

Biopolymer 생산성 *Bacillus*속 균주의 세포융합과 융합주의 세포특성

김성호* · 임무현

대구대학교 식품공학과

초 록 : Biopolymer를 생산하는 *Bacillus subtilis* K-1과 유당 이용능이 있는 *Bacillus coagulans*를 융합시켜 획득된 융합주에 의해 생산된 biopolymer의 특성 변화, 생산성 향상의 연구의 일환으로 두균주의 융합을 시도하였고 융합주의 특성을 조사하였다. 원형질체 융합은 33% PEG(Mw. 6,000), 1% PVP, 10 mM CaCl₂이 함유된 fusion fluid(FF)에서 5분간 반응하였고, 항생제가 함유된 선별배지에 증충 후, 3일간 배양했을 때 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus coagulans* 변이주 들간의 융합빈도는 $4.6 \times 10^{-5} \sim 1.8 \times 10^{-7}$ 이었다. 융합주의 세포특성 검토에서 분리된 모든 융합주의 segregation 비는 1~6%로 나타나 유전적으로 안정하였고, 각 균주가 요구하는 영양 요구성 marker와 항생제의 함유배지에서 생육이 확인되었다. 주요 융합주의 DNA함량은 모균주보다 1.6~2.7배 높게 나타났다. 융합주의 전자현미경 관찰에서 두 모균주는 간상체로서 두꺼운 세포벽과 이중막을 확인할 수 있었고 원형질체 형성과정에서 팽윤된 세포에서 구형의 원형질체 방출이 이루어지고, 원형질체 융합과정 및 형성된 융합체에서 융합체내 전형적인 vesicle이 확인되었으며 모균주보다 큰 형태의 세포를 확인할 수 있었다.(1998년 12월 28일 접수, 1999년 1월 26일 수리)

서 론

미생물에 의한 biopolymer들 중 고분자peptide와 다당류는 미생물의 배양상, 생육상의 대사 산물로서 주로 capsule(협막)이나 slime(점질물)의 형태로 존재하는데, 이들은 바이러스의 감염이나 극한조건에서 자기 보호기능과 독성물질의 중화, 숙주의 탐식세포에 대한 저항성, 타 물체에 부착성을 갖는 것으로 알려져 있으며,^{1,2)} 특히 협막성 biopolymer는 병원성 미생물의 항원으로서의 특성으로 세균질병의 백신 개발에 이용되고 있다.^{3,4)}

미생물에 의한 biopolymer의 발효생산은 연속 배양기술에 의한 높은 생산성과 발효인자들의 조절 등에 따라 물성적인 성질, 순도, 종류 등을 다양하게 생산할 수 있으나 발효설비에 대한 경제성, 배양액에서의 미생물의 제거, 발효조내 교반 및 통기 등의 문제점도 있다.^{1,2)} 특히 발효의 효율성을 위하여 생산성 향상과 품질개선을 위한 균주의 개량 및 육종의 한 방법으로서 세포융합 등의 방법이 널리 이용되고 있으며,^{5,7)} 미생물 세포의 속, 종 과 자웅의 구별 없이 비 특이적인 융합과 유전조작이 어려운 미생물의 대부분의 genome이 전달되어 고빈도의 재조합체가 이루어지는 장점이 있다.^{8,9)} Kao 등⁹⁾이 식물세포 원형질체에 polyethylene glycol(PEG)과 CaCl₂를 가하면 융합주가 생긴다고 보고한 이후, fungi, 효모, *Bacillus*속, *Brevibacterium*속, *Streptomyces*속, 그리고 그람음성균에도 널리 응용되어 다양한 발효공업에 이용되고 있다.¹⁰⁻¹⁵⁾

대개 미생물이 생산하는 biopolymer는 분자상의 구조가 복잡하고 성질이 다양하여 특수한 용도로써 광범위하게 이용되고 있으며, 최근에는 생산수율, 화학적 구조와 물성학적

특성을 유전자 조작을 통한 독특한 기능을 가진 biopolymer를 생산하는 미생물의 균주 개발 연구가 이루어지고 있다.^{16,17)} 그러나 산업적으로 이용성이 높으며 유전 교환계가 알려지지 않은 biopolymer생산 세균에 대한 유전 조작은 복잡하고 고분자peptide와 다당류가 같이 함유된 복합 화합물의 biopolymer를 생산하는 *Bacillus*속 균주에 대한 유전 조작은 널리 알려지지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 조작이 간단 하면서 재조합 빈도가 높은 세포융합기술을 이용하여 biopolymer생산 미생물을 융합하여, 고 생산수율과 새로운 biopolymer를 개발하기 위하여 DNA유연성을 갖는 같은 *Bacillus*속의 선택으로 1) 융합주의 안정성, 2) biopolymer 생산에 다양한 기질의 이용성, 3) 융합주에 의해 생산된 biopolymer의 구성물질의 특성적 변화에 대한 기초연구로서 유당 이용능이 있는 *Bacillus coagulans*와 biopolymer 생산성의 *Bacillus subtilis* K-1을 선택하여 융합에 대한 일련의 조건을 조사하고 획득된 융합주의 세포특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

균주는 전보¹⁸⁾에서 사용된 gentamycin(Gm, 100 µg/ml)에 내성 및 arginine 요구성인 *Bacillus subtilis* SM-2 변이주와 kanamycin(Km, 100 µg/ml)에 내성인 *Bacillus coagulans* CM-12를 사용하였다.

