

삼투압 스트레스를 받은 *Yersinia enterocolitica*의 성장에 미치는 glycine betaine을 비롯한 osmolyte의 영향

박 신*

대구대학교 자연자원대학 농화학과

초록 : 고염분으로 삼투압 스트레스를 받은 *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 세포내에 축적되는 osmolyte를 ^{13}C NMR을 통해 조사하였다. 자연계에 흔히 존재하는 가장 강력한 osmolyte로 알려진 glycine betaine의 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica* ATCC 9610 세포내 농도 (801.9 nmol/mg protein)는 삼투압 스트레스를 받지 않은 세포 (19.2 nmol/mg protein) 보다 41.8배 많이 검출되어 *Y. enterocolitica* ATCC 9610의 가장 주요한 osmolyte로 작용하였다. Proline도 284.8 nmol/mg protein의 농도로 검출되어 *Y. enterocolitica* ATCC 9610의 osmolyte로 작용하였다. Glycine betaine을 비롯한 각종 osmolyte가 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica* 세포성장에 미치는 역할을 검증하기 위해 *Y. enterocolitica*의 성장속도에 미치는 이들의 영향을 조사하였다. 2.5%의 NaCl이 첨가된 MMA 배지에 glycine betaine과 proline을 각각 첨가했을때, 1 mM glycine betaine의 경우 osmolyte를 첨가하지 않은 대조구에 비해 성장속도가 3.6배 증가하였으며 5 mM proline의 경우는 1.3배 증가하였다. Dimethylglycine도 2.5%의 NaCl을 첨가한 MMA 배지에 5 mM의 농도로 첨가하였을때 대조구에 비해 성장속도가 3.1배 증가하였는데, monomethylglycine은 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica*의 성장에 어떤 영향도 미치지 못하였다. Carnitine은 2.5%의 NaCl이 첨가된 MMA 배지에 5 mM의 농도로 첨가되었을때 대조구에 비해 2.4배 성장속도가 증가하였으며 choline은 성장에 어떤 영향도 미치지 못하였다. 이상의 결과로 glycine betaine은 *Y. enterocolitica* ATCC 9610의 가장 주요한 osmolyte로 작용하며, proline, dimethylglycine 그리고 carnitine도 *Y. enterocolitica* ATCC 9610의 osmolyte로 작용하여 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica* ATCC 9610의 성장속도를 증가시켰다(1995년 4월 10일 접수, 1995년 5월 30일 수리).

서 론

일부 세균은 세포 외부의 고삼투압으로 인한 스트레스에 잘 적응하여 건조한 표면이나 고염분용액 등의 열악한 환경조건하에서도 성장할 수 있는 능력을 발전시켜 왔다. *Salmonella oranienburg*,¹⁾ *Escherichia coli*,²⁾ *Salmonella typhimurium*,³⁾ *Listeria monocytogenes*,^{4,5)} *Pseudomonas aeruginosa*,⁶⁾ *Pseudomonas mendocina*,⁷⁾ 그리고 *Klebsiella pneumoniae*⁸⁾ 등 주로 장내세균에서 이런 특징이 보고되고 있다. 내삼투압 특성을 가진 세균은 삼투압 스트레스시 일반적으로 세포내에 osmolyte라고 불리는 삼투보호물질 (osmoprotectant)을 축적함으로써 세포내 팽압을 유지시키고 세포외부의 고삼투압으로 인해 일어날 수 있는 탈수현상을 방지하여 세포성장을 촉진시킨다.^{9,10)} 대부분의 osmolyte는 저분자량의 유기물질로서 물에 대한 용해도가 높으며, 생리상태의 pH에서 전하가 0이며, 효소에 대한 독성이 없는 조건들을 갖추고 있다.¹¹⁻¹⁴⁾ Osmolyte에는 polyols(sugars, glycerol), amino acid (proline, glutamate), amino acid 유도체 (glycine betaine, γ -aminobutyric acid), peptides, methylamines 그리고 urea 등 유기화합물과 potassium ion과 같은

