

## 토양에서 분리한 *Pseudomonas* sp.에 의한 Phosphinothricin과 Glyphosate의 생분해

정광보 · 조홍범 · 채영규<sup>1</sup> · 최영길\*

한양대학교 생물학과, 생화학과<sup>1</sup>

본 연구에서는 토양 내에서 비선택적으로 작용하는 제조제인 phosphinothricin(PPT)을 분해할 수 있는 세균을 분리·동정하고, 돌연변이 유도 및 세포융합의 기법을 통해 그 능력을 개량하였으며, 아울러 다른 제조제인 glyphosate 저항성 균주 (*Pseudomonas cepacia*)와의 종간 세포융합을 이용하여 두가지 제조제에 동시에 작용 할 수 있는 균주의 개발 가능성을 알아보았다. 이때, 분리된 PPT 분해균주는 *Pseudomonas paucimobilis*로 동정되었고, ethylmethansulfate를 처리하여 영양 요구성 돌연변이주를 얻은 뒤, 이를 종내 세포융합을 위한 균주로 사용하였다. Lysozyme과 EDTA를 이용하여 원형질체를 형성시켰을때, 원형질체 재생율은 *P. paucimobilis*의 경우 6.5%, *P. cepacia*의 경우 8.8%로 나타났다. 세포 융합의 fusogen으로 polyetyleneglycol 6,000을 사용하여, 종내 융합을 통한 융합체 F1, F2, 종간 융합을 통한 융합체 F3, F4를 얻었다. 종내 융합의 결과, 융합체 F1의 경우 야생형에 비해 PPT 분해능이 약 11% 정도 향상되었으며, 종간융합을 통하여 얻은 융합체의 경우, PPT 분해능 및 glyphosate 저항성 등의 모균주 특성을 모두 지니고 있었다.

**KEY WORDS** □ Phosphinothricin, Glyphosate, *Pseudomonas paucimobilis*, *Pseudomonas cepacia*, Spheroplast fusion

일반적으로 제조제는 식물체의 아미노산 생합성 과정을 방해하거나, 광합성의 전자전달회로에서 전자의 흐름을 억제하여 식물체를 고사시킨다. 이중 아미노산 생합성을 억제하는 제조제는 그 대상으로 하는 아미노산에 따라 다음과 같이 3종류로 구분된다(25). 첫째, 방향족 아미노산의 생합성을 억제하는 경우로, prechorosmate aromatic amino acid biosynthetic pathway에서 shikimate-3-phosphate(S3P)를 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate(EPSP)로 촉매하는 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)를 제어하는 제조제로서 glyphosate가 대표적이다. 둘째, 암모니아 및 ATP의 존재하에 L-glutamic acid로 부터 L-glutamine의 전환을 촉매하는 glutamine synthetase(GS)의 작용을 억제하는 제조제로 phosphinothricin(PPT)을 들 수 있다. 셋째, valine, leucine 등과 같은 branched-chain amino acid의 생합성 중 pyruvate를 2-acetolactate로 전환하는 acetolactate synthase(ALS)의 작용을 억제하는 sulfonylureas 및 imidazolines 등의 제조제가 알려져 있다.

