

## 김치 starter용으로 개량된 내산성 변이주 *Leuconostoc mesenteroides*의 내산성 특성

김영찬 · 정은영 · 김은혜 · 정대현 · 정선호 · 이동희 · 권태종 · 강상모\*  
건국대학교 미생물공학과

**Properties of Acid Tolerance of Acid-Resistant Mutant *Leuconostoc mesenteroides* Which Was Improved as Kimchi Starter.** Kim, Young-Chan, Eun-Yung Jung, Eun-Hae Kim, Dai-Hyun Jung, Seun-Ho Jung, Dong-Heui Yi, Tae-Jong Kwon, and Sang-Mo Kang\*. Department of Microbiological Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea - To investigate the increased acid tolerance of a acid-resistant mutant *Leuconostoc mesenteroides* M-100 improved as a kimchi starter, proton permeability, ATPase activity, glycolysis activity,  $Mg^{2+}$  releasement, and membrane fatty acid composition were studied and compared with its wild type *Leuconostoc mesenteroides* Mw. In the proton permeability experiment, the maximum values of the average half time ( $t_{1/2}$ ) of pH equilibration through the cell membrane of the Mw and the M-100 were about 8.6 min and 9.2 min in 150 mM KCl solution, respectively. In the 3% NaCl solution, the  $t_{1/2}$  values of the Mw and the M-100 were 6min and 8.6 min, respectively. The values and pHs of maximal specific activities of ATPase originated from the Mw and the M-100 were 0.6U at pH 5.5 and 0.8U at pH 5.5, respectively. The result of pH dependence of glycolysis showed that the M-100 had higher activities than that of Mw except at pH 5.0. The releases of magnesium from the Mw and the M-100 were observed about 36.5% and 13% at pH 4.0 after 2 hours, respectively. The results of comparison of membrane fatty acid composition of the Mw with the M-100 showed that  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{18:1}$ , and  $C_{19:0cyclo}$  were major different fatty acids between two strains and the content of  $C_{18:1}$  and  $C_{19:0cyclo}$  were 23.4%, 10.2% in the Mw and 15.1%, 12.2% in the M-100. These results indicated that acid tolerance of the M-100 was significantly improved in comparison with its wild type Mw.

**Key words:** *Leuconostoc mesenteroides*, mutation, ATPase, proton permeability, glycolysis, fatty acid, magnesium releasement

전보[15]에서 김치의 산패를 지연시키고, 관능 향상을 위한 방법의 하나로 HCl을 기준으로 10°C에서 pH 4.2 이상에서만 자라는 *Leuconostoc mesenteroides*를 pH 3.8에서 자랄 수 있도록한 내산성 변이주 *Leuconostoc mesenteroides* M-10을 김치에 starter로 첨가하여 김치 산패지연과 관능향상에 유의적인 효과가 있음을 발표하였다. 나아가 본 연구실에서는 김치 starter로써 더욱 적합한 균주의 개량을 위하여 유기산 혼합 용액(lactic acid:acetic acid=1:2)으로 pH 3.8로 조정된 MRS 배지에서도 증식하는 내산성 변이주 *Leuconostoc mesenteroides* M-100을 김치에 starter로 첨가하여 더욱 좋은 결과를 얻었다.

이러한 내산성 변이균주의 김치 첨가 효과는 변이균주가 갖는 야생균주보다 강한 내산성, 그리고 이에 기인된 낮은 pH에서의 starter 균주의 높은 생존능에 그 주된 원인이 있는 것으로 생각된다.

일반적으로 알려진 젖산균의 내산성을 결정하는 요인

들로서 세포막의 수소 이온 투과도[3, 4, 7, 25],  $H^+$ -ATPase 활성[1, 3, 4, 7, 11, 12, 25, 28], 해당 작용의 pH 의존성[3, 4],  $Mg^{++}$  해리도[4], 원형질막의 지방산 조성[2, 10, 25, 29, 30] 등이 보고되어 있다.

수소 이온 투과도는 세포질막 자체의 물리적 성질, 그와 연관되는 지방산 조성의 변화 및  $H^+$ -ATPase를 비롯한 세포질막에 발현되는 다양한 효소의 양과 활성 등의 통합적인 것으로 산성 환경에서 순 수소 이온 투과도가 낮을수록 내산성이다.

$H^+$ -ATPase는 세포질을 환경 pH보다 높게 유지하는데 주된 작용을 하는 막단백질로, 발효 과정중에 생성되는 유기산에 의해 외부 pH가 낮아지면 세포 내부로 수소 이온의 유입이 늘어나게 되는데, 이때  $H^+$ -ATPase의 활성이 높을수록 수소 이온을 효과적으로 방출하여 세포 내부의 pH를 유지함으로써 산에 대한 내성을 나타내는 것으로 보고 있다. 또한 환경상의 pH가 낮아질수록 젖산 등 생성된 유기산이 uncoupler로 작용하여 세포내·외의  $\Delta pH$ 를 감소시키므로서 proton motive force가 낮아지며, 세포 내부의 pH가 일정 수준 이하로 저하되면  $H^+$ -

\*Corresponding author  
Tel. 82-2-450-3524, Fax. 82-2-450-3517

ATPase의 활성이 상실되므로 산성 pH 영역에서 높은 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성을 갖는 균주는 내산성 균주라고 할 수 있다. Bender 등[3]은 내산성이 강한 *Lactobacillus casei*와 이보다 내산성이 약한 *Actinomyces viscosus*의 수소 이온 투과도, H<sup>+</sup>-ATPase 활성 및 해당 작용을 비교한 결과, 산성 pH영역에서 높은 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성을 갖으며, 높은 해당 작용의 활성을 유지하는 생리적인 특성을 내산성에 관한 중요한 인자로 제시하였다.

