

乳酸桿菌 Phage에 對한 Sodium Pyrophosphate의 溶菌抑制作用

朴基文 · 姜國熙

成均館大學校 農科大學 酪農學科

(1982년 8월 29일 접수)

Inhibition of Phage Lytic Activity in *Lactobacilli* Cells by Sodium Pyrophosphate

Gi Mun Park and Kook Hee Kang

Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University Suwon, Korea

(Received August 29, 1982)

In order to determine a proper amount of sodium pyrophosphate (SPP) which protect *Lactobacilli* from phage attack, *Lactobacillus casei* YIT-9018 was grown in Ca^{++} free Murata medium having various concentrations of SPP after infections with phage J1 at different multiplicities of infection (MOI). It was found that the level of SPP to inhibit phage activity depended upon the level of MOIs. When the bacteria were infected by less than 10^{-1} of MOI, 0.15% of SPP was sufficient, while with 10^0 of MOI, 0.175% of SPP was needed to inhibit the lytic activity completely.

유산균을 종균으로 사용하는 공장에서 bacteriophage의 오염은 항상 문제시 되고 있다.

이것에 대한 대책의 하나로써 유산균 배지에 phage 증식을 억제시키는 물질을 첨가하는 문제가 보고되어 있다.

즉, Richardson 등(1976)¹⁾, Jonas 등(1977)²⁾에 의한 PWM(Phage inhibitory Whey-based Medium)과 Collins 등(1950)³⁾, Hargrove(1959)⁴⁾, Kriel 등(1976)⁵⁾에 의한 인산염의 이용 Cherry와 Watson(1946)⁶⁾이 보고한 phage 흡착에 필수적인 Ca^{++} 를 제거한 PRM(Phage Resistant Medium)이 사용 되어 왔다.

특히 Van Vunakis와 Herriott(1962)⁷⁾는 이러한 인산염 중 pyrophosphate가 T-even coli phage DNA를 유리시킴으로써 phage를 불활성화시킨다고 보고하였고 Kang과 Park(1982)⁸⁾은 $CaCl_2$ 가 제거된 MRT 액체배지에서 0.1~0.2% Sodium pyrophosphate가 유산균 phage 증식에 가장 효과적일 것으로 보고하였다.

따라서 본 실험에서는 식품첨가물로 사용되는 sodium pyrophosphate를 이용하여 첨가농도와 MOI(Multiplicity of Infection) 수준에 따른 유산균과 phage의 증식에 대하여 그리고 sodium

pyrophosphate 농도에 의한 phage의 불활성화에 대해 검토하였다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 phage 주

본 실험에 사용한 숙주균은 유산균 *Lactobacillus casei* YIT 9018을 사용하였고 그의 대표적인 독성 phage J1을 각각 한국 야쿠르트 연구소에서 분양받아 사용하였다.

유산균수 측정

유산균수측정은 Kang등(1981)⁹⁾의 Bromocresol purple를 이용한 평판배양법을 사용하였으며 감염 후 유산균 증식의 간접적인 측정을 위하여 Ishiwa와 Yokokura(1971)¹⁰⁾의 Klett Summerson 비색계를 이용한 방법으로 실시하였다.

Phage 수 측정

phage 수 측정에는 Murata 등(1969)¹¹⁾의 Murata 배지를 이용하여 Adams(1959)¹²⁾의 중층법에 의한 용균반 계수법을 사용하였다.

Sodium pyrophosphate 첨가

L. casei 증식에 필수성분이 아닌 $CaCl_2$ 를 제거한 MRT 액체배지에 20% sodium pyrophos-

phate를 121°C, 15분 가압멸균 후 농도별로 첨가하였다.

MOI 수 측정

속주세포수에 대한 phage의 감염수를 측정하여 MOI로 나타내었다.

결과 및 고찰

MOI 수준에 따른 유산균의 증식

0.15% sodium pyrophosphate를 첨가한 CaCl₂가 제거된 MRT액체배지 10ml를 가지시험관에 넣은후, 유산균 0.1ml(10⁸/ml)와 MOI 수준이 다르도록 조제한 phage액 0.1ml를 각각 접종하여 37°C water bath에 배양하면서 유산균 증식을 흡광도로 측정하였다.

