

Establishment of Protoplast Formation Method for the Acquisition of Single Colony for Strain Improvement, and Medium Optimization for β -glucan Production

Woo Shik Shin, Su Ye Sung, Yong-Seub Jeong¹, and Gie-Taek Chun

Division of Life Sciences, Kangwon National University,

¹Faculty of Biotechnology, Chonbuk National University

담자균류의 경우 균사체 액상배양 시 포자를 형성하지 않기 때문에 단일 유전자를 보유한 균주의 선별이 거의 불가능하였으므로 본 연구에서는 균사체로부터 세포막을 제거하여 각각의 단일 핵을 보유한 원형질체를 분리하고, 이들을 재생하여 우수한 품종의 균주를 선별해 내는 실험방법을 확립하고자 하였다. 다양한 종류의 효소를 테스트한 결과, Novozym 234를 사용하였을 때 *P. linteus*의 원형질체 형성률이 가장 높았다. 원형질체를 회수하기 위해 삼투압과 물리적인 충격이 적은 회수 방법을 개발하여 원형질체를 회수한 결과 $10^5 \sim 10^6$ protoplasts/ml를 얻을 수 있었다. 한편 원형질체재생빈도는 재생배지의 종류에 상관없이 $10^2 \sim 10^3$ 을 나타냈으나 재생 기간은 RM4 배지가 가장 빠른 것으로 나타났다. 상기와 같은 원형질체 형성 방법에 의해 얻은 단일균주(single cell)들에 대한 액상배양을 통해 morphology가 훌륭하며, 성장속도 및 조단백다당체의 생산성도 우수한 균주들을 반복 screening cycle을 통해 선별해 나갔다. 그 결과 초기에 사용한 wild type 균주보다 성장속도가 월등히 우수하여 배양시간이 단축될 뿐만 아니라, 종균배양 시에는 균사 모양(filamentous morphology)으로, 그리고 생산배양 조건에서는 1 mm 미만의 적은 pellet을 형성하는 고성장성(모균주에 비해 약 200% 증가)의 우수한 균주를 선별할 수 있었다. 또한 miniaturized cell culture 방법을 적용하여 대량의 균주를 액상배양을 통해 신속하게 선별함으로써 조다당체 고생산성 및 고 성장성 균주를 효율적으로 선별할 수 있었다. 한편 고생산성 균주의 경우 조단백다당체의 함량이 건조세포 무게당 거의 일정한 양을 함유하고 있는 것으로 관찰되었으므로, 조단백다당체의 생산성을 증가시키기 위해서는 액상 본배양의 균체량 증가가 가장 중요한 것으로 판단되었다. 따라서 세포량 증가에 가장 중요한 요인인 생산배지 성분과 조성이 세포 생산성에 미치는 영향을 더욱 집중적으로 조사하였다. 이를 위해 라틴박격법에 의해 결정된 정치배양배지를 이용하는 정치배양 방법을 도입하고, 종균배양배지 성분을 달리함과 동시에 Response surface method(RSM)를 적용하여 생산배지의 조성을 통계학적 방법으로 최적화한 결과, 배양 초기 조건에 비해 선별된 생산균주 대부분의 세포농도가 약 200% 이상 증가하는 고무적인 결과를 얻을 수 있었다. 또한 최적화된 배지에서의 균체성장이 매우 적은 pellet 형태로 성장하는 결과로부터, 최적화된 배지성분 뿐만 아니라 최적의 배지성분이 제공해주는 훌륭한 배양 형태적 특성에 의해 세포생합성이 크게 향상되었다고 결론지을 수 있었다.