

***Lactobacillus casei* YIT 9018의 Mutants의 특성**

유선이 · 강현삼*

한국야쿠르트 연구소 *서울대 자연대학 미생물학과

**Characterization of the cured mutants of
*Lactobacillus casei***

Yoo Sunny · Hyen-Sam Kang*

Hankook Yakurt Institute, * Dept. of Microbiology, College of Natural Sciences,
Seoul National University

The cured mutant strains (CW, CSM, CEM, CAM) we obtained from *Lactobacillus casei* YIT 9018 spontaneously and by ethidium bromide treatments. The lactose fermenting ability of those mutants was tested and plasmid was found to have some functions in lactose metabolism. Plasmid (PLC) has been detected in *Lactobacillus casei* YIT 9018, but has not been detected in mutants CSM, CEM, CAM. These plasmid cured mutants showed a decrease in the ability to produce lactic acid from lactose.

발효유제품의 제조 과정에서 유산균의 주 기능은 lactose로부터 lactic acid를 생산하는 발효능이다. 따라서 유산균의 lactose 대사능의 안정성이 매우 중요시 되고 있는데, 실질적으로 유산균에 있어 이러한 특성이 불안정하여 자연 발생적으로, 또는 화학물질등에 의해 lactose 대사능이 저하된 mutant 들이 수시로 나타남에 따라 이에 대한 연구가 계속되어 왔다. 특히, 이와 같은 균의 변성이 plasmid DNA와 관련되어 있을 것이라 추정하고 plasmid에 관한 연구가 중점적으로 진행되어 왔다. 1974년 Cords등에 의해 *streptococci*에서 plasmid가 존재함이 최초로 확인되었고, 1976년 Efstathiou등이 *streptococcus lactis*에서 lactose 대사와 plasmid와 연관성이 있음을 보고한 이후 현재에 이르기 까지 유산구균에 있어 Lac⁺ plasmid의 존재를 확실시 해 줄 많은 연구가 있었다(Kempler 등, 1979; Walsh 등, 1981; Vaughan 등 1983). 반면, 유산간균의 경우는 plasmid분리상의 난점으로

인해 Chassy 등(1976)에 의해 plasmid 존재가 밝혀진 이래 Martin(1978), Klaenhammer (1980), Todd (1984) 등에 의한 몇편의 plasmid 분리에 대한 논문이 있었으며, Bruce 등(1978)에 의해 *Lactobacillus casei*에서 존재하는 plasmid 역시 lactose 대사에 관여하고 있음이 보고된 바 있다. 최근에 이르러서는 유산구균 뿐만 아니라 유산간균에서 까지 lac. plasmid의 cloning이 이루어지고 있으나(Douglas 등, 1984; Susan 등, 1984; Lee 등, 1985; Bruce 등, 1983), 국내에서는 아직까지 유산균에 대한 유전학적 연구는 초기 상태에 머무르고 있는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 *Lactobacillus casei* YIT 9018을 실험 균주로 선정하고 이 균주에 대해 lactose 대사능이 저하된 mutant들을 얻은 후 각 균주의 특성을 확인하였으며, plasmid를 분리 정제하여 나타나는 형상을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

실험 균주로는 *Lactobacillus casei* YIT 9018 을 사용하였으며, plasmid reference 균주로는 *Escherichia coli* V 517 (Francis 등, 1978) 을 사용하였다. 균주의 보존 및 種배양을 위한 배지로는 탈지유 및 Rogosa's broth (Efthiou 등, 1962) 를 썼고, mutant 선별을 위해서는 lactose indicator agar 및 백아한천 배지 (Sanae 등, 1983) 를 사용하였다. Lactose indicator agar 는 MRS 배지 (J. C. De Man 등, 1960) 에서 glucose 대신 lactose 를 첨가하고 indicator dye 로서 bromo cresol purple 을 0.004% 첨가하여 사용하였다. 또한 plasmid 분리를 위해서는 0.5% glycine 첨가된 TCM 배지 (beef extract 4.5 g, peptone 7.5g, yeast extract 5g, tween 80 1g, K_2HPO_4 3g, KH_2PO_4 1.5g, glucose 2g, glycine 5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5g, $MnSO_4$ 0.25 mg, 증류수 1l) 를 사용하였고, 항생물질에 대한 내성 실험에는 TSB 배지 (glucose 20g, trypticase peptone 15g, pytone peptone 5g, yeast extract 1g, Na-acetate 5g, 증류수 1l, pH 6.8) 를 사용하였다.

