

## *Lactobacillus casei* Bacteriophage의 分類 및 特性에 관한 研究

金永昌·朴敏哲\*·姜國熙\*\*·尹永皓\*\*\*·李光雄

(서울大 自然大·\*聖心女大·\*\*成均館大 農大·\*\*\*韓國야쿠르트乳業)

### Classification and Characterization of Bacteriophages of *Lactobacillus casei*

KIM, Young Chang, Min Chul PARK\*, Kook Hee KANG\*\*,  
Young Ho YOON\*\*\* and Kwang-Woong LEE

(Coll. Natural Sci., Seoul Nat. Univ., \*Song-Sim Coll. Women, \*\*Coll. Agr.,  
Sung Kyun Kwan Univ., and \*\*\*Han Kuk Yakult Co.)

#### ABSTRACT

Phages of *Lactobacillus casei* (PLC) isolated from plant drainage were classified and characterized. The results are as follows:

1. On the basis of host range pattern, phages could be divided into 2 groups (PLC-B and PLC-C). PLC-B group phages could be further divided into 5 sub-groups ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_4$  and  $B_5$ ). Although PLC-C group phages had the same host range, they could be also divided into 2 sub-groups ( $C_1$  and  $C_2$ ) by morphological type.

2. It was  $B_3$  group phages that represented a major proportion (44.4%) of phages tested. However,  $B_1$  group phages were shown to have the widest host range.

3. Electron micrographs revealed that the phages fell into three different morphological types.  $B_1$ ,  $B_2$  and  $B_3$  group phages had a hexagonal head (52 nm in diameter) and a sheathless noncontractile tail (245 nm in length).  $B_4$  and  $C_2$  group phages had a hexagonal head (56 nm) and a short flexible tail (169 nm) having no sheath.  $B_5$  and  $C_1$  group phages were shown to have a hexagonal head (81 nm) and a contractile tail (140 nm) having a sheath, a base plate and tail fibers.

4. The inactivation of the phages by antisera indicated that serological relationships correlated completely with morphological types.

5.  $B_1$ ,  $C_1$  and  $C_2$  group phages produced a large (1.2 mm in diameter) plaque with a clear ring. The morphology of plaques of  $B_3$  and  $B_5$  group phages was the same as those produced by the above, but the average plaque sizes for  $B_3$  and  $B_5$  were 0.8 mm and 0.5 mm, respectively.  $B_2$  and  $B_4$  group phages produced a small (0.5 mm) turbid plaque with an irregular edge.

6. The latent period and the average burst size of both  $B_1$  and  $B_3$  group phages were 90 min and 100, respectively. These phages required calcium ions for their multiplication.

7.  $B_3$  group phages could not be adsorbed to R-variant  $KC_1$ .

8. The order of resistance of phages to heat was  $B_2 > B_1, B_4$  and  $B_5 > B_3$  and  $C_2$ .  $B_5$  group phages were more stable than  $B_3$  in various pH values.  $C_2$  group phages were more sensitive to UV irradiation than  $B_1$  and  $B_3$  group phages.

9. Strains YIT 9018 and IAM 1043 were induced by mitomycin C treatment. Phage particles detected in the lysates had a hexagonal head (38 and 49 nm, respectively), but no tail. Any sensitive indicator strain could not be isolated in spite of repeated trials.

## 緒 論

最近 國內의 醱酵乳 消費量이 急増현에 따라 많은 醱酵乳 生産工場이 세워지고 있으며 그 生産量도 增加一路에 있다. 이와 함께 莫大한 財政的 損失을 招來하는 phage의, 感染防止에 대한 관심도 漸次 높아져 가고 있다.

外國의 境遇에는 오래 前부터 phage의 感染防止를 위하여 많은 研究가 遂行되어져 왔다. Collins *et al.* (1950)은 phage가 增殖하기 위해서는 칼슘이 필요하다는 事實에 着眼하여 磷酸이나 citrate를 處理하여 牛乳에 存在하는 칼슘을 除去한 phage-resistant medium (PRM)을 開發하였으며, Reiter(1956)은 이온교환법을 이용하여 PRM을 제조하였다. 그러나 이러한 PRM培地에서는 *Leuconostoc*을 包含한 여러 菌株가 잘 자라지 못하며 몇몇 乳酸球菌 phage는 칼슘을 要求하지 않는다는 Sozzi(1972)의 報告를 考慮한다면 실용화에는 한계가 있는 것으로 보인다.

다른 하나의 方法은 phage 抵抗變異菌株를 利用(Marshall and Berridge, 1976)하여 phage 感受性 樣式이 서로 다른 菌주를 混合培養하는 것이다. 이 方法은 한 菌주가 phage의 感染을 받아 溶菌되더라도 다른 菌주는 이 phage에 대해서 抵抗性이 있기 때문에 醱酵에는 별 支障이 없게 된다. 또한 phage感受性 樣式이 서로 다른 starter를 번갈아 使用하는 starter rotation system(Collins, 1955; Lawrence *et al.*, 1976)은 매우 効果的인 方法이다. 이는 어떤 特定한 phage에 대한 宿主菌을 starter로 使用하지 않는 동안은 工場排水系에 그 phage의 수가 현격히 減少하기 때문이다. 이러한 方法을 効果的으로 수행하기 위해서는 主된 汚染源인 工場排水系에 存

在하는 phage의 분포를 把握할 필요가 있다(Sakurai *et al.*, 1969).

Phage의 分類에는 宿主域, 形態學的 特性, 血清學的 特性 外에 여러가지 生理學的 特性 등이 利用되고 있으나(Adams, 1952; Coetzee *et al.*, 1960; Zottola and Marth, 1966; Bradley, 1967), 宿主域은 돌연변이에 의해서 쉽게 變換 수 있기 때문에 그 重要性에 있어서 形態學的 特性이나 血清學的 特性보다는 낮게 評價되고 있다. 그러나 實際 醱酵上에 있어서의 問題點은 starter의 phage感受性이기 때문에 starter rotation system을 確立하기 위해서는 宿主域이 가장 重要한 要素가 되어야만 한다(Chopin *et al.*, 1967).

本 實驗에서는 이러한 觀點에서 工場排水系에 存在하는 phage를 純粹 分離하여 指示菌의 感受性에 의해 分類하고 各種 phage의 形態學的 特性, 血清學的 特性과 기타 몇 가지의 特性을 比較 檢討하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 菌 株

本 實驗에서 使用한 *Lactobacillus casei* 菌株는 Table 1과 같이 血清學的으로 B型菌이 10株, C型菌이 4株이었으며, 工場排水系로부터 phage를 分離하기 위한 宿主菌으로는 S-1株(B型菌)와 IAM 1045株(C型菌)를 使用하였다.

