

## 김치 Starter용으로 개량된 *Leuconostoc paramesenteroides*의 내산성 변이주가 갖는 내산성 특성

김영찬 · 정은영 · 김은해 · 정대현 · 최태부 · 권태종 · 강상모\*  
건국대학교 미생물공학과

**Acid Tolerance of the Acid-Resistant Mutant of *Leuconostoc paramesenteroides* Improved for Kimchi Starter.** Kim, Young-Chan, Eun-Yung Jung, Eun-Hae Kim, Dai-Hyun Jung, Tae-Boo Choe, Tae-Jong Kwon, and Sang-Mo Kang\*. Department of Microbiological Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea - To investigate the increased acid tolerance of an acid-resistant mutant *Leuconostoc paramesenteroides* P-100 improved as a kimchi starter, proton permeability, ATPase activity, glycolysis activity, Mg<sup>2+</sup> release, and membrane fatty acid composition were studied and compared with its wild type *Leuconostoc paramesenteroides* Pw. 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 Pw and the P-100 were about 6.4 min and 7.8 min in 150 mM KCl solution, respectively. In the 3% NaCl solution, the  $t_{1/2}$  values of the Pw and the P-100 were 5.5 min and 6.9 min, respectively. The values and pHs of maximal specific activities of ATPase originated from the Pw and the P-100 were 0.5 unit/mg protein and 0.78 unit/mg protein at pH 6.0, respectively. The result of pH dependence of glycolysis showed that the P-100 had higher activities than that of Pw except at pH 7.0. The releases of magnesium from the Pw and the P-100 were observed about 54.5% and 23.2% at pH 4.0 after 2 hours, respectively. The results of comparison of membrane fatty acid composition of the Pw with the P-100 showed that C<sub>8:0</sub>, C<sub>9:0</sub>, C<sub>10:0</sub>, C<sub>11:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, and C<sub>19:0,cyclo</sub> were major different fatty acids between two strains and the content of C<sub>18:1</sub> and C<sub>19:0,cyclo</sub> were 2.8%, N.D (not detected) in the Pw and 0.4%, 2.3% in the P-100. These results indicated that acid tolerance of the P-100 was significantly improved in comparison with its wild type Pw.

**Key words:** *Leuconostoc paramesenteroides*, acid tolerance, ATPase, proton permeability, glycolysis, fatty acid, magnesium release

*Leuconostoc paramesenteroides*는 김치가 저온에서 발효될 때의 주 발효 균종의 하나로, 김치 숙성중 당대사를 통하여 주 발효 산물인 젖산 등의 유기산을 생성함과 동시에 다양한 종류의 방향족 화합물과 CO<sub>2</sub> 등을 생산하여 김치에 신선한 맛과 풍미를 더하여 준다. 그러나, 이러한 *Leuconostoc*속 균들은 동형 발효형이며, 다량의 산 생성에 의해 김치를 산패에 까지 이르게 하는 *Lactobacillus*속 균들에 비해 낮은 내산성을 갖는다. 이러한 내산성에 관련된 생리적인 차이로 인하여 *Leuconostoc*속 균들은 김치 발효시 김치의 발효 말기까지 지속적으로 발효에 관여하지 못한다. 이러한 증식 현상은 김치 발효에서 산 생성이 낮고, 젖산의 유기산과 CO<sub>2</sub>의 생산이 비교적 높은 동형 발효형 젖산균종의 증식이 일반적으로 김치 발효 초기에 국한되고 있음을 의미한다.

일반적으로 알려진 젖산균의 내산성을 결정하는 요인들로서 세포막의 수소 이온 투과도[3, 4, 6, 27], H<sup>+</sup>-ATPase 활성[1, 3, 4, 6, 10, 11, 13, 27, 30], 해당 작용의 pH 의존

성[3, 4], Mg<sup>++</sup> 해리도[4], 원형질막의 지방산 조성[2, 9, 19, 27, 31, 32] 등이 보고되어 있다.

수소 이온 투과도는 세포질막 자체의 물리적 성질, 그와 연관되는 지방산 조성의 변화 및 H<sup>+</sup>-ATPase를 비롯한 세포질막에 발현되는 다양한 효소의 양과 활성 등의 통합적인 것으로, 세포내부로 유입된 수소 이온이 효과적으로 방출될 때 알짜 수소 이온 투과도가 낮아지며, 알짜 수소 이온 투과도가 적을수록 내산성이다.