에너지 대사의 가장 기초가 되는 해당 작용은 산에 대한 가장 예민한 대사과정으로 해당 작용의 저해는 가장 중요한 성장 제한요소가 된다. 즉, 균주가 낮은 pH 영역에서도 해당 작용이 활발히 이루어지는 경우에는 내산성을 보유하는 것으로 설명할 수 있다.

그리고 Bender 등[3]은 산성 환경에서 균주의 세포막이 손상되면 세포의 무기질이 유출되는데, 특히 Mg<sup>2+</sup>의 경우 세포막의 손상 정도가 클수록 해리량이 많아 이를 측정 비교하므로써 내산성 균주의 특성을 보고하였다.

한편 원형질막의 지방산 조성을 분석하므로써 대상 균주가 내산성 특성을 갖고 있는지 알 수 있는데, Aldo 등[2]은 내산성이 강한 *Lac. casei*, *Lac. plantarum*, *Lac. acidophilus* 등 젖산균의 지방산을 분석한 결과 C<sub>19:0 cyclo</sub>의 함량이 35-39%로 높았던 반면, 이들 균주보다 내산성이 약한 *Lac. bulgaricus*는 그 함량이 13%로 매우 낮음을 보고하였으며, Sim 등[25]은 *Lac. casei*를 대상으로 배양조건에 따른 내산성의 변화와 원형질막의 지방산 조성간의 관계를 조사한 결과 내산성이 증가할수록 C<sub>18:1</sub>은 감소되는 반면 C<sub>19:0 cyclo</sub>는 증가되고, C<sub>19:0 cyclo</sub>가 증가될수록 물질의 투과성이 감소함을 보고하였다.

따라서 본 실험에서는 김치의 starter용으로 개량된 내산성 변이주 *Leu. mesenteroides* M-100의 증가된 내산성에 관한 생리적인 특성들을 그것의 야생균주와 비교하여 내산성 특성 인자인 수소 이온 투과도, H<sup>+</sup>-ATPase 활성, 해당 작용, Mg<sup>2+</sup> 해리도 및 세포막 지방산 조성의 차이를 밝혀 본 균주를 starter로 첨가한 김치에 있어서 발효말기인 산도가 높은 환경에서까지 본 변이균이 생육할 수 있는 원인을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 수소 이온 투과도

야생균주 Mw와 내산성 변이균주 *Leu. mesenteroides* M-100을 MHHD배지[19] (trypticase peptone 10, caseamino acid 3, phyton peptone 1.5, yeast extract 1, Tween 80 1, 10 mM MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, glucose 21 g/L, pH 7.0)에서 30℃, 15시간 2회 전배양한 후, 원심분리(8,000 rpm, 4℃, 10 min.)하였다. 균체 농도를 10 mg (dry weight)/mL로 조정된 후 다시 30℃, 15시간 본배

양하여, Bender 등[3]의 방법을 변형하여, 수소 이온 투과도를 측정하였다. 세포내외간에 수소 이온의 cell내 유입에 따른 pH의 경시적인 변화(ΔpH)는 1분 간격으로 10분동안 측정하였으며, 이때 최저로 떨어지는 pH를 pH<sub>α</sub>라고 한 다음, 다시 5%(v/v)의 butanol을 0.15 mL 첨가하여 세포막을 파괴한 후, 외부 환경과의 평형을 이루는 pH를 pH<sub>ω</sub>로 하였다. pH<sub>α</sub>와 pH<sub>ω</sub>의 차이의 평균 pH에 도달하는데 걸리는 시간을 t<sub>1/2</sub>로 정의하였다.

그리고 김치에는 식염이 약 3% 정도 함유되어 있으므로 Na<sup>+</sup> 존재시 수소 이온 투과도의 차이를 알아보기 위해 KCl 용액 대신 NaCl 3%로 조정된 인산 완충용액을 사용하여 상기와 동일한 방법으로 수소 이온 투과도를 측정하여 비교하였다.

### H<sup>+</sup>-ATPase 활성

조효소액의 제조 조효소액의 제조[3, 5, 6, 21]는 다음과 같이 하였다. 균주를 대수 증식기 후반까지 배양하고 원심분리하여 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1mM dithiothreitol 그리고 0.1 mM diisopropylfluorophosphate가 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척하였다. 세척된 균체(wet weight 5.0 g)를 40 mM 6-aminohexanate, 6 mM β-aminobenzoamide, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol 그리고 0.1 mM diisopropylfluorophosphate가 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 0.25 g/mL 수준으로 현탁하여 hard glass tube에 넣고 sonication(70% pulse, 30 min, in ice)하였다. DNase I (Sigma), RNase A(Sigma)를 10 μg/mL첨가하고 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 균체 파쇄액을 원심분리(15,000×g, 20 min)하여 파쇄되지 않은 균체와 침전물을 분리하고 상등액을 초원심분리(200,000×g, 30 min)하여 ATPase를 함유하는 membrane vesicle을 획득하였다. 획득된 침전물을 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol 그리고 0.1 mM diisopropylfluorophosphate가 함유된 50 mM maleic acid, Tris, NaOH buffer(pH 7.0)와 small hand homogenizer를 이용하여 재차 세척한 후, 다시 초원심분리(200,000×g, 30 min)하였다. 획득된 침전물을 가능한 소량의 동일 buffer로 재현탁하여 plastic tube에 나누어 액체 질소에서 실험전까지 -20℃에서 보관하였다.

