

Calcium Carbonate Buffer System을 이용한 *Bifidobacterium longum*의 배양 효율 증대에 관한 연구

이기용 · 황인범 · 허태련
인하대학교 생물공학과

Enhancement of Cultivation Efficiency of *Bifidobacterium longum* Using Calcium Carbonate Buffer System

Ki-Yong Lee, In-Bum Hwang and Tae-Ryeon Heo
Department of Biological Engineering, Inha University

Abstract

Calcium carbonate (CaCO_3) immobilized with alginate was studied as buffer system to enhance the cultivation efficiency of *Bifidobacterium longum* (ATCC 15707) which is inhibited at low pH. To test the buffering effect of the immobilized CaCO_3 beads, pH value in each modified trypticase-peptone yeast (TPY) broth which is adjusted to pH 4.0 with acetic acid, lactic acid and complex solution of acetic and lactic acid, 3:2 (M:M) was tested by concentration of CaCO_3 bead and reaction time. The buffering effect of CaCO_3 bead became higher with increasing the amount of CaCO_3 bead in the acidic solution. The growth rate of bifidobacteria and buffering effect were examined in relation to the amount of CaCO_3 bead and concentration of glucose in the modified TPY media. The growth rate of bifidobacteria and buffering effect were increased with increasing the amount of CaCO_3 bead and concentration of glucose. Also, the exponential time of bifidobacteria became longer with increasing the amount of CaCO_3 bead and concentration of glucose in the modified TPY media. When we observed the growth rate of bifidobacteria by the method of pH-controlled culture and CaCO_3 buffer system, the CaCO_3 buffer system was more effective than that of pH-controlled culture. Therefore, this CaCO_3 buffer system may be useful as a method to enhance of the cultivation efficiency of bifidobacteria.

Key words: alginate bead, calcium carbonate, bifidobacteria

서 론

유산균은 식품의 영양가치의 향상, 장내 균총의 균형 유지, 유당 소화의 개선 등의 여러가지 생리학적 효과가 보고되고 있으며 그 중에서도 bifidobacteria가 크게 주목받고 있다. Bifidobacteria는 편성 및 통성 혐기성인 그람 양성균의 간균으로 무아포성이며 인체의 장내에 서식하면서 장내의 pH를 떨어뜨려 부패균의 생장을 저해하는 정상작용을 한다^(1,2). 근래에 들어 건강에 대한 사회적 관심이 증가하면서 치료 및 예방학적 측면에서 장내 균총과 건강과의 관련성이 폭넓게 연구, 검토되고 있으며 전세계적으로 bifidobacteria를 함유한 유제품 및 생균제 등이 지속적으로 개발되고 있다.

Bifidobacteria는 요구르트를 비롯한 여러가지 낙농 유제품에 종균으로 사용되고 있으며 인공 영양아를 위한 조제분유의 제조, 그리고 사람과 가축에 대한 치료제 및 예방제로써의 생균제 등에 광범위하게 이용되고 있다⁽³⁾. Bifidobacteria는 1960년대 이후부터 일본이나 유럽등지에서 요구르트를 비롯한 낙농유제품에 사용되기 시작하였으며, 우리나라에서도 80년대 중반에 처음으로 소개되기 시작하여 주로 요구르트와 우유, 생균제 등에 사용되고 있고 그 소비량이 매년 크게 증가하고 있는 추세이다. 그러나 bifidobacteria의 배양에 대한 연구의 부족으로 최근까지도 우리나라는 종균을 거의 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다⁽⁴⁾.

Bifidobacteria는 영양요구가 복잡하여 고가의 배지를 필요로 하고 산소에 민감한 혐기성의 균이며 낮은 pH 환경에서 급격히 사멸하는 등의 특성이 있어서 고농도 배양에 어려움이 있어 왔다. 첫번째로 bi-

