

Flavimonas oryzihabitans KU21의 원형질체 생성, 재생 및 융합

이수연 · 임영복 · 박용근 · 이영록*

고려대학교 이과대학 생물학과 서울대학교 분자미생물학 연구센터

아닐린 분해균주 *Flavimonas oryzihabitans* KU21의 원형질체 생성, 재생, 그리고 융합 등의 최적 조건을 조사하였다. 세포를 37°C로 prewarming 시킨 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0) 완충액으로 현탁 시킨 후 0.5% volume 용량의 0.1 M EDTA와 100 µg/ml의 lysozyme으로 차례로 처리하였을 때 90% 이상 원형질체로 전환되었으며, 이때 효소처리는 37°C에서 진탕하지 않고 처리했을 때가 가장 효과적이었다. MgCl₂와 CaCl₂ 수용액은 원형질체의 안정성을 높였고 완충액에 0.8% BSA를 첨가함으로써 상온에서 4시간 까지 원형질체의 생존력을 80%까지 유지할 수 있었다. 원형질체의 재생은 overlaying 방법이 가장 효과적이어서 3.8%의 재생율을 보였다. Rich regeneration medium에 20 mM CaCl₂를 첨가하였을 때 재생율이 약 3.5배 증가하였고 완충액에 0.8% BSA를 첨가했을 때는 4.5배의 증가율을 나타내었다. 삼투안정제로 0.5 M sucrose를 첨가한 rich regeneration medium에서 *F. oryzihabitans*의 원형질체는 top plating하여 6시간 이후부터 재생되기 시작하여 11시간까지 80%의 재생이 이루어졌다. 융합원으로 40% PEG6000과 CaCl₂를 사용하여 *F. oryzihabitans*의 종내 원형질체 융합을 유도하였을 때 recombinants의 생성율은 $2.0 \times 10^{-5} \sim 3.6 \times 10^{-5}$ 이었으며 recombinants들은 여러 세대 후에도 분리되지 않고 안정하였다.

KEY WORDS □ *Flavimonas oryzihabitans*, spheroplast, regeneration, fusion

아닐린은 염색제, 디니트로 아닐린계의 제초제, 살충제, 화학약품의 제조에 있어서 원료 또는 중간대사 물질로 널리 이용되고 있는 방향족 화합물이다. 이러한 과정에서 환경에 유입되는 많은 양의 아닐린은 산화, 중화, 흡착 등의 여러 복잡한 반응을 거쳐 생물에 직·간접으로 유해한 아닐린 유도체인 azobenzene, triazone과 같은 recalcitrant 분자를 형성하여 난분해성 환경오염 물질이 되고 있다(13, 14). 자연계에는 아닐린을 분해하는 세균이 존재하며 *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Moraxella*속 등이 관여하는 것으로 알려졌다(12). 이들 미생물에 의한 분해는 인위적으로 난분해성 물질을 제거하고자 했을 때 가져올 수 있는 2차적 오염문제가 없다는 점에서 그 가치를 크게 인정받고 있다(8). 그러나 이들 분해균주의 대다수는 기질 농도가 일정수준 이상이 되면 생육이 거의 중단되고 균주의 특성에 따라 일정 기질만을 분해하는 성질을 갖기 때문에 여러가지 난분해성 유기화합물이 혼합되어 있는 실제 폐수에서 이를 정화하기 위해서는 고농도의 난분해성 물질에 대한 내성을 갖게 하든지 또는 여러 기질을 동시에 분해 할 수 있는 균주의 개량이 요구된다.

원형질체 융합 방법은 형질전환, 형질도입, 접합 등의 유전자 재조합 방법이 갖는 일반적인 한계요인에 제한받지 않으므로 세균류, 조류, 균류 등 넓은 범위에서 사용될 수 있으며(1), DNA 전달이 bidirectional하고 공여세포의 전체 유전자군과 세포질이 수용세포로 함께 전달될 수 있어 특정 목적을 위한 균주의 개발, 균주의 생산성 향상과 같은 산업균주 개발에

효과적인 방법으로 알려져 있다. 또한 일반적인 유전자 재조합방법으로는 유전자 전달이 어려운 세균에서도 융합시키고자 하는 균주의 원형질체 형성과 형성된 원형질체의 정상 세포로의 재생이 원만하게 이루어 진다면 보다 간편한 실험방법과 적은 비용으로 유전자 재조합체를 얻을 수 있는 이점이 있다.

