Cellulomonas 속 종간 원형질 융합체의 특성

배 무 · 임정화
이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

Physiological Characteristics of Fusants by Interspecific Protoplast Fusion of the Genus *Cellulomonas*

Bae, Moo and Jung Hwa Lim
Department of Biology, College of Natural Science, Ehwa Womans University, Seoul, 120-750, Korea

ABSTRACT: In order to investigate physiological characteristics of fusants by interspecific protoplast fusion of the genus *Cellulomonas*, protoplasts of *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901 and *Cellulomonas bibula* NCIB 8142 were fused and cell wall regenerated.

To give gene maker, *C. bibula* was treated with 500 ug/ml NTG for 1 hr and arginine requiring auxotrophic mutants were isolated. Protoplasts of the genus *Cellulomonas* were obtained by treatment with 600 ug/ml lysozyme, and 0.5 M sorbitol was optimal for osmotic stabilizer on protoplast formation. Protoplast fusion was enhanced by 40% PEG(M.W. 6,000) containing 25 mM $CaCl_2$ at 30°C for 30 min and fusion frequency between *C. bibula* and *C. flavigena* was 5×10^{-4}. Processes of protoplast formation, cell wall regeneration and protoplast fusion were observed by scanning electron microscope.

By comparing enzyme activities of cellulase, exocellobiohydrolase, β-glucosidase of the parent strains of *Cellulomonas* with those of their mutants and fusants, fusants with increased enzyme activity were obtained. By the studies on nutritional requirement, antibiotic resistance, cellulolytic enzyme activities, type of peptidoglycan and motility of two mutants and fusants, fusants were proved to be recombinant of both mutant strains.

KEY WORDS: Protoplast fusion of *Cellulomonas*.

Cellulose는 풍부한 자원이나 화학적 및 효소학적 분해에 대해 비교적 안정하여 cellulose를 이용하려면 보다 저분자 물질의 유용한 당형태로 분해되야 하는데 *Cellulomonas* 속 균주는 cellulose를 분해 자화시킬 수 있어 미래의 자원으로 이용될 가능성이 있다(배와 김, 1974).

Kao와 Michayluk가 PEG를 이용하여 식물 원형질체 융합을 유도한 이래 원형질체 융합법은 미생물 균주 개량에 많이 이용되고 있으며(Fodor and Alföldi, 1976; Gotz *et al.*, 1981) 유전정보 전달방법인 형질전환, 형질도입, 접합이 모두 한 방향으로 DNA만 전달되 세포질의 상호작용을 알 수 없으며, 전체 genome이 도입될 수 없기 때문에 cytoplasm의 상호작용 뿐 아니라 전체 genome의 연구에 있어 원형질체 융합법이 관심을 끌고 있다(Foder *et al.*, 1979). *Cellulomonas* 속의 원형질체 융합은 *Bacillus* 속과의 속간 융합(Gokhal *et a.*, 1984)과 종내 융합(Kim and Lee, 1985)이 보고되어져 있고 진보에서 *C. flavigena*와 같은 *Cellulomonas* 속인 CS1-1간의 종간 융합을 보고하였다(배와 조, 1988).

Cellulose 분해에는 cellulase, exocellobiohydrolase β-glucosidase 등 여러 효소가 관계하는데 앞의 연구(배와 조, 1988)에서는 돌연변이 유발과정중 cellulase 활성을 거의 잃어버렸으므로 cellulase 활성을 유지하고 있는 다른 균주과의 융합에 의해 융합체를 얻고 융합체의 cellulose 분해효소활성 및 세포학적 특징을 조사해 보고 그 생리학적 변화특성을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서는 *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901(이하 *C. flavigena*로 약함)과 한국과학기술원에서 분양받은 *Cellulomonas bibula* NCIB 8142 (*C. bibula*로 약함)을 사용하였다.

배지 및 완충용액

본 실험에서 정상세포의 배양을 위한 영양배지와 최소배지의 조성은 김 등의 보문(Kim and Lee, 1985)과 같고 원형질체 형성을 위한 고장액(lysis fluid; LF)과 원형질체 희석용 고장액(dilution fluid; DF), 융합용액(fusion fluid; FF) 및 재생용 배지(RCM)는 전문(이와 배, 1986; 배와 조, 1988)에서와 같이 사용하였다.

돌연변이주의 분리

C. bibula 균주는 대수증식기 중기에 500 μg/m*l* NTG(N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine)를 60분간 처리한 다음 최소배지에 현탁하고 2000 unit/m*l*의 penicillin G를 더하고 배양하여 변이주를 농축하여 영양요구성 돌연변이주를 선별하였다(Gerhardt *et al.*, 1981; Fitzgerald *et al.*, 1975).

