

## *Lactobacillus* sp. JC-7과 *Lactobacillus acidophilus* 88간의 Bacteriocin생산 세포융합주들의 형태 및 생리학적 성질에 관한 연구

조영배 · 최현정 · 배경미 · 전홍기<sup>†</sup>

부산대학교 미생물학과

### Morphological and Physiological Properties of Interspecific Electrofusants, Bacteriocin Producer, from *Lactobacillus* sp. JC-7 and *Lactobacillus acidophilus* 88

Young-Bae Jo, Hyun-Jung Choi, Kyung-Mi Bae and Hong-Ki Jun<sup>†</sup>

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

#### Abstract

Interspecific fusants were made from the cells of two strains of *Lactobacillus* genus, a streptomycin resistant *Lactobacillus* sp. JC-7 and a kanamycin resistant *L. acidophilus* 88. The morphological and physiological properties of the fusants were examined by determining bacteriocin productivity, acid-producing activity, ability of carbohydrates utilization and three important enzyme activities. The fusants produced a bacteriocin against indicator strains and fusant No. 1, 4 exhibited a larger inhibition zone compared to that of *L. acidophilus* 88.  $\beta$ -Galactosidase, phospho- $\beta$ -galactosidase, lipase activities and resistance to NaCl of *Lactobacillus* sp. JC-7 were better than those of *L. acidophilus* 88. Fusant No. 3 and 7 exhibited excellent lipase activities. Protease activity and acid productivity of *L. acidophilus* 88 were better than those of *Lactobacillus* sp. JC-7. Protease activities of all fusants were higher than those of parental strains, and especially fusant No. 5 and 7 exhibited excellent proteolysis ability.

**Key words:** *Lactobacillus* sp. JC-7, *Lactobacillus acidophilus*, electrofusion, recombinant strain

#### 서 론

김치는 한국인의 식생활에 중요한 전통 발효식품으로, 배추나 무 등의 야채를 원료로 하여 소금, 마늘, 생강, 고춧가루, 파, 젓갈 등의 양념을 첨가하여 발효시켜 만든 특수발효채소이다. 김치는 야생적으로 존재하는 미생물에 의한 복합발효에 의해 숙성되어지며, 재료 중의 탄수화물, 아미노산 등으로부터 산미, 지미, 방향을 내는 저분자 물질들이 생김으로서 독특한 맛과 향을 갖게 된다.

이러한 김치에 우점종으로 존재하는 유산균은 오래 전부터 요구르트, 버터, 치즈와 같은 유가공 식품에서도 중요한 역할을 담당하고 있을 뿐만 아니라, kefir, koumiss, soy sauce, 김치, 된장 등의 발효식품에서도 발효를 담당하는 주요 구성 균종으로 존재한다(1).

또한 유산균은 각종 동물의 장관내에 서식하며 소화관내에서 점막의 보호 및 장내 이상발효의 개선(2), 칼슘의 체내 흡수촉진(3) 등 여러가지 유익한 생리작용을 나타내기 때문에 정장제와 같은 의약품과 사료첨가제로도 이용되고 있다. 최근에는 유산균에 의한 혈중 cholesterol 저하작용(4), 면역기능 부활효과가 밝혀졌으며, 특히 면역기능 부활작용은 병원성 세균에 대한 감염 방어효과, 항암효과 등의 약리효능을 갖는다고 알려져 있다(5). 이러한 유산균의 면역기능 부활작용은 interferon유도, mitogen활성, 항체형성 및 세포성 면역의 활성화 등의 기작에 의한 것으로 밝혀졌다.

김치에 존재하고 있는 미생물들은 김치 발효가 진행되면서 유산균들이 우위를 점하게 되어서 여러가지 유기산이나 bacteriocin 등과 같은 생리 활성물질의 생합성에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. Bacteriocin

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

은 Gram positive 및 Gram negative 세균의 여러 균종들에 의해서 생성되는 항균성 peptide나 protein으로서 세균의 생육을 저해하는 물질이다(6). 이제까지 bacteriocin에 대한 연구로서 bacteriocin은 고분자 물질이고 단백질 분해효소에 민감하며, 항균 범위가 좁은 특징을 가짐이 밝혀졌다. 항균 범위가 좁기 때문에 항생제만큼 사람에게 효과적이지는 못하지만 항생제 내성 균주가 문제시 되고 있는 발효식품계에 있어서 가장 적합한 식품첨가제로서의 가치를 인정받고 있다(7).

한편, 김치는 최적 숙성기가 지나면 과도한 산의 생성에 의해 김치가 시어지게 되는데, 김치의 최적 숙성기에 주 발효 균주인 유산균의 생육을 다소 지연시키거나 숙성기에 관여하는 유산균 외의 다른 균들의 생육을 억제함으로써 과도한 유기산의 생성을 억제할 수 있리라 생각되어진다. 그러므로, 김치에 존재하는 최적 숙성기에 관여하는 유산균 외의 다른 유산균의 생육에만 영향을 미치고 김치를 섭취하는 사람에게는 아무런 영향을 미치지 못하는 bacteriocin이 그 역할의 수행에 가장 적합하다고 보여진다. 그러나, bacteriocin을 생산하는 유산균이 김치 발효의 최적 숙성기에 관여하는 균과 반드시 일치한다고는 보기 어려우므로 김치 발효에서 우점종으로 작용하는 유산균에게 bacteriocin 생성능을 부여한다면 김치의 최적 숙성기의 연장에 매우 효과가 있을 것으로 생각된다.

