

김치에서 산내성을 가진 *Leuconostoc mesenteroides* LM3의 분리

사금희 · 백상규 · 윤혜선 · 강경희 · 정진국 · 김일섭 · 문혜연 · 김사열 · 유춘발¹ · 진익렬*

경북대학교 대학원 미생물학과
¹대구대학교 식품공학과

Isolation of an acid-tolerant *Leuconostoc mesenteroides* LM3 from Kimchi

Geum-hee SA, Sang-Kyoo PAIK, Hae-sun YUN, Kyung-hee KANG, Jin-kook JUNG,
Il-sup KIM, Hye-yon MOON, Sa-Yeul GHIM, Choon-Bal YU¹ and Ingyol JIN*

Department of Microbiology, Graduate School, Kyungpook National University, Taegu 702-701,
¹Department of Food Sciences and Technology, Taegu University, Taegu 712-714, South Korea

Abstract

In order to understand stress response of *Leuconostoc mesenteroides* against lactic acid, a new *Leuconostoc* sp. which has acid tolerance was isolated from various Kimchi samples. And it identified as *Leuconostoc mesenteroides* LM3 by comparing its fatty acid composition with reference strain. Its growth pattern was investigated by adding a given concentration of lactic acid at the lag phase to the stationary phase. In the DeMan, Rogosa, Sharpe (MRS) media containing over 0.4% (final v/v) lactic acid, this strain grew slowly. After exposure of the stationary phase cells to 4% of lactic acid for 60 min, this strain could survive, whereas a reference strain, *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505, showed no survival. And changes of trehalose concentration, the activity of trehalase and ATPase in the growth of *Leuconostoc mesenteroides* LM3 after addition of 0.6% (final v/v) lactic acid were investigated : After exposure to lactic acid, trehalose concentration in this strain was increased in comparison with no treatment, but its trehalase activity was not changed. And its ATPase activity was constant, and intracellular pH was almost constant. This result meant *Leuconostoc mesenteroides* LM3 should have a tolerance against lactic acid. It remains to further study the mechanism of this acid tolerance.

Key words – *Leuconostoc*, acid tolerance, lactic acid, Kimchi

서 론

한국 전통발효 음식인 김치의 맛을 결정하는 것은 배추나 무 등 여러 가지 원료와 젖산균의 적절한 발효에 의한

그 생산물들이다. 김치숙성에 이르기까지는 *Leuconostoc mesenteroides*가 우점균으로 나타나는데, 이 균주는 김치발효 초기에 등장하여 젖산, 아세트산, 이산화탄소 등을 생산하여 김치를 숙성시킨다. 보통 숙성 김치의 pH는 4.2 정도이며 0.6% 정도의 젖산 농도를 나타냄으로서 깊은 맛과 좋은 향을 가지게 된다[13]. 김치발효가 후기로 진행되면서 우점균인 *Leuconostoc mesenteroides*의 균수가 줄어들고 이에

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-53-950-5377, Fax : 82-53-955-5522
E-mail :

관하여 *Lactobacillus plantarum*이나 *Saccharomyces cerevisiae* 등이 우점균으로 대체되는데, 이들은 *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 젖산의 3~4배의 젖산을 생산하여 고농도의 젖산이 축적됨에 따라 김치를 pH 3 이하로 떨어지게 하여, 결과적으로 *Leuconostoc mesenteroides*는 사멸하게 되고 김치는 시어지게 된다. 그래서 먹기에 알맞게 발효된 김치의 상태를 유지하기 위해서는 *Leuconostoc mesenteroides*의 우점률 및 생존율을 유지시키는 것이 필요하다.

이 연구는 대구지역의 김치들을 수거하여 김치에서 산내성을 가진 *Leuconostoc mesenteroides*를 분리하였다. 그래서 분리한 *Leuconostoc mesenteroides* LM3의 산내성도를 알아보기 위해 균의 성장곡선을 확인하고, 유도기 및 지수성장기 등 각 성장기에 젖산을 배지에 첨가함으로써 성장에서의 영향과 pH의 변화를 관찰하고 대조균주와 비교하였으며, 성장시기별로 젖산을 첨가하여 각종 스트레스에 대한 chemical protector인 trehalose의 세포내 축적 정도와 이를 분해하는 trehalase 활성 및 ATPase에 의한 세포내 pH 조절가능성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

균주분리 및 배양

대구지역 식당 및 가정에서 무작위로 채취한 200여 김치 샘플에서 산내성을 가진 *Leuconostoc mesenteroides* 균주를 분리하였다. 대조균주는 한국생명공학연구원 유전자은행에서 분양받은 *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505(ATCC8293, NCDO523)을 사용하였다. 이 실험에서 사용된 균주는 젖산균 선택배지인 MRS(DeMan, Rogosa, Sharpe)배지 (Difco, Le Pont de Claix, France)에서 30℃, 24시간동안 정치배양을 하였다.

젖산 처리조건

젖산에 대한 내성을 확인하기 위해서 분리균과 대조균을 대수기와 정지기까지 배양하고 각 생육주기의 균체를 모아 세척한 뒤, 다시 새 MRS액체배지로 옮긴 후 0.6% (v/v) 젖산을 첨가하였다. 1시간 동안 젖산을 처리한 후 균체를 모아 실험재료로 사용하였다.