본 연구에서는 아닐린을 자화하는 능력을 갖는 *Flavimonas oryzihabitans*를 경기도 일원의 논 밭의 토양으로부터 분리 동정하였다. 아닐린 분해균주로 현재까지 여러속의 세균들이 보고된 바 있으나 *F. oryzihabitans*의 경우는 아직 보고된 바 없으며 본 연구가 처음이라 생각된다. *F. oryzihabitans*는 CDC Group Ve-2에 속하는 그람 음성 간균으로(4) 현재 널리 사용되고 있는 유전자 재조합 방법인 형질전환, 접합 등과 같은 방법 뿐만 아니라 원형질체 융합 방법 또한 정립되어 있지 않은 상태이다. 원형질체 융합 방법은 다른 유전자 재조합 방법에 비해 염색체 재조합 빈도가 높고 플라스미드의 도입수단으로서도 이용할 수 있는 장점이 있으므로 원형질체 융합에 의해 보다 강력하고 다양한 탄화수소 자화균주를 개발하고자 우선 아닐린 분해균주인 *Flavimonas*의 원형질체 생성, 재생, 그리고 융합에 관한 기초 연구를 수행하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주들을 Table 1에 표시하였다.

Table 1. Bacterial strains and their characteristics.

Strain	Relevant Characteristics	Source
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>		
KU 21	Ani ⁺	This study
KU 21C	Ani ⁻ Cm ^r	Mutant induced from KU 21
KU 211	Ani ⁺ Trp ⁻	∕
KU 218	Ani ⁺ , His ⁻	∕
KU 2181	Ani ⁺ , His ⁻ , Sm ^r	∕
<i>Pseudomonas acidovorans</i> K 82	Ani ⁻ , Ap ^r , Sm ^r , Rif ^r	Kang <i>et al.</i> (10)

F. oryzihabitans KU21 was isolated from the soil of rice and crop fields around Kyunggi Province. *F. oryzihabitans* KU21C~KU2181 were mutant strains induced from KU21 with NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine). Ani, aniline; Cm, chloramphenicol; Sm, streptomycin; Ap, ampicillin; Rif, rifampicine; Trp, tryptophan; His, histidine.

균주의 배양에는 nutrient broth(NB)를 사용하였고, 원형질체의 재생을 위해서는 완전재생배지(RRM)로는 rich regeneration medium(nutrient broth, 8g; casamino acid, 0.05g; sucrose, 171g; CaCl₂, 2.9g; agar, 15 g/l) 을 사용하였다. Illing(9) 등의 배지를 다소 변형시킨 최소배지를 최소재생배지(MRM)로 사용하였다(glucose, 10.0g; MgSO₄·7H₂O, 0.05g; glutamic acid, 10.0g; K₂SO₄, 1.0g; CaCl₂·2H₂O, 2.9g; MOPS(0.1 M), 100 ml; sucrose, 200.0g; agar 15 g/l).

항생제 표지를 융합체 선별을 위한 유전적 지표로 사용한 경우는 완전재생배지에 클로람페니콜(Cm)은 100 µg/ml, 스트렙토마이신(Sm)은 50 µg/ml의 농도로 첨가하여 사용하였다.

아닐린 분해균주의 분리 및 동정

토양 시료 2g을 0.9% NaCl 용액 100 ml이 담긴 250 ml 플라스크에 넣고 30°C에서 1시간 동안 진탕 배양시킨 다음, 1시간 방치 후 상등액 1 ml을, 아닐린을 단일 탄소원으로 하는 최소액체배지(K₂HPO₄, 1g; KH₂PO₄, 1g; MgSO₄·7H₂O, 0.41g; CaCO₃, 0.02g; F₂SO₄·7H₂O, 0.05g; aniline, 1.0g; distilled water 1 l)에 접종하여 30°C에서 1주일간 진탕 배양(200 rpm/min)한 후 아닐린을 단일 탄소원으로 하는 한천 평판 배지에 각각 도말하여 2~3일간 배양하였다. 배양 후 단일 집락을 골라 여러번 순수 분리하였다. 선별된 세균에 대한 동정은 그람염색과 광학 현미경을 통한 형태적 특성 및 VITEK System(MacDonald Douglas Health System Company)에 의한 생화학적 특성에 따라 동정하였다.

원형질체의 생성

*Flavimonas*는 기존의 그람음성균의 원형질체 생성 방법으로는 원형질체의 생성이 어려워 Weiss(19)와 Lee and Lee(11)의 방법을 변형하여 사용하였다.

