

Cellulomonas 속 종간의 원형질체 형성조건의 차이에 대하여

이은주 · 배 무

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

Interspecific Variation in the Protoplast Formation of the Genus *Cellulomonas*

Lee, Eun-Ju and Moo Bae

Department of Biology, College of Natural Science, Ewha Womans University, Seoul, Korea.

Abstract: In order to develop interspecific fusion of the genus *Cellulomonas* capable of assimilating cellulose, the optimum conditions for the protoplast formation was investigated to examine the susceptibility of cell wall, between different species of the same genus using scanning electron microscope. The variation in the susceptibilities of *Cellulomonas* sp. CS 1-1 and *C. flavigena* to lysozyme treatment were considerably remarkable, although they belong to the same genus. The rate of protoplast formation of CS1-1 was 99.9% being treated with lysozyme (100 $\mu\text{g/ml}$) for 30 minute and that of *C. flavigena* was about 80% being treated at the concentration of 600 $\mu\text{g/ml}$ of lysozyme for 6 hours. The susceptibility of cell wall to the lysozyme treatment on protoplast formation of the strain, CS1-1 seems not to be depend on the cultural periods of cells. On the contrary, that of *C. flavigena* was considerably depend on the periods. Cells of *C. flavigena* at mid exponential phase could be more efficiently converted to protoplast cells than those at late exponential phase be done. The rate of the protoplast formation was 95%, when cells of *C. flavigena* at mid exponential phase were treated with lysozyme 600 $\mu\text{g/ml}$ for 6 hours and observed by SEM. In the evaluation of protoplast formation of the CS1-1 results of counting method in plate after osmotic shock treatment were similar to the results of the direct observation method by means of SEM. But in the case of *C. flavigena* the latter method was much more reliable than the former, because the differences between the number of spheroplasts and protoplasts were not able to figure out on counting the number of protoplast after osmotic shock treatment.

Key Words: *Cellulomonas* protoplast

Cellulomonas 속 세균은 Biomass 이용에 유용시 되고 있으나 우수 균주 육종이 시급한 상태이다. 균주 개발을 위한 방법중 원형질체 용해를 위해서는 이들 *Cellulomonas* 속 세균의 원형질체 형성이 선행되어야 하는데 아직까지 그 형성조건이 명확히 확립된 바 없고 균주에 따라서는 쉽게 (Kim과 Lee, 1985) 형성되나 또 다른 균주의 경우에는 원형질체화에 장시간이

소요되는 경우가 알려지고 있다 (Lee, 1984 ; Bae 등, 1986).

Cellulomonas 속 세균은 배양기간과 배양조건등에 따라 gram 염색성이 변화되며 대부분의 gram 양성균은 peptidoglycan 층에 N-acetyl-muramic acid가 tetra peptide의 L-alanine과 연결되어 있으나 *Cellulomonas* 속 균이 포함되는 Coryne 형 세균은 glycine과 연결되어 있으며 (Gh-

uysen 등, 1970) peptidoglycan 층의 cross link 정도나 성질이 lysozyme 처리에 미치는 영향이 크다는 점으로 미루어 볼 때 *Cellulomonas* 속 균의 원형질체화에 대한 연구에 있어 같은 속 균주들 일지라도 원형질체 형성의 조건이 달라질 수 있다고 하겠다. 그러므로 이에 원형질체 용해를 위한 원형질체의 형성조건을 *Cellulomonas* sp. CS1-1과 *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901에서 살펴 본바 중간에도 원형질체화 조건에 현저한 차이가 있음이 주사전자현미경적 연구로 확인되었기에 보고한다.

재료 및 방법

사용균주

Cellulase 생산균으로는 호주의 Richard 및 Ide (1981)가 사용한 *Cellulomonas* sp. CS1-1 (이하 CS1-1으로 약함)으로 KAIST에 보관되어 있는 균주와 *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901 (이하 *C. flavigena*로 약함)을 영국 Torry Research Station, Aberdeen에서 구입하여 사용하였다.

