

## 乳酸桿菌 Bacteriophage의 증식억제물질

姜國熙 · 朴基文

成均館大學校 農科大學酪農學科

(1982년 8월 29일 수리)

## Effect of Phosphates on Lytic Activity of Bacteriophages Infected in *Lactobacillus* Cells

Kook Hee Kang and Gi Mun Park

Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Korea

(Received August 29, 1982)

### Abstract

*Lactobacillus casei* YIT 9018 was infected with phage J1 and subjected to grow in  $Ca^{++}$  free MRT (spell out) medium under the presence of four different types of phosphates, sodium-metaphosphate, pyrophosphate, dibasic phosphate, and potassium-phosphate. Among the phosphates tested, sodium pyrophosphate showed sufficient inhibition on the lytic activity of the phage at 0.1% level whereas other phosphate needed more than 0.2% for the same effect. When the concentration of sodium pyrophosphate increased to 0.17%, the bacteria could be protected from lysis until the second succeeding transfer.

### 서 론

유산균 발효유 제조시, 배양 초기에 phage가 배양액에 감염되면 유산균이 용균되어 버리므로 발효유의 제조가 불가능하게 된다. 배양액에 phage가 감염되는 경우에 유산균의 증식을 가능하게 하기 위하여 phage오염 대책에 대한 연구가 Stanley (1978)<sup>1)</sup>, Frank (1979)<sup>2)</sup>, Erickson (1980)<sup>3)</sup> 등에 의해 보고되고 있다. 또 Cherry와 Watson (1949)<sup>4)</sup>, Sozzi (1972)<sup>5)</sup>, Osada 등 (1974)<sup>6)</sup> 은 phage가 증식하기 위하여  $Ca^{++}$ 이 필요하다고 보고하였다. 이러한  $Ca^{++}$ 를 배양액내에서 제거함으로써 phage 증식을 억제하는 phage-resistant medium (PRM)에 대해 다음과 같이 보고되어 있다.

즉, Collins 등 (1950)<sup>7)</sup> 은 citrate와 phosphate를, Hargrove (1959)<sup>8)</sup> 는 2% sodium phosphate ( $NaH_2PO_4 : Na_2HPO_4 = 3 : 2$ )를, Van Vunakis와 Herriott (1961)<sup>9)</sup> 은 pyrophosphate를, Kriel 등 (1976)<sup>10)</sup> 은 2% potassium phosphate ( $K_2HPO_4 : KH_2PO_4 = 3 : 2$ ) 등 주로 phosphate 계통의 물질을 첨가하여 우유배양액내의  $Ca^{++}$ 를 제거하여, PRM을 제조 후, 유산균을 이용한 발효유 제품에 사용함으로써 phage 감염에 의해 발생하는 문제점을 해결하여 왔다.

따라서 본 실험에서는 유산균 배양액에 phage가 감염되는 경우에도, 유산균의 증식을 가능하게 하는 물질을 찾아 그 적정농도를 결정하기 위하여 주로 식품에 사용하고 있는 인산염계통의 식품첨가물<sup>11)</sup>을 이용하여 본 실험을

실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 사용균주

본 실험에 사용한 시험균은 homi발효, 유산균인 *Lactobacillus casei* YIT9018을 사용하였다. 실험에 사용하기 위하여 병동보존 중인 균주에서 1백금침을 5 ml의 MRT<sup>12)</sup> 액체배지에 2회계대하여 활력을 증가 시킨후 본 실험에 사용하였다.

### 2) Phage 주

본 실험에 사용한 phage주는 *L. casei* YIT9018을 숙주균으로 하는 대표적인 독성 phageJ1을 단독으로 사용하였다.

### 3) 배 지

유산균 배양에는 MRT배지에서 *L. casei* 증식에 필수성분<sup>13)</sup> 이 아닌 CaCl<sub>2</sub>를 제거한 액체배지를 사용하였다. 이 배지에서의 EOP<sup>14)</sup>(efficiency of plate)는 0.23을 나타내었다.