균주를 NB 10 ml에 하룻밤 전배양 한 후 배양액 0.5 ml을 새로운 NB 배지에 본 배양하여 580 nm에서 흡광도가 0.8~0.9 정도 되게 배양하였다. 배양액을

8,000 r.p.m(at room temperature)에서 10분간 원심 분리하여 세포를 수확한 후 세포 0.5g을 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0, prewarmed at 37°C) 12.5 ml에 현탁시킨 후 1 M sucrose를 첨가한 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)을 동량 처리하였다. 이 세포 현탁액에 0.5% volume(v/v)의 0.1 M EDTA(pH 7.6)와 lysozyme(100 µg/ml)을 넣은 후 증류수(prewarmed at 37°C)로 2배 희석하여 37°C에서 30분간 정치배양하여 원형질체를 생성시켰다. 생성된 원형질체는 MgCl₂ (최종농도 20 mM)을 첨가하여 안정화시켰다. 원형질체를 생성시킨 후 원형질체를 현탁시키고 희석하는데는 10 mM Tris-HCl 완충용액에 20 mM MgCl₂, 0.5 M sucrose 그리고 0.8% BSA가 첨가된 spheroplasting buffer를 사용하였다.

원형질체의 생성율은 osmotic sensitivity와 nutrient agar 평판배지에서 성장하는 장상세포수를 총 세포수에서 뺀수로 산출하였다. Osmotic sensitivity는 원형질체 현탁액과 증류수의 비율을 1:5로 혼합하여 580 nm에서의 흡광도를 측정하여 정상세포의 흡광도에 대한 감소율을 %로 표시하여 osmotic sensitivity를 결정하였다.

원형질체의 생존력

생성된 원형질체 1 ml의 현탁액에 fluorescein diacetate(stock solution, 1 mg ml⁻¹ in acetone) 20 µl와 propidium iodine(stock solution, 1 mg ml⁻¹ in D.W.) 2 µl를 첨가하여 10분간 원형질체를 형광 생체 염색을 한 후 형광 현미경으로 관찰하였다(9).

원형질체의 전자현미경적 관찰

EDTA와 lysozyme을 처리하여 생성시킨 *Flavimonas* 원형질체 혼합액을 0.5 M sucrose와 20 mM MgCl₂를 포함하고 있는 0.2 M cacodylate 완충액(pH 6.2)에 녹인 1% glutaraldehyde로 절고정한 다음(6), 3회 세척한 후 1% OsO₄로 후고정하였다. 고정된 시료를 재 세척한 다음 아세톤으로 탈수하고 Epon으로 포매하였다. 시료를 LKB 2088 Ultratome으로 절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 염

색하여(16) 전자현미경으로 관찰하였다.

원형질체의 재생과 융합

EDTA와 lysozyme을 처리하여 생성된 원형질체를 원심분리한 후, 침전된 원형질체를 spheroplasting buffer로 재현탁하고 회석하였다. 회석한 원형질체 현탁액 0.1 ml을 재생배지 top agar에 넣어 동일한 조성을 지닌 평판배지에 top plating 한 후 RRM은 4~5일간 중층배양하였고, MRM은 8~10일간 중층 배양 하였다. 재생율은 생성된 원형질체에 대한 재생된 클로니 수를 100분율로 표시하였다.

원형질체의 융합방법은 Schaeffer 등(17)의 방법을 따랐다. EDTA와 lysozyme 처리에 의해 원형질체로 변형된 두 균주를 각각 1 ml씩 섞은 후 원심분리하여 얻어진 침전물을 0.5 M sucrose와 20 mM MgCl₂를 포함하고 있는 Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 0.2 ml로 재현탁한 후 40%(w/v) PEG 6000을 1.8 ml 첨가하여 10분간 처리하여 원형질체를 융합시켰다. 융합체의 선별을 유도시킨 원형질체 혼합액을 융합체만이 생장할 수 있는 항생제가 첨가된 rich regeneration medium 선택 배지에서 4~5일 중층배양 하였다. 그리고 융합을 위한 유전적 표지로 영양요구성을 사용했을 경우는 아미노산이 첨가되지 않은 최소재생 배지에서 8~10일간 중층배양하여 직접 융합체를 선별하였다. 융합율은 재생된 수에 대한 융합체의 수의 배율로 나타내었다.

결과 및 고찰

아닐린 분해균주의 분리 및 동정

경기도 일원에서 채취한 논밭의 토양으로부터 아닐린을 단일탄소원으로 이용하여 자랄 수 있는 세균을 분리해, 아닐린이 단일 탄소원으로 첨가된 한천 평판배지에서 생장이 비교적 좋은 균주를 1차 선별하였고, 이들 균주를 다시 아닐린을 단일 탄소원으로 하는 액체 최소배지에 접종하여 일정시간동안 배양한 후 이 배양액을 6,000 rpm 속도로 5분간 원심분리하여 세균을 침전시킨 후 상층액을 회수 한 뒤, spectrophotometer를 이용하여 280 nm에서 UV absorbance를 측정하여 분리한 세균의 상대적인 아닐린 분해능을 조사한 후 우량균주를 선별하여 KU21 ($\mu=0.19 \text{ h}^{-1}$ in 10.7 mM aniline minimal medium)로 명명하였다.

