

## 가금류 생균제 개발을 위한 *Lactobacillus fermentum* YL-3의 배양조건 최적화 및 캡슐화

김 경 · 장금일<sup>1</sup> · 김정호<sup>2</sup> · 김광엽<sup>1\*</sup>

충북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>충북대학교 식품공학과 및 생물건강산업개발연구센터,  
<sup>2</sup>서원대학교 식품영양학과

## Optimization of Culture Conditions and Encapsulation of *Lactobacillus fermentum* YL-3 for Probiotics

Kyong Kim, Keum-Il Jang<sup>1</sup>, Chung-Ho Kim<sup>2</sup> and Kwang-Yup Kim<sup>1\*</sup>

Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology and Research Center for Bioresource and Health,  
Chungbuk National University

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Seowon University

This experiment was performed to improve the stability of *Lactobacillus fermentum* YL-3 as a poultry probiotics. The culture conditions that improve acid tolerance of *L. fermentum* YL-3 were investigated by changing several factors such as medium composition, temperature, anaerobic incubation and culture time. Also, *L. fermentum* YL-3 was encapsulated with alginate, calcium chloride and chitosan. The stable culture conditions of *L. fermentum* YL-3 were obtained in anaerobic incubation using MRS media without tween 80 for 20 hour at 42°C. The capsule after treatment with 1% chitosan was formed close membrane by a bridge bond. Immobilization of *L. fermentum* YL-3 in capsule was observed by confocal laser scanning microscopy, and cell viability was  $2.0 \times 10^9$  CFU/g above the average. *L. fermentum* YL-3 capsule after acid treated at pH 2.0 for 3 hour survived about 40%, but those encapsulated with 1% chitosan survived about 65%. Survival rate of capsule stored at room temperature decreased about 2~3 log cycle during 3 weeks, but viability of capsule stored at 4°C during 3 weeks maintained almost  $10^8$  CFU/g levels.

**Key words:** probiotics, *Lactobacillus fermentum* YL-3, acid tolerance, encapsulation

### 서 론

야생동물들은 어미와 환경으로부터 장내 정상 균총을 빠르게 구성하지만, 인간에 의해서 길들여진 가축들은 어미와 접촉하는 것이 제한되고, 사료와 항생제, 스트레스 등에 영향을 크게 받기 때문에 정상적인 장내 균총을 구성하지 못한다<sup>(1,2)</sup>.

이에 대한 중요성을 인식하여 1947년 처음으로 동물에 대한 연구를 시작하였고 자돈에 장내 유산균을 투여하여 건강 증진과 증체 효과를 확인하는 실례가 보고된 이후, probiotics는 1974년 Parker와 Fuller에 의해 살아있는 미생물 첨가제의

개념으로 정립되었다<sup>(3)</sup>. 그 이후로 probiotics용 유산균은 현재 세계 여러 나라에서 개발되었으며 그 소비는 계속적으로 증가하고 있다<sup>(3,5)</sup>. 유산균의 기능으로는 식품내 풍미를 제공 및 단백질 부분 분해에 의한 소화 흡수성의 향상, 장내 정상 세균총의 유지, 장내 이상 발효의 개선과 부패세균에서 발생된 독성물질의 무독화, 면역기능 부활작용 및 항체 생성, 세균의 감염방지, 항암효과 등이 알려진 것으로 보고되어 있다<sup>(4,7)</sup>.

그러나 국내 가축 유산균 probiotics 제조사의 대부분은 외국으로부터 유산균 원료를 수입하여 제품화하기 때문에 국내의 생산 기술은 발전을 하고 있지 못하고 있으며, 국내 환경에 맞는 생균제의 부족으로 양돈업에서는 이중의 경제적 손실을 안고 있다. 조 등<sup>(8)</sup>은 국내 건강한 산란계의 맹장으로부터 probiotics로서의 이용할 수 있는 유산균을 최종 선별하였는데, 사료에 첨가되는 유산균을 생균으로써 적용하기 위해서는 몇 가지 고려해야할 사항이 있다.

첫째, 위액은 염산의 낮은 pH에 의해 외부 미생물이 생존 상태로 위를 통과하지 못하도록 작용하므로 분리된 균주의

\*Corresponding author : Kwang-Yup Kim, Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Gaeshin-dong, Heungduk-gu, Cheongju, Chungbuk, 361-763, Korea  
Tel: 82-43-261-2568  
Fax: 82-43-271-4412  
E-mail: kimky@trut.chungbuk.ac.kr

경우 산에 대한 내성을 증진시킬 수 있는 방법의 검토가 필요하다<sup>(7-12)</sup>. 그러므로 위액에 충분히 견딜 수 있는 균주를 배양조건을 통해 확립해야 한다.

둘째, 열악한 환경 조건에서 가공 및 저장 중 발생하는 미생물의 사멸을 고려해야 한다. 예전부터 사용해 오던 생균제 제품에서의 고질적인 문제점은 저장되는 동안 급격한 균수의 사멸로 보존기간이 짧아 충분한 생균제를 섭취할 수 없었다는 점이다. 대표적으로 균체 건조를 통한 분말 형태의 보존이 그 예이다<sup>(10)</sup>. 이는 사료에 첨가를 용이하게 하기 위한 방법이었으나 건조시 세포내 수분의 부족으로 세포의 사멸 및 손상 등의 문제점을 가지고 있었다. 이 조건을 충족시킬 수 있는 방법으로 캡슐제조가 연구 중에 있는데, 캡슐이란 고체(solids), 액체(liquids) 또는 기체상의 물질이 특정 조건에서 외부로 유출될 수 있도록 작고 밀봉된 캡슐 내로 포장하는 기술이다<sup>(13,14)</sup>. 캡슐화를 위한 조건으로는 내부 물질을 보호할 수 있을 만큼 안전성 및 견고성을 지녀야 한다. 또한 세포에 손상을 주지 않는 성분으로 미생물의 대사를 고려하여 수분, 영양분 등이 함께 캡슐화 되어야 하며 세포의 대사산물이 통과할 수 있도록 반투과성이어야 한다. Alginate는 점성, 겔화성, 수화성, 보수성, 금속이온 반응성, 결합성 및 필름형성성 등의 효과를 가지고 있으며 중금속의 체외배출작용, 혈압상승억제작용, 혈중 콜레스테롤 억제작용, 정장 및 변비개선, 소화관 점막 보호작용 및 장내 유해 미생물의 증식억제작용 등의 생리효과에 대한 연구가 보고되어 있다<sup>(14)</sup>. Alginate 재료를 이용한 캡슐 제조시, 우선 열처리 과정이 없으며 수용액 상태에서 이루어지기 때문에 수분 손실에 따른 세포의 파괴를 줄일 수 있다<sup>(13-15)</sup>. 또한 제조과정이 간단하고 처리 시간이 짧으며 표면적이 확장되므로 사료의 효율성에도 도움이 되고 체내 함께 유입되어 장내에서 분해되면 위의 생리적 효과와 더불어 probiotics의 보충제로써 충분히 유용하리라 사료된다. 그러나 alginate 캡슐은 산 및 열에 불안정한 특성을 지니며 인산염에 풀어지는 단점을 가져 이를 보완하기 위한 방법으로 키토산(chitosan)을 이용, 2중막을 형성하여 안정성을 높이는 연구가 보고되어 있다<sup>(16)</sup>. 그리고 최근 양돈 산업의 사료첨가제로써 주목받고 있는 규산염 광물질인 제오라이트(zeolite)를 첨가하여 저장성 및 성장 촉진을 향상시키고자 하였다. 제오라이트는 장내의 과잉 수분을 흡수하고 설사를 방지하며 사료의 장내 통과속도 지연 및 배설물의 악취를 감소시키는 효과가 있다. 또한 결정체 구조 속에 무수히 많은 공동(空洞)을 가져 흡습성, 흡착성이 높고 펠렛 제조시 결합제(cementing agent)로도 기능을 하는 것으로 보고되어 있다<sup>(17)</sup>.