원형질체 형성과 세포벽 재생

*C. bibula*의 원형질체 형성 및 재생은 *C. flavigena*(이와 배, 1986)에서와 같이 10시간 배양한 후 600 μg/m*l* lysozyme을 더하고 6시간 배양하였으며, 생성된 원형질체는 DF에 현탁하여 RCM에 도말한 다음 중층하여 30℃에서 5-7일 배양하였다.

원형질체 융합

두 균주의 원형질체를 660 nm에서 O.D를 측정하여 동일 농도로 혼합한 후 25 mM $CaCl_2$가 포함된 40% polyethyleneglycol(PEG) 6000 용액을 더하고 30분간 방치하였다(배와 조, 1988).

주사전자현미경(SEM) 관찰

전자현미경 관찰을 위한 시료는 보문(이와 배, 1986)에 따라 실행 제작하여 scanning electron microscope JEOL JSM-35CM(이대 중앙기기실)로 10,000배 확대하여 관찰하고 부착된 카메라로 Kodak verichrome pan 120 film을 이용하여 촬영하였다.

효소활성 측정

탄소원으로 CMC(sodium carboxymethyl cellulose)만을 포함하는 완전배지에 종배양액을 접종하여 30℃에서 48시간 진탕 배양하여 원심분리 후 상등액을 세포외 조효소액으로 사용하였고, 회수된 균체는 동량의 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁하여 intact cell에서의 효소활성 측정에 사용하였다(Stoppok *et al.*, 1982).

Cellulase(EC 3.21.4)는 CMC 1%를 포함하는 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0) 0.5 m*l*에 조효소액 0.2 m*l*를 더하여 40℃에서 30분간 진탕 반응시키고(Kim and Wimpenny, 1981; Thayer *et al.*, 1984), Somogyi-Nelson의 방법(Somogyi, 1952)에 따라 환원당을 측정하였다.

Exocellobiohydrolase(EC 3.2.1.91)는 avicel 1%를 기질로 효소 반응시간만 1시간으로 하여 cellulase와 동일한 방법으로 활성을 측정하였다(Haggett, 1979). Cellulase와 exocellobiohydrolase의 1 unit는 효소액 1 m*l*가 1분 동안 기질과 반응하여 1 μmole의 glucose를 생성하는 활성으로 하였다.

β-glucosidase(EC 3.2.1.21)는 5 mM PNPG (P-nitrophenol-β-glucopyranoside) 0.5 m*l*와 5 mM $MgCl_2$를 포함하는 10 mM phosphate buffer (pH 6.5) 1.5 m*l*를 37℃에서 30분 반응시킨 후 1 M Na_2CO_3 2 m*l*를 더하고 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 1 unit는 효소액 1 m*l*가 1분 동안 PNPG와 반응하여 1 μmole의 PNP를 유리하는 활성으로 하였다(Han and Srinivasan, 1969).

세포벽의 분리추출 및 peptidoglycan의 amino acid type 결정

세포벽의 추출과 peptidoglycan의 amino acid 결정은 Schleifer와 Kandler(1972)의 방법을 사용하였다. thin layer chromatography를 행할 때 사용한 전개용매는 isopropanol과 acetic acid와 H_2O(75 : 10 : 15 v/v)였다(Haper and Davis, 1979).

결과 및 고찰

돌연변이주의 분리

C. bibula 균주의 NTG 처리에 의해 arginine 요구성 변이주를 얻었고, cellulose 분해에 관계하는 효소인 cellulase와 exocellobiohydrolase 활성을 비교하였다(Table 1). 이 중 효소활성이 증가된 54번 변이주를 100 μg/m*l*의 neomycin이 첨가된 CC 평판배지에 도말하여 항생물질 내성이 있는 균주를 얻었으며 본 연구실에서 분리했던 *C. flavigena* 23 (Ade^-, Km^r)와의 원형질체 융합 실험에 모균주로 사용하였다.