분리균주 KU21은 그람염색과 광학현미경하의 형태적 특성 및 VITEK system(MacDonald Douglass Health System Company)에 의한 생화학적 특성에 따라 동정한 결과 *Flavimonas oryzihabitans*로 밝혀졌으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다.

*Flavimonas oryzihabitans*의 원형질체 생성

*F. oryzihabitans*의 원형질체 생성을 위한 최적조건을 조사한 결과, *Flavimonas* 균주의 경우는 다른 그람음성균의 원형질체를 생성하기 위한 연구들(3, 11, 15, 19)과는 달리 세포를 수확한 후 현탁시키는 Tris-

Table 2. Characteristics of *Flavimonas oryzihabitans* KU 21.

Test	Result
Morphology	rod
Gram stain	-
Mortality	+
OF test	Oxidative
Growth at 42°C	-
Growth at 4°C	-
Esculin hydrolysis	-
Urease	+
Citrate as carbon source	+
Malonate	+
Tryptophan deaminase	-
H ₂ S formation	-
β -galactosidase	-
Arginine dehydrolyase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Acid production from	
Lactose	-
Maltose	-
Sucrose	-
Inositol	-
Adonitol	-
Rhamnose	-
Manitol	+
Raffinose	-
Xylose	+
Arabinose	+
Oxidase	-
Catalase	+
Fluorescence on King, Medium B	-
Acetamide hydrolysis	+

OF, oxidative and fermentative

HCl 완충용액의 농도와 사용하는 모든 완충용액의 온도가 매우 중요하였다. Tris-HCl 완충용액의 농도는 0.2 M이 가장 효과적이었는데, 높은 Tris-HCl 농도는 세포외막의 안정성을 파괴시켜 이로 인해 lysozyme이 펩티도글리칸층을 쉽게 침투 할 수 있게 해주는 듯하다. 원형질체를 효과적으로 생성시키는 lysozyme의 최적농도는 50~100 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며 그람음성균의 원형질체 생성에는 EDTA 처리가 중요하기 때문에 농도별로 EDTA를 처리하여 그 효과를 조사한 결과 EDTA 농도에는 그리 큰 차이를 보이지 않았다. 효소처리시의 온도와 처리방법은 37°C에서 진탕하지 않고 효소처리를 할 때가 가장 효과적이었다 (Table 3).

원형질체의 전자 현미경적 관찰

EDTA와 lysozyme을 처리하여 생성된 *Flavimonas*의 원형질체를 전자현미경으로 관찰하였다(Fig. 1). *F. oryzihabitans*의 외층막은 거의 100% 제거된 세포에서 외층막이 절단되어 벗겨지지 시작하는 세

Table 3. Effect of various environmental conditions on the spheroplasts formation of *F. oryzae*.

Lysozyme (μg/ml)	Osmotic sensitivity(%)	EDTA (mM)	Osmotic sensitivity(%)	Tris-HCl (mM)	Osmotic sensitivity(%)	Temp. (°C)	Osmotic sensitivity(%)
20	42.68	10	84.04	10	61.12	0 S	76.47
50	85.82	20	84.87	20	68.42	US	82.35
100	85.82	50	69.11	50	65.63	30 S	71.41
150	80.85	80	83.70	100	71.46	US	82.35
200	80.95	100	83.16	200	82.58	37 S	61.91
300	71.43	200	83.78	300	80.02	US	82.82

*, The conversion rate of cells to spheroplasts was assayed by osmotic sensitivity. To detect the osmotic shock, 5 ml of D.W. was added to 1 ml of the spheroplast suspension. The light absorption of the samples was detected at 580 nm.

Osmotic sensitivity was detected as percent decrease in turbidity. S, shaking; US, unshaking.



Fig. 1. Thin section of EDTA-lysozyme treated spheroplast of *F. oryzae* KU21.

포까지 그 정도가 다양하였다. 외층막이 완전히 제거되지 않고 세포막에 남아있는 형태는 *E. coli*의 원형질체(2), *P. alcalifaciens*의 원형질체(3) 그리고 *Mycobacteria*의 원형질체(15)에서도 관찰된 바 있다. 특히 *P. alcalifaciens*에서는 원형질체의 외층막이 15% 정도만이 벗겨졌는 데도 원형질체의 융합이 이루어지는 것으로 미루어, 외층막이 100% 제거되지 않아도 융합이 일어나며 다만 제거된 정도는 융합율에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

