

Lactobacillus casei YIT 9018의 自然突然變異株의 發生과 그 特性

姜國熙·金東運*·車松一

成均館大學校 酪農學科

Characteristics and Occurance of Spontaneous Mutant in *Lactobacillus casei* YIT 9018

Kang Kook-Hee, Dong-Un Kim*, and Song-Il Cha

Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

In this study characterization of spontaneous Lac⁻ mutant of *Lactobacillus casei* YIT 9018 was investigated. The frequency of occurring the spontaneous Lac⁻ mutant cells from stock culture strains was approximately 0.5% in MRS Media and 0.29% in 10% nonfat dried milk, otherwise, that from pure Lac⁺ colony it was 0.25% in MRS Media and 0.1% in 10% nonfat dried milk. In the physiological difference the spontaneous Lac⁻ mutants were defective in lactose and/or galactose-fermenting ability and also needed longer time for coagulation of nonfat dried milk than wild type.

유산균을 종균으로 사용하는 발효 유제품의 제조에 있어서 종균의 활력유지는 대단히 중요하다. 그러나 종균을 보존 또는 사용하는 과정에서 종균의 활력 특히 유산생성력이 자연적으로 감퇴되어 제품 제조에 막대한 지장을 초래하는 경우가 있다.

Group N *Streptococci*의 경우 유당발효능이 불안정하여 산생성이 빠른 세포로부터 산생성이 느린 변이주가 자연적으로 발생하며(1-5), 이러한 산생성이 느린 변이주는 유당대사(6), 단백질 분해력(3, 8, 9), 또는 유당대사와 단백질 분해력 모두에 결함이 있는 것으로 밝혀졌다(7).

이와같은 연구는 최초로 Hariman과 Hammer(10)에 의해서 *Str. lactis*에서 약 2%의 산생성이 느린 변이주가 나타난다고 하였으며, Okulitch와 Eagles(11)는 *Str. cremoris*를 glucose, mannose, fructose, salicin이 들어있는 배지에서 계속 계대하는 경우 lactose 이용성이 상실된다고 하였다.

Yawger와 Sherman(12)은 *Str. lactis*로부터 lactose를 이용하지 못하는 Lac⁻ 변이주를 분리하였고, Hunter(13)는 galactose metabolism에 결함이 있고 lactose를 이용하지 못하는 *Str. cremoris* 변이

주를 보고하였으며, Hirsch(14)는 *Str. lactis* 354를 glucose broth에 계속 계대함으로써 lactose 이용능력이 상실됨을 관찰하였다. 이러한 유당발효능의 자연적인 소실이 유산균의 plasmid에 의하여 일어나는 현상이 밝혀지고 있다(15-25).

본 실험에서는 *L. casei* YIT 9018로부터 spontaneous Lac⁻ cell의 발생빈도와 이러한 변이주의 특성을 분석하여 종균관리에 대한 기초적 자료를 얻는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 성균관대학교 낙농학과 미생물 실험실에서 보존하고 있는 *Lactobacillus casei* YIT 9018, *L. bulgaricus* SKD-0001, *Streptococcus lactis* SKD-1001, *Str. cremoris* SKD-1003, *Str. thermophilus* SKD-1005, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* SKD-1007을 사용하였다.

배 지

Key words: Spontaneous mutant, *Lactobacillus casei*, Lac⁻ mutant
* Corresponding author

우유의 응고시간을 관찰하기 위하여 10% 환원탈지유를 사용하였고 *Lactobacillus*로부터 spontaneous Lac⁻ cell을 얻기 위하여 MRS-lactose indicator agar(MRS Medium에서 glucose 대신 lactose를 넣고 indicator dye로써 Bromocresol purple을 0.004% 첨가)를 사용하였고, *Streptococci*의 경우 Lactic Medium을 변형시킨 Lactic-lactose indicator agar를 사용하였다.

Spontaneous Lac⁻ 변이주의 분리

*Lactobacillus*로부터 spontaneous Lac⁻ mutant의 발생을 조사하기 위하여 pure Lac⁺ colony와 4°C 냉장고에 보관중인 보존균주에서의 발생 등 두가지 경우로 구분하여 행하였다. 첫째 우선 pure Lac⁺ colony를 선별하여 MRS broth와 10% 환원탈지유에 각각 배양하여 MRS-lactose indicator agar에 도말하였으며, 둘째 보존균주에서 균을 이식하여 MRS broth와 10% 환원탈지유에 각각 배양한 후 MRS-lactose indicator agar에 도말하여 48시간이 경과된 plate에 나타난 colony중 작고 창백한 것을 선별하여 우유응고시간, 생균수, 산도, 당발효 시험을 행하여 Lac⁻ 변이주를 얻었다. *Streptococci*의 경우 Lactic-lactose indicator agar를 사용하였다.

