

## Enhanced production in recycle fed-batch cultivation by *Lactic acid bacteria* Isolated from Kimchi

Lim Joe, Kyu Hyuk Kwun, Hae Choon Chang<sup>1</sup> and Jung Heon Lee

Department of Chemical Engineering, Chosun University

<sup>1</sup>Department of food and nutrition, Chosun University

Tel : +82-62-230-7259, Fax : +82-62-230-7226

### Abstract

A process for efficient recycle fed-batch culture was carried out to increase cell mass and spore production by Lactic acid bacteria isolated from Kimchi. A large quantity of cell mass obtained by feeding concentration of sugar in recycle fed-batch culture. When the high density of salt was created that the cell mass was come-down. In this study, cultured in different feeding concentration of sugar conditions. Lactic acid bacteria by recycle fed-batch culture was investigated in 2L working volume of fermenter, obtained the maximum cell mass was 15.17g/L.

*Keywords:* recycle fed-batch culture, *Lactic acid bacteria*, Sugar feeding

### Introduction

유산균(Lactic acid bacteria)은 포도당 또는 유당과 같은 탄수화물을 분해하여 유산(젖산)이나 초산과 같은 유기산을 생성하는 균이다. 또한 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물중의 한 종으로서 그 이용은 오랜 역사를 갖고 있다. 인류는 19세기 Pasteur에 의하여 유산균의 실체가 밝혀지기 훨씬 이전부터 각종 발효식품, 장류, 주류, 김치, 의약품, 가축사료 등에 이르기까지 생활에 광범위하게 활용해 왔다.<sup>1)</sup> 이들은 낮은 pH 및 혐기성조건하에서 당류를 발효해서 다량의 젖산을 생성하지만 생육에 많은 종류의 영양물질을 요구하는 특성을 가지고 있다.<sup>2)</sup> 이들 유산균은 발효가 진행될 때 부가적으로 미량의 방향물질을 생산하여 맛과 풍미를 향상시켜 주며<sup>3)</sup> 또한 protease, lipase 등의 효소를 생산하여 유제품의 숙성을 돕는다. 현재 밝혀진 유산균은 300~400여 종이며 그중에서도 김치유산균은 우리가 많이 다루고 있는 균이다.<sup>4)</sup>

김치유산균은 김치에 존재하는 균으로서 그 숫자는 그램당 10억 이상 존재한다. 김

치 중에 들어있는 많은 종류의 유산균들은 주로 glucose, maltose를 분해하는 유산균으로 간균형태의 *Lactobacillus plantarum*과 쌍연쇄상구균의 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Pediococcus*속 등이 많이 있다. 김치의 맛을 살리는데 있어서 유산균의 작용이 아주 크다. 일반적으로 유산균은 장내(腸內)에서 각종 세균총과 더불어 증식하고 여러 가지 영양소를 생합성하는 것으로 알려져 있다. 그 외에 생리 적 효과로는 장내의 부패성 세균의 증식을 억제하고 장내 유해물질의 특성을 제거시켜주며 영양소로써는 비타민B 복합체를 주로 생성함과 동시에 혈중 콜레스테롤치 저하와 항암작용, 면역증강작용 등에도 커다란 효능이 있는 것으로 보고되어 있다. 또한 유산균이 생성하는 유산과 초산은 장(腸)의 연동운동을 촉진시켜 주며 장내의 pH를 낮추어 변(便)의 완충작용으로 변비(便秘)를 개선하는 효과도 있는 것으로 알려져 있다. 김치유산균에 관련된 연구도 많이 진행되고 있는 동시에 대량 생산을 위한 유가식 배양도 많이 사용되고 있다. 유가식 배양은 배양액 중의 기질농도를 적당한 값으로 유지시켜 균주의 증식 또는 대사산물의 생산을 유지시키는 데에 필요한 양을 공급함으로써 효율 좋은 발효생산을 행하는 데에 적합한 배양방법이다. 본 연구에서는 김치 유산균을 이용하여 유가식 배양조건 변화에 따른 세포의 성장 특성을 알아보았다.

## Materials and methods

### 1) 균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 김치에서로부터 기능성 고분자를 생산하는 *Lactic acid bacteria*이고 MRS배지에서 2주 간격으로 계대배양하면서 실험에 사용하였고 균주의 오랜 보관을 위해서 동결건조방법을 사용하였다. 균주 배양을 위한 배지의 조성은 Yeast extract 5g/L, Peptone 10g/L, Sugar 20g/L, Ammonium citrate 2g/L, Sodium acetate 5g/L, Magnesium sulfate 0.1g/L, Manganese sulfate 0.1g/L, Dipotassium phosphate 2g/L이었고 20배 농축배지를 만들어서 일정한 속도로 주입하여 유산균 성장을 알아보았다.

