

속간 원형질체 융합에 의한 섬유질 기질로부터  
L-Lysine 생산균주 개발  
— 융합조건 및 융합체의 성질 —

성낙계\*·정덕화·박법규·정영철·전효곤\*

경상대학교 식품공학과

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

Sung, Nack-Kie\*, Duck-Hwa Chung, Buk-Kyu Park, Young-Chul Chung, and Hyo-Kon Chun<sup>+</sup>

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

To produce L-lysine from cellulosic substrate, the intergeneric protoplast fusion between *Cellulomonas flavigena* and *Corynebacterium glutamicum*, *Cellulomonas flavigena* and *Brevibacterium flavum* was performed. The fusion frequencies were  $1.9 \times 10^{-6}$  to  $2.1 \times 10^{-6}$  for the regenerated protoplasts when two parental strains were treated with 30% of polyethyleneglycol (M.W. 6000) containing 5 mM EDTA at 30°C for 30 min. Two fusants, FCB3 and FCC 19 were finally selected by comparison of their genetic stability and L-lysine productivity. The properties of fusants-DNA content, G + C content and L-lysine productivity-were investigated. The DNA content of fusants was greater than those of the parental strain and their G + C contents are equal to half of total G + C content of two parental strains. The fusants showed high productivity of L-lysine from carboxy methyl cellulose as substrate.

최근까지 행하여져 온 L-lysine 생산균주의 돌연변이에 의한 육종(1-4)은 생산성 향상에 한계가 있어 *Brevibacterium*의 종(5), 속(6) 간 그리고 *Brevibacterium*과 *Corynebacterium*간의 이속(7-10)간 원형질체 융합에 의한 균주 개발연구가 진행되고 있다. 융합세포는 영양요구성이나 항생물질저항성 등의 표지 유전인자를 이용하여 선택배지상에쉬 쉽게 선발할 수 있지만, 융합체의 재확인을 위해서는 세포의 형태적 비교(11), DNA 함량비교(12), 핵수의 세포학적 분석(13), 탄수화물의 자화능조사(12) 및 random spore analysis(13) 등의 방법이 이용되고 있다. 본인 등은 섬유소 기질로부터 L-lysine을 생산할 목적으로 *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium glutamicum* 및 *Cellulomonas*

*flavigena*의 원형질체 형성과 재생 조건을 전보(14)에서 보고한 바 있으며, 본 연구에서는 이속간 원형질체 융합의 조건, 융합체 중에서 유전안정성이 우수하고 L-lysine 생성능이 높은 균주의 성질 및 섬유소를 기질로 사용하였을 때의 L-lysine 생성능을 친주와 비교 검토하였다.

#### 재료 및 방법

#### 균 주

본 실험에 사용된 균주는 전보(14)에서 선발한 영양요구성·약제내성 변이주와 이들을 세포융합시켜 얻은 융합주로서 Table 1과 같다.

**Key words:** L-Lysine production, Intergeneric protoplast fusion, cellulosic substrate.

\* Corresponding author.

<sup>+</sup> Present address: Genetic Engineering Center, KAIST, P.O. Box 131 Cheongnyang, Seoul, Korea

**Table 1. List of strains used**

| Strains                               | Phenotype  | Source                         |
|---------------------------------------|--|--------------------------------|
| <i>Brevibacterium flavum</i> -200     | hos <sup>-</sup> , str <sup>r</sup>                    | <i>B. flavum</i> ATCC14067     |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> -10 | met <sup>-</sup> , thr <sup>-</sup> , rif <sup>r</sup> | <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 |
| <i>Cellulomonas flavigena</i> -50     | try <sup>-</sup> , val <sup>-</sup> , kan <sup>r</sup> | <i>C. flavigena</i> KFCC31221  |
| FCB 3                                 | wild type  | fusant                         |
| FCC 19                                | wild type  | fusant                         |

