

## *Lactobacillus fermentum* KLB12의 열 전처리에 따른 열 스트레스 내성 증진 및 프로테오믹 변화

김 주 현 · <sup>1</sup>박 미 영 · <sup>1</sup>김 승 철 · 윤 현 식 · † 소 재 성  
인하대학교 생물공학과, <sup>1</sup>이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실  
(접수 : 2003. 5. 14. 게재승인 : 2003. 8. 16.)

## Improved Viability and Proteome Analysis of *Lactobacillus fermentum* KLB12 upon Heat Stress

Joo-Hyun Kim, Mi-Young Park<sup>1</sup>, Seung-Cheol Kim<sup>1</sup>, HyunShik Yun, and Jae-Seong So†

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ehwa Woman's University, Seoul 158-710, Korea

(Received : 2003. 5. 14. Accepted : 2003. 8. 16.)

In the previous study, we have isolated several vaginal lactobacilli from Korean woman and selected one of them (KLB12) for further study, which was identified as *Lactobacillus fermentum* by sequence analysis of 16S rRNA gene. Formulated *L. fermentum* KLB12 can be used for ecological treatment of bacterial vaginosis. For pharmaceutical formulation, the spray-drying process is required where stress such as high temperature is routinely applied. In this study, we found that heat stress at 60°C for 20~30min reduced the viable cell population of KLB12 by 10<sup>6</sup>~10<sup>9</sup>. However, adaptation of KLB12 cells at 52°C made them more thermotolerant upon exposure to 60°C. The level of thermal protection in RSM (reconstituted skim milk) by adaptation in acid (pH 5), cold (4°C), ethanol (3%), NaCl (0.3M) was also examined. Although not as efficient as the homologous stress, adaptations in both cold and NaCl gave considerable cross protection against heat stress. When chloramphenicol was added during heat adaptation, adaptation effect was abolished. This suggests that *de novo* protein synthesis is necessary during the adaptation process. Important changes in proteome during heat adaptation was examined with two-dimensional gel electrophoresis.

**Key Words :** *Lactobacillus fermentum* KLB12, spray-drying, heat adaptation, cross protection, *de novo* protein synthesis

### 서 론

*Lactobacillus spp.*는 여성의 질 내에 정상 우점균총으로 존재하면서 여러 가지 병원성 미생물의 생장 억제 물질을 생성하여 기회성 감염을 최소화한다. 현재까지 세균성 질염 치료를 위한 방법으로 항생제를 주로 사용하고 있으나, 항생제를 사용할 경우 정상 세균총인 *Lactobacillus spp.*까지 제거하게 되어 만성적인 세균성 질염이 발생하게 된다. 따라서 항생제 치료를 대체하기 위한 방법으로 정상세균총을 복구시키는 생태적 치료 방법이 요구되었고, 이를 위하여 정상 우점균인 *Lactobacillus spp.*를 제제화 하는 것이 필요하다. 이런 제제

화의 방법으로 분말건조 방법이 경제적으로 이용되고 있다(1-4). 하지만 이 과정에서 고온의 스트레스를 거치게 되고, 생존력은 급격히 감소하게 된다. 이에 대응하여 *L. acidophilus* 경우에는 spray-drying 과정 동안에 보호 보조제로 토마토 주스나 설탕을 넣기도 하고(5), *L. helveticus*는 열 내성을 증진시키는 방법으로 calcium alginate bead를 이용해 포집하는 방법을 사용하기도 하였다(6). 최근에 들어서는 LAB 종의 스트레스 반응에 대한 연구가 많이 이루어지면서(7-9), 제제화 과정 동안의 스트레스와 관련하여 생존력을 증진시키는 방법이 함께 연구되어 졌다. 이와 같은 방법으로 다른 환경 스트레스에 전처리 하여 spray-drying 과정뿐만 아니라 freeze-drying 과정 동안에도 생존력을 증진시키는 것은 보고된 바 있다(3, 4, 9). 또한 스트레스 노출 시 유도되는 단백질이 변성된 단백질의 분해나 재접힘 상태를 촉진시키는 chaperone 역할을 함으로서 세포의 손상을 복구시키거나 생

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering,  
Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel : +82-32-860-7516, Fax : +82-32-875-0827  
E-mail : sjaseon@inha.ac.kr

장 활성을 유지시키는 역할을 한다는 것이 보고되어 있다 (10-13). 특히 적정 온도에서 갑자기 변화하여 올라가면, 급속하게 발현 양이 증가하는 것으로 heat shock protein이 알려져 있으며, 이것은 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Lactococcus lactis*에서 연구가 많이 진행되고 있다(14-16).

