

*Streptococcus lactis*의 Protoplast 융합에 관한 연구

차상훈 · 김성욱 · 정건섭 · 신원철* · 오두환 · 유주현

연세대학교 공과대학 식품공학과
*강원대학교 공과대학 발효공학과
(1985년 6월 11일 수리)

A Study on the Protoplast fusion of *Streptococcus lactis*

Sang Hoon Cha, Sung Uk Kim, Kun Sub Chung,
Won Cheol Shin*, Doo Hwan Oh and Ju Hyun Yu

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea *Department of
Fermentation Technology, Kang weon National University

(Received June 11, 1985)

To investigate the condition for the protoplast fusion of *Streptococcus lactis*, streptomycin (200 ug/ml) resistant and rifampicin (200 ug/ml) resistant mutants were isolated. By using these markers, protoplast fusion was carried out in the presence of CaCl₂ and polyethylene glycol. The optimal conditions for the protoplast fusion were obtained by treatment of protoplasts with 150 mM CaCl₂ (final concentration; 25 mM) and 40% (w/v) PEG 4,000 for 2 min. At the optimal conditions, the fusion frequency was 6.26×10^{-5} .

On the other hand, genetic recombination between the antibiotic resistant mutants by mating was not observed.

1982년 Kondo등⁽¹⁾이 Lac 플라스미드를 이용하여 Lactic Streptococci의 형질전환체계를 보고하였지만 아직까지 형질전환체계 및 적당한 플라스미드 운반체의 개발은 미약한 실정이며, Lactic Streptococci의 유전학적 연구 및 균주개발을 위해서는 protoplast 융합방법이 적합하다고 알려져 있다.^(2~4)

Lactic Streptococci의 protoplast 융합에 대하여서는 1980년 Gasson⁽⁵⁾이 protoplast 융합에 의한 염색체상 표지인자의 재조합과 플라스미드의 전달을 최초로 보고한 이래 1983년 Okamoto등⁽⁶⁾의 보고가 있기는 하지만 아직 protoplast 융합에 대한 체계적인 연구가 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 *Streptococcus lactis* ATCC 11454를 선정하여 융합체선별을 위한 약제내성 변이주를 분리하였으며, 이 표지유전인자를 사용하여 protoplast 융합시의 여러 영향인자에 관하여

검토하였다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 *Streptococcus lactis* ATCC 11454와 UV를 5 erg/mm²/sec의 조사량으로 90초간 처리하여 분리한 약제내성 변이주를 사용하였다.

Protoplast 제조용 배지로는 20mM DL-threonine을 첨가한 modified Lactic broth (tryptone 0.5%, yeast extract 0.25%, gelatin 0.25%, NaCl 0.4%, Sodium acetate 0.15%, glucose 1%, pH 6.8)를 사용하였으며, protoplast 재생용 배지로는 1% (w/v) gelatin, 0.5M sucrose를 첨가한 T₅ 평판배지를 사용하였다.

Protoplast제조 및 융합

Protoplast 제조 및 재생은 전보⁽⁹⁾에서 결정된 최적조건을 이용하였으며 protoplast 융합방법은 Götz 등⁽¹⁰⁾의 방법을 변형하여 사용하였다.

20mM DL-threonine을 함유한 modified Lactic broth에서 대수기 중반까지 정치배양한 후 원심분리하여 균체를 모으고, 20µg/ml의 lysozyme이 들어있는 THMS buffer (30mM Tris-HCl, pH 8.0, 3 mM MgCl₂, 0.5M sucrose)로 37°C에서 3시간 처리하여 얻은 두 변이주의 protoplast (5×10⁷ protoplasts)를 1:1로 혼합한 후 원심분리 (8,000×g, 20min.)하여 얻은 균체를 0.36ml의 THMS buffer에 현탁시키고, 0.04ml의 CaCl₂ 용액과 2 ml의 polyethylene glycol (PEG) 용액을 가하여 3분간 반응시킨 후 7 ml의 THMS buffer를 가하여 반응을 중지시켰다. 이를 상온에서 원심분리하여 (8,000 × g, 20min.) protoplast를 모은 후 THMS buffer로 현탁하고 일정량을 취하여 0.6% agar를 함유한 재생배지 3 ml에 접종한 다음 streptomycin과 rifampicin이 200µg/ml씩 들어있는 선택배지에 중층도말하여 10~12일간 배양한 후 나타나는 colony수를 측정하였다. 이 때 PEG의 분자량, 농도, 처리시간 및 CaCl₂의 농도를 변화시키면서 protoplast 융합의 최적조건을 검토하였다.

PEG는 THMS buffer에 용해하여 사용하였으며 융합효율은 선택평판배지에 나타난 colony 수에 대한 재생배지에서 나타난 colony수의 비로 나타내었다.

