

Cross-flow filtration에 의한 *Bifidobacterium longum*의 고농도 배양

이명석 · 박연희^{1*}

이주대학교 산업대학원 생물공학과, ¹이주대학교 화학 · 생물공학부

초록 : *Bifidobacterium longum*을 고농도 배양하기 위하여 최적 생육 조건을 조사하고 cross-flow filtration으로 생육 저해 대사산물인 lactic acid와 acetic acid를 제거하면서 균체 순환 배양을 사용하였다. 회분 배양에서는 탄소 원으로 glucose를 50 g/l의 농도로 사용하고 초기 pH 6.5인 경우 생육이 가장 높았다. *B. longum*을 cross-flow filtration으로 12시간 배양한 결과, 회석속도 0.31 h⁻¹에서 최대 균체농도에 도달하여 16.4 g/l의 건조균체량을 얻었으며 이로써 회분 배양시 보다 약 4배 높은 균체를 생산하였다.(1996년 11월 11일 접수, 1996년 12월 19일 수리)

서 론

*Bifidobacterium longum*은 모유영양아가 인공영양아에 비해 전염병에 대한 저항성이 높다는 임상학적 관찰에 의하여 의학적 관심이 높아졌으며 이는 모유영양아의 장내 균총들 중에서 우세하게 나타나는 *Bifidobacteria*가 lactic acid와 acetic acid 등을 생성하여 pH를 저하시켜 유해미생물의 증식을 억제하며 독성 amine의 생성 억제, phosphoprotein phosphatase 작용에 의한 모유의 α -casein의 소화 촉진 및 발암성 *N*-nitrosamines의 분해 등의 기능에 기인하는 것으로 보고되었다.^{9,12,16} 또한 Tamura¹⁷은 *Bifidobacteria*가 인간의 장내세균들 가운데서 건강에 유익한 존재로 인식되고 있으며, 사람의 장내에서 올리고당과 비타민 B₁, B₂를 합성하고 항균성 물질 등을 생성하여 장내 유해균 및 외부 침입균의 증식을 억제하므로써 장내 부패를 방지한다고 연구보고 하였다. Hidaka,⁸ Mitsuoka¹⁰ 등은 *Bifidobacteria*가 숙주의 면역 기능을 자극하여 감염에 대한 저항성을 증진시키고 생성된 유기산이 장관을 자극하여 연동 운동을 항진시키며 소화 흡수를 촉진시키는 등의 유익한 작용을 하는 것으로 보고하였다. 이러한 연구 결과를 토대로 *Bifidobacteria*는 대표적 probiotic으로 식품과 의약품에 널리 이용되고 있으며 국내에서도 이미 *Bifidobacteria*를 첨가한 각종 유제품이 개발되어 그 산업적 수요가 증가하고 있어 *Bifidobacteria*의 고농도 배양이 필요한 실정이다.

그러나, *Bifidobacteria*는 완전 혐기성 세균으로 최적 온도 37~41°C, 최적 pH는 6.5~7.0이며, 환원당으로부터 acetic acid와 lactic acid를 3 대 2의 비율로 생산하는 특성⁴을 가지고 있어서 보통 회분배양을 할 경우 배양 중에 형성되는 독성 대사산물 즉, acetic acid나 lactic acid에 의해서 크게 저해를 받으므로 배양액 내에서 성장이 극히 제한적이다. 그러므로, 최근에는 반응기내의 미생물 농도를 높게 유지하기 위하여 반응기 외부에 막등을 설치하여 미생물을 분리하여 반응기 내로 미생물을 재순환시키는 방법을 사용하기에 이

르렀다. 이러한 방법을 이용하여 Ohleyer 등¹⁵은 *Lactobacillus delbrueckii*을 발효 시 배양 중에 형성되는 lactic acid를 cell recycle reactor를 사용하여 연속적으로 제거하므로써 고농도 배양을 가능케 하였고 Nishizawa 등^{13,14}은 알콜 발효에서 microfiltration 장치로서 hollow fiber module을 이용하여 미생물의 농도를 증가시켰다. 그러나 microfiltration은 열에 안정하지 못하고, ultrafiltration module은 high filtration flux 생산에는 적합하지 못하다.

