

## Bacillus sp. SSA3 균주의 Expression Vector 開發

조윤래\* · 김종규 · 권대준  
영남대학교 농축산대학 응용미생물학과

### Construction of Expression Vector of *Bacillus* sp. SSA3 Strain

Jo, Youl-Lae\*, Jong-Kyu Kim and Dea-Jun Kwoen

Department of Applied Microbiology, College of Agriculture and  
Animal Science, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

**Abstract** — The promoter regions from chromosomal DNA of *Bacillus* sp. SSA3 which is responsible for fermentation of Korean traditional soy sauce, were cloned for construction of expression vector of *Bacillus* sp. SSA3. Recombinant plasmids were constructed by insertion of *Hind*III-cleaved *Bacillus* sp. SSA3 chromosomal DNA fragments in front of the CAT gene of pGR71 plasmid and  $\beta$ -galactosidase gene of pUC18 plasmid. 6 recombinant plasmids were isolated from chloramphenicol resistant *E. coli* JM109 clones. All these plasmids were found to have promoter activity in *Bacillus* sp. SSA3 and *E. coli* JM109. When these 6 clones of *Bacillus* sp. SSA3 were cultivated in LB agar medium supplemented with 10% NaCl, fused CAT gene expression of 4 clones was significantly decreased in common. But the others were poorly inhibited.

韓國 在來式 간장·된장에서 分離 同定된 *Bacillus* sp. SSA3는 한국 재래식 간장·된장을 製造하는데 있어서 아주 우수한 菌株로 判明되었다(1-5). 그러나 *Bacillus* sp. SSA3 균주를 사용한 한국 재래식 간장·된장 제조를 工業化하기 위해서는 여러 方面으로의 균주 育種이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

*Bacillus*속에 대한 균주 육종은 많은 연구의 對象이 되어 왔다. 특히 그 중에서도 *Bacillus*속 균주는 외래 有用 蛋白質 유전자의 발현 및 단백질의 分泌面에서 많은 연구자들의 관심의 대상이 되고 있다. 그래서 이들 *Bacillus*속 균주들을 有用 단백질 생산을 위한 安정한 세포로 사용하기 위해 多方面에서 많은 연구를 進行하여 왔다(6). 그러나 *Bacillus*속 균주들은 微生物 分類상 다른 屬 균주들과는 달리 屬 間遺傳子 傳達 및 發現에 있어서 매우 限定的인 面을 보이고 있다(7).

본 연구에서는 遺傳子 操作 技術을 이용한 *Bacillus* sp. SSA3 균주의 育種을 하기 위해 유전자 전달 및

발현을 위한 vector-host 體系確立의 일환으로 異屬의 遺傳子 發現을 위한 expression vector를 製作하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 使用菌株와 배지 및 plasmid

본 연구에 사용된 菌株 및 plasmid에 있어서 숙주세포로서는 한국재래식 간장·된장 발효균 *Bacillus* sp. SSA3(3)와 *E. coli* JM109 균주를 사용하였으며 plasmid는 pUC18과 promotor probe vector pGR71(8)를 사용하였다. *Bacillus* sp. SSA3의 원형질체 형질전환에는 SMMP 완충용액과 SMM 완충용액을 사용하였으며 재생배지로는 nutrient agar 배지를 사용하였다.

#### DNA 정제 및 형질전환

DNA의 정제는 Birnboim과 Doly의 알칼리변성법(9)을 변형하여 행하였으며 *E. coli* JM109의 plasmid DNA에 의한 형질전환은 Dagert와 Ehlich의 방법(10)에 의해, 또한 *Bacillus* sp. SSA3의 형질전환은 Chang

**Key words:** *Bacillus* sp. SSA3, soy sauce fermentation, expression vector

\*Corresponding author

과 Cohen의 방법(11)에 의해 행하였다.

**삽입 유전자 promoter 활성 측정**

Promoter probe vector pGR71 plasmid의 *Hind*III 절단 부위에 삽입된 *Bacillus* sp. SSA3 由來의 DNA 단편 中 promoter의 활성은, 그 再組合된 plasmid에 의해 형질전환된 숙주세포를 chloramphenicol이 여러 濃度로 함유된 LB 한천배지상에 接種하여, 37°C 에서 24시간 배양하여 그 生育 與否, 즉 내성의 程度를 promoter의 活性으로 표시하였다. 또한 pUC18의 *Hin*dIII 절단 부위에 삽입된 *Bacillus* sp. SSA3 由來의 DNA 단편 中 promoter 활성은, 0.4% X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto-pyranoside) 함유된 L-broth 배지 위에서 靑色の colony를 나타내는 것으로 판단하였다.