무기 이온이 있다.^{11,15,16)} 최근에는 내삼투압성을 가진 세균에서 뿐만아니라 저온성 세균에서도 저온 스트레스시 세포 내부에 osmolyte가 축적됨이 밝혀져⁵⁾ 이에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다. *Y. enterocolitica*는 그람음성의 통성혐기성세균로서 인간에게 질병을 일으키는 식품미생물이다. *Y. enterocolitica*는 많은 식품으로부터 분리되었으며,¹⁷⁻¹⁹⁾ 대표적인 오염사고는 1976년 뉴욕에서 오염된 초코렛시럽으로 만든 우유를 먹고 220명의 학생이 중독된 사고가 있다.¹⁹⁾ *Y. enterocolitica*는 *L. monocytogenes*⁵⁾와 같이 0°C 정도의 저온에서도 자랄 수 있으며,²⁰⁻²²⁾ 또한 내삼투압성을 가진 장내세균으로서 식품안정성의 면에서 대형오염사고를 일으킬 수 있는 위험한 균이다. 많은 장내세균의 경우 삼투압 스트레스시 세포내 osmolyte가 축적된다고 보고된 바가 있으나 *Y. enterocolitica*의 경우 이에 대한 보고가 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 ^{13}C NMR을 이용하여 *Y. enterocolitica* 세포내에 축적되는 osmolyte를 조사하였으며, *Y. enterocolitica*의 가장 주요한 osmolyte인 glycine betaine을 비롯한 일반적으로 세균의 osmolyte로 알려진 proline, carnitine, choline 그리고 glycine betaine의 demethyl유도체인 monomethylglycine, dimethyl-

찾는말 : *Yersinia enterocolitica*, psychrotroph, osmolyte, glycine betaine, monomethylglycine, dimethylglycine, carnitine, proline, choline

*연락처

glycine 등이 고삼투압 조건에서 *Y. enterocolitica*의 성장에 미치는 영향을 조사하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 *Y. enterocolitica* ATCC 9610은 American Type Culture Collection (Rockville, Md.)으로 부터 구입하여 사용하였다. 균주의 보존은 균주를 Brain heart infusion(BHI; Difco) 고체배지에 접종하여 27°C에서 배양한 후 4°C의 냉장고에서 보관하였으며 매달 계대배양을 실시하였다.

배지

Y. enterocolitica ATCC 9610의 완전배지로는 BHI를 사용하였으며, 최소배지로는 minimal A(MA) 배지²³⁾에 thiamine 17 mg/l를 첨가한 배지 (이하 MMA로 명명)를 사용하였는데 그 조성은 K₂HPO₄ 10.5 g/l, KH₂PO₄ 4.5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/l, sodium citrate 0.5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/l, glucose 2.0 g/l 그리고 thiamine 17 mg/l이다. Glucose는 0.45 µm 여과막(Millipore)으로 제균한 후 고압살균한 배지에 첨가하였다. 실험목적에 따라 glycine betaine, monomethylglycine, dimethylglycine, carnitine, proline 그리고 choline 등을 MMA 배지에 첨가하였는데 proline이외의 화합물은 0.45 µm 여과막으로 제균한 후 첨가하였다.

종균점종

나사마개 시험관에 살균한 BHI 액체배지 2.5 ml를 넣고 *Y. enterocolitica* ATCC 9610을 1백금이 가득히 접종한 후 27°C에서 약 5시간정도 진탕배양하면 후기 대수기(late log phase)에 도달한다. 이 배양액을 MMA배지에 5% 접종하여 27°C에서 후기 대수기까지 진탕배양한 것을 종균으로 사용하였다.

성장속도측정

액체배지에서 *Y. enterocolitica*의 성장속도를 측정하기 위해 살균한 가지달린 플라스크에 실험목적에 따라 제조된 MMA나 BHI 배지 15 ml를 넣고 위에서 제조한 종균을 2% 접종한 후 27°C에서 진탕배양하였다. 배양액은 일정시간마다 녹색 (no.54) 필터를 가진 Klett-Summerson 비색계를 통해서 혼탁도를 측정하여 성장속도를 계산하였다.⁵⁾ 성장속도 실험은 3회반복 실시하였다.