따라서 본 연구에서는 물리적 강도가 높고 고온이나 화학물질에 매우 안정하여 멸균과 재사용이 가능한 ceramic microfilters를 이용하여 *Bifidobacterium longum* 배양에서 문제가 되는 lactic acid나 acetic acid를 효과적으로 제거하면서 균체 재순환식 연속배양하므로써, 최근 산업적 수요가 급증하고 있는 *Bifidobacterium longum*의 고농도 배양방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707로서 혐기적 조건에서 BL agar medium¹¹에 2회 계대 배양하여 사용하였다. BL medium의 조성은 Table 1과 같다.

배양 방법

전 배양 방법으로 실험균주 한 백금이를 BL broth 배지가 들어 있는 250 ml 삼각플라스크에 접종한 후 N₂ 가스로 산소를 완전히 제거한 다음 silicon rubber로 막아 외부와의 공기 접촉을 차단시켜 혐기적 상태를 유지시키면서 37°C에서 16~20시간 계대 배양 후 working volume이 5 l인 jar fermenter(Bioflo II, NBS, USA)에 2% 접종하고 pH는 4M 농도의 NaOH 용액을 이용하여 pH 5.5로 일정하게 유지시키면서 37°C에서 20시간 배양하였다. 배양중 발효조내

찾는말 : high cell density, *Bifidobacterium longum*, cell recycle, cross-flow filtration

*연락처자

Table 1. Composition of BL agar medium

Ingredients	Contents
Beef extract	2.4 g
Proteose peptone	10.0 g
Bacto-casitone	5.0 g
Bacto-soytone	3.0 g
Yeast extract	5.0 g
Starch, soluble	0.5 g
Glucose	10.0 g
Solution A ¹	10.0 ml
Solution B ²	5.0 ml
Toray silicone S75535 (10% soln.)	5.0 ml
Tween 80	1.0 g
L-cystein · HCl · H ₂ O (5% soln.)	10.0 ml
Distilled water	970.0 ml

¹Dissolve 25 g of KH₂PO₄ and 25 g of K₂HPO₄ in distilled water, and make up to 250 ml of solution ²Dissolve 10 g of MgSO₄ · 7H₂O and 0.5 g of FeSO₄ · 7H₂O, 0.5 g of NaCl and 0.337 g of MnSO₄ in distilled water, and make up to 250 ml of solution

에 혐기적 상태를 유지시키기 위하여 0.1 vvm의 N₂ 가스를 공급하였고 cross-flow filtration은 발효중 lactic acid와 acetic acid가 많이 축적되는 대수기 후반기에 filtration을 시작하였다.

Cross-flow filtration에 의한 연속배양

연속배양에는 cross-flow filtration system을 이용한 균체 재순환식 발효조를 사용하였다(Fig. 1). 발효조에 ceramic filter를 연결하고 peristaltic pump에 의하여 발효액이 순환되면서 균체를 재순환 하였고, 발효 생성물은 막을 통해 연속 제거되도록 하였다. Ceramic filter는 pore size가 1.2 µm, 직경 840×2.7 mm인 ceramic을 재질로한 multi-hole type(17 holes)으로 Milipore사 제품을 사용하였다. 배양온도는 37°C, 교반속도는 150 rpm으로 하였고, pH는 4M NaOH로 6.5가 일정하게 유지되도록 자동 조절하였으며 0.1 vvm의 N₂ 가스를 공급하여 발효조내의 혐기적 상태를 유지시켰다. 한편 cross-flow filtration을 위하여 처음에는 회분식 배양을 수행하다가 8시간 이후부터는 배양액을 분당 10 l의 속도로 통과시키면서 연속배양으로 전환하는 방법을 사용하였고, 발효 생성물이 막을 통해 제거되는 만큼 feeding pump를 통해 새로운 배지를 연속 공급하므로써 working volume을 5 l로 일정하게 유지시키면서 배양하였다.

