

호모발효 젖산균의 분리 및 특성

하 미 영 · 정 선 용 · †김 성 준
전남대학교 공과대학 환경공학과
(접수 : 2002. 4. 23., 게재승인 : 2002. 8. 19.)

Isolation and Characteristics of a Homofermentative Lactic Acid Bacterium

Mi-Young Ha, Seon-Yong Chung, and Seong-Jun Kim†

Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2002. 4. 23., Accepted : 2002. 8. 19.)

This study was targeted to isolate and characterize a bacterium producing lactic acid in a large amount. Lactic acid bacteria of about fifty strains were isolated from *kimchi*, a Korean traditional fermented vegetable food. Strain KH-1 of them was most effective in the lactic acid production and showed 99% homology with *Lactobacillus casei* from analysis of 16S rRNA sequencing. The conversion ratio of lactic acid from glucose by *L. casei* KH-1 was 98% in anaerobic condition, and the lactic acid was composed as racemic mixture of D(-)-and L(+)-lactic acid, 7% and 93%, respectively. This result indicated that *L. casei* KH-1 was a homofermentative bacterium mainly producing L(+)-lactic acid. The strain KH-1 used glucose as a preferential substrate but not utilized lactose. In investigation of more inexpensive nitrogen source for cultivation of strain KH-1 using industrial MRS medium, when yeast extract and corn steep liquor were used at the ratio of 1 to 1, the molar yield of lactic acid produced per mole of glucose(Yp/s) was 1.09.

Key Words : Lactic acid, *Lactobacillus casei*, homofermentative

서 론

젖산(Lactic acid, 2-hydroxy propionic acid)은 자연계에 널리 존재하는 유기산으로 1881년 미국에서 유기산중 처음으로 발효법에 의해 상업적으로 생산되었다(1). 그 동안 식품첨가물용 산미제, 공업용 및 의약, 화장품 원료로 주로 사용되어 왔으나, 최근 생분해성 고분자 화합물의 원료로 주목을 받고 있어 시장의 성장이 기대되고 있다. 또한, 생분해성 고분자 화합물은 난분해성 물질로 생활환경의 큰 오염원인 합성플라스틱 폐기물문제를 해결하기 위한 면에서 재인식되어 효율적인 생산을 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 또한, 미생물에 의해 생산되는 젖산은 L(+), D(-)-이성질체를 구분하여 얻을 수 있는 장점이 있기 때문에 젖산의 합성 제조법보다 발효법에 대해 관심을 기울이고 있다. 해당 과정의 최종 산물로서 피루브산의 환원에 의해 생성되고 조해성이 강한 주상 결정체를 이루는 L(+)-이성질체는 근육 동물조직과 사람의 혈액에 존재하므로 생분해성 플라스틱과 수술용 봉합사와 같은 의약

품의 제조원료 등으로 사용되므로 D(-)-이성질체보다 선호되고 있다. 그러나 발효공정에 있어 젖산 균주는 아미노산, 비타민, 지방산, 퓨린, 피리미딘등을 영양물질로 사용하는 복잡한 영양요구성을 가지고 있고(2), 젖산, 아세트산과 같은 산물에 의한 성장 저해로 산물의 생산률이 낮아지므로 저렴한 원료사용에 의해 생산원가를 절감하고 우수한 균주 개발을 함으로서 젖산 발효의 경제성을 향상시키는 것이 중요한 과제로 남아 있다. 젖산균주, 특히 *Lactobacillus* 속들을 성장시키는데 있어 상업적으로 생산되고 있는 MRS배지는 질소원으로 yeast extract (YE), meat extract(ME), peptone from casein(PFC)이 사용되고 있어 젖산균주의 영양 요구성은 충분히 만족시키나, 원료비용에 상당한 부분을 차지하는 질소원이 고가이므로 산업에 적용시켜 대량의 젖산생산을 할 경우에는 경제적이 못하므로 전분제조의 부산물로서 다량의 영양분을 함유하고 원료비용이 낮은 corn steep liquor(CSL)이 대량 발효공정에서 공업용 질소원으로 사용되어지고 있다. 그러나 CSL은 발효시간이 길고, 함유 불순물에 의한 후속 정제 및 분리 비용 상승 등의 단점이 있어 문제해결을 위한 배지 성분의 최적화 연구도 다양하게 진행되고 있다(3).

