

김치에서 분리한 *Pediococcus pentosaceus*와 *Leuconostoc mesenteroides*의 원형질체 형성 및 재생

김연희 · 박연희*
아주대학교 생물공학과

Protoplast Formation and Regeneration of *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Kimchi

Yun-Hee Kim and Yun-Hee Park*

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

Abstract — Two lactic strains, *Leuconostoc mesenteroides* Lu5 and *Pediococcus pentosaceus* P1 isolated from *Kimchi*, were used to determine the optimum conditions for protoplast formation and regeneration. The maximum protoplast formation rate was obtained with both strains at early exponential growth phase and decreased rapidly during growth phase. For *P. pentosaceus* P1, 30 µg/ml of lysozyme treatment was sufficient to obtain over 90% of protoplast formation and 300 µg/ml for *L. mesenteroides* Lu5, showing great difference in sensitivity of these strains to lysozyme. For both strains, best results were obtained at pH 7, using 0.5 M sucrose as osmotic stabilizer. For regeneration of protoplast, the highest regeneration rate was obtained after 15 minutes of lysozyme treatment and declined drastically with prolonged digestion.

우리나라의 대표적 발효식품인 김치는 가정에서 소량 담가 먹는 방법이 전통적인 것이었으나 1970년대 이후 산업화가 시작되었으며, 수년 전부터 김치 수출과 국내 소비의 증가로 공장 생산이 매년 증가하고 있다.

김치를 대규모로 공장 생산하는 경우 보다 우수하고 균일한 품질을 위한 starter의 사용 가능성이 이미 보고되기 시작하였으나(1-4) 김치는 그 원료, 제조방법 및 관련 미생물의 복합성으로 인하여 실용화에 이르기까지는 많은 연구가 필요한 실정이다. 김치는 여러 종류의 미생물이 관여하는 자연발효에 의한 것으로 starter 제조를 위해서는 적합한 균주의 선택이 가장 중요하다.

현재까지 김치에서 분리 동정된 젖산균은 김치의 원료, 소금의 농도, 발효 온도 및 제조 방법에 따라 많은 차이를 보이고 있으나(5-9), 김치의 풍미가 좋은 저온에서 발효시킨 경우 초기에는 *Leuconostoc mesenteroides*가 주종을 이루고 있으며 *Lactobacillus plantarum* 등 *Lactobacillus* spp.는 대체로 최적 숙성기

이후에 나타나는 것으로 밝혀졌다(8-10). 또한, *Pediococcus* spp.도 주로 발효 중기에 관여하는 것으로 알려져 있으며(6, 10), 박 등(11-13)은 다른 유해균에 대해 억제 작용이 있는 균주에 대해 보고한 바 있다. 그러므로 김치의 starter로서는 초기 발효에 관여하며 젖산 생성이 비교적 적은 *Leuconostoc* 속과 *Pediococcus* 속의 두 균주의 특성을 동시에 지닌 융합주가 적합하다고 보겠다. 지금까지 젖산균의 원형질체 형성, 재생 및 융합에 관한 연구는 *Lactococcus* spp. 및 *Lactobacillus* spp.를 주로 하였으며(14), 채소발효에 관련된 젖산균에 대한 보고는 매우 적었다. 그러나, 젖산균은 종류에 따라 lysozyme과 같은 세포벽 분해 효소에 대한 감수성의 차이가 커서 원형질체를 형성하기 어려운 경우도 있으므로 새로운 균주의 세포융합을 위해서는 그 균주의 원형질체 형성 및 재생의 최적조건을 조사하는 것이 중요하다.

그러므로, 본 연구에서는 김치에서 분리한 *Leuconostoc* 및 *Pediococcus* 속의 균주 중에서 유해세균에 대하여 생육 억제 작용이 있는 것으로 알려진(15) *Pediococcus pentosaceus* P1과 *Leuconostoc mesenteroides* Lu5의 세포융합을 목적으로 원형질체 형성과 재생에 대한 최적조건을 조사하여 세포융합을 통한 starter 개발의 기초자료를 얻고자 하였다.

Key words: *Kimchi*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, protoplast formation, regeneration

*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

김치에서 송(15)이 분리한 *Pediococcus pentosaceus* P1과 *Leuconostoc mesenteroides* Lu5를 원형질체 형성 및 재생 실험 균주로 사용하였다.

사용배지

젖산균의 생육과 원형질체 형성에 사용한 기본배지로는 MRS 배지를 사용하였으며 원형질체의 재생에는 Tween 80을 뺀 MRS 배지에 0.5 M sucrose, 0.02 M MgCl₂ 그리고 gelatine과 agar를 각각 2.5%, 1% 씩 첨가한 재생배지(RM : Regeneration Medium)를 사용하였다.