그리하여 본 연구에서는 분리된 균주의 생존에 관한 연구로 살아 있는 상태로 위를 거쳐 장내에 정착하여 생균제로써의 기능을 수행할 수 있도록 내산성과 저장성에 초점을 맞추었으며 먼저, 배양 방법만으로도 세포의 생리적인 변화를 유도함으로써 내산성을 향상시킬 수 있는 배양조건을 세포막 지방산 분석과 연결지어 GC-MIS를 이용, 탐색하고자 하였다<sup>(4,11,12)</sup>. 또한 사료 첨가물용 캡슐을 alginate와 chitosan으로 제조 후, 세포의 포집상태는 confocal laser scanning microscopy(CLSM)로 관찰하고<sup>(18)</sup> 캡슐 외막은 scanning electron microscopy(SEM)를 이용하여 관찰하였으며 캡슐화된 균

체의 내산성 및 냉온도와 상온에서의 저장성을 통해 경제적 대량 생산 등의 가능성을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 보관

본 연구의 사용 균주는 28~32주령의 국내 건강한 산란계의 맹장으로부터 내산성, 내담즙성 및 병원성균 억제능력 등의 시험을 거쳐 최종 선별된 *Lactobacillus fermentum* YL-3<sup>(9)</sup>로 10% glycerol을 첨가한 MRS(Difco, Maryland, USA) 배지에 동결 보관하였고 MRS agar slant에 2회 이상 계대 배양하면서 최대 활성을 가진 균체를 이용하였다.

### 사용 배지

유산균의 증식용 배지로 이용되는 *Lactobacilli* MRS broth (MRS<sup>+</sup>, Difco, Maryland, USA)와 배지 조성에 tween 80 성분을 첨가하지 않고 0.1 N HCl을 이용하여 pH 6.5 ± 0.2로 조절된 modified MRS(MRS<sup>-</sup>)를 사용하였다.

### 배양조건별 내산성 변화

Tween 80 성분에 의한 배지 조성별 내산성을 알아보려고 MRS<sup>+</sup>와 MRS<sup>-</sup> broth에 *L. fermentum* YL-3를 각각 37°C에서 24시간동안 호기적으로 배양 후 pH 2.0에서의 생존율을 비교하였으며, 일반적으로 유산균은 통성혐기성균으로 산소에 영향 없이 잘 자라나 주로 혐기상태에서 성장이 빠르다는 보고<sup>(11)</sup>에 따라 혐기배양과 호기배양을 병행하여 비교하였으며, 혐기배양은 anaerobic jar(anaerobic system, Difco)를 이용하였다. 배양온도에 따른 내산성의 변화를 알아보기 위하여 MRS-배지를 사용하였고 온도는 28, 37, 42°C로 하였으며, 배양시간을 일정하게 하기 위해 24시간으로 하였다. 시간별 분석에서는 온도를 37°C로 일정하게 하고 시간을 12, 24, 48시간으로 배양하여 내산성을 비교하였다. 내산성은 조건별로 배양된 *L. fermentum* YL-3 균체를 4°C에서 3,421×g로 10분간 원심분리(micro high speed centrifuge, VS-15000 CFN, vision scientific co.)한 후, 6 N HCl로 pH 2.0으로 보정한 saline buffer에 회수된 균체를 넣고 37°C의 항온수조에서 유지하면서 1시간 간격으로 시료를 1 mL씩 취하여 saline buffer에 단계회식 후 MRS<sup>+</sup> agar에 평판 도말하였다.

### 배양 조건별 지방산 분석

*L. fermentum* YL-3의 세포막 지방산을 분석하고자 위의 조건별로 배양한 후 균체를 약 40 mg정도 회수하여 saponification, methylation, extraction, washing 단계를 거쳐 지방산을 얻었다<sup>(19)</sup>. Saponification은 세포막 또는 세포벽의 지질로부터 지방산을 분리하는 과정이고, methylation은 지방산에 methyl ester를 형성하여 지방산의 기화를 촉진하며 extraction은 지방산을 수용층에서 유기층으로 전이한다. 마지막 단계인 washing은 GC분석에 사용할 지방산을 정제하는 목적을 가진다. GC는 Hewlett-Packard 6890 series로 하였고 capillary column은 ultra 2(23 m diameter×0.25 mm ID×0.33 film thickness)를 사용하였다. Detector는 FID(flame ionization detector), injector는 split injection port를 사용하였으며 초고

순도의 H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Air를 각각 30, 30, 400 mL/min의 유속으로 하였다. 분석상 조건은 injection temperature 250°C, detector temperature는 300°C, oven temperature는 170~300°C의 조건으로 하여 분석하였다.