그 결과는 다음의 Fig. 1과 같다. 즉, MOI = 10⁻¹이하인 경우, phage가 감염되지 않은 비교균과 거의 같은 유산균의 증식을 보였으나,

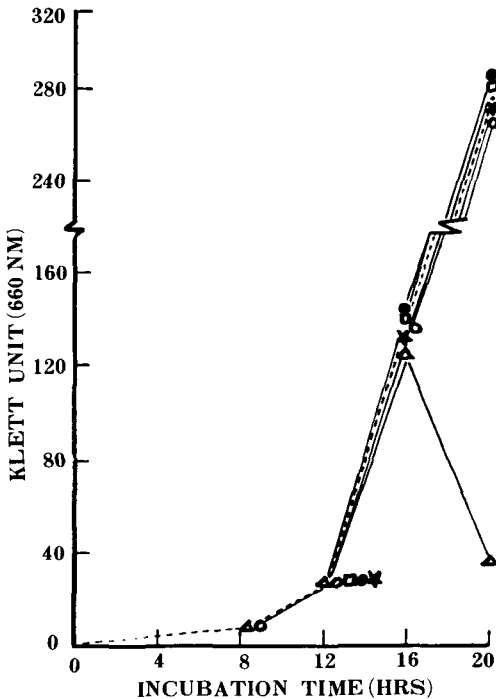


Fig. 1. Growth of *L. casei* YIT 9018 in CaCl₂-free MRT broth with 0.15% sodium pyrophosphate at various MOI levels. : control, -△- : MOI = 10⁰, -○- : MOI = 10⁻¹, -□- : MOI = 10⁻², -★- : MOI = 10⁻³, -●- : MOI = 10⁻⁴

MOI = 10⁰인 경우 배양 16시간 후부터는 phage에 의해 유산균이 용균됨을 알 수 있었다.

따라서 phage 감염 후 유산균의 증식에 미치는 sodium pyrophosphate의 작용에는 MOI 수준과 배양시간에 따라서도 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다

MOI 수준에 따른 유산균과 phage 수 변화

앞에서 사용한 20시간 배양 후의 MRT 배양액 중의 유산균과 phage 수를 측정하여 다음의 Fig. 2에 나타내었다.

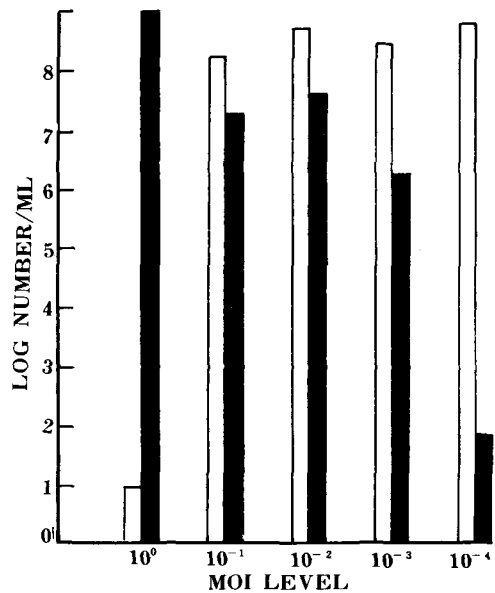


Fig. 2. Changes in viable cell count of *L. casei* YIT 9018 and titer of phage J 1 in CaCl₂-free MRT broth with 0.15% sodium pyrophosphate at various MOI levels after 24hrs of incubation. □ : viable cell count of *L. casei* YIT 9018, ■ : titer of phage J 1

즉, MOI = 10⁰인 경우 배양 24시간 후에 phage 수는 약 10⁸/ml로 증가한 반면 유산균은 10¹/ml 이하로 감소함을 나타냈으며 sodium pyrophosphate를 첨가하지 않은 비교균과 거의 비슷한 수준을 나타내었다.

그러나 MOI가 10⁻¹이하인 경우, phage의 증식이 점차 억제되기 시작하여 M.O.I. = 10⁻⁴에서는 약 10²/ml의 수준까지 증식이 억제됨을 보여 주고 있다. 이때의 유산균 수는 MOI = 10⁻¹

이하에서는 거의 같은 수준인 $10^8 \sim 9$ /ml의 균수를 나타내었다.

따라서 앞의 결과와 같이 phage 감염수가 유산균수 보다 많은 경우에는 0.15%의 sodium pyrophosphate를 첨가하여도 유산균이 용균되었다.

Sodium pyrophosphate 농도에 따른 유산균의 증식

Fig. 1의 실험결과 0.15% sodium pyrophosphate가 첨가된 배지에서 MOI = 10^0 인 경우 phage에 의해 유산균이 증식하지 못하고 용균되었다.