활성측정 H<sup>+</sup>-ATPase 활성은 Fiske-Subbarow의 방법[3]에 따라 측정하였으며, 그 과정은 상기와 같이 조제된 조효소액 100 μL에 10 mM MgSO<sub>4</sub>와 2 mM ATP (Sigma)를 함유한 pH 3.5, 4.0, 4.2, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5로 조정된 완충액 900 μL를 각각 첨가하고 30℃에서 10분 동안 효소반응시켰다. 여기에 3 mL의 증류수와 1 mL의 3.5N 황산용액을 가하여 효소반응을 종결시켰다.

효소반응이 완료된 용액에 3.5% ammonium molybdate 용액 1 mL 가한 후 2.1% NaHSO<sub>3</sub>에 0.7% Developer(Kodak, D-76)를 혼합한 용액 1 mL을 첨가하였다. 이것을 실온에서 20분간 반응시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하고, standard curve로부터 ATPase에 의해 유리된 inorganic phosphate의 양을 환산하였다. 효소의 단위는 1분 동안 1 μmol의 inorganic phosphate를 유리시키는 효소의 양을 다음의 단백질 정량법에 따라 단위중량으로 환산하여 1 unit로 하였다.

**Protein 정량방법** Protein의 정량은 정확한 막단백질의 함량 측정이 가능하도록 변형된 Lowry방법[17, 32]에 따라 측정하였다.

#### 해당 작용

Bender 등의 방법[4]을 이용한 것으로 대수증식기 후 반까지 균체를 배양하고, 이를 원심분리하여(6,000 rpm, 4°C, 20 min.) 균체를 회수하였다. 다음 deionized water로 세척한 후 1 mM MgCl<sub>2</sub>를 함유한 인산완충용액(pH 7.2, 20 mM)에 균체를 2 mg/mL(dry weight) 수준으로 현탁하여 시험관에 1 mL씩 분주하였다. 이를 30°C에서 30분간 배양하고 원심분리한 후(10,000 rpm, 4°C, 3 min.), 세포를 원하는 pH의 wide range buffer(glucose를 33.3 mM 함유한 citrate/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer)에 현탁시킨 다음, 다시 30°C에서 2시간 배양하고 원심분리 후 상등액을 glucose oxidase가 포함된 glucose 정량용 kit(영동제약)로 glucose 함량을 측정하였다. 즉, sample 20 μL에 발색시약 3 mL을 첨가, 혼합한 후 37°C에서 18분간 반응시켜 505 nm에서 흡광도를 측정하여 표준액의 흡광도를 기준으로하여 각 sample의 glucose 함량을 정량하였다.

#### Mg<sup>++</sup> 해리도

Mg<sup>++</sup> 해리도 측정을 위한 균체 시료 준비는 Bender 등의 방법[4]에 따라 실시하였고, ICP(Inductively coupled plasma)로 측정하였다.

**균체의 총 Mg<sup>++</sup> 함량** 건조 균체 단위 중량당 Mg<sup>++</sup> 함량 측정을 위하여 균주 현탁액 5 mL을 취하여 110°C에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 중량을 측정하고, 550-660°C의 온도에서 6시간 회화시켰다. 이 회분을 방냉 후 6N HCl 10 mL을 첨가하여 100°C에서 24시간 분해시킨 후 ICP로 측정하였다.

**pH profile에 따른 균체 Mg<sup>++</sup> 해리도** 균체 현탁액 10mL을 HCl을 사용하여 각각 pH 4, 5, 6 으로 조절하고, 30분, 1시간, 2시간 경과한 후 1 mL을 취하여 원심분리한 후 상등액으로 유출된 Mg<sup>++</sup>을 ICP로 측정하였다. Mg<sup>++</sup> 함량 측정을 위한 ICP 측정 조건은 instrument는 ICP Emission spectro analyzer, gas는 argon(purity 99.999%), wavelength spectrum(nm)은 280.270, line

gas pressure(psi)는 70, coolant gas flow rate(L/min)는 12, blizer sample gas pressure(psi)는 40, carrier gas flow rate(L/m)는 0.4, pump rate(mL/min.)는 1.5 그리고 integration period(sec) 10으로 하였다.

#### 세포막의 지방산 조성

세포막의 지방산 조성은 Jung의 방법[14]에 따라 실시하였다. 즉, 각 균주를 대수증식기 말기까지 증식시킨 후 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 10 min)하고 균체를 증류수로 2회 세척하였다. 분리된 균체의 무게(wet weight)를 측정하고, teflon 피막의 밀봉 유리병에 균체 1-5 mL과 methanol/HCl 5% 용액 1.5 mL, chloroform 0.3 mL을 첨가하여 72°C, 건조 오븐에서 24시간 메탄올 가수 분해하면서 8시간 간격으로 0.3 mL chloroform을 첨가하고, 5분간 초음파 파쇄하였다. 그 후 질소 가스로 농축시킨 다음 다시 chloroform을 첨가하고, glass wool을 통과시키는 과정을 3회 가량 반복하면서 불순물을 제거하고 지질층을 추출하였다. 각 지방산의 동정에 사용된 표준물질은 Sigma(#189-199)를 이용하였다.

