

유산균의 이종간(異種間) 세포융합균주의 기능특성

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

Functional Properties of a Interspecific Protoplast Fusant from *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*

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

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 — An interspecific fusant was made from the protoplasts of two strains of *Lactobacillus* genus (*L. bulgaricus* and *L. helveticus*). And in order to test the applicability of the fusant in manufacturing the cheddar cheese, functional properties of the strain was examined by determining acid-producing activity, three important enzyme activities and volatile free fatty acid-producing activity. The recombinant strain did not exhibit greatly increased acid-producing activity. Lipase and volatile free fatty acid-producing abilities of the fusant, however, were remarkably higher than those of the two parental strains. The fusant actually produced the cheese product of the highest amount of total volatile free fatty acid after 7 days ripening at 10°C. Finally, the cheddar cheese ripened with this strain was also evaluated to be high preference and flavor intensity by organoleptic panel tests.

미생물에서 융합법이 이용되는 분야는 유전학적 이용(1), 균주육종에의 이용(2), 중간 잡종의 형성(3), 세포내 소기관들의 전달방법(4)과 세포학적 이용(5) 등이다. 특히 생산균주의 육종 및 생물학적 연구 방법의 개발은 protoplast fusion 방법을 적용함으로써 크게 발전되리라 사료되며, 미생물을 이용한 protoplast fusion 방법이 산업적으로 이용되어 온 연구결과도 많다(6). *Lactobacillus*와 *Streptococcus*는 발효 낙농제품에 주로 이용되는 균주들로 균주 개량을 위해 세포융합법을 이용하였다(7).

융합에 의한 개량균주의 방향성분 생성에 관한 연구는, 유산균이 일반적으로 증식이 높고 영양요구성이 크며 대사산물 분비능력이 우수하지 못하여 유산균에 의한 후숙발효로는 다양한 flavor 생성이 매우 어려

우므로, 유산균을 육종적 차원에서 변이시켜 균주의 생산성을 향상시키는데 그 목적이 있다.

*Lactobacilli*는 균마다 단백질 분해능력 정도가 다르나 세포외 peptidase와 proteinase는 넓은 온도와 pH에서 활성을 갖는다(8). Proteolysis가 원하는 변화를 일으킬 뿐만 아니라 품질저하를 일으키기도 하지만 치즈 숙성에서 향, 쓴맛성분, 조직변화(9), 숙성가속에 관여한다. 특히 *L. bulgaricus*와 *L. helveticus*는 모두 고온균으로 lactase 생성이 각각 양호함은 물론 그 밖에 *L. bulgaricus*는 다른 유산균에 비해 protease를 많이 생산하는 특징을 가지고 있다(10). 그러나 *L. helveticus*는 protease보다 lipase를 생성하는 능력이 강하므로, 치즈제조에 서로 상보적 특성을 조합하여 가장 보편화된 체다 치즈 숙성에 결정적 flavor를 생산하게 하는 lipase를 획득하는 것은 매우 중요한 과제이다.

본 연구에서는 *L. bulgaricus*와 *L. helveticus*의 세

Key words: Protoplast fusant, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, lipase activity

*Corresponding author

포용함으로 육성한 융합주(11) 중에서 유전안정성이 높은 융합균주를 분리해 내고 융합주의 치즈 숙성과 관련된 기능적 특성을 조사하였으며, 본 융합균주를 이용하여 숙성시킨 체다 치즈의 품질검사를 실시함으로써 균주개량 가능성에 대해 검토하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 *L. bulgaricus* IFO 13953 과 *L. helveticus* IAM 12090이며, 이들 균주들이 가지는 항생제 내성을 이용하여 두 균주를 융합(11)시켰으며 이때 얻은 융합주 중에서 생육이 왕성하고 유전적으로 안정한 균주를 선정하였다.

완전배지로는 MRS 배지를 사용하였으며, 선택배지로 MRS 배지에 kanamycin 200 µg/ml와 lincomycin 2 µg/ml를 가하여 사용하였고, 당 발효성 조사에는 MRS broth에서 glucose와 meat extract를 제외하고 chlorphenol red를 0.004% 가하여 사용하였다.

