특집 : 유산균의 산업적 이용(Ⅲ)

유산균의 유기산 대사

정 창 민
(주)바이오리더스

자연계에서 미생물의 활동에 의한 유기물의 무기화는 물질 순환의 사이클을 완성시켜 생물은 그 때문에 안정한 생활을 영위할 수 있다. 이 유기물의 무기화는 넓은 의미로는 부패 및 발효이다. 단지, 생화학적 과정으로 부패와 발효만을 본다면, 본질적인 차이는 없지만 원재료가 미생물에 의한 물질적 변화를 받은 후에 인간에 있어 무용한 것으로 되었을 경우를 부패라 하며, 유용한 것으로 될 경우에 있어 발효라 부르는 점이 있다. 부패는 자연물질의 중요한 구성성분인 단백질 및 그 외의 함질소 유기화합물이 미생물의 혐기적인 작용에 의해 아민류 및 황화 수소등이 생성되는 결과로서 악취를 생성하나, 발효는 식물조직에 있어서 주요 유기 화합물인 탄수화물의 분해 결과로서 알코올 및 유기산등을 생성하는 특징이 있다. 일반적으로 식품 발효생산의 특징은 미생물상의 천이를 제어하는 것으로, 그 수단으로서는 유산균에 의한 유산의 생성, 효모에 의한 alcohol의 생성, 발효계에 식염의 첨가, 발효계내의 산소 공급의 제어 및 NO_2^- 및 SO_3^{2-}의 첨가 방법을 들수 있다. 이와 같은 방법에 의해서 식품은 발효의 과정을 거치나, 발효 미생물중에서 대표적인 것으로 유산균을 들 수 있다.

유산균은 19세기 중반 Pasteur에 의해서 그 존재가 밝혀진 후, Metchnikoff의 불로 장수설이 제창된 이후에 주목이 집중되었으며, 항암 효과, 감염방어 효과, 항균 작용, 항 콜레스테롤 및 항 변이원 작용등에 관한 유산균의 생리적 기능에 대한 연구 결과는 몸에 좋은 음식물의 섭취를 통하여 건강을 유지 관리하고 질병을 예방해보려는 국민들의 의식과 더불어 유산균을 사용한 발효 유제품에 대한 관심이 높아지고 있다. 한편, 유업계에서 사용되고 있는 유산균 starter로서의 기능으로는 당의 발효(유산의 생성 및 오염균의 억제), 단백질의 분해(생육에 필요한 아미노산, peptide의 생성 및 cheese의 숙성), flavor의 생성(유기산, acetaldehyde, actoin 및 diacetyl), 조직의 부여(산 생성에 의한 유 단백질의 응고 및 세포외 다당 물질) 및 항균 물질의 생산(유산에 의한 pH의 저하, 과산화 수소, diacetyl, bacteriocin 등등)이 중요하다[1]. 따라서 본 고에서는 이러한 유산균의 특성 중에서 발효유제품의 flavor 생성에 관련한 유산균의 유기산 대사에 관하여 논하려 한다.

유산균에 의해 대사되는 유기산 중에서 중요한 것으로는 발효 제품의 풍미 성분인 diacetyl 및 acetoin의 생성에 직접적으로 관여하는 Citrate의 대사를 들 수 있으며, 이러한 풍미 성분의 생성능력을 갖고 있는 균주로서는 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*와 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* 등이 일반적이나, 유산간균인 homo-또는 hetero-fermentative *lactobacilli*의 일부 균주들도 Citrate를 대사해서 풍미 성분을 생산하며[2], 그의 대사과정에 대해서는 간략히 Fig. 1에 나타냈다. 그러나, 이러한 균주들에 의한 citrate의 이용성은 citrate를 세포내로 유입하는 citrate permease(Cit P)의 유전자가 plasmid에 code되어 있는 관계로 인하여 불안정한 것으로 많은 연구자에 의하여 밝혀졌다. 특히, Nakamura[3]는 *Lb. plantarum* IFO 3070의 균주로부터 DNA plasmid의 제거제인 Acridine orange 및 Etidium bromide를 사용하여 얻은 Citrate 대사 결손 주와 wild type 균주와의 plasmid DNA를 비교 분석한 결과, 7MDa의 plasmid DNA가 Citrate 대사에 필요한 것으로 보고하였다. David와 그의 연구팀은 *Lac. lactis* 및 *Leuconostoc*속의 균주들로부터 Plasmid에 code되어 있는 *cit*P 유전자를 cloning하여 그의 염기 배열을 결정하여, 그의 상동성은 거의 일치하는 것으로 보고하고 있다[4,5]. 한편, 이와 더불어, Kempler등[6]은 citrate를 acetate 및 oxaloacetate로 분해하는 citrate lyase는 citrate 투과 효소를 code하고 있는 plasmid의 결손에 의해서 효소의 활성이 저하되며, 이의 원인으로서는 citrate 분해효소의 유도적인 생산에는 세포내로 유입된 citrate가 활성화 물질로서 작용하기 때문이라고 추정하였다. 한편, Morishita등[7]은 *Lb. plantarum* ATCC 8014, Lb. casei ATCC 7469 및 *Lb. helveticus* ATCC 15009의 균주를 사용하여, citrate cycle에 관여하는 효소의 활성을 측정한 결과를 토대로 이 균주들에 있어서의 불완전한 TCA cycle을 시사하고 있다(Fig. 1).