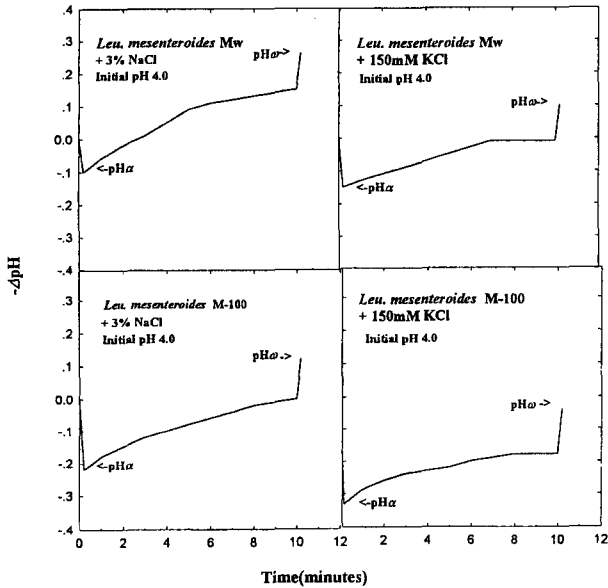
분석은 Shimazu Corp. GC-8A를 사용하였으며, gas chromatography 측정 조건을 보면, detector는 flame ionization detector, column은 DB1 capillary column, 지지체는 chromosorb WAW, DMCS 100/120, 충전 기질은 15% DEGS인 것을 사용하였다. 시료 주입 온도는 270°C, 검출기 온도는 300°C로 하였으며, 온도 구배 분석을 위한 프로그램은 초기 온도 50°C, 초기 시간 0 min, 최종 온도 ① 100°C ② 150°C ③ 300°C, 최종 시간 ① 0 min. ② 0 min. ③ 20 min. 그리고 온도 구배를 위한 온도 상승 속도는 ① 10°C/min. ② 3°C/min. ③ 4°C/min. 으로 하였다. Carrier gas는 N<sub>2</sub>를, 가스 흐름 속도는 200 kPa로 하였다.

## 결과 및 고찰

#### 수소 이온 투과도

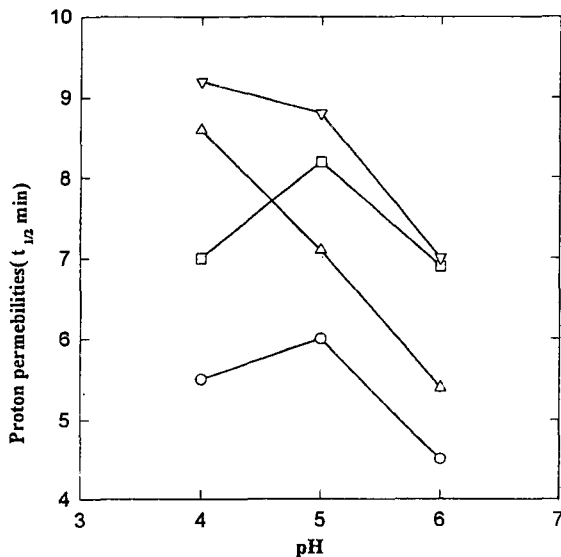
수소 이온 투과 정도는  $t_{1/2}$  값으로 나타내는데,  $t_{1/2}$  값이 큰 것은 수소 이온에 대한 투과가 적은 상태를,  $t_{1/2}$  값이 작은 것은 수소 이온에 대한 투과가 큰 상태를 나타낸다[3].

*Leu. mesenteroides*의 야생균주 Mw와 변이균주 M-100간의 수소 이온 투과도를 pH 4.0에서 측정할 결과는 Fig. 1과 같다. Acid pulse를 주었을 때 세포 외부의 수소 이온이 세포내로 유입되면서 pH의 변화가 있게 되는데, 150 mM KCl에 현탁시켜 실험한 경우, 야생균주 Mw와 변이균주 M-100의  $t_{1/2}$  값은 초기 pH가 4일 때 각각 7.0 분과 9.2분이었으며, 3% NaCl로 현탁시킨 경우는 pH 4에서 야생균주 Mw, 변이균주 M-100이 각각 5.5분, 8.6분으로 각각 나타나 야생균주 Mw, 변이균주 M-100 모



**Fig. 1.** Proton uptakes by the Mw and M-100 after an acid pulse.

두 150 mM KCl에 현탁시킨 것보다 3% NaCl로 현탁시켰을 때 수소 이온의 투과도가 높아 상대적으로  $t_{1/2}$  값이 낮게 나타났다. Tempest 등[27]의 보고에 의하면  $\text{Na}^+$  첨가는 수소 이온의 유출을 빨리 진행시켜 세포내의 pH를 높여준다고 하였다. 본 실험에서도  $\text{Na}^+$ 로 인해 높은 수소 이온 투과도를 보였다. 그러나 초기 pH가 높아질수



**Fig. 2.** Proton permeabilities of Mw and M-100 strains as a function of environmental pH value.

Symbols:  $\circ$ , *Leu. mesenteroides* Mw+3% NaCl solution;  
 $\square$ , *Leu. mesenteroides* Mw+150 mM KCl solution;  
 $\triangle$ , *Leu. mesenteroides* M-100+3% NaCl solution;  
 $\nabla$ , *Leu. mesenteroides* M-100+150 mM KCl solution.

록  $\text{Na}^+$  첨가에 대한 영향은 작아졌다.

각 pH에서의  $t_{1/2}$  최대값의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 150 mM KCl에 현탁시킨 경우, 야생균주 Mw는 pH 5에서 8.2분 이었으나, 변이균주 M-100은 pH 4에서 9.2분 이었고, 3% NaCl로 현탁시켰을 때  $t_{1/2}$  최대값은 야생균주 Mw는 pH 5에서 6분으로, 변이균주 M-100은 pH 4에서 8.6분으로 나타났다. 따라서  $t_{1/2}$  최대값은 150 mM KCl에 현탁시킨 경우와 3% NaCl로 현탁시킨 경우 모두 야생균주 Mw는 pH 5일 때, 변이균주 M-100은 pH 4일 때로 나타났다. 이와 같이 야생균주 Mw와 변이균주 M-100간의  $t_{1/2}$  최대값을 나타내는 pH는 각각 pH 4, pH 5로 차이를 보였다. 본 특성 변화로 인해 내산성 변이균주 M-100을 김치 첨가시 발효말기인 pH 4 부근에서 야생균주 Mw보다 높은 생육활성을 유지할 수 있었던 것이 이러한 수소 이온 투과도가 작아져 나타난 것으로 생각된다.