균주의 개량 방법으로 이전에는 UV, MNNG 등의 돌연변이원을 이용한 돌연변이 유발법과 자연계에서의 우량 균주 선택 등에 주로 의존하였으나, 분자 유전학의 발달과 더불어 새로운 유전 공학의 기술을 이용한 균주 개량방법이 많이 개발되어졌다. 그 중에서 유전자 전달에 의한 균주 개량방법으로는 transformation(8), transfection(9), conjugation(10), cell fusion(11) 등이 있으며, 특히 cell fusion을 이용한 균주 육종법은 미생물 고유의 특성에 구애받지 않고 인위적 또는 물리적인 방법에 의해 새로운 종류의 균주를 얻을 수 있는 것이 장점이며, 일반적으로 같은 종내의 교환 뿐만 아니라 서로 다른 종, 속간에도 유전자 재조합이 가능하다.

최근에는 electroporation을 이용한 electrotransformation(12)과 electrofusion(13) 기법이 각광을 받고 있다. 이는 살아있는 세포가 강한 전기장에 놓이게 되면 인접 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 있는 것으로 보고되고 있다(14). 이

electrofusion 기법의 장점으로는 protoplast를 만들 필요가 없고 삼투압 안정제가 필요하지 않으며, 또한 이전의 protoplast를 이용하는 방법보다 훨씬 간편하고 빨리 수행할 수 있어서 유리하다고 보고되어 있다(15).

이러한 연구 결과들을 토대로 볼 때 *L. acidophilus*는 대량의 bacteriocin을 생산하고 강장작용이 우수하기 때문에 이러한 성질을 김치로부터 분리한 유산균에 부여하여 김치 발효에 관여하는 우량 균주가 개발된다면 김치의 저장성을 개선하고 고품위화 및 상품화하는데 크게 기여할 수 있으리라 생각되어진다.

따라서, 김치 발효 숙성기간을 연장하고 신선도를 오랫동안 유지할 수 있는 김치 발효 starter의 개발을 목적으로 전보(16)에서는 김치로부터 김치 발효의 우점종으로 작용하면서 bacteriocin 생성능이 없는 유산균을 분리, 동정하였으며, 본 분리균주와 bacteriocin 생성능이 우수한 *L. acidophilus* 88을 electrofusion시켜 이에 대한 제한조건, 즉 electrofusion에 영향을 미치는 방전시간, 전압, 2가 양이온, PEG의 농도 등을 검토하였다. 이어서 본 연구에서는 electrofusion 기법에 의해 융합된 융합 균주들 중 bacteriocin 생성능을 갖는 균주들만을 선별하여 그 융합 균주들과 모균주간의 생리적, 유전적 성질 및 융합 균주들의 형태적 특성들을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

본 연구에 사용된 균주는 streptomycin(2.5mg/ml)에 내성을 가지는 *Lactobacillus* sp. JC-7과 kanamycin(600 $\mu$ g/ml)에 내성을 가지는 *Lactobacillus acidophilus* 88을 MRS broth에 접종한 후 37°C에서 4~8시간 정치 배양시킨 다음 4,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 집균하였다. 집균된 균체를 electroporation buffer(pH 7.4)로 2회 세척하고 동일 buffer에  $1.6 \times 10^8$  cell/ml이 되도록 두 균을 동량 섞어서 현탁하였으며, 균현탁액 80 $\mu$ l를 취하여 electrofusion(BTX Electrocell manipulator 600)을 실시하였다. 전기융합이 끝난 후 적당량의 융합 용액을 취하여 선택배지와 재생배지에 각각 도말하여 30°C에서 3일간 정치배양한 후 얻은 융합균주를 사용하였다.

### 융합균주의 선별

융합주를 선택배지에 1주일 간격으로 계대배양을 계속하면 상당량의 융합주들이 segregation되므로 elec-

trofusion(BTX Electrocell manipulator 600)에 의해 융합된 융합균주를 선택배지(MRS + streptomycin 2.5 mg/ml, kanamycin 600 $\mu$ g/ml)에서 1주일 간격으로 10 회 이상 계대배양하였다. Segregation되지 않고 안정성을 계속 유지하며 bacteriocin 생성능이 양호한 8개의 융합균주를 선별한 뒤 이들의 생리학적 특성에 대해 검토하였다.

### Bacteriocin 생성능 검토

Bacteriocin 생성능은 Staskawicz와 Panopoulos(17)의 방법을 약간 변형시켜서 행하였다 즉, bacteriocin 생성능을 조사하고자 하는 융합균주의 전배양액을 4°C에서 원심분리(12,000rpm, 10min)하여 그 상등액 5ml를 MRS agar plate에 점적하고 전배양된 indicator strain (*Lactobacillus helveticus* CNRZ 1096) 60 $\mu$ l를 섞은 0.5% top agar를 중층하여 37°C에서 8~12시간 배양하였다. 이때 생육저지환의 생성유무로 bacteriocin 생성능을 판별하였다.