한편, Radler등[8]은 유산균 78균주를 사용하여 Tartrate의 대사 경로를 검토하여, Homo 발효형식을 갖고 있는 *Lb. plantarum*과 Hetero 발효의 *Lb. brevis*의 두 균주만이 Tartrate를 분해하였으며, *Lb. plantarum*에 의한 최종 산물은 각각 유산, 이산화탄소 및 초산인 반면에, *Lb. brevis*의 경우에는 초산, 이산화탄소 및 succinate를 생성하는 것으로 보고하고 있다. 또한 이 대사 경로에 있어서 NAD 및 $NADH_2$가 co-factor로서 작용하며, NAD는 이산화탄소 및 초산의 생성에, $NADH_2$는

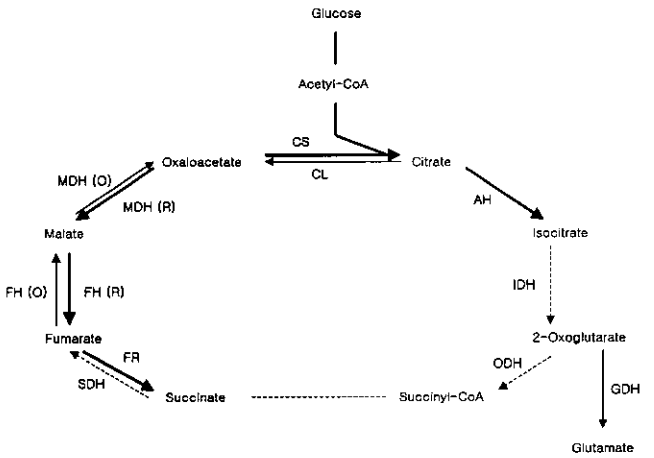

Fig. 1. Postulated Non-cyclic Tricarboxylate Pathway in Lactobacilli. Thick arrow, enzyme the activity of which was demonstrated in all the strains; Thin arrow, enzyme the activity of which was demonstrated in one to three strains; Dotted arrow, enzyme the activity of which could not be detected in all strains; Dotted line, enzyme the activity of which was not measured in all strains. Abbreviations; CS, citrate syntase; AH, aconitase; IDH,isocitrate dehydrogenase; ODH, 2-oxoglutarate dehydrogenase; SDH, succinate dehydrogenase; FH, fumarase; MDH, malate dehydrogenase; CL, citrate lyase; FR, fumarate reductase; GDH, glutamate dehydrogenase; (O), oxidative reaction; (R), reductive reaction.

유산 및 succinate의 생성에 영향을 미치고 있다.