FCB 3 is fusant between *C. flavigena*-50 and *B. flavum*-200

FCC 19 is fusant between *C. flavigena*-50 and *C. glutamicum*-10

**Table 2. Composition of various solutions**

| Solutions            | Composition   |
|----------------------|---|
| Fusion solution(FS)  | Tris-maleate buffer(pH6.5) supplemented with 0.25M sodium 0.01M MgSO <sub>4</sub> , 0.25M sodium succinate and 5mM EDTA |
| Saline-EDTA solution | 0.15M NaCl, 0.01M EDTA, pH8.0   |
| SSC solution         | 0.15M NaCl and 0.015M trisodium citrate, pH 7.0   |

## 배 지

사용된 배지와 용액은 전보(14)와 동일하다. 단 융합체의 L-lysine 생산용 배지(A medium)(5)은 CMC 10g, CaCO<sub>3</sub> 10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 10g, NaCl 5g, Urea 3g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25g, FeSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.01g, MnSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.01g, biotin 50 μg, thiamine·HCl 200 μg/l, pH7.0을 사용하였고, 융합에 사용된 용액과 DNA 함량 및 DNA 염기정량에 사용된 용액의 조성은 Table 2와 같다.

## 원형질체 융합(5)

전보(14)와 같이 500 mg/ml의 lysozyme이 함유된 lysis solution에서 6시간 동안 나출시킨 각각의 parental protoplast(1×10<sup>8</sup> cells/ml)를 동량(1 ml 씩)으로 혼합한 후 원심분리(8,000 rpm, 5분)하여 상정액을 제거하고 2 ml의 fusion solution으로 현탁시키고, 여기에 30%의 PEG 용액 18 ml를 가하여 30°C에서 30분간 융합시켰다. 이 융합체를 원심분리(8,000 rpm, 5분, 실온) 한 다음 fusion solution으로 2회 세척하고 동일한 용액으로 희석하여 streptomycin((200 μg/ml)과 kanamycin(50 μg/ml), rifampicin(10 μg/ml)과 kanamycin(50 μg/ml)을

함유한 재생용 완전고체배지(agar 1.5%)상에 동일한 약제를 함유한 재생용 완전고체배지(agar 0.7%)로 중층하여 33°C에서 7~10일간 배양시켜 형성된 colony의 영양요구성을 조사하여 융합체를 선발하였다. 융합율은 약제를 함유하지 않은 재생용 배지에 생성된 colony 수에 대한 약제를 함유한 재생용 배지에 생성된 colony 수의 비로 나타내었다.

## DNA 함량의 정량

Marmur법(15)을 변경하여 사용하였다. 즉 완전액체배지에서 대수증식기 중기까지 배양한 각 균체를 원심분리하여 1/10 Vol.의 saline-EDTA로 현탁하고 lysozyme(90 mg/ml)을 37°C, 60분간 반응시켜 세포벽을 제거한 다음 현탁액의 최종농도가 1%가 되게 SDS를 가하여 50°C, 10분간 처리하였다. 이 액에 최종농도가 1M이 되게 5M K·AC를 첨가하여 0°C에서 40분간 방치한 후 원심분리(13,000 rpm, 45분, 4°C)하여 얻은 상정액에 2배의 냉 ethanol을 가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 SSC 용액에 용해시켜 RNase(50 μg/ml)를 37°C, 30분간 처리한 후 TE buffer로 포화시킨 동량의 phenol, phenol-chloroform, chloroform으로 단백질을 연속 3회씩 제거한 다음 2배의 ethanol로 재 침전시켜 SSC 용액에 용해하여 O.D 260 nm에서 각 균주의 DNA 함량을 측정하였다.

## DNA의 염기정량

각 균주의 정제된 DNA로 부터 염기정량은 Bendich의 법(16)에 준하였다. 즉, 70% iso-propanol : HCl : H<sub>2</sub>O=65 : 17 : 18의 전개용매로 전개시킨 다음 0.1 N 염산으로 30°C, 1시간 전탕, 추출한 후 원심분리한 상정액을 230~310 nm에서 흡광도를 측정하고, 각 흡광계수로 부터 염기량을 계산하였다.

**아미노산 분석(17)**

배양액중의 아미노산 분석은 융합주를 A medium에서 48시간 배양한 다음 원심분리(10,000 rpm, 30분)하여 그 상정액을 Toyo Roshi membrane filter로 제균한 후, -20°C에서 보관하면서 사용하였다.

