Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 25, No. 2, 121-128 (1997)

김치에서 분리한 *Lactobacillus* sp. JC-7과 *Lactobacillus acidophilus* 88간의 Electrofusion 최적조건 설정

조영배 · 최현정 · 백형석 · 전홍기*
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Evaluation of Optimum Conditions for the Electrofusion between *Lactobacillus* sp. JC-7 Isolated from Kimchi and *Lactobacillus acidophilus* 88. Young-Bae Jo, Hyun-Jung Choi, Hyung-Suk Baik and Hong-Ki Jun*. *Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea* – A lactic acid bacterium was isolated from kimchi. The isolated strain was identified as the genus *Lactobacillus* through its morphological, cultural, and physiological characteristics and named as *Lactobacillus* sp. JC-7. The optimum conditions for the electrofusion between streptomycin (2.5 mg/ml) resistant mutant of *Lactobacillus acidophilus* 88 and kanamycin (600 μg/ml) resistant mutant of *Lactobacillus* sp. JC-7 were evaluated. The highest number of fusants were obtained at a capacitance value of 120 msec (1670 μF), a field strength of 100 V/cm, and a pulse controller setting of 72Ω. The optimum pH of electroporation buffer was 7.5 and the concentration of divalent cation was 1 mM Mg^{2+}. Electrofusants were efficiently obtained by addition 20% polyethylene glycol to electroporation buffer. The yield of fusion was better than that of using polyethylene glycol mediated chemical induction.

김치는 한국인의 식생활에 중요한 전통 발효 식품으로서 식이 섬유소, 비타민, 무기질 등을 공급해 주는 우수한 식품이다(1). 김치는 미생물에 의한 복합 발효로 숙성되어지며 재료 중의 탄수화물, 아미노산 등으로부터 산미, 지미, 방향을 내는 저분자 물질들이 생김으로서 김치에 독특한 맛과 향을 주게 된다(2).

김치 발효 초기에는 Gram 음성균인 *Aeromonas*속과 Gram 양성균인 *Bacillus*속이 우점종으로 나타나고, 이어서 Gram 양성균인 유산균에 의해서 김치가 숙성되지만 말기에는 효모들에 의해서 연부 현상이 나타나게 된다(3). 김치 발효에서 가장 중요한 기능을 담당하고 있는 유산균은 발효 기간 동안 유산을 과도하게 생산하여 김치의 산패를 유도하며 발효 후기에는 유산을 기질로 하는 효모가 증식하여 pH를 상승시키고, 균체가 분비하는 pectin 분해 효소에 의해서 김치가 연부된다(4). 김치는 최적 숙성기가 지나면 과도한 유기산의 생성에 의해 김치가 시어지게 되는데, 김치의 최적 숙성기에 주 발효 균주인 유산균의 생육을 다소 지연시키거나 숙성기에 관여하는 유산균 외의 다른 균들의 생육을 억제함으로서 과도한 유기산 생성을 억제할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 김치의 저장성을 높이고 신선도를 유지하기 위해서는 새로운 김치 starter의 개발이 요구된다. 이러한 유산균의 균주 육종 방법으로 최근에는 electroporation을 이용한 electrotransformation(5)과 electrofusion(6) 기법이 각광을 받고 있다. 이는 살아있는 세포가 강한 전기장에 놓이게 되면, 임계 전압에서 세포벽과 막은 탈분극이 되어 거대 분자들이 자유롭게 이동할 수 있는 pore가 만들어 지게 되는데, 다시 전장을 제거하면 투과될 수 있는 세포벽 및 막의 pore가 막히는 원리를 이용한 것으로 최근 발표된 유산균의 유전학적 균주 개량에 대한 연구에서도 이 방법을 많이 이용하고 있다(7). Electrofusion 기법은 protoplast를 만들 필요가 없다는 장점(8)이 있으며, 삼투압 안정제가 필요하지 않고 electroporation에 의해 transformation된 세포나 fusion된 세포의 재생에 필요한 시간도 protoplast를 이용했을 때 필요한 3~5 일에 비해서 36~48 시간으로 적기 때문에 이전의 protoplast를 이용하는 방법보다 훨씬 간편하고 빨리 수행할 수 있어서 유리하다(8).

Bacteriocin은 Gram positive 및 Gram negative 세균의 여러 균종들에 의해서 생성되는 항균성 peptide나 protein으로서 세균의 생육을 저해하는 물질이다(9). Bacteriocin은 고분자 물질이고 단백질 분해 효소에 민감하며, 항균 범위가 좁은 특징을 가진다. 항균 범위가 좁기 때문에 항생제만큼 사람에게 효과적이지는 못하지만 항생제 내성 균주가 문제시 되고 있는 발효 식품에 가장 적합한 식품 첨가제로서의 가치를 인정받고 있다(10). 유산균이 생성하는 bacteriocin은 다른 세균의 bacteriocin과는 달리 유산균 자체와 그 대사 산물에 대

*Corresponding author
Tel. 82-51-510-2270, Fax. 82-51-513-4532
E-mail: hgjun@hyowon.cc.pusan.ac.kr
Key words: *Lactobacillus* sp. JC-7, *Lactobacillus acidophilus* 88, Electrofusion

한 안정성, 유산균이 발효제로서 사용되는 발효 식품의 풍부함과 그 다양성으로 인해 연구가 촉진되어 왔다. Bacteriocin에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 대표적인 유산균 종으로는 *Lactobacillus*속의 *L. fermenti*(11), *L. helveticus*(12), *L. acidophilus*(13), *L. plantarum*(14) 등과 *Pediococcus*속의 *P. acidilactici*(15)와 *P. pentosaceus*(16) 등이 있다. 이 중 *L. acidophilus*는 사람의 장에서 주로 발견되며, *Lactobacillus* 중에서도 탁월하게 장내 정상 균총을 안정화시켜주며 장 질환을 예방하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(17). *Lactobacillus*가 생산하는 bacteriocin의 80% 정도를 *L. acidophilus*가 생산한다(18)는 보고가 있는데, 이는 *L. acidophilus*의 장 질환 예방 작용이 본균이 생성하는 bacteriocin과도 깊은 관련성이 있을 것이다.

