

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* ATCC 11602-A1의 세포벽 구성분과 Phage 내성과의 관련성에 관한 연구

이춘화 · 배인휴^{1*} · 강국희
성균관대학교 낙농학과, ¹순천대학교 축산학과

The Relationship between the Cell Wall Components of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602-A1 and Its Bacteriophage Resistance

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

Department of Dairy Science, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea
¹Department of Animal Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract — Relation the phage defense mechanism of phage resistant *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602-A1 to its cell wall components was investigated. To determine whether teichoic acid which is known to be one of the phage receptor site present on the cell wall, phage adsorption was examined after treatment 5% TCA(60°C) and concanavalin A to the cell wall of A1 and parent strain. However, the adsorption rate of two strains did not change. Total amount of phosphate after TCA treatment did not change in both strains, but a difference between the two strains was observed. Ribitol and glycerol, components of teichoic acid, could not be detected in the cell walls of two strains by GC analysis. These results suggest that although teichoic acid was not present in the cell walls of both strains, the composition of cell wall of two strains was not identical. Measurement of amount of protein and SDS-polyacryamide gel electrophoresis were carried out to examine the involvement of cell wall protein in phage resistance, showing that protein is nothing to do with phage adsorption of parent strain, but phage resistance of A1 is related to protein. Cell wall carbohydrates of A1 contained rhamnose, glucose, and galactose. Total amount of carbohydrate of 1% SDS-treated A1 cell wall was reduced to the level of parent strain. The results suggest that phage resistance of A1 was due to the presence of a higher level of carbohydrates than parent strain, and to interaction of carbohydrate and protein.

Bacteriophage(phage)의 숙주세포 감염시에 나타내는 세포흡착부의 특이성은 각 숙주-phage마다 다양한 것으로 알려지고 있다. 최근에는 phage의 세포흡착부 특이성이 phage 내성균주가 갖는 내성기작과 관련이 있는 것이 인정되어 주목을 받아오고 있다. Phage 흡착부 특이성에 의한 phage 내성 발현은 숙주세포의 phage 흡착부가 변하거나 숙주세포의 세포벽 성분에 의해 phage 흡착부가 가리워짐으로 인해 phage의 흡착이 저해되므로써 이루어진다는 것이 일부 균주에서 보고되었다(1, 2).

Gram 양성균에서의 phage 흡착은 거의 대부분 세포표면을 구성하는 탄수화물과 관련되어 있다. *Lac-*

tococcus species에서의 phage 흡착부는 대부분 세포벽 구성물질에서 검출되었고 대개는 peptidoglycan이나 lactococcus group-specific 탄수화물의 일부가 phage의 흡착부가 된다(3-5).

Streptococcus lactis ML3의 phage 흡착부는 세포막의 단백질 부위(6)라는 주목할 만한 예외가 있으나 대부분의 gram 양성균의 경우는 세포벽에 phage 흡착부를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.

최근 Valyasevi 등(7)은 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* KH의 phage 흡착부는 세포벽 외측 polysaccharide 중의 L-rhamnose라고 보고하였다. 또한 *L. casei* S-1 (8)과 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* EB7(3)에 있어서의 phage 흡착은 D-galatosamine과 L-rhamnose의 혼합물과 관련이 있고, *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* F7/2와 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* Wg2-1의 경우 phage

Key words: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, phage resistance, extracellular wall polysaccharides
*Corresponding author

흡착부가 peptidoglycan matrix 내의 탄수화물이었음이 보고된 바 있어(9) 세포의 phage 흡착부가 특정의 탄수화물과 연관이 있음을 시사하였다.

본 연구는 유가공업에서 전통적으로 사용해 온 스타터 균주인 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602와 그의 phage 내성변이주인 A1의 phage 흡착부 구성분의 차이가 phage 내성기작과의 관련성 여부를 규명하므로써 향후 유가공 산업에서 유용한 phage 내성균주 개발의 기초 자료를 확보하고자 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.

세포벽의 분리

세포벽은 Sijtsma 등(5)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 3회 통과시켜 세포를 완전히 파쇄하였다. 그 용출액을 3,000×g로 4°C에서 10분간 원심분리하여 비파쇄세포와 debris를 제거하고 그 상등액을 다시 같은 조건에서 20,000×g로 원심분리한 후 침전된 세포벽을 동결건조하여 실험에 사용하였다.

