

Lactobacillus acidophilus 88의 Protoplast 형성 및 재생에 관한 연구

전홍기* · 허 경 · 조영배 · 백형석
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Studies on the Protoplast Formation and Regeneration of *Lactobacillus acidophilus* 88

Jun, Hong-Ki, Kyeong Heo, Young-Bae Jo and Hyung-Suk Baik
Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University,
Pusan 609-735, Korea

Abstract — In the course of the study on strain improvement by protoplast fusion, *Lactobacillus acidophilus* 88 protoplasts production and regeneration conditions were investigated. This strain produced a bacteriocin that revealed strong inhibitory activity against various indicator strains, especially *L. helveticus* CNRZ 1096. Protoplasts of *L. acidophilus* 88 strains were very efficiently obtained by treatment with 125 µg/ml lysozyme in a protoplast forming buffer containing 20 mM N-2-hydroxy-ethyl-piperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid(HEPES, pH 7.0) and 1 M sucrose at 37°C for 30 min. However, treatment with mutanolysin was not effective for the production of *L. acidophilus* 88 protoplasts under the same conditions. High protoplast yield was obtained from the cells at the middle to late logarithmic growth phase in the de Man, Rogosa and Sharpe(MRS) medium. Regeneration was efficiently accomplished with the MRS medium containing 10% sucrose.

유전자 이전에 의한 균주 개발 방법으로는 transformation(1), conjugation(2), transduction(3), protoplast fusion(4) 등이 있으며, 이러한 방법들 중에서 protoplast fusion은 유전자 cloning 기법과 함께 균주육종을 위한 조작기법으로 널리 이용되고 있으며, 특히 유산균과 같이 유전물질 교환기술이 발달되지 않은 분야에서 산업적으로 이용되고 있는 균주의 개량에 적절한 방법으로 평가되고 있다. 이 방법은 미생물 고유의 특성에 구애받지 않고, 새로운 종류의 미생물을 얻을 수 있다는 것이 장점이며, 일반적으로 동종내 교환(5) 뿐만 아니라, 서로 다른 종(6), 또는 속(7) 간에서도 유전자 재조합이 가능하다.

실제로, *Lactobacillus*의 경우에는 유전 전달 시스템에 대한 정보의 부족, 안정된 marker, 적합한 vector의 개발 등 여러가지 문제들로 인하여 산업적 유용균주를 개발하는데 많은 어려움이 따르고 있다(5). *Lactobacillus acidophilus*는 각종 유제품 생산에 이용되는 균주로서 사람의 장에서 주로 발견되며 여러 *Lactobacillus* 중에서도 탁월하게 장내 정상 균총을 안

정화시켜 주며, 바람직하지 못한 균주의 생육을 저해시켜서 장질화를 예방해 주는 데 큰 역할을 한다(8). 뿐만 아니라, 장조직에서 암을 유발시키는 세균의 효소 생성을 억제시켜 주는 작용을 가진다는 보고(9)도 있다. 이러한 작용들은 *L. acidophilus*가 모든 *Lactobacillus*들 중에서 가장 뛰어난 bacteriocin 생성능을 가지고 있다는 연구 결과(10, 11)들과도 깊은 연관이 있다.

Bacteriocin은 그람 양성, 또는 음성 세균의 여러 종들에 의해 생성되는 항균성 peptide나 단백질(12)로서 세균의 생육을 저해한다. Bacteriocin은 *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, 및 *Lactobacillus* 등의 젖산균에 의해 생성되며(13) 특히 nisin은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*가 생산하는 bacteriocin으로서 가공식품에 있어서 중대한 식품오염균인 *Clostridium botulinum*에 대해서 항균작용이 있기 때문에 아질산을 대신하는 식품보존제로서 통조림가공등에 이용되고 있으며, 미국에서는 1988년 FDA(Food and Drug Administration)로부터 GRAS(Generally Recognized As Safe)로 인가되어 저온살균 치즈에의 사용이 인가되어 있다. 최근, nisin이 식품 방부제로서 안정하며, 그 효과 또한 우수하다고

Key words: *Lactobacillus acidophilus* 88, protoplast formation, regeneration
*Corresponding author

인정되어 현재 세계 45개국에서 널리 이용되고 있다는 보고도 있다(14). *L. acidophilus*의 bacteriocin과 관련된 산업적 이용, 개발 및 성질 규명에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있으며, 발효 산업 측면에서도 큰 기대를 모으고 있다. 그러나 bacteriocin 생성능이 우수한 *L. acidophilus*의 경우, 절대 혐기적인 성장환경을 필요로 하며 세포조작의 어려움 때문에 균주개발에 대한 제반 기초 연구가 극히 부족한 실정이다(15).

*L. acidophilus*가 가지는 bacteriocin 생성능을 유제품의 발효 공정상에 접목시킨다면 잡균 오염 예방의 측면에서 상당한 의의를 가질 것으로 기대되어, 본 연구에서는 유산균에 대한 균주육종의 일환으로 bacteriocin 생성능이 우수한 *L. acidophilus* 88과 산생성능, 내산성, 및 내열성 등이 우수한 *L. casei*를 융합시키기 위한 기초실험으로 *L. acidophilus* 88의 protoplast 형성 및 재생조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용된 균주인 *L. acidophilus* 88(16)은 미국 North Carolina 대학에서 분양 받아 사용하였다.

사용 배지 및 완충용액

*Lactobacillus*의 생육 및 재생에 사용된 배지의 조성은 Table 1과 같았다. Protoplast를 형성시키는데

Table 1. Composition of MRS and regeneration media (RM)

Ingredient	MRS medium(%)	RM(%)
Peptone	1	1
Beef extract	1	1
Yeast extract	0.5	0.5
Glucose	2	2
Tween 80	0.1	0.1
K ₂ HPO ₄	0.2	0.2
Sodium acetate	0.5	0.5
Ammonium citrate	0.2	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	0.02
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.005	0.005
Sucrose		10
Gelatin		2.5
MgCl ₂		6 mM
CaCl ₂		6 mM
Agar	1.5	1.2

(pH 7.0)

MRS(Man Rogosa Sharpe) medium(17)을 사용하였다. 항생제 내성 균주 분리시에는 각종 항생제가 농도별로 포함된 MRS 배지와 RM(Regeneration Medium) 배지를 사용하였다. 사용 완충액으로서는 균을 세척하는데 20 mM HEPES buffer(N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, pH 7.0)를 사용하였으며, 삼투압 안정제로서 1 M sucrose를 20 mM HEPES buffer에 가하여 PFB(protoplast forming buffer)로 사용하였다.

사용 시약 및 효소

Protoplast의 형성을 위한 용균효소인 mutanolysin (endo-N-acetylmuramidase, 6,080 units/mg solid)과 lysozyme 그리고 HEPES와 각종항생제(streptomycin, lincomycin, rifampicin, kanamycin등)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, 63178 U.S.A.)제품을 사용하였다. 또한 균의 증식을 위한 MRS 배지는 Difco사 제품을 사용하였고 그의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

Bacteriocin 생성능 검토

Staskawics등(18)의 방법을 약간 변형시켜서 bacteriocin 생성 유무를 조사하였다. 즉, bacteriocin 생성능을 조사하고자 하는 균주의 배양액을 MRS agar plate에 5 μl씩 점적하여 37°C에서 6시간 배양한 후, 전배양된 indicator 균액 200 μl를 0.8% top agar 4 ml에 섞어 중층시킨 다음, 37°C에서 하룻밤 동안 배양시켰다. 이때 보여지는 생육 저지환을 통해서 bacteriocin 생성능을 검사하였다.

모균주에 대한 항생제 내성 시험 및 돌연 변이주의 분리

융합 조건에 알맞은 항생제 marker를 결정하기 위하여 대표적인 몇 종류의 항생제들을 첨가하여 내성 시험을 실시하고 spontaneous mutation 방법(16)을 이용하여 내성 균주를 선별하였다. 즉 *L. acidophilus* 88을 항생제 농도가 낮은 고체배지에 접종한 후, 생성된 colony를 항생제가 든 선택 배지에 옮기고, 점차적으로 항생제 농도를 높여 주면서 동일 방법을 계속하여 높은 항생제 농도에 내성을 가진 변이주를 분리하였다.

