

## *Bacillus subtilis*의 Ura<sup>-</sup>와 Trp<sup>-</sup>菌株의育成과 Protoplast 調製 및 Regeneration

河 一 湖 · 李 啓 瑚

서울대학교 農科大學 食品工學科

(1985년 3월 5일 수리)

Isolation of Uracil and Tryptophan Auxotrophs of *Bacillus subtilis*  
and Regeneration of their Protoplasts.

Il-Ho Ha and Ke-Ho Lee

Dept. of Food Sci. and Technol., College of Agriculture, Seoul National University,  
Suwon, Korea

### Abstract

To investigate the fusion of bacterial protoplasts, two auxotrophic mutants of *Bacillus subtilis* were isolated after treatment with nitrosoguanidine. Two auxotrophs were uracil-auxotroph and tryptophan-auxotroph. Back mutation frequencies of *ura*<sup>-</sup> and *trp*<sup>-</sup> -auxotrophs were  $2.4 \times 10^{-8}$  and less than  $1.0 \times 10^{-8}$ , respectively. The optimal pH and temperature of protoplast formation with lysozyme were 6.5 and 30°C. The optimal lysozyme concentration was 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The regeneration frequency of protoplast was 3.3%.

### 緒 論

*Bacillus subtilis*는 gram-positive bacteria로서 가장 널리 연구되어 왔으며 그것의 genetic map이 많이 밝혀져 있다. *B. subtilis*에 대한 연구로는 포자 형성, 포자 발아, 성장시의 생화학적, 형태학적 변화, 세포벽 합성, 세포의 성장 및 분열, 많은 catabolic pathway들에 대한 효소학적 특징 등이 있다. 이러한 과정들에 손상을 입은 mutant들의 분리 및 유전학적 특징규명은 위와 같은 연구에서 중요한 역할을 하였다.<sup>1-3)</sup>

특히 영양 요구성 변이주(auxotroph)의 육성에는 NGT,<sup>4)</sup> ICR-191 등과 같은 화학적 물질과 UV

조사, 고열등과 같은 물리적 방법에 의해서 변이주를 유기시켰으며 변이주의 분리에는 penicillin method, replica method를 고안 사용하여 왔다.

또한 영양 요구성 변이주를 이용한 *B. subtilis*의 protoplast fusion에 대한 연구가 진행되어 왔다.<sup>5-9)</sup> *B. subtilis*는 gram-positive bacteria이므로 lysozyme에 의해서 gram negative bacteria에 비해서 protoplast를 만들기에 유리한 것으로 알려져 있다.<sup>10)</sup> protoplast는 hypertonic medium에서 안정하며 적절한 조건하에서 성장하여 세포 분열까지 행한다. 이러한 protoplast에 PEG(polyethyleneglycol)를 가하면 세포막 사이에 fusion이 일어나서 gene 상호간의 유전자 재조합이 일어나는 것으로 보고 되었다.<sup>5-13)</sup>

Protoplast 를 다시 세포벽을 합성하여 본래의 bacillary 형태로 변화시키는 regeneration medium 이 여러가지 제안 되었으며 regeneration을 위한 물리적인 조건도 연구되었고 현미경 및 전자 현미경을 이용한 관찰도 이루어졌다.<sup>6), 14-15)</sup>

Regeneration medium 에서 자란 균체중 replica method 에 의해서 최소배지에서도 균락을 형성하는 것만을 recombinants 로 판정하는 방법이 제안되었으며 fusants 의 regeneration 과 genetic recombination 을 지배하는 요인에 대한 연구도 보고되어 있다.<sup>3), 5)</sup>

본연구는 *B.subtilis* 를 이용한 원형질체 융합을 위한 기초 연구로서 시료인 두 가지의 영양 요구성 변이주를 육성 분리하고 protoplast 를 형성하는 최적조건과 형성된 protoplast 의 regeneration 조건을 검토하여 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 균 주

서울대학교 농과대학 식품공학과에 보관중인 *Bacillus subtilis* SRI-B1 을 사용하였다.

