

Adipic acid-resistant 변이주 *Leuconostoc mesenteroides*의 내산성 특성

이종근 · 이흥석 · 김영찬 · 주현규¹ · 이시경² · 정대현² · 강상모*
한국보건산업진흥원, ¹선문대학교 응용생물과학부, ²건국대학교

Characteristics of Acid Tolerance of Adipic Acid-Resistant Mutant Strain, *Leuconostoc mesenteroides*. Lee, Joong-Keun, Hong-Seok Lee, Young-Chan Kim, Hyun-Kyue Joo¹, Si-Kyung Lee², Dae-Hyun Jung², and Sang-Mo Kang*. Korea Health Industry Development Institute, Seoul 156-050, Korea, ¹Department of Biological Science, SunMoon University, Asan-si, 336-840, ²93-1 Mojin-dong, Guangjin-gu, Kun-Kuk University, Seoul 143-701, Korea - To determine an increased acid tolerance of an adipic acid-resistant mutant *Leuconostoc mesenteroides*(ANaM100) developed for use as a Kimchi starter, proton permeability of cytoplasm, activities of H⁺-ATPase, Mg⁺⁺ release and fatty acid composition of cytoplasmic membranes of strain ANaM100 were studied and compared with those of its wild type(LMw). The value of protons permeability of LMw after an acid shock at pH 5.0 was 5.4 min., while the value of ANaM100 cells was 8.4 min. at the same pH. The pH of maximal specific activities of ATPase originated from the LMw and ANaM100 were 0.87 unit/mg protein at pH 6.0 and 0.92 unit/mg protein at pH 5.5, respectively. The release of magnesium ion from ANaM100 was observed about 12.8% at pH 4 after 2 hours, while the wild strains of LMw released Mg⁺⁺ about 27.6% under the same conditions. The content of C_{19:0-cyclo} and C_{18:1} in a membrane fatty acid of ANaM100 was higher and lower, respectively than that of LMw. These results indicated that acid tolerance of adipic acid-resistant strain, ANaM100 was significantly improved in comparison with that of its wild type, LMw. In addition, the strain ANaM100 showed adipic acid resistance based on the result of growth of the strain in comparison with that of strain LMw in a broth containing adipic acid.

Key words: acid tolerance, adipic acid, mutant, *Kimchi*

김치는 전래의 독특한 방법에 따라 각 가정에서 제조되어 자가 소비되어 왔으나, 최근의 급격한 경제성장과 핵가족화, 주택구조의 변화, 편리한 생활의 추구, 소비양상의 변화 등에 따라 가정에서 직접 담궈 소비하기보다는 산업화되어 생산되는 제품을 이용하는 경향이 높아지고 있다. 그러나 김치는 신선한 야채와 향신료를 사용하여 자연발효를 해야하고, 김치의 숙성기가 발효 진행중인 발효중기에 한정된다는 점, 또한 신선한 김치를 선호하는 특성상 가열 살균, 보존료첨가 등이 관능적으로 부적합한 점이 있어 김치 보존성 향상에 장애요인으로 되고 있으며 최근 이러한 장애요인을 해결하기 위한 연구[1,9,14,18]가 계속되고 있다. 김치의 저장성을 높이기 위해서는 김치를 냉장 또는 냉동 저장하여 김치의 주효 발효균주인 유산균의 증식을 억제하여 김치가 숙성에 도달하는 시간을 연장함으로써 김치의 저장기간을 연장시킬 수 있다. 또한 보존료를 사용할 수 있는데 이를 위해 이용될 수 있는 보존료의 조건은 우선 안전성이 인정되어야 하고 낮은 산도에서도 김치의 주요 발효균주인 유산균의 증식억제능을 함유하고 있어야

한다. 특히 김치의 산패 주요균인 *Lactobacillus plantarum* 등의 증식억제에 효과적이어야 하며, 반면에 김치의 주요발효균으로서 김치의 풍미나 발효초기에 관여하는 유산균들의 증식은 촉진시켜야 할 것이다. 이와 같은 조건들을 충족시키기 위하여 보존료 단독 사용보다는 starter culture를 함께 이용하는 것이 효과적이다. 사용 가능한 많은 보존료 중에서 adipic acid는 미국에서 GRAS 물질로 지정되어 식품에 제한 없이 사용이 가능하고, 국내에서도 산미료 및 식품보존제로 그 사용을 허용하고 있으며, 특유한 감귤계의 산미로 김치를 제조하는데 첨가제로서 적합할 것으로 보인다[6,15,20]. 또한 김치발효의 이상발효균으로서 풍미향상에 중요한 역할을 하는 *Leuconostoc mesenteroides*를 starter로 김치에 첨가하면 가식기간 연장과 동시에 관능적인 향상을 기대할 수 있다. 이를 위한 *Leu. mesenteroides*의 기본조건으로는 adipic acid에 대한 저항성 및 산성조건하에서도 증식이 가능하여야 한다. 이와 같은 조건을 충족시키기 위하여 본 연구실에서는 *Leu. mesenteroides*를 변이처리하여 내산성 및 adipic acid에 저항성을 갖는 변이주를 개발하였다.

