

반추동물용 활생제로서 *Lactobacillus* sp. FFy111-1이 생산한 Lactate Dehydrogenase의 특성에 관한 연구

성하균* · 김동균** · 배희동* · 신형태*

성균관대학교 생명공학부*, 상지대학교 동물자원학과**

Characteristics of Lactate Dehydrogenase Produced from *Lactobacillus* sp. FFy111-1 as a Ruminant Probiotic

H. G. Sung*, D. K. Kim**, H. D. Bae* and H. T. Shin*

Faculty of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University*

Department of Animal Science and Technology, Sangji University**

ABSTRACT

The objective of this experiment is to study the possibility of lactate dehydrogenase(LDH) enzyme to prevent lactate accumulation in the rumen. For understanding capacity of bacterial LDH in rumen environments, this study was conducted to explore the effects of temperature, pH, VFAs and metal ions on *Lactobacillus* sp. FFy111-1's LDH activity, and the LDH activation in rumen fluid accumulated lactate. The optimum pH and temperature of LDH were pH 7.5 and 40°C respectively. The LDH activity had a good thermostability at range from 30 to 50°C. The highest pH stability of the enzyme was at ranges from pH 7.0 to 8.0 and the enzyme activities showed above 64% level of non-treated one at pH 6.0 and 6.5. The LDH was inactivated by VFAs treatments but was enhanced by metal ion treatments without NaCl and CuSO₄. Especially, the LDH activity was increased to 127% and 124% of its original activity by 2 mM of BaCl₂ and MnSO₄ addition, respectively. When the acidic rumen fluid was treated by LDH enzyme of *Lactobacillus* sp. FFy111-1, the lactate concentration in the rumen fluid was lower compared with non-treated rumen fluid ($P < 0.05$). This lactate reduction was resulted from an action of LDH. It was proved by result of purified D,L-LDH addition that showed the lowest lactate concentration among the treatments ($P < 0.05$). Although further investigation of microbial LDH and ruminal lactate is needed, these findings suggest that the bacterial LDH has the potential capability to decrease the lactate accumulated in an acidic rumen fluid. Also, screening of super LDH producing bacteria and technical development for improving enzyme activity in rumen environment are essential keys for practical application.

(Key words : Lactate dehydrogenase, *Lactobacillus* sp., Lactate accumulation)

I 서 론

반추위내 서식하는 혐기성 미생물들은 반추 동물과 상호 공생관계로서 매우 다양한 미생물 (박테리아, $10^9 \sim 10^{11}$ /mL; 프로토조아, $10^5 \sim 10^6$ /mL; 곰팡이, $10^3 \sim 10^5$ /mL)들이 생태계를 유지하고 있다

(Trinci 등, 1994; Russell과 Rychlik, 2001). 이들이 반추위 발효를 유지하기 위해서는 풍부한 섬유질 사료를 공급 받아야 한다. 그러나 많은 반추동물은 높은 생산성(유 생산량 및 증체량)을 유지하기 위하여 고 에너지 사료 즉, 곡류 위주의 저 섬유질 사료가 급여되고 있는 실정이다.

Corresponding author : H. T. Shin, Dept. of Food and Biotechnology, Faculty of Life Science and Technology, Sungkunkwan University, Suwon, 440-746, South Korea. Tel : 031-290-7804, Fax : 031-290-7904, E-mail : htshin@skku.edu.

곡류사료는 *Streptococcus bovis* 또는 *Lactobacillus* sp.와 같은 반추위내 대표적 유산 생성균들이 빨리 증식 할 수 있는 탄소원인 전분을 다량 제공한다(Russell과 Hino, 1985; Moore과 Martin, 1991). 따라서 곡류 위주의 농후사료 공급은 이들의 증식과 성장 촉진, 유산(lactic acid)의 반추위내 다량 축적, 반추위내 pH 저하, 반추위 섬유소 소화 장애 및 대사성 질병을 일으킨다(Slyter, 1976). 유산(pK 3.9)은 휘발성지방산(VFA, pK 4.5)보다 산도가 매우 강하기 때문에 반추위 급성 산중독증(반추위내 pH < 5.5)의 주원인으로 알려져 있다. 이러한 유산중독과 pH 저하를 예방하기 위하여 미생물(Kung과 Hession, 1995), 항생제(Coe 등, 1999) 및 완충제(Aslan 등, 1995) 등을 이용하여 반추위 발효조작이 다각도로 시도되었으며, 이러한 노력은 반추위 기능을 다소 증진시킬 수 있었지만 아직 해결하여야 할 문제점들이 많이 남아있다.