원형질체의 안정성과 재생

원형질체를 안정화시킨다고 보고된 여러가지 화학 물질들중(18) 몇 가지에 대하여 이들이 *F. oryzae*의 원형질체에 미치는 영향을 조사하였다 (Table 4). 세균의 원형질체에 대해 삼투안정제로 널리 사용되고 있는 0.5 M sucrose 용액과 중류수를 대조군으로 하였을 때 0.2 M CaCl₂, 0.2 M MgCl₂ 수용액이 원형질체의 안정화에 가장 효과적이었다. 본 연구에서는 *F. oryzae*의 원형질체를 안정화시키기 위하여 재생배지에 0.5 M sucrose와 20 mM CaCl₂를 함께 첨가하여 사용하였다. CaCl₂를 첨가하지 않았을 때보다 재생배지에 CaCl₂를 첨가했을 때 재생율이 약 3.5배 증가하였다(Table 5). 재생배지에 gelatin을 첨가함으로써 재생율이 약간 증가하

Table 4. Stability of spheroplasts in various solution.

Solution	Optical density ^a
D.W.	0.02
0.5 M Sucrose	0.23
0.02 M CaCl ₂	0.23
0.001 M CaCl ₂	0.17
0.02 M MgCl ₂	0.23
0.001 M MgCl ₂	0.17
0.01 M KCl	0.04
0.01 M NaCl	0.03
0.01 M Lysine	0.01
0.01 M NH ₄ Cl	0.04
Control ^b	0.24

^aTo investigate spheroplasts stability, spheroplast samples (1 ml) were added to 5 ml of the solution indicated and then detected optical density at 580 nm.

^bNormal cell (1 ml) was added to D.W. 5 ml and then optical density was detected.

였고, 원형질체 생성과 회색에 사용되는 완충액에 BSA(bovine serum albumine)을 첨가함으로써 원형질체의 재생율 4.5배 정도 높일 수 있었다. 그러나 재생배지에 직접 BSA를 첨가한 실험군에서의 재생율은 BSA를 첨가하지 않았을 때와 거의 같은 수준이었다. 이와같은 결과는 BSA가 원형질체 재생시 부수적으로 필요한 영양물질로 제공되는 것이 아니라 원형질체를 생성하고, 재생, 그리고 융합시키는 과정 동안 원형질체가 받게되는 기계적 상해 효과를 감소시켜 주는 안정화 물질로서 작용하는 것임을 시사해 준다.

원형질체의 생존력

본 연구에서는 0.8% BSA를 원형질체 완충액에 첨가 하여 이것이 *F. oryzae* KU21 균주의 원형질체 생존력에 얼마나 큰 기여를 하는지를 FDA (fluorescein diacetate) 염색법으로 조사하였다.

FDA 분자는 원형질막을 자유로이 통과하지만 살아있는 원형질체나 세포에서만은 esterase에 의하여

Table 5. Effect of BSA, gelatin, and divalent-cation on the regeneration of *Flavimonas spheroplasts*.

	Concentration of BSA				
	None	0.1%	0.5%	0.8%	1.0%
RRM	1.02×10^7	2.21×10^7	3.80×10^7	4.43×10^7	4.43×10^7
RRM + 20 mM CaCl ₂	3.57×10^7	3.01×10^7	4.42×10^7	5.52×10^7	5.72×10^7
RRM + 0.5% Gelatin	1.23×10^7	4.55×10^7	4.07×10^7	6.32×10^7	6.23×10^7
RRM + 1.0% BSA	1.12×10^7	1.48×10^7	2.90×10^7	5.07×10^7	6.80×10^7

"regenerated cell number.

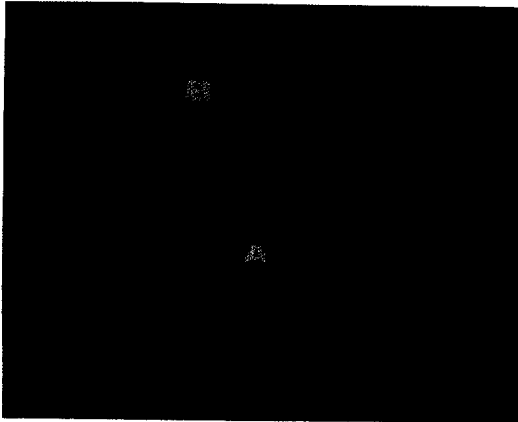


Fig. 2. The FDA staining of *Flavimonas spheroplasts* to assess spheroplasts viability. Viable spheroplasts had a green fluorescence (A) and non-viable spheroplasts were red (B).