유전안정성

융합체를 1주일 간격으로 선택배지에 계대배양을 계속하면 상당량이 segregation되어 선택배지에서 생육하지 못하게 된다. 그러므로 3회 이상 계대배양 후 segregation되지 않고 안정한 융합주를 완전배지에 접종하여 37°C 에서 12시간 가량 배양하고 적당히 희석하여 완전배지에 도말하였다. 나타난 colony를 다시 완전배지와 선택배지에 replica하여 완전배지와 선택배지에서 생육된 colony의 비로서 유전안정성을 검토하였다.

당 발효성

당 용액은 10%로 조제하여 여과 멸균한 후 무균적으로 최종 농도 2% 되게 발효배지(MRS fermentation medium)에 가하였다(12). 각 당 용액을 가한 발효 배지에 균을 접종한 후 37°C 에서 12시간 정도 배양하여 색깔변화 유무를 관찰하였다.

조 효소액 조제

각 균주를 MRS 배지상에서 37°C, 12시간 정지 배양한 후 배양액을 4,000×g에서 10분간 원심분리하여 인산 완충액으로 세척하고 상등액과 세척액을 모아 투석막을 이용하여 4°C 에서 하룻밤 투석한 후 동결건조(EYELA Freeze Dryer FD-1, Tokyo Rikaki-

kai Co.)한 것을 조 효소액으로 제조하여 사용하였다.

치이즈 제조

치이즈는 72°C 에서 15초간 살균한 grade A 우유에 각 균주를 starter로 사용하여 0.6% titratable acidity에 이르러 커드를 milling한 후 각 균주의 효소액을 첨가하고 salting(25 g/kg 우유), pressing 한 후 최종적으로 파라핀 코팅하여 4~10°C, 습도 80~90% 발효실에 옮겨 저장하였다. 또 치즈 숙성기간 동안의 성분변화를 검토하기 위해 체다 치즈 성분을 각각 혼합한 가공 체다 치즈를 제조하여 시료로 사용하였다(13).

산 생성

각 균주의 산 생성능력을 비교하기 위해 10% reconstituted skim milk에 각 균주를 starter로 사용하여 발효시켰을 때 변화하는 pH를 시간별로 측정하여 이를 산 생성능력으로 표시하였다(14).

Lactase Activity

Lactase(β -galactosidase)의 역가 측정은 Kim(15)의 방법을 사용하였으며 specific activity는 효소 단백질 1 mg에 의하여 상기조건에서 1분 동안 유리된 o-nitrophenol 양을 표준곡선으로부터 계산하여 nmol로 표시하였다.

Protease Activity

조효소액에 12% TCA 용액을 같은 양 첨가하여 Whatman No. 4 여지로 여과하였다. 이 여액을 1 ml 취해 pH 7.0의 0.6% casein(Sigma Co.) 용액 5 ml에 가하여 30°C 에서 24시간 반응시켜 생성한 tyrosin 함량을 Folin Ciocalteu reagent method(16)에 의해서 30분간 발색한 후 650 nm에서 흡광도를 측정하여 L-tyrosin 표준액의 표준곡선으로부터 protease activity를 tyrosin 함량(μ g/ml)으로 나타내었다.

Lipase Activity

Lipase activity는 Stead(17)의 방법에 의하였으며 1분 동안 4-MU(4-methylumbelliferone) 1 nmol을 유리하는데 필요한 효소량을 1 unit 효소 역가로 표시하였다.

총 휘발성 유리지방산

각 균주의 조효소액을 가공 체다치이즈와 반응시켜

치이즈 sample 100 g을 세절하고 증류수 600 ml에 넣어 균질화한 후, 유 등(18)의 방법에 따라 총 휘발성 유리지방산량을 측정하였다.

관능검사

관능검사는 NIRT taste panel 방법(19)을 변형하여 실시하였으며 preference(0~8)는 전체적인 선호도를, intensity(0~8)는 치즈 향기의 강도를 나타낸 것이다. 또 cheddar flavor quality(0~5)는 체다 치즈로서의 품질적 유사함을 나타내는 지표로 사용하고자 cheddar 향기를 관능 대상으로 삼았다.

결과 및 고찰

유전 안정성

선별된 융합주를 선택배지에서 1주일 간격으로 3회 계대배양 후에 99% 이상이 segregation되었다. 이것은 융합주가 불안정하여 대부분 모균주로 되돌아간 것으로 추측된다. 따라서 segregation되지 않은 융합주를 수회 선택배지에 계대배양하여 유전적 안정성을 살펴본 결과 Table 1에 나타난 것처럼 선택배지에서 10주 이상 계대배양하여도 segregation되지 않는 것으로 보아 유전적으로 매우 안정화된 균주임을 알 수 있었다. 이와 같이 유전적으로 안정화된 융합주를 대상으로 융합주의 치즈 숙성과 관련된 기능적 특성을 검토하였다.

