KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 40, No. 4, pp. 424~429 (2008)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

©The Korean Society of Food Science and Technology

Leuconostoc paramesenteroides 유기산 내성 변이균주의 내산성 특성

김영환 · 김희중 · 오균식 · 김선영 · 이시경[1] · 강상모*

건국대학교 미생물공학과, [1]건국대학교 응용생물공학과

The Acid-resistant Characteristic of Organic Acid Tolerance Mutant of *Leuconostoc paramesenteroides*

Young-Hwan Kim, Hee-Zoong Kim, Kyun-Sik Oh, Sun-Young Kim, Si-Kyung Lee[1], and Sang-Mo Kang*

Department of Microbial Engineering, Konkuk University

[1]Department of Applied Bio-Sciences, Konkuk University

Abstract To investigate the acid tolerance characteristics of the acid-resistant mutant, *Leuconostoc paramesenteroides* P-200, as a kimchi starter, this study examine proton permeability, ATPase activity, glycolysis activity, Mg^{2+} release, and membrane fatty acid composition, and compared the data to that of its wild-type, *L. paramesenteroides* LP-W. In the proton permeability experiment, the LP-W and P-200 strains' average maximum half-time ($t_{1/2}$) values for pH equilibration through the cell membrane were approximately 5.7 and 9.3 min in 150 mM KCl solution, and 4.2 and 8.3 min in 3% NaCl solution, respectively. Their values and pH levels for maximal specific ATPase activity showed that P-200 had greater activity than LP-W. And the results of pH-dependent glycolysis activity showed that P-200 had greater activity than LP-W. Furthermore, after 2 hr at pH 4.0, LP-W and P-200 had percent magnesium release values of approximately 12% and 34%, respectively. A comparison of their membrane fatty acid compositions indicated that C18 and cyclo-C19 were the major different fatty acids between the two strains, and their contents of C18 and cyclo-C19 were 2.5% and not detected, respectively, in LP-W, and 6.4% and 11.4%, respectively, in P-200. These results indicate that the P-200 strain has significantly improved acid tolerance as compared to its wild type, LP-W.

Key words: organic acid tolerance, *Leuconostoc paramesenteroides,* kimchi

서 론

김치는 알맞게 숙성되었을 때 맛이 좋지만 계속해서 발효가 진행되어 완숙기가 지나면 산패되는데, 이것은 *Lactobacillus plantarum*이 계속하여 젖산을 생산하기 때문이다(1). 그러나 김치가 숙성 중 특이 맛이 가장 좋을 때가 있는데 이런 경우는 대부분 저온숙성시킬 때이며 이때 *Leuconostoc paramesenteroides*가 많이 분포한다는 것이 알려져 있다(1).

따라서 산에 약한 *L. paramesenteroides*를 개량하여 내산성을 부여함으로 김치의 맛을 좋게 하면서 산패를 지연시키고자 하였다. 먼저 HCl에 내성을 갖도록 변이처리하여 얻은 *L. paramesenteroides* P-100을 김치에 starter로 첨가하였을 때 산패가 지연되었으나 젖산에 비교적 약하여 김치의 산패억제에 한계를 보였다(2). 이의 단점을 보완하고자 김치에 다량 함유된 유기산에 내성을 갖도록 균을 변이시켰다. 이렇게 김치의 대표적 유기산(젖산:초산=2:1)에 내성을 갖도록 변이시킨 *L. paramesenteroides* P-200를 김치에 starter로 첨가하였을 때 발효말기까지(35일) 산패가 억제되는 발효특성을 보여 보고하였다(2).

*Corresponding author: Sang-Mo Kang, Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
Tel: 82-2-450-3524
Fax: 82-2-3437-8360
E-mail: kangsm@konkuk.ac.kr
Received October 25, 2007; revised May 26, 2008;
accepted July 7, 2008

본 논문에서는 이 유기산 내성 변이주 P-200의 내산성을 결정하는 요인들을 알아보기 위하여 세포막의 proton 투과도, H^+-ATPase 활성, glycolysis의 pH 의존성, Mg^{++} 해리도, 세포막의 지방산 조성 등에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

