



## Heat Shock Stress에 의한 *Lactobacillus acidophilus* 30SC의 생리적 특성

문용일<sup>1</sup> · 한수민 · 박동준<sup>2</sup> · 지연태<sup>3</sup> · 김광현 · 오세종\*

<sup>1</sup>우석대학교 애완동물·허브자원학부 · <sup>2</sup>한국식품연구원 ·

<sup>3</sup>전남대학교 생명과학기술학부 · 전남대학교 동물자원학부 농업과학기술연구소

### Physiological Properties of *Lactobacillus acidophilus* 30SC Exposed to Heat Shock Stress

Yong-Il Moon<sup>1</sup>, Soo-Min Han, Dong-Jun Park<sup>2</sup>, Youn-Tae Chi<sup>3</sup>, Kwang-Hyun Kim, and Sejong Oh\*

<sup>1</sup>Division of Pet & Herb Science, Woosuk University

<sup>2</sup>Korea Food Research Institute

Department of Animal Science and <sup>3</sup>School of Biological Sciences & Biotechnology, Institute of Agricultural Science & Technology, Chonnam National University

#### Abstract

We examined the enhancement of thermotolerance for storage conferred on *Lactobacillus acidophilus* 30SC by adaptation to different stresses. The viable cells of *Lactobacillus acidophilus* 30SC were compared with their viability prior to heating at 45, 55°C and 60°C. Heat-adapted (45°C for 15 min) *L. acidophilus* 30SC in MRS broth exhibited higher survivability at lethal temperature of 55°C than control. Cellular protein profiles of *L. acidophilus* 30SC during heat adaptation were examined with SDS-PAGE, and scanning electron microscopy. When *L. acidophilus* 30SC was heat-adapted at 55°C for 15min, 5 new protein spots of ca 8-45 kDa size were observed on 2D SDS-PAGE. It was presumed that new proteins of *L. acidophilus* 30SC were produced to adapt to the environment of higher growth temperature.

**Key words :** *Lactobacillus acidophilus*, thermotolerance, heat-shock proteins, stress

#### 서 론

유산균(Lactic acid bacteria; LAB)은 그람양성균으로 구형 또는 막대 모양을 띠고 있으며, 탄수화물을 전환시켜 주요 최종 대사산물로 젖산을 생성하는 것이 특징이다. 최근의 연구를 종합해 보면 *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* 등의 미생물이 유산균의 범주에 속한다고 할 수 있다(Pot et al., 1994). 오래 전부터 유산균은 직접 혹은 간접적으로 식품에 이용되어 왔는데 유산균을 이용한 식품은 대사산물인 젖산에 의하여 저장성이 향상되고, 식품의 향미와 조직감이 개선되는 장점을 가

진다. 발효식품을 통하여 섭취된 유산균은 장내로 유입된 후 장내 상피세포에 착생하게 되어 병원성 미생물의 증식 저해, 면역 활성 증진, 암 발생률의 감소, 그리고 발암 원인성 효소의 생성 억제 등 숙주에 많은 도움을 준다(Fuller, 1989).

전보의 연구(Oh et al., 2000)에서 *Lactobacillus acidophilus* 30SC는 인공위액 내에서의 내산성 및 0.3%의 담즙산을 포함한 배지 내에서의 내담즙산성이 우수하고 열에 안정한 bacteriocin을 생산함으로써 병원성 미생물과 부패성 미생물의 생육을 억제시키는 능력이 있어 probiotics로써 이용 가능성이 높은 유산균으로 확인되었다.

Probiotics를 산업적으로 이용하기 위해서는 대량 생산이 요구되는데 probiotics의 생산 및 저장 중에 사멸을 최소화하는 것이 매우 중요하다. 제조과정과 보관 중에 유산균의 사멸을 최소화하기 위하여 배양방법의 조절, 미세 캡슐화, 포장 방법에 관련된 연구가 진행되었다. 그러나 probiotics의 생산, 저장, 혼합시 안정성을 지속할 수 있는 방법을 연구 개발하

\* Corresponding author : Sejong Oh, Department of Animal Science, Chonnam National University, PukGwangju, P.O. Box 205, Gwangju 500-757, Korea. Tel: +82-62-530-2116, Fax: +82-62-530-2129, E-mail: soh@chonnam.ac.kr

기 위해서는 heat shock stress에 의한 유산균의 생리적 변화를 우선적으로 규명해야 할 필요가 있다.

