

Bacillus subtilis var, 816 Bacteriophage의 分離와 一般의性質에 關한 研究

李 周 植

(서울대학교 自然科學大學 微生物學科)

Studies on the Isolation and Characterization of Bacteriophage
of *Bacillus subtilis* var, 816

Zoo-Shik LEE

(Dept. of Microbiology College of Natural Sciences, S.N.U)

Abstract

Bacillus subtilis var. 816 was used for manufacturing fermented soybean which in turn is used as flavoring agent. Fermentation of soybean or flat wheat was occasionally failed.

It was elucidated that the failure was due to the presence of bacteriophage. According to Hemphill and Whitely (1975), this bacteriophage might be belonged to the virulent phage group I as it is similar to SP82G, $\phi 25$. In fact, the phenomena of the increase of moisture, disappearance of mucin and existence of undesirable bacteria was attributed to the contamination of the above phage during the course of fermentation of soybean or flat wheat,

Particularly disappearance of mucin was sufficiently correlated by the replication of the bacteriophage.

The above phage can grow in the range of 30°C to 70°C. The optimum temperature was 40~50°C. The optimum pH range was between pH 7.4 and pH 8.0

It is noticeable that *staphylococci* was replicating simultaneously with the phage. The head of 816 phage is hexagonal with a diameter of $10 \times 165 \sim 10 \times 240$ nm. The end of the tail is enlarged. It has a size of 25 nm and this end arears are spreaded widely as fingers.

緒 論

Bacillus subtilis var.816 菌株는 “*Bacillus* 屬菌을 使用한 調味食品 製造用 醱酵콩의 製造”에 쓰여지는 菌株이다(Lee, 1974).

이 菌株는 우리나라 固有食品 製造用 “메주” 醱酵過程에서 分離된 菌株이며 實驗結果 利用價値가 多樣 했으므로 實際로 새로운 細菌메주 醱酵에 應用 되었다. 그러나 이 菌株는 콩과 밀쌀의 醱酵時에 종종 異常 醱酵의 現象을 나타내었으므로 이에 對한 原因을 調查 研究한 結果 1種의 Bacterio-

phage를 檢出 分離 할 수 있었다. 본 phage는 *Bacillus subtilis*의 phage群에 屬하며 HMU-Contains phage의 SP82G株 또는 $\phi 25$ 株에 類似 하였다(Hemphill and Whiteley, 1975) 또한 生物學的인 調查에서도 유사한 點을 나타내었으나 生理的인 調查에서는 아직도 精密한 實驗을 進行中이다. 본 phage群 *Bacillu subtilis* var.816 phage의 感染 增殖 豫防에 重要한 生長에 미치는 溫度 pH 營養 抵抗 등이 于先 調查 되었다. 특히 816 phage와 共棲하는 1種의 *Staphylococcus* type을 發見 하였고 이 共棲 phage-staphylo-

ccus type는 본 實驗에 特異한 여러가지 結果를 가져 왔다. 이에 對한 實驗 結果를 報告코져 한다.

材料 및 方法

본 實驗에 使用한 材料는 *Bacillus subtilis* var. 816 菌株와 본 菌株로 醱酵시킨 醱酵콩 또는 醱酵밀쌀에서의 phage의 檢出方法 檢出된 菌株와 phage의 培養實驗, phage의 溶菌斑形成實驗 phage와 共棲하는 *Staphylococcus* type에 對한 實驗 phage 生長의 溫度, pH 耐熱性 等 一般性質에 對한 實驗을 하였다. 또 電子顯微鏡의 形態와 構造 調査에 是 negative stain 法과 shadowing 法으로 實施하였다.

1. *Bacillus subtilis* var. 816 菌株의 由來

B. subtilis var. 816의 菌株는 主로 市販 메주의 深部에서(즉 속메주) 分離한 것이고 *B. subtilis* ATCC 6633과 *B. natto* SS와 비교 實驗한 結果 *B. subtilis*에 屬하는 變異株로 認定 되었기에 *Bacillus subtilis* var. 816이라고(Lee, 1974)하여 본 實驗에 使用한 것이다.

