

Polymerase Chain Reaction에 의한 *Lactobacillus casei* 및 돌연변이 균주들의 비교 분석

남진식 · 이정준¹ · 신명수¹ · 나석환¹ · 백영진¹ · 유민*

계명대학교 생물학과, ¹한국야쿠르트유업(주) 연구소

Analysis of *Lactobacillus casei* and Mutant Strains by Polymerase Chain Reaction

Nam, Jin-Sik, Jeong-Jun Lee¹, Myeong-Su Shin¹, Seog-Hwan Na¹,
Young-Jin Baek¹ and Min Yoo*

Department of Biology, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea

¹Hankuk Yakult Institute, Euiwang-Si, Kyunggi-Do, 437-020, Korea

Abstract — To classify *Lactobacillus casei* strains on the basis of difference in their chromosomal DNA sequence, we have performed polymerase chain reactions on their chromosomal DNA by using random primers, and followed by analyzing randomly amplified polymorphic DNA fragments. We also developed a mini-preparative method to isolate PCR-grade chromosomal DNA from *Lactobacillus casei* strains within 3 hours. Based on RAPD patterns by polymerase chain reactions with degenerated random primers, 4 *Lactobacillus casei* strains and 2 mutant strains were successfully discriminated. Results were very sensitive, strain-specific and reproducible. It was also reliable. These results suggest that RAPD may be applied efficiently for the identification of several *Lactobacillus casei* strains.

유산균은 자연적인 발효에 관여하거나 산업적으로 요구르트, 치즈 등의 starter로 널리 이용되고 있다(1). 특히 *Lactobacillus casei*는 인간 생활과 밀접한 관계를 맺고 있는데 이것은 *L. casei*가 식품의 질과 보존성을 높여 주고 또한 인간의 장내에서 안정한 균총을 형성하여 유해한 다른 균들의 서식을 저해함으로써 장내 환경을 건강한 상태로 유지시켜 줌(2)과 동시에 항암성 물질을 분비하는 등(3, 4) 그 유용성이 크기 때문이다. 이러한 특성과 함께 산성에서 강한 생존력 때문에 위에서도 사멸하지 않고 장에까지 안전하게 도달할 수 있는 것은 *L. casei*의 또 다른 장점이다(5). 유용한 유산균을 신속하게 분리하는 것은 유산균을 starter로 사용하는 산업체에서는 항상 중요한 과제가 되어 왔다. 그러나 자연계에 존재하는 *Lactobacillus* 균주들은 그 종류가 워낙 다양한 만큼 단백질 분해 능력은 물론 발효취, bacteriophage에 대한 내성 등 여러 생리적 특성들이 또한 다양하다. 때문에 우수한 균주만을 신속하게 선별하고자 하는 오랜 숙원에도

불구하고 대상 균주들의 생리, 생화학적인 정보가 충분하게 축적되지 못하고 있어 체계적인 분류가 아직 어려운 실정이다.

최근에 polymerase chain reaction(PCR)(6, 7)의 발달과 함께 random primer를 사용한 randomly amplified polymorphic DNA(RAPD)의 연구가 가능하게 되었다. 이 RAPD 방법은 정확하면서도 많은 균주를 한번에 비교할 수 있는 장점이 있어 이미 여러 식물 및 미생물들의 유전적 관계를 비교하기 위한 수단으로 널리 이용되고 있다(8, 9). 따라서 RAPD를 이용하여 유용한 유산균주를 유전자 차원에서 선별하는 것도 당연히 가능할 것으로 예상되는데 아직은 실험적인 어려움 때문에 *L. casei* 경우에는 이 방법이 그다지 적용되지 못하고 있는 실정이다. 가장 큰 문제점은 그람양성균인 *L. casei*의 세포벽이 lysozyme을 이용하는 일반적인 방법으로는 쉽게 파괴되지 않기 때문에(10)에 chromosomal DNA의 추출이 매우 어렵다는 점이다. 게다가 대부분의 RAPD 실험이 많은 종류의 primer를 필요로 하기 때문에 산업계에서 적용하기에는 다소 번거로움이 뒤따른다는 단점도 있다.

이러한 문제점을 극복하고자 본 연구에서는 종래

Key words: *Lactobacillus casei*, random primer, polymerase chain reaction, RAPD

*Corresponding author

의 plasmid 분리 방법을 변형시켜 PCR에 적합한 chromosomal DNA를 신속하게 분리하는 방법을 확립하고, random primer에 degeneracy를 부여한 뒤 RAPD가 가능한 지를 조사하여 *Lactobacillus* 균주들을 선별하는데 필요한 primer의 수를 가능한 줄이고, 증폭된 DNA 절편들이 균주 특이성(specificity)과 반복성(reproducibility)을 보이는 지를 조사하였다. 한편으로는 이 결과에 기초하여 *L. casei*의 여러 균주들과 돌연변이 균주들을 비교하였다. 궁극적으로 본 연구는 *L. casei*에만 국한된 것이 아니라, 산업체가 요구하는 다양한 유용 균주를 분자유전학 차원에서 신속하게 분리, 동정하는 방법을 마련하기 위한 기초 자료를 제시할 것이다.

