

김치에서 분리한 *Lactobacillus brevis*의 내산성

이갑상 · 신용서 · 이철호*

원광대학교 생명자원과학부, *고려대학교 생명공학원

Acid Tolerance of *Lactobacillus brevis* Isolated from Kimchi

Kap-Sang Lee, Yong-Seo Shin and Cheri-Ho Lee*

College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University

*Graduate School of Biotechnology, Korea University

Abstract

We isolated wild lactic acid bacteria from kimchi and identified as *Lactobacillus brevis* by using API 50 CHL Kit, some morphological and physiological tests. In order to evaluate the acid tolerance of *Lactobacillus brevis*, its survivals rate, glycolysis assay, membrane permeability, and pH profiles of H⁺-ATPase were also determined. When *Lactobacillus brevis* were incubated in Lactobacilli MRS broth adjusted to various levels of pH for 2 hours, the decreases in its population at pH 4.0 and 3.0 were about 2.61 log cycles/mL and 5.89 log cycles/mL, respectively, but there was no decrease at pH 6.0 and 5.0. Glycolysis by *Lactobacillus brevis* had optimal pH about 6.5 and glucose degradation was reduced by 50% at a pH of 5.2. Mg²⁺ release from *Lactobacillus brevis* cells in medium with pHs of 4.0 and 3.0 was 24.3 and 71.2% of totals, respectively. The H⁺-ATPase of *Lactobacillus brevis* showed a maximal activity between pH values of approximately 6.5 to 7.0.

Key words: kimchi, *Lactobacillus brevis*, acid tolerance, glycolysis, H⁺-ATPase

서 론

김치는 우리나라 전통 발효식품으로 이의 품질에 관여하는 주요 미생물인 젖산균이 김치중에 존재하는 발효성당을 이용하여 젖산, 초산 등과 같은 유기산을 생성하여 김치에 신맛과 풍미를 부여할 뿐만 아니라 pH를 저하시켜 바람직하지 못한 균의 증식을 억제한다^(1,4).

유기산에 의한 미생물의 생육억제 기작으로는 세포의 외부환경에 있어 대부분이 약산인 유기산의 함량이 증가하게 되면 비해리 상태의 유기산량이 증가하게 되고 이 비해리 상태의 유기산은 미생물의 세포막을 통해 세포내로 유입된다. 세포내로 유입된 유기산은 다시 해리되어 세포질의 pH를 저하시키고 양자기동력(proton motive force)을 와해시켜 결국 영양분의 수송을 저해하거나 세포내의 여러 가지 대사과정을 저해하여 미생물의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다^(5,6).

이에 대한 방어기작으로 막결합성 H⁺-ATPase (membrane bound H⁺-ATPase)의 활성화 양이 관여한다는 보

고 있다. 즉, 세포내로 유입된 proton은 H⁺-ATPase에 의해 세포외로 방출되어 세포내의 pH 항상성(pH homeostasis)을 유지할 수 있다는 것이다. 이때의 반응은 에너지 의존성으로 알려져 있다^(7,8).

일반적으로 젖산균은 다른 미생물에 비해 생육 가능한 pH의 범위가 넓어 낮은 pH 환경에서도 생육이 가능한 것으로 보고되고 있다⁽⁹⁾. 그러나 전통발효식품으로 우리나라 식문화의 매우 중요한 김치중에 존재하는 젖산균의 내산성에 관한 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 실험에서는 숙성된 김치에서 *Lactobacillus brevis*를 분리, 동정하고, 그 내산성을 평가함으로써 김치의 품질에 관한 연구에 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

김치 젖산균의 분리 및 동정

김치 착즙액을 살균된 saline solution (0.85% NaCl)을 이용하여 적정배수로 희석하고 Lactobacilli MRS agar (Difco, USA)에 도말하여 배양한 후 순수분리 하였다. 분리된 균주는 20% glycerol 용액에 현탁하여

Corresponding author: Kap-Sang Lee, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

deep freezer (-70°C)에 넣어 보관하면서 실험에 사용하였다. 분리균주의 동정은 기본적으로 Bergey's manual of systematic bacteriology에 준하여 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성을 조사하고, API 50 CHL Kit (France)을 이용하여 49개 당 이용성을 조사, 비교함으로써 동정하였다^(10,11).