Kobayashi[12]는 일반적으로 내산성 균주의 경우, 산성 pH 영역에서 수소 이온에 대한 투과도가 낮은 성질을 갖고 있으며, 이런 낮은 투과도는 세포막의 물리적인 성질에 기인되는 것일 뿐만 아니라, 세포질막에 결합되어 있는 수소 이온-전위성 ATPase의 발현 양 및 그것의 비활성(specific activity) 등의 특성과 연관되는 것이라고 하였다.

따라서 변이균주 M-100도 야생균주 Mw에 비해 산성 pH 영역에서 수소 이온 투과도가 적은 것으로 나타나 변이균주 M-100이 야생균주 Mw에 비해 증가된 내산성을 획득하였음을 확인할 수 있었다.

**ATPase 활성**

$\text{H}^+$ -ATPase의 활성이 내산성에 관여하는 기작은 발효 과정에서 생성되는 유기산에 의해 외부 pH가 낮아지면 세포 내부로 수소 이온의 유입이 늘어나게 되는데, 이때  $\text{H}^+$ -ATPase의 활성이 높을수록 수소 이온을 효과적으로 방출하여 세포 내부의 pH를 유지함으로써 산에 대한 내성을 주는 것으로 알려져 있다[9].

Fig. 3에서 볼 수 있듯이 *Leu. mesenteroides*의 야생균주 Mw와 변이균주 M-100의  $\text{H}^+$ -ATPase 활성은 buffer pH range를 pH 7.5, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.2, 4.0, 및 3.5로 조정하였을 때, pH 5.5에서 비활성이 가장 높게 나타났다. 야생균주 Mw와 변이균주 M-100간의 최고 활성은 야생균주 Mw가 0.6 unit/mg protein, 변이균주 M-100은 0.8 unit/mg protein으로 변이균주가 야생균주보다  $\text{H}^+$ -ATPase 활성이 높았으며, 더욱이 pH가 내려갈수록 변이균주가 야생균주보다 활성이 높은 것을 알 수 있었다. 이와 같이 변이균주 M-100이 증가된 내산성을 갖는 것이  $\text{H}^+$ -ATPase 활성 실험에서도 확인되었다.

Bender 등[4]은 수소 이온 투과도와  $\text{H}^+$ -ATPase 활성

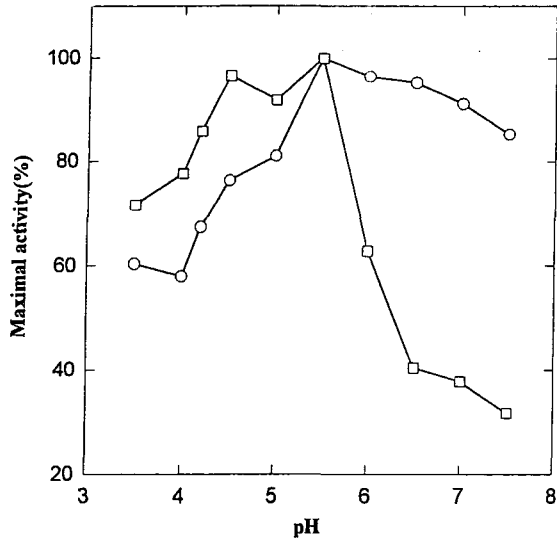


Fig. 3. Activity-pH profiles for ATPases of membranes isolated from cells of Mw and M-100 of *Leuconostoc mesenteroides*. The maximal activities of the membrane ATPase were 0.6 and 0.8 U/mg of membrane protein of Mw and M-100, respectively.

Symbols: ○—, *Leuconostoc mesenteroides* Mw; □—, *Leuconostoc mesenteroides* M-100.

을 비교하였는데, 일반적으로 ATPase의 활성이 가장 높을 때의 pH는 수소 이온 투과도가 가장 낮을 때의 pH보다 1 unit 정도 높으며, 이 차이는 ATPase가 세포막의 세포질 표면에 위치하고 있어, 세포가 산성환경에 놓여 있을 때 세포질은 상대적으로 알칼리 상태를 유지하면서 세포막 내외의 ΔpH를 유지할 수 있기 때문이라고 하였다.

본 실험에서도 *Leu. mesenteroides*의  $t_{1/2max}$ 는 야생균주 Mw가 pH 5일 때 변이균주 M-100은 pH 4.0일 때였는데, H<sup>+</sup>-ATPase 활성의 최고 활성은 모두 pH 5.5로 나타나 Bender 등[4]의 보고와 거의 일치하였다.

#### 해당 작용 활성

Na-citrate buffer를 사용하여 pH profile에 따른 해당 작용 활성을 측정한 결과는 Fig 4와 같다. 해당 작용 활성이 최대 이루어지는 pH는 *Leu. mesenteroides*의 야생균주 Mw는 pH 5일 때, 변이균주 M-100은 pH 6에서였다. 변이균주의 해당 작용의 최적 pH가 야생균주보다 낮지는 않았으나, pH 5에서를 제외한 전체적으로 측정 pH 범위내에서 야생균주 Mw에 비해 변이균주 M-100이 증대된 해당 작용 활성을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로도 M-100이 Mw보다 더 내산성인 것을 알 수 있었다. 그리고 변이균주들의 높은 해당 작용 활성은 Bender 등[4]이 내산성 균주가 낮은 pH 환경에서도 높은 해당 작용을 유지할 수 있는 이유는 해당 작용에 관여되는 효소 그 자체가 산에 저항성이기 보다는 내산성이 증가된

