

Lactobacillus crispatus KLB46의 생균제제화를 위한 저온 전처리시 생균력 증진의 효과

김주현·이석용·장정은·¹김승철·윤현식·[†]소재성
인하대학교 생물공학과, 초정밀 생물분리기술연구센터, ¹이화여자 대학교 의과대학 산부인과학교실
(접수 : 2001. 12. 12., 개재승인 : 2001. 12. 19.)

Effect of Cold Adaptation on the Improved Viability of *Lactobacillus crispatus* KLB46

Joo Hyun Kim, Suk-Yong Lee, Chung Eun Chang, Seung-Cheol Kim¹, Hyun Shik Yun, and Jae-Seong So[†]
Department of Biological Engineering and the Center for Advanced Bioseparation Technology Inha University

¹Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ehwa Womans University

(Received : 2001. 12. 12., Accepted : 2001. 12. 19.)

Lactobacilli have been considered to play important roles in the health of human vagina. They secrete inhibitory substances to prevent vaginal infection by pathogenic organisms. In a previous study, we have isolated several lactobacilli from Korean woman and one of them (KLB46) was selected and identified as *Lactobacillus crispatus* which showed high antimicrobial activity. In this study, cold adaptation prior to subsequent stresses exposure was examined whether *L. crispatus* KLB46 maintain the viability better than the non-adapted cells under stresses. For pharmaceutical formulation, the lyophilization process is required where stresses such as freezing/thawing and dehydration are routinely applied. Formulated *L. crispatus* KLB46 can be used for ecological treatment of bacterial vaginosis. The response of cold adapted cells to other environmental stresses such as acid, heat, ethanol, NaCl, and H₂O₂ was also examined. The results showed that cold-adapted cells maintained higher survival rate compared with the non-adapted cells (freezing-thawing, 3-folds; dehydration; 3-folds; acid, 3-folds; heat, 10-folds). However, we did not observe any positive effect of cold adaptation on other stresses such as ethanol, NaCl and H₂O₂. When chloramphenicol was added during cold adaptation, adaptation effect was abolished. This confirms that *de novo* protein synthesis is necessary during the adaptation process. Moreover, we have identified cold shock protein homolog that codes for a major cold shock protein by PCR amplification using degenerate primers.

Key Words : *Lactobacillus crispatus* KLB46, cold adaptation, stress, CSP

서 론

*Lactobacillus spp.*는 여성의 질 내에 정상 우점균총으로 존재하면서 여러 가지 병원성 미생물의 생장 억제 물질을 생성하여 기회성 감염을 최소화한다. 그러나 어떠한 원인에 의해 세균성 질염이 발생하면 우점균인 *Lactobacillus spp.*의 수가 감소하고 혐기성 세균인 *Gardenerella vaginalis*가 증가하는 상태가 되면서 분비물이 심한 악취를 띠고, pH가 증가하게 된다. 현재까지 세균성 질염 치료를 위한 방법으로 항생제를 주로 사용하고 있으나, 항생제를 사용할 경우 정상 세균총인 *Lactobacillus spp.* 까지 제거하게 되어 반성적인 세균성 질염

이 발생하게 된다. 따라서 항생제 처리를 대체하기 위한 방법으로 정상세균총을 복구시키는 생태적 치료 방법이 요구되고, 이를 위하여 정상 우점균인 *Lactobacillus spp.*를 제제화 하는 것이 필요하다(1). 이런 제제화의 방법인 동결건조 과정에서는 세포가 물리적이고 생화학적인 스트레스를 겪게 되는 것으로 알려져 있다(2). 이러한 스트레스에는 여러 가지 종류의 생화학 반응을 포함하는 저온 스트레스가 포함된다. 저온 충격 반응은 특별한 단백질 합성을 위한 유전자의 발현이 저온내성 효과를 더 촉진한다는 것으로 해석되고 있다(3). 주요한 저온 충격 단백질로 CspA가 알려져 있는데, 이것은 *Escherichia coli*를 비롯한 여러 미생물에서 알려져 있다(4-6). 여러 미생물에서 이러한 단백질의 발현을 통해서 저온 전처리가 저온내성을 부여하는 것으로 알려져 있다(7,8). 37°C에서 자라는 *E. coli*를 10°C에서 6시간 동안 저온 전처리 하면, 환경스트레스에 노출되었을 때, 세포의 생균력이 전처리를 하지 않았던 것과 비교해서 현저하게 유지되는 것을 볼

*Corresponding Author : Department of Biological Engineering and the Center for Advanced Bioseparation Technology Inha University Tel : +82-32-860-7516, Fax : +82-32-875-0827