Proton 투과도

야생균주(*L. paramesenteroides* KCCM 35471)와 이의 유기산 내성 변이균주 M-200을 MHHD배지(trypticase peptone 10 g, casamino acd 3 g, phyton peptone 1.5 g, yeast extract 1 g, tween 80 1 g, 10 mM $MnSO_4 \cdot H_2O$, glucose 21 g/L, pH 7.0)에서 30°C, 15시간 2회 전배양한 후, 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 10분)하였다. 균체 농도를 10 mg(dry weight)/mL로 조정한 후 다시 30°C, 15시간 본배양하여, Bender 등(3)의 방법을 변형하여, proton 투과도를 측정하였다. 즉, 원심분리(6,000 rpm, 4°C, 20분)하여 회수된 균체를 5 mM $MgCl_2$ 용액으로 2회 세척한 후, 1 mM $MgCl_2$와 150 mM KCl을 함유한 인산 완충용액(pH 7.2, 20 mM)으로 현탁시켜, 100 mM HCl과 50 mM KCl 또는 10 mM HCl과 150 mM KCl 혼합용액을 가하여 pH 4, 5, 6로 조절한 후 약 2분정도 안정화시켰다. Acid pulse를 유발시키기 위해 10 mM HCl과 150 mM KCl 혼합용액을 50 μL 첨가하고, 세포내외간에 proton의 cell내 유입에 따른 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 $t_{1/2}$로 정의하였다.

그리고 김치에는 식염이 약 2.5% 정도 함유되어 있으므로 Na^+ 존재시 proton 투과도의 차이를 알아보기 위해 KCl 용액 대신 NaCl 3%로 조정한 인산 완충용액을 사용하여 상기와 동일한 방법으로 proton 투과도를 측정하여 비교하였다.

H^+-ATPase 활성

조효소액의 제조(4-6)는 다음과 같이 하였다. 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 $MgCl_2$가 함유된 Tris-HCl buffer(pH 7.5, 75 mM) 10 mL에 현탁하여 얼음속의 hand glass tube에 넣고 sonication(60% pulse, 15분)하였다. DNase I(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), RNase A(Sigma Chemical Co.)를 10 μg/mL 첨가하고, β-aminobenzoamide(분자량 136.2)를 40 mM 수준으로 첨가한 후 실온에서 45분간 반응시켰다. 반응이 끝난 균체 파쇄액을 원심분리(15,000×*g*, 20분)하여 파쇄되지 않은 균체와 침전물을 분리하고 상층액을 ATPase 활성 측정용 조효소액으로 사용하였다.

H^+-ATPase 활성은 Fiske-Subbarow의 방법(3)에 따라 측정하였으며, 그 과정은 다음과 같다. 조제된 조효소액 100 μL에 10 mM $MgSO_4$와 2 mM ATP(Sigma Chemical Co.)를 함유한 pH 3.5, 4.0, 4.2, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5로 조정된 완충액 900 μL를 각각 첨가하고 30°C에서 10분 동안 효소반응시켰다. 여기에 3 mL의 증류수와 1 mL의 3.5 N 황산용액을 가하여 효소반응을 종결시켰다. 효소반응이 완료된 용액에 3.5% ammonium molydate 용액 1 mL를 첨가하였다. 이것을 실온에서 20분간 반응시킨 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하고 standard curve로부터 ATPase에 의해 유리된 inorganic phosphate의 양을 환산하였다. 효소의 단위는 1분 동안 1 μmol의 inorganic phosphate를 유리시키는 효소의 양을 다음의 단백질 정량법에 따라 단위 중량으로 환산하여 1 unit로 하였다.

Protein의 정량은 Lowry 방법(7,8)에 따라 측정하였으며, 그 과정은 다음과 같다. 조효소액 0.3 mL에 alkaline sodium dodecyl sulfate 용액((2%(w/v) Na_2CO_3, 1%(w/v) sodium dodecyl sulfate, 0.4%(w/v) NaOH, 0.16%(w/v) sodium tartate)) 10 mL와 cupric 용액(4%(w/v) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 0.1 mL가 혼합된 용액 1 mL를 첨가한 후 상온에서 10분간 반응시키고, 이 반응액에 Folin-Ciocalteu phenol reagent를 동일한 양의 증류수로 희석한 용액 0.1 mL를 첨가하고 강하게 진탕하면서 상온에서 45분간 반응시킨 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Bovine serum albumin으로 조정한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 정량하였다.

Glycolysis

Bender 등의 방법(9)을 이용한 것으로 대수증식기 후반까지 균체를 배양하고, 이를 원심분리하여(6,000 rpm, 4°C, 20분) 균체를 회수하였다. 다음 탈이온수로 세척한 후 1 mM $MgCl_2$를 함유한 인산완충용액(pH 7.2, 20 mM)에 균체를 2 mg/mL(dry weight) 수준으로 현탁하여 시험관에 1 mL씩 분주하였다. 이를 30°C에서 30분간 배양하고 원심분리한 후(10,000 rpm, 4°C, 3 min), 세포를 원하는 pH의 wide range buffer(glucose를 33.3 mM 함유한 citrate/$NaHPO_4$ buffer)에 현탁시켰다. 다시 30°C에서 2시간 배양하고 원심분리 후 상층액을 glucose oxidase가 포함된 glucose 정량용 kit로 glucose 함량을 측정하였다. 즉, sample 20 μL에 발색시약 3 mL를 첨가, 혼합한 후 37°C에서 18분간 반응시켜 505 nm에서 흡광도를 측정하여 표준액의 흡광도를 기준으로하여 각 sample의 glucose 함량을 정량하였다.

