

Flavimonas oryzihabitans와 Pseudomonas sp.간 원형질체 융합에 의한 Aniline과 4-chlorobiphenyl 분해균주 개발

박형수 · 박용근* · 김무훈 · 고범준 · 조미영 · 김치경²

삼성엔지니어링 기술연구소, ¹고려대학교 생명공학원, ²충북대학교 자연과학대학 미생물학과

아닐린분해능이 있는 *Flavimonas oryzihabitans*과 4-chlorobiphenyl (4-CBP)를 분해하는 *Pseudomonas* sp.를 원형질체 융합하여 아닐린과 4-CBP를 모두 분해하는 융합균주를 개발하고, 융합체의 특성을 조사하였다. *F. oryzihabitans*는 융합체 선별표지 위해 NTG처리하여 chloramphenicol 내성(Cm^r)을 유발하였다. Lysozyme-EDTA에 의한 각 모균주의 원형질체 생성율은 약 99%이었고, 원형질체의 재생율은 5.0~6.6%이었다. 원형질체는 40% PEG 6000을 사용하였을 때 효과적으로 융합이 이루어졌으며 융합율은 3.16×10^{-4} 이었다. 융합균인 F22의 DNA양은 모균주에 비해 약 2배 정도 증가 하였으며, 생화학적 특성은 모균주의 특성이 혼합하여 나타났다. F22는 5 mM 아닐린 최소배지에서는 모균주와 성장능과 분해능이 거의 비슷하였고, 10 mM 아닐린 최소배지에서는 1.5배 빠른 성장속도를 나타내었으나, 4-CBP 분해능은 모균주보다 약간 낮게 나타났다.

Key words □ aniline, biodegradation, fusant, spheroplast fusion, 4-chlorobiphenyl

지난 수십년간 산업발전과 농업에서 사용되어온 다양한 유기합성 화합물이 생태계에 방출, 축적되어 대기와 수질 및 토양의 오염을 심화시키고 있다(12). 특히 수질 오염의 주된 물질은 제초제, 살충제, 세척제, 염료(15) 등으로 제초제의 경우는 생물체내에서 독성을 나타내는 정도가 매우 심각하여 관심의 대상이 되고 있다(1).

아닐린은 니트로 아닐계로 제초제, 폭약, 살충제, 염색제, 플라스틱, 화학 약품의 원료 또는 중간합성산물로 많이 이용되어왔다(24). 그런 과정으로 환경에 방출되는 많은 양의 아닐린은 산화, 중합, 흡착과 같은 여러 복잡한 반응을 거쳐서 생물체에 유해한 아닐린 유도체, Azobenzene, Triazone 같은 난분해성 물질을 형성한다(34). 이런 아닐린은 증발, 광산화, 화학결합(24)같은 물리, 화학적 과정으로 일부 분해가 이루어지나 그 양은 매우 적고 대부분의 아닐린은 *Pseudomonas*(21), *Alcaligenes*(40), *Delftia*(22), *Acinetobacter*(44)등에 의해 생분해된다.

Polychlorinated biphenyls(PCBs)에 대한 미생물의 분해 정도는 biphenyl에 치환되어 있는 염소의 수와 위치에 따라 달라지며, 염소의 수가 많을수록 난분해 특성을 나타낸다고 보고되고 있다(3). 그러나 biphenyl의 한쪽 벤젠 고리에 염소가 붙어있지 않는 PCBs는 그 고리에서 미생물에 의한 환 개열(ring fission)이 보다 쉽게 일어나 생분해성이 높다고 한다(42). 이러한 이유 때문에 미생물에 의한 4-CBP의 분해 과정에는 4가지의 효소가 관여하며 중간대사물질인 4-chloro-2,3-dihydroxybiphenyl을 거쳐 4-chlorobenzoate(4CBA)로 변환된다(39,43). 4-CBA는 탈염소화가 일어난 후, 계속적으로 분해되어 protocatechuate나 catechol로 변

환되는 과정과 4-chlorocatechol로 변환된 후 환 개열이 먼저 진행되어 chlorine이 떨어지면서 β -ketoacid pathway를 따라 완전히 분해되는 과정이 알려져 있다.

세균의 세포융합 실험은 Foder와 Alfoldi(11)가 *Bacillus megaterium*에서 Schaeffer(36)등이 *B. subtilis*에서 성공한 이래, 그람양성균 뿐만 아니라 *Pseudomonas* 속(26)과 같은 그람음성 세균이나 *Streptomyces*속(19)과 같은 방선균에서도 연구가 이루어지고 있다. Chen 등(1987)은 *Fusobacterium*과 *Enterococcus* 간의 속간 원형질체 융합을 통해 Dehydrovanillin(DDV)의 분해율이 높은 융합균주를 제조하였고, Lee 등(25)은 *Pseudomonas*의 원형질체를 융합하여 살리실산의 분해능이 강화된 균주를 선별하였다. 그리고, 아닐린 분해능을 갖는 *Flavimonas*와 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)분해능을 갖는 *Alcaligenes* 간의 속간 융합을 통해 기질 분해능이 광범위하고 아닐린 분해능이 강화된 융합체를 얻었다(27).