E-mail : sjaecheon@inha.ac.kr

수 있었다(9). 이와 관련해 *Bacillus subtilis*도 저온 전처리 한 것이 하지 않은 것보다 얼림에 대한 내성이 증가됨을 확인하였다(8). 이런 현상은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain에서도 관찰되었다(5). 위와 같이 저온 전처리 후에 저온 내성이 증가하는 현상은 동결건조 과정뿐만 아니라 또 다른 스트레스로 작용하는 건조와 활성 산소 스트레스에도 내성이 증가를 보이는지 적용하여 볼 필요가 있다. *Salmonella typhimurium*은 낮은 pH로 전처리를 한 경우 열, 에탄올, 산화적인 스트레스에 대한 생균력이 증가되었고(10), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403은 영양 결핍 배지에서 열, 에탄올, 산, 삼투압과 산화적 스트레스에서도 증가된 내성을 나타내었다(11). 또한 이러한 내성 증진 효과 현상은 생장 곡선을 거치는 동안 활발하게 진행되며, 최대 내성은 세포가 정지기에 들어갔을 때 일어남을 확인하였다(12). 본 연구에서는 *L. crispatus* KLB46이 저온 전처리를 통해 얼림과 녹임, 건조, 산과 열 등의 환경 스트레스에 대해 증가된 내성을 가지는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였고, 저온 전처리 과정 중에 신규 단백질 생성이 필요하다는 것을 chloramphenicol 처리를 통하여 확인하였다. 또한 *L. crispatus* KLB46의 저온 충격 단백질(Csp)을 분자적 수준에서 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 한국여성의 질로부터 분리한 *Lactobacillus* spp. 종 항균 활성이 우수한 *Lactobacillus crispatus* KLB46을 선택하여 실험을 수행하였다. 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, K₂HPO₄ 2 g, tween 80 1 g, FeSO₄ · 7H₂O 35 mg, MgSO₄ 575 mg, MnSO₄ · 7H₂O 120 mg)을 37°C에서 12시간 동안 혼기적 조건으로 정체배양 하였다.

저온 전처리 조건

37°C에서 12시간 동안 배양한 세포(정지기)를 두 가지로 나누어서 하나는 37°C에서 계속 배양하고, 다른 하나는 10°C에서 4시간(배가시간의 5배)동안 전처리 하였다. 전처리 시간이 지나면 37°C에서 계속 배양한 것과 저온 전처리 한 배양액을 원심분리(8000 rpm, 5 min)해서 세포를 수거한 후, 0.1 M PBS(phosphate buffer saline, pH 7.2)에 혼탁하였다. 세포는 0.1 M PBS에 O.D₆₀₀이 1이 되도록 재현탁 하고, 이를 여러 가지 스트레스 실험에 적용하였다. 그리고 스트레스에 노출된 시간마다 생균수 측정을 위하여 colony counting을 실시하고, 생균수 측정을 초기 colony 수를 기준으로 % survival로 나타내었다.

얼림/녹임 및 건조 스트레스 실험

전처리 한 것, chloramphenicol(25 µg/mL)을 포함하여 전처리 한 것과 전처리 하지 않은 것으로 나누어 0.1 M PBS에 재현탁한 세포를 microtube에 1 mL씩 분주하여, -70°C에 보관 중인 ethanol bath에 급속 냉동시킨 후, -70°C에 24시간 동안 얼림 조건에 들어갔다. 녹임 과정은 실온에서 30분 동안

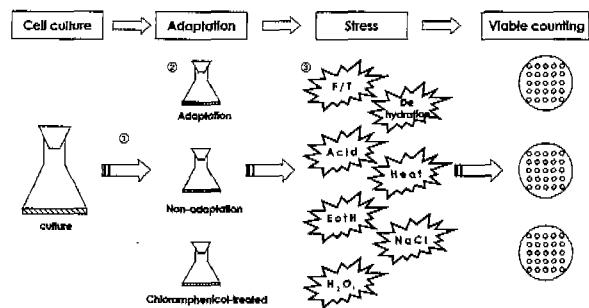


Figure 1. Schematic drawing of cold adaptation test. ① Culture of cells to the late exponential or early stationary phase before adaptation. ② Adaptation for 4 hrs (ca. five generation times). ③ F / T : Freeze(-70°C) / Thaw(R.T.), dehydration (37°C), acid (pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.2), heat (42°C), EtOH (5%, 10%), NaCl (5%, 10%, 15%), H₂O₂ (10 ppm, 50 ppm, 100 ppm) * In order to examine whether protein synthesis is required for the adaptation, chloramphenicol (25 µg/mL) was added during the adaptation period.

수행하며, 재냉동을 위하여 다시 -70°C에 보관하였다. 이런 과정을 3-4번 반복하였으며 전조 스트레스 실험에서는 nylon membrane disc에 균주 혼탁액을 4 µL씩 떨어뜨린 후, 시간별로 disc를 5개씩 취해서 0.1 M PBS가 500 µL 들어 있는 microtube에 1분 동안 vortex하여 재현탁 시킨 후 colony를 계수하였다. 스트레스 시간(1시간) 동안은 37°C incubator에 보관하면서, 20분 간격으로 3회 계수하였다.