따라서 MOI = 10^0 으로 phage가 감염된 경우에 배지내의 sodium pyrophosphate 농도를 변화시켜 유산균의 증식을 조사하였다.

다음의 Fig. 3에서 보듯바와 같이 MOI = 10^0 인 경우 0.15% 이하의 sodium pyrophosphate 첨가는 배양 24시간 후, 유산균이 거의 용균됨을 나타내고 있다.

그러나 0.175%로 첨가하면 phage의 증식이 억제되어 비교균과 거의 비슷한 유산균 증식을

나타내었다.

또 그 이상의 농도에서는 phage에 의한 유산균의 용균현상은 없었으나, 위의 결과와 같이 유산균 자체의 증식이 억제되었다.

따라서 sodium pyrophosphate 농도와 phage 감염수에 의해 유산균의 증식에 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Sodium pyrophosphate 농도에 따른 phage의 활성변화

sodium pyrophosphate가 phage 활성에 미치는 영향을 시험하기 위하여 $CaCl_2$ 가 제거된 MRT 액체배지에 sodium pyrophosphate의 농도가 0.05 ~ 0.25% 되도록 첨가하고 또 phage J1을 1×10^5 /ml의 농도로 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, phage 수를 측정할 결과, sodium pyrophosphate를 첨가한 배지나 첨가하지 않은 배지에서 phage 수의 변화는 나타나지 않았다.

이 결과는 pyrophosphate가 T-even coli phage에 작용하면 DNA를 방출하여 phage를 불활성화한다는 Van Vunakis와 Herriott(1962)의 보고와는 다른 결과를 나타내었다.

유산균과 phage의 증식에 미치는 sodium pyrophosphate의 영향

$CaCl_2$ 를 제거한 MRT 액체배지에 sodium pyrophosphate 첨가가 phage 증식을 억제하고 반면에 유산균의 증식은 가능하게 하였다.

따라서 0.15% sodium pyrophosphate를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에 MOI 수준이 다르게 phage를 감염시킨 후 24시간 배양하여 유산균과 phage 수를 측정할 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

즉 sodium pyrophosphate를 첨가한 배지에서 phage 수는 MOI = 10^0 인 경우 약 10^8 /ml 까지 증가하였고 MOI가 감소하면서 phage 증식이 억제되어 M.O.I. = 10^{-4} 인 경우 약 10^2 /ml 까지 증식이 억제되었다.

반면에 유산균수는 MOI = 10^0 일 때는 10^7 /ml로 거의 사멸하였으나, MOI = 10^{-1} 이하부터는 약 $10^8 \sim 9$ /ml의 유산균 수를 나타내었다.

그러나 sodium pyrophosphate를 첨가하지 않은 배지에서 phage 수는 MOI 수준에 큰 영향이 없이 약 10^7 /ml로 증가된 반면 유산균수는 MOI = 10^{-2} 이상인 경우 완전히 사멸하였고, 10^{-3} 에서는 6×10^1 /ml, 그리고 10^{-4} 일 때는 1×10^5 /ml로 용균됨을 보여주고 있다.

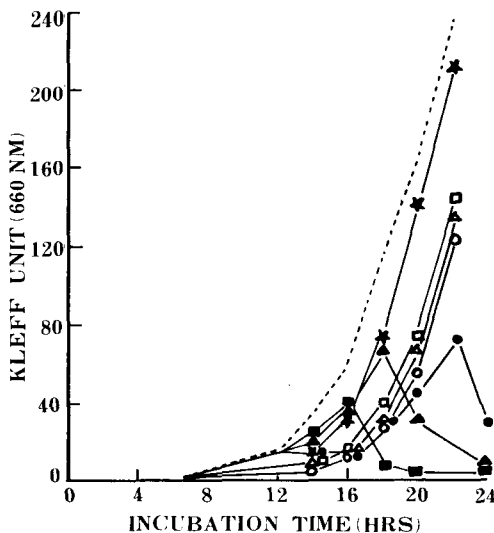


Fig. 3. Growth of *L. casei* YIT 9018 in the $CaCl_2$ -free MRT broth with various sodium pyrophosphate concentrations after infection with phage J1 at 10^0 of MOI. Sodium pyrophosphate was added to make concentration of 0.10% (■), 0.125% (▲), 0.15% (●), 0.175% (★) 0.20% (□), 0.225% (△), and 0.25% (○). Non was added to control (···).