이처럼 필수 아미노산의 생합성에 관련된 식물 효소들이 제조제의 기본적인 target이 되고 있으며, 미

생물에 있어서도 아미노산의 생합성 경로가 식물과 유사하기 때문에 이들 제조제에 의해서 생장에 치명적인 영향을 받게 된다. 그러나 자연계에 분포하는 미생물들 중에는 제조제의 구조를 변환시켜 제조제에 저항성을 가지거나 혹은 더욱 적극적으로 이들을 생분해하여 영양원으로 이용하는 능력을 가진 미생물들이 있다(20, 25). 예를 들면, glyphosate는 *Arthrobacter*(32), *Pseudomonas*(20), *Salmonella*(7) 등의 미생물에 의하여 분해된다고 알려졌으며 PPT의 경우 *Streptomyces*, *Pseudomonas*가 이를 분해하는 것으로 알려졌다(9, 10, 41). 따라서 토양 미생물에 의한 이들 제조제의 내성 및 분해능을 개량하는 연구도 활발하다. 균주 개량의 방법으로는 돌연변이 유발 및 원형질체 융합, 유전자 재조합등의 다양한 방법이 있으며, 원형질체 융합의 경우 산업 균주 개발에 효과적인 방법으로 알려져 있다(31). 초기에는 분류학적으로 유사성이 많은 종내, 종간융합이 연구되었으나(19), 근래 들어서는 *Fusobacterium varium*과 *Streptococcus faecium*을 사용 DDV(dehydrodivanillian) 분해율을 높이는 융합체를 만드는 등(5), 속간의 원형질체 융합도 활발히 연구되어 좋은 결과를 얻고 있다.

본 연구에서는 *Streptomyces hygroscopicus*에 의하여 생성되는 bio-antibiotics인 PPT(9)를 분해하는 미생물을 토양으로 부터 분리, 동정하고, 종내 원형질체 융합을 이용하여 분해능이 향상된 균주를 개발하며, 아울러 방향족 아미노산의 생합성을 억제하는

\*To whom correspondence should be addressed.

“이 논문은 1990년도 교육부 학술연구조성비의 일부에 의하여 연구되었음”

제조제인 glyphosate(18, 39)에 대해 내성을 나타내는 균주로 본 실험실에서 분리된 *Pseudomonas cepacia*와 PPT 분해균주 사이에 세포융합 기법을 이용하여, 두 가지 제조제에 대하여 동시에 분해능 및 저항성을 갖는 균주의 개발을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### PPT 분해균주의 분리 및 동정

PPT에 대한 내성 혹은 분해능을 가진 미생물의 분리를 위해 제조제가 처리된 밭에서 토양을 채취하여 Bartsch와 Tebbe 등의 방법(3)을 변형하여 실험하였다. 토양 시료 1g을 10 ml의 0.5% sodium hexametaphosphate 용액에 한시간 담가두었다가 상층액을 PPT가 함유된 Winogradski minimal salt(WMS) 배지(38)와 0.5% yeast extract, 2 mM glucose 완전 배지에 접종하고 농화배양하였다. 질소원으로 공급되는 PPT는 0.1, 1, 10, 20, 40 및 80 mM의 농도로 계대배양할 때 마다 높혀주었다. 얻어진 콜로니를 5 mM glucose, 5 mM succinate, 10 mM glycerol과 WMS가 포함된 배지 혹은 5 mM glucose, 20 mM PPT가 들어있는 M9 배지에 접종하여 PPT에 저항성이 있거나 PPT를 이용하는 균주를 선별하였다. 선별된 세균에 대한 동정은 그람 염색과 광학현미경을 통한 형태적 특성 및 API Kit(API bio Merieux)에 의한 생화학적 특성에 따라 동정하였다.

### 세포 추출액의 제조

토양에서 분리된 PPT를 변환시키거나 저항성을 갖는 균주를 5 mM glucose와 20 mM PPT가 들어있는 M9 배지(200 ml)에서 2일간 배양하였고, 원심분리기를 이용하여 세포를 수확(8,000×g, 12분)한 다음 10 mM NaCl를 포함하는 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 두번 씻은 후 같은 완충액에 1.7 g/ml의 세포가 되게 하였다. 세포가 들어있는 완충액을 ultrasonicator(Cole-Parmer Instrument Ltd.)를 사용하여 20초 동안 80 Watt로 5분 동안 세포를 분쇄하였고, 이 파쇄액을 원심분리(8,000×g, 20분)하여 상층액을 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5)로 투석하였다. 단백질 양은 BCA protein assay kit(Pierce)을 사용하였고, 표준시료로 bovine serum albumin을 사용하였다. 얻어진 세포 추출액은 -20°C에 보관하였다.