본 연구에서는 전통적인 발효 식품인 김치로부터 높은 젖산 생산성을 가진 호모발효젖산균을 분리 동정하고, 특성을 파악하여 경제적인 젖산 생산을 위한 배양 조건을 연구하고자 한다.

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1864, Fax : +82-62-530-0864
E-mail : seongjun@chonnam.ac.kr

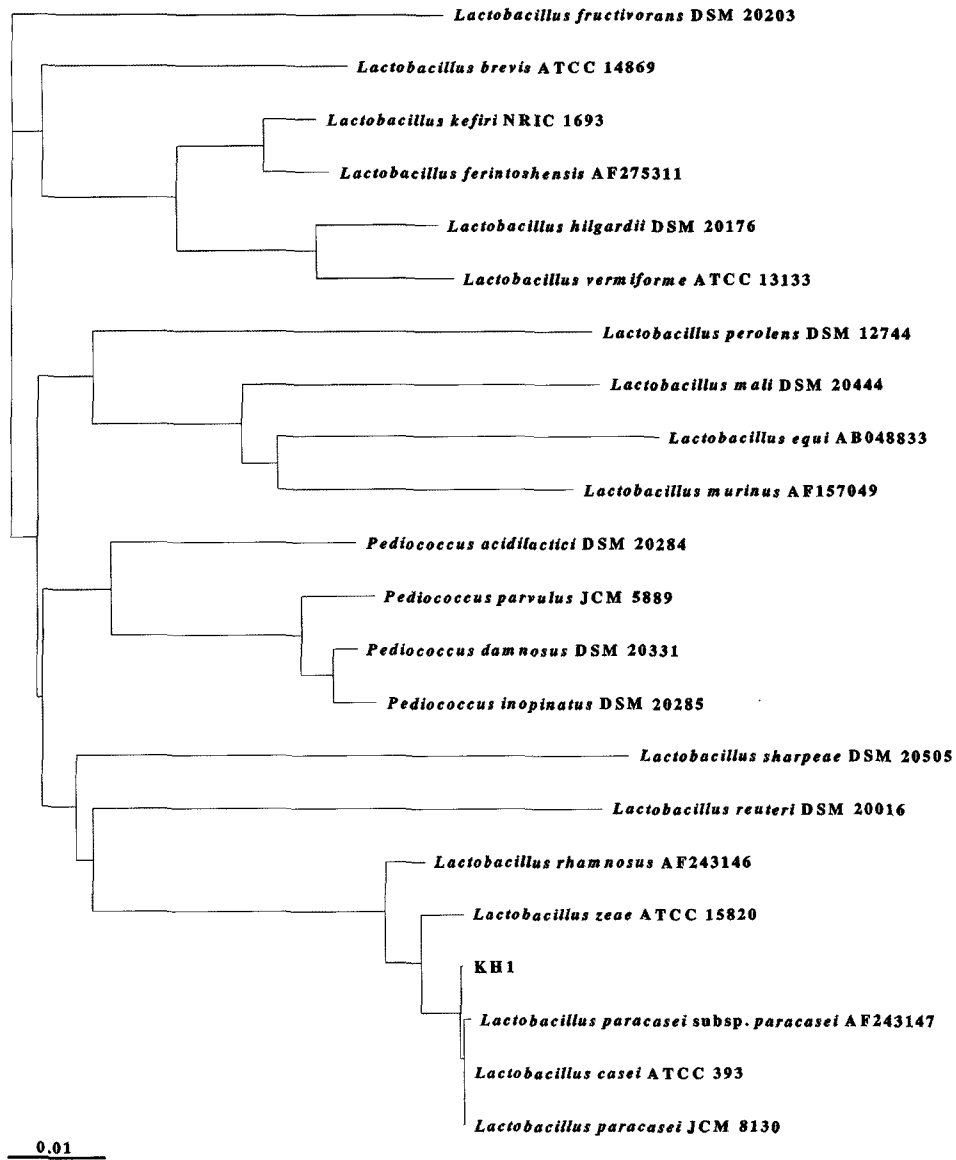


Figure 1. Phylogenetic relationship of strain KH-1 based on maximum-likelihood analysis of 16S rRNA.