Teichoic 산 분석

Concanavalin A(Conc. A)에 의한 phage 흡착의 억제 : 세포와 0~100 mg/ml의 Conc. A를 β-glycerophosphate buffer(1.9% β-glycerophosphate, 0.025% MgSO₄, 10 mM CaCl₂, pH 6.8)에 넣어 22°C, 5분 배양한 후 phage(10⁶ pfu/ml)를 첨가하여 30°C, 10분간 배양하여 원심분리한 후 미흡착 phage 수를 측정하였다(5).

인 정량 : 세포벽의 인 함량은 Ames(13) 방법에 따라 정량하였다.

단백질 분석

단백질 정량 : 세포벽의 단백질 함량은 Buret(12) 방법에 따라 Bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 정량하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : 세포벽의 단백질 구성을 조사하기 위해 Oram(6)의 방법에 따라 전기영동한 후 은염색(silver stain)하여 나타난 band를 비교 검토하였다.

당 분석

Thin-layer chromatography(TLC) : 50 mg의 건조된 세포벽을 1 N H₂SO₄ 1 ml로 100°C에서 2시간 가수분해하여 냉각시킨 후 포화 Ba(OH)₂를 사용하여 pH 5.2~5.5로 조정하고 원심분리한 후 상등액을 감압 건조하였다. 이것을 증류수 0.3 ml에 녹여서 시료로 사용하였다. 시료 1 μl를 cellulose TLC plate(20 cm×20 cm : Merck)에 spot하여 n-butanol : water : pyridine : toluene(10 : 6 : 6 : 1, v/v)로 전개시킨 후 aminobenzoic acid를 분무하여 100°C에서 4분간 발색시켰다(14).

High performance liquid chromatography(HPLC)에 의한 세포벽 성분분석 : TLC와 같은 조건의 시료를 HPLC(Tosho AXI column 4.6 mm×15 cm ; flow rate, 0.4 ml/min ; eluent, 0.5 M Borate buffer pH 8.7 ; detection, RI detector)를 사용하여 정량분석하였다(5).

Gas chromatography(GC)에 의한 세포벽 성분분석 : 당과 당질알코올(sugar alcohol)의 양적인 분석을 하기 위해 TLC와 같은 조건의 시료를 GC(Supelco SP-2330 capillary column 30 m×0.32 mm mid ; carrier gas, He ; detection, FID detector) 분석하였다(15).

결과 및 고찰

세포벽 구성분의 teichoic 산 분석

그람 양성균의 세포벽의 teichoic 산과 결합하여 phage 흡착을 방해하는 것으로 알려진(5) concanavalin A를 농도(0~100 mg/ml)를 달리하여 두 균주에 처리한 결과 phage 흡착율에는 아무런 변화가 없었다. 세포벽의 teichoic 산 함량을 조사하기 위하여 teichoic 산과 결합되어 있는 인함량을 TCA를 처리한 후 측정하였다(Table 1). 그 결과 모균주에서는 5.75 μg/mg였고 A1에서는 6.5 μg/mg으로 나타나 다소의 균주간의 총인함량 차이가 나타났으며, TCA 처리 후 두 균주 모두 큰 변화가 없는 것으로 보아 이들 세포벽에는 teichoic 산이 존재하지 않는 것으로 확인되었다. 한편, Gas chromatography 분석 결과에서도 teichoic 산의 구성성분인 ribitol이나 glycerol이 나타나지 않았다. 이로써 모균주와 A1의 phage 흡착부

Table 1. Phosphate content of the cell wall of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and A1 after SDS and TCA treatment

Treatment	phosphate content($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
	11602	A1
None	5.75	6.5
TCA(100°C)	5.5	5.0

Table 2. Sugar composition and protein content of cell walls of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and A1 before and after SDS treatment

Treatment and strain	sugar composition(%)				protein content ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
	rhm	glu	gal	rhm + glu + gal	
No SDS					
11602	8	3	15	28	619
A1	12	2	23	37	590
SDS					
11602	4	0	16	20	272
A1	4	0	24	28	330

와 teichoic 산과는 관련이 없었으나 모균주와 A1 간에는 세포벽 성분구성에서 차이가 있음이 인정되었다.