본 연구는 이들 기초연구를 토대로, 연구실에서 분리한 균주 중 아닐린을 분해하는 *Flavimonas*와 4-CBP 분해능을 갖는 *Pseudomonas*균주의 원형질체 융합을 통해 다기능 분해균주를 개발하고자 하였다. 그리고 융합체에 대한 생리, 생화학적 성질과 안정성을 조사하고, 두 가지 난분해성 물질에 대해 분해능이 안정적으로 나타난 균주를 선별하여 각각의 기질에 대한 분해능을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에서 사용된 균주는 Table 1에 표시하였다. 아닐린을 분해하는 *F. oryzihabitans* KC23은 본 연구실에서 분리하였으며,

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-3290-3422, Fax: 02-927-9028
E-mail: ykpark@korea.ac.kr

Table 1. Bacterial strains and their characteristics

Strains	Characteristics	Source
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	4-CBP ^r , BP ^r , Ap ^r	Kim (20)
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> KC23	Ani ⁺	Choi (8)
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> KC23-1	Ani ⁺ , Cm ^r	This study

4-CBP, 4-chlorobiphenyl; BP, biphenyl; Ap, Ampicillin; Ani, aniline; Cm, chloramphenicol.

F. oryzihabitans KC23-1는 NTG처리하여 얻은 돌연변이균이다. *Pseudomonas* sp. DJ-12는 4-CBP를 단일 탄소원, 질소원과 에너지원으로 사용하는 균주이다.

배지 및 완충 용액

*F. oryzihabitans*의 배양에는 Nutrient Broth(DIFCO, Detroit, USA)를 사용하였고, *Pseudomonas* sp. DJ-12는 Luria-Bertani (LB)배지를 사용하였다. 원형질체 재생에는 Rich Regeneration Medium(RRM)을 사용하였다(9). 원형질 융합체의 탄화수소 자화능을 조사하기 위해서는 Bartha 배지(2)와 PAS 배지(5)에 각 기질을 일정농도 첨가하여 사용하였다. 4-CBP 분해 균주에 대한 최소배지는 MM2 배지(23)를 사용하였다. 원형질체 생성에는 spheroplasting buffer인 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액에 삼투안정제로 0.5 M sucrose를 첨가하여 사용하였다(27).

NTG 처리에 의한 돌연변이 유발

원형질 융합체에 필요한 유전적 지표를 도입하기 위하여 Miller의 방법(29)을 변형하여 항생제 내성이 없는 *F. oryzihabitans* KC23을 NTG(Sigma Co., St. Louis, USA) 처리하여 돌연변이를 유발하였다. *F. oryzihabitans* KC23을 LB 5 ml에 접종하여 30°C에서 3~5 10^8 cell/ml 까지 배양한 후 8,000×g에서 5분간 원심분리하여 균을 침전시켰다. 상등액을 제거하고 0.1 M citrate buffer(pH 5.5) 5 ml로 3회 세척하고 4 ml 0.1 M citrate buffer에 현탁한 후 NTG를 최종농도가 100 µg/ml이 되도록 맞추어서 30분간 30°C에서 정치하였다. 8,000×g에서 5분간 원심분리하여 침전시킨 후 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)로 세척하고 LB 10 ml에 재현탁하여 12시간 배양하였다. 이를 10⁻⁶까지 희석하고 LB 항생제(Cm; 100 µg/ml)배지에 도달한 후 30°C에서 20~24시간 배양하여 직접 선별하였다.

항생제 저항성 조사

실험에 사용한 균주들에 대한 항생제 및 중금속 내성을 조사하였다. 항생제로 ampicillin(Ap), streptomycin(Sm), chloramphenicol(Cm), kanamycin(Km)이 농도별로 첨가된 고체배지에 세균을 접종하여 30°C에서 48~72시간 배양하면서 집락의 생성유무에 따라 내성여부를 판별하였다.

원형질체 생성

Pseudomonas sp. DJ-12와 *F. oryzihabitans* KC23-1의 원형질체 생성은 Lee등의 방법으로 유도하였다(28). *Pseudomonas*는

LB 5 ml에 *Flavimonas*는 NB 5 ml에 전배양한 후 배양액 0.5ml을 각각의 새로운 배지 50 ml에 본 배양하여 660 nm에서 흡광도가 0.9정도 되도록 배양하였다. 배양액을 9,000×g에서 10분간 원심분리하여 세포를 수확한 후 37 세포 0.5 g을 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0, 37°C) 12.5 ml에 현탁시킨 후 1 M sucrose를 첨가한 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)을 동량처리 하였다. 이 세포 현탁액에 1% (v/v)의 0.1 M EDTA(pH 7.6)와 lysozyme (100 µg/ml)을 넣은 후 증류수(37°C)로 2배 희석하여 37°C에서 30분간 정치배양하여 원형질체를 생성시켰다. 생성된 원형질체는 MgCl₂(최종 농도: 20 mM)를 첨가하여 안정화시켰다. 원형질체 생성율은 총 세포수(input cell No.)에서 nutrient agar 배지에서 자란 세포수(osmotic resistant cell No.)를 뺀 수를 총 세포수에 대한 비율과 원형질체 현탁액과 증류수의 비율을 1:5로 혼합하여 580 nm에서의 흡광도를 측정하여 정상세포의 흡광도에 대한 감소율을 %로 표시한 osmotic sensitivity로 나타내었다.

원형질체 재생

각 균주로부터 얻은 원형질체의 재생을 위해서는 RRM배지를 사용하였다. Lysozyme 과 EDTA 를 처리하여 생성된 원형질체를 원심분리한 후, 침전된 원형질체를 spheroplasting buffer로 10⁻⁵~10⁻⁷까지 희석하였다. 희석한 원형질 현탁액 0.1 ml을 재생 배지 top agar 3 ml에 넣어 RRM 평판배지에 top plating하여 4~5일 배양하였다. 재생율은 생성된 원형질체에 대한 재생된 콜로니수를 100분율로 표시하였다.