선택배지

1% CaCO₃를 첨가한 MRS 한천배지에 김치샘플을 10⁶

배까지 희석한 뒤 도말하여 콜로니 주변에 투명한 환을 생성하는 균을 일차적으로 선별하고 균을 분리하였고, 0.002%의 bromophenol blue를 첨가한 MRS한천배지에서 균침색의 콜로니를 나타내는 균주를 이차적으로 선별하였다. 그리고 Lee의 방법[3]을 응용하여 Sucrose 한천배지(Sucrose 2%, peptone 1.5%, NaCl 0.5%, Tween80 0.1%, Yeast extract 0.6%, L-cysteine 0.01%, Agar 1.5%, pH 6.5)을 최종 선택배지로 이용하였다.

지방산 분석

Miller의 방법을 응용[17]하여 Gas chromatography를 실행하였다. 50 ml의 MRS배지에서 배양한 세포를 screw cap tube(Pyrex)로 옮겨 15% NaOH와 50% methanol을 1 ml 넣고 100℃에서 30분간 끓인 후 다시 냉각시킨다. 6.0N HCl 325 ml, methanol 275 ml 혼합한 용액을 2 ml 넣고 섞은 후 80℃에서 10분간 가열하고 찬 물로 냉각시킨다. Hexan과 Methyl-tert Butyl Ether를 동량으로 넣은 용액을 1.25 ml 첨가한 뒤 10분간 섞어준다. 용액이 두 층으로 나뉘면 하층의 용액을 제거하고 NaOH 용액(10.8 g NaOH, 900 ml d'H₂O)을 3 ml 넣고 5분간 섞어준다. 두 층으로 나뉘면 상등액을 다시 screw sample vial (Hewlett Packard)로 옮겨 시료로 사용하였다. 지방산의 분석에는 Hewlett Packard series II Gas Chromatography model 5890A (Microbial ID, Inc. Delaware, USA)를 이용하여 측정하였다. 이용한 separation column은 25 cm×0.22 cm×0.33 cm methyl phenyl silicone fused silica capillary column (HP 1909B-102)을 사용하였고, Microbial Identification System Software (Microbial ID, Inc., Delaware, USA)를 통해 지방산의 profile을 확인하였다. Standard calibration 용액 (Microbial ID, Inc., Delaware, USA)을 이용하여 standard peak을 잡았고, 이를 통해 시료의 peak을 구하였다. Gas Chromatography의 조건은 다음과 같이 잡았다[14]. Carrier Gas, Hydrogen; Column Head Pressure, 10 psi; Split Ratio, 100 : 1; Split Vent, 50ml/min; Septum Purge, 5 ml/min; FID Hydrogen, 30 ml/min; FID Nitrogen, 30 ml/min; FID Air, 400 ml/min; Initial Temperature, 170℃; Program Rate, 5℃/min; Final Temp, 270℃; FID Temperature, 300℃; Injection Port, 250℃; Injection volume, 2 μl.

젖산 존재하의 생육

MRS 액체배지에서 24시간 배양한 균주를 0.1%에서 1.0%의 젖산을 첨가한 MRS 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 30°C에서 배양하면서 2시간 간격으로 흡광도와 세포외부 pH를 측정하였다. 흡광도는 Spectrophotometer (Beckman, DU-40, USA)를 사용하여 660 nm에서 측정하였고, extracellular pH는 pH meter (Mettler, DELTA 320, Rev A, UK)를 이용하였다.

젖산에 대한 민감성 측정

MRS 액체배지에서 24시간 배양한 균주를 증류수로 세척하여 균체가 생산하는 젖산을 제거한다. 동량의 새 배지에 옮긴 후, 젖산을 농도별로 첨가하여 1시간 반응 후 추출, MRS 한천배지에 5 μ l 떨어뜨려 30°C에서 24시간 배양한 후 결과를 관찰하였다.

Trehalose 정량

증류수로 세척한 일정한 농도의 세포(10^9 cells/ml)를 1시간동안 끓는 물에 중탕시켜 세포를 용해시키고 원심분리를 통해 그 상등액을 모았다. 상등액 500 μ l를 2배 희석한 뒤, Somogi-Nelson법을 이용해 환원당을 정량하여 대조구로 사용하였다. 그리고 다른 500 μ l의 상등액에 400 μ l의 50 mM phosphate buffer (pH 5.7)를 넣은 후, trehalase (Sigma, Steinheim, Germany)를 1.5 μ l 넣고 37°C에서 24시간 반응시킨 후 Somogi-Nelson법으로 비환원성 말단을 가진 trehalose로부터 해리된 환원당을 정량하였다. Trehalase 반응후의 당정량과 이전의 당정량의 차이로 trehalose의 양 (μ g/mg protein)을 계산하였다.

Trehalase 활성 측정

준비된 균체시료에 50mM Tris-Cl (pH 7.0)과 glass bead를 넣고 micromixer로 파쇄하였다. 원심분리하여 상등액을 모은 후 100 μ l의 상등액은 D-Glucose assay Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 이용하여 반응시키고 340 nm에서 흡광도를 측정하여 세포내 glucose를 정량하였다. 또한 50 μ l의 상등액을 trehalase의 시료로 사용하여 0.5 M trehalose 용액을 넣고 20분간 반응시킨 후 끓는 물에 5분간 끓여 반응을 중지시켰다. 이후 D-glucose assay Kit를 이용하여 반응시킨 다음 340 nm에서 측정하였다. 흡

광도값은 standard curve를 통해 glucose량으로 환산하였으며, 상등액내의 일정한 단백질 농도(mg/ml)를 기준으로 trehalase 반응후의 glucose양과 반응 전의 glucose양의 차이로 trehalase 활성(μ M/min,mg protein)을 정하였다. 단백질 정량은 Bradford 법을 이용하였다[4].

