

김치 유래 젖산균의 Cell-envelope Proteinase 존재 확인

이유진 · 최재연 · 이형주¹ · 장해춘² · 김정환³ · 정대균⁴ · 김영석⁵ · 김소미⁶ · 이종훈*
경기대학교 식품생물공학과, ¹서울대학교 식품공학과, ²조선대학교 식품영양학과, ³경상대학교 식품공학과,
⁴경희대학교 유전공학과 및 유전공학연구소, ⁵이화여자대학교 식품영양학과,
⁶제주대학교 아열대 원예산업 연구센터

Identification of the Cell-envelope Proteinase of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi. Lee, Yujin, Jae Yeon Choi, Hyong Joo Lee¹, Hae Choon Chang², Jeong Hwan Kim³, Dae Kyun Chung⁴, Young-Suk Kim⁵, Somi Kim Cho⁶, and Jong-Hoon Lee*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea, ¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea, ²Department of Food and Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea, ³Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea, ⁴Institute and Department of Genetic Engineering, KyungHee University, Suwon 449-701, Korea, ⁵Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea, ⁶Subtropical Horticulture Research Center, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea. The partial 16S rDNA sequences of 6 lactic acid bacterial strains isolated from Kimchi were determined. Two strains were *Leuconostoc mesenteroides* and the rest were incorrectly classified and turned out to be *Lactobacillus*. As the case of dairy lactic acid bacteria, the strains isolated from Kimchi also had cell-envelope proteinase (CEP) activity. As the result of partial CEP gene amplification with CEP-specific primers, the expected 1.2-kb amplicon was obtained not from *Leu. mesenteroides* but from *Lactobacillus* strains. The deduced amino acid sequence of PCR product amplified from the genomic DNA of *Lactobacillus pentosus* KFRI821 showed 95% and 92% homology with those of PrtPs from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, respectively. The PCR amplicon was used as a probe and the result of Southern hybridization illuminated the location of CEP gene in chromosomal DNA of *Lb. pentosus* KFRI821.

Key words: Cell-envelope proteinase, Kimchi, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*

김치의 발효과정은 배추 등의 채소류나 양념들의 표면에 부착되어 있는 미생물의 상호작용에 의해 자연적으로 진행된다. 김치의 발효를 주도하는 젖산균은 통성혐기성균으로 발효 초기에는 *Leuconostoc*속이 우세하게 증식하고 발효 후기에는 *Lactobacillus*속이 우세하게 증식하는 것으로 알려져 있다[6,14].

젖산균은 영양요구성이 매우 까다로운 미생물로 복잡한 단백질 분해체계를 가지는 것으로 알려져 있다. 유제품 유래 젖산균의 경우, 우유단백질의 대부분을 차지하는 카제인은 세포벽에 부착된 cell-envelope proteinase (CEP)에 의해서 분해되어 여러 가지 크기의 peptide로 만들어지고, 이들의 transport 시스템에 의해서 세포 내로 이동된 다음, 세포 내 peptidase들에 의해서 분해되어 이용된다고 보고되었다[2,3,21,27,30].

우유단백질 분해시스템 중 카제인 분해의 초기 단계에 작용하는 CEP는 유제품 유래 젖산균에 의해 초기에 카제인을 oligopeptide로 분해하는 능력을 가진 유일한 효소[23]로서, CEP 유전자가 삭제되거나 변형된 균주는 우유에서의 생육이 거의 없는 것으로 알려져 있다[33]. 따라서 이 효소는 젖산균의 성장과 아주 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 추정되고 있다[20,31,33]. 유제품 유래 젖산균들로부터 cloning 되어 분자생물학적으로 그 특성들이 규명된 CEP 유전자들은 각각 *prtP*, *prtB*, *prtH*로 명명되었고, 이들은 subtilase 유래로 알려진 serine proteinase에 속하는 것으로 보고되었다[20,25,26]. 여러 종의 lactococci로부터 *prtP*의 존재가 보고되었고[4,9,15,17,18,26], *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151, *Lactobacillus helveticus* CNRZ303, *Lb. helveticus* L89, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ392 등의 *Lactobacillus*에서도 그 존재가 보고되었다[13,15,19,20]. 특히 1,902개의 아미노산으로 구성되어 있는 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*의 PrtP는 lactococcal PrtP들과 96%의 높은 상동성을 나타내고 있다[7,13]. 또한, lactococcal PrtP와 27%의 상동성을 갖고 있는 *Lb.*