Lactate dehydrogenase(LDH)는 반추위 미생물이 탄수화물을 이용하는 대사에 있어 lactate와 pyruvate 사이에 가역반응을 일으키는 효소로써(Russell과 Rychlik, 2001), 반추위내 lactate를 생성하는 대표적 박테리아로 알려진 *Streptococcus bovis*와 *Lactobacillus* sp. 뿐만 아니라 lactate를 이용하는 반추위 박테리아 *Selenomonas ruminantium*과 *Megaspora elsdenii*도 LDH를 생산하며 이들에 대한 연구가 Scheifinger 등(1975) 그리고 Hino와 Kuroda(1993)에 의하여 수행되었다. 그러나 반추위내 lactate 생성 및 이용과 관련하여 LDH의 기능을 이해하고 반추위 산중독을 조절하기 위해서는 LDH에 대한 더 많은 연구가 요구된다.

LDH는 미생물의 종류에 따라 다른 형태의 효소(L-nLDH, D-nLDH, L-iLDH 및 D-iLDH)와 다양한 효소학적 특성이 있고, 특히 이들은 반응환경에 따라 다른 반응역가를 나타낸다(Garvie, 1980). 일반적으로 박테리아가 생성한 LDH는 pH 6.0~8.0 그리고 25~30°C에서 최적 반응을 보이나 어떤 미생물들은 pH 5.3 또는 8.6 그리고 55~60°C의 조건에서 최적 활성을

갖는 LDH를 분비한다고 보고 되었다(Weerkamp와 MacElroy, 1972, Wrba 등, 1990). 그리고 LDH 역가는 oxamate과 oxalate에 의해 억제되고, 금속이온(Cd^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+})과 황화합물[$CuSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$]에 의해 영향을 받는다고 보고 되었다(Hensel 등, 1977; Strasser de Saad 등, 1986). 그리고 반추위내에는 효소활성에 영향을 줄 수 있는 많은 요인 즉 온도, pH, 외부로부터 유입된 사료와 그들의 구성 성분, 반추미생물의 대사산물 등이 있다.

따라서 반추위내 유산축적 방지용 활성제로 lactate dehydrogenase를 활용하기 위한 기초적 단계로써, 본 생명공학 연구실에서 선별한, LDH 효소활성이 가장 좋은 박테리아 *Lactobacillus* sp. FFy111-1이 생성하는 효소를 이용하여, 반추위내에서 효소작용에 영향을 줄 수 있는 대표적 요소인 pH, 온도, VFA, 금속이온들에 대한 LDH 효소활성을 평가하고, 반추위액내 lactate에 대한 LDH 반응역가를 평가하여 이들의 활용 가능성을 검증하고자 본 연구를 수행하였다.

II 재료 및 방법

1. 사용균주 및 실험 설계

본 연구는 다양한 샘플로부터 분리한 240여종의 미생물중 lactate dehydrogenase(LDH) 역가가 가장 좋은 *Lactobacillus* sp. FFy111-1을 사용하였다. 그리고 본 균주가 생산하는 효소의 활성을 평가하기 위하여 여러 조건의 효소반응환경을 조성하여 수행하였으며 효소의 반응환경 조성을 위한 요소로는 다양한 범위의 온도와 pH의 영향 그리고 여러 농도의 다양한 휘발성 지방산과 금속이온에 대한 효소 활성을 측정하였고 반추위액에서 lactate에 대한 효소작용도 평가 하였다.

2. Lactate dehydrogenase 효소 준비

효소액 준비를 위하여 균주는 tryptic soy

broth(TSB, DIFCO)와 0.03%(w/vol) yeast extract를 함유하고 있는 배양액 10 mL를 40 mL의 튜브에서 두 번 계대배양 후에 TSB 배양액에서 39°C를 유지하면서 24시간 배양하였다. 그 후 배양액은 4°C에서 10분간 원심분리(12,000 × g)한 후 상등액은 버리고 수거된 박테리아를 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 세척하고 효소액을 추출하기 위하여 사용되었다. 효소액은 수거된 박테리아를 초음파분쇄기(VCX 400, Sonic & Materials Inc., USA)로 분쇄 후에 원심분리(20,00 × g, 10 min)하여 상등액을 이용하였다. 초음파 분쇄하는 동안 분쇄된 박테리아는 Gram 염색 후 현미경으로 계속 관찰하여 박테리아가 80% 이상 분쇄 될 때까지 분쇄하였으며 총 소요시간은 10분(on: 3 sec; off: 5 sec; 20 kHz, pulse 40%) 이었다.

3. LDH의 활성 측정

LDH 역가는 Bergmeyer(1974)가 사용한 UV측정방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 효소 반응을 위한 총 혼합액은 0.5 mL로 50 mM Tris-HCl(pH 7.0), 12.5 mM L-lactate(sodium salt), 1.5 mM nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)와 조효소액(샘플의 효소 역가에 따라 1~2 mg/mL의 단백질을 함유하였다. 효소반응은 25°C에서 조효소액을 넣은 시점부터 시작되었으며, 20분 후 효소반응으로 생성된 NADH를 UV spectrophotometer(Specord S100, Analytik Jena, Carlzeiss Technology, Germany)를 이용 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH의 효소 역가는 1 mg 단백질량의 조효소액이 1분간 효소반응에 의해 생성된 NADH의 μmole 량($\mu\text{mole NADH}/\text{mg protein}/\text{min}$)으로 나타내었다. 그리고 LDH의 상대비교 역가(relative activity)는 최고(또는 비처리) 효소역가에 대한 상대비율(%)로 나타내었다. 조효소액의 단백질 정량은 Coomassie Protein Assay Reagent Kit(Pierce, USA)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin(Sigma, USA)을 표준단백질로 사용하였다(Bradford, 1976).