¹³C NMR 측정

4%의 NaCl이 첨가된 BHI배지 1l에 상기 방법으로 제조된 종균을 5% 접종한 후 27°C에서 진탕배양하였다. 배양액이 후기 대수기에 도달하면 배양액 900 ml를 4개의 250 ml 원심분리병에 담고 6000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였으며, 분리된 세포는 7% perchloric acid로 추출하였다. ¹³C NMR 측정을 위한

시료준비는 Smith와 Smith의 방법²⁴⁾에 준하여 실시하였다. ¹³C NMR 스펙트럼은 General Electric Omega 300 spectrometer를 사용하여 75.58 MHz에서 얻어졌으며, 기타 parameter도 위에서 언급된 방법²⁴⁾과 같았다. Osmolyte의 농도는 표준물질인 50 mM alanine의 resonance intensity와 비교함으로써 결정하였다. 내부 osmolyte의 함량은 Lowry 등의 방법²⁵⁾에 의하여 측정된 단백질량으로 표준화하였다.

결과 및 고찰

온도의 영향

Y. enterocolitica ATCC 9610의 최소배지로는 MA배지²³⁾를 기초로 하였으며 *Y. enterocolitica*의 아미노산 및 thiamine 영양요구성을 조사하기 위해 MA배지에 cystine, valine, tryptophan, casamino acid, 그리고 thiamine 등을 각각 첨가하여 27°C에서 성장속도를 비교하였다. 결과를 표로 나타내지는 않았지만 17 mg/l의 thiamine을 첨가하였을 때 *Y. enterocolitica*의 성장속도가 크게 증가하였으며 아미노산의 경우 별 영향을 미치지 못하였다. 따라서 MA에 17 mg/l의 thiamine을 첨가한 MMA배지를 본 연구에서 *Y. enterocolitica* ATCC 9610의 최소배지로 사용하였다. BHI 완전배지 또는 탈지우유 등 식품에서 *Y. enterocolitica* 성장에 미치는 온도의 영향은 다수 보고되었으나^{21,26-28)} 그 최적온도가 다소 달리 보고되었으며, 또한 최소배지에서 온도의 영향에 관한 논문은 전무한 실정인 바, 본 실험을 수행하기 앞서 MMA배지에서 *Y. enterocolitica* ATCC 9610의 최적온도 및 온도의 영향을 4°C~37°C 범위에서 조사하였다. MMA배지에서 *Y. enterocolitica* ATCC 9610의 성장에 미치는 온도의 영향은 Table 1에 나타난 바와 같이 최적온도는 27°C였으며 그때 성장속도는 0.39 h⁻¹이었다. *Y. enterocolitica*는 저온성 세균으로서 4°C에서 유도기(lag time)가 140 h 이었으며 성장속도는 0.021 h⁻¹이었다. 37°C에서는 성장이 14일까지 관찰되지 않았다.

삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica* 세포내 축적되는 osmolyte

Y. enterocolitica ATCC 9610의 삼투압 스트레스에 관한 연구를 수행하기 앞서 NaCl의 적정농도 및 성장속도에

Table 1. Growth of *Y. enterocolitica* ATCC 9610 in MMA medium at different temperatures.

Temp. (°C)	Lag time (h)	Growth rate (h ⁻¹)
37	— ^a	— ^a
34	68.3 ± 8.3	0.15 ± 0.015
27	9.0 ± 0.7	0.39 ± 0.023
7	56.7 ± 5.3	0.038 ± 0.002
4	140.0 ± 14.7	0.021 ± 0.0025

^aNo growth during 14 days of incubation.