*Corresponding author
Tel. 82-31-249-9656, Fax. 82-31-253-1165
E-mail: jhl@kyonggi.ac.kr

delbrueckii subsp. *bulgaricus* NCDO1489 유래의 PrtB는 1,946개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며[5,20,22], lactococcal PrtP와 45%의 상동성을 보이는 *Lb. helveticus* CNRZ32 유래의 PrtH는 1,849개의 아미노산 잔기로 구성되어 있다[20,37]. 지금까지의 보고에 따르면 유제품 유래 젖산균인 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2, *Lac. lactis* subsp. *lactis* UC317, *Lac. lactis* subsp. *cremoris* SK11, *Lac. lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 등의 *Lactococcus*속 균주들로부터는 plasmid DNA에서 CEP 유전자가 확인되었고[4,10,22,30], *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCDO1489, *Lb. helveticus* CNRZ32 등의 *Lactobacillus*속 균주들에서는 chromosomal DNA에서 그 존재가 확인되었다[5,13,17,20].

유제품 유래 젖산균의 생육이 단백질 분해시스템의 일부인 CEP에 의해 영향을 받는 것과 마찬가지로 김치 유래 젖산균도 김치 제조과정 중 첨가되는 젖갈이 함유하고 있는 단백질의 분해가 젖산균의 성장속도와 김치의 풍미에 큰 영향을 미칠 것으로 추정된다. 그러나 아직까지 김치 유래 젖산균을 대상으로 한 단백질 분해계에 대한 생화학적·분자생물학적 기초연구는 전무하다. 따라서 본 연구에서는 김치로부터 분리한 젖산균을 대상으로 생육과 밀접한 관계를 가지고 있는 CEP 유전자의 존재를 알아보았다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

본 연구에서 사용한 젖산균은 김치에서 분리되어 한국식품개발연구원에 기탁된 균주와 경상대학교 식품공학과 김정환 교수가 김치로부터 분리하여 *Leuconostoc mesenteroides*로 동정한 C7 균주를 분양받아 사용하였다(Table 1). 균주들은 MRS broth (Difco, USA)를 사용하여 30°C 미호기적 조건에서 16시간 배양하였다.

Genomic DNA 및 plasmid DNA 분리

김치 유래 젖산균들로부터의 genomic DNA 추출은 Johansen & Kibbenich의 방법[8]을 변형하여 사용하였고, plasmid DNA의 추출은 Anderson & McKay의 방법[1]을 변형하여 사용하였다.

16S rDNA 증폭을 위한 primer 제작 및 PCR

분양받은 균주들의 확인을 위한 *Leuconostoc*속 특이적 primer (Forward: 5'-TGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTG-3'; reverse: 5'-CACTTCTATCTCTAAAAGCTTCA-3')는 GenBank database에 등록된 *Leu. mesenteroides* (M23035) [36]와 *Leu. lactis* (ABO23968), *Leu. paramesenteroides* (M23033) [36], *Pediococcus pentosaceus* (M58834), *Lactobacillus plantarum* (AJ271852), *Lactobacillus hilga-*

rdii (M58821), *Lactobacillus amylophilus* (M58806), *Lactobacillus confusus* (X52567) [16]의 16S rDNA 염기서열을 CLUSTAL W multi-alignment program (European molecular biology laboratory)을 이용하여 *Lactobacillus*속과 *Pediococcus*속에는 비특이적이고 *Leuconostoc*속에는 특이적인 부분을 선정하여 제작하였다. 젖산균의 확인과 동정에 사용한 16S rDNA 증폭용 primer (Forward: 5'-TGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTG-3'; reverse: 5'-GACCATGCACCACTGTCACTTTGTC-3')는 *Lactobacillus*속과 *Pediococcus*속, *Leuconostoc*속에서의 보존영역을 선정하여 제작하였다.

PCR은 genomic DNA 10 ng을 template로 *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan) 2.5 unit을 첨가하여 UNOII thermal cycle (Biometra, Germany)을 사용하여 반응하였다. PCR 온도조건은 95°C 5분동안 pre-denaturation을 수행하고 95°C 1분, 52°C 1분, 72°C 2분의 과정을 30회 반복하여 실행하였다.