### 조효소액 제조

Protease 및 lipase의 활성을 검토하기 위한 조효소액은 다음과 같이 제조하여 사용하였다. 즉 모균주 및 융합균주를 MRS배지상에서 37°C, 12시간 정치배양한 후 배양액을 4,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리(4°C)하여 인산 완충액으로 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

모균주와 융합주의 산생성능을 비교하기 위해 Kaneko 등의 방법(18)에 따라 10% reconstituted skim milk에 각 균주를 starter로 사용하여 37°C에서 발효시켰을 때 변화하는 pH를 시간별로 측정하여 이를 산생성 능력으로 표시하였다.

### 당 발효성

Okada 등의 방법(19)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)(20)에 가하였다. 각 당용액을 가한 발효배지에 균을 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하여 색깔의 변화 유무를 관찰하였다.

### 배양온도가 생육도에 미치는 영향

모균주와 융합균주의 생육에 미치는 배양온도의 영향을 검토하기 위하여 MRS broth(pH 7.0)에 전배양된 균액을 0.5% 접종한 후 배양온도(4, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 44, 48, 50°C)를 달리하여 균의 생육유무를 관찰하였다

### 내산성과 내알칼리성

모균주와 융합주의 내산성을 알아보기 위해서는 pH 3.0~6.0까지로 조제된 MRS broth에, 내알칼리성을 알아보기 위해서는 pH 9.0~11.0까지로 조제된 MRS broth에 전배양된 균액을 0.5% 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 균의 생육 정도를 관찰하였다.

### NaCl에 대한 내성

모균주와 융합주의 NaCl에 대한 내성을 알아보기 위해 NaCl이 각각 2, 4, 6, 8, 및 10%의 농도가 되도록 첨가된 MRS broth에 전배양된 균액을 0.5% 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 균의 생육 정도를 관찰하였다.

### $\beta$ -Galactosidase activity와 phospho- $\beta$ -galactosidase activity

$\beta$ -Galactosidase 활성은 Okamoto와 Morichi의 방법(21)과 McKay 등의 방법(22)을 혼합, 변형하여 사용하였다. 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 $\mu$ l/ml농도로 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2ml를 첨가하여 반응을 중지시켜 실온에서 10분간 방치한 다음, 420nm에서 흡광도를 측정하였다 이때 toluenized cell액 1ml로 Lowry법(23)에 의해 단백질량을 구하였다. Specific activity는 효소 단백질 1mg에 의해 상기 조건에서 1분 동안 유리된 o-nitrophenol의 양을 표준 곡선으로부터 산출하여 nanomole(nmol)로 표시하였다.

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

#### Protease activity

Protease 활성은 Anson-萩原법(24)과 Juffs방법(25)을 혼합, 병용하여 측정하였다. 즉 2% casein용액(pH 7.0의 0.02M potassium phosphate buffer에 녹임) 1ml에 조효소액 1ml를 가하여 37°C 항온조에서 5시간 반응시킨 후 0.4M trichloroacetic acid 2ml를 첨가하여 효소반응을 정지시키고, 항온조에 방치한 후 원심분리하여 이 여액 1ml에 0.44M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5ml와 2배로 희석한 folin 시약 1ml를 첨가하여 37°C에서 20분간 발색시켜서 650nm에서 흡광도를 측정하고, L-tyrosin 표준액의 표준 곡선으로부터 protease 활성을 tyrosin( $\mu$ g/ml)함량으로 나타내었다(26).

#### Lipase activity

Lipase의 활성은 Kwon과 Rhee의 방법(27)등의 방법으로 측정하였다. 즉 5ml isooctane, 0.5ml olive oil 및 2ml sodium phosphate buffer(pH 7.0)가 들어 있는 시험관에 1ml의 조효소액을 첨가하여 65°C에서 30분간 반응시킨 후, 6N HCl 1ml를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 상부의 5ml isooctane층을 1ml의 cupric acetate-pyridine액(pH 6.1)과 90초간 vortex시켜 715nm에서 나타난 흡광도로 효소 활성을 측정하였다. Oleic acid의 표준 곡선으로부터 lipase 활성을 얻었다. 1분간 1 $\mu$ mol의 유리지방산을 생성하는 효소의 양을 1unit로 정하였다.

#### 모균주와 융합주에 대한 형태학적 관찰

##### 광학 현미경 관찰

모균주와 융합주의 세포 현탁액을 buffer로 세척한 후 원심분리(4,000 $\times$ g, 10min)하여 얻은 균체를 crystal violet으로 염색시킨 뒤 광학 현미경(Nikon, Microflex HFX-11)으로 관찰하였다.