Protoplast의 형성

Protoplast 형성은 Fig. 1과 같이 행하였다. 균을 MRS broth에 접종한 후 37°C에서 8~12시간 정지 배양시킨 후, 4000×g에서 10분간 원심분리하여 균

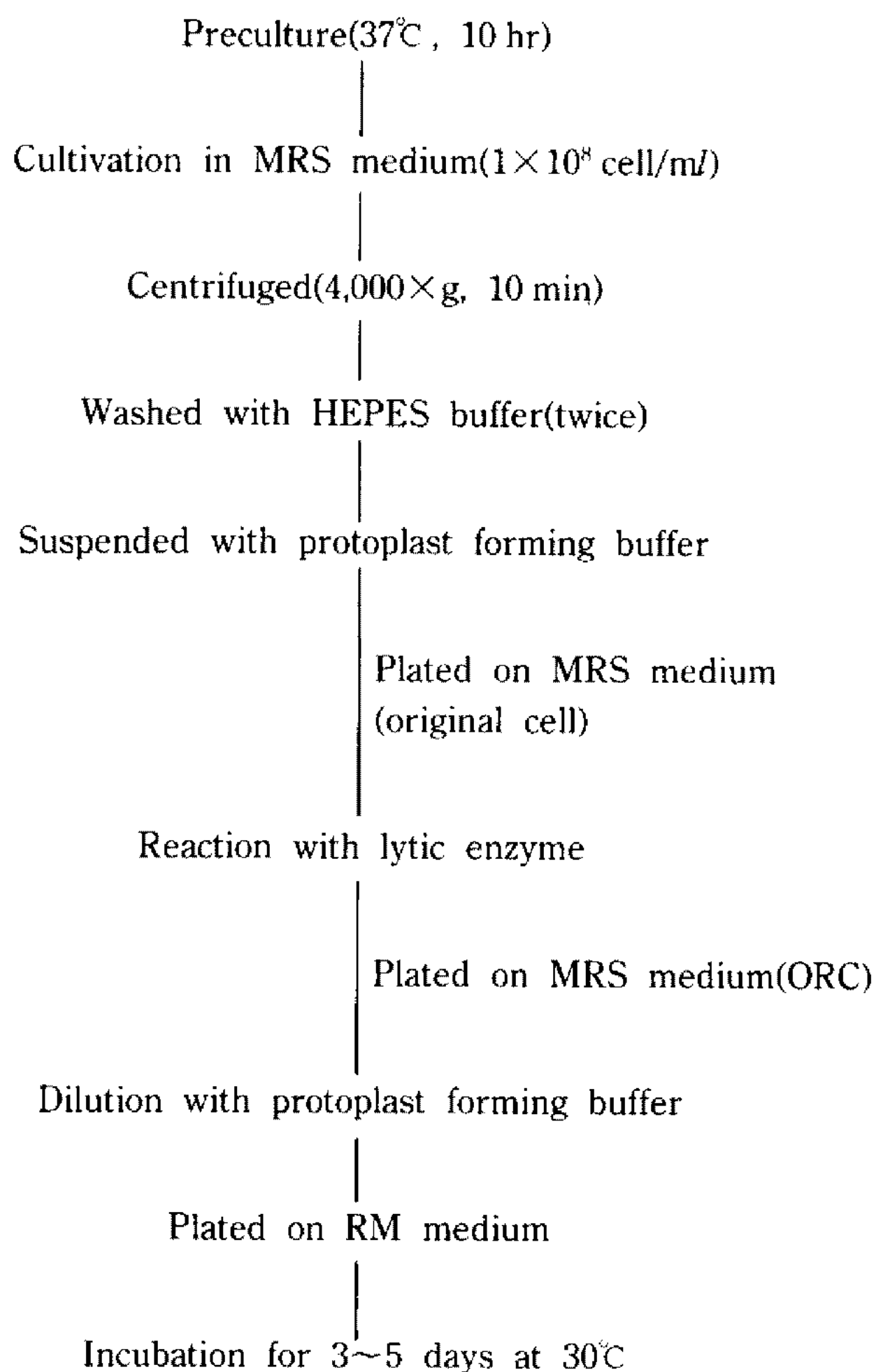


Fig. 1. Procedure of protoplast formation and regeneration.

체를 모은 다음, 20 mM HEPES buffer(pH 7.0)로 2회 세척하고 PFB에 현탁하였다. Lysozyme을 125 µg/ml 농도로 녹인 PFB를 균 현탁액에 가하여, 효소반응을 37°C에서 30분 동안 행하였다. 원형질체 현탁액을 물로 희석하고 MRS plate 배지에 plating하여 얻은 삼투저항성 세포수(osmotic resistant cell)를 계산하여 원형질체 형성율을 구하였다.

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

Protoplast 형성에 대한 제반조건

유산균의 protoplast 형성에 영향을 주는 요인인 효소 처리 전의 생육시기, 처리 효소의 종류 및 농도, pH, 안정제 농도 등의 조건들을 검토하였다. 효소의 농도는 mutanolysin을 12.5, 25, 37.5 µg/ml로 하고 lysozyme은 25, 50, 125, 250 µg/ml의 농도별로 실시하였다. 반응 시간은 15, 30, 50분으로 하고, sucrose 농도는 0.25, 0.5, 0.75, 1 mol로, Mg²⁺ 농도는 0, 6,

12, 24 mM로 하였다.

Protoplast의 재생

Fig. 1에서와 같이 protoplast 현탁액을 PFB로 희석하여 재생 배지에 도말한 후, 균 재생을 위하여 30°C에서 3~5일간 혐기상태하에서 배양하였다. Protoplast화되지 않은 균 수를 알기 위하여 protoplast 현탁액을 물로 희석하여 MRS 배지에 도말하고 혐기적으로 37°C에서 2일간 배양하였다. 재생빈도는 원형질체 수에 대한 순수 재생균수의 비로 나타내었다.

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

Protoplast 재생조건 검토

효소 처리 시간에 따른 재생 빈도를 알아보기 위하여 15, 30, 50분간 반응시키고, 삼투압 안정제에 따른 효과를 검토하기 위하여, sucrose가 농도별로 첨가된 고체 배지상에서 도말하여 관찰하였다.

결 과

모균주의 bacteriocin 생성능 검토

L. acidophilus 88의 bacteriocin 생성능을 검토한 결과, Table 2에서와 같이 여러 indicator 균들에 대하여 생육저지능을 나타내었으며, 특히, *L. helveticus* 균주들에 대해서는 생육저지능이 훨씬 강했다. *L. acidophilus* 88은 non-lactobacilli indicator 균주들에 대하여 lactobacilli indicator 균주들보다는 약한 생육저지능을 나타내었다. 특히 병원성 균인 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* 등에 대해 생육저지능을 나타내어 발효공정시 잡균오염 방지에 어느 정도 효과가 있을 것으로 기대되었다. 이후의 bacteriocin 생성능 검토에는 *L. acidophilus* 88의 생육저지능 효과가 가장 양호했던 *L. helveticus* CNRZ 1096균을 indicator로 사용하였다(Fig. 2). *L. acidophilus* 88 이외의 protoplast 융합실험의 다른 모균주인 *L. casei*는 Table 3 및 Fig. 2에서와 같이 bacteriocin 생성능이 미약하거나 거의 없었다.

항생제 marker 결정 및 변이주 분리

Protoplast 융합주를 식별하는 방법에는 영양 요구성 marker에 의한 방법(19), 항생제내성 marker에 의한 방법(20), 두가지의 병행법(21)이 있으나 그 중에서 항생제 내성 marker에 의한 방법을 이용하기 위해 spontaneous mutation방법(16)으로 모균주인 *L.*

Table 2. Bacteriocin production of *L. acidophilus* 88

Strains	Bacteriocin production
Lactobacilli indicators	
<i>L. acidophilus</i>	+
<i>L. bulgaricus</i> IFO 13953	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	+
<i>L. helveticus</i> IAM 12090	+
<i>L. helveticus</i> CNRZ 328	+
<i>L. helveticus</i> CNRZ 1094	+
<i>L. helveticus</i> CNRZ 1096	+
<i>L. plantarum</i>	-
<i>L. brevis</i>	-
<i>L. casei</i> KCTC 1121	-
Non-Lactobacilli indicators	
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3026	(+)
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3851	+
<i>Sarcina lutea</i> IFO 1099	(+)
<i>Streptococcus lactis</i>	(+)
<i>Pseudomonas fragi</i> IFO 3458	(+)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	(+)
<i>Serratia polymuthicum</i> IFO 3055	-
<i>Staphylococcus aureus</i> IAM 1011	+
<i>Pediococcus acidilactis</i> KCTC 3101	-
<i>Escherichia coli</i>	-

+ : good production, (+): weak production, - : no production.

acidophilus 88과 *L. casei*의 항생제 내성변이주를 선별을 시도하였다. Table 4에서와 같이 streptomycin(2 mg/ml)에 내성을 가진 *L. casei*와 kanamycin(600 µg/ml)에 대해 내성을 나타내는 *L. acidophilus*의 변이주를 분리하였다.