Table 1. *L. casei* strains used in this study

Strains	Serological groups	Origin/Source
S-1	B	Yakult Institute, Japan
SG-R	B	Yakult Institute, Japan
YIT 9018	B	Yakult Institute, Japan
NG1	B	Streptomycin resistant mutant

		of S-1, obtained by NG* mutagenesis	ØBN	Plant drainage, 1979. 8. 29.
			K2	Plant drainage, 1979. 12. 27.
KC1	B	Rough colonial variant of S-1, selected by phage TK93 inf- ection	Ø4	Plant drainage, 1980. 2. 9.
			Ø5	Plant drainage, 1980. 2. 9.
			Ø6	Plant drainage, 1980. 2. 9.
BN3	B	Commercial starter	Ø7	Plant drainage, 1980. 2. 9.
PR1	B	Phage resistant mutant of YIT 9018, obtained by NG* muta- genesis	Ø9	Plant drainage, 1980. 2. 9.
			LK1	Plant drainage, 1980. 2. 9.

PR5	B	"
PR35	B	"
PR46	B	"
IAM 1043	C	Institute of Applied Microbiol- ogy, Tokyo University
IAM 1045	C	"
YIT 0003	C	Yakult Institute, Japan
YIT 0015	C	Yakult Institute, Japan

\*NG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

## 2. Phage 株

本實驗에서 사용한 phage는 Table 2와 같으며 phage는 야쿠르트工場排水系로부터 3회의 溶菌斑(plaque)分離에 의하여 純粹分離한 後使用하였다.

Table 2. Phage strains of *L. casei* used

Phage strains	Origin/Source
J1	Yakult Institute, Japan
NHc	Yakult Institute, Japan
FYc	Yakult Institute, Japan
TK6	Plant drainage, 1976. 6. 23.
TK93	Plant drainage, 1976. 6. 23.
PD1	Plant drainage, 1978. 9. 21.
PD2	Plant drainage, 1978. 9. 21.
PD3	Plant drainage, 1978. 9. 21.
PD4	Plant drainage, 1978. 9. 21.
PD5	Plant drainage, 1978. 9. 21.
CP1	Plant drainage, 1978. 9. 21.
CP2	Plant drainage, 1978. 9. 21.
K1	Plant drainage, 1979. 7. 13.
TK79	Plant drainage, 1979. 7. 13.
Ø1	Plant drainage, 1979. 8. 4.
Ø2	Plant drainage, 1979. 8. 4.

## 3. 培地

宿主菌과 phage 증식에 사용한 培地는 MRT 培地(Murata *et al.*, 1969)로서 그 組成은 glucose 10 g, peptone 10 g, sodium acetate 10 g, yeast extract 5 g, beef extract 3 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.5 g, NaCl 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 0.01 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001 g, 증류수 1,000 ml로서 pH를 6.0으로 조정한 후 121°C에서 15分間 加壓殺菌하였다. 한천 농도는 下層培地는 1.2%, 上層培地는 0.6%였다.

## 4. Phage의 定量

Phage의 定量에는 Adams (1959)의 重層法에 의한 溶菌斑 計數法을 使用하였다.

## 5. Phage溶菌液의 調製

### 1) 毒性(virulent) phage

代數期 初期의 宿主菌(S-1, IAM 1045)培養液에 phage를 M.O.I. 약 0.05로 感染시켜 (Khosaka, 1977) 37°C에서 靜置 培養하였다. 培養期間 동안 溶菌을 把握하기 위해서 Klett-Summerson 比色計(filter No. 66)로 濁度を 測定하였다.

### 2) 溶原(temperate) phage

溶原菌(YIT 9018, IAM 1043)을 最終濃度 4.0 µg/ml의 mitomycin C(MC)로 處理하였다 (Ishiwa and Sakurai, 1972). 溶菌 現象의 觀察은 위에서 言及한 바와 같다.

## 6. Phage 溶菌液의 濃縮 및 精製

Phage液의 濃縮 및 精製는 Yamamoto *et al.* (1970)의 方法을 약간 수정하여 使用하였다.

### 1) 濃縮

Phage液 2 l를 中和시킨 후 MgCl<sub>2</sub>를 0.005 M의 농도로 첨가하고 DNase와 RNase(Miles Laboratories, Ltd)를 각각 1 µg/ml 加하고 상온에서 1時間 처리하였다. 3,000×g에서 20分間 원심

분리하여 殘渣를 버리고 上清液에 10%(w/v) PEG 6,000을 加하고 다시 1 M NaCl을 加한 뒤 4°C에서 1夜 放置하였다. 그 後 8,000×g에서 10分間 원심분리하여 phage를 침전시킨 후 다시 20 ml의 J<sub>1</sub> buffer (Khosaka, 1977)에 현탁하여 약 100배 농축하였다(Fig. 1).

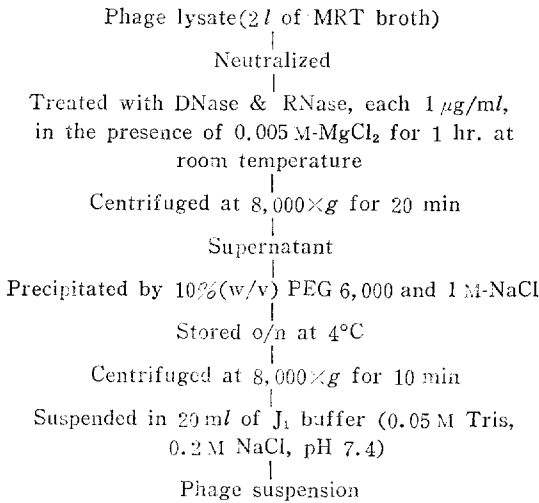


Fig. 1. Concentration of bacteriophages.

2) 精 製

濃縮된 phage 현탁액을 저속원심분리(2,500×g, 10分間)하여 잔사는 버리고 상청액 18 ml를 Fig. 2와 같이 20 ml의 CsCl step gradient( $\rho$ : 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7 溶液 각 4 ml)상에 加한 후 10°C에서 23,000 rpm으로 4時間 동안 원심분리하였다. 이때 使用한 초원심분리기는 MSE Superspeed 65 Mk. 3형이었으며 6×38 ml(aluminum) swing-out rotor를 부착하여 使用하였다.

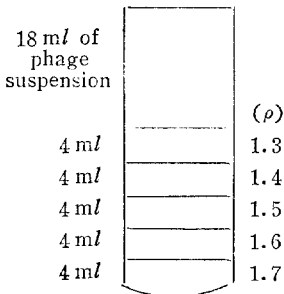


Fig. 2. Schematic representation of CsCl step gradient used for bacteriophage purification. Gradient was run for 4 hours at 23,000 rpm as described in the text.

7. 電子顯微鏡에 의한 觀察

精製한 phage를 0.1 M-ammonium acetate(pH 7.2) 완충액으로 1夜 透析하여 試料로 使用하였다(De Klerk *et al.*, 1965). Microscopic grid (300 mesh)에 collodion 支持膜을 입히고 그 위에 phage試料를 고정하여 2% phosphotungstate (pH 7.2)로 negative staining (Hayat, 1972)을 한 후 JEOL, JEM T-7 전자현미경으로 60 KV에서 觀察하였다.

