

Lactobacillus acidophilus 88과 *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953간의 세포융합주의 특성에 관한 연구

조영배 · 김혜정 · 김성구* · 백형석 · 전홍기[†]

부산대학교 미생물학과

*부산수산대학교 생물공학과

Characteristics of a Interspecific Protoplast Fusant from *Lactobacillus acidophilus* 88 and *Lactobacillus bulgaricus* IFO 13953

Young-Bae Jo, Hye-Jeong Kim, Sung-Koo Kim*, Hyung-Suk Baik and Hong-Ki Jun[†]

Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Dept of Biotechnology and Bioengineering, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Abstract

An interspecific fusant was made from the protoplasts of two strains of *Lactobacillus* genus (streptomycin and lincomycin resistant *L. bulgaricus* and kanamycin resistant *L. acidophilus* 88). The functional properties of the fusant were examined by determining bacteriocin productivity, acid-producing activity, ability of carbohydrates fermentation and three important enzyme activities. The recombinant strain revealed bacteriocin productivity. Acid production and β -galactosidase, phospho- β -galactosidase, lipase and protease activity of *L. bulgaricus* were better than those of *L. acidophilus* 88. Among fusants, β -galactosidase activity of two strains were better than that of the parent strains but phospho- β -galactosidase activity remarkably lower. One fusant revealed the improved proteolysis compared to that of the parent strains. Lipase activity of *L. bulgaricus* was better than that of *L. acidophilus* but another fusant exhibited the highest lipase activity.

Key words : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, electrofusion, recombinant strain

서 론

젖산균은 각종 동물의 장관내에 서식하며 소화관내에서 점막의 보호 및 장내 이상 발효의 개선(1), 칼슘의 체내 흡수 촉진(2) 등 여러가지 유익한 생리작용을 나타내기 때문에 정장제와 같은 의약품과 사료첨가제로도 이용되고 있다. 최근에는 유산균에 의한 혈중 cholesterol 저하작용(3), 면역기능 부활효과가 밝혀졌으며, 특히 면역기능 부활작용은 병원성 세균에 대한 감염 방어 효과, 항암 효과 등의 약리 효능을 갖는다고 알려져 있다(4). 이러한 유산균의 면역기능 부활작용은 interferon 유도, mitogen 활성화, 항체형성 및 세포성 면역의 활성화 등의 기작에 의한 것으로 밝혀졌다(2).

정상 발효를 일으키는 유산균들 중에서, *Lactobacillus*

*bulgaricus*는 고온성 starter로서 액상요쿠르트 및 치즈제조에 이용되는 균주이며, 특히 lactase의 활성이 뛰어나서 유산균 중에서 유산의 생성량이 가장 많다(5). *Lactobacillus acidophilus*는 애시도필러스 밀크(acidophilus milk)의 생산을 위하여 호열성 starter로서 이용되며, 사람의 장에서 주로 서식하면서 장질환 예방(6)에 중요한 역할을 한다. 뿐만 아니라, 장조직에서 암을 유발시키는 세균의 효소생성을 억제시켜 주는 작용(7)도 있는 것으로 알려져 있다. 또한 *L. acidophilus*는 *Lactobacillus*가 생산하는 항균물질인 bacteriocin의 80% 정도를 생성(8)하기 때문에 식품보존과 관련하여 식품산업에의 이용, 개발 및 성질 규명에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있으며, bacteriocin의 항균활성을 이용하고자 하는 발효산업 측면에서도 큰 기대

[†]To whom all correspondence should be addressed

를 모으고 있다. Bacteriocin은 그람 양성, 음성 세균의 여러 종들에 의해 생성되는 항균성 peptide나 단백질(9)로서 종류에 따라 cell membrane, rRNA 또는 ribosome의 작용을 저해하거나 peptidoglycan, lipid, DNA, 단백질의 합성 등을 저해하는 등(10) 그 작용기작이 매우 다양하다.