### PPT acetyltransferase의 효소학적 분석

위에서 얻어진 세포 추출액에서 PPT acetyltransferase (PAT)의 분석은 chloramphenicol acetyltransferase assay를 위한 분석방법(41)을 변형한 분광학적인 방법으로 분석하였다(3, 10). 즉, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2)에 0.4 mg/ml의 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 10 mM acetyl-CoA가 들어있는 반응액에 일정량의 세포 추출액을 넣고 10 mM의 PTT를 첨가한 후 한시간 동안 30°C에서 반응시킨 후 412 nm에서 monitoring하였

Table 1. Bacterial strains used

Strain	Phenotype	Sources or references	
<i>P. paucimobilis</i>	wild type	prototroph	This study
<i>P. paucimobilis</i>	HPMM-1	ade <sup>-</sup> , gua <sup>-</sup>	"
<i>P. paucimobilis</i>	HPMM-4	met <sup>-</sup> , asp <sup>-</sup>	"
<i>P. cepacia</i>	wild type	prototrope	(22)

다. 이는 DTNB와 환원된 CoA에서 생성된 5'-thio-2-nitrobenzoic acid를 검출하는 것이며 이의 molar extinction coefficient는 412 nm에서 13,600이다. PAT 1 unit는 1 μmol의 PPT가 1분간 아세틸화하는 것으로 정의하였다(3).

### 제조제 분해능 측정

선별된 균주를 20 mM PPT 함유 WMS 배지에서 대수기 말기까지 배양한 뒤 원심분리(Hitachi, 10 min, 3,000×g)하고 상등액을 취하여 microfuge로 2차 원심분리(GMBH German, 20 min, 5,000×g)하고 상등액을 취하여 high pressure liquid chromatography (HPLC; Waters, USA)를 통해 잔류 PPT양을 측정하였다(3). 시료를 phenylisothiocyanate를 이용하여 유도체화 시킨뒤 Pico. Tag C<sub>18</sub> column (150×3.9 mm, 4 m)을 사용하여 0.8 ml/min의 유속으로 측정하였으며 이동상으로 sodium acetate trihydrate와 triethylamine를 사용하였다.

### 제조제의 최소 억제농도(MIC) 측정

PPT 분해 균주와 glyphosate 저항성 균주에 대하여 각각의 상대방 제조제에 대한 최소 억제농도(MIC)를 측정하였다. *P. paucimobilis*의 경우 agar가 함유된 Dworkin-Foster salt mixture (DF) 배지(11)에 glyphosate-농도를 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 및 6.4 mM이 되게 첨가한 후 균을 접종하였다. *P. cepacia*의 경우는 agar가 함유된 WMS 배지에 PPT 농도를 1, 2, 4, 8, 16, 32 및 64 mM되게 첨가한 후 균을 접종하였다. 각각의 경우 30°C 배양기에서 이틀동안 배양한 후 colony 형성유무를 확인함으로써 각 제조제에 대한 최소 억제농도를 정하였다.

### 원형질체 융합에 사용된 균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주 및 그 특성을 Table 1에 나타냈다. Glyphosate 저항성인 *Pseudomonas cepacia*는 본 연구실에서 분리된 균주(22)를 사용하였으며, 성장배지로는 NaCl 15 mg, potassium acetate 4.0 g 이 첨가된 DF 배지에 유일한 인산원으로 glyphosate를 0.1 mM 에서 10 mM까지 첨가하여 사용하였다. 원형질체 재생을 위해 만들어진 rich regeneration medium (RRM)은 Coetzee 등(6)의 방법에 따랐다. 순도 99%의 glyphosate는 (주) 동양화학 및 미성화학에서, PPT는 (주) 경농에서 제공받아 사용하였으며, casamino acid는 Difco (Detroit, Michigan, USA)제품을, sucrose, ethyl-

methanesulfonate (EMS), lysozyme, amino acid 등은 Sigma (St. Louis, Mo.) 제품을 사용하였다.