Mg^{++} 해리도

Mg^{++} 해리도 측정을 위한 균체 시료 준비는 Bender 등의 방법(9)에 따라 실시하였고, ICP(inductively coupled plasma)로 측정하였다. 즉, 야생균주와 변이균주를 대수증식기 말기까지 배양한 후 원심분리(8000 rpm, 4°C, 10 min)하여 집균하였다. 회수된 균체를 차가운 증류수로 1회 세척한 후 100 mL 증류수에 현탁시켰다. 실험에 사용된 모든 용기는 H_2SO_4에 24시간 침적한 후 증류수로 세척하여 건조시켜 사용하였다.

건조 균체 단위 중량당 Mg^{++} 함량 측정을 위하여 균주 현탁액 5 mL를 취하여 110°C에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 중량을 측정하고, 550-660°C의 온도에서 6시간 회화시켰다. 이 회분을 방냉 후 6 N HCl 10 mL 첨가하여 100°C에서 24시간 분해시킨 후 ICP로 측정하였다.

균체 현탁액 10 mL를 HCl을 사용하여 각각 pH 4, 5, 6으로 조절하고, 30분, 1시간, 2시간, 경과한 후 1 mL를 취하여 원심분리한 후 상층액으로 유출된 Mg^{++}을 ICP로 측정하였다.

세포막의 지방산 조성

세포막의 지방산 조성은 Sim(10) 및 Rizzo(11) 등의 방법을 참고하였다. 즉, 각 균주를 대수증식기 말기까지 증식시킨 후 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 10분)하고 균체를 증류수로 2회 세척하였다. 분리된 균체의 중량(wet weight)를 측정하고, teflon linded screw capped vial에 균체 1-5 mL과 methanol/HCl 5% 용액 1.5 mL, chloroform 0.3 mL을 첨가하여 72°C, dry oven에서 24시간 methanolysis하면서 8시간 간격으로 0.3 mL chloroform을 첨가하고, 5분간 mild sonication하였다. 그후 질소 가스로 농축시킨 후 다시 chloroform을 첨가하고, glass wool을 통과시키는 과정을 3회 가량 반복하면서 불순물을 제거하고 지질층을 추출하였다. 각 지방산의 동정에 사용된 표준물질은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다. Gas chromatography 측정조건은 다음과 같다. 즉, GC-8A 모델(Shimadzu, Kyoto, Japan)의 기계에, 검출기는 flame ionization detector를 사용하였으며, DBI capillary column을 사용하였고, support는 chromosorb WAW, DMCS 100/120을 이용하였다. 주입온도는 270°C, 검출온도는 300°C로 하였고, 초기온도는 50°C로 하여, 최종온도 100°C, 최종시간 0분, 프로그램속도 10°C/분과 150°C, 0분, 3°C/분 및 300°C, 20분, 4°C/분의 3가지의 프로그램을 적용하였다. Carrier gas는 질소 gas(200 kPa의 속도)를 사용하였다.

결과 및 고찰

Proton 투과도

Proton 투과도는 세포질막 자체의 물리적 성질, 그와 연관되는 지방산 조성의 변화 및 H^+-ATPase를 비롯한 세포질막에 발현되는 다양한 효소의 양과 기능활성 등의 통합적인 것으로, 내산성일수록 산성 환경에서 net proton permeability가 낮아지는 것으로 알려져 있다(3-11,12).

Fig. 1은 각 pH에서의 *L. paramesneteroides*의 proton 투과도로 $t_{1/2}$ 최대값의 결과는 나타낸 것이었다. 150 mM KCl에 현탁시킨 경우, 야생주 *L. paramesenteroides*(이하 LP-W라 함)의 경우 pH

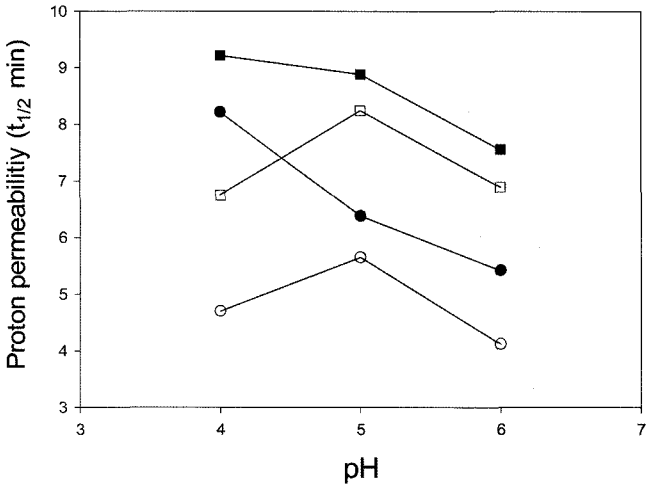


Fig. 1. Proton permeabilities of LP-W and P-200 strains as a function of environmental pH value. ○, *L. paramesenteroides* LP-W+3% NaCl solution; □, *L. paramesenteroides* LP-W+150 mM KCl solution; ●, *L. paramesenteroides* P-200+3% NaCl solution; ■, *L. paramesenteroides* P-200+150 mM KCl solution.