생육 시기에 따른 protoplast 형성 조건

생육 시기에 따른 protoplast 형성 조건을 검토하기 위해 MRS broth에 전배양액 1%(V/V)를 접종하여 37 °C에서 정치배양하면서 3시간 간격으로 생육도를 측정하였으며, 배양시간에 따른 protoplast 형성율을 검토하였다. Fig. 3에서와 같이 *L. acidophilus* 88의 경우 대수증식기 중반 이후부터 말기까지 즉 배양 6~10 시간까지가 protoplast 형성이 가장 양호하였다.

Protoplast 형성에 미치는 세포벽 분해 효소의 영향

대부분의 유산균의 경우 lysozyme에 저항성을 가지고 mutanolysin에 대한 감수성이 있는 것으로 알려져 있으며 특히 lactobacilli는 streptococci에 비해

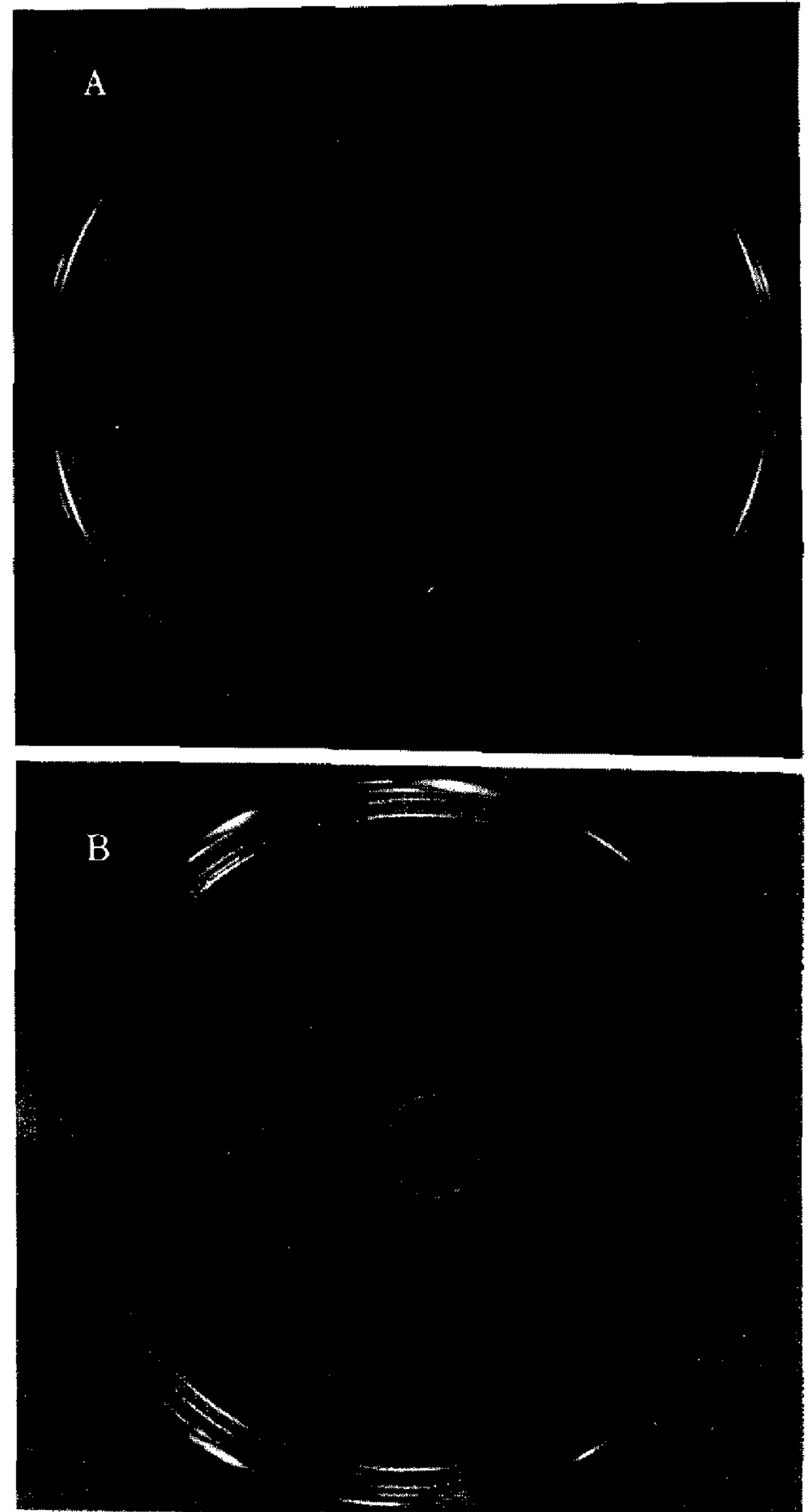


Fig. 2. Antagonistic activity of *L. acidophilus* 88 (A) and *L. casei* (B) overlaid with *L. helveticus* CNRZ 1096.

Table 3. Bacteriocin production of *L. casei*

Indicator strains	Bacteriocin production
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>L. acidophilus</i>	(+)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	-
<i>L. helveticus</i> CNRZ 1094	-
<i>L. helveticus</i> CNRZ 1096	-
<i>Sarcina lutea</i> IFO 1099	-

(+): weak production, - : no production.

lysozyme에 저항성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(22). 그러나 Fig. 4와 5에서와 같이 *L. acidophilus*

Table 4. Antibiotic resistance patterns of *L. casei*, *L. acidophilus* and their mutant strains

Antibiotics	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i> mutant	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i> mutant
Streptomycin (mg/ml)				
0.5	-	+	-	-
1	-	+	-	-
2	-	+	-	-
Kanamycin (µg/ml)				
200	-	-	+	+
300	-	-	+	+
400	-	-	+	+
500	-	-	-	+
600	-	-	-	+

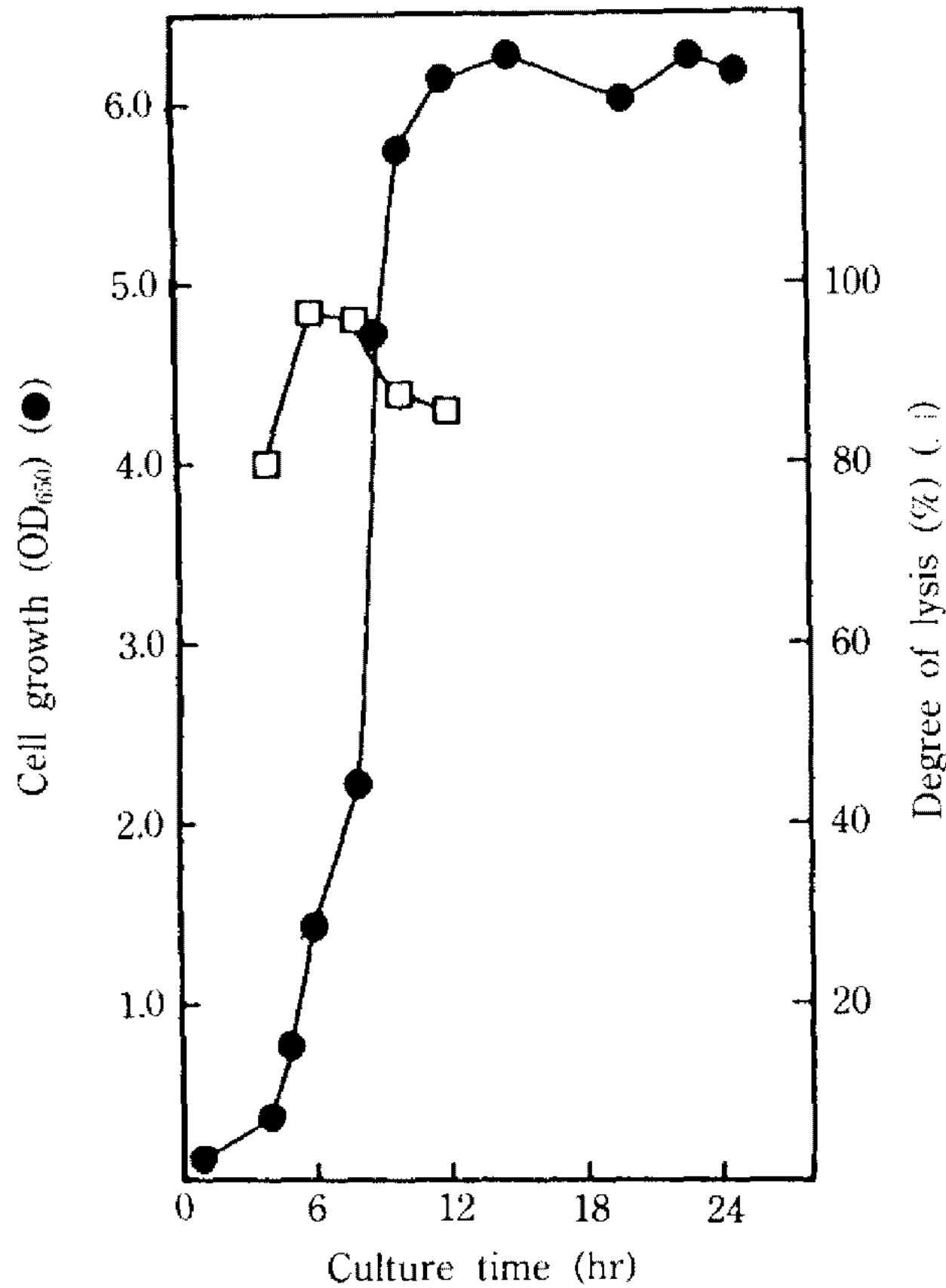


Fig. 3. Effect of growth phase on protoplast formation of *L. acidophilus* 88.

