

Cellulomonas속 원형질체 재생과 종간 융합조건

배 무*·조보연

이화여자대학교 생물학과

Protoplast Regeneration and Interspecific Fusion of the Genus *Cellulomonas*

Bae, Moo* and Bo-Yeon Cho

Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

In order to establish the process of interspecific protoplast fusion of the genus *Cellulomonas* capable of utilizing of cellulose, *C. flavigena* NCIB 12901 and *Cellulomonas* sp. CS1-1, the optimum conditions for the regeneration and fusion were examined. The condition of suitable osmotic stabilizer for the protoplast regeneration of *C. flavigena* was established by using 0.4M sorbitol. And then, by addition of 3% polyvinyl pyrrolidone (PVP) to cell wall regeneration medium, regeneration frequency was increased 3 times higher than that without PVP addition. The optimum conditions for the interspecific protoplast fusion between auxotrophic and antibiotics resistant mutants were obtained with 40%(W/V) of PEG (polyethylene glycol) 6000 as the fusogenic agent and 25mM of CaCl_2 on treating time for 15 min. The fusion frequency between mutants was from 2.0×10^{-4} to 4.0×10^{-4} under the optimum conditions. The fusants were confirmed to revert from protoplast to cells of rod type during regeneration process and the aggregation of protoplast by PEG was observed. Also the progress of fusion was observed by scanning electron microscopy. Many isolated fusants were shown to be complement clones of both parents which occurred at a high frequency among the isolated clones.

매년 식물에 의해 합성되고 화학적 및 효소학적으로 분해에 대하여 비교적 안정한 cellulose는 풍부한 자원으로써 이들을 분해 자화할 수 있는 *Cellulomonas*속 세균은 매우 유용하여 산업적으로 이용될 가능성이 높다(1).

*Cellulomonas*속 균주의 개량을 위한 연구로는 돌연변이 유발(2)이나, cellulase 유전자의 cloning을 통한 효소활성이 증가된 균주선별이 이루어져 왔다. 최근 새로운 미생물 육종 수단으로써 중·속에 관계 없이 비특이적이며 DNA 형질전환이나 접합 혹은 다른 방법으로는 유전자 조작이 어려운 미생물에서도 세포질과 함께 대부분의 genome이 전달되어 높은 빈도로의 재조합체를 이룰 수 있는 원형질체 융합법(3-5)이 많이 연구되면서 *Cellulomonas*속 세균에서도 *Bacillus*와의 속간 융합(6)과 종내 융합(7)이 시

도된 바 있다.

그러나 이들 균주의 원하는 형질을 가진 우량 융합균주를 효율적으로 얻기 위해서는 우선 융합 유도제에 의한 원형질체 융합유도와 정상 세포로의 재생 전환에 대한 방법의 개선이 선행되어야 한다.

본 연구에서는 *Cellulomonas*속 균주의 종간 융합 방법을 확립하기 위해 원형질체 재생 및 융합방법에 대한 여러가지 요인을 조사하여 최적 조건을 밝히고 재생과 융합과정을 주사 전자현미경으로 확인하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서는 cellulose 분해균인 *Cellulomonas*

Key words: Protoplast regeneration, interspecific fusion, *Cellulomonas* sp.

* Corresponding author

flavigena NCIB 12901(이하 *C. flavigena*로 약함)과 *Cellulomonas* sp. CS1-1(KAIST KCTC 보관 균주)로 이하 CS1-1 균주로 약함)을 사용하였으며 원형질체 융합실험시에 모균주로는 이들 야생형 균주로부터 NTG 처리를 통해 분리한 변이주를 그 대상으로 하였다(Table 1).

배지 및 원충용액

본 실험에 사용한 정상세포의 배양을 위한 영양배지 조성 및 최소배지의 조성은 김 등의 보문(7)과 같다. 원형질체 형성을 위한 고장액(Lysis Fluid ; LF)은 원형질체 형성과정시 사용한 방법(8a, b)에 따라 사용하였으며 원형질체 희석용 고장액(Dilution Fluid ; DF)은 LF에서 glucose와 yeast extract를 제외하고 pH 6.5로 조절하여 사용하였다. 원형질체 융합에 사용한 융합용 고장액(Fusion Fluid ; FF)는 Kaneko와 Sakaguchi(9) 방법에 따라 삼투압 안정제로 0.4 M sorbitol을 첨가하여 사용하였다. 세포벽 재생을 위한 재생용 배지(RCM)는 최소배지에 yeast extract 5g/l, casamino acid 5g/l와 삼투압 안정제를 첨가하여 사용하였다. 균의 고체배양을 위한 solid agar에는 1.5% agar를, 원형질체 재생을 돕기 위한 중층 유동성 배지에는 0.8% 피도록 재생용 배지에 agar를 첨가하여 사용하였다.