재료 및 방법

사용 균주

실험에 사용된 *L. casei* YIT 9018 (*L.c* 9018), *L. casei* CHR. Hansen (*L.c* Chr), *L. casei* Marshall (*L.c* Mar), *L. casei* ATCC 4646 (*L.c* 4646) 균주들과 *L. casei* CAM (CAM), *L. casei* CSM (CSM) 돌연변이 균주들은 한국 야쿠르트 유업(주) 연구소로부터 분양 받았다. CAM과 CSM은 각각 acridine dye를 처리하였거나 균 보존 과정에서 자연적으로 변이가 유도된 균주들이다.

시약

Mutanolysin은 M-1 enzyme으로서 Dainippon Pharmaceutical Co., LTD. (Japan)의 제품을 사용하였고 dNTP는 Boehringer Mannheim(Germany)으로부터 구입하였다. Taq DNA polymerase는 한국생공(주)과 Perkin-Elmer Cetus Co.(USA)로부터 구입하였으며 PCR machine은 Ericomp 수냉식 temperature cycler를 사용하였다. 기타 전기영동에 사용된 시약 및 일반시약들은 구입 가능한 최상의 제품을 사용하였다.

PCR primers

RAPD를 위한 random primer는 모두 4 종류를 사용하였으며 이들은 한국생공(주)에 의뢰하여 제조하였거나 실험실에 보관중이던 것을 사용하였다. 각각의 명칭과 자세한 sequence는 Table 1에 표시한 바와 같다. 이들 중 17-1과 17-2는 모두 17mer로서 각각 24 또는 16의 degeneracy(11)를 가지도록 제작하였고 27mer인 27-1, 27-2 역시 32 또는 48의 degeneracy를 가지도록 고안하여 random priming의 기회를 최대한 증가시켰다. Primer 원액은 -20°C 에 저장, 보관하였으며 실험 직전에 TE buffer로 희석, 사용하였다.

균주의 배양과 저장

균주를 장기적으로 저장하기 위해서는 50% glycerol stock을 만들어 -70°C 에서 보관하였고 2주일 이하의 단기 보존을 위하여는 11% skim milk에서 72시간 이상 배양한 균액을 -20°C 에 냉동 보관하여 사용하였다. 균의 활력을 항상 높은 상태로 유지하기 위해서는 TCM broth에서 연속적으로 2~3회 계대 배양한 후 사용하였다. TCM broth는 1 liter에 beef extract 4.5 g, peptone 7.5 g, yeast extract 5.0 g, tween 80 1 ml, K_2HPO_4 3.0 g, KH_2PO_4 1.5 g, glucose 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g을 녹여 최종 pH를 6.8로 조절하였다(10).

Chromosomal DNA의 순수 분리

PCR 반응에 적합한 *L. casei*의 chromosomal DNA를 분리하기 위해서는 이전에 보고된 바 있는 plasmid 분리 방법을 변형하여 실시하였다(10). *L. casei*의 세포벽을 제거하기 위해서는 M-1 enzyme을 사용하였고 처리 과정중에 DNA가 물리적인 힘에 의해 분해되는 것을 최소한으로 줄이기 위하여 phenol 처리를 가능한 한 온화한 조건에서 신속하게 실시하였다. Phosphate buffer는 0.02 M KH_2PO_4 용액과 0.02 M K_2HPO_4 용액을 51 : 49(pH 6.8)로 혼합하여 제조하였으

Table 1. PCR primers used for the generation of RAPD

Name	length(bp) ^a	sequence	degeneracy	max. ^b (G+C)%
17-1	17	CCTGGTGG(ACGT)GA(AGT)GA(AG)GT	24	70.6
17-2	17	ATCACCCA(AG)TT(ACGT)G(AT)CCA	16	52.9
27-1	27	GGGGAATTCAGACGTT(GA)CA(GA)CT(ACGT)GA(CT)G	32	59.3
27-2	27	CCCTCTAGAGGTGGAA(ACGT)GT(GA)TG(GAT)AT(GA)T	48	55.6

Degenerated sequences are indicated in brackets, ^abp means base pairs, ^bmax.(G+C)% means the maximum GC content when calculated for G or C for the degenerated positions.

Table 2. Procedures for the isolation of chromosomal DNA from *L. casei* strains

1. Inoculate cells in 3 ml of TCM broth with 0.5% glycine
2. Incubate for 15 hours at 37°C
3. Harvest cells in an Eppendorf tube
4. Wash with 1 ml of phosphate buffer
5. Resuspend washed cells in 400 μ l of enzyme reaction buffer
6. Add 10 μ l of M-1 enzyme (1.5 mg/ml in phosphate buffer)
7. Incubate for 15 minutes at 37°C
8. Harvest and resuspend protoplasts in 500 μ l of TE buffer (pH 7.5)
9. Add 25 μ l of 10% sodium dodecyl sulfate
10. Add 5 μ l of proteinase K (10 mg/ml)
11. Mix gently and incubate for 1 hour at 37°C
12. Add 500 μ l of Tris-saturated phenol and invert gently for 10 minutes
13. Centrifuge and transfer the supernatant to a new Eppendorf tube
14. Add 700 μ l of chloroform/isoamyl alcohol and invert gently for 10 minutes
15. Centrifuge and transfer the supernatant to a new Eppendorf tube
16. Add 50 μ l of 3 M NaAc (pH 5.2)
17. Add 1 ml of prechilled absolute ethanol (-20°C)
18. Transfer DNA threads appeared to an Eppendorf tube containing 1 ml of 70% ethanol with a U shaped Pasteur pipette
19. Invert well and centrifuge for 10 minutes at room temperature
20. Dry DNA pellet and resuspend in 30 μ l of TE buffer (pH 7.5)
21. Examine 5 μ l of DNA sample by agarose gel electrophoresis