8. 中和試驗

J<sub>1</sub> phage의 抗血清을 YP broth(Sakurai *et al.*, 1969)에 K 값이 약 0.2 min<sup>-1</sup>이 되도록 稀釋한 후 2.7 ml를 취해 37°C 恒溫水槽에 넣고 phage 溶菌液(10<sup>8</sup>~10<sup>10</sup> PFU/ml) 0.3 ml를 混合, 40分間處理한 후 生殘 phage數를 測定하였다.

9. 一段増殖 實驗

代數期 初期의 培養液 1 ml와 phage液 1 ml를 섞어 (M.O.I. 약 5) KCN용액을 1/500 M이 되도록 混合한 후 (Clowes and Hayes, 1968) 10分間 放置하였다. 그 후 2回 원심분리하여 洗滌한 후 10 ml의 MRT액체培地에 懸濁하고 이 중 1 ml를 50 ml MRT액체 배지에 接種하여 37°C에서 培養하면서 經時的으로 phage數를 測定하였다.

10. 吸 着

代數期 初期의 宿主菌에 phage液을 感染重도가 0.1~0.3이 되도록 加하여 37°C에서 10分間 吸着시켰다. 그 後 chloroform을 處理하여 遠心分離한 後 上清液의 未吸着 生殘 phage數를 測定하였다(Clowes and Hayes, 1968).

11. 熱耐性

De Klerk *et al.*(1963)이 記述한 바와 같이 55°C 水槽에서 豫熱한 MRT액체 배지 5 ml에 phage溶菌液 0.05 ml를 加하여 熱處理하였으며 經時的으로 試料를 채취하여 氷冷한 MRT액체 배지로 희석하여 生殘 phage數를 測定하였다.

12. pH 安定性

pH 3.5~6.5는 0.1 M citrate-0.2 M sodium phosphate dibasic 완충액을 pH 7.0~7.5는 0.1 M Tris-HCl 완충액을 使用하였으며 완충액 5 ml에 10<sup>9</sup>/ml의 phage液 0.05 ml를 加하고 37°C에서 40分間 處理한 後 生殘 phage數를 測定하였다(Sakurai *et al.*, 1975).



PLC-B5	PD4	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	PD5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PLC-C	NHc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	FYc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	CP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	CP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	LK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	

\* +, lysis of bacterial strain; -, no lysis.

2. 形態學的 特性

*L. casei*의 phage 24株 中 電子顯微鏡으로 形態를 觀察한 것은 B<sub>1</sub>型이 3株(J<sub>1</sub>, Ø<sub>1</sub>, Ø<sub>2</sub>), B<sub>2</sub>型이 1株(K<sub>2</sub>), B<sub>3</sub>型이 6株(TK<sub>93</sub>, TK<sub>79</sub>, TK<sub>6</sub>, PD<sub>1</sub>, PD<sub>2</sub>, PD<sub>3</sub>), B<sub>4</sub>型이 1株(ØBN), B<sub>5</sub>型이 1株(PD<sub>4</sub>), C型이 5株(NHc, FYc, CP<sub>1</sub>, CP<sub>2</sub>, LK<sub>1</sub>)로 모두 17株이었으며 이들의 크기는 Table 4와 같았다. C型 phage 5株는 宿主域이 모두 같았으나 形態는 2種類로 區分할 수 있었기 때문에 C<sub>1</sub>型(NHc, FYc, CP<sub>1</sub>, CP<sub>2</sub>)과 C<sub>2</sub>型(LK<sub>1</sub>)으로 兩分하여 表示하였다.

*L. casei*의 phage는 形態學的으로 크게 3種類로 區分할 수 있었다. 즉 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 및 B<sub>3</sub>型 phage는 Bradley(1967)의 B型 phage에 속하는 것으로서 이들은 52 nm程度의 頭部와 245 nm程度의 긴 尾部로 構成되어 있으며 形態는 頭部가 多面體이고 尾部는 尾鞘(sheath)가 없는 非收縮性이며 尾部 끝에는 底板(base plate)이 없고 단지 flowery end로 되어 있었다(Plate I, 1, 2 및 3).

그리고 B<sub>4</sub> 및 C<sub>2</sub>型 phage는 Bradley(1967)의 C型 phage에 속하는 것으로서 形態는 위 group과 유사하나 크기는 차이가 있었다. 즉 多面體의 頭部는 56 nm로 비슷하였으나 非收縮性的의 尾部는 169 nm로 훨씬 짧았다(Plate I, 4 및 II, 7).

反面에 B<sub>5</sub> 및 C<sub>1</sub>型 phage는 Bradley(1967)의 A型 phage에 속하는 것으로서 다른 group에 비해 훨씬 커다란 多面體의 頭部(81 nm)와 收縮性的의 짧은 尾部(140 nm)를 갖고 있었다(Plate I, 5 및 II, 6). 특히 이들 phage에는 底板이 뚜렷하며 尾鞘의 尾纖維(tail fiber)도 存在하였다.

3. 血清學的 特性

B<sub>1</sub>型에 속하는 phage J<sub>1</sub>의 抗血清에 의한 各種 phage의 不活化를 比較 檢討하였던 바, Table 5

Table 4. Dimension\* of phages of *L. casei*

Phage group	Phage strain	Head diameter	Tail length	Overall length
PLC-B1	J1	60	225	285
	Ø1	52	234	286
	Ø2	48	240	288
PLC-B2	K2	54	236	290
PLC-B3	TK93	50	280	330
	TK79	49	238	287
	TK6	55	262	317
	PD1	58	265	323
	PD2	46	228	274
PLC-B4	PD3	51	237	288
	ØBN	58	168	226
	PD4	84	134	218
PLC-C1	NHc	84	138	222
	FYc	79	146	225
	CP1	81	140	221
	CP2	78	144	222
PLC-C2	LK1	54	169	223

\*Dimensions(nm) are the mean of 10 measurements.

와 같이 B<sub>3</sub>(TK93) 및 B<sub>4</sub>(K<sub>1</sub>)型 phage는 B<sub>1</sub>型 phage와 비슷한 反應을 나타내었으며 B<sub>5</sub>(PD<sub>5</sub>) 및 C<sub>1</sub>(CP<sub>1</sub>)型 phage는 위 3種類의 phage와는 다른 反應을 나타내었다. B<sub>4</sub>型과 B<sub>1</sub>型은 서로 형태는 같지만 단지 B<sub>4</sub>型이 尾部가 짧다는 점에 차이가 있는데 血清學的으로는 兩者가 구별되지 않았다. 反面에 B<sub>5</sub> 및 C<sub>1</sub>型과 같이 B<sub>1</sub>型과 형태가 다른 것은 血清學的으로도 뚜렷한 차이가 있었다.

