

호알칼리성 *Bacillus* sp. F 204와 *Bacillus* sp. K 17의 원형질체 융합

성낙계¹ *·노종수¹·박석규²·정영철¹

¹경상대학교 식품공학과 ²경남대학교 식품공학과

Intragenetic Protoplast Fusion between Alkalophilic *Bacillus* sp. F204 and *Bacillus* sp. K17

Sung, Nack-Kie¹*, Jong-Su Roh¹, Seok-Kyu Park², Young-Chul Chung¹

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

²Department of Food Engineering, Kyung Nam University, Masan 630-701, Korea

To develop cellulase and xylanase-producing strain by protoplast fusion, alkalophilic *Bacillus* sp. F204 and K17 were treated with NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) and isolated antibiotics resistant strains of S20 (Km', Cm') and G70 (Str'). The frequency of protoplast formation was about 95% when cells of mid-log phase were treated with 200 μ g/ml lysozyme at 37°C for 30-45 minutes. Under addition of 0.4-0.5M sodium succinate, 0.5% casamino acid, 1.5% polyvinylpyrrolidone, 25mM MgCl₂, and 50mM CaCl₂ to the regeneration medium, the regeneration frequency of *Bacillus* sp. F204 and K17 was 24.9% and 26.2%, respectively. The fusion frequency was 6.6×10^{-6} in the presence of 30% polyethylene glycol 6000 containing 50mM Ca⁺⁺ at 45°C for 5 minutes. Cellulase complex and xylanase activities of fusant were compared with parental strains.

천연섬유소 자원으로부터 그 주성분인 cellulose와 hemicellulose를 구성하는 xylan을 효소적으로 가수 분해시킨다면 자연계에 풍부한 이들 cellulose·xylan biomass는 에너지 및 식량자원이나 미생물의 발효기 질 등에 가장 효율적으로 이용될 수 있을 것이다. 그리하여 cellulose·xylan 분해계 효소가 세균(1-3) 곰팡이(4, 5) 방선균(6, 7) 등 많은 미생물에서 보고 되어 있으나 균생육 및 효소생성이 좋은, 약산성-중성범위의 배양조건에서 최적인 것이 대부분이다(1-7). 그런데 이와같은 일반적인 정상환경 보다 이상환경에서 생육하는 미생물이나 그 분비효소를 발효공업·식품공업 등의 생물화학공업에 산업적으로 응용한다면 잡균오염의 방지나 여러단계의 생물전환

공정 중 일부 공정의 삭제 및 안정성 등의 부여로 공업적 실용화에 유리할 것으로 판단된다(8-11). 이런 점을 고려하여 단일융합주의 *Bacillus*로 활성이 높은 호알칼리성 cellulase 및 xylanase를 세포에서 동시에 다량으로 생성·분비하는 균주를 얻기 위하여 본 연구에서는 전보(8-10)에 보고된 xylanase I, II 및 β -xylosidase를 생산하는 *Bacillus* sp. K17과 섬유소분해계 효소를 생산하는 분리균 *Bacillus* sp. F204로부터 약제내성 변이주를 분리하고, 두 호알칼리성 균주간의 원형질체 형성, 정상세포로의 재생 및 polyethylene glycol(PEG)처리에 의한 융합조건을 검토한 결과를 보고하는 바이다.

Key words: Alkalophilic *Bacillus* sp., protoplast fusion, cellulase, xylanase
*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 xylan계 분해효소를 생성하는 호알칼리성 *Bacillus* sp. K17 균주와 토양에서 분리한 호알칼리성 cellulase complex를 생산하는 *Bacillus* sp. F204 균주를 NTG (N-methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine) 처리하여 각각 변이시킨 *Bacillus* sp. G70, S20을 사용하였다.