환경 스트레스(산, 열, 에탄올, 염, 과산화수소) 실험

12시간 동안 배양한 세포를 전처리 한 것과 전처리 하지 않은 것으로 나눈다. 스트레스 조건으로 MRS 배지의 pH를 acetic acid를 이용해서 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 그리고 배지 pH인 6.2 상태로 조정한 다음 두 종류의 균주 시료를 각각 10%씩 접종하였으며, 접종 후 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 또한 열, 에탄올, 염, 과산화수소는 전처리 한 것과 전처리 하지 않은 것으로 나누어 0.1 M PBS(pH 7.2)에 재현탁 후에 각각의 스트레스 조건을 주었다. 열은 42°C에서 60분 동안 20분 간격으로, 에탄올은 5%(v/v)와 10%(v/v)로 나누어 4시간 동안 1시간 간격으로 측정하였다. 삼투압 스트레스를 위해 NaCl 를 5%(w/v), 10%(w/v)와 15%(w/v) 침가한 후 3시간 동안 1시간 간격으로 생균수를 측정하였으며, 산화적 스트레스를 위해 H₂O₂를 10, 50, 100 ppm(v/v)으로 가한 후 1시간 동안 20분 간격으로 생균수를 측정하였다. Figure 1은 환경 스트레스 실험에 관한 전체 모식도이다.

PCR를 통한 *cspA* 확인

L. crispatus KLB46의 genomic DNA는 이미 발표된 방법으로 추출하였다(13). 기존에 발표된(14,15) 여러 *cspA* 유전자 염기서열 중 보존적 부위를 포함하는 oligonucleotide primer로 CSP1 (5'- CCC CTG CAG GGT ACA GTA AAA TGG TTC AAC GC -3')과 CSP2 (5'- CCC GGA TCC GGT TAC GTT AGC AGC TGC CGG GCC -3')를 사용하여, PCR (polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR 조건은 pre-denaturation 95°C에서 5분, denaturation 95°C에서 15초, annealing 55°C에서 30초, elongation 72°C에서 30초, post-elongation

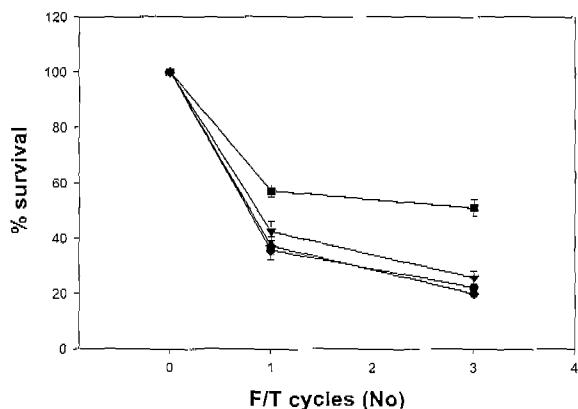


Figure 2. Survival of cold-adapted at 4°C(●), 10°C(■), non-adapted(◆) and chloramphenicol treated(▼) *L. crispatus* KLB46 after freezing-thawing(F/T).

72°C에서 4분 동안 수행하였다. PCR product는 2% agarose gel에서 전기영동(100 V, 80 mA)하여 확인하였다.

Southern blot hybridization

L. crispatus KLB46 genomic DNA 분리 후(13), *Pst* I, *Sal* I, *EcoR* I, *Xho* I, *Not* I으로 제한 효소 처리한 후 0.75% agarose에 전기 영동 하였다. 이것을 nylon membrane에 옮긴 후, probe로 digoxigenin-dUTP labelling and detection kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하였다.

결과 및 고찰

전처리 최적 조건과 열림/녹임 및 건조 스트레스에 대한 전처리 효과

이미 보고된 바 있는 *E. coli*나 *Salmonella*에서의 저온 전처리 조건은 각각 다른 성장곡선과 온도, 시간이 주어졌다. 이를 바탕으로 *L. crispatus* KLB46에서도 적합한 전처리 온도를 정하기 위한 실험이 수행되었다. 이전의 보고서에 따르면 배양 온도인 37°C를 기준으로 그 보다 낮은 온도로 28°C, 20°C, 15°C, 10°C, 4°C에서 저온 전처리 하여 -20°C에 노출시킨 결과 10°C와 4°C에서 보다 높은 전처리 효과가 확인되었다. 이것으로 10°C와 4°C로 저온 전처리 온도를 선택하여 -70°C에서의 열림/녹임 스트레스에 적용시켜 보았다. 그 결과 10°C에서 전처리 한 것이 4°C에서 보다 약 3배의 높은 생균력을 보였다(Figure 2). 이것은 *L. lactis* 경우, 4°C의 너무 낮은 온도에서의 전처리는 미생물의 대사작용과 세포가 성장하는 것을 저해한다고 하는 것과 유사한 결과이다(5). 또한 10°C에서 저온 전처리 한 것이 전처리 하지 않은 것에 비해 생균력 유지에 약 3배의 효과가 나타남을 볼 수 있다(Figure 2). 동일한 전처리 조건을 건조 스트레스 실험에도 적용시킨 결과 전처리 한 것이 하지 않은 것에 비해 약 3배의 효과를 보임을 확인하였다(Figure 3). 위에서 보는 바와 같이 제제화를 위해 주요 스트레스로 작용하는 열림과 녹임, 건조 스트레스의 과정에서는 모두 10°C에서 4시간 동안 저온 전처리 한 것이 상대적으로 높은 생균력 유지 효과를 보였다.