2. 배 지

A. Nutrient broth(NB broth)

영양요구성 균주선발을 위한 배양에는 nutrient broth(Difco) 8g 을 1l 의 증류수에 녹여서 15psi, 15분간 가압살균후 사용하였다.

B. 최소배지

영양 요구성 균주 선발을 위한 최소배지는 Davis 의 최소배지 (pH7.0) 를 사용하였다.<sup>16)</sup>

C. Penicillin Selection Medium 과 Supplemented Penicillin Selection Medium.<sup>17), 18)</sup>

Table 1. Composition of minimal broth or agar medium

In one flask:	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Sodium citrate	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
Distilled water	500 ml
In a seperate flask:	
Agar (delete for use as broth)	15 g
Glucose	5 g
Distilled water	500 ml

Penicillin selection medium 은 최소배지에 penicillin(sigma)을 500 U/ml 로 첨가하여 membrane filter (Millipore, 0.45μm) 로 계균하여 사용하였다.

Supplemented penicillin selection medium 은 최소배지에 amino acid 혼합 용액 (Table 2) 을 첨가하여 사용하였다.

Table 2. Compositions of amino acid mixture solution for supplemented penicillin selection medium

Histidine	Leucine	Tyrosine
Cysteine	Valine	Phenylalanine
Threonine	Lysine	Tryptophan
Methionine	Glycine	
Isoleucine	Serine	

Each of them was added to a final concentration of 40μg/ml (pH 7.0)

D. Regeneration medium

제조된 protoplast 를 regeneration 시키는 배지로는 Wyrick 등이 제안한 DPA 배지<sup>19)</sup> (Table 3) 와 Takashi 등이 제안한 HC 배지를 사용하였다.<sup>20)</sup>

Table 3. Composition of regeneration medium

Casamino acid (Difco)	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g
0.5M Sodium succinate(pH 7.3)	
20mM MgCl <sub>2</sub>	
Glucose	5 g
Tryptophan	0.1 g
Plasma expander**	
Distilled water	1 l

\* For DPA medium: Heat-inactivated(56°C for 30min.) and filter-sterilized horse serum(5ml)

\*\*For HC medium: Polyvinylpyrrolidone(1.5%)

3. 영양요구성 변이주의 분리 및 확인

A. NTG 사멸 곡선<sup>21)</sup>

NB broth 에서 대수 증기까지 증식시킨 후 원심분리 (5,000×g, 5min, 10°C) 하여 균체를 얻은 후 TM Buffer (Table 4)<sup>16)</sup> 로 두 번 세척한 후 3×10<sup>8</sup> cells/ml 로 TM Buffer 에 현탁시켜서 실험 직전에 만든 methyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine(NTG) (1mg/ml) 용액을 넣어 최종 농도가

50 $\mu$ g/ml 가 되도록 한 후 37°C 항온수조에서 정 처시킨 후 10분 간격으로 처리액을 취해서 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)로 희석해서 NB 평판 배 지에 도말하여 30°C에서 24시간 배양한 후 그 균 락의 수를 세었다.

**Table 4.** Composition of tris-maleic acid buffer(TM buffer)

2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol(Tris)	6 g
Maleic acid	5.8 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O*	0.1 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *	5 mg
Distilled water	1 l
pH 6.0	

\*Seperately autoclaved and aseptically added.

B. 영양요구성 변이주의 분리

NB broth에서 대수 증기까지 증식시킨 후 균체를 회수하여 TM Buffer로 두번 세척하여 현탁시킨 후 NTG(50 $\mu$ g/ml)처리를 하여 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)로 두번 세척하여 supplemented penicillin selection medium에서 3~4시간 증식시키고 penicillin selection medium에서 8~12시간 배양 후 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>으로 희석하여 NB 한천 배지에 도말하여서 30°C에서 배양하였다.<sup>22)</sup>

C. 영양 요구성 변이주의 확인

NTG 처리된 후 증식된 균락이 직경 2mm 정도가 되었을 때 velvet을 이용한 replica method<sup>23,24)</sup>에 의해서 완전 평판 배지에서는 증식하지만 최소 평판배지에서 자라지 못하는 균주를 확인하였으며 확인된 영양요구성 균주의 영양 요구성을 알아내기 위하여 Table 5와 같은 영양 성분의 조합을 사용하였다.