원형질체 형성 및 세포벽 재생

*C. flavigena*와 CS1-1의 원형질체 형성방법은 전 보문(8, 10)에 의해 각각 10시간, 6시간 동안 배양한

후 lysozyme을 처리하여 형성시켰다. 생성된 원형질체는 DF 용액에 희석하여 RCM 재생배지 위에 도달한 다음 RCM 유동성 한천배지로 중층하고 30°C에서 3~5일간 배양하여 형성된 균체수를 관찰하였다.

원형질체 융합

융합시키고자 하는 두 균주의 원형질체를 동일한 농도로 혼합한 후 원심분리(2500 rpm, 15 min.)하여 회수한 뒤 FF 용액 1/10 volume에 현탁하였다. 여기에 9/10 volume의 PEG를 첨가하여 실온에서 0-30분간 방치한 후 FF 용액을 동량을 추가하여 PEG 반응을 정지시키고 다시 원심분리하여 PEG를 제거하였다. 여기에서 얻은 원형질체를 DF에 재현탁하고 재생배지에 kanamycin 100 µg/ml, chloramphenicol 50 µg/ml를 첨가한 선별 융합배지에 도달한 후 동일한 항생물질을 함유하는 유동성 한천배지로 중층하여 30°C에서 7-10일간 배양하여 생성되는 균체수를 조사하였다.

주사전자현미경(SEM) 관찰

전자현미경 관찰을 위한 시료는 전 보문(10)에 따라 실험 제작하여 Scanning Electron Microscope JEOL JSM-35 CM(이대 중앙기기실)로 10,000배 확대하여 관찰하고 부착된 카메라로 Kodak verichrome pan 120 film을 이용하여 촬영하였다.

결과 및 고찰

원형질체의 세포벽 재생

원형질체는 적당한 조건의 배지상에서 다시 세포

Table 1. Mutant derived from *Cellulomonas flavigena* and *Cellulomonas* sp. CS1-1

mutants	phenotype
<i>C. flavigena</i> NCIB 12901	
cf K 21	Km ^r
cf A 23	Ade ⁻ , Km ^r , Sm ^r
cf V 11	Val ⁻ , Km ^r , Sm ^r
cf L 4	Lys ⁻ , Sm ^r
cf V 13	Val ⁻
<i>Cellulomonas</i> sp. CS1-1	
cs C 43	Cm ^r
cs L 27	Lys ⁻ , Cm ^r
cs L 34	Lys ⁻ , Cm ^r , Nm ^r
cs H 88	His ⁻ , Cm ^r
cs A 116	Arg ⁻ , Cm ^r
cs A 115	Ade ⁻ , Cm ^r
cs T 52	Trp ⁻ , Cm ^r

Table 2. Effect of various osmotic stabilizers on protoplast regeneration of *Cellulomonas flavigena*

osmotic stabilizer (0.5M)	regenerated cells No. (cells/ml)	regeneration frequency(%)
KCl	—	0
Na-succinate	—	0
Sucrose	1.2 × 10 ⁷	0.77
Sorbitol	9.8 × 10 ⁷	6.28
Mannitol	8.0 × 10 ⁷	5.13

Intact cells (1.56 × 10⁹ cells/ml) were treated with lysozyme (400 µg/ml) at 30 °C for 6 hr.

