

## **Lactobacillus plantarum Bacteriophage SC 921의 phage particle protein 및 genome의 특성**

김재원 · 신영재 · 심영섭 · 유승구<sup>1</sup> · 윤성식\*

연세대학교 생물자원공학과, <sup>1</sup>연세대학교 생명공학과

**Phage Particle Proteins and Genomic Characterization of the *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage SC 921.** Kim, Jae-Won, Young-Jae Shin, Young-Sup Shim, Seung-Ku Yoo<sup>1</sup>, Sung-Sik Yoon\*. Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea, <sup>1</sup>Department of Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea – Bacteriophage SC 921 of *Lactobacillus plantarum*, isolated from kimchi, showed high lytic effects at 0.2 M.O.I. level. The phage particle contained 4 major proteins (48, 34, 32, 29 kDa). Intact DNA of phage SC 921 is a double stranded linear molecule, and the genomic size is approximately 66.5 kilobase pairs (kbp). Restriction analysis of the genome showed that *Sma* I gave single site cut and *Xba* I gave 2 site cuts, while *Cla* I, *Kpn* I, and *EcoR* I formed 4, 5, and 6 cuts, respectively. *Hind* III digested phage DNA to many fragments. A restriction map of genomic DNA was constructed using the restriction endonuclease *Kpn* I, *Sma* I, and *Xba* I. Bacteriophage SC 921 was compared with B2 phage which had been reported to infect *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014(KCCM 11322). Bacteriophage SC 921 differs from B2 phage at least in the size of its genome and phage particle proteins.

**Key words:** characterization, *Lactobacillus plantarum*, bacteriophage, *Kimchi*

Bacteriophage는 1917년 프랑스의 Herelle이 환자의 분변을 제균한 여액이 질병균 배양액을 투명하게 용해시킨다는 사실을 발견하고 이 물질을 초미생물이라 생각하여 bacteriophage라고 명명하였다[6].

Phage는 독자적으로 증식이 불가능하고 숙주세균의 세포 안에 침입하여 증식한다. 한개의 phage가 숙주세균 안에 들어가서 새로운 phage를 만드는데, 그 수(burst size)가 매우 다양하며 증식속도가 세균보다 매우 빠르다. phage는 자신이 인식할 수 있는 수용체가 정해져 있으므로 세균에 대한 host range가 매우 좁다[10].

Bacteriophage의 전형적인 생활환은 phage의 꼬리 부분이 숙주균의 세포벽에 흡착(adsorption)과 유전전달 물질(DNA 또는 RNA)의 주입(injection) 단계를 거쳐, 숙주세포 안에서 복제(replication), 번역(translation) 및 조립(assembly), 그리고 방출(release)의 순서로 진행된다[6].

phage가 특정 세균의 세포벽에 존재하는 수용체에 흡착하여 자신의 유전물질을 숙주 세포 내로 침투시키면, 이 유전 전달물질은 숙주 중에서 자기의 유전전달물질을 복제하고, 단백질합성을 하며, 유전물질과 합성된 각 단백질을 조립하여 완전한 여러 개의 phage particle을 함

성한 다음 숙주세포를 용균(lysis) 시켜 밖으로 방출되는 것이다. 또한 단백질 합성시 숙주세포막을 분해하기 위한 lytic enzyme(endolysins)을 생산하게 되는데, 이는 peptidoglycan을 분해하는 역할을 하는 것으로 일반적으로 muramidase로 밝혀진 것이 많다[2]. Gram 양성균의 경우 outer membrane이 없고, 바깥쪽에 peptidoglycan이 두껍게 자리잡고 있으므로 이 enzyme에 의해 분해되었을 경우 phage는 세포 밖으로 나올 수 있고 숙주균은 사멸하게 된다. 또한 phage의 형태를 이루는 단백질들은 여러개의 particle로 이루어져 있는데, 이들의 구조적인 결합에 따라 다양한 형태를 가지게 된다.

현재까지 연구된 *Lactobacillus* 속 phage로는 *L. casei* [9], *L. sake*[13], *L. bulgaricus*[4], *L. acidophilus*[1], *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[12], *L. helveticus*[18], *L. delbrueckii* subsp. *lactis*[7], *L. gasseri*[8], *L. plantarum*[3, 16, 19] 등을 숙주균으로 하는 것들이 있다. 이들 중에서 *Lactobacillus plantarum*을 용균시키는 bacteriophage에 관하여 국내에서는 보고된 바가 전혀 없고, 외국에서도 발표된 연구가 몇 없다. 특히 phage DNA의 구조와 관련된 연구보고는 단 한편 밖에 없으며[16], DNA 염기서열에 관한 정보는 아직까지 발표된 바가 없다.