돌연변이 유발

자연 돌연변이는 계속되는 계대 과정 및 보존 과정에서 균주를 lactose indicator agar 에 도말하여 나타나는 colony 를 선별하였으며, 인공 돌연변이를 유발시키기 위해서는 ethidium bromide 및 acridine orange 를 사용하였다. mutagen 처리는 Bruce 등 (1978) 의 방법을 다소 수정하여, 계대 배양한 균액을 mutagen 첨가한 MRS broth 에 24시간씩 2 차례 옮겨 배양후 lactose indicator agar 에 도말하여 37°C 에서 48시간 배양한 후 나타나는 colony 를 선별하였다. 이렇게 선별된 colony 들은 각각 백아한천 배지에 picking 하여 확인하였다.

Lactose 대사능 측정

정상균주 및 mutant 들을 각각 계대 배양한 후 10% Difco skim milk 및 탄소원을 다르게 한 Rogosa's broth 에 각각 동량씩 접종하여 37°C 에서 배양하면서, 배양시간에 따른 유산 생성

정도를 pH 및 산도 측정하여 비교하였다. 또한 탄소원으로서 lactose, glucose, galactose 가 각각 주어진 때의 산 생성정도 차이를 보기 위해서 탄소원을 다르게 한 백아한천 고체 배지에 disc 를 놓고 각 균 배양액을 disc 위에 떨어뜨린 후 37°C 에서 60시간 배양하여 나타나는 clear zone 을 관찰하였다.

당 발효 시험

각 균주를 MRS broth 에서 15시간 배양하여 멸균 생리식염수로 씻어준 후 다시 식염수에 현탁시켰다. 당 발효 broth (glucose 2% MRS broth 에 chlorophenol red 0.04% 및 각 당을 2%씩 각각 첨가한 broth) 에 균 현탁액을 3 μ l 씩 접종하여 37°C 에서 2~3 일 배양후 결과를 확인하였다.

변이주의 항생물질에 대한 내성

TSB broth 에 streptomycin 을 비롯한 5 가지 항생제를 각각 농도별로 첨가한 후 각균 배양액을 동량 접종하여 37°C 에서 15시간 배양후 균의 성장 유무로 minimum inhibitory concentration 을 정하였다.

Plasmid DNA 의 분리 및 정제

0.5% glycine 첨가한 TCM broth 40ml 에 계대 배양한 균액을 0.05% 접종하고 37°C 에서 15시간 배양후 균체 수확하여 TES buffer (T. R. Klaenhammer 등, 1978) 로 씻어준후 STE buffer (Dougial 등, 1983) 에 현탁시켰다. 균 현탁액에 N-acetylmuramidase 25 μ g/ml, egg white lysozyme 5mg/ml 되게 가하여 37°C 에서 20분 반응시킨후 SDS 를 최종농도 1% 되게 처리하여 cell lysis 를 시켰다. 이렇게 하여 얻어진 lysate 로 부터 plasmid DNA 의 분리, 정제는 Dougial 등 (1983) 의 방법에 따랐고 최종적으로 얻어진 DNA 침전은 40 μ l TE buffer 에 녹여 회수하였다. 다량분리를 위해서는 2l TCM broth 에 균체 배양후 Dougial 방법에 따라 얻어진 DNA 침전을 최종적으로 9ml TE buffer 에 녹여 CsCl-EtBr 초원심분리하여 T. Maniatis 등 에 의해 서술된 일반적인 방법을 이용하여 plasmid DNA 만 순수분리 정제하였다.