상기의 연구 결과들을 토대로 볼 때 *L. acidophilus*는 대량의 bacteriocin을 생산하고 강장 작용이 우수하기 때문에 이러한 성질을 김치에서 분리한 유산균에 부여하여 김치 starter로 개발한다면, starter 균주가 생산하는 bacteriocin에 의해 다른 유산균의 생육을 다소 지연시키거나 숙성기에 관여하는 유산균 외의 다른 균들의 생육을 억제함으로서 과도한 유기산의 생성을 억제하게 되어 김치의 저장성을 개선하고 고품위화 및 상품화에 크게 기여할 수 있으리라 생각되어진다. 따라서 본 연구는 김치 발효 숙성기간을 연장하고 신선도를 오랫동안 유지할 수 있는 김치 발효 starter의 개발을 목적으로 최적 숙성기에 있는 김치로부터 bacteriocin 생성능이 없는 유산균을 분리하여 동정하였으며, 본 분리균주와 bacteriocin생성능이 우수한 *L. acidophilus* 88을 융합시키기 위해 electrofusion에 대한 최적조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용된 균주인 *Lactobacillus acidophilus* 88은 본 실험실에 보관하고 있는 균주(19)를 사용하였고, JC-7 균주는 김치에서 분리하여 사용하였다. 즉 김치 발효를 주도하는 김치 유산균을 분리하기 위해, 가정에서 식용되는 김치 중 담근지 1~2 주 정도 되어서 가장 맛이 좋은 최적 숙성기의 김치를 수집한 후 내용물 전체를 마쇄하여 멸균 거즈로 여과하고 10^6~10^8 정도로 멸균수로 희석한 다음 $CaCO_3$가 2% 첨가된 MRS 배지를 이용하여 37℃에서 2일간 평판 배양하여 clear zone을 형성하는 colony를 유산균으로 분리하였다. 분리된 유산균들의 bacteriocin생성능을 검토한 후 bacteriocin생성능이 없는 균주들을 분리한 다음 이들중에서 분리빈도가 가장 높은 JC-7균주를 본 실험의 공시균주로 선택하였다.

사용 배지 및 완충액

유산균의 생육과 protoplast 형성에는 MRS medium (Difco)을 사용하였고, protoplast의 재생을 위해서는 MRS medium에 10% sucrose, 2.5% gelatin, 6 mM $MgCl_2$, 6 mM $CaCl_2$를 첨가한 재생배지(RM, regeneration medium)를 사용하였다. 융합유무를 확인하기 위해 적당한 항생제가 포함된 재생배지를 선택배지(SM, selective medium)로 사용하였다. 균을 세척하는데 사용된 완충액은 20 mM HEPES buffer(N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid, pH 7.0)였으며, protoplast를 삼투압으로부터 보호하기 위해 20 mM HEPES buffer에 1M sucrose를 가하여 protoplast forming buffer(PFB)로 사용하였다. Electrofusion시에는 7 mM HEPES buffer에 272 mM sucrose와 1 mM $MgCl_2$를 첨가한 electroporation buffer(pH 7.4)(7)를 이용하였다.

분리 유산균의 bacteriocin 생성능 검토

상기에서 분리한 유산균을 Kojic(20), Staskawicz(21) 등의 방법을 약간 변형시켜서 bacteriocin 생성 유무를 조사하였다. 즉, bacteriocin 생성능을 조사하고자 하는 분리 균주의 전배양액을 4℃에서 원심분리(12,000 rpm, 10 min)하여 그 상등액 5 μl를 MRS agar plate에 점적하고 전배양된 indicator strain (*Lactobacillus helveticus* CNRZ 1096) 60 μl를 섞은 0.5% top agar를 중층하여 37℃에서 8~12 시간 배양하였다. 이때 생육저지환의 생성유무로 bacteriocin 생성능을 판별하였다.

균주의 동정

김치로부터 분리한 분리 균주 JC-7의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제특성을 조사하였으며, 이에 따른 분리균의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vo. 2(22)와 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria(23)에 준하여 실시하였다.

항생제 내성 변이주의 분리

Electrofusion에 의해 생성된 융합주를 식별하기 위해 항생제 내성 변이주를 spontaneous mutation 방법(24)으로 분리하였다. 즉 항생제가 들어 있지 않은 MRS배지에서 생육한 *L. acidophilus* 88을 streptomycin이 0.5 mg/ml가 들어 있는 MRS medium에 접종하여 37℃에서 배양한 후, 생성된 colony를 다시 streptomycin이 1.0 mg/ml가 들어 있는 MRS medium에 접종하여 37℃에서 배양하였다. 분리 균주 JC-7의 경우에는 kanamycin이 100 μg/ml가 들어 있는 MRS medium에 접종하여 37℃

에서 배양한 후, 생성된 colony를 다시 kanamycin이 200 μg/m*l*가 들어 있는 MRS medium에 접종하여 37℃에서 배양하였다. 이와 같이 *L. acidophilus* 88의 경우 streptomycin의 농도가 0~2.5 mg/ml 까지, 분리 균주 JC-7의 경우 kanamycin의 농도가 0~600 μg/ml까지 항생제의 농도를 점차적으로 높여주면서 위의 방법을 반복함으로서 항생제 내성변이주를 각각 분리하였다.

