

Streptococcus lactis KB21의 lactose constitutive mutant에 관한 연구

朴 淵 姬 · 래리 맥케이*
亞洲工科大学 化工科 · *미국미네소타대학
(1980년 11월 4일 접수)

Studies on the lactose constitutive mutants of *Streptococcus lactis* KB 21

Yun Hee Park and Larry L. McKay*

Dept. of Chemical Engineering, A-Jou Institute of Technology, Suwon, Korea,,

*Dept. of Food Science and Nutrition, University of Minnesota U.S.A.

Abstract

From *S. lactis* KB₂₁, stabilized strain by intergration of the lactose plasmid into the host chromosome, several lactose constitutive mutants were obtained by UV irradiation and spontaneous mutation. The rapid growth of the mutants in the medium containing lactobionate confirmed their constitutive nature. The mutants synthesized phospho- β -galactosidase with an activity of 1.7 to 3.4 times that of the parent.

서 론

낙농발효식품의 제조에 젖산균이 이용된 것은 오랜 역사를 가지고 있으나 젖산균의 lactose대사의 연구는 약10여년전 부터 시작되었다.

낙농제품의 대표적인 치즈에서 starter로 사용하는 젖산균의 역할은 젖산의 생성이 가장 중요하므로 균주 선택의 기준은 높은 젖산 생성, phage 저항성 및 풍미의 생성으로 들고 있다¹⁾.

그런데 *Lactic Streptococcus*에서는 이 젖산을 생성하는 lactose의 발효기능이 불안정한 것이 이미 40여년 전부터 알려져^{2,3)} 오랫동안 문제가 되어 왔으나 그 원인을 밝히지 못하였다. 그후 1970년대에 이르러 McKay 등의⁴⁻⁶⁾ 연구로 균주가 lactose발효기능을 잃는 것은 이 기능이 bacteria의 plasmid에 연결되어 있어서 bacteria의 분열과정에서 이 불안정한 plasmid를 잃기 때문으로 밝혀졌다.

이 문제는 McKay, Klaenhammer등이⁷⁻⁹⁾ phage transduction으로 *S. lactis*의 lactose plasmid를 host chromosome에 도입시키는데 성공함으로써 genetic manipulation에 의한 새로운 가능성을 보여 주고 있다.

한편 *Lactic Streptococcus*의 lactose를 분해시키는 phospho- β -galactosidase는 유도효소로서 Gilliland등은¹⁰⁾ 이 효소가 *Lactic Streptococcus*가 우유에서 자라는 동안 충분한 induction이 일어나지 못한다고 주장하였다. 이러한 점을 고려하여 Schifsky¹¹⁾등은 induction이 없이도 높은 phospho- β -galactosidase를 생성하는 lactose constitutive mutant를 분리하는 방법을 연구하였다.

이 실험에서는 lactose plasmid가 host chromosome에 도입되어 lactose발효가 안정된 균주를 parent로 하여 이로부터 lactose constitutive mutant를 얻음으로써 높은 lactose 이용능력을 가진 균주를 구하고자 하였다. 이러한 연구는 실

용적 목적뿐만 아니라 *Lactic Streptococcus*의 lactose 대사의 연구에도 도움이 될 것으로 기대하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 균주

실험에 사용한 *Streptococcus lactis* KB21은 Minnesota대학 식품미생물실험실에 보관중인 것을 사용하였고 2주에 한번씩 lactic broth에 옮겨 21°C에서 24시간 배양 후 4°C에서 보관하였다.

2. 배지 및 배양조건

Lactose constitutive mutant의 분리에 사용한 Harvey-Collins 배지의¹²⁾ 조성은 gasamino acid 1.0g, yeast extract 1.0g, KH_2PO_4 2-5g, Mg SO_4 0.2g sodium acetate, 2.0g L-tryptophan 100mg, L-serine 100mg, L-threonine 100mg이었다. 이를 증류수 1l에 녹여 pH 6.8로 조절한 것을 기본배지로 하고 탄소원은 실험에 따라 sodium lactobionate 0.02M, 또는 glucose 0.5%를 가하였다.

그 외에는 경우에 따라 lactic broth,¹³⁾ semi-synthetic medium¹²⁾을 사용하였다. phospho- β -galactosidase의 측정용 배양에는 lactic broth와 다른 성분은 같고 탄소원을 0.5% glucose만 가하였다.