H<sup>+</sup>-ATPase는 세포질을 환경 pH 보다 높게 유지하는데 주된 작용을 하는 막단백질로, 발효 과정 중에 생성되는 유기산에 의해 외부 pH가 낮아지면 세포 내부로 수소 이온의 유입이 늘어나게 되는데, 이때 H<sup>+</sup>-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 환경보다 상대적으로 염기성인 세포내로 유입된 후 해리되어 세포내·외의 pH 차를 감소시키므로서 proton motive force가 낮아지며, 세포 내부의 pH가 일정 수준 이하로 저하되면 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성이

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

상실된다. 그러므로 산성 pH 영역에서 높은 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성을 갖는 균주는 내산성 균주라고 할 수 있다. 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[4]은 산성 환경에서 균주의 세포막이 손상되면 세포의 무기질이 유출되는데, 특히 Mg<sup>++</sup>의 경우 세포막의 손상 정도가 클수록 해리량이 많아 이를 측정 비교하므로써 내산성 균주의 특성을 보고하였다.

한편 원형질막의 지방산 조성을 분석하므로써 대상 균주의 내산성 특성을 알 수 있다. Aldo 등[2]은 내산성이 강한 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* 등의 젖산균의 지방산을 분석한 결과 C<sub>19:0.cyclo</sub>의 함량이 35-39%로 높았던 반면, 이들 균주보다 내산성이 약한 *Lactobacillus bulgaricus*는 그 함량이 13%로 매우 낮음을 보고하였으며, Sim 등[27]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 증가될 수록 물질의 투과성이 감소함을 보고하였다.

본 연구실에서는 김치의 저장성 향상을 위하여 내산성으로 개량된 *Leu. mesenteroides* M-100의 김치 첨가 효과와 내산성에 관한 생리적인 특성을 보고하였으며[16], *Leu. paramesenteroides* P-100의 김치 첨가 결과를 보고하였다[15].

본 실험에서는 *Leu. paramesenteroides* P-100을 starter로 첨가한 김치에 있어서 발효 말기의 고농도 산성 환경에서 생육할 수 있는 원인을 규명하기 위해서, 내산성 변이주 *Leu. paramesenteroides* P-100과 그것의 야생균주간의 내산성에 관련된 생리적인 특성을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 수소 이온 투과도

*Leu. paramesenteroides* 야생균주 Pw와 그것의 내산성 변이균주 *Leu. paramesenteroides* P-100을 MHHD배지 [20] (trypticase peptone 10, casamino 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 배양하여, Bender 등[3]의 방법을 변형하여 수소 이온 투과도를 측정하였으며, 전보[16]에서 보고된 방법과 동일하게 실시하였다.

세포 내외간에 수소 이온의 세포내 유입에 따른 pH의 경시적인 변화(ΔpH)는 1분 간격으로 10분 동안 측정하

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

### H<sup>+</sup>-ATPase 활성

**조효소액의 제조** 조효소액의 제조는 Sim 등[27]의 방법과 Laubinger 등[5, 18, 22]의 방법을 수정하여 사용하였으며, 전보[16]에서 보고된 방법과 동일하게 실시하였다.

**활성측정** H<sup>+</sup>-ATPase 활성은 Bender 등[4]의 방법에 따라, 효소반응시 생성되는 무기 인산 이온으로부터 생성되는 heteropolymolybdenum의 정량을 통해서 ATPase 활성을 측정하는 Fiske-Subbarow[4]의 방법으로 수행하였다. 효소 활성은 pH 3.5, 4.0, 4.2, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5에서 측정되었으며, 1분 동안 1 μmol의 무기 인산 이온을 유리시키는 효소의 양을 단백질 정량법에 따라 중량 단위로 환산한 것을 1 unit로 하였다.

**단백질 정량** 단백질의 정량은 정확한 막단백질의 함량 측정이 가능하도록 Lowry방법[17, 34]을 수정하여 측정하였다.

### 해당 작용 활성

해당 작용 활성은 Bender 등[4]의 방법을 사용하였다. 활성 측정에 사용할 균체는 대수증식기 후반까지 배양하고, 이를 원심분리하여(6,000 rpm, 4℃, 20 min.) 회수하였다. 다음 증류수로 세척한 후 1 mM MgCl<sub>2</sub>를 함유한 인산완충용액(pH 7.2, 20 mM)에 균체를 2 mg/mL (dry weight) 농도로 현탁하여 시험관에 1mL씩 분주하였다. 이를 30℃에서 30분간 배양하여 세포내 잔여 대사산물을 고갈시키고 원심분리(10,000 rpm, 4℃, 3 min.)한 후, glucose를 33.3 mM 함유하며 pH가 3.0에서 7.0까지 조정된 citrate/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer에 동일 농도로 현탁시켰다. 이 현탁액을 30℃에서 2시간 배양하고 원심분리(10,000 rpm, 4℃, 3 min.) 후 상등액을 glucose oxidase가 포함된 glucose 정량용 kit(영동제약)로 glucose 함량을 측정하였다.

### Mg<sup>++</sup> 해리도

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

균체의 총  $Mg^{++}$  함량 건조 균체 단위 중량당  $Mg^{++}$  함량 측정을 위하여 균체 배양액 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.