배지

정상세포배양을 위한 영양배지는 다음과 같다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, K_2HPO_4 0.1 g, K_2HPO_4 1.2 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.01g, Glucose 0.5 g, Yeast extract 3.0 g을 증류수 1 l (pH 7.0)에 용해한 후 멸균하여 사용하였다 (Kim과 Lee, 1982). 정상세포를 원형질체로 형성시키는데 사용하는 용액으로 Lysis Fluid (LF)는 영양배지 1/2 volume에 osmotic stabilizer로 0.5 M sucrose와 0.01 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하여 사용하였으며 원형질체 희석용 고장용액인 Dilution Fluid (DF)는 SMM 완충액 (0.5 M sucrose - 0.02 M maleate buffer - 0.02 M MgCl_2 , pH 6.5) (Wyrick과 Rogers, 1973)을 사용하였다. Lysozyme 용액은 멸균한 0.07 M tris 완충액 (pH 8)에 5 mg/ml 되도록 만들어 사용하였다 (Coetzee 등, 1979).

원형질체 형성방법

균주를 영양액체배지에 하룻밤 증배양한 후

새로운 영양액체배지에 본배양하여 30°C에서 대수증식기 말기인 CS1-1 균주는 7 시간, *C. flavigena* 균주는 12시간까지 진탕배양하여 키운 후 원심분리 (4,000 rpm, 20분)로 균을 회수하여 tris 완충액으로 세척한 후 LF에 현탁시켜 (final conc. $1.0 - 1.5 \times 10^9$ cells/ml) lysozyme (Sigma 제품) 용액을 CS1-1 균주는 10 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 15 - 60분간, *C. flavigena* 균주는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 30분, 300 - 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 2, 6 시간 처리하여 30°C에서 정치배양하여 원형질체 형성을 관찰하였다.

원형질체 형성확인

원형질체의 형성을 확인하는 방법은 두가지로서, 형성되어진 원형질체에 osmotic shock을 준 후 영양고체배지에 도말하여 30°C에서 2일 배양한 후 나타나는 균체수를 원형질체화되지 않은 균체수라 생각하고 lysozyme 용액처리 전에 $1.0 - 1.5 \times 10^9$ cells/ml로 수를 맞추어 둔 정상세포를 도말하여 같은 조건으로 배양한 후 나타나는 균체수를 감하여 나온 수를 원형질체 수라 가정하고 이를 정상세포수에 대한 백분율로 산출하는 원형질체 계수방법과 주사전자현미경 (SEM)으로

The rate of protoplast

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

A; number of intact cells

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

정상세포 모양인 간상이 원형질체 되므로써 구형으로 변화되어진 모양을 직접 관찰하는 방법을 사용하였다.

주사전자현미경 (SEM) 관찰

SEM 관찰을 위한 시료는 정상세포는 0.1 M 인산완충액 (pH 7.4)으로, 원형질체는 DF 용액에 현탁시켜 3% glutaldehyde (Fisher 제품)로 처리한 후 원심분리하여 각각의 완충액으로 세척하고 회수하여 1% osmium tetroxide (w/v, Polysciences 사 제품)로 4°C, 2시간 처리한 다음 각 완충액으로 다시 세척한 후 에틸알콜 농도별로 60, 70, 80, 90, 95, 100%에서 각

20분간씩 탈수시켜 isoamylacetate로 20분간 처리하여 critical point dryer로 건조시킨후 pedestal 위에 부착시켜 ion sputtering device로 4분씩 2회 도금하여 준비하였다(최, 1982). 준비된 시료는 Scanning Electron Microscope JEOL JSM-35CF(이대 중앙기기실)로 10,000배 확대하여 관찰하고 부착된 카메라로 Kodak verichrome pan 120 film을 사용하여 촬영하였다.

결과 및 고찰

Cellulomonas 속 균의 성장곡선

사용균주를 영양액체배지에 접종하여 하룻밤 30°C에서 진탕배양하여 종배양하였고 이를 새로운 영양액체배지에 본배양하여 30°C에서 진탕배양하여 1시간 간격으로 spectrophotometer 600 nm에서 optical density를 측정 한 결과가 Fig. 1 과 같았다.

