

Lactobacillus acidophilus 30SC의 고온충격에 의한 반응

문용일^{1*} · 한수민 · 오세중

^{1*}우석대학교 이공대학 애완동물 · 허브자원학부
전남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부

서 론

젖산균은 다른 미생물과 같이 다양한 stress를 받으면서 생장을 하는데 영양소 부족, 산 생성, 온도, 삼투압, 압력 등과 같은 자연적 혹은 환경적 stress에 적응하면서 생존할 수도 있어야 비로소 인체에 유익한 역할을 수행할 수 있게 된다⁽¹⁾. 젖산균은 발효와 숙성과정에서 온도, pH, 그리고 carbon 공급원의 변화 등 다양한 stress를 받는다. 고온 및 저온충격을 포함한 stress 적응과 관련된 일련의 단백질이 발견되지만 이러한 환경변화에 대한 젖산균의 적응기작에 관해서는 현재까지도 세계 각국에서 연구중에 있다^(1, 2).

Fuller^(3, 4)는 생균제를 장내 미생물 균형의 개선을 통해 숙주동물에게 이익을 주는 살아있는 미생물 사료첨가제라고 정의하였고, 현재까지 많은 미생물들이 생균제로의 이용 가능성이 연구되어왔다. 생균제는 실제로 매우 유익한 균주를 이용한다 할지라도 생균제의 생산, 저장, 사용의 과정에서 죽지 않고 살아있는 것이 중요하다. Probiotics가 효과적이기 위해서는 여러 환경에서 활력이 유지되어야 하는데, 특히 분말, 과립, 정, 액상, pellet, spray 등 여러 가지 형태로 가공하였을 때 생존율의 감소를 최소화 시켜야 된다. 따라서 생균제의 생산, 저장, 혼합 시 안정성을 지속할 수 있는 방법을 연구 개발하여야 하기 위해서는 고온 충격에 의한 젖산균의 생리적 변화를 우선적으로 규명해야 할 필요가 있다. 본 연구는 probiotic 활성이 높은 *L. acidophilus* 30SC의 생존성을 증진시키기 위한 기초자료를 얻고자, 열처리 동안 새로이 발견되는 단백질을 일차원 및 이차원 전기영동을 이용하여 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. *Lactobacillus acidophilus* 30SC에 대한 고온 처리

본 연구에 사용된 *L. acidophilus* 30SC은 고려대학교 식품과학부에서 분양받아 사용하였으며, -20℃에서 냉동보관하면서 시험전에 MRS 액체배지(Difco, Detroit, MI)를 사용하여 37℃에서 2회 계대배양한 후 사용하였다. 대수증식기의 세포를 회수하여 멸균된 생리적 식염수로 2회 세척한 다음, 약 10⁸ cfu/ml의 농도로 MRS 배지에 접종한 다음, 45℃ 및 55℃

의 항온수조에 각각 15분간 배양한 다음 37℃로 냉각하였다. 이때 열충격 전, 후에 시료를 각각 채취하여 전기영동의 시료로 사용하였다.

2. 세포질 단백질의 추출

젖산균 세포질 단백질은 신⁽²⁾과 Giard 등⁽⁵⁾의 방법을 변형하여 추출하였다. Heat shock이 완료된 젖산균 배양액을 원심분리하여 세포를 회수하여 0.9% 생리식염수로 2회 세척하였다. 여기에 lysozyme이 함유된 100mM tris buffer을 첨가하고 glass beads(106 microns acid washed, Sigma)를 넣은 후에 vortexing을 하여 세포를 파쇄하였다. 여기에 4배 부피의 cold 아세톤을 첨가하여 20분간 4℃에서 정치시킨 후 원심분리하여 침전된 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질에 8M urea를 첨가하여 -80℃에 보관하면서 시료로 사용하였다.

3. Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

상기 방법으로 추출된 젖산균 세포질 성분을 sample buffer와 동량을 혼합하여 100℃에서 3분간 끓인 후 사용하였으며, tricine이 첨가된 8-16% gradient gel을 제조하여 125 V(constant), 80mA의 조건으로 60분간 수행하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie Brilliant Blue G-250 staining 용액으로 염색 후 탈색하여 molecular weight marker(Bio-Rad Co. USA)와 비교하여 분자량을 계산하였다.