본 실험에서는 *Lactobacillus spp.* 중에서 항균력이 우수한 균주인 *L. fermentum* KLB12를 선택하고, spray-drying 과정 동안 생존력을 증진시키기 위한 방법으로 열 전처리 조건을 수행하였다. 또한 열 전처리 동안의 새로이 발현되는 단백질이 생존력을 증진시키는 것을 확인하고, 단백질의 발현 여부를 2-D electrophoresis를 이용하여 관찰해 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 한국여성의 질로부터 분리한 *Lactobacillus spp.* 중 항균 활성이 우수하고 열 내성이 뛰어난 KLB12이다. 이를 16S rRNA를 이용하여 분자동정 하였다. 배지는 MRS를 사용하여 (1 ℓ 기준으로 glucose 20 g, peptone No.3 10 g, beef extract 10 g, yeast extract 5 g, sodium acetate 5 g, ammonium citrate 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g, tween 80 1 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 35 mg, MgSO<sub>4</sub> 575 mg, MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 120 mg)을 37°C에서 혐기적 조건으로 정지배양 하였다. 또한 열 스트레스 처리 시 현탁액으로 RSM (reconstituted skim milk)을 사용하였다.

### 열 내성 측정(D value 와 T value)

*L. fermentum* KLB12를 2% 접종 후 8시간 동안 배양한 후, 세포를 수거하고, 0.01 M sodium phosphate buffer로 2번 씻었다. 다시 새 MRS 배지에 현탁하여, 60°C와 65°C에서 열을 가하였다. 2분 간격으로 희석하여 pour plate 방법으로 생존수를 측정하고, 초기 생존수를 기준으로 % survival로 나타내어 D value (decimal reduction time)과 T value (thermal death time)를 측정하였다.

### 생장곡선에 따른 열 내성 측정

*L. fermentum* KLB12를 2% 접종 후, 초기에는 2~3시간 간격으로 하고, 10시간 이후부터는 시간 간격을 늘려서 50시간까지 생존수와 OD를 측정하였다. 대수기는 접종 후 4시간, 정지기는 접종 후 8시간으로 구분하여 생장 곡선에 따른 열 내성과 열전처리 효과를 확인하였다. 전처리 조건은 52°C에서 15분 동안 하였고, 열 스트레스 조건으로 60°C에서 20분 동안 노출시켰다. 전처리 한 것과 하지 않을 것을 나누어서 colony counting을 하고, % survival로 비교하였다.

### 표면 관찰(SEM)

열 전처리 효과를 가시적으로 확인하기 위해서 SEM을 이용하였다. 열전처리 (52°C, 15 min) 한 것과 하지 않은 것으로 나누어 열 스트레스 (60°C, 30 min)에 노출시킨다. 세포를 수거한 후, 0.01 M sodium phosphate buffer로 2번 씻는다. 그리고 유리판 (5mm×5mm)에 얇게 묻혀서 말린다. 그 후 코팅하여 FE-SEM (field emission scanning electron microscopy,

Hitach S-4200)으로 10kv×6k 조건에서 관찰하였다.

### 최적의 열 전처리 조건

정지기까지 자란 세포를 수거하고 ddH<sub>2</sub>O, PBS (potassium phosphate buffer), MRS 와 20% RSM에 세포를 현탁 시킨 후, freeze-drying 시킨다. Powder 상태를 다시 saline에 현탁시켜 생존수를 확인하고, 그 중 높은 생존수를 유지하는 배지인 MRS와 20% RSM을 선택하여 전처리 (52°C, 15 min) 한 것과 하지 않은 것을 나누어, 60°C에서 20분 동안 노출시켰다. 또한 전처리 조건을 수행할 때, sucrose를 넣었을 때와 전처리 온도를 42°C → 47°C → 52°C 로 5분씩 점차적으로 증가시켜 전처리한 것을 비교하였다.

### cross-protection의 효과

열 전처리 조건 (52°C, 15 min) 뿐만 아니라, 다른 환경 스트레스에도 전처리를 수행하였다. 저온 (4°C), 산 (pH 5), NaCl (0.3 M), 에탄올 (3%) 조건에서 전처리 하였고, 전처리 시간은 15분으로 모두 동일하게 하였다. 또한 단백질 합성 저해제인 chloramphenicol (100 µg/ml)을 처리하여 전처리 동안에 유도되는 단백질 합성이 열 스트레스에 노출되었을 때 내성을 유도하는데 필요한가를 확인하였다. 위의 조건으로 열 스트레스 노출 시간은 30분까지 측정하였다.

