

속간 원형질체 융합에 의한 섬유질 기질로 부터

L-lysine 생산균주 개발

— 원형질체의 형성 및 재생 —

성낙계^{1*}·정덕화¹·이무영²·정영철¹

경상대학교 식품공학과 ²동경대학교 농예화학과

Development of L-Lysine Producing Strains from Cellulosic Substrate by the Intergeneric Protoplast Fusion — Conditions for Formation and Regeneration of Protoplast —

Sung, Nack-Kie^{1*}, Duck-Hwa Chung¹, Mu-Young Lee², Young-Chul Chung¹

¹ Department of Food Science and Technology, Gyeong Sang National University, Jinju 660-701, Korea

² Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo, Japan

In order to produce L-lysine from cellulosic substrates by the intergeneric protoplast fusion between cellulolytic bacteria, *Cellulomonas flavigena* KFCC31221 and amino acid producing bacteria, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, conditions for protoplast formation and regeneration of these strains were investigated. After the strains were mutated with 500 $\mu\text{g/ml}$ N-methyl-N'-nitro N-nitrosoguanidine for 30 min and the mutants were enriched by treating 300 $\mu\text{g/ml}$ penicillin-G for 2 hrs, *B. flavum* Hse⁻ Str^r, *C. glutamicum* Met⁻ Thr⁻ Rif^r and *Cellulomonas flavigena* Try⁻ Val⁻ Kan^r were isolated. The rate of protoplast formation ranged from 95 to 98% when strains were treated at the concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$ of lysozyme, pH 6.5, 33°C, for 6 hrs. in Tris- malate buffer supplemented with 0.4M sucrose as osmotic stabilizer. Approximately 30-33% protoplast was regenerated on the regeneration complete medium(RCM) containing 1.5% agar and 0.5M sodium succinate overlaid with the same medium except 0.7% agar.

원형질체 융합 기술은 조작이 용이하고, 성적능력에 의존하지 않고서 염색체 재조합 빈도가 높아 유전물질의 교환계가 규명되어 있지 않은 균주에 있어서 유력한 육종 수단(1~11)으로 이용될 수 있다. 지금까지 원형질체 융합에 관한 연구는 동족간(3~7, 18), 이종간(8, 9) 융합이 주종을 이루고 왔으나 최근에는 이속간 융합(10, 25)이 활발히 연구되고 있다. 산업적으로 중요한 아미노산 및 핵산 생산균주인 coryneform bacteria는 유전물질의 교환계가 규명되어 있지 않아 원형질체 융합에 의한 균주 개발이 진행되고 있는데, Kaneko 등(5)은 *Brevibacterium flavum*의 원형질체 형성, 재생 및 융합조건을 보고하였고, Akamatsu 등(13)은 *B.*

*flavum*을 중간 융합시켜 L-lysine 생산성을 증가시켰으며, 경 등(25)은 *B. flavum*과 *Corynebacterium glutamicum*을 이속간 융합시켜 L-lysine 생성능을 12% 높였으나, 이들 연구는 glucose와 같은 단당류에서 아미노산을 유도하였다. 본 연구는 L-lysine 생산균주로 알려진 *B. flavum*과 *C. glutamicum*에 섬유소 자화능이 우수한 *Cellulomonas flavigena*를 이속간 융합시켜 비교적 값싸고 풍부한 기질인 섬유소로부터 아미노산을 생산할 목적으로 이들 균주를 번이시켜 영양요구성 및 억제내성주를 분리하고, 원형질체의 형성과 재생에 미치는 조건을 조사하였다.

Key words: Intergeneric protoplast fusion, protoplast formation & regeneration, L-lysine production

* Corresponding author

재료 및 방법

균 주

본 실험에서는 일본동경대학교로 부터 분양받은 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032와 한국중균협회로 부터 분양받은 *Cellulomonas flavigena* KFCC31221 그리고 이들을 변이시킨 *B. flavum*-200(hos⁻, str^r), *C. glutamicum*-10(met⁻, thr⁻, rif^r) 및 *C. flavigena*-50(try⁻, val⁻, kan^r)을 사용하였다.