### Na<sup>+</sup>-alginate를 이용한 캡슐 제조

위에서 변화시킨 최적배양조건을 이용하여 세포를 원심분리로 농축하였고 멸균시켜 용해된 4% sodium alginate(kanto, Japan)와 보존제를 섞어 충분히 교반시켰다. 보존제에는 3%(w/v) ascorbic acid(sigma, USA), 2.5%(w/v) mannitol(sigma, USA) 및 0.1% tween 20이 첨가되었다. 농축 세포, 보존제 및 4% sodium alginate를 1:1:2로 혼합하여 peristaltic pump(vision scientific co. Ltd)에 flexible tube를 연결하고 그 끝에 23 gauge needle을 연결하여 위 용액이 멸균 15 g/L 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, shinyo, Japan)용액에 분사되도록 제조 후 캡슐의 견고성을 위하여 1시간 교반하여 캡슐을 제조하였다.<sup>(14-16)</sup>

### 1% chitosan을 이용한 피막처리

Chitosan은 순수한 물이나 일반적인 용매에는 녹지 않고 특정조건의 용매에 용해되는데 주로 acetic acid와 같은 유기산이 용매로 이용된다. 그리고 gel상의 chitosan은 작은 분자들이 통과할 수 있는 세공이 많으며 얇은 다공성 막을 형성하는 성질을 가지고 있다. 또한 chitosan은 양이온의 전하를 가져 alginate와 같은 음전하의 다당류와는 다전해질성 복합체를 형성하는 것으로 알려져 있다.<sup>(16)</sup> Alginate를 이용한 capsule의 단점을 보완하기 위하여 1% acetic acid(junsei, Japan)에 chitosan(haein co. Ltd) 1%를 첨가한 후 4°C에서 24시간 교반 분해한 용액에 alginate capsule을 넣어 30분간 코팅처리한 후 멸균 생리 식염수로 2회 세척하였다.

### 3% zeolite 첨가

사료용으로서의 가치가 알려진 점토광물질인 제올라이트는 특히 가금류에 있어서 장내가스 및 독소제거, 사료효율개선, 흡착성 등의 효과를 보이며 3% 전후의 수준으로 첨가시 브로일러의 증체율 향상에 대한 연구보고<sup>(18)</sup>에 따라 사료효율 및 캡슐질량의 향상, 저장성 등의 영향력을 알아보고자 실험하였다. 15 g/L CaCl<sub>2</sub> 용액에 3%의 zeolite(heuksalm, Korea)를 첨가하여 멸균한 후 교반하면서 혼합액을 적하하여 alginate capsule을 제조하였으며 1% chitosan으로 30분간 처리하였다.

### 캡슐의 형태 및 세포의 관찰

Scanning electron microscopy(SEM, hitachi-570, Japan): 상온에서 24시간 건조시킨 캡슐을 고정한 후 critical point dryer(CPD)에서 20분간 건조시키고 -80°C에서 7분간 gold coating하고 다시 건조시킨 후 표면을 전자현미경으로 관찰하였다.

Confocal laser scanning microscopy(CLSM, MRC-1024, bio-rad Inc, hemel hempstead, England, Kr/Ar ion laser): 캡슐 내부의 *L. fermentum* YL-3의 포집상태를 보기 위하여 캡슐 제조 전에 균체를 0.1% Pyronin Y(sigma)로 10분간 염색한 후 여러 번의 수세 과정을 거쳐 캡슐을 제조하였으며

제조된 캡슐은 0.03% Fluorescein isothiocyanate(FITC, sigma, USA)에 10~15분간 침지시킨 후 수세 과정을 거쳐 슬라이드 글라스에 올려놓고 테이프로 고정하고 mounting oil을 떨어뜨린 후 광학적 절편(optical sectioning)으로 연속적 영상을 재구성하여 관찰하였다.

### 캡슐화된 *L. fermentum* YL-3의 내산성

멸균 filter paper를 이용하여 수분을 제거한 캡슐 1g를 취해 pH 2.0으로 보정해 놓은 saline buffer 9 mL에 넣고 37°C의 항온 수조에 넣어 3시간 정치시킨 후 캡슐 분해 용액 10 mL을 넣었다. 상온에서 자동 rotator를 통해 완전히 녹을 때까지 약 15~30분간 교반 분해한 후 시료 용액 1 mL를 취해 saline buffer로 단계 희석하여 MRS<sup>+</sup> agar에 평판 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 캡슐 물질의 분해는 0.1 M sodium citrate(kanto, pH 8.0) 용액을 사용하였으며 유산균 캡슐의 총균수는 pH를 조절하지 않은 시료에 분해용액을 처리하여 같은 방법으로 측정된 생균수로 하였다.

### 캡슐화된 *L. fermentum* YL-3의 저장성

캡슐제조 후 수분을 제거한 캡슐을 멸균 비닐 pack에 넣어 공기가 통하지 않도록 sealing한 후 25°C와 4°C에 보관하면서 생존율을 알아보았다. 1주 간격으로 캡슐 1g을 0.1 M sodium citrate용액 9 mL에 넣어 캡슐을 분해한 후 0.85% 생리식염수로 단계 희석하여 MRS<sup>+</sup> agar에 도말하여 생균수를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 배지 조성(tween 80)에 따른 내산성 및 지방산 변화

*L. fermentum* YL-3가 polyoxyethylene sorbitan monooleate (tween 80)로 공급된 배지와 제거된 배지에서 성장 속도와 산 생성에 저해를 받는지를 48시간의 생장곡선으로 알아본 결과는 Fig. 1과 같다. 대수기인 12시간 사이에서 성장이 다소 늦어지는 것을 볼 수 있었으나 정상기인 24시간에서는 비슷한 수치로 균수의 성장을 나타내었으며 산 생성 역시 pH 4.2 ± 0.2로 큰 차이를 보이지 않아 산 생성에서도 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 미생물 세포막의 지방산 조성은 배양 온도, pH, 배지 조성, 염 농도, 성장속도 등 여러 요소에 의해 변화한다. 특히 oleic acid(C<sub>18:1</sub> ω9c)는 tween 80으로 공급된 배지 내에서 성장한 젖산균 세포막에 속해져 있는데 주로 유산균의 성장을 촉진하는 역할을 하고 있으며 세포막에 존재하는 C<sub>18:1</sub>의 지방산들이 위의 여러 요소에 의해 자연적으로 메틸화되어 cyclopropane fatty acids(CFAs) 형태로 전환하기도 한다.<sup>(11,12)</sup> 유산균의 CFAs는 C<sub>19:0</sub> cyc ω8c(lactobacillic acid) 형태로 존재하는데 이 성분은 세포막 유동성에 중요 성분으로 오존 분해 및 동결, 건조동 산화적 처리등에 강한 지방산으로 알려져 있다. MRS<sup>+</sup>, MRS<sup>-</sup> 배지를 이용하여 내산성과 지방산과의 관련성을 알고자 pH 2.0에서 6시간 동안 내산성을 알아보았고(Fig. 2), 회수된 균체를 이용하여 지방산을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 6시간 이후 MRS<sup>+</sup>에서 배양된 균체는 1.68 × 10<sup>8</sup> CFU/mL의 균수를 보였고

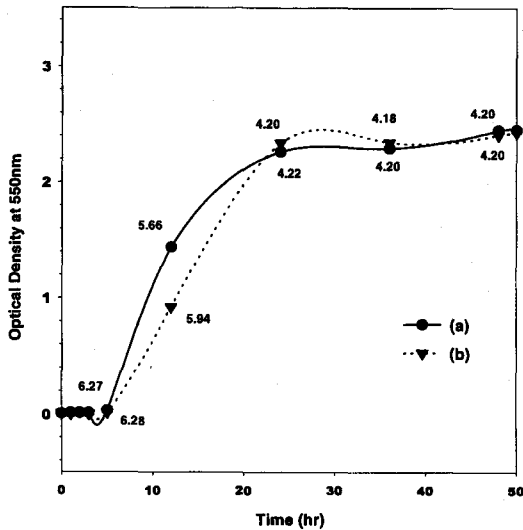


Fig. 1. Growth curve of *Lactobacillus fermentum* YL-3 in relation to the Tween 80.

