

**Coryneform bacteria의 原形質體 形成, 再生 및 融合에 관한 研究**

신명교 · 이세영 · 임번삼 · 전문진  
(고려대학교 농화학과)

**The protoplast formation, regeneration and fusion of coryneform bacteria.**

**Shin, Myung-Gyo, Se-Yong Lee, Bun-Sam Lim and Moon-jin Chun**  
(Dept. of Agricultural Chemistry, Korea Univ)

**ABSTRACT**

In order to develop a protoplast fusion system for industrial coryneform bacteria, the optimum conditions for the formation and regeneration of protoplast were examined for *Brevibacterium flavum* and *Corynebacterium glutamicum* and the protoplast fusion was performed.

For the formation of the protoplast of *B. flavum* and *C. glutamicum*, the optimum time for penicillin G treatment to obtain protoplast was mid-exponential growth phase ( $O.D_{260}=0.6-0.8$ ,  $8.0 \times 10^7-1.0 \times 10^8$  cell/ml). At the optimum conditions (0.3 units/ml penicillin G and  $400 \mu\text{g/ml}$  lysozyme for treatment), frequencies of protoplast formation and protoplast regeneration were 99% and 25%, respectively. Protoplast regeneration frequency was highest under the optimum conditions for the protoplast formation. Addition of 25mM  $\text{Mg}^{2+}$  and 50mM  $\text{Ca}^{2+}$  to the regeneration medium further increased the regeneration frequencies.

The protoplast fusion frequencies of *B. flavum* and *C. glutamicum* in intraspecies fusion were  $1.0 \times 10^{-6}$  and  $7.8 \times 10^{-4}$ , of the regenerated protoplast respectively, when 33% of PEG (polyethylene glycol) 6,000 was used as the fusing agent.

**序 論**

原形質體 融合은 1974년 Kao 등이 植物 原形質體에 polyethylene glycol (PEG)과  $\text{CaCl}_2$ 를 가하면 原形質體 融合이 일어나는 것을 發見한 이래 이 방법을 利用하여 방선균(Okanishi, 1974), Bacillis속(Foder and Alföldi, 1976; Schaeffer 등, 1976; Akamatsu 등), Staphylococcus(Götz 등, 1981) 속 등에서 매우 活潑히 研究되었다. 이 原形質體를 이용한 세포융합은 原形質體와 原形質體에서 정상세포로 재생(regeneration)이 가능한 세균에서는 모두 가능하며 특히 유전교환 계가 알려지지 않은 세균에서는 유력한 육종수단이 될 수 있다(Kaneko and Sakaguchi, 1979; Foder and Alföldi, 1976; Götz 등, 1981). 또한

세포를 原形質體로 만들므로서 plasmid의 導入 頻度を 높일 수 있을 뿐만 아니라 原形質體 融合에 의해서 分離, 精製가 어려운 플라스미드의 도입에도 利用될 수 있다(Foder & Alföldi, 1976; Akamatsu & Sekiguchi, 1982; Lee, 1983). 한편 Coryneform bacteria는 아미노산 및 핵산을 生産하는 産業的으로 매우 重要的 菌株이면서도 지금까지 이들에 대한 遺傳物質의 交換界가 거의 알려져 있지 않고 있었다. 1979년 Kaneko 등이 *B. flavum*을 사용하여 原形質體 融合을 시도하여 成功하였고, 1981년 Katsumata 등이 역시 *B. flavum*의 原形質體 融合方法을 사용하여 lysine生産性を 높였다는 報告가 있다(有馬賢治, 高野勇, 1979).

그러나 國內에서는 거의 研究가 안된 상태이고 世界的으로도 Coryneform bacteria에 대한 遺

傳의 研究는 초보단계이다.

本 研究에서는 Coryneform bacteria인 *B. flavum*과 *C. glutamicum*을 사용하여 原形質體의 形成과 再生의 最適條件을 조사하였고, 同種間의 原形質體 融合을 시도하였다.