본 연구에서는 개발된 변이주를 김치제조시 starter로 이용하기 위한 첫 단계로서 변이주 *Leu. mesenteroides*의 adipic acid에 대한 저항성과 내산성에 관한 생리적인 특성들을 검토하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-2-450-3524, Fax. 82-2-450-3517
E-mail: kangsm@kkucc.ac.kr

재료 및 방법

사용균주 배양 및 보관

건국대학교 미생물공학과에서 김치에서 분리 보관중인 *Leuconostoc mesenteroides* 야생형(LMw)과 pH 5.0에서 adipic acid 저항성균주로 변이시킨 균주 *Leu. mesenteroides* (ANaM100)를 이용하였다. 변이균주의 배양은 MRS broth에 NaCl을 2.5% 첨가하고, adipic acid를 이용하여 pH 5.0으로 조정된 배지를 사용하여 10°C에서 30일 간격으로 계대 배양하면서 실험을 수행하였으며, 균체수가 10^8 cell/mL이 되도록 조정하여 사용하였다.

Adipic acid 내성

MRS broth를 HCl 및 adipic acid로 각각 pH 3.5, 3.8, 4.0 및 4.5가 되도록 조정한 후, NaCl을 0% 또는 3%되게 첨가하고 *Leu. mesenteroides*의 야생균주(LMw)와 adipic acid 내성 변이균주 (ANaM100)를 배지량의 1%씩 접종하여 20°C에서 배양하면서 경시적으로 배양액을 취하여 pH의 변화와 660 nm에서 흡광도로 증식정도를 측정하였다.

수소이온 투과도

Leu. mesenteroides 야생균주(LMw)와 이들의 변이균주인 ANaM100을 MHHD배지[16,17] (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 20°C, 15시간 2회 전 배양한 후 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 10 min.)하여 균체의 농도를 10 mg(dry weight)/mL로 조정한 후, 다시 20°C에서 15시간 본 배양하고, Bender 등[2]의 방법을 변형하여, 수소이온 투과도를 측정하였다. 즉, 원심분리(6000 rpm, 4°C, 20 min.)하여 회수된 균체를 5 mM MgCl₂ 용액으로 2회 세척한 후, 20 mM 인산완충용액(pH 7.2, 1 mM MgCl₂+150 mM KCl)으로 현탁시켜 100 mM HCl과 50 mM KCl 또는 10 mM HCl 과 150 mM KCl 혼합용액을 가하여 pH 3, 4, 5 및 6으로 조절한 후 약 2분 정도 안정화시켰다. Acid pulse를 유발시키기 위해 10 mM HCl과 150 mM KCl 혼합용액을 50 μ l 첨가하고, 세포 내외간에 수소이온의 cell내 유입에 따른 세포외부 pH의 경시적인 변화(Δ pH)를 1분 간격으로 10분 동안 측정하였다. 이때 최저로 떨어지는 pH를 pH α 라고 한 다음, 다시 5% (v/v)의 butanol을 0.15 mL 첨가하여 세포막을 파괴한 후, 외부 환경과의 평형을 이루는 pH를 pH ω 로 하였다. pH α 와 pH ω 의 차이의 평균 pH에 도달하는데 걸리는 시간을 $t_{1/2}$ 로 정의하였다.

H⁺-ATPase 활성

조효소액의 조제

조효소액의 조제는 Bender 등[2]의 방법에 따라 균주를

대수증식기 후반까지 배양하고 원심분리하여 0.1 M KCl 용액으로 2회 세척하였다. 세척된 균체(wet weight 0.5 g)를 1 mM EDTA와 2 mM MgCl₂가 함유된 Tris-HCl buffer (pH 7.5, 75 mM) 10 mL에 현탁하여 hand glass tube에 넣고 sonication(60% pulse, 15분, on ice)하였다. DNase I (Sigma), RNase A (Sigma)를 10 μ g/mL 첨가하고, β -aminobenzoamide (M.W. 136.2)를 40 mM수준으로 첨가한 후 실온에서 45분간 반응시켰다. 반응이 완료된 균체파쇄액을 원심분리(15,000 rpm, 20 min., 4°C)하여 파쇄되지 않은 균체와 침전물을 분리하였다. 상등액을 초원심분리(40,000 rpm, 30 min., 4°C)하여 ATPase의 catalytic site가 외부로 노출된 membrane vesicle을 획득한 후, 2 mM MgCl₂가 함유된 Tris-HCl 완충액에 현탁하여 ATPase 활성측정용 조효소액으로 사용하였다.

활성측정

H⁺-ATPase 활성은 조제된 조효소액 100 μ l에 10 mM MgSO₄와 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 μ l를 각각 첨가하고 30°C에서 10분 동안 효소 반응시켰다. 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% NaHSO₃에 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 μ mole inorganic phosphate를 유리시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다[2].

