

***Pseudomonas* spp. 의 원형질체 생성과 재생**

이주실 · 이영록

고려대학교 이과대학 생물학과

**The Spheroplast Formation and Regeneration of
Pseudomonas spp.**

Lee, Joo-Shil, Yung-Nok Lee

Department of Biology, College of Science, Korea University, Seoul, Korea

The optimal conditions for the formation and the regeneration of *Pseudomonas* spheroplast were measured. *Pseudomonas* spp. cells were transformed to spheroplasts from 99.0% to 99.9% by treatment of 100 ug/ml lysozyme and 10mM EDTA at room temperature. The optimal pH for the spheroplast formation was pH 8.0. Magnesium chloride, calcium chloride and streptomycin were effective on the stabilization of *Pseudomonas* spheroplast, while Mg⁺ and Na⁺ ions were effective on the formation of *Pseudomonas* spheroplast. Rich Regeneration Medium was used for the regeneration of *Pseudomonas* spheroplast. To improve regeneration frequency, Bovin Serum Albumine and cationic ions were added to the spheroplast dilution beffer and regeneration environment respectively. Treatment of 20mM calcium chloride in the Rich Regeneration Medium could improve the yield of regenerants as much as 28-fold. Treatment of 1% Bovin Serum Albumine in the spheroplast formation and dilution buffer increased the yield of regenerants to 10-fold. Also, the regeneration frequency was improved to 14-fold when Rich Regeneration Meidum containing 0.5% Gelatin was used for regeneration as well as 1% Bovin Serum Albumine.

공해물질인 방향족 탄화수소를 분해하는 능력이 강력하고 다양한 균주를 개발하는 것은 공장 폐수나 농약 등으로 오염된 자연환경을 정화하는 데 크게 기여하게 될 것이다.

다른 유전자 재조합 방법에 비해 염색체 재조합 빈도가 높고, 플라스미드의 도입수단으로서도 이용할 수 있는 원형질체 융합법은 Foder and Alföldi (1976)와 Schaffer *et al.*, (1976)이 각각 세균에서는 처음으로 *Bacillus*의 원형질체 융합에 성공한 이래, *Bacillus*속 (Gabor and Hotchkiss, 1979; Sanchez-Rivas, 1982)과 *Streptomyces*속 (Hopwood, 1979; Kozo

et al., 1979)에서 집중적으로 연구되어 왔고, *Brevibacterium* (Kaneko and Sakaguchi, 1979)과 *Staphylococci* (Götz and Lindberg, 1981) 등에서도 연구가 활발히 진행되고 있다.

그러나 이들은 모두 그람양성균이며 그람음성균에 대한 연구는 *E. coli* (Tsenin *et al.*, 1978)와 *Providencia alkalifaciencie* (Coetzee *et al.*, 1979)에서 몇 편 보고 되었을 뿐이고, 특히 *Pseudomonas*에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 상태에 있다.

본 연구실에서는 우리나라 자연환경에서 분리 동정한 *Pseudomonas* 중 방향족 탄화수소를

자화하는 능력이 있는 균주를 심별한 바 있는데 (Kim and Lee, 1984), 본 연구에서는 원형질체 용합에 의해 보다 강력하고 다양한 탄소수소 자화균주를 개발하고자 우선, *Pseudomonas* 의 원형질체 형성 및 재생에 미치는 여러가지 환경요인들의 영향을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 본 연구실에서 분리 동정한 *Pseudomonas putida* KU 188, *P. putida* KU218, *P. aeruginosa* KU141, *P. sp.* KU33, *P. sp.* KU51 (Kim and Lee, 1984), 그리고 *P. aeruginosa* PAO303 등이다.

원형질체의 생성

Birdsell and Cota-Robels(1967) 의 방법을 변형하여 원형질체 생성을 유도하였다.