세포 농도 측정

세포의 농도는 spectrophotometer(Varian DMS 200, U.S.A)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 보정곡선으로부터 결정하였고, 건조균체량은 배양액을 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 증류수로 3번 세척후 105°C에서 항량에 도달할 때까지 건조한 후 측정하였다.

생균수 측정

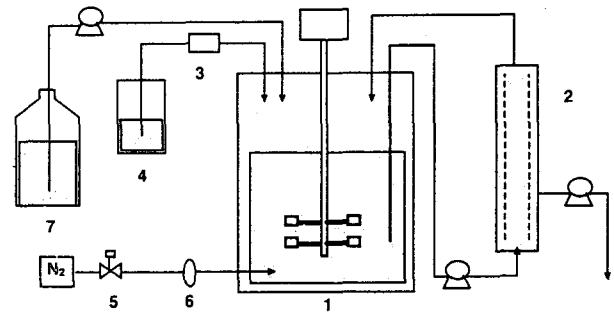


Fig. 1. Schematic diagram of continuous culture system with cross-flow filtration unit. 1. fermenter 2. ceramic filter 3. pH controller 4. 4N NaOH 5. solenoid valve 6. air filter 7. feed tank.

생균수 측정을 위한 회석액은 Bryant와 Burkey의 방법³⁾에 의하여 조제하였고, 배지는 BL agar plate를 사용하여 Gas Pak anaerobic jar(BBL)내에서 37°C로 48시간 배양하여 나타난 colony수를 측정하였다.

분석 방법

Glucose, lactic acid 및 acetic acid의 분석은 배양액을 15,000 rpm으로 10분간 원심 분리 한 후 상등액을 membrane filter(pore size 0.45 µm)로 여과하여 high performance liquid chromatography로 분석하였다.^{1,2,5)} Glucose 분석은 J&W사의 accuapere amino column을 50°C로 유지시키고 acetonitrile과 water를 80 : 20으로 혼합한 용액을 이동상 용매로 사용하여, RI detector(Varian RI-4)로 검출하였다. Lactic acid와 acetic acid는 30°C로 유지시킨 Varian사의 amino tag column에 H₃PO₄로 pH를 2.5로 조절 한 0.1M ammonium phosphate를 이동상 용매로 사용하여 210 nm에서 검출하여 측정하였다.

결과 및 고찰

회분배양

Bifidobacterium longum 발효 시 저해 대사산물의 축적으로 인한 pH 변화와 미생물 성장과의 관계를 알아보기 위하여 배양온도 37°C에서 pH를 조절하지 않고 회분배양을 실시한 결과 미생물의 성장과 pH 변화는 Fig. 2와 같았다.

회분배양 결과 pH 변화는 lactic acid와 acetic acid의 축적으로 인하여 배양 초기에는 서서히 떨어지다가 대수기 중기부터는 급격히 낮아져 배양 종료기에는 약 pH 4까지 떨어졌다. 이로 인해 미생물의 성장은 대수기 기간이 아주 짧았으며 배양을 시작한지 약 8시간 이후부터는 미생물의 성장이 둔화되어 12시간만에 정상기에 도달하였다. 또한 최종 건조 균체량은 0.86g/l이었으며 생균수는 1.2×10⁸ cells/ml로 매우 낮은 수준이었다.

회분식 배양의 최적조건

*Bifidobacterium longum*을 배양하여 고농도의 균체를 얻기 위하여 균체 성장에 있어서 기본적으로 중요한 영향을

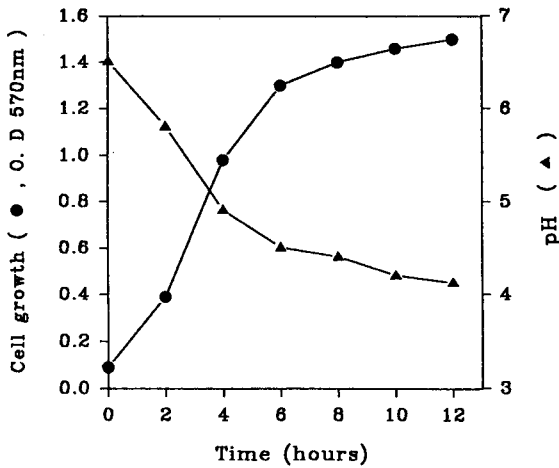


Fig. 2. Changes of cell growth and pH in batch culture of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 in BL broth at 37°C.

