

## *Bifidobacterium*의 생존력 증대를 위한 세포포집기술개발

박희경·배기성·†허태련  
인하대학교 공과대학 생물공학과  
(접수 : 1999. 2. 24., 게재승인 : 1999. 7. 13.)

### Development of Cell Entrapment Technology for the Improvement of *Bifidobacterium* Viability

Hee-Kyung Park, Ki-Sung Bae, and Tae-Ryeon Heo†  
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
(Received : 1999. 2. 24., Accepted : 1999. 7. 13.)

*Bifidobacterium* spp. can provide human beings with several beneficial physiological effects. Therefore, there has been a considerable interest in products *Bifidobacterium* spp. dietary supplements or as starter cultures for probiotic products that may assist in the improvement of health on the human. But industrial applications have been