배 지

완전배지(CM), 최소배지(MM), 보족배지(SM) 및 재생배지(RCM)의 조성은 Table 1과 같고, 각종 용액의 조성은 Table 2와 같다. 원형질체 재생을 돕기 위한 중층 soft agar는 0.7%를 첨가하였다.

변이주의 분리

완전액체배지에서 대수증식기 중기까지 배양된 액 20 ml를 원심분리(4,000 rpm, 10분)하여 Tris-buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 후 동일 buffer로 2×10⁸ cells/ml의 현탁액을 만들어 NTG를 최종농도가 200~2500µg/ml되게 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시킨 후 saline으로 NTG를 세척한 다음 Tris-buf-

Table 1. Composition of media (/liter)

Ingredient	CM	MM	SM	RCM
Meat extract	10g	—	—	10g
Peptone	10g	—	—	10g
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	10g	10g	—
KH ₂ PO ₄	—	1g	1g	—
NaCl	5g	50mg	50mg	5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	0.4g	0.4g	—
FeSO ₄ ·6H ₂ O	—	2mg	2mg	—
MnSO ₄ ·6H ₂ O	—	2mg	2mg	—
Dextrose	20g	20g	20g	20g
Biotin	—	50µg	50µg	—
Thiamine.HCl	—	200µg	200µg	—
Sodium succinate	—	—	—	135g
Methionine	—	—	50mg	—
Threonine	—	—	100mg	—
Homoserine	—	—	100mg	—
pH	7.0	7.0	7.0	6.5

Table 2. Composition of various solutions

Solutions	Composition
Buffer solution(BS)	0.05M Tris-malate buffer(pH7.0)
Lysis solution(LS)	BS supplemented with 0.4M sucrose, 0.01M MgSO ₄ and 500µg/ml lysozyme
Dilution solution(DS)	Lysis solution excluded lysozyme
Fusion solution(FS)	BS(pH 6.5) supplemented with 0.25M sucrose, 0.01M MgSO ₄ , 0.25M sodium succinate and 5mM EDTA

fer로써 현탁액을 만들었다. NTG로 처리된 균현탁액 0.2 ml를 20 ml의 완전액체배지에서 3시간 배양시킨 후 원심분리하여 질소원을 제거하고 0.1% yeast extract를 첨가한 최소액체배지에서 6시간 N-starvation시킨 다음 Lederberg(12)의 방법에 의거 2시간동안 penicillin-G(300µg/ml)를 처리하여 변이주를 농축시켰다. 농축된 현탁액을 Tris-buffer로 희석하여 완전배지상에 도말하여 생긴 colony를 최소배지에 replica하여 변이율을 조사하고 보족배지로서 ml 당 methione 50µg, threonine 100µg, rifampicine 10µg 첨가한 배지와 homoserine 100µg, streptomycine 200 g을 첨가한 배지 그리고 tryptophan 20µg, valine 150µg, kanamycine 50µg을 첨가한 배지에 변이된 균을 접종하여 30°C에서 3~4일간 배양하여 영양요구성 및 약제내성균주로 선발하였다.

원형질체의 형성 및 재생

전 배양액 0.2 ml를 20 ml의 완전액체배지에서 대수증식기 중기(1×10⁸ cells/ml)까지 증식시켜 penicillin-G(0.3 unit/ml)로 2시간 처리한 후 원심분리(4,000 rpm, 10분)하여 Tris-malate buffer(BS)로 2회 세척한 다음 lysis용액(LS)에서 원형질체를 형성시켰다. 그리고 원형질체의 재생은 원형질체를 dilution용액(DS)으로 희석하여 Kaneko(5) 등의 방법에 따라 0.7% agar로 중층하여 30°C에서 7일간 배양시켜 정상세포로 재생시켰다. 재생율은 lysozyme을 처리하지 않았을 때 형성된 colony수에 대한 lysozyme 처리 후 DS로 희석하였을 때 생긴 colony수에서 BS로 희석하였을 때 형성된 colony수로 감하였을 때의 colony수의 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

