

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* ATCC 11602의 Bacteriophage 내성균주 A1의 특성에 관한 연구

이춘화 · 강국희 · 배인휴^{1*}

성균관대학교 낙농학과, ¹순천대학교 축산학과

The Characteristics of Bacteriophage-resistant *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602-A1

Lee, Chun-Hwa, Kuk-Hee Kang and In-Hyu Bae^{1*}

Department of Dairy Science, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

¹Department of Animal Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract — The phage resistance mechanism of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602-A1 was investigated. When parent and A1 were incubated at 30 and 40°C, A1 grew well and multiplication of phage(MOI=1) on A1 slightly occurred at 40°C in contrast with parent. There was a great difference of proteolytic activity between parent and A1, irrespective of the temperature. As a result of SDS treatment on culture broth, survival rate of A1 was 27% at the lethal concentration of parent and adsorption rate of phage was increased to 95~97%, which was considered to come from the exposure of phage receptor site masked by an unknown component. These results suggest that acridine orange (AO) treatment leads to the modification of cell wall, conferring resistance to high temperature and lytic phage. No change in plasmid profiles of A1 at 30 and 40°C were found, which suggests that plasmid is not relative to temperature-resistance of A1.

젖산균은 유제품내에서 젖산 생성과 특이한 풍미를 생성하므로 발효유제품의 스타터 미생물로 사용되고 있다. 젖산균에 의한 상업적 발효에서 bacteriophage (phage)에 의한 발효실패가 크게 문제가 되고 있으며 그 동안 phage 오염 대책에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다.

젖산균을 발효유제품 스타터로 반복 사용할 때에 발생하는 phage 공격에 저항할 수 있는 내성균주의 개발이 주목을 끌게 되면서 몇개의 phage 내성균주들이 미국과 뉴질랜드에서 선발되었고 이것들이 multiple-strain starter로 사용되고 있다(1-3).

그러나 이런 균주들의 내성기작이 밝혀지지 않아 영구적인 내성균주로는 정착되지 못하고 있어서 최근에는 phage 내성균주들의 내성기작을 밝히는데 연구의 초점이 모아지고 있다.

일부 lactococci 균주들의 phage 내성을 밝히는 과정에서 온도는 phage-숙주간의 상호관계상 매우 미묘하고도 다양한 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다(4-7). 특히 phage-숙주간에 있어서 극심한 용균유발은 배양온도의 차이에 따라 다른데 어떤 phage는 22~32°C에서 심한 용균을 일으키고 38°C나 그 이상의 온도에서는 숙주 증식이 잘 이루어짐에도 용균을 일으키지 않았음이 관찰되었다(4, 6-8).

한편 어떤 phage 내성균주들의 경우 고온(40°C)에서 phage에 의한 용균이 일어난(9) 반면 acraflavin 처리에 의해 얻어진 phage 내성균주의 어떤 것은 고온(40°C)에서도 phage에 의한 용균없이 정상적인 성장을 나타낸 것으로 보고되었다(10). 따라서 배양온도는 phage와 숙주의 어느 한쪽에 영향을 미쳐 용균 현상에 영향을 주는 요인으로 작용하고 있음을 알 수 있다.

본 연구는 전보(11)에서 보고한 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602를 변이유발소로 처리하여 선발한 phage 내성균주의 phage 내성기작을 밝히는

Key Words: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, phage resistance, temperature resistance

*Corresponding author

과정의 일환으로서 phage 내성균주의 생육과 phage 내성에 온도가 미치는 영향을 조사하고, 이 내성균주의 phage 내성과 숙주의 세포벽 구조 변화와의 관련 가능성을 검토하고자 수행되었다.

재료 및 방법

미생물 및 bacteriophage

본 시험에 사용한 유산균과 phage는 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 및 동종 phage인 Hp ATCC-B1 으로서 모두 ATCC로부터 분양받았으며, A1은 위의 ATCC 11602를 AO 처리하여 선발한 phage 내성균주이다. 시험균과 phage는 M17 broth(12)를 사용하여 30℃에서 배양하여 4℃에 냉장보관하며 사용하였다.

시험균주의 증식성 및 산생산성

시험균주를 18시간 증균하고 이를 M17 broth에 1% 접종한 후 1시간마다 경시적으로 취하여 Spectrophotometer SP-8 400(Pye Unicam, Ltd)을 사용, 650 nm에서 흡광도(optical density : O.D)를 측정하였고, 생균수는 배양액을 0.85% 생리 식염수에 희석하여 그 희석액 0.1 ml를 M17 agar plate에 도말한 후 30℃에서 48시간 배양하여 증식성을 조사하였으며, 산생산성은 배지의 pH 변화를 측정하여 조사하였다.

