

*Lactobacillus casei*와 *Lactobacillus delbrueckii*간의 Protoplast 융합에 관한 연구

전홍기* · 김미경 · 백형석

부산대학교 미생물학과

Studies on the Protoplast Fusion between *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii*

Jun, Hong-Ki*, Mi-Gyeong Kim and Hyung-Suk Baik

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract — Protoplast fusion between lincomycin resistant *Lactobacillus casei* KCTC 1121 and rifampicin resistant *Lactobacillus delbrueckii* JK-414 was attempted to obtain the improved strains. Protoplasts of *L. casei* and *L. delbrueckii* were produced by mutanolysin digestion at 42°C for 15 min. *L. casei* cells were converted to protoplasts by treating with 5 µg/ml of mutanolysin in 20 mM HEPES buffer (pH 7.0) containing 0.75 M sucrose at the middle logarithmic growth phase. In case of *L. delbrueckii* 1.0 M sucrose was used osmotic stabilizer. Regeneration of protoplast in both strains was efficiently accomplished on the regeneration medium containing 10% sucrose, 6 mM MgCl₂, 6 mM CaCl₂, and 2.5% gelatin. Protoplast fusion between *L. casei* and *L. delbrueckii* was carried out in the presence of 40% of PEG 4,000. The frequency of protoplast fusion was found to be about 3.2×10^{-4} . Acid production of *L. casei* was better than that of *L. delbrueckii*. Among fusants, F23 and F35 exhibited excellent lactic acid production. F23 and F24 exhibited the improved proteolysis compared to that of the parent strains and they had twice as much as DNA content of the parents.

유가공업을 포함한 발효공업에 있어서 보다 안정하며 우수한 형질을 가진 균주를 개발하기 위해 최근에는 protoplast 융합이 널리 이용되고 있으며, 이 방법은 유산균과 같이 유전물질 교환기술이 잘 발달되지 않은 세균의 유전학을 연구하는데 이용되고 있을 뿐만 아니라 산업적 이용세균의 균주 개량에 비교적 쉽고 유용한 기술로 평가되고 있다(1).

*Lactobacillus*속의 protoplast 형성은 1873년 Neujahr 등(2)에 의해 연구가 처음으로 시작되었으며, 1974년 Kao와 Michayluk이 polyethylene glycol (PEG)과 Ca²⁺이 융합제로 유효하다고 보고한 이래(3), 융합 유도물질인 PEG를 이용한 protoplast 융

합연구가 활발히 이루어지고 있으며, 세균의 경우에는 *Bacillus megaterium*의 protoplast 융합과(4) 유산균의 protoplast 융합에 관한 연구 등이 이루어졌다(5-8). 유산간균은 lysozyme에 대한 감수성이 약하여 protoplast를 형성하는데 많은 어려움이 있었다. 그러나 *Streptomyces globisporus*로부터 endo-N-acetylmuramidase(mutanolysin)가 분리되어 원형질체 형성에 사용되고 있으며, 또한 근래에 유산구균의 원형질융합이 보고되어(7-9) 유산간균의 경우도 이 연구들을 토대로 하여 세포융합에 대한 연구가 이루어지고 있다(5, 6). *Lactobacilli*는 chain상의 미호기성 간균으로서 유당 자화능력이 생육과 젖산의 생성에 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러나, 일부 유산균에서는 유당 분해능이 저조하며 환경조건에 따라 유당 분해능이 달라지게 되므로 유당 분해능의 강화와 안정화가 요망된다고 하겠다. 유당으로부터의 유산 생성능을 높이기

Key words: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* JK-414, protoplast, regeneration, protoplast fusion

*Corresponding author

위해서는 lactase의 활성이 높아야 하며, protease의 활성이 높아서 적당한 정도의 유단백질 분해가 일어나야 한다. 유산만을 생성하는 정상 유산 발효균 중 *L. casei*는 한국인이 입맛에 맞는 액상 요구르트 및 cheese의 제조시 starter로 이용되는데 젖산 생성능이 우수하지만 protease 활성이 낮은 단점이 있고 *L. delbrueckii*는 다른 유산균과 달리 발효유 제조에는 거의 쓰이지 않고 간장 등 발효 식품에 주로 이용되는데 protease의 활성이 높은 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 이들 두 균주의 성질 중 장점만을 가지고 있는 우량한 균주의 검색과 개발을 위해, *L. casei*와 *L. delbrueckii*의 protoplast 형성, 재생방법을 검토하였으며, 이를 토대로 원형질체의 융합조건을 검토함과 아울러 융합주와 모균주간의 생리적 성질을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

Lincomycin에 내성을 나타내는 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* KCTC 1121과 *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047로부터 자외선 조사에 의해 유도된 rifampicin 내성변이주 *L. delbrueckii* JK-414를 사용하였다.

배지

유산균의 생육과 protoplast를 형성하기 위해서 MRS medium을 사용하였고(10) 재생을 위해서는 MRS medium에 sucrose 10%, gelatin 2.5%, $MgCl_2$ 6 mM, $CaCl_2$ 6 mM을 첨가한 배지(이하 재생배지)를 사용하였다. 융합주의 생리학적 성질을 검토하기 위해 산 생성능과 protease test에서는 10% skim milk를 사용하였으며, β -galactosidase assay에서는 beef extract와 glucose를 넣지 않고 당을 lactose로 한 MRS broth에 균을 배양하였다.

시약

Protoplast 형성을 위한 용균 효소로는 mutanolysin (Sigma Chemical Co.)을 사용하였고, MRS medium은 Difco사 제품을 사용하였다. 균을 세척하는데 20 mM HEPES buffer(pH 7.0)를 사용하였으며(11), HEPES는 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다.