염기서열 결정 및 분석

PCR에 의하여 증폭된 단편은 전기영동한 다음, 0.8% agarose gel에서 회수하여 pGEM-T Easy vector (Promega, USA)에 cloning하였다. 재조합 plasmid에 삽입된 단편의 염기서열 결정은 수탁업체(Core biosystem, Korea)에 의뢰하여 실행하였다. 염기서열 및 아미노산서열 분석은 CLUSTAL W multi-alignment program과 DNASIS software (Hitachi software engineering company, Japan)를 이용하였고, 염기서열과 아미노산서열의 상동성 검사는 GenBank database에 등록된 정보를 대상으로 Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 의해 실행하였다.

Cell-envelope proteinase의 조제

CEP의 안정화를 위해 MRS broth에 8 mM CaCl₂를 첨가하여 30°C에서 16시간 정지배양한 50 ml 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 다음, 균체를 15 mM CaCl₂가 첨가된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 10 ml로 3회 반복해서 씻어내고 CaCl₂가 첨가되지 않은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 5 ml에 현탁하여 30°C에서 1시간 보존하여 세포벽에 결합된 단백질을 유출시켰다[9,12,23,32]. 원심분리에 의해 균체를 제거하고 얻은 상등액을 CEP 조효소로 하였다. 조효소액의 단백질 정량에는 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA)를 사용하였고, 표준물질로는 (γ-globulin)을 사용하였다.

Cell-envelope proteinase의 활성측정

조효소액 200 μl와 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 300 μl에 0.1% casein-용액 100 μl를 첨가하여 30°C에서 1시간 반응시킨 후, 동량의 12% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) 용액을 첨가하고 실온에서 30분간 방치하여 반응을

종결시켰다. TCA가 첨가된 반응액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 상등액의 흡광도를 280 nm에서 측정하여 활성으로 환산하였다[32]. 효소활성단위는 30°C에서 60분 동안 1 μmol의 tyrosine을 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

Cell-envelope proteinase 특이적 primer 제작 및 PCR CEP 유전자의 증폭에 사용할 primer (Forward: 5'-GGCACAGTTGTCTCGGTTATTGACA-3'; reverse: 5'-GGCCATTGACGTACCAGACATATTT-3')는 CLUSTAL W multi-alignment program을 이용하여 GenBank database에 등록된 *Lac. lactis* subsp. *cremoris* HP (AF247159), *Lac. paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151(M83946) [7], *Lac. lactis* SK11 (J04962) [34], *Lac. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 (M24767) [11] 유래의 *prtP* 유전자를 대상으로 Gram-positive cocci의 surface protein과 subtilase 유래의 단백질들에서의 보존영역에 해당하는 부분의 염기서열을 비교하여 제작하였다[7,20].

PCR은 annealing 온도를 58°C에서 수행한 것을 제외하고 16S rDNA 증폭조건과 동일하게 실행하였다.

Southern hybridization

제한효소로 처리한 DNA를 agarose gel에서 전기영동하고 Southern이 기술한[29] capillary transfer 방법에 따라 nylon membrane (Boehringer, Germany)에 transfer 하였다. Hybridization은 Dig DNA labeling and detection kit (Roche, Germany)를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 60°C에서 수행하였다.

결과 및 고찰

16S rDNA의 부분 염기서열을 통한 균주동정

지금까지 진행된 김치 유래 미생물에 대한 연구를 통하여

많은 종류의 젖산균이 분리, 동정되었지만 기존에 분류된 유제품 유래 젖산균과의 생화학적 특성의 차이에 의하여 분류에 많은 어려움이 보고되었다[6,28]. 또한 많은 젖산균이 유사한 영양요구성을 나타내고 있어 기존의 생화학적 방법에 의한 동정에는 많은 시간이 소요될 뿐만 아니라 오류가 있다는 보고에 따라 최근에는 rRNA의 염기서열이 동정과 분류에 널리 사용되고 있다[24,35].