SDS(sodium dodecyl sulphate) 처리

phage 내성과 세포벽과의 관련성을 검토하기 위하여 SDS를 처리하였는데 시험균주의 18시간 배양액 1%를

M17 broth에 접종하여 4시간 배양한 후 Sinha(10)의 방법에 따라 SDS를 농도별로 처리하여 30℃에서 30분간 진탕배양하였다.

Phage 흡착 시험

18시간 배양한 시험균주들의 배양액에 phage 현탁액과 0.2 M CaCl₂ 0.1 ml를 가해주고(MOI=0.001) 30℃에서 10분 배양후 원심분리(4℃, 10,000×g, 10분)하였다. 여기서의 상등액을 취하여 미흡착 phage수를 plaque수 산정법에 따라 측정하였다(12, 13).

Plasmid 분리

Plasmid DNA의 분리는 Guerry 등(14)과 Megers 등(15)의 방법에 따라 분리하였다.

단백질 분해력

단백질 분해력 측정은 phenol 시약을 이용한 Hull 방법(16)에 따라 유리 tyrosin 함량을 650 nm에서 흡광도(O.D)로써 조사하였다.

결과 및 고찰

온도가 시험균주의 생육에 미치는 영향

서로 다른 온도가 acridine orange(AO) 처리에 의해 분리한 phage 내성균주 A1과 모균주의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위해 각각 30℃와 40℃에서 두 균주를 배양하였다. 각각의 온도에서 18시간 동안 미리 증균시킨 배양액 1%를 M17 broth에 접종하여 배양

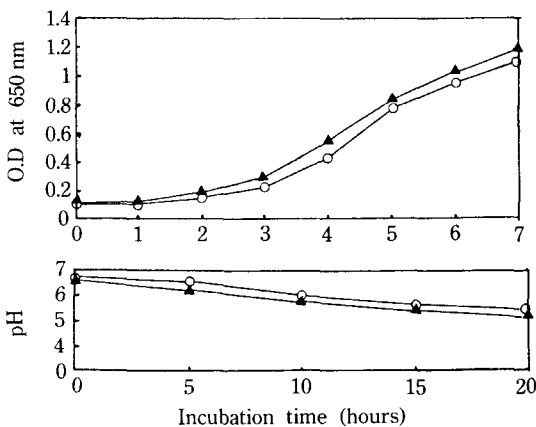


Fig. 1. Growth of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and its mutant A1 at 30°C.
 -○- ATCC 11602 -▲- mutant A1

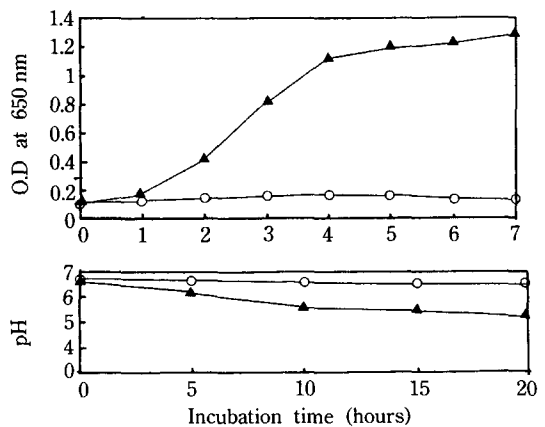


Fig. 2. Growth of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and its mutant A1 at 40°C.
 -○- ATCC 11602 -▲- mutant A1

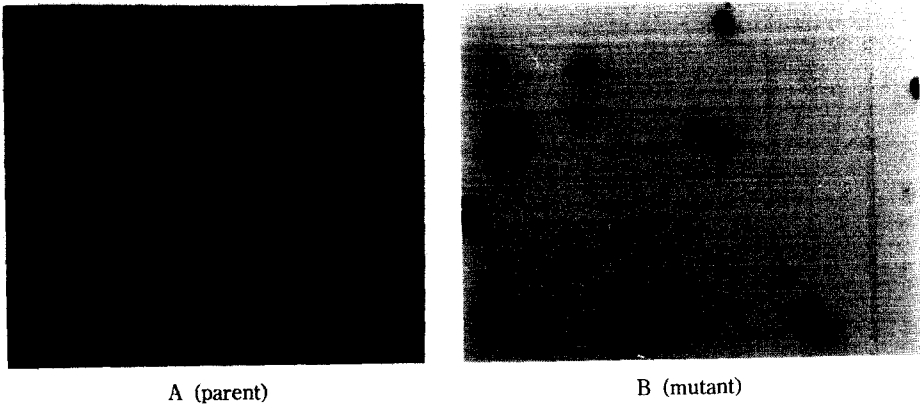


Fig. 3. Cell morphology of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and its mutant A1. A: ATCC 11602 B: mutant A1