원형질체의 융합 및 융합체의 선별

원형질체의 융합방법은 Schaeffer 등(36)과 Gabor(14)의 방법을 변형하여 사용하였다. Lysozyme과 EDTA로 처리하여 원형질체로 변형된 두 균주를 0.8 ml씩 섞은 후 4,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 균주를 0.5 M sucrose와 20 mM MgCl₂를 포함하고 있는 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 0.16 ml로 재현탁한 후 20 mM CaCl₂가 포함된 40%(w/v) PEG 6000을 1.74 ml 첨가하고 약하게 교반한 후 실온에서 10분간 정치 하였다. 다음 4,000×g에서 5분간 원심분리하여 원형질체 혼합액을 침전시킨후 0.5M sucrose가 첨가된 NB 배지 1 ml로 재현탁시키고 37°C에서 90분간 배양하여 원형질체 융합을 유도하였다. 융합체는 직접적인 방법과 간접적인 방법을 사용하여 선별하였다. 직접적인 방법은 원형질체 융합을 유도시킨 원형질체 혼합액을 융합체만이 성장할 수 있는 항생제가 첨가된 RRM 재생배지에 4~5일 동안 중층 배양하였고, 간접적인 방법에서는 원형질체 혼합액을 10⁻⁵~10⁻⁷ 배로 희석하여 RRM과 같은 조성인 top agar(0.6% agar) 3 ml에 넣어 RRM 평판배지에 3~4일 동안 중층 배양하여 재생시켰다. 그리고 모균주가 각각 성장할 수 있는 선택배지에 replica 하여 모균주들의 표현형을 모두 나타내는 콜로니를 융합체로 선별하였다. 항생제를 융합체 선별을 위한 유전적 지표로 사용한 경우는 직접 선별방법의 경우는 완전배지에, 간접선별시는 replica용 선택배지에 Ap은 200 µg/ml, Cm은 100 µg/ml, Sm은 100 µg/ml의 농도로 첨가하여 사용하였다.

융합체의 안정성 조사

원형질 융합체의 안정성을 조사하기 위해 직접선별된 재조합체와 모균주의 표현형을 모두 나타내는 콜로니들을 각각의 선택배지에서 따서 NB에 접종하여 580 nm에서의 흡광도가 0.8~1.0이 되게 배양하였다. 이 배양액을 NA 평판배지에 접종하여 생성된 콜로니들을 다시 각각의 선택배지에 replica하여 융합체의 성질이 후대에서도 안정하게 유지되는가를 조사하였다.

융합체의 형태, 생리 및 생화학적 특성

융합체의 생리학적 특성은 Palleroni(32), Starr등(37)의 방법에 의해 조사하였고, 그리고 API 20 E(BioMerieux Co, St. Louis, USA) 그람 음성균 동정카드를 사용하여 18시간 동안 반응 시킨 후 융합체의 효소활성과 생화학적 특성을 조사하였다.

DNA 함량 측정

Stewart(38)와 Farahnak등(10)의 방법을 변형하여 DNA를 추출하였다. LB 액체 배지에 균주를 접종하여 하룻밤 진탕배양 후 1 ml을 취해 원심분리한 후 10% perchloric acid 1.3 ml에 현탁시켜 30분간 얼음에 방치하였다. 이것을 다시 원심분리하여 상등액을 버린 후 10% perchloric acid 1.3 ml에 재현탁시켜 80°C에서 20분간 처리한 후 원심분리하여 상등액을 수집하였다.

DNA 농도는 diphenylamine방법을 사용하여 측정하였다(4). Solution A(1.5 g diphenylamine, 100 ml glacial acetic acid, 1.5 ml concentrated H₂SO₄)와 solution B(1.6% acetaldehyde)를 준비하고 실험직전에 20 ml solution A와 0.1 ml solution B를 혼합하여 solution C를 제조하였다. DNA 추출액 1 ml과 solution C 1 ml을 혼합하여 30°C에서 16~20시간 정치하여 발색시킨 후, 600 nm에서 spectrophotometer(Beckman, DU 650, Fullerton, USA)로 흡광도를 측정하였다. 표준 DNA로는 calf thymus DNA(Sigma Co., St. Louis, USA)를 사용하였다.

기질 분해능 측정

기질 분해능은 UV-spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 아닐린은 최소 액체 배지에 균주를 접종하여 배양하면서 일정시간별로 660 nm에서 균체농도를 측정하고, 모균주와 융합체의 생장율을 측정하였고, 아닐린의 기질 분해능은 원심분리후 상등액을 280 nm의 흡수치로 측정하였다(21). 4-CBP 분해능은 동일량의 diethyl ether(Merck Co, Darmstadt, USA)로 추출하고 diethyl ether를 대조구로 하여 240 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

항생제 저항성 조사

융합체의 선별지표로 사용하기 위해서 균주들의 항생제 저항성을 조사한 결과, *Pseudomonas* sp. DJ-12는 ampicillin에 대해서 높은 저항성(>800 µg/ml)을 지니고 있었으며, *F. oryzae* KC23-1은 chloramphenicol에 대하여 100 µg/ml까지 저항성을 나타내었다. 따라서 융합균주 선별 지표로 Ap와 Cm을 사용하였다.

Table 2. Effect of lysozyme concentration on the formation of spheroplasts

Lysozyme (µg/ml)	Osmotic sensitivity (%)*	
	<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	<i>F. oryzae</i> KC23-1
20	8.3	15.4
50	14.3	22.7
100	60.1	71.1
200	68.3	62.3
400	40.1	34.9
1000	ND	32.1

ND: Not determined.