세균은 노출된 환경에 적응하기 위하여 유전자 발현을 조절, 세포막 성분을 변화시키는 것으로 알려지고 있다(Diez *et al.*, 1999; Gahan & Hill, 1999; Hill *et al.*, 1995). 최근에 이와 관련하여 세균들의 외부 stress에 대한 반응성에 관련된 연구가 이루어지고 있으나, 주로 병원성 미생물에 국한되고 있으며, 유산균에 대한 연구는 매우 적은 실정이다.

따라서 본 연구는 probiotics로서의 활성이 높은 *L. acidophilus* 30SC의 생존성을 증진시키기 위한 기초 자료를 얻음으로써, 이를 기능성 식품 및 의약품 등으로 이용할 수 있는 방안을 모색하기 위해 *L. acidophilus* 30SC의 heat shock stress에 의한 생존성의 변화를 조사하고 heat shock stress를 가하였을 때 새로이 발현되는 단백질(heat-shock proteins)을 1차원 및 2차원 전기영동을 이용하여 확인하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

본 연구에 사용한 *Lactobacillus acidophilus* 30SC는 고려대학교 식품과학부로부터 분양받아 사용하였다. 균주의 보존을 위해 MRS 배지(Difco, Detroit, MI)를 사용하여 37°C에서 2회 계대 배양한 후, 원심분리(3,000×g, 20 min)한 다음 cell pellet에 skim milk(10%), lactose(2%), yeast extract(0.3%)가 함유된 배지를 제조하여 혼합하였다. 이것을 vial에 1 mL씩 분주하여 동결건조하고 -80°C의 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

*L. acidophilus* 30SC에 대한 Heat Shock Stress 조건 대수증식기의 *L. acidophilus* 30SC의 세포를 원심분리(3,000×g, 20 min, 4°C)를 통해 회수하여 멸균된 생리적 식염수로 2회 세척하고 약 10<sup>8</sup> CFU/mL의 농도로 MRS 배지에 접종한 다음, 45 및 55°C의 항온수조에서 각각 15분간 heat shock stress를 가하였다. Heat shock stress의 영향은 MRS 배지를 이용하여 생존수를 평가하여 비교하였다.

### Heat Shock Stress에 의한 고온 내성 증진 효과

고온 배양시 생존율의 증진 효과를 조사하기 위하여 상기 조건으로 heat shock stress를 가한 *L. acidophilus* 30SC 세포를 37°C에서 6시간 동안 배양한 다음 배양온도를 55°C와 60°C로 높인 후 생존율을 비교하였다. 37°C에서 배양한 것을 대조군으로 하여 다음과 같이 생존율(%)을 계산하여 고온에 대한 내성을 평가하였다.

$$\text{Survival rate(\%)} = \frac{\text{Log No. of viable cells after heat treatment}}{\text{Log No. of initial viable cells}}$$

### Heat Shock Stress에 의한 저온내성 증진효과

동일한 방법으로 heat shock stress를 가한 후 *L. acidophilus* 30SC 배양액 100 μL를 9.9 mL의 생리식염수에 접종하여 -20°C에서 24시간 냉동 후 37°C에서 10분간 해동하여 생존수를 측정하였으며, 생존율(%)을 아래와 같이 계산하여 저온에 대한 내성을 평가하였다.

$$\text{Survival rate(\%)} = \frac{\text{Log No. of viable cells after freezing-thawing}}{\text{Log No. of initial viable cells}}$$

### 세포질 단백질의 추출

*L. acidophilus* 30SC의 세포질 단백질은 Shin(2003)과 Giard 등(2001)의 방법을 변형하여 다음과 같이 추출하였다. 상기 조건으로 heat shock stress를 가한 후 *L. acidophilus* 30SC 배양액을 원심분리(6000×g, 15 min, 4°C)하여 세포를 회수하여 멸균된 생리식염수로 2회 세척하였다. 여기에 lysozyme이 함유된 100 mM tris buffer를 첨가하고 glass beads(10<sup>6</sup> microns acid washed, Sigma)를 넣은 후에 교반하여 세포벽을 파괴하였다. 여기에 4배 부피의 cold acetone을 첨가하여 20분간 4°C에서 정지시킨 후 원심분리(8000×g, 20 min, 4°C)하여 침전된 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질에 8 M urea를 첨가하여 -80°C에 보관하면서 전기영동을 위한 시료로 사용하였다.