**종내 및 종간 원형질체 융합에 의한 균주개량**

PPT 분해능을 가진 분리균주의 종내 원형질체 융합 및 glyphosate 내성균주와의 종간 융합에 의한 균주개량은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

Loveless와 Howarth(24)의 방법에 따라 *P. paucimobilis* 균주 배양액에 생존율이 5~10% 되도록 EMS를 처리하여 돌연변이를 유도하고 이들 돌연변이주의 영양요구성은 Gerhardt 등(14)의 방법에 따라 확인하였다. 이들 영양요구성 돌연변이주는 Lee(23)의 방법에 따라 최종 세포농도가 600 nm에서의 흡광도가 2.0이 되도록 현탁하여 ml당 100 g의 lysozyme과 100 g의 EDTA를 처리함으로써 원형질체를 생성한 후, Schaeffer등(35)의 방법으로 원형질체의 융합을 시도 하고 RRM 평판배지에서 배양하여 재생시킨 다음 각각의 모균주의 요구 아미노산을 첨가한 PPT 함유 WMS 배지에서 성장하는 colony를 융합체로 선별 하였다.

한편 PPT 분해균주와 glyphosate 저항성 균주와의 원형질체 융합에 의한 균주개량을 위해서 원형질체 상태인 균주 *P. paucimobilis*와 *P. cepacia*를 각각 1 ml씩 섞은 후 상기와 동일한 방법으로 융합하여 재생시킨 뒤, 각각의 모균주 선별배지에 replica하여 모균주의 표현형을 모두 나타내는 clone을 융합체로 선별하였다.

원형질 융합체의 제조제에 대한 내성 및 분해능은 모균주 각각의 MIC 농도를 기준으로 생존 유무를 비교 측정하였으며 PPT의 경우는 HPLC 분석을 병행하였다.

**결과 및 고찰**

**PPT 분해균주의 분리 및 동정**

유일한 질소원으로 공급된 PPT를 80 mM 농도까지 첨가한 WMS 배지에서도 생존한 colony중에서 형태적 특성에 따라 5균주를 선별하였다. PPT의 대사에 관련된 효소에 관한 연구(3, 37)에 따르면 PPT의 초기 대사는 2-oxo-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (PPO), N-acetyl-PPT 등 2종류의 대사산물을 생성하는데 세가지의 효소 즉, PPT-oxidase, PPT-transaminase, PAT와 같은 효소가 관여하는 것으로 알려졌는데 그중 PPT의 생분해가 불가능한 상황에서도 PPT의 아미노기를 acetylation 시키는 PAT activity를 통해 해독을 시키는 mechanism이 알려지고 있다. 따라서 이들 선별 균주들에 대하여 PAT assay를 한 결과 그 정도가 극히 미미하여 검출되지 않는 경우가 대부분이었으나, 단지 HP-137의 경우에서만 PAT 효소 활성도를 나타내었다(data not shown). HP-137의 경우 PAT 효소 활성도가 있고 PPT를 유일한 질소원으로 포함하는 WMS배지에서 자라는 성질을 평가할 때, 이 세균이 PPT를 도양내에서 변환시키는 것으로 간주하였으며, fusion을 통한

**Table 2.** Morphological and biochemical characteristics of isolated strain, HP-132

PARAMETERS	CHARACTERISTICS
Colony form	circular
Cell arrangement	single, pair
Shape	rod
Gram stain	-
Motility	+
VP test	+
Gelatin liquefaction	-
Nitrate reduction	-
Oxidase test	-
$\beta$ -galactosidase	+
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	-
H <sub>2</sub> S production	-
Urease test	-
Tryptophan deaminase	-
Indole production	-
Assimilation test	
Glucose	+
Arabinose	+
Mannose	+
Mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
Maltose	+
Gluconate	+
Caprate	-
Adipate	-
Malate	-
Citrate	+
Phenyl-acetate	-

균주 개량을 하기 위한 대상 균주로 선택하였다.

