

Biopolymer 생산성 *Bacillus*속 균주의 원형질체 형성과 재생

김성호* · 임무현

대구대학교 식품공학과

초 록 : Biopolymer를 생산하는 *Bacillus*속의 균주개량의 목적으로 biopolymer를 생산하는 균주인 *Bacillus subtilis* K-1과 유당 이용능이 있는 *Bacillus coagulans*의 원형질체 형성과 재생에 관하여 조사하였다. 영양요구성과 항생제 내성의 marker가 부여된 두 변이주의 원형질체 형성조건에서 *Bacillus subtilis* mutant SM-2의 경우, 대수기 중기에 penicillin G(1.0 unit/ml)를 첨가한 다음 1.5시간 반응 후 삼투압 안정제로서 0.4 M sucrose와 25 µg/ml의 lysozyme이 함유된 lysis fluid(LF, pH 7.0)내에서 37°C, 40분간 반응시켰을 때, 원형질체 형성율은 99.6%, 세포벽 재생을 2.4%였다. *Bacillus coagulans* mutant CM-12의 경우 대수기 중기에 penicillin G 0.3 unit/ml와 glycine 0.5%를 혼합첨가하고 1시간 반응시킨 후 삼투압 안정제로서 0.6 M lactose와 300 µg/ml의 lysozyme이 함유된 LF(pH 7.0)내에서 37°C, 30분간 반응시켰을 때, 원형질체 형성율 90.8%, 세포벽 재생을 2.2%였다. 세포벽 재생효율을 높이기 위한 재생배지는 trypticase soy broth(TSB)에 0.4 M sucrose, 0.7% casamino acid, 1% PVP, 25 mM CaCl₂, 25 mM MgCl₂, 1.5% agar가 함유된 배지에 0.4% soft agar로서 중층 했을 때 *Bacillus subtilis* SM-2의 재생율은 5.1%, *Bacillus coagulans* CM-12의 재생율은 10.3%로 2~4배 가량 향상 되었다.(1998년 12월 28일 접수, 1999년 1월 26일 수리)

서 론

미생물이 생산하는 biopolymer는 식품공업에서 식품의 안정감과 질감증가를 위한 유화제, 안정제, 응고제로서의 역할과 가공공정에서의 마찰력 감소, 결정질의 크기 조절 등에 널리 이용되고 있다.^{1,2)} 또한 의료 및 제약공업에는 biopolymer의 생체 적합성과 무독성의 특성으로 수술용 인공 봉합사, 인공수정체, 수술용 솜, 접골 이음쇄 등의 생체 대체재 뿐 만 아니라, 생리적 활성에 기인한 면역증강물질, 항종양제 등 의약품으로서,^{3,4)} 환경 산업의 폐수정화용 응집제와 중금속 제거제 등으로, 산업용품으로서 연마제, 접착제, 도료, 농약조제, 약품전달수단, 다이어트 식품 등에 이르기까지 광범위하게 응용되고 있다.^{5,6)}

미생물을 이용한 유용물질의 생산에서 가장 근본적인 일은 발효에 관여하는 우수 미생물의 분리와 생산성 향상과 품질 개선을 위한 균주의 개량 및 육종이 이루어져야 하며 이에 대한 방법으로 돌연변이주의 획득, 유전자 조작에 의한 DNA 재조합, 형질교환, 접합, 형질도입, 세포융합 등의 방법이 널리 이용되고 있다.^{7,9)} 그중 세포융합은 Kao 등¹⁰⁾이 식물 세포 원형질체에 polyethylene glycol(PEG)과 CaCl₂를 가하면 융합체가 생긴다고 보고한 이후, fungi,¹¹⁾ 효모¹²⁾와 세균분야의 *Bacillus*속,^{9,13)} *Brevibacterium*속,¹⁴⁾ *Streptomyces*속¹⁵⁾ 그리고 그람 음성균¹⁶⁾에도 널리 응용되어왔다.

Alginate, xanthan gum과 같은 다당류 등의 biopolymer의 화학적 구조 및 물성학적인 특성에 관한 기존 연구와 더불어 미생물이 생산하는 다당류의 생산 수율을 높이는 연구와 독특한 기능을 가진 biopolymer를 생산하는 미생물의

균주 개발 연구는 지속적으로 이루어지고 있다. 그러나, 산업적으로 이용성이 높으며 유전 교환계가 알려지지 않은 세균 세포에 대해서는 유전 조작이 어렵고 복잡하며,^{17,18)} polysaccharide와 polypeptide와 같은 복합 화합물을 구성하고 있는 biopolymer를 생산하는 균주에 대한 유전적 조작은 더욱 복잡하다. 따라서 이러한 복합물질로 이루어진 biopolymer를 생산하는 균주들에 대한 개량은 이들 물질의 이용성과 생산성의 연구와 더불어 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

이에 본 실험에서는 조작이 간단하면서 재조합 빈도가 높은 세포 융합기술을 이용하여 biopolymer생산 미생물을 융합시켜 융합주가 갖는 새로운 특징의 biopolymer의 생산과 연구개발의 일환으로 원형질체 융합에 가장 중요한 요소인 원형질체의 형성과 재생에 대한 조사를 하였다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 용액

본 실험에 사용된 균주는 분리 동정된¹⁹⁾ *Bacillus subtilis* K-1과 한국중균협회(KCCM)에서 분양받은 *Bacillus coagulans* KCCM 11712, KCCM 12669를 모균주로 하여 돌연변이를 유발하였다.

실험에 사용된 배지의 종류 및 조성으로서 complete medium(CM)은 3% trypticase soy broth(TSB, pH 7.0)를 minimal 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) 및 MM에 각 돌연변이주의 요구물질을 첨가한 supplementary medium(SM)을 사용하였

찾는말 : *Bacillus subtilis*, 생체고분자물질, 원형질체 형성, 세포재생
*연락처

고, 원형질체 재생용 기본배지는 CM배지에 0.5 M sodium succinate를 첨가한 고장액의 regeneration complete medium (RCM, pH 8.0)을, 재생을 향상을 위한 배지의 조건검토에는 기초배지인 Trypticase soy broth(TSB)에 삼투압 안정제, 2가 금속염, 아미노산 및 casamino acid 와 polyvinylpyrrolidone (PVP) 등을 첨가하여 재생용 최적배지 regeneration growth medium(RGM, pH 8.0)의 조성을 조사하였으며, 돌연변이 유발, 원형질체 형성, 재생에 사용된 용액과 완충용액으로는 0.05 M tris-malate buffer(TM buffer, pH 7.0), 0.05 M phosphate buffer(PP buffer, pH 7.0), Dilution fluid(DF pH 7.0)는 0.05 M TM buffer에 0.5 M sucrose를, Lysis fluid(LF)는 DF에 lysozyme(25~500 µg/ml)을 첨가하여 이용하였다.