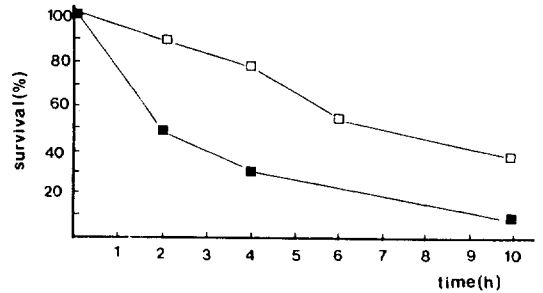


Fig. 3. Comparison of the loss of spheroplast viability in spheroplasting solution with (□) and without (■) 0.8% BSA.

Spheroplasts of *F. oryzae* KU21 lost viability quite rapidly when held in spheroplasting solution at room temperature. Addition of 0.8% BSA to spheroplasting solution improved the stabilization of spheroplasts over extended period (4~6 hr) and thus improved regeneration frequencies.

분자가 파괴된다. 파괴되면 형광체를 방출하는데, 이것은 손상되지 않은 막을 가진 원형질체 내에서만 머무르게 된다. 축적된 형광체가 형광을 발하므로 형광 현미경하에서 살아있는 원형질체는 초록색으로 관찰이 된다(Fig. 2). 그 결과 BSA를 첨가하지 않은 완충액으로 원형질체를 현탁시켰을 때는 매우 급격하게 생존력이 감소하였으나, 0.8% BSA를 첨가한 대조구에서는 상온에서 약 4시간까지 약 80%의 원형질체가 안정하였다(Fig. 3). 그러나, BSA를 RRM 재생배지에 첨가하였을 때는 재생율을 증가시키지 못했다(Table 5). 즉, BSA는 재생에 필요한 부수적 영양물질로 작용하므로 원형질체의 재생을 증가시키는 것이 아니라 원형질체의 생존력을 유지시켜 줌으로써 그만큼 원형질체의 재생율을 증가시키는 것으로 생각된다. 이와같은 결과는 Illing(9) 등의 결과와도 일치하며 Illing(9) 등은 완충액에 1% BSA를 첨가함으로써 *Streptomyces* 원형질체가 상온에서 6시간까지 원형질체의 75% 정도가 안정한 것을 관찰한 바 있다. 그러므로 본 실험에서는 원형질체를 형성시킨 후에는 원형질체 완충액에 0.8% BSA를 첨가하여 사용하였다. 그러나, 본 실험에서 사용한 형광 생체 염색법에 의하면 원형질체의 80%가 상온에서 4시간

까지 안정하게 생존하였으나 이렇게 높은 생존력은 배지상에서 직접 재생시켜 결정하는 재생율로는 나타나지는 않았다. 형광 생체 염색에 의한 원형질체의 생존력과 재생배지상에서의 재생 사이에는 큰 차이를 보이고 있는데(Table 6), 이 이유는 아직 확실치 않으며 좀더 연구를 계속하여야 할 것이다.

Kinetics of spheroplasts regeneration

원형질체는 정상세포와는 달리 Brij-58와 같은 non-ionic detergent에 매우 민감한(4, 7) 성질을 이용하여 *Flavimonas* 원형질체가 재생되는데 걸리는 시간을 측정하였다. EDTA-lysozyme 방법으로 원형질체를 생성시킨 후 적당하게 희석하여 재생배지에 도말하였다. 이것을 30°C에서 배양하면서 1시간 간격으로 1 ml의 0.1% Brij-58을 조심스럽게 overlay 한후 다시 재배양 시켰다. 세포벽이 재생 되지 않은 원형질체는 Brij-58에 노출되었을 경우 죽어버리게 되므로 Brij-58에 대한 민감성을 잃게되는 시간을 원형질체의 세포벽이 재생되는 시간으로 생각할 수 있다. 이러한 방법으로 *Flavimonas* 원형질체가 재생되는 시간을 측정할 결과 *F. oryzae* KU21 원형질체는 top plating 한후 6시간 이후부터 재생되기 시

Table 6. Effect of regeneration technique on regeneration of *F. oryzihabitans* spheroplasts.

EDTA-lysozyme incubation time (min)	Spheroplast ^a formation frequency (%)	Regeneration frequency (%) ^b		
		spreading	overlayed ^c	embedding ^d
30	90.10	2.82%	3.80%	3.72%
60	99.92	0.47%	1.13%	1.34%
90	99.98	0.01%	0.68%	0.52%

^a. Spheroplast formation frequency was determined with the following equation, $100 \times [(\text{No. of input cell- No. of OR cell}) / (\text{No. of input cell})]$.

^b. Frequency of regeneration was determined with the following equation $\text{RF} (\%) = 100 \times [(\text{No. of regenerated cell- No. of OR cell}) / (\text{No. of input cell})]$.

^c. Spheroplast suspension was mixed in a test tube with the melted soft agar at 40°C and poured onto the surface of rich regeneration medium.

