

*Lactobacillus plantarum*을 용균시키는 Bacteriophage SC 921의 분리 및 특성

윤성식* · 신영재¹ · 최학종 · 허 송² · 오두환²

연세대학교 생물자원공학과, ¹(주) 오투기 중앙연구소, ²연세대학교 식품·생물공학과

Isolation and Characterization of the *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage SC 921. Sung-Sik Yoon*, Young-Jae Shin¹, Hak-Jong Choi, Song Her² and Doo-Hwan Oh². Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Wonju, 220-710, Korea, ¹OTTOGI Corporation Research Center, Anyang, 431-070, Korea, ²Department of Food and Biotechnology, Yonsei University, Seoul, 120-749, Korea - Among the lactic flora responsible for the development of acidity and characteristic flavor of *Kimchi* which is a traditional fermented Chinese cabbage. Homofermentative *Lactobacillus plantarum* is rod-shaped and to be known to exert major role during later fermentation period. Once this strain establishes main flora in the *Kimchi* fermentation process, it gives rise to excess acid production to reduce the taste and quality of *Kimchi* during storage. As a primary work to increase the keeping quality using virulent *Lactobacillus plantarum* bacteriophages, it was isolated successfully from collected *Kimchi* samples and their characteristics were studied. The new isolated phage, named SC 921, adsorbed to its host without Ca²⁺, and nearly eliminated at 60°C of heat treatment for 5 min. This phages were stable at pH 4~10 but inactivated below pH 3.0 or pH 11.0 above. The latent period, rise period, and burst size of this phage was 100 min, 120 min, 31±2 pfu/ml, respectively. Electron micrograph showed the phages particles were unusually oval feature of head (dia 80~120 nm) without contractile tail.

최근 국내에서는 우리 전통 식품인 김치에 대한 연구가 상당히 활발하게 이루어지고 있고, 김치의 제조 또한 기계적인 연속 공정을 통하여 산업적으로 대량생산 되고 있다. 김치는 그 종류도 많거니와 발효에 관여하는 미생물의 종류도 매우 다양한 관계로 복잡한 발효과정을 거쳐 제조되는데, 특히 이것의 발효에 참여하는 미생물의 종류에 따라 김치의 품질도 상당한 영향을 받게 된다(1, 2).

대체적인 김치의 발효과정을 보면, 우선 발효 초기에는 그람 음성균인 *Aeromonas* 속과 그람 양성 세균인 *Bacillus* 속이 출현하고, 이어서 그람 양성 젖산균이 발효를 주도하다가 발효 말기에는 효모의 증식으로 인하여 김치 조직중의 펙틴이 분해되어 연부현상이 나타난다고 알려져 있다(3). 김치 발효에 관련된 세균중에서 *Leuconostoc mesenteroides*는 주발효균으로서 김치의 바람직한 풍미 형성에 중요한 균주인 반면, *Lactobacillus plantarum*은 과숙을 유발하는 산패 원인균으로 알려져 있다(4). 그러므로 김치의 저장성을 향상시키기 위해 *L. plantarum*의 지나친 증식을 제어 하고자하는 방법이 다각도로 연구되고 있다. *L. plantarum*은 그람 양성 간균으

로 포도당을 이용하여 DL-lactic acid를 생산하며, 생육적온은 37°C 정도이며, 침채류는 물론 사일리지(silage) 발효에도 중요한 세균이다(5).

따라서 이 세균에 대한 virulent phage를 이용한다면 김치의 저장성을 향상시킬 수 있는 가능성이 있다는 전제하에 우선 다양한 김치 시료를 수집하고 수집된 시료로부터 *L. plantarum* phage를 분리하였다. 본 연구는 분리한 *L. plantarum* phage를 정제하고 그 형태적 특징과 몇가지 생리적 특성을 검토한 결과이다.

재료 및 방법

사용배지

본 실험에 사용한 *Lactobacillus plantarum* 및 기타 유산균의 계대배양과 bacteriophage의 증식을 위해서는 MRS 배지(pH 6.5)(6)를 사용했으며, 분리한 bacteriophage의 titer 측정을 위해서는 MRS hard agar(1.5 % agar) 및 MRS soft agar(0.7% agar)를 사용하였다.

사용균주

분리한 bacteriophage의 숙주균으로서 *L. plantarum* KCCM 11322와 *L. plantarum* KCCM 12116을 사용하였으며, host range 검정을 위해서 한국종균협회(KCCM)로부터 분양받은 *Lactobacillus* spp. 9균주, *Leuconostoc*

*Corresponding author
Tel. 82-371-760-2251, Fax. 82-371-763-4323
E-mail: sunsik@dragon.yonsei.ac.kr
Key words: *Lactobacillus plantarum*, Bacteriophage, *Kimchi*

Table 1. Determination of host range

Bacterial strains	Infection
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 12116	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCCM 32825	-
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 11509	-
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 11904	-
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 35464	-
<i>Lactobacillus casei</i> KCCM 32405	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> KCCM 35469	-
<i>Lactobacillus helveticus</i> KCCM 11223	-
<i>Leuconostoc dextranicum</i> KCCM 35046	-
<i>Leuconostoc lactis</i> KCCM 12204	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCCM 11324	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3541	-
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCCM 11728	-

+: infected, -: not infected

spp. 4균주, *Pediococcus* sp. 1균주를 사용하였다(Table 1). 사용 균주는 모두 1주일에 한번씩 새로운 MRS 배지에 1%가 되도록 접종하고 16~18시간 배양한 다음 4°C 냉장고에 보존하였다.