미치는 농도의 영향을 조사하였다 (Fig. 1). *Y. enterocolitica* ATCC 9610은 0~2.5% NaCl이 첨가된 MMA 배지에서 성장할 수 있었으나, 3% 이상의 NaCl이 첨가되었을 경우 7일 동안 성장이 관찰되지 않았다. 반면 BHI 배지에서는 6%의 NaCl이 첨가되었을때에도 성장을 관찰할 수 있었다. 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica* ATCC 9610 세포내 축적되는 osmolyte를 조사하기 위해 4%의 NaCl이 첨가된 BHI 배지에서 *Y. enterocolitica*를 후기 대수기까지 진탕배양한 후 원심분리하였다. 분리된 세포는 7%의 perchloric acid로 추출한 후 앞서 언급된 방법²⁴⁾으로 ¹³C NMR로 osmolyte를 검출하였다. NMR 분광법은 osmolyte의 구조와 화학반응에 관계없이 미량수준으로 축적되는 탄소원자를 가지는 어떤 osmolyte도 검출할 수 있기 때문에 특히 유용한 방법이다. 4% NaCl을 첨가한 BHI 배지에서 자란 *Y. enterocolitica* 세포추출물의 NMR 스펙트럼은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 2개의 주요한 osmolyte가 축적됨을 볼 수 있다. Glycine betaine은 *Y. enterocolitica*의 가장 중요한 osmolyte로서 170.0, 66.9, 그리고 54.2 δ (ppm)에서 고농도로 검출되었으며 proline은 176.0, 62.1, 47.0, 29.8 그리고 24.6 δ (ppm)에서 검출되었다. Osmolyte의 농도는 표준 물질인 50 mM alanine (176.7, 51.5, 17.1 δ (ppm))의 resonance intensity와 비교하여 결정되었으며, Lowry 등의 방법²⁵⁾에 의해 측정된 세포내 단백질함량에 대한 검출된 osmolyte의 양으로 표준화되었다. 4% NaCl이 첨가된 BHI 배지에서 자란 *Y. enterocolitica* 세포내 glycine betaine의 농도는 801.9 nmol/mg protein으로 그림에 나타내지는 않았지만 삼투압 스트레스를 받지 않은 BHI 배지에서 자란 *Y. enterocolitica*의 경우 glycine betaine의 농도가 19.2 nmol/mg protein 인 것에 비해 41.8배나 많이 축적되었다. Glycine betaine은 *E. coli*,²⁾ *L. monocytogenes*^{4,5)}

등에서의 주요한 osmolyte로 알려져 있으며 ¹³C NMR을 이용한 본 연구에서도 *Y. enterocolitica*의 주요 osmolyte로 확인되었다. 한편 4%의 NaCl이 첨가된 BHI배지에서 자란 *Y. enterocolitica* 세포내 proline의 축적은 284.8 nmol/mg protein인 반면, 그림으로 나타내지는 않았지만 삼투압 스트레스를 받지않은 BHI에서 자란 *Y. enterocolitica* 세포내 proline의 축적은 검출되지 않았다. 따라서 proline도 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica*의 osmolyte로 확인되었다.

삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica*의 성장에 미치는 glycine betaine과 proline의 영향

고염분으로 삼투압 스트레스를 받은 경우와 삼투압 스트레스를 받지 않은 *Y. enterocolitica* 성장속도에 미치는 glycine betaine의 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 삼투압 스트레스를 받지 않은 *Y. enterocolitica* 세포는 glycine betaine을 첨가해도 성장에 유의한 영향을 미치지 못하였다. 반면 NaCl을 2.5% 첨가한 MMA배지에서 자란 *Y. enterocolitica*의 경우 glycine betaine을 1 mM 첨가했을 때 성장속도가 0.26 h⁻¹로서 glycine betaine을 첨가하지 않았을 때의 성장속도 0.072 h⁻¹에 비해 3.6배 증가하였다. 또한 NaCl을 3.0% 첨가한 MMA 배지에 glycine betaine을 첨가하지 않았을때 7일까지 성장이 관찰되지 않았지만, glycine betaine이 0.1~10.0 mM 농도로 첨가되었을때 성장속도가 0.17~0.21 h⁻¹로 나타

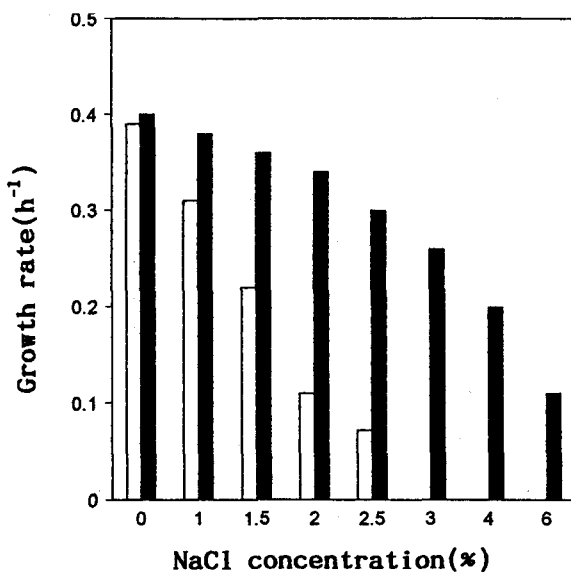


Fig. 1. Growth of *Y. enterocolitica* ATCC 9610 in MMA medium (open bar) and BHI (solid bar) in the presence of NaCl at 27°C.