Protoplast 형성 및 재생

Protoplast의 형성 및 재생은 다음과 같이 행하였다. 즉 균을 MRS broth에 접종한 후 37℃에서 8-12시간 동안 정치배양한 후, 4000×g에서 10분간 원심분리하여 집균한 뒤 20 mM HEPES buffer로 2회 세척한 다음, PFB에 현탁하여 *Lactobacillus* sp. JC-7은 200 μg/ml농도의 lysozyme과 10 μg/ml 농도의 mutanolysin을 첨가하였으며, *L. acidophilus*는 125 μg/ml의 lysozyme을 처리하여 37℃에서 30분간 효소반응을 행하였다. 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℃에서 3-5일간 배양하였다.

PEG를 매개로 한 protoplast의 융합

PEG를 매개로 한 protoplast 융합은 다음과 같이 행하였다. 즉 서로 다른 항생제내성 marker를 가진 두 protoplast 현탁액 동량을 섞어서 원심분리하여 0.1 ml의 PFB에 현탁시킨 후, polyethylene glycol(PEG 4,000) 용액 0.9 ml을 첨가하였다. PEG 작용을 멈추기 위해 PFB를 가하여 원심분리한 뒤 동일 buffer에 현탁하고 적당히 희석하여, 두 균주의 유전적 marker인 항생제가 모두 포함된 선택배지와 포함되어 있지 않은 재생배지에 각각 도말하여 37℃에서 3-5일간 배양하였다. 융합 효율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Fusion yield}\,(\%) = \frac{\text{CFU* on selective medium}}{\text{CFU on regeneration medium}} \times 100$$

(CFU*; Colony Forming Unit)

Electrofusion에 미치는 제반 조건검토(8, 25, 26)

Electrofusion을 실시하기 위해 서로 다른 내성 marker를 갖는 두 균을 MRS broth에 접종한 후 37℃에서 4~8 시간 정치 배양시킨 다음 4,000×g에서 10분간 원심 분리하여 집균하였다. 집균된 균체를 electroporation buffer (pH 7.4)로 2회 세척하고 동일 buffer에 1.6×10^8 cell/m*l*이 되도록 두 균을 동량 섞어서 현탁하였으며, 균현탁액 80 μ*l*를 취하여 electrofusion(BTX Electrocell manipulator 600)을 실시하였다. 전기융합이 끝난 후 적당량의 융합용액을 취하여 선택배지와 재생배지에 각각 도말하여 30℃에서 3일간 정치배양하였다. 융합효율은 PEG를 매개로 한 protoplast의 융합에서와 동일한 방법으로 구하였다.

Electrofusion에 미치는 방전시간의 영향을 검토하기 위하여 전압을 100 V로 고정시킨 다음 방전시간을 30, 60, 90, 120, 150 msec로 달리하여 검토하였으며, 전압의 영향을 검토하기 위하여 상기의 실험에서 결정된 방전시간을 기준으로 전압을 50, 100, 150, 200, 250 V/cm로 달리하여 검토하였다. 또한 electrofusion에 미치는 2가 양이온의 영향을 검토하기 위하여 electrofusion 최적 방전시간 및 전압하에서 2가 양이온중 Ca^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}의 농도를 0, 1, 3, 5 mM로 달리하여 electrofusion buffer에 첨가함으로서 융합효율에 미치는 영향을 검토하였다. Electrofusion에 미치는 PEG 농도의 영향을 검토하기 위하여 electrofusion 최적조건하에서 electrofusion buffer에 PEG 4000을 0, 10, 20, 30%(w/v)되도록 첨가하여 그 영향을 검토하였다. Electrofusion에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 electrofusion 최적조건하에서 electrofusion buffer의 pH를 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5로 조절하여 검토하였다.

결과 및 고찰

공시균주의 선택

최적 숙성기의 김치 시료로부터 $CaCO_3$가 2% 첨가된 MRS 배지를 이용하여 clear zone을 형성하는 colony를 유산균으로 분리하였다. 분리된 유산균들 중에서 bacteriocin생성능이 없고 분리빈도가 가장 높은 균주인 No. 7 균주를 공시균주로 선택하였다.

분리균 JC-7의 동정

분리균의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 제반 특성을 조사한 결과 Table 1에서와 같이 분리 균주는 비운동성이며 포자를 형성하지 않는 그람 양성의 통성 혐기성 간균이었다(Fig. 1). Arabinose, rhamnose 및 adonitol 등을 포함한 몇 가지 탄수화물을 제외하고 대부분의 탄

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the isolated strain JC-7

Contents	Characteristics
Shape	rod and round end
Cell size (μm)	0.1-0.2×0.4-0.8 μm
Mortility	nonmortility
Gram stain	positive
Colonies	circular, convex
Colony surface	smooth
Colony color	milky color
Colony opacity	opaque

Fig. 1. Electron micrographic of the isolated strain JC-7. Indicator bar represents 200 nm.

Table 2. Assimilation of various carbon sources by the isolated strain JC-7

Carbon sources	Assimilation ability
Glucose	positive
Fructose	positive
Mannose	positive
Galactose	positive
Sucrose	positive
Lactose	positive
Maltose	positive
Rhamnose	negative
Arabinose	negative
Trehalose	positive
Raffinose	positive
Ribose	positive
Melibiose	positive
Cellobiose	positive
Sorbitol	positive
Mannitol	positive
Adonitol	negative
Salicin	positive
Inuline	positive
Esculin	positive
Gluconate	positive
Inositol	negative
Glycogen	negative
Starch	negative
Melezitose	positive

수화물에 대해서 양성 반응을 나타내었으며(Table 2), oxidation-fermentation test는 양성이었으나, indole test, urease test에는 모두 음성을 나타내었다. 또한 catalase와 oxidase가 음성이었고, 포도당 배지에서 산을 잘 생성하였다(Table 3). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2(22)에 의하면 glucose에서 CO_2를 생성하지 못하고, 증식에 thiamine을 요구하지 않으며, 15℃에서 증식하고, spore를 형성하지 않으며 운동성이 없는 화학 종속 영양균인 통성혐기성 균들로, oxidase-negative, catalase-negative이며 growth factor 요구성을 보이며 포도당에서 산을 생성하는 균들을 *Lactobacillus*속으로 정의하고 있다. 본 실험에서 사용된 JC-7균주는 상기의 *Lactobacillus*속의 특징을 가지고 있었고 그 외 배양적, 생화학적인 여러가지 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 (22)와 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria(23)에 따라 동정한 결과, *Lactobacillus*속으로 동정되어 편의상 *Lactobacillus* sp. JC-7이라 명명하여 본 실험에 사용하였다.