원형질체의 형성

원형질체의 형성은 Lee-Wickner(14)와 Miyamoto(16)의 방법을 사용하였다. 즉, MRS broth 30 ml에 24시간 배양한 젖산균 배양액을 2% 접종하여 35°C에서 배양액의 O.D가 약 0.3~0.4 될 때까지 배양한 후 2,700×g로 15분간 원심분리 하였다. 회수한 균체를 10 ml의 protoplast forming buffer(PFB : 0.02 M HEPES : N-2-Hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 0.5 M sucrose, 0.02 M MgCl₂, pH 7.0)로 2회 세척한 후 6 ml PFB로 재현탁 하였다. 여기에 같은 PFB에 녹여 여과 멸균한 lysozyme 용액을 동량 가한 다음 37°C에서 15분간 천천히 섞어 원형질체를 만들고 2,700×g로 5분간 원심분리한 후 PFB를 첨가하여 원형질체 현탁액을 준비하였다.

원형질체 형성에 미치는 생육시기별 영향을 보기 위해 MRS 배지에 균주를 접종하여 35°C에서 배양하면서 1시간마다 원형질체 형성을 조사하였으며, lysozyme 농도의 영향을 실험한 경우에는 *Pediococcus pentosaceus* P1의 경우 lysozyme을 10, 20, 30, 40 µg/ml까지 처리하였고, *Leuconostoc mesenteroides* Lu5의 경우 100, 200, 300, 400 µg/ml를 각각 처리하였다. 또한 삼투압 안정제의 영향을 알아보기 위하여 PFB에 첨가하는 sucrose의 농도를 0.25, 0.5, 0.75 M로 조절하여 사용하였다.

원형질체 생성 측정

원형질체의 생성정도는 lysozyme 처리 후 반응액을 일정량의 증류수에 현탁한 후 600 nm에서 흡광도의 감소를 측정하여 용균 정도(degree of lysis)로 나타내거나(17), lysozyme 처리전 원 균수(original cell)와 원형질체 형성 후 삼투저항성 균수(osmotic resistant

cell, ORC)의 차이를 산출하여 원형질체 형성율(regeneration frequency)로 표시하였다. ORC는 원형질체 현탁액을 증류수로 희석한 뒤 MRS agar에 도말하여 배양 후 나타나는 colony forming unit로 하였다.

$$\text{용균 정도}(\%) = \frac{O.D_{600}(t_0) - O.D_{600}(t_1)}{O.D_{600}(t_0)} \times 100$$

O.D₆₀₀(t₀): lysozyme 처리시간이 0일 때 증류수 현탁 후 흡광도

O.D₆₀₀(t₁): lysozyme 처리시간이 t일 때 증류수 현탁 후 흡광도

$$\text{원형질체 형성율}(\%) = \frac{\text{원균 수} - \text{삼투저항성 균수}}{\text{원균 수}} \times 100$$

원형질체의 재생

생성된 원형질체를 PFB에 희석한 후 RM에 접종하고 30°C에서 5~6일간 배양하였다. 재생효율은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{재생빈도}(\%) = \frac{\text{재생배지상의 균수} - \text{삼투저항성 균수}}{\text{원균수} - \text{삼투저항성 균수}} \times 100$$

결과 및 고찰

원형질체 형성의 최적 생육시기

P. pentosaceus P1과 *L. mesenteroides* Lu5의 생육시기에 따라 원형질체 생성을 조사한 결과 두 균주 모두 대수증식기의 초기에 가장 높은 원형질체 생성율을 보였다(Fig. 1). 원형질체 형성에 가장 적합한 시기는 젖산균의 종류에 따라 차이가 있으나 대체로 대수증식기의 중간부터 정지기 초반으로 보고되었다. *Lactococcus lactis*의 경우 차 등(18)은 대수증식기 중반의 균체가 lysozyme에 의한 원형질체 제조에 가장 적당하다고 보고하였으며 Jun 등(19)은 *L. bulgaricus*에서, Kang 등(20)은 *L. casei*의 경우 대수증식기 중반에서 정지기 초반까지의 균체가 가장 원형질체 형성율이 높다고 보고하였다. 그러나, 본 실험에서 *P. pentosaceus* P1과 *L. mesenteroides* Lu5는 대수증식기 초기의 균체를 lysozyme으로 처리했을 때 원형질체 형성율이 가장 높았으며 배양시간을 연장하면 급격히 감소하였다. 이 결과는 *Lactobacillus* spp.로 실험한 경우(19, 20) 대수증식기의 중반에 원형질체 형성율이 최고에 달하고 배양시간이 연장되어도 변화가 없거나 약간 감소하는 결과에 비하여 매우 큰 차이를 보였다.