*C. bibula*의 원형질체 형성 및 세포벽 재생

*C. bibula*의 원형질체 형성에 있어 삼투압 안정제의 종류 및 농도의 효과를 삼투압 감도 상대치에 의해 알아보았다(Fig. 1). 삼투압 안정제로는 0.5 M Sorbitol이 최적이었다. 같은 *Cellulomonas* 속 균주인 *C. flavigena*는 0.4 M sorbitol이(배와 조, 1988)

Table 1. *Mutants derived from cellulomonas bibula NCIB 8142 and enzyme activity of mutants*

Strains	Nutritional requirement	Cellulase (unit/ml)	Exocellobiohydrolase(unit/ml)	Reducing sugar(umole/ml)
Wild		89	3.15	1582
Mutants				
4	Arg^-	63	3.51	2838
35	Arg^-	84	.24	1431
36	Arg^-	115	6.05	3220
38	Arg^-	71	3.57	3380
46	Arg^-	77	3.27	3059
47	Arg^-	59	6.97	2919
54	Arg^-	102	12.86	2673
62	Arg^-	62	9.20	3401

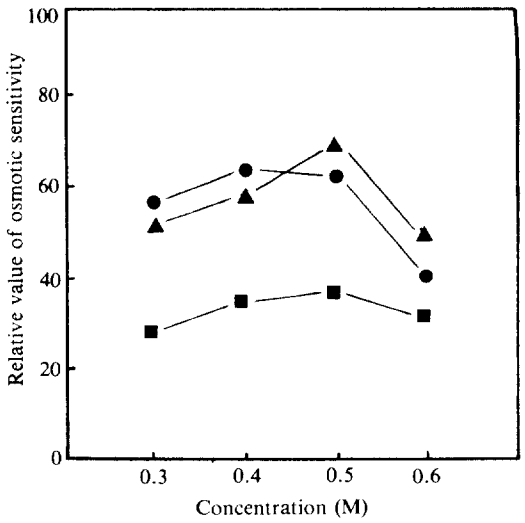

Fig. 1. *Effect of concentration of osmotic stabilizers on protoplast formation of Cellulomonas bibula.*

●–● : Mannitol ▲–▲ : sorbitol

■–■ : Sucrose

Relative value of osmotic censitivity $= \frac{A-B}{A} \times 100$

A: Absorbance when cell suspension treated by lysozyme was diluted in hypertonic solution at the ratio 1 to 5.

B: Absorbance when cell suspension treated by lysozyme was diluted in 0.8% saline solution at the ratio 1 to 5 for osmotic shock.

*B. subtilis*는 0.5 M sucrose (Schaeffer *et al.*, 1976)가 삼투압 안정제로 사용되었다.

삼투 충격을 준 후 남은 삼투 내성 균체수를 세어 얻은 원형질체 형성률은 (Akamatsu and Sekiguchi, 1981) *C. flavigena* 23과 *C. bibula* 54 모두 99.9%였고, RCM 상에서 재생빈도는 *C. flavigena* 23은 5.56%였고 *C. bibula* 54는 6.66%였다 (Table 2).

Table 2. *Protoplast formation and regeneration*

	Strain	Frequency(%)
The rate of protoplast formation	*C. flavigena* 23 (Ade^- Km^r)	99.9
	C. bibula 54 (Arg^- Neo^r)	99.9
Regeneration frequency	*C. flavigena* 23 (Ade^- Km^r)	5.56
	C. bibula 54 (Arg^- Neo^r)	6.66

The rate of protoplast formation $= \frac{A-B}{A} \times 100$ (%)

A: number of protoplasts

B: number of osmotic resistant cells in plate after osmotic shock

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

A: number of protoplasts

B: number of regenerated cells on the regeneration medium

C: number of osmotic resistant cells in plate after osmtic shock

원형질체 형성 및 세포벽 재생은 SEM 관찰을 통해 확인하였다. *C. bibula*의 정상세포는 간상으로 (Fig. 2A), lysozyme 처리에 의해 세포벽이 분해되면 구형의 원형질체 (Fig. 2B)가 형성되고 이를 다시 재생배지에서 재생시키면 재생된 세포는 정상세포와 같은 간상을 나타내었다 (Fig. 2C).

원형질체 융합

C. bibula 54와 *C. flavigena* 23 간의 융합빈도는 5×10^{-4}으로 이는 이들 영양요구주의 reversion frequency인 2×10^{-9}과 1×10^{-9}에 비해 훨씬 높은 빈도로 균주의 reversion에 의한 것이 아님을 알 수 있다 (Table 3). 이 융합빈도는 *C. flavigena*와 CS1-1 간의 융합빈도인 $2\text{-}4\times10^{-4}$ (배와 조, 1988)과 비슷하며, coryne형 세균에서는 $10^{-4}\text{-}10^{-6}$으로 보고되었다 (김 등, 1985; 신 등, 1984). PEG 처리 후 두 원형질체간의 융합은 SEM으로 관찰하였는데 (Fig. 2D), 융합 원형질체는 비융합 원형질체보다 크기가 월등히 크다.