본 연구는 전보[20]에서 김치의 저장성 향상을 목적으로 분리한, *L. plantarum*을 용균시키는 bacteriophage SC 921의 phage particle protein의 구성, phage와 숙주

\*Corresponding author  
Tel. 82-371-760-2251, Fax. 82-371-763-4323  
E-mail: sunsik@dragon.yonsei.ac.kr

균과의 비율에 따른 용균효과 측정, phage DNA의 구조를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용배지

*Lactobacillus plantarum*의 계대배양과 bacteriophage의 증식을 위해서 MRS 배지(Difco, USA)에  $\text{CaCl}_2$ 를 0.1 M 첨가하여 사용했으며, 분리한 bacteriophage의 배양 및 titer 측정을 위해서는 MRS broth, MRS 한천배지(MRS broth+1.5% agar) 및 MRS 연한천배지(MRS broth+0.7% agar)를 사용하였다.

### 사용균주

분리한 bacteriophage의 숙주균으로서는 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에서 분양받은 *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322와 *L. plantarum* KCCM 12116 및 본 실험실에서 분리한 *L. plantarum* YSD-1, *L. plantarum* YSD-2를 MRS 한천배지에서 2주간격으로 계대배양하면서 각각 사용하였다.

### M.O.I. 수준에 따른 탁도의 변화

Bacteriophage와 숙주간의 비율을 각각 0.002, 0.02, 0.04, 0.2가 되도록 접종한 후 37°C에서 배양하면서 숙주로 사용한 *L. plantarum* 용균됨에 따라 일어나는 탁도의 변화를 600 nm에서 U.V. spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu)를 사용하여 1시간 간격으로 측정하였다.

### Phage particle protein의 분석

Bacteriophage 용액( $3.0 \times 10^{10}$  p.f.u./ml)과 PEG 6000 용액(9% PEG 6000, 0.5 M NaCl)을 혼합하여 열음중에서 30분간 방치한 후  $7,800 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 침전한 bacteriophage particle을 SM buffer로 현탁시킨 다음 100°C에서 3분간 boiling하여 denaturation 시켰다 [14]. 단백질 전기영동은 SDS-polyacrylamide gel은 Laemmli[11] 등의 방법에 따라 조제하였으며 시료와 표준단백질은 12.5% acrylamide gel상에서 30 mA, 100 V로 전기영동하였다. 전기영동에 사용한 표준단백질은 phosphorylase B(97 kDa), bovine serum albumin(66 kDa), ovalbumin(45 kDa), carbonic anhydrase(31 kDa), soybean trypsin inhibitor(21 kDa), lysozyme(14 kDa)을 적당량 혼합하여 사용하였다. 전기영동 후 gel을 Coomassie brilliant blue(Sigma, USA)로 염색하고, methanol 10%(v/v)와 glacial acetic acid 10%(v/v)을 섞어 만든 탈색용액에서 탈색하였다. 사진 촬영은 color film(ASA 100)을 이용하고, micro 렌즈 사진기

(Minolta X-370)로 촬영하였다.

### Intact DNA의 형태분석

Intact DNA가 linear form 인지 circular form인지를 알아내기 위하여 Exo III(DNA의 3'→5' exonuclease)로 37°C에서 30분간 반응시킨 후, S1 nuclease로 다시 30분간 반응시켜서 DNA의 size가 줄어드는지 여부를 전기영동을 하여 관찰하였다[14].

### Restriction enzyme pattern 및 bacteriophage DNA의 크기 관찰

Bacteriophage의 DNA분리는 Sambrook 등[17]의 방법을 변형하여 실시하였으며, 분리한 phage DNA의 restriction enzyme pattern을 간단히 보기 위해 *Hind* III, *Eco* RI, *Sma* I, *Kpn* I, *Cla* I으로 37°C에서 2시간 동안 digestion하였다.