배지 및 배양방법

균증식 및 효소활성 측정용 배지는 Horikoshi(11) 등이 사용한 PY-glucose 배지 (glucose 5g; polypeptone 5g; Yeast extract 5g; K_2HPO_4 1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g; pH 8.0 per liter)와 glucose 대신 CMC (carboxymethyl cellulose), xylan, avicel로 대체한 PY-CMC, PY-xylan, PY-avicel (pH 10.3)의 배지를 사용하였다. 그리고 Wyrick 등(12)의 DPA 배지를 변형시킨 재생용 기본배지 (glucose 5g; polypeptone 5g; Yeast extract 5g; K_2HPO_4 1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g; Sodium succinate 0.6M; $MgCl_2$ 50mM; Casamino acid 5g; Polyvinylpyrrolidone 20g; pH 8.0 per liter)를 사용하였다. 각종 용액은 SMM (0.5M sucrose; 0.02M $MgCl_2$; 0.02M malate buffer; pH 6.8) SMMD (SMM에 DNase I $5 \mu g/ml$ 첨가) 및 LF (SMM에 lysozyme $150 \mu g/ml$ 첨가)를 사용하였다.

PY-glucose 배지 20ml를 가압살균 ($121^\circ C$, 1kg/cm², 15min)한 후 공시균주를 접종하여 항온진탕수조 ($45^\circ C$, 12hr)에서 배양한 전배양액 0.1ml를 새로운 PY-glucose 배지에 재접종하고 동일한 조건으로 6시간 더 진탕배양하여 약제내성 변이주의 분리와 원형질체 형성 및 재생용 대상균체로 사용하였다.

변이주의 분리

PY-glucose배지에서 대수증식기 중기까지 생육시킨 배양액 20ml를 원심분리 (12,000×g, 5min)하여 얻어진 균체를 50mM Tris malate 완충액 (pH 6.8)으로 2회 세척한 다음 다시 현탁액 (1×10^8 cell/ml)을 만들어 NTG의 최종 농도가 $500 \mu g/ml$ 되게 첨가하여 $40^\circ C$ 에서 30분간 처리하였다. NTG를 동일 완충용액으로 2회 세척하여 제거한 후 PY-glucose배지로 재현탁한 용액 0.1ml를 각종 항생제가 첨가된 PY-glucose 고체 배지상에 도말하여

항온기 ($37^\circ C$, 3~4일)에서 배양하였을 때 나타난 콜로니를 약제내성 균주로 선발하였다.

원형질체 형성 및 재생(19)

전배양액 0.1ml를 20ml의 PY-glucose배지에 접종하여 대수증식기 중기 (5~6hr)까지 도달했을 때 penicillin G (0.3 unit/ml)로 약 1.5시간 처리하여 원심분리 (12,000×g, 5min)하고 얻어진 균체를 SMM 완충용액으로 2회 세척한 다음 LF용액에 현탁시켜 $37^\circ C$ 에서 40분간 처리하여 원형질체를 형성시켰다. 원심분리 (8,000×g, 3min)하여 원형질체를 모은 후 SMM 완충액으로 현탁시킨 다음 그 일정량 (1×10^7 원형질체)을 재생용 기본배지에서 재생용 soft agar 5ml와 중충하고 $37^\circ C$ 에서 4~7일간 배양하여 정상세포로 재생시켰다. 원형질체 형성율은 정상세포의 콜로니수에서 LF 처리하여 형성된 원형질체 현탁액에 삼투압충격을 가한 후 PY-glucose 고체 배지상에 나타난 콜로니수를 빼 것에 대한 정상세포 콜로니수의 백분율로 나타내었으며, 재생빈도는 재생용 기본배지상에 나타난 콜로니수에 대한 최초 원형질체수의 백분율로 나타내었다.

원형질체의 융합

SMMD 용액으로 처리한 두 변이주의 원형질체를 1:1로 혼합한 후 원심분리 (8,000×g, 3min)하여 얻은 원형질체를 SMM 완충용액으로 세척하고, 원래 부피의 1/10 정도로 동일 완충용액으로 재현탁시켜 SMM 완충용액에 녹인 30% PEG를 원래 부피의 9/10 정도로 첨가하였다. 그리고 $45^\circ C$ 에서 5분간 정치 배양한 후 PEG를 제거하고 streptomycin과 kanamycin을 $50 \mu g/ml$ 씩 함유하는 재생용 선택배지 (1.5% agar)에 동일한 약제를 함유한 재생용 soft agar (0.8% agar) 5ml로 중충하고 $42^\circ C$ 에서 4~7일간 배양시켜 나타난 콜로니수를 측정하였다. 융합빈도는 재생용 선택배지 (항생제 첨가)상에 나타난 콜로니수에 대한 재생용 기본배지상에 나타난 원형질체수로 표시하였다.