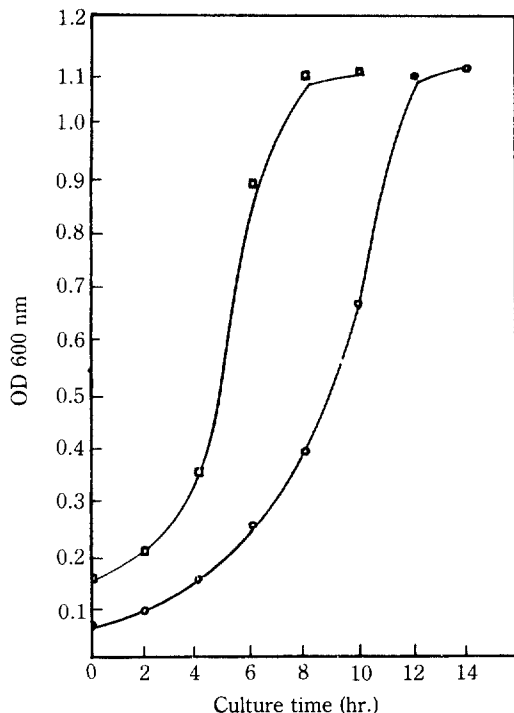


Fig. 1. Growth curves of *Cellulomonas* sp. CS1-1 (open square) and *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901 (open circle)

Cellulomonas 속 중간 원형질체화의 차이

두 균주를 원형질체화 하는데 필요되어지는 lysozyme의 농도와 처리시간을 살펴본 결과가 Table 1, Fig. 2, 3 과 같았다. 두 균주를 대수증식기 말기까지 배양한 후 lysozyme 용액을 처리하여 준 것으로 CS1-1 균주는 7 시간배양하여 lysozyme 용액 최저 10µg/ml, 15분간 처리한 것으로부터 최고 100µg/ml, 60분간 처리하여 30°C에서 정치배양하여 원형질체화 한 후 osmotic shock에 의한 원형질체 계수방법으로 Table 1의 결과를, 주사전자현미경으로 각 단계를 관찰, 사진촬영하여 Fig. 2의 결과를 얻었는데 lysozyme의 농도가 낮은 30µg/ml로 30분간 처리한 경우에도 94.3%나 되는 형성율을 보였으며 100µg/ml, 30분 처리한 경우 99.9%의 높은 형성율을 보여주어 osmotic shock 후 생존균의 계수방법에 의하면 균주의 원형질체

Table 1. Effects of concentrations and treating period of lysozyme on protoplast formation of *Cellulomonas* sp. CS1-1 and *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901

Conc. of lysozyme (µg/ml)	Treating period of lysozyme	*Protoplast forming rate (%)	
		CS1-1	<i>C. flavigena</i>
10	15min.	66.7	
30		82.5	
100		97.2	
10	30min.	79.1	
30		94.3	
100		99.9	88.3
10	60min.	86.2	
30		98.7	
100		99.9	
300	2hrs.		99.9
400	2 hrs.		99.9
	6 hrs.		99.9
500	2 hrs.		99.9
	6 hrs.		99.9
600	2 hrs.		99.9
	6 hrs.		99.9

*Protoplast formation rate was estimated by counting method in plate after osmotic shock treatment.