##### 세포 체적

Sipiczki와 Ferenczy의 방법(28)에 의하여 현미경을 통하여, 모균주와 융합주의 세포 체적을 측정하였다. 즉, 세포의 長徑과 短徑을 micrometer로 측정한 후 다음 식을 이용하여 세포의 체적을 구하였다.

$$\text{Cell volume}(V) = \frac{4}{3} \pi \frac{a}{2} \left[ \frac{b}{2} \right]^2$$

(a: length of cells, b: width of cells)

## 결과 및 고찰

### 융합주의 bacteriocin 생성능

최종적으로 선별된 융합주들의 bacteriocin 생성능을 indicator 균주로 *Lactobacillus helveticus* CNRZ 1096을 사용하여 검토했다. 그 결과, Fig. 1에서와 같이 모균주인 *L. acidophilus* 88의 bacteriocin 생성능이 확실하게 7개의 융합주들에게 전달되었으며, 이들의 bacteriocin 생성능은 모균주인 *L. acidophilus* 88과 같거나 더 강한 bacteriocin 생성능을 나타내었다. 따라서 김치 발효에서 우점종으로 작용하면서 *L. acidophilus* 88보다 더 강한 bacteriocin 생성능을 나타내는 fusant No. 1, 4를 김치발효의 starter로 사용한다면 과도한 산생성을 유발시키는 다른 유산균을 억제함으로써 김치의 최적숙성기 연장에 효과가 있을 것으로 사료된다.

### 산 생성능

모균주와 융합주의 발효기간 동안의 산 생성능력을 검토한 결과(Fig. 2), 대부분의 균주들이 생육과 동시

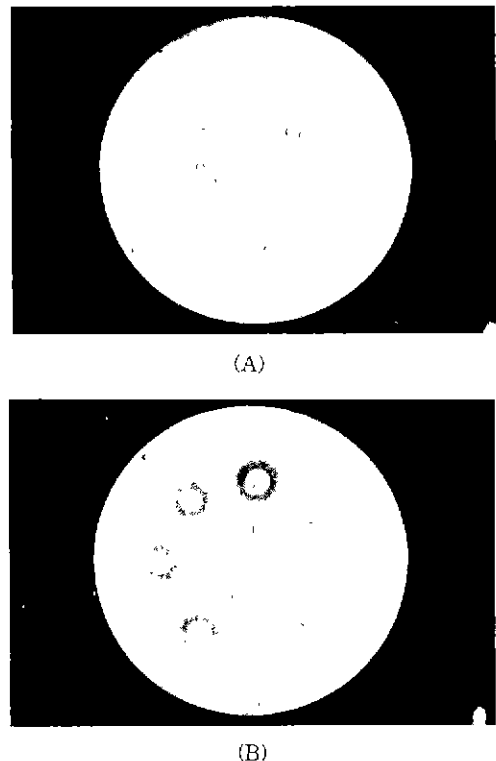


Fig. 1. Bacteriocin activity of *L. acidophilus* 88 (A) and fusants (B) against indicator *L. helveticus* CNRZ 1096.

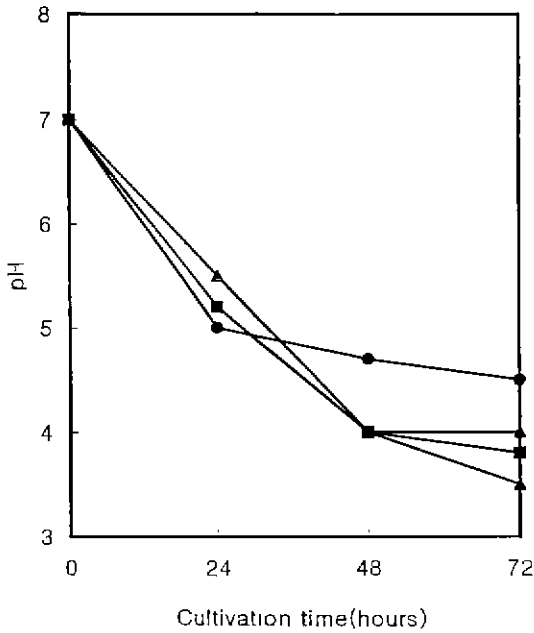


Fig. 2. Acid producing ability of parental strains and fusants.

-△- *Lactobacillus* sp. JC-7 -▲- *L. acidophilus*  
 -●- Fusant 2 -■- Fusant 6

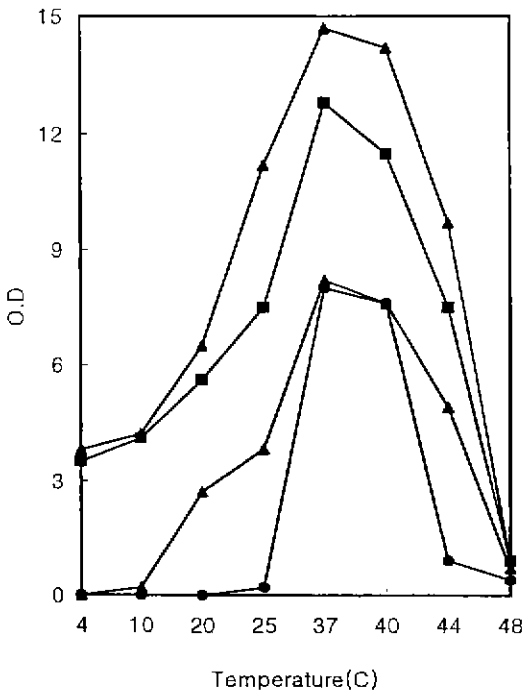


Fig. 3. Growth test of parental strains and fusants at various temperature.

