

Streptococcus lactis의 Protoplast 생성 및 재생

차상훈 · 신원철 · 오두환 · 유주현

연세대학교 식품공학과

Protoplast Formation and Regeneration of *Streptococcus lactis*

Sang-Hoon Cha, Won-Cheol Shin, Doo-Hwan Oh, Ju-Hyun Yu

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul

Abstract

Conditions for efficient formation and regeneration of protoplasts of *Streptococcus lactis* ATCC 11454 were investigated. Addition of 20mM DL-threonine into growth medium, growth phase and lysozyme concentration had significant effects on protoplast formation. Approximately, 20% regeneration efficiency was obtained by optimizing the medium composition and modifying the plating procedure.

서 론

Bacteriocin 생산과 낙농발효에 있어서 중요한 위치를 차지하고 있는 *Lactic streptococci*의 gene transfer system을 개발하기 위하여 protoplast의 이용에 관한 연구가 최근에 와서 활발히 진행되고 있다.^(1~4)

*Lactic streptococci*의 protoplast생성에는 용균효소로 mutanolysin, 리소짐 또는 리소짐과 α -아밀라아제(Wako산 제품)를 혼합하여 사용하고 있으며 protoplast의 생성 및 재생효율은 균주 및 사용하는 용균효소의 종류에 따라 다른 것으로 알려져 있다.^(1~4)

본 연구에서는 *S. lactis* ATCC 11454에 리소짐만을 처리하여 효율적으로 protoplast를 생성시킬 수 있었으며, 이때 protoplast의 생성과 재생에 미치는 영향인자 및 제반조건에 관하여 조사하여 몇가지 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지조성

본 연구에 사용한 균주는 *Streptococcus lactis* ATCC 11454 이었다.

Protoplast 생성용 기본배지로는 modified lactic broth

(트립톤 0.5%, 효모추출물 0.25%, 젤라틴 0.25%, 염화나트륨 0.4%, 초산나트륨 0.15%, 포도당 1%, pH 6.8)를 썼고 protoplast 재생용 기본배지로는 슈크로스(최종농도: 0.5M)를 첨가한 T₂평판배지⁽⁵⁾를 사용하였다.

Protoplast의 생성

10ml의 균체배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 TH buffer (30mM Tris-HCl, pH 8.0)로 세척후 1ml의 THMS buffer (30mM Tris-HCl, pH 8.0, 3mM MgCl₂, 0.5M 슈크로스)에 현탁시키고 리소짐이 포함된 THMS buffer를 동량 가한 후 37°C에서 3시간 처리하여 protoplast를 제조하였다.

이때 protoplast 생성정도는 Yamamura 등⁽⁶⁾의 방법을 이용하여 osmotic shock에 의한 용해정도로써 측정하였으며 이때 흡광도는 600nm에서 측정하였다.

$$\text{용균율 (\%)} = \frac{\text{OD}_{600}(o) - \text{OD}_{600}(t)}{\text{OD}_{600}(o)} \times 100$$

OD₆₀₀(o); 리소짐 처리시간이 0일때 증류수로 희석한 반응액의 흡광도

OD₆₀₀(t); 리소짐 처리시간이 t일때 증류수로 희석한 반응액의 흡광도

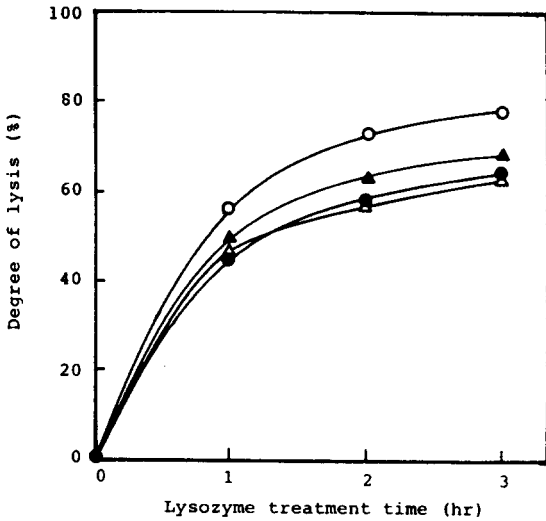


Fig. 1. Effect of amino acids on protoplast formation of *S. lactis* ATCC 11454
 ○; 20mM DL-threonine, △; 20mM L-lysine
 ▲; 20mM glycine, ●; control
 (lysozyme concentration; 30µg/ml)

Protoplast의 재생

생성된 protoplast를 THMS buffer로 적절히 희석하여 재생배지에 접종하고 30°C에서 5~6일간 배양한 후 균락수를 관찰하였으며, protoplast로 되지 않은 세균수는 증류수로 희석한 후 배지에 접종하여 측정하였다.