*Lactobacillus brevis*의 내산성실험

Agar plate에서 회수한 균체를 saline solution으로 세척한 후 생균수가 약 10^8 /mL 수준이 되도록 현탁하였다. 젓산을 이용하여 Lactobacilli MRS broth (Difco, USA)의 pH를 3.0, 4.0, 5.0 및 6.0으로 조정하였다. pH가 조정된 Lactobacilli MRS broth에 균체 현탁액 10%를 접종한 후 25°C로 배양하면서 경시적인 균수의 변화를 pour plate method로 측정하였다⁽¹²⁾.

Glycolysis assay

Bender⁷⁾와 Marquis의 방법을 변형하여 회수된 *Lactobacillus brevis* 균체를 세척한 후에 세포내에 잔존하는 glucose를 소모시키기 위해 1.0 mM MgCl₂가 살균된 potassium phosphate 완충액에서 37°C로 30분간 배양시켰다. 이 배양액을 원심분리(10,000×g, 20 min)하여 균체를 회수하고 세척한 다음 1.0 mM MgCl₂와 13.9 mM glucose가 첨가된 saline solution (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)에 현탁하고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 이 배양액을 즉시 원심분리(10,000×g, 20 min)하여 상정액을 얻었다. Glucose의 정량분석은 glucose assay kit (Sigma Chemical Co., USA)을 사용하여 실시하였다. 이때 glycolysis 수준은 최초 첨가된 glucose 량에 대하여 *Lactobacillus brevis* cell에 의해 대사된 양의 비율로 하였다.

Mg²⁺의 누출

Mg²⁺ 누출 측정은 박과 신⁽¹³⁾의 방법에 준하였다. 즉, MRS broth에서 24시간 배양한 *Lactobacillus brevis* 균체를 배양액으로부터 회수하여 saline solution으로 현탁액을 만든 후, 젓산을 이용하여 pH를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0으로 조정하고 실온에 2시간 방치하였다. 그 후 현탁액은 즉시 원심분리(10,000×g, 20 min)하여 상정액을 취하고 Atomic absorption spectrophotometer (AAS Varian spectra AA 30/40, USA)로 Mg²⁺ 함량을 측정하여 균체로부터 누출된 Mg²⁺ 량으로 하였다. 이때 균체내의 총 Mg²⁺ 함량은 초기 현탁액을 HNO₃: HClO₄ (2:1, v/v)로 내용물이 무색이 될 때까지 분해하여 AAS로 정량하였다. AAS 분석조건은 Lamp current

은 3.5 mA, Wave length은 228.8 nm였으며, Fuel은 acetylene 이었다.

H⁺-ATPase 분리 및 활성측정

Lactobacilli MRS broth에서 24시간 배양한 *Lactobacillus brevis* 균체를 회수, 세척하여 얻었다. 이 균체를 0.4 M sucrose와 2.0 mM MgSO₄이 함유한 75 mM Tris buffer (pH 7.5)에 현탁시키고 20분간 초음파(Danbary Model LC 500, 16 kHz) 처리로 균을 파쇄한 후 원심분리(5,000×g, 20 min, 4°C)하여 파쇄되지 않은 cell debris를 제거하였다. cell debris가 제거된 상정액은 DNase와 RNase (10 µg/mL, Sigma Chemical Co., USA)를 각각 처리하여 실온에서 45분간 방치하였다. 이 액은 다시 원심분리(35,000×g, 20 min, 4°C)하여 cell membrane fraction을 얻고 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 조효소액은 cell membrane fraction을 10% glycerol과 10 mM MgSO₄이 함유된 50 mM Tris buffer(pH 7.0)에 현탁하여 제조하였다. 조효소액 중의 단백질 정량은 BSA (bovine serum albumin, Sigma Chemical Co., USA)를 표준단백질로 이용하여 Lowry 등⁽¹⁴⁾의 방법을 사용하였다.

