

Streptomyces mitakaensis 의 원형질체 형성 및 재생조건 연구

한순옥 · 이영주 · 이형환*
건국대학교 생물학과 유전공학연구소

Conditions of Protoplast Formation and Regeneration of *Streptomyces mitakaensis*

Han, Soon Ok, Young Chu Lee and Hyung Hoan Lee*

Institute for Genetic Engineering and Department of Biology,
Kon Kuk University, Seoul 133, Korea

The optimal conditions for the protoplast formation and regeneration of *Streptomyces mitakaensis* have been investigated. *S. mitakaensis* cells were converted to protoplast by treating with 0.1 mg/ml of lysozyme in phosphate-tris buffer (pH 7.2) to the cells grown at the late logarithmic growth phase in the GBYN medium (glycerol 20g, beef extract 5g, yeast extract 5g, NaCl 5g in 1 liter of distilled water) contained 0.5% glycine. Cell regeneration from protoplast was accomplished in 10 days post inoculation on the R2 regeneration agar medium and at 3 days post inoculation on the H2 regeneration liquid medium. The efficiency of the regeneration was 0.1% in 3 days at 35°C.

항생물질중에 약 70%가 *Streptomyces* 속의 균주들에 의해 생산되는 것으로 알려져 있으며 (1), 이러한 *Streptomyces* 균주에서의 항생물질 생산의 증가에 관한 연구는 대부분 자연에서 분리된 야생주에 인위적 돌연변이를 일으켜 생산성이 높은 균주를 선택하는 방법으로 이루어져 왔으나 1970년대 들어와서는 유전자 조작을 통하여 항생물질의 수율을 향상시키는 방향으로 연구가 진행되고 있다 (2).

Streptomyces 의 세포벽이 lysozyme 에 의해 쉽게 분해되는 것을 Romano 등 (3,4) 이 보고한 이후 Sagara 등 (5) 은 고농도 glycine 이 함유된 배지에서 성장한 *S. griseoflavus* 의 균사체는 lysozyme 의 작용에 민감하게 반응하여 mesosome 들이 소실된 원형질체가 형성되는 것을 보고 하였다. 또한 Okanish 등 (6) 은 *Streptomyces* 원형질체를 형성하여 다시 원래의 균사체 상태로 재생시키는 방법을 개발하였으며, Baltz (7) 은 *S. fradiae* 의 원형질체를 융합하여 유전적 재조합을 시킨 후에 이 세포를 재생시킨 연구를 보고 하기도 했다. 그러나 이같은 *Streptomyces* 속에 대한 많은 연구에도 불구하고 아직까지 상당수의 종들에 대한 원형질체 형성과 재생 방법 및 적정 조건들을 위한 많은 연구가 필요한 실

정이다.

본 연구에서는 항생물질 mikamycin 을 생산하는 균주 *Streptomyces mitakaensis* 의 항생제 생산 유전자의 효율을 높이기 위한 기초연구로 이 균주의 원형질체 형성과 재생에 관한 조건을 연구하였으며 이에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균 주

Streptomyces mitakaensis (K-2484) 을 사용하였으며, 건국대학교 축산대학 김창한 박사로부터 분양받았다.

사용한 배지

상기 균주 보관배지로는 peptone-yeast extract-glucose slant 배지를 사용하였다 (8).

SPMM 배지의 조성은 다음과 같다. 즉 soluble starch 10g, polypeptone 10g, malt extract 10g, molasses 10g 을 증류수 1 l 에 녹여 pH 7.2 로 조정 한 후 가압숙염균 (121°C 에서 15 Lb 로 15 분간) 하여 초기 배양액으로 사용하였다.

Key words: Protoplast formation & regeneration, *Streptomyces mitakaensis*

*Corresponding author

GBYN 배지의 조성과 제조과정은 다음과 같다. 즉 glycerol 20g, beef extract 5g, yeast extract 5g 과 sodium chloride 5g 을 증류수 1 l 에 녹여 pH 7.0으로 조정 한 후 가압습윤멸균(121°C에서 15Lb로 15분간)하여 본 배양액으로 사용하였다.

재생배지는 Okanish 등(6), Shirahama 등(9)이 개발한 R1, R2와 R3고체배지와 이들 배지에 beef extract 3g/l, yeast extract 3g/l와 casamino acid 0.3g/l을 추가한 H1, H2와 H3액체배지를 사용하였다. 고체배지의 경우에는 0.4% agarose gel(type II, Sigma Co.)을 상층젤로 사용하였다.

