

# *Bacillus natto* SH-89 및 *Bacillus megaterium* IAM 1166의 protoplast fusion에 의한 vitamin B<sub>12</sub>의 생산

微生物科

秦成鉉 · 鄭久永 · 沈宗煥 · 裴基哲

## Production of vitamin B<sub>12</sub> by using protoplast fusion between *Bacillus natto* SH-89 and *Bacillus megaterium* IAM 1166

Department of Microbiology

S. H. Jin, K. Y. Jung, J. H. Shim, K. C. Bae

### Abstract

This study was designed to breed a high vitamin B<sub>12</sub> produced by fusants which fused the protoplast between *Bacillus natto* and *Bacillus megaterium*.

A bacterial strain SH-89 was isolated from Chungkookjang and showed a high activity of protease and stringiness.

The morphological and physiological properties of strain SH-89 on various media were carried out according to Bergey's manual of Systematic Bacteriology and Manual for the Identification of medical bacteria.

The strain SH-89 was named as *Bacillus natto* SH-89.

To increase the high activity of strains, *Bacillus natto* SH-89 and *Bacillus megaterium* IAM 1166 were mutated and were isolated with penicillin-screening method of 300µg/ml and 400µg/ml N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

Mutation of *Bacillus natto* SH-89 and *Bacillus Megaterium* IAM 1166 showed ratio of 72% and 68%, which enhanced about 30% by penicillin screening method.

Auxotrophic mutants of *Bacillus natto* SH-89-34 (thr<sup>-</sup>try<sup>-</sup>rif<sup>r</sup>) and *Bacillus megaterium* BK-13 (arg<sup>-</sup>ade<sup>-</sup>lys<sup>-</sup>str<sup>r</sup>) were isolated among mutants.

Protoplast were induced by being incubated with 500 $\mu$ g/ml lysozyme of lysis solution and the ratio of protoplast formation and regeneration were ranging from 99% and 67%, respectively.

Fusion frequencies of fusants between *Bacillus natto* SH-89-34 and *Bacillus megaterium* BK-13 showed in the ranges of  $1.0 \times 10^{-5}$  under the treatment of 30% PEG 6000 containing 3% PVP.

The fusant, MNF-72 showed the highest productivity of 7.85 $\mu$ g/g-cell vitamin B<sub>12</sub> in the production medium.

The immobilization system of sodium alginate showed the highest productivity that batch and continuous fermentor system were produced the 0.58 $\mu$ g/ml $\cdot$ hr and 0.80 $\mu$ g/ml $\cdot$ hr vitamin B<sub>12</sub> under optimum condition.

## I. 緒 論

우리나라를 비롯한 東洋에서는 오래전부터 動物性 단백질보다는 植物性 단백질, 特히 大豆食品 등이 단백질의 給源이 되어져 왔다. 대두는 組織이 치밀할 뿐만 아니라 hemagglutinin과 단백질분해효소의 inhibitor 등이 含有되어 있으므로<sup>1)</sup> 加熱處理 및 기타 여러가지 가공방법에 따라서 각 民族의 기호에 맞는 特有의 제품으로 食用되어져 왔다.

대두발효식품중 하나인 청국장은 다른 대두발효식품과는 달리 가장 발효기간이 짧으며<sup>2)</sup> 고, 발효과정중 subtilin 등의 분비로 汚染이 적은 식품으로<sup>4)</sup> 주 발효 세균은 *Bacillus natto*임이 잘 알려져 있다.<sup>5)</sup>

청국장에 관한 研究로는 1894년 矢部<sup>6)</sup>가 세균 및 효소학적 연구에 대해 보고한 것을 始初로 1905년 澤村<sup>7)</sup>에 의해 *Bacillus natto*로 명명되어 졌으며, 그 이후 세균학적<sup>8-11)</sup> 및 효소학적 연구<sup>12)</sup>가 많이 이루어졌다.

Vitamin B<sub>12</sub>는 抗惡性 貧血因子이며 동물단백 인자로 각종 비타민제제나 사료 등에 添加됨으로 그 수요가 漸次的으로 增加하고 있는 실정이다<sup>13)</sup>.

Vitamin B<sub>12</sub>를 醱酵生産하는 微生物로는 *Corynebacterium*, *Actinobacter*, *Streptomyces*,

*Nocardia*, *Achromobacter*, *Propionibacter*, *Pseudomonas* 및 *Bacillus* 등 많은 미생물이 關與하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>14)</sup>

1952년 Demain이 *Pseudomonas denitrificans*로 vitamin B<sub>12</sub>를 産業的으로 生産하기 시작한 것을 始初로<sup>15)</sup> 1968년 Demain 등<sup>15)</sup>은 동 균주의 발효배지에 5mg/ml의 betain과 4ng/ml의 choline을 添加한 결과 20μg/ml의 vitamin B<sub>12</sub>를 축적하였음을 보고하였으며, Marwha 등<sup>16)</sup>은 *Propionibacterium Shermanii*의 발효배지에 0.05% glutamate와 0.5% betain을 첨가함으로써 5.43μg/ml-medium의 vitamin B<sub>12</sub>가 축적되었음을 報告한 바 있다.

또한 Kojima 등<sup>17)</sup>은 *Arthrobacter tumescens*의 발효배지에 炭素源으로 Ethyl alcohol 添加時 370μg/ml의 收率을 보고하였고, Yongsmith와 Apiraktivongse<sup>18)</sup>은 *P. freudenreichii*로 대두 殘餘物을 첨가한 발효배지에서 4000μg/l의 vitamin B<sub>12</sub>를 生産하였으며, Yongsmith와 Chutima<sup>19)</sup>는 *Propionibacterium* AKU 1251을 sodium alginate로 菌體固定化를 하여 batch식 醱酵를 行하였을 때 1,670μg/l을 生産하였음을 보고하였다.

한편 1974년 Kao<sup>20)</sup>에 의해 polyethyleneglycol(PEG)로 식물원형질체 融合이 行해진 이후 미생물육종의 方法으로 원형질체 融合이 널리 이용되고 있으며<sup>21,22)</sup>, 원형질체融合은 조작이 簡便할 뿐아니라 유전교환계가 잘 알려져지않은 균주의 육종에 有力한 미생물 有種方法으로서, 원형질체가 정상세포로 再生이 가능한 모든 균주에 利用할 수 있다<sup>23)</sup>.

따라서 본 연구는 *Bacillus natto* 및 *Bacillus megaterium*간의 종간融合에 의한 단백질 및 미분해단백의 效果的이용으로 vitamin B<sub>12</sub>으로의 轉換을 시도하였을 때의 生産성을 검토했으며, 生産성 향상을 위한 발효조건을 調査하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 菌株

본 實驗에 使用한 strain SH-89는 市販 청국장에서 분리하였으며 vitamin B<sub>12</sub> 生産균주인 *Bacillus megaterium* IAM 1166은 日本 東京大學 應用 微生物 研究所에서 分讓받아 완전배지 (Complete medium : CM)에 계대보존하여 使用하였으며, vitamin B<sub>12</sub> 精製용 균주로서 *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830은 국립보건원에서 分讓받아 vitamin B<sub>12</sub> inoculum medium (Difco Co.)에 繼代 保存하여 使用하였다.

또한 strain SH-89 및 *Bacillus megaterium* IAM 1166의 營養要求性 變異株 및 細胞融合에 의해 얻은 融合菌株는 Table 1에 나타내었다.

## 2. 培地 및 溶液

본 實驗에 使用한 배지는 完全배지 (Complete medium ; CM), 最少배지 (Minimum medium ; MM)와 原型質體의 再生에 使用한 再生용원전배지 (Regeneration complete medium ; RCM), protease 생산균주 분리용배지 (Selected medium ; STM)를 使用하였으며, 또한

Table 1. List of strains used

Strain	Phenotype	Source
Strain SH-89	Wild type	
<i>B. megaterium</i> IAM 1166	Wild type	
<i>Lactobacillus leichum</i> - <i>annij</i> ATCC 7830	Wild type	
Strain SH-89-34	thr <sup>-</sup> try <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	Strain SH-89
<i>B. megaterium</i> BK-13	arg <sup>-</sup> ade <sup>-</sup> str <sup>r</sup>	<i>B. megaterium</i> IAM 1166
MNF*-72	thr <sup>-</sup> try <sup>-</sup> arg <sup>-</sup> ade <sup>-</sup> lys <sup>-</sup> rif <sup>r</sup> -str <sup>r</sup>	fusant

\*MNF-72 is fusant between strain SH-89-34 and *B. megaterium* BK-13

vitamin B<sub>12</sub> 생산용배지 (vitamin B<sub>12</sub> producing medium ; B<sub>12</sub>PM) 등 각종배지의 組成은 Table 2와 같이 調製하여 使用하였다. 그리고 원형질체 再生을 위한 중중용RCM(0.7% agar)은 Kaneko 등의 方法<sup>24)</sup>에 따랐으며 protoplast fusion에 使用된 각종 溶液의 組成은 Table 3과 같다.

