

## 비살균 무첨가 배추즙에서 *Leuconostoc mesenteroides* WiKim32의 배양 특성

한 응 수<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>세계김치연구소 연구개발본부

### Culture characteristics of *Leuconostoc mesenteroides* WiKim32 in kimchi cabbage juice without supplements and sterilization

Eung Soo Han<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Research and Development Division, World Institute of Kimchi

**Abstract** This study was performed to develop an economical culture method of lactic acid bacteria (LAB) for kimchi fermentation. *Leuconostoc mesenteroides* WiKim32 was grown to  $1 \times 10^9$  CFU/mL and maintained at 8.88 log CFU/mL for four days by culturing in kimchi cabbage juice (KCJ) without supplements and sterilization. *Leuconostoc mesenteroides* WiKim32 was cultured in 100 mL of KCJ by inoculating with 0.1% starter culture and adding 100 mL of KCJ everyday by adjusting pH to 5.5 using 1 M NaOH at 20°C for four days. KCJ was prepared by extraction of kimchi cabbage leaves after washing them with citric acid and ethanol. Adjusting pH over 6.0 was favorable for the growth of LAB in the initial stage, but LAB growth was retarded in the later stage. In contrast, adjusting pH below 5.0 was not beneficial for the growth of LAB; therefore, pH was adjusted to 5.5.

**Keywords:** lactic acid bacteria, kimchi cabbage juice, fed-batch culture, non-sterilized, non-supplemented

## 서 론

상품김치의 소비가 증가하면서 종균김치를 생산하는 공장이 늘고 있다. 대부분은 동결건조 유산균을 양념에 혼합하여 김치의 품질을 균일하게 하기 위한 목적으로 사용하고 있으나(Lee 등, 2015), 종균 비용이 많이 소요되고 종균의 활력이 저하되는 문제가 있다. 이러한 문제의 해결방안으로 김치공장에서의 유산균을 직접 배양하여 절임배추에 접종하는 방법이 제시되었다(Han과 Park, 2018). 김치공장의 부산물로 버려지는 배추 걸잎을 이용하여 유산균을 배양하면 종균의 생산비용을 절감할 수 있고, 폐기물 처리비용도 줄일 수 있다(Moon 등, 2013; Jeong 등, 2017). 배추즙은 포도당을 비롯한 영양물질이 고르게 들어 있어 유산균 배양 배지의 조건을 갖추고 있으나, 영양소를 추가로 보충하거나 배춧잎에 오염된 미생물을 살균하는데 상당한 비용이 수반된다.

현재까지는 MRS배지를 대체할 유산균 배양 배지로 여러 가지 영양소를 조합하여 최적의 유산균 배양 배지를 개발하는 연구(Kim 등, 2004; Peck 등, 2013)와 배추즙을 기본으로 하여 영양소를 추가하려는 연구(Park과 Jeon, 2002; Park 등, 2013a)에 집중되었고, 버섯추출물이나(Zhao 등, 2016) 콩 가수분해물을 기본으로 한 배지(Park 등, 2013b) 등이 연구되었다. 이들은 모두 배지를 가열하거나(Park 등, 2013a) 막여과하여(Jung과 Sohn, 2017) 살균하므로 가열취가 발생하거나 제조공정이 추가되므로 김치공장

에 직접 적용하는 데에 한계가 있다. 김치에 접종할 종균을 배양하기 위해서는 집중한 균을 우점종으로 배양할 수 있으면 가열살균이 필요 없는 저비용 기술의 적용이 가능하므로 배춧잎을 구연산, 에탄올, 소금 용액으로 세척하여 배추즙의 초기 미생물수를 낮추는 배지 제조방법이 보고되었다(Han과 Yang, 2019). 또한 유산균의 균체 생산량을 극대화하기 위하여 다양한 영양소를 첨가하는 방법들(Jung과 Sohn, 2017; Ryu 등, 2008)이 연구되었으나 유산균 배양액을 직접 절임배추에 접촉시켜 접종한다면 균체의 농도가 높지 않아도 접종이 가능하므로 배추즙에 영양소를 추가하지 않는 경제적인 배양방법도 가능하다.

