의 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 1번 씻고 0.5 M sucrose가 든 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 4 ml에 현탁하였다. 1 mM EDTA를 첨가하고 20분 후면거의 모든 세포가 spheroplast로 되는데 spheroplast

현탁액을 원심분리 4°C에서 15,000 rpm으로 15분)하여 상등액(periplasmic amylase)과 spheroplast로 분리하였다. Spheroplast를 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 4 ml에 현탁하고 얼음위에서 1분간 3번 sonication하여 세포내 amylase 시료로서 이용하였다.

Amylase 활성 측정

Somogyi-Nelson법(15)에 따라 amylase의 활성을 조사하였다. Amylase 활성의 1 unit는 효소액 1 ml가 1분동안 기질과 반응하여 1 mg의 환원당을 생성한 것으로 하였다.

결과 및 고찰

알카리성 amylase 유전자의 크로닝

Bacillus sp. AL-8의 염색체 DNA를 EcoRI로 자르고 조각들을 재료 및 방법에서처럼 EcoRI로 자른 pBR 322 DNA에 ligation시켰다. Competent cell로 만든 *E. coli* HB 101(Amy⁻)에 hybrid plasmid DNA를 혼합하여 배양시킨 후 ampicillin과 tetracycline이 포함된 고체배지에서 형질전환 균주를 선별하였다. 형질전환의 빈도는 1.1×10^{-8} 이었다.

$$\text{형질전환빈도} = \frac{\text{LB(Ap, Tc) plate 위의 콜로니수}}{\text{LB plate 위의 콜로니수}}$$

Table 1. Amylase activity of transformants of *E. coli* derived from pBR322 and amylase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. AL-8.

Transformants	Amylase activity (units/ml)
JW8	54
JW13	58
JW14	11
JW17	23
JW18	26
JW20	65
JW33	9

Transformed colonies which formed clear zones on starch plates were cultured with rotary shaker in 10 ml of LB broth (containing 1% soluble starch and 50 μ g/ml ampicillin) for 2 days at 30°C. They were harvested by centrifugation and then suspended in 1.2 ml of lysozyme solution. After 30 min incubation at 37°C, supernatant which was separated by centrifugation was used as enzyme solution. Enzyme activity was measured at pH 10 for 10 min at 50°C.

선별된 400개의 콜로니 중에서 1% soluble starch 를 포함한 LB 고체배지에서 cup-method로 amylase 생성을 확인하여 7개의 콜로니를 재선별하였고 JW 8, JW 13, JW 14, JW 17, JW 18, JW 20, JW 33 으로 명하였다. 7개의 콜로니 중 LB(Ap, Tc, St) 액체배지에서 배양시킨 후 용균시켜 얻은 효소액의 amylase 활성을 조사하였다. 그 중 JW 8, JW 13, JW 20에서 알칼리성 amylase의 활성이 높게 나타났다(Table 1).

클로닝된 amylase 유전자의 성질

새 형질전환 균주의 hybrid plasmid(pJW)를 추출하여 EcoRI으로 자른 후 전기영동한 결과 pJW 8과 pJW 13은 5.8 kb의 EcoRI 조각을 pJW 20은 3.0 kb 의 EcoRI 조각을 포함하였다.

E. coli에서 알칼리성 amylase 유전자의 발현과 분포

Bacillus sp. AL-8은 36시간 배양시킨 경우 240 units/ml로 알칼리성 amylase 생성이 최고였으나 *E. coli*는 48시간 배양했을 때 최적으로 70-180 units/ml의 활성을 나타냈다. *E. coli*에서 전체 amylase 활성의 98-100%가 세포에서 발견되었으며

Table 2 Amounts and location of the alkaline amylase produced by transformants

transformants	alkaline amylase activity (units/ml)		
	extracellular	periplasmic	cellular
JW8	0	50	26
JW13	0	70	37
JW20	2	82	13

Transformants were grown at 37°C at 37°C for 24h in LB broth. Culture broth were centrifuged to supernatant (the extracellular amylase) and cells. The cells were suspended in 4ml solution composed of 0.5M sucrose and 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) and then added 1mM EDTA. After 20min, the suspension was separated into spheroplast and supernatant (the periplasmic amylase) by centrifugation (15,000rpm, 15min, 4°C). The spheroplast was suspended in 4ml of 10mM Tris-HCl buffer and sonicated three times for 1min, the resultant sonicate was used as the cellular amylase sample. Amylase activity of samples was measured at pH 10 for 10 min at 50°C. The values represent units of alkaline amylase activity per ml extract.