항생제 marker 결정 및 변이주 분리

Electrofusion 및 protoplast fusion에 의해 생성된 융합주를 식별하는 방법에는 영양요구성 marker에 의한 방법(27), 항생제 marker에 의한 방법(24, 25)이 있는데 그 중에서 항생제 marker에 의한 방법을 이용하여 융합주를 선별하기 위해 spontaneous mutation 방법(24)으로 모균주인 *Lactobacillus* sp. JC-7과 *L. acidophilus* 88의 항생제 내성 변이주를 분리하였다. Table 4에서와 같이 streptomycin(2.5 mg/m*l*)에 내성을 가진 *Lactobacillus* sp. JC-7 변이주와 kanamycin(600 μg/m*l*)에 내성을 가진 *L. acidophilus* 88 변이주를 분리하였다.

Electrofusion에 대한 제반 조건 검토

Electrofusion에 영향을 미치는 방전시간, 전압, 2가 양이온, PEG의 농도 등에 대해 검토하였으며, 융합효율은 PEG를 매개로 한 protoplast의 융합효율과 동일한 방법으로 계산하였다.

1) 방전시간의 영향

Electrofusion에 미치는 방전시간의 영향을 검토하기 위하여 전압을 100 V로 고정시킨 다음 방전시간을 30, 60, 90, 120, 150 msec로 달리하여 검토하였다. Fig. 2에서와 같이 방전시간이 90 msec일때 보다 120 msec일때가 융합효율이 더 높았으며, 방전시간이 길어질수록 오히려 융합효율이 급격히 감소하였다. 이러한 결과는

Table. 3. Biochemical and physiological characteristics of the isolated strain JC-7

Tests	Characteristics
Aerobic growth	positive
Anaerobic growth	positive
Catalase test	negative
Arginine decarboxylase test	positive
Starch hydrolysis	negative
Urease test	negative
Glucose (acid-production)	positive
Citrate utilization	positive
Esculine hydrolysis	positive
Oxidation fermentation test	fermentation
Lysine decarboxylase test	negative
Ornithine decarboxylase test	positive
Hydrolysis of O-nitrophenyl-D-galactopyranoside	positive
Growth on 4.5% NaCl	positive
β-Galactosidase test	positive
Growth at 45℃	positive
Growth at 15℃	positive
Gas production on glucose	negative
Growth on peptone base	positive
Growth on 0.5 μg/m*l* bacitracin	positive
Growth on 0.2 μg/m*l* optochin	positive
Hemicellulase test	positive
Growth on 10% bile	positive
Growth on 40% bile	positive
Tetrazolium Red	positive
Growth at 0.1 μ*l*/m*l* novobiocin	positive
Utilization of pyruvate	positive
Utilization of xylose	positive
Hemolysin activity	negative
Growth on 0.03% DP 300	negative
Utilization of acetamide	negative
Growth on 0.02% plant indican	negative
Utilization of malonate	negative
Growth on 0.03% polymyxin	negative
Utilization of tryptophan	negative
Growth on 0.2% p-coumaric	negative
Production of H_2S	negative

Table 4. Antibiotic resistance patterns of *Lactobacillus* sp. JC-7, *L. acidophilus* 88, and their mutant strains

Antibiotics	*Lacto-bacillus* JC-7	*Lacto-bacillus* JC-7 mutant	*L. acido-philus* 88	*L. acido-philus* 88 mutant
Streptomycin (mg/ml)				
0.5	+	+	-	-
1	-	+	-	-
1.5	-	+	-	-
2	-	+	-	-
2.5	-	+	-	-
Kanamycin (μg/ml)				
100	+	+	+	+
200	+	+	+	+
300	-	-	+	+
400	-	-	+	+
500	-	-	-	+
600	-	-	-	+