(a) incubation in MRS supplemented with tween 80 (MRS<sup>+</sup>). (b) incubation in MRS without tween 80 (MRS<sup>-</sup>).

MRS<sup>-</sup>에서 배양된 균체는  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL의 생존율을 보임으로써 1 log cycle 이상 pH에 내성이 생겼음을 알 수 있었다. 세포막 지방산 분석에서는 MRS<sup>+</sup>에서 35.5%로 가장 많은 함량을 보였던 C<sub>18:1</sub> ω9c(oleic acid)이 MRS<sup>-</sup> 배지에서는 나타나지 않았으며, C<sub>19:0</sub> cyc ω8c는 11.9%(MRS<sup>+</sup>)에서 36.5%(MRS<sup>-</sup>)로 24.6%가 상승하는 효과를 얻었다. 또한 Fig. 3의 GC chromatogram (A)에서 12.9분쯤에 분석되던 oleic acid peak가 (B)에서 검출되지 않은 것으로 보아 MRS<sup>-</sup>에서 oleic acid가 감소하고 lactobacillic acid(C<sub>19:0</sub> cyc ω8c)가 상승되었을 것으로 생각되어진다. 이는 lactobacillic acid(C<sub>19:0</sub> cyc ω8c)성분이 균체의 내산성과 관련이 있다는 Sim 등<sup>(4)</sup>의 연구 보고와 일치하는 결과를 나타내어 oleic acid를 포함하는 tween 80성분의 제거는 *L. fermentum* YL-3의 내산성을 향상시킨다고 사료되어진다.

**배양 온도, 배양 시간, 혐기 배양에 따른 내산성 및 지방산 변화**

*L. fermentum* YL-3은 생육 온도 범위가 25~42°C로 비교적 넓은 범위를 갖으며 보통 37°C에서 생육한다. Tween 80이 제거된 MRS<sup>-</sup> 배지에서 배양된 유산균이 내산성에 훨씬 강함을 나타낸 바, 배양온도 및 시간에 따른 내산성의 변화에서는 배지를 MRS<sup>-</sup>를 사용하였다. 온도에 따른 유산균의 내

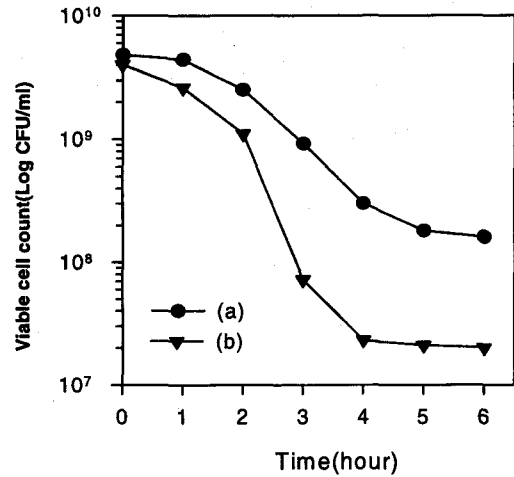


Fig. 2. Acid tolerance at pH 2.0 of *Lactobacillus fermentum* YL-3 in relation to the tween 80.

(a) incubation in MRS supplemented with tween 80 (MRS<sup>+</sup>). (b) incubation in MRS without tween 80 (MRS<sup>-</sup>).

산성 실험결과, 28°C에서 배양된 YL-3는 빠른 사멸을 보였으며 Fig. 4에서 보이는 바와 같이, 배양 온도가 상승할수록 초기균수에 비해 생존율은 높아졌다. Fatty acid 분석 결과는 Table 2에 명시되어 있는데, lactobacillic acid 성분이 28°C에서보다 37°C에서 14%가 상승했으며, 37°C와 42°C에는 약 2% 정도가 상승했다. 배양시간별 fatty acid 변화에서는 12시간과 24시간에서는 5%의 차이를 보였으며 48시간 배양시에 약 6%가 상승하였다. 그러나 배양 시간은 48시간에서 최적의 내산성을 보이거나 산업적 측면에서 생균수를 고려해야 하므로 대수기 상태의 균주를 이용하기로 하였다. 일반적으로 유산균은 호기 배양에서보다 혐기 배양에서 더 빠른 성장을 한다. YL-3를 anaerobic jar를 이용하여 37°C에서 24시간 혐기 배양하여 호기 배양된 균체와 내산성을 비교해 보았다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 혐기배양시 내산성이 증가하였으며 Table 2에서의 지방산 분석에서도 C<sub>19:0</sub> cyc ω8c 성분이 약 4%정도 상승하였다. 즉, 내산성을 높이기 위해서는 호기배양보다는 혐기배양을 하는 것이 더 효과적일 것으로 사료된다. Sim 등<sup>(4)</sup>의 연구 보고에서도 배양 온도가 30.5°C에서 40.5°C로 높아질수록, 배양시간이 11시간에서 32시간으로 길어질수록 C<sub>18:1</sub>은 최고 40.2%에서 최저 13.4%까지 감소하였고 C<sub>19:0</sub> cyc ω8c는 9.5%에서 최고 41.1%까지 증가하는 결과를 얻었다. 이는 온도를 높게, 배양시간을 길게 하는 것이 내산성의 증가를 가져온다는 결과와 일치하였다.

Table 1. Fatty acids profiles of *Lactobacillus fermentum* YL-3 cultured in MRS<sup>+</sup> and MRS<sup>-</sup> for 24 hour at 37°C

Strain	Medium	fatty acid composition (%)					
		14:0	16:0	18:0	18:1 <sup>1)</sup> ω7c	18:1 ω9c	19:0 <sup>2)</sup> cycω8c
<i>L. fermentum</i> YL-3	MRS <sup>+</sup>	3.8 ± 0.5	27.8 ± 3.5	1.4 ± 0.4	1.4 ± 8.59	35.5 ± 1.9	11.9 ± 0.4
	MRS <sup>-</sup>	1.9 ± 0.7	31.8 ± 3.2	2.8 ± 0.6	23.8 ± 1.6	<sup>3)</sup> ND	36.5 ± 1.7

<sup>1)</sup>This position of the double can be located by counting from methyl(ω) end the carbon chain.