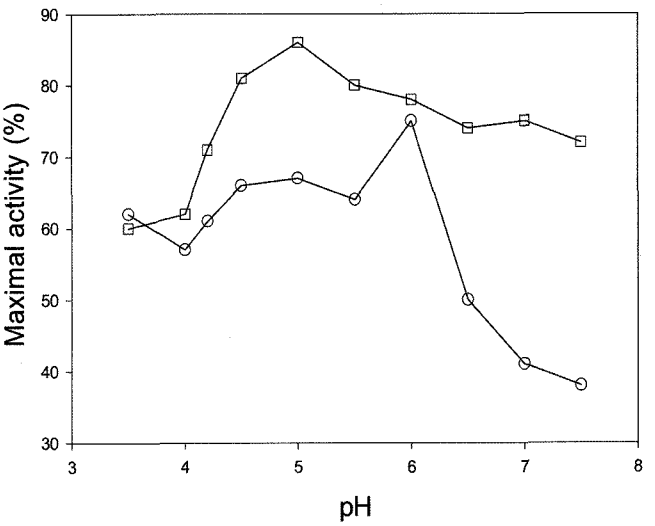


Fig. 2. Acidity-pH profiles for ATPase of membranes isolated from cells of LP-W and P-200 of *L. paramesenteroides*. The maximal activities of the membrane ATPase were 0.6 and 0.7 U/mg of membrane protein of LP-W and P-200. ○, *L. paramesenteroides* LP-W ; □, *L. paramesenteroides* P-200.

5에서 8.31분이며 유기산 내성 변이균주 P-200은 pH 4에서 9.2분이었다. 그리고 3% NaCl 용액에서 볼 때 LP-W는 pH 5에서 8.9분이며, P-200은 pH 5에서 8.2분이었다. 변이균주 P-200의 $t_{1/2}$ 최대값이 pH 4.0, 5.0 그리고 6.0에서 모두 야생균주 LP-W 보다 2내지 3분 정도 더 큰 값을 가지며 실제로 proton의 평형을 이루는 시간이 약 50% 정도 더 길었다. 이와 같이 KCl에서나 NaCl에서 유기산내성 변이주 P-200이 proton 투과도가 LP-W 보다 더 낮은 것을 알 수 있었다.

Kobayashi(13)는 일반적으로 내산성 균주의 경우, 산성 pH 영역에서 proton에 대한 투과도가 낮은 성질을 갖고 있으며, 이런 낮은 투과도는 세포막의 물리적인 성질에 기인되는 것일 뿐만 아니라, 세포질막에 결합되어 있는 proton-전위성 ATPase의 발현 양 및 그것의 비활성(specific activity) 등의 특성과 연관되는 것이라고 하였다.

본 특성 변화로 인해 유기산 내성 변이균주 P-200을 김치에 첨가 시 발효말기인 pH 4 부근에서 야생균주 LP-W 보다 높은 생육활성을 유지할 수 있었던 이유가 이러한 proton 투과도가 낮아서 나타난 것으로 생각되었다.

그리고 유기산내성 변이균주 P-200이 HCl 내성 변이주 *L. paramesenteroides* P-100에 비하여 내산성이 더 강하며 P-100과는 달리 김치에 starter로 첨가시 김치를 발효기간 35일 내내 산패시키지 않았다(2). 그 원인 중의 하나를 proton 투과도에서 볼 수 있었다. P-200의 경우, proton 투과도에서는 HCl 내성균 M-100(14)하여 pH 4와 5에서 proton 투과도로 $t_{1/2}$ 최대값은 약 1분정도씩 더 큰 값으로 나타내었다. 즉 P-200이 proton 투과도 값에서 비교해 볼때 P-100에 비하여 산에 견디는 힘이 더 강하다는 것을 알 수 있었다.

ATPase 활성

H^+-ATPase의 활성이 내산성에 관여하는 기작은 발효 과정 중에 생성되는 유기산에 의해 외부 pH가 낮아지면 세포 내부로 수소이온의 유입이 늘어나게 되는데, 이때 H^+-ATPase의 활성이 높을수록 수소 이온을 효과적으로 방출하여 세포 내부의 pH를 유지함으로써 산에 대한 내성을 주는 것으로 알려져 있다(15).