**4. Osmotic Stabilizer**

Osmotic stabilizer로는 Wyrick 등이 제안한 SMM Buffer(0.5M Sucrose, 0.02 M Maleate, 0.02M MgCl<sub>2</sub>)를 membrane filter(0.45 $\mu$ m)로 제균하여 사용하였다.<sup>10,19)</sup>

**5. Protoplast의 조제<sup>10,19)</sup>**

NB broth에서 대수 증기까지 증식시킨 후 원심분리(5,000 $\times$ g, 5분 10°C)하여 균체를 회수하여 SMM Buffer로 두번 세척 후 3 $\times$ 10<sup>8</sup> cells/ml의 농도로 SMM Buffer에 다시 현탁시켜서 lys-

**Table 5.** Composition of supplements in minimal agar plates

Pool	Supplements
1	Adenine
	Histidine
	Phenylalanine
	Glutamate
2	Uracil
	Leucine
	Tyrosine
	Serine
3	Cysteine
	Isoleucine
	Tryptophan
	Alanine
4	Methionine
	Valine
	Threonine
	Aspartate
5	Vitamin B1(4 $\mu$ g/ml)
	Lysine
	Proline
	Arginine

Each of them was added to a final concentration of 40 $\mu$ g/ml.

ozyme의 농도가 200 $\mu$ g/ml가 되도록 첨가하여 30°C 항온수조에서 정처하였으며 protoplast는 현미경(Olympus Type BH,  $\times$ 800)으로 관찰하였으며 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 protoplast를 현탁시켜서 파괴되지 않은 균체의 수를 Hemacytometer(C.A. Hausser & Son, Phil. U SA)로 세 후 다음 식에 의하여 protoplast생성율을 정하였다.

$$\frac{\text{최초의 균체수} - \text{파괴되지 않은 균체수}}{\text{최초의 균체수}} \times 100(\%)$$

**6. Protoplast Regeneration Frequency**

제조된 protoplast를 SMM Buffer로 연속적으로 희석하여 regeneration 배지에 도말한 후 30°C에서 3일간 배양하여 생성된 균총의 수를 측정하였다.

結果 및 考察

1. 영양요구성 변이주의 분리

Protoplast fusion 을 시킨 다음 fusant 에서 손쉽게 recombinants 를 분리하고자 융합에 사용하는 fusion partner 의 균주 각각에 적절한 표식을 하여야 되기 때문에 영양요구성 표식<sup>10)</sup>을 지닌 균주의 개발을 위하여 NTG 를 사용하여 인공적으로 돌연변이를 유기시켰다.

돌연변이주 유기를 위한 NTG 의 처리 조건을 고찰해 본 결과는 Fig. 1 과 같았다.

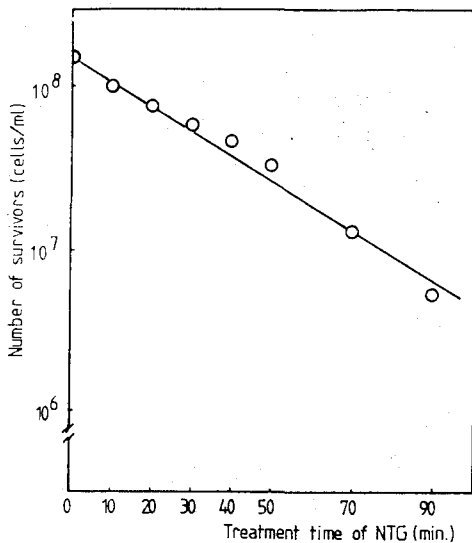


Fig. Survival curve of *B. subtilis* (50% NTG/TM Buffer 1ml)

Adelberg 등의 결과에 따르면 NTG 로 돌연변이를 유기시키는 경우 50%를 사멸시키는 조건에서 가장 효과가 우수한 것으로 알려져 있으나<sup>4)</sup> 본 실험에서 50% 사멸 조건인 20분간으로 처리하였을 때 많은 auxotrophs 가 분리되었다. 그러나 대부분이 polyauxotrophs 로 나타났기 때문에 영양 요구성이 복잡하여 확인하는 데 어려움이 많았으므로 5분간의 NTG 처리 시간을 사용하여 좋은 결과를 얻었다.

