

## Adipic acid 저항성 변이주 *Leuconostoc paramesenteroides*의 내산성 특성

이중근 · 이홍석 · 김영찬 · 주현규\* · 이시경\*\* · 강상모\*\*\*  
한국보건산업진흥원, \*신문대학교 응용생물과학부,  
\*\*건국대학교 응용생물화학과, \*\*\*건국대학교 미생물공학과

### Properties of Acid Tolerance of the Adipic acid-resistant Mutant of *Leuconostoc paramesenteroides*

Joong-Keun Lee, Hong-Seok Lee, Young-Chan Kim, Hyun-Kyu Joo\*,  
Si-Kyung Lee\*\* and Sang-Mo Kang\*\*\*

Korea Health Industry Development Institute,

\*Department of Biological Science, SunMoon University,

\*\*Department of Apply Biology and Chemistry, Kun-Kuk University,

\*\*\*Department of Microbiological Engineering, Kun-Kuk University

#### Abstract

Properties of acid tolerance of an adipic acid-resistant mutant, *Leuconostoc paramesenteroides* (ANaP100) were studied and compared with those of its paired wild type of *Leu. paramesenteroides* (LPw). The value of protons permeability of LPw after an acid shock at pH 5.0 was 4.3 min, while the value of ANaP100 was 4.8 min at the same pH. The maximal specific activities of ATPase of LPw and ANaP100 were 0.59 unit/mg protein and 0.63 unit/mg protein at pH 6.0, respectively. The release of magnesium ion from the mutant strain was about 27.3% at pH 4 after 2 hrs, while the wild strain was about 52.2% under the same conditions. The contents of C<sub>19:0,cyclo</sub> and C<sub>18:1</sub> in a membrane fatty acid of ANaP100 and LPw were higher and lower, respectively, than that of LPw. These results indicated that acid tolerance of ANaP100 was improved in comparison with that of its wild type, LPw.

Key words : adipic acid, acid tolerance, lactobacilli, *kimchi*

#### 서 론

Adipic acid는 대장식품과 사용량의 제한이 없을 뿐만 아니라 김치의 산성 pH 영역에서 젖산균에 대해 강한 억제능을 갖고있어 김치의 저장성을 향상시키기 위한 방안으로 이용될 수 있다<sup>(1)</sup>. 즉, adipic acid를 김치에 첨가함으로써 젖산균의 생육을 억제시켜 김치의 저장성 향상을 기대할 수 있다. 이와 더불어 김치발효의 주요 발효균주인 유산균을 starter로 첨가하여 김치의 산패균으로 알려진 *Lactobacillus plantarum* 등의 증식을 억제하면 더 나은 결과를 기대할 수 있을 것이다. 이때 이용될 starter의 조건은 adipic acid에 대한 저

항성뿐 만 아니라 김치의 pH를 고려시 내산성도 함유해야 할 것이다. 내산성을 확인하는 지표로는 수소이온 투과도, H<sup>+</sup>-ATPase의 활성, Mg<sup>2+</sup>의 해리도 측정, 세포막의 지방산 조성의 변화 등을 이용할 수 있다. 수소이온 투과도는 세포질막 자체의 물리적 성질과 그와 연관되는 지방산조성의 변화 및 H<sup>+</sup>-ATPase를 비롯한 세포질막에 발현되는 다양한 효소의 양과 기능활성 등의 통합적인 것으로서 산성환경에서 net proton permeability가 낮을수록 내 산성으로 고려되고 있으며<sup>(2)</sup>, 또한 김치발효 과정 중에 생성되는 유기산으로 세포 외부의 pH가 낮아지면 삼투압에 의해 세포 내부로 수소이온의 유입이 늘어나게 되는데, 이때 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성이 높을수록 수소이온을 효과적으로 방출하여 세포 내부의 pH 저하를 방지함으로써 산성환경에서도 생육하게 되어 내산성을 갖게 된다<sup>(3)</sup>. 외부환경의 pH가 낮아질수록 젖산 등 생성된 유기약산은 비해리형태로 세포내부로 유입되어 해리되므로써 proton

Corresponding author : Sang-Mo Kang, 93-1 Mojin-dong, GuangJin-Gu Department of Microbiological Engineering, Kun-Kuk University, Seoul 143-701, Korea.  
Tel : 82-2-450-3524  
Fax : 82-2-450-3517  
E-mail : Kangsm@kkucc.konkuk.ac.kr

