

이산화탄소의 항균 효과

- 총 설 -

홍석인[†] · 변유량*

한국식품개발연구원

*연세대학교 생명공학과 및 생물산업소재연구소

Antimicrobial Effect of Carbon Dioxide on Microorganisms

Seok-In Hong[†] and Yu-Ryang Pyun*

Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

*Dept. of Biotechnology and Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract

Carbon dioxide is effective for extending the shelf-life of perishable foods by retarding microbial growth. The overall effect of carbon dioxide is to increase both the lag phase and generation time of microorganisms. However, the role of carbon dioxide in affecting the growth and metabolism of any given microorganisms is not clear yet, although its inhibitory effect is generally found at moderate to high concentrations. Systematic studies of the effects of carbon dioxide on microorganisms are therefore warranted. It is also necessary to understand the role of carbon dioxide in the preservation of foods as well as the control by carbon dioxide of fermentations of biotechnological importance. In this review, the antimicrobial effect of carbon dioxide on microorganisms is investigated in terms of its gas and solution properties, inhibition of microbial growth and specific metabolic processes, perturbation of membrane structure.

Key words: carbon dioxide, antimicrobial gas, inhibitory effect, microorganisms

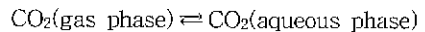
서 론

미생물에 대한 이산화탄소의 생육 억제효과가 알려진 것은 거의 100여년 전으로 그 이후 CO₂는 항균성 기체로서 오염 미생물의 번식을 지연시키는 기능에 힘입어 식품 포장 및 저장에 많이 이용되고 있다. 구미에서는 이미 수십년 전부터 신선 과채류, 식육, 해산물 등의 유통에 실제로 CO₂를 이용하여 왔다. 일반적으로 CO₂ 치환 후 저온에서 저장하면 미생물, 특히 gram⁻ 호기성 세균과 곰팡이의 오염을 효과적으로 억제할 수 있다 (1). 미생물에 미치는 CO₂ 기체의 영향은 확실치 않으나 CO₂ 자체가 용해성이 매우 강한 기체이므로 세포와 그 주변 환경에 화학적 변화를 유발시키는 것으로 판단된다. 그로 인해 미생물의 생육 유도기(lag phase)와 세대시간(generation time)을 증가시키는데, 이러한 영향은 적용 CO₂의 농도, 배양 온도, 대상 미생물, 배양액의 수분활성도 등 여러가지 조건에 따라 달라질 수 있다 (2,3). 이와 관련하여 식품이나 미생물 배양액에 대한

CO₂의 영향을 직접 확인하고자 하는 시도가 매우 많았음에도 불구하고, 아직까지 정확한 CO₂의 생육억제 작용기작은 불분명한 상태이다. 본 고에서는 미생물에 대한 CO₂의 영향을 전반적으로 검토하면서 아울러 설명이 가능한 CO₂의 작용기작에 대해 살펴보고자 하였다.

CO₂의 기체 및 수용액 특성

CO₂는 수분과 지방에 대해 용해도가 매우 높은 특징이 있으며, 이때 CO₂ 용해도는 대기중의 기체 분압과 온도에 의해 좌우된다. 즉 기체 분압이 높아질수록, 온도가 낮아질수록 수용액에 대한 CO₂의 용해도는 증가한다. 이러한 CO₂ 기체의 수용화는 상온의 비교적 분압이 낮은 범위에서 아래의 Henry 법칙에 잘 따른다.



$$[\text{CO}_2]_{\text{dissolved}} = H \cdot P_{\text{CO}_2}$$

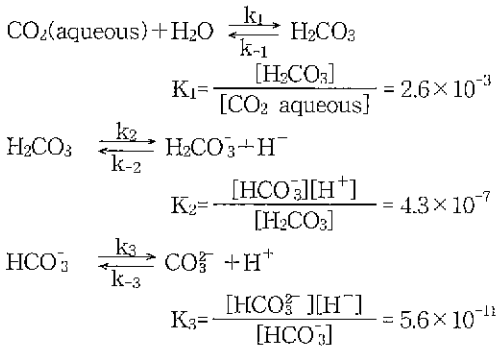
H: Henry's law constant(mole/L · atm)

*P*co₂: partial pressure of carbon dioxide(atm)

[†] To whom all correspondence should be addressed

Table 1에서 보듯이 물에 대한 CO₂ 용해도는 0°C에서 값이 20°C에 비해 2배 가량으로 CO₂의 평균 효과는 지온에서 더 현저한 것도 일부는 이러한 용해도 차이에 기인한다고 볼 수 있다(5). 수용액 내에서 CO₂는 수화되어 약산인 carbonic acid [H₂CO₃] (pK_a=6.35)를 형성하고, 이는 pH에 따라 bicarbonate[HCO₃⁻]나 carbonate [CO₃²⁻]로 해리되어 용액의 pH를 감소시킬 수 있다(6). 일반적으로 CO₂가 수화되어 carbonic acid를 형성하는 과정은 매우 느리게 일어나지만 carbonic acid가 bicarbonate와 수소이온으로 해리되는 과정은 매우 급속히 진행되기 때문에 (k₁, k₋₁ << k₂, k₋₂), 실제로 carbonic acid는 비교적 강한 산처럼 작용할 수 있다.

그러나 pH 8 이하에서는 carbonate 이온의 농도가 무시할 만한 수준이므로 대부분 pH 값이 3~7인 식품 내부에서는 CO₂가 용존 CO₂와 bicarbonate의 혼합물 형태로 존재하며 그 비율은 pH에 따라 달라진다. 이러한 CO₂와 bicarbonate는 모두 미생물의 생화학적 활성화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(7).



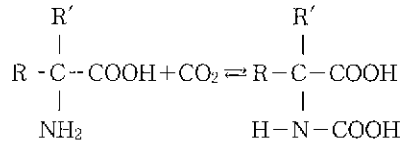
K₁, K₂, K₃: equilibrium constants for hydration of carbon dioxide, dissociation of carbonic acid, and dissociation of bicarbonate, respectively at 298°K, 1 atm

Table 1. Solubility of carbon dioxide in water at various pressures and temperatures(volumes of CO₂ at 1 atm/volume of water)

Pressure (psi)	Temperature(°C)				
	0	12	20	26	32
15	3.46	2.20	1.71	1.84	1.20
25	4.58	2.04	2.29	1.93	1.70
35	5.80	3.69	2.86	2.42	2.13
45	6.95	4.43	3.44	2.91	2.56
55	8.11	5.17	4.02	3.40	2.99
60	8.71	5.53	4.31	3.64	3.20
70	9.86	6.27	4.89	4.14	3.63
80	11.02	7.00	5.46	4.62	4.06
90	12.18	7.74	6.04	5.12	4.49
100	13.34	8.40	6.62	5.60	4.91

Data from Quinn and Jones(4)

또한 CO₂는 자유 아미노기와 결합하여 carbamates를 형성하므로서 아미노산이나 펩티드, 단백질과 반응하기도 한다(8)



이 CO₂와 자유 아미노기와의 가역반응은 단백질의 등전점보다 높은 pH 조건에서 더욱 잘 일어나며, 수화 반응보다 몇 배나 빠르게 진행된다. 그러나 수용액 내의 반응물질 농도 측면에서 단백질보다는 물이 훨씬 더 고농도이므로 평형 상태에서 carbamate의 양은 미미한 수준이며, 지온에서는 반응이 상대적으로 더 느리게 진행된다. 그럼에도 불구하고 단백질의 carbamation은 단백질 입체구조 내부에 정전기적 인력이나 반발력을 형성하여 결과적으로 구조적 변형을 야기할 수 있으며, 전하 반전(RNH₃⁺→RNHCOO⁻)에 따른 단백질의 기능성 변화를 유발할 수도 있다(8) 예를 들어 Silliker(9)에 따르면 헤모글로빈과 같은 단백질에 상당량의 CO₂가 결합할 수 있는데, 이러한 carbamates의 형성은 미생물의 주변 환경이 CO₂에서 공기로 전환된 후에도 여전히 생육이 억제되는 소위, 잔류 효과(residual effect)를 야기시킨다고 한다.

한편 용존 CO₂는 세포막을 자유롭게 투과(P=0.3~0.6cm/s)할 수 있으나 bicarbonate 이온은 거의 투과(P=10⁻⁷~10⁻⁸cm/s)할 수 없다는 사실이 Hunter(10)에 의해 밝혀지므로서 CO₂가 세포에 미치는 생화학적 영향은 한층 더 복잡해졌다. 더욱이 gram⁻균에서는 세포 외막이 원형질막의 친유성(lipophilic) 차단성을 공유함에도 불구하고 Cl⁻이나 PO₄³⁻ 등의 이온을 흡수할 수 있는 음이온 통로(anion-specific pores, ionophore)를 갖고 있는데(11), bicarbonate 이온도 세포 외막을 투과할 수 있는지는 아직 확실치 않다. 대개 세포 내부(pH≅7)와 외부의 pH가 다르기 때문에 원형질막을 통과한 CO₂는 용존 기체, carbonic acid와 bicarbonate의 평형 혼합물 형태로 존재한다(12) 그러나 미생물에서는 decarboxylation과 같은 효소 촉매반응에 의해 bicarbonate 보다는 수용성 CO₂로 존재할 가능성이 높다고 한다(13). 이상에서와 같이 CO₂의 평균 효과는 CO₂나 bicarbonate, 혹은 이들의 복합적인 영향에 기인하는 것으로 판단된다.

CO₂와 bicarbonate의 평균 효과

미생물 세포나 세포막 내에서의 CO₂와 bicarbonate

농도를 직접 측정하는 것은 거의 불가능하다. 그러나 이들 농도를 좌우하는 각각의 인자에 대해서는 상당히 알려져 있어 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 대부분 수용액 상태에서 CO₂ 농도는 주로 주변 환경의 pH와 온도에 의해 결정된다.

미생물 세포에 대한 CO₂와 bicarbonate의 영향을 각기 구별하기 위하여 Sears와 Eisenberg(14)는 모형 시스템을 이용하여 실험하였는데, 그 결과 CO₂와 bicarbonate는 표면장력, 수용화, 이온 투과도와 같은 세포막 특성에 대해 서로 다른 효과를 나타내었고 일부는 상반된 효과를 나타내기도 하였다. 한편 *Bacillus cereus* 포자는 고농도 CO₂에 의해 발아가 완전히 억제되었으며, *Clostridium sporogenes*와 *Cl. perfringens*는 고압 CO₂에서 발아가 억제되었다(15). 특히 이러한 발아 억제는 bicarbonate 농도보다 용존 CO₂ 농도와 밀접한 관계가 있었다. 또한 Jones(7)는 gram 균이 CO₂에 민감하다는 측면에서 *Pseudomonas aeruginosa*를 이용하여 CO₂와 bicarbonate의 생육 억제효과를 확인하였다. 균의 생육억제는 배지 용액내 CO₂ 농도에 비례하였으나 bicarbonate 이온 농도에는 거의 영향을 받지 않았

다. 다만 bicarbonate 이온 농도가 높은(≥100 mM) 경우에 약간의 부가 효과를 볼 수 있었다. 더욱이 온도는 CO₂ 기체의 용해도에만 영향을 미칠 뿐 *Ps. aeruginosa*의 생육억제에는 거의 영향이 없어 Enfors와 Molin(5)의 결과와 일치하였다

미생물 생육에 대한 CO₂의 영향

미생물에 대한 CO₂의 영향은 지연시간(lag time) 증가, 생육속도 감소, 수율 저하 등의 다양한 형태로 나타날 수 있다. 예를 들어 CO₂로 처리한 신선 육류의 저장 수명이 연장되는 것은 미생물의 지연시간 증가로 인해 균체량이 위험 수준까지 도달하는데 상당한 시간을 필요로 하기 때문이다. *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *B. subtilis*, *Salmonella*, *Yersinia* 등 여러 미생물에서 CO₂의 지연시간 증가 효과를 확인할 수 있었으나(1,5, 9,16), 이러한 효과가 모든 균종에 대해 적용되는 것은 아니다. 특히 일부 균주는 온도 의존성이 있어 저온에서 더 현저하게 지연시간이 증가한다고 한다(17).

한편 Table 2에 나타낸 바와 같이 대다수 미생물은 CO₂에 의해 생육속도가 저하되며, 일반적으로 알려진

GAS PHASE

*p*CO₂ determined by:
Phase volume
Temperature and pressure
Atmosphere composition

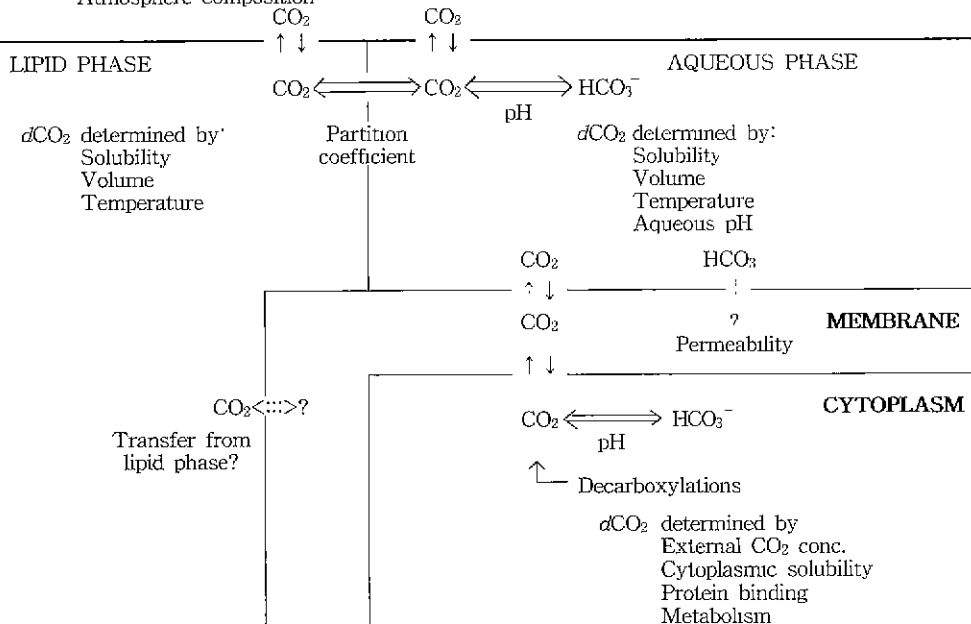


Fig. 1. Factors affecting the distribution of dissolved carbon dioxide between a cell and three environmental phases(7).

Table 2. Effect of elevated carbon dioxide concentration on the growth and survival of cells and microbes

Species	Description of inhibition effect
<i>Aquaspirillum fermentans</i>	0.05 to 0.2 atm $p\text{CO}_2$ is the optimum for growth. Above 0.2 atm inhibition occurs although cells are still able to grow at 1 atm.
<i>Aspergillus</i> sp.	Complete inhibition of growth at 1 atm $p\text{CO}_2$
<i>Bacillus cereus</i> (vegetative cells) (spores)	Specific growth rate(μ)=0 at 3 atm $p\text{CO}_2$. 50% inhibition of μ occurs at 1.3 atm while 20% inhibition occurs at 0.5 atm. 1 atm $p\text{CO}_2$ at pH 6.7 reduced % germination to 25% of control. % germination is higher at pH 6.7 than at pH 5.6. i.e. CO_2 (aq) appears to be the effector. The inhibitory effect of CO_2 (aq) is shared by other gases with inhibition of germination, in increasing order of potency $\text{He} < \text{Ar} = \text{N}_2 < \text{Ar} < \text{Kr} < \text{Xe} < \text{N}_2\text{O} < \text{CO}_2$. N_2O and CO_2 were the only gases inhibiting germination at 1 atm with the inhibitory effect of these gases being completely reversible at increased hydrostatic pressure, i.e. they behave as typical anaesthetics. Thus, it is not surprising that the inhibitory effect of the above gases are in the order of their relative lipid solubilities. Additional 'chemical' effects are however, proposed for N_2O and CO_2 . It is worth noting that germination appears to be more sensitive to this additional chemical effect or, alternatively, more sensitive to the membrane effect than is the growth rate of the vegetative cells.
<i>Bacillus megaterium</i>	At 0.78 atm $p\text{CO}_2$, μ is decreased four-fold.
<i>Bacillus subtilis</i> (vegetative cells) (spores)	In continuous culture, μ is greatest at $p\text{CO}_2=0.03$ atm. At 0.17 atm, μ is decreased by 40% (pH 7.0, 37°C). Germination was increasingly inhibited as $[\text{HCO}_3^-]$ was increased from 10 to 100mM at pH 8.0. The observed inhibition was more marked at pH 6.0, indicating that both CO_2 (aq) and HCO_3^- inhibit germination. Note that alcohols, well known for their membrane perturbing effects, also inhibit germination.
<i>Candida scottii</i>	In the pH range 4.5 to 5.5, $p\text{CO}_2$ values between 0.01 and 0.42 atm gave apparent competitive inhibition of growth. This effect was presumed to be due to inhibition of membrane transport processes by CO_2 (aq). Along with the decrease in μ the protein content of the cells also decreased, suggesting possible inhibition of amino acid synthesis.
<i>Candida utilis</i>	Inhibition of specific growth rate occurs at pH>7.0 and appears to be due in part to elevation of $[\text{HCO}_3^-]$ above some critical level.
<i>Clostridium sporogenes</i> (spores)	1 atm $p\text{CO}_2$ stimulated germination of spores while 40% inhibition of germination was observed at 4 atm. Total inhibition appeared to occur at or below 55 atm (pH 6.7). The initial stimulatory effect of 1 atm $p\text{CO}_2$ was higher at pH 5.2, suggesting involvement of molecular CO_2 (aq) in some critical process.
<i>Clostridium perfringens</i>	Stimulation as for <i>C. sporogenes</i> however, inhibition is less marked in this species with only 8% inhibition of germination at 10 atm.
<i>Escherichia coli</i> Mouse adrenal tumour cells	4 atm $p\text{CO}_2$ caused total death within 24h. A decrease in μ and final cell yield at $p\text{CO}_2>0.05$ atm was observed in aqueous culture. The growth inhibition was accompanied by a decreased glycolytic flux and lowered lactate/pyruvate ratio. In contrast to liquid culture, monolayer culture were unaffected at 0.15 atm. This suggests that HCO_3^- was the predominant inhibitory species.
<i>Mucor rouxii</i>	Yeast-like morphological development occurs at $p\text{CO}_2 > 0.3$ atm in normal filamentous cells. One strain showed total growth inhibition at 1 atm (other strains are less sensitive) displayed a relief of CO_2^- mediated inhibition when certain small peptides were added to the growth medium. This effect is highly specific and cannot be reproduced by amino acids, vitamins, fatty acids or sterols.
<i>Penicillium</i> sp.	Sporulation of vegetative cells is inhibited at $p\text{CO}_2$ values from 0.05 to 0.2 atm. Growth is not generally inhibited in this range.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	$p\text{CO}_2>0.05$ atm inhibits growth.
<i>Polytomella agilis</i>	$[\text{HCO}_3^-]>5\text{mM}$ (pH 7 to 8) reduces μ . The effect may be exerted at the membrane.

Table 2. (continued)

Species	Description of inhibition effect
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	In aspartate-yeast extract broth(21°C) growth was inhibited at >0.1 atm while at 0.3 atm growth was reduced to 15~30% of the maximum rate.
<i>Pseudomonas fragi</i>	Growth rate was inhibited 20, 35, 45, 60 and 70% at pCO_2 values of 0.08, 0.3, 0.5, 0.64 and 0.86 atm, respectively. Total growth inhibition occurs at ~2 atm. The optimum pCO_2 for growth appears to be close to zero atm.
<i>Saccharomyces</i> sp.	Maximum growth rate attainable is proportional to the inverse of pCO_2 . Excess pCO_2 is inhibitory both for growth rate and yield of cells. At 30 atm, deleterious effects on cell viability are observed.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	At 25°C and pH 4.5, $pCO_2 > 0.5$ atm begin to reduce exponential growth rate with complete inhibition at 2.7 atm (0% ethanol, 5% glucose). The inhibition appears to be exponential with increasing pressure. The effects on growth are not due to pressure <i>per se</i> since no effects on cell division are found at 2.7 atm nitrogen pressure. Metabolism (i.e. glycolytic production of CO_2) does not appear to be affected at pCO_2 below 12 to 13 atm. CO_2 inhibition had no effect on DNA-replication with CO_2 treated cells containing nearly twice as much DNA per cell. Dry weight per cell also increased for the CO_2 treated cells, indicating that division and not growth was the inhibited process, i.e. inhibition of cell division occurs after the DNA replication event and results in uncoupling of DNA replication growth. This inhibition of growth is aggravated by the presence of ethanol, high concentration of glucose with ethanol being especially synergistic.
<i>Scenedesmus obliquus</i>	This photosynthetic algal species has its highest specific growth rate at 0.05 atm pCO_2 . Inhibition occurs above 0.07 atm.
<i>Schizophyllum commune</i>	0.05 atm pCO_2 prevents fruiting but does not inhibit mycelial growth. The effect appears to be due to the inhibition of an enzymatic step in the synthesis of cell wall R-glucan, resulting in decreased levels of this glucan. This appears to cause an altered structure rendering it resistant to degradation.
<i>Sclerotium rofsii</i>	pCO_2 values of 0.01 to 0.02 atm enhance growth but inhibit sclerotium formation. 0.1 to 0.12 atm pCO_2 completely inhibits growth. Similar patterns of growth inhibition are observed if the enzyme succinate dehydrogenase is inhibited.
<i>Streptococcus cremoris</i>	50% inhibition of growth rate only occurs at 8.6 atm pCO_2 , there is no effect on μ below 4.8 atm while total growth inhibition occurs at 11 atm.
<i>Streptococcus sanguis</i>	The optimum for growth is 0.003 to 0.02 pCO_2 . HCO_3^- and not CO_2 (aq) appears to be the species implicated in this stimulation.

Data from Jones and Greenfield(13)

균주의 생육저해 정도는 다음과 같다(1,13,18-20).

Anaerobic bacteria < Aerobic bacteria

Gram⁺ bacteria < Gram⁻ bacteria

Yeast, Lactobacilli < *Pseudomonas*

Streptococcus cremoris < *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae* < *Pseudomonas aeruginosa* < *Pseudomonas fragi* < *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia* sp. < *Sclerotium rofsii*

CO_2 의 지연시간 증가효과에서와 마찬가지로 *Ps. fragi*의 경우 저온에서 기체 용해도 증가에 따라 생육속도 감소가 더 분명하게 나타났다(1). Molin(18)은 12종의 통성 혐기성균을 대상으로 CO_2 에 의한 생육억제를 관찰한 바 있는데, 균종에 따라 상당한 차이를 발견할

수 있었다. Table 3에서 보듯이 *Lactobacillus*류는 CO_2 에 대한 저항성이 가장 강하지만 저해를 많이 받는 여러 *Enterobacteriaceae*에 비해 생육속도 자체가 더 낮은 편이다.

미생물의 생육인자로서 중요한 의미를 갖는 수을 역시 CO_2 에 의해 세포내 에너지 생성/소비율이 영향을 받아 감소할 것으로 예상되었으나, 현재까지 발표된 결과에 의하면 거의 영향이 없다고 한다(21, 22). 다만 휴지기(stationary phase)의 *Ps. aeruginosa*를 CO_2 로 포화시킨 glucose-nitrate 액체배지에서 배양했을 때 지연시간이 매우 길어져서 결과적으로 최종 균체수율이 35~60% 정도 감소했다는 보고가 있다(7).

그 밖에도 CO_2 영향에 의해 미생물 세포의 생화학적 변화로 세포막의 지질조성이 달라질 수 있다. Castelli

Table 3. Anaerobic growth rates of different bacteria in high(100%) and low(5%) carbon dioxide

Microorganism	Maximum specific growth rate(h^{-1})		% inhibition by high CO ₂
	5% CO ₂ /95% N ₂	100% CO ₂	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.34	0.16	53
<i>Bacillus cereus</i>	0.24	0.08	67
<i>Brocothrix thermosphacta</i>	0.08	0.06	25
<i>Citrobacter freundii</i>	0.43	0.28	35
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.20	0.12	40
<i>Escherichia coli</i>	0.40	0.27	33
<i>Lactobacillus viridescens</i>	0.13	0.12	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.13	0.11	15
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.41	0.29	29
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.27	0.20	26
<i>Yersinia frederiksenii</i>	0.25	0.12	52

Data from Molin(18)

등(23)에 따르면 일정한 CO₂ 분압조건에서 bicarbonate 농도를 조절할 경우 *S. cerevisiae*의 세포막 지질 조성은 변화 없었으나, 용존 CO₂ 농도를 높일 경우 세포막의 지질 총량과 함께 불포화 지방산의 비율이 증가하였다. 이러한 변화는 pH 차이에 기인하는 것보다 생육속도 감소에 의한 결과로 판단되는데, 실제로 *E. coli*, *Ps. fluorescens*, *L. heterohiochii* 등 미생물의 생육속도가 감소하면 세포막의 불포화 지방산이 증가하였다 고 한다(24-27).

CO₂에 의한 대사 저해

세포내 대사과정 혹은 세포 활성이 CO₂에 민감하게 영향을 받는지를 확인하기 위해 여러가지 연구가 시도되었으며, Table 4는 그 결과 중 일부를 요약한 것이다. 표에서 알 수 있듯이 각 미생물 또는 세포의 대사활동에 대한 CO₂ 저해는 매우 복잡한 특성을 갖는데, 예를 들어 CO₂ 분압이 4 atm 이하인 무산소 조건에서 효모는 DNA 복제, 해당 과정(glycolysis), 건조 균체량에 전혀 변화가 없었으나, 세포 분할만은 상당히 영향을 받는 것으로 밝혀졌다(13).

효소에 대한 CO₂의 영향은 미생물대사 경로상의 특정 효소가 저해되어 이와 관련한 반응이 억제되는데, 보고된 바로는 여러가지 종류의 decarboxylases나 TCA 회로 효소 등이 주로 저해를 받는다(13). 대부분의 경우 효소작용 저해를 유발하는 CO₂ 농도는 생육억제에 필요한 것보다 훨씬 더 높다고 알려져 있다. 특정 효소에 대한 CO₂ 효과에서 주목할 만한 사실로서 *Ps. fluorescens*는 균체 생육보다 체외 분비효소인 lipase 생합성이 CO₂에 의해 더 억제되는 것으로 보고되었다(28).

일반적으로 호기성 미생물은 CO₂에 의해 호흡대사가 억제되며, 일부 통성 혐기성 균주도 영향을 받는다

는 보고가 있으나(18), 대부분 혐기성 미생물의 생육은 CO₂에 영향을 받지 않는다. 그러나 구체적으로 CO₂가 미생물의 전자전달계에 어떻게 작용하는지에 대한 연구 결과는 미비한 형편이다. 일부 밝혀진 바에 의하면 CO₂로 포화시킨 액체배지에서 배양한 *Ps. fluorescens*는 cytochrome oxidase의 활성이 그대로 유지되었으며(21), 저농도로 bicarbonate를 첨가할 경우 미토콘드리아의 cytochrome-c-oxidase가 오히려 더 활성화되었다(29). *Pseudomonas*균은 무산소보다 유산소 조건에서 CO₂에 의한 억제 효과가 더 현저하게 나타남으로써 생육억제의 주요인이 호흡저해에 따른 에너지 부족 때문이 아님을 간접적으로 확인할 수 있었다(30).

세포내 pH 변화 측면에서 Wolfe(31)는 CO₂ 저해 효과가 세포 원형질 내부의 산성화에 따른 결과라고 제안하였고, Eklund(19)는 sorbate나 benzoate와 같은 약산으로도 CO₂ 생육억제와 유사한 효과를 얻을 수 있다고 주장하여 이를 뒷받침하였다. 한편 세포내 pH에 대한 CO₂ 영향을 확인하기 위하여 Tan과 Gill(32)은 *Ps. fluorescens*의 세포 내부 pH를 측정하였는데, 용존 CO₂ 농도가 1mM 증가할 때마다 pH는 약 0.03 단위씩 감소하였다. 그러나 외부 환경의 pH가 낮을 때에도 동일한 세포내 pH 감소가 확인됨으로써 이 경우 CO₂에 의한 세포내 pH 변화가 미생물 생육저해의 주원인은 아니라고 설명하였는데, 이들의 실험 결과를 자세히 살펴보면 세포 내외의 pH 구배(Δ pH)는 CO₂에 의한 외부 환경 pH 및 생육속도 변화에 대해 매우 높은 상관관계를 갖고 있어 새로운 각도의 해석이 필요하다고 생각된다.

CO₂는 미생물의 기질 흡수에도 저해 효과가 있는 것으로 알려져 있다. Tan과 Gill(32)에 따르면 CO₂가 균체의 생육속도는 물론 glucose, aspartate, glutamate와 같은 기질의 흡수를 저해하며, 당보다 아미노산의 흡수

Table 4 Effect of carbon dioxide on microbial and cellular metabolic processes

Species	Description of effect
<i>Aspergillus</i> sp.	Itaconic acid production is a function of $p\text{CO}_2$. Specific production rate= $1+3.40 \times p\text{CO}_2$ (g/g. day), and specific growth rate= $2.8-123 \times p\text{CO}_2$ (g/g. day)
<i>Bacillus cereus</i>	Production of α -amylase is reduced at $p\text{CO}_2 > 0.1$ atm.
<i>Bacillus subtilis</i>	Riboxin production is best at 0.008 atm $p\text{CO}_2$ while inosine production is inhibited above 0.03 atm with half-maximum yield at 0.15 atm.
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	Both glucose uptake and glutamine formation are reduced above 0.01 atm $p\text{CO}_2$. At 0.2 atm, reduction in yield of glutamine is only 10%, indicating relative insensitivity to elevated $p\text{CO}_2$.
Erythrocytes (red blood cells)	Glucose uptake rate is not affected below 0.05 atm $p\text{CO}_2$. However, as $p\text{CO}_2$ decreases lactate production increases, i.e. increased $p\text{CO}_2$ may be stimulating the carboxylation of pyruvate to malate or phosphoenol pyruvate to oxaloacetate. HCO_3^- has been implicated as the major effector
<i>Escherichia coli</i>	Removal of metabolically produced CO_2 increases the formate dehydrogenase activity by 60%. 1 atm $p\text{CO}_2$ totally inhibits formate dehydrogenase(EC 1.2.1.2) but has no effect on hydrogen dehydrogenase(EC 1.1.2.1.2). 0.05 atm $p\text{CO}_2$ gives 50% inhibition of protein synthesis while 1 atm $p\text{CO}_2$ totally inhibits protein synthesis.
<i>Penicillium chrysogenum</i>	At O_2 saturation, inhibition of carbohydrate metabolism occurs above 0.04 atm $p\text{CO}_2$ and penicillin production is markedly reduced above 0.08 atm $p\text{CO}_2$.
<i>Saccharomyces</i> sp.	At $p\text{CO}_2 > 10$ atm, the formation of glycerol and higher alcohols decreased while the formation of aldehydes and alcohols increased. The reported increase in ethanol production rate by removal of metabolically produced CO_2 appears to be due to stimulated growth rather than to a reduction in inhibition of glycolytic flux
Spermatozoa	1 atm $p\text{CO}_2$ gave 60~70% inhibition of anaerobic glycolysis and CO_2 (aq) was implicated as the effector. Aerobic glycolysis had its optimum rate at 0.004 to 0.03 atm $p\text{CO}_2$ (pH 7.0) with the inhibitory effect of elevated CO_2 being especially directed against lactate production and endogenous CO_2 production.
<i>Streptomyces</i> sp.	In the production of the antibiotics tetracycline and oleandomycin both the yield of antibiotic and the respiratory rate was decreased by 40~50% at 0.15~0.20 atm $p\text{CO}_2$. However, further increases in $p\text{CO}_2$ did not appear to aggravate the inhibition.
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Optimum oxidation of(ferrous) iron occurs at 0.07 atm $p\text{CO}_2$.

Data from Jones and Greenfield(13)

가 더 민감하게 영향받는다(1)고 한다. King과 Nagel(21)도 *Ps. aeruginosa*를 이용하여 몇몇 기질에 대해 흡수 저해 효과를 확인한 바 있는데, 당보다는 유기산의 흡수가 더 저해된다고 보고하였다.

CO_2 에 의한 세포막의 구조 변화

CO_2 가 미생물의 세포막 성분과 반응하여 물리화학적 구조에 영향을 미친다는 사실은 의심할 여지가 없으나, 이러한 변화가 생육을 억제하기에 충분한지는 의문이다. 대부분의 미생물 세포막은 물론 진핵세포의 세포막은 공통된 기본 구조를 갖고 있기 때문에 균종에 따른 CO_2 내성 차이를 설명하기란 매우 어렵다. 예를 들어 일부 젖산균은 고압인 경우를 제외하고는 CO_2 에 거의 영향을 받지 않는다(1). 이러한 젖산균의 CO_2 내성이 산성 pH에서의 생육능력과 관계있는지를 확인하

기 위해 Jones(7)는 *Lactobacillus* 균을 최저 생육한계 pH 조건에서 배양하면서 CO_2 의 영향을 살펴보았다. 실험 결과 어떠한 저해 효과도 발견할 수 없었는데, 이는 균주의 내산성이 CO_2 에 의해 저하되지 않으며 반대로 pH가 낮아도 CO_2 의 생육억제 효과는 향상되지 않음을 의미한다.

또한 Sears와 Eisenberg(14)는 모형 시스템을 이용하여 세포막의 구조 및 기능에 미치는 CO_2 와 bicarbonate의 영향을 설명하고자 하였다. 이들에 의하면 bicarbonate는 세포막의 이온 투과도를 증가시킬 뿐만 아니라 수용액과 지질 사이의 계면장력을 감소시키는데, 이에 반해 CO_2 는 이러한 효과가 전혀 없이 세포막 표면에서 탈수를 유발하여 지질 분자의 간격을 변화시킨다고 한다.

세포막 구조 변화와 관련하여 CO_2 의 마취(anaest-

hesia; narcosis) 효과에 대한 연구도 꾸준히 계속되었다. Lenaz 등(33)은 마취제 효과에 대한 고찰에서 지질의 유동성 증대, 세포막의 용적 증가, 세포막/미세포막 단백질 구조에 대한 영향 등 모든 마취 효과는 일정한 농도 이상에서만 나타나며, 또한 마취제 분자의 소수성에 비례한다고 하였다. 대부분 기체의 마취 및 항균 효과는 지질에 대한 용해 특성파도 깊은 상관관계가 있어(1), 세포막의 소수성 부위에 일정량의 기체가 채워져 세포막 용적이 일정한 이상으로 증가하면서 마취 증상이 시작된다고 한다(34,35). 이러한 용적 증가는 세포막 지질의 상 전이 [gel(ordered phase)→liquid crystalline(fluid phase)]를 동반함으로써 세포막 단백질의 구조적 변화를 통해 세포막의 유동성을 향상시키고, 결국 세포막 교란을 유발하여 이로 인해 세포막의 기능 저해나 투과도 증가와 같은 현상이 나타나는 것으로 생각된다(35). 따라서 온도 증가로 세포막의 유동성이 증가하면 마취 또는 항균 효과가 향상되어야 하겠지만 실제로 CO₂의 용해도는 온도가 낮을수록 증가하므로 저온에서 더 효과적이며, 심지어 식물 세포에서는 CO₂에 의해 투과도가 낮아지기도 한다(36). 이상과 같이 CO₂가 세포막에 용해되어 지질을 결정화된 액체 상태로 만든다는 상 전이(phase transition) 가설(37)은 매우 설득력 있으나, 아직까지 실험 결과로 이를 충분히 뒷받침하지 못하는 실정이다.

CO₂에 의한 미생물 억제 효과에 있어 세포막 지질층의 변화에 따른 전체적인 투과도 증가보다 특정 지질-단백질의 상호작용 붕괴가 더 중요한 역할을 할 수도 있다. 즉, 세포막 지질의 물리적 상태에 따라 수동 이송과는 관계없이 능동 이송에 관여하는 세포막 결합 단백질의 생화학적 기능이 달라질 수 있고(38), 세포막 구조의 물리적 변형에 의해서도 세포막 단백질에 대한 영향이 매우 달라진다(39,40). 또한 CO₂의 마취 효과는 세포막 뿐만 아니라 원형질에도 작용할 수 있는데, 예를 들어 섬유질 조류인 *Nitella clavata*에 CO₂ 처리를 하면 원형질에서 가역적인 sol-gel 전환이 서서히 일어나고 이는 단백질의 carbamation과 연관이 있는 것으로 판단된다(41). 이러한 원형질의 상 전이로 인해 물분자와 전해질이 외부로 유출되며, 더욱이 carbamate 형성과 그에 따른 효소 단백질의 변화는 아마도 반응 촉매로서의 고유 기능을 상실케 한다고 추정된다.

한편 Jones(7)는 형광성 시험물질인 1-anilinonaphthylamine-8-sulphonate(ANS)와 N-phenyl-1-naphthylamine(PhNap)을 이용하여 *Ps fluorescens*의 세포막 유동성을 연구하였다. PhNap은 세포내 원형질막의 소수성 부위에 자리 잡기 때문에 지질의 유동성 변화를

관찰할 때 사용할 수 있으며(42), ANS는 확실치 않지만 아마도 원형질막 주변에 위치할 것으로 추측된다. PhNap나 ANS를 이용한 실험 결과에서 CO₂가 미생물 세포막을 불활성화시킬 수는 없으나, 적어도 세포 외막의 환경 조건은 변화시킬 수 있음을 확인하였다.

결론적으로 CO₂는 Enfors와 Molin(5,43)이 주장한 바와 같이 미생물 세포막에 대해 이온 투과성 증대, 유동성 변화와 같은 주로 물리화학적 영향을 미치는 것으로 생각된다. 특히 세포막의 유동성 변화는 저온에서 생육 억제 효과가 향상되는 것파도 관련 있어, 균주가 CO₂에 노출되면 저온에서와 같이 세포막의 지질 성분은 불포화 지방산의 증가, 새로운 인지질 삽입 등의 변화를 겪을 것으로 예상된다. CO₂에 의한 세포막의 유동성 증가 혹은 감소 여부는 향후 지속적인 연구로 정확한 결과가 밝혀지리라 예상되며, 현재까지 분명한 것은 세포막에 대한 CO₂ 영향으로 유동성의 변화가 야기되고 그로 인해 특정 단백질-지질 상호작용도 영향을 받아 세포막에 결합되어 있는 단백질의 활성이 감소한다는 사실이다. 특히 단백질-지질 상호작용에 대한 영향은 정도 차이가 있으나, 이송(active transport) 시스템이 가장 민감하게 반응하는 것으로 추측된다.

요 약

이산화탄소는 항균성 기체로서 오염 미생물의 번식을 지연시키는 기능이 있어 식품의 저장성 연장에 매우 효과적으로 사용된다. 이러한 이산화탄소의 미생물 억제 효과는 일반적으로 생육 유도기와 세대시간의 증가에 따른 것으로 알려져 있으나, 이산화탄소가 미생물의 생육과 대사에 어떻게 영향을 미치는지는 아직도 정확하게 밝혀지지 않은 상태이다. 그러므로 미생물에 대한 이산화탄소의 영향을 보다 체계적으로 연구할 필요가 있으며, 더욱이 식품의 저장성은 물론 중요 발효공정의 조절이라는 측면에서 이산화탄소의 역할을 올바르게 이해할 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 이산화탄소의 항균 효과를 구체적으로 살펴보고자 이산화탄소의 기체 및 수용액 특성, 미생물 생육 억제, 대사 저해, 세포막의 구조 변화 등을 중심으로 고찰하여 정리하였다.

문 헌

1. Enfors, S. O. and Molin, G.: Effect of high concentrations of carbon dioxide on the growth of *Pseudomonas fragi*, *Bacillus cereus* and *Streptococcus cremoris*. *J. Appl. Bacteriol.*, **48**, 409(1980)

2. Tomkins, R. G. : The inhibition of the growth of meat-attacking fungi by carbon dioxide. *J. Soc. Chem. Ind.*, **51**, 261T(1932)
3. Wodzinski, R. J. and Frazier, W. C. : Moisture requirements of bacteria. IV. Influence of temperature and increased partial pressure of carbon dioxide on requirements of three species of bacteria. *J. Bacteriol.*, **81**, 401(1961)
4. Quinn, E. L. and Jones, C. L. : *Carbon dioxide* Reinhold Pub. Corp. New York, p.7(1936)
5. Enfors, S. O. and Molin, G. : The effect of different gases on the activity of microorganisms. In "Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity" Robert, T. A., Hobbs, G., Christian, J. H. B. and Skovgaard, N.(eds.), Academic Press, London, p.335 (1981)
6. Knoche, W. : Chemical reactions of CO₂ in water. In "Biophysics and physiology of carbon dioxide" Bauer, C., Gros, G. and Bartels, H.(eds.), Springer-Verlag, Berlin, p.3(1980)
7. Jones, M. V. : Modified atmosphere. In "Mechanisms of action of food preservation procedures" Gould, G. W.(ed.), Elsevier Applied Science Publishing Co., London, UK. p.247(1989)
8. Dixon, N. M. and Kell, D. B. : The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.*, **67**, 109(1989)
9. Silliker, J. H. : The influence of atmospheres containing elevated levels of CO₂ on the growth of psychrotrophic organisms in meat and poultry. In "Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity" Roberts, T. A., Hobbs, G., Christian, J. H. B. and Skovgaard, N.(eds.), Academic Press, London, p.369 (1981)
10. Hunter, M. J. : Human erythrocyte anion permeabilities measured under conditions of net charge transfer. *J. Physiol.*, **268**, 35(1977)
11. Hancock, R. e. W., Poole, K. and Benz, R. : Outer membrane protein P of *Pseudomonas aeruginosa* : regulation by phosphate deficiency and formation of small anion selective channels in lipid bilayer membranes. *J. Bacteriol.*, **150**, 730(1982)
12. Daniels, J. A., Krishnamurthi, R. and Rizvi, S. S. : A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *J. Food Protect.*, **48**, 532(1985)
13. Jones, R. P. and Greenfield, P. F. : Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 210(1982)
14. Sears, D. F. and Eisenberg, R. M. : A model representing a physiological role of CO₂ at the cell membrane. *J. Gen. Physiol.*, **44**, 869(1961)
15. Enfors, S. O. and Molin, G. : The influence of high concentrations of carbon dioxide on the germination of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.*, **45**, 279(1978)
16. Bennik, M. H. J., Smid, E. J., Rombouts, F. M. and Gorris, L. G. M. : Growth of psychrotrophic foodborne pathogens in a solid surface model system under the influence of carbon dioxide and oxygen. *Food Microbiol.*, **12**, 509(1995)
17. Silliker, J. H. and Wolfe, S. K. : Microbiological considerations in controlled-atmosphere storage of meats. *Food Technol.*, **34**, 59(1980)
18. Molin, G. : The resistance to carbon dioxide of some food related bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 214(1983)
19. Eklund, T. : The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *Int. J. Food Microbiol.*, **1**, 179(1984)
20. Ogihara, H., Kame, M., Yano, N. and Haruta, M. : Effect of carbon dioxide, oxygen, and their gas mixture on the growth of some food-borne pathogens and spoilage bacteria in modified atmosphere package of food. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **34**, 283(1993)
21. King, A. D. and Nagel, C. W. : Influence of carbon dioxide on the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Food Sci.*, **40**, 362(1975)
22. Molin, G. : Effect of carbon dioxide on growth of *Pseudomonas putida* ATCC 11172 on asparagine, citrate, glucose and lactate in batch and continuous culture. *Can. J. Microbiol.*, **31**, 763(1985)
23. Castell, A., Litterru, G. P. and Barbaresi, G. : Effect of pH and CO₂ concentration changes on lipids and fatty acids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Mikrobiol.*, **66**, 34(1969)
24. Simensky, M. : Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 522(1974)
25. Gill, C. O. : Effect of growth temperature on the lipids of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.*, **89**, 293(1975)
26. Uchida, K. : Effects of cultural conditions on the cellular fatty acid composition of *Lactobacillus heterohydrochi*, an alcoholophilic bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 837(1975)
27. Wauthoz, P., EL Liou, M. and Decallonne, J. : Gas chromatographic analysis of cellular fatty acids in the identification of foodborne bacteria. *J. Food Protect.*, **58**, 1234(1995)
28. Rowe, M. T. : The effect of carbon dioxide on growth and extracellular enzyme production by *Pseudomonas fluorescens* B52. *Int. J. Food Microbiol.*, **6**, 51(1988)
29. Bendall, D. S., Ranson, S. L. and Walker, D. A. : Effects of carbon dioxide on the oxidation of succinate and reduced diphosphopyridine nucleotide by *Ricinus mitochondria*. *Biochem. J.*, **76**, 221(1960)
30. Gill, C. O. and Tan, K. H. : Effect of carbon dioxide on the growth of meat spoilage bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 317(1980)
31. Wolfe, S. K. : Use of CO and CO₂ enriched atmospheres for meats, fish and produce. *Food Technol.*, **34**, 55 (1980)
32. Tan, K. H. and Gill, C. O. : Physiological basis of CO₂ inhibition of a meat spoilage bacterium, *Pseudomonas fluorescens*. *Meat Sci.*, **7**, 9(1982)
33. Lenaz, G., Curatola, G. and Mascotti, L. : Perturbation of membrane fluidity. *J. Bioenerg.*, **7**, 223(1976)
34. Miller, K. W., Paton, W. B. M., Smith, R. A. and Smith,

- E. B. : The pressure reversal of anaesthesia and the critical volume hypothesis. *Molecular Pharmacology*, **9**, 131(1973)
- 35 Roth, S. H. : Membrane and cellular action of anaesthetic agents. *Fed. Proc.* **39**, 1595(1980)
36. Glinka, Z. and Reinhold, L. : Induced changes in the permeability of plant cell membranes to water. *Plant Physiol.*, **49**, 602(1972)
37. Lee, A. G. : Model for action of local anesthetics. *Nature*, **262**, 545(1976)
- 38 Sullivan, K. H., Jain, M. K. and Koch, A. L. : Activation of the β -galactosidase transport system in *Escherichia coli* ML-308 by n-alkanols: modification of lipid-protein interaction by a change in bilayer fluidity. *Biochim. Acta*, **352**, 287(1974)
39. Roth, W. G., Leckie, M. P. and Dietzler, D. N. ' Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **126**, 434(1985)
40. Walter, R. P., Morris, J. G. and Kell, D. B. : The roles of osmotic stress and water activity in the inhibition of growth, glycolysis and glucose phosphotransferase system of *Clostridium pasteurianum*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 259(1987)
41. Fox, D. L. : Presumed carbaminoprotein equilibria and free energy exchanges in reversible carbon dioxide narcosis of cytoplasm. *J. Theoretical Biology*, **90**, 441(1981)
- 42 Radda, G. A. and Vanderkooi, J. . Can fluorescent probes tell us anything about membranes? *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 509(1972)
43. Enfors, S. O. and Molin, G. ' The influence of temperature on the growth inhibitory effect of carbon dioxide on *Pseudomonas fragi* and *Bacillus cereus*. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 15(1981)

(1997년 9월 9일 접수)