

페배추 추출물을 이용한 *Leuconostoc citreum* GR1 종균 배양용 최적 배지 및 배양 조건 개발

문신혜¹ · 장해춘² · 김인철^{1*}

¹목포대학교 식품공학과

²조선대학교 식품영양학과, 김치연구센터

Development of a Novel Medium with Chinese Cabbage Extract and Optimized Fermentation Conditions for the Cultivation of *Leuconostoc citreum* GR1

Shin-Hye Moon¹, Hae-Choon Chang², and In-Cheol Kim^{1*}

¹Dept. of Food Engineering, Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Kimchi Research Center, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

ABSTRACT In the kimchi manufacturing process, the starter is cultured on a large-scale and needs to be supplied at a low price to kimchi factories. However, current high costs associated with the culture of lactic acid bacteria for the starter, have led to rising kimchi prices. To solve this problem, the development of a new medium for culturing lactic acid bacteria was studied. The base materials of a this novel medium consisted of Chinese cabbage extract, a carbon source, a nitrogen source, and inorganic salts. The optimal composition of this medium was determined to be 30% Chinese cabbage extract, 2% maltose, 0.25% yeast extract, and 2× salt stock (2% sodium acetate trihydrate, 0.8% disodium hydrogen phosphate, 0.8% sodium citrate, 0.8% ammonium sulfate, 0.04% magnesium sulfate, 0.02% manganese sulfate). The newly developed medium was named MFL (medium for lactic acid bacteria). After culture for 24 hr at 30°C, the CFU/mL of *Leuconostoc (Leuc.) citreum* GR1 in MRS and MFL was 3.41×10^9 and 7.49×10^9 , respectively. The number of cells in the MFL medium was 2.2 times higher than their number in the MRS media. In a scale-up process using this optimized medium, the fermentation conditions for *Leuc. citreum* GR1 were tested in a 2 L working volume using a 5 L jar fermentor at 30°C. At an impeller speed of 50 rpm (without pH control), the viable cell count was 8.60×10^9 CFU/mL. From studies on pH-stat control fermentation, the optimal pH and regulating agent was determined to be 6.8 and NaOH, respectively. At an impeller speed of 50 rpm with pH control, the viable cell count was 11.42×10^9 (1.14×10^{10}) CFU/mL after cultivation for 20 hr – a value was 3.34 times higher than that obtained using the MRS media in biomass production. This MFL media is expected to have economic advantages for the cultivation of *Leuc. citreum* GR1 as a starter for kimchi production.

Key words: *Leuconostoc citreum*, optimization of medium, fermentation conditions, pH-stat control

서 론

김치는 매일 우리의 식탁에 올라가는 우리나라 고유의 식품으로 80년대 이전에는 각 가정에서 자가제조하여 소비되어 왔으나 군납용 김치를 생산하면서부터 공장에서 김치 제조가 시작되었고, 88 서울올림픽을 계기로 세계적으로 알려지면서 수요가 증가함에 따라 현대적 시설을 갖춘 제조업체에서 김치를 본격적으로 생산하게 되었다(1-3). 또한 국내에서는 여성의 사회 진출과 편리성 추구, fast food의 성장으로 공장에서 생산되는 포장용 김치의 수요가 증가되었다. 김치의 수요량은 연간 150만 톤 내외이고 그중 배추김치는 전체의 70%인 100만 톤 규모로 국내외적인 요인에 의해

김치의 산업적 대량 생산이 크게 요구되고 있다.

하지만 김치의 산업화에 있어서 김치의 표준화가 문제되고 있다(5). 김치는 개방형으로 제조되고 있고 많은 미생물이 작용하는 발효식품으로 그 조절이 어렵다. 이를 해결하기 위한 한 가지 방안으로 종균 배양에 의한 김치 생산을 들 수 있다. 우점종의 종균 접종 시 잡균을 제어하여 일정한 맛을 이끌어 낼 수 있고 발효 부산물들에 의해 그 맛 또한 향상시킬 수 있다. Lee와 Kim(6)은 종균을 첨가하여 제조한 김치와 첨가하지 않은 김치를 관능검사 비교한 결과, 조직감은 거의 차이가 없고 종균을 첨가한 김치에 대해 향, 맛, 종합 기호도가 더 좋게 나타났다고 보고하였으며, Kang 등(7)과 Jin 등(8)의 연구에서는 균주 첨가 김치는 비첨가 김치에 비해 맛이 더 우수하였고, 선정된 균주들은 김치의 맛을 좋게 한다고 하였다. 이처럼 종균 김치에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Received 18 March 2013; Accepted 20 June 2013

*Corresponding author.

E-mail: ickim@mokpo.ac.kr, Phone: 82-61-450-2426

종균으로는 대표적인 김치 유산균인 *Leuconostoc* 속이 이용되고 있다. *Leuconostoc* 속은 김치발효의 초기부터 중기에 가장 많이 나타나는 유산균으로 젖산, 초산, CO₂를 생성하는 hetero 젖산 발효균이다. 이는 CO₂에 의한 상쾌미와 유기산의 독특한 산미를 내고 텍스처를 생산하며 장내 소화물질의 이동을 도와서 장내 청소를 해준다(9). 이 중 *Leuc. citreum*은 김치가 맛있다고 느껴질 때까지의 발효를 주도하며, 다른 김치 유산균의 활동을 억제하는 항생물질을 생산하는 기능을 가지고 있어 발효 종균으로 사용하면 다른 김치 유산균의 발효활동을 제어할 수 있다(7,10,11).

유용 미생물의 산업화에 있어서 유용 균주의 탐색 및 분리뿐만 아니라 최적 배지조성의 개발이 중요하다. 각 균주마다 필요한 영양 요구성이나 생육 특성이 다양하기 때문에 종균의 특성에 따라 배지 최적화를 포함한 배양조건의 최적화 및 스케일 업에 관한 심도 있는 연구가 필요하다(12). 일반적으로 이용되고 있는 유산균 배지인 MRS 배지는 *Leuconostoc* 속에 대해 최적화되어 있지 않고 가격이 높아서 종균의 대량화를 위한 배지로 이용하기에는 많은 비용이 소모된다. 김치원료인 배추는 다듬는 과정에서 약 10% 이상의 배추 쓰레기가 다량 발생되어 처치가 곤란하다. 또한 Choi와 Park(13)이 김치공장의 배추 절입폐수로 효모균체 생산을 보았는데 절입폐수만 이용할 경우 균체량이 낮은 편이었고 배추 쓰레기 착즙액을 추가로 첨가할 경우 균체량이 크게 증가한다고 보고하였다. 배추는 가용성 고형물 함량이 3.4~6.6°Brix의 범위로 나타나고(14), 당 함량이 약 2.18%(5, 13)로 미생물 배지 성분으로 이용 가능성이 높다고 판단하여, 본 연구에서는 김치 종균을 대량 생산하기 위해 폐배추 추출물을 이용하여 새로운 배지를 개발하였고 최적의 배양 조건을 확립하였다.