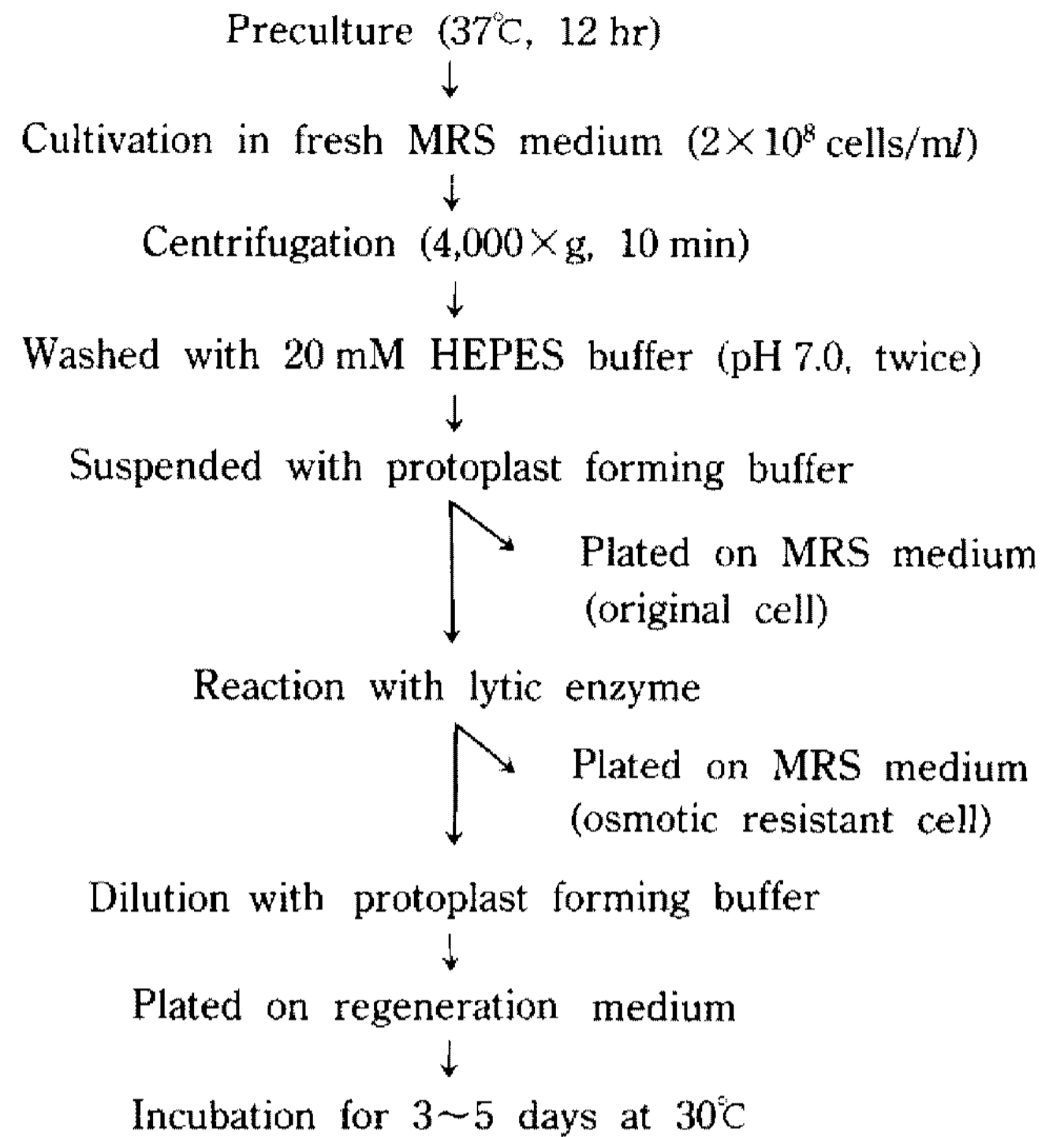


Fig. 1. Procedure of protoplast formation and regeneration.

삼투압 안정제로서 sucrose를 20 mM HEPES buffer에 가하여 protoplast forming buffer(이하 PFB라 약함)로 사용하였다. Protoplast 융합에 사용한 polyethylene glycol(PEG)은 Junsei Chemical Co. 제품으로 PEG를 PFB에 녹여 융합 촉진제로 사용하였다.

Protoplast의 형성 및 재생

배양한 균을 원심분리(4,000×g, 10분)하여 세척한 뒤 PFB에 현탁하였다. 용균효소를 녹인 buffer를 균 현탁액에 가하여 반응시켰다. Protoplast의 형성과 재생과정을 요약하면 Fig. 1과 같았다. Protoplast 형성은 광학현미경으로 구형 세포를 관찰함으로써 확인하였고(×1,000) 효소반응 후의 반응액 0.2 ml를 물 0.8 ml에 현탁해서 spectrophotometer를 사용하여 650 nm에서 흡광도 감소를 측정하는 방법과 protoplast 현탁액을 물로 희석한 뒤 MRS agar에 도말하여 얻은 osmotic resistant cell(ORC)을 계산하는 방법과 병용하여 protoplast 형성율을 구하였다. 그리고 protoplast 재생은 protoplast 현탁액을 PFB로 희석하여 재생배지에 도말한 후 30°C에서 3~5일간 배양하였다.

Protoplast의 융합

Protoplast 융합과정은 Fig. 2와 같았다. 즉 서로

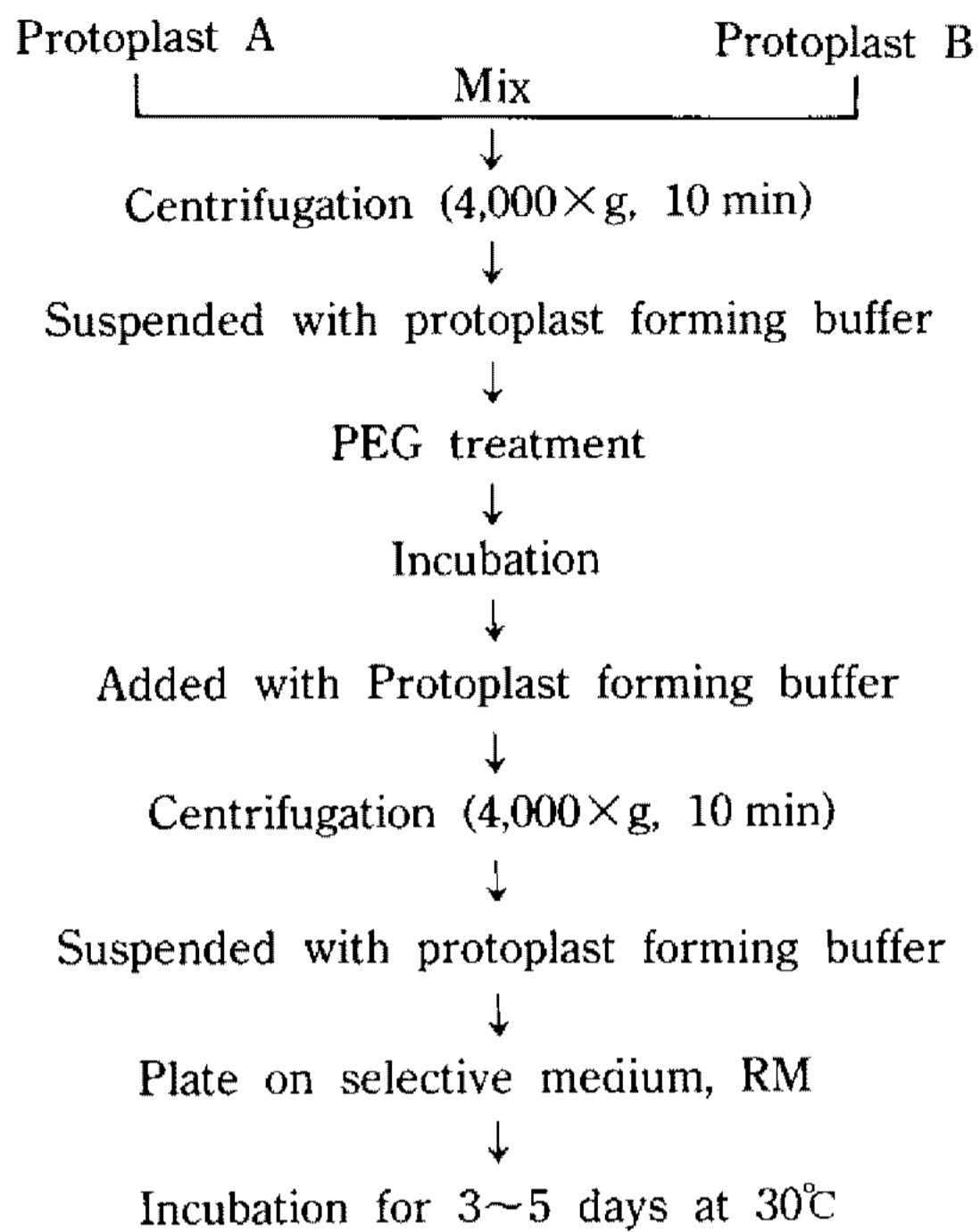


Fig. 2. Procedure of protoplast fusion.