Corresponding author: Tae-Ryeon Heo, Department of Biological Engineering, Inha University

fidobacteria는 혐기성 미생물이기 때문에 배양시 배지 내의 산소 분압을 떨어뜨리기 위한 혐기 배양 장치가 필요하다^(6,7). 지금까지는 혐기성균의 배양을 위해 이산화탄소나 질소 가스를 배지에 불어넣어 주거나 가스팩을 이용하는 방법 등으로 해결해 왔으나, 산업적으로 대량생산할 경우에는 그 장치 또한 대형화되어야 한다. 두번째로 bifidobacteria는 자신이 생성한 산과 산에 의해 조성되는 낮은 pH 환경에 의하여 생장이 크게 저해받기 때문에 배양시 문제가 되고 있다. 균종마다 차이가 있으나 대개 pH 5.0~4.5 이하에서 생장이 거의 멈추며 급속히 사멸하게 된다^(8,9). 그러므로 bifidobacteria를 배양하기 위해서는 배지내의 pH를 일정 수준 이하로 떨어지지 않게 알칼리를 첨가하여 일정 pH를 유지시켜 주거나 신선한 배지로 계속 치환해주는 등 여러가지 방법을 사용하고 있다^(10,12). 그러나 알칼리용액을 지속적으로 첨가해 주는 pH 조절배양(pH-controlled culture)의 경우는 배양중 배양액내 이온 강도를 계속적으로 증가시켜 균의 활력을 떨어뜨릴 수 있으며 배양 중에 발생하는 많은 양의 산을 제거해 주기 위하여 배양액의 일부를 지속적 새로운 배지로 치환해 주는 방법이나 반투과성막을 이용한 배양 방법 등은 원하는 정도의 총균수 농축효과를 얻기 위하여 초기 배양액의 수습배에 달하는 배지가 필요하며 공급해 주는 대부분의 당과 영양물질들이 반투과성 막을 통해 빠져 나오게 되기 때문에 대량 생산을 위한 공정에 있어 여러 가지 문제점이 있다⁽¹⁰⁾. 또한, 한외여과장치 등의 막분리 장치가 부수적으로 필요하기 때문에 공정에 번거로움이 있다. 수용액에서 불용성인 calcium carbonate (CaCO₃)는 산과 반응하여 칼슘염과 이산화탄소 및 물을 생성함으로써 수용액내의 수소 이온을 제거시키는 중성의 완충물질로 대량 발효 공정 중 안정제로 사용되고 있다⁽¹³⁾. 따라서 CaCO₃를 bifidobacteria의 배양에 이용할 경우에 배양 중 생성되는 초산 및 유산과 반응하여 배양액내 수소 이온을 제거시킴으로써 배양액내 pH를 안정화시키게 되고 부반응으로 생성되는 이산화탄소는 배양액내 산소 분압을 떨어뜨림과 동시에 배양액내 환경을 혐기적 조건으로 만들어 줌으로써 bifidobacteria가 성장하기에 적당한 환경을 제공해 줄 것이다.

본 연구는 낮은 pH 환경에서 생장이 억제되는 혐기성 유산균인 bifidobacteria의 고농도 배양을 위한 공정을 개발하기 위하여 alginate를 이용한 고정화된 CaCO₃의 비드를 완충제로 배양액에 도입함으로써 bifidobacteria의 성장 중에 생성되는 산에 의한 균증식 저해 억제 효과와 부수적으로 생성되는 이산화탄소에

의한 혐기적 환경이 bifidobacteria의 증식과 활력 유지에 미치는 영향을 조사하고 배양 효율의 증대를 위하여 고정화된 CaCO₃ 비드의 양과 배양액내 당의 농도에 따른 균 생장과 활력에 관하여 비교 검토함으로써 pH 조절장치와 혐기장치를 사용하지 않는 고농도 배양공정을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

CaCO₃ 비드의 제조

Calcium carbonate (CaCO₃)는 Sigma사의 special grade 제품을 사용하였고 alginic acid는 Sigma사의 3,500 cp (medi-viscosity) 제품을 사용하였다. CaCO₃ 비드의 제조는 sodium alginic acid를 1.5% (w/v)가 되도록 증류수에 넣고 교반기를 이용하여 충분히 교반한 후 CaCO₃를 20% (w/v)가 되도록 첨가하여 충분히 섞일 때까지 교반해 주었고, 충분히 섞인 혼합 콜로이드액은 peristaltic pump를 사용하여 주사바늘(Gage 20)을 통하여 200 mM CaCl₂ 용액에 떨어뜨려 비드를 제조한 후에 증류수로 3회 세척하여 사용하였다.

산에 대한 CaCO₃ 비드의 완충 효과

TPY 배지에서 K₂HPO₄를 첨가하지 않은 조정된 TPY (m-TPY)배지에 초산, 유산, 그리고 물농도로 초산과 유산을 3:2의 비율로 혼합한 혼합 산용액을 이용하여 pH를 4.0으로 조정한 후 CaCO₃ 비드 10, 20, 30, 40, 그리고 50% (w/v)를 첨가하여 pH의 변화를 시간에 따라 측정하였다.