$$\text{regeneration frequency (\%)} = \frac{B-C}{A} \times 100$$

A; Number of protoplasts

B; Number of regenerated cells on RCM

C; Number of osmotic resistant cells in plate after osmotic shock

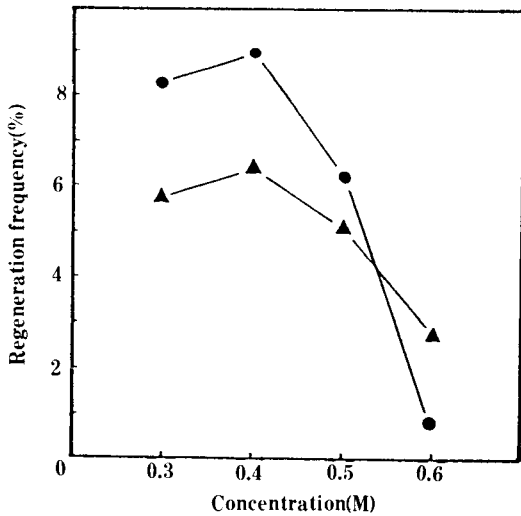


Fig. 1. Effect of concentrations of osmotic stabilizers on protoplast regeneration of *C. flavigena*. (●—●; sorbitol, ▲—▲; mannitol)

벽을 합성하여 정상세포로 전환되어질 수 있다(11). *C. flavigena*의 원형질체 세포벽 재생에 적당한 삼투압 안정제의 종류와 농도는 Table 2와 Fig.1과 같다.

무기염류인 KCl, Na-succinate 0.5 M을 포함하는 재생배지에서는 재생되지 않았으며 당 알콜인 sorbitol, mannitol과 당 sucrose를 삼투압 안정제로 첨가하여 주었을 때 재생되었다. 특히 sorbitol과 mannitol에서 비교적 재생율이 높게 나타났다. Sorbitol, mannitol을 삼투압 안정제로 하여 그 농도에 따른 재생율을 검토한 결과 모두 0.4 M에서 효과적이었으며 mannitol보다는 sorbitol에서의 재생율이 높게 나타났다. 이는 *B. subtilis* 경우 0.5 M Na-succinate(12, 13), *Brevibacterium flavum*은 0.5 M Na-succinate(9, 14), *Streptomyces*는 0.4 M sucrose(15)로 균주에 따라 삼투압 안정제의 농도는 대체로 비슷하나 그 종류와 농도가 다소 차이를 보이며 세포벽 재생에 영향을 미쳤다.

원형질체의 재생율을 높이는 것은 용해빈도를 높이는 데 필히 요구되는 필수 불가결한 요소로써 재생 빈도를 높이기 위해 2가 중금속, 과량의 아미노산, plasma expander인 dextran, gelatin(9, 13, 16), bovine serum albumin(17, 18) 등이 알려져 있다. 최근 몇몇 균주에서 그 효과가 보고되어지고 있는 polyvinyl pyrrolidone(PVP)을 재생배지에 첨가함으로써 재생에 미치는 효과를 알아보았다(Table 3). 3% PVP를 첨가하였을 때 재생율은 50.4%로 첨가

Table 3. Effect of polyvinyl pyrrolidone(PVP) on protoplast regeneration of *Cellulomonas flavigena*.

PVP concentration (%)	regenerated cells (cells/ml)	No. regeneration frequency (%)
none	2.68×10^8	16.7
1	2.83×10^8	18.0
2	2.38×10^8	15.1
3	7.92×10^8	50.4
4	2.30×10^8	14.6

Intact cells (1.57×10^9 cell/ml) were treated with lysozyme ($400 \mu\text{g/ml}$) at 30°C for 6 hr.

하지 않았을 때보다 약 3배 정도 증가되었음을 알 수 있다. 보고된 다른 균주에서도 3% 농도로 처리하였을 때 재생율이 무첨가시에 비해 현저한 증가를 보였는데(12, 19) 그 증가율은 균주마다 차이를 보이고 있다.

*C. flavigena*의 정상세포는 $0.5 \times 1.5 - 2.0 \mu\text{m}$ 의 간상 세포로(Fig. 2, A) lysozyme 처리에 의해 구형

