

배지조성 및 배양환경 최적화에 의한 *Bifidobacterium*의 고농도 배양

송수한 · 김택범¹ · 지근억² · 오훈일 · 오덕근^{1*}
세종대학교 식품공학과, ¹세종대학교 생명공학과, ²서울대학교 식품영양학과

High Density Cell Culture of *Bifidobacterium* by Optimization of Medium Composition and Culture Conditions. Song, Su-Han, Teak-Bum Kim, Geun Eog Ji, Hoon Il Oh, and Deok-Kun Oh. Department of Food Science and Technology, ¹Bioscience and Biotechnology Sejong University, Seoul 143-747, Korea, and ²Department of Food Science and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea - *Bifidobacterium* strain was isolated from the feces of breast fed infants. The isolated strain was identified as *Bifidobacterium longum* by 16S rRNA sequence analysis and named as *Bifidobacterium* SH2. The MRS medium was modified to obtain high density cells of *Bifidobacterium* SH2. The optimal medium was determined to be 50 g/L lactose, 10 g/L beef extract, 10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 7 g/L sodium acetate, 2 g/L ammonium citrate, 2 g/L disodium phosphate, 1 g/L tween 80, 0.2 g/L MnSO₄ and 0.5 g/L L-cysteine. The pH and temperature were optimized as 5.0 and 37°C, respectively. Through out the optimization of medium composition and culture conditions, the dry cell weight and viable cell count were 2.5 times and 1.8 times higher than those in MRS medium, respectively.

Key words: *Bifidobacterium*, MRS medium, culture conditions, medium optimization

인간의 장에는 10¹¹ CFU/g 정도의 미생물이 서식하고 있고, 그 양도 분변의 40~50%에 이르는 것으로 알려져 있다 [1]. 이들 세균 중 젖산균은 각종 유기산을 생성하여, 장내 pH를 저하 시킴으로써 *Clostridium*, *Shigella*, *Escherichia coli* 등 유해 미생물의 장내 생육을 억제하고, 장관 벽을 자극하여 연동운동을 촉진시켜 소화 흡수를 돕고, 생성된 산은 다시 ammonia와 amine을 이온형태로 전환시킴으로써 유해 물질의 장내 흡수를 억제시키는 유익한 균이다 [2,12]. 최근 유산균 발효유가 인체에 미치는 건강증진효과가 연구되어 많은 사실들이 밝혀지고 있고, 그 예로써 장내 유산균의 개선, 정장 작용, 설사와 변비의 개선, 혈중 콜레스테롤의 저하효과, 유산균의 세균성 식중독 억제효과, 항암 효과 등의 기능성이 있음이 밝혀지고 있다 [3]. 이들 유산균들 중에서 최근 가장 주목을 받고 있는 균이 *Bifidobacterium*이며, 1965년경부터 *Bifidus*균은 Lactic acid bacteria 보다 오히려 장내 균총을 구성하는 중요한 균으로 인식되어져 왔고, 최근에는 각종 발효식품의 제조균으로서, 또한 정장제 제조균이나 probiotics균 또는 prebiotics균으로서 인체의 건강 기능 조절에 있어서 그 중요성이 인식되고 있다. 이들은 대장암 증식 억제 기능이 있다고 알려진 butyrate의 생산기능은 떨어지지만 정장 효과가 우수한 acetate 등을 효율적으로 생산하여 유해 세균의 증식 억제, 강력한 발암성과 돌

연변이성 유도물질인 nitrosamine의 생성억제, 면역세포의 활성화 작용으로 동물 실험에서 *Bifidobacterium* 투여군에서 암의 발생이 현저히 감소하는 것으로 알려져 있다 [4,5]. 그러나 *Bifidus*균이 영양요구성과 배양방법이 까다롭고, 절대 혐기성이라는 특성으로 인하여 주로 플라스크 위주로 연구되어 왔고, 발효조에 의한 배양 및 산업화 연구는 이루어지지 않고 있으며, 일부 이루어진 결과조차 기업 주요기술과 관계되어 공개되지 못하고, 주로 국외에서 행하여졌기 때문에 국내에서 사용되는 대부분의 starter 유산균 및 *Bifidus*균의 대부분은 수입에 의존하고 있는 실정이다 [13]. 따라서 본 실험에서는 생균 및 사균체로서도 건강증진효과가 탁월한 *Bifidobacterium*를 MRS 배지를 기본 배지로 이용하여 이를 최적화 시킨 후 온도, pH, 교반속도 등의 배양조건을 최적화 시킴으로써 고농도의 균체를 회수하고자 하였다.