분양받은 균주들의 확실한 동정을 위하여 *Lactobacillus*속과 *Pediococcus*속, *Leuconostoc*속에서의 보존영역을 선정하여 제작한 16S rDNA 증폭용 primer set과 *Leuconostoc* 속 특이적으로 제작한 primer set을 사용하여 분양받은 균주

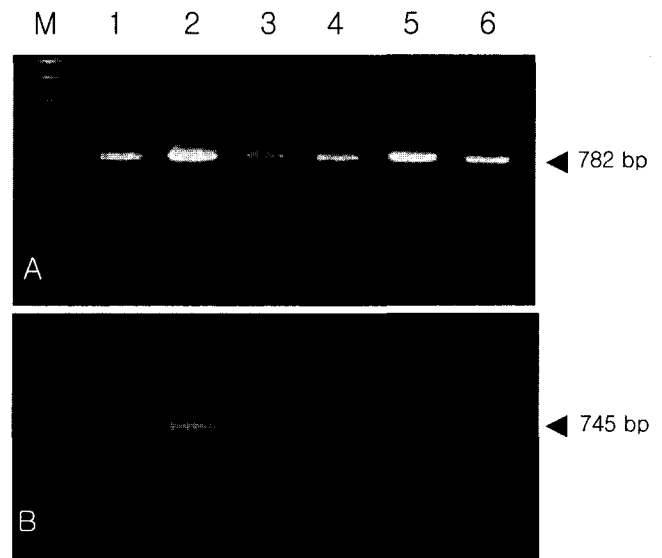


Fig. 1. PCR products obtained by the amplification of genomic DNA with 16S rDNA amplification primer set (A) and *Leuconostoc*-specific primer set (B). Lanes: M, DNA size marker; 1, *Leu. mesenteroides* C7; 2, *Leu. mesenteroides* KFRI817; 3, *Leu. mesenteroides* KFRI818; 4, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KFRI819; 5, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KFRI820; 6, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KFRI821.

Table 1. New identification of strains isolated from Kimchi by partial 16S rDNA sequence determination.

Strain	Homologous microorganism (Accession number)	% Identity	New identification
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> C7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (AF375902)	94	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFRI817	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (AB023246)	100	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFRI818	<i>Lactobacillus brevis</i> (AF090328)	99	<i>Lactobacillus brevis</i> KFRI818
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KFRI819	<i>Lactobacillus pentosus</i> (D79211)	100	<i>Lactobacillus pentosus</i> KFRI819
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KFRI820	<i>Lactobacillus brevis</i> (AF090328)	99	<i>Lactobacillus brevis</i> KFRI820
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KFRI821	<i>Lactobacillus pentosus</i> (D79211)	100	<i>Lactobacillus pentosus</i> KFRI821

들의 genomic DNA를 template로 PCR을 수행한 결과, 16S rDNA 증폭용 primer set을 사용한 경우 모든 젖산균주로부터 PCR 산물이 증폭되었으나 특이적 primer set에서는 *Leu. mesenteroides* C7 균주와 *Leu. mesenteroides* KFRI817 균주를 제외한 나머지 균주들의 genomic DNA에서는 증폭되지 않는 것으로 나타나 C7 균주와 817 균주를 제외한 나머지 균주들은 동정에 오류가 있는 것으로 예상되었다(Fig. 1). 따라서 분양받은 균주들의 genomic DNA를 template로 증폭한 PCR 산물을 cloning하여 염기서열을 결정하고 Blast program을 이용하여 GenBank database에 등록된 16S rDNA 염기서열 정보와의 상동성 검색을 해보았다. 그 결과, 819 균주와 821 균주는 *Lactobacillus pentosus*의 16S rDNA의 염기서열과 100% 상동성을 보이고, 818 균주와 820 균주는 *Lactobacillus brevis*의 16S rDNA의 염기서열과 99% 상동성을 보이는 것으로 나타났다. 따라서 819 균주와 821 균주를 *Lb. pentosus* KFRI819와 821로, 818 균주와 820 균주는 *Lb. brevis* KFRI818과 820로 새로이 명명하였다(Table 1).

Cell-envelope proteinase 활성

균주들로부터 추출한 CEP 조제액의 단백질 분해 활성을 측정한 결과, lactococci와 lactobacilli 등의 유제품 유래 젖산균들과 마찬가지로 김치에서 분리한 젖산균들도 CEP를 가지고 있는 것으로 나타났고, 817 균주 및 C7 균주와 같은 *Leuconostoc*속보다는 819 균주와 821 균주와 같은 *Lactobacillus*속 균주가 높은 CEP 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다(Table 2).