Fig. 2에서 볼 수 있듯이 buffer pH range를 pH 7.5, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.2, 4.0 및 3.5로 조정하였을 때, pH 5에서 비활성이 가장 높게 나타났다. 각 균주의 최대 활성은 야생균주 LP-W가 pH 6에서 0.6 unit/mg 그리고 P-200이 pH 5에서 0.7 unit/mg을 나타내었다. 거의 모든 경우에서 내산성 변이균주가 야생균주보다 H^+-ATPase의 활성이 높은 것을 알 수 있었다.

본 실험에서 H^+-ATPase의 최대활성은 LP-W의 경우는 pH 6일 때이고, 내산성 변이균주 P-200은 pH 5에서 최대 활성을 나타내었다. 이는 proton 투과도와 H^+-ATPase 활성을 비교하였을 때, ATPase의 활성이 가장 높을 때의 pH는 proton 투과도가 가장 낮을 때의 pH 보다 1 unit 정도 높으며, 이 차이는 ATPase가 세포막의 세포질 표면에 위치하고 있어 세포가 산성환경에 놓여 있을 때 세포질은 상대적으로 알칼리 상태를 유지하면서 세포막 내외의 ΔpH를 유지할 수 있기 때문이라고 하는 Bender 등(9)의 보고와 같은 결과이다.

그리고 P-200과 P-100(2)의 H^+-ATPase의 활성을 비교해보면 김치에서 중요한 pH 4-5 사이의 범위에서 비슷한 활성을 나타내나 pH 5에서 P-200이 P-100에 비하여 약 5% 더 높은 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. H^+-ATPase 활성차이에 의해서도 P-200이 P-100보다 더 내산성이 강한 것으로 보인다.

Glycolysis 활성

에너지 대사의 가장 기초가 되는 glycolysis는 산에 대한 가장 예민한 대사과정으로 glycolysis의 저해는 가장 중요한 성장제한 요소가 된다(3,9). 즉 균주가 낮은 pH 영역에서도 glycolysis가 활발히 이루어지는 경우에는 내산성을 보유하는 것이라 할 수 있다.

Na-citrate buffer를 사용하여 pH profile에 따른 glycolysis 활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. Glycolysis 활성이 최대로 이루어지는 pH는 P-200은 pH 4일때 97%이었고 LP-W는 pH 5일때 96%이었다. 그리고 pH 5를 제외하면 측정한 pH 3-7 범위에서 LP-W에 비하여 P-200이 높은 glycolysis 활성을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 유기산내성 변이균주가 야생균주에 비해 더 내산성인 것을 알 수 있었다.

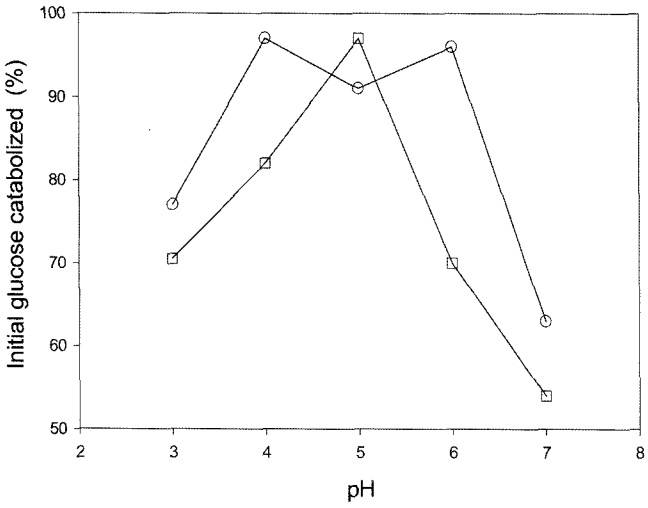


Fig. 3. Glycolysis activities of LP-W and P-200 of *L. paramesenteroides*. ○, *L. paramesenteroides* LP-W; □, *L. paramesenteroides* P-200.

유기산 내성 변이균주의 높은 해당작용 활성은 Bender 등(9)이 내산성 균주가 낮은 pH 환경에서도 높은 해당작용을 유지할 수 있는 이유는 해당작용에 관여되는 효소 그 자체가 산에 저항성이기 보다는 내산성이 증가된 환경에서 보다 높게 유지되는 세포질내의 pH와 연관되어 있다고 제안하였듯이, 변이균주가 야생균주에 비해서 세포질내의 pH를 높게 유지할 수 있어 내산성이 증가되었다고 생각되었다.

그리고 유기산내성 변이균주 P-200이 HCl 내성 변이주 *L. paramesenteroides* P-100(2)에 비하여 내산성이 더 강한 것을 glycolysis 활성에서도 알 수 있었다. 즉, P-200의 경우, HCl 내성균 P-100에 비하여 김치에서 중요한 pH 4에서 glycolysis 활성이 97%를 나타내었으나 P-100은 약 85% 정도를 나타내어 P-200이 pH 4에서 상당히 활성이 좋은 것을 알 수 있었다.