**Table 5.** Inactivation of various phages by anti-J<sub>1</sub> serum

Phage strains	Survival fraction*
J1	$1.2 \times 10^{-3}$
TK93	$1.0 \times 10^{-3}$
K1	$1.1 \times 10^{-3}$
PD5	$8.0 \times 10^{-1}$
CP1	$7.5 \times 10^{-1}$

\* The anti-J<sub>1</sub> serum was diluted to *K* value of about  $0.2 \text{ min}^{-1}$  in YP broth and warmed to 37°C. The various phages were mixed with the antisera and sampled to determine the surviving phages after 40 min.

4. 生理學的 特性

1) 溶菌斑(plaque)의 形態

溶菌斑의 形態는 一般的으로 phage의 種類에 따라 다르기 때문에 phage 분류에 중요한 특징이 된다.

B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub> 및 C<sub>2</sub>형 phage는 투명한 원형 溶菌斑을 形成하며 크기는 1.2 mm 정도였으며 B<sub>3</sub> 및 B<sub>5</sub>형 phage 역시 투명하고 圓形인 溶菌斑을 形成하였으나 크기는 각각 0.8 mm, 0.5 mm 정도로 약간 작았다.

그러나 B<sub>2</sub>와 B<sub>4</sub>형 phage는 0.5 mm 정도의 작고 혼탁한 不定形의 溶菌斑을 形成하였다.

2) 潛伏期와 放出數

一段增殖實驗 結果 phage J<sub>1</sub>과 TK93의 潛伏期는 90分, 放出數는 100으로 서로 같았다(Table 6).

**Table 6.** Some properties of *L. casei* phages

Phage strains	Latent period (min)	Burst size	E.O.P. on citrate media*
J1	90	100	0.006
TK93	90	100	0.02

\* The citrate sensitivity of the phage was expressed as their relative efficiency of plating (E.O.P.) on MRT media supplemented with 2% (w/v) sodium citrate.

3) 칼슘 要求性

2%(w/v) sodium citrate를 첨가한 배지에서 의 平板效率(efficiency of plating)을 측정 한 결

과는 Table 6과 같이 phage J<sub>1</sub>이 0.006, phage TK93이 0.02로서 정도의 차이는 있으나 모두 증식에 칼슘을 필요로 함을 알 수 있었다.

4) 吸着

Phage J<sub>1</sub>과 TK93의 S-1株와 R-variant KC<sub>1</sub>株에 대한 吸着率은 Table 7과 같으며 phage TK93은 R-variant KC<sub>1</sub>株에 吸着할 수 없기 때문에 溶菌되지 않음을 알 수 있었다.

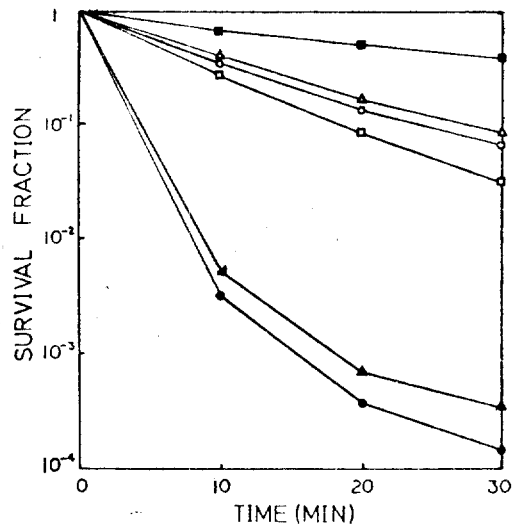
**Table 7.** Adsorption of phages to S-1 and R-variant KC<sub>1</sub>

Phage strains	Bacterial strains	
	S-1	KC <sub>1</sub>
J1	90%	60%
TK93	93%	1%

5. 物理化學的 要因에 對한 安定性

1) 熱耐性

MRT broth에서 55°C로 30分間 處理하였을 境遇 B<sub>2</sub>형 phage(K<sub>2</sub>)는 거의 安定하였으나(生殘率 약 50%), B<sub>1</sub>, B<sub>4</sub> 및 B<sub>5</sub>형 phage(Ø<sub>1</sub>, K<sub>1</sub>, PD<sub>5</sub>)는 90%이상 사멸하였고 感受성이 가장 큰 B<sub>3</sub> 및 C<sub>2</sub>형 phage(TK93, LK<sub>1</sub>)는 99.9% 이상 사멸하였다(Fig. 3).



**Fig. 3.** Heat inactivation of bacteriophages. The phages were maintained at 55°C in MRT broth. At intervals the samples were brought to chilled MRT broth to determine the viable phage. Symbols: ○, phage Ø<sub>1</sub>; ●, phage TK93; □, phage K<sub>1</sub>; ■, phage K<sub>2</sub>; △, phage PD<sub>5</sub>; ▲, phage LK<sub>1</sub>.

2) pH 安定性

各種 phage의 완충액 內에서의 pH安定性を 조사한 結果는 Fig. 4와 같다. B<sub>3</sub>형 phage(PD<sub>4</sub>)는 pH 3.8까지 매우 安定하였으나 pH 3.6부터 급격히 사멸하였고 B<sub>3</sub>형 phage(TK79)는 pH 6에서도 不安定성을 나타내어 뚜렷한 차이를 나타내었다.

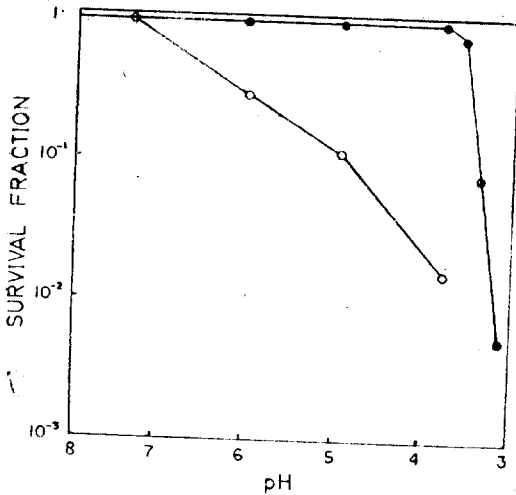


Fig. 4. pH stability of bacteriophages. At zero time, 0.05 ml of phage lysate were added into 5 ml of pre-warmed buffer solution (pH 3.5-6.5, 0.1 M citrate-0.2 M sodium phosphate dibasic buffer; pH 7.0-7.5, 0.1 M tris-HCl buffer) in 37°C water bath. After 40 min, samples were withdrawn, diluted in chilled MRT broth, and assayed for viable counts. Symbols: ○, phage TK79; ●, phage PD4.

3) 紫外線 感受性

자외선 照射에 의한 phage의 死滅 効果는 Fig. 5와 같이 B<sub>1</sub>형 phage(J<sub>1</sub>)와 B<sub>3</sub>형 phage(TK93)는 비슷한 정도의 耐性を 보였으며 이에 비해 C<sub>2</sub>형 phage(LK<sub>1</sub>)는 紫外線 感受성이 매우 높아 70 sec 照射에 약 99% 死滅하였다.