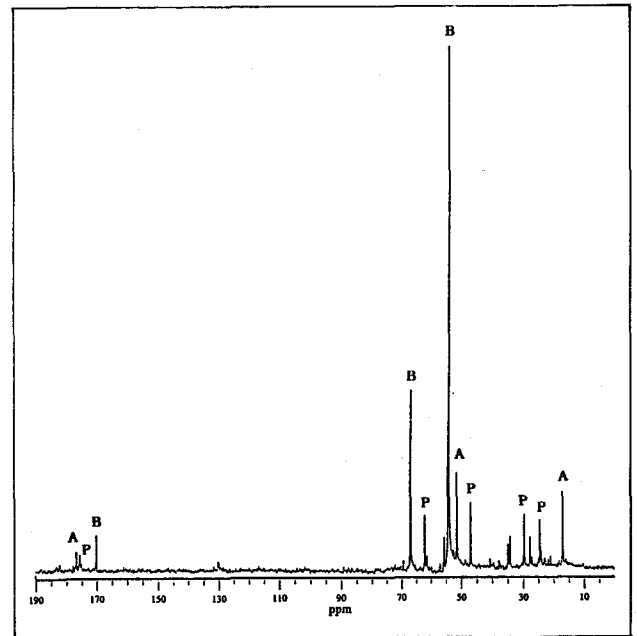


Fig. 2. Natural-abundance ¹³C NMR spectrum of the perchloric acid extract of *Y. enterocolitica* ATCC 9610 grown in BHI with NaCl (4%). Resonances at 176.7, 51.5 and 17.1 δ (ppm)(A) arise from alanine which was added as the internal concentration standard (50 mM). Resonances at 170.0, 66.9, and 54.2 δ (ppm)(B) arise from glycine betaine. Resonances at 176.0, 62.1, 47.0, 29.8 and 24.6 δ (ppm)(P) arise from proline.

나, glycine betaine은 *Y. enterocolitica*의 osmolyte로 작용하여 세포의 성장을 촉진시킨다는 것을 알 수 있다. Ko 등⁵⁾은 삼투압 스트레스를 받은 *L. monocytogenes* 세포내 glycine betaine의 축적은 생합성 작용에 기인하는 것이 아니라 배지로 부터 세포막을 통한 수송기작에 의한다고 보고하였는바, *Y. enterocolitica*도 glycine betaine이 MMA 배지내에 첨가될 경우에만 내삼투압 효과를 가지는 것으로 보아 *Y. enterocolitica* 세포내 glycine betaine의 축적이 생합성 작용이 아니라 세포막을 통한 수송 기작에 의해 이루어 진다는 것을 알 수 있다. Glycine betaine의 최적농도는 2.5%의 NaCl을 첨가한 MMA 배지에서는 1 mM이었으나, NaCl의 농도가 3.0%로 증가했을때는 그보다 더 높은 농도 (5 mM)에서 최고 성

장속도를 나타내었다. 이는 NaCl의 농도가 높을수록 세포내에 팽압을 유지시키고 탈수현상을 방지하는데 더 많은 glycine betaine을 요구한다고 생각할 수 있다. Proline이 *Y. enterocolitica*의 성장에 미치는 영향은 Table 3에 나타난 바와 같이, 2.5% NaCl로 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica*에 1 mM의 proline이 첨가되었을 경우 성장속도가 0.095 h⁻¹로서 proline이 첨가되지 않았을 경우의 성장속도 0.072 h⁻¹에 비해 약 1.3배 정도 증가하였다. Beumer 등⁴⁾은 *L. monocytogenes*와 같은 그램양성 세균의 경우 proline은 10 mM 정도의 고농도에서 내삼투압성을 가지는데 비해 그램음성 세균의 경우 1 mM 정도의 저농도에서도 내삼투압 효과를 가진다고 보고한 바, 본 연구에 사용된 *Y. enterocolitica*는 그램음성 세균으로써 Beumer 등⁴⁾이 보고한 바와 같이 1~5 mM의 저농도 에서도 내삼투압 효과를 나타내었다.