<sup>2)</sup>Cyc: cyclopropane ring formation.

<sup>3)</sup>ND: not detected.

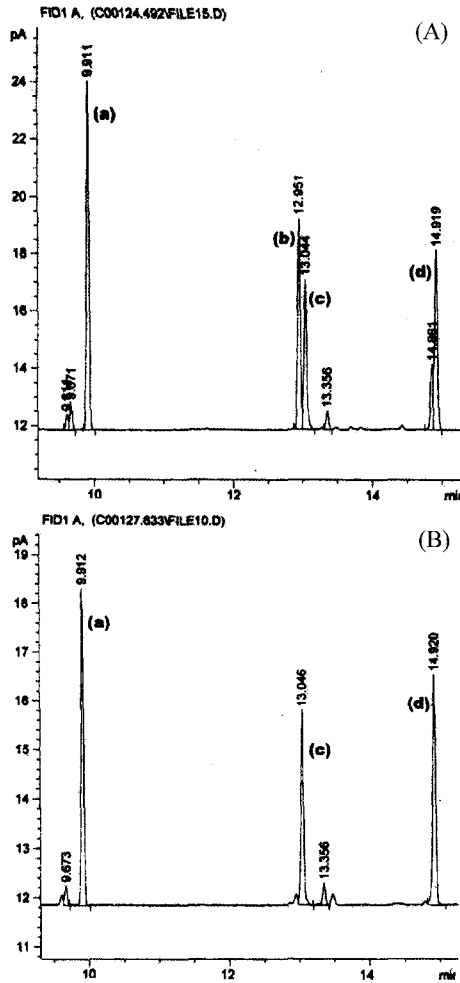


Fig. 3. GC chromatogram of fatty acids in *Lactobacillus fermentum* YL-3 cultured in MRS supplemented with tween 80 (A) and without tween 80 (B). (a) peak: C<sub>16:0</sub>, (b) peak: C<sub>18:1 ω9c</sub>, (c) peak: C<sub>18:1 ω7c</sub>, (d) peak: C<sub>19:0 cyc ω8c</sub>.

캡슐 제조

*L. fermentum* YL-3의 증식용 배지로는 MRS를 이용하였으며 온도가 높을수록 내산성이 상승됨이 보이는데 42°C로 하였으며 대수기 말기 상태의 균주를 이용하기 위해 20~24

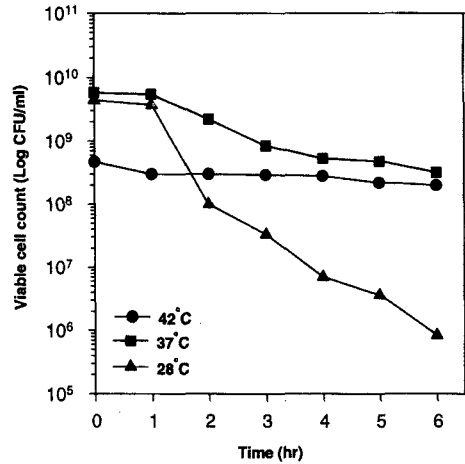


Fig. 4. Acid tolerance of *Lactobacillus fermentum* YL-3 incubated at different temperature for 24 hour.

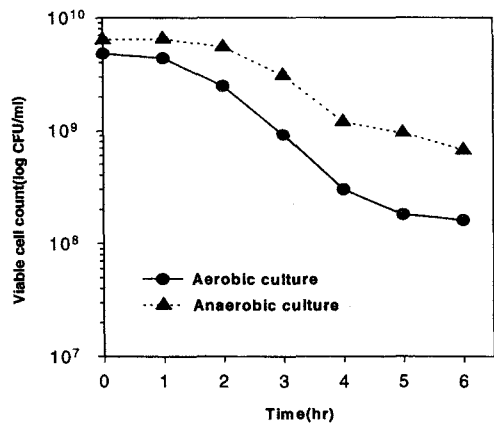


Fig. 5. Acid tolerance of *Lactobacillus fermentum* YL-3 incubated in anaerobic and aerobic condition at 37°C for 24 hour.

시간 배양하여 캡슐 제조에 이용하였다. 보존액에는 ascorbic acid, mannitol, tween 20이 첨가되는데 3% ascorbic acid는 항산화제 역할로 산소와의 접촉에 대한 영향을 저하시켜 내부 물질을 보호하는 역할을 하며 2.5% mannitol은 유산균의 영양소로 작용, 0.1% tween 20은 유화제로 발효과정 중 생성되는 CO<sub>2</sub>에 의한 캡슐의 손상을 방지하고 동결 보호제 등

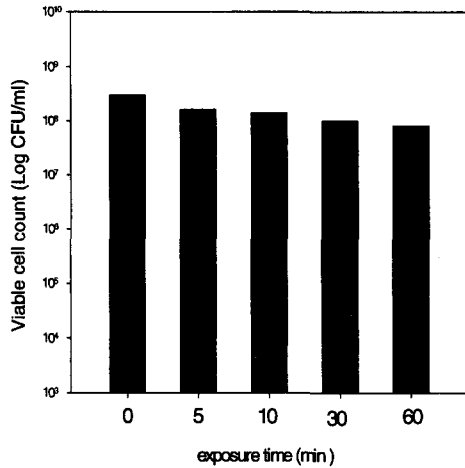
Table 2. Fatty acids profiles of *Lactobacillus fermentum* YL-3 at different temperature, incubation time and culture conditions

Medium	culture condition	hour	°C	fatty acid composition(%)						
				14:0	16:0	18:0	18:1 <sup>1)</sup> ω7c	18:1 ω9c	19:0 <sup>2)</sup> cyc ω8c	
MRS <sup>-</sup>	aerobic	48	28	1.3 ± 0.1	27.5 ± 0.8	1.9 ± 0.3	38.6 ± 1.2	1.8 ± 0.3	22.5 ± 0.8	
			37	1.9 ± 0.7	31.8 ± 3.2	2.8 ± 0.6	23.8 ± 1.6	<sup>3)</sup> ND	36.5 ± 1.7	
			42	1.4 ± 0.1	47.4 ± 2.9	4.0 ± 0.4	5.3 ± 1.1	ND	38.6 ± 0.5	
	anaerobic	48	37	12	1.9 ± 0.4	32.4 ± 0.8	2.7 ± 0.5	28 ± 1.5	3.0 ± 0.4	25.8 ± 2.5
				24	2.3 ± 0.9	34.3 ± 1.0	2.4 ± 0.1	23.9 ± 0.3	ND	30.3 ± 0.9
				48	1.9 ± 0.7	31.8 ± 3.2	2.8 ± 0.6	23.8 ± 1.6	ND	36.5 ± 1.7
				12	1.4 ± 0	32.6 ± 0.3	2.2 ± 0.2	14.6 ± 2.3	ND	40.8 ± 0.4
				24	1.4 ± 0	32.6 ± 0.3	2.2 ± 0.2	14.6 ± 2.3	ND	40.8 ± 0.4

<sup>1)</sup>This position of the double can be located by counting from methyl(ω) end the carbon chain.

