

## 패류로부터 젖산 세균의 분리 및 특성

강창호<sup>1</sup>, 정호진<sup>1</sup>, 구자룡<sup>1</sup>, 전은진<sup>1</sup>, 광대영<sup>1</sup>, 홍채환<sup>2</sup>, 김시환<sup>2</sup>, 서지연<sup>2</sup>, 한도석<sup>2</sup>, 소재성<sup>1\*</sup>

# Identification and Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Shellfishes

Chang-Ho Kang<sup>1</sup>, Ho Geon Jeong<sup>1</sup>, Ja-Ryong Koo<sup>1</sup>, Eun Jin Jeon<sup>1</sup>, Dae Yung Kwak<sup>1</sup>, Chae Hwan Hong<sup>2</sup>, Si Hwan Kim<sup>2</sup>, Ji Yeon Seo<sup>2</sup>, Do Suck Han<sup>2</sup> and Jae-Seong So<sup>1\*</sup>

접수: 2012년 3월 13일 / 게재승인: 2012년 5월 17일

© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Lactic acid is an important product arising from the anaerobic fermentation by lactic acid bacteria (LAB). It is used in the pharmaceutical, cosmetic, chemical, and food industries as well as for biodegradable polymer and green solvent production. The poly lactic acid (PLA) is an important material for bio-plastic manufacturing process. For PLA production by new LAB, we screened LAB isolates from shellfish. A total of 28 LAB were isolated from various shellfishes. They were all Gram positive, oxidase and catalase negative. Based on API 50CHL kit, 7 strains among the 28 isolates were identified as *Lactobacillus plantarum*, 6 strains as *Lactobacillus delbrueckii*, 5 strains as *Leuconostoc mesenteroides*, 3 strains as *Lactobacillus brevis*, 2 strains as *Lactococcus lactis*, 1 strain as *Lactobacillus salivarius*, 1 strain as *Lactobacillus paracasei*, 1 strain as *Lactobacillus pentosus*, 1 strain as *Lactobacillus fermentum* and 1 strain as *Pediococcus pentosaceus*. Also, we examined the amount of total lactic acid produced by these new strains by HPLC analysis with Chiralpak MA column. One strain E-3 from *Mytilus edulis* was indentified as *Lactobacillus plantarum*

and found to produce 20.0 g/L of D-form lactic acid from 20 g/L of dextrose. Further studies are underway to increase the D-lactic acid production by E-3.

**Keywords:** lactic acid bacteria (LAB), poly lactic acid (PLA), isolation, identification, D-form

### 1. 서론

젖산 (lactic acid)은 L형, D형, DL형의 이성질체가 있으며, 음료의 산미제, 주류발효 초기의 부패방지제, 화장품 등으로 다양하게 이용되고 있는 중요한 화학 물질이다. 젖산은 화학적 전환기술로 Poly lactic acid (PLA) 중합 중간체인 락타이드 (Lactide)나 아크릴산 (Acrylic acid) 등의 유용 화학물질로 변환된다 [1]. L형 젖산과 D형 젖산을 같이 사용한 경우, 폴리 유산의 융점이 높아지고, 결정화도 증가되는 현상을 보여 결과적으로 소재의 높은 열안정성 확보가 가능하게 되었다 [2]. L형 젖산의 경우 식품산업에서 대부분의 응용분야에 사용되기에 많은 연구가 이루어져 있는 반면, D형 유산의 경우 응용성이 낮아 연구가 거의 이루어지지 않았다. D형 젖산을 생산하는 연구 방법 중 최근 부각되고 있는 방법으로는 자연계에서 젖산을 과량으로 생산하는 자연균주 (*Lactobacillus* spp. 등)를 선발하여 생산하는 방법이 있다. 이 방식으로 접근할 경우 젖산균의 특성상 수율, 생산성 면에서 우수한 것으로 알려져 있다. Kimura 연구팀의 연구 결과 [3]에 따르면 *Lactobacillus delbrueckii*와 *Sporolactobacillus inulinus*를 이용하면 발효 반응으로 생산