4. pH와 온도가 LDH 활성에 미치는 영향

반추위내 정상적 온도와 pH를 근거로 다양한 범위의 온도와 pH가 LDH의 효소 활성에 미치는 영향을 구명하기 위하여 pH는 3.0~11.0 범위와 온도는 10~60°C에서 효소 활성을 측정하였다. 그리고 pH와 온도에 대한 효소의 안정성을 평가하기 위해서 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0과 11.0인 각각의 완충제와 조효소액을 1:1로 혼합하여 39°C에 30분간 방치한 후 남아 있는 효소의 역가를 측정하여 비교하였다. 그리고 온도는 30, 40, 50, 60과 70°C에 조효소액을 60분간 보관하면서 10분마다 효소의 활성을 측정하여 남아있는 효소의 역가 변화를 비교하였다. 그리고 각각의 pH의 범위에 적합한 완충제(50 mM citrate, pH 3.0~5.0; 50 mM acetate, pH 4.0~6.0; 50 mM MES sodium salt, pH 5.0~8.0; 50 mM potassium phosphate, pH 6.0~8.0; 50 mM sodium phosphate, pH 7.0~9.0; 50 mM borate, pH 7.0~10.0; 50 mM glycine, pH 9.0~11.0)를 제조하여 사용하였다.

5. VFAs와 금속이온이 LDH 활성에 미치는 영향

휘발성 지방산과 금속이온이 LDH의 효소 활성에 미치는 영향을 구명하기 위하여 휘발성지방산(VFAs)으로는 반추위내 존재하는 대표적 VFAs인 acetate, propionate, butyrate, valerate, isobutyrate과 isovalerate를 각각 0.5, 10, 20, 30과 40 mM의 농도로 제조하였고 금속이온으로는 BaCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, CaCl₂, NaCl, KCl, MgSO₄, MnSO₄, CuSO₄과 FeSO₄를 각각 2 mM과 10 mM로 제조하여 사용하였다. 그리고 제조된 각각의 용액과 효소액을 각각 0.5 mL씩 혼합하여 39°C에 30분간 방치한 후 남아 있는 LDH의 역가를 평가하였다.

6. 반추위액내 lactate에 대한 LDH의 작용

반추위액내에서 lactate에 대한 LDH의 작용을

평가하기 위하여 lactate가 축적된 반추위액은 실험관내 반추발효(*in vitro* rumen fermentation)를 통하여 얻었다. 반추발효는 실험관(125 mL serum bottle)내에서 반추위액(50 mL)에 55% soluble starch, 26% glucose, 6% cellulose, 7% cellobiose와 6% trypticase로 구성되어 있는 산생성 혼합기질을 2.5% 첨가하여 39°C에서 20시간 배양하였다. 이때 실험관 반추발효에 사용한 반추위액은 반추위에 누관이 설치된 Holstein (550 kg)으로부터 채취하여 사용하였으며 모든 과정은 혐기적 상태에서 진행되었다.

반추위액내 lactate에 대한 LDH의 작용을 평가하기 위하여 효소액(0.2 mL)과 상기 반추위액(1.8 mL)을 혼합하여 39°C에서 30분 반응한 후에 반추위액내 감소한 lactate 양을 측정하였으며, 순수한 LDH(Sigma L2881 and L3936)를 이용하여 반추위액내 LDH의 효소작용을 비교 검토하였다. Lactate 정량은 carboxylic acid column (25 cm, 4.6 mm, Supelco, USA)이 장착된 HPLC (Varian 9012, Optimize Technologies Inc., USA)를 이용하여 200 mM phosphoric acid(0.8 mL/min)에서 분석하였다.

7. 통계처리

시험을 통해 얻어진 연구 결과의 수치는 SAS (1996)의 ANOVA(Analysis of Variance) Procedure로 분석하였고, 처리간 유의성을 위해 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)를 이용하였다.

III 결과 및 고찰

1. Lactate dehydrogenase의 반응 특성

반추동물의 반추위내 정상적인 온도와 pH는 39°C와 6.8로 알려져 있으나 반추위내 pH는 여러 요인에 의하여 영향을 많이 받는다. 따라서 온도와 pH가 *Lactobacillus* sp. FFy111-1이 생산하는 lactate dehydrogenase(LDH) 효소활성에 미치는 영향은 Fig. 1, 2, 3, 4에서 보는 바와 같다.

