

## *Lactobacillus casei* YIT 9018로부터 분리한 Prophage Cured Strain의 특성

이정준\* · 오태광<sup>1</sup> · 장효일<sup>2</sup> · 백영진

한국 야쿠르트 유업(주) 연구소, <sup>1</sup>KIST, 유전공학연구소 응용미생물 연구그룹,

<sup>2</sup>고려대학교 자연자원대학 유전공학과

## Characterization of Prophage Cured Strain Derivative from *Lactobacillus casei* YIT 9018

Lee, Jeong-Jun\*, Tae-Kwang Oh<sup>1</sup>, Hyo-Ihl Chang<sup>2</sup> and Young-Jin Baek

Hankuk Yakult Institute, Euiwang-Si, Kyunggi-Do 437-020, Korea

<sup>1</sup>Applied Microbiology Research Group, Genetic Engineering Research Institute,  
Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 17, Taeduk Science Town,  
Taejeon 305-606, Korea

<sup>2</sup>Department of Genetic Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

**Abstract** — *Lactobacillus casei* HY 2782, prophage cured strain was characterized to be stable as much as *L. casei* YIT 9018, parent strain. By southern hybridization, it was confirmed that the temperate phage was incorporated in chromosomal DNA of *L. casei* YIT 9018 as a prophage. It was also proved that the prophage was cured from chromosomal DNA of *L. casei* HY 2782. The growth rate, lactic acid producing ability, carbohydrates fermentation, and enzymatic activity of *L. casei* HY 2782 were found to be similar to those of *L. casei* YIT 9018. When *L. casei* HY 2782 was used as a host, the multiplicity of infection (M.O.I.) of the temperate phage for *L. casei* HY 2782 was 1.0~5.0. Restriction enzyme analysis of pLC90 plasmid from *L. casei* HY 2782 was shown that the size was an approximately 68.22 kb. The plasmid profiles, genomic DNA patterns, and cellular fatty acids composition of *L. casei* HY 2782 were similar to those of *L. casei* YIT 9018. And the major fatty acids composition of these strains were C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub> and C<sub>19:cyclo</sub>. 10 sets of arbitrary primer in the PCR were screened to find differentiation against two strains of *L. casei*. Among them, b<sub>5</sub>-1/17-1 primer was produced an approximately 1.3 kb DNA band of only *L. casei* YIT 9018. And b<sub>5</sub>-2/17-2 primer was produced an approximately 1.0 kb DNA band of only *L. casei* HY 2782.

유산균의 lysogenic strain이 1949년 Reiter(1)에 의해 처음 보고된 이래, lysogenic strain에 prophage 상태로 존재하는 temperate phage에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 그리고 temperate phage가 virulent phage의 source로서 작용할 수 있는가를 알아보기 위해 temperate phage와 virulent phage의 연관성도 많이 연구되어 왔다(2, 3). 이 같은 temperate phage와 virulent phage의 연관성과 관련하여 Shimizu-Kadota와 Sakurai(4)는 prophage가 curing된

균주를 사용하면 virulent phage  $\phi$ FSV의 출현을 방지할 수 있음을 시사하였다.

그러나 prophage cured strain이 산업적으로 이용되기 위해서는 균증식 능력, 산생성 능력, 당 이용성 그리고 풍미생성 능력이 변화되지 않아야 한다(5). Shimizu-Kadota와 Sakurai(4)는 *L. casei* S-1으로부터 분리한 prophage cured strain이 균증식 능력, 산생성 능력, 당 이용성 등 모균주의 생리적 특성을 그대로 유지하고 있다고 보고하였다. 그러나 Chang과 Yoon(6)은 *L. casei* ATCC 27139로부터 분리한 prophage cured strain이 유당분해 능력을 상실하여 산생성 능력이 저하되었다고 보고하였다.

본 연구는 *L. casei* YIT 9018로부터 분리한 pro-

**Key words:** *Lactobacillus casei* YIT 9018, prophage cured strain, *Lactobacillus casei* HY 2782, characterization

\*Corresponding author

phage cured strain인 *L. casei* HY 2782와 temperate phage DNA간의 southern hybridization을 통하여 prophage가 완전히 curing 되었음을 확인하였다. 그리고 *L. casei* HY 2782와 모균주의 특성을 분자생물학적 방법을 통해 비교하여 *L. casei* HY 2782가 모균주의 특성들을 그대로 유지하고 있는 안정된 균주임을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 연구에는 prophage cured strain인 *L. casei* HY 2782와, 이 균주의 모균주이며 lysogenic strain인 *L. casei* YIT 9018이 사용되었다.

### 사용배지

*L. casei*의 계대배양과 생균수 측정에는 MRS 배지(7)를 사용하였으며, 산생성 능력 측정에는 10% (w/v) skim milk에 3%(w/v) glucose가 첨가된 배지를 사용하였다. *L. casei*의 genomic DNA, plasmid DNA 분리시에는 TCM broth(8)에 0.5%(w/v)의 glycine을 첨가하여 사용하였다. 그리고 phage의 증식 및 titer 측정에는 MRT 배지(9)를 사용하였다.

### Chromosomal DNA와 plasmid DNA 분리

*L. casei* 균주의 Chromosomal DNA는 Sharp(10)의 방법에 따라 분리하였으며, plasmid DNA 분리는 Bae 등(8)의 방법에 따라 실시하였다.

### Temperate phage의 분리 및 농축

MRT broth에 lysogenic strain인 *L. casei* YIT 9018을 0.1%(v/v) 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후, 4°C에서 10,000×g로 15분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상층액을 취하였다. 이 상층액을 0.22 μm의 membrane filter를 통해 여과하여 temperate phage를 분리한 후, Yamamoto 등(11)의 방법에 따라 농축하였다.

### Temperate phage DNA의 분리

Temperate phage DNA의 분리는 Sambrook 등(12)의 방법에 따라 실시하였다.

### Southern hybridization

*L. casei*의 chromosomal DNA를 각각 *Pvu* II와 *Sal* I으로 digestion시키고, control로 temperate phage DNA를 *Bam*HI과 *Xho* I으로 double diges-

tion시킨 후, 0.7% agarose gel에서 70 volt로 2시간 동안 전기영동을 실시하였다. 이들을 20×SSC(3 M NaCl, 300 mM sodium citrate, pH 7.0)를 사용하여 capillary blot 방법으로 nylon membrane(positively charged, Boehringer Mannheim)에 transfer시키고 120°C에서 30분간 baking하여 fix시켰다.

*Sal* I으로 digestion시킨 temperate phage DNA를 boiling water bath에서 10분간 열처리하여 denaturation시킨 후, random hexanucleotide로 priming하고 DIG(Digoxigenin-11-dUTP)으로 labeling하여 probe로 사용하였다.

Hybridization은 5×SSC(750 mM NaCl, 75 mM sodium citrate, pH 7.0)에 1.0%(w/v) blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% sodium dodecyl sulfate(SDS)를 첨가한 hybridization buffer에 DIG labeling된 DNA probe를 첨가하여 gentle shaking하면서 68°C에서 15시간 실시하였다. 그리고 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase를 binding시킨 후, X-phosphate(BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium)와 NBT(Nitroblue tetrazolium)를 가지고 colorimetric detection을 하였다.

### 균증식 및 산생성 능력

*L. casei*의 균증식과 산생성 능력은 10% skim milk에 3% glucose를 첨가하고 여기에 각 균주를 0.5%(v/v) 접종하여 37°C에서 6일간 배양하면서 생균수와 적정산도를 측정하여 비교하였다. 적정산도는 시료량과 0.1 N NaOH의 소모량을 아래식에 대입하여 산출하였다.

$$\text{적정산도(\%)} = \frac{0.1 \text{ N NaOH의 소모량(ml)}}{\text{시료량(g)}} \times 0.9$$

### 당 이용성과 효소활성

*L. casei*의 당 이용성을 알아보기 위해 API 50 CHL strip kit를 사용하였으며, 효소활성의 측정에는 API ZYM strip kit(API system, France)를 사용하였다.

