

*Lactobacillus plantarum*과 *Leuconostoc mesenteroides*의 Protoplast 생성의 최적 조건

전역한·박범식·조재선
경희대학교 산업대학 식품가공학과·식량자원개발연구소

Optimum Conditions for the Protoplast Formation of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*

Uck-Han Chun, Buem-Seek Park and Jae-Sun Cho

Department of Food Science and Technology,
Food Resources Development Institute, College of Industry
Kyung-Hee University, Suwon 449-701, Korea

ABSTRACT

Protoplasts of both strains were produced by lysozyme digestion at 30°C for 180min. Both strains were treated with 40µg/ml of lysozyme in 30mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 10% sucrose at the late logarithmic growth phase. It was found that the efficiency of protoplast formation was high at 30°C and pH 7.5 by measuring the decrease in absorbance. Optimum concentrations of sucrose Ca²⁺, Mg²⁺ for protoplast formation were determined to be 15%, 20mM and 6mM, respectively. Hydrolysis of cell wall and protoplast formation efficiency for *L. plantarum* showed better results than those for *Leu. mesenteroides*. The resistances to antibiotics erythromycin and chloramphenicol were chosen as the selection marker for the fusant between *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides*. Production phase of protoplast in *Leu. mesenteroides* was also compared with *L. plantarum* in this paper.

서 론

형질전환(transformation), 형질도입(transduction)에 의한 유전적 재조합은 모든 세균에서 관찰되는 것이 아니며 특정의 속과 종에 속하는 균주에 한정되어 있으며 접합에 의한 재조합의 출현 빈도는 낮다. 돌연변이에 의해서 개량된 균주에 대하여 새로운 세포 융합법을 적용시키면 여러 가지 형질의 재조합체를 얻을 수 있으므로 균주 개량의 유력한 방법으로 이용된다.

세포융합은 원핵미생물과 진핵미생물(1, 2, 3, 4)

에서 유전적 재조합을 위하여 이용하는 일반적인 기술로 특히, 산업적 미생물에 유전적 다양성을 가진 새로운 균주의 개발에 이용된다. 산업적으로 중요한 세균의 세포융합과 형질전환에 대한 방법은 잘 확립되어져 있으나, *Lactobacilli*에 대한 연구는 초기단계에 있다(5).

Protoplast을 생성하기 위해서 *Streptomyces*속, *Streptococcus*속, *Lactobacillus*속 등에서는 아미노산을 성장 배지에 과량 첨가하면 protoplast 생성 효율이 증가되며, 세포벽 용균 효소로는 mutanolysin, lysozyme 또는 α-amylase를 혼합, lysozyme과

mutanolysin을 혼합 병용하여 사용하고 있으며, protoplast의 형성 효율 및 재생 효율은 균주 및 사용하는 용균 효소의 종류에 따라 다른 것으로 알려져 있다. 삼투압 안정제로 사용되는 sucrose, lactose, sorbitol, NaCl, KCl 등의 종류에 따라 재생 효율이 다르고, Ca^{2+} , Mg^{2+} 은 protoplast의 안정화 및 재생 효율에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

대부분의 Gram-positive bacteria는 일반적으로 lysozyme에 대한 용균 작용에 대하여 Gram-negative bacteria 보다 감수성이 약한 것으로 알려져 있다. 대부분 *Lactobacilli*의 세포벽의 외부층이 일정한 단백질 배열로 이루어져 있어 lysozyme의 용균 작용에 대한 감수성이 떨어져 mutanolysin 또는 lysozyme의 혼합물을 병용하여 완전한 lysis에 사용되고 있다. 본 연구에서는 김치발효에 관여하는 *L. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*를 이용한 protoplast fusion을 위한 protoplast 생성의 최적 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

Lactobacillus plantarum(ATCC 8014), *Leu. mesenteroides*(KCCM 3547)을 MRS broth medium(6)에서 3일간 30°C에서 계대배양하여 각각 10%를 접종하였고, 균주를 보존하기 위하여 MRS medium에 배양한 후 배양액에 80% glycerol을 40:60으로 혼합한 다음 냉동고에 보관하여 사용하였다.

