

Lactobacillus acidophilus 88과 *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953간의 Electrofusion에 관한 연구

조영배 · 김혜정 · 김성구* · 백형석 · 전홍기*

부산대학교 미생물학과

*부산수산대학교 생물공학과

Studies on the Electrofusion between *Lactobacillus acidophilus* 88 and *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953

Young-Bae Jo, Hye-Jeong Kim, Sung-Koo Kim*, Hyung-Suk Baik and Hong-Ki Jun*

Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Dept. of Biotechnology and Bioengineering, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Abstract

The optimal conditions for eletrofusion between the cells of streptomycin(2mg/ml) and lincomycin(5µg/ml) resistant *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953 and of kanamycin(600µg/ml) resistant *Lactobacillus acidophilus* 88 were investigated. The highest numbers of electrofusant were obtained at a capacitance value of 100msec(2,300µF), a field strength of 500V/cm and at a pulse controller setting of 49ohms. When various divalent cations were added to the electroporation buffer, the electrofusion yield was slightly increased by the addition of 1mM Mg²⁺. Electrofusants were very efficiently obtained by addition of 30% polyethylene glycol in electroporation buffer. Fusion yield of electroporation was better than that of polyethylene glycol mediated chemical induction method.

Key words : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, electrofusion

서 론

발효공업에서 우수한 형질을 가진 균주를 육종하기 위해 protoplast 융합이 널리 이용되고 있으며, 젖산균과 같이 유전물질 교환기술이 잘 개발되어 있지 않은 세균의 균주개량에 유용한 기술로 평가되고 있다(1). 특히 protoplast fusion은 미생물 교유의 특성에 구애받지 않고, 인위적 또는 물리적인 방법에 의해 새로운 종류의 균주를 얻을 수 있는 장점이 있다. 1974년 Kao와 Michayluk이 polyethylene glycol(PEG)과 Ca²⁺이 융합제로 유효하다고 보고한 이래(2) 융합 유도물질인 PEG를 이용한 protoplast 융합연구가 활발히 이루어지고 있으며, *Bacillus megaterium*(3), *Lactobacillus fermentum*(4), *Lactobacillus casei*(5), *Streptococcus lactis*(6) 등의 protoplast 융합에 관한 보고가 있다. 최근

에는 electroporation을 이용한 electrotransformation(7)과 electrofusion(8, 9) 기법이 각광을 받고 있으며, 최근 발표된 젖산균의 유전학적인 균주육종에 대한 연구에서도 이 방법을 많이 사용하고 있는 것으로 보고되고 있다(10).

*Lactobacillus bulgaricus*는 고온 젖산균으로서 protease 활성과 젖산 생성능이 높은 반면, *Lactobacillus*는 protease 활성이 낮고 젖산 생성능이 약하지만 bacteriocin(11) 생산능이 매우 뛰어난 장점을 가지고 있다. Bacteriocin은 그람 양성, 또는 음성 세균의 여러 종들에 의해서 생성되는 항균성 peptide나 단백질로서 세균의 생육을 저해시킨다.

우리 교유의 전통 발효식품인 김치는 젖산균을 중심으로 일어나는 복합발효에 의하여 숙성되어진다(12). 그러나 김치숙성 기간 중 젖산균의 과도한 증식

*To whom all correspondence should be addressed

으로 인하여 산도가 급격히 증가되고 발효 후기에는 김치내에 축적된 젖산을 이용하여 효모가 증식하게 됨으로서 김치가 연부되어 식품으로서의 가치를 점차 상실해 간다(13,14). 이러한 문제점들을 해결하기 위해서는 김치발효에 이용될 starter 균주의 개발이 시급한 과제이다. 즉 젖산의 생성능이 낮고, 다른 미생물들의 생육을 저해시키는 bacteriocin과 같은 생리활성물질을 생성하는 젖산균을 육종하여 김치발효의 starter 균주로 사용한다면 김치의 신선도와 저장성을 높임과 동시에 상품화도 가능할 것이다.

따라서, 본 연구에서는 김치발효에 대한 starter 균주 육종의 일환으로 내열성, protease 활성 및 젖산 생성능이 우수한 *L. bulgaricus*와 bacteriocin의 생산능이 뛰어난 *L. acidophilus*를 융합시키기 위해 electrofusion 방법을 이용하여 융합조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용된 균주인 *Lactobacillus acidophilus* 88(15)은 미국 North Calolina대학에서, *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953은 KCTC에서 각각 분양받아 사용하였다.