### 4) 유산균의 증식측정

유산균의 증식정도를 측정하기 위하여 가지 시험관에<sup>15)</sup> 9ml의 MRT액체배지를 넣은 후 *L. casei* YIT9018을 접종하여 37°C water bath에서 배양하면서 Klett Summerson colorimeter<sup>16)</sup>를 이용하여 660nm(red filter No. 66)에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1) 인산염농도에 따른 유산균의 증식

본 실험에 사용할 각 인산염의 농도를 결정하기 위하여 우선, CaCl<sub>2</sub>를 제거한 MRT 액체

**Table 1. Proliferation level of *L. casei* YIT 9018 at various phosphates concentrations**

Phosphates	Concentration				
	0.1%	0.5%	0.1%	1.5%	2.0%
Sodium metaphosphate	++	++	++	+	-
Sodium polyphosphate	+	-	-	-	-
Sodium pyrophosphate	++	-	-	-	-
Sodium phosphate monobasic	++	++	++	++	++
Sodium phosphate dibasic	++	++	+	-	-
Sodium phosphate tribasic	++	++	-	-	-
Potassium phosphate monobasic	++	++	++	++	++
Potassium phosphate dibasic	++	++	++	+	+

++ : high    + : average    - : unchanged

배지내에서 첨가 인산염의 농도에 따른 유산균의 증식정도를 조사하였다.

즉 9 ml의 액체배지에 농도별로 각 인산염을 첨가한 후 10<sup>6</sup>/ml의 *L. casei* YIT9018 배양액 1 ml를 접종하여 37°C에서 12시간 배양한 후 증식정도를 육안으로 조사한 결과 Table 1과 같다. 이 결과에서 보는 것처럼 각 인산염의 농도와 종류에 따라 유산균의 증식에 상당한 차이를 나타내었다.

### 2) phage 감염 후 유산균의 증식

CaCl<sub>2</sub>를 제거한 MRT액체배지에 *L. casei* YIT9018 증식이 가능한 농도의 인산염을 첨가한 후 *L. casei* YIT9018(10<sup>6</sup>/ml)을 접종하고 phage J1을 MOI(Multiplicity of infection) = 10<sup>-2</sup>가 되게 감염시킨 다음, 유산균의 증식정도를 흡광도로 측정한 결과 Fig. 1과 같았다.

즉 sodium phosphate(monobasic), sodium phosphate(tribasic), potassium phosphate(monobasic)의 경우 유산균의 증식이 가능한 농도에