Table 3. Effect of EDTA concentration on the formation of spheroplasts

EDTA (mM)	Osmotic sensitivity (%)	
	<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	<i>F. oryzae</i> KC23-1
10	43.4	37.5
20	ND	40.0
50	47.5	40.9
100	40.1	43.3
200	42.5	59.6

ND: Not determined.

원형질체 생성을 위한 최적 조건

Lysozyme에 의한 원형질체의 최적조건을 결정하기 위하여 lysozyme을 ml당 20 µg에서 1 mg까지 처리하여 원형질체를 생성정도를 조사하였다. lysozyme의 최적 농도는 균주에 따라 다소 차이를 보였으나, *F. oryzae* KC23-1은 100 µg/ml에서 비교적 원형질체 생성이 효과적으로 이루어졌고, *Pseudomonas* sp. DJ-12는 최적농도가 200 µg/ml으로 나타났다 (Table 2).

그람 음성균은 구조상 외막을 가지고 있어 원형질체 생성에 EDTA의 처리가 중요므로, 10 mM에서 200 mM까지 처리하여 각 균주의 원형질체 생성에 미치는 EDTA의 효과를 조사하였다. 그 결과 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 EDTA의 농도 증가에 따른 원형질체 생성율이 크게 변화하지는 않았으나, *F. oryzae* KC23-1은 EDTA의 농도가 증가할수록 생성율도 증가하였다 (Table 3). Tris-HCl 완충용액의 농도는 20 mM부터 400 mM까지 달리하면서 그 효과를 조사한 결과, *Pseudomonas* sp. DJ-12와 *F. oryzae* KC23-1 모두 Tris-HCl 완충 용액의 농도가 높을수록 원형질체 생성율이 점차로 증가하였다 (Table 4). 높은 Tris-HCl 농도는 세포외막의 안정성을 파괴시켜 이로 인해 lysozyme이 펩티도글리칸층으로 쉽게 침투하여 작용하기 때문인 것으로 사료된다.

그리고 원형질체를 안정화시킨다고 보고된(41) 여러가지 화학물질들에 대하여 이들의 원형질체 안정화에 미치는 효과를 조사하였다 (Table 5). Lee(26)등은 *Pseudomonas*에서, Okanishi(31)는 *Streptomyces*의 원형질체 생성에 Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ 이온들이 효과적이라고 보고한 바 있다. 세균의 원형질체에 대해 삼투안정제로

Table 4. Effect of Tris-HCl concentration on the formation of spheroplasts

Tris-HCl (mM)	Osmotic sensitivity (%)	
	<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	<i>F. oryzihabitans</i> KC23-1
20	ND	25.0
50	12.5	31.3
100	46.3	32.0
200	44.8	33.2
400	57.1	43.5

ND: Not determined.

Table 5. Stability of spheroplasts in various solution

Solution	Optical density ^a	
	<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	<i>F. oryzihabitans</i> KC23-1
Control ^b	0.28	0.25
D.W.	0.09	0.05
10 mM NH ₄ Cl	0.12	0.07
10 mM KCl	0.11	0.08
10 mM NaCl	0.12	0.07
20 mM CaCl ₂	0.23	0.21
20 mM MgCl ₂	0.24	0.24
500 mM Sucrose	0.26	0.24

^aTo investigate spheroplasts stability, spheroplast samples (1 ml) were added to 5 ml solution indicated, and then detected optical density at 580 nm. The decrease of optical density indicates cell lysis.

^bControl-Normal cells(1 ml) were added to D.W. 5 ml, and then optical density was detected.

사용되고 있는 0.5 M sucrose용액과 증류수를 대조구로 하였을 때 0.02 M MgCl₂, 0.02 M CaCl₂ 수용액이 균주에 따라 다소 차이가 있었으나, 원형질체 안정화에 가장 효과적이었다.

원형질체 재생을 위한 조건

4-CBP 분해균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12와 아닐린 분해균주 *F. oryzihabitans* KC23-1에 대한 원형질체 재생에 미치는 2가 양이온의 효과는 RRM배지에 MgCl₂, CaCl₂를 농도별로 첨가하여 조사하였다(Table 6). 그 결과 MgCl₂는 두 균주 모두 원형질체 재생에는 뚜렷한 효과가 없었으며 *Flavimonas* 원형질체의 경우는 재생율이 오히려 약간 감소하였다. 융합원으로 사용되고(11), 원형질체에서 정상세포로 재생되는데 효과적으로 작용한다고 보고된 CaCl₂를 단독 처리 하였을 경우 *Pseudomonas*는 높은 재생율을 보였다. *Flavimonas*는 큰 효과는 없었지만, 대조구에 비해 2.5~5배정도 증가하였다. 그러나 MgCl₂와 CaCl₂를 동시에 처리한 경우는 Ca²⁺만을 단독처리했을 때보다 오히려 재생율이 낮았다. Mg²⁺ 보다 Ca²⁺이 효과 좋은 이유는 융합시 발생하는 hexagonal phase 형성을 증진시키며, 단백질 응집과 세포간 접촉을 증가시켜준 것으로 사료된다(18).

원형질체의 생성률 및 재생율의 비교

Table 6. Effect of divalent-cation on spheroplast regeneration

Solutions		Regenerated cell (×10 ⁷)	
MgCl ₂ (mM)	CaCl ₂ (mM)	<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	<i>F. oryzihabitans</i> KC23-1
-	-	5.4	8.7
20	-	4.2	4.1
40	-	4.8	6.4
-	20	97.2	21.6
-	40	77.7	16.3
20	20	8.7	7.1
20	40	9.3	14.2
40	20	7.2	5.1
40	40	6.3	4.5

ND: Not determined.