Protoplast 형성

Protoplast를 형성시키기 위한 방법은 대수증식기 말기의 배양액으로부터 *L. plantarum* 균주를 4000rpm에서 10분간 원심분리하여 30mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 두 번 세척한 후에 SM-Tris buffer(Tris buffer에 10% sucrose와 2.5mM $MgCl_2$)로 현탁하여 세포벽 분해효소(40 μ g/ml lysozyme)를 처리하고 protoplast 형성률을 측정하였다.

분석방법

*L. plantarum*의 protoplast 형성률을 측정하는 방법에는 osmotic shock에 의한 세포의 용해 정도를 흡광도 600nm에서 측정하여 용균율(%)을 $\{O.D._{600}(0) - O.D._{600}(+)\} / [O.D._{600}(0)] \times 100$ 으로 산출하는

방법, 1% sodium dodecyl sulfate(SDS) sensitivity를 A_{420} 에서 측정하여 $[A_{420} \text{ post-SDS} / A_{420} \text{ pre-SDS}]$ 로 계산하는 방법(7)과 흡광도 660nm에서 turbidity의 유의적 감소로서 protoplast의 형성 정도를 결정하는 방법(8)을 이용하였다.

Protoplast 형성시기는 1% SDS 측정으로 결정(7)하였는데, 세포벽 용균효소로 처리하는 동안 20분 간격으로 220분까지 protoplast 현탁액의 일정량을 A_{420} 에서 먼저 측정하고, 1% SDS와 동량 첨가하여 잘 혼합한 다음 4분 동안 상온에서 정치시킨 후에 A_{420} 에서 다시 측정하였다. $A_{420} \text{ ratio}(A_{420} \text{ post-SDS} / A_{420} \text{ pre-SDS})$ 로 protoplast하였는데 nonprotoplast control은 1% SDS 첨가 후에도 감소하지 않는다. 또한 이 비율로 lytic enzyme의 농도를 결정할 수 있다. 또한 protoplast 형성률(8)을 흡광도 660nm에서 turbidity의 유의적 감소로 측정하여 protoplast 형성 시간을 비교 결정하였다. 또한 protoplast 형성을 광학현미경으로 확인하였다.

Protoplast의 형성 효율은 osmotic resistant cell(ORC)을 sucrose가 없는 Tris buffer로 두 번 세척하여 MRS 고체 배지상에 도말하여 30°C에서 2~3일간 배양한 후 일정 크기의 집락수를 계수하였고, original cell은 MRS 고체 배지상에 도말하여 ORC와 같은 조건으로 집락수를 측정하였다. Protoplast 형성 효율은 $100 \times [\text{Initial cell number} - \text{ORC cell number}] / \text{Initial cell number}$ 로 결정하였다.

결과 및 고찰

생육시기에 따른 효소 처리시간의 영향

*L. plantarum*의 protoplast 형성률은 1% SDS sensitivity를 absorbance ratio(420nm)를 이용하여 측정하였고, lysozyme 단독으로 농도를 40 μ g으로 하여 protoplast 형성(또 세포 lysis 정도)을 측정하는 것으로 세포벽 분해효소를 220분까지 처리하여 A_{420} ratio는 0.9 정도를 나타내었는데, 보고(7)에 의하면 A_{420} 이 0.2 정도에서 우수한 protoplast의 용합 유도 효과를 얻었다고 하였다. 그러나 흡광도 660nm에서의 유의적 감소 경향이 Fig. 1에서와 같이 *L. plantarum* 균주가 180분일 때 나타내고 있다. 이후의 실험에서는 세포벽 분해효소로 40 μ g의 lysozyme만을 사용하였으며, protoplast의 수확 시간을 180분으로 하여 수행하였다.

*L. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*의 성장시기에 따른 protoplast의 형성률이 가장 좋은 시기를 선택

Table 1. The efficiency of protoplast formation of *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides* at various growth phase.