재료 및 방법

배추 추출물 제조

김치 공장(Wang-in Food Co., Ltd., Jeonnam, Korea)으로부터 배추 폐기물을 수거하여 배추 전체의 1/4에 해당하는 흰색의 밀동 부분을 줄기로, 나머지 겉잎을 잎으로 구분하였다. 잎과 줄기를 분리하여 수돗물과 각각 1:1(v/v)로 혼합하여 한약추출기(NO-300, Ngentec, Incheon, Korea)로 121°C에서 15분 조건으로 추출한 다음, 여과포로 압착하여 얻은 액을 잎과 줄기 추출물로 사용하였다. 배추 추출물의 일반적인 성분은 Table 1과 같다.

균주 및 배지

본 연구에서 사용한 *Leuc. citreum* GR1 균주는 김치로부터 분리·동정된 유산균으로 조선대학교 김치연구센터에서 분양 받았고 MRS 배지(MRS, Criterion, Santa Maria, CA, USA)에서 3회 이상 계대배양을 걸쳐 glycerol stock법으로 -70°C에 균주를 보관하였다(15). 전배양 배지로는 MRS 배

Table 1. General components of chinese cabbage waste extracts

Composition	Concentration (g/L)
Maltose	0.83
Glucose	7.32
Fructose	10.54
Ascorbic acid	0.16
Soluble dietary fiber	2.42

Table 2. Basal compositions of CCM¹⁾ medium

Composition	Amount (L)
Cabbage extract	400 mL
Nitrogen source (yeast extract)	5 g
Carbon source (glucose)	40 g
Inorganic salt (1.0× salt stock)	
Sodium acetate trihydrate (CH ₃ COONa·3H ₂ O)	10 g
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	4 g
Sodium citrate (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O)	4 g
Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	4 g
Magnesium sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2 g
Manganese sulfate (MnSO ₄ ·4~5H ₂ O)	0.1 g

¹⁾CCM: Chinese cabbage medium.

지를 사용하였고, 본배양 배지로는 MRS 배지와 GABA 생성 유산균 배지로 개발된 CCM(Chinese cabbage media, Table 2) 배지(16)를 기본으로 폐배추 추출물, 탄소원, 질소원 그리고 무기염류의 조성을 달리하여 제조한 배지를 사용하였다. 제조한 배지는 121°C에서 15분간 멸균하였다. 폐배추 잎과 줄기 추출물의 농도는 0~40%로 사용되었고, 탄소원으로는 glucose, fructose, maltose, lactose, sucrose, galactose를 0~8%로, 질소원으로는 yeast extract, beef extract, peptone을 0~1%로, 무기염류는 1× salt stock을 기준으로 0~3×로 사용하였다. 1× salt stock은 sodium acetate trihydrate(CH₃COONa·3H₂O), disodium hydrogen phosphate(Na₂HPO₄·12H₂O), sodium citrate(C₆H₅Na₃O₇·2H₂O), ammonium sulfate((NH₄)₂SO₄), magnesium sulfate(MgSO₄·7H₂O), manganese sulfate(MnSO₄·4~5H₂O)로 구성되었다.

Leuc. citreum GR1의 배양 및 균체 생육 확인

Leuc. citreum GR1을 MRS 고체 평판 배지에 도말하여 이를 배양 후, MRS 액체 배지에 접종하여 30°C에서 20~24시간 전배양 시키고, 4°C에서 3,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하여 균체를 회수하고 멸균수로 세척한 다음, 균체 현탁액을 본배양 배지에 1%가 되도록 접종하여 30°C에서 24시간 동안 정치배양 시켰다(17). 배양시킨 후 멸균수 9 mL에 배양액 1 mL를 혼합하여 10배씩 연속적으로 희석시킨 다음, MRS 배지 plate에 0.1 mL씩 분주·도말(spread plate method)하여 48시간 동안 배양한 후 균체 생육을 확인하였다. 또한 최종 결정된 배지와 MRS 배지 비교 시에는

0~24시간 동안 분광광도계(microplate spectrophotometer, BioTek, Seoul, Korea)로 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하여 생육곡선도 확인하였다.

FE-SEM 사진을 통한 균체 크기 비교

Micro test tube에 배양액 500 μL를 넣고 원심분리(4°C, pulse) 하여 상등액을 제거하고 PBS buffer(pH 7.3)로 3회 세척 후, 2.5% glutaraldehyde(PBS, pH 7.4)로 4시간 전고정하고, 0.1 M-sodium cacodylate buffer(pH 7.4)로 3회 각 15분씩 세척하였다. 1% OsO₄(osmium tetroxide)로 2시간 후고정 후, 0.1 M-sodium cacodylate buffer(pH 7.4)로 3회 각 15분씩 수세하고, 50~100% 농도의 ethanol로 각 15분씩 탈수시켰다. 그리고 tert-butanol로 3회 각 20분씩 치환시켜 동결건조 하여 cell을 고정하였다. 이후 금속코팅(E-1010, Hitachi, Chiyoda, Japan)한 다음 전계방출형주사전자현미경(S-4800, Hitachi)으로 사진을 찍어 균체 크기를 확인하였다.

5 L 발효조 배양 및 배양 시간, 배양 조건 확인

최적화시킨 배지를 5 L jar 발효조(Kobiotech, Incheon, Korea)에 2 L의 working volume으로 제조하고, 전배양 시킨 *Leuc. citreum* GR1을 1%로 접종하였다. 최적의 배양 시간을 확립하기 위해 배양하는 24시간 동안 4시간 간격으로 균을 채취하였으며 생균수를 확인하였다. 교반 속도의 영향을 규명하기 위해 impeller의 교반속도를 0, 50, 100, 150 rpm으로 각각 배양하여 비교하였고 최적의 교반속도를 선정하였다. 또한 pH-stat의 조절 pH를 결정하기 위하여 *Leuc. citreum* GR1을 24시간 동안 배양하여 pH 변화 pattern을 확인하였고 이를 바탕으로 배양 초기, 중기, 말기 pH인 6.8, 6.0 그리고 5.5에 대하여 각각 실험하였다. pH 조절제로는 1/2로 희석한 암모니아수(25~28%, Daejung Chemicals Co., Siheung, Korea)와 3 M 수산화나트륨(97%, Daejung Chemicals Co.,)을 제조하여 사용하였다.