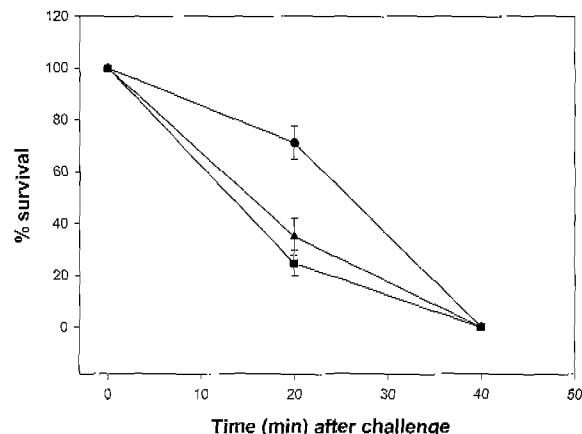


Figure 3. Survival of cold-adapted (●), non-adapted (■) and chloramphenicol treated (▲) *L. crispatus* KLB46 after dehydration.

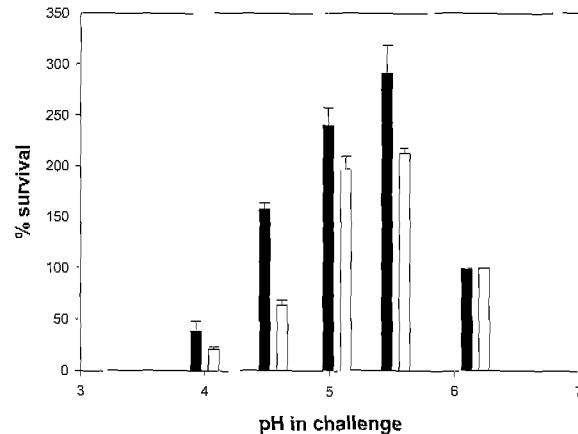


Figure 4. Survival of cold-adapted (■) and non-adapted (□) *L. crispatus* KLB46 after exposure to pH 3.5, 4.5, 5.0, 5.5 and 6.2.

Chloramphenicol 처리시 저온 전처리 효과 저해

단백질 합성 저해제인 chloramphenicol을 이용하여 전처리 동안에 유도되는 단백질 합성이 스트레스에 노출되었을 때 내성을 유도하는데 필요한가를 확인하였다. 본 연구에서는 *L. crispatus* KLB46의 제제화를 위한 주요 공정인 동결/건조 과정에 주어지는 열림과 녹임 그리고 건조 스트레스에 미치는 chloramphenicol의 효과를 확인하기 위하여, chloramphenicol (25 µg/mL)을 세포에 침가 후, 4시간 동안 10°C에서 전처리 하였다. 이것을 스트레스 조건에 적용시켜본 결과 chloramphenicol과 함께 전처리한 것이 전처리 하지 않은 것과 같은 스트레스 대응 양상을 보였다(Figure 2). 전처리시 chloramphenicol의 효과는 건조 스트레스에서도 같은 결과를 보였다(Figure 3). 이는 전처리 과정에서 이루어지는 단백질 합성이 스트레스에 대한 내성을 유도에 반드시 필요하다는 것을 나타낸다.

산 스트레스에 대한 저온 전처리 효과

L. crispatus KLB46는 배양액의 pH가 5.5에서 최대 생균수를 보인다는 것은 이미 보고된 바 있다(1). 하지만 MRS 배지의 초기 pH가 6.2이기 때문에 이 pH를 기준으로 0.5씩 pH를 낮춰가면서 pH 3.5까지 스트레스 실험을 수행하였다. Figure 4에서와 같이 pH 5.5에서 최대 생균수를 보이고, pH가 낮

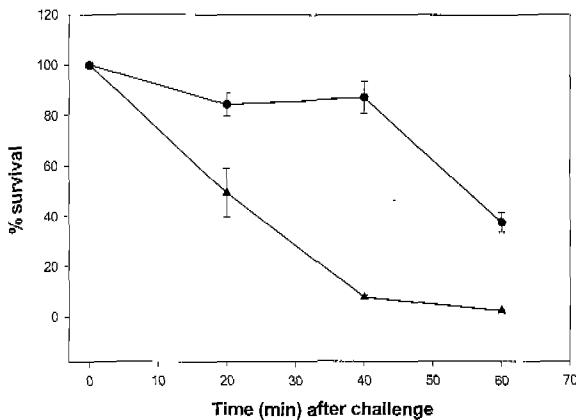


Figure 5. Survival of cold-adapted (●) and non-adapted (▲) *L. crispatus* KLB46 after exposure to 42°C.