### SDS-PAGE

전처리 온도를 42°C, 52°C, 62°C에서 15 min 동안 하였을 때와 전처리 시간을 52°C에서 15 min, 30 min, 45 min, 60 min 하였을 때로 나누어 단백질 추출을 하였다. 세포를 정지기까지 키운 후, OD<sub>600</sub>가 약 1이 되도록 새 MRS에 현탁시킨다. 그 후 전처리 조건을 수행하고, 세포를 수거한다 (8000 rpm, 10 min, 4°C). Extraction buffer (40 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 150 mM ammonium sulfate, 1 mM PMSF [phenylmethylsulfonyl fluoride], 10% glycerol)에 현탁시키고, 세포를 씻는다. 다시 1/100 (vol.) 의 extraction buffer에 세포를 현탁시킨 후, glass bead를 약 0.1 g 넣고 vortexing하여 cell를 파쇄한다. 이 때 vortexing을 1분 동안 수행한 후, 얼음물에 1분 동안 보관하는 과정을 5회 반복한다. 다시 상등액을 얻기 위해 원심분리 (8000 rpm, 10 min, 4°C) 시키고, 새 micro tube 에 옮긴다. 5× sample buffer 와 섞은 후, 100°C에서 5 min 동안 끓여서 -70°C에 보관한다. 12% acrylamide gel를 만들어서 10 µℓ 로딩하고, stacking gel에서는 100 V, 50 mA 조건으로, separating gel에서는 150 V, 70 mA로 전기영동 한다. 또한 band 확인을 위하여 Coomassie staining과 destaining을 하였다.

### Protein extraction for 2-DE

열 전처리 (52°C, 15 min)를 한 것과 하지 않은 것을 나누어서 세포를 파쇄하는 과정은 위의 방법과 동일하다. 새 micro tube에 상등액을 옮긴 후, Bradford assay를 이용하여 단백질량을 정량한다. 그 후, PlusOne 2-D Clean-Up Kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 단백질 침전과 washing 과정을 거친다. 실온에서 air drying 시킨 후, rehydration solution (8 M urea, 2% CHAPS, bromophenol

blue)에 현탁시켜 -70°C에 보관한다.

**IEF (Iso electric focusing)**

Strip holder에 rehydration solution에 포함된 sample를 450  $\mu$ l 로딩하고, 그 위에 dry strips (24 cm, NL pH 3-7, Amersham Pharmacia Biotech)을 얹는다. 그리고 IPGphor system (Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 IEF를 실시한다. 조건은 10 hr 동안 20°C를 유지하면서 rehydration을 하고, 30 V에서 1 hr, 100 V에서 1 hr, 200 V에서 1 hr, 500 V에서 1 hr, 1000 V에서 1 hr을 수행한 뒤, 8000 V까지의 gradient 로 1 hr 동안하며 총 90000 Vhr 로 step-n-hold 방법으로 실시한다. IEF가 모두 끝나면 strips을 equilibration solution (2% SDS, 50 mM Tris-HCl [pH 8.8], 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 0.002% bromophenol blue)에 넣고 10분 동안 흔들면서 SDS-PAGE 조건에 맞추어 준다.

**SDS-polyacrylamide gel electrophoresis**

12.5%의 acrylamide homogeneous gel을 만들고, Ettan DALT system (Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하였다. 한 개의 gel 당 1 W 씩 1 hr 동안, 그 다음부터는 5 W→10 W→15 W씩 늘려서 총 9 hr 동안 로딩하였다. Gel은 PlusOne silver staining kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 staining하고, 20% glycerol 에 넣어 4°C에 보관하였다. 그리고, 두 장의 gel pattern을 비교하기 위해서 ImageMaster (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하였다.

**결과 및 고찰**

**열 스트레스 내성**

*Lactobacillus spp.* 중에서 항균활성이 뛰어나고, 열 내성이 좋은 것으로 선택되어진 KLB12는 분자동정으로 *Lactobacillus fermentum*임이 확인되었다. 열 내성을 측정하는 값으로 D value는 60°C에서 50분, 65°C에서 14~16분 사이로 측정되었고, T value는 60°C에서 90~100분, 65°C에서 36~38분으로 측정되었다(Fig. 1). 이는 KLB12와 비슷한 항균활성을 갖는 *L. crispatus* KLB46에 비하여 3~5배정도 높은 열 내성을 보인다. 또한 *Lactobacillus spp.* 중 *paracasei*와 *salivarius*와도 비교하여 상대적으로 높은 값을 나타내는 것을 확인하였다(4).

**성장시기에 따른 열 내성과 열 전처리 효과**

성장시기에 따른 열 내성을 확인하기 위하여, 생장곡선을 50시간까지 CFU와 OD를 측정하였다(Fig. 2). 그 후 대수기는 접종 후 4시간으로, 정지기는 접종 후 8시간으로 나누어서 열 전처리 (52°C, 15 min)하여 열 스트레스 (60°C, 20 min)에 노출시킨 결과 정지기에서의 세포가 배수기보다 약 10~100배 정도 높은 생존수를 보였다(Fig. 3). 위와 같이 대수기 보다 정지기에서 더 높은 내성을 보이는 것은 *Lactobacillus acidophilus* 뿐만 아니라 몇몇 균주에서도 보고 되어지고 있고(8), 정지기에서 더 높은 열 내성을 갖는 것을 membrane fluidity와 관련하여 fatty acid analysis를 통해서도 설명한 바 있다(17, 18). 또한 열 전처리한 것이 하지 않은 것보다 대수기와 정지기 모두에서 약 10~100배정도 효과를

보이는 것으로 열 전처리 과정이 생존수를 증진시키는 것으로 확인되었다(Fig. 3). 그리고 이 결과로 37°C에서 자란 것과 그것을 열 전처리 하여 열 스트레스에 노출시켰을 때와 바로 노출시켰을 때를 나누어 SEM 촬영을 하였을 때, 열 전처리 한 후 열 스트레스에 노출 시켰을 때가 더욱 세포의 모양이 유지되고 있는 것으로 열 전처리 효과를 가지적으로 확인할 수 있었다(Fig. 4).