한편 분리균주 HP-137은 그람염색, 광학현미경에 의한 형태적 특성 및 API 20NE kit에 의한 생화학적 시험 결과 *Pseudomonas paucimobilis*로 판단되었다 (Table 2).

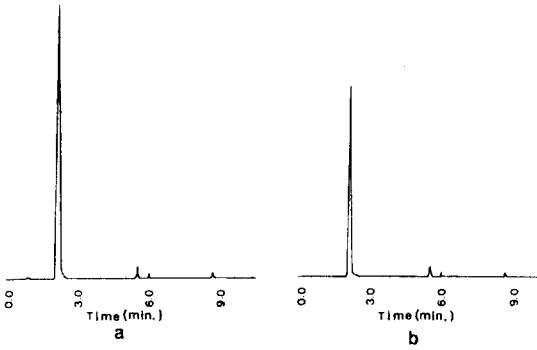
**분리 균주의 PPT 분해능 측정**

최종 분리균주인 *P. paucimobilis*를 36시간 배양한 뒤 HPLC로 분석한 결과, retention time은 대략 2분 30초였으며 약 47%의 분해율을 나타내었는데(Fig. 1). 이는 Bartsch와 Tebbe(3)에 의해 도양에서 분리된 *Rhodococcus* sp.의 약 50%와 비슷한 수준의 분해능을 나타내었다. 아울러 이 분리균주의 PPT 분해능이 chromosomal DNA에 기인하는지 혹은 plasmid에 기인하는지를 판단하기 위하여 plasmid 분리시험 및 curing test를 병행한 결과 PPT 분해능은 chromoso-

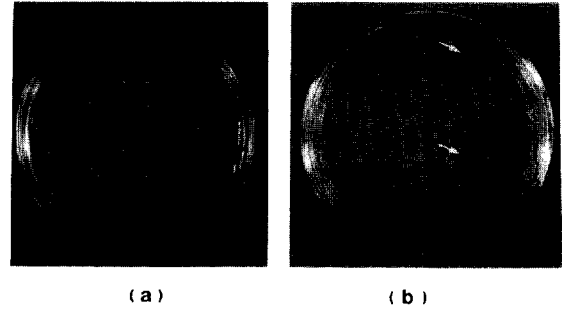
mal DNA에 기인함을 알 수 있었다(data not shown).

**원형질체 융합에 의한 균주의 개량**

1) 돌연변이주의 분리 및 효용



**Fig. 1.** High pressure liquid chromatograms of remaining PPT from culture medium.  
 a) WMS containing 20 mM PPT  
 b) *P. paucimobilis* was cultured in WMS containing 20 mM PPT.



**Plate 1.** Photograph of fusants isolation.  
 Regenerated colonies of fusants were toothpicked from RRM to selective medium containing 20 mM PPT a) or 3 mM glyphosate (b) and incubated at 30°C for three days.

**Table 3.** Biochemical characteristics of fusants.

Biochemical characteristics	fusants			
	F1	F2	F3	F4
$\beta$ -galactosidase	-	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Urease test	-	+	+	+
Indole production	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	-	+	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-
Assimilation test				
Glucose	+	+	+	+
Arabinose	-	+	+	+
Mannose	+	+	-	+
Mannitol	-	+	-	+
N-acetyl-glucoamine	-	+	+	+
Maltose	-	+	+	+
Gluconate	+	+	+	+
Caprate	+	-	-	-
Adipate	-	-	-	-
Malate	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+
Phenyl-acetate	+	+	+	+

분리균주 *P. paucimobilis*의 개량을 위하여 돌연변이 유발원인 EMS를 3%되게 처리하였을 때 적정 처리 시간은 20분이었으며 이 결과 생긴 돌연변이주 중에서 표현형이 서로 다른 5개의 돌연변이주를 얻었다. 이 균주들을 NA 배지에 3회 계대배양한 후 영양 요구성에 대한 표현형을 확인하여 back mutation이 일어나지 않고, 성장율이 뛰어난 HPMM-1과 HPMM-4를 *P. paucimobilis*의 종내 세포 융합을 위한 돌연변이주로 최종적으로 선정하였으며(Table 1). 이들에 대한 PPT 분해 효율을 HPLC를 통해 측정된 결과 HPMM-1은 다소 높은