Protein 정량

Protein의 정량은 Lowry 방법[7,12]에 따라 다음과 같이 측정하였다. 조효소액 0.3 mL에 alkaline sodium dodecyl sulfate 용액(2% Na₂CO₃, 1% sodium dodecyl sulfate, 0.4% NaOH, 0.16% sodium tartarate) 10 mL과 cupric 용액 (4% CuSO₄·5H₂O) 0.1 mL이 혼합된 용액 1 mL를 첨가한 후 상온에서 10분간 반응시키고, 이 반응액에 foline-cioalcey phenol reagent를 동일한 양의 증류수로 희석한 용액 0.1 mL를 첨가하고 강하게 진탕하면서 상온에서 45분간 반응시킨 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하여 bovine serum albumin으로 조정된 표준곡선으로부터 단백질 함량을 정량하였다.

pH profile에 따른 균체 Mg⁺⁺ 해리도

Mg⁺⁺ 해리도 측정을 위한 균체시료 준비는 Bender 등[3]의 방법에 따라 실시하였고, Inductively coupled plasma (ICP)로 측정하였다. 즉, *Leu. mesenteroides*의 야생균주(LMw)와 변이균주 ANaM100을 대수증식기 말기까지 배양한 후 원심분리(8000 rpm, 4°C, 10 min.)하여 집균하였다. 회수된 균체를 차가운 2차 증류수로 1회 세척한 후

100 mL 2차 증류수에 현탁시켰다. 실험에 사용된 모든 용기는 H₂SO₄에 24시간 침적한 후 2차 증류수로 세척한 다음 건조하여 사용하였다.

균체 현탁액 10 mL를 HCl을 사용하여 각각 pH 4, 5 및 6 으로 조절하고, 1시간, 2시간 그리고 3시간 경과한 후 각각 1 mL를 취하여 원심분리한 후 상등액으로 유출된 Mg⁺⁺을 ICP로 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.): 10 으로 하였다.

세포막의 지방산 조성

세포막의 지방산 조성은 Jung[8]의 방법에 따라 LMw와 ANaM100을 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 헥산을 3 mL씩 첨가하고 강하게 vortexing하여 원심분리한 후, 상등액을 회수하고, 무수 Na₂SO₄와 유리섬유층을 통과시키는 과정을 2회 가량 반복하면서 불순물과 수분을 제거하고 질소가스로 휘발시켜 필름화시켰다. 이것을 사용전 적량의 헥산으로 용해하여 사용하였으며, 각 지방산의 동정에 사용된 표준물질은 Sigma (#189-18)를 이용하였다. 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 temp. ① 100°C ② 150°C ③ 300°C, Final time: ① 0 min. ② 0 min. ③ 20 min., Program rate: ① 10°C/min. ② 3°C/min. ③ 4°C/min., Carrier gas: N₂, Gas flow rate: 200 kPa로 하였다.

결과 및 고찰

Adipic acid 첨가에 따른 생육도

Leuconostoc mesenteroides 야생균주(LMw)와 변이균주 ANaM100을 pH와 NaCl의 농도를 달리한 배지에서의 생육도를 측정하였다 (Fig. 1~2). LMw와 ANaM100은 NaCl의 첨가량에 따른 영향은 거의 없었으며, pH에 따른 차이를 보였는데 전체적으로 볼 때, HCl로 pH를 조정할 경우가 adipic acid로 pH를 조정할 경우보다 증식이 원활하였으며, LMw 보다는 ANaM100이 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 경우도 pH 4.0이상에서는 ANaM100이 양호한 증식을 보여 adipic acid에 대해서 저항성이 생긴 것으로 보인다. 따라서 ANaM100은 LMw에 비해 adipic acid에 대해 저항성을 갖으며, pH 4.0까지의 산성조건까지는 내성을 갖게 됨으로써 adipic acid가 첨가된 김치발효 말기까지 보다 효과적으로 *Lac. plantarum*과 경쟁적으로 발효를 주도할 수 있다고 생각한다.

수소이온 투과도

수소이온 투과도는 세포질막 자체의 물리적 성질과 그와 연관되는 지방산조성의 변화 및 H⁺-ATPase를 비롯한 세포질막에 발현되는 다양한 효소의 양과 기능활성 등의 통합적인 것으로서 산성환경에서 net proton permeability가 낮을수록 내산성으로 생각된다고 하였다[10]. Kobayashi[13]는 치아플라그에서 생육하는 미생물들중 내산성이 가장 높은 *Lac. casei*와 산에 민감한 *Act. viscosus*간의 수소이온 투과도를 비교한 결과, 산성영역에서 *Lac. casei*가 *Act. viscosus*보다 t_{1/2} 값이 높아 수소이온 투과가 적었다고 하였다. 수소이온 투과정도는 세포내부와 외부가 완전히 평형이 이루어지는 시간의 반 즉 t_{1/2} 값으로 나타내는 데, t_{1/2} 값이 크면 수소이온에 대한 투과가 적은 상태를, t_{1/2} 값이 작으면 수소이온에 대한 투과가 많은 상태를 나타낸다[2]. 초기 pH를 각각 3, 4, 5 및 6으로 달리하여 *Leu. mesenteroides*의 야생균주 LMw와 변이균주 ANaM100의 수소이온 투과도를 측정하여, t_{1/2} 값을 pH별로 정리한 결과는 Fig. 3과 같다.