효소 농도의 영향

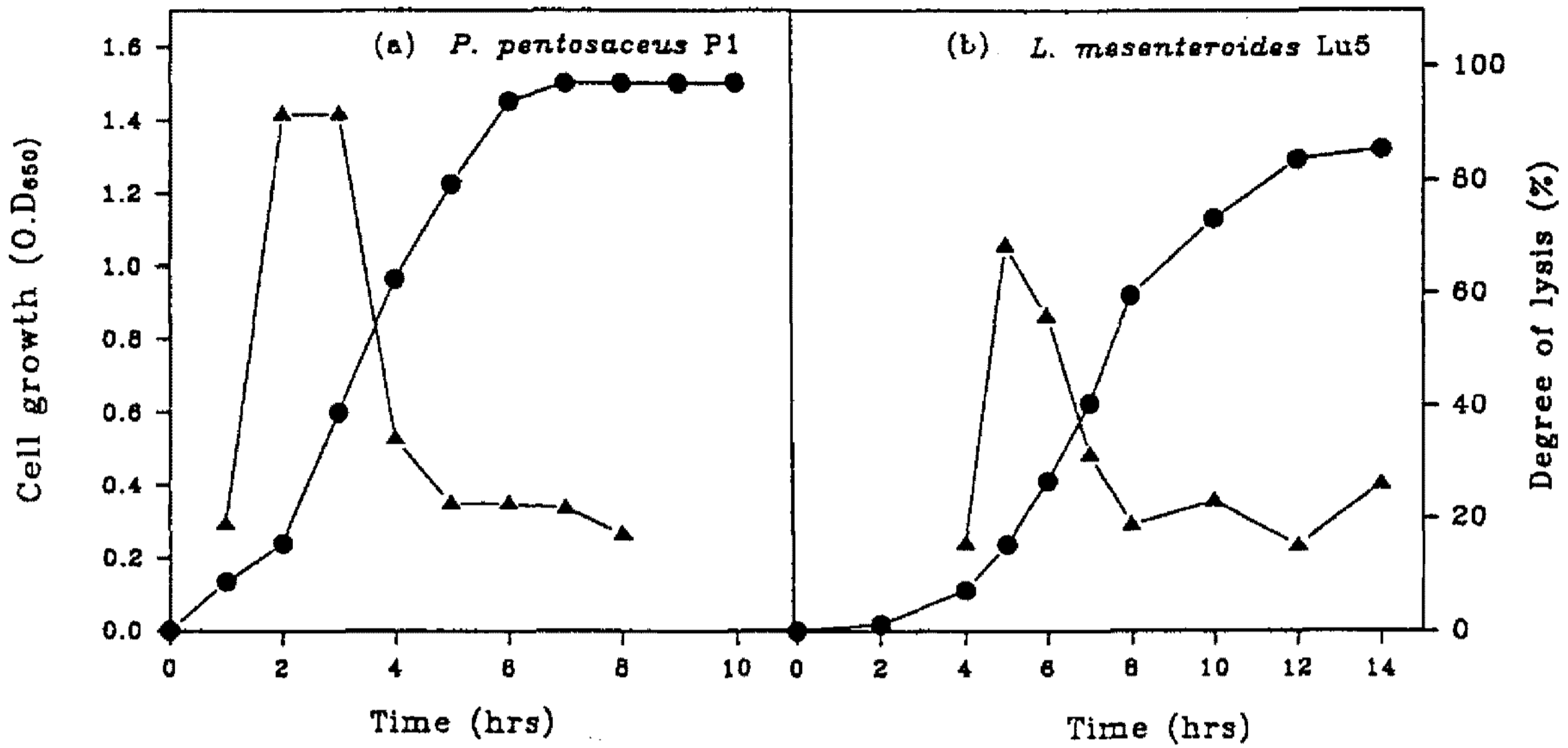


Fig. 1. Effect of growth phase on protoplast formation of *P. pentosaceus* P1 (a) and *L. mesenteroides* Lu5 (b). Reaction was performed with 30 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme for *P. pentosaceus* P1, 300 $\mu\text{g/ml}$ for *L. mesenteroides* Lu5 at 37°C for 15 min: cell growth (●), cell lysis (▲)

