

*Lactobacillus bulgaricus*와 *Lactobacillus helveticus*간의 Protoplast 융합에 관한 연구

박현정 · 백형석 · 송재철¹ · 전홍기*
부산대학교 미생물학과, ¹울산대학교 식품영양학과

Studies on the Protoplast Fusion between *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*

Park, Hyun-Jeong, Hyung-Suk Baik, Jae-Chul Song¹ and Hong-Ki Jun*

Department of microbiology, College of Natural Sciences,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

¹Department of Food and Nutrition, College of Natural Sciences,
University of Ulsan, Ulsan 680-748, Korea

Abstract — The optimal conditions for protoplast fusion between the cells of kanamycin resistant *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953 and those of lincomycin resistant *Lactobacillus helveticus* IAM 12090 were investigated in this study. The highest fusion frequency of 9.1×10^{-4} was obtained when protoplast fusion was carried out for 0.5 min using 40% PEG 4000 solution as a cell fusion stimulant and subsequent post-PEG-incubation was undergone at 30°C for 30 min in the PPI medium.

Protoplast 융합은 낙농업에서 사용되는 균주들의 개량이나 유전적 연구에 많이 사용되고 있는 일종의 유전자 조작 방법으로, 융합에 이용되는 융합 유도 물질은 1974년 Kao와 Michayluk(1)에 의해서 발견되었다. 따라서 polyethylene glycol(PEG)의 융합유도 효과가 발견된 이후 protoplast 융합연구가 활발하여졌으며, 많은 미생물들이 protoplast 융합연구에 이용되어 왔다. 곰팡이(2), 효모(3), 방선균(4), 세균(5) 뿐만 아니라 유산균 protoplast의 융합에 관한 연구(6)도 이루어졌다. PEG는 다른 융합제에 비해 비교적 무독성이고 예외적으로 높은 수준으로 세포융합을 야기시킨다. 그러므로 최근에는 세포 융합물질로 PEG를 주로 사용하고 있다.

산업적으로 중요한 세균의 세포융합과 형질전환(transformation)에 대한 방법은 잘 확립되어 있으나(7), lactobacilli에 대한 연구는 초기 단계에 있다(8). 유산균은 당을 자화하여 최종대사산물의 50% 이상이

젖산을 생성하는 세균을 지칭하는 것으로 균종에 따라 각각 고유한 특징을 가지고 있으므로, 유가공에서 단독 또는 혼합 배양하여 제품의 조직과 풍미 등의 향상에 이용하고 있다.

본 연구에서는 치즈 숙성과 관련한 향미성분 생산균주들 즉, 젖산 생성능이 뛰어난 *L. bulgaricus*와 유리지방산 생성능이 뛰어난 *L. helveticus*를 융합시켜 모균주의 우량형질을 가진 새로운 융합체를 얻기 위해, 전보(9, 10)에서 보고한 원형질체 형성 및 재생에 대한 조건을 이용하여, 원형질체 융합의 최적 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953과 *Lactobacillus helveticus* IAM 12090이며 이 균주들은 냉동 보존시켰으며 원형질체를 형성시키는 데 MRS broth를 사용하였다. Protoplast 형성용 완충용액(protoplast forming buffer; PB)은 0.5 M

Key words: Protoplast fusion, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*

*Corresponding author

sucrose가 포함된 20 mM HEPES(pH 7.0)를 사용하였다. 세포벽 재생을 위하여 MRS 배지에 5% sucrose, 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 2.5% gelatin, 그리고 0.5% bovine serum albumin을 첨가하여 사용하였다. 선택 배지는 MRS 배지에 kanamycin 200 µg/ml와 lincomycin 2.0 µg/ml를 가하여 사용하였다.

Protoplast 융합에 사용한 PEG(polyethylene glycol) 중에서 PEG 1000, PEG 4000, PEG 6000은 Junsei Chemical Co. 제품을 사용하였고, PEG 8000은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다.

Protoplast 형성

Protoplast는 전보(9, 10)에서 결정된 최적조건들을 이용하여 조제하였다. 균을 MRS broth에 접종하여 대수증식기 중반까지 정치배양한 후, 4,000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 모은 다음, 20 mM HEPES buffer(pH 7.0)에 현탁시키고 이 과정을 다시 한번 되풀이하여 얻은 균주세포를 PB에 현탁시켰다. Lysozyme과 mutanolysin을 녹인 완충액을 균체 현탁액에 동량 가하여 *L. bulgaricus*는 최종농도 lysozyme 50 µg/ml, mutanolysin 2.5 µg/ml되게 하였으며, *L. helveticus*는 lysozyme 50 µg/ml, mutanolysin 5 µg/ml되게 하였다. 용균효소를 가한 균체 현탁액을 천천히 교반하면서 각각 37°C 와 42°C 에서 일정시간 동안 배양하였다.