Growth phase (hr)	<i>L. plantarum</i>			<i>Leu. mesenteroides</i>		
	Initial cells (CFU/ml) ^a	ORC ^b cells (CFU/ml)	Frequency of protoplast (%)	Initial cells (CFU/ml)	ORC cells (CFU/ml)	Frequency of protoplast (%)
5	5.0×10^8	3.0×10^8	40.0	3.0×10^8	4.5×10^7	85.0
10	5.3×10^9	4.0×10^9	24.5	18.0×10^8	12.8×10^8	28.9
15	11.5×10^8	15.8×10^8	86.2	27.0×10^8	10.6×10^8	60.7
20	9.0×10^8	16.8×10^8	81.3	40.0×10^8	14.9×10^9	0
25	16.9×10^8	22.6×10^8	86.6	16.6×10^9	22.6×10^8	0

a CFU: Colony forming unit, b ORC: Osmotic resistant cells

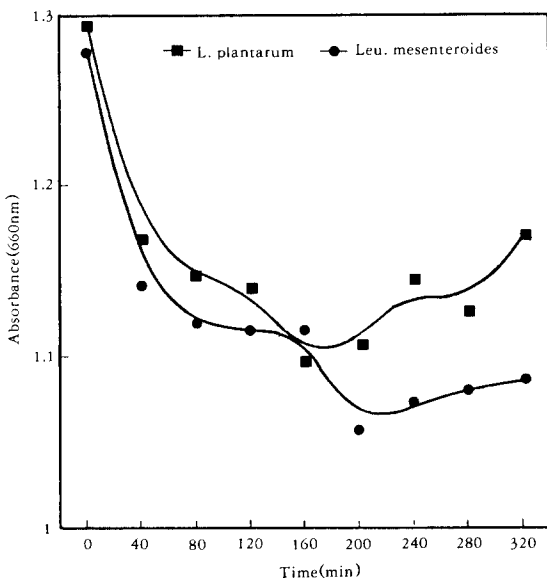


Fig 1. The efficiency of protoplast formation measured at 660nm from *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides*.

하기 위한 실험을 수행하였다. 실험결과 Table 1에서처럼 대수증식기 후반에서 protoplast 형성이 양호하였다. 또한 protoplast 형성 정도를 초기 O.D.에 대하여 lysozyme 처리 후 O.D.와의 편차를 이용하여 결정하였는데 대수 증식기 말기인 15시간을 배양하였을 때 세포벽 용균효소의 작용이 가장 양호하게 나타났다.

대수 증식기 후반을 지나 정지기에 이르러서는 protoplast 형성 정도는 감소하였는데, 이는 세포벽

의 구조가 완전하게 형성되어 lytic enzyme이 세포벽 성분에 대하여 용균작용을 일으키지 못하였기 때문으로 보인다(9). 또한 세포벽 용균효소로 사용한 lysozyme에 대한 감수성과 비교해 볼 때 protoplast 형성률이 *L. plantarum* 균주가 대수증식기 말기에 그 형성률이 86%로 일치하였으나, *Leu. mesenteroides*의 경우에는 *L. plantarum*과는 달리 정지기 초기에 protoplast 형성률이 96%로 가장 양호하게 나타났다(Table 1).

삼투압 안정제의 영향

삼투압 안정제는 protoplast에 민감하게 반응하는데, 이와 같은 안정제로는 sucrose 단독 또는 gelatin과 병용하여 사용한다. 이때 sucrose는 삼투압 안정제로서뿐만 아니라 세포벽 가수분해의 자극제 역할도 하는 것(10)으로 유추되기도 하는데, 여기에서는 protoplast forming buffer에 들어 있는 삼투압 안정제로 sucrose의 농도를 달리하면서 2.5mM MgCl₂를 사용한 결과를 Table 2에 정리하였다. 5%와 control일 경우에 O.D.의 편차가 10% 이상의 sucrose 처리 때보다 약간 높게 나타났고, 오히려 20% sucrose의 농도에서는 용균작용에 영향을 주지 않았다. 이는 *L. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*의 세포벽 용균작용에 어느 정도 부수적 역할을 하리라고 여겼던 것과는 달리 큰 영향을 주지 못한 것으로 여겨진다. 또한 효소 처리시간이 180분에서 240분으로 경과되면서 유의적인 흡광도 감소경향을 보이지 않고 오히려 O.D.가 증가된 것은 효소 처리 후 어느 정도 세포벽 가수분해가 이루어졌지만 시간이 경과함에 따라서 lysozyme에 내성을 갖고 있는 균주가 본래의 완전한 세포벽을 형성하기 때문으로 사

