

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* ATCC 11602-A1의 Bacteriophage 저항성 기작에 관한 연구

이춘화 · 배인휴^{1*}

성균관대학교 낙농학과, ¹순천대학교 축산학과

Characteristics of the Bacteriophage Resistance Mechanism of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602-A1

Lee, Chun-Hwa and In-Hyu Bae^{1*}

Department of Dairy Science, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

¹Department of Animal Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract— The characteristics of the bacteriophage resistant *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602-A1, the phage-resistant mutant of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602, was examined. Electron microscopic study of phage adsorption to A1 revealed that after 10 min. incubation of the host-phage mixture, A1 did not show phage adsorption, and after 60 min. did not show a real burst and the release of new phage particles which could be detected in the mixture of its parent strain and phage. However, the phage adsorption rate of A1 after SDS treatment increased to 98%. Moreover, when the cell walls from A1 and parent strain, and the polysaccharide(PS) and peptidoglycan(PG) of their cell wall were mixed with phage and incubated for 15 min., PS and PG from A1 did not bind phage, but only SDS-treated cell wall bound phage, and the cell wall and PS of parent strain bound phage. Both A1 and parent strain treated with 0.2 N HCl- and 5% TCA(100°C) did not bind phage. The results suggest that the phage receptor is still present in the cell wall of the A1, but a cell wall constituent hydrolyzed by SDS blocks phage adsorption by masking the phage receptor. It also suggests that the phage receptor of parent strain is associated with PS of the cell wall.

발효 유제품 제조에 있어서 lactococci는 주요 스타터로 사용되고 있으나 이에 대한 bacteriophage (phage) 오염은 제품제조상 빈번한 발효 실패를 가져오므로 유가공 산업에서는 심각한 문제가 되고 있다.

Lactococci의 phage가 Whitehead와 Cox(1)에 의해 보고된 이래 이들의 phage 내성 변이주가 발견되어 산업적 실용화 노력이 꾸준히 진행되어 왔다(2). Phage 내성변이주의 상업화를 시도하는 노력의 일환으로 phage 내성 변이주가 갖는 내성기작을 규명하려는 여러 연구보고(3, 4)가 있었다.

지금까지 제기된 phage 내성변이주에 있어서 내성 기작의 하나는 숙주의 phage 흡착부위에서 일어난 변화에 기인하는 것으로서 phage 흡착부의 생화학적

구성분이 phage 감수성균과는 다르게 구성되어 있다는 것이다.

Lactococci의 phage 흡착부위에 관하여는 1968년에 Oram과 Reiter(5)가 처음으로 보고하였는데 후에 Oram(6)은 *Streptococcus lactis* ML3의 경우에는 phage가 세포의 원형질막에 흡착한다는 것을 발견하였다. Vlegels 등(7)은 phage 내성 변이주들의 내성 기작은 non-peptidoglycan polymer에 의한 흡착부의 가리워짐(shielding)이라고 하였고, 임 등(8)은 phage 내성균주, *L. casei* LM1의 세포벽 외부에 capsule층이 존재하여 phage 흡착을 방해한다고 보고하였다. Sijtsma 등(9)은 phage 감수성균주와 내성균주의 phage 흡착부에서의 차이점은 phage가 숙주의 흡착부에 접근하기 어려움(inaccessibility)이라 하는 숙주의 phage에 대한 어떤 차단작용을 보고한 바 있다.

본 연구는 전보(10)에서 밝힌 바와 같이 *L. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602의 phage 내성변이주인

Key words: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, phage resistance, phage receptor

*Corresponding author

A1의 phage 내성기작이 세포벽 성분과 연관이 있음을 확인하고 모균주와 A1간의 세포벽 구성의 차이를 규명하여 그 내성 기작을 밝히고자 수행되었다.

재료 및 방법

미생물 및 phage

본 시험에 사용한 유산균과 phage는 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 및 동종 phage Hp ATCC-B1으로써 ATCC로부터 분양받았으며 phage 내성균주인 A1은 acridine orange(AO)를 처리하여 얻었다(10). 시험균과 phage는 M17 배지(11)를 사용하여 30°C에서 배양한 뒤 4°C에 냉장보관하며 사용하였다.

전자 현미경 관찰

주사 전자 현미경(Scanning Electron Microscopy, SEM) : 18시간 증균한 배양액(M17 배지 30°C)을 2% glutaraldehyde로 slide glass에 고정한 다음 sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 3회 세척한 후 냉동 건조하고 gold coating한 다음 SEM으로 관찰, 촬영하였다.

투시 전자 현미경(Transmission Electron Microscopy, TEM) : 18시간 증균한 배양액(M17 배지 30°C) 0.1 ml에 phage(10^9 pfu/ml) 0.2 ml와 20 mM $CaCl_2$ 를 혼합한 후 phage 흡착 여부를 검사하기 위해 30°C에 10분간 배양한 후 시료를 취하여 negative 염색 후 전자현미경으로 관찰하였고, 세포내 phage 증식을 위해 60분 배양 후 시료를 취해 Epon mixture에 embedding하여 ultramicrotome으로 절단하여 전자현미경으로 관찰하였다(12, 13).