이번 연구에서는 종균발효를 기반한 김치를 생산하는 김치공장 내부에서 종균을 자체 생산하여 사용하는 방법을 개발하고자 가열살균하지 않은 배추즙에 영양소를 추가하지 않고 유산균을 배양하는 방법을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 배추와 배추즙

배추는 2018년 10월에 광주 서부농수산물시장에서 구입하여 비가식부를 제거한 다음 외부의 푸른 걸잎을 포기당 5잎씩 떼어서 시료로 사용하였다. 배추즙은 배추 걸잎을 에탄올 20%와 구연산 1% 수용액으로 세탁기에서 10분간 교반 세척한 다음 10분간 중력탈수하고 마쇄 착즙하였다(Han과 Yang, 2019).

### 배추즙의 성분분석

배추즙의 조단백질, 조지방, 탄수화물, 포도당, 무기질과 비타민은 식품의 기준 및 규격(Ministry of Korea Food and Drug Safety, 2019)에 따라 분석하였고, 초산, 구연산, 사과산은 WIKIM-SOP-C002 (World Institute of Kimchi, 2012)에 따라 분석하였다.

\*Corresponding author: Eung Soo Han, Research and Development Division, World Institute of Kimchi, Gwangju 61755, Korea  
Tel: +82-62-610-1732  
Fax: +82-62-610-1850  
E-mail hanakimchi@wikim.re.kr  
Received May 9, 2019; revised June 29, 2019;  
accepted July 3, 2019

### 유산균과 배양

시험에 사용한 유산균은 세계김치연구소에서 배양하여 동결건조한 *Leuconostoc mesenteroides* WiKim32 균으로 균의 농도는 g 당 9.62 log CFU였다. 착즙 냉동 배추즙을 해동하여 얻은 배추즙은 pH가 3.71로 산성이었으므로 1 M NaOH로 pH를 조정하였고 염도는 정제염으로 염도 1.5%로 조정하였으며, 500 mL 플라스크에 100 mL씩 분취하여 유산균을 0.1% 접종하고 알루미늄 호일로 덮어 정온배양기에서 정치 배양하였다.

### 배양액 pH

배양액의 pH는 배양액에 직접 pH meter (TitroLine easy, SI Analytics, Mainz, Germany)를 넣어 측정하였다.

### 유산균수 측정

유산균 수는 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe agar, Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하여 37°C에서 48시간 배양하여 나타난 집락수를 계수하였다.

### 통계처리

실험 결과는 Statistical Analysis System (SAS, Cary, NC, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 계산하였고, Duncan's multiple range test 방법으로  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 분석하였다

## 결과 및 고찰

### 배추즙의 성분특성

대한민국 배추의 일반적인 성분특성을 식품성분표(Rural Development Agency, 2018)를 바탕으로 계절별 배추의 평균을 구한 결과는 Table 1과 같다. 일반성분은 수분 94.8%, 단백질 1.25%, 지방 0.05%, 회분 0.66%, 탄수화물 3.20%였고 이 중 당이 1.75%, 섬유소가 1.4%였다. 주요 무기질은 칼륨 258 mg%, 칼슘 52 mg%, 인 40 mg%, 마그네슘 13 mg%, 나트륨 9 mg%였고, 주요 비타민은 아스코르빈산 15.16 mg%, 니아신 0.416 mg%, 베타카로틴 0.146 mg%, 리보플라빈 0.052 mg%, 엽산 0.034 mg%로 무기질과 비타민이 다양하고 풍부하게 들어 있었다.

배추의 겉잎을 세척 탈수하고 착즙한 배추즙의 일반성분은 단백질 1.02%, 지방 0.00%, 탄수화물 2.78%였고 이 중 포도당이 1.36%로 평균배추의 일반성분보다 낮았고, 포도당만 검출되어 과당과 맥아당도 검출되었다는 보고(Moon 등, 2013)와 차이가 있었다. 그리고 유기산으로 초산, 구연산, 사과산이 각각 45.3, 15.5, 8.5 mg% 검출되었다. 그러나 비타민과 무기질은 각각 아스코르빈산 37.4 mg%, 칼륨 622 mg%, 칼슘 194 mg%, 인 54 mg%, 마그네슘 28 mg%, 나트륨 20 mg%로 평균배추의 함량보다 평균 2.38배(1.34-3.73) 높아서 배추의 겉잎이 배추 전체의 평균보다 일반성분의 함량은 적으나 비타민과 무기질은 풍부함을 확인하였다.