효소활성도의 측정

조효소액으로서는 PY-CMC, xylan, avicel 배지로 액체진탕배양 ($45^\circ C$, 3일)한 배양액을 원심분리 (10,000×g, 10min)하여 그 상청액을 사용하였다. 융합주의 효소활성도에서 xylanase, carboxymethyl cellulase (CMCase) 및 avicelase 활성은 50mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 1% 기질용액 각각 0.8, 0.75, 0.7ml와 조효소액 0.2, 0.25, 0.3

mL를 혼합하여 50°C의 진탕수조에서 각각 10, 10, 60분간 반응시킨 후(avicelase 활성은 10,000×g에서 2분간 원심분리하여 avicel 제거) 3.5% DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 1mL를 첨가하여 정확히 5분간 끓인 다음 냉각하고 510 nm에서 흡광도를 측정하여 D-xylose, D-glucose(CMCase, avicelase)를 정량하였다. xylanase의 효소단위는 μM D-xylose/ml/min로 그리고 CMCase 및 avicelase의 효소단위는 μg D-glucose/ml/min으로 표시하였다.

결과 및 고찰

변이주의 분리

융합주 선별을 위한 항생제 marker는 균체를 대수 증식기 중기까지 증식시킨 다음 500 μg/ml의 NTG 농도로 40°C에서 30분간 처리하여 얻었으며, 그 결과 항생제 내성을 나타내는 변이주는 Table 1과 같다.

Bacillus sp. K 17변이주(G 70)는 streptomycin에 내성을 나타내고 *Bacillus* sp. F 204(S 20)는 chloramphenicol, kanamycin에 내성이 있었으며, reversion 빈도는 4~5×10⁻⁸ 정도로 비교적 낮아 원형질체 융합을 위한 선택 marker로 사용하는데 적당하다고 판단되어진다.

원형질체 형성 및 재생의 최적조건

원형질체 형성 및 재생의 최적조건 인차로는 균체의 배양시간, 삼투압안정제의 종류 및 농도, lysozyme의 처리(시간, 농도, pH, 온도)와 각종 무기염 등 여러가지를 들 수 있다.

배양시간 및 삼투압 안정제

본 공시균주의 경우 세포벽 조성에 영향을 주는 균체 배양시간은 peptidoglycan의 손실로 아마 세포

벽이 가장 얇은 시기인 대수증식기 중기(13)에 해당되는 시간을 택하였다. 원형질체 형성시 사용되는 삼투압안정제로서 KCl, sorbitol 및 sucrose 상호간에 큰 차이가 없어 이들 중 sucrose가 용균효소액 중에서 균일하고 안정된 원형질체가 형성된다는 보고(14)에 따라 sucrose를 Fig.1에서와 같이 0.2~0.7 M로 조절하여 조사하여 본 결과 0.4 M의 sucrose 농도에서 최대의 원형질체 형성율을 보여주었다. 이것은 다른 보고자(12, 15, 16)들의 경우와 비교하여 볼 때 균중에 따라서는 약간씩의 농도차이를 보여주었다.

Lysozyme의 처리농도 및 시간

Lysozyme의 처리농도에 따른 원형질체 형성 및 재생율은 37°C에서 40분간 각 농도별로 처리하여 본 결과(Table 2, a) K 17과 F 204는 150 μg/ml 효소 농도에서 원형질체 형성율은 각각 94.9, 92%였으며 재생율은 23, 22%였다. 그러나 peptidoglycan crosslink의 과도한 가수분해로 재생빈도는 약간 낮아지긴 하지만 융합빈도를 개선하기 위하여 200 μg/ml 농도로 실험을 행하였다. 한편 다른 보고자(12, 16, 17)의 경우 *Bacillus*에서는 50~500 μg/ml 농도 범위가 많이 사용되었는데 주로 250 μg/ml 효소농도로 처리할 경우 99% 이상의 형성율로 본 공시균주의 경우와 유사한 경향이었으며 재생율은 보고(12, 19)된 균중에 따라 10~30%의 범위를 나타내었다. 특히 Chen(19) 등은 고온성균인 *Bacillus stearothermophilus*의 경우에 70% 이상의 높은 재생율을 보고하였다. 그리고 효소 처리시간(Table 2,