6. 溶原 phage

*L. casei* YIT 9018株와 IAM 1043株는 mitomycin C에 의해서 용균현상이 관찰되었으며(Fig. 6) 전자현미경下에서도 phage 粒子를 관찰할 수 있었다(Plate II, 8 및 9). 이들은 尾部가 없이 오직 多面體의 頭部(각각 38 및 49 nm)만으로 이루어져 있었다. 그러나 이들 溶原 phage의 感

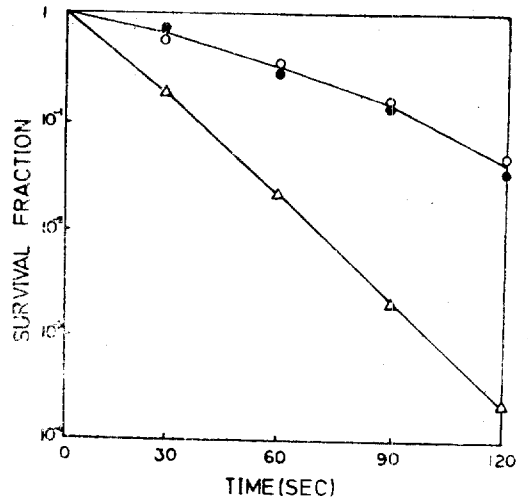


Fig. 5. Sensitivity of PLC-B group phages (○, phage J<sub>1</sub>; ●, phage TK93) and PLC-C group phage (△, phage LK<sub>1</sub>) to UV irradiation. Bacteriophage (5ml) were irradiated after a 1x10<sup>-2</sup> dilution of a lysate into Tris-salts. The irradiation was done in a 90-mm glass petri dish with constant stirring. The UV source was a Toshiba 15 W germicidal lamp (GL-15), placed at a distance of 500 mm.

受性菌은 발견되지 않았으며 여러 번의 시도에도 불구하고 cured strain (Seaman *et al.*, 1964)을 선별할 수 없었다.

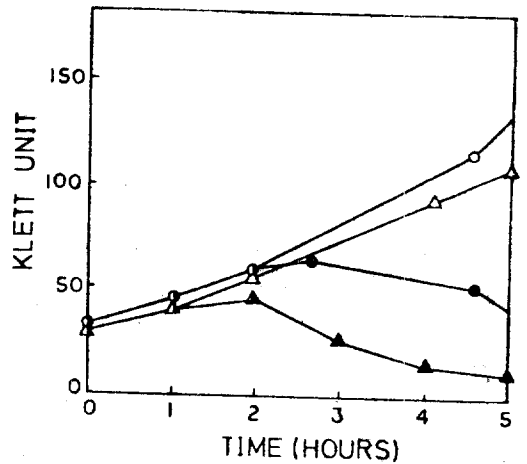


Fig. 6. Changes in optical density after induction of YIT 9018 and IAM 1043 by mitomycin C. Optical density was measured by a Klett-Summerson colorimeter using No. 66 filter. Symbols: ○, YIT 9018 (control); ●, YIT 9018 (MC treatment); △, IAM 1043 (control); ▲, IAM 1043 (MC treatment).



## 考 察

일반적으로 乳酸菌 phage는 宿主域이 매우 좁다. Coetzee *et al.* (1960)이 分離한 phage 14株와 Hino and Ikebe(1965)가 分離한 phage J<sub>1</sub>等이 모두 種特異性을 나타낼 뿐 아니라 특히 Watanabe *et al.* (1970)이 分離한 *L. casei* phage PL-1을 이용하여 Stetter *et al.* (1978)이 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* 屬에 속하는 균주 155株에 대해서 宿主域을 조사한 결과, 오직 분리시 使用한 S-1株만을 溶菌시킨다고 報告하였다. 본 실험에서 使用된 phage도 숙주역이 매우 좁아서 *L. casei*의 혈청학적 B型菌과 C型菌에 각각 特異性을 나타내었다.

Sakurai *et al.* (1975)은 *L. casei* B型 phage를 분리하여 이들을 J<sub>1</sub>系 4종류의 phage와 SG-T phage로 나눌 수 있음을 보고하였고, Kang *et al.* (1977)은 國內에서 J<sub>1</sub>系 4종류의 phage를 檢出할 수 있었음을 보고하였으나 SG-T phage는 發見하지 못하였다. 이들이 분리한 phage의 숙주역, 형태학적 특성 및 溶菌斑의 形態 등을 比較하여 볼 때 J<sub>1</sub>系 phage와 SG-T phage는 각기 B<sub>1</sub> 및 B<sub>3</sub>型 phage와 B<sub>5</sub>型 phage에 해당되는 것으로 思料된다. 그러나 본 실험에서 분리한 B<sub>2</sub> 및 B<sub>4</sub>型 phage는 溶原性을 의미하는 흔탁한 溶菌斑을 形成한다는 점에서 特異하였으며 특히 B<sub>4</sub>型 phage는 形態學的으로 Bradley (1967)의 group C에 속하는 것으로서 *L. casei*의 phage에 있어서는 지금까지 다른 사람들에 의하여 이런 形態의 phage가 報告된 바 없었다.

宿主域에 의한 分類가 다른 特性에 의한 分類와 一致하지는 않기 때문에 (Tsaneva, 1976) 형태학적 특성 및 혈청학적 특성등과 함께 比較 검토하는 것이 바람직 하다. PLC-C형 phage도 宿主域에 있어서는 1종류로 分類되었으나 형태학적으로 2종류가 存在하기 때문에 C<sub>1</sub> 및 C<sub>2</sub>형으로 나누었다. 따라서 C형 phage에 대한 宿主域 실험은 충분치 못한 것으로 思料되며 앞으로 더 많은 宿主菌을 利用하여 實驗해야 할 것이다.

PLC-B형 phage에 속하는 B<sub>4</sub>와 B<sub>5</sub>형 phage가 각각 PLC-C형 phage에 속하는 C<sub>2</sub>와 C<sub>1</sub>型 phage와 유사한 형태를 갖고 있는 것은 系統學的으로 매우 흥미로우며 이들 사이의 혈청학적 관계는 앞으로 交叉中和反應에 의하여 體系的으로 검토해야 할 것이다. Wilkowske *et al.* (1954)은 乳酸球菌의 phage가 혈청학적으로 7종류가 存在함을 報告하였으나, 아직 乳酸桿菌에 있어서는 體系的인 報告가 없는 실정이다. 다만 Sakurai *et al.* (1969)이 *L. casei* C형균의 phage에 血清學的으로 2종류가 있음을 報告하였고 Sakurai *et al.* (1975)은 *L. casei* B형균의 phage에 2종류가 있음을 報告하였을 뿐이다. 본 실험의 結果에서 PLC-B型 phage가 2종류로 나뉜 것은 위 報告와 一致하며 PLC-C型 phage도 형태학적으로 C<sub>1</sub> 및 C<sub>2</sub>型으로 區分할 수 있었기 때문에 이것도 역시 위 報告와 一致하는 것으로 思料된다.