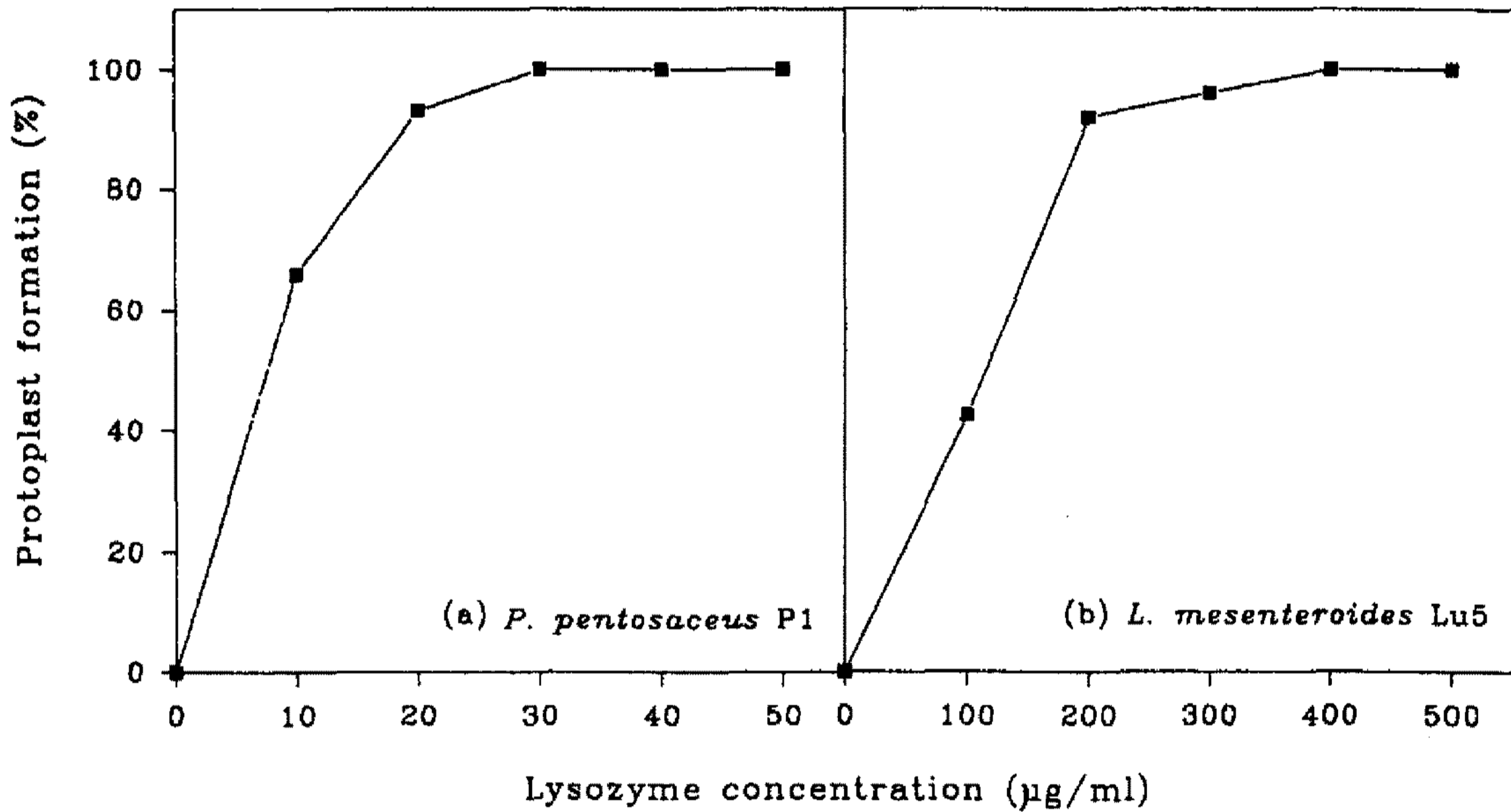


Fig. 2. Effect of lysozyme concentration on protoplast formation of *P. pentosaceus* P1 (a) and *L. mesenteroides* Lu5 (b).

Reaction was performed with various concentration of lysozyme for 30 min.

Lysozyme 처리 농도가 원형질체 형성에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig.2) 두 균주는 lysozyme 감수성에서 큰 차이를 보여 *P. pentosaceus* P1의 경우는 30 $\mu\text{g/ml}$ 로 30분 처리했을 때 99% 이상의 높은 생성율을 보였으나 *L. mesenteroides* Lu5의 경우에는 그보다 10배 높은 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 약 90%의 생성율을 보였다. *Pediococcus acidilactici*로 실험한 보고에서는(21) 세포벽 분해효소로 mutanolysin을 사용하여 양호한 결과를 얻었으나, 이 실험 결과 *Pedio-*

coccus 속에서도 species에 따라 lysozyme 만으로도 원형질체 생성이 가능할 것으로 사료되었다.

한편, 차 등(18)은 lysozyme 농도가 20 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 최대를 나타내었고 그 이상에서 감소하는 경향을 보인다고 하였으나, 본 실험에서는 Fig.2에서 보는 바와 같이 *P. pentosaceus* P1의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$, *L. mesenteroides* Lu5의 경우 500 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 감소 현상이 나타나지 않았다.