**Table 4.** PPT-degrading rate of strains by HPLC.

Strains	PPT-degrading rate
<i>P. paucimobilis</i>	
wild type	47.0%
HPMM-1	51.8%
HPMM-4	47.9%
F1	52.5%
F2	52.2%
F3	48.0%
F4	47.4%

분해 효율을 나타냈고, HPMM-4의 경우는 야생형과 비슷한 정도를 나타내었다(Table 4).

2) 세포 융합체의 선별 및 특성

*P. paucimobilis*의 영양요구성 돌연변이주인 HPMM-1과 HPMM-4를 서로 원형질 융합하였을 때 융합율은 5%였으며, 융합을 통해 융합체 F1, F2를 얻었다. PPT 분해균주인 *P. paucimobilis*와 glyphosate 내성균주인 *P. cepacia* 간의 종간 원형질체 융합을 하였을 때의 융합율은  $4.08 \times 10^3$ 이었으며, 이들을 모균주의 특성 배지에 replica 배양 후 생존하는 것(Plate 1)만을 대상으로 하여 융합체 F3, F4를 얻었다. 이들 각각에 대한 생화학적 특성을 API 20NE kit으로 검토한 결과는 Table 3과 같다.

3) 융합체의 분해능 및 저항성 측정

PPT 분해균주인 *P. paucimobilis*의 돌연변이주 간의 종내 원형질 융합체인 F1과 F2, 그리고 *P. paucimobilis*와 glyphosate 내성균주인 *P. cepacia*의 종간 원형질 융합체인 F3과 F4 각각의 PPT 분해능을 야생형 균주, 돌연변이 균주등과 비교한 결과(Table 4) 모든 융합체가 야생형과 유사하거나 더 높은 분해능을 나타내었고 특히 종내 융합체인 F1 strain은 야생형보다 약 11% 정도 분해능이 향상된 것으로 나타났다.

또한 *P. paucimobilis*와 *P. cepacia*의 융합 결과 얻은

융합체 F3, F4의 경우, *P. paucimobilis* 야생형의 PPT 분해능을 그대로 유지하였고, glyphosate에 대해서는 *P. cepacia* 야생형의 5 mM 저항성에 비해 약간 떨어진 3 mM 정도로 나타났다. 그러나 MIC test 결과, PPT 분해균주인 *P. paucimobilis*는 80 mM 이상의 PPT 농도에서도 생존한 반면 glyphosate 저항성 균주인 *P. cepacia*는 32 mM 농도의 PPT에서는 생존할 수 없는 것으로 나타났고, glyphosate의 경우에 있어서는 *P. cepacia*가 5 mM 농도에서 생존한 반면 *P. paucimobilis*는 0.1 mM (data not shown) 농도에서도 생존할 수 없었던 점에 비추어 보면, 본 연구에서 두 균주를 융합하여 얻은 융합체는 두 가지 제조체에 대하여 동시에 작용할 수 있는 개량 균주로 판단 되어진다.