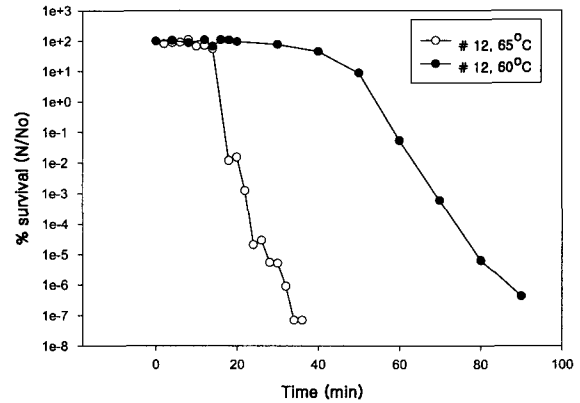


Figure 1. Survival of *L. fermentum* KLB12 heated in MRS at 60°C and 65°C.

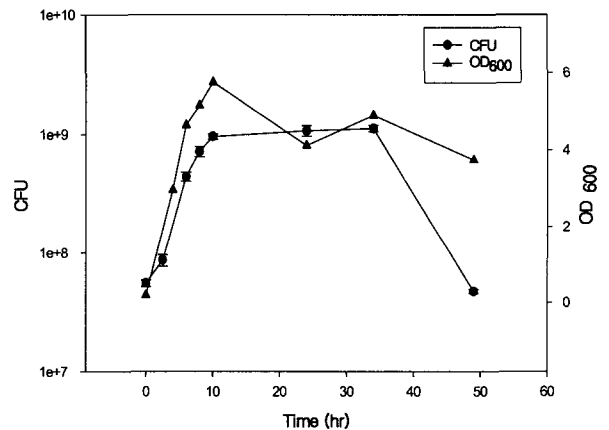


Figure 2. Growth curve of *L. fermentum* KLB12.

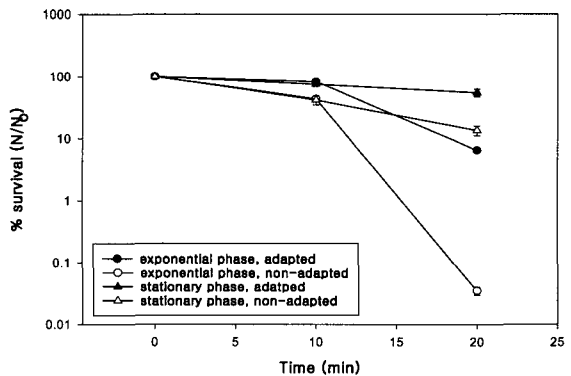


Figure 3. Survival of heat-adapted and non-adapted of *L. fermentum* KLB12 cells at different growth phase.

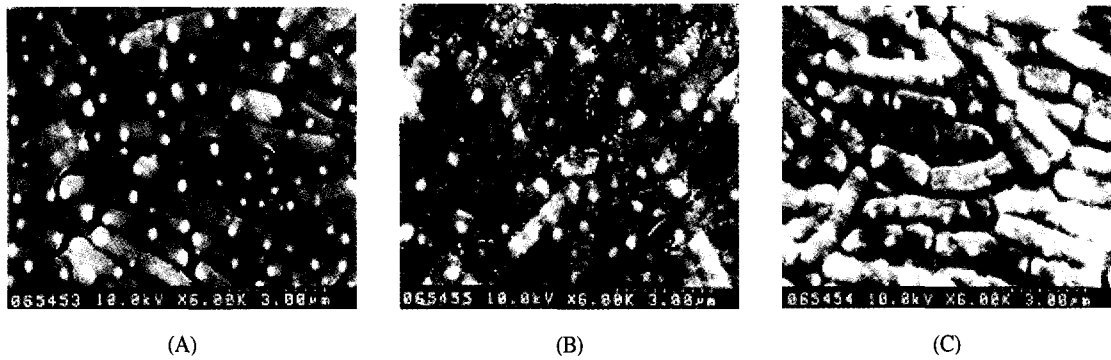


Figure 4. Analysis of morphological changes of *L. fermentum* KLB12 during heat stress. Nontreated cells (A), and cells undergoing extreme heat (60°C) stress (B) were analyzed by scanning electron microscopy. For comparison, cells subjected to heat adaptation (52°C) and the to extreme heat (60°C) stress were also analyzed (C).