LDH 효소활성의 최적 온도를 구명하기 위하

여 효소액을 사용하여 10~60°C까지의 각 온도 별로 효소활성을 측정한 결과 40°C(3.92 μ mole NADH/min/mg)에서 최대 활성을 나타내었다 (Fig. 1). 그리고 35와 45°C에서는 각각 최고 효소역가의 98과 95%의 역가를 나타내었으며, 비교적 넓은 온도 범위(30~50°C)에서 좋은 효소활력(>80%)을 나타내었다. 그리고 그 외의 온도에서는 낮은 효소활력을 나타냈고 50°C 이상에서는 효소역가가 급속히 떨어지는 현상을 보였다. 효소의 온도 안정성은 Fig. 2에서와 같이 30~70°C까지의 각각의 온도에서 60분 동안 효소역가를 측정한 결과 30°C에서 가장 좋은 안정성을 나타내었다. LDH는 30°C에서 60분 동안 비처리 효소의 90% 이상의 효소 활성을 유지하였으며, 40°C에서도 80%의 효소 활성을 유지하였다. 그리고 50과 60°C에서는 10분 동안 60% 이상의 효소활성을 유지하였으나 60분 후에는 40% 이하의 효소 활성을 보였다. 그러나 70°C에서는 가장 나쁜 안정성을 보였으며 60분 후 단지 6%의 효소활성을 나타내었다. 본 실험에 사용한 것과 같은 종의 균주(*Lactobacillus acidiphilus*, *Lactobacillus plantarum*)를 사용한 다른 연구(Dennis와 Kaplan, 1960; Gasser 등, 1970)에서도 본 실험 결과와 유사한 온도 범위에서 효소 활성을 나타내는 것으로 보고 하였다.

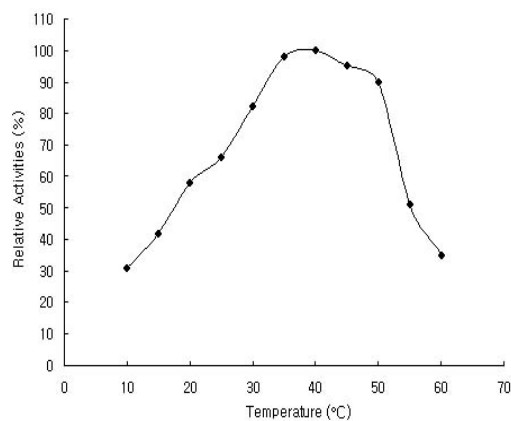


Fig. 1. Comparisons of lactate dehydrogenase (LDH) activity at different temperatures. Relative activity(%) was based on the highest enzyme activity of LDH.

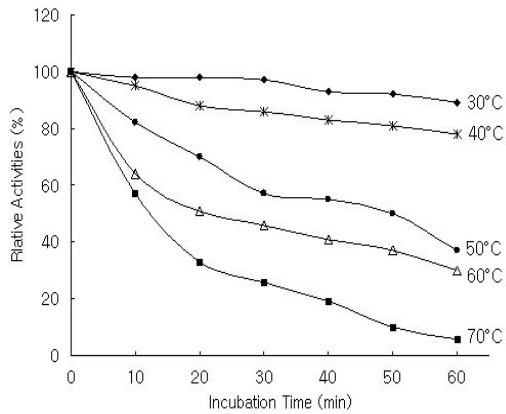


Fig. 2. Thermal stability of lactate dehydrogenase(LDH) at different temperature (°C based on untreated LDH activity.

Lactate dehydrogenase 효소활성에 미치는 pH의 영향은 여러 연구들(Gasser 등, 1970; Hensel 등, 1977; Garvie, 1980)에 의하여 보고 되었으며, *Lactobacillus* sp. FFy111-1이 생산하는 LDH 효소활성의 최적 pH를 알기 위하여 pH 3.0~10.0 까지의 각 pH별 효소 활성을 측정된 결과 pH 7.5(2.68 μ mole NADH/min/mg)에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 3). 전반적으로 LDH 효소역가는 알칼리성 pH 범위에서 산성 pH보다 높은 경향을 나타내었다. LDH는 pH 7.0~8.5의 범위에서 최고 효소역가의 90% 이상 활성을 보였으나 pH 6.0과 6.5에서는 각각 64와 79%의 효소활성을 나타냈다. 본 실험과 유사한 결과로 Dennis와 Kaplan(1960)과 Gasser 등(1970)은 *L. plantarum*과 *L. acidophilus*가 각각 pH 7.5와 pH 7.8에서 LDH 활성이 가장 높은 것으로 보고하였다. Fig. 3에서와 같이 사용한 완충제에 따라 효소활성이 차이를 보였는데 이는 완충제의 화학적 특성에 의해 발생한 것으로 phosphate, citrate, Tris-glycine과 sodium acetate와 같은 완충제가 효소억제 작용이 있다고 다른 연구(Brown 등, 1975; Gordon과 Doelle, 1976; Garvie, 1980)에서 보고한 바 있다.