삼투압 안정제의 조성

삼투압 안정제로는 Okanish 등(6)이 사용한 phosphate-tris(PT) 완충액을 이용하였다.

세포벽 분해효소 제조

삼투압 안정제인 PT 완충액에 lysozyme(Sigma Co.)을 녹인 후 미세공 여과지(0.2~0.45 μ m)로 여과하여 사용하였으며, 농도는 Table 1에 있는 것과 같다. 저장이 필요할 때는 2%(w/v) 농도로 하여 완충액에 희석하여 사용하였다. 상기의 과정은 저온에서 행하였으며 4°C에 보관하였다.

생장곡선

Baltz(7)의 방법을 수정하여 사용하였다. 평판배지에 있는 *S. mitakaensis*(K-2484) 콜로니를 백금이로 취한 후 유리구슬이 포함된 전배양 배지(SPMM) 50 ml에 접종하여 28°C에서 180 rpm으로 48시간 진탕배양했다. 유리구슬이 포함된 본 배양배지(GBYN)에 최종농도가 2%되게 재 접종한 다음 0

Table 1. Concentration of lysozyme for *Streptomyces mitakaensis* protoplast formation.

Final lysozyme concentration (mg/ml)	2% (w/v) lysozyme solution (ml)	PT buffer (ml)	Total (ml)
0	0	5	5
0.5	0.125	4.875	"
1	0.25	4.75	"
2	0.5	4.5	"
3	0.75	4.25	"
4	1	4	"
5	1.25	3.75	"

Table 2. Glycine concentrations in GBYN medium for protoplast formation of *Streptomyces mitakaensis*

Final glycine concentration (%)	20% glycine solution (ml)	GBYN culture medium (ml)	Total (ml)
0	0	30	30
0.5	0.75	29.25	"
1	1.5	28.5	"
2	3	27	"
3	4.5	25.5	"
4	6	24	"
5	7.5	22.5	"

시간부터 8 시간 간격으로 spectrophotometer (Schimadzu, UV-12)로 600 nm에서 O.D.를 측정하여 성장곡선을 작성하였다.

원형질체형성이 잘되는 glycine 최적농도 결정

20%(w/v) glycine을 제조하여 미세공 여과지(0.45 μ m)로 여과한 후 Table 2와 같이 GBYN 배지에 각각 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5%되게 첨가한 다음에 SPMM 전 배양 배지에서 48시간 배양한 *S. mitakaensis* 배양액을 최종농도가 2%되게 각각 접종하여 48시간 다시 배양했다. 48시간 후에 각 배지에 Table 2와 같이 lysozyme을 처리하여 반응시킨 뒤에 원형질체 형성정도를 혈구계산기로 계산하고, 위상차 현미경으로 관찰하여 원형질체 형성이 잘 되는 glycine 최적농도를 결정하였다.

*S. mitakaensis*의 원형질체 형성 및 분리

평판배지에서 배양된 *S. mitakaensis*를 1 백금이 취하여 SPMM 전배양 배지에 접종 후, 28°C에서 150 rpm으로 48시간 진탕배양한 다음, glycine이 함유된 GBYN 배지에 최종농도가 2%되게 접종시켜 28°C에서 150 rpm으로 24시간 진탕배양했다. 이 배양액을 600×g에서 10분간 원심분리(Kontron H-401, A24·24 rotor)하여 균사체를 얻은 후 0.3M sucrose 용액으로 2 번 세척하여 가라앉은 침전관에 PT-완충액을 첨가하여 부유시킨 후 lysozyme 용액을 가하여 30°C 항온기에서 원형질체를 형성시켰다. 원형질체의 분리는 Okanishi 등(6), Baltz(7), 그리고 Shirahama 등(9)의 방법을 수정하여 사용하였다. 원형질체가 형성된 용액을 cotton wool과 glass wool로 여과한 후에 500×g로 8 분간 원심분

리하여(Kontron H-401, A24·24 rotor) 형성된 원형질체를 수확하였다. 이때 원심분리하여 균사체는 가라앉히고 상층액만 취한 뒤 이를 다시 500×g로 8분간 원심분리하여 완전한 원형질체만을 수확하였다. 원형질체 분리액은 lysozyme을 처리한 용액의 일부를 취해 위상차현미경 하에서 혈구계산기로 원형질체 형성수를 세어 측정하였다. 원형질체를 형성할 때 영향을 주는 요인들을 조사하기 위해 glycine 농도, 균사체 배양시간, 세포벽 분해 효소의 농도 및 처리시간, 온도 등을 달리해서 최적조건을 구하였다.