### 材料 및 方法

#### 1. 菌 株

本 實驗에서는 아미노酸과 核酸 生成菌株인 *B. flavum*과 *C. glutamicum*을 使用했다.

#### 2. 培 地

營養培地로는 nutrient broth를 使用하였고, 最小培地의 조성은 다음과 같다(1당):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10g; Urea, 3g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1g; NaCl, 50mg;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.4g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ , 2mg; glucose, 20g; biotin, 50 $\mu\text{g}$ ; thiamine, 200 $\mu\text{g}$ . 菌 成長培地로는 MMYE를 使用하였으며 이것은 最小培地에 yeast extract (Difco 製)를 0.1%되게 첨가한 것이다. 再生培地로는 營養培地에 0.5M 되게 sodium succinate를 첨가하거나(RNB), 最小培地에 0.5M되게 sodium succinate를 첨가하여(RMM) 使用하였다. 또 菌의 固體培養을 위한 solid agar에는 agar를 1.5%되게 첨가하였고 原形質體의 再生을 돕기 위한 重層 soft agar에는 agarose (Sigma 製)를 0.6%되게 넣었다.

Dilution fluid (D.F)는 原形質體의 稀釋用 高藏溶液으로 그 조성은 sucrose 0.25M, sodium succinate 0.25M, EDTA 0.001M,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.02M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.11M,  $\text{MgCl}_2$  0.01M이며 pH를 6.5되게 하였다.

融合에 使用되는 fusion fluid (F.F.)는 D.F에 EDTA (Junsei Co., Tokyo Jusei Co., Tokyo)을 5mM되게 추가한 것이다.

Lysis fluid (L.F)는 原形質體를 형성하기 위한 溶液으로 그 조성은 MMYE를 전체부피의 반이 되게 넣고 sucrose 0.41M,  $\text{MgSO}_4$  0.01M되게 한 후, lysozyme을 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 추가로 첨가한 것이다.

#### 3. 化學製

Penicillin G는 40,000units/mg solid로 Sigma 社에서 購入하여 使用하였고 streptomycin과 rifampicin은 各各 한독약품(주), 유한양행(주)

에서 購入하여 使用하였다.

#### 4. 原形質體의 形成과 觀察

原形質體의 形成은 Kaneko 等(1979)의 方法을 使用했다. 菌을 10ml의 NB broth에 한 백금니 接種하여 하룻밤 培養한 後 0.2ml를 취하여 20ml의 MMYE broth에 接種하고 30°C에서 진탕배양하였다(120rpm). 細胞數가 0.8~1.0×10<sup>8</sup>cells/ml ( $\text{O.D}_{550}$ =0.6~0.8) 되었을 때 penicillin G를 0.3unit/ml되게 處理하고 1.5시간 내지 2시간 더 진탕배양하였고 이것을 원심분리(10,000 rpm, 10분, Hitachi RPR-20 rotor)하여 菌을 回收하고 10ml의 LF培地에 懸탁시킨 후 100ml의 conical flask에 담아 30°C에서 정지배양하면서 시간이 경과함에 따라 原形質體의 形成程度를 觀察하였다.

原形質體 形成의 확인은 위상차현미경 (Microscope Dialux Leit Wetzlar, Germany)을 使用하여 1,000배에 正常細胞와 形態를 비교하여 확인하는 直接方法과, NB plate에서 成長하는 正常細胞를 총세포수에서 펜 수로 間接확인했다.

#### 5. 正常生育細胞의 確認

LF培地에 있는 菌을 一定量 取하여 hypotonic TM buffer (pH 6.5)로 稀釋한 後 hypotonic NB agar에 도달하여 30°C에서 培養했고 2日 경과 후 나타나는 colony를 계산하였다. TM buffer의 조성은 다음과 같다(1당).

Trisma base (Merk Co.), 50mM; Maleic acid, 50mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.4mM;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 7.5mM; Sodiumcitrate, 1.7mM; pH 6.5

#### 6. 原形質體의 再生

生成된 原形質體를 hypertonic D.F溶液으로 稀釋하여 RNB solid agar위에 도달하고 3ml의 soft agar를 重層하였다. 30°C에서 7~10日 培養한 後 形成되는 colony를 觀察하여 確認하였다.