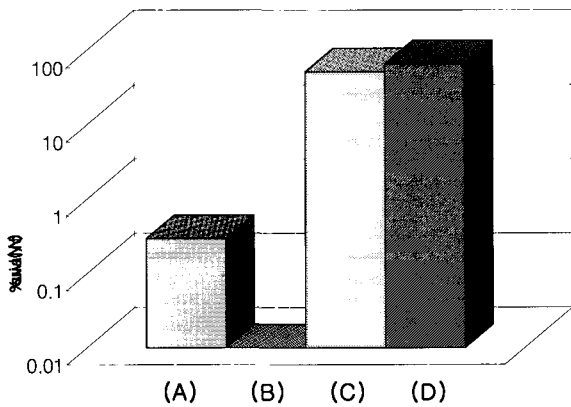


Figure 5. Survival of freeze-dried cells of *L. fermentum* KLB12 in PBS (A), ddH<sub>2</sub>O (B), MRS (C) and RSM (D).

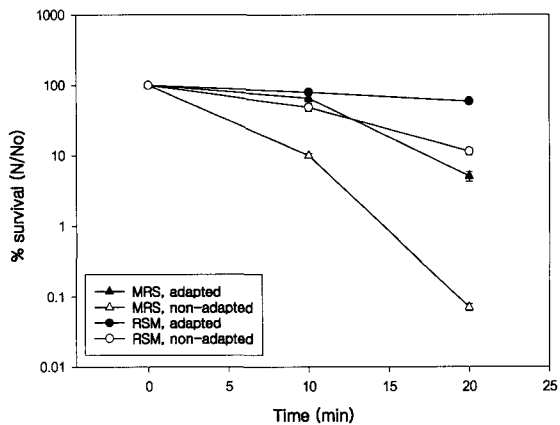


Figure 6. Survival of heat-adapted and non-adapted of *L. fermentum* KLB12 in MRS and RSM.

**최적의 열 전처리 조건**

열 전처리 시 생존력을 증진시키는 효과를 최적화하기 위한 방법으로 현탁 배지, 전처리 온도 조건을 달리하였을 때와 sucrose를 첨가하였을 때를 나누어 실험하였다. 우선 제제화 과정인 freeze-drying에 RSM, MRS, ddH<sub>2</sub>O, PBS에 세포를 현탁시켜 적용시킨 결과, MRS와 RSM에서 보다 높은 생존력을 유지하는 것을 확인하였다(Fig. 5). 이 결과는 starvation 상태인 PBS와 ddH<sub>2</sub>O보다는 풍부한 영양소가 있는 MRS와 우유

단백질이 있는 RSM이 스트레스에 대한 보호 효과가 높은 것으로 보여지며, 특히 RSM 경우 우유 단백질이 세포를 포집하여 스트레스 노출 시 보호한다는 것을 CSLM으로 확인한 결과로 설명할 수 있겠다(4). 이 결과를 바탕으로 MRS와 RSM에 세포를 현탁시켜 열 스트레스를 노출시킨 결과, RSM에서 열 전처리한 것과 하지 않은 것 모두 10~100배 정도 높게 나타났다(Fig. 6).

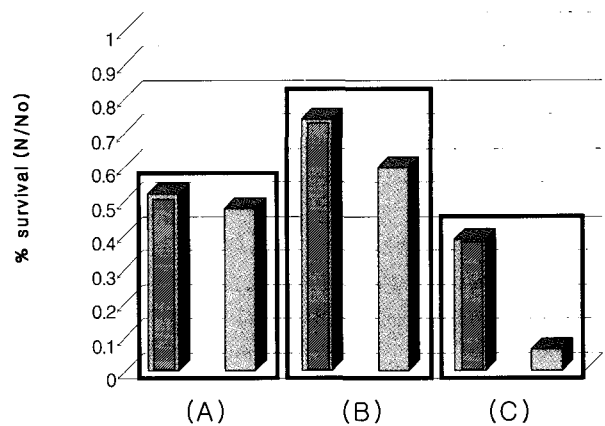


Figure 7. Effect of sucrose (hatched) and adaptation conditions ; gradient adaptation (A), one-step adaptation (B), non-adaptation (C) of *L. fermentum* KLB12 against heat stress.

또한 열 전처리 온도인 52°C에서도 스트레스 온도가 될 수 있기 때문에, 그 보다 낮은 42°C부터 5°C씩 늘려 가는 방법으로 42°C → 47°C → 52°C로 5분 동안 점차적으로 증가시켜 전체 열 전처리 시간을 15분으로 하여 비교하였다. 그 결과, Fig. 7에서 보는 바와 같이 그리 큰 차이는 아니지만, 한 조건(52°C)에서 전처리 한 것이 높은 생존력을 유지하는 것으로 나타났다. 이는 점차적으로 증가시켰을 때의 전처리 시간이 충분하지 않기 때문일 수도 있으나, 같은 전처리 시간을 적용하였을 때는 한 온도(52°C) 조건에서 전처리 하는 것이 그 효과가 더 높다고 할 수 있겠다. 이어지는 실험으로 건조 스트레스 과정에서 보호 효과를 보이는 sucrose를 열 전처리 동안에 첨가하였을 때를 비교하였다(19). RSM의 현탁 배지에 2% sucrose를 첨가하여 위와 같은 조건으로 열 전처리를 하였을

때, 조건에 상관없이 sucrose가 첨가된 세포에서 모두 높은 생존력을 보였다(Fig. 7). 이는 sucrose가 건조 스트레스뿐만 아니라 열 스트레스 대해서도 보호 작용이 있는 것을 확인할 수 있다. 이것으로 열 전처리 시 2% sucrose가 포함된 20%의 RSM에 세포를 현탁시켜 52°C에서 15분 동안 전처리 하는 것이 최적의 조건이라 할 수 있겠다.