ATPase 활성 측정

세포내 H⁺-ATPase의 활성측정은 Eilis의 방법을 이용하였다[5]. 25 ml의 MRS 액체배지에서 배양한 균을 모아 세척한 후 10 mM MgSO₄가 포함된 75 mM Tris-Cl buffer (pH 6.5) 2.5 ml에 현탁하여 ATPase 활성측정을 위한 균체 시료로서 사용하였다. 균체시료에 250 μ l toluene을 넣고 혼합한 뒤, 35°C에서 5분간 방치하였다. Ethanol을 넣은 드라이아이스와 37°C에 번갈아 넣으며 냉각과 녹임을 2번 반복한 후 균체를 모으고 세척하였다. 다시 위의 buffer 1 ml에 현탁한 후 -70°C에 보관하고 이를 활성측정을 위한 샘플로 사용하였다. 샘플 10 μ l에 990 μ l의 buffer (50mM Tris-Cl, 10 mM MgSO₄, pH 6.5)를 넣고 37°C에서 5분간 방치하고, 미리 준비한 0.1 mM ATP를 125 μ l 첨가하여 37°C에서 반응시킨다. 반응후 malachite green reagent [5.7% (w/v) ammonium molybdate in 6.0 N HCl : 2.3% (w/v) polyvinyl alcohol : 0.08% (w/v) malachite green : water = 1:1:2:2] 를 1 ml 넣고 5 분간 실온에 둬으로써 반응을 중지시키고 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 standard curve를 이용해 ATPase 활성으로 전환하였다. 단위는 μ M/min,mg protein 이고 standard는 NaH₂PO₄로 측정하였다.

세포내 pH 측정

준비된 균체시료를 세척하고 2 ml의 증류수에 현탁하였다. 10 μ M의 5-(and-6)-carboxy SNARF®-1, acetoxymethyl ester, acetate (Molecular Probes, Leiden, Netherlands)를 첨가한 뒤 한 시간 동안 실온에 두었다. 그 후 균체를 모아 세척하고 4 ml 증류수에 현탁한 다음 Fluorescence Spectrophotometer (L20B, 미국 PERKIN ELMER, USA)로 측정하였다. 측정조건은 다음과 같다. Ex : 534nm, Em : 580/610, Slit width : 5mm (Ex, Em) 측정한 값은 pH를 조정된 phosphate buffer를 Fluorescence Spectrophotometer로 측정하여 standard curve를 구한 뒤, 비교하여 pH를 산출하였다.

결 과

김치에서 *Leuconostoc mesenteroides* LM3 분리

대구지역 식당과 가정에서 채집한 김치를 사용하여, CaCO₃가 포함된 MRS배지에서 1차적으로 유산균주를 분리하였다. 즉, MRS한천배지에 도말된 균주의 콜로니에서 젖산을 생산할 경우 투명한 환을 형성하는 특징을 이용하여 젖산발효균(Lactic acid bacteria)를 일차적으로 분리하였다(Fig. 1-A). 이후 분리된 균주에서 *Leuconostoc*속 균주를 분리하기 위해 Bromophenol Blue가 첨가된 MRS배지와 Sucrose배지를 사용하였다(Fig. 1-B and C). *Leuconostoc*속 균주의 경우 bromophenol blue가 포함된 배지에서 자라게 되면 콜로니 전체가 균청색으로 염색되는 모습을 띄게 되고, 또한 sucrose를 탄소원으로 대사할 경우 콜로니의 형태가 끈적한 액체처럼 변하게 된다. 이들 균주 중에서 Gram staining과 fermentation type을 조사하여 균주의 모양과 이산화탄소 생성유무를 확인하고, 위의 배지에서의 결과와 더불어 *Leuconostoc mesenteroides*로 추정되는 균주를 분리하였다. 이들을 대상으로 0.6% 젖산을 함유하는 MRS에서 생육하는 균주를 최종적으로 내산성을 가진 균주로 간주하였다.

위와 같은 과정에서 분리한 균주를 LM3라 명명하고, 그의 지방산 조성을 한국생명공학연구원 유전자은행에 의뢰하여 분석을 하였다(Table 1). 그 결과 탄소수 14개에서 19개 사이에서 지방산 조성이 관찰되었고, C_{16:0}과 C_{19:0}(cyclo w8c)가 전체의 54% 이상을 차지하는 것을 알 수 있었다. LM3균주는 상대적으로 탄소수 18개의 지방산의 함량이 높게 나타났다. 전체적으로 각 탄소 조성 간에 LM3균주와

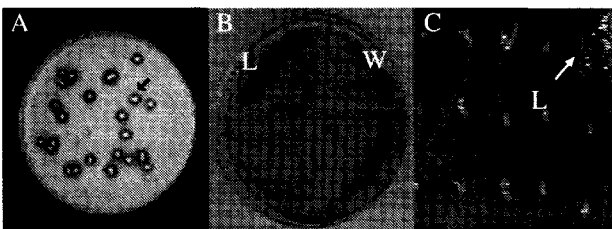


Fig. 1. Isolation of lactic acid bacteria. A, MRS medium containing CaCO₃; B, MRS medium containing BromoPhenol Blue; C, Sucrose medium. W and L denote *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505 and LM3, respectively.