#### 7. 原形質體 融合

融合시키고자 하는 두 菌株을 原形質體로 만들고 各各 菌株의 cell 농도가 같게 造製한 後 (1.0×10<sup>8</sup>cells/ml~1.0×10<sup>8</sup>cells/ml) 1ml씩 同量 섞은 後 遠心分離(4°C, 15", 3,000rpm, Hitachi)하여 상등액을 除去하고 0.2ml의 F.F에 懸탁시켰다. 여기에 polyethylene glycol (PEG) 6,000 33%溶液을 1.8ml첨가하여 즉시 고르게 均一化한 後 30°C 물중탕에서 15分 경과 후 F.F

培地를 2ml 첨가하여 PEG의 作用을 中斷시키고, 이중 0.1ml를 取하여 再組合體를 選別할 수 있는 再生培地에 도말하고 여기에 soft agar를 重層하여 30°C에서 培養하면서 10~14日 경과 후 나타나는 colony를 觀察하였다. 또한 이때 自發的인 돌연변이에 의한 回歸變異體와 區別하기 위하여 두 親株菌을 混合하지 않고 各各 같은 方法으로 같은 選別培地에 plating하여 형성된 colony도 觀察하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 原形質體의 形成

原形質體 形成方法은 菌株마다 多小 틀리는 점 이 있으나 세포벽을 除去함에 있어서는 lysozyme 이나 그 外 lytic enzyme을 使用하여 왔다. 방선 균에서는 培地에 글라이신을 處理하여 原形質體 形成率을 높였으며(Okanishi 등, 1974) Bacillus 菌에서는 lysozyme을 42°C에서 처리하여 높은 형성율을 얻었다는 報告가 있고(Foder & Alföldi, 1976), 효모에 있어서는 lytic enzyme과 함께 mercaptoethanol과 KCl을 세포벽 용해액에 넣 어 줌으로써 原形質體 形成을 용이하게 하였다는 發表가 있었다(Foder 등). Coryneform bacteria 의 경우는 他菌株와는 달라, Kaneko 등은 菌 의 대수증식기에 penicillin G를 처리하고, 다시 lysozyme을 처리하는 方法을 使用하였다. 本 實驗에서도 Kaneko(1979)이 使用했던 penicillin G 와 lysozyme 처리방법을 적용하였으며, 原形質體 形成의 最適條件을 찾기 위해 penicillin G의 처리시기, penicillin G의 처리농도, lysozyme의 처리 농도 및 처리시간을 달리해 보았다. 原形質體 形成은 현미경하에서 세포형태의 變化와 低藏液 培地중에서의 colony 形成 정도에 의해서 確認하였다. Coryneform bacteria의 경우 정상세포는 rod 혹은 V-shape이나 원형질체의 경우 구형의 형태를 띄고 있어 形態變化로 정상세포와 原形質體의 區別이 可能하며, 정상세포와 原形質體의 형태는 그림 1과 같다.

가) Penicillin G의 處理時期에 따른 原形質體의 形成; 菌의 대수증식기 초기, 중기, 말기를 택하여 penicillin G를 0.3unit/ml濃度로 처리하고 各各을 2시간 진탕배양 시킨 후 lysozyme이



(A)



(B)

Fig. 1. Morphology of intact cell (A) and protoplasts (B) of *B. flavum*

含有된 LF培地에 옮겨 시간이 경과함에 따라 原形質體 形成을 觀察하였다(표 1).

Penicillin G를 0.3unit/ml 처리하였을때 成長에는 영향을 주지 않았다. 표 1에서와 같이 대수증식기의 초기 및 중기에서는 lysozyme 처리 후 8시간이 경과하면서 99%이상의 原形質體 형성율을 보인 반면, 정지기로 넘어 가는 상태의 세포들은 원형질체 형성율이 66%에 불과하여 큰 差異를 나타내었다. 또 融合時 cell수를 고려한다면 대수증식기 중기의 상태에 penicillin G를 처리하는 것이 바람직하다고 본다.

