

Lactobacillus casei YIT 9018로부터 Prophage cured strain의 분리 및 특성

이정준 · 김경태 · 백영진*

한국야쿠르트유업(주) 연구소

Isolation and Characterization of Prophage cured strain derivatives from *Lactobacillus casei* YIT 9018

Lee, Jeong-Jun, Gyung-Tae Kim and Young-Jin Baek*

Hankuk Yakult Institute, Wanggok-dong, Euiwang-si, Kyunggi-do, 437-020, Korea

Prophage cured strain derivatives from *Lactobacillus casei* YIT 9018 were isolated from thermoinducible mutant of the parent lysogenic strain. Two thermoinducible mutants were isolated from *L. casei* YIT 9018 strain treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Prophage cured strains were selected after heat induction of thermoinducible strains at 42°C for 30 min in MRT medium containing anti- ϕ FSV serum. The prophage cured strains, *L. casei* HYM 1213 and *L. casei* HYM 4024, could be used as an indicator strain for temperate phage ϕ FSV. The growth, lactic acid producing ability and carbohydrates fermentation of *L. casei* HYM 1213 were similar to the parent *L. casei* YIT 9018 strain, but *L. casei* HYM 4024 was not. One of the prophage cured strain, *L. casei* HYM 1213, could be used industrially to produce lactic acid beverages because this strain could not induce the virulent phage ϕ FSV. The physiological characterization of *L. casei* HYM 1213 strain was similar to the parent *L. casei* YIT 9018 strain.

유산균 발효유 제조에 사용되는 *Lactobacillus casei* YIT 9018 균주는 내산성(1), 인체 장내에서의 활성(2-5), 제품의 품질에 대한 안정성(4) 등에서 높이 평가되고 있으나, 발효과정 중 bacteriophage의 발생으로 인해 이상발효를 일으켜 산업적 손실을 가져오기도 한다(6, 7). 이들 bacteriophage는 주위 환경으로부터 혼입된 virulent phage와 strain에 함유되어 있는 temperate phage ϕ FSV로부터 유래된 virulent phage ϕ FSV로 구분되어진다.

Shimizu-Kadota 등(8)은 temperate phage ϕ FSV와 virulent phage ϕ FSV의 형태, viral structural proteins 그리고 DNA 구조를 비교함으로써 virulent phage ϕ FSV가 temperate phage ϕ FSV로부터 유래

되었음을 밝히고, prophage cured strain의 생성으로 virulent phage ϕ FSV의 출현을 방지할 수 있음을 시사하였다.

Prophage의 induction은 mitomycin C, 자외선(UV), 열처리 등에 의해서 prophage repressor를 불활성화시킴으로 이루어질 수 있는데 Yokokura 등(9)은 mitomycin C에 의해 *Lactobacilli*에서 prophage를 induction시켰으며 McKay와 Baldwin(10)은 *Streptococcus lactis* C2 균주에 UV를 처리하여 prophage를 induction시켰다. 그러나, Shimizu-Kadota와 Sakurai(11)는 *L. casei* S-1 균주에서는 mitomycin C나 UV에 의해서 induction되지 않고 열처리에 의해서 이루어질 수 있다고 보고하였고, 장과 윤(12)도 *L. casei* ATCC 27139 균주에 열처리를 하여 prophage cured strain을 분리하였다.

그러나 prophage cured strain이 산업적으로 이용되

Key words: *Lactobacillus casei*, virulent phage ϕ FSV, thermoinducible mutant, prophage cured strain

*Corresponding author

기 위해서는 유산균 고유의 생리적 특성이 변화되지 않아야 한다. Shimizu-Kadota와 Sakurai(11)는 *L. casei* S-1 균주로부터 생성된 cured strain이 산생성능력을 유지하였다고 보고하였으며, Chopin 등(13)은 *Streptococci* group N의 cured strain 중에서 한 균주만이 산생성능력에 영향을 받지 않았다고 보고하였다. 또한 장과 윤(12)은 *L. casei* ATCC 27139 균주에서 cured strain을 분리하였으나 유당 분해력이 상실되어 산생성능력이 떨어졌다고 보고하였다.

이에 본 연구는 *L. casei* YIT 9018 균주의 thermoinducible mutants에 열처리를 하여 prophage cured strain을 분리하였으며, 이들의 생리적 특성을 파악하여 모균주와 유사한 유산생성력과 당분해력을 지닌 산업적으로 유용한 균주를 선발하였기에 보고한다.

재료 및 방법

균주 및 bacteriophage 주

본 연구에 사용된 균주는 Table 1과 같으며, virulent phage ϕ FSV는 한국 야쿠르트 공장에서 검출된 Lac N22 phage를 사용하였다.