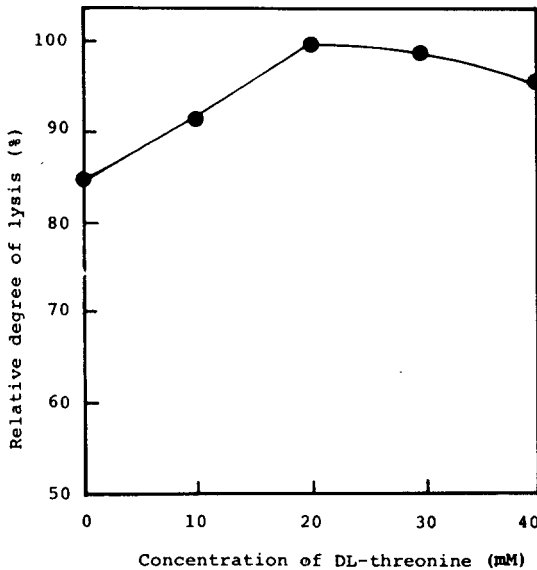


Fig. 2. Effect of DL-threonine concentration on protoplast formation of *S. lactis* ATCC 11454
 (lysozyme concentration; 30µg/ml, enzyme treatment time; 3hrs)
 The degree of lysis at the optimal concentration was taken as 100%.

이때 재생효율은 다음과 같이 산출하였다.

재생효율 (%)

$$= \frac{\text{No. of regenerant} - \text{No. of osmotic resistant cell}}{\text{No. of total viable cell}} \times 100$$

결과 및 고찰

Protoplast의 생성

가. 세포벽 분해에 미치는 아미노산의 영향

Streptomyces 속, *Streptococcus* 속, *Lactobacillus* 속 등에서 성장배지에 아미노산을 과량 첨가하면 protoplast 생성효율이 증가된다는 보고^(9~11)에 따라 *S. lactis* ATCC 11454에 대한 아미노산의 영향을 조사하였다.

Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 DL-트레오닌이 첨가된 배지에서 자란 균체가 세포벽 분해효율이 가장 좋았으며, 20mM이 되게 첨가하는 것이 적당하였다.

Streptomyces 속의 경우 글리신 첨가시, 생육을 부분적으로 저해하는 농도에서 최대의 protoplast생성을 나타낸다고 보고⁽⁹⁾되어 있으나 본 실험에서 사용한 DL-트레오닌의 경우에는 사용한 농도범위인 40mM 이내에서 균의 생육에 거의 영향을 주지 않았다.

나. 생육시기의 영향

20mM DL-트레오닌을 함유한 배지에서 배양한 균체의 생육시기별 세포벽 분해정도를 검토한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 4시간 정도 배양한 midlogari-

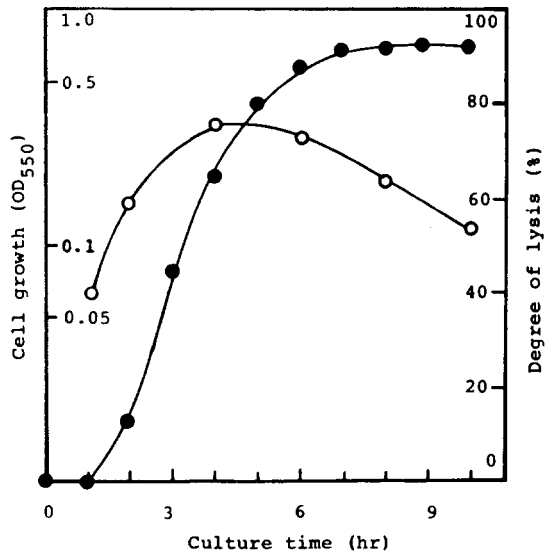


Fig. 3. Effect of growth phase on protoplast formation of *S. lactis* ATCC 11454
 ●; Cell growth, ○; degree of lysis
 (lysozyme concentration; 30µg/ml, enzyme treatment time; 3 hrs)