교배에 의한 유전적 재조합

교배 (Mating)는 Gasson 등⁽¹¹⁾의 방법에 따라 br-

oth mating, plate mating 및 filter mating을 행하였다.

교배에 의한 재조합 빈도는 선택평판배지에 나타난 colony수에 대한 T₅₀ 평판배지에 나타난 colony수의 비로 나타내었다.

결과 및 고찰

변이주의 분리

Protoplast 융합시 융합체를 선별하기 위해서는 선택 marker를 가진 균주가 있어야 하므로 약제내성 변이주를 분리하여 이를 선택 marker로 사용하였다.

UV를 사용하여 streptomycin과 rifampicin에 각각 내성을 나타내는 변이주를 분리하였으며, 분리된 변이주들의 항생제 내성을 연속희석법에 의하여 조사한 결과는 Table 1에 나타내었고, 이들의 protoplast 생성정도 및 재생효율은 Table 2에 나타내었다.

Protoplast 융합의 조건

PEG 분자량의 영향

Protoplast 융합을 유도하는 물질로 알려져 있는 PEG는 그 분자량에 따라 융합촉진 효율이 다르며 최적 분자량은 각 균주에 따라 다른 것으로 알려져 있다.^(12~13)

따라서 PEG 분자량의 영향을 조사하기 위하여 1 M CaCl₂와 분자량이 다른 PEG 40% (w/v) 용액을 사용하여 융합빈도를 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 모두 융합을 촉진하는 것으로 나타났으며 분자량 4,000의 PEG를 사용하였을 때 가장 높

Table 1. Sensitivities of *Streptococcus lactis* mutants against streptomycin and rifampicin

	Concentration of streptomycin (µg/ml)						
	200	100	50	25	12.5	6.25	0
<i>Streptococcus lactis</i> 11454	-	-	-	+	+	+	+
<i>Streptococcus lactis</i> MS - 1	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus lactis</i> MR - 2	-	-	-	+	+	+	+
	Concentration of rifampicin (µg/ml)						
	200	100	50	25	12.5	6.25	0
<i>Streptococcus lactis</i> 11454	-	-	-	-	-	+	+
<i>Streptococcus lactis</i> MS - 1	-	-	-	-	-	+	+
<i>Streptococcus lactis</i> MR - 2	+	+	+	+	+	+	+

+ : growth and - : non growth

Table 2. Efficiency of protoplastization and regeneration for strains of *S. lactis*

Strains	No. of cells before lysozyme treatment/ml	Frequency of osmotic resistant cell *	Regeneration efficiency (%)
11454	2.9×10^8	3.3×10^{-5}	20.7
MS-1	2.8×10^8	2.8×10^{-5}	21.3
MR-2	2.72×10^8	6.1×10^{-5}	18.6

* Ratio of osmotic resistant cells per cells before lysozyme treatment.

은 융합빈도를 나타내었다.

PEG 농도의 영향

융합빈도는 PEG 용액의 농도에 따라 영향을 받으며, " ~ " 일반적으로 fungal protoplast의 융합시에는 30% 내외의 낮은 농도가 사용되고 있고, bacterial protoplast의 융합시에는 이보다 다소 높은 농도의 PEG 용액이 사용되고 있다.

따라서 PEG 농도의 영향을 살펴보기 위하여 여러 농도의 PEG 4,000을 사용하여 PEG 농도에 따른 융합빈도의 변화를 조사하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 PEG 4,000의 농도가 증가할 수록 protoplast 재생효율은 감소하는 경향을 나타내었으며 융합빈도는 40% (w/v) 까지 증가하다가 그 이상

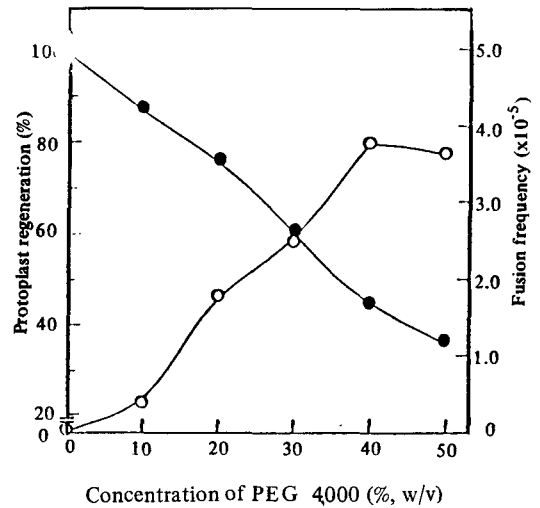


Fig. 2 Effect of different concentration of PEG 4,000 on protoplast regeneration and fusion frequency

● ; protoplast regeneration
○ ; fusion frequency

에서는 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

이 결과는 일정농도 이상의 PEG 용액을 사용하면 점도가 높기 때문에 protoplast를 효과적으로 신속히 coating 하지 못하여 융합빈도가 다소 낮아진다는 Hopwood⁽¹³⁾의 보고와 유사하였다.