변이주의 분리

500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 NTG로 30 $^{\circ}\text{C}$, 30분간 처리 후 penicillin-G(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 첨가된 최소배지에서 3~4시간 배양하면 변이주는 resting cell로 존재하지만 변이되지 않은 모균주는 penicillin-G에 의해 사멸되게 되므로 변이주의 농축과 변이율을 증가시킬 수 있는데, 이런 방법(12)으로 reversion frequency가 10^{-8} ~ 10^{-9} 정도로 낮은 약제내성 및 영양요구성을 동시에 가지는 변이주를 Table 3과 같이 분리하였다. *B. flavum*은 $\text{str}^r(100\mu\text{g}/\text{ml})$ hse^- , *C. glutamicum*은 $\text{rif}^r(5\mu\text{g}/\text{ml})$ met^- thr^- , *C. flavigena*는 $\text{kan}^r(50\mu\text{g}/\text{ml})$ try^- val^- 의 gene marker를 가지는 것으로 나타났다.

원형질체의 형성조건

미생물의 세포벽 구성 성분에 따라 원형질체 형성 방법에 차이는 있으나 Gram-positive bacteria의 세포벽을 제거함에 있어서는 주로 lysozyme을 사용하여 왔다(13, 14). Kaneko(5) 등은 coryneform bacteria의 세포벽 제거시에 penicillin-G와 lysozyme을 동시에 처리하여 원형질체 형성율을 증가시켰다는 보고에 따라 본 실험에서도 penicillin-G와 lysozyme을 동시에 처리하였고, 원형질체 형성의 최적조건을 찾기 위해 osmotic stabilizer의 종류 및 농도, 배양시간, lysozyme 처리 pH, 온도, 농도 및 시간을 조사하였다. 원형질체 형성시에 osmotic stabilizer의 종류와 농도는 원형질체의 안정성과 재생에 영향(13, 15)을 미치므로 대수증식기 중기의 균체를 penicillin-G로 처리하고 각각 0.5M의 KCl, sucrose 및 sorbitol을 함유한 lysis용액으로 30 $^{\circ}\text{C}$, 3시간 반응시켰을 때의 원형질체 형성율은 Fig.1과 같이 sucrose가 가장 양호하였다. 또한 sucrose의 최적농도는 3균주 모두 0, 4 M이었으며(Fig. 2), 이때의 원

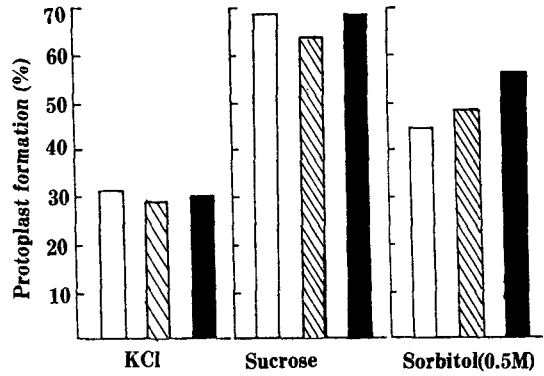


Fig. 1. Comparison of osmotic stabilizers on the protoplast formation.

□; *B. flavum*, ▨; *C. glutamicum*, ■; *C. flavigena*

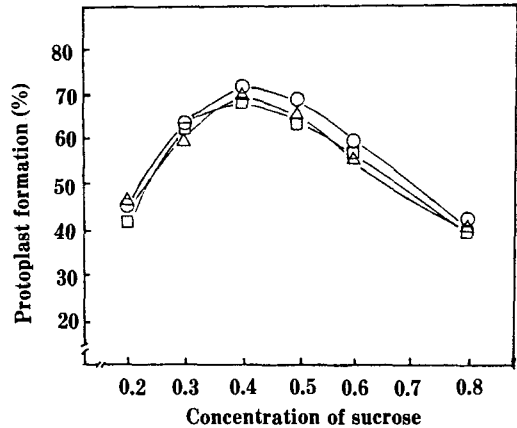


Fig. 2. Effect of sucrose concentration on the protoplast formation

○-○; *B. flavum*, □-□; *C. glutamicum*, △-△; *C. flavigena*

형질체 형성율은 68~72% 정도였다. 이는 *Streptomyces* 속(6, 8), *Bacillus* 속(4, 13~15), *Brevibacterium* 속(5) 및 *Corynebacterium* 속(16)에 대한 보고와 균종에 따라 다소 차이는 보이나 비

Table 3. Auxotrophs induced by NTG treatment.