배지 pH에 따른 균체  $Mg^{++}$  해리도 균체 현탁액 10mL을 HCl을 사용하여 각각 pH 4, 5, 6으로 조절하고, 30분, 1시간, 2시간 경과한 후 1 ml을 취하여 원심분리한 후 상등액으로 유출된  $Mg^{++}$ 을 ICP로 측정하였다.  $Mg^{++}$  함량 측정을 위한 ICP 측정 조건은 instrument는 I.C.P 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 조성 분석은 Jung 등[26]의 방법을 변형하여 사용하였으며, 지방산 조성 분석을 위한 막지방산의 추출, 시료의 전처리, gas chromatography의 분석 조건등은 전보[16]에서 보고된 방법과 동일하게 실시하였다.

결과 및 고찰

수소 이온 투과도

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

*Leu. paramesenteroides*의 야생균주 Pw와 변이균주 P-100의 수소 이온 투과도를 pH 4.0에서 측정한 결과는 Fig. 1과 같으며, 각 pH에서의  $t_{1/2}$  최대값은 Fig. 2에 나타내었다. 10 mM HCl과 150 mM KCl 혼합 용액 100  $\mu$ l를 첨가하여 acid pulse를 주었을 때 세포 외부의 수소 이온이 세포내로 유입되면서 pH의 변화가 있게 되는데, 150 mM KCl에 현탁시킨 경우, 야생균주 Pw와 변이균주 P-100의  $t_{1/2}$  값은 초기 pH가 4.0일 때 각각 6.1분과 7.2분이었으며, 3% NaCl로 현탁시킨 경우는 pH 4.0에서 야생균주 Pw는 4.7분, 변이균주 P-100는 5.3분이었다.  $t_{1/2}$  최대값은 150 mM KCl에 현탁시킨 경우, 야생균주 Pw, 변이균주 P-100 모두 pH 5.0일 때로 각각 6.4분, 7.8분이었으며, 3% NaCl로 현탁시킨 경우에서도 양균주 모두 pH 5.0일 때 5.5분, 6.9분으로 최대값을 나타냈다. 이와 같이 야생균주 Pw, 변이균주 P-100 모두 같은 pH 영역에서  $t_{1/2}$  최대값이 나타났으나, 변이균주 P-100가 야

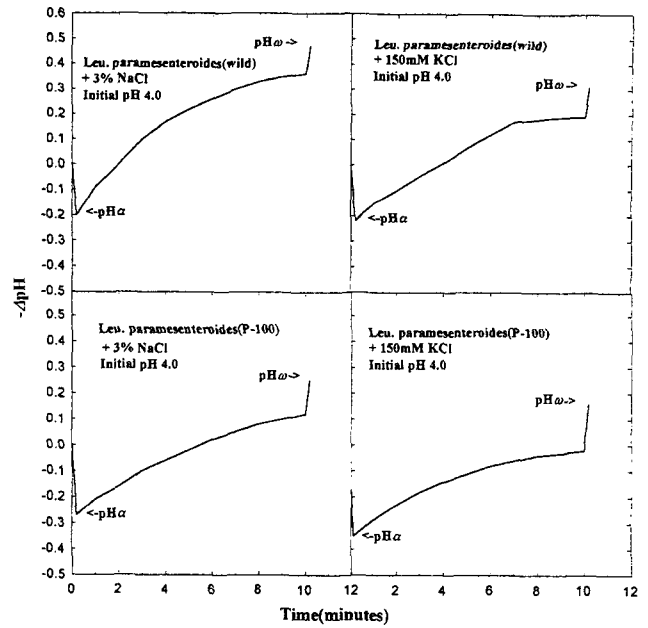


Fig. 1. Proton uptakes by *Leu. paramesenteroides* Pw and its mutant P-100 after an acid pulses at pH 4.0.

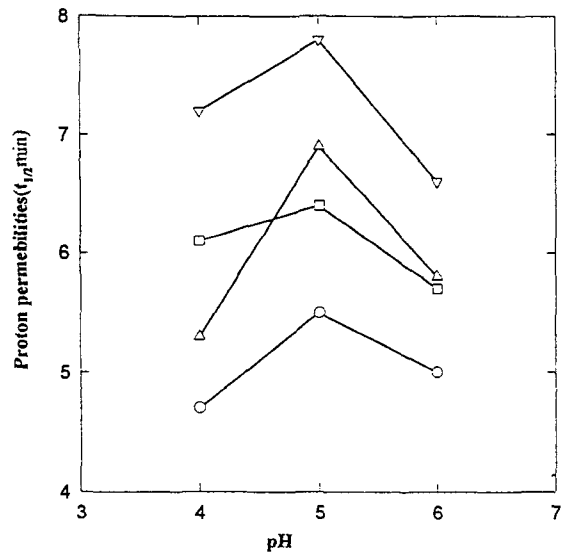


Fig. 2. Proton permeabilities (as presented  $t_{1/2}$  values) of *Leu. paramesenteroides* Pw and its mutant P-100 at various pH values with 150 mM KCl and 3% NaCl. Symbols:  $\circ$ , strain Pw at 3% NaCl;  $\square$ , strain Pw at 150 mM KCl;  $\triangle$ , strain P-100 at 3% NaCl;  $\nabla$ , strain at 150 mM KCl.