삼투압 안정제 및 pH의 영향

원형질체는 불안정한 상태이므로 삼투압에 민감하여 삼투압 안정제로 sucrose가 주로 사용되며 lactose, raffinose, maltose 등도 사용된다. Sucrose는 삼투압을 유지할 뿐 아니라 lysozyme의 세포벽 가수분해에 대한 자극제 역할도 하며 농도에 따라 그 효율이 증가한다고 보고하였다(22).

본 실험에서 sucrose의 농도를 달리하여 원형질체 형성율을 조사한 결과(Fig. 3) *P. pentosaceus* P1에서는 sucrose의 농도가 0.5 M, 0.75 M일 때에는 처리 시간 15분 후에 90% 이상의 원형질체 형성율을 보였고 시간의 경과에 따른 변화가 거의 없었으나, sucrose를 첨가하지 않는 경우와 0.25 M에서는 15분 후에 형성율은 각각 40%, 60% 이하였으며 60분까지 계속 증가하였다.

L. mesenteroides Lu5에서는 sucrose 농도에 따른 원형질체 형성율에 차이가 매우 적었으며 첨가하지 않은 경우에도 *P. pentosaceus* P1에 비하여 높은 원형질체 형성율을 나타내었다.

한편, pH의 영향을 보면 두 균주 모두 pH 7에서 가장 높은 원형질체 형성율을 보였으며, Jun 등(19)이 *L. bulgaricus*로 실험하였을 때 pH 7에서 최고의 원형질체 형성율을 보인 결과와 일치하였다(Fig. 4).

원형질체의 재생

P. pentosaceus P1과 *L. mesenteroides* Lu5의 원형질체 형성 및 재생에 미치는 lysozyme 처리 시간의

영향을 알아 보기 위하여 lysozyme 농도를 *P. pentosaceus* P1의 경우는 50 µg/ml, *L. mesenteroides* Lu5의 경우는 500 µg/ml로 고정하고 효소처리시간을 달리하여 원형질체를 형성시킨 후 재생배지에 배양하여 재생 효율을 알아보았다(Table 1, 2).

두 균주에서는 lysozyme 처리 시간이 길어지면 원형질체 형성율은 증가하는 반면, 재생율은 감소하는 것을 볼 수 있었다. *P. pentosaceus* P1은 15분 처리