NTG 에 의해서 유기된 영양요구성 균주들 중에서 영양 성분 조합(Table 4)에서 성장을 나타낸 2개의 균주 9-11-3과 10-8-31이 분리되었으며 9-11-3 균주는 uracil 을 요구하였으며 10-8-31 균주는 tryptophan 을 요구하였다.

그들의 안정성은 Table 6 과 같으며 *trp*<sup>-</sup> 균주

가 *ura*<sup>-</sup> 균주에 비해서 더욱 안정하였다.

Table 6. Stability toward genetic reversion of parental strains

Strain	Reversion observed	
	Marker	Frequency
<i>Trp</i> <sup>-</sup>	<i>trp</i> <sup>+</sup>	less than $1 \times 10^{-8}$
<i>Ura</i> <sup>-</sup>	<i>ura</i> <sup>+</sup>	$2.4 \times 10^{-8}$

2. *Bacillus subtilis* 의 성장곡선

Protoplast 의 생성과 protoplast 로부터 다시 세포막을 합성하여 본래의 세포로 성장하는데 있어서 대수기 중기의 균체가 가장 우수한 것으로 보고되어 있으므로 *B. subtilis* 의 성장곡선이 요구된다.<sup>7,25)</sup>

Fig. 2 에서 나타난 *B. subtilis* 의 성장곡선은 250ml 삼각 플라스크에 NB broth 50ml 를 넣고 진탕배양기 (30°C, 100 stroke/min.)에서 배양한 결과이다.

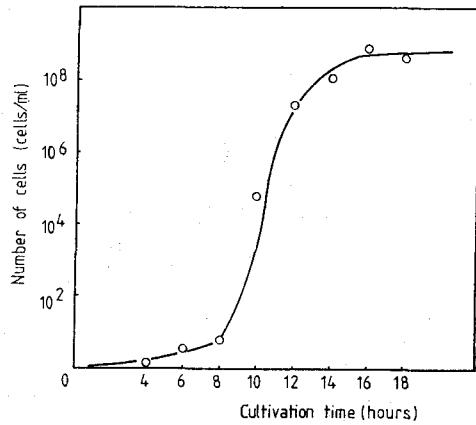


Fig. Growth curve of *B. subtilis*

Fig. 2 에서 나타난 바와 같이 접종후 8시간까지는 균체가 배지에 적응하는 lag phase 이고 8시간부터 14시간까지가 logarithmic phase 에 해당되었다. 회수할 수 있는 균체량을 고려하며 접종후 12시간의 균체를 회수하여 사용하였다.

3. Protoplast 의 조제

Protoplast fusion 을 행하기 위해서는 protoplast 를 충분히 획득할 수 있어야 함으로 lysozyme 처리에 의해서 protoplast 를 형성시켰다.

Protoplast 형성에 영향을 미치는 pH, 온도, lysozyme 의 최적 농도에 대하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) pH 의 영향 : Lysozyme 의 최적 pH 를 구하기 위해서 균체를 SMM buffer 에 현탁시킨후

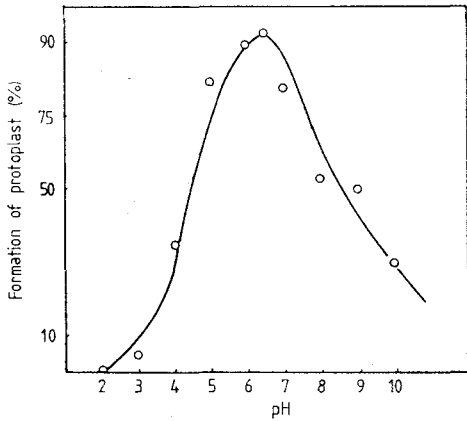


Fig. 3. Effect of pH on protoplast formation

100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 lysozyme 을 첨가한 후 진탕 항은 수조(37°C, 60 strokes/min.)에서 15분간반응시킨 후에 protoplast 생성을 도모하였고 이때 생성율의 결과는 Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 3에서 나타난 바와 같이 최적 pH는 6.0~7.0 근처에 있는 것으로 사료되어 pH 5.0과 pH 7.5 사이에서 0.5 단위로 다시 실시 해본 결과 pH 6.5에서 가장 많은 protoplast 생성이 관찰되었다.