반추위내의 pH는 섭취하는 사료에 의해 영향을 많이 받으며, 특히 곡류사료의 과다급여는 반추위내 pH를 6.0 이하로 떨어뜨리고

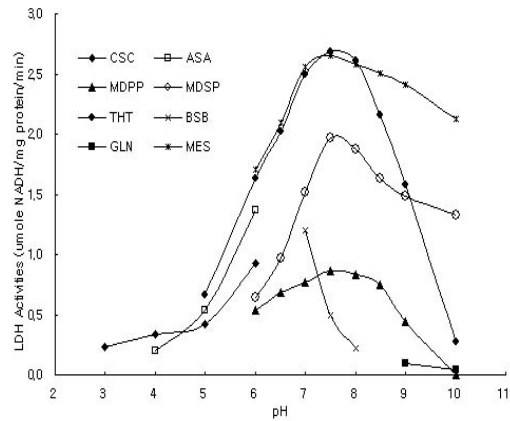


Fig. 3. Effects of pH using different buffer solution on lactate dehydrogenase (LDH) activities.

- CSC : Citrate-Sodium citrate.
- ASA : Acetate-Sodium acetate.
- MDPP : Mono-Dipotassium phosphate.
- MDSP : Mono-Disodium phosphate.
- THT : Tris HCl-Tis.
- BSB : Borate-Sodium borate.
- GLN : Glycine.
- MES : 2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate.

급성 산중독증은 pH 5.0 이하 일 때 발생한다(Owens 등, 1998). 따라서 LDH 효소의 pH 안정성을 조사하기 위하여 pH 2.0~11.0에서 효소액을 30분간 처리한 후 효소의 활성을 비교한 결과 pH 7.0과 8.0에서 가장 높은 안정성을 보였다(Fig. 4). LDH는 pH 6.0~9.0의 범위에서는 가장 높은 안정성을 보인 효소역가의 93% 이상 효소활성을 유지하였으며, pH 5.5에서는 75% 이상의 효소활성을 유지하였다.

따라서 *Lactobacillus* sp. FFy111-1이 생산하는 LDH 효소활성을 위한 최적 pH는 7.5로 정상반추위 pH 6.8보다 다소 높았지만 pH 5.5에서 75% 이상의 안정성을 보이고 35~45°C의 온도 범위에서 최적 효소활성과 높은 안정성을 유지하는 것을 고려할 때, *Lactobacillus* sp. FFy111-1이 생산한 LDH를 반추위에 적용하였을 경우에 효소 활성을 나타낼 것이라고 사료된다.

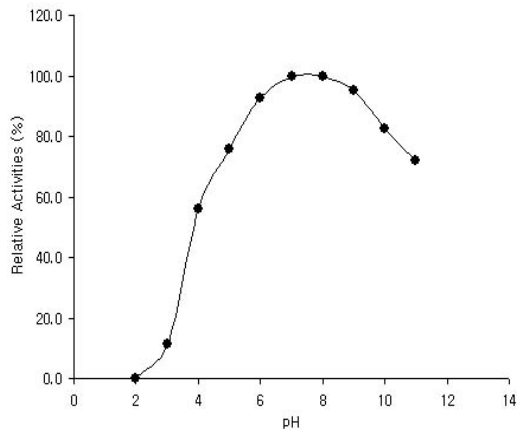


Fig. 4. Stability of lactate dehydrogenase(LDH) at different pH.

Relative activity(%) was based on the highest activity of LDH.

2. VFAs와 금속 이온의 첨가가 LDH 활성에 미치는 영향

VFAs는 반추위내 미생물의 대사산물로써 이들의 농도는 사료의 형태 및 발효 시간에 따라 많은 영향을 받는다(Owens 등, 1998). 따라서 LHD 활성을 여러 농도의 VFAs(0.5, 10, 20, 30 및 40 mM)로 30분간 처리를 한 후 효소의 역가를 측정하여 처리하지 않은 효소 역가와 비교한 결과는 Fig. 5와 같다.

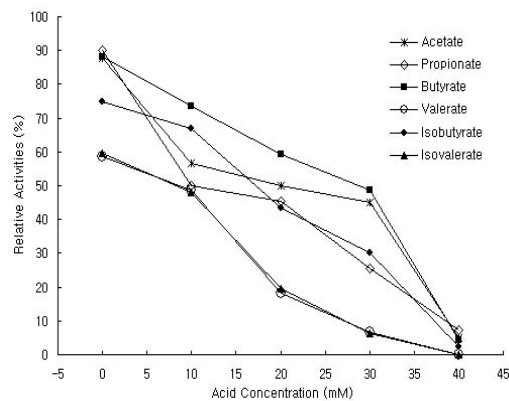


Fig. 5. Effects of different volatile fatty acid addition on lactate dehydrogenase(LDH) activities.

Relative activity(%) was based on enzyme activity of untreated LDH activity.