원형질체의 세포 재생방법

형성된 원형질체를 원심분리하여 수확한 다음 삼투압 안정제인 PT 완충액으로 2번 세척하여 lysozyme 용액을 제거한 후에 다시 PT 완충액으로 적정수준으로 희석하여 R1, R2, R3 고체평판배지에 도달하여 28°C에서 정치배양하면서 2일 간격으로 집락을 세어 세포가 재생되는 것을 관찰하였으며 이를 변형한 H1, H2, H3 재생 액체배지에도 형성된 원형질체 용액을 접종하여 28°C에서 120 rpm으로 회전배양하면서 24시간 간격으로 위상차 현미경 하에서 세포가 재생되는 것을 관찰하였다. 또한 고체배지에 접종할 때는 0.4% agarose type II (Sigma Co.)를 상층젤로 사용하여, 하나는 평판배지에 원형질체 용액을 도달한 후 표면이 건조된 상태에서 5 ml agarose gel를 30°C로 냉각시켜 그 위에 도달하였으며, 다른 한 방법은 agarose gel에 원형질체 용액을 접종하여 혼합 후 평판배지에 직접 부어 도달하는 2가지 방법을 사용하였다. 이때 대조 실험으로는 GBYN 배지에 증류수로 희석된 원형질체 용액을 도달하여 역시 28°C에서 정치배양하면서 집락이 형성되는가를 관찰하였다.

재생비율은 R1, R2, R3 고체평판 배지에서 28°C로 14일 이상 배양하여 원형질체가 재생되는 수를 측정하여 구하였으며, 원형질체를 형성시키기 위한 조건이 재생에 미치는 영향을 조사하기 위한 glycine 처리농도와 lysozyme 처리농도를 달리하여 재생정도를 관찰했다.

결과 및 고찰

***Streptomyces mitakaensis*의 성장곡선 측정**

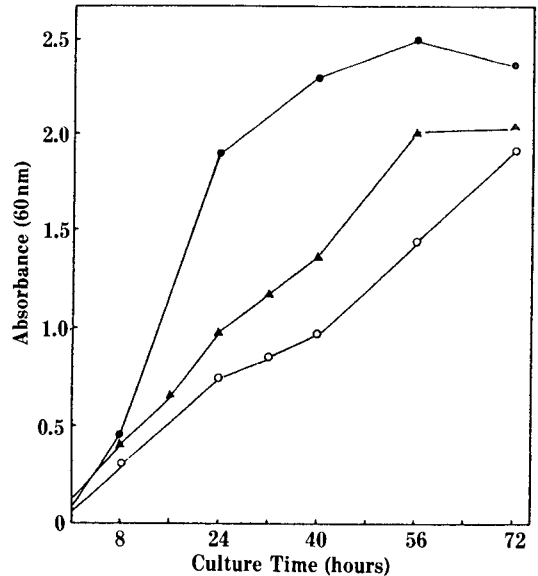


Fig. 1. Growth curves of *Streptomyces mitakaensis* at various glycine concentrations in GBYN medium.

(-●-): 0% glycine,
 (-▲-): 0.5% glycine,
 (-○-): 1% glycine.

진 배양된 *Streptomyces mitakaensis*의 균액을 glycine이 첨가되지 않은 GBYN 본 배양 접종한 후 일정시간 간격으로 O.D.를 측정하여 성장곡선을 그린 결과 Fig.1의 양상을 나타냈다. 본 실험에서는 배양액 제조시 유리구슬을 첨가하여 균체를 배양하였기 때문에 흡광도 측정이 가능하였다. Glycine이 첨가되지 않은 배지에서 성장한 균체는 정상적인 "S" 곡선을 나타냈으며 유도기는 8시간 정도였고, 8시간 이후부터 대수증식기가 시작되어 24시간 이후부터 정체기에 들어가기 시작하여 48시간 후에는 정체기에 도달 하였으며, 정체기는 매우 짧아 곧 사멸기로 들어갔다. Glycine이 0.5%와 1.0%가 포함된 배지에서 성장한 균체는 유도기가 없이 시간에 따라서 비례하며 증식을 했고, glycine이 첨가되지 않은 배지에서 성장한 균체보다 성장속도가 약 2배 정도 낮았으며, 성장곡선은 직선형으로 나타났고, glycerol 0.5%가 든 배양은 58시간 후에 정체기에 도달하여 정체기는 하루정도 계속되다 사멸기로 들어갔다. 또한 glycine 농도가 1%일 경우에는 균체의 성장은 유도기 없이 직선적으로 증식했으나, 제일 저조한 것으로 나타났고 성장곡선은 직선형이었다.