사용 배지 및 완충액

유산균의 생육과 protoplast를 형성하기 위해 Difco 사 제품인 MRS medium(16)을 사용하였고, 재생을 위해서는 MRS medium에 10% sucrose, 2.5% gelatin, 6mM MgCl₂, 6mM CaCl₂을 첨가한 재생배지를 사용하였다. 균을 세척하는데 사용된 완충액은 20mM HEPES buffer(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid, pH 7.0, Sigma Chemical Co.)이며 protoplast를 삼투압으로부터 보호하기 위해 20mM HEPES buffer에 1M sucrose를 가하여 protoplast forming buffer(PFB)로 사용하였다. Electrofusion시에 7mM HEPES buffer에 272mM sucrose와 1mM MgCl₂를 첨가한 electrofusion buffer(pH 7.4)를 이용하였다(17). Protoplast 형성을 이용한 용균 효소로는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, 63178 U.S.A.)의 lysozyme과 mutanolysin(endo-N-acetyl muramidase, 6,080units/mg solid)을 사용하였으며, 각종 항생제(kanamycin, streptomycin, lincomycin, rifampicin)와 gelatin 등은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였고, 그 외 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

항생제 내성변이주의 분리

Protoplast 융합에 의해 생성된 융합주를 식별하기 위하여 항생제 내성 변이주를 spontaneous mutation 방법(15)으로 분리하였다. 즉 항생제가 들어있지 않은 MRS 배지에서 생육한 *L. acidophilus* 88과 *L. bulgaricus* IFO 13953 균주를 streptomycin, kanamycin, lincomycin 등이 각각 0.5mg/ml, 100µg/ml, 1µg/ml 들어있는 MRS 배지에 접종하여 37°C에서 배양한 후, 생성된 colony를 streptomycin, kanamycin, lincomycin 등이 각각 1.0mg/ml, 200µg/ml, 2µg/ml 들어있는 MRS broth에 접종하여 배양하였다. 이와 같이 streptomycin의 경우 0~2mg/ml, kanamycin의 경우 0~600µg/ml, lincomycin의 경우 0~5µg/ml 까지 점진적으로 항생제의 농도를 높혀 가면서 상기의 방법을 반복함으로써 항생제 내성변이주를 분리하였다.

Protoplast 형성 및 재생

Protoplast의 형성은 Jun 등의 방법(18)에 따라 Fig. 1과 같이 행하였다. 균을 MRS broth에 접종한 후 37°C에서 8~12시간 동안 정지배양한 후, 4,000×g에서 10분간 원심분리하여 집균한 뒤 200mM HEPES buffer로 2회 세척한 다음, PFB에 현탁하여 *L. bulgaricus* IFO 13953 DMS 200µg/ml 농도의 lysozyme과 10µg/ml 농도의 mutanolysin을 첨가하였으며, *L. acidophilus* 88은 125µg/ml의 lysozyme을 첨가하여 37°C에서 30분간

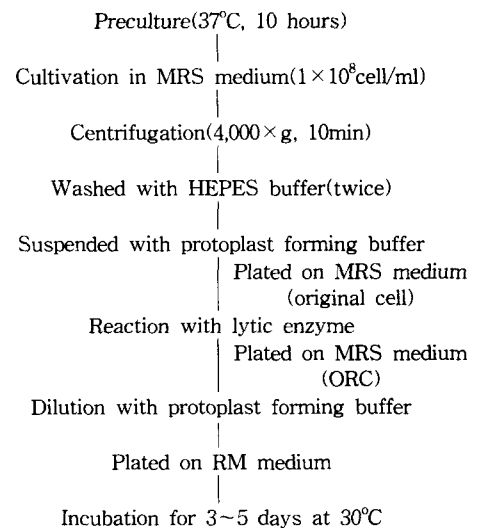


Fig. 1. Procedure of protoplast formation and regeneration.