<sup>1</sup>인하대학교 생물공학과

<sup>1</sup>Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel: +82-32-860-7516, Fax: +82-32-872-4046  
e-mail: sjaeseon@inha.ac.kr

<sup>2</sup>현대자동차 중앙연구소 기반기술연구팀

<sup>2</sup>Central Research Institute, Hyundai Motors, Uiwang, Gyeonggi, Korea

**Table 1.** Some morphological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria from shellfishes

strain No.	Gram stain	Motility	Facultative anaerobic	Catalase	Oxidase	API50CHL kit
A-1	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-3	+	-	+	-	-	
A-4	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>
A-5	+	-	+	-	-	
A-6	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus brevis</i>
M-1	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
M-2	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
T-1	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>
T-2	+	-	+	-	-	<i>Lactococcus lactis</i>
T-4	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus brevis</i>
E-1	+	-	+	-	-	<i>Lactococcus lactis</i>
E-2	+	-	+	-	-	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
E-3	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>
E-4	+	-	+	-	-	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
E-5	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus paracasei</i>
N-1	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
N-2	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus pentosus</i>
N-3	+	-	+	-	-	
N-4	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
N-5	+	-	+	-	-	
C-1	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>
C-2	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus fermentum</i>
C-3	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>
C-4	+	-	+	-	-	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
C-5	+	-	+	-	-	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
G-1	+	-	+	-	-	
G-2	+	-	+	-	-	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
G-4	+	-	+	-	-	

A: Isolated from *Arca avellana Lamarck*, M: Isolated from *Macra veneriformis Reeve*, T: Isolated from *Tapes philippinarum*, N: Isolated from *Neptunea arthritica cumingi*, C: Isolated from *Turbo cornutus*, E: Isolated from *Mytilus edulis*, G: Isolated from *Crassostrea gigas*, +, growth; -, no growth.

Data are from triplicate experiments.

된 젖산 중 D형 젖산의 함유량이 98%이상의 고순도로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

젖산균은 혐기적 또는 통성 혐기성으로 증식하는 그람 양성 세균으로, 자연계에 널리 분포되어있는 미생물이다. 전통적으로 다양한 발효식품에 이용되어 왔고, 일반적으로 안전하다고 인식되는 미생물 (GRAS, generally recognized as safe)로서 [4], *Bergey's Manual* [5]에서는 그람양성 구균과 그람양성 간균에서 다루고 있다. Catalase 음성으로 포자를 형성하지 않고, 혐기성 병원성 균주의 생장을 억제하기 위해 다양한 억제물질들을 생산하며, 글루코오스 대사과정에서 생산된 젖산을 통해 낮은 pH를 유지하는 것으로 알려져 있다 [6]. 기존의 젖산을 생산하는 균주의 분리는 김치 등 식음료에서 분리하여 상업적으로 사용되었다 [7,8]. *Leuconostoc*과 *Lactobacillus vulgaricus* 등은 D형 젖산을 주로 생산하며, *Bacillus*, *Rhizopus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*의 미생물은 L형 젖산을 생산하는 것으로 알려져 있다 [7]. PLA 합성의 경우 pH와 온도 등 다양한 환경 스트레스에 강한 젖산생산 균주가 요구된다. Lee의 연구결과 [9]에 따르면, 패류인 굴에서 분리한 *Lactobacillus spp.*가 다양한 환경 스트레스에 내성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

이에 본 연구에서는 패류에서 분리한 젖산균의 젖산생산 관련 연구가 전무한 바, 다양한 패류에서 젖산균을 분리·동정하여 발효과정에서 생산되는 L형과 D형의 젖산 생산량과 총 젖산 생산량을 확인해 보았다. 이를 통해 환경 스트레스 내성이 높은 D형 젖산생산 균주를 선별하여 PLA 연구의 기초 자료로 이용하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 배지 및 시약

패류에서 젖산균의 분리를 위하여 Rogosa SL media와 0.1% bromocresol purple (BCP)이 첨가된 *Lactobacilli* MRS media는 Difco사 (MI, USA) 제품을 사용하였고, 계대배양에는 MRS media를 사용하였다. 균주의 보존을 위하여 균배양액에 glycerol이 25%(v/v)가 되도록 조성하여 -70°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 분리한 균주의 생화학적 특성 검사를 위해서는 Gram stain sets는 Difco사 (MI, USA) 제품, oxidase reagent는 Sigma-Aldrich사 (MO, USA) 제품, API 50 CHL kit는 BioMerieux사 (France) 제품을 사용하였다.

