Lactobacillus crispatus KLB46의 스트레스 전처리시 열 내성 증진효과

곽대영, 강창호, 전한을, 소재성*

Improved Cell Viability of *Lactobacillus crispatus* KLB46 by Stress Adaptation

Dae-Yung Kwak, Chang-Ho Kang, HanEul Jeon, and Jae-Seong So*

접수: 2014년 2월 10일 / 게재승인: 2014년 3월 21일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Lactobacilli, the dominant species of microorganisms in the vaginal flora of healthy women, play important roles to prevent bacterial vaginosis and other sexually transmitted diseases. In this study, we carried out studies on stress adaptation prior to various stress treatment. We found that heat or salt adapted KLB46 showed higher cell viability than non adapted upon heat stress at 60°C for 20 min. When chloramphenicol was added during the adaptation process, heat tolerance was abolished. This result suggested that *de novo* protein synthesis was essential during adaptation.

Keywords: *Lactobacillus crispatus* KLB46, adaptation, stress response, cell viability

1. INTRODUCTION

Lactobacilli는 여성의 질 내에서 병원균의 생장을 억제하는 물질을 생성하여 기회성 감염을 막는 역할을 한다. 그러나 기회성 감염 등에 의하여 세균성 질염이 발병하면 질내 우점균총에서 *Lactobacillus* spp.가 감소하고 혐기성 세균인 *Gardnerella vaginalis*가 증가하여 질 내의 pH가 상승하며 분비물이 심한 악취를 띤다. 세균성 질염은 성접촉에 의한 질병과 HIV에 대한 감염 위험을 높이며 현재에는 치료하기 위하여

항생제 치료를 주로 사용하고 있으나, 정상 세균총인 *Lactobacillus* spp. 까지 제거되어 치료 기간이 길고 재발의 가능성이 높으며 임신중의 여성의 경우 저출생 체중아의 조기분만을 유발한다 [1]. 이러한 치료방법을 대체하기 위한 방법으로 프로바이오틱스를 이용한 정상 세균총을 복구시키는 방법이 요구되었고, 이를 위하여 질 내 우점균인 *Lactobacillus* spp.를 제재화하기 위한 다양한 연구가 필요하다 [2].

균주의 제재화 방법으로는 동결건조와 분무건조가 많이 이용되어 왔다. 분무 건조는 동결 건조에 비해 공정의 시간이 짧고 적은 비용으로 대량생산이 가능하며, 운송 및 보관이 용이하다 [3,4]. 그러나 분무 건조는 제재화 과정에서 세포가 열에 노출되어 생존수와 기능성이 감소하며 세포의 해리가 발생하며, 적용 가능 균주에 대하여 종 특이적(strain-dependent) 성향을 보인다 [4,5]. 분무건조 과정에서의 세포 손실을 줄이기 위하여 다양한 연구가 진행되어 왔으며 열 전처리를 통한 고온 충격 단백질의 일시적 발현이 고온에 대한 내성을 증진시켜주는 것으로 알려져 있다 [6]. 열 전처리에 의한 고온 내성 증진은 *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*과 같이 다양한 유산균에서 그 효과가 확인되었다 [5,7]. 이러한 전처리 효과는 스트레스 조건에서 발현된 방어기작이 다른 스트레스에 대한 내성에 영향을 미치는 cross protection 효과의 가능성을 보여주며, 고온뿐만 아니라 다른 환경스트레스에 전처리 한 경우에서도 내성의 변화를 보이는지 확인할 필요가 있다. 본 연구에서는 *Lactobacillus crispatus* KLB46을 고온 전처리하여 고온, 산, 염, 과산화수소, 에탄올 등의 다양한 환경스트레스에 대한 내성의 변화를 확인하였고, 산, 염, 과산화수소, 에탄올 등에 전처리하여 상동 스트레스에 내성 증진을 보이는지 확인하고 내성 증진을 보이는 전처리가 고

인하대학교 생물공학과
Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel: +82-32-860-8666, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: sjaseon@inha.ac.kr

온에 대한 내성 증진에 영향을 주는지 확인하였다. 또한 전처리 과정에서 chloramphenicol를 처리하여 전처리시 *de novo* protein synthesis 여부를 확인하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 균주 및 배지

본 연구에 이용한 균주는 건강한 한국 여성의 질에서 분리한 *Lactobacillus* spp. 중 항균 활성이 높은 *L. crispatus* KLB46을 선택하여 실험을 수행하였다 [8]. 배지는 Lactobacilli MRS media (Difco, MI, USA)를 사용하여 37°C에서 혐기 조건으로 24시간 배양한 균주를 동일 조건에서 8시간 계대배양하여 (7.6×10^8 - 1.4×10^9 CFU/mL) 실험에 사용하였다. 균주의 보존을 위하여 균 배양액에 glycerol이 25% (v/v)가 되도록 조성하여 -70°C에서 보관하였다.

2.2. D value와 T value 측정

37°C에서 8시간 동안 배양한 균주를 원심분리 (5204×g, 5 min)하여 세포를 수거한 후, 0.01 M PBS에 2회 세척한 후 MRS에 재현탁하였다. 재현탁한 균주를 water bath를 사용하여 60°C에 노출시켜 D value (decimal reduction time)와 T value (thermal death time)를 측정하여 열 스트레스 시간을 결정하였다.

2.3. 열 전처리 조건

MRS에 재현탁한 균주를 하나는 37°C에서 계속 배양하고, 다른 하나는 water bath를 사용하여 15분간 열 전처리하여 여러 가지 스트레스 실험에 적용하였다. 전처리 온도를 결정하기 위하여 42°C, 47°C와 52°C에서 전처리한 세포에 열 스트레스 실험을 수행하여 가장 높은 생존수를 보이는 전처리 온도를 환경스트레스 실험에 적용하였다. 스트레스에 노출된 시간마다 생존수를 측정하였다.

2.4. 염 전처리 조건

MSR의 염 농도를 각각 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 M로 조정된 뒤 배양한 균주를 원심분리 (5204×g, 5 min)하여 세포를 수거한 후, 0.01 M PBS에 2회 세척한 후 각각의 MRS배지에 재현탁하고 15분간 전처리 하였다. 전처리 후 다시 세포를 수거하여 MRS 배지에 재현탁한 후 스트레스 실험에 적용하였다. 스트레스에 노출된 시간마다 생존수를 측정하였다.

2.5. 열 스트레스 실험

균주를 전처리한 것, chloramphenicol (25 µg/mL)을 포함하여 전처리한 것과 전처리하지 않은 것으로 나누어 스트레스 실험을 진행하였다. 열 스트레스는 water bath를 사용하여 60°C에서 20분 동안 수행하였으며 5분 간격으로 생존수를 측정하여 초기 colony 수를 기준으로 % survival (N/N_0)로 나타내었다.

2.6. 환경 스트레스 실험

균주를 전처리한 것과 전처리하지 않은 것으로 나누어 각각의 스트레스 조건에 두 종류의 균주를 10% 접종하여 37°C에서 4시간 동안 배양하여 1시간 간격으로 생존수를 측정하였다. 삼투압 스트레스 반응을 측정하기 위하여 NaCl을 MRS 배지에 5% (w/v), 10% (w/v)와 20% (w/v) 첨가하여 사용하였으며, 산화적 스트레스 반응을 측정하기 위하여 H_2O_2 를 MRS 배지에 50, 100 ppm(v/v) 첨가하여 사용하였다. 에탄올은 5% (v/v), 10% (v/v) 첨가하여 사용하였다. 산 스트레스는 MRS 배지의 pH를 acetic acid를 사용하여 3.5, 3.7, 3.9로 조정하여 사용하였다. 각각의 실험은 스트레스 처리하지 않은 MRS 배지에 배양한 균주를 대조군으로 % survival (N/N_0)로 나타내었다.

2.7. Cross protection 실험

열을 제외한 다른 전처리 조건이 열 스트레스에 주는 영향을 확인하기 위하여 상동 스트레스 조건에서 내성의 증가를 보이는 전처리 조건을 선별하는 실험을 진행하였다. 염, 과산화수소와 에탄올 전처리 실험을 위하여 8시간 동안 배양한 균주를 사용하였으며 각각 0.3 M NaCl, 10 ppm H_2O_2 과 3% EtOH를 포함한 MRS 배지에서 15분간 전처리 하였다. 산 전처리 실험에는 균주 배양시 pH 변화를 고려하여 4시간 동안 배양한 균주를 사용하였으며, acetic acid를 사용하여 pH 5.0으로 적정한 MRS 배지에서 1시간 동안 전처리하였다. 실험 결과에서 내성의 증가를 보이는 조건을 선별하여 열 스트레스 실험에 적용하였다.

2.8. SEM 분석

고온의 스트레스에 노출되었을 때 열 전처리가 세포의 형태에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 SEM 촬영을 수행하였다. 열 전처리한 균주와 전처리하지 않은 균주를 고온 스트레스 조건인 60°C에 20분간 노출시킨 후 1% glutaraldehyde (Junsei, Japan) 용액에 4°C에서 24시간 동안 고정화시킨 후 에탄올로 탈수하여 시료를 준비하였다. Field Emission SEM (Hitach S-4300, Japan)을 이용하여 균주의 형태 변화를 관찰하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 열 스트레스와 열 전처리 온도 조건과 세포 형태의 변화

열 스트레스 조건과 열 전처리 조건을 결정하기 위하여 D/T value 측정과 다양한 온도에서 전처리를 한 후 열 스트레스를 가하는 실험을 수행하였다. 60°C와 65°C에서 열 스트레스 실험을 진행하였으며 60°C의 D value 와 T value는 각각 5분과 20분, 65°C에서는 각각 3분과 12분이었다. 실험을 진행하기 위한 열 스트레스 최적 온도를 60°C로 결정하고 42, 47, 52°C에서 15분 동안 각각 전처리한 균주를 60°C에 20분간 노출시

켜 전처리 효과를 확인하였으며 52°C에서 전처리하였을 때 가장 높은 생존력을 보였다 (Fig. 1). 42°C에서 전처리한 경우 전처리하지 않은 경우와 유사한 생존력을 보였으며 52°C에서 전처리한 경우 47°C에서 전처리한 경우보다 약 43배 높은 생존력을 보였다. 또한 열 전처리 과정에서 chloramphenicol을 처리한 경우 열 내성 증진 효과를 보이지 않았다. 이를 통하여 내성 증진 효과는 전처리 과정에서 새로운 단백질의 합성이 필요하다는 것을 확인하였다 [9]. 주사 전자 현미경을 통하여 세포의 형태 변화를 확인한 결과 전처리를 하지 않은 경우 60°C에 20분간 노출하였을 때 세포가 완전히 해리되었으나 (Fig. 2b), 전처리를 한 경우 동일한 열 스트레스 조건 하에서 세포 외형의 변화는 있었으나 해리되지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 2c).

3.2. 다양한 환경 스트레스에서 열 전처리 효과 확인

열 충격 단백질의 발현은 열 스트레스, 산화적 스트레스와 삼투압 스트레스에 대한 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다 [10]. 본 실험에서는 다양한 환경 스트레스 조건으로 산, 에탄올, 과산화수소, 염을 이용하였다. 해당 스트레스에 대하여 열 전처리한 균주와 전처리 하지 않은 균주를 각각 노출시킨 결과 산 스트레스의 경우 pH 3.5에서는 전처리에 관계없이 1시간 이내에 모두 생존력을 잃는 것을 확인할 수 있었으며 pH 4.0과 4.5에서는 초기 성장률에 차이는 보였으나 4시간 경과 후에는 전처리에 관계없이 비슷한 생존력을 보였다 (Fig.

3). 과산화수소, 염과 에탄올은 각기 다른 농도에서 전처리에 관계없이 비슷한 수준의 생존력을 보였으며, 열 전처리에 대한 내성 증진 효과는 확인할 수 없었으나 열 전처리하지 않은 균주와 유사한 생존력을 보여 열 전처리에 의한 내성 감소 또한 보이지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 내성 증가의 유도 조건과 시간, 그리고 스트레스 노출에 대한 반응이 각각의 균마다 다르기 때문이라고 보고된 바 있다 [11]. 유사한 생존력을 보이는 조건들에 대하여 전처리 조건과 스트레스에 대한 노출 조건을 달리하여 연구해볼 필요가 있다.

3.3 Cross protection 효과의 확인

*Listeria monocytogenes*는 산과 염 전처리에 의해 고온에 대한 내성의 증가를 보였고 다양한 유산균종이 전처리 과정을 통하여 세포 표면의 lipid와 protein profile의 변화, 스트레스 반응 단백질의 발현과 exopolysaccharide의 생성 등을 통하여 다양한 스트레스에 대하여 cross protection 효과를 보인다고 보고된바 있다 [12,13]. 본 실험에서는 상동 전처리와 스트레스 실험을 통하여 에탄올과 과산화수소에 전처리 한 경우 상동 스트레스에 대한 내성 증진 효과를 확인할 수 없었으며, 상동 스트레스에 대하여 내성 증진을 보이는 산과 염 전처리에 대하여 열 스트레스 실험을 진행하였다. 염 전처리의 경우 열 스트레스 내에서 전처리하지 않은 경우보다 높은 생존력을 보였으며 0.3 M의 염에 전처리 한 경우 가장 높은 생존력을 보였다 (Fig. 4). 이러한 내성 증진은 염에 의한 osmotic

Fig. 1. Viability of heat adapted *L. crispatus* KLB46 on 60°C heat stress for 20 min.

Fig. 2. SEM images of heat adapted *L. crispatus* KLB46. (a); *L. crispatus* KLB46, (b); non adapted KLB46 on 60°C heat stress for 20 min, (c); 52°C adapted KLB46 on 60°C heat stress for 20 min, (d); 0.3 M salt adapted KLB46 on 60°C heat stress for 20 min.

Fig. 3. Viability of non adapted and heat adapted *L. crispatus* KLB46 on various stress conditions for 4 h. (a); Viability on acidity stress. (b); Viability on EtOH stress. (c); Viability on oxidative stress. (d); Viability on salt stress.

stress 조건 내에서 열 충격 단백질의 발현에 의한 것으로 추정되며 [14], 염 전처리 과정에서 chloramphenicol을 처리하였을 경우 열 전처리와 동일하게 전처리 효과를 보이지 않아 새로운 단백질의 합성에 의한 열 내성 증진임을 확인하였다 (Fig. 4). 주사 전자 현미경을 통하여 세포의 형태 변화를 확인한 결과 염에 전처리한 경우 60°C에서 20분간 노출하였을 때 세포 외형의 변화는 보이나 해리되지 않고 형태를 유지하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2d). 산 전처리의 경우에는 산 스트레스에서는 생균력의 증진을 보였으나 열 스트레스 실험에서는 열 내성의 변화가 크지 않았다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 한국 여성의 질에서 분리한 *L. crispatus* KLB 46를 52°C에서 열 전처리하여 고온 스트레스에 대한 내성 증진효과를 확인하였다. 열 전처리를 한 경우 가열 치사 시간 (60°C, 20분)에서 약 4%의 높은 생균력을 보였으며 산, 염, 에탄올, 과산화수소 등의 환경 스트레스 조건에서는 큰 생균력

의 변화를 보이지 않았다. 또한 염 전처리시 가열 치사 시간에서 약 0.2%의 생균력을 보여 고온 스트레스에 대한 cross protection 효과를 확인하였다. 그리고 전처리 과정에서 단백질 합성을 억제하는 chloramphenicol을 처리하여 내성 증진 효과가 전처리시 새로운 단백질의 합성에 의한 것임을 확인하였다. 따라서 열과 염 전처리가 분무건조를 이용한 제재화 과정에서 균주가 겪게 되는 고온 스트레스에 대하여 균주의 생균력 유지에 효과를 보여줄 것으로 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 2012년도 산학협동재단의 학술연구비 지원사업으로 수행된 연구과제입니다.

REFERENCES

1. Bastani, P., A. Homayouni, V. G. Tabrizian, and S. Ziyadi (2012)

Fig. 4. Viability of salt adapted *L. crispatus* KLB46 on 60°C heat stress for 20 min.

- Dairy probiotic foods and bacterial vaginosis: A review on mechanism of action. pp. 445-456. In: EC Rigobelo (eds.). *Probiotics*. InTech.
2. Chang, C. E. (2000) *Isolation and characterization of Lactobacillus spp. from human vagina for the ecological treatment of bacterial vaginosis*. M.S. thesis, Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon, Korea.
 3. Heidebach, T., P. Frst, and U. Kulozik (2012) Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 52: 291-311.
 4. Silva, J., R. Freixo, P. Gibbs, and P. Teixeira (2011) Spray-drying for the production of dried cultures. *Int. J. Dairy Tech*. 64: 321-335.
 5. Paz, R., L. Lavari, G. Vinderola, G. Audero, A. Cuatrin, N. Zaritzky, and J. Reinheimer (2012) Effect of heat-treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Res Int*. 48: 748-754.
 6. Moseley, P. L. (1997) Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J. Appl. Physiol*. 83: 1413-1417.
 7. Sharareh, S. B., W. Shengqian, T. Stefan, H. Maria, A. Iris, M. U. Frank, W. Michael, and V. Helmut (2013) Impact of heat treatment and spray drying on cellular properties and culturability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12. *Food Res Int*. 54: 93-101.
 8. Park, M. Y., H. M. Park, J. S. So, and S. C. Kim (2004) Microbiologic and molecular genetic analysis of *Lactobacillus* spp. isolated from vagina of Korean women and a pilot clinical study on the treatment of vaginitis using the best *Lactobacillus* strain KLB46. *Korean J. Obstet Gynecol*. 47: 1154-1164.
 9. Kim, J. H., S. Y. Lee, C. E. Chang, S. C. Kim, H. S. Yun, and J. S. So (2001) Effect of cold adaptation on the improved viability of *Lactobacillus crispatus* KLB46. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*. 16: 626-631.
 10. Fiocco, D., V. Capozzi, P. Goffin, P. Hols, and S. Giuseppe (2005) Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 77: 909-915.
 11. O' Sullivan, E. and S. Condon (1997) Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ Microbiol*. 63: 4210-4215.
 12. Skandamis, P. N., Y. Yoon, J. D. Stopforth, P. A. Kendall, and J. N. Sofos (2008) Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol*. 25: 294-303.
 13. Lorca, G. L. and G. F. de Valdez (2009) *Lactobacillus* stress response. pp. 115-137. In: Ljungh and T Wadstrm (eds.). *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*. Calister Academic Press. Norfolk. UK.
 14. Prasad, J., P. McJarrow, and P. Gopal (2003) Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR 20) in relation to viability after drying. *Appl. Environ Microbiol*. 69: 917-925.