2. *Bacillus subtilis* var. 816 phage의 檢出 方法

본 實驗에서 分離된 phage를 *Bacillus subtilis* var. 816 phage 또는 816 phage로 命名 使用하기로 하였다. phage의 宿主菌을 얻는 方法으로 phage 感染이 없다고 認定되는 *B. subtilis* var 816 菌株로 蒸餾콩 또는 蒸餾밀쌀에 接種하여 40°C에서 18~20時間 醱酵시킨 醱酵콩 또는 醱酵밀쌀에서 粘質性이 강한 것과 없는 것 중 없는 쪽을 接種하여 菌株를 다시 分離 하므로써 816 phage를 檢出 하는 方法을 擇하였다.

3. 816 phage의 繼代 培養 實驗

實驗에 쓰여진 培養基는 普通 寒天培地(neutrient agar media)와 Peptone 0.5, Glucose 0.5% Yeast extract 0.25% KH_2PO_4 0.1%의 寒天培地 및 Beef extract 1.0%, Peptone 1.0%, NaCl 0.5% 配合의 液體培地 等を pH7.2~7.4로 調整 使用하였

다. 指示菌은 40°C內外에서 20時間 培養한 固形 또는 液體 培養한 것을 다시 液體培地에 옮겨 胞子の 混在와 連鎖狀의 菌體를 피하고 指示菌의 濃度를 $5 \times 10^7 \sim 10^8/\text{ml}$ 로 하였다.

4. 溶菌斑 形成 實驗

溶菌斑 形成에는 Adams의 寒天 重層法(Adams 1959)을 使用 하였다. 共棲 phage의 稀釋에는 broth medium으로 使用하고 寒天 重層 培養法(agar layer method)에 使用한 soft-agar는 0.7%의 것을 使用하였다.

5. phage 共棲 *Staphylococcus* type의 檢出

816 phage의 純粹 繼代는 實際로 어려운 일이었다. 醱酵콩 또는 醱酵밀쌀에서의 1代에서는 純粹하게 檢出 되었으나, 2代에 가서는 *Staphylococcus* type의 菌체와 共棲하는 경우가 있으므로 宿主菌과 交代 混合 繼代 培養으로 그 發育을 調査하였다.

6. 一般 性質 調査

一般 生理的 性質 調査는 816 phage의 發育 生長에 미치는 溫度的 影響 最適 pH의 決定, 耐熱性, 繼代性 等を 實驗하였다.

7. 電子顯微鏡의 檢出

電子顯微鏡의 檢出은 2% PTA를 添加 collodion膜을 입히고 carbon coating한 mesh를 利用한 negative stain 法과 carbon coating한 mesh에 따라서 말린후 vacuum evaporator에 넣어 20° 角度에서 chromium 으로 shadowing 하는 方法을 使用하였다.

結 果

Bacillus subtilis var. 816 菌株로 醱酵시킨 콩 밀쌀에서 phage의 有無에 對한 肉眼的인 檢出은 粘質物質의 消失에 따라 쉽게 證明할 수 있었다. 7회의 醱酵實驗에서의 結果는 Table1와 같다.

醱酵콩이나 醱酵밀쌀에서 粘質性이 강한 때에는 phage 檢出이 없었으나 그와 反對로 粘質物質이 弱하거나 없을 때에는 phage 檢出은 容易 하였다. 正常醱酵時에는 粘質物質이 많았으나 異常醱酵라고 斷定되었을

Table 1. The presence of phage and mucin during soybean and flat wheat fermentation,

No	1	2	3	4	5	6	7
mucin	+++ (+++)	++ (++)	++ (++)	++ (++)	± (+)	± (-)	- (-)
phage	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	+ (+)	+ (+)	++ (++)

() Indicates the phage that is present during flat wheat

- : no mucin + : about 10cm ++ : about 50cm
+++ : about 100cm (by the length of the string by using the loop)