Bacteriophage의 분리 및 농축

Bacteriophage의 분리는 double-layer method를 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 서울 및 강원도 지역의 대중 음식점에서 김치 시료를 수집한 다음 냉장상태로 실험실로 이송하였다. 각 시료를 생리식염수(0.85% NaCl)로 희석한 후 7,500 rpm에서 15분간 원심분리하고 상등액을 따라내어 pH를 6.5로 조정하고 다음 1 ml 취하여 멸균 시험관에 넣었다. 여기에 MRS 연한천배지 1 ml (50°C), 숙주균인 *L. plantarum* 현탁액 0.1 ml을 재빨리 넣어 혼합한 다음 미리 굳혀 놓은 MRS 한천배지에 중층(overlay)하여 37°C 24시간 동안 배양한 후 생긴 plaque를 확인하고, 이를 백금으로 취하여 소량의 생리식염수에 현탁한 다음 위 과정을 반복하여 plaque를 얻으므로써 순수 분리하였다.

분리한 phage를 MRS 배지중에서 대수기로 증식한 *L. plantarum* MRS 배양액(OD₆₀₀=1.5)과 혼합하여 37°C에서 키운 후 7,500 rpm에서 20분간 원심분리하고 0.22 µm membrane filter (Millipore Corp.)으로 여과하여 high-titer phage 용액(4.6×10⁸ pfu/ml)을 조제하였다. 이 용액은 냉장고(4°C)에 보존하면서 사용하였고, stock phage는 glycerol을 첨가하지 않은 MRS 액체 배지 중에서 동결시켜 보관하였다.

Bacteriophage의 흡착

Phage의 흡착은 Terzaghi and Terzaghi(7)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 하룻밤 동안 배양시킨 *L.*

plantarum 종배양액을 새로운 MRS 배지에 1% 접종하여 4시간 동안 배양한 후 CaCl₂는 최종 농도가 100 mM이 되도록, bacteriophage 용액은 M.O.I.(multiplicity of infection)가 0.05가 되도록 첨가하였다. 흡착을 위하여 37°C에서 5분 간격으로 25분간 정치한 다음 새로운 배지를 10 ml 첨가하고 7,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액중에 들어 있는 phage수를 측정하였다. 흡착율은 초기 phage수에 대한 흡착된 phage의 수를 백분율로 표시하였다.

One-step growth kinetics 측정

One-step growth kinetics는 다음과 같이 실시하였다. 하룻밤 동안 배양시킨 *L. plantarum*(OD₆₀₀=1.5~2.0)과 bacteriophage 용액을 M.O.I.(multiplicity of infection)가 0.05가 되게 첨가한 후 흡착을 위하여 10분간 방치한 후 7,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 흡착하지 않은 상등액은 제거하고 pellet을 0.9 ml의 MRS 액체배지로 현탁한 후 0.1 ml를 취하여 이를 9.9 ml의 MRS 액체배지에 첨가하여 37°C에서 배양하면서 20분 간격으로 titer를 측정하였다(8, 9).

Bacteriophage의 열안정성 측정

Bacteriophage 현탁액(4.6×10⁸ pfu/ml)을 45°C, 50°C, 55°C, 그리고 60°C에서 각각 5분, 10분, 15분, 30분간 처리시킨 후 적당히 희석하여 MRS 연한천배지 3 ml에 숙주균인 *L. plantarum* 현탁액 0.1 ml과 혼합하여 상기와 같이 중층법으로 plaque수를 계산하였다(10, 11).

Bacteriophage의 pH 안정성 측정

Bacteriophage의 pH 안정성을 검토하기 위하여 MRS 액체배지(pH 6.5) 9 ml을 5 N HCl과 5 N NaOH를 이용하여 각각 pH 3~11로 보정한 후 bacteriophage용액 1 ml를 첨가하여 상온에서 1시간 방치시킨 후 위와같은 방법으로 titer를 측정하였다(10). 또한 산성조건에서의 안정성을 상세히 알아보기 위하여 MRS 액체배지를 pH 4~7로 보정한 후 bacteriophage용액을 첨가하여 상온에 방치하면서 1시간 간격으로 plaque수를 측정하였다.

Host range의 검정

Host range의 검정은 spot test를 통하여 실시하였다. MRS 연한천배지 3 ml에 MRS 배지에서 하룻밤 동안 배양하여 활력이 양호한 14개의 유산균들을 각각 0.1 ml씩 첨가한 후 가볍게 진탕한 다음 MRS 한천 배지상에 overlay하여 굳혔다. 여기에 적당히 희석시킨 bacteriophage 용액 1방울(약 10 µl)을 떨어뜨리고 잠시 후 37°C 항온조에 넣어 24시간 이상 배양하면서 plaque 형성 유무를 관찰하였다(12).

전자현미경 관찰

Bacteriophage 용액을 2.5% glutaraldehyde로 고정된 후 coating한 grid 위에 한방울 떨어뜨려 풍건하였다. 완전히 건조 되었을 때 2% phosphotungstic acid로 2분 정도 처리한 후 4% uranyl acetate(pH 4.5)와 lead citrate로 이중 염색하여 PHILIPS EM-100으로 관찰하였다(8).

결과 및 고찰

Bacteriophage의 분리

우선 김치중에 존재하는 *Lactobacillus plantarum* bacteriophage를 분리하기 위하여 서울 및 강원도 지역의 대중 음식점에서 배추 김치 시료를 수집하였다. 과숙된 것으로 보이는 김치 시료를 냉장하여 실험실로 운반한 다음 원심 분리하고 pH를 6.5로 조정하여 다음 plaque assay를 실시하여 phage plaque를 성공적으로 얻을 수 있었다. 이 bacteriophage plaque의 크기는 Fig. 1에 나타나 바와 같이 평균직경이 1.0~1.5 mm로 관측되었다. 또한 이것을 mid-exponential phase의 *L. plantarum*(OD₆₀₀=1.5)현탁액에 첨가하여 high-titer phage 용액(4.6 × 10⁸ pfu/ml)을 조제하였으며 이를 bacteriophage SC 921이라 명명하였다.

흡착에 대한 CaCl₂의 영향

일반적으로 숙주 세포에 대한 phage의 흡착은 무기염류의 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 유산균 phage의 경우 Ca²⁺과 같은 이온은 숙주세포 표면에 존재하는 음전하를 중화 시키므로써 흡착을 촉진하는 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나(13), Fig. 2에서 보여준 바와 같이 이 phage는 Ca의 존재와 무관하게 10분 후에 최대의 흡착을 보였다. 따라서 이 phage는 Ca-independent phage에 속하는 것으로 생각되었다.