PEG 처리시간의 영향

융합빈도는 PEG 처리시간에 의하여 영향을 받으며 장시간 처리시에는 protoplast의 안정성이 감소하는 것으로 알려져 있다. " ~ "

PEG 처리시간에 따른 융합빈도의 변화를 조사하기 위하여 1M CaCl₂와 40% (w/v)의 PEG 4,000 용액의 처리시간을 변화시킨 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 1분까지는 protoplast regeneration효율이 급격히 감소하다가 그 이상에서는 서서히 감소하는 경향을 나타내었으며, 융합빈도는 2분까지 증가하다가 그 이상에서는 거의 변화가 없었다. 그러나 융합체의 수 자체는 처리시간이 2분이었을 때 최대를 나타내었고 그 이상으로 처리하면 감소하였기 때문에 PEG 처리시간은 2분으로 하는 것이 적당하였다.

CaCl₂의 영향

Protoplast 융합시 Ca²⁺은 세포막에 작용하여 세포간의 응집을 조장하거나 PEG 용액과 반응하여

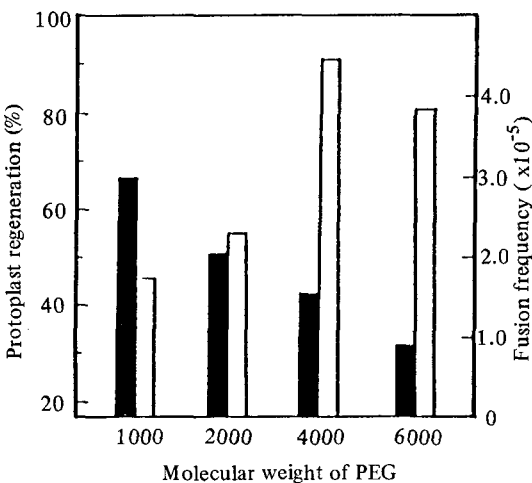


Fig. 1 Effect of different molecular weight of PEG on protoplast regeneration and fusion frequency

■ ; protoplast regeneration
□ ; fusion frequency

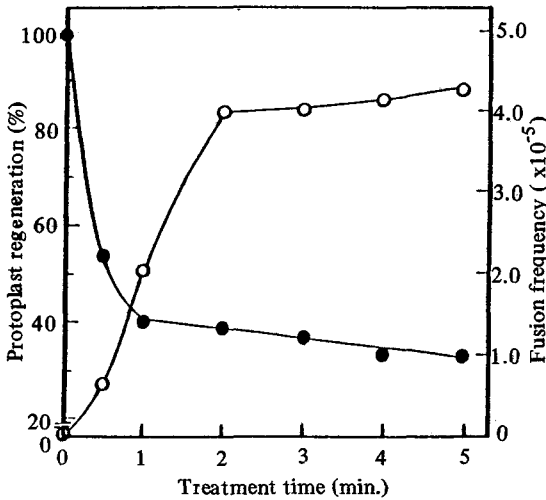


Fig. 3 Effect of the duration of PEG treatment on protoplast regeneration and fusion frequency
 ● ; protoplast regeneration
 ○ ; fusion frequency

세포간의 접촉을 유리하게 한다고 알려져 있다.^{9,11-13} 따라서 융합에 미치는 Ca²⁺의 영향을 조사하기 위하여 CaCl₂의 농도를 변화시켜 처리한 후 융합 빈도를 조사하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 150mM에서 (최종농도; 25mM) 가장 높은 융합빈도를 나타내었으며 Ca²⁺이 존재하지 않는 경우에도 융합이 일어나는

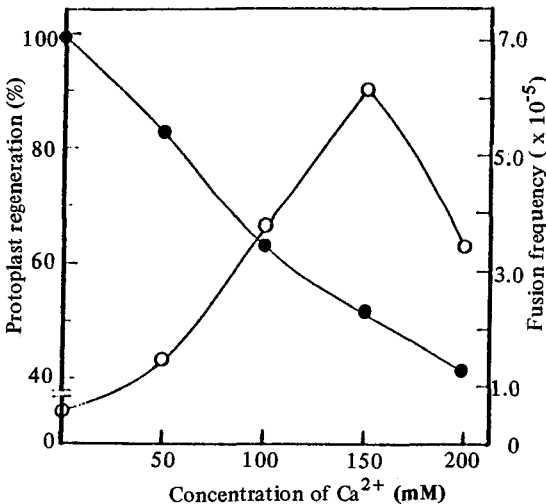


Fig. 4 Effect of Ca²⁺ on protoplast regeneration and fusion frequency
 ● ; protoplast regeneration
 ○ ; fusion frequency