했을 때의 세포증식성(O.D)과 산생산성은 Fig. 1, 2에서 보는 바와 같다. 30°C에서의 세포증식성 및 산생산성은 모균주와 A1간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났으나 40°C에서 모균주는 생장이 정지된 반면 A1은 정상적인 생장을 하였다. 30°C과 40°C에서 배양한 두 균주를 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 3에 나타냈는데 모균주는 전형적인 연쇄상의 세포형태를 나타낸 반면 내성균주는 크기가 작은 단쇄상 세포형태를 우세하게 나타냈다.

Sinha(10)는 *Streptococcus cremoris*의 acriflavin(AF)-resistant 변이주는 모균주에 비하여 단쇄상이 우세하며, phage 내성이고 40°C에서 잘 성장한다고 보고하였다. 본 시험에서도 그와 유사한 현상이 나타났는데 이는 AO에 의해 세포벽의 구조적 변형이 일어난 변이주들이 phage내성과 온도 내성을 나타낸 것으로 판단된다.

배양 온도가 phage 증식에 미치는 영향

30°C와 40°C에서 배양했을 때의 phage 증식은 Fig. 4에 나타낸 바와 같다.

30°C에서의 phage 증식은 모균주의 경우 2시간째부터 3.2×10^9 cfu/ml로 증가하였으나 내성균주인 A1에서는 증식이 일어나지 않았다. 40°C 배양시 모균주의 경우 phage가 계속 감소되었는데 이것은 40°C에서 모균주가 증식되지 않았기 때문이다. 그러나 A1의 경우 phage 증식이 나타났다.

Eddy(17) 등은 배양온도를 높인 상태에서 스타터 균주의 생육은 세균 표면에 있는 phage 흡착부나 흡착가용성(receptor availability)을 변화시켜 phage 흡착력

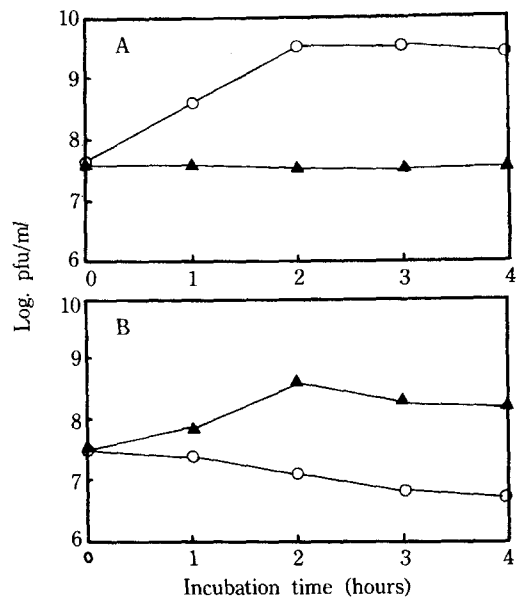


Fig. 4. Development of phage on *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and its mutant A1 at 30°C (A) and 40°C (B). —○— ATCC 11602 —▲— mutant A1

을 증가시킨다고 하였다. 따라서 고온에서 생육한 스타터 균주는 치즈 제조과정에서의 phage 공격에 대하여 감수성을 갖게 된다고 하였다. Sanders(9)는 40°C에서 phage가 더 빠르게 증식하는 것은 배지 중의 phage 증식인자가 자극되었거나 세포의 phage 방어 기작이 불활성화된 것이라고 보고하였다. 본 시험에서도 위의 연구자들의 시험 결과와 유사하게 높은 배양온도에서 A1이 모균주보다 다소 높은 phage 증

Table 1. SDS sensitivity and phage adsorption (%) of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and phage-resistant A1

Strains	Survivals (%) at SDS conc. ($\mu\text{g/ml}$)				phage adsorption (%) at 1% SDS treatment	
	0	50	100	200	0	1
ATCC 11602	100.0	0.001	0.001	0.001	98	98
A1	100.0	78.93	27.9	9.7	0	97

식성을 나타낸 것은 온도가 phage 흡착에 관련된 여러 요인들에 영향을 주어 나타난 결과인 것으로 사료되었다.