### SDS-PAGE

전기영동은 상기 방법으로 추출된 *L. acidophilus* 30SC의 세포질 단백질 성분을 tricine이 첨가된 8~16% gradient gel을 제조하여 125 V(constant), 80 mA의 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.

### 2차원 전기영동(Two-Dimensional Electrophoresis)

2차원 전기영동은 O'Farrell(1975)의 방법을 활용하여 실시하였다. 등전점 전기영동(isoelectric focusing electrophoresis)을 위한 gel은 pH 범위가 3~10인 immobilized pH gradient gel(IPG) strip(7 cm, Bio-Rad Co. USA)을 사용하여 0.2%의 ampholyte(Bio-Rad Co. USA)가 함유된 rehydration buffer(8 M urea, 0.5% CHAPS, 10 mM DTT) 85 μL와 시료 40 μL를 혼합하여 실온에서 16시간 방치시켰다. 그 후 전압을

3000 V까지 조정하면서 10000 VH(volt hours)에 이를 때까지 등전점 전기영동을 수행하였다. 반응이 끝난 strip을 14% gel에 올려 1% agarose solution으로 굳힌 다음 200 V constant의 조건에서 1시간 영동을 실시하였다. 전기영동 후 gel은 silver 염색을 수행하여 spot을 확인하였다.

주사전자현미경(Scanning Electron Microscope)을 이용한 세포 형태 관찰

주사전자현미경 표본 제조는 다음과 같이 수행하였다. 회수된 균체를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.3)에 희석한 2.5% glutaraldehyde 용액으로 4℃에서 2시간 동안 고정하였다. 동일 완충액으로 완충된 1% osmium tetroxide 용액으로 2시간 동안 후고정(postfixation)하였다. 고정된 세포는 50, 60, 70, 80, 90, 95, 그리고 100%의 에탄올로 각각 15분씩 3회 세척하여 탈수시킨 다음 hexamethyldisilazane으로 15분씩 2회 치환하여 대기 중에서 건조시켰다. 건조된 표본은 이온 도금 장치를 사용하여 20 nm 두께의 금도금을 실시한 후 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM, Hitachi S-450, Japan)으로 15 kV의 가속 전압 하에서 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

Heat Shock Stress에 따른 *L. acidophilus* 30SC의 생존수 변화

Fig. 1은 37℃에서 배양하여 대수증식기의 *L. acidophilus* 30SC 세포를 회수한 다음 45와 55℃에서 15분씩 heat shock stress를 가한 후 37℃에서 배양하였을 때 생존수의 변화를 나타낸 것이다. 55℃로 15분간 heat shock stress를 가한 경우

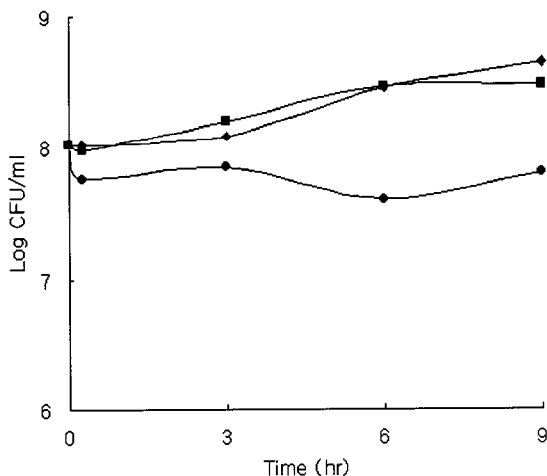


Fig. 1. Survival of heat-shocked and non heat-shocked *L. acidophilus* 30SC in MRS medium at 37°C incubation. -◆-, non heat-shocked; -■-, 45°C for 15 min heat-shocked; -●-, 55°C for 15 min heat-shocked.

*L. acidophilus* 30SC는 다소 사멸하는 것으로 나타났으나, 초기 균수를 계속 유지하는 것으로 나타났다. 45℃로 15분간 Heat shock stress를 가한 경우, 37℃에서 계속 배양한 것과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 일반적으로 *L. acidophilus*의 최적 배양온도는 35~40℃ 부근이지만, 45℃에서도 사멸없이 생장이 가능하기 때문에 본 실험에서도 45℃에서 사멸이 나타나지 않았기 때문인 것으로 생각되었다(Gomes and Malcata, 1999).