## 2.2. 균주의 분리

2011년 7월부터 12월까지 인천 서해안의 양식어장에서 채취한 패류 (돌조개, 동죽, 바지락, 갈색띠매물고둥, 소라, 진주담치, 굴)를 냉장상태를 유지하면서 실험실로 운반하여 균주 분리 실험을 진행하였다. 패류시료 중 패각이 손상되지 않은 것을 골라 멸균된 칼로 내용물을 200 g이 될 때까지 탈각하여, 멸균된 비커에 넣은 후 phosphate buffered saline (PBS; 2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) 200 mL를 부어 혼합한다. 혼합 후에 멸균된 blending cup에 넣어 blender (7011S, Waring, Torrington, CT)를 이용하여 90초 (low speed 30 s, high speed 60 s)동안 갈아준다. PBS로 10<sup>-1</sup>-10<sup>-2</sup>까지 희석한 용액 100 µL를 Rogosa 고체배지에 도말한 후, CO<sub>2</sub>치환하여 37°C에서 2일간 배양한다. 생성된 콜로니는 0.1% BCP가 들어있는 MRS 평판배지에 배양하여 동정용 균주로 사용하였다. 순수 분리된 균주는 MRS액체 배지에서 배양한 후 25% glycerol로 조성하여 -70°C에서 보관하며 동정과 생화학적 특성 시험에 사용하였다.

## 2.3. 분리균주의 동정

분리된 균주는 MRS 액체배지에서 37°C로 24시간 배양한 후 그람염색 [10]을 실시하여 위상차 현미경으로 형태학적 특성을 관찰하였다. 또한 분리한 균주의 생화학적 특성을 조사하기 위하여, A Laboratory Method in Food and Dairy Microbiology [11]와 The Prokaryotes [12]의 방법을 참고하여 실험을 실시하였다. Catalase test는 배양 평판에 3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 첨가한 후 O<sub>2</sub> 발생 유무를 관찰하였고, oxidase test는 콜로니를 비금속성 막대를 사용하여 슬라이드에 올려놓고 Kovac's reagent를 한 방울 떨어뜨려 변색여부를 관찰하였다. 최초 분리한 28균주의 동정을 위하여 API 50CHL kit을 사용하여 배지의 색변화를 관찰한 후, API web program (<http://apiweb.biomerieux.com>, Biomerieux)을 이용하여 동정하였다. D형 젖산을 가장 많이 생산하는 균주는 추가적으로 16S rRNA gene sequencing을 이용하여 분자 동정하였다.

## 2.4. HPLC를 이용한 젖산 생산량 분석

분리된 28종의 균주는 MRS 액체배지 5 mL에서 48시간 동안 정치 배양한 후, 배양액을 0.2 µm filter (Minisart, Satorius)를 사용하여 필터링하여 HPLC (Younglin, Korea)를 통해 L형과 D형의 젖산 생산량과 총 젖산 생산량을 분석하였다. 분석에 사용된 컬럼은 Chiralpak<sup>®</sup>MA (reverse phase type, 4.6 × 50 mm), 이동상으로는 2 mM CuSO<sub>4</sub>를 0.5 mL/min의 유속으로 이용하였고, UV 검출기로 254 nm에서 검출하였으며, 시료 주입량은 0.02 mL였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 패류에서 유산균 분리

인천 서해안에서 양식되는 돌조개 (*Arca avellana Lamarck* A), 동죽 (*Macrta veneriformis Reeve* M), 바지락 (*Tapes*