전체 DNA의 genome size를 측정하기 위해 restriction enzyme pattern에서 가장 많은 절단부위를 나타내는 enzyme으로 digestion 한 후 0.7%의 agarose gel에 전기영동하고,  $\lambda$  phage DNA를 *Hind* III로 digestion시킨 marker(Promega Co., USA)와 비교하여 크기를 확인하였다.

### Bacteriophage DNA의 restriction enzyme mapping

*Sma* I, *Kpn* I, *Xba* I의 세가지 enzyme으로 single 및 double digestion(*Sma* I; 25°C-2h, *Kpn* I, *Xba* I; 37°C-2h)하고, 전기영동을 한 후 특정 band를 gel elution (GENECLEAN II® Kit, BIO 101 Inc.)하여 확인함으로서 mapping을 실시 하였다[15].

### DNA 전기영동

전기영동은  $0.5 \times$  TBE 완충용액(0.045 M Tris-borate, 0.001 EDTA) 및 0.7% agarose 수평 gel을 이용하여 100 V에서 1-2시간 실시하였다. 전기영동 후 gel을 0.1 g/ml의 ethidium bromide 용액에서 30분간 염색한 후 U. V. illuminator(SL-20, Seoulin Sci. Co., Korea)로 관찰하였다. 전기영동한 gel 사진은 micro렌즈와 U. V. 및 red filter를 부착한 사진기(SL-5GD-photographic system, Seoulin Sci. Co., Korea)에 polaroid 흑백 필름(Kodak 667)을 사용하여 촬영하였다.

## 결과 및 고찰

### M.O.I 수준에 따른 용균효과의 측정

M.O.I가 0.2일 경우 용균이 가장 빠르게 진행되어 7시간 후에는 혼탁도가 초기값에 도달하였다(Fig. 1). M.O.I가 0.002, 0.02, 0.04일 경우 24시간 후에도 용균현상이

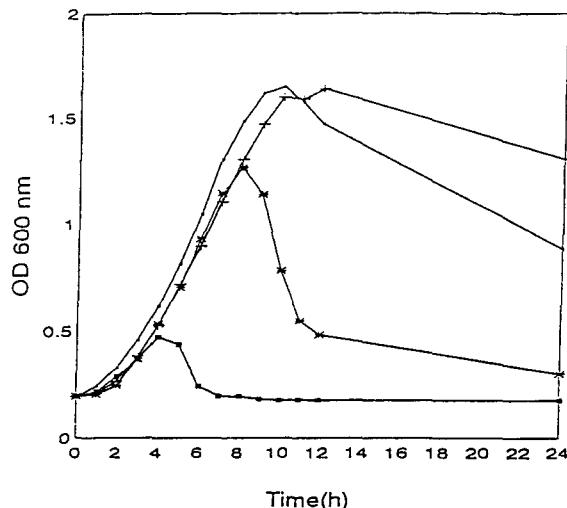


Fig. 1. Spectrophotometric analysis of turbidity showing lytic effects at various M.O.I. levels.

M.O.I. level: ■, 0.002; +, 0.02; \*, 0.04; ▨, 0.2.

느리게 진행되는 것을 관찰할 수 있었다.

#### Phage particle protein의 분석

분리한 bacteriophage의 particle protein<sup>o</sup> 몇 개의 구조적 단백질로 구성되어 있는지 알아보기 위해서 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 4개의 major

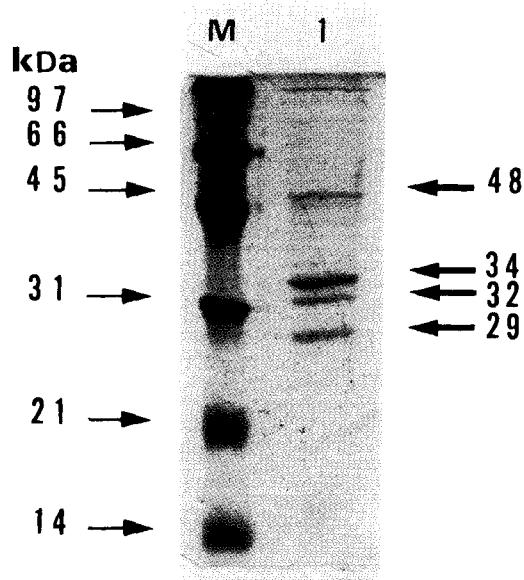


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of phage particle proteins.