재료 및 방법

실험균주

배양실험에 사용된 균주는 건강한 모유 영양아의 분변에서 분리된 300여 종의 *Bifidobacterium* 중 내 산성력, 내 담즙산력, 항 돌연변이 능력, 콜레스테롤 저하 능력이 우수한 10여 종의 *Bifidus*균을 서울대 지근억 교수 연구실로부터 분양 받아 사용하였다. 이들 *Bifidus*균을 1%의 CaCO₃가 첨가된 MRS agar 배지 (Table 1)에 계대하여 colony를 가장 빨리 형성하고, 유기산 생성능력이 왕성하여 가장 큰 투명환을 형성하는 colony를 선별하여 5 세대에 걸쳐

*Corresponding author
Tel. 82-2-3408-3767, Fax. 82-2-3408-3334
E-mail: deokkun@sejong.ac.kr

tooth picking하여 매번 가장 우수한 성질을 보이는 균을 선별하여 20% glycerol을 첨가하여 -80°C에서 냉동 보관 후 사용하였다. 분리된 *Bifidus*균의 동정은 (주)BIFIDO에 의뢰하여 16s rRNA 염기서열분석법을 이용하여 동정 결과 이 균주는 *Bifidobacterium longum* 속으로 밝혀졌고 *Bifidobacterium* SH2라 명명하였다.

배지성분 최적화

배지 성분 중 탄소원 최적화 실험은 MRS 배지에서 탄소원을 제거하고 여러 가지 탄소원의 농도를 각각 30 g/L 첨가하여 수행하였다.

최적 유기 질소원을 찾기 위해 배지에 유기 질소원으로서 control로 MRS 배지를 구성하는 5 g/L yeast extract, 10 g/L beef extract, 10 g/L peptone을 사용하였고, 또 한 가지 질소원을 25 g/L로 하여 배지에 yeast extract, beef extract, malt extract, peptone, tryptone, casitone를 각각 첨가하여 균체량을 측정하였다.

무기염 및 기타 성분 최적화에서는 sodium acetate ammonium citrate, tween 80, MgSO₄, MnSO₄, maleic acid 등의 각각 성분의 농도별 균체량을 측정하였다.

배양조건 최적화

균주 배양은 glycerol stock 상태로 냉동 보관된 균주를 MRS배지를 함유한 cap tube에 접종하여 37°C에서 18시간 정도 정체 배양한 후 Spectrophotometer(Shimadzu UV-1240, Kyoto, Japan)을 이용하여 OD(600nm)값이 14 정도에 도달하여 다시 한번 cap tube에 옮겨 18시간 배양하였다. 이 배양액을 본 배양에 사용하였으며, 본 연구에서 본 배양은 cap tube와 발효조를 사용하여 2 종류의 본 배양을 수행하였다. Cap-tube의 본배양은 20, 50 ml의 cap-tube에 배지를 가득 채워, 별도의 gas 치환 없이 tube내 산소가 존재하는 공간을 최대한 줄여 혐기적인 조건을 유지시켰다. 발효조의 본 배양은 7 L fermentor(Bio-12G, Bio-tron, Korea)에서 조업부피 4 L로 배양하였고, 배양기 내의 혐기적인 조건을 유지 시켜 주기 위해서 N₂:CO₂=95:5의 비율인 혼합가스를 사용하였다. 일반적으로 *Bifidus*균은 배양 중 균체들이 서로 뭉치는 현상이 발견되는데 이는 균체가 생성하는 다당류의 영향, 세포벽의 소수성 정도, 형태, 영양상태 등 여러 가지 원인에 때문이고, 이는 어느정도의 물리적인 힘을 줌으로써 해결 할 수 있다[6]. 그러나, *Bifidobacterium* SH2 균주는 균체들이 뭉치는 현상이 발견되지 않았으므로 교반속도를 200~300 rpm으로하여 배양하면 균체가 잘 혼합될 뿐만아니라 pH조절을 위하여 첨가시켜준 암모니아수가 원활히 섞일수 있었다.