Strains	Genotype	Origin	Reversion frequency
<i>B. flavum</i> 200	hos^- str^-	<i>B. flavum</i> ATCC 14067	1.0×10^{-9}
<i>C. glutamicum</i> 10	met^- thr^- rif^r	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	1.3×10^{-9}
<i>C. flavigena</i> 50	try^- val^- kan^r	<i>C. flavigena</i> KFCC 31221	8.0×10^{-8}

str^r : streptomycin resistance to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

rif^r : rifampicin resistance to 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

kan^r : kanamycin resistance to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

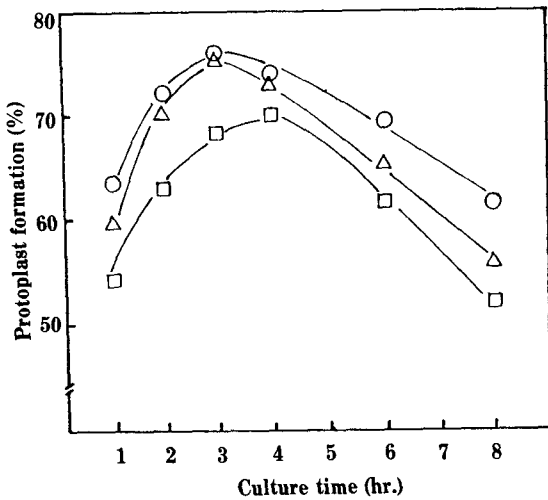


Fig. 3. Effect of culture time on the protoplast formation.
 ○-○; *B. flavum*, □-□; *C. glutamicum*, △-△; *C. flavigena*

교적 비슷한 결과를 보였다.

배양시간에 따른 원형질체 형성율은 *B. flavum*과 *C. flavigena*는 3시간, *C. glutamicum*는 4시간 배양했을 때 가장 높았는데, 이는 각 균주의 대수증식기 증기에 해당하며 배양시간의 연장은 세포벽의 두께가 신장되어 원형질체 형성율의 저하를 초래하는 것으로 생각된다(Fig. 3).

Lysozyme에 의한 원형질체 형성 최적 pH를 조사하기 위하여 0.4 M의 sucrose와 0.01 M MgSO₄를

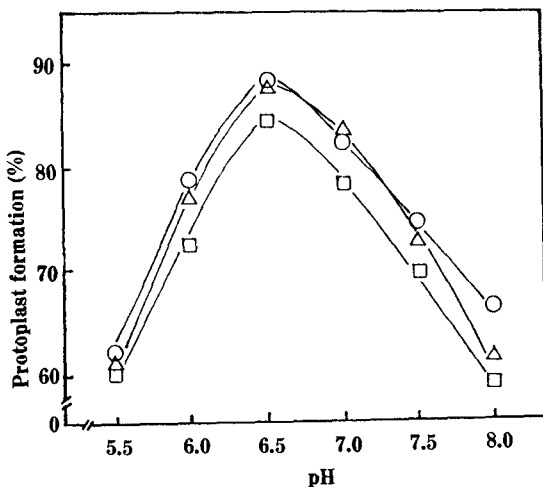


Fig. 4. Effect of pH on the protoplast formation.
 ○-○; *B. flavum*, □-□; *C. glutamicum*, △-△; *C. flavigena*

함유한 각종 pH의 Tris-malate buffer에 300 μg/ml의 lysozyme으로 30°C, 3시간 반응시킨 결과는 Fig. 4와 같이 pH 6.5에서 *B. flavum*은 88%, *C. glutamicum*는 84%, *C. flavigena*는 87%의 원형질체가 형성되었다. 원형질체 형성 최적온도는 33°C로서 세균주 모두 높았다(Fig. 5). pH 6.5, 33°C 이상 또는 이하의 pH와 온도에서는 원형질체 형성율이 현저히 감소하는데, 이는 균의 생육최적 pH 및 온도는 원형질체 형성 pH 및 온도와 일치하는 경향을 보였고, 또한 온도가 상승하거나 강산, 강알칼리에서는 lysozyme 활성이 감소하는 것으로 추정된다.

