

*Cellulomonas flavigena*의 원형질체 형성과 주사전자현미경적 연구

배 무 · 이은주

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과
(1986년 2월 21일 수리)

Studies on the Protoplast Formation of *Cellulomonas flavigena* and its Observations under Scanning Electron Microscope.

Moo Bae and Eun Ju Lee

Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul Korea
(Received February 21, 1986)

In order to develop a protoplast fusion of the genus *Cellulomonas* having high assimilability of cellulose, the optimum conditions for the protoplast formation of *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901 was investigated and observed by means of Scanning Electron Microscope. The results suggested that the susceptibility of the cell wall by lysozyme treatment on protoplast formation was considerably depend on the cultural periods of the cells. Cells of *C. flavigena* at mid exponential phase could more efficiently convert to protoplast cells than those at late exponential phase did. The rate of the protoplast formation was 95%, even though the rate was over 99.9% on counting by indirect method after osmotic shock treatment, when cells of the organism at mid exponential phase were treated with lysozyme (400ug/ml) for 6 hours and observed by SEM. In the evaluation of protoplast formation of the genus *Cellulomonas*, direct method of the observation under Scanning Electron Microscope was much more reliable than the counting method of protoplasts after osmotic shock treatment. Because differences between the number of spheroplast and protoplast were not able to be figured out on counting the number of protoplast after osmotic shock treatment.

Cellulomonas 속 세균은 섬유소 소화능이 강해 섬유자원이용의 관점에서 매우 유용시되고 있는 균으로서 유전자 조작에 의한 우수 균주 육종의 대상이 되고 있으나 원형질체 세포로 전환시킬 수 있는 방법에 대하여 아직 뚜렷한 방법이 확립되지 못하고 있다. Coryne 형 세균인 *Brevibacterium*의 원형질체화에 관해서는 Kaneko⁽¹⁾, 그리고 국내에서는 Shin⁽²⁾ 등에 의해서 연구되었으나 lysozyme의 처리시간이 장시간 소요되고 원형질체화의 과정이 광학현미경만으로 관찰되어 정확한 처리조건을 알아내기가 어렵고 더우기 *Cellulomonas*의 원형질체화에 관해서는 보고된 논문을 찾아보기 어려운 실정이다.

Kim⁽³⁾ 등의 *Cellulomonas* 속 미동정균의 원형질체화는 쉽게 이루어지는 것으로 보고되었으나 본 연구에서 사용한 type culture 균주인 *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901에서 원형질체화 조건에 벗가지 특징적인 성질이 관찰되었으며, 전자현미경적으로 이를 관찰 연구하였기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

균주

Cellulomonas flavigena NCIB 12901 (이하 *C. flavigena*로 약함)은 영국 Torrey Research Station,

Aberdeen에서 구입하였다.

배지

*C. flavigena*의 배양을 위해서 다음과 같은 영양 배지를 사용하였다⁽³⁾. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, KH_2PO_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, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.01 g, Glucose 5.0 g, Yeast Extract 3.0 g을 증류수 1 l (pH 7.0)에 용해한 후 멸균하여 사용하였다. 정상세포를 원형질체로 형성시키는데 사용하는 용액으로 Lysis Fluid (LF)는 영양배지 1/2 volume에 삼투안정제로 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 완충액-0.02 M MgCl_2 , pH 6.5)을 사용하였다⁽⁴⁾. Lysozyme 용액은 멸균한 0.07 M tris 완충액 (pH 8)에 5 mg/ml 되도록 만들어 사용하였다⁽⁶⁾.

원형질체 형성방법

균주를 영양액배지에 하룻밤 증배양한 후 새로운 영양액배지에 본배양하여 30°C에서 대수증식기 말기(12시간)까지 진탕배양하여 키운 후 원심분리(4,000 rpm 20분)로 균을 회수하여 tris 완충액으로 세척한 후 LF에 $1.0-1.5 \times 10^9$ cells/ml 되도록 현탁시켜 lysozyme (Sigma 제품) 용액을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 30분, 300-600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 2, 5, 6시간 처리하여 정지배양하여 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 원형질체화 되지 않은 균체수라 생각하고 lysozyme 용액 처리전에 $1.0-1.5 \times 10^9$ cells/ml로 수를 맞추어 둔 정상세포를 도말하여 같은 조건으로 배양한 후 나타나는 균체수를 감하여 나온 수를 원형질체수라 가정하고 이를 정상세포수에 대한 백분율로 산출하는 원형질체 계수방법과 주사전 자현미경으로 정상세포 모양인 간상이 원형질체되므로써 구형으로 변화되어진 모양을 직접 관찰하는 방법을 사용하였다.