### Temperate phage의 M.O.I. 값 설정

Temperate phage의 숙주로 *L. casei* HY 2782를 사용할 때, temperate phage가 숙주를 완전히 용균시킬 수 있는 M.O.I.(Multiplicity of infection) 값을 Benson(13)의 방법에 따라 설정하였다.

*L. casei* HY 2782를 50 ml의 MRT broth에 3.0×10<sup>6</sup> cfu/ml의 농도로 접종한 후, temperate phage를 각각 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> pfu/ml의 농도로 감염시켜

37°C 에서 18시간 배양하면서 *L. casei* HY 2782의 생균수와 배양액의 흡광도(650 nm)를 측정하였다.

배양 종료 후, 완전히 용균된 배양액의 초기 숙주 접종농도와 temperate phage의 감염 농도를 아래식에 대입하여 M.O.I. 값을 설정하였다.

$$\text{M.O.I.} = \frac{\text{Temperate phage 감염농도}}{\text{숙주 접종농도}}$$

#### Pulsed-field gel electrophoresis

Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)를 위한 전기영동기기로는 Gene Navigator System(Pharmacia, Sweden)을 사용하였으며, 동사가 제공한 실험 조건 및 방법을 약간 수정하여 다음과 같이 실시하였다.

Glycine이 0.5%(w/v) 첨가된 20 ml의 TCM broth에 *L. casei*를  $1.5 \times 10^8$  cfu/ml이 될 때까지 배양한 후, 20 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 2회 세척하여, 1.5 ml의 SET buffer(6.7% sucrose-1 mM EDTA-50 mM Tris, pH 8.0)에 현탁하고, 이 현탁액과 동량의 1%(w/v) low-melting temperature agarose를 첨가하였다. 여기에 5 µl의 M-1 enzyme(1.5 mg/ml in 20 mM potassium phosphate, pH 6.8)과 10 µl의 lysozyme(50 mg/ml in 25 mM Tris, pH 8.0)을 넣고 37°C 에서 30분간 교반한 후, 이 용액을 insert molds에 분주하여 4°C 에서 15분 이상 방치하므로써 DNA insert block을 만들었다. 이 block을 EPS solution [0.5 M EDTA(pH 9.0), 1 mg/ml proteinase K, 1% sodium lauroyl sarcosine]에 넣어 50°C 에서 48시간 동안 정치시켰다. 2회에 걸쳐 이 DNA insert block을 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF)가 첨가된 TE buffer(10 mM Tris.Cl-1 mM EDTA, pH 8.0)에 넣어 실온에서 2시간 동안 정치시켰다. 그리고 PMSF가 첨가되지 않은 TE buffer로 block을 3회 세척한 후 제한효소가 20~30 units 첨가된 eppendorf tube에 DNA insert block을 넣어 37°C 에서 48시간 반응시켜 genomic DNA를 digestion 하였다.

이 DNA insert block을 1.2% agarose gel의 lane

에 insert한 후, Gene Navigator System을 이용하여 0.5 sec. pulse로 450 volt에서 4~5시간 동안 전기영동을 실시하였다.

#### Cellular fatty acid 분석

*L. casei*를 MRS agar plate에 streaking하여 37°C 에서 48시간 배양한 후, 형성된 colony를 회수하여 8 µl의 0.5 N NaOH와 8 µl의 100% methyl alcohol 혼합용액에 현탁한 다음, 95°C 에서 5분간 가열하여 비누화 반응을 시켰다. 여기에 9 µl의 14% BF<sub>3</sub>/methanol(Sigma, USA)을 혼합하여 95°C 에서 5분간 가열하고, 3 µl의 hexane을 첨가한 후 다시 95°C 에서 2분간 가열하여 fatty acid를 추출하였다.

추출된 fatty acid를 실온까지 냉각시킨 후 포화 NaCl 용액을 첨가하여 hexane 층의 회수를 용이하게 하였다. Hexane 층을 회수한 후 이를 시료로 하여 gas chromatography(14)를 실시하였다.

#### Arbitrarily primed polymerase chain reaction

*L. casei*에 대한 PCR 분석은 Ericomp TCX20-110/6(Singleblock™ Easy Cyclor system, USA)을 사용하여 수행하였으며, primer는 arbitrary primer로서 17 mer인 17-1, 17-2 그리고 27 mer인 b<sub>5</sub>-1, b<sub>5</sub>-2를 단독 또는 서로 조합하여 사용하였다. 각 arbitrary primer의 sequences는 Table 1과 같다.

25 µl reaction volume에 대해 각각의 primer를 62.5 pmole, template로 사용할 *L. casei* 균주의 chromosomal DNA를 125 ng, dNTP는 250 µM, Taq polymerase는 1 unit로 최종농도가 이루어 지도록 첨가하였으며, 10×Taq buffer를 0.1 µl 넣고 멸균 증류수로 mass up 한 후 혼합하여 사용하였다.

PCR의 반응조건은 denaturation 92°C /45 sec., annealing 28°C /1 min., extension 72°C /2 min.을 40 cycles 실시하였으며, 첫번째 denaturation은 92°C /2 min., 마지막 extension은 72°C /5 min.으로 반응시간을 연장하여 실시하였다.

Table 1. PCR primers used in this study

Name	length (bp) <sup>a</sup>	Sequences	degeneracy	max.(G+C)% <sup>b</sup>
17-1	17	CCTGGTGG(GACT)GA(GAT)GA(GA)GT	24	70.6
17-2	17	ATCACCCA(AG)TT(CTGA)G(TA)CCA	16	52.9
b <sub>5</sub> -1	27	GGGGAATTCAGACGTT(GA)CA(GA)CT(ACGT)GA(CT)G	32	59.3
b <sub>5</sub> -2	27	CCCTCTAGAGGTGGAA(ACGT)GT(GA)TG(GAT)AT(GA)T	48	55.6

Degenerated sequences are indicated in brackets, <sup>a</sup>bp means base pairs, <sup>b</sup>max.(G+C)% means the maximum (G+C)% when calculated for G or C for the degenerated positions.

PCR에 의해 증폭된 DNA를 확인하기 위해 10  $\mu$ l의 반응액을 1.4% agarose gel에서 80 volt로 3시간 동안 전기영동한 후, EtBr 용액(0.5  $\mu$ g/ml)에서 30분간 staining하고 증류수에서 30분간 destaining하여 자외선 하에서 polaroid 사진을 촬영하였다.

## 결과 및 고찰

### Southern hybridization에 의한 prophage cured strain의 확인

Temperate phage가 prophage 상태로 *L. casei* YIT 9018에 incorporation 되어 있는가와 *L. casei* HY 2782 균주에서 prophage genome이 완전히 curing되었는가를 확인하기 위하여 southern hybridization을 실시하고 그 결과를 Fig. 1, 2에 나타내었다.

*Bam*HI과 *Xho*I으로 double digestion 한 temperate phage DNA와 *Sal*I으로 digestion한 temperate phage DNA probe가 hybridization되어 band들이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 1, b, lane 1), 이 band들은 lysogenic strain인 *L. casei* YIT 9018의 chromosomal DNA를 *Pvu*II로 digestion하여 temperate phage DNA probe와 hybridization을 실시한 경우(Fig. 1, b, lane 4)에서도 동일한 위치에 나타나는 것을 볼 수 있었다. 그리고 *L. casei* YIT 9018의 chro-

somal DNA를 *Sal*I으로 digestion하여 temperate phage DNA probe와 hybridization을 실시한 경우에도 band가 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 2, b, lane 2). 따라서 *L. casei* YIT 9018의 chromosomal DNA에 temperate phage가 prophage 상태로 incorporation 되어 있음을 확인할 수 있었다.

그러나 prophage cured strain인 *L. casei* HY 2782의 chromosomal DNA를 *Pvu*I로 digestion하여, *Sal*I으로 digestion한 temperate phage DNA probe와 hybridization을 실시한 경우에는 band가 나타나지 않았다(Fig. 1, b, lane 2). 또한 *Sal*I으로 digestion한 *L. casei* HY 2782의 chromosomal DNA와 temperate phage DNA probe가 hybridization되었을 때에도 band가 나타나지 않았다(Fig. 2, b, lane 1). 이 같은 결과를 통해 prophage genome이 *L. casei* HY 2782의 chromosomal DNA로부터 완전히 curing되어 있음을 알 수 있었다.