^d. Spheroplast suspension was placed on the surface of rich regeneration medium and then the melted soft agar at 40°C was poured and mixed with spheroplasts on the agar plate.

작하여 11시간까지 거의 80%의 재생이 이루어졌다 (Fig. 4). 그리고 *F. oryzihabitans*의 원형질체 재생은 overlaying 방법이 가장 효과적이었으며 재생율은 3.8%이었다 (Table 6).

원형질체의 융합

항생제 내성과 영양요구성을 융합체 선별을 위한 유전적 표지로 사용하기 위해 *F. oryzihabitans* KU21을 NTG 처리하여 돌연변이주를 얻은뒤, 이를 종내 원형질체 융합을 위한 균주로 사용하였다 (Table 1). 융합(fusogenic agent)으로 40% PEG6000과 CaCl₂를 사용하여 상온에서 10분간 처리한 후 융합체만이 성장할 수 있는 선택재배매지에서 직접 융합체를 선별했을 때 recombinants의 생성율은 $2.0 \times 10^{-5} \sim 3.6 \times$

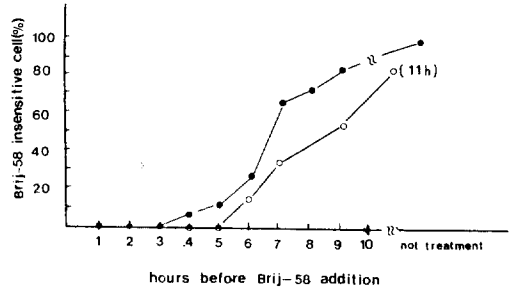


Fig. 4. Spheroplast regeneration as measured by insensitivity to Brij-58.

Spheroplasts are sensitive to nonionic detergents such as Brij-58, whereas intact cells are not. Suitable dilution of the spheroplast suspension was spread on plates of rich regeneration media and incubated at 30°C. At 1 h intervals for 12 h, sets of four plates were overlayed with 1 ml of 0.1% Brij-58 in D.W. and reincubated at 30°C overnight.

The loss of sensitivity of spheroplasts to Brij-58 was taken to indicate regeneration, and the kinetics of this loss was taken to regeneration time. (●), regeneration of *Pseudomonas acidovorans* K82 spheroplasts; (○), regeneration of *Flavimonas oryzihabitans* KU21 spheroplasts.

10^{-5} 이었고, 직접선별법에 의해 선별된 융합체들은 후대에도 계속 안정하였다 (Table 7). 그러므로 본 연구에서 수행된 *Flavimonas*의 원형질체 융합 방법은 안정한 유전자 재조합체를 얻을 수 있는 효과적 방법이라고 생각된다. 따라서 이를 바탕으로 아닐린 분해균주 *Flavimonas*와 다른 방향족 세균과의 원형질체 융합을 통해 난분해성 방향족 화합물을 분해하는 능력이 보다 강력하고 다양한 균주를 개발한다면 공장 폐수나 농약등으로 오염된 자연환경을 정화하는데

Table 7. Properties of recombinants produced by spheroplast fusion of *F. oryzihabitans*.

Fusion	Phenotype	Selection marker	Frequency of recombinants formation	No. of tested colonies	Colonies growing in selective medium			
					Cm	Sm	Cm+Sm	MM
<i>F. oryzihabitans</i> KU21C	Cm ^r							
×		Cm ^r Sm ^r	3.6×10^{-5}	100	100	100	100	
<i>F. oryzihabitans</i> KU2181	Sm ^r His							
<i>F. oryzihabitans</i> KU211	Trp ⁻							
×		prototrophs	2.0×10^{-5}	100				100
<i>F. oryzihabitans</i> KU218	His							

크게 기여할 수 있으리라 생각된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구과제의 일부로 수행되었으며, 한국과학재단의 연구비 지원에 감사 드린다.