세포의 화학적 처리

대수증식기의 세포에 SDS(1%, 30분, 45°C), trypsin (1.5 mg/ml, 30분, 37°C), proteinase K(1.5 mg/ml, 30분, 37°C), α -amylase(0.5 mg/ml, 60분, 37°C), HCl(0.2 N, 0.05 N, 30분, 100°C), NaOH(0.05 M, 30분, 22°C), trichloroacetic acid(TCA, 5%, 30분, 60°C 또는 100°C)를 처리하여 원심분리하고 phosphate buffer(10 mM, pH 6.8)로 세척하여 동 buffer에 현탁하였다(14).

세포벽 성분에 의한 phage의 불활성화

세포벽의 분리 : 세포벽은 Sijtsma 등(9)의 방법에 따라 대수 증식기의 세포를 수거하고 증류수로 세척하여 phosphate buffer(10 mM, pH 6.8, 4°C)에 현탁하고 냉각시킨 French press(22,000 lb/in²)를 3번 통과시켜 세포를 완전히 파쇄하였다. 그 용출액을 3,000

×g로 10분 원심분리하여 비파쇄세포와 파쇄 잔유물을 제거하고 그 상등액을 다시 20,000×g로 원심분리한 후 침전한 세포벽을 동결건조하여 실험에 사용하였다. 세포벽 성분의 phage 흡착 억제효과를 시험하기 위하여 세포벽 1 mg과 phage 희석액(10^7 pfu/ml)을 Tris-HCl(20 mM $CaCl_2$ 함유) buffer에서 30°C, 15분 동안 예비 배양한 후 그 혼합물의 phage 수를 측정하였다. 불활성화율(% inactivation)은 세포벽을 첨가하지 않은 대조구와 비교했을 때 감소된 phage 수로 나타냈다(9).

Peptidoglycan(PG)과 polysaccharide(PS)의 분리 : 세포벽(300 mg)을 5% TCA 50 ml로 90°C에서 15분 처리하고 냉각시킨 후 11,000×g에서 15분간 원심분리하여 peptidoglycan이 함유된 TCA-insoluble 침전물을 얻었다. 그 침전물을 5% TCA로 한번 세척한 다음 증류수로 세척하고 동결건조하여 이를 PG로 사용하였고, TCA-soluble 상등액에 9배의 에탄올을 첨가하여 4°C에서 18시간 정치한 후 원심분리하여 PS를 함유한 침전물을 에탄올로 씻은 다음 동결건조하여 이를 PS로 사용하였다(15).

PS와 PG의 phage 흡착 억제 효과를 시험하기 위해 Tris-HCl(20 mM $CaCl_2$ 함유) buffer에 현탁한 PS와 PG에 phage 희석액(10^7 PFU/ml)을 혼합하여 30°C에서 60분 동안 예비 배양한 후 그 혼합물의 phage 수를 측정하여 불활성화율(% inactivation)을 측정하였다.

결과 및 고찰

전자 현미경 관찰

전자 현미경에 의한 phage 내성균주 A1의 형태적 특성과 phage와의 관계를 검사하기 위해 시험균주를 주사현미경으로 관찰한 결과(Fig. 1), 외형상의 차이는 없었고 세포 크기에 있어서 A1이 모균주 보다 약간 작게 관찰되었다. 세포의 밀집정도로 보아 A1이 더 높은 밀집성을 보여 모균주 보다 빠른 세포분열을 보였다. 임 등(8)에 의한 전자현미경 관찰에 의하면 *L. casei* LM-1(phage 내성균주)과 모균주와는 외형상의 차이는 없었고 세포 크기에서는 LM-1이 약간 큰 것으로 보고되었다. Phage 흡착을 negative 염색한 결과(Fig. 2), 모균주의 세포벽에는 phage가 흡착되었으나 A1에는 phage가 전혀 흡착하지 않았다. Phage 흡착 10분 후와 60분 후의 세포를 TEM으로 관찰한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. Phage와 세포를 혼합한 10분 후 모균주에서는 이미 phage 두부가 나타났으나 A1에서는 아무런 변화가 나타나지 않았다. Phage 흡착 60분 후에 모균주에서는 용균이 일

