

*Lactobacillus casei*의 Bacteriophage 耐性突然變異菌分離

姜國熙, 李京和, 朴基文, 劉溢濟, *金永昌

成均館大學校農科大學酪農學科

*韓國야쿠르트研究所

(1982년 8월 26일 수리)

Development of Phage-resistant Mutants from *Lactobacillus casei*

Kook Hee Kang, Kyung Hwa Lee, Gi Mun Park, Yik Je Yoo, and Young Chang Kim*

Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University,

*Han Kuk Yakult Institute

(Received August 26, 1982)

Abstract

A lactic starter organism, *Lactobacillus casei* YIT 9018 was treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) to obtain phage-resistant mutants. Freshly grown cells suspended in citrate buffer were exposed to NTG of 50 g/ml for 40 min. Among 88 colonies isolated eight colonies showed distinct resistance to phages isolated previously from milk plants. The eight new colonies showed character similar to the original *L. casei* except that they responded differently to phage of different sources and thus were designated as eight different mutants of *L. casei*. From the phage resisting together with the fermentative ability equivalent to the the mother organism the mutants may be considered to be used as starter cultures for fermented milk.

緒 論

유산균을 제품제조에 사용하는 발효유 공장에는, 그 유산균을 숙주로 하는 bacteriophage가 공장의 내외부에 존재하다가, 種菌탱크, 배양탱크 등에 오염되어 酸生成저하, 잡균오염등을 유발하여 제품생산에 지장을 초래하는 경우가 있다.

우리나라에도 1971년부터 발효유공장의 수가 많이 증가하였으며, 수 차례에 걸쳐 phage의 오염사고가 있었던 것으로 전해지고 있다.

姜¹⁾ 등, 金²⁾ 등은 발효유 공장에서 *Lactobacillus casei*를 숙주로 하는 耐性phage를 분리하여, 그 종류를 분류하였다.

이러한 phage 오염에 대한 대책은 공장내부의 위생상태를 철저히 하면서, 필요한 경우에는 일정기간 phage 내성균주를 사용하는 방법이 이용되고 있다.

Whitehead and Cox³⁾는 phage 오염에 대한 대책으로 phage 내성변이 균주를 starter로 사용코저, 최초로 시도하였고, Anderson and Meanwell,⁴⁾ Hunter and whitehead,⁵⁾ Meanwell and Symons,⁶⁾ Czulak and Naylor⁷⁾등도 이와 같은 연구를 하였으나, 이들이 분리한 변이균주는 사용중에 다시 感受性으로 변하거나, 혹은 새로운 phage가 출현하므로써 좋은 결과를 얻지 못하였다. 그러나, Czulak⁸⁾ 등은 phage 저항변이 균주를 사용하여 3년 이상 phage의 오염을 방지 하였고, Thunell⁹⁾

등은 *Streptococcus cremoris*의 phage 저항균주를 사용하여, 6900 만 파운드의 치즈를 phage 오염 없이 제조하였다.

이들이 사용한 phage 저항 균주는, 우유배지에 starter를 접종하고 거기에 phage를 감염시켜, curd를 형성케한 후, 이것으로부터 분리한 자연돌연변이에 의한 것이다.

돌연변이균의 분리에는 이외에도 자외선, X선, γ 선, 등의 照射방법과 여러가지 變異誘起物質을 처리하는 방법이 있다. Jenkins¹⁰에 의하면 X선, 자외선, γ 선을 照射하는 방법보다 변이유기제 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)을 처리하는 것이 좋은 결과를 얻었다고 하며, Greenwich and Pantynkhina¹¹에 의하면, NTG는 缺失變異를 유발하기 때문에 點變異를 일으키는 자외선보다 변이유기율이 높다고 하였다.

또, 點變異에 의하여 얻어진 변이균주는 복귀변이가 쉽게 일어난다고는 Brock¹²는 보고하였다. NTG는 1960년 Mandell and Greenberg¹³가 최초로 사용하였고, 그후에 Adelberg¹⁴ 등은 *E. coli*에 NTG 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를, 15~30분 처리하여 가장 많은 수의 돌연변이 균주를 얻었고, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 처리균체의 75%가 사멸하였다고 보고하였다.