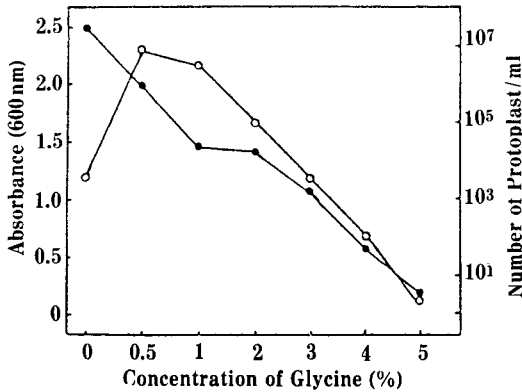


Fig. 2. Cell growth and number of protoplast formation of *Streptomyces mitakaensis* at various glycine concentrations.

(-●-): Cell growth, (-○-): Number of protoplast

원형질체의 형성 및 분리

1) Glycine 이 원형질체 형성에 미치는 영향 ;

SPMM 배지에서 배양된 *S. mitakaensis* 균액을 glycine 농도가 상이한 GBYN 배지에 접종한 다음 56시간 배양한 후를 기준으로하여 균사체 성장과 원형질체 형성에 관해 비교 조사한 결과는 Fig.2에 제시됐다. 균사체 성장은 glycine 이 함유되지 않은 배지에서는 배양 56시간 후 O.D가 2.5로 균체농도가 제일 높았고, 3% glycine 농도에서는 역시 배양 56시간이 경과후 O.D가 1.13으로 성장이 저조했으며, 5%에서는 배양 56시간이 경과한 후에도 O.D가 0.2로 균사체가 거의 성장하지 못함을 알 수 있었다. 배지에 glycine 농도가 증가함에 따라서 균사체의 증식은 반비례로 줄어드는 현상을 관찰할 수 있었다. 원형질체 형성에 있어서는 glycine 이 첨가되지 않은 배지에서 성장한 균체에 lysozyme 처리를 하였을 경우에는 원형질체 형성수가 ml 당 3×10³으로 생성율이 낮았으나, 0.5% glycine 이 첨가된 배지에서 성장한 균체에서는 lysozyme 처리시 원형질체가 ml 당 9×10⁶으로 3,000배가 증가하여 원형질체 형성율이 제일 높았다. 1% glycine 을 첨가한 배지에서 원형질체 형성은 ml 당 5×10⁶ 세포였으나, 2% glycine 농도부터는 원형질체 형성도 증식량과 같이 저조했다. 0.5% glycine 농도에서 균사체의 성장이 제일 높았고, 원형질체도 제일높게 형성되었으므로 이후의 실험에서는 GBYN 본 배양액의 glycine 농도를 0.5%로 하여 사용 하였다. 이와 같은 결과는 glycine 을 배지에 첨가하여 균체를 성장 시킬 경우 균이 성장하면서 peptidoglycan 의 D

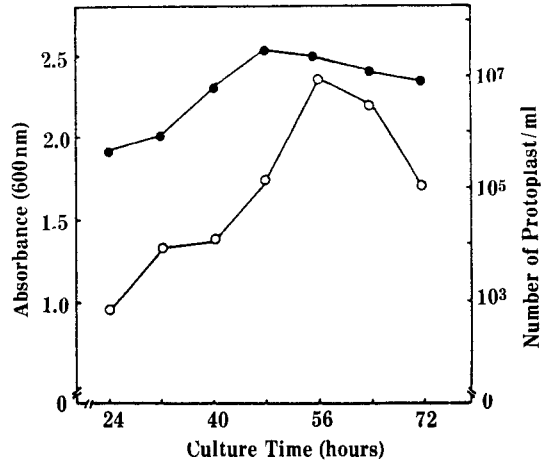


Fig. 3. Number of *Streptomyces mitakaensis* protoplast according to growth phase.

(-●-): Cell growth, (-○-): Number of protoplast

-alanine 이 glycine 으로 대체되면서 교차연관이 형성되는 것을 방해하는 것으로 Hammes 등(10)은 보고를 했으며, 본 실험에 있어서도 *S. fradiae* 의 경우와 거의 비슷하게 성장저해가 일어나는 것을 알수 있었다.