당 발효능력

여러가지 당의 발효성 여부는 indicator인 chlorphenol red의 색깔변화로 판정하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 *L. bulgaricus*는 glucose, fructose, lactose 등은 발효시켰으나 그 외의 당은 발효시키지 못하였으며, *L. helveticus*는 glucose, galactose, lactose 등은 발효시켰으나 그외의 당들은 발효시키지

못하였다. Fusant는 glucose, lactose만 발효시키고 다른 당은 발효시키지 못하였다. 이러한 결과로부터 융합주는 두 모균주의 특성을 공통적으로 가지고 있는 재조합체임을 알 수 있었다. 일반적으로 *L. bulgaricus*와 *L. helveticus*의 당 발효능력은 거의 동일하며 단 maltose를 *L. helveticus*만이 발효시킨다고 보고한 결과(12)와 상이한 결과를 얻었다.

산 생성능력

모균주와 융합주의 발효기간 동안의 산 생성능력을 검토한 결과(Fig. 1) 대부분의 균주들이 생육과 동시에 산을 분비하였는데 시간경과에 따라 거의 비례적으로 산이 생성되어 pH가 저하되었다. *L. bulgaricus*가 *L. helveticus*보다는 산 생성능력이 다소 우수하며 융합주는 두 균주의 중간정도 능력을 가진 것으로 나타났지만 6시간 이후에는 세 균주 모두 거의 동일한 양상을 띠었다.

상기 결과를 분석해 볼 때 실험에 사용한 두 균주는 모두 산 생성능력을 가지고 있으며 융합한 균주 또한 산을 많이 분비하는 것으로 판단되어 치즈발효에 이용 가능할 것으로 사료된다. 이러한 결과는 lactase에 의해서 lactic acid가 생성되는 것으로 배양액

Table 2. Abilities of carbohydrate fermentation of test strains

	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. helveticus</i>	Fusant
Glucose	+	+	+
Galactose	-	+	-
Fructose	+	-	-
Lactose	+	+	+
Saccharose	-	-	-
Maltose	-	-	-
Raffinose	-	-	-

+ : growth - : no growth

Table 1. Genetic stability of fusant by successive subculture

	Percentage of auxotrophs (%)*			
	1st subculture	3th subculture	5th subculture	10th subculture
Fusant	4.6	2.1	1.5	1.2

*Frequency of auxotrophs(%) = $\frac{\text{No. of colonies on CM} - \text{No. of colonies on SM}}{\text{No. of colonies on CM}} \times 100$