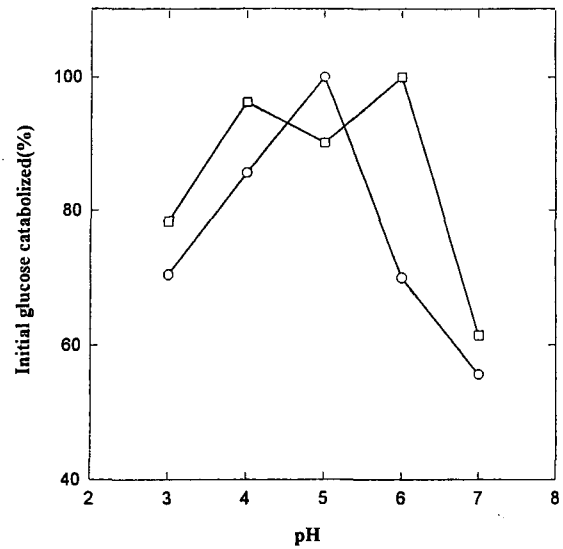


Fig. 4. Activity-pH profiles of cells for Mw and M-100 of *Leuconostoc mesenteroides*. The data presented indicated the percentage of the glucose added initially that was catabolized after 2 hours at 30 °C.

Symbols: ○—, *Leuconostoc mesenteroides* Mw; □—, *Leuconostoc mesenteroides* M-100.

환경에서 보다 높게 유지되는 세포질내의 pH와 연관되어 있다고 제안하였듯이, 변이균주가 야생균주에 비해서 세포질내의 pH를 높게 유지할 수 있어 내산성이 증가된다는 것을 알 수 있었다.

그러나 *Leu. mesenteroides* 변이균주 M-100의 해당 작용 최적 pH가 야생균주보다 낮으리라 예상했으나 야생균주의 최적 pH가 더 낮은 수치를 보였다. 이러한 결과는 젖산균의 증식에 필요한 ATP 생성이 주로 해당 작용 경로에 의해 이루어지고 있으나, 극한 산성환경에서 부가적인 대사작용을 수행하는데, 일반적으로 arginine deaminase 대사 경로가 있음이 보고되었고[4], L-malate를 lactate와 CO<sub>2</sub>로 전환하는 malolactic 발효[8, 22, 24]와, citrolactic 발효[13, 26, 31] 및 그외에 부가적인 대사 경로로 에너지를 획득할 수 있다고 알려지고 있는 histidine/histamine 교환반응[20] 등 다양한 인자에 기인하는 것으로 생각된다.

따라서 변이균주의 에너지 획득성 대사에 있어서 증가된 내산성과의 연관성은 이러한 다양한 에너지 형성상 2차 대사 작용들에 대한 인자가 더욱 충분히 고려되어야 하겠다.

#### Mg<sup>++</sup> 해리도

*Leu. mesenteroides*의 야생균주 Mw와 변이균주 M-100의 pH별 Mg<sup>++</sup> 해리도를 측정한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 야생균주 Mw의 경우 pH 4에서 2시간 경과후 Mg<sup>++</sup> 해리도가 36.5%로 최대를 보였으나, 변이균주 M-

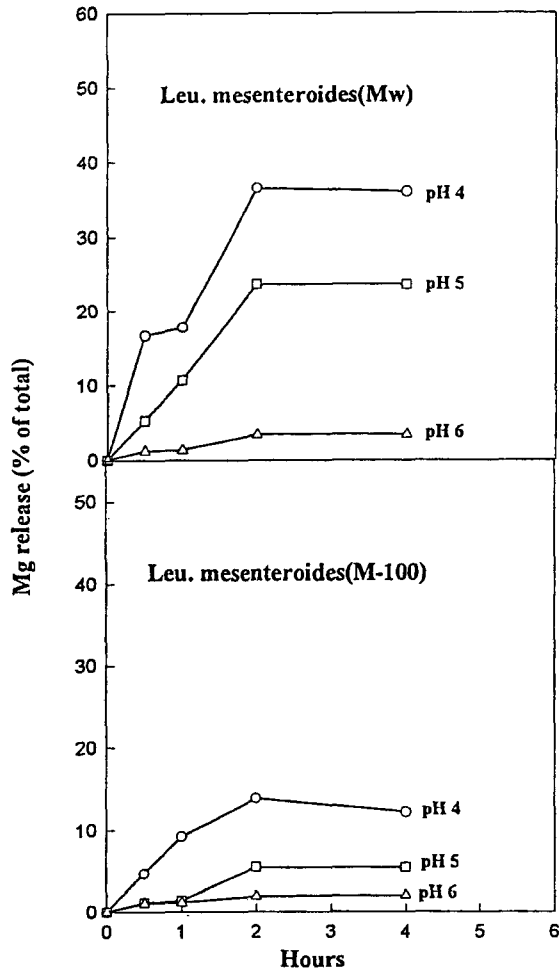


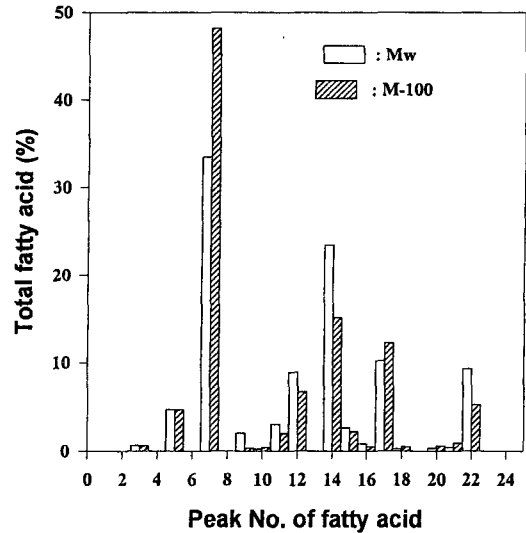
Fig. 5. Percent of Mg released from cell membrane of Mw and M-100 of *Leuconostoc mesenteroides* as affected by pH.