The rate of protoplast formation

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

A; number of intact cells

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

주사전자현미경 (SEM) 관찰법

SEM 관찰을 위한 시료는 정상세포는 0.1M 인산 완충액 (pH 7.4)으로 원형질체는 DF 용액에 현탁시

켜 3% glutaldehyde (Fisher 제품)로 처리한 후 원심분리하여 각각의 완충액으로 세척하고 회수하여 1% osmium tetroxide (w/v, Polysciences 제품)로 4°C, 2시간 처리한 다음 각 완충액으로 다시 세척한 후 에틸알콜 농도별로 60, 70, 80, 90, 95, 100%에서 각 20분간씩 탈수시켜 isoamylacetate와 에틸알콜 (95%)을 1:1 비율로 혼합한 액에 20분간, 순수 isoamylacetate로 20분간 처리하여 critical point dryer로 건조시킨 후 pedestal 위에 부착시켜 ion sputtering device로 4분씩 2회 도금하여 준비하였다⁽⁶⁾. 준비된 시료는 Scanning Electron Microscope JEOL JSM-35CF (이대증상기기실)로 10,000배 확대하여 관찰하고 부착된 카메라로 Kodak verichrome pan 120 film을 사용하여 촬영하였다.

실험결과 및 고찰

Lysozyme의 농도와 처리시간의 영향

대수증식기 말기인 12시간 배양한 *C. flavigena* 균주에 lysozyme을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 30분간, 300, 400, 500, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 2, 5, 6시간 처리하여 원형질체화 시킨 결과 Table 1, Fig. 1과 같으며 Table 1은 osmotic shock에 의한 원형질체 계수방법으로

Table 1. Effect of concentrations and treating period of lysozyme on protoplast formation of *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901.

Conc. lysozyme ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Treating period lysozyme of (hrs.)	*Protoplast formation rate (%)	
100	1/2	88.3	
	300	2	99.9
		5	99.9
400	6	99.9	
	2	99.9	
		5	99.9
500	6	99.9	
	2	99.9	
		5	99.9
600	6	99.9	
	2	99.9	
		5	99.9
	6	99.9	

*The rate of protoplast formation was figured out by means of the counting the survivals after the osmotic shock treatment.

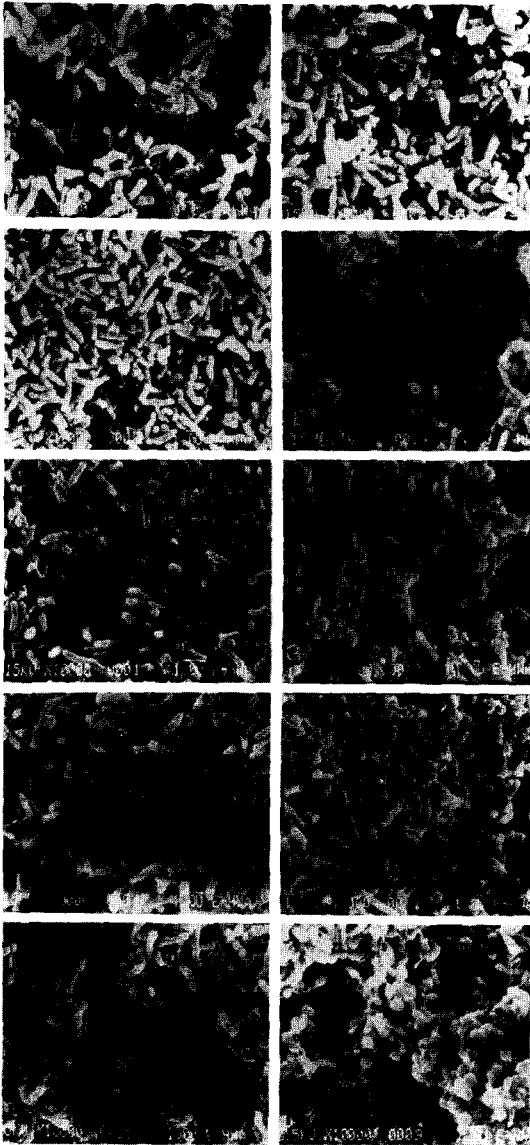


Fig. 1. Scanning Electron Micrographs of protoplast formation of *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901 at late exponential phase (cultured for 12 hrs.).