Table 7. Spheroplast formation and regeneration efficiency

	Osmotic sensitivity (%)*	
	<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	<i>F. oryzihabitans</i> KC23-1
Input cell (No./ml)	8.0 × 10 ¹⁰	2.7 × 10 ¹⁰
Osmotic resistance cell(No./ml)	1.8 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸
Regenerated cells (No./ml)	4.2 × 10 ⁹	2.0 × 10 ⁹
Spheroplast formation frequency (%) ^a	99.7 %	99.1 %
Regenerated frequency (%) ^b	5.0%	6.6%

^aSpheroplast formation frequency (%) = $\frac{\text{Input cell No.} - \text{O.R. cell No.}}{\text{Input cell No.}} \times 100$

^bRegenerated frequency (%) = $\frac{\text{R. cell No.} - \text{O.R. cell No.}}{\text{Input cell No.}} \times 100$

각 균주에 대한 원형질체 생성률은 lysozyme-EDTA의 방법을 사용한 결과 99% 정도로 매우 높게 생성되었고, 원형질체의 재생은 RRM에 20 mM CaCl₂를 첨가하여 사용한 결과 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 5.0%, *F. oryzihabitans* KC23-1은 6.6%의 비율로 재생되었다. 지금까지 보고된 세균의 원형질체 재생율은 Garbor와 Hotchkiss(14)가 *B. subtilis*에서 얻은 결과인 10~75%를 제외하고 *Bacillus*속이 대부분 1~10%이고(11,36), *Streptomyces*속이 10~15% (30)로 다른 세균에 비해 재생율이 비교적 높다. 이들에 비해 그람음성균인 *E. coli*와 *P. alcalifaciens* 그리고, *F. varium*은 0.1~0.2% (7,9)로 재생율이 비교적 낮다. 본 연구에서 얻은 재생율은 다른 그람 음성균의 재생율에 비하면 재생율이 비교적 높게 나타났다. 그리고 재생배지로는 조사된 균주간의 차이는 있었지만, RRM배지가 재생배지로 적합하였다(Table 7).

융합체의 성질과 안정성

융합체의 선별표지로 항생제를 사용하기 위해 각각의 모균주의 항생제 내성을 조사하였다. 융합원으로는 Schaeffer(36)등의 방법에서 사용한 40% PEG 6000을 사용하였는데, Lee등(18)은 40% 이상에서는 점도가 높아져 원형질체를 신속히 coating하지

못하므로 융합빈도가 낮아진다고 보고하였고, Peberdy는 높은 농도의 PEG는 독성이 강하여 원형질체의 변형을 심하게 하여 융합빈도를 낮게 한다고 하였다(35). Gabor와 Hotchkiss(14)이 사용한 배지에 90분간 37°C에서 배양 후 RRM배지에 증중배양하여 융합체를 유도하였다. 이 방법은 재생율은 감소되나, 세포융합빈도를 증가시키는 것으로 알려져 있는데, 본 실험 결과 얻어진 융합빈도는 3.16×10^{-4} 으로 나타났다. 이는 *arthrobacter*와 *Pseudomonas*의 융합빈도와 유사한 수치이다(17). 원형질 융합체는 안정성을 조사한 결과 재조합체로 선별된 융합체는 안정한 것으로 조사되었다(Table 8). 그리고 이 융합체의 형질은 여러세대 후에도 안정하게 유지되는 것으로 조사되었다(자료제시생략). Frehel 등(13)과 Park 등(33)은 PEG처리 후 원형질체 융합과정을 전자현미경으로 관찰하여, 세포막이 접촉하여 융합부위에 vesicle이 존재함이 관찰되었다.

생리, 생화학적 특성 및 DNA 함량

모균주 *Pseudomonas* sp. DJ-12, *Flavimonas oryzae* KC23-1 및 융합체들의 생리 생화학적 특성을 API 20 E kit로 조사하였다(Table 9). 그 결과 융합체 F22는 모균주에 없던 ONPG 검사에서 양성반응을 나타내었다. 아직까지 *F. oryzae*의 염색체의 특성이 밝혀져 있지 않은 상태이므로 융합체에서 모균주에 없던 성질이 발현되는 기작은 설명할 수 없으나, 모균주에 없었던 성질이 융합체에서 발현되는 성질은 Chen 등(6)의 실험에서도 관찰한 바 있다. 이 후에 두 모균주와 융합체들의 유전자 분석을 통해서 융합으로 어떻게 모균주의 염색체가 조합되었는지 명확히 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

모균주의 세포당 DNA 함량은 *Pseudomonas* sp. DJ-12가 약 7.21×10^{-6} µg/cell 이고 *F. oryzae* KC23-1은 6.97×10^{-6} µg/cell 이었다. 융합체 F22의 DNA함량은 12.93×10^{-6} µg/cell로 모균주에 비해 평균 함량이 약 2배 가량 증가하였다. 따라서 원형질체 융합에 의해 모균주들의 염색체들이 혼합되어 이배체상태로 존재하는 것으로 추정된다.