NB(Nutrient Broth)배지 10ml에 *Pseudomonas* 를 접종하여 진탕배양기에서 하룻밤을 배양한 후, 배양액 0.5ml를 새로운 NB배지 50ml에 접종하여 6시간 배양하였다. 배양액을 9,000 r. p. m에서 5분간 원심분리하여 수확한 후 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8)로 세척하였다. 0.5 M 슈크로오스와 20 mM MgCl₂가 첨가된 Tris-HCl 완충액으로 최종세포농도가 600nm에서의 흡광도가 2.0 (5.0~8.0 × 10⁸ cells/ml)이 되게 재현탁하였다. 이 세포현탁액에 ml당 100 μg의 lysozyme을 첨가하여 15분간 처리하고, 여기에 현탁액과 동량의 10 mM EDTA를 첨가하여 상온에서 10분간 정치배양하여 원형질체를 생성하였다.

원형질체 생성물은 Osmotic sensitivity와 Nutrient agar 평판배지에서 성장하는 정상 세포수를 총 세포수에서 뺀 수로 측정하였고, 생성된 원형질체의 형태는 전자현미경으로 관찰하였다.

Osmotic sensitivity

Osmotic sensitivity는 원형질체 현탁액과 증류수의 비율을 1:5로 혼합하여 600 nm에서의

흡광도를 측정하여, 정상세포의 흡광도에 대한 감소율을 %로 표시하여 Osmotic sensitivity를 측정하였다.

Leakage 양

Lysozyme-EDTA로 처리된 세포현탁액은 원형질체와 정상세포를 제거하기 위해 원심분리한 후, 침전물을 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 흡광도의 증가율(%)로 유출양을 나타내었다. 이때 슈크로오스와 2가 양이온이 첨가되지 않은 상태에서 완전히 용해된 용액의 260 nm에서의 흡광도를 100%로 하여 기준치로 삼았다.

원형질체의 전자현미경적 관찰

원형질체를 0.5M 슈크로오스와 20 mM MgCl₂를 포함하고 있는 0.2M 카코딜레이트 완충액(pH 6.2)에 녹인 1% 글루타르알데하이드로 전고정하여(Frehel et al., 1979), 3회 세척한 후 1% O₃I₂로 후고정하였다. 고정된 시료를 재세척한 다음 아세톤으로 탈수하고 Epon으로 포매하였다. 시료를 LKB 2088 ultratone으로 절편을 만들어 우라닐아세테이트와 리드사이트 레이트로 염색하여(Venable et al., 1965) 전자현미경으로 관찰하였다.

원형질체의 재생

Pseudomonas 원형질체의 재생을 위해서는 RRM (Rich Regeneration Media ; Coetzee et al., 1979) 배지를 사용하였다.

Lysozyme과 EDTA를 처리하여 생성시킨 원형질체를 원심분리한 후, 침전물을 0.5M 슈크로오스와 20 mM MgCl₂가 포함된 Tris-HCl 완충액으로 재현탁하고 적당히 희석하였다. 희석된 원형질체 현탁액 0.1ml를 RRM Top agar 2.5 ml에 넣어 RRM 평판배지에서 3일간 중층 배양하였다. 재생율은 생성된 원형질체에 대한 재생된 콜로니 수를 100분율로 표시하였다.

결과 및 고찰

원형질체의 생성을 위한 최적조건

lysozyme의 효과

원형질체를 효과적으로 생성시키는 lysozyme의 최적농도를 구하기 위하여 세포현탁액 ml당 lysozyme을 20 μg에서 150 μg까지 첨가하여

Table 1. Effect of lysozyme concentration on the formation of *Pseudomonas* spp. spheroplasts.

Lysozyme ($\mu\text{g/ml}$)	Osmotic sensitivity (%) ^a	
	<i>P. putida</i> KU188	<i>P. aeruginosa</i> KU141
20	22.4	24.0
40	51.4	62.8
60	60.8	67.2
80	68.8	72.8
100	71.4	76.4
150	71.4	68.4

a; Osmotic sensitivity was detected as percent decrease in turbidity. A fall in optical density at 600nm indicates lysis.