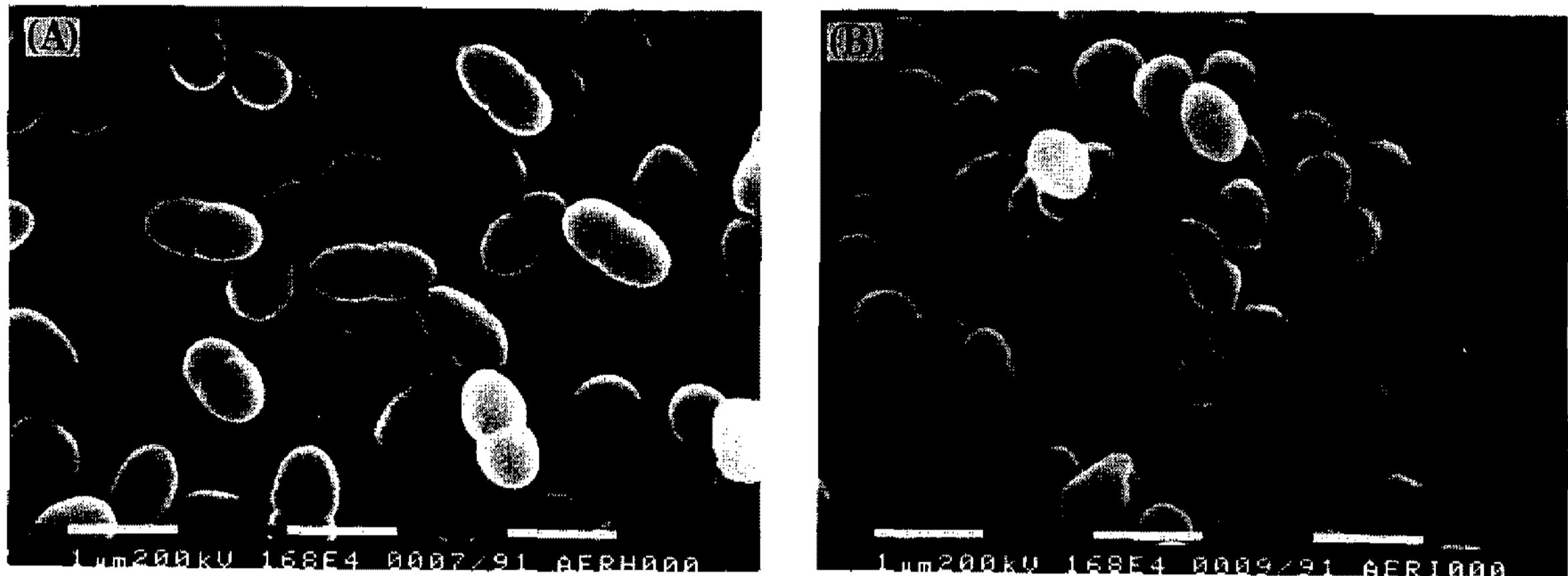


Fig. 1. Scanning electron micrographs of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 (A) and A1 (B).

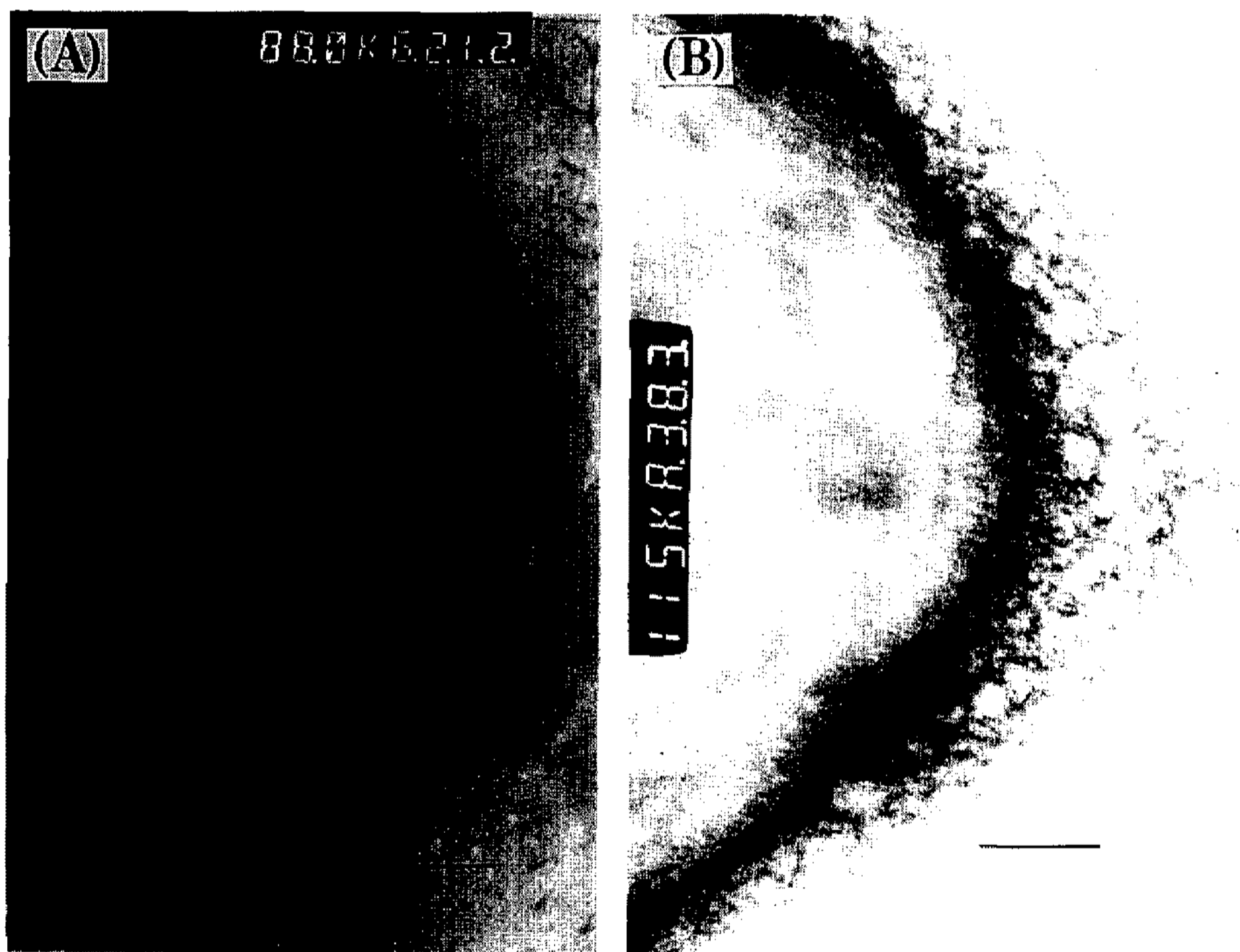


Fig. 2. Negative stained electron micrographs of phage adsorbed to the cell walls of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 (A) and A1 (B).
Bar on figures represent 100 nm.