Schäfer 등(9)은 *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis*와 *Lc. lactis* subsp. *cremoris*의 phage 흡착율 감소에는 세포벽의 탄수화물과 인 함량의 감소가 관련이 깊다고 보고하였으며 Valysevi 등(7)은 세포벽에 고온의 TCA 처리 후 총인함량(50.3 ng/mg)의 변화는 없었고 GC 분석에서도 teichoic 산의 구성성분인 ribitol이나 glycerol이 발견되지 않았으며 phage 흡착부는 세포벽 외층의 다당류였다고 보고하였다. 반면, *Staphylococcus aureus*(16, 17)와 *Bacillus subtilis*(18)의 세포벽 teichoic 산은 phage 흡착에 필수적인 것으로 보고되었다.

세포벽 구성분의 단백질 분석

1% SDS 처리 후 단백질량과 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의한 band를 조사한 결과는 Table 2와 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 세포벽 구성 단백질량은 두 균주간에 큰 차이를 나타내지 않았으나 SDS 처리 후 단백질량은 두 균주 모두 크게 감소하여 나타났다. 전기영동에 의한 단백질 band의 분포를 보면 44,000 KD 이하의 band가 많이 분포되어 있었으며 모균주와 A1 사이에는 band 구성이 서로 다르게 나타났다. 그러나 1% SDS 처리 후의 단백질 band는 나타나지