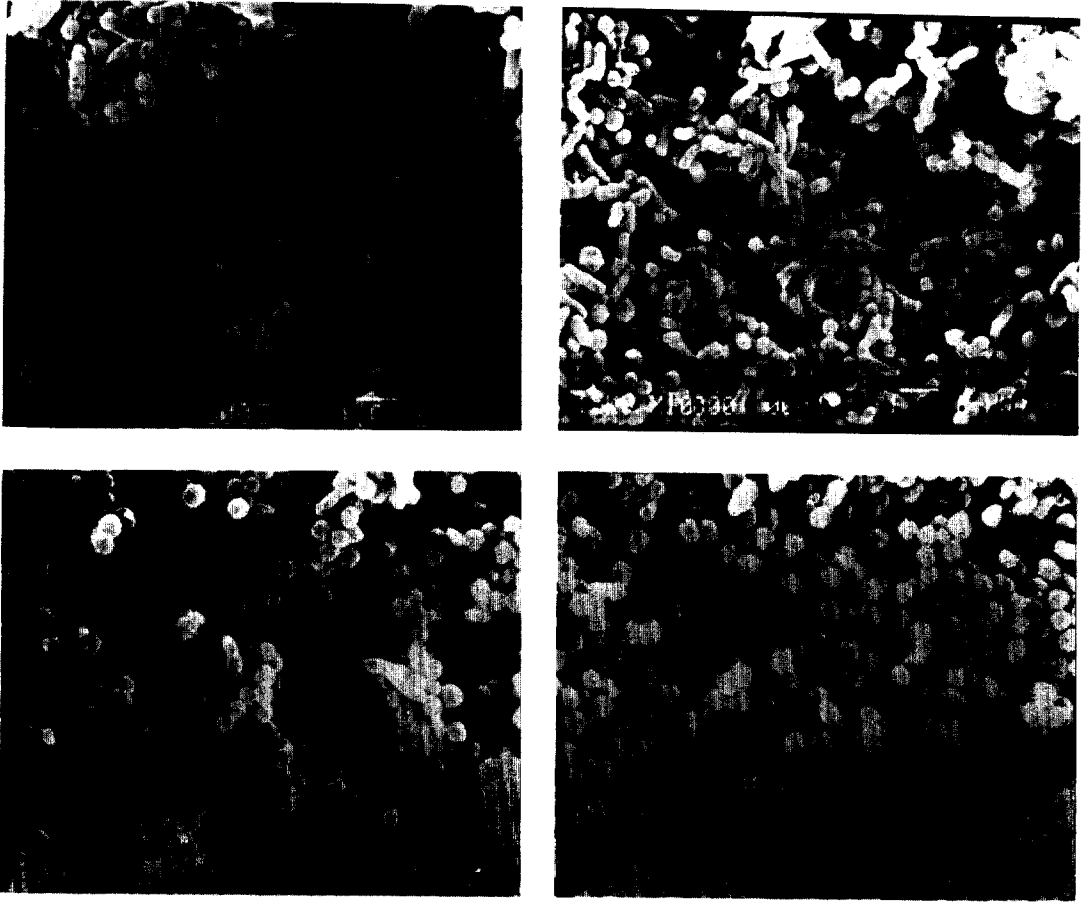


Fig. 2. Scanning Electron Micrographs of protoplast for mation of *Cellulomonas* sp. CS1-1

Cells were treated as follows;

A. Intact cell

C. Lysozyme 50µg/ml for 30min. at 30°C

B. Lysozyme 10µg/ml for 30min. at 30°C

D. Lysozyme 100µg/ml for 30min. at 30°C

형성이 비교적 쉬운 것으로 나타났다 (Table 1). SEM 관찰결과 (Fig. 2) 에서도 100 µg/ml 의 lysozyme 으로 30 분간 처리하였을 때 간상이 모두 구형화되어 원형질체화 되었음을 볼 수 있었다. 그러나 *C. flavigena* 균주는 역시 대수증식기 말기가 되는 12시간까지 배양하여 CS1-1 균주에서 높은 원형질체 형성율을 나타낸 조건인 lysozyme 100 µg/ml, 30분간 처리한 것으로부터 최고 600 µg/ml, 6 시간 처리하여 30 °C에서 정치배양하여 같은 방법으로 조사하여 본 결과 osmotic shock에 의한 원형질체의 계수인 Table 1과 SEM으로의 관찰인 Fig. 3에서와 같이 나타났는데 CS1-1 균주가 원형질체 계수방법으로 99.9%의 최고 형성율을 낸 ly -

sozyme 100 µg/ml으로 30분간 처리한 경우 *C. flavigena*는 88.3%로 그보다 낮은 형성율을 보였으며 SEM 사진결과로는 아직 원형질체화가 이루어지지 않고 있다. 그 이상의 농도와 처리시간인 300 µg/ml 2 시간의 처리에서는 osmotic shock에 의한 원형질체의 계수로는 99.9%의 최고 형성율을 보였으나 SEM 관찰로는 그보다 훨씬 낮은 형성율을 나타냈고 400 µg/ml 의 lysozyme 으로 2 시간 처리한 것부터 600 µg/ml, 6 시간 처리까지도 마찬가지로 결과로 osmotic shock에 의한 원형질체 계수로는 99.9%의 최고 형성율을, SEM의 관찰로는 그에 훨씬 못미치는 형성율을 보였다. 그러나 SEM의 관찰에 있어 농도와 처리시간이 길어