*phillipinarum* T), 갈색띠매물고둥 (*Neptunea arthritica cumingi* N), 소라 (*Turbo cornutus* C), 진주담치 (*Mytilus edulis* E), 굴 (*Crassostrea gigas* G) 등 총 6종에서 분리한 28개의 분리 균주에 대해서 형태학적 및 생리 화학적 특성을 조사하였다. 그람염색을 실시하여 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 모든 분리 균주들이 그람양성으로 나타났다. 분리 균주에 대한 여러 가지 형태학적 및 생리 화학적 특성을 조사한 결과는 Table 2에서 보여주는 바와 같다. 분리 균주 모두에서 catalase와 oxidase는 음성이었고, BCP가 들어있는 MRS배지에서 산을 생산하여 생성된 콜로니 주변이 노란색으로 변하는 등 젖산균의 일반적인 특징과 잘 일치하였다.

**Table 2.** Species distribution of lactic acid bacteria isolated randomly from shellfishes

Species	A	M	T	N	C	E	G	Total
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	0	1	0	2	1	0	7
<i>Lactobacillus brevis</i>	2	0	1	0	0	0	0	3
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	1	0	4	1	0	0	6
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	1	0	0	1	0	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0	0	0	0	1	1	3	5
<i>Lactobacillus salivarius</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Lactobacillus pentosus</i>	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0	0	0	0	0	1	0	1
Total	5	2	3	5	5	5	3	28

A: Isolated from *Arca avellana Lamarck*, M: Isolated from *Macrta veneriformis Reeve*, T: Isolated from *Tapes phillipinarum*, N: Isolated from *Neptunea arthritica cumingi*, C: Isolated from *Turbo cornutus*, E: Isolated from *Mytilus edulis*, G: Isolated from *Crassostrea gigas*.

### 3.2. 분리 균주의 동정

분리된 28종의 균주에 대하여 API 50CHL Kit을 이용한 실험 결과를 웹 프로그램을 통해 동정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 총 28개의 균주 중 A-3, 4, 5, T-1, E-3, C-1, 3의 7개 균주가 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었고, M-2, N-1, 3, 4, 5, C-5의 6개 균주가 *Lactobacillus delbrueckii*, E-2, G-1, 2, 4, C-4의 5개 균주가 *Leuconostoc mesenteroides*, A-1, 6, T-4의 3개 균주가 *Lactobacillus brevis*, T-2, E-1의 2개 균주가 *Lactococcus lactis*로 동정되었다. 그 외에는 E-4는 *Pediococcus pentosaceus*, E-5는 *Lactobacillus paracasei*, N-2는 *Lactobacillus pentosus*, M-1은 *Lactobacillus salivarius*, C-2는 *Lactobacillus fermentum*으로 각각 동정되었다. 28개의 균주 중 D형 젖산을 가장 많이 생산하는 E-3 균주의 경우 16S rRNA gene sequencing을 이용하여 추가 동정결과, API 50CHL Kit와 같이 *L. plantarum*으로 재확인 하였다.

### 3.3. 패류에서의 젖산균 종 (species)의 분포

패류에서 분리한 젖산균 28종을 동정한 결과를 토대로 하여 패류에서의 주요 젖산균의 종 분포를 살펴본 결과는 Table 2에 나타내었다. 돌조개에서 분리한 5주 중 *Lactobacillus brevis* 2주, *Lactobacillus plantarum* 3주가 동정되었다. 진