CM: complete medium

SM: selective medium

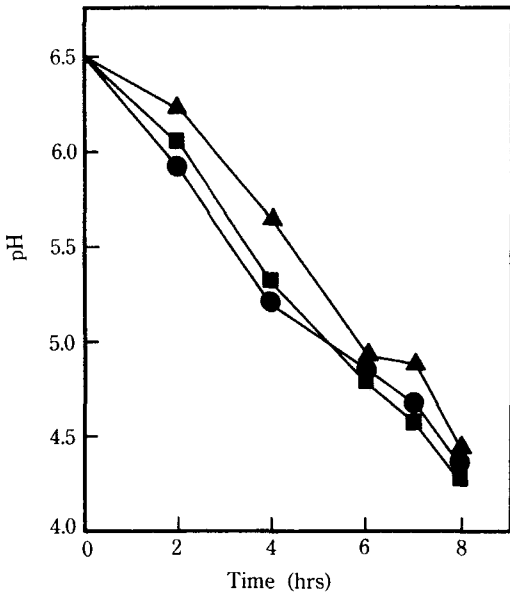


Fig. 1. Acid production during fermentation by test strains

●: *L. bulgaricus*, ▲: *L. helveticus*, ■: Fusant

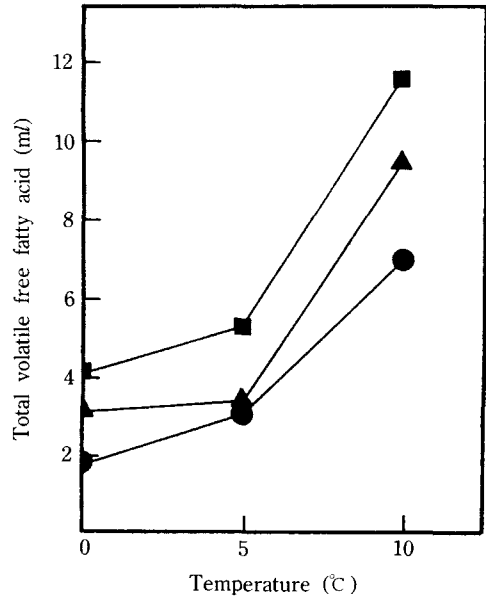


Fig. 2. Effect of ripening temperature on production of total volatile free fatty acid during ripening periods (7 days).

●: *L. bulgaricus*, ▲: *L. helveticus*, ■: Fusant

Table 3. Enzyme activities of test strains

Strains	Activity		
	Lactase ¹⁾	Protease ²⁾	Lipase ³⁾
<i>L. bulgaricus</i>	1,032	6.9	89
<i>L. helveticus</i>	928	2.6	1,260
Fusant	1,119	6.7	2,060

1) Specific activity was expressed as nanomoles of o-nitrophenol liberated from ONPG or ONPG-6-P per milligram of enzyme protein per minute, 2) Tyrosine content (μg/ml), 3) 4-MUO (Oleic acid esters; units/mg)

중의 lactase 역가 측정에서도 비슷한 결과(Table 3)를 나타내었다.

조 효소액의 역가

유산균주가 분비하는 효소는 주로 lactase, protease, lipase 이외 기타 효소들이 있다. 일반적으로 야생주는 이러한 효소들 중에서 특정한 효소를 다량 생산하는 경향을 나타내므로 이를 유산균 발효에 이용하고 있다. 각 균주의 효소 생성능력을 비교 검토하기 위하여 발효 후 조 효소액에 함유된 각 효소의 역가를 측정된 결과(Table 3), *L. bulgaricus*는 lactase와 protease 역가가 다소 양호하였으며 *L. helveticus*

는 lipase 생성능력이 우수한 균주로 나타났다. 특히 상기 두 균주를 융합한 융합주는 lactase, lipase 역가가 우수하였으며 protease는 *L. bulgaricus*와 비슷한 수준을 나타내어 전체적으로 융합주의 효소 분비능력이 양호하였다. 이러한 연구 결과는 융합주의 치즈 숙성에 관여하는 지방산 생성과도 관련이 있는 것으로 사료되었다.

총 휘발성 유리 지방산 생성능력

각 균주의 총 휘발성 유리지방산 생성에 미치는 숙성온도 영향을 검토하기 위하여 가공치즈를 0, 5, 10°C의 숙성온도 조건에서 7일간 조효소액과 반응시켜 비교한 결과(Fig. 2), 온도 상승에 따라 총 휘발성 유리지방산 생성이 증가하였다. 특히 10°C에서 숙성시킨 것은 가장 양호한 결과를 얻었다. 총 휘발성 유리지방산 생성능력은 융합주, *L. helveticus*, *L. bulgaricus*순으로 감소하였으며 이것은 유리지방산 생성이 lipase 역가와 관련되어(20) 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

일반적으로 치즈 숙성시 10°C 이상에서 치즈를 숙성시키면 생성 지방산 종류 중 긴 사슬 지방산류가 다량 생성되어 rancid flavor를 생성한다는 보고(19)에

따라 실제 체다 치즈 숙성시 10°C 이하로 설정하였다.

Fig. 3은 숙성온도를 10°C로 하여 숙성기간을 최대 7일로 하여 치즈의 총휘발성 유리지방산 생성을 검토하였다. 숙성 초기 24시간 동안에는 유리지방산 생성량이 증가하지 않았으나 숙성기간이 경과됨에 따라 점차 증가하였으며 숙성 7일째에는 융합주와 *L. helveticus*가 많은 유리지방산을 생성하였다. 일반적으로 숙성 24시간 이후 융합주와 *L. helveticus*는 *L. bulgaricus*에 비하여 신속하게 총 유리지방산을 생성하였다. 상기 결과는 치즈의 지방 분해에 기인한 것으로 Hwang 등(21)의 연구결과와 일치하였다.