**Chloramphenicol acetyltransferase(CAT) 활성 측정**

선별된 clones의 promoter의 활성은 Shaw의 방법 (12)에 따라 측정하였으며 chloramphenicol acetyltransferase(CAT)의 1 unit는 37°C 에서 분당 acetylation되는 chloramphenicol의 mol수로 표시하였다.

**결과 및 고찰**

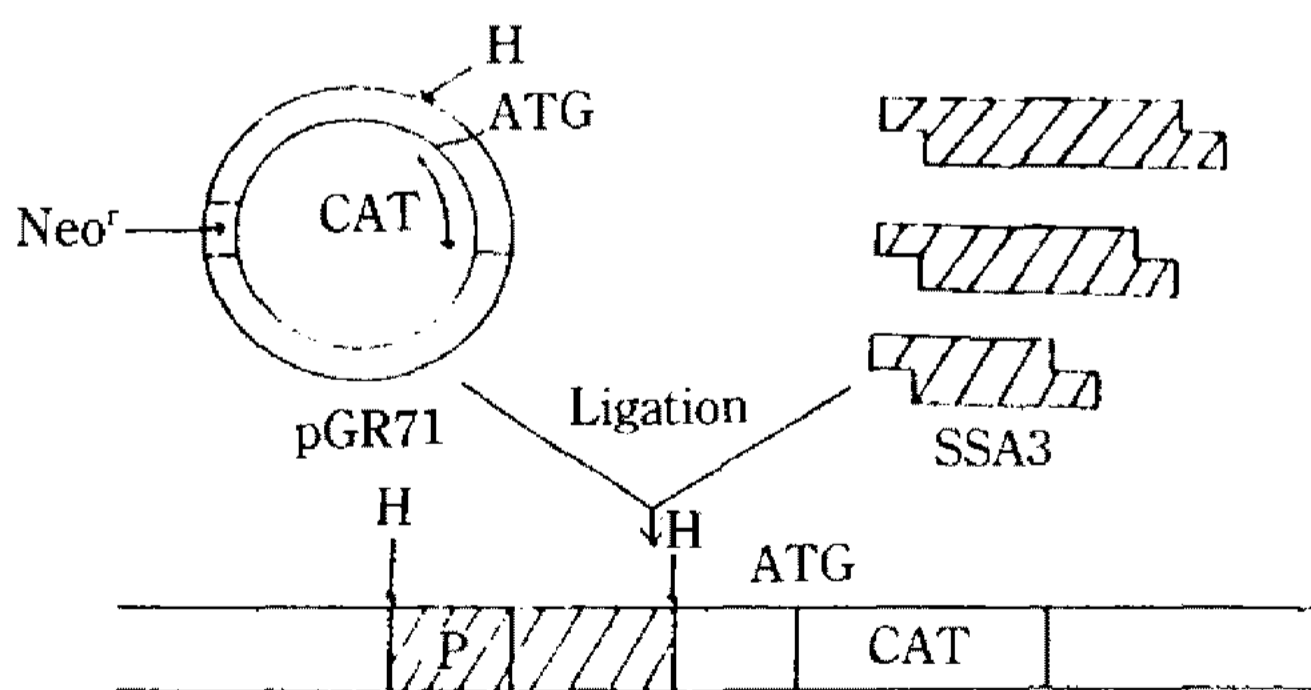
**Transcription fusion에 의한 promoter 선별**

*Bacillus* sp. SSA3와 *Escherichia coli* JM109 宿主細胞에서 遺傳子의 transcription 水準에서 制御될 수 있는 expression vector를 제작하기 위해 *Bacillus* sp.

SSA3 chromosome 유전자의 promoter 부위를 pGR71 plasmid의 promoter가 缺損된 CAT 유전자의 構造遺傳子와 fusion하고자 하였다. 그 방법은 Fig. 1에서 표시한 바와 같다. *Bacillus* sp. SSA3로부터 精製한 chromosomal DNA를 制限酵素 *Hind*III로 切斷하여 약 200~1,000 bp 정도의 DNA 斷片을 分離한 後, pGR71 plasmid를 *Hind*III로 절단하여 ligation시킨 다음 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 10 μl/ml의 chloramphenicol이 첨가된 L-broth 한천배지에서 總 15개의 colony를 확인할 수 있었다. 이 colony로부터 plasmid DNA를 精製하여 再組合된 plasmid인지를 확인하기 위해 制限酵素 *Hind*III로 절단하였다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 200~600 bp 정도의 DNA 단편들을 각각 확인할 수 있었다. 이와 같이 clones를 選別한 결과 Table 1에서와 같이 4 clones을 선별할 수 있었다.