균주

실험에 사용된 균주는 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 배양액을 trypticase-proteose peptone-yeast extract (TPY) 액체 배지에 2% (v/v) 접종한 후 37°C 혐기 배양조에서 계대 배양하여 사용하였다.

배지

Bifidobacteria의 배양용 배지는 trypticase-proteose peptone-yeast extract (TPY) 배지를 기본배지로 사용하였으며 조정된 TPY (m-TPY)배지로는 phosphate를 포함하지 않은 TPY 기본 배지에 glucose와 제조한 CaCO₃ 비드를 첨가하여 사용하였다. 당농도는 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 그리고 5.0%가 되도록 포도당을 첨가하였고, CaCO₃ 비드의 양은 배양액 부피당 무게로 측정하여 첨가하였다. 생균수 측정용 배지로는 TPY 한천배지를 사용하였다.

배양 조건

*Bifidobacteria*의 배양 특성 변화 실험은 2.5 l 발효기에 1,000 ml TPY 기본배지 또는 TPY 조정배지를 넣고 121°C에서 15분간 가압멸균한 후 2% (v/v) 계대 배양된 bifidobacteria 배양액을 접종하여 질소 또는 이산화탄소 가스의 치환 없이 37°C에서 200±10 rpm으로 교반하여 배양하였다. 연속 pH 조절배양(pH-controlled culture)은 멸균된 2 N NaOH를 이용하여 배양액내 pH가 지속적으로 5.5와 6.0이 되도록 조절하면서 질소 가스를 주입시켜 혐기적으로 배양되었다.

pH, 흡광도 및 산도 측정

접종 직후부터 2시간 간격으로 3 mL씩 배양 시료를 채취하여 pH meter로 pH를 측정하였고, 균 증식도는 UV/VIS spectrophotometer (Perkin-Elmer, Lambda 3B)를 사용하여 흡광도 600 nm에서 측정하였으며 산도는 0.1 N NaOH용액으로 적정하여 총산도(TA)를 측정하였다.

$$\text{총산도}(\%, \text{젖산}) = 0.1 \text{ N NaOH의 mL} \times 0.09$$

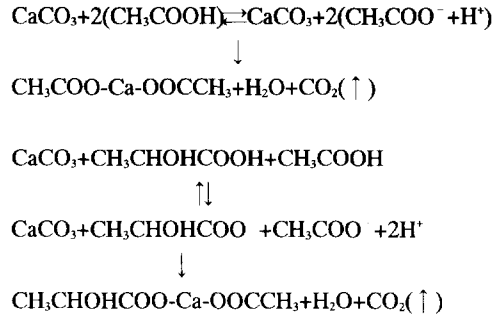
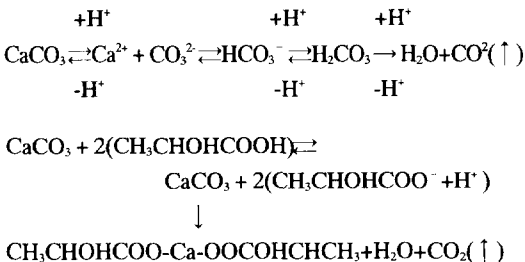
생균수 측정

*Bifidobacteria*의 생균수는 시료를 10배 희석방법으로 희석한 후 TPY 한천배지에 도말하여 vacuum chamber에 넣고 진공펌프로 공기를 빼준 후 이산화탄소로 치환하여 대기압보다 약간 낮은 압력(650 torr)을 유지시키면서 37°C 배양기에서 48시간 배양하여 생성된 평균 콜로니의 수에 희석배수를 곱하여 측정하였다.

결과 및 고찰

CaCO₃ 비드의 제조

고정화된 CaCO₃ 비드는 평균 지름이 2.5 mm로 제조되었으며 수화된 형태로 습윤가압멸균 과정을 거치더라도 비드의 형태 변화는 없었다. CaCO₃는 유산 및 초산과 반응하여 칼슘염과 이산화탄소 및 H₂O를 생성하게 되며 이러한 반응은 다음과 같이 일어난다⁽³⁾.