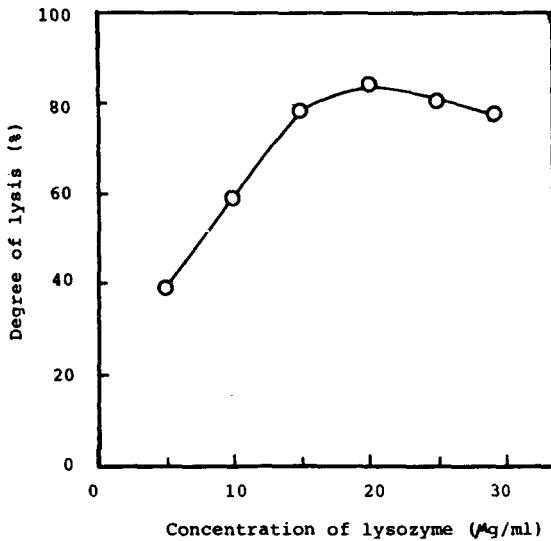


Fig. 4. Effect of lysozyme concentration on protoplast formation of *S. lactis* ATCC 11454 (enzyme treatment time; 3hrs)

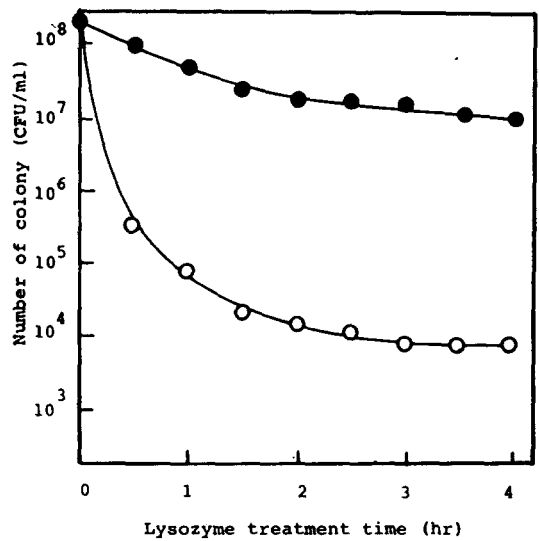


Fig. 5. Effect of lysozyme treatment time on protoplast formation and regeneration of *S. lactis* ATCC 11454

●; No. of colonies regenerated/ml
○; No. of osmotic resistant cells/ml

thmic phase의 균체가 protoplast제조에 적당하였다.

다. 리소짐의 처리조건

리소짐의 농도를 변화시켰을 때 Fig. 4에서와 같이 세포벽 분해는 최종농도 20 μg/ml에서 최대를 나타내었고 그 이상에서는 감소하는 경향이였다. 이는 Metcalf등⁽¹¹⁾과 Okamoto등⁽⁴⁾의 보고와 유사한 결과로써 리소짐의 농도가 일정량 이상이 되면 균체의 응집현상이 일어나며, 또한 리소짐이 세포표면을 둘러싸서 용균되기 어려운 복합체를 형성하기 때문인 것으로 알려져 있다.⁽¹²⁾

리소짐 처리시간의 영향을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. Protoplast생성정도는 초기에 급격히 증가하다가 3시간 이상에서는 거의 변화가 없었으며 재생 효율은 시간이 경과함에 따라 서서히 감소하였으므로 처리시

간은 3시간으로 결정하였다. 이상에서 결정된 조건을 이용하였을 때 삼투압에 안정한 세포수는 0.003% 정도이므로 *S. lactis* ATCC 11454의 protoplast 생성은 용균효소로써 리소짐 단독처리 만으로도 충분히 가능하다고 판단되었다.

Table 1. Effect of osmotic stabilizer on the regeneration of *S. lactis* ATCC 11454 protoplasts

Osmotic stabilizer	No. of regenerated cells (CFU/ml)	Regeneration efficiency (%)
Sucrose	2.47 x 10 ⁷	9.14
Lactose	5.2 x 10 ⁶	1.92
Sorbitol	1.1 x 10 ⁶	0.40
NaCl	2.3 x 10 ⁵	0.08
KCl	0.8 x 10 ⁵	0.03

* Each osmotic stabilizer was added at the concentration of 0.5 M (final concentration)

** No. of initial cells were 2.7x10⁸/ml and No. of osmotic resistant cells were 9x10³/ml

Protoplast의 재생조건

가. Osmotic stabilizer의 영향

Osmotic stabilizer의 종류를 달리하여 재생효율을 조사한 결과 (Table 1), 슈크로오스를 첨가한 경우가 가장 좋았으며 NaCl과 KCl의 경우에는 재생이 거의 일어나지 않았다. 또한 Fig. 6에 나타난 바와 같이 슈크로오스의 농도는 0.5M (최종농도)이 가장 적당하였으며, 이는 Okamoto등⁽⁴⁾이 보고한 20% (w/v)와는 차이가 있으나 Gasson⁽¹³⁾이 사용한 농도와는 일치하였다.

