

工場排水系에 存在하는 乳酸桿菌 Virulent Phage에 관한 研究

姜國熙 · 白永振 · 姜英燦 · 金基元

한국야쿠르트 研究室

Studies on *Lactobacillus* Virulent Phage in Plantdrainage

Kook Hee Kang, Young Jin Baek, Young Chan Kang
and Ki Won Kim

Laboratory of Korea Yakult Milk Products Co. Ltd. Seoul, Korea

(Received February 3, 1977)

Abstract

We isolated *lactobacillus* phages hosting *L. casei* strains, and examined distribution of the phages and resistance to the sanitary reagent treatment in drainages of Korea Yakult plant.

- 1) There were Type 1, 11, 111, and 1v of the phage J₁ in plantdrainages and the order of distribution was Type 1v > Type 11 > Type 1 > Type 111.
- 2) All the phages in plantdrainages were completely removed by spreading the invert soap.
- 3) Sodium hypochloride, invert soap and cresol were most effective sanitary reagents, and isopropyl alcohol and ethyl alcohol were a weak sanitary reagents.

서 론

乳酸菌食品을 제조하고 있는 工場의 内部와 그 주변에는 장기간에 걸쳐 乳酸菌 flora가 定着하고 있기 때문에 토양이나 먼지속에 混在하고 있던 乳酸菌 phage가 外的條件이 좋아지면 增殖할 수 있는 기회를 얻게된다. 이러한 경우에 乳酸菌 phage에 관한 지속적인 검사와 그 대책을 수립함으로써 製品의 생산과정중에 phage의 침입을 防止할 수가 있다. 外國에는 乳酸菌食品의 歷史가 오래되었고, 제품의제조공정에서 phage의 오염으로 異常醱酵을 일으킨 事件도 있었으며, 이에따라 乳酸菌에 대한 研究가 많은 연구자들에 의하여 報告되어 있다.

Kopeloff¹⁾는 *Lactobacillus acidophilus*와 *L. bul-*

*garicus*의 溶菌 phage를 분리하였고, Meyers 등은 *L. casei*의 phage를 분리하여 그 성질을 조사하였으며, Coetzea²⁾ 등은 *Lactobacillus* 菌의 phage에 관하여 宿主域을 調査하여 報告하였다. 日野等³⁾은 *L. casei* S-1을 宿主로 하는 J₁ phage를 분리하여 生物學的性質을 研究하였다. 櫻井等⁴⁾은 工場排水로부터 乳酸菌 phage를 분리하여, 宿主菌의 感受性과 phage의 潜伏期, 平均放出量의 差異에 따라 *L. casei* B型菌의 속하는 phage로서 J₁, G, G₁₀, Uz, Nhs, 또한 *L. casei* C型菌에 속하는 phage로서 FYc, NHc, NTc, φ218, TKc, TZc, TMc로 분류하였고, *L. plantarum*의 phage도 PB, PH, φ219 φ786으로 분류하였다.

우리는 야쿠르트 製造工場의 排水溝로부터 *L. casei* S-1을 宿主로하는 溶菌 phage를 分離하여

그 分布를 조사하였다. 또한 phage 除去에 대한 대책을 강구한 결과 손쉽게 근절할 수가 있었으며, 分離한 phage 를 宿主菌感受性差異에 따라 type 分類하였던바 몇 가지 成績을 얻었기에 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 宿主菌

日本야쿠르트 中央研究所로부터 入手한 *L. casei* S-1, 21, SGR, J₁R 을 phage 分離用 指示菌으로 사용하였다.

2. 培地

宿主菌의 保存에는 ILS培地⁷⁾, 菌株增殖, phage 數測定에는 MRT-broth 培地⁸⁾를 사용하였다.

3. 宿主菌增殖

L. casei S-1, 21, J₁R은 37°C, SGR은 30°C 에서 培養하여 1×10⁸/ml 정도까지 增殖한 신선한 것을 指示菌으로 사용하였다.

4. Phage 試料採取

工場外部의 排水, 고인물과 찌꺼기를 건열멸균한 피펫을 사용하여 멸균된 시험관에 약 5ml 씩 채취하였다. 試料는 每週 同一場所에서 채취하고 試料채취후에는 每日 2~3회 逆性비누를 충분히 散布하여 소독하였고, 試料採取 直前에는 소독액의 散布나 청소를 하지 않도록 注意하였다.