ATPase 활성은 Sutton⁽¹⁵⁾의 방법에 준한 것으로 100 µL의 조효소용액에 10 mM MgCl₂와 5 mM ATP (Sigma Chemical Co., USA)를 함유한 50 mM Tris maleate buffer (pH 7.5) 900 µL를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 3 mL의 증류수와 1 mL의 3.5 N H₂SO₄ 용액으로 반응을 정지시켰다. 이 반응용액에 3.5% (NH₄)₂MoO₄ 용액을 1 mL 가한 후 2.1% NaHSO₄에 0.7% Developer (Kodak, D-76)를 혼합한 용액 1 mL를 첨가하고 실온에서 20분간 방치하여 spectrophotometer (Varian spectra AA 30/40, USA, 660 nm)로 흡광도를 측정하였다. 이때 ATP에서 유리된 inorganic phosphate의 양은 standard curve로부터 환산하였다. 효소의 단위는 1분당 1 µmole의 inorganic phosphate를 유리시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

결과 및 고찰

김치젓산균의 분리 및 동정

숙성된 김치 착즙액 중 젓산균은 Lactobacilli MRS agar을 이용하여 순수분리 하였으며, 분리된 균의 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같이 gram 양성의 간균으로, catalase와 oxidase가 음성이었으며, arginine으로부터 NH₃을 생성하였고, 생육 최적온도는 25°C 이었으나 45°C에서는 거의 생육하지

Table 1. Morphological and physiological characteristics of strain KS-27 isolated from kimchi

Morphological test	
Shape	rod
Gram stain	+
Physiological test	
production catalase	-
production oxidase	-
NH ₃ from arginine	+
Temperature sensitivity	
25°C	+++
35°C	+
45°C	-

+ : Positive, - : Negative

못하였다. API 50 CHL Kit을 이용한 49개 당 이용성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 즉, API 50 CHL Kit의 identification table의 type strain과 비교할 때 amygdaline 음성 및 5 keto-gluconate 양성인 점에서만 차이가 있었을 뿐 나머지 47개 당 이용성은 *Lactobacillus brevis*와 동일한 것으로 나타났다. 이상의 형태학적, 생리학적 특성과 API 50 CHL Kit을 이용한 당 이용성의 결과를 비교, 검토하여 분리균을 최종적으로 *Lactobacillus brevis*로 동정하였다.

산성조건에서 *Lactobacillus brevis*의 생존율

김치에서 분리한 *Lactobacillus brevis*을 pH 6.0, 5.0, 4.0 및 3.0으로 조정된 Lactobacilli MRS broth에서 2시간 동안 배양하면서 경시적으로 측정된 생균수는 Fig. 1과 같다. 즉 pH 6.0과 5.0에서의 생균수는 배양 2시간 동안 거의 변화가 없이 일정한 균수를 유지하였으나 pH 4.0에서는 배양시간이 경과함에 따라 서서히 감소하여 초기균수 7.63 log cfu/mL에서 배양 2시간 후에는 5.02 log cfu/mL 수준으로 2.61 log cycles/mL 정도의 생균수가 감소한 것으로 나타났다. 또한 pH 3.0에서는 초기균수 7.63 log cfu/mL에서 배양 2시간 후에 1.74 log cfu/mL로, 5.89 log cycles/mL의 많은 수의 균이 사멸한 것으로 나타났다.