Table 2. Degree of cell lysis^a for *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides* at various sucrose concentrations.

Sucrose conc.(%)	<i>L. plantarum</i>			<i>Leu. mesenteroides</i>		
	Time(min)			Time(min)		
	90	180	240	90	180	240
0	0.00 ^a	0.07	-0.01	0.00	0.035	-0.02
5	0.00	0.07	-0.01	0.05	0.085	0.00
10	-0.01	0.055	-0.01	0.00	0.065	0.05
15	0.00	0.055	-0.01	0.00	0.06	-0.01
20	-0.01	0.055	-0.02	0.00	0.06	0.65

^aDifference in O.D.(660nm) at interval initial and sampling time

Table 3. Protoplast formation efficiency of *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides* at various sucrose concentrations.

Sucrose conc.(%)	<i>L. plantarum</i>		<i>Leu. mesenteroides</i>	
	ORC ^a cells (CFU/ml) ^b	Frequency of protoplast(%)	ORC cells (CFU/ml)	Frequency of protoplast(%)
0	19.7×10^8	31.8	24.1×10^7	91.9
5	23.2×10^8	19.7	25.5×10^8	15.0
10	17.1×10^8	40.8	22.7×10^8	24.3
15	29.4×10^7	89.8	23.1×10^6	99.2
20	11.6×10^8	59.9	16.0×10^8	46.7

^a ORC: Osmotic resistant cells, ^b CFU: Colony forming unit

* Initial cell number was 28.9×10^8 for *L. plantarum* and 30×10^8 for *Leu. mesenteroides*, respectively.

료된다. 그러나 양균주 모두 15%의 sucrose 농도에서는 protoplast 형성률이 양호하여 *L. plantarum*이 90%, *Leu. mesenteroides*가 99%의 높은 protoplast 형성률을 보여주고 있다(Table 3). 이는 sucrose가 protoplast 형성에 있어서 중요한 삼투압 안정제로 작용하고 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

pH와 온도에 따른 Protoplast의 형성

pH에 따른 protoplast 형성 정도를 알아 보기 위하여 pH를 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0으로 변화하면서 *L. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*의 흡광도 감소를 측정하였다. 흡광도 660nm에서 residual absorbance를 측정된 결과 pH 7.5에서 유의적인 흡광도 감소를 보였다(Fig. 2). 그러나 *Leu. mesenteroides*는 모든 pH 영역에서 뚜렷한 감소 경향을 보이지 않아 *L. plantarum*에 준하여 protoplast formation의 최적 pH를 결정하였다. 그리고 온도를 25°C, 30°C, 37°C, 42°C 그리고 실온에서 protoplast

의 형성을 조사한 결과, *L. plantarum*은 30°C에서 유의적인 흡광도 감소가 나타났다(Fig. 3). *Leu. mesenteroides* 균주는 흡광도 감소 수준이 pH와 비슷한 경향을 나타내어 그 변화 정도가 가장 양호하고 *L. plantarum*에 준한 온도 범위인 30°C로 결정하였다.