LDH의 효소활성은 본 실험에 사용한 모든 VFAs들에 의하여 억제되는 예민한 반응을 보였다. 효소액을 0.5 mM의 VFAs로 처리하였을 때 LDH 활성은 acetate, propionate와 butyrate에서 각각 비처리 LDH 활성의 88, 90과 88%의 효소활성을 나타내었으나, valerate, isobutyrate과 isovalerate은 각각 59, 75와 60%로 낮은 효소활성을 유지하였다. 그리고 10mM VFAs를 처리를 하였을 때 butyrate과 isobutyrate에서만 70% 이상의 LDH 효소활성을 유지하였으며 다른 VFAs에서는 이보다 낮은 효소활성을 유지하였다. 전반적으로 모든 처리에서 LDH는 VFAs 처리 농도가 증가할수록 효소활성이 감소하였으며, 40 mM VFAs로 처리하였을 때 모든 처리구의 효소활성은 2~7% 정도만 남아있었다. LDH 효소활성과 VFAs의 관계에 대한 연구결과는 많지 않지만 Brown 등(1975)은 sodium acetate에 대한 효소활성 억제현상을 보고한 바 있다. 그리고 VFA는 아니지만 Crow와 Prichard (1977)는 citrate이 LHD 효소활성에 영향을 주었다고 보고하였으며, 본 실험(LDH의 반응 특성)에서도 완충제로 사용한 각종 유기산들에 따라 LDH 효소활성이 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다.

LDH 효소활성과 여러 금속이온의 관계는 Garvie(1980)가 보고한 바 있으며, 반추위액에는 사료와 함께 유입된 다양한 금속이온이 잔존한다. 따라서 다양한 금속이온과 *Lactobacillus* sp. FFy111-1이 생산하는 LDH 효소활성과의 관계는 Table 1과 같다.

금속이온을 2와 10 mM 농도로 LDH를 처리하였을 때 처리하지 않은 LDH 활성에 비하여 전반적으로 효소활력이 향상되는 경향을 나타내었으며 특히, 2 mM BaCl₂와 MnSO₄에서는 각각 비처리 효소활성의 127과 124%으로 상당히 증가된 효소활성을 나타내었다. 그러나 NaCl (2 mM)과 CuSO₄(2와 10 mM)에서는 효소활성이 억제되는 경향이 나타났으며 특히, 10 mM CuSO₄에서는 LDH 활성이 크게 억제되어 38%의 효소활성만이 유지되었다. CuSO₄가 *Pediococcus pentosaceus*의 LDH 활성을 억제하였다는 결과

Table 1. Effects of different metal ion addition on lactate dehydrogenase(LDH) activities

	2 mM		10 mM	
	Enzyme activity ^a	Relative activity ^b	Enzyme activity	Relative activity
Non	3.269 ± 0.134	100	3.269 ± 0.134	100
BaCl ₂	4.151 ± 0.204	127	3.922 ± 0.096	120
ZnCl ₂	3.334 ± 0.321	102	3.465 ± 0.132	106
CoCl ₂	3.301 ± 0.258	101	3.563 ± 0.239	109
CaCl ₂	3.661 ± 0.187	112	3.497 ± 0.398	107
NaCl	3.203 ± 0.098	98	3.595 ± 0.210	110
KCl	3.497 ± 0.165	107	3.367 ± 0.225	103
MgSO ₄	3.563 ± 0.078	109	3.791 ± 0.321	116
MnSO ₄	4.053 ± 0.321	124	3.759 ± 0.288	115
CuSO ₄	3.236 ± 0.105	99	1.242 ± 0.503	38
FeSO ₄	3.563 ± 0.095	109	3.628 ± 0.175	111

^a Enzyme activity : μ mole NADH per mg protein per min.

^b Relative activity : % based on enzyme activity of non-treatment.

는 Gordon과 Doelle(1975)에 의하여 보고 되었으며, Cu²⁺에 의해 *Lactobacillus casei*와 *Leuconostoc lactis*의 LDH 활성이 억제되었다고 Gordon과 Doelle(1974, 1976)이 발표한 바 있다.

이상의 결과와 같이 LDH는 VFAs에 의하여 효소 활성이 감소하는 경향을 보였으나 일부 VFAs에서는 70% 이상의 효소활성을 유지하였고 금속이온에 의한 LDH 효소활성의 증진 효과를 고려할 때 *Lactobacillus sp.* FFy111-1이 생산하는 LDH는 반추위에서도 효소 작용을 할 수 있으리라 사료된다.

3. 반추위액내 lactate에 대한 LDH의 작용

본 실험에서 사용한 LDH의 최종적 적용대상은 반추위에 축적된 lactate이며, 반추위액에는 효소의 활성에 영향을 주는 많은 요인들이 복잡한 상호관계를 형성하고 있다(Russell과 Hino, 1985; Weimer, 1992, 1996). 따라서 산중독 상태의 반추위액 내 lactate에 대한 LDH 효소활성을 평가하기 위하여 실험관내 산중독 반추발효를

통하여 pH 4.70, 38.21 mM lactate, 144.67 mM VFAs(51.08 molar % acetic acid, 19.68 molar % propionic acid, 21.59 molar % butyric acid)를 갖는 산중독 상태의 반추위액을 얻었으며, 이에 대한 LDH의 효소작용은 Fig. 6과 같다.