Mg^{++} 해리도

Bender 등(9)에 의하면 균주의 세포막이 산에 의해 손상(acid damage)를 받게 되면 세포중의 무기질이 세포밖으로 유출되는데, 무기질중 Mg^{++}이 가장 민감한 지표로서 균주가 내산성일수록 Mg^{++} 해리도가 낮아지게 된다고 보고하였다.

*L. paramesenteroides*의 야생균주 LP-W, 그리고 유기산내성 변이균주 P-200의 pH별 Mg^{++} 해리도를 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 야생균주 LP-W는 pH 4에서 2시간 경과 후 Mg^{++} 해리도가 35.5%로 최대를 보였다. 그러나 변이균주 P-200은 12% 정도로 LP-W 보다 1/3가량 적게 나왔다. 그리고 pH 6에서는 모든 균에서 거의 산에 의한 손상을 입지 않은 것을 알 수 있었다.

본 실험에서는 모든 실험균주가 pH는 낮고, 시간이 경과할수록 Mg^{++}의 해리도는 높아짐을 보였다. *L. paramesenteroides*의 야생균주 LP-W 보다 유기산내성 변이균주 P-200이 동일 조건일 때 Mg^{++}의 해리도가 상대적으로 낮아 내산성이 더 강한 것을 알 수 있었다.

그리고 HCl 내성변이주 P-100(2)과 유기산 내성 변이주 P-200과의 Mg^{++} 해리도를 비교해 볼 때 P-100은 pH 4에서 2시간 경과 후 24% 정도 용출된데 비하여 P-200은 이의 약 절반정도 용출되었다. 여기서도 P-200이 P-100 보다 더 내산성임을 알 수 있었다.

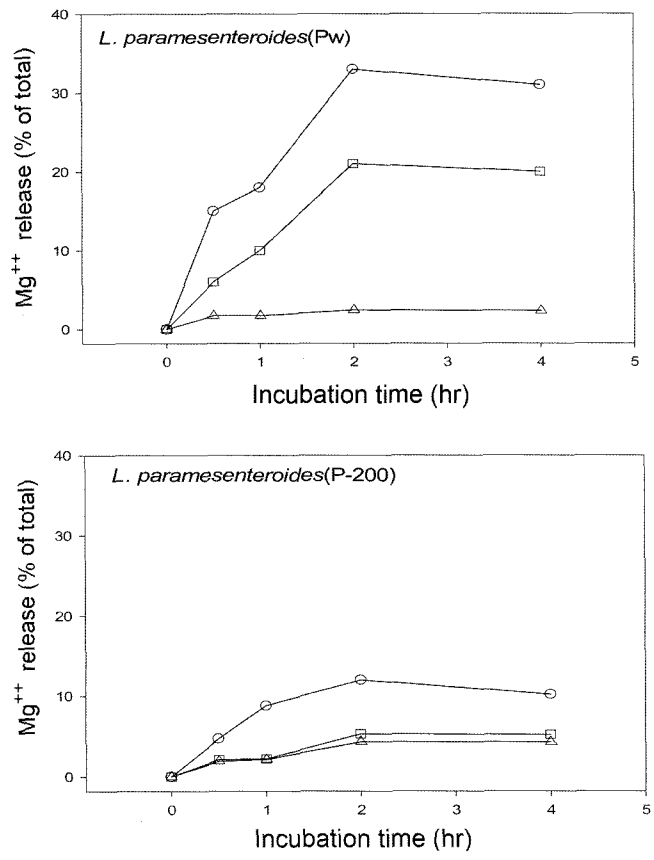


Fig. 4. Percent of Mg^{++} released from cell membrane of LP-W and P-200 of *L. paramesenteroides* affected by pH. ○, pH 4; □, pH 5; △, pH 6.

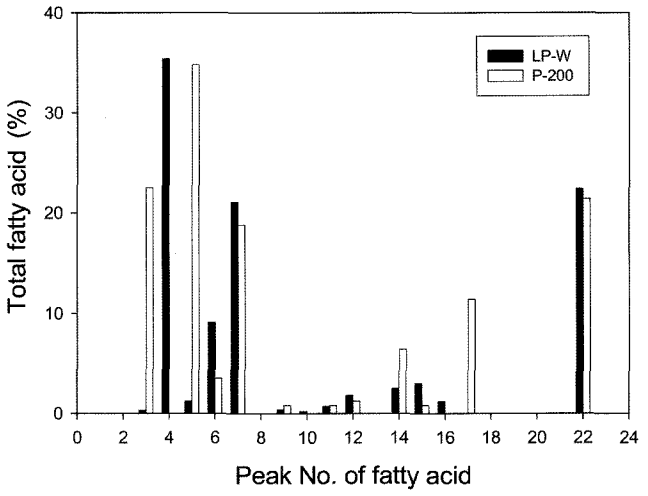
세포막의 지방산 조성

생태계에 존재하는 미생물이 외부 환경변화에 가장 먼저 접하고 반응하는 것이 세포막으로, 미생물은 외부환경이 급격하게 변화한다 해도 세포막의 구조적, 화학적 변화로 그 영향을 최소화하여 세포내의 항상성을 유지하려 하는 유순 방어막으로서의 기능이 있으며(16), 항생제 내성 병원성 세균에 대해서도 위의 기능이 보고되어 있다(17).