Table 2. Effect of exogenous glycine betaine on the growth rate of osmotically stressed and non-stressed *Y. enterocolitica* ATCC 9610 grown in MMA medium at 27°C.

Conc. of GB ^a (mM)	Growth rate (h ⁻¹) (mean±SD) at indicated NaCl level		
	0% NaCl	2.5% NaCl	3.0% NaCl
0	0.39±0.023	0.072±0.002	— ^b
0.1	0.40±0.011	0.22±0.020	0.17±0.020
0.5	0.39±0.014	0.25±0.015	0.19±0.017
1.0	0.39±0.028	0.26±0.012	0.20±0.006
5.0	0.39±0.012	0.24±0.012	0.21±0.015
10.0	0.38±0.007	0.24±0.017	0.20±0.012

^aGB, glycine betaine; ^bNo growth during 7 days of incubation.

Table 3. Effect of exogenous proline on the growth rate of osmotically stressed and non-stressed *Y. enterocolitica* ATCC 9610 grown in MMA medium at 27°C.

Conc. of proline (mM)	Growth rate (h ⁻¹) (mean±SD) at indicated NaCl level		
	0% NaCl	2.5% NaCl	3.0% NaCl
0	0.39±0.023	0.072±0.002	— ^a
1	0.40±0.020	0.095±0.010	0.012±0.001
2	0.41±0.014	0.092±0.015	0.014±0.001
5	0.39±0.018	0.095±0.009	0.018±0.002
10	0.38±0.018	0.095±0.010	0.017±0.002

^aNo growth during 7 days of incubation.

Table 4. Effect of exogenous dimethylglycine, monomethylglycine, carnitine and choline on the growth rate of osmotically stressed *Y. enterocolitica* ATCC 9610 grown in MMA medium with 2.5% NaCl at 27°C.

Conc. of osmolyte (mM)	Growth rate (h ⁻¹) (mean±SD) at indicated exogenous osmolyte				
	GB	DMG	MMG	Carnitine	Choline
0	0.072±0.002	0.072±0.00	0.072±0.002	0.072±0.002	0.072±0.002
1	0.26±0.012	0.20±0.015	0.073±0.010	0.12±0.008	0.071±0.004
2	0.25±0.006	0.21±0.017	0.071±0.008	0.14±0.011	0.070±0.008
5	0.24±0.012	0.22±0.020	0.074±0.011	0.17±0.020	0.069±0.005
10	0.24±0.017	0.22±0.015	0.073±0.009	0.16±0.015	0.068±0.007

^aGB, glycine betaine; DMG, dimethylglycine; MMG, monomethylglycine.

삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica*의 성장에 미치는 glycine betaine 유도체, carnitine, choline의 영향

Glycine betaine의 demethyl 유도체인 dimethylglycine과 monomethylglycine이 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica*의 성장에 어떤 영향을 미치는가를 조사하기 위해 2.5%의 NaCl이 첨가된 MMA배지에 dimethylglycine과 monomethylglycine을 0~10.0 mM 농도로 각각 첨가하여 성장속도를 비교하였다. Dimethylglycine이 5 mM의 농도로 첨가되었을 경우 *Y. enterocolitica*의 성장속도는 0.22 h⁻¹로 대조구의 성장속도 0.072 h⁻¹에 비해 3.1배 증가하였다(Table 4). 이는 dimethylglycine이 *Y. enterocolitica*의 osmolyte로 작용한다는 것을 의미하며, osmolyte로서의 역할은 glycine betaine (1 mM 첨가시 성장속도 0.26 h⁻¹)보다는 약간 떨어졌다. Monomethylglycine은 0.1~10.0 mM의 농도로 첨가되었을때 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica*의 성장에 어떤 영향도 미치지 않았는데 glycine betaine, dimethylglycine 그리고 monomethylglycine이 비슷한 구조이면서 osmolyte로서의 작용이 다소 다르다는 것은 흥미로운 일이다. 이는 생리상태의 pH에서 이들 세 화합물의 전하 차이로 인한 세포막 투과성과 세포막 투과에 관계하는 효소와의 친화성 차이로 인한 결과라고 사료된다. 일반적으로 세균