The lytic enzyme concentration used for protoplast formation was 125 µg lysozyme/ml.

88의 경우 lysozyme 125 µg/ml 이상일 때 protoplast의 형성율이 매우 우수하였으며, mutanolysin을 농도별로 첨가하였을 때는 lysozyme의 경우에서와 같이 양호한 protoplast 형성효율을 얻지 못하였다.

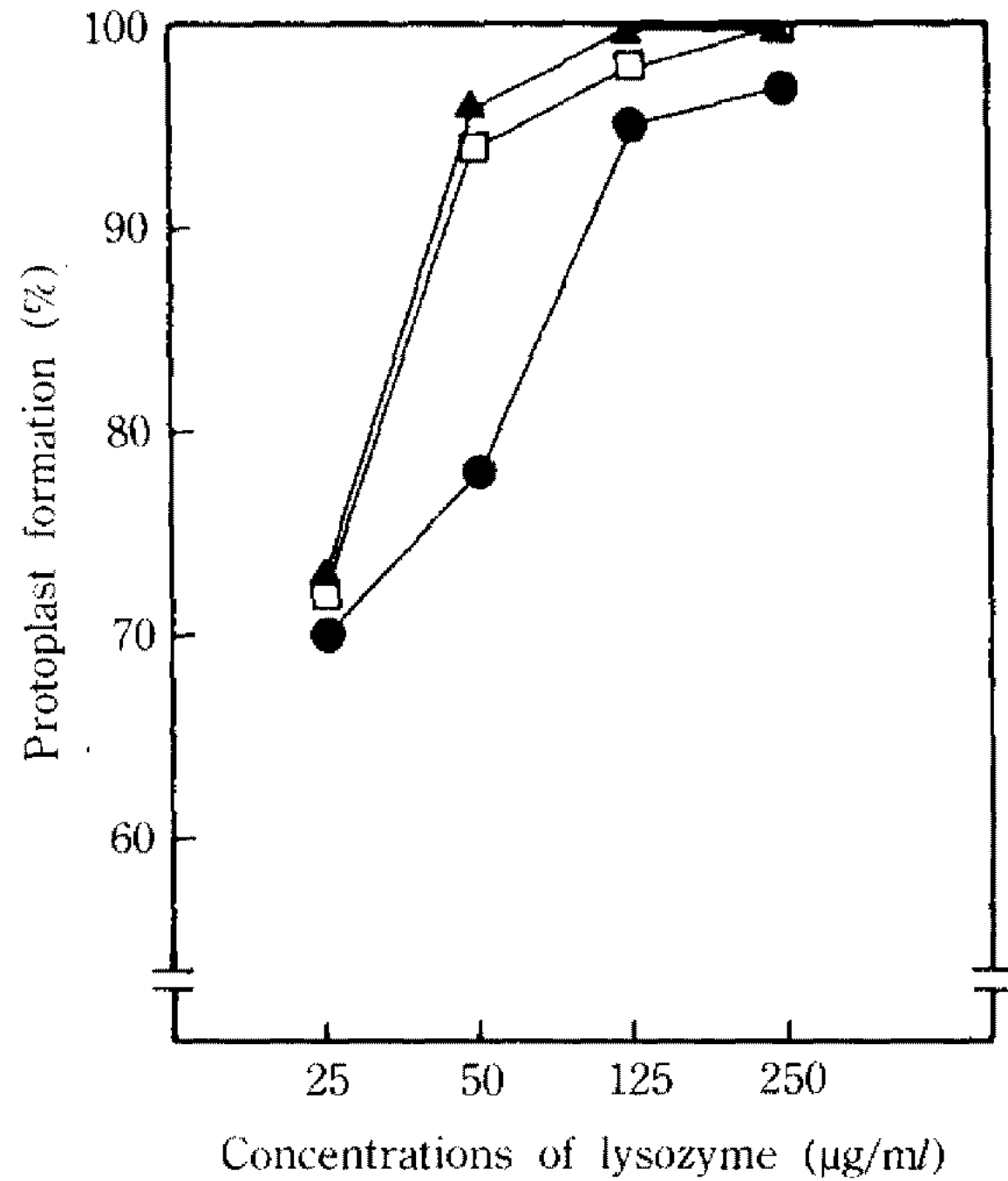


Fig. 4. Effect of lysozyme concentrations on protoplast formation of *L. acidophilus* 88.

Treatment time: ●; 15 min. □; 30 min. ▲; 50 min.

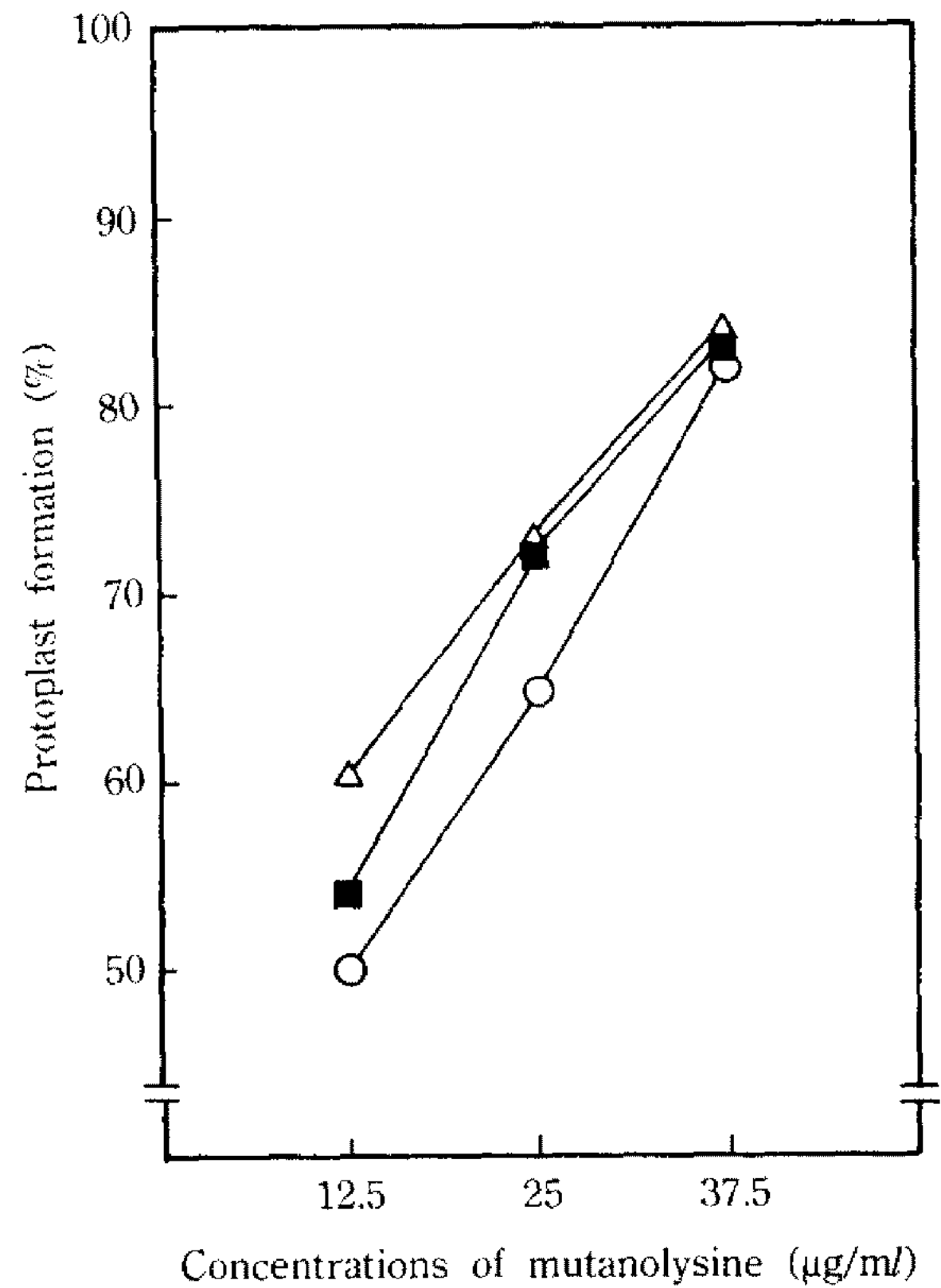


Fig. 5. Effect of mutanolysin concentrations on protoplast formation of *L. acidophilus* 88.