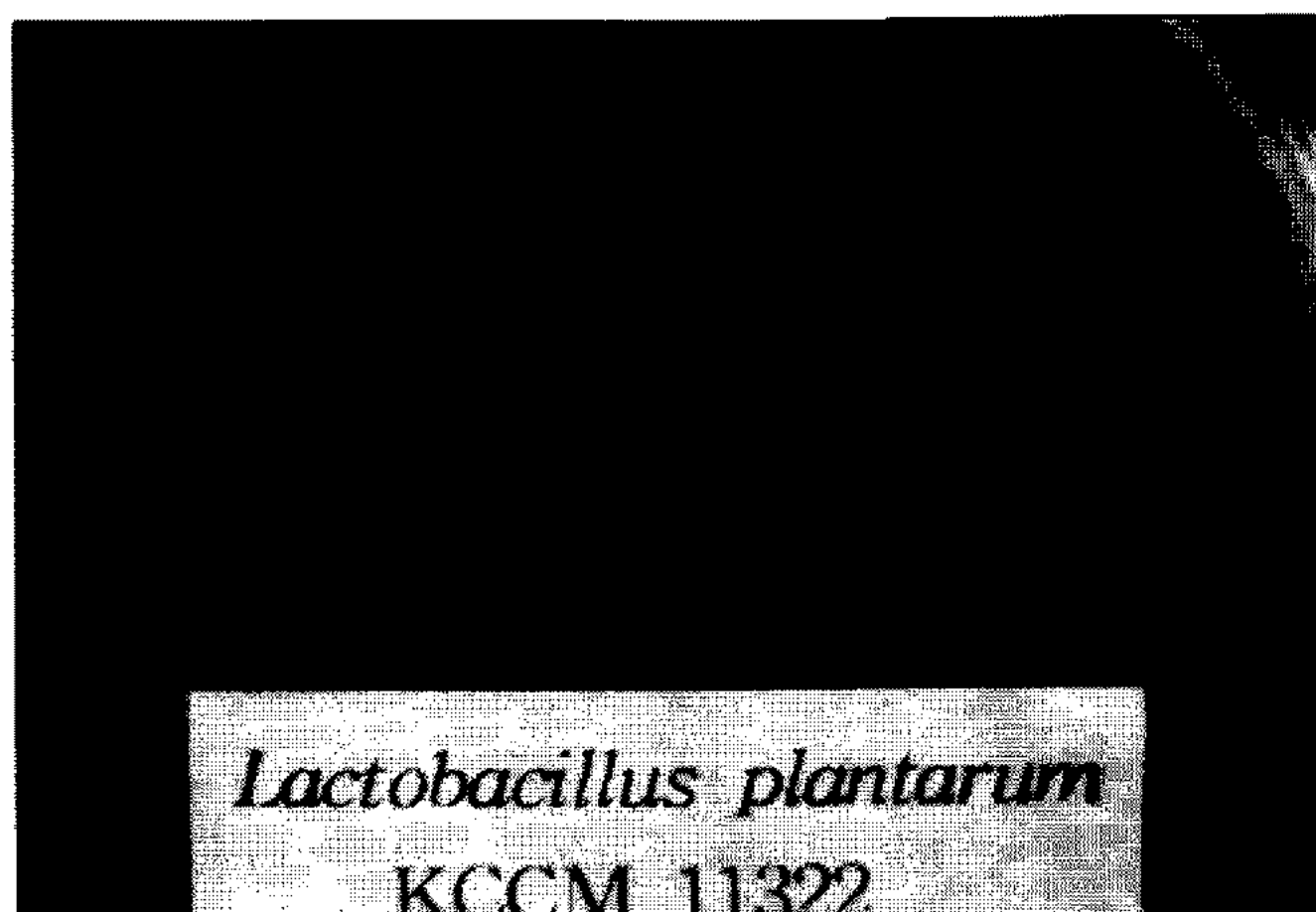


Fig. 1. Plaques produced by *Lactobacillus plantarum* bacteriophage SC 921.

One-step growth kinetics 측정

Fig. 3은 본 phage의 일단계증식 실험의 결과를 나타낸 것이다. Bacteriophage가 숙주균에 흡착하여 용균이 일어나기 시작할 때까지의 시간, 즉 잠복기(latent period)는 약 100분 이었고, 용균이 시작하여 완료될 때까지의 시간(rise period)은 약 120분 이었으며, 한개의 bacteriophage가 숙주균에 흡착하여 새로이 방출되는 평균방출량(burst size)은 약 31(±2) pfu/infected cell이었다.

