

Lactobacillus crispatus 생균 생산을 위한 whey 배지 최적화

장정은, 구자룡, 소재성, 윤현식*

Production of Viable *Lactobacillus crispatus* by Using Whey Based Medium

Chung Eun Chang, Ja-Ryong Koo, Jae-Seong So, and Hyun Shik Yun*

접수: 2011년 8월 23일 / 게재승인: 2011년 12월 20일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Whey based medium was optimized for the production of viable *Lactobacillus crispatus* KLB 46 isolated from the vagina of Korean women. Among the various nitrogen sources such as yeast extract, beef extract, and proteose peptone no. 3 supplemented to whey, beef extract showed the highest viable cell production. The addition of Tween 80 to the whey based medium increased viable cell concentration. As beef extract supplementation is not economically attractive, corn steep liquor was added as a supplementary nitrogen sources. When corn steep liquor was supplied with beef extract with the ratio 5 : 1, the viable cell count was 3.11×10^9 CFU/mL. Also, the addition of mineral salts containing sodium acetate (5 g/L), potassium phosphate dibasic (2 g/L), magnesium sulfate (0.1 g/L) and manganese sulfate (0.05 g/L) to the whey medium increased viable cell count further (5.00×10^9 CFU/mL).

Keywords: *Lactobacillus crispatus*, cheese whey, media optimization, viable cell

1. 서론

*Lactobacillus*는 건강한 질을 유지하는데 중요한 역할을 하는 보호균종이다. *Lactobacillus*는 젖산, 과산화수소, 박테리 오신과 같은 우리가 원하지 않는 병원성 세균의 성장을 저해

하는 물질을 생산한다 [1,2]. 질 내부에서 세균성 질염을 일으키는 *Gardnerella vaginalis*나 다른 혐기성 미생물들은 정상인의 *Lactobacillus* 우점 균총을 사라지게 한다 [1,3]. *Lactobacillus*를 우점 균총으로 회복하는 것은 질 내 다른 세균성 질염을 일으키는 유해균을 제거하기 때문에 질염 치료를 위하여 중요하다 [4,5]. 질염 환자들은 질 내 정상 균총을 회복하기 위하여 여러 종류의 non-prescription 제품을 이용할 수 있으며 시판되는 제품으로는 *Lactobacillus*를 포함하는 유제품 (yogurt, acidophilus milk)이나 *Lactobacillus* 파우더와 정제 제품이 있다 [2]. 세균성 질염을 살아있는 *Lactobacillus*를 이용하여 생태학적으로 처리하기 위해서는 *Lactobacillus* 생균을 대량으로 생산하여야 한다. *Lactobacillus*를 일반적으로 배양하는데 이용되는 MRS 배지는 고가이므로 *Lactobacillus* 생균 정제를 생산하기 위해서는 저가의 배지 개발이 필요하다. 본 연구에서는 *Lactobacillus*를 대량으로 생산하기 위하여 cheese whey를 사용하고자 한다.

Cheese whey는 유제품 생산 시설에서 생산되는 부산물이며 4.5% 유당과 0.8% 단백질, 그리고 미량의 무기물과 비타민을 포함하고 있다 [6]. 여러 연구자에 의하여 cheese whey가 포함되어 있는 배지를 이용하여 *Lactobacillus*에 의한 젖산 발효에 대한 연구가 수행되었다 [7,8]. 본 연구에서는 cheese whey를 이용하여 *Lactobacillus* 생균수를 최대화하기 위한 배지를 연구하였다. 높은 생균수를 얻기 위하여 배지내 질소원의 종류 및 농도, Tween 80 및 무기물의 영향을 고찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. Strain, medium and culture condition

본 연구에서는 질에서 분리된 *Lactobacillus crispatus* KLB

46을 사용하였다 [4]. 균주는 10% glycerol 용액에 현탁 후 deep freezer (-70°C)에 보관하였다. Cell은 MRS 배지 (Difco Lab., U.S.A.)를 이용하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였다.

2.2. Aerobic and anaerobic cultures

통기성 및 혐기성 조건을 위하여 foam 플러그와 rubber 플러그를 이용하여 incubator에서 shaking (200 rpm) 및 static 배양을 하였다. 온도는 37°C에서 24시간 동안 250 mL Erlenmeyer flask에 MRS 배지 50 mL을 넣고 배양하였다.