전기영동은 0.6% agarose gel 에 DNA 용액 20 μ l 를 넣고 100-150V 의 전압으로 3~5 시간

전기영동 시킨 후 EtBr 용액(최종농도 1 µg/ml)에 염색한 후 U. V. 조사하여 나타나는 band를 확인하였다.

결과 및 고찰

변이주의 선별

L. casei YIT 9018로부터 4종의 mutants를 얻었다(Table 1). 모균을 편의상 CS라 명명하고, 얻어진 mutants를 각각 CW, CSM, CEM, CAM이라 strain No. 를 붙였다. CS를 계속 계대해 나가는 과정에서 CW를 얻었으며 mutant CSM은 CS를 동결 건조하여 보존하는 과정에서 얻었다. 또한, CEM, CAM은 mutagen 처리함으로써 얻을 수 있었다.

Lactose 대사능

유당 대사능을 측정하기 위하여 탈지유 및 Rogosa's broth에서의 배양시간에 따른 유산 생성량을 비교한 결과는 Fig. 1 과 Table 2에 제시하였다. 탈지유 및 탄소원으로 lactose 첨가한 Rogosa's broth에서 배양하였을 때, CSM, CEM, CAM 등은 lactic acid 생성량이 현격히 저하됨을 나타냈으며 CW의 경우도 CS에 비해 다소 떨어짐을 확인하였다. 반면, 탄소원으로 glucose 첨가한 Rogosa's broth에 배양한 경우엔 4종의 mutants 모두 CS와 거의 동일한 수준으로 유산 생성을 하였다. 또한 백아한천 고체 배지에서의 clear zone 정도를 비교한 결과 lactose배지에서는 뚜렷한 차이를 보였으나 lactose분해 산물인 glucose와 gala-

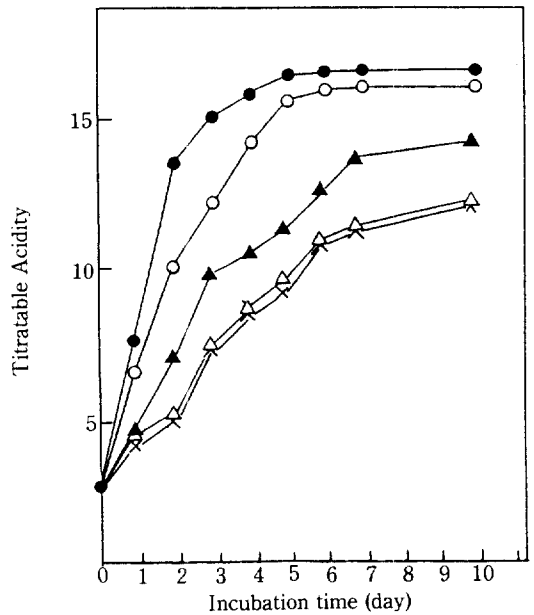


Fig. 1. Titratable Acidity in 10% Difco skim milk (●) CS (○) CW (×) CSM (▲) CEM (△) CAM
*Titratable Acidity: Volume in ml of 0.1 N NaOH needed to neutralize 10g of sample

ctose 배지에서는 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2). 이와 같은 결과로부터, 실험에서 얻어진 mutant들은 lactose가 cell membrane을 통과해 세포내로 들어가는 과정이나, 또는 들어온 lactose를 glucose와 galactose로 분해하는 능