100은 13%로 약 1/3 가량 적게  $Mg^{++}$ 이 유출되었고, 중성에 가까운 pH 6.0에 있어서는 야생균주 Mw, 변이균주 M-100 모두 거의 산 손상(acid damage)을 입지 않는 것을 알 수 있었다.

Bender 등[4]에 의하면 균주의 세포막이 산에 의해 손상(acid damage)을 받게 되면 세포중의 무기질이 세포 밖으로 유출되는데, 무기질중  $Mg^{++}$ 이 가장 민감한 지표로서 균주가 내산성 일수록  $Mg^{++}$  해리도가 낮아지게 된다고 보고하였다.

본 실험에서도 모든 실험 균주가 pH가 낮고, 시간이 경과할수록  $Mg^{++}$  해리도가 높아짐을 보였으며, 각 균주간에 있어서 동일한 pH, 동일 경과 시간에 있어서는 변이균주 M-100이 야생균주 Mw와 비교해 볼 때  $Mg^{++}$  해리도가 상대적으로 낮아 내산성의 특성을 갖는 것을 알 수 있었다.

세포막의 지방산 조성



Ref. of Peak NO.														Un-					
C80	C80	C100	C110	C120	C130	C140	C150	C161	C160	C170	C181	C180	C191	C190	C200	C221	C220	C241	Un-
NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	NO.7	NO.8	NO.9	NO.10	NO.11	NO.12	NO.13	NO.14	NO.15	NO.16	NO.17	NO.18	NO.19	NO.20	NO.21	NO.22
																			known

Fig. 6. Fatty acids compositions of lipid from Mw and M-100 of *Leu. mesenteroides*.

*Leu. mesenteroides*의 야생균주 Mw와 변이균주 M-100의 세포막 지방산 조성은 Fig. 6과 Table 1과 같다. Fig. 6에서 보여주듯이  $C_{12}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{17}$ ,  $C_{18:1}$ ,  $C_{19:0,cyclo}$  등의 지방산이 *Leu. mesenteroides*의 세포막에서 주로 검출되었다.  $C_{12}$ 는 야생균주 Mw가 33.5%, 변이균주 M-100은 48.2%로 변이균주 M-100에서 약 1.4배 높게 함유되었으며,  $C_{14}$ 는 야생균주 Mw가 2.0%, 변이균주 M-100은 0.3%로서, 변이균주 M-100이 약 1/7 정도 적게 함유되었다.  $C_{18:1}$ 은 야생균주 Mw가 23.4%, 변이균주 M-100이 15.1%로서 적은 함량을 보인 반면,  $C_{19:0,cyclo}$ 는 변이균주 M-100이 12.2%로, 야생균주 Mw이 10.2%에 비해 증가되었다.

Kates[16]는 세포막의 지방산 조성이 배지종류, 배양 온도 등의 배양조건과 배양시간에 따라 큰 차이가 있었다고 보고하였으며, Veerkamp[30]와 Sim[25]에 의하면  $C_{18:1}$ 의 감소와  $C_{19:0,cyclo}$ 의 증가는 내산성 증가와 관련이 있다고 하였는데, 내산성 변이균주 M-100의 결과와 잘 일치하였다.

이러한 세포질막의 물리적인 지방산 조성의 변화는 그 자체의 물질 투과성과 연관될 뿐만 아니라 내산성에 연관되는 각종 막단백질의 활성화에 영향을 끼칠 수 있다는 생각되나, 아직까지는 명확한 설명이 되지 않는 실정므로, 특정 지방산 조성의 liposome 혹은 특정 막단백질을 함유하는 proteoliposome 등을 통한 연구가 계속되어야 하겠다.

이러한 연구 결과들을 종합하여 볼 때, 야생균주 Mw

에 비해 변이균주 M-100이 증가된 내산성을 획득하였음을 확인할 수 있었으며, 이러한 증가된 내산성은 김치에 starter로 첨가하여 발효시 *Lactobacillus plantarum*과의 경쟁적 생육에 견딜 수 있는 내성을 주었을 것으로 생각된다.

## 요 약

김치 starter로 개량된 내산성 변이균주 M-100이 획득한 증가된 내산성에 관한 생리적 성질을 규명하기 위하여 수소 이온 투과도, ATPase 활성, 해당 작용 활성,  $Mg^{+2}$  해리도 그리고 막지방산 조성등을 그것의 야생균주 Mw와 비교 분석하였다. 수소 이온 투과도 실험 결과 150 mM KCl 수용액 및 3% NaCl 수용액에서 변이균주 M-100의  $t_{1/2}$ 값이 pH 4.0, 5.0 그리고 6.0에서 모두 야생균주 Mw보다 낮은 값을 보였다. ATPase 활성의 결과에서도 전체 pH 범위에서 변이균주 M-100이 야생균주 Mw보다 높은 활성을 보였다. 해당 작용의 pH 의존성 결과에서는 최대 활성의 해당 작용이 일어나는 pH가 야생균주 Mw는 5.0, 변이균주 M-100의 경우는 6.0으로 예상과는 약간 상이하였으나, pH 5.0을 제외한 전체적인 범위에서 변이균주 M-100의 해당 작용 활성이 야생균주 Mw보다 높게 유지됨을 확인하였다.  $Mg^{2+}$  해리도에 있어서는 pH 4에서 2시간 경과후 야생균주 Mw에 비해 변이균주 M-100이 약 1/3 가량 적게  $Mg^{+2}$ 가 유출되었다. 막지방산 조성의 변화는 환경상의 낮은 pH에 대한 반응양상을 나타내는 중요한 지표로 측정된 결과를 보면, 야생균주 Mw와 변이균주 M-100간의 비교결과  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{18:1}$ ,  $C_{19:0,cyclo}$  등에서 주된 차이를 나타내었으며, 특히  $C_{18:1}$ 은 야생균주 Mw가 23.4%, 변이균주 M-100이 15.1%로서 변이균주 M-100에서 감소된,  $C_{19:0,cyclo}$ 는 변이균주 M-100이 12.2%로, 야생균주 Mw이 10.2%에 비해 증가되었다.

