

## 김치에서 분리된 *Lactobacillus buchneri*의 젖산 생산 특성

심현수, 김명동\*  
강원대학교 식품생명공학과

Received: June 22, 2015 / Revised: July 22, 2015 / Accepted: July 22, 2015

### Characteristics of Lactic Acid Production by *Lactobacillus buchneri* Isolated from Kimchi

Hyun-Su Sim and Myoung-Dong Kim\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

Lactic acid is a useful platform chemical for a wide range of food and industrial applications such as pharmaceuticals and cosmetics. Among 313 strains of lactic acid bacteria isolated from different traditional Korean fermented foods, eight *Lactobacillus* strains effectively utilized xylose as a carbon source to produce lactic acid. A lactic acid bacterium identified as *Lactobacillus buchneri* produced the highest amount of lactic acid from xylose under anaerobic conditions. The optimum xylose concentration and incubation temperature were 50 g/l and 37°C, respectively; under these conditions, 22.3 g/l lactic acid was produced.

**Keywords:** *Lactobacillus buchneri*, kimchi, xylose, lactic acid, fermented foods

김치는 배추, 무, 열무, 오이, 갓 등의 주재료와 마늘, 파, 생강, 고춧가루, 젓갈 등의 부재료를 이용하는 우리나라의 대표적인 전통발효식품이다[9, 10]. 김치의 발효에는 호기성 및 혐기성 세균과 효모가 관여하며, *Leuconostoc* 속, *Lactobacillus* 속, *Lactococcus* 속, *Pediococcus* 속, *Weissella* 속 등의 젖산균이 김치의 발효를 주도하는 것으로 보고되었다[11, 16]. 젖산균은 발효과정 중 젖산, 초산 등의 유기산, 박테리오신(bacteriocin)을 비롯한 유해 미생물 생육억제물질 및  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 등의 생리활성물질을 생성하는 것으로 알려져 있다[4, 8]. 또한 젖산균은 식품의 맛, 향, 조직감 및 보존성을 향상시킬 뿐만 아니라 유당불내증과 변비의 완화, 혈중 콜레스테롤의 감소, 골다공증 예방, 항암 및 면역 기능 증진 효과 등을 지닌 것으로 보고되었다[7, 13, 15, 22].

김치 유래 젖산균 중 *Lactobacillus buchneri*는 통성혐기성균으로 GABA를 생산하는 것으로 보고되었으며[4], 식품이나 사료의 저장성을 증진시키는 기능을 갖는 것으로 보고되었다[5]. 또한 내산성, 내염성 및 콜레스테롤 감소 효과가

뛰어나 프로바이오틱스로서(probiotics)의 가치가 기대되는 젖산균이다[23].

젖산(lactic acid)은 의약품, 화장품, 식품 방부제 등 각종 유기화합물의 원료로 널리 사용되고 있으며[3], 최근에는 생분해성 플라스틱, 약물전달소재, 생체대체소재 등의 원료로 사용되는 polylactic acid에 대한 관심이 높아짐에 따라 그 수요가 급증하고 있다[6, 17]. 젖산을 화학적 합성법으로 생산할 경우, L-lactic acid와 D-lactic acid의 혼합물 형태로 생산되기 때문에 목적하는 젖산을 순수하게 생산하기 어려우므로[3], 산업적으로 이용되는 젖산은 주로 미생물 발효로 생산하고 있다[1, 21]. 기존에는 주로 포도당을 기질로 이용하였으나, 최근에는 식물유래 바이오매스를 이용하여 젖산을 생산하는 시도가 점차 증가하고 있다[1, 21]. 식물유래 바이오매스는 90% 이상이 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 등으로 구성되어 있으며, 상당량의 자일로스(xylose)를 함유하고 있다[14, 21]. 따라서 식물유래 바이오매스를 기질로 이용하여 젖산을 생산하기 위해서는 포도당 뿐만 아니라 자일로스를 효율적으로 대사할 수 있는 미생물의 선발이 매우 중요하다[17].