M: marker proteins (phosphorylase: 97 kDa, BSA: 66 kDa, ovalbumin: 45 kDa, carbonic anhydrase: 31 kDa, soybean trypsin inhibitor: 21 kDa, lysozyme: 14 kDa), lane 1: phage particle proteins.

band로 나타났는데 각각의 분자량은 48, 34, 32, 29 kDa이었다. Coveney 등[5]이 보고한바에 의하면 *Streptococcus cremoris*와 *Streptococcus lactis*를 감염시키는 phage중 몇몇은 40, 35, 34 kDa의 phage particle protein을 공통으로 가진다고 하였다. 그리고, 지금까지 보고되어온 *L. plantarum* bacteriophage 중에서 capsid protein에 대하여 보고된 것은 B2 phage밖에 없는데 [13] 이는 5개의 main protein으로 각각 37, 32.5, 26, 25, 21 kDa의 단백질로 이루어져 있다고 하였다. B2 phage는 본 실험에서 사용한 *L. plantarum* KCCM 11322(ATCC 8014)를 숙주로 하는 phage로서, 동일 균주를 숙주로 하지만 본 연구의 phage SC 921과 B2 phage와는 구성 단백질이 다르다는 것을 알 수 있다.

#### Bacteriophage DNA의 형태분석

*Exo III*로 30분간 반응시킨 후, single stranded DNA endonuclease인 S1 nuclease로 다시 30분간 반응시켜서 전기영동을 해 본 결과 DNA의 size가 줄어든 것을 확인하였다(Fig. 3). 그러므로 아래의 제한효소에 대한 실험 결과와 더불어 볼 때, SC 921은 linear 형태의 double strand DNA임을 확인 할 수 있었다. Nes 등[19]은 B2 phage의 경우에도 linear form의 double strand의 DNA를 유전전달물질로 가지고 있다고 보고하였다[16].

#### Restriction enzyme pattern 및 genomic DNA의 크기

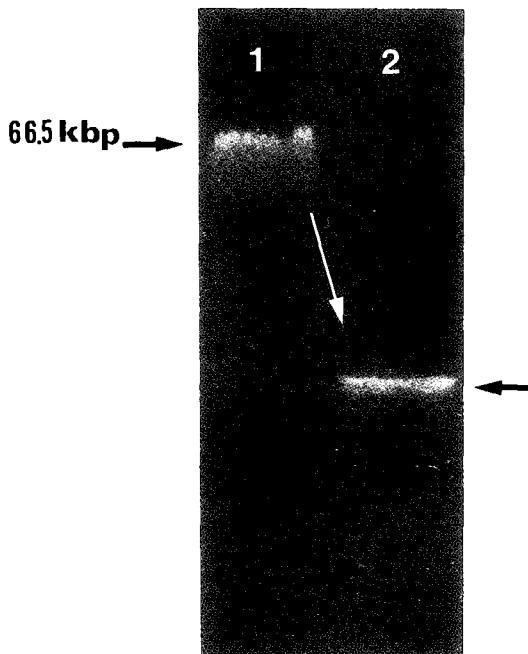
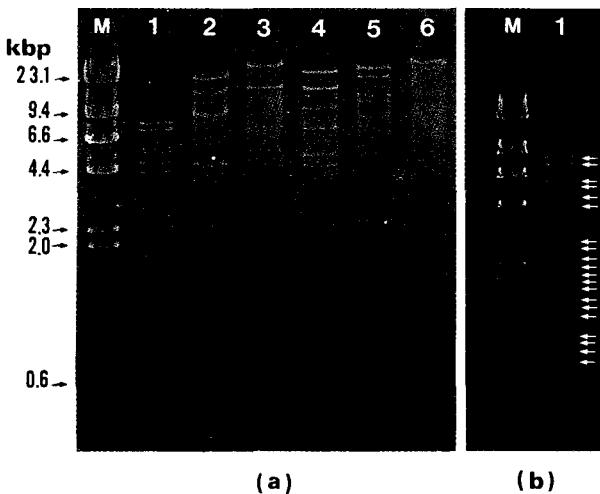


Fig. 3. Agarose gel electrophoretic analysis of phage DNA treated by *Exo III* and S1 nuclease.  
lane 1: intact DNA, lane 2: DNA treated by *Exo III* and S1 nuclease.