### 초기 pH의 영향

배추즙의 초기 pH를 중성과 약산성으로 조정하여 5°C에서 유산균을 배양한 결과 Table 2에서 보듯이 중성(pH 7.0)에서는 빠르게 성장하여 배양 5일에 8.60 log CFU/mL로 증식하였고, 약산성(pH 4.5)에서는 느리게 성장하여 배양 15일에 8.37 log CFU/mL로 증식하였다. 그러나 구연산과 에탄올로 세척하여 착즙한 배추즙 배지는 pH가 3.61로 낮아서 배양 15일에 겨우 5.08 log CFU/mL로 증식하였고 21일까지도 유산균이 1 mL 당 10만마리 이하로 거의 증식하지 못하였다.

배추즙에 효모추출물을 1% 첨가하면 Table 3과 같이 유산균의 성장속도는 무첨가보다 약간 느렸으나 유산균의 농도는 중성에서 15일차에 10억 마리 이상으로 증식하였고 배양 21일까지 1 mL 당 1억 마리 이상으로 더 높게 유지되었다. 이는 유산균배양용 배추즙 배지에 질소원과 엽혼합물을 첨가하여 *Leuconostoc citreum* GR1을 30°C에서 24시간 배양하여 9.87 log CFU/mL의 균체농도로 얻은 결과(Moon 등, 2013)보다는 조금 낮은 결과였다.

초기 pH를 중성으로 조정한 배양액의 pH는 약산성으로 조정된 배양액보다 초기에는 더 빠르게 낮아졌으나 21일차에는 비슷하였고, 효모추출물을 1% 첨가하면 초기 pH의 조정과 관계없이 무첨가구보다 느리게 낮아졌다. 이는 김치유래 유산균을 배추즙에 질소원과 엽혼합물을 첨가하여 pH 5.5-6.8에서 배양한 결과 pH의 영향이 크기 않았다는 보고(Moon 등, 2013)와 유사하였고, 배추즙 70% 희석액에 sucrose 0.5%, yeast extract 1%, soy peptone 1%를 첨가하여 *Leuconostoc mesenteroides* 중균을 9.16 log

**Table 1. Composition of kimchi cabbage and kimchi cabbage juice of outer leaves**

Materials	Protein	Fat	Carbohydrate	Sugar	Ca	Mg	P	K	Na	Ascorbic acid
	g/100 g				mg/100 g					
Kimchi cabbage	1.25	0.05	3.20	1.75	52	13	40	258	9	15.2
Kimchi cabbage juice	1.02	0.00	2.78	1.36	194	28	54	622	20	37.4

Revised from Korean Food Composition Table 9<sup>th</sup> revision. <http://koreanfood.rda.go.kr>

**Table 2. Influence of pH on the growth of lactic acid bacteria in kimchi cabbage juice at 5°C without supplements and sterilization (Unit: log CFU/mL)**

Culture time (day)		0	5	9	13	15	19	21
Control	pH	3.61	3.77	3.65	3.59	3.45	3.45	3.45
	LAB	3.49±0.20 <sup>a</sup>	4.43±0.19 <sup>a</sup>	4.49±0.20 <sup>a</sup>	4.92±0.13 <sup>a</sup>	5.08±0.07 <sup>a</sup>	4.69±0.12 <sup>a</sup>	4.48±0.07 <sup>a</sup>
pH 4.5	pH	4.54	4.59	4.55	4.47	4.26	4.14	4.03
	LAB	7.27±0.03 <sup>b</sup>	7.24±0.02 <sup>b</sup>	7.55±0.09 <sup>b</sup>	7.84±0.12 <sup>b</sup>	8.37±0.05 <sup>b</sup>	8.34±0.18 <sup>b</sup>	8.18±0.11 <sup>b</sup>
pH 7.0	pH	7.29	4.70	4.49	4.28	4.08	4.08	4.04
	LAB	7.87±0.13 <sup>c</sup>	8.60±0.00 <sup>c</sup>	8.62±0.04 <sup>c</sup>	8.36±0.32 <sup>c</sup>	8.43±0.14 <sup>b</sup>	8.12±0.10 <sup>b</sup>	8.34±0.01 <sup>c</sup>

<sup>a-b</sup>Means with different small letter in the same column differ significantly by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

CFU/mL의 농도로 배양할 때 pH가 5.5에서 4.0으로 낮아졌다는 보고(Jeong 등, 2017)와 유사하였다.