Protoplast 융합 및 재생

원형질체 융합은 Hopwood와 Wright의 방법(11)을 변형시켜 행하였다. 항생제 내성이 다른 두균주를 각각 최적 조건에서 protoplast로 만든 후, 두 protoplast 현탁액 동량(0.5 ml)을 섞어서 Eppendorf Centrifuge로 원심분리(4,000×g, 10분)하여 침전된 protoplast에 protoplast 형성용 완충액(PB) 0.1 ml를 가해 백금으로 천천히 현탁시킨 다음 PEG 용액 0.9 ml를 첨가하였다. PEG 작용을 멈추기 위해 PPI 배지(Post-PEG-Incubation medium : PB 0.9 volume + glucose를 제외한 MRS broth 0.1 volume)를 가한 후 다시 원심분리(4,000×g, 10분)하여 PB 1 ml에 재현탁하고, protoplast 형성용 완충액으로 적당히 희석하여 kanamycin(200 µg/ml)과 lincomycin(2 µg/ml)이 포함되어 있는 재생용 배지와 포함되어 있지 않은 재생용 배지에 각각 도말하여, 30°C 에서 3~5일간 배양하였다. 모균주의 재생조건이 약간 다르기 때문에 두 원형질체를 융합시켰을 때의 재생배지는 모균주의 재생조

건을 조금씩 수정하여 조제하였다. 대조실험은 PEG 용액대신 protoplast 형성용 완충액을 가하여 동일한 방법으로 실험하였다. 융합빈도는 선택 배지에서 형성된 colony수를 재생배지에서 형성된 colony수에 대한 비율로 산출하였다.

Transmission Electron Microscopy

각 사용모균주의 원형질체 현탁액과 PEG 처리한 현탁액을 원심분리(4,000×g, 10분)하고 25% glutaraldehyde를 균체의 1/10되게 첨가하여 원심분리하였다. 이 pellet에 2.5% glutaraldehyde를 가하여 전고정한 후 원심분리하고 0.5 M sucrose가 함유된 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 수회 세척하였다. 세척한 균체에 Kellenberger 고정액(12)을 가하여 4°C 에서 하룻밤 동안 방치하였다. 고정된 세포를 Kellenberger 완충액으로 세척하고 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)에 녹인 2% 한천에 embedding하여 굳힌 다음, 1 mm³로 잘라서 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 수회 세척하고 30, 50, 70, 80, 90% ethanol로 2회, 95%, 100% ethanol로 3회 세척하여 수분을 제거하고, toluene에 2회 방치하였다. 이것에 epoxy resin인 Epon 812 A+B혼합액과 중합 촉진제인 DMP-30[2,4,6-tris(dimethylaminomethyl)phenol]을 최종 농도 1.5%되게 가하고, Epon 혼합액과 toluene의 비가 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1(v/v)이 되는 용액에 각각 1시간씩 방치한 다음 Epon에 embedding하여, 37°C 에서 12시간, 48°C 에서 24시간, 60°C 에서 24시간 중합반응시켰다. Ultramicrotome(LKB 2088 Ultratome V)으로 박편을 만들어 폴로디온 지지막을 입힌 200 mesh의 구리 grid에 붙여서 uranyl acetate와 lead citrate로 30분씩 2중 염색하였다. 염색된 시료는 증류수로 수세하고 건조시킨 후 lead citrate에서 5분간 방치시키고, 다시 수세하고 건조시켜 건조된 시료를 투과 전자현미경(JEOL 100S Electron Microscope, Japan)으로 75 KV에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

Genetic marker 결정

Protoplast 융합주를 선발하는 방법에는 영양요구성 marker에 의한 방법(5), 항생제 내성 marker에 의한 방법(8), 두가지가 병행된 방법(11) 등이 있으나 lactobacilli의 경우에는 영양요구성 marker 도입이 까다로운 반면(13) 항생제 내성 marker 조사는 다소 쉽