본 실험에서도 변이유기제 NTG를 사용하여 발효유제조에 사용하는 유산균의 phage 저항성 돌연변이 균주를 분리하고, 이것을 phage 오염시에 starter로 사용할 수 있는지, 그 특성을 검토하였기에 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

試驗菌株

발효유의 starter로 사용하고 있는 유산균 *Lactobacillus casei* YIT9018을 韓國야쿠르트연구소로부터 분양받아 시험균주로 사용하였다.

Phage株

돌연변이균의 phage에 대한 저항성을 시험하기 위하여 4종의 phage를 사용하였으며, 이들 phage의 분리원은 다음 표 1과 같다.

試驗菌培地

L. casei YIT9018의 보존에는 I. L. S. 배지¹⁵

Table 1. Sources of phages used.

Phage	Source
J ₁	Donated from Yakult institute, Japan
TK ₉₃	Isolated from Yakult Plant, Anyang, Korea, 1976
PD ₅	Isolated from Yakult Plant, Anyang, Korea, 1978
K ₁	Isolated from Yakult, Pyongtak, Korea, 1979

를 사용하였고, 菌의 증식에는 M. R. T. broth¹⁵를, 유산균의 생균수측정에는 B. C. P. 배지¹⁶를 사용하였다.

NTG처리용시험균배양

L. casei YIT9018에 NTG를 처리하기 위하여, M. R. T. broth에 시험균을 접종, 37°C에서 배양하여 $1 \times 10^8/\text{ml}$ 정도까지 증식한 신선한 것을 사용하였다.

NTG처리

NTG는 Wako pure chemical industries Ltd.의 제품을 사용하였다. 이 시약은 발암성물질이므로 사용시에는 손에 고무장갑을 끼고, 피펫은 면진한 것을 사용하였다. NTG stock solution은 0.1M citrate buffer (pH5.5)에 NTG 1mg/ml가 되도록 조제하고 균체처리시에는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하였다.

생균수 및 산도

생균수와 산도의 측정은 姜¹⁶ 등의 방법에 의하여 실시하였다.

實驗結果 및 考察

돌연변이균의 분리

M. R. T. broth 5ml에 *L. casei* YIT 9018을 접종하여, 37°C에서 4~5시간 배양후, 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 균체를 citrate buffer로 5ml씩, 3회세척한다. 여기서 얻은 균체에 4ml의 citrate buffer를 첨가, 현탁한 후, NTG stock solution 0.2ml를 주입하여, 37°C에서 30분간 배양한 후에, 원심분리하여 얻은 균

체를 5 ml의 phosphate buffer에 현탁, 세척하여 2 회 반복한다. 여기서 얻은 균체에 10 ml의 M. R. T. broth를 첨가, 현탁한 다음, 37°C에서 24 시간 배양한 것을 돌연변이 균액으로 하여, 이 균액을 M. R. T. agar에 streaking하여 48시간 배양한 후, 출현한 88개의 colony를 분리하여 phage 감수성 시험에 사용하였다.

돌연변이 균주의 Phage 感受性試驗

앞에서 분리한 돌연변이 균주의 phage에 대한 저항성 여부를 결정하기 위하여 spot test¹⁵⁾를 실시하였다.

분리한 88균주를 숙주균으로 하여, 4 종류의 phage를 감염시켜 본 결과, 4 종류의 phage에 대하여 저항성을 나타내는 것은 8 균주였으며, 이들을 각각 *L. casei* PR5, PR6, PR35, PR38, PR40, PR46, PR47, PR48로命名하였다. 이들 균주의 현미경적 세포형태⁶⁾는 Parent strain과 유사하였고, phage 저항성의 지속성을 1개월 간격으로 검정한 결과는 표 2와 같다. 즉 돌연변이균주 PR5, PR6, PR38, PR48은 분리 후 4개월까지 J₁ phage와 TK93 phage에 대하여 저항성을 나타냈으며, K₁ phage에 대하여 4

이들 4 종류의 phage에 대하여 4개월간 모두 저항성을 나타낸 균주는 PR38 하나뿐이었다.