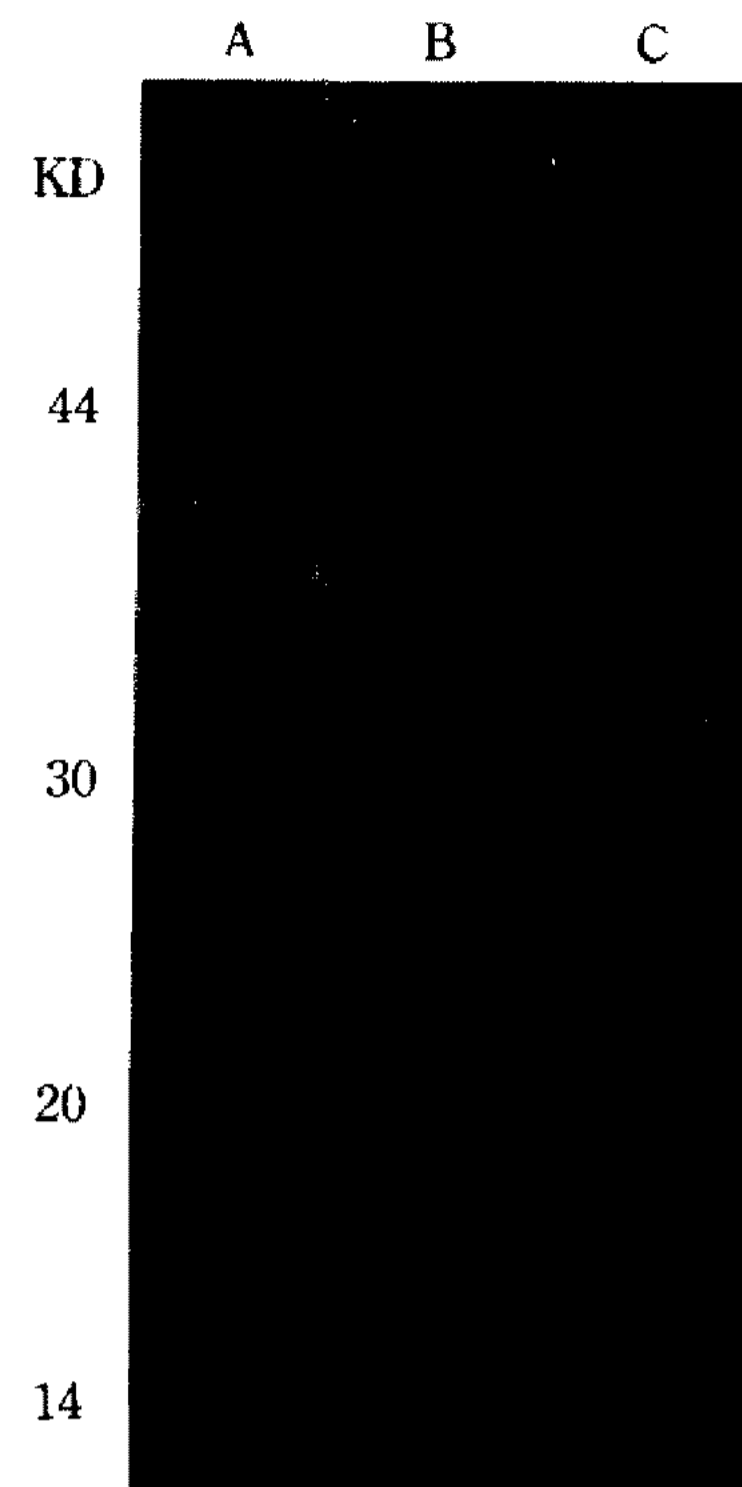


Fig. 1. Protein profiles of the cell walls of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 (B) and A1 (C) on SDS polyacrylamide gel.

The molecular weights of marker proteins (A).

않았는데 이는 1% SDS에 의해 단백질이 용해되어 유실된 결과인 것으로 추정되었다. 1% SDS 처리 후 A1의 경우 단백질 함량의 감소와 더불어 phage 흡착율이 증가(97%)되어 나타난 것은(10) 세포벽에 결합되어 있는 단백질이 phage와 숙주간의 흡착성에 관련하고 있음을 시사해 주는 것이었다. 모균주의 경우 1% SDS 처리 후 단백질량은 감소하였으나 phage 흡착율은 변화하지 않았다. 이로써 단백질은 phage 흡착에 관여하지 않으나 A1의 phage 내성에는 관여하는 것으로 판단된다. 즉 A1의 세포벽 phage 흡착부의 단백질이 단독으로 A1의 phage 내성을 발현하는 것이 아니라 다른 세포벽 구성분들, peptidoglycan이나 다당류와 상호조합을 이루어 phage 흡착에 영향을 주므로써 나타나는 것으로 판단되었다. Valysevi 등(7)도 SDS 처리로 총단백질이 손실되어 Coomassie blue 염색에 의해 단백질 band가 나타나지 않았으며, 단백질은 phage 흡착에 필요하지 않는다고 보고한 바 있으나 Norstrom 등(19-21)은 단백질과 다른 polymers와 같은 여러 화합물들이 복합적으로 phage 흡착부를 가리게 되며, 세포벽의 이 polymer들이 변화함에 따라 숙주에 대한 phage 감수성이 변하게 된다고 보고하여 본 실험 결과와 유사한 사실을 제시하였다.

세포벽 구성분의 당 분석

세포벽의 당구성을 조사하기 위하여 모균주와 A1의 세포벽을 1N H₂SO₄으로 가수분해한 뒤 cellulose TLC plate를 사용하여 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 모균주와 A1의 당구성은 rhamnose, glucose, galactose로 되어 있었으며 HPLC 분석에 의한 구성당의 양은 Table 2에 나타냈다. Rhamnose와 glucose 함량은 균주간에 큰 차이가 없으나 SDS 처리 후에는 A1의 rhamnose 양이 4%로 감소되었다. Galactose는 모균주에 비해 A1이 더 높게 나타났으나 SDS 처리 후에도 크게 변하지 않았다. A1의 구성당 총합량이 1% SDS 처리 후에는 모균주의 총구성당 함량과 같은 28%로 감소되었는데 여기서 A1의 세포벽의 전체 구성당의 함량이 모균주 수준으로 감소되었을 때 phage 흡착이 이루어진다는 사실을 확인할 수 있었다. 그러나 Valyaseri 등(7)은 galactose와 rhamnose는 phage 흡착부의 구성성분이며 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH의 결정적인 phage 흡착부는 세포벽외층 polysaccharide의 rhamnose임을 밝힌 바 있다. Yokokura(8)는 D-galactose와 L-rhamnose의 혼합물이 phage 흡착부라고 보고하였다. 따라서 A1의 흡착부에 있어서의 내성 기작 발현은 개개의 구성당 성분에 의한 것보다는 세포벽의 rhamnose, glucose 및 galactose가 결합하여 총당함량이 모균주의 그것보다 증가되는데서 이루어지는 것임을 알 수 있었다.