### 고온 배양에서의 변화

생균수 측정시와 같은 방법으로 heat shock stress를 가하고 6시간 동안 37℃에서 배양한 후 추가로 55℃에서 20분 동안, 60℃에서 8분 동안 heat shock을 가하기 전, 후의 시료를 채취하여 생존율을 측정하였다. 20분간 55℃의 heat shock을 가한 결과 45℃ 처리구의 생존율이 53.7%로 가장 높았고 37℃에서 계속 배양한 대조구는 23.0%, 55℃ 처리구는 11.0%를 나타냈다(Fig. 2). 같은 조건에서 8분간 60℃의 heat shock을 가했을 때 55℃ 처리구의 생존율은 heat shock 2분 후까지는 가장 높았으나 이후 급격히 감소하여, heat shock 4분 후부터는 대조구와 처리구의 생존율이 서로 비슷한 수치로 근접하는 양상을 나타냈다(Fig. 3).

Kim 등(2003)은 *Lactobacillus fermentum* KLB12를 열 전처리(52℃, 15 min)하여 열 stress(60℃, 20 min)에 노출시킨 결과 열 전처리한 것이 하지 않은 것보다 대수기와 정지기 모두에서 약 10~100배 정도 높은 생존율을 보여 열 전처리 과정이 생존수를 증진시킨다고 보고하였다. Boutibonnes 등(1995)은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403에 대한 42℃ 전처리가 치사 수준인 52℃에서의 15분 혹은 30분 동안의 열

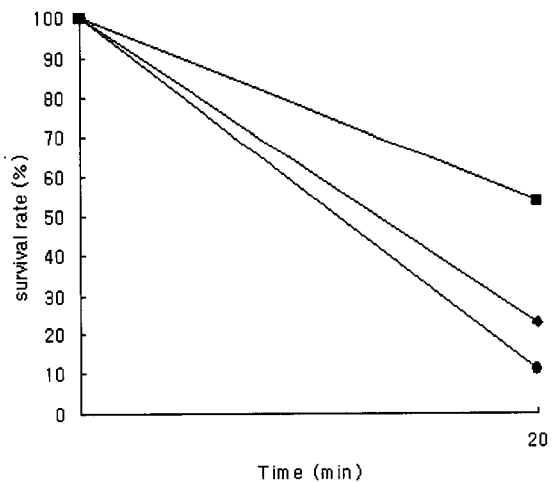


Fig. 2. Survival of heat-shocked and non heat-shocked *L. acidophilus* 30SC in MRS medium at 55°C. -◆-, non heat-shocked; -■-, 45°C for 15 min heat-shocked; -●-, 55°C for 15 min heat-shocked.

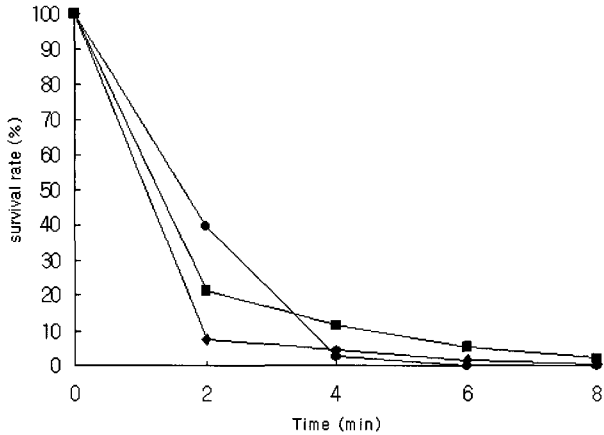


Fig. 3. Survival rate of heat-shocked and non heat-shocked of *L. acidophilus* 30SC in MRS medium at 60°C.

◆-, non heat-shocked; ■-, 45°C for 15 min heat-shocked; ●-, 55°C for 15 min heat-shocked.

처리에 대한 생존력을 증진시킨다고 하였다. 또한 Kim 등 (2001b)은 37°C에서 배양한 후 치사 수준의 고온(60°C)에 1시간 동안 노출된 *Lactobacillus acidophilus* LA1-1과 비치사 수준의 고온(53°C)에 30분간 노출된 후 치사 수준의 고온(60°C)에 1시간 동안 노출된 *Lactobacillus acidophilus* LA1-1의 생존율은 각각 0.003%와 0.5%를 나타냈다고 보고한 바 있다.