Protoplast 형성률은 *L. plantarum*이 pH 7.0과 pH 7.5의 중성영역에서 형성률이 85%로 좋았고, *Leu. mesenteroides*는 *L. plantarum*보다 pH 전영역에서 protoplast 형성률이 떨어졌으나 pH 7.5에서 형성률이 65%로 가장 양호하게 나타났다(Table 4). 또한 산성 영역에서보다는 염기성 영역에서의 protoplast 형성률이 좋았다. 온도에 따른 protoplast 형성률은 *Leu. mesenteroides*가 실온과 37°C에서 90% 정도로 가장 양호하게 나타났으며, *L. plantarum*은 lysozyme을 처리한 후 방치하였을 때 실온에서는 그 형성률이 30% 미만으로 매우 적었고 저온에서 고온으로 온도가 상승할수록 protoplast 형성률이 90%에서 98%로 어느 정도 증가하는 경

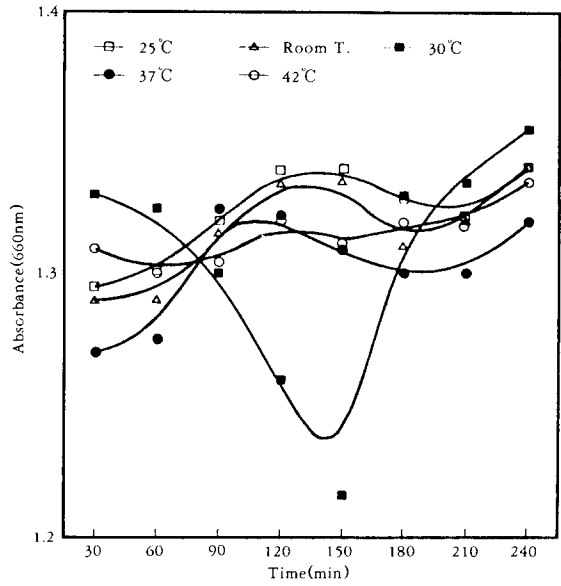
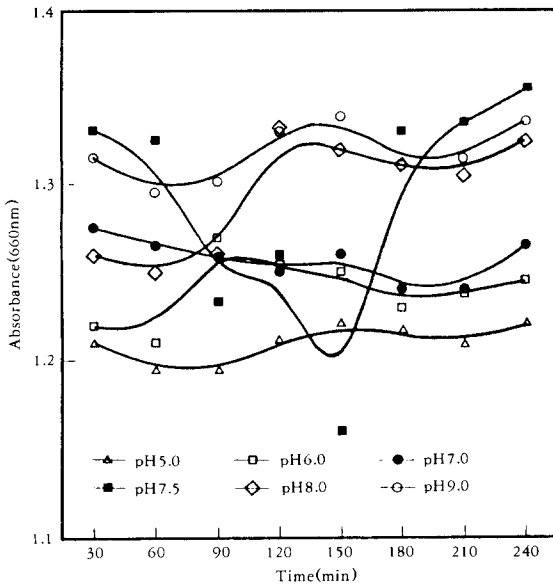


Fig 2. The efficiency of protoplast formation of *L. plantarum* at various pH.

Fig 3. The efficiency of protoplast formation of *L. plantarum* at various temperature at 660nm.

Table 4. The efficiency of protoplast formation of *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides* at various pH.

pH	<i>L. plantarum</i>		<i>Leu. mesenteroides</i>	
	ORC ^a cells (CFU/ml) ^b	Frequency of protoplast(%)	ORC cells (CFU/ml)	Frequency of protoplast(%)
5.0	4.5 × 10 ⁸	31.8	6.4 × 10 ⁹	17.9
6.0	3.0 × 10 ⁸	54.5	3.3 × 10 ⁹	57.5
7.0	1.0 × 10 ⁸	84.8	3.3 × 10 ⁹	57.5
7.5	8.0 × 10 ⁷	87.9	2.7 × 10 ⁹	65.4
8.0	5.0 × 10 ⁸	24.2	5.1 × 10 ⁹	34.6
9.0	6.4 × 10 ⁸	3.0	7.2 × 10 ⁹	17.9

a ORC: Osmotic resistant cell, b CFU: Colony forming unit

* Initial cells number was 6.6 × 10⁸ *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides* 7.8 × 10⁹

향을 나타내었다(Table 5).