반응을 시켰다. Protoplast 현탁액을 증류수로 희석하고 MRS배지에 도말하여 얻은 osmotic resistant cell(ORC)을 계산하여 protoplast 형성율을 구하였다. Protoplast 재생은 protoplast 현탁액을 PFB로 희석하여 재생배지에 도말한 후 30°C, 3~5일간 배양하였다.

$$\text{Protoplast formation(\%)} = \frac{\text{No. of original cells} - \text{No. of ORC}}{\text{No. of original cells}} \times 100$$

(ORC : Osmotic resistant cells)

PEG를 매개로 한 protoplast의 융합

Protoplast 융합 과정은 Hopwood와 Wright의 방법(19)을 변형시켜 Fig. 2와 같이 행하였다. 서로 다른 항생제 marker를 가진 두 protoplast 현탁액 동량을 섞어서 원심분리하여 0.1ml의 PFB에 현탁시킨 후, polyethylene glycol(PEG)용액 0.9ml을 첨가하였다. PEG 작용을 멈추기 위해 PFB를 가하여 원심분리한 뒤 동일 buffer에 현탁하고 적당히 희석하여, 재생배지에 두 균주의 유전적 marker인 streptomycin, kanamycin, lincomycin 모두 포함된 선택배지(selective medium)와 포함되어 있지 않은 재생배지(regeneration medium)에 각각 도말하여 3~5일간 배양하였다. 융합 효율은 다음과 같이 계산하였다.

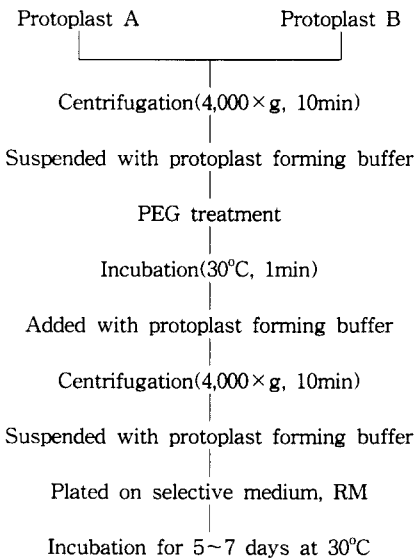


Fig. 2. Procedure of protoplast fusion for PEG mediated chemical induction.

Fusion yield(%) =

$$\frac{\text{CFU on selective medium}}{\text{CFU on regeneration medium}} \times 100$$

(CFU : Colony Forming Unit)

Transmission electron microscope(TEM)의 관찰

*L. acidophilus*와 *L. bulgaricus*의 protoplast를 PEG 처리에 의해 세포융합이 일어나는 과정을 Park 등의 방법(20)으로 전자현미경하에서 관찰하였다.

Electrofusion에 미치는 제반 조건 검토(7-9)

서로 다른 항생제 내성을 나타내는 두 protoplast 현탁액 동량을 섞어 원심분리하여 electrofusion buffer (pH 7.4)로 2번 세척한 다음 동일 buffer에 현탁시켜 400μl을 취하여 cuvette(BTX disposable cuvette P/N 620, 2mm gap)에 넣었다. 전기융합기(BTX Electro-cell manipulator 600)에 cuvette을 장착하고 charging voltage, capacitance, resistance 값을 입력한 다음 방전시켰다. 방전이 끝난 후, cuvette에서 sample을 채취하여 적당히 희석하여 항생제가 포함된 재생배지와 항생제가 들어있지 않은 재생배지에 각각 도말하여 30°C에서 3일간 정치배양하였다.

Electrofusion에 미치는 방전시간의 영향을 검토하기 위해 전압을 100V로 고정시킨 다음 방전시간을 50, 100, 150, 200, 250msec로 달리하여 electrofusion을 행하였으며, 상기의 실험에서 결정된 방전시간을 기준으로 전압을 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5KV/cm로 달리하여 electrofusion에 미치는 방전시간의 영향에 대하여 검토하였다. Electrofusion에 미치는 2가 양이온의 영향을 검토하기 위해 electrofusion 최적 방전시간 및 전압하에서 2가 양이온 중 Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺의 농도를 1, 3, 5mM로 달리하여 electrofusion buffer에 첨가하였으며, electrofusion 최적 조건하에서 electrofusion buffer에 PEG 4000을 0, 10, 20, 30, 40%(w/v) 되도록 첨가하여 electrofusion에 미치는 PEG의 영향을 검토하였다.