다른 항생제 내성을 나타내는 두 protoplast 현탁액 동량을 섞어서 원심분리(4,000×g)하여 침전된 protoplast에 PFB 0.1 ml로 현탁하고, PEG 용액 0.9 ml를 첨가하여 30°C 1분간 반응시킨 다음 즉시 PFB에 현탁하여 다시 원심분리하였다. lincomycin과 rifampicin을 포함한 재생배지와 포함되어 있지 않은 재생배지에 각각 도말하여 30°C에서 5~7일간 배양한 후 나타난 집락을 분리하여 특성을 검토하였다.

유전적 안정성

Seu 등(12)의 방법에 따라 융합주의 유전적 안정성을 검토하였다. 즉, 수차례 계대배양 후 segregation되지 않고 안정한 융합주를 완전배지에 도말한 다음, 나타난 colony를 다시 완전배지와 선택배지에 toothpicking하여 완전배지와 선택배지에서 생육된 colony의 비로써 유전적 안정성을 조사하였다.

DNA 함량 측정

DNA는 Delley 등(13)의 방법으로 추출하였고, 정량은 Gerhardt 등(14)의 방법으로 행하였다. 즉, 먼저 cell을 원심분리하고 1 M NaCl로 세척한 뒤 원심분리하여 다시 TE[10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1 mM EDTA] buffer로 씻고 37°C에서 1시간 동안 mutanolysin(200 µg/ml)을 처리하였다. Sodium dodecyl sulfate, EDTA, proteinase K를 각각 최종농도 0.1%, 75

mM, 200 µg/ml로 첨가하여 65°C에서 4시간 동안 반응시켰으며, phenol로 DNA를 추출하고 ethanol로 침전시켰다. 침전된 DNA를 TE buffer에 녹여 RNase A(200 µg/ml)로 처리한 다음 chloroform으로 추출하고 ethanol로 재침전시켜 TE buffer에 녹였다. 1 cm의 light path를 가진 cuvette로 흡광도를 측정할 때 DNA 함량계산식은 다음과 같았다.

$$\text{DNA mg/ml} = A_{260}/20$$

$$A_{260} : 260 \text{ nm에서의 OD}$$

산 생성 능력

각 균주의 산 생성 능력을 비교하기 위해 10% skim milk에 각 균주를 starter로 하여 발효시켰을 때 생성되는 젖산의 양을 Baek 등(15)의 방법으로 측정하였으며 acidity는 titrable lactic acid의 전체 양으로 표시하였으며 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Acidity}(\%) = \frac{0.1 \text{ N NaOH ml} \times 0.009 \times 100}{\text{sample 무게}}$$

β-Galactosidase 활성

β-Galactosidase 활성은 Okamoto 등(16)의 방법을 사용하였다. 즉, cell을 원심분리하여 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 두번 세척한 뒤 동일 buffer로 현탁하고 toluenized cell을 만든 뒤 0.1 ml를 취하여 12 mM o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) 0.2 ml와 섞어 37°C에서 반응시켰다. 충분한 노란색을 나타내었을 때 0.5 M Na₂CO₃ 2 ml를 첨가하여 반응을 중지시킨 뒤 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protein 정량은 Lowry법(17)을 사용하였으며 비활성은 효소단백질 1 mg에 의하여 1분 동안 유리된 o-nitrophenol의 양을 표준곡선으로부터 계산하여 nmol로 표시하였다.

Protease 활성

Protease의 활성은 Anson-萩原법(18)에 의해 측정하였다. 즉, 2% casein 용액(0.02 M potassium phosphate buffer, pH 7.0) 1 ml에 조효소액 1 ml를 가하여 37°C 항온조에 3시간 반응시킨 후 0.4 M trichloroacetic acid 2 ml를 첨가하여 효소반응을 정지시켰다. 반응액 1 ml에 0.44 M Na₂CO₃ 용액 5 ml와 2배로 희석한 folin 시약 1 ml를 첨가한 후 37°C, 20분간 발

색시켜 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 L-tyrosin 표준액의 표준곡선으로부터 tyrosin 함량($\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

Protoplast의 형성

생육시기 : Lytic enzyme으로 mutanolysin을 사용하여 protoplast를 보다 효과적으로 만들기 위하여 growth cycle내에서 가장 좋은 시기를 선택하였다. Fig. 3에서처럼 대수 증식기 중반에서 protoplast 형성이 양호하였다. 그러나 배양시간을 정지기까지 연장하였을 경우, protoplast 형성율은 감소하였는데 이

는 세포벽의 구조가 완전하게 형성되어 lytic enzyme이 세포벽 성분에 잘 작용하지 못하기 때문인 것으로 추정된다. 이러한 결과는 Lee-Wickner 등의 보고(19)와 일치하였다.

세포벽 분해효소의 농도 : *L. casei*와 *L. delbrueckii*에 대한 protoplast 형성율을 조사하기 위해 mutanolysin을 농도별로 가한 결과, Fig. 4와 같이 42°C에서 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상일 때 두 균 모두 protoplast 형성율이 우수하였다. Lee-Wickner 등(19)에 의하면 균주에 따라 mutanolysin 단독, 또는 lysozyme과 혼합하여 사용하는 것이 protoplast 형성에 양호하다고 보고하였다. 본 연구에서는 혼합사용이 별 효과가 없었기 때문에 mutanolysin의 농도를 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 고정하여 사용하였다.

삼투압 안정제 : Protoplast는 삼투압에 민감하므로 안정제로서 sucrose가 주로 쓰인다. Fig. 5와 같이 *L. casei*는 sucrose가 0.75 M~1.0 M일 때, *L. delbrueckii*는 1.0 M일 때 protoplast 형성율이 높았다. 이것은 sucrose가 삼투압 안정제로서만이 아니라 세포벽 가수분해의 자극제 역할도 하는 것(20)으로 해석되는데 이러한 결과는 Baek 등이 sucrose 농도가 1 M일 때 protoplast 형성이 잘 되는 것으로 보고한 것(21)과 유사하였다.