SDS 처리

Sinha(10)와 Vlegels(18)는 AF-resistant 변이주가 세포막의 구조적 변형을 일으켜 온도와 phage에 대한 내성을 갖는 것으로 보고하였다. 본 시험에서도 세포벽과 phage 내성과의 관련성을 조사하기 위해 lipopolysaccharide와 lipoprotein의 강력한 용매인 SDS를 농도별로 처리한 후 생존수와 흡착율을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 모균주는 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 거의 사멸하였지만 A1은 27%의 생존율을 나타낸 것으로 보아 변이주의 경우 그 세포표면의 어떤 구조적 변형이 이루어진 것임을 알 수 있었다. 또한 A1에 1%의 SDS를 처리했을 때 phage 흡착율은 모균주와 비슷한 흡착율(95~97%)을 나타냈다.

Neviani 등(19)은 *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892의 lysozyme 처리에 의해 선발된 phage 내성 변이주에 SDS를 처리한 결과 phage 흡착율이 92%로 증가되었는데 이와 같이 높은 phage 흡착율은 세포표면에 있는 어떤 물질에 의해 phage 흡착부가 가리워졌던 것이 SDS에 의해 제거된 데 기인한 것으로 보고하였다.

Nordstrom(20)과 Wu(21) 및 Sijtma(22)는 단백질과 다른 polymers와 같은 여러가지 화합물들이 *Staphylococcus aureus*와 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* SK110의 세포벽의 phage 흡착부를 가린다고 하였다.

본 시험균주 A1에서도 AO 처리에 의한 세포벽 구조의 변형이 일어나 phage 흡착부가 가려져 내성을 나타냈으나 SDS 처리에 의해 세포벽의 phage 흡착부를 가리고 있던 어떤 물질이 SDS의 작용을 받아 분해되면서 phage 흡착부가 노출됨에 따라 흡착율이 증가했던 것으로 인정되었다. 따라서 A1의 phage 내성과 온도 내성은 A1에 대한 AO 처리시 유발된 변이가 세포벽 구성성분과 구조에 어떤 변화를 주어 나타나는

결과인 것으로 판단되었다.

Plasmid DNA 분리

높은 배양온도(40°C)에서의 phage 내성과 plasmid와의 연관성을 검토하기 위해 A1을 30°C와 40°C에서 배양한 후 각각 plasmid DNA를 분리하여 조사한 결과, 온도변화에 따른 plasmid profile(4개 band, 약 2.5, 3.0, 6.0, 6.3 Mdal)의 변화는 나타내지 않으면서 phage 내성은 그대로 유지되어 나타났다.

de Vos 등(23)은 *Str. cremoris* SK11의 phage 내성 균주를 열처리하여 plasmid를 curing시키면 phage 감수성균으로 전환되는 현상을 나타냈다고 하였으며 Vlegels(18)는 37°C에서 *Lc. lactis* subsp. *cremoris*를 curing했을 때 plasmid는 소실되었으나 phage 내성에는 변화가 없었으므로 이 phage 내성은 plasmid 소실과 관련된 것이 아니라 낮은 phage 흡착률 때문이라고 하였다. 따라서 A1에 있어서 plasmid가 온도 내성과 관련이 없을 뿐만 아니라 phage 내성에도 영향을 미치지 않는 것으로 인정되었다.

단백질 분해력

30°C에서 18시간 증균한 배양액 1%를 10% 환원 탈지유에 접종한 후 이들의 단백질 분해력을 조사한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 모균주와 A1간의 단백질 분해력은 큰 차이를 나타냈는데 모균주는 30°C에서의 정상적인 성장에도 불구하고 A1보다 낮은 분해력을 나타낸 반면 A1은 온도와 상관없이 높은 단백질 분해력을 나타냈다. 모균주가 30°C에서 보다 40°C에서 더 낮은 단백질 분해력을 나타낸 것은 균주의 최적생육온도보다 높은 온도에서 균의 정상적인 증식이 안되었기 때문이다.

A1의 높은 단백질 분해력은 group N-lactococci의 phage 내성균주들이 일반적으로 낮은 단백질 분해력을 나타내는 것(24, 25)과는 대조적인 현상으로써 이에 대한 추가적인 연구가 요망되었다.