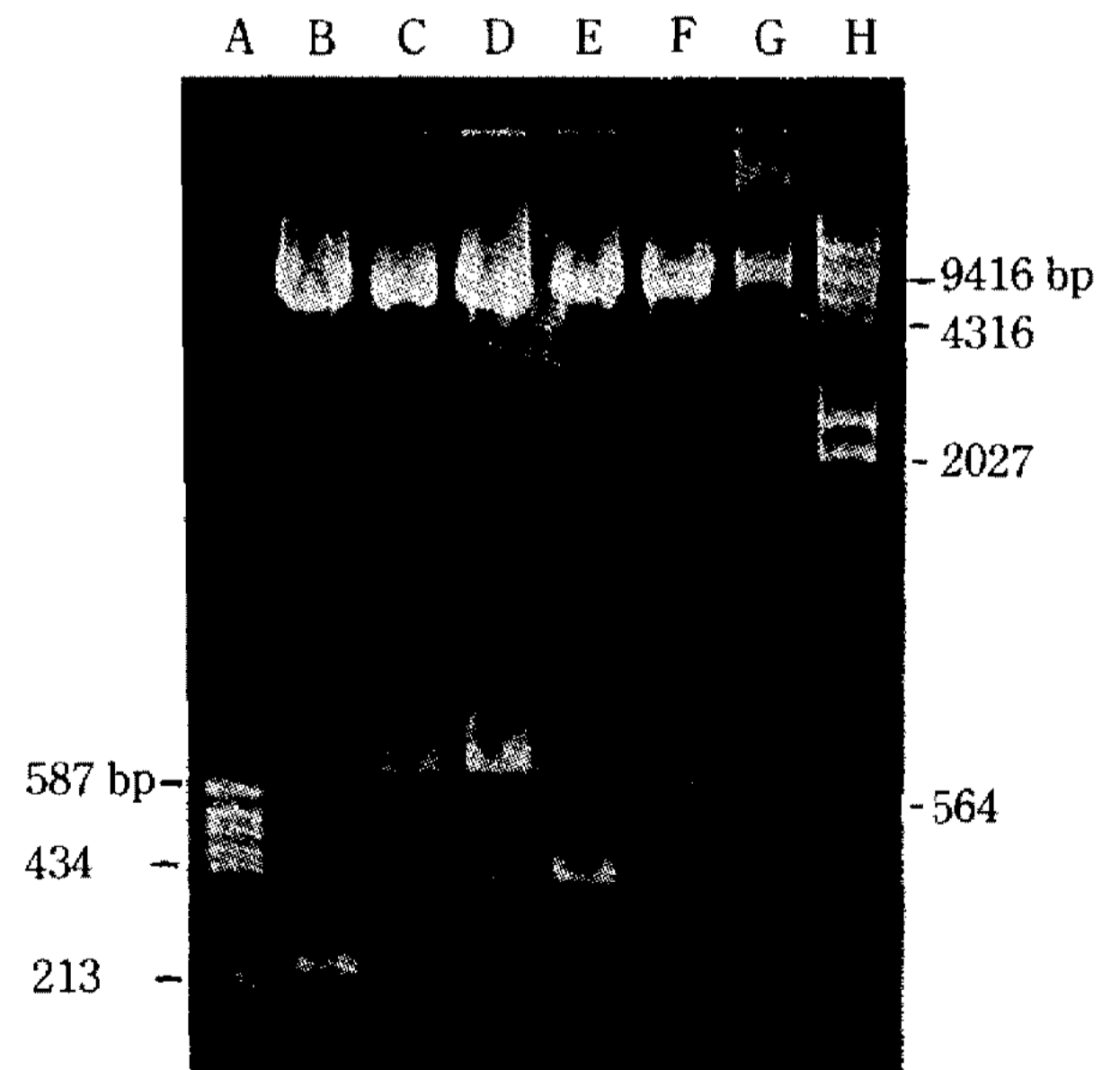
**Transcription-translation fusion에 의한 promoter 선별**

*Bacillus* sp. SSA3와 *E. coli* JM109 숙주세포에서 유전자의 transcription-translation 水準에서 制御될



**Fig. 1. Construction of expression vector by transcription fusion.**

▨: *Bacillus* sp. SSA3 chromosomal DNA fragment, CAT: chloramphenicol acetyltransferase structural gene, H: *Hind*III restriction site, P: promoter, Neor: neomycin resistant gene.