*L. casei*의 phage PL-1은 感染과정에서 phage DNA의 細胞內 침투에 칼슘을 필요로 한다 (Watanabe and Takesue, 1972)는 것이 밝혀졌다. 본 실험에서 使用한 phage J<sub>1</sub>과 TK93도 증식에 칼슘을 필요로 하였으나 De Klerk *et al.* (1963)이 분리한 *L. casei* phage 4株는 칼슘을 要求하지 않았기 때문에 乳酸菌 phage도 다른 종의 phage (Adams, 1952)에서의 마찬가지로 칼슘의 要求性을 分類에 利用할 수 있을 것이다.

Phage TK93은 R-variant의 세포벽에 吸着할 수 없기 때문에 溶菌을 일으키지 못하였다. 따라서 이러한 사실을 利用한다면 phage의 吸着機作 및 S-R variation (De Klerk and Coetzee, 1962) 등의 研究에 도움을 줄 것이다.

溶原菌과 溶原菌이 갖고 있는 溶原 phage에 對해 感受性이 있는 菌株를 混合培養할 때는 phage 감염문제가 발생할 수 있기 때문에 菌株의 溶原性 與否의 파악은 매우 중요한 문제이다. Huggins and Sandine (1977)은 상업적으로 이용되는 유산구균 starter 菌株 63株에 대해 溶原 與否를 파악한 결과 3株는 자발적으로 적은 數의 phage를 放出함을 報告하였다. 본 實驗에서 使用한 YIT 9018株와 IAM 1043株도 자외선이나 mitomycin C (Otsuji *et al.*, 1959)로 處理했을 때 溶菌 現象이 파악되었으며 전자현미경下에서도 phage

粒子가 관찰되었다. 그러나 이들 溶原 phage에 대한 感受性菌은 發見되지 않았다. De Klerk and Hugo (1970)는 *L. acidophilus*의 溶原 phage에 對해서, Tohyama *et al.* (1972)은 *L. salivarius*의 溶原 phage에 對해서 각기 研究하였으나 대부분의 乳酸桿菌 溶原 phage는 感受性菌을 발견

할 수 없었고 불과 數종의 溶原 phage에 대해서만 感受性菌을 얻을 수 있었다(Sakurai *et al.*, 1971; Tohyama *et al.*, 1972). 이러한 現象은 乳酸球菌의 경우도 마찬가지였다(Lowrie, 1974; Kozak *et al.*, 1973; McKay and Baldwin, 1973).

## 摘 要

本實驗에서는 phage의 汚染을 防止하기 위한 starter rotation system의 確立을 위하여 *Lactobacillus casei*를 宿主菌으로 하는 phage를 工場排水系로부터 分離하여 特性을 比較 檢討하며 分類하였던 바, 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. *L. casei*의 phage는 宿主域에 의해 PLC-B型 ( $B_1, B_2, B_3, B_4$  및  $B_5$ ) phage와 PLC-C型 phage로 兩分할 수 있었으며 PLC-C型 phage는 形態學的 特性에 의해  $C_1$  및  $C_2$ 型 phage로 細分할 수 있었다.

2. 工場排水系에는  $B_3$ 型이 가장 많았고(44.4%) 또한 지속적으로 存在함을 알 수 있었다. 그러나 가장 광범위한 宿主域을 보인 phage는  $B_1$ 型이었다.

3. *L. casei*의 phage는 형태학적으로 크게 3종류로 나눌 수 있었다.  $B_1, B_2$  및  $B_3$ 型 phage는 多面體의 頭部(52 nm)와 尾鞘가 없는 非收縮性的의 尾部(245 nm)로 構成되어 있으며 底板이 없고 flowery end로 이루어져 있다.  $B_4$ 와  $C_2$ 型 phage는 多面體의 頭部(56 nm)와 훨씬 짧은 非收縮性的의 尾部(169 nm)를 갖고 있었다. 반면에  $B_5$ 와  $C_1$ 型 phage는 多面體의 頭部(81 nm)와 收縮性的의 尾部(140 nm)로 構成되어 있으며 底板이 있고 尾鞘와 尾纖維도 있었다.

4. 血清學的 特性은 形態學的 特性和 밀접한 關係를 나타내었다. 즉 形態가 유사한 phage는 中和試驗에서도 비슷한 反應을 보였으며 形態가 서로 다른 phage는 中和試驗에서도 뚜렷한 차이를 나타내었다.

5.  $B_1, C_1$  및  $C_2$ 型 phage는 투명한 圓形 溶菌斑을 形成하며 크기는 1.2 mm 정도였고  $B_3$  및  $B_5$ 型 phage는 形態는 같으나 크기가 各各 0.8 mm, 0.5 mm 정도로 약간 작았다. 그러나  $B_2$ 와  $B_4$ 型 phage는 0.5 mm 정도의 작고 혼탁한 不定形의 溶菌斑을 形成하였다.

6.  $B_1$ 과  $B_2$ 型 phage는 潛伏期間이 90分, 평균 放出數가 100으로 서로 같았고 增殖에 培養을 必要로 하였다.

7.  $B_3$ 型 phage가 R-variant인 KC1株를 溶菌시키지 못한 것은 吸着이 일어나지 않기 때문이었다.

8. 熱耐性的의 크기는  $B_2 > B_1, B_4, B_5 > B_3, C_2$ 의 順序였고 pH 安定性은  $B_5$ 가  $B_3$ 보다 크고 UV感受性은  $C_2 > B_1, B_3$ 로 나타남을 알 수 있었다.

9. YIT 9018株와 IAM 1043株는 mitomycin C 에 의해 誘發되어 phage particle을 放出하였으며 이들은 多面體의 頭部(각각 38 및 49 nm)만을 갖고 있고 尾部는 없었다. 여러 번의 反復實驗에도 불구하고 이들에 대한 感受性菌은 발견되지 않았다.