생균주 Pw에 비해  $t_{1/2}$  값이 높아 세포내의 수소 이온 투과가 적은 것으로 나타났다.

야생균주 Pw와 변이균주 P-100의 수소 이온 투과도 결과를 전보[16]에서 보고한 *Leu. mesenteroides*의 야생균주 Mw 및 변이균주 M-100의 결과와 비교해보면, *Leu. mesenteroides*의 경우 pH 4.0에서 야생균주 Mw와 변이균주 M-100의  $t_{1/2}$  값이 각각 150 mM KCl에서 7.0

분과 9.2분, 3% NaCl에서 5.5분과 8.6분이어서, *Leu. mesenteroides*의 야생균주 및 변이균주가 각각 *Leu. paramesenteroides*의 야생균주 및 변이균주보다 상대적으로 높은 내산성을 보임을 알 수 있었으며, 또한 측정된 범위중 최대의  $t_{1/2}$ 값을 보이는 pH가 *Leu. mesenteroides* 경우 pH 4.0이어서, 두 속간의 상대적 내산성에 관한 차이를 확인할 수 있었다.

Kobayashi[11]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 specific activity 등의 특성과 연관되는 것이라고 하였다. 또한 Tempest 등[29]의 보고에 의하면  $\text{Na}^+$  첨가는 수소 이온의 유출을 빨리 진행시켜 세포내의 pH를 높혀 준다고 하였다. 본 실험에서도  $\text{Na}^+$ 로 인해 높은 수소 이온 투과도를 보였다. 그러나 초기 pH가 높아질수록  $\text{Na}^+$  첨가에 대한 영향은 극소화되었다.

수소 이온 투과도의 결과로부터, 김치 발효 말기인 pH 4.0 부근에서도 P-100은 야생균주 Pw보다 낮은 수소 이온 투과도 즉 높은 내산성을 보임으로서, 높은 생육 활성을 유지할 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

#### ATPase 활성

$\text{H}^+$ -ATPase의 활성이 내산성에 관여하는 기작은 발효 과정 중에 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[8]. 야생균주 Pw와 변이균주 P-100의  $\text{H}^+$ -ATPase 활성을 각 pH에서 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 3에서 볼 수 있듯이 *Leu. paramesenteroides*의 야생균주 Pw와 변이균주 P-100의  $\text{H}^+$ -ATPase 활성은 buffer pH range를 pH 7.5에서 3.5까지 조정하였을 때, 야생균주 Pw와 변이균주 P-100 모두 pH 6.0에서 최고의 활성을 보였으며, 최대 활성은 야생균주 Pw가 0.5 unit/mg protein, 변이균주 P-100은 0.7 unit/mg protein으로 변이균주 P-100이 야생균주 Pw보다 높은 활성을 나타내었다. 더욱이 pH가 내려갈수록 변이균주 P-100이 야생균주 Pw보다 높은 효소활성을 유지하여, 변이균주 P-100이 야생균주 Pw보다 증가된 내산성을 보임을 확인할 수 있었다.

한편, 전보[16]에서 보고한 것처럼 *Leu. mesenteroides* Mw와 M-100은 pH 5.5에서 각각 0.6 unit/mg protein, 0.8 unit/mg protein의 최대 활성을 보여, *Leu. paramesenteroides* 야생균주 Pw와 변이균주 P-100이 각각

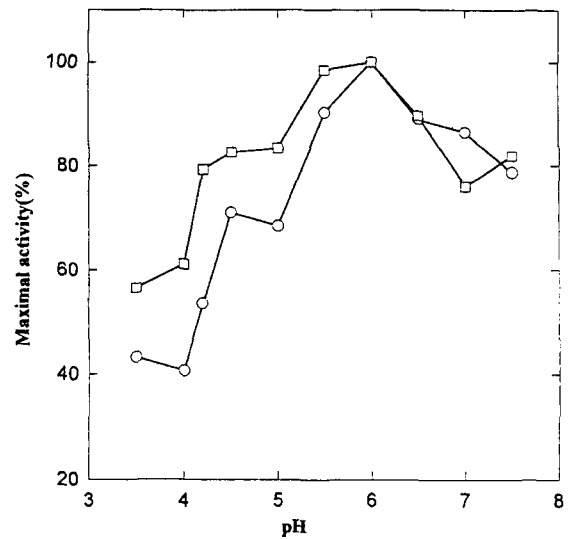


Fig. 3. Activity-pH profiles for ATPase of membrane isolated from *Leu. paramesenteroides* Pw and its mutant P-100. The maximal activities were 0.5 U/mg, 0.7 U/mg for the Pw and P-100, respectively.