영양요구성 및 항생제 내성균주의 분리

Bacillus subtilis K-1를 N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine (MNNG)로서 변이 처리한 균주를 Lederberg등의 방법²⁰⁾으로 영양요구성 균주를 분리하였고 항생제 내성균주의 분리를 위해 *Bacillus subtilis* K-1과 *Bacillus coagulans*의 변이주를 kanamycin(Km), gentamycin(Gm), streptomycin(Sm), ampicillin(Amp) 등의 항생제에 대하여 농도구배법²¹⁾으로 항생제 내성균주를 분리하고 상대 균주의 항생제 최소저해농도(minimal inhibition concentration, MIC)를 조사하여 내성농도로 하였다.

원형질체 형성 및 형성을 측정

원형질체 형성은 두 균주를 MMYE 액체배지에서 대수기 중기까지 배양 후 *Bacillus subtilis* K-1 변이주는 1.0 unit/ml의 penicillin G를 *Bacillus coagulans* 변이주는 0.3 unit/ml의 penicillin G와 0.5% glycine을 혼합 첨가 후 1~3시간 반응시키고 이를 원심 분리하여 TM buffer로 2회 세척한 것을 1/2용량의 DF에 현탁시키고, 25~500 µg/ml의 lysozyme이 첨가된 2배 농도의 LF용액을 첨가하여 37°C에서 10~120 min간 반응시켜, 원형질체를 형성시켰다. 원형질체의 형성은 위상차 현미경(×1000)에서 관찰, 확인하였고 원형질체의 형성정도는 lysozyme처리 전 TM buffer에 현탁된 원균을 멸균수에 적절히 희석하여 CM고체배지에 도말·배양 후, 생성된 colony를 total viable cell(TVC)로, lysozyme을 처리한 후 형성된 원형질체 현탁액을 멸균수에 현탁하여 osmotic shock를 준 후, 원심 분리하여 CM고체배지에 도말·배양 후 생성된 osmotic resistant cell(ORC)의 차이를 산출하여 다음의 원형질체 형성율로 계산하였다.

$$\text{Protoplast formation(\%)} = \frac{\text{TVC} - \text{ORC}}{\text{TVC}} \times 100$$

세포벽 재생 및 재생을 측정

세포벽의 재생은 lysozyme으로 처리하여 얻어진 원형질체를 고장액의 DF에 현탁하여 원심분리하고, DF로 적당히 희석하여 희석액 0.1 ml를 5 ml의 soft agar(agar 0.5%)에 첨가하여 RCM 또는 RGM solid agar(agar 1.5%)에 증충하

고, 37°C, 3~7일간 배양하여 정상 세포로 재생시켜 나타난 colony를 계측 후 regenerated cell(RGC)로 하였다. 이때의 재생율을 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Regeneration frequency(\%)} = \frac{\text{RGC} - \text{ORC}}{\text{TVC} - \text{ORC}} \times 100$$

결과 및 고찰

영양요구성 및 항생제 내성균주의 분리

Bacillus subtilis K-1 균주를 MNNG처리하여 1차 선발한 균주를 대상으로 아미노산의 영양요구성 균주를 선별, 분리하였다. *Bacillus subtilis* K-1의 변이주를 대상으로 한 영양요구성주는 4개 균주를 최종 획득하였고 이들 변이주가 요구하는 영양요구성과 항생제 내성에 대한 실험의 결과는 Table 1과 같다. *B. subtilis* mutant들은 Gm에서 내성, Km에는 감수성을, *B. coagulans* mutant들은 Km에 내성, Gm에 감수성을 갖는 colony를 선발하여 사용하였다. 이들 두 균주의 항생제 내성농도와 상대 항생제에 대한 최소저해농도(minimal inhibition concentration, MIC)는 *B. subtilis* 변이주들은 Gm 400 µg/ml에서, Km에 대해서는 25 µg/ml의 농도까지 생육 가능하였고 *B. coagulans*의 변이주는 Km 400 µg/ml에서 Gm은 50 µg/ml농도까지 생육 가능하여 이후 융합 실험시 이들 두 항생제를 각각 100 µg/ml씩 첨가 후 융합실험에 사용하였다.

원형질체 형성의 Penicillin G와 glycine의 영향

세포융합의 가장 중요한 전제조건은 원형질체의 형성에 있다. 이들 원형질체 형성에는 세포벽의 붕괴가 원형질체 형성의 중요한 조건이다. 특히 penicillin G는 세포벽 합성을 저해하는 중요한 인자로 알려져 있다.²²⁾ 또한 Gram 양성균의 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan내의 alanine을 glycine이 치환함으로써 세포벽의 구조가 깨어지거나 상당히 약해진다고 알려져 있다.²³⁾ 따라서 이들 분자가 원형질체 형성과 재생에 미치는 영향을 알아 보았다.

B. subtilis SM-2의 경우 penicillin G 1.0 unit/ml를 *B. coagulans* CM-12는 penicillin G 0.3 unit/ml와 glycine 0.5% 혼합용액을 대수기 중기에 첨가 후 반응시간별로 원형질체

Table 1. Selection of auxotrophs and antibiotic resistant strains from *B. subtilis* K-1 and *B. coagulans* strains

Strains	Phenotype	Source strain
<i>B. subtilis</i> SM-2	Arg ⁻ , Gm ^R	<i>B. subtilis</i> K-1 (wild type)
<i>B. subtilis</i> SM-10	His ⁻ , Gm ^R	<i>B. subtilis</i> K-1 (wild type)
<i>B. subtilis</i> SM-13	His ⁻ , Asp ⁻ , Gm ^R	<i>B. subtilis</i> K-1 (wild type)
<i>B. subtilis</i> SM-21	Ile ⁻ , Gm ^R	<i>B. subtilis</i> K-1 (wild type)
<i>B. coagulans</i> CM-12	Km ^R	<i>B. coagulans</i> KCCM 11721
<i>B. coagulans</i> CM-24	Km ^R	<i>B. coagulans</i> KCCM 12669

Gm^R: Gentamycin resistance to 100 µg/ml and kanamycin sensitivity to 25 µg/ml.

Km^R: Kanamycin resistance to 100 µg/ml and gentamycin sensitivity to 50 µg/ml.