Treatment time: ●; 15 min. □; 30 min. ▲; 50 min.

Protoplast 형성에 미치는 삼투압 안정제의 영향
PFB에 0.25, 0.5, 0.75 및 1 M의 sucrose를 각각

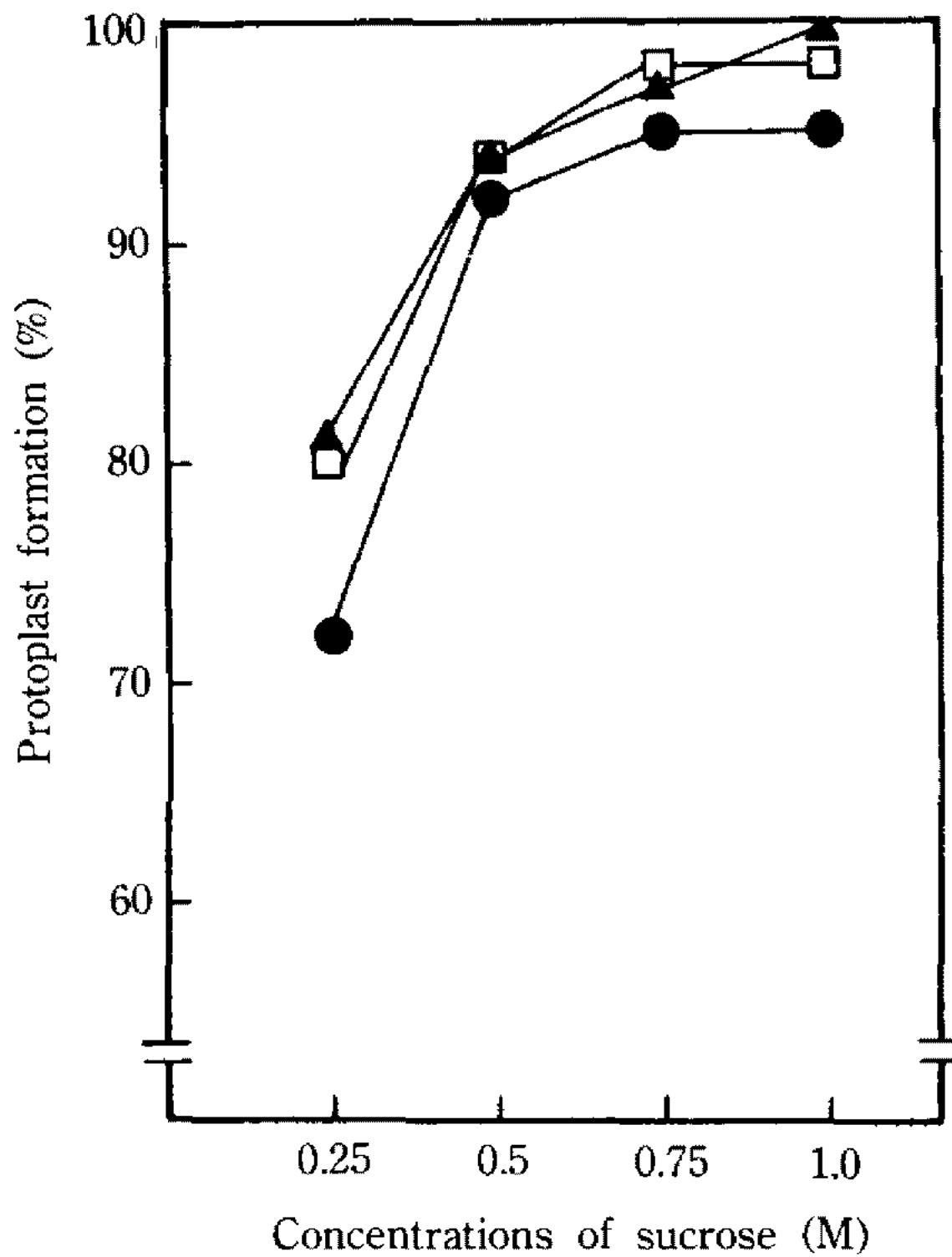


Fig. 6. Effect of sucrose concentrations on protoplast formation of *L. acidophilus* 88.

Reaction was performed with 125 µg/ml lysozyme dissolved in the 20 mM HEPES buffer containing various concentrations of sucrose.

Treatment time: ●; 15 min. □; 30 min. ▲; 50 min.

첨가하여 protoplast 형성에 미치는 삼투압 안정제의 영향을 검토한 결과, Fig. 6에서와 같이 *L. acidophilus* 88은 삼투압 안정제로서 sucrose 0.75 M과 1.0 M에서 protoplast 형성이 양호하였다. Sucrose가 삼투압 안정제로서의 역할 뿐만 아니라 세포벽 가수분해 자극제로서도 작용된다는 보고(23)도 있어, protoplast 형성시 적당한 농도의 sucrose가 protoplast 형성을 높여줄 수 있을 것으로 사료되었다. *L. reuteri*의 경우, 삼투압안정제로 sucrose와 MgCl₂를 사용하였을 때 protoplast 형성효율이 증가하였다는 보고(24)와 *L. casei*와 *L. delbrueckii*의 경우 MgCl₂에 의해 오히려 protoplast 형성효율이 급격히 감소하였다는 서로 상반된 보고(25)가 있어 PFB에 1.0 M의 sucrose를 첨가하여 MgCl₂가 protoplast 형성에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 7에서와 같이, MgCl₂ 6 mM까지는 protoplast 형성에 큰 영향을 미치지 않았으나, MgCl₂의 농도가 그 이상으로 증가할 수록 protoplast 형성 저해가 확실하게 나타났다. 이러한 결과들을 종합해 보면 원형질체 형성에 사용되는 공통적인 삼투압 안정제는 찾기 어려우며 삼투압 안정제의 종류와 농도가 균종에 따라 각각 다르다는 것을 알 수 있었다.