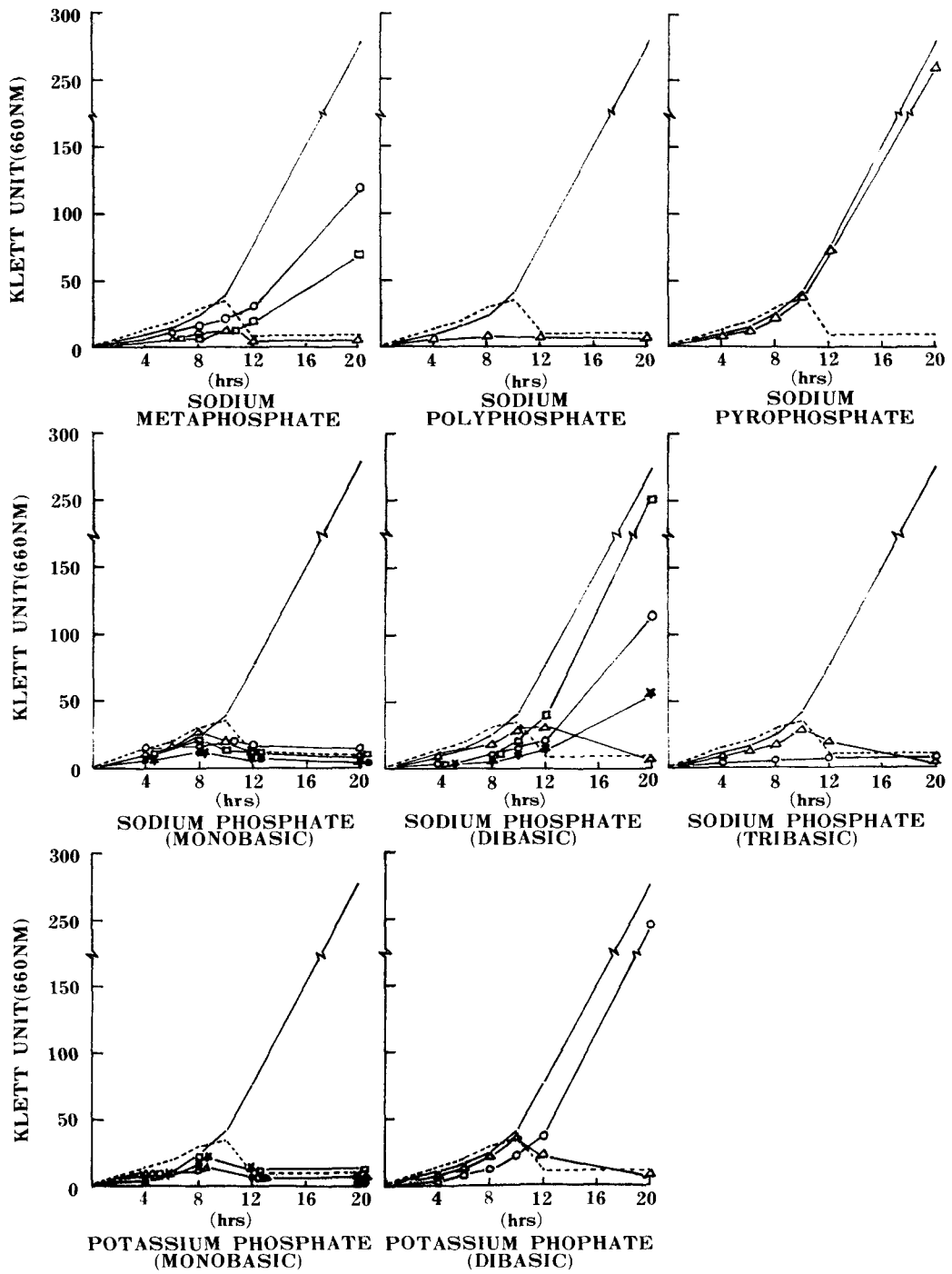


Fig 1. Growth of *L. casei* YIT9018 in CaCl<sub>2</sub>-free MRT broth containing various amount of phosphates after infection of phage J1. Phosphates were added to make 0% (---), 0.1% (△), 0.5% (○), 1.0% (□), 1.5% (★), and 2.0% (●). For control (—), neither phosphate nor phage was added.

서 phage J1에 의해 유산균이 용균됨으로써 p-hage의 증식억제 현상은 나타나지 않았으며, 특히 sodium polyphosphate는 0.1% 농도에서도 유산균이 잘 증식하지 못하는 것으로 나타났다.

그러나, sodium metaphosphate의 경우, 0.5% 농도에서 유산균의 증식이 가능하며 sodium pyrophosphate를 첨가한 경우 0.1% 수준에서 p-hage가 감염되지 않은 비교균과 거의 비슷한 유산균 증식을 나타내었다. 그러나 0.5% 수준부터는 phage의 증식은 억제하나 적정농도를 넘어서서 유산균의 자체 증식이 억제됨을 보여 주었다.

sodium phosphate(dibasic)의 경우, 0.1%에서는 phage의 증식을 억제하지 못하고 유산균

의 용균이 일어났으나 0.5~1.0%까지는 phage의 증식이 억제되어 phage가 감염되지 않은 비교균과 비슷한 유산균 증식을 나타내었다.