이 외에 유산균의 주요한 유기산 대사로서는 L-Malate로부터 L-Lactate를 생산하는 경로이며, Fig. 1에 나타낸 바와 같이 이에 관련하는 효소에 의해 3종류의 경로로 나누어진다. 즉, Malolactic enzyme에 의해 중간 대사산물의 생성 없이 직접 유산과 이산화탄소로 변환되는 경로, L-malate enzyme의 작용에 의해 Pyruvate로 탈탄산된 후, 유산으로 변환되는 과정 및 L-malate dehydrogenase의 작용에 의해서 Oxalacetate를 생성되어, 이것이 Pyruvate를 경유하여 유산으로 변환되는 과정이다. 이 대사 과정 중에서 L-malic acid로부터 Lactic acid로의 전환 과정인 malolactic fermentation은 와인 제조 시 Yeast들에 의한 알코올 발효 후에 유산균에 의해 일어나는 대사로, 와인의 산미 및 풍미의 조절에 이용되는 중요한 step 중의 하나이다. 이러한 대사능을 갖고 있는 유산균으로는 *Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Oenococcus*속 등의 광범위한 균종에 분포하고 있지만, 일반적으로 과즙 및 와인의 발효 과정에서 분리되는 유산균은 *Oenococcus oenos, Leu. mesenteroides* 및 *Lb. plantarum*이 대부분이며, *Pediococcus*속의 분리 빈도는 낮다. Caspritz등[9]은 *Lb. plantarum*의 malolactic enzyme은 2개의 동일한 subunit로 구성되어 있으며, 분자량은 140kDa으로 보고하고 있으며, Labarre등[10]은 *O. oeni*의 malolactic enzyme의 유전자 *mleS*의 염기배열을 결정하여, *Lac. lactis*의 유전자에 매우 상동한 것으로 보고하고 있다. 한편, 본 효소는 NAD 및 Mn^{2+}에 의존적으로 Malate에 작용하며, Olsen등[11]은 *Lb. plantarum*을 glucose 제한하에서의 Chemostat 배양 시, malate를 첨가함으로서 균체량이 26% 증가하는 것으로 보고하고 있다. 이러한 현상에 대해 Renault등[12]은 malolactic 발효에서는 기질 인산화에 따른 대사 energy의 생성이 직접적으로 일어나지 않는 점으로부터 유산균에 의한 malolactic 발효는 세포내로 유입된 malate는 탈탄산되어 proton이 소비됨으로서 세포내의 pH 유지에 유효하게 작용하기 때문이라고 추정하였다. 아울러 Loubiere등[13]은 *Leuc. oenos*를 glucose 및 malate 공존하에서 malate의 수송에 대해 검토한 결과 본 균은 malate를 monoanion의 uniport와 malate의 monoanion/H+의 symport에 의해 유입되는 것에 의해 균의 증식성이 glucose 단독 배양보다도 개선되는 것으로 보고하고 있다.

한편, 와인의 제조에 있어서 yeast에 의한 alcoholic fermentation과 malolactic fermentation이 동시에 일어나도록 하기 위하여, Saccharomyces cerevisiae에서 mleS 유전자를 발현시켜 malate의 분해를 검토하였으며[14], Volschenk등[15]은 malate permease를 code하는 유전자 *mae1*을 이용하여 recombinant malolactic *S. cerevisiae* 균주를 작제하여 malate의 효과적인 분해를 보고하고 있다.

Malate로부터 Fumarate hydratase(EC 4.2.1.2)의 작용에 의해 생성되는 fumarate의 대사능을 갖고 있는 유산균으로는 *Lb. brevis*가 알려져 있으며, Radler등[16]은 fumarse 활성의 유무는 유산균의 균종에 따라 다르며, *Streptococcus*속은 fumarase 활성이 없는 것으로 보고하고 있다. 한편, Jung등[17]은 유산균 49균주에 대해서 fumarate로부터 L-malate의 생성능에 대해 조사한 결과, *Streptococcus*속, *Enterococcus*속, *Lactococcus*속 및 *Leuconostoc*속의 균주는 L-malate의 생성능이 약한 반면에 *Lactobacillus*속에서는 실험에 공시한 균주 전부가 fumarase의 활성을 갖고 있는 것으로 보고하고 있다. 특히, L-marate의 높은 생성능을 나타낸 균주로서는 *Lb. delbrueckii, Lb. curuvatus, Lb. fermentum* 및 *Lb. plantarum*이었으며, 그중에서도 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*가 가장 높은 생성능을 나타내었다. Fumarase는 TCA cycle을 구성하는 중요한 효소 중의 하나로 TCA cycle을 보유하고 있지 않은 유산균이 보다 강한 Fumarase 활성을 보유하고 있는 생리적 필요성에 대한 연구는 상당히 흥미 있는 일이라 하겠다. 한편, 이 균주를 사용하여 fumarate가 균의 생육에 미치는 영향을 검토한 결과, fumarate를 생육 배지에 첨가함으로서 균의 생육도는 약 1.3배 증가하는 것으로 나타났다 (미발표). 유산균의 생육에 있어 유기산에 의한 촉진 효과에 대해서는 오래 전부터 알려져 왔으며, Barnen등[18]은 TCA cycle에 관여하는 Citrate, isocitrate, succinate 및 L-malate가 *Lb. casei* 393

균주의 생육은 촉진되나, fumarate는 균의 생육을 저해한다고 하였다. 한편, Harvey등[19]은 citrate에 의한 유산균의 생육 촉진 효과에 대하여 당류를 energy원으로서 형성되는 세포질 구성 성분의 합성능이 citrate를 첨가하는 것에 의해 증가하기 때문이라고 추정하였다.