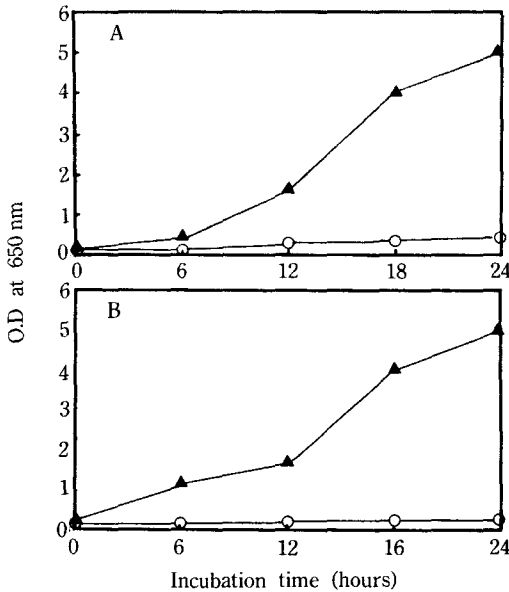


Fig. 5. Proteolytic activity of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602 and mutant A1 at 30°C (A) and 40°C (B). —○— ATCC 11602 —▲— mutant A1

A1이 나타낸 높은 단백질 분해력은 A1이 모균주보다 증식성, 산생산성이 높은 이유와 밀접한 관계가 있다. 즉 우유내에서의 유산균 증식에는 유리 아미노산의 공급이 필수적인데 이는 유산균이 갖고 있는 균체의 단백질 분해효소계에 의해 우유중의 단백질이 분해되어 증식에 필요한 유리 아미노산이 적절히 공급됨에 따라 증식성, 산생산성이 비례적으로 증가하여 나타나기 때문이다(26). Richardson(26)은 *Str. cremoris* HP와 106의 proteinase-negative 변이주들 중 phage 내성균주들이 이 많은데 이것은 phage 흡착부와 관련된 proteinase의 소실 때문이라고 하였다. 따라서 A1의 높은 단백질 분해력은 A1의 균체의 단백질분해 효소계가 phage 흡착부와 상관없이 존재하고 있음을 알 수 있었고 A1의 이러한 성질은 치즈의 숙성 측면에서 상당한 이용 가능성이 있는 것으로 고려되었다.

아울러 다른 AO 처리 변이주들의 단백질 분해활성에 대한 추가적인 검토가 이루어지므로써 보다 유용한 단백질 분해 효소계를 갖는 phage 내성균주의 개발과 치즈 산업에의 기여가 전망될 수 있을 것으로 본다.

요 약

본 연구는 acridine orange(AO) 처리에 의해 선발한 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 11602의 phage 내성

균주인 A1의 phage 내성발현 기작에 관하여 검토한 것이다. A1을 40°C 에서 배양했을 때 모균주와는 달리 정상적인 성장을 나타내면서 phage 내성은 그대로 유지했으며, 이때의 세포형태는 모균주의 경우 연쇄상을 A1은 단쇄상의 형태를 나타냈다. 40°C 에서 모균주에서의 phage 증식은 정지되었는데 A1의 경우는 미약한 phage 증식을 나타냈다. 모균주와 A1간에 있어서의 단백질 분해력은 배양온도와는 상관없이 큰 차이를 나타냈다.

40°C 의 배양온도에서 A1이 나타낸 phage 내성과 세포표면과의 관련성을 검토하기 위하여 SDS를 처리한 결과 모균주는 거의 대부분 사멸되었으나 A1은 27%가 생존하였다. 1% SDS로 처리한 A1의 phage 흡착율은 모균주와 비슷한 수준(95~98%)을 나타냈는데 이는 A1 세포벽의 흡착부를 가리고 있던 어떤 물질이 SDS에 의한 분해에 의해 흡착부가 노출됨에 따른 결과로 고려되었다. 이로써 A1의 phage 내성과 온도에 대한 내성은 AO 처리시 세포벽 구조의 변형에 의해 이루어진 현상인 것으로 인정되었다. 40°C 에서의 A1에 대한 plasmid 변화를 조사한 결과 plasmid 소실이나 변화가 일어나지 않아 plasmid가 A1의 온도 내성과는 관련이 없는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Daniell, S.D. and W.E. Sandine. 1981. Development and commercial use of a multiple strain starter. *J. Dairy Sci.* **64**: 407-415.
2. Heap, H.A. and R.C. Lawrence. 1976. The selection of starter strains for cheesemaking. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.* **11**: 16-20.
3. Henning, D.R., C.H. Black, W.E. Sandine and P.R. Elliker. 1968. Host-range studies of lactic streptococci bacteriophage. *J. Dairy Sci.* **51**: 16-21.
4. Hunter, G.J.E. 1943. Bacteriophages for *Str. cremoris*. Phage development at various temperatures. *J. Dairy Res.* **13**: 136-145.
5. Mullan, W.M.A., C. Daiy and P.E. Fox. 1981. Effect of cheesemaking temperatures on the interactions of lactic streptococci and their phages. *J. Dairy Res.* **48**: 465-471.
6. Sozzi, T., J.M. Poulin and R. Maret. 1978. Effect on incubation temperature on the development of lactic acid bacteria and their phage. *J. Dairy Res.* **45**: 259-265.
7. Zeheren, V.L. and H.R. Whitehead. 1954. Growth characteristics of streptococcal phages in relation to cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* **37**: 209-219.

