

Ca-Alginate에 고정화된 Calcium Carbonate를 완충제로 사용한 *Bifidobacterium longum*의 배양 증대와 저장 안정성

이기용, 유원규, 김지연, 허태련
인하대학교 생물공학과 식품생물공학실
(032) 860-7511, FAX (032) 875-0827

Abstract

Calcium carbonate (CaCO_3) bead immobilized with alginate were developed as buffer system to enhance the cultivation efficiency of bifidobacteria. When *Bifidobacterium longum* KCTC 3128 and HLC 3742 were independently cultivated in 2.5-liter fermenter buffered the CaCO_3 bead, NaOH, Na_2CO_3 , and NH_4OH . The proliferation of bifidobacteria and their storage stability were higher in culture broth buffered CaCO_3 beads than in culture broth buffered with NaOH, Na_2CO_3 , and NH_4OH . Therefore, CaCO_3 bead may be useful as a buffer to enhance of the cultivation efficiency and viability of bifidobacteria.

서론

Bifidobacteria를 비롯한 유산균들은 배양과정 중 당 발효 부산물로 생성되는 유기산에 의하여 배양액 내 pH가 낮아지게 되어 균 생장이 저해되고 사멸하게 된다. 일반적으로 유산균 배양에 이용되는 배양액들의 자체 완충능력은 배양액 내 pH를 조절하기에 충분하지 못하기 때문에 유산균의 고농도 배양을 위해서는 NaOH, KOH, NaCO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 또는 NH_4OH 등과 같은 알칼리용액을 지속적으로 첨가하여 주는 pH 조절 방법이 요구된다¹⁾. 그러나 이러한 중화제를 사용하는 pH 조절은 배양액내 이온강도를 지속적으로 증가시켜 균의 활력과 증식을 감소시킬 뿐만 아니라 첨가되는 중화제의 농도가 높을 경우 발효기의 교반시간과 pH 전극의 늦은 반응시간(response time) 등으로 인하여 배양액 내 큰 pH 변동과 국부적으로 높은 pH 상태를 유발하게 되고, 낮은 농도의 알칼리용액이 사용될 경우 많은 양의 알칼리 용액의 첨가로 배양액이 희석되므로 균의 생화학적 환경변화를 가져올 수 있다²⁾. 또한, Lloyd와 Pont³⁾는 유산균 배양시 완충제의 종류와 배양 조건이 증식한 균체량과 생존력에 영향을 주는 것을 보고하였다. 이에 본 연구는 CaCO_3 비드를 완충제를 사용한 bifidobacteria 배양과 Na_2CO_3 , NH_4OH , 그리고 NaOH 등과 같은 완충용액을 이용한 배양의 균 증식과 저장 안정성을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

CaCO₃ 비드의 제조는 sodium alginate가 2%(w/v)가 되도록 증류수에 넣고 교반기를 이용하여 녹인 후, CaCO₃를 15%가 되도록 첨가하여 교반해 주었고, CaCO₃가 혼합된 Na-alginate 콜로이드액은 혼합 콜로이드액을 100 mM CaCl₂ 용액에 떨어뜨려 직경이 1.53 mm가 되도록 비드를 제조하였다. 이와 같은 방법으로 제조된 CaCO₃ 비드는 증류수로 3회 세척한 후 사용하였다. Bifidobacteria 균주로는 한국인 분변으로부터 분리한 *Bifidobacterium longum* HLC 3742 균주⁴⁾와 한국 과학기술연구원 생물공학연구소에서 동결건조된 상태로 분양 받은 *B. longum* KCTC 3128 균주를 각각 0.5% glucose와 0.05% L-cysteine HCl이 들어있는 10 ml trypticase-proteose peptone-yeast extract 액체배지에 2%(v/v) 접종하여 37°C에서 16~24시간 3회 혐기적으로 계대배양하여 균을 활성화시킨 후 사용하였다. *B. longum* KCTC 3128은 유전공학 연구소로부터 분주 받았으며, *B. longum* HLC 3742 균주는 한국인 분변으로부터 분리된 균주로 완충제 종류에 따른 bifidobacteria 배양은 20% Na₂CO₃, 20% NH₄OH, 그리고 2 N NaOH 용액을 이용하여 TPY 배양액내 pH를 5.5가 되도록 조절하면서 37°C에서 100±10 rpm으로 교반하여 배양하였고, CaCO₃를 완충제로 사용한 배양은 배양액의 30%에 해당하는 CaCO₃ 비드를 첨가하여 150±10 rpm으로 교반하여 배양하였다. 완충제 종류에 따른 bifidobacteria 배양액의 안정성 평가는 배양액의 균체량이 최고에 달하였을 때 균체를 취하여 4°C 냉장고에 6 개월간 저장한 후 배양액 내 생균수 변화를 조사하였다.