Table 1. Major fatty acid profiles of test strains. KCTC-3505, *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505; LM3, strain isolated from Kimchi

Compound	Percentage (%)	
	KCTC3505	LM3
14:00	7.86	6.49
16:1 w7c/15 Iso 2OH	11.55	11.18
16:00	34.51	34.29
17:0 cyclo	1.18	0.43
18:1 w9c	10.49	13.08
18:1 w7c	4.35	5.93
19:0 cyclo w10c/19w6	9.83	7.66
19:0 cyclo w8c	20.22	20.45

대조균주간의 조성비율이 3% 미만의 낮은 오차가 나타남으로써 LM3균주가 *Leuconostoc mesenteroides*인 것으로 동정할 수 있었다.

젖산 존재하의 분리균주의 성장패턴

분리한 LM3균주의 성장패턴을 알아보고 젖산을 첨가하여 그에 따른 생육저해현상을 조사하였다. 실험결과 이 균주의 성장속도가 대조균주와 크게 다르지 않음을 알 수 있었다. 0.5% 이상농도의 젖산을 첨가한 배지에서 자랐을 때 LM3균주의 경우 성장이 느려지는 것을 관찰할 수가 있었고, 이는 대조균주의 패턴과 비슷하였다(Fig. 2). 그리고 성장속도가 빠른 지수성장기 동안 첨가한 젖산에 의해 외부 pH가 급격히 떨어지는 것을 관찰하였다. 정상적인 성장에서는 초기 pH는 5.5이고 정지기로 들어선 후 pH는 4.2까지 떨어지는 결과를 보여주었다. 그러나 0.2% 젖산을 첨가한 경우 생육이 40% 정도 감소하였고, 0.5% 이상 젖산을 첨가한 경우 균의 성장 속도가 느려졌으며, 더불어 이 농도에서는 초기에 첨가한 젖산에 의해 떨어진 pH도 변동 없이 계속되고 있음을 볼 수 있었다. 균의 성장이 가장 활발한 지수성장기일 때 젖산을 첨가한 결과, 0.4% 이상에서는 성장이 지연되었고 그 역시 대조균주와 같은 결과를 보여주었다(Fig. 3).

젖산에 대한 분리균주의 내산성도

정지기에서 여러 농도로 젖산을 첨가하여 30분씩의 간격을 주어 90분까지 처리하여 생존유무를 관찰한 결과,

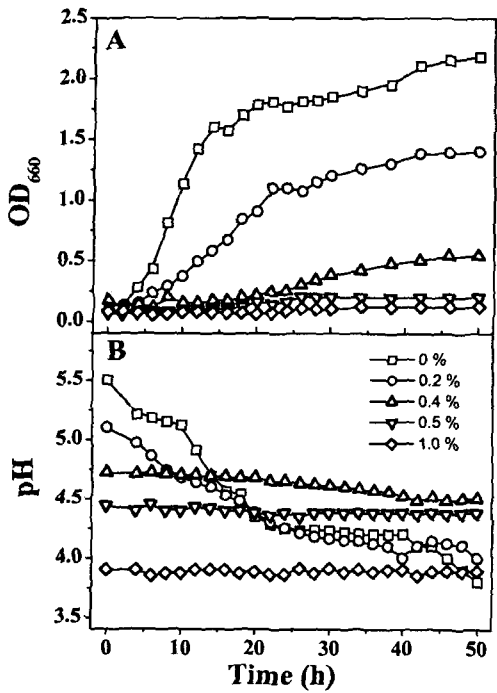


Fig. 2. Growth and extracellular pH of *L. mesenteroides* LM3.

Cells were grown in the MRS media containing 0% (-□-), 0.2% (-○-), 0.4% (-△-), 0.5% (-▽-), and 1.0% (-◇-) of lactic acid. A, Growth curve; B, extracellular pH.

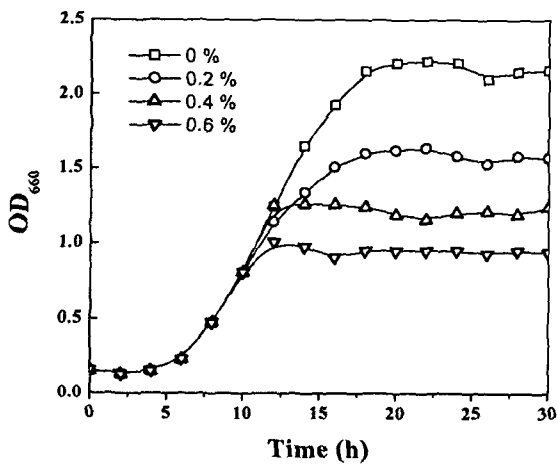


Fig. 3. Growth of *L. mesenteroides* LM3 in the MRS media supplemented with lactic acid in the middle of the growth (10 hours) with different concentrations by 0% (-□-), 0.2% (-○-), 0.4% (-△-), and 0.6% (-▽-).