배양온도는 특별한 언급이 없을 때는 모두 32°C로 하였다.

3. 균체 생육의 측정

균체의 생육은 spectrophotometer를 사용하여 650nm에서 측정한 absorbance로 나타내었다.

4. Lactose constitutive mutant의 분리

1) Spontaneous Mutant

Parent strain을 sodium lactobionate를 함유하는 Harvey-Collins배지에 접종하여 6일간 배양한 다음 같은 배지에 옮겨 24시간 배양 후 lactic agar plate에 접종하여 colony를 분리하였다.

2) 자외선조사에 의한 Mutant

Parent strain을 lactic broth에서 10시간 배양 후 원심분리하여 멸균한 0.85% NaCl용액에 현탁시키되 그 농도를 20배 희석액의 흡광도를 650nm에서 약 0.05가 되도록 조절하였다. 이 현탁액 10 ml를 petri dish에 넣고 70초 동안 자외선을 조사시켰다. 이를 lactose broth에 접종하여 알미늄 종이로 싸서 배양시켰다. 2일후 sodium lactobionate를 함유하는 Harvey-Collins배지에 옮겨 24

시간 배양후 lactic agar plate에 접종하여 colony를 분리하였다.

5. Phospho- β -galactosidase의 측정

Schifsky등¹¹⁾의 방법을 사용하였다. phospho- β -galactose의 activity는 건조균체에 대한 ortho-nitrophenyl의 nano mole로 표시하였다.

결과 및 고찰

Parent culture로 부터 lactose constitutive mutant를 분리하기 위하여 Schifsky등이¹¹⁾ Chemostat를 사용하는 방법등 여러가지 방법을 시도하였으나 새로운 방법을 찾지 못하였고 이미 Langridge가¹⁴⁾ *E. coli*의 constitutive mutant 연구에 사용한 lactobionic acid를 탄소원으로 하는 배지를 사용하는 방법이 가장 효과적임을 밝혔다.

Lactobionic acid는 lactose operon을 유도시키지 못하므로 이를 유일한 탄소원으로 하는 배지에서 자라는 균주는 induction이 일어나지 않아도 phospho- β -galactosidase를 생성하는 lactose constitutive mutant로 간주할 수 있다.

Parent strain, *S. lactis* KB21을 sodium lactobionate를 함유하는 Harvey-Collins배지에 접종하여 생육을 조사하여 보면 Fig. 1에서 보는 바와 같이 2일 후부터 빠른 생육을 보이고 있다. 이는 spontaneous constitutive mutant에 의한 것이며 초기의 생육은 이미 접종시에 균체에 있던 phospho- β -galactosidase에 의해 lactobionate를 이용한 것으로 볼 수 있다.

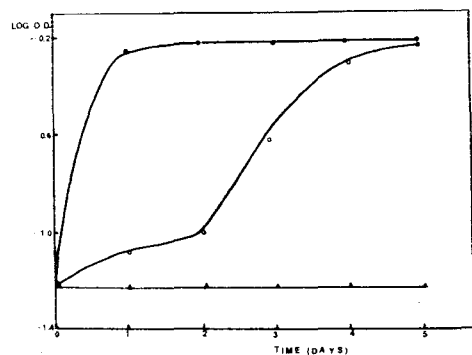


Fig. 1. Growth of *S. lactis* KB21 in Harvey-Collins medium containing 0.5% glucose (●), 0.02M sodium lactobionate (○) and without added carbohydrate (▲)

Fig. 2에서는 parent strain과 spontaneous mutant로 분리한 *S. lactis* M₂, *S. lactis* M₄의 생육을 비교하였다. 두 mutant는 Schifsky등이¹¹⁾

S. lactis C₂로 부터 얻은 spontaneous mutant와 거의 비슷한 생육곡선을 보여주고 있다.

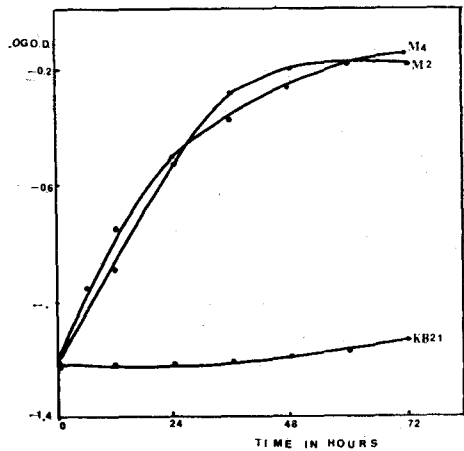


Fig. 2. Comparative growth of *S. lactis* KB21 and spontaneous lactose constitutive mutants in Harvey-Collins medium containing 0.02M sodium lactobionate.