융합체의 유전적 안정성

융합체의 유전적 안정성은 400개 이상의 집락을 완전배지와 최소배지상에 replica 하여 조사하였으며 (이와 김, 1988) 그 결과는 Table 4에 나타내었다. 자연 형질 분리기 일어난 영양요구주의 비율은 7번, 8번 융합체를 제외하고는 0-0.39%로 융합체는 비교적 안정하였다.

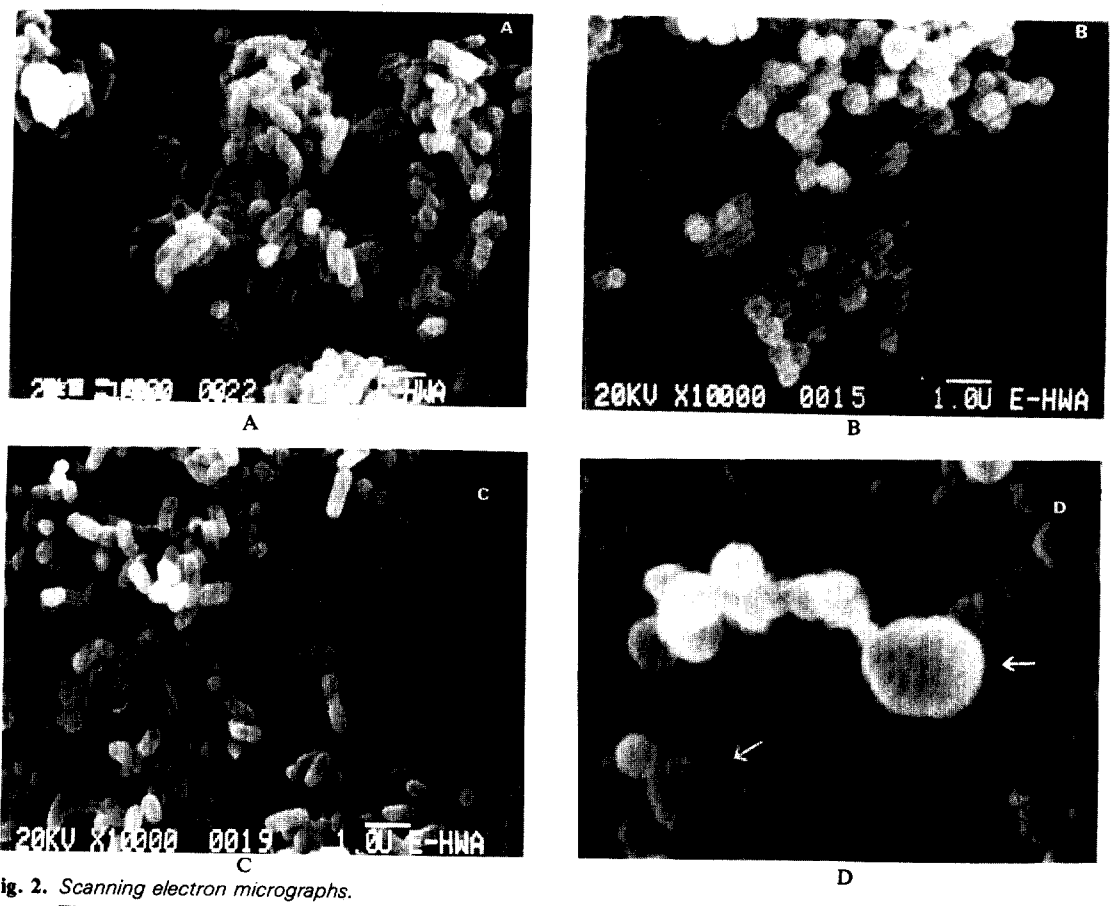

Fig. 2. *Scanning electron micrographs.*
The photographs were taken magnification of 10,000X
A. Intact cells of *Cellulomonas bibula*
B. Protoplasted cells of *C. bibula*
C. Regenerated cells of *C. bibula*
D. Micrographs of interspecific protoplast fusion. Fused protoplast after PEG treatment.