이와 같이 bacteriocin의 항균활성을 김치발효에 이용되는 starter균주에 도입시킨다면 젖산균의 과도한 증식으로 인한 산패를 지연시켜 김치의 상품성과 저장성을 높힐 수 있을 것이다. 전보(11)에서는 김치발효에 대한 starter균주에 대한 균주육종의 일환으로서 *L. bulgaricus*와 *L. acidophilus*의 장점들을 동시에 가지는 새로운 균주를 개발하기 위해 *L. bulgaricus*와 *L. acidophilus*를 electrofusion시켰다. 본 연구에서는 이들 융합균주 중에서 유전적으로 안정성이 높고 bacteriocin 생성능을 나타내는 균주를 분리하였으며, 모균주의 우량형질을 가진 새로운 균주를 선별하기 위해 융합주에 대한 생리학적 특성들을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용된 균주는 streptomycin(2mg/ml)과 lincomycin(5μg/ml)에 내성을 가진 *Lactobacillus bulgaricus* 및 kanamycin(600μg/ml)에 내성을 가진 *Lactobacillus acidophilus*와 두 균주를 electrofusion시켜 얻은 융합균주를 사용하였다.

융합균주의 선별

Electrofusion(11)에 의해 융합된 융합균주를 선택배지(MRS + streptomycin 2mg/ml, kanamycin 600μg/ml)에서 1주일 간격으로 10회 이상 계대배양하였다. Segregation되지 않고 안정성을 계속 유지하며 bacteriocin 생성능이 양호한 12개의 융합균주를 선별한 뒤 이들의 생리학적 특성에 대해 검토하였다.

Bacteriocin 생성능 검토

Bacteriocin 생성능은 Staskawics와 Panopoulos(12) 등의 방법에 따라 행하였다. 즉 융합주의 균액을 MRS agar plate에 5μl씩 접종하여 37°C에서 3시간 배양시킨 후, MRS broth에 전배양한 indicator 균주(*Lactobacillus helveticus* CNRZ 1096)의 균액 100μl를 5ml의 0.8% top agar에 섞어 증충한 다음 37°C에서 12시간 이상 배양하였다. 이 때 나타나는 생육 저지환을 통해

서 bacteriocin 생성능을 검토하였다.

조효소액 제조

Protease 및 lipase의 활성을 검토하기 위한 조효소액은 다음과 같이 제조하여 사용하였다. 즉 모균주 및 융합균주를 MRS 배지상에서 37°C, 12시간 정치배양한 후 배양액을 4,000×g에서 10분간 원심분리(4°C)하여 인산완충액으로 세척하고 상등액과 세척액을 모아 투석막을 이용하여 4°C에서 하룻밤 투석한 후 동결건조(EYELA Freeze Dryer FD-1, Tokto Rikakikai Co., LTD)한 것을 조효소액으로 제조하여 사용하였다.

산 생성능

융합주의 산 생성 능력을 비교하기 위해 Kaneko 등의 방법(13)에 따라 10% reconstituted skim milk에 각 균주를 starter로 사용하여 37°C에서 발효시켰을 때 변화하는 pH를 시간별로 측정하여 이를 산 생성 능력으로 표시하였다.

당 발효성

Okada 등의 방법(14)에 따라 모균주 및 융합균주의 당 발효능을 조사하였다. 즉 MRS broth에서 beef extract, yeast extract, glucose를 제외하고 chlorophenol red를 0.004% 가하여 당 발효성 조사에 사용하였다. 당용액은 10%로 조제하여 여과멸균한 후, 무균적으로 최종 농도 2%가 되도록 발효배지(MRS fermentation medium)(15)에 가하였다. 각 당용액을 가한 발효배지에 균을 접종한 후 37°C에서 12시간 동안 배양하여 색깔의 변화유무를 관찰하였다.