Rizzo 등(11)은 내산성이 강한 *Lactobacillus casei, Lac. plantarum, Lac. acidophilus* 등 젖산균의 지방산을 분석한 결과 $C_{19:0\ cyclo}$의 함량이 높았던 반면(35-39%), 이들 균주보다 내산성이 약한 *Lac. bulgaricus*는 그 함량이 매우 낮음(13%)을 보고하였고(18), Sim 등(10)은 *Lac. casei*를 대상으로 내산성의 변화와 지방산 조성의 관계를 연구하였는데 내산성이 증가할수록 $C_{18:1}$은 감소되고 $C_{19:0\ cyclo}$는 증가한다고 하였다.

Fig. 5에서 보듯이 *L. paramesenteroides*는, C_9, C_{11}, C_{12} 등의 지방산이 많이 검출되었고, C_9의 경우 야생균주 LP-W는 35.4%인 반면 변이균주 P-200은 검출되지 않았다. P-200에서 C_8, $C_{10:0}$, $C_{19:0\ cyclo}$의 경우 많은 증가를 보여, 각각 0.3에서 22.5%, 1.2에서 34.8%, 0에서 11.4%로 증가하였다. $C_{18:1}$의 경우 야생균주 LP-W는 2.5%이나 변이균주 P-200은 6.4%로 지방산이 증가를 하였다. 그러나 $C_{19:0\ cyclo}$의 경우 LP-W는 0%이나 P-200에서는 11.4%로 매우 증가하는 경향을 보여, P-200의 경우 비록 $C_{18:1}$이 6.4%로 증가함에도 불구하고 $C_{19:0\ cyclo}$의 함량이 높아 내산성을 충분히 보유할 것으로 생각되었다.

따라서 5가지 내산성특성을 조사한 것 중 지방산조성에서 가



Ref. of peak No.																			Unknown
$C_{6:0}$	$C_{9:0}$	$C_{10:0}$	$C_{11:0}$	$C_{12:0}$	$C_{13:0}$	$C_{14:0}$	$C_{15:0}$	$C_{16:1}$	$C_{16:0}$	$C_{17:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:0}$	$C_{19:1}$	$C_{19:0,cyclo}$	$C_{20:0}$	$C_{22:1}$	$C_{22:0}$	$C_{24:0}$	NO.22
NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	NO.7	NO.8	NO.9	NO.10	NO.11	NO.12	NO.13	NO.14	NO.15	NO.16	NO.17	NO.18	NO.19	NO.20	NO.21	

Fig. 5. Fatty acids compositions of the wild and mutant strains of *L. paramesenteroides*.

장 큰 차이를 보였는데 무엇보다 $C_{19:0,\ cyclo}$가 0%에서 11.4%로 크게 증가하므로 지방산 조성의 변화가 P-200이 LP-W 보다 더 강한 내산성을 가질 수 있었던 것에 가장 많이 기여하였을 것으로 생각되었다.

그리고 유기산내성 변이균주 P-200이 HCl 내성 변이주 P-100에 비하여 내산성이 더 강한 것을 지방산조성 분석에서도 알 수 있었다. 즉, P-200은 $C_{19:0\ cyclo}$의 함량이 11.4%인데, P-100은 2.4%으로 약 5배 더 많았다. 따라서 내산성 정도의 특성을 나타내는 proton 투과도, H^+-ATPase의 활성, glycolysis 활성, Mg^{++} 해리도, 지방산조성에서 볼 때 여기서도 가장 큰 차이는 지방산 조성에서 $C_{19:0\ cyclo}$의 함량 차이라고 생각되었다. 이로 인하여 P-200이 P-100 보다 훨씬 더 내산성이 강한 것으로 생각되었다.