Lysozyme 농도와 반응시간에 따른 원형질체 형성율은 300 μg/ml의 lysozyme으로 33°C에서 3시간동안 반응시 90% 이상 증가하지 않았다. 따라서 효소 농도를 500 μg/ml로 증가시켜 2시간 간격으로 8시간 반응시켰을 때의 결과는 Fig. 6과 같다. 원형질체 형성에 비교적 장시간 반응이 요했으며, 500 μg/ml로서 6시간 반응시 *B. flavum*은 98%, *C. glutamicum*는 95%, *C. flavigena*는 96%의 원형질체 형성을 보였다. 이 결과는 Foder 등(14)을 비롯한 여러 연구자들의 보고(5, 16, 19, 20)와는 약간 차이가 있는데, 이는 균종이나 반응조건에 따른 차이로 생각되며, 그리고 효소농도의 증가나 반응시간의 연장은 세포벽의 재생이나 융합에 나쁜 영향을 미치므로 본 실험에서는 500 μg/ml, 6시간 처리하여 얻은 원형질체로 재생 및 융합실험을 행하였다.

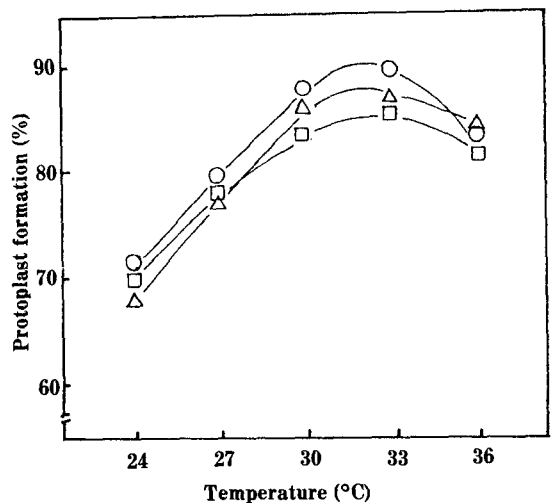


Fig. 5. Effect of temperature on the protoplast formation.
 ○-○; *B. flavum*, □-□; *C. glutamicum*, △-△; *C. flavigena*

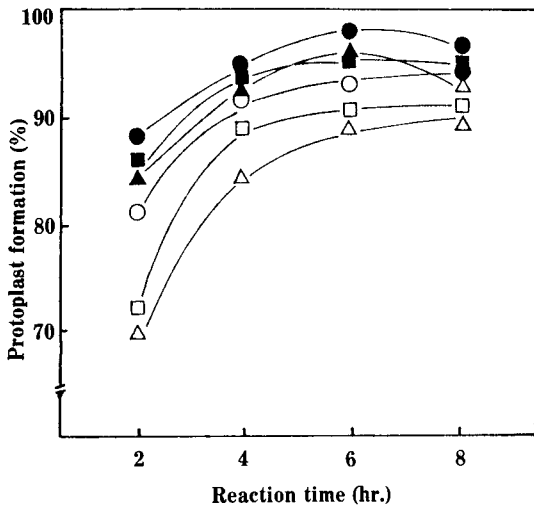


Fig. 6. Effect of reaction time and enzyme concentration on the protoplast formation.

- ; *B. flavum*, 300µg/ml
- ; *B. flavum*, 500µg/ml
- ; *C. glutamicum*, 300µg/ml
- ; *C. glutamicum*, 500µg/ml
- △-△; *C. flavigena*, 300µg/ml
- ▲-▲; *C. flavigena*, 500µg/ml

원형질체의 재생

원형질체의 정상세포로의 재생율의 증가는 융합율을 높이는데 중요한 요소이므로 재생에 관한 몇가지 조건을 검토하였다. 재생용 배지에 첨가된 sodium succinate 농도는 세 균주 모두 0.5M일 때 재생이 양호하였는데, *B. flavum*은 30%, *C. glutamicum*