motive force가 낮아지며, 세포 내부의 pH가 일정 수준 이하로 저하되면 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성이 상실되므로 산성 pH 영역에서 높은 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성을 갖는 균주는 내산성 균주라고 할 수 있어<sup>(2)</sup> H<sup>+</sup>-ATPase의 활성은 내산성 특성을 측정하는 지표가 된다. Mg<sup>2+</sup>의 해리도 측정은 산성환경에서는 균주의 세포막이 손상되어 세포의 무기질이 유출되며, 특히 Mg<sup>2+</sup>의 경우 세포막의 손상 정도가 클수록 해리량이 많다고 알려져 있어 이를 측정하여 비교함으로써 내산성 균주의 특성을 알 수 있다<sup>(4)</sup>. 또한 지방산 조성의 변화도 내산성 지표로서 보고되고 있다<sup>(4)</sup>. *Leuconostoc paramesenteroides*는 저온성 젖산균으로서 저온 발효김치에서 숙성기까지 관여하나 산에 대한 내성이 약해 숙성기 이후 급격히 사멸된다<sup>(5)</sup>. 이를 극복하고 adipic acid와 같이 김치의 산패방지를 위한 첨가제로서 이 균주를 이용하고자 본 연구실에서는 *Leu. paramesenteroides*를 pH 5.0 조건하에서 adipic acid에 저항성을 갖도록 변이 처리하여 adipic acid 및 내산성을 향상시켰다. 본 연구에서는 변이주의 증가된 adipic acid 저항성 및 내산성에 관한 생리적인 특성들을 야생균주와 비교하여 내산성 특성 인자인 수소이온투과도, H<sup>+</sup>-ATPase의 활성, Mg<sup>2+</sup>의 해리도 측정 및 세포막 지방산 조성을 지표로 삼아 조사하였으며 또한 adipic acid 존재 하에서의 변이균주의 증식도를 조사하여 adipic acid 저항성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 배양 및 보관

전국대학교 미생물공학과에서 김치에서 분리 보관중인 *Leuconostoc paramesenteroides* 야생형(LPw)과 adipic acid 저항성 변이균주 *Leu. paramesenteroides* (ANaP100)를 이용하였다. 변이균주의 배양은 MRS broth에 NaCl을 2.5% 첨가하고, adipic acid를 이용하여 pH 5.0으로 조정된 배지를 사용하여 10°C에서 30일 간격으로 계대배양하면서 실험을 수행하였으며, 균체수가 10<sup>8</sup> cell/mL이 되도록 조정하여 사용하였다.

### Adipic acid 저항성

MRS broth를 HCl 및 adipic acid로 각각 pH 3.5, 3.8, 4.0 및 4.5가 되도록 조정된 후, NaCl을 0% 및 2% 되도록 첨가하고 야생균주(LPw)와 adipic acid 내성 변이균주(ANaP100)를 배지량의 1%씩 접종하여 20°C에서 배양하면서 경시적으로 배양액을 취하여 pH의 변화와 660 nm에서 흡광도로 증식정도를 측정하였다.

### 수소이온 투과도

*Leuconostoc paramesenteroides*의 야생균주(LPw)와 변이균주(ANaP100)를 MHHD배지<sup>(6,7)</sup> (trypticase peptone 10.0 g, casamino acid 3.0 g, phytone peptone 1.5 g, yeast extract 1.0 g, tween 80 1 g, pH 7.0)에서 전 배양한(20°C, 15시간 2회) 후 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 10 min.)하여 균체의 농도를 10 mg(dry weight)/mL로 조정된 후, 다시 20°C에서 15시간 본 배양하고, Bender 등<sup>(8)</sup>의 방법을 변형하여, 수소이온 투과도를 측정하였다. 즉, 원심분리(6,000 rpm, 4°C, 20 min.)하여 회수된 균체를 5 mM MgCl<sub>2</sub> 용액으로 2회 세척한 후, 20 mM 인산완충용액(pH 7.2, 1 mM MgCl<sub>2</sub>+150 mM KCl)으로 현탁시켜 100 mM HCl과 50 mM KCl 또는 10 mM HCl과 150 mM KCl 혼합용액을 가하여 pH 3, 4, 5 및 6으로 조절된 후 약 2분 정도 안정화시켰다. Acid pulse를 유발시키기 위해 10 mL로 조정된 균체 혼합용액(균체농도 10 mg dry weight/mL)에 10 mM HCl과 150 mM KCl 혼합용액을 50 μl 첨가하고, 세포 내외간에 수소이온의 세포내 유입에 따른 세포외부 pH의 경시적인 변화(ΔpH)를 1분 간격으로 10분 동안 측정하였다. 이때 최저로 떨어지는 pH를 pH α라고 한 다음, 다시 5%(v/v)의 butanol을 0.15 mL 첨가하여 세포막을 파괴한 후, 외부 환경과의 평형을 이루는 pH를 pH ω로 하였다. pH α와 pH ω의 차이의 평균 pH에 도달하는데 걸리는 시간을 t<sub>1/2</sub>로 정의하였다.

