

**L-글루타민산 生產菌 *Brevibacterium lactofermentum*의  
Bacteriophage에 關한 研究**

李 泰 雨

(清州女子師範大學 生物學科)

**Studies on the Bacteriophages of  
*Brevibacterium lactofermentum***

**RHEE, Tai Woo**

(Dept. of Biology, Cheongju Women's Educational College)

**ABSTRACT**

Many industrial processes those employ bacteria are subjected to phage infestations. In L-glutamic acid fermentations using acetic acid, the phage infestations of the organisms have been recently recognized. In efforts to elucidate the sources of phage contamination involved in the abnormal fermentation, a series of study was conducted to isolate the phages both from the contents of abnormally fermented tanks and the soil or sewage samples from the surroundings of a fermentation factory, to define major characteristics of the phage isolates, and finally to determine the correlation between the phage isolates and temperate phages originating from the miscellaneous bacterial species isolated from the soil or sewage samples. The results are summarized as follows;

- 1) All phages were isolated from the irregular fermentation tanks and soil or sewage samples, and they were designated as phage PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, PR-6, and PR-7, in the order of isolation. These PR-series phages were proved to be highly specific for the variant strains of *Br. lactofermentum* only, namely, phage PR-1 and PR-2 for *Br. lactofermentum* No. 468-5 and phage PR-3~PR-7 for *Br. lactofermentum* No. 2256. By cross-neutralization test, the 7 phages could be subdivided into 3 groups, i.e., phage PR-1 and PR-2 the first, phage PR-3, PR-4, PR-5, PR-6 the second, and the phage PR-7 the third.
- 2) The 7 phages were virulent under the experimental conditions. They produced plaques with clear and relatively sharp margins without distinct halo. The mean sizes of plaques were 1.5mm in diameter for phage PR-1 and PR-2, and 1.0mm for phages PR-3~PR-7. Double layer technique modified by Hongo and described by Adams, was applied to assay of the PR-series phages. The factors influencing the plaques were as follows; young age cells of host bacteria cultured for 3~6 hours represented the largest number and size, optimum was pH 7.0, incubation temperature was 39°C, and agar concentration and amount of overlayer medium were 0.6% and 0.2ml, respectively.

- 3) PR-series phages were stable in 0.05M tris buffer and 0.1M ammonium acetate buffer solution. The addition of  $5 \times 10^{-3}$ M magnesium ion effectively increased the stability. Thermostability experiments indicated that PR-series phages were stable at the temperature between 50°~55°C in nutrient medium, 45°~50°C in buffer solution. However, the phages were completely inactivated at 60°C and 65°C within 10 minutes. The phages were stable at the range of pH 6~9 in nutrient medium and of pH 8~9 in buffer solution, respectively. Exposure of the phages to UV for 25, 60 and 100 seconds resulted in the complete loss of infectivity, respectively.
- 4) Electron microscopy showed that PR-series phage particles exhibited rather similar morphology, differing in the size. All of PR-series phages had a multilateral head and had a simple long tail about three to five times long as compared with head. By the size, phage PR-1 and PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, and PR-6 and PR-7 were classified into same groups, respectively. The head and tail size of phage PR-1, PR-5, PR-5(T) and PR-7 were 85nm, 74nm and 235nm and 350nm, and 72nm and 210nm, respectively.
- 5) Nucleic acids of PR-series phages were double stranded DNA. The G+C contents of phage PR-1, PR-5 and PR-7 were 56.1, 52.9 and 53.7, respectively. The values of G+C contents derived from the  $T_m$  were in agreement with the chemically determined values.
- 6) PR-series phages effectively adsorbed on their host bacteria at the rate of more than 90% during 5 min. K value for phage PR-1, PR-5 and PR-7 were calculated to be  $6 \times 10^9$  ml per minute, respectively. The pH of the medium did effect adsorption rate, but both temperature and age of host cells did not. Generally, optimum adsorption condition of phages seemed to be almost same as optimum growth conditions of host bacteria.
- 7) In one-step growth experiments, the latent periods at 30°C for PR-1, and PR-7 were about 70, 50 and 55 min, respectively. The corresponding average burst size was 200, 70 and 90, respectively. Lysis period according to the multiplicity of infection and a phage series. In case of m.o.i. 100, strain No. 2256 (PR-5) and No. 468-5(PR-1) failed to grow and turbidity decreased after 50 and 70min, respectively.
- 8) In the lysate of a plaque purified phage PR-5 infected bacteria, there observed 2 types of phage particles, i.e., phage PR-5 and PR-5 (T) of similar morphology but differing at the length of phage tail, and phage tail-like particles. The phage tail-like particles could be divided into 4 types by the length. Induction experiments of *Br. lactofermentum* with UV irradiation, mitomycin C or bacitracin treatment produced neither phage PR-5 (T) or phage tail-like particles.
- 9) No lysis occurred when the growth of 7 strains of miscellaneous bacteria, isolated from soil and sewage samples, were inoculated with either phage PR-5 (T) or phage tail-like particles the inoculation of phage PR-5 pellet resulted in the growth inhibition of the organisms in the spot test. The lysates obtained from 3 miscellaneous soil derived bacteria following mitomycin C treatment the growth of *Br. lactofermentum*, but did not lyse the bacterium.

## 序　　論

Bacteriophage의 發見은, Twort (1915) 가 세균 콜로니의 透明變換을 보고 한 것과 이와는 별도로 d'Herrelle (1917) 역시 “赤痢菌에 대한 눈에 보이지 않는 拘抗物”이라는 論文에서 抗細菌 바이러스의 存在를 밝혀내고 이를 bacteriophage라고 부른 것이 최초이다. Bacteriophage (以下 파아지라고 略함)에 관한 초기 연구는 주로 파아지에 의한 질병의 치료와 예방을 위하여 병원세균의 파아지를 대상으로 삼았으며 (Stent, 1963), 특히 大腸菌 파아지의 집중적인 연구는 오늘날 分子生物學의 눈부신 발전을 가져와 生命의 本質을 이해하는 데 중요한 역할을 맡고 있다.

파아지가 工業微生物에 미치는 영향에 관한 研究는 이보다 훨씬 늦어서 Whitehead (1953) 등이 밝혀낸 치즈 제조시에 야기되는 酸生產의 지체현상이 Streptococcal phage의 오염에 의한 것이라는 사실을 보고한 것이 최초이며 협기성균인 butanol-acetone 生產菌의 異常醣酵 역시 파아지 오염에 의한 것임이 밝혀졌다(木下等, 1952; 本江等, 1965). 그 밖에도 streptomycin 생산균의 Actinophage(Saudek & Collingsworth, 1947), 醣酵乳 生산균 Lactobacillus의 파아지(村田, 1968), amylase 生산균인 *Bacillus subtilis*의 파아지(北原와, 金子, 1958) 등이 계속하여 발견되므로서 파아지 오염이 醣酵工業에 있어서 해결되지 않으면 안될 중요한 문제로 대두되었다. 파아지 오염을 극복하는 대책으로는 통상 파아지 耐性菌株를 분리하여 사용하며(Burnet & Lush, 1936; 山田, 1972). 그 밖의 방법으로는 계면활성제, (Oki et al., 1968), 抗生劑(Oki et al., 1965) 등도 사용하고 있으나 모든 방법이 파아지 오염을 모면하는 일시적인 수단에 불과하며 궁극적인 해결방법이 되지 못하고 있다. 이를 증명하는 예로는 本江等(1965)이 행한 연구가 있다. 즉 그는 butanol-ac-

etone 生산균인 *Cl. saccharoperbutylacetonicum*의 탱크 배양중에 발생되는 파아지 汚染을 防除하기 위하여 파아지가 발생할 때마다 파아지의 耐性菌을 분리하여 使用하였으나, 耐性菌마다 1年間에 다른 새로운 12개의 HM 파아지가 連續하여 發生하였던 희귀한例를 報告하고 있다.

1959년부터 내규모 醣酵法으로 바뀐 L-글루타민산 生산공장에서도 파아지에 의한 피해가 나타나 발효속도의 저연 내지는 정지, 용균현상등의 이상발효가 보고되고 있으며(土屋等, 1963), 이상발효의 정도는 배지의 조성과 파아지의 오염시기, 균과 파아지간의 농도 및 배양조건등에 따라 차이가 있다. L-글루타민산 生산균은 상당히 광범위하게 보고되어 있으나(山田, 1972), 발효공업에 이용되는 菌은 주로 陽性無胞子形成菌인데 그중 *Mycobacterium*(Gardner & Weiser, 1947) 및 *Corynebacterium*(Freeman, 1951) 등에서 파아지가 분리되었고, 微生物工業에 있어서는 L-글루타민산 生산균에서 처음 보고되고 있다. Oki et al., (1964 a, 1967)은 *Brevibacterium lactfermentum* 2256의 파아지를 糖基質의 異常醣酵槽(P系 파아지)와 공기중(AP系 파아지)에서 분리하여 血清學의으로 5群으로 分類하였으며, 그 밖에도 *Microbacterium ammoniaphilum*의 파아지(瀬戸等, 1965 a, b, c) 및 *Br. glutamigenes*(Su, 1966)의 파아지등의 연구가 있다.

한편 L-글루타민산 生산 공정에 있어서 *Br. lactofermentum*은 糖質原料以外에도 초산을 원료로 하여 L-글루타민산을 생산할 수 있음이 밝혀졌다(奥村等 1962). 이에 따라 生산공정은 점차 초산원료로 전환 됨으로서 生산원가의 절감과 아울러 이제까지 번번히 發生하던 파아지의 오염에 의한 발효의 이상도 극복할 수 있게 되어, 저자가 대상으로 조사한 三樂오션공장(日本, 九州)에서도 1970年부터 단계적으로 원료를 초산으로 전환하였다. 사용균주는 *Br. lactofermentum* 468-5였으며, 초산으로 원료를 전

한한 후부터 발효공정은 약 2년간 순조롭게 진행되었다. 그러나 그 후 酵酶工程에 다시 異常이 나타났는데 그 원인을 조사한 결과, 그때까지 초산基質을 使用한 L-글루타민산 발효공정에 파아지가 발생하였다는 예가 보고 된 바 없었던 파아지에 의한 酵酶의 異常임이 밝혀졌다. 이에 本論文은 초산原料의 L-글루타민산 酵酶工程에 파아지에 의한 이상이 생긴 것을 계기로, 이와같은 파아지가 發生하는 것이 溶原파아지(Temperate phage)에 의한 自體誘發인지 아니면 주변 토양 속에 분포하는同一屬 내지는 다른 屬 세균의 각종 파아지로 부터 유입되는 毒性 파아지의 오염인지의 여부를 밝히고자 異常 酵酶槽로부터 파아지를 분리하였고, 또 공장주변의 토양 및 汚泥 등에서 각종 雜菌과 더불어 *Br. lactofermentum*의 여러 변이 주 및 *Br. flavum* 등 직접생산에 쓰이는 菌株를 宿主로 하는 파아지를 분리하여 이들간의 相互關係를 조사함으로써 異常酵酶를 일으키는 파아지의 汚染源을 解明코자 하였으며, 아울러 異常酵酶槽과 土壤 및 汚泥에서 분리한 파아지의 形태와 각종 性狀 및 새로이 발견된 *Brevibacterium*의 파아지 尾樣粒子等에 關하여 調査研究한 結果를 報告코자 한다.

## 材料 및 方法

### 1. 使用菌株 및 培地

宿主菌으로는 streptomycin 耐性파아지耐性을 갖춘 *Br. latofermentum* No. 468—5와 특수한 耐性을 갖추지 않았으나 높은 收率로 L-글루타민산을 生産하는 *Br. lactofermentum* No. 2256을 使用하였다. 그 밖에 공장주변의 土壤과 汚泥에서 分離한 수백 개의 菌株가 사용되었고, *Bacillus* group, *Microbacterium* 및 수종의 *Brevibacterium* 屬의 菌株가 사용되었다.宿主菌과 파아지增殖에 사용한 培地는 nutrient medium (NM배지)으로서 그組成은 glucose 10g, polypeptone 10g, meat extract

7g, yeast extract 2g, NaCl 3g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.2g, 증류수 1,000ml로서 pH7.0에 맞춰 115°C에서 15分間 保溫하였다. 한천 농도는 下層培地 1.2%, 上層培地는 0.6%였다.

### 2. 標本의 採集과 野生菌株의 分離

Fig. 1에서 표시된 바와 같이 공장주변의 15개 지점은 선정한 후, 1973年 1月부터 12月까지 매월 전 지점에서 표본을 채취하였다. 표본의 채취는 멸균한 대나무 칼로 表面에서 10cm 깊이까지 土壤, 汚泥 먼지 등을 채취하여 멸균한 비닐 자루에 넣고 4°C의 항온실에 保存하였다. 야생균주의 분리는 회석법에 의한 단 colony법으로 分離하였고 한 표본에 대해 3枚의 平板을 使用하였다.

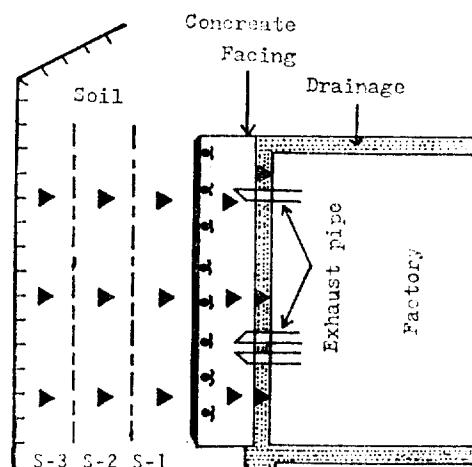


Fig. 1. Map of sampling position in the factory  
▲: Sampling position ●: Tap

### 3. 파아지의 分離 및 定量

#### (1) 파아지의 分離

##### ① 異常酵酶槽에서의 分離

이상 발효고를 5,000×g로 10분간 원심 분리한 上清을 NM배지로 적당히 회석하여 평판당 5~50개의 용균반(plaque/plate)이 생기게 한 후, 한 시간 정도 배양한 숙주균 배양액 10ml에 이 용균반 하나를 감염시켜 용균이 될때까지 진탕 배양한다(Bradley, 1965; Hongo et al., 1965 a). 이러한 조

작을 3회 반복하여 얻은 용균액을 순수한 파아지株로 하였다.

### (2) 土壤 및 汚泥에서의 分離

표본 1g을 peptone 5ml에 희석한 후 20分間 원심분리( $5,000 \times g$ , 4°C)하여 얻은 上清 0.5ml를 숙주균 배양액(OD<sub>660</sub>0.3) 10ml에 접종하여 15시간동안 진탕배양한 다음 이 培養液에다 chlorform을 가해서 (30°C, 30분) 숙주균을 죽인 후에, (富澤, 1970) 이를 원심분리( $5,000 \times g$ , 10분)하여 얻은 上清을 가지고 각 檢定菌에 대해서 spot test하여 파아지를 분리하였다.

### (2) 파아지의 定量

파아지의 定量은 重層法(double layer method)에 의한 溶菌斑計數法(plaque counting method)으로 정량하였으며(Adams, 1959), PR-파아지의 용균반이 형성되는 각 조건은 조사 후에 결정하였다.

## 4. 分離한 파아지의 特性

### (1) 宿主域의 決定

檢定菌을 파아지가 용균시킬 수 있는가의 여부로 판정하였다. 즉 하룻밤 배양한 검정균을 중증법으로 접종하고, 평판위의 4곳에다가 파아지 용균액( $10^8 \text{ PFU/ml}$ )을 0.5ml씩 spot한 후 30°C에서 15~24시간 동안 배양시켰다(Hongo et al., 1965 a; Oki et al., 1964 d). 판정은 용균에 의해 투명반이 생성되는가의 여부로서 결정하였다. 사용한 菌株는 본 실험실(日本九州大 微生物學 研究室)에 보관되어 있는 것이었다.

### (2) 非溶原菌株와 파아지 型의 決定

宿主細菌의 용원성 여부는 NM培地와 초산배지에서 군주 No. 468-5와 No. 2256을 15시간 배양하여 원심분리한 후, 上清을 얻어서 spot test하여 決定하였다(Luria, 1951; Hongo et al., 1965 a). 分離된 파아지가 毒性型(virulent)인가 溶原型(temperate)인가의 決定은 무작위적으로 10주씩의 耐性菌을 분리하여 순화시킨 후, 이 내성균으로부터 파아지가 故出되는가의 여부를 조사하여 決定하였다(本江等, 1965).

### (3) 파아지의 安定性

① 희석액에서의 파아지 安定性: 파아지의 原液  $10^8 \text{ PFU/ml}$ 를 피검액으로  $10^5$ 배 희석하여 파아지가  $10^4 \text{ PFU/ml}$ 되게 한 후, 30°C에서 60분간 방치한 다음 0.1ml를 취해서 잔존 파아지를 정량하였다(Hongo et al., 1965 b).

② pH안정성: 배지의 pH를 N-HCl과 N-NaOH를 가하면서 유리전극 pH메타(Hitachi M3형)로 측정하여 pH~pH11까지 조정한 뒤, 파아지액( $10^6 \text{ PHU/ml}$ ) 0.1ml를 소정 pH의 배지 또는 완충액 9.9ml에 넣고 30°C에서 60분간 반응시킨 후에 잔존 파아지의 양을 정량하였다(Hongo et al., 1966 d; Oki et al., 1964 b).

③ 温度不活性化: 파아지액( $10^6 \text{ PFU/ml}$ ) 0.1ml를 미리 소정 온도의 항온조 속에 놓아둔 0.9ml의 배지 또는 완충액에 가한 후, 10분 후에 0.1ml를 취해 잔존 파아지의 양을 정량하였다(Hongo et al., 1966 d; Oki et al., 1964 b).

④ 紫外線照射에 의한 不活性化: 0.1M 초산 암모니움 완충액으로 희석한 파아지액( $10^4 \text{ PFU/ml}$ )을 샤크에 1ml 두께로 넣고 光再活性化(Dulbecco, 1950; Bowen, 1953)를 방지하기 위해 암실에서 자외선 살균등(東芝電氣 GL 15型 15W 주파장 257nm)으로 소정의 시간동안 조사한 후에 잔존 파아지의 양을 정량하였다(Harm, 1963). 시료와 자외선등과의 거리는 40cm였다.