**배양액의 pH조정 효과**

배추즙에 효모추출물을 1% 첨가한 다음 초기 pH를 6.0으로 조정하여 5°C에서 배양한 결과 Table 4에서 보듯이 유산균이 배양 3일차에 1 mL 당 1억 마리 이상으로, 6일차에 10억 마리 이상으로 증식하여 pH 무조정구와 유의적인 차이가 없었으나, 그 후로는 유의적으로 차이가 있어서 무조정구에서는 1 mL 당 1억 마리 수준으로 감소하였으나 pH를 6.0으로 조정한 구에서는 유산균수가 배양 20일차까지 1 mL 당 10억 마리 이상을 유지하였다.

배양액의 pH는 무조정구에서는 초기 6.03에서 3일차에 5.62, 6일차에 4.48로 낮아져 그 후 4.2 수준을 유지하였고, 배양액의 pH가 5.5 이하로 낮아지면 1 M NaOH를 넣어 pH 6.0으로 조정하면서 배양한 조정구에서는 6일차에 4.41로 낮아져 6.0으로 조정하였고 10일차에 다시 5.08로 낮아져 6.0으로 조정하였으며, 그 후에는 서서히 낮아져 18일차에 5.33으로 낮아졌다. 이는 배추즙 배지에 영양소를 첨가하고 pH를 6.8로 조정하면서 20시간 배양하여 유산균수를 10.06 log CFU/mL로 배양(Moon 등, 2013)한 것보다는 낮았으나 비살균 무첨가 배추즙으로 유산균수를 1 mL 당 10억 마리 이상으로 20일 이상 유지할 수 있는 배양 방법이었다.

**배추즙 추가효과**

영양소로 탄소원, 질소원, 무기질, 비타민을 추가하지 않고 배

추즙만을 추가로 공급하면서 유산균을 배양한 결과는 Table 5와 같다. 배추즙 100 mL에 유산균을 0.1% 첨가하여 25°C에서 배양하면서 매일 배추즙을 25 mL씩 추가하고 pH를 6.0으로 조정할 결과 배양 1일차에 1 mL 당 10억 마리 이상으로 빠르게 증가했다가 2일차부터 감소하여 3일차에 1억 마리 이하로 감소하였다. 그리고 배추즙을 50 mL씩 추가하여 배양하면 배양 2일차까지 10억 마리 이상으로 증가했다가 3일차에 1억 마리 이하로 낮아졌다. 배양온도 25°C의 배양조건에서 배추즙을 추가하지 않으면 1일차에 10억 마리 가까이 증식했다가 그 후 빠르게 감소했지만 배추즙을 추가하면 10억 마리 이상으로 증식하였고 유산균수가 2일차까지 10억 마리 이상으로 유지되었다.

그리고 GABA (gamma-aminobutyric acid)를 생산하기 위한 방법으로 *Lactobacillus brevis*의 유가식 배양 조건을 32°C, pH 5.0, glutamate 초기농도 400 mM에서 12시간 간격으로 glutamate를 1.5 mol과 1.2 mol씩 추가하여 36시간 배양한 결과 GABA를 1005 mM 농도로 생산하여(Li 등, 2010), 유가식 배양이 대사산물 생산에 효과적임을 보고하였다.

그러나 유가식 배양 3일차에는 pH는 6.0 이상으로 조정되었지만 유산균수는 1억 마리 이하로 감소하였다. 이는 영양소는 적정하게 공급되었지만 pH를 6.0으로 조정하는 과정에서 배지에 Na 이온이 증가되었기 때문으로 생각된다. Joe 등(2005)은 김치유산균의 생산성을 높이기 위하여 반복 유가식 배양 방법으로 22시간 배양 후 배양액 500 mL를 빼내고 농축배지 500 mL를 공급하여 32시간에 건체량 15.17 g/L를 얻었는데, 36시간 후부터는 고

**Table 3. Influence of initial pH and yeast extracts supplement on the growth of lactic acid bacteria in kimchi cabbage juice at 5°C without sterilization (Unit: log CFU/mL)**