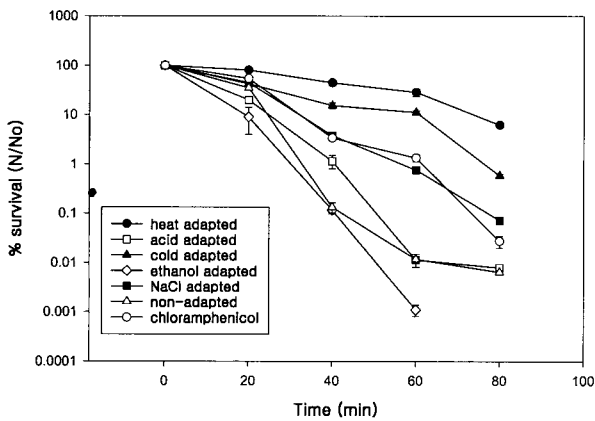


Figure 8. Cross-protection of *L. fermentum* KLB12 against heat stress by adaptation in heat, cold, ethanol, NaCl and acid.

**다른 스트레스에 대한 전처리 효과와 chloramphenicol 처리 시 전처리 효과 저해**

*Lactobacillus* spp.에서 제제화 과정 동안 같은 종류의 스트레스에 대한 전처리 뿐만 아니라 다른 환경 스트레스에도 전처리 시켜 그 효과를 확인하고, 전처리 조건에 적용하는 실험은 몇몇 보고되어 있다(3, 9, 20). 이 실험에서도 열 전처리 조건과 더불어 다른 환경 스트레스에도 전처리 조건을 수행하였다. 저온 (4°C), 산 (pH 5), 에탄올 (3%), NaCl (0.3 M)에 15분 동안 전처리 하여 60°C에서 80분 동안 열 스트레스에

노출시킨 결과, 전처리 하지 않은 것에 비해 10~1000배까지 높은 생존력을 보였고, 열 > 저온 > NaCl의 조건 순으로 전처리 효과를 보였다. 하지만 산과 에탄올은 효과가 거의 나타나지 않았다(Fig. 8). 이것으로 같은 종류의 열 전처리 효과 보다는 덜하지만, 저온과 NaCl도 열 스트레스에 대한 생존력을 증진시키는 간접 효과 (cross-protection)가 있음을 확인할 수 있었다. 이런 간접 효과의 결과는 *L. crispatus* KLB46으로 저온 전처리 하여 열 스트레스에 노출시켰을 때 효과를 확인한 바 있다(9). 또한 *L. paracasei*에서는 NaCl로 전처리 하였을 경우 열 스트레스에 대한 전처리 효과가 보고되었고(3), *Lactococcus lactis*에서는 NaCl로 처리하였을 때 유도되는 단백질이 Heat shock protein임을 확인하고, NaCl이 열 스트레스 반응에 대한 유사한 기작을 가지고 있는 것을 밝힌 바 있다(14). 또한 단백질 합성 저해제인 chloramphenicol을 이용하여 전처리 동안에 유도되는 단백질 합성이 열 스트레스에 노출되었을 때 내성을 유도하는데 필요한가를 확인하였다. 열 전처리 조건에 chloramphenicol (100 µg/ml)을 첨가한 후, 열 스트레스에 적용시켜본 결과 chloramphenicol과 함께 전처리 한 것이 전처리 하지 않은 것과 같은 스트레스 대응 양상을 보였다(Fig. 8). 이는 전처리 과정에서 이루어지는 단백질 합성이 스트레스에 대한 내성 유도에 반드시 필요하다는 것을 나타낸다.