### (4) 파아지의 電子顯微鏡的 觀察

#### ① 파아지 液의 濃縮 및 精製

파아지 액의 浓縮과 정제는 Hongo et al., (1966 c)이 사용한 방법을 따랐다. 즉 용균액( $10^{10} \text{ PFU/ml}$ )을 저속 원심분리( $5,000 \times g$ , 10分)하여 잔사는 버리고 上清을 milipore filter로 여과한 후, 이를 다시 고속 원심분리( $30,000 \times g$ , 60分)하여 高力價의 파아지액을 정제하였다. 그 方法은 Fig. 2와 같다.

#### ② 電子顯微鏡用試料의 作成

Microscopic grid(銅, 3mm, 150mesh)에

溫式法으로 collodion膜을 덮어 상온에서 氣乾하고, 정제한 파아지 혼탁액을 분무법으로 collodion 막위에 고정하여 (william & Fraser, 1953) 40°C에서 건조한 후 carbon

蒸着하였다(Hitachi HUS-3型 使用). 사용한 전자 현미경은 JEM-100 B型(Japan Electron Opticus Laboratory Ltd.)이었다.

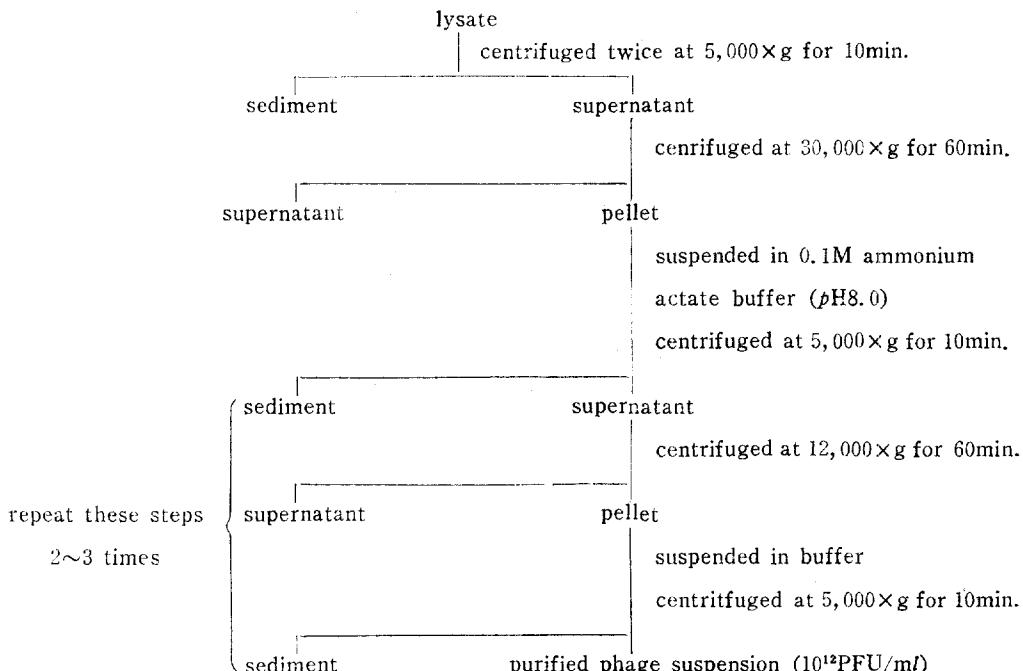


Fig. 2. Concentration and purification of the PR-phages.

### (5) 파아지의 血清學的 檢查

#### ① 抗파아지 血清의 製造

高力價의 抗原파아지 용액( $10^{12}$ PFU/ml)은 Fig. 2와 같이 정제하여 0.1M 초산 암모니움 완충액(pH 7.4)으로 혼탁시켜 4°C에 보존하면서 사용하였으며, 抗血清을 얻기 위하여 抗原인 파아지 혼탁액 1ml를 토끼의 耳翼靜脈에 週 1回씩 주사하여 10週間 계속하였다. 8回부터는 5ml의 피를 耳翼靜脈에서 채혈하여 K價를 측정하였다. 채혈 전에는 24시간동안 紿食을 중단하여 血清을 놓게 하였고, 10週後에 耳翼靜脈으로부터 20ml씩을 採血하였다. 채혈한 피는 시험관에 넣어 30°C에서 60분간 방치한 후에 혈병을 제거하고, 원심관에 넣어 냉장고 속에 냉동시켜 두었다가 1夜 방치한 뒤에 이를 원심분리하여서 血清을 얻었다. 血清은 密栓하여 4°C에 보존 하였으며 사용하기에 앞

서 56°C에서 30분간 방치한 후에 사용하였다. 또한 숙주균체에서 유래하는 항체도 흡수 제거하였다(Hongo et al., 1966 d; Oki et al., 1967).

#### ② 抗파아지 血清의 定量

K價의 측정은, 항파아지 血清의 2倍 연속 계열을 만들어 이 희석액 0.5ml와 각 파아지액 0.5ml씩 ( $1 \times 10^8$ PFU/ml)을 섞어 혼합시킨 후에 30°C에서 5分間 反應시켰다. 반응이 끝난후, 反應液 0.1ml를 취해서 氷冷培地를 가지고 바로 10<sup>3</sup>倍로 희석하여 잔존 파아지의 수를 정량하였다. 交叉中和反應은 파아지액 ( $10^5$ PFU/ml)과 抗血清(K=10)을 각각 0. ml씩 혼합하여 같은 방향으로 정량하였으며, K價는 다음 式으로 구하였다.

$$K = 2.3D/T \cdot \log P_o/P$$

P는 반응한 파아지의 수,  $P_o$ 는 T 分後의 미반응 잔존 파아지의 수, D는 반응액내의

抗파아지血清의 희석배수이다 (Dellbrück, 1945; Jerne & Scovstad, 1953).

### (6) 파아지의 生育特生

#### ① 파아지의 吸着

파아지액 ( $1 \times 10^8$  cells/ml)과 균액 ( $1 \times 10^8$  cells/ml)을 각각 1ml씩 넣고 잘 섞어서(반응온도  $30^{\circ}\text{C}$ ) 0, 1, 3, 5분 후에 각각 0.1ml씩을 취하여 冰冷한 배지 9.9ml에 넣은 후 100배로 희석함과 동시에 흡착의 진행을 정지시키기 위해 바로  $5,000 \times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ )로 원심분리하여 균에 흡착한 파아지를 침강시켰다. 다음 상청액속에 남은 未吸着 잔존파아지數를 용균반계수법으로 정량하였다 (Hongo et al., 1966 e).

#### ② 一段增殖實驗

Ellis & Delbrück (1939)의 방법에 의했다. 즉 균액 ( $1 \times 10^8$  cells/ml) 0.9ml와 파아지액 ( $1 \times 10^8$  PFU/ml) 1ml를 섞어  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 吸着시켰다 (感染重度는 0.1). 이 반응액에다  $K=10$ 의 抗血漿 0.1ml를 다시 5분간 반응시킨 후  $1:10^4$ 배 희석하여 抗血清의 作用을 없애고 일정시간마다 0.1ml씩을 取해 파아지수를 정량하였다 (Hongo et al., 1966 e).

#### ③ 파아지에 依한 溶菌

溶菌實驗은 18ml의 NM 액체배지를 넣은 T-시험판에 숙주균을 OD<sub>660</sub>  $0.1 \times 10^6$  cells/ml 되게 접종하여  $30^{\circ}\text{C}$ 로 진탕 배양하면서 OD<sub>660</sub> 0.3 ( $1 \times 10^8$  PFU/ml)이 되었을 때 파아지를 (m.o.i. 0.01~100) 숙주균에 감염시켜 용균정도를 측정하였다 (Hongo et al., 1966 f).

### (7) 파아지의 核酸

#### ① 파아지의 濃縮精製와 DNA의 分離

파아지의 정제는 Fig. 2와 같은 方法으로 2번 정제 한 다음 trypsin ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 RNase ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 DNase ( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ )로  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 처리한 후 (Hongo et al., 1966 c) 3번 더 분획 원심분리하여 이를 효소를 제거하고  $2 \times 10^{12}$  PFU/ml 되게  $5 \times 10^{-3}$  M Mg<sup>2+</sup> 이온을 첨가한 0.05M 초산암모니움 완충액 ( $\text{pH}7.4$ )으로 혼탁시켜 사용하였다.

DNA의 추출은 Kaiser & Hogness (1960)의 方法을 따랐다. 즉, 파아지 혼탁액에 동양의 phenol 포화수 [증류한 phenol을 0.05M 초산암모니움 완충액 ( $\text{pH}7.4$ )에 포화시킨 용액]을 가해  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 DNA를 용출시킨 다음 원심분리 ( $20,000 \times g$ , 15분)하여 상층액은 다른 시험판에 옮기고 잔사는 한번 더 같은 方法으로 처리하여 상층액을 분리한 후 이 수용액에다 2배량의 absolute ethanol을 가해 遊離되는 DNA침전을 유리막대로 감아내었다. 모든 조작은 열음속에서 진행되었으며 ethanol 온도는 낮을수록 반응이 잘 나타났다.

#### ② 파아지 核酸의 鹽基組成

파아지 속에 含有된 核酸의 종류는 diphenylamine 반응 (Burton, 1955)과 hydroxylamine 반응 (Schuster, 1961)에 의해 定性하여 결정하였다. DNA의 酸分解는 Wyatt & Cohen (1953)의 방법을 따랐다. 즉 약 5mg의 DNA를 파이렉스 유리관 (10~100mm)에 넣고 formic acid (98~100%, Merk제) 0.5ml를 가해서 감압하면서 주동이를 녹여 봉합한 후에  $175^{\circ}\text{C}$ 로 30분간 가열하였다. 충분히 식힌 다음 판을 열어 감압증발 전조시킨 후 1N-HCl을 가해 水溶性物質을 잘 녹힌 다음 micropipette으로 이 시료 0.01ml를 여파지 (동양여자 No. 51)에다 작게 spot하였다. 대조로서는 동시에 5개의 염기 (adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil; Nutritional Biochemical Corporation製)를 같이 spot하였다. (Hongo et al., 1966 g). 용매는 Wyatt & Cohen (1953)의 isopropanol (65%, v/v) hydrochloric acid (2N) 수용액을 사용하였고 하강법으로 전개하였다. Chromatogram 上의 spot는 Manasulu light (Manasulu Chemical Industry 製)으로 검출하여 작게 잘라서 시험판에 넣고 0.1N-HCl 5.0ml를 가해  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간 염기를 용출시켰다. 용출액은 원심분리하여 (4,000r.p.m., 5분) 上清을 UV-spectrophotometer (Hitachi EPM 2A형)로 측정하였다. 최대 흡수파장에 있어서의 흡

수도와 분자흡수계수로부터 다음식에 따라 염기량을 구하였다(Bendich, 1975).  $M = \frac{E}{5 \times OD}$  M은 염기의 몰수, E는 분자 흡수 계수, OD는 최대흡수파장이며, 분자 흡수 계수는 Wyatt & Cohen (1973)이 선택한 값을 택했다.

### (3) DNA의 温度變性

DNA의 이중나선은 온도의 상승에 따라 수소 결합이 끊어져 변성을 일으키므로 (Doty, 1961) 온도에 따른 흡광도의 변성을 측정하였다. 방법은 Marmur & Doty(1962)의 方法을 따랐다. 즉 DNA용액(표준 saline-citrate 용액에 거의 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 녹아 있는 것)을 작은 시험관에 넣고, 10°C 상승에 약 2분씩 걸리게 하여 같은 온도에서 10분간 둔 후, 260nm에서 흡광도를 측정하였다 (Hongo et al., 1966 g). 염기의 조성율은 Marmur & Doty (1962)의 式  $G+C = (T_m - 69.3)/0.41$ 에 의해 계산하였다.  $T_m$ 은 比吸光度의 중간점이다.

## 5. *Br. lactofermentum*의 파아지 PR 5-(T)와 파아지 尾樣粒子의 誘發

### ① 自然誘發: 菌을 정지기까지 배양한다

음 균액을 원심분리( $5000 \times g$ , 20분)하여 얻은 上清을 다시 membrane filter(pore size 0.8 $\mu$ )로 여과하여 여과액을 해당菌에 대해 spot test하여 조사하였다(Hongo et al., 1965 a).

② 자외선에 의한 誘發: 각 균주를 액체 배양 OD<sub>660</sub> 0.2~0.3의 균액을 별균사례에 옮겨(두께 2mm以下) 자외선 燈(15W, 주파장 257nm) 밑에 30cm의 거리에 두고 40~120초 조사한 후 계속 6~8시간 진탕 배양하면서 용균 여부를 관찰하였고 또 배양액 上清으로 spot test하여 조사하였다 (Hongo et al., 1969; 富澤, 1970).

### ③ 藥劑에 의한 誘發

試驗菌을 진탕 배양하다가 OD<sub>660</sub> 0.35이 되었을 때 mitomycin C (1~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )나 bacitracin (5~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 배양액 속에 가한 후 계속 진탕배양하면서 濁度를 조사하여 溶菌如否를 결정하였다(Ogata et al., 1972; 富澤, 1970).

## 6. 野生菌에 의한 *Br. lacotofermentum*의 生育阻害

공장주변 15개 地所에서 채집된 180개 표

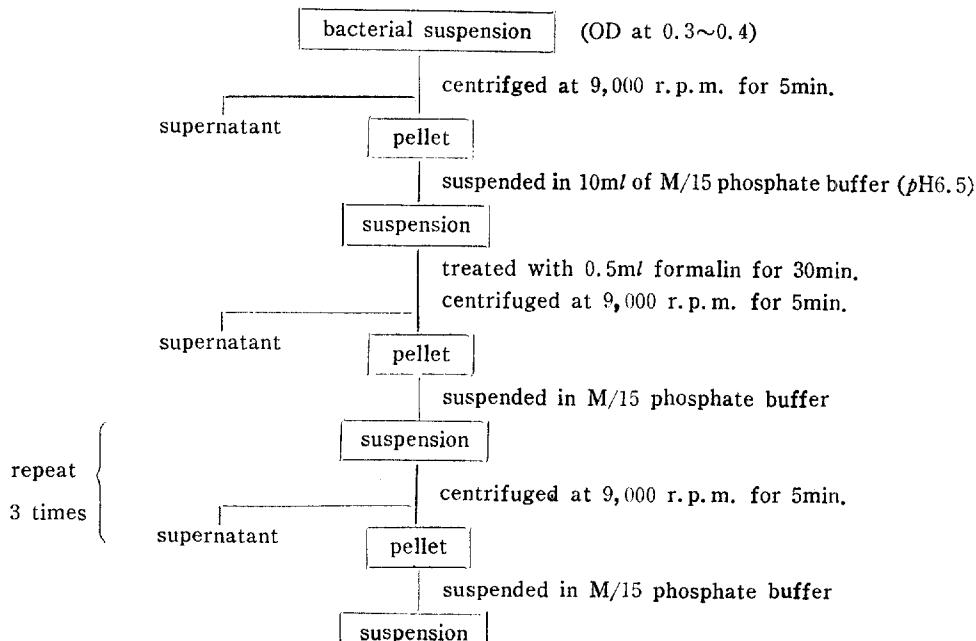


Fig. 3. Formalin treatment of bacteria for phage infection

본中 30개를 무작위적으로 선택한 후 한 표본당 3매씩의 평판을 만들고 15주씩 분리한野生菌株의 培養液上清과 또 이들 野生菌株培養液에다 mitomycin C를 1~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 처리하여 (Ogata et al., 1972) 약 6시간 동안 진탕 배양시켜서 원심분리한 上清을 가지고, 피검균인 *Br. lactofermentum* 468-5와 2256에 spot test하여 生育阻害 如否를 판정하였다.

### 7. 파아지 PR-5 (T)와 파아지 尾樣粒子感受性菌의 檢出

순수한 배양액과 자외선 및 mitomycin C로 처리한 *Br. lactofermentum* 2256의 배양액을 원심분리(5,000×g, 10분) 한 후 上清을 가지고 여러 야생균주를 피검균으로 spot test하여 감수성 여부를 조사하였다. 또, 파아지 PR-5 溶菌液을 원심분리(3,000×g, 60분)하여 上清과 pellet으로 분획한 뒤 이들 각각 여러 야생균에 spot test하여 감수성 여부를 조사하였다.生育이 억제된 것은 다시 액체배양에서 용균여부를 조사하였다.

### 8. 野生菌 溶菌液에 依한 *Brevibacterium*-의 溶菌

① 無處理한 *Brevibacterium*의 용균: 야생균 용균액 0.1ml를 T字시험판에서 배양된 *Brevibacterium* 배양액(OD<sub>660</sub> 0.2~0.3, 18ml)에 접종하고 경시적으로 탁도를 조사하여 용균여부를 판정하였다. 대조는 용균액을 열처리(100°C, 5분)하여 불활성화 시킨 것을 접종하였다.

② Formalin으로 處理한 *Brevibacterium*의 용균: formalin으로 처리한 방법은 Fig. 3과 같으며 이 혼탁액 5ml와 용균액 上清 1ml를 섞어 4~6시간 진탕하면서 용균여부를 조사하였다 (Ogata, 미발표). 대조는 역시 용균액을 열처리하여 접종하였다.

## 結果와 考察

초산을 基準로 하는 L-글루타미 산 酸酵槽의 異常은 濾過性, 傳播性, 宿主特異性等의 調査에서 전형적인 파아지 汚染에 의한 것임이 밝혀졌다. 따라서 *Br. lactofermentum* 468-5에 감염되는 파아지 PR-1, PR-2는 아주 특이하다고 하겠다. 왜냐하면 streptomycin 耐性菌株는 streptomycin 感受性菌株보다 일반적으로 파아지 耐性이 強하며 (Hirose et al., 1967), 특히, 菌株 No. 468-5는 이제까지 밝혀진 파아지에 대해 강력한 耐性을 갖춘 균주이기 때문이다. 한편 본 파아지의 연구를 위하여 설정한 반합성배지인 nutrient medium에서의 숙수균 세대시간은 균주 No. 468-5는 33분, 균주 No. 2256은 38분으로 생육이 양호하였고 Mg<sup>2+</sup> 이온 5×10<sup>-3</sup>M의 첨가는 파아지의 안정성을 높혀 주었다. 한편,宿主菌인 菌株 No. 468-5와 菌株 No. 2256은 모두 非溶原性菌株임이 확인되었으며, 分離한 7개의 파아지에 대한 溶原能(lysogenizing ability)을 調査한 결과, 본 실험조건 하에서는 모두 毒性型(virulent)임이 밝혀졌다.