Symbols: ○, strain Pw; □, strain P-100.

의 *Leu. mesenteroides*의 야생균주 Mw 및 변이균주 P-100과의 비교시 상대적으로 낮은 내산성을 갖음을 알 수 있었다.

Bender 등[4]은 수소 이온 투과도와  $\text{H}^+$ -ATPase 활성을 비교하였는데, 일반적으로 ATPase의 활성이 가장 높을 때의 pH는 수소 이온 투과도가 가장 낮을 때의 pH보다 1 unit 정도 높으며, 이러한 차이는 ATPase가 세포막의 세포질 표면에 위치하고 있어 세포가 산성환경에 놓여 있을 때 세포질은 상대적으로 알칼리 상태를 유지하면서 세포막 내외의  $\Delta\text{pH}$ 를 유지할 수 있는 중요한 요인이라고 분석하였다.

본 실험에서도  $t_{1/2, \text{max}}$ 는 야생균주 Pw, 변이균주 P-100 모두 pH 5.0일 때였고,  $\text{H}^+$ -ATPase의 최대 활성은 pH 6.0에서 나타나 Bender 등[4]의 보고와 거의 일치하였다.

#### 해당 작용 활성

Citrate/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer를 사용하여 pH 변화에 따른 해당 작용 활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 해당 작용 활성이 최대로 이루어지는 pH는 야생균주 Pw, 변이균주 P-100 모두 pH 5.0일 때였다. 변이균주 P-100의 해당 작용 최적 pH가 야생균주보다 낮지는 않았으나, 전체적으로 측정 pH 범위내에서 야생균주 Pw에 비해 변이균주 P-100이 증가된 해당 작용 활성을 보였다. 이러한 해당 작용 활성 측정에 의해서도 변이균주 P-100이 야생균주 Pw보다 더 내산성인 것을 확인할 수 있었다. 그리고 변이균주 P-100의 높은 해당 작용 활성은 Bender 등[4]이 내산성 균주가 낮은 pH 환경에서도 높은 glyco-

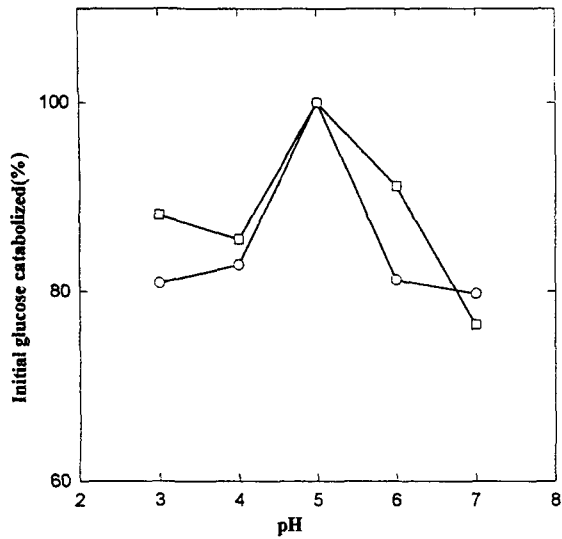


Fig. 4. Activity-pH profiles of glycolysis for *Leu. paramesenteroides* Pw and P-100. Symbols; ○, strain Pw; □, strain P-100.

lytic 대사작용을 유지할 수 있는 이유는 glycolytic enzyme 그 자체가 acid-resistant이기 보다는 내산성이 증가된 환경에서 보다 높게 유지되는 세포질내의 pH와 연관되어 있다고 제안하였듯이, 변이균주 P-100이 야생균주 Pw에 비해서 세포질내의 pH를 높게 유지 함으로서 유발된다고 할 수 있겠다. 또한 전보[16]에서 보고된 *Leu. mesenteroides* 속의 경우와 비교해 보면, 야생균주간에는 *Leu. paramesenteroides* Pw가, 변이균주간에는 *Leu. mesenteroides* M-100이 상대적으로 높은 해당 작용 활성을 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

그러나, 젖산균종의 에너지 대사의 경우, 증식에 필요한 ATP 생성이 주로 해당 작용 경로에 의해 이루어지고는 있으나, 극한 산성환경에서는 그외의 다양한 방법에 의해서 생리적 에너지를 획득할 수 있는 대사계가 있다고 보고되고 있으며, 그러한 대사계에는 arginine deaminase pathway[4], L-malate를 lactate와 CO<sub>2</sub>로 전환하는 malolactic 발효[7, 23, 25], citrolactic 발효[12, 24, 28, 33] 및 histidine/histamine 교환반응[21] 등이 알려져 있다.