(-) : no phage (+) : rare (++) : few

(+++): many

때에는 phage 粘質物質은 거의 없었다. 이
異常醱酵時에 phage 檢出은 强하게 나타났
었다. 1회에서 4회의 醱酵過程에서는 phage
가 보이지 않는 正常醱酵가 行해졌으나 5
회에서 6,7회에 가서는 phage 檢出로 인한
異常醱酵의 狀態를 나타내었고 더구나 7회
에서의 醱酵成績은 完全 異常醱酵이었으며
phage의 檢出 역시 현저하게 나타났었다.
이와 같은 많은 반복의 醱酵實驗에서 얻은
成績의 한 예를 時間의 經過에 따라 그 結
果를 表示하면 Fig. 1의 成績과 같다. 正常
醱酵時에는 mucin이 時間의 經過에 따라 增
加 하였으나 phage의 發生은 mucin이 形成
된 8時間 以後 부터 急激히 增加하고 mucin
의 形成이 거의 없는 異常醱酵로 끝나는 現
象을 보였다. 본 菌을 使用한 醱酵實驗에서
生成되는 粘質物質은 phage의 影響을 많이
받고 있다는 것을 證明하였다.

816 phage의 檢出과 繼代 培養 實驗은
pH 7.2~7.4로 調整된 普通寒天培地 broth

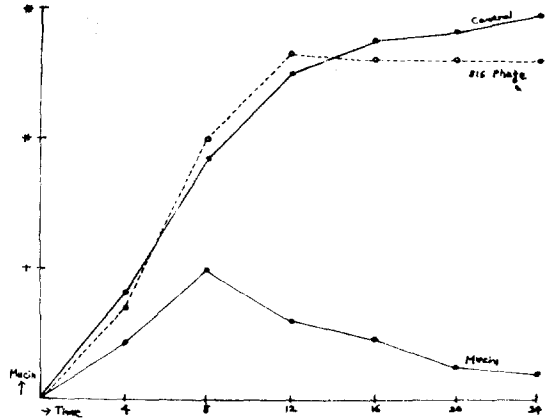


Fig 1. Relation of mucin and 816 phage formation in fermented soybean and flat wheat.

培地를 使用하여 固形培地에서의 phage 繼
代와 broth培地 에서의 phage의 檢出 等으
로 쉽게 證明할 수 있었다.

phage negative의 指示菌은 純粹培養 한
것을 使用하였다. plate나 slant 繼代는 1
次로 準備 해둔 phage를 도달하고 2次로 指
示菌을 도달하는 固形培地上的 二重培養에
서 쉽게 擴散性的 溶菌斑을 여러 모양으로
觀察할 수 있었다. 그 成績을 Table 2에 表
示하였다.

15회의 반복 實驗에서 指示菌인 宿主
bacteria의 出現과 phage의 出現은 反對現象
으로 현저하게 나타났다. 그 成績은 plate나
slant에서 同一하였다. 이때 *Staphylococcus*
type의 共棲 出現이 4회에서 證明 되었다.
Adams의 寒天 重層法으로서의 溶菌斑 形
成 實驗에서 溶菌斑 形成은 容易하였고 溶
菌斑은 平均 直徑 1~2mm의 不正圓形이었
고 周邊이 確實히 透明하게 나타났다(Fig

Table 2. Relation of host strain and 816 phage in the plate and slant agar media

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
plate	host/ phage	-/ ##	##/ +	+/ ##	##/ +	##/ +	-/ ##	+/ ##	##/ -	##/ -	+/ ##	##/ -	##/ -	##/ ##	##/ ##
slant	host/ phage	-/ ##	##/ +	+/ ##	##/ +	##/ +	-/ ##	+/ ##	##/ -	+/ ##	##/ +	+/ ##	##/ -	##/ ##	##/ ##

- : no phage + : rare ## : few ### : many
- : no bacteria + : rare ## : few ### : many
S : present of *Staphylococcus* type



Fig. 2. photograph of plaque of phage 816(light substance is plaque and dark substance is a *B. subtilis* var. 816)



Fig. 3. photograph of plaque formed by 816 phage on an agar plate with *Bacillus subtilis* var. 816 (light substance is a plaque and dark substance is a *B. subtilis* var. 816)

2, 3). 溶菌斑 形成 實驗은 0.7% soft agar 로 重層培養法에 따라 實驗한 結果 그 形成이 容易하였다. phage 感染이 없는 *Bacillus subtilis* var. 816 指示菌을 agar plate 培地에 塗沫한 후 phage 溶液(broth 培地에 培養된 phage 液)을 한 방울 spotting 하여 培養하여 溶菌의 有無를 調査함은 勿論 phage 溶液을 *Bacillus subtilis* var. 816 株의 指示菌과 重層 培養에 依해 均一한 溶菌斑을 얻을 수 있었다. 溶菌斑은 1.0~1.5mm 폭의 不正形이고 不規則 圓形의 透明 하였고 周邊의 규획이 確實할 때와 不確實 할 때가 있었다.