Cell-envelope proteinase 존재 확인

균주들의 genomic DNA를 template로 CEP 특이적 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 817 균주로부터는 약 1.25 kb, 1.1 kb의 단편이, C7 균주로부터는 약 1.0 kb와 0.7 kb 크기의 단편이 증폭되었다. 한편 818, 819, 820, 821 균주의 genomic DNA로부터는 1.2 kb 정도의 동일한 크기의 단편이 증폭되었는데, 이 단편의 크기는 primer 제작

시 예상한 PCR 산물의 크기와 일치한다(Fig. 2). 817 균주와 C7 균주로부터 증폭된 단편들의 염기서열을 결정한 결과, CEP 유전자와 관련 없는 유전자들이 증폭된 것으로 나

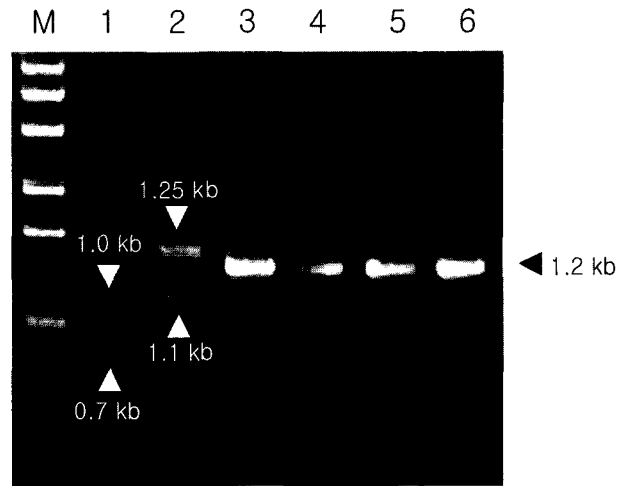


Fig. 2. PCR products obtained by the amplification of genomic DNA with CEP gene-targeted PCR primers. Lanes: M, DNA size marker; 1, *Leu. mesenteroides* C7; 2, *Leu. mesenteroides* KFRI817; 3, *Lb. brevis* KFRI818; 4, *Lb. pentosus* KFRI819; 5, *Lb. brevis* KFRI820; 6, *Lb. pentosus* KFRI821.

```

GGCACAGTTGTCG9GTTATTGACACTGGCATTGACCCACACATAAAGACATGCGGGTAAGGGATGATAAAGACGGTCAAACACCAAAA 90
G T V V S V I D T G I D P T H K D M R L S D D K D V K L T K
TCTGATGTTGAAAGATTCACCTGATACCGCCAAAGCATGGCCCTATTTTACTCCAAAAGTCCCATATGGGTTTAAITTAAGCGTGATAATAAC 180
S D V E R F T D T A K H G R Y F T S K V P Y G F N Y A D N N
GACACCAATTACAGATGATACGGTTGAGGACCAACACCGCATGCATGTTGCTGGGATCATCGTGTCAAGGGACAGSTGACGATCCAAACC 270
D T I T D D T V D E Q H G M H V A G I I G A N G T G D D P T
AAGTCTGTGTGGAGTGGCCGCAAGGACAGCTACTGGCAATGAAAGTTTCCACCACTCTGACACTTCTGCACAAACCGGGTCCAGCT 360
K S V V G V A P E A D L L A M K V F T N S D T S A T T G S A
ACCTTGGTTTCTGCATTGAAGACTGGCCAAAATCGGTGGCGATGCTCCACATGCTCTAGATCTGATTCAAGTAACCAACCTTG 450
T L V S A I E D S A K I G A D V L N M S L G S D S G N Q T L
GAGGATCCAGAAATGCTGCGGTGCAAAATGCTAACGAAATCAGGACACAGCCGCGCTCAITTTCTGCTGGAACTCAGGAAACATCCGGTCA 540
E D P E I A A V Q N A N E S G T A A V I S A G N S G T S G S
GCAACTCAAGGTGTCAACAAAGATATTACGGTTTCCAAAGCAATGAATGGTGGGAACCGCAGGACATCAGGAGGAGGACCAACAGTT 630
A T Q G V N K D Y Y G L Q D N E M V G T P G T S R G A T T V
GCTTCCGCTGAGAACACGGATGTCATCAGTCAGGCASTGACCATACAGATGGTACAGGTTTACAGCTTGGACCGAAACCAATTACGTT 720
A S A E N T D V I S Q A V T I T D G T G L Q L G P E T I Q L
TCAAGCAACGATCTCACTGGTAGCTTTGACCAAAGAGTTTATGTTGTCAAGATGCTAGTGGGACCTCAGCAAGGGGACGACAGCC 810
S S N O L T G S F D Q K K F Y V V K D A S G D L S K G A A A
GACTATACTGCTGACGCTAAAGGCAAAATGGCCATCGTTAAACGTGGCGAATCTTACCTTCTGACAAACAAAATAAGCCCAAGCCGCT 900
D Y T A D A K G K I A I V K R G E L T F A D K Q K Y A Q A A
GGTGTCTGCTGGCTGATCATTGTCAACAACGATGGCACAGCAACACCGCTTCACTTCTATTACGTTAADCACCACCTTCCCAACATTGGG 990
G A A G L I J V N N D G T A T P L T S I T L T T F P T F G
CTCTCCAGTAAACCGGTCAAAAGCTGGTTGACTGGGTCCAGACACACCCGGATGATAGTCTCGGTGTCAGGATTCGCCCTGACGCTGITA 1080
L S S K T G Q K L V D W V T A H P D D S L G V K I A L T L L
CCAAATCAGAGATATCTGAGACAAAGATGCTGACTTCACATCCTATGGCCAGTTCACATCTTCTTCAAAACAGATATACCGCA 1170
P N O R Y T E D K M S D F T S Y G P V S N L S F K P D T A
CCAGGCGGCAACATCTGCTCAACGCAAAACAAATGGCTACACAAATAATGCTGTGTACGCTCAATGGCC 1239
P G G N I W S T Q N N N G Y T N M S G T S M A
    
```