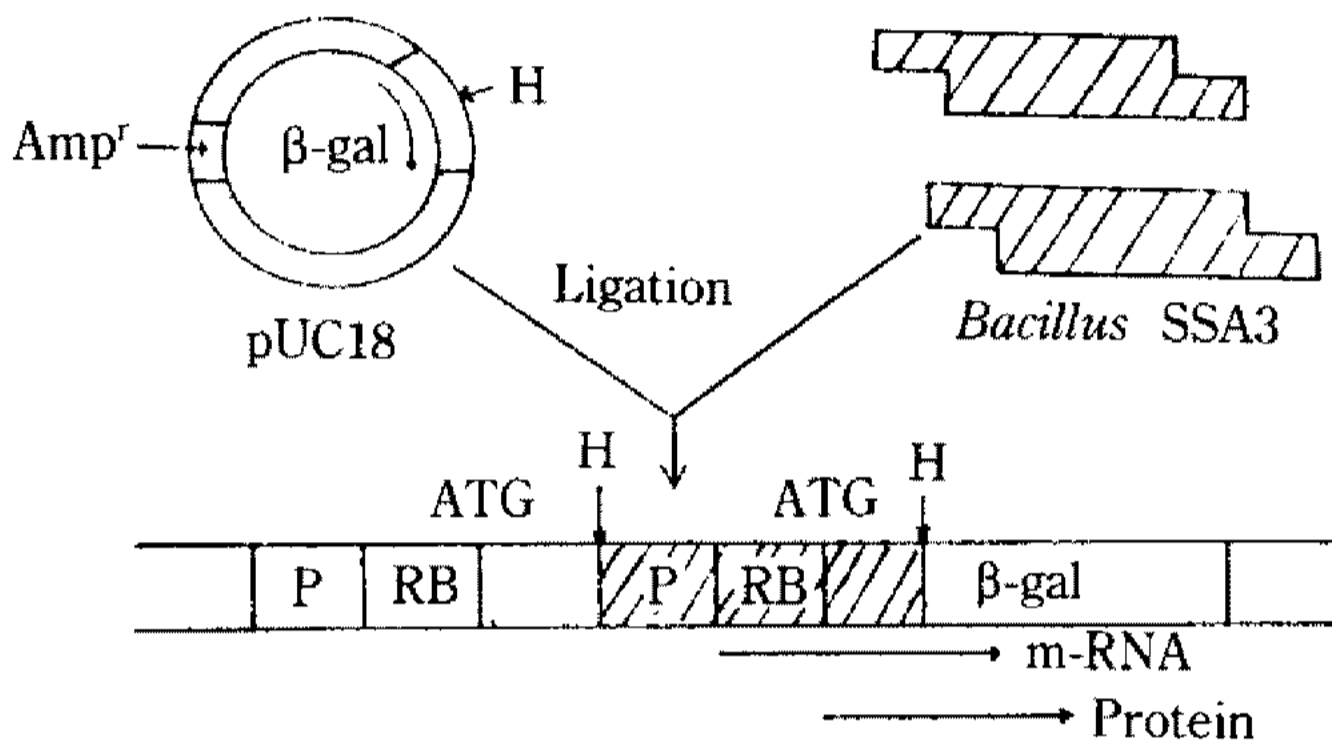


**Fig. 2. Agarose gel (1.2%) electrophoresis of the recombinant plasmid DNA selected by the transcription fusion.**

A: *Hae*III digested pBR322 plasmid DNA standard marker, B: *Hind*III digested pGR71-J4 plasmid, C: *Hind*III digested pGR71-J3 plasmid, D: *Hind*III digested pGR71-J2 plasmid, E: *Hind*III digested pGR71-J1 plasmid, F: *Hind*III digested pGR71 plasmid, G: pGR71 plasmid, H: *Hind*III digested λ-DNA standard marker