균체내의 아미노산 분석은 완전액체배지에 본 배양한 균액을 원심분리(10,000 rpm, 30분)하여 멸균수로 3회 세척한 다음 동결건조한 균체 50mg을 ampoule에 넣은 후 6N HCl 5ml를 가하여 냉각상태에서 탈기, 밀봉하고 110°C±1°C의 sand bath상에서 22시간 가수분해시켰다. 이 액을 수회 세척하여 여과시킨 다음 rotary evaporator에서 감압, 농축, 진고하여 HCl을 제거시킨 후 citrate buffer(pH 2.2) 25ml에 용해시킨 다음 아미노산 분석기(LKB 4150, England)로 분석하였고, 분석조건은 Table 3과 같다. 균체의 조단백질은 Microkjeldahl법(18)에 따라 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**원형질체 융합**

전보(14)의 원형질체 형성 및 재생의 최적조건으로 하여 원형질체 융합시에 융합촉진제로 이미 밝혀진 PEG(6-11, 19)를 분자량 및 농도별로 처리하여 *B. flavum*과 *C. flavigena* 그리고 *C. glutamicum*과 *C. flavigena*간의 이속간 융합빈도를 검토하였다.

세균의 세포융합에 주로 사용되는 PEG 4000(7)과 PEG 6000(5, 10)을 30% 농도로 하였을 때 융합빈도는 PEG 6000이 높게 나타났다(Table 4). PEG 6000의 최적농도는 30%가 적당하였고 그 이상의 농도에서는 융합빈도의 증가는 거의 없었다(Fig. 1).

PEG 농도가 20%로 낮으면 안정제로서의 작용이 미흡하였고, 너무 높으면 원형질체 재생율의 감소를

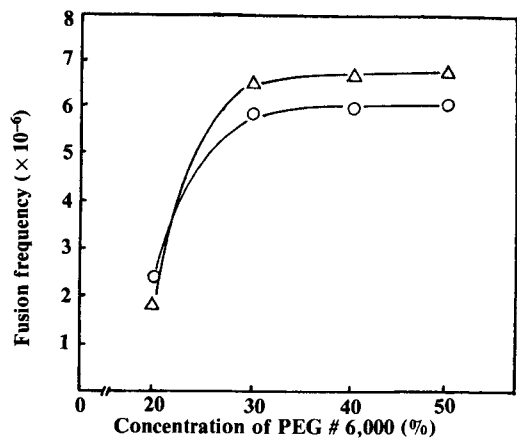
**Table 3. Operating conditions of Amino acid analyzer**

|                  |   |
|------------------|---|
| Instrument       | : LKB Amino Acid Analyzer No. 4150                |
| Column           | : sodium form                                     |
| Injection volumm | : 20u/  |
| Solvent system   | : pH3.2, 4.25, 10 sodium citrate buffer 0.4M NaOH |
| Flow rate        | : 40ml/ min.                                      |
| Chart speed      | : 0.2cm/ min.                                     |
| Recorder         | : LKB Integrator                                  |

**Table 4. Effect of PEG type on the fusion frequency**

| Strains  | Fusion frequency       |                        |
|--|------------------------|------------------------|
|  | PEG 4000               | PEG 6000               |
| <i>B. flavum</i> -200<br>×<br><i>C. flavigena</i> -50    | 5.8 × 10 <sup>-6</sup> | 1.9 × 10 <sup>-6</sup> |
| <i>C. glutamicum</i> -10<br>×<br><i>C. flavigena</i> -50 | 6.6 × 10 <sup>-6</sup> | 2.1 × 10 <sup>-6</sup> |