Bacteriophage의 열안정성

분리 · 농축한 bacteriophage 용액(4.6 × 10⁸ pfu/ml)을

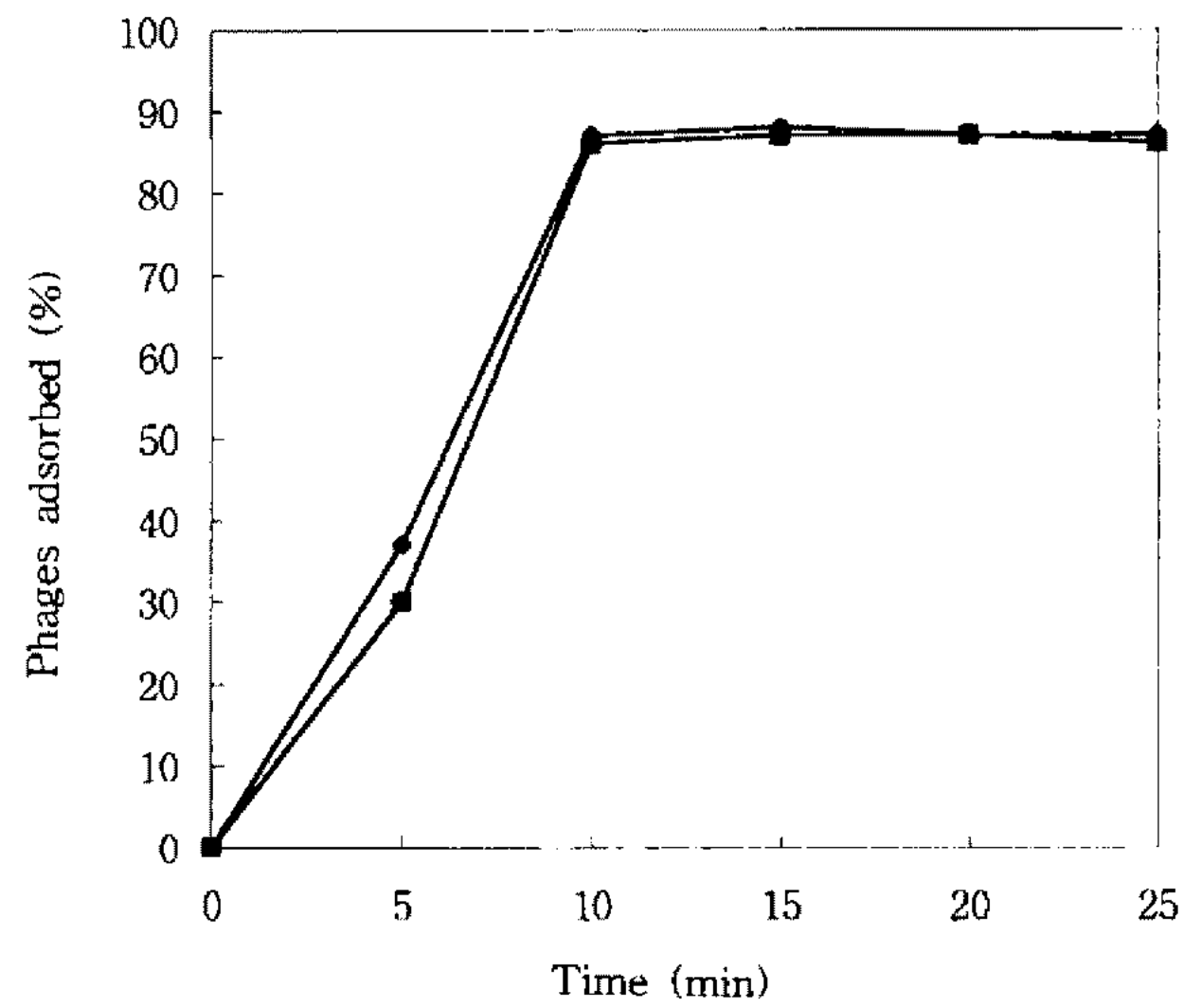


Fig. 2. Adsorption of *Lactobacillus plantarum* bacteriophage SC 921 on their hosts at 37°C. (■): control, (◆): 100 mM CaCl₂.