아질수록 생균수는 감소하였다. 그리고 pH 3.5에서는 생균수를 전혀 보이지 않았다. 저온 전처리 한 것은 각각의 pH에서 전처리 하지 않은 것보다 적게는 1.5배에서 많게는 3배까지 생균수 유지 효과를 보였다. 결과적으로 배지의 pH 6.2 조건 이외에 최적 조건인 pH 5.5 뿐만 아니라 스트레스 조건인 pH 4.0, 4.5, 5.0에서도 전처리 효과를 확인할 수 있었다.

열 스트레스에 대한 저온 전처리 효과

유산균인 *L. lactis*는 식품의 질을 높이기 위한 과정으로 열 충격을 주어서 고온내성을 유발시키고, 그것을 통해 환경 스트레스에 적용하여 세포의 생균력을 높이는 시도는 여러 차례 이루어져 왔다(5,11). 또한 *L. lactis*에서는 산 내성과 관련해서 다른 스트레스에 비하여 고온내성이 현격히 증가했음을 보이고, 산 내성과 고온내성을 연관지어 설명한 바 있다(11). 본 실험에서는 *L. crispatus* KLB46을 저온 전처리 한 것과 하지 않은 것을 구분하여 42°C에서 열 스트레스 조건을 가한 후 60분 동안 20분 간격으로 생균수를 측정한 결과, 40분이 지난 후에 전처리 한 것이 약 10배의 높은 생균력이 유지됨을 확인하였으며, 60분까지 측정한 결과 그 효과의 폭은 조금 줄어들었으나, 여전히 전처리 효과를 확인할 수 있었다(Figure 5).

에탄올, 삼투압, 산화적 스트레스에 대한 저온 전처리 효과

저온 전처리를 통해서 열립과 녹임 스트레스 이외에 다른 환경 스트레스에 적용한 예는 거의 보고되어 있지 않으며 몇몇 연구에서 산 전처리가 다른 환경 스트레스 대응에 미치는 영향에 관한 결과가 보고되어 있다(12,16-18). 본 실험에서는 여러 다른 환경 스트레스로 에탄올, 염 그리고 과산화수소를 이용하였다. 에탄올과 염은 주로 식품에 항균제로 사용되고, 특히 에탄올은 투과와 관련해서 음식에 사용되는 색소나 향을 침가하는 용매로도 광범위하게 사용되어지고 있다(12). 하지만 동결 건조 시 배지 내에 수분활성저하로 이온 강도가 증가하여 삼투압에 대한 저해를 받게되고, 통성 혐기성인 *L. crispatus* KLB46에서는 과산화수소 축적 시 불활성 발효 과정 저해를 받게된다(16). 위의 스트레스 조건을 각각 노출시킨 결과 10% ethanol은 5% ethanol에 비해 2시간째에 세포의 생균력이 급격히 떨어져서, 거의 0%에 가까운 값을 나타내었

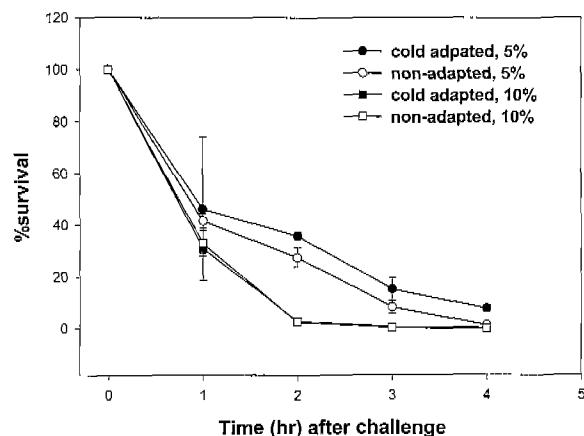


Figure 6. Survival of cold-adapted and non-adapted *L. crispatus* KLB46 after exposure to ethanol.