### 1. 파아지의 命名

*Br. lactofermentum* No. 468-5에 依한 L-글루타민산 발효중에 異常이 나타났던 각기 다른 발효조로부터 분리한 2 파아지를 파아지 PR-1, PR-2로 命名하였고 공장주변의 오염가능 지역에서 채취한 토양이나 오니등의 서로 다른 표본으로부터 분리한 다섯개의 파아지를 파아지 PR-3, PR-4, PR-5, PR-6, PR-7로 명명하였다.

### 2. PR-파아지의 宿主域

파아지의 宿主域은 매우 특이적이어서 單一菌種 숙주균에만 감염되는 것과 다른 종의 세균에게도 감염 될 수 있는 多重毒性

(multiple virulence)을 나타내는 것도 있다고 한다(d'Herrelle, 1926). Oki 等(1964 a) 이 분리한 P系 파아지 多重毒性을 나타내 그 宿主域이 *Brevibacterium*屬의 菌種과 *Microbacterium* 및 *Bacillus* 屬까지 확대된다고 보고하고 있으므로 本 7개의 PR系 파아지에 대해서도 *Microbacterium* 및 *Bacillus* 屬까지 확대하여 검토하였다. 그

결과는 Table 1과 같이 *Br. lactofermentum*을 제외한 조사된 모든 균주에 대해 감수성이 없었으며 同一種의 變異菌間에서도 높은宿主特異性을 나타내서 파아지 PR-1, PR-2는 균주 No. 468-5에만 감염되었고, 파아지 PR-3, PR-5, PR-6, PR-7은 균주 No. 2256에만 감염되었다.

Table 1. Host range of 7 PR-series phage of *Brevibacterium lactofermentum*

| tested bacteria                            | PR-phage |   |   |   |   |   |   |
|--|----------|---|---|---|---|---|---|
|  | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| <i>Brevibacterium lactofermentum</i> 468-5 | +        | + | - | - | - | - | - |
| <i>Brevibacterium lactofermentum</i> 2256  | -        | - | + | + | + | + | + |
| <i>Brevibacterium flavum</i> 2247          | -        | - | - | - | - | - | - |
| <i>Brevibacterium glutarium</i>            | -        | - | - | - | - | - | - |
| <i>Brevibacterium luseum</i>               | -        | - | - | - | - | - | - |
| <i>Brevibacterium saccarolyticum</i>       | -        | - | - | - | - | - | - |
| <i>Brevibacterium lactofermentum</i> 465   | -        | - | - | - | - | - | - |
| <i>Microbacterium glutamicus</i>           | -        | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bacillus subtilis</i>                   | -        | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bacillus circulans</i>                  | -        | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bacillus cereus</i>                     | -        | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bacillus natto</i>                      | -        | - | - | - | - | - | - |

+: Lysis -: No lysis

### 3. 溶菌斑(Plaque)의 形成

#### (1) 溶菌의 形態

용균반은 일반적으로 파아지의 종류에 따라 형태가 다르기 때문에 용균반의 비교관찰은 파아지의 분리에 중요한 요소가 된다. 그러나 용균반의 형태는 동일종의 변이에 따라서도 크게 변화하는데(Hershey & Rotman, 1949), 형태의 변화에는 용균반이 크게 되는 것(r변이), 작게 되는 것(m변이), 투명하지 않게 되는 것(tu변이) 등이 일려져 있다(Hershey & Rotman, 1949). PR系 파아지의 溶菌斑의 크기는 배양 10~15時間後에 最大로 커지며, 파아지粒子 하나하나의 擴散速度, 潜在期, 吸着速度(Adams, 1956) 等의 條件과 파아지의 genome에 의해 溶菌斑의 性狀等이決定된다. 또 溶菌斑

의 生成은宿主菌의 파아지 感受性에 의해 결정되므로 耐性菌에 가까운菌이 섞여 있으면 不透明한 溶菌斑이 形成된다.

Plate 1, 2에서 보는 바와 같이 파아지 PR-5의 용균반은 지름이 平均 1mm로서 파아지 PR-5, PR-2의 平均 1.5mm보다 작은 所見을 보였으며 파아지 PR-3, PR-4, PR-6, PR-7도 파아지 PR-5와 大同小異하였다. 溶菌斑의 形狀은 모두 中央이 透明하고 周邊은 확실한 무리(halo)가 없는 圓型이었다. 따라서 PR系파아지의 용균반은 형태는 모두 같았으나 크기는 2종류로 나뉘었다. 본 PR系 파아지의 溶菌斑의 形狀을 Oki et al., (1964a)의 P系 파아지와 비교하기에는 조건이 달라서 곤란하지만 파아지 P<sub>61</sub>의 0.7~1.8mm, 파아지 P<sub>465</sub>의 0.4~1.4mm 등 조사된 4개의 P系 파아지와 본 7개의 PR系 파아지의 용균반을 비교하면, 크기와 형태

등에 다소 차이가 있는 듯하였다.

## (2) 溶菌斑形成의 最敵條件

파아지의 定量時 일반적으로 사용하는 重層法(double layer method)은 條件에 따라 溶菌斑의 數 및 形態의 差異가 크게 나타나 計數에 큰 오차를 나타낸다(Hongo *et al.*, 1965 b). 그러므로 誤差의 幅을 最少銀度로 줄이기 위해서는 용균반의 크기와 수에 영향을 미치는 요소를 찾아 溶菌斑이 一定하게 되는 條件을 決定하지 않으면 안된다. 이를 위하여 Table 2에서 Table 7까지의 조건을 검토 하였는데, 計數를 용이하게 하기 위하여 용균반은 가능한 한 크게 되는 조건을 구했고, 용균반의 수는 많이 나타나는 조건을 구했다. 모든 결과는 平板 3장의 平均數이며 표준오차  $\pm 5\%$  以內로 구하였다.

上層培地의 寒天濃度는 적을수록 용균반의 크기가 작으나 0.5% 以下는 한천의 응고가 어려웠으므로 Oki *et al.* (1964 b)은 0.5%를 사용하였지만 본 실험에서는 0.6%를 最低寒天濃度로 잡았다. 上層培地의 量은 0.2 ml이 最適이었고 이보다 많으면 용균반의 크기가 작아지고 수도 줄었다. 배지의 pH는 6.5에서 7.5사이가 양호하였는데 이는 숙주균의 最適 pH域이었다. 감수성 세균의 배양시간은 어릴수록 용균반은 크고 수도 많이 나타났었다. 즉 대수기의 균이 좋았으며 정지기에 가까울 수록 용균반의 수가 주는 것은 사멸균체에 파아지가 흡착하기 때문으로 생각된다. 이때 접종한 균수는 모두  $1 \times 10^8$  cells/ml였다. 파아지의 증식을 위해 가해지는 宿主菌의 數 역시 溶菌斑形成에 영향을 미쳐 숙주균수가 너무 많으면 용균반이 작아지고 수도 적게 나타나는 것은 숙주균의 생육이 넘쳐나기 때문으로 생각되며 너무 적어도 용균반의 형성이 잘 안된다. 용균반 수는  $5 \times 10^7$ 에서  $1 \times 10^8$ 까지는 거의 변하지 않았으나 OD<sub>660</sub> 0.6에서 菌數가  $1 \times 10^8$  cells/ml이므로 OD 0.4~0.6의 배양균액 0.1ml를 사용함이 좋았다. 마지막으로 평판 배양의 온도는 숙주균의 生育適溫에서의 조건이 좋았으므로 30°C로 정하였다.

**Table 2.** Agar concentration of overlayer medium and the number and size of the plaques formed by phage PR-1

| %   | number | plaque | size(mm) |
|-----|--------|--------|----------|
| 0.4 | —      |        | 2.0      |
| 0.5 | 395    |        | 1.7      |
| 0.6 | 405    |        | 1.5      |
| 0.7 | 392    |        | 1.3      |
| 0.8 | 390    |        | 1.0      |
| 1.0 | 384    |        | 0.4      |

**Table 3.** The quantity of overlayer medium and the number and size of the plaques formed by phage PR-1

| ml  | number | plaque | size(mm) |
|-----|--------|--------|----------|
| 0.1 | 393    |        | 1.0      |
| 0.2 | 396    |        | 1.5      |
| 0.3 | 372    |        | 1.3      |
| 0.4 | 300    |        | 1.0      |
| 0.5 | 247    |        | 0.6      |
| 1.0 | 185    |        | 0.3      |

**Table 4.** pH of overlayer medium and the number and size of the plaques formed by phage PR-1

| pH  | number | plaque | size(mm) |
|-----|--------|--------|----------|
| 5.3 | 250    |        | 0.4      |
| 5.6 | 300    |        | 0.7      |
| 5.9 | 351    |        | 1.2      |
| 6.2 | 372    |        | 1.2      |
| 6.5 | 390    |        | 1.4      |
| 7.0 | 402    |        | 1.5      |
| 7.5 | * 373  |        | 1.4      |
| 8.0 | 192    |        | 1.2      |

**Table 5.** Cultural age of strain No. 468-5 cells and the number and size of the plaques formed by phage PR-1

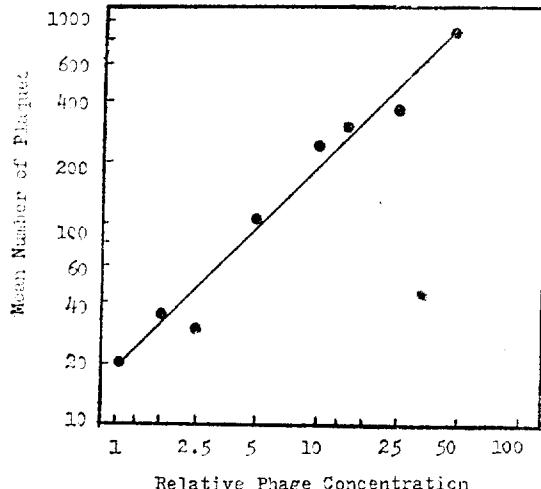
| hours of culture | number | plaque | size(mm) |
|------------------|--------|--------|----------|
| 2                | 390    |        | 1.6      |
| 3                | 395    |        | 1.5      |
| 4                | 394    |        | 1.5      |
| 6                | 390    |        | 1.5      |
| 8                | 372    |        | 1.3      |
| 10               | 357    |        | 1.2      |
| 15               | 305    |        | 1.0      |

**Table 6.** The number of host cells and the number and size of the plaques formed by phage PR-1

| number ( $\times 10^6$ ) | number | plaque size(mm) |
|--------------------------|--------|-----------------|
| 400                      | 275    | 0.9             |
| 200                      | 390    | 1.3             |
| 100                      | 401    | 1.5             |
| 50                       | 398    | 1.5             |
| 20                       | 391    | 1.6             |
| 10                       | 306    | 1.7             |
| 5                        | 250    | 2.2             |

**Table 7.** Temperature of incubation and the number and size of the plaques formed by phage PR-1

| temperature( $^{\circ}\text{C}$ ) | number | plaque size(mm) |
|-----------------------------------|--------|-----------------|
| 20                                | 183    | 0.7             |
| 25                                | 300    | 1.2             |
| 30                                | 408    | 1.5             |
| 33                                | 396    | 1.5             |
| 37                                | 275    | 1.3             |
| 40                                | 201    | 0.9             |



**Fig. 4.** Linear relationships between number of plaques and phage concentration

### (3) 稀釋倍數와 溶菌斑數의 比例

용균반 계수법에 의한 파아지의 정량에는 석회액에 따른 용균반수의 비례관계가 증명되지 않으면 안된다(Ellis & Delbrück,

1939).  $1.96 \times 10^4$  PFU/ml의 파아지 PR-1 용균액을 NM배지로 희석한 결과 용균반수는 Fig. 4와 같이 희석배수에 대한 正比例 하였다. 이는 하나의 溶菌斑이 하나의 파아지 입자로부터 유래된다는 사실(Stent, 1963)이 파아지 PR-1에서도 적용됨을 나타낸다고 하겠다.

### 4. 物理化學的 要因이 파아지 感染能에 미치는 영향

#### (1) 鹽類溶液(salt solution)에서의 파아지 安定性

파아지를 연구함에 있어서 파아지가 흡착하는 데 최적의 이온상태를 밝히는 것은 매우 중요하다. PR系파아지는 NM배지로 희석할 경우 상당히 안정하였다. 그러나 鹽溶液이나 합성배지로 희석하면 포함된 鹽의 종류와 농도차에 의해 파아지는 안정성을 쉽게 잃기도 한다. 즉 파아지에게 安定性을 주는 最適의 陽이온의 造成은 파아지의 種類에 따라 다르다고 한다(Stent, 1963). 대개 파아지는 식염수속에서는 아주 심하게 활성을 잃어버려 감수성균이라 하더라도 흡착하지 못한다고 한다(Stent, 1963). 그러나  $\text{Mg}^{2+}$  이온과 같은 2가의 陽이온을 加하면 안정성을 나타낸다고 한다(Puck *et al.*, 1951; Tolmach & Puck, 1952). 그 이유를 Adams(1959)는  $\text{Mg}^{2+}$  이온이 파아지와 일시적으로 복합체를 만들기 때문에 안정화시킨다고 설명하고 있으며, Puck & Tolmach(1954)는 세균의 표면막은 파아지 입자와同一한 전하를 띠기 때문에 파아지가 흡착하는 것을 방해하지만 陽이온은 이를 中和시켜 준다고 설명하고 있다. 하여튼 陽이온은 흡착 과정에 필요한 세포막의 미묘한 구조변화를 파아지에게 부여하는 때문에 생각된다(Stent, 1963). 鹽溶液은 파아지의 희석 이외에도 파아지의 경제나 자외선 照射등의 정량적인 실험을 할 때 사용하는 것으로 파아지의 안정성이 높은 희석액을 선택하여야 한다. PR系 파아지의 희석액을

**Table 8.** Cofactor requirements of PR-series phages in various salt solutions

| salt solutions   | phage survivals (%)<br>PR-1 | PR-5 | PR-7 |
|--|-----------------------------|------|------|
| nutrient broth   | 100                         | 100  | 100  |
| distilled water  | 40                          | 2    | 20   |
| physiological salt sol.                                  | 20                          | 50   | 50   |
| physiological sol. + $10^{-3}$ M Mg <sup>2+</sup>        | 80                          | 90   | 90   |
| phosphate buffer (0.1M)                                  | 85                          | 90   | 80   |
| phosphate buffer (0.067M) + $10^{-3}$ M Mg <sup>2+</sup> | 70                          | 100  | 100  |
| phosphate buffer (0.067M) + $10^{-3}$ M Mn <sup>2+</sup> | 15                          | 20   | 8    |
| phosphate buffer (0.067M) + $10^{-3}$ M Ca <sup>2+</sup> | 5                           | 15   | 10   |
| phosphate buffer (0.067M) + $10^{-4}$ M Mg <sup>2+</sup> | 95                          | 100  | 100  |
| 0.02M Tris buffer  | 95                          | 100  | 100  |
| 0.05M Tris buffer  | 100                         | 100  | 100  |
| 0.1M ammonium acetate buffer                             | 95                          | 100  | 100  |
| 0.005M ammonium acetate buffer                           | 100                         | 100  | 100  |
| 0.1M ammonium acetate buffer                             | 100                         | 100  | 100  |
| 0.5M ammonium acetate buffer                             | 100                         | 95   | 95   |

\*The assay carried out by plaque counting method after treatment for 60 min at 30°C.

조사한 결과는 Table 9와 같다. Oki *et al.* (1964 b)은 *Brevibacterium*의 P系 및 AP系 파아지의 정제에 0.1M인산 완충액을 사용하였고, Hongo *et al.* (1965)은 HM파아지의 정제에 인산 완충액 (**0.002M**)과 Mg<sup>2+</sup> 이온( $10^{-3}$ M)의 혼합液을 사용하였으나 PR系 파아지는 인산 완충액에서 불안정하였다. 그러나 0.05M과 0.1M 초산암모니움 완충액과 0.05M Tris 완충액에서 안정하였다. 한편 NM배지 를 만들때 Mg<sup>2+</sup> 이온을  $5 \times 10^{-3}$ M 혼합하면 파아지의 안정성이 높았으므로 완충액에 Mg<sup>2+</sup> 이온을 添加하여 사용하였다.

## (2) pH 安定性

파아지는 어느 일정한 pH 범위에서만 안정성을 나타내는데 대개 中性域에서 안정하다고 한다(Stent, 1963). PR系 파아지는 Fig. 5에서와 같이 NM배지에서는 pH6에서 pH9까지의 범위에서 안정하였으나 0.1M초산암모니움 완충액내에서는 pH8.0에서 가장 높은 안정성을 보였다. 이 결과는 Oki *et al.* (1964 b)의 P系 파아지와 일치하는

所見이었다.