LM3균주의 경우 4% 농도에서 30분 처리한 경우에도 정상 상태와 같은 콜로니 밀도를 보여주고 있다(Fig. 4). 이에 비

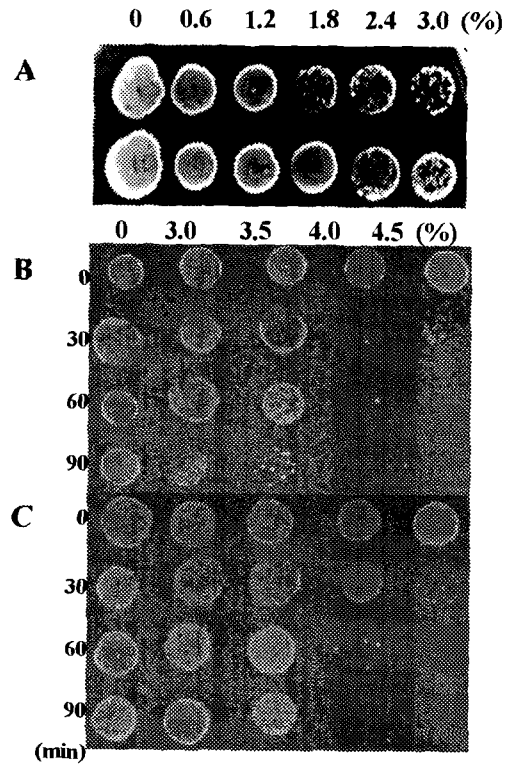


Fig. 4. Sensitivity test against lactic acid.

A, The cells growing at the mid-log phase were treated with the MRS media containing the given concentration of lactic acid for an hour; upper, *L. mesenteroides* KCTC3505; lower, *L. mesenteroides* LM3; B and C, The cells of the stationary phase treated with each concentration of lactic acid for 0 to 90 min; B, *L. mesenteroides* KCTC3505; C, *L. mesenteroides* LM3. Following lactic acid treatment, the cells were spotted onto the MRS agar plate.

해 대조균주의 경우는 3% 농도를 처리하였을 때 60분에서부터 영향을 받으며, 4% 이상에서는 생존이 불가능한 것으로 나타났다. 이에 따라 성장 동안에 젖산을 첨가하면 성장에 큰 영향을 미치고 이는 대조균주와의 차이가 없었으나, 정지기에서 고농도로 짧은 시간에 처리하는 경우 LM3 균주가 대조균주보다 더 큰 생존율을 보이는 것을 알 수 있었다.

젖산 존재하의 세포내 trehalose 양과 trehalase 활성의 변화

지수성장기와 정지기의 세포에 젖산을 처리하였을 때의 trehalose 양의 변화를 관찰한 결과이다(Fig. 5). 대표적인

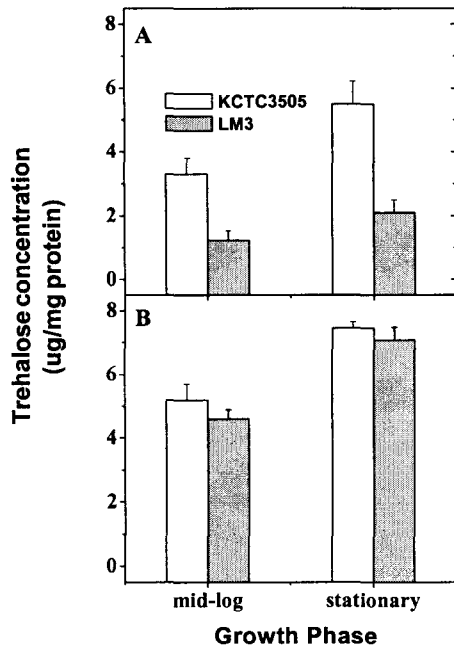


Fig. 5. The cells of the mid-log phase or the stationary phase were exposed to the MRS media with (panel B) or without (panel A) 0.6% (final v/v) of lactic acid for an hour. And then the cells were treated to assay the amount of trehalose. White and gray bar denote *L. mesenteroides* KCTC3505 and LM3, respectively.

stress protectant로 알려져 있는[18] trehalose의 세포 축적은 대조균주보다 LM3균주에서 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 젖산 처리 후 대조균주의 trehalose축적량이 증가하는 것과 비교했을 때, 이 균주의 경우 초기 trehalose양은 적으나 젖산을 처리함에 따라 trehalose의 축적량이 높게 나타났다. 그리고 지수성장기 보다 정지기에서 trehalose축적량이 더 높은 것을 관찰할 수 있었다.

한편 trehalose를 분해하여 효과적으로 스트레스에 대처하도록 하는 trehalase 활성은 대조균주에서는 정지기에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6). 이는 젖산에 대한 반응에 따른 trehalase축적을 위해 trehalase의 활성이 감소한 것이라 여겨진다. 그러나 LM3균주는 젖산 처리에 관계없이 거의 변화하지 않는 활성을 보였다.

젖산 존재하의 ATPase 활성, 세포내 pH의 변화
균주가 생성하는 유기산에 의해 변화하는 세포 외부 pH

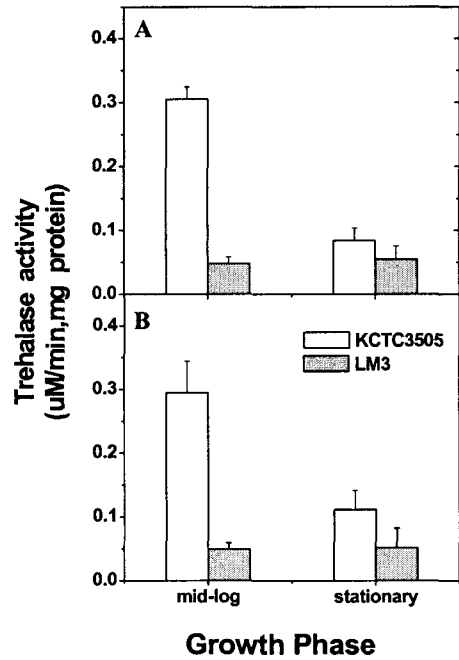


Fig. 6. Changes in the trehalase activity of *L. mesenteroides* KCTC3505 and LM3.