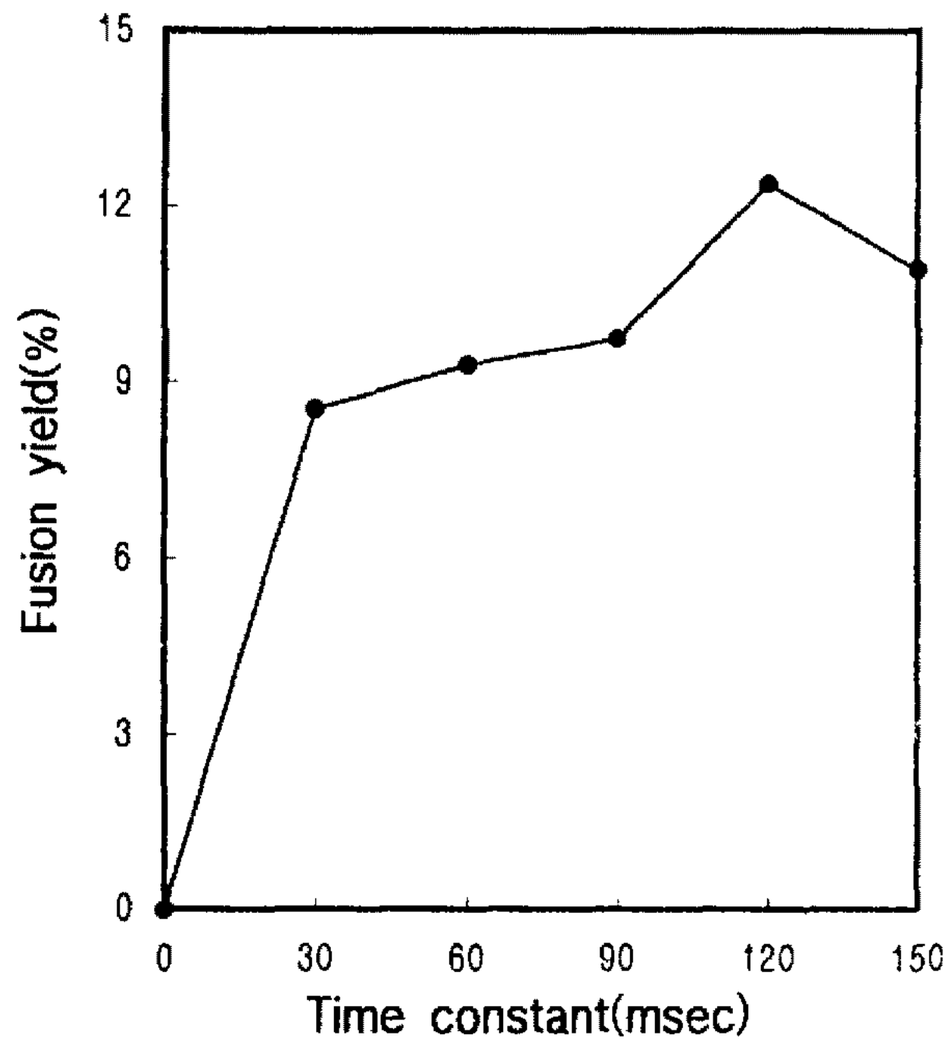

Fig. 2. Effect of electroporation time on the electrofusion between *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp. JC-7.
Electrofusion was carried out under the field strength of 100 V/cm.

protoplast가 전자장에 노출되는 시간이 짧은 경우, 융합을 일으키기에 충분한 시간이 되지 못하여 융합효율이 떨어지며, 이와는 반대로 protoplast가 전기장에 오래 노출되면 전기충격에 의해 사멸함으로서 융합효율이 감소하는 것으로 사료되었다.

2) 전압의 영향

방전시간을 120 msec로 고정한 다음 전압을 50, 100, 150, 200, 250 V/cm로 달리하여 융합효율을 비교한 결과 Fig. 3에서와 같이 100 V/cm일때 융합효율이 가장 양호하였으며, 전압을 강하게 걸어 줄수록 융합효율은 급격히 감소하였다.

이상에서와 같이 방전시간이 길어지고 전압이 높을수록 융합효율이 감소하는 것은 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*에 대한 electrofusion결과(6)와 일치하는 것으로 이하의 실험에서는 융합조건을 효율이 가장 양호한 120 msec, 100 V/cm로 고정하여 사용하였다.

3) 2가 양이온의 영향

Ruthe 등(28)은 electrofusion의 융합 효율에 미치는 2가 양이온의 영향을 검토하여 Mg^{2+}는 강한 방전의 충격으로 인한 cell lysis를 완화시켜 주고 Ca^{2+}는 fusion을 저