Glycolysis에 대한 pH의 영향

pH 변화에 따른 *Lactobacillus brevis*의 glycolysis 수준은 배지내에 첨가된 glucose의 대사량을 측정함으로써 평가되었다(Fig. 2). 즉, *Lactobacillus brevis*의 glycolysis을 위한 최적 pH는 약 6.5정도로, Bender 등¹⁷⁾이 보고한 *Lactobacillus casei*의 최적 pH 6.0 보다는 높고 *Actinomyces viscosus*의 7.0 보다는 낮은 것으로 나타났다. 최적 pH 6.5 보다 높은 pH (pH 8.0 까지)에서의 glycolysis 능력은 비교적 안정적이었으나 낮은

Table 2. Carbohydrate fermentation of strain KS-27 isolated from kimchi

Carbohydrates	Isolated strain	Type strain
Glycerol	-	-
Erythritol	-	-
D-Arabinose	-	-
L-Arabinose	+	+
Ribose	+	+
D-Xylose	+	+
L-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
β-Methyl-xyloside	-	-
Galactose	+	+
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Mannose	+	+
L-Sorbose	-	-
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
α-Methyl-D-mannoside	-	-
α-Methyl-D-glucoside	-	-
N Acetylglucosamine	+	+
Amygdaline	-	+
Arbutine	+	+
Esculine	+	+
Salicine	+	+
Cellobiose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	+
Melibiose	+	+
Saccharose	+	+
Trehalose	+	+
Inuline	-	-
Melezitose	-	-
D-Raffinose	+	+
Amidon	-	-
Glycogene	-	-
Xylitol	-	-
β-Gentiobiose	+	+
D-Turanose	-	-
D-Lyxose	-	-
D-Tagatose	-	-
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Arabitol	-	-
L-Arabitol	-	-
Gluconate	+	+
2 ceto-gluconate	-	-
5 ceto-gluconat	+	-

+ : Fermented, - : Not fermented

pH에서는 민감하여 최적 pH인 6.5(대사된 glucose량; 100%)에서 pH 4.5(대사된 glucose량; 20%) 사이에서는 glycolysis 능력이 급격히 감소하였다. 그러나 pH

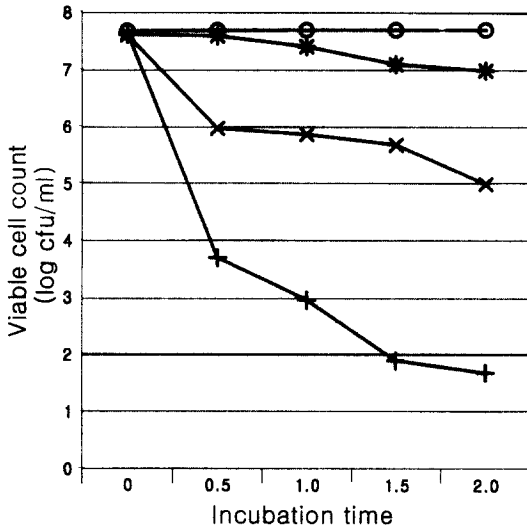


Fig. 1. Survivals of *Lactobacillus brevis* isolated from kimchi under acidic conditions. Each values were the average of triplication +—+: pH 3, ×—×: pH 4, *—*: pH 5, ○—○: pH 6

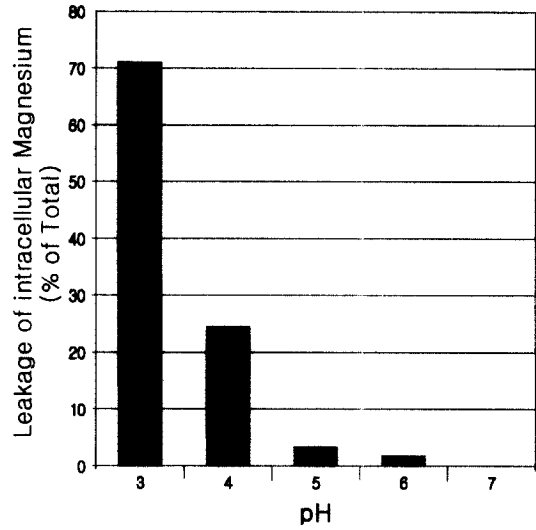


Fig. 3. Effects of acid damage on the magnesium leakage from *Lactobacillus brevis* cells isolated from kimchi. Each values were the average of triplication and indicated by the release of magnesium from cells in suspension at various pHs.