원형질체를 생성시켰다.

Lysozyme의 최적농도는 사용균주에 관계없이 모두 100 $\mu\text{g/ml}$ 인 것으로 나타났으며, 20 μg 에서 100 μg 까지는 원형질체의 생성이 증가되나 100 μg 이상에서는 100 μg 을 처리한 경우와 거의 동일한 효과를 나타내었다. 그 결과를 Table 1에 표시하였다.

EDTA의 효과

그람 음성균의 원형질체를 생성하기 위한 연구들(Witholt *et al.*, 1976; Weiss, 1976)에서 EDTA 처리의 중요성이 인식되었다. 그람 음성균인 *Pseudomonas*의 원형질체 생성에 미치는 EDTA의 효과를 조사하기 위하여, 농도별로 EDTA를 처리하여 원형질체를 생성시켰다. 그 결과 EDTA의 최적농도는 10mM이었고, 균주간에 큰 차이는 없었다(Table 2).

pH의 영향

수소이온 농도가 원형질체 생성에 미치는 영

Table 2. Effect of EDTA concentration on the formation of *Pseudomonas* spp. spheroplasts.

EDTA (mM)	Osmotic sensitivity (%)	
	<i>P. putida</i> KU188	<i>P. aeruginosa</i> KU141
20	62.1	72.3
10	68.0	74.2
2	62.4	73.8

향을 조사하였다.

최적 pH는 8.0이었고 산성쪽으로 갈수록 원형질체 생성이 저조하였다(Table 3). *Bacillus* 속의 원형질체 생성에 많이 사용되고있는 SMM 완충액의 pH는 6.5인데(Wyrick and Rogers, 1973), *Pseudomonas*의 경우에는 이 수소이온 농도에서는 원형질체의 생성이 매우 저조하였다. 그러나 Table 3에서 보는 바와 같이 pH 8.0에서는 상당히 촉진되었는데 이는 *E. coli*의 경우에 있어서도 비슷하다(Weiss, 1976).

Table 3. Effect of pH on the formation of *Pseudomonas* spp. spheroplasts.

pH	Osmotic sensitivity (%)	
	<i>P. putida</i> KU188	<i>P. aeruginosa</i> KU141
6.8	44.1	46.4
7.2	72.6	72.4
7.6	75.5	70.0
8.0	80.2	82.4
8.4	80.6	74.0

온도와 진탕 효과

원형질체를 생성시키기 위한 효소처리시의 온도는 세균의 종류와 균주에 따라 다양하였고, 효소처리 방법도 정지상태에서 처리하거나 또는 진탕시키면서 처리하는 등 그 방법이 다양하였다(Frehel *et al.*, 1979; Elliott *et al.*, 1975).

*Pseudomonas*의 원형질체를 생성하는데 미치는 온도와 진탕의 효과는 앞서의 lysozyme과 EDTA의 농도 및 pH의 경우와는 달리 균주에 따라 비교적 큰 차이를 보였다. 사용된 모든 균주에서 거의 동일한 효과를 나타내는 조건은 정지상태의 상온에서 효소를 처리하였을 때였으며, *P. species* 33과 *P. species* 51은 조사한 온도범위 내에서는 온도가 높아질수록 오히려 역효과를 나타내었다(Table 4).

Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ion이 원형질체 생성에 미치는 영향

*Streptomyces*의 원형질체 생성에 효과가 있다고 보고된(Okanishi, 1974) Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ion들이 *Pseudomonas*의 원형질체 생성에는 어떻게 작용하는 지를 조사하였다.

원형질체 생성에 가장 효과적인 것으로 나타난 ion은 Na^+ 로서, 1mM NaCl을 첨가하였을 때 Na^+ ion을 첨가하지 않은 대조구 보다 10배 이상 원형질체가 생성되었다. 원형질체 생성과

안정화에 모두 효과가 있는 ion은 Mg^{+2} ion 이었고, Na^+ ion은 원형질체 생성에는 효과적이었으나 원형질체를 안정화시키는 데에는 별다른 효과가 없었다.

