

치스제조시 抗 Phage—抗血清의 이용시험

서울우유협동조합 鄭 忠 一

치스제조시 젖산균 phage의 문제를 해결하기 위해 4종의 phage에 대한 항혈청을 제조하여 치즈 제조시의 그 첨가 효과를 실험하였다.

I. 材料 및 方法

1) 乳酸菌株과 phage

Str. cremoris BK 5 와 Z 8 그리고 이들의 homologous phage bk5 와 z 8을 사용하였다.

2) phage lysate

30°C에서 1시간 培養한 broth culture에 CaCl₂와 함께 phage를 接種(대략 phage 1에 菌体10의比率)하고 4시간 培養시킨 乳酸菌培養液의 optical density는 0.08~0.1 (620nm)이었다. phage를 接種한 乳酸菌培養液는 phage strain에 따라 약간의 차이는 있었지만 대개 30°C에서 2~3시간후부터 部分的인 溶菌現象을 나타내기 시작하였다. Phage lysate 10 ml에 chloroform 0.5 ml을 添加하여 7~8회 세게 흔들어준뒤 chloroform과 Cell debris를 除去하기 위하여 1oz의 Mc Cartney 병에 分注한 후 遠心分離機로 2,675 G에서 10分間 分離하여 phage lysate을 調製하였다.

이와 같이 얻은 phage lysate의 titer는 $9.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^{10}$ 이었으며 phage stock는 前述한 바와 같이 使用時까지 냉장고에 4°C로 保管하였다.

3) 抗原準備

Phage lysate을 純粹精製하기 위하여 RC-5 초고속 냉동원심 분리기(Sorvall Inc. Newtown, Conn. U. S. A)를 사용하여 12,000 G로 한시간동안 遠心分離하였다.

上澄液은 透析膜에 넣고 20%의 Polyethylene Glycol (P. E. G) 4,000 용액에 넣고 냉장고(3~4°C)에 하룻밤 放置하여 濃縮시켰다. 濃縮된 phage lysate의 Titer는 10^{10} (z8)과 5×10^9 (bk5)이었다.

4) 抗体제조

Stock phage strain에 대한 抗体는 아래와 같은 방법으로 준비하였다.

濃縮된 phage lysate 2ml을 토끼 6마리에 각각 동시에 주사하였으며 첫주사후 3주째 다시 주사하고 그후 일주일 간격으로 3회 연속 주사하였다.

주사된 토끼의 귀정맥으로부터 每注射直前과 마지막 주사후 일주일만에 혈액을 채취하여 즉시 37°C로 30分間 定置한 후 냉장고에 하루밤 방치하였다가 2,675 G로 10分間 遠心分離한 血清을 抗体로 사용하였다.

分離된 抗体는 使用時까지 저온냉동시켜 보관하였다.

5) Phage의 中和實驗

Phage의 中和實驗은 滅菌生理食鹽水에 면역혈청을 희석한 후 각 희석액 1ml씩을 미리 일정한 농도로 조정된 同量의 phage 液에 混合한다음 37°C로 30分間 培養하였으며 抗体의 phage 中和能力은 酸度測定을 통하여 비교하였다.

II. 結果

Table 1에서 나타난 바와 같이 phage z8 (5.4×10^6)과 bk5 (3.3×10^6)은 血漬희석액 1/80, 1/160과 1/40, 1/80에서 각각 完全中和 되었고 2번째 注射後 얻어진 血漬이 가장 강한 中和能力을 나타냈다. 3번째 注射時부터는 오히려 中和能力이 떨어지기 시작하였다. 實驗結果 Duitschaeuer와 Quinn(1969)¹⁷⁾ 그리고 Erskine(1964)¹⁸⁾에 依해 報告된 것보다 훨씬 抗体의 中和能力이 높았으나 商業的으로 利用되기에는 아직 未洽하였다.

스타터배양액과 phage 희석액을 混合한 牛乳에 血清 희석액(Neutralization titer 800)을 0.6%, 0.4%씩 각각 첨가한 경우 Fig.1과 2에서 보는 바와 같이 control과 거의 비슷한 酸度の 增加를 나타냈으며 0.2% 添加의 경우도 lag phase가 조금 길어지기는

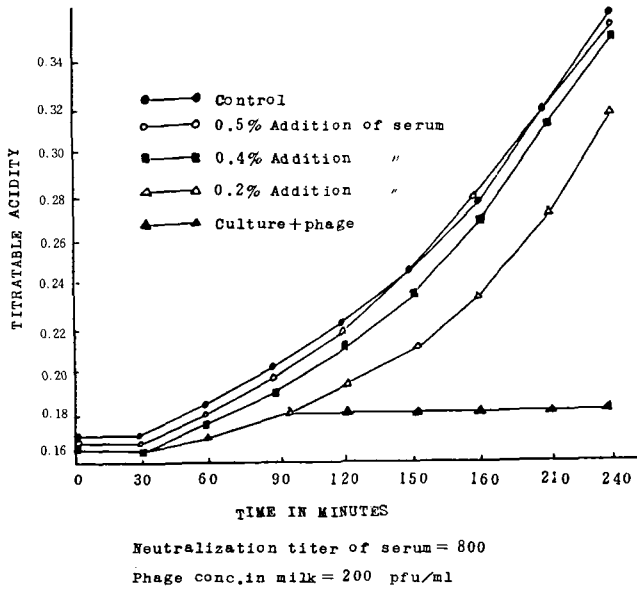


Fig 1. Changes in acid production of *Str. cremoris* Z 8 mixed with properly diluted rabbit sera and phage z 8