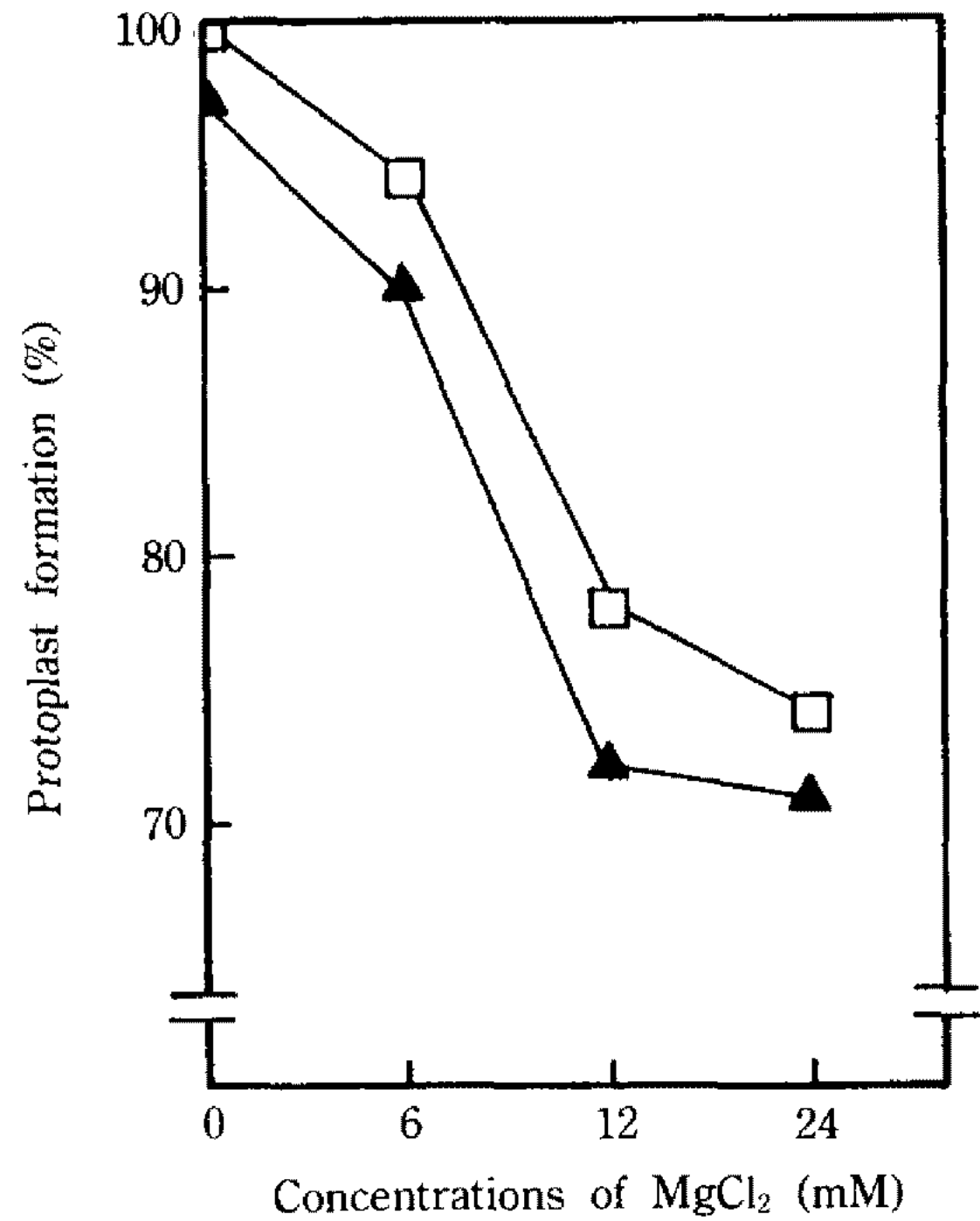


Fig. 7. Effect of Mg²⁺ concentrations on protoplast formation of *L. acidophilus* 88.

Reaction was performed with 125 µg/ml lysozyme dissolved in the 20 mM HEPES buffer containing various concentrations of Mg⁺⁺ ion.

Treatment time: △; 15 min. ■; 30 min.

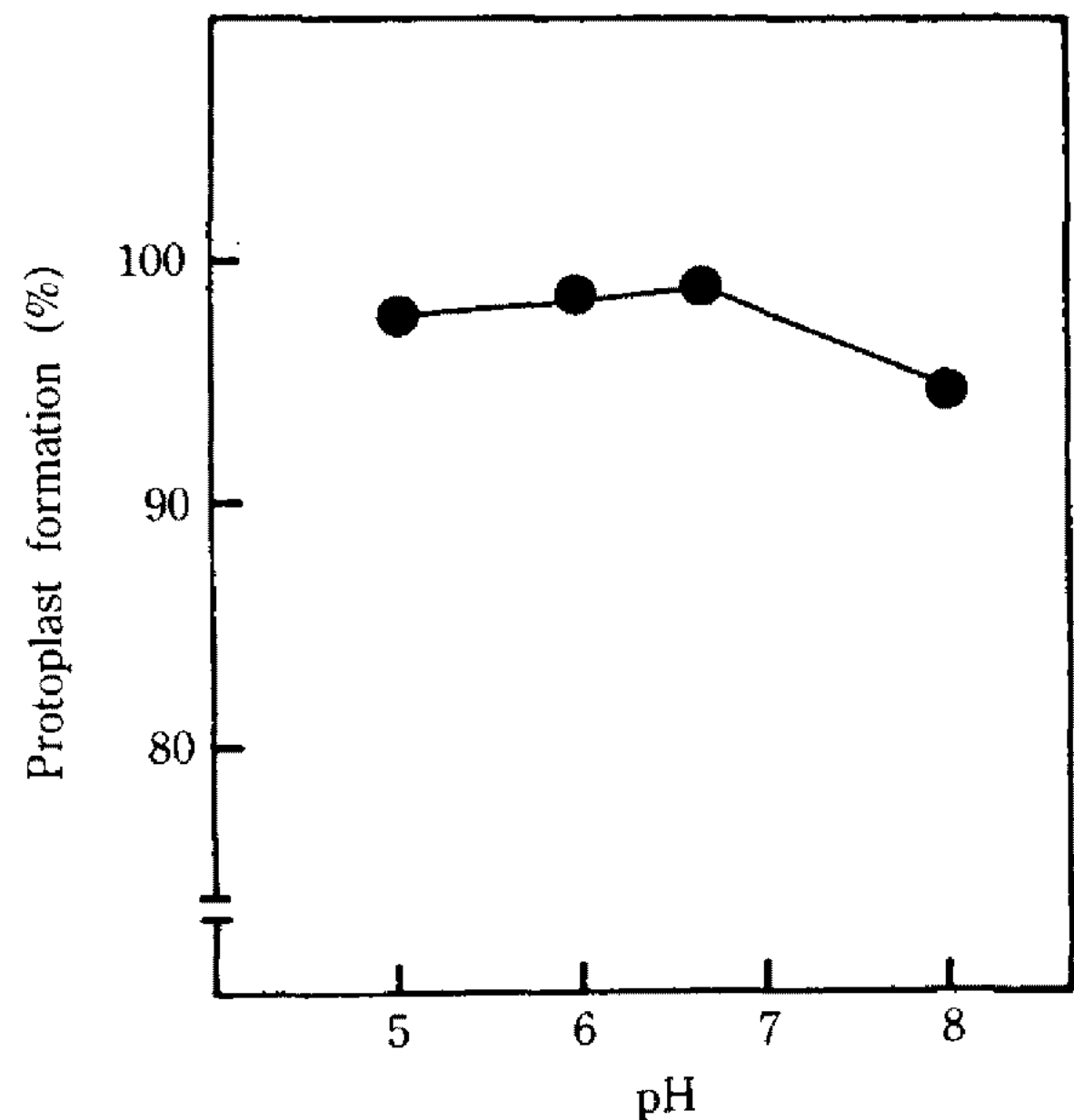


Fig. 8. Effect of pH on protoplast formation of *L. acidophilus* 88.

The lytic enzyme concentration used for protoplast formation was 125 µg lysozyme/ml.