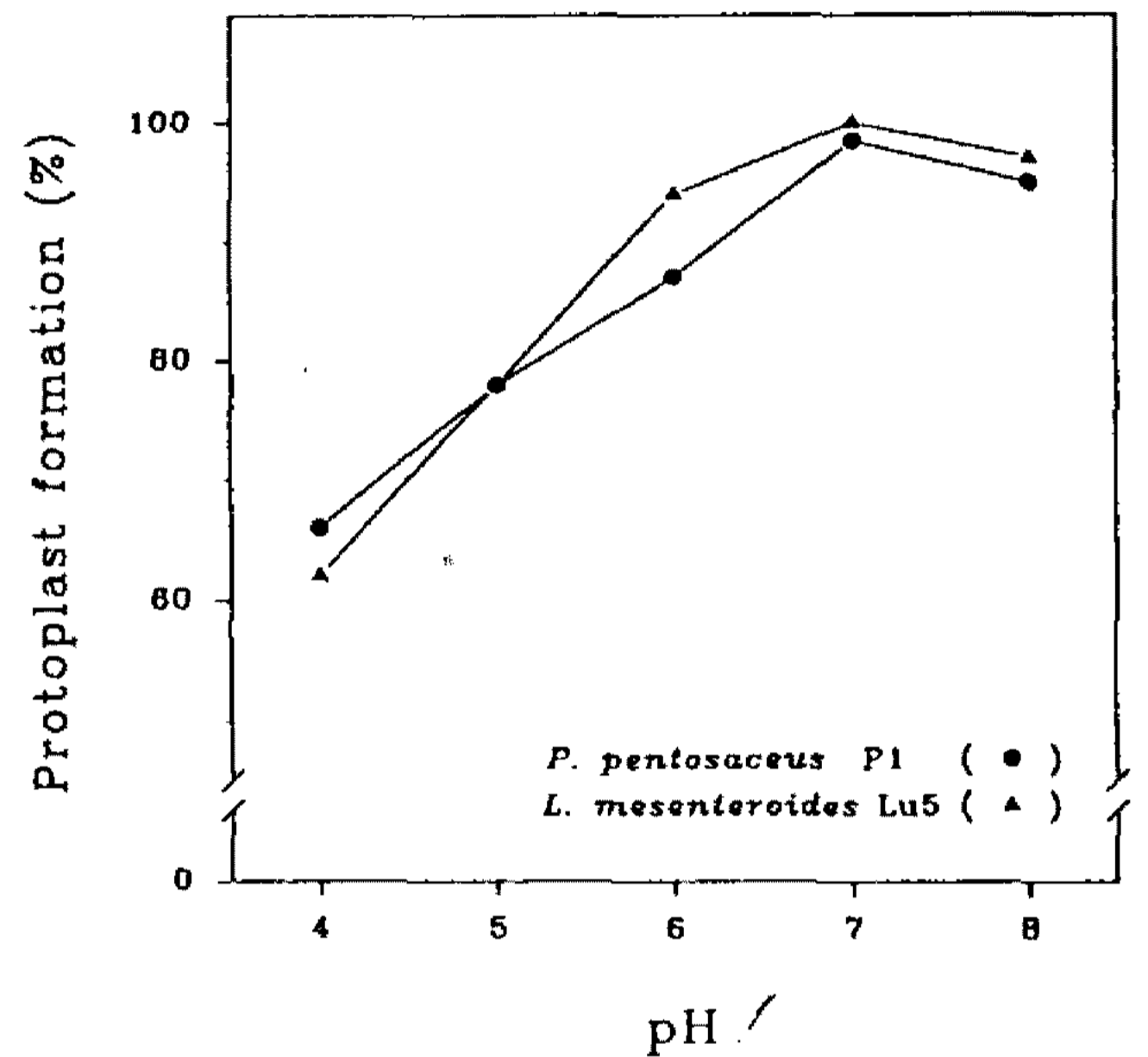


Fig. 4. Effect of pH on protoplast formation of *P. pentosaceus* P1 and *L. mesenteroides* Lu5.