## (3) 温度不活性化

파아지는 보통 배지액 내에서는 常温에서도 안정하다. P系 파아지는 60°C 以上에서 不活性화되어 잔존 파아지의 양이 급격히 준다고 한다(Oki *et al.*, 1964 b). 그러나 PR系파아지는 NM배지 내에서도 이보다 낮은 50~55°C, 완충액 내에서는 45~50°C에서 급격히 불활성화되었다(Fig. 6). PR系파아지 중에서는 파아지 PR-1이 温度變化에 대해 가장 안정하였고 파아지 PR-5가 가장 큰 온도 불활성화를 나타내었다. 일정 온도에 있어서의 불활성화의 비율은 지수 함수적으로  $V_0/V = e^{-Kt}$ 의 式에 따른다. 최초의 파아지 수  $V$ 에 대한 잔존 파아지의 수  $V_0$ 의 비는 모두 직선으로 일차 반응식을 따르며, 작용시간  $t$ 가 증가함에 따라 잔존 파아지의 數는 감소한다. 파아지의 온도 불활성화에 관해서는 많은 보고가 있는데 불활성화가 일어나는 것은 파아지 단백질의 변성에 기인하는 것 같다. Krueger(1932)

예 의하면 *Staphylococcus*의 K파아지는 51~61°C에서 단백질의 열변성이 일어난다고 하였고, 또 Gold & Watson (1950)은 *C. madisoni*의 파아지는 인산 완충액에서 60°C로 5분간 처리하면 완전히 失活되나 당밀 배지에서는 60°C로 30분간 처리하여도 失活되지 않는다고 하였다. 그러므로 각 파아지의 온도 안정성을 실험 방법이나 화석액의 차이에 따라 상당히 다르다. 한편 파아지에는 濃度感受性突然變異體 및 热耐性의 突然變異體도 존재하지만 대부분 不活性化를 일으키는 濃度는 40°C보다는 높다고 한다 (Stent, 1963).

#### (4) 紫外線照射에 依한 不活性化

紫外線에 의한 파아지의 不活性化는 파아지의 核酸分子中의 어떤 要素가 UV量子의 에너지를 흡수하여 勵起되고 흡수된 에너지의 일부가 파아지의 溶菌斑形成能을 파괴하는 때문이며, 이러한 변화는 同一 polypeptide鎖위에 인접해 있는 thymine 殘基가 dimer를 형성하기 때문이다(Beukers & Berends, 1960; Wacker et al., 1960). UV殺菌燈은 2536Å의 파장에서 가장 많은 放射エネルギー를 내며(Zelle & Hollaender, 1954), UV 1量子의吸收는 T偶數系 파아지를 주이기에 充分한 量이라고 한다(Stent, 1963). 紫外線에 의한 파아지의 不活性化는 단순히 지수함수적으로 일어나기 때문에(Harm, 1959) 최초의 파아지 數  $V$ 에 대한 紫外線照射 후의 殘存파아지의 數  $V_0$ 의 對數는 時間 경과에 따라 直線의으로 減少하며 이 관계는 다음式으로 나타낸다.

$$V_0/V = e^{-KD}$$

$D$ 는 단위면적 당의 照射量이며,  $K$ 는 感度를 나타내는 함수이다(Zelle & Hollaender, 1954). 紫外線照射에 의한 PR系파아지의 不活性化曲線은 Fig. 7과 같으며 紫外線量에 대한 不活性化率은 파아지 PR-1, PR-7, PR-5의 순서로 컸는데 파아지 PR-1과 PR-5는 時間경과에 따라 직선적으로 감소되었으나 파아지 PR-7은 직선적으로 감소하지 않았다. PR系파아지와 P系파아지의 자외

선조사에 의한 不活性率을 비교하면 P系파아지의  $P_{114}$ ,  $P_{401}$ ,  $P_{435}$ 는 120초 동안 조사함으로서 완전히 불활성화 되나 파아지  $P_{16}$ 은 저항성이 커서 자외선 조사에 의해 불활성화 되지 않는다고 하였는데 (Oki et al., 1964 b), PR系 파아지는 파아지 PR-1이 25초, 파아지 PR-7이 60초, 파아지 PR-5가 120초 照射로 不活性化되었으므로 PR系파아지가 P系 파아지보다 자외선 감수성이 큰 편이었다.

### 5. 分離한 파아지의 特性

#### 1) 파아지의 形態

파아지 粒子의 形態가 電子顯微鏡으로 관찰된 이래(Ruska, 1940), 계속하여 그 特異性들이 확실히 밝혀졌다. 일반적으로 파아지 粒子는 球狀 혹은 多面體의 頭部와 長短의 尾部를 갖는다. 頭部에는 離子가 함유되어 있고 尾部는 숙주細胞의 吸着器官이다.  $T_3$ ,  $T_7$  파아지는 당초 尾部가 없었던 것으로 관찰되었으나 William & Fraser(1953)가 동결乾燥法을 사용하여 단순한 尾部가 있다는 것을 밝혀냄으로써 그 이후에는 아주 특수한 파아지 이외에는 一般的으로 尾部를 갖고 있는 것으로 생각되고 있다. Brenner & Horne (1953)에 依해서 보편적으로 使用하게 된 negative 염색법을 적용하여 파아지 粒子의 미세구조가 밝혀졌다. 파아지 粒子의 形態나 크기는 파아지의 種類에 따라 다르므로 그 특징이 파아지 分類의 하나의 기준이 되고 있다. 本論文의 주제인 L-클루타민 生產菌의 파아지의 形態에 대해서는 아직까지 P系의 4파아지(Oki et al., 1964 d)외에는 보고된 바 없다. *Br. lactofermentum*균에 발생하는 7개의 PR系파아지의 形態를 電子顯微鏡을 使用하여 관찰하였다. 파아지 粒子는 縱濁法으로 固定乾燥하였을 때 癢集됨이 없이 잘 分散되었고, 또 파아지 이외의 雜物은 보이지 않았다. Plate 3에서 파아지 PR-1의 전자현미경 사진을 보여준다. 파아지 PR-1은 多面

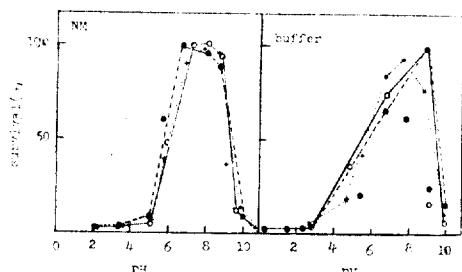


Fig. 5. pH stability of PR-phages in NM medium and 0.1M ammonium acetate buffer solution ○:PR-1 ●:PR-5 +:PR-7

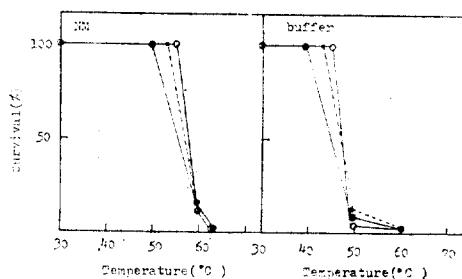


Fig. 6. Thermostability of PR-phages in NM medium and 0.1M ammonium acetate buffer solution ○:PR-1 ●:PR-5 +:PR-7

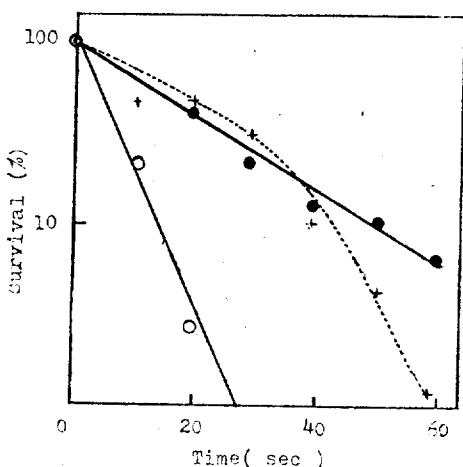


Fig. 7. Ultraviolet light inactivation curves of PR-phages in 0.1M ammonium acetate buffer +  $5 \times 10^{-3}$  M  $Mg^{2+}$   
○: PR-1 ●: PR-5 +: PR-7

體의 頭部에 終板(end plate)이나 尾部纖條(tail fiber)가 없는 단순한 모양의 긴 尾部를 갖고 있으며, 頭部의 지름은 85nm였고

尾部의 길이는 375nm였다. 파아지 PR-5의 電子顕微鏡 사진은 Plate 4와 같다. 이 파아지의 형태도 파아지 PR-1과 마찬가지로 頭部는 多面體이고 終板이나 尾部纖條가 없는 긴 尾部를 갖고 있으며 크기는 파아지 PR-1보다 작았다. 파아지 PR-5의 전자顕微鏡 사진에는 두 가지 크기의 파아지와 다수의 파아지 尾樣粒子가 發見되었다. 이러한 사실은 처음 실험상의 잘못에 의해 나타난 것으로 看做하여 파아지의 分리로부터 모든 실험조작을 다시하여 확인하였으나 결과는 마찬가지였다. 그러므로 작고 많이 나타나는 것을 파아지 PR-5로 정하였고 크고 적게 나타나는 것을 파아지 PR-5(T)로 정하였다. 파아지 PR-5의 용균액 중에 두 종류의 파아지가 출현하는 이유를 처음에는 흔히 파아지가 숙주균에 흡착하여 핵산을 방출하였기 때문에 尾部가 수축된 형태로 변형된 것이 아닌가 생각하였다. 그러나 파아지 PR-5(T)가 파아지 PR-5보다 尾部가 훨씬 길므로 핵산을 방출한 수축형이라면 파아지 PR-5가 수축형일 것이다. 일반적으로 핵산을 방출한 頭部는 다소 萎縮하는 경향이 있을 수 있으므로 頭部가 작은 파아지가 핵산을 방출한 것으로 생각할 수 있으나 尾部의 경우는 核酸을 방출한 것은 收縮하기 때문에 더 짧은 尾部를 갖고야 하는데도 파아지 PR-5(T)는 훨씬 긴 尾部를 갖고 있으므로 서로 相異한 파아지로 區別하였다. 그리고 파아지를 정제할 때 溶菌이 일어난 최후의 것을 정제하였기 때문에 흡착하여 收縮한 것 보다는 흡착하지 않은 유리된 파아지가 더 많이 나타날 것이므로 파아지 PR-5가 수축형이라고는 생각할 수 없다. 그러므로 여기에 나타나는 파아지 PR-5(T)는 파아지 PR-5와는 확실히 다른 파아지임에 틀림없으며 또한 분리과정에서도 두 종류의 파아지가 混入감염되어 增殖할 수는 없으므로 파아지 PR-5(T)는 이미 宿主菌內에 生存하던 溶原파아지로 간주 하여야 될 것이다. 그러나 *Br. lactofermentum* 2256은 紫外線 및 mitomycin C, bacitracin의 약제

처리에 의해서도 溶菌되지 않는(6-(2) 참조)  
 非溶原菌株이므로 파아지 PR-5(T)가 溶原  
 파아지라면 缺損突然變異體(defective mu-  
 tant)인 prophage (Jacob 1952 ; Lwoff,  
 1951)가 外來毒性파아지의 감염에 의해 誘  
 發된 결과가 아닌가 생각된다. Jacob, Fue-  
 rst & Wollman (1957)은 감염성의 파아지  
 를 重感染시켜서 defective prophage를 誘  
 發시켰는데 이는 交雜에 의해 defective pr-  
 ophage의 genome의 바뀐 때문이라고 하였  
 다. 한편 prophage는 immunity substance  
 를 갖고 있어 다른 파아지의 감염을 방해하  
 나 이는 同種파아지에만 작용하는 특이성을  
 갖고 있기 때문에 (Jacob, 1960; Kaiser &  
 Jacob, 1957) 毒性파아지가 세균표면에 吸  
 着하는 것을 방해하지 않으며 (Stent, 1963),  
 外來파아지도 內在파아지도 같이 증식할 수  
 있다고 한다 (Bertani 1953; Jacob & Woll-  
 man, 1953). 그러므로 파아지 PR-5(T)는  
 종원파아지일 가능성성이 크다고 하겠다. 파  
 아지 PR-5(T)의 형태는 Plate 5와 같으며  
 파아지 PR-5(T)와 다른 PR系파아지의 形  
 態을 비교한 모식도는 Fig. 8과 같다. *Br.*  
*lactofermentum* PR系파아지의 형태는  
 크기만 다를 뿐 7개 모두 같은 외형을 나타  
 ණ다. 그중 파아지 PR-1이 가장 커고 파아  
 지 PR-7이 가장 작았으며, 크기 이외에는  
 형태상 차이가 없었으므로 血清學的 差異  
 를 갖는 3개의 파아지와 파아지 PR-5(T)만  
 을 論하였다. *Br. lactofermentum* 2256의  
 P系파아지의 형태조사는 4개의 파아지에  
 관해서만 보고되어 있는데 (Oki et al., 1964  
 d) P系의 4파아지와 본 7개의 PR系파아  
 지를 형태적으로 비교하면, 외형은 마찬가  
 지로 球型과 같은 頭部와 긴 尾部를 갖고  
 있으므로 일반 형상은 유사하였으나 크기에  
 있어서는 본 PR系 7개의 파아지와 P系의  
 4파아지와는 모두 크기에 차이가 있었다.  
 그러나 그중 파아지  $P_{114}$ 와 파아지 PR-5는  
 큰 차이를 보였으나 尾部에 대한 頭部의 比  
 가 파아지  $P_{114}$ 는 3.5, 파아지 PR-5는 3.1  
 로 다소 차이가 있었고, 尾部의 굽기도 파

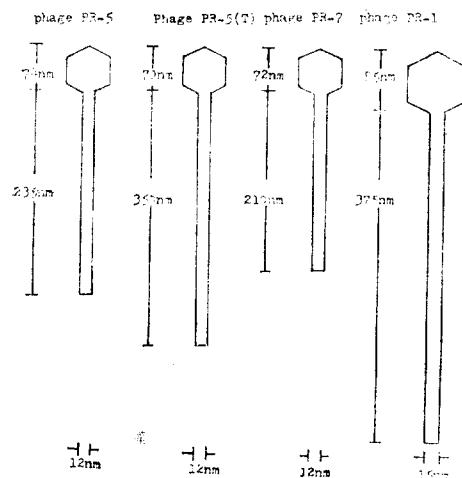


Fig. 8. Schematic morphology of PR-phages

아지  $P_{114}$ 가 15nm인 데 비해 파아지 PR-5는 12nm로 차이가 있었으며 頭部의 형태도 Oki et al., (1964)은 球型으로 밝혔으나 본 파아지의 경우 다각형을 나타내고 있어 P系의 4파아지와 본 PR系의 7개의 파아지와는 형태상 다른 종으로 판정하였다. 파아지의 관찰 중 파아지의 尾部가 여러 가지 굽은 상태로 나타난 것은 시료 작성 시의 인공적 인 곡折磨 것이다.

## (2) 파아지의 核酸

파아지의 核酸에 關한 研究는 各種파아지  
 가 發見됨에 따라 널리 調査되어 왔으나 大  
 腸菌파아지의 詳細한 研究外에는 대부분 깊  
 이 研究되어 있지 않다.

대부분의 파아지가 함유하는 핵산은 DN  
 A인데 이 파아지 DNA의 酸基造成은 고등  
 생물과는 달리 특수한 염기를 갖는 경우가  
 많다. Wyatt & Cohen (1953)은 대장균 파  
 아지  $T_2$ ,  $T_4$ ,  $T_6$ 에는 cytosine 대신에 새  
 로운 염기인 5-hydroxymethylcytosine 이  
 함유되어 있음을 밝혀냈으며, 그 후 많은 연구자들에 의해 *Bacillus subtilis*의 毒性型  
 파아지들은 대부분 thymine 대신에 5-hy-  
 droxymethyluracil을 갖고 있고, 또 용원성  
 파아지인 *B. subtilis*의 파아지 PBS2는  
 thymine 대신에 uracil을 갖고 있는 사실 등  
 이 밝혀졌다 (Virus 도감). 이와 같이 파아지

의 핵산에는 많은 차이가 있으므로 파아지의核酸은 파아지分類의 중요한檢索기준이 되고 있다. *Brevibacterium*屬 세균을宿主로 하는 파아지들의核酸에 관한研究로는 P系의 3파아지와 파아지Ap 85Ⅲ의 DNA(Oki et al., 1968)에 대해調査된 것뿐이다. PR系파아지의核酸 역시 모두DNA였으므로 우선 파아지PR-1의DNA의鹽基造成을 분석하였다. 그 결과 paper chromatogram上에 나타난 spot의  $R_f$ 值는原點쪽에서부터 0.23, 0.34, 0.46, 0.75였는데 이 값은 Wyatt(1955)가 分析한 DNA의  $R_f$ 치(Whatman No. 1사용) 즉 guanine 0.25, adenine 0.36, cytosine 0.47, thy-

mine 0.77과 거의一致하고 있다. 따라서原點쪽에서부터 guanine, adenine, cytosine, thymine으로同定되었으며 uracil은 없었다. 또 spot溶出液의 자외선 흡수곡선을 분석한 결과 역시 각각의鹽基에 따라 전형적인곡선을 나타냈으므로 이를 다시 확인하였다. 그리고 파아지PR-5와 PR-7도 같은 방법으로 분석하였다. 그 결과 Table 9와 같이 PR系파아지의 guanine과 cytosine, adenine과 thymine의 몰농도비는 1에 매우 가까워서 A+T/G+C의 비는 파아지PR-1은 0.78파아지PR-5는 0.89, 파아지PR-7은 0.86이었다.

한편 温度의變化에 따른DNA의 전형적

Table 9. DNA base composition of PR-phages determined chemically

| phages | mole percent |         |          |         |       |
|--------|--------------|---------|----------|---------|-------|
|        | guanine      | adenine | cytosine | thymine | G + C |
| PR-1   | 28.1         | 22.2    | 28.0     | 21.7    | 56.1  |
| PR-5   | 26.6         | 23.8    | 26.3     | 23.3    | 52.9  |
| PR-7   | 26.9         | 22.9    | 26.8     | 23.4    | 53.7  |

인 温度變性曲線은 Fig. 9와 같이 매우 급격하였다.  $T_m$  value는 높은 温度를 나타냈으며,  $T_m$  value로부터 구한 G + C 함량의 percent는 化學的으로 分析하여 얻은 결과와 대개 일치되는 결과였다. 본 실험의 결과와 P系 및 AP系파아지의核酸에 대해 Oki et al. (1968)이 分析한結果와를比較하면 PR系파아지의 G + C 함량은 52.9~56.1%, P系파아지는 34~55.3%, 그리고 파아지Ap 85Ⅲ은 56.6%로 대개 유사한 값을 나타냈다. 그러므로 *Br. lactofermentum*을宿主로 하는 파아지들은 *E. coli*의 T系파아지(34.2~35%), *B. subtilis*의毒性型내지는溶原性파아지(38~43%), *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*의 HM系파아지(26.1~35.2%) 등보다 G + C의含量이 높았다. 한편 파아지PR-5와 PR-7의 G + C의含量은類似하였으나 이 결과는 이들 두 파아지가 서로 같은 것을 의미하는 것은 아니다.