결과 및 고찰

항생제 내성변이주의 분리

Protoplast 융합에 의해 생성된 융합균주를 식별하는 방법에는 영양요구성 marker에 의한 방법(21), 항생제 내성 marker에 의한 방법(22), 양자의 병행법(23)

Table 1. Antibiotic resistance patterns of *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* 88 and their mutant strains

Antibiotics	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. bulgaricus</i> mutant	<i>L. acidophilus</i> 88	<i>L. acidophilus</i> 88 mutant
Streptomycin(mg/ml)				
0.5	-	+	-	-
1	-	+	-	-
2	-	+	-	-
Kanamycin(μg/ml)				
200	-	-	+	+
300	-	-	+	+
400	-	-	+	+
500	-	-	-	+
600	-	-	-	+
Lincomycin(μg/ml)				
3	-	+	-	-
4	-	+	-	-
5	-	+	-	-

등이 있으나 그 중에서 항생제 내성 marker에 의한 방법을 이용하기 위해 spontaneous mutation방법(15)으로 모균주인 *L. bulgaricus*와 *L. acidophilus* 88의 항생제 내성변이주를 분리하였다. Table 1에서와 같이 streptomycin(2mg/ml)과 lincomycin(5μg/ml)에 내성을 나타내는 *L. bulgaricus* 변이주와 kanamycin(600μg/ml)에 내성을 가지는 *L. acidophilus* 변이주를 분리하였다.

Electrofusion에 미치는 제반 조건 검토

Electrofusion에 영향을 미치는 전기방전시간, 전압, 2가 양이온, PEG의 농도 등에 대해 검토하였으며, 융합 효율은 PEG를 매개로 한 protoplast의 융합 효율과 동일한 방법으로 계산하였다.

방전시간의 영향

Electrofusion에 미치는 방전시간의 영향에 대하여 검토하였다. 전압을 100V로 고정시킨 다음 방전시간을 50, 100, 150, 200, 250, 300msec로 달리하였을 때, Fig. 3에서와 같이 방전시간이 50msec일 때 보다 100 msec일 때가 융합 효율이 더 높았으며, 방전시간이 길어질수록 오히려 융합 효율이 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 protoplast가 전자장에 노출되는 시간이 짧은 경우, 융합을 일으키기에 충분한 시간이 되지 못하여 융합 효율이 떨어지며, 이와는 반대로 protoplast가 전기장에 오래 노출되면 전기충격에 의해 사멸함으로써 융합 효율이 감소하는 것으로 사료되었다.

전압의 영향

방전시간을 100msec로 고정한 다음 전압을 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5KV/cm로 걸어 주었을 때 Fig. 4에서와 같이 0.5KV/cm일 때 융합 효율이 가장 양호하였으며, 전압을 강하게 걸어줄수록 융합 효율은 급격히 감소하

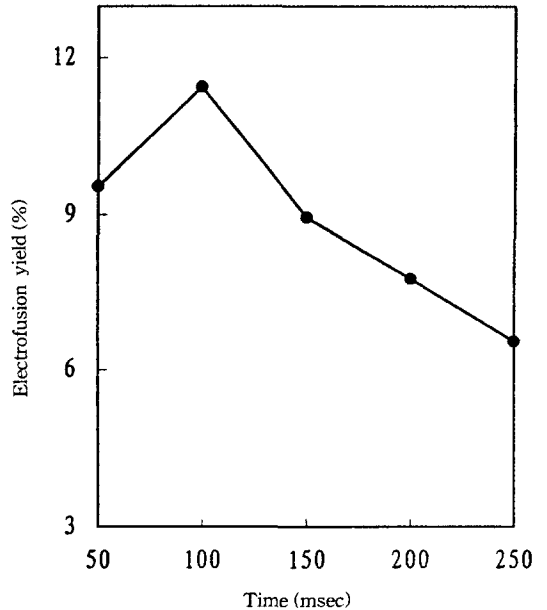


Fig. 3. Effect of electroporation time on the electrofusion between *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*.

였다.

이상에서와 같이 방전시간이 길어지고 전압이 높을수록 융합 효율이 감소하는 것은 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*에 대한 electrofusion 결과(8)와 일치하는 것으로 이하의 실험에서는 융합조건을 효율이 가장 양호한 100msec, 0.5KV/cm로 고정하여 사용하였다.