기질 분해능 측정

F. oryzae KC23-1의 융합체 중에서 여러세대 후에도 형질이 안정하게 유지되며, 4-CBP와 아닐린에서 모두 성장하는 융합체 F22에 대하여 기질 분해능을 조사하였다. 아닐린(5 mM, 10 mM)을 단일 탄소원으로 하는 최소 배지에 *F. oryzae* KC23-1과 융합균주 F22를 각각 접종하여 70시간의 성장능과 분해능을 조사한 결과, 5 mM 농도에서는 융합체와 모균주가 40시간이후에 성장능이 감소하였고, 아닐린 분해능

역시 유사하게 나왔으며(Figure 1), 10 mM 농도에서는 융합체가 배양 30시간 이후 1.5배 정도 빠른 증식속도를 나타내었으며, 기질분해능 역시 융합균주가 높게 나타났다(Figure 2). 분해되지 않고 잔류한 아닐린의 양은 5 mM을 사용한 경우 10%정도의 잔존율을 나타내었으나, 10 mM을 사용한 실험에서는 KC23-1균주는 40%정도 분해되지 않았고, F22균주는 30%이상 잔류하였다. 이는 아닐린의 독성에 의한 것으로 사료된다. 또한 융합체 F22와 모균주 *Pseudomonas* sp. DJ-12를 MM2 최소배지에 배양하여 4-CBP에 대한 성장능과 기질 분해능을 조사한 결과를 Figure 3에서 나타내었다. *Pseudomonas* sp. DJ-12는 4-CBP와 BP를 모두 분해할 수 있고 이들의 분해는 meta-cleavage 분

Table 9. Biochemical test for *Pseudomonas*, *Flavimonas* and their fusant by API 20 E kit

Test	Substrates	<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	<i>F. oryzae</i> KC23-1	F22*
ONPG	ONPG	-	-	+
ADH	arginine	-	-	-
LDC	lysine	-	-	-
ODC	ornithine	-	-	-
CIT	sodium citrate	-	-	-
H ₂ S	sodium thiosulphate	-	-	-
URE	urea	-	-	-
TDA	tryptophane	-	+	+
IND	indole	-	-	-
VP	sodium pyruvate	+	-	-
GEL	kohn's gelatin	-	-	-
GLU	glucose	+	+	+
MAN	mannitol	-	-	-
INO	inositol	-	-	-
SOR	sorbitol	-	-	-
Rhm	rhamnose	-	-	-
SAC	sucrose	-	-	-
MEL	melibiose	-	-	-
AMY	amygdalin	-	-	-
ARA	arabinose	-	-	-
OX	filter paper	+	+	+

*F22, fusant between DJ-12 and KC23-1; +, positive response; -, negative response

Table 8. Stability of fusant

Fusant	Selective medium	Recombinant colonies (No.)			Selected Recombinants (No.)	
	F22*	From Ap'	From Cm'	From Sm'	From Ap'Cm'	From Cm'Sm'
	F22*	100	100	-	100	-

Colonies classified as recombinant were picked with tooth pick from differential media, inoculated separately into nutrient broth, shaken at 30°C until grown to an O.D 660 nm of 1.0, and streaked out on nutrient agar media. After 24 h growth at 30°C, single colonies(100 colonies) were replicated to diagnostic media. Further 24 h growth at 30°C, the results were again analyzed and subclones were reclassified as parental recombinant.

* F22 ; *Pseudomonas* sp. DJ-12 (Ap') X *F. oryzae* KC23-1 (Cm')

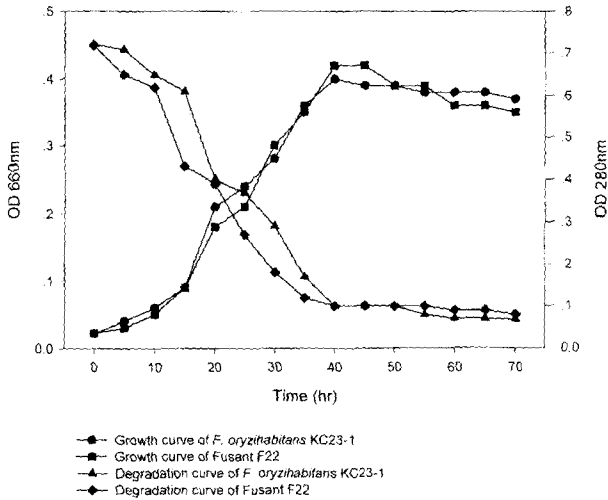


Fig. 1. The cell growth and aniline (5 mM) degradation curve of *F. oryzihabitans* KC23-1 and F22. F22 was obtained by spheroplast fusion between *Pseudomonas* sp. DJ-12 and *F. oryzihabitans* KC23-1.

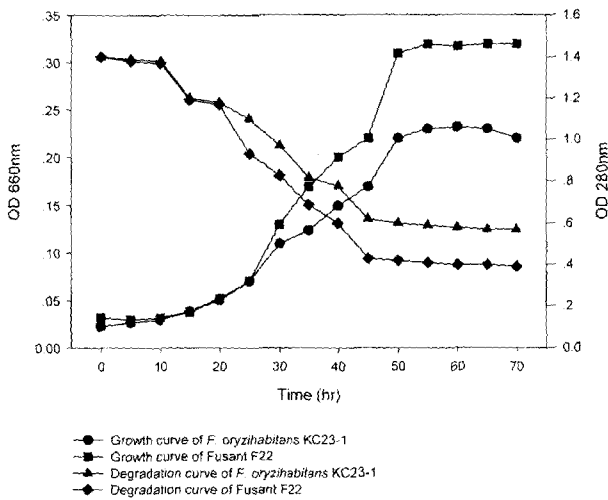


Fig. 2. The cell growth and aniline (10 mM) degradation curve of *F. oryzihabitans* KC23-1 and F22. F22 was obtained by spheroplast fusion between *Pseudomonas* sp. DJ-12 and *F. oryzihabitans* KC23-1.