5. Phage count 와 분리조작

phage 試料 0.1ml 를 MRT-hard 培地(Agar 15%)로 만든 plate 上에 注入한다. 50°C 의 MRT-soft 培地 (Agar 7.5% 포함) 2.5ml 가 들어있는 試驗管 속에 指示菌 0.2ml 를 注入하여 plate 上의 phage 試料에 혼합하여 응고시킨다. 이것을 24시간 培養하여 plate 上에 出現한 plaque 를 計數하여 phage 數로 하였다.

6. 指示菌의 感受성에 의한 phage 의 分類

Plate 上에 plaque 가 100~200개 出現하도록 phage 試料를 심는다. 出現한 plaque 는 멸균된 이쑤시게(tooth pick)로 찍어서 MRT broth 1ml 에 희석하고 이것을 指示菌 *L-casei* S-1, 21, SGR, J₁R 에 따라 軟寒天法으로 심고 S-1에 出現한 plaque 數를 1로하여 他指示菌의 平板效率를 比較算出하고 이 기준에 따라 type을 분류하였다.

7. Phage 의 增殖

消毒劑의 phage 에 대한 殺菌效果를 시험하기 위한 phage 試料를 만들기 위하여, 工場排水에서 분

리한 phage 를 增殖하여 사용하였다. 즉 MRT broth 10ml 에 *L. casei* S-1 을 10⁷~10⁸/ml 정도로 增殖시킨다음, 분리한 phage plaque 1개를 따서 接種한다. 이것을 37°C에서 1夜 培養후 3000r. p. m에서 20分 원심분리하여 上清液을 phage 液으로 사용하였다. 이렇게하여 10⁸/ml 의 phage 液이 얻어졌다.

結果 및 考察

1. 工場排水系에 존재하는 乳酸菌 phage 分布

1976. 6. 야쿠르트 製造工場 外部 排水溝로부터 乳酸桿菌(*L. casei* S-1)을 宿主로 하는 J₁系 phage 가 最初로 檢出되었다. 그 結果를 表 1에 表示한다. 工場排水中에는 乳酸菌이 常在하고 있으므로 이中에 phage 가 混在할 경우 外面因子가 적합하게 되면 phage 의 增殖이 가능하다. 表 1에서 보듯 바와 같이 phage 檢査 第 1회에는 9개의 試料中에 phage 가 10¹~10⁵/ml 로 存在하였다. 이것을 제거하기 위하여 逆性비누 100倍 液을 每日 3회 씩 散布하면서 1週 간격으로 phage 檢査를 계속하였다. 1週後에는 逆性비누 散布의 効力이 현저하게 나타나서 phage 의 檢出場所는 約 半數로 減少되었다. phage 가 檢出된 場所에 대하여 청소와 소독을 3週間 철저히 계속한 결과 phage 를 完全히 除去할 수가 있었고 4週째 檢査에서는 全試料에 있어서 phage 가 檢出되지 않았다.

2. 工場排水系에 存在하는 phage 의 type 과 分布

工場排水系에 存在하는 乳酸菌溶菌 phage 에 대하여 樓井等⁶⁾의 方法에 따라 type 분류를 실시한

Table 1. Distribution of *Lactobacillus* phage in plantdrainage (Phage count/ml)

Interval	1st week	2nd week	3th week	4th week
Sample No.				
1	9.5×10 ¹	0	5.5×10 ³	0
2	2.0×10 ¹	0	0	0
3	1.6×10 ³	4.0×10 ¹	1.7×10 ³	0
4	7.3×10 ²	0	0	0
5	1.0×10 ¹	0	0	0
6	2.5×10 ³	8.0×10 ¹	5.5×10 ¹	0
7	1.9×10 ⁴	1.0×10 ³	2.8×10 ³	0
8	1.6×10 ⁴	5.8×10 ⁴	1.7×10 ³	0
9	1.5×10 ⁵	2.4×10 ⁵	1.2×10 ³	0

* Date of the first sampling is 1st week of June, 1976

Table 2. Classification and distribution frequency of *Lactobacillus* phage J₁ distributing in the plantdrainage