Mg²⁺, Ca²⁺의 각 농도에 따른 Protoplast 안정화 효과

Protoplast 융합에 있어서 protoplast의 안정화 및 재생 효율에 영향을 주는 것으로 알려진 MgCl₂는 *L. plantarum*과 *Leu. mesenteroides* 양 균주 모두 660nm에서 유의적인 흡광도 감소를 나타내지는

못하였다. 그러나 protoplast 형성 정도는 control 및 각 첨가 농도에 따라서 *L. plantarum*은 control 일 경우와 20mM을 사용하였을 때 protoplast 형성률이 양호하였다. Control일 경우의 80%보다는 MgCl₂의 농도가 20mM일 때 그 형성률이 98%로 더욱 좋았으며, 6mM에서는 65% 정도의 protoplast 형성률을 나타내었다. *Leu. mesenteroides*는 control, 2.5mM, 20mM일 때 각기 protoplast 형성

Table 5. The efficiency of protoplast formation of *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides* at various temperature.

Temperature (°C)	<i>L. plantarum</i>		<i>Leu. mesenteroides</i>	
	ORC ^a cells (CFU/ml) ^b	Frequency of protoplast(%)	ORC cells (CFU/ml)	Frequency of protoplast(%)
25	14.5×10^7	89.6	9.9×10^8	30.8
실온	10.2×10^8	27.1	14.4×10^7	89.9
30	10.0×10^7	92.8	3.5×10^8	75.5
37	4.0×10^7	97.1	11.0×10^7	92.3
42	1.5×10^7	98.9	7.6×10^8	46.8

a ORC: Osmotic resistant cells, b CFU: Colony forming unit

* Initial cells number was 14.0×10^8 *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides* 14.3×10^8

Table 6. The efficiency of protoplast formation of *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides* at various MgCl₂ concentrations.

MgCl ₂ conc. (mM)	<i>L. plantarum</i>			<i>Leu. mesenteroides</i>		
	Initial cells (CFU/ml) ^a	ORC ^b cells (CFU/ml)	Frequency of protoplast (%)	Initial cells (CFU/ml)	ORC cells (CFU/ml)	Frequency of protoplast (%)
0	8.3×10^8	16.7×10^7	79.9	7.1×10^9	1.9×10^8	73.5
2.5	8.0×10^9	7.1×10^8	11.1	5.1×10^9	1.4×10^9	72.7
6	5.0×10^8	17.4×10^7	65.2	24.0×10^8	16.3×10^8	32.1
10	4.8×10^8	27.9×10^8	41.9	20.0×10^8	12.4×10^8	38.0
20	7.6×10^9	1.0×10^8	98.7	5.3×10^9	13.8×10^8	73.9

a CFU: Colony forming unit

b ORC: Osmotic resistant cells

Table 7. Cell lysis degree^a of *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides* at various CaCl₂ concentrations at 660nm.

CaCl ₂ conc. (mM)	<i>L. plantarum</i>			<i>Leu. mesenteroides</i>		
	Time(min)			Time(min)		
	90	180	240	90	180	240
0	0.035 ^a	0.025	0.015	0.02	0.02	0.00
2.5	0.02	0.01	-0.01	0.01	0.02	0.00
6	0.01	0.01	0.00	0.015	0.02	0.015
10	0.04	0.032	0.02	0.02	0.02	0.00
20	0.025	0.015	-0.01	0.027	0.017	0.002

a Difference in O.D.(660nm) between initial and sampling time

물이 70% 정도로 비슷하게 나타났다 (Table 6).

CaCl₂는 Ca²⁺로 protoplast의 안정화와 재생효율에 영향을 주는데 *L. plantarum*과 *Leu. mesenteroides* 양 균주 모두 660nm에서 lysozyme 처리 후 흡광도 감소가 거의 나타나지 않았다 (Table 7). 흡

광도 감소는 초기 O.D.와의 편차로 결정하였는데 유의적인 감소 경향을 보이지 않았으며, 또한 protoplast 형성에도 control일 경우에 79%로 CaCl₂ 2.5mM에서 10mM의 농도에서는 65%에서 70% 정도로 protoplast 형성률이 control일 경우보다 다

Table 8. The efficiency of protoplast formation of *L. plantarum* and *Leu. mesenteroides* at various CaCl_2 concentrations.