며 enzyme reaction buffer는 여기에 0.6 M MgCl₂, 0.6 M CaCl₂ 용액을 각각 10 ml 씩 첨가하고 sucrose를 최종 농도 1 M 되도록 하여 준비하였다. TE buffer는 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA가 되도록 준비하였다. Chromosomal DNA 분리를 위한 전체 과정은 Table 2에 표시하였다.

PCR 반응

PCR 반응액을 준비하기 위해서 125 ng의 chromosomal DNA, dNTP 250 μ M, reaction buffer(200 mM Tris-Cl, pH 8.4, 15 mM MgCl₂, 250 mM KCl, 1 mg/ml gelatin) 2.5 μ l와 primer 125 pmoles을 0.5 ml Eppendorf tube에 혼합하였다. 2 종류의 primer를 혼합하여 사용할 때에는 혼합한 양이 125 pmoles이 되도록 하였다. 여기에 Taq DNA polymerase 0.2~0.5 units와 H₂O를 첨가하여 전체 반응액을 25 μ l로 준비하였다. 준비된 반응액 위에 20 μ l의 mineral oil을 덮어 반응 도중에 수분의 증발로 인한 반응액의 감소가 일어나지 않도록 하였다. 반응은 denaturation을 92°C에서 45초, extension을 72°C에서 1분간 실시하였다. 반응 횟수는 40 cycle로 하였으며 annealing 온도와 시간은 25°C로부터 45°C까지 다양하게 변화시키며 조사한 뒤 최종적으로 28°C에서 1분으로 고정시켰다.

전기영동과 RAPD의 확인

PCR 반응의 결과는 전기영동으로 확인하였다. 전체 반응액 중 10 μ l를 채취하여 loading buffer(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll(type 400)) 4 μ l와 혼합한 뒤 1.0~1.4% agarose gel 상에서 8 V/cm로 전기영동하였고 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide 용액으로 염색한 뒤 UV transilluminator 위에서 육안으로 band의 크기와 강도를 확인하였다. 사진 촬영이 필요한 경우에는 gel을 destaining하여 type 667 film으로 촬영 보관하였다.

결과 및 고찰

Chromosomal DNA의 순수 분리

*L. casei*의 세포벽을 제거하고 protoplast를 형성시키기 위하여 M-1 enzyme을 사용하였다(12). Protoplast 형성과 그 이후의 chromosomal DNA 분리 과정은 sucrose로 삼투압을 맞춘 buffer 속에서 전개함으로써 물리적인 충격에 의한 DNA의 자연 분해를 최소한으로 줄였다. 본 실험에 사용된 4가지 균주로부터 분리한 chromosomal DNA는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 이들의 크기는 모두 25 kb 이상으로 보이며 전체 과정은 약 3시간이 소요되었다.

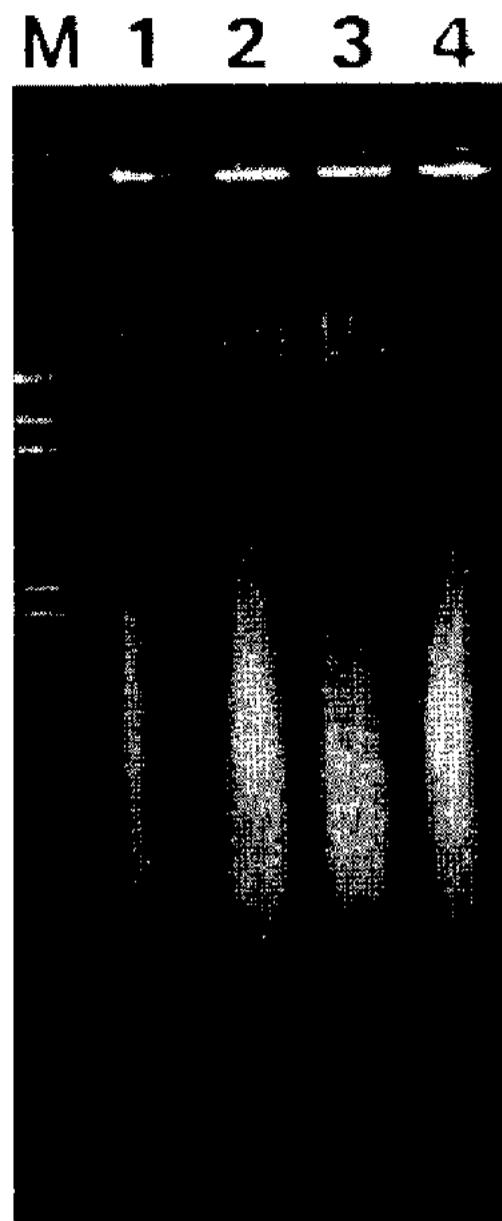


Fig. 1. Electrophoresis of chromosomal DNA and RNA. Lanes 1, 2, 3, 4 represent chromosomal DNA and RNA isolated from *L.c* 9018, *L.c* Chr, *L.c* Mar, *L.c* 4646, respectively. Lane M represents λ -DNA digested with *Hind*III.