2.3. Whey-based medium

건조된 분말 cheese whey (Sigma Chemical Co.; 65% lactose, 11% protein)에 물을 섞어 유당농도가 5%가 되도록 cheese whey를 재구성하여 사용하였다. 질소원의 종류에 따른 영향을 보기 위하여 proteose peptone no. 3, beef extract, yeast extracts, corn steep liquor (CSL)를 각각 준비하여 cheese whey 배지에 첨가하였다. 다른 배지 구성원들도 따로 준비하여 cheese whey 배지에 첨가한 후 85% (v/v) phosphoric acid와 50% (v/v) NH₄OH 용액을 이용하여 pH를 5.5로 조절하여 사용하였다. 1% (v/v) *L. crispatus* KLB 46을 배지에 접종한 후 37°C에서 배양하고 생균수와 흡광도를 30시간 동안 측정하였다.

2.4. Analytical methods

생균수는 배양액을 희석하여 MRS plate에서 spot-counting method [9]를 이용하여 측정하였다. 배양액의 optical density는 spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 600 nm의 파장에서 측정하였다. 배양액의 pH는 pH meter (MP220, Mettler Toledo, Switzerland)로 측정하였다. Cheese whey 배지의 단백질질을 정량하기 위하여 Protein assay kit (BioRad Laboratories, Hercules, U.S.A.)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

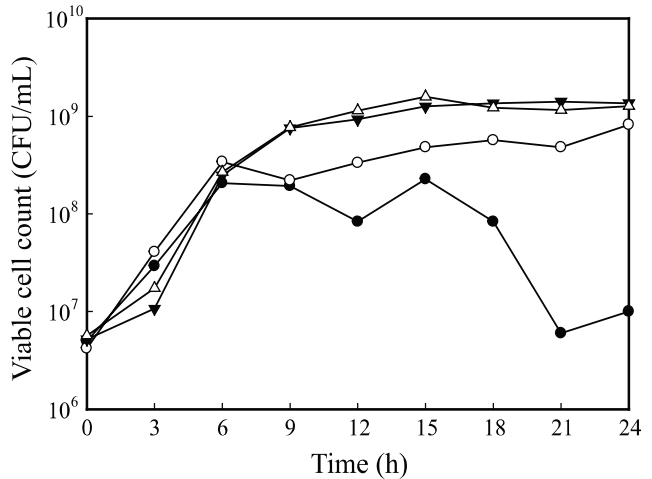
3.1. Aerobic and anaerobic cultures

L. crispatus KLB 46의 성장을 foam plug와 rubber plug를 이용하여 통기 조건과 혐기조건하에서 각각 고찰하였다. *L. crispatus* KLB 46를 통기조건에서 shaking incubator에서 배양하였을 때 생균수는 15시간 후에 크게 감소하였다 (Fig. 1). Static 배양 조건에서 *L. crispatus* KLB 46의 생균수는 통기성 또는 혐기성 배양과 상관없이 높게 유지되었다. 최대 생균수는 배양시작 15시간 후 1.58×10^9 CFU/mL이었으며, 따라서 이후 모든 실험을 혐기성 static 조건에서 실시하였다.

3.2. Effect of nitrogen source

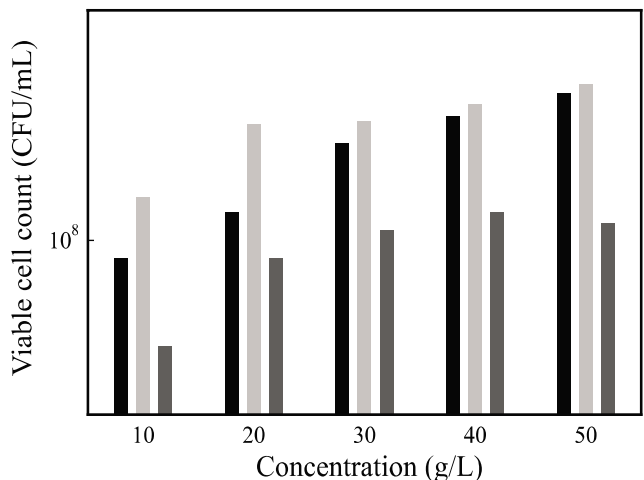
건조된 분말 형태의 cheese whey를 재구성한 후 측정된 단백질 농도는 8.18 mg/mL이었지만 autoclave 이후 단백질 농도는 2.12 mg/mL이었다. Fig. 2에 질소원에 따른 *L. crispatus* 생균수의 변화를 나타내었다. 그림에 나타난 바와 같이 가

장 높은 생균수는 beef extract가 질소원으로 사용되었을 때 얻어졌다. Beef extract의 농도가 20 g/L 일 때, 생균수는 1.59×10^8 CFU/mL이었다. Beef extract의 농도가 20 g/L 이상일 때, 생균수는 beef extract 농도에 비하면 크게 증가하지는 않았다.