## 3. 試藥

본 實驗에 使用한 penicillin-G, streptomycin, rifampicin, casamino acid, nucleic acid mixture, vitamin B<sub>12</sub>는 Sigma Co. 제품을, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)는 Aldrich Co., Polyethyleneglycol 6000 (PEG 6000)과 polyvinylpyrrolidone (PVP)는 Wake Co., lysozyme은 Boehringer Mannheim Co.의 製品을 使用하였으며 배지중 vitamin B<sub>12</sub> 접종용배지 (vitamin B<sub>12</sub> inoculum medium)와 vitamin B<sub>12</sub> 定量用 배지 (vitamin B<sub>12</sub> assay medium)는 Difco Co. 제품을 使用하였다.

고정화 담체로 使用된 sodium alginate와 Agar는 Junsei Co., polyacrylamide는 Bio-Rad Co., κ-carrageenan은 Sigma Co. 製品을 使用하였고, 기타아미노산, 糖類 및 시약들은 特級을 使用하였으며 중류수는 脫이온수를 使用하였다.

Table 2. Composition of media

(gram per liter)

Ingredient	CM	MM	RCM	SM	STM	B <sub>12</sub> PM
Bacto - beef extract	3		3			
Bacto - pepton	5		5			
Soy - peptone						3
Yeast extract					0.05	
Casein					0.5	
Tryptone						17
Sucrose		0.1		0.1		
Glucose					1	
L - Monosodiumglutamate		0.05		0.05		
NaCl		0.005		0.005		5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>					0.1	2.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O		0.042		0.042		
Mgso <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O					0.02	
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O						10ppm
Sodium succinate			135			
Biotin	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Adenine sulfate				20mg		
Tryptophane				20mg		
Arginine · HCl				20mg		5
Lysine				30mg		
Threonine				200mg		
pH	7.0	7.0	6.5	7.0	7.0	7.3

CM : Complete medium, MM : minimum medium, RCM : Regeneration complete medium, SM : Supplemented medium, STD : Selected Medium, B<sub>12</sub>PM : Vitamin B<sub>12</sub> productive medium.

Table 3. Composition of various solution

Solution	Composition
Buffer solution (BS)	0.05M Tris-malate buffer(pH 7.0)
Lysis solution (LS)	BS supplemented with 0.4M sucrose, 0.01M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 1,000 $\mu g/ml$ lysozyme
Dilution solution (DS)	Lysis solution excluded lysozyme
Fusion solution (FS)	BS(pH 6.5) supplemented with 0.4M sucrose, 0.01M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 50mM EDTA

#### 4. Protease 生産菌株의 分離

市販 청국장을 求入하여 該菌 生理食鹽水로  $10^4 - 10^5$ 회 稀釋하여 protease 生産菌株 分離用 배지(Selected medium : STM)에 塗抹하였을 때 배지중의 casein을 分解하여 clear zone을 생성하는 colony 중 diameter가 가장 큰 colony를 選拔하였다.

#### 5. 分離菌株의 同定

分離株의 同定은 微生物의 分類と 同定<sup>25)</sup>, Bergey's manual of Systematic Bacteriology<sup>26)</sup> 및 Manual for the identification of medical bacteria<sup>27)</sup> 등의 일반세균 동정법에 따라 실시하였다.

#### 6. 酵素活性의 測定

酵素活性은 Casein-Folin법<sup>28)</sup>에 따라 測定하였다. 즉, 조 효소액으로 CM液體배지에서 30℃, 24시간 배양하여 遠心分離한 上澄液 1ml와 0.6% Hammastein casein 2ml를 40℃에서 30분간 反應을 시킨 후 0.4M Trichloroacetic acid 5ml로 反應을 정지시킨 다음 濾過하였다. 여액 1ml에 0.4M Sodium carbonate 5ml 및 Folin phenol reagent 1ml로 35℃에서 30분간 발색을 시켜 620nm에서 吸光度를 測定하였으며, 1분간 1 $\mu g$ 에 相當하는 tyrosine을 生成하는 能力을 1 Unit로 하였다.

## 7. 菌體中の vitamin B<sub>12</sub>의 抽出

균체중에 含有된 vitamin B<sub>12</sub>의 抽出은 岡田 등의 方法<sup>20)</sup>에 準하여 實驗하였다. 즉, vitamin B<sub>12</sub>생산용배지(B<sub>12</sub>PM)에서 얻어진 균체를 集菌하여 生理食염수로 2회 洗滌한 다음 0.2M 초산완충액(pH4.5) 5ml와 KCN(0.5mg/ml) 0.2ml을 가하고 달이온수로 40ml로 하여 100℃에서 30분간 加熱處理를 행한 후 冷却시켰다.

여기에 10% metaphosphate 0.3ml을 가하여 0℃에서 1분간 放置한 다음 전량을 50ml로 하였다. 이를 원심분리(15,000rpm, 5min, 0℃, Beckman No. J2-21)하여 상등액을 分離하고 상등액 20ml을 取해 1N-NaOH로 pH 6.0이 되게 調整한 다음 전량을 40ml로 정용하여 vitamin B<sub>12</sub>를 定量하였다. 한편으로 상등액 20ml을 2N-NaOH로 pH 11-12로 調整하여 120℃에서 30분간 autoclave에서 加熱處理한 다음 pH 6.0으로 하여 전량을 40ml로 정용하여 vitamin B<sub>12</sub>정량시 blank로 使用하였으며, vitamin B<sub>12</sub>의 정량에 使用한 檢量線은 Fig.1에 나타내었다.

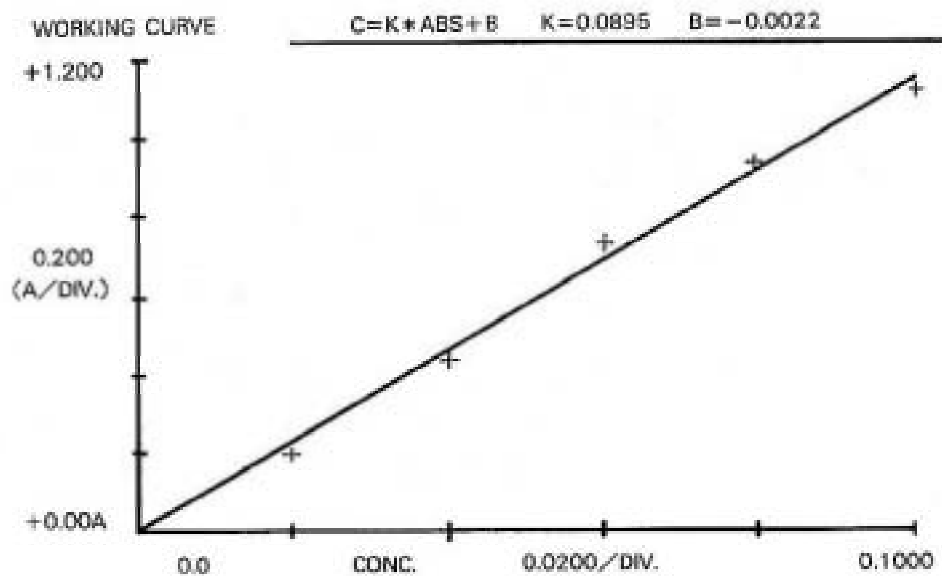


Fig. 1 The calibration curve for the determination of vitamin B<sub>12</sub>

## 8. 變異株의 分離 및 濃縮

CM액체배지에서 대수증식기 중기( $1 \times 10^8$  cells/ml) 까지 배양한 菌液 20ml을 8,000rpm에서 5분간 원심분리하여 集菌한 다음 BS로 2회 세척하고 동량의 MNNG( $1,000 \mu\text{g/ml}$ ) 용액으로  $30^\circ\text{C}$  에서 30분간 變異시켰다. 이를 BS로 3회 세척하여 窒素原을 除去한 MM액체배지에서 6시간동안 N-starvation을 시킨 다음 penicillin-G 溶液( $600 \mu\text{g/ml}$ 으로  $30^\circ\text{C}$  에서 2시간동안 變異株의 濃縮을 행하였다<sup>30)</sup>

## 9. 營養要求性 및 藥劑耐性株의 분리

변이원(MNNG)처리와 penicillin-G로 농축한 菌液을 casamino acid(free vitamin)  $1\text{mg/ml}$ , nucleic acid mixture  $10 \mu\text{g/ml}$  및 藥劑로써 streptomycin  $100 \mu\text{g/ml}$ , rifampicin  $50 \mu\text{g/ml}$  되게 添加한 MM고체배지에 도달하여  $30^\circ\text{C}$  에서 3-7일간 배양시켰을 때 형성된 colony를 Sherman등의 방법<sup>31)</sup>에 따라 營養要求성과 藥劑耐성을 갖는 菌株로 分離하였다.

## 10. 原型質體의 形成과 融合

Kaneko등의 방법<sup>24)</sup>에 따라 4시간동안 본 배양시킨 變異株를 1.5시간동안  $0.3 \text{ Unit/ml}$ 의 penicillin-G로 處理한 다음 BS로 3회 세척하고 DS에 현탁하여 동량의 LS로 原型質體를 형성시켰다. 原型質體의 融合은 두 균주의 原型質體  $10\text{ml}$  ( $1 \times 10^8$  cells/ml)씩을 混合시켜 원심분리( $4,000\text{rpm}$ ,  $10\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ )한 후 集菌한 다음 FS  $2\text{ml}$ 에 현탁하고 여기에  $0.1\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  및 3% PVP를 含有한 30% PEG 6000용액  $20\text{ml}$ 를 가하여  $30^\circ\text{C}$  에서 30분간 融合을 행하였다.