CaCl ₂ conc. (mM)	<i>L. plantarum</i>		<i>Leu. mesenteroides</i>	
	ORC ^a cells (CFU/ml) ^b	Frequency of protoplast(%)	ORC cells (CFU/ml)	Frequency of protoplast(%)
0	13.6 × 10 ⁸	78.5	16.9 × 10 ⁸	52.8
2.5	21.2 × 10 ⁸	66.7	16.2 × 10 ⁸	54.7
6	17.0 × 10 ⁸	73.2	14.2 × 10 ⁸	60.3
10	18.2 × 10 ⁸	71.3	—	—
20	57.0 × 10 ⁸	10.1	11.6 × 10 ⁸	67.6

a ORC: Osmotic resistant cells, b CFU: Colony forming unit

* Initial cells number was 63.4×10^8 *L. plantarum* and 35.8×10^8 *Leu. mesenteroides*

소 떨어져 *L. plantarum* 균주에는 영향을 주지 않는 것으로 여겨진다. *Leu. mesenteroides*은 *L. plantarum*과는 달리 50%에서 60% 정도로 control일 경우보다 CaCl_2 사용농도가 증가할수록 protoplast 형성률이 양호해지는 경향을 나타내었다(Table 8).

Gelatin의 영향

Plasma expander로 알려진 gelatin을 첨가하였을 경우에는 660nm에서 유의적인 흡광도 감소 경향을 보이지 않아 세포벽의 용균작용에는 영향을 주지 않는 것으로 사료되며, 단지 protoplast를 형성시키는데 있어서 중요한 보조적 역할을 수행하는 것으로 여겨진다.

항생제 Marker를 이용한 Fusant의 선별

Protoplast fusant를 선별하기 위한 방법으로는 영양요구성 marker에 의한 방법(1), 항생제 내성 marker에 의한 방법(5), 두 가지가 병행된 방법(11) 등이 있으나 *Lactobacilli*의 경우에는 영양요구성 marker의 도입이 까다로운 반면(12) 항생제 내성 marker 조사는 다소 쉽기 때문(13)에 비교적 다루기 쉬운 항생제 내성 marker를 protoplast fusant의 선발에 이용하고자 하였다.

여러 항생제에 대한 sensitivity를 antibiotic agar diffusion method(14)로 균주 발육을 하기 위한 최소 저지 농도를 조사한 결과 marker로 이용할 수 있는 항생제는 erythromycin(15 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ampicillin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), tetracyclin(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 등이며, kanamycin, rifampicin, neomycin, streptomycin, lincomycin은 *L. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *L. brevis*, *Ped. acidilactici* 등 네 균주 공히 비슷한 내

성 또는 민감성을 나타내었다(Table 9). Erythromycin(7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 chloramphenicol(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 사용하여 *L. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*의 fusant의 선발 실험을 계속 진행하고 있다.

요 약

김치 발효에 주관여 미생물로 작용하는 *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* 균주에 세포 융합법을 적용시켜 우수한 형질의 재조합체를 얻기 위한 균주 개량의 방법으로 이용하고자 하여 그 기초가 되는 원형질 형성의 최적 조건을 조사하였다.