결과 및 고찰

CaCO₃ 비드를 완충제로 사용한 bifidobacteria의 회분식 배양과 Na₂CO₃, NH₄OH, 그리고 NaOH 등과 같은 완충용액을 이용하여 배양액내 pH를 연속적으로 5.5로 조절한 회분식 배양을 비교 검토하기 위하여 우량 선별 분리균주인 *B. longum* HLC 3742 균주와 비교 선별균주인 *B. longum* KCTC 3218 균주를 완충제 종류별로 배양한 결과 Table 1에서와 같이 완충제 종류에 따라 다양한 증식도를 나타내었다. HLC 3742 균주와 KCTC 3128 균주 모두에서 NaOH를 완충제로 사용한 경우가 가장 낮은 증식도를 나타내었고, Na₂CO₃, NH₄OH, 그리고 CaCO₃ 비드를 완충제로 사용한 순서로 높은 증식도를 나타냈다. 특히 NH₄OH를 완충제로 사용한 경우 최대 균체량을 얻기까지 걸리는 시간이 CaCO₃ 비드를 완충제로 사용한 경우보다 빠름에도 불구하고 최대 균체량에서는 CaCO₃ 비드를 완충제로 사용한 경우보다 약 14~

Table 1. Comparison of various buffer systems

Bifidobacteria	Buffer	pH	Max. growth time (hr)	Max. growth (O. D. ₆₀₀)	Viable cell counts (cfu/ml)
<i>B. longum</i>	NaOH	5.50	16	6.74	4.0×10^9
	Na ₂ CO ₃	5.50	18	13.21	6.7×10^9
ATCC 15707	NH ₄ OH	5.50	16	12.16	6.1×10^9
	CaCO ₃	5.02	20	14.52	7.1×10^9
<i>B. longum</i>	NaOH	5.50	16	8.41	4.8×10^9
	Na ₂ CO ₃	5.50	18	13.31	7.2×10^9
HLC 3742	NH ₄ OH	5.50	16	12.98	7.0×10^9
	CaCO ₃	4.97	18	15.14	8.2×10^9

Table 2. Stability of *Bifidobacterium longum* HLC 3742 and KCTC 3128 cultivated in various buffer systems during storage at 4°C for 6 months

Bifidobacteria	Buffer	Storage time				Survival percentage (%)
		0		6 months		
		pH	Viable cell counts (cfu/ml)	pH	Viable cell counts (cfu/ml)	
<i>B. longum</i>	NaOH	5.50	4.0×10^9	5.31	1.1×10^8	2.75
	Na ₂ CO ₃	5.50	6.7×10^9	5.35	9.6×10^7	1.43
ATCC 15707	NH ₄ OH	5.50	6.1×10^9	5.17	4.3×10^6	0.09
	CaCO ₃	5.02	7.1×10^9	4.62	1.9×10^9	26.76
<i>B. longum</i>	NaOH	5.50	4.8×10^9	5.35	1.4×10^8	2.91
	Na ₂ CO ₃	5.50	7.2×10^9	5.41	9.2×10^7	1.28
HLC 3742	NH ₄ OH	5.50	7.0×10^9	5.23	6.1×10^6	0.09
	CaCO ₃	4.97	8.2×10^9	4.75	2.8×10^9	34.15