2가 양이온의 영향

2가 양이온의 융합에 미치는 영향을 검토하기 위하여 PFB의 Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ 농도를 달리하여 첨가한 후 electrofusion에 미치는 영향을 검토한 결과, Table 2

에서와 같이 대체적으로 2가 양이온의 농도가 증가할수록 융합 효율이 감소하였으나 1mM의 Mg^{2+} 은 control에 비해 융합 효율이 약간 증가하였다.

PEG의 영향

PEG는 지질 융합제에 비하여 무독성이며 지질 단층막의 표면전위를 수백 mV 까지 저하시키므로, 전위

감소에 의해 세포의 응집이 일어나게 된다(24). Fig. 5에서와 같이 PEG 4000의 농도가 높아질수록 융합 효율이 증가하였으나 40%에서는 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 현상은 PEG에 현탁된 protoplast가 직류에 노출되면, lysis가 일어나지 않도록 PEG에 의해 보호되어진다(8)는 보고와 일정 농도 이상의 PEG 용액을 사용하면 접도가 높아 protoplast를 신속하게 coating하지 못하므로 융합빈도가 낮아진다는 보고(25)와 관련이 있을 것으로 사료되었다.

PEG-mediated fusion과 electrofusion의 융합 효율 비교

Electrofusion에 의한 융합 효율과 PEG 매개에 의한 융합 효율을 비교했을 때, Table 3에서와 같이 electrofusion과 chemical fusion은 융합 효율에 있어서 거의 차이가 없었으나 이 두가지 방법을 혼합하여 실시했을 때 융합 효율이 크게 증가함을 알 수 있었다. 즉 electrofusion buffer에 PEG 4000의 최종 농도가 10, 20, 30% 되도록 첨가했을 때 PEG 농도 의존적으로 융합 효율이 증가하였으며, PEG 30%에서 약 1.5배의 융합 효율이 증가하였다.

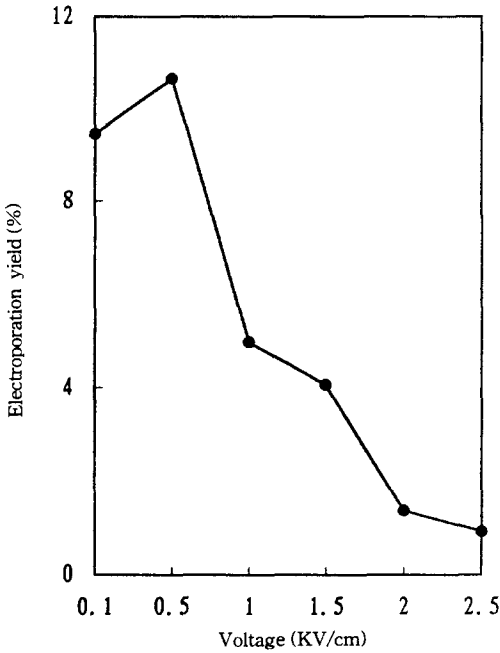


Fig. 4. Effect of electroporation voltage on the electrofusion between *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*.

Table 2. Effect of the divalent cations on electrofusion yield

Bivalent cation	Concentration(mM)	Electrofusion yield(%)
None	0	10.3
Ca^{+2}	1	8.4
	3	7.0
	5	6.2
Mg^{+2}	1	11.0
	3	8.3
	5	7.6
Mn^{+2}	1	6.3
	3	5.3
	5	4.1

Electroporation was carried out in electrofusion buffer containing various divalent cations at the concentrations indicated

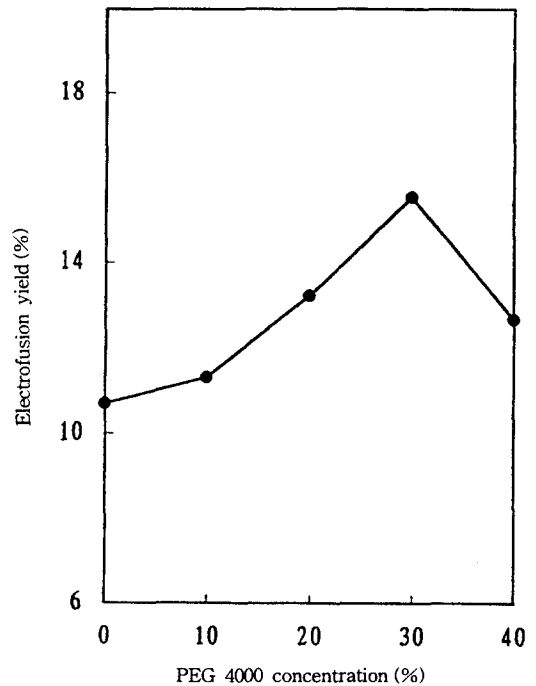


Fig. 5. Effect of PEG concentration on the electrofusion between *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*.