Table 3. *Fusion frequency and reversion frequency of auxotrophic mutants*

	Strains		Frequency
Fusion frequency	C. flavigena 23 × C. bibula 54 (Ade⁻ Km^r × Arg⁻ Neo^r)		5×10^{-4}
Reversion frequency	C. flavigena 23	(Ade⁻ Km^r)	1×10^{-9}
	C. bibula 54	(Arg⁻ Neo^r)	2×10^{-9}

$$\text{Fusion frequency} = \frac{\text{number of regenerated cells on FCM}}{\text{number of regenerated cells on RCM}}$$

RCM; regeneration complete agar medium
FCM; regeneration complete agar medium containing antibiotics

Table 4. *Genetic stability of fusants*

Strains	Colonies on CC	Colonies on MM	Auxotrophs (Segregants %)
Fusant 2	456	455	0.22
4	378	378	0
5	498	498	0
6	408	407	0.25
7	408	402	1.47
8	571	457	19.96
9	497	497	0
11	510	508	0.39
12	749	747	0.27
13	443	442	0.23

CC; complete medium, MM; minimal medium

Table 5. *Enzyme activity of mutants and fusants*

Strains	Enzyme activity (unit/ml)				Reducing sugar (umole/ml)
	Cellulase Extracellular	Exocellobiohydrolase Extracellular	β glucosidase Intact cell	β glucosidase Extracellular	
Wild					
C. flavigena	93	7.18		3.33	2180
C. bibula	89	3.15		0.31	1582
Mutants					
C. flavigena 23	0	13.25	6.81	3.42	54
C. bibula 54	103	12.86	8.42	0.18	3154
Fusants					
1	0	13.42	7.05	2.00	72
2	162	12.96	8.62	0.40	2231
3	0	14.36	7.01	1.78	48
4	0	13.11	7.71	3.03	42
5	0	11.60	6.06	2.62	98
6	152	22.55	8.62	0.76	2779
7	0	9.26	6.80	3.61	226
8	0	12.49	5.44	2.69	77
9	188	25.30	15.37	2.21	2926
10	0	12.32	6.49	3.15	83
11	105	15.33	12.93	0.36	3124
12	133	18.18	9.37	0.21	3556
13	175	22.14	8.80	0.31	2614

효소 활성

야생형 균주와 돌연변이주, 융합체 각각의 cellulase, exocellobiohydrolase, β-glucosidase 활성을 측정하여 Table 5에 나타내었다. Cellulase의 경우 융합의 모균주인 *C. flavigena* 23은 돌연변이 유발 과정에서 그 활성을 잃었고 *C. bibula* 54는 활성단위가 103이며 융합체 중 9번은 188, 13번은 175로 야생형보다 2배 활성이 증가된 융합체를 얻을 수 있었다. Exocellobiolhydrolase에 대해 융합체 6번, 9번은 야생형 *C. flavigena*보다는 3배 *C. bibula*보다는 8배 변이주인 모균주보다는 2배 활성이 증가된 융합체를 얻을 수 있었다. β-glucosidase의 세포에서의 위치는 균종에 따라 다르나(Stoppok *et al.*, 1982) *C. flavigena* 23에서 위치별로 역가를 측정해보면 Table 6과 같고 intact cell에서 그 활성이 가장 높다. β-glucosidase의 세포외 효소활성은 야생형 균주와 융합체 중 높은 역가를 나타내는 균주와 비슷했으나 intact cell에서는 모균주와 비교하여 2배 정도 활성이 증가된 융합체를 얻을 수 있었다.

이상에서처럼 야생형 균주나 모균주보다 효소 활성이 증가된 융합체의 선별은 원형질체 융합을 통한 균주 개량의 가능성을 말해준다.

Table 6. *Cellular distribution of β-glucosidase from C. flavigena 23*

Distribution	β-glucosidase activity (unit/ml)
Extracellular	3.42
Intracellular (supernatant after sonication)	1.13
Intact cell (cell suspension before sonication)	6.81

Peptidoglycan의 amino acid type

Cellulomonas 속 균주의 peptidoglycan의 아미노산에는 alanine-glutamic acid-ornithine-alanine이 있고 세번째 ornithine과 다른 tetrapeptide의 네번째 alanine을 연결해 주는 interbridge로 *C. flavigena* 종만 aspartic acid를 갖고 *Cellulomonas* 속의 다른 균주들은 glutamic acid를 갖