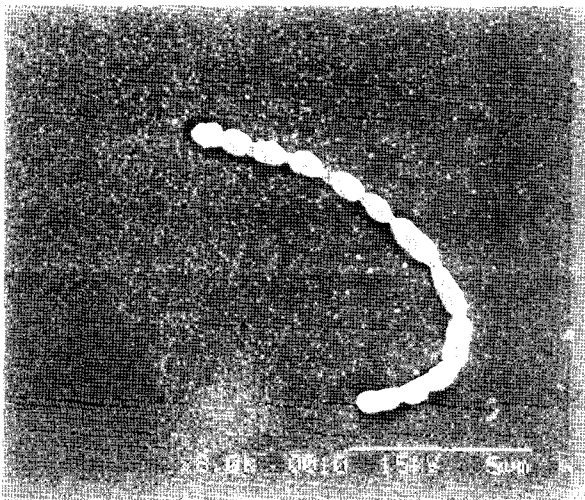


Figure 2. Morphology of *Lactobacillus casei* KH-1 observed by SEM.

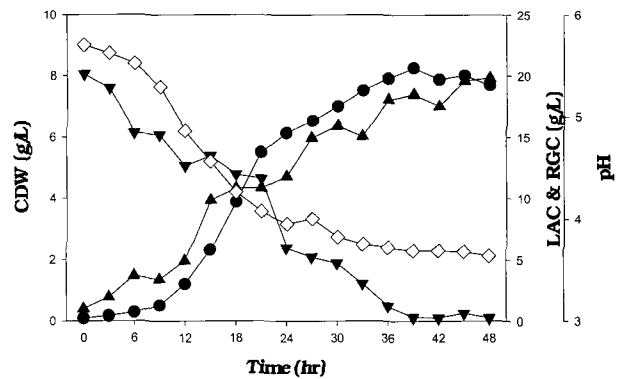


Figure 3. Changes of pH, cell dry weight(CDW), concentrations of residual glucose(RGC) and lactic acid(LAC) in anaerobic batch culture of *L. casei* KH-1 (37°C, 150rpm) Circle(●), triangle up(▲), triangle down(▼) and diamond(◇) represent CDW, LA, RGC, and pH, respectively.

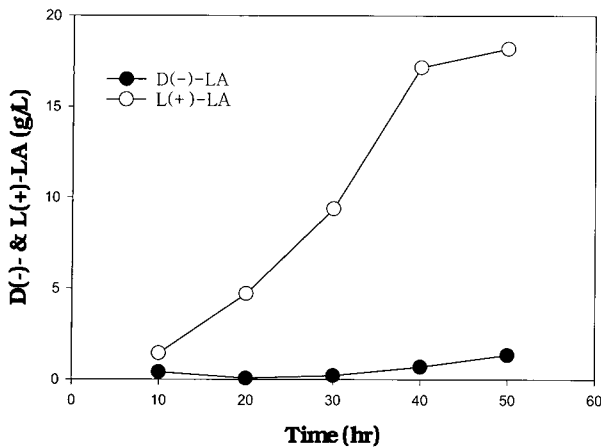


Figure 4. Changes of the concentration of D(-)-lactic acid and L(+)-lactic acid produced in MRS broth containing 20 g/L glucose by *L. casei* KH-1 under anaerobic batch culture(37°C, 150 rpm).

질체의 비율이 다소 높았다. Figure 4에서 보여주는 것과 같이 L(+)-lactic acid는 급격한 세포의 성장과 함께 증가하므로 생분해성 플라스틱과 수술용 봉합사와 같은 의약품 제조원료의 발효생산에 적용이 가능하다.