4. 이차원 전기영동(Two-Dimensional Electrophoresis, 2-DE)

이차원 전기영동은 O'Farrell⁽⁶⁾의 방법을 활용하여 실시하였다. 등전점 전기영동(isoelectric focusing electrophoresis)을 위한 gel은 pH 범위가 3-10인 immobilized pH gradient gel(IPG) strip(7cm, Bio-Rad Co. USA)을 사용하여 85µl의 rehydration buffer와 시료 40 µl를 혼합하여 실온에서 16시간 방치시켰다. 그 후 전압을 3000V까지 조정하면서 10000 VH(volt hours)에 이를 때까지 수행하였다. 반응이 끝난 strip을 14% gel에 올려 1% agarose solution으로 굳힌 다음 200V constant의 조건에서 1시간 영동을 실시하였다. 전기영동 후 gel은 silver 염색을 수행하여 spot을 확인하였다.

5. 주사전자현미경에 의한 세포 형태

주사전자현미경 표본 제조는 다음과 같이 수행하였다. 회수된 균체를 0.1M phosphate buffer(pH 7.3)에 희석한 2.5% glutaraldehyde 용액으로 4℃에서 2시간동안 고정하였다. 동일 완충액으로 완충된 1% osmium tetroxide 용액으로 2시간동안 후고정(postfixation)하였다. 고정된 세포는 50, 60, 70, 80, 90, 95, 그리고 100%의 에탄올로 각각 10분씩 2회 세척하여 탈수시킨 다음 hexamethyldisilazane으로 15분씩 2회 치환하여 대기중에서 건조시켰다. 건조된 표본은 이온도금장치를 사용하여 20nm두께의 금도금을 실시한 후 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM, Hitachi S-450, Japan)으로 15kV의 가속전압하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

L. acidophilus 30SC를 37°C에서 배양한 후 45°C와 55°C에서 15분씩 heat shock을 준 다음 다시 37°C에서 배양한 다음 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 생존성을 평가한 것이다 (Fig. 1). 55°C의 heat shock에는 *L. acidophilus* 30SC의 사멸이 있는 것으로 나타났다. 나머지 처리구는 37°C에서 계속 배양한 것과 별다른 차이를 나타내지 않았다.

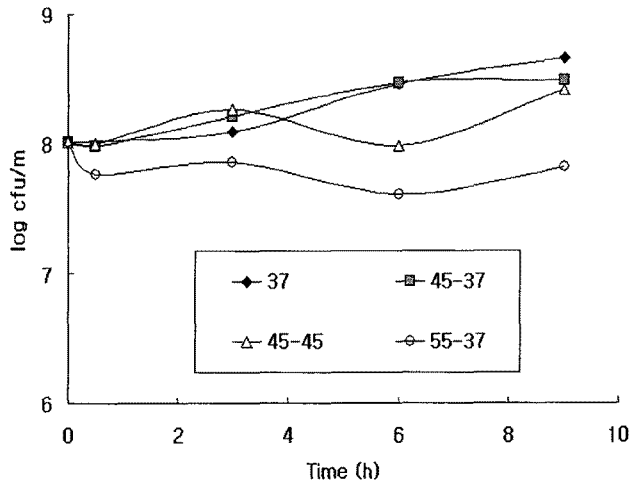


Fig. 1. Survival of *L. acidophilus* 30SC at 45°C and 55°C for 15 min after preincubation at 37°C.

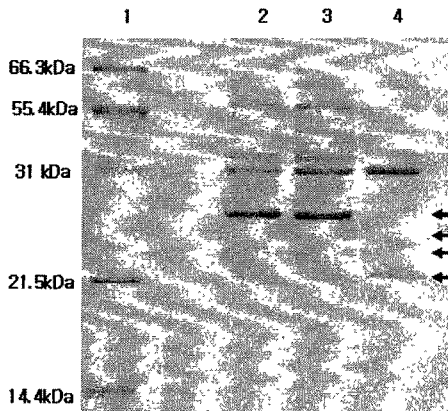


Fig. 2. CB stained gel electrophoretic patterns on SDS-PAGE of *L. acidophilus* 30SC cellular protein. Lane 1, molecular weight standard; lane 2, cultured at 37°C; lane 3, cultured at 45°C heat shock; lane 4, cultured at 55°C heat shock.