Fig. 3. Partial nucleotide and deduced amino acid sequence of the cell-envelope proteinase from *Lb. pentosus* KFRI821 (GenBank accession number: AF468027).

Table 2. Proteolytic activity of the crude cell-envelope proteinase in lactic acid bacteria isolated from Kimchi.

Strain	Specific activity (U/mg protein)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> C7	12.9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFRI817	5.0
<i>Lactobacillus brevis</i> KFRI818	18.0
<i>Lactobacillus pentosus</i> KFRI819	22.8
<i>Lactobacillus brevis</i> KFRI820	8.5
<i>Lactobacillus pentosus</i> KFRI821	47.0

One unit of activity was expressed as the enzyme amount that produced 1 μmol tyrosine in 1h.

Table 3. The % amino acid identities between pairs of cell-envelope proteinases from different microorganisms.

Strain	Lbpen	Laclac ^a	Lbpa ^b	Lbhel ^c	Lbbul ^d	Ref.
Lbpen	100					This work
Laclac	95	100				[10]
Lbpa	92	97	100			[7]
Lbhel	65	44	43	100		[20]
Lbbul	43	26	26	27	100	[5]

Pair alignments between homologous proteins were made with the CLUSTAL W program.

Lbpen, *Lactobacillus pentosus* KFRI821; Laclac, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO763; Lbpa, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151; Lbhel, *Lactobacillus helveticus* CNRZ32; Lbbul, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCDO1489.

^aPrtP of *Lac. lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 was aligned.

^bPrtP of *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151 was aligned.

^cPrtH of *Lb. helveticus* CNRZ32 was aligned.

^dPrtB of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCDO1489 was aligned.

타났다.

한편 가장 높은 CEP 활성을 나타내는 821 균주의 PCR 산물의 염기서열을 결정 한 결과(Fig. 3), PCR 산물의 추정 아미노산서열은 *Lac. lactis* subsp. *cremoris* NCDO763의 PrtP와 95%, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151의 PrtP와 92%의 높은 상동성이 있는 것으로 나타났다. Table 3에는 CLUSTAL W multi-alignment program을 이용하여 유제품 유래 젖산균들에서 알려진 CEP와 821 균주로부터 유래한 추정 CEP의 아미노산서열의 상동성을 비교한 결과를 나타내었다. 상기의 결과로 보아 김치에서 분리된 *Lb. pentosus*와 *Lb. brevis* 등의 *Lactobacillus*속 균주는 지금까지 유제품 유래 젖산균에서 밝혀진 CEP와 높은 상동성을 가지고 있지만, 김치 발효의 주요균으로 알려진 *Leuconostoc*속 균주는 기존에 밝혀진 CEP와 유전자 및 아미노산 수준에서 상당한 차이가 있는 CEP를 보유하고 있을 것으로 추정된다.