**열 전처리 시 발현되는 단백질 확인**

열 전처리 동안 새로이 발현되는 단백질을 확인하기 위하여, 전처리 온도와 시간을 달리하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 그 결과, 37°C를 대조구로 하여 42°C, 52°C, 62°C로 전처리 온도를 달리하였을 때 전체적인 발현 정도만 확인할 수 있었고, 구체적인 크기의 밴드로는 구별을 할 수 없었다. 또한 같은 온도 (52°C)에서 전처리 시간을 달리 하였을 때 (15분, 30분, 45분)를 달리 하여 비교한 결과, 37°C인 대조구에 비해서 전처리 한 것이 단백질의 발현 양이 많았으나, 전처리 시간에

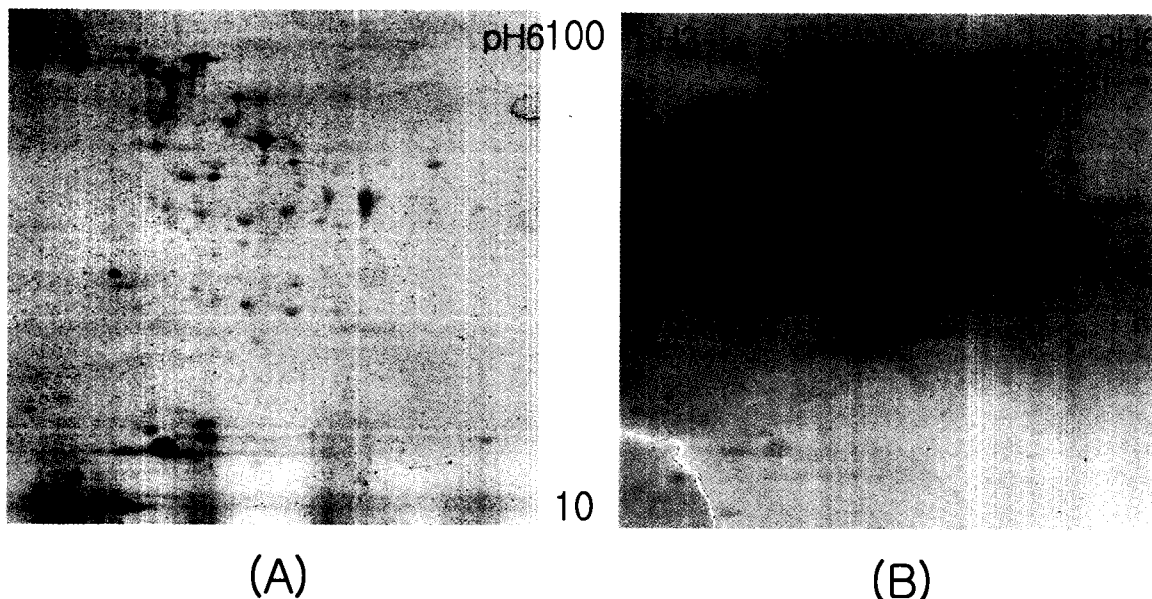


Figure 9. 2D gel electrophoresis of *L. fermentum* KLB12 total proteins before (A) and after (B) heat shock.

따라서 거의 차이가 나지 않았다. 따라서 신규 단백질 발현 여부의 정확한 비교를 위하여 52°C에서 15분 동안 전처리 한 것을 선택하여 2-D electrophoresis 실험을 수행하였다. pH 범위로 3~6, 크기는 10~100 kDa 사이에 있는 spots을 스캔한 그림은 다음과 같다(Fig. 9). 이것을 ImageMaster로 분석한 결과 전처리 하지 않은 것은 총 107 개의 spots을, 전처리 한 것은 총 114개의 spots을 확인하였다. 이를 대조구와 비교한 결과, 5배 이상 과발현된 단백질은 총 17개의 spots으로 pH 4~5, 100 kDa에 가까운 범위에 나타났고, 반대로 5배 이하 감소하여 발현된 단백질은 총 8개의 spots으로 아주 작거나 큰 크기의 범위에 나타났다. 또한 열 전처리 동안에 새로이 생성된 단백질은 총 7개 spots으로 나타났으며, 이것은 과발현된 단백질과 같은 범위에 나타났다(Fig. 10). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 와 *Lactococcus lactis* 에서도 열 전처리 시 새로이 발현되는 heat shock proteins 은 pH 4~5 범위로 크기는 다양하게 나타났다(15, 16). 따라서 열 전처리 동안 새로이 생성된 단백질과 과발현 되는 단백질을 확인하였고, 이렇게 선별된 단백질의 동정을 통해서 열 전처리에 의해 발현 정도가 변화되는 단백질을 확인하는 실험을 진행 중에 있다.

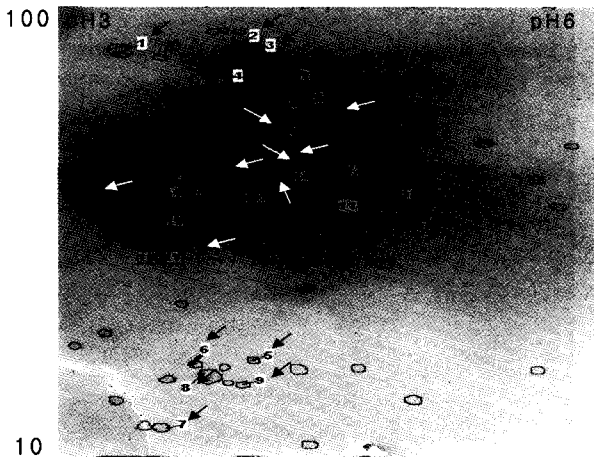


Figure 10. Protein patterns determined for *L. fermentum* KLB12 by heat adaptation. Heat-shock-induced spots (5 fold, 17 spots) are non-arrow square, minor heat-shock-induced spots (5 fold, 8 spots) are black-arrow square, and newly synthesized spots (7 spots) are white-arrow square.