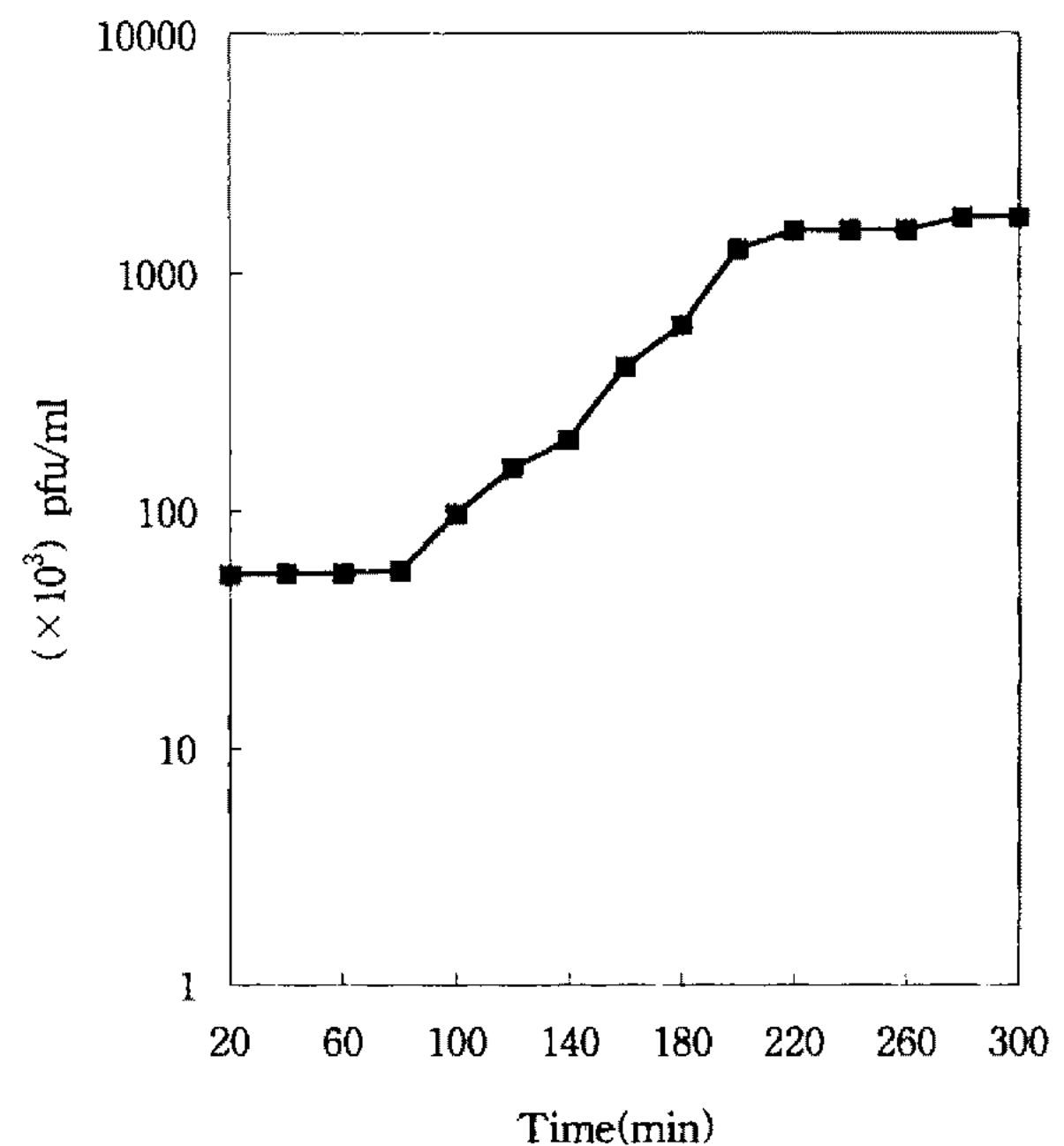


Fig. 3. One-step growth kinetics of the *Lactobacillus plantarum* bacteriophage SC 921.

45°C, 50°C, 55°C, 60°C에서 각각 5분, 10분, 15분, 30분간 반응시킨 다음 중층법으로 titer를 측정된 결과 45°C에서 5분 반응 후 bacteriophage의 상대 생존율은 83%이었으나 60°C에서 5분 반응 후의 상대 생존율은 0.2%로 쉽게 사멸되는 것으로 나타났다. 또한 반응시간이 길어질수록 상대 생존율은 감소한 바, 45°C, 50°C, 60°C에서 30분 반응 후의 상대 생존율은 각각 37%, 30%, 2%로 감소하였다(Fig. 4). Travors(10) 등은 *L. plantarum* bacteriophage fri의 경우 45°C에서 15분 반응시 상대 생존율이 85%였다고 보고한 성적과 비교하면 이 phage는 열에 쉽게 사멸되는 것으로 판단되었다.

Bacteriophage의 pH 안정성

Bacteriophage의 pH 안정성을 검토하기 위하여 MRS 액체배지(pH 6.5) 9 ml을 5 N HCl과 5 N NaOH를 이용하여 각각 pH 3~11로 조정된 후 bacteriophage 용액 1 ml를 첨가하여 실온에서 1시간 방치시킨 후 titer를 측정된 결과, Fig. 5와 같이 pH 4~10에서는 대체로 안정하였으나 pH 3 이하나 pH 11 이상에서의 생존율은 아주 낮게 나타났다. 특히 김치의 저장성을 향상시키기 위한 기초연구로 산성조건에서의 안정성을 상세히 알아보기 위하여 MRS 액체배지를 pH 4~7로 조정된 후 위와같은 방법으로 5시간까지 1시간 간격으로 phage titer를 측정된 결과 각각 35%, 55%, 58%, 63%로 산성조건으로 갈수록 상대 생존율은 감소하였다(Fig. 6).

Host range의 검정

분리한 bacteriophage의 숙주 감수성 영역을 조사하기 위하여 *Lactobacillus* spp. 9균주, *Leuconostoc* spp. 4균주,

Streptococcus sp. 1균주를 bacteriophage와 적당량으로 혼합하여 plaque 형성 유무를 관찰한 결과 Table 1과 같이 *L. plantarum* KCCM 11322와 *L. plantarum* KCCM 12116에서만 plaque 형성을 관찰하였고 나머지 유산균들에 대해서는 plaque를 형성하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 이 phage는 좁은 숙주영역을 가지는 것으로 판단되었다.

Bacteriophage의 형태학적 특성

Yokokura 등(1974)은 inducible *Lactobacillus* phage의 일반적인 형태는 isometric head와 긴 수축성 꼬리를 가지고 있다고 보고한 바 있으며 이러한 형태의 phage는 *Siphoviridae* family로 알려져 있다(14). 본 연