분리 2개월째에 phage 저항성을 상실한 균주들은 복귀변이가 일어난 것으로 추측된다.

Phage 돌연변이균주의 생육

phage 저항변이균주를 발효유의 종균으로 사용하려면, 우유배지에서의 생육이 Parent Strain과 같아야 한다. 이것을 검토하기 위하여 10% 탈지환원유에 배양하면서 생균수의 변화를 조사하였다. 그 결과는 그림 1과 같다. Parent strain인 *L. casei* YIT9018의 생균수는 접종 3일째에 3.25×10^9 /ml에 도달하였으며 phage 저항돌연변이균주의 성장모양도 Parent strain과 비슷하였다. 전배양기간중에 있어서, *L. casei* YIT9018을 control로 하여 phage 저항균주간의 생균수를 最小有意差檢定(L. S. D.)을 한 결과, 1% 유의수준에서 유의차가 인정되지 않았다($p > 0.01$).

Table 2. Spot tests for phage resistance of *L. casei* mutants.

mutants	Phage interval (months)	Phage														
		J ₁ 0 2 4	TK93 0 2 4	PD5 0 2 4	K ₁ 0 2 4											
PR 5		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
PR 6		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PR35		+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
PR38		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PR40		+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
PR46		+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
PR47		+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PR48		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YIT 9018		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Resistant - : sensitive

개월간 저항성을 유지한 균주는 PR5, PR6, PR38, PR47, PR48이었고, PD5 phage에 대하여는 PR38, PR46, PR47이 4개월동안 저항성을 유지하였다.

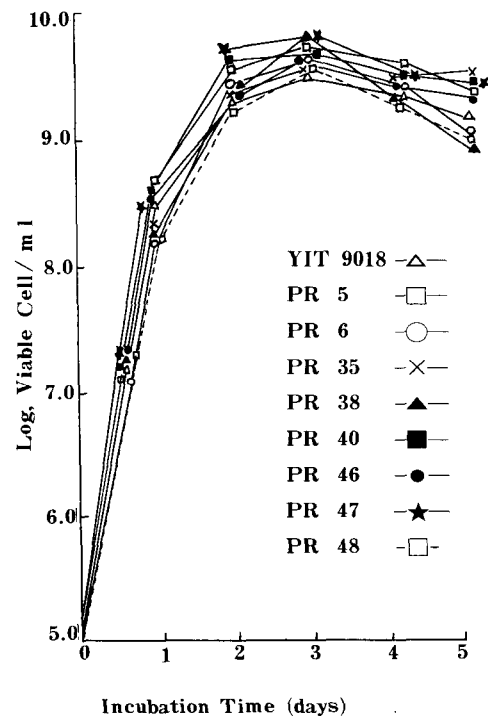


Fig. 1. Growth curves of *L. casei* YIT 9018 and Phage Resistant Mutants in Skim milk at 37°C.

Phage저항균주의 산생성력

발효유의 생산용균주로서 중요한 성질의 하나는 酸生成力이다. 종균의 산생성력이 일정한 수준에서 유지되지 않으면, 제품의 품질에 지장을 초래하게 된다.

phage 저항균주의 酸生成力을 시험하기 위하여 10%탈지 환원유에서 배양시험한 결과는 그림 2 와 같다.