배지

실험에 사용된 배지로서는 3% trypticase soy broth(TSB, pH 7.0)를 complete medium(CM)으로 사용하였고 minimal

찾는말 : *Bacillus subtilis*, 생체고분자물질, 원형질체, 세포재생, 융합
*연락처자

medium(MM)은 1% glucose, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.4% Na₂HPO₄·12H₂O, 0.05% NaCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.1 µg/ml biotin(pH 6.5)의 조성으로 supplementary medium (SM)은 MM에 각 돌연변이 균주의 요구물질들을 첨가하여 사용하였고, 세포의 재생에는 전보¹⁶⁾에서 조사된 3% trypticase soy broth(TSB), 0.4M sucrose, 0.7% casamino acid, 1.0% polyvinylpyrrolidone(PVP), 25 mM CaCl₂, 25 mM MgCl₂, 1.5% agar, pH 8.0의 regeneration growth medium(RGM)배지에 0.4% soft agar를 증충하여 사용하였으며, 융합주의 선별배지(fusant selection medium, FSM)는 RGM에 100 µg/ml kanamycin, 100 µg/ml gentamycin, 1.5% agar, pH 8.0의 조성으로 사용하였다.

용액

원형질체 형성과 재생에 사용된 용액으로 0.05M tris-maleate buffer(TM buffer, pH 7.0), 0.05 M phosphate buffer(PP buffer, pH 7.0), Dilution fluid(DF, 0.05 M TM buffer, 0.4 M sucrose, pH 7.0), Lysis fluid(LF, 0.05 M TM buffer, 0.4 M sucrose, 25~300 µg/ml lysozyme)를 이용하였고 원형질체 융합에는 fusion fluid(FF)(0.05 M DF, 33% PEG, 1% PVP, 10mM CaCl₂, pH 8.0)를 DNA함량 측정에는 Saline-EDTA(0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 7.0)와 Saline sodium citrate solution(SSC, 0.15 M NaCl, 0.015 M trisodium citrate, pH 7.0)을 사용하였다.

원형질체 형성

원형질체 형성은 *Bacillus subtilis* SM-2와 *Bacillus coagulans* CM-12를 MMYE 액체배지에서 대수 중기까지 배양 후 *Bacillus subtilis* SM-2는 penicillin G를 1.0 unit/ml를 단독으로, *Bacillus coagulans* CM-12는 penicillin G 0.3 unit/ml와 glycine 0.5%을 혼합 첨가 후 반응 후 원심 분리하여, 1/2용량의 DF에 현탁 시키고, lysozyme이 25 µg/µl과 300 µg/ml의 농도로 첨가된 2배 농도의 LF용액에 각각 첨가하여 37°C에서 각각 40분, 30분간씩 반응시켜 원형질체를 형성시킨 후, 세포융합에 이용하였다.

원형질체 융합

두균주의 원형질체를 각각 2.5 ml씩 혼합 후, 원심 분리하여 0.5 ml의 DF에 현탁하고, 4.5 ml의 fusion fluid용액(FF)을 첨가하여 37°C, 5분간 반응 후, 원심 분리하여 DF에 현탁한 후, 0.1 ml를 soft agar(0.4%)에 섞어 융합체 비선별 배지인 RGM과 융합체 선별배지(FSM)에 각각 증충하여 37°C, 3~7일간 배양하여 생성된 colony를 계측하여 다음의 식으로 융합빈도를 계산하였다.

$$\text{Fusion frequency} = \frac{\text{No. of colony on FSM agar plate}}{\text{No. of colony on RGM agar plate}}$$

융합균주의 전자현미경 관찰

융합에 사용된 모균주, 원형질체 형성과정, 융합과정, 융

합후 재생된 세포의 형태를 투사형 전자현미경(TEM)으로 관찰하기 위하여 다음과 같이 시료를 제작하였다. 즉, 정상 세포 배양액은 0.2 M PP buffer (pH 7.0)에, 원형질체와 세포벽 재생과정, 융합과정상에 있는 세포는 고장액의 DF에 각각 현탁시켜 2.5% glutaraldehyde를 첨가한 후 4°C에서 4시간 진탕, 고정시킨 것을 원심분리하고 정상세포는 PP buffer로 원형질체와 융합체들은 DF로 각각 4회 수세 후 예비 고정이 끝난 시료에 2%(w/v) osmium tetroxide용액과 0.2 M PP buffer(또는 DF)를 1:1로 첨가하여 4°C에서 2시간 진탕하고, 다시 0.2 M PP buffer(또는 DF 용액)로 3회 수세 후 완전고정 시켰다. 이를 ethanol의 농도를 50%→70%→80%→90%→95%→100%로 높여가며 각각 20분간 실온에서 진탕하여 2회 탈수시킨 후 propylene oxide로 30분간 2회 치환시켰다. 이 치환물은 propylene oxide: epon (V/V, 1:1) 혼합액에서 2시간, 1:2 혼합액에서 3시간동안 embedding시켰다. 이를 37°C(12시간)→45°C(12시간)→60°C(48시간)으로 열중합 반응시킨 것을 ultramicrotome으로 얇게 절단시키고 이를 uranyl acetate 와 lead acetate로 20분간 이중 염색시킨 후 carbon coating하여 투사전자현미경에서 관찰하고 75 KV에서 촬영하였다.

유전적 안정성 검토

선별된 융합주를 5°C의 냉장실에 30일 이상 보존한 후 항생제가 첨가된 선택배지에서 10회 이상 계대 배양시킨 것을 CM액체배지에 접종한 후 37°C, 24시간 진탕 배양하여 이를 멸균 증류수에 10⁸/ml로 희석하여 CM과 항생제 첨가한 선택배지에서 생육된 colony의 수를 계측하고, 그 차이를 segregate된 균수로 하여 아래의 segregation 비율로 표시하였다.

$$\text{Segregation yield (\%)} = \frac{\text{No. of segregated Colony}}{\text{No. of colony on CM plate}} \times 100$$

영양요구성 물질의 이입 확인

MM배지, 항생제가 첨가된 MM배지 및 MM에 요구성 아미노산을 첨가한 SM배지 등에 융합균주를 접종하고 37°C에서 3~4일간 배양하고 colony의 생육 상태를 관찰하여 친주가 갖는 유전형질의 도입 여부를 확인하였다.