젖산의 생산에 미치는 초기 pH의 영향

Vaughn(1955)에 의하면 당 발효는 pH에 큰 영향을 받는데 상한 포도주에서 분리한 *Lactobacillus hilgardia*은 pH 5.0-5.5에서 포도당을 발효시켰으나 pH 6.5-7.0에서는 포도당을 이용하지 못했다고 보고했다. 분리균주 *L. casei* KH-1의 초기 pH에 따른 균의 생육과 젖산생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 4.0에서 7.0사이의 범위에서 배양하였고 Figure 5에 결과를 나타내었다. 대부분의 *Lactobacillus*속은 lactococci보다 낮은 pH에서 견디고 5.7보다 낮은 때가 균의 성장과 산물 생산에 있어 최적의 조건이라고 하지만(9), *L. casei* KH-1은 pH 5.7일 때 최적이었다. 초기 pH 4.0에서는 *L. casei* KH-1가 느리게 성장하고 젖산의 생산도 최적일 때의 50%밖에 못 미쳤으나. 산에 내성을 가지고 있다고 할 수 있다. 젖산발효는 최적의 pH에서도 산물에 의해 pH가 낮아져 세포 성장이 저해되어 산물의 생성률 또한 낮아지므로 젖산의 생산성을 높이기 위해서는 적정한 pH에서의 pH조절이 필요함을 알 수 있다.

L. casei KH-1의 당 이용성

L. casei KH-1의 세포성장과 젖산생산에 효과적으로 이용되는 탄소원에 대한 조사가 이루어졌고, 결과는 Table 1에 나타

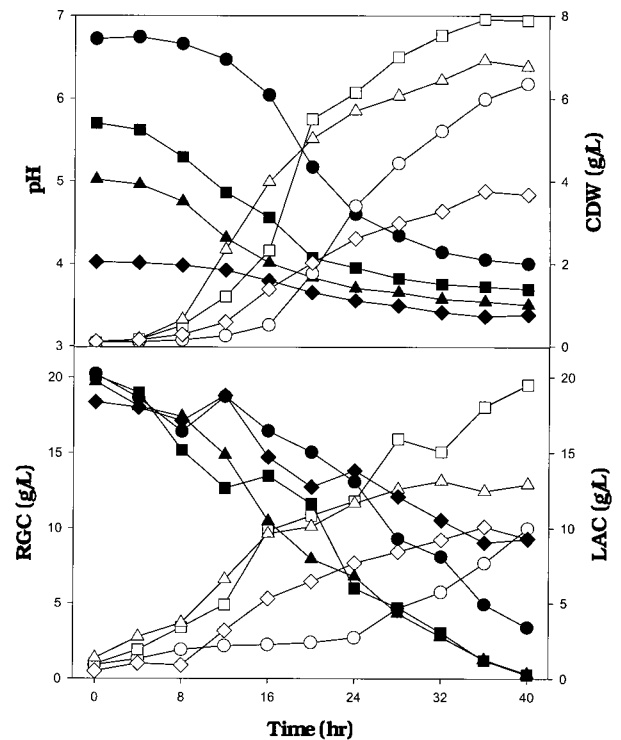


Figure 5. Changes of pH, cell dry weight(CDW), concentrations of residual glucose(RGC), and lactic acid(LAC) at various initial pH in anaerobic batch culture of *L. casei* KH-1 (37°C, 150 rpm). Opened symbols indicate CDW and LAC, and closed symbols indicate pH and RGC. Initial pH 7.0, 5.7, 5.0 and 4.0 are represented by circle, square, triangle and diamond, respectively.