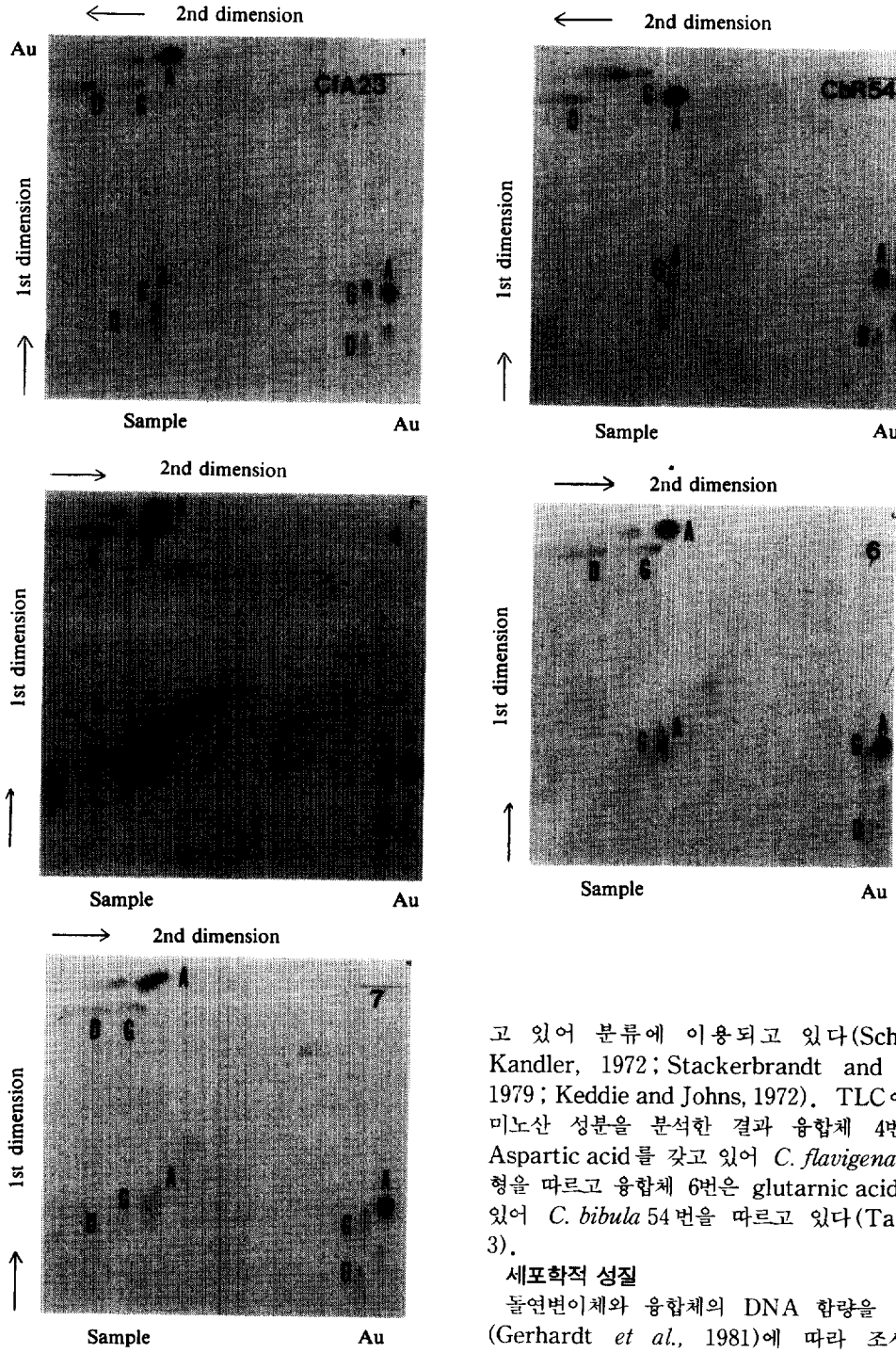

Fig. 3. *Two dimensional chromatograms of amino acids of cell wall peptidoglycan of mutants and fusants*
CfA23: C. flavigena 23, CbR54: C. bibula 54, 4: Fusant 4, 6: Fusant 6, 7: Fusant 7, Au: Authentic, A: Alanine, G: Glutamic acid, D: Aspartic acid

고 있어 분류에 이용되고 있다(Schleifer and Kandler, 1972; Stackerbrandt and Kandler, 1979; Keddie and Johns, 1972). TLC에 의해 아미노산 성분을 분석한 결과 융합체 4번과 7번은 Aspartic acid를 갖고 있어 *C. flavigena* 23 모균주형을 따르고 융합체 6번은 glutarnic acid만을 갖고 있어 *C. bibula* 54번을 따르고 있다(Table 7, Fig. 3).

세포학적 성질

돌연변이체와 융합체의 DNA 함량을 Burton법(Gerhardt *et al.*, 1981)에 따라 조사하였으며(Table 8) 융합체의 DNA 함량은 다소 증가한 경우도 있으나 효모(최 등, 1988; 이와 김, 1988)나 곰팡이(Chung *et al.*, 1988)에서처럼 이배체 상태로 존재하는 것은 볼 수 없었다.