나. Plasma expander의 영향

Plasma expander의 첨가에 의해 재생효율이 증가하는 것으로 알려져 있으므로,^(4,13,14) plasma expander에 속하는 젤라틴, polyvinyl pyrrolidone의 영향을 검토하였다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 polyvinyl pyrrolidone은 2.5% (w/v)를, 젤라틴은 1% (w/v)를 첨가하는 것이 좋았으나 젤라틴의 효과가 더 우수하였으며 이때 재생효율은 2배가량 증가하였다. 이러한 결과는 2.5% (w/v)의 젤라틴을 첨가함으로써 재생효율이 20배가량 증가된다는 Okamoto등⁽⁴⁾의 보고와 일치하지 않는데 이

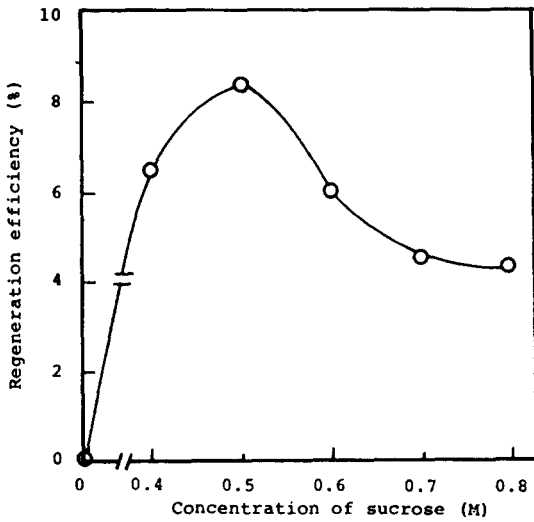


Fig. 6. Effect of sucrose concentration on the regeneration of *S. lactis* ATCC 11454 protoplasts

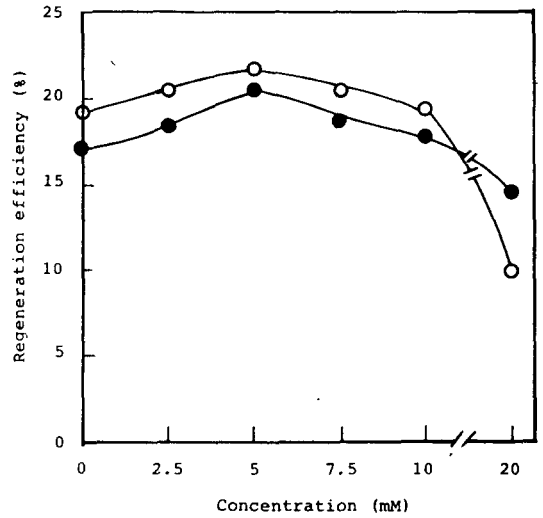


Fig. 8. Effect of CaCl_2 and MgCl_2 on the regeneration of *S. lactis* ATCC 11454 protoplasts ●; CaCl_2 , ○; MgCl_2

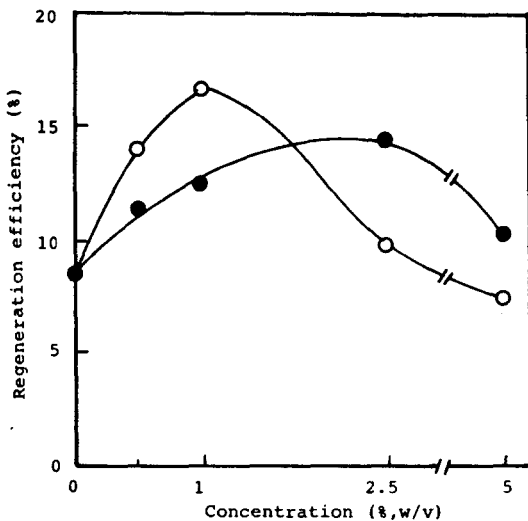


Fig. 7. Effect of plasma expanders on the regeneration of *S. lactis* ATCC 11454 protoplasts ●; polyvinyl pyrrolidone, ○; gelatin

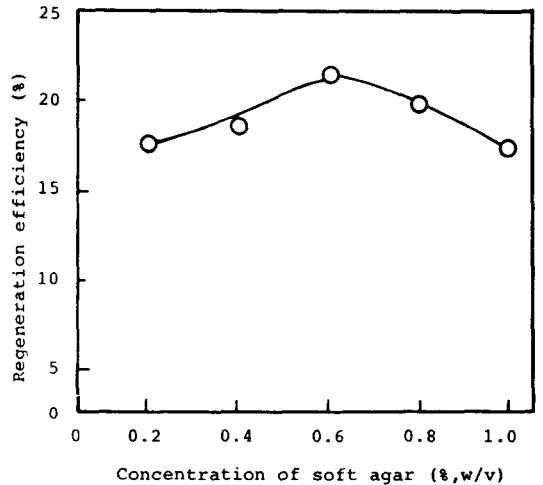


Fig. 9. Effect of soft agar concentration on the regeneration of *S. lactis* ATCC 11454 protoplasts

는 아마도 재생배지조성의 차이에 기인되는 것으로 추측된다.