유산과 초산을 생성하는 bifidobacteria의 배양에 완충제로서 CaCO₃를 사용할 경우 배양액내 수소 이온과 반응하여 배양액내 pH가 낮아지는 것을 억제할 수 있게 되며 부반응으로 생성되는 이산화탄소는 가스 상태로 배출됨으로 일정 분압을 유지시킬 경우 상대적으로 배양액내의 산소 분압을 낮추게 되어 혐기성 미생물인 bifidobacteria의 생장에 유용한 혐기적 환경을 제공해 준다. 또한, 고정화된 CaCO₃비드는 배양액내 탁도에 변화를 주지 않음으로 흡광도 측정에 의한 균 성장도를 배양과정 중 항상 검사할 수 있고 배양액내 급격한 pH 변화를 주지 않음으로써 배양액내 일정한 pH 수준을 유지시킬 수 있으며 균 배양 후 균 분리 공정에서 배양액으로부터 간단히 분리가 가능하므로 회수하여 재사용할 수 있는 편리함이 있다.

고정화된 CaCO₃ 비드의 완충 효과

조정된 TPY 배지에 초산, 유산 및 초산과 유산을 3:2 몰농도 비율로 혼합한 산용액을 이용하여 배지의 pH를 4.0으로 조절한 후 CaCO₃ 비드의 양을 달리하여 20분간 반응시켜 pH 상승효과를 측정된 결과 CaCO₃ 비드의 양이 증가할수록 높은 pH 상승효과를 나타내었으며 20% 이상의 CaCO₃ 비드가 첨가되었을 때 반응액내 pH가 반응 20분 이내에 5.0 이상으로 상승됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 20% CaCO₃ 비드를 첨가하여 반응시간에 따른 pH 상승효과를 보면 초산이 첨가된 m-TPY 배지의 경우 반응 20분 후 pH가 5.0 이상으로 상승하였고 유산에 의해 pH가 4.0으로 조정된 배지의 경우에는 반응 8분 후 pH가 5.0 이상으로 상승하였으며 초산과 유산의 혼합 산용액에 의해 pH가 조정된 배지의 경우에는 반응 7분 후에 pH가 5.0 이상으로 상승되었다. 따라서 첨가되는 CaCO₃ 비드의 양에 따라 다양한 pH 상승효과를 얻을 수 있음을 확인할 수 있었으며 배양액내 pH를 5.0 이상 유지시키기 위해서는 CaCO₃ 비드의 양이 20% 이상 첨가되어야 적당할 것으로 판단되었다.

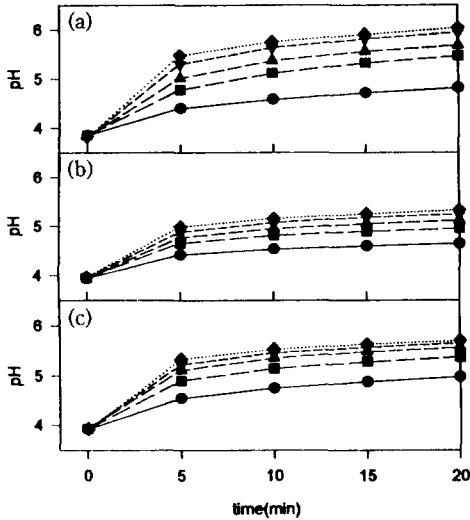


Fig. 1. Buffering effect of CaCO₃ beads in the modified TPY broth. (a) pH 4.0 mTPY broth adjusted with lactic acid, (b) pH 4.0 mTPY broth adjusted with acetic acid, (c) pH 4.0 mTPY broth adjusted with lactic and acetic acid. ●—●: 10% CaCO₃ bead, ■—■: 20% CaCO₃ bead, ▲—▲: 30% CaCO₃ bead, ▼—▼: 40% CaCO₃ bead, ◆—◆: 50% CaCO₃ bead.

CaCO₃ 완충제를 이용한 bifidobacteria의 배양 특성 고정화된 CaCO₃ 비드를 20% 첨가한 m-TPY 배지에 bifidobacteria를 배양하면서 배양액내 pH 변화, 적정산도 및 증식도를 조사하여 대조구인 일반 TPY 배지에서 배양된 것과 비교해 본 결과 Fig. 2와 같았다. 대조구의 경우 배양액내 pH가 약 4.7까지 떨어졌고 적정산도는 약 0.8%까지 증가하였으며 균 증식도는 흡광도 2.0까지 도달하였으나 고정화된 CaCO₃ 비드가 20% 첨가된 경우에는 배양액내 pH가 5.2까지 떨어졌다가 그 이후부터는 pH 5.8 정도를 유지하였고 적정산도는 0.2%를 넘지 않았으며 균 증식도는 흡광도 4.3까지 도달하여 대조구보다 총균수에서 두배 이상 높은 효과를 나타내었다.