-△- *Lactobacillus* sp. JC-7 -▲- *L. acidophilus*  
 -●- Fusant 1 -■- Fusant 8

에 산을 분비하여 배양시간이 경과함에 따라 거의 비례적으로 pH가 낮아졌다. *Lactobacillus* sp. JC-7보다 *L. acidophilus* 88이 산생성능이 좋았고, fusant No. 6은 두 모균주의 중간적인 산생성능을 나타낸 반면 fusant No. 2는 36시간 이후부터는 두 모균주에 비해 산생성능이 감소하였다.

당 발효성

여러종류의 당에 대한 발효성 유무는 지시약인 chlorophenol red의 빛깔이 배양액의 pH가 중성에서 산성으로 낮아질 때 빨간색에서 노란색으로 변하는 원리를 이용하였다. Table 1에서처럼 *L. acidophilus* 88은 lactose와 sorbitol 그리고 mannose를 이용하지 못하는 반면, *Lactobacillus* sp. JC-7은 조사한 모든 탄소원을 이용하였다. *L. acidophilus* 88과 *Lactobacillus* sp. JC-7의 두 모균주를 electrofusion시킨 융합주들의 당 발효성은 거의 대부분 *L. acidophilus* 88쪽의 당 발효성 성질을 획득하였다.

배양온도가 생육도에 미치는 영향

모균주와 융합균주의 생육에 미치는 배양온도의 영향을 검토하기 위해 배양온도(4, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 44, 48, 50°C)를 각기 달리하여 배양한 결과, Fig. 3에서와 같이 *Lactobacillus* sp. JC-7은 4~44°C까지 좋은 성장을 보였고 *L. acidophilus* 88은 25~44°C에서 좋은 성장을 보였다. 융합주는 Fusant 8을 제외하고는 거의 25~44°C까지만 성장을 보여서 *L. acidophilus* 88

Table 1. Carbohydrate fermenting ability of parental strains and fusants

Strains	Carbohydrates sources						
	Sac	Lac	Man	Mal	Fru	Glu	Sor
<i>Lactobacillus</i> sp. JC-7	++	++	++	++	++	++	+
<i>L. acidophilus</i>	(+)	-	-	(+)	±	(+)	-
Fusant 1	+	-	-	(+)	(+)	(+)	-
2	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)	-
3	+	-	-	(+)	+	(+)	-
4	±	-	-	(+)	(+)	(+)	-
5	±	-	-	(+)	(+)	(+)	-
6	±	-	-	(+)	++	(+)	-
7	(+)	-	-	(+)	+	(+)	-
8	+	-	-	(+)	++	(+)	-

±+: very well growth, +. growth

(+) partial growth, - no growth

Sac: saccharose Lac lactose Man' mannose

Mal: maltose Fru: fructose Glu: glucose

Sor: sorbitol

과 유사했고 Fusant 8은 *Lactobacillus* sp. JC-7과 유사했다.

내산성과 내알칼리성

Fig. 4에서 보듯이 *Lactobacillus* sp. JC-7은 pH 3~7, pH 9에서는 잘 자랐고 *L. acidophilus* 88은 pH 3~7, 9~11에서 모두 잘 자랐으나, 융합 균주들은 *Lactobacillus* sp. JC-7의 양상을 따라서 pH 9 이상에서는 잘 자라지 않았다.

NaCl 내성

모균주와 융합주의 NaCl 농도에 대한 내성을 검토한 결과 Fig. 5에서 보는 것처럼 *Lactobacillus* sp. JC-7은 10% 농도까지도 성장을 보였으나 *L. acidophilus* 88은 4% 정도까지만 성장을 보였다. 융합주들은 대부분이 모균주보다 성장이 저조했으나 Fusant 6은 *L. acidophilus* 88과 유사한 성장을 보였다.

$\beta$ -Galactosidase 및 phospho- $\beta$ -galactosidase activity

모균주와 융합균주에 대한  $\beta$ -galactosidase 및 pho-

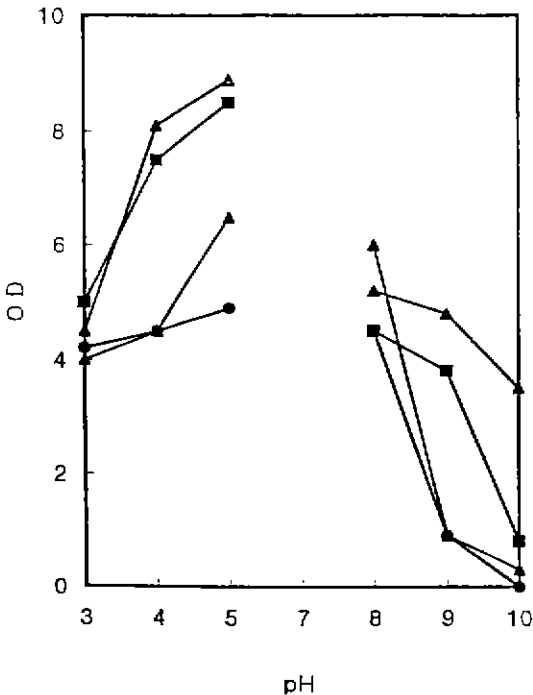


Fig. 4. Growth test of parental strains and fusants at various pH.  
 -△- *Lactobacillus* sp. JC-7 -▲- *L. acidophilus*  
 -●- Fusant 3 -■- Fusant 8