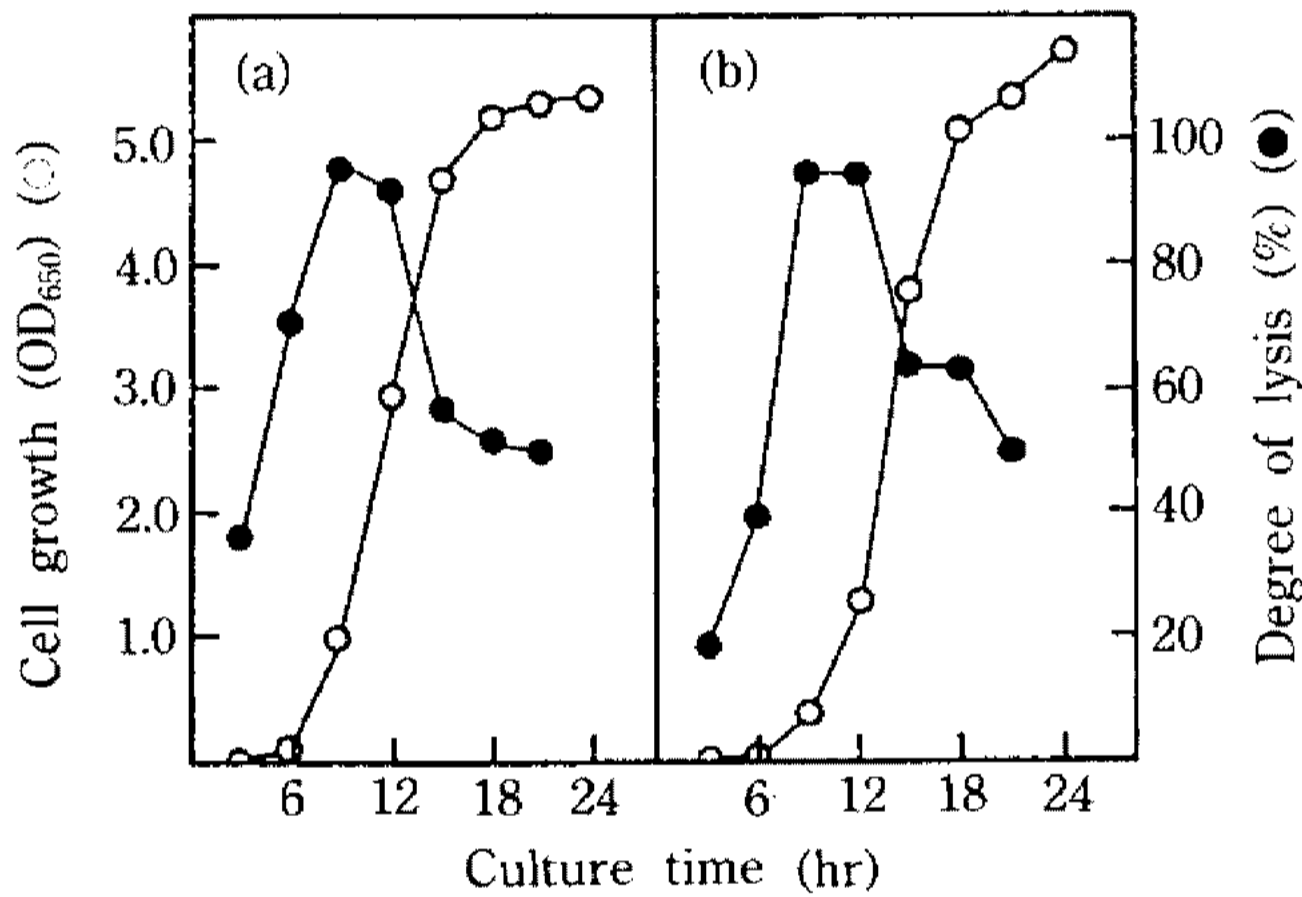


Fig. 3. Effect of growth phase on protoplast formation of (a) *L. casei* KCTC 1121 and (b) *L. delbrueckii* JK-414.

Protoplast의 재생

효소 처리시간 : Table 1, 2에서와 같이 *L. casei*와

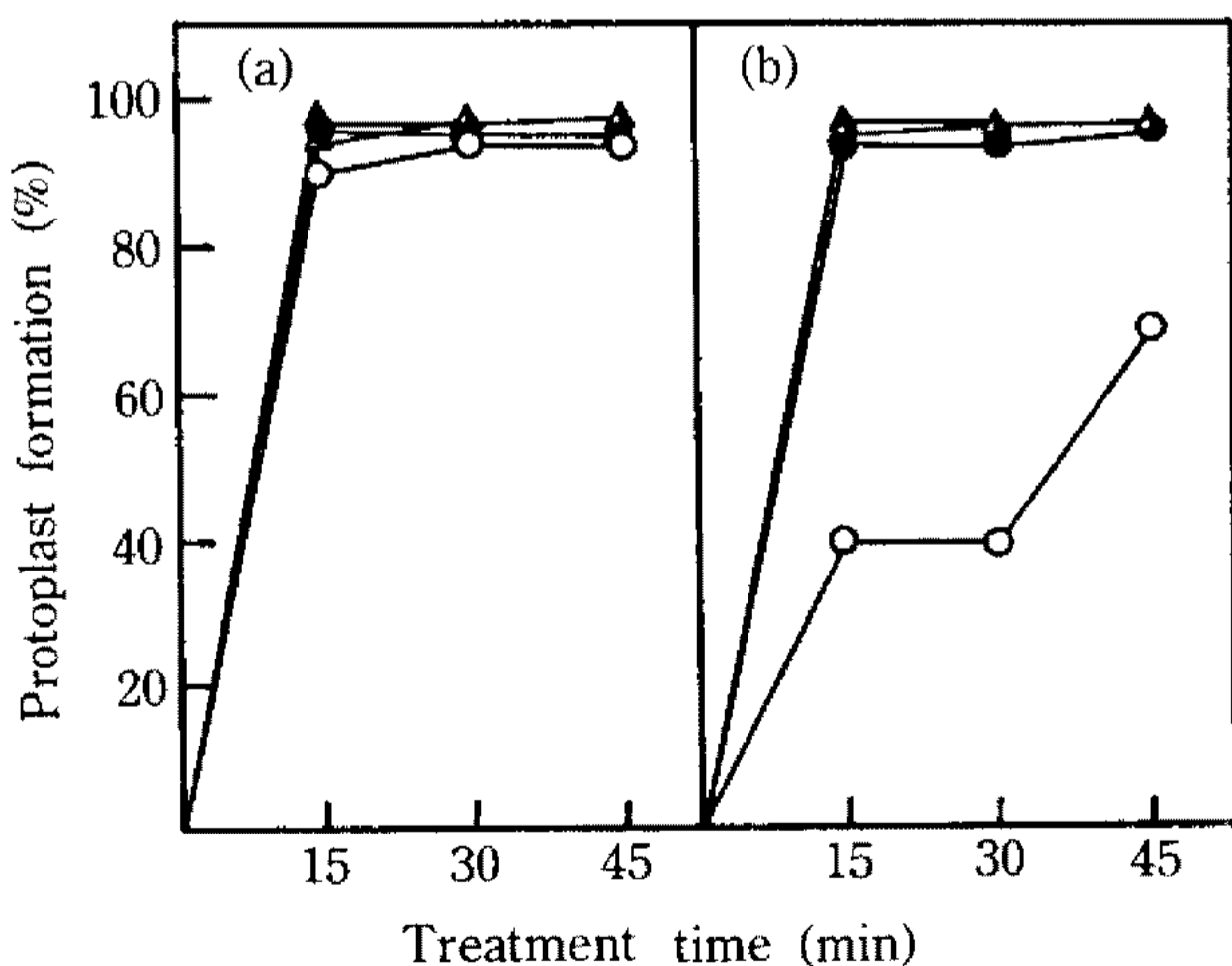


Fig. 4. Effect of mutanolysin concentration on protoplast formation of (a) *L. casei* KCTC 1121 and (b) *L. delbrueckii* JK-414.