고정화된 CaCO₃의 양을 10, 20, 30 그리고 50%로 첨가한 각각의 m-TPY 배지에서 bifidobacteria를 배양하여 배양액내 pH 변화를 대조구인 일반 TPY에서의 pH 변화와 비교한 결과 Fig. 3과 같았다. 대조구인 일반 TPY 배지의 경우 배양액내 균이 증식함에 따라 가장 빠르게 pH가 낮아졌으며 대수기 이후에는 pH가 4.7이하로 떨어졌으나 CaCO₃ 비드가 배양액에 10% 첨가된 경우에는 pH가 5.2 이상 유지되었고 20%일 때는 pH가 5.18까지 떨어진 후에 5.7 이상을 유지하였으며 30%의 경우에는 pH가 5.38까지 떨어진 후에 5.9

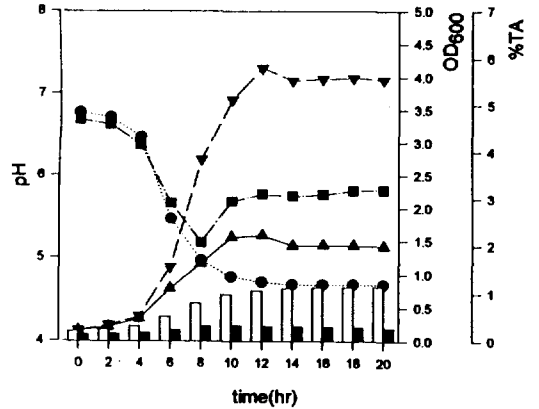


Fig. 2. The growth of *Bifidobacterium longum* in TPY broth with and without CaCO₃ bead. ○—○: pH change in mTPY broth with CaCO₃ bead, ●—●: growth of bifidobacteria in TPY broth without CaCO₃ bead, ▲—▲: growth of bifidobacteria in mTPY with CaCO₃ bead, □—□: % TA value in TPY broth without CaCO₃ bead, ■—■: % TA value in mTPY broth with 20% CaCO₃ bead.

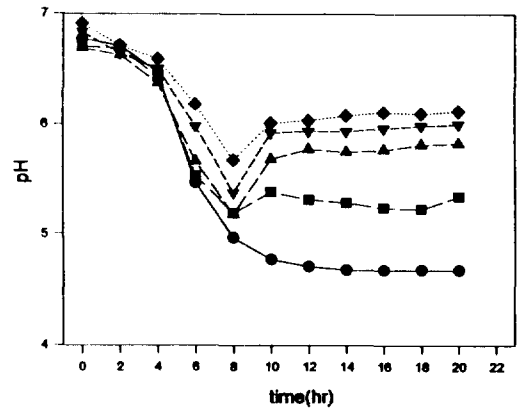


Fig. 3. pH change in mTPY broth with the different concentration of CaCO₃ beads. ●—●: TPY broth without CaCO₃ bead, ■—■: mTPY broth with 10% CaCO₃ bead, ▲—▲: mTPY broth with 20% CaCO₃ bead, ▼—▼: mTPY broth with 30% CaCO₃ bead, ◆—◆: mTPY broth with 50% CaCO₃ bead.

이상을 유지하였다. 따라서 배양액에 첨가된 CaCO₃ 비드의 양이 증가할수록 배양액내 완충 능력이 높게 나타남을 관찰할 수 있었다. 배양액내 첨가된 CaCO₃ 비드의 양에 따른 균 증식도를 보면 CaCO₃ 비드가 첨가되지 않은 대조구의 경우 흡광도가 2.22였으나 10%의 CaCO₃ 비드가 첨가된 경우 흡광도가 3.64로 증가하였고 20%일 때는 5.01, 30%일 때는 5.81, 그리고 50%의 경우에는 5.92로 증가한 후 완만히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). CaCO₃ 비드가 50%로 첨가된 배양액의 경우 배양액내 완충 능력은 30%의 경우

보다 충분히 높음에도 불구하고 균 증식도는 크게 증가하지 않았는데 이것은 배양액내 영양분 고갈에 의한 균증식 둔화 현상인 것으로 생각되었다.