세포의 부분은 전체 활성의 0-2%이었다. 재료와 방법에서 밝힌 바와 같이(14) 세포를 spheroplast로 바꾸어 periplasmic space로의 amylase의 분비를 본

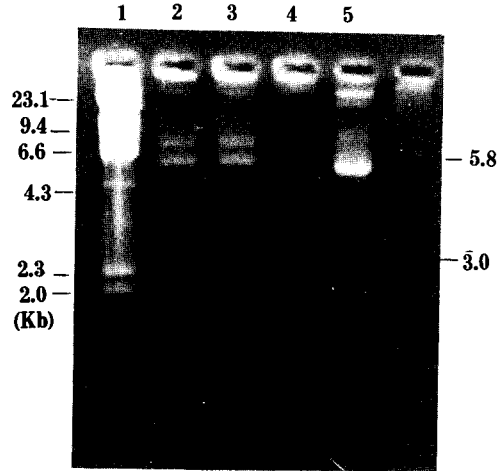


Fig. 1. Gel analysis of plasmid DNA

DNA was digested with Hind III (1) and used as size marker. pJW8, pJW13, pJW20 and pBR 322 were digested with EcoRI (2,3,4,5). They were electrophoresed in 1% agarose gel.

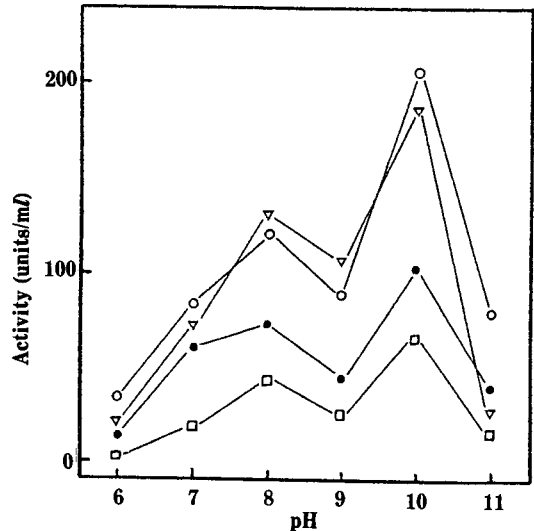


Fig. 2. Effect of pH on the activity of three transformants (JW-8, JW-13, JW-20) and *Bacillus* sp. AL-8 alkaline amylase

Amylase was incubated at appropriate temperature for 10 min.

- : amylase from *Bacillus* sp. AL-8
- : alkaline from transformant JW-8
- ▽: amylase from transformant JW-13
- : alkaline from transformant JW-20

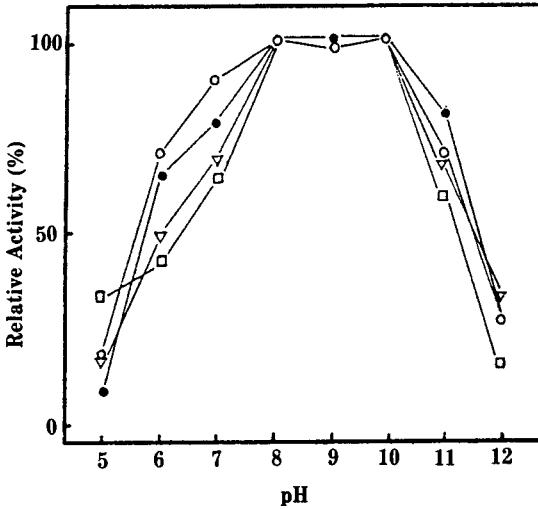


Fig. 3. Effect of pH on stability of alkaline amylase.
The enzyme was incubated in 0.05M buffer at the appropriate pH values for 10 min at 50°C. The amount of enzyme activity remaining after incubation at each pH value was measured.

- : amylase from *Bacillus* sp. AL-8
- : amylase from transformant JW-13
- ▽: amylase from transformant JW-20

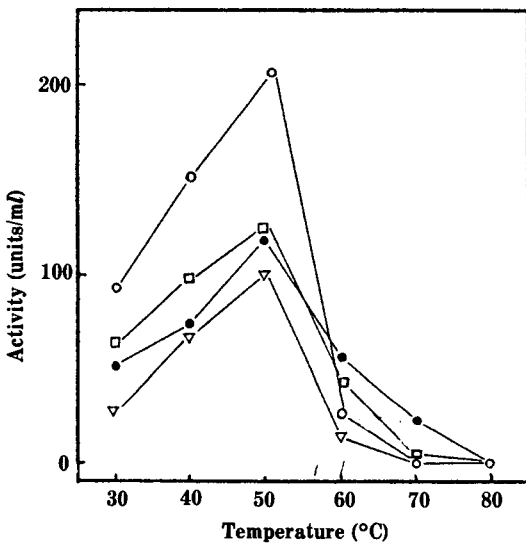


Fig. 4. Effect of temperature on enzyme activity of transformants and *Bacillus* sp. AL-8.

- : amylase from *Bacillus* sp. AL-8
- : amylase from transformant JW-8
- ▽: amylase from transformant JW-13
- : amylase from transformant JW-20

결과 전체 활성의 65-85%가 periplasmic space에서 발견되었다(Table 2).