본 연구에서는 전통 발효식품인 김치로부터 젖산 생산능이 우수한 젖산균을 분리하고 자일로스를 이용한 젖산 생산 특성에 대하여 조사하였다.

#### \*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6458, Fax: +82-33-259-5565

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

젖산생산능이 우수한 균주를 확보하기 위하여 전국에서 44점의 전통발효식품을 수집하였다. 젖산균을 순수분리하기 위하여 채취된 시료를 멸균된 생리식염수(0.85% NaCl)에 현탁한 후, 적정 농도로 희석하여 자일로스(Sigma-Aldrich, USA)가 20 g/l의 농도로 함유된 MRS (proteose peptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, beef extract 10 g/l, polysorbate 80 g/l, ammonium citrate 2 g/l, sodium acetate 1 g/l, manganese sulfate 0.05 g/l, dipotassium phosphate 1.83 g/l, xylose 20 g/l) 평판배지에 도달한 후 30°C에서 48시간 배양하여 단일집락을 확보하였다.

분리한 젖산균의 염색체 DNA는 5 ml의 MRS 액체배지에서 48시간 배양한 후 Park 등의 방법[12]으로 추출하였다. 분리한 젖산균의 16S rRNA 유전자의 증폭은 518F(5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG)와 800R(5'-TACCAGGGTATCTAATCC) 프라이머를 이용하였다[2]. 증폭한 16S rRNA 유전자의 염기서열을 확보한 후 National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA)의 BLAST를 사용하여 타 균주와의 유전자 단편의 상동성을 근거로 동정하였다[12].

고농도의 자일로스에서 젖산생산능이 우수한 균주를 선별하기 위하여 분리한 젖산균을 자일로스가 50 g/l로 함유된 5 ml의 MRS배지에 접종하고 30°C에서 96시간 동안 배양한 후, 젖산생산능을 평가하였다. 젖산생산능이 우수하였던 8점의 젖산균을 선발하여 이후의 실험을 진행하였다.

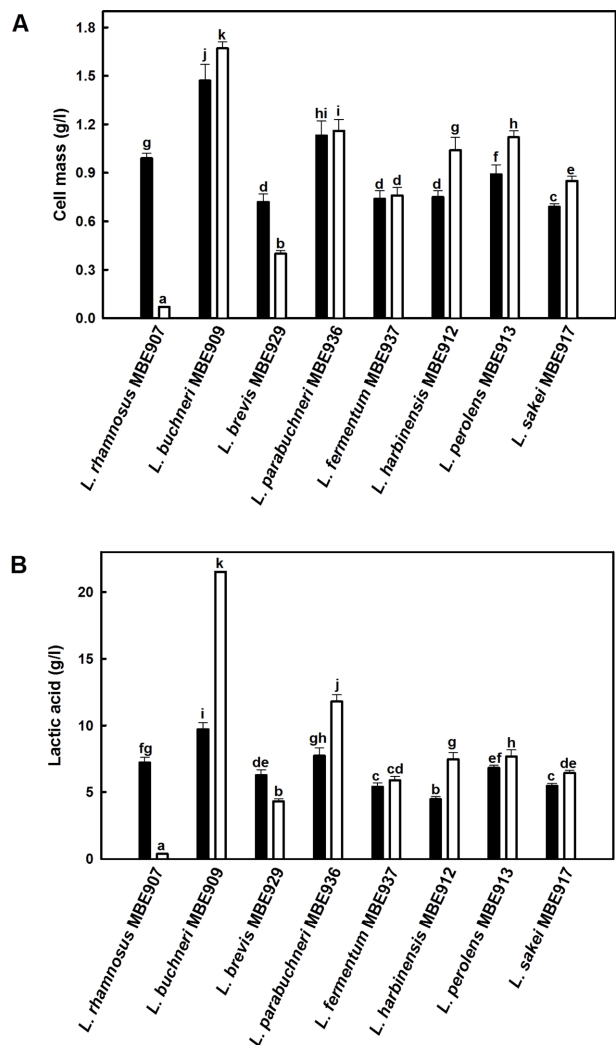
자일로스가 50 g/l 농도로 첨가된 5 ml의 MRS 배지에 1차 선별한 8점의 균주를 접종하고, 진탕배양기(Hanbaek Scientific Co., Korea)를 이용하여 30°C에서 200 rpm으로 24시간 동안 전배양하였다. 흡광광도계(GE Healthcare, Sweden)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하고 원심분리하여 적정량의 세포를 회수한 후 멸균 증류수로 3회 세척하고 50 g/l의 자일로스가 첨가된 100 ml의 MRS 배지에 초기 흡광도가 0.1이 되도록 접종하였다. 호기적 배양은 baffled flask(DURAN, Germany)를 사용하여 200 rpm으로 교반하였고, 혐기적 배양은 oxyrase (bioWORLD, USA)를 2% (v/v)의 농도로 첨가된 배지를 screw cap baffled flask (SPL, Korea)에 넣어 밀봉한 후 50 rpm으로 교반하였다.