나) Penicillin G의 처리농도가 原形質體 形成에 미치는 영향: penicillin G의 처리농도가 原形質體 形成에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 penicillin G 농도를 0.3unit/ml, 1unit/ml로 各各 처리한 후 lysozyme을 300μg/ml 처리하고, hypotonic NE agar plating하여 삼투압에 저항성이 있는 균수를 측정함으로써 osmotically

**Table 1.** Effect of penicillin G treatment time on the protoplast formation in *B. flavum*(Unit:cell/ml)

PG-treated at	Items	Reaction time (hr)	After treated with lysozyme (300µg/ml)			
			immediate	8	16	24
initial log. phase	Viable cell number*		$1.0 \times 10^3$	$3.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$5.0 \times 10^1$
	Protoplast number**		0	$9.97 \times 10^7$	$9.975 \times 10^7$	$9.95 \times 10^7$
	pff.(%)***		0	99	99	99
mid log. phase	Viable cell number		$4.0 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$	$7.5 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$
	Protoplast number		0	$3.985 \times 10^7$	$3.992 \times 10^7$	$3.995 \times 10^5$
	pff. (%)		0	99	99	99
transit log. phase	Viable cell number		$4.0 \times 10^9$	$1.37 \times 10^9$	$9.95 \times 10^9$	$2.4 \times 10^3$
	Protoplast number		0	$2.63 \times 10^9$	$3.005 \times 10^9$	$3.76 \times 10^9$
	pff. (%)		0	66	75	94

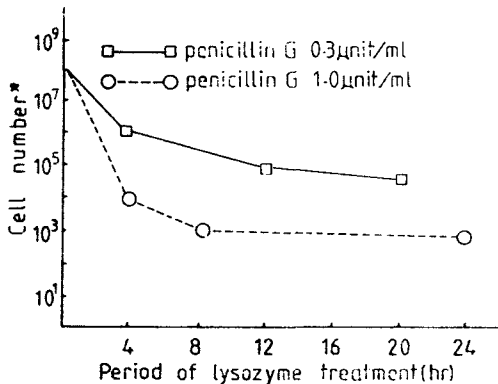
\* Cell solutions were diluted with hypotonic TM buffer and plated on hypotonic NB agar

\*\* Protoplast number = Total cell - Viable cell number

\*\*\* Protoplast formation frequency:

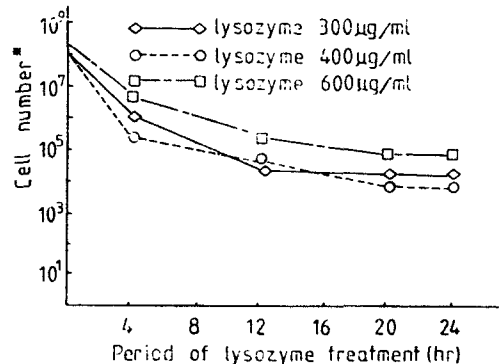
$$\text{pff. (\%)} = \frac{\text{Protoplast number}}{\text{Total cell number}} \times 100$$

$$= \frac{\text{Total cell number} - \text{Viable cell number}}{\text{Total cell number}} \times 100$$



**Fig. 2.** Effect of penicillin G concentration on the protoplast formation of *B. flavum*

\* Cell solution was diluted with hypotonic TM buffer (pH 6.5), plated on NB agar medium and counted colony after 3 days incubation at 30°C



**Fig. 3.** Effect of lysozyme concentration on the protoplast formation of *B. flavum*

\* Cell solution was diluted with hypotonic TM buffer (pH 6.5), plated on NB agar medium and counted colony after 3 days incubation at 30°C

fragile cell (protoplast) 수를 간접적으로 측정 하였다(그림 2).