Experimental conditions were the same to Fig. 5.

는, 지수성장기의 경우 pH 5.2, 정지기 에서는 pH 4.1까지 떨어졌다. 0.6% 젖산을 처리했을 때, pH는 4.2 정도로 나타났다(data not shown). 각 성장시기별 ATPase 활성을 측정된 결과, 젖산처리 후 대조균주는 ATPase 활성이 증가한 반면, LM3균주는 다소 감소하는 양상을 보였으나 성장시기에 상관없이 거의 동일한 활성을 유지하였다(Fig. 7). 세포내의 pH를 측정된 결과에서 LM3균주는 젖산 처리 후 pH 6으로 처리전의 pH와 거의 동일하게 나타났다(Fig. 8). 이는 젖산 처리 후에 pH 4까지 감소하는 경향을 보이는 대조균주와 다른 양상을 보였다.

고 찰

이 연구는 대구지역의 김치를 대상으로 내산성을 지니고 있는 젖산발효균주를 분리하고, 그 산내성의 원인을 밝히고자 하였다. 그 결과 LM3라고 명명한 선별균주를 분리할 수 있었으며, 이 균주는 Bergey's manual[7]과 지방산 분석법에 의거하여 *Leuconostoc mesenteroides*로 최종 동정되었다(Fig. 1; Table 1). 그리고 이 균주의 생육도와 젖산에

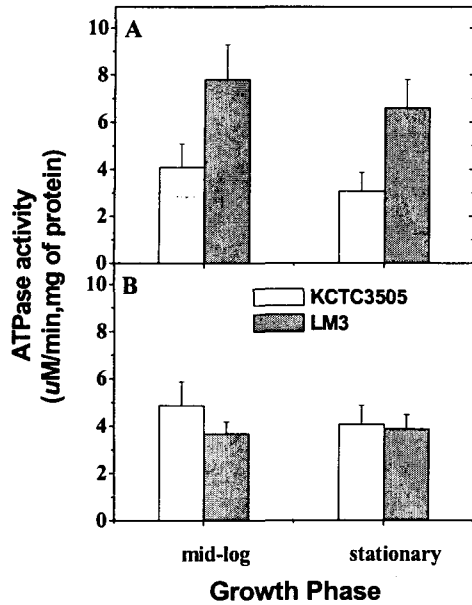


Fig. 7. Changes in the ATPase activity of *L. mesenteroides* KCTC3505 and LM3. Experimental conditions were the same to Fig. 5.

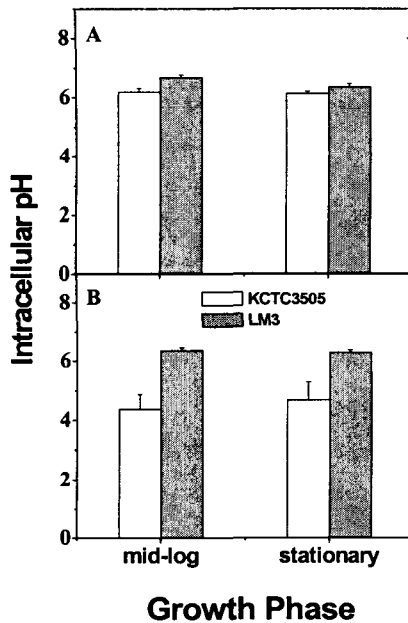


Fig. 8. Changes in the intracellular pH of *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505 and LM3. Experimental conditions were the same to Fig. 5.

대한 다양한 스트레스 반응들을 관찰함으로써, 우리가 분리한 LM3 균은 대조균주보다 산내성도가 높았으며(Fig. 4)

그 요인을 균주의 성장과 acid response factor의 변화를 관찰함으로써 알게 되었다.

생육초기부터 증가한 젖산에 의해 생육이 저해된 원인은 외부 pH가 낮은 것으로 생각된다[19]. 위의 결과(Fig. 2, 3)를 통해, 성장동안에는 젖산에 의해 낮아진 균체의 외부 pH가 대조균주와 LM3균주 모두에서 생육에 저해를 주는 것을 확인하였다. 이 부분에 있어서 LM3균주의 산내성도는 성장단계에서의 어떤 변화라기보다는 다른 부분에서의 산내성도의 증가를 보일 수 있을 것이라고 생각할 수 있다.

Trehalose는 세균, 효모, 곰팡이 등 다양한 세포에서 합성되어지는 이당류로서, 효모의 경우 세포막과 수소결합을 함으로써 세포막을 안정시키고 또한 각종 효소의 활성을 안정화시킨다고 알려져 있다[18]. 이러한 기능을 지닌 trehalose는 산에 의한 스트레스뿐만 아니라 다양한 스트레스 인자에 의해서도 유도적으로 합성이 되어진다. 더불어 이 trehalose를 분해하는 trehalase의 활성도 스트레스가 가해지는 환경에서 높아진다고 보고되고 있다. 즉 합성과 분해라는 상반된 반응이 스트레스 환경에서 동시에 유도적으로 증가한다는 것이 이 trehalose 대사의 특징이며, 흔히 이러한 현상을 paradoxical situation이라고 부른다[18].