**Table 1. Characteristics of the recombinant plasmids by transcription fusion**

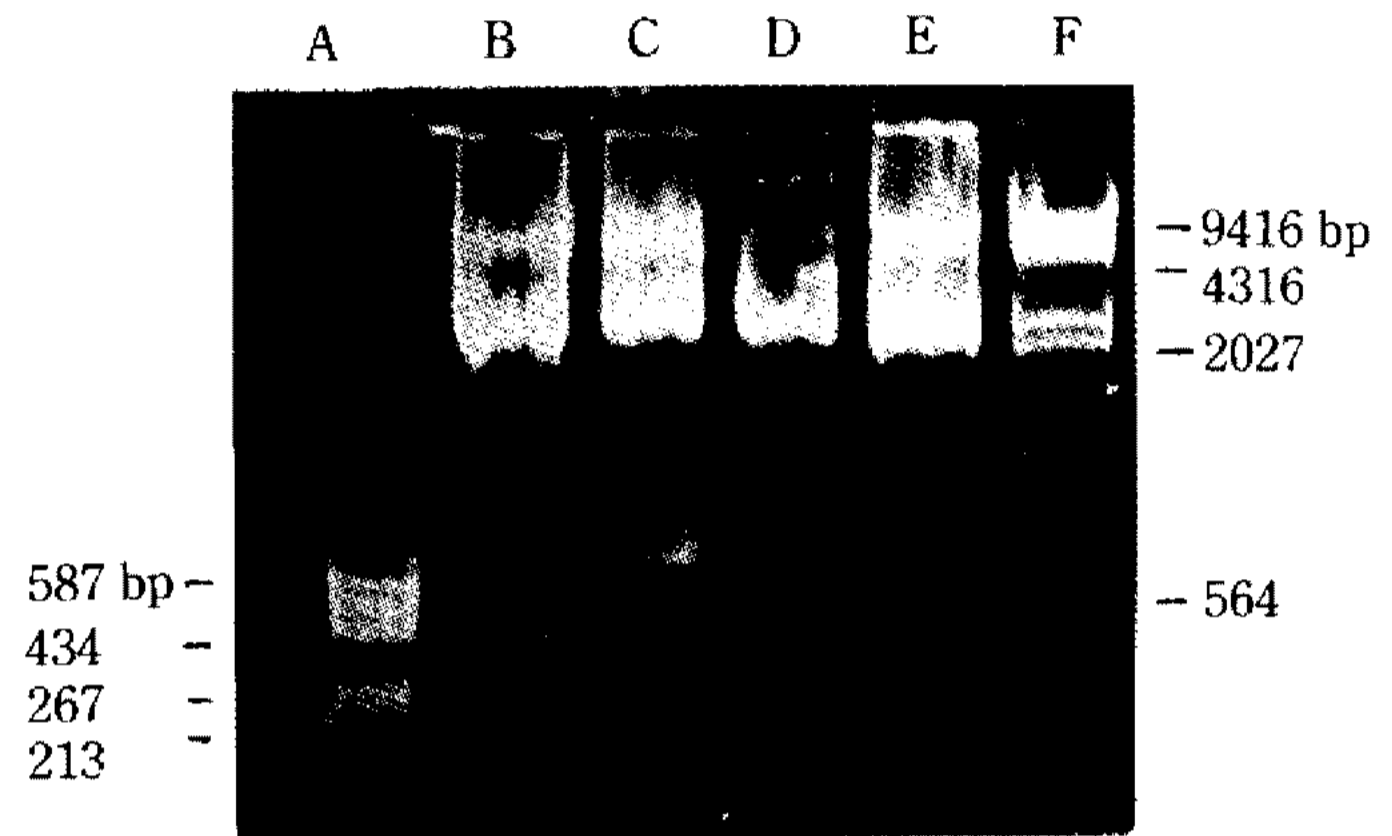
Clone	Insert (bp)	Chloramphenicol resistance ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		CAT activity
		<i>E. coli</i> JM109	<i>Bacillus</i> sp. SSA3	<i>E. coli</i> JM109
pGR71	—	<10	<10	0.
pGR71-J1	430	40	150	22.56
pGR71-J2	650	100	125	41.80
pGR71-J3	630	70	100	30.20
pGR71-J4	230	125	100	58.47



**Fig. 3. Construction of expression vector by transcription-translation fusion.**

▨: *Bacillus* sp. SSA3 chromosomal DNA fragment, P: promoter, H: *Hind*III restriction site, RB: ribosome binding site, Amp<sup>r</sup>: ampicillin resistant gene

수 있는 expression vector를 제작하기 위해 Fig. 3와 같이 *Bacillus* sp. SSA3의 chromosomal 유전자의 promoter-ribosome 결합部位-蛋白質合成開始部位를 포함해서 일부 단백질의 N-末端을 코드하는 부위와 pUC18 plasmid의  $\beta$ -galactosidase의 제한효소 *Hind*III 切斷部位인 N-末端部位를 fusion하고자 하였다. *Bacillus* sp. SSA3로부터 정제한 chromosomal DNA를 제한효소 *Hind*III로 절단하여 약 200~1,000 bp 정도의 DNA 단편을 분리한 후, *Hind*III로 절단한 다음 CIP(calf intestinal alkaline phosphatase)를 처리한 pUC18 plasmid와 ligation시킨 후 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 neomycin과 X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)을 추가한 L-broth 한천배지상에서青色 colony를 선별하는 것으로  $\beta$ -galactosidase의 활성을 확인하였다. Self-ligation된 plasmid를 내재하는 形質轉換體도青色의 colony 색을 나타낼 것이므로 이러한 colony는 IPTG(Isopropylthio- $\beta$ -D-galactosidase), X-gal을 추가한 배지상에서는  $\beta$ -galactosidase의 誘導로 말미암아 검정색으로 colony의 색이 변하는 것으로 區別하였다.