배지 및 시약

Phage 증식 및 titer 측정에는 MRT 배지(14)가 사용되었고, thermoinducible mutants 선발에는 Rogosa's 배지(15)가 사용되었다.

유산균의 생리적 특성 검사에는 MRS 배지(16)가 사용되었으며 산생성능력 측정에는 10% skim milk가 사용되었다. 또한 당 발효능력 측정에는 MILS 배지와

Table 1. *Lactobacillus casei* strains used.

Strains	Description
YIT 9018	Parent strain; Temperate phage ϕ FSW harbored
TS 204	Thermoinducible mutant of YIT 9018 (this study)
TS 909	Thermoinducible mutant of YIT 9018 (this study)
HYM 1213	Prophage cured strain derivatives from TS 204 (this study)
HYM 4024	Prophage cured strain derivatives from TS 909 (this study)
YIT 9029	Indicator strain for temperate phage ϕ FSW
YIT S-1	Temperate phage ϕ FSW harbored

WMILS 배지를 사용하였으며, 그 조성은 Table 2와 같다.

NTG 용액은 0.1 M citrate buffer (pH 5.5)에 NTG 1 mg/ml의 농도가 되도록 조제하여 사용하였다.

Virulent phage ϕ FSV에 대한 항혈청 제조

Yamamoto 등(17)의 방법에 따라 PEG 6000으로 처리하여 농축된 phage 액을 freund's complete adjuvant와 동량혼합하여 2.5kg의 토끼(male)에 2ml를 피하 주사하였다.

그 후 2주간격으로 phage 액만을 ear vein에 3회 booster injection하여 항체의 titer를 측정하고, 혈청을 수거한 후 56°C에서 10분 동안 열처리하여 냉동보관하면서 사용하였다.

Thermoinducible mutants의 분리

Thermoinducible mutants의 분리는 Shimizu-Kadota와 Sakurai(11)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, *Lactobacillus casei* YIT 9018 균주를 MRT broth에서 $2\sim 4 \times 10^8$ cfu/ml가 되도록 배양하였고, 0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.5)로 세척한 후 NTG 용액을 최종 농도가 100 μ g/ml이 되도록 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 이를 원심분리한 후 다시 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 세척하고 새로운

Table 2. Composition of MILS and WMILS medium. (g/l)

Composition	MILS	WMILS
Peptone	5	5
Tryptose	-	3
Soytone	5	5
Yeast extract	5	5
Lactose	20	10
Na-acetate	1	1
NaCl	2	2
Tween 80	1	1
CaCO ₃	-	5
Tryptone	3	-
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.01	0.01
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	0.2
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001	0.001
pH	6.0	6.8
D.W.	1000 ml	1000 ml

MRT broth로 현탁한 다음, Rogosa agar plate에서 100~200개의 colony가 생성되도록 희석하여 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 균체들 중에서 replica-plating method에 의해 42°C에서만 성장이 억제된 균체들을 온도감수성 변이주로 선발하였다.

온도감수성 변이주를 MRT broth에서 다시 42°C로 30분간 열처리한 후 30°C에서 24시간 동안 배양하고, soft agar layer method(18)로 temperate phage ϕ FSW의 titer를 측정하여, ϕ FSW의 생산성이 증가한 것을 thermoinducible mutants로 최종 선발하였다.

Prophage cured strains의 분리

선발된 thermoinducible mutants를 anti- ϕ FSV serum이 함유된 MRT broth에서 30°C, 24시간 2회 계대배양한 후, anti- ϕ FSV serum이 함유된 새로운 MRT broth에 0.05% 접종하여 42°C에서 30분간 열처리하고 다시 37°C에서 18시간 배양하였다.

배양액을 MRT agar medium에 plating하여 42°C에서 성장한 colony를 선발하여 MRT broth에서 37°C, 18시간 배양하였다. 이들이 temperate phage ϕ FSW에 대한 숙주로 작용하는가를 확인한 후 ϕ FSW-sensitive strain 즉, prophage cured strain으로 분리하였다.

Prophage cured strains의 생리적 특성 검사

유산균의 증식정도를 측정하기 위해 MRS 배지에 균주를 0.05% 접종하여 37°C에서 배양하면서 650nm에서 흡광도 변화를 관찰하였다.

또한, 유산생성능력은 10% skim milk 및 MRS broth에 접종하여 37°C에서 배양하면서, 배양시간에 따른 pH 변화 및 적정산도를 측정하여 비교하였다.

당 발효 시험

Okada 등(19)의 방법을 수정하여 실시하였다. 각 균주를 MILS broth에 접종하여 18시간 배양하고 멸균 생리식염수로 원심분리하여 균체를 회수하였다.