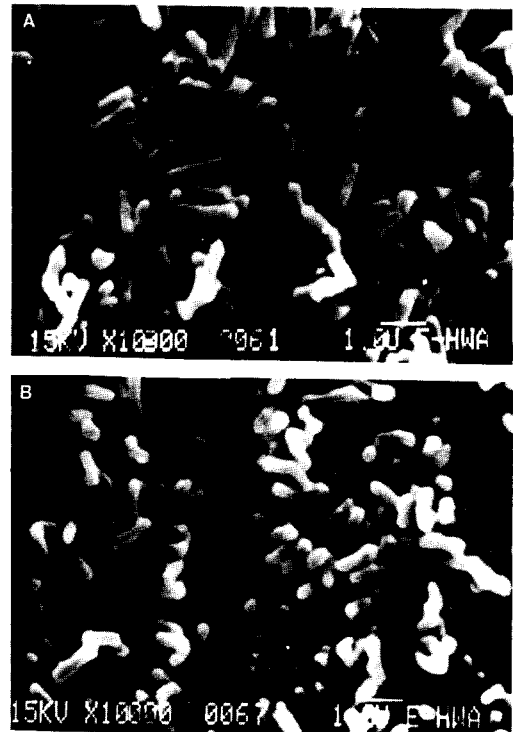


Fig. 2. Scanning electron micrographs of intact cells of *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901 and *Cellulomonas* sp. CS1-1.

A. *C. flavigena* NCIB 12901
B. CS1-1

의 원형질체가 형성된다(Fig. 3, A). 이들 원형질체를 재생 배지상에 도달하고 0.8% 유동성 한천배지로 증충한 후 배양하여 나타난 집락을 SEM을 통해 관찰한 결과 재생배지에서 세포벽의 재합성으로 다시 간상의 정상세포로 전환되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3, B).

원형질체 융합

원형질체에 효과적으로 융합을 이끄는 융합 유도제(fusogenic agent)로 PEG(17, 20, 21)와 CaCl₂(3, 22)가 알려져 있다. 본 실험 세균의 융합 실험에는 주로 이용되는 PEG 4000과 6000을 30%(w/v) 농도로 하고 CaCl₂는 1M로 하여 융합빈도를 조사하였다(Table 4). PEG 분자량에 따른 융합빈도는 큰 차이가 없었으며(11) CaCl₂도 약 1.7×10⁻⁵ 빈도로 융합을 일으켰으나 PEG보다는 효과가 떨어짐을 알 수 있었다. 또한 원형질체간에 자발적으로도 융합이 일어나나 PEG를 첨가함으로써 약 100배의 증가된 융합빈도를 얻을 수 있었다.

PEG 농도 10%-50%(w/v)까지 구간별로 처리에 따른 원형질체 재생율과 융합빈도는 Fig. 4와 같다.



Fig. 3. Scanning electron micrographs of protoplast regeneration.

- A. Protoplasted cells of *C. flavigena*
- B. Regenerated cells of *C. flavigena*

Table 4. Effect of fusogenic agents on interspecific protoplast fusion of *Cellulomonas* sp.

fusogenic agent	fusion frequency
none	9.18 × 10 ⁻⁷
PEG 6000	1.10 × 10 ⁻⁴
PEG 4000	1.07 × 10 ⁻⁴
1 M CaCl ₂	1.71 × 10 ⁻⁵

PEG concentration; 30 w/v %
treating time of fusogenic agent; 30 min.

$$\text{fusion frequency} = \frac{B-C}{A}$$

A; Number of regenerated cells on RCM
B; Number of regenerated cells on FCM
C; Number of regenerated cells on FCM without fusogenic agent treatment

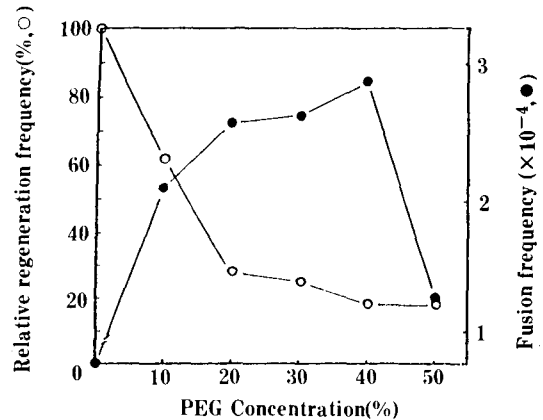


Fig. 4. Effect of PEG 6000 concentrations(w/v %) on regeneration and fusion of *Cellulomonas* protoplast. treating time; 30 min.

$$\text{Fusion frequency} = \frac{\text{No. of regenerated cells on FCM}}{\text{No. of regenerated cells on RCM}}$$