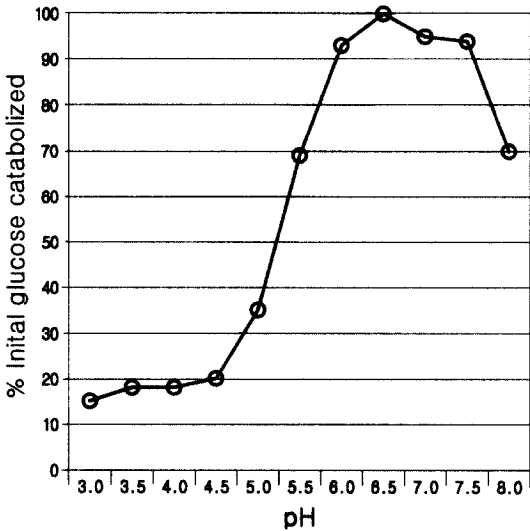


Fig. 2. pH sensitivities of glycolysis by *Lactobacillus brevis* isolated from kimchi. The data presented were average values of triplication and indicated the percentages of the glucose added initially that was catabolized after 2 hours at 37°C

4.5~3.0 사이에서 대사된 glucose 량은 최대값에 대해 15~20% 정도로 낮은량이었으나 변화는 거의 없었다.

세포막 투과성에 대한 pH의 영향

일반적으로 미생물은 산에 노출되게 되면 일차적으로 세포막에 존재하는 active transport protein이 불활

성화 되어 세포막의 선택적인 투과성기작이 손상을 입게되고 이로 인해 세포내의 cytosolic materials 들이 세포외로 누출된다고 알려져 있다⁽¹³⁾. 따라서 산에 의한 *Lactobacillus brevis* cells내에 존재하는 Mg⁺⁺ 누출량의 수준을 측정함으로써 세포막 손상에 미치는 산의 영향을 평가하였다(Fig. 3). pH 7.0에서 *Lactobacillus brevis* cells로부터의 Mg⁺⁺ 누출은 검출되지 않았으나, pH 6.0에서부터는 Mg⁺⁺이 누출되기 시작하여 pH가 감소할수록 그 누출량은 증가하였다. 즉, pH 6.0과 5.0에서는 Mg⁺⁺이 누출되긴 하였으나 극히 적은량이었으며 pH 4.0과 3.0에서는 *Lactobacillus brevis* cells에 함유된 전체 Mg⁺⁺ 량의 각각 24.3%와 71.2%가 누출되었다.

H⁺-ATPase의 pH profiles

세포내로 유입된 proton은 세포막 결합성 H⁺-ATPase 에 의해 세포외로 방출되어 세포내의 pH 항상성을 유지하게 되므로 H⁺-ATPase 활성은 미생물의 내산성과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다^(7,8). *Lactobacillus brevis* cells의 세포막에서 분리한 H⁺-ATPase의 활성에 대한 pH의 영향은 Fig. 4와 같다. 즉, H⁺-ATPase의 최적 pH는 약 6.5~7.0이며 pH가 증가할수록 그 활성은 급격히 감소하여 최대활성값에 대한 백분율이 50%의 활성값을 갖는 pH 값은 약 7.7 정도였다. pH 9.0에서는 그 활성이 거의 소실되는 것으로 나타났으나, pH 값이 낮아질 때는 그 활성의 감소폭이 비교적 완만

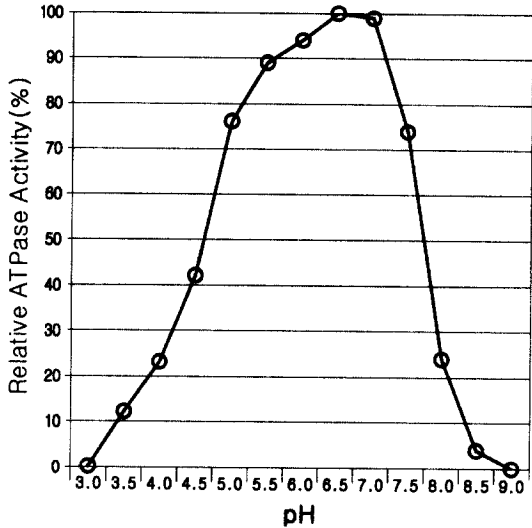


Fig. 4. pH profiles in the membrane-bound ATPase activity of *Lactobacillus brevis* isolated from kimchi. The points showed average values of triplication. 100% activity was defined as the maximum activity seen from the averaged values.