내었다. *Lactobacillus casei*에 의한 젖산생산에 있어 Roukas Katzckidon(1998)연구(10)에 따르면 lactose를 기질로 사용할 때 기질이용률과 젖산의 수율이 각각 80%, 0.83 g·g⁻¹을 얻었다. Bruno-Barcena(1999)의 연구(11)에서는 glucose를 기질로 *L. casei*에 의해 0.84 g·g⁻¹의 젖산수율을 보였다. 또한 M. Siebold 등(1995)은 기질로 glucose를 이용한 MRS배지에서 세가지 *Lactobacillus*속에 대한 젖산수율을 비교하였는데 *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. salivarius*은 각각 0.89, 0.93, 0.92 g·g⁻¹의 젖산을 얻었다(12). 이에 비해 *L. casei* KH-1는 젖산생산에 기질을 이용하는데 있어 이당류인 sucrose의 이용은 다소 낮았고, 특히 *Lactobacillus* 속에 속함에도 불구하고 이전의 연구(13)와는 달리 lactose를 기질로서 이용하지 못함을 보여주었다. 그러나 *L. casei* KH-1은 세포의 성장과 젖산의 생산에 단당류인 포도당을 완벽하게 이용하여 얻은 세포와 젖산의 수율은 각각 0.38 g·g⁻¹, 0.99 mole·mole⁻¹으로 높았다. 그러므

Table 1. Effect of various carbon sources on the yields of cell and lactic acid by *L. casei* KH-1^a

Substrate	CDW (g/L)	LAC (g/L)	LA Productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{xs} ^b (g g ⁻¹)	Y _{ps} ^c (mole mole ⁻¹)
Glucose	7.69	19.81	0.41	0.38	0.99
Sucrose	7.14	16.83	0.35	0.36	0.85
Lactose	0.55	0.37	0.01	0.14	0.02

^a Batch cultures were conducted at 37°C, 150 rpm for 48hr, under anaerobic conditions and without pH controlled. Initial pH was 5.7. ^b Cell yield derived from glucose(Y_{xs}) was expressed in terms of gram-dry cell weight per glucose. ^c The yield of lactic acid(Y_{ps}) was expressed in moles of lactic acid produced per mole of glucose catabolized.

Table 2. Effect of various nitrogen sources on the yields of cell and lactic acid by *L. casei* KH-1^a

Nitrogen sources	CDW (g/L)	LAC (g/L)	LA Productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{x/s} (g g ⁻¹)	Y _{ps} (mole mole ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	0.08	1.54	0.03	0.004	0.08
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.06	6.85	0.14	0.003	0.34
NaNO ₃	0.05	2.27	0.05	0.003	0.11
Urea	0.06	2.35	0.05	0.003	0.11
Bacto peptone	3.49	16.47	0.34	0.174	0.82
Yeast extract(YE)	7.87	19.32	0.40	0.394	0.96
Casein hydrolysate	0.08	1.50	0.03	0.004	0.08
Corn Steep Liquor(CSL)	4.08	15.57	0.32	0.204	0.78
Tryptone	1.04	11.62	0.24	0.052	0.58
Meat extract(ME)	6.30	19.56	0.41	0.315	0.98
Beef extract	3.68	18.03	0.38	0.184	0.90
Peptone from casein(PFC)	2.32	14.26	0.30	0.116	0.71
MRS broth*	7.65	19.52	0.41	0.383	0.98

^a Batch cultures were conducted at 37°C, 150 rpm for 48 hr, under anaerobic conditions and without pH controlled. Initial pH was 5.7.

Table 3. Effect of mixing ratio of YE and CSL on the yields of cell and lactic acid by *L. casei* KH-1^a

Mixing ratio of YE and CSL	CDW (g/L)	LAC (g/L)	LA Productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{x/s} (g g ⁻¹)	Y _{ps} (mole mole ⁻¹)
YE	9.58	22.94	0.72	0.45	1.08
YE : CSL = 3 : 1	10.32	22.44	0.70	0.47	1.03
YE : CSL = 1 : 1	10.49	22.07	0.69	0.52	1.09
YE : CSL = 1 : 3	7.98	18.00	0.56	0.44	1.00
CSL	3.60	10.06	0.31	0.24	0.66
MRS	7.52	15.06	0.47	0.44	0.88

^a Batch cultures were conducted at 37°C, 150 rpm for 32 hr, under anaerobic conditions and without pH controlled. Initial pH was 5.7.