Table 2. Acid production in Rogosa's broth

| medium | incubation time (hr.) strain | pH | | | |
|--------|---------------------------------|------|------|------|------|
| | | 0 | 10 | 24 | 48 |
| RL | CS | 6.47 | 6.25 | 3.83 | 3.72 |
| | CW | 6.47 | 6.30 | 3.98 | 3.75 |
| | CSM | 6.47 | 6.30 | 5.82 | 5.42 |
| | CEM | 6.47 | 6.31 | 5.75 | 3.87 |
| | CAM | 6.47 | 6.32 | 5.90 | 5.59 |
| RG | CS | 6.23 | 6.01 | 3.72 | 3.59 |
| | CW | 6.23 | 6.02 | 3.71 | 3.61 |
| | CSM | 6.23 | 6.02 | 3.72 | 3.60 |
| | CEM | 6.23 | 6.00 | 3.72 | 3.59 |
| | CAM | 6.23 | 6.04 | 3.73 | 3.59 |

* medium : RL...Rogosa's broth-glucose + lactose
RG...Rogosa's broth

Table 1. The mutant strains obtained from *L. casei* YIT 9018

| strain No. | |
|------------|--|
| CS | <i>Lactobacillus casei</i> YIT 9018 |
| CW | Spontaneous mutant 1 of <i>L. casei</i> YIT 9018 |
| CSM | Spontaneous mutant 2 of <i>L. casei</i> YIT 9018 |
| CEM | Induced mutant 1 of <i>L. casei</i> YIT 9018 *Mutagen: Ethidium bromide 10 µg/ml |
| CAM | Induced mutant 2 of <i>L. casei</i> YIT 9018 *Mutagen: Acridine orange 15.5 µg/ml |

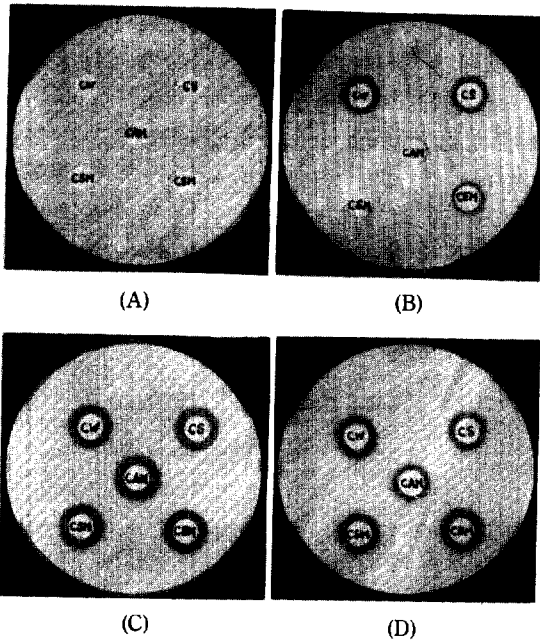


Fig. 2. Detection of fermentation abilities of carbohydrates by *Lactobacillus casei* YIT 9018 & mutants on agar plate (A) control: not added carbohydrate agar plate (B) Lactose agar plate (C) Glucose agar plate (D) Galactose agar plate *incubation condition: 37°C, 60 hr.

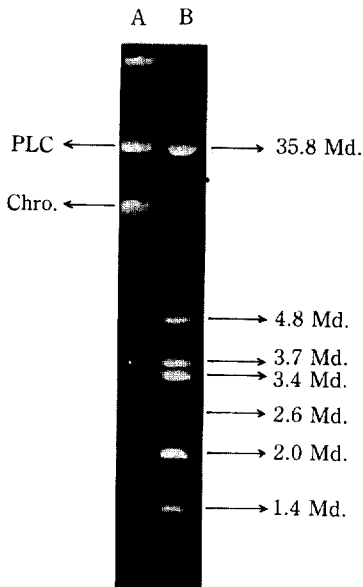


Fig. 3. Relative electrophoresis mobility on agarose gels of *L. casei* YIT 9018 plasmid DNA (A) *L. casei* YIT 9018 (B) *Escherichia coli* V517