## 11. 融合株의 分離

융합한 후 원심분리( $4,000\text{rpm}$ ,  $10\text{min}$ , room temp.)하여 FS로 2회 세척한 다음 동일한 溶液으로 희석하고 RCM배지상에 藥劑를 함유한 증증용 RCM( $0.7\%$  agar)와 融合菌液을 잘 혼합하여 증증시킨 다음  $30^\circ\text{C}$  항온기에서 7-10일간 培養하여 형성된 colony의 營養요구성을 檢討하여 융합균주로 분리하였다.

## 12. 菌體의 固定化

CM에서 대수증식기 중기까지 培養시킨 배양액을 원심분리( $8,000\text{rpm}$ ,  $5\text{min}$ )하여 集菌한 다음 BS로서 3회 세척한 다음 固定化에 사용하였다. 즉,  $16\text{g}$ 의 cell paste와 2.5% sodium



alginate 500ml를 혼합시켜 19-26 gauge 주사바늘을 통해 0.1M CaCl<sub>2</sub>용액을 떨어뜨려 固定化시켰으며 고정화된 bead는 0.025M CaCl<sub>2</sub> 용액에 침지하여 4℃에서 12시간 熱誠시켜 活性化하여 사용하였다.

Bead내의 生存指數(Viability index, V.I)는 bead를 sodium tripolyphosphate 용액(100mg/ml)에 용해시켜 Ringer 용액으로 희석한 다음 methylene blue 染色法으로 生菌數를 측정하였으며 시간경과에 따른 배지중의 free cell 수는 Haematocytometer를 이용하여 계측하였다.

### 13. Vitamine B<sub>12</sub>의 生産性 檢討

Vitamin B<sub>12</sub> 生産능이 우수한 兩株를 分離할 목적으로 변이원 처리를 행하여 얻은 變異株와 이를 변이주를 융합시킨 融合株를 free cell 狀態 및 固體 고정화를 이용하여 醱酵를 행하였을때의 vitamin B<sub>12</sub> 축적량을 測定하였다. 즉, 각각의 free cell 및 고정화 bead를 30℃에서 12, 24, 36, 72, 96시간 배양한 다음 원심분리(8,000rpm, 10min)로 集菌하여 saline용액으로 3회 세척한 후의 cell paste를 岡田 등의 방법<sup>20)</sup>에 따라 *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830을 使用하여 測定하였다(Fig. 2)

### 14. 連續式 罐形발효

연속식 罐形발효기는 내경 2cm인 유리관을 이용하여 製作하였으며 規格은 총 용량 220ml, 충전용량은 총 容積의 70-80%로 하여 고정화세포의 破壞를 防止하기 위하여 6cm 간격으로 stainless망을 設置하였다. 또한 罐물리에 경질유리자켓(직경 5cm)을 설치하고 Water pump (Haake-Gelman, type 000-5818)로 반응기온도를 30℃로 維持하였으며 B<sub>12</sub>PM을 peristaltic pump(LKB)로 하단에서부터 일정한 流量으로 供給하면서 醱酵를 행하였으며 罐形 발효기의 裝置는 Fig. 3과 같다.

Preparation of test culture

Preparation of vitamin B<sub>12</sub> standard solution

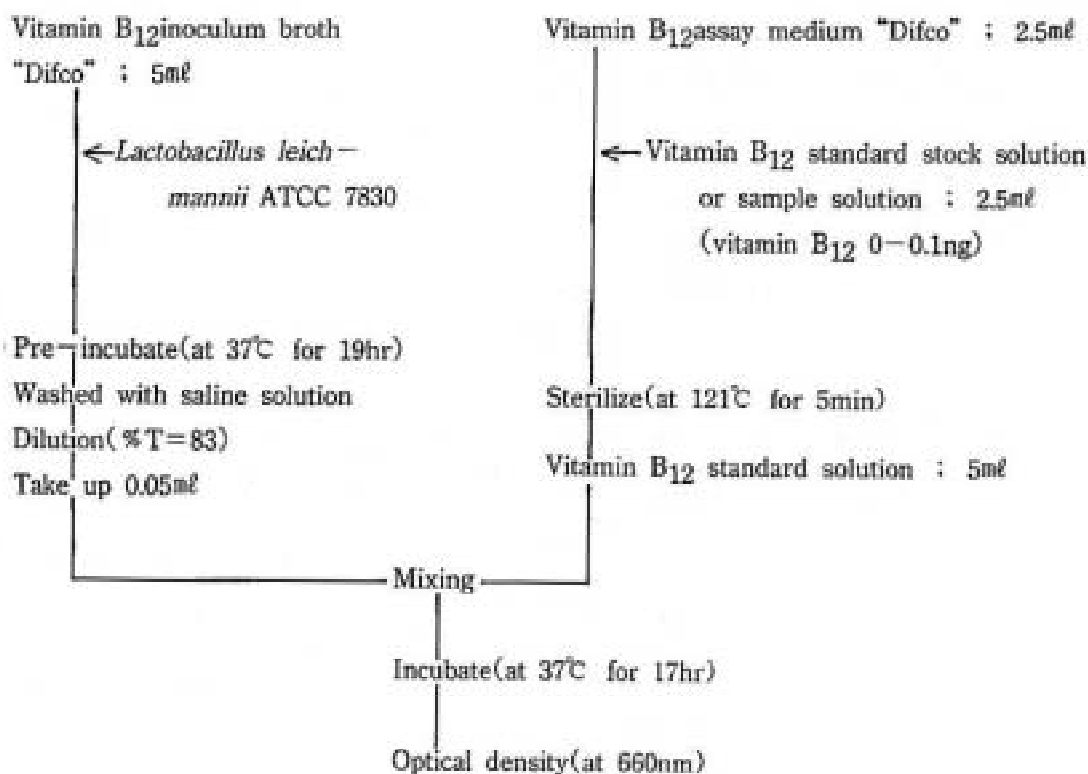


Fig. 2. Procedure of vitamin B<sub>12</sub> microbiological assay for conditioning

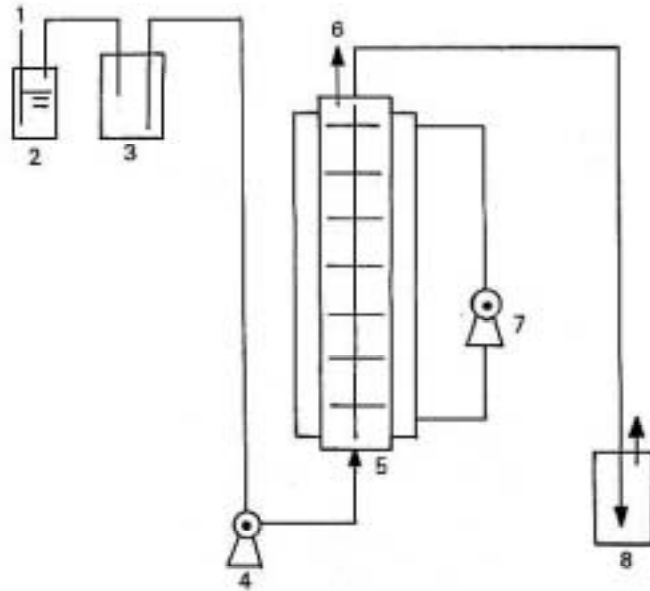


Fig. 3. Schematic diagram of continuous vitamin B<sub>12</sub> fermentation.

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. Air inlet                                       | 5. Reactor              |
| 2. Bottle with conc-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 6. CO <sub>2</sub> Vent |
| 3. Medium reservoir                                | 7. Circulation pump     |
| 4. Peristaltic pump                                | 8. Product reservoir    |

### III. 結果 및 考察

#### 1. protease 生産菌株의 分離

市販 청국장을 求入하여 滅菌생리식염수에 희석하고 STM(Selected medium)에 도달하였을 때 casein 分解能이 우수한 균주를 6균주 選拔하여 Fig. 4 와 같이 STM(Selected medium) 상에 生育한 colony의 diameter로써 protease activity가 가장 우수한 균주인 SH-89를 최종 選拔하였다.

## 2. 分離菌株의 同定

청국장에서 분리한 SH-89균주의 분류, 동정을 행하기 위하여 그 형태학적 특성을 조사한 결과를 Table 4에 나타내었다.