따라서 젖산 스트레스에 대한 세포의 반응이 LM3와 대조균주의 생존능과 어떠한 연관성이 있는지를 조사하고자 하였고, 아울러 trehalose의 축적과 trehalase 활성의 변화 및 세포막 H⁺-ATPase 활성을 검사하였다. 먼저 젖산이 존재하지 않는 배지에서 자란 경우, 그 구성적 trehalose 양은 지수성장기나 정지기 모두에서 대조균주에서 더 많은 양이 관찰되었다. 또한 젖산이 존재하는 스트레스 환경에서 두 균주 모두 trehalose의 양이 유도적으로 증가하였고, 최종 축적량은 지수성장기나 정지기에서 두 균주간 유사한 양을 보였다. 그러나 LM3균주의 경우 젖산의 존재에 의해 축적되는 trehalose의 양이 대조균주의 축적량보다 월등히 많았다. 이로써 LM3균주가 스트레스 환경에 즉각 반응한다는 것을 알 수 있었다. 한편, Hartke[9]에 따르면 지수성장기일 때보다 정지기일 때의 내산성도가 증가한다고 했다. 조사결과, 두 균주 모두 정지기에서 세포내 trehalose 축적농도가 지수성장기의 경우보다 높아지는 현상은 이런 주장과 일치하였다(Fig. 5).

한편 trehalose를 분해하는 효소활성, 즉 trehalase의 활성은 대조균주가 LM3균주보다 높은 것으로 확인되었으며

(Fig. 6), 젖산 스트레스에 의해서 두 균주 모두 trehalase의 활성이 전혀 증가되지 않는 결과가 나왔다. 대조균주의 경우, 지수성장기엔 높은 활성을 보였으나 정지기에서는 오히려 trehalase의 활성이 낮아졌다. 그러나 LM3균주는, 지수성장기에 trehalase의 활성이 높고 정지에 낮아진다는 기존의 보고[18]와 달리, 지수성장기나 정지기 모두에서 활성의 변화를 보이지 않았다(Fig. 5-6). 결과적으로 trehalase의 축적량이 젖산에 의한 스트레스 동안 증가하고 trehalase에 의해 분해되지 않았다는 것을 알 수 있었다. 이번 연구에서 LM3균주의 특이한 trehalase 관련대사의 의미를 분명하게 밝히지는 못하고 있으나, trehalase의 활성이 젖산 스트레스에 대한 산내성에 영향을 주지 않고 있는 것으로 추측된다. 결론적으로 trehalase 양과 trehalase 활성의 변화에서 외부 pH의 변화에 세포가 일차적으로 반응한다는 것을 확인하였고, 젖산에 노출된 시간동안 trehalase의 축적속도가 trehalase에 의한 trehalase의 분해속도보다 빠르다는 것을 알 수 있었으며, 이것은 젖산 처리시간동안 trehalase에 의한 세포의 방어가 지속되고 있다는 것을 의미하였다.

세포내 H⁺ATPase는 세포외로 수소이온을 방출함으로써 세포내의 pH를 조절하고, 정상적인 영양분의 유입 등 생육과 관련한 기능을 하는 데 필수적인 것이다[5]. 그리고 glucose대사를 할 때 생산되는 대사산물에 의해 세포내 pH는 약산성화가 되며 이로 인해 세포내에 있는 ATPase가 세포내 항상성을 유지하기 위해 활성화된다[8]. 이 효소의 활성을 비교해 보면, LM3균주에서는 구성적으로 높은 활성으로 존재하던 것이 젖산이 첨가된 경우는 오히려 대조균주보다 낮은 활성을 보이고 있다(Fig. 7). 즉 LM3균주의 ATPase의 활성이 젖산에 의해 활성이 저해되었음을 암시하고 있다. 반면 대조균주는 젖산의 첨가여부와 상관없이 일정한 활성을 유지하고 있었다. 결과적으로 두 균주 모두 0.6%의 유기산 스트레스 환경에서 유사한 활성을 가지고 있었다. 그러나 실제 세포내 pH는 LM3균주에서 보다 안정한 것으로 나타났다(Fig. 8). 다시 말해서, 대조균주의 경우엔 젖산의 존재로 인해 세포내 pH가 감소한 반면, LM3균주는 정상조건과 유사한 pH를 유지하고 있었다. 결과적으로 LM3균주는 세포막에 존재하는 H⁺ATPase 이외의 다른 기작을 통해서 세포내의 pH를 안정하게 유지하는 기작을 가지고 있음을 암시하고 있다. 이러한 결과들을 통

해 LM3균주는 최소한 trehalase의 세포보호기능에 의해서 생존능의 우위를 보이고 있고, 세포내 pH의 안정성을 가진다는 특성을 지니고 있었으나, 그것이 ATPase 활성에 의한 것은 아니었다.

따라서 LM3균주의 젖산에 대한 내성기작중 하나는 바로 세포내 pH를 유지하는 능력에 있으며, 젖산에 의해 낮아진 pH 환경이 세포에서는 trehalase와 같은 chemical protectant들의 축적과 앞으로 밝혀져야 할 다른 인자의 활성을 통해 세포내의 pH가 안정하게 유지된다는 것을 의미하고(Fig. 8) 이 때문에 ATPase의 활성이 감소하는 결과에도 산내성을 나타내게 된다는 것을 의미한다.