**Fig. 4. Agarose gel (1.2%) electrophoresis of the recombinant plasmid DNA selected by the transcription-translation fusion.**

A: *Hae*III digested pBR322 plasmid DNA standard marker, B: *Hind*III digested pUC18-E2 plasmid/*E. coli* JM109 transformant, C: *Hind*III digested pUC18-E1 plasmid/*E. coli* JM109 transformant, D: *Hind*III digested pUC18 plasmid, E: pUC18 plasmid, F: *Hind*III digested  $\lambda$ -DNA standard marker

또한 이들 colony로부터 plasmid를 정제하여 제한효소 *Hind*III로 절단한 후 插入된 DNA 단편을 확인하였다. 이렇게 해서 最終적으로 2 clones를 선별할 수 있었다. 선별된 2 clones의 각각의 再組合 plasmids는 pUC18-E1, pUC18-E2로 命名하고, 이들 각각의 再組合 plasmid DNA를 精製하여 插入된 DNA 단편을 확인한 결과 Fig. 4에서와 같이 각각 660 bp, 330 bp 정도의 DNA 단편이 插入되어 있음이 확인되었다. 이들 삽입된 DNA 단편을 *Hind*III로 處理하여 切斷, 分離한 후 앞에서의 transcription fusion에서와 같이 *Hind*III로 절단한 pGR71 plasmid에 ligation시킨 후 *E. coli* JM109와 *Bacillus* sp. SSA3에 형질전환하였다. 이렇게 해서 재조합된 plasmid는 CAT 構造 유전자에 promoter 部位의 삽입으로 chloramphenicol에 대한 耐性を 나타낼 것이다. 선별된 재조합 plasmid는 pGR71-E1, pGR71-E2로 命名하였으며, 이들

**Table 2. Characteristics of the recombinant plasmids by transcription-translation fusion**

Clone	Insert (bp)	Chloramphenicol resistance ( $\mu\text{g/ml}$ )		CAT activity <i>E. coli</i> JM109
		<i>E. coli</i> JM109	<i>Bacillus</i> sp. SSA3	
pGR71	—	<10	<10	0
pGR71-E1	660	200	175	81.40
pGR71-E2	330	175	150	53.89

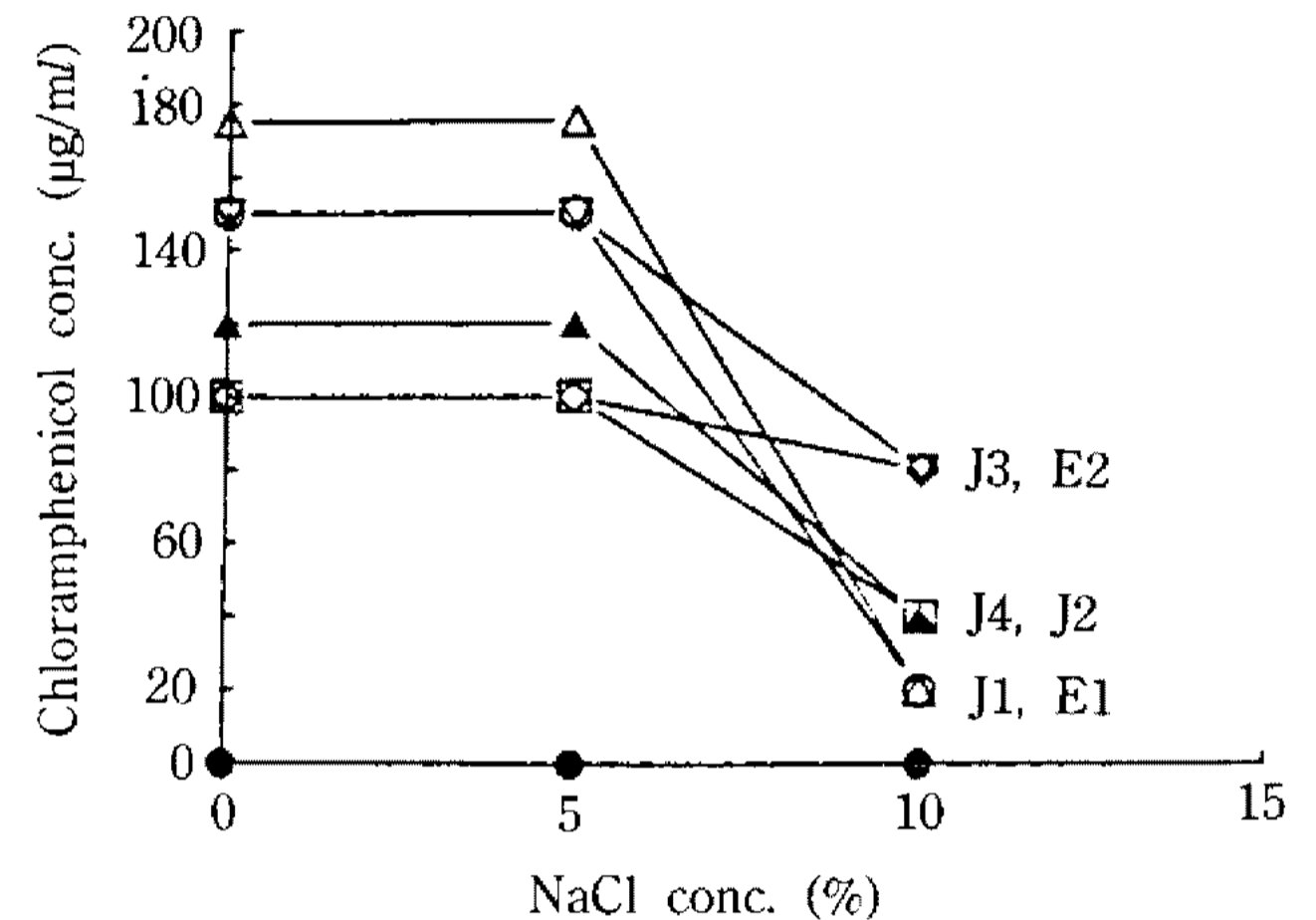
은 Table 2에서와 같이 chloramphenicol에 대한 높은 내성을 나타내었다.

