

Alkaline Protease를 생산하는 *Bacillus subtilis* 의 원형질체 융합

최양미 · 이태경 · 홍범식* · 성하진** · 양한철

고려대학교 식품공학과, *고려대학교 식량공학과, **고려대학교 유전공학과

Protoplast Fusion of Alkaline Protease Producing *Bacillus subtilis*

Yang-Mi Choi, Tae-Kyung Lee, Bum-Shik Hong*, Ha-Chin Sung** and Han-Chul Yang

Department of Food Technology, *Department of Food Engineering,

**Department of Genetic Engineering,

Korea University, Seoul 136-075, Korea

Abstract

To improve alkaline protease producing strain by protoplast fusion, a strain of *Bacillus* sp. was treated with 100 μ g/ml NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) for 45 minutes and mutants of *Bacillus subtilis* Arg⁻, Try⁻, His⁻ and Ade⁻ were isolated. The frequency of protoplast formation was about 99%, when cells of exponential phase were treated with 200 μ g/ml lysozyme at 42°C for 10~30 minutes. In a regeneration medium containing 0.3M sodium succinate, 2.0% polyvinylpyrrolidone, 0.5% casamino acid, 10mM MgCl₂ and 20mM CaCl₂, regeneration frequency of the isolated *Bacillus subtilis* strains was 25.2%. The fusion frequency between mutants was from 2.1 $\times 10^{-5}$ to 8.1 $\times 10^{-5}$ under optimum condition.

서 론

1966년 이후 alkaline protease는 주로 세제에 첨가되어 효소세제¹⁾로서 시판되었으며 그 수요가 급증하여 총 세제의 70%를 차지하고 있다. 저자들은 alkaline protease 활성이 높은 균주를 토양으로부터 분리하였고, 분리균의 형태적·생리적 특성을 조사한 결과 *Bacillus subtilis*로 동정하였으며 동시에 효소를 정제하여 그 특성을 전보²⁾에 보고한 바 있다.

Bacillus 속 균주의 개량을 위한 연구로서는 돌연변이 유발이나 유전자의 cloning³⁾을 통한 효소 활성이 증가된 균주선별이 이루어져 왔다. 최근 종·속에 관계없이 비특이적이며 세포질과 함께

대부분의 genome이 전달되어 높은 빈도로 재조합체를 이룰 수 있는 원형질체 융합법^{4,5)}이 많이 연구되고 있으므로 본 연구는 분리균 *Bacillus subtilis*로부터 우량 융합균주를 효율적으로 얻기 위하여 영양요구성 변이주를 분리하여 원형질체의 형성·재생 및 융합의 최적조건에 대하여 연구하여 보고한다.

재료 및 방법

1. 사용균주

토양에서 분리한 alkaline protease 생산균 *Bacillus subtilis*를 NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)로 처리하여 영양요구주를 선별하여 사용하였다.

1989년 6월 20일 수리

Corresponding author : H.C. Yang

2. 배 지

돌연변이주 분리에 사용한 완전배지는 L배지, 최소배지는 Davis 최소배지⁹⁾를 pH 10.0으로 조정하여 사용하였다. Wyrick와 Rogers⁷⁾의 DPA 배지를 변형시킨 재생용 기본배지(glucose 5g; yeast extract 5g; K₂HPO₄ 1g; MgSO₄·7H₂O 0.2g; sodium succinate 0.5M; MgCl₂ 20mM; casamino acid 5g; polyvinylpyrrolidone 80g; pH 10.0 per liter)를 사용하였으며 액체용액은 SMM(0.5M sucrose, 0.02mM MgCl₂, 0.02M maleate buffer) 및 LF (SMM에 lysozyme 첨가)를 사용하였다.

3. 변이주의 분리

영양요구성 변이는 Alderberg등⁸⁾의 방법을 변형하여 사용하였다.

완전액체배지에서 대수기 증기까지 배양하여 이 균체를 Tris-malate buffer(pH 7.5)로 세척한 후 동일 buffer로 현탁한 뒤 NTG를 최종농도 30~1,000 µg/ml 되게 첨가하여 30°C에서 반응시켰다. NTG 처리된 균체를 phosphate buffer (pH 7.0)로 2번 세척한 후 최소액체배지에서 휴지기말기까지 배양한 후 100µg/ml의 ampicillin을 처리하여 변이주를 농축시키고 완전배지에 도말하였다. 형성된 colony를 다시 완전배지와 최소배지에 이식하여 최소배지에서 자라지 않는 영양요구주를 선별한 후 Holliday⁹⁾의 amino acid pool을 이용하여 영양요구성을 확인하였다. 영양요구성 변이주의 복원빈도는 최소배지에서 자라는 colony수를 완전배지에서 자라는 colony 수로 나눈 값으로 표시하였다.