균체량 측정

균체농도는 주기적으로 채취한 배양액을 희석하여

Spectrophotometer 이용하여 600 nm에서 OD 0.8 이하가 되도록 희석해서 측정한 후 건조균체량(dry cell weight, DCW)과 OD값 사이의 관계식을 이용하여 얻은 건조 균체중량으로 환산하여 구하였다. 생균수 측정은 표준방법(standard plate count method)을 사용하였으며, MRS agar 배지에 도말하여 anaerobic jar(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 넣어 혼합가스(N₂:CO₂=95:5)로 기체를 2회 치환 후 37°C에서 48시간 이상 배양한 후에 나타난 colony수를 계수하여 CFU/ml로 표시하였다.

잔당량 측정

배지내 잔당량은 배지를 15,000 × g에서 3분간 원심 분리한 후 상등액을 phenol-sulfuric method(total sugar)법으로 측정하였다[10].

배지 및 시약

균주의 배양에는 Hardy Diagnostics(Santa Maria, CA, USA)의 MRS 조성을 기초로 하여 조제하여 사용하였고, 배지 조제에 사용된 yeast extract, beef extract, peptone 등은 Hardy Diagnostics(Santa Maria, CA, USA)의 제품을 사용하였다. 이외의 시약은 1급 시약을(Duksan Chemical Co., Korea)사용하였다.

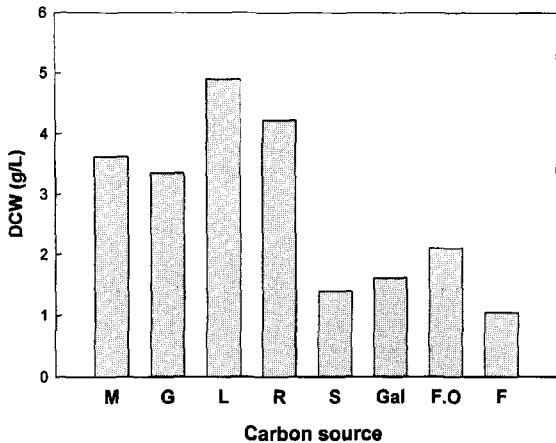
결과 및 고찰

배지조성의 최적화

*Bifidobacterium*은 종에 따라 균체 생산이 잘 되는 탄소원이 다르므로 균체 생산에 적합한 탄소원을 알아보았다[7,11,13]. MRS 배지 성분에서 탄소원을 제거하고 여러 가지 탄소원으로 배양한 결과 *Bifidobacterium* SH2는 lactose에서 건조 균체량 4.83 g/L로 가장 잘 성장하였고(Fig. 1), fructooligosaccharide, glucose, maltose 및 raffinose 등은 비교적 성장을 잘 하는 반면, fructose, sucrose 및 galactose가 첨가된 배지에서는 낮은 균체 농도를 보였다. 따라서 가격도 비교적 저렴하고 균체 회수량도 가장 많은 lactose를 *Bifidobacterium* SH2의 배양에 탄소원으로 결정하였다.

유기질소원 최적화 실험에서는 *Bifidobacterium* SH2의 생육에 가장 적합한 유기질소원은 control과 beef extract로 건조 균체량이 각각 5.05 g/L, 4.92 g/L로 비슷하게 나타났으나(Fig. 2), 이를 발효조에서 배양할 경우에는 beef extract만을 넣어준 것에 비해 혼합 유기질소원인 beef extract, yeast extract 및 peptone을 넣어준 경우 20% 정도 균체량이 증가하였으므로 *Bifidobacterium* SH2의 배양을 위한 질소원으로 MRS 배지 조성상의 혼합 유기질소원을 선택하였다.

MRS 배지내에 5 g/L 첨가되는 sodium acetate의 최적 농도를 알아보기 위해 배지 중에 sodium acetate를 여러



M: maltose, G: glucose, L: lactose, R: raffinose, S: sucrose
Gal: galactose, FO: fructooligosaccharides, F: fructose

Fig. 1. Effect of various carbon sources on the growth of *Bifidobacterium* SH2.
The concentration of carbon source was 30 g/L.