- A. Intact cell
Cells were treated as follows;
B. Lysozyme 100 $\mu\text{g/ml}$ for 30 min. at 30°C.
C. Lysozyme 300 $\mu\text{g/ml}$ for 2 hrs. at 30°C.
E. Lysozyme 300 $\mu\text{g/ml}$ for 6 hrs. at 30°C.
F. Lysozyme 400 $\mu\text{g/ml}$ for 2 hrs. at 30°C.
G. Lysozyme 400 $\mu\text{g/ml}$ for 6 hrs. at 30°C.
I. Lysozyme 500 $\mu\text{g/ml}$ for 2 hrs. at 30°C.
K. Lysozyme 500 $\mu\text{g/ml}$ for 6 hrs. at 30°C.
L. Lysozyme 600 $\mu\text{g/ml}$ for 2 hrs. at 30°C.
N. Lysozyme 600 $\mu\text{g/ml}$ for 6 hrs. at 30°C.

형성율을 볼 것이고 Fig. 1 은 SEM으로 관찰한 것 중 대표적인 사진이다.

Osmotic shock에 의한 원형질체 계수방법의 결과인 Table 1 에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 30분 처리한 경우는 88.3%, 나머지는 모두 99.9%의 높은 형성율을 보여 거의 모두가 원형질체화 되어진 것으로 나타났다. 그러나 SEM 관찰 사진결과(Fig. 1)로는 각각의 경우 원형질체화가 잘 이루어지지 않고 있으며 lysozyme의 농도가 높고 처리시간이 길어질수록 오히려 균체자체가 파괴되어진 것을 볼 수 있다. Table 1의 높은 원형질체 형성율은 osmotic shock에 의한 원형질체 계수방법시 세포벽이 덜 벗겨진 spheroplast가 osmotic shock을 받아 파열된 것일 가능성이 높으며 전자현미경 관찰결과 실제의 형성율은 lysozyme 600 $\mu\text{g/ml}$ 로 6시간 처리시 약 80%정도인 것으로 나타났다.

배양기간에 따른 원형질체화의 차이

*Cellulomonas flavigena*균이 일반세균에 비하여 원형질체화에 장시간을 요하기 때문에 배양기간이 원형질체의 형성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 본 균주를 대수증식기 중기인 9시간, 말기인 12시간 배양한 후 12시간 배양한 세포에는 lysozyme 300, 400, 500, 600 $\mu\text{g/ml}$ 로 2, 5, 6시간을(Fig.1), 9시간 배양한 세포에는 그보다 낮은 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 1, 2시간, 400 $\mu\text{g/ml}$ 로 1, 2, 6시간, 600 $\mu\text{g/ml}$ 로 2, 6시간의 여러조건하에 처리한 결과의 주요사진이 Fig. 2와 같다.

12시간으로 대수증식기 말기까지 배양한 균체의 경우는 300, 400, 500, 600 $\mu\text{g/ml}$ 각 농도로 2시간 처리하였을 때는 거의 원형질체화 되지 않았으며 처리시간이 길어질수록 형성되는 원형질체수가 증가하기는 했으나 균체들이 파괴된 경우가 많았고 완전하게 세포벽이 벗겨진 원형질체가 아닌 spheroplast가 생성되어지는 결과를 보였다. 그러나 이보다 짧게 9시간 배양한 대수증식기 중기의 균체를 사용한 경우에는 400 $\mu\text{g/ml}$ 로 2시간 처리한 경우 12시간 배양한 균체를 사용하였을 때 거의 원형질체화 되어지지 않았던 것이 상당수가 원형질체화 되었음을 발견할 수 있었다. 또한 12시간 배양한 경우보다 전반적으로 농도도 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 로 낮고 처리시간도 1, 2시간으로 짧게 처리하였음에도 불구하고 원형질체화가 잘 이루어졌으며 400, 600 $\mu\text{g/ml}$ 로 6시간 처리한 경우 95% 이상이 원형질체화됨을 관찰할 수 있었다. 이는 대수 증식기 말기에 600 $\mu\text{g/ml}$ 로 6시간 처리하여 약 80%의 원형질체를 얻었던 것보다 높은 원형질체화 형성율이