발효식품 제조에 있어 미생물의 역할은 풍미 성분의 형성에 상당히 중요하다. 그 중에서도 미생물의 대사 산물로서의 유기산은 전통발효식품인 된장 및 간장, 발효 유제품 뿐만 아니라 과즙 및 청량음료등의 정미·산미 성분으로서 중요한 역할을 하고 있으며, citrate를 포함하는 수종의 유기산은 산미료로서 산업계에서 이용되고 있다. 그러나, 각각의 유기산의 산미도 및 질은 다르며, 그들의 양적인 균형 여하에 의해 제품의 풍미에 결함을 초래할 수 있으나, 이러한 것은 제품의 제조에 사용하는 균주의 대사 특성을 이해함과 동시에 효소학적·유전학적 연구를 통하여 제품의 풍미 개선을 도모할 수 있을것으로 생각된다.

참고문헌

1. Tamime, A. Y. 1981. In Dairy Microbiology Vol. 2, R. K. Robinson(Ed), Applied Science Publishers, GB, p113.
2. Medina de Figueroa R, Alvarez F, Pesce de Ruiz Holgado A, Oliver G, Sesma, F. 2000. Citrate utilization by homo- and heterofermentative lactobacilli. *Microbiol Res.*, **154(4)**: 313-320.
3. Nakamura S. 1993. Citarate 발효성 *Lactococcus lactis*에 있어서 plasmid DNA의 기능 해석 및 대사 특성의 개조에 관한 연구, 박사학위 논문, Okayama Uni.
4. David S, van der Rest ME, Driessen AJ, Simons G, de Vos WM. 1990. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the *Lactococcus lactis* citrate permease gene. *J Bacteriol.*, **172**: 5789-5794.
5. Vaughan EE, David S, Harrington A, Daly C, Fitzgerald GF, De Vos WM. 1995. Characterization of plasmid-encoded citrate permease(citP) genes from *Leuconostoc* species reveals high sequence conservation with the *Lactococcus lactis citP* gene. *Appl Environ Microbiol.*, **61**: 3172-3176
6. Kempler G. M. & McKay L. L. 1979. *Appl. Envirom. Microbiol.*, **37**: 316.
7. Morishita T. and Yajima M. 1995. Incomplete operation of biosynthetic and bioenergetic functions of the citric acid cycle in mutiple auxotrophic lacobacilli. *Biosci. biotech. Biochem., 59*: 251-255.
8. Radler F. and Yannissis C. 1972. *Arch. Mikrobiol.*, **82**: 219.
9. Caspritz, G and F. Radler. 1983. Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum* Purification, properties, and distribution among bacteria. *J. Biol. Chem.*, **258**: 4907-4910.
10. Labarre C, Guzzo J, Cavin JF, Divies C. 1996. Cloning and characterization of the genes encoding the malolactic enzyme and the malate permease of *Leuconostoc oenos. Appl Environ Microbiol.*, **62(4)**: 1274-1282.
11. Olsen EB, Russell JB, Henick-Kling T. 1991. Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum* a basis for energy derivation from malolactic fermentation. *J Bacteriol,* **173(19)**: 6199-6206.
12. Renault P, Gaillardin C, Heslot H. 1988. Role of malolactic fermentation in lactic acid bacteria. *Biochimie.*, **70(3)**: 375-379.
13. Loubiere P, Salou P, Leroy MJ, Lindley ND, Pareilleux A. 1992. Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *J. bacteriol.* **174**: 5302-5308.
14. Ansanay V, Dequin S, Blondin B, Barre P. 1993. Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis. FEBS Lett.*, **332**: 74-80.
15. Volschenk H, Viljoen M, Grobler J, Bauer F, Lonvaud-Funel A, Denayrolles M, Subden RE & van Vuuren HJ. 1997. Malolactic fermentation in grape musts by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae. Am. J. Enol. Vitic.*, **48**: 193-197.
16. Radler F, Brohl K. 1984. The metabolism of several carboxylic acids by lactic acid bacteria. *Z Lebensm Unters Forsch,* **179**: 228-31.
17. 鄭 昌敏, 宮本 拓, 片岡啓, 米屋武文, 大平猪一朗. 1993. Fumaric acidからL-Malic acidの生産能を有している乳酸菌の檢索とその性質. 日本食品工業學會誌, **40**: 316.
18. Branen AL, Keenan TW. 1970. Growth stimulation of Lactobacillus casei by sodium citrate. *J Dairy Sci.*, **53**: 593-597.
19. Harvey R. J. and Collins E. B. 1963. *J. Bacteriol.*, **86**: 1301.