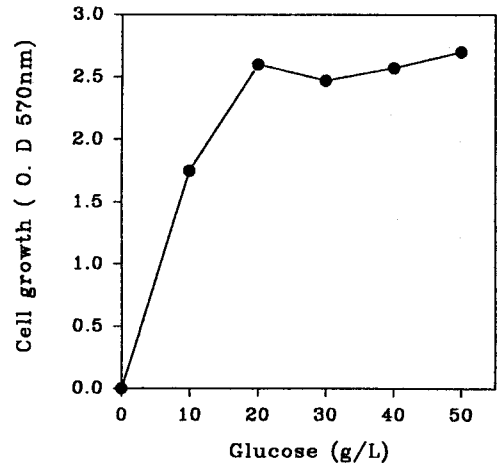


Fig. 4. Effect of glucose concentration on the growth of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 at 37°C. Cell growth was determined after 20 hours of culture.

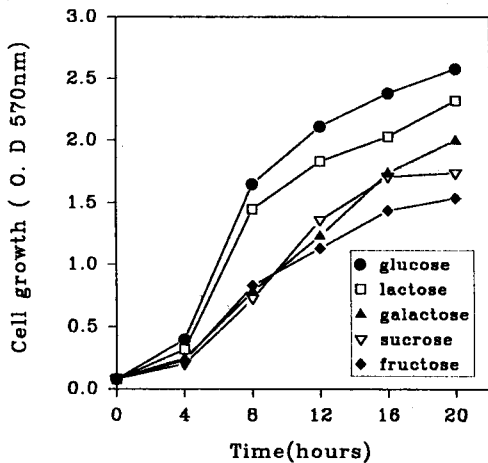


Fig. 3. Growth of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 on different carbohydrates at 37°C. *B. longum* ATCC 15702 was cultivated on BL broth containing 2% of each carbohydrate.

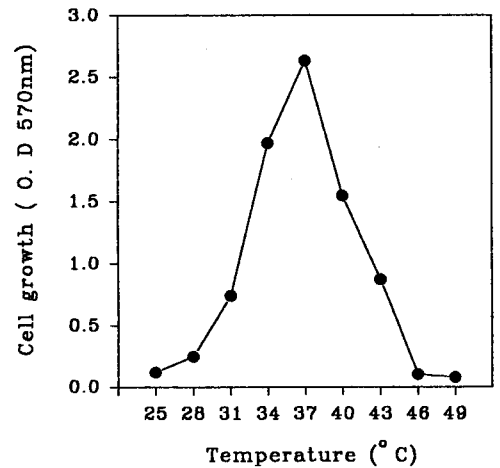


Fig. 5. Effect of temperature on the growth of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 at a concentration of 50 g/l of glucose. Cell growth was determined after 20 hours of culture at pH 7.0.

미치는 탄소원, 탄소원의 농도, 배양온도 및 pH에 대한 최적 균체 생산 조건을 확립하기 위하여 회분식 배양을 실시하였다.

탄소원 및 농도의 영향

기본배지에 2%의 glucose, lactose, galactose, sucrose 및 fructose를 각각 첨가하여 배양한 결과 lactose를 사용했을 경우 glucose 다음으로 생육이 우수하였다. 그러나, galactose, sucrose, fructose의 경우는 생육속도가 glucose나 lactose에 비하여 떨어지는 것으로 나타났으며, total cell growth도 적었다(Fig. 3). 이 결과는 강¹⁸⁾이 보고한 당의 첨가에 따른 *B. longum*의 균체 증식에 관한 연구 결과와 일치하였다. 그러나 본 실험에 있어서 glucose가 lactose에 비해 균체 증식이 높게 나타난 것은 사용 균주의 특성에 기인한 것으로 추정된다.