<sup>2)</sup>Cyc: cyclopropane ring formation.

<sup>3)</sup>ND: not detected.

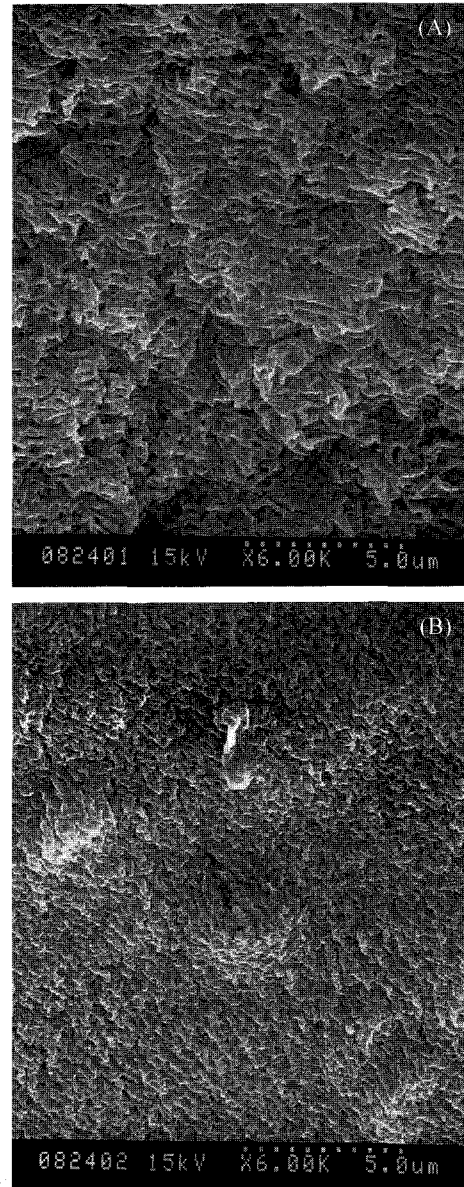


**Fig. 6. Changes in viable cell count of *Lactobacillus fermentum* YL-3 in 4% sodium alginate added with preservatives.** Preservatives: 3% (w/v) ascorbic acid +2.5% (w/v) mannitol +0.1% tween 20.

의 역할을 하므로 첨가하였다. 완전 구형의 캡슐제조를 위한 방법으로 1.3~1.5% CaCl<sub>2</sub>의 농도와 4% sodium alginate의 사용이 구형의 캡슐 제조에 가장 효과적이라는 보고(20)에 따라 사용하였으며 그 결과 비교적 일정한 구형의 캡슐이 형성되었다. Capsule제조 시 피복물질인 alginate와 보존제의 혼합액이 *L. fermentum* YL-3의 생존에 미치는 영향을 살펴본 결과(Fig. 6), 혼합 직후 3.0×10<sup>8</sup> CFU/mL 정도의 초기 균수에서 약간씩 감소하는 경향을 보였는데, 30분간은 10<sup>8</sup> CFU/mL 수준을 유지하다가 60분 후에는 8.0×10<sup>7</sup> CFU/mL로 약 60%정도가 사멸하였다. Alginate는 현재 일부 병원성 균에 대하여 항균 작용을 갖는 물질로 알려져 있으며 *L. fermentum* YL-3의 경우 약간의 항균작용을 가지나 크게 사멸하지는 않으며 최대한 시간을 짧게 하여 캡슐제조를 하는 것이 유리할 것으로 사료된다.

**캡슐의 관찰**

단일막인 alginate 캡슐과 chitosan으로 코팅처리를 한 alginate-chitosan 캡슐의 표면을 SEM을 이용하여 관찰하였다. alginate capsule의 표면은 비교적 영성한 polymatrix를 형성하여 많은 얇은 격막으로 이루어져 있으며 여러 군데 공동(空洞)을 형성하여 염산에 의한 침투 및 수분의 손실을 받을 가능성이 있으며 세포가 외부로 유출될 수 있다. 이것을 30분간 chitosan으로 처리한 Fig. 7(B)에서는 alginate와 chitosan의 가교 결합에 의해 좀더 촘촘한 matrix를 통하여 비교적 안정한 막을 형성하였다. Artur(16)의 연구에 의하면 chitosan 처리 후 캡슐 size가 약 6~16% 정도의 감소를 보였다고 보고되는데, 이는 alginate capsule 내부로 chitosan의 침투에 의한 확산 및 막 내부로의 cross-linkage와 관련이 있는 것으로 보고되어 있다. 본 실험에서도 역시 30분간의 교반 후 캡슐 size가 줄어들었으며 외형적으로도 단단하고 같은 조건의 건조 후에도 수분의 손실이 적음을 알 수 있었다. Fig. 8(B)은 캡슐화된 *L. fermentum* YL-3의 내부의 모습이며, Fig. 8(A)은 FITC로 염색된 캡슐을 위에서부터 광학현미경으로 찍은 모습이다. Alginate 캡슐은 FITC로 염색시 내부까지 침투를 하



**Fig. 7. Outer surface of alginate capsule (A) and alginate capsule treated with 1% chitosan (B).**

지 못하고 걸 부분만이 염색이 되어 내부의 세포 포집 상태와는 함께 볼 수 없어 400배로 하여 optical sectioning하여 montage로 나타내었다. 고정화 된 *L. fermentum* YL-3은 filamentous 형태가 아닌 단일 간균(single rod) 형태의 모양으로 캡슐 1개당 약 107개 정도의 균이 포집되어 나타났다.