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

**Mg<sup>++</sup> 해리도**

*Leu. paramesenteroides*의 변이균주 P-100의 pH 범위 별 Mg<sup>++</sup> 해리도를 야생균주 Pw와 비교하여 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 야생균주 Pw 경우에 있어서는 pH 4.0

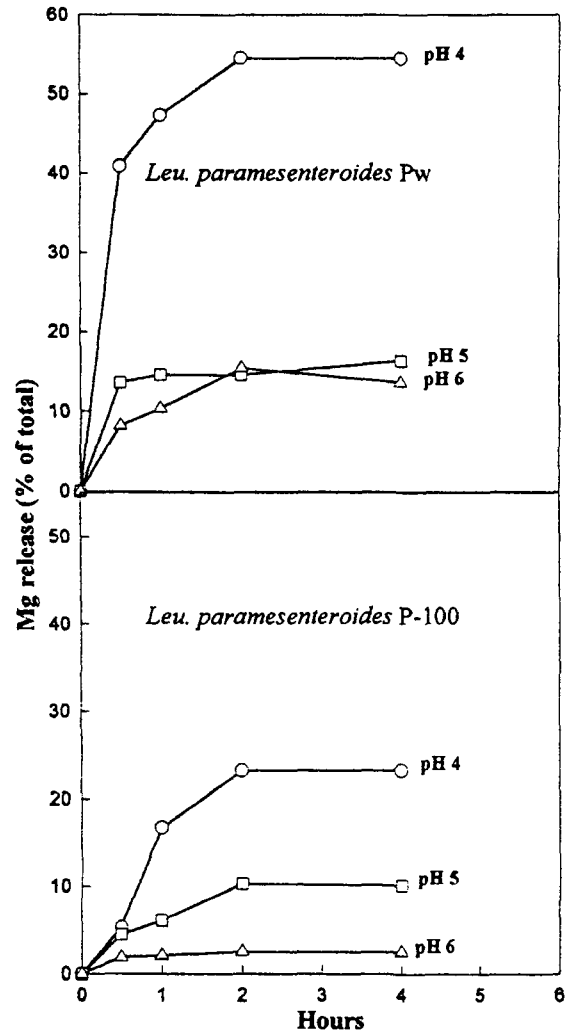


Fig. 5. Percent of Mg<sup>++</sup> released from cell membrane of *Leu. paramesenteroides* Pw and its mutant P-100 at various pH. Symbols; ○, at pH 4.0; □, at pH 5.0; △, at pH 6.0.

에서 2시간 경과 후 Mg<sup>++</sup> 해리도가 54.5%로서 최대를 보였으나, 변이균주 P-100은 23.2%로서 야생균주에 비해 약 1/2 가량 Mg<sup>++</sup>이 적게 유출되었고, pH 6.0에 있어서는 야생균주 Pw가 최대 15.4%, 변이균주 P-100이 최대 2.5%를 나타내었다.

Bender 등[4]에 의하면 균주의 세포막이 산에 의해 손상(acid damage)을 받게 되면 세포중의 무기질이 세포 밖으로 유출되는데, 무기질중 Mg<sup>++</sup>이 가장 민감한 지표로서 균주가 내산성일수록 Mg<sup>++</sup> 해리도가 낮아지게 된다고 보고하였다.

본 실험에서도 모든 실험 균주가 pH가 낮고, 시간이 경과할수록 Mg<sup>++</sup> 해리도가 높아짐을 보였으며, 각 균주간에 있어서 동일한 pH, 동일 경과 시간에 있어서는 변이균주 P-100이 야생균주 Pw와 비교해 볼 때 Mg<sup>++</sup> 해리도가 상대적으로 낮아 내산성의 특성을 갖는 것을 알

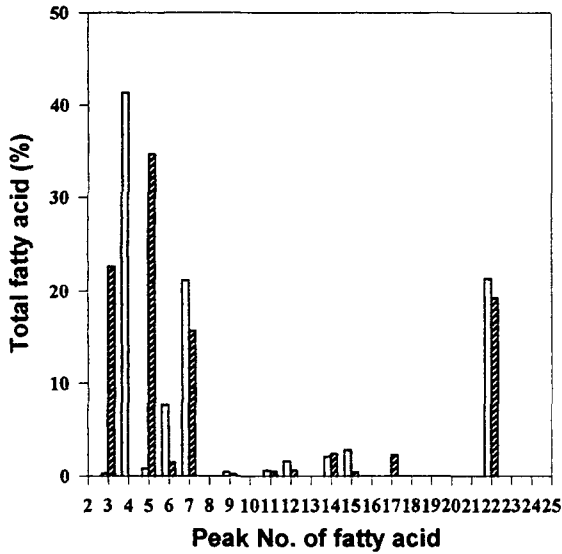


Fig. 6. Fatty acids compositions of lipid from *Leu. paramesenteroides* Pw and its mutant P-100.

Symbols; □, Pw; ▨, P-100.