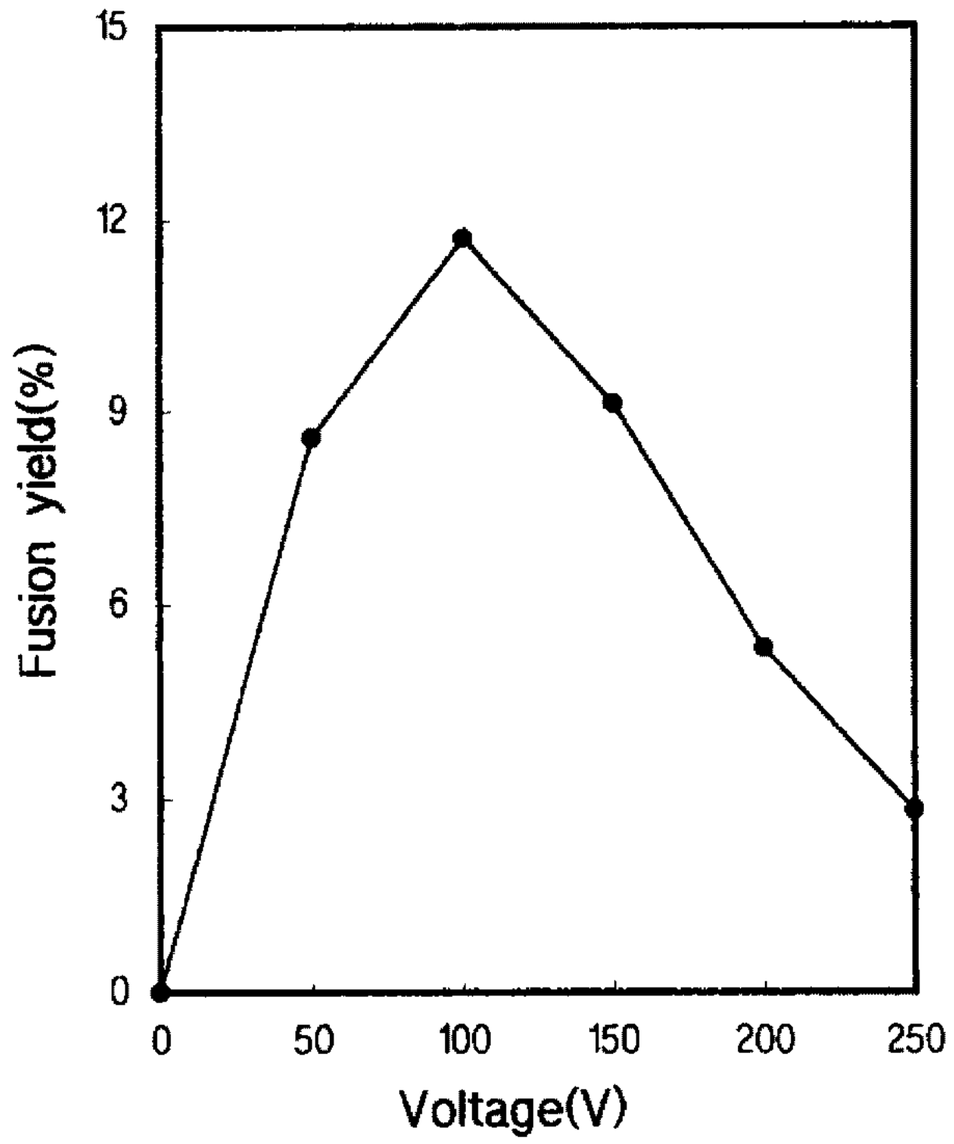

Fig. 3. Effect of electroporation voltage on the electrofusion between *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp. JC-7.
Electrofusion was carried out under the capacitance value of 120 msec(1670 μF).

Table 5. Effect of divalent cations on electrofusion yield

Divalent cation	Concentration (mM)	Fusion yield (%)
None		9.82
Mg^{2+}	1	12.37
	3	9.57
	5	6.29
Mn^{2+}	1	8.33
	3	5.78
	5	3.86
Ca^{2+}	1	7.23
	3	5.21
	5	3.75

Electrofusion was carried out in buffer containg various kinds and concentrations of divalent cations.

해한다고 보고하였다. 따라서, 본 연구에서도 2가 양이온이 융합 효율에 미치는 영향을 검토한 결과, Table 5에서와 같이 1 mM의 Mg^{2+}를 첨가한 경우 대조군보다 융합효율이 양호하였으며, 이는 Mg^{2+}이 강한 방전의 충격으로부터 cell lysis를 완화 시켜 준다는 Ruthe 등(28)의 결과와 일치하는 것으로 사료되었다. 그러나 Mg^{2+}도 농도가 증가됨에 따라 대조군보다 융합효율이 감소하였다. 또한 Mn^{2+}와 Ca^{2+}의 경우에서는 1 mM농도에서도 융합효율이 대조군보다도 낮았으며, 전반적으로 첨가한 양이온의 농도가 증가할수록 융합 효율이 감소하였다.

4) PEG의 영향

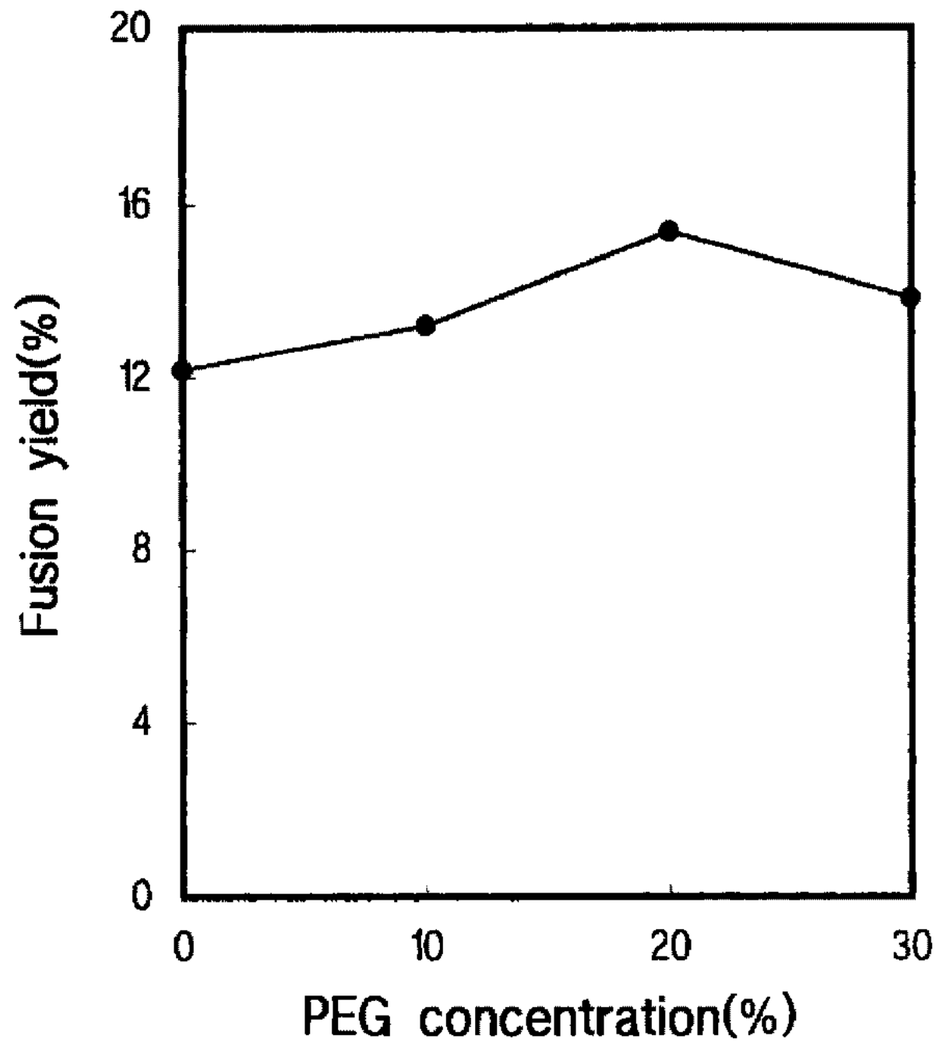

Fig. 4. Effect of PEG concentration on the electrofusion between *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp. JC-7.
PEG 4000 was added to electrofusion buffer as indicated concentrations. Electrofusion was carried out under the field strength of 100 V/cm and the capacitance value of 120 msec(1670 μF).