**캡슐화된 *L. fermentum* YL-3의 내산성**

MRS<sup>+</sup>에서 배양된 free cell (A)과 배양 조건을 통해 생리적 변화를 유도시킨 induced cell (B)과 여기에 캡슐화된 (C)와 chitosan으로 코팅 처리한 (D)의 내산성을 비교해 본 결과를 Fig. 9에 나타내었는데, 1시간에서는 (B), (C) 및 (D)는 모두 90%를 넘는 생존율을 보였고, 2시간에서는 (B)는 45% 정도의 생존율을 나타내었으며, (C)는 80%, (D)는 90%의 생존율로 캡슐화된 *L. fermentum* YL-3이 내산성에 강함을 알

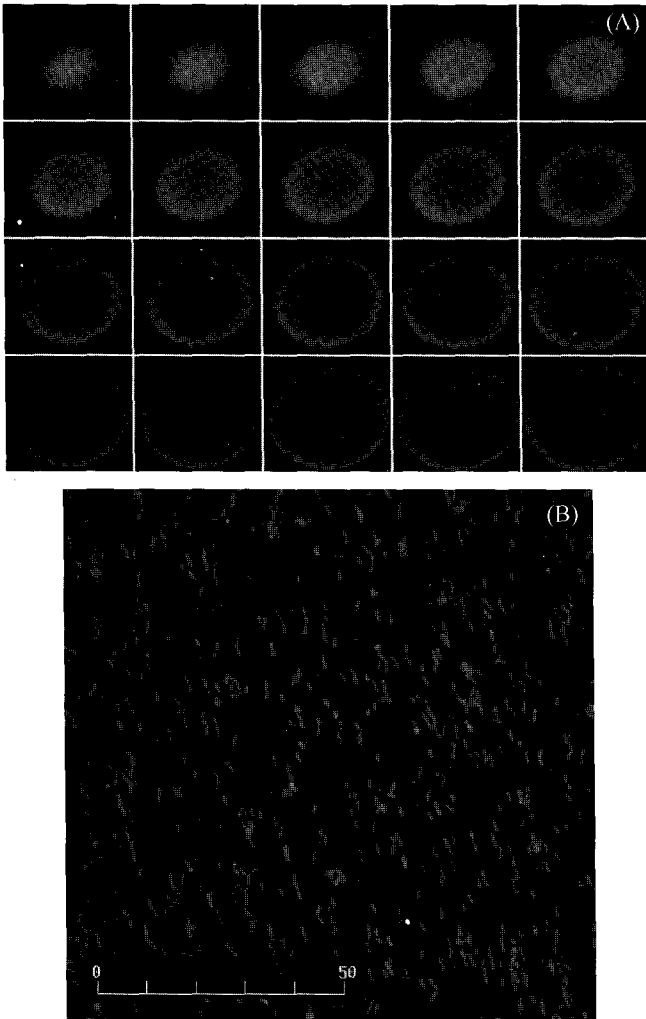


Fig. 8. Confocal laser scanning microscopy images of optical sections from the top of the capsule (A) and *Lactobacillus fermentum* YL-3(pyronin Y, red) immobilized in capsule (B). (A): magnification=10×40, (B): magnification=10×100, scale bar=50 μm.

수 있었다. 3시간째에서 (A)는 1% 정도밖에 살지 못한 반면 (B)는 약 20%의 생존율을 보였고, (C)는 40%, (D)는 65% 정도의 생존율을 보임으로써 chitosan으로 처리한 캡슐이 낮은 pH에 대한 침투를 덜 받음을 알 수 있었다.

**캡슐화된 *L. fermentum* YL-3의 저장성**

미생물을 캡슐화하는 주요 목적은 저장시 발생하는 미생물의 사멸율을 감소시켜 저장기간을 연장시키고 수분 및 산소와의 영향을 최소화하여 미생물의 생존율을 높이는 데 있으므로 alginate capsule과 1% chitosan 처리구, 3% zeolite 처리구의 저장성을 4°C와 25°C에서 비교하였다. 그 결과, Fig. 10에서 보는 바와 같이, 상온인 25°C에서는  $2.0 \times 10^9$  CFU/g 이었던 초기 균수가 1주 사이에 2~3 log cycle 정도로 급격히 사멸되었으며 chitosan 처리구나 zeolite 처리구에 의한 상온에서의 저장성 향상에는 영향을 미치지 못했다. 4°C에서는  $2.0 \times 10^9$  CFU/g 이었던 초기 균수가 3주까지 모두  $10^8$  CFU/g 이상의 생존율을 나타내었으며, 특히 chitosan으로 처리한

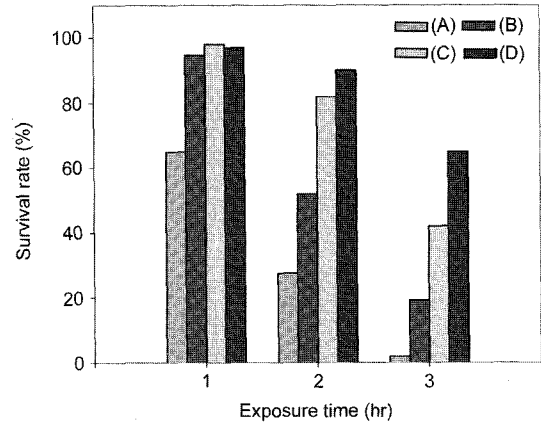


Fig. 9. Survival rate of *Lactobacillus fermentum* YL-3 exposed at pH 2.0 for 3 hour. (A): free cell, (B): induced cell by changing culture conditions, (C): encapsulated cell using alginate, (D): encapsulated cell using alginate-chitosan.

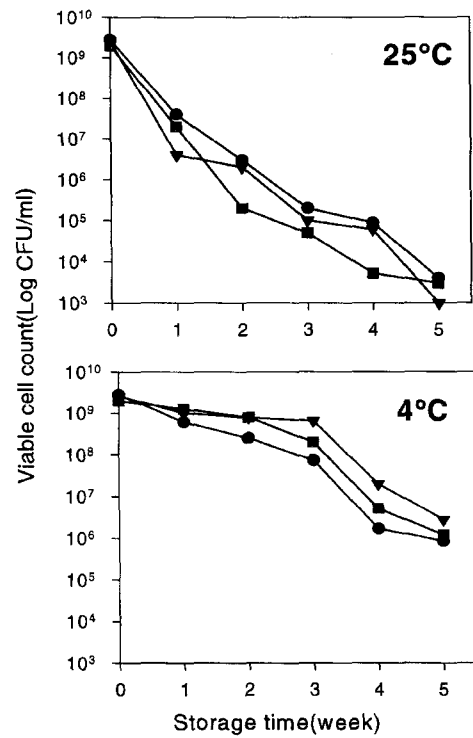


Fig. 10. Survival of encapsulated *Lactobacillus fermentum* YL-3 stored during 5 weeks at 4°C and 25°C.

(●): alginate capsule, (▲): alginate-chitosan capsule, (■): alginate-chitosan capsule supplemented with 3% zeolite.

capsule의 저장성이 3주 후 약 24% 정도로 alginate capsule에 비해 생존율이 높았다. 또한 alginate capsule은 다당류로 이루어졌기 때문에 세균 및 곰팡이 등에 의해 저장 중 오염이 되었고 수분의 손실과 함께 캡슐의 손상을 볼 수 있었으나 chitosan 처리 후에는 수분의 손실이 적었고 처음 capsule 제조시와 형태상에 큰 차이를 보이지 않았으며 chitosan에 의한 항균 작용에 의해서 곰팡이에 대한 오염을 막을 수 있었다. 한편, zeolite 처리구에서는 capsule을 단단하게 해주는 특

성 및 캡슐간의 흡착력, 캡슐의 질량을 증가시켜 주었는데, alginate chitosan capsule 10개당 평균 61.5 mg이었고 3% zeolite 처리 시에는 87 mg으로 약 25 mg 정도 증가하였으나 저장성에는 큰 차이를 보이지 않았다.