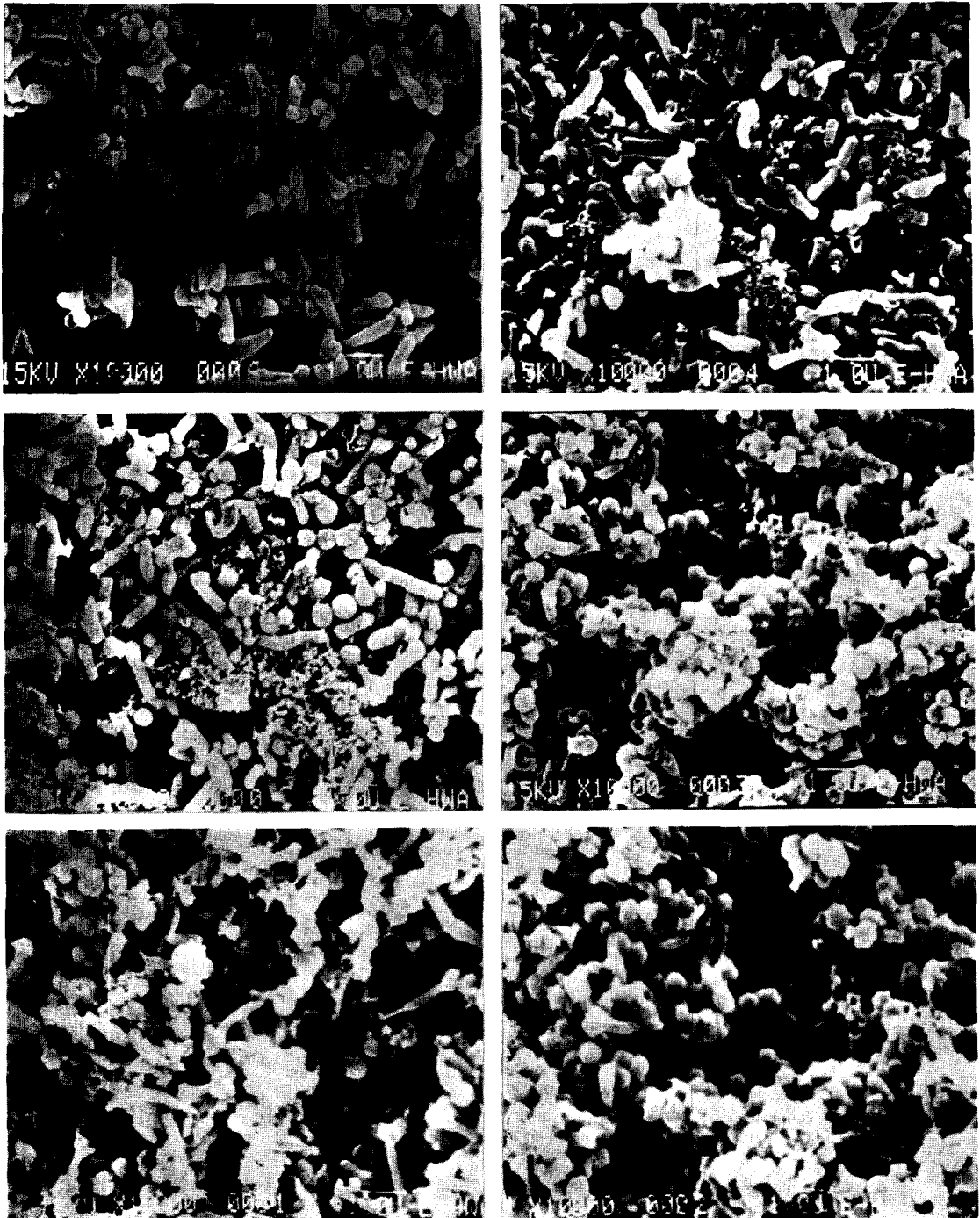


Fig. 2. Scanning Electron Micrographs of protoplast formation of *Cellulomonas flavigena* 12901 at mid exponential phase (cultured for 9 hrs.).

Cells were treated as follows;

- A. Lysozyme 100 $\mu\text{g/ml}$ for 1 hrs. at 30°C.
 D. Lysozyme 200 $\mu\text{g/ml}$ for 2 hrs. at 30°C.
 F. Lysozyme 400 $\mu\text{g/ml}$ for 2 hrs. at 30°C.

- G. Lysozyme 400 $\mu\text{g/ml}$ for 6 hrs. at 30°C.
 H. Lysozyme 600 $\mu\text{g/ml}$ for 2 hrs. at 30°C.
 I. Lysozyme 600 $\mu\text{g/ml}$ for 6 hrs. at 30°C.