다. CaCl_2 와 MgCl_2 의 영향

Ca^{++} 과 Mg^{++} 은 protoplast의 안정화 및 재생효율에 영향을 주는 것으로 알려져 있으므로⁽¹⁴⁾ CaCl_2 와 MgCl_2 의 영향을 조사하였다.

1% (w/v)의 젤라틴을 함유한 T배지에 CaCl_2 의 농도를 달리하여 본 결과 (Fig. 8), 5mM까지는 약간의 증가를 보였으나 그 이상에서는 감소하였다. 또한 1%

(w/v) 젤라틴, 5mM CaCl_2 를 첨가한 배지에 MgCl_2 의 농도를 달리하여 본 결과 (Fig. 8), 5mM까지는 약간의 증가를 보였으나 10mM 이상에서는 급격히 감소하였다.

라. Plating procedure에 의한 영향

Protoplast를 재생배지에 접종하는 방법 및 agar overlay method를 이용할 때 한천의 농도에 의하여 재생효율이 달라진다고 알려져 있으므로^(13,15) 한천 농도에 의한 영향을 조사하였다. 이때 T, 평판배지에 CaCl_2 를 첨가하면 침전물이 형성되어 균락의 관찰이 곤란하므로⁽¹⁶⁾ 0.5M 슈크로스, 1% (w/v) 젤라틴만을 첨가한

T. 배지를 사용하였다.

Fig. 9에서 보는 바와 같이 0.6% 한천을 사용하는 것이 좋았으며, 앞서 실험한 glass rod를 이용하여 도달한 경우와 비교해 보면 agar overlay method를 사용하였을 때 약 30%정도 재생효율이 증가함을 알 수 있었다. 그러나 Streptomyces 속이나 Brevibacterium 속의 실험보고^(13,14)와 비교해 볼때, protoplast의 접종 방법 및 한천의 농도가 재생효율에 별로 커다란 영향을 주지 않았다.

요 약

Streptococcus lactis ATCC 11454의 protoplast 생성 및 재생에 관하여 조사하였다. Protoplast의 생성은 용균효소로써 리소짐 단독처리 만으로 충분히 가능하였으며 균체의 배양은 20mM DL-트레오닌을 첨가한 배지를 사용하는 것이 좋았으며 생육시기와 리소짐 농도 등이 중요한 영양인자였다. 배지조성의 최적화 및 protoplast를 배지에 접종하는 방법을 변형시킴으로써 약 20%정도의 재생효율을 얻을 수 있었다.

문 헌

1. Davis, F. L. and Gasson, M. J. : *J. Dairy Res.*, **48**, 363 (1981)
2. Anderson, D. G. and McKay, L. L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 245 (1984)
3. Gasson, M. J. : *FEMS Lett. Microbiol.*, **9**, 99 (1980)
4. Kondo, J. K. and McKay, L. L. : *J. Dairy Sci.*, **65**, 1428 (1982)
5. Okamoto, T., Fujita, Y. and Irie, R. : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 259 (1983)
6. Fujita, Y., Okamoto, T. and Irie, R. : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2103 (1983)
7. Thomas, T. D., Jarvis, B. D. W. and Skipper N. A. : *J. Bacteriol.*, **118**, 329 (1974)
8. Yamamura, M., Terakishi, Y., Tanaka, A. and Fukui, S. : *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 13 (1975)
9. Okanish, M., Suzuki, K. and Umezawa, H. : *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 389 (1974)
10. Chassy, B. M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 603 (1976)
11. Chassy, B. M. and Giuffrida, A. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 153 (1980)
12. Metcalf, R. M. and Deibel, R. H. : *J. Bacteriol.*, **99**, 674 (1969)
13. Figac, J., Hranueli, D., Smokvina, T. and Alacevic, M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1178 (1982)
14. Akamatsu, T. and Sekiguchi : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2887 (1981)
15. Kaneko, H. and Sakaguchi, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1007 (1979)
16. Terzachi, B. E. and Sandine, W. E. : *Appl. Microbiol.*, **29**, 807 (1975)

(1984년 7월 6일 접수)