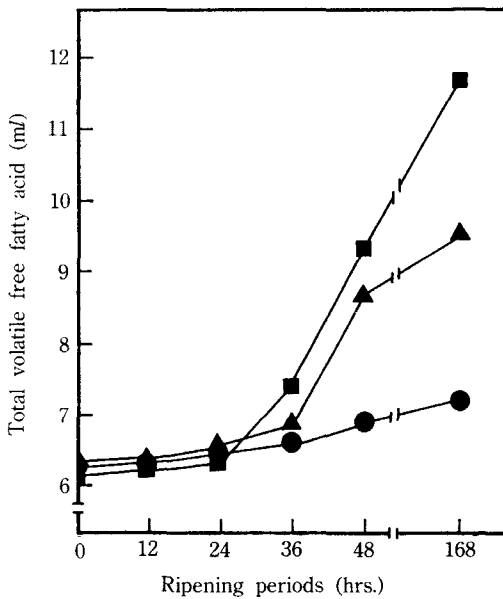


Fig. 3. Change of total volatile fatty acid in cheese during ripening periods at 10°C.

●: *L. bulgaricus*, ▲: *L. helveticus*, ■: Fusant

관능검사

각 균주에서 조제한 조효소액을 가공치즈와 10°C에서 7일간 반응시켜 숙련된 panelist들에 의해 치즈 flavor 강도와 체다 flavor 그리고 전체적인 선호도에 대하여 관능검사를 실시하였다(Table 4). 그 결과 control과 비교하여 *L. helveticus*와 융합주는 체다 flavor를 많이 느끼게 하였으나 *L. bulgaricus*는 다소 발현 flavor가 약한 편이었다. 향기강도(flavor intensity)는 융합주가 가장 강한 flavor를 생성하여 지방산류가 다량 생성되었음을 암시하였으며 *L. bulgaricus*는 flavor 강도가 낮은 편이었다. 전체적인 선호도에 있어서 *L. helveticus*가 가장 양호한 것으로 나타났으며 융합주에 의해서 생성된 flavor도 긍정적인 선호도를 나타내었다. 따라서 본 융합주에 의해서 생성된 flavor는 지방산류는 물론 기타 flavor 물질이라도 관능적으로 선호도가 높고 특히 체다 flavor로서 특징을 가진 것으로 생각되어 본 융합주의 산업적 이용가능성이 매우 높을 것으로 사료되었다.

요 약

*Lactobacillus bulgaricus*와 *Lactobacillus helveticus*의 원형질 융합주를 만들고, 융합주의 치즈 숙성과 관련된 기능적 특성을 조사하기 위하여 산 생성능, lactase, protease 및 lipase 등 중요 효소활성과 휘발성 지방산 생성량 등을 분석하였으며, 최종적으로 본 융합주를 이용하여 제조된 cheddar cheese의 품질 검사를 실시하였다. 융합주의 산 생성능은 두 모균주와 비교해 볼 때 큰 차이는 없었으나, 융합주의 lipase 및 총 휘발성 지방산 생성능은 현저히 높은 수치를 보였다. 실제, 본 융합균주를 이용하여 10°C에서 7일간 숙성제조한 cheddar cheese의 휘발성 지방산 생산량 역시 두 모균주의 경우와 비교해서

Table 4. Effect of mean flavor panel scores of ripened imitation processed cheese¹⁾

Treatment	Preference ²⁾	Intensity ³⁾	Cheddar flavor quality ⁴⁾
<i>L. bulgaricus</i> enzyme	3.2	2.4	1.3
<i>L. helveticus</i> enzyme	5.3	4.2	3.6
Fusant enzyme	5.0	7.6	4.1
Control (no enzyme treatment)	3.6	1.2	1.9

1) Cheese was treated with crude enzyme at 10°C for 7 days, 2) Preference: 0(low)~8(high), 3) Intensity: 0(low)~8(high), 4) Cheddar flavor quality: 0(low)~5(high)

크게 향상된 값을 나타내었다. 또한 관능검사 결과도 두 모균주를 이용하여 숙성시킨 cheese에 비해서 융합균주로 숙성시킨 제품이 그 선호도 및 향미의 강도면에서 훨씬 우수함을 증명하였다.