최적 배양 온도를 설정하기 위하여 25, 30, 37, 42°C에서 50 g/l의 자일로스가 첨가된 200 ml의 MRS 배지를 사용하여 *Lactobacillus buchneri*를 혐기적으로 배양하고 젖산생산량을 측정하였다. 자일로스 농도에 따른 젖산생산량을 비교하기 위하여 자일로스가 각각 20, 50, 100, 150 g/l의 농도로 첨가된 MRS 배지를 사용하였으며 일정 시간마다 배양액을 회수하여 균체농도 및 젖산 농도를 측정하였다.

젖산 및 자일로스 농도는 Rezex ROA-Organic Acid H+ (Phenomenex, USA) 컬럼이 장착된 HPLC (Shimadzu,

Japan)를 사용하였다. 이동상은 0.005 N 황산용액을 0.6 ml/min의 유속으로 사용하였으며, 굴절률 검출기(Refractive Index Detector, Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 모든 측정은 3회 반복하였으며 통계처리는 SPSS 21 (IBM, USA)을 이용하였으며, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검정하였다.

전국에서 수집한 전통발효 식품으로부터 313점의 젖산균을 분리 및 동정하였다. 동정된 젖산균 중에서 5 ml 배양규모에서 젖산 생산량이 우수한 것으로 나타난 *Lactobacillus rhamnosus* MBE907, *L. buchneri* MBE909, *L. brevis*



**Fig. 1.** Cell growth (A) and lactic acid production (B) of lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. Cells were grown in 5 ml MRS medium containing 50 g/l xylose at 30°C. Black (■) and white (□) bars indicate aerobic and anaerobic conditions, respectively. Averages and standard errors from three independent cultures were shown. Different letters indicate significant difference between means ( $p < 0.05$ ).

MBE929, *L. parabuchneri* MBE936, *L. fermentum* MBE937, *L. harbinensis* MBE912, *L. perolens* MBE913, 및 *L. sakei* MBE917로 명명된 균주들의 젖산생산량을 평가하였다.

선발된 젖산균을 자일로스가 50 g/l 농도로 첨가된 MRS를 사용하여 호기적 또는 혐기적 조건에서의 균체성장 및 젖산생산량을 조사하였다(Fig. 1). 시험에 사용한 8점의 젖산균 중에서 *L. buchneri* MBE909는 혐기적 배양조건에서 가장 우수한 젖산생산량( $21.52 \pm 0.05$  g/l)을 나타냈으며, 균체성장 또한  $1.67 \pm 0.04$  g/l로 가장 우수하였다. *L. rhamnosus* MBE907은 혐기적 배양조건에서 균체의 성장 정도가 상대적으로 미미하였으며 다른 젖산균과 비교하여 상대적으로 낮은 젖산생산량( $0.38 \pm 0.01$  g/l)을 나타내었다. 그 외의 균주들은 호기적, 혐기적 조건 모두 균체성장 및 젖산생산 수준이 유사하였다. 젖산생산량이 가장 우수한 *L. buchneri* MBE909를 이용하여 이후의 실험을 진행하였다.