Table 3. Comparison of protoplast fusion yield between *L. acidophilus* 88 and *L. bulgaricus* via electrofusion or chemical fusion

Fusion method	Fusion yield(%)
Electrofusion	10.7
Electrofusion and PEG 10%	11.3
Electrofusion and PEG 20%	13.2
Electrofusion and PEG 30%	15.5
Electrofusion and PEG 40%	12.6
Chemical fusion	9.3

전자현미경적 관찰

*L. bulgaricus*와 *L. acidophilus*의 protoplast를 PEG 처리에 의해 세포융합이 일어나는 과정을 TEM으로 관찰하였다. 두 균의 원형질체가 PEG 처리에 의해 접촉하여 접촉부위(contact zone)를 형성하고 있고(Fig. 6(A)), 이러한 접촉부위는 융합과정이 진행됨에 따라 원형질막이 부분적으로 파괴되어 원형질 혼합(fusing stage)이 일어나는 것으로 생각된다(Fig. 6(B, C)). 이렇게 해서 얻어진 융합주들을 수차례 계대배양하여 광학현미경으로 관찰해 본 결과 본래의 모균주와 유사한 간균이었다.

에 의해 생성된 융합주를 식별하기 위해 streptomycin (2mg/ml)과 lincomycin(5 μ g/ml)에 내성을 나타내는 *L. bulgaricus* 변이주와 kanamycin(600 μ g/ml)에 내성을 나타내는 *L. acidophilus* 88 변이주를 분리하였다. Electrofusion을 500V/cm, 100msec(49ohms, 2300 capacitance)에서 수행했을 때 가장 융합이 잘 일어났으며 전기장의 세기와 시간이 증가할수록 융합 효율이 현저히 감소하였다. 2가 양이온은 대체적으로 융합 효율을 감소시키는 경향을 나타내었으나 1mM MgCl₂에서는 융합 효율이 약간 증가하였다. PEG 4000을 electrofusion buffer에 30% 되도록 첨가했을 때 가장 양호한 융합 효율을 나타내었으며 그 이상에서는 오히려 융합 효율이 감소하였다. Electrofusion법과 PEG 매개에 의한 융합법의 융합 효율을 비교한 결과, 거의 비슷한 융합 효율을 나타내었으나 electrofusion법과 PEG 매개에 의한 융합법을 혼합하였을 때 가장 양호한 융합 효율을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 기초과학연구소 학술연구조성

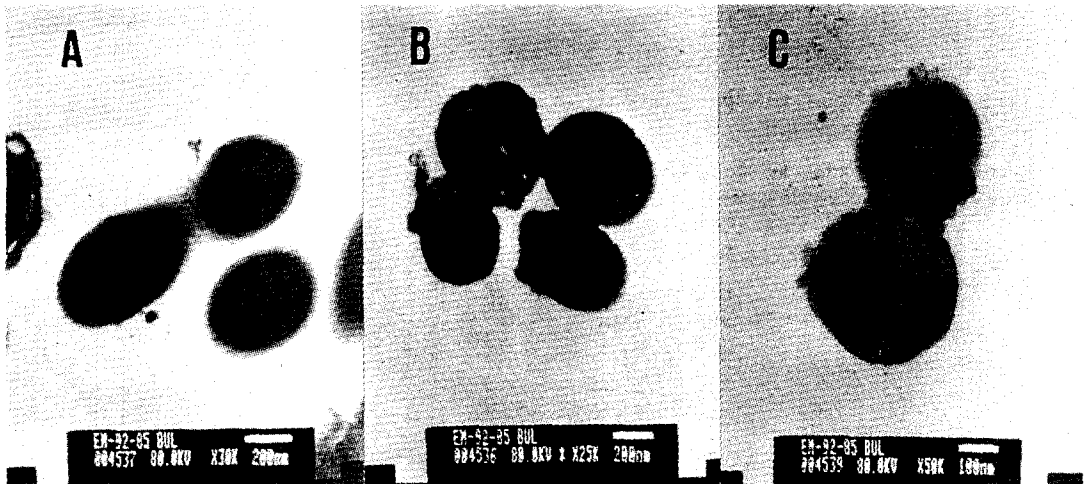


Fig. 6. Transmission electron micrographs of protoplast fusion between *L. bulgaricus* and *L. acidophilus*. (A) Contacting stage($\times 30,000$) (B) Initial fusion stage($\times 25,000$) (C) Final fusion stage($\times 50,000$)