4. 원형질체 형성 및 재생

원형질체 형성 및 재생은 Schaeffer 등¹⁰⁾의 방법을 변형하여 행하였다. 대수증식기 중기의 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 SMM 용액에 현탁시킨 후 LF용액으로 원형질체를 형성시켰다. 생성된 원형질체 희석액을 재생배지위에 도말한 후 재생용 soft agar로 증충하고 37°C에서 2~4일간 배양하여 재생시켰다.

원형질체 형성율은 정상세포 colony수에 대한 정상세포의 colony수에서 lysozyme 처리하여 형성된 원형질체 현탁액에 삼투압 충격을 가한 후 고체배지상에 나타난 colony수를 펜 수를 백분율로 나타내었으며, 재생빈도는 최초 원형질체수에

대한 재생용 기본배지상에 나타난 colony수의 백분율로 나타내었다.

5. 원형질체 융합

두 변이주의 원형질체를 1:1로 혼합한 후 원심분리하여 얻은 원형질체를 원래 부피의 1/10의 SMM 완충용액으로 현탁시키고 9/10 부피의 polyethylene glycol(PEG) 용액으로 반응시켰다. PEG 처리 균체를 SMM 용액에 희석하여 재생용 기본배지와 재생용 최소배지상에 도말하여 37°C에서 2~4일간 배양하여 재생시켰다. 융합빈도는 재생용 기본배지상에 나타난 colony 수에 대한 재생용 선택배지상에 나타난 원형질체수로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 변이주 분리

100µg/ml의 NTG로 약 45분 처리하였을 때 최대의 돌연변이율을 얻었으며 ampicillin을 사용하여 영양요구주를 농축한 결과 약 5배로 변이주가 농축되었다. 그 결과 reversion frequency가 10⁻⁸~10⁻⁹ 정도로 낮은 영양요구성 변이주를 Table 1과 같이 분리하였다.

Table 1. Auxotrophs induced by NTG treatment from *Bacillus subtilis*

Mutants	Genotype	Reversion frequency
BH 12	His ⁻	2.1×10 ⁻⁹
BT 63	Try ⁻	6.5×10 ⁻⁸
BA 15	Arg ⁻	8.6×10 ⁻⁹
BA 13	Ade ⁻	4.9×10 ⁻⁸

2. 원형질체 형성 및 재생조건

1) Lysozyme 처리

원형질체 형성을 위한 lysozyme 처리는 1~5분간 각 온도별로 처리한 결과 42°C에서 99% 이상의 원형질체 형성율을 보였다(Fig. 1).

Lysozyme 농도와 반응시간에 따른 원형질체 형성율은 42°C에서 10분간 반응시 300µg/ml 이상의 농도에서 약 99% 이상이었으나, 재생율을 고려하여 약 200µg/ml 농도로 하였다. *Bacillus* 속에서 lysozyme 농도는 50~500µg/ml 범위가 많이 사용되는 다른 연구자들의 보고^{5,7)}와 유사한 경향이였다. 반응시간은 원형질체 형성과 재생율을 고려하

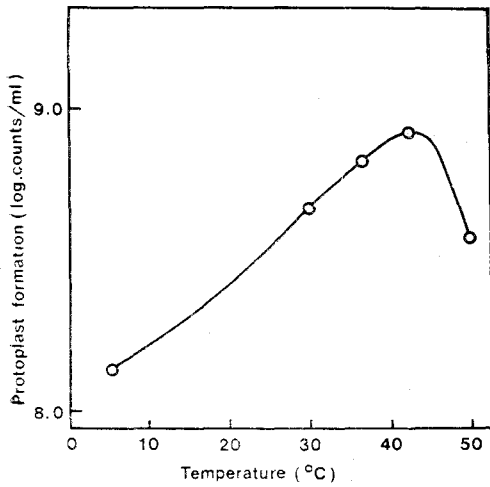


Fig. 1. Effect of temperature in lysozyme treatment on the formation of protoplast

여 20분으로 하였으며 (Table 2), Wyrick과 Rogers²⁾, Schaeffer 등¹⁰⁾의 *Bacillus* 속인 경우 대체로 10~60분 사이였다.

Table 2. Effect of concentration (a) and treatment time (b) of lysozyme on the protoplast formation and regeneration frequency

Frequency(%)	Lysozyme conc. ($\mu\text{g/ml}$)					
	50	100	150	200	300	400
Pff*	86.8	95.8	96.4	98.5	99.1	99.9
Rf**	28.0	26.1	25.0	23.0	19.6	16.7

Frequency(%)	Treatment time(min.)				
	5	10	20	40	60
Pff*	84.7	92	99	99	99
Rf**	26	22	20	14.7	12.5

Pff*: Protoplast formation frequency.