Culture time (day)		0	5	9	13	15	19	21
pH 4.5	pH	4.47	4.54	4.49	4.43	4.30	4.25	4.22
	LAB	7.37±0.04 <sup>a</sup>	7.32±0.10 <sup>a</sup>	7.43±0.10 <sup>a</sup>	7.80±0.17 <sup>a</sup>	7.85±0.10 <sup>a</sup>	8.26±0.15 <sup>a</sup>	8.25±0.15 <sup>a</sup>
pH 7.0	pH	6.90	5.49	4.87	4.51	4.33	4.26	4.27
	LAB	7.85±0.05 <sup>b</sup>	8.32±0.00 <sup>b</sup>	8.74±0.03 <sup>b</sup>	8.98±0.20 <sup>b</sup>	9.06±0.10 <sup>b</sup>	8.69±0.04 <sup>b</sup>	8.63±0.04 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup>Means with different small letter in the same column differ significantly by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ )

**Table 4. Effects of adjusting pH on the growth of lactic acid bacteria in kimchi cabbage juice at 5°C without sterilization (Unit: log CFU/mL)**

Culture time (day)		0	3	6	10	12	15	18	20
N	pH	6.03	5.62	4.48	4.25	4.23	4.14	4.12	4.22
	LAB	6.96±0.04 <sup>a</sup>	8.12±0.21 <sup>a</sup>	9.12±0.05 <sup>a</sup>	8.43±0.07 <sup>a</sup>	8.44±0.08 <sup>a</sup>	8.51±0.03 <sup>a</sup>	8.00±0.02 <sup>a</sup>	8.01±0.06 <sup>a</sup>
A	pH	6.03	5.56	4.41	5.08	5.79	5.51	5.33	5.79
	LAB	6.87±0.04 <sup>a</sup>	8.15±0.10 <sup>a</sup>	9.20±0.25 <sup>a</sup>	9.07±0.14 <sup>b</sup>	9.25±0.04 <sup>b</sup>	9.17±0.09 <sup>b</sup>	9.03±0.07 <sup>b</sup>	9.20±0.05 <sup>b</sup>

N: not adjust pH, A: adjust pH to 6.0 with 1M NaOH

<sup>a-b</sup>Means with different small letter in the same column differ significantly by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ )

**Table 5. Effects of adding kimchi cabbage juice on the growth of lactic acid bacteria in 100 mL kimchi cabbage juice at 25°C without supplements and sterilization (Unit: log CFU/mL)**

Culture time (day)		0	1	2	3	4
0 mL	pH	6.10	6.08	6.01	6.03	-
	LAB	6.85±0.03 <sup>a</sup>	8.98±0.20 <sup>a</sup>	8.81±0.03 <sup>a</sup>	7.81±0.03 <sup>a</sup>	7.89±0.08 <sup>a</sup>
25 mL	pH	6.10	6.03	6.05	6.09	-
	LAB	6.85±0.03 <sup>a</sup>	9.16±0.01 <sup>a</sup>	9.00±0.04 <sup>b</sup>	7.87±0.03 <sup>a</sup>	8.10±0.02 <sup>b</sup>
50 mL	pH	6.10	6.06	5.99	6.14	-
	LAB	6.85±0.03 <sup>a</sup>	9.09±0.14 <sup>a</sup>	9.37±0.07 <sup>c</sup>	7.89±0.19 <sup>a</sup>	7.90±0.05 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup>Means with different small letter in the same column differ significantly by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ )

**Table 6. Effects of starter inoculation, adjusting pH and adding kimchi cabbage juice on the growth of lactic acid bacteria in kimchi cabbage juice at 20°C without supplements and sterilization (Unit: log CFU/mL)**

Culture time (day)		0	1	2	3	4
Not adjusted	pH	5.01	4.81	4.67	4.41	4.40
	LAB	7.17±0.04 <sup>a</sup>	7.70±0.02 <sup>a</sup>	8.88±0.02 <sup>a</sup>	8.74±0.01 <sup>a</sup>	8.57±0.08 <sup>a</sup>
Adjust to pH 5.0	pH	5.01	4.88	4.66	4.45	4.50
	LAB	7.17±0.04 <sup>a</sup>	7.73±0.03 <sup>a</sup>	8.87±0.00 <sup>a</sup>	8.78±0.11 <sup>a</sup>	8.87±0.07 <sup>b</sup>
Adjust to pH 5.5	pH	5.57	4.91	4.57	4.67	4.96
	LAB	7.29±0.07 <sup>a</sup>	8.32±0.05 <sup>b</sup>	9.06±0.05 <sup>b</sup>	8.92±0.01 <sup>b</sup>	8.88±0.05 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Means with different small letter in the same column differ significantly by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

염농도의 영향으로 성장이 감소되었다는 보고와 유사하였다.