통계 처리

통계 처리 방법은 IBM SPSS statistics(v.20, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 모든 자료에 대해 평균과 표준편차를 산출하였으며, 평균치 차이를 검증하기 위하여 일원배치분산분석(One-way ANOVA)을 적용하였다. 또한 평균치에서 유의한 차이가 나타난 변인에 대해서 사후검증(Post hoc, Duncan's multiple range test)을 실시하였다. 본 연구에 대한 실험 결과의 유의차 평가는 P<0.05로 하였다.

결과 및 고찰

배추 추출물에 따른 종류 및 농도 결정

최적배지조성을 결정하기 위한 배추 추출물을 선택하기 위하여 배추 잎과 줄기 추출물을 각각 0, 10, 20, 30, 40%로

Table 3. Viable cell count of *Leuc. citreum* GR1 on CCM medium in different concentrations of chinese cabbage extracts

Chinese cabbage extract	Concentration (%)	Cell growth (×10 ⁹ CFU/mL)
Leaf	0	1.6±0.20 ^{a1,2)}
	10	4.0±0.18 ^c
	20	4.3±0.40 ^{cd}
	30	4.4±0.42 ^d
	40	4.2±0.37 ^{cd}
Stem	0	1.7±0.17 ^a
	10	3.4±0.21 ^b
	20	3.4±0.01 ^b
	30	3.5±0.20 ^b
	40	3.5±0.09 ^b

¹⁾Value were means±SD.

²⁾The different letters in a column of cell growth are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

기본적인 CCM 배지를 변형하여 제조한 다음 *Leuc. citreum* GR1을 배양시켰다. 24시간 후 생균수를 비교해본 결과 Table 3과 같았다. 잎 추출물은 1.6×10⁹~4.4×10⁹ CFU/mL, 줄기 추출물은 1.7×10⁹~3.5×10⁹ CFU/mL의 생육을 나타내었고, 이는 잎 추출물이 줄기 추출물보다 1.15~1.27배 더 높은 생균수 값을 보였다. 특히 잎 추출물을 30% 넣은 CCM 배지에서 4.4×10⁹ CFU/mL로 가장 높았다. Liu(16)의 연구에서 잎 추출물이 Ca, K, Mg, Na, Fe, Cl, NO₂, Fe, Br, PO₄ 등을 비롯한 대부분의 미네랄 요소가 줄기 추출물보다 높은 함량을 보여주었고 유산균의 성장에 미네랄 성분이 요구된다고 하여 본 연구결과와 일치하였다.

탄소원에 의한 *Leuc. citreum* GR1의 영향

균체의 생육에 최적화된 배지를 결정하기 위하여 탄소원의 종류와 농도에 따른 영향을 조사하였다. 기본배지에서 배추 추출물은 최적의 조건인 잎 30%를 선택하였고, 탄소원의 최적화를 위해 6개의 당 glucose, fructose, maltose, lactose, sucrose, galactose를 0~8% 농도로 배지를 제조하여 *Leuc. citreum* GR1의 생육을 비교하였다. 비교 결과 maltose가 모든 농도에서 가장 높은 생육을 보였다(Fig. 1). 반면 탄소원이 첨가되지 않은 대조구 배지에서 탄소원 첨가 배지의 0.04~0.07배로 낮은 생육을 보여 탄소원의 영향이 크다는 것을 확인하였다. Jang(18)의 연구에서 배지 성분들이 *Leuc. citreum*의 성장에 미치는 영향을 보았는데 당성분이 가장 높게 나타났고 균주 성장에는 주로 탄소원이 큰 영향을 미친다고 하였다. Glucose, fructose, maltose, sucrose를 탄소원으로 이용했을 때는 탄소원을 첨가하지 않은 경우보다 높은 생육을 보였지만 lactose와 galactose는 성장이 거의 이루어지지 않았고, galactose에 대해 오히려 생육이 억제되는 결과를 보였다. Lee(19)의 연구에서도 김치로부터 분리, 동정한 5종의 유산균 균주에 대해 API test 결과 glucose, fructose, maltose는 모두 이용할 수 있는