당농도에 따른 bifidobacteria의 배양 특성

조정된 TPY 배지에 고정화된 CaCO₃ 비드의 양을 30%로 첨가한 후 배양액내 포도당 농도를 달리하여 bifidobacteria의 배양 특성을 조사하였다. 배양액내 포도당 농도가 1.0%로 첨가된 경우에는 대수기가 약 6시간동안 지속되면서 균증식이 흡광도 6.14까지 증가하였고 배양액내 pH는 5.55 이상으로 유지되었으며 적정산도는 0.44%까지 증가한 후 감소하는 경향을 보

였다(Fig. 5). 포도당 농도가 1.5%인 경우에는 균증식이 10.44까지 증가하였고 pH는 5.4 이상이 유지되었으며 적정산도는 0.36%까지 증가한 후 지속적으로 감소하였다(Fig. 6). 2%의 포도당이 첨가된 경우에는 대수기가 약 9시간동안 지속되면서 균증식이 11.44까지 증가하였고 pH는 5.25까지 떨어졌다가 점차 증가하였으며 적정산도는 0.44%까지 이하로 유지되었다(Fig. 7). 포도당을 2.5% 첨가해 준 경우에는 대수기가 약 10시간동안 지속되면서 균증식은 흡광도 약 16 정도까지 증가하였고 pH는 5.3 이상을 유지하면서 0.56%의 적정산도를 나타내었다(Fig. 8). 이때 배양액내 시료를 채취하여 10배 희석 방법을 이용하여 생균수를 측정된 결과 평균 1.54×10^{10} cfu/ml로 나타났다. 또한 배양액내 포도당 농도가 5%인 경우 대수기의 지속 시간이 약 12시간동안 지속되면서 균증식이 16.6까지

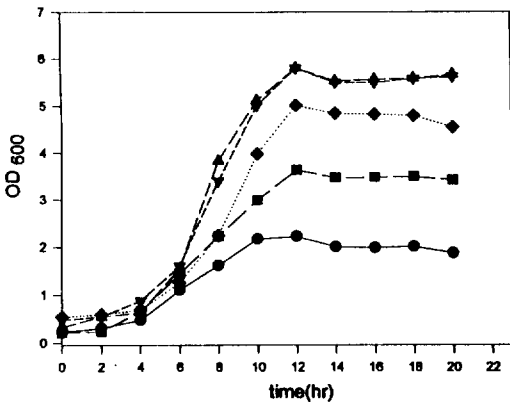


Fig. 4. Growth of bifidobacteria in mTPY broth with the different concentration of CaCO₃ beads. ●—●: TPY broth without CaCO₃ bead, ■—■: mTPY broth with 10% CaCO₃ bead, ▲—▲: mTPY broth with 20% CaCO₃ bead, ▼—▼: mTPY broth with 30% CaCO₃ bead, ◆—◆: mTPY broth with 50% CaCO₃ bead.

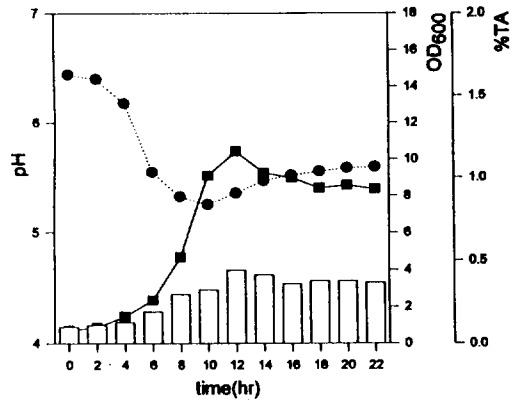


Fig. 6. Growth of bifidobacterium in CaCO₃ buffer system with 1.5% glucose. ●—●: pH, ■—■: growth, □: % TA.

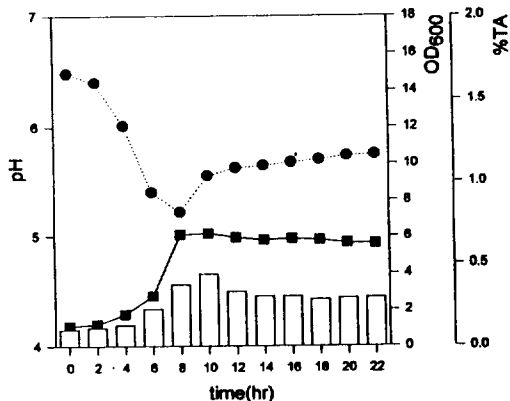


Fig. 5. Growth of bifidobacterium in CaCO₃ buffer system with 1.0% glucose. ●—●: pH, ■—■: growth, □: % TA.