**Fig. 4.** 0.7% agarose gel electrophoresis of phage SC 921 DNA digested by various restriction enzymes (a) and *Hind* III digestion for measuring the full size of DNA (b).  
 (a) M:  $\lambda$ -*Hind* III size marker, lane 1: *Hind* III, lane 2: *EcoR* I, lane 3: *Sma* I, lane 4: *Kpn* I, lane 5: *Cla* I, lane 6: intact DNA.  
 (b) M:  $\lambda$ -*Hind* III size marker, lane 1: *Hind* III.

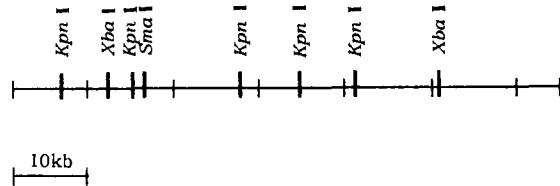
분리한 bacteriophage DNA를 *Hind* III, *EcoR* I, *Sma* I, *Kpn* I, *Cla* I으로 37°C에서 2시간 동안 digestion한 후 electrophoresis를 실시한 결과는 Fig. 4와 같다. B2 phage는 *Xba* I, *Sac* I, *Bgl* I, *Sma* I에 대해 한개의 절단부위를 가지고, *Ava* I은 2개, *Sal* I은 5개의 절단부위를 가지는 것으로 보고되었다[16]. 그러나 phage SC 921은 *Sma* I에 대해서 1개, *Cla* I, *Kpn* I, *EcoR* I에 대해서 각각 최소 4, 5, 6개의 절단부위를 가지고 있고, *Hind* III에 대해서는 절단부위가 매우 많은 것을 알 수 있었다(Fig. 4)... *Xba* I에 대해서도 2개의 절단부위를 가지고 있는 것으로 관찰되었다(Table 1).

DNA의 전체 genome size를 측정하기 위해서 가장 많은 절단부위를 가지는 *Hind* III로 digestion하여 전기영동을

**Table 1.** Fragments induced by restriction enzyme for map of phage DNA

Fragment sizes (kbp)							
<i>Xba</i> I	<i>Sam</i> I	<i>Kpn</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Kpn</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Sma</i> I	
<i>Kpn</i> I	<i>Kpn</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Sma</i> I				
<i>Sma</i> I							
17	*23	*18	*32	*23	*35	*47	
16	16	17	18	17	17	*18	
9.4	9.4	9.4	*13	9.4	*13		
7.5	6.6	7.5	*3.9	6.6			
6.6	4.7	6.6		4.7			
4.7	3.2	4.7		4.1			
4.1	1.0	4.1					
3.2							
1.0							

\*Fragments not shown in triple enzyme digestion.



**Fig. 5.** Restriction map of the genomic DNA of phage SC 921 using the restriction endonuclease *Kpn* I, *Sma* I, and *Xba* I.

실시하여 측정한 결과, 전체 genome size는 약 66.5 kbp 정도였다(Fig. 4). 이는 73 Kbp 정도의 B2 phage와 비교해 볼 때 intact DNA의 크기는 약간 작은 것으로 나타났다.

#### Bacteriophage DNA의 restriction enzyme mapping

*Sma* I, *Kpn* I, *Xba* I의 세 가지 enzyme으로 single digestion, double digestion하고(Table 1), gel elution과 enzyme digestion(data not shown)하여 mapping하였다(Fig. 5). B2 phage의 restriction enzyme mapping과 비교해 본 결과 *Sma* I의 절단점의 수는 같으나 그 위치가 다르고, *Xba* I의 절단부위의 수로 보아도 SC 921, B2가 각각 2개, 1개로 서로 다른것을 알 수 있다.

## 요약

김치로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum* bacteriophage SC 921은 M.O.I가 0.2일 경우 용균효과가 빠르게 진행됨을 알 수 있었고, SDS-PAGE를 실시하여 phage particle protein을 조사해 본 결과 4개의 major protein으로 구성되어 있는데 이들은 각각 48, 34, 32, 29 kDa으로 구성되어 있다. *Exo* III로 30분간 반응시킨 후 S1 nuclease를 처리하여 DNA의 형태를 조사해 본 결과 intact DNA는 linear form의 double strand를 유전전달 물질로 가지고 있었다. 제한효소에 대한 절단 효과를 조사한 결과, *Sma* I에 대해서 1개, *Xba* I, *Cla* I, *Kpn* I, *EcoR* I에 대해서 각각 2, 4, 5, 6개의 절단부위를 가지고 있으며, *Hind* III에 대해서는 절단부위가 매우 많은 것을 알 수 있었다. *Hind* III를 이용하여 intact DNA의 genome size를 측정해본 결과 약 66.5 kbp정도였다. 위의 실험결과와 restriction enzyme mapping을 통해 기존에 알려진 bacteriophage B2와 비교해본 결과 숙주균주는 같으나 단백질적인 구조나 유전전달물질로 본 구조는 서로 다름을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구비(961-0502-020-2)의 부분적인 지원에 의해 이루어졌습니다.