Table 4. Effect of temperature and shaking on the formation of *Pseudomonas* spp spheroplasts.

Temp. (°C)	Cond.	Osmotic sensitivity (%)					
		<i>P. putida</i> KU188	<i>P. putida</i> KU218	<i>P. aeruginosa</i> KU141	<i>P. aeruginosa</i> PAO303	<i>P. species</i> KU33	<i>P. species</i> KU51
21	^a S	68.1	77.0	68.0	63.0	68.0	54.8
	^b US	63.3	81.6	72.0	75.2	80.8	93.0
37	S	63.6	70.6	65.6	87.9	72.0	41.0
	US	70.9	80.7	64.0	75.1	71.9	66.6
42	S	51.8	63.3	72.8	72.0	60.9	78.9
	US	51.8	66.9	69.6	73.0	22.9	20.0

^aS : Shaking, ^bUS: Unshaking Cond: Shaking condition

Table 5. Effect of Na^+ , Mg^{+2} and Ca^{+2} ions on the formation of spheroplast.

Conc. of cation (mM)		<i>P. putida</i> KU188			<i>P. aeruginosa</i> PAO303		
		osmotic shock	leakage (%)	osmotic resistant cells	osmotic shock	leakage (%)	osmotic resistant cells
NaCl	50	0.021	110.5	8.0×10^5	0.031	70.0	5.3×10^6
	30	0.028	94.2	1.0×10^5	0.036	106.2	2.0×10^5
	10	0.019	96.9	3.5×10^5	0.032	99.2	2.6×10^6
	1	0.018	101.7	$<1.0 \times 10^5$	0.055	102.3	2.3×10^5
MgCl ₂	50	0.139	35.0	9.0×10^5	0.184	57.0	2.4×10^7
	30	0.135	36.8	2.1×10^5	0.196	43.3	2.4×10^7
	10	0.148	36.8	1.5×10^5	0.184	42.1	2.3×10^7
	1	0.034	79.8	2.2×10^5	0.118	42.1	2.0×10^6
CaCl ₂	50	0.191	56.1	9.1×10^6	0.210	43.7	1.9×10^7
	30	0.200	56.1	9.1×10^6	0.191	52.7	1.4×10^7
	10	0.175	38.1	6.5×10^6	0.196	47.2	2.8×10^7
	1	0.080	62.2	3.8×10^6	0.068	54.3	1.0×10^6
No. addition		0.032	100	4.2×10^6	0.046	100	1.9×10^6

Spheroplasts of *Pseudomonas* spp. were prepared by Lysozyme-EDTA in Tris-HCl buffer (pH8.0) contained each ion and 0.5M sucrose. To detect the osmotic shock, 5ml of distilled water was added to 1ml of the spheroplast suspension. And then, the light absorption at 600nm of the samples were detected. To determine the amount of leakage, the spheroplast suspension was centrifuged. Leakage was expressed as the percentage increase in light absorption at 260nm (E_{260}) in the supernatant fluid, taking the increase in E_{260} in the completely lysed fluid without the addition of sucrose and cations as 100%. The pellet was resuspended and diluted with 10mM Tris-HCl buffer contained each ion and 0.5 M sucrose. 0.1ml of the sample was spread on the NA media to detect osmotic resistant cells.

Fusogen으로도 사용되고 (Foder and Alföldi, 1976), 원형질체에서 정상세포로의 재생에도 효과적으로 작용한다고 보고된 (Landman *et al.*, 1968) Ca^{+2} ion은 *Pseudomonas*의 원형질체 생성에는 오히려 역효과를 나타내어 Ca^{2+} ion의 농도가 높아질수록 원형질체 생성율이 낮아졌다 (Table 5).