Rf**: Regeneration frequency.

배양시간에 따른 원형질체 형성율은 대수증식기 중달기에서 최대 생성율을 나타내었으며, 재생은 대수증식기 말기와 정지기 초기에서 가장 높은 재생율을 보였다 (Fig. 2).

2) 원형질체의 세포벽 재생

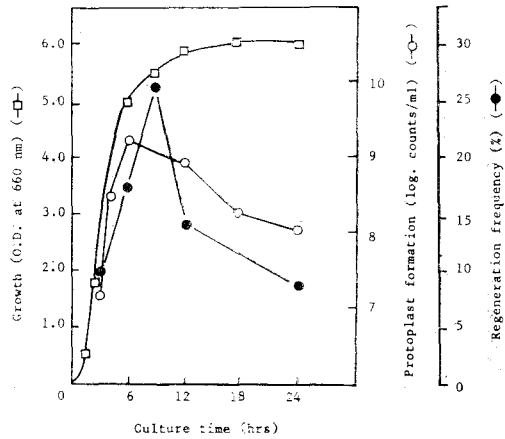


Fig. 2. Effect of culture time on protoplast formation and regeneration

원형질체의 재생율은 융합에 중요한 요소이므로 재생에 관한 몇가지 조건을 검토하였다.

2가 양이온 중 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이온이 원형질체의 재생에 미치는 영향을 보기 위하여 MgCl_2 와 CaCl_2 를 농도별로 재생용 기본배지에 첨가한 결과 Table 3에서와 같이 MgCl_2 10mM, CaCl_2 20mM에서 최고 재생율을 보였다. 2가 양이온은 원형질체의 안정성과 재생에 영향이 있다는 보고¹¹⁻¹³⁾가 있다.

재생용 기본배지에 첨가한 sodium succinate 효과는 0.3M일 때 약 24%의 재생율을 보였다 (Fig. 3).

Table 3. Effect of divalent-cations on the regeneration frequency

Mg^{++} (mM)	Ca^{++} (mM)	Relative regeneration frequency
0	0	50.1
20	0	54.2
20	10	64.3
20	20	89.1
20	50	58.4
20	100	26.8
0	20	89.8
10	20	100.0
20	20	85.1
50	20	34.9
100	20	26.3

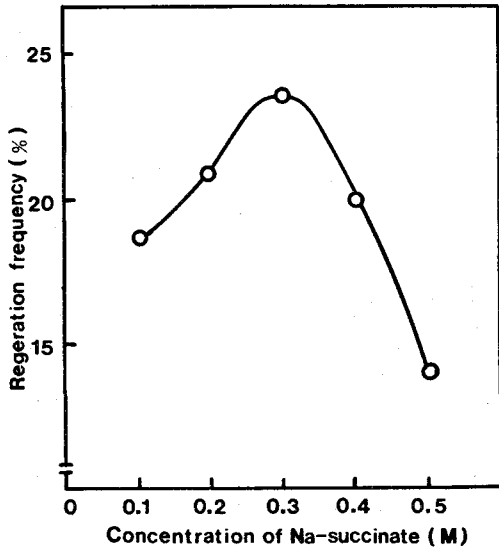


Fig. 3. Effect of concentration of sodium succinate on the regeneration frequency

Polyvinylpyrrolidone(PVP)를 재생배지에 첨가함으로써 재생에 미치는 효과를 본 결과 Fig. 4에서와 같이 2% PVP를 첨가하였을때 재생율은 25.1%로 무첨가시보다 약 2배 이상 증가하였다. PVP는 *Bacillus subtilis*의 경우 gelatin¹⁴⁻¹⁶⁾이나 serum^{12,17,18)} 대신 효과적으로 대체될 수 있는 plasma expander로 Akamatsu와 Sekiguchi¹⁹⁾에 의해 보고된 바 있다.

세포대사의 활성화를 촉진시켜 재생율에 영향을

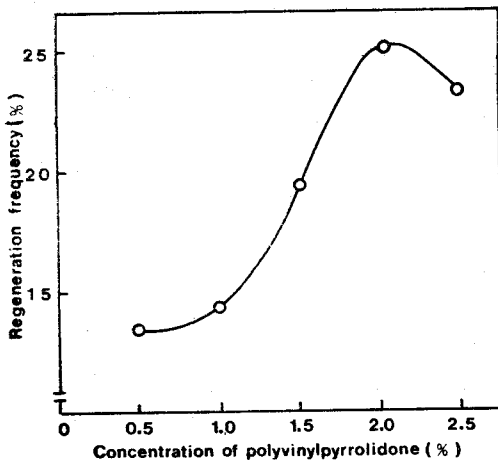


Fig. 4. Effect of concentration of polyvinylpyrrolidone on the regeneration frequency

주는 casamino acid¹⁹⁾를 농도별로 첨가한 결과 0.5% 첨가시 가장 좋은 효과를 나타내었다(Fig. 5).