초래하는 경향을 보였다. 이는 *B. flavum*의외의 다른 보고(5, 7, 10)와 비교해서 PEG 농도는 일치하나, PEG 분자량은 6000보다 4000이 더 양호하다는 보고(20)와는 약간 상이한 것으로 나타났다. 융합빈도는 1.9 × 10<sup>-6</sup>으로 비교적 낮았는데 이런 결과는 균종에 의한 차이와 속간 융합이 중간 혹은 종내 융합보다 낮기 때문으로 추측된다. 그리고 융합체 134 균주를 선발하여 영양요구성 및 약제내성을 조사하였다(Table 5). *C. flavigena*와 *B. flavum*간의 융합체 70주 중 31주, *C. glutamicum*과 *C. flavigena*간의 융합체 64주 중 24주가 완전한 염색체 재조합이 일어났고, 나머지는 친주 중의 어느 한쪽의 phenotype을 가지거나 불완전한 재조합이 일어난 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 영양요구성을 나타내지 않은 균주가 비교적 많은 것은 염색체 재조합 빈도가 높고 또한 영양요구성을 나타내는 균은 생육에 있어서 비정상적인 상태를 보이므로 이러한 비정상적인 상태를 회복하려는 방향으로 융합이 되는 빈도가 높기 때문인 것으로 생각된다.



**Fig. 1. Effect of PEG # 6,000 concentration on the protoplast fusion.**

○-○ ; *B. flavum*-200 and *C. flavigena*-50  
△-△ ; *C. glutamicum*-10 and *C. flavigena*-50

**Table 5. Fusant formation by intergeneric protoplast fusion**

|                          | Try | Val | Hos | Met | Thr | Kan | Str | Rif | No. of colony |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|
| Parental strains         |     |     |     |     |     |     |     |     |               |
| <i>C. flavigena</i> -50  | -   | -   | +   | +   | +   | R   | S   |     | -             |
| <i>B. flavum</i> -200    | +   | +   | -   | +   | +   | S   | R   |     | -             |
| Fusant                   |     |     |     |     |     |     |     |     |               |
|                          | -   | -   | +   | +   | +   | R   | R   |     | 26            |
|                          | +   | +   | -   | +   | +   | R   | R   |     | 10            |
|                          | -   | +   | +   | +   | +   | R   | R   |     | 1             |
|                          | +   | -   | +   | +   | +   | R   | R   |     | 1             |
|                          | +   | +   | +   | +   | +   | R   | R   |     | 31            |
|                          | -   | -   | -   | +   | +   | R   | R   |     | 1             |
| Parental strain          |     |     |     |     |     |     |     |     |               |
| <i>C. flavigena</i> -50  | -   | -   | +   | +   | +   | R   |     | S   | -             |
| <i>C. glutamicum</i> -10 | +   | +   | +   | -   | -   | S   |     | R   | -             |
| Fusant                   |     |     |     |     |     |     |     |     |               |
|                          | -   | -   | +   | +   | +   | R   |     | R   | 20            |
|                          | +   | +   | +   | -   | -   | R   |     | R   | 16            |
|                          | -   | -   | +   | +   | -   | R   |     | R   | 2             |
|                          | -   | +   | +   | +   | +   | R   |     | R   | 1             |
|                          | +   | +   | +   | +   | +   | R   |     | R   | 24            |
|                          | -   | -   | +   | -   | -   | R   |     | R   | 1             |

**융합체의 성질**

융합체를 최소배지와 완전배지에서 1개월간 보존 후 10일 간격으로 최소배지상에서 5회 subculture하여 유전안정성이 우수하고 L-lysine 생성능이 높은 융합체로 밝혀진 FCC 3(*C. flavigena* × *B. flavum*)와 FCC 19(*C. flavigena* × *C. glutamicum*)를 최종선발하여 몇가지 특성을 조사하였다.

**DNA 함량** : 영양요구성에 따라 융합주를 선발하였으나 융합체로서의 재확인을 위해 친주와 융합체의 DNA 함량을 조사하였다(Table 6). 각 parental strain에 비해 융합체의 DNA 함량이 높은 것으로 보아 2개의 세포가 융합된 것임을 알 수 있었다(12).