不確實한 境界를 가질 때에는 *Staphylococcus* type의 共棲가 證明되었다. 이 같은 溶菌斑 形成은 phage 溶液 代身에 醱酵콩이나 醱酵밀쌀의 洗滌液으로서도 溶菌斑은 出現하였다. 이때는 더욱 不規則 하였다. phage 共棲 *Staphylococcus* type의 檢出은 Table 2에서 證明한 것과 같이 *Staphylococcus* type만을 純粹分離 할 수 있었고 이 *Staphylococcus* type

가 溶菌 作用을 가지고 있는가를 實驗 하기 爲해 純粹 分離된 本 菌과 *Bacillus subtilis* var. 816 菌과의 混合 培養에서 역시 溶菌 現象이 현저하게 나타났으며 90%의 確율이었다. phage 共棲 *Staphylococcus* type의 保存과 繼代는 agar 培地에서는 2代까지 可能하였으나 3代에서는 不可能하였다. 이것은 phage 共棲 *Staphylococcus* type와 *Bacillus subtilis* var. 816 菌의 二重 培養에서 溶菌 現象으로 그 活性을 쉽게 證明할 수 있었다. 그리고 phage 共棲 *Staphylococcus* type의 培養 培地의 保存은 20°C에서 8~9일 5°C에서는 10~15일간 可能 하였다.

phage의 檢出은 mucin의 生産을 억제하였고 mucin 生産에 對한 억제 實驗結果는 다음과 같다.

phage 稀釋에 따라 mucin의 生成 差異는

Table 4. Inhibition of mucin production by phage

No	3×10 ¹	3×10 ⁴	3×10 ⁷	3×10 ¹⁰	control
1	++	+	-	-	+++
2	+	--	-	-	+++
3	+	--	-	-	+++
4	+	-	-	-	+++
5	±	-	-	-	+++

- : no mucin + : about 10cm ++ : about 50cm +++ : about 100cm (by the length of the string by using the loop)

- : no phage + : rare +++ : few ++++ : many

Table 3. The plaque formed by 816 phage

No	by cultured 816 phage		by cultured 816 phage
1	- (+)	5	+++(-)
2	++ (-)	6	+++(-)
3	- (-)	7	+++(-)
4	- (+)	8	+++(-)

- : no plaque + : rear +++ : few ++++ : many (+) : formed mucin

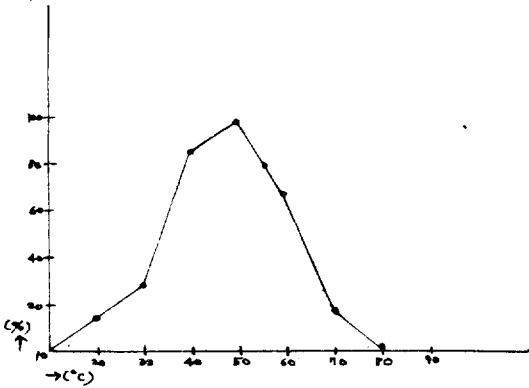


Fig. 4. The dependence of phage reproduction on temperature.

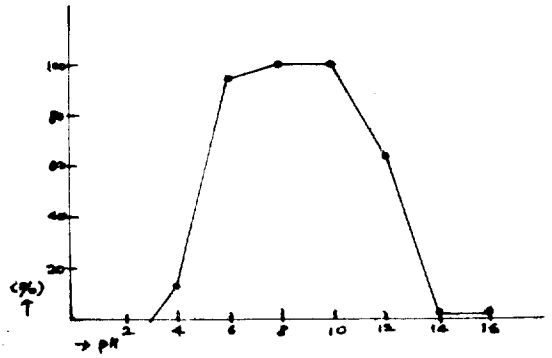


Fig. 5. The dependence of phage reproduction on pH

본 phage의 溫度에 對한 生長은 40~60°C에서 가장 繁殖이 좋았고 最適 發育 溫度는 50°C이었다.

pH에 대한 본 phage의 發育은 pH6~8에서 良好하였다.