分離株 SH-89의 형태학적 특성은 Gram 양성의 운동성을 가진 간균으로써 cell의 폭과 길이는  $0.8\mu\text{m}$  및  $3\mu\text{m}$  이며 Gram 염색 시 spore의 형태는 ellipsoidal로서 Bergey's manual에 따라 *Bacillus subtilis*에 속하는 것으로 推定 되었으나, spore의 위치에 있어 *Bacillus subtilis*는 central인데 반해 分離株 SH-89균주의 경우 terminal을 나타내었으며 (Fig. 5),

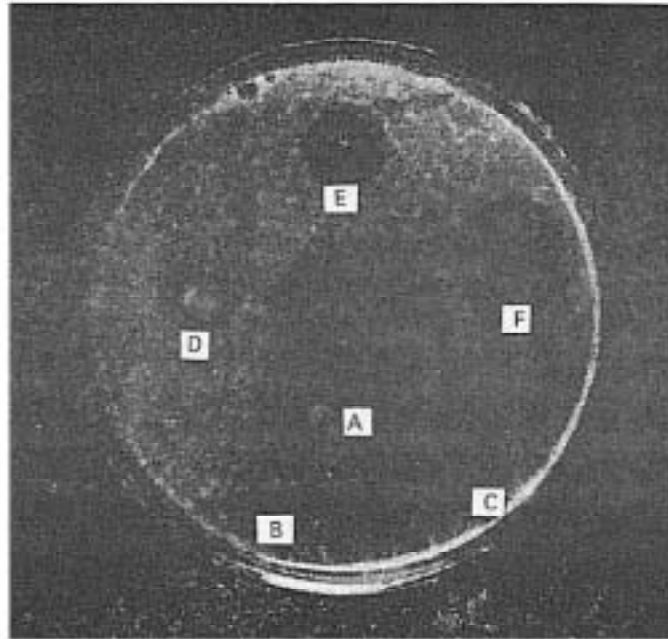


Fig. 4. Comparison of clear zone of strains producing protease on STM(Selected medium)

A ; Strain SH-89

Table 4. Comparison of major morphological characteristics of strain SH-89 and *Bacillus subtilis* as reference

Factor	SH-89	<i>Bacillus subtilis</i>
Gram staining	positive	positive
Shape of cell	Rod	Rod
Width of cell( $\mu\text{m}$ )	0.8	0.7-0.8
Length of cell( $\mu\text{m}$ )	3	2-3
Spore shape	Ellipsoidal	Ellipsoidal
Spore position	Terminal	Central
Motility	Active	Active



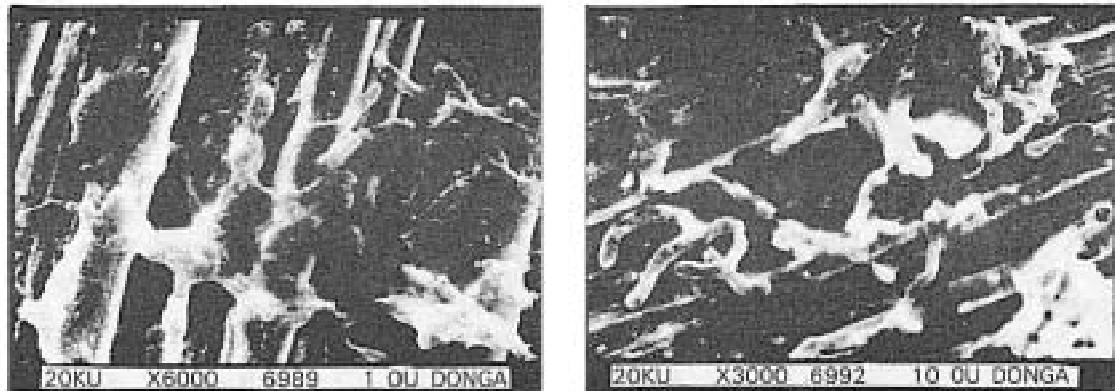
Fig 5. Photograph of strain SH-89 isolated (x1000)  
Bar indicates  $3\mu\text{m}$

그리고 分離株 SH-89 菌株는 Hara 및 Ueda의 sucrose-glutamate배지에서 *stringiness*를 형성하는 성질을 갖고 있는 점으로 보아 *Bacillus*속 중 *Bacillus natto*균의 特徵種 하나인 *stringiness* 형성균에 속하며 또한 SH-89는 생리적, 생화학적 특성에 있어 *Bacillus subtilis*와 달리 D-xylose 분해능이 없으며, Biotin을 요구하는<sup>1)</sup>점 등의 차이를 나타내었으므로(Table 5), 最終적으로 *Bacillus natto*로 同定되어 *Bacillus natto* SH-89로 命名하였다.

한편 *Bacillus natto* SH-89(A, x6,000) 및 *Bacillus megaterium* IAM 1166(B, x3,000)의 전자현미경상에서의 형태를 Fig. 6에 나타내었으며, 양 균주는 모두 간균으로 나타났다.

### 3. 變異株의 分離 濃縮

分離株 *Bacillus natto* SH-89 및 vitamine B<sub>12</sub>生産菌株로 알려진 *Bacillus megaterium* IAM 1166으로 우수균주의 분리 및 protoplast fusion 에 이용할 genetic marker를 얻기 위하여 가장 널리 이용되고 있는 강력한 변이원인 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)을 각각의 菌株에 최종농도 500µg/ml로 30°C incubator에서 30분간 처리하였다. 변이원 처리후 30°C에서 3-7일간 배양시 완전배지(CM)



(A)

(B)

Fig. 6. Scanning electron microphotograph of *Bacillus natto* SH-89 and *Bacillus megaterium* IAM 1166

A : *Bacillus natto* SH-89 (x6,000)

B : *Bacillus megaterium* IAM 1166 (x3,000)

Table 5. Comparison of physiological and biochemical characteristics of strain SH-89 and *Bacillus subtilis* as reference

Facter	SH-89	<i>Bacillus subtilis</i>
Utilization of citrate	positive	positive
Diamination of phenylamine	negative	negative
Nitrate reduced to nitrate	positive	positive
Formation of indole	negative	negative
Urease reaction	∅	∅
Hydrolysis of casein	positive	positive
gelatin	∅	∅
starch	∅	∅
Acid from D-glucose	positive	positive
L-arabinose	∅	∅
D-xylose	negative	∅
D-manitol	positive	∅
Growth at pH 6.8, nutrient broth	positive	positive
pH 5.7, nutrient broth	∅	∅
Growth in NaCl 7%	positive	positive
10%	negative	ND*
Growth at 5°C	negative	negative
10°C	∅	d**
30°C	positive	positive
40°C	∅	∅
50°C	∅	d
55°C	negative	negative
Biotin require	positive	∅

ND\* : no data available

d\*\* : 11-89% of strains are positive

에는 生育하나 最少培地 (MM)에는 生育하지 않는 균주를 變異株로 분리하였으며 *Bacillus natto* SH-89의 경우 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *Bacillus megaterium* IAM 1166의 경우 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MNNG 처리로 33-38%의 變異率 및 生存率을 나타내었다.(Fig. 7).

한편 變異率을 높이기 위해 Lederberg등의 방법<sup>30)</sup>에 따라 Penicillin-G 처리를 행하였다.

變異株의 농축은 最少培地(MM)에서 penicillin처리로 인해 돌연변이주는 resting cell로 존재하지만 증식하는 parental cell은 細胞膜이 파괴되어 결과적으로 變異株의 濃縮을 피할수 있다. 이와 같이 變異率을 높이기 위하여 처리한 penicillin-G의 농도는 Fig. 8과 같으며 *Bacillus natto* SH-89의 경우 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *Bacillus megaterium* IAM 1166의 경우 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 penicillin을 처리함으로써 變異率을 약30%까지 上昇 시킬 수 있었는데 이는 *Brevibacterium flavum*과 *Corynebacterium glutamicum*으로 penicillin 농축을 행한 成<sup>31)</sup>등의 結果와 유사한 傾向을 나타내었다.