Degenerated primer에 의한 RAPD 생성

RAPD를 위하여 degenerated primer를 사용한 이유는 많은 primer를 제조해야 할 때 생기는 경제적, 실험적 번거로움을 줄이면서도 그와 동일한 효과를 얻고자 하였기 때문이다. 실제 실험에 앞서 degenerated primer들이 과연 유용한 random product를 증폭하는지 확인할 필요가 있었다. 이를 위하여 *L.c* 9018의 chromosomal DNA를 template로 사용하고 primer를 변화시키면서 실시한 PCR 결과는 Fig. 2와 같다. Lane 1, 2, 3, 4는 각각 17-1, 17-2, 27-1, 27-2의 primer를 사용한 경우로서 PCR 결과가 서로 다른 형태를 보여주고 있어 각 lane마다 증폭된 band들이 각각의 primer에 의해 선택적으로 증폭된 것임을 알 수 있었다. 전체적으로 볼 때 선명한 band만을 고려하면 lane마다 대개 1~6개의 band를 형성하였는데 그 크기는 약 100~2 kb까지 다양하였다. 어떤 경우에는 희미한 band나 100 bp 이하의 작은 band도 발견되었는데 자료 분석에는 포함시키지 않았다. Primer들을 혼합하여 사용한 결과는 lane 5부터 lane 10까지 나타나 있는데 특히 lane 1, 5, 6, 7에서 17-1 primer가 공통으로 사용된 점으로 미루어 볼 때 공통으로 확인되는 250 bp band는 이 primer에 의하여 선택적으로, 그리고 반복적으로 증폭된 band임을 보여주는 증거라 하겠다. Lane 2와 9에서 확인되는 300 bp band 역시 유사한 경우로 이는 17-2 primer에 의한 것임을 시사하고 있다. Lane 8도 17-1과 17-2

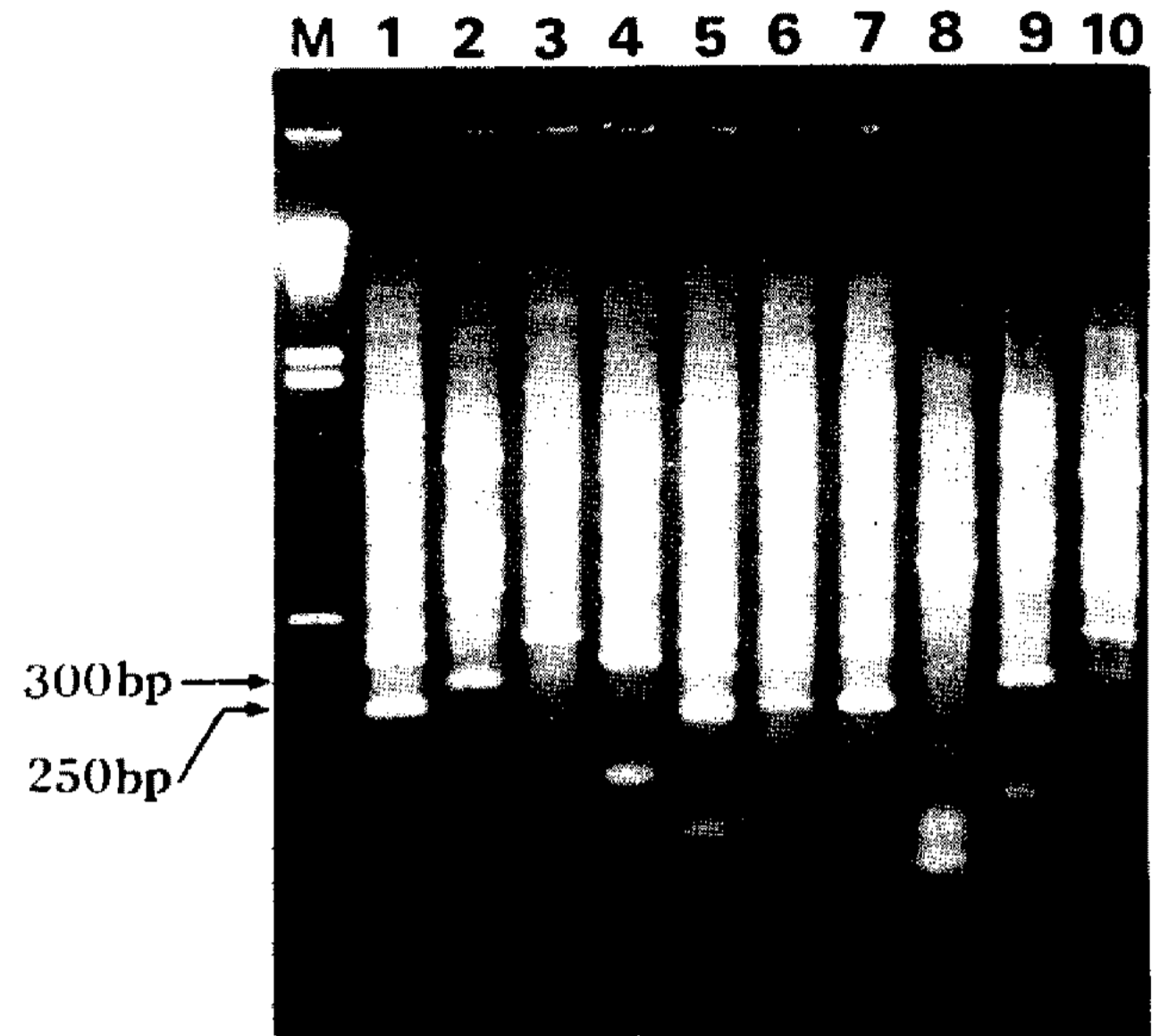


Fig. 2. RAPD analysis of *L.c* 9018 with various combination of random primers.