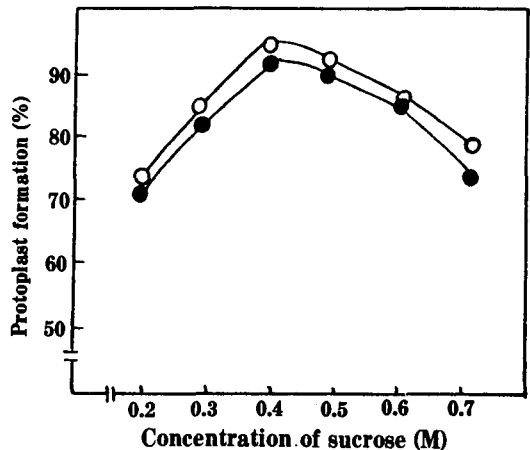


Fig. 1. Effect of concentration of sucrose on the protoplast frequency.

○; *Bacillus* sp. K17
●; *Bacillus* sp. F204

Table 1. Antibiotic characteristics of *Bacillus* sp. K 17 and *Bacillus* sp. F 204 mutant

Strains	Antibiotics						Reversion frequency
	Cm	Am	Str	Pen	Km	Tc	
G 70	-	-	+	-	-	-	4 × 10 ⁻⁸
S 20	+	-	-	-	+	-	5 × 10 ⁻⁸

Cm; Chloramphenicol (15 μg/ml), Am; Ampicillin (30 μg/ml), Str; Streptomycin (50 μg/ml), Pen; Penicillin (30 μg/ml), Km; Kanamycin (50 μg/ml), Tc; Tetracycline (12 μg/ml)

+; resistance, -; sensitive

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

(a)

Frequency(%)	Strains	Lysozyme concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
		100	150	200	250	300
P_{ff}^*	K 17	86.2	94.9	97	99	99
	F 204	75	92	95	99	99
R_f^{**}	K 17	26	23	21	16.9	13.9
	F 204	24	22	19.5	15.3	12

(b)

Frequency(%)	Strains	Treatment time(min)				
		20	30	45	70	90
P_{ff}^*	K 17	87	93	97.5	99	99
	F 204	84	94	95.3	99	99
R_f^*	K 17	25.1	22.7	20	16.5	14.7
	F 204	23	21	16.2	14.3	12.5

* P_{ff} : Protoplast formation frequency

** P_f : Regeneration frequency

b)은 원형질체 형성 및 재생율을 함께 고려하여 볼 때 K17은 45분, F204는 30분이 적당하였으며 다른 보고자(12, 16, 17)의 *Bacillus*속인 경우는 대체로 5~50분 사이였으나 효소의 농도 및 특성에 따라서 약간씩 상이한 보고를 하였다.

Sodium succinate 농도의 영향

재생용 기본배지에 첨가한 sodium succinate의 농도가 원형질체 재생에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Fig.2와 같다. *Bacillus* sp. F204는 0.4 M, *Bacillus* sp. K17은 0.5 M sodium succinate를 첨가했을 때 각각 23, 25.1% 재생되었다. Götz 등(17, 19, 20)은 *Bacillus subtilis*, *Staphylococci* 및 *Brevibacterium flavum*의 경우에 0.5 M sodium succinate가 적당하다고 보고하였으며, 그의 보고자(11, 13, 21)들의 결과와 비교하여 보면 농도는 대체로 비슷한 경향이였으나 첨가한 종류는 다소 상이하였다.

2가 양이온의 첨가효과

원형질체 재생에 미치는 2가 양이온의 효과는 MgCl_2 와 CaCl_2 를 25 mM, 50 mM, 100 mM 농도가 되게 재생용 기본배지에 첨가한 결과, Table 3과 같다. Table 3에 나타난 바와 같이 K17 균주는 CaCl_2 보다 MgCl_2 가 효과적이었으며 25 mM 첨가시는 1.9배의 증가를 보였는데 CaCl_2 50 mM의 단독 첨가시