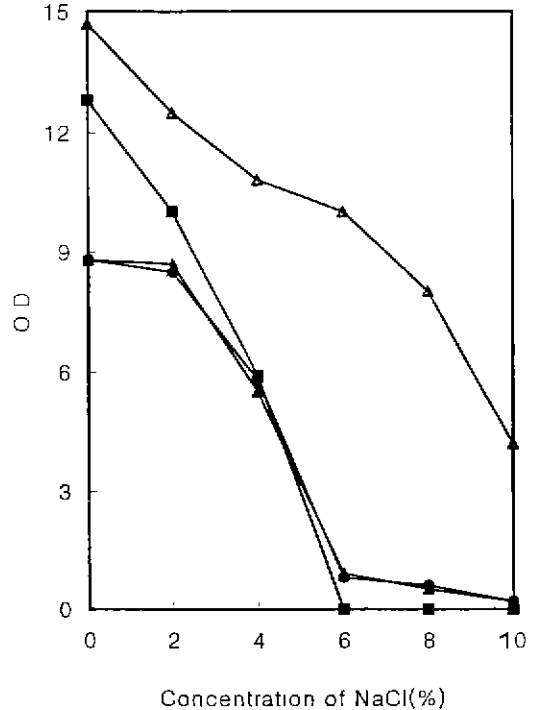


Fig. 5. Resistance to NaCl of parental strains and fusants.

-△- *Lactobacillus* sp. JC-7 -▲- *L. acidophilus*  
 -●- Fusant 3 -■- Fusant 8

spho- $\beta$ -galactosidase의 활성을 검토하기 위해 대수 증식기까지 생육시킨 균을 원심분리하여 집균한 다음 toluenized cell로 만들어 효소활성을 측정하였다. Table 2에서 보는 것처럼 모든 융합 균주들의 효소 활성이 모균주보다 낮았다. 그중 Fusant 6의 활성이 *L. acidophilus*

Table 2.  $\beta$ -Galactosidase and phospho- $\beta$ -galactosidase activity of parental strains and fusants

Strains	$\beta$ -Galactosidase activity(nmol) <sup>1)</sup>	Phospho- $\beta$ -galactosidase activity(nmol) <sup>1)</sup>
<i>Lactobacillus</i> sp. JC-7	3591	27
<i>L. acidophilus</i>	2163	17
Fusants 1	688	13
2	1433	13
3	1281	10
4	289	3
5	1311	10
6	1973	23
7	1305	18
8	1731	22

<sup>1)</sup>Specific activity was expressed as nanomoles of o-nitrophenol liberated from ONPG per milligram of enzyme protein per minute

philus 88 균주와 거의 비슷하게 나타났다. 또한 모균주와 융합주의 phospho-β-galactosidase 효소 활성은 모균주와 융합주 모두 활성이 낮았는데, 이러한 결과는 Lactobacillus에 속하는 균주가 phospho-β-galactosidase 활성이 낮고, β-galactosidase 활성이 높다는 보고(29)와도 일치하는 것이었다.

Protease activity

모균주와 융합주의 발효기간 동안의 protease활성을 검토한 결과, Table 3에서와 같이 L. acidophilus 88이 Lactobacillus sp. JC-7보다 활성이 높았으며, 모든 융합주는 두 모균주보다 높은 활성을 보였으며 특히 Fusant 7의 protease 활성은 모균주의 활성의 2배 이상 높았다. 이와 같은 결과는 Baek 등이 protoplast융합으로 proteolytic activity가 향상된 융합주를 얻었다는 보고(30)와도 일치하였다.

Lipase activity

모균주와 융합주의 lipase 활성을 검토한 결과는 Table 4에 나타내었다. Lactobacillus sp. JC-7의 활성이 L. acidophilus 88보다 높았고 Fusant 7은 Lactobacillus sp. JC-7 균주보다 높은 lipase 활성을 나타내었다.

Table 3 Protein activity of parental strains and fusants

Strains	Protease activity (μg/ml) <sup>1)</sup>	Strains	Protease activity (μg/ml) <sup>1)</sup>
Lactobacillus sp. JC-7	11.416	Fusant 4	19.775
L. acidophilus	13.315	5	23.539
Fusant 1	18.371	6	18.652
2	20.056	7	34.719
3	14.101	8	19.045

<sup>1)</sup>Tyrosine content

Table 4. Lipase activity of parental strains and fusants

Strains	Lipase activity (units/ml) <sup>1)</sup>	Strains	Lipase activity (units/ml) <sup>1)</sup>
Lactobacillus sp. JC-7	3.000	Fusant 4	2.59
L. acidophilus	1.751	5	2.992
Fusant 1	1.216	6	2.03
2	2.383	7	4.011
3	3.615	8	1.073

<sup>1)</sup>One unit was defined as the amount of enzyme that produced 1μmole of free fatty acid per minute