Lactate이 축적된 상기의 반추위액에 두 가지의 LDH 효소(*Lactobacillus sp.* FFy111-1이 생산한 LDH 효소와 정제된 D,L-LDH)를 처리 하였을 때 반추위액내 lactate 농도가 감소되었으며, 반추위액내 lactate 농도는 각각 비처리, LDH 효소처리 및 정제된 D,L-LDH 처리간의 차이는 통계적으로도 입증되었다($P < 0.05$). *Lactobacillus sp.* FFy111-1의 효소를 본 반추위액에 처리하였을 때 반추위액 내 lactate 농도는 비처리 반추위액의 78% 수준으로 감소하였다. 이 같은 결과는 lactate dehydrogenase의 작용에 의한 것으로 정제된 시판용 D,L-LDH로 처리한 실험으로 입증 할 수 있었다. 정제된 시판용 D,L-LDH로 처리한 반추위액의 lactate 농도는 비처리 반추위액의 43% 수준을 나타내었다. 이와 같은 상기 결과들은 미생물 LDH가 반추위액내 lactate

축적을 줄일 수 있는 잠재적 가능성을 시사하는 기초적 자료가 되리라 사료된다. 하지만 lactae 축적으로 인한 반추위 산중독을 해결하기 위해서는 앞으로 반추위의 복잡한 미생물대사와 lactate 생산, 생산된 lactate와 미생물 유래 LDH, 그리고 이들 LDH의 probiotics로 활용 기술에 대한 연구가 더 필요하다.

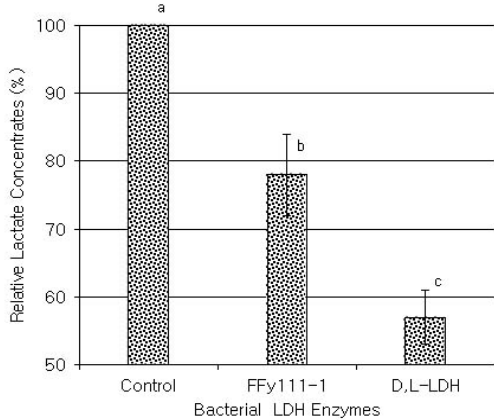


Fig. 6. Relative lactate concentrations in rumen fluid after treatments of lactate dehydrobenase(LDH).

Relative lactate concentration(%) was based on the lactate concentration in rumen fluid untreated LDH(control).

^{abc} Different superscripts are significant different(p < 0.05).

Control : Tris-HCl which using preparation of crude enzyme.

D,L-LDH : Mixture of L-LDH and D-LDH (1 : 1).

L-LDH : Commercial enzyme purified from porcine heart(Sigma L2881).

D-LDH : Commercial enzyme purified from *Staphylococcus epidermidis* (Sigma L9636).

IV 요약

본 연구는 미생물 유래 lactate dehydrogenase (LDH)를 이용하여 반추위내에 lactate 축적을 예방하기 위한 가능성 검증을 목적으로 수행되었다. 미생물의 효소활성에 영향을 주는 많은

반추위내 요인들 중 대표적인 것들 즉, 온도, pH, 휘발성지방산(VFAs) 그리고 금속이온들이 *Lactobacillus* sp. FFy111-1의 LDH 효소활성에 미치는 영향과, 반추위액내 축적된 lactate에 대한 LDH 작용을 평가하였다.

Lactobacillus sp. FFy111-1의 LDH는 각각 pH 7.5와 40°C에서 가장 좋은 효소 활력을 보였다. 온도 안정성은 30°C에서 가장 좋게 나타났으며 30~50°C의 온도 범위에서는 80% 이상의 활성을 유지하였다. 그리고 pH 안정성은 pH 7.0과 8.0에서 모두 가장 좋은 결과를 나타냈으며 pH 6.0과 6.5에서 64% 이상의 효소활성을 유지하였다. VFAs와 금속이온이 LDH에 미치는 영향을 측정하였을 때, VFAs 처리는 LDH 효소활성을 억제하였으나, NaCl과 CuSO₄를 제외한 금속이온 처리에서는 LDH 효소활성이 증가되었다. 특히 2 mM BaCl₂와 MgSO₄로 처리 하였을 때 각각 비처리 효소활성의 127과 124% 수준까지 효소활성이 증진되었다.

반추위액내 축적된 lactate에 대한 LDH 작용을 보기 위하여 *Lactobacillus* sp. FFy111-1의 효소를 산중독 반추위액에 처리하였을 때 lactate의 농도가 무처리 반추위액내 lactate 농도의 78% 수준으로 감소하였다(P < 0.05). 이와 같은 lactate 감소는 LDH의 작용에 의해 나타난 현상으로 정제된 D,L-LDH를 첨가한 실험결과(34% lactate)에서 입증되었다(P < 0.05).