의 osmolyte로 알려진 carnitine 그리고 choline의 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica* 성장속도에 미치는 영향을 조사하였다 (Table 4). Carnitine이 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica*의 성장속도에 미치는 영향은 2.5%의 NaCl이 포함된 MMA배지에 5 mM의 carnitine이 첨가되었을 때 성장속도는 0.17 h^{-1} 로 carnitine이 첨가되지 않았을 때의 성장속도 0.072 h^{-1} 에 비해 2.4배 증가하였다. Carnitine은 Fig. 2에서 *Y. enterocolitica*의 osmolyte로 검출되지 않았다. 반면 그림으로 나타내지는 않았지만 MMA배지에 carnitine을 첨가하여 ^{13}C NMR을 통해 조사한 결과, carnitine은 506.5 nmol/mg protein 농도로 검출되었다. 이는 carnitine이 세포내의 생합성계에 의해 생성되는 것이 아니라 세포막을 통한 수송계에 의해 배지로 부터 세포내로 이동되어 내삼투압 효과를 가지는 것으로, Fig. 2에서 carnitine이 검출되지 않은 것은 BHI 배지에 carnitine이 존재하지 않거나, glycine betaine에 의해 carnitine이 억제된 것으로 판단된다. Choline의 내삼투압 효과를 실험한 결과는 Table 4에 나타난 바, choline은 삼투압 스트레스를 받은 *Y. enterocolitica*의 성장에 유의한 영향을 미치지 못하였다. 따라서 choline은 *Y. enterocolitica*의 osmolyte로 작용하지 않는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 1993년도 해외 Post-Doc. 연수지원에 이루어진 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Christian, J. H. B. (1955) The water relations of growth and respiration of *Salmonella oranienburg* at 30°C. *Aust. J. Biol. Sci.* **8**, 490-497.
- Perroud, B. and D. Le Rudulier (1985) Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.* **161**(1), 393-401.
- Csonka, L. N. (1981) Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **182**, 82-86.
- Beumer, R. R., M. C. Te Giffel, L. J. Cox, F. M. Rombouts and T. Abee (1994) Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(4), 1359-1363.
- Ko, R., L. T. Smith and G. M. Smith (1994) Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **172**, 426-431.
- D'souza-Ault, M. R., L. T. Smith and G. M. Smith (1993) Roles of N-Acetyl- glutaminyl glutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 473-478.
- Pocard, J. A., L. T. Smith, G. M. Smith and D. Le Rudulier (1994) A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB 70 to osmotic stress. *J. Microbiol.* **176**(22), 000-000.
- Le Rudulier, D., S. S. Yang and L. N. Csonka (1982) Nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* during osmotic stress: effect of exogenous proline or proline overproducing plasmid. *Biochem. Biophys. Acta.* **719**, 273-283.
- Csonka, L. N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**(1), 121-147.
- Garcia-perez, A. and M. Burg (1991) Renal medullary organic osmolytes. *Physiol. Rev.* **71**, 1081-1115.
- Csonka, L. N. and A. D. Hanson (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 569-606.
- Galinski, E. A. (1993) Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-soluble interaction, stress protection. *Experientia* **49**, 487-496.
- Reed, R. H. and W. D. P. Stewart (1985) Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from fresh water and marine habitats. *Mar. Biol.* **88**, 1-9.
- Warr, S. R. C., R. H. Reed and W. D. P. Stewart (1984) Osmotic adjustment of cyanobacteria: the effect of NaCl, KCl, sucrose and glycine betaine on glutamine synthetase activity in a marine and halotolerant strain. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2169-2175.
- Measures, J. (1975) Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria. *Nature*(London) **257**, 398-400.
- Yancey, P., M. Clark, S. Hand, R. Bowlus and G. Somero (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.
- Asplund, K., V. Tuovinen, P. Veijalainen and J. Hirn (1990) The prevalence of *Yersinia enterocolitica* 0:3 in Finnish pig and pork. *Acta Veterinaria Scandinavica.* **31**(1), 39-43.
- Aulisio, C., J. Stanfield, S. Weagant and W. Hill (1983) Yersiniosis associated with tofu consumption: serological, biochemical and pathogenic studies of *Yersinia enterocolitica* isolates. *J. Food Prot.* **46**, 226.
- Black, R. E., R. J. Jackson, T. Tsai, M. Medevesky, M. Shayegani, J. C. Geeley, K. J. E. MacLeod and A. W. Wakelee (1978) Epidermic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *New Eng. J. Med.* **298**(2), 76.
- Bercovier, H. and H. H. Mollaret (1984) In 'Bergey's Manual of Systematic Microbiology: *Yersinia*' Kreig N. R. and J. G. Holt (Eds.), Vol. 1, p.498-506, Williams and Wilkins, Baltimore and London
- Buckeridge, S. A., A. Seaman and M. Woodbine (1980) In 'Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment, Society for Applied Bacteriology Technical Series: Effects of temperature and carbohydrate on the growth and survival of *Yersinia enterocolitica*' Gould, G. W., and J. E. L. Corry (Eds.), No. 15, p. 205-214 Academic Press, London
- Heim, F., K. Fehlhaber and G. Scheibner (1984) Untersuchungen über das Verhalten von *Yersinia enterocolitica* bei unterschiedlichen Temperaturen und verschiedenen pKs-Salzkonzentrationen. *Arch. Exp. Vet. Med.* **38**, 729-734.
- Burrows, T. W., and W. A. Gillett (1966) The nutritional requirements of some *Pasteurella* species, *J. Gen. Microbiol.*