세포벽의 당구성분이 phage를 불활성화시킬 수 있는지를 조사하기 위하여 세포벽의 구성 당성분의 농도를 0.1~0.5 M로 달리하여 phage와 배양했을 때

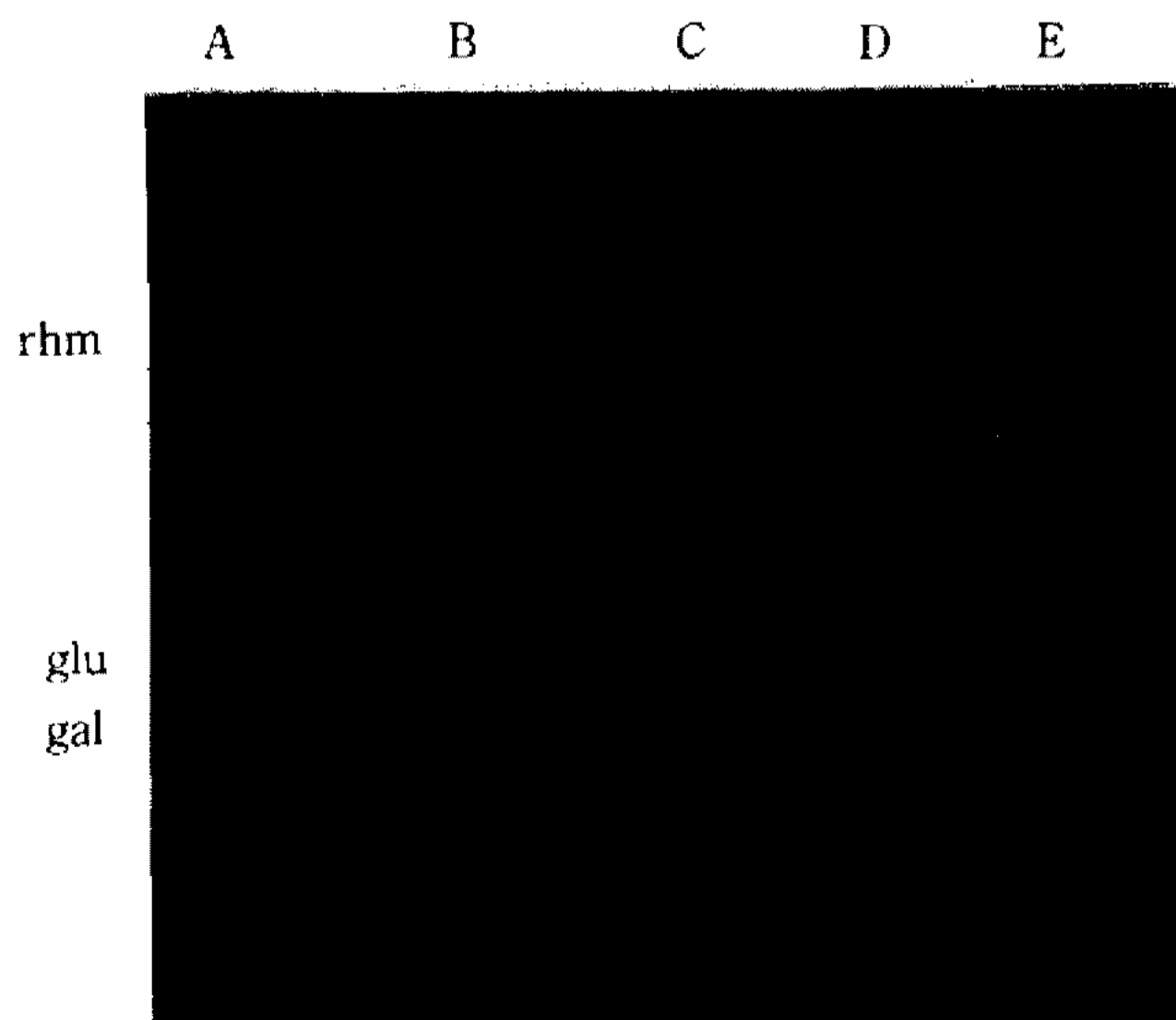


Fig. 2. Composition of the cell wall polysaccharide of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC and A1 on TLC. A; 1.0% soln.(rhamnose + glucose + galactose), B-C; 11602-A1, D-E; 11602-A1 after SDS treatment

의 phage 불활성화율(inactivation율)은 Fig. 3에 나타난 바와 같다.