하였고 50%의 활성값을 갖는 pH 값은 약 4.7 정도였으며, pH 3.0에서 H⁺-ATPase 활성은 거의 소실되었다.

요 약

숙성된 김치에서 *Lactobacillus brevis*를 분리, 동정하고 내산성과 그와 관련된 glycolysis assay, 세포막 투과성, H⁺-ATPase 활성을 평가하였다. pH가 4.0과 3.0으로 조정된 *Lactobacilli* MRS broth에서 *Lactobacillus brevis*는 배양 2시간 후 각각 2.61 log cycles/mL 및 5.89 log cycles/mL의 많은 수의 균이 사멸하였으나 pH 6.0과 5.0에서는 배양 2시간 동안 거의 변화가 없었다. *Lactobacillus brevis*의 glycolysis을 위한 최적 pH는 약 6.5였으며 pH 4.5~3.0에서도 최대값에 대해 15~20%의 glycolysis의 수준을 나타내었다. 세포내의 Mg²⁺ 누출은 pH 7.0과 pH 6.0에서는 일어나지 않아 세포막 투과성이 안정적이었으나 pH가 감소할수록 그 누출량이 증가하여 pH 4.0과 pH 3.0에서는 전체 Mg²⁺ 함량 중 각각 24.3%와 71.2%가 세포외로 누출되어 세포막 투과성이 손상되었음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 '96학년도 교육부 학술연구조성비 지원에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Ahn, S.J.: The effect of sorbic acid on the kimchi fermentation and stability of ascorbic acid (in Korean). *Korean J. Soc. Food Sci.*, 1, 18-26 (1985)
- Kim, W.J., Kang, K.O., Kyung, K.H. and Shin, J.I.: Addition of salts and their mixtures for improvement of storage stability of kimchi (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 20, 28-33 (1988)
- Park, K.J. and Woo, S.J.: Effect of Na-acetate, Na-malate and K-sorbate on the pH, acidity and sourness during kimchi fermentation (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 20, 40-44 (1988)
- Kim, S.D.: Effect of pH adjuster on the fermentation of kimchi (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 14, 259-264 (1985)
- Freese, E., Sheu, W. and Galliers, E.: Function of lipophilic acids and antimicrobial food additives. *Natures*, 241, 321-325 (1973)
- Hunter, D.R. and Segel, I.H.: Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: evidence of a proton or charge gradient as the driving force. *J. Bacteriol.*, 113, 1184-1187 (1973)
- Bender, G.R., and Marquis, R.E.: Membrane ATPase and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus plantarium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2120-2124 (1990)
- Booth, I.R.: Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 49, 359-363 (1985)
- McDonald, L.C., Fleming, H.P. and Hassan, H.M.: Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2120-2125 (1990)
- Macfaddin, J.F.: Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed., Williams & Wilkins, USA (1984)
- Roh, H.J., Shin, Y.S., Lee, K.S. and Shin, M.K.: Effect of water extract of green tea on the quality and shelf life of cooked rice (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 417-420 (1996)
- Shin, Y.S., Kim, S.H. and Lee, K.S.: Survivals of lactic acid bacteria and its characteristics under the acidic and anaerobic condition (in Korean). *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 373-377 (1995)
- Park, C.S. and Shin, Y.S.: Effect of *phellodendry cortex* L. on the activity of glucosyltransferase and human gingival cell, growth and membrane permeability of *Streptococcus mutans* JC-2 (in Korean). *J. Korean Academy Dental Health*, 19, 447-456 (1995)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-269 (1951)
- Sutton, S.V.W. and Marquis, R.E.: Membrane-associated and solubilized ATPase of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *J. Dent. Res.*, 66, 1095-1099 (1987)