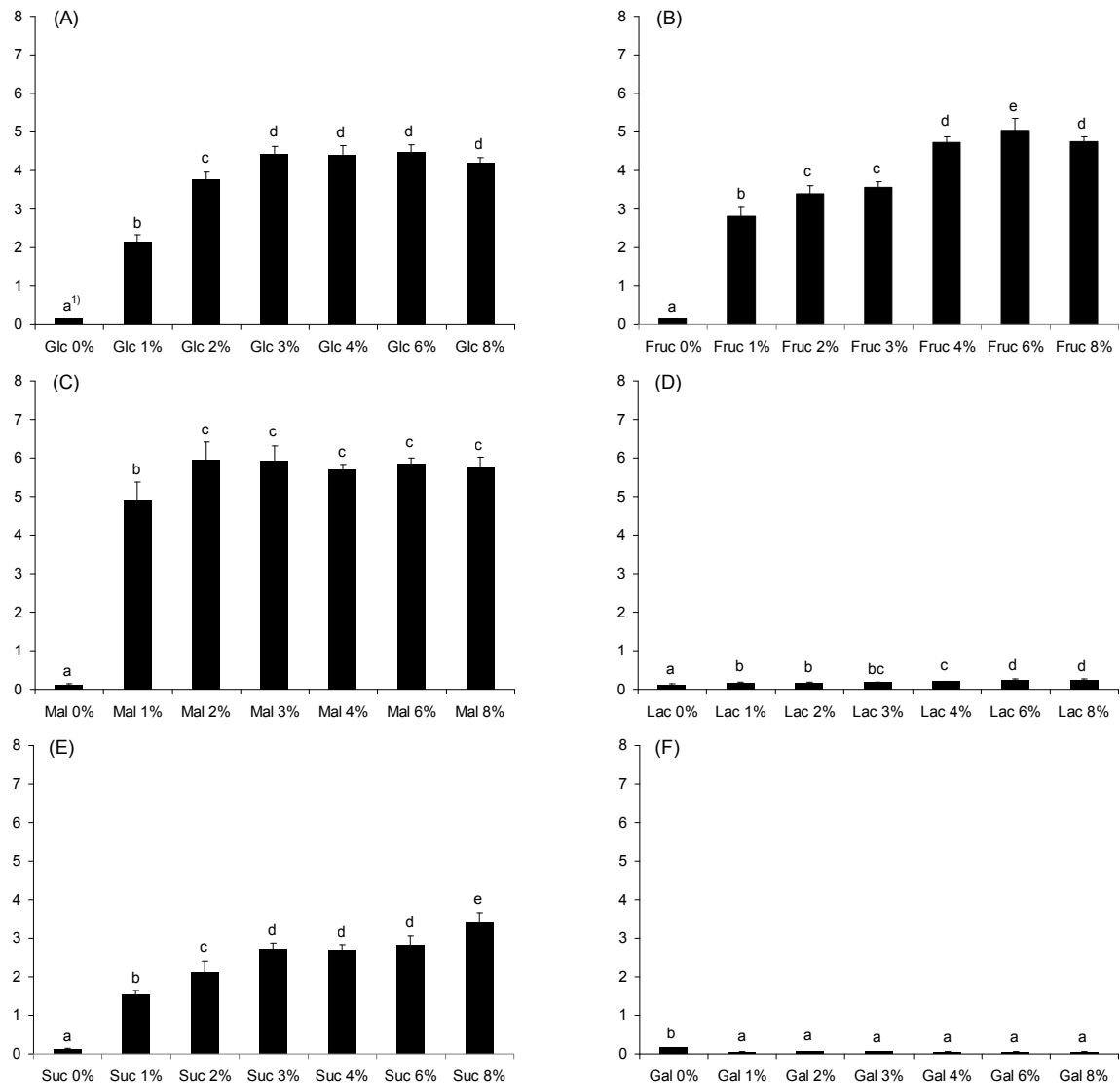


Fig. 1. Carbon source effect for *Leuc. citreum* GR1 growth on CCM medium. (A) glucose, (B) fructose, (C) maltose, (D) lactose, (E) sucrose, (F) galactose. ¹⁾The different letters in each graph are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

반면 lactose를 모두 이용하지 못하는 것으로 나타났다. Glucose는 6%일 때 4.5×10^9 CFU/mL로, fructose는 6%일 때 5.0×10^9 CFU/mL로, maltose는 2%일 때 6.0×10^9 CFU/mL로, sucrose는 8%일 때 3.4×10^9 CFU/mL로 가장 높은 생균수를 나타내었다. 본 연구 결과 김치 종균인 *Leuc. citreum* GR1의 균체 생산용 탄소원으로는 maltose 2%가 가장 적합하였다. 전통발효식품에서 분리한 유산균인 *Lactobacillus plantarum* TJ-LP-002는 탄소원 첨가 물질로 maltose, glucose, cellobiose, lactose 순으로 균체 생육을 나타내어(20) maltose의 이용성이 가장 큰 것은 같았지만, *Leuc. citreum* GR1과 달리 lactose에 대해 활성이 있는 것으로 나타났다. 미생물은 이용하는 탄소원의 범위가 다양하며, 균의 종류에 따라 이용할 수 있는 활성이 다르다고 보고되어 있다(21).

질소원에 의한 *Leuc. citreum* GR1의 영향

질소원의 최적화 조건을 찾기 위해 기본배지에서 배추 추출물은 최적화된 잎 30%로, 탄소원은 maltose 2%로 고정하고 질소원으로 yeast extract, beef extract, peptone을 0~1%의 농도로 배지를 제조하여 *Leuc. citreum* GR1의 생육을 비교하였다(Fig. 2). 실험 결과 yeast extract, peptone, beef extract 순으로 높게 나타났다. 질소원을 첨가하지 않을 경우 비교적 낮은 생육을 나타냈지만 그 영향은 탄소원보다 크지 않았다. Beef extract를 질소원으로 사용한 경우 가장 큰 생균수를 보인 0.75%는 질소원을 첨가하지 않은 배지에 대해 1.4배의 높은 결과를 보였다. Peptone의 경우 질소원을 첨가하지 않은 배지에 대해 1.7~2.1배 높은 생육이 있었지만 yeast extract가 더 큰 생육을 보였다. Yeast extract는 peptone에 비해 농도에 따른 생균수가

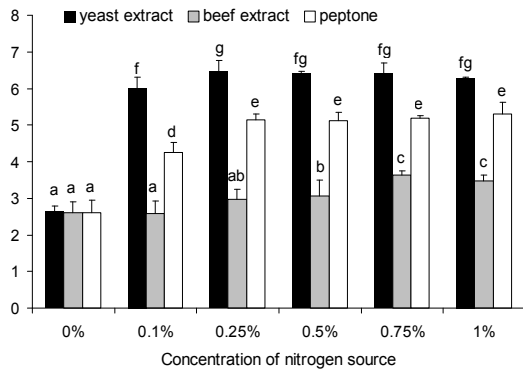


Fig. 2. Nitrogen source effect for *Leuc. citreum* GR1 growth on CCM medium. The different letters in each graph are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

beef extract보다 1.74~2.4배, peptone보다 1.19~1.47배 더 높은 생육을 보였다. Yeast extract의 농도가 0.25%일 때 생균수가 6.5×10^9 CFU/mL로 가장 높았다. 최대 균체 생산과 비용절감 문제를 고려했을 시 yeast extract 0.25%가 가장 적합하다고 판단하였다. Kim 등(20)은 유산균의 생육과 질소원에 의한 영향 관계에 대해 yeast extract가 가장 효과적이라고 보고하였는데, 본 연구에서도 동일한 효과를 확인할 수 있었다. 또한 Lee(22)는 *Leuc. mesenteroides*의 생산을 위한 최적 질소원으로 peptone, yeast extract, whey를 조사하였는데 본 결과와 같이 yeast extract에서 가장 높은 생육을 나타내었다. 그러나 농도가 증가할수록 생균수가 증가한다는 보고와 다르게 본 연구에서는 0.25%에서 최적의 결과를 얻어, 균중에 따라 유사하지만 다른 영양요구성을 보이는 것으로 판단된다. Kim(21)은 질소원이 단백질 합성의 기초 물질이 되는 각종 아미노산의 생합성에 필요하고 미생물의 생육에 영향을 주며, 무기질소원인 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{HPO}_3$ 등의 암모늄염은 곰팡이, 효모, 대장균 등이 잘 이용하고 유기질소원인 peptone, yeast extract, meat extract, malt extract 등은 모든 미생물이 잘 이용한다고 하였다.