형성과 재생에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. *B. subtilis* SM-12는 penicillin G를 1.5시간 처리한 경우 원형질체 형성율이 약 83% 정도로 가장 높았으나 반응시간이 길어질수록 오히려 원형질체 형성율은 감소하였고, 세포의 재생율도 원형질체 형성을 처럼 1.5시간 이상 반응에서 감소하였다. *B. coagulans* CM-12는 penicillin G와 glycine을 혼합첨가 후 반응하였을 때 원형질체 형성율은 1시간 후에 80%, 1.5시간 후 약 82%로 1.5시간 반응하였을 때 형성율이 높았으나 세포 재생율은 1시간 반응한 것은 1.1%, 1.5시간은 0.84%로 1시간 반응이 가장 적당한 것으로 나타나 penicillin G와 glycine의 혼합 처리시 과도한 세포벽의 분해가 세포의 재생에 좋지 않은 결과를 주는 것으로 사료된다.

Kaneko 등¹⁴⁾이 처음 시도한 후 *Bacillus*속 뿐 아니라 방선균과 *Coryne*형과 같은 Gram 양성세포의 원형질체 형성에 penicillin과 lysozyme이 동시에 처리되고 있다.^{24,25)} 김과 이²⁶⁾는 penicillin G처리가 *Bacillus pumilus*와 *Cellulomonas flavigena*의 원형질체 형성에 큰 영향이 없었으나 *B. pumilus*는 대수기 말기에서, *C. flavigena*는 유도기에서 각각 0.3 unit/ml를 처리했을 때 재생에 효과가 있었다고 보고하였다. 임²⁷⁾은 *Coryne*형 세균이 방선균에 비해 glycine내성이 강하다고 보고하였고, 한 등²⁸⁾은 *Streptomyces mitacaensis*를 0.5% glycine이 첨가된 배지에서 처리한 후의 원형질체 형성율이 glycine을 처리하지 않은 균체의 원형질체 형성율에 비해 3,000배가 증가한다고 보고하였다.

Lysozyme처리의 영향

세포융합에 필요한 원형질체 형성에 가장 중요한 역할을

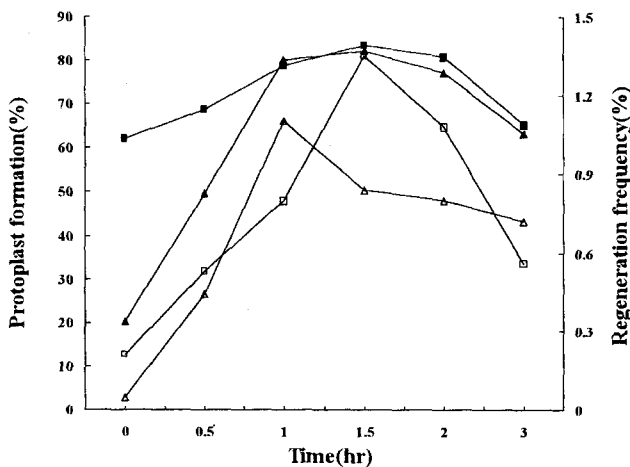


Fig. 1. Effect of penicillin G and glycine on the protoplast formation and regeneration frequency. Intact cells of *B. subtilis* SM-2 (1 unit/ml of penicillin G) and *B. coagulans* CM-12 (0.3 unit/ml penicillin G and 0.5% glycine solution) were treated in MMYE medium for different time, respectively. DF containing lysozyme (100 $\mu\text{g/ml}$) were treated to the cells for 30 min at 37°C for protoplast formation (PF) and regeneration frequency (RF). Regeneration was performed by pourplating the protoplast of two strains on RCM (TSB medium containing 0.5 M sodium succinate) and incubated for 72 hours at 37°C. ■—■: SM-2 (PF), ▲—▲: CM-12 (PF), □—□: SM-2 (RF), △—△: CM-12 (RF).

하는 것이 세포벽 분해이다. 세포벽 분해효소로서 가장 널리 이용되는 lysozyme은 세포벽 성분의 분해에 직접적으로 관여하여 한다고 알려져 있다.²⁹⁾

Lysozyme을 25~500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 10~120분간 처리한 후의 원형질체 형성과 재생율을 조사한 결과는 Fig. 2, 3과 같다. *B. subtilis* SM-2는 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 40분간 처리하였을 때 95%이상의 원형질체를 형성하였고, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 20분간 처리시 약 94% 정도로 형성율이 높았다. 그러나 재생율의 경우 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 40분간 처리한 것이 2.6%로 가장 높게 나타나, lysozyme의 과도한 처리는 오히려 원형질체 형성과 재생에 불리한 조건으로 작용하는 것으로 나타났다. *B. coagulans* CM-12의 경우 원형질체 형성과 재생율이 lysozyme을 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 30분간 처리했을 때 각각 91.7%와 2.2%였고, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 10분간 처리시 92.8%로 원형질체 형성율은 높았으나 재생율이 오히려 낮게 나타났다. 이는 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 30분 이상 처리시 고농도의 lysozyme이 원인이 되어 균체의 응집현상을 일으켜 원형질체 형성과 재생에 나쁜 영향을 미치는 것으로 사료된다. 그러나 lysozyme의 반응 농도는 균종이나 반응조건의 차이에 따라 큰 차이를 가져올 수 있기 때문에^{3,14)} 단일 균에 절대적인 농도를 적용하기에는 무리라 사료된다. 또한 lysozyme의 반응시간과 농도는 밀접한 관련성이 있어 대개 농도가 높을수록 반응시간은 짧은 경향을 나타내지만, 이러한 경우도 균종과 환경조건에 따라 다양하게 나타날 수 있다. 대체적으로 *Bacillus*속

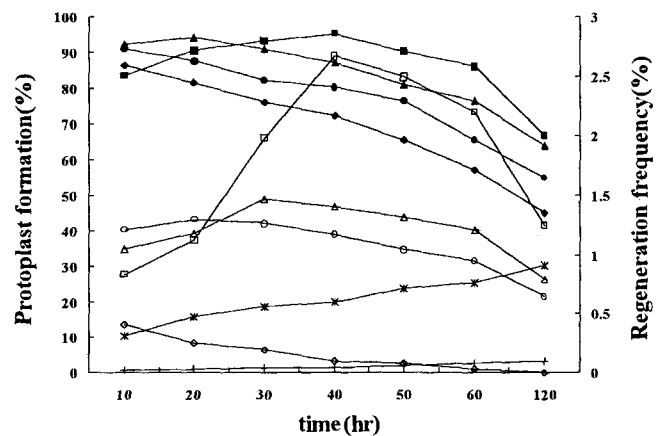


Fig. 2. Effect of lysozyme on the protoplast formation and regeneration frequency of *B. subtilis* SM-2. Intact cells of *B. subtilis* SM-2 were treated with 1 unit/ml of penicillin G in MMYE medium for 1.5 hours. DF containing various concentration of lysozyme were treated to the cells for different time at 37°C for protoplast formation (PF) and regeneration frequency (RF). Regeneration was performed by pourplating the protoplast of two strains on RCM (TSB medium containing 0.5 M sodium succinate) and incubated for 72 hours at 37°C. Control was treated only 1.0 unit/ml penicillin G solution without lysozyme. *—*: control (PF), ■—■: 25 $\mu\text{g/ml}$ (PF), ▲—▲: 50 $\mu\text{g/ml}$ (PF), ●—●: 100 $\mu\text{g/ml}$ (PF), ◆—◆: 200 $\mu\text{g/ml}$ (PF), +—+: control (RF), □—□: 25 $\mu\text{g/ml}$ (RF), △—△: 50 $\mu\text{g/ml}$ (RF), ○—○: 100 $\mu\text{g/ml}$ (RF), ◇—◇: 200 $\mu\text{g/ml}$ (RF).