Table 1. Antibiotic resistance patterns of the two parent strains

Concentrations of antibiotics (μg/ml)	<i>L. bulgaricus</i> IFO 13953	<i>L. helveticus</i> IAM 12090
Kanamycin		
25	+	+
50	+	(+)
100	+	-
150	+	-
200	+	-
Lincomycin		
0.25	-	+
0.50	-	+
0.80	-	+
1.00	-	+
2.00	-	(+)

+: growth, (+); partial growth, -; no growth

때문에(14) 본 실험에서는 비교적 다루기 쉬운 항생제 내성 marker를 이용하여 protoplast 융합주를 선발 하였다. 따라서 본 연구에서는 원균주의 생리적 성질을 이용하기 위하여 *L. bulgaricus*와 *L. helveticus*의 항생제 내성 marker를 조사해 본 결과, *L. bulgaricus*는 kanamycin에 내성을 보이고 *L. helveticus*는 lincomycin에 내성을 보이므로 이를 marker로 사용하였다(Table 1).

Protoplast 융합의 조건

Protoplast를 응집하고 융합시키는 물질인 PEG는 분자량, 농도, 처리시간 등에 따라 융합율이 다르므로 (15) 분자량 1,000, 4,000, 6,000, 8,000인 PEG 40% 용액을 사용하여 융합체의 융합빈도를 조사하였다. 그 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 PEG 4,000으로 처리하였을 때 최대 빈도의 protoplast fusion을 일으켰으며, PEG 6,000에서도 좋은 결과를 얻었다. 그러나 점성이 너무 높아서 사용하기가 불편하였다. *Brevibacterium*속(16)의 경우는 PEG 6,000, *Bacillus subtilis*(17)도 PEG 6,000, *Cellulomonas*속(18)의 경우는 PEG 3,350을 사용하였으며, *Acetobacter aceti*(19)는 PEG 4,000을 사용하였을 때 가장 좋은 결과를 얻었다고 보고하고 있다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 세균은 주로 PEG 4,000~6,000을 사용하였을 때 융합이 잘 되는 것으로 사료된다.

Fig. 2에서 나타난 것처럼 세포 융합을 가장 잘 일

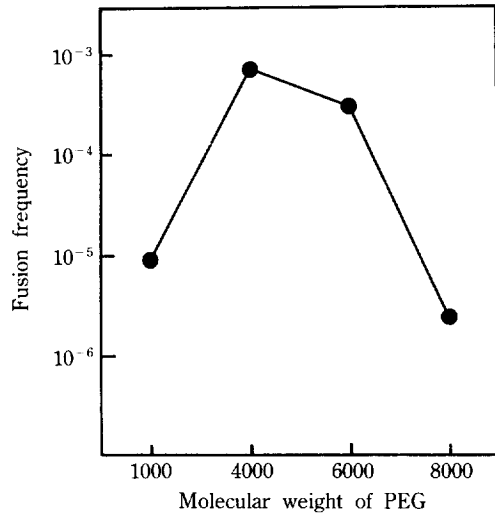


Fig. 1. Effect of molecular weights of PEG on the frequency of protoplast fusion.

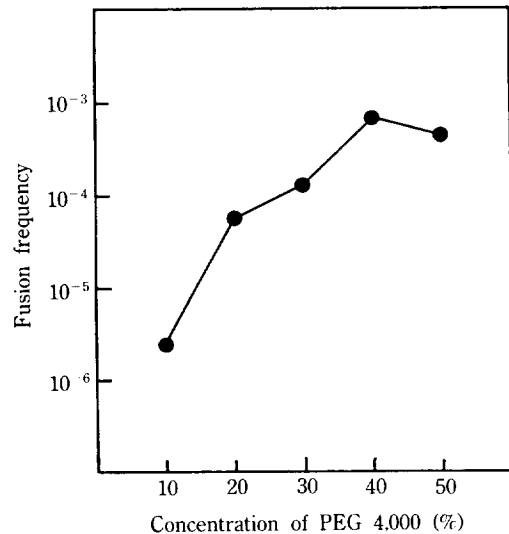


Fig. 2. Effect of the concentration of PEG 4,000 on the frequency of protoplast fusion.