이를 통해 LM3균주가 유기산 스트레스에 빨리 대응하고 외부의 pH변화에 세포를 안정화시킨다는 것을 확인하였다. 이후 젖산 처리시 시간의 변화에 따른 각 요인들의 변화와 젖산의 장시간 노출에 대한 세포의 반응을 연구해야 할 것이다. 그리고 젖산에 대해 일차적인 방어 이후의 스트레스 단백질들을 포함하는 여러 가지 단백질의 발현수준에서 세포방어기작에 대한 연구 역시 이루어져야 한다. 대조균주와 같은 성장패턴을 보이면서도 정지기에서 나타나는 생존율은 성장동안에는 발현되지 않았던 단백질이나 유전자발현이 있을 것으로 추측된다. 이에 따라 젖산을 처리하였을 때 나타나는 단백질들의 발현정도를 확인하고 그 단백질들을 동정하는 연구도 행해져야 할 것이다.

요 약

이 연구는 주변의 김치들을 수거하여 젖산에 내성을 가진 *Leuconostoc mesenteroides*을 선택배지를 이용하여 분리하고, 지방산 조성을 분석하여 동정한 결과, *Leuconostoc mesenteroides* LM3균주로 동정했다. 이어서 그의 성장패턴을 관찰하고, 유도기와 지수성장기에서 젖산을 첨가한 결과 성장저해가 일어났음을 확인했으며, 젖산의 최종농도가 0.4%이상인 배지에서는 성장속도가 느려짐을 알았다. 그리고 정지기시작단계에서 고농도의 젖산을 단시간 처리하였을 때, 대조균주가 생존하지 못하는 4%농도에서도 *Leuconostoc mesenteroides* LM3균주가 생존하는 것을 확인하여 산에 대한 내성이 뛰어난임을 알 수 있었다. 이에 trehalase 농도의 변화, 그리고 trehalase와 ATPase 활성을 측정하였고, 이를 통해 젖산에 의한 세포내의 변화를 관찰하였다.

그 결과, 각 성장시기별로 0.6% 젓산을 첨가했을 때 *Leuconostoc mesenteroides* LM3균주가 trehalose 축적률이 높아졌으나 trehalase 활성엔 큰 변화가 없었다. ATPase 활성은 감소하는 경향을 보였으나 시기별 활성은 일정하였고, 세포내 pH를 측정한 결과 *Leuconostoc mesenteroides* LM3균주는 pH 6으로 일정하게 유지되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 · 한국과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원에 의한 것입니다

참고 문헌

- Balows, A., H. G. Truper and M. Dworkin. 1991. The Genus *Leuconostoc*, pp.1508-1512, In Wilhelm H. Holzappel, U. Schillinger, *The Prokaryotes*. Springer-Verlag
- Lim, C. R., H. K. Park and H. U. Han. 1989 Reevaluation of Isolation and Identification of Gram-Positive Bacteria in *Kimchi*. *Kor. Jour. Microbiol.* **27**, 404-414.
- Lee, C. W., C. Y. Ko and D. M. Ha. 1992. Microfloral Changes of the Lactic Acid Bacteria during *Kimchi* Fermentation and Identification of the Isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 102-109.
- Bollag, D. M. and S. J. Edelstein. 1991. Bradford Assay. pp50-51 In Daniel M. Bollag, Stuart J. Edelstein, *Protein methods*, A John Wiley & Sons, INC.
- O'sullivan, E. and S. Condon. 1999. Relationship between Acid tolerance, Cytoplasmic pH, and ATP and proton-ATPase Levels in Chemostat Cultures of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2287-2293
- Rallu, F., A. Gruss and E. Magiuiu. 1996. *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 243-251
- Garvie, E. I. 1986. Genus *Leuconostoc*. In James T. Staley, *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Miwa, H., H. Esaki and J. Umemori. 1997. activity of proton-ATPase in Ruminant Bacteria with Special Reference to Acid Tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2155-2158
- Hartke, A., S. Bouche, X. Gansel, P. Boutibonnes, and Y. Auffray. 1994. Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3474-3478
- Siegmundfeldt, H., K. B. Rechner and M. Jakobsen. 2000 Dynamic Changes of Intracellular pH in Individual lactic Acid Bacterium Cells in Response to a Rapid Drop in Extracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2330-2335
- Cheigh, H. S. and K. Y. Park. 1994 Biochemical, Microbiological, and Nutritional Aspects of *Kimchi* (Korean Fermented Vegetable Products). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **34**, 175-203
- 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
- Cho, J. S. 2000. *Kimchi study*. Yulim Publishing co.
- Lee, J. S., M. C. Jung and W. S. Kim. 1996. Identification of Lactic Acid Bacteria from *Kimchi* by Cellular FAMES Analysis. *Kor. J. Appl. Microbiol. biotechnol.* **24**, 234-241
- 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
- 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
- Miller, L. T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters including hydroxy acid. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 861-867
- Strom, A. R. and I. Kaasen. 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli* : stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **8**, 205-210
- Kim, Y. C., E. Y. Jung and E. H. Kim. 1998 Properties of Acid Tolerance of Acid-Resistant Mutant *Leuconostoc mesenteroides* Which Was Improver as *Kimchi* Starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 102-109

(Received November 13, 2002; Accepted December 23, 2002)