Acid pulse를 주게되면 세포 외부의 수소이온이 세포내로 유입되면서 pH의 변화가 생기는데, LMw와 ANaM100의 t_{1/2} 값은 우선 LMw는 초기 pH가 3, 4, 5 및 6에서 각각 3.3분, 4.4분, 5.4분 그리고 8.0분이었으며, ANaM100은 5.0분, 6.3분, 8.4분 및 10.0분으로 나타났다. 이러한 결과는 두 균주 모두 pH가 높을수록 수소이온의 투과도가 낮아 세포질 안의 고유성이 높게 유지되었으며, 야생균주 LMw보다는 변이균주인 ANaM100이 모든 pH 범위에서 수소이온의 투과가 더욱 낮아 t_{1/2} 값은 높았다. Kim[10]은 *Leu. mesenteroides*의 야생균주와 변이균주에 대한 수소이온 투과도 실험에서 t_{1/2} 최대 값이 야생균주는 pH 5에서 8.2분, 변이균주는 pH 4에서 9.2분이었다고 하였는데 본 실험에서는 야생균주, 변이균주 모두가 pH 6에서 각각 8.0분, 10.0분으로 나타나 다소 상이한 경향을 보였다. 이는 사용균주의 차이와 Kim[10]은 변이균주가 내산성만을 갖도록 처리한 반면, 본 실험에서의 변이균주는 내염성도 강화한 차이로 인하여 수소이온의 투과도가 다른 것으로 보인다. 본 실험의 결과로 볼 때 변이균주는 내산성을 갖고 있는 것으로 나타났다.

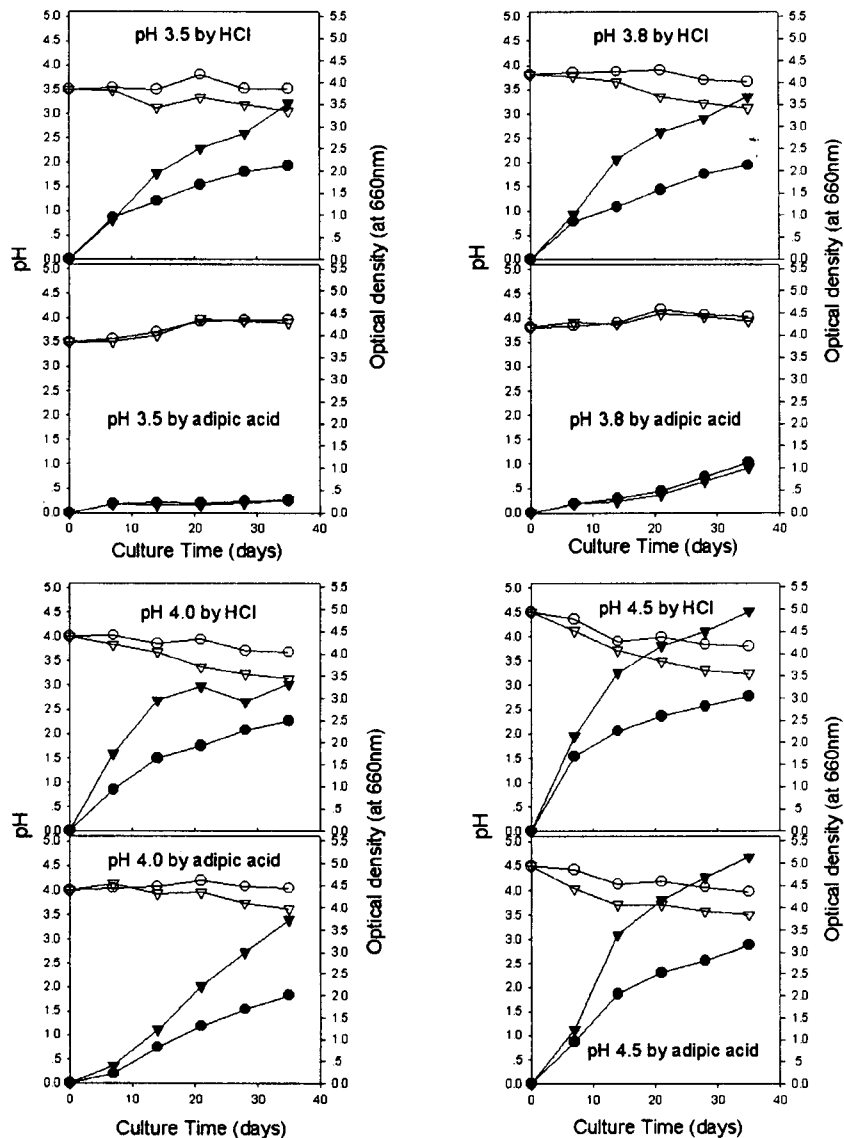


Fig. 1. Cell growth of wild LMw and mutant ANaM100 strains of *Leu. mesenteroides* in MRS broth without NaCl adjusted with HCl or adipic acid at 20°C. Symbols: (○), pH of LMw; (▽), pH of ANaM100; (●), O.D. of LMw; (▼), O.D. of ANaM100.