으키는 PEG 4,000의 최적 농도는 40%였다. PEG 4,000의 농도가 40%까지는 융합빈도가 계속 증가하였으나 50%에서 조금 감소하였다. 높은 농도에서 융합 빈도가 감소하는 것은 삼투압에 의한 protoplast의 손상 때문으로 사료된다. 또한 Hopwood(20)는 일정 농도 이상의 PEG 용액을 사용하면 점도가 높아 원형질체를 신속히 coating하지 못하므로 융합빈도가 낮아진다고 보고하였으며, Peberdy(21)는 높은 농도의

PEG는 독성이 강하고 원형질체를 쪼그라들게 함으로서 융합빈도가 낮아진다고 주장하고 있다. 따라서 *Lactobacillus*속과 *Streptococcus*속의 경우 대개 40~50%의 PEG 4,000과 PEG 6,000을 사용하여 높은 융합빈도를 얻었다는 보고(8)와 일치하였다.

PEG를 미생물에 장시간 처리할 경우 생존력이 감소한다는 보고(20)가 있어서 원형질체를 융합할 때

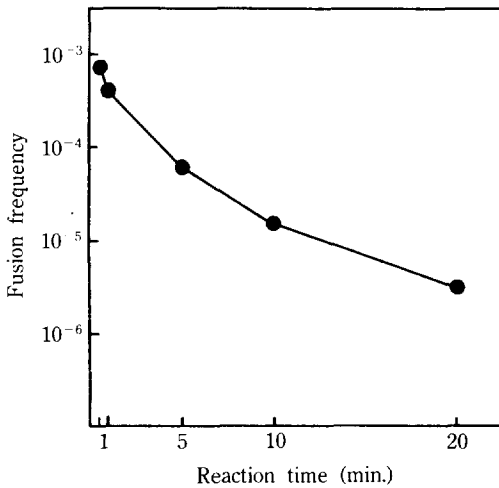


Fig. 3. Effect of PEG treatment time on the frequency of protoplast fusion.

가장 효과적인 PEG 처리시간을 찾기 위해서 PEG를 0.5, 1, 5, 10, 20분 처리한 후 융합시켰다(Fig. 3). 그 결과 PEG를 0.5분 처리했을 때 가장 높은 융합빈도를 얻었으며, 시간이 경과함에 따라 융합빈도가 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 각 원형질체의 효과적인 융합이 PEG 처리 즉시 일어난다는 것을 의미하는데 이 결과는 Baltz(22)의 보고와 일치하였으나, 이와 반대로 Gabor와 Hotchkiss(15)는 PEG 처리시간이 길어질수록 재생율은 감소하고 융합빈도는 증가한다고 보고하였다.

PEG에 의한 원형질체 융합은 PEG를 처리한 후 새로운 원형질체 형성용 완충액으로 희석하여도 계속 융합이 일어나는 것으로 알려져 있으며(23), PEG 처리에 의해서 응집되고 쪼그라든 세포(shrink)는 세포 사이의 PEG중합체(polymer) 분자들이 융합을 방해하기 때문에 그 상태로는 융합되지 않고, 부풀어 오르고(swollen) 덜 응집된 세포 사이에서 대부분의 PEG가 제거된 후에 광대한 융합이 일어나는 것으로 알려져 있다(24). 또 PEG 처리 후의 최적 배양조건을 구하기 위하여 배양온도에 대한 영향을 조사하였다. Table 2에서 나타난 바와 같이 PPI 온도는 30°C 에서 가장 높은 융합빈도를 나타내었으나 25°C 이하에서는 융합이 거의 이루어지지 않았다. 이것은 재생의 최적 온도와 일치하는 것으로 이러한 결과는 Gabor와 Hot-

Table 2. Effect of post-PEG-incubation temperature of fusion mixture on fusion frequency

Temperature (°C)	No. of regenerated cells (CFU/ml) ¹	Total recombinants (CFU/ml)	Recombination frequency
20	2.7 × 10 ³	0	0
25	5.9 × 10 ⁴	4	6.8 × 10 ⁻⁵
30	4.3 × 10 ⁶	5.2 × 10 ³	1.2 × 10 ⁻³
37	4.8 × 10 ⁶	4.2 × 10 ³	8.7 × 10 ⁻⁴
42	1.0 × 10 ⁶	3.6 × 10 ²	3.6 × 10 ⁻⁴

¹CFU; colony forming units

Table 3. Effect of PPI time of fusion mixture on fusion frequency

Time (min)	No. of regenerated cells (CFU/ml) ¹	Total recombinants (CFU/ml)	Recombination frequency
0	1.1 × 10 ⁶	5.7 × 10 ²	5.2 × 10 ⁻⁴
30	2.8 × 10 ⁶	2.4 × 10 ³	8.4 × 10 ⁻⁴
60	2.2 × 10 ⁶	8.4 × 10 ³	3.8 × 10 ⁻⁴
90	1.9 × 10 ⁶	7.4 × 10 ²	3.9 × 10 ⁻⁴
120	8.7 × 10 ⁵	5.1 × 10	5.9 × 10 ⁻⁵