자일로스가 50 g/l의 농도로 첨가된 MRS 배지를 사용하여 배양온도를 25, 30, 37, 42°C로 설정하고 혐기적인 조건에서 배양하면서 균체성장 및 젖산 생산량을 비교하였다(Table 1). 배양온도가 25°C인 경우 균체생장이  $1.97 \pm 0.02$  g/l로 가장 높게 나타났으나 젖산생산량은  $17.87 \pm 0.10$  g/l로 실험구 중 가장 낮은 수준을 나타내었다. 이러한 결과는 자일로스가 젖산생산보다는 균체 성장에 주로 사용되었기 때문인 것으로 사료된다. 배양온도를 30°C로 증가시키면 젖산생산량( $21.52 \pm 0.05$  g/l)은 유의적으로 증가하였으나 균체성

장( $1.67 \pm 0.04$  g/l)은 감소하였다. 배양온도 37°C에서는 젖산생산량이  $22.27 \pm 0.30$  g/l로서 상대적으로 가장 우수한 결과를 나타내었다. 배양온도 30°C와 37°C에서 유사한 수준의 젖산이 생산되었지만 소모한 자일로스에 대한 젖산의 수율을 고려하면 37°C에서 배양한 경우가 30°C에서 배양한 결과 대비 약 15% 정도 높은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 Taniguchi 등[19]의 자일로스에서 젖산을 생성할 수 있는 *L. vaccinostercus* NRIC 1075 균주가 30°C에서 최대의 젖산을 생성하였다는 연구결과와는 다소 차이가 있었다. 이는 *L. vaccinostercus*의 최적 성장온도가 *L. buchneri*의 최적 성장온도와 다르기 때문으로 사료된다. 배양온도가 42°C인 경우는 균체성장 및 젖산생산 모두 상대적으로 가장 낮은 수준을 나타내었다. Thomas [20]의 연구결과에 따르면 *L. delbrueckii* 균주는 45°C에서 배양하였을 때, 50 g/l의 자일로스로부터 약 25.1 g/l로 가장 높은 농도의 젖산을 생성하여 고온에서도 높은 젖산생산능을 보였다.

젖산생산을 위한 최적의 자일로스 농도를 결정하기 위하여 혐기적인 조건에서 배양온도를 37°C로 설정하고 자일로스 농도를 20, 50, 100, 150 g/l로 첨가한 MRS 배지를 이용하여 균체성장 및 젖산생산을 조사하였다(Table 2). 자일로스를 20 g/l 농도로 첨가한 경우 배양초기에 주입한 자일로스는 균체에 의하여 모두 소모되었으며 젖산생산량은  $15.57 \pm 0.20$  g/l로서 상대적으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 자일로스가 50 g/l의 농도로 첨가되었을 시, 젖산생산량은

**Table 1. Effects of cultivation temperature on growth and lactic acid production by *Lactobacillus buchneri* MBE909.**

	Temperature (°C)			
	25	30	37	42
Cell mass (g/l)	$1.97 \pm 0.02$	$1.67 \pm 0.04$	$1.30 \pm 0.01$	$1.02 \pm 0.07$
Lactic acid concentration (g/l)	$17.87 \pm 0.10$	$21.52 \pm 0.05$	$22.27 \pm 0.30$	$20.81 \pm 0.15$
Lactic acid yield (g lactic acid/g xylose consumed)	$0.80 \pm 0.03$	$0.69 \pm 0.02$	$0.85 \pm 0.02$	$0.70 \pm 0.01$
Lactic acid production rate (g/l·h)	$0.09 \pm 0.00$	$0.13 \pm 0.00$	$0.18 \pm 0.00$	$0.21 \pm 0.02$

\*Each value shown is the average  $\pm$  standard error from three independent batch cultivations performed with 50 g/l xylose for 96 h.