Southern hybridization에 의한 CEP 유전자의 소재 분석

유제품 유래 젖산균들의 CEP 유전자는 *Lactobacillus*속의 chromosomal DNA와 *Lactococcus*속의 plasmid DNA로부터 확인되었다는 보고들에 따라, 김치 유래 젖산균인 821 균주로부터 genomic DNA와 plasmid DNA를 각각 추출하여 *prtP* 유전자의 일부로 확인된 약 1.2 kb의 PCR 산물을 probe로 Southern hybridization을 실시하여 CEP 유전자의 소재를 분석한 결과는 Fig. 4와 같다. Hybridization band가 plasmid DNA에서 확인되지 않은 반면 genomic DNA에서는 확인되어, 김치에서 분리된 *Lb. pentosus* KFRI821의 경우에도 CEP 유전자가 chromosomal DNA에 존재하는 것으로 확인되었다.

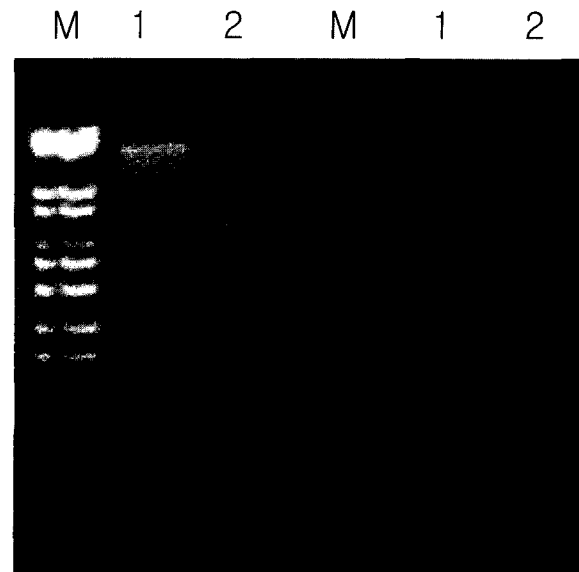


Fig. 4. Southern hybridization analysis of genomic (lane1) and plasmid (lane2) DNAs from *Lb. pentosus* KFRI821. DNA size marker (M). DNAs were digested with *EcoRI*.

요 약

김치로부터 분리된 젖산균들의 16S rDNA 부분 염기서열 결정 결과, 6균주 중 2균주는 *Leuconostoc mesenteroides*로, 나머지 균주는 *Lactobacillus*속으로 재동정되었다. 이들 김치 유래 젖산균들은 유제품 유래 젖산균과 마찬가지로 cell-envelope proteinase (CEP)로 추정되는 세포외 proteinase 활성을 보유하고 있는 것으로 나타났고, 젖산균의 CEP 특이적 primer를 제작하여 PCR을 수행한 결과, *Leu. mesenteroides*로부터는 예상 크기의 PCR 산물이 증폭되지 않았지만 *Lactobacillus*속 균주들로부터는 예상되는 1.2 kb의 DNA 단편이 증폭되었다. *Lactobacillus pentosus* KFRI821의 genomic DNA로부터 증폭된 PCR 산물의 추정 아미노산서열은 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*의 PrtP와 95%, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*의 PrtP와 92%의 높은 상동성을 보였다. 증폭된 PCR 산물을 probe로 하여 Southern hybridization을 수행한 결과, *Lb. pentosus* KFRI821의 CEP 유전자는 chromosomal DNA에 암호화 되어있는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-00191) 지원으로 수행되었음.