따라서 단일 제조체 분해능 향상을 위한 돌연변이 유도 및 세포융합 방법의 이용은 유용하다고 생각되며, 또한 세포융합을 이용하여 여러가지 제조체에 동시에 작용할 수 있는 우수 균주의 개발 가능성도 충분하다고 생각한다. 아울러 이러한 결과는 향후 개량 균주의 유전자 연구를 통해, 비선택적 작용으로 경작대상 작물에도 약해를 끼치는 이들 제조체에 대한 내성을 동시에 가지는 transgenic plant의 개발에도 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. Alikhanian, S.I., N.F. Ryabchenko, and N.O. Bukanov., 1981. Transformation of *B. turingiensis* subsp. *galleria* protoplast by plasmid pBC16. *J. Bacteriol.*, **146**, 7-9.
2. Baltz, R.H., 1978. Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.*, **107**, 93-102.
3. Bartsch, K., and C.C. Tebbe, 1989. Initial steps in the degradation of phosphinothricin (glufosinate) by soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 711-716.
4. Bayer, E., K.H. Gugel, K. Hägel, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W.A. König, and H. Zähler, 1972. Phosphinothricin und phosphinothricyl-alanyl-alanin. *Helvet. Chim. Acta.*, **55**, 224-239.
5. Chen, W., K. Ohmiya, and S. Shimizu, 1987. Intergenic protoplast fusion between *Fusobacterium vauium* and *Enterococcus faecium* for enhancing dehydrodivanillia degradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 542-548.
6. Coetzee, J.N., F.A. Sirgel, and Lecatsas, 1979. Genetic recombination in fused spheroplasts of *Providencia alkalifaciens*. *J. Gen. Microbiol.*, **114**, 313-322.
7. Comai, L., D. Facciotti, W.R. Hiatt, G. Thompson, R.E. Rose, and D.M. Stalker, 1985. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature*, **317**, 741-744.
8. Dancer, B.N., 1980. Transfer of plasmids among *Bacilli*. *J. Gen. Microbiol.*, **121**, 263-266.
9. De Block, M., J. Botterman, M. Vandeviele, J. Dock, C. Thoem, V. Gossele, N. R. Movva, C. Thomson, M. V. Mantagu, and J. Leemans, 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.*, **6**, 2513-2518.
10. De Block, M., D.D. Brouwer, and P. Tenning, 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiol.*, **91**, 694-701.
11. Dworkin, M., and J.W. Foster, 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.*, **75**, 592-603.
12. Fodor, K., and L. Alföldi., 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73**, 2147-2150.
13. Gabor, M.H., and E.D. Hotchkiss, 1979. Parameters regeneration and genetic recombination after fusion of *B. subtilis* protoplast. *J. Bacteriol.*, **137**, 1346-1353.
14. Gehardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costalow, E.W. Nester, W.A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips, 1981. Manual of methods for general bacteriology, p. 222-242. American Society for Microbiology, Washington DC.
15. Habeeb, A.F.S.A., 1972. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Methods Enzymol.*, **25**, 457-465.
16. Harris, H., and J.F. Watkins, 1965. Hybrid cells derived from mouse and man: Artificial heterokaryons of mammalian cell from different species. *Nature*, **205**, 640-646.
17. Imai, S., H. Seto, T. Sasaki, T. Tsuruoka, H. Ogawa, A. Satoh, S. Inouye, T. Niida, and N. Otake, 1984. Studies on the biosynthesis of bialaphos(SF-1293). 4. Production of phosphonic acid derivatives, 2-hydroxyethyl-phosphonic acid, hydroxymethylphosphonic acid and phosphonoformic acid by blocked mutants of *Streptomyces hygroscopicus* SF-1293 and their roles in the biosynthesis of bialaphos. *J. Antibiot.*, **37**, 1505-1508.
18. Jaworski, E.G., 1972. Mode of action of N-phosphonomethyl-glycine: Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 1195-1198.
19. Kaneko, H., and K. Sakaguchi, 1979. Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *J. Biol. Chem.*, **254**, 1007-1013.
20. Kishore, G.M., and D.M. Shah, 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 627-663.
21. Lea, P.J., K.W. Joy, J.L. Ramos, and M.G. Guerrero, 1984. The action of 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry*, **23**, 1-6.