Each lane shows PCR result with primers as follows: lane 1: 17-1, lane 2: 17-2, lane 3: 27-1, lane 4: 27-2, lane 5: 17-1, 17-2, lane 6: 17-1, 27-1, lane 7: 17-1, 27-2, lane 8: 17-2, 27-1, lane 9: 17-2, 27-2, lane 10: 27-1, 27-2. Lane M represents λ -DNA digested with *Hind*III.

primer를 사용하였으나 250 bp와 300 bp band가 보이지 않는 이유는 서로가 random priming을 간섭함으로써 이의 증폭을 방해하였기 때문인 것으로 사료된다. 때때로 약간의 smear 현상이 배경으로 나타났는데 이는 Taq DNA polymerase의 농도가 높을수록 강하게 나타났으며 효소의 농도가 지나치게 낮을 경우에는 오히려 band가 1, 2개 사라지는 것이 관찰되었다(data not shown). Annealing 온도 역시 중요한 요소로 작용하였는데 본 실험의 경우 최적 온도는 28°C였고 35°C 이상에서는 band가 형성되지 못하였다(data not shown). 이는 일반적으로 RAPD를 위한 적정 온도가 35°C 전후인 것과 비교할 때 다소 낮은 것인데 random sequence이면서 동시에 degeneracy가 있는 primer를 사용하였기 때문인 것으로 사료된다. 결과를 종합하면 PCR 반응에 의하여 적절한 수와 크기의 band가 확인되었기 때문에 본 실험 방법에 의해 분리한 chromosomal DNA는 degenerated primer들과 함께 RAPD 분석에 응용이 가능하다는 것이 확인되었다. 동시에 이러한 band의 증폭은 각 primer에 대해 특이적이면서도 항상 반복적임을 확인되었다.