Penicillin G의 두 농도에서 다 같이 4시간이 경과한 후 90% 이상 原形質體化 하였으며, 특히 penicillin G를 1unit/ml로 처리한 경우, 99.9% 이상 原形質體化하여 8시간 경과후 부터 더 이상의 變化는 없었다. 반면, penicillin G를 0.3 unit/ml로 처리했을 때는 12시간까지 구준하게 原形質體가 形成되었음을 관찰할 수 있었다. 바

라서 原形質體 形成에 있어서는 1unit/ml농도의 penicillin G처리가 훨씬 效果的이었다.

다) Lysozyme 농도가 原形質體 形成에 미치는 效果: Lysozyme의 농도가 原形質體 形成에 미치는 效果를 보기 위해 penicillin G를 0.3unit/ml 처리하고, lysozyme을 300µg/ml, 400µg/ml, 600µg/ml처리하였다(그림 3).

Lysozyme단독으로서의 原形質體 形成에 미치는 영향은 크지 않았으나 penicillin G를 처리하

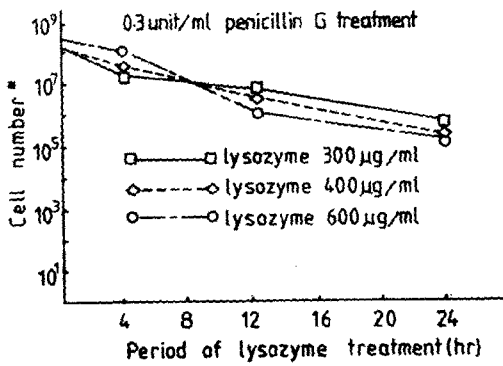


Fig. 4. Effect of lysozyme concentration on the protoplast regeneration of *B. flavum*

\* Cell solution was diluted with hypertonic DF medium, mixed with hypertonic RNB soft agar, plated on solid RNB agar medium and counted colony after 1 week incubation at 30°C

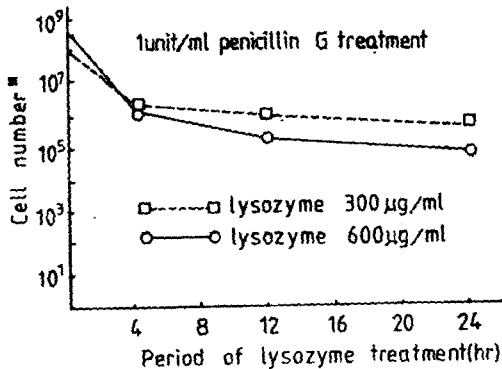


Fig. 5. Effect of lysozyme concentration on the protoplast regeneration of *B. flavum*

\* Cell solution was diluted with hypertonic DF medium, mixed with hypertonic RNB soft agar, plated on solid RNB agar medium and counted colony after 1 week incubation at 30°C

였을 때는 lysozyme의 농도가 높아질수록 原形質體 형성율도 多小 증가하는 것으로 나타났다.

2. 原形質體 再生

가) 원형질체 형성과 재생간의 상호관계: 原形質體의 세포벽 재생에 있어서는 原形質體의 安定性 및 再生時에 수반되는 物理, 化學的 要因도 상당히 크게 영향을 줄 뿐만 아니라 原形質體 形成에서의 여러 要因들이 재생에도 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다(그림 4, 그림 5).

그림 4는 penicillin G를 0.3unit/ml 처리하고 lysozyme을 각각 300µg/ml, 400µg/ml, 600µg/

Table 2. Regeneration frequency\* of the protoplast of *B. flavum*

Penicillin G concentration (unit/ml)	Lysozyme concentration (µg/ml)	Period of lysozyme treatment (hr)		
		4	12	24
0.3	300	17	5	0.5
	400	25	2.8	0.1
	600	20	0.2	0.02
1.0	300	3	2	0.1
	600	0.3	1	0.05

$$* \text{R.f. (\%)} = \frac{\text{Colony number on RNB agar}}{\text{Total cells - non protoplasted cells}} \times 100$$

ml 농도의 처리로 原形質體를 形成했을 때의 재생을 관찰한 것이고, 그림 5는 penicillin G를 1unit/ml을 처리하고 lysozyme을 300µg/ml, 600 µg/ml로 처리했을 때의 再生을 관찰한 것이다. penicillin G와 lysozyme의 농도가 증가하면 原形質體의 형성율은 증가하였으나, 반면 재생율은 급격히 감소하였으며, 또한 lysozyme 처리시간이 길어짐에 따라 原形質體 형성율은 증가하나 재생율은 감소했다(표 2).