pH에 따른 protoplast의 형성

원형질체 완충액의 pH와 protoplast 형성율과의 관계를 검토하기 위하여 pH 5는 20 mM citrate buf-

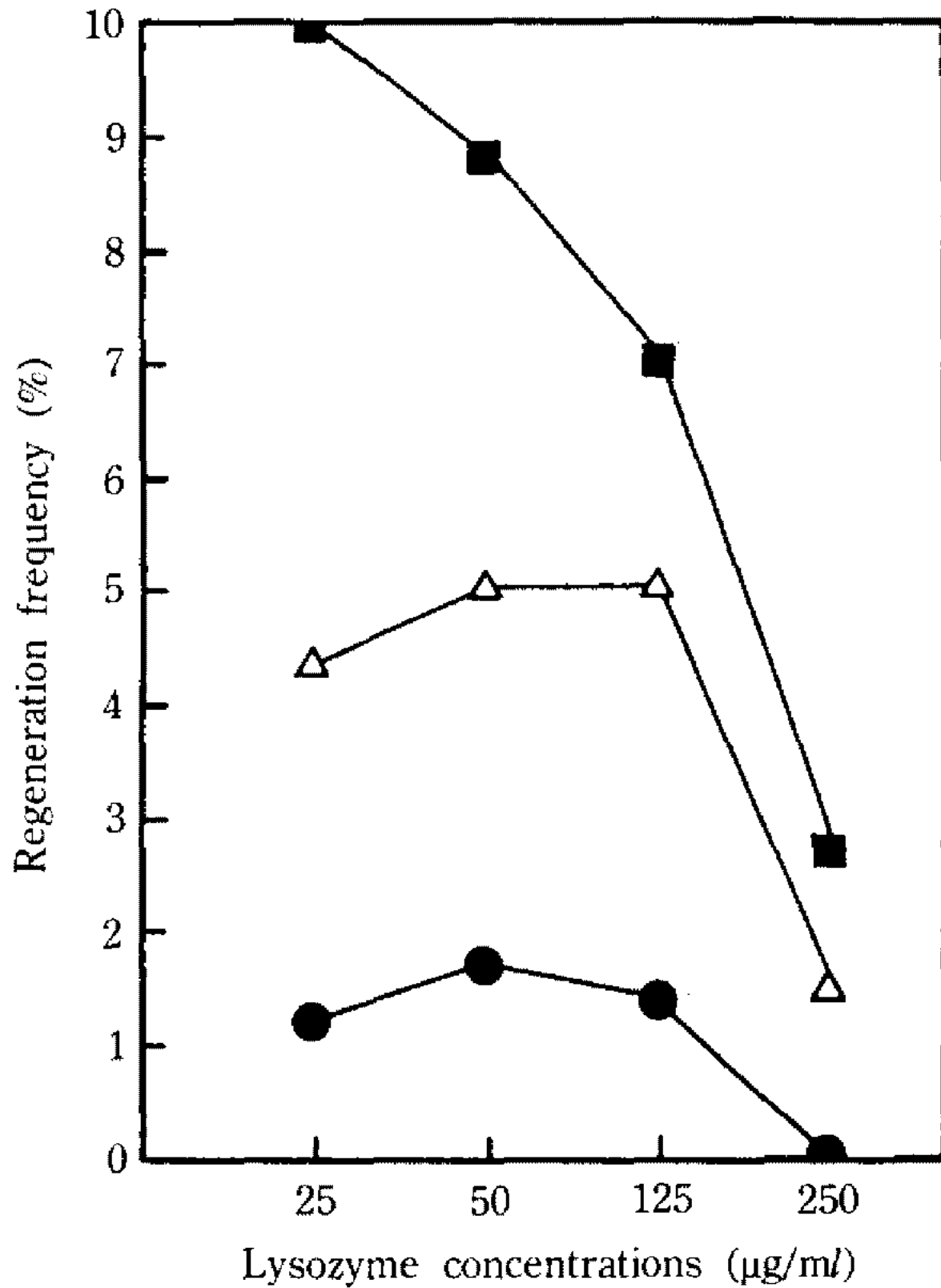


Fig. 9. Effect of lysozyme concentrations on protoplast regeneration of *L. acidophilus* 88.

Treatment time: ■; 15 min. △; 30 min. ●; 50 min.

fer, pH 6은 potassium phosphate buffer, pH 7은 20 mM HEPES buffer, pH 8은 20 mM Tris-HCl buffer를 이용하여 protoplast 형성율을 측정하였다. Fig. 8에서와 같이, *L. acidophilus* 88의 경우 pH 6과 7 부근에서는 protoplast 형성율이 매우 양호하였던 반면 pH 8 부근에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 더우기 *L. casei*의 경우 pH 5와 6 부근에서 protoplast 형성율이 극히 저조하지만 pH 7 이상에서는 protoplast 형성율이 매우 양호하다는 결과가 보고된 바 있다(25). 따라서 *L. acidophilus* 88과 *L. casei*를 융합시키기 위해서는 두 균주 공히 pH 7 부근에서 protoplast를 형성시키는 것이 융합효율 측면에서 가장 바람직할 것으로 생각되었다.

Protoplast 재생에 미치는 세포벽 분해효소의 영향

Protoplast 재생에 미치는 세포벽 분해효소의 영향을 검토한 결과, Fig. 9에서와 같이 lysozyme 농도가 증가할 수록 protoplast 형성율은 증가하였으나, 재생율은 감소하였다. 이러한 결과는 효소 처리 시간이 길어지면 재생하는데 필요한 세포벽 primer를 남기지 않고 거의 완전히 가수분해시키기 때문인 것으로 보고(20)되어 있다. 그러나 높은 재생율을 얻기 위해 효소

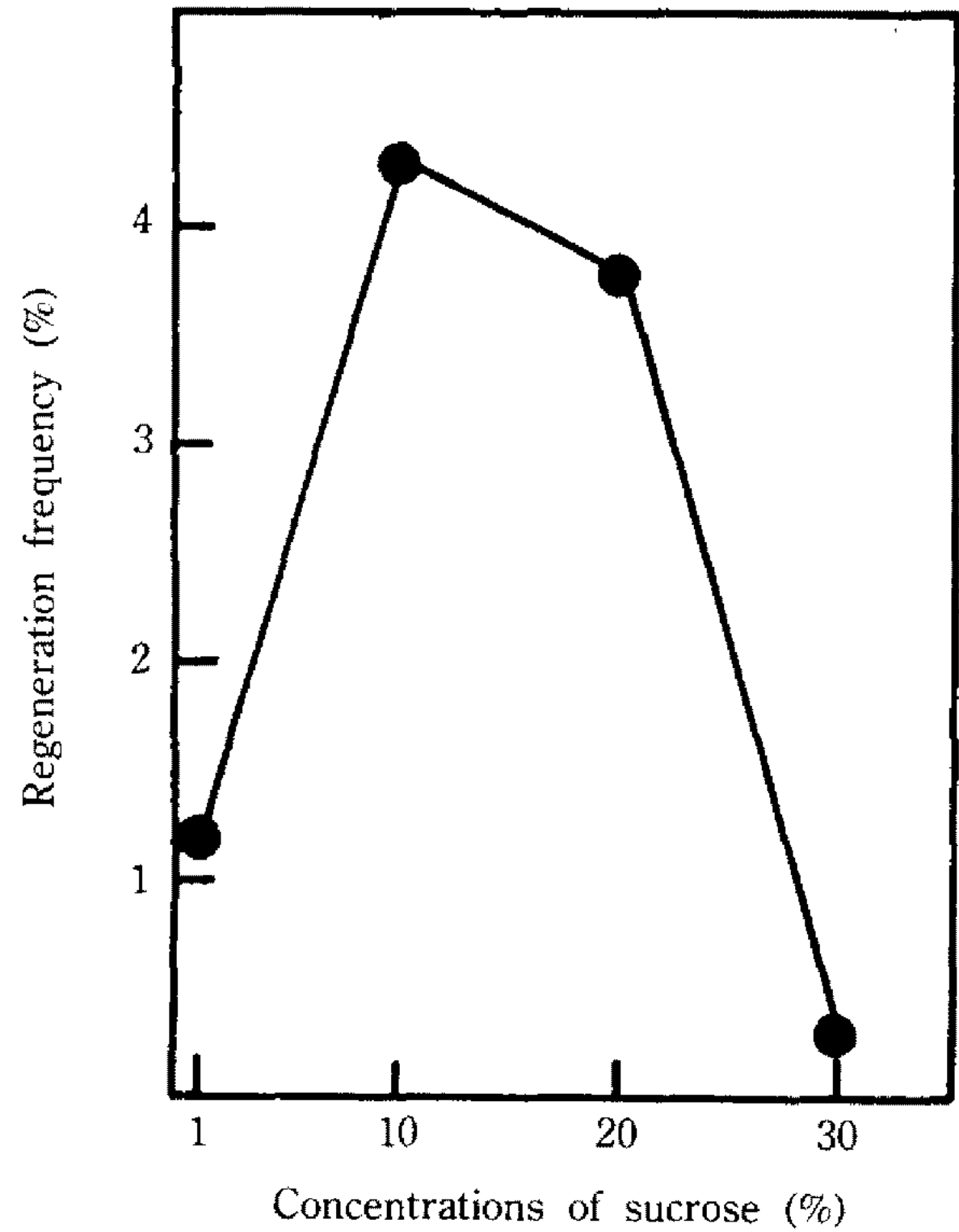


Fig. 10. Effect of sucrose concentrations on protoplast regeneration of *L. acidophilus* 88.

Reaction was performed with 125 µg/ml lysozyme dissolved in the 20 mM HEPES buffer containing various concentrations of sucrose.

처리 시간을 무조건 짧게하는 것은 융합하는데 유리하지 않으므로 효소 처리 시간을 protoplast 형성율과 재생율이 양호한 30분으로 하였다.

Protoplast 재생에 미치는 삼투압 안정제의 영향

Protoplast 재생에 미치는 sucrose 농도의 영향을 검토해 본 결과, Fig. 10에서와 같이 sucrose 농도 10%일 때 재생율이 가장 좋았으며 20%일 때도 양호하였다. 그러나, sucrose의 농도가 10% 이하이거나 20% 이상일 때에는 오히려 재생율이 감소하였다.