어나 새로운 phage 방출이 관찰되었으나 A1은 원래의 세포모양 그대로를 유지하고 있었다.

이상의 결과에 따라 phage 내성균주 A1과 모균주의 세포벽은 그 구조상 차이가 있음을 알 수 있었고 이 차이에 의해 A1의 phage 흡착이 억제되는 원인으로 작용하고 있음을 추정할 수 있었다. 이러한 A1의 세포벽 구성의 차이는 phage 흡착성에 영향을 미칠 것으로 보이며, 임 등(8)은 phage 내성 균주의 세포벽 외부에 capsule층이 존재하여 phage 흡착을 방해한다고 보고하였다.

위 전자현미경 관찰 결과에 따르면 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602의 동종의 phage HP의 두부는

길이와 너비가 같았으며 미부는 길고 유연성이 있는 것으로 나타났다.

Phage가 숙주의 세포벽에 흡착하는 데는 2가 양이온을 요구한다. 이것은 phage 흡착 초기 단계의 기작에 중요한 의미를 갖는다. 따라서 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602에 대한 phage 흡착에 몇가지 2가 양이온들의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다.

먼저 Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} 은 phage 흡착율을 90% 이상으로 나타냈고 Zn^{++} 은 68%, Na^{++} 은 40%의 흡착율을 나타냈으며 2가 이온을 첨가하지 않는 경우에는 phage가 흡착되지 않았다. *Streptococcus faeca-*

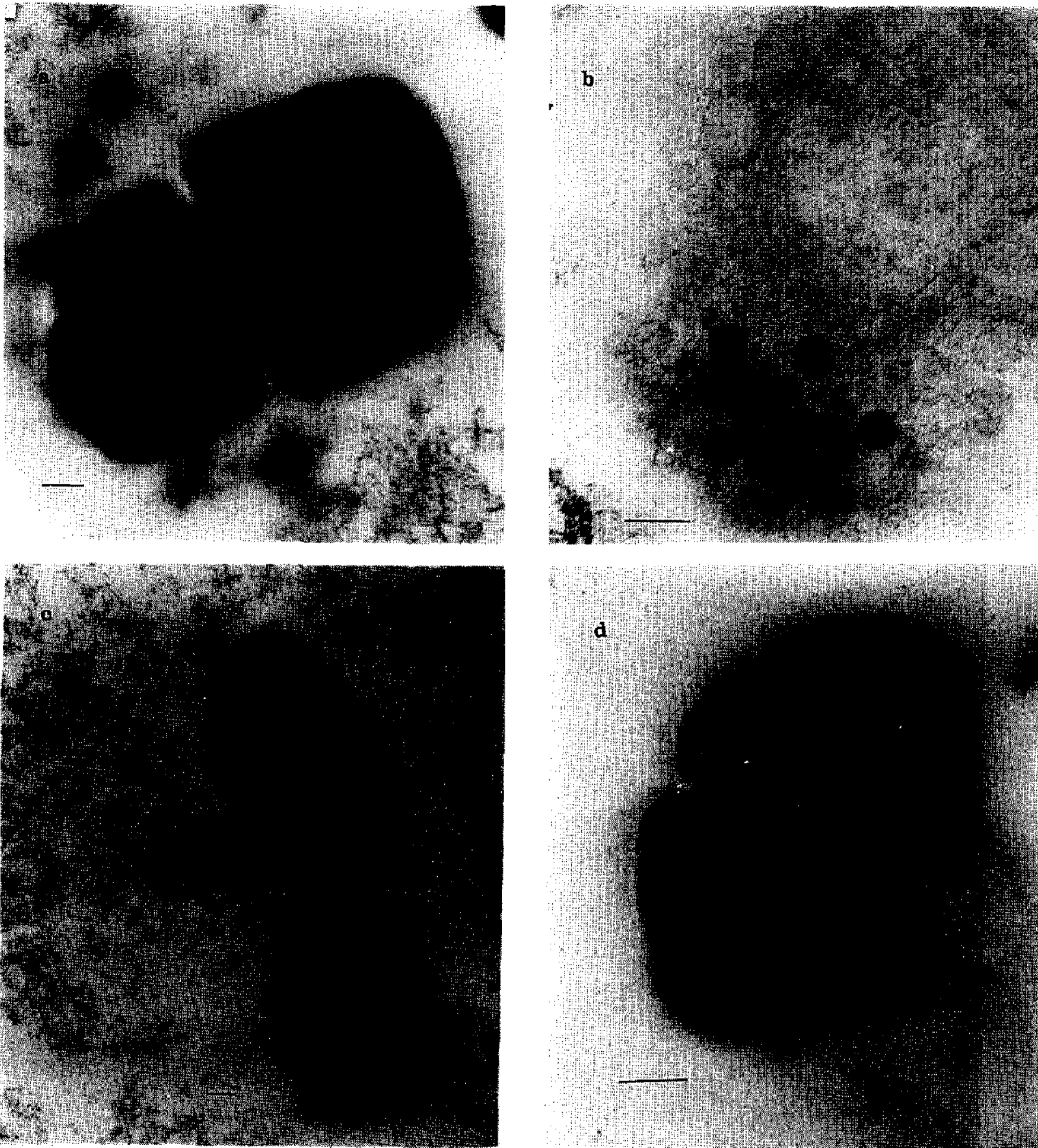


Fig. 3. Transmission electron micrographs of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and A1 at 10 min (a, c) and 60 min (b, d) after incubated with phage. Bar on figures represent 100 nm.