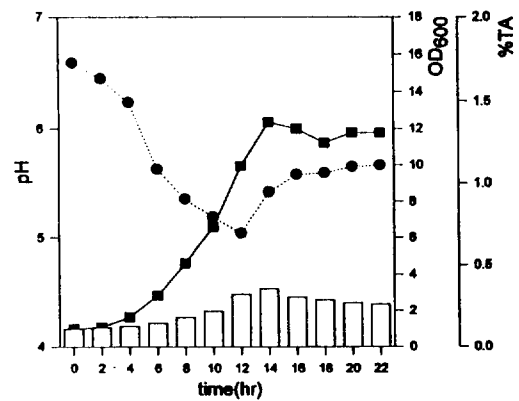


Fig. 7. Growth of bifidobacterium in CaCO₃ buffer system with 2.0% glucose. ●—●: pH, ■—■: growth, □: % TA.

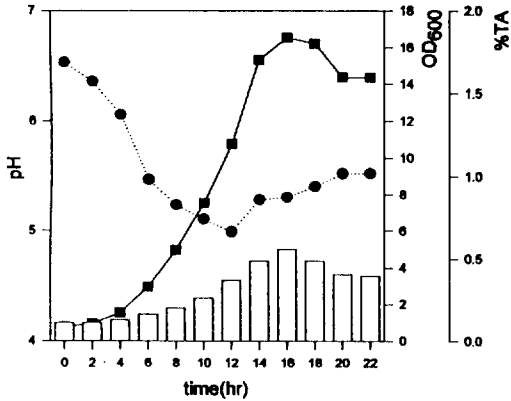


Fig. 8. Growth of bifidobacterium in CaCO₃ buffer system with 2.5% glucose. ●—●: pH, ■—■: growth, □: % TA.

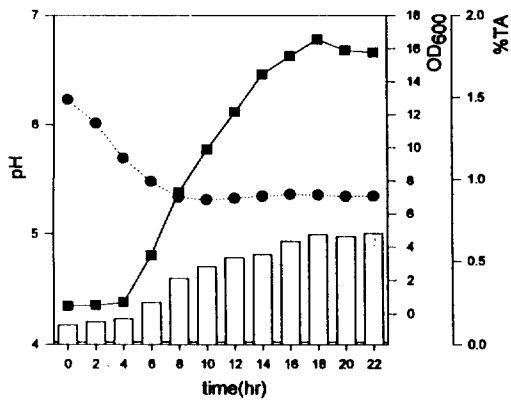


Fig. 9. Growth of bifidobacterium in CaCO₃ buffer system with 5.0% glucose. ●—●: pH, ■—■: growth, □: % TA.

증가하였으며 배양액내 pH는 급격한 강하 없이 5.3 이상이 유지되면서 적정산도가 0.7%까지 서서히 증가하는 형태를 보여 당농도 2.5%일 때의 균증식도에 비하여 크게 증가하지 않았다(Fig. 9). 이러한 결과는 배양액내 당농도 증가에 따른 배양액내 삼투압의 증가와 다른 영양분의 고갈때문인 것으로 판단되었다. 따라서 배양액내 CaCO₃ 비드의 양과 배양액내 영양분의 양을 적절히 조절한다면 bifidobacteria의 고농도 배양이 가능할 것으로 생각되었다.

NaOH에 의한 pH 조절과 CaCO₃ 비드의 완충효과

TPY 배지에 bifidobacteria를 배양하면서 배양액내 pH를 2 N NaOH로 5.5와 6.0으로 조절해 준 결과 대수기때 배양액내 적정산도가 0.33%와 0.29%로 나타났으며 균증식도는 흡광도 3.4와 4.85로 각각 조사되

Table 1. Comparison of CaCO₃ buffer system with NaOH buffer system

Buffer system	Parameter		
	pH	growth (OD ₆₀₀)	%TA
NaOH	5.5	3.40	0.33
	6.0	4.85	0.29
CaCO ₃	5.8	5.80	0.23

었다(Table 1). 또한 NaOH를 이용한 pH 조절배양의 경우가 20%의 CaCO₃ 비드를 첨가하여 배양된 배양액의 흡광도 5.8보다 낮음을 알 수 있었으며 배양액내 적정산도 값도 CaCO₃ 비드를 도입한 배양보다 높게 나타냄을 관찰할 수 있었다. 그러므로 효율적인 bifidobacteria 배양을 위해서는 CaCO₃ 비드를 이용한 배양액내 완충작용이 NaOH를 이용한 완충작용보다 매우 효과적인 것으로 생각되었다.