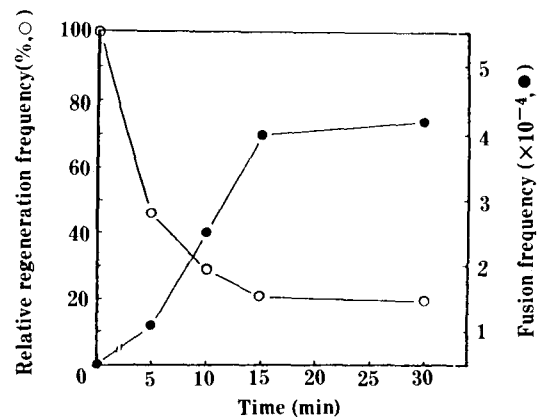
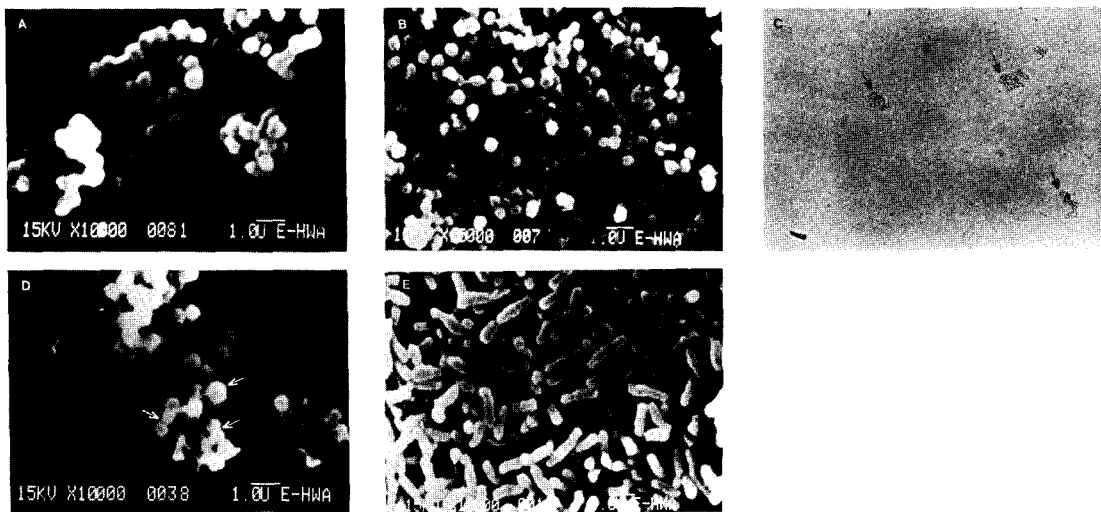


Fig. 5. Effect of duration of PEG treatment on regeneration and fusion of *Cellulomonas* protoplast. PEG concentration; 40% (w/v)

Table 5. Effect of Ca^{++} ions on the regeneration and fusion of *Cellulomonas* protoplast

Concentration of $CaCl_2$	Regenerated cell on RCM (cells/ m^2)	Fusion frequency	Relative value	
			Regeneration frequency	Fusion frequency
0 mM	0.52×10^7	1.7×10^{-5}	100	100
5 mM	0.68×10^7	2.0×10^{-4}	131	1176
10 mM	2.10×10^7	4.6×10^{-4}	404	2705
25 mM	1.52×10^7	7.1×10^{-4}	292	4176
50 mM	1.48×10^7	5.4×10^{-4}	285	3176
100 mM	1.36×10^7	4.0×10^{-4}	261	2352

**Fig. 6. Scanning electron micrographs of interspecific protoplast fusion of *Cellulomonas* sp.**A. Protoplasted cells of *C. flavigena*

B. Protoplasted cells of CS1-1

C. Aggregated protoplasts after PEG treatment (The photographs were taken at magnification of 800X under

the light microscope.)

D. Fused protoplasts after PEG treatment

E. Regenerated cells of fusant

PEG의 원형질체에 대한 독성으로 처리농도가 증가할수록 재생율은 감소하는 것을 알 수 있으며 융합빈도는 20%에서 점차 증가하여 40%에서 2.5×10^{-4} 빈도로 가장 높고 50%에서 급격히 감소하였다. 이 결과는 대부분 세균에서 많이 사용하는 40%(w/v)와 일치하며 (3, 5, 12, 25) 이에 비해 곰팡이에서는 이보다 낮은 20-30%가 효율적으로 나타나고 있다 (23, 24).