Peak No.; No. 3 is C<sub>8:0</sub>; No. 4 is C<sub>9:0</sub>; No. 5 is C<sub>10:0</sub>; No. 6 is C<sub>11:0</sub>; No. 7 is C<sub>12:0</sub>; No. 8 is C<sub>13:0</sub>; No. 9 is C<sub>14:0</sub>; No. 10 is C<sub>15:0</sub>; No. 11 is C<sub>16:1</sub>; No. 12 is C<sub>16:0</sub>; No. 13 is C<sub>17:1</sub>; No. 14 is C<sub>18:1</sub>; No. 15 is C<sub>18:0</sub>; No. 16 is C<sub>19:1</sub>; No. 17 is C<sub>19:0</sub>; No. 18 is C<sub>20:0</sub>; No. 19 is C<sub>22:1</sub>; No. 20 is C<sub>22:0</sub>; No. 21 is C<sub>24:0</sub>; No. 22 is unknown.

수 있었다.

또한, 전보[16]에서 보고된 바를 바탕으로 *Leu. mesenteroides*와 *Leu. paramesenteroides* 속간의 차이를 살펴보면 야생균주 Mw와 Pw의 Mg<sup>++</sup> 해리도는 pH 4.0에서 2시간 경과 후 야생균주 Mw가 36.5%였으며, 변이균주 M-100이 13.0%였으므로 *Leu. mesenteroides*의 야생균주 및 변이균주가 각각의 *Leu. paramesenteroides* 야생균주 및 변이균주보다 상대적으로 내산성이 강함을 확인할 수 있었다.

세포막의 지방산 조성

*Leu. paramesenteroides* 야생균주 Pw와 변이균주 P-100의 세포막 지방산 조성은 Fig. 6과 같다. 야생균주 Pw는 C<sub>9:0</sub>, C<sub>12:0</sub>, C<sub>11:0</sub>, C<sub>18:0</sub>의 순으로 함량이 높았으며, 변이균주 P-100은 C<sub>10:0</sub>, C<sub>8:0</sub>, C<sub>12:0</sub>, C<sub>18:1</sub>의 순으로 함량이 높아, 두 균주간의 지방산 조성에 많은 차이를 보였다. 즉 야생균주 Pw와 변이균주 P-100은 C<sub>8:0</sub>의 경우 각각 0.3%, 22.6%이고, C<sub>10:0</sub>는 0.8%, 34.6%, C<sub>11:0</sub>은 7.7%, 1.5%, C<sub>18:0</sub>은 2.8%, 0.4%로 함량에 차이를 보였다.

한편 내산성 지표 지방산인 C<sub>18:1</sub>과 C<sub>19:0,cyclo</sub>의 함량 차이를 보면, C<sub>18:1</sub>은 야생균주 Pw와 변이균주 P-100이 각각 2.1%, 2.4%로서 거의 차이가 없었으나, C<sub>19:0,cyclo</sub>의 경우, 야생균주는 검출되지 않은 반면, 변이균주 P-100은 2.3%로 나타나 P-100은 내산성을 갖는 것을 세포막의 지방

산 조성으로 부터도 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Kates[14]이 보고한 배양조건과 배양시간이 세포막의 지방산 조성 변화에 미치는 영향과 Veerkamp[32]과 Sim 등[27]이 보고한 내산성이 강한 균주일수록 C<sub>18:1</sub>이 감소되고 C<sub>19:0,cyclo</sub>가 증가된다는 보고와 잘 일치하였다.

또한, 전보[16]에서 보도된 *Leu. mesenteroides*의 경우와 비교해 보면, C<sub>18:1</sub> 경우는 야생균주 Mw에서 23.4%, 변이균주 M-100에서 12.2%로 *Leu. paramesenteroides*가 오히려 낮은 함량을 보여 두 속간의 상대적 내산성에 대한 결과들과 일치하지는 않았으나, C<sub>19:0,cyclo</sub>의 경우는 야생균주 Mw에서 10.2%, 변이균주 M-100에서 12.2%로 *Leu. mesenteroides*가 높은 함량을 갖음을 확인할 수 있었다.

이상의 실험 결과에서 보는 바와 같이 김치의 저장성 향상을 위하여 내산성으로 개량된 변이균주 P-100이 야생균주 Pw에 비해서 수소 이온 투과도, H<sup>+</sup>-ATPase 활성, 해당 작용 활성, 세포막의 산손상에 의한 Mg<sup>++</sup> 해리도, 그리고 세포질막의 지방산 조성의 변화 등에서 상대적으로 증가된 내산성을 갖고 있음을 확인하였으며, 본 변이균주 P-100을 starter로 첨가한 김치에 있어서, 변이균주 P-100이 발효 말기인 낮은 산성환경에서 생육할 수 있는 원인을 규명할 수 있었다. 또한 *Leu. paramesenteroides*와 *Leu. mesenteroides*의 야생균주들간, 그리고 변이균주들간의 속간비교에서는 전체적으로 *Leu. mesenteroides*가 큰 내산성을 보유하고 있음을 알 수 있었다.