(2) 온도의 영향 : Protoplast 생성을 위한 lysozyme 처리의 최적온도를 알기 위하여 SMM bu-

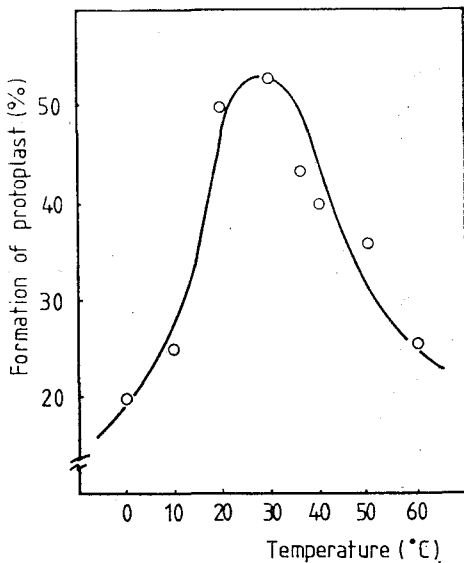


Fig. 4. Effect of temperature on protoplast formation

ffer (pH 6.5)에서 lysozyme(100 $\mu\text{g/ml}$ )으로 처리하였고 0°C에서 60°C까지 10°C 간격으로 항은 수조에서 반응시킨 후(20분간)관찰한 결과는 Fig. 4에서와 같다.

Fig. 4에서 볼 수 있듯이 20~40°C에서 비슷한 정도의 활성을 나타내고 있었으며 높은 온도가 균체에 미치는 좋지 않은 영향을 고려하여 본 실험에서는 lysozyme 처리온도를 30°C로 하였다.

(3) Lysozyme 의 농도 : lysozyme 처리의 최적 농도를 알기 위하여 SMM buffer(pH 6.5)에서 lysozyme 의 농도를 달리하면서 30°C에서, 15분간) 처리로 얻은 결과는 Fig. 5에서와 같다.

Fig. 5에서 나타난 바와 같이 lysozyme 의 농도가 높아질수록 높은 활성을 나타내고 있었으나 200 $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 30분후에 모두 동일한 활성에 도달하는 것으로 나타났다.

또한 lysozyme 처리 후에 다시 lysozyme 을 제거해야 하므로 같은 활성을 나타내는 가장 낮은 농도인 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 최적농도로 결정하였다.

#### 4. Protoplast Regeneration

Protoplast 를 regeneration 배지에서 배양한 결과는 Table 7에 나타난 바와 같다.

DPA 배지에서는 regeneration 율이 0.6%로 매우 낮았으며 HC 배지에서는 3.3%로 DPA 배지에 비해서 약 5배정도의 향상을 보이고 있다. 그러나 HC 배지도 protoplast fusion에 사용할 배지

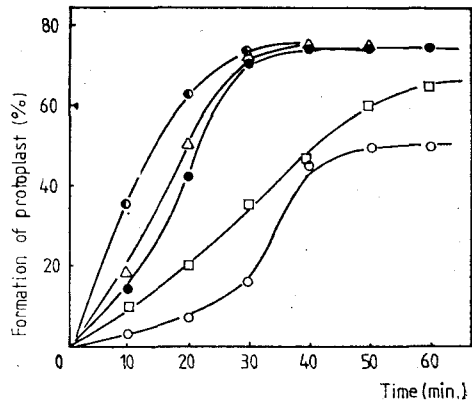
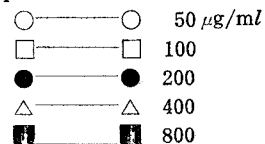


Fig. 5. Effect of lysozyme concentration on protoplast formation



**Table 7.** Protoplast regeneration frequency on regeneration playtes

Medium	Regeneration Frequency(%)
DPA	0.6
HC	3.3

로서는 regeneration율이 낮으므로 앞으로 regenerant의 수율을 높이기 위한 더 많은 연구가 되어져야 하리라고 사료된다.