Electrofusion에 미치는 PEG 농도의 영향을 검토하기 위하여 electrofusion 최적 조건하에서 electrofusion buffer에 PEG 4000을 0, 10, 20, 30%(w/v)되도록 첨가하여 electrofusion을 행하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 PEG 4000의 농도가 높아질수록 융합효율이 증가하였으나 30% 이상에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 현상은 PEG에 현탁된 protoplast가 직류에 노출되면, lysis가 일어나지 않도록 PEG에 의해 보호되어 진다는 보고(6)와 일정농도 이상의 PEG용액을 사용하면 점도가 높아 protoplast를 신속하게 coating하지 못하므로 융합빈도가 낮아진다는 보고(29)와 관련이 있을 것으로 사료되었다.

5) pH의 영향

Electrofusion에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 electrofusion 최적 조건하에서 electrofusion buffer의 pH를 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5로 조절하여 검토한 결과 Fig. 5와 같이 pH 7.5 부근에서 가장 높은 융합효율을 나타내었으며 pH 8.5 이상에서는 융합효율이 급격히 감소하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 중성 또는 약 알카리 영역에서 electrofusion을 수행하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

PEG-mediated fusion과 electrofusion의 융합효율 비교

Electrofusion에 의한 융합효율과 PEG매개에 의한 융

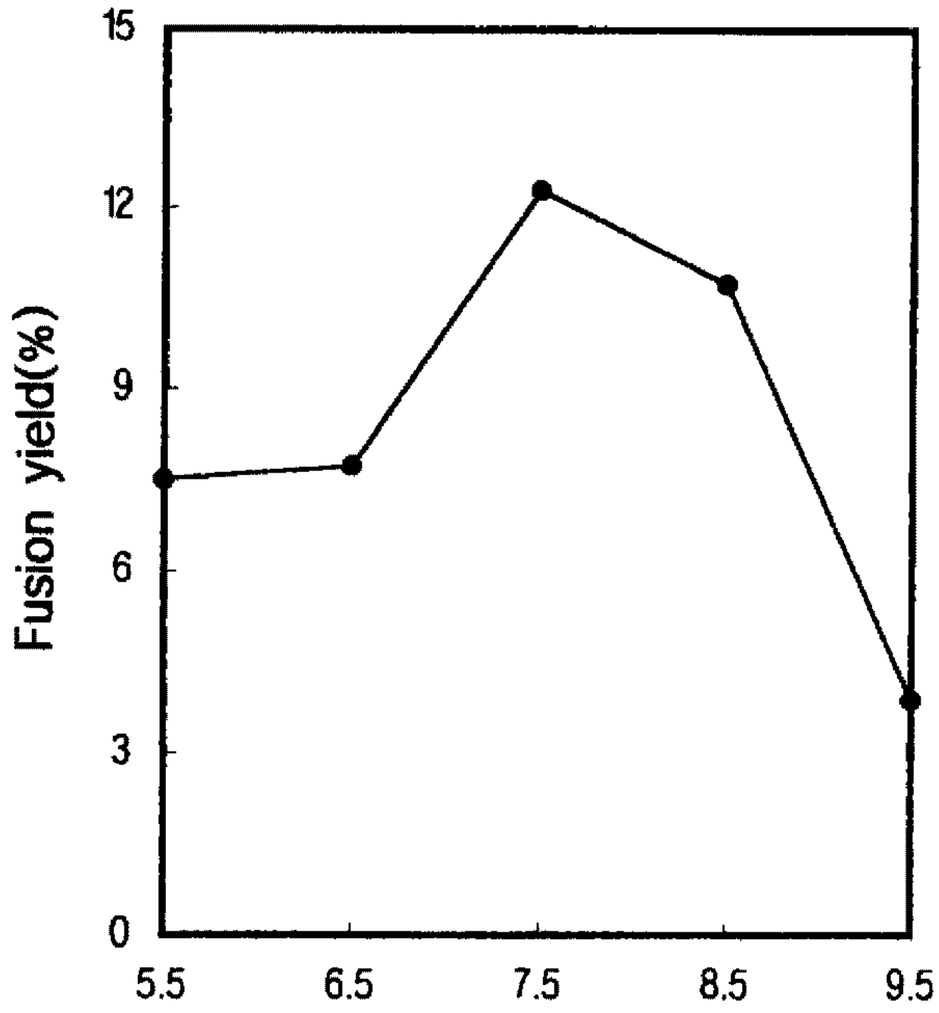

Fig. 5. Effect of pH of electroporation buffer on the electrofusion between *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp. JC-7.
Electrofusion was carried out under the field strength of 100 V/cm and the capacitance value of 120 msec(1670μF).

Table 6. Comparision of fusion yield of *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp. JC-7 via electric field and chemical induction.

Fusion method	Fusion yield (%)
Electrofusion	12.2
Electrofusion with PEG 10%	13.2
Electrofusion with PEG 20%	15.4
Electrofusion with PEG 30%	13.8
Chemical fusion	7.8

합효율을 비교한 결과 Table 6에서와 같이 융합효율에 있어서 electrofusion이 chemical fusion보다 양호하였으며, electrofusion buffer에 PEG 4000의 최종농도를 20% 정도 첨가했을때 chemical fusion 보다 약 2배의 융합효율이 증가되었다. 따라서 융합효율은 chemical fusion<electrofusion<electrofusion+20% PEG 순이었다.