Lactose를 뺀 WMILS 배지에 CaCO₃, 0.5%와 2.0%의 각 당을 첨가하여 당 배지를 준비하였다. 준비된 당 배지에 위의 균현탁액을 picking하여 37°C에서 3일 배양한 후 CaCO₃에 의한 halozone 생성유무를 확인하였다.

Plasmid DNA 분리 및 DNA의 전기영동

Lactobacillus spp. 균주의 plasmid DNA 분리는

N-acetylmuramidase를 사용한 배 등(20)의 방법에 준하여 실시하였다.

DNA의 전기영동은 Maniatis 등(21)의 방법을 수정하여 사용하였는데, Tris borate buffer(pH 8.0)를 전해질로 놓고 plasmid DNA sample 20 μ l에 loading buffer 5 μ l를 혼합하여, 40mA로 4~5시간 동안 DNA를 전개시켰다. 이 때 agarose(sigma, type II)는 0.6%를 사용하였다.

전개가 끝난 agarose gel은 Et. Br(0.5 μ g)에 30분간 staining하여 간단히 tap water로 washing한 다음 UV illuminator에서 DNA band를 관찰하였다.

결과 및 고찰

Thermoinducible mutants의 분리 및 특성

모균주인 *L. casei* YIT 9018 균주에 NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)를 처리(100 μ g/ml)하여 42°C에서 성장이 억제되는 온도감수성 변이주를 14주 선발하였다. 이들을 42°C에서 30분간 열처리하여 temperate phage ϕ FSW의 생성율을 비교해본 결과, TS 204 균주와 TS 909 균주에서 열처리 후 temperate phage ϕ FSW가 약 100배 정도 증가함을 보여 이들을 thermoinducible mutants로 선발하였다(Table 3).

Prophage cured strains의 분리

Thermoinducible mutants로 선발된 *L. casei* TS

Table 3. Effect of heat treatment on ϕ FSW productivity of thermoinducible mutants.

<i>L. casei</i> strains	titrated on <i>L. casei</i> YIT 9029 (PFU/ml)*	
	Heat treatment	Control
YIT 9018	8.2 × 10 ³	8.0 × 10 ³
TS 204	2.9 × 10 ⁵	6.9 × 10 ³
TS 305	4.7 × 10 ³	5.2 × 10 ³
TS 527	7.2 × 10 ³	4.3 × 10 ³
TS 619	2.9 × 10 ³	4.8 × 10 ³
TS 909	4.6 × 10 ⁵	2.8 × 10 ³

*Cells were grown at 30°C in MRT broth, and the culture was divided into two portions. One-half of the culture was heated at 42°C for 30 min (Heated treatment), and the other half was not heated (Control). These preparations were incubated at 30°C for an addition 18 h and centrifuged, and the supernatant on *L. casei* 9018.

Table 4. Activity as a host for temperate phage ϕ FSW.

<i>L. casei</i> mutants	temperate phage ϕ FSW harbored		
	YIT S-1	YIT 9018	YIT 9029
YIT 9029	9.6×10^3	8.7×10^3	-
HYM 1213	6.7×10^3	6.4×10^3	-
HYM 1926	-	-	2.6×10^3
HYM 2753	-	-	4.8×10^3
HYM 3842	-	-	2.5×10^3
HYM 4024	9.4×10^3	8.9×10^3	-
HYM 4878	-	-	4.0×10^3

204 균주와 TS 909 균주를 anti- ϕ FSV serum 이 함유된 MRT 배지에서 42°C, 30 분간 열처리하여 생존하는 균주를 분리하고, 이들이 temperate phage ϕ FSW 에 대한 숙주로 작용하는지를 확인하였다.

이 결과 *L. casei* TS 204 균주에서 prophage 가 curing 된 HYM 1213 균주와 *L. casei* TS 909 균주에서 유래된 HYM 4024 균주가 *L. casei* strain 의 temperate phage ϕ FSW 에 대해 *L. casei* YIT 9029 균주와 비슷한 수준의 감수성을 나타냈다(Table 4). 그리고, temperate phage ϕ FSW 의 indicator strain 인 *L. casei* YIT 9029 균주와 cross check 를 실시한 결과 Table 4 와 같이 *L. casei* HYM 1213 균주와 HYM 4024 균주에서는 temperate phage ϕ FSW 가 check 되지 않아 이들이 확실한 prophage cured strains 임을 알 수 있었다.

또한, 이 두 균주를 여러 종류의 온도에서 열처리하여 temperate phage ϕ FSW 가 induction 되는지를 알아본 결과, 어떤 온도에서도 temperate phage ϕ FSW 가 나타나지 않으므로써 *L. casei* HYM 1213 균주와 *L. casei* HYM 4024 균주가 prophage cured strain 임을 재확인 할 수 있었다.