### 2) 배양조건 및 유가식 배양

플라스크 배양에 사용된 접종원은 300ml 플라스크를 2개를 준비하여 배지를 각각 100ml씩 만들어 pH 6.5로 하고 121°C에서 15분간 살균하여 균을 접종한 후 30°C shanking incubator(Dongyang Scientific Co.)에서 12시간 진탕배양(100rpm)하여 사용하였다. 본 배양에서는 접종비의 10%인 200ml의 전배양액을 접종하였고 유가식 배양

은 5L 발효기(Hanil Scientific Co.)에서 working volume 2L로 하여 온도는 30°C, 교반속도는 100rpm~200rpm, 통기량은 1.0으로 변화를 주어 배양을 실시하였고 탄소원을 측정하여 탄소원 농도감소와 함께 유기식 배양을 하여 농축배지를 일정한 속도로 주입하였다. pH는 1N HCl과 5N NaOH로 조절하였다.

### 3) 분석 방법

부동한 조건에서 유산균의 성장조건을 알아보기 위하여 처음에는 4시간 간격으로 sample를 각각 1ml씩 취하여 UV-vis 흡광광도계(Dong-il SHIMADZU)를 이용하여 파장 600nm에서 O.D(optical density)를 측정하였고 나머지 1ml로는 1.5ml micro-tube에 담아 1,2000rpm에서 10min 원심분리한 후 상등액은 버리고 분리된 세포를 증류수로 3회 세척하여 50°C에서 24hr 건조시켜 건조 중량을 측정하였다. 6시간 간격으로 sample를 취하여 위의 방법과 마찬가지로 흡광도와 전체량을 측정하였다. HPLC를 이용하여 유기산을 측정하는 방법은 이미 사용되어 왔다. 본 연구에서 생성된 각종 산과 탄소원 농도는 HPLC(Dong-il SHIMADZU)분석기기를 통하여 분석하였다.

### Results and discussions

본 연구에서는 발효가 시작하여 4시간 동안 회분식 배양을 진행하였고 8시간 지난 후에는 탄소원 농도가 4g/L로 되어 균 성장을 유지하기 위하여 농축 기질을 일정한 속도로 첨가하면서 유기식 배양을 진행하였다.

아래 그림1은 20배 농축배지를 기질로 유기식 배양을 하였을 때 시간에 따른 Sugar 농도, 전체량 농도 등의 변화를 보여주고 있다.

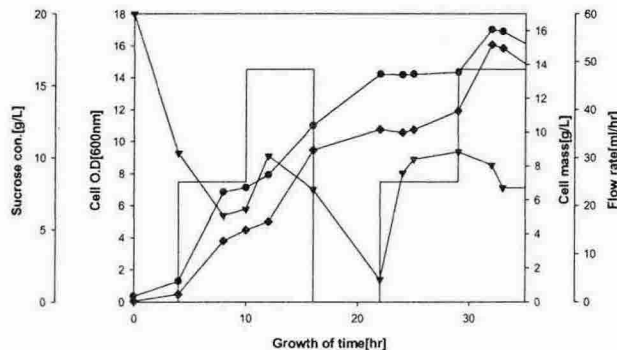


Fig 1. Time course of recycle fed-batch culture.

●●● : Cell O.D.[600nm] ■ ■ ■ : Cell mass[g/L] ▲▲▲ : Sucrose con.[g/L] ---: flow rate

22시간동안 유가식 배양을 진행한 후 products 500ml를 빼내고 다시 농축배지 500ml를 일정하게 공급하여 32시간 지나서 건체량을 최고로 15.17g/L 생성되었다. 36시간 이후부터는 고염농도의 영향으로 균체의 성장이 감소되기 시작하였다. 전체적인 배양과정에 5N NaOH용액을 100ml 소모되었다.

#### References

1. Carr, J. G. (1975), Lactic acid bacteria in beverages and foods, Academic Press, New York.
2. Sharpe, M. E. (1979), Lactic acid bacteria in the dairy industry, J. Soc. Dairy Technol, 32, 9-18.
3. J.C.DeMan, M.Rogosa, M.E.Sharpe, A medium for the cultivation of *Lactobacilli*, J. Appl. Bacteriol. 23(1960) 130-135.
4. D.M.Bai, M.Z.Jia, X.M.Zhao, R.Ban, F.Shen, X.G.Li, S.M.Xu, L(+)-lactic acid production by pellet form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor, Chem.Eng.Sci. 58(2003) 785-791.