균체증식에 가장 적합한 탄소원으로 glucose의 농도를 0.5~5%의 수준으로 첨가하여 20시간 배양 후 최종 균체증식을 측정된 결과(Fig. 4), 2% 이하에서는 탄소원의 고갈로

균체 증식이 현저히 낮았고, 2~5% 사이에서는 거의 비슷한 수준의 균체증식 효과가 있었으나 5%에서 가장 높게 나타났으며, 더 높은 농도에서는 그 이상의 균체증식 효과는 없었다. 따라서 *B. longum*의 최적 탄소원의 농도는 5%로 결정하였다.

배양온도의 영향

최적 탄소원의 농도와 초기 pH 7.0으로 조절된 배양액의 온도 25~49°C 사이에서 3°C씩 변화시켜 배양한 결과, 37°C에서 균체증식이 가장 높게 나타났으며 이는 *B. longum*이 자라는 장내 온도와 일치하는 결과였으며 46°C 이상에서와 25°C 이하에서는 균의 증식이 관찰되지 않았다(Fig. 5).

pH의 영향

회분배양에서 *B. longum*은 배양액내의 독성 대사산물인 lactic acid와 acetic acid의 영향으로 인한 pH 감소로 성장

Table 2. Effect of pH on growth of *B. longum* at a concentration of 50 g/l of glucose at 37°C for 20 hrs

pH	specific growth rate (μ_{max})	viable cell count (cells/ml)	dry cell weight (g/l)
6.0	0.28	2.6×10^9	2.86
6.5	0.34	1.4×10^{10}	3.90
7.0	0.37	3.2×10^9	3.35

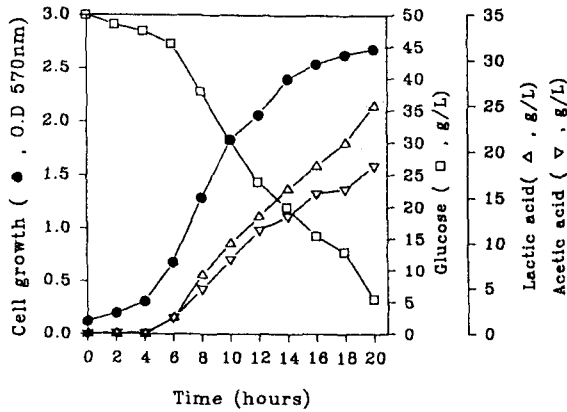


Fig. 6. Changes of cell growth, glucose, lactic acid and acetic acid during batch culture of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 at optimum conditions. Batch culture was carried on BL broth containing 50 g/l of glucose at 37°C. pH of culture broth was maintained at pH 6.5.

이 극히 제한적인 것을 알 수가 있었다. 따라서 배양중 pH가 낮아지는 것을 방지하기 위하여 4M 농도의 NaOH 용액으로 pH를 일정하게 유지시키고 pH를 6.0~7.0 사이에서 0.5씩 변화시켜 가면서 회분배양을 실시하였다. Table 2는 각 pH에서의 비 성장속도, 최대 성장속도, 생균수 및 최종 건조 균체량을 나타내었으며 회분배양 결과 최적 균체 증식 pH는 6.5로 나타났다.

탄소원 종류와 농도, 배양 온도 그리고 pH에 대한 최적 배양 조건을 구한 결과를 조합하여 *B. longum*을 회분 배양한 결과(Fig. 6), 최종 건조 균체량은 4.1 g/l로 pH 조절 없이 배양한 것에 비해 약 5배 정도 증가량을 보였다. 한편 시간 변화에 따르는 lactic acid 농도의 변화는 acetic acid와 거의 같은 농도로 증가하였으며 대수기 후반부터는 많은 양이 축적되어 상대적으로는 미생물의 성장이 급속한 감소 현상을 보였는데 이는 lactic acid나 acetic acid 축적으로 인하여 저해 받기 때문이며, non-growth phase에서 glucose가 계속 소비되는 것은 미생물의 maintenance energy로서 이용되기 위해 필요하기 때문으로 추측된다.