Table 3. Genetic recombination by mating

Mating type (MS-1xMR-2)	Input cell (CFU/ml)	Recombinant (CFU/ml)	Frequency of recombination (CFU/ml)
Broth mating	5.6 x 10 ⁸	8	1.43 x 10 ⁻⁸
Plate mating	2.05 x 10 ⁹	36	1.76 x 10 ⁻⁸
Filter mating	2.3 x 10 ⁹	28	1.22 x 10 ⁻⁸

* Spontaneous mutation frequency of MS - 1 against rifampicin (200 g/ml) : 1.32 x 10⁻⁸

** Spontaneous mutation frequency of MR-2 against streptomycin (200 g/ml): 1.1 x 10⁻⁸

것을 알 수 있었다.

*Staphylococcus aureus*의 protoplast 융합시 Ca²⁺이 염색체 재조합에 필수적이라는 Götts 등⁽⁹⁾의 보고와 비교해 볼 때 *Streptococcus lactis*의 protoplast 융합시에는 Ca²⁺의 첨가가 필수적인 것은 아니며 단지 융합빈도를 증가시키는데 효과가 있음을 알 수 있었다.

교배에 의한 유전적 재조합

Mating에 의한 유전자 전달 및 재조합 현상이 몇 균주의 *Streptococcus lactis*에서 보고되어져 있다.^(2,10)

따라서 두 약제내성 변이주 사이에서 mating에 의한 약제내성 유전자의 재조합이 일어나는 가를 조사한 결과, Table 3에 나타낸 바와 같이 broth mating, plate mating, filter mating에 의하여 재조합체가 나타나는 빈도가 모두 1.76 x 10⁻⁸ 이하였으며, 이는 두 균주의 자연적 돌연변이 빈도와 거의 일치하는 것이므로 교배에 의한 약제내성 유전자의 재조합 현상은 일어나지 않는 것으로 판단되었다.

요 약

유전물질이 쉽게 교환될 수 없는 세균의 유전학적 연구와 새로운 균주개발에 유용한 protoplast 융합을 *Streptococcus lactis*에 적용하기 위하여 UV를 사용하여 streptomycin(200μg/ml)과 rifampicin(200μg/ml)에 각각 내성을 나타내는 변이주를 분리하였으며 이 변이주들을 사용하여 protoplast 융합의 영향인자를 검토하였다.

두 약제내성 변이주의 protoplast를 1:1의 비율로 혼합하고 CaCl₂와 polyethylene glycol(PEG)로 처리하여 융합세포를 얻을 수 있었으며, 이 때 CaCl₂

의 최적 처리농도는 150mM (최종농도 : 25mM) 이었고 40% (w/v) 의 PEG 4,000 으로 2 분간 처리하는 것이 가장 좋았다.

용합빈도는 최대 6.26×10^{-8} 이었다.

Mating 에 의한 약제내성 유전자의 재조합 현상은 일어나지 않았다.

사 사

본 연구는 한국학술진흥재단 연구비로 수행되었으며 지원하여 주신데 대해 심심한 사의를 드립니다.

참고문헌

1. Kondo, J.K. and L.L. McKay: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1213-1215 (1982)
2. Davis, F.L. and M.J. Gasson : *J. Dairy Res.*, **48**, 363-376 (1981)
3. Anderson, D.G. and L.L. McKay : *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 245-249 (1984)
4. Chater, K.F. and D.A. Hopwood : *TIBS*, **7**, 445-447 (1982)
5. Gasson, M.J. : *Fems. Microbiol. Lett.*, **9**, 99-102 (1980)
6. Okamoto, T., Y. Fujita and R. Irie : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2675-2676 (1983)
7. Thomas, T.D., K.W. Turner and V.L. Crow : *J. Bacteriol.*, **144**, 672-682 (1980)
8. Cha, S.A., W.C. Shin, D.H. Oh and J.H. Yu: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **16**, 363-367 (1984)
9. Gotz, F., S. Ahrne and M. Lindberg : *J. Bacteriol.*, **145**, 74-81 (1981)
10. Gasson, M.J. and F.L. Davis : *J. Bacteriol.*, **143**, 1260-1264 (1980)
11. Peberdy, J.F. : *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 21-39 (1979)
12. 有馬 賢治, 高野 勇 : *醸酵工学会誌*, **57**, 380-395 (1979)
13. Hopwood, D.A. : *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**, 237-272 (1981)
14. Ochi, K., J.M. Hitchcock and Katz : *J. Bacteriol.*, **139**, 984-992 (1979)
15. Hranueli, D., J. Pigac, T. Smokvina and M. Alacevic: *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1415-1422 (1983)