Table 10.  $T_m$  values and mole percent G + C of PR-phages DNA

| phages | mole percent |       |
|--------|--------------|-------|
|        | $T_m$ (°C)   | G + C |
| PR-1   | 92.4         | 56.34 |
| PR-5   | 91.0         | 52.92 |
| PR-7   | 91.1         | 53.17 |

### (3) 파아지의 感染 및 增殖

#### ① 파아지吸着의 動力學

파아지가菌에吸着하는것이菌體內에서파아지가增殖하는最初의 단계이다.吸着에는特定한陽이온의 적당한농도가 필요하다고하였고(Adams, 1959), 또 어떤파아지의吸着에는트립토판과같은보조인자를요구한다고한다(Andereson, 1945).파아지는尾部의끌으로숙주균세포에吸着하는데이는세균세포의表面에있는特異의receptor부위와의不可逆的結合에依한다고한다(Burnet, 1934; Stent, 1963).

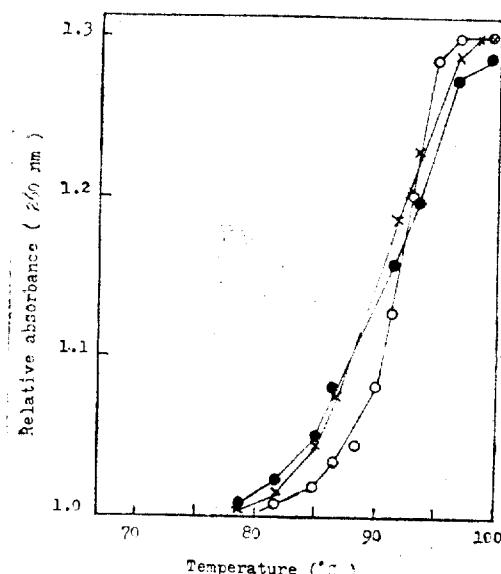


Fig. 9. Thermal denaturation curves of DNA

- : phenol extracted of phage PR-1
- : phenol extracted of phage PR-5
- ×: phenol extracted of phage PR-7

\*The result expressed as relative absorbance at 260nm being the ratio of absorbance at t/absorbance at 25°C.

吸着은 1次反應의 동역학에 따르며 흡착 속도정수는 다음식으로 구한다(Krueger, 1931).

$$K = 2.3/Bt \log P_0/P$$

K는 吸着速度定數이며 B는 細菌數, P는 0分에 있어서의 파아지의 數이고,  $P_0$ 는 t分後의 미흡착 殘存 파아지의 數이다. 吸着된 파아지는 바로 頭部속의 핵산을 菌體內에 주입하게 된다. 그 결과는 Fig. 10에서와 같이 파아지 PR-1은 5分間에 95%, 파아지는 PR-5는 90%, 파아지 PR-7은 87%였다. 각 파아지의 K價는 순서대로  $6 \times 10^9$ ,  $4.6 \times 10^9$ ,  $1.8 \times 10^9$ 으로 계산된다. L-글루타민산 생산균 파아지  $P_{61}$ 은 pH7~7.5, 온도 30~35°C에서 吸着이 양호했고 5분간에 80~90% 吸着 하였다고 한다(Oki et al., 1964 b). PR계파아지도 역시 5분간에 80~90% 吸着하였고 10分後에는 대개 吸着이 끝났다. 파아지가 菌에 吸着할 때에는 균의 生理狀態 및 pH 온도등의 환경에 의해서

영향을 받기 때문에(Delbrück, 1940) 파아지의 발생을 억제하는 대책으로 흡착단제를 방해하는 방법을 사용하기도 한다. 파아지 PR-1을 가지고 파아지의 흡착에 영향을 미치는 인자들을 검토하였다. 어느것이나 흡착시간은 5분간이었다.

#### i) 宿主菌의 age의 영향

숙주균을 2시간에서 10시간까지 30°C에서 배양하면서 각 단계에서의 파아지 흡착율을 검토하였다. Table 11과 같이 숙주균의 age에 의한 차이는 없었다. 이 결과는 Oki et al.(1964 c)의 결과와 마찬가지였는데 이는 숙주균의 세포벽 표면에 있는 phage receptor는 age와 관계 없이 감수성을 나타내고 있음을 의미한다고 할 수 있다. 즉 age에 따른 세균 세포벽의 표면 변화는 없다고 하겠다.

#### ii) 温度의 영향

흡착에 대한 온도의 영향에 대해 Stent & Wollman(1952)은  $T_4$  파아지는 25°C에서 5°C까지 온도를 낮추면 吸着速度定數가 1/10로 준다고 하였다. 파아지 PR-1의 온도 변화에 대한 吸着率을 검토하기 위해 20°C

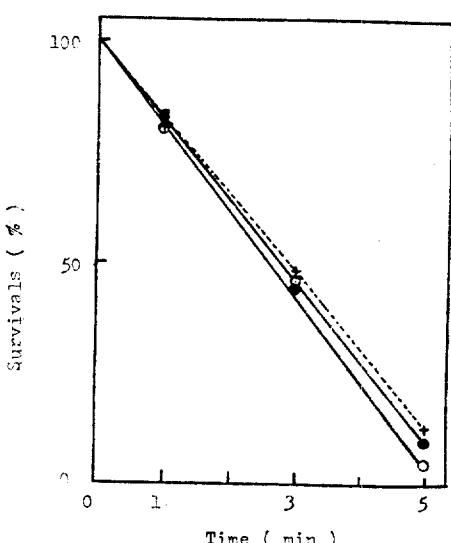


Fig. 10. Adsorption kinetics of PR-phages onto host strains

- : Phage PR-1
- : Phage PR-5
- +: Phage PR-7

에서 40°C까지 온도를 변화시키면서 흡착율을 조사한 결과 30~35°C에서 높은 흡착율을 보였고 20°C와 40°C에서도 85%와 64%의 높은 흡착율을 나타냈으므로 결국 파아지 PR-1은 20~40°C 사이에서는 흡착하는 데 온도의 영향은 받지 않는다고 하겠다 (Table 12).

### iii) pH의 영향

pH 6.0으로부터 pH 9.0의 범위에서 검토하였다. pH는 1N-HCl 또는 1N-NaOH로 조정하였다. Table 13과 같이 pH 7과 pH 8에서의 흡착율은 거의 변하지 않으나 이 범위를 벗어나면 흡착율은 저하되었다. 이는 파아지의 pH 안정성에서의 실험 결과와

**Table. 11.** Effect of bacterial age on adsorption of phage PR-1

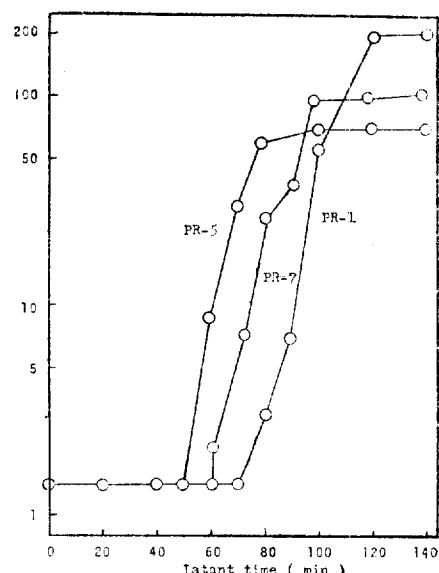
| culture time(hr) | adsorption rate(%) |
|------------------|--------------------|
| 3                | 95                 |
| 4                | 95                 |
| 5                | 95                 |
| 10               | 95                 |

**Table. 12.** Effect of temperature on adsorption of phage PR-1

| temperature(°C) | adsorption rate(%) |
|-----------------|--------------------|
| 20              | 85                 |
| 25              | 88                 |
| 30              | 95                 |
| 35              | 93                 |
| 40              | 84                 |

**Table. 13.** Effect of pH on adsorption of phage PR-1

| pH  | adsorption rate(%) |
|-----|--------------------|
| 6.0 | 60                 |
| 6.5 | 73                 |
| 7.0 | 95                 |
| 7.5 | 95                 |
| 8.0 | 95                 |
| 8.5 | 84                 |
| 9.0 | 77                 |



**Fig. 11.** One step growth curves of phage PR-1, PR-5 and PR-7

같은 所見으로 서로 관계가 있는 것으로 생각된다. 파아지의 吸着은 대개 中性域의 pH에서 吸着速度가 가장 크다고 한다(Stent, 1963).

### ② 一段增殖實驗

Ellis & Dellbrück(1939)는 一段增殖實驗(One-step growth experiment)을 考案하여 파아지가 宿主에 감염되면 어느 일정시간 까지 잠복해 있다가 일정량의 자손 파아지數가 급격히 증가되어 나타난다는 사실을 확실하게 밝혔다. 一段增殖에 의해서 정해지는 파아지 增殖의 媒介變數(parameter)는 그 파아지의 增殖이 진행되고 있을 때의 生理的 條件에 따라서 變動한다. 即, 潜伏期(latent period)의 길이는 温度에 따라서 변하며(Maeløe, 1950), 또 숙주세균의 영양이나 배지, pH 등도 파아지의 潜伏期와 放出數(burst size)에 영향을 미친다(Dellbrück, 1940; Heden, 1951). 그리고 잠복기와 방출수는 파아지 種의 여러 系統이나 또는 동일 系統內의 파아지 變種間에서도 서로 다르며 숙주세균의 계통에 따라서도 상당한 차이를 나타내지만 세균 세포당 감염되는 파아지 입자의 수에 의해서는 큰 차이

를 나타내지 않는다고 한다(Dellbrück & Luria, 1942). 그러므로 잠복기의 길이와 파아지의 放出數는 같은 생리적 조건인 경우 파아지 種에 따라 특이한 값을 나타내기 때문에 一段增殖實驗은 파아지 증식을 연구하는 기본이 되는 것이다.

*Br. lactofermentum*의 PR系 파아지의 증식 양상을 조사하였다. 파아지 증식의 최적 조건은 대개 숙주균의 최적 生育條件와 일치하므로 PR系 파아지의 증식 조건도 숙주균의 최적 생육조건을 따랐다. 조사한 결과는 Fig. 11과 같으며 잠복기는 파아지 PR-5가 50분이었고 파아지 PR-7이 60분, 그리고 파아지 PR-1이 70분으로 가장 길었다. 파아지의 방출수는 파아지 PR-1이 200 particles/cell이었고, 파아지 PR-7이 100 particles/cell, 파아지 PR-5가 70 particles /cell이었다. 이는 Oki et al. (1964 c)의 P系 파아지의 잠복기 60~80분과 방출수 8~23 particles/cell에 비해 방출수가 높았다.

### ③ 파아지 감염에 따른 溶菌樣狀

파아지의 增殖은 一段增殖實驗 이외에도 全體培養液의 濁度의 변화를 조사하여 感染細菌의 溶菌樣狀을 측정해 볼 수 있다. 숙주배양액에 파아지가 감염되면 濁度는 잠시 떨어지는데 그 이유는 감염에 의한 細胞外膜의 酵素的 변화 때문에 생기는 光學的 성질의 변화 때문이라고 한다. 그 후 곧 증식은 회복되어 정상으로 증식하다가 잠복기가 끝나면 배양액의 濁度는 다시 급격히 떨어져 투명하게 溶菌된다(Doermann, 1948). 그러나 숙주세균에 대한 감염파아지수의 比가 낮으면 초기에는 溶菌의 정도가 낮아서 숙주균의 성장곡선은 增殖이 저해되는 듯한 양상만 나타내다가 감염이 몇번이고 반복되면 비로소 현저한 용균양상이 나타난다. 그러므로 溶菌速度는 m. o. i.에 따라 현저한 차이를 나타내며 파아지 種에 따른 잠복기의 길이 방출수등의 차이에 의해서도 각기 다른 양상을 나타낸다. 한편 溶菌阻害現像도 발견되었는데 이는 잠복기가 끝나기 전에 새로운 파아지에 의해 重感染되면 lyso-

zyme의 영향이 억제되어(Koch & Dreyer, 1958) 자손파아지가 방출되지 않은 채 전체 배양액의 용균이 늦어지는 현상을 말한다(Doermann, 1948).

파아지 PR-1과 PR-5에 의한 *Br. lactofermentum* 468-5와 2256 菌株의 溶菌樣狀을 검토하였다. 그 결과는 Fig. 12, 13과 같으며 m. o. i. 별로 溶菌되는 시간과 정도가 달랐다. 多重感染인 m. o. i. 100의 경우 菌株 No. 468-5의 파아지 PR-1과 No. 2256 菌株의 파아지 PR-5를 비교할 때 파아지 PR-1보다 파아지 PR-5의 溶菌시간이 짧은 것은 파아지 PR-5의 잠복기가 파아지 PR-1보다 짧은 때문이라고 생각된다. 溶菌시간도 파아지 PR-1이 70분 파아지 PR-5가 50분으로 一般增殖實驗에서의 잠복기와一致하는 결과를 얻었다. 또한 숙주균 배양액의 OD<sub>660</sub> 0.3일때 파아지를 가한 후 잠시 濁度가 감소되는 것은 Doermann(1948)의 실험 결과와一致하는 所見이었다. m. o. i. 10의 경우 파아지 PR-1은 70분 후에 완전히 숙주균을 용균시켰으나 파아지 PR-5는 210분 후에 완전히 용균시켰다. 이 결과는 m. o. i. 10의 파아지 PR-5가 전부 숙주균에 吸着하지 못한 결과로 해석되며 약 4번 반복하여 감염되어서야 비로소 용균시켰는데 m. o. i. 1의 경우도 똑같이 210분 걸렸으므로 본 실험의 경우 m. o. i. 10의 감염능력은 m. o. i. 1과 큰 차이가 없었다고 하겠다. 한편 파아지 PR-1의 경우도 m. o. i. 1과 0.1이 모두 3회 반복 감염되어 같은 시간에 용균되었으므로 용균되는 시간과 m. o. i.와는 정비례적으로一致되지는 않는 결과였다. 한편 파아지 PR-1에 있어서 같은 시간에 용균된 m. o. i. 1과 0.1을 비교하면 濁度의 차이는 컸는데 파아지 PR-5의 경우는 m. o. i. 10과 1이 같은 시간에 용균되었어도 탁도의 차이가 크지 않았던 것은 파아지간의 용균능력의 차이 즉 1차 방출된 파아지수의 多小에 의해 재감염되는 양에 차이가 있었던 때문으로 생각된다. 즉, 파아지 PR-1이 파아지 PR-5보다 방출수가 2배 이상 크기 때

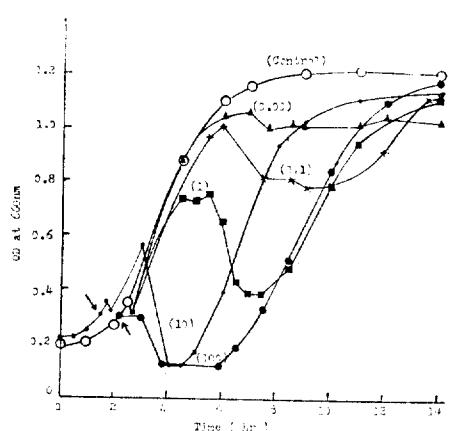


Fig. 12. Lysis of host bacterium (strain 468-5) by phage PR-1 infection at different m.o.i. ( ): m.o.i. (phage/bacterium)  
arrow: phage addition

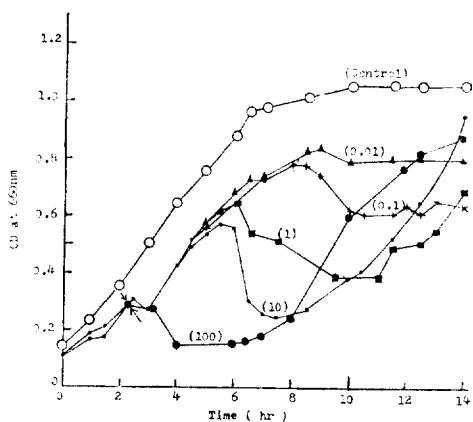


Fig. 13. Lysis of host bacterium (Strain 2256) by phage PR-5 infection at different m.o.i. ( ): m.o.i. (phage/bacterium)  
arrow: phage addition

문에 일단 증식 후에 재감염되는 비율 즉 m.o.i. 가 커진 때문일 것이다. 그리고 본 파아지의 용균시간을 고찰할 때 중감염은 없었다고 하겠다. 한편, 용균후에 어느 정도의 시간이 경과되면 숙주균은 다시 증식하게 되는데 이는 系代培養中 자연히 變異된 파아지 耐性菌의 증식에 의한 것으로서 본 숙주균에는 상당히 많은 내성균이 함유되어 있기 때문에, 내성균이 함유되어 있지 않을 경우 시간의 차이만 있을 뿐 거의 모두 OD<sub>660</sub> 0.1 정도까지 용균된다. 그러나 여기서는 공장자체에서 사용하고 있는 菌株 그

대로를 사용하여 행한 실험이므로 이 결과를 보고한다.