요 약

본 연구에서는 *L. fermentum* KLB12을 열 전처리 함으로서 제제화 과정 동안 거치게 되는 열 스트레스에 대한 내성이 증진됨을 확인하고, 최적의 열 전처리 조건을 수행하였다. 또한 열 전처리 뿐만 아니라, 저온과 열 전처리 조건에도 열 스트레스에 대한 간섭 효과를 확인하였다. 그리고 내성 증진에 신규 단백질 합성이 필요함을 확인하였으며 나아가, 2-D electrophoresis를 통하여 7개의 신규 단백질을 확인하였다. 따라서 이 균주를 제제화하기 위한 방법으로 열 전처리를 이용할 경우 생존력 유지에 큰 효과를 얻을 수 있다고 사료된다.

감 사

본 연구는 산학협동재단의 지원 아래 수행되었으며, 2D gel electrophoresis와 Image 분석은 초정밀생물분리기술연구센터(ERC)의 기기를 이용하였습니다.

REFERENCES

1. Fu, W. Y. and M. R. Etzel (1995), Spray drying of lactococcus lactis ssp. lactis C2 and cellular injury, *J. Food Sci.* **60**, 195-200.
2. Lian, W. C., H. C. Hsiao, and C. C. Chou (2001), Survival of bifidobacteria after spray-drying, *Int. J. Food Microbiol.* **1**-8.
3. Desmond, C., C. Stanton, G. F. Fitzgerald, K. Collins, and R. P. Ross (2001), Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying, *Int. Dairy J.* **11**, 801-808.
4. Gardiner, G. E., E. O'Sullivan, J. Kelly, M. A. E. Auty, G. F. Fitzgerald, J. K. Collins, R. P. Ross, and C. Stanton (2000), Comparative survival rates of human-derived probiotic lactobacillus paracasei and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying, *Appl. Environ. Microbiol.* **6**, 2605-2612.
5. Prajapati, J. B., R. K. Shah, and J. M. Dave (1986), Nutritional and therapeutic benefits of a blended-spraydried acidophilus preparation, *Cult. Dairy Prod. J.* **21**, 16-21.
6. Selmer-Olsen, E., T. Sorhaug, S. E. Birkeland, and R. Pehrson (1999), Survival of lactobacillus helveticus entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 79-85.
7. Lorca, G. L., R. R. Raya, M. P. Taranto, and G. F. de Valdez (1998), Adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*, *Biotechnol. Lett.* **20**, 239-241.
8. Graciela, L. L. and Graciela Font de Valdez (1999), The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of lactobacillus acidophilus to environmental stress, *Cryobiol.* **39**, 144-149.
9. Kim J. H., S. Y. Lee, C. E. Chang, S. C. Kim, H. S. Yun, and J. S. So (2001), Effect of cold adaptation on the improved viability of lactobacillus crispatus KLB46, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 626-631.
10. Movahedi, S. and W. Waites (2000), A two-dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of bacillus subtilis cells during sporulation, *J. Bacteriol.* **182**, 4758-4763.
11. Konkel, M. E., B. J. Kim, J. D. Klena, C. R. Young, and R. Ziprin (1998), Characterization of thermal stress response of campylobacter jejuni, *Infect. Immun.* **66**, 3666-3672.
12. Otani, M., J. Tabata, T. Ueki, K. Sano, and S. Inouye (2001), Heat-shock-induced proteins from myxococcus xanthus, *J. Bacteriol.* **183**, 6282-6287.
13. Pagan, R., S. Condon, and F. J. Sala (1997), Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of listeria monocytogenes, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3225-3232.
14. Kilstup, M., S. Jacobsen, K. Hammer, and F. K. Vogensen (1997), Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in lactococcus lactis, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1826-1837.
15. Whitaker, R. D. and C. A. Batt (1991), Characterization of the heat shock response in lactococcus lactis subsp. lactis, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1408-1412.
16. Eun Mong L., S. D. Ehrlich, and E. Maguin (2000), Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Electrophoresis* **21**, 2557-2561.

17. Annous, B. A., F. K. Michael, and J. K. Michael (1999), Changes in membrane fatty acid composition of *pediococcus* sp. strain NRRL B-2354 in response to growth conditions and its effect on thermal resistance, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2857-2862.
18. Johnsson, T., P. Nikkila, L. Toivonen, H. Rosenqvist, and S. Laakso (1995), Cellular fatty acid profiles of *lactobacillus* and *lactococcus* strains in relation to the oleic acid content of the cultivation medium, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4497-4499.
19. Samuel, B. L., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, and L. M. Crowe (1995), Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3592-3597.
20. Lou, Y. and A. E. Yousef (1997), Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1252-1255.