### H<sup>+</sup>-ATPase 활성

조효소액의 조제 : 조효소액의 조제는 균주를 대수 증식기 후반까지 배양하고 원심분리하여 0.1 M KCl 용액으로 2회 세척하였다. 세척된 균체(wet weight 0.5 g)를 1 mM EDTA와 2 mM MgCl<sub>2</sub>가 함유된 Tris-HCl buffer(pH 7.5, 75 mM) 10 mL에 현탁하여 hand glass tube에 넣고 sonication(60% pulse, 15분, in ice)하였다. DNase I(Sigma), RNase A(Sigma)를 10 μg/mL 첨가하고, β-aminobenzoamide(M.W. 136.2)를 40 mM수준으로 첨가한 후 실온에서 45분간 반응시켰다. 반응이 완료된 균체 파쇄액을 원심분리(15,000 rpm, 20 min., 4°C)하여 파쇄되지 않은 균체와 침전물을 분리한 후, 상등액을 초원심분리(40,000 rpm, 30 min., 4°C)하여 ATPase의 catalytic site가 외부로 노출된 membrane vesicle을 획득한 후, 2 mM MgCl<sub>2</sub>가 함유된 Tris-HCl 완충액에 현탁하여 ATPase 활성측정용 조효소액으로 사용하였다<sup>(8-11)</sup>.

### 활성측정

H<sup>+</sup>-ATPase 활성<sup>(8)</sup>은 조제된 조효소액 100 µl에 10 mM MgSO<sub>4</sub>와 2 mM ATP(Sigma)를 넣고, pH 3.5, 4.0, 4.2, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 및 7.5로 조정된 완충액 900 µl를 각각 첨가하고 30°C에서 10분 동안 효소 반응시켰다. 여기에 3 mL의 증류수와 1 mL의 3.5 N 황산용액을 가하여 효소반응을 종결시켰다. 효소 반응이 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 mL를 첨가하였다. 이것을 실온에서 20분간 반응시킨 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준곡선으로부터 ATPase에 의해 유리된 inorganic phosphate의 양을 환산하였다. 효소의 단위는 1분 동안 1 µmole inorganic phosphate를 유리시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

### Protein 정량

Protein의 정량은 Lowry 방법에 따라 측정하였으며 bovine serum albumin으로 조정한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 정량하였다.

### pH profile에 따른 균체 Mg<sup>++</sup> 해리도

Mg<sup>++</sup> 해리도 측정을 위한 균체시료 준비는 Bender 등<sup>(4)</sup>의 방법에 따라 실시하였고, inductively coupled plasma(ICP)로 측정하였다. 즉, *Leu. paramesenteroides*의 야생균주(LPw)와 변이균주(ANaP100)를 대수 증식기 말기까지 배양한 후 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 10 min.)하여 집균하였다. 회수된 균체를 차가운 2차 증류수로 1회 세척한 후 100 mL 2차 증류수에 현탁시켰다. 실험에 사용된 모든 용기는 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 24시간 침적한 후 2차 증류수로 세척한 다음 건조하여 사용하였다. 균체 현탁액 10 mL를 HCl을 사용하여 각각 pH 4, 5 및 6으로 조절하고, 1시간, 2시간 그리고 3시간 경과한 후 각각 1 mL를 취하여 원심분리한 후 상등액으로 유출된 Mg<sup>++</sup>을 ICP emission spectro analyzer로 측정하였으며 ICP 측정조건은 Gas: Argon (purity 99.999%), Wavelength spectrum(nm): 280, 270, Line gas pressure(psi): 70, Coolant gas flow rate(L/min.): 0.12, Blizer Sample gas pressure(psi): 40, Carrier gas flow rate(L/min.): 0.4, Pump rate(mL/min.): 1.5, Integration period(sec.): 10으로 하였다.

### 세포막의 지방산조성

세포막의 지방산조성은 Jung<sup>(12)</sup>의 방법에 따라 *Leu. paramesenteroides*의 야생균주(LPw)와 변이균주 (ANaP

100)를 대수증식기 말기까지 증식시킨 후 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 10 min.)하고 균체를 증류수로 2회 세척하였다. 분리된 균체의 무게(wet weight)를 측정하고, 50 mg/mL이 되도록 methanol/HCl 5% 용액으로 현탁하여, 그 액을 초음파로 파쇄(70% pulse, 5분, in ice)후 마개가 테프론으로 코팅된 vial에 2 mL씩 나누고 가열(100°C, 3시간)하였다. 다음으로 이들 각각에 대하여 핵산을 3 mL씩 첨가하고 강하게 vortexing하여 원심분리한 후, 상등액을 회수하고, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 유리섬유층을 통과시키는 과정을 2회 가량 반복하면서 불순물과 수분을 제거하고 질소가스로 휘발시켜 필름 화시켰다. 이것을 사용전 적량의 핵산으로 용해하여 사용하였으며, 각 지방산의 동정에 사용된 표준물질은 Sigma(#189-18)를 이용하였다. 분석은 Shimazu Corp. GC-8A를 사용하였으며 Gas chromatography 측정조건은 Detector: Flame ionization detector, Column: BPX 5 capillary column, Material: Fused silica, Injection temperature: 270°C, Detector temperature: 300°C, Temperature: Initial temp. 50°C, initial time 0 min., Program final temperature ①100°C ②150°C ③300°C, Final time: ①0 min. ②0 min. ③20 min., Program rate: ①10°C/min. ②3°C/min. ③4°C/min., Carrier gas: N<sub>2</sub>, Gas flow rate: 200 kPa 로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 변이균주의 adipic acid 저항성