원형질체의 안정성

원형질체의 안정성을 높이는 여러가지 화학물질에 대한 연구에서 (Tabor, 1962) 원형질체를 안정화 시킨다고 보고된 것들 중 몇 가지에 대하여 *Pseudomonas*에서도 같은 작용을 하는가를 조사하였다.

그 결과 0.5M 슈크로오스 용액을 제외하고 원형질체의 안정화에 기여하는 것은 균주에 따라 다소의 차이는 있었으나 $MgCl_2$, $CaCl_2$, Streptomycin 수용액이 효과적이었다 (Table 6). 이러한 결과는 Tabor (1962)가 *E. coli*와 *Mi-*

*crococcus*에서 실험한 결과와 일치한다. 또한 $MgCl_2$ 와 $CaCl_2$ 는 *Streptomycete*에서도 같은 효과를 나타낸다고 보고되었다 (Okanishi *et al.*, 1974).

원형질체의 전자현미경적 관찰

P. putida KU188의 정상세포와 lysozyme과 EDTA로 처리된 원형질체를 전자현미경으로 관찰하였다.

*Pseudomonas putida*의 세포 외투막은 정상세포를 고정하여 절편으로 만든 시료에서 잘 관찰되었는데 Fig. 1(a, b)는 외층막과 세포막으로 된 envelope의 형태를 잘 나타낸다. Fig. 2(a~d)는 *P. putida* KU188의 원형질체의 형태이다.

*P. putida*의 외층막은 모든 세포에서 100% 제거되지는 않았고, 외층막이 절단되어 벗겨지기 시작하는 세포에서 (Fig. 2; a, b) 거의 100% 제거된 세포까지 제거된 정도가 다양하였다 (Fig. 2; c, d).

Table 6. *Pseudomonas spp. spheroplast stability in various solutions*^a

Solutions	Optical density			
	<i>P. putida</i> KU188	<i>P. putida</i> KU218	<i>P. aeruginosa</i> KU141	<i>P. aeruginosa</i> PAO303
0.5M sucrose	0.185	0.250	0.145	0.120
distilled water	0.038	0.044	0.021	0.016
0.001M $MgCl_2$	0.105	0.129	0.085	0.084
0.001M $CaCl_2$	0.160	0.220	0.125	0.140
0.01M KCl	0.053	0.060	0.030	0.090
0.01M NaCl	0.068	0.071	0.040	0.084
0.01M NH_4Cl	0.070	0.064	0.039	0.069
0.01M L-lysine HCl	0.060	0.060	0.032	0.030
0.01M streptomycin	0.155	0.180	0.121	0.103
control ^b	0.165	0.174	0.165	0.140

a: *Pseudomonas* species cells were converted spheroplasts by lysozyme-EDTA procedure. To investigate the stability of spheroplast, samples (1 ml) of the spheroplast were added to 5 ml of the solution indicated and then detected optical density at 600nm. A fall in optical density indicates lysis.

b: Normal *Pseudomonas* cells (1 ml) were added to distilled water 5 ml and then detected optical density.

Table 7. Effect of di-cation on the regeneration of *Pseudomonas putida* KU188

Di-cation added to RRM media		Regeneration	
$MgCl_2$ (mM)	$CaCl_2$ (mM)	No. of Colony	Increased rate (%)
—	—	35	100
10	—	44	125
20	—	30	85
50	—	49	145
—	10	920	2678
—	20	1000	2857
—	50	600	1714
10	10	102	291
10	20	112	320
10	50	60	171
20	10	109	311
20	20	76	217
20	50	102	291
50	10	36	102
50	20	55	157
50	50	78	222

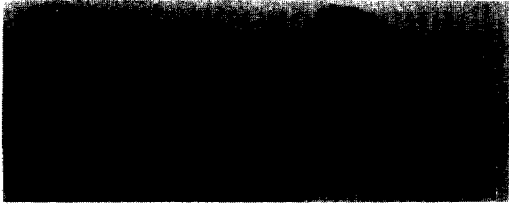


Fig. 1. (a, b) Thin section of normal *Pseudomonas putida* KU188.
OM, outer membrane; CM, cytoplasmic membrane