**Table 2. Effects of initial xylose concentrations on growth and lactic acid production by *Lactobacillus buchneri* MBE909.**

	Xylose (g/l)			
	20	50	100	150
Cell mass (g/l)	$1.22 \pm 0.05$	$1.30 \pm 0.01$	$1.23 \pm 0.06$	$1.22 \pm 0.04$
Lactic acid concentration (g/l)	$15.57 \pm 0.20$	$22.27 \pm 0.30$	$22.05 \pm 0.13$	$17.97 \pm 0.21$
Lactic acid yield (g lactic acid/g xylose consumed)	$0.78 \pm 0.05$	$0.85 \pm 0.02$	$0.88 \pm 0.01$	$0.74 \pm 0.02$
Lactic acid production rate (g/l·h)	$0.13 \pm 0.01$	$0.18 \pm 0.03$	$0.19 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.03$

\*Each value shown is the average  $\pm$  standard error from three independent cultivations performed at 37°C for 96 h.

22.27 ± 0.30 g/l로 가장 우수하였으며 31.84 ± 1.28 g/l의 자일로스를 소모하여 약 85%의 수율을 나타내었다. 초기 자일로스 농도를 100 g/l로 증가시킨 경우 젖산생산량이 22.05 ± 0.13 g/l, 젖산생산성이 0.19 ± 0.01 g/l h로서 높은 수준을 나타내었으나 균체에 의하여 이용되지 않은 자일로스 잔류량이 75.69 ± 0.34 g/l로 나타났다. 초기 자일로스 농도가 150 g/l인 경우는 젖산생산량이 17.97 ± 0.21 g/l로 50 g/l, 100 g/l의 자일로스를 사용하였을 때보다 감소하였으며 소모한 자일로스 대비 생산된 젖산의 수율이 약 74%로서 모든 실험구 중 가장 낮게 나타났다. 균체성장은 사용한 초기 자일로스 농도에 따라 유의적인 차이가 없었다. Tanaka [18]의 연구에서 *Lactococcus lactis* IO-1 균주는 5 g/l의 자일로스가 포함된 배지에서 젖산을 거의 생성하지 못하였으나 70 g/l의 자일로스가 첨가되었을 때는 약 33.3 g/l의 젖산을 생성하여 자일로스 농도에 따라 다른 발효양상을 나타내었다.

기존의 *L. buchneri* 관련 연구는 신경 전달 물질인 GABA의 생산[4]과 사료에 균을 직접 첨가하여 저장성을 향상시키는 것[5]이 주를 이루었으나 본 연구에서는 김치에서 분리된 *L. buchneri* 균주를 이용하여 오탄당인 자일로스를 탄소원으로 이용하여 유용물질인 젖산을 생산하는 기초연구를 수행하였다. 본 연구를 통해 *L. buchneri* MBE909는 자일로스를 효율적으로 대사하여 젖산을 생성한다는 것을 확인하였으며, 혐기적인 조건의 배양온도 37°C에서 초기 자일로스 농도가 50 g/l일 때 상대적으로 가장 우수한 젖산생성능을 나타내었다. 배지최적화 및 균주개량을 통하여 젖산 생산성이 추가적으로 향상된다면 생물산업적 관점에서 높은 활용성이 기대된다.

## 요 약

전국에서 수집한 전통발효 식품으로부터 젖산균을 분리 및 동정하였으며, 그 중에서 8점의 *Lactobacillus* 속 젖산균을 이용하여 젖산생산능을 평가하였다. 자일로스가 50 g/l 첨가된 MRS 배지를 이용하여 호기 또는 혐기배양을 실시한 결과 *L. buchneri* MBE909로 명명된 균주가 혐기적인 배양조건에서 가장 우수한 젖산생산량을 나타내었다. 혐기적인 조건에서 젖산생산을 위한 *L. buchneri* MBE909 균주의 최적 배양온도는 37°C이었으며, 초기 자일로스 농도가 50 g/l일 때 젖산생산량(22.3 ± 0.3 g/l)이 가장 우수하였다. 본 연구를 통해 *L. buchneri* MBE909 균주는 자일로스를 효율적으로 대사하여 젖산을 생성할 수 있다는 것을 확인하였다.