ATPase 활성

김치발효 과정 중에 생성되는 유기산으로 세포 외부의 pH가 낮아지면 삼투압에 의해 세포 내부로 수소이온의 유입이 늘어나게 되는데, 이때 H⁺-ATPase의 활성이 높을수록 수소이온을 효과적으로 방출하여 세포 내부의 pH 저하를 방지하므로써 산성환경에서도 생육하게 되어 내산성을 갖게 된다[4]. 또한 외부환경의 pH가 낮아질수록 젖산 등 생성된 유기약산은 비해리형태로 세포내부로 유입되어 해리되므로써 protonmotive force가 낮아지며, 세포 내부의 pH가 일정 수준 이하로 저하되면 H⁺-ATPase의 활성이 상실되므로 산성 pH 영역에서 높은 H⁺-ATPase의 활성을

갖는 균주는 내산성 균주라고 할 수 있어[10] H⁺-ATPase의 활성은 내산성 특성을 측정하는 지표가 된다. *Leu. mesenteroides*의 야생균주(LMw)와 변이균주ANaM100에 대한 H⁺-ATPase 활성은 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, *Leu. mesenteroides*의 야생균주는 pH 6.0에서, 변이균주는 pH 5.5일 때 specific activity가 가장 높게 나타났다(Fig. 4).

야생균주와 변이균주간의 maximal activity는 *Leu. mesenteroides*는 야생균주 LMw가 0.87 unit/mg protein이고, 변이균주 ANaM100은 0.92 unit/mg protein이었으며, 변이균주가 야생균주보다 H⁺-ATPase 활성이 높았으며, pH가 내려갈수록 변이균주의 활성이 야생균주보다 높은 것을

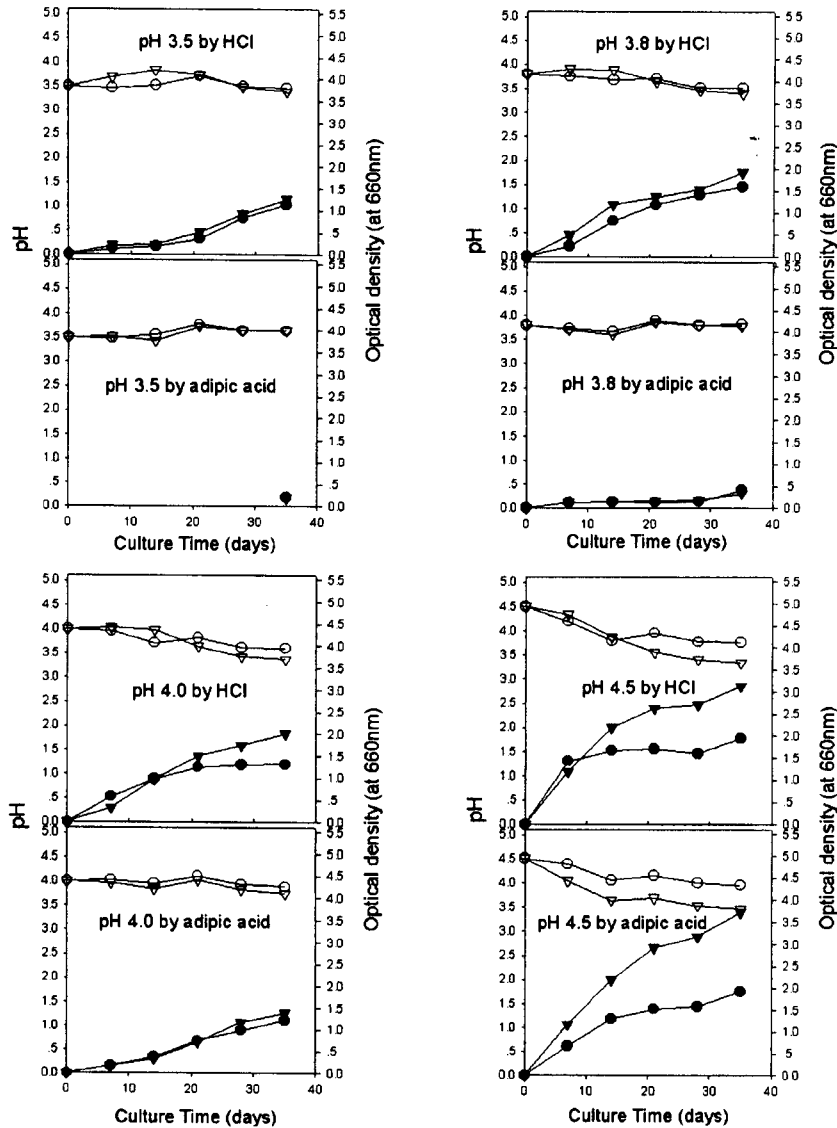


Fig. 2. Cell growth of wild LMw and mutant ANaM100 strains of *Leu. mesenteroides* in MRS broth containing 3% NaCl adjusted with HCl or adipic acid at 20°C.