Prophage cured strains 의 생리적 특성

MRS 배지에서 *L. casei* HYM 1213 균주와 *L. casei* HYM 4024 균주의 성장율은 모균주인 *L. casei* YIT 9018 균주와 거의 차이가 없는 것으로 나타났으나(Fig. 1), 배양시간에 따른 pH 변화 측정결과 Fig.2 와 같이 24 시간 배양 후 *L. casei* HYM 1213 균주가 pH3.95 를 나타내어 *L. casei* YIT 9018 균주, *L. casei* YIT 9029 균주의 pH3.88, pH3.90 과는 큰 차이를 보이지 않는데 대해, *L. casei* HYM 4024 균주는 pH4.14 를 나타내어

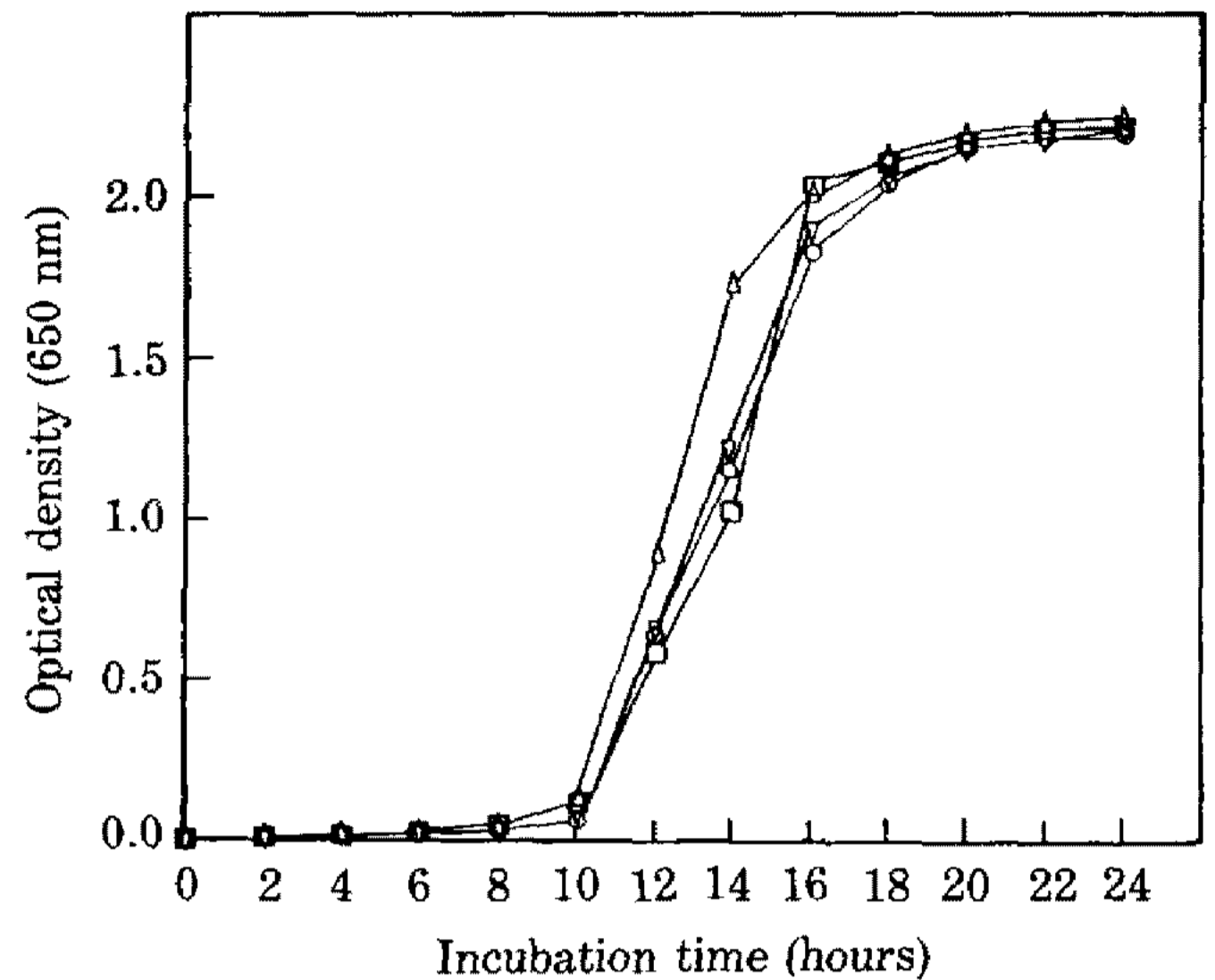


Fig. 1. Comparison of growth between parent strains and prophage cured strains in MRS medium.