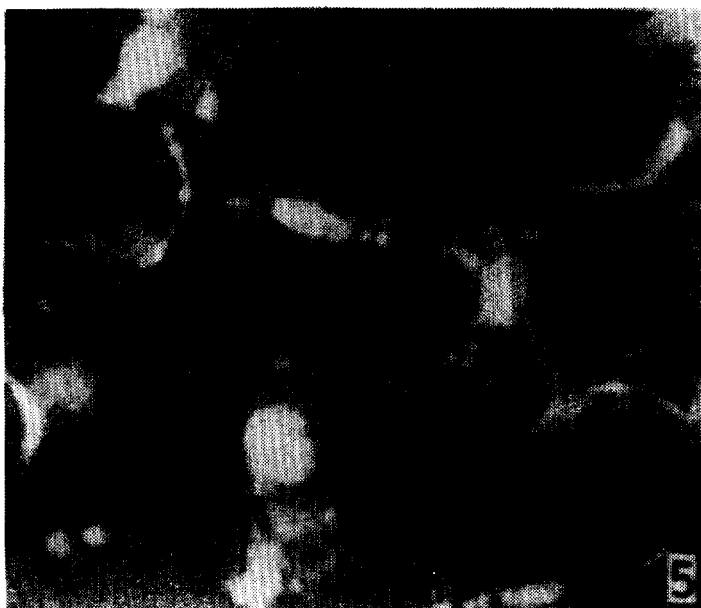
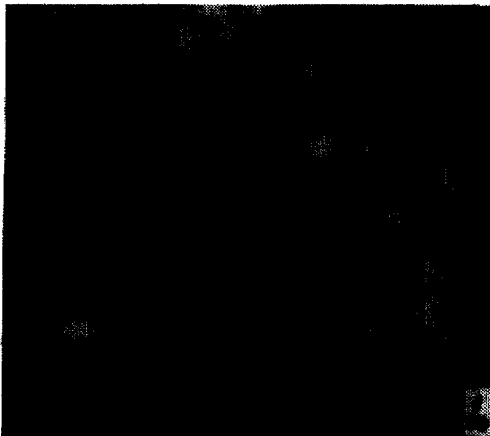
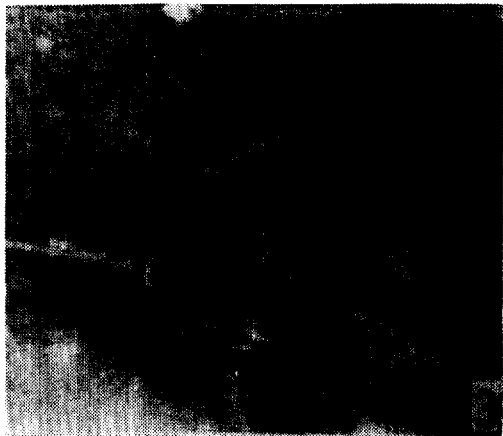
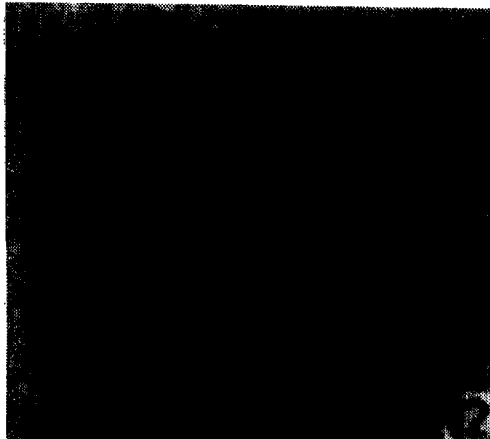
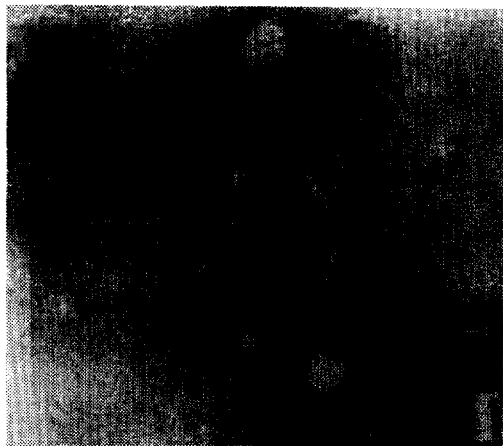
## 引用 文 獻

1. Adams, M. H., 1952. Classification of bacterial viruses: characteristics of the T5 species and of the T2, C16 species. *J. Bacteriol.* **64**, 387-396.
2. Adams, M. H., 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York.
3. Bradley, D. E., 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **31**, 230-314.
4. Chopin, M. C., A. Chopin and C. Roux, 1976. Definition of bacteriophage groups according to their lytic action on mesophilic lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 741-746.
5. Clowes, R. C. and W. Hayes, 1968. Experiments in microbial genetics. Blackwell Scientific Publications.
6. Coetzee, J. N. and H. C. De Klerk, 1962. Lysog-