### 삽입 DNA 단편의 promoter 활성

pGR71 plasmid에 삽입된 *Bacillus* sp. SSA3 chromosome 유래의 DNA 단편에 promoter 부위의 존재여부와 또한 활성은 각 선별된 6 clones들의 chloramphenicol 내성 정도와 CAT activity 활성으로 표시하였다. Transcription fusion에 의해 선별된 4 clones의 재조합 plasmid는 Table 1에서 표시한 바와 같이 *E. coli* JM109에서 chloramphenicol에 대해 40  $\mu\text{g/ml}$  이상의 높은 내성을 나타내었으며 또한 CAT activity assay에서도 잘 일치하였다. 그리고 *Bacillus* sp. SSA3에 형질 전환한 결과 재조합 plasmid pGR71-J1은 *E. coli* JM109에서보다 *Bacillus* sp. SSA3에서 훨씬 높은 내성을 나타내었으며 다른 재조합 plasmid는 *E. coli* JM109에서와 비슷한 정도의 내성을 나타내었다. 이 결과로서 새롭게 선별된 4 clones의 chloramphenicol에 대한 내성은 새롭게 삽입된 *Bacillus* sp. SSA3 chromosomal DNA HindIII 단편으로부터起因하였으며, 삽입된 DNA 단편에는 promoter 부위가 존재하는 것으로 思料된다. Transcription-translation fusion에 의해 선별된 2種類의 재조합 plasmid pGR71-E1, pGR71-E2는 Table 2에서와 같이 *E. coli* JM109와 *Bacillus* sp. SSA3내에서도 높은 promoter 활성을 나타내었다. 그리고 *E. coli* JM109내에서도 chloramphenicol 내성 정도와 CAT 활성이 잘 일치하고 있음을 볼 수 있다. 이것으로 이들 2種類의 재조합 plasmid내에는 promoter 부위-ribosome 결합 부위-단백질 합성개시부위가 내재되어 있는 것으로 사료된다.

### 선별 clones의 promoter 활성에 대한 NaCl의 영향

*Bacillus* sp. SSA3 균주는 내염성균으로 NaCl이 약 10% 첨가된 배지 중에는 그 생육이 다소 저하되나



**Fig. 5. Effect of NaCl for promoter activity of the selected recombinant plasmids in *Bacillus* sp. SSA3.**

$\Delta$ - $\Delta$ : pGR71-E1,  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ : pGR71-J2,  $\nabla$ - $\nabla$ : pGR71-E2,  $\square$ - $\square$ : pGR71-J4,  $\circ$ - $\circ$ : pGR71-J1,  $\diamond$ - $\diamond$ : pGR71-J3,  $\bullet$ - $\bullet$ : SSA3

약 15%까지 생육이 가능하다(4). 그리고 간장·된장 발효시 일반가정에서는 그 농도의 차이가 있겠으나 약 20%의 염이 첨가되고 있다(13). 따라서 *Bacillus* sp. SSA3 균주를 사용하여 간장·된장 발효시 이들 선별된 재조합 plasmid를 expression vector로 사용할 경우 이들 plasmid 중에 삽입되어진 promoter 영역에 대한 NaCl에 의한 영향의 유무가 예상된다. 그러므로 선별된 clones 중의 promoter의 활성에 대한 NaCl의 영향을 조사하였다. 이들의 활성은 0~10% 농도의 NaCl과 0~200  $\mu\text{g/ml}$ 의 chloramphenicol이 각각 첨가된 LB 한천배지내에서의 생육 즉 내성 정도로 표시하였다. Fig. 5에서와 같이 선별된 6 clones 모두 공통적으로 5% NaCl에서는 그 활성이 감소되지 않았으나 10% NaCl에서는 급격히 감소하였다. 그러나 pGR71-J3와 pGR71-E2 clone은 각각 80  $\mu\text{g/ml}$ 의 chloramphenicol 내성을 나타내었으므로 이것으로 10% NaCl에서는 6 clones 중에서 이들 2 clones에 비교적 높은 promoter 활성이 있음을 알 수 있다.