요 약

균주개량 방법의 일환으로 electrofusion법을 이용하여 protease 활성, lipase 활성, 내열성, 내산성 등이 우수한 *L. bulgaricus*와 bacteriocin을 생산하는 *L. acidophilus*간의 융합조건을 검토하였다. Electrofusion

비(과제번호 : BSRI-94-4410)에 의한 연구결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

문 헌

1. Peberdy, J. F. : Protoplast fusion—a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganism.

- Enz. Microbiol. Technol.*, **2**, 23(1980)
2. Kao, K. N. and Michayluk, M. R. : A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, **115**, 355(1974)
 3. Fodor, K. and Alfoldi, L. : Fusion of protoplast of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 2147 (1976)
 4. Iwata, M., Mada, M. and Ishiwa, H. : Protoplast fusion of *Lactobacillus fermentum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 392(1986)
 5. Baek, Y. J., Yoo, M., Kim, Y. K., Bae, H. S. and Kim, H. U. : Studies on the protoplast fusion of *Lactobacillus casei*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 265(1986)
 6. Okamoto, T., Fujita, Y. and Irie, R. : Fusion of protoplast of *Streptococcus lactis*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2675(1983)
 7. Natori, Y., Kano, Y. and Imamoto, F. : Genetic transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *Biochimie*, **72**, 265(1990)
 8. Reed, W. M. : Protoplast fusion of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus lactis* via electric field or chemical induction. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **33**, 287(1987)
 9. McIntyre, D. A. and Harlander, S. K. : Genetic transformation of intact *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* by high-voltage electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 604(1989)
 10. Mercenier, A. and Chassy, B. M. : Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie*, **70**, 503(1988)
 11. Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. : Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1808(1983)
 12. 최신양 : 김치발효와 보존성. *식품과학*, **21**, 19(1988)
 13. 한홍의, 임종락, 박현근, 문상식, 박영선, 주홍택 : 김치 부패시 *Brettanomyces custersii*와 *Klebsiella oxytoca*의 편리공생. *인하대학교 기초과학연구소 논문집*, **11**, 171(1990)
 14. Ha, S. S. : Studies on the effects of polygalacturonase and film-forming microbes on the soft-deterioration of the pickled vegetables. *Bulletin of the Scientific Research Institute*, **5**, 139(1960)
 15. Muriana, P. M. and Klaenhammer, T. R. : Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 553(1987)
 16. De Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. : A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130(1960)
 17. Hashiba, H., Takiguchi, R., Ishii, S. and Aoyama, K. : Transformation of *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti* with plasmid pLHR by electroporation. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1537(1990)
 18. Jun, H. K., Heo, K., Jo, Y. B. and Bail, H. S. : Studies on the protoplast formation and regeneration of *Lactobacillus acidophilus* 88. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 143(1994)
 19. Hopwood, D. A. and Wright, H. M. : Bacterial protoplast fusion : Recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 307(1978)
 20. Park, H. J., Baik, H. S., Song, J. C. and Jun, H. K. : Studies on the protoplast fusion between *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 107(1993)
 21. Fodor, K. and Alfoldi, L. : Fusion of protoplast of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2147(1976)
 22. Kang, Y., Kim, J. H. and Ryu, D. Y. : Protoplast fusion of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2221 (1987)
 23. Okamoto, T., Fujita, Y. and Irie, R. : Fusion of protoplast of *Streptococcus lactis*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2675(1983)
 24. Cocconcelli, P. S., Morrelli, L., Vescovo, M. and Bottazzi, V. : Intergeneric protoplast fusion in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **35**, 211(1986)
 25. Hopwood, D. A. and Wright, H. M. : Protoplast fusion in *Streptomyces* : Fusions involving ultraviolet-irradiated protoplast. *J. Gen. Microbiol.*, **126**, 21(1981)

(1995년 10월 18일 접수)