Protoplast를 생성하기 위하여 세포벽 용균 효소로 lysozyme 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 protoplast 형성률이 가장 좋은 생육시기인 15hr으로 결정하였다. 30 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.5에서 현저한 흡광도 감소 경향과 protoplast 형성률도 우수하였다. 15% sucrose, 20mM MgCl_2 , 6mM CaCl_2 에서는 흡광도 감소 경향을 보이지 않았으나 protoplast 형성률은 다른 농도에서보다 증가하는 경향을 나타냈다. Plasma expander로 알려진 gelatin을 첨가하였을 경우에는 660nm에서 유의적인 흡광도 감소 경향을 보이지 않았으며 단지 protoplast를 형성시키는데 있어서 중요한 보조적 역할을 수행하는 것으로 여겨진다. 균주 발육을 하기 위한 최소 저지 농도를 조사한 결과 marker로 이용할 수 있는 항생제는 erythromycin(15 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ampicillin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), tetracyclin(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), chloramphenicol(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이었다. *Leu. mesenteroides*는 모든 조건에서 *L. plantarum*보다 용균 작용과 protoplast 형성 효율이 낮아 *L. plantarum*에 준하여 proto-

Table 9. The results of antibiotic susceptibility tested by agar diffusion method.

Antibiotics($\mu\text{g}/\text{ml}$)	<i>L. plantarum</i>	<i>Leu. mesenteroides</i>	<i>L. brevis</i>	<i>Ped. acidilactici</i>
Kanamycin(300 μg)	R	R(I)	R(I)	R(I)
Lincomycin(300 μg)	R(I)	R(I)	R(I)	R(I)
Rifampicin(100 μg)	R	R	R	R
Erythromycin				
150 μg	S	S	S	S
135 μg	S	S	S	S
75 μg	S	S	S	S
15 μg	I	I	R(I)	I
7.5 μg	I	R(I)	R(I)	R(I)
1.5 μg	R	R	R(I)	R
Streptomycin(100 μg)	R	R	R(I)	R(I)
Ampicillin				
100 μg	S	S	S	S
90 μg	S	S	S	S
50 μg	I	I	S	I
10 μg	R	R	R(I)	R
5 μg	R	R	R(I)	R
1 μg	R	R	R(I)	R
Tetracycline				
300 μg	S	S	S	S
270 μg	S	S	S	S
150 μg	S	S	I	S
30 μg	S	S	R(I)	S
15 μg	I	I	R(I)	I
3 μg	R	R	R(I)	R
Neomycin(300 μg)	R	R	I	R
Chloramphenicol				
300 μg	S	S	S	S
270 μg	S	S	S	S
150 μg	S	S	S	S
30 μg	R	R(I)	R(I)	R(I)
15 μg	R	R	R(I)	R(I)
3 μg	R	R	R(I)	R(I)

* R : Resistance, I : Intermediate, S : Susceptibility.

plast 생성조건을 결정하였다.

참고문헌

1. F. Katalin and A. Lajos(1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 2147.
2. J. Anne, H. Eyssen and P. D. Sommer(1976), *Nature*, **262**, 719.
3. A. Svoboda(1978), *J. Gen. Microbiol.*, **109**, 169.
4. R. H. Baltz and P. Matsushima(1983), *Avances in Protoplast Fusion and Transformation in Streptomyces*, 143, In 6th International Protoplast Symposium, Basal.
5. Yup Kang, Jung H. Kim and D. Y. Dewey Ryu(1987), *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2221.
6. J. C. De Man, M. Rogosa and M. E. Sharpe (1960), *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130.

7. W. M. Coby, I. A. Casas and W. J. Dobrogosz (1988), *Appl. and Enviro. Micribiol.*, **54**, 2599.
8. K. Kazuo, M. Hirosumi, S. Masaru and O. Masao(1989), *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1185.
9. L. J. Lee-Wickner and B. M. Chassy(1984), *Appl. Environ. Microbiol. Chem.*, **488**, 994.
10. M. Shirai, C. Ishii and T. Aida(1983), *Agri. Biol. Chem.*, **47**, 877.
11. H. A. Hopwood and H. M. Wright(1978), *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 307.
12. T. Morishita, T. Fukada, M. Shrota and T. Yura(1974), *J. Bacteriol.*, **120**, 1098.
13. G. W. Reinbold and M. S. Reddy(1974), *J. Milk Food Technol.*, **137**, 1346.
14. Ronald M. Atlas(1986), *Basic and Practical Microbiology*, 365, Macmillan Publisher Co.