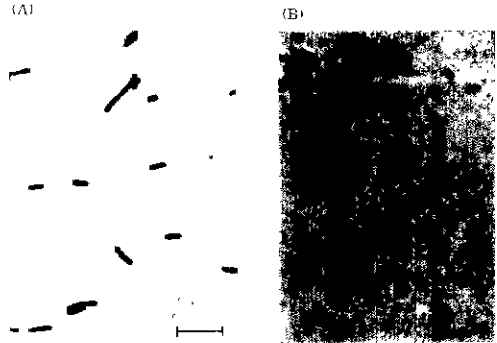


Fig. 6. Photographs of L. acidophilus 88(A) and Lactobacillus sp. JC-7(B). (indicator bar : 5μm, ×1,000)

모균주와 융합 균주의 형태학적 관찰

광학 현미경

Fig. 6은 L. acidophilus 88이 장간균이고 Lactobacillus sp. JC-7은 단간균임을 보여주고 Fig. 7은 융합주의 광학 현미경 사진을 보여주고 있는데, 모균주보다 크기가 커졌음을 알 수 있다. 이는 융합시의 방전에 의한 cell lysis의 피해를 줄이기 위해서는 cell이 모여서 크기가 커지는 것이 유리하다는 보고(31)와도 연관성이 있다고 보여진다.

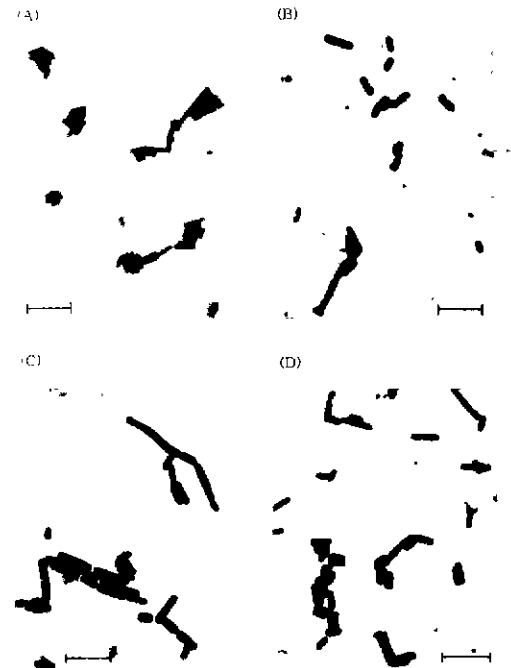


Fig. 7. Photographs of fusants No. 4(A), 5(B), 7(C) and 8(D). (indicator bar 5μm, ×1,000)

Table 5. Cell size and capacity of parental strains and fusants

Strain	Cell size		
	Length( $\mu\text{m}$ )	Width( $\mu\text{m}$ )	Volume( $\mu\text{m}^3$ )
<i>Lactobacillus</i> sp. JC-7	0.4~0.8	0.1 ~0.2	0.002~0.02
<i>L. acidophilus</i>	1.3~2.4	0.2 ~0.4	0.03 ~0.2
Fusant 1	1.7~7.4	0.2 ~0.7	0.04 ~1.9
2	0.9~1.7	0.2 ~0.6	0.02 ~0.32
3	1.2~3.9	0.2 ~0.9	0.03 ~1.53
4	1.2~3.5	0.2 ~0.7	0.03 ~0.9
5	1.3~4.3	0.3 ~0.7	0.06 ~1.10
6	1.1~4.4	0.25~0.8	0.04 ~1.47
7	1.3~5.5	0.15~0.7	0.02 ~1.41
8	1.4~3.8	0.2 ~0.7	0.03 ~0.98

## 세포 체적

광학 현미경 상에서 micrometer로 세포 체적을 관찰한 결과를 Table 5에 나타내었다. *L. acidophilus* 88이 *Lactobacillus* sp. JC-7보다 컸으며 융합주 대부분이 모균주보다 훨씬 체적이 큰 것으로 나타났다.

## 요 약

김치 발효 균주의 개량을 목적으로 최근 각광을 받고 있는 electrofusion기법에 중점을 둔 fusion법을 이용하여 김치의 최적 숙성기의 발효에 관여하는 *Lactobacillus* sp. JC-7 분리균주와 bacteriocin 생성능이 우수한 *L. acidophilus* 88간의 융합을 실시하여 얻은 융합주들의 생리적, 유전적 성질 및 형태적 특성을 검토하였다. 융합주와 모균주의 생리학적 성질검토에 있어서 *Lactobacillus* sp. JC-7이 *L. acidophilus* 88보다  $\beta$ -galactosidase, phospho- $\beta$ -galactosidase, lipase활성, NaCl 내성 등이 높았고, 성장 가능한 pH와 온도 범위가 넓었다. 반면 *L. acidophilus* 88은 *Lactobacillus* sp. JC-7보다 protease 활성이 높았고, 산생성능이 좋았다. 당 발효능의 경우 *Lactobacillus* sp. JC-7균주는 saccharose, lactose, mannitol, maltose, fructose, glucose, sorbitol 등의 당을 모두 강하게 발효했으나, *L. acidophilus* 88 균주는 fructose만을 강하게 발효했고, saccharose, maltose, glucose 등은 약하게 발효하는 것으로 나타났다. 융합주는 당 발효능, 성장 온도 범위, NaCl 내성 등의 성질은 *L. acidophilus* 88의 특징을 가졌고, 산생성능, 내산성 & 내알칼리성 등의 성질은 두 모균주의 특성을 모두 가지는 것으로 나타났다.