*Leu. paramesenteroides*의 야생균주(LPw)와 변이균주(ANaP100)를 HCl과 adipic acid로 pH를 달리한 배지에서의 생육도를 측정하였다(Fig. 1, 2). LPw와 ANaP100은 전체적으로 볼 때, HCl로 pH를 조정할 경우가 adipic acid로 pH를 조정할 경우보다 증식이 원활하였으며, LPw 보다는 ANaP100이 양호한 증식을 보였다. 이는 HCl로 pH를 조정할 경우 해리되어 pH만 낮아진 반면 adipic acid로 pH를 조정할 경우에는 adipic acid가 갖는 항균작용의 영향이 있었던 것으로 보인다. 그러나 adipic acid로 pH를 조정할 경우에도 LPw보다는 ANaP100이 양호한 증식을 보여 adipic acid에 대해서 내성이 생긴 것으로 보인다. NaCl을 2% 되게 첨가하였을 경우에는 pH 3.8이하에서 증식이 매우 억제되는 경향을 보여, 낮은 pH에서는 염농도에 의한 영향을 받는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 변이균주인 ANaP100은 야생균주에 비해 adipic acid에 대해 내성을 갖으며, pH 4.0까지는 내성을 갖게 됨으로써 adipic acid가 첨가된 김치의 발효 말기까

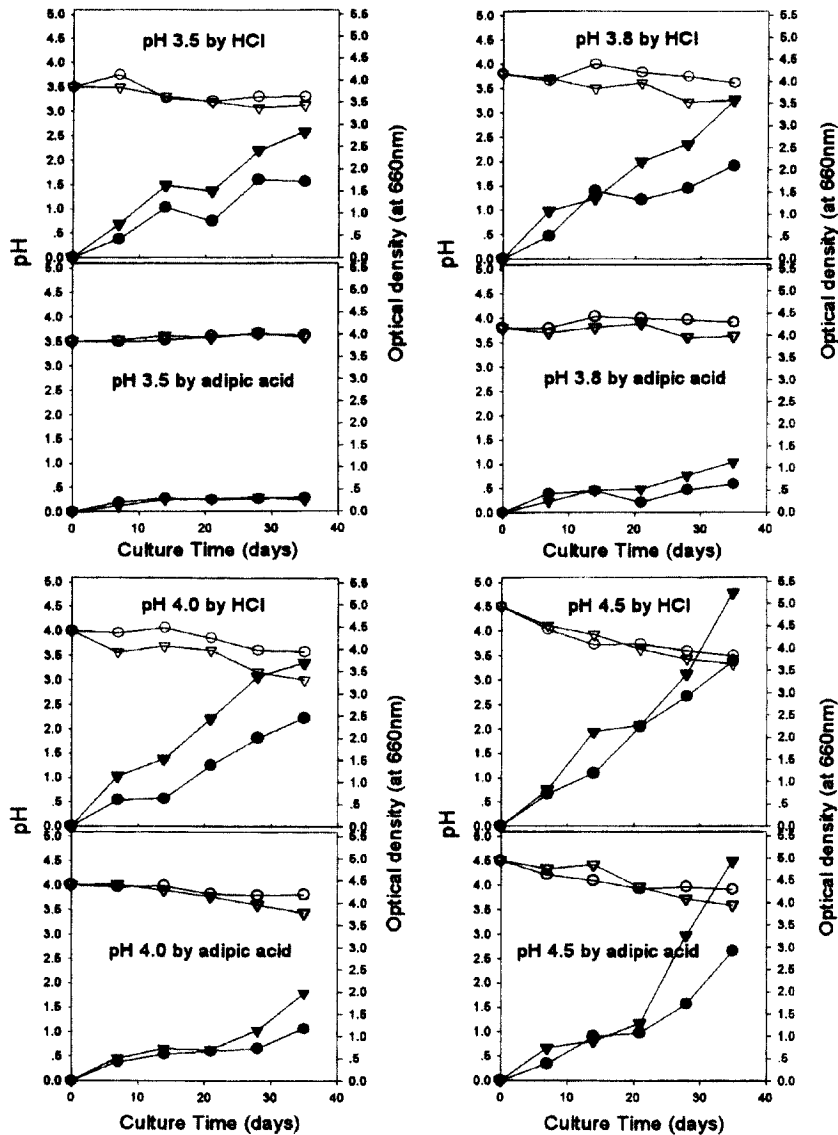


Fig. 1. Cell growth of wild LPw and mutant ANaP100 strains of *Leu. parmesenteroides* in MRS broth without NaCl adjusted with HCl or adipic acid at 20°C.

Symbols: (○), pH of LPw; (▽), pH of ANaP100; (●), O.D. of LPw; (▼), O.D. of ANaP100.

지 보다 효과적으로 발효에 관여 할 수 있을 것으로 생각한다. 즉 ANaP100 균 자체가 *L. plantarum*을 억제시키진 않으나, 김치제조시 adipic acid를 첨가하고 변이균주를 starter로 다량 첨가함으로써 adipic acid 존재하에서 *L. plantarum*은 adipic acid에 대한 저항성이 약해 생육이 저해되는 반면 변이균주는 김치 발효계에서 상대적인 생태우위를 차지하게 되어 경쟁적으로 발효를 주도할 수 있을 것으로 생각된다.