당발효시험

당발효 시험용 broth(MRS broth와 Lactic broth에서 glucose를 빼고 Bromocresol purple 0.004%와 각 당용액을 1%씩 각각 첨가한 broth)에 균 현탁액

Table 1. Occurance of Lac⁻ cell in Lac⁺ colony of lactic acid bacteria

Organism	No. of colonies examed	No. of Lac ⁻ colonies	Frequency of Lac ⁻ (%)
<i>L. casei</i> YIT 9018	4417	11	0.25
<i>L. bulgaricus</i>			
SKD-0001	3594	4	0.1
<i>Str. latiss</i>			
SKD-1001	2906	23	0.79
<i>Str. cremoris</i>			
SKD-1003	4891	45	0.92
<i>Str. thermophilus</i>			
SKD-1005	2776	0	0
<i>Str. faecalis</i> var.			
<i>liquefaciens</i>	3275	0	0
SKD-1007			

을 일정량 접종하고 *L. casei* YIT 9018, *L. bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens*는 37°C에서 *Str. lactis*, *Str. cremoris*는 30°C에서 48시간 배양 후 배지의 변색을 기준으로 하였다.

통계처리

Spontaneous Lac⁻ mutant의 평균치에 대한 통계적 유의성 및 검정을 위하여 X²-test를 하였다.

결과 및 고찰

Spontaneous Lac⁻ 변이주의 발생

Group N *Streptococci*의 경우 변이세포는 1~2%의 비율로 발생한다고 보고되어 있으나 그 외의 starter 균주에 대해서는 보고된 것이 없다.

Table 1은 널리 쓰이는 유업용 유산균의 spontaneous Lac⁻ 변이주의 발생빈도를 조사한 것으로서

Table 2. Occurance of Lac⁻ cells by successive transfer of Lac⁺ cell in 10% reconstituted skim milk

Transfer	Milk clotting time(hrs)	No. of colonies examed	No. of Lac ⁻ colonies	Frequency of Lac ⁻ (%)
1st	30	1732	2	0.11
•				
•				
•				
4	30			
5	92	807	624	77.1
6	80			
7	60			
8	30			
•				
•				
•				
10	30	1503	4	0.27
•				
•				
•				
20	30	3291	3	0.09
•				
•				
•				
30	30	1938	2	0.1

Table 3. Occurance of Lac⁻ cells in Lac⁺ colony of *L. casei* YIT 9018 in 10% reconstituted skim milk

Colony No.	No. of colonies examed	No. of Lac ⁻ colonies	Frequency of Lac ⁻ (%)
1	1732	2	0.11
2	2644	3	0.11
3	1509	1	0.06
Total	5905	6	0.1%

X² = 0.0636, D.F. = 2, α = 0.05

Table 4. Occurance of Lac⁻ cells in stock culture of *L. casei* YIT 9018 in 10% reconstituted skim milk

colony No.	No. of colonies examed	No. of Lac ⁻ colonies	Frequency of Lac ⁻ (%)
1	4453	15	0.33
2	3380	8	0.25
3	2451	7	0.28
Total	10284	30	0.29%

X² = 0.7043, D.F. = 2, α = 0.05

*Str. lactis*나 *Str. cremoris*는 각각 0.79%, 0.92%로 발생되어 앞에서 보고된 결과와 거의 일치하였으며 *L. casei* YIT 9018과 *L. bulgaricus*에서도 각각 0.25%, 0.1%의 높은 빈도로 발생되었다. *Str. faecalis* var. *liquefaciens*의 경우 Lac⁻ cell이 전혀 나타나지 않았는데 이것은 *Str. faecalis* var. *liquefaciens*의 plasmid DNA의 특성을 연구한 결과 단백질 분해력 및 유당 이용성이 plasmid에 연관되어 있지 않음을 보고한(26) 내용을 검토해 볼 때 이 균주의 유당 이용성이 비교적 안정한 것으로 사료된다. 그러나 더 많은 수의 colony를 검사하여 Lac⁻ cell의 발생에 관하여 연구하여야 할 것이다.

유산균은 배양도중 갑자기 유산생성력이 감소하는 경우가 나타난다. Table 2는 *L. casei* YIT 9018의 경우 자연적으로 발생하는 유당발효능의 소실을 관찰하기 위한 실험으로써 30세대 계대배양하는 과정에서 5세대 계대시 spontaneous Lac⁻ cell의 비율이 77%로써 높게 나타났으며, 응고시간이 90시간으로 지연된 것은 자연적으로 유당이용능이 감퇴된 Lac⁻ cell이 배양도중 갑자기 발생하였기 때문이다. 그러나 이와같은 현상이 5세대 계대때만 나타나는 것은 아니며 실험도중 가끔 관찰되었다.