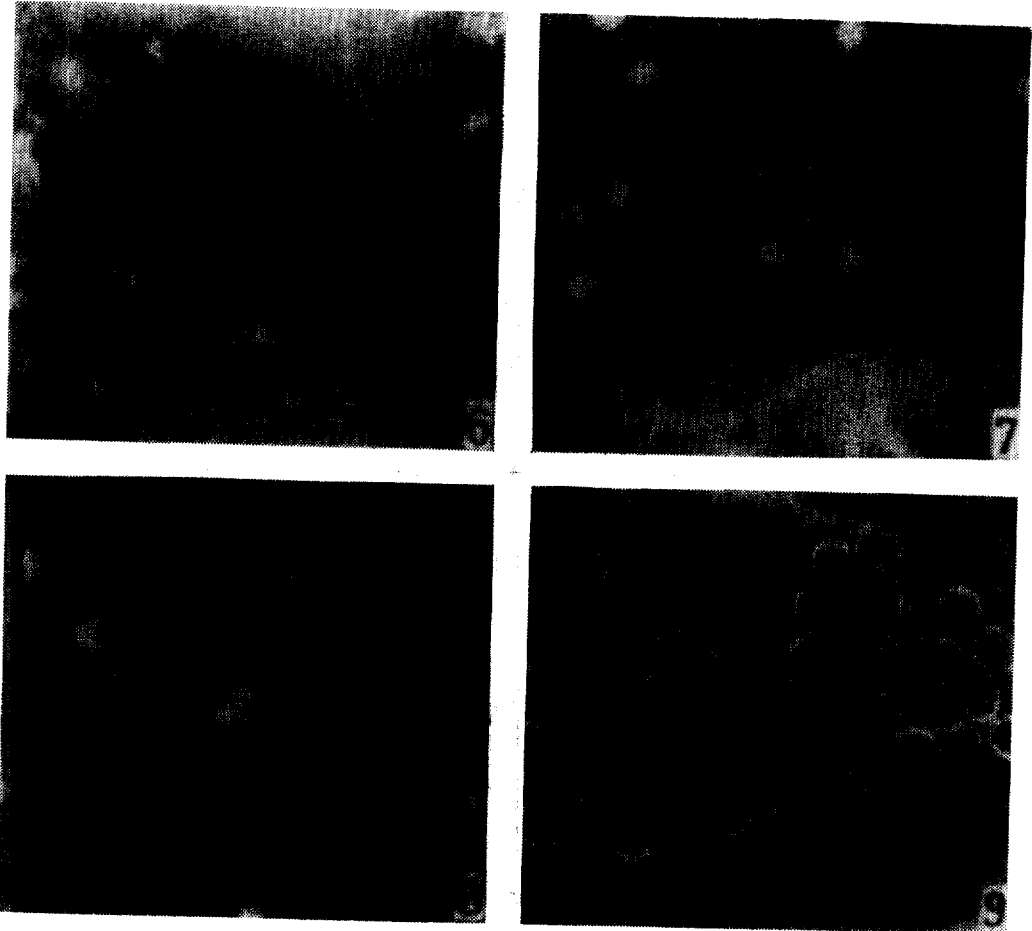
- eny in the genus *Lactobacillus*. *Nature* **194**, 505.
7. Coetzee, J. N., H. C. De Klerk and T. G. Sacks, 1960. Host-range of *Lactobacillus* bacteriophages. *Nature* **187**, 348-349.
  8. Collins, E. B., 1955. Action of bacteriophage on mixed-strain cultures. V. Similarities among strains of lactic streptococci in commercially used cultures and use of a whey activity test for culture selection and rotation. *Appl. Microbiol.* **3**, 145-149.
  9. Collins, E. B., F. E. Nelson and C. E. Parmelee, 1950. The relation of calcium and other constituents of a defined medium to proliferation of lactic streptococcus bacteriophage. *J. Bacteriol.* **60**, 533-538.
  10. De Klerk, H. C. and J. N. Coetzee, 1962. The S-R variation in *Lactobacillus casei*. *J. Gen. Microbiol.* **27**, 155-166.
  11. De Klerk, H. C., J. N. Coetzee and J. J. Thron, 1963. The characterization of a series of lactobacillus bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* **32**, 61-67.
  12. De Klerk, H. C., J. N. Coetzee and J. T. Fourie, 1965. The fine structure of lactobacillus, bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* **38**, 35-38.
  13. De Klerk, H. C. and N. Hugo, 1970. Phage-like structures from *Lactobacillus acidophilus*. *J. Gen. Virol.* **8**, 231-234.
  14. Dulbecco, R., 1950. Experiments with photoreactivation of bacteriophages inactivated with ultraviolet radiation. *J. Bacteriol.* **59**, 329-336.
  15. Hayat, M. A., 1972. Basic electron microscopy techniques. Van Nostrand Reinhold Co.
  16. Hino, M. and N. Ikebe, 1965. Studies on the lactic acid bacteria employed for beverage production. Part II. Isolation and some properties of a bacteriophage infected during the fermentation of lactic acid beverage. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **39**, 472-476.
  17. Huggins, A. R. and W. E. Sandine, 1977. Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 184-191.
  18. Ishiwa, H. and T. Sakurai, 1972. Induction procedures of lytic enzymes and temperate phages of lysogenic strains of group C *Lactobacillus*. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **46**, 245-251.
  19. Kang, K. H., Y. J. Back, Y. C. Kang and K. W. Kim, 1977. Studies on *Lactobacillus* virulent phage in plant-drainage. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **5**, 13-17.
  20. Khcsaka, T., 1977. Physicochemical properties of a virulent *Lactobacillus* phage containing DNA with cohesive ends. *J. Gen. Virol.* **37**, 209-214.
  21. Kozak, W., M. Rajchert-Trzpił, J. Zajdel and W. T. Dobrzanski, 1973. Lysogeny in lactic streptococci producing and not producing nisin. *Appl. Microbiol.* **25**, 305-308.
  22. Lawrence, R. C., T. D. Thomas and B. E. Terzaghi, 1976. Reviews of the progress of dairy science: cheese starters. *J. Dairy Res.* **43**, 141-193.
  23. Lowrie, R. J., 1974. Lysogenic strains of group N lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* **27**, 210-217.
  24. Marshall, R. J. and N. J. Berridge, 1976. Selection and some properties of phage-resistant starters for cheese-making. *J. Dairy Res.* **43**, 449-458.
  25. McKay, L. L. and K. A. Baldwin, 1973. Induction of prophage in *Streptococcus lactis* C<sub>2</sub> by ultraviolet irradiation. *Appl. Microbiol.* **25**, 682-684.
  26. Murata, A., E. Sceda and R. Saruno, 1969. Factors influencing plaque formation by bacteriophages of *Lactobacillus acidophilus*. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **43**, 311-316.
  27. Otsuji, N., M. Sekiguchi, T. Iijima and Y. Takagi, 1959. Induction of phage formation in the lysogenic *Escherichia coli* K-12 by mitomycin C. *Nature* **184**, 1079-1080.
  28. Reiter, B., 1956. Inhibition of lactic streptococcus bacteriophage. *Dairy Inds.* **21**, 877-881.
  29. Sakurai, T., K. Tohyama and H. Arai, 1971. Properties of a temperate phage of *Lactobacillus salivarius*. *Jap. J. Bacteriol.* **26**, 473-481.

30. Sakurai, T., S. Kubo and E. Onoue, 1975. Distribution and succession of *Lactobacillus* phages in plant-drainages. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **49**, 169-177.
31. Sakurai, T., T. Takahashi and H. Arai, 1970. The temperate phages of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus casei*. *Jap. J. Microbiol.* **14**, 333-336.
32. Sakurai, T., T. Takahashi, K. Kamiyama and H. Arai, 1969. Isolation of bacteriophages parasitic on *Lactobacillus casei* and *L. plantarum* and their several properties. *Virus (Japan)* **19**, 311-324.
33. Seaman, E., E. Tarmy and J. Marmur, 1964. Inducible phages of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **3**, 607-613.
34. Sozzi, T., 1972. Calcium requirements for lactic starter phages. *Milchwissenschaft* **27**, 503-507.
35. Stetter, K. O., H. Priess and H. Delius, 1978. *Lactobacillus casei* phage PL-1. Molecular properties and first transcription studies *in vivo* and *in vitro*. *Virology* **87**, 1-12.
36. Tohyama, K., T. Sakurai, H. Arai and A. Oda, 1972. Studies on temperate phages of *Lactobacillus salivarius*. *Jap. J. Microbiol.* **16**, 385-395.
37. Tsaneva, K. P., 1976. Electron microscopy of virulent phages for *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 590-601.
38. Watanabe, K. and S. Takesue, 1972. The requirement for calcium in infection with *Lactobacillus* phage. *J. Gen. Virol.* **17**, 19-30.
39. Watanabe, K., S. Takesue, K. Jin-Nai and T. Yoshikawa, 1970. Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*. *Appl. Microbiol.* **20**, 409-415.
40. Wilkowske, H. H., F. E. Nelson and C. E. Parmelee, 1954. Serological classification of bacteriophages active against lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* **2**, 243-249.
41. 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.
42. Zottola, E. A. and E. H. Marth, 1966. Thermal inactivation of bacteriophages active against lactic streptococci. *J. Dairy Sci.* **49**, 1338-1341.

**PLATE I**



## PLATE II



## Explanation of Plates

**Plate I.**

1. Phage Ø1.  $\times 146,000$ .
2. Phage K2.  $\times 69,000$ .
3. Phage TK93.  $\times 100,000$ .
4. Phage ØBN.  $\times 100,000$ .
5. Phage PD4.  $\times 265,000$ .

**Plate II.**

6. Phage CP1.  $\times 69,000$ .
7. Phage LK1.  $\times 100,000$ .
8. Phage-like particles induced from YIT 9018.  $\times 112,000$ .
9. Phage-like particles induced from IAM 1043.  $\times 100,000$ .