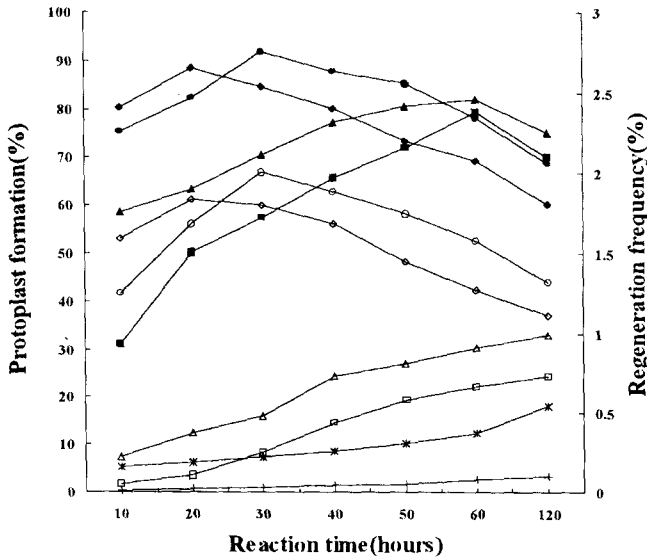


Fig. 3. Effect of lysozyme on the protoplast formation and regeneration frequency of *B. coagulans* CM-12. Intact cells of *B. coagulans* CM-12 were treated with 0.3 unit/ml penicillin G and 0.5% glycine mixture in MMYE medium for 1 hours. DF containing various concentration of lysozyme were treated to the cells for different time at 37°C for protoplast formation (PF) and regeneration frequency (RF). Regeneration was performed by pourplating the protoplast of two strains on RCM (TSB medium containing 0.5 M sodium succinate) and incubated for 72hours at 37°C. Control was treated only 0.3 unit/ml penicillin G and 0.5% glycine mixture solution without lysozyme. *—*: control (PF), ■—■: 100 µg/ml (PF), ▲—▲: 200 µg/ml (PF), ●—●: 300 µg/ml (PF), ◆—◆: 500 µg/ml (PF), +—+: control(RF), □—□: 100 µg/ml (RF), △—△: 200 µg/ml (RF), ○—○: 300 µg/ml (RF), ◇—◇: 500 µg/ml (RF).

은 50~500 µg/ml의 농도가 주로 이용되는 것으로 알려져^{13,29)} 있으며 김과 이²⁶⁾의 *B. pumillus*가 500 µg/ml의 농도로 20분간, 진 등³⁰⁾의 *B. natto*와 *B. megaterium*은 각각 300 µg/ml과 500 µg/ml로 30분간 처리하여 99%이상의 원형질체를 얻었다고 보고하였다.

삼투압 안정제의 영향

LF내 삼투압 안정제로는 고농도의 당과 염이 주로 이용된다. 이들 고농도의 당과 염이 원형질 형성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 4, 5와 같다. *B. subtilis* SM-2는 0.5 M sucrose를 첨가한 결과 원형질체 형성율이 약 96%정도 형성되었고 재생율이 약 2.2%이상으로 나타나 가장 효과적인 삼투압 안정제였으나 KCl과 NaCl같은 염은 원형질체 형성율에서 각각 80%, 91%로 나타나 sucrose에 비해 낮을 뿐 아니라 재생율도 0.08%와 0.03%로 거의 재생되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4). *B. coagulans* CM-12는 0.5 M sucrose를 첨가할 경우 90.3%였는데 반해 0.5 M lactose는 90.8%로 원형질체 형성율이 비슷하였고 재생율도 lactose가 2.1%로 1.8%인 sucrose보다 우수한 결과를 보였다.

Lysis fluid의 삼투압 안정제로서 *B. subtilis* SM-2는 sucrose를, *B. coagulans* CM-12는 lactose를 각각 농도별로 변화시

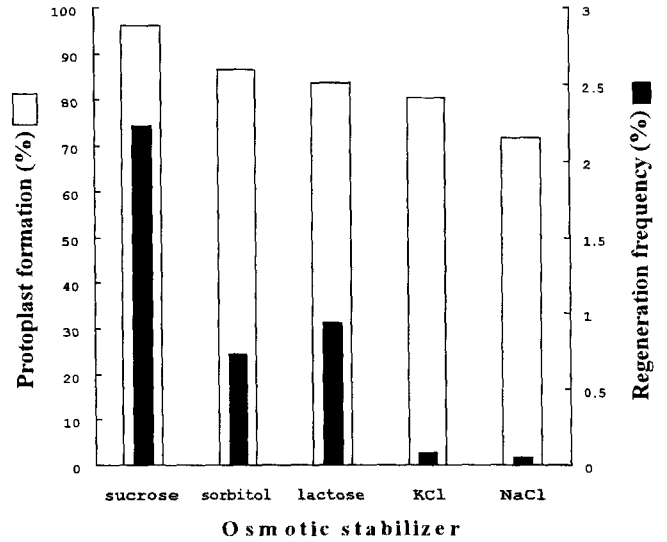


Fig. 4. Effect of osmotic stabilizer on the protoplast formation and regeneration frequency of *B. subtilis* SM-2. Intact cells of *B. subtilis* SM-2 were treated with 1.0 unit/ml penicillin G in MMYE medium for 1hours. DF containing 25 µg/ml lysozyme were treated to the cells for 40 min at 37°C for protoplast formation (PF) and regeneration (RF). Various osmotic stabilizer 0.5 M was added in DF with lysozyme. Regeneration was performed by pourplating the protoplast of two strains on RCM (TSB medium containing 0.5 M sodium succinate) and incubated for 72 hours at 37°C.