22. Lee, B.C., 1991. Isolation, identification of glyphosate-resistant microorganism and the cloning of resistant gene. Master thesis. Hanyang University.
23. Lee, J.S., 1986. The formation of biparental clone and the transfer of plasmids by the spheroplast fusion in *Pseudomonas* spp. Ph.D. thesis. Korea University.
24. Loveless, A., and S. Howarth, 1959. Mutation of bacteria at high levels of survival by ethylmethane-sulfonate. *Nature*, **184**, 1780-1782.
25. Mazur, B.J., and S.C. Falco, 1989. The development of herbicide resistant crops. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 441-470.
26. Moore, J.K., H.D. Braymer, and A.D. Larson, 1983. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 316-320.
27. Ochi, K., M.J.M. Hitchcock, and Kalz. 1979. High-frequency fusion of *Streptomyces parvulus* or *Streptomyces antibioticus* protoplasts induced by polyethylenglycol. *J. Bacteriol.*, **139**, 984-992.
28. Ogawa, A., Tsuruoka, T., Inouye, S., and Niida, T., 1973. Studies on a new antibiotic SF-1293. II. Chemical structure of antibiotic SF-1293. *Sci. Rep. Meiji Seika*, **13**, 42-48.
29. Palleroni, N.J., 1984. Genus I. *Pseudomonas*. in *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. I. (Krieg, N.R. and J.G. Holt, eds) p. 141-199. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
30. Patin, S.A., 1982. Pollution and the biological resources of the oceans. Butterworth Scientific, London.
31. Peberdy, J.F., 1979. Fungal protoplast: Isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 21-39.
32. Pipke, R., A. Schulz, and N. Amrtein, 1987. Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 974-978.
33. Rastogi, N., H.L. David, and E. Rafidinarivo, 1983. Spheroplast fusion as a mode of genetic recombination in *Mycobacteria*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1227-1237.
34. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
35. Schaeffer, P., B. Came, and R. Hotchkiss, 1976. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73**, 2151-2155.
36. Shaw, W.V., 1975. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol.*, **43**, 737-755.
37. Smith, A.E., 1988. Persistence and transformation of the herbicide [<sup>14</sup>C] glufosinate-ammonium in prairie soils under laboratory conditions. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 393-397.
38. Starr, M.P., M. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, and H. G. Schlegel, 1981. *The Prokaryotes*. Vol. II. p.1846. Springer-Verlag, New York.
39. Steincken, H.C., and N. Amrhein, 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **94**, 1207-1212.
40. Tebbe, C.C., and H.H. Reber, 1988. Utilization of the herbicide phosphinothricin as a nitrogen source by soil bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 103-105.
41. Thomson, C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Cramer, J.E. Davies, M. Lauwereys, and J. Botterman, 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.*, **6**, 2519-2523.

(Received January 6, 1992)

(Accepted February 9, 1992)

---

**ABSTRACT: Simultaneous Biodegradation of Phosphinothricin and Glyphosate by *Pseudomonas* sp.**

Joung, K.B., H.B. Cho, Y.G. Chai<sup>1</sup>, and Y.K. Choi\*(Dept. of Biology, <sup>1</sup>Biochemistry. Hanyang University, Seoul, Korea)

This study describes isolation and identification of a soil bacterium which is degradable of phosphinothricin and improvement of the isolated strain by using mutagenesis and spheroplast fusion. The experiment was performed to search for a possibility of development of a new strain which is both PPT-degradable and glyphosate-resistant by using interspecies cell fusion between the PPT-degrading bacterium, *Pseudomonas paucimobilis* and a glyphosate-resistant strain, *Pseudomonas cepacia*. Auxotrophic mutants were obtained by the treatment of *P. paucimobilis* with ethylmethanosulfate, and used to cell fusion. Lysozyme and EDTA were used to spheroplast formation and regeneration rates of the spheroplast were 6.5% in *P. paucimobilis* and 8.8% in *P. cepacia*, respectively. Polyethylenglycol 6,000 was used to cell fusion as fusogen. The fusants F1, F2, F3 and F4 were obtained by the intra- and interspecies cell fusion. The fusant F1 of intraspecies cell fusion was higher to the wild type by 11% in PPT degrading ability, and the fusant F3 of interspecies cell fusion developed glyphosate-resistant and PPT-degrading ability which were properties of two parental strains.