- 45, 333-345.
24. Smith, L. T. and G. M. Smith (1989) An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **171**, 4714-4717.
25. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
26. Adams, M. R., C. L. Little and M. C. Easter (1991) Modeling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 65-71.
27. Hannah, M., J. Stewart, Z. Carpenter and C. Vanderzandt (1977) Heat resistance in skim milk. *J. Food Sci.* **42**, 1134.
28. Sutherland, J. P. and A. J. Bayliss (1994) Predictive modeling of growth of *Yersinia enterocolitica*: the effect of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.* **21**, 197-215.

Effects of Glycine Betaine and Related Osmolytes on Growth of Osmotically Stressed *Yersinia enterocolitica*

Shin Park (Department of Agricultural Chemistry, Taegu University, Kyungbook, 713-714, Korea)

Abstract : Osmolytes accumulated in the osmotically stressed *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 were investigated using natural abundance ^{13}C NMR spectroscopy. Glycine betaine, one of the more common and most effective osmolytes found in nature, was the dominant osmolyte in osmotically stressed *Y. enterocolitica* cells. Glycine betaine concentration was 41.8 times higher (801.9 nmol/mg protein) in stressed cells than in unstressed cells (19.2 nmol/mg protein). Proline was the minor osmolyte, and its concentration was 284.8 nmol/mg protein. The effects of glycine betaine and related osmolytes on growth rate of osmotically stressed *Y. enterocolitica* were investigated to identify their ability as osmolytes for *Y. enterocolitica*. When glycine betaine and proline were added in MMA medium containing 2.5% NaCl, the growth rate with glycine betaine (1 mM) was 3.6 times higher than in control (no addition of osmolyte), and that with proline was 1.3 times higher. Dimethylglycine (5 mM) also increased the growth rate 3.1 folds. On the other hand, monomethylglycine had no effect on growth of osmotically stressed and unstressed *Y. enterocolitica*. When carnitine was added in MMA medium containing 2.5% NaCl, carnitine (5 mM) increased the growth rate 2.4 folds, but choline had no effect on growth of osmotically stressed *Y. enterocolitica*. The above results indicate that glycine betaine is the dominant osmolyte in osmotically stressed *Y. enterocolitica*, and proline, dimethylglycine and carnitine also act as minor osmolytes.

*Corresponding author