0.5 M rhamnose에 의해서는 60%, 0.4 M galactose에 의해서는 50% 불활성화되었으나 glucose에 의해서는 20% 수준에 머물렀다. 각 당들을 혼합하였을 때의 phage inactivation율을 조사하여 본 결과는 30% 수준 정도여서 큰 효과를 나타내지 못했다.

이러한 결과를 바탕으로 하여 phage 불활성화 효과가 높은 당성분 혼합에 의한 phage 불활성화 효과를 조사하고자 M17 broth에 0.5 M rhamnose와 0.4 M (rhamnose + glucose + galactose)을 혼합한 당을 첨가하여 phage가 감염된 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602의 증식을 조사한 결과는 Fig. 4에 나타냈다. 혼합한 당은 액체배지에서의 phage lysis에 전혀 영

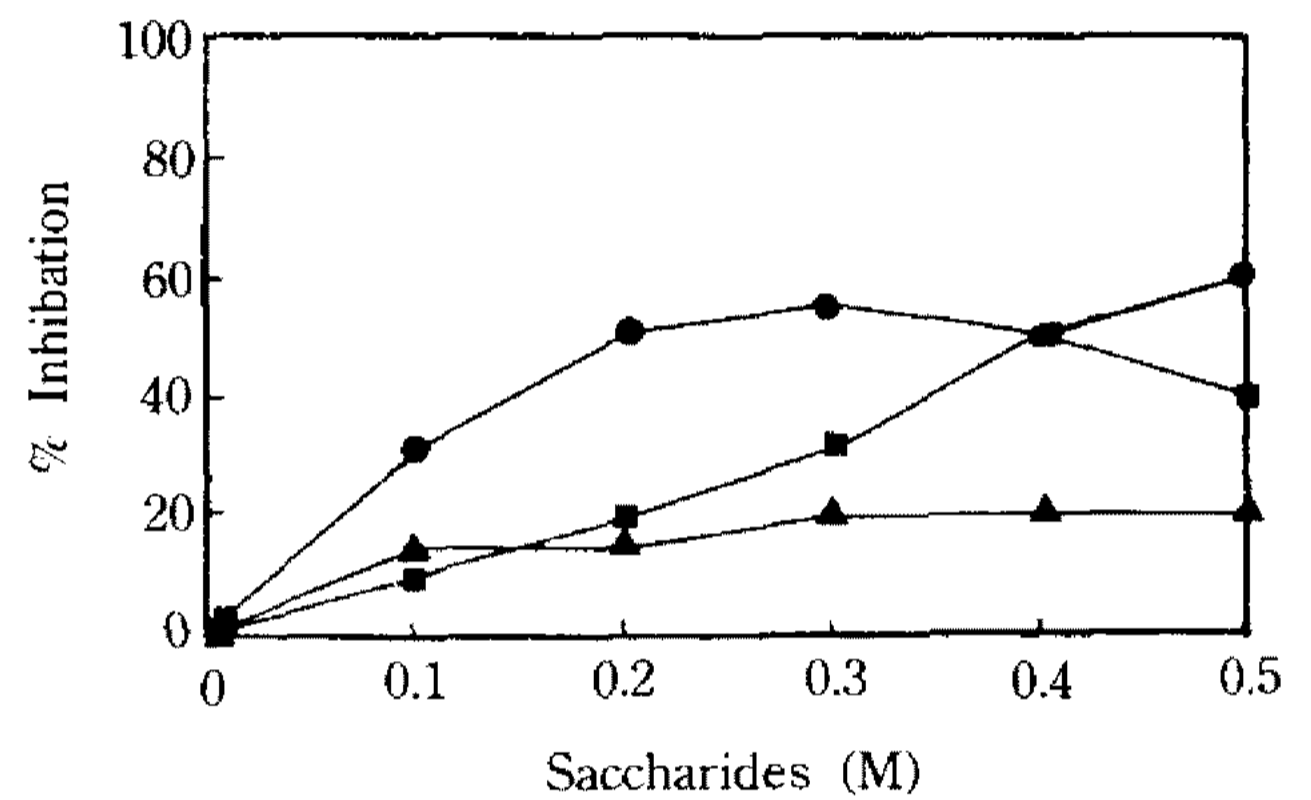


Fig. 3. Effects of different concentrations of saccharides on infectivity of phage. Phage was preincubated with CaCl₂ and the indicated concentrations of saccharides. The mixtures were diluted, mixed with cells and assayed for the number of plaques. The amount of inhibition is expressed as percentage of inhibition by a control that was not preincubated with a saccharide. Symbols; (●), rhamnose; (■), galactose; (▲), glucose