균주 특이성(specificity)과 반복성(reproducibility)
L. casei 균주들의 선택적 구별 : RAPD가 성공적

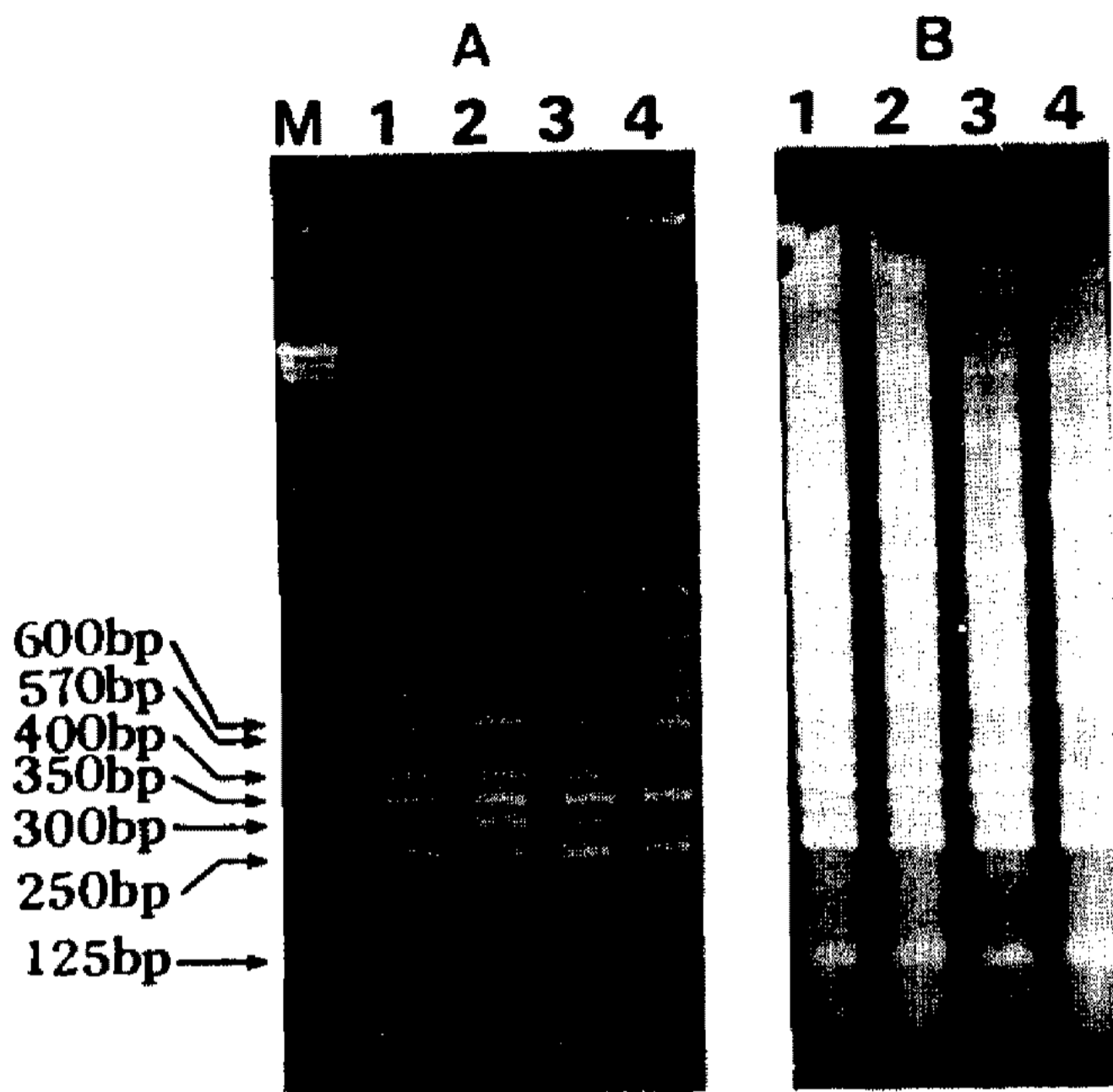


Fig. 3. RAPD analysis of *L. casei* strains.
Lanes 1, 2, 3, 4 of each panel represent *L.c* 9018, *L.c* Chr, *L.c* Mar, *L.c* 4646, respectively. Primer used was 17-1. Panels A and B show the results of PCR experiments which were carried out independently. Lane M represents λ -DNA digested with *Hind*III.

으로 균주분리와 동정에 이용되려면 균주 특이성(specificity)과 민감성(sensitivity), 그리고 반복성(reproducibility)이 있어야 한다. 특히 RAPD는 일반적인 PCR에 비하여 낮은 온도에서 실시되므로 균주간의 유전적 유연 관계가 높을 수록 그 결과는 유사할 것이 예상되며 더욱이 이 결과가 반복적이어야 일관성 있는 분석이 가능하기 때문이다. 이를 조사하기 위하여 실시한 실험 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. Panel A와 B는 조건은 동일하나 template DNA 분리로부터 전기영동에 이르기까지 각기 독립적으로 수행된 실험 결과이다. 여기에 사용한 template는 *L.c* 9018, *L.c* Chr, *L.c* Mar, *L.c* 4646 균주들의 chromosomal DNA였고 primer로는 17-1을 사용하였다. 이들은 모두 *L. casei* 균주로서 PCR 결과 125 bp, 250 bp, 300 bp, 350 bp들을 공통으로 나타내어 예상한 바와 같이 유전자 체계가 매우 유사하다는 것을 보여 주었다. 그럼에도 불구하고 *L.c* 4646에서만은 400 bp band가 나타나지 않았다는 점과 *L.c* 9018이 570 bp band를 나타낸 반면 그외의 균주들에서는 대신에 600 bp band를 나타낸 것을 볼 때 결국 이들은 매우 유사하면서도 그러나 조금씩 상이하다는 보여주는 것이라 하겠다. Panel A와 B의 결과가 완전히 동일하기 때문에 RAPD를 이용한 이 실험은 반복적이면서도 균주간의 미세한 차이를 구별해낼 수 있을 만큼 민감한

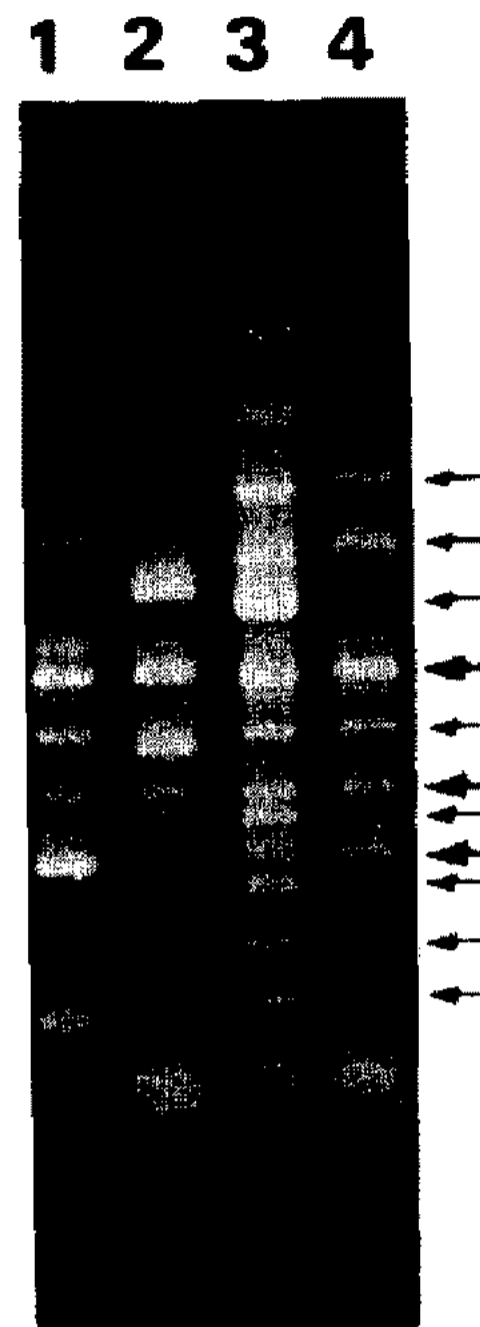


Fig. 4. Strain-specific patterns of RAPD with different sets of degenerated random primers.
Primers used were 17-2, 27-2. Strains used were as follows: lane 1: *L.c* 9018, lane 2: *L.c* Chr, lane 3: *L.c* Mar, lane 4: *L.c* 4646