며 농도도 600 $\mu\text{g/ml}$ 보다 낮은 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 처리한 경우일지라도 95% 이상의 형성율을 보였다는 점에서 배양기간이 원형질체화에 상당히 큰 영향을 미침을 알 수 있었다. 이는 *cellulomonas* 속 균이 배양기간과 배양조건등에 따라 gram염색성이 변화하여 배양기간이 원형질체화에 매우 중요한 요인이 되어진다고 하겠다. 대부분의 gram양성균은 peptidoglycan층의 N-acetyl-muramic acid가 tetrapeptide의 L-alanine과 연결되어 있는데 비해 coryne형 세균에서는 glycine과 연결되어 있고 또 peptidoglycan층의 cross-link의 정도나 성질이 lysozyme 처리에 미치는 영향이 크다는 내용으로⁽⁷⁾ 미루어 *cellulomonas* 속 균의 특이성을 짐작할 수 있다.

Osmotic shock에 의한 원형질체 계수법과 SEM 촬영 결과의 비교검토

원형질체 형성확인 방법으로써 형성된 원형질체를 0.8% 생리식염수에 처리해 osmotic shock을 줌으로써 원형질체가 파열되도록 유도하고 이를 회석하여 고체 배지에 도말하여 생성되는 생존균수를 헤아려 원래의 생존균수와 그 수를 비교하는 원형질체 계수법이 널리 알려져 있으며, 또 원형질체화율이 계산방법으로 이용되고 있는데 이 방법과 주사전자현미경(SEM)으로 직접 확인하는 두가지 방법을 비교하였다. Table 1의 결과에서 알 수 있듯이 원형질체 계수법으로 그 형성율을 관찰했을 때 모두 높은 형성율을 보여 원형질체가 거의 이루어졌으리라 짐작하였으나 SEM관찰 결과는 원형질체형성이 Table 1의 결과와는 달리 별로 이루어지지 않은 것을 확인할 수 있어 두가지 방법에서의 실험결과가 서로 달리 나타났다. 이는 완전한 원형질체화가 이뤄지지 않은, 세포벽이 덜 벗겨진 spheroplast가 원형질체 계수방법시에 osmotic shock을 받아 파괴됨으로써 높은 형성율을 나타나게 한 것으로 짐작된다. 그러므로 원형질체 형성을 확인하는 방법으로써 원형질체에 osmotic shock을 주어 형성율을 측정하는 간접적인 방법은 정확치 못하여 그 신뢰도가 매우 낮은 것으로 밝혀졌으며 현미경으로 직접 관찰하는 방법이 필히 병행되어야 한다고 생각된다.

이상의 결과로써 본 *C. flavigena* 균의 원형질체 형성을 위한 조건의 일단을 밝힐 수 있었으며 원형질체 형성확인에 있어서 osmotic shock에 의한 원형질체 계수방법과 전자현미경으로의 직접적인 관

찰이 꼭 이루어져야 함을 알 수 있고 세균세포의 원형질체화에는 배양기간의 고려가 중요함을 알 수 있었다.

요 약

Cellulose분해력이 높은 *Cellulomonas flavigena* NCIB 12901의 원형질체 융합을 위한 원형질체의 형성조건을 조사하여 본 결과 배양기간에 따라 원형질체의 형성율이 매우 달라져 대수증식기 말기보다는 증기때의 세포를 lysozyme처리하는 것이 더 효율적이며 lysozyme 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 6시간처리하여 95% 이상이 형성됨을 관찰할 수 있었다. 또한 원형질체 형성확인법으로 osmotic shock에 의한 원형질체 계수법은 spheroplast의 형성과 원형질체의 형성이 구별되어 지지 않으므로 그 결과가 전자현미경상으로 직접 관찰된 결과와 일치하지 않는 경우가 있어 전자현미경으로의 관찰이 뒤따라야 하는 것을 알 수 있었다.

사 사

본 연구의 전자현미경 사진촬영에 도움을 준 이대 중앙기기실 송 회경조교에 감사드린다.

참고문헌

1. Kaneko, H. and K. Sakaguchi: *Agri. Biol. Chem.* **43**,(5) 1007 (1979)
2. 신명교, 이세영, 임번삼, 전문진 : *Kor. J. Microbiol.* **22**, (3) 175 (1984)
3. 김병홍 : 세포융합법에 의한 cellulose 분해세균의 육종에 관한 연구, KAIST 연구보고서 (1982)
4. Wyrick, P.B. and H.J. Rogers: *J. Bacteriol.* **116**,456 (1973)
5. Coetzee, J.N., F.A. Sirgel and G. Lecatsas: *J. Gen. Microbiol.* **114**, 313 (1979)
6. 최영희 : *Bacillus thuringiensis*의 전자현미경적 연구, 건국대학교 대학원 생물학과 석사학위논문 (1982)
7. Ghugsen J.M. and M. Leyh-Bouille: *FEBS Symposium* **20**, 59 (1970)