## 감사의 말

본 연구는 과학기술처의 선도기술개발과제 연구비 지원에 의하여 이루어진 내용의 일부로서 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Adolph, A. and J. Charlotte. 1985. Altered expression of  $H^+$ -ATPase in *Streptococcus faecalis* membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **122**: 151-157.
- Aldo, F. Rizzo, H. Korkeala, and I. Mononen. 1987. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2883-2888.
- Bender, G. R. and R. E. Marguis. 1987. Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2124-2128.
- Bender, G. R., V. W. S. Scott, and R. E. Marguis. 1986. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral *Streptococci*. *J. Infect. Imm.* **53**: 331-338.
- Bert, P., M. Douwe, J. S. Eddy, U. Trees, A. Tjakko, P. R. Pierre, and W. N. Konings. 1991. Malolactic fermentation: Electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.* **173**: 6030-6037.
- Chun, U. H., B. S. Park, and J. S. Cho. 1994. Optimum conditions for the protoplast formation of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **9**: 191-199.
- Claire, M. T., C. Posthuma, S. Juke, P. S. Lolkema, D. Charles, and W. N. Konings. 1996. Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* **175**: 2178-2185.
- Cox, D. J. and T. H. Kling. 1989. Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *Eur. J. Biochem.* **171**: 5750-5752.
- Dencher, N. A. 1990. Dynamic interaction between membrane constituents studied by biophysical techniques and functional reconstitution of membrane proteins into lipid bilayers, pp. 343-360. In *Dynamics and Biogenesis of Membranes*, Vol. **H40**, Springer-Verlag, Berlin.
- Goldberg, I. and L. Eschar. 1997. Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 489-496.
- Hiroshi K. 1985. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **260**: 72-76.
- Hiroshi K. 1982. Regulation of the cytoplasmic pH in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **257**: 13246-13252.
- Hugenholtz, J., L. Perdon, and T. Abee. 1993. Growth and generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* during citrate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4216-4222.
- Jung, S. H., E. L. Susan, I. H. Rawle, and J. G. Zeikus. 1993. *Sarcina ventriculi* synthesizes very long chain dicarboxylic acid in response to different form of environmental stress. *J. Biol. Chem.* **268**: 2828-2835.
- Kang, S. M., W. S. Yang, and Y. C. Kim. 1995. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for *Kimchi* fermentation and effect of starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 461-471.
- Kates, M. 1964. Bacterial lipids. *Advan. Lipid Res.* **2**: 17-90.
- Kirazov, L. P., G. V. Lubomir, and E. P. Kirazov. 1993. Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing

- fractions. *Anal. Biochem.* **208**: 44–48.
18. McDonald, L. C., H. P. Fleming, and H. M. Hassan. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantorum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2120–2124.
  19. McDonald, L. C., R. F. Mcfeeters, M. A. Daeschel, and H. P. Fleming. 1987. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1382–1384.
  20. Molenaar, D., J. B. Bosscher, and B. Tenbrink. 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus bucheri*. *J. Bacteriol.* **175**: 2864–2870.
  21. Poole, R. K. 1993. The isolation of membranes from bacteria. In *Biomembrane Protocol*, pp. 109–122, Vol. **19**, Humana Press, Totowa, New Jersey.
  22. Renault, P., C. Gaillardin, and H. Heslot. 1989. Product of the *Lactococcus lactis* gene required for malolactic fermentation in homologous to a family of positive regulators. *J. Bacteriol.* **171**: 3108–3114.
  23. Romans, A., B. Poolman, and H. Santos. 1994. Uniport of anionic citrate and proton consumption in citrate metabolism generates a proton motive force in *Leuconostoc oenos*. *J. Bacteriol.* **176**: 4899–4905.
  24. Salema, M., B. Poolman, and J. S. Lolkema. 1994. Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *Eur. J. Biochem.* **225**: 289–295.
  25. Sim, J. H., S. K. Kim, and Y. J. Baek. 1995. Influence of culture conditions on acid tolerance of *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 17–23.
  26. Starrenburg, M. J. C. and J. Hugenholtz. 1991. Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Eur. J. Biochem.* **57**: 3535–3540.
  27. Tempest, D. W., J. L. Meers, and C. M. Brown. 1970. Influence of environment on the content and composition of microbial free acid pools. *J. Gen. Microbiol.* **64**: 171–185.
  29. Terry, A. K., A. Raanan, S. Michael, and A. A. Guffanti. 1985. Buffering capacity of bacilli that grow at different pH ranges. *J. Bacteriol.* **162**: 768–772.
  30. Toni, D. and F. I. Johannes. 1993. Preparation and characterization of highly pure fractions of outer membrane, cytoplasmic and intracytoplasmic membranes from *Ectothiorhodospira mobilis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 111–117.
  31. Veerkamp, J. H. 1971. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J. Bacteriol.* **108**: 861–867.
  32. Verhue, W. M. and F. S. B. Tian. 1991. Study of the citrate metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* by means of <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3371–3377.
  33. Winterbourne, D. J. 1993. Chemical assays for proteins, pp. 197–202. In *Biomembrane Protocol*, Vol. **19**, Humana Press, Totowa, New Jersey.

(Received October 10, 1997)