요 약

낮은 pH 환경에서 생장이 억제되는 혐기성 유산균인 bifidobacteria의 배양효율 증대를 위한 완충제로서 alginate로 고정화된 평균 지름 2.5 mm의 CaCO₃ 비드를 제조하였다. 고정화된 CaCO₃ 비드의 완충 효과를 조사하기 위하여 초산, 유산 및 초산과 유산을 3:2 몰농도 비율로 혼합한 산용액을 이용하여 pH 4.0으로 조정된 m-TPY 배지에 첨가되는 CaCO₃ 비드의 양을 달리하여 20분간 반응시킨 결과 첨가되는 CaCO₃ 비드의 양에 따라 다양한 pH 상승 효과가 나타남을 관찰하였고, 배양액에 첨가되는 CaCO₃ 비드의 양을 달리하여 bifidobacteria의 배양 특성을 조사한 결과 배양액에 첨가되는 CaCO₃ 비드의 양이 증가할수록 배양액내 완충 능력과 균증식도가 크게 증가하였다. 또한, CaCO₃ 비드가 30%로 도입된 배양액에 포도당 농도를 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% 그리고 5.0%로 각각 첨가하여 당농도에 따른 bifidobacteria의 배양 특성을 조사한 결과 배양액내 당농도가 증가함에 따라 배양액내 균증식도와 대수기의 지속 시간이 크게 증가되었다.

따라서 bifidobacteria의 배양효율 증대를 위하여 완충제로서 고정화된 CaCO₃ 비드의 이용은 매우 효과적인 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 인하대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Anatoly, B. and Robin, M.C.: *Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida (1989)
2. Jeremija, L.R. and Joseph, A.K.: *Bifidobacteria and their role*. Birk user Verlag. Basel · Boston · Stuttgart (1983)
3. Tomotari, M.: *Bifidobacteria and their role in human health*. *J. of Industrial Microbiology*, **6**, 263 (1990)
4. 이정치, 강국희, 이호, 백영진, 한홍의, 김태한: 유산균의 산업적 이용 미생물과 산업. *한국미생물학회*, **17**(3), 35 (1991)
5. Norio, I. and Seiichi, S.: *Bifidobacteria*: Research and development in Japan. *Food Technol.*, 126 (1993)
6. Seiichi, S., Fumiaki, A., Norio, I., Hiroshi, M., Tomoko, Y., Tomoko, A. and Mamoru, T.: Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J. Dairy Sci.*, **75**, 3296 (1992)
7. Uesugi and Yajima, M.: Oxygen and "strictly anaerobic" intestinal bacteria I. Effect of dissolved oxygen on growth. II. Oxygen metabolism in strictly anaerobic bacteria. *Zeitschrift f r All gemeine Mikobiologie.*, **18**, 287, 18, 593 (1978)
8. Misra, A.K. and Kuila, R.K.: Cultural and biochemical activities of *Bifidobacterium bifidum*. *Milchwissenschaft*, **45**(3), 155 (1990)
9. Desjardins, M.L., Denis, R., Christian, T. and Jacques, G.: Uncoupling of growth and acid production in *Bifidobacterium* sp. *J. Dairy Sci.*, **73**, 1478 (1990)
10. Masayuki, T., Nobuharu, K. and Takeshi, K.: High concentration cultivation of *Bifidobacterium longum* in fermenter with cross-flow filtration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 438 (1987)
11. Beverley, A.D. and George, T.M.: Effect of dilution rate and carbon availability *Bifidobacterium breve* fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 800 (1984)
12. Christian C., Madec, M.N. and Patrick B.: Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **53**, 189 (1992)
13. Open, U. and Thames P.: *In vitro Cultivation of Microorganisms*. Butterworth-Heinemann Ltd., Linacre House. Jordan Hill, Oxford, p.36 (1992)

(1995년 12월 26일 접수)