### 균증식 및 산생성 능력

Prophage cured strain이 발효유 제조에 산업적으로 사용되기 위해서는 모균주가 지니고 있는 균증식 능력과 산생성 능력의 유지가 우선되어야 한다(5). 따라서 prophage cured strain인 *L. casei* HY 2782가 모균주인 *L. casei* YIT 9018로부터 mutation 과정을 거쳐 분리되면서, 균증식 능력과 산생성 능력이 감소

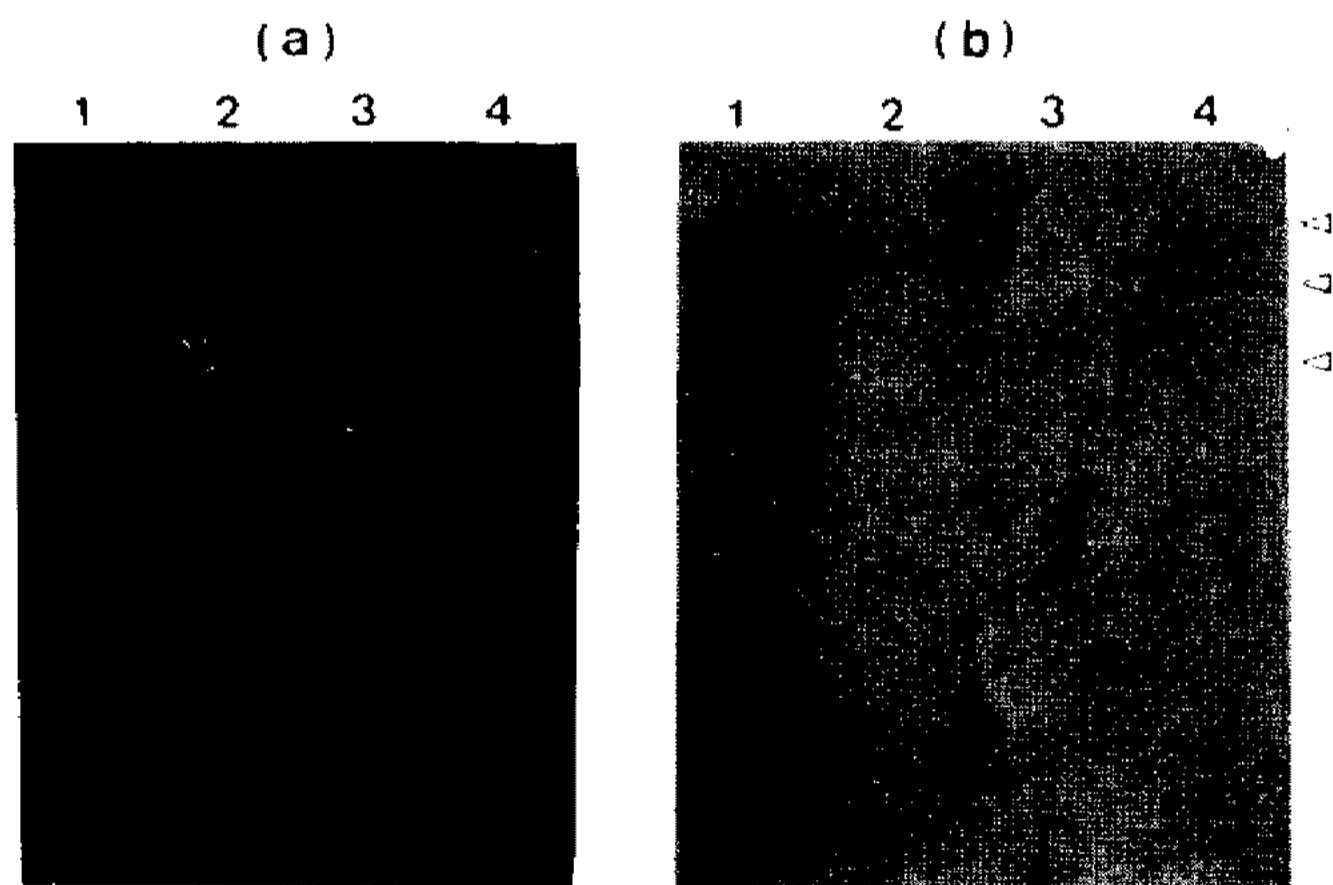


Fig. 1. Southern hybridization of *L. casei* strains with temperate phage DNA probe I.

(a) Agarose gel electrophoregram of *Pvu*II digested chromosomal DNA from *L. casei* strains.

Lane 1, YIT 9018; lane 2, HY 2782; lane 3, YIT 9029; lane 4, *Bam*HI+*Xho*I digested temperate phage DNA  
(b) The corresponding southern hybridization of *L. casei* strains with *Sal*I digested temperate phage DNA probe

Lane 1, *Bam*HI+*Xho*I digested temperate phage DNA; lane 2, YIT 9029; lane 3, HY 2782; lane 4, YIT 9018

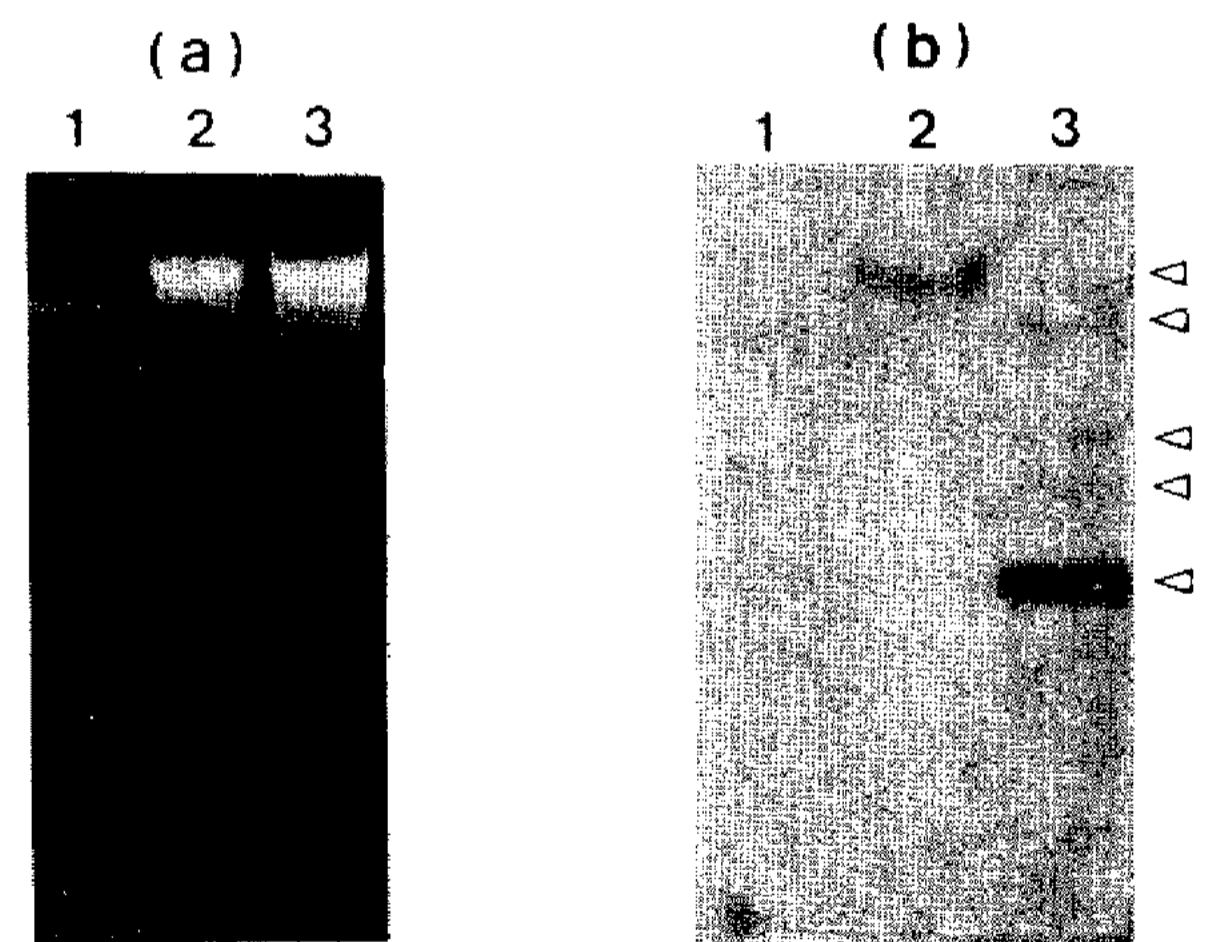


Fig. 2. Southern hybridization of *L. casei* strains with temperate phage DNA probe II.