2) 균사체 배양시간에 따른 원형질체 형성효과 ;

0.5% glycine 을 함유한 GBYN 본 배양액에서의 성장기별 원형질체 생성량을 조사한 결과는 Fig.3과 같다. 원형질체 형성은 대수기말에 ml 당 10⁵ 세포 정도로 상당량의 원형질체를 생성하기 시작하여 정체기에 도달하는 56시간 정도 배양했을 때는 ml 당 5×10⁶ 세포의 원형질체를 형성하여 최고치를 나타내었고 정체기말부터 원형질체 생성량은 감소하기 시

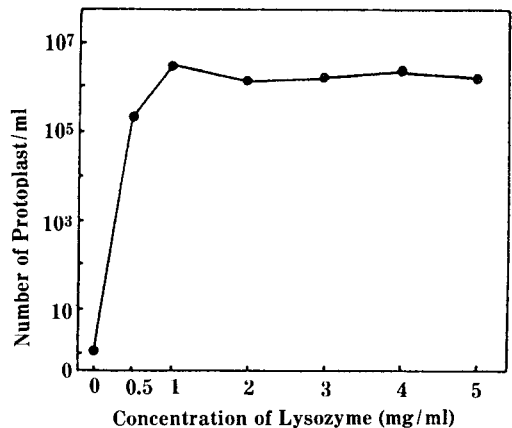


Fig. 4. Effect of lysozyme concentration in the formation of *Streptomyces mitakaensis* protoplast.

작하였다.

3) Lysozyme 이 원형질체 형성에 미치는 영향 :

① 농도에 따른 영향 : 세포벽 분해효소인 lysozyme 을 0.5 mg/ml 의 농도로부터 1 mg/ml 의 간격으로 총 5 mg/ml 까지 처리한 결과 0.5 mg/ml 의 lysozyme 용액을 처리하였을 때부터 원형질체는 급격히 형성되어 1 mg/ml 을 처리했을 때 ml 당 5×10^6 세포를 나타내었으며, 그 이상의 lysozyme 농도에서도 거의 동일한 수치를 나타냈기 때문에 이후의 실험에는 lysozyme 농도를 1 mg/ml 으로 처리하여 사용하였다(Fig.4).

② 처리온도에 따른 영향 : 원형질체 형성을 위한 lysozyme 처리 최적온도를 조사하기 위해 반응후 형성된 원형질체 수를 세어 측정 한 결과, 35°C에서 최고치인 5×10^6 세포를 나타내었고, 40°C 이후는 원형질체 형성수가 급격히 떨어졌다(Fig.5). 이와같은 결과는 *S. kasugaensis* MB 273-18a 균주가 20°C에서 형성율이 가장 좋게 나타났다는 Shirahama 등(9)의 보고와 비교하면 상당한 차이를 나타내었다.

③ 처리시간에 따른 영향 : Glycine 이 0.5% 함유된 배지에서 성장한 대수증식기말의 균사체에 lysozyme(1 mg/ml)을 처리하여 원형질체 형성을 측정 한 결과는 1 시간동안 반응된 배양액에서 10^7 개의 원형질체가 형성되어 가장 많은 원형질체를 수확할 수 있었으며, 1시간 이후는 원형질체 수가 줄어들기 시작함을 알 수 있었다(Fig.6).

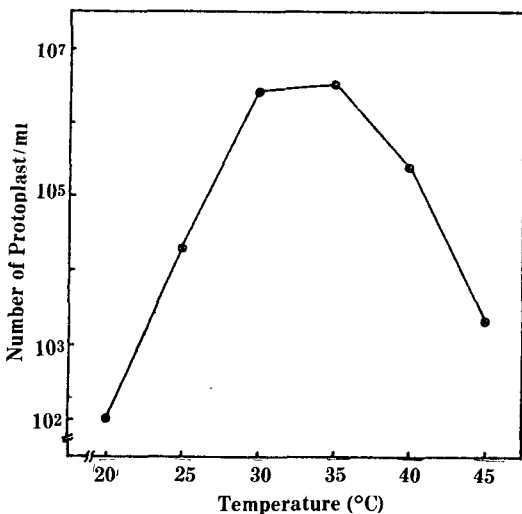


Fig. 5. Effect of temperature in the formation of *Streptomyces mitakaensis* protoplast