Cross-flow filtration에 의한 연속 배양

회분배양에서 생육을 저해하는 대사산물인 lactic acid와 acetic acid를 제거하여 *B. longum*을 고농도로 배양하기 위하여 cross-flow filtration을 이용하여 균체를 재순환하면서 연속배양을 시도하였다. 배양 초기에는 회분 배양을 하다가 독성 대사산물이 축적되므로써 미생물의 증가가 감소하는 대수기 후반기인 8시간 이후부터 continuous cross-flow

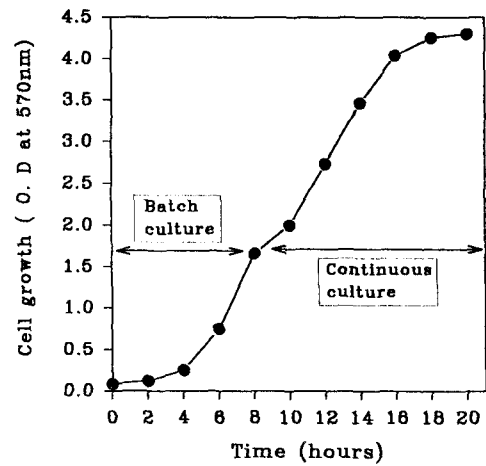


Fig. 7. Growth of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 in the continuous culture with cross-flow filtration system.

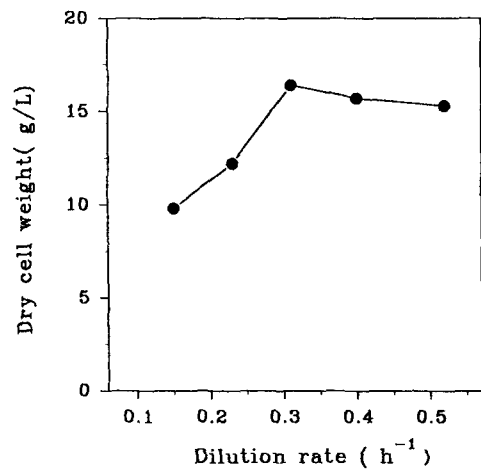


Fig. 8. Effect of dilution rate on the growth of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 with cross-flow filtration at 37°C.

filtration을 시작하였으며 filtration 되어 배양기 내에 배지가 감소하는 만큼 새로운 배지를 연속적으로 공급함으로써 배양기 내의 working volume을 5l로 일정하게 유지시키면서 20시간 동안 배양하였다. 이때 dilution rate는 0.31 h^{-1} 로 하였다. 그 결과(Fig. 7), 배양시 생성되는 독성 대사산물이 cross-filtration에 의해 제거됨에 의해 회분배양에 비해서 대수기를 2~3시간 정도 연장할 수가 있었으며, 최종 균체 생육이 크게 증가하였다. 한편, 연속배양으로 전환 후 2시간 동안은 미생물의 성장이 조업 전환으로 인하여 약간 둔화되는 현상을 보였으며, 배양기내에 미생물의 농도가 높아질수록 filtration flux는 점차적으로 줄어드는 현상을 보였는데 이것은 filter 표면에 세포층이 축적되므로써 일어나는 현상으로 filtration unit를 증가시키는 방법으로 이를 해결할 수 있으리라 생각된다.

균체 막순환 발효조에서 가장 중요한 operating parameter인 dilution rate(D)의 영향을 관찰하기 위하여 filtration flux 값을 변화시킨 결과(Fig. 8), dilution rate를 0.15 h^{-1} 부터 0.31 h^{-1} 까지 증가시킬 경우 균체 농도가 증가하였으나, dilution rate를 더 높였을 경우는 조금씩 감소하

였다. 따라서, 균체 막 순환 발효조에서 dilution rate는 0.31 h^{-1} 이 최적 조건임을 알 수 있었다.

Masayuki 등^{7,8)}은 *B. longum* 배양시 3개의 filtration unit를 사용하여 54.5 g/l의 건조 균체량을 얻었다고 보고하였으나, 본 실험에서는 1개의 filtration unit를 사용하여 최종 건조 균체량을 16.4 g/l 얻었으며 생균수는 3.5×10^{10} cells/ml으로 pH를 조절하지 않은 회분배양 시에 비해 약 20배 정도, pH를 조절한 회분배양 시에 비해 4배 정도 cell productivity를 높인 결과를 얻었다.