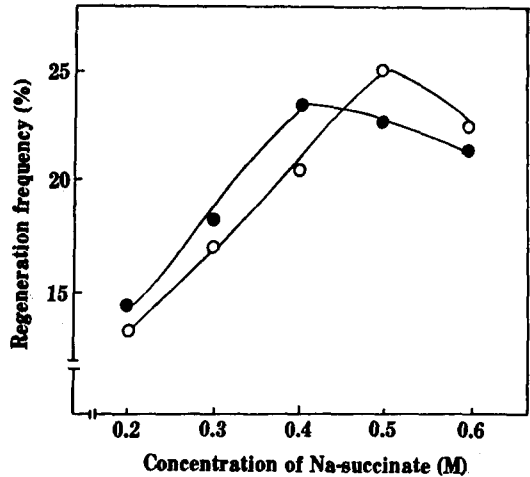


Fig. 2. Effect of concentration of sodium succinate on the regeneration frequency.

○; *Bacillus* sp. K17
●; *Bacillus* sp. F204

나 혼합 첨가시에는 큰 변화를 나타내지 않은 반면에 F204는 MgCl_2 보다 CaCl_2 첨가가 효과적이었으며 50 mM 첨가시는 1.3배의 증가를 나타내었고, 특히 25 mM MgCl_2 와 혼합첨가를 할 경우는 약 2배의 월등한 효과가 있었다. 2가 양이온의 첨가효과에 대한 설명은 상세하게 밝혀진 바 없으나 Tabor, Okamoto 등(22, 23)은 양이온이 osmotic stability 및 plasma expander의 효과를, Rogers 등(13)은 특히 Mg^{++} 이온의 결핍은 ATPase와 같은 dissociable enzyme의 손실과 막의 fragmentation 현상을 유발하여 막

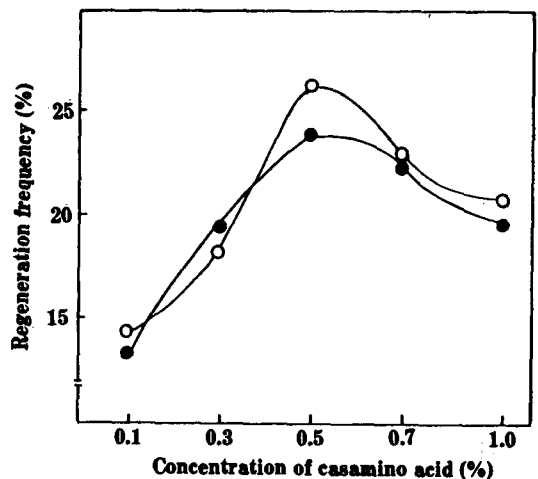


Fig. 3. Effect of concentration of casamino acid on the regeneration frequency.

○; *Bacillus* sp. K17
●; *Bacillus* sp. F204

Table 3. Effect of di-Cation on the protoplast regeneration of *Bacillus* sp. K17 and *Bacillus* sp. F204

Di-cation added to RPYmedium		Regeneration			
MgCl ₂ (mM)	CaCl ₂ (mM)	<i>Bacillus</i> sp. K17		<i>Bacillus</i> sp. F204	
		Colony No./ml	Relative value (%)	Colony No./ml	Relative value (%)
—	—	1.5 × 10 ⁶	100	3.0 × 10 ⁵	100
25	—	2.9 × 10 ⁶	193	3.1 × 10 ⁵	103
50	—	2.3 × 10 ⁶	153	3.5 × 10 ⁵	117
100	—	1.6 × 10 ⁶	106	3.2 × 10 ⁵	106
—	25	1.6 × 10 ⁶	106	3.8 × 10 ⁵	127
—	50	2.7 × 10 ⁶	180	3.9 × 10 ⁵	130
—	100	1.7 × 10 ⁶	113	3.3 × 10 ⁵	110
25	25	1.8 × 10 ⁶	120	3.7 × 10 ⁵	123
25	50	3.1 × 10 ⁶	207	5.9 × 10 ⁵	197
25	100	1.3 × 10 ⁶	86	2.8 × 10 ⁵	93
50	25	2.0 × 10 ⁶	133	3.4 × 10 ⁵	113
50	50	1.9 × 10 ⁶	127	3.4 × 10 ⁵	113
50	100	2.2 × 10 ⁶	147	2.7 × 10 ⁵	90
100	25	2.1 × 10 ⁶	140	3.5 × 10 ⁵	117
100	50	2.2 × 10 ⁶	147	4.0 × 10 ⁵	133
100	100	1.4 × 10 ⁶	96	3.0 × 10 ⁵	100

안정화에 아주 큰 영향이 있다는 보고를 한 바도 있다.