로 *L. casei* KH-1을 이용한 젖산의 생산에 whey나 낙농에서 발생하는 lactose와 같은 기질은 효과적이지 못하였지만, glucose를 효과적인 기질로 사용하였으므로 지구상의 가장 풍부한 biomass인 섬유소물질을 당화하여 얻어진 단당류를 본 젖산발효에 사용된다면 보다 경제적인 젖산 생산이 가능하리라 사료된다.

질소원에 따른 *L. casei* KH-1의 젖산생산

젖산균은 복잡한 영양 요구성을 가지고 있기 때문에 균마다 선호하는 아미노산, 비타민등이 다르고, 특히 질소원은 원료비의 상당부분을 차지하고 있어 발효에 의한 젖산생산의 경제성을 결정하는 중요한 요인이므로 *L. casei* KH-1의 젖산 생산에 효과적인 질소원을 조사하였고 Table 2에 결과를 나타냈다. MRS배지에 포함되어 있는 질소원의 총 질소함량(N=2.73 g/L)에 해당하는 농도로 각각의 단일 물질을 배지의 질소원으로 사용하였을 때 *L. casei* KH-1은 유기질소원들은 이용했지만 무기질소원들은 이용하지 못했다. 특히 유기질소원으로 YE나 ME를 사용하였을 때 젖산수율은 0.96, 0.98 mole · mole⁻¹을 나타내었다. 이는 *Lactobacillus delbrueckii*에 의한 질소원에 따른 젖산생산에 관한 Arasaratnam 등의 (1996) 연구(14)에서 질소원의 총 질소함량이 3.1 g/L이었을 때 젖산의 수율이 0.82 mole · mole⁻¹이었던 것과 비교하였을 때 *L. casei* KH-1에 의한 젖산생산이 더욱 효과적임을 나타내었다. 젖산균의 성장과 젖산 생산에 있어 YE와 ME의 단일 사용은 3가지 유기질소원(YE, ME, PFC)이 포함된 MRS 배지와 비슷

한 수율의 젖산을 얻었다. 이는 *L. casei* KH-1의 성장과 젖산의 생산에 이용되는 질소원은 단일 유기질소원 즉, ME 또는 YE로 대체 가능하므로 MRS배지에서 보다 발효 젖산생산의 경제성을 높일 수 있었다. 그러나 YE도 값비싼 원료에 속하므로(15-17) 최근에는 발효의 경제성을 향상시키기 위해 다량의 영양분을 함유하고 원료비용이 낮아 대량 발효공정에 전분제조의 부산물인 CSL이 사용되어지고 있으나 YE에 비해 발효시간이 길고, 함유 불순물에 의한 후속 정제 및 분리 비용 상승 등의 단점이 있어 보완이 요구되고 있다. 그러므로 YE와 CSL를 혼합하여 사용하므로 젖산 발효의 경제성을 높이고자 하였다. *L. casei* KH-1은 YE와 CSL을 1:1의 비율로 혼합하여 질소원으로 사용하였을 때 젖산 생산에 효과적임을 Table 3에서 나타내고 있는데, 이 때의 CDW의 수율은 0.52 g · g⁻¹이고 젖산의 수율은 1.09 mole · mole⁻¹로써 최대값을 보였다.

요약

생분해성 고분자 합성물질의 원료가 되는 젖산을 주로 생산하는 균을 김치로부터 분리하였다. SEM을 사용하여 관찰한 분리한 균의 형태는 연쇄간균이었고 16S rRNA sequencing에 의해 계통발생학적 분석의 결과 *Lactobacillus casei* KH-1로 명명하였다. *L. casei* KH-1는 glucose를 젖산으로 98%를 전환시키는 호모발효균이었으며, D(-)와 L(+)-이성질체를 각각 7%와 93%를 포함하는 racemic mixture로 젖산을 생산하였다.