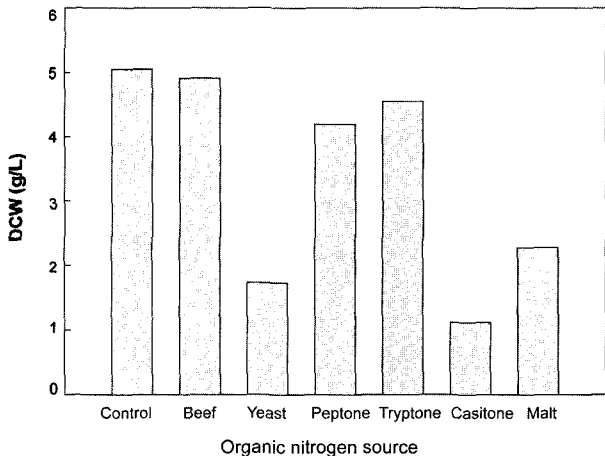


Fig. 2. Effect of organic nitrogen source on the growth of *Bifidobacterium* SH2.
The concentration of nitrogen source was 25 g/L.

가지 농도로 첨가하여 sodium acetate가 *Bifidobacterium* SH2의 생육에 미치는 영향을 실험하였다. 그 결과 건조 균체량은 sodium acetate양이 7 g/L일 때 최대를 나타내었다(Fig. 3).

MRS 배지에 첨가되는 다른 성분인 ammonium citrate, tween 80 등의 최적량은 MRS 배지의 함량과 동일하게 각각 2 g/L, 1 g/L로 나타났으며(data not shown), MRS 배지에 미량으로 첨가되는 성분에는 MgSO₄, MnSO₄, maleic acid가 있는데 이 중 maleic acid와 MgSO₄의 농도별 실험에서는 균체 성장에 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 MnSO₄는 MRS에는 0.05 g/L 존재하지만 *Bifidobacterium* SH2의 성장에서는 0.2 g/L일 때 최대 균체량을 보였다(Fig. 4).

배지 최적화 결과 *Bifidobacterium* SH2의 고농도 배양을 위한 최적화 배지는 Table 1과 같고, 배지 최적화 결과

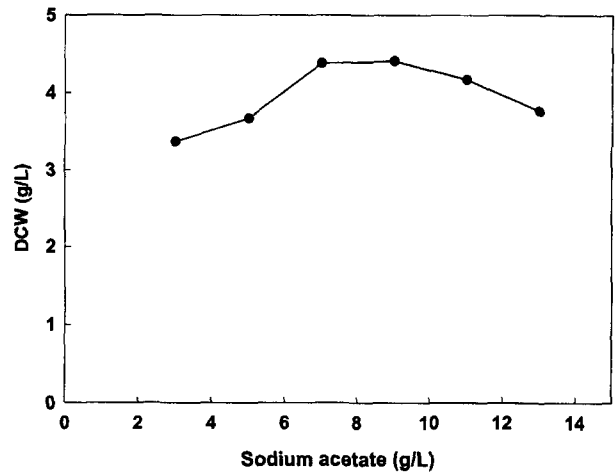


Fig. 3. Effect of the concentration of sodium acetate on the growth of *Bifidobacterium* SH2.

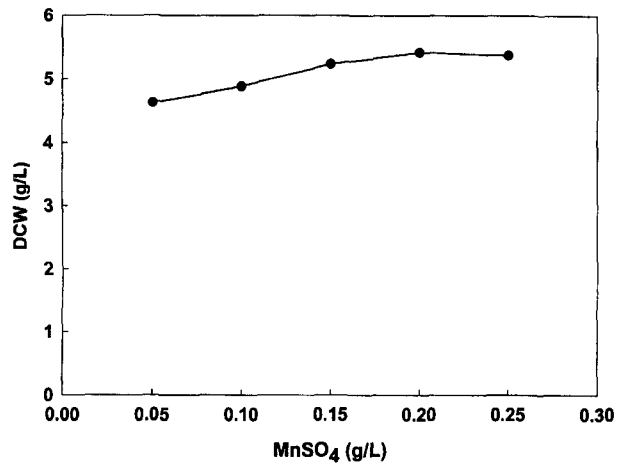


Fig. 4. Effect of the concentration of MnSO₄ on the growth of *Bifidobacterium* SH2.