**G+C 함량** : 완전 정제된 DNA를 Bendich법(16)에 따라 G+C 함량을 측정하였다(Table 7). G+C 함량은 변이주 *B. flavum*-200은 56.4%, *C. glutamicum*-10은 56.8%, *C. flavigena*-50은 71.7%였으나, 융합체는 각 parental strain의 어느 친주와도 G+C 함량이 일치하지 않았다. 특히 융합체의 G+C 함량이 양친주의 G+C 총량의 1/2에 해당하는 것은 양친주의 성질을 가진 반수체로서 유전적

**Table 6. DNA content in parents and fusants**

| Strains                  | Content of DNA(fg/cell) |
|--------------------------|-------------------------|
| <i>B. flavum</i> -200    | 8.1                     |
| <i>C. glutamicum</i> -10 | 8.4                     |
| <i>C. flavigena</i> -50  | 7.2                     |
| FCC 3*                   | 9.0                     |
| FCC 19**                 | 9.3                     |

\* Fusant between *C. flavigena*-50 and *B. flavum*-200

\*\*Fusant between *C. flavigena*-50 and *C. glutamicum*-10

안정화가 된 융합체이고, 또한 융합체는 친주의 유전적 성질을 가지고 있는 것으로 보아 완전한 recombinant인 것임을 알 수 있었다.

**CMC 분해능 및 L-lysine 생산능** : 모균주와 융합체의 carboxymethyl cellulose(CMC) 분해능과 L-lysine 생성능은 1% glucose와 1% CMC가 각각 함유된 A medium에서 30°C, 48시간 진탕배양하여 측정하였다(Table 8). 친주인 *B. flavum*-200과 *C. glutamicum*-10은 탄소원으로 CMC만 함유된 배지에

**Table 7. Base composition of DNA from mutants and fusants**

| Strains                  | mol % |      |      |      | G + C content (%) |
|--------------------------|-------|------|------|------|-------------------|
|                          | G     | A    | C    | T    |                   |
| Mutant                   |       |      |      |      |                   |
| <i>B. flavum</i> -200    | 28.0  | 21.5 | 28.4 | 21.7 | 56.4              |
| <i>C. glutamicum</i> -10 | 28.2  | 21.5 | 28.6 | 21.7 | 56.8              |
| <i>C. flavigena</i> -10  | 35.8  | 14.6 | 35.9 | 14.9 | 71.7              |
| Fusants                  |       |      |      |      |                   |
| FCB 3                    | 30.4  | 18.7 | 31.6 | 19.3 | 63.0              |
| FCC 19                   | 32.9  | 17.0 | 32.9 | 17.1 | 65.8              |

G: Guanine A: Adenine C: Cytosine T: Thymine

서는 CMC 자화능 없어 생육과 L-lysine 생성이 전혀 없었고, 반면에 *C. flavigena*-50은 1% CMC가 첨가된 A medium에서는 L-lysine 생성은 없었으나 세포의 CMCCase 활성은 3.12로 나타났다. 융합체

**Table 8. Comparison of CMCase activity and L-lysine productivity in parental strains and their fusants**

| Strains                  | L-Lysine(mg/100ml) |        | CMCase activity <sup>a</sup> |       |
|--------------------------|--------------------|--------|------------------------------|-------|
|                          | 1%Glucose          | 1%CMC  | 1%Glucose                    | 1%CMC |
| <i>B. flavum</i> -200    | 213.56             | —      | —                            | —     |
| <i>C. glutamicum</i> -10 | 423.07             | —      | —                            | —     |
| <i>C. flavigena</i> -50  | —                  | —      | 0.34                         | 3.12  |
| FCB 3*                   | 206.20             | 203.69 | 0.30                         | 2.08  |
| FCC 19**                 | 385.45             | 222.90 | 0.32                         | 2.50  |

a: Extracellular carboxymethyl cellulase(CMCCase) activity is expressed as  $\mu\text{mol glucose}/\text{ml}, \text{min}^{-1}/\text{mg protein}$  and determined according to Horikoshi *et al.*(23)