부적절한 생육 환경에 직면했을 때 세균에 의해 발현되는 생존 기작들을 일반적으로 stress response라 한다(Kim *et al.*, 2001b). 이와 같은 생존 기작 중 하나는 세포가 적당한 수준의 stress에 노출될 때, 추후 증가된 stress의 수준에 대해 저항성의 증진을 획득하도록 하는 적응 반응(adaptative response)이다(Csonka and Hanson, 1991; Demple, 1991; Foster and Hall, 1991). 이러한 stress 반응의 방식은 정상적으로는 치사 수준인 stress에 대해 세균이 생존할 수 있도록 한다(Kim *et al.*, 2001b).

### Heat Shock Stress에 의한 저온 내성 증진 효과

동일한 방법으로 heat shock stress를 가한 직후와 -20°C로 24시간 동안 동결 처리하여 해동한 직후의 생균수를 측정하여 생존율을 비교한 결과 heat shock을 가하지 않은 대조군의 생존율이 55.8%로 가장 높았고, 45°C 처리구는 29.5%, 55°C 처리구는 0.7%로 각각 나타났다(Fig. 4). 이는 Heat shock stress가 동결 수준의 저온 처리에 대해서는 내성의 증진을 유도하지 못한 결과로 사료된다. 따라서 *L. acidophilus* 30SC의 heat shock stress에 의한 저온 내성 증진 효과를 확인하기 위해서는 저온 처리 온도와 노출 시간을 조정하여 추가적인 실험을 수행해야 할 것으로 판단되었다.

Kim 등(2001a)은 *Lactobacillus crispatus* KLB46을 10°C에서 4시간 전처리하여 42°C의 열 stress를 60분 동안 가한 후

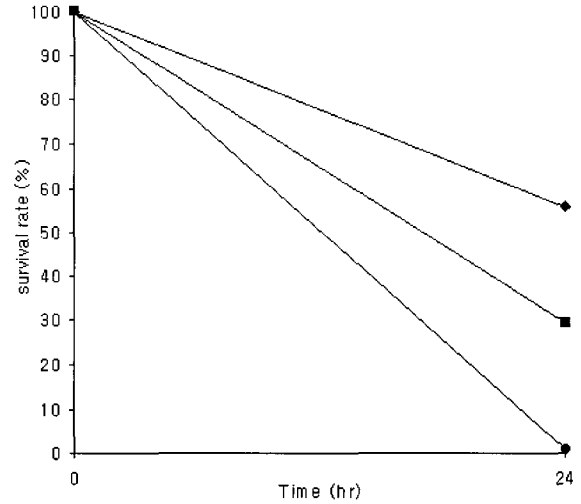


Fig. 4. Survival of heat-shocked and non-shocked of *L. acidophilus* 30SC in MRS medium at -20°C.

◆-, non heat-shocked; ■-, 45°C for 15 min heat-shocked; ●-, 55°C for 15 min heat-shocked.

생균수를 측정된 결과, 40분이 지난 후에 전처리한 것이 하지 않은 것에 비해 약 10배의 높은 생균력을 유지했다고 보고한 바 있다. 또한 Kim 등(2003)은 *L. fermentum* KLB12를 저온(4°C)에서 15분 동안 전처리하여 60°C에서 80분 동안 열 stress에 노출시킨 결과, 전처리하지 않은 것에 비해 1,000배 정도 높은 생균력을 나타냈다고 하였다. 이를 통해 유산균에 대한 저온 처리가 고온 stress에 대한 저항성의 증진에 영향을 미치는 것으로 추정할 수 있다.

### Tricine-SDS-PAGE 및 2차원 전기영동

Fig. 5는 *L. acidophilus* 30SC의 세포질에서 추출한 단백질

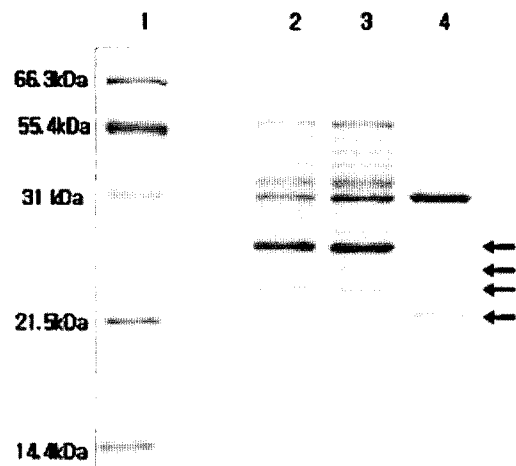


Fig. 5. Electrophoretic patterns on SDS-PAGE of *L. acidophilus* 30SC cellular protein.