건조 균체량이 50% 이상 증가하였다(Fig. 5)

배양조건 최적화

최적화 배지를 이용하여 배양조건의 최적화 실험을 수행하였다. 먼저 *Bifidobacterium* SH2의 최적 성장 온도를 알아보기 위하여 300ml bottle에 접종하여 35, 37, 39°C로 각각 설정된 incubator에서 배양한 결과 *Bifidobacterium* SH2의 최적 온도는 37°C이었다(data not shown). Cap-tube에서 정체 배양 할 경우와는 달리, 발효조에서 균을 배양 할 경우는 pH, aeration rate, agitation speed 등을 조절하여 배양조건을 최적화 시킬 수 있기 때문에 일반적으로 균체 수율이 높아지게 되고, 기질의 이용능력 또한 변하게 된다[11]. 따라서 최적 기질 농도를 알아보기 위하여 lactose를 발효조에서 50, 70, 90, 120 g/L의 농도로 각각 발효를 수행하였다. Cap-tube에서는 lactose의 농도가 30 g/L까지는

Table 1. Compositions of medium component in MRS and modified MRS(M-MRS) media (unit : g/L)

Component	MRS	M-MRS
Dextrose	20	
Lactose		50
Peptone	10	10
Beef extract	10	10
Yeast extract	5	5
Sodium acetate	5	7
Disodium phosphate	2	2
Ammonium citrate	2	2
Tween 80	1	1
MgSO ₄	0.1	0
Maleic acid	0.1	0
MnSO ₄	0.05	0.2
L- cysteine		0.5

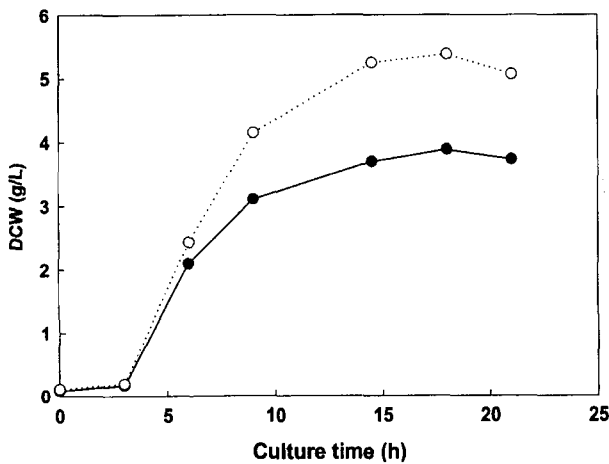


Fig. 5. Growth of *Bifidobacterium* SH2 in MRS medium and in modified MRS(M-MRS) medium (○) M-MRS, (●) MRS.

증가하였으나 그 이상에서는 균체 농도가 큰 차이가 없었다. 발효조에서는 lactose농도가 30 g/L까지는 증가하였고 70 g/L일 때 가장 높은 균체량을 얻을 수 있었다(Fig. 6).

Bergey's Manual에 의하면 *Bifidobacterium* SH2 균주의 경우 배양 후반부에는 pH가 4.5~3.9까지 떨어지게 되므로 pH를 조절하지 않을 경우 배양 말기에 세포는 급속히 사멸하기 시작한다. 따라서 최적 pH를 알아보기 위해 pH를 4.5~7.0 범위에서 균을 배양하였다. 접종 후 배지의 pH는 일반적으로 6.4~6.5 정도이었고, 원하는 pH로 조절하기 위하여 별도의 산을 사용하지 않고 자연 발효시켜 선정된 pH에 도달한 시점부터 암모니아수 원액을 이용하여 pH를 조절 하였다. 실험 결과 *Bifidobacterium* SH2 균주의 배양을 위한 최적 pH는 5.0으로 나타났다(Fig. 7). 이와 같이 *Bifidobacterium* SH2가 낮은 pH에서 최적 성장을 보이는 이유는 pH를 조절하기