Symbols : (○), pH of LMw; (▽), pH of ANaM100; (●), O.D. of LMw; (▼), O.D. of ANaM100.

알 수 있었다.

Kim[10]은 H⁺-ATPase의 maximal activity를 측정한 결과 *Leu. mesenteroides*의 야생균주가 0.6 unit/mg protein 이고, 변이균주는 0.8 unit/mg protein 이라고 보고하였는데 정도의 차이는 있으나 이는 본 실험의 결과와 거의 유사한 수준이었다.

Bender 등[2]은 수소이온 투과도와 H⁺-ATPase 활성을 비교하였는데, 일반적으로 손상되지 않은 세포의 최소 수소이온 투과도에 대한 pH는 적어도 막 ATPase의 최적 pH 보다 1 pH unit 정도 높으며, 이 차이는 ATPase가 세포막의 세포질 표면에 위치하고 있고, 세포가 산성배지에 있을 때 세포질은 상대적으로 알칼리상태를 유지하면서 세포막

내외의 ΔpH를 유지할 수 있기 때문이라고 하였다.

본 실험에서는 *Leu. mesenteroides*의 t_{1/2} 최대 값은 LMw, ANaM100 모두 pH 6.0일 때였는데, H⁺-ATPase 활성의 maximal activity는 LMw는 pH 6.0, ANaM100은 pH 5.5일 때로 나타나, Bender 등[2]의 보고와는 차이가 있었는데, 이는 본 균주의 경우 내산성뿐만 아니라 내염성도 갖는 균주로 변이시키므로써 세포의 ATPase 활성이 변화하였기 때문인 것으로 보인다.

Mg⁺⁺ 해리도

Mg⁺⁺의 해리도 측정은 산성환경에서는 균주의 세포막이 손상되어 세포의 무기질이 유출되며, 특히 Mg⁺⁺의 경우

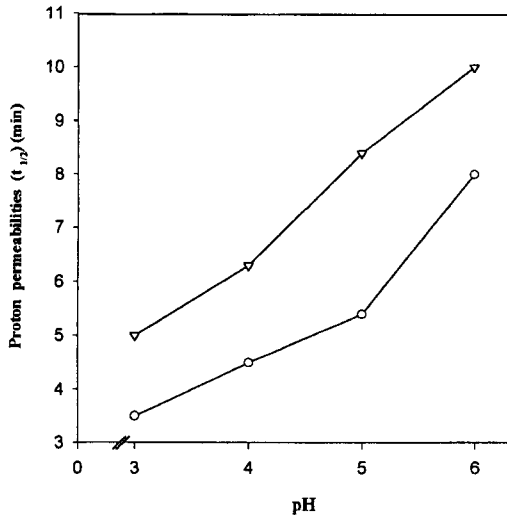


Fig. 3. Proton permeabilities of the wild and mutant stains *Leu. mesenteroides* as a function environmental pH value. Symbols: (○), *Leu. mesenteroides* wild type LMw; (▽), *Leu. mesenteroides* mutant ANaM100.

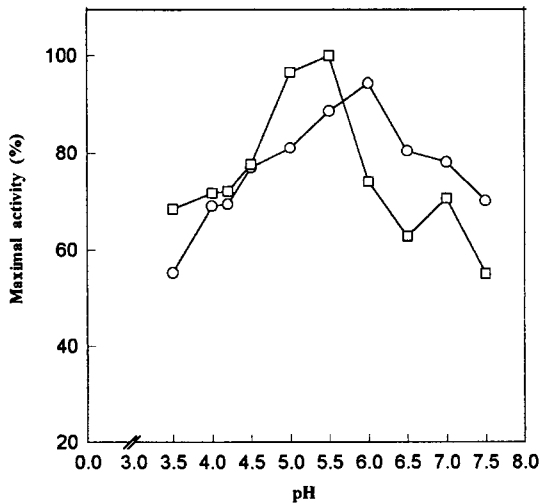


Fig. 4. Activity-pH profiles for ATPases of membranes isolated from cells of wild type LMw and mutant ANaM100 of *Leuconostoc mesenteroides*. Symbols: (○), *Leu. mesenteroides* wild type LMw; (□), *Leu. mesenteroides* mutant ANaM100.

세포막의 손상 정도가 클수록 해리량이 많다고 알려져 있어[3] 이를 측정하여 비교함으로써 내산성 균주의 특성을 알 수 있다.