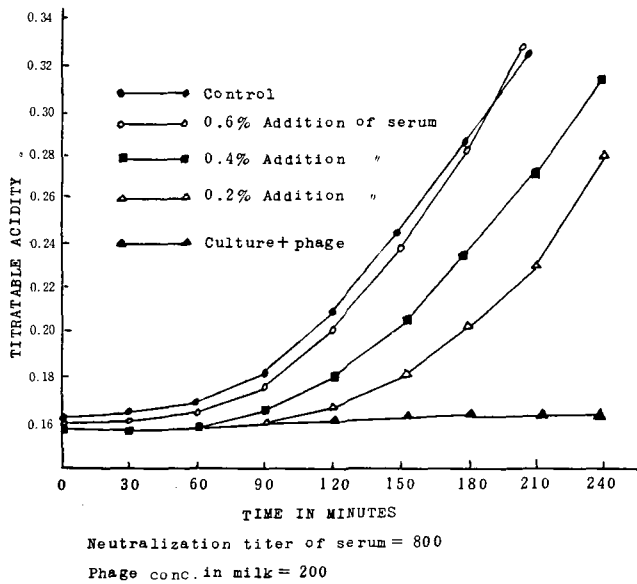


Fig 2. Changes in acid production of *Str. cremoris* Bk 5 mixed with properly diluted raddit sera and phage bk 5

NEUTRALIZATION TITER OF RABBIT SERA TO

Table 1.

Str. cremoris PHAGE STRAIN z8/AND bk5

Phage Strain & Conc' n.	No. of Bleeding	No. of Sample	Serum Dilution						
			1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
z8 (5.4×10^6)	1st *	1	92	130	108				
		2	114	88	124				
	2nd	1	0	4	80	TNTC**			
		2	19	130	TNTC	TNTC			
	3rd	1			0	0	5	256	
		2			0	13	TNTC	L	
	4th	1					21	TNTC	L
		2				48	TNTC		
	5th	1					124	TNTC	L
		2				120	TNTC	TNTC	L
bk5 (3.3×10^6)	1st *	3	264	240	286				
		4	204	115	216				
	2nd	3	0	7	78				
		4	0	3	39	178			
	3rd	3		0	7	197	TNTC	L	
		4			0	2	62	TNTC	L
	4th	3				TNTC	TNTC	L	
		4				6	189	TNTC	L
	5th	3				264	TNTC	L	
		4				28	286	TNTC	L

3

4

* 1st bleeding was made just before 1st injection and mixed the phage concentration 5.4×10^6 and 3.3×10^6 respectively.

** L :

T. N. T. C : Too Numerous To Count

했으나 培養後 90分부터 모두 正常的으로 酸을 生成하였다. 이것은 보다 높은 抗原性(antigenicity)을 갖는 phage를 구하여 血清의 中和力을 더욱 높여 준다면 實用化도 可能하다고 보며 더우기 中和力이 높은 血清을 菌株別로 凍結乾燥시켜 保管하였다가 非常用으로 使用한다면 經濟的으로도 매우 有益할 것으로 思料된다.

SUMMARY

Immune sera from phage-injected rabbits were

used to determine the neutralization of phages and to find whether there is a possible way to apply for industrial purpose.

The results obtained were follows :

1. Antigen-Antibody reaction

1) The phages z8(5.4×10^6) and bk5(3.3×10^6) were completely neutralized at serum dilution of 1/80, 1/160 and 1/40, 1/80 respectively, and the antiserum obtained after second injection showed the highest neutralizing capability.

2) The acid production of starter culture mixed with phage and antiserum dilution of 0.4–0.6% was increased almost the same as that of control according to the incubation period.

Addition of 0.2% of serum dilution show normal acid production after 90 min. incubation, even through the lag phase prolonged.

참 고 문 헌

- 1) Billing, E. 1970. Methods in Microbiology 3B : 315.
- 2) Crawford, R. J. M. 1962. 16th International Dairy Congress B : 322.
- 3) Czulak, J. and Hammond, L. A. 1953, Australian Journal of Dairy Technology 8 : 89.
- 4) Erskine, J. M. 1970. Applied Microbiology 19 : 638, 707.
- 5) Keogh, B. P. 1972. Australian Journal of Dairy Technology 27 : 86.
- 6) Keogh, B. P. and Pettingill, G. 1966. Applied Microbiology 14 : 421.
- 7) Murata, A., Soeda, E. and Saruno, R. 1969. Journal of Agricultural Chemical Society of Japan 43 : 311.
- 8) Smith, K. L. and Porter, R. M. 1967. Journal of Immunology.