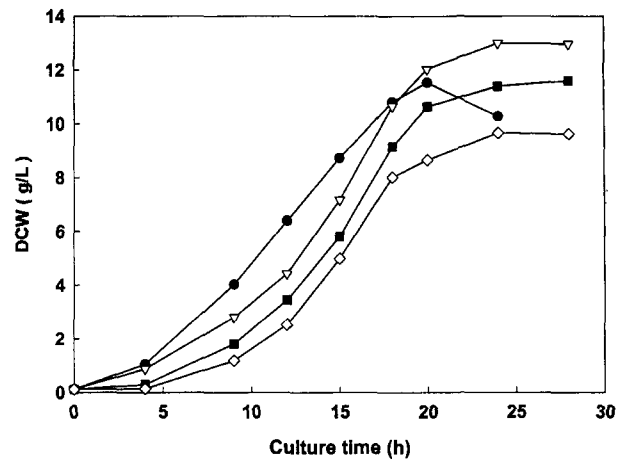


Fig. 6. Effect of the concentration of lactose on the growth of *Bifidobacterium* SH2. (●) 50 g/L, (▽) 70 g/L, (■) 90 g/L, (◇) 120 g/L.

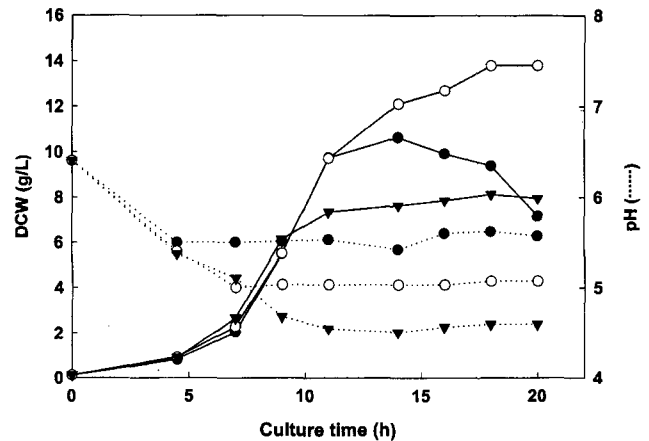


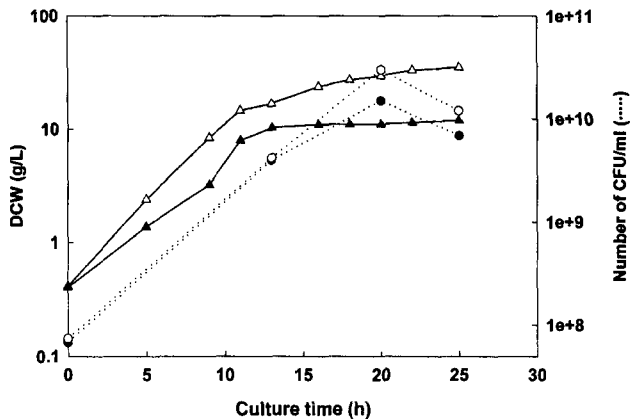
Fig. 7. Effect of various pH on the growth of *Bifidobacterium* SH2. (●) pH 5.5, (○) pH 5.0, (▽) pH 4.5.

위해 사용되는 암모니아수의 영향으로 추정 할 수 있다. 배양 중 사용된 암모니아수의 투입 시작 시간과 양을 Table 2에 나타내었는데, 이와 같이 pH가 5.0 보다 높게 설정될 경우 배양중에 투입되는 다량의 암모니아수의 영향으로 대수 증식기의 균주들이 영향을 받기 때문으로 추정된다.

혼합기체의 첨가량이 균체 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 혼합기체를 0에서 0.25 vvm까지 변화시키며 배양하였다. 접종 전 약 30분 가량 0.5 vvm의 유속으로 기체를 공급하여 배양기 내를 혐기적인 상태를 만든 후 샘플채취 시를 제외하고, 배양기의 공기 주입구와 배출구를 밀봉하여 기체의 흐름을 차단한 것을 0 vvm으로 하였다. 두 가지 실험에 균체량 차이가 거의 없어 *Bifidobacterium* SH2의 성장에 혼합기체의 첨가량은 균체 성장에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 판명되었다(data not shown).