무기염류에 의한 *Leuc. citreum* GR1의 영향

잎 추출물 30%, maltose 2%, yeast extract 0.25%의 기본 조건에서 균체의 최대 생산에 적합한 혼합무기염류의 농도를 확인하였다. 혼합무기염류는 sodium acetate tri-

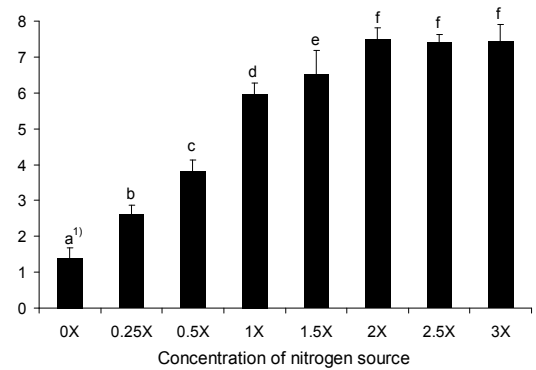


Fig. 3. Effect of salt concentration for *Leuc. citreum* GR1 on CCM medium. ¹⁾The different letters in each graph are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

hydrate, disodium hydrogen phosphate, sodium citrate, ammonium sulfate, magnesium sulfate, manganese sulfate로 이루어져 있으며 1.0× salt stock을 기준으로 농도를 변화시켜 예비실험을 통해 0~3.0× 농도로 8개 구간 (Table 4)을 정하여 생균수를 비교하였다(Fig. 3). 생균수는 0×, 0.25×, 0.5×, 1.0×, 1.5× salt stock에서 1.40×10^9 CFU/mL, 2.60×10^9 CFU/mL, 3.80×10^9 CFU/mL, 5.97×10^9 CFU/mL, 그리고 6.51×10^9 CFU/mL로 가장 높은 생균수를 나타내는 2× salt stock의 7.49×10^9 CFU/mL보다 1.26~5.35배 낮은 생육을 보였고, 2.5×, 3× salt stock의 생균수는 7.39×10^9 CFU/mL, 7.43×10^9 CFU/mL로 유사한 값을 나타내었다. 배지 단가를 고려하였을 시 2× salt stock을 선정하는 것이 가장 적합한 것으로 사료된다. Kim 등(20)은 전통발효식품에서 분리한 유산균인 *Lactobacillus plantarum* TJ-LP-002의 경우 가장 큰 영향을 주는 무기염류는 manganese sulfate, ammonium citrate이었고, 단독 첨가 시보다 혼합 첨가 시에 좋은 영향을 나타낸다고 보고하였다.

최적화 배지에서의 균체 생육 및 형태

최적화된 배지의 조성은 배추 추출액 잎 30%, maltose 2%, yeast extract 0.25%, 2.0× salt stock이고 이 배지를 MFL(medium for lactic acid bacteria)로 명명하였다. MFL 배지와 일반적 유산균 배지인 MRS 배지에 각각 *Leuc. citreum* GR1을 24시간 동안 배양하여 흡광도(OD₆₀₀)와 생

Table 4. Composition and amount of salt used in medium development (g/L)

N fold of salt stock solution (×)	0	0.25	0.5	1.0 ¹⁾	1.5	2.0	2.5	3.0
Sodium acetate trihydrate	0	2.5	5	10	15	20	25	30
Disodium hydrogen phosphate	0	1	2	4	6	8	10	12
Sodium citrate	0	1	2	4	6	8	10	12
Ammonium sulfate	0	1	2	4	6	8	10	12
Magnesium sulfate	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
Manganese sulfate	0	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3

¹⁾Composition of basal stock solution.

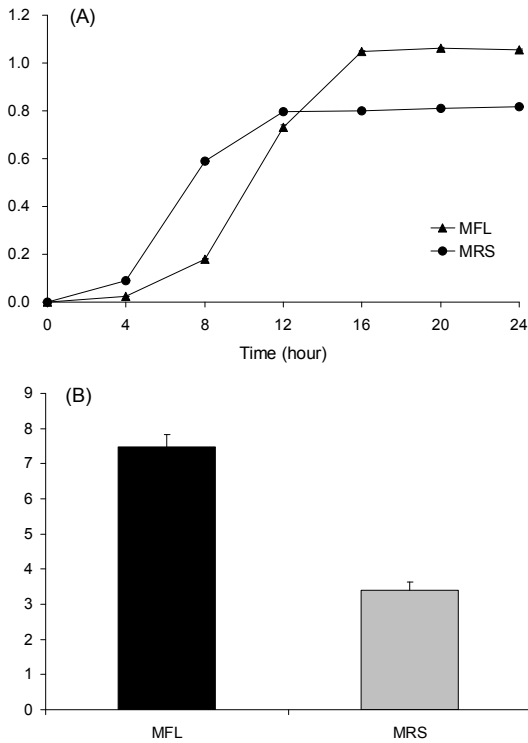


Fig. 4. Comparison of cell growth curves and viable cell counts between MFL and MRS medium for *Leuc. citreum* GR1. (A) was growth curve of *Leuc. citreum* GR1 in MRS and MFL medium for 24 hours. (B) was viable cell counts of *Leuc. citreum* GR1 in MRS and MFL medium after 24 hours.