40%(w/v) PEG를 원형질체 혼합액에 처리하여 PEG 처리시간이 원형질체 재생 및 융합체 생성에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 5). 처리시간 15분까지는 원형질체 융합빈도가 계속 증가하였고 15분 이후에는 거의 변화가 없었으며 원형질체의 재생은 5분 처리부터 급격히 감소하여 PEG를 처리하지 않았을 때보다 약 20%만이 재생되어 나왔다. PEG 처리

시간이 길어질수록 재생율은 감소하고 융합빈도는 증가한다는 보고는 Gabor와 Hotchkiss (7)가 보고한 바 있는데 효율적인 처리시간은 균주에 따라 차이를 보이고 있다.

원형질체 융합 유도제로 사용되며 많은 균주에서 원형질체 안정화에 기여하는 Ca^{++} 에 대한 원형질체의 재생과 융합에 대한 영향은 $CaCl_2$ 를 0-100 mM로 포함하는 PEG 용액을 원형질체 현탁액에 처리하여 알아보았다 (Table 5). $CaCl_2$ 10 mM에서 재생율은 무첨가시보다 4배 증가하였으며 이에 따라 융합빈도는 27배, 25 mM에서는 40배 증가를 보였다.

두 융합모균의 원형질체를 혼합하고 PEG를 처리한 후 광학현미경과 주사전자현미경을 통해 융합과정을 관찰하였다 (Fig. 6). PEG 처리 10-15분 경과후 원형질체 간에 서로 응집 (aggregation) 되는 것을 볼

수 있었으며 이는 PEG의 작용기작으로써 응집을 통한 세포간의 접촉으로 융합이 야기된다고 (9, 21, 25, 26) 알려져 있다(Fig. 6, C). B에서 서로 물리적으로 부착된 원형질체와 원형질체 사이에 외형이 모호하게 되고 그 크기가 월등히 큰 융합원형질체를 관찰할 수 있다. C는 융합선별 배지상에 나타난 재생된

융합균주로 모균주보다 그 크기가 커진 간상세포를 관찰할 수 있었다.

원형질체 융합에 효율적인 조건으로 나타난 PEG 6000을 융합 유도제로 하여 처리농도 40% (w/v), 처리시간 15분으로 영양요구주간에 원형질체 융합을 실시하였다(Table 6). 각기 다른 요구주간에 융합빈도의 차이를 보여 약 $2.0-4.0 \times 10^{-4}$ 의 융합빈도를 보였다. 이는 이들 영양요구주의 reversion frequency인 $10^{-8}-10^{-9}$ (Table 7)보다 매우 높은 빈도로 균주들의 reversion에 의한 것이 아닐을 알 수 있었다.

영양요구주이면서 항생물질 내성 변이주를 모균주로 하여 얻은 중간 융합균주중 임의로 선택하여 이들의 영양요구성을 검토한 결과는 Table 8과 같다. 재생된 융합균주는 선택 배지중 한쪽에만 성장하는 모균주형 (parental type)과 양 모균주의 선택배지에서 모두 성장하거나 양 모균주의 요구성을 모두 보이는 재조합형 (recombinant type)으로 나눌 수 있었다. 이중 영양요구성을 나타내지 않는 균주가 비교적 많이 나타났는데 이는 비정상적인 상태를 회복하기 위해 complement type으로 융합되는 경향이 높기 때문으로 사료된다(3, 9, 18).

Table 6. Fusion frequency of interspecific protoplast fusion of *Cellulomonas* species

parental strains	fusion frequency
cf A 23 × cs L 27 (Ade ⁻ , Km ^r × Lys ⁻ , Cm ^r)	4.20×10^{-4}
cf A 23 × cs H 88 (Ade ⁻ , Km ^r × His ⁻ , Cm ^r)	1.93×10^{-4}

Table 7. Reversion frequencies of auxotrophic mutants

mutant	reversion frequency
cf A 23 (Ade ⁻ , Km ^r)	1.0×10^{-9}
cs L 27 (Lys ⁻ , Cm ^r)	2.3×10^{-8}
cs H 88 (His ⁻ , Cm ^r)	1.2×10^{-8}

Table 8. Genetic characterization of fusants obtained from interspecific protoplast fusion

	Ade	His	Lys	Cm	Km	No. of colonies obtained
EXP. 1 Parental						
cf A 23	-	+	+	S	R	
cs H 88	+	-	+	R	S	
Fusant						
	+	+	+	R	R	5
	-	+	+	R	R	1
	+	-	+	R	R	0
	-	-	+	R	R	1
EXP. 2 Parental						
cf A 23	-	+	+	S	R	
cs L 27	+	+	-	R	S	
Fusant						
	+	+	+	R	R	37
	-	+	-	R	R	0
	+	+	-	R	R	4
	-	+	-	R	R	0