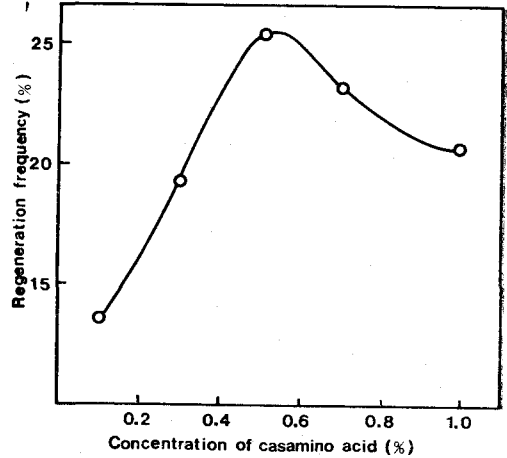


Fig. 5. Effect of concentration of casamino acid on the regeneration frequency

3. 원형질체 융합

원형질체 융합시 융합 유도제로 사용되는 PEG^{10,17,20)}의 분자량에 따른 융합빈도는 큰 차이가 없었으나²¹⁾ PEG 6,000에서 융합빈도가 높았다. PEG 6,000의 농도를 20~60%(w/v)까지로 만들어 *B. subtilis* BH 12와 BT 63과의 융합을 유도하고 그 융합빈도를 본 결과 40%에서 융합빈도 약 8.1×10^{-5} 로 가장 높았으며 40% PEG의 처리시간에 따른 융합체 생성은 처리시간 1분에서 5분까지는 융합빈도가 증가하였고 처리시간이 길어짐에 따라 재생율과 융합빈도는 감소하였다(Fig. 6).

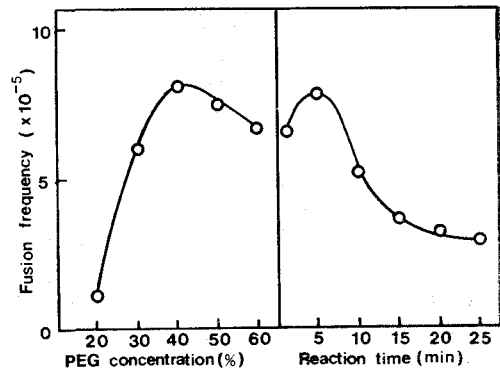


Fig. 6. Effect of concentration and reaction time of PEG on the protoplast fusion frequency.

원형질체 융합에 효율적인 조건으로 나타난 PEG 6,000을 융합유도제로 하여 처리농도 40%(w/v), 처리시간 5분으로 영양요구주간에 원형질체융합을 실시하였다(Table 4). 각기 다른 요구주간에 융합빈도의 차이를 보여 약 $2\sim 8\times 10^{-5}$ 의 융합빈도를 보였다. 이는 이들 영양요구주의 reversion frequency인 $10^{-8}\sim 10^{-9}$ 보다 매우 높은 빈도로, 균주들의 reversion에 의한 것이 아님을 알 수 있었다. 그리고 융합주의 생리적 배양학적 특성과 유전적 안정성 검토는 계속 실험하고자 한다.

Table 4. Fusion frequency of the crosses between protoplast from various auxotrophic mutants

Cross(genotype)	Fusion frequency
BT 63(try ⁻)×BH 12(his ⁻)	8.1×10^{-5}
BT 63(try ⁻)×BA 13(ade ⁻)	2.1×10^{-5}
BT 63(try ⁻)×BA 15(arg ⁻)	7.7×10^{-5}
BH 12(his ⁻)×BA 13(ade ⁻)	3.3×10^{-5}
BH 12(his ⁻)×BA 15(arg ⁻)	4.1×10^{-5}
BA 13(ade ⁻)×BA 15(arg ⁻)	5.0×10^{-5}