**Table 3.** Lactic acid productivities with lactic acid bacteria from shellfishes

strain No.	Species	L-form lactic acid concentration (g/L)	D-form lactic acid concentration (g/L)	Total lactic acid concentration (g/L)
A-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	6.5	4.3	10.8
A-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	10.3	8.8	19.1
A-4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	10.1	8.4	18.5
A-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	7.4	4.2	11.6
A-6	<i>Lactobacillus brevis</i>	8.8	4.4	13.2
M-1	<i>Lactobacillus salivarius</i>	9.8	1.1	10.9
M-2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	15.6	9.0	24.6
T-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	12.4	0.5	12.9
T-2	<i>Lactococcus lactis</i>	8.4	5.5	13.9
T-4	<i>Lactobacillus brevis</i>	11.6	0.8	12.4
E-1	<i>Lactococcus lactis</i>	10.5	0.2	10.7
E-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.2	0.4	1.6
E-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.2	20.0	22.2
E-4	<i>Pediococcus pentosaceu</i>	27.2	7.1	34.3
E-5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	30.0	4.4	34.4
N-1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	9.4	1.9	11.3
N-2	<i>Lactobacillus pentosus</i>	10.6	1.0	11.6
N-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	7.4	2.4	9.8
N-4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	9.9	1.3	11.2
N-5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	10.6	1.9	12.5
C-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	11.3	11.2	22.5
C-2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	17.8	2.9	20.7
C-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8.5	12.2	20.7
C-4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	13.2	0.6	13.8
C-5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	19.9	9.7	29.6
G-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	10.3	10.1	20.4
G-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	16.5	15.2	31.7
G-4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14.6	14.3	28.9

A: Isolated from *Arca avellana Lamarck*, M: Isolated from *Mactra veneriformis Reeve*, T: Isolated from *Tapes philippinarum*, N: Isolated from *Neptunea arthritica cumingi*, C: Isolated from *Turbo cornutus*, E: Isolated from *Mytilus edulis*, G: Isolated from *Crassostrea gigas*.

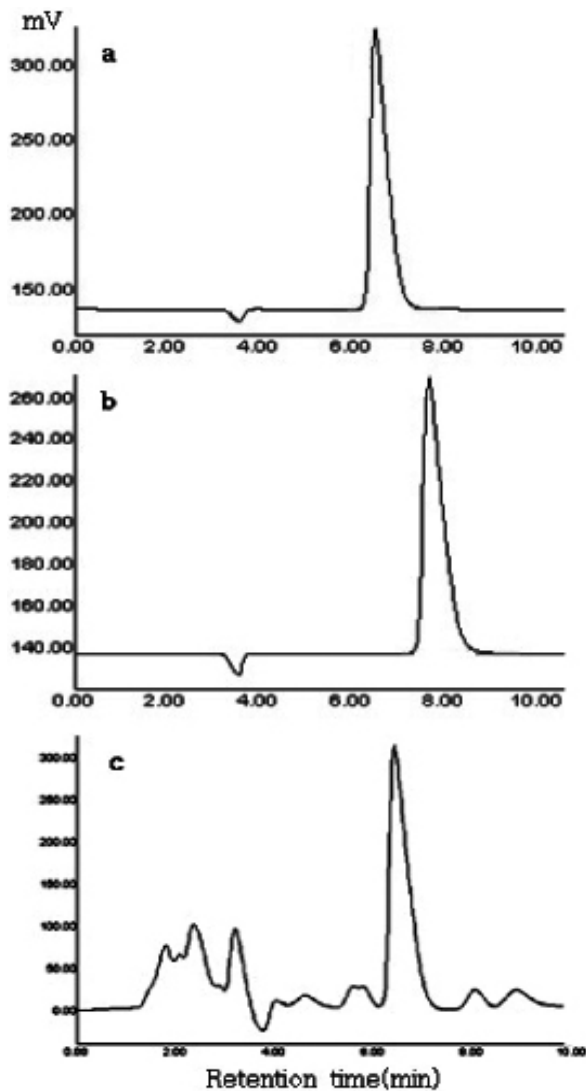
주담치에서 분리한 5주는 각각 1주씩 *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceu*, *Lactobacillus paracasei*로 동정되었다. 갈색띠매물고둥에서 분리한 5주 중 *Lactobacillus delbrueckii* 4주, *Lactobacillus pentosus* 1주가 동정되었다. 동죽에서 분리한 2주는 *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus delbrueckii*로 동정되었다. 바지락에서 분리한 3주는 *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*로 동정되었다. 소라에서 분리한 5주 중 *Lactobacillus plantarum* 2주, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii*가 각각 1주씩 동정되었다. 그리고 굴에서 분리한 3주는 모두 *Leuconostoc mesenteroides*로 동정되었다. Lee [9]의 연구 결과를 보면, 굴에서 분리한 젖산균의 분포에서 *Lactobacillus paracasei*가 가장 많았으며, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus johnsonii* 등이 분포하는 것을 확인할 수 있었다.