## Acknowledgments

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Develop-

ment (Project No. PJ009993)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

## References

- Ahn SJ, Cayetano RD, Kim TH, Kim JS. 2015. Lactic acid production from hydrolysate of pretreated cellulosic biomass by *Lactobacillus rhamnosus*. *Korean Chem. Eng. Res.* **53**: 1–5.
- Anzai Y, Kudo Y, Oyaizu H. 1997. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 249–251.
- Cho KH, Cho YK, Hong SS, Lee HS. 1995. Isolation of microorganism with high productivity and cultivation optimization for lactic acid production. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 6–11.
- Cho YR, Chang JY, Chang HC. 2007. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 104–109.
- Holzer M, Mayrhuber E, Danner H, Braun R. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol.* **21**: 282–287.
- Ilmen M, Koivuranta K, Ruohonen L, Suominen P, Penttila M. 2007. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 117–123.
- Jang MH, Kim MD. 2011.  $\beta$ -1,4-xylosidase activity of *Leuconostoc* lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **43**: 169–175.
- Kim KA, Kim MG, Jang KL, Jun HK. 2003. Production of L-lactic acid from soluble starch by *Enterococcus* sp. JA-27. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 250–256.
- Kim MJ, Oh YA, Kim MH, Kim MK, Kim SD. 1993. Fermentation of chinese cabbage kimchi soaked with *L. acidophilus* and cleaned materials by ozone. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **22**: 165–174.
- Lee CW, Ko CY, Ha DM. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 102–109.
- Lee MK, Park WS, Kang KH. 1996. Selective media for isolation and enumeration of lactic acid bacteria from kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**: 754–760.
- Park EH, Lee DH, Seo JH, Kim MD. 2011. Cloning and characterization of a glyoxalase I gene from the osmotolerant yeast *Candida magnoliae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 277–283.
- Saarela M, Lahteenmaki L, Crittenden R, Salminen S, Mattila-Sandholm T. 2002. Gut bacteria and health foods—the European perspective. *Int. J. Food Microbiol.* **78**: 99–117.
- Saha BC. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 279–291.
- Seo JH, Lee H. 2007. Characteristics and immunomodulating

- activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**: 681–687.
16. So MH, Kim YB. 1995. Cultural characteristics of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 506–515.
  17. Tamakawa H, Ikushima S, Yoshida S. 2012. Efficient production of L-lactic acid from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain. *J. Biosci. Bioeng.* **113**: 73–75.
  18. Tanaka K, Komiyama A, Sonomoto K, Ishizaki A, Hall SJ, Stanbury PF. 2002. Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 160–167.
  19. Taniguchi M, Tokunaga T, Horiuchi K, Hoshino K, Sakai K, Tanaka T. 2004. Production of L-lactic acid from a mixture of xylose and glucose by co-cultivation of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 160–165.
  20. Thomas S. 2000. Production of lactic acid from pulp mill solid waste and xylose using *Lactobacillus delbrueckii* (NRRL B445). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86**: 455–468.
  21. Wang J, Wang Q, Xu Z, Zhang W, Xiang J. 2015. Effect of fermentation conditions on L-lactic acid production from soybean straw hydrolysate. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 26–32.
  22. Yu MH, Im HG, Lm NK, Hwang EY, Choi JH, Lee EJ, et al. 2009. Anti-hypertensive activities of *Lactobacillus* isolated from kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **41**: 428–434.
  23. Zeng XQ, Pan DD, Guo YX. 2010. The probiotic properties of *Lactobacillus buchneri* P2. *J. Appl. Microbiol.* **108**: 2059–2066.