- Δ: *L. casei* YIT 9018
- : *L. casei* YIT 9029
- : *L. casei* HYM 1213
- ▽: *L. casei* HYM 4024

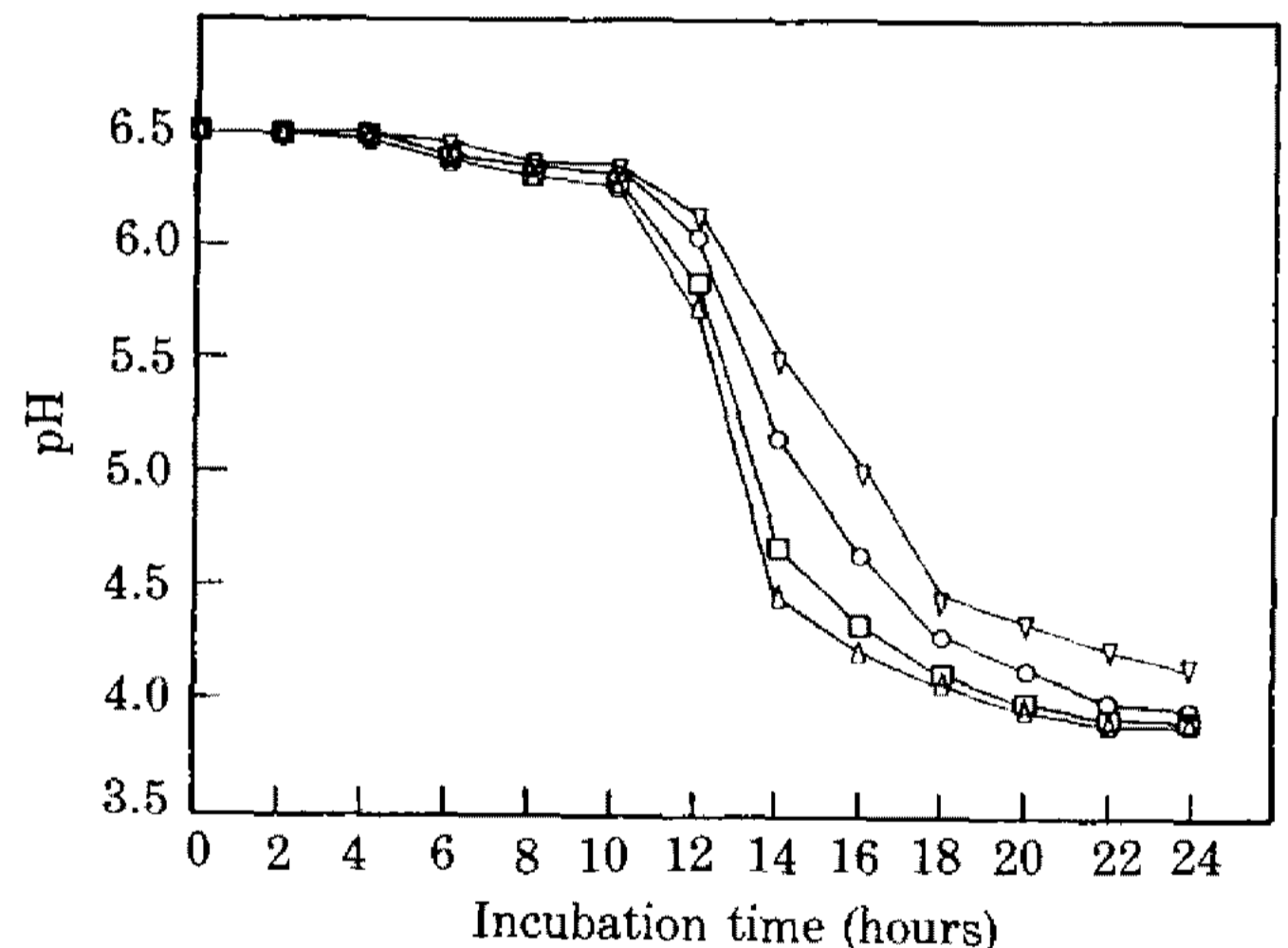


Fig. 2. Changes of pH between parent strains and prophage cured strains in MRS medium.

- Δ: *L. casei* YIT 9018
- : *L. casei* YIT 9029
- : *L. casei* HYM 1213
- ▽: *L. casei* HYM 4024

모균주보다 다소 높아, 모균주와 차이를 보였다.