L. casei KH-1은 다른 *Lactobacillus*속과는 달리 세포의 성장과 젖산의 생산에 기질로서 lactose를 이용하지 못하였지만 glucose의 이용은 이전의 연구들과 비교할 때 효과적이었다. *Lactobacillus*속의 배양에 사용되는 MRS배지의 질소원을 저렴한 원료 즉, YE와 CSL를 1:1로 첨가한 배지로 대신하여 최대의 젖산수율($1.09 \text{ mole} \cdot \text{mole}^{-1}$)을 얻어 젖산발효에 효과적인 질소원의 대체가 이루어졌다.

REFERENCES

- Vickroy, T. B. (1985), Lactic Acid, in *Comprehensive Biotechnology Vol. 3*, H. W. Blanch, S. Drew, and D. I. C. Wang, Eds., pp761-776, Pergamon Press, New York.
- Kwon, S. H., P. C. Lee, E. G. Lee, Y. K. Chang, and N. Chang (2000), Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate, *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 209-215.
- Kim, Y. H., K. B. Lee, and S. H. Moon (1999), A study on industrial media for production of lactic acid in batch and continuous fermentations, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 181-187.
- Thomas, M. W. and K. M. Bhat (1988), Methods for measuring cellulase activities, *Method. Enzymol.* **160**, 87-112.
- Jøgen J. L., B. Pot, H. Christensen, G. Rusul, E. O. John, B. W. Wee, K. Muhamad, and M. G. Hasanah (1999), Identification of lactic acid bacteria from *Chili Bo*, a Malaysian Food Ingredient, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 599-605.
- Salminen, S. and A. von Wright (1993), Lactic Acid Bacteria, p13, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Cho, K. H., Y. K. Cho, S. S. Hong, and H. S. Lee (1995), Isolation of microorganism with high productivity and cultivation optimization for lactic acid production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 6-11.
- Antonio Gonzalez-vara, R., D. Pinelli, M. Rossi, D. Fajner, F. Magelli, and D. Matteuzzi (1996), Production of L(+) and D(-)-lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* subsp. *casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryiformis* subsp. *torquens* DSM 20004 in continuous fermentation, *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 548-552.
- Hofvendahl, K. and H. H. Barbel (2000), Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 87-107.
- Roukas, T. and P. Kotzckidon, (1998), Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch cultures, *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 199-204.
- Bruno-Barcena, J. M., A. L. Ragout, P. R. Cordoba, and F. Sineriz (1999), Continuous production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* in two-stage systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 316-324.
- Siebold, M., P. V. Frieling, R. Joppien, D. Rindfleisch, K. Schugerl, and H. Roper (1995), Comparison of the production of lactic acid by three different lactobacilli and its recovery by extraction and electro dialysis, *Proc. Biochem.* **30**, 81-95.
- Senthuran, A., V. Senthuran, H. K. Rajni, and B. Mattiasson (1999), Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization, *J. Biotechnol.* **73**, 61-70.
- Arasaratnam, V., A. Senthuran, and K. Balasubramaniam (1996), Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*, *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 482-486.
- Aeschlimann A., U. von Stockar (1990), The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 398-402.
- Olmos-Dichara, A., F. Ampe, J. L. Uribelarra, A. Pareilleux, and G. Goma (1997), Growth and lactic acid production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in batch and membrane bioreactor: influence of yeast extract and tryptone enrichment, *Biotechnol. Lett.* **19**, 709-714.
- Payot, T., Z. Chemaly, and M. Fick, (1999), Lactic acid production by *Bacillus coagulans*-kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 191-199.
- Barakat, R. K., M. W. Griffiths, and L. J. Harris, (2000), Isolation and characterization *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus* spp. From cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat, *J. Food Microbiol.* **62**, 83-94.
- Yin, P., Nishina, N., Y. Kosakai, K. Yahiro, Y. S. Park, and M. Okabe (1997), Enhanced Production of L-(+)-Lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor, *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 249-253.
- Kari, K. N., M. Hujanen, M. Leisola, and A. Palva (2000), Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic Acid, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3835-3841.