자외선 조사로 얻은 mutant, *S. lactis* U₁, *S. lactis* U₂, *S. lactis* U₄와 parent strain의 생육을 같은 배지에서 비교하면 Fig. 3에서 보는 바와 같다. *S. lactis* U₁은 다른 두 mutant에 비하여 낮은 생육을 나타내었다.

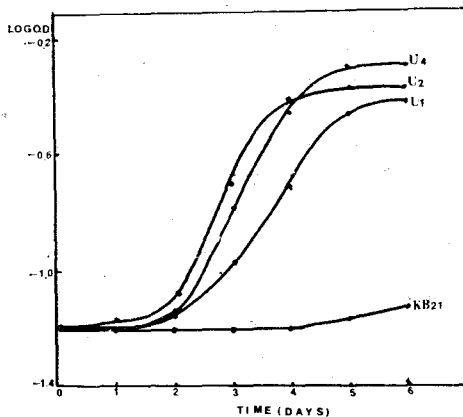


Fig. 3. Comparative growth of *S. lactis* KB21 and UV induced lactose constitutive mutants in Harvey-Collins medium containing 0.02M sodium lactobionate.

한편 McKay등은^{15,16)} *Streptococcus*의 lactose 대사에 관한 연구에서 *S. lactis*의 lactose 흡수는 phosphorylation transport 경로를 거치므로 흡수된 lactose phosphate의 분해는 그 전에 믿었던 β -galactosidase에 의한 것이 아니고 phospho-

β -galactosidase에 의한 것이라고 밝혔다.

이 실험에서 얻은 mutant와 parent strain의 phospho- β -galactosidase activity를 측정 한 결과는 Tab. 1과 같다.

Tab. 1. Specific activity of phospho- β -galactosidase in toluene treated cells of *S. lactis* KB21 and lactose constitutive mutants.

Organism	Specific activity*
<i>S. lactis</i> KB21	0.7
<i>S. lactis</i> U ₁	1.2
<i>S. lactis</i> U ₂	2.4
<i>S. lactis</i> U ₄	1.7
<i>S. lactis</i> M ₂	1.2
<i>S. lactis</i> M ₄	1.5

*Results are expressed as nanomoles of ONP formed from ONPG-P per minute per milligram of dry cell.

Mutant의 specific activity는 parent strain의 약 1.7~3.4배 정도이며 자외선 처리로 얻은 mutant의 phospho- β -galactosidase activity는 대체로 spontaneous mutant 보다 높았다.

또한 이 측정결과를 보면 *S. lactis* KB21은 상당히 높은 기본 phospho- β -galactosidase activity를 가진 것을 알 수 있으며 이는 Schifsky등의¹¹⁾ 결과와 같았다. 그의 연구에 의하면 *S. lactis*는 glucose만 함유하는 배지에서도 phospho- β -galactosidase가 생성되었으며 또한 glucose-lactose diauxie 현상을 볼 수 없다고 하였다. 이러한 현상은 *E. Coli*의 경우 internal induction에 의한 것 등 몇가지 가능성이 알려져 있으나^{17,18)} *S. lactis*의 경우에는 확실한 원인이 밝혀지지 않았다.

Parent strain과 가장 높은 phospho- β -galactosidase activity를 가진 *S. lactis* U₂를 lactose를 함유하는 semi-synthetic 배지에서 생육을 비교한 결과는 Fig. 4와 같다.

두 균주의 생육차이는 물론 lactobionate 배지에서의 생육이나, phospho- β -galactosidase activity의 차이에 비하면 훨씬 적으나 6시간 후에는 상당한 차이를 나타내었다.