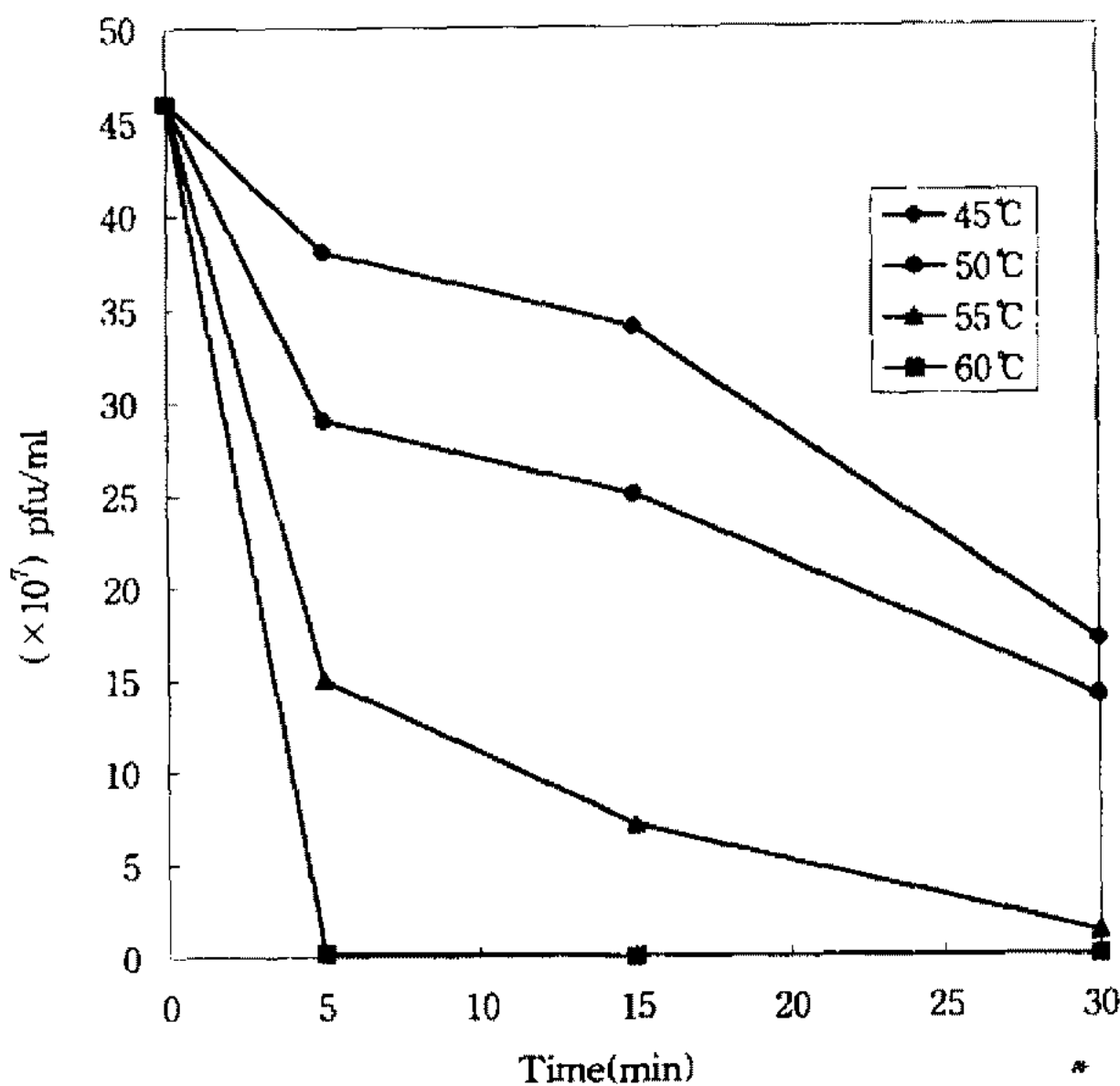


Fig. 4. Heat stability of the *Lactobacillus plantarum* bacteriophage SC 921.

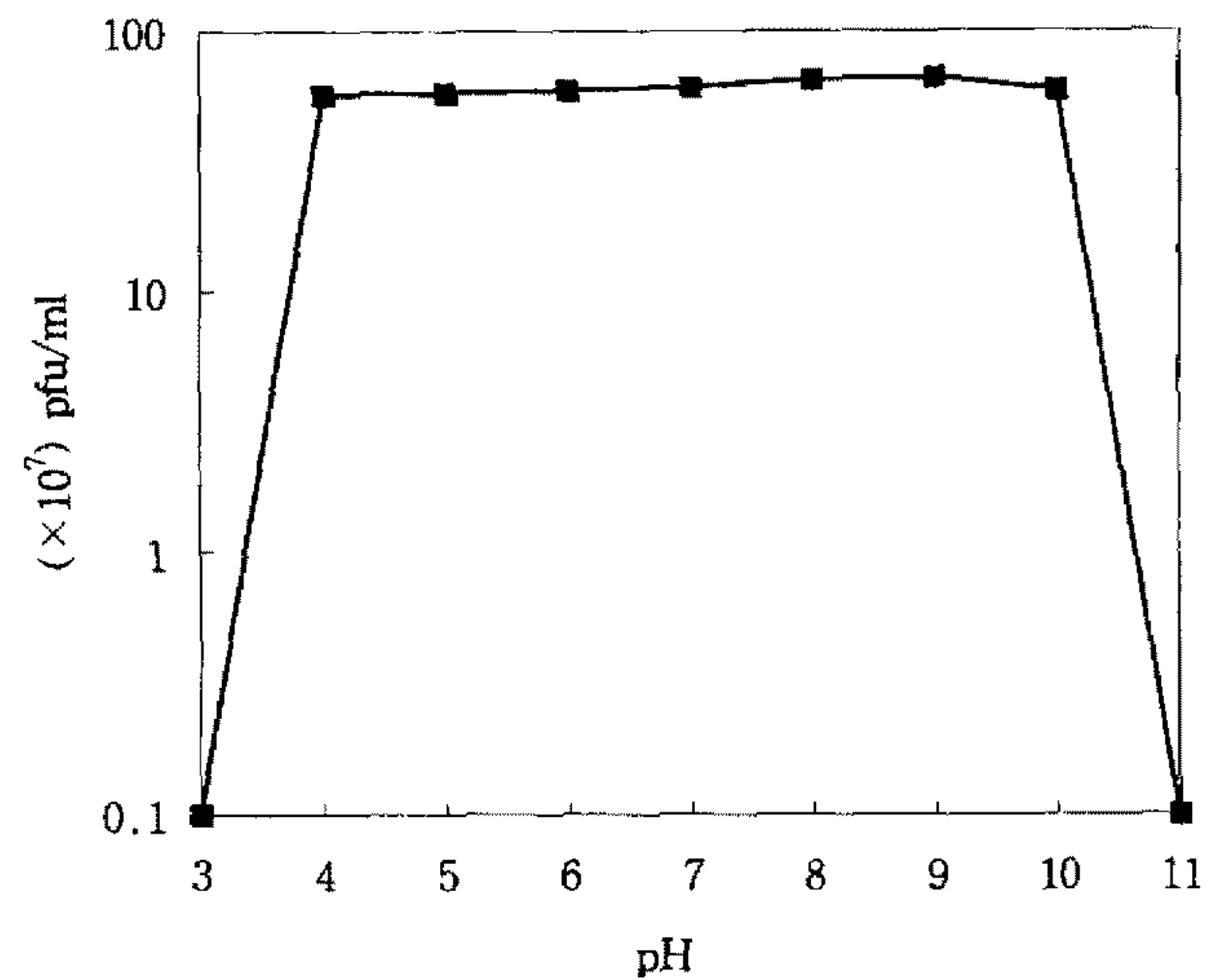


Fig. 5. pH stability of the *Lactobacillus plantarum* bacteriophage SC 921.