#### (4) 파아지의 血清學的 分類

파아지의 抗原 抗體反應이 成立한다는 사실은 Bordet & Ciucu(1921)에 의해 밝혀졌다. 파아지 입자는 대부분 단백질로 되어 있으므로 抗原으로 작용하여 免疫이 成立되기 때문에 血清중에는 抗體가 생기며 파아지의 抗體는 宿主細胞에 대해 완전히 자율성을 갖는다고 한다(Stent, 1963). 抗體의 특이성은 매우 민감하여 抗原의 미세한 화학적 성질의 차이까지도 檢知해 볼 수 있으므로 파아지種 상호간의 혈청학적 類緣關係에 따라 분류에 응용되고 있다. 특히 血清學的 類緣關係가 있는 파아지는 生物學的行動 即, 形態學的, 化學的, 遺傳學的으로 類緣關係가 크다고 한다(Stent, 1963; 富澤, 1970). 抗原으로서의 파아지 입자와 抗血清파의 反應은 파아지가 抗體에 의해 파괴되는 것이 아니라 단지 感染能力을 상실하는 中和反應이다(富澤, 1970). 이는 하나의 抗體分子가 하나의 파아지 粒子와 충돌하여 複合體를 형성함으로써 흡착이(Stent, 1963) 일어나지 못하거나(Delbrück, 1945) 흡착이 일어나더라도(Burnet, 1933) 감염능력은 상실된다. 또 파아지와 中和抗體와의 반응은 대개 不可逆의어서 회색에 의해 중화반응을 정지시켜도 再活性化되지 않는다고 한다(Hershey, 1943). 한편 어떤 抗파아지 血清은 同種파아지 이외에 他種파아지와의 交叉反應에서도 이를 不活性화시키는데 이 경우 이를 두 파아지는 共通抗原을 갖고 있으므로(Adams & Wade, 1955) 同種내지는 近緣種으로 분류한다. 그러므로 파아지의 血清學的 類緣關係의 조사는 交叉中和反應에 의한다. *Br. lactofermentum* PR系파아지의 宿主域은 단지 두 종류의 變異菌株 No. 468-5와 No. 2256에만 한정되는 특이성을 나타냈으나 形態的으로는 크기가 서로 다른 종류로 구별되었다. 그러므로 7개의 PR系파아지間의 血清學的 類緣關係를 調査하기 위해, 각각의 PR系 파아지를 10週間

씨 토끼에게 주사하여 (Hershey & Chase, 1952) 抗파아지 血清을 얻었는데 그들의 K 價는 Table 14와 같이 10에서 1,300까지 크게 달랐다.

Table 14. Neutralization rate constants of PR-phages with homologous antisera

| groups | phages | K values |
|--------|--------|----------|
| I      | PR-1   | 1,300    |
|        | PR-2   | 800      |
|        | PR-3   | 112      |
| II     | PR-4   | 79       |
|        | PR-5   | 10       |
| III    | PR-6   | 63       |
|        | PR-7   | 446      |

이는 파아지 抗原間의 化學的 性質의 차이로 因한 免疫反應誘發의 差異때문이거나 토끼자신의 抗體生產能의 個體差 때문인 것으로 料된다.

한편, Oki *et al.*, (1967)은 10개의 P系파아지와 8개의 Ap系파아지 그리고 2개의 L系파아지 및 파아지 S<sub>1</sub> 등 21개의 분리원이 서로 다른 *Br. lactofermentum* 변이주의 파아지들을 상호 交叉中和反應 시켜서 파아지 P<sub>4</sub>와 파아지 L<sub>1</sub>의 단일 파아지 뿐인 2個群을 포함하여 血清學的으로 5個群으로 나누었다. 한편 저자는 그들의 P系 파아지와 본 PR系 파아지 상호간의 血清學的 類緣關係를 밝힐 수 없어 단지 PR系 파아지 간의 類緣關係만을 조사하였다. *Br. lactofermentum*의 7개의 PR系파아지와 7개의 抗파아지 血清을 각각 조합하여 49개의 실험구에 대해 교차중화반응을 행하였다. 그 결과는 Table 15와 같이 7개의 파아지는 3群으로 정확히 나눌 수 있었다. 즉 파아지 PR-1, PR-2의 2種과 파아지 PR-3, PR-4, PR-5, PR-6의 4種 및 파아지 PR-7이 각각 달랐는데 이 결과는 형태적인 분류와 일치하였다. 이는 혈청학적 특징과 형태학적 특성이 대개 일치한다는 의견(富澤, 1970)과 같은 결과였다. 이어서 PR系파아지 간의 각 抗原과

아지에 대한 각 抗파아지 血清의 각 抗血清價를 비교검토하였다. 抗血清價는 중화에 따른 파아지數의 減少 即 中和能力으로써 표현되므로 여러 파아지간의 교차반응에서 얻은 抗血清의 力價 K는 파아지간의 유연관계를 나타내며 일반적으로 親株와 變異株間에는 K價의 차이가 없다고 하여 유연관계가 먼 파아지 일수록 값이 낮고 유연관계가 먼으면 0을 나타낸다. PR系파아지 상호간의 交叉中和反應에서 얻은 K價는 Table 16과 같다. 본실험의 결과 같은 群에 속하는 파아지에 대한 抗血清의 K價는 거의 같은 수준을 보였다. 즉, 같은 群의 反應을 보이는 파아지간에는 다소의 고저는 있으나 큰 差는 없었다. 그러므로 같은 수준의 反應을 보인 파아지 PR-1과 PR-2 그리고 파아지 PR-3, PR-4, PR-5, PR-6은 각각 매우

Table 15. Results of cross-neutralization test of PR-series antisera

| groups | phages | monospesific antisera |   |   |   |   |   |   |
|--------|--------|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
|        |        | 1                     | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| I      | PR-1   | +                     | + | - | - | - | - | - |
|        | PR-2   | +                     | + | - | - | - | - | - |
|        | PR-3   | -                     | - | + | + | + | + | - |
| II     | PR-4   | -                     | - | + | + | + | + | - |
|        | PR-5   | -                     | - | + | + | + | + | - |
| III    | PR-6   | -                     | - | + | + | + | + | - |
|        | PR-7   | -                     | - | - | - | - | - | + |

+ : neutralization - : no neutralization

Table 16. K values of 7-phages with homologous and heterologous antisera

| groups | antisera | PR-phages |      |     |    |    |    |     |
|--------|----------|-----------|------|-----|----|----|----|-----|
|        |          | 1         | 2    | 3   | 4  | 5  | 6  | 7   |
| I      | 1        | 1300      | 1085 | 0   | 0  | 0  | 0  | 0   |
|        | 2        | 758       | 800  | 0   | 0  | 0  | 0  | 0   |
|        | 3        | 0         | 0    | 112 | 80 | 74 | 82 | 0   |
| II     | 4        | 0         | 0    | 91  | 79 | 81 | 70 | 0   |
|        | 5        | 0         | 0    | 8   | 11 | 10 | 13 | 0   |
|        | 6        | 0         | 0    | 76  | 60 | 78 | 63 | 0   |
| III    | 7        | 0         | 0    | 0   | 0  | 0  | 0  | 446 |

가까운 類緣關係를 갖고 있음이 확실하였다.

## 6. 파아지 尾樣粒子의 發見과 誘發

### (1) 파아지 尾樣粒子의 形態

溶菌液속에 나타나는 파아지 尾樣粒子에對한 研究는 Gratia(1925)가 colicin으로 알려져 있는 抗菌物質(antibacterial substance)의 관찰과 研究를 報告함으로써 시작되었다. Colicin은 核酸이 함유되지 않은 蛋白質粒子로서 한 分子만 細菌表面膜의 特定한 receptor에 吸着되면 세균의 DNA, RNA 및 蛋白質合成等이 阻害되어 細菌을 죽이는데, 이 粒子는 이러한 粒子를 生産하는 같은 種의 革주 중 아주 특정한 革주에만 阻害作用을 갖기 때문에 低分子로서 세균내에 들어가 多種細菌에 대해 抗菌力を 갖는 抗生物質(antibiotics)과는 구조와 기능이 완전히 다르다고 한다(Reeves, 1970). Colicin이 發見된 후에 여러 연구자에 의해 대장균이외의 세균들에서도 이러한 蛋白質粒子의 存在가 發견되었는데 發견된 菌種에 따라

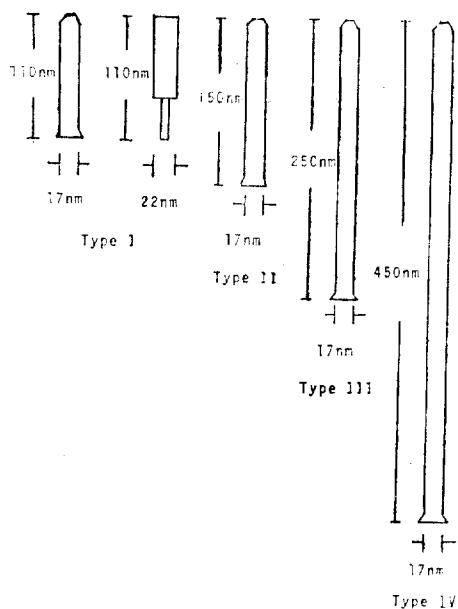


Fig. 14. Schematic morphology of phage tail-like particles detected in the lysate of phage PR-5

Vibriocin (Wahba, 1965), Pyocin(Jacob, 1954), Subtilicin(Nomura& Hosoda, 1965), Enterococcin(Brock Peacher and Pierson, 1963)등으로 命名하여 부르며, Jacob *et al.*, (1953)은 이러한 粒子를 통틀어 bacteriocin이라고 하였다. 이들은 自然狀態의 세균속에서도 發견되나 대개 溶菌液속에서 훨씬 더 쉽게 發견되고 있다. 이들은 파아지 모양(phage-like) 또는 파아지 꼬리모양(phage tail-like)의 形태를 하고 있어, defective phage인 것 같이 보이며(Endo *et al.*, 1965), 頭部를 가진 것과 갖지 않은 것이 있다고 한다. *E. coli* 15가 生産하는 colicin(Mukai, 1960; Ryan *et al.*, 1955)의 形태는 길이가 130~150nm, 지름이 20~30nm이며 6각형의 頭部를 갖고 있다고 한다.

또 Clostosin M (Ogata *et al.*, 1972)은 길이가 125nm, 폭 22nm로 두부가 없고 한쪽 끝에는 基板(base plate)이 약간 나타난다고 한다. *Brevibacterium*屬 細菌中에서는 아직 이러한 파아지尾樣粒子의 존재가 發견되지 않고 있는 파아지 PR-5 용균액 속에서 많은 파아지尾樣粒子가 나타났으므로 defective phage(Stent, 1963)의 尾部가 아닌가 檢討하였으나 크기와 形態가 近似한 것도 있었으나一致하지 않는 것도 있어 defective phage의 尾部라고 단정할 수는 없었다. 파아지 PR-5 용균액 속에 나타난 파아지尾樣粒子(Plate 6, 7, 8, 9)의 구조는 Fig. 14와 같이 모두 두부가 없고 한쪽 끝에는 基板이 있었는데(Plate 7 참조), 이들은 크기에 따라 110×17~22nm, 150×17nm, 250×17nm, 450×17nm의 4型으로 나눌 수 있었다.

*Cl. saccharoperbutylacetonicum* 용균액 속에서 發견된 Clostocin의 경우同一한 용균액 속에서 크기가 다른 두 종류의 Clostocin O와 M이 發견되었고 또 이들은 sheath를 갖는 것과 갖지 않는 것 등 여러 구조가 나타났다. 본 실험에서도 發견된 파아지 미양입자는 여러 크기를 나타냈는데 그중 III형과 IV형은 확실히 다른 세균에서 發견

된 파아지 미양입자보다 길었으나 I형파 II형은 유사한 구조를 갖고 있었다. 또 I형에서는 드물지만 두부와 sheath 같은 것을 갖는것도 나타나 형태적으로는 bacteriocin 일 확실한 가능성을 배제할 수는 없다. 그러나 이들 粒子들은 형태적인 특징 이외에는 수집되는 量이 적어 확실히 파아지 尾樣粒子 즉 bacteriocin이라는 생리적인 증거를 밝힐 수 없었으므로 이들을 대량으로 분리해 각종 性狀을 밝히고자 mitomycin C (Ogata et al., 1972) 또는 자외선을 조사하여 이들을 유발시키고자 시도하였으며 또 이들에 대해 感受性이 큰 菌을 토양 및 오니로부터 분리해 대고자 하였으나 어느 방법으로도 분리되지 않았다. 그러나 이러한 결과 만으로 파아지 미양입자가 아니라고 부정하기에는 형태적인 특징이 너무 확실하므로 새로운 실험조건에서는 유발시킬 수 있을 것으로 생각된다.

#### 2) 파아지尾樣粒子 및 파아지 PR-5(T)의 誘發

*Br. lactofermentum* 2256 菌株는前述한 바와 같이 溶原파아지가 自然誘發(spontaneous induction) 되지 않는 非溶原菌株였음이 확인되었다. 그러나 파아지 PR-5 溶菌液속에서 2종류의 파아지가 發見되었고 아울러 多數의 파아지 尾樣粒子가 發見되었으므로 *Br. lactofermentum*은 溶原菌株 또는 缺損溶原菌株라고 가정할 수 있다. 그러므로 자외선과 mitomycin C, bacitracin 등 약제처리에 의한 人工誘發을 시도하였다. 溶原파아지의 自然誘發率 ( $0.1\sim 1\mu\text{g}/\text{ml}$ )은 보통 0.1%이하로 낮으나 자외선이나 mitomycin C를 作用시키면 誘發되는 율은 100% 가깝게 높아진다고 하며 (富澤, 1970; Tomizaloa & Ogawa, 1967), 어떤 균은 高温 ( $42\sim 45^\circ\text{C}$ , 10분) 처리로서 prophage가 誘發되기도 한다고 한다(Horiuchi & Inouchi, 1967). 이들에 의한 人工誘發機構는 거의 알려져 있지 않지만 이를 모두가 DNA에 손상을 주는 처리로서 파아지 증식에 필요한 기능의 發現을 억제시키는 immunity

substance 자체나 또는 그 機能을 파괴시킴으로써 이제까지 억제되었던 파아지의 諸機能을 發現시켜 주는 것으로 설명하고 있다 (Thomas & Bertani, 1964). 그러므로 誘發에 필요한 자외선양이나 藥劑의 量이 너무 많아도 prophage 自體에 傷害를 주거나 宿主의 파아지 生產能力을 저하시키므로 誘發效果의 極大值는 除限되어 있으며, 자외선 量은 溶原菌의 生菌數가 거의  $1/100$ 이 되는 양이 좋다고 한다(富澤, 1970). 그러므로 이러한 조건을 고려하여 *Br. lactofer-*

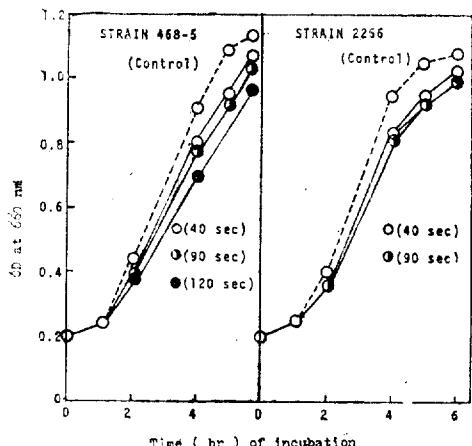


Fig. 15. Effect of ultraviolet light for induction of phage PR-5 (T) and phage tail-like particles

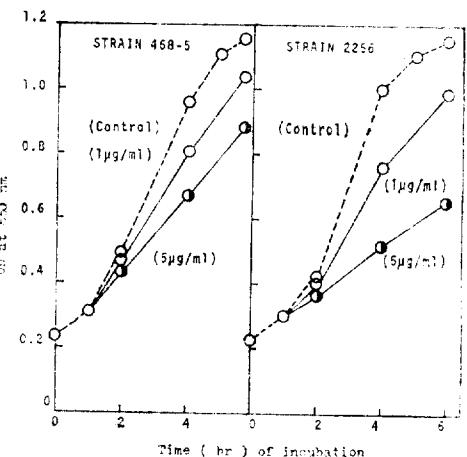


Fig. 16. Effect of mitomycin C for induction of the phage PR-5 (T) and phage tail-like particle

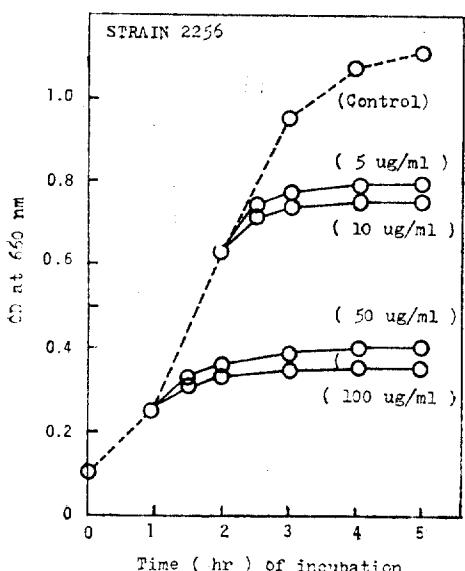


Fig. 17. Effect of bacitracin for induction of the phage PR-5 (T) and phage tail-like particles

*mentum* No. 468-5와 No. 2256 菌株에게자외선(Hongo *et al.*, 1969)과 약제(mitomycin C, bacitomycin)를 처리하여 溶原파아지의 誘發을 시도하였다(Ogata, 1972; Tomizawa & Ogawa, 1967). 그러나 Fig. 15, 16, 17과 같이 숙주균의 생육만 억제되었고 용원 파아지는 유발되지 않았다.