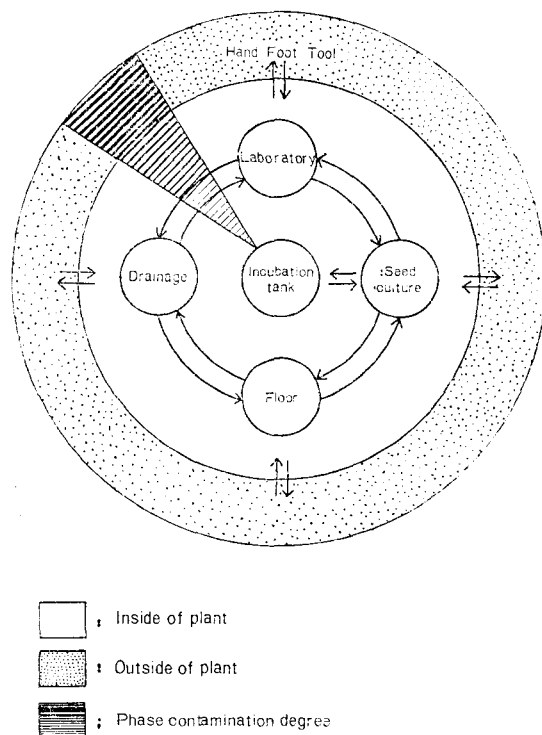
Indicator organism Phage type	Relative count of phage (S-1=1)				Distribution ratio of phage J ₁
	S-1	No. 21	J ₁ R	SGR	
1	1	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	1	4(%)
11	1	1	10 ⁻⁶	1	14(%)
111	1	1	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	1(%)
Iv	1	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	81(%)
SG-T	1	1	1	10 ⁻⁶	0(%)

* No. 21, J₁R, SGR Strains are resistant mutants to the phage J₁

결과 表 2와 같은 成績을 얻었다. 즉 工場排水系로부터 분리한 phage의 plaque 100개에 대하여 指示菌 *L. casei* S-1, 21, SGR, J₁R을 사용하여 調査한 결과 Type I, II, III, IV로 분류되었고 그 중에서도 Type IV가 81%로 가장 많고 그 다음이 Type II이었다. SG-T Type의 phage는 檢出되지 않았다. 櫻井等⁶⁾에 의하여 보고된 日本야쿠르트 製造工場에 분포하고 있는 phage type을 보면 J₁系 phage의 Type I, II, III, IV 그리고 SG-T phage가 存在하고 있으며, 이들중에서도 Type IV가 지속적으로 분포하고 있음을 알수있다. 韓國야쿠르트 工場의 排水系에 지속적으로 존재하는 phage가 어떤 type인지에 대한 檢討는 하지 않았으나 日本야쿠르트 研究所 櫻井等의 報告된 결과와 表 2에서 Type IV가 81%로서 가장 광범위하게 분포되어 있다는 것을 종합하여 볼때 韓國야쿠르트 工場排水水中에 지속적으로 存在하는 것도 Type IV일 가능성이 크다고 생각한다. 이 문제는 今後에 詳細히 調査하고자 한다.

3. 工場에 있어서 phage 増殖의 徑路

工場에 있어서 phage가 最初로 増殖하는데에는 어떠한 過程이 必要한가를 實驗적으로 證明하기에는 매우 곤란하다. 그러나 phage가 最初로 存在하는 場所가 工場外部라고 생각할때 圖 1과 같은 Model을 提示할 수 있다. 즉 乳酸菌을 供給하는 초기에 있어서는 工場 주변에 phage가 存在하였다 하더라도 宿主菌에 吸着할 수 있는 거리가 너무나 멀리 격리되어 있기 때문에 phage의 増殖은 거의 不可能하다고 생각할 수 있다. 그러나 時日이 경과함에 따라서 公廠의 주위에는 乳酸菌이 점점 높은 밀도로 存在하게 되고, 따라서 먼거리에서 있던 phage와의 거리도 단축되어 phage가 宿主菌에 吸着할 수 있는 기회가 점점 증가하게 된다. 韓國야쿠르트의 경우를 보면 1971년에 製品生産을 시작



하여 phage가 最初로 檢出된 것이 1976년이므로 phage 増殖이 本格的으로 일어나는데 所要되는 時間은 約 5年으로 간주된다. 圖 I에 있어서 빗금 친 부분은 圓의 외각으로 갈수록 phage의 汚染度가 높아지고 工場內部로 들어 갈수록 위생적 환경이 구비되어 있기 때문에 phage 汚染度가 낮아지는 것을 表示하고 있다. 圓의 외부로부터 內部로 phage를 移動시키는 수단을 작업관리자의 손과 발 그리고 用具들이며 이러한 것들의 소독행위가 철저할 경우에는 phage의 工場內部的 침입은 용이하게 防止할 수 있으나, 그렇지 못한 경우에는 배양 탱크에 까지도 phage의 침입이 가능하다는 것을