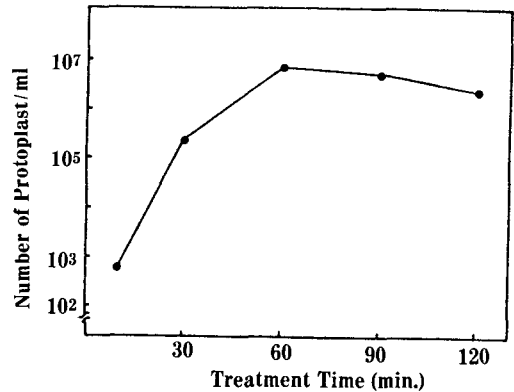


Fig. 6. Number of protoplasts of *Streptomyces mitakaensis* formed according to treatment time of lysozyme.

원형질체 재생

S. mitakaensis 원형질체는 원래의 균사체 상태로 환원하기 위해서 Okanishi 등(6)이 개발한 R1, R2 배지와 Shirahama 등(9)이 고안한 R3 배지를 사용해서 접종방법을 달리하여 평판배지와 액체배지 상에서 재생여부를 관찰하였다.

R1 고체평판 배지에서는 원형질체 용액을 접종한 지 14일이 경과한 후에도 집락이 형성되지 않았으나, R2 배지에서 배양 10일 후에 집락이 형성되는 것을 관찰할 수 있어, 이 결과로 미루어 보아 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 와 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 의 농도가 1.0-12% 와 0.295%가 적합한 농도임을 알 수 있으며, R2 배지의 질소원 proline 이 R1배지의 asparagine 보다 적당함을 알 수 있었다. 또한 R2 배지에 beef extract, yeast extract 와 casamino acid 를 첨가한 액체배지에서 3 일간 배양후 위상차현미경으로 검정한 결과 재생 현상을 관찰할 수 있었다. 그러나 R3 배지에서는 원형질체 용액을 접종한지 14일이 경과한 후에도 집락이 형성되지 않았으며, R3 배지에 beef extract, yeast extract 와 casamino acid 를 첨가해 보았으나 역시 재생 현상을 관찰할 수 없었다. 따라서 R3 배지는 *S. mitakaensis* 의 원형질체의 재생을 위해서는 적합치 않은 것으로 생각된다. 그러나 R2 재생배지에서도 재생은 0.1% 이하로 극히 저조하게 나타났다.

요 약

Streptomyces mitakaensis 균주의 원형질체 형성과

정상세포로의 재생에 관한 최적조건을 연구했다. *S. mitakaensis* 균주를 GBYN 배지(glycerol 20g, beef extract 5g, yeast extract 5g 과 NaCl 5g, 증류수 1,000ml)에 glycine 0.5% 함유된 배지에서 대수증식기말까지 배양한 뒤에 lysozyme(1mg/ml)을 35°C에서 60분간 처리를 했을 때에 원형질체 형성은 최고치를 나타냈다. 정상세포로의 재생은 R2 평판배지에 원형질체를 접종한 후 10일이 됐을 때에 재생이 되는것을 관찰했고, H2액체 배지에서는 3 일후에 재생되는 것을 관찰했다. 세포재생 비율은 0.1% 정도였다.

참고문헌

1. Hopwood, D.A. and N.J. Merrick: *Bacteriol. Rev.*, **41**, 595-635 (1977).
2. Queener, S.W. and R.H. Baltz: *Annual Reports on Fermentation Processes* **3**, 5-45 (1979).
3. Romano, A.H. and W.J. Nickerson: *J. Bacteriol.*, **72**, 478-482 (1956).
4. Romano, A.H. and A. Sohler: *J. Bacteriol.*, **72**, 865-868 (1956).
5. Sagara, Y., K. Fukui, F. Ota, N. Yoshida, T. Kashiyama and M. Fujimoto: *Japanese J. Microbiology*, **15**, 73-84 (1971).
6. Okanishi, M., K. Suzuki and H. Umezawa: *J. Gen. Microbiol.*, **80**: 389-400 (1974).
7. Baltz, R.H.: *J. Gen. Microbiol.*, **107**: 93-102 (1978).
8. Williams, S.T. and T. Cross: C. Bootu, ed., Vol. 4, Academic Press, N.Y., 295-334.
9. Shirahama, T., T. Furumai and M. Okanishi: *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1271-1273 (1980).
10. Hammes, W.: *J. Bacteriol.*, **116**: 1029-1053 (1973).

(Received February 18, 1987)