Penicillin G 1unit/ml, lysozyme 600µg/ml 처리에서 가장 좋은 原形質體 형성율을 보였으나(그림 2, 그림 3), 再生에서는 가장 낮은 재생율을 나타냈으며(그림 3, 그림 4, 표 2), 오히려 penicillin G의 농도가 0.3unit/ml, lysozyme의 농도가 400µg/ml에서 形成된 原形質體가 재생율 25%로 가장 效果的이었다.

나) 2가 양이온이 原形質體 再生에 미치는 영향: 방선균에 있어서는 菌株마다 多小 차이가 있으나, Mg<sup>++</sup>농도가 20mM, Ca<sup>++</sup> 농도가 50mM 되게 再生培地에 첨가함으로써 正常細胞로의 재생율이 4%에서 40%로 10배 정도 증가시켰으며(Okanishi 등, 1974) 또 *Bacillus*속에서도 horse serum이나 bovine serum albumin 같은 plasma expender를 再生培地상에 첨가함으로써 재생율을 높였다는 報告가 있다(Gabor and Hotchkiss, 1979). 따라서 Coryneform bacteria에 있어서도 2가 양이온이 原形質體 再生에 미치는 效果를 살펴 보고자 Mg<sup>++</sup>와 Ca<sup>++</sup>농도를 25mM, 50mM, 100mM되게 再生培地에 첨가하였다. 2가 양이온의 效果는 Mg<sup>++</sup>의 경우 25mM농도에서 Mg<sup>++</sup>를 첨가하지 않은 培地와 비교하여 재

**Table 3.** Effect of di-cation on the protoplast regeneration of *B. flavum*

Di-cation added to RNB medium		Regeneration	
MgCl <sub>2</sub> (mM)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	Colony number	Relative value (%)
—	—	1.9×10 <sup>6</sup>	100
25	—	3.2×10 <sup>6</sup>	168
50	—	2.7×10 <sup>6</sup>	142
100	—	2.0×10 <sup>6</sup>	105
—	25	2.0×10 <sup>6</sup>	105
—	50	3.0×10 <sup>6</sup>	158
—	100	2.3×10 <sup>6</sup>	121
25	25	2.5×10 <sup>6</sup>	131
25	50	4.0×10 <sup>6</sup>	210
25	100	1.4×10 <sup>6</sup>	73
50	25	2.9×10 <sup>6</sup>	152
50	50	2.0×10 <sup>6</sup>	105
50	100	2.9×10 <sup>6</sup>	152
100	25	2.5×10 <sup>6</sup>	131
100	50	2.5×10 <sup>6</sup>	131
100	100	1.9×10 <sup>6</sup>	100

생율이 1.6배 증가하였으며, 또 Ca<sup>++</sup>는 50mM에서 역시 1.6배 증가하였다. Mg<sup>++</sup>와 Ca<sup>++</sup>를 함께 培地에 첨가했을 때는 Mg<sup>++</sup> 25mM, Ca<sup>++</sup>가 50mM에서 첨가하지 않은 培地에 비해 2.1배의 재생을 증가를 나타냈다. 이와같은 결과는 *B. flavum* 뿐만 아니라 *C. glutamicum*에서도 얻어져 Coryneform bacteria의 原形質體 再生에 Mg<sup>++</sup>와 Ca<sup>++</sup>의 양이온이 영향을 주고 있음을 알 수 있었다(표 3).