*lis*에 있어서 bacteriophage ATCC 29200의 흡착은 Ca^{++} , Mg^{++} 존재시에만 촉진되고 그 외의 2가 이온들에 의해서는 오히려 흡착이 억제되었고(16), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* KH에 있어서 Ca^{++} , Co^{++} , Zn^{++} 을 첨가하는 경우 phage 흡착율이 90% 이상, Mg^{++} , Mn^{++} 의 경우는 80% 이상으로 나타났다(17). 본 실험에서도 2가 이온이 phage 흡착에 요구되고 있음을 알 수 있었는데 특히 Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} 이 필수적인 양이온이었다.

Phage 흡착 특성의 가역 또는 비가역적 흡착 여부를 확인하기 위해 세포벽과 phage를 혼합한 후 원심분리 전후의 용균 반점 수를 세어본 결과 이

phage는 비가역적 흡착을 하며 비가역율은 98.5%로 나타났다. 즉 원심분리 전과 후의 phage 용균 반점 수가 같게 나타났다. 여기서 만약 가역적 이었다면 원심분리하지 않은 혼합물에서 더 많은 용균 반점이 생성되었을 것이다. 이에 대한 확실한 증거는 Fig. 5에서 나타난 바와 같다. Phage를 세포벽에 흡착시킨 후 원심분리하여 모아진 phage와 세포벽 혼합물을 buffer에 현탁한 후에도 phage 수의 증가는 나타나지 않았다. 이로써 본 phage의 흡착성은 비가역적임을 알 수 있었다.