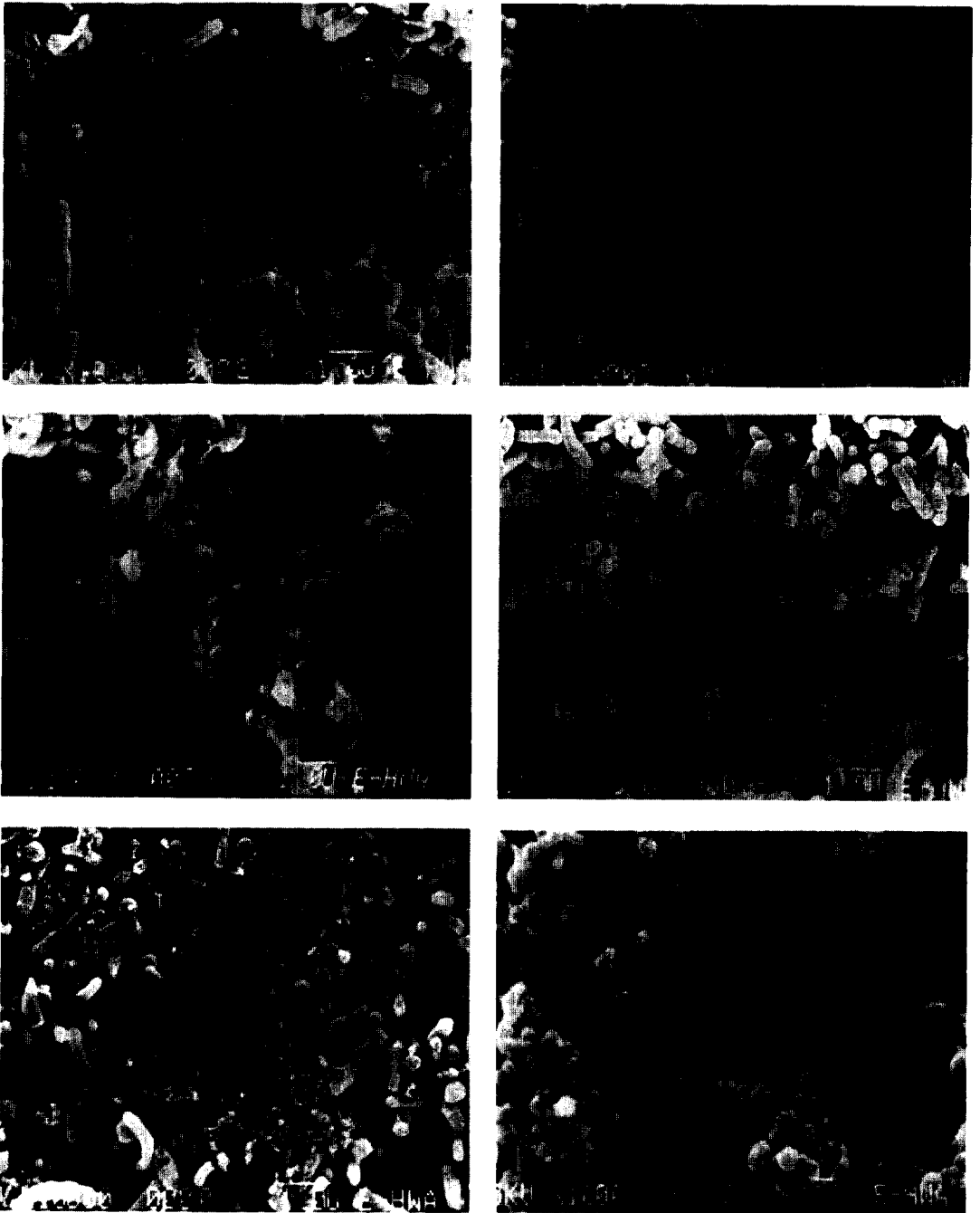


Fig. 3. Scanning Electron Micrographs of protoplast formation of *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901