해경로를 통해 이루어지며, plasmid에 분해유전자가 존재하지 않고, chromosome 상에 위치함이 밝혀져 있으며, 또한 여러개의 염소가 결합된 PCBs의 분해에도 적용이 가능한 균주라고 보고된 바 있다(16). DJ-12는 반응 25시간 후부터 균체량이 증가한 반면, 융합체 F22는 모 균주에 비해 늦게 성장하여 45시간 후부터 성장능이 높아졌으며, 두 균주 모두 60시간 이후는 비슷한 양상을 나타내었다. 따라서 이상의 결과로 세포융합에 의하여 두 가지 이상의 난분해성물질의 분해능을 가지는 융합균주의 개발이 유전자조작방법에 비해 간단하고, 저렴하게 유용한 균주를 개발할 수 있는 유용한 기법으로 보이며, 이후 다양한 난분해성 유기화합물들을 분해하는 보다 안정된 융합균주를 선별하면, 이들을 실제 폐수 정화과정에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

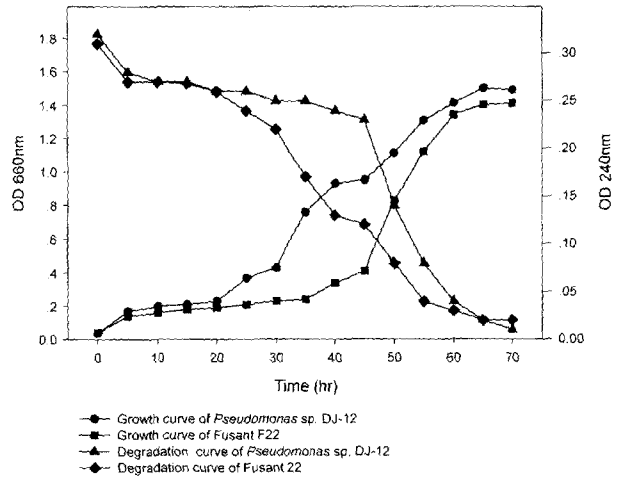


Fig. 3. The cell growth and degradation curve of *Pseudomonas* sp. DJ-12 and fusant F22 on 0.5 mM 4-chlorobiphenyl. F22 was obtained by spheroplast fusion between *Pseudomonas* sp. DJ-12 and *F. oryzihabitans* KC23-1.

참고문헌

- Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals environmental concern. *Science* 211, 132-138.
- Bartha, R. 1980. Biochemical transformations of aniline herbicide in soil. *J. Agric. Food Chem.* 16, 602-604.
- Bedard, K.D., R.E. Wagner, M.J. Brennon, M.L. Habert, and J.F. Brown, Jr. 1987. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1094-1102.
- Burton, K. 1968. Determination of DNA concentration with diphenylamine. pp.163-166. In Colowick, S.P., and N.D. Kaplan(ed), *Methods in Enzymology*. Vol.12. Academic Press Inc., N.Y.
- Chatterja, D.K., S.T. Kellof, S. Hamada and A.M. Chakrabarty. 1981. Plasmid specifying total degradation of 3-chlorbenzoate by a modified ortho pathway. *J. Bacteriol.* 146, 639-643.
- Chen, W., K. Ohmiya, and S. Shimizu. 1986. Protoplast formation and regeneration of dehydrodivanillin-degrading strains *Fusobacterium varium* and *Enterococcus faecium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 612-616.
- Chen, W., K. Ohmiya, and S. Shimizu. 1987. Intergeneric proplast fusion between *Fusobacterium varium* and *Enterococcus faecium* for enhancing dehydrodivanilline degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 542-548.
- Choi, S.J. 1993. Isolation and characterization of *Flavimonas oryzihabitans* KC-23 degrading aniline and restriction mapping of plasmid pKC23, Master Thesis, Korea University.
- Coetzee, J.N., F.A. Sirqel, and Lecatsas. 1979. Genetic recombination in fused spheroplasts of *Providencia alcalifaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 114, 313-322.
- Faraħnak, F., T. Seki., D.Y. Ryu, and D.O. grydziak. 1986. Construction of lactose-assimilating and high ethanol-producing yeasts by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 362-367.
- Fodor, K., and I. Alfoldi. 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 73, 2147-2150.
- Fogarty, A.M., and O.H. Tuovinen. 1991. Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiol. Rev.* 55