(a) Agarose gel electrophoregram of *Sal*I digested chromosomal DNA from *L. casei* strains.

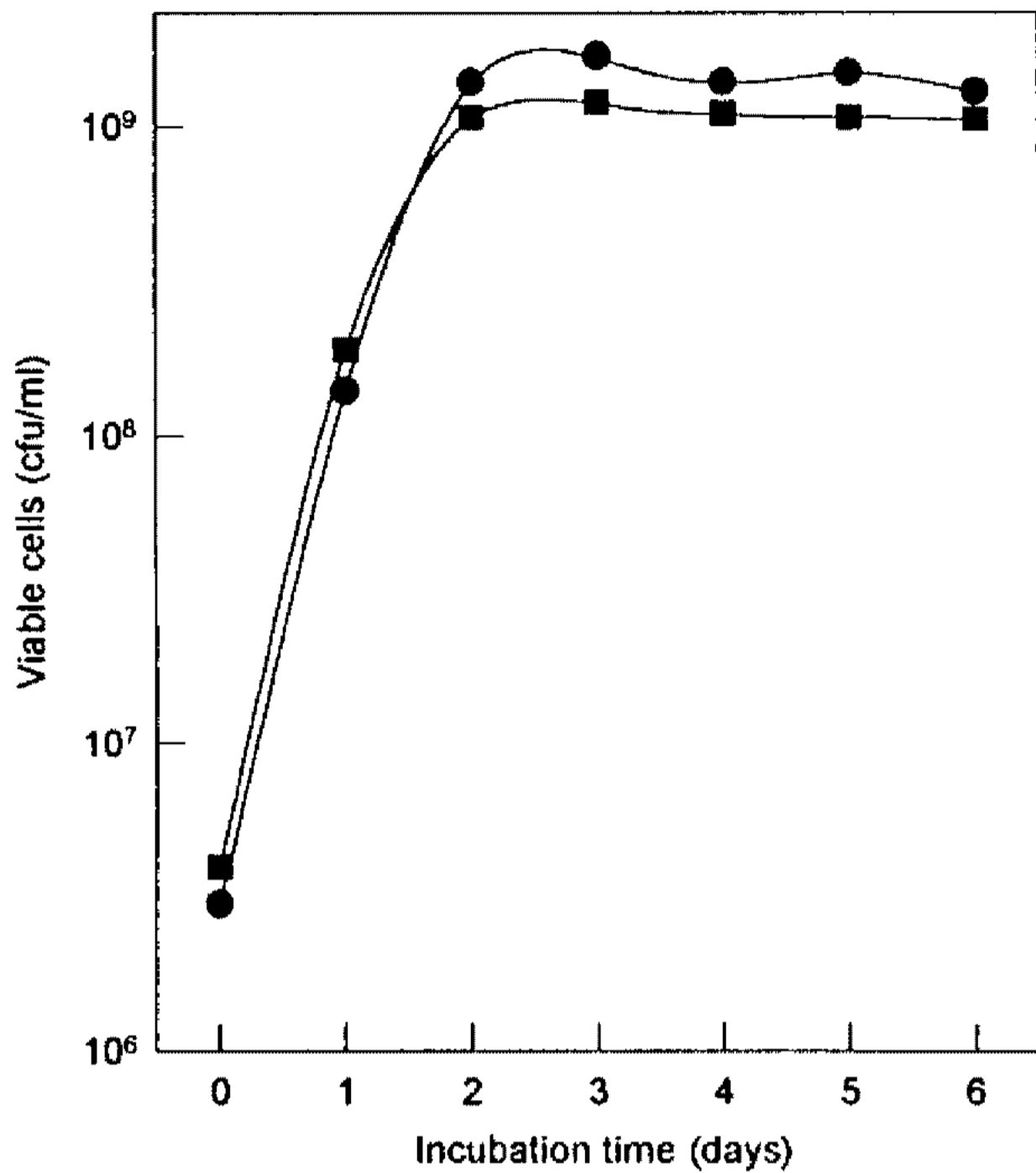
Lane 1, *Bam*HI+*Xho*I digested temperate phage DNA; lane 2, YIT 9018; lane 3, HY 2782

(b) The corresponding southern hybridization of *L. casei* strains with *Sal*I digested temperate phage DNA probe.

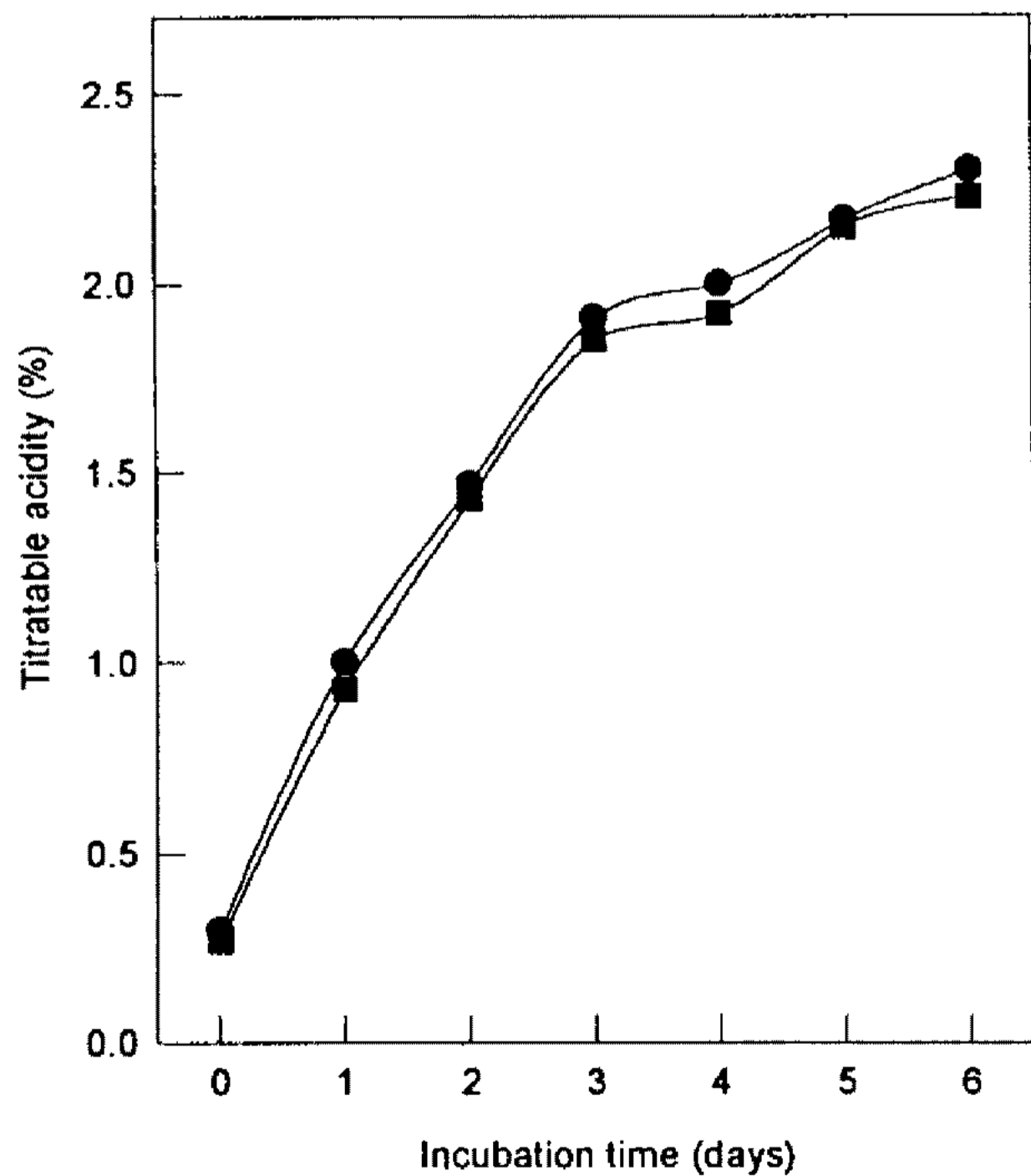
Lane 1, HY 2782; lane 2, YIT 9018; lane 3, *Bam*HI+*Xho*I digested temperate phage DNA