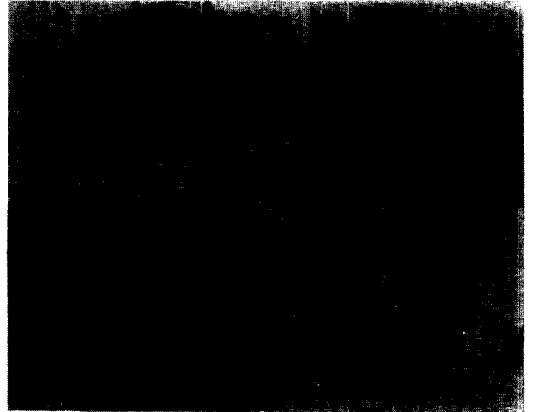


Fig. 2. (a, b) Thin section of Lysozyme-EDTA treated spheroplast.
Note the break in the outer membrane.
(c, d) Thin section of Lysozyme-EDTA treated spheroplast.
Note the outer membrane and the presence of a cytoplasmic membrane bounding the cytoplasm.

외층막이 완전히 제거되지 않고 세포막에 남아 있는 형태는 *E. coli*의 원형질체 (Birdsell and Cota-Robels)나 *Providencia altalifaciencia*의 원형질체 (Coetzee et al., 1979)의 전자현미경 사진에서도 관찰된 바 있다. 특히 *P. alcalifaciencia*에서는 원형질체의 외층막의 15% 정도가 벗겨졌는 데도 원형질체의 융합이 이루어진 것으로 미루어, 외층막이 100% 제거되지 않아도 융합이 일어나며, 다만 제거된 정도는 융합율에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

원형질체의 재생을 위한 최적조건

원형질체 재생에 미치는 양이온의 효과

Pseudomonas 원형질체의 재생에 미치는 2가 양이온의 효과를 조사하기 위하여 RRM배지에 $MgCl_2$ 와 $CaCl_2$ 를 농도별로 첨가하여 이들 2가 양이온의 효과를 조사하였다.

그 결과 $MgCl_2$ 는 원형질체의 재생에 뚜렷한 효과가 없었고 20 mM $CaCl_2$ 를 단독으로 처리하였을 경우 재생율이 28배까지 증가하였다. 또한 $MgCl_2$ 와 $CaCl_2$ 를 함께 처리한 경우에는 Ca^{2+} ion만을 단독으로 처리했을 때보다 오히려 재생율이 낮았으며, 이러한 현상은 Mg^{2+} ion 농도가 높아질수록 더욱 뚜렷하게 나타났다 (Table 8).

원형질체의 재생에 미치는 BSA와 Gelatin의 효과

원형질체의 생성과 회색에 사용되는 완충액에 BSA를 첨가함으로써 원형질체의 재생을 도울 수 있었으며 또한 재생배지에 Gelatin을 첨가함으로써 원형질체의 재생율이 약간 증가되었다.

BSA를 0.5 M 슈크로오스와 20 mM $MgCl_2$ 를 포함하고 있는 10mM Tris-HCl완충액에 0.1%에서 1.0%까지 농도별로 첨가하여 원형질체를 생성시킨 후 적당히 희석하여 RRM배지에서 재생시켰다. 0.1%에서 0.5%까지는 원형질체의 재생에 영향을 미치지 못했으나 1% BSA를 첨가한 경우에는 약 10배 가까이 재생율이 증가되었다. 또한 RRM배지에 0.5% Gelatin을 첨가함으로써 얻어진 재생율의 증가는 별로 뚜렷하지 못했다.