Casamino acid의 첨가효과

Casamino acid를 plasma expander로 재생용 기본배지에 첨가할 경우 원형질체 재생율에 영향이 있다는 보고 (24)가 있으므로 첨가되는 casamino acid의 농도에 따른 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. *Bacillus* sp. F204와 *Bacillus* sp. K17 두 균주 모두 0.5%를 첨가했을 때 가장 좋은 효과를 나타내었는데, 그때의 재생빈도는 각각 23.6, 25.9%였다. 한편 casamino acid의 역할이 분명하지는 않지만 Akamatsu 등(24)은 손상된 원형질체의 복구나 원형질체에서 간균형 세포로의 전환 및 생세포의 증가 등 일반적인 세포대사의 활성화를 촉진시킬 것이라고 보고한 바 있다.

Polyvinylpyrrolidone(PVP)의 첨가효과

재생용 기본배지에 첨가하는 PVP 농도가 원형질체 재생에 미치는 영향을 조사하여 본 결과, Fig. 4에서와 같이 두 균주 모두 재생이 잘 되었으며 그중 1.5% 일 때가 가장 좋은 효과를 나타내었다. PVP는 casamino acid와 비슷한 효과를 나타내는 plasma expander이며 Akamatsu 등(24)은 *Bacillus subtilis*의 경우에 PVP를 재생용 배지내의 gelatin이

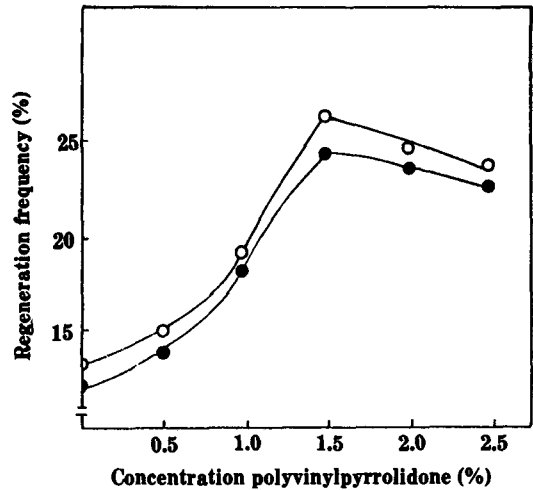


Fig. 4. Effect of concentration of polyvinylpyrrolidone on the regeneration frequency.

○; *Bacillus* sp. K17
●; *Bacillus* sp. F204

나 serum 대신에 효과적으로 대체할 수 있었으며 또한 PVP가 세포에서 무기물이 잘 침투될 수 있도록 촉진시켜 준다는 보고를 한 바 있다.

원형질체 융합에 미치는 PEG의 영향

PEG의 분자량, 농도 및 처리시간에 따른 원형질체 융합의 작용기작은 이미 보고(25)된 바 있지만, 명확하게는 아직 밝혀져 있지 않은 상태이다. 원형질체 융합에서 PEG 분자량은 1,000~6,000 범위가 주로 이용되는데, PEG 1,500, 4,000, 6,000을 30% 농도로 하여 융합빈도를 조사한 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 PEG 6,000이 다른 보자(21, 26)의 경우와는 달리 융합빈도가 높게 나타났다. 이는 균종에 따라 상이하겠지만 저분자량의 경우는 높은 삼투압성으로 융합빈도가 낮아진 것으로 생각되며 다음으로 PEG 농도는 다른 균종에서와 마찬가지로 본 공시균주의 원형질체 융합에서도 30~40%에서 융합빈도가 높았다. 20% 이하의 저농도와 50% 이상의 고농도에서는 각각 원형질체의 응집현상과 삼투압손상으로 융합빈도가 낮아진 것으로 생각된다. 또한 PEG 처리시간은 5분간 처리했을 때 6×10^{-6} 의 융합빈도를 나타내었으며 시간이 길어짐에 따라 융합빈도가 감소하는 경향을 보여주는데 이는 PEG를 오랫동안 처리함에 따라 독성효과와 multiple fusion의 기회가 증가하는 등 재생빈도가 감소하여 융합빈도도 감소된다고 볼 수 있다.