또는 상실되지 않았는가를 알아보았다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 *L. casei* HY 2782를 10%



**Fig. 3. The growth curves of *L. casei* strains.** These strains were cultured in 10% skim milk and 3% glucose at 37°C for 6 days.  
●: *L. casei* HY 2782, ■: *L. casei* YIT 9018



**Fig. 4. The changes of titratable acidity of *L. casei* strains.** These strains were cultured in 10% skim milk and 3% glucose at 37°C for 6 days.  
●: *L. casei* HY 2782, ■: *L. casei* YIT 9018

skim milk에 3% glucose를 첨가한 배지에서 배양한 경우, 배양 2일 후에  $1.5 \times 10^9$  cfu/ml을 보이면서 stationary phase로 접어드는 것을 볼 수 있었으며, 이는 배양 2일 후에  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml을 나타낸 모균주와 동일한 균증식 능력임을 알 수 있었다. 또한 Fig. 4에서 보는 바와 같이 *L. casei* HY 2782의 산생성 능력이 배양 6일 후에 적정산도 2.3%를 나타내 모균주와 차이가 없는 것을 알 수 있었다.

**당 이용성과 효소활성**

*L. casei* HY 2782와 모균주인 *L. casei* YIT 9018과의 당 이용성을 비교해 본 결과, 두 균주 모두 *L. casei*의 분류에 중요한 당(15)으로 알려져 있는 maltose, lactose, mannose, trehalose, amygdalin 등을 이용하면서 다른 당들의 이용성에서도 차이를 보이지 않았다 (Data not shown).

그리고 효소활성에서도 두 균주간의 차이를 발견하지는 못하였다(Table 2). 일반적으로 leucine aryla-

**Table 2. Comparison of enzymatic activities of *L. casei* strains**

Enzymes	Enzymatic activity*	
	<i>L. casei</i> HY 2782	<i>L. casei</i> YIT 9018
Control	0	0
Phosphatase alkaline	0.5	1
Esterase	2	2
Esterase Lipase	4	4
Lipase	0	0
Leucine arylamidase	5	5
Valine arylamidase	4	4
Cystine arylamidase	2	2
Trypsin	0	0.5
Chymotrypsin	2	2
Phosphatase acid	5	5
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	5	5
α-galactosidase	0	0
β-galactosidase	5	5
β-glucuronidase	0	0
α-glucosidase	5	5
β-glucosidase	1	1
N-acetyl-β-glucosaminidase	1	1
α-mannosidase	0	0
α-fucosidase	0	0.5

\*: 0: 0 nmole, 1: 5 nmole, 2: 10 nmole, 3: 20 nmole, 4: 30 nmole, 5: ≥40 nmole

midase activity가 높은 균주가 산생성 능력도 높은 것으로 알려져 있는데(16), *L. casei* HY 2782와 YIT 9018의 leucine arylamidase activity가 40 nmole 이상으로 높게 나타나, 이 두 균주의 산생성 능력이 높음을 간접적으로 알 수 있었다. 그리고  $\alpha$ -glucosidase의 activity가 40 nmole 이상으로 높게 나타나 *L. acidophilus*, *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, *L. bulgaricus*에서는  $\alpha$ -glucosidase activity가 없다는 보고(17)와 차이를 나타냈다. 따라서 *L. casei*와 이들 유산균과의 분류, 동정을 위한 지표로  $\alpha$ -glucosidase activity의 이용이 가능할 것으로 생각된다.

#### Prophage cured strain에 대한 temperate phage의 M.O.I. 값 설정

Multiplicity of infection(M.O.I.) 값은 숙주세포의 접종농도에 대한 phage의 감염농도로서(13), phage에 대한 숙주세포의 감수성을 나타내는 한 지표로 이용할 수 있다.

Lysogenic strain인 *L. casei* YIT 9018은 temperate phage에 대한 감수성을 갖고 있지 않으므로 이들에 대한 숙주로서 사용할 수 없었다(5). 그러나 prophage cured strain인 *L. casei* HY 2782는 temperate phage의 숙주로 작용할 수 있으므로, 이 경우 숙주를 완전히 용균시킬 수 있는 temperate phage의 농도 즉, M.O.I. 값을 측정하여 temperate phage에 대한 감수성 정도를 알아 보았다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 prophage cured strain인 *L. casei* HY 2782가  $3.5 \times 10^6$  cfu/ml의 농도로 접종되었을 때, temperate phage의 감염농도가  $10^7$  pfu/ml인 경우에는 숙주인 *L. casei* HY 2782가 거의 증식하지 못하고 초기의 농도만을 유지하는 것으로 나타났으며, temperate phage가  $10^6$  pfu/ml의 농도로 감염된 경우에는 배양 9시간 후부터 숙주세포의 수가 감소하기 시작하여 배양 18시간 후에 완전히 용균됨을 볼 수 있었다. 또한  $10^5$ 과  $10^4$  pfu/ml의 temperate phage 감염농도에서는 각각 12시간과 15시간 후부터 숙주세포의 수가 감소하는 것을 볼 수 있었으나, 숙주세포의 완전한 용균현상은 나타나지 않았다.

따라서 prophage cured strain인 *L. casei* HY 2782를 temperate phage의 숙주로 사용할 경우, 숙주세포를  $10^6$  cfu/ml의 농도로 접종하고 temperate phage를  $10^6$  cfu/ml의 농도로 감염시켜 37°C에서 18시간 동안 배양하면 숙주세포의 완전한 용균현상을 볼 수 있었으며, 이로써 *L. casei* HY 2782에 대한 temperate phage의 M.O.I. 값은 1.0~5.0 정도임을 알 수 있었다. 이 같은 결과는 J-1 phage가 *L. casei*에