Table 8. Effect of BSA and gelatin on the regeneration *Pseudomonas putida* KU188

	Concentrations (%) of BSA				
	0	0.1	0.3	0.5	1
RRM media	80×10^5	160×10^5	200×10^5	200×10^5	770×10^5
RRM+0.5% gelatin media	35×10^5	150×10^5	150×10^5	110×10^5	1070×10^5

a: Regenerated cell number

Table 9. Regeneration efficiency of *Pseudomonas* strains

Strains	<i>P. putida</i> KU188	<i>P. putida</i> KU218	<i>P. aerugi- nosa</i> KU141	<i>P. aeruginosa</i> PA0303
Sphero - plasts (No./ml)	1.4×10^9	7.9×10^8	1.5×10^9	8.0×10^8
Regenerated cells (No./ml)	1.0×10^8	2.5×10^7	1.1×10^8	1.1×10^8
Regenerated frequency (%)	6.6	3.1	6.8	13.5

다. 그러나 1% BSA 처리구에서 생성된 원형질체를 재생시킬 때에는 RRM배지에 Gelatin을 첨가한 경우 14배까지 재생율이 증가되었다.

이러한 결과는 재생율이 증가된 정도에는 차이가 있지만 Gabor and Hotchkiss (1978) 가 *Bacillus subtilis*에서 얻은 결과와 일치한다.

적 요

Pseudomonas 속에 속하는 여러균주의 원형질체 생성을 위한 최적조건과 이들의 재생에 영향을 미치는 몇 가지 요인들을 조사하였다.

*Pseudomonas*는 lysozyme (100 $\mu\text{g/ml}$) 과 10mM EDTA를 처리하였을 때 99.0%에서 99.9%까지 원형질체로 전환되었으며, 이때 사용한 완충액의 최적 pH는 8.0이었고 효소처리는 상온에서 진탕하지 않고 처리하였을 때가 비교적 균주간에 차이가 없이 효과적으로 원형질체가 생성되었다. MgCl_2 , CaCl_2 , 그리고 Streptomycin 수용액이 원형질체의 안정성을 높였고, 원형질체의 생성에는 Mg^{+2} 와 Na^+ 이온이 효과적으로 작용하였다.

원형질체의 재생은 Rich Regeneration Medium배지에 20mM CaCl_2 를 첨가하였을 때 원형질체의 재생율이 28배까지 증가하였다. 원형질체의 생성과 그것을 희석하는데 사용한 완충액에 1% Bovine Serum Albumine를 첨가한 경우 재생율이 10배 가까이 증가되었고, 또한 완충액에 1% BSA를 첨가하고 재생배지에 0.5% 젤라틴을 첨가했을 때에는 14배까지 재생율이 증가되었다.

REFERENCES

1. Alicanian, S.I., N.F. Ryabchenko, and N.O. Bukanov, 1981. Transformation of *Bacillus turingiensis* sub sp. galleria protoplasts by plasmid pBC 16. *J. Bacteriol.* 146, 7-9.
2. Birdsell, D.C., and E.H. Cota-robells, 1967. Production and ultrastructure of lysozyme and Etylenediamine-tetra acetate-Lysozyme spheroplasts of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 93, 427-437.
3. Coetzee, J.B.M., F.A. Sirgel, and G. Lecat-
sas, 1979. Genetic recombination in fused spheroplasts of *Providencia alcalifaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 14, 313-322.
4. DeCastro-Costa, M.R., and O.E. Landman, 1977. Inhibitory protein controls the reversion of protoplasts and L forms of *B. subtilis* to the walled state. *J. Bacteriol.* 129, 678-689.
5. Elliott, T.S.J., J.B. Ward, and H.J. Rogers, 1975. Formation of cell wall polymers by reverting protoplasts of *B. licheniformis*. *J. Bacteriol.* 124, 624-632.
6. Forder, K., and L. Alfoldi, 1976. Fusion of

또한 Landman and Forman (1969) 도 재생배지에 Gelatin을 첨가하여 원형질체의 재생율을 높였다고 보고하고 있는 것으로 미루어 BSA 와 Gelatin은 여러가지 종류의 세균의 원형질체의 재생에 효과가 있는 것으로 생각된다.