그리고 potassium phosphate(dibasic)의 경우는 0.5% 수준에서 phage에 의해 유산균이 용균되지 않고 증식함을 보여주었다.

이와같은 실험 결과는 앞의 서론에서 설명한 PRM제조시 사용한 phosphate농도와는 본 실험에서 사용한 액체배지가 탈지유가 아니라서 그 농도차이는 있었지만 거의 같은 종류의 인산염들이 phage 증식을 억제함으로써 유산균의 증식을 가능하게 하였다.

즉 식품첨가 인산염 중에서 sodium metaphosphate, sodium pyrophosphate, sodium phospho-

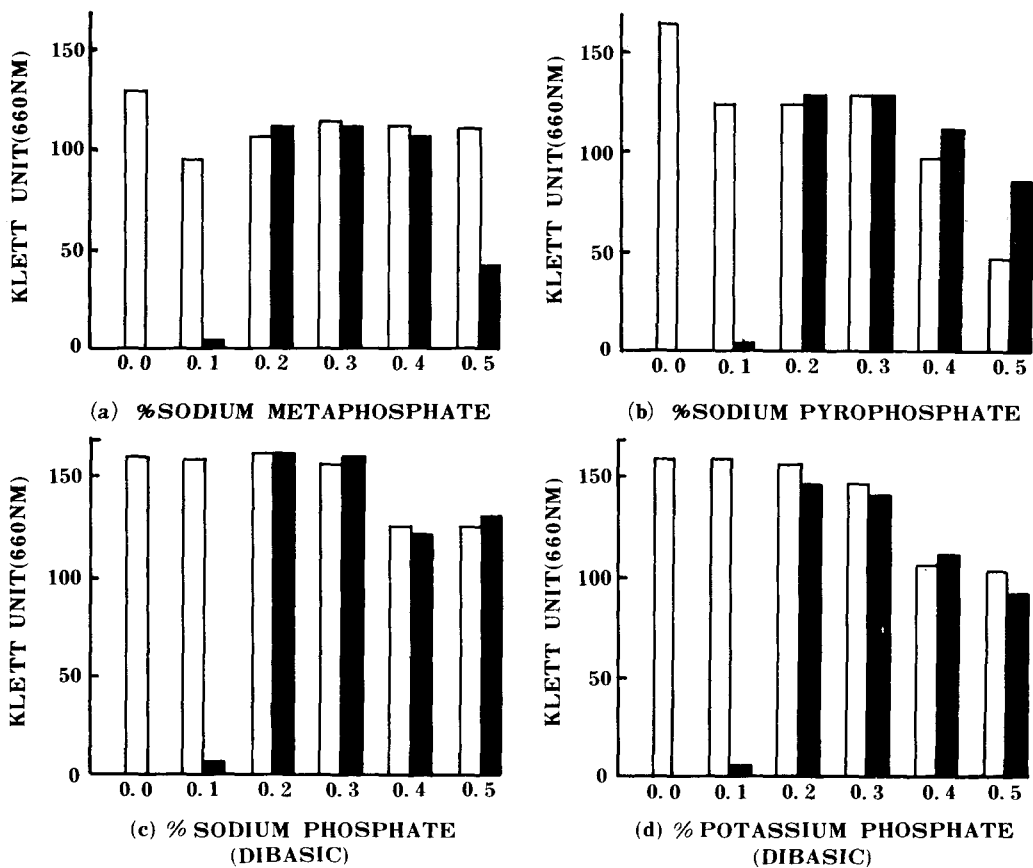


Fig 2. Proliferation level of *L. casei* YIT9018 in the CaCl<sub>2</sub> free MRT broth with various phosphates concentrations which restrained the growth of phage J1.

The incubation time was for 16 hrs at 37°C  
 □ : various phosphates + *L. casei* YIT9018  
 ■ : various phosphates + *L. casei* YIT9018 + J1

te(dibasic)이 phage 감염 후에도 유산균의 증식을 가능하게 하는 물질로 판정되었다.