또한, 10% skim milk 에서의 적정산도 측정결과(Fig. 3)도 *L. casei* HYM 1213 균주는 5일 배양 후 1.1% 를 나타내 모균주와 비슷한 결과를 보임으로써 산생성 능력이 변화되지 않았음을 알 수 있어 산업용 균주로 사용가능함을 보여주었으나, *L. casei* HYM 4024 균주는 0.8% 이하를 나타내 산생성능력이 저하되었음을 알 수 있었

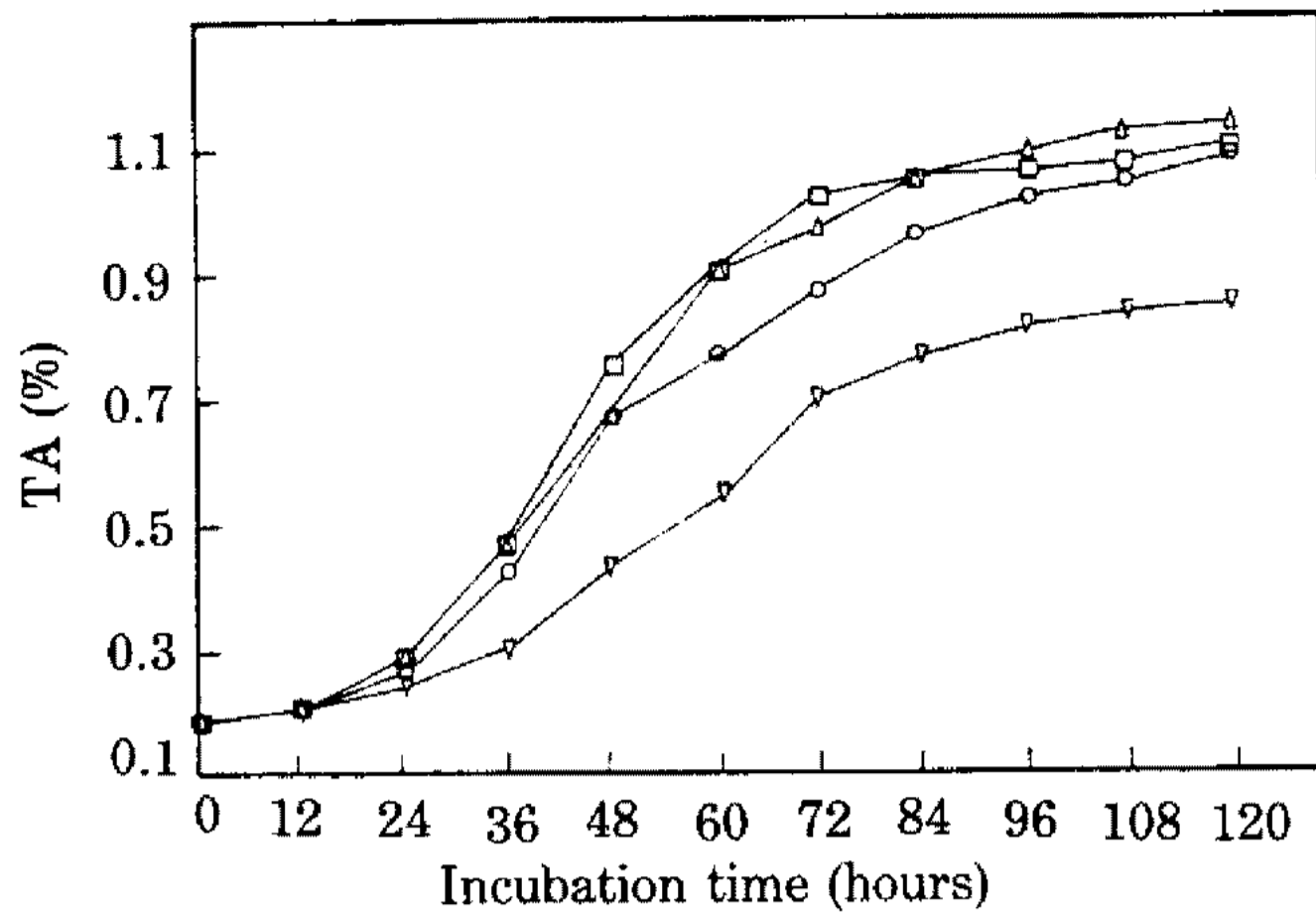


Fig. 3. Changes of titratable acidity between parent strains and prophage cured strains in 10% skim milk.

Δ: *L. casei* YIT 9018
 □: *L. casei* YIT 9029
 ○: *L. casei* HYM 1213
 ▽: *L. casei* HYM 4024

Table 5. Pattern of fermented carbohydrates between parent strains and prophage cured strains.