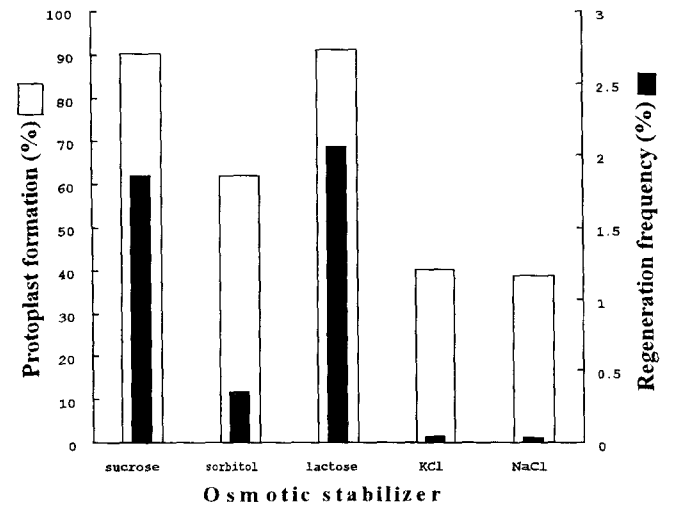


Fig. 5. Effect of osmotic stabilizer on the protoplast formation and regeneration frequency of *B. coagulans* CM-12. Intact cells of *B. coagulans* CM-12 were treated with 0.3 unit/ml penicillin G and 0.5% glycine in MMYE medium for 1.5 hours. DF containing 300 µg/l lysozyme were treated to the cells for 30 min at 37°C for protoplast formation and regeneration frequency. Various osmotic stabilizer 0.5 M was added in DF with lysozyme. Regeneration was performed by pourplating the protoplast of two strains on RCM (TSB medium containing 0.5 M sodium succinate) and incubated for 72hours at 37°C.

킨 lysis fluid를 사용하여 원형질체 형성과 재생율을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. *B. subtilis* SM-2는 0.4 M sucrose를 첨가하였을 때 약 99%의 원형질체 형성율과 2.4%의 재생율을 보여 가장 우수한 결과를 보였고, 농도가 증가할수록

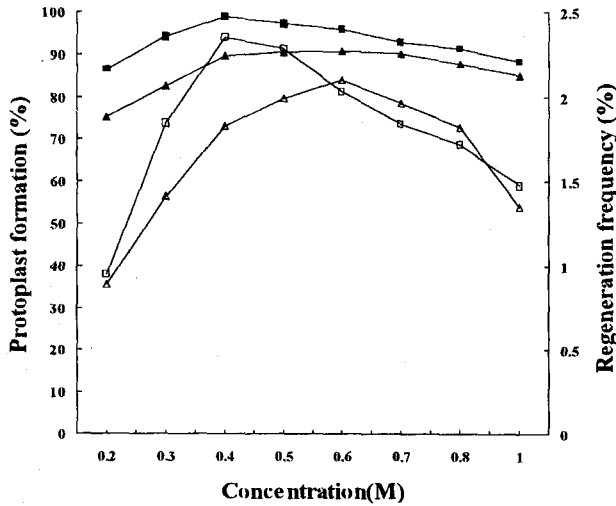


Fig. 6. Effect of osmotic stabilizer concentration on the protoplast formation and regeneration frequency. Sucrose and lactose as osmotic stabilizers were added in DF with lysozyme for protoplast formation (PF) and regeneration frequency (RF) after lysis of *B. subtilis* SM-2 and *B. coagulans* CM-12, respectively. Regeneration was performed by pourplating the protoplast of two strains on RCM (TSB medium containing 0.5 M sodium succinate) and incubated for 72hours at 37°C. ■—■: SM-2 (PF), ▲—▲: CM-12 (PF), □—□: SM-2 (RF), △—△: CM-12 (RF).

원형질체 형성율은 감소하였으나 대체로 1.0 M까지 안정하였다. 재생율은 0.5 M 이상의 농도에는 급격한 감소를 보여 0.5 M 이상의 삼투압 안정제는 오히려 재생에 나쁜 결과를 보였다. 또, *B. coagulans* CM-12의 경우 lactose 0.6 M에서 원형질체 형성율이 90.7%이었고 재생율이 2.1%로 나타나 삼투압안정제로서 가장 적절한 농도였다. 그러나, lactose 농도가 0.5 M과 0.6 M에서 90%이상의 원형질체 형성율을 보였으나 그 외의 농도에서 80%내외로 형성율이 감소하였고 재생율은 0.4 M-0.7 M사이에서 안정하여 *B. subtilis* SM-2에 비해 농도에 의한 영향을 덜 받는 것으로 나타났다. 원형질체 형성에 삼투압 안정제로서 많이 이용되는 sucrose는 균일하고 안정된 원형질체의 형성에 관여하는 것으로 보고되어 있다.²⁹⁾

재생배지내 삼투압 안정제의 영향

재생용 배지에 첨가되는 삼투압 안정제로서 사용되는 고농도의 당과 염을 재생용 기초배지인 TSB에 첨가하여 *B. subtilis* SM-2와 *B. coagulans* CM-12의 재생율을 측정 한 결과는 Fig. 7과 같다. *B. subtilis* SM-2와 *B. coagulans* CM-12 두 균주에 0.5 M의 sucrose를 첨가한 경우가 재생율이 높은 것으로 나타났다. *B. subtilis* SM-2에 sucrose 0.5 M을 첨가한 경우 3.5%의 재생율을 나타내었고, sodium succinate를 첨가하였을 때도 비교적 재생율이 높았으나 그의 안정제들은 큰 효과가 없는 것으로 나타났다. *B. coagulans* CM-12 균주는 0.5 M의 sucrose를 첨가한 경우 5.8%, 0.5 M의 lactose를 첨가한 경우 4.1%로 나타나 대체로 재생율이 높았고 sodium succinate는 *B. subtilis* SM-2와 비슷한 2.2%의 재생율이었다.

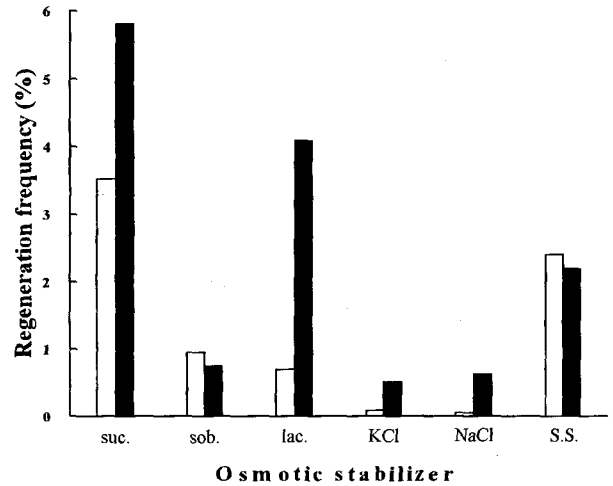


Fig. 7. Effect of osmotic stabilizers in RGM on the regeneration frequency. Protoplasts were regenerated in RGM supplemented with 0.5 M of various osmotic stabilizer. *Suc.: Sucrose, Sor.: Sorbitol, Lac.: Lactose, S.S: Sodium succinate. □: SM-2, ■: CM-12.