Lane 1, molecular weight standard; lane 2, cultured at 7°C; lane 3, cultured at 45°C heat-shock for 15 min; lane 4, cultured at 55°C heat-shock for 15 min.

의 전기영동 profile을 보여주고 있다. 전체적인 band 형태는 heat shock stress와 관계없이 유사하게 나타났다. 특히 45°C로 15분 동안 heat shock stress를 준 경우 37°C에서 배양한 것과 거의 동일하였다. 55°C에서 15분간 heat shock stress를 준 경우 약 22와 25 kDa의 단백질들이 새로이 발현된 것으로 나타났으나, 24 와 27 kDa로 추정되는 단백질의 발현 정도는 낮았음을 확인하였다.

*L. acidophilus* 30SC의 세포질 단백질에 대한 2차원 전기영동을 실시하여 새로운 단백질의 생성과 기존의 단백질의 소실을 비교한 결과는 Fig. 6과 같다. 37°C와 비교할 때 55°C로 heat shock stress를 준 경우 5개의 새로운 protein spot을 발견할 수 있었다. 그러나 6개의 단백질 spot은 55°C의 heat shock stress에 노출되었을 때 소실된 것으로 확인되어 단백질의 분석이 필요한 것으로 생각되었다.

Stress 노출시 유도되는 단백질이 변성된 단백질의 분해나 재접힘 상태를 촉진시키는 chaperone 역할을 함으로써 세포의 손상을 복구시키거나 성장 활성을 유지시키는 역할을 한

다는 것이 보고되어 있다(Konkel *et al.*, 1998; Movahedi and Waites, 2000; Otani *et al.*, 2001; Pagan *et al.*, 1997). Kim 등 (2001b)은 stress에 대한 적응 반응으로, 새로운 단백질이 발현되거나 기존의 단백질이 높은 수준으로 발현되며 stress에 의해 발현된 단백질은 변성된 단백질이 세포에 손상을 주기 전에 단백질의 변성을 방지하고 변성된 단백질의 올바른 재접힘을 유도하거나 변성된 단백질을 제거한다고 보고한 바 있다.

#### 세포 형태 관찰

주사전자현미경을 이용하여 *L. acidophilus* 30SC의 세포 형태를 관찰한 결과(Fig. 7), heat shock stress를 가했을 때 이에 대한 반응으로 세포의 길이가 상대적으로 길어졌음을 확인했다(Table 1).

Shin(2003)은 *L. casei* LDTM90의 최적 생장온도(37°C)에서 성장정체기(25시간)에 있는 세포 형태는 비교적 길이가 짧은 간상 형태로 관찰되었으나, 최적 생장 온도에서 성장정

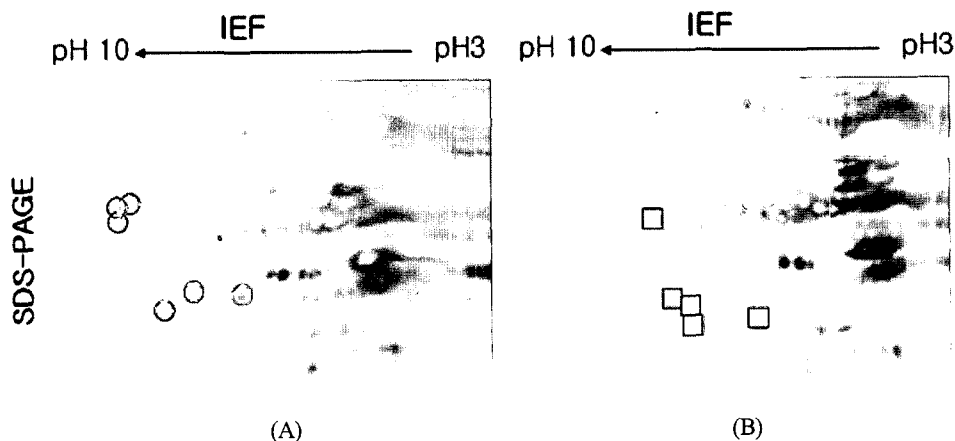


Fig. 6. Two-dimensional SDS-PAGE pattern of cellular proteins of *L. acidophilus* 30SC. (A), cultured at 37°C; (B), cultured at 55°C heat-shock for 15 min.

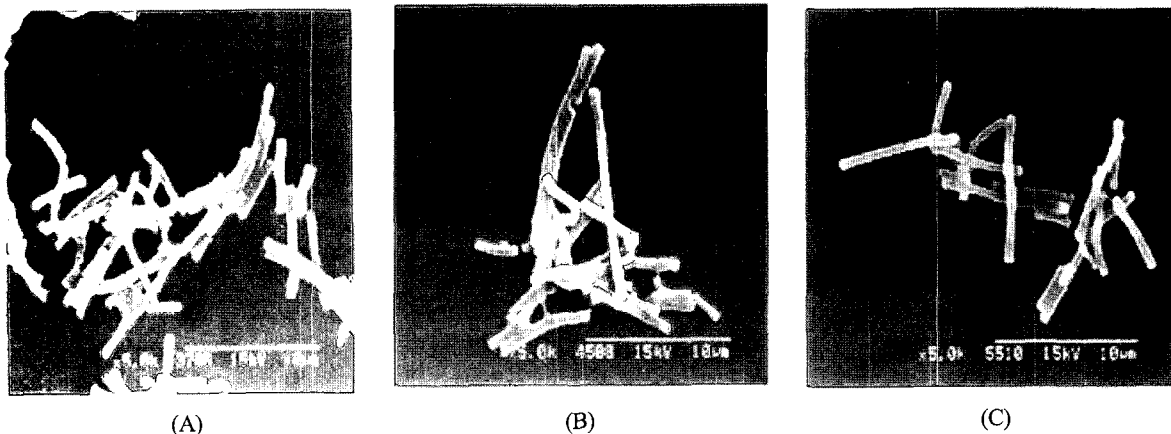


Fig. 7. Scanning electron micrographs of cells of *L. acidophilus* 30SC.

(A), cultured at 37°C; (B), cultured at 45°C heat-shock for 15 min; (C), cultured at 55°C heat-shock for 15 min.

**Table 1. Cell size of heat-shocked and non heat-shocked *L. acidophilus* 30SC** (Unit:  $\mu\text{m}$ )

Treatment condition	Cell size
37°C incubation	4.44±1.81
45°C for 15 min heat-shocked	4.72±1.18
55°C for 15 min heat-shocked	5.68±2.67

체기까지 배양 후 25와 20°C로 낮추어 5시간과 20시간 추가 배양한 경우에는 다소 긴 rod 형태를 나타낸다고 보고하였다. Fernández Murga 등(2000)도 *L. acidophilus* CRL640 세포의 형태가 배양온도 저하에 의하여 짧은 간균의 형태(30-40°C)에서 길고 curled filaments 형태(25°C)로 바뀐다고 보고함으로써 생장온도의 변화가 유산균의 세포 형태와 길이에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

## 요 약

Probiotics로서의 활성이 높은 *Lactobacillus acidophilus* 30SC의 생존성을 증진시키기 위한 기초 자료를 얻고자, heat shock stress를 가한 후 생존수를 측정하고, 생존율의 변화를 통해 고온 처리에 의한 고온 및 냉동 내성의 증진 효과를 평가하였다. 또한 열처리 동안 새로이 발현되는 단백질을 1차원 및 2차원 전기영동을 이용하여 확인하였으며, 주사전자현미경을 사용하여 세포 모양을 관찰하였다. *L. acidophilus* 30SC는 55°C의 heat shock stress를 받았을 때 생존 균수가 감소하는 것으로 나타났다. 나머지 처리구는 37°C에서 계속 배양한 것과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 특히 45°C로 heat shock stress를 준 경우 37°C에서 배양한 것과 거의 동일하였다. *L. acidophilus* 30SC에 45°C로 heat shock stress를 가한 뒤 추가로 55 및 60°C에 노출시켰을 때 가장 높은 생존율을 나타냈고, 치사 수준인 55°C의 heat shock stress를 받은 후 55°C 및 60°C에 노출되었을 때 생존율이 급격히 감소하는 경향을 보였다. *L. acidophilus* 30SC에 55°C로 15분간 Heat shock stress를 준 경우 약 22와 25 kDa의 단백질들이 새로이 발현된 것으로 나타났으나, 24와 27 kDa로 추정되는 단백질의 발현 정도는 낮았음을 확인하였다. 2차원 전기영동을 실시한 결과, 37°C에서 배양한 대조구와 비교할 때 55°C로 heat shock stress를 준 경우 새로이 5개의 protein spot을 발견할 수 있었다. 주사전자현미경으로 세포의 형태를 관찰한 결과 heat shock stress를 준 경우에는 세포의 길이가 신장되는 경향을 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 2004년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의해

수행되었으며, *Lactobacillus acidophilus* 30SC 균주분양을 해주신 고려대학교 김세현 교수님과 Oklahoma State University의 Stanley Gilliland 교수님께 감사드립니다.

## 참고문헌

- Boutibonnes, P., Bisson, V., Thammavongs, B., Hartke, A., Panoff, J. M., Benachour, A., and Auffray, Y. (1995) Induction of thermotolerance by chemical agents in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Int. J. Food Microbiol.* **25**, 83-94.
- Csonka, L. N. and Hanson, A. D. (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**, 569-606.
- Demple, B. (1991) Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Ann. Rev. Gen.* **25**, 315-337.
- Diez-Gonzalez, F. and Russel, J. B. (1999) Factors affecting the extreme acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *F. Microbiol.* **16**, 367-374.
- Fernández Murga, M. L., Cabrera, G. M., de Valdez, G. F., Disalvo, A., and Seldes, A. M. (2000) Influence of growth temperature on cyrotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 342-348.
- Foster, J. W. and Hall, H. K. (1991) Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**, 5129-5135.
- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
- Gahan, C. G. M. and Hill, C. (1999) The relationship between acid and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **50**, 93-100.
- Giard, J. C., Laplace, J. M., Rincé, A., Pichereau, V., Benachour, A., Leboeuf, C., Flahaut, S., Auffray, Y., and Hartke, A. (2001) The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis* **22**, 2947-2954.
- Gomes, A. M. P. and Malcata, F. X. (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 139-157.
- Hill, C., O'Driscoll, B., and Booth, I. (1995) Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *Int. J. Food*

- Microbiol.* **28**, 245-254.
12. Kim, J. H., Lee, S. Y., Chang, C. E., Kim, S. C., Yun, H. S., and So, J. S. (2001a) Effect of cold adaptation on the improved viability of *Lactobacillus crispatus* KLB46. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 626-631.
  13. Kim, J. H., Park, M. Y., Kim, S. C., Yun, H. S., and So, J. S. (2003) Improved viability and proteome analysis of *Lactobacillus fermentum* KLB12 upon heat stress. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 294-300.
  14. Kim, W. S., Perl, L., Park, J. H., Tandianus, J. E., and Dunn, N. W. (2001b) Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Curr. Microbiol.* **43**, 346-350.
  15. Konkel, M. E., Kim, B. J., Klena, J. D., Young, C. R., and Ziprin, R. (1998) Characterization of thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **66**, 3666-3672.
  16. Movahedi, S. and Waites, W. (2000) A two-dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of *Bacillus subtilis* cells during sporulation. *J. Bacteriol.* **182**, 4758-4763.
  17. O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
  18. Oh, S., Kim, S. H., and Worobo, R. W. (2000) Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.* **83**, 2747-2752.
  19. Otani, M., Tabata, J., Ueki, T., Sano, K., and Inouye, S. (2001) Heat-shock-induced proteins from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **183**, 6282-6287.
  20. Pagan, R., Condon, S., and Sala, F. J. (1997) Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria Monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3225-3232.
  21. Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., and Schleifer, K. H. (1994) Taxonomy of lactic acid bacteria. In: Bacteriocins of lactic acid bacteria. De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. (eds.), Chapman and Hall, London. pp.13-90.
  22. Shin, J. G. (2003) Physiological properties of lactic acid bacteria exposed to lower-growth temperature. Ph. D. thesis, Seoul National Univ., Seoul, Korea.

---

(2005. 7. 7. 접수 ; 2005. 8. 25. 채택)