사 사

본 연구는 1991년도 문교부 지원의 유전공학 연구를 위한 학술 연구 조성에 의하여 수행되었으며 지원하여 주심에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ferenczy, L. 1980. Fusion of protoplasts of auxotrophic fungal mutants: Diversity in the genetic background of nutritional complementation. L. Ferenczy and G.L. Farkas (ed), Pp. 55-62. In *Advances in Protoplast Research*. Pergamon Press. Oxford.
2. Morgan, A.J. 1983. Yeast strain improvement by protoplast fusion and transformation. In 6th International Protoplast Symposium. pp. 156-166. Basel.
3. Anne, J., H. Eyssen and P. De Sommer. 1976. Somatic hybridization of *Penicillium roqueforti* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature*. **262**: 719-721.
4. Fournier, F., C. Gerbaud, H. Balano, M. Aigle, T. Heslot and M. Guerieau. 1980. Use of spheroplasts to transform yeast with chimeric plasmids. L. Ferenczy and G.L. Farkas (ed), Pp. 43-48. In *Advances in Protoplast Research*. Pergamon Press. Oxford.
5. Sentandreu, R., E. Herrero, M., V. Elorza, H. Rico and J. Pastor. 1983. Synthesis and assembly of wall polymers on regenerating yeast protoplasts. In 6th International Protoplast Symposium. Pp. 187-195. Basel.
6. Hopwood, D.A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**: 237-272.
7. Kanatani, K., K. Yoshida, T. Tahara, M. Sakamoto and M. Oshimura. 1990. Intraspecific protoplast fusion of *Lactobacillus plantarum*. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1185-1187.
8. Sharpe, M.E. 1979. Lactic acid bacteria in the dairy industry. *J. Soc. Dairy Technol.* **32**: 9-18.
9. Lawrence, R.C., L.K. Creamer and J. Gilles. 1987. Cheese ripening technology: Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Sci.* **70**: 1748-1760.
10. Argyle, P.J., G.E. Mathison and R.C. Chandan. 1976. Production of cell-bound proteinase by *Lactobacillus bulgaricus* and its location in the bacterial cell. *J. Appl. Bacteriol.* **41**: 175-184.
11. Park, H.J., H.S. Baik, J.C. Song and H.K. Jun. 1993. Studies on the protoplast fusion between *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**: 107-112.
12. Harrigan, W.F. and M.E. McCance. 1976. MRS fermentation medium. In *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press. San Francisco.
13. Kaneko, T., H. Suzuki and T. Takahashi. 1987. Influence of cellular components and redox potential of liquid concentrated culture of *Lactobacillus bulgaricus* on acid-producing activity and viability. *J. Dairy Sci.* **70**: 1128-1133.
14. Song, J.C. 1983. Solvent extractin of lactose from skim milk powder and the application of the protein as a replacement for caseinate. The Ohio State Univ. Ph.D. Thesis.
15. Kim, T.H. 1985. The lactose utilization systems and strain improvement by protoplasts in *Lactobacillus sporogenes* and *Lactobacillus casei*. Seoul National Univ. Ph.D. Thesis.
16. Verdi, R.J., D.M. Barbano, M.E. Dellavalle and G.F. Senyk. 1987. Variability in true protein, casein, nonprotein, nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. *J. Dairy Sci.* **70**: 230-242.
17. Stead, D. 1983. A fluorimetric method for the determination of *Pseudomonas fluorescens* AR II lipase in milk. *J. Dairy Res.* **50**: 491-502.
18. 유제현, 中西武雄, 頂山亭三. 1974. 각종 유산균의 풍미성분 생성에 관한 연구. I. 각종 유산균의 유산, 비단백태 질소, 아미노태 질소, 또는 유리 지방산 생성에 관한 지방의 영향. *Jap. J. Dairy Sci.* **23**: A-195-202.
19. Law, B.A. and A.S. Wigmore. 1983. Accelerated ripening of Cheddar cheese with a commercial proteinase and intracellular enzymes from starter streptococci. *J. Dairy Res.* **50**: 519-525.
20. 광해수. 1989. 리파제의 특성이 체다치이즈의 풍미 향상에 미치는 영향. *식품과학과 산업.* **22**: 70-77.
21. Hwang, J.H., J.W. Huh and J.H. Yu. 1987. Studies on the flavor changes during ripening in domestic cheddar cheese. II. The changes of volatile free fatty acids and volatile carbonyl compounds. *Kor. J. Dairy Sci.* **9**: 110-117.

(Received May 20, 1993)