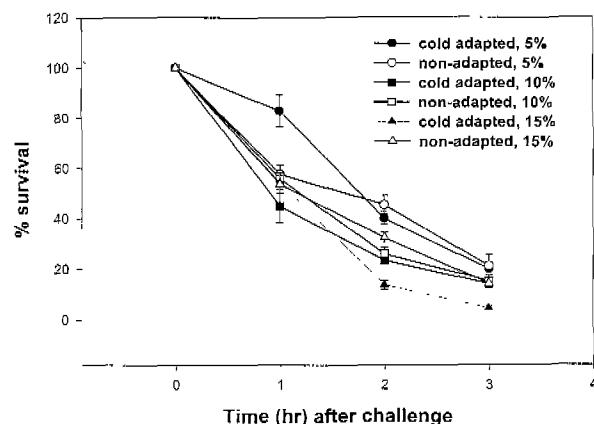


Figure 7. Survival of cold-adapted and non-adapted *L. crispatus* KLB46 after exposure to various concentration of NaCl.

고, 전처리 한 것과 하지 않은 것은 비슷한 양상을 보였다(Figure 6). 5%의 에탄올은 매 시간마다 전처리 한 것이 약 5% 더 높은 생균력을 보이며 조금씩 감소했다. 염은 각기 다른 농도마다 비슷한 폭으로 감소하고, 또한 전처리 한 것과 하지 않은 것의 차이는 거의 없었다(Figure 7). H_2O_2 또한 10, 50, 100 ppm의 농도에서 모두 40분 이내에 세포의 생균력이 급속히 떨어지는 양상은 전처리 한 것과 하지 않은 것 모두 유사하게 나타났다(Figure 8). 위의 결과는 열립과 녹임, 건조, 산, 열 스트레스에 비해서 전처리 효과는 거의 보이지 않았다. 이것은 *L. lactis*를 산, 에탄올, 과산화수소, 염, 열에 전처리 한 후 pH 스트레스에 노출 시켰을 때, 산과 열 전처리 한 것만 효과를 보이는 경우와 유사하였다(19). 똑같은 조건에서 *S. typhimurium*를 적용시켰을 경우에 위와 같은 전처리 조건에서 모두 pH 스트레스에 효과를 보였는데, 이것은 전처리 시 내성 증가를 위한 유도 시간과 스트레스 노출 시간이 각각의 균마다 반응하는 것이 다르기 때문이라고 보고되었다(19). 여기에서는 *L. crispatus* KLB46을 10°C에서 4시간동안 저온 전처리 시 열립과 녹임, 건조, 산, 열 스트레스에서는 내성을 유도하기 위한 온도와 시간이 적절했다고 보여진다. 하지만 에탄올, 염, 과산화수소 스트레스에서는 전처리와 노출 조건을 달리해서 연구해 볼 필요가 있겠다.

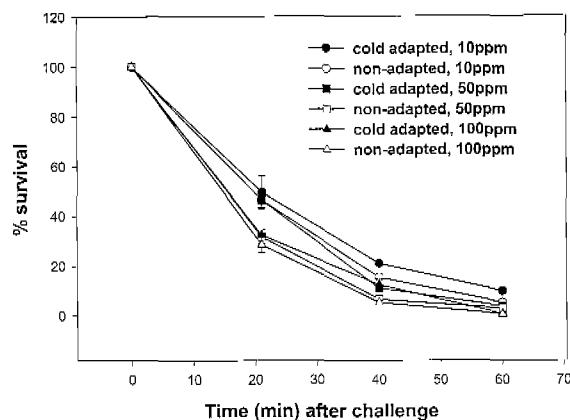


Figure 8. Survival of cold-adapted and non-adapted *L. crispatus* KLB46 after exposure to various concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2).

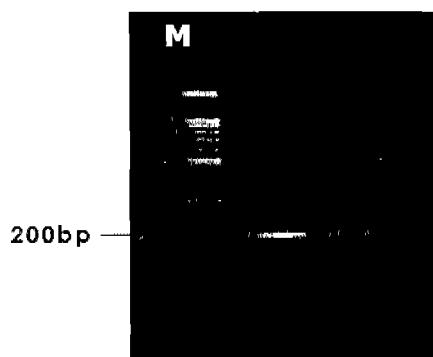


Figure 9. PCR product of csp gene(200bp) amplified from total genomic DNA of *L. crispatus* KLB 46 using primers designed from known csp genes of other bacteria. M, size marker.

PCR를 통한 *cspA* gene 확인

저온 충격 단백질이라 부르는 특이적인 단백질은 여러 미생물에서 온도가 낮아짐에 따라 급속하게 유도되는 것으로 알려져 있다(8). *E. coli*는 37°C에서 10°C로 온도가 낮아질 때 13개의 Csp의 합성이 유도된다(5). 이것들은 다양한 세포 과정을 수반하고 있으며, 모두 *E. coli* cold shock regulon에 포함되어 있다. 그 중에서 CspA 단백질은 낮은 온도로 노출

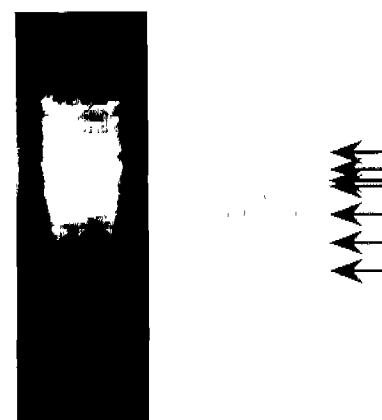


Figure 10. Multiple fragments homologous to csp genes were identified in *L. crispatus* KLB46 by genomic Southern analysis.