Table 7. *Cell well amino acid analysis for mutants and fusants*

Strains	Amino acid present in cell walls			Peptidoglycan type
	Alanine	Glutamic acid	Aspartic acid	
Mutants				
C. flavigena 23	+	+	+	D-Asp
C. bibula 54	+	+	–	D-Glu
Fusants				
4	+	+	+	D-Asp
5	+	+	–	D-Glu
7		+	+	*D-Asp*

D-Asp: D-Aspartic acid, D-Glu: D-Glutamic acid

C. flavigena 균종은 운동성이 없고(Rocasa and Cummins, 1977) *C. bibula*는 운동성이 있다. 융합체에 대해서도 운동성을 조사하고 그외 모균주인 두 돌연변이주간에 차이가 있는 특성과 융합체의 특성을 비교하였다(Table 9). 융합체는 영양요구성과 항생물질 내성에 대해 서로 상보적인 형질이 보완된 재조합체였고 4번과 7번 균주는 cellulase 활성과 peptidoglycan type은 *C. flavigena* 23을 따르나 운동성은 *C. bibula* 54를 따르는 재조합체였다.

Table 8. *DNA contents in mutants and fusants*

Strains	DNA contents (fg/cell)	Relative DNA contents
C. flavigena 23	18.3	1.15
C. bibula 54	15.9	1.00
Fusant 1	19.0	1.19
2	15.8	0.99
3	19.9	1.25
4	19.5	1.23
5	18.5	1.16
6	16.8	1.06
7	17.1	1.07
8	19.1	1.20
9	15.9	1.00
10	16.5	1.04
11	17.9	1.13
13	18.7	1.18

DNA contents were determined in balanced growth at 30°C in rich medium

Table 9. *Genetic and cytological characterization of mutants and fusants*

strains	nutritional requirement		antibiotic resistance Km	Neo	cellulase (unit/ml)	peptidoglycan type	motility
Mutants							
C. flavigena 23	Ade⁻	Arg⁺	R	S	0	D-Asp	–
C. bibula 54	Ade⁺	Arg⁻	S	R	103	D-Glu	+
Fusants							
4	Ade⁺	Arg⁺	R	R	0	D-Asp	+
6	Ade⁺	Arg⁺	R	R	152	D-Glu	+
7	Ade⁺	Arg⁺	R	R	0	D-Asp	+

Km; Kanamicin, Neo; Neomycin, R; Resistant, S; Sensitive

적 요

섬유소를 분해할 수 있는 *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901과 *Cellulomonas bibula* NCIB 8142의 종간 원형질체 융합을 하고 그로부터 얻은 융합체의 특성을 조사하였다. *C. bibula*의 원형질체는 lysozyme(600 μg/ml)를 6시간 처리하여 얻었으며, 삼투안정제로는 0.5M sorbitol의 최적이었고 원형질체 재생률은 6.7%였다. 원형질체 융합은 25mM $CaCl_2$를 포함하는 40% PEG (M.W. 6000)를 30℃에서 30분간 처리함으로 수행하였고 *C. bibula*와 *C. flavigena*의 융합 빈도는 5×10^{-4}으로 원형질체 형성 및 세포벽 재생과 융합과정은 주사전자현미경으로 관찰하였다. Cellulase, exocellobiohydrolase, β-glucosidase 활성이 증가된 융합체를 얻었고, 모균주와 융합체의 영양요구성, 항생물질 내성, 효소활성, 세포벽 성분, 운동성 등을 비교하여 융합체는 모균주의 재조합체임을 밝히었다.

사 사

본 논문은 1989년 이화여자대학교 교수연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사하고, 본 연구에 세균균주를 제공해준 한국과학기술원 유전공학센터 고영희 박사께 감사드립니다.