또한 고농도의 염이 첨가된 배지상에서 *Bacillus* sp. SSA3는 그 유전자의 promoter 활성에 정도의 차이는

있겠지만 대체로 감소될 것으로 추측할 수 있다. 그리고 이들 선별된 clones들을 실제 간장·된장 발효시에 expression vector로 사용시 NaCl의 농도에 대응한 적당한 clones을 선택함으로써 목적으로 하는 유전자 발현의 인위적 조정이 가능하리라 사료된다. 그러나 여기서 언급되어야 할 것은 pGR71-E1, pGR71-E2 재조합 plasmid는 m-RNA의 ribosome binding 부위가 삽입된 것으로 추측되며 또한 다른 pGR71-J1~J4의 재조합 plasmid 중에도 ribosome binding 부위의 존재 가능성을 배제할 수 없다. 그러므로 이들 선별된 6 clones의 NaCl에 대한 영향은 단백질 생합성에 대한 과정중 translation 수준의 가능성을 배제할 수 없다. 이것은 앞으로의 6종류의 재조합 plasmid의 염기배열 결정을 통해서 해석될 수 있을 것이다.

## 요 약

한국 재래식 된장·간장 발효균 *Bacillus* sp. SSA3 균주의 expression vector를 개발하기 위해 *Bacillus* sp. SSA3의 chromosomal DNA로부터 유전자의 promoter 부위를 cloning하였다. Recombinant plasmid를 제작하기 위해 *Bacillus* sp. SSA3의 chromosomal DNA를 *Hind*III로 절단한 단편을 pGR71 plasmid의 CAT gene과 pUC18 plasmid의  $\beta$ -galactosidase gene의 전방에 삽입시킨 후, *E. coli* JM109에 형질 전환하였다. *E. coli* JM109의 chloramphenicol 내성 clones으로부터 6 recombinant plasmid를 선별하였다. 이들 선별된 plasmid는 *Bacillus* sp. SSA3와 *E. coli* JM109에서 promoter의 활성이 확인되었다. 그리고 실제 간장·된장 발효시 여러 농도의 염이 첨가되므로 이 선별된 재조합 plasmid를 *Bacillus* sp. SSA3의 expression vector로 사용시 각 재조합 plasmid 중에 삽입된 promoter의 염에 대한 영향의 정도를 확인하기 위해 10% NaCl이 첨가된 LB medium상에서 배양하였을 때, 이들 중 *Bacillus* sp. SSA3의 4 clones은 융합 CAT gene의 발현이 강하게 감소되었으나 2 clones은 약하게 저해되었다.

## 감사의 말

본 연구는 89년도 교육부 지원 학술진흥재단의 자유평과과제 학술연구 조성비에 의해서 수행되었으며,

연구비지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Kim, J.K., S.Y. Chung, and J.G. Jang. 1988. Characteristics of aroma produced by microorganisms during fermentation of ordinary Korean soy sause. *The Institute of Resource Development Yeoungnam University* **5**: 83-93.
2. Song, J.Y., C.W. Ahn, and J.K. Kim. 1984. Flavor components produced by microorganism during fermentation of Korean ordinary soybean paste. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 147-152.
3. Kwon, O.H., J.K. Kim, and Y.G. Chung. 1986. The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste. *J. Kor. Agri. Chem. Soc.* **29**: 422-428.
4. Ki, W.K., J.K. Kim, D.H. Kang, and Y.U. Cho. 1987. Development of excellent mutants for manufacture of ordinary Korean soy sauce and soybean paste. *Kor. J. Microbiol. Biotech.* **15**: 21-28.
5. Kim, J.K. and S.D. Kim. 1988. Genetic breeding of Korean soy sauce-fermenting *Bacillus* by UV mutation. *Kor. Agri. Chem. Sci.* **31**: 346-350.
6. Ganesan, A.T. and J.A. Hoch. 1986. *Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications*, Pp. 83-140. Academic Press.
7. 柳田友道. 1980. 微生物科學, **1**: 51-112. 學會出版社.
8. Goldford, D.S., R.H. Doi, and R.L. Rodrigue. 1981. Expression of Tn 9-derived chloramphenicol resistance in *Bacillus subtilis*. *Nature* **293**: 309-311.
9. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
10. Dargert, M. and Ehrlich, S.D. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *E. coli* cells. *Gene* **6**: 23.
11. Cohn, S.N. and Chang, S. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 111-115.
12. Shaw, W.V. 1975. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymology* **43**: 737-755.
13. Kim, J.K. and C.S. Kim. 1980. The taste components of ordinary Korean soy sauce. *J. Kor. Agri. Chem. Soc.* **23**: 89-106.

(Received September 28, 1992)