참 고 문 헌

1. Alföldi, L., 1982. Fusion of microbial protoplasts: Problems and perspectives, p. 59-77. In L. Alföldi (ed.), Genetic engineering of microorganisms for chemical. Plencem, New York.
2. Birdsell, B. and C.R. Cota-Robels, 1967. Production and ultra-structure of ethylenediamine-tetraacetate-lysozyme spheroplasts of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **93**, 427-437.
3. Coetzee, J.N., F.A. Sirgel, and L. Lecatsas, 1979. Genetic recombination in fused spheroplasts of *Providencia alcalifaciens*. *J. Gen. Microbiol.* **114**, 313-322.
4. Cosby, W.M., I.A. Casas, and W.J. Dobrogosz, 1988. Formation, regeneration, and transfection of *Lactobacillus plantarum* protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2599-2602.
5. Decker, C.F., G.L. Simon, and J.F. Keiser, 1991. *Flavimonas oryzihabitans* (*Pseudomonas oryzihabitans*, CDC Group Ve-2) bacteremia in the immunocompromised host. *Arch. Intern. Med.* **151**, 603-604.
6. Frehel, C., A.M. Lheritire, C. Sanchez-Rivas, and P. Scheffer, 1979. Electron microscopic study of *Bacillus subtilis* protoplast fusion. *J. Bacteriol.* **137**, 1354-1361.
7. Gruss, A. and R. Novick, 1986. Plasmid instability in regenerating protoplasts of *Staphylococcus aureus* is caused by aberrant cell division. *J. Bacteriol.* **165**, 878-883.
8. Heitkamp, M.A. and C.E. Cerniglia, 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oilfield. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1612-1614.
9. Illing, G.T., I.D. Normansell, and J.F. Peberdy, 1989. Protoplast isolation and regeneration in *Streptomyces calavuligerus*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2289-2297.
10. Kahng, H.Y., S.I. Kim, M.J. Woo, Y.K. Park, and Y.N. Lee, 1992. Isolation and characterization of aniline-degrading bacteria. *Kor. Jour. Microbiol.* **30**, 199-206.
11. Lee, J.S., M.R. Lee, and Y.N. Lee, 1989. Spheroplasts fusion of *Pseudomonas* spp. using plasmid as selection marker. *Kor. Jour. Microbiol.* **26**, 298-304.
12. Loidl, M., C.O. Hinteregger, G. Ditzelmüller, A. Ferschl, and F. Streichsbier, 1990. Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-born *Pseudomonas acidovorans* strains. *Arch. Microbiol.* **155**, 56-61.
13. Minard, R.D., S. Russel, and J.M. Ballay, 1977. Chemical transformation of 4-chloroaniline to a triazine in a bacterial culture medium. *J. Agric. Food. Chem.* **25**, 841-841.
14. Parris, G.E. 1980. Environmental and metabolic transformations of primary aromatic amines and related compounds. *Residue Rev.* **76**, 1-30.
15. Rastogi, N., H.L. David, and E. Rafidinarivo, 1983. Spheroplast fusion as a mode of genetic recombination in *Mycobacteria*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1227-1237.
16. Venable J.H. and R. Coggeshall, 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **25**, 407-408.
17. Schaeffer, P., B. Cami, and R. Hotchkiss, 1976. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2151-2155.
18. Tabor, C.W., 1982. Stabilization of protoplasts and spheroplasts by spermine and other polyamines. *J. Bacteriol.* **83**, 1101-1111.
19. Weiss, R.L., 1976. Protoplast formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **128**, 668-670.

(Received July 19, 1993)

(Accepted August 7, 1993)

ABSTRACT: Spheroplast Formation, Regeneration and Fusion of *Flavimonas oryzihabitans* KU 21

Lee, Soo-Youn, Young-Bock Lim, Yong-Keun Park, and Yung-Nok Lee*
(Department of Biology, College of Science, Korea University, Seoul 136-701,
and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University,
Seoul 151-742, Korea)

The optimal conditions for the formation, the regeneration, and the spheroplast fusion of *Flavimonas oryzihabitans* spheroplasts were investigated. Cells were transformed to spheroplasts effectively by treatment of 0.5% volume (v/v) of 0.1 M EDTA and 100 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme at 37°C for 30 min without shaking. Magnesium chloride and calcium chloride were effective on the stabilization of spheroplasts, and 20 mM calcium chloride in the rich regeneration medium improve the yield of regenerants as much as 3.5-fold. Addition of 0.8% bovine serum albumine (BSA) in dilution buffer for spheroplast formation improved the stabilization of spheroplasts over extended periods (4~6 hr) at room temperature, and thus increased the yield of recombinants to 4.5-fold. The spheroplast formation frequency and regeneration frequency of *F. oryzihabitans* strain was 90.10% and 3.80%, respectively. The first regenerated cell of *F. oryzihabitans* spheroplasts were appeared 6 hours after plating. By 11 hours after plating, 80% of spheroplasts were regenerated on the rich regeneration medium containing 0.5 M sucrose. The intraspecific spheroplast fusion of *F. oryzihabitans* was carried out and the properties of obtained fusants were investigated. Formation of fusion products was effective when the *Flavimonas* spheroplast mixture was treated with 40%(w/v) PEG6000 and 20 mM CaCl_2 for 10 min at room temperature, and the formation of frequency of recombinants were $2.0 \times 10^{-5} \sim 3.6 \times 10^{-5}$. All tested recombinant clones were very stable on further propagation.