### 3. 原形質體 融合

1974년 Kao 등이 polyethylene glycol (PEG)를 融合에 사용하여 成功했다는 報告(Kao and Michalyuk, 1974)가 있는 이후 PEG의 使用效果는 절대적이다. 방선균에서는 PEG 4,000 42%를 使用함으로써 再組合빈도가 40%나 증가하였으며 PEG처리시간도 5分 内外에서 效果의이었다(Götz 등, 1981). *Bacillus*에서는 PEG를 Mg<sup>++</sup>나 Ca<sup>++</sup>와 함께 處理함으로써 原形質體의 融合을 촉진시켰다는 報告가 있다(Schaeffer 등, 1976). 本 研究에서는 Kaneko 등이 사용한 方法을 근거로 實驗하였다.

融合에 사용한 原形質體는 本 實驗에서 최적 조건으로 확립된 方法에 의해 만들었다. 즉, 대

**Table 4.** The protoplast fusion frequency of *B. flavum*

Cross (phenotype)	Reversion frequency		Fusion frequency (Str <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup> )	
	Str <sup>r</sup>	Rif <sup>r</sup>	With PEG	without PEG
Str <sup>r</sup>				
×	5.0×10 <sup>-8</sup>	2.0×10 <sup>-8</sup>	1.0×10 <sup>-6</sup>	1.0×10 <sup>-8</sup>
Rif <sup>r</sup>				

Str<sup>r</sup>: Streptomycin resistance

Rif<sup>r</sup>: rifamycin resistance

**Table 5.** The protoplast fusion frequency of *C. glutamicum*

Cross (phenotype)	Reversion frequency		Fusion frequency	
	Arg <sup>+</sup>	Ile <sup>+</sup>	Arg <sup>+</sup>	Ile <sup>+</sup>
Arg <sup>-</sup>				
×	2.5×10 <sup>-6</sup>	2.5×10 <sup>-5</sup>	7.8×10 <sup>-4</sup>	
Ile <sup>-</sup>				

수증식기 증기에 penicillin G를 0.3unit/ml로 2시간 處理하고 이어 lysozyme을 400μg/ml 濃度로 hypertonic medium상에서 반응시키고, 5시간 경과후 각각protoplast 수를 5.0×10<sup>8</sup>cells/ml 내외로 보정하였다. 材料 및 方法란에 記述되어 있는 融合方法으로 *B. flavum* ATCC 21528의 Thr<sup>-</sup>, Str<sup>r</sup> 변이주와 Thr<sup>-</sup>, Rif<sup>r</sup> 변이주간의 同種間 原形質體 融合을 시도하여 表 4와 같은 結果를 얻었다. 選別培地로는 streptomycin과 rifampicin이 각각 50μg/ml 첨가된 RNB agar가 사용되었다.

표 4에서 融合에 PEG를 使用하였을 때 原形質體 融合 頻도가 재생세포당 1.0×10<sup>-6</sup>으로 얻어졌다. 이는 原形質體 融合에 PEG를 사용하지 않았을 경우인 1.8×10<sup>-8</sup>에 비해 10<sup>2</sup>배 이상 증가했다. 또 *C. glutamicum* Agr<sup>-</sup>변이주와 Ile<sup>-</sup>변이주를 原形質體 融合하여 표 5와 같은 結果를 얻었다.

표 5에서와 같이 영양요구성을 선별 표식으로 하였을때 融合頻도는 재생세포당 7.8×10<sup>-4</sup>을 나타냈으며 Arg<sup>-</sup>변이주와 Ile<sup>-</sup>변이주가 reversion되는 頻도는 각각 2.5×10<sup>-6</sup>, 2.5×10<sup>-5</sup>으로 나타났다.

위와같은 結果로 보아 Coryneform bacteria에

있어서 原形質體 融合에 의해 再組合體 形成이 가능하며, 실제 育種에도 利用될 수 있으리라고 생각한다.