- 225-223.
13. Frehel, C., A.M. Lheritire, C. Sanchez-Rivas, and P. Scheffer. 1979. Electron microscopic study of *Bacillus subtilis* protoplast fusion. *J. Bacteriol.* 137, 1354-1361.
 14. Gabor, M.H., and Hotchkiss, R.D. 1979. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplasts. *J. Bacteriol.* 137, 1346-1353.
 15. Gardy, C.D.L. 1986. Biodegradation of hazardous waste by conventional biological treatment. *Hazardous wastes and Hazardous Materials* 3, 4, 333.
 16. Han, J.J., T.K. Sung and C.K. Kim. 1993. Cloning and expression of *pchAB* genes from *Pseudomonas* sp. DJ-12 in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* 31, 129-135.
 17. Hong, J.P., J.S. Lee and Y.N. Lee. 1992. Improvement of the strains degrading recalcitrant aromatic compounds by cell fusion between *Arthrobacter* spp. and *Pseudomonas putida*. *Kor. J. Microbiol.* 30, 207-212.
 18. Hopweed, D. A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 35, 237-272.
 19. Illing, G.T., I.D. Normansell, and J.F. Peberdy. 1989. Protoplast isolation and regeneration in *Streptomyces peptomyces calavuligerus*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2289-2297.
 20. Kim, C.K., J.W. Kim, and Y.C. Kim. 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* 25, 122-128.
 21. Kahng, H.Y., S.I. Kim, M.J. Woo., Y.K. Park and Y.N. Lee. 1992. Isolation and characterization of aniline-degrading bacteria. *Kor. J. Microbiol.* 30, 199-206.
 22. Kahng, H.Y., J.J. Kukor., K.H. Oh. 2000. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline. *FEMS Microbiol. Lett.* 190, 215-221.
 23. Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on the agar plate. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 454-457.
 24. Konopka, A., D. Knight, and R.F. Turco, 1989. Characterization of *Pseudomonas* sp. capable of aniline degradation in the presence of secondary carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 385-389.
 25. Lee, J.S., Y.W. Lee, and Y.N. Lee. 1987. Properties of biparental clones formed by spheroplast fusion of *Pseudomonas putida*. *Kor. J. Microbiol.* 25, 198-204.
 26. Lee, J.S., M.R. Lee, and Y.N. Lee. 1988. Spheroplast fusion of *Pseudomonas* sp. using plasmid as selection marker. *Kor. J. Microbiol.* 26, 298-304.
 27. Lee, S.Y., Y.B. Lim, Y.K. Park, and Y.N. Lee. 1993. Spheroplast Formation, Regeneration and Fusion of *Flavimonas oryzae* KU21. *Kor. J. Microbiol.* 31, 318-325.
 28. Lee, S.Y., J.S. Lee, Y.K. Park, and Y.N. Lee. 1994. Improvement of the strains degrading aniline by spheroplast between *Flavimonas oryzae* and *Alcaligenes* sp. *Kor. J. Microbiol.* 32, 353-359.
 29. Miller, J.M. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold spring Harbor Laboratory, New York. New York.
 30. Ochi, K., M.J.M. Hitchcock, and Kalz. 1979. High-frequency fusion of *Streptomyces parvulus* and or *Streptomyces antibioticus* protoplasts induced by polyethylene glycol. *J. Bacteriol.* 139, 984-992.
 31. Okanishi, M., Suzuki, and H. Wumezawa, 1974. Formation and reversion of *Streptomyces protoplasts*: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* 80, 389-400.
 32. Palleroni, N.S. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. I, pp. 141-199. William and Wilkins, Baltimore/London.
 33. Park, C., B.S. Lim., M.J. Chun and W.K. Kim. 1985. Electron microscopic observations on protoplast fusion of Coryneform Bacteria. *Kor. J. Microbiol.* 23, 265-270.
 34. Parris, G.E. 1980. Environmental and metabolic transformation of primary aromatic amines and related compounds. *Residue Rev.* 76, 1-30.
 35. Peberdy, J.F. 1979. Fungal protoplasts: Isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33, 21-39.
 36. Schaeffer, P., B. Cami, and R. Hotchkiss. 1976. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 2151-2155.
 37. Starr, M.P., H. Stolop, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel. 1981. *The Prokaryotes*. Springer-Verlag.
 38. Stewart, P.R. 1975. Analytical methods for yeast, pp.111-147. In Prescott, D.M.(ed), *Methods in cell biology*. Vol.12. Academic Press Inc., New York, New York.
 39. Sung, T.K., J.H. Nam and C.K. Kim. 1993. Enzymatic properties of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase purified from *Pseudomonas* sp. DJ-12. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 150-156.
 40. Surortsera, E. G., and A. I. Bol'nova. 1980. Aniline as the sole source of carbon, nitrogen, and energy for *Alcaligenes faecalis*. *Mikrobiologiya* 49, 49-53.
 41. Tabor, C.W. 1982. Stabilization of protoplasts and spheroplasts by spermine and other polyamines. *J. Bacteriol.* 83, 1101-1111.
 42. Tucker, E.S., V.W. Saeger, and O. Hicks. 1975. Activated sludge primary biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 705-713.
 43. Walia, S., A. Khan, and N. Rosenthal. 1990. Construction and applications of DNA probes for detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic-contaminated soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 254-259.
 44. Wyndham, R.C. 1986. Evolved aniline catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus* during continuous culture of river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 781-789.

(Received November 20, 2000/Accepted December 6, 2000)

ABSTRACT : Development of Fusant Degrading Aniline and 4-chlorobiphenyl by Spheroplast Fusion between *Pseudomonas* sp. and *Flavimonas oryzihabitans*

Park, Hyung Soo, Yong Keun Park^{1*}, Moo Hoon Kim, Bum Jun Ko, Mi Young Cho, and Chi Kyung Kim²(Samsung Engineering R&D Center, Yongin 449-900, ¹Department of Biology and Biotechnology of Graduate School, Korea University, Seoul 136-701, ²Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea)

Spheroplast cell fusions were performed with *Flavimonas oryzihabitans* degrading aniline and *Pseudomonas* sp. degrading 4-chlorobiphenyl to develop the new fusant degrading aniline and 4-CBP and its characters were investigated. *F. oryzihabitans* was induced to antibiotic marker (Cm^r) by NTG treatment for the fusants selection. The results of spheroplast formation and regeneration frequencies of the strains treated with lysozyme-EDTA were 99% and 5.0~6.6%, respectively. Fusion products were treated with 40% (v/v) PEG 6000 and fusion frequency was 3.16×10^{-4} . The DNA content of fusant, F22 was approximately 2-fold compared with parents. The fusant was stable, and showed the mixed biochemical characteristics of the parent strains. F22 was similar to parent for cell growth pattern and degrading capacity on 5 mM aniline but cell growth rate of F22 was 1.5-fold higher than that of the parent on 10 mM aniline. However 4-CBP degrading ability of F22 was slightly lower than that of parental strain.