세포의 화학적 처리

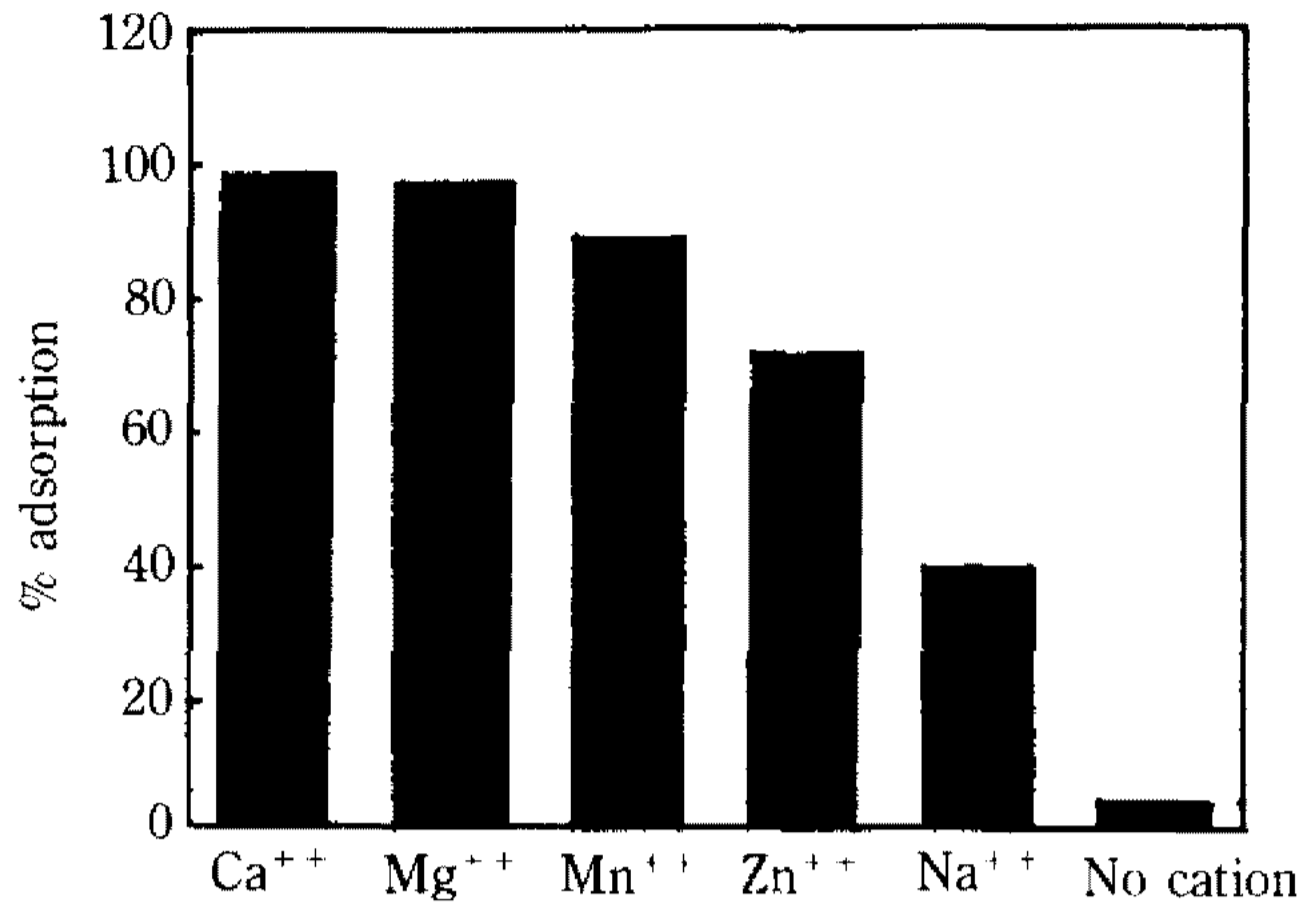


Fig. 4. Effects of cations on phage binding to the cell wall. Cell walls (200 µg/ml) were incubated with phage (10⁸ PFU/ml) in the absence or presence of 15 Mm Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺, or Na⁺⁺. The mixtures were centrifuged and assayed for the titer of phage in the supernatant.

Lc. lactis subsp. *cremoris* ATCC 11602와 phage 내성 변이주 A1의 phage 흡착부위와 세포벽 구성성분과의 관련성을 밝히기 위해 전세포를 화학적으로 처리한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

공시균주 모두 HCl(0.05 N)과 TCA(5%, 60°C) 처리시 phage 흡착율에 변화가 없었으나 1% SDS 처리시는 모균주와 A1의 phage 흡착율은 각각 99%, 98%로 A1 흡착율에 큰 변화가 나타났다. 0.05 M NaOH 처리에 의해서는 A1의 흡착율은 40.5%였다. 그람양성 균의 세포벽 성분 중 teichoic 산은 phage 흡착부로서 알려져 있는데(18), 공시균주들의 세포벽에 teichoic 산이 존재하는지를 확인하기 위해 세포벽의 teichoic 산을 제거하는 방법으로 세포벽을 5% TCA로 60°C 에서 처리한 후 phage 흡착성을 조사한 결과 phage 흡착율에는 변화가 없었다. 이로써 세포벽에 teichoic 산이 존재하지 않음을 알 수 있었다. α-amylase, trypsin 및 proteinase K 처리시 모균주와 A1의 phage 흡착율에는 아무런 변화가 나타나지 않았다. 이로써 모균주와 A1의 세포벽은 이들 효소에 의해 분해되지 않는 물질로 구성되어 있다고 추정할 수 있었다. 반면 모균주는 강산성 물질(0.2 N HCl, 5% TCA 100°C)에 의해 흡착율이 0%로 감소된 것으로 보아 phage 흡착부위는 산 가수분해물인 탄수화물과는 관련이 있으나 단백질과는 관련이 없음을 알 수 있었고, A1은 SDS에 의해 흡착율이 98%로 증가된 것으로 보아 phage 흡착부위가 SDS 분해성의 어떤 물질에 의해 가려져 있음을 알 수 있었다. 전보(10)에 의해서도 A1의 세포벽의 흡착부위가 SDS에 의해