Jacob등¹⁹⁾에 의하면 Lactose constitutive mutant는 regulator gene의 변이에 의한 것과 operator gene의 변이에 의한 두 종류가 가능하나 완전한 constitutive mutant는 regulator gene의

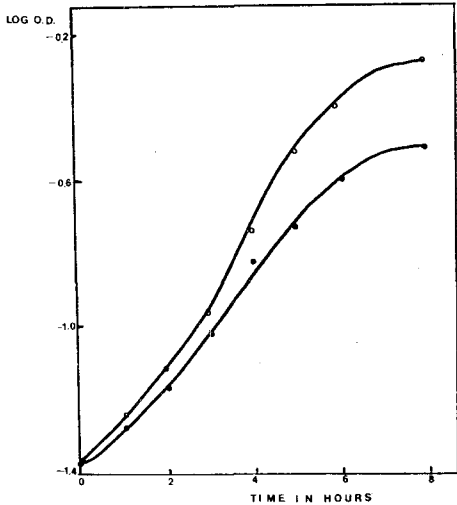


Fig. 4. Comparative growth of *S. lactis* KB21 (●) and UV-induced mutant *S. lactis* U₂(○) in semi-synthetic medium containing 0.5% lactose.

변이에 의한 것이라고 하였다. 또한 Langridge¹⁴⁾는 *E. coli*의 연구에서 얻은 lactose constitutive mutant의 대부분은 regulator gene의 변이에 의한 것임을 밝혔다. 이 실험에서는 이들 constitutive mutant가 어떠한 gene의 변이로 생긴 것인지는 아직 밝히지 못하였다.

요 약

Lactose plasmid로 host chromosome에 도입시킨 *S. lactis* KB21으로 부터 spontaneous mutant와 자외선 처리로 lactose constitutive mutant를 분리하였다. lactobionate를 탄소원으로 하는 배지에서 parent는 거의 생육하지 못하는 반면 mutant는 빠른 생육을 보임으로써 lactose constitutive mutant임을 확인하였다. Mutant의 phospho-β-galactosidase activity는 parent의 약 1.7~3.4배를 나타내었다.

참고문헌

1. Reiter, B. and J.D. Oram: J. Dairy Res. 29 : 63(1962)

2. Yawger, E.S. and J.M. Sherman: J. Dairy Sci. 20 : 83(1937)
3. Hunter, G.J.E.: J. Dairy Res. 10 : 464(1939)
4. Mckay, L.L., K.A. Baldwin, and E.A. Zottola: Appl. Microbiol. 23 : 1090(1972)
5. Mckay, L.L. and K.A. Baldwin: Appl. Microbiol. 28 : 342(1974)
6. Mckay, L.L., K.A. Baldwin and J.E. Efstathiou: Appl. Environ. Microbiol. 32 : 45 (1976)
7. Mckay, L.L., B.R. Cords, and K.A. Baldwin: J. Bacteriol. 115 : 810(1973)
8. Klaenhammer, T.R., L.L. Mckay and K.A. Baldwin: Appl. Environ. Microbiol. 35 : 592 (1978)
9. Mckay, L.L. and K.A. Baldwin: Appl. Environ. Microbiol. 36 : 360(1978)
10. Gilliland, S.E., M.L. Speck, and J.R. Woodard, Jr.: Appl. Microbiol. 23 : 21(1972)
11. Schifsky, R.F. and Mckay, L.L.: J. Dairy Sci. 58 : 492(1975)
12. Harvey, J.R. and E.B. Collins J. Bacteriol. 86 : 1301(1963)
13. Elliker, P.R.A.W. Anderson, and G. Hannonson: J. Dairy Sci. 39 : 1611(1956)
14. Langridge, J.: Molec. Gen. Genet. 105 : 74 (1969)
15. Mckay, L.L., L.A. Walter, W.E. Sandine and P.R. Elliker: J. Bacteriol. 99 : 603(1969)
16. Mckay, L.L., A. Miller III, W.E. Sandine and P.R. Elliker: J. Bacteriol. 102 : 804(1970)
17. Wu, H.C. and H.M. Kalckar: Proc. Nat. Acad. Sci. 55 : 622(1966)
18. Overath, P.: Molec. Gen. Genet. 101 : 155 (1968)
19. Jacob, F. and J. Monod: J. Molec. Biol. 3 : 318(1961)