Lac⁺ colony와 보존균주(4°C 냉장고에서 1개월간 보존)를 각각 10% 환원 탈지유에 배양하여

Table 5. Occurance of Lac⁻ cells in Lac⁺ colony of *L. casei* YIT 9018 on MRS medium

colony No.	No. of colonies	No. of Lac ⁻	Frequency of Lac ⁻
1	1742	3	0.17
2	1088	2	0.18
3	1587	6	0.38
Total	4417	11	0.25%

X² = 1.7465, D.F. = 2, α = 0.05

Table 6. Occurance of Lac⁻ cells in stock culture of *L. casei* YIT 9018 on MRS medium

colony No.	No. of colonies examed	No. of Lac ⁻ colonies	Frequency of Lac ⁻ (%)
1	387	2	0.5
2	297	2	0.67
3	499	2	0.4
Total	1182	6	0.5%

X² = 0.2854, D.F. = 2, α = 0.05

Table 7. Occurance of Lac⁻ cell from stock culture stored at 4°C

Period	No. of colonies examed	No. of Lac ⁻ colonies	Frequency of Lac ⁻ (%)
1 month	2319	6	0.26
2 month	2134	9	0.42
3 month	3250	9	0.27
4 month	2541	6	0.25%

MRS-lactose indicator agar에 도말하였을 때 Lac⁻ cell이 0.1%, 0.29%의 빈도로 발생하였으며(Table 3, 4), MRS broth에 배양하였을 경우에는 Lac⁺ colony로부터 0.25%, 보존균주로부터 0.5%의 빈도로 발생하였다(Table 5, 6).

ILS Medium에 배양한 보존균주를 4°C 냉장고에 1~4개월간 보존할 경우 보존기간에 따른 Lac⁻ cell의 발생빈도는 거의 비슷한 양상을 보였다(Table 7).

이상과 같은 결과를 종합해 볼 때 pure Lac⁺ colony보다 보존균주에서 Lac⁻ cell의 발생빈도가 2배 이상 높게 나타난 것은 보존균주를 냉장고속에서 장기간 보존하는 과정에 원인이 있는 것으로 생각되며, 10% 탈지유에서 보다 MRS broth에서 약 2배

Table 8. Characteristics of spontaneous Lac⁻ cells obtained from *L. casei* YIT 9018

Strain	Lactose	Galactose	Milk clotting time(hrs)
Wild type	+	+	30
M-1	-	-	720
M-2	-	+	240
M-2R	+ ^W	+	110

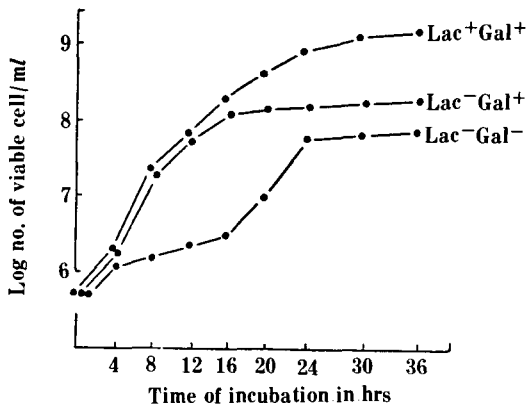


Fig. 1. Comparison of growth of Lac⁺ and Lac⁻ cells of *L. casei* YIT9018 incubated at 37° in 10% reconstituted skim milk.

정도의 Lac⁻ cell이 더 발생하는데 이것은 합성배지인 MRS broth에서 미생물이 더 빨리 성장하여 산도가 급격히 떨어지기 때문이라 생각되며, 반면에 10% 탈지유에서는 MRS broth에서 보다 늦게 성장하여 산도가 비교적 서서히 떨어지며 또한 고형물에 의한 완충작용의 결과로 생각되어진다.

Spontaneous Lac⁻ mutant의 특성

L. casei YIT 9018로부터 3종류의 spontaneous mutant를 얻었으며 분리된 mutant는 각각 M-1, M-2로 명명하였고 M-2의 revertant는 M-2R로 표시하였다(Table 8). 분리된 spontaneous Lac⁻ mutant에 대한 23가지 당의 발효시험의 결과는 lactose나 galactose 이용에 있어서만 차이가 있었고 그 외의 당에 대해서는 wild type과 동일한 결과를 나타내었다. M-1은 우유를 응고시키는데 720시간을 요하였으며 계속 배양하더라도 revertant가 나타나지 않았으나 M-2는 240시간 후에 우유를 응고시켰으며 배양 4일째부터 revertant가 나타났다. Revertant인

M-2R은 110시간만에 우유를 응고시켰는데 이것은 wild type과 비교해 볼 때 full revertant가 아닌 partial revertant라고 생각된다.