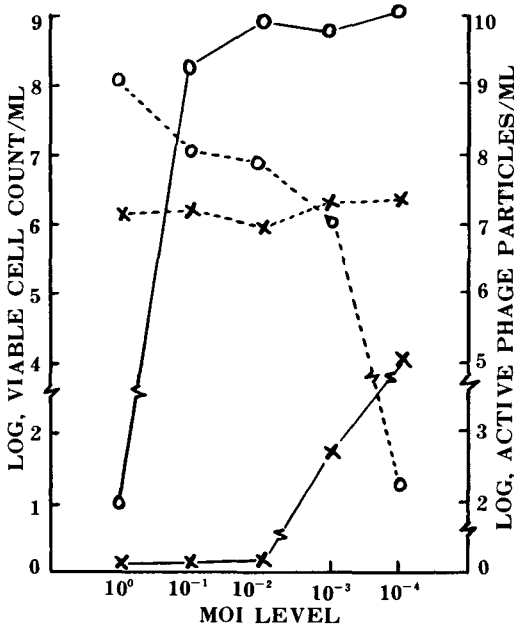


Fig. 4. Changes in viable cells of *L. casei* YIT 9018 and titer of phage J1 in CaCl_2 -free MRT broth with and without 0.15% sodium pyrophosphate at various MOI levels after 24hrs of incubation. —○—: viable cell count of *L. casei* YIT 9018 with sodium pyrophosphate, ...○...: titer of phage J1 with sodium pyrophosphate, —×—: viable cell count of *L. casei* YIT 9018 without sodium pyrophosphate, ...×...: titer of phage J without sodium pyrophosphate.

이 결과로써 sodium pyrophosphate 첨가에 의한 phage의 증식억제 작용은 분명하게 나타났으며 phage 오염을 예방하는 유력한 방법으로 인정되었다.

요 약

CaCl_2 를 제거한 MRT 액체배지에 phage가 $\text{M O I} = 10^0$ 이상으로 감염된 경우에는 0.15% sodium pyrophosphate 농도에서 유산균이 용균되었으나, 0.175% 이상의 농도에서는 유산균이 정상적으로 증식함을 알 수 있었다.

그러므로 phage 감염 후 유산균의 증식은 sodium pyrophosphate 농도와 phage 감염수에 의해 결정된다고 사료된다. 이 때에 sodium pyrophosphate의 phage 증식억제 농도에서 phage 불활성화는 나타나지 않았다.

0.15% sodium pyrophosphate를 첨가한 배지에서는 $\text{M O I} = 10^{-1}$ 이하로 phage가 감염되면 유산균이 증식하여 배양 24시간 후 약 $10^8 \sim 9$ /ml의 균수를 나타냈으며, 무첨가 배지에서는 $\text{M O I} = 10^{-3}$ 이상일 때 유산균이 거의 사멸하였고 10^{-4} 일 때는 약 1×10^5 /ml로 용균됨을 나타내었다.

참 고 문 헌

- Richardson, G. H., C. T. Cheng, and R. Young: *J. Dairy Sci.* **60**, 378-386(1976)
- Jonas, L. L., C. A. Ermstrom, and G. H. Richardson: *Cultured Dairy Products Journal* **12**(2), 12-14 (1977)
- Collins, E. B., F. E. Nelson, and C. F. Parmelle: *J. Bacteriol.* **60**, 533-538(1950)
- Hargrove, R. E.: *J. Dairy Sci.* **42**, 906(1959)
- Kriel, J. B., W. H. Holzapfel, and L. A. Mountford: *South African J. of Dairy Technology* **8**(1), 45-49(1976)
- Cherry, W. B. and D. W. Watson: *J. Bacteriol.* **58**, 611-620(1949)
- Van Vunakis, H. V. and R. M. Herriot: *J. Bacteriol.* **83**, 590-596(1961)
- Park, G. M. 성균관대학교 석사학위논문(1982)
Kang, K. H. and G. M. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **10**(4), 253-258
- Kang, K. H., Y. J. Yoo, K. H. Lee, G. M. Park, Y. H. Park, and J. Y. Lee: *成大科學技術研究* **10**, 147-155(1982)
- Ishiwa, H. and T. Yokokura: *Japan J. Microbiol.* **15**, 539-541(1971)
- Murata, A., E. Soeda, and R. Saruno: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **43**, 311-316(1969)
- Adams, M. H.: *Bacteriophage*, Interscience Publishers, Inc., New York, (1959)