## 요 약

본 실험에서는 *L. fermentum* YL-3의 생존에 관한 연구로 살아 있는 상태로 위를 거쳐 장내에 정착하여 생균제로서의 기능을 수행할 수 있도록 내산성과 저장성에 초점을 맞추었다. 유산균 성장촉진 물질로 첨가되어 온 tween 80 성분의 제거가 pH 2.0에서 *L. fermentum* YL-3의 내산성을 약 1 log cycle 정도 향상시켰다. 지방산 분석에서는 세포의 유동성 및 동결 등에 저항성을 가진다고 보고되는 C<sub>19:0</sub> cyc ω8c(lactobacillic acid)의 성분이 24.6% 증가함으로써 내산성이 향상됨을 알 수 있었다. 온도별에서도 배양 온도가 상승할수록 내산성은 향상되었으며 배양시간 역시 길수록 향상되나 생균수를 고려해야 하므로 42°C의 배양온도에서 대수기 말기의 균체를 이용하였다. 그래서 최종 배양 조건은 tween 80이 제거된 MRS<sup>-</sup> 배지에서 20~24시간 42°C에서 혐기 배양을 실시한 균체를 capsule 제조에 이용하였다. Alginate capsule이 산, 열, 인산염 등에 풀어지는 단점을 가져 무독성의 1% chitosan을 이용하였으며 표면의 관찰 결과, chitosan처리 후 가교 결합에 의하여 더욱 촘촘한 막이 형성되었으며 alginate capsule에서 여러 군데 보이던 미세 구멍이 줄었으며 CLSM을 이용한 *L. fermentum* YL-3의 포집은 안정한 상태로 포집 균수는 약 2.0×10<sup>9</sup> CFU/g 정도였다. 캡슐화된 *L. fermentum* YL-3의 내산성에서는, 3시간 동안 pH 2.0에서 alginate capsule은 약 40 %가 생존한 반면 chitosan 처리 후의 alginate capsule은 약 65% 정도로 생존율의 향상을 보였다. 캡슐화된 *L. fermentum* YL-3의 저장성에서는 상온인 25°C에서는 초기 균수에서 1주 사이 2~3 log cycle 정도로 급격히 사멸되었으며 chitosan 처리구나 zeolite 처리구에 의한 상온에서의 저장성 향상에는 영향을 미치지 못했다. 4°C에서는 2.0×10<sup>9</sup> CFU/g 이었던 초기균수가 3주까지 모두 10<sup>8</sup> CFU/g 이상의 생존율을 나타내었으며 특히 chitosan으로 처리한 capsule의 저장성은 3주 후 약 24% 정도로 alginate capsule에 비해 생존율이 높았다.

## 문 헌

- Mundt, J.O. Enterococci; In Bergey's manual of systematic Bacteriology, Vol. 2, p. 1063, Williams & Wilkins, London, (1986)
- Promspon, B., Morishita, T.Y., Aye, P.P., Cobb, C.W., Reldkamp, A. and Clifford, J.R. Evaluation of avian specific probiotic and *Salmonella typhimurium*-specific antibodies on the colonization of *Salmonella typhimurium* in broiler. J. Food Protec. 61: 176-180

- (1998)
- Cho, M.K., Kim, K., Kim, C.H. and Kim, K.Y. Isolation and characterization of *Lactobacillus fermentum* YL-3 as a poultry probiotic. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 279-284 (2000)
- Sim, J.H., Kim, S.K., Baek, Y.J., Oh, T.K. and Yang, H.C. Influence of culture conditions on acid tolerance of *Lactobacillus casei* YIT 9018. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 17-23 (1995)
- Fuller, R. Probiotics in man and animal, J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378 (1989)
- Kleanhammer, T.R. Microbiological consideration in selection and preparation of *Lactobacillus* strains for use as dietary. J. Dairy Sci. 65: 1339-1349 (1982)
- Shin, M.S., Kim, H.M., Kim, G.T., Huh, C.S., Bae, H.S. and Baek, Y.J. Selection and characteristic of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean feces. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 495-501 (1999)
- Conway, P.L. and Goldin, B.R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci. 70: 1-12 (1987)
- McDonald, L.C., Fleming, H.P. and Hassan, H.M. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2120-2124 (1990)
- Park, C.J., Pyeon, J.S., Cho, Y.K., Hong, S.S. and Lee, H.S. Characteristics of *Enterococcus* sp. isolated from animal intestine and its powder. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 393-398 (1996)
- Johnsson, T., Nikkila, P., Toivonen, L., Rosenqvist, H. and Laakso, S. Cellular fatty acid profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains in relation to the oleic acid content of the cultivation medium. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4497-4499 (1995)
- Nikkila, P., Johnsson, T., Rosenqvist, H. and Toivonen, L. Effect of pH on growth and fatty acid composition of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus fermentum*. Appl. Biochem. Biotech. 59: 245-258 (1996)
- Dziedzic, J.D. Microencapsulation and Encapsulated Ingredient. Food Technol. 42: 136 (1988)
- Cho, Y.H., Shin, D.S. and Park, J.Y. Microencapsulation technology of food industry. Food Sci. Ind. 30: 98-111 (1997)
- Chang, H.N. and Seong, G.H. Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in lipid-core alginate capsules. Biotech. Bioeng. 51: 157-162 (1996)
- Bartkowiak, A. Alginate-oligochitosan microcapsules. II. Control of mechanical resistance and permeability of the membrane, Chem. Mater. 12: 206-212 (2000)
- Kim, J.G., Lee, S.H., Lee, C.H., Lee, N.S., Son, Y.S. and Lim, S.K. Field treatment of cow manure originated from the clay mineral feeding and the change of nitrogen in soils. Korean J. Environ. Agri. 18: 366-371 (1999)
- Hassan, A.N. and Frank, T.F. Observation of encapsulated lactic acid bacteria using confocal laser microscopy, J. Dairy Sci. 78: 2624-2628 (1995)
- MID. Inc. Operating manual Ver 6, Sherlock microbial identification system
- Kim, H.S. Studies on the viability of *Lactobacillus acidophilus* IFO 3205 by microencapsulation, Ph.D. dissertation, Seoul National University, Seoul (1990)

(2001년 9월 19일 접수)