한편 본 변이균주는 약 1개월에 1회 정도 계대배양

을 하면서 starter로 사용시 변이특성을 확인한 후 사용하였으며, 그때까지는 reversion이 발생하지 않았으나 1개월 이후 reversion이 일어나는지에 대해서는 더 검토되어야 할 것으로 생각된다.

#### 수소이온 투과도

*Leu. parmesenteroides* 야생균주와 변이균주 : 수소이온 투과도는 세포내부와 외부가 완전히 평형이 이루어지는 시간의 반 즉  $t_{1/2}$  값으로 나타내는 데,  $t_{1/2}$  값

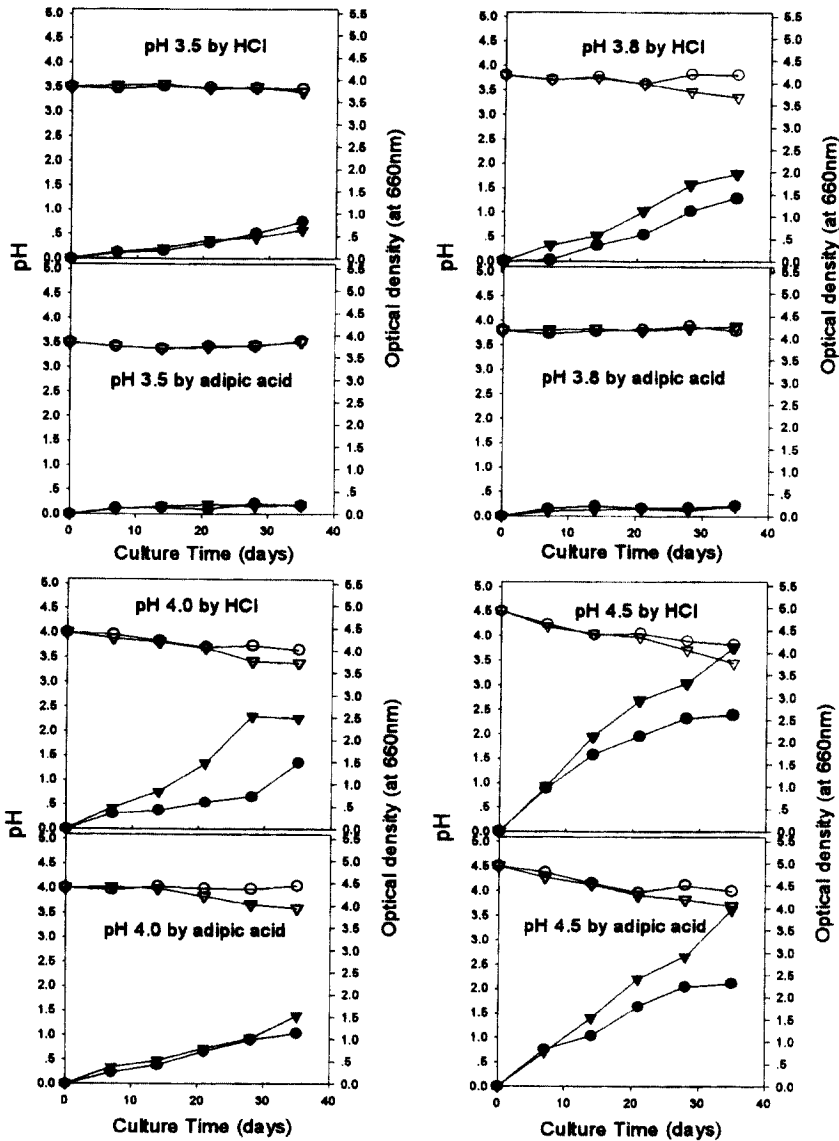


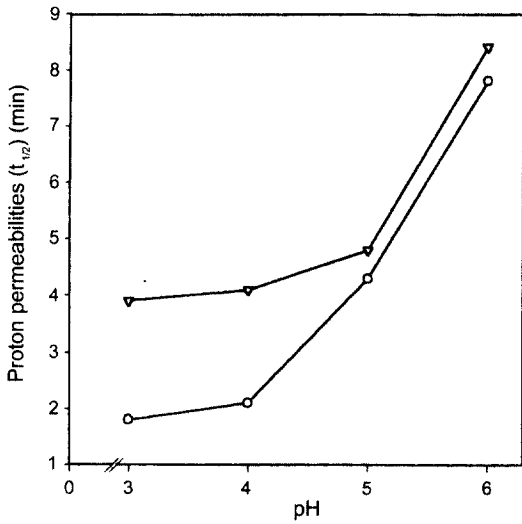
Fig. 2. Cell growth of wild LPw and mutant ANaP100 strains of *Leu. paramesenteroides* in MRS broth containing 2% NaCl adjusted with HCl or adipic acid at 20°C.

Symbols: (○), pH of LPw; (▽), pH of ANaP100; (●), O.D. of LPw; (▼), O.D. of ANaP100.