된 후에 200배 이상이 유도되며, 다른 저온 충격 유전자를 조절하는 역할을 한다. 이외에도 *Saccharomyces cerevisiae*에서는 배양 온도가 30°C에서 10°C로 변화할 때 4가지 유전자의 발현이 증가하고(5), *Dictyostelium discoideum*에서는 저온 충격에 의해서 세포막의 단백질 합성이 증가되는 것이 보고된 바 있다(8). 본 실험에서도 온도를 37°C에서 10°C로 변화하여서 저온 전처리의 효과를 확인하였다. 또한 chloramphenicol 처리시 전처리 효과가 보이지 않는 것으로 전처리 과정에서는 반드시 단백질 합성이 필요하다는 것을 알 수 있었다. 이것은 *csp* 유전자의 발현이 증가한 것으로 유추하여, *csp* 유전자를 목표로 하는 primer를 제작하여 PCR을 수행한 결과, 200bp의 Csp homolog를 확인할 수 있었다(Figure 9). 이것은 *L. crispatus* KLB46에서도 37°C에서 10°C로 온도가 낮아짐에 따라 *csp* 유전자 발현에 의해 Csp 단백질의 합성이 이루어져 전처리 효과가 나타남을 암시한다. 이런 Csp homolog 수를 확인하기 위하여 southern blot을 수행한 결과 적어도 7개의 homolog를 확인할 수 있었다(Figure 10). 또한 Csp의 염기서열을 분석한 후 *L. plantarum*과 *L. helveticus*를 포함한 다른 미생물의 Csp와 비교하여 본 결과, CspA와 높은 유사성을 지니고 있음이 확인되었다(Figure 11). 나아가, *E. coli*와 *S.*

```

1--- [REDACTED] GFGFITPDDGSKDVFVHFSA--NGYKSLDEGQKV SFTIESGAKGPAAANVT [REDACTED]
2--- MEHGTVKWFNADKGFGFITRENGSDVVFVHFSAIQEDGFKSLDEGQAVNFVEESDRGPAAANVTKA
3--- MKNGTVKWFNADKGFGFITGEDGTDVFVHFSAIQTDGFKTLDEGQKV TYDEEQGDRGPQATNVQPQ
4--- MKNGTVKWFNADKGYGFGITGEDGNDVFVHFSAIQTDGFKTLLEEGQKVTFDEESSDRGPQAANVVVPQ
5--- DKGYGFITGEDGQDVFVHFSAINGEGYKSLDEGQAVSYDVEQSDR
6--- KGFITGSDNKDVFVHFSAIKTDGFKSLEEGQKV SYDVEQGGGRGPQAAN
7--- KGFITGEDGQDVFVHFSAINGEGYKSLDEGQAVSYDVEQSDRGPQAAN
8--- MAKIKGQGKWFNESKGFGFITPADGSKDVFVHFSAIQGNGFKTLAEQVNVEFEI QDGQKGPAAVNVTAI
9--- MQNGKVKWFNNEKGFGFIEVEGGDDVFVHFATAIEGDGYKSLEEGQEV SFEIVEGNRGPQASNVVKL
10-- SGKMTGIVKWFNADKGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDGYKSLDEGQKV SFTIESGAKGPAAGNVTSL
11-- MTKGTVKWFNPDKGFGFITSEDGQDVFAHFSQIQTSGFKTLDEGQKVTFDVEAGQRGPQAVNIEKA

```

Figure 11. Similarity of Csp sequence of other strains. 1, *Lactobacillus crispatus* KLB46(GenBank accession number ; AF443825) ; 2,3,4 *Lactobacillus plantarum* ; 5, *Lactobacillus casei* ; 6, *Lactobacillus helveticus* ; 7, *Lactobacillus acidophilus* ; 8, *Salmonella typhimurium* ; 9, *Bacillus subtilis* ; 10, *Escherichia coli* ; 11, *Lactococcus lactis*

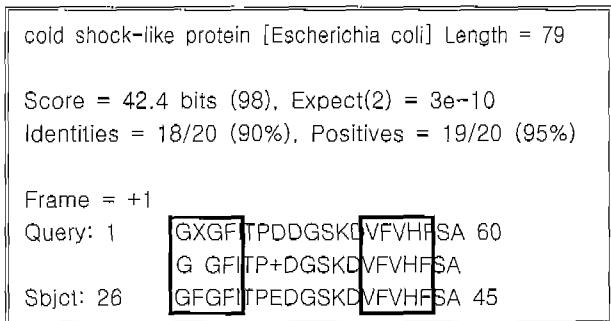


Figure 12. RNA binding site in sequence of csp gene of *L. crispatus* KLB46. Two boxes are RNP1 and RNP2

*typhimurium*에서 확인된 Csp의 특이적인 RNP (ribonucleoprotein) biding site가 *L. crispatus* KLB46의 Csp에도 존재하는 것을 확인하였다(Figure 12).