\*: Fusant between *C. flavigena*-50 and *B. flavum*-200

\*\* : Fusant between *C. flavigena*-50 and *C. glutamicum*-10

FCB 3 및 FCC 19는 CMC만 탄소원으로 하여 각각 203.39 mg/ 100 ml, 222.90 mg/ 100 ml의 L-lysine

**Table 9. Contents of amino acid produced in the culture broth of mutants and fusants**

(dry base mg/100ml)

| strains<br>Amino acids | <i>B. flavum</i> -200(a) | <i>C. glutamicum</i> -10(a) | FCB 3*(b) | FCC 19**(b) |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------|-------------|
| Asp.                   | 355.24                   | 392.34                      | 293.6     | 386.87      |
| Thr.                   | 149.12                   | 209.12                      | 126.4     | 153.26      |
| Ser.                   | 132.99                   | 273.07                      | 117.4     | 150.66      |
| Glu.                   | 309.04                   | 363.97                      | 411.37    | 320.40      |
| Pro.                   | 732.87                   | 523.31                      | 139.59    | 91.86       |
| Gly.                   | 116.24                   | 232.25                      | 197.75    | 149.84      |
| Ala.                   | 293.12                   | 252.34                      | 216.02    | 267.39      |
| Cys.                   | 29.34                    | 149.45                      | 12.70     | 57.58       |
| Val.                   | 203.12                   | 292.45                      | 249.39    | 230.45      |
| Met.                   | 105.41                   | 142.12                      | 49.43     | 110.31      |
| Isoleu.                | 198.34                   | 132.19                      | 125.15    | 143.30      |
| Leu.                   | 232.12                   | 354.12                      | 226.79    | 264.12      |
| Thr.                   | 89.45                    | 192.32                      | 86.45     | 122.87      |
| His.                   | 104.21                   | 173.25                      | 153.5     | 235.87      |
| Phe.                   | 173.25                   | 306.38                      | 114.26    | 141.22      |
| Thr.                   | 254.34                   | 98.19                       | 87.035    | 68.93       |
| Lys.                   | 213.56                   | 423.07                      | 203.69    | 222.90      |
| Arg.                   | 129.73                   | 189.24                      | 124.56    | 163.07      |
| Total                  | 3380.49                  | 4699.18                     | 2935.085  | 3280.9      |

\* Fusant of *B. flavum*-200 and *C. flavigena*-100.

\*\*Fusant of *C. glutamicum*-10 and *C. flavigena*-100

a. The cells were cultivated in A medium contained glucose instead of CMC-Na

b. The cells were cultivated in A medium contained CMC.

을 생성하여 CMC를 자화하여 L-lysine을 축적함이 확인되었다. glucose를 탄소원으로 하고 당농도도 5~10%를 첨가한 다른 연구자들(2-8, 21)에 비하여 L-lysine 생성능은 낮으나, 비교적 값싸고 풍부한 섬유질로부터 L-lysine 생성이 가능한 균주육종에 의의가 있으며, 또한 본 연구에서는 탄소원농도를 1% 첨가했기 때문에 당농도를 높이고, 섬유질 자화성이 우수하고 대사제어를 받지 않은 균주가 개발되면 L-lysine 생성능이 증가되리라 사료된다.

**배양액내의 아미노산 조성** : 친주인 *B. flavum*-200과 *C. glutamicum*-10은 CMC만 첨가된 A medium에서는 생육하지 못하므로 CMC 대신에 1% glucose를 첨가하였고, 융합체 FCB3와 FCC19는 1% CMC를 주 탄소원으로 하여 A medium에서 배지중에 아미노산 조성을 측정하였다(Table 9). 융합체 FCB3은 L-lysine 외에 glutamic acid, aspartic acid, valine 및 leucine을 상당량 축적하였으며, FCC19는 aspartic acid, glutamic acid, alanine, valine, leucine 및 histidine 등의 순으로 생성량이 많았으나 두 융합체 모두 proline 함량이 감소하였

고, 전체적인 아미노산 생성 양상이 모균주와 융합체 사이에 다소 차이를 보였다.

**균체내의 조단백질 및 구성아미노산** : 융합주의 SCP로서의 이용 가능성을 조사하기 위하여 건조균체의 조단백질 함량 및 구성아미노산을 정량한 결과는 각각 Table 10, 11과 같다.

**Table 10. Intracellular crude protein content of mutants and fusants**

| Strains                  | Crude Protein(Dry base) |
|--------------------------|-------------------------|
| <i>B. flavum</i>         | 41.2%                   |
| <i>C. glutamicum</i>     | 43.1%                   |
| <i>C. flavigena</i>      | 39.5%                   |
| Mutants                  |                         |
| <i>B. flavum</i> -200    | 40.8%                   |
| <i>C. glutamicum</i> -10 | 40.1%                   |
| <i>C. flavigena</i> -50  | 38.5%                   |
| Fusants                  |                         |
| FCB 3                    | 42.5%                   |
| FCC 19                   | 43.3%                   |

**Table 11. Amino acid composition of cell of mutants and fusants.**

(Dry base, g/100g)

| Amino acid | <i>C. glutamicum</i> | <i>B. flavum</i> | <i>C. flavigena</i> | <i>C. glutamicum</i><br>-10 | <i>R. flavum</i><br>-200 | <i>C. flavigena</i><br>-100 | FCC19 | FCB3  |
|------------|----------------------|------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------|-------|
| Asp.       | 4.58                 | 4.56             | 4.59                | 3.97                        | 3.72                     | 4.38                        | 4.87  | 3.94  |
| Thr.       | 1.86                 | 1.26             | 1.39                | 1.94                        | —                        | 1.29                        | 1.51  | 1.26  |
| Ser.       | 2.37                 | 2.06             | 2.27                | 2.03                        | 2.03                     | 2.23                        | 1.53  | 1.27  |
| Glu.       | 3.35                 | 3.91             | 4.37                | 2.26                        | 3.05                     | 4.35                        | 4.20  | 4.11  |
| Pro.       | 0.24                 | 0.30             | 0.23                | 0.06                        | 0.11                     | 0.20                        | 0.92  | 1.40  |
| Gly.       | 2.67                 | 2.14             | 1.59                | 1.33                        | 2.08                     | 0.48                        | 1.50  | 1.98  |
| Ala.       | 2.97                 | 2.29             | —                   | 1.53                        | 2.10                     | —                           | 3.67  | 3.56  |
| Cys.       | 0.20                 | 0.21             | 0.25                | 0.20                        | —                        | 0.24                        | 0.58  | 0.53  |
| Val.       | 2.54                 | 3.36             | 2.74                | 2.47                        | 2.41                     | —                           | 2.30  | 2.49  |
| Met.       | 1.28                 | 0.68             | —                   | 1.27                        | 1.20                     | —                           | 1.01  | 0.49  |
| Ileu.      | 1.62                 | 1.89             | 2.01                | 1.49                        | 1.27                     | 1.98                        | 1.43  | 2.09  |
| Leu.       | 2.67                 | 2.40             | 2.48                | 2.11                        | 2.40                     | 2.25                        | 3.64  | 3.47  |
| Thr.       | 1.24                 | 0.98             | 1.41                | 1.78                        | 0.32                     | 1.40                        | 1.23  | 1.30  |
| His.       | 1.79                 | 1.55             | 1.75                | 1.57                        | 1.50                     | 1.53                        | 2.36  | 1.54  |
| Phe.       | 0.36                 | 0.78             | 1.48                | 0.94                        | 0.68                     | 1.39                        | 1.41  | 1.37  |
| Try.       | —                    | 0.36             | —                   | —                           | —                        | —                           | —     | —     |
| Lys.       | 5.85                 | 6.01             | 3.65                | 6.97                        | 6.00                     | 3.23                        | 3.23  | 3.04  |
| Arg.       | 1.97                 | 1.87             | 1.34                | 1.43                        | 1.30                     | 1.17                        | 1.63  | 1.25  |
| Total      | 37.38                | 36.61            | 31.55               | 30.93                       | 30.17                    | 26.12                       | 34.66 | 33.79 |

융합체 FCB3의 조단백질의 함량은 42.5%, FCC 19는 43.3%로서 친주 및 변이주의 단백질 함량과 별다른 차이를 보이지 않았다.

Table 11에서 보는 바와 같이 균체의 구성아미노산 조성은 친주, 변이주 및 융합체 모두 aspartic acid, lysine, glutamic acid, leucine 등의 함량이 높았으며, 특이한 것은 변이주 *C. flavigena*-50에 검출되지 않은 methionine, alanine 등이 융합체 FCB3 및 FCC 19에서는 검출되었다. 이는 섬유질 기질로부터 SCP 생산만을 목적으로 한 김 등(22)의 *Cellulomonas* 속의 조단백질 함량 보다는 낮으나, 본 연구에는 L-lysine 생산 후의 부산물의 이용 측면을 고려해 보면 배지조성, 배양조건 등의 몇가지 조건을 개선하면은 lysine 등의 아미노산 함량이 높아 배합사료의 성분으로서 혼합 가능성을 고려할 필요가 있으리라 생각된다.