앞으로 原形質體의 正常細胞에로의 재생율을 높이고, 세포융합빈도를 높이는 研究가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

### 摘 要

一般的인 Coryneform bacteria의 育種에 原形質體 融合을 적용하기 위하여, 核酸 및 아미노酸 生産에 使用되고 있는 産業菌株인 *B. flavum*과 *C. glutamicum*을 사용하여 原形質體의 形成과 再生의 最適條件을 調査하고, 原形質體의 融合을 시도하였다. 그 結果, 原形質體의 形成에 있어서는 *B. flavum*과 *C. glutamicum*에서 모두 대수증식기 중반( $O.D_{590}=0.6\sim 0.8$ ,  $0.8\times 10^8\sim 1.0\times 10^8$  cells/ml)에 penicillin G 0.3 unit/ml를 處理하고 2시간 더 培養시킨 후 lysozyme 400 $\mu$ g/ml를 hypertonic medium에서 4시간 처리하였을 때 99% 이상의 原形質體의 形成率을 보였다. 原形質體의 再生은 原形質體의 形成條件과 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌으며, penicillin G 0.3 unit/ml, lysozyme 400 $\mu$ g/ml 처리에서 원형질체 재생율이 25%로 가장 높게 나타났다. 또  $Mg^{++}$ 와  $Ca^{++}$ 를 각각 25mM, 50mM되게 再生培地에 첨가하여 증으로써 재생율이 增加하였다. 한편, 同種間 原形質體 融合에서 PEG 6,000을 33%농도로 使用했을 때, *B. flavum*과 *C. glutamicum*에서 재생세포당 각각  $1.0\times 10^{-6}$ ,  $7.8\times 10^{-4}$ 의 再組合 頻도를 나타냈다.

### 參 考 文 獻

- Akamatsu, T., Ohnishi, B., and J. Sekiguchi. Fusion of protoplasts of *Bacillus* species, *Advances in Biotechnology*; Proc. 6th internatl Ferment Symp. 5th Internatl. Symp. on Yeast Vol. 3. Permagon Press. Canada. Ltd. Ontario. in Press.
- Akamatsu, T. and J. Sekiguchi, 1981. Studies on Regeneration media for *Bacillus Subtilis* Protoplasts. *Agric. Biol. Chem.* 45(12) 2887.
- Akamatsu, T. and J. Sekiguchi, 1982. Transformation of *Bacillus* protoplasts by plasmid PTP<sub>4</sub> DNA, *Agric. Biol. Chem.* 46 (6) 1617.
- Chang, S. and S.N. Cohen, 1979. High frequency transformation of *Bacillus Subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Molec. Gen. Genet.* 168 111.
- Foder, K. and L. Alföldi, 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium* Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73 2147.
- Foder, K., K. Rostas and L. Alföldi. Bacterial protoplasts and their possible use in bacterial genetics. *Advances in Protoplast research.*
- 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.
- Götz, F. Ahrné, S. and N. Lindberg, 1981. Plasmid transfer and genetic Recombination by Protoplast fusion in *Staphylococci*. *J. Bacteriol.* 145 74.
- Kaneko H. and K. Sakaguchi, 1979. Fusion of protoplasts and Genetic Recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, 43(5); 1007.
- Kao., K.N. and M.R. Michayluk, 1974. A Method for high frequency intergenic fusion of plant protoplasts. *Planta.* 115. 355.
- Lee, J. W., 1983. Development of plasmid-Vector of Coryneform bacteria. Master thesis. Graduate School, Korea Univ.
- Ochi, K., Hitchwck, M.J.M. and E. Katz, 1979. Highfrequency fusion of *streptomyces. parvulus* or *Streptomyces antibioticus* protoplasts. induced polyethylene glycol. *J. Bacteriol.* 139(3) 984.
- Okanishi, H. et al., 1974. Formation reversion of *Streptomyces* protoplast: Culture condition and morphological Study. *J. Gen. Microbiol.* 80 389.
- Schaeffer, P., Cami. B. and R.D. Hotchkiss, 1976. Fusion of bacterial protoplasts Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73 2151.
- 有馬賢治, 高野勇, 1979. 微生物の プロトプラスト 融合. *醸工誌* 57 380.
- 勝亦瞭一, 高山健一郎, 古屋, 晃, 1981. 日本特許昭 56 109587.