이상의 연구 결과들을 고려하여 볼 때 미생물이 생성한 LDH는 반추위내 축적된 lactate를 감소시킬 수 있는 충분한 가능성을 갖고 있다고 사료된다. 또한 더 좋은 미생물의 발굴과 반추위 환경에서 LDH 활성을 높이기 위한 기술개발이 LDH 효소의 실제적 응용을 위하여 필수적이다.

V 인용 문헌

1. Aslan, V., Thamsborg, S. M., Jorgensen, R. J. and Basse, A. 1995. Induced acute ruminal acidosis in goats treated with yeast(*Saccharomyces cerevisiae*) and biocarbonate. Acta Vet. Scand. 36:65-77.

2. Bergmeyer, H. U. 1974. Methods of Enzymatic Analysis(3rd Ed). Academic Press, Inc. New York.
3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
4. Brown, A. T., Christian, C. P. and Eilert, R. L. 1975. Purification, characterization and regulation of a nicotinamide adenine dinucleotide- dependent lactate dehydrogenase from *Actinomyces viscosus*. *J. Bacteriol.* 122:1126-1135.
5. Coe, M. L., Nagaraja, T. G., Sun, Y. D., Wallace, N., Town, E. G., Kemp, K. E. and Hutchenson, J. P. 1999. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *J. Anim. Sci.* 77:2259-2268.
6. Crow, V. L. and Prichard, G. C. 1977. Fructose 1,6-diphosphate-activated L-lactate dehydrogenase from *Streptococcus lactis*; kinetic properties and factors affecting activation. *J. Bacteriol.* 131:82-91.
7. Dennis, D. and Kaplan, N. O. 1960. D- and L-Lactic acid dehydrogenases in *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* 235:810-818.
8. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics.* 11:1.
9. Garvie, E. I. 1980. Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiological Review.* 44: 106-139.
10. Gasser, F., Doudoroff, M. and Contopoulos, R. 1970. Purification and properties of NAD dependent lactic dehydrogenases of different species of *Lactobacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 62:241-250.
11. Gordon, G. L. and Doelle, H. W. 1974. Molecular aspects for the metabolic regulation of the nicotinamide adenine dinucleotide-dependent D(-)-lactate dehydrogenase from *Leuconostoc*. *Microbios.* 9:119-215.
12. Gordon, G. L. and Doelle, H. W. 1975. Production of racemic lactic acid in *Pediococcus cerevisiae* cultures by two lactate dehydrogenases. *J. Bacteriol.* 121:600-607.
13. Gordon, G. L. and Doelle, H. W. 1976. Purification, properties and immunological relationship of L(+)-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. *Eur. J. Biochem.* 67:543-555.
14. Hensel, R., Mayr, U., Stetter, K. O. and Kandler, O. 1977. Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. I. Purification and kinetics of the allosteric L-lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei ssp. casei* and *Lactobacillus curvatus*. *Arch. Microbiol.* 112:81-93.
15. Hino, T. and Kuroda, S. 1993. Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:255-259.
16. Kung, L. Jr. and Hession, A. O. 1995. Prevention *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentation with *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* 73: 250-256.
17. Moore, G. A. and Martin, S. A. 1991. Effect of growth conditions on the *Streptococcus bovis* phosphoenol pyruvate glucose phosphotransferase system. *J. Anim. Sci.* 69:4967-4973.
18. Owens, F. N., Secrist, D. S., Hill, W. J. and Gill, D. R. 1998. Acidosis in cattle; A Review. *J. Anim. Sci.* 96:275-286.
19. Russell, J. B. and Hino, T. 1985. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis* : A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J. Dairy Sci.* 68:1712-1721.
20. Russell, J. B. and Rychlik, J. L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292:1119-1122.
21. SAS. 1996. User,s Guide, Version 6.12. Statistical Analysis System Inst. Inc. Cary NC. USA.
22. Scheifinger, C. C., Latham, M. J. and Wolin, M. J. 1975. Relationship of lactate dehydrogenase specificity and growth rate to lactate metabolism by *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol.* 30: 916-921.
23. Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43:910-929.
24. Strasser de Saad, A. M., Pesce de Ruiz, A. A. and Oliver, G. 1986. D-(+)-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus murinus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 8:370-374.
25. Trinci, A. P. J., Davies, D. R., Gull, K., Lawrence, M. I., Nielsen, B. B., Rickers, A. and Theodrou, M. K. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol. Res.* 98:129-141.
26. Weerkamp, A. and MacElroy, R. D. 1972. Lactate dehydrogenase from an extremely *Thermophilic*

- bacillus*. Arch. Microbiol. 85:113-122.
27. Weimer, P. J. 1992. Cellulose degradation by ruminal microorganisms. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 12:189-194.
28. Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal digest cellulose faster? J. Dairy Sci. 79:1496-1502.
29. Wrba, A., Janicke, R. Huber, R. and Steter, H. O. 1990. Lactate dehydrogenase from the extrem thermophile *Thermotoga maritima*. Eur. J. Biochem. 188:195-201.
- (접수일자 : 2004. 2. 19. / 채택일자 : 2004. 7. 13.)