## 요 약

섬유소 기질로부터 L-lysine을 생산할 목적으로 *Cellulomonas flavigena*에 *Brevibacterium flavum* 및 *Corynebacterium glutamicum*을 각각 이속간 원형질체 융합을 하여 융합조건과 융합체의 성질을 조사하였다.

각각의 parental protoplast를 동량으로 혼합한 후 30% PEG 6000으로 30°C, 30분간 융합시킨 결과  $1.9 \times 10^{-6} \sim 2.1 \times 10^{-6}$ 의 융합빈도를 얻었고, 134주의 융합체 중 유전적 안정화가 판명되고 CMC 기질로부터 L-lysine 생성능이 인정된 FCB3 및 FCC 19를 최종 선별하였다. FCB3 및 FCC 19는 친주보다 DNA 함량이 높을 뿐 아니라 G+C 함량도 융합전 친주의 G+C 총함량의 약 1/2에 해당하여 반수체로서 안정화 되어 있었으며, 그리고 친주와 반대로 CMC 자화능이 있어 CMC로부터 L-lysine을 배지 중에 축적하였다.

## 사 사

본 연구는 84~86년도 한국과학재단의 학술연구비에 의해 수행된 연구결과의 일부이며 재단의 연구지원에 심심한 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Sano, K. and I. Shii: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 97 (1971).
2. Tosaka, O., K. Takinami and Y. Hirose: *Agri. Biol. Chem.*, **42**(4), 745 (1978).
3. Shii, I., H. Ozaki and K.U. Jakeda: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 97 (1971).
4. Ozaki, H. and K.U. Takeda: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(1), 101 (1982).
5. Kaneko, H. and K. Sakaguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **43**(5), 1007 (1979).
6. Tosaka, O., M. Krasawa, S. Ikeda and H. Yoshii: *4th Intl. Symp. on GIM Abstracts* (1982).
7. Zhdanova, N., V. Livshits, A. Shtannikov, T. Leonova and L. Kozyreva: *4th Intl. Symp. on GIM Abstracts* (1982).
8. 唐澤 昌彦, 戸坂 修, 池田 茂穂, 吉井 寛依: 日本公開特許, 昭 58-158184(1983).
9. 신명교, 이세영, 임번삼, 전문진: 한국산업미생물학회지, **22**(3), 175(1984).
10. 경기천, 임번삼, 이세영, 전문진: 한국산업미생물학회지, **13**(3), 279(1985).
11. Svoboda, A.: *J. Gen. Microbiol.*, **109**, 169 (1978).
12. Yamamoto, M. and L. Ferenczy: *FEMS Microbiology Letters*, **2**, 203 (1977).
13. Sipiczki, M. and L. Ferenczy: *Molec. Gen. Genet.*, **151**, 77 (1977).
14. 성낙계, 정덕화, 이무영, 정영철: 한국산업미생물학회지, **16**(2), 150(1988).
15. Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961).
16. Bendich, A.: *Methods in Enzymol.*, **3**, 208 (1961).
17. Moore, S., Spackman, D.H. and Stein, W.H.: *Anal. Chem.*, **30**, 1185 (1958).
18. Herbert, D., P.J. Phipps and R.E. Strange: *Methods in Microbiol.*, **5B**, 209 (1971).
19. Kao, K.N. and M.R. Micbayluk: *Planta*, **115**, 355 (1974).
20. Foder, K. and T. Alfold: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**(6), 2147 (1976).
21. Park, C., B.S. Lim, and M.J. Chun: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**(2), 104-111 (1987).
22. Kim, B.H. and M. Bae: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **5**(4), 167 (1977).
23. Horikoshi, K., Nakao, M., Kurono, Y. and Sashihara, N.: *Can. J. Microbiol.* **30**, 774-779. (1984).

(Received March 3, 1988)