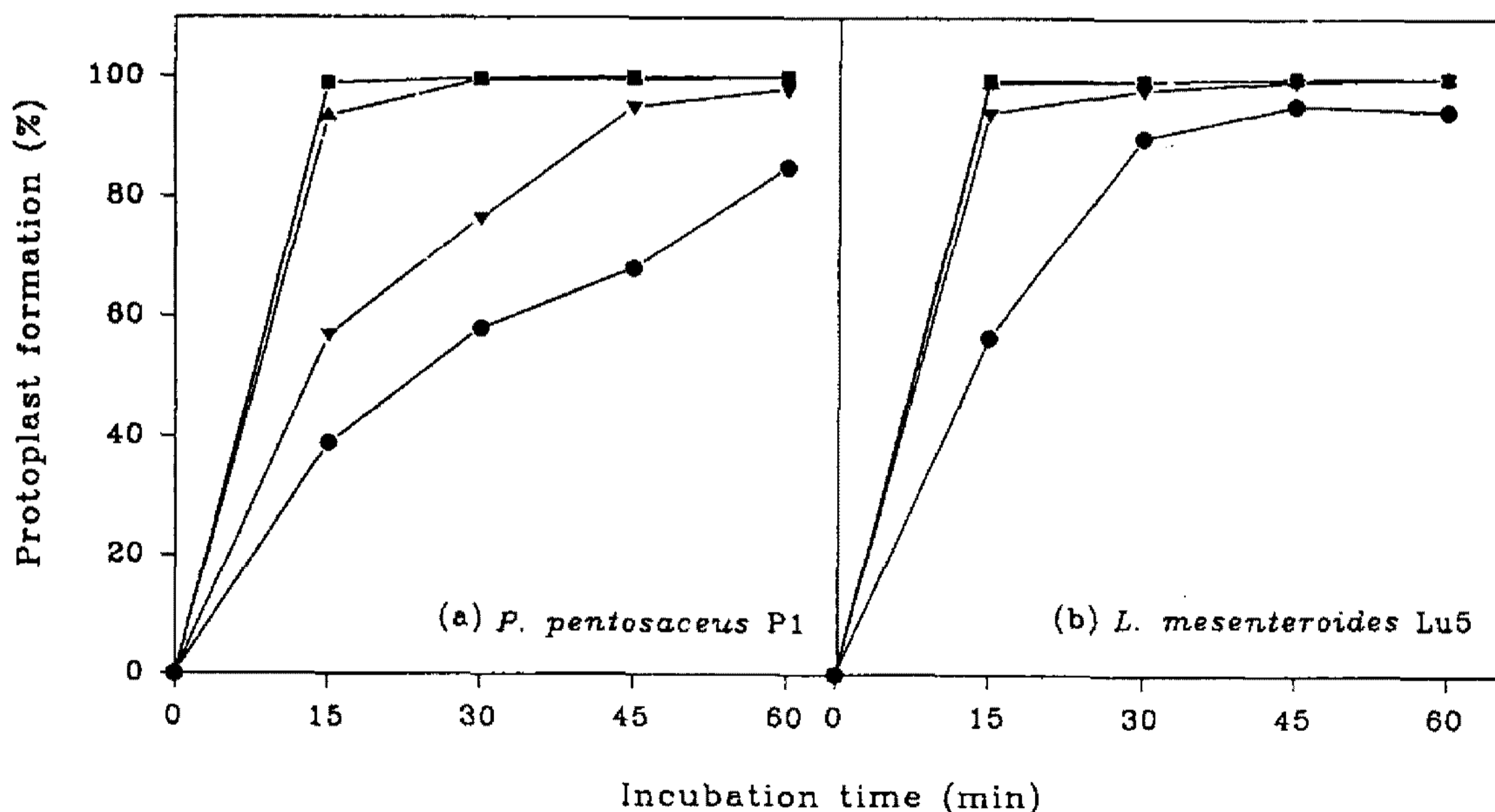


Fig. 3. Effect of sucrose concentration on protoplast formation of *P. pentosaceus* P1 (a) and *L. mesenteroides* Lu5 (b).

Sucrose concentration: 0 M (●), 0.25 M (▼), 0.5 M (▲), 0.75 M (■)

Table 1. Effect of the lysozyme treatment time on the formation and regeneration of protoplast of *P. pentosaceus* P1

Treatment time (min)	No. of total colonies (CFU/ml)	No. of ORC (CFU/ml)	Frequency of protoplast (%)	Frequency of regeneration (%)
15	7.6×10^{12}	5.0×10^{12}	91.94	4.56
30	3.2×10^{12}	2.1×10^{12}	96.61	1.84
45	3.0×10^9	1.3×10^9	99.99	0.003

The lysozyme concentration used for protoplast formation was 50 $\mu\text{g/ml}$ and the number of initial cell was 6.2×10^{13} CFU/ml.

Table 2. Effect of the lysozyme treatment time on the formation and regeneration of protoplast of *L. mesenteroides* Lu5

Treatment time (min)	No. of total colonies (CFU/ml)	No. of ORC (CFU/ml)	Frequency of protoplast (%)	Frequency of regeneration (%)
15	4.2×10^{11}	7.5×10^{10}	99.50	2.31
30	2.0×10^{10}	8.0×10^9	99.95	0.08
45	9.8×10^9	7.2×10^9	99.95	0.017

The lysozyme concentration used for protoplast formation was 500 $\mu\text{g/ml}$ and the number of initial cell was 1.5×10^{13} CFU/ml.

했을 경우 최고 4.6%의 재생율을 보였으며, *L. mesenteroides* Lu5의 경우는 2.3%의 재생율을 보였고 처리시간이 길어짐에 따라 재생율이 크게 감소하였다. 이는 효소반응시간이 지나치게 길 경우 세포벽 재생에 필요한 primer 조차 남기지 않고 세포벽이 완전히 가수분해되어 재생율이 낮아지게 되는 것으로 볼 수 있으며, Otto 등(23)이 *Leuconostoc mesenteroides*로 실험한 경우나 Kang 등(20)의 실험결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서 원형질체 형성율과 재생율이 모두 양호한 최적시간의 결정이 중요하며, 특히 *Leuconostoc mesenteroides*에서 최적조건은 균주에 따라 차이가 매우 커서 관심있는 특정 균주에 대해서는 그 조건을 별도로 결정할 필요가 있다고 강조하였다(23). 본 실험에서 얻은 재생율은 Morita 등(21)이 *P. acidilactici*에서 7.2%, Otto 등(23)이 *Leuconostoc mesenteroides*로 얻은 8.6%에 비하여 낮은 결과를 얻었으나 재생 배지의 조성을 달리하여 재생율을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

P. pentosaceus P1과 *L. mesenteroides* Lu5의 세포 융합을 위한 기초 실험으로 각 균주의 원형질체 형성의 최적조건과 원형질체의 형성에 적합한 용균 효소처리의 처리 농도 및 시간을 조사하였다. 원형질체 형성에 적합한 최적생육시기는 lysozyme으로 처리했

을 경우 두 균주 모두 대수증식기 초기로 나타났으며 배양시간을 연장하면 원형질체의 생성정도가 감소하는 특징을 보였다. 그러나 이 두 균주는 lysozyme 감수성에 큰 차이를 보여 *P. pentosaceus* P1의 경우에는 30 $\mu\text{g/ml}$ 로 30분 처리했을 경우 99% 이상의 높은 생성율을 보였으나, *L. mesenteroides* Lu5의 경우는 10배 높은 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 약 90%의 생성율을 보였다. 또한 삼투압 안정제로 사용하는 sucrose의 농도는 0.5 M 이상일 때 protoplast 형성율이 높았으며, 최적 pH는 두 균주 모두 7로 나타났다. 한편, lysozyme 처리 시간이 protoplast 형성과 재생에 미치는 영향은 두 균주 모두 15분에서 가장 높은 재생율을 보였으며 처리시간을 연장하면 재생율이 크게 낮아지는 결과를 얻었다.