균수를 측정하여 생육 특성을 비교하였다. 생육곡선을 보면 (Fig. 4) MRS 배지에서 배양할 경우 2~12시간까지는 MFL

배지보다 흡광도 값이 더 높게 나타났다. 4~6시간대에 가장 큰 성장을 보였고 성장 기울기가 점점 완만해졌다. 12시간에 정상기에 도달하여 24시간의 흡광도와 유사한 값을 나타내었다. 반면에 MFL 배지에서 배양할 경우 점점 성장 기울기가 커져 10~12시간대에 가장 큰 성장을 보였고 12시간 이후에도 지속적으로 성장하여 MRS 배지에 비해 정상기 도달시간이 늦게 나타나는 것으로 판단된다. 24시간 배양시 MRS 배지에 배양했을 때보다 1.3배 더 높은 흡광도 결과를 보였다. 그리고 2~12시간 사이에 MRS 배지에서 더 높은 흡광도 값을 나타낸 것은 균수의 차이라 하기보다 흡광도가 상대적 균수로 생균수를 직접적으로 나타내지 않으므로 Fig. 5와 같이 균의 크기 차이로 인해 나타나는 결과로 사료된다. 생균수를 비교해보면(Fig. 4) MFL 배지에서 7.49×10^9 CFU/mL로 MRS 배지에서의 3.41×10^9 CFU/mL보다 2.2배 더 높은 결과를 확인하였다. Kim 등(9)이 연구한 *Leuc. citreum*의 최적배지는 glucose 2%, yeast extract 1.25%, K₂HPO₄ 4.26%, sodium acetate 0.6%, ammonium citrate 0.41%로 MRS 배지에 비해 169%의 생산성을 보였는데, 본 연구에서는 MRS 배지보다 220%의 생산성을 보여 이보다 높게 나타났다. 또한 Lee(22)에서는 *Leuc. mesenteroide*의 배지를 최적화하였는데 배지 조성은 yeast extract 2.5%, sucrose 1.0%, MnSO₄ 0.001%로 하였으며, 최적화 배지의 균주 생산성은 MRS 배지의 48%로 낮은 생산성을 나타내었다. 전계방출형주사전자현미경을 이용하여 FE-SEM 사진(Fig. 5)을 찍어 각 배지에서 배양된 균체를 관찰한 결과 난형의 구균모양으로 균체 형태는 같으나 MFL 배지에서 배양한 평균 균체 크기가 가로 0.67 μm, 세로 0.48

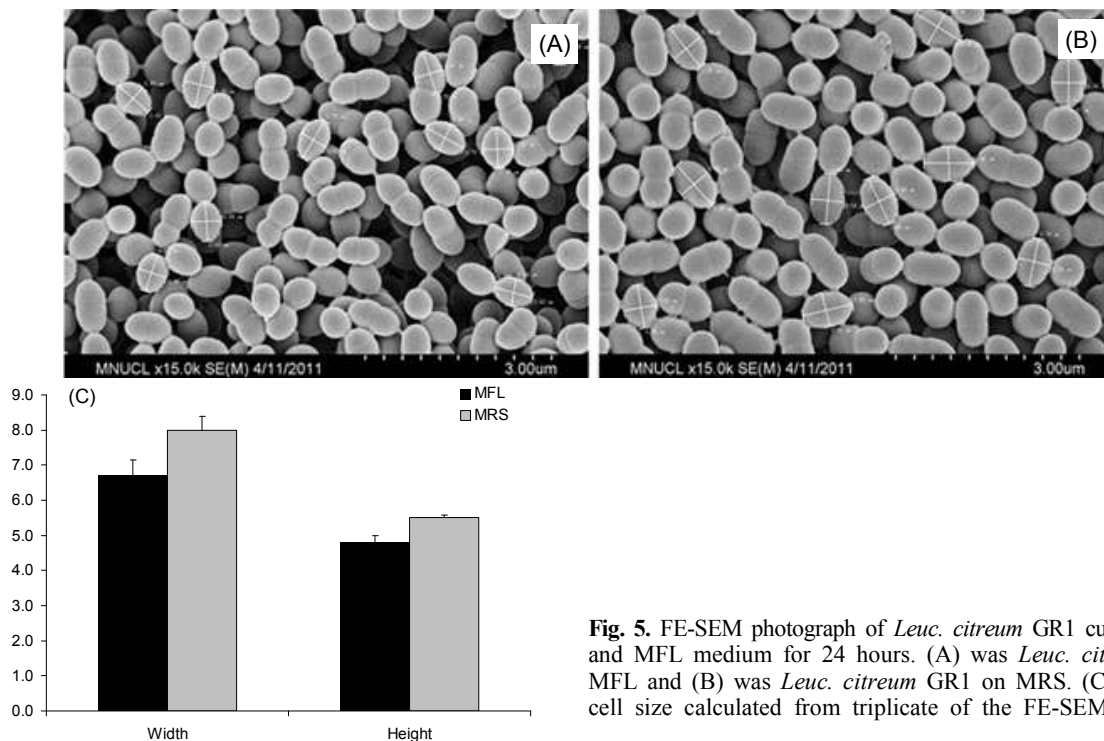


Fig. 5. FE-SEM photograph of *Leuc. citreum* GR1 cultured in MRS and MFL medium for 24 hours. (A) was *Leuc. citreum* GR1 on MFL and (B) was *Leuc. citreum* GR1 on MRS. (C) was average cell size calculated from triplicate of the FE-SEM.

Table 5. Effect of impeller agitation speed for *Leuc. citreum* GR1 fermentation in 5 L-jar fermentor

Culture time (hr)	Cell growth ($\times 10^9$ CFU/mL)			
	0 rpm	50 rpm	100 rpm	150 rpm
0	0.06 \pm 0.00 ^{b1,2)}	0.05 \pm 0.00 ^{ab}	0.05 \pm 0.00 ^{ab}	0.05 \pm 0.00 ^a
4	0.49 \pm 0.02 ^a	0.51 \pm 0.01 ^a	0.49 \pm 0.01 ^a	0.51 \pm 0.02 ^a
8	2.76 \pm 0.17 ^a	3.08 \pm 0.17 ^a	3.52 \pm 0.16 ^b	3.56 \pm 0.23 ^b
12	6.46 \pm 0.42 ^a	7.66 \pm 0.32 ^c	7.12 \pm 0.36 ^b	6.68 \pm 0.15 ^a
16	8.06 \pm 0.20 ^a	8.60 \pm 0.34 ^a	8.56 \pm 0.33 ^a	8.49 \pm 0.38 ^a
20	7.73 \pm 0.25 ^a	8.15 \pm 0.36 ^{ab}	8.01 \pm 0.49 ^{ab}	8.27 \pm 0.42 ^b
24	7.25 \pm 0.15 ^a	7.60 \pm 0.46 ^a	7.67 \pm 0.46 ^a	7.73 \pm 0.40 ^a

¹⁾Value were means \pm SD.

²⁾The different letters in each row of cell growth are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

μ m로 MRS 배지에서 배양한 균체 크기의 가로 0.80 μ m, 세로 0.55 μ m보다 각각 1.19배, 1.15배 더 작았다. 이러한 결과는 두 배지 간의 생육에 따른 흡광도 차이는 크지 않으나 생균수에서 크게 차이가 나는 요인으로 해석할 수 있다.