8. Sanders, M.E. and T.R. Klaenhammer. 1981. Evidence for plasmid linkage of restriction and modification in *Str. cremoris* KH. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 944-950.
9. Sanders, M.E. and T.R. Klaenhammer. 1984. Phage resistance in a phage-insensitive strain of *Str. lactis*: Temperature-dependent phage development and host-controlled phage replication. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 979-785.
10. Sinha, R.P. 1977. Acraflavin-resistant mutant of *Str. cremoris*. *Anti. Agent. Chem.* **12**: 383-389.
11. 배인휴, 이춘화, 승종원. 1992. 유산균 스타터의 박테리오파지의 내성균주 선발에 관한 연구. *한국낙농학회지* **14**: 314-323.
12. Terzaghi, B.E. and W.E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophage. *Appl. Microbiol.* **29**: 807-813.
13. Vlegels, P.A.P., W.C. Hazeler, T.H. Helmerhost and J.T.M. Wouters. 1988. Phage resistance of *Str. cremoris* due to low adsorption efficiency. *Neth. Milk Dairy J.* **42**: 195-206.
14. Guerry, P., D.J. Leblance and S. Falkow. 1973. General method for the isolation of plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **116**: 1064-1066.
15. Megers, J.A., D. Sanchez, L.P. Elwell and S. Falkow. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **127**: 1529-1537.
16. Hull, M.E. 1947. Studies on milk protein. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the protein in milk. *J. Dairy sci.* **30**: 881-884.
17. Eddy, D.W. and R.R. Hull. 1987. The effect of temperature on the multiplication of *Str. cremoris* bacteriophage ϕ NZ104MG. *The Australian J. Dairy Technol.* **42**: 48-52.
18. Vlegels, P.A.P., T.H. Helmerhost, P.B. van der Ven, S. Biesterveld and J.T.M. Wouters. 1989. Plasmid profiles of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* strains and mutants in relation to phage resistance. *Neth. Milk Dairy J.* **43**: 245-259.
19. Neviani, E., D. Carminati and G. Giraffa. 1992. Selection of some bacteriophage- and lysozyme-resistant variants of *L. helveticus* CNRZ 892. *J. Dairy Sci.* **75**: 905-913.
20. Nordström, K. and A. Forsgren. 1974. Effect of protein A on adsorption of bacteriophage of *Staphylococcus aureus*. *J. Virol.* **14**: 198-202.
21. Wu, T.C.H. and J.T. Park. 1971. Chemical characterization of a new surface antigenic polysaccharide from a mutant of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **108**: 874-884.
22. Sijtsma, L., A. Sterkenburg and J.T.M. Wouters. 1988. Properties of cell walls of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and SK112 and their relation to bacteriophage resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2808-2811.
23. de Vos, W.M., H.M. Underwood and F.L. Davies. 1984. Plasmid encoded bacteriophage resistance in *Str. cremoris* SK11. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 175-178.
24. King, W.R., E.B. Collins and E.L. Abbrutt. 1983. Frequency of bacteriophage-resistant and slow acid-producing variants of *S. cremoris*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1481-145.
25. Coventry, M.J., A.J. Hiller and G.R. Jaro. 1984. Changes in the metabolism of factory-derived bacteriophage resistant derivative of *Str. cremoris*. *The Australian J. Dairy Technol.* **39**: 154-159.
26. Richardson, G.H., C.A. Ernstrom, J.M. Kim and C. Daly. 1983. Proteinase negative variants of *Streptococcus cremoris* for cheese starters. *J. Dairy Sci.* **66**: 2278-2286.

(Received June 14, 1993)