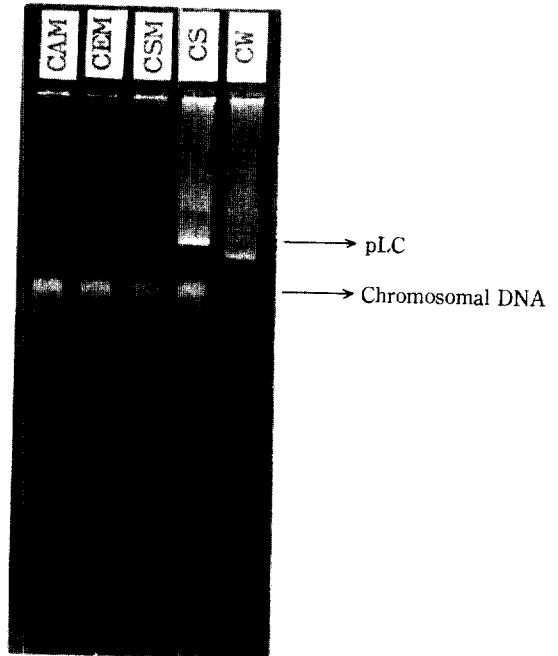


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from *L. casei* YIT 9018 & mutants

력에 결함이 생겨 lactose 대사능이 저하됨을 추정할 수 있겠다.

항생물질에 대한 내성 및 당 발효

lactose를 비롯한 13가지 당에 대한 발효능 시험 결과 lactose이동에 있어서만 mutants의 발효 시간이 지연되었으며 그외의 당에 대해서는 5 균주 모두 동일한 결과를 나타냈다. 또한 항생제로서 streptomycin, kanamycin, paromomycin, neomycin, gentamycin에 대한 MIC 측정 결과 정상균주와 mutants의 내성 차이가 없었다.

Plasmid 분리 및 전기영동

CS의 plasmid를 분리하여 reference로서 *E. coli* V517로부터 추출한 plasmid와 같이 전기영동하여 나타나는 DNA band를 확인한 결과 35.8Md이상의 큰 크기의 plasmid가 CS에 존재함을 확인하고, 이를 pLC라 명명하였다(Fig. 3.). 또한 실험에서 얻어진 4종의 mutants의 plasmid를 분리하여 CS로부터 분리한 plasmid와 함께 전기영동하여 나타나는 형태를 비교한 결과, CW의 경우는 pLC가 다소 deletion되어 약간의 mobility 차이를 나타냈으며 CSM,

CEM, CAM의 경우는 pLC가 완전 소실되어 있음을 확인하였다 (Fig. 4).

이상의 결과로부터, 얻어진 mutants들의 lactose 대사능의 저하와 유전적인 결함을 확인하였다. 따라서, *L. casei* YIT 9018이 지니고 있는 plasmid (pLC)는 시험된 항생제에 대한 내성 및 lactose 이외의 당에 대한 발효능과는 무관하나, lactose 대사에는 관여하고 있음을 추정할 수 있겠다. 또한 plasmid가 소실된 mutants의 경우에도 완전한 Lac⁻는 되지 않는 점으로 미루어 lactose 대사에 필요한 대부분의

gene은 chromosomal DNA 상에 존재하고 있을 가능성이 높다 하겠다. 물론, pLC가 lactose 대사에 관여하고 있음을 입증하기 위해서 plasmid 소실된 mutant cell 내에 CS로부터 분리, 정제한 pLC를 집어 넣어 lactose 대사능이 회복됨을 확인하는 실험이 뒷받침 되어야 하겠으나, 아직까지 유산균에 있어서의 transformation system이 정립되어 있지 않은 상태이므로 이에 대한 보완적인 연구를 앞으로 진행시켜야 할 것이다.