4. 營養要求性 및 藥劑耐性株의 分離

변이원(MNNG)처리와 penicillin-G로 농축한 菌液의 영양요구성원을 조사하기 위하여 ca-samino acid

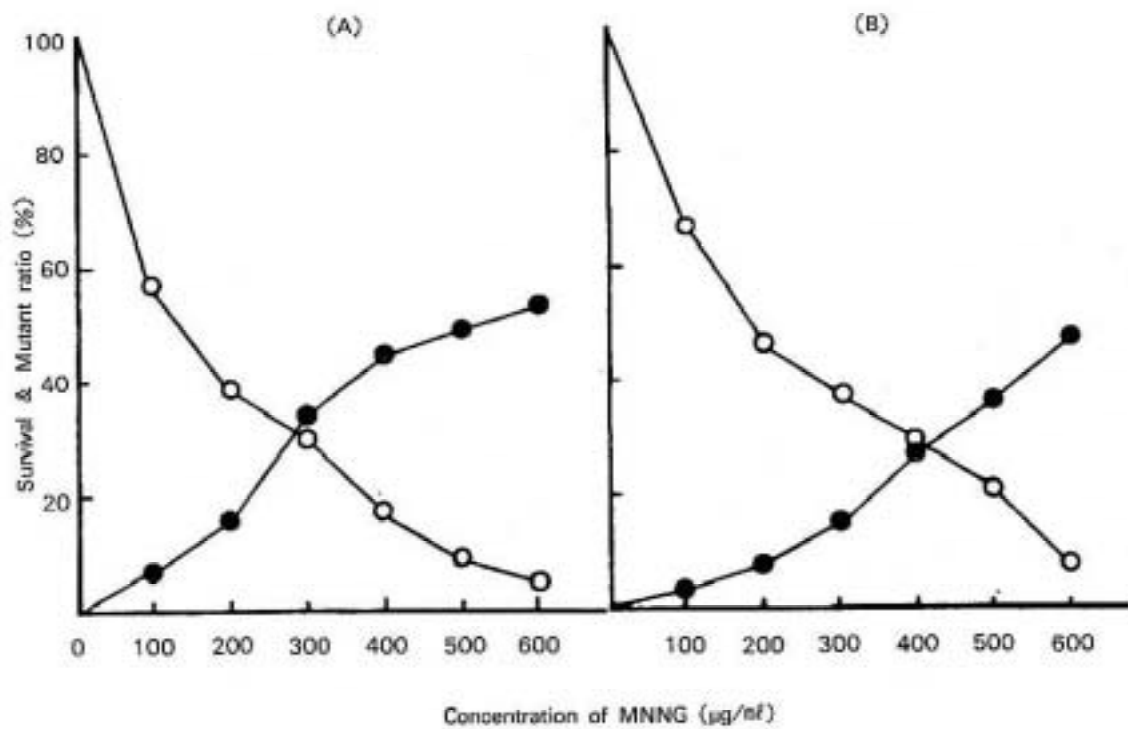


Fig. 7. Effect of MNNG concentration on the survival and mutation ratio by *Bacillus natto* SH-89 (A) and *Bacillus megaterium* IAM 1166 (B)

○ — ○ : survival ratio  
● — ● : mutation ratio

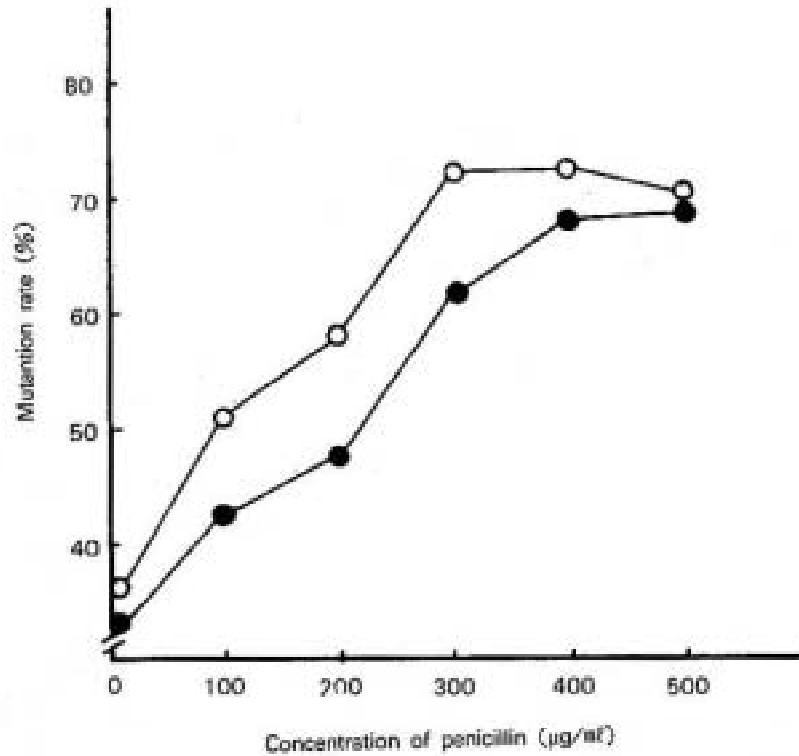


Fig 8. Effect of penicillin treatment on the mutation

- — ○ : *Bacillus natto* SH-89
- — ● : *Bacillus megaterium* IAM 1166

(free vitamin) 1mg/ml, nucleic acid mixture 10µg/ml, rifampicin 50µg/ml을 각각 첨가한 MM고체배지에 生育한 colony를 Sherman등의 방법<sup>31)</sup>에 따라 營養要求性 및 藥劑耐性株로 확인된 균주중 *Bacillus natto* SH-89-34의 경우 SM고체배지상에 stringiness를 형성하고 threonine, tryptophane의 營養要求性和 rifampicin내성주이며, 2500 Unit/ml로 가장 protease activity가 높았는데 반해 stringiness를 형성하지 않는 *Bacillus natto* SH-89-173 및 *Bacillus natto* SH-89-1214의 경우 protease activity가 낮았으며, 단일 營養要求性 균주의 protease activity가 전체적으로 낮은 경향을 나타내었다.

Vitamin B<sub>12</sub> 生産菌株인 *Bacillus megaterium* IAM 1166을 변이원처리를 행하여 分離한 變異株의 營養要求性 藥劑抗性 stringiness 및 B<sub>12</sub>PM에서 vitamin B<sub>12</sub>생산능은 Table 7에 나타낸 바와 같이 arginine, adenine, lysine의 營養要求性を 갖으며 streptomycin에 耐性を 나타내는 *Bacillus megaterium* BK-13은 4.82μg/g-cell로 가장 우수하였다.

또한 SM에서 stringiness가 형성되지 않는 *Bacil-*

Table 6. Protease activity and stringiness of the mutants of *Bacillus natto* SH-89 isolated

Strain	Phenotype	Stringiness on SM*	Protease activity(Unit/ml)
(parent)			
<i>B. natto</i> SH-89	Wild type	+	950
(mutant)			
<i>B. natto</i> SH-89-17	pro <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	1350
<i>B. natto</i> SH-89-23	arg <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	1270
<i>B. natto</i> SH-89-34	thr <sup>-</sup> try <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	2500
<i>B. natto</i> SH-89-57	leu <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	1520
<i>B. natto</i> SH-89-72	lys <sup>-</sup> met <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	2140
<i>B. natto</i> SH-89-132	arg <sup>-</sup> lys <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	1970
<i>B. natto</i> SH-89-173	ade <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	-	1140
<i>B. natto</i> SH-89-304	leu <sup>-</sup> thr <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	2070
<i>B. natto</i> SH-89-461	lys <sup>-</sup> try <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	1740
<i>B. natto</i> SH-89-712	met <sup>-</sup> pro <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	2320
<i>B. natto</i> SH-89-816	arg <sup>-</sup> leu <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	2320
<i>B. natto</i> SH-89-1214	lys <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	-	1490
<i>B. natto</i> SH-89-1272	try <sup>-</sup> met <sup>-</sup> rif <sup>r</sup>	+	1910

\*SM is minimum medium containing auxotrophic material

Table 7. Vitamin B<sub>12</sub> productivity of the mutants of *B. megaterium* IAM 1166

Strain	Phenotype	Stringiness on SM*	Vitamin B <sub>12</sub> productivity (μg/g-cell)
(parental strain)			
<i>B. megaterium</i> IAM 1166	Wild type	+	3.95
(mutant)			
<i>B. megaterium</i> BK-9	met <sup>-</sup> try <sup>-</sup> str <sup>r</sup>	+	4.35
<i>B. megaterium</i> BK-13	arg <sup>-</sup> ade <sup>-</sup> lys <sup>-</sup> str <sup>r</sup>	+	4.35
<i>B. megaterium</i> BK-55	leu <sup>-</sup> str <sup>r</sup>	-	4.04
<i>B. megaterium</i> BK-134	pro <sup>-</sup> lys <sup>-</sup> str <sup>r</sup>	-	4.17
<i>B. megaterium</i> BK-174	met <sup>-</sup> thr <sup>-</sup> str <sup>r</sup>	+	4.59
<i>B. megaterium</i> BK-212	ade <sup>-</sup> str <sup>r</sup>	+	3.98

\*SM : Minimum medium containing auxotrophic material

*ius megaterium* BK-55 및 *Bacillus megaterium* BK-134의 경우 vitamin B<sub>12</sub>의 생산능이 다소 낮은 경향을 나타내었다

##### 5. 原型質體의 形成과 融合

원형질체 형성을 위한 細胞壁 溶解효소는 lysozyme, zymolase, cellulase<sup>35)</sup>, β-glucuronidase<sup>36)</sup> 및 mutase<sup>37)</sup> 등의 lytic enzyme이 사용되어지고 있으며, osmotic stabilizer에 있어서도 sucrose, sorbitol, mannitol, KCl 등이 일반적으로 使用되고 있으나 본 연구는 Kaneko 등의 방법<sup>24)</sup>에 따라 變異株 *Bacillus natto* SH-89-34 및 *Bacillus megaterium* BK-13을 0.4M sucrose가 함유된 LS로 protoplast를 시켰을 때, lysozyme 농도에 따른 protoplast 形成率을 Fig. 9에 나타내었다.

*Bacillus natto* SH-89-34의 경우 300μg/ml, *Bacillus megaterium* BK-13의 경우 500μg/ml의 lysozyme 처리시 99% 이상의 protoplast가 形成되었다. 따라서 이와같은 결과는 Furuya<sup>38)</sup>, Okanishi<sup>39)</sup> 등의 보고와는 다소의 차이가 있으나 이는 균중에 따른 차이로 사료된다.