Cells were treated as follows;

A. Lysozyme 100 μ g/ml for 30min. at 30 $^{\circ}$ C

C. Lysozyme 600 μ g/ml for 6hrs. at 30 $^{\circ}$ C
(cultured for 12hrs.)

E. Lysozyme 400 μ g/ml for 2hrs. at 30 $^{\circ}$ C

B. Lysozyme 400 μ g/ml for 2hrs. at 30 $^{\circ}$ C

D. Lysozyme 100 μ g/ml for 1hr. at 30 $^{\circ}$ C

F. Lysozyme 600 μ g/ml for 6hrs. at 30 $^{\circ}$ C
(cultured for 9hrs.)

질수록 원형질체의 형성율도 증가하기는 하여 600 $\mu\text{g/ml}$ 의 lysozyme 용액으로 6 시간 처리하였을 때 80% 정도의 원형질체 형성을 보였다. 이는 CS1-1 균주의 경우보다 훨씬 높은 농도와 처리시간을 요구하는 것으로 *C. flavigena* 균주는 원형질체화가 비교적 어려운 것으로 나타났으며 같은 속 균주이지만 원형질체 형성에 필요한 lysozyme 농도와 처리시간이 매우 다르다는 것을 보여주었다.

Cellulomonas 속 균의 원형질체화에 배양기간이 미치는 영향은 CS1-1 균주를 대수증식기 중기인 4 시간, 말기인 7 시간, 정지기인 15 시간 동안 각기 배양하여 lysozyme을 100 $\mu\text{g/ml}$ 30분간 처리하여 30°C에서 정지배양하여 원형질체화 한 후 osmotic shock에 의한 원형질체 계수법으로 검사한 결과 15시간 배양한 경우 96.3%로 다소 형성율이 떨어지나 대수증식기 중기인 4 시간이나 말기인 7 시간 모두 배양기간에는 별 차이없이 95% 이상의 높은 형성율을 보여 배양기간이 원형질체 형성에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었는데 *C. flavigena* 균주 경우에는 이와는 달리 배양기간에 따라 원형질체화가 이루어지는 것이 민감하여 SEM 관찰사진인 Fig. 3에서 비교하여보듯 대수증식기 중기인 9 시간 배양한 세포의 경우 말기인 12 시간 배양한 세포보다 lysozyme 농도도 낮고 처리시간도 짧게하였음에도 불구하고 훨씬 원형질체화가 잘 이루어졌다. 이에 같은 *Cellulomonas* 속 균주인 CS1-1 균주와 *C. flavigena* 균주가 배양기간에 영향을 받는 정도가 서로 다를 것을 짐작할 수 있었다.

원형질체의 형성확인 방법의 검토

Cellulomonas 속 두 균주의 원형질체 형성의

확인에 있어서 osmotic shock에 의한 원형질체 계수방법의 결과인 Table 1과 균체의 모양이 간상에서 구형으로 변화됨을 주사전자현미경 상으로 관찰한 Fig. 2, 3이 그 결과가 균주에 따라 다르게 나타났다. CS1-1 균주는 Table 1의 형성율과 Fig. 2에서 보여주는 간상에서 구형으로의 변화율이 동일하였으나 *C. flavigena* 균주에서는 Table 1에서는 높은 형성율을 나타냈다고 할지라도 Fig. 3의 사진으로는 그렇지 못한 낮은 변화율을 보여주어 두 방법의 결과가 매우 다르게 나타났다. 그러므로 osmotic shock을 주어 원형질체를 계수하는 원형질체 형성확인방법과 주사전자현미경으로 간상에서 구형으로의 모양변화를 관찰하는 확인 방법이 CS1-1 균주에서는 모두 유용되어질 수 있으나 *C. flavigena* 균주는 osmotic shock을 주어 원형질체를 계수하는 방법은 osmotic shock을 줄 때 세포벽이 덜 벗겨진 spheroplast가 파열되거나 혹 세포자체의 파괴등의 착오에 의한 것이 부가될 가능성이 높으므로 osmotic shock에 의한 원형질체 형성확인방법으로는 부적합하며 주사전자현미경으로의 관찰이 필요함을 제시하고 있다. 이에 같은 속 균주라 해도 균주에 따라 원형질체의 형성확인방법이 다르게 선택되어야 함을 알 수 있었다.