적 요

L. casei YIT 9018은 자연적으로, 또는 mutagen 처리하여 plasmid DNA가 curing 또는 deletion 되었으며, 이러한 유전적 결함이 생긴 mutants는 다음과 같은 특성을 나타냈다.

1) 탄소원으로 lactose가 주어졌을 때 mutants의 유산 생성능이 현저히 저하되었다. 2) 탄소원으로 glucose 및 galactose 첨가시엔 유산 생성 정도가 정상균주와 큰 차이가 없었다. 3) 5가지 항생제에 대한 내성 및 lactose 이외의 당에 대한 발효능 시험 결과 정상과 차이가 없었다.

감사의 말

본 연구에 도움을 주신 오 상진씨와 한국 야쿠르트 연구소 윤 쾌병 소장님의 배려에 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. B.R. Cords, L.L. McKay and Patricia Guerry, 1974. Extrachromosomal elements in group N streptococci. *J. Bacteriol.* **117**: 1149-1152
2. Bruce, M. Chassy, Lyang Ja Lee, Jeffrey B. Hansen, 1983. Molecular cloning of *Lactobacillus casei* lactose metabolic genes. *Dev. Ind. Microbiol.* **24**: 97-108
3. Chassy, B.M., E. Gibson, and A. Giuffrida, 1976. Evidence for extrachromosomal elements in *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* **127**: 1576-1578
4. Dougial, G. Anderson and L.L. McKay, 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA FROM *Lactic streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 549-552
5. Douglas, G, Anderson and L.L. McKay, 1984. In vivo cloning of *lac* genes in *Streptococcus lactis* ML 3. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 245-249
6. Efthyiou, C. and Hansen, P.A., 1962. An antigenic analysis of *L. acidophilus*. *J. Infect. Dis.* **110**: 258-267
7. Frances L. Macrina, Dennis J. Kopecko. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: Convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* **1**: 417-420
8. J.C. De Man, M. Rogosa, and M. Elisabeth Sharpe, 1960. A Medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135
9. J.D. Efstathiou and L.L. McKay, 1976. Plasmids in *Streptococcus lactis*: Evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 38-44
10. Kempler, G.M., and L.L. McKay, 1979. Genetic evidence for plasmid linked lactose metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 1041-1043
11. Lyang-Ja Lee Wickner and Bruce M. Chassy, 1985. Characterization and Molecular cloning of cryptic plasmids isolated from *Lactobacillus*

- casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **7**, 245-249
12. Martin, B. Smiley and Vincent Fryder, 1978. Plasmids, lactic acid production, and N-acetyl-D-Glucosamine fermentation in *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 777-781.
 13. Susan, L. Harlander, Larry L. McKay and Charles F. Schachtele. 1984. Molecular cloning of the Lactose-metabolizing genes from *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 347-351
 14. Sanae Okada, Tai Uchimura, Naohira Ohara and Michio Kozaki. 1983. A new method of sugar fermentation of Lactic Acid Bacteria. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **57**: 227-230
 15. T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sanbrook. Molecular cloning: A Laboratory Manual.
 16. Tood, R. Klaenhammer 1984. A general method for plasmid isolation in *Lactobacilli*. *Current Microbiology* **10**: 23-28
 17. T.R. Klaenhammer, L.L. McKay and K.A. Baldwin 1978. Improved lysis of Group N *Streptococci* for isolation and rapid characterization of Plasmid deoxyribonucleic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 592-600
 18. T.R. Klaenhammer and S.M. Sutherland 1980. Detection of plasmid deoxyribonucleic acid in an isolate of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 671-674
 19. Vaughan, L. Crow, Graham P. Davey *et al.* 1983. Plasmid linkage of the D-Tagatose-6-Phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: Effect on Lactose and Galactose metabolism. *J. Bacteriol.* **153**: 73-83
 20. Walch, P.M., and L.L. McKay. 1981. Recombinant plasmid associated with cell aggregation and high-frequency conjugation of *Streptococcus lactis* ML3 *J. Bacteriol.* **146**: 937-944

(Received August 3, 1985)