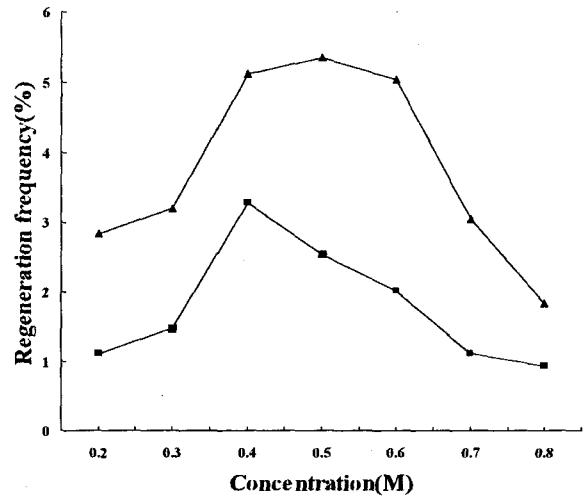


Fig. 8. Effect of sucrose in RGM on the regeneration frequency. Protoplasts were regenerated in RGM supplemented with various sucrose concentration as osmotic stabilizer. ■—■: SM-2, ▲—▲: CM-12.

Sucrose가 재생 배지에서 삼투압의 안정화 작용에 가장 효과적인 것으로 나타나 이들 sucrose의 농도를 0.2~0.8 M으로 첨가한 후 재생율을 검토한 결과는 Fig. 8과 같다. *B. subtilis* SM-2의 경우 sucrose 0.4 M에서 3.3%로 재생율이 가장 높았으나 0.5 M에서는 2.5%로 재생율이 감소하여 농도가 증가할수록 재생율은 감소하는 것으로 나타났다. *B. coagulans* CM-12는 sucrose 0.4 M에서 5.2%였고 0.5 M에서 5.4%, 0.6 M에서 5.1%로 나타나 0.5M에서 재생율이 가장 좋았으나 대체로 0.4-0.6 M까지 재생율이 안정한 결과를 보였으며 0.7 M에서는 3.1%까지 재생율이 감소하였다.

원형질체의 재생율은 손상된 정상세포나 불안정한 상태의 원형질체를 안정적으로 유지시키는 삼투압 안정제의 종류와 농도가 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{26,29)} *Bacillus*속의 재생에 삼투압 안정제로서 주로 sucrose와

sodium succinate가 이용^{14,24,30)} 되지만 균종과 조건에 따라 다양하게 이용되는 것으로 알려져 있다.^{9,26)}

재생배지내 casamino acid의 영향

*Bacillus*속의 영양요구성 균주의 원형질체 재생용배지에는 혈장증량제의 일종인 casamino acid가 첨가될 경우 세포 재생과 증식에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.³⁶⁾

B. subtilis SM-2와 *B. coagulans* CM-12 균주의 세포재생에 미치는 casamino acid의 영향을 조사한 결과는 Fig. 9와 같다. *B. subtilis* SM-2는 casamino acid를 첨가하지 않는 경우 3.34%의 재생율이었으나 0.5% 첨가시 4.2%로 증가하였고 0.7% 첨가시에도 비슷한 재생율을 나타내었으나, 1.0%를 첨가시 재생율은 3.0%까지 감소하는 것으로 나타났다. *B. coagulans* CM-12의 경우는 casamino acid를 첨가하지 않은 경우 약 5.3%를 0.7% 첨가시 5.8%의 재생율을 나타내어 큰 변화는 없는 것으로 나타났다. 그러나 두 균주 모두 0.7%이상 첨가시에는 재생율이 감소하는 것으로 나타나 casamino acid의 과다첨가는 재생에 저해 요소로 작용될 수 있는 것으로 사료된다. Akamatsu 등³¹⁾은 casamino acid가 손상된 원형질체 복구나 원형질체에서 간균상의 세포로의 복귀와 생세포수의 증가등 일반적인 세포대사 활성을 촉진시키는 역할을 한다고 하였다. 성 등²⁴⁾은 *Bacillus*속의 재생에 casamino acid를 0.5% 첨가하였을 때 재생 빈도의 증가가 있었다 하였고, 김과 이²⁶⁾는 *B. pumillus*와 *Cellulomonas fimi*간의 융합 실험에서 두 균주의 재생에 casamino acid 0.1%를 투여할 때 재생에 효과적이라고 하였다. 또한, 임²⁷⁾은 *Brevibacterium fermentum*의 재생에 casamino acid 0.5%가 유용하다고 보고하였는데 본 연구에서의 casamino acid 첨가량이 이들 연구 결과보다 다소 높았다.

재생배지내 PVP, gelatin 과 dextran의 영향

재생배지내 혈장증량제의 일종인 PVP, gelatin과 dextran 첨가는 재생율을 높여주는 역할을 한다고 알려져 있다.^{9,29,31)}

PVP, gelatin, dextran을 각각 농도별로 첨가 후 재생율을

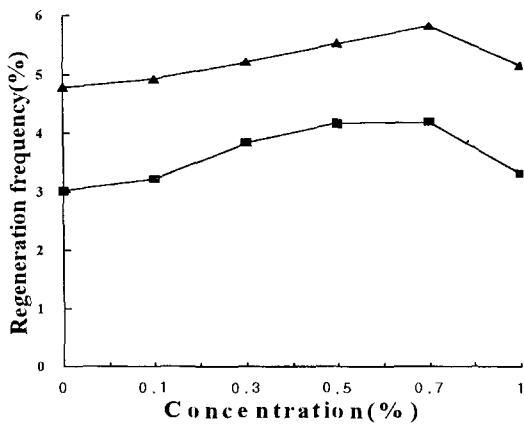


Fig. 9. Effect of casamino acid in RGM on the regeneration frequency. Protoplasts were regenerated in RGM supplemented with 0.5 M sucrose and various casamino acid concentration. ■—■: SM-2, ▲—▲: CM-12.