융합균주의 DNA함량측정

모균주와 융합균주의 DNA함량은 Marmur법¹⁹⁾을 변형하여 측정하였다. 즉, CM 액체배지에서 배양된 대수 중기의 균체를 원심 분리하여 saline-EDTA용액에 현탁하고 lysozyme (500 µg/ml)을 첨가하여 37°C, 1시간 반응 후, 25% sodium dodecyl sulfate를 첨가(final conc. 1%)하고 가열(60°C, 10분) 후, 냉각하여 5 M sodium perchlorate를 첨가(final conc. 1 M)하고 정치(4°C, 60분)후, 1/2 용량의 chloroform-phenol을 첨가하고, 원심 분리(10,000 rpm, 30분)한 상등액에 2배의 냉알코올을 첨가하여 DNA를 회수하였다. 회수한 DNA는 여분의 ethanol을 제거시켜, SSC용액에 용해시킨 후, RNase

(final conc. 50 µg/ml)를 37°C 30분 처리하여 DNA를 회수하고 chloroform-phenol을 10 ml씩 3회 처리하여 단백질을 제거하고 원심분리 후 ethanol을 첨가하여 DNA를 재회수시키고 이를 다시 SSC용액에 재 용해시키는 조작을 2회 반복하여 최종적으로 SSC에 용해시켜 260 nm에서 흡광도 값을 측정하여 표준DNA(calf thymus DNA)의 각 농도의 흡광도 값에서 DNA 함량값을 환산하였다.

결과 및 고찰

원형질체 융합에 PEG 분자량의 영향

PEG는 원형질체에 작용하여 수용액 중에서 음전하를 띠면서 분자간의 정전기적 사슬을 형성하며 Ca²⁺ 양이온에 의한 탄수화물 분자 사이를 연결해주는 작용에 의해 융합이 형성된다고 알려져 있다.⁹⁾ 따라서 이러한 PEG의 작용이 융합빈도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다. PEG를 사용하지 않았을 경우 융합빈도는 3.5×10⁻⁸로 극히 낮았으나, PEG 분자량간의 융합빈도는 대개 10⁻⁶으로 나타나 거의 차이가 없는 것으로 나타났고 PEG 4,000과 PEG 6,000의 융합빈도가 다소 높게 나타났다.

보통 세균의 세포융합에 이용되는 PEG의 분자량은 거의가 4,000~6,000을 사용하였을 때 융합빈도가 높은 것으로 알려져 있는데 그중 *B. subtilis*,⁸⁾ *Brevibacterium*속¹²⁾ 등이 PEG 6,000을 사용하였고 융합빈도는 균종에 따라 10⁻⁴~10⁻⁶으로 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다.^{8,12)}

융합에 PEG농도의 영향

PEG 6,000을 11~55%(w/v)까지 농도를 변경하여 융합빈

Table 1. Effect of PEG type on the fusion frequency of protoplast from *B. subtilis* SM-2 and *B. coagulans* CM-12

PEG Molecular weight	Fusion frequency
None	3.5×10 ⁻⁸
4,000	4.8×10 ⁻⁶
6,000	6.2×10 ⁻⁶
8,000	1.3×10 ⁻⁶

Fusants were overlaid on to non-selection medium (RGM) and selection medium (FSM) and incubated at 37°C for 3~4 days. Protoplasts of two strains were fused in fusion fluid (FF) supplemented with different molecular weight of PEG for 10min at 37°C.

Table 2. Effect of PEG concentration on the fusion frequency of protoplast from *B. subtilis* SM-2 and *B. coagulans* CM-12

PEG (Mw. 6,000) concentration (%)	Fusion frequency
0	1.3×10 ⁻⁸
11	7.3×10 ⁻⁸
22	1.1×10 ⁻⁶
33	5.7×10 ⁻⁶
44	1.3×10 ⁻⁶
55	1.5×10 ⁻⁷

Fusants were overlaid on to non-selection medium (RGM) and selection medium (FSM) and incubated at 37°C for 3~4 days. Protoplasts of two strains were fused in FF supplemented with various concentration of PEG (Mw. 6,000) for 10 min at 37°C.

도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. PEG의 농도는 11%에서 융합빈도가 증가하여 33%에서 융합빈도가 5.7×10⁻⁶으로 가장 높았고 그 이상의 농도에서는 융합빈도가 급속히 감소하는 것으로 나타났다. 이는 대개 PEG의 농도가 20~40%의 농도에서 주로 사용된 보고와 유사한 결과를 보였다.^{7,9)} 또한 PEG를 고농도에서 처리할 경우 원형질체 응집현상, 삼투압 손상 및 PEG의 독성효과로 인하여 융합빈도가 감소한 보고^{15,21)}와 유사한 결과를 보였다.

PEG 처리시간의 영향

PEG의 처리시간이 원형질체 융합에 미치는 영향을 알아본 결과는 Table 3과 같다. PEG는 5분간 반응시켰을 때 융합빈도가 가장 높았고 10분이후 부터는 융합빈도가 급격히 감소되었다. 대개 PEG의 처리시간은 균종에 따라 다르나 수분간 처리하는 것이 보통이다. 또한 원형질체 융합은 PEG처리 즉시 일어나는 것으로 알려져 있고,²²⁾ PEG처리 시간이 길어질수록 응집과 세포사이의 PEG 중합체 분자가 분자상호간의 융합을 방해하기 때문에 융합빈도가 감소된다고 한 보고²³⁾와 장시간의 처리는 PEG의 독성효과와 multiple fusion이 증가되어 오히려 재생빈도와 융합빈도의 감소가 일어난다 한 보고²³⁾와 유사한 결과를 보였다.

PVP 농도의 영향

Fusion fluid(FF)에 PVP첨가가 융합빈도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같다. PVP를 FF에 농도별로 첨가한 것과 PVP 1%를 첨가한 FF용액으로 처리하였을 때 1.2×10⁻⁵까지 융합빈도가 증가하였다.

Table 3. Effect of PEG treatment periods on the fusion frequency of *B. subtilis* SM-2 and *B. coagulans* CM-12

PEG treatment time (min)	Fusion frequency (%)
0	1.0×10 ⁻⁶
5	6.0×10 ⁻⁶
10	5.5×10 ⁻⁶
15	2.8×10 ⁻⁶
20	7.2×10 ⁻⁷
30	3.3×10 ⁻⁸

Fusants were overlaid on to non-selection medium (RGM) and selection medium (FSM) and incubated at 37°C for 3~4 days. Protoplasts of two strains was fused in FF supplemented with 33% of PEG (Mw. 6,000) for different reaction times at 37°C.

Table 4. Effect of PVP concentration on fusion frequency of protoplast from *B. subtilis* SM-2 and *B. coagulans* CM-12

PVP concentration (%)	Fusion frequency
0	6.3×10 ⁻⁶
0.5	8.1×10 ⁻⁶
1.0	1.2×10 ⁻⁵
2.0	5.3×10 ⁻⁶
3.0	1.2×10 ⁻⁷
4.0	5.3×10 ⁻⁸

Fusants were overlaid on to non-selection medium (RGM) and selection medium (FSM) and incubated at 37°C for 3~4 days. Protoplasts of two strains was fused in FF supplemented with 33% of PEG (Mw. 6,000) and various concentrations of PVP for 5 min at 37°C.

PVP가 세포벽 재생에 효과적인 물질일 뿐만 아니라 세포간의 융합에도 촉진적인 작용을 한다는 임²⁴⁾의 보고와 유사한 결과였다. 그러나 임²⁴⁾은 PVP 3% 농도로 PEG를 동시에 처리하였을 때 효과적이라고 한 보고 보다 본 연구는 PVP가 저농도로 사용되었다. 그러나 본 실험에서 처리한 PVP는 분자량이 360,000을 사용하여 임²⁴⁾이 사용한 PVP(Mw. 30,000~90,000)보다 분자량이 큰 PVP로서 PVP분자량도 융합에 어느 정도 영향을 미칠 것으로 사료된다.

CaCl₂의 영향

CaCl₂는 융합촉진제인 PEG에 보조제로서 주로 세포단백질의 응집으로 세포간 접촉을 증가시키고,¹⁹⁾ 융합시 membrane의 hexagonal phase형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾ 원형질체 융합에 이용되는 FF에 CaCl₂를 농도별로 첨가하여 융합빈도를 조사한 결과는 Table 5와 같다. 원형질체 융합빈도는 CaCl₂ 10 mM을 첨가하였을 때 가장 높았고, 50 mM까지는 비슷한 빈도였으나 100 mM에서는 급격히 감소하였다. 이는 재생용 배지에 CaCl₂ 및 MgCl₂의 농도가 각각 25 mM씩 첨가되어 있기 때문에 과잉 농도의 2가 양이온은 오히려 융합에 저해를 일으키리라 사료된다.

융합주의 선별과 융합빈도

B. subtilis mutant 균주들과 *B. coagulans* mutant 균주를 각각 조합하여 FF 용액으로 처리하여 항생제 maker가 각각 함유된 융합주 선별배지(FSM)에 중층, 배양하여 얻은 융합빈도는 Table 6같다. 융합주의 선별과정에서 대체로 모든 융합체가 10⁻⁵~10⁻⁶의 융합빈도로 나타났다.

*Bacillus*속의 세포융합빈도는 균종과 세포융합에 이용되는 균종간의 DNA 유연성에 따라 다르지만 대개 10⁻³~10⁻⁷까지 다양하게 나타난다고 알려져 있고,^{7,26)} 성 등²¹⁾은 *Bacillus*속간의 융합에서 6.2×10⁻⁶의 빈도를, 김과 이¹⁹⁾는 *B. pumilus*와 *Cellulomonas*속과의 융합에서 2~3×10⁻⁷의 빈도를, 진 등²⁷⁾은 *B. natto*와 *B. megaterium*간의 융합에 1.0×10⁻⁶으로 나타났다고 보고하여 이들의 연구보다 본 융합빈도수가 다소 높은 것으로 나타났다.

융합주의 유전적 안정성 검토

5°C에서 30일간 보존한 융합주를 CM agar배지와 항생제

가 첨가된 선택배지(FSM)에서 10회 이상 계대 배양하여 유전적으로 안정한지의 여부를 판단한 결과는 Table 7과 같다. 융합주의 segregation비는 대체로 1~6%내외로 전반적으로 안정한 결과를 보였으며 융합주 FSC1323가 0.1%로 가장 안정하였고 융합주 FSC0212와 FSC1012가 1.2%로 대체로 안정한 결과를 보였다. 융합체의 안정도는 균종과 DNA 유연성이 주요한 요인이 되는 것²⁸⁾으로 알려져 있다. 따라서 본 연구의 결과는 같은 *Bacillus*속간의 원형질체를 융합함으로써 DNA유연성에서 유사한 특징을 갖기 때문에 유전적으로 안정한 결과를 얻은 것으로 보인다.

융합주의 marker 이입확인

영양요구성과 항생제 내성을 갖는 *B. subtilis* mutant들과 항생제 내성을 갖는 *B. coagulans* mutant들간의 융합주에서 얻어지는 영양요구성과 항생제 내성의 형질을 확인한 결과는 Table 8과 같다. Fusant SC-0212는 RGM에 Gm과 Km 항생제를 첨가한 배지에서 총 158개 균주를 획득하였고 그 중 MM에 arginine이 함유된 배지에서 152개 균주가 생육하였다. Fusant SC-1012는 총 125개의 균주중 MM에 요구물질인 histidine을 첨가한 배지에서 120개의 균주가 fusant

Table 6. Comparison of selection method for fusion frequency of protoplast from *B. subtilis* and *B. coagulans*

Fusants	Fusion frequency	
	Direct ¹⁾	Indirect ²⁾
FSC0212	4.6×10 ⁻⁵	8.0×10 ⁻⁶
FSC0223	4.8×10 ⁻⁶	3.0×10 ⁻⁷
FSC1012	9.1×10 ⁻⁶	2.3×10 ⁻⁶
FSC1023	3.6×10 ⁻⁶	6.5×10 ⁻⁷
FSC1312	1.1×10 ⁻⁶	7.2×10 ⁻⁷
FSC1323	2.5×10 ⁻⁶	6.8×10 ⁻⁷
FSC2112	1.8×10 ⁻⁷	8.3×10 ⁻⁷
FSC2123	3.6×10 ⁻⁶	6.7×10 ⁻⁶
Culture time (days)	3	7

¹⁾Fusants were overlaid on to non-selection medium (RGM) and selection medium (FSM) and incubated at 37°C for 3~4 days.

²⁾Fusants were spreaded on to non-selection medium and incubated 37°C for 4~5 day and transferred to selection medium (FSM) by replica and incubated for 3~4 days at 37°C.

Protoplasts of two strains was fused in FF supplemented with 33% of PEG (Mw. 6,000 and 1% of PVP for 5 min at 37°C.

Table 7. Genetic stability of the fusants

Fusants	Colony No. on CM agar medium (×10 ⁷)	Colony No. on antibiotics medium (×10 ⁷)	Segregated colony No.	Segregation yield (%) ¹⁾
FSC0212	245	242	3	1.2
FSC1012	338	334	4	1.2
FSC1312	278	269	9	3.2
FSC2112	187	178	9	4.8
FSC0223	333	320	13	3.9
FSC1023	221	209	12	5.4
FSC1323	288	274	14	0.1
FSC2123	112	105	7	6.3

¹⁾Segregation yield (%) = $\frac{\text{No. of segregated colony}}{\text{No. of colony on CM plate}} \times 100$

Table 5. Effect of CaCl₂ concentration on fusion frequency of protoplast from *B. subtilis* SM-2 and *B. coagulans* CM-12

CaCl ₂ concentration (mM)	Fusion frequency
0	8.5×10 ⁻⁶
5	9.2×10 ⁻⁶
10	4.3×10 ⁻⁵
30	3.8×10 ⁻⁵
50	3.0×10 ⁻⁵
100	6.5×10 ⁻⁶

Fusants were overlaid on to non-selection medium (RGM) and selection medium (FSM) and incubated at 37°C for 3~4 days. Protoplasts of two strains were fused in fusion fluid supplemented with 33% of PEG (Mw. 6,000), 1% PVP and various CaCl₂ concentration for 5 min at 37°C.

SC-1312는 총 185개 균주중 isoleucine이 함유된 MM배지에서 178개의 균주가 fusant SC-2112는 총 141개 균주중 isoleucine이 함유된 MM배지에서 총 130개가 생육하였다.

이와 같이 RGM에 Gm과 Km이 함유된 배지에서 생육된 균체보다 MM에 *B. subtilis* mutant가 요구하는 아미노산을 첨가한 선택배지에서 생육하는 균수가 적은 것은 융합체가 불안정하여 segregation되었거나, 불안정한 재조합체 또는 부분적인 재조합체 때문인 것으로 사료된다.

융합주의 DNA함량

세포융합 여부에 대한 판단으로 DNA함량을 측정한다.²⁸⁾ 따라서 각 융합주(Table 8)와 융합에 이용된 *B. subtilis* SM-2와 *B. coagulans* CM-12의 DNA함량을 측정된 결과는 Table 9와 같다. 세균 세포내 DNA함량은 세포의 크기가 작고, *Bacillus*속과 같이 내생포자를 형성하는 균종은 측정된 DNA 함량값의 유의성의 차이가 크기 때문에 본 실험에서는 배양체의 세포수를 ml 당 10⁷으로 조절하고 10⁷개의 세포의 DNA함량을 3회 반복 측정된 결과 대체로 융합주의

Table 8. Genetic characteristics of fusants derived from mutants of *B. subtilis* and *B. coagulans*

Fusants	Medium (No. of colony)				
	RGM +Km, Gm	MM	MM (+a.a.) ¹⁾	CM+Gm	CM+Km
<i>B. subtilis</i> SM-2 (arg ⁻ , Gm ^R)					
×	+	-	+(arg) ¹⁾	+	+
<i>B. coagulans</i> CM-12 (Km ^R)	(158) ²⁾	(0)	(152)	(158)	(158)
<i>B. subtilis</i> SM-10 (his ⁻ , Gm ^R)					
×	+	-	+(his) ¹⁾	+	+
<i>B. coagulans</i> CM-12 (Km ^R)	(125)	(0)	(120)	(125)	(125)
<i>B. subtilis</i> SM-13 (his ⁻ , asp ⁻ , Gm ^R)					
×	+	-	(asp) ¹⁾	+	+
<i>B. coagulans</i> CM-12 (Km ^R)	(185)	(0)	+(his) ¹⁾	(185)	(185)
<i>B. subtilis</i> SM-21 (ile ⁻ , Gm ^R)					
×	+	-	+(ile) ¹⁾	+	+
<i>B. coagulans</i> CM-12 (Km ^R)	(141)	(0)	(130)	(137)	(138)

¹⁾Each amino acid was added 20 µg/ml in MM.

²⁾All values in parentheses are number of colony grown on each media.

Table 9. DNA contents in fusant and parent strains

Strains	Contents of DNA (mg/10 ⁷ cells)
FSC0212	2.94±0.74
FSC1012	2.41±0.60
FSC1312	1.97±0.57
FSC2112	1.78±0.33
<i>B. subtilis</i> SM-2	1.13±0.78
<i>B. coagulans</i> CM-12	1.08±0.55

Parent and fusant strains were cultured CM broth for 12 hours at 37°C.

DNA함량이 모균주보다 높았으며 특히 FSC0212와 FSC 1012 융합균주는 모균주의 DNA함량보다 2배 이상 높았고 그 외 융합주 들은 모균주 보다 1.5~1.8배정도 함량이 높은 것으로 보아 두 균주의 DNA 또한 융합에 의해 함량의 변화가 일어난 것으로 나타나 전 등³⁰⁾의 유산간균 간의 융합에서 융합주의 DNA함량이 모균주의 2~6배로서 모균주의 단상체 DNA가 융합에 의해 이배체 혹은 polyploid 상태로 존재한다고 한 보고와 유사한 결과임을 알 수 있었다.

모균주와 원형질체의 전자 현미경 관찰

원형질체를 형성하기 전 정상세포의 형태는 Fig. 1의 A, B와 같다. 정상세포는 *Bacillus*속의 전형적인 간상체를 관찰할 수 있었다. *B. coagulans* CM-12(A)와 *B. subtilis* SM-2(B)의 정상적인 두 세포는 외형적으로는 구별할 수 없을 정도로 유사하였다. 또한 두 세포의 세포벽과 세포막 및 포자의 형태도 관찰할 수 있었다.

원형질체의 형성과정과 형성된 원형질체는 Fig. 2의 A, B와 같다. *B. coagulans* CM-12(A)와 *B. subtilis* SM-2(B)의 원형질체 형성과정으로서 원형질체 형성은 lysozyme의 작용으로 세포벽성분의 일부 부분이 부분적으로 파괴되고 이곳으로 팽윤된 원형질체가 유리되는 것을 볼 수 있었다. 또한 Fig. 2 A의 *B. coagulans*의 원형질체는 대체로 분열과정에 있는 두 세포의 division band부분으로 원형질체가 나출되어 이곳을 통한 원형질체의 방출이 목격되었으며 형성된

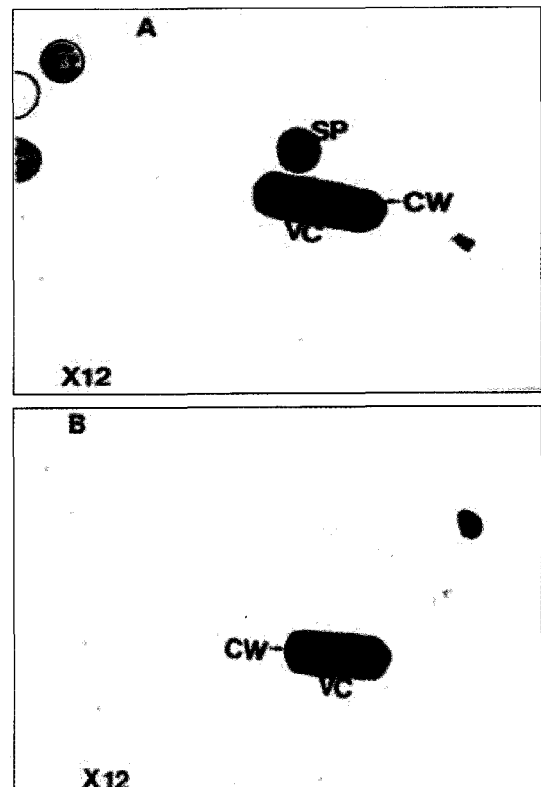


Fig. 1. Transmission electron microscopy of *B. subtilis* SM-2(A) and *B. coagulans* CM-12(B)(×12,000). CW: Cell wall, VC: Vegetative cell, SP: Spore

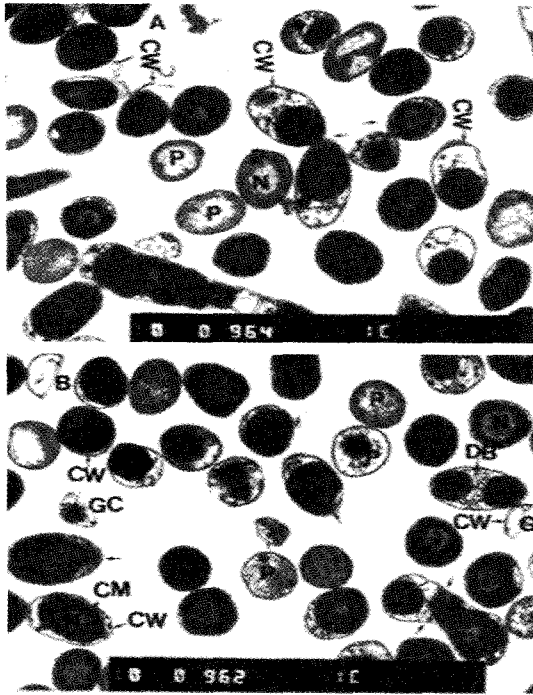


Fig. 2. Transmission electron microscopy of releasing stage for protoplast formation of *B. subtilis* SM-2(A) and *B. coagulans* CM-12(B)($\times 10,000$). CW: Cell wall, VC: Vegetative cell, SP: Spore, P: Protoplast, GC: Ghost cell, CM: Cell membrane, DB: Division band, N: Nuclear region.

원형질체는 거의 구형모습을 이루고 있었다. 두 균주 모두 일부 잔존 세포벽성분과 ghost cell의 모습을 확인할 수 있었고 핵물질이 존재하는 nuclear region을 확인할 수 있었다. 이 두 균주가 각기 세포벽 파괴과정(cell wall bursting stage)과 파괴된 cell wall 부분으로 원형질체가 방출되는 (releasing stage)단계를 보고²⁴⁾한 결과와 유사한 것을 확인할 수 있었다.

융합과정과 융합주의 전자현미경 관찰

B. subtilis SM-2와 *B. coagulans* CM-12 두 균주의 원형질체 융합 과정을 FF용액 처리 직후와 처리후 일정시간(5~10분) 반응후의 모습을 나타낸 것은 Fig. 3 A, B와 같다. Fig. 3의 A는 두 원형질체가 서로 접촉되면서 이루어지는 contacting과정으로서 두 원형질체가 contacting후 원형질막이 소실되면서 두 원형질체가 결합되어지는 것으로 보인다. Fig. 3의 B는 융합이 진행되고 있는 fusion단계로 확인되었고 두 원형질체가 융합 후 완전한 정상세포로의 재생을 위한 세포벽의 재생과정도 일부 확인되었다. Fig. 4의 A와 B는 융합된 균주를 나타낸 것으로 융합균주 대부분에서 vesicle이 존재하는 것으로 나타났는데 이는 융합과정에서 PEG와 고장액으로 원형질체를 융합했을 때 나타나는 특이적인 모습이라 알려져 있다.²⁹⁾ Fig. 5의 A의 그림은 세포벽이 재생된 후 완전한 간상체의 모습을 보였고 B는 배양했을 때 균의 모습을 나타내면서 division band에 의해 분열되기 직전의 모습을 볼 수 있었다. 그리고 융합주는 융합전

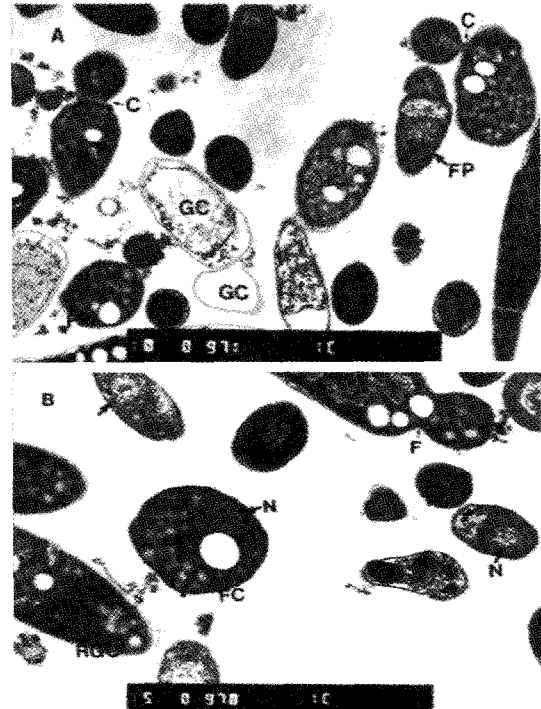


Fig. 3. Transmission electron microscopy of fusion stage of *B. subtilis* SM-2 and *B. coagulans* CM-12 protoplast. (A); contact stage($\times 10,000$), (B); fusion stage($\times 15,000$), CW: Cell wall, VC: Vegetative cell, SP: Spore, P: Protoplast, GC: Ghost cell, CM: Cell membrane, DB: Division band, N: Nuclear region, FP: Fusion performing cell, RGC: Regeneration cell, FC: Fusant cell.

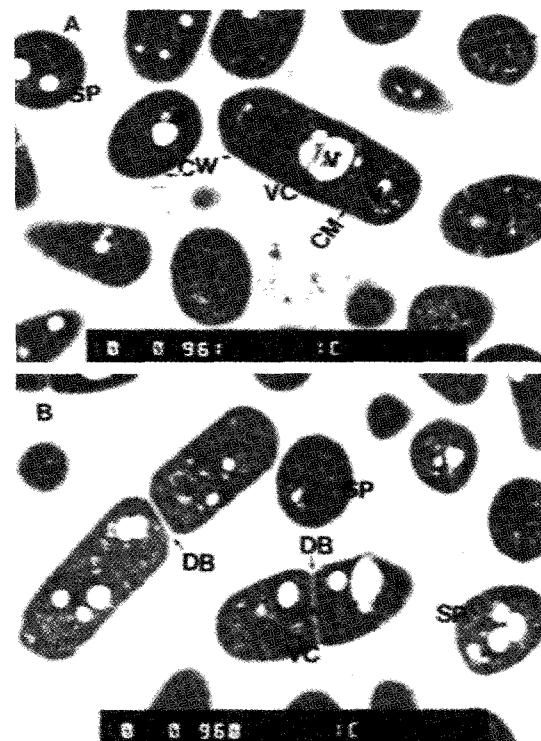


Fig. 4. Transmission electron microscopy of regenerated cell after protoplast fusion of *B. subtilis* SM-2 and *B. coagulans* CM-12($\times 10,000$). CW: Cell wall, VC: Vegetative cell, SP: Spore, P: Protoplast, GC: Ghost cell, CM: Cell membrane, DB: Division band, N: Nuclear region, V: Vesicle.

모균주의 형태(Fig. 1 A, B)보다 훨씬 큰 형태의 세포임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1998학년도 대구대학교 교비지원에 의한 연구로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Kang, K. S. and Cottrell, I. W. (1979) Polysaccharides, In Microbial Technology, Pepler, H. J. and D. Perlman, (eds), Academic Press, New York, 1, pp.417-475.
- Sutherland, I. W. (1979) Microbial polysaccharides and polysaccharase. Barkeley, R. C. W., Gooday, G. W. and Ellwood, D. C. (eds), Academic Press, pp.1-34.
- Nakayama, S., Shirakawa, T. and Ohnishi, T. (1979) Production and some properties of slimy polysaccharide produced by acetic acid bacteria *Hakkokogaku*, **57**, 31-35.
- Singh, P. P., Vhistler, R. L., Tokuzen, R. and Nakahara, W. (1974) Scleroglucan an antitumor polysaccharide from *Sclerotium glaucum*. *Carbohydr. Res.* **37**, 245-249.
- Gasson, M. J. (1983) Genetic transfer systems in lactic acid bacteria, *Atoonie Van Leuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **49**, 275-282.
- Kondo, J. K. and McKay, L. L. (1982) Transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1213-1215.
- Fodor, K. and Alföldi, L. (1976) Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**(6), 2147-2150.
- Schaeffer, P., Cami, B. and Hotchkiss, R. D. (1976) Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**(6), 2151-2155.
- Kao, K. N. and Michayluk, M. R. (1974) A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* **115**, 355-3.
- Anne, J., Eyssen, H. and De Sommer, P. (1976) Somatic hybridization of *Penicillium roqueforti* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature* **262**, 719-721.
- Sipiczki, M. and Ferenczy, L. (1977) Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. *Mol. Gen. Genet.* **151**, 77-81.
- Kaneko, H. and Sakaguchi, K. (1979) Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **43**(5), 1007-1013.
- Hoopwood, D. A., Wright, H. M., Bibb, M. J. and Cohn, S. N. (1977) Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. *Nature* **268**, 171-174.
- Götz, F., Ahmé, S. and Lindberg, M. (1981) Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion Staphylococci. *J. Bacteriol.* **145**, 74-81.
- Kim, D. M. and Lee, K. H. (1990) Studies on protoplast formation and regeneration of *Bacillus pumilus* and *Cellulomonas fimi*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**(2), 109-114.
- Goldberg, J. B. and Ohem, D. E. (1987) Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alg B mutants; Role of alg B in high-level production of alginate. *J. Bacteriol.* **169**(4), 1593-1595.
- Harding, N. E. (1987) Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* **169**(6), 2854-2857.
- Kim, S. H. and Yim, M. H. (1998) Protoplast formation and regeneration of *Bacillus* strains producing biopolymer. *Agric. Chem. Biotechnol.*
- Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218.
- Akamatsu, T. and Sekiguchi, J. (1981) Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplasts. *Agric. Biol. Chem.* **45**(12), 2887-2894.
- Sung, N. K., Roh, J. S., Park, S. K. and Chung, Y. C. (1988) Intrageneric protoplast fusion between alkalophilic *Bacillus* sp. F204 and *Bacillus* sp. K17. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**(4), 275-281.
- Ochi K., Hitchcock, M. J. M. and Katz, E. (1979) High-frequency fusion of *Streptomyces antibioticus* protoplasts induced by polyethylene glycol. *J. Bacteriol.* **139**(3), 984-992.
- Matsushima, P. and Baltz, R. H. (1986) Protoplasts fusion, in Demain, L. A. and Nadine, A. S. (eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, American Society for Microbiology Press, Washington D. C. pp.170-183.
- Lim, B. S. (1985) Studies on the breeding of L-lysine producing microorganisms by cell fusion and bioreactor system by immobilization of fusants. Ph. D. Dissertation, Univ. of Korea, Seoul.
- Santamaric, R., Mesas, J. M. and Martin, J. F. (1982) Genetic recombination by protoplast fusion in *Coryneform* bacteria. 4th. G. I. M. Abstract, 60.
- Gabor, H. M. and Hotchkiss, R. D. (1979) Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplasts. *J. Bacteriol.* **137**(3) 1346-1353.
- Jin, S. H., Park, B. G., Roh, M. H., Kim, D. G. and Ryu, B. H. (1990) Production of vitamin B12 by using protoplast fusion between *Bacillus natto* and *Bacillus megaterium*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**(6), 611-617.
- Brzobohaty, B. and Kovac, L. (1986) Genetic transformation of yeast protoplasts with DNA encapsulated in liposomes. *FEMS Microbiology Letters*, **35**, 29-31.
- Frehel, C., Lheritier, A. M., Sanchez-Rivas, C. and Schaeffer, P. (1979) Electronic microscopic study of *Bacillus subtilis* protoplast fusion. *J. Bacteriology* 1354-1361.
- Jun, H. K., Kim, M. G. and Baik, H. S. (1992) Studies on the protoplast fusion between *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**(1), 6-13.

Cell fusion and fusants characterization of *Bacillus* strains producing biopolymer

Seong-Ho Kim and Moo-Hyun Yim(Department of Food Science & Technology, Tae-Gu University, Kyungsan, 712-714, Korea)

Abstract : To improve biopolymer productivity and properties of *Bacillus* strains, protoplast fusion was performed between biopolymer producing *Bacillus subtilis* K-1 and lactose utilizing *Bacillus coagulans*. The results were as follows; Protoplasts mixed in fusion fluid containing 33% PEG 6000, 1% PVP and 10 mM CaCl₂ were reacted for 5 min at 37°C and then centrifused protoplasts were directly overlaid on the selective media containing 100 µg/ml antibiotics and incubated for 3 days. At this conditions, the frequency of protoplast fusion was generally in the range of 4.6×10^{-5} to 1.8×10^{-7} in ratio. Segregation ratio was observed between 1 to 6% indicating genetic stability of all the fusants. Fusants growth were also observed on the media contained amino acid and antibiotics as required marked materials. DNA contents of the selected fusants were 1.6 to 2.7 times more than that of parent strains. With observation by TEM microscopy, spherical protoplasts were first released from the swollen parental cells and then contracted to fuse in the process of fusion. And fused cells were observed representative vesicle. Originally, the parental cells were observed as in the morphology of thick-walled and double membrane-surrounded rod shape with TEM microscopy.

Key words : *Bacillus subtilis*, biopolymer, protoplast, cell regeneration

*Corresponding author