Carbohydrates	<i>L. casei</i> strains			
	YIT 9018	YIT 9029	HYM 1213	HYM 4024
Arabinose	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Gluconate	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-

+ : Fermented, - : Not fermented

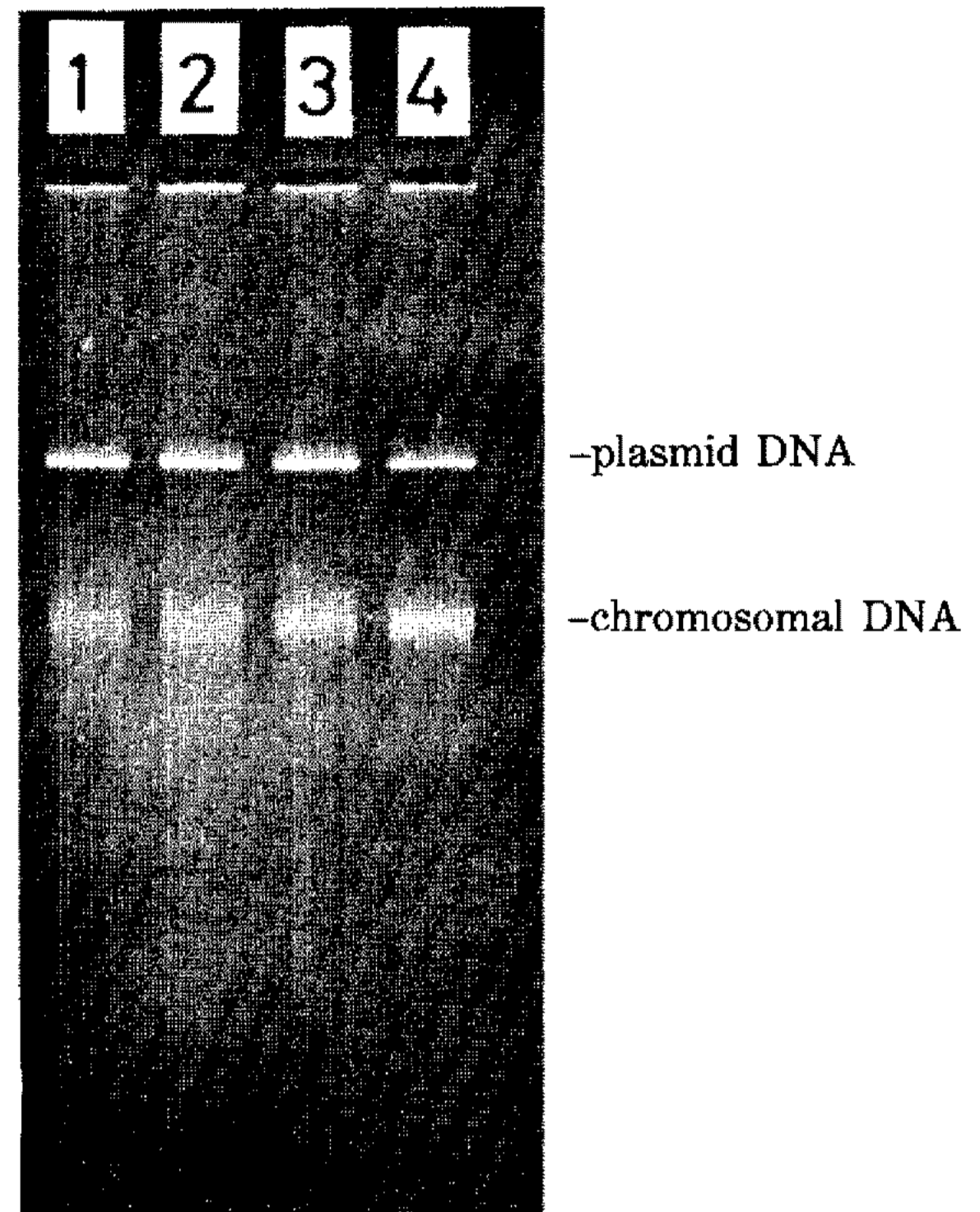


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from parent strains and prophage cured strains.

lane 1: *L. casei* YIT 9018
 lane 2: *L. casei* YIT 9029
 lane 3: *L. casei* HYM 1213
 lane 4: *L. casei* HYM 4024

고, 산업용 종균으로서의 사용은 곤란한 것으로 예측되었다.

Lactose를 비롯한 21가지의 당류에 대한 발효능시험 결과 *L. casei* HYM 1213 균주와 *L. casei* HYM 4024 균주가 모균주와 동일한 결과를 보임으로써 유당분해 능력이 손실되지 않은 것을 알 수 있었다(Table 5).