참고문헌

1. **김종헌, 임번삼, 이세영, 전문진**, 1985. Coryne형 세균의 원형질체 융합 빈도 향상, 한국미생물학회지, **23**, 190-196.
2. **배 무, 김병홍**, 1974. 농산폐자원의 이용에 관한 연구(제2보), 섬유소 자화세균의 분리 및 동정, 한국산업미생물학회지, **2**, 1-7.
3. **배 무, 조보연**, 1988. *Cellulomonas* 속 원형질체 재생과 종간 융합조건, 한국산업미생물학회지, **16**, 303-309.
4. **이은주, 배 무**, 1986. *Cellulomonas* 속 종간의 원형질체 조건의 차이에 대하여, 한국미생물학회지, **24**, 154-160.
5. **이종수, 김찬조**, 1988. *Saccharomyces cerevisiae* D-71과 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S의 세포융합으로 육성한 융합주의 특성, 한국산업미생물학회지, **16**, 297-302.
6. **최원기, 전순배, 이용규, 배 석, 이진종, 이 향**, 1988. Protoplast fusion of lactose assimilating yeasts, 한국미생물학회지, **26**, 188-196.
7. **Akamatsu, T. and J. Sekiguchi**, 1981. Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplasts, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2887-2894.
8. **Chung, K.C., C.R. Park, S. Bai, S.B. Chun, and K.C. Kim**, 1981. Isolation and characterization of intraspecific complementing fusants of *Penicillin verruculosum, Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **182-186.**
9. **Fitzgerald, G. and L.S. Williams**, 1975. Modified penicillin enrichment procedure for the selection of bacterial mutants, *J. Bacteriol.*, **122**, 345-346.
10. **Fodor, K. and L. Alfoldi**, 1976. Fusion of protoplast of *Bacillus megaterium, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2147-2150.
11. **Fodor, K., K. Rostas and L. Alfoldi**, 1979. Bacterial protoplasts and their possible use in bacterial genetics, In Advances in protoplasts research, Pergamon Press, 19-28.
12. **Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N., Costilow, E.W., Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips**, 1981. Manual of method for general bacteriology, *Amer. Soc. Microbiol.*, 224-242, 348-350.
13. **Gokhale, D.V., E.S. Han, V.R. Srinivasant and D.V. Deobagkar**, 1984. Transfer of DNA coding for cellulases from *Cellulomonas* species to *Bacillus subtilis* by protoplasts fusion, *Biotechnol. Lett.*, **6**, 627-632.
14. **Gotz, F., S. Ahrne and M. Lindberg**, 1981. Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in *Staphylococci, J. Bacteriol.*, **145**, 74-81.
15. **Haggett, K.D., P.P. Gray and N. W. Dunn**, 1979. Crystaline cellulose degradation by a strain of *Cellulomonas* and its mutant derivatives, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 183-190.
16. **Han, Y.W. and V.R. Srinivasan**, 1969. Purification and characterization of m-glucosidase of *Alcaligenes faecalis, J. Bacteriol.*, **100**, 1355-1363.
17. **Harper, J.J. and G.H.G. Davis**, 1979. Two-dimensional thin-layer chromatography for amino and analysis of bacterial cell walls, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **29**, 56-58.
18. **Keddie, R.M. and D. Jones**, 1972. Saprophytic, Aerobic Coryneform bacteria, In The prokaryotes, Springer-Verlag, 1838-1878.
19. **Kim, B.H. and H.J. Lee**, 1985. Genetic recombination by protoplast fusion of *Cellulomonas* sp. CS1-1, *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 309-314.
20. **Kim, B.H. and J.W.T. Wimpenny**, 1981. Growth and cellulolytic activity of *Cellulomonas flavigena, Can. J. Microbiol.*, **27**, 1260-1266.
21. **Rocosa, M., C.S. Cummins, R.A. Lelliott and R.M. Keddie**, 1977. Bergey's manual of determinative bacteriology 8th, The Williams and Wilkins company, Balimor, 599-631.
22. **Schaeffer, B. Cami and R.D. Hotchkiss**, 1976. Fusion of bacterial protoplast, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **73**, 2151-2154.
23. **Schleifer, K.H. and O. Kandler**, 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407-477.
24. **Somogyi, M.**, 1952. Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-28.
25. **Song, E.K. and Y.H. Park**, 1987. A study on optimal conditions for protoplast formation and regeneration of *Streptomyces cattleya, Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 61-67.
26. **Stackerbrandt, E. and O. Kandler**, 1979. Taxonomy of the genus *Cellulomonas*, Based on phenotypic characters and deoxyribonucleic acid-deoxiribonucleic acid homology and proposal of seven neotype strains, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **29**, 273-283.
27. **Stoppok, W., P. Rapp and F. Wagner**, 1982. Formation, location and regulation of endo-1,4-β-Glucanases and β-Glucosidases from *Cellulomonas uda, Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 53.
28. **Thayer, D., S.V. Lowther and J.G. Phillips**, 1984. Cellulolytic activities of strains of the genus *Cellulomonas, Int. J. Syst. Bacteriol.*, **14**, 432-438.

(Received January 12, 1990)
(Accepted March 2, 1990)