### 3) 인산염의 적정농도 결정

Fig. 1의 실험결과를 토대로 phage 증식을 억제하는 각 인산의 적정농도를 결정하기 위하여 본 실험을 실시하였다. 즉,  $\text{CaCl}_2$ 를 제거한 M-RT액체배지에 4 종류의 인산염을 각 농도별로 첨가한 후 *L. casei* YIT 9018 ( $10^7/\text{ml}$ )과 phage J1 ( $10^5/\text{ml}$ )액을 0.1ml씩 각각 접종한 후 37°C에서 16시간 배양한 다음 흡광도를 측정하여 인산염을 첨가하지 않고 유산균만을 배양한 비교군과 각 인산염을 첨가한 후 유산균을 배양한 것, 그리고 인산을 첨가한 배지에 유산균과 phage를 혼합하여 배양한 각 처리별 유산균의 증식을 조사한 결과 Fig. 2와 같다. 즉 sodium metaphosphate의 경우 0.2~0.4%에서 phage가 감염되지 않은 비교군과 거의 비슷한 흡광도를 나타냈으며 sodium metaphosphate 첨가에 의한 유산균의 증식에도 거의 영향을 미치지 않았다. 그리고 sodium pyrophosphate의 경우 0.1~0.2%에서 sodium phosphate(dibasic)은 0.2~0.3%에서 potassium phosphate(dibasic)의 경우 0.2~0.35%에서 phage의 증식을 억제하여 배양액에 phage가 감염되었을 지라도 유산균의 증식을 가능하게 하였다.

### 4) phage가 감염된 배양액의 1차 계대

만약 starter 배양액에 phage가 감염되었을 경우, phage 증식억제 물질에 의해 유산균이 증식하였을 지라도 배양탱크내에 이 감염된 starter 배양액을 첨가하였을 경우 유산균과 phage의 증식이 어떻게 변화하는지 알아 보았다.

즉, 앞의 실험결과 유산균이 증식한 phage 감염액 0.5ml를 신선한 9ml의  $\text{CaCl}_2$ 가 제거된 MRT액체배지에 이식하였을 때의 유산균 증식 결과는 Table 2와 같다. 즉, sodium metaphosphate(0.4%), sodium phosphate(dibasic) (0.3%), potassium phosphate(dibasic) (0.3%)의 경우 신선한 액체배지에 1차 계대 후 배양액내에 존재하는 phage가 증식하여 유산균을 용균시켰으

**Table 2. Proliferation of *L. casei* YIT 9018 in the  $\text{CaCl}_2$  free M. R. T. broth with phage J1 which was restrained by various phosphates**

Phosphates	$\text{CaCl}_2$ free M. R. T. broth		
	starter	1 st subculture	2 nd subculture
Sodium metaphosphate (0.4%)	-	+	+
Sodium pyrophosphate (0.2%)	-	-	+
Sodium phosphate dibasic (0.3%)	-	+	+
Potassium phosphate dibasic (0.3%)	-	+	+
	- : no lysis	+ : lysis	

나, sodium pyrophosphate(0.2%)의 경우 1차 계대 후에도 phage 증식억제를 보여 주었다. 이 1차 계대배양액을 다시 새로운 배지에 2차 계대 하였을 때는 sodium pyrophosphate의 경우에도 역시 phage 증식에 의해 유산균이 용균됨을 나타내었다.

여기서 sodium pyrophosphate 농도에 따른 1차 계대 후 phage의 활성을 조사해 본 결과는 Table 3과 같다. 즉 sodium pyrophosphate 농도에 따라 다른 결과를 보여 주고 있다.

**Table 3. Proliferation of *L. casei* YIT 9018 in the  $\text{CaCl}_2$  free M. R. T. broth with phage J1 which was restrained by various sodium pyrophosphate concentrations**

% Sodium pyrophosphate	$\text{CaCl}_2$ free M. R. T. broth	
	starter	1 st subculture
0.11%	-	+
0.14%	-	+
0.15%	-	+
0.16%	-	+
0.17%	-	-
0.18%	-	-
0.19%	-	-
0.20%	-	-

- : no lysis                      + : lysis.