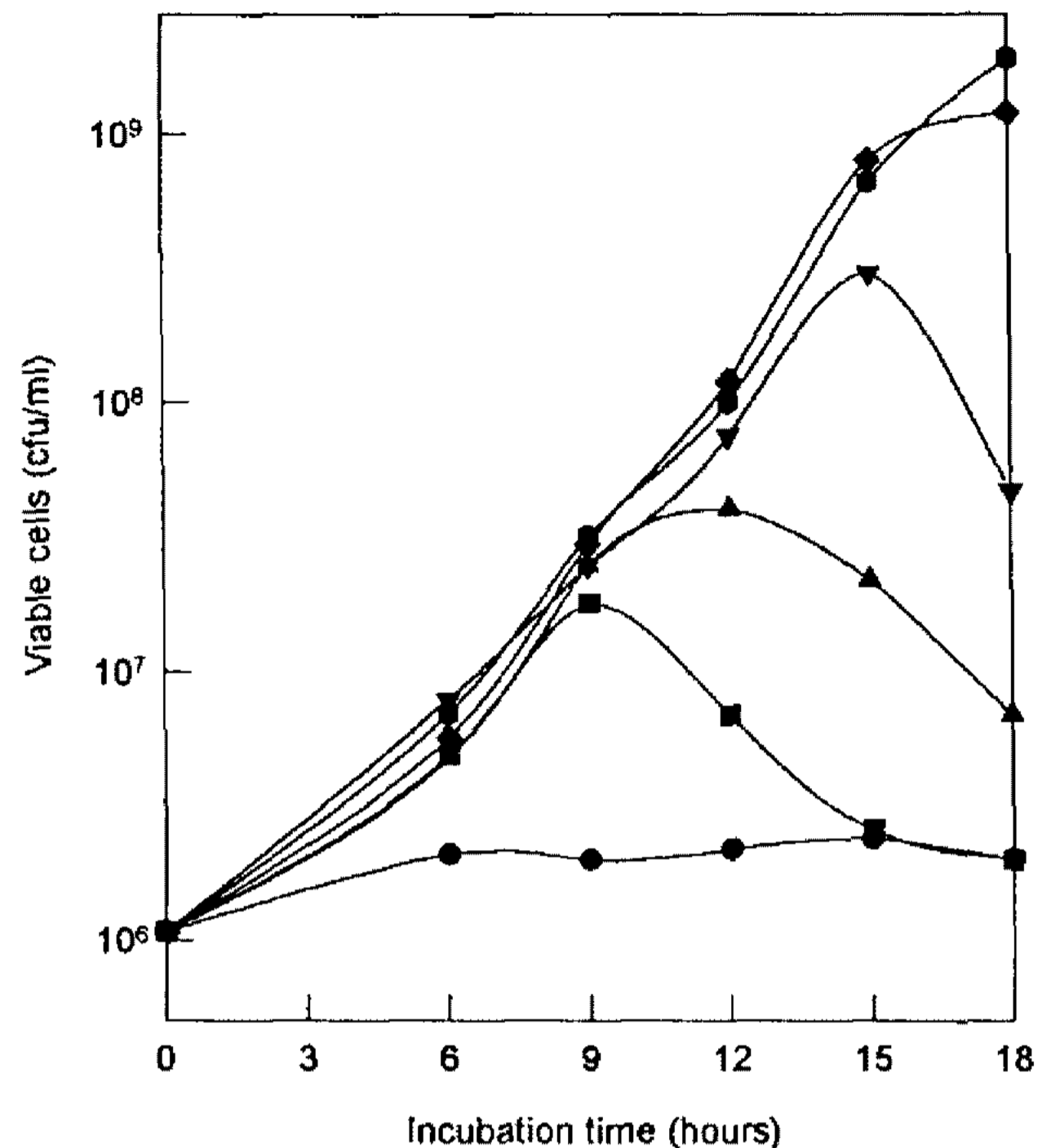


Fig. 5. The change of viability of *L. casei* HY 2782 when infected temperate phage by various infection concentrations at 37°C for 18 hours.

Initial infection conc. of temperate phage; ●:  $10^7$  pfu/ml, ■:  $10^6$  pfu/ml, ▲:  $10^5$  pfu/ml, ▼:  $10^4$  pfu/ml, ◆:  $10^3$  pfu/ml, ●: Non infection of temperate phage

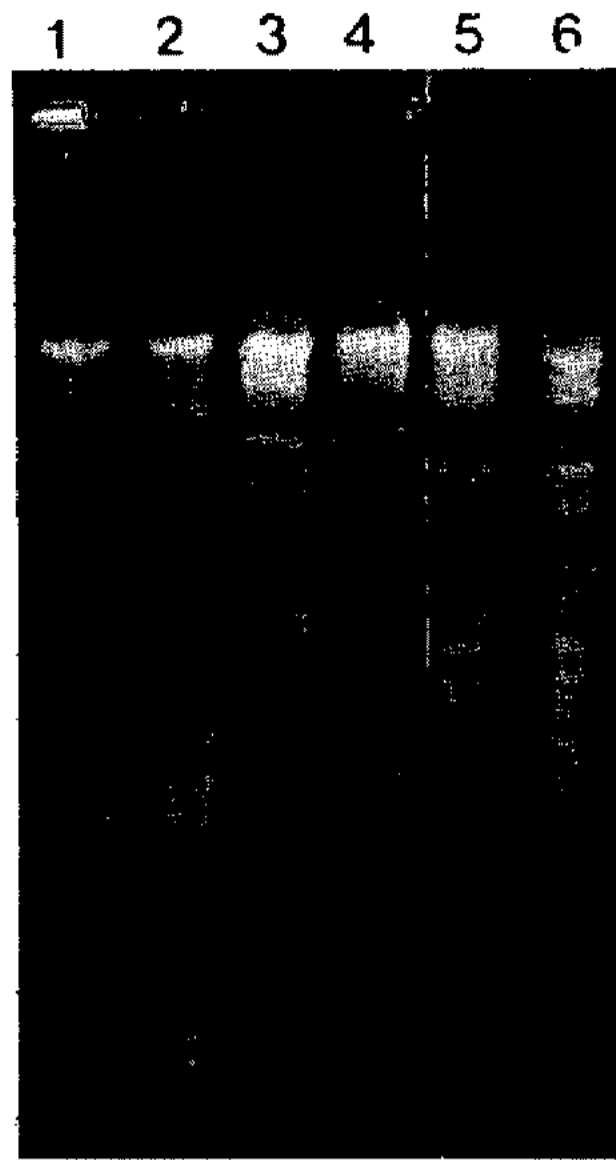
대해 10~100(18)의 M.O.I. 값을 나타내는 것과 비교해 볼 때 매우 낮은 값으로 temperate phage의 용균능력이 J-1 phage에 비해 현저히 떨어짐을 알 수 있었다.

#### pLC90 plasmid의 제한효소절편 지도

Prophage cured strain인 *L. casei* HY 2782로부터 plasmid DNA(pLC90 이라 명명)를 분리하여 *Bam*HI, *Xho*I, *Bgl*I, *Sal*I을 기준으로 제한효소절편 지도를 작성한 후, 모균주인 *L. casei* YIT 9018의 plasmid DNA와 비교해 보므로써, plasmid에 관련된 lactose 분해능력이나 그 밖의 생리적 특성의 변화 가능성을 알아보려고 하였다.

Fig. 6과 Table 3에서 보는 바와 같이 pLC90 plasmid는 68.22 kb의 size를 나타내며, *Bam*HI, *Xho*I, *Bgl*I, *Sal*I으로 처리하였을 경우 각각 5개, 4개, 5개 그리고 5개의 절편을 얻을 수 있었고, 이중 또는 삼중으로 처리하였을 경우에는 9개~15개의 많은 절편이 나왔다. 이 결과를 기초로 하여 pLC90 plasmid의 제한효소절편 지도를 Fig. 7에 작성하였다. 그리고 pLC90 plasmid를 기타 여러가지 제한효소로 처리하여 잘라 본 결과 *Sma*I(4개), *Pst*I(8개), *Kpn*I(10개),





**Fig. 8. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic DNA from *L. casei* strains.**

Electrophoresis was run in a 1.2% agarose gel for 5 h at 450 V with 0.5 sec. pulse time.

Lane 1, 3, 5: *L. casei* YIT 9018 genomic DNA was digested with *Sph* I, *Not* I, and *Xma* I, respectively.