○; mutanolysin 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ○; mutanolysin 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, △; mutanolysin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ▲; mutanolysin 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$

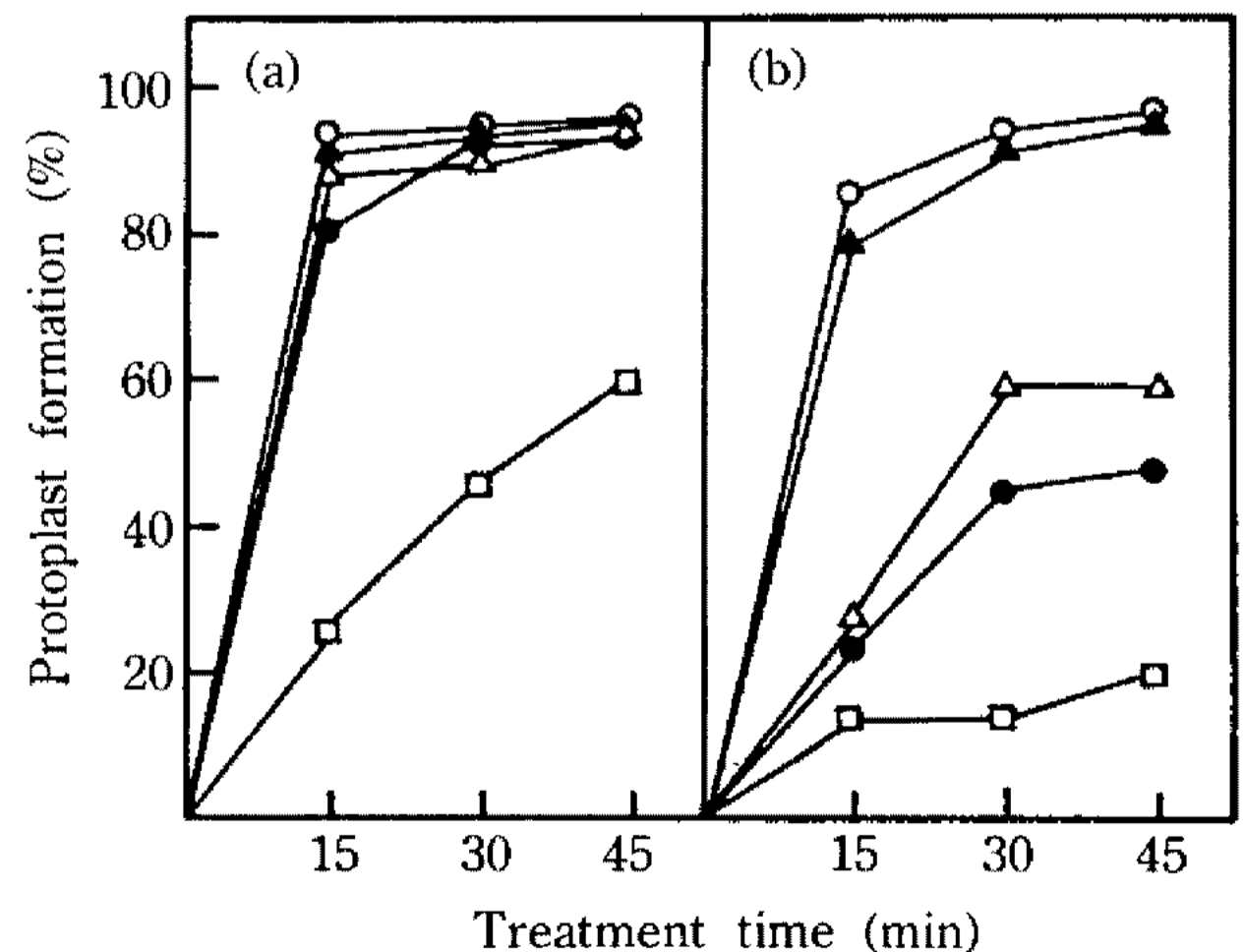


Fig. 5. Effect of the sucrose concentration on protoplast formation of (a) *L. casei* KCTC 1121 and (b) *L. delbrueckii* JK-414.

□; none, ●; sucrose 0.25 M, △; sucrose 0.5 M, ▲; sucrose 0.75 M, ○; sucrose 1.0 M

Table 1. Effect of the enzyme treatment time on the formation and regeneration of protoplasts of *L. casei* KCTC 1121

Treatment time (min)	No. of regenerated cells (CFU*/ml)	No. of ORC** (CFU/ml)	Frequency of protoplasts (%)	Frequency of regeneration (%)
15	9.1×10^7	1.4×10^7	97.6	13.6
30	1.8×10^7	1.0×10^7	98.3	1.4
45	1.0×10^7	5.4×10^6	99.1	0.8

No. of initial cells was 5.8×10^8 ml.

The enzyme concentration was mutanolysin 5 μ g/ml.

*CFU; colony forming unit

**ORC; osmotic resistant cell

Table 2. Effect of the enzyme treatment time on the formation and regeneration of protoplasts of *L. delbrueckii* JK-414

Treatment time (min)	No. of regenerated cells (CFU/ml)	No. of ORC (CFU/ml)	Frequency of protoplasts (%)	Frequency of regeneration (%)
15	1.0×10^8	3.3×10^7	95.7	9.1
30	6.5×10^7	2.8×10^7	96.4	5.0
45	1.8×10^7	8.0×10^6	99.0	1.3

No. of initial cells was 7.7×10^8 ml.

The enzyme concentration was mutanolysin 5 μ g/ml.

Table 3. Effect of osmotic stabilizers on the regeneration of protoplasts of *L. casei* KCTC 1121 and *L. delbrueckii* JK-414

Sucrose (%)	MgCl ₂ (mM)	CaCl ₂ (mM)	Gelatin (%)	<i>L. casei</i> KCTC 1121	<i>L. delbrueckii</i> JK-414
1	0	0	0	4.0%	13.0%
10	0	0	0	6.4%	15.6%
20	0	0	0	6.3%	13.0%
30	0	0	0	4.0%	10.4%
10	0	0	0	5.2%	11.3%
10	6	0	0	7.1%	15.6%
10	12	0	0	4.6%	14.7%
10	24	0	0	5.8%	12.1%
10	6	0	0	5.9%	12.1%
10	6	6	0	10.1%	13.0%
10	6	12	0	7.3%	11.3%
10	6	24	0	7.3%	12.1%
10	6	0	0	12.1%	10.3%
10	6	6	1	16.5%	15.9%
10	6	6	2.5	18.7%	20.3%
10	6	6	5	17.5%	15.6%

소하였다. 이러한 결과들은 효소 처리시간이 길어지면 재생하는데 필요한 세포벽 primer를 남기지 않고 거의 완전히 가수분해시키기 때문인 것으로 생각되었으나(6) 높은 재생율을 얻기 위해서 효소 처리시간을 무조건 짧게 하는 것은 융합하는데 유리하지 않으므로 효소 처리시간을 protoplast 형성율과 재생율이 양호한 15분으로 하였다.