즉, sodium pyrophosphate의 첨가농도가 0.16% 이하일 경우, 새로운 배지에 1차 계대 후 유산균의 용균이 일어났으나 0.17% 이상에서는 phage 증식이 억제됨을 보여주고 있다. 따라서 인산염에 의해 phage가 불활성화 되기 보다는 증식이 억제된 상태로 존재하는 것으로 생각되며 sodium metaphosphate, sodium phosphate(dibasic), potassium phosphate(dibasic)은 유산균 발효유 제조용 PRM사용이 가능한 것으로 보이며 sodium pyrophosphate의 경우, starter 배양액에 첨가하면 이 starter 배양액에 phage가 감염되더라도 배양탱크에 접종하여도 유산균의 증식이 가능하다고 사료된다.

## 요 약

본 실험의 결과를 요약해 보면 인산염의 종류와 농도에 따라서 유산균의 증식과 phage 감염 후의 유산균 증식에 미치는 영향을 검토하였다.

특히, phage 증식억제제를 나타내는 물질은 sodium metaphosphate, sodium pyrophosphate, sodium phosphate(dibasic), potassium phosphate(dibasic)으로써 각각 0.2~0.4%, 0.1~0.2%, 0.2~0.3%, 0.2~0.35%에서 phage 감염 후 유산균의 증식을 가능하게 하였다.

그리고 phage 감염 후에도 증식한 유산균 배양액을 새로운 배지에 1, 2차 계대 하였을 때, 역시 인산염의 종류와 농도에 따라 배양액에 존재하는 phage에 의해 유산균의 증식에 큰 영향을 미쳤다.

특히 sodium pyrophosphate의 경우, 0.17% 이상에서는 1차 계대 후에도 phage의 증식이 억제되어 유산균이 증식하기 때문에 starter 배양액용 P. R. M 제조에 이용이 가능한 것으로 보여진다.

## 참 고 문 헌

- 1) Stanley, G.: *Dairy Industries International*. September, 23~29(1978).
- 2) Frank, J. P.: *Dairy and Ice Cream Field*. August, 42(1979).
- 3) Erickson, R. J.: *Dairy Industries Interna-*

*tional March*, 37~44(1980)

- 4) Cherry, W. B. and D. W. Watson: *J. Bact* 58, 611~620(1949)
- 5) Sozzi, P. T.: *Milchwissenschaft*. 279, 503~505(1972).
- 6) Osada, Y., T. Une., T. Ikeuchi and H. Ogawa: *Japan J. Microbiol* 18, 321~326(1974).
- 7) Collins, E. B., F. E. Nelson and C. F. Parmelle: *J. Bact.* 60, 533~538(1950).
- 8) Hargrove, R. E.: *J. Dairy Sci.* 42, 906(1959).
- 9) Van Vunakis, H. V. and R. M. Herriott: *J. Bact.* 83, 590~596(1961).
- 10) Kriel, J. B., W. H. Halzapfel and L. A. Mount Ford: *South African J. Dairy Technology* 8, 45~49(1976).
- 11) 김일환, *食品工業* 35, 91~97(1976).
- 12) Murata, A., E. Soeda, and R. Saruno: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 43, 311~316(1974).
- 13) Morishita, T., T. Fukada, M. Shirota and T. Yura.: *J. Bact.* 120, 1078~1084(1974).
- 14) Kim, Y. C., M. C. Park., K. H. Kang, Y. H. Yoon and K. W. Lee: *Korea J. Microbiol.* 17, 165~178(1979).
- 15) Ekulund, C. and C. E. Lankford: *Laboratory manual for General Microbiology*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs. New Jersey(1977)
- 16) Ishiwa, H and T. Yokokura: *Japan J. Microbiol.* 15, 539~541(1971).