15% 정도 적었고, Na₂CO₃를 완충제로 사용한 경우는 최대 균체량에서 CaCO₃ 비드를 완충제로 사용한 경우보다 약 6~12% 적은 것으로 조사되었다. 완충제별로 두 균주의 증식도를 비교해 보면 HLC 3742 균주가 4 종류의 완충제에서 KCTC 3128 균주보다 높은 증식도를 나타내고 있어 HLC 3742 균주가 KCTC 3128 균주보다 증식도에서 우수한 균주임을 확인할 수 있었다. 이와 같이 완충제를 달리하여 배양한 bifidobacteria 배양액을 4°C 상태에서 6 개월 동안 저장한 후 배양액내 생균수를 조사한 결과 Table 2와 같이 CaCO₃ 비드를 완충제로 사용한 HLC 3742 균주와 KCTC 3128 균주 배양액의 경우 저장 초기 생균수의 약 34%와 27% 정도가 생존한 것으로 나타나 다른 완충제를 사용한 경우보다 높은 안정성을 보였으며, NaOH

를 사용한 경우는 2.9%와 2.8%의 생존율을 Na_2CO_3 를 사용한 경우는 약 1.3%와 1.4%의 생존율을 NH_4OH 를 완충제를 사용했을 경우에는 각각 보다 낮은 0.09%를 나타내어 Na_2CO_3 와 NH_4OH 완충제는 NaOH 보다 증식면에서 우수하였으나 저장에 따른 안정성 측면에서는 오히려 나쁜 것으로 나타났다. 그러므로 bifidobacteria의 효과적인 고농도 회분식 배양을 하기 위해서는 Na_2CO_3 , NH_4OH , 그리고 NaOH 등과 같은 완충용액을 이용하는 것보다 CaCO_3 비드를 완충제로 이용하는 것이 더 바람직하다고 사료되었다.

요약

Bifidobacteria의 배양효율을 증대하기 위하여 완충제로써 CaCO_3 를 Ca-alginate에 고정화한 비드를 제조하여 사용하였다. *B. longum* KCTC 3218과 한국인 분변에서 분리한 *B. longum* HLC 3742 균주를 CaCO_3 비드, NaOH , Na_2CO_3 , NH_4OH 등을 완충제로 각각 사용한 2.5-liter 발효기에서 각각 배양하여 균 증식과 저장에 따른 생존력을 조사한 결과 CaCO_3 비드를 완충제로 사용한 경우가 다른 완충제를 사용한 경우보다 균 증식과 저장 안정성에서 효과적임을 알 수 있었다. 따라서 완충제로써 CaCO_3 비드는 bifidobacteria의 고농도 배양과 생존력 증대에 유용할 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Venkatesh, K.V., M.R. Okos and P.C. Wankat. "Kinetic model of growth and lactic acid production from lactose by *Lactobacillus bulgaricus*." (1993) Proc. Biochem., 28, 231-241.
2. Open, U. and P. Thames. "The effect of pH on growth. In in vitro cultivation of microorganisms." (1992) Butterworth-Heinemann Ltd., Linacre House. Jordan Hill, Oxford. 35-36.
3. Lloyd, G.T. and E.G. Pont. "Some properties of frozen concentrated starters produced by continuous culture." (1973), Dairy Research., 40, 157-167.
4. Lee, K.Y. and Heo, T.R. "Identification of *Bifidobacterium* strains at the genus level by thin layer chromatographic determination of organic acids with culture broth of isolated bacteria strain from human feces." (1998) Food Sci. Biotechnol., 7(2), 95-99.