5 L 발효조 배양 최적화

Scale-up을 위해 5 L 발효조에 최적화된 MFL 배지를 만들어 *Leuc. citreum* GR1을 24시간 동안 배양하면서 교반속도와 pH의 영향에 대해 조사하였다. 발효조의 교반속도를 0, 50, 100, 150 rpm으로 설정하고, 4시간마다 균을 채취하여 생균수를 통한 생육을 비교한 결과 Table 5와 같다. 처음 4시간까지는 전체적으로 비슷하게 증가하다가 그 이후부터 교반을 하지 않았을 경우 가장 떨어지는 성장을 보였다. 16시간대에 생균수는 교반하지 않을 때 8.06×10^9 CFU/mL, 교반속도 50 rpm일 때 8.60×10^9 CFU/mL, 교반속도 100 rpm일 때 8.56×10^9 CFU/mL, 그리고 교반속도 150 rpm일 때 8.49×10^9 CFU/mL로 유의적 차이는 나타나지 않았지만 50 rpm일 때 평균값이 좀 더 높게 나타났다. *Leuc. citreum* GR1은 통성 혐기성균으로 정치배양이 일반적이지만, 공기 유입을 차단한 상태에서의 교반은 균체와 영양소의 분산에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 발효조의 교반속도를 50 rpm으로 설정하고, pH의 영향을 보기 위해 발효조 내의 pH를 6.8, 6.0, 그리고 5.5로 설정하여 조절하

면서 4시간마다 균을 채취하여 생균수를 비교하였다(Table 6). *Leuconostoc* 속은 hetero fermentation을 하며, 균주가 성장하는 동안 탄소원으로부터 전환된 유산, 초산, 개미산 등에 의해 배양액의 pH가 저하되고 저하된 pH가 대사를 억제하기 때문에 일정 pH 이상을 유지시키는 것이 필요하다. Gunsalus 등(23)은 homo type 유산균의 대사산물 생산 발효에 있어서 pH 6.5 이상을 유지하는 것이 중요하다고 보고하였고, Adamberg 등(24)은 pH 저하가 균체 비성장속도(specific growth rate) 및 비유산생성속도(specific lactate production rate) 모두를 저하시킨다고 보고하고 있다. *Leuc. citreum* GR1은 hetero type 유산균으로 배양하는 동안 산이 생성되어 pH가 저하되고, 이로 인해 균체 성장에 영향을 미칠 수 있으므로 pH-stat 조절 방식으로 배지 내의 pH를 일정하게 유지하며 균체 생육을 관찰하였다. pH 조절제로는 암모니아수와 수산화나트륨 수용액을 이용하였다. 암모니아수나 수산화나트륨 모두 최적 발효시간은 20시간이었으며, 암모니아수의 경우는 pH 6.0일 때 10.88×10^9 (1.09×10^{10}) CFU/mL, 수산화나트륨의 경우는 pH 6.8일 때 11.42×10^9 (1.14×10^{10}) CFU/mL로 생균수가 가장 높았으며, 이는 MRS 배지 균체 생산 수율의 3.34배에 달하는 높은 값이다. Otgonbayar 등(25)의 연구에서 *Leuc. citreum*과 *Leuc. mesenteroides*의 pH에 따른 fructose 생산과 biomass(g/L)를 확인한 결과 pH 6.5가 가장 높았고, pH 5.5, pH 4.5의 순으로 생산성이 낮아진다고 보고하였다. 따라서 유산균 발효 시에는 배지 pH를 6.0 이상으로 유지시키는 것이 바람직하다고 판단되며, 본 연구에서는 수산화나트륨으로 pH 6.8로 유지하는 것이 가장 높은 균체 수율을 얻을 수 있었다.

요 약

종균용 김치를 제조를 하기 위해서는 김치 공장에서 저가로 종균이 대량배양 되어야 한다. 그러나 현재의 유산균배지는 종균 생산용으로 사용하기에는 비용이 많이 든다. 이를 해결하기 위해서는 새로운 배지를 개발해야 하는데 새로운 배지를 개발하기 위한 기본적인 요소에는 배추 추출액, 탄소원,

Table 6. Effect of pH control agent in pH-stat controlled 5 L-jar fermentation of *Leuc. citreum* GR1

Culture time (hr)	Cell growth ($\times 10^9$ CFU/mL)					
	pH 6.8		pH 6.0		pH 5.5	
	Ammonia water	Sodium hydroxide	Ammonia water	Sodium hydroxide	Ammonia water	Sodium hydroxide
0	0.05 \pm 0.00 ^{a1,2)}	0.05 \pm 0.00 ^{bc}	0.05 \pm 0.00 ^{ab}	0.05 \pm 0.00 ^{bc}	0.07 \pm 0.00 ^d	0.06 \pm 0.00 ^c
4	0.47 \pm 0.11 ^b	0.33 \pm 0.04 ^a	0.45 \pm 0.11 ^b	0.40 \pm 0.04 ^{ab}	0.63 \pm 0.04 ^c	0.50 \pm 0.03 ^b
8	2.82 \pm 0.43 ^b	2.13 \pm 0.22 ^a	2.88 \pm 0.51 ^{bc}	2.91 \pm 0.20 ^{bc}	4.03 \pm 0.43 ^d	3.31 \pm 0.38 ^c
12	7.86 \pm 0.37 ^b	9.29 \pm 1.13 ^c	9.30 \pm 0.86 ^c	9.48 \pm 0.69 ^c	6.90 \pm 0.06 ^a	8.63 \pm 0.58 ^{bc}
16	9.11 \pm 0.49 ^a	11.12 \pm 0.64 ^c	10.67 \pm 0.35 ^{bcd}	10.91 \pm 0.65 ^{cd}	10.13 \pm 0.35 ^b	10.30 \pm 0.44 ^{bc}
20	9.16 \pm 0.40 ^a	11.42 \pm 0.49 ^c	10.88 \pm 0.49 ^{bc}	11.14 \pm 0.86 ^{bc}	10.47 \pm 0.64 ^b	10.83 \pm 0.42 ^{bc}
24	8.73 \pm 0.57 ^a	10.74 \pm 0.73 ^c	10.70 \pm 0.41 ^c	10.40 \pm 0.52 ^{bc}	9.83 \pm 0.12 ^b	10.00 \pm 0.27 ^{bc}

¹⁾Value were means \pm SD.