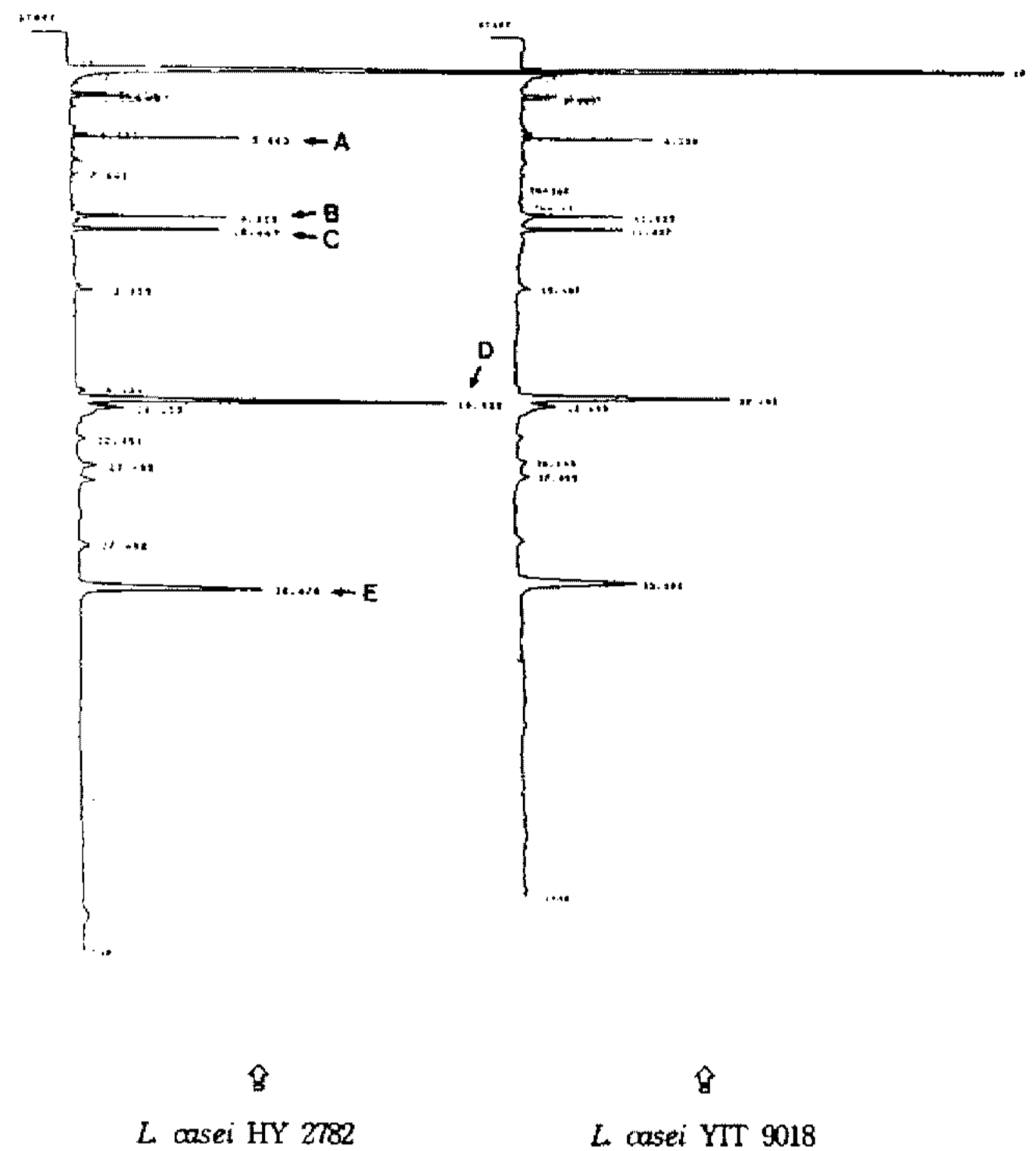
Lane 2, 4, 6: *L. casei* HY 2782 genomic DNA was digested with *Sph* I, *Not* I, and *Xma* I, respectively.

였다. DNA 절편 수를 줄이기 위해 recognition site가 비교적 큰 제한효소를 사용하여 절단하였으나, Fig. 8에서 보는 바와 같이 균주간 차이를 확인하지는 못하였다. 이 같은 결과는 *L. casei* S-1의 genomic DNA에 prophage 상태로 존재하는 temperate phage의 DNA가 약 41.3 kb의 크기(19)임을 고려할 때, *L. casei* HY 2782가 *L. casei* YIT 9018로부터 prophage가 curing된 균주라해도 PFGE를 통해 확인할 수 있을 정도의 변화는 아니었으며, 아울러 *L. casei* HY 2782의 chromosomal DNA 상에 다른 커다란 변화가 일어나지 않았기 때문으로 생각된다.

#### *L. casei* 균주의 cellular fatty acids 비교 분석

*L. casei* HY 2782의 cellular fatty acids composition을 알아보고, 모균주인 YIT 9018의 fatty acids composition과 비교를 통해 complex mutation의 가능성을 알아보려고 하였다.

Bacteria의 fatty acid composition은 일반적으로 성장온도나 성장배지에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있으므로(20), 이러한 영향에 의한 차이를 최소화하기 위해 *L. casei*가 잘 자라는 MRS 배지에서 *L. casei* HY 2782와 YIT 9018을 동일조건으로 배양한 후, cellular fatty acids를 gas chromatography에 의해 정성분석하여 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다.



**Fig. 9. GC spectrums of cellular fatty acids of *L. casei* strains.**

A, C<sub>14:0</sub>; B, C<sub>16:1</sub>; C, C<sub>16:0</sub>; D, C<sub>18:1</sub>; E, C<sub>19:cyclo</sub>

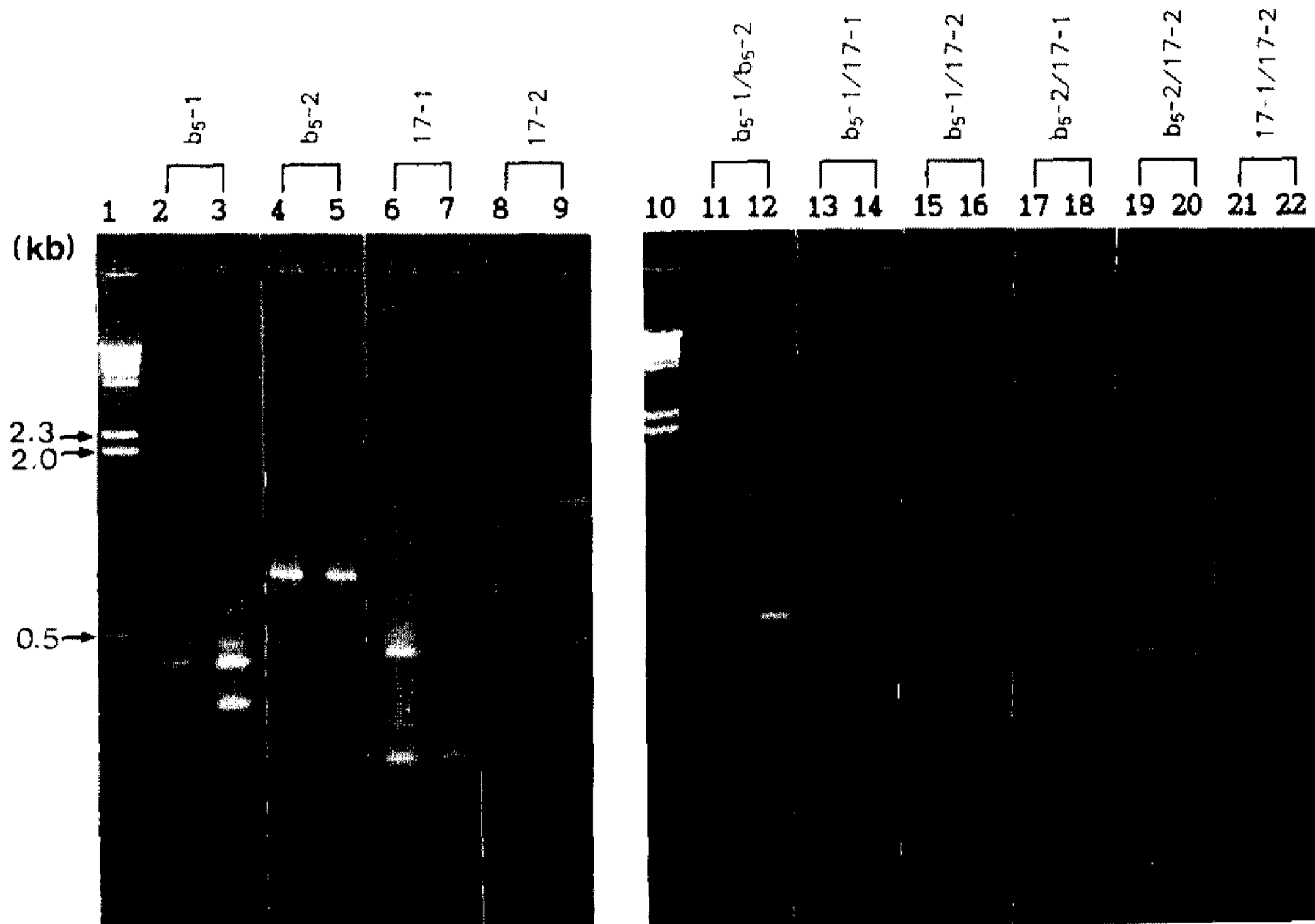
*L. casei* HY 2782와 YIT 9018의 전체적인 fatty acids composition은 비슷하며 tetradecanoic acid (*n*-C<sub>14:0</sub>), palmitoleic acid(*n*-C<sub>16:1</sub>), hexadecanoic acid (*n*-C<sub>16:0</sub>)의 포화지방산, octadecanoic acid(*n*-C<sub>18:1</sub>)의 불포화지방산 그리고 11,12-methylenehexadecanoic acid(C<sub>19:cyclo</sub>)가 주요 구성성분임을 알 수 있었다. 이 결과는 Veerkamp(21)와 Rizzo 등(22)이 *L. casei*의 fatty acids 분석을 통해 C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>19:cyclo</sub>가 주요 구성성분이라고 보고한 것과 일치하였다.