배양온도 및 초발 pH의 영향

융합균주의 생육에 미치는 배양온도의 영향을 검토하기 위하여 MRS broth(pH 7.0)에 전 배양된 균액을 0.5% 접종한 후 배양온도를 44, 46, 48 및 50°C로 달리 하여 균의 생육유무를 관찰하였으며, 생육에 미치는 초발 pH의 영향을 조사하기 위하여 배지의 초발 pH를 3.0~5.0 까지 조정된 다음, 37°C에서 배양하여 균의 생육 유무를 조사하였다.

β -Galactosidase activity와 phospho- β -galactosidase activity

β -Galactosidase 활성은 Okamoto와 Morichi의 방법(16)과 McKay 등의 방법(17)을 변형하여 사용하였

다. 즉 균체를 원심분리하여 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 2번 세척하고 동일 buffer에 현탁한 뒤, acetone : toluene(9 : 1, v/v)액을 10 μ l/ml 농도로 첨가한 후 5분간 vortex하여 toluenized cell을 만든 뒤, 0.1ml을 취하여 12mM ONPG(o-nitrophenyl-D-galactoside)를 함유하는 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.2ml과 섞어 37°C에서 반응시켰다. 반응액이 충분한 노란색을 나타내었을 때, 0.5M Na₂CO₃ 2ml을 첨가하여 반응을 중지시켜 실온에서 10분간 방치한 다음, 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 toluenized cell액 1ml로 단백질량을 구하였다(15). Specific activity는 효소 단백질 1mg에 의해 상기 조건에서 1분 동안 유리된 o-nitrophenol의 양을 표준 곡선으로 부터 산출하여 nanomoles로 표시하였다.

Phospho- β -galactosidase의 활성은 ONPG-6-P(o-nitrophenyl-D-galactopyranoside-6-phosphate)를 기질로 하여 측정하였으며, 활성측정과 specific activity는 β -galactosidase와 동일한 방법으로 행하였다.

Protease activity

Protease 활성은 Anson-萩原법(18)과 Juffs방법(19)을 이용하여 측정하였다. 즉 2% casein용액(pH 7.0)의 0.02M potassium phosphate buffer에 녹임) 1ml에 조효소액 1ml을 가하여 37°C 항온조에서 5시간 반응시킨 후 0.4M trichloroacetic acid 2ml을 첨가하여 효소 반응을 정지시키고, 원심분리하여 이 여액 1ml에 0.44M Na₂CO₃ 5ml과 2배로 희석한 folin 시약 1ml을 첨가하여 37°C에서 20분간 발색시켜서 650nm에서 흡광도를 측정하고, L-tyrosin 표준액의 표준 곡선으로 부터 protease 활성을 tyrosin(μ g/ml) 함량으로 나타내었다(20).

Lipase activity

Lipase의 활성은 Kwon과 Rhee의 방법(21)을 이용하여 측정하였다. 즉 5ml isoctane, 0.5ml olive oil 및 2ml sodium phosphate buffer(pH 7.0)가 들어있는 시험관에 1ml의 조효소액을 첨가하여 65°C에서 30분간 반응시킨 후, 6N HCl 1ml을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 상부의 5ml isoctane 층을 1ml의 cupric acetate-pyridine액(pH 6.1)과 90초간 vortex시켜 715nm에서 나타난 흡광도로 효소 활성을 측정하였다. Oleic acid의 표준 곡선으로 부터 lipase 활성을 얻었다. 1분간 1 μ mol의 유리지방산을 생성하는 효소의 양을 1unit로 정하였다.

결과 및 고찰

융합주의 bacteriocin 생성능

최종적으로 선별된 융합주들의 bacteriocin 생성능을 indicator 균주로 *Lactobacillus helveticus* CNRZ 1096을 사용하여 검토한 결과, Fig. 1에서와 같이 모균주인 *L. acidophilus*가 생성한 bacteriocin에 의해 indicator균의 생육이 저해되었음을 알 수 있었다. 융합균주의 경우 모균주인 *L. acidophilus* 88 보다는 bacteriocin 생성능이 약하게 나타났으나 이는 모균주중 bacteriocin 생성능이 있는 *L. acidophilus*로 부터 bacteriocin 생성능이 전달되어진 것으로 사료되었다.