검토한 결과는 Fig. 10과 같다. *B. subtilis* SM-2의 경우 PVP를 1.0%첨가하였을 때 4.7%로 재생율이 가장 높았으며 대개 0.5~1.5%까지 재생율은 거의 비슷하게 나타났다. 그러나 PVP함량이 2.0%이상에서는 오히려 재생율이 급격히 감소하여 PVP의 농도가 재생에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. *B. coagulans* CM-12 역시 PVP 1.0%에서 8.9%의 재생율을 나타내어 PVP를 첨가하지 않은 것보다 재생율이 월등히 증가하였고 역시 *B. subtilis* SM-2와 마찬가지로 2%이상에서는 재생율의 급격한 감소를 보였다. Gelatin과 dextran의 경우는 무첨가군 보다 첨가시 오히려 재생율이 감소하여 재생에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

Akamatsu 등³¹⁾은 PVP가 철, 색소, 수용성 비타민류 등을 결합하여 재생세포 내로 전달함으로써 세포의 재생을 돕는다고 하였으며, 임²⁷⁾은 *Brevibacterium*속, *Corynebacterium*속 등의 재생에 PVP 3%가 김과 이²⁶⁾는 PVP 1.5%가 세포재생에 효과적이었다고 한 결과와 비교하였을 때 본 실험의 결과는 다소 낮은 농도이었다.

재생배지내 Ca²⁺과 Mg²⁺이온의 영향

재생배지내 Ca²⁺과 Mg²⁺이온의 첨가는 PVP와 같이 재생에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다.²⁹⁾

B. subtilis SM-2와 *B. coagulans* CM-12의 재생에 미치는 Ca²⁺과 Mg²⁺이온의 영향을 조사하기 위해 MgCl₂와 CaCl₂를 0~100 mM로 단독 혹은 복합적으로 첨가 후 재생에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. *B. subtilis* SM-2의 경우는 MgCl₂를 단독으로 첨가한 경우가 첨가하지 않은 것보다 재생율이 낮게 나와 MgCl₂단독으로는 재생에 큰 영향이 없는 것으로 나타났다. 그러나 CaCl₂의 경우 25 mM과 50 mM의 첨가시 무첨가의 경우보다 재생율이 더 높게 나

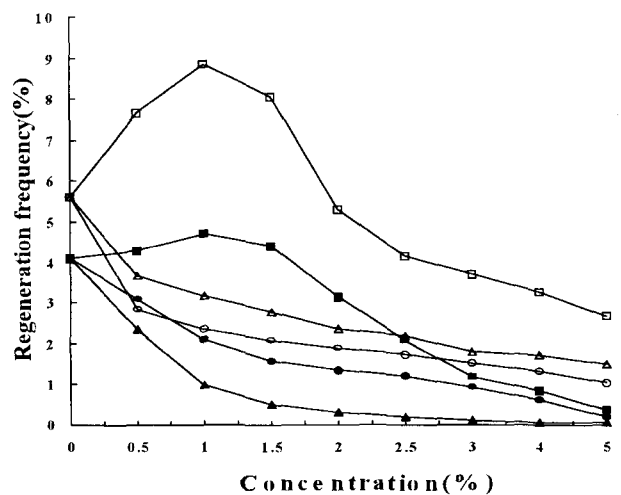


Fig. 10. Effect of PVP, dextran and gelatin in RGM on the regeneration frequency. Protoplasts were regenerated in RGM supplemented with 0.5 M sucrose and 0.7% casamino acid and various PVP, dextran and gelatin concentration. ■—■: PVP (SM-2), ▲—▲: gelatin (SM-2), ●—●: dextran (SM-2), □—□: PVP (CM-12), △—△: gelatin (CM-12), ○—○: dextran (CM-12).

Table 2. Effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ ion on regeneration frequency of *B. subtilis* SM-2 and *B. coagulans* CM-12

MgCl ₂ (mM)	CaCl ₂ (mM)	Regeneration frequency (%)	
		<i>B. subtilis</i> SM-2	<i>B. coagulans</i> CM-12
-	-	4.3	8.4
25	-	4.0	8.3
50	-	3.8	8.9
100	-	3.6	8.1
-	25	4.6	9.0
-	50	4.9	9.2
-	100	3.1	8.8
25	25	5.2	10.2
25	50	4.9	10.3
25	100	5.0	9.9
50	25	4.7	9.0
50	50	3.3	7.4
50	100	4.2	7.6
100	25	2.7	6.8
100	50	1.7	6.3
100	100	1.2	5.8

Protoplast were regenerated in RGM supplemented with 0.5 M sucrose, 0.7% casamino acid, 1% PVP and different concentration of CaCl₂ and/or MgCl₂.

왔으나 100 mM에서는 오히려 감소하였다. 그러나 MgCl₂와 CaCl₂를 각각 25 mM씩 혼합 첨가한 경우 5.2%를, 각각 50 mM과 25 mM을 혼합 첨가한 경우 5.0%의 재생율을 보여 혼합 첨가시 재생율이 높았으나 CaCl₂이 고농도로 첨가될수록 오히려 재생율은 감소하여 25 mM이 적정농도였다. *B. coagulans* CM-12도 *B. subtilis* SM-2와 비슷한 경향을 보여 25 mM씩 혼합 첨가할 경우 10.2%, MgCl₂ 25 mM과 CaCl₂ 50 mM 혼합 첨가시 10.3%로 거의 비슷한 재생율을 나타내었다.

Ca²⁺과 Mg²⁺이온의 첨가 효과는 이들 양이온이 삼투안정제와 PVP등에 작용하여 효과를 갖는다는 보고²⁹⁾와 원형질체의 재생 과정에서 2가 양이온의 결핍에 의한 ATPase의 손실과 막의 분절현상을 방지함으로써 막의 안정화 현상을 갖는다는 보고³⁰⁾가 알려져 있다.