균주에 따른 *Pseudomonas*의 재생율 비교

P. putida KU188을 사용하여 조사한 재생조건이 다른 균주에도 적용되는 가를 조사하였다.

앞서 조사한 결과에서 RRM배지에 20mM CaCl_2 를 첨가하였을 때 재생율이 28배까지 증가되었고, 1% BSA는 원형질체의 재생에 효과는 있었으나 사용상에 불편한 점이 있었으므로 *Pseudomonas* 원형질체의 재생배지로는 RRM배지에 20mM CaCl_2 를 첨가한 것을 사용하였다. 그 결과 Table 9에 표시한 바와 같이 조사된 4 균주는 재생율이 균주간에 다소의 차이를 나타내었다. 그러나 조사한 4 균주 모두에서 RRM배지가 재생배지로 적합하였다.

- proroplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **73**, 2147-2150.
7. Frehel, C., A.M. Lheritier, C. Sanchez-Rives, and P. Schaeffer, 1979. Electron microscopic study of *Bacillus subtilis* protoplast fusion. *J. Bacteriol.* **137**, 1354-1361.
 8. Gabor. M.H., and R.D. Hotchkiss, 1979. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplasts. *J. Bacteriol.* **137**, 1346-1353.
 9. Gotz, F., S. Ahrene, and M. Lindberg, 1981. Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in staphylococci. *J. Bacteriol.* **145**, 74-81.
 10. Hopwood D.A., and H.M. Wright, 1979. Factors affecting recombinant frequency in protoplast fusions of *streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 137-143.
 11. Kaneko, H and K. Sakaguchi, 1979. Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*, *Agsic. Biol. Chem.* **43**, 1007-1013.
 12. Kim. J.K., and Y.N. Lee, 1984. Isolation and identification of *Pseudomonas* utilizing hydrocarbon. *Kor. J. Microbiol.* **22**; 29-34.
 13. Kozo, O., M.J.M. Hitchcock, and E. Kotz., 1979. Highfrequency fusion of *Streptomyces parrulus* or *Streptomyces antibiotics* protoplasts induced by polyethylene glycol. *J. Bacteriol.* **139**, 984-992.
 14. Landman, O.E., A. Ryter and C. Frehel, 1968. Gelatin-induced reversion of protoplast of *B. subtilis* to the Bacillary form: electron microscopic and physical study. *J. Bacteriol.* **96**, 2154-2170.
 15. Landman, O.E., and A. Forman, 1969. Gelatin-induced reversion of protoplasts of *B. subtilis* to the bacillary form: biosynthesis of micromolecules and wall during successive step. *J. Bacteriol.* **99**, 576-589.
 16. Okanishi, M., K. Suzuki, and H. Umezawa, 1974. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* **80**, 389-400.
 17. Schaeffer, P., B. Cami, and R.D. Hotchkiss, 1976. Fusion of Bacterial protoplasts. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* **73**, 2151-2155.
 18. Stanier, R. Y., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff, 1966. The aerobic *Pseudomonads*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159-273.
 19. Tabor, C.W. 1962. Stabilization of protoplasts and spheroplasts by spermine and other polyamines. *J. Bacteriol.* **83**, 1101-1111.
 20. Venable J. H., and R. Coggeshall, 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **25**, 407-408.
 21. Weiss. R.L, 1976. Protoplast formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **128**, 668-670.
 22. Witholt B., M. Boekhout, M. Brock, J. Kingma, H. van. Heerkhuizen, and L. de teji, 1976. An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown. *Analytical Biochemistry.* **74**, 160-170.
 23. Wyrick, P.B., and H.J. Rogers, 1973. Isolation and characterization of cell wall-defective variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **116**, 456-465.

(Received Jan. 24, 1986)