### 3.4. HPLC에 의한 총 젖산 생산량 확인

동정된 28주의 젖산균을 MRS 배지에서 배양하여, 대사물질로 배양액에서 생산되는 총 젖산량과 젖산의 형태별 생산량을 확인해 보았다 (Table 3). 총 젖산생산량을 중별로 보면,

*Lactobacillus plantarum*에 속하는 7주는 11.6-22.5 g/L, *Lactobacillus delbrueckii*에 속하는 6주는 9.8-29.6 g/L, *Lactobacillus brevis*에 속하는 3주는 10.8-13.2 g/L, *Leuconostoc mesenteroides*에 속하는 5주는 1.6-31.7 g/L, *Lactococcus lactis*인 2주는 10.7-13.9 g/L의 젖산을 생산하는 것을 확인할 수 있었다. Fu [13]의 연구결과를 보면, *Lactobacillus plantarum*은 37°C, pH 6에서 15-25시간 발효 후에 총 젖산이 10-12 g/L, Stenroos [14]의 연구에서는 *Lactobacillus delbrueckii*가 20시간 발효 후 L형의 젖산을 12 g/L, Garde [15]의 연구에서는 *Lactobacillus brevis*와 *Lactobacillus pentosus*에서 각각 19.0 g/L, 11.5 g/L의 젖산을 생산하는 것으로 알려져 있다. *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus pentosaceu*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentosus*로 동정된 균주들은 각각 10.9 g/L, 34.3 g/L, 34.4 g/L, 20.7 g/L, 11.6 g/L의 생산량을 나타냈으며, 대부분 L형의 젖산을 생산하고 있었다. Ko [7]의 연구에서 시판김치에서 분리 및 동정된 젖산균의 젖산생산 형태를 보면, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*에서는 L형의 젖산, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*에서는 D형의 젖산을 주로 생산하는 것으로 알려져 있으며, Sung [16]의 연구결과에서 *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc*

*mesenteroides*에서 D형 젖산이 주로 생산되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 패류로부터 분리·동정된 젖산균의 경우 균주에 따라서 차이가 있기는 하지만, 기존에 알려져 있던 젖산 생산량보다 많이 생산하는 균주들을 확인할 수 있었다. 28개의 균주 중 *Lactobacillus plantarum*으로 동정된 E-3 균주의 경우 D형 젖산을 20.0 g/L를 생산하여, 28개의 균주 중 D형 젖산 생산량이 가장 많았다 (Fig. 1). 또한 *Leuconostoc mesenteroides*으로 동정된 G-1, 2, 4의 3주는 D형 젖산이 10.1-15.2 g/L로 L형 젖산과 비슷한 생산량을 보이는 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 1.** Determination of the configuration of Lactic acid converted from pyruvate using HPLC equipped with a chiral column. (a) Standard sample of D-form lactic acid, (b) standard sample of L-form lactic acid, (c) D-form lactic acid production from E-3.

본 연구를 통해 자연계인 패류에서 젖산균을 분리하는 방법과 젖산의 형태별 생산량의 확인 결과자료는 차후 PLA의 기초 연구에 참고자료로 활용되길 기대하며, 지속적으로 자연계에서의 젖산균의 분리를 진행하도록 할 것이다.