위의 결과는 유산균을 유가식으로 배양하면 비살균 무첨가 배추즙을 일정량씩 추가하는 것으로 유산균을 1 mL 당 10<sup>9</sup> 마리 이상으로 배양할 수 있으나 NaOH 첨가량을 줄이는 것이 바람직함을 시사하는 것이다.

### 김치공장 조건에서의 유산균 배양

배양한 유산균을 김치종균으로 사용하기 위하여 김치공장의 배양여건을 고려하여 배양온도를 20°C, 중균접종량을 0.1%, 배추즙 첨가량을 매일 100 mL씩 추가하고, pH를 약산성(pH 5.0/5.5)으로 조정하여 배양 시험한 결과는 Table 6과 같다.

초기 pH를 5.01로 조정하여 접종 배양하면 유산균수는 배양 2 일차에 8.88 log CFU/mL로 높아졌는데, 이는 25°C, pH 6.0 배양 조건보다는 느리고 낮게 성장한 결과이나 배양 4일차까지 1억 마리 이상을 유지하였다. 또한 pH를 매일 5.0으로 조정하면서 배양하면 유산균수가 pH 무조정구와 배양 3일차까지 유의적 차이가 없었고 4일차에야 유의적으로 높았다. 그러나 pH를 5.5로 조정하면서 배양하면 배양 초기부터 유산균수가 유의적으로 높아서 1 일차에 1억 마리 이상, 2일차에 10억 마리 이상으로 증식하였고 4일차까지 8.88 log CFU/mL 이상으로 유지되었다.

배양액의 pH는 초기 pH를 5.01로 조정하여 접종 배양하면 지속적으로 낮아져 4일차에 4.40으로 감소하였고, 1 M NaOH로 매일 5.0으로 조정한 처리구도 무조정구와 유사하게 낮아져 pH 조정의 효과가 작았다. 그러나 pH를 매일 5.5로 조정한 처리구는 1일간 배양한 후의 pH도 더 높게 유지되었고 유산균수도 유의적으로 높아서 pH 조정 효과가 인정되었다.

### 유산균 배양 연구

종균이나 프로바이오틱스를 생산하기 위한 유산균 배양 연구가 균주의 선발, 배지의 조성, 유산균의 배양조건, 배지의 살균조건 등으로 전개되었다.

종균의 선발은 김치용 종균 선발에 집중되어 종균을 접종하면 김치의 관능품질을 개선하고 품질유지기간을 연장하며 기능성을 부여할 수 있다고 하였으며(Lee 등, 2015), 이속균주를 혼합한 종균으로 김치의 품질을 1.5배 연장할 수 있었다고 보고하였다(Kim 등, 2019). 그리고 구미에서는 과일과 채소를 유산발효시켜 영양소와 생리활성물질 생산에 활용하였고(Axelle 등, 2018), 과채발효에 적합한 유산균 혼합균주를 선발하는 기준을 제시하였다(Cagno 등, 2013).

배지의 조성 연구는 단일성분을 혼합하여 최적의 배지를 개발하려는 연구로 MRS 배지를 대체할 유산균 배양용 배지를 통계적 방법으로 연구하여 glucose (20 g/L), yeast extract (12.5 g/L), sodium acetate trihydrate (6.12 g/L), potassium phosphate (42.55

g/L), dibasic ammonium citrate (4.12 g/L)의 조성으로 *Leuconostoc citreum* 배양용 최적배지를 개발하였고(Kim 등, 2004), *Leuconostoc mesenteroides* 대수증식을 위한 배지를 single omission 방법으로 연구하여 glutamine, methionine, valine, nicotinic acid를 필수영양소로, 8종의 아미노산과 5종의 비타민을 보조영양소로 선정하였다(Kim 등, 2012). 한편 배추즙에 영양소를 첨가하여 배지를 개발하려는 연구로는 배추를 한약추출기로 121°C에서 15분간 가열추출하고 여기에 질소원과 염혼합물을 첨가하여 *Leuconostoc citreum* GR1에 최적화된 배지를 개발하였고(Moon 등, 2013), 배추즙 70% 희석액에 sucrose 0.5%, yeast extract 1%, soy peptone 1%, ark shell powder 1.5%를 첨가하여 *Leuconostoc mesenteroides* 종균의 산업적 생산을 위한 배추즙 배지를 개발하였으며(Jeong 등, 2012), 계속된 연구로 유산균의 산업적 생산을 위한 배지제조방법을 개발하였다(Jeong 등, 2017; Peck 등, 2013). 그리고 배추즙 배지 외에 유산균 배양을 위한 간단하고 저렴한 범용성 배지를 버섯추출물 200 g/L, sodium acetate 5 g/L, riboflavin 0.5 mg/L로 개발하였고(Zhao 등, 2016), 발아시켜 껍질을 벗긴 콩을 10배 가수하여 분쇄하고 121°C에서 15분간 멸균하여 유산균 배양용 식용배지를 개발하였다(Park 등, 2013b). 이들은 모두 영양소를 추가하고 가열 살균하므로 비용이 추가로 소요된다.