Table 3. Bactericidal effect of various reagents to *Lactobacillus* phage

Reagent	Item	Reagent* Concentration	Initial phage count per ml	phage count per ml after reagent treatment.		
				5	10	15(minute)
Sodium-hypochloride (10~15% active chlorine solution)		×100	1.9×10 ⁸	—	—	—
		×200	1.9×10 ⁸	—	—	—
		×500	1.9×10 ⁸	—	—	—
Invert soap		×100	1.9×10 ⁸	—	—	—
		×200	1.9×10 ⁸	—	—	—
		×500	1.91×10 ⁸	—	—	—
Cresol		3%	1.9×10 ⁸	—	—	—
		5%	1.9×10 ⁸	—	—	—
		10%	1.9×10 ⁸	—	—	—
Isopropyl alcohol		30%	3.6×10 ⁸	7.2×10 ⁷	1.0×10 ⁷	4.5×10 ⁶
		50%	3.6×10 ⁸	2.3×10 ⁷	1.0×10 ⁷	2.0×10 ⁶
		70%	3.6×10 ⁸	5.0×10 ⁶	3.8×10 ⁶	6.0×10 ⁵
Ethyl alcohol		30%	3.6×10 ⁸	7.0×10 ⁷	1.9×10 ⁷	3.0×10 ⁶
		50%	3.6×10 ⁸	3.0×10 ⁷	2.1×10 ⁷	1.0×10 ⁶
		70%	3.6×10 ⁸	6.5×10 ⁶	2.0×10 ⁶	2.0×10 ⁵

* Reagents were diluted with distilled water

提示하고 있다.

4. 工場の phage 에 대한 消毒劑의 効果

工場排水에서 분리한 溶菌 phage 의 消毒劑耐性에 관하여 調査한 結果는 表 3 과 같다. 各種 消毒劑는 적당한 量으로 희석하여 사용하였다. phage 試料는 10⁸/ml 로 조정하여 使用하고 消毒液과 혼합직전에 phage 數를 精確하게 측정하였다. phage 試料 0.1ml 를 各種 消毒液 10ml 에 혼합하여 一定 時間 망치후, 그 0.1ml 를 冷却된 生理食鹽水 10 ml 에 희석하고 그 속에 殘存하고 있는 phage 數를 count 하여 消毒劑의 phage 에 대한 殺菌效果로 표시하였다. 表 3 에서 보면 염소수와 逆性비누 100 倍液中에서 5분이면 phage 를 완전히 殺菌시키는 效果를 나타내고 있다. isopropyl alcohol, ethylalcohol 은 phage 殺菌에 큰 效果가 없음을 알수있다. 樓井⁶⁾ 등은 J₁系 phage 의 各 type 別로 藥劑耐性(逆性비누 10,000倍液)을 調査하여, 抵抗性에 있어서 상당한 차이가 있음을 報告하고 있다. 즉, Type I 과 II 는 抵抗性이 매우 약하고 Type III 과 IV, 그리고 SG-T phage 는 一般적으로 抵抗性이 크다고 認定하고 있다.

要 約

한국야쿠르트 製造工場の 排水中에 존재하는 *L.*

casei 를 宿主로 하는 *Lactobacillus* phage J₁系의 分포를 調査한 結果는 다음과 같다.

1. 工場の 排水中の J₁系 phage 에는 Type I, II, III, IV가 存在하고 있었으며 分포순위로 보면 Type IV > Type II > Type I > Type III 이었다.

2. 工場排水中の phage 는 逆性비누를 散布하여 完全히 除去되었다.

3. 各種 消毒劑의 phage 에 대한 殺菌效果는 염소수, 逆性비누, 크레졸이 가장 強力한 効力을 나타내었고, isopropyl alcohol, ethyl alcohol 등은 殺菌力이 微弱하였다.

參 考 文 獻

- (1) Kopeloff. W.; *J. Infect. Dis.*, **55**, 368 (1934).
- (2) Meyers. C. E., Walter, E. L. and Green, L. B.; *J. Dent., Res.*, **37**, 175 (1958).
- (3) Coetzea, J. N., De Klerk, H. C. and Sacks, T. G.; *Nature*, **187**, 348 (1960).
- (4) 日野昌弘, 池邊信夫; 日本農化, **39** (12), 472 (1965).
- (5) 樓井稔三, 高橋徳太郎, 上山訓由, 新井浩; 日本 *Virus*, **19** (6), 72(1969)

- (6) 櫻井稔三, 久保須實子, 尾上에이子; 日本農化, **49**(3), 169 (1975). **26**, 473(1971)
- (7) 櫻井稔三, 遠山清, 新井浩; 日本細菌學雜誌, **43**, 311 (1969)
- (8) 村田晃, 添田榮一, 猿野琳次郎; 日本農化, **43**, 311 (1969)