원형질체는 正狀細胞와는 달리 세포벽이 일부 파괴되거나 세포벽에서 유리된 不安定한 상태

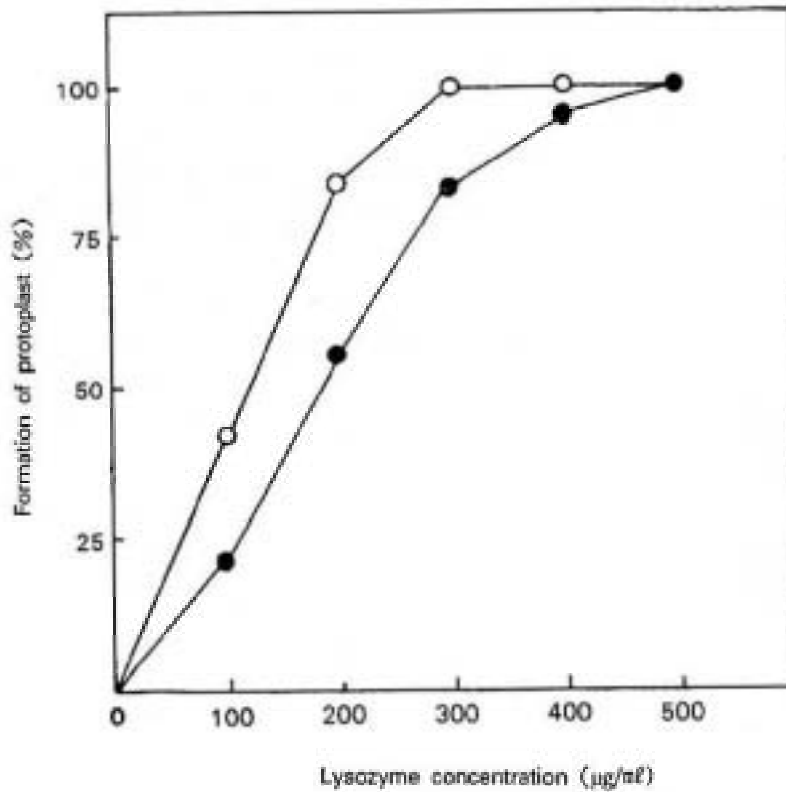


Fig. 9. Effect of lysozyme concentration on the protoplast formation *Bacillus natto* SH-89-34(Thr<sup>-</sup>Try<sup>-</sup>Rif<sup>r</sup>) and *Bacillus megaterium* BK-13(Arg<sup>-</sup>Ade<sup>-</sup>Lys<sup>-</sup>Str<sup>r</sup>) were treated in LS at 30°C for 30min

○—○ ; *Bacillus natto* SH-89-34  
 ●—● ; *Bacillus megaterium* BK-13

므로 세포벽제성에 사용되는 osmotic stabilizer의 종류에 따라 再生率이 크게 달라질수 있다. 본 實驗에 使用한 osmotic stabilizer로는 Kaneko 등의 방법<sup>24)</sup>에 따라 sodium succinate를 RCM에 添加하였을때의 원형질체의 再生에 미치는 영향을 調査하였으며(Fig. 10) 0.5M sodium succinate를 첨가하고 0.7% agar를 含有한 RCM으로 培養하였을 때 *Bacillus natto*SH-89-34는 67%, *Bacillus megaterium*BK-13은 65%로 가장 높은 再生率을 나타내었다. 이는

osmotic stabilizer의 농도에 있어 Akamatsu 등<sup>43)</sup>과 Kaneko 등<sup>24)</sup>의 보고와는 일치하나 숲 등<sup>44)</sup> 및 申 등<sup>45)</sup>의 결과와는 다소 상이하였다.

## 6. 融合株의 分離

變異株 *Bacillus natto* SH-89-34 및 *Bacillus megaterium* BK-13을 融合시키기 위해, 融合촉진제인 30% PEG 6000을 단독으로 사용하였을 때와 融合자극제로 알려진 3% polyvinylpyrrolidone(PVP)를 첨가 하였을때의 融合빈도는 Table 8과 같다.

PEG 6000을 단독으로 사용시 融合빈도는  $1.0 \times 10^{-6}$ 으로 낮은 경향이였으나 3% PVP를 添加함으로써 融合빈도는  $1.0 \times 10^{-5}$ 으로 다소 상승하였다. 그러나 전체적으로 融合빈도가 낮은 상태였는데 이는 變異株

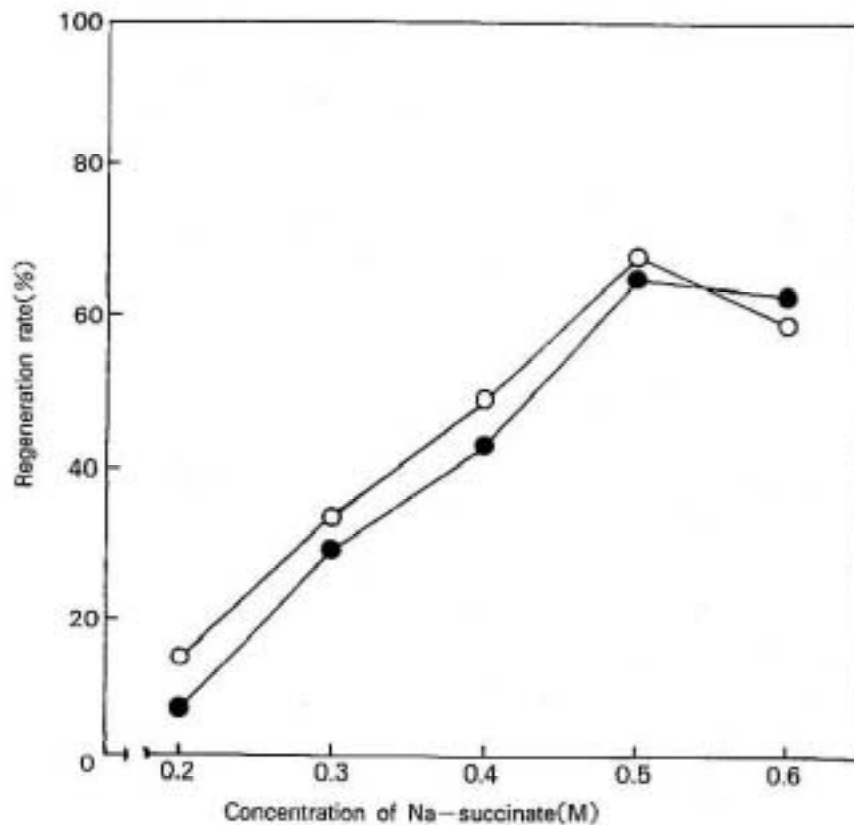


Fig. 10. Effect of Na-Succinate concentration on the regeneration

- : *Bacillus natto* SH-89-34
- : *Bacillus megaterium* BK-13

Table 8. Fusion frequency between *B. natto* SH-89-34 and *B. megaterium* BK-13

Cross	Fusion frequency (str <sup>r</sup> rif <sup>r</sup> )	
	With 30% PEG6000	With 30% PEG6000 + 3% PVP★
<i>B. natto</i> SH-89-34 (thr <sup>-</sup> try <sup>-</sup> rif <sup>r</sup> ) X		
<i>B. megaterium</i> BK-13 (arg <sup>-</sup> ade <sup>-</sup> lys <sup>-</sup> str <sup>r</sup> )	1.0×10 <sup>-6</sup>	1.0×10 <sup>-6</sup>

★ Polyvinylpyrrolidone

의 genetic marker의 차이에 기인한 것으로 사료된다.

그리고 分離한 融合株 85균주에 대한 genetic marker를 調査한 結果는 Table 9와 같다. *Bacillus natto* SH-89-34와 *Bacillus megaterium* BK-13간의 融合體중 완전한 열색체 제조 합이 일어난 것은 39주였으며, 나머지 46주는 친주중의 어느 한편의 phenotype을 가지거나 불완전한 제조업이 일어난 것으로 보인다. 이와같이 불완전한 제조합체가 많이 나타나는 것은 열색체 제조합빈도가 낮고 또한 營養要求性菌株의 경우 비정상적 상태를 回復하려는 방향으로 融合이 이루어진 것으로 생각된다.

한편 융합체에 의한 stringiness 및 vitamin B<sub>12</sub>의 생산성을 검토한 結果는 Table 10과 같으며, Vitamin B<sub>12</sub>생산성이 우수한 融合株 MNF-25, MNF-72, MNF-101, MNF-162를 선발하였고 이중 MNF-72가 7.85μg/g-cell의 vitamin B<sub>12</sub>를 生産하여 가장 우수한 菌株로 알려졌다.

## 7. 菌體의 固定化

菌體를 固定化할 수 있는 담체의 선정을 위하여 polyacrylamide, agar, κ-carrageenan 및 sodium alginate에 vitamin B<sub>12</sub>生産能이 뛰어난 融合株인 MNF-72를 固定化시킨 bead를 B<sub>12</sub>PM에 대해 20 : 1의 比率로 500ml 삼각플라스크에서 30℃, 24시간 진탕배양한 다음 菌體를 추출하여 vitamin B<sub>12</sub>를 測定한 結果는 Table 11과 같다.