요 약

김치 발효 숙성기간을 연장하고 신선도를 오랫동안 유지할 수 있는 김치 발효 starter의 개발을 목적으로 최적 숙성기에 있는 김치로부터 bacteriocin 생성능이 없는 유산균을 분리하여 동정하였으며, bacteriocin 생성능이 없는 분리균주와 bacteriocin생성능이 우수한 *L. acidophilus* 88을 융합시키기 위해 electrofusion에 대한 최적 조건을 검토하였다. 분리균주는 *Lactobacillus*속으로 동정되어 *Lactobacillus* sp. JC-7이라 명명하였다. Electrofusion에 의해 생성된 융합주를 식별하기 위해 streptomycin (2.5 mg/ml)에 내성을 나타내는 *Lactobacillus* sp. JC-7 변이주와 kanamycin(600 μg/m*l*)에 내성을 나타내는 *L. acidophilus* 88 변이주를 분리하였다. Electrofusion을 100 V/cm, 120 msec(72 ohms, 1670 capacitance)에서 수행했을 때 융합효율이 가장 양호하였으며 전기장의 세기와 시간이 증가할수록 융합 효율이 현저히 감소하였다. 2가 양이온은 농도가 증가할수록 대체적으로 융합효율을 감소시키는 경향을 나타내었으나 1 mM $MgCl_2$에서는 대조군에 비해 융합효율이 약간 증가하였다. PEG 4000을 electrofusion buffrer에 20%되도록 첨가했을 때 가장 양호한 융합효율을 나타내었으며 그 이상에서는 오히려 융합효율이 감소하였다. Electrofusion법과 PEG매개에 의한 융합법의 융합 효율을 비교한 결과, 융합효율은 chemical fusion<electrofusion<electrofusion+20% PEG 순을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 기초과학연구소 학술연구조성비(과제번호: BSRI-95-4410)에 의한 연구결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

참고문헌

1. 이서래. 1987. 김치의 맛과 영양. 식품과 영양. **8**: 20-22.
2. 최신양. 1988. 김치 발효와 보존성. 식품 과학. **21**: 19-24.
3. 박현근, 임종락, 한홍의. 1990. 각 온도에서 김치 발효중 미생물의 천이 과정. 인하대학교 기초 과학 연구소 논문집. 11: 161.
4. 신동화. 1994. 공장김치의 발효온도 및 포장방법별 성분과 미생물의 변화. 한국식품과학회 심포지움발표논문집(김치의 과학). pp 82-136.
5. Hashiba, H., R. Takiguchi, S. Ishii, and K. Aoyama. 1990. Transformation of *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti* with plasmid pLHR by electroporation. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1537-1541.
6. Reed, W. M. 1987. Protoplast fusion of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus lactis* via electric field or chemical induction. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 287-294.
7. Chassy, B. M. and J. L. Flickinger. 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**: 173-177.
8. Harlander, S. K. 1987. Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, In *Streptococcal Genetics* (eds. by Ferretti, J. J., and Curtiss, R.), Washington, D. C; American Society for Microbiology, pp 229-233.
9. Marugg, I. D. 1991. Bacteriocins, Their role in developing natural products. *Food Biotechnol.* **5**: 305-312.
10. Stiles, M. E. and J. W. Hasting. 1991. Bacteiocin production by lactic acid bacteria: Potential for use in meat

preservation. *Trend Food Sci. Tech.* **2**: 247-251.
11. De Klerk, H. C. and J. A. Smit. 1967. Properties of *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. *J. Gen. Microbiol.* **48**: 309-316.
12. Joeger, M. and T. R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **167**: 439-446.
13. Muriana, P. M. and T. R. Klaenhammer. 1991. Cloning, phenotypic expression and DNA sequence of the gene for lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus. J. Bacteriol.* **55**: 1779-1788.
14. Ruiz-Barba, J. L., J. C. Piard, and R. Jimenez-Diaz. 1991. Plasmid profile and curing of plasmid in *Lactobacillus plantarum* strain isolated from green olive fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* **71**: 417-421.
15. Ray, S. K., M. C. Johnson, and B. Ray. 1989. Bacteriocin plasmids of *Pediococcus acidilactici. J. Ind. Microbiol.* **4**: 163-171.
16. de Saad, A. M. S. and M. C. M. de Nadra. 1993. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 406-410.
17. Sandine, W. E. 1979. Role of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J. Food Protect.* **42**: 259-262.
18. 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.
19. Jun, H. K., K. Heo, Y. B. Jo, and H. S. Baik. 1994. Studies on the Protoplast Formation and Regeneration of *Lactobacillus acidophilus* 88. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 143-151.
20. Kojic, M., J. Svircevic, A. Banina, and L. Topisirovic. 1991. Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacitilactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1835-1837.
21. Staskawicz, B. J. and N. J. Panopoulos. 1979. Phaseolotoxin transport in *E. coli* and *Salmonella typhimurium* via the oligopeptide permease. *Phytopathology* **69**: 663-666.
22. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The William and Wilkans Co., U.S.A.
23. Jean, F. M. 1980. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 2nd ed. The William and Wilkans Co., U.S.A.
24. Okamoto, T., Y. Fujita, and R. Irie. 1983. Fusion of protoplasts of *Streptococcus lactis. Agric. Biol. Chem.* **47**: 2675-2676.
25. Dunny, G. M., L. N. Lee, and D. J. LeBlanc. 1991. Improved Electroporation and Cloning Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1194-1201.
26. MacIntyre, D. A. and S. K. Harlander. 1989. Improved Electroporation Efficiency of Intact *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Cells Grown in Defined Media. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2621-2626.
27. Okamoto, T. and T. Morichi. 1979. Distribution of β-galactosidase activity among lactic *Streptococci. Agric. Biol. Chem.* **43**: 2389-2390.
28. Ruthe, H. J. and J. Adler. 1985. Fusion of bacterial spheroplasts by electric fields. *Biochem. Biophis. Acta* **819**: 105-113.
29. Hopwood, D. A. and H. M. Wright. 1981. Protoplast fusion in *Streptomyces*: Fusions involving ultraviolet-irrediated protoplast. *J. Gen. Microbiol.* **126**: 21-27.

(Received 28 November 1996)