삼투압 안정제 : Protoplast를 PFB로 희석한 후 재생배지에 도달하여 3~5일 후 나타나는 colony를 선택하였다. 재생배지에 첨가하는 삼투압 안정제로서 sucrose, MgCl₂, CaCl₂, gelatin을 사용해 본 결과 Table 3과 같이 *L. casei*, *L. delbrueckii* 모두 sucrose 10%, MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 6 mM, gelatin 2.5%일 때 가장 좋은 재생율을 보였다.

Protoplast 융합 및 융합주의 생리학적 성질 검토

PEG 농도에 따른 영향 : Fig. 6에서 나타난 것처럼 protoplast 융합을 가장 잘 일으키는 PEG 4000의 농도는 40~50%였다. PEG 4000의 농도가 40%까지는 융합빈도가 계속 증가하였으나, 그 이후에는 거의 변화가 없었다. 이러한 결과는 *Lactobacillus*속과 *Streptococcus*의 경우 대개 40~50%의 PEG 4000과 PEG

*L. delbrueckii*는 효소 처리시간이 길어질수록 protoplast 형성율은 증가하였으나 protoplast 재생율은 감

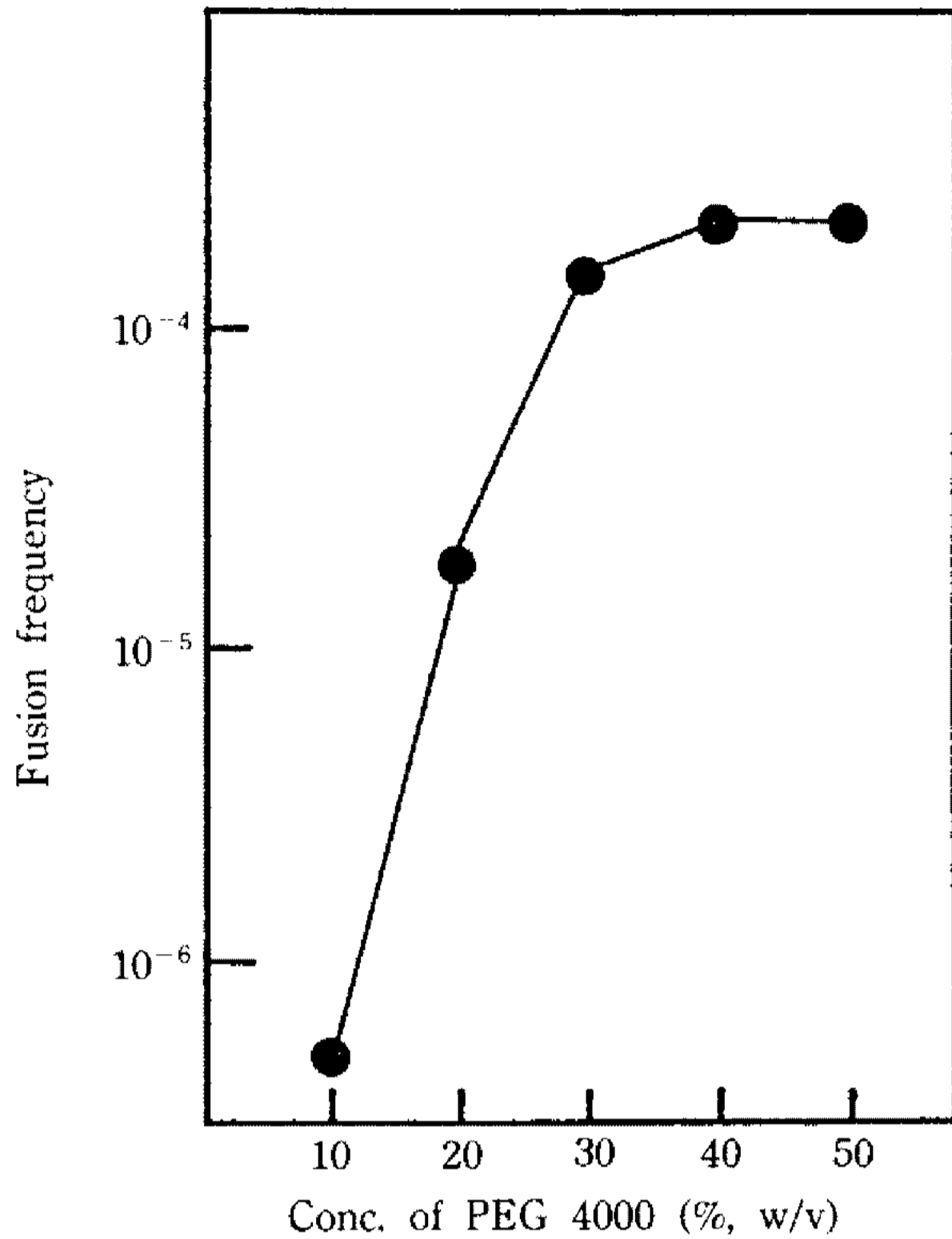


Fig. 6. Effect of the concentration of PEG 4,000 on the frequency of protoplast fusion.

6000을 사용하여 높은 융합빈도를 얻었다는 보고(5, 8)와 유사하였으며, 본 실험에서의 융합빈도는 3.2×10^{-4} 이었다.

유전적 안정성 : 선별된 융합주를 선택배지(lincomycin 6 µg/ml, rifampicin 50 µg/ml)에서 1주일 간격으로 5회 계대배양한 후에 모균주로 되돌아가지 않고 선택배지에 나타난 colony를 완전배지와 선택배지에 toothpicking한 결과, Table 4에서와 같이 F6, F25, F28, F36을 제외한 나머지 10개의 융합주는 비교적 안정하여 이 융합주들의 생리학적 성질을 검토하였다.

DNA 함량 : 융합주와 모균주의 세포당 DNA 함량을 비교한 결과를 보면 Table 5에서와 같이 F23, F24, F35는 모균주의 DNA 함량의 2배로서 단상체인 모균주 사이에 융합이 이루어져 이배체의 융합세포가 만들어진 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 효모 등의 세포 융합결과와 유사하였다(12, 22). 그러나 F1, F11, F16, F27의 DNA 함량은 모균주의 3~6배 정도로 나타나 DNA가 polyploid 상태로 존재하는 것으로 사료되었으며 F14, F18, F39는 *L. casei*의 DNA 함량과 유사한 것으로 나타났다.

산 생성 능력 : 모균주와 융합주의 발효기간 중의

Table 4. Genetic stability of fusants

Strains	Colonies on		Auxotrophs (%)
	CM*	SM**	
F1	496	494	0.4
F6	212	208	1.9
F11	292	292	0
F14	405	402	0.74
F16	300	300	0
F18	636	632	0.63
F23	530	530	0
F24	466	464	0.43
F25	240	194	19.2
F27	295	295	0
F28	436	430	1.38
F35	416	414	0.35
F36	292	287	1.71
F39	330	330	0

*CM; complete medium

**SM; selective medium

Table 5. DNA content in cells of parents and fusants

Strains	Content of DNA (fg/cell)
<i>L. casei</i> KCTC 1121	4.7
<i>L. delbrueckii</i> JK-414	9.6
F1	25.6
F11	53.8
F14	3.5
F16	32.6
F18	4.9
F23	13.2
F24	12.4
F27	37.3
F35	16.7
F39	5.6

산 생성 능력을 검토한 결과 Fig. 7에서와 같이 *L. casei*가 *L. delbrueckii*보다 skim milk에서 산 생성 능력이 훨씬 우수하였으며, 융합주 F23, F35도 *L. delbrueckii*보다 산 생성 능력이 우수하였으나 *L. casei*보다는 낮았다.