따라서, *B. longum*을 비롯한 Bididus균의 고농도 배양을 위해 ceramic 재질의 cross-filtration 장치를 이용한 균체 재순환식 연속배양 방법이 매우 효과적인 방법으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Badoud, R. and G. Pratz (1986) Improved HPLC analysis of some carboxylic acid in food and beverages as their *p*-nitrobenzyl esters. *J. Chromatogr.* **360**, 119-136.
2. Benecke, I. (1984) Resolution of underivatized 2-hydroxy acids by HPLC. *J. Chromatogr.* **291**, 155-164.
3. Bryant, M. P. and L. A. Burkey (1953) Cultural method and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumeri. *J. Dairy.* **36**, 205-217.
4. Buchanan, R. E. and N. E. Gibbbson (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed., The Williams & Wilkins, Baltimore.
5. Distler, W. (1978) Separation of some carboxylic acids by reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr.* **152**, 250-252.
6. Hidaka, H. (1985) The role of intestinal flora in nutrition. *Biseibutsu.*, **1**, 32-40.
7. Masayuki T., N. Kotani, and T. Kobayashi (1987) High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermenter with cross-flow filtration. *J. Ferment. Technol.* **65(2)**, 179-184.
8. Masayuki T., N. Kotani, and T. Kobayashi. (1987) High-concentration cultivation of *Bifidobacterium longum* in fermenter with cross-flow filtration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 438-441.
9. Mayer, J.B. (1966) Moglichkeiten einer physiologischen therapies beim saugling mit *Bacterium bifidum* (*Lactobacillus bifidus*). *Msch. Kinderheik.* **144(2)**, 67-73.
10. Mitsuoka, T. (1984) Medical effect of lactic acid bacteria and a new field of utilization. *Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi.* **31**, 285-296.
11. Mitsuoka, T. (1980) 腸内菌の世界, 叢文社, 東京.
12. Multing, D., W. Escherish, and J. P. Mayer. (1968) The effect of *Bacterium bifidum* on intestinal bacterial flora and toxic protein metabolites in chronic liver diseases. *Amer. J. Proctol.* **19**, 335-342.
13. Nishizawa, Y., Y. Mitani, M. Tamaki, and S. Nagai. (1983) Ethanol production by cell recycling with hollow fibers. *J. Ferment. Technol.* **61**, 599-605.
14. Nishizawa, Y., Y. Mitani, M. Tamaki, and S. Nagai. (1984) Ethanol production by repeated batch culture with hollow fibers. *J. Ferment. Technol.* **62**, 41-47.
15. Ohleyer, E., H. W. Blanch, and C. R. Wilke. (1985) Continuous product of lactic acid in a cell recycle reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **11**, 317-332.
16. Rowland, I. R. and P. Grasso. (1975) Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* **29**, 7.
17. Tamura, Z., (1983) Nutriology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora.*, **2**, 3-16.
18. 강국희 (1988) Oligo당의 장내세균 증식에 미치는 영향에 관한 연구. *Korean J. Dairy Sci.* **10(4)**, 159-169.

High Cell Density Culture of *Bifidobacterium longum* by Cross-flow Filtration

Myong-Suk Lee and Yun-Hee Park^{1*} (Department of Biotechnology, Graduate School of Industry; ¹School of Chemical Engineering and Biotechnology, Ajou University)

Abstract : The conditions for production of high cell density of *Bifidobacterium longum* were investigated and the cross-flow filtration system was used to remove the inhibitory metabolites, lactic acid and acetic acid. The maximum cell growth was observed with glucose as carbon source at the concentration of 50 g/l at 37°C with the initial pH 6.5. When *B. longum* was cultured in a cross-flow filtration system, the maximum cell growth was observed at a dilution rate(D) of 0.31 h^{-1} and the dry cell weight was 16.4 g/l(3.5×10^{10} cell/ml), which was about four times higher than that obtained in the batch culture with pH control.

Key words : high cell density, *Bifidobacterium longum*, cell recycle cross-flow filtration

*Corresponding author