### 참고문헌

1. Barefoot, S. F., J. L. McArthur, J. K. Kidd, and D. A. Grinstead. 1990. Molecular evidence for lysogeny in *Lactobacillus acidophilus* and characterization of a temperate bacteriophage. *J. Dairy Sci.* **73**: 2269–2277.
2. Boizet, B., Y. Lahbib-Mansais, L. Dupont, P. Ritzenthaler, and M. Mata. 1990. Cloning, expression and sequence analysis of an endolysin-encoding gene of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage mv1. *Gene* **94**: 61–67.
3. Caso, J. L., C. G. de los Reyes-Gavilan, M. Herrero, A. Montilla, A. Rodriguez, and J. E. Suarez. 1995. Isolation and characterization of temperate and virulent bacteriophages of *Lactobacillus plantarum*. *J. Dairy Sci.* **78**: 741–750.
4. Chow, J. J., C. A. Batt, and A. J. Sinskey. 1988. Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1138–1142.
5. Coveney, J. A., G. F. Fitzgerald, and C. Daly. 1987. Detailed Charaterization and comparison of four lactic streptococcal bacteriophages based on morphology, restriction mapping, DNA homology, and structural protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1439–1447.
6. Dimmock N. J. and S. B. Primrose. 1974. *Introduction to Modern Virology*, pp. 1–16. 4th(ed). Blackwell Science.
7. Forsman, P. and T. Alatossava. 1991. Genetic variation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophages isolated from cheese processing plants in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1805–1812.
8. Henrich, B., B. Binishofer, and U. Blasi. 1995. Primary structure and functional analysis of the lysis genes of *Lactobacillus gasseri* bacteriophage Φadh. *J. Bacteriol.* **177**: 723–732.
9. Herrero, M., C. G. de los Reyes-Gavilan, J. L. Caso, and J. E. Suarez. 1994. Characterization of φ 393-A2, a bacteriophage that infects *Lactobacillus casei*. *Microbiology* **140**: 2585–2590.
10. Jarvis, A. W. 1989. Bacteriophage of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **72**: 3406–3428.
11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
12. Lahbib-Mansais, Y., B. Boizet, L. Dupont, M. Mata, and P. Ritzenthaler. 1992. Characterization of a temperate bacteriophage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and its interactions with the host cell chromosome. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1139–1146.
13. Leuschner, R. G. K., E. K. Arendt, and W. P. Hammes. 1993. Characterization of a virulent *Lactobacillus sake* phage PWH2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 617–622.
14. Mariko S. K., 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.
15. Nakashima Y., H. Ikeda, Y. Kita, F. Miake, and K. Watanabe. 1994. Restriction map of genomic DNA of *Lactobacillus casei* bacteriophage PL-1 and nucleotide sequence of its cohesive single-stranded ends. *J. Gen. Virol.* **75**: 2537–2541.
16. Nes, I. F., J. Bredehaug, and K. O. von Husby. 1988. Characterization of the bacteriophage B2 of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Biochimie* **70**: 423–427.
17. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, pp. 260–289. 2nd(ed). Cold Spring Harbor. NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
18. Sechaud, L., M. Rousseau, B. Fayard, M. L. Callegari, P. Quenee, and J.-P. Accolas. 1992. Comparative study of 35 bacteriophages of *Lactobacillus helveticus*. Morphology and host range. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1011–1018.
19. Trevors, K. E., R. A. Holley, and A. G. Kempton. 1983. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage isolated from a meat starter culture. *J. Appl. Bacteriol.* **54**: 281–288.
20. Yoon, S. S., Y. J. Shin, H. J. Choi, S. Her, and D. H. Oh. 1997. Isolation and characterization of the *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage SC 921. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 96–101.

(Received November 15, 1997)