참고문헌

1. 이신호, 김순동. 1988. Starter의 첨가가 김치의 숙성에 미치는 효과. 한국영양식량학회지 17(4): 342-347.
2. 최신양, 이신호, 구영조, 신동화. 1989. Starter를 이용한 숙성 발효김치의 제조. 한국산업미생물학회지 17(4): 403-406.
3. 현인환, 김광수, 정낙현. 1990. 젖산균 첨가가 김치의 비휘발성 유기산 생성에 미치는 영향. 한국식품영양학회지 3: 141.
4. 하덕모, 차동수. 1994. *Enterococcus faecium* bacte-

- riocin 생산 균주를 starter로 이용한 김치의 제조. 한국산업미생물학회지 22(5): 550-556.
5. 조남철, 전덕영, 신말식, 홍윤호, 임현숙. 1988. 마늘의 농도가 김치미생물에 미치는 영향. 한국식품과학회지 20(2): 231-235.
 6. Mheen, T.I. and T.W. Kwon. 1984. Effect of temperature and salt concentration on Kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 16(4): 443-450.
 7. 이현중, 백지호, 양문, 한홍의, 고용덕, 김홍재. 1993. 온도강하에 의한 김치발효의 유산균 군집의 특징. 한국미생물학회지 31(4): 346-353.
 8. 소명환. 1994. 김치에서 분리한 저온성 젖산균의 특성. 고려대학교 박사학위논문.
 9. 임종탁, 박현근, 한홍의. 1989. 김치에서 서식하는 Gram 양성세균의 분리 및 동정의 재평가. 한국미생물학회지 27(4): 404-414.
 10. 이철우, 고창영, 하덕모. 1992. 김치발효 중의 젖산균의 경시적 변화 및 분리 젖산균의 동정. 한국산업미생물학회지 20(1): 102-109.
 11. 송현주, 박연희. 1992. 젖산균이 물김치에서 분리한 효모의 생육에 미치는 영향. 한국산업미생물학회지 20(2): 219-224.
 12. 박연희, 권정주, 조도현, 김수일. 1983. 김치에서 분리한 젖산균의 미생물 생육 저해. 한국농화학회지 26(1): 35-40.
 13. 박연희, 조도현. 1986. 김치에서 분리한 *Pediococcus*의 미생물 생육 저해. 한국농화학회지 29(2): 207-211.
 14. Lee-Wickner, L.J. and B.M. Chassy. 1984. Production and regeneration of *Lactobacillus casei* protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(5): 994-1000.
 15. 송현주. 1991. 김치젖산균의 미생물 생육억제에 대한 연구. 아주대학교 석사학위논문.
 16. Miyamoto, T., K. Nishoka, and H. Morita. 1985. Protoplast formation and Regeneration of some lactic acid bacteria. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 49: 1371-1376.
 17. Yamamura, M., Y. Teranishi., A. Tanaka., and S. Fukui. 1975. Preparation of protoplasts of hydrocarbon-utilizing yeast cells and their respiratory activities. *Agric. Biol. Chem.* 39(1): 13-20.
 18. 차상훈, 신원철, 오두환, 유주현. 1984. *Streptococcus lactis*의 protoplast 생성 및 재생. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* 15(3): 363-367.
 19. Jun, H.K., H.J. Park, H.S. Baik, and J.C. Song. 1991. Production and regeneration of *Lactobacillus bulgaricus* protoplasts. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1(4): 246-250.
 20. Kang, Y., J.H. Kim, and D.Y. Ryu. 1987. Protoplast fusion of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.* 51(8): 2221-2227.
 21. Morita, H., T. Miyamoto, K. Nishioka, M. Izumimoto, and K. Kataoka. 1990. Protoplast formation and regeneration of *Pediococcus acidilactici* NCDO 1859. *JPN. J. Zootech. Sci.* 61(11): 1047-1049.
 22. 전흥기, 김미경, 백형석. 1992. *Lactobacillus casei*와 *Lactobacillus elbruekii* 간의 protoplast 융합에 관한 연구. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20(1): 6-13.
 23. Otts, D.R. and D.F. Day. 1987. Optimization of protoplast formation and regeneration in *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(7): 1694-1695.

(Received 4 February 1995)