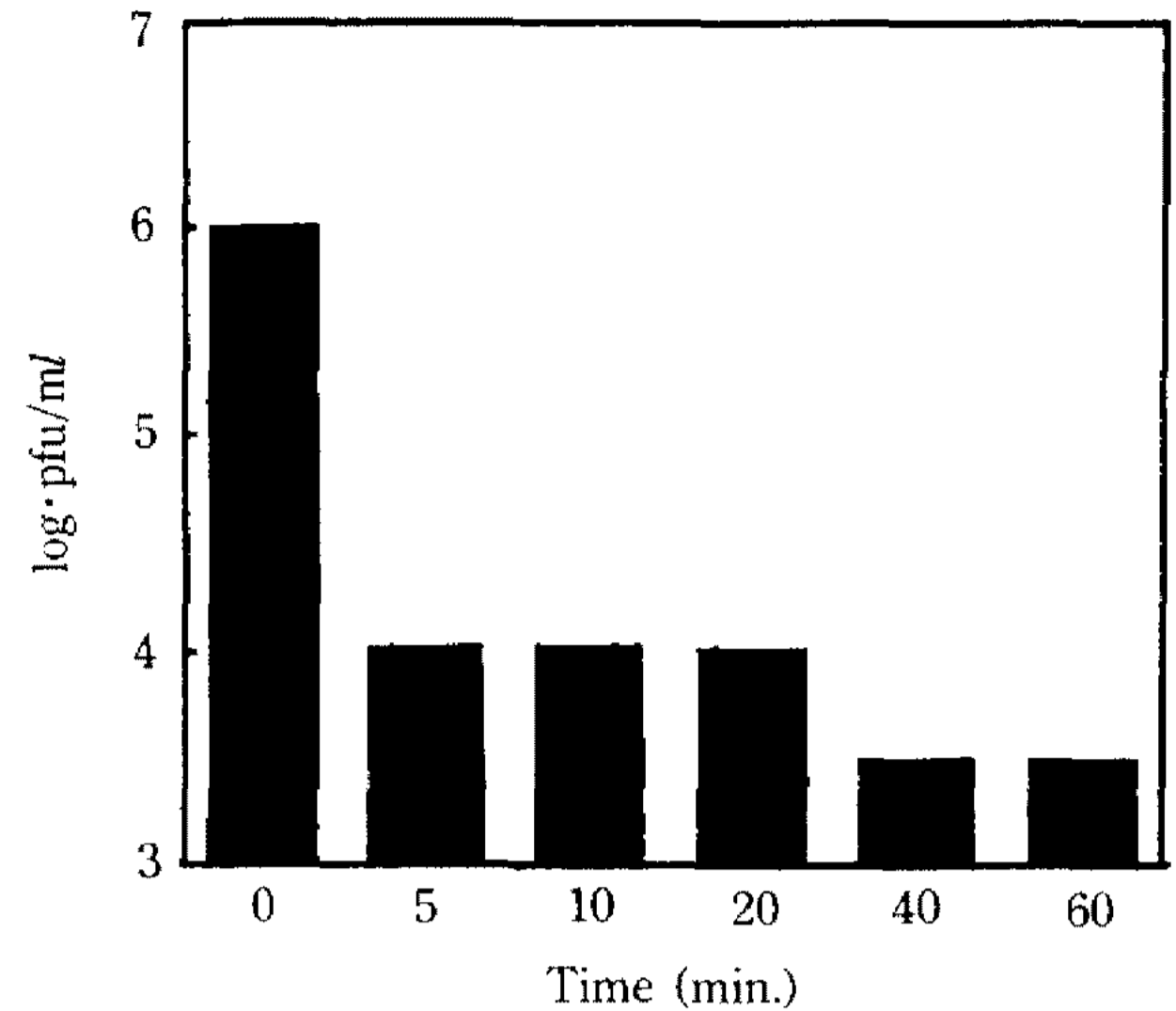


Fig. 5. Irreversibility of phage binding to the cell wall. Cell wall (400 µg/ml) mixed with phage (10⁸ PFU/ml) and 15 mM CaCl₂ were incubated for 15 min and centrifuged.

The supernatants were removed, and the pellets were suspended in 1 ml of 50 mM Tris-HCl pH 6.8. The amount of infectious phage was assayed at the indicated times after suspension.

Table 1. Effects of chemical treatment on adsorption of phage to *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and A1

pretreatment	phage adsorption(%)	
	11602	A1
None	98	0
SDS(1%)	99	98
α-amylase(0.5 mg/ml)	91	0
Trypsin(1.5 ml/ml)	95	0
Proteinase K(1.5 mg/ml)	96	0
HCl(0.2 N)	0	0
HCl(0.05 N)	99	0
NaOH(0.05 M)	93	40.5
TCA(5%, 60°C)	95	0
TCA(5%, 100°C)	0	0

분해되는 물질로 가려져 있음을 알 수 있었는데 SDS 처리 후 phage 증식 여부를 확인하기 위해 phage를 감염시켜 본 결과 A1에서의 phage 증식은 일어나지 않았고 초기의 phage 수준 그대로를 유지하였다. 모균주에서도 마찬가지로 phage 증식은 일어나지 않았다. Neviani의 보고(19)에서도 1% SDS 처리에 의해 phage 증식이 관찰되지 않았다고 하였다. 이는 1% SDS에 의한 숙주균의 사멸로 인해 phage 흡착 후 증식이 진행되지 않았던데 기인한 것으로 사료된다.

Table 2. Inactivation of phage by cell walls, PS and PG from *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and A1 before and after SDS treatment

Treatment and strain	Inactivation(%)		
	by cell wall	by PS	by PG
No SDS			
11602	97	99	0
A1	1	0	0
SDS			
11602	96	—	—
A1	95	—	—

세포벽 성분에 의한 phage 불활성화

세포벽에 phage 흡착부위가 존재함을 밝히기 위해 세포벽, 세포벽의 polysaccharide(PS), 및 peptidoglycan(PG)을 phage와 함께 배양함으로써 이들 성분이 phage 불활성화에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2).

모균주에서 분리한 세포벽은 SDS 처리 전후 모두 다 phage를 96~97% 불활성화시키지만 A1의 경우는 SDS 처리한 후에 95%를 불활성화시켰다. 위 결과로 미루어 A1의 세포벽에도 phage 흡착부가 존재하나 SDS에 의해 분해되는 어떤 물질이 가리고 있었음을 알 수 있었다. Oram의 보고(5)에 의하면 *N-streptococci*의 phage 흡착부는 대부분이 세포벽에 있지만 *Str. lactis* ML3의 경우는 흡착부위가 세포막에 존재한다고 하였다. 한편, Sijtsma 등(9)은 phage 내성균주의 phage 흡착부위는 세포벽에 존재한다고 하였다.

세포벽에서 분리한 PG와 PS를 phage와 혼합하여 배양한 결과(Table 2), 모균주의 PS는 phage 불활성화율이 99%인 반면 PG는 0%였고 A1의 PS와 PG는 모두 다 phage 불활성화율이 0%였다.

Ishibashi 등(15)도 phage가 PS에는 흡착하나 PG에는 흡착하지 않았다고 보고하였다. 이로써 모균주의 phage 흡착부는 세포벽 중에서도 PS에 존재함을 확인할 수 있었고 A1의 PS에는 phage가 흡착하지 않는 것으로 보아 PS의 구성당 성분의 함량 비율이 phage 흡착에 중요한 요인으로 작용함을 확인할 수 있었다. Vlegels 등(7)에 의하면 wild type 균주와 그것의 내성변이주는 세포벽의 구성이 서로 달랐고 변이주에서의 PG와 PS(rhamnose가 풍부한)의 비율이 현저하게 낮았다고 보고하였다. 따라서 PS polymers에 의한 이 변이주들의 세포벽에 있는 흡착부의 가림(shielding)은 phage 내성의 주요 기작의 하나로 제기되었다.