Bacillus subtilis var. 816의 溫度에 對한 死滅하는 實驗에서는 60°C에서 大部分 死滅하는 狀態이고 70°C에서는 全滅하는 狀態이었다.

B. subtilis var. 816의 phage 形態를 電子顯微鏡上으로 그 크기와 形態를 調査하였다. 方法으로는 negative stain法과 shadowing 方法으로 하였고 크기는 直徑 約 75~100 μ 의 head는 六角形이었고 螺旋構造를 가진 막대 모양이고 10 \times 165~10 \times 240 μ 의 先端部로 되어있고 꼬리의 先端部는 膨大하여 25 μ 이고 손가락 모양으로 넓게 퍼진 부분이 있었다.

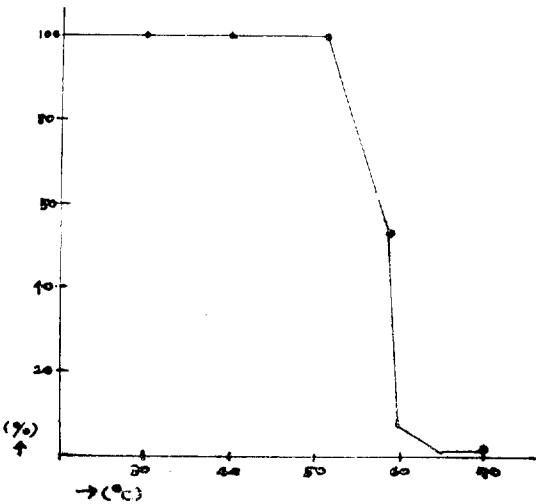


Fig. 6. The death of phages by heat treatment

볼 수 있으나 control에 비해 억제 되는것이 確實하였다(Table 4).

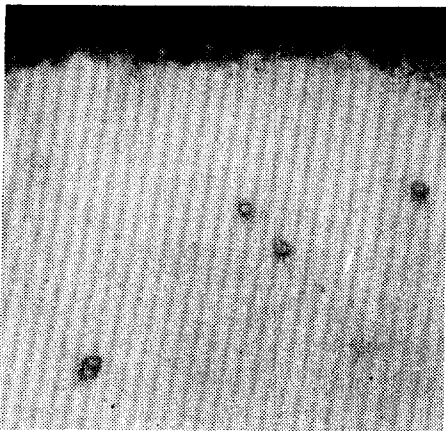


Fig. 7. Micrograph of 816 phage by negative stain method ($\times 40,000$)

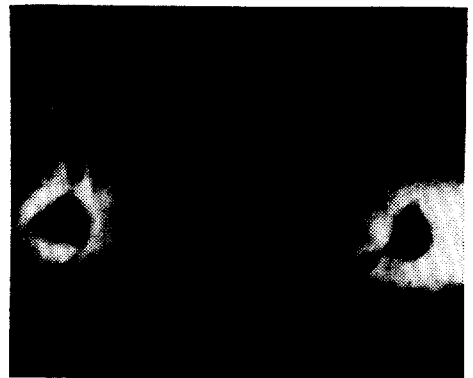


Fig. 8. Micrograph of 816 phage by negative stain method ($\times 90,000$)

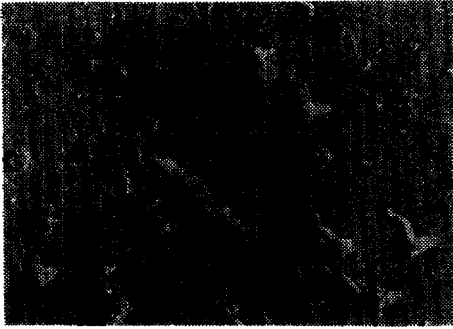


Fig. 9. Micrograph of 816 phage by shadowing method ($\times 60,000$)

Bacillus subtilis var. 816 phage가 그菌體에 침입하여 파괴하고 있음을 實驗으로 밝힐 수 있었다. 즉 꼬리 部分을 菌體에 附着시키고 內容 物質이 體內에 침입시키고 있음을 證明할 수 있었다.