β-Galactosidase 활성 : 각 균주의 β-galactosidase의 효소 생성 능력을 비교 검토하기 위하여 발효 후 초효소액의 함유된 효소의 활성을 측정한 결과, Table 6에서와 같이 *L. casei*는 *L. delbrueckii*보다 β-galacto-

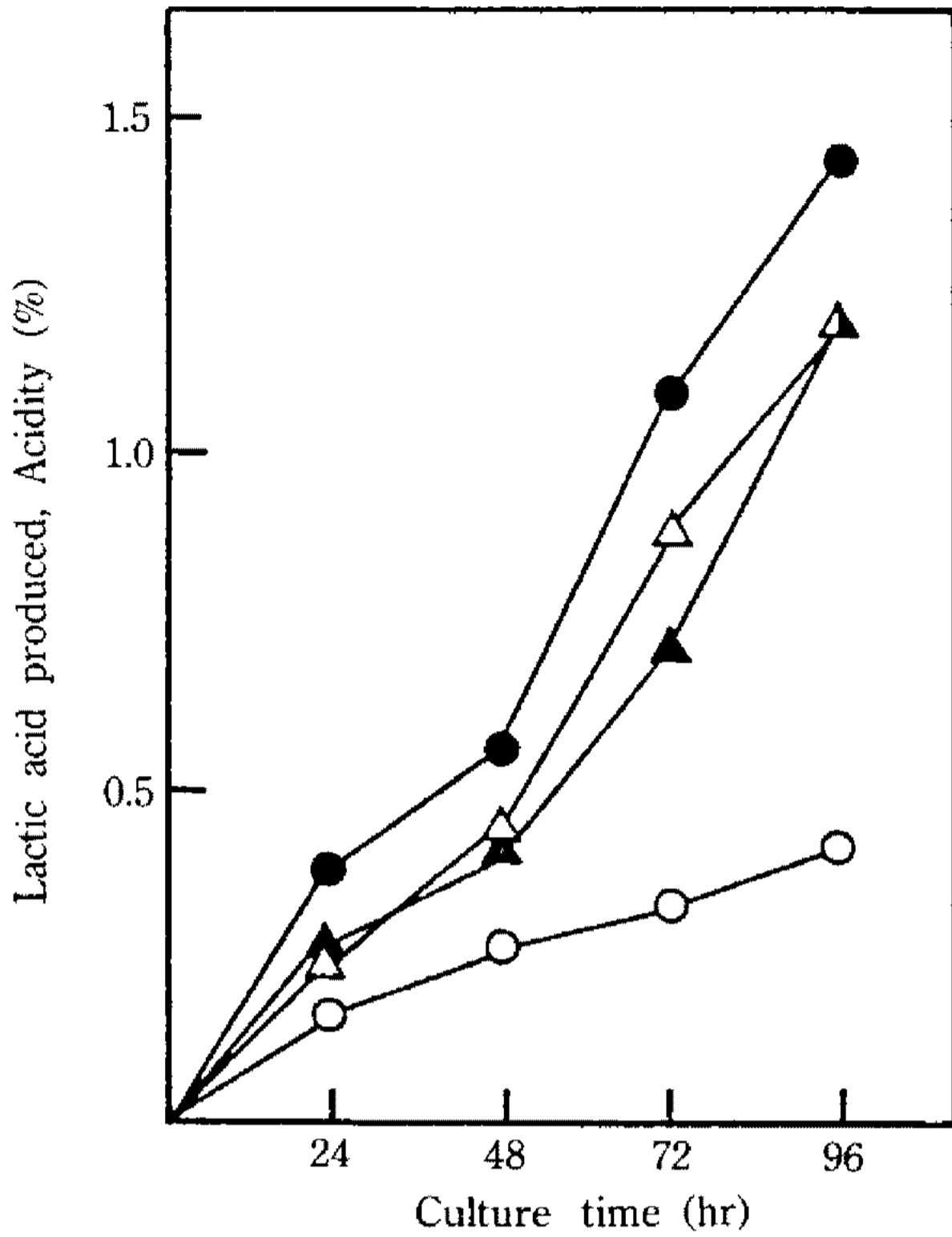


Fig. 7. Lactic acid production of parent strains and two fusants in 10% skim milk.