효소 활성에 있어서는 두 모균주 모두 높은  $\beta$ -galactosidase 활성을 보였으나, phospho- $\beta$ -galactosidase 활성은 거의 없었고, 융합주들은 모균주보다 모

두 낮은 활성을 보였다. Protease 활성은 모균주보다 융합주 쪽이 우수했다. Lipase의 경우 융합주들이 대체로 *Lactobacillus* sp. JC-7보다는 낮고, *L. acidophilus* 88보다는 높은 활성을 보였으나, Fusant 3, 7은 두 모균주보다 높은 활성을 보였다. 그리고 *L. acidophilus* 88 균주와 융합주들의 bacteriocin 생성능을 검토한 결과, Fusant 1, 4의 bacteriocin 생성능이 *L. acidophilus* 88보다 높았다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년도 기초과학연구소 학술연구조성비(과제번호 : BSRI-96-4410)에 의한 연구결과의 일부분으로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

## 문 헌

- Carr, J. G. : Lactic acid bacteria in beverages and foods Academic Press, New York(1975)
- Gilliland, S. E., Spock, M. L. and Morgan, C. G. : Detection of *Lactobacillus acidophilus* in feces of humans, pigs and chickens. *Appl. Microbiol.*, **30**, 541(1975)
- Cavard, D. and Lazdunski, C. J. : Purification and molecular properties of a new colicin. *Eur. J. Biochem.*, **96**, 519(1979)
- 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)
- 이정지 · 유산균 이용의 최근 동향. 미생물과 산업, **17**, 36(1991)
- Marugg, I. D. : Bacteriocins, their role in developing natural products. *Food Biotechnol.*, **5**, 305(1991)
- Daeschel, M. A. : Application of bacteriocins in food systems In "Biotechnology and food safety" Kung, S. D.(ed.), p.91(1990)
- Badu, R., Jones, S. and Warner, P. J. : Spheroplast and electroporation-mediated transformation of *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*, **9**, 41(1989)
- Cosby, W. M., Casas, I. A. and Dobrogosz, W. J. : Formation, regeneration, and transfection of *Lactobacillus plantarum* protoplasts. *Appl. Environmental Microbiology*, **54**, 2599(1988)
- Taketoo, N., Sasaki, Y. and Sasaki, T. : A new method for conjugal transfer of plasmid pAM $\beta$ 1 to *Lactobacillus plantarum* using polyethylene glycol *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3333(1989)
- Kang, Y., Kim, J. H. and Ryu, D. Y. : Protoplast fusion of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2221 (1987)
- Natori, Y., Kano, Y. and Imamoto, F. : Genetic transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *Biochimie*, **72**, 265(1990)



- 13 Reed, W. M. : Protoplast fusion of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus lactis* via electric field or chemical induction *J. Gen Appl. Microbiol.*, **33**, 287 (1987)
- 14 Mercener, A. and Chassy, B. M. : Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie*, **70**, 503(1988)
- 15 Harlander, S. K. : Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation. In "Streptococcal genetics" Ferretti, J. J and Curtiss, R (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., p.229(1987)
- 16 Jo, Y. B., Choi, H. J., Baik, H. S. and Jun, H. K. . Evaluation of optimum conditions for the electrofusion between *Lactobacillus* sp JC-7 isolated from kimchi and *Lactobacillus acidophilus* 88. *Kor. J. Appl Microbiol Biotechnol.*, **25**, 121(1997)
- 17 Staskawicz, B. J and Panopoulos, N J. : Phaseolotoxin transport in *E. coli* and *Salmonella typhimurum* via the oligopeptide permease. *Phytopathology*, **69**, 663 (1979)
- 18 Kancko, 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)
- 19 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)
- 20 Harrigan, W. F. and McCance, M. E. . MRS fermentation medium. In "Laboratory methods in food and dairy microbiology" Academic Press, San Francisco (1976)
- 21 Okamoto, T and Morichi, T : Distribution of  $\beta$ -galactosidase activity among lactic streptococci. *Agric. Biol. Chem* , **43**, 2389(1979)
- 22 McKay, L. L., Miller, A., Sandinc, W. E. and Elliker, P. R. : Mechanisms of lactose utilization by lactic acid streptococci . enzymatic and genetic analysis. *J. Bacteriol* , **102**, 804(1970)
- 23 Randel, A. L. and Rosebrough. J. N. . Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.*, **192**, 265(1951)
- 24 江上不二夫編 標準生化学実験. 文光堂. p 208(1953)
- 25 Juffs, H. S. . Proteolysis detection in milk, I. Interpretation of raw milk suppliers in relation to natural variation, bacterial counts and other factors. *J. Dairy Res.*, **40**, 371(1973)
- 26 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)
- 27 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)
- 28 Sipiczki, M. and Ferenczy, L : Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophs mutants of identical mating type. *Mol. Gen. Genet.*, **157**, 77(1977)
- 29 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)
- 30 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)
- 31 Ruthe, H. J. and Adler, J. . Fusion of bacterial spheroplasts by electric fields *Biochemica et Biophysica Acta*. **819**, 105(1985)

(1997년 8월 30일 접수)