Plasmid DNA 분리

L. casei HYM 1213 균주와 *L. casei* HYM 4024 균주의 plasmid DNA를 분리하여 모균주인 *L. casei* YIT 9018 균주와 *L. casei* YIT 9029 균주로부터 추출한 plasmid DNA와 같이 전기영동하여 나타나는 DNA band를 확인한 결과, *L. casei* HYM 1213 균주는 *L. casei* YIT 9018 균주와 동일한 38.5Md 크기의 plasmid DNA와 작은 양의 chromosomal DNA fragments를 나타냈으며 *L. casei* HYM 4024 균주도 동일한 결과를 보였다(Fig. 4). 이는 두 균주로부터 prophage가 cured 되었지만, plasmid에는 어떠한 영향도 미치지 않은 것으로 생각되었다.

이상의 결과로 미루어 볼 때, prophage가 cured된 새로운 유산균 strains를 확보함에 따라서 새로운

strains는 배양 중에 prophage가 induction되어 virulent phage ϕ FSV로 전환되는 경우가 없게 되었다.

따라서 virulent phage가 균배양 중에 외부로부터 오염만 되지 않는다면, prophage가 cured된 *L. casei* HYM 1213 균주를 starter 균으로 사용할 경우 prophage로 기인된 발효유 배양의 문제점은 없게 되어 액상 발효유를 안정하게 생산하는 기반이 확립되었다.

요 약

L. casei YIT 9018 균주에 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine을 처리하여 thermoinducible mutants를 분리하였고, 이 균주를 42°C에서 30분 동안 열처리하여 prophage가 cured된 균주 *L. casei* HYM 1213과 *L. casei* HYM 4024를 분리하였다.

Prophage cured strain *L. casei* HYM 1213과 *L. casei* HYM 4024는 temperate phage ϕ FSW에 대해 지시균으로서의 능력을 가지고 있었으며, 어떤 온도에서도 temperate phage ϕ FSW가 검출되지 않았다.

이들의 생리적 특성을 모균주인 *L. casei* YIT 9018과 비교한 결과 *L. casei* HYM 1213 균주는 균의 증식, pH 변화, 산생성능력, 당 발효능력에서 모균주와 유사한 것으로 나타났으나, *L. casei* HYM 4024 균주는 pH 변화와 산생성능력이 모균주에 비해 미약한 것으로 나타났다. Plasmid DNA는 두 균주 모두 모균주와 동일한 size를 보여주어, prophage가 cured되었어도 plasmid DNA에는 손실을 가져오지 않았음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 김현욱, 유광현, 이돈성, 고준수: *Korean Journal of Animal Science*. **22**(4), 291(1980).

2. 강국희, 이수원, 백영진, 강영찬, 윤영호, 김기원: *Korean Journal of Animal Science*. **19**(3), 227(1977).
3. 김익상, 신희섭, 장우현: *J. Korean Publ. Hlth Ass.* **4**(1)(1978).
4. 박재용: *J. Korean Publ. Hlth Ass.* **3**(2)(1977).
5. 이용욱: *J. Korean Publ. Hlth Ass.* **3**(1)(1977).
6. 강국희, 백영진, 강영찬, 김기원: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **5**(1), 13(1977).
7. Hino, M. and N. Ikebe: *J. Agr. Chem. Soc. Jap.* **39**, 472 (1965).
8. Shimizu-Kadota, M., T. Sakurai and N. Tsuchida: *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(2), 669 (1983).
9. Yokokura, T., S. Kodaira, H. Ishiwa and T. Sakurai: *J. General Microbiol.* **84**, 277 (1974).
10. McKay, L.L. and K.A. Baldwin: *Appl. Microbiol.* **25**, 682 (1973).
11. Shimizu-Kadota, M. and T. Sakurai: *Appl. Environ. Microbiol.* **43**(6), 1284 (1982).
12. 장동훈, 윤영호: *Korean J. Dairy Sci.* **11**(1), 52(1989).
13. Chopin, M.C., A. Rouault and M. Rousseau: *Le Lait*. **63**, 102 (1983).
14. Murata, A., E. Soeda and R. Saruno: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. **43**(5), 311 (1969).
15. Efthymiou, C. and P.A. Hansen: *J. Infec. Dis.* **110**, 258 (1962).
16. De Man, J.C., M. Rogosa and M.E. Sharpe: *J. Appl. Bact.* **23**, 130 (1960).
17. Yamamoto, K.R., B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Lawhorne and G. Treiber: *Virology*. **40**, 734 (1970).
18. Adams, M.H.: Interscience publisher Inc. New York. (1959).
19. Okada, S., T. Uchimura, N. Ohara and M. Kozaki: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. **57**(3), 227 (1983).
20. 배형석, 백영진, 김영기, 유 민, 박무영: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**(3), 289(1985).
21. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. (1982).

(Received May 7, 1990)