유산균의 배양조건으로 Joe 등(2005)은 김치유산균의 생산성을 높이기 위하여 반복 유가식 배양 방법으로 22시간 배양 후 배양액 500 mL를 빼내고 농축배지 500 mL를 공급하여 32시간에 건체량 15.17 g/L를 얻었는데 36시간 후부터는 고염농도의 영향으로 유산균의 성장이 감소되었다고 보고하였다. 그리고 GABA를 생산하기 위한 *Lactobacillus brevis*의 유가식 배양조건으로 glutamate 초기농도 400 mM에서 12시간 간격으로 glutamate를 1.5 mol과 1.2 mol씩 추가하여 32°C에서 pH 5.0으로 36시간 배양한 결과 GABA를 1005 mM 농도로 생산하여 유가식 배양이 유산균체 생산과 대사산물 생산에 효과적임을 보고하였다(Li 등, 2010).

한편 과채류를 발효시킨 유산균음료 연구로 Yoon 등(2006)은 양배추즙에 *Lactobacillus plantarum*을 접종하여 30°C에서 48시간 배양하면 9 log CFU/mL 농도로 증식되었고, 초기 pH 5.0-5.8에서 72시간 배양 후 pH가 3.4-3.6으로 낮아졌으며, 이를 4°C에서 4주간 저장하여도 유산균수가 7 log CFU/mL 이상으로 유지되었다고 보고하였다. 그리고 Savard와 Champagne (2017)은 당근, 양배추, 양파 혼합 채소즙을 유산균으로 발효시킬 때 pH 완충제로 구연산소다를 첨가하여 초기 pH를 7.0-5.8로 조정하면 배양 80일 까지 pH 4.0 이상으로 유지되었고, 150 mM 첨가하면 당대사를 2.8배 증대시키고 유산균을 2.3배 높게 배양하여 배양액의 품질을 장기간 유지할 수 있었다고 보고하였다. 이들 결과는 영양소를 추가하지 않고 유산균을 배양할 수 있고 pH를 조정하여 유산균 발효를 촉진할 수 있음을 보여준 것이다.

배지의 살균은 121°C에서 15분간 가열살균하는 방법(Park 등, 2013a)과 막여과하는 방법(Jung과 Sohn, 2017) 등이 있고, 가열살균이나 막여과 없이 배춧잎을 세척하여 감균하고 착즙하는 방법이 보고되었다(Han과 Yang, 2019).

## 요 약

배추 겉잎을 착즙하여 얻은 비가열 배추즙에 영양소를 첨가하지 않고 유산균을 접종하여 균수를 1 mL 당 10억 마리 이상으로 증식시키고 8.88 log CFU/mL 이상으로 4일간 유지하였다. 이때 배양조건은 배추즙 100 mL에 *Leuconostoc mesenteroides* WiKim32를 0.1% 접종하고 비살균 무침가 배추즙을 매일 100 mL씩 첨가하고 1 M NaOH로 pH를 5.5로 조정하였으며 20°C에서 4일간 정지 배양하였다. 배추즙은 배춧잎을 구연산과 에탄올로 세척하여 착즙하였고, pH를 6.0 이상으로 조정하면 초기 생육은 빠르나 후기에는 유산균의 생육이 억제되었고, 5.0 이하로 조정하면 조정 효과가 미약했으므로 5.5로 조정하였다. 이번 연구는 김치공장에서 종균을 경제성 있게 생산하는 방법으로 비살균 무침가 배추즙에 유산균을 고농도로 배양할 수 있음을 보여주었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품기술개발사업(고부가가치식품기술개발사업, 과제번호 317036-3)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사합니다.