이 그림에 나타난 것처럼, phage 저항변이균주의 산생성력은 Parent serain 과 비교하여 볼때 1% 수준에서 유의적인 차이가 없었다.

phage저항균주의 당발효시험

분리한 돌연변이균주가 당발효의 생리적성질에 있어서 parent strain 과 同一한가를 확인하여 위하여 다음과 같이 시험하였다. 즉, 포도당을 제외한 L. L. S. broth 2ml 에 지시약 chlorophenol red 0.004% 를 첨가하고 당의 최종농도를 6% 로 하기 위하여 당용액 1 ml 를 첨가하였다. 여기에 원심분리한 균체를 1 ml 증류수로 희석한 후, 1 백금이 씩 접종하였다. 이 실험의 결과는 표 3 과 같다. 이 표에 나타난 것과 같이 parent strain 과 돌연변이균의 당발효성이 동일하였으며, PR47은 methyl-D-glucose 를 분해하지 못하는 것으로 나타났다.

Phage저항균주의 耐酸性시험

L. casei YIT9018 은 발효유의 종균으로서 특히 내산성이 강하여 胃液에서도 사멸하지 않고

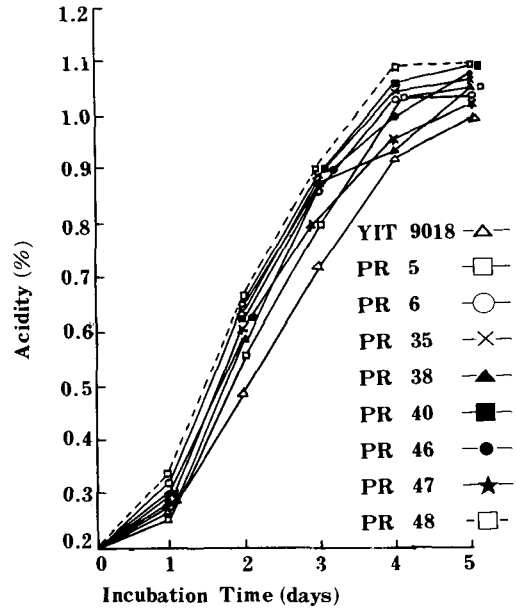


Fig. 2. Acid Formation by *L. casei* YIT 9018 and its Mutants in Skim milk

腸内に 도달하는 것으로 姜⁸ 등은 보고 하고 있다. 이와 같이, 발효유중의 유산균이 腸内に 정착하게 되면, 腸内有害細菌을 억제하는 등의 효과를 기대할수 있으므로 유산균의 耐酸性은 극히 중요시 되고 있다. 따라서, 본 실험에서 분리한 phage 저항돌연변이균주의 경우도 耐酸性이 parent strain 과 비교하여 어떠한지 검토할 필요가 있다. 이에 대한 실험을 위하여, pH2.0 의 0.1M HCl-KCl buffer 을 조제하여 인공위액의 내용으로 사용하였다.

Table 3. Utilization of Carbon Compounds by *L. casei* YIT9018 and its Mutants

mutants carbon source	PR 5	PR 6	PR 35	PR 38	PR 40	PR 46	PR 47	PR 48	YIT9018
Dextrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl-D-glucose	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : utilized

- : Not utilized

사람이 음식을 먹을 경우에 음식이 胃内に 머무르는 시간은 10분~3 시간 정도로 알려져 있으므로, 이와 같은 조건을 맞추기 위하여 시험균의 처리시간을 1.5시간과 3 시간으로 하였다. *L. casei* YIT9018을 control로 하여 실시한 이 실험의 결과는 그림 3에서 보는 바와 같다. 즉, *L. casei* YIT 9018은 완충액중에서 1.5 시간후에는 75%, 3 시간 후에는 73%의 생존율을 나타내었고, phage 저항균주의 경우에는 약간 낮은 생존율을 보였다. phage 저항 균주의 내산성을 증가시키는 문제는 별도로 검토해야 할 문제로 생각된다.