2.5% sodium alginate로 고정화하여 vitamin B<sub>12</sub>의 생산량을 측정한 結果 8.2μg/g-cell의 높은 수율을 얻은데 비해 polyacrylamide 및 agar에의한 固定化 菌體에서는 vitamin B<sub>12</sub>의 생산량이 낮았으나 κ-carrageenan의 경우 sodium alginate와 큰 차이점은 없었다. 이는 L-glutamic acid생산에 있어 菌體 固定化담체 κ-carrageenan이 sodium alginate보다 우수하였다는 보고<sup>60)</sup>와는 차이가 있었지만 본 實驗에서는 固定化 시 45℃의 온도에서 cell paste와 混濁함으로써 whole cell의 활성저하와 사멸균수의 증가에 의해 vitamin B<sub>12</sub>의 생산이 낮았던 것으로 생각된다.

Table 9. Fusant formation by protoplast between *B.natto* SH-89-34(thr<sup>-</sup>try<sup>-</sup>rif<sup>r</sup>) and *B. megaterium* BK-13 (arg<sup>-</sup>ade<sup>-</sup>lys<sup>-</sup>str<sup>r</sup>)

Strain	Arg	Ade	Lys	Thr	Try	Str	Rif	No.of colony
	(parental strain)							
<i>B. natto</i> SH-89-34	+	+	+	-	-	S	R	-
<i>B. megaterium</i> BK-13	-	-	-	+	+	R	S	-
	(fusnat)							
	+	+	+	-	-	R	R	12
	-	-	-	+	+	R	R	9
	+	+	+	+	+	R	R	39
	-	+	+	-	-	R	R	7
	+	-	-	+	+	R	R	15
	+	+	+	+	-	R	R	3

R : Resistant, S : Sensitive

Table 10. Stringiness and vitamin B<sub>12</sub> productivity of fusants

Strain	Stringiness on SM**	Vit B <sub>12</sub> productivity (µg/g-cell)
MNF*-25	+	5.25
MNF-72	+	7.85
MNF-101	-	4.99
MNF-156	+	6.82
MNF-162	+	5.17

\*Fusant between *B. natto* SH-89-34(thr<sup>-</sup>try<sup>-</sup>rif<sup>r</sup>) and *B. megaterium* BK-13(arg<sup>-</sup>ade<sup>-</sup>lys<sup>-</sup>str<sup>r</sup>)

\*\*Minimum medium containing auxotrophic material



### 8. Vitamin B<sub>12</sub>의 生産性 檢討

Vitamin B<sub>12</sub>生産성이 뛰어난 融合株MNF-72를 이용하여 free cells상태 및 菌體固定化를 이용하여 batch식과 연속식발효등의 醱酵條件을 檢討한 결과는 Fig 11.과 같다.

Free cells의 경우, 최적 배양시간은 48시간으로 나타났으며 더이상의 발효시간 경과에 따른 vitamin

Table 11. Vitamin B<sub>12</sub> production of whole cells immobilized in various matrices

Concentration of matrix for immobilization	(%)	Production on whole cells(μg/g)
Sodium alginate	2.5	8.2
Polyacrylamide	7.0	5.9
Agar	1.5	6.3
κ-Carrageenan	2.5	7.7

B<sub>12</sub>生産성은 급속히 減少하였고, 固定化 담체로써 batch식 醱酵의 경우 72시간 이후로는 free cells과 같이 점차적으로 減少하는 경향이었는데 이는 bead내의 生菌數의 감소와 기질의 감소에 따른 것으로 생각된다.

한편 관형발효조에 의한 연속식 발효는 batch식 보다 vitamin B<sub>12</sub>生産성이 뛰어났으며, 72시간 배양시 0.80μg/ml·hr의 높은 수율을 나타내었다.

또한 free cells의 경우 醱酵시간의 경과에 따라 생산량의 급속한 감소와는 달리 固定化醱酵는 시간의 경과에 따라 점차적으로 減少하는 추세였다. 그리고 bead내의 생존지수 및 배양액 중의 free cells 수에 있어서 batch식의 경우 72시간에 생존지수는 0.96에서 0.94로 減少하였으나 연속식 발효의 경우 96시간까지 bead내 생존지수 및 free cells수는 0.95 및 1×10<sup>6</sup>cells/ml로 나타났다.

이와같은 結果는 Yongsmith 및 Chutima<sup>19)</sup>가 *Propionibacterium* AKU 1251을 sodium alginate로 고정화 하여 batch식 醱酵를 행했을 때 0.33μg/ml·hr의 vitamin B<sub>12</sub>을 얻었음을 보고한 結果보다 변이주 *Bacillus natto*SH-89-34와 *Bacillus megaterium* BK-13의 融合株인 MNF-72를 이용한 연속식발효로서 훨씬 높은 수율을 얻을 수 있었다.

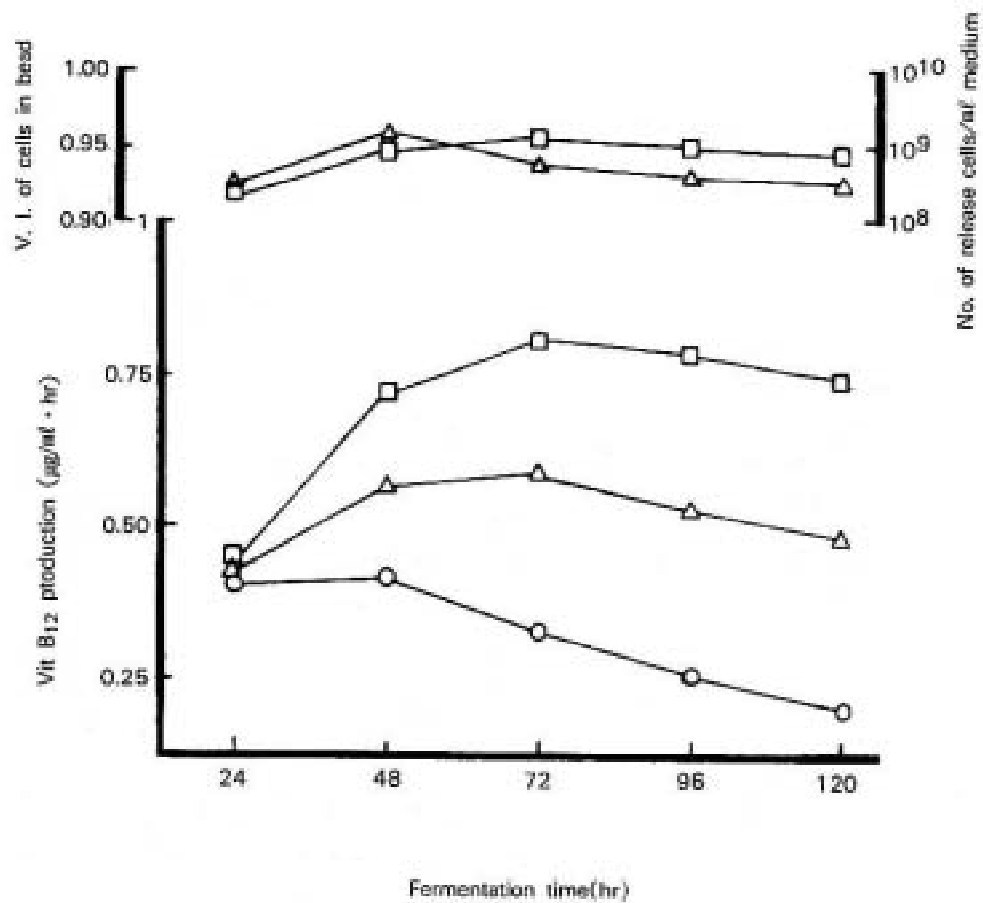


Fig. 11. Vitamin B<sub>12</sub> production and viability index(V.I.) in bead during fermentation time

- : free cell of fusant MNF-72
- △—△ : batch fermentation by immobilized system
- : continuous fermentation by tube fermentator

## IV. 要 約

Vitamin B<sub>12</sub>의 生産性を 높이기 위하여 청국장에서 分離한 SH-89와 vitamin B<sub>12</sub> 生産菌株로 알려진 *Bacillus megaterium* IAM 1166 菌주간의 protoplast fusion을 始圖하였다.

청국장에서 분리한 菌주 SH-89는 Bergey's manual과 一般 微生物 同定實驗法에 따라 分類·同定한 結果 *Bacillus natto* SH-89로 命名하였다.

菌株의 활성을 높이기 위하여 *Bacillus natto* SH-89 및 *Bacillus megaterium* IAM 1166에 각각 300 $\mu$ g/ml 및 400 $\mu$ g/ml의 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)처리를 행한 후 penicillin 농축을 하였을 때 變異率は 72% 및 68%로써 Penicillin-screening에 의해 약 30%정도의 變異率 향상을 나타내었다.

변이원 처리에 의해 활성이 우수하며 genetic marker로써 thr<sup>-</sup> try<sup>-</sup> rif<sup>r</sup>인 *Bacillus natto* SH-89-34 및 arg<sup>-</sup> ade<sup>-</sup> lys<sup>-</sup> str<sup>r</sup>의 genetic marker를 가진 *Bacillus megaterium* BK-13을 分離하였다.