이 크면 수소이온에 대한 투과가 적은 상태를,  $t_{1/2}$  값이 작으면 수소이온에 대한 투과가 많은 상태를 나타낸다<sup>(8)</sup>.

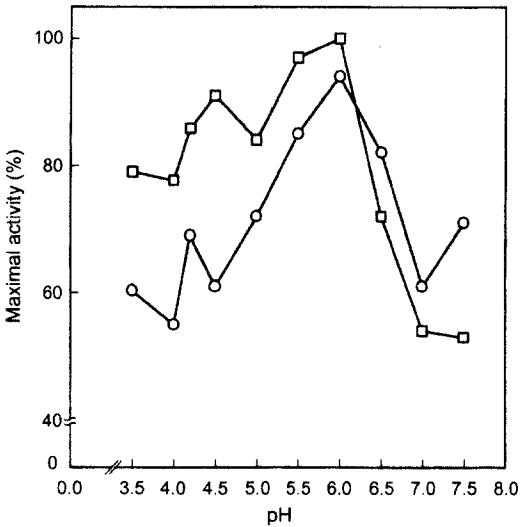
Kobayashi<sup>(13)</sup>는 정상상태하에서 세포질막의 pH는 proton-translocating ATPase에 의해 중성으로 조정되며, 세포질내로 수소이온이 유입되더라도 specific transport system에 의해 정상적으로 조정된다고 하였으며, Bender 등<sup>(8)</sup>은 내산성 균주의 경우 산성 pH 영역에서 수소이온에 대한 투과도가 낮은 성질을 갖고

있으며, 이런 낮은 투과도는 세포질막에 결합되어 있는 proton-translocating ATPase 발현 양의 차이 때문이라고 하였다. 그리고 치아플라크에서 생육하는 미생물들중 내산성이 가장 높은 *Lactobacillus casei*와 산에 민감한 *Actinomyces viscosus*간의 수소이온 투과도를 비교한 결과, 산성영역에서 *Lac. casei*가 *Act. viscosus*보다  $t_{1/2}$  값이 높아 수소이온 투과가 적었다고 하였다. Acid pulse를 주게되면 세포 외부의 수소이온이 세포내로 유입되면서 pH의 변화가 생기는데, *Leu.*



**Fig. 3.** Proton permeability of the wild and mutant stains of *Leu. paramesenteroides* as a function of environmental pH value.

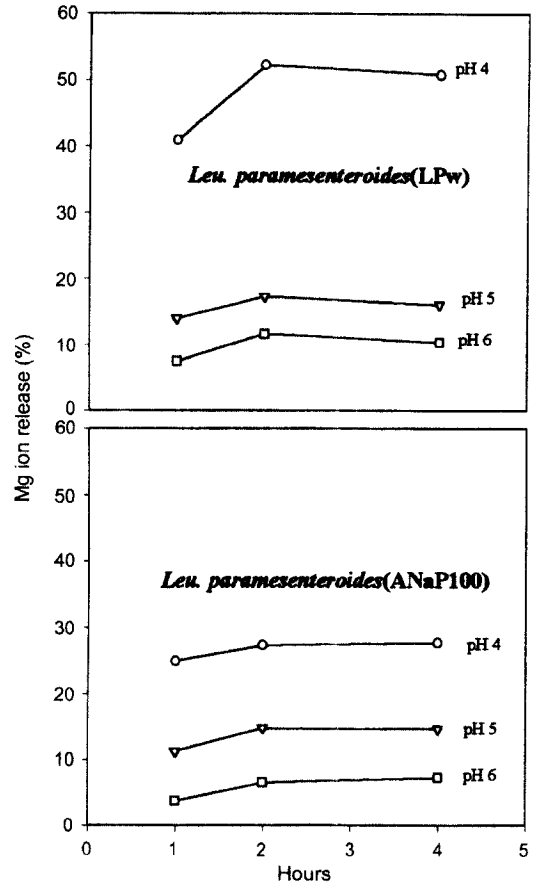
Symbols: (○), *Leu. paramesenteroides* wild type LPw; (▽), *Leu. paramesenteroides* mutant ANaP100.



**Fig. 4.** ATPases activity of cytoplasmic membrane of wild type and mutant of *Leuconostoc paramesenteroides* at different pHs.

Symbols: (○), *Leu. paramesenteroides* wild type LPw; (▽), *Leu. paramesenteroides* mutant ANaP100.

*paramesenteroides*의 야생균주(LPw)와 변이균주(ANaP 100)의 수소이온 투과도를 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. 초기 pH를 3, 4, 5 및 6으로 하여 수소이온 투과도를 측정할 경우, 야생균주 LPw와 변이균주 ANaP100의 t<sub>1/2</sub> 값은 초기 pH가 3에서 1.8분, 3.9분 pH 4에서



**Fig. 5.** Degree of Mg<sup>++</sup> efflux from cell membranes of *Leu. paramesenteroides*.

2.1분과 4.1분이었으며, pH 5에서 4.3분, 4.8분, pH 6에서는 7.8분, 8.4분으로 나타나 LPw보다는 ANaP100이 모든 pH 범위에서 t<sub>1/2</sub> 최대 값이 높아 내산성이 있는 것으로 확인되었다.