●; *L. casei* KCTC 1121, ○; *L. delbreuckii* JK-414, ▲; F23, △; F35

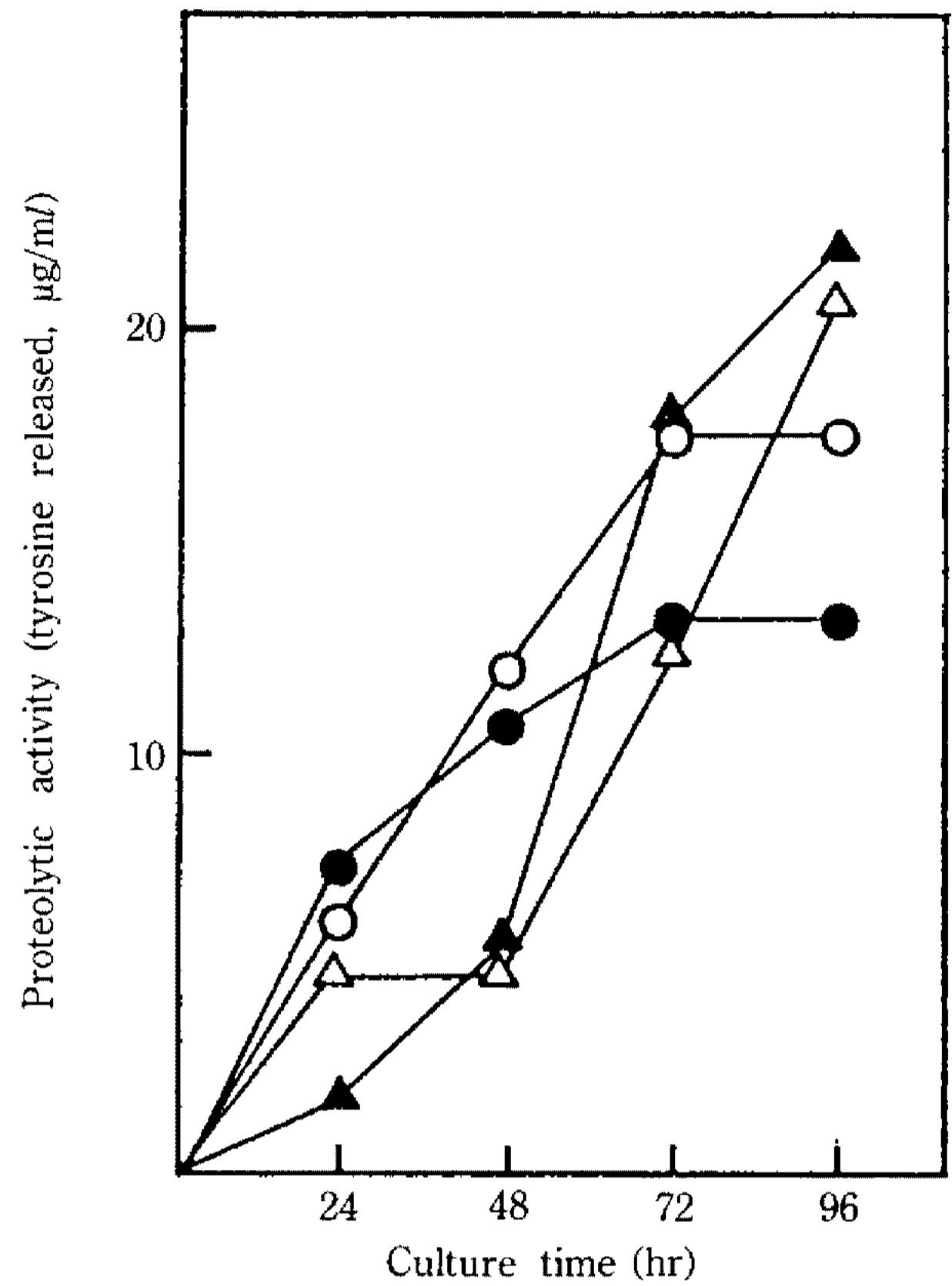


Fig. 8. Proteolytic activity of parent strains and fusants in 10% skim milk.

●; *L. casei* KCTC 1121, ○; *L. delbreuckii* JK-414, ▲; F23, △; F35

Table 6. β -galactosidase activity* of parents and fusants

Strains	β -galactosidase activity
<i>L. casei</i> KCTC 1121	680
<i>L. delbrueckii</i> JK-414	496
F1	376
F11	119
F14	411.1
F16	130
F18	375.9
F23	118
F24	505.1
F27	600
F35	778
F39	714

*Specific activity was expressed as nanomoles of *o*-nitrophenol liberated from ONPG per milligram of enzyme protein per minute.

sidase 활성이 양호하였으며, F24와 F27은 두 균주 중간 정도의 효소활성을 보였고 F35와 F39는 모균주보다 β -galactosidase 활성이 높았다.

Protease 활성 : 모균주와 융합주의 발효기간 동안

의 protease 활성을 검토한 결과, Fig. 8에서와 같이 *L. delbrueckii*가 *L. casei*보다 활성이 높았으며, 융합주 중 F23과 F24는 모균주보다 protease 활성이 높았다. 이와같은 결과는 Baek 등이 protoplast 융합으로 proteolytic activity가 향상된 융합주를 얻었다는 보고와 유사하였다(15). 융합주 중 특히 F23, F24는 우유에서 젖산 생성능이 우수하고 proteolytic activity도 모균주보다 우수하며 고온에서도 잘 성장하는 등 성질이 우수하였다.

요 약

유산균주의 균주개량방법의 일환으로 protoplast fusion 방법을 사용하여 lincomycin에 내성을 나타내는 *Lactobacillus casei* KCTC 1121과 rifampicin에 내성을 나타내는 *Lactobacillus delbrueckii* JK-414의 protoplast 형성과 재생, 융합에 대한 조건 및 융합주의 생리학적 성질 등을 검토하였다. *Lactobacillus casei*와 *Lactobacillus delbrueckii* JK-414는 삼투압 안

정제로 sucrose가 함유된 protoplast forming buffer에서 5 µg/ml의 mutanolysin으로 42°C, 15분간 처리했을 때 protoplast 형성율이 높게 나타났다. *L. casei*와 *L. delbrueckii*는 대수 증식기 중반에서 protoplast가 가장 잘 형성되었으며, MRS 배지에 삼투압 안정제로 sucrose 10%, MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 6 mM, gelatin 2.5%를 첨가하여 만든 재생배지에서 재생효율이 가장 좋았다. 한편, *L. casei*와 *L. delbrueckii* 사이의 protoplast 융합은 40%의 PEG 4,000을 처리하였을 때 가장 양호하였으며, 그 융합 효율은 3.2×10^{-4} 이었다. *L. casei*가 *L. delbrueckii*보다 높은 산 생성능을 보였으며 융합주 중 특히 F23, F35의 산 생성능이 우수하였다. 융합주 중 F23, F24의 protease 활성이 모균주의 protease 활성보다 높았으며, 이들 융합주의 DNA 함량은 모균주의 2배였다.

감사의 말

본 연구는 1990년도 교육부 지원 유전공학 학술연구 조성비에 의하여 수행된 연구(유산균 육종에 관한 연구)의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Peberdy, J.F. 1980. Protoplast fusion—a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganism. *Enz. Microbiol. Technol.* **2**: 23-29.
2. Neujahr, H.Y., B. Borstad, and I.M. Logardt. 1973. Factors affecting the resistance of *Lactobacillus fermenti* to lysozyme. *J. Bacteriol.* **116**: 694-698.
3. Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta.* **115**: 355-367.
4. Fodor, K. and L. Alföldi. 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**: 2147-2150.
5. Iwata, M., M. Mada, and H. Ishiwa. Protoplast fusion of *Lactobacillus fermentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 392-393.
6. Kang, Y., J.H. Kim, and D.D.Y. Ryu. 1987. Protoplast fusion of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2221-2227.
7. Gasson, M.L. 1980. Production, regeneration and fusion of protoplasts in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 99-102.
8. Okamoto, T., Y. Fujita, and R. Irie. 1985. Interspecific protoplast fusion between *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1371-1376.
9. Okamoto, T., Y. Fujita, and R. Irie. 1983. Fusion of protoplasts of *Streptococcus lactis*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2675-2676.
10. De Man, J.C., M. Rogosa, and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.
11. Cosby, W.M., I.A. Casas, and W.J. Dobrogosz. 1988. Formation, regeneration and transfection of *Lactobacillus plantarum* protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2599-2602.
12. Seu, J.H., Y.H. Kim, D.Y. Jun, and J.T. Lee. 1986. A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 305-310.
13. Delley, M., B. Mollet, and H. Hottinger. 1990. DNA probe for *Lactobacillus delbrueckii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1967-1970.
14. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. pp. 456. American Society for Microbiology.
15. Baek, Y.J., H.S. Bea, Y.K. Kim, M. Yoo, and H.U. Kim. 1986. Studies on the genetic recombination by intraspecific fusion of *Lactobacillus casei* protoplast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 319-324.
16. Okamoto, T., and T. Morichi. 1979. Distribution of β-galactosidase activity among lactic streptococci. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 2389-2390.
17. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
18. 江上不二夫編. 1953. 標準生化學實驗. pp. 208, 文光堂.
19. Lee-Wickner, L.J., and B.M. Chassy. 1984. Production and regeneration of *Lactobacillus casei* protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **488**: 994-1000.
20. Shirai, M., C. Ishii, and T. Aida. 1983. Protoplast formation of *Bacillus colistinus*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 877-879.
21. Baek, Y.J., H.S. Bea, M. Yoo, Y.K. Kim, and H.U. Kim. 1986. A study on the protoplast formation and regeneration of *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 251-257.
22. Chung, K.S., Y.J. Koo, and D.H. Shin. 1987. Intergeneric protoplast fusion between *Hansenula anomala* var. *anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 145-149.

(Received October 17, 1991)