(●- foam plugs at shaking condition, -▲- foam plug at static condition, -○- rubber plugs at shaking condition, -△- rubber plug at static condition)

Fig. 1. Aerobic and anaerobic culture conditions of *L. crispatus* KLB 46.



(■: proteose peptone No. 3, ▒: beef extract, ■: yeast extract)

Fig. 2. Effects of various nitrogen sources on viable cell production of *L. crispatus* KLB 46.

3.3. Effect of Tween 80

Tween 80은 *Lactobacilli*의 성장에 좋은 영향을 주는 인자로 알려져 있다 [10]. Cheese whey 배지에서 생균수에 대한 Tween 80의 영향을 고찰하였다. Table 1에 생균수에 대한 Tween 80의 영향을 정리하였다. Whey 배지에 Tween 80을 첨가한 결과 생균수가 7.7배 증가하였다. 얻어진 생균수는 1.5×10^9 CFU/mL로 MRS 배지에서 배양했을 때 얻을 수 있는 생균수와 유사한 수준이었다.

Table 1. Effect of Tween 80 concentration on the growth of *L. crispatus* KLB 46 in a whey-based medium

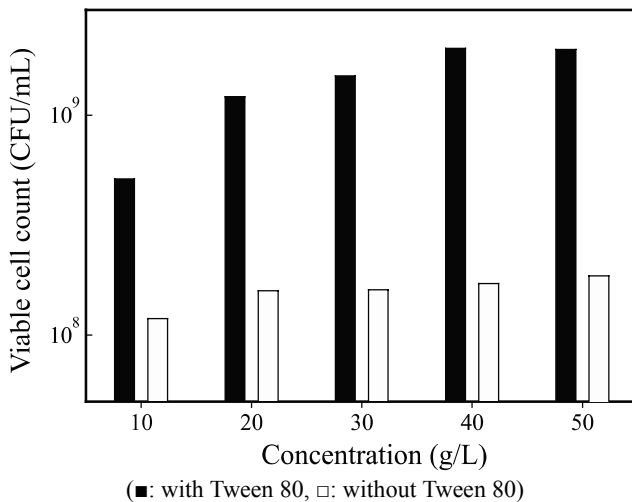
Tween 80 concentration (%)	Viable cell number (CFU/mL)
0	1.6×10^8
0.05	1.0×10^9
0.1	1.2×10^9
0.15	1.2×10^9
0.2	1.1×10^9
0.25	8.7×10^8

Table 2. Effect of addition of CSL and beef extract on the viable cell production

BE/CSL (g/L)	CFU/mL	OD ₆₀₀	Final pH
10/20	1.4×10^9	7.1	3.89
10/30	1.9×10^9	7.6	3.92
10/40	2.4×10^9	7.7	3.95
10/50	3.1×10^9	7.9	3.97
10/60	3.0×10^9	8.3	4.00
20/0	1.3×10^9	4.8	3.96
20/10	1.4×10^9	6.7	3.92
20/20	1.7×10^9	7.5	3.93
20/30	2.1×10^9	7.8	3.96
20/40	2.2×10^9	8.0	3.99

BE: Beef extract.

CSL: Corn steep liquor.

**Fig. 3.** Effect of beef extract on viable cell production of *L. crispatus* KLB 46.

3.4. Use of CSL as nitrogen source

Whey 배지에 20 g/L beef extract와 0.1% (w/v) Tween 80을 첨가하였을 때 높은 *L. crispatus* KLB 46 생균수가 얻어졌다. 그런데 *Lactobacillus*를 대량으로 생산하기 위해서 고가의 beef extract는 전체 발효공정의 비용을 상승시키는데 큰 영향을 미친다. 따라서 본 연구에서는 질소원으로서 CSL를 whey 배지에 사용하였다. CSL는 가격이 싸지만 비타민, 아미노산, 미네랄과 함께 많은 성장인자를 함유하는 경제적인 질소원이다. Whey 배지에 CSL의 농도가 100 g/L 일 때 *L. crispatus* KLB 46의 최대 생균수는 약 1.04×10^9 CFU/mL