²⁾The different letters in each row of cell growth are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

질소원, 무기염류가 있다. 선정된 최적배지 조성은 배추 추출액 30%, maltose 2%, yeast extract 0.25%, 2× salt stock(2% sodium acetate trihydrate, 0.8% disodium hydrogen phosphate, 0.8% sodium citrate, 0.8% ammonium sulfate, 0.04% magnesium sulfate, 0.02% manganese sulfate)으로 나타났다. 그리고 새롭게 개발된 배지의 이름은 MFL로 명명하였다. *Leuconostoc(Leuc.) citreum* GR1을 30°C에서 24시간 배양하면 MRS 배지에서는 3.41×10^9 CFU/mL, MFL 배지에서는 7.49×10^9 CFU/mL의 생균수로 MFL 배지에서 배양하면 MRS 배지에서 배양했을 때보다 2.2배 더 높은 성장을 보였다. 또한 최적화 배지의 scale-up을 위해 5 L 발효조를 이용하여 2 L의 working volume으로 *Leuc. citreum* GR1을 배양하였다. 교반속도는 50 rpm에서 생균수 8.60×10^9 CFU/mL를 얻었다. 발효조의 pH 조절은 pH-stat mode로 하였으며, 균체 성장의 최적 pH는 수산화나트륨 수용액을 이용한 pH 6.8이었고, 이 조건으로 20시간 배양 후 11.42×10^9 (1.14×10^{10}) CFU/mL의 균체를 얻을 수 있었다. 이는 MRS 배지로 사용하여 얻은 생균수의 3.34배에 해당하는 높은 값으로, 본 연구에서 개발된 MFL 배지는 김치 종균용 *Leuc. citreum* GR1 배양을 위한 배지로 배지 단가 절감, 높은 균체 수율 등 충분한 경제적 장점을 기대할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 연구개발사업 310014-03-1-CG000에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Kim SH, Yang JY, Kang SA, Chun HK, Park KY. 2007. Current state and improvement for Korean kimchi industry. *Food Industry and Nutrition* 12(2): 7-13.
- Choi SY, Lee MK, Choi KS, Koo YJ, Park WS. 1998. Changes of fermentation characteristics and sensory evaluation of Kimchi on different storage temperature. *Korean J Food Sci Technol* 30: 644-649.
- Liu W, Ko KH, Kim HR, Kim IC. 2012. The effect of insoluble dietary fiber extracted from chinese cabbage waste on plasma lipid profiles in rats fed a high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 33-40.
- Kim HC. 2010. A study on the export competitiveness analysis for Korean kimchi in Japan market. *Journal of Commodity Science and Technology* 28: 39-49.
- Yu HG, Kim KH, Yoon S. 1992. Effects of fermentable sugar on storage stability and modeling prediction of shelf-life in kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 24: 107-110.
- Lee SH, Kim SD. 1988. Effect of starter on the fermentation of kimchi. *J Korean Soc Food Nutr* 17: 342-347.
- Kang SM, Yang WS, Kim YC, Joung EY, Han YG. 1995. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for kimchi fermentation and effect of starter. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 461-471.
- Jin HS, Kim JB, Yun YJ, Lee KJ. 2008. Selection of Kimchi starters based on the microbial composition of kimchi and their Effects. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 671-675.
- Kim H, Eom HJ, Lee JS, Han JS, Han NS. 2004. Statistical optimization of media composition for growth of *Leuconostoc citreum*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 9: 278-284.
- Choi IK, Jung SH, Kim BJ, Park SY, Kim J, Han HU. 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 247-253.
- Choi HJ, Shin YJ, Yu JH, Yoon SS. 1996. A new selective medium for the isolation and detection of *Leuconostocs* in foodstuffs. *Korean J Food Sci Technol* 28: 279-284.
- Yoon S, Kwak HK, Kim YK, Kim HK, Park MS, Yeom KJ, Oh HS, Lee MJ, Lee JH, Ji KE. 2006. *Functional food*. Lifescience Publisher, Seoul, Korea. p 268-273.
- Choi MH, Park YH. 1998. Production of yeast biomass from waste brine of kimchi factory. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 41: 331-336.
- Shim ST, Kim KJ, Kyung KH. 1990. Effect of soluble solids contents of chinese cabbage on kimchi fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 22: 278-284.
- Lee KH, Pank KY, Kim SM, Kim WS, Paik HD. 2002. Development of a culture medium for growth and sporulation of *Bacillus polyfermenticus* SCD. *Korean J Food Sci Technol* 34: 263-268.
- Liu WL. 2012. Production of γ -aminobutyric acid by immobilized *Lactobacillus brevis* F109-MD3 using Chinese cabbage waste. *PhD Dissertation*. Mokpo National University, Jeonnam, Korea.
- Kim DC, Choi JW, In MJ. 2011. Utilization of *Leuconostoc mesenteroides* 310-12 strain in the fermentation of a traditional Korean rice-based beverage. *J Appl Biol Chem* 54: 21-25.
- Jang WK. 2010. A study on the strain identification and culture optimization for onion fermentation. *MS Thesis*. Konkuk University, Seoul, Korea.
- Lee WK. 2010. Development of lactic acid bacteria for functional soy yogurt. *MS Thesis*. Mokpo National University, Jeonnam, Korea.
- Kim YJ, Jang SJ, Park JM, Kim CU, Park YS. 2010. Culture conditions of garlic resistant lactic acid bacteria for feed additives. *Food Engineering Progress* 14: 65-74.
- Kim CH. 2004. *Food microbiology*. Yu Han Publisher, Seoul, Korea. p 60-61.
- Lee JA. 2007. Studies on the *Leuconostoc mesenteroides* for the development of kimchi starter. *MS Thesis*. Hankyong National University, Anseong, Korea.
- Gunsalus IC, Niven CF. 1942. The effect of pH on the lactic acid fermentation. *J Biol Chem* 145: 131-136.
- Adamberg K, Kask S, Laht TM, Paalme T. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Int J Food Microbiol* 85: 171-183.
- Otgonbayar, Erdene G, Eom HJ, Kim BS, Ko JH, Han NS. 2011. Mannitol production by *Leuconostoc citreum* KACC 91348P isolated from Kimchi. *J Microbiol Biotechnol* 21: 968-971.