것으로 나타났다. 기타 여러 조합의 primer들을 사용하여 실험을 반복한 결과 17-2와 27-2를 혼합 사용하였을 때에는 Fig. 4에서처럼 *L.c* 9018, *L.c* Chr, *L.c* Mar, *L.c* 4646이 모두 구별될 수 있었다. Fig. 4에서 모든 균주에 공통적으로 나타나는 band들은 굵은 화살표로 표시하였으며 특정 균주에서만 특이하게 나타나거나 또는 결핍된 band들은 가는 화살표로 표시하였다. 마찬가지로 공통적인 band가 여러 개 나타나기 때문에 이들 균들이 매우 유사함을 다시 한번 입증하고 있으며 그러나 각 균주마다 특이한 band들이 잘 구별이 되고 있어 degenerated primer를 사용함으로써 선택적이고 반복적인 균주의 동정이 가능함을 보여주고 있다. 본 실험의 목적이 RAPD를 이용하여 대상 균주들을 유전자 차원에서 구별하는 것이 가능한 지를 확인하기 위한 것이므로 더 이상 자세한 phylogeny는 조사하지 않았다.

돌연변이 균주의 선택적 구별 : 돌연변이주의 염색체 DNA 변화로 말미암아 primer와 template가 일치하지 않게 되면 특정 band의 증폭 여부가 달라지게 되므로 본 실험에 사용한 primer들이 얼마나 민감하게 돌연변이를 검출할 수 있는지 알아 보기 위하여 *L.c* 9018의 돌연변이 균주들을 비교 분석하였다. 사용한 primer는 17-1, 17-2와 27-1이었고 이들의 결과는 Fig. 5의 Panel A, B, C에 나타내었다. 전체적으로