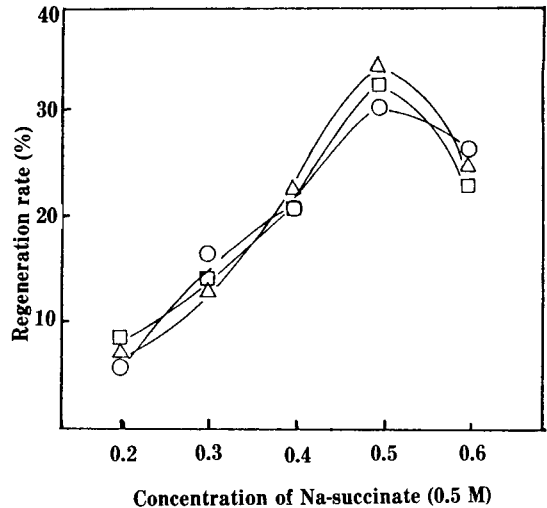


Fig. 7. Effect of Na-succinate concentration on the regeneration.

- ; *B. flavum*, □-□; *C. glutamicum*, △-△; *C. flavigena*

는 33%, *C. flavigena*는 35%가 재생되었다(Fig. 7). 이것은 *Bacillus subtilis*의 경우 0.5M sodium succinate가 재생에 적합하다는 Akamatsu 등(13)의 보고를 비롯한 다른 연구자들의 보고(14~16)와 농도에 있어서는 비슷한 수준이나, 그 종류에 있어서는 다소 상이하였다.

원형질체를 중층, 기본배지의 agar 농도, 그리고 overlay agar의 농도에 따라 재생용배지에 재생시킬 때의 재생균수는 Table 4와 같이 0.5M의 sodium

Table 4. Colony formation from protoplast of *B. flavum*, *C. glutamicum* and *C. flavigena*

Overlay medium (agar %)	Basal medium (agar %)	Viable count/ml		
		<i>B. flavum</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>C. flavigena</i>
—*	CM 1.5	4.8×10^3	5.0×10^3	5.4×10^3
—	RCM 1.5	6.7×10^6	7.0×10^6	7.2×10^6
—	RCM 2.0	5.9×10^6	6.0×10^6	5.7×10^6
RCM 0.8	RCM 1.2	2.8×10^7	2.9×10^7	3.0×10^7
RCM 0.8	RCM 1.5	2.9×10^7	3.2×10^7	2.9×10^7
RCM 0.8	RCM 1.8	3.0×10^7	3.0×10^7	2.9×10^7
RCM 0.8	RCM 2.0	2.7×10^7	3.1×10^7	3.0×10^7
RCM 0.5	RCM 1.5	2.7×10^7	2.9×10^7	2.7×10^7
RCM 0.6	RCM 1.5	2.9×10^7	3.2×10^7	3.0×10^7
RCM 0.7	RCM 1.5	3.1×10^7	3.5×10^7	3.4×10^7
RCM 0.8	RCM 1.5	3.1×10^7	3.2×10^7	3.3×10^7

* The protoplasts were spread onto basal agar medium without overlay agar.

succinate를 함유한 재생용기본배지 (agar 1.5%)를 사용하여 재생용 soft agar 0.7%로 증충하였을 때 가장 양호하였다. 이때 *B. flavum*은 30%, *C. glutamicum*은 33%, *C. flavigena*는 35%의 재생율을 보였는데, 이 재생율은 *Zymomonas*의 이 등(22)의 보고와 *Lactobacillus casei*의 경우 황 등(23)은 2.3%, *Clostridium pasteurianum*의 경우 Minton 등(24)은 10%의 재생율보다는 높은 빈도였으나, 다른 *Bacillus* 속(4, 7)과 *Streptomyces* 속(4, 6)에 대한 보고와는 비슷한 재생빈도를 보였다.