Table 2. Feeding amount of ammonia water on the growth of *Bifidobacterium* SH2 in 7L fermentor

	Feeding amount of ammonia water (ml)	Feeding start time (h)	DCW (g/L)
pH 5.5	350	4.5	10.63
pH 5.0	180	7.5	13.79
pH 4.5	75	11.0	8.13

**Fig. 8. Growth of *Bifidobacterium* SH2 in MRS medium and in M-MRS medium.**

(Δ) M-MRS, (\circ) CFU/ml of M-MRS, (\blacktriangle) MRS, (\bullet) CFU/ml of MRS.

최적조건에서의 균체성장

발효조를 이용하여 최적화 한 M-MRS 배지에서 온도 37°C, pH 5.0에서 배양한 결과 MRS 배지에서 보다 건조균체량은 2.7배 증가하여 14 g/L를 나타내었고, 생균수는 1.8배 증가한 3×10^{10} 을 나타내었다(Fig. 8). 이상의 결과는 *Bifidobacterium*의 균체 성장에 대한 skim milk 배지를 사용하여 높은 농도로 얻은 2.5×10^9 보다 높은 수준이다[8]. 본 연구를 통하여 *Bifidobacterium*을 고농도로 배양함으로써 혐기 배양의 기초를 확립함은 물론 한국인 유발암 2 위로 급부상하고 있는 대장암 발생의 억제에 기여 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서 사용된 *Bifidobacterium*은 모유를 섭취한 유아의 분변으로부터 분리되었으며 16s rRNA 염기서열분석 결과 *Bifidobacterium longum*속으로 동정되어 *Bifidobacterium* SH2라 명명하였다. *Bifidobacterium* SH2의 고농도 배양을 위하여 기본 배지로 MRS 배지를 변형하여 최적화한 결과 최적 배지의 조성은 50 g/L lactose, 10 g/L beef extract, 10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 7 g/L sodium acetate, 2 g/L ammonium citrate, 2 g/L disodium phosphat, 1 g/L

tween 80, 0.2 g/L MnSO₄, 0.5 g/L L-cysteine이었다. 배양조건을 최적화한 결과 pH는 5.0에서, 온도는 37°C에서 균체량이 최대로 나타났다. 배지와 배양 조건을 최적화하여 건조 균체량과 생균수가 MRS 배지 보다 각각 2.7배, 1.8배 증가한 결과를 얻었다.

감사의 글

본 논문은 2000년도 과학기술부 생명공학 실용화 사업의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Anatoly, B. and M. C. Robin. 1989. Biochemistry and Physiology of *Bifidobacteria*. CRC Press, Inc. Florida. pp. 1-131.
- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8 ed. pp. 669-676.
- Gilliland, S. E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *Microbiol. Rev.* **87**: 175-181.
- Hughes, D. B. and D. G. Hoover. 1991. *Bifidobacteria* - Their potential for use in american dairy products. *Food Technol.* **45**: 74-83.
- Hirayama, K. and J. Rafter. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* **2**: 681-686.
- Husain, I., J. A. Poupard, and R. F. Norris. 1991. Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum*. *J. Bacteriol.* **111**: 841-844.
- Kim, T. S., H. H. Hyun, and H. H. Lee. 1995. Fermentation conditions for production of cell mass and comparison of saccharide utilization in *Bifidobacterium longum* and *B. breve*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 285-291.
- Lim, K. S., C. S. Huh, and Y. J. Back. 1990. Studies on the growth of *Bifidobacterium bifidum* HY-8108 in milk. Effect of addition of growth promoting substances and cultivation with other lactic acid bacteria on the growth of *Bifidobacterium bifidum* HY-8108. *Kor. J. Dairy Sci.* **12**: 172-180.
- Roy, D., F. Dussault, and P. Ward. 1990. Growth requirements of *Bifidobacterium* strains in milk. *Milchwissenschaft.* **45**: 500-513.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
- Stanbury P. F., A. Whitaker, and S. J. Hall. 1994. *Principles of fermentation technology*, pp 147-166. 2nd ed. Butterworth Heinemann, Boston.
- Wood, B. J. B., W. H. Holzapfel. 1995. *The Lactic acid bacteria(2). The genera of the Lactic Acid Bacteria*. Blackik Academic & Professional, London. Chapter 8. pp. 279-306.
- 장영효 1992. *Bifidobacterium*의 성장촉진물질에 관한 연구. 성균관 대학교 석사학위 논문.

(Received Dec. 20, 2001/Accepted Mar. 7, 2002)