*Leu. mesenteroides*의 변이균주 ANaM100의 pH profile 별 Mg⁺⁺ 해리도를 야생균주 LMw와 비교하여 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. LMw의 경우 pH 4에서 2시간 경과 후 Mg⁺⁺ 해리도가 27.6%로 최대를 보였으나, ANaM100은 12.8%로 약 1/2 정도 적게 Mg⁺⁺이 유출되었고, pH 6.0에 있어서는 모든 시간대에서 야생균주 LMw, 변이균주 ANaM100 모두 1% 이내의 Mg⁺⁺이 유출되어 거의 산 손

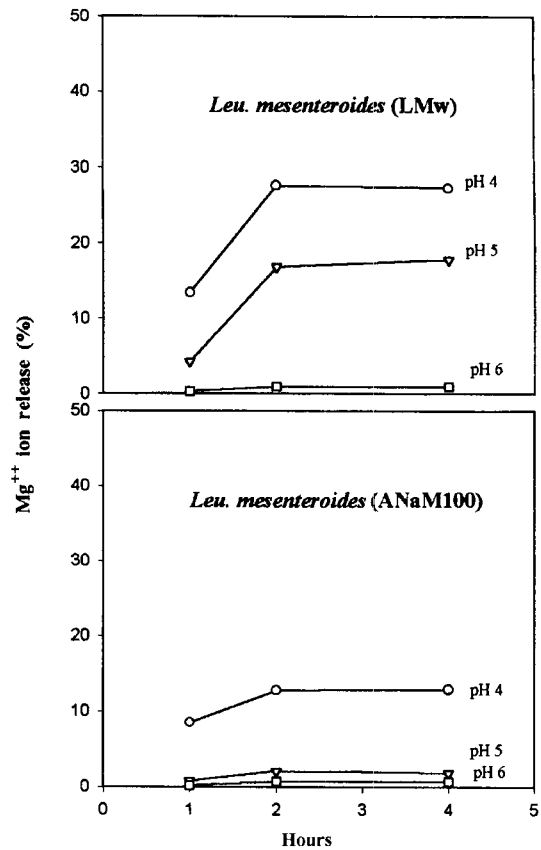


Fig. 5. Mg⁺⁺ ion released from cell membranes of *Leuconostoc mesenteroides*.

상을 입지 않았음을 알 수 있었다. Kim 등[11]은 *Leu. mesenteroides*의 야생균주와 변이균주의 pH별 Mg⁺⁺ 해리도를 측정한 결과 pH 4에서 2시간 경과후 야생균주의 Mg⁺⁺ 해리도가 36.5%로 최대를 보이고, 변이균주는 13%로 약 1/3 가량 적게 Mg⁺⁺이 유출되었다고 하였는데 이는 본 결과와 유사한 경향을 보였다. Bender 등[3]에 의하면 균주의 세포막이 산성화에 의해 손상을 받게 되면 세포중의 Mg⁺⁺, K⁺ 등이 세포 밖으로 유출되는데, 이중 Mg⁺⁺이 더 민감한 지표로서 pH가 낮을수록 용해가 빠르며, 균주가 내산성일수록 Mg⁺⁺ 해리도가 낮아지게 된다고 보고하였다. 본 실험에서도 pH가 낮고, 시간이 경과할수록 Mg⁺⁺ 해리도가 높아짐을 보였으며, 동일한 pH, 동일 경과시간에 있어서는 변이균주 ANaM100이 야생균주 LMw와 비교해 볼 때 Mg⁺⁺ 해리도가 상대적으로 낮아 내산성의 특성을 갖는 것을 알 수 있었다.

세포막의 지방산조성

Table 1에서 나타나듯이 *Leu. mesenteroides*의 야생균주 (LMw)와 변이균주(ANaM100) 세포막에서의 지방산 함량은 C_{16:0}, C_{18:2}, C_{18:1} 그리고 C_{19:0,cyclo} 등이 주로 검출되었으며, 야생균주와 변이균주간의 지방산 함량은 C₁₂, C_{14:1},

Table 1. Fatty acids of wild and mutant strains of *Leu. mesenteroides*

	Fatty acid (%)															
	C ₁₀	C ₁₂	C _{14:1}	C _{14:0}	C _{16:1}	C _{16:0}	C _{17:1}	C _{18:2}	C _{18:1}	C _{18:0}	C _{19:1}	C _{19:0,cyclo}	C _{20:1}	C _{20:0}	C _{22:0}	Unknown
LMw	ND	0.02	0.27	6.21	7.51	18.18	0.65	16.09	24.03	7.87	1.10	2.26	5.01	1.23	0.9	8.67
ANaM100	ND	4.98	4.51	4.71	4.89	19.09	0.39	7.2	16.03	8.94	0.46	14.04	3.14	0.62	1.0	10.0

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 10°C/min., ② 3°C/min., ③ 4°C/min., Carrier gas: N₂, Gas flow rate : 200 kPa

C_{16:0}, C_{18:0}, C_{19:0,cyclo} 및 C_{22:0}이 야생균주 LMw보다 변이균주인 ANaM100에서 증가되는 경향을 보였고 나머지 지방산은 감소되는 경향을 보였다. C₁₂는 야생균주 LMw가 0.02% 였던 반면, 변이균주 ANaM100은 4.98%로서 가장 높은 비율의 증가를 보였으며, C_{19:1}은 야생균주 LMw가 1.10%, 변이균주 ANaM100이 0.46%로서 가장 높은 비율의 감소를 보였다. 한편, Farrell 등[5]은 균들의 세포막 지방산 조성은 배지종류, 배양온도 등과 같은 배양조건과 배양시간에 따라 큰 차이가 있었다고 보고하였으며, VeerKamp[21]는 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*균주에서, Sim 등 [19]은 *Lac. casei* YIT 9018에서 지방산 조성을 조사한 결과 C_{18:1}의 감소와 C_{19:0,cyclo}의 증가는 원형질막의 인공위액에 대한 내성을 증진시켜 내산성을 증가한다고 하였는데, 이는 본 실험의 결과와도 일치하여 변이균주가 내산성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