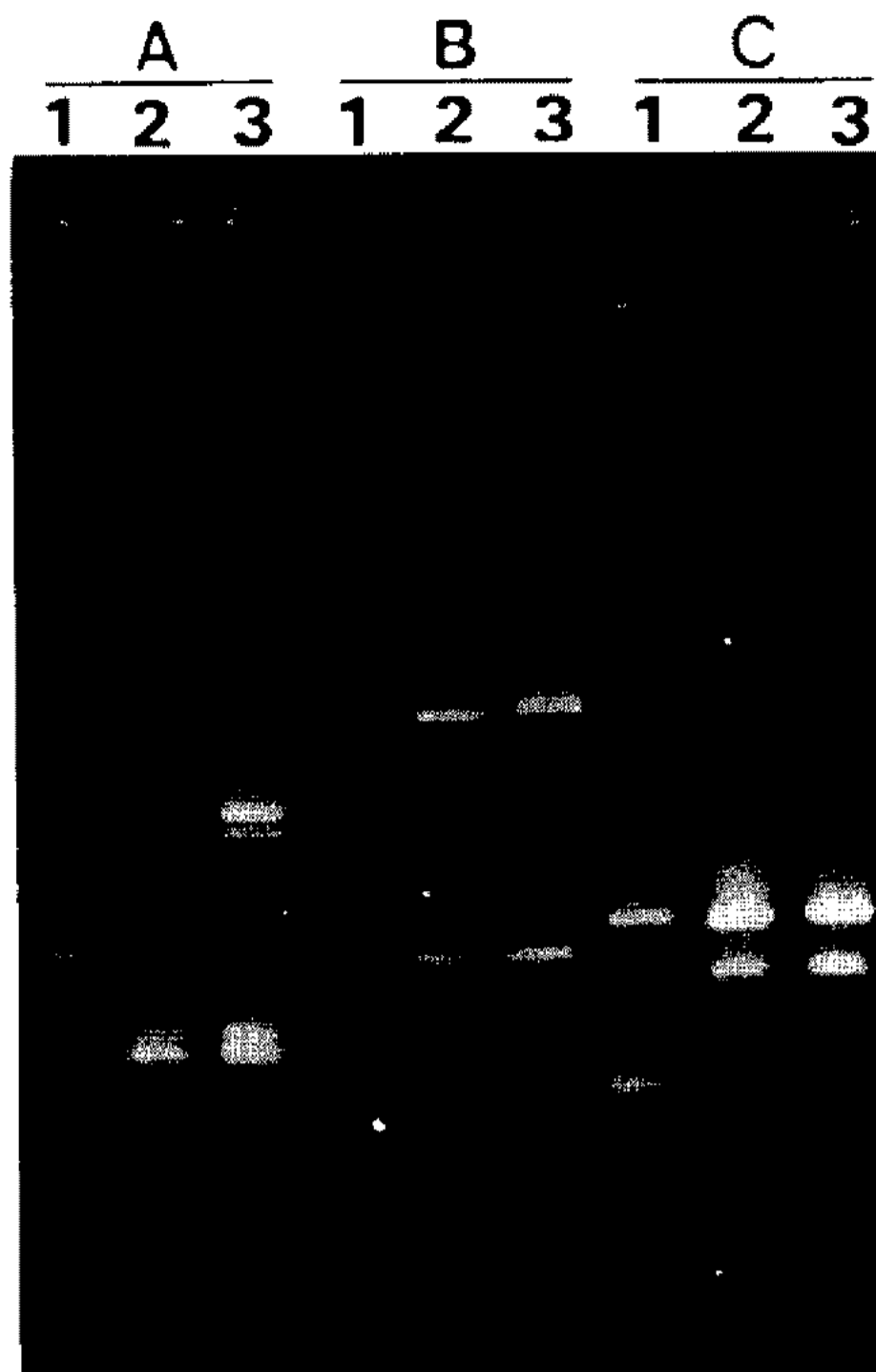


Fig. 5. RAPD analysis of *L.c* 9018 and its mutant strains.

Lanes 1, 2, 3 of each panel represent *L.c* 9018, CAM and CSM, respectively. Primers used were as follows: A. 17-1, B. 17-2, C. 27-1. Arrow indicates the specific band for strain CSM.

돌연변이 균주들과 *L.c* 9018은 분명한 차이를 보였으나 돌연변이 균주들은 서로 매우 유사하였다. 그러나 17-1 primer를 사용하였을 때는 panel A에서 화살표로 표시한 바와 같이 CAM과 CSM을 확실하게 구별할 수 있었다. 이것은 degenerated primer를 사용한 RAPD 방법이 서로 다른 strain 뿐 아니라 돌연변이주간의 염색체 차이까지도 구분할 수 있을 정도로 민감하다는 것을 재확인하는 결과이다.

요 약

PCR 반응에 따른 RAPD를 산업적으로 유용한 유산균주를 신속하고 정확하게 분리하기 위한 방법의 하나로 사용할 수 있는지 가능성을 조사하기 위하여 *L. casei*의 4개 strain과 이들의 돌연변이 균주 2 종류를 비교하였다. 또한 *L. casei*로부터 농도와 순도 면에서 PCR template에 적합한 chromosomal DNA를 3시간만에 추출할 수 있는 방법을 확립하였다. RAPD를 위하여는 degenerated primer를 이용하였는데 PCR 결과로 볼 때 분석에 적합한 수와 크기의 random product들이 증폭되었다. 본 실험에 사용된 조건과 primer들은 *L. casei*의 대상 균주들과 돌연변이

균주들을 정확하고 특이적으로 구별할 수 있었는데 경우에 따라서는 적절히 primer들을 혼합하여 사용할 때 더욱 확실한 구별이 가능하였다. 본 실험의 결과는 반복성이 매우 우수한 것으로 확인됨으로서 장차 산업적으로 유용한 *L. casei* 균주들을 신속, 정확하게 분리, 동정하는 데에 이용 가치가 높을 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국야쿠르트 유업 주식회사의 산학 공동 연구 지원에 의해 수행된 것이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Moat, A.G. 1985. Biology of the lactic, acetic, and propionic acid bacteria, Pp. 143-188. In Demain, A.L. and N.A. Solomon (eds.), *Biology of Industrial Microorganisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Menlo Park.
2. Ayebo, A.D., I.A. Angelo, and K.M. Shahani. 1980. Effect of ingesting *Lactobacillus acidophilus* milk upon fecal flora and enzyme activity in human. *Milchwissenschaft* 35: 730-733.
3. Matsuzaki, T., K. Tsukio, and T. Yokokura. 1987. Antitumor effect of *Lactobacillus casei* YIT 9018 (LC9018) on mouse B16 melanoma and its highly metastatic variants. *Biotherapy* 1: 271-277.
4. Matsuzaki, T., Y. Shimizu, and T. Yokokura. 1990. Augmentation of antimetastatic effect on Lewis lung carcinoma (3LL0) in C57BL/6 mice by priming with *Lactobacillus casei*. *Med. Microbiol. Immunol.* 179: 161-168.
5. 김현욱, 유광현, 이돈성, 고준수. 1980. 산성환경에서 *Lactobacillus casei* YIT 9018의 생존에 관한 연구. *Korean J. of Anim. Sci.* 22: 291-300.
6. Vosberg, H. 1989. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. 83: 1-15.
7. Bereswill, S., A. Pahl, P. Bellemann, W. Zeller, and K. Geider. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3522-3526.
8. Kersulyte, D., J.P. Woods, E.J. Keath, W.E. Goldman, and D.E. Berg. 1992. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriology* 174: 7075-7079.
9. Martin, G.B., J.G.K. Williams, and S.D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using

- random primers and near isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 2336-2340.
10. Bae, H.S., Y.J. Baek, Y.K. Kim, M. Yoo, and M.Y. Pack. 1985. Rapid and simple method for isolating plasmid DNA from lactic acid bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 289-296.
11. Brown, T.A. 1992. *Genetics*, Pp. 126-127. Chapman & Hall. UK.
12. Baek, Y.J., H.S. Bae, M. Yoo, Y.K. Kim, and H.U. Kim. 1986. A study on the protoplast formation and regeneration of *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 251-257.

(Received July 25, 1994)