요 약

김치 starter로 개량된 유기산내성 변이균주 *L. paramesenteroides* P-200이 갖는 강한 내산성에 관한 생리적 성질을 규명하기 위하여 proton 투과도, ATPase 활성, glycolysis 활성, Mg^{++} 해리도, 세포막의 지방산 조성을 야생균주(LP-W)와 비교 분석하였다. Proton 투과도 실험 결과 150 mM KCl 수용액 및 3% NaCl 수용액에서 변이균주 P-200의 $t_{1/2}$ 최대값이 pH 4.0, 5.0 그리고 6.0에서 모두 야생균주 LP-W 보다 2내지 3분 정도 더 큰 값을 가지며 실제 proton 투과도 실험에서 proton의 평형을 이루는 시간이 LP-W 보다 약 50% 정도 더 길었다. ATPase 활성의 결과에서도 최대 활성은 P-200이 pH 5에서 0.7 unit/mg을, LP-W가 pH 6에서 0.6 unit/mg을 나타내어, 산성 환경에서 P-200이 LP-W보다 더욱 높은 활성을 유지하였다. 또한 전체 pH 4-7 범위에서 P-200이 야생균주 LP-W 보다 높은 활성을 보였다. 해당작용의 pH 의존성 결과에서는 최대 활성이 P-200은 pH 4에서 97%이었고, LP-W는 pH 5에서 96%이었다. 그리고 pH 5를 제외하면 측정한 pH 3-7 범위에서 LP-W에 비하여 P-200이 높은 해당작용 활성을 보였다. Mg^{++} 해리도에 있어서는 pH 4에서 2시간 경과 후 P-200이 LP-W 보다 약 1/3 정도 Mg^{++}이 유출되었다. 지방산조성의 경우, LP-W에서 내산성을 증가시키는 $C_{19:0\ cyclo}$은 0%이었으나 P-200의 경우는 11.4%로 크게 증가하였다. 따라서 이상 5가지 내산성특성을 조사한 것 중 지방산조성에서 가장 큰 차이를 보였는데, 무엇보다 $C_{19:0\ cyclo}$가 0%에서 11.4%로 크게 증가하여 이러한 지방산 조성의 변화가 P-200이 LP-W 보다 더 강한 내산성을 가질 수 있었던 것에 가장 크게 기여하였을 것으로 생각되었다.

문 헌

1. Mheen TI, Kwon TW. Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 16: 443-450 (1984)
2. Kim YC, Jung EY, Kim EH, Jung DH, Yi OS, Kwon TJ, Kang SM. Strain improvement of *Leuconostoc paramesenteroides* as a acid-resistant mutant and effect on kimchi fermentation as a starter. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 26: 151-160 (1998)
3. Gary R, Bender R, Marguis E. Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. Appl. Environ Microb. 53: 2124-2128 (1987)
4. Poolman B, Molenaar D, Smid EJ, Ubbink T, Abee T, Renault PP, Konings WN. Malolactic fermentation: Electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energe. J. Bacteriol. 173: 6030-6037 (1991)
5. Chun UH, Park BS, Cho JS. Optimum conditions for the protoplast formation of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 9: 191-199 (1994)
6. Poole RK. The isolation of membranes from Bacteria. Biomembrane Protocols 19: 109-122 (1993)
7. Kirazov LP, Venkov LG, Kirazov EP. Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing fractions. Anal. Biochem. 208: 44-48 (1993)
8. Graham JM, Higgins JA. Chemical assays for proteins. Biomembrane Protocols 19: 197-202 (1993)
9. Bender GR, Sutton SV, Marquis RE. Acid tolerance, protein permeabilities, and membrane ATPases of *Oral Streptococci*. Infect. Immun. 53: 331-338 (1986)
10. Sim JH, Kim SK, Baek YJ, Oh TK, Yang HC. Influence of culture conditions on acid tolerance of *Lactobacillus casei* YIT 9018. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 23: 17-23 (1995)
11. Rizzo AF, Korkeala H, Mononen I. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of

Lactobacilli. Appl. Environ Microb. 53: 2883-2888 (1987)
12. Marty-Teysset C, Posthuma C, Lolkema JS, Schmitt P, Divies C, Konings WN. Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroids*. J. Bacteriol. 175: 2178-2185 (1996)
13. Kobayashi H. Regulation of the cytoplasmic pH in *Streptococcus faecalis*. J. Biol. Chem. 257: 13246-13252 (1982)
14. Kim YC, Jung EY, Kim EH, Jung DH, Jung SH, Yi DH, Kwon TJ, Kang SM. Properties of acid tolerance of acid-resistant mutant *Leuconostoc mesenteroids* which was improved as kimchi starter. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 26: 102-109 (1998)
15. Jos AF, Kamp OD. Dynamics and Biogenesis of Membranes. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 343-360 (1990)
16. Vigh L. The primary signal in the biological perception of temperature. P. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9090-9094 (1993)
17. Durieu I, Abbas-Chorfa F, Drai J, Iwaz J, Steghens J-P, Puget M, Ecochard R, Bellon G. Plasma fatty acids and lipid hydroperoxides increase after antibiotic therapy in cystic fibrosis. Eur. Respir. J. 29: 958-964 (2007)
18. Veerkamp JH. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. J. Bacteriol. 108: 861-867 (1971)