**ATPase 활성**

야생균주(LPw)와 변이균주(ANaP100)에 대한 H<sup>+</sup>-ATPase 활성은 Fig.4에서 볼 수 있듯이 buffer를 pH 3.5, 4.0, 4.2, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 및 7.5로 조정하였을 때, pH 6에서 비활성이 가장 높게 나타났다. 야생균주 LPw와 변이균주 ANaP100간의 최고 활성은 LPw가 0.59 unit/mg protein, ANaP100은 0.63 unit/mg protein으로써 변이균주가 야생균주보다 H<sup>+</sup>-ATPase 활성이 높았으며, pH가 내려갈수록 변이균주가 야생균주보다 활성이 높은 것을 알 수 있었다. 이와 같이 변이균주 ANaP100이 증가된 내산성을 갖는 것이 H<sup>+</sup>-ATPase 활성실험에서도 확인되었다.

Table 1. \*Fatty acids profiles of wild and mutant strains of *Leu. paramesenteroides*

(%)

	Fatty acids														Un-known	
	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14:1</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>17:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>19:1</sub>	C <sub>19:0,cyclo</sub>	C <sub>20:1</sub>	C <sub>20:0</sub>		C <sub>22:0</sub>
LPw	2.68	22.47	0.87	7.23	4.81	8.76	ND	11.23	14.37	5.37	7.34	0.88	2.75	1.06	1.10	9.08
ANaP100	15.89	18.32	ND	4.45	4.11	6.54	ND	9.32	10.99	3.96	6.17	2.28	1.64	0.84	0.88	14.61

N.D.: Not detected.

\*Condition of gas chromatography:

Detector: Flame ionization detector, Column: BPX 5 capillary column, Material: Fused silica, Injection temp.: 270°C, Detector temp.: 300°C, Temperature: Initial temp. 50°C, initial time 0 min., Program final temp. ① 100°C ② 150°C ③ 300°C, Final time: ① 0 min. ② 0 min. ③ 20 min., Program rate: ① 1 0°C/min. ② 3°C/min. ③ 4°C/min., Carrier gas: N<sub>2</sub>, Gas flow rate: 200 kPa

### Mg<sup>++</sup> 해리도

ANaP100의 pH profile별 Mg<sup>++</sup> 해리도를 LPw와 비교하여 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. LPw의 경우 pH 4에서 2시간 경과 후 Mg<sup>++</sup> 해리도가 52.2%로서 최대를 보였으나, ANaP100은 27.3%로서 야생균주에 비해 약 1/2 가량 Mg<sup>++</sup>이 적게 유출되었고, pH 6.0에 있어서는 LPw가 최대 11.7%, ANaP100이 최대 7.3%를 나타내었다. Bender 등<sup>(4)</sup>에 의하면 균주의 세포막이 산성화에 의해 손상을 받게 되면 세포중의 Mg<sup>++</sup>, K<sup>+</sup> 등이 세포 밖으로 유출되는데, 이중 Mg<sup>++</sup>이 더 민감한 지표로서 pH가 낮을수록 용해가 빠르며, 균주가 내산성일수록 Mg<sup>++</sup> 해리도가 낮아지게 된다고 보고하였다. 본 실험에서도 실험 균주가 pH가 낮고, 시간이 경과할수록 Mg<sup>++</sup> 해리도가 높아짐을 보였으며, 각 균주 간에 있어서 동일한 pH, 동일 경과시간에 있어서는 변이균주 ANaP100과 야생균주 LPw와 비교해 볼 때 Mg<sup>++</sup> 해리도가 상대적으로 낮아 내산성의 특성을 갖는 것을 알 수 있었다.

### 세포막의 지방산조성

Table 1에서 나타나듯이 내산성의 지표로 볼 수 있는 지방산인 C<sub>18:1</sub>과 C<sub>19:0,cyclo</sub>의 함량차이를 보면, C<sub>18:1</sub>은 야생균주 LPw가 14.37%, 변이균주 ANaP100이 10.99%로서 감소하였으며, C<sub>19:0,cyclo</sub>의 경우는 야생균주가 0.88%, 변이균주 ANaP100은 2.28%로서 증가되어 내산성이 증가되었음을 확인할 수 있었다. 또한 지방산의 함량을 전체적으로 보면, 야생균주 LPw는 C<sub>12</sub>, C<sub>18:2</sub>, C<sub>18:1</sub> 등의 함량이 높았으며, 변이균주 ANaP100은 C<sub>12</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>18:1</sub> 등이 함량이 높아 두 균주 간의 지방산조성은 다소 차이가 있었다. 한편 원형질막의 지방산조성을 분석함으로써 대상 균주가 내산성 특성을 갖고 있는지 여부를 확인할 수 있는데, Rizzo 등<sup>(14)</sup>은 내산성이 우수한 *Lac. casei*, *Lac. plantarum* 그리고 *Lac. acidophilus* 등 젖산균의 지방산을 분석한 결과 C<sub>19:0,cyclo</sub>의 함량은 35-39%로 높았던 반면, 이들

균주보다 내산성이 약한 *Lac. bulgaricus*는 그 함량이 13%로 매우 낮았다고 보고하였으며, Sim 등<sup>(15)</sup>은 *Lac. casei*에 대해 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>의 함량과 내산성과는 높은 상관성이 있음을 보고하였다.