요 약

김치 starter로 개량된 *Leu. paramesenteroides* Pw의 내산성 변이주 P-100이 획득한 증가된 내산성에 대한 생리적 성질을 규명하기 위하여 수소 이온 투과도, ATPase 활성, 해당 작용 활성, Mg<sup>2+</sup> 해리도, 그리고 세포질막의 지방산 조성의 변화 등을 야생균주 Pw와 비교하여 측정하였다. 수소 이온 투과도의 경우 150 mM KCl에서 실험한 결과, t<sub>1/2</sub>의 최대값은 야생균주 Pw와 변이균주 P-100에서 각각 6.4분과 7.8분였으며, 3% NaCl의 존재 시는 야생균주 Pw는 5.5분, 변이균주 P-100은 6.9분이였다. 야생균주 Pw와 변이균주 P-100의 ATPase 활성 측정결과, 최고 활성은 양 균주 모두 pH 6.0에서 각각 0.5 unit/mg protein, 0.78 unit/mg protein이였다. 해당 과정 활성에 있어서는 pH 7.0을 제외한 전 측정 범위에서 변이균주 P-100이 야생균주 Pw보다 높은 값을 보였으며, 세포막의 산손상에 의한 Mg<sup>2+</sup> 해리도는 pH 4.0에서 2시간후 야생균주 Pw가 54.5% 그리고 변이균주 P-100이 23.2%로 관찰되였다. 지방산 조성 변화의 결과, 양 균주간에 C<sub>8:0</sub>, C<sub>9:0</sub>, C<sub>10:0</sub>, C<sub>11:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, 그리고 C<sub>19:0,cyclo</sub> 등의 지방산에서 주된 차이를 보였으며, 내산성의 지표로 간주되는 C<sub>18:1</sub>은 야생균주 Pw와 변이균주 P-100에서 각

각 2.1%, 2.4%로 거의 차이가 없었으나, C<sub>19:0,cyclo</sub>의 경우, 야생균주 Pw는 무검출, 변이균주 P-100에서는 2.3%로 차이를 보였다. 이러한 측정의 결과들을 종합하여 볼 때, 야생균주 Pw에 비하여 변이균주 P-100이 증가된 내산성을 가졌음을 확인 할 수 있었다.

### 감사의 말

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

### REFERENCES

- Adolph, A. and J. Charlotte. 1985. Altered expression of H<sup>+</sup>-ATPase in *Streptococcus faecalis* membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**: 151-157.
- Aldo, F. Rizzo, Hannu Korkeala, and Ilkka 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. Immun.* **53**: 331-338.
- 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. *Dynamics and Biogenesis of Membranes* 343-360.
- 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.
- Kobayashi, H. 1985. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **260**: 72-76.
- Kobayashi, H. 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.
- Jerald, J. B., J. A. S. Wilhelmus, and E. R. Kashket. 1984. Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1134-1139.
- Kates, M. 1964. Bacterial lipids. *Advan. Lipid Res.* **2**: 17-90.
- Kim, Y. C., E. Y. Jung, E. H. Kim, D. H. Jung, O. S. Lee, T. J. Kwon, and S. M. Kang. 1997. Strain improvement of *Leuconostoc paramesenteroides* as a acid-resistant mutant and effect on kimchi fermentation as a starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 151-160.
- 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. 1997. 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., 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.
- Laubinger, W. and P. Dimroth. 1987. Characterization of the Na<sup>+</sup>-stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an enzyme of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> type. *Eur. J. Biochem.* **168**: 475-480.
- McDonald, L. C., H. P. Fleming, and H. M. Hassan. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2120-2124.
- 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.
- 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.
- Poole, R. K. 1993. The isolation of membranes from Bacteria, pp. 109-122. *Biomembrane Protocol*, chapter 10, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- 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.
- 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.
- 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.
26. Jung, S. H., E. L. Susan, I. H. Rawle, and J. G. Zeikus. 1993. *Sarcina ventriculi* synthesizes very long chain carboxylic acid in response to different form of environmental stress. *J. Biol. Chem.* **268**: 2828–2835.
  27. 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.
  28. Starrenburg, M. J. C. and J. Hugenholtz. 1991. Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Eur. J. Biochem.* **57**: 3535–3540.
  29. 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.
  30. 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.
  31. 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.
  32. Veerkamp, J. H. 1971. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J. Bacteriol.* **108**: 861–867.
  33. 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.
  34. Winterbourne, D. J. 1993. Chemical assays for proteins, pp. 197–202. *Biomembrane Protocol*, chapter 18, Humana Press, Totowa, New Jersey.

(Received March 13, 1998)