抄 錄

세균의 protoplast 융합을 연구하기 위하여 *Bacillus subtilis*로부터 두 개의 영양 요구성 균주를 NTG 처리에 의해서 분리하였다. 두 개의 영양 요구성 균주는 Uracil 요구성 균주와 Tryptophan 요구성 균주였다. *ura*<sup>-</sup>균주와 *trp*<sup>-</sup>균주의 친주로의 역돌연변이율은 각각  $2.4 \times 10^{-8}$ 과  $1 \times 10^{-8}$ 이었다. Lysozyme 처리에 의하여 protoplast를 만들기 위한 최적 pH와 온도는 6.5와 30°C였다. Protoplast 생성을 위한 lysozyme의 최적농도는 200 µg/ml였다. Protoplast가 본래의 균체로 회복되는율은 3.3%였다.

參 考 文 獻

1. Henner, D.J., and Hoch, J.A.: *Mirobiol. Rev.* 44 : 57(1980).
2. Potvin, B.W., Kellerher, R.J. Jr., and Gabor, H.: *J. Bacteriol.* 96 : 2171(1975).
3. Ward, J.B., and Zahler, S.A.: *J. Bacteriol.* 116 : 719(1973).
4. Adelberg, E.A., Mandel, M., and Chen, G. C.C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18 : 788(1965).
5. Fodor, K. and Alföldi, L.: *Molec. Gen. Genet.* 168 : 55(1979).
6. Frehel, C., Lheritier, A., Sanchez-Rivas, C. and Schaeffer, P.: *J. Bacteriol.* 137 : 1354(1979).
7. Gabor, M.H., and Hotchkiss, R.D.: *J. Bac-*

- teriol.* 137 : 1346(1979).
8. Guillen, N., Gabor, M.H., Hotchkiss, R.D., and Hiirschbein, L.: *Molec. Gen. Genet.* 185 : 99(1982).
9. Schaeffer, P., Cami, B., and Hotchkiss, R.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 : 2151(1976).
10. Schaeffer, P., and Hotchkiss, R.D.: *Methods in Cell Biol.* 20 : 149(1978).
11. Blow, A.M., Botham, G.M., and Lucy, J. M.: *Biochem. J.* 182 : 555(1979).
12. Parahad jopoulos, D.: *Biochim. Biophys. ACTA* 465 : 579(1977).
13. Tilcock, C.P.S., and Fisher, D.: *Biochim. Biophys. ACTA* 577 : 53(1979).
14. Hadlaczy, G., Fodor, K., and Alföldi, L.: *J. Bacteriol.* 125 : 1172(1976).
15. Landman, O.E., Pyter, A., and Frehel, C.: *J. Bacteriol.* 96 : 2154(1968).
16. Gerhardt, P. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for microbiology, Washington. U.S.A.
17. Davis, B.D.: *J. Am. Chem. Soc.* 70 : 4267(1948).
18. Lederberg, J., and Zinder, N.: *J. Am. Chem. Soc.* 70 : 4267(1948).
19. Wyrick, P.B., and Rogers, H.J.: *J. Bacteriol.* 116 : 456(1973).
20. Takashi, A. and Junichi, S.: *Agric. Biol. Chem.* 48(651)(1984).
21. Miller, J.H., 1972. *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Habor Laboratory. U.S.A.
22. Clowes, R.C., and Hayes, W. 1968. *Experiments in microbial genetics*. Blackwell Scientific Pub. Great Britian.
23. Adams, J.N.: *J. Bacteriol.* 89 : 1627(1965).
24. Lederberg, J., and Lederberg, E.M.: *J. Bacteriol.* 63 : 399(1952).
25. Fodor, K., and Alföldi, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73 : 2147(1976).