이었다. 그러나 높은 CSL 농도에서는 배지의 점도가 높아 배양시 혼합에 어려움이 있었다. 따라서 beef extract나 CSL를 각각 사용하기 보다는 혼합하여 사용하는 것이 효과적이다. Table 2에 CSL와 beef extract의 혼합 비율에 따른 생균수를 정리하였다. Beef extract와 CSL를 1:5로 혼합하여 whey 배지에 첨가하였을 때 생균수가 beef extract만 사용하였을 때보다 약 2배 (3.11×10^9 CFU/mL) 향상되었다. OD 값은 CSL에 포함되어 있는 물질 때문에 정확한 값을 얻을 수 없었으며 최종 pH에는 큰 차이가 없었다.

3.5. Effect of trace element

미량원소는 배지에 높은 농도로 포함되어 있지는 않지만 세포 성장에 있어서 필수적이다. MRS 배지에 사용되는 미량원소를 첨가하면서 생균수를 측정한 결과, ammonium citrate (2 g/L)를 제외한 sodium sulfate acetate (5 g/L), potassium phosphate dibasic (2 g/L), magnesium sulfate (0.1 g/L), manganese (0.05 g/L)가 첨가 되었을 경우에 생균수는 5.00×10^9 CFU/mL로 미량원소가 포함되지 않은 배지의 생균수 4.47×10^9 CFU/mL 보다 높았으며, MRS 배지보다 3.3배 높은 생균수를 얻을 수 있었다.

4. 결론

새균성 질염을 *Lactobacillus*를 이용한 생태학적 처리를 위해서 *Lactobacillus*를 대량 생산하여야 한다. *Lactobacillus*를 일반적인 배양 방식인 MRS 배지를 이용한 방식은 고가이기 때문에 저가의 배지 개발이 필요하다. 본 연구에서는 cheese whey를 이용하여 *Lactobacillus* 생균수를 최대화하기 위하여 질소원과 Tween 80, CSL를 이용하여 연구를 하였다. *Lactobacillus* 배양에 가장 많이 이용되는 MRS 배지와 비교하여 본 연구에서 얻어진 whey 배지는 3배 이상 증가시켰으며 배지의 원가를 고려하면 생산단가를 약 10배 정도 감소시킬 수 있었다. Whey는 COD가 높아 처리없이 배출될 경우 환경오염에 영향을 미치지만 본 연구에서 얻어진 결과를 이용하여 *Lactobacillus crispatus* KLB 46 생균의 대량 생산을 위한 배지로 이용가능하다.

감사

이 논문은 인하대학교의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Klebanoff, S. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M., and K. K. Holmes (1989) Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. Clinical Microbiol.* 27: 251-256.

2. Hughes, V. L. and S. L. Hillier (1990) Microbiologic characteristics of *Lactobacillus* products used for colonization of the vagina. *Obstet. Gynecol.* 75: 244-248.
3. Sobel, J. D. (1989) Vaginal infections in adult women. *Med. Clinical North America* 74: 1578-1602.
4. Chang, C. E., S. C. Kim, J. S. So, and H. S. Yun (2001) Cultivation of *Lactobacillus crispatus* KLB 46 isolated from human vagina. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6: 128-132.
5. Parent, D., Bossens, M., Bayot, D., Kirkpatrick, C., Graf, F., Wilkinson, F. E., and R. R. Kaiser (1996) Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied *Lactobacilli Acidophili* and a low dose of Estriol a placebo-controlled multicentric clinical trial. *Arzne-Fors/Drug Res.* 46: 68-73.
6. Lund, B., Norddahl, B., and B. Ahring (1992) Production of lactic acid from whey using hydrolysed whey protein as nitrogen source. *Biotechnol. Lett.* 14: 851-856.
7. Amrane, A. and Y. Prigent (1998) Lactic acid production rates during the different growth phases of *Lactobacillus helveticus* cultivated on whey supplemented with yeast extract. *Biotechnol. Letters* 20: 379-383.
8. Arasaratnam, V., Senthuran, A., and K. Balasubramaniam (1996) Supplementation of with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Enz. Microbial Technol.* 19: 482-486.
9. De Man, J. C., Rogosa, M., and M. E. Sharpe (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.