요 약

Adipic acid에 대해 저항성을 갖도록 변이된 *Leu. mesenteroides*(ANaM100)의 내산성 특성을 야생균주(LMw)와 비교한 결과 수소이온 투과도의 경우 pH 5에서 t_{1/2} 값이 *Leu. mesenteroides*의 야생균주는 5.4분, 변이균주는 8.4분으로서 변이균주가 내산성이 높았다. H⁺-ATPase 활성은 maximal activity가 LMw는 pH 6.0에서 0.87 unit/mg protein, ANaM100은 pH 5.5에서 0.92 unit/mg protein으로서 변이균주가 야생균주보다 활성이 높았다. 세포막의 산손상(acid damage)에 의한 Mg⁺⁺ 해리도에서도 pH 4.0에서 2시간 경과후 LMw는 27.6%, ANaM100은 12.8%로서 야생균주에 비해 약 1/2가량 Mg⁺⁺이 적게 유출되어 산에 의한 세포막의 손상이 적었다.

원형질막의 지방산 조성은 변이균주에서 C_{18:1}은 감소하고, C_{19:0, cyclo}는 증가하여 내산성이 증대되었다. 따라서 변이균주의 내산성이 야생균주에 비해 증가되었음이 확인되었다. 또한 adipic acid가 첨가된 배지에서 변이균주의 증식이 야생균주에 비하여 우수하여 변이균주가 adipic acid

저항성을 함유함을 확인하였다.

REFERENCES

- Ahn, S. J. 1988. The effect of salt and food preservatives on the growth of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Korean J. Soc. Food Sci.* 4: 39-50.
- Bender, G. R. and R. E. Marquis. 1987. Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2124-2128.
- Bender, G. R., S. V. W. Sutton, and R. E. Marquis. 1986. Acid tolerance, Proton permeabilities, and membrane ATPases of Oral *Streptococci*. *J. Infect. Immun.* 53: 331-338.
- Dencher, N. A. 1990. Dynamics and biogenesis of membranes Springer Verlag. pp. 343-360 New York.
- Farrell, J. and A. H. Rose. 1967. Temperature effects on microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 21: 101-120.
- FDA. 1996. Code of federal regulations, title 21 parts 170 to 199: 439.
- Graham, J. M. and J. A. Higgins. 1993. Methods in molecular biology (Biomembrane protocols). Humana press inc. 19: 197-202.
- 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. chemi.* 268: 2828-2835.
- Kim, W. J., K. O. Kang, K. H. Kyung, and J. I. Shin. 1991. Addition of Salts and Their Mixtures for Improvement of Storage Stability of Kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 188-191.
- Kim, Y. C. 1997. Characteristics of the acid-tolerance mutant *Leuconostoc* sp. and its effect as a starter for the acidification-retardation of Kimchi. pp. 117-147 Ph. D. thesis Kon-Kuk Univ. Korea.
- Kim, Y. C., E. Y. Jung, E. H. Kim, D. H. Jung, S. H. Jung, D. H. Yi, T. J. Kwon, and S. M. Kang. 1998. Properties of acid tolerance of acid-resistant mutant *Leuconostoc mesenteroides* which was improved as Kimchi starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 102-109.
- Kirazov, L. P., L. G. Venkov, and E. P. Kirazov. 1993. Com-

- parison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing fractions. *Anal. Biochem.* **208**: 44–48.
13. Kobayashi, H., N. Murakami, and T. Unemoto. 1982. Regulation of the cytoplasmic pH in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **257**: 13246–13252.
 14. Lee, C. Y., H. S. Kim, and J. K. Chun. 1968. Studies on the manufacture of canned “Kimchi”. *J. Korean Agri. Chem. Soc.* **10**: 33–38.
 15. Matsuda, T., T. Yano, A. Maruyama, and H. Kumagai. 1994. Antimicrobial activities of organic acids determined by minimum inhibitory concentrations at different pH ranged from 4.0 to 7.0. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **41**: 687–702.
 16. 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.
 17. McDonald, L. C., H. P. Fleming, and H. M. Hassan. 1990. Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2120–2124.
 18. Mheen, T. I. and T. W. Kwon. 1984. Effect of Temperature and Salt Concentration on Kimchi Fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16**: 443–450.
 19. Sim, J. H., S. K. Kim, Y. J. Baek, T. K. Oh, and H. C. Yang. 1995. Influence of Culture Conditions on Acid Tolerance of *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Kor. J. Appl. Microbiol Biotechnol.* **23**: 17–23.
 20. Yamamoto, Y., N. Karube, K. Higashi, and H. Yoshii. 1987. Inhibitory Activity of Adipic Acid on Food Spoilage Microorganisms. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* **34**: 88–93.
 21. Veerkamp, J. H. 1971. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J. Bacteriol.* **108**: 861–867.

(Received November 4, 1999)