¹CFU; colony forming units

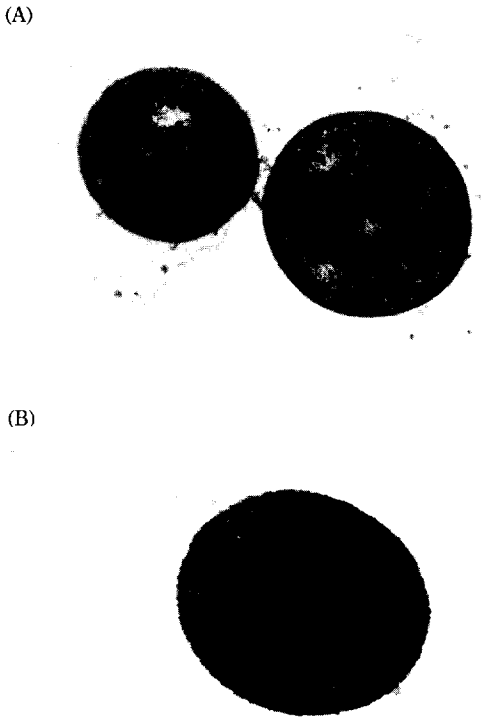


Fig. 4. Transmission electron micrographs of (A) protoplasts of *L. bulgaricus* IFO 13953 ($\times 20,000$), (B) protoplasts of *L. helveticus* IAM 12090 ($\times 30,000$).

chkiss(15)에 의해서도 확인되었으며 Maggio 등(24)은 이 온도를 37°C로 결정한 바 있다.

PEG 처리 후 배양시간에 따른 융합 빈도를 알아 보기 위해 배양시간을 30, 60, 90, 120분으로 하여 Table 3과 같은 결과를 얻었다. 30분 배양했을 때 가장 높은 융합 빈도를 나타내었으며 그 이상 배양했을 때는 융합빈도가 점차 감소하였다. 이는 Frehel 등(25)의 연구 결과와 일치하였으나 Sanchez-Rivas와 Garro (23)는 37°C에서 PPI 시간에 따라 융합빈도가 높아진다고 보고하였다.

전자현미경적 관찰

*L. bulgaricus*와 *L. helveticus* 세포를 효소 처리하여 원형질체를 형성시켜 TEM으로 관찰하였다. 원형질체가 완전한 구형을 나타내고 있는 것은 Fig. 4에서 확인할 수 있었으며, 이들 두 균의 구형의 원형질체가 PEG 처리에 의해 접촉하여 접촉부위(contact zone)를 형성하고 있고(Fig. 5A), 이러한 접촉부위는 융합과정

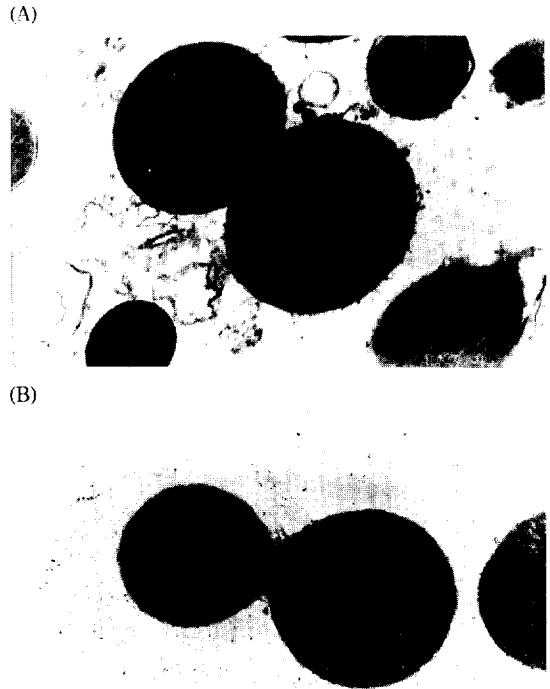


Fig. 5. Transmission electron micrographs of protoplast fusion between *L. bulgaricus* IFO 13953 and *L. helveticus* IAM 12090 ($\times 20,000$). (A) contacting stage (B) fusing stage

이 진행되어 감에 따라 부분적으로 원형질막이 파괴되어 원형질이 상호 혼합되는 것으로 생각된다(fusing stage)(Fig. 5B). 이와같이 원형질이 서로 혼합되므로 해서 하나의 융합체를 형성하게 되고, 융합체를 여러번 계대배양하여 관찰해 본 결과 본래의 모균주와 유사한 균이었다.