산 생성능

모균주와 융합주의 발효기간 동안의 산 생성능력을 검토한 결과(Fig. 2), 대부분의 균주들이 생육과 동시에 산을 분비하여 배양시간이 경과함에 따라 거의 비례적으로 pH가 낮아졌다. *L. bulgaricus*가 *L. acidophilus*보다 산생성능이 월등히 우수하였으며, 융합균주는 모균주의 중간 정도의 산생성능을 나타내었다.

당 발효성

여러 종류의 당에 대한 발효성 유무는 지시약인 chlorophenol red의 색깔변화로 판정하였다. Table 1에서 처럼 *L. acidophilus*는 lactose와 sorbose를 이용하지 못하고 maltose를 이용하는 반면, *L. bulgaricus*는 lactose와 sorbose는 이용하지만 maltose를 이용하

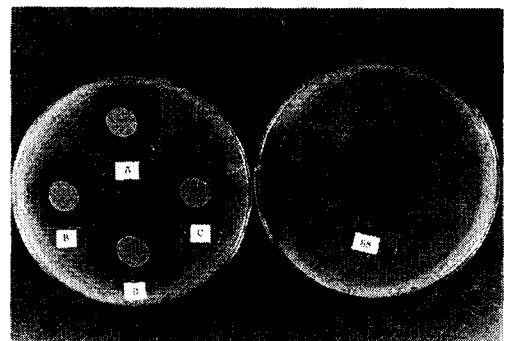


Fig. 1. Bacteriocin activity from *L. acidophilus* 88 and fusants against indicator *L. helveticus* CNRZ 1096.

(A) Fusant No. 7 (B) Fusant No. 9
(C) Fusant No. 11 (D) Fusant No. 12
(88) *Lactobacillus acidophilus* 88

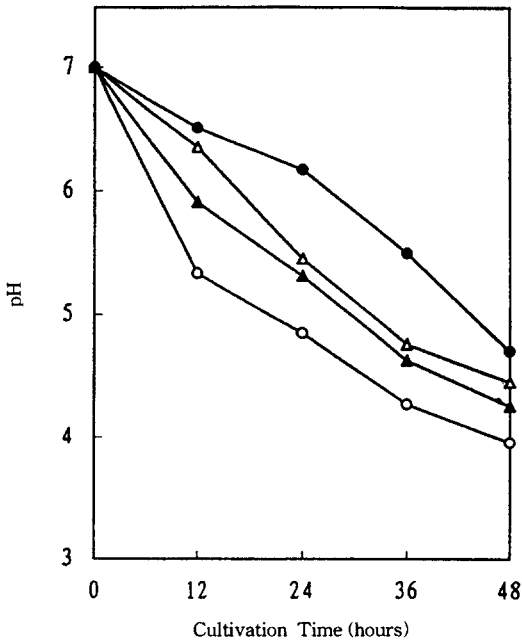


Fig. 2. Acid production during fermentation by *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and fusants.
 ● - *L. acidophilus* ○ - *L. bulgaricus*
 ▲ - Fusant No. 7 △ - Fusant No. 11

Table 1. Abilities of carbohydrate fermentation of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and fusants

Strains	Carbohydrate source			
	Lactose	Maltose	Sorbose	Sorbitol
<i>L. acidophilus</i>	-	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i>	+	-	+	-
Fusant No. 1	+	-	+	(+)
2	+	-	(+)	-
3	+	-	-	-
4	+	-	+	+
5	+	-	+	-
6	+	+	+	-
7	+	-	-	+
8	+	-	-	-
9	+	-	+	-
10	+	-	-	-
11	+	-	+	(+)
12	+	+	-	-

+ : Growth, (+) : Partial growth, - : No growth

지 못하였다. 융합주들 중에서 6, 12번 균주의 경우 모균주들의 발효 특징을 공통적으로 지닌 재조합체임을 알 수 있었으며, 모균주 모두가 sorbitol을 이용하지 못함에도 불구하고 4, 7번 균주는 sorbitol을 발효시키는 것으로 나타나 융합과정에서 모균주의 성질과는 다른

새로운 형질을 획득할 수도 있다는 결과를 얻었다.