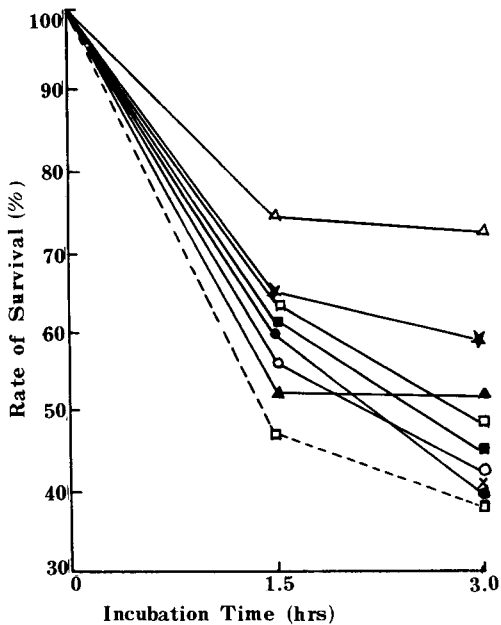


Fig. 3. Survival of *L. casei* YIT 9018 and its Mutants in Artificial Gastric Juice (PH 2.0)

YIT 9018—△—, PR 5—□—, PR 6—○—
PR 35—×—, PR 38—▲—, PR 40—■—,
PR 46—●—, PR 47—★—, PR 48—◻—

要 約

발효유 starter로서 사용하고 있는 유산균 *L. casei* YIT 9018을 NTG로 처리하여 4 종류의 phage (J₁, Tk93, PD5, K₁)에 대하여 저항성을 나타내는 8 개의 돌연변이균주(PR5, PR6,

PR35, PR38, PR46, PR47, PR48)를 분리하여, 酸生成力, 生育, 糖酸酵性, 耐酸性을 시험하였다.

Phage 저항균주 8 개중에서 특히 PR38은 4 종류의 phage에 대하여 4 개월동안 저항성을 유지하였고, 생육속도, 산생성력 등에 있어서 parent strain과 비교할때, 有意的인 차이가 없었고 (P>0.01), 인공위액에서의 耐酸性은 parent strain보다 약한 것으로 나타났다. 糖酸酵性에 있어서는 兩者 사이에 차이가 없었다.

본 실험에서 분리한 PR38은 발효유제조시에 phage가 감염되면, Parent strain 代用으로 사용할 수 있는 가능성이 제시되었다.

참 고 문 헌

- 1) 姜國熙, 白永振, 姜英燦, 金基元: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 5(1), 13-17 (1977)
- 2) 金永昌, 朴敏哲, 姜國熙, 尹永皓, 李光雄: *Kor. Jour. Microbiol.* 17(4), 165-178 (1979)
- 3) Whitehead, H. and G. A. Cox: *J. Dairy Res.* 7, 55 (1936)
- 4) Anderson, E. B. and L. J. Meanwell: *J. Dairy Res.* 13, 58 (1942)
- 5) Hunter, G. J. and H. R. Whitehead: *J. Dairy Res.* 16, 368 (1949)
- 6) Meanwell, L. J. and J. M. Symons: *Proc. 13 13th Int. Dairy Congr.* 3, 1109 (1953)
- 7) Czulak, J. and J. Naylor: *J. Dairy Res.* 23, 131-133 (1956)
- 8) Czulak, J., D. J. Bant, S. C. Blyth, and J. B. Crace: *Dairy Industries International Feb.* 44, 17-19 (1979)
- 9) Thunell, R. K., W. E. Sandine, and F. W. Bodyfelt: *J. Dairy Sci.* 64, 2270-2277 (1981)
- 10) Jenkins, J. B.: *Genetics*, Houghton Mifflin Co., 352-400 (1975)
- 11) Greenwich, A. G. and E. L. Pantynkhina: *Uzbekist Biol. Zh.* 5, 3-10 (1969)
- 12) Brock, T. D.: *Biology of Microorganisms*, 3rd ed, Prentice-Hall Inc. 350-373 (1979)
- 13) Mandell, J. and J. Greenberg: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 3, 575 (1960)

- 14) Adelberg, E. A., M. Mandell, and G. C. C. chen : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 788-795 (1965)
- 15) 姜國熙, 李京和, 朴基文, 劉溢濟, 金永昌 : 成大科學技術研究 10, 137-145 (1982)
- 16) 姜國熙, 李載英, 朴勇河, 白永振 : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 10(1), 9-14 (1982)