요 약

유산균 스타터의 하나인 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602의 phage 내성균주인 A1의 phage 내성 기작과 숙주 세포벽과의 연관성을 조사하였다. A1에 대한 phage 흡착시의 특성을 전자현미경으로 관찰한 결과, 숙주와 phage를 혼합하여 10분간 배양한 후 A1의 세포에는 phage가 흡착하지 않았고, 60분 후에도 모균주와 phage 혼합배양에서 나타나는 용균과 새로운 phage 방출현상이 관찰되지 않았다. 그러나 A1에 SDS를 처리한 후의 phage 흡착율은 98%로 증가하였고 A1과 모균주의 세포로부터 분리한 세포벽과 그 세포벽에서 분리한 polysaccharide(PS)와 peptidoglycan(PG)을 phage와 혼합하여 15분간 방치 후 이들 성분에 대한 phage 흡착성을 조사하였던 바 A1의 경우 PS와 PG에는 흡착되지 않았고 SDS 처리한 세포벽에만 phage가 흡착하였으며 모균주에서는 세포벽과 PS에 흡착하는 것으로 나타났다. 이들 세포에 0.2 N HCl과 5% TCA를(100°C) 처리하여 phage의 흡착성을 조사한 결과, 이들 균주 모두에서 phage 흡착이 일어나지 않았다. 위 결과에 따라 A1의 세포벽에는 여전히 phage 흡착부가 존재하나, SDS에 의해 분해되는 세포벽의 어떤 물질에 의해 가리워져서 phage 내성을 나타내는 것이고 모균주의 phage 흡착부는 세포벽의 PS와 관련되어 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Whitehead, H.R. and G.A. Cox. 1935. Selection of starter cultures for cheese-manufacture. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.* **16**: 319-320.
- Sandine, W.E. 1989. Use of bacteriophage-resistant mutants of lactococcal starters in cheesemaking. *Neth. Milk Dairy J.* **43**: 211-219.
- Klaenhammer, T.R. 1987. Plasmid-directed mechanisms for bacteriophage defense in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 313-325.
- Sanders, M.E. 1988. Phage resistance in lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**: 411-421.
- Oram, J.D. and B. Reiter. 1968. The adsorption of phage to group N streptococci. The specificity of adsorption and the location of phage receptor substance in cell-wall and plasma-membrane. *J. Gen. Virol.* **3**: 103-119.
- Oram, J.D. 1971. Isolation and properties of a phage receptor substance from the plasma membrane of *S. lactis* ML3. *J. Gen. Virol.* **13**: 59-71.
- Vlegels, P.A.P., W.C. Hazeleger, T.H. Helmerho-

- rst, and J.T.M. Wouters. 1988. Phage resistance of *Streptococcus cremoris* due to low adsorption efficiency. *Neth. Milk Dairy J.* **42**: 195-206.
8. 임광세, 장영호, 백영진, 김현욱. 1991. *Lactobacillus casei* LM-1의 bacteriophage 저항성 기작에 관한 연구. *한국축산학회지* **33**: 730-737.
 9. Sijtsma, L., A. Sterkenburg, and J.T.M. Wouters. 1988. Properties of the cell walls of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and SK112 and their relation to bacteriophage resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2808-2811.
 10. 이춘화, 강국희, 배인휴. 1993. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602의 bacteriophage 내성 균주 A1의 특성에 관한 연구. *한국산업미생물학회지* **21**: 293-298.
 11. Terzaghi, B.E. and W.E. Sandine. 1975. Improved medium for Lactic streptococci and their bacteriophage. *Appl. Microbiol.* **29**: 807-813.
 12. Budde-Niekie, A. and M. Teuber. 1987. Electron microscopy of the adsorption of bacteriophages to lactic acid streptococci. *Milchwissenschaft.* **42**: 551-554.
 13. Hayai, M.A. 1986. *Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy*, Pp. 290-291. Academic Press, Inc.
 14. Schäfer, A., A. Geis, H. Neve, and M. Teuber. 1991. Bacteriophage receptors of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* F7/2 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**: 69-74.
 15. Ishibashi, K., S. Takesue, K. Watanabe, and K. Oishi. 1982. Use of lectins to characterize the receptor sites for bacteriophage PL-1 *Lactobacillus casei*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2251-2259.
 16. 김정환, 장영호, 이돈성, 김현욱. 1985. *Streptococcus faecalis* bacteriophage ATCC 29200의 특성과 생존에 관한 연구. *한국낙농학회지* **7**: 90-97.
 17. Valyasevi, R., Sandine, W.E., and Geller, B.L. 1990. The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1882-1889.
 18. Archibald, A.R. and H.E. Coapes. 1972. Blocking of bacteriophage receptor sites by concanavalin. *J. General Microbiol.* **73**: 581-585.
 19. Neviani, E., D. Carminati, and G. Giraffa. 1992. Selection of some bacteriophage- and lysozyme-resistant variants of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892. *J. Dairy Sci.* **75**: 905-913.

(Received March 28, 1994)