이상의 결과들으로써 원형질체 형성조건이나 배양기간의 영향, 원형질체의 형성확인 방법들이 CS1-1 균주와 *C. flavigena* 균주에서 서로 다르게 나타났으므로 *Cellulomonas* 속 종간의 융합을 위한 원형질체화의 처리조건을 각 균주마다 각기 검토하여야만 효율적인 형성이 가능함을 알 수 있었다.

적 요

Cellulose 분해력이 높은 *Cellulomonas* 속 세균의 원형질체 융합을 위한 원형질체 형성조건을 조사하여 본 결과 같은 *Cellulomonas* 속인 *Cellulomonas* sp. CS1-1과 *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901 균주일지라도 그 형성조건에 현저한 차이가 있어 CS1-1균주는 lysozyme 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 30분 정도의 처리로 99.9%의 높은 원형질체 형성율을 얻을 수 있는 반면 *C. flavigena* 균주는 lysozyme 농도도 훨씬 높고 장시간이 소요되어 600 $\mu\text{g/ml}$, 6시간 정도의 처리에 약 80%의 원형질체 형성을 보였다. 또한 세균 배양기간이 미치는 영향도 CS1-1균주는 별 영향을 받지 않고 원형질체화 되었으나 *C. flavigena* 균주는 매우 민감하게 영향을 받아 대수증식기 중기의 세포가 말기의 세포보다 원형질체화가 잘 이루어졌다.

원형질체 형성확인방법에서도 CS1-1 균주는 osmotic shock을 주어 원형질체를 계수하거나 SEM으로 확인하거나 같은 결과를 얻었으나 *C. flavigena* 균주는 osmotic shock에 의한 원형질체의 계수결과와 SEM으로의 결과가 서로 달라 확인방법으로 두 방법이 병행되어야 함을 보여주었다.

사 사

본 연구의 사진촬영에 도움을 주신 이대 중앙기기실 송 회경조교께 감사드립니다.

REFERENCES

1. 이무영, 1984. *Brevibacterium flavum* 과 *Corynebacterium glutamicus* 의 변이와 속간 원형질체융합, 경상대학교 대학원 식품가공학과 석사학위 논문
2. 최영희, 1982. *Bacillus thuringiensis* 의 전자현미경적 연구, 건국대학교 대학원 석사학위 논문.
3. Bae, M., and E.J. Lee, 1986. study on the protoplast formation of *Cellulomonas flavigena* K.J. *Appl. microbiol and Bioeng.* **14**: 175-179.
4. Coetzee, J.N., F.A. Sirgel and G. Lecatsas, 1979. Genetic Recombination in fused spheroplasts of *Providencia alcalifaciens*, *J. Gen. Microbiol.*, **114**: 313-322
5. Ghuysen. J.M. and M. Leyh-Bouille, 1970. *FEBS Symposium* **20**: 59
6. Kim, B.H. and H.J. Lee, 1985. Genetic Recombination by Protoplast Fusion of *Cellulomonas* sp. CS1-1, *K.J. Microbiol.* **23**: 309-314
7. Kim, B. H. and H. J. Lee, 1982, 세포융합법에 의한 Cellulose 분해균의 육종에 관한 연구, KAIST 연구보고서
8. Richard, P.A.D. and J.A. Ide, 1981. *Biochemistry Letters* **3**(9): 487
9. Wyrick, P.B. and H.J. Rogers, 1973. Isolation and characterization of cell wall defective variants of *Bacillus licheniformis*, *J. Bacteriol.*, **116**: 456-465

(Received Apr. 10, 1986)