요 약

치이즈 숙성에 관여하는 유산균의 균주 개량 방법의 일환으로 원형질체 융합방법을 이용하여 *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953과 *Lactobacillus helveticus* IAM 12090을 융합시켰다. Kanamycin 내성주인 *L. bulgaricus*와 lincomycin 내성주인 *L. helveticus*, 각각의 원형질체에 40% PEG 4,000을 첨가하여 0.5분간 반응시켰을 때 높은 융합율을 얻었으며, 또한 PPI배지를 가하여 30°C에서 30분간 PEG 처리 후 배양을 실시하였을 때 가장 높은 융합률, 9.1×10^{-4} 을 얻었다.

감사의 말

본 연구는 1991년도 교육부 지원 유전공학 학술 연구 조성비에 의하여 수행된 연구(유산균 육종에 관한 연구)의 일부로 연구비 지원에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*. **115**: 355-367.
2. Anne, J., H. Eyssen and P. De Sommer. 1976. Somatic hybridization of *Penicillium roqueforti* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature*. **262**: 719-721.
3. Svoboda, A. 1978. Fusion of yeast protoplast induced by polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* **109**: 169-175.
4. Baltz, R.H. and P. Matsushima. 1983. Advances in protoplast fusion and transformation in *Streptomyces*. In 6th International Protoplast Symposium, pp. 143-148. Basel.
5. Fodor, K. and L. Alföldi. 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **73**: 2147-2150.
6. Gasson, M.L. 1980. Production regeneration and fusion of protoplasts in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 99-102.
7. Kim, S.D. and J. Spizizen. 1985. Transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by recombinant plasmid DNA. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 345-348.
8. Kang, Y., J.H. Kim and D.D.Y. Ryu. 1987. Protoplast fusion of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 2221-2227.
9. 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**: 246-250.
10. Jun, H.K., H.J. Park, J.C. Song and H.S. Baik. 1993. Protoplast formation and regeneration in *Lactobacillus helveticus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **21**(2):
11. Hopwood, D.A. and H.M. Wright. 1978. Bacterial protoplast fusion: Recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **162**: 307-317.
12. 東昇, 遠山益. 1973. 전자현미경 실습(생물학. 의학에의 응용). pp. 84-134. 共立出版株式會社.
13. Morishita, T., T. Fukada, M. Shirota and T. Yura. 1974. Genetic basis of nutritional requirements in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* **120**: 1078-1084.
14. Reinbold, G.W. and M.S. Reddy. 1974. Sensitivity or resistance dairy starter and associated microorganisms to selected antibiotics. *J. Milk Food Technol.* **37**: 517-521.
15. Gabor, M.H. and R.D. Hotchkiss. 1979. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplasts. *J. Bacteriol.* **137**: 1346-1353.
16. Kaneko, H. and K. Sakaguchi. 1979. Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 1007-1013.
17. Schaeffer, P., B. Cami and R.D. Hotchkiss. 1976. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **73**: 2151-2155.
18. Kim, B.H. and H.J. Lee. 1985. Genetic recombination by protoplast fusion of *Cellulomonas* sp. CS 1-1. *Kor. J. Microbiol.* **23**: 309-314.
19. Fukaya, M., H. Tagami, K. Tayama, H. Okumura, Y. Kawamura and T. Beppu. 1989. Spheroplast fusion of *Acetobacter aceti* and its application to the breeding of strains for vinegar production. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2435-2440.
20. Hopwood, D.A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**: 237-272.
21. Peberdy, J.F. 1979. Fungal protoplasts: Isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 21-39.
22. Baltz, R. H. 1978. Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 93-102.
23. Sanchez-Rivas, C. and A.J. Garro. 1979. Bacterial fusion assayed by a prophage complementation test. *J. Bacteriol.* **137**: 1340-1345.
24. Maggio, B., Q.F. Ahkong and J.A. Lucy. 1976. Polyethylene glycol, surface potential and cell fusion. *Biochem. J.* **158**: 647-650.
25. Frehel, C., A.M. Lheritier, C. Sanchez-Rivas and P. Schaeffer. 1979. Electron microscopic study of *Bacillus subtilis* protoplast fusion. *J. Bacteriol.* **137**: 1354-1361.

(Received February 3, 1993)