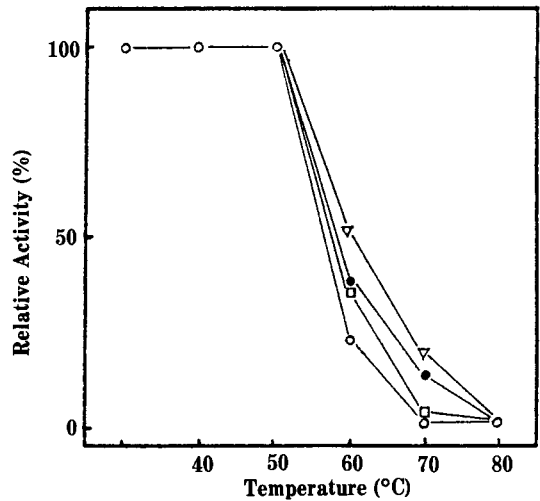


Fig. 5. Thermostability of alkaline amylase with temperatures.

The enzyme was incubated for 10 min. at each temperature and then quickly cooled in an ice bath. The remaining alkaline amylase activity was measured at pH 10 for 10 min at 50°C.

- : amylase from *Bacillus* sp. AL-8
- : amylase from transformant JW-8
- ▽: amylase from transformant JW-13
- : amylase from transformant JW-20

E. coli에서 생성된 amylase의 효소적 성질

Donor 균주인 *Bacillus* sp. AL-8과 세 형질전환 균주 JW 8, JW 13, JW 20에 의해 생성된 amylase의 효소 활성이 50°C에서 10분간 다양한 pH(6-11)에서 조사되었다. 형질전환 균주 모두에서 amylase 활성에 대한 성질이 균주와 같아 최적 활성 pH는 10이었다(Fig. 2).

형질전환된 *E. coli*에서 발현된 알카리성 amylase의 pH 안정성도 다양한 pH(6-11)에서 10분간 조사해 본 결과 pH8-10에서 100% 안정하였다(Fig. 3).

형질전환된 *E. coli* HB 101에서 발현된 알카리성 amylase는 *Bacillus*의 amylase와 같이 50°C에서 가장 큰 활성을 보였고(Fig. 4), 50°C까지 100% 안정하였다(Fig. 5). 이상의 실험결과에서 본 바와 같이 *Bacillus* sp. AL-8의 알카리성 amylase 유전자 E. coli로 형질전환되어 *E. coli* 내에서 발현되어 알카리성 amylase를 생성하였음을 확인하였다.

요 약

알카리성 amylase를 내는 *Bacillus* sp. AL-8의 알카리성 amylase 유전자를 amylase를 생성하지 않

는 *Escherichia coli* HB 101에 pBR 322를 vector로 하여 형질전환하였다. *E. coli*도 알카리성 amylase를 생성하여 50°C에서 최적 활성온도를 가지며 50°C까지 열안정성을 갖고, pH 10에서 최적 활성 pH를 나타내는 동시에 pH 8-10에서 안정하였다. 알카리성 amylase 유전자가 *E. coli*에 형질전환되어 donor 세포와 같은 효소 성질을 갖고 있으며 pBR 322로 삽입된 유전자는 pJW 8에서 5.8 kb이며 pJW 20에서는 3.0 kb로 *E. coli*에서 안정하게 발현되었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 차관연구비로 수행되었으며 이에 깊은 감사를 표하는 바입니다.

참고문헌

- Gibson, T.: *J. Bacteriol.*, **28**, 313-322 (1934).
- Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1407-1414 (1971).
- Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1783-1791 (1971).
- Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 285-293 (1972).
- Horikoshi, K.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **384**, 477-483 (1973).
- Horikoshi, K. and A. Teruhiko: *Alkalophilic microorganisms; A new microbial world*, Japan scientific societies (1982).
- Ingle, M.B. and E.W. Boyer: *Microbiology* 1976, Am. Soc. Microbiol. (1976).
- 황재원: 알카리성 *Bacillus* species AL-8의 amylase 생성과 gene cloning, 이화여대 대학원 석사논문 (1986).
- Rodriguez, R.L. and R.C. Tait: *Recombinat DNA techniques*, Addison Wesley Publishing Company (1983).
- Maniatis, T., E.F. Friyych and J. Sambrook: *Molecular cloning. A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor (1982).
- Holmes, D.S. and M. Quigley: *Anal. Biochem.*, **114**, 193-195 (1981).
- Mandel and Higa: *J. Mole. Biol.*, **53**, 159 (1970).
- Sealey P.G. and Ed M. Southern: *Gel electrophoresis of nucleic acid. A practical approach*, IRL press (1982).
- Tsukagoshi N., H. Ihara, H. Yamagata and S. Udata: *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 58-63 (1984).
- Ando, E., H. Terayama, K. Nishizawa and T. Yamakawa: *Biochemical research method*, Asakura Press (1967).

(Received November 28, 1987)