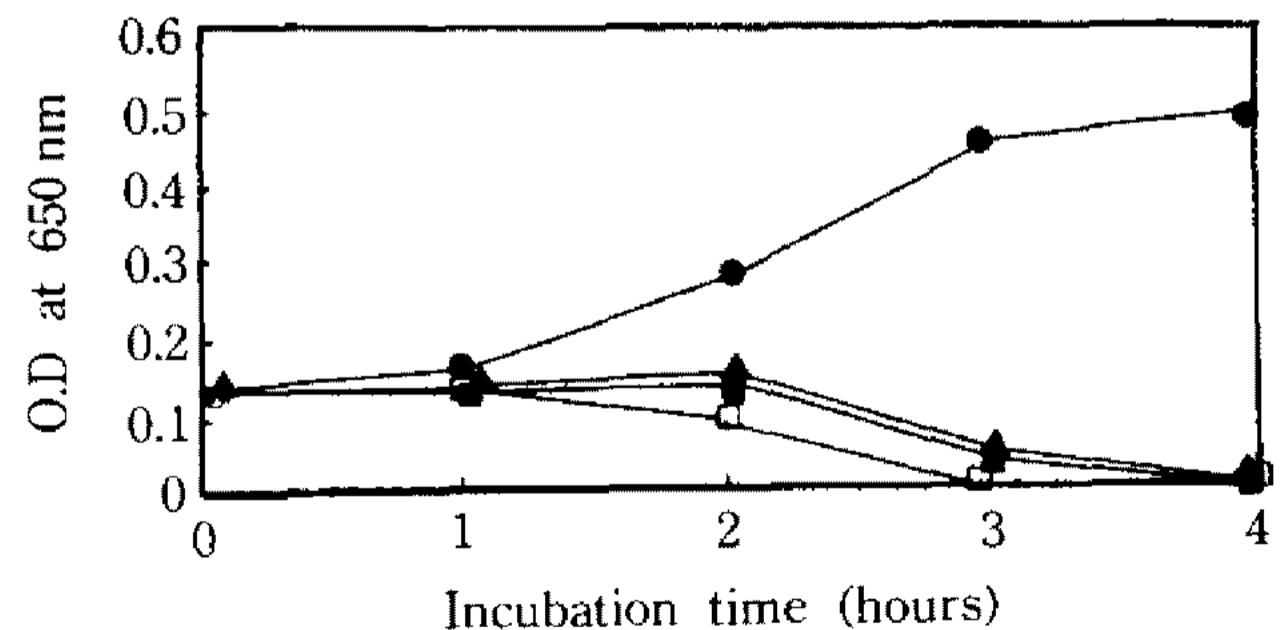


Fig. 4. Effects of rhamnose on the growth of phage-infected liquid culture cultures of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602. Growing cultures containing 0.5 M rhamnose (▲), 0.4 M (rh. + gal. + glu.) (■), and no rhamnose (□) were infected with phage at a multiplicity of 0.001, but the control (●) was not infected

향을 미치지 못했고 0.5 M rhamnos는 1시간 정도의 지연을 가져왔을 뿐 phage에 의한 lysis를 막지는 못했다. Sijtsma 등(5)과 Schäfer 등(9)도 몇가지 단당류를 phage와 혼합하여 배양했을 때 phage 흡착을 막지 못했다고 보고하였다. 반대로 Yokokura(8)는 *L. casei* S-1의 TCA 추출물이 phage 흡착을 강하게 억제하는 것으로 보고하였고 Keogh와 Pettingill(3)은 D-galactosamine와 L-rhamnose의 혼합물이 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* EB7의 phage 흡착을 효과적으로 불활성화시켰다고 보고하였다. 최근 Valyasevi 등(7)은 0.3 M의 rhamnose에 의해 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* KH의 phage 흡착이 억제됨을 관찰한 바 있다. 본 실험에서는 외래 공급 당성분(exogeneous sugar)이 모균주의 phage를 불활성화시키지 못하는 것으로 판단되었다.