#### 4. 결론

패류로부터 젖산을 생산하는 자연균주를 분리·동정하고, HPLC를 통해 생산되는 젖산량을 확인하고자 하였다. 분리된 균주는 MRS 배지에서 배양되었으며, 형태학적 관찰 및 생화학적 특성을 조사하였으며, API 50CHL kit를 통해 균주를 동정하였다. 분리된 28개의 균주를 동정한 결과, 7개 균주가 *Lactobacillus plantarum*, 6개 균주가 *Lactobacillus delbrueckii*, 5개 균주가 *Leuconostoc mesenteroides*, 3개 균주가 *Lactobacillus brevis*, 2개 균주가 *Lactococcus lactis*로 동정되었다. 그 외에 *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum*으로 각각 1 균주씩 동정되었다. 동정된 28균주를 배양하여 생산되는 젖산의 형태 및 젖산 생산량을 확인해 본 결과, 균주에 따라 차이가 있지만 1.6-34.4 g/L의 젖산을 생산하는 것을 확인하였다. 28균주 대부분은 L형의 젖산을 주로 생산하였으며, *Lactobacillus plantarum*으로 동정된 E-3 균주의 경우 D형 젖산을 20.0 g/L를 생산하여 D형 젖산 생산량이 가장 많았다. 또한 *Leuconostoc mesenteroides*으로 동정된 G-1, 2, 4의 3주는 D형 젖산이 10.1-15.2 g/L로 L형 젖산과 비슷한 생산량을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

차후 본 연구에서 D형 젖산을 주로 생산하는 진주담치에서 분리된 E-3균주에 대해 분자유전학적인 방법으로 젖산의 생산에 관여하는 lactate dehydrogenase (LDH) 유전자의 과발현을 진행하며, DL형의 젖산을 생산하는 균에서 분리된 G-1, 2, 4의 3균주에 대해서는 L형 젖산을 발현하는 유전자의 knock-out을 통해 D형 젖산의 생산량과 순도가 증가되는 것을 확인해 볼 것이다.

#### 감사

본 논문은 (주)현대엔지비와 인하대학교의 지원에 의하여 연구되었음.

#### References

1. Korea Biotechnology Industry Organization. Bio-product Market and Bio Technical Development Trend. <http://www.koreabio.org>. (2010).
2. Ikada, Y., K. Jamshidi, H. Tsuji, and S. H. Hyon (1991) Stereocomplex formation between enantiomeric poly (lactides). *Macromolecules*. 20: 904-906.
3. Fukushima, K., K. Sogo, S. Miura, and Y. Kimura (2004) Production of D-lactic acid by bacterial fermentation of rice starch. *Macromol. Biosci*. 4: 1021-1027.
4. Sandine, W. E., K. S. Muralidhara, P. R. Elliker, and D. C. England (1972) Lactic acid bacteria in food and health: a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *J. Milk Food Technol*. 35: 691-702.

5. Gilliland, S. E. (1990) *Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.* 87: 175-188.
6. Barbers, C. and S. Boris (2006) *Benson's Microbiological Applications (General microbiology, complete version)*. 10th ed., pp. 251-289. McGraw-Hill College, NY, USA.
7. Ko, J. L., C. K. Oh, M. C. Oh, and S. H. Kim (2009) Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Commercial *Kimchi*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 732-741
8. Kim, S. Y., J. D. Kim, J. S. Son, S. K. Lee, K. J. Park, and M. S. Park (2011) Biochemical and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 446-452.
9. Lee, H. I., M. H. Kim, K. Y. Kim, J. S. So (2010) Screening and selection of stress-resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). *Anaerobe*. 16: 522-526.
10. Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (1994) *Methods for general and Molecular Bacteriology*. pp. 31-32. American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
11. Cappuccino, J. G. and N. Sherman (1987) Biochemical activities of microorganisms. In *A Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. 2nd ed., pp. 125. The Benjamin Cummings Publishing Company, California, USA.
12. Rouff, K. L. (1992) The genus *Streptococcus*. In *The Prokaryotes*. 2nd ed., pp. 1450. Springer-Verlag, NY, USA.
13. Fu, W., and A. P. Mathews (1999) Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem Eng. J.* 3: 163-170.
14. Stenroos, S. L., Y. Y. Linko, and P. Linko (1982) Production of L-lactic acid with immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnol. Lett.* 4: 159-164.
15. Garde, A., G. Jonsson, A. S. Schmidt, and B. K. Ahring (2002) Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technol.* 81: 217-223.
16. Sung, H. G. (1999) *Isolation, identification and characterization of the lactate dehydrogenase-producing microorganism from nature for direct-fed microbials*. Ph.D. Thesis. University of SungKyunKwan, Suwon, Korea.