## References

Axelle SM, Remize F, Pouchet P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Res. Int.* 104: 86-99 (2018)

Cagno RD, Coda R, Angelis MD, Gobbetti M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* 33: 1-10 (2013)

Han ES, Park HW. Kimchi inoculating system and process thereof. Korea patent 10-2018-0012120 (2018)

Han ES, Yang JH. Microbial reduction of kimchi cabbage leaves by washing with citric acid and ethanol. *Food Eng. Prog.* 23: 112-117 (2019)

Jeong EJ, Moon DW, Oh JS, Moon JS, Eom HJ, Choi HS, Kim CS, Han NS. Composition optimization of cabbage extract medium for cell growth of *Lactobacillus plantarum*. *KSBBS. J.* 27: 347-351 (2012)

Jeong EJ, Moon DW, Oh JS, Moon JS, Seong HB, Kim KY, Han NS. Development of cabbage juice medium for industrial production of *Leuconostoc mesenteroides* starter. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 2112-2118 (2017)

Joe L, Kwun KH, Chang HC, Lee JH. Enhanced production in recycle fed-batch cultivation by lactic acid bacteria isolated from kimchi. pp. 312-315. In: Symposium on Proceeding of Current

Biotechnology and Bioengineering (XVII). October 27, The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Jinju City Hall, Jinju, Korea (2005)

Jung IS, Sohn M. Method of manufacturing growth medium for lactic acid bacteria using membrane filter and growth medium for lactic acid manufactured by the method. Korea patent 10-2018-0062426 (2017)

Kim H, Eom HJ, Lee J, Han J, Han NS. Statistical optimization of medium composition for growth of *Leuconostoc citreum*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9: 278-284 (2004)

Kim YJ, Eom HJ, Seo EY, Lee DY, Kim JH, Han NS. Development of a chemically defined minimal medium for the exponential growth of *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 1518-1522 (2012)

Kim MJ, Lee HW, Lee ME, Roh SW, Kim TW. Mixed starter of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc citreum* for extending kimchi shelf-life. *J. Microbiol.* 57: 479-484 (2019)

Lee ME, Jang JY, Lee JH, Park HW, Choi HJ, Kim TW. Starter cultures for kimchi fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 559-568 (2015)

Li H, Qiu T, Huang G, Cao Y. Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microb. Cell. Fact.* 9: 85-91 (2010)

Ministry of Food and Drug Safety. Food Code(2019-16). Available from: <https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/food/foodRvlv/foodRvlv.do>. Accessed Jan. 31, 2019.

Moon SH, Chang HC, Kim IC. Development of novel medium with Chinese cabbage extract and optimized fermentation conditions for the cultivation of *Leuconostoc citreum* GR1. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1125-1132 (2013)

Park HG, Jeon IC. Culture medium for lactic acid bacteria prepared from Chinese cabbage wastes. Korea patent 10-0453376 (2002)

Park SH, Kim TW, Lee JH, Choi HJ, Park HW, Kim HJ, Jang JY, Kang MR. Preparation of edible media for culturing bacteria using waste of salted cabbages. Korea patent 10-1744324 (2013a)

Park SL, Park SH, Jang J, Yang HJ, Moon SW, Lee MK. Edible culture media from cereals and soybeans for pre-cultivation of lactic acid bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42:991-995 (2013b)

Peck BR, Kim D, Song SK, Do HK, Lee KH, Holzapfel W. Culture media for lactic acid bacteria and culture and storage method of them in industrial scale. Korea patent 10-2014-0102888 (2013)

Rural Development Agency. Korean Food Composition Table 9th revision. <http://kireanfood.rda.go.kr>. (2018)

Ryu BH, Lee JH, Sim GS, Ha WK. Plant media, plant excipient composition and preparation method for powder fermented by plant origin lactic acid bacteria using the same. Korea patent 10-2010-0076540 (2008)

Savard T, Champagne CP. Sodium citrate reduces residual levels of carbohydrates and increases bacterial counts in a fermented mixed vegetables medium. *Food Biosci.* 18: 34-37 (2017)

World Institute of Kimchi. Manual of Kimchi Quality Test, WIKIM-SOP-C002 (2012)

Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresour. Technol.* 97: 1427-1430 (2006)

Zhao Y, Wang Y, Song Z, Shan C, Zhu R, Liu F. Development of a simple, low-cost and eurytopic medium based on *Pleurotus eryngii* for lactic acid bacteria. *AMB Express* 6: 65-72 (2016)