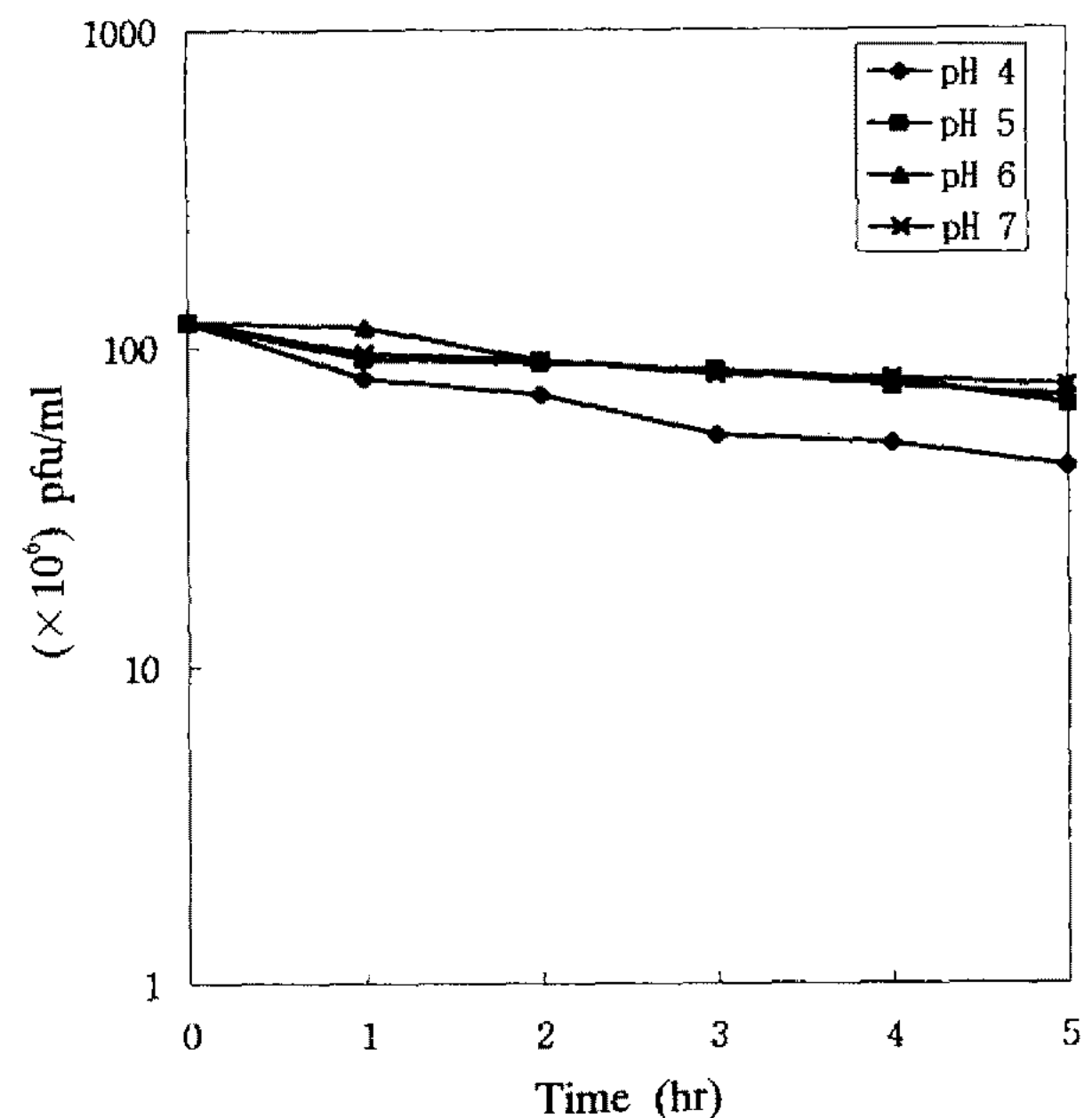


Fig. 6. Inactivation of *Lactobacillus plantarum* bacteriophage SC 921 at different pH.