원형질체의 재생배지내 도말방법의 영향

원형질체의 재생시 재생배지의 표면에 도말한 것과 soft agar를 원형질체와 함께 재생 고체배지에 증충 할 때 soft agar와 재생배지에 사용되는 solid agar의 양이 재생에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.^{11,12)}

원형질체의 재생에 영향을 미치는 재생용 배지에 solid agar의 농도를 변화시켜 제조한 것에 도말 후 배양한 것과 재생용 배지에 1.5% solid agar에 soft agar의 양을 변화시켜 증충한 후 배양할 때 재생율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 재생에 미치는 도말 방법과 agar양의 영향에서 도말 방법으로는 spread방법 보다 soft agar와 함께 재생용 배지에 증충 하는 것이 재생에 효과적이었다. 특히, 두 균주 모두 soft agar를 0.4% 함유한 재생용 soft agar에 원형질체를 같이 증충한 것이 재생에 효과적인 것으로 나

Table 3. Effect of plating method and agar concentration on the regeneration frequency of *B. subtilis* SM-2 and *B. coagulans* CM-12

Overlay medium (soft agar, %)	RGM medium (solid agar, %)	Regeneration frequency (%)	
		<i>B. subtilis</i> SM-2	<i>B. coagulans</i> CM-12
- ¹⁾	RGM (1.5%)	2.1	4.9
- ¹⁾	RGM (1.8%)	2.3	4.6
- ¹⁾	RGM (2.0%)	1.9	4.2
RGM (0.3%) ²⁾	RGM (1.5%)	4.8	9.3
RGM (0.4%) ²⁾	RGM (1.5%)	5.1	10.3
RGM (0.5%) ²⁾	RGM (1.5%)	4.9	10.1
RGM (0.6%) ²⁾	RGM (1.5%)	4.7	9.9
RGM (0.7%) ²⁾	RGM (1.5%)	4.6	9.8
RGM (0.8%) ²⁾	RGM (1.5%)	4.3	8.6

¹⁾Spread plating method.

²⁾Pour plating method.

Protoplasts were spreaded on to RGM without soft agar and were overlaid on to RGM with soft agar medium.

타났다. 이때의 재생율은 *B. subtilis* SM-2의 경우, 5.1%, *B. coagulans* CM-12는 10.3%였다.

감사의 글

본 연구는 1998학년도 대구대학교 교비지원에 의한 연구로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Moore, C. O., Tuschhoff, J. V., Hasting, C. W. and Schanefelt, R. V. (1984) Application of starches in foods. 2nd ed., Academic Press, New York, p.571.
- Nakas, J. P. and Henwood, A. (1989) Microbes make polysaccharides from hemicellulose, *Bioprocessing Technol.* June, 6-7.
- Burton, K. A., Cadmus, M. C. and Watson, P. R. (1976) A unique biopolymer from *Rhinochadiella mansonii* NRRL Y-6272; Production in 20 liter fermentors. *Biotechnol and Bioeng.* **18**, 1669-1677.
- Yoshida, Y., Suzuki, R. and Yagi, Y. (1988) Production of levan by a *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 252-260.
- Bodie, E. A., Schwarzfz, R. D. and Catene, A. (1985) Production and characterization of a polymer from *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(3), 629-633.
- Sutherland, I. W. (1979) Microbial polysaccharides and polysaccharase, in Barkeley, R. C. W., G. W. Gooday and D. C. Ellwood(eds), Academic Press, pp1-34.
- 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.
10. Kao, K. N. and Michayluk, M. R. (1974) A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* **115**, 355-367.
 11. Anne, J., Eyssen, H. and De Sommer, P. (1976) Somatic hybridization of *Penicillium roqueforti* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature* **262**, 719-721.
 12. Sipiczki, M. and Ferenczy, L. (1977) Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. *Mol. Gen. Genet.* **151**, 77-81.
 13. Schaeffer, P., Cami, B. and Hotchkiss, R. D. (1976) Fusion of bacterial protoplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**(6), 2151-2155.
 14. Kaneko, H. and Sakaguchi, K. (1979) Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **43**(5), 1007-1013.
 15. 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.
 16. Götz, F., Ahmé, S. and Lindberg, M. (1981) Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion Staphylococci. *J. Bacteriol.* **145**, 74-81.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Lee, Y. L., Kim, S. H., Cheong, N. H. and Yim M. H. (1992) A study on the production of viscous substance during the *Chungkookjang* fermentation. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **35**(3), 202-209.
 20. Lederberg, J. and Zinder, N. (1948) Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. *J. Amer. Chem. Soc.* **70**, 4267-4268.
 21. Szybalsky, W. (1952) Microbial selection I. Gradient plate technique for study of bacterial resistance. *Science* **116**, 46-48.
 22. Makoto, I. (1971) Metabolic maps. Kyoitsu Pub. Co., Tokyo, p.12.
 23. Hammes, W., Schleifer, K. H. and Kandler, O. (1973) Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **116**(2), 1029-1053.
 24. 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.
 25. Ryu, B. H., Kim, H. S., No, M. H., Park, B. G., Jung J. S. and Bae, K. C. (1989) Improvement of L-Lysine productivity by using cell fusion and immobilized system. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**(1), 154-163.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Han, S. O., Chung, M. K. and Lee, H. H. (1987) Electron microscopy observation of protoplast formation of *Streptomyces mitakaensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**(2), 95-97.
 29. 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.
 30. 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.
 31. Akamatsu, T. and Sekiguchi, J. (1981) Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplasts. *Agric. Biol. Chem.* **45**(12), 2887-2894.
 32. Rogers, H. J. Perkins, H. R. and Ward, J. B. (1980) Microbial cell walls membranes. Chapman & Hall, London.

Protoplast Formation and Regeneration 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 *Bacillus* strains producing biopolymer, conditions for protoplast formation and regeneration were investigated in biopolymer producing *Bacillus subtilis* K-1 and lactose utilizing *Bacillus coagulans*. *Bacillus subtilis* K-1 mutant (SM-2) and *Bacillus coagulans* mutants (CM-12) were marked auxotrophic and antibiotics-resistant (SM-2) and an antibiotics-resistant mutants, respectively. To formate protoplasts derived from the mutants, conditions were established as follows. For *B. subtilis* mutant SM-2, its culture in mid-logarithmic phase was added with penicillin G (1.0 unit/ml) and further reacted for 1.5 hr. Cells were collected and then treated in lysis fluid (pH 7.0) containing 0.4 M sucrose and lysozyme (25 µg/ml) for 40 min at 37°C. Protoplast formation was very successful (99.6%) and the ratio of cell wall regeneration was 2.4%. For *Bacillus coagulans* mutant CM-12, its mid-logarithmic phase culture was treated with penicillin G (0.3 unit/ml) and glycine (0.5%) for 1hr. Cells were collected and then resuspended in lysis buffer (pH 7.0) containing 0.6 M lactose and lysozyme (300 µg/ml) for 30 min at 37°C. Protoplast formation was also successful (90.8%) and cell wall regeneration ratio was similar to SM-2 (2.2%). To improve regeneration frequency, regeneration medium was obtained as followed condition,. Cell wall regeneration was improved 2-4 folds with 5.1% for *B. subtilis* SM-2 and 10.3% for *B. coagulans* CM-12 when protoplasts mixed with soft top agar(0.4%) was overlaid onto trypticase soy broth medium containing 0.4 M sucrose, 0.7% casamino acid, 1% PVP, 25 mM MgCl₂, 25 mM CaCl₂ and 1.5% agar.

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

* Correspond author