Wild type과 Lac⁻ 변이주들을 동일균수로 10% 환원탈지유에 접종하여 일정한 시간 간격으로 생균수를 비교해 보면(Fig. 1), Lac⁻Gal⁺는 배양 12시간째까지는 wild type과 거의 동일한 수준으로 성장하다가 16시간째부터는 stationary phase로 접어들면 wild type은 growth가 계속 유지되어 배양 36시간째 1.5×10⁹cell/ml에 도달하였으며 이 균수는 Lac⁻Gal⁻에 비해 17배에 해당된다.

이상과 같은 결과를 검토해 보면 일반적으로 자연 돌연변이의 발생은 대단히 낮은 비율로 나타나지만 *L. casei* YIT 9018에서는 0.1% 이상의 대단히 높은 비율로 발생하였으며, 이러한 변이주는 다시 wild type으로 완전히 복구되지 않는 불가역적인 현상이라고 생각된다. 그리고 계대배양 과정중 Lac⁻ 변이주의 돌발적인 발생을 방지하기 위한 배양조건에 관한 연구가 행해진다면 유산균, 종균 관리에 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

L. casei YIT 9018에서 자연적으로 발생하는 Lac⁻ mutant의 발생빈도와 이러한 변이주의 특성을 검토하였다. 보존균주로부터 spontaneous Lac⁻ mutant의 발생은 MRS 배지에서 0.5%, 10% 환원탈지유에서 0.29%, pure Lac⁺ colony로부터의 발생은 MRS 배지에서 0.25%, 10% 환원탈지유에서 0.1%의 빈도로 나타났다. 분리된 spontaneous mutant는 대부분이 Lac⁻ mutant였고 가끔 Lac⁻Gal⁺도 나타났다. Lac⁻Gal⁺ mutant는 배양 4일째부터 partial revertant가 출현하였으나 Lac⁻Gal⁻는 전혀 나타나지 않았으며 Lac⁻ mutant는 wild type보다 우유를 응고시키는데 더 많은 시간을 요하였다.

참고문헌

1. Garvie, E.I.: *J. Dairy res.* **26**, 227 (1959).
2. Garvie, E.I. and L.A. Mabbit: *J. Dairy res.* **23**, 305 (1956).
3. Citti, J.E., W.E. Sandine and P.R. Elliker: *J. Dairy Sci.* **48**, 14 (1963).
4. Pearce, L.E.: *18th International Dairy Congress, Sydney, IE*, 118 (1970).
5. Westhoff, D.C., R.A. Cowman and M.L. Speck: *J. Dairy Sci.* **54**, 1253 (1971).

6. Mckay, L.L., K.A. Baldwin and E.A. Zottla: *Appl. Microbiol.* **23**, 1090 (1972).
7. Mckay, L.L. and K.A. Baldwin: *Appl. Microbiol.* **28**, 342 (1974).
8. Pearce, L.E., N.A. Skipper and B.D.W. Jarvis: *Appl. Microbiol.* **27**, 933 (1974).
9. Mckay, L.L. and K.A. Baldwin: *Appl. Microbiol.* **29**, 546 (1975).
10. Harimman, N.A. and B.W. Hammer: *J. Dairy Sci.* **14**, 40 (1931).
11. Okulitch, O. and B.A. Eagles: *Can. J. Res. Ser.* **14**, 320 (1936).
12. Yawger, E.S. and J.M. Sherman: *J. Dairy Sci.* **28**, 83 (1937).
13. Hunter, G.J.E.: *J. Dairy res.* **10**, 464 (1939).
14. Hirsch, A.: *J. Gen. Microbiol.* **5**, 208 (1951).
15. Cords, B.R., L.L. Mckay and P. Guerry: *J. Bacteriol.* **117**, 1149 (1974).
16. Anderson, D.G. and L.L. Mckay: *J. Bacteriol.* **129**, 367 (1977).
17. Kempler, G.M. and L.L. Mckay: *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 1041 (1979).
18. Kuhl, S.A., L.D. Larsen and L.L. Mckay: *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 1193 (1979).
19. Efstathiou, J.D. and L.L. Mckay: *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 38 (1976).
20. Larsen, L.D. and L.L. Mckay: *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 944 (1978).
21. Mckay, L.L., K.A. Baldwin and J.D. Efstathiou: *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 45 (1976).
22. Chassy, B.M., E.M. Gibson and A. Giuffrida: *J. Bacteriol.* **127**, 1576 (1976).
23. Chassy, B.M., E.M. Gibson and A. Giuffrida: *Curr. Microbiol.* **1**, 141 (1978).
24. Chassy, B.M., E.M. Gibson and A. Giuffrida: *plasmid.* **2**, 296 (1979).
25. Hofer, F.: *FEMS Microbiol. Letters.* **1**, 167 (1977).
26. 강국희, 이명기, 박연희: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 417 (1985).

(Received October 4, 1988)