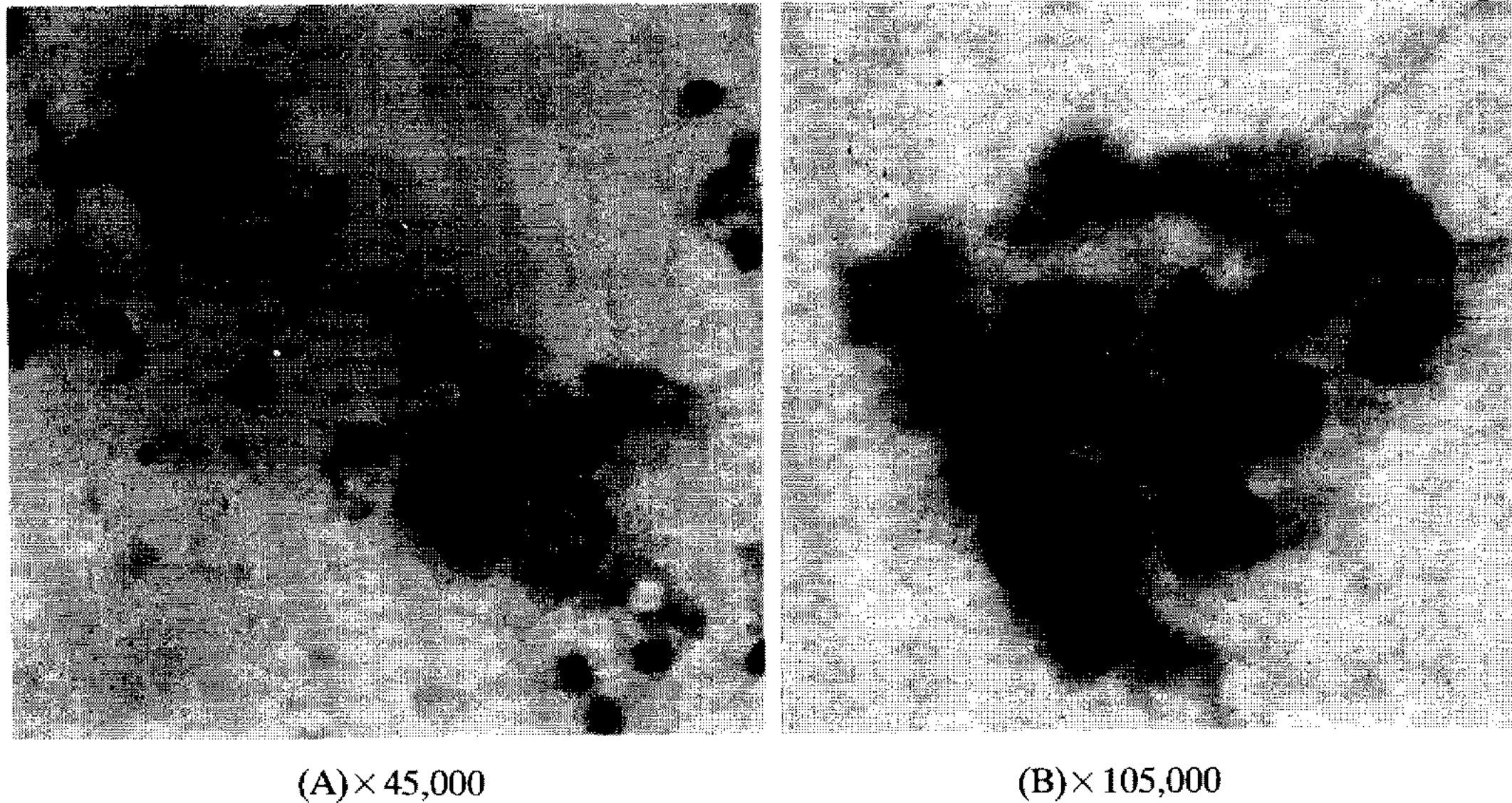


Fig. 7. Electron micrograph of the *Lactobacillus plantarum* bacteriophage SC 921.

구에서 분리한 *L. plantarum* bacteriophage를 negative staining 방법으로 염색한 후 전자현미경을 이용하여 45,000배와 105,000배로 확대하여 그 형태를 관찰한 결과 꼬리는 없고 head만이 존재하는 특징적인 형태의 phage로 관찰되었다. Head의 모양은 Fig. 7과 같이 전체적으로 계란형을 나타냈으며 직경은 약 80~120 nm인 것으로 나타났다.

요 약

Lactobacillus plantarum bacteriophage를 이용하여 김치의 저장성을 향상시키기 위한 기초실험으로 서울 및 강원도 일원의 대중 음식점에서 수집한 김치로부터 *Lactobacillus plantarum*를 용균시키는 bacteriophage를 분리하는데 성공하였으며, 분리된 phage를 *L. plantarum* bacteriophage SC 921이라 명명하였다. 이 phage의 생리적 특징을 살펴본 결과는 다음과 같았다. 숙주에 대한 흡착은 10분만에 최대 흡착율에 도달하였으며 Ca-independent한 흡착 양식을 보여주었다. 잠복기(latent period)은 약 100분 이었고, rise period은 약 120분 이었으며, 평균방출량(burst size)은 약 31(\pm 2) pfu/infected cell이었다. 열안정성을 측정된 결과 60°C에서 5분 반응 후에는 생존율이 2% 정도로 매우 낮았다. 이 phage는 pH 4~10에서는 대체적으로 안정하였으나, pH 3 이하나 pH 11 이상에서는 거의 모두 사멸하였다. 또한 공시한 유산균중 *Lactobacillus plantarum*만 특이적으로 용균시키는 것으로 나타났다. 전자현미경을 이용하여 최대 105,000배로 확대하여 그 형태를 관찰한 결과 수축성 꼬리는 없고 계란형의 head(직경 80-120 nm)만으로 구성된 특징적인 형태의 phage로 관찰되었다.

감사의 말

본 연구는 과학재단 1996년도 핵심연구비(과제번호 961-0502-020-2)의 지원에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김치의 과학. 1994. 김치의 과학 심포지움 논문집. pp 43-65, 한국식품과학회. 서울.
2. 심선택, 경규향, 유양자. 1990. 김치에서 젖산균의 분리 및 이들 세균들의 배추즙액 발효. 한국식품과학회지. **22**: 273.
3. 민태익, 권태완. 1984. 김치발효에 대한 온도 및 소금 농도의 영향. 한국식품과학회지. **16**: 443.
4. 박현근, 임종락, 한홍희. 1990. 각 온도에서 김치 발효중 미생물의 천이 과정. 인하대학교 기초과학연구소 논문집. 제11집. p161.
5. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. p 585. Williams and Wilkins Co, Baltimore.
6. De Man, J. C., Rogosa, M., and Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **13**: 289-296.
7. Terzaghi, E. and Terzaghi, B. E. 1978. Effect of lactose concentration on the efficiency of plating of bacteriophage on *Streptococcus cremors*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 471.
8. Herrero, M., Reyes-Gavilan, C. G. de los, Caso, J. L. and Suarez, J.E. 1994. Characterization of ϕ 393-A2, a bacteriophage that infects *Lactobacillus casei*. *Microbiology.* **140**: 2585-2590.
9. Chow, J. J., Batt, C. A. and Sinskey, A.J. 1988. Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1138-1142.

10. Trevors, K. E., Holley, R. A., and Kempton, A. G. 1983. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage isolated from a meat starter culture. *J. Appl. Bacteriol.* **54**: 281-288.
11. Ackerman, H. W., Audurler, A., Berthiaume, L., and Jones, L. A. 1978. *Guidelines for bacteriophage characterization*. In *Advances in Virus Research*. Lauffer(ed.), pp. 1-24. New York, Academic Press.
12. Leuschner, R. G. K., Arendt, E. K. and Hammes, W. P. 1993. Characterization of a virulent *Lactobacillus sake* phage PWH2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 617.
13. Hayes, W. 1984. The genetics of bacteria and their viruses. 2nd ed. pp 121-125. CBS Publ. Co. New Delhi, India.
14. Heap, H. A. and Jarvis, A. W. 1980. A comparison of prolate and small isometric headed lactic streptococcal bacteriophages., *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **15**: 75-81.

(Received 20 November 1996)