REFERENCES

1. Anderson, D. G. and L. L. McKay. 1983. Simple and rapid

- method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 549-552.
2. Exterkate, F. A. 1976. Comparison of strains of *Streptococcus cremoris* for proteolytic activities associated with the cell wall. *Neth. Milk Dairy J.* **30**: 95-105.
 3. Exterkate, F. A. 1984. Location of peptidases outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 177-183.
 4. Fitzgerald, G., J. Law, P. Vos, F. Hayes, G. Daly, and W. M. de Vos. 1992. Cloning and partial sequencing of the proteinase gene complex from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 709-718.
 5. Gilbert, C., D. Atlan, B. Blance, R. Portalier, J. E. Germond, L. Lapierre, and B. Mollet. 1996. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Bacteriol.* **178**: 3059-3065.
 6. Han, H. U., C. R. Lim, and H. K. Park. 1990. Determination of microbial community as an indicator of Kimchi fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **22**: 26-32.
 7. Holck, A. and H. Naes. 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* NCDO151. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1353-1364.
 8. Johansen, E. and A. Kibenich. 1992. Characterization of *Leuconostoc* isolated from commercial mixed strain mesophilic starter cultures. *J. Dairy Sci.* **75**: 1186-1191.
 9. Juillard, V., H. Laan, E. R. S. Kunji, C. M. Jeronimus-Stratingh, A. P. Bruins, and W. N. Konings. 1995. The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.* **177**: 3472-3478.
 10. Hirashima, A., Kiwaki, M., H. Ikemura, and M. Shimizu-Kadota. 1989. Molecular characterization of a cell wall-associated proteinase gene from *Streptococcus lactis* NCDO763. *Mol. Microbiol.* **3**: 359-369.
 11. Kok, J., K. J. Leenhouts, A. J. Haandrikman, A. M. Ledebøer, and G. Venema. 1988. Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 231-238.
 12. Laan, H. and W. N. Konings. 1989. Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 3101-3106.
 13. Laloi, P., D. Atlan, B. Blance, C. Gilbert, and R. Portalier. 1991. Cell-wall associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397: differential extraction, purification and properties of the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 196-204.
 14. Lee, S. H., N. Y. Park, and W. J. Choi. 1999. Changes of lactic acid bacteria and selective inhibitory substances against homo and hetero lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 410-414.
 15. Martin-Hernandez, C., A. Alting, and F. Exterkate. 1994. Purification and characterization of the mature, membrane associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 828-834.
 16. Martinez-Murcia, A. J. and M. D. Collins. 1990. Nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA from *Lactobacillus viridescens* and *Lactobacillus confuses*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3402.
 17. Monnet, V., D. Lebars, and J. C. Gripon. 1986. Specificity of a cell wall proteinase from *Streptococcus lactis* NCDO763 towards bovine β -casein. *FEMS Microbiol. Lett.* **36**: 127-131.
 18. Monnet, V., W. Bockelman, J. C. Gripon, and M. Teuber. 1989. Comparison of cell wall proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ACI and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO763. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 112-118.
 19. Naes, H. and J. Nissen-Meyer. 1992. Purification and N-terminal amino acid sequence determination of the cell-wall-bound proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 313-318.
 20. Pederson, J. A., G. J. Miliski, B. C. Weimer, and J. L. Steele. 1999. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.* **181**: 4592-4597.
 21. Pritchard, G. G. and T. Coolbear. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 179-206.
 22. Roland, J. S. 1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 139-155.
 23. Rul, R., D. R. Maria, P. Garault, and B. Monnet. 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4772-4778.
 24. Shin, D. H., M. S. Kim, J. S. Han, D. K. Lim, and W. S. Bak. 1996. Changes of chemical composition and microflora in commercial Kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**: 137-145.
 25. Siezen, R. J. and J. A. Leunissen. 1997. Subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* **6**: 501-523.
 26. Siezen, R. J., W. M. de Vos, J. A. Leunissen, and B. W. Dijkstra. 1991. Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Eng.* **4**: 719-737.
 27. Smid, E. J., B. Poolman, and W. N. Konings. 1991. Casein utilization by lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2447-2452.
 28. So, M. H. and Y. B. Kim. 1995. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**: 495-505.
 29. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
 30. Tan, P. S. T., B. Poolman, and W. N. Konings. 1993. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Res.* **60**: 269-286.
 31. Thomas, T. D. and O. E. Mills. 1981. Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* **35**: 255-273.
 32. Tsakalidou, E., R. Anastasiou, I. Vandenberghe, J. van Beeu-

- men, and G. Kalanizopoulos. 1999. Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC178: characterization and specificity for β -casein. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2035-2040.
33. Vincent, J., D. L. Bars, E. R. S. Kunji, W. N. Konings, J. C. Gripon, and J. Richard. 1995. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3024-3030.
34. Vos, P., M. van Asseldonk, F. van Jeveren, R. Siezen, G. Simons, and W. M. de Vos. 1989. A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *J. Bacteriol.* **171**: 2795-2802.
35. Ward, L. J. H., J. C. S. Brown, and G. P. Davey. 1995. Detection of dairy *Leuconostoc* strains using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 204-208.
36. Yang, D. and C. R. Woese. 1989. Phylogenetic structure of the *Leuconostoc*: an interesting case of a rapidly evolving organism. *Sys. Appl. Microbiol.* **12**: 145-149.
37. Zevaco, C. and J. C. Gripon. 1998. Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Lait* **68**: 393-408.

(Received Jan. 29, 2002/Accepted Apr. 10, 2002)