Cm; chloramphenicol, Km; kanamycin
S; sensitive cell, R; resistant cell

요 약

Cellulose를 이용할 수 있는 *Cellulomonas*속 균주의 중간 세포의 융합방법을 확립하기 위해 원형질체 재생 및 융합조건에 대해 검토하였다. *Cellulomonas*속 균주의 원형질체는 osmotic stabilizer를 포함하는 재생배지에서 유동성 한천배지로 증충하여 재생시켰고 재생 확인은 주사전자현미경으로 하였다. 원형질체 융합은 항생물질 내성과 영양요구성 돌연변이주의 유전자 표지에 확인하였다.

Lysozyme을 처리하여 형성된 *C. flavigena* 원형질체의 세포벽 재생은 osmotic stabilizer로 0.4 M sorbitol을 포함하는 재생배지에서 약 15% 수준이었으며 여기에 polyvinyl pyrrolidone(PVP) 3% 첨가로 재생율을 약 3배 정도 증가시킬 수 있었다. *Cellulomonas*속 균주의 변이주간의 원형질체 융합은 융합유도제로 PEG 6000을 취하여 최적농도 40% (w/v), 최적 처리시간 15분, Ca 농도 25 mM에서 약 $2.0-4.0 \times 10^{-4}$ 의 융합빈도를 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. 배무, 김병홍 : 한국미생물학회지, 2, 1(1974).

2. Choi, W.Y., K.D. Hagett and N.W. Dunn: *Aust. J. Biol. Sci.* **31**, 553 (1978).
3. Foder, K. and L. Alföldi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2147 (1976).
4. Peberdy, J.F.: *Enzyme Microb. Tech.*, **2**, 23 (1980).
5. Schaeffer, P. and R.D. Hotchkiss: *Methods Cell Biol.*, **20**, 149 (1978).
6. Gokhale, D.V., E.S. Han, V.R. Srinivasant and D.V. Deobagker: *Biotechnol. Lett.*, **6**, 627 (1984).
7. Kim, B.H. and H.J. Lee: *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 309 (1985).
8. a. 배무, 이은주: 한국산업미생물학회지, **14**, 175(1986).
b. 조보연, 배무: 한국산업미생물학회지, **15**, 299(1986).
9. Kaneko, H. and K. Sakaguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1007 (1979).
10. 이은주, 배무: 한국미생물학회지, **24**, 154 (1986).
11. Hoppwood, D.A.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**, 237 (1981).
12. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2887 (1981).
13. Landman, O.E. and A. Forman: *J. Bacteriol.*, **99**, 576 (1969).
14. 신명교, 이세영, 임번삼, 전문진: 한국미생물학회지, **22**, 175(1984).
15. Yoo, J.C., S.W. Hong and Y.C. Hah: *Kor. J. Microbiol.*, **24**, 364 (1986).
16. Landman, O.E., A. Ryter and C. Frehel: *J. Bacteriol.*, **96**, 2154 (1968).
17. Gabor, M.H. and R.D. Hotchkiss: *J. Bacteriol.*, **137**, 1346 (1979).
18. Okamoto, T., Y. Fujita and R. Irie: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 259 (1983).
19. 김종현, 임번삼, 이세영, 전문진: 한국미생물학회지, **23**, 190(1985).
20. Schaeffer, P., B. Cami and R.D. Hotchkiss: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2151 (1976).
21. Smith, C.L., Q.F. Ahkong, D. Fisher and J.A. Lucy: *Biochim. Biophys. Acta.*, **692**, 109 (1982).
22. Götz, F., S. Ahrne and M. Lindberg: *J. Bacteriol.*, **145**, 74 (1981).
23. 전순배, 정기철, 배석: 한국미생물학회지, **24**, 243(1986).
24. Ohnuki, T., Y. Etoh and T. Beppu: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 451 (1982).
25. Ochi, K., M.J.M. Hitchcock and E. Katz: *J. Bacteriol.*, **139**, 984 (1979).
26. Gumpert, J.: *Arch. Microbiol.*, **126**, 263 (1980).

(Received July 5, 1988)