고 찰

유제품을 비롯한 발효음료, silage, kefir, 피클, koumiss, soy souce 등 발효식품의 소비가 증가함에 따라, 식생활과 밀접한 관계를 가지는 *Lactobacillus*는 유제품의 대량 수용에 대한 공급원으로서 중요성을 가지고 있기 때문에 발효기술 개선과 더불어 균주개량의 필요성이 대두되었다. 균주육종에 대한 조작기법중 protoplast fusion은 유산균과 같이 유전물질의 교환기술이 발달되지 않은 산업적 이용균주의 개량에 적절한 방법으로 평가되고 있다(4). 본 실험에서는, 이러한

Table 5. Conditions for protoplast formation of lactobacilli

Conditions	Lactobacilli strains				
	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. helveticus</i>
Culture age	middle log phase	middle to late log phase	middle log phase	middle or late log phase	middle or late log phase
Lytic enzyme	mutanolysin 5 µg/ml	lysozyme 125 µg/ml	mutanolysin 5 µg/ml	lysozyme 50 µg/ml + mutanolysin 2.5 µg/ml	lysozyme 50 µg/ml + mutanolysin 5 µg/ml
Reaction time	15 min.	30 min.	15 min.	10 min.	30 min.
Reaction temp.	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C
Stabilizer for protoplast	0.75 M sucrose	1.0 M sucrose	1.0 M sucrose	0.5 M sucrose	1.0 M sucrose

protoplast fusion 방법을 이용하여 lactase 활성, 산 생성능 및 내열성, 내산성이 뛰어난 *L. casei*와 강한 bacteriocin 생성능을 지닌 *L. acidophilus* 88간의 융합을 실시하기 위하여 먼저 *L. acidophilus* 88에 대한 protoplast 형성 및 재생에 대한 제반조건들을 살펴 보았다. 지금까지 발표된 여러 lactobacilli들의 protoplast 형성 조건들을 비교, 검토해 본 결과(Table 6), 생육시기에 따른 protoplast 형성은 *L. casei*와 *L. delbrueckii*(26), *L. helveticus*(27), *L. bulgaricus*(28), *L. acidophilus* 모두 대수증식기 중반이 가장 양호한 것으로 나타났으며, lytic enzyme의 종류와 효소처리시간 및 처리온도는 *L. casei*와 *L. delbrueckii* 모두 lytic enzyme으로 mutanolysine을 단독 사용하여 42°C에서 15분간 처리했을 때 높은 protoplast 형성효율을 얻었다. 그리고 *L. helveticus*는 lysozyme과 mutanolysine을 혼합, 병용하여 42°C에서 15분간 처리했을 때 높은 protoplast 형성효율을 얻었으며, *L. bulgaricus*는 *L. helveticus*와 마찬가지로 lysozyme과 mutanolysine을 혼합, 병용하여 37°C에서 10분간 처리했을 때 높은 protoplast 형성효율을 얻었다. 본 실험에 이용된 *L. acidophilus* 88은 lysozyme을 단독 사용하여 37°C에서 30분간 처리했을 때 높은 protoplast 형성효율을 얻었다. 또한 protoplast 안정제로서 모두 sucrose가 사용되었으나 그 농도는 각 균종마다 달랐다. 결과적으로 *Lactobacillus*에 대한 protoplast 형성조건은 종에 따라 다르기 때문에 유산간균 육종을 위한 기초자료로서 활용하기 위해서는 각 균주에 대해 protoplast를 만들기 위한 효소의 종류, 작용시간, 온도 및 안정제등이 연구되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

유산균 육종의 일환으로 protoplast fusion 방법을

사용하여 *Lactobacillus casei* KCTC 1121과 *Lactobacillus acidophilus* 88을 융합시키기 위해 먼저 *L. acidophilus* 88의 원형질체 형성 및 재생 조건을 조사하였다.

L. acidophilus 88은 다양한 indicator 균들에 대해 강한 생육저지효과를 나타내는 bacteriocin을 생산하였으나, *L. casei*는 bacteriocin 생성능이 거의 없었다. 융합시 유전적인 선별 marker를 부여하기 위하여 streptomycin(2 mg/ml)에 내성을 가진 *L. casei*와 kanamycin(600 µg/ml)에 대해 내성을 나타내는 *L. acidophilus* 88을 분리하였다. *L. acidophilus* 88은 대수증식기 중반에서 후반에 원형질체가 가장 잘 형성되었고, lysozyme 125 µg/ml를 원형질체 형성을 위한 완충액에서 37°C, 30분간 처리했을 때 원형질체 형성 및 재생율이 가장 좋았으나, mutanolysine에 대해서는 감수성이 적었다. 원형질체 형성을 위한 완충액은 20 mM HEPES buffer(pH 7.0)에 삼투압 안정제로 sucrose 1 M을 가했을 때 가장 양호하였으며, MgCl₂는 원형질체 형성에 좋지 않았다. Protoplast 재생은 재생용 배지에 10%의 sucrose를 첨가했을 때 가장 효과적이었다.

사 사

본 연구는 1992년도 문교부 지원의 유전공학 연구를 위한 학술 연구조성비(Bacteriocin을 생산하는 *Lactobacillus acidophilus* 88을 이용한 유산 간균의 육종에 관한 연구)에 의하여 수행되었으며 지원하여 주심에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kondo, J.K. and L.L. McKay. 1982. Transforma-

- tion of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1213-1215.
2. Gasson, M.J. and F.L. Davies. 1980. High frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. *J. Bacteriol.* **43**: 1260-1264.
 3. McKay, L.L., B.R. Cords, and K.A. Baldwin. 1973. Transduction of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *J. Bacteriol.* **115**: 810-815.
 4. Gasson, M.L. 1980. Production regeneration and fusion of protoplasts in lactic *Streptococci*. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 99-102.
 5. Gasson, M.J. 1983. Genetic transfer systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.* **49**: 275-282.
 6. Tubb, R.S., A.J.P. Brown, B.A. Searle, and A.R. Goodey. 1981. Pp. 75. In G.G. Stewart and I. Russell (ed.), *Current development in yeast research*, Pergamon Press Ltd., Canada.
 7. Weber, H. and L. Spata. 1981. Pp. 213. In G.G. Stewart and I. Russell (ed.), *Current development in yeast research*. Pergamon Press Ltd., Canada.
 8. Speck, M.L. 1976. Interactions among *lactobacilli* and man. *J. Dairy Sci.* **59**: 338-343.
 9. Goldin, B.R., L. Swenson, J. Dwyer, M. Sexton, and S.L. Gorbach. 1980. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**: 255-261.
 10. Barefoot, S.F. and T.R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1808-1815.
 11. Deklerk, H.C. and J.N. Coetzee. 1961. Antibiosis among lactobacilli. *Nature(London)*. **192**: 340-341.
 12. Tagg, J.R., A.S. Dajani, and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**: 722-756.
 13. Daeschel, M.H. 1989. Antimicrobial substances from Lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* **43**: 164-166.
 14. John, W.H. and S. Miloslav. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriosin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* **173**: 7491-7500.
 15. Yoshino, S., S. Ogata, and S. Hayashida. 1984. Regeneration of protoplasts of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 249-250.
 16. Muriana, P.M. and T.R. Klaenhammer. 1987. Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 553-560.
 17. De Man, J.C., M. Rogosa, and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.
 18. Staskawicz, B.J. and N.J. Panopoulos. 1979. Phageolotoxin transport in *E. coli* and *Salmonella typhimurium* via the oligopeptide permease. *Phytopathology.* **69**: 663-666.
 19. Fodor, K. and L. Alföldi. 1976. Fusion of protoplast of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**: 2147-2150.
 20. Kang, Y., J.H. Kim, and D.Y. Ryu. 1987. Protoplast fusion of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2221-2227.
 21. Okamoto, T., Y. Fujita, and R. Irie. 1983. Fusion of protoplasts of *Streptococcus lactis*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2675-2676.
 22. Yokogawa, K., S. Kawata, S. Nishimura, Y. Ikeda, and Y. Yoshimura. 1974. Mutanolysin, bacteriolytic agent for cariogenic streptococci: partial purification and properties. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **6**: 156-165.
 23. Shirai, M., C. Ishii, and T. Aida. 1983. Protoplast formation of *Bacillus colistinus*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 887-879.
 24. Vescovo, M., L. Morelli, P.S. Cocconcelli, and V. Bottazzi. 1984. Protoplast formation, regeneration and plasmid curing in *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 333-334.
 25. Kim, M.K. 1991. Studies on the Cell Fusion between *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii*. MS Thesis. Pusan University.
 26. Jun, H.K., M.K. Kim, and H.S. Baik. 1992. Studies on the protoplast fusion between *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 6-13.
 27. Jun, H.K., H.J. Park, J.C. Song, and H.S. Baik. 1993. Protoplast formation and regeneration in *Lactobacillus heveticus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 101-106.
 28. 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.

(Received January 24, 1994)