#### Arbitrarily primed polymerase chain reaction에 의한 *L. casei* 균주의 비교

Arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP-PCR)을 실행시켜 *L. casei* HY 2782와 YIT 9018 균주간에 나타나는 DNA polymorphisms으로 두 균주의 차이를 확인하였으며, 그 결과를 Fig. 10에 나타내었다.

b<sub>5</sub>-1, b<sub>5</sub>-2, 17-1, 17-2의 단일 primer를 사용하였을 경우에는 *L. casei* 균주간에 차이점이 볼 수 있는 DNA band를 확인할 수 없었다. 그러나 이 primer들을 서로 조합하여 사용한 결과 b<sub>5</sub>-1/17-2 primers와 b<sub>5</sub>-2/17-2 primers를 사용하여 PCR을 실행한 경우에만 두 균주간에 나타나는 DNA band pattern 차이를 확인할 수 있었다. 즉 b<sub>5</sub>-1/17-2 primer를 사용하였을





**Fig. 10. Genomic fingerprints of *L. casei* strains by arbitrarily primed polymerase chain reactions.** *L. casei* strains were fingerprinted by AP-PCR with *b*<sub>5</sub>-1, *b*<sub>5</sub>-2, 17-1, and 17-2 primers. The resulting amplified material was resolved by electrophoresis through a 1.4% agarose gel for 3 h at 80 V. Lane 1, 10:  $\lambda$  *Hind* III size marker  
Lane 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19, 21: *L. casei* YIT 9018  
Lane 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 18, 20, 22: *L. casei* HY 2782

때는 *L. casei* YIT 9018에만 나타나는 약 1.3 kb의 DNA band를 볼 수 있었으며, *b*<sub>5</sub>-2/17-2 primer를 사용하여 PCR을 실행하였을 때는 *L. casei* HY 2782에만 나타나는 약 1.0 kb의 DNA band를 볼 수 있었다. 그리고 이 결과들은 동일조건으로 PCR을 반복실행시킨 경우에도 동일한 DNA band pattern을 나타내 재현성이 있음을 확인할 수 있었다.

### 요 약

Prophage cured strain인 *Lactobacillus casei* HY 2782의 특성을 조사하여, *L. casei* HY 2782가 모균주인 *L. casei* YIT 9018의 특성을 유지하고 있는 안정된 균주임을 확인하였다.

Temperate phage DNA를 probe로 한 southern hybridization을 통해 *L. casei* YIT 9018의 chromosomal DNA에 temperate phage가 prophage 상태로 incorporation되어 있음을 확인하였으며, *L. casei* HY 2782의 chromosomal DNA로부터 prophage genome이 완전히 curing 되었음을 알 수 있었다.

*L. casei* HY 2782가 균증식 능력, 산생성 능력, 당 이용성 그리고 효소활성에 있어서 *L. casei* YIT 9018과 차이가 없는 안정된 균주임을 알 수 있었다. Prophage cured strain인 *L. casei* HY 2782가 temperate phage의 숙주로 이용될 때, 숙주에 대한 temperate phage의 M.O.I. 값은 1.0~5.0로 나타났다.

*L. casei* HY 2782로부터 분리한 pLC90 plasmid의 제한효소절편 분석을 통해 pLC90 plasmid의 크기가 68.22 kb 임을 알 수 있었으며 *L. casei* HY 2782의 plasmid profiles, genomic DNA patterns 그리고 cellular fatty acids 구성성분이 모균주인 *L. casei* YIT 9018과 동일함을 확인하였다. 그리고 두 균주의 주요 fatty acids 구성성분은 C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>19:cyclo</sub>이었다. Arbitrarily primed polymerase chain reaction을 실행하여 두 균주간 차이를 확인하였다. *b*<sub>5</sub>-1/17-2 primer를 사용한 경우는 *L. casei* YIT 9018에만 나타나는 약 1.3 kb의 DNA band를 볼 수 있었으며, *b*<sub>5</sub>-2/17-2 primer를 사용하여 PCR을 실행하였을 때는 *L. casei* HY 2782에만 나타나는 약 1.0 kb의 DNA band를 볼 수 있었다.

## 참고문헌

1. Reiter, B. 1949. Lysogenic strains of lactic streptococci. *Nature*. **164**: 667-668.
2. Lowrie, R.L. 1974. Lysogenic strains of group N lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* **27**: 210-217.
3. Huggins, A.R. and W.E. Sandine. 1977. Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 184-191.
4. Shimizu-Kadota, M. and T. Sakurai. 1982. Prophage curing in *Lactobacillus casei* by isolation of a thermoinducible mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1284-1287.
5. Lee, J.J., G.T. Kim, and Y.J. Baek. 1990. Isolation and characterization of prophage cured strain derivatives from *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 215-220.
6. Chang, D.H. and Y.H. Yoon. 1989. A study on prophage curing of *Lactobacillus casei* ATCC 27139. *Kor. J. Dairy Sci.* **11**: 52-59.
7. De Man, J.C., M. Rogosa, and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.
8. Bae, H.S., Y.J. Baek, Y.K. Kim, M. Yoo, and M.Y. Park. 1985. Rapid and simple method for isolating plasmid DNA from lactic acid bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 289-296.
9. Murata, A. 1971. Temperature-sensitive growth of wild-type phage J1 of *Lactobacillus casei*. *Agr. Biol. Chem.* **35**: 667-673.
10. Sharp, P.A. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
11. Yamamoto, K.R., B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Lawhorne, and G. Treiber. 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* **40**: 734-744.
12. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
13. Benson, H.J. 1990. *Microbiological Applications, A Laboratory Manual in General Microbiology*. 5th ed. Wm. C. Brown Publishers.
14. Kim, S.K., S.J. Lee, Y.J. Baek, and Y.H. Park. 1994. Isolation of bacteriocin-producing *Lactococcus* sp. HY 449 and its antimicrobial characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 259-265.
15. Sneath, P.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins.
16. Desjardins, M.L., D. Roy, and C. Toupin. Uncoupling of growth and acids production in *Bifidobacterium* sp. *J. Dairy Sci.* **73**: 1478-1484.
17. Lee, B.H., S. Hache, and R.E. Simard. 1986. A rapid method for differentiation of dairy lactic acid bacteria by enzyme systems. *J. Ind. Microbiol.* **1**: 209-217.
18. Kim, G.T., J.J. Lee, I.Y. Suh, S.H. Na, and Y.J. Baek. 1991. Effect of the phage  $\phi$ FSV on the growth of *Lactobacillus casei*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 147-152.
19. Shimizu-Kadota, M., T. Sakurai, and N. Tsuchida. 1983. Prophage origin of a virulent phage appearing on fermentations of *Lactobacillus casei* S-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 669-674.
20. Sasser, M. 1990. *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids*. MIDI Technical note #101. MIDI. 115. Barkdale Prof. Center, New York.
21. Veerkamp, J.H. 1971. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J. Bacteriol.* **108**: 861-867.
22. Rizzo, A.F., H. Korkeala, and I. Mononen. 1987. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2883-2888.

(Received August 19, 1994)