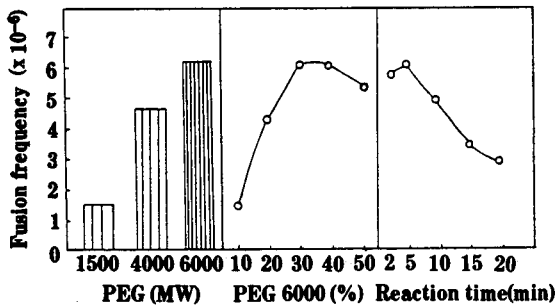


Fig. 5. Effect of MW, concentration and reaction time of PEG on the protoplast fusion frequency.

Ca⁺⁺의 첨가 효과

Losy 등(27)은 2가 양이온의 첨가는 융합시 일어나는 hexagonal phase의 형성을 촉진한다고 보고했으며 또한 Hoopwood 등(28)은 단백질응집과 세포간의 접촉을 증가시켜 준다고 보고하였다. 융합촉진제인 PEG에 보조제인 Ca⁺⁺의 농도를 높여줌으로써 융합빈도는 점차 증가되었으며, 50mM 첨가시 6.2×10^{-6} 의 융합빈도를 나타내었다(Fig. 6).

융합주 선발

이상의 조건에서 얻은 원형질체를 융합 촉진제인 30% PEG와 45°C에서 5분간 처리한 후 약제가 함유된 재생용 선택배지에 증충하여 배양시킨 결과 융합빈도는 6.2×10^{-6} 이었으며 융합주 중 비교적 효소활성이 높은 균주를 검토한 결과는 Table 4와 같다. 모균주와 융합주간의 효소활성을 비교하여 본 결과

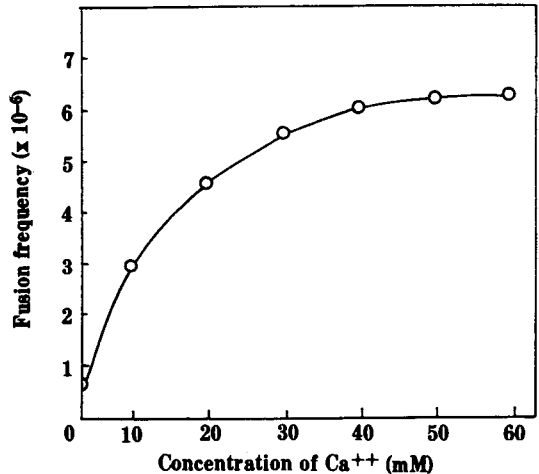


Fig. 6. Effect of Ca⁺⁺ concentration on the protoplast fusion frequency.

Table 4. Fusion frequency and extracellular enzyme activity of fusants

Strains	Enzyme activity (units/ml)			Fusion frequency
	Xylanase	CMCase	Avicelase	
Parental strains				
<i>Bacillus</i> sp. K17	9.09	—	—	
<i>Bacillus</i> sp. F204	3.9	120	221	
Fusants				
BFK 27	9.8	115	216	
68	8.4	94	154	6.2×10^{-6}
107	9.1	80	201	
184	8.0	108	174	

융합주는 CMCase와 avicelase는 모균주보다 약간 낮았으며, xylanase는 *Bacillus* sp. F 204 보다는 효소활성이 2배 이상 높았고 *Bacillus* sp. K 17 보다는 약간 높은 효소활성을 보였다. 그리고 융합주의 생리적 배양학적 특성과 유전적 안전성 검토는 계속 실험하고자 한다.