## 7. 野生菌을 사용한 파아지 汚染源의 探索

### (1) 野生菌에 依한 *Br. lactofermentum* 의 生育阻害

*Br. lactofermentum* 468-5와 2256 감수성 파아지가 독성형임은 발생된 파아지가 주변으로부터 오염되었음을 뜻하는 것이다. 그러므로 이러한 독성파아지의 발생원으로는 첫째 취급 중에 주변토양이나 오니속으로 유출된 L-글루타민산 생산균주가 거기서 생장하는 동안 이들 유출된 균에 파아지가 발생하고 發生한 파아지가 다시 발효조에 오염을 일으킬 수도 있다고 가정할 수 있다. 그러나 파아지 내성균에 대한 새로운 파아지의 발생속도는 매우 빨라서, 本江等(1964)

은 1년 사이에 12개의 새로운 파아지가 내성균마다 연속하여 발생한 사실을 보고하고 있으므로, 발생되는 파아지가 유출된 균에서 발생되는 파아지의 재오염 뿐이라면, 내성균에 감염될 수 있는 새로운 파아지의 번이 유발속도가 너무 빠르기 때문에 토양속에는 내성균에 대한 파아지가 이미 존재하고 있다고 가정할 수 있을 것이다. 따라서 숙주균은 *Brevibacterium*屬에만 한정되는 것이 아니라 各種 세균으로부터 발생되는 파아지가 숙주를 상호전환하면서 오염될 수도 있을 것으로도 가정할 수 있다. 그러므로 토양속에 서식하는 각종균주로 부터 *Br. lactofermentum*의 生育를 저해시키는 용원파아지나 파아지 미양입자가 방출되는가를 조

Table 17. Growth inhibition of *Br. lactofermentum* by lystates and culture broth of various bacteria

| strain | lysis by<br>*MMC | tested<br>bacteria    | treatment<br>none | lysis by<br>*MMC |
|--------|------------------|-----------------------|-------------------|------------------|
| 5-S-1  | Lysis            | No. 2256<br>No. 468-5 | -<br>-            | ++<br>++         |
| 6-S-2  | No lysis         | No. 2256<br>No. 468-5 | +                 | -<br>-           |
| 6-W-2  | Lysis            | No. 2256<br>No. 468-5 | -<br>+            | ±<br>-           |
| 7-C-1  | Lysis            | No. 2256<br>No. 468-5 | +                 | -<br>-           |
| 7-C-2  | Lysis            | No. 2256<br>No. 468-5 | +                 | -<br>-           |
| 7-C-3  | Lysis            | No. 2256<br>No. 468-5 | +                 | -<br>-           |
| 7-S-1  | Lysis            | No. 2256<br>No. 468-5 | +                 | ±<br>-           |
| 11-S-1 | No lysis         | No. 2256<br>No. 468-5 | -<br>-            | ±<br>-           |
| 12-S-1 | Lysis            | No. 2256<br>No. 468-5 | -<br>-            | ++<br>++         |
| 12-S-2 | Lysis            | No. 2256<br>No. 468-5 | ++<br>++          | +<br>+           |
| 1-S-1  | Lysis            | No. 2256<br>No. 468-5 | -<br>-            | ++<br>++         |
| 1-S-2  | Lysis            | No. 2256<br>No. 468-5 | -<br>+            | -<br>-           |

\*: mitomycin C

+: inhibition -: no inhibition

사하였다. 결과는 Table 17과 같으며 이 표에서는 시험한 수백개의 야생균주 중 조금이라도生育이 저해되는 결과를 나타낸 12균주만을 기재한 것으로서 이들 이외에는 균주 No. 468—5와 No. 2256의 생육이 전혀 저해받지 않았으므로 표에서 제외하였다.

(2) 파아지 PR-5(T)와 파아지 尾樣粒子感受性菌의 檢出

파아지 PR-5의 감염에 의한 *Br. lactofermentum* 2256의 溶菌液속에서 發見된 溶原파아지나 파아지 尾樣粒子는 自然誘發도 人工誘發도 되지 않았다. 그러나 소량의 응원파아지가 自然誘發된다면 그리고 土壤中에 이 溶原파아지에 感受性이 強한 菌株가 存在한다면 *Br. lactofermentum*의 溶原파아지가 이 感受性野生菌의 毒性파아지로 作用하여 增殖할 것이며, 이 增殖된 파아지가

다시 *Brevibacterium*의 발효조내에 재 오염될 수 있다는 가정하에서 각 토양으로부터 分離한 野生菌株들을 대상으로 溶原파아지 내지는 파아지 尾樣粒子의 感受性을 조사하였다. 이 결과는 Table 18과 같으며 1-S-1 균주는 모든 시험구에 대해 生育이 저해되었으나 나머지 균주는 영향이 없었다. 한편 파아지 PR-5 용균액 上清中의 파아지 尾樣粒子와 pellet 중의 독성 내지는 溶原파아지에 感受性을 보이는 野生菌株의 檢出 결과는 Table 19와 같다. 여기에서 1-S-1 균주는 上清과 pellet 양쪽에 對해 모두 生育이 억제되었으나 나머지 菌株는 pellet에 對해 서만 生育이 억제되었다. 그러므로 1-S-1 菌株는 2256 菌株의 모든 배양액에 대해 生育이 억제되었다.

(3) 野生菌 溶菌液에 의한 *Br. lactofer-*

**Table 18.** Killing activity of culture broth of *Br. lactofermentum* 2256 on various isolated bacteria

| treatment | tested bacteria |       |        |        |       |        |       |
|-----------|-----------------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|
|           | 6-W-2           | 7-S-1 | 11-S-1 | 12-S-2 | 5-S-1 | 12-S-1 | 1-S-1 |
| none      | —               | —     | —      | —      | —     | —      | +     |
| *MMC      | —               | —     | —      | —      | —     | —      | +     |
| UV        | —               | —     | —      | —      | —     | —      | +     |

\*MMC: mitomycin C

+ : growth

- : no inhibition

**Table 19.** Killing activity of phage PR-5 lysate on various isolated bacteria

| lysate      | tested bacteria |       |        |        |       |        |       |
|-------------|-----------------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|
|             | 6-W-2           | 7-S-1 | 11-S-2 | 12-S-2 | 5-S-2 | 12-S-1 | 1-S-1 |
| supernatant | —               | —     | —      | —      | —     | —      | +     |
| pellet      | +               | +     | +      | +      | +     | +      | +     |

+ : growth inhibition

- : no inhibition

*mentum*의 溶菌

각종 표본에서 분리한 野生菌 中 mitomycin C에 의해 溶菌이 일어난 균주는 10菌株였다. 溶菌이 일어난 것은 어떤 다른 요인도 있겠으나 이들 중에 포함되었던 溶原파아지가 mitomycin C에 의해 誘發되어 溶菌된 것으로 간주 할 수 있다. 이들 중 溶菌液 上清이 *Br. lactofermentum*의 生育을 強하게 阻害하였던 菌株는 1-S-1, 1-S-2, 12-S-1의 3菌株였다. 그러므로 이들 3菌株

로부터 誘發된 溶原파아지가 *Br. lactofermentum*의 毒性파아지로서 作用하여 *Br. lactofermentum*을 溶菌시킬 수 있는가를 調査하였다. 그러나 두 가지 方法 모두 *Brevibacterium*을 溶菌시키지 못하였다. 1-S-1 菌株가 균주 No. 2256의 배양액 上清과 파아지 PR-5 溶菌液에 依해 生育저해 된 것은 균주 No. 2256 균주에 대해 1-S-1이 비단백질성 生육저해물질을 생산하기 때문이며 응원파아지나 미양입자에 의해 저해

받은 것은 아니다. 또한 주변토양에서 분리한 세균의 용균액이 *Brevibacterium*의 生育은 억제시켰으나(Table 17) 용균시키지 못한 것은 좀더 규명되어야 할 것이며 토양에

서 生育하고 있는 세균의 溶菌液이 *Brevibacterium*의 生育을 저해한다는 것은 파아지의 宿主域이 변이될 수 있다는 가능성은 강력히 시사하는 것으로 생각된다.

## 摘 要

세균을 사용하는 발효공장에서는 파아지의 오염이 해결되어야 할 중요한 문제이다. 초산을 사용하는 L-글루타민산 발효공장에 異常이 생긴 것을 조사한 결과 파아지의 오염에 의한 것임이 밝혀졌다. 이를 계기로 파아지의 오염원이 溶原파아지에 의한 自體誘發인지 아니면 주변환경에 常存하고 있는 파아지의 유입에 의한 것인지를 여부를 밝히고자 이상발효를 않으킨 파아지를 이상발효조로부터 분리하였고 또 파아지가 常存할 수 있는 발효공장 주변의 토양과 오니로부터 *Br. lactofermentum*을 속주로 하는 파아지를 분리하였다. 또 주변토양 속에 살고 있는 각종 잡균이 溶原파아지를 유발시켜 이 공원파아지가 *Brevibacterium*에게 감염될 수 있는가의 여부를 조사하였다. 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 이상발효조와 토양 및 오니에서 분리한 파아지는 분리한 순서대로 파아지 PR-1, PR-2, PR-3, PR-5, PR-6 및 PR-7로 命名하였다. 이 PR系파아지는 높은 宿主特異性을 나타내 파아지 PR-1, PR-2는 *Br. lactofermentum* No. 468-5에만 그리고 파아지 PR-3~PR-7는 군주 No. 2256에만 宿主域이 한정되었다. 交叉中和反應의 결과 이 7개의 파아지는 3群으로 나뉘었는데, I群에는 파아지 PR-1과 PR-2가 속했고 II群에는 파아지 PR-3~PR-6, 그리고 III群에는 파아지 PR-7이 속했다.

2. 7개의 PR系파아지는 본실험 조건 하에서 모두 毒性파아지임이 밝혀졌다. 모든 溶菌斑의 형태는 중앙이 투명하고 주변에는 특별한 무리가 없는 원형이었다. 溶菌斑의 평균 크기는 파아지 PR-1, PR-2가 1.5mm, 파아지 PR-3~PR-7은 1mm였다. PR系파아지의 定量은 Adams(1959)의 용균반 계수법을 사용하였다. 파아지 PR-1을 가지고 정량조건을 검토했던 결과는 다음과 같다. 피검균의 age는 어릴수록 좋았고, 피검균수는  $1 \times 10^8/ml$ 가 좋았으며 상층배지의 한천 농도와 양은 각각 0.6%와 0.2ml였다. 배지의 pH는 7.0이 좋았고, 배양온도는 30°C가 좋았다.

3. PR系파아지는 0.05M tris buffer와 0.05M 및 0.01M ammonium acetate buffer에서 안정하였고  $Mg^{2+}$ 이 온  $5 \times 10^{-3}M$ 의 첨가는 파아지에게 안정성을 주었다. 파아지의 온도 불활성화는 NM매자비에서 50~55°C 완충액내에서는 45~50°C에서 급격히 불활성화되기 시작하여 각각 65°C와 60°C에서 완전히 불활성화 되었다. pH에 대한 PR系파아지의 안정성은 pH 6에서 pH 9까지의 범위내에서 안정하였으며 0.1M 초산암모니움완충에 속에서는 pH 8에서 가장 안정하였다. 자외선 照射에 의한 불활성화는 파아지 PR-1이 25초 파아지 PR-7이 60초, 파아지 PR-5는 100초에서 완전히 불활성화되었다.

4. 전자현미경을 사용하여 관찰한 7개의 파아지는 크기만 다를 뿐 모두 같은 형태였다. 즉, 모두 단체의 頭部와 終板이나 尾部纖條가 없는 단순한 긴 꼬리를 갖고 있었다. 크기는 파아지 PR-1이 두부 85nm 尾部 375nm로 가장 컼고, 파아지 PR-7은 頭部 72nm, 尾部 210nm로 다른 파아지보다 작았다. 그리고 파아지 PR-5 용균액 속에서는 頭部 74nm, 尾部 235nm인 파아지와 頭部 70nm, 尾部 350nm인 두 형태의 파아지 PR-5와 PR-5(T)가 발견되었다.

5. *Br. lactofermentum*의 파아지 PR-1, PR-5, PR-7을 정제하여 核酸를 分離하였다. 핵산은 DNA二重鎖로서 화학적으로 분석한 GC함량은 파아지 PR-1이 56.1, 파아지 PR-5가 52.9, 파아지 PR-7이 53.7이었다. DNA의 온도 변성에 따라  $T_m$ 으로부터 구한 GC의 함량도 52.92~53.17로 화학적으로 분석한 결과와 유사하였다.

6. PR系파아지의 흡착은 5분동안에 90%이상 이루어졌다. 파아지 PR-1, PR-5, PR-7의 속주균에의 흡착능을 검토했던 결과 K값의 순서대로  $6 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $1.8 \times 10^9$ 이었다. 흡착에 영향을 주는 인자로서 속주균의 age, 온도, 배지의 pH에 대해 검토했던 결과 속주균의 温度와 age는 별 영향을 미치지 않았으나 pH는 다소 영향을 주었다. 그러나 배지 속주균의 최적 生育범위 내에서 파아지도 최적 吸着條件를 갖는 것으로 생각된다.

7. 一段增殖實驗의 結果 最小繁殖기는 파아지 PR-5, PR-7, PR-10 각각 50分, 55分, 70分이었다. 한개의 감염균 당 평균 파아지의 放出數는 파아지 PR-5가 70, 파아지 PR-7이 100, 파아지 PR-10이 200이었다.

속주균의 용균양상은 속주균과 파아지에 따라 다르며 동일계에 있어서도 感染된 파아지의 양(m.o.i.)에 따라 다르다. m.o.i. 100으로 다중감염시킨 경우 감수성균은 증식하지 못한 채 일단증식실험의 繁殖기와同一한 결과로서 균주 No. 2256(PR-5)은 50분, 균주 No. 486-5(PR-1)는 70분에 용균되었다.

8. 파아지 PR-5 용균액 속에서 두 종류의 파아지 즉, 파아지 PR-5와 파아지 PR-5(T)가 발견되었다. 두 파아지는 유사한 형태를 갖고 있으나 尾部의 길이는 차이가 현저하였다. 또한 파아지 PR-5 용균액 속에서 다수의 파아지 미양입자가 발견되었다. 이들 파아지 미양입자는 크기에 따라 4형으로 분류되었다. 파아지 PR-5(T)와 파아지 미양입자를 유발시키기 위하여 자외선 照射 및 mitomycin C와 bacitracin을 처리하였으나 모든 경우 이들은 유발되지 않았다.

9. 토양 및 오니 표본으로부터 분리한 7株의 잡균에 대해 파아지 PR-5(T)와 파아지 尾樣粒子에 대한 감수성을 조사하였으나 이들은 용균되지 않았다. 그러나, 파아지 PR-5의 pellet을 가지고 spot test한 경우 이들 7株의 잡균은 生育이 저해되었다. 각종 토양 및 오니에서 분리된 잡균으로부터 mitomycin C에 의해 유발된 溶菌液中 3용균액이 *Br. lactofermentum*의 생육을 억제하였으나 이들 용균액은 *Br. lactofermentum*을 용균시키지는 못하였다.

## REFERENCES

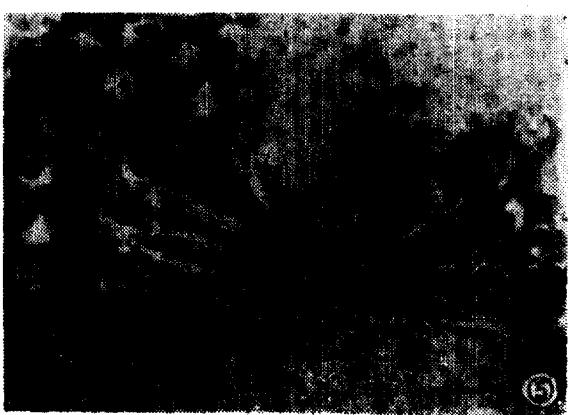
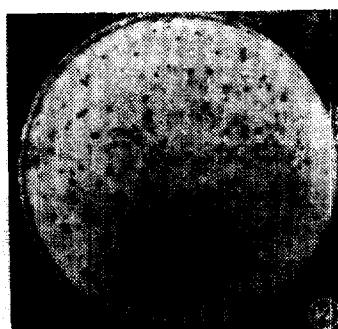
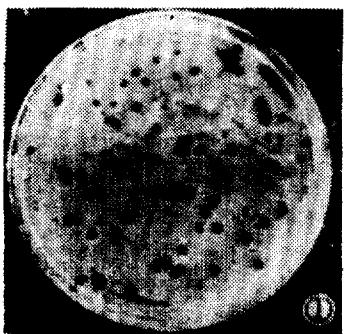
- 1. Adams, M.H., and E. Wade, 1955. Classification of bacterial viruses characteristics of the T1, D20 species of colidysentery phages. *J. Bacteriol.* **70**, 253.
- 2. Adams, M.H., 1959. "Bacteriophages" Interscience publishers. New York.
- 3. Anderson, T.F. 1945 The role of tryptophane in the adsorption of two bacterial viruses on their host *Escherichia coli*. *J. Cellular Comp. Physiol.*, **25**, 17. cofactorial virus T4. *J. Bacteriol.* **55**, 165.
- 4. Bendich, A., "Method in Enzymology," Ed. by S.P. Colowich and N.O. Kaplan, 1957. Academic Press Inc., N.Y., **3**, 715.
- 5. Bertani, G., 1953. Lysogenic virus lytic cycle of phage multiplication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **18**, 65.
- 6. Beukers, R. and W. Berends, 1960. Isolation and identification of the irradiation product of thymine. *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 550.
- 7. Bordet, J. and M. Ciucă, 1921. Determinisme de l'autolyse micobienne transmissible. *C.R. Soc. Biol.* **84**, 276.
- 8. Bowen, G.H., 1953. Kinetic studies on the mechanism of photoreactivation of bacteriophage T2 inactivated by ultraviolet light. *Ann. Inst. Pasteur* **84**, 218.
- 9. Bradley, D.E., 1965. The isolation and morphology of some new bacteriophages specific for *Bacillus* and *Acetobacter*. *J. Gen. Microbiol.* **41**, 233.
- 10. Brenner, S., and R.W. Horne 1959 A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 103.
- 11. Brock, T.D., B. Peacher and Pierson, D. 1963. Survey of the bacteriocins of Enterococci. *J. Bacteriol.* **86**, 702.
- 12. Burnet, F.M., 1933. The classification of dysentery coli-bacteriophages II. The serological classification of colidysentery phages. *J. Pathol. Bacteriol.* **37**, 107.
- 13. Burnet, F.M. 1934 The phage inactivating agent of bacterial extracts. *J. Pathol. Bacteriol.* **38**, 285.
- 14. Burnet, F.M. and D. Lush, 1936. Induced lysogenicity and mutation of bacteriophage within lysogenic bacteria. *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **14**, 27.
- 15. Burton, K., 1955. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of