요 약

전통적인 유산균 스타터의 하나인 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602의 phage 내성균주인 A1의 phage 내성과 세포벽과의 관련성을 조사하였다. 먼저 세포벽 성분중 phage 흡착부로 작용하는 teichoic 산이 존재하는지의 여부를 밝히기 위해 5% TCA(60°C)와 concanavalin A를 처리한 후 phage 흡착성을 조사한 결과 모균주의 phage 흡착율에는 변화가 없었다. 세포벽의 인(P) 총합량은 TCA 처리 후 A1과 모균주에 있어서 변화가 없었으나 균주간에는 차이가 나타났다. 또한 GC 분석 결과에서도 이들 균주의 세포벽에서는 teichoic 산의 구성분인 ribitol과 glycerol이 나타나지 않았다. 이로써 A1과 모균주의 세포벽에는 teichoic 산이 존재하지 않았으나 A1과 모균주의 세포벽 성분에는 차이가 있었다. A1의 phage 내성과 단백질과의 관련을 조사하기 위해 세포벽의 단백질 정량과 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시한 결과 모균주의 phage 흡착에는 단백질이 관여하지 않으나 A1의 phage 내성에는 단백질이 관여하고 있는 것을 알 수 있었다. A1의 세포벽의 당구성은 rhamnose, glucose와 galactose로 되었고 이에 대한 SDS 처리 후 A1의 총 당합량이 모균주의 수준으로 감소하였다. 위 결과로 A1의 phage 내성은 세포벽의 당합량이 모균주보다 높은 데서 기인하며 이 구성당과 단백질이 상호 작용하므로써 나타나는 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Sanders, M.E. and T.R. Kleanhammer. 1984.

- Phage resistance in a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: temperature-dependent phage development and host-controlled phage replication. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 979-985.
2. Vlegels, P.A.P., A. Sterkenburg, L. Sijtsma, and J.T.M. Wouter. 1986. Phage resistance in *Streptococcus cremoris*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* **52**: 365-366.
3. Keogh, B.P. and G. Pettingill. 1983. Adsorption of bacteriophage eb7 on *Streptococcus cremoris* EB 7. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1946-1948.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Valyasevi, R., W.E. Sandine, and B.L. Geller. 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.
8. Yokokura, T. 1977. Phage receptor material in *Lactobacillus casei*. *J. Gen. Microbiol.* **100**: 139-145.
9. 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.
10. 이춘화, 강국희, 배인휴. 1993. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602의 bacteriophage 내성균주 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. Gerhardt, P., G.R.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. Pp. 358-359. American society for microbiology.
13. Ames, B.N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate, and phosphatases. *Meth. Enzymol.* **8**: 115-118.
14. Colwell, R.R. and R. Grigorova. 1987. *Methods in Microbiology*. Pp. 201-202. Academic Press.
15. Albersheim, P., D.J. Nevins, P.D. English, and A. Karr. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-li-

- quid chromatography. *Carbohydr. Res.* **5**: 340-345.
16. Chatterjee, A.N. 1969. Use of bacteriophage-resistant mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of *Staphylococcus aureus*. *J. bacteriol.* **98**: 519-527.
17. Coyette, J. and J.M. Ghuysen. 1968. Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. IX. teichoic acid and phage adsorption. *Biochemistry* **7**: 2385-2389.
18. Young, F.E. 1967. Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in *Bacillus subtilis* 168. *Proc. N.A.S.C.* **58**: 2377-2384.
19. Norström, K. and A. Forsgren. 1974. Effect of protein A on adsorption of bacteriophages of *Staphylococcus aureus*. *J. Virol.* **14**: 198-202.
20. Sleytr, U.B. and P. Messner. 1983. Crystalline surface layers on bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 311-339.
21. Wu, T.C.H. and J.T. Park. 1971. Chemical characterization of a new surface antigenic polysaccharide from a mutant of *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 630-634.

(Received March 28, 1994)