考 察

Bacillus subtilis var. 816^{9,10}을 使用하여 蒸餾콩 또는 蒸餾밀쌀을 醱酵시킬때 粘質物質(mucin)의 出現에 따라 phage의 出現을 間接적으로 알아낼 수 있었다. 異常醱酵時에는 phage가 强하게 나타났다. Fujii *et al*^{3,4} 등이 *Bacillus natto* 菌株 8株에 對한

實驗에서 粘質物質과 溶菌斑(plaque)의 相互關係가 있다는 報告는 본 實驗의 結果와도 一致 되는 點이 있었다. 816 phage의 檢出을 蒸餾콩이나 蒸餾밀쌀에서 모두 證明되었고 異常醱酵와 mucin 결핍에서는 100% 본 實驗의 phage가 證明되었다. 밀쌀醱酵에서 證明된 본 實驗의 結果는 처음인 것으로 본다. 溶菌斑 形成에 對한 實驗에서 본 phage가 1.0~1.5mm폭의 不正形 溶菌斑 形成도 證明되었으나 phage 繼代의 1代에서 2~3代까지는 純粹하게 保存 繼代가 잘 되었으나 3~4代에 가서는 *Staphylococcus type*이 發生하여 混合됨에 따라 본 816 phage의 보존은 거의 不可能 하였고 Fujii³, Hemphill *et. al*⁷ 등의 여러 文獻에서도 전혀 밝혀지지 않았다. 溶菌斑 現象은 溶菌性 酵素의 存在를 證明하는 것이고 Adams¹¹ Glenn⁶ Tagg¹⁷에서도 相當한 內容이 밝혀져 있으나 *Staphylococcus type*等 다른 細菌에 依한 關係는 언급하지 않았다. 그러나 Fujii³는 異常醱酵의 原因으로서의 natto-phage 뿐만 아니라 많은 雜菌의 汚染도 無視 못할 事實이라 하고 있다. 본 816 phage는 *Streptococcus type*와 같이 共存함을 여러 實驗에서 證明되었으나 그 生理的 實驗은 現在 계속 研究中이다.



Fig. 10. Micrograph of particles of phage 816 absorbed to a *Bacillus subtilis* var. 816 cell
Note : that the virions attach by the tip of their tail photographed by negative stain method $\times 40,000$

Staphylococcus type 共存 phage의 保存은 20°C에서 8~9일간 5°C에서 10~15일간 可能하였다. phage의 溫度에 對한 生長은 40~60°C이고 最適 發育 溫度는 50°C이었고 pH6~8이 좋았고 最適 pH는 7.0이었음은 Hemphill, Whiteley⁷⁾에서의 *Bacillus subtilis* phage의 性質과 Fujii³⁾의 natto-phage의 性質 報告와 大同小異하였다. 본 816 phage의 形態는 六角形의 75~100 μ 의 head에 螺旋構造를 가진 막대상의 10 \times 165~10 \times 240 μ 의 꼬리부로 되어 있고 끝 부분은 膨大하고 掌狀(손가락상)의 넓게 퍼진 부로 되어 있었고 이같은 構造는 Hemphill⁷⁾ William¹⁹⁾ Price¹⁵⁾ McAttister¹⁴⁾ Green⁵⁾ 등이 *B. subtilis* phage의 SP82G株에 유사하게 해당하거나 Hemphill⁷⁾ Liljemark^{12, 13)}

가 取扱하는 *B. subtilis* phage의 ϕ 25株에 유사함을 알수 있고 Fujii³⁾의 *Bacillus natto* phage라고도 유사하였다. 그러므로 본 816 phage는 *B. subtilis* phage의 SP82G, 25株에 유사한 形態를 가졌으므로 Hemphill and Whiteley의 *subtilis* phage의 分類의 virulent phage group 1에 類似하나 Unusual bases의 HMU(hydroxymethyluracil)에 對한 實驗 등이 없어 단정 하기가 곤란하다. 또한 Fujii³⁾의 natto-phage와도 흡사 하였다. 그러나 많은 文獻에서는 *Staphylococcus* type와 共棲하는 變形體, 전파자 또는 운반자의 役割에 對한 것은 찾아볼 수 없었다. 이 問題는 본 phage 해결의 重要한 일이므로 계속 研究되어야 한다.