요 약

호알칼리성 *Bacillus* sp. F 204와 *Bacillus* sp. K 17간에 원형질체 융합에 의한 cellulase와 xylanase를 동시에 생산하는 균주를 개발하기 위하여 두 균주에 500 $\mu\text{g/ml}$ NTG를 처리한 후 약제내성변이주인 S 20(K_m^r , C_m^r)과 G 70(Str^r)을 분리하였다. 원형질체 형성율은 균체를 대수증식기 중기까지 배양하여 200 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme으로 37°C에서 30-45분간 처리하였을 때 약 95%였다. 재배지에 0.4-0.5 M sodium succinate, 0.5% casamino acid, 1.5% polyvinylpyrrolidone, 25 mM MgCl_2 및 50 mM CaCl_2 를 첨가하므로 *Bacillus* sp. F 204와 *Bacillus* sp. K 17의 재생율은 각각 24.9%, 26.2%였다. 50 mM Ca^{++} 을 첨가한 30%의 PEG 6,000용액을 45°C에서 5분간 융합시킴으로써 6.2×10^{-6} 빈도로 융합주를 얻었다. cellulase, xylanase 및 avicelase를 생산하는 융합주는 모균주와 비교하였다.

사 사

본 연구는 86-87년도 한국과학재단의 목적기초연구비에 의해 수행된 연구결과와 일부이며 재단의 연구지원에 심심한 감사를 드립니다.

참고문헌

- Koide, A., A. Nakamura, T. Vozumi and T. Beppu: *Agric. Biol. Chem.*, **50**(1), 233 (1986).
- Whittle, D.J., D.G. Kilburn, R.A.J. Warren and R.C. Miller Jr.: *Gene*, **17**, 139 (1982).
- Stoppok, W., Peter Rapp and Fritz Wagner: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 44-53 (1982).
- Rapp, P.E. Grote, and F. Wagner: *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 857-866 (1981).
- Dekker, R.F.H. and G.N. Richards: *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.*, **32**, 272-352 (1976).
- Nakanishi, K., T. Yasui and T. Kobayashi: *J. Ferment. Technol.*, **34**, 813-817 (1976).
- Vziie, M.M. Matsuo and T. Yasui: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1159 (1985).
- Sung, N.K., I.S. Kang, H.K. Chun, T. Akiba and K. Horikoshi: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**(2), 81-89 (1984).
- Kang, I.S., N.K. Sung, H.K. Chun, T. Akiba and K. Horikoshi: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**(6), 447-453 (1986).
- Sung, N.K., I.S. Kang, H.K. Chun, T. Akiba and K. Horikoshi: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**(4), 267-272 (1987).
- Horikoshi, K. and T. Akiba: *Alkalophilic Microorganisms*, Japan Scientific Societies press Tokyo, (1982).
- Wyrick, P.B. and H.J. Rogers: *J. Bacteriol.*, **116**, 456-465 (1973).
- Rogers, H.J., Perkins, H.R., and Ward, J.B.: *Microbial Cell walls and membranes*, Chapman & Hall, London, (1980).
- Gabor, M.H., Hotchkiss, R.D.: *J. Bacteriol.*, **137**, 1346 (1979).
- Forder, K., Hamdlezy, G. Alfoldi, L.: *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **121**, 390 (1975).
- Schaeffler, P., Cami B., Hotchkiss, R.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**(6), 2151-2155 (1976).
- Gotz, F. Ahnne, S., and M. Lindbery: *J. Bacteriol.*, **145**, 74 (1981).
- Chen, Z.S.F. Wojcik and N.E. Welker: *J. Bacteriol.*, **165**(3), 994-1001 (1986).
- Akamatsu, T. and J. Sekiguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **45**(12), 2887-2894 (1981).
- Kaneko, H. and Kenji Sakaguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **43**(5), 1007-1013 (1979).
- Hotchkiss, R.D. and M.H. Gabor: *The molecular biology of the Bacilli* Vol. II, Academic press, Inc. (1985).
- Okamoto, T., K.K. Fujita and R. Irie: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 259 (1983).
- Tabor, C.W.: *J. Bacteriol.*, **83**, 1101 (1961).
- Akamatsu, T. and J. Sekiguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **45**(12), 2887-2894 (1981).
- Hui, S.W., and Isac, T., L.T. Boni and A. Sen: *J. Memb. Biol.*, **84**, 137 (1985).
- Sung, Nack-Kie, Duck-Hwa Chung, Mu-Yong Lee, Yong-Chul Chung: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(2), 150-155 (1988).
- Losy, J.A.: *Novel Symp. no 34*, (1976).
- Hopwood, D.A.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**, 237-272 (1981).

(Received May 31, 1988)