이상의 결과들을 종합해보면 adipic acid에 대해 저항성을 함유한 변이균주 ANaP100은 야생균주 LPw보다 증가된 내산성을 획득하였음을 확인할 수 있었으며, 또한 adipic acid에 대해서도 저항성을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 adipic acid와 변이주를 첨가한 김치의 저장기간 연장에 대한 연구가 필요하다.

## 요 약

Adipic acid에 대해 저항성을 갖도록 변이된 *Leuconostoc paramesenteroides* (ANaP100) 균주의 내산성 특성을 조사하기 위하여 수소이온 투과도, H<sup>+</sup>-ATPase 활성, Mg<sup>++</sup> 해리도, 원형질막의 지방산 조성을 지표로 삼아 야생균주(LPw)와 비교하였다. 수소이온 투과도의 경우 pH 5에서 t<sub>1/2</sub> 값이 LPw는 4.3분, ANaP100은 4.8분으로서 변이균주가 다소 내산성이 높았으며 H<sup>+</sup>-ATPase 활성은 maximal activity가 *Leu. paramesenteroides*는 모두 pH 6.0에서 가장 높았고 LPw는 0.59 unit/mg protein, 변이균주는 0.63 unit/mg protein으로서 ANaP100이 LPw보다 활성이 높았다. 세포막의 산 손상(acid damage)에 의한 Mg<sup>++</sup> 해리도에서도 pH 4.0에서 2시간 경과 후 LPw는 52.2%, ANaP100은 27.3%로서 LPw에 비해 약 1/2가량 Mg<sup>++</sup>이 적게 유출되어 산에 의한 세포막의 손상이 적었다. 원형질막의 지방산 조성은 ANaP100가 C<sub>18:1</sub>은 감소하고, C<sub>19:0,cyclo</sub>는 증가하여 내산성이 증대되었으며 또한 adipic acid 첨가시에도 LPw에 비해 우수한 증식을 보였다. 따라서 ANaP100이 LPw에 비해 내산성이

증가되었으며 adipic acid 저항성도 함유하는 것이 확인되었다.

## 문 헌

1. Yamamoto, Y., Karube, N., Higashi, K. and Yoshii, H. Inhibitory activity of adipic acid on food spoilage microorganisms. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 34: 88-93 (1987)
2. Kim, Y.C. Characteristics of the acid-tolerant mutant *Leuconostoc* sp. and its effect as a starter for the acidification- retardation of *kimchi*. Thesis, Kon-Kuk Univ. Seoul, Korea (1997)
3. Dencher, N.A. Dynamics and biogenesis of membranes, p. 343-360, Springer-Verlag, New York (1990)
4. Bender, G.R., Sutton, S.V.W. and Marquis, R.E. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral *Streptococci*. *J. Infect. Immun.* 53: 331-338 (1986)
5. So, M.H. Characteristics of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from kimchi. Paper presented at 1st Symposium on science of kimchi of Korean Society of Food Sci. and Technol. Seoul, Korea (1994)
6. McDonald, L.C., McFeeters, R.F., Daeschel, M.A. and Fleming, H.P. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1382-1384 (1987)
7. McDonald, L.C., Fleming, H.P. and Hassan, H.M. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2120-2124 (1990)
8. Bender, G.R. and Marquis, R.E. Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2124-2128 (1987)
9. Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E.J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P.P. and Konings, W.N. Malolactic fermentation : Electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.* 173: 6030-6037 (1991)
10. Chun, U.H., Park, B.S. and Cho, J.S. Optimum conditions for the protoplast formation of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 9: 191-199 (1994)
11. Graham, J.M. and Higgins, J.A. Methods in molecular biology (Biomembrane protocols). pp. 109-122, Chapter 19, Humana press, Totowa, New Jersey.(1993)
12. Jung, S.H., Susan, E.L., Rawle, I.H. and Zeikus, J.G. *Sarcina ventriculi* synthesizes very long chain dicarboxylic acid in response to different form of environmental stress. *J. Biol. Chem.* 268: 2828-2835 (1993)
13. Kobayashi, H., Murakami, N. and Unemoto, T. Regulation of the cytoplasmic pH in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 257: 13246-13252 (1982)
14. Rizzo, A.F., Korkeala, H. and Mononen, I. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2883-2888 (1987)
15. Sim, J.H., Kim, S.K., Baek, Y.J., Oh, T.K. and Yang, H.C. Influence of culture conditions on acid tolerance of *Lactobacillus casei* YIT 9018 (in Korean). *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 17-23 (1995)

(1999년 11월 10일 접수)