摘 要

Bacillus subtilis var. 816 菌株는 “*Bacillus* 菌을 使用한 調味食品 製造用 醱酵종의 製造”에 쓰여지는 菌株이나 應用面에 있어서 大豆 또는 밀쌀의 醱酵가 고르지 못 할때가 많았다. 그 原因을 追求한 結果 bacteriophage에 基因한 事實임을 確認하고 그것을 檢출할 수 있었다. 檢出된 bacteriophage는 Hemphill and Whiteley의 分類에 따르면 *Bacillus subtilis* 毒性 phage 第 1群(virulent phage group 1)에 屬하여 SP82, ϕ 25株에 類似하였다. 實際로 大豆 密쌀을 醱酵시킬때 水分의 異常增加, 粘質의 消失, 雜菌의 發生 등을 招來하는 現象은 phage에 基因되었다. 特別 phage의 增殖으로 粘質素의 減小은 顯著하였다. 본 phage는 30°C에서 漸次 增殖하고 40~50°C에서 더욱 잘 生長하였고 70°C가 되면 弱화 死滅하는 것을 보았으며 最適水素이온濃度는 pH 7.4~8.0이었다. 본 phage 增殖時에 一種의 *Staphylococcus* type의 共棲는 特異한 事實로 研究되었다.

REFERENCES

- Adams, M.H., 1959, "Bacteriophage" Interscience publishur, Inc, New York
- Edgar, R.S. and Wood, W.B., 1966, Morphogenesis of Bacteriophage T₄ in Extracts of Mutant-infected cells. *Proc. N.A.S* 55, 399~505
- Fujii H. et al, 1967, On the formation of Mucilage and Isolation of Bacteriophage by *Bacillus natto*. *J. Agricultural chemistry* 41, No. 1
- Fujii H. et al, 1963, On the formation of Mucilage by *Bacillus natto*. *J. Agricultural chemistry* 37, No. 8
- Green, D.M. and Laman, D., 1972, Organization of gene function in *Bacillus subtilis* bacteriophage SP82G *J. virol.* 9, 1033~1046
- Green. D.M., 1976 Production of extracellular proteins by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol* 30, 41~62
- Hemphill. H.E. and Whiteley, H.R., 1975, Bacteriophages of *Bacillus subtilis*. *Bacteriological Reviews*, 39 257~315.
- Iizuka, H, 1968, Catalogue of cultures. JFCC (The Japanese Federation of Culture Collections of Microorganisms)
- Lee. Z.S., 1967, Catalogue of cultures KFCC (The Korean Federation of Cultures Collections of Microorganisms).
- Lee. Z.S., 1974, Studies on the *Bacillus subtilis* var. 816. Ministry of Education Report of Research.

11. Lee, Z.S, 1974, Techniques fermentational foods by *Bacillus subtilis* var. 816 obtain a patent from the patent Bureau No. 258
12. Liljemark, W.F. and D.L. Anderson, 1970, Structure of *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 25 and ϕ 25 deoxyribonucleic acid. *J. virol.* **6**, 107~113
13. Liljemark, W.F, and D.L. Anderson, 1970, Morphology and physiology of the intracellular development of *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 25. *J. virol.* **6**, 114~124
14. McAttister, W.T. *et al.*, 1972, Bacteriophage SP 82G inhibition of intracellular deoxyribonucleic acid inactivation process in *Bacillus subtilis*. *J. virol.* **10**, 51~59
15. Price, A.R. *et al.*, 1972, Thymidine triphosphate nucleotidohydrelase and deoxyuridylylate hydroxymethylase induced by mutants of *Bacillus subtilis* bacteriophage SP82G. *J. virol.* **10**, 1240~1241
16. Showe, M.K. and Black, L.W. 1973, Assembly core of Bacteriophage T₄ : and intermediate in head formation. *Nature New Biology* **242**
17. Tagg, J.R. Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W, 1976, Bacteriophage of Gram positive Bacteria. *Bacteriological Reviews*, **40**, 722~756
18. Whitely, H.R. *et al.*, 1974, Mixed infection of *Bacillus subtilis* involving bacteriophage SP82G and ϕ 22. *J.Virol.* **14**, 1463~1469
19. Williams, G.L. *et al.*, 1972, Early extracellular events events in infection of competent *Bacillus subtilis* by DNA of bacteriophage SP 82G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **69**, 1545~1549