요약

본 연구에서는 *L. crispatus* KLB46을 저온 전처리함으로서 제제화 과정에 받게 되는 얼림과 녹임, 건조 스트레스뿐만 아니라, 여러 다른 환경 스트레스에 대한 내성이 증진된다는 것을 확인하였다. 그리고 내성 증진에 신규 단백질 합성이 필요함을 확인하였으며 나아가, 저온 충격 유전자(csp)를 확인하였다. 따라서 이 균주를 제제화 하기 위한 방법으로 저온 전처리를 이용할 경우 생균력 유지에 큰 효과를 얻을 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 인하대학교 생명공학 특성화 사업단과 초정밀 생물분리연구센터의 지원 아래 수행되었습니다.

REFERENCES

- Chang, C. E. (2000), Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. from human vagina for the ecological treatment of bacterial vaginosis. M. S. Thesis, Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon.
- Park, J. -I., C. M. Grant, P. V. Attfield, and I. W. Dawes (1997), The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3818-3824.
- Perrin, C., C. Guimont, P. Bracquart, and J. L. Gaillard (1999), Expression of a new cold shock protein of 21.5 kDa and of the Major cold shock protein by *Streptococcus thermophilus* after cold shock, *Curr. Microbiol.*, **39**, 342-347.
- Horton, A. J., K. M. Hak, R. J. Steffan, J. W. Foster, and A. K. Bej (2000), Adaptive response to cold temperatures and characterization of *cspA* in *Salmonella typhimurium* LT2, *Antonie van Leeuwenhoek*, **77**, 13-20.
- Kim, W. S., N. Khunajakr, and N. W. Dunn (1998), Effect of cold shock on protein synthesis and on cryotolerance of cells frozen for long periods in *Lactococcus lactis*, *Cryobiol.*, **37**, 86-91.
- Wouters, J. A., F. M. Rombouts, W. M. de Vos, O. P. Kuipers, and T. Abe (1999), Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4436-4442.
- Panoff, J. -M., B. T. Vongs, J. -M. Laplace, A. Hartke, P. Boutibonnes, and Y. Auffray (1995), Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, *Cryobiol.*, **32**, 516-520.
- Thieringer, H. A., P. G. Jones, and M. Inouye (1998), Cold shock and adaptation, *BioEssays*, **20**, 49-57.
- Graumann, P. L. and M. A. Marahiel (1996), Some like it cold: response of microorganism th cold shock, *Arch Microbiol.*, **166**, 293-300.
- Leyer, G. J. and E. A. Johnson (1993), Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1842-1847.
- Hartke, A., S. Bouche, X. Gansel, P. Boutibonnes, and Y. Auffray (1994), Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3474-3478.
- Barker, C. and S. F. Park (2001), Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids and osmotic stress by ethanol, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1594-1600.
- Lee, S. -Y. , C. E. Chang, S. -C. Kim, H. S. Yun, and J. -S. So (2000), A rapid small method for extraction of genomic DNA from *Lactobacillus* spp, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 411-413
- Francis, K. P. and G. S. A. B. Stewart (1997), Detection and speciation of bacteria through PCR using universal major cold-shock protein primer oligomers, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 286-293.
- Nakashima, K., K. Kanamaru, T. Mizuno, K. Horikoshi (1996), A novel member of the *cspA* family of genes that is induced by cold shock in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **178**, 2994-2997.
- Park, H. -K., J. -S. So, and T. -R. Heo (1995), Acid adaptation promotes survival of *Bifidobacterium breve* against environmental stresses, *Food and Biotech.*, **4**, 226-230.
- Bryan, P. J., R. J. Steffan, A. DeLaola, J. W. Foster, and A. K. Bej (1999), Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*, *Curr. Microbiol.*, **38**, 168-175.
- 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.
- O'sullivan, E. and S. Condon (1997), Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4210-4215.
- Abee, T. and J. A. Wouters (1999), Microbial stress response in minimal processing, *Int. J. Food Microbiol.*, **50**, 65-91.
- Graumann, P. L. and M. A. Marahiel (1998), A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain, *TIBS*, **23**, 286-290.
- Kim, W. S. and N. W. Dunn (1997), Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance, *Curr. Microbiol.*, **35**, 59-63.
- O' Driscoll, B., C. G. M. Gahan, and C. Hill (1996), Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1693-1698.
- Yoo, J. C. (2001), The effect of cold-adaptation on stress responses and identification of a cold shock gene, *cspA* in *Bradyrhizobium japonicum*, M. S. Thesis, Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon.