

진균류의 원형질막 단백질 변화에 미치는 식품보존제의 영향

이학미 · 이종삼*

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

Effects of Antiseptics on the Protein Change of Plasma Membrane in various Fungal Cells

Hak-Mi Lee and Chong-Sam Lee*

Department of Biology, College of Natural Sciences,
Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea

ABSTRACT: Plasma membrane from the fungal cells (*Aspergillus phoenicis*, *Rhizopus acidus*, *Candida albicans*) treated with sodium benzoate (S.B), potassium sorbate (P.S) and calcium propionate (C.P) during the cultivation were separated. The contents and patterns of plasma membrane proteins compared with those of the control. The growth of *A. phoenicis* was decreased by the average 64.0% in the S.B treatment. That of *R. acidus* was inhibited by the average 69.0% in the P.S treatment. Also, That of *C. albicans* was showed the deminution of the average 59.5% in the S.B treatment. The contents of protein involved in the plasma membrane of the each fungal cells were inhibited the average 41.0%, 41.7% and 59.5% in the S.B treatment, respectively. In case of *A. phoenicis*, the changes in the protein pattern involved in the plasma membraneshowed the aspect similar to the control on the 1st day and 2nd day of cultivation in the treatment group, but 116 KD~97 KD band almost disappeared in the 5th day of cultivation, and 45 KD~29 KD band was uncleared through the cultivation. In S.B treatment group *R. acidus* was showed the loss of 116 KD~97 KD band from the middle stage of cultivation and P.S, and C.P treatment group were started the loss at the early stage and completely lost at the 36 hours of cultivation. In *C. albicans*, 116 KD~97 KD band were started the loss at the early stage to compare with the control and 66 KD~45 KD band were dimmed at the 96 hours of cultivation. Especially, the C.P treatment group were perfectly lost at the 96 hours of cultivation.

KEYWORDS: Antiseptics, *A. phoenicis*, *R. acidus*, *C. albicans*, Membrane protein, Plasma membrane

원형질막은 세포 내외를 격리하는 역할과 막을 통한 물질의 수송과 환경을 감지하여 대사 조절에 필요한 정보의 전달이라는 서로 상반되는 역할을 한다. 격리의 역할은 양극성을 가진 인지질이 담당하며, 운반과 정보 전달의 역할은 단백질의 기능인데, 특히 단백질은 표재성 단백질과 내재성 단백질이 있다(Helenius와 Simons, 1975; krzywicki, 1975). 표재성 단백질은 pH나 염 농도의 변화에 의해서 쉽게 분리되어지며(Krzywicki, 1975; Grady 등, 1988) 다른 단백질에 또는 인지질의 polar

head group에 이온 결합에 의해서 연결되어 있으며, 분자량이 약 12 KD 정도의 수용성 단백질인 cytochrome C가 있는데, 미토콘드리아 막에서 쉽게 분리되며 미토콘드리아의 전자전달 사슬의 기능을 가지고 ATP 환원에 관여한다(Owen 등, 1989). 표재성 단백질은 몇몇 내재성 단백질과 결합되어 있다. 또 다른 예는 skeletal인데 이것은 막 skeletons와 관계된 많은 단백질들이 있다. skeletal 막 단백질은 사람의 적혈구의 원형질 막의 spectrin이 있다. 220 KD~240 KD의 분자량인 spectrin은 막의 골격을 유지시켜 주는 역할을 하고 있다(Yeagle, 1987). 내재성 단백질은 막의 내부에 또는

*Corresponding author

막을 횡단하여 매몰되어 있으며, 이 부위에 탄화수소가 밀집되어 있어 탄수화물이 풍부한 단백질이다. 막 지질의 탄화수소 사슬과 상호작용을 하기 때문에 무극성 상호작용과 경쟁할만한 계면활성제를 이용하여 막으로 부터 분리할 수 있는데, 대표적인 계면활성제로는 HEPES(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), TritonX-114 등이 있다(Helenius와 Simons, 1975; Krzywicki, 1975; Bordier, 1981; Blanchard, 1984; Grady 등, 1988). 내재성 단백질은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 한가지는 지질 이중 층에 걸쳐 있어서 물질 수송을 담당하는 막 단백질이다. 그 예로는 분자량이 약 30 KD이며 55%가 탄수화물인 glycoporin이 있다. 다른 하나는 anchored protein인데 지질 이중 층의 소수성 잔쪽 부위에 매몰되어 있어, 안에서 단백질을 잡고 있는 역할을 하는 anchor로써 유지된다. 여기에는 cytochrome b5가 있다(Eisenberg, 1984; Yeagle, 1987).

원형질막에서 가장 중요한 운반기능을 하기 위해서는 세포 내에 수송계가 필요하다(Owen 등, 1989). 첫째로 포도당을 수송하기 위한 특별한 단백질이 존재하며, 둘째로 원형질막을 가로질러 있는 음이온 수송계에 관여하는 단백질이 있는데, 이것은 ATP의 산화 즉, 에너지가 필요하지 않다. 또 다른 원형질막 수송계의 예는 Na^+/K^+ ATPase이다. 이 기작은 ATP의 산화 즉, 에너지가 소모되는 수송이다(Carafoli, 1987; Aaronson 등, 1988). 단, 포도당과 음이온 수송계는 한 개의 polypeptide로 구성된 반면, Na^+/K^+ ATPase는 2개의 각기 다른 polypeptide로 구성되어 있으며, Na^+/K^+ ATPase는 약 110 KD의 분자량을 가진다. 이렇게 Na^+ 을 따라서 세포가 필요로 하는 영양분이 운반되는 것이다(Bowman와 Slayman, 1979). 이외에도 원형질막과 그 외부 구조를 형성하는 효소도 원형질막에는 존재하며, 막의 turn over에 관여하는 phospholipase와 protease가 있고, 세포의 단백질이 원형질막을 통과할 때 signal peptide를 전달하는 역할을 담당하는 효소인 peptidase도 있다. 또한 환경감지 단백질도 존재한다(Griffin, 1994).

일반적인 동물세포의 원형질막의 수송을 담당하는 Na^+/K^+ ATPase, sarcoplasmic reticulum의

Ca^{2+} -stimulated ATPase와 같은 기능을 가진 효소가 진균류에서는 거의 같은 구조의 H^+ -ATPase가 있다(Bowman 등, 1981; Carafoli, 1987). 원형질막 H^+ -ATPase는 약 $100 \text{ KD} \pm 5 \text{ KD}$ 의 내재성 단백질이며, 지질 층에 깊게 끼여 있는 electrogenic proton pump로 알려져 있고, 동물세포의 ATPase가 하는 모든 기능을 하고 있다. 원형질막 단백질은 polysomal mRNA와 cDNA에서 유도된 RNA로부터 합성되고, 후 전자 과정을 거쳐 microsomal membrane 안에서 합쳐진다(Bowman와 Slayman, 1977). K^+ 수송의 역할을 하는 원형질막 ATPase는 K^+ 에 의한 효소활성의 자극에도 이용되며, proton-translocating ATPase는 다양한 H^+ -dependent co-transport system을 유도하는 큰 막 전위를 일으키는 기능을 한다(Delhez 등, 1977; Dufour와 Goffeacet, 1987; Bowman 등, 1981; Aaronson 등, 1988).

식품첨가물 Sodium borate(S.B)은 세균과 곰팡이의 발육을 저지하는 작용을 가지고 있는 산성형 보존료로 pH에 따라 효능이 현저히 다르며, 곰팡이, 효모 등 여러 종류의 미생물에 효과가 있는데 특히 항균 범위가 넓다(지, 1994). P.S은 천연에 존재하는 것으로 알려져 있으며 곰팡이의 균사 생성을 억제하는 작용을 하며(Tsai 등, 1984), 효모, 곰팡이, 세균의 생장에 저해작용을 하기 때문에, 사람의 음식물, 의약품, 포장품 등의 보존제로 광범위하게 사용되고 있다(Sofos와 Busta, 1981).

곰팡이에서 Potassium sorbate(P.S)는 acyl S-CoA dehydrogenase 활성도를 감소시켜 불포화 지방산이 축적되고, 정상적인 지방산 산화가 일어나지 못하므로 곰팡이의 대사 과정과 생장이 억제된다(Sofos와 Busta, 1981). Calcium propionate(C.P)는 알칼리에 의한 프로피온산이 제거되지 않고 그대로 산으로 잔류하기 때문에 pH가 산성으로 유지됨으로써 항균 작용이 효과적이다(지, 1994). *Leucostoma persoonii* Hohn에 의해 발생하는 peach 암증병에 calcium 염을 처리하면 병원균에 대한 저항력의 증가를 가져오며, 빵, 건초, 곡류의 저장에 있어서 곰팡이나 박테리아의 억제제로서 잘 알려져 있으며, *Chalara elegans*에 의해 발생하는 검은 뿌리 부패병을 감소시키는데(Draughon 등,

1982; Biggs 등, 1994), C.P의 활성 기작은 지방이 풍부하게 결합된 분자를 세포 내에서 쉽게 녹이고, 미생물의 세포막 투과성을 억제하기도 하고, 전자 전달계로부터 산화적인 인산화와 기질수송의 coupling을 일으킨다(Biggs 등, 1994; Milward 1976; Tsai 등, 1984).

이와 같이 생체막에 함유되어 있는 막 단백질의 분리와 그의 기능에 관한 연구는 다양하게 연구되어 왔다. 본 연구는 진균 세포의 막 단백질의 종류와 패턴에 식품보존제가 어떤 영향을 미치는가를 대조구와 비교 분석하였다.

재료 및 방법

세포의 배양

균주 *Aspergillus phoenicis*, *Rhizopus acidus*, *Candida albicans*를 본 실험에 이용하였다.

균주의 배양

A. phoenicis *A. phoenicis*를 potato dextrose agar 사면 배지에 접종하여 28°C에서 48시간 배양 후, 멸균 증류수를 넣어 포자 현탁액을 만들었다. S.B(7 mM), P.S(11 mM), C.P(12 mM)를 각각 첨가한 Czapek 배지에 포자 현탁액을 접종(1.1×10^6 spores/ml)하여 28°C에서 진탕 배양(150 rpm/min)하였다.

R. acidus *R. acidus*를 potato dextrose agar 사면 배지에 접종하여 28°C, 48시간 배양한 후 포자 현탁액을 만들어 S.B(10 mM), P.S(12 mM), C.P(5 mM)을 각각 첨가한 yeast extract 배지에 포자 현탁액을 접종(2.8×10^6 spores/ml)하여 28°C에서 36시간 동안 진탕 배양(130 rpm/min) 하였다.

C. albicans *C. albicans*는 YM 액체 배지(peptone, yeast extract, malt extract, glucose, d.w)에서 24시간 전 배양한 후 수확한 *C. albicans*를 S.B(12 mM), P.S(16 mM), C.P(5 mM)를 각각 처리한 YM액체 배지에 접종(최종흡광도 1.8 O.D. at 660 nm)하여 28°C에서 96시간 동안 진탕 배양(130 rpm/min) 하였다.

원형질막 분리

*A. phoenicis*와 *R. acidus* 수확한 세포를 증류수로 2~3회 세척한 뒤 다소 변경된 Marriott의 방법(1977)을 이용하여 원형질 막을 분리하였다. 수확된 세포를 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4, 0.6 M KCl, 10 mM MgSO₄ 포함)으로 현탁시켜 마쇄한 후 원심분리(sorval RC 5B 400×g, 5 min)하였다. 얻어진 상등액을 원심분리(1,500×g, 5 min)하여 분리된 상등액을 다시 원심분리(8,000 rpm, 5 min)하였다. 상등액을 원심분리(sorval ultra pro 80, 82,500×g, 30 min)하였다. 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, Mg⁺⁺ 포함)으로 만든 50% sucrose 용액에 이 침전물을 현탁시키고, 50%와 20% sucrose 용액으로 sucrose gradient를 형성한 후 현탁액을 주입하였다. 이 gradient를 원심분리(sorval AH-629 rotor, 82,500×g, 90 min)하여 crude한 원형질막을 추출한 뒤, 이들을 20% sucrose 용액으로 재현탁시켜서 원심분리(sorval ultra T-880 rotor, 82,500×g, 60 min) 하여 얻어진 침전물을 본 실험에 이용하였다.

C. albicans

원형질체 형성 원형질체 형성은 Anderson와 Millbank(1966) 그리고 Chun, *et al.*, 방법(1986)을 이용하였다. 배양된 세포를 수확(9,000 rpm, 5 min)한 뒤 멸균 증류수로 세척(9,000 rpm, 5 min)하였다.

이들 세포를 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 현탁하여, 원심분리(9,000 rpm, 5 min)한 후, 20 mM mercaptoethanol이 첨가된 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, 0.5 M sucrose, 20 mM MgCl₂ 함유)에 세포를 재현탁(최종농도 $5.0 \sim 8.0 \times 10^8$ cell/ml)시켰다. 그리고 세포벽을 제거하기 위하여 lysozyme을 세포현탁액에 첨가(100 μg/ml)하여 25°C에서 약 30~40분간 정치시켰다. 그후 원심분리(2000×g, 10 min)하여 상등액만 모았다. 형성된 원형질체 상등액을 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, Mg⁺⁺ 함유)를 넣어 원심분리(5,000×g, 30 min)한 후 얻어진 침전물을 다음 실험에 이용하였다.

원형질막 분리 *C. albicans*의 원형질막 분리는 Marriott의 방법(1975)을 이용하여 분리하였다. 원심분리에 의해 수확된 원형질체를 0.1 M Tris-

HCl 완충용액(pH 8.0, Mg^{++} 함유)으로 만든 50% sucrose 용액에 재현탁시키고, 50%와 20% sucrose를 continuous sucrose gradients를 형성한 후, 현탁액을 주입시켰다. 이 gradient를 원심분리(sorval AH-629 rotor, 82,500×g, 120 min)하여 crude한 원형질막을 분리하였고, 여기에 20% sucrose 용액을 재현탁시켜 원심분리(sorval ultra T-880 rotor, 82,500×g, 90 min)하여 순수한 원형질막을 분리하였다.

원형질막의 함량측정 분리한 각각의 원형질막에 20 mM HEPES 완충용액(1 mM DDT(dichlorodiphenyl-trichloroethane), 600 mM NaCl 함유) 5 ml를 가하여 혼합시킨 후 이들의 함량을 건조량으로 측정하였다(Blanchard, 1984; Furth 등, 1984).

원형질막 단백질의 추출 HEPES 완충용액에 원형질막을 첨가하여 만든 현탁액을 냉동상태에 10~20분 방치하였다. 그후 원심분리(16,000 rpm, 30 min)하여 얻어진 상등액에서 1 ml를 취하여 protein함량을 측정하였다(Bollag와 Edelstein, 1991).

단백질 함량측정 단백질 함량 측정은 Lowry 법(1951)를 이용하였으며, 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

단백질 농축 단백질은 acetone 농축법(Bollag와 Edelstein, 1991)에 의해 농축하였다. Sample 양의 약 5배 정도의 냉각된 acetone(-20°C)을 넣고 혼합하였다. -20°C에서 10분간 정지한 후에 원심분리(15,000 rpm, 5 min)하였다. 상등액을 완전히 제거한 뒤 건조시켰다.

전기영동 원형질막에 함유된 단백질의 변화양상을 대조구와 비교하기 위하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis법(Bollag와 Edelstein, 1991)을 사용하였다. 5%의 stacking gel과 8%의 separating gel을 이용하였고, sample을 완충용액(10 ml 제조시, 0.6 ml 1 M Tris-HCl(pH 6.8), 5 ml 50% glycerol, 2 ml 10% sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.5 ml 2-mercaptoethanol, 1 ml 1% bromophenol blue, 0.9 ml H_2O)에 용해시킨 후 100°C에서 2분간 가열하였다. 전기영동 완충용액은 0.02 M Tris-glycine 완충용액(pH 8.3)을 이용하였으며, 70 mA에서 4시간 동안 실온에서

시행하였다. Coomassie brilliant blue R 250으로 단백질 보호를 위해 염색하였으며, 후에 7% acetic acid가 함유된 50% methanol로 탈색하였다. Standard molecular weight marker로서는 myosin(205 KD), β -galactosidase(116 KD), phosphorylase b(97 KD), bovine albumin(66 KD), egg albumin(45 KD), carbonic anhydrase(29 KD)를 사용하였다.

결 과

세포의 생장

식품 보존제가 각각 첨가된 배지에서 배양한 *A. phoenicis*, *R. acidus* 및 *C. albicans* 세포의 생장 변화를 Fig. 1, 2, 3에 나타내었다. *A. phoenicis*의 생장은 배양기간동안 S.B처리구는 대조구에 비해 평균 63%, P.S 처리구는 평균 64%, C.P 처리구는 평균 54%의 생장억제를 보였다. P.S 처리구가 다른 두 개의 처리구보다 높은 저해율을 나타내었다(Fig. 1). *R. acidus*의 S.B 처리구는 배양기간동안 대조구에 비해 평균 49%, P.S는 평균 69%, C.P는 평균 48%의 생장억제를 나타내었다. *R. acidus*에는 P.S가 가장 뚜렷한 생장저해 효과가 관찰되었다(Fig. 2). *C. albicans*의 S.B 처리구는 평균 83%의

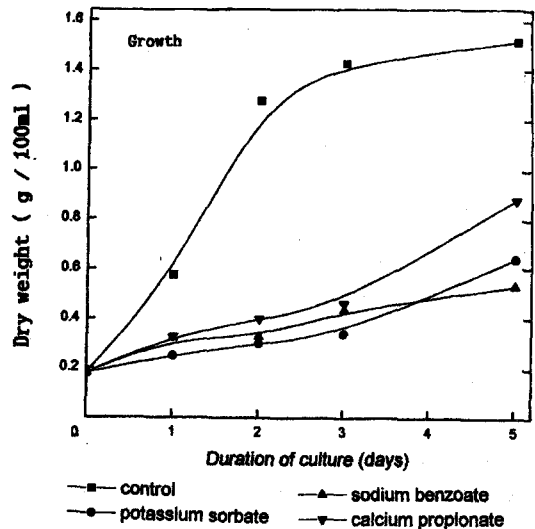


Fig. 1. Growth of *A. Phoenicis* treated with various antiseptics during the cultivation.

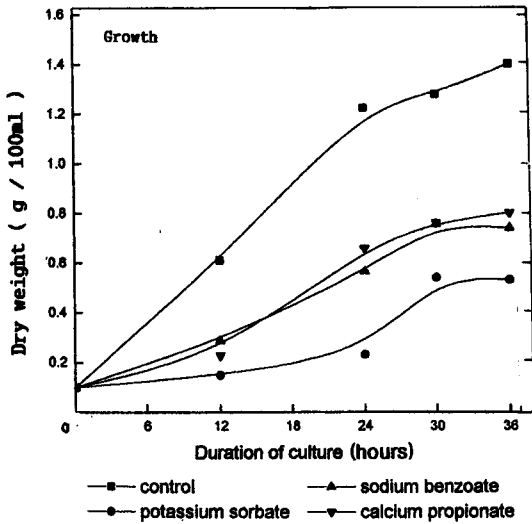


Fig. 2. Growth of *R. acidus* treated with various antiseptics during the cultivation.

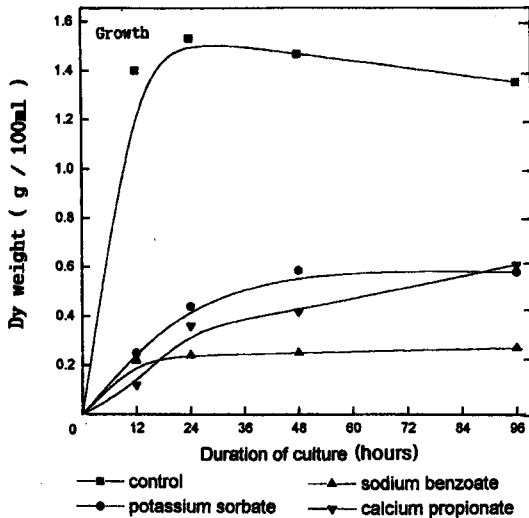


Fig. 3. Growth of *C. albicans* treated with various antiseptics during the cultivation.

가장 현저한 성장저해 효과를 나타내었고, P.S 처리구에서는 67%, C.P 처리구는 73%의 성장억제 효과를 보여주었다. *C. albicans*의 성장저해는 S.B가 가장 뚜렷한 것으로 나타났다(Fig. 3).

원형질막의 단백질 함량 변화

식품보존제를 처리한 배지에서 생육된 *A. phoenicis*, *R. acidus*, *C. albicans*의 원형질막에 있는 단백질 함량 변화를 Fig. 4, 5, 6에 표시하였다.

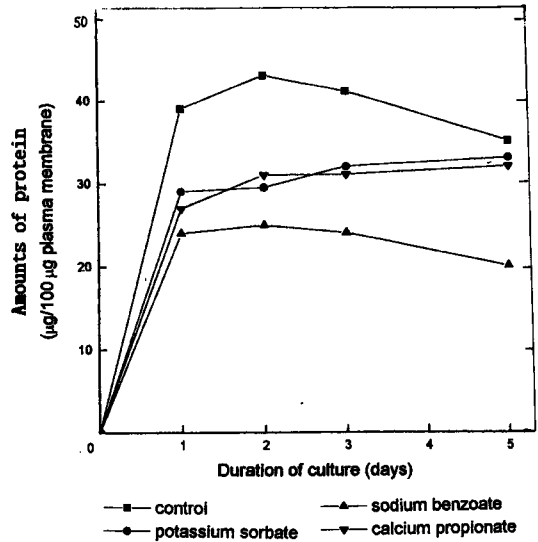


Fig. 4. Changes in contents of protein in plasma membrane of *A. phoenicis* treated with various antiseptics.

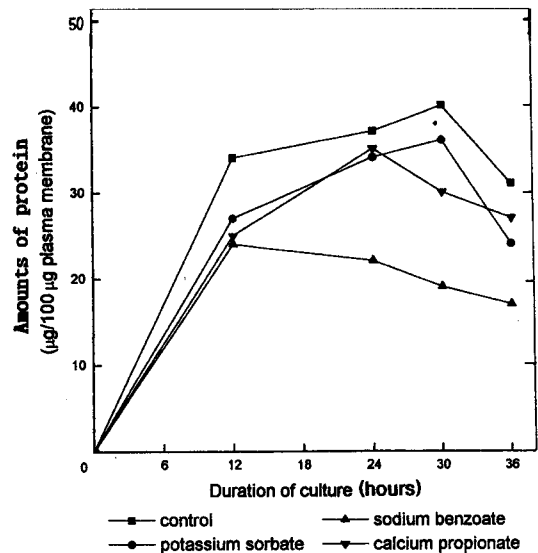


Fig. 5. Changes in contents of protein in plasma membrane of *R. acidus* treated with various antiseptics.

*A. phoenicis*의 경우, Fig. 4에 표시된 바와 같이 대조구에 비해 S.B 처리구는 1일째 38%, 2일째 42%, 3일째 41%, 5일째는 43% 감소하여 평균 41%의 감소를 나타내었으며, P.S 처리구는 1일째 26%, 2일째 31%, 3일째 21%, 5일째 6% 감소율에, 평균 21%의 감소를 나타내었고, C.P 처리구에서는

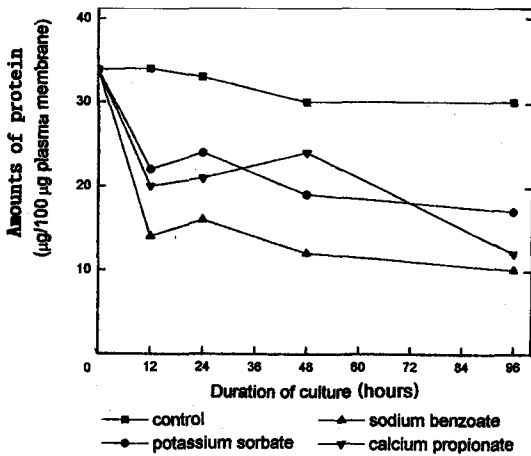


Fig. 6. Changes in contents of protein in plasma membrane of *C. albicans* treated with various antiseptics.

1일째 31%, 2일째 28%, 3일째 74%, 5일째 9%의 감소를 보여 주어, 평균 23% 억제되었다. *A. phoenicis*에서는 S.B에 의한 단백질의 함량이 가장 크게 감소된 것으로 나타났다.

Fig. 5에 나타난 바와 같이 *R. acidus*의 생장은 S.B 처리구는 12, 24, 30, 36시간에 각각 29%, 41%, 52%, 45%의 저해를 보여서 배양기간중 평균 41.8%의 함량감소가 분석되었다. P.S 처리구는 12시간에 21%, 24시간에는 8%, 30시간에 10%, 36시간에는 23%로 평균 15.5%가 억제된 것으로 나타났다. C.P를 처리한 배지에서 생육된 세포는 대조구에 비해 12시간에 26%, 24시간에 5%, 30시간에 25%, 36시간에 13%의 감소를 보여 평균 17.2%의 감소를 보였다. *R. acidus* 경우에 S.B가 단백질의 함량에 현저한 억제작용을 하는 것으로 관찰되었다.

Fig. 6에서와 같이 *C. albicans*에서는 S.B처리구에서는 대조구에 비해 12, 24, 48, 96시간에 각각 51%, 52%, 60%, 67%의 함량감소로 평균 59.5%의 저해를 보여주었으며, P.S 처리구에서는 12시간에 35%, 24시간에는 27%, 48시간에는 37%, 96시간에는 43%의 억제 효과를 보여 평균 억제율은 35.5%였다. C.P 처리구에서는 배양 12시간에 41%, 24시간에 36%, 48시간에 20%, 96시간에 60%의 감소로 평균감소율은 39.2%를 나타내었다.

*C. albicans*의 경우 S.B 처리구가 단백질 함량변

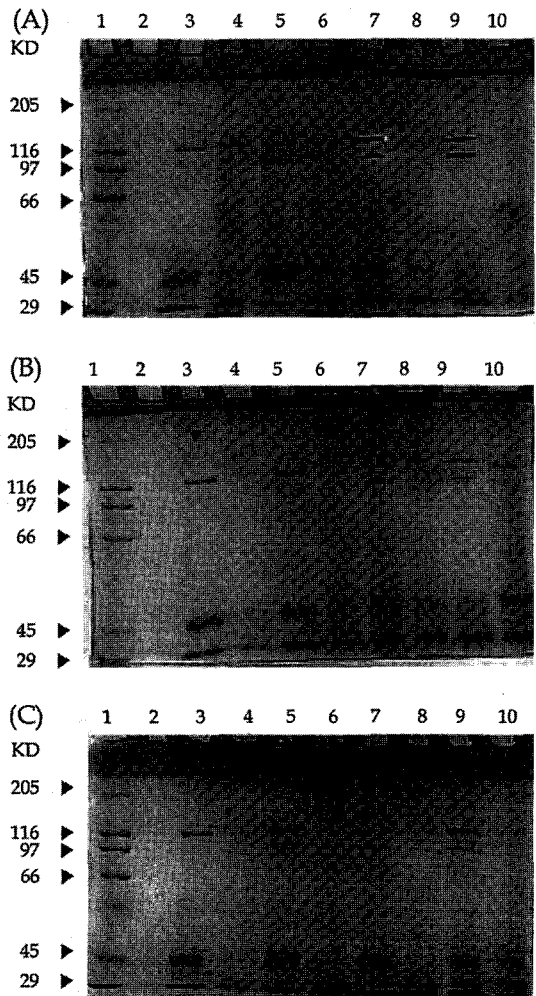


Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of protein in plasma membrane of *A. phoenicis* treated with S.B(A), P.S(B), C. P(C).

Lane 1. is a molecular weight markers; Lane 3, 5, 7, 9 are 1, 2, 3, 5 days of culture in control; Lane 4, 6, 8, 10 are 1, 2, 3, 5 days of culture treated with antiseptics.

화가 가장 큰 것으로 관찰되었다. 이 결과로, 원형질막의 단백질 함량에 현저한 억제작용을 하는 식품 보존제는 S.B인 것으로 확인되어 있다.

막 단백질의 패턴 변화

식품 보존제를 처리한 세포의 원형질막에 함유된 단백질의 패턴변화는 Fig. 7, 8, 9에 나타내었다.

Fig. 7에서 처럼, *A. phoenicis*의 대조구는 116

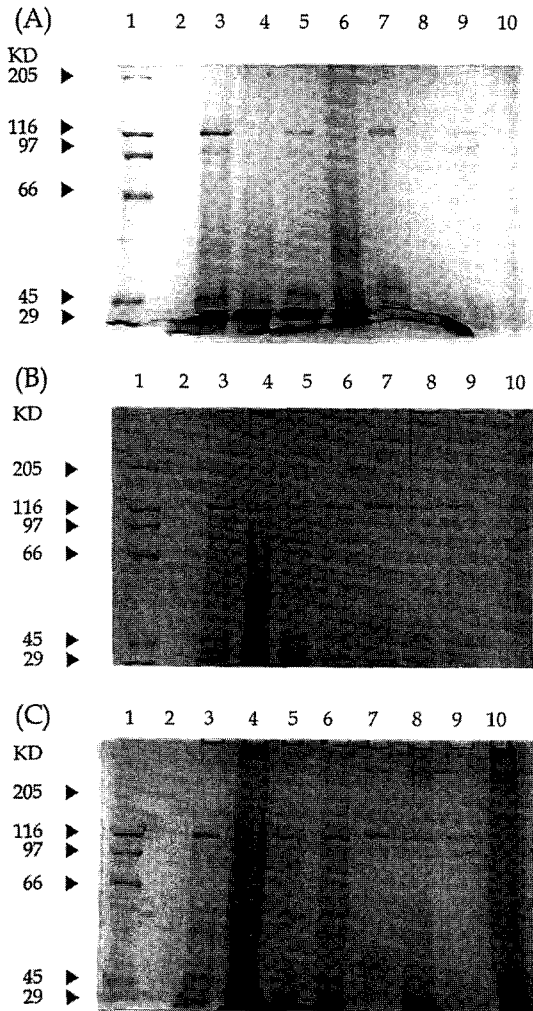


Fig. 8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of protein in plasma membrane of *R. acidus* treated with S.B(A), P.S(B), C.P (C).

Lane 1. is a molecular weight markers; Lane 3, 5, 7, 9 are 12, 24, 30, 36 hours of culture in control; Lane 4, 6, 8, 10 are 12, 24, 30, 36 hours of culture treated with antiseptics.

KD~97 KD 사이의 밴드와 45 KD~29 KD 사이의 밴드가 배양하는 동안 명확히 나타난 것에 비해 S. B 처리구에서는 1일과 2일까지는 밴드가 점점 희미해지다가, 배양 3일째 거의 소실되었고, 배양 5일째 완전히 소실되었다. P.S 처리구는 116 KD~97 KD 사이의 밴드는 배양 초부터 배양말기까지 희미하게 나타났으나, 이것도 역시 대조구에 비해서는

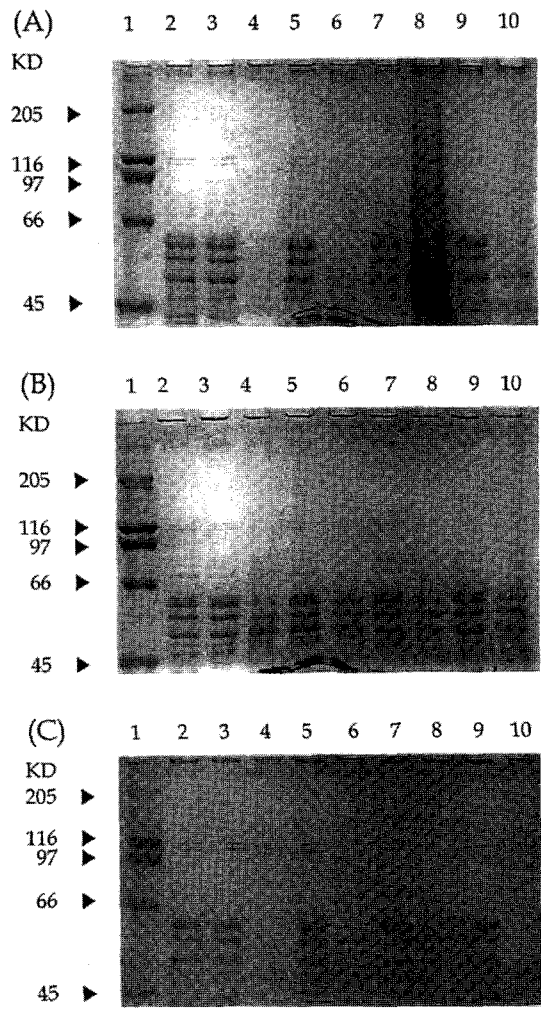


Fig. 9. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of protein in plasma membrane of *C. albicans* treated with S.B(A), P.S(B), C. P.(C).

Lane 1. is a molecular weight markers; Lane 2, 3, 5, 7, 9 are 0, 12, 24, 48, 96 hours of culture in control; Lane 4, 6, 8, 10 are 0, 12, 24, 48, 96 hours of culture treated with antiseptics.

희미한 밴드였다. 45 KD~29 KD 사이의 밴드는 배양기간동안 대조구에 비해 희미하게 관찰되었다. C.P 처리구는 116 KD~97 KD 사이의 밴드가 배양 기간 동안에는 희미하게 나타났으며, 배양 5일째는 116, 97 KD의 모든 밴드는 거의 보이지 않았고, 45 KD~29 KD 사이의 밴드만이 배양기간동안 희미하게 나타났다.

Fig. 8에서 보여주는 바와 같이 *R. acidus*의 대조구에서는 배양 기간 동안 116, 97 KD 및 45 KD~29 KD 사이의 밴드들이 선명하게 나타났다. 그러나, S.B 처리구에서는 116 KD~97 KD 사이의 밴드가 12, 24, 30시간에는 극히 희미하다가 배양 말기인 36시간에 완전히 소실되었으며, 45 KD~29 KD 사이의 밴드 역시 배양중기까지는 희미하게 나타났으나, 36시간에는 완전히 소실되었다. P.S 처리구는 116 KD~97 KD, 45 KD~29 KD 밴드가 12, 24, 30시간에는 대조구에 비해 약간 희미할 뿐 명확한 밴드를 볼 수 있었으나, 36시간에는 완전 소실되었다. C.P 처리구는 116 KD의 밴드가 배양 30시간까지는 대조구와 유사한 양상을 보이다가 배양 말기인 36시간에는 급격히 소실되었으며, 96 KD의 밴드는 대조구에 비해 희미해졌으며, 배양 말기에 완전히 소실되었다. 처리구의 45 KD~29 KD 사이의 밴드는 배양 말기인 36시간에 소실되었다.

식품보존제를 처리한 *C. albicans*의 단백질 패턴은 Fig. 9에 나타내었는데, 대조구에서는 116 KD~97 KD의 밴드가 배양기간동안 볼 수 있었고 66 KD와 45 KD 사이에 많은 밴드들이 나타났다. S.B 처리구는 116 KD가 배양 기간내에 아주 희미하게 나타났으며, 66 KD~45 KD 사이들의 밴드가 대조구에 비해 적은 양의 밴드만이 나타났다. P.S 처리구는 116 KD 밴드가 48시간부터 희미해져서 96시간은 거의 소실, 66 KD와 45 KD 사이의 밴드들이 대조구에 비해 희미하게 나타났음을 볼 수 있었다. C.P 처리구는 116 KD 밴드가 12, 24시간에는 희미해지다가 배양 말기에 들어서면서 거의 소실되었다. 또, 66 KD~45 KD 사이의 밴드는 48시간까지 적은 양이 나타나다가 96시간째 완전히 소실되었다.

위 결과로, 식품보존제를 처리한 배지에서 배양한 진균류의 원형질막의 단백질은 이들 보존제에 의해 상당히 영향을 끼쳐서 다양한 변화를 관찰할 수 있었으며 특히, 116 KD~97 KD 사이의 밴드가 가장 뚜렷한 변화를 나타내었다.

고 찰

식품보존제는 식품에 감염된 미생물 및 곰팡이의

생장을 억제함으로써 보다 오랜 기간동안 식품을 안전하게 보존하여 인간들의 건강한 생활에 도움을 주기 위해 사용되는 필요 불가결의 물질이다.

S.B는 곰팡이, 효모 등의 발육을 저지하는데 식품보존제 중에서 항균범위가 넓은 편에 속하며(지, 1994), P.S는 *A. niger*의 발아 및 catalase 합성과 활성도를 감소시켜 진균류의 생장을 억제시킨다. C.P는 막단백질대사를 저해하고 미생물의 투과성을 방해하기 때문에 영양물질이 세포내로의 흡수가 감소되며, 전자전달계에서 산화적 인산화 과정을 방해하기 때문에 생장이 떨어진다(Biggs 등, 1994).

본 실험에서도 식품보존제를 처리한 배지에서 배양된 *A. phoenicis*, *R. acidus*, *C. albicans*의 생장이 억제되었는데, 이는 식품보존제가 생장에 필요한 효소의 합성과 활성도를 저해함으로써(Griffin, 1994), 물질대사의 기능을 떨어뜨리고 세포막에 분포된 단백질의 물질수송 기능을 저해하여 영양물질의 수송이 이루어지지 않아 생장이 억제되었다고 생각된다.

원형질막을 통해서 모든 영양물질들은 세포내로 들어오며, 대사분비물들은 세포밖으로 방출된다. 그러기 위해서, 막은 모든 외부세포의 자극에 반응을 나타내는데, 물, O₂, CO₂, 그리고 glycerol과 많은 지용성 분자 같은 이온성질을 띠지않는 분자들을 제한없이 투과시킬 수 있다. 그러나, 포도당이나 아미노산과 같은 분자들은 특수한 수송기작이 필요하다. 특히 이온 수송에 관계하는 효소는 막표면에 존재하고, 그 예로는, Na⁺/K⁺ ATPase가 있으며, Ca⁺⁺을 세포밖으로 내보내는 효소인 Ca⁺⁺/ATPase가 있다(Owen 등, 1989).

실험결과에서 나타났듯이, *A. phoenicis* 대조구의 경우는 물질수송 막 단백질 부분인 45 KD~29 KD 사이의 밴드들이 배양 중간기에 희미해지다 배양 말기에 완전히 소실되는 양상이 보였으며, P.S 처리구와 C.P 처리구는 배양기간동안 희미하게 나타났다. 116 KD~97 KD 사이의 밴드들은 ATPase 부분을 나타내는데, 대조구의 경우, 배양기간동안 선명한 밴드의 양상을 볼 수 있었던 것에 비해 S.B 처리구는 배양 3일째부터 소실되었고, P.S 처리구는 배양초기부터 희미해 보이다가 5일째 약간 나타났지만, 이것도 역시 대조구에 비해 희미해졌다. C.P

처리구는 배양 5일째의 밴드가 소실됨을 볼 수 있었다. *R. acidus*의 경우는 대조구에서 배양기간 동안에 45 KD~29 KD사이의 밴드와 116 KD~97 KD사이의 밴드들이 선명하게 나타난 것에 비해, S.B 처리구는 45 KD~29 KD 사이의 밴드가 배양중간기까지는 희미하게 나타났다가 36시간째 완전소실되었고, 116 KD~97 KD 사이의 밴드는 배양말기에 완전 소실되었다. P.S 처리구는 116 KD~97 KD 사이의 밴드에서 배양말기인 36시간에 급격히 소실되었고, 45 KD~29 KD 사이의 밴드도 같은 양상을 보였다. *C. albicans*의 경우는 *A. phoenicis*나 *R. acidus*의 경우와 116 KD~97 KD 사이의 밴드의 변화는 유사한 양상을 나타내었으나, 66 KD~45 KD 사이의 밴드변화가 나타났다. 66 KD~45 KD 사이의 많은 단백질 밴드들이 대조구에서 배양기간동안 선명하게 나타났고, S.B와 P.S처리구의 경우는 배양기간동안 희미하게 나타났으며, C.P처리구의 경우는 배양 말기에 밴드가 거의 소실되었다.

결론적으로, 위와 같이 실험에 사용한 균주들이 45 KD~29 KD 사이의 밴드가 배양말기에서 거의 소실돼 있는데 이들 단백질은 내재성 단백질이다. 물질수송의 기능이 있는 막 단백질인데 분자량이 약 30 KD 정도이고, 55%가 탄수화물로 이루어져 있고 음이온 channel로 구성되어 있는 glycoporin이다. 이들의 소실로 인하여 감광색소인 rhodopsin (M.W-38 KD) 등의 이온전달 체계에 이상이 생겨 세포내로의 정상적인 물질 수송이 일어나지 못하였다.

3가지 균주의 특징적인 변화는 116 KD~97 KD 사이의 배양말기의 밴드소실이었다. 식품보존제 처리에 의한 이러한 변화는 약 $100 \text{ KD} \pm 5 \text{ KD}$ 정도의 내재성막 단백질인 H^+/ATPase 에 이상이 생겨서 유발된 것인데, H^+/ATPase 는 지질층에 깊게 매몰되어 있어서 양성자펌프의 기능을 수행한다. 또한 K^+ 에 의한 효소활성의 자극에 이용되고, H^+ -dependent co-transport system을 유도하여 막전위를 일으키는 기능을 한다. 이렇게 수송 기작에 관여하는 막단백질인 H^+/ATPase 의 막전위에 이상이 생기므로써, ATP를 효과적으로 이용하지 못하고, 양이온과 대사물질을 세포밖으로 방출시키지 못할 뿐만 아니라, 세포내 조직과 결합하여 기능을 돕는

역할에 방해를 받아 생장 및 원형질막 단백질 자체가 억제, 소멸되어 단백질의 함량변화가 나타나는 것으로 생각된다. 특히, *C. albicans*의 66 KD~45 KD 사이의 밴드들이 변화를 나타낸 것은, 내재성 단백질이고 물질수송에 기능을 하는 막 단백질인 HMG-CoA reductase(분자량 97 KD)가 콜레스테롤 생합성이 일어나는 소포체에 분포하여 glycosylation시켜 수용성인 약 50 KD의 분자량의 분자를 원형질막에 방출하여 막 안쪽에 위치시킨다. 이 분자는 glycoporin에 해당되는데(Yeagle, 1987), 66 KD~45 KD 사이의 밴드변화는 처리구에 의해서 glycoporin의 음이온 channel기작에 억제작용이 생겨 세포내로의 음이온 수송에 장애를 가져온 것으로 사료된다.

본 실험에서의 결과에서 관찰되듯이 생장이 억제되고 원형질막 단백질의 함량이 감소되었으며, 단백질의 양상도 다양한 변화를 나타내었다. 이로 인하여 원형질막에 분포된 단백질의 주 기능인 물질수송에 이상이 나타냄으로써, 막 투과성의 변화와 세포내로 수송되는 물질이 달라져 대사작용의 변화가 생겼기 때문에 위와 같은 변화가 생긴 것으로 생각되어지며, 본 실험에서 사용되었던 식품보존제 중에서 가장 넓은 항균작용능을 가진 S.B가 가장 현저하게 억제작용을 하였다. 이러한 결과는 식품보존제의 효과에 대한 이론을 뒷받침 할 수 있는 결과라 하겠다.

적 요

S.B, P.S, C.P 를 각각 처리한 배지에 배양된 진균류(*Aspergillus phoenicis*, *Rhizopus acidus*, *Candida albicans*)에서 원형질막을 분리하였다. 원형질막 단백질의 함량과 특성을 대조구와 비교하였다. *A. phoenicis*의 생장은 S.B 처리구에서 평균 64.0%가 감소하였다. *R. acidus*의 생장은 P.S 처리구에서 평균 69.0%가 감소하였다. 또한 *C. albicans*의 생장도 S.B 처리구에서 평균 59.5%의 감소를 나타내었다. 여러 진균세포 원형질막에 함유된 단백질의 함량은 S.B 처리구에서 평균 41.0%, 41.7%, 59.5%가 각각 억제되었다. *A. phoenicis*의 원형질막 단백질의 변화 양상은 처리구에서는 배양

1일째, 2일째는 대조구와 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 배양 1일째 116 KD~97 KD 밴드는 거의 사라졌고 45 KD~29 KD 밴드는 희미하게 관찰되었다. *R. acidus*는 S.B 처리구에서 배양 중간기부터 116 KD~97 KD 밴드가 소실되었으며, P.S 처리구와 C.P 처리구는 배양초에 소실되기 시작하여 배양 36시간에는 완전히 소실되었다. *C. albicans*에서는 116 KD~97 KD 밴드가 대조구와 비교하여 배양초에 소실되기 시작하였고 66 KD~45 KD 밴드는 배양 96시간에 희미하게 나타났다. 특히 C.P 처리구에서는 배양 96시간에 완전히 소실되었다.

참고문헌

- 지성주, 1994. 식품첨가물, 보존료 및 살균제. 광일문화사. PP 301-337.
- Aaronson, L. R., Hager, K. M., Davenport, J. W., Mandala, S. M., Chang, A., Speicher, D. W. and Slayman, C. W. 1988. Biosynthesis of the plasma membrane H⁺/ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **263**: 14552-14588.
- Anderson, B. and Millbank, J. W. 1996. Protoplast formation and yeast cell-wall structure. *Biochem. J.* **99**: 682-287.
- Biggs, A. R., EL-kholi, M. M. and El-Neshaway, S. M. 1994. Effect of calcium on growth, pectinase activity, and colonization of peach twigs by *Leucostoma personii*. *Plant Dis.* **78**: 886-890.
- Blanchard, J. S. 1984. Buffer for enzymes. *Methods in Enzymology.* **104**: 404-414.
- Bollag, K. M. and Edelstein, S. J. 1991. Protein methods. 2nd edition. pp.95-116.
- Bordier, C. 1981. Phase separation of integral membrane protein in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**: 1604-1607.
- Bowman, B. J. and Slayman, C. W. 1977. Characterization of plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **252**: 3357-3363.
- Bowman, B. J., Blasco, F. and Slayman, C. W. 1981. Purification and characterization of the plasma membrane ATP of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **256**: 12343-12349.
- Bowman, B. J. and Slayman, C. W. 1979. The effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **254**: 2928-2934.
- Bowman, E. J., Bowman, B. J. and Slayman, C. W. 1981. Isolation and characterization of plasma membranes from Wild type *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **256**: 12336-12342.
- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 395-433.
- Chun, S. B., Chung, K. C. and Sak, B. 1986. Protoplast fusion of *Candida Pseudotropicalis*: The conditions for protoplast formation, regeneration and fusion. *Kor. J. Microbiol.* **24**: 243-250.
- Delhez, J. J., Dufour, P., Thines, D. and Goffeau, A. 1977. Comparison of properties of plasma membrane-bound and mitochondria-bound ATPase in the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **79**: 319-328.
- Draughon, F. A., Mobley, D. C., Safley, L. M. and Backus, W. R. 1982. Effect of calcium propionate and sodium diacetate on fungi in silage. *J. Food Sci.* **47**: 1018-1019.
- Dufour, J. P. and Goffeau, A. 1987. Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma membrane *pombe*. *J. Biol. Chem.* **253**: 7026-7032.
- Eisenberg, D. 1984. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 595-623.
- Furth, A. J., Bolton, H., Potter, J. and Priddle, D. 1984. Separating detergent form proteins. *Meth. Enzymol.* **104**: 318-328.
- Grady, J. K., Chasteen, N. D. and Harris, D. C. 1988. Radicals form "Good's" buffers. *Anal. Biochem.* **173**: 111-115.
- Griffin, K. H. 1994. Molecular architecture, Fungal physiology. 2nd edition. pp. 63-76.
- Helenius, A. and Simons, K. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochem. Biophys. Acta.* **415**: 29-79.
- Krzywicki, T. G. 1975. Structural studies of the associations between biological membrane components. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 1-28.
- Lowry, H. N., Rosenbrough, J., Farr, A. J. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Marriott, M. S. 1975. Enzymic activity of purified plasma membranes from the yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *J. Gen. microbiol.* **89**: 349-352.

- Marriott, M. S. 1977. Mannanprotein location and biosynthesis in plasma membranes from the yeast form of *Candida albicans*. *J. Gen. microbiol.* **103**: 51-59.
- Milward, Z. 1976. Further experiments to determine the toxicity of propionic acid to fungi infesting stored grain. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **66**: 319-324.
- Owen, T. J., Earnest, J. P. and McNamee, M. G. 1989. Solubilization and reconstitution of membrane protein; *Biological Membranes* (a practical approach). Oxford University press. pp. 139-177.
- Sofos, J. N. and Busta, F. F. 1981. Antimicrobial activity of sorbate. *J. food Sci.* **44**: 614-622.
- Tsai, W. J., Shao, K. P. and Bullerman, L. B. 1984. Effects of sorbate and propionate on growth and aflatoxin production of sublethally injured *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Sci.* **49**: 86-93.
- Yeagle, P. 1987. Functions of cell membrane. *The membranes of cells*. Academic press. pp. 4-153.