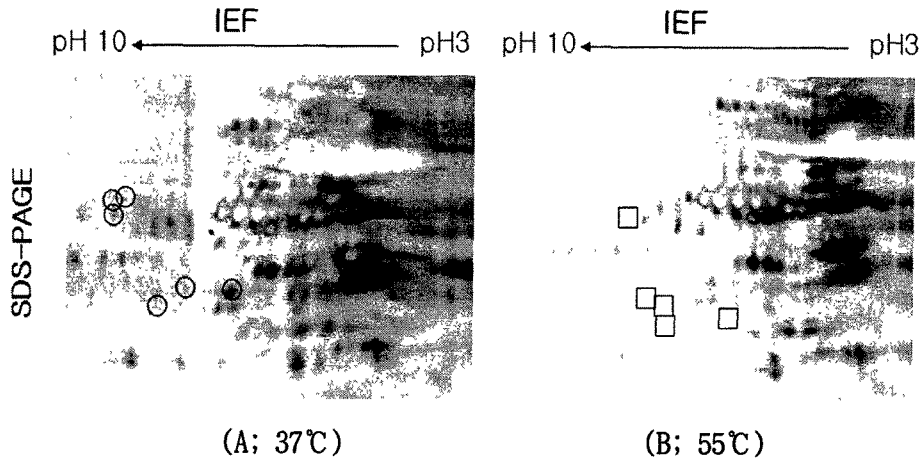


Fig. 3. Two-dimensional SDS-PAGE pattern of cellular proteins of *L. acidophilus* 30SC. A, 37°C incubation; B, 55°C for 15min heat treatment.

Fig. 2는 *L. acidophilus* 30SC의 세포질에서 추출한 단백질의 전기영동 profile을 보여주고 있다. 전체적인 band형태는 heat shock과 관계없이 유사하게 나타났다. 특히 45°C로 heat shock을 준 경우 37°C에서 배양한 것과 거의 동일하였다. 55°C에서 15분 heat shock을 준 경우 약 22kDa와 25kDa의 단백질들이 새로이 발현된 것으로 나타났으나, 24 kDa와 27kDa로 추정되는 단백질의 발현정도는 낮았음을 확인하였다.

Fig. 3은 *L. acidophilus* 30SC의 세포질 단백질에 대한 이차원 전기영동을 실시하여 새로운 단백질의 생성을 비교한 것이다. 37°C와 비교할 때 55°C로 heat shock을 준 경우 새로이 5개의 protein spot을 발견할 수 있었다. 그러나 6개의 단백질 spot은 55°C heat shock에서 소실된 것으로 확인되어 단백질의 분석이 필요한 것으로 생각되었다.

요 약

Probiotic 활성이 높은 *L. acidophilus* 30SC의 생존성을 증진시키기 위한 기초자료를 얻고자, 열처리 동안 새로이 발현되는 단백질을 일차원 및 이차원 전기영동을 이용하여 확인하였으며, 세포 모양을 주사전자현미경을 사용하여 관찰하였다. 55°C의 heat shock에는 *L. acidophilus* 30SC의 사멸이 있는 것으로 나타났다. 나머지 처리구는 37°C에서 계속 배양한 것과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 45°C로 heat shock을 준 경우 37°C에서 배양한 것과 거의 동일하였다. 55°C에서 15분 heat shock을 준 경우 약 22kDa와 25kDa의 단백질들이 새로이 발현된 것으로 나타났으나, 24 kDa와 27kDa로 추정되는 단백질의 발현정도는 낮았음을 확인하였다. 이차원 전기영동을 실시한 결과, 37°C와 비교할 때 55°C로 heat shock을 준 경우 새로이 5개의 protein spot을 발견할 수 있었다. 그러나 6개의 단백질 spot은 55°C heat shock에서 소실된 것으로 확인되어 추가적인 단백질의 분석이 필요한 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 이 논문은 2004년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. van de Guchte et al. (2002) *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 187-216.
2. 신정걸. (2003) 서울대학교 박사학위논문.
3. Fuller, R. (1989) *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
4. Fuller, R. (1992) Chapman & Hall, London.
5. Giard, J. -C. et al. (2001) *Electrophoresis* **22**, 2947-2954.
6. O'Farrell P.H. (1975). *J. Biol Chem.* **250**, 4007-4021.