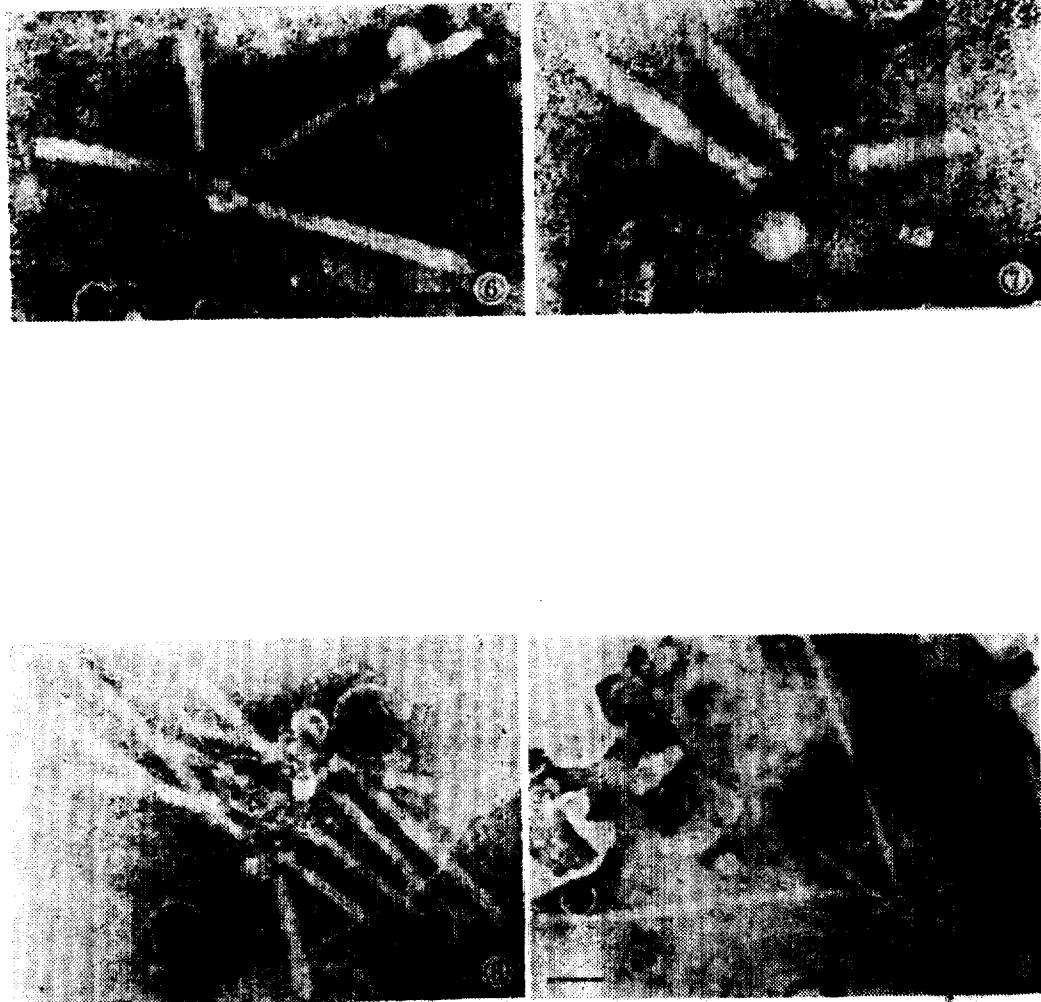
- deoxyribonucleic acid and the synthesis of protein in the multiplication of bacteriophage T2. *Biochem. J.* **61**, 432.
16. Delbrück, M., 1940. Adsorption of bacteriophages under various physiological conditions of the host. *J. Gen. Physiol.* **23**, 631.
17. Delbrück, M., 1940. The growth of bacteriophages and lysis of the host. *J. physiol.* **23**, 643.
18. Delbrück, M. and S.E. Luria, 1942. Interference between two bacterial viruses acting upon the same host, and mechanism of virus growth. *Arch. Biochem.* **1**, 111.
19. Delbrück, M., 1945. Effects of specific antibacterial viruses(bacteriophages). *J. Bacteriol.* **50**, 137.
20. Doty, P., 1961. Polynucleotide and nucleic acide. *J. Polymer Sci.* **55**, 1.
21. Doermann, A.H., 1948. Lysis and lysis inhibition with *Escherichia coli* bacteriophage. *J. Bacteriol.* **55**, 257.
22. Dulbecco, R., 1950. Experiments with photoreactivation of bacteriophages inactivated with ultraviolet radiation. *J. Bacteriol.* **59**, 329.
23. Ellis, E.L. and M. Delbrück, 1939. The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **22**, 365.
24. Endo, H., K. Ayabe, and K. Takeya, 1965. Inducible phage of *Escherichia coli* 15. *Virology* **25**, 467.
25. Freeman, V.J., 1951. Studies on the virulence of bacteriophage infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **61**, 672.
26. Gardner, G.M. and R.S. Weiser, 1947. A bacteriophage for *Mycobacterium smegmatis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **66**, 205.
27. Gold, W. and D.W. Watson, 1950. Studies on the bacteriophage infection cycle (I). A lytic activity for bacteriophages of *Clostridium madisonii*. *J. Bacteriol.* **57**, 13.
28. Gratia, A., 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **93**, 1040.
29. Harm, W., 1959. Untersuchungen zur Wirkungsweise eines die UV-Empfindlichkeit bestimmenden Gens der Bakteriophagen T2 und T4. *Z. Vererbungslehre* **90**, 428.
30. Harm, W., 1963. Mutants of phage T4 with increased sensitivity to ultraviolet. *Virology* **19**, 66.
31. Heden, C.G. 1951 Studies of the infection of *E. coli* b with the bacteriophage T2. *Acta Pathol. Mathol. Microbiol. Scand. Suppl.* No. 88
32. d'Herelle, F., 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des *Bacilles dysenteriques*. *Compt. rend.*, **165**, 373.
33. d'Herelle, F., 1926. Le bacteriophage et son comportement. Masson, Paris, Paris English translation: The bacteriophage and its behaviour. Wilkins, Baltimore.
34. Hershey, A.D., 1943. Experiments with bacteriophages supporting the lattice-hypothesis. *J. Immunol.* **47**, 77.
35. Hershey, A.D. and P. Rotman, 1949. Genetic recombination between host range and plaque type mutants of bacteriophage in single bacterial cells. *Genetics* **34**, 44.
36. Hershey, A.D. and M. Chase, 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **36**, 39.
37. Hershey, A.D., 1958. The production of recombinants in phagecrosses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **23**, 19.
38. Hirose, Y., J. Nakamura, H. Okada, K. Kinoshita, I. Kameyama and T. Shioi, 1967. Studies on L-glutamic acid fermentation. (II). Resistance of a streptomycin-resistant strain of *Brevibacterium lactofermentum* to bacteriophage and to lysozyme. *Agr. Biol. Chem.* **41** (1), 19.
39. 本江元吉, 村田晃, 原田良造 赤星恭助, 長山健, 高橋節男, 1965. ブタノール酵酛(第32報).

- サツカム型ブタノール・リッヂ生産菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* の工業的使用での異常酵素。農化 **39**, 252.
40. Hong, M. and A. Murata, 1963. Bacteriophages of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (I). Some characteristics of the twelve phages obtained from the abnormally fermented broths. *Agr. Biol. Chem.* **29**(12), 1135.
41. Hong, M. and A. Murata, 1965. II. Enumeration of phages by the application of the plaque count technique and some factors influencing. *Agr. Biol. Chem.* **29**, (12), 1140.
42. Hongo, M. and A. Murata, 1966. III. Morphology of the twelve HM-phages. *Agr. Biol. Chem.* **30**(3), 292.
43. Hongo, M., T. Aono and A. Murata, 1966. IV. Serological characteristics of the HM-phages. *Agr. Biol. Chem.*, **30**(4), 399.
44. Hongo, M., T. Miyamoto and A. Murata, 1966. V. Growth characteristics of the HM phages. *Agr. Biol. Chem.* **30**(5), 500.
45. Hongo, M. and A., Murata 1966. VI. Further characterization of HM-phages. *Agr. Biol. Chem.* **30**(9), 913.
46. Hongo, M., H., Ono S. Ogata, and A. Murata, 1966. VII. Base composition of deoxyribonucleic acids from HM-phages and their hosts. *Agr. Biol. Chem.* **30**(10), 982.
47. Hongo, M., A. Murata, and S. Ogata, 1969. XVI. Isolation and some characters of a temperate phage. *Agr. Biol. Chem.* **33**(3), 337.
48. Horiuchi, T. and H. Inokuchi, 1967. Temperature-sensitive regulation system of prophage lambda induction. *J. Mol. Biol.* **23**, 247.
49. Jacob, F., 1952. Production de bacteriophages par action de la methylbio(chloroethyl) amine sur des bactéries lysogènes. *C. R. Acad. Sci. Paris* **234**, 2238.
50. Jacob, F., A. Lwoff, A. Siminovitch, and E. Wollman, 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogenie. *Ann. Inst. Pasteur* **84**, 222.
51. Jacob, F. and E.L. Wollman, 1953. Induction of phage development in lysogenic bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **18**, 101.
52. Jacob, F. 1954. Biosynthèse induite et mode d'action d'une pyocine, antibiotique de *Pseudomonas pyocyanea*. *Ann. Inst. Pasteur* **86**, 149.
53. Jacob, F., C. Fuerst, and E.L. Wollman, 1957. Recherches sur les bactéries lysogènes defectives. II. Les types physiologiques liés aux mutations du prophage. *Ann. Inst. Pasteur* **93**, 724.
54. Jacob, F., 1960. Genetic control of viral functions. *Harvey Lectures* **54**, 1.
55. Jerne, N.K. and L. Scovstad, 1953. The rate of inactivation of bacteriophage T4r in specific antiserum. *Ann. Inst. Pasteur* **84**, 73.
56. Kaiser, A.D. and F. Jacob, 1957. Recombination between related temperate bacteriophages and the genetic control of immunity and prophage localization. *Virology* **4**, 509.
57. 木下祝郎, 板垣史郎, 奥村拓二, 1952, *Clostridium acetobutylicum* の Bacteriophage に関する研究(第1報). 電子顕微鏡的観察に就て. 農化 **26**, 104.
58. 北原賞雄, 金子太吉, 1958. 酸酵微生物のフアジ現象に関する研究(第4報). 細菌アミラーゼ工場に侵入したフアジの分離. 農化 **32**, 405.
59. Koch, G. and W.J. Dreyer, 1958. Characterization of an enzyme of phage T2 as a lysozyme. *Virology* **6**, 291.
60. Krueger, A.P. and J.H., Northrop 1931. The kinetics of bacteriophage reaction. *J. Gen. Physiol.* **14**, 233.
61. Krueger, A.P., 1931. The adsorption of bacteriophage by living and dead susceptible bacteria. *J. Gen. Physiol.* **14**, 493.
62. Krueger, A.P., 1932. The heat inactivation

- of an antistaphylococcus bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **15**, 393.
63. Lwoff, A.M. and L. Siminovitch, 1951. Induction de la lyse d'une bactérie lysogène sans production de bacteriophage mutants as evidence for the exponential rate of phage reproduction. *Cold Spring Harbor Syn. Quant. Biol.* **1**, 463.
64. Maeløe, O., 1950. Some effects of changes of temperature on intracellular growth of the bacterial virus T4r. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **27**, 680.
65. Marmur, J. and P. Doty, 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* **5**, 109.
66. Mukai, F.H., 1960. Interrelationship between colicin sensitivity and phage resistance. *J. Gen. Microbiol.* **23**, 539.
67. 村田晃, 1968. 酸酵協会誌 **26**, 1.
68. Nomura, M. and J. Hosoda, 1956. Nature of the primary action of the autolysin of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **75**, 573.
69. Ogata, S. O. Mihara, Y. Ikeda and M. Hongo, 1972. Inducible phage tail-like particles of *Ct. saccharoperbutylactonicum* and its related strains. *Agr. Biol. Chem.* **36**(8), 1413.
70. Oki, T., R. Harada, K. Akahoshi and T. Mataui, 1964. Studies on the bacteriophages of L-glutamic acid producing bacteria, *Brevibacterium* species (I). Lysis in L-glutamic acid fermentation and confirmation of bacteriophages. *Agr. Biol. Chem.*, **38**(4), 192.
71. Oki, T., R. Harada, K. Akahoshi, T. Matsui and Y. Maeda, 1964. II. Some general properties of the phages. *Agr. Biol. Chem.* **38**(4), 198.
72. Oki, T., Matsui, T., Akahoshi, K., and Harada, R. 1964. III. The growth of bacteriophage. *Agr. Biol. Chem.* **39**(8), 376.
73. Oki, T., T. Matsui, K. Akahoshi and R. Harada, 1964. VI. Electron microscopic observation of phage and its host range. *Agr. Biol. Chem.* **38**(8), 381.
74. Oki T., K. Akahoshi, T. Matsui and R. Harada, 1965. V. The inhibition of bacteriophage multiplication by antibiotics in L-glutamic acid fermentation. *Agr. Biol. Chem.* **39**, (1), 22.
75. Oki, T., T. Matsui and A., Ozaki 1967. VI. Serological characteristics of the twenty one *Brevibacterium* phages. *Agr. Biol. Chem.* **31**(7), 861.
76. Oki, T. and A. Ozaki, 1967. *Agr. Biol. Chem.* **31**, 1466.
77. Oki, T. and A. Ozaki, 1968. *Agr. Biol. Chem.* **32**, 320.
78. 奥村信二, 都河龍一郎, 角田俊直, 河野景明, 井松俊規, 宮地昇, 1962. L-クルタミン酸酵酛に関する研究(第一報). 自然界より分離したクルタミン酸生産菌 *Brevibacterium*屬 細菌. 農化 **49**, 141.
79. Puck, T.T., A. Garen and J. Cline, 1951. The mechanism of virus attachment to host cells(I). The role of ions in the primary reaction. *J. Exptl. Med.* **93**, 65.
80. Puck, T.T. and L.J. Tolmach, 1954. IV. Physicochemical studies on virus on virus and cell surface groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **51**, 229.
81. Reeves, P., 1972. "The bacteriocins", Springer-Verlag Berlin, Heiderberg, New York.
82. Ruska, H., 1940. Die Sichtbarmachung der Bakteriophagen Lyse in Übermikroskop. *Naturwiss.* **28**, 45.
83. Ryan, F.J., P. Fried, and F. Mukai, 1955. A colicin produced by cells that are sensitive to it. *Biochim. Biophys. Acta.* **18**, 131.
84. Saudek E.C. and D.R. Collingsworth, 1947. A bacteriophage in the streptomycin fermentation. *J. Bacteriol.* **54**, 41.
85. Schuster, H., 1961. The reaction of tobacco mosaic virus ribonucleic acid with hydroxylamine. *J. Mol. Biol.* **3**, 447.
86. 濱戸進, 大澤岳義, 山本外男, 1965. L-クルタ

- ミン酸生産菌 *Microbacterium ammoniphilum* のフアジに関する研究(第1報)。フアジの一般的性質。農化 **39**, 41.
87. 瀬戸進, 大澤岳義, 山本外男, 1965 (第2報)。(その1) フアジの 増殖について, (その2) フアジ 感染菌の形態變化について。農化 **39**, 48.
88. 瀬戸進, 大澤岳義, 山本外男, 1965. (第三報)。(その1) フアジ 耐性株について, (その2) 溶原菌株の確認。農化 **39**, 54.
89. Stent, G.S. and E.L. Wollman, 1952. On the two-step nature of bacteriophage adsorption. *Biochim. Biophys. Acta.* **8**, 260.
90. Stent, G.S., 1963. Molecular biology of bacterial viruses, Freeman.
91. Su, Yuan-Chi, Yu, Sheng-Huai, and Tung, Chang-Chin, 1966. *Chem. Abs.* **66**, 93965 u.
92. Thomas, R. and L.E. Bertani, 1964. On the control of replication of temperate bacteriophage superinfecting immune host. *Virology* **24**, 241.
93. Tolmach, L.J. and T.T. Puck, 1952. The mechanism of virus attachment to host cells (Ⅲ). *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5551.
94. Tomizawa, J. and T. Ogawa, 1967. Effect of ultraviolet irradiation on bacteriophage lambda immunity. *J. Mol. Biol.* **23**, 247.
95. 富澤純一, 1970. “ベクテリオフアジ”的實驗, 岩波書店。
96. 土野卓兒, 椎尾剛, 岡田弘, 龜山巖, 角田俊直, 1963. L-クルタミン酸 酸酵におけるベクテリオフアジの研究(第一報)。ベクテリオフアジの確認。農化 **37**, 686.
97. Twort, F. W., 1915. An investigation of the ultramicroscopic viruses. *Lancet* (2), 189.
98. Wacker, A., H. Dellweg, and D. Weinbaum, 1960, Stahlenchemische Veränderung der Bakterien-Desoxyribonuclein Säure *in vivo*. *Naturwiss.* **47**, 477.
99. Wacker, A., 1961. Stahlenchemische Veränderungen von Pyrimidinen *in vivo* und *in vitro*. *J. Chim. Phys.* **58**, 1041.
100. Wahba, A.H., 1965. Vibrioine production in the Cholera and El Tor vibrios. *Bull. World Health Organization* **33**, 661.
101. Whitehead, H.R., 1953. *Bacteriol. Rev.* **17**, 109.
102. Williams, R.C. and D. Fraser, 1953. Morphology of the seven T-bacteriophages. *J. Bacteriol.* **66**, 458.
103. Wyatt, G.R. and S.S. Cohen, 1953. The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses. The occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochem. J.* **55**, 774.
104. Wyatt, G.R., 1955. The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: The occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochem. J.* **55**, 774.
105. Wyatt, 1955. Separation of nucleic acid components by chromatography on filter paper. In "Nucleic acids", Chargaff, E., and Davison, J.N., eds. Academic Press, New York. Vol. 1-7.
106. 山田浩ア, 1972. “アミノ酸酸酵”(上, 下)。共立出版株式會社。
107. Zelle, M. and A. Hollaender, 1954. Monochromatic ultraviolet action spectra and quantum yields for inactivation of T1 and T2 *Escherichia coli* bacteriophages. *J. Bacteriol.* **68**, 210.





### Explanation of Plates

- Plate 1. Plaques of phage PR-1 on *Br. lactofermentum*
- Plate 2. Plaques of phage PR-5 on *Br. lactofermentum*
- Plate 3. Electron micrograph of phage PR-1
- Plate 4. Electron micrograph of phage PR-5
- Plate 5. Electron micrograph of phage PR-5 (T)
- Plate 6,7,8,9. Electron mirograph of various phage tail-like particles