4. 원형질체 형성과 융합의 전자현미경 관찰

Fig. 7은 전자현미경 사진으로서 2~2.5×0.5

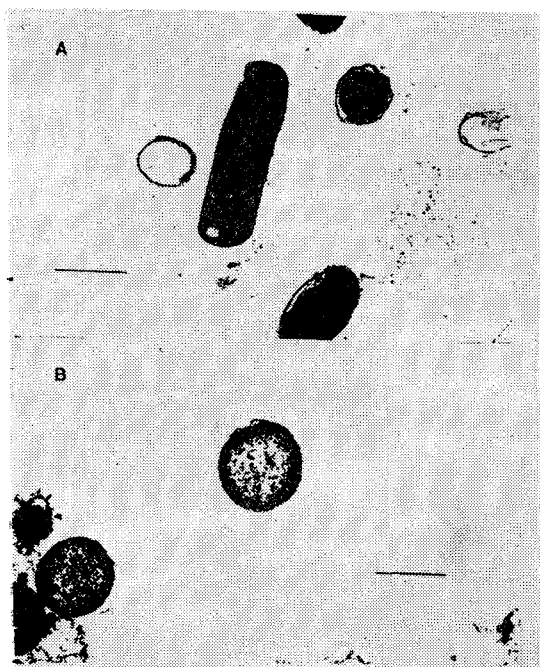


Fig. 7. Transmission electron microphotographs of intact cells and protoplast (bar : 0.5μm)

~0.6μm 크기의 친주 *Bacillus subtilis*와 lysozyme 처리에 의한 구형의 원형질체를 관찰한 것이고, 융합과정도 관찰되었다(Fig. 8).



Fig. 8. Transmission electron microphotographs of protoplast fusion.

A: Protoplasts just before fusion after PEG treatment (bar : 0.25μm).

B: Fused protoplasts after PEG treatment (bar : 0.5 μm).

초 록

Alkaline protease를 생산하는 *Bacillus subtilis*를 100μg/ml NTG 처리하여 Arg⁻, Try⁻, His⁻, Ade⁻ 영양요구성주를 분리하였다. 원형질체 형성은 대수증식기의 균체를 lysozyme 200μg/ml로 42°C에서 10~30분간 처리하였을 때 약 99%였다. 재생배지에 0.3M sodium succinate, polyvinylpyrrolidone 2.0%, casamino acid 0.5%, 10mM MgCl₂ 및 20mM CaCl₂를 첨가했을 때 재생율은 25.2%였다. 원형질체 융합은 40%(w/v)의 PEG 6,000 용액을 상온에서 1~5분간 처리시 약 $2\sim 8\times 10^{-5}$ 의 융합빈도를 얻을 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 鶴大典 : 科學と工業, 43(1969)
2. 장신재, 김윤숙, 성하진, 최용진, 양한철 : 한

- 국농화학회지, 31 : 356(1988)
3. Nagami, Y. and Tanaka, T.: *J. Bacteriol.*, 166 : 20(1986)
 4. Foder, K. and Alfoldi, L.: *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73 : 2147(1988)
 5. Schaeffer, P. and Hotchkiss, R.D.: *Methods Cell Biol.*, 20 : 149(1978)
 6. Gerhardt, P., Murray, R.E.G., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Phillips, G.B.: *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, p.239(1981)
 7. Wyrick, P.B. and Rogers, H.J.: *J. Bacteriol.*, 116 : 456(1973)
 8. Alderberg, E.A., Mandel, M. and Chen, G. C.C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18 : 788(1965)
 9. Holliday, R.: *Nature*, 178 : 987(1956)
 10. Schaeffer, P., Cami, B. and Hotchkiss, R. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73(6) : 2151(1976)
 11. Rogers, H.J., Perkins, H.R. and Ward, J.B.: *Microbial Cell Walls and Membranes*, Chapman & Hall, London (1980)
 12. Okamoto, T., Fujita, K.K. and Irie, R.: *Agric. Biol. Chem.*, 47 : 259(1983)
 13. Tabor, C.W.: *J. Bacteriol.*, 83 : 1101(1961)
 14. Landman, O.E., Ryter, A. and Frehel, C.: *J. Bacteriol.*, 96 : 2154(1968)
 15. Landman, O.E. and Forman, A.: *J. Bacteriol.*, 99 : 576(1969)
 16. Kaneko, H. and Sakaguchi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 43 : 1007(1979)
 17. Gabor, M.H. and Hotchkiss, R.D.: *J. Bacteriol.*, 137 : 1346(1979)
 18. Otts, D.R. and Day, D.F.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 : 1694(1987)
 19. Akamatsu, T. and Sekiguchi, J.: *Agric. Biol. Chem.*, 45 : 2887(1981)
 20. Smith, C.L., Ahkong, Q.F., Fisher, D. and Lucy, J.A.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 692 : 109(1982)
 21. Hoppwood, D.A.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 35 : 237(1981)