요 약

L-Lysine 생산균주인 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 과 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032에 섬유소 자화능이 우수한 *Celulomonas flavigena* KFCC 31221를 속간 융합시켜 섬유소로부터 L-lysine을 생산할 목적으로 이들 균주의 영양요구성 변이주 분리, 원형질체의 형성 및 재생의 조건을 조사하였다. NTG(500 μ g/ml)로 유기하여 penicillin-G(300 μ g/ml)로 농축한 변이주에서 *B. flavum*은 hse⁻ str^r(100 μ g/ml), *C. glutamicum*는 met⁻ thr⁻ rif^r(5 μ g/ml), *C. flavigena*는 try⁻ val⁻ kan^r(50 μ g/ml)의 gene marker를 가지는 영양요구성과 약제내성균주를 분리하였다. 공시균주의 원형질체 형성은 osmotic stabilizer로서는 0.5 M sucrose, 배양기간은 대수증식기 중기의 균이 양호하였고, lysozyme 최적 처리 pH, 온도, 농도 및 반응시간은 각각 pH 6.5, 33°C, 500 μ g/ml, 6시간으로 나타났으며, 이때의 원형질체 형성율은 95-98%였다. 원형질체를 1.5% agar가 함유된 완전재생용 배지위에 0.7% agar가 함유된 완전재생용 배지로 증충했을 때 약 30~33%의 재생율을 보였다.

사 사

본 연구는 84~86년도 한국과학재단의 학술연구비에 의해 수행된 연구결과의 일부이며 재단의 연구비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Kao, K.N. and H.R. Micbayluk: *Planta*, **115**, 355

- (1987).
2. Schaeffer, P., B. Carni and R.D. Hotchkiss: *Proc. Natl. Acad. USA*, **73**(6), 2151 (1976).
3. Foder, K. and L. Alford: *Proc. Natl. Sci. USA*, **73**(6), 2147 (1976).
4. Baltz, R.H.: *J. Gen. Microbiol.*, **107**, 93 (1978).
5. Kaneko, H. and K. Sakaguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **43**(5), 1007 (1979).
6. Baltz, R.H. and P. Matsushima: *J. Gen. Microbiol.*, **127**, 137 (1981).
7. Okanish, T., T. Furmai and T. Shirahama: *Agric. Biol. Chem.*, **45**(5), 1271 (1981).
8. Godfrey, O., L. Ford and M.L.B. Huder: *Can. J. Microbiol.*, **24**, 994 (1978).
9. Tosaka, O., M. Krasawa, S. Ikeda and H. Yoshii: *4th Intl. Symp. on GIM Abstracts* (1982).
10. Zhdanova, N., V. Livshits, A. Shtannikov, T. Leonova and L. Kozyreva: *4th. Intl. Symp. on GIM Abstracts* (1982).
11. 전문진 : 科學技術處報告書(1983).
12. Lederberg, J. and N. Zinder: *J.A.C.S.* **70**, 4267 (1948).
13. Akamatsu, T. and J. Sekeiguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **45**(12), 2887 (1981).
14. Foder, K., G. Hadlaczky and L. Alford: *J. Bacteriol.*, **121**(1), 390 (1975).
15. Wyrick, P.B. and H.J. Rogers: *J. Bacteriol.*, **116**(1), 456 (1973).
16. Furuya, A., R. Katsumata, A. Ozaki and T. Oka: *J. Bacteriol.*, **159**(1), 306 (1984).
17. Gotz, F., S. Ahrne and M. Lindberg: *J. Bacteriol.*, **145**(1), 74 (1981).
18. Keller, V.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**(3), 580 (1983).
19. Okanishi, M., K. Suzuki and H. Umezawa: *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 389 (1974).
20. Matsushita, K., E. Shingawa, O. Adachi and M. Ameyama: *Biol. Chem.*, **45**(6), 1515 (1981).
21. Palleroni, N.J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(6), 1865 (1983).
22. 李啓準, 成治南: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**(2), 99 (1984).
23. 黃仁奎, 白永振, 韓長熙, 裴炯錫: *遺傳工學*, **3**, 11 (1983).
24. Minton, N.P. and J.G. Morris: *J. Bacteriol.*, **155**(1), 432 (1983).
25. 경기천, 임변삼, 이세영, 전문진 : 한국산업미생물학회지, **13**(3), 279 (1985).

(Received March 8, 1988)