Protoplast fusion을 행하기 위하여 500 $\mu$ g/ml의 lysozyme처리 시 protoplast formation ratio와 Regeneration ratio는 99% 및 67%를 나타내었다.

변이주 *Bacillus natto* SH-89-34 및 *Bacillus megaterium* BK-13간에 3% PVP를 添加한 30% PEG로 protoplast fusion을 행하였을 때 融合빈도는 1.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>을 나타내었다.

融合株 MNF-72는 vitamin B<sub>12</sub> 生産용 培地에서 7.85 $\mu$ g/ml의 높은 生産성을 나타내었으며, 融合株 MNF-72를 sodium alginate로 固定化를 하여 batch식 및 연속식발효를 행하였을 때 72시간에 0.58 $\mu$ g/ml·hr 및 0.80 $\mu$ g/ml·hr의 vitamin B<sub>12</sub>를 生産하였다.

## 參 考 文 獻

1. Su-Yung Kim and Ze-Uook Kim(1967) : Studies on the changes of protein, peptide and amino acid during Natto preparation. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 8, 11-20.
2. Ke-H0 Lee, Hyo-Ji Lee and Moon-Kyo Chung(1971) : Studies on Chung-Kook-Jang(part I). *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, 14(3), 191-200
3. Sook-Hee Rhee, Sun-Ki Kim and Hong-Sik Choi(1983) : Studies of lipids in Korean Soybeanfermented Foods(I). *Kor. J. Food Sci. Technol.* 15 (4), 399-403.
4. Nah-Ju Sung, Young Ae-Ji and Sung-Young Chung (1984) : Changes in Nitroge-

- nous Compound of soy-bean during Chung-Kook-Jang Koji Fermentation, *J. Kor. Soc. Food Nut.* 13(3), 275-284
5. 好井久雄, 金子安之, 山口和夫(1974) ; 食品微生物學, 技報堂, 183-186
  6. 失部規矩治(1984) ; 日本農學會報, 24, 4
  7. 澤村眞(1905) ; 日本農學會報, 67, 1
  8. Jeong-Sook Suh, Myung-Ki Ryu and Yun-Hang Hur(1983) ; Effect of Bacillus strain on the ChungKookJang Processing(III), *Kor. J. Food Sci. Technol.* 15(4),385-391
  9. 林右布(1959) ; 納豆に 關な 研究(2), 大阪市立衛生研究所報, 272-275
  10. 林右布(1959) ; 納豆に 關な 研究(2), 大阪市立衛生研究所報, 276-281
  11. Yoshie Hasegawa, Toru Inuta, Hitoshi Obata and Tai Tokuyama(1988) ; Induction of a High vitamin B<sub>12</sub> productive Natto strain through protoplast fusion, *Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi*, 35(3), 154-159
  12. Bok-Ran Kim, Young-Bong Han and Chang-Hee Park(1987) ; Changs of free sugar and free amino acid during the Natto fermentation kused by *Bacillus subtilis* S. N. U. 816, *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 10(2), 192-197.
  13. Friedrich, W. (1988) ; Vitamins, Walter de Gruyter, 837-928
  14. Sebrell, W. H. and Haris, R. S. (1968) ; The vitamins, second edition, 2, 120-261
  15. Demain, A. L., Daniels, H. J., Schnable, L. and White, R. F. (1968) ; Specificity of the Stimulatory Effect of Betaine on the Vitamin B<sub>12</sub> Fermentation, *Nat.* 220(28), 1324-1325
  16. Marwaha, S. S., Sethi, R. P. and Kennedy, J. F. (1983) ; Role of amino acids, betaine and choline in vitamin B<sub>12</sub> by biosynthesis by strains of *Propionibacterium*, *Enzyme Microbiol Technol* 5,454
  17. Kojima, I. Sato, H. and Fujiwara, Y. (1978) ; Process for fermentatively producing vitamin B<sub>12</sub>, U. S. Patent, 4(119), 429-495
  18. Yongsmith, B. and Apiraktivongse, P. (1983) ; Vitamin B<sub>12</sub> production from soybean curd whey with *Propionibacterium freudenrichii*, *J. Ferment. Technol.*, 61, 105
  19. Yongsmith, B. and Chutima, K. (1983) ; Production of vitamin B<sub>12</sub> by living bacterial cells immobilized in calcium alginate gels, *J. Ferment. Technol.*, 61,593
  20. Kao, K. N. and M. R. Michayluk(1974) ; A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115, 355.
  21. Foder, K. and L. Alfölder(1976) ; Fusion of protoplast of *Bacillus megaterium*, *Proc.*

- Natl. sci. USA*, 73(6), 2147-2150.
22. Gabor, M. H. and R. D. Hotchkiss(1979) ; Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* Protoplasts, *J. Bacteriol.* 137, 1346.
  23. Götz, F., Ahrne, S. and N. Linderberg(1981) ; Plasmid transfer and genetic regeneration by protoplast fusion in *Staphylococci*, *J Bacteriol.* 145, 74.
  24. Kaneko, H. and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*, *Agric. Biol. Chem.*, 43 (5)
  25. 長谷川武治(1984) ; (改訂版) 微生物の分離と 同定(下), 99-160.
  26. Holt, J. G. (1989) ; Bergey's manual of Systematic Bacteriology, vol 2,1104-1139
  27. S. T. Cowan(1979) ; Manual for the identification of medical bacteria, second edition, 70-180
  28. 萩原文二(1959) ; 酵素研究法, 2,240
  29. 岡田憲幸, 田部井英夫, 森勝美, 加藤清昭, 柳本正勝(1983) ; 食總研報, Rept. Natl. Food Res. Inst. 43,121
  30. Lederberg, J. and N. Zinder(1948) ; Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin, *J. A. C. S.* 70,4267
  31. Sherman, F., Gerald, R. F. and James, B. H.(1983) ; Methods in yeast genetics, cold spring *Habor Lab.* New York, 5
  32. Hasegawa, Y., Inuta, T., Obata, H. and Tokuyama, T. (1988) ; Induction of a high vitamin B<sub>12</sub> productive Natto strain through protoplast fusion, *Nippon Shoruhin Kogyo Garashi*, 35(3), 154-159
  33. Sung, Nack-Kie, Duck-Hwa Chung, Mu-Young Lee and Young-Chul Chung(1988) ; Development of L-lysine producing strains from cellulosic substrate by the intergeneric protoplast fusion. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 16(2), 150-155.
  34. Beung-Ho Ryu, Hye-Sung Kim Myung-Hoon Roh, Bub-Gyu Park, Jong-Soon Chung and Ki-Chul Bai(1989) ; Improvement of L-lysine productivity by using cell fusion and immobilized system. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 21(1), 154-163.
  35. Yamada, T. and Sakaguchi, K. (1981) ; protoplast induction in *Chlorella species*, *Agric. Biol. Chem.* 45, 1905
  36. Hong, S. W., Hah, Y. C. and Park, H. M. (1984) ; The conidial protoplast fusion of cellulolytic fungus, *Trichoderma Reingii*. *Kor. J. Microbiol.* 22,207

37. Stephen, E. R. and Nasin, A. (1981) : Production of protoplasts in different yeasts by mutanase, *Can. J. Microbiol.* 27,550
38. Furuya, A., Katsumata, R., Ozaki, A. and Oka, T. (1984) : Protoplast transformation of glutamate producing bacteria with plasmid DNA, *J. of Bacteriol.*, 159,306
39. Okanishi, M. Suzuki, K. and Umezawa, H. (1974) : formation and Reversion of *Streptomyces* protoplast ; Cultural condition and morphological study, *J. Gen. Microbiol.* 80
40. Park Chung, Bun-Sam Lim, Moon-Jin Chun and Woo-Kap Kim(1985) : Electron Microscopic observation on protoplast fusion of *Coryneform* bacteria, *Kor. J. Microbiol.*, 23(4), 265-270.
41. Hah, Y. C., Lim, H. M., Park, H. M. and Hong, S. W. (1983) : Electron microscope study of protoplasts released from the mycelium of *Trichoderma Koningii*, *Kor. J. Electron Microscopy*, 13,49
42. Kim, H. S. and Dewey, D. Y. Ryu(1982) : Continuous glutamate production using on immobilized whole-cells system, *Technol and Bioeng.*, 24,2167
43. Akamatsu, T. and Seheguchii, J. (1981) : Studies on generation media for *Bacillus subtilis* protoplast. *Agric. Biol. Chem.*, 45,2887
44. Kim, Jong-Heon, Beon-Sam Lim, Se-Young lee and Moon-Jin Chun(1985) : Frequency improvement of protoplast fusion in *Coryneform* bacteria, *Kor. J. Microbiol.*, 23 (3) 190-196.
45. Shin, Myoung-Gyo, Se-Young Lee, Bun-Sam Lim and Moon-Jin Chun(1984) : The protoplast formation regeneration and fusion of *Coryneform* bacteria, 22(3), 175-181.
46. Karube, I., Wang, Y., Tamiya, E. and Kawrai, M. (1987) : L-Glutamate production by protoplasts immobilized in carrageenan gel, *J. Biotech.*, 6, 1