융합균주의 생육에 미치는 배양온도의 영향

모균주와 융합균주의 생육에 미치는 배양온도의 영향을 검토하기 위해 배양온도를 44, 46, 48 및 50°C로 각기 달리하여 배양한 결과, Table 2에서와 같이 *L. bulgaricus*는 50°C에서도 미약한 성장을 보였으나, *L. acidophilus*는 46°C에서 생육하지 못하였다. 융합주 4, 7, 9번은 50°C에서도 약한 생육을 나타내었으며, 대체적으로 융합주들은 모균주인 *L. bulgaricus*에 가까운 특성을 나타내었다.

융합균주의 생육에 미치는 초발 pH의 영향

배지의 초발 pH를 3~5로 조절하여 모균주와 융합균주의 생육에 미치는 초발 pH의 영향을 검토한 결과 (Table 3), *L. bulgaricus*는 pH 3에서 약한 생육을 보였으나, *L. acidophilus*는 pH 4에서 미약한 생육을 나타내었으며, 융합주 10번은 pH 4에서 오히려 모균주인 *L. bulgaricus* 보다 더 좋은 생육도를 나타내었다.

β -Galactosidase 및 phospho- β -galactosidase activity

모균주와 융합균주에 대한 β -galactosidase 및 phospho- β -galactosidase의 활성을 검토하기 위해 대수증식기까지 생육시킨 균을 원심분리하여 집균한 다음 toluenized cell로 만들어 효소활성을 측정하였다. Table 4에서와 같이 *L. bulgaricus*는 *L. acidophilus* 보

Table 2. Effect of temperature on the growth of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and fusants

Strains	Temperature			
	44°C	46°C	48°C	50°C
<i>L. acidophilus</i>	+	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i>	+	+	+	(+)
Fusant No. 1	+	+	-	-
2	+	+	+	-
3	+	+	-	-
4	+	+	+	(+)
5	+	+	+	-
6	+	+	-	-
7	+	+	+	(+)
8	+	+	+	-
9	+	+	+	(+)
10	+	+	+	-
11	+	+	-	-
12	+	+	+	-

+ : Growth, (+) : Partial growth, - : No growth

Table 3. Effect on initial pH on the growth of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and fusants

Strains	pH 3	pH 4	pH 5
<i>L. acidophilus</i>	-	(+)	+
<i>L. bulgaricus</i>	(+)	+	+
Fusant No. 1	-	+	+
2	-	+	+
3	-	+	+
4	-	+	+
5	-	+	+
6	-	+	+
7	-	+	+
8	-	+	+
9	-	+	+
10	+	+	+
11	-	+	+
12	-	+	+

+ : Growth, (+) : Partial growth, - : No growth

Table 4. β -Galactosidase and phospho- β -galactosidase activities of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and fusants

Strains	Specific activity ¹⁾	
	β -Galactosidase	Phospho- β -galactosidase
<i>L. acidophilus</i>	995	4
<i>L. bulgaricus</i>	2112	41
Fusant No. 1	327	16
2	306	12
3	628	3
4	519	23
5	501	7
6	701	39
7	3019	8
8	1856	7
9	1399	58
10	229	3
11	1104	41
12	2231	6

¹⁾Specific activity was expressed as nanomoles of o-nitrophenol liberated from ONPG or ONPG-6-P per milligram of enzyme protein per minute

다 β -galactosidase 활성을 훨씬 뛰어났으며, 융합주 8, 9, 11번은 두 모균주 중간 정도의 효소 활성을 나타내었고, 융합주 7, 12번은 모균주 보다 β -galactosidase 활성이 더 뛰어났다. Phospho- β -galactosidase 활성은 모균주인 *L. bulgaricus*가 *L. acidophilus* 보다 뛰어났으나, β -galactosidase 활성에 비해서는 매우 미미한 것이었다. 이러한 결과는 *L. bulgaricus*가 β -galactosidase 활성이 높고 phospho- β -galactosidase의 활성이 낮다는 보고(22)와도 일치하는 것이었다. 융합주들도 대부분 phospho- β -galactosidase의 활성이 미미하였으

Table 5. Protease and lipase activities of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and fusants

Strains	Enzyme activity	
	Protease(μ g/ml) ¹⁾	Lipase(units/ml) ²⁾
<i>L. acidophilus</i>	8.3	1.09
<i>L. bulgaricus</i>	28.2	3.82
Fusant No. 1	29.1	0.55
2	30.3	0.62
3	18.9	5.27
4	14.2	2.23
5	12.3	3.96
6	21.5	4.27
7	38.9	2.82
8	17.8	1.27
9	37.0	2.77
10	15.0	5.46
11	16.3	5.86
12	14.3	2.27

¹⁾Tyrosine content

²⁾One unit was defined as the amount of enzyme that produced 1 μ mole of free fatty acid per minute

나 융합주 9번만이 모균주 보다 양호한 활성을 나타내었다.

Protease activity

모균주와 융합주의 발효기간 동안의 protease 활성을 검토한 결과, Table 5에서와 같이 *L. bulgaricus*가 *L. acidophilus* 보다 활성이 높았으며, 대부분의 융합주는 두 모균주 중간 정도의 활성을 보였으나, 7, 9번 균주는 모균주 보다 protease 활성이 더 높았다. 이와 같은 결과는 Baek 등이 protoplast 융합으로 proteolytic activity가 향상된 융합주를 얻었다는 보고(23)와 *L. bulgaricus*가 유산균 중에서 protease 활성이 가장 높은 균주 중의 하나라는 보고(24)와도 일치하였다.

Lipase activity

모균주와 융합균주의 lipase 활성을 검토한 결과 (Table 5), 모균주인 *L. bulgaricus*가 *L. acidophilus* 보다 lipase 활성이 높았으며, 융합주 3, 10, 11번은 모균주 보다 더 높은 활성을 나타내었다.

요 약

유산균의 균주개량방법의 일환으로 protoplast fusion기법과 electrofusion법을 이용하여 protease 활성, lipase 활성, 내열성, 내산성 등이 우수한 *L. bulgaricus* 와 bacteriocin을 생산하는 *L. acidophilus*를 융합시켜

연은 융합주들의 생리학적 성질을 검토하였다. 산 생성능, 내열성, 내산성, protease, lipase 활성 등은 *L. bulgaricus*가 *L. acidophilus* 보다 우수하였다. *L. bulgaricus*는 lactose와 sorbose를 이용하였으나 maltose와 sorbitol을 이용하지 못하는 반면, *L. acidophilus*는 maltose를 이용하고 lactose와 sorbose를 이용하지 못하였다. 융합주 가운데서는 3, 6, 7, 8, 10번이 모균주의 발효능 특성을 함께 지님으로서 재조합체임을 확인할 수 있었으며, sorbitol의 경우 모균주에서는 발효능이 전혀 나타나지 않았음에도 불구하고 융합주 4, 7번이 발효능을 나타내어 융합과정에서 새로운 형질을 획득하기도 한다는 사실을 알 수 있었다. Lactase 활성은 모균주 모두 높은 β -galactosidase 활성을 보였으나, phospho- β -galactosidase 활성은 거의 없었으며 융합주들도 다소 차이는 있었지만 모균주와 유사한 효소 활성을 나타내었다. 발효에 있어서 key enzyme으로 작용하는 protease, lipase 등의 효소 활성도 모균주의 활성 보다 우수한 융합주도 존재하였다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 기초과학연구소 학술연구조성비(과제번호 : BSRI-94-4410)에 의한 연구결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

문헌

- Gilliland, S. E., Speck, M. L. and Morgan, C. G. : Detection of *Lactobacillus acidophilus* in feces of humans, pigs and chickens. *Appl. Microbiol.*, **30**, 541(1975)
- Rasic, J. : In "Fermented Milk : Current Research", Association International des Fabricants de Yogurts (1989)
- Pulusani, S. R. and Rao, D. R. : Whole body, liver and plasma cholesterol levels in rats fed thermophilus, bulgaricus and acidophilus milks. *J. Food Sci.*, **48**, 280(1983)
- 이정치 : 유산균 이용의 최근 동향. *미생물과 산업*, **17**, 36(1991)
- De Vos, W. M. and Simons, G. : Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci : The phospho- β -galactosidase and β -galactosidase genes and their expression products. *Biochimie*, **70**, 461 (1988)
- Sandine, W. E. : Role of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J. Food Protect.*, **42**, 259(1979)
- Goldin, B. R., Swenson, L., Dwyer, J., Sexton, M. and Gorbach, S. L. : Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 255(1980)
- Barefoot, S. F., Klaenhammer, T. R. : Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1808(1983)
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. : Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **40**, 722(1976)
- Schillinger, U. : Bacteriocins of lactic acid bacteria. In "Biotechnology and food safety" Bills, D. D. and Kung, S. D.(eds.), Butterworth-Heinemann, Boston, p.55(1990)
- Jo, Y. B., Kim, H. J., Kim, S. K., Baik, H. S. and Jun, H. K. : Studies on the electrofusion between *Lactobacillus acidophilus* 88 and *Lactobacillus bulgaricus*. inpress(1995)
- Staskawicz, B. J. and Panopoulos, N. J. : Phaseolotoxin transport in *E. coli* and *Salmonella typhimurium* via the oligopeptide permease. *Phytopathology*, **69**, 663(1979)
- Kaneko, T., Suzuki, H. and Takahashi, T. : 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(1987)
- Okada, S., Uchimura, T., Ohara, N. and Kozaki, M. : A new method of sugar fermentation test for identification of lactic acid bacteria. *Nippon Nogenikagaku Kaishi*, **58**, 227(1983)
- Harrigan, W. F. and McCance, M. E. : MRS fermentation medium. In Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, San Francisco (1976)
- Okamoto, T. and Morichi, T. : Distribution of β -galactosidase activity among lactic streptococci. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2389(1979)
- McKay, L. L., Miller, A., Sandine, W. E. and Elliker, P. R. : Mechanisms of lactose utilization by lactic acid streptococci : enzymatic and genetic analysis. *J. Bacteriol.*, **102**, 804(1970)
- 江上不二夫編 : 標準生化學實驗. 文光堂, p.208(1953)
- Juffs, H. S. : Proteolysis detection in milk. I. Interpretation of raw milk suppliers in relation th natural variation, bacterial counts and other factors. *J. Dairy Res.*, **40**, 371(1973)
- Lin, Y., Means, G. E. and Feeney, R. E. : The action of proteolytic enzymes on N,N'-dimethyl proteins : Basis for a microassay for proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.*, **244**, 789(1969)
- Kwon, D. Y. and Rhee, J. S. : A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *JAOCS.*, **63**, 89(1986)
- Leong-Morgenthaler, P., Zwahlen, M. C. and Hottinger, H. : Lactose metabolism in *Lactobacillus bulgaricus* : analysis of the primary structure and expression of the genes involved. *J. Bacteriol.*, **173**, 1951(1991)

23. Baek, Y. J., Bae, H. S., Kim, Y. K., Yoo, M. and Kim, H. U. : Studies on the genetic recombination by intraspecific fusion of *Lactobacillus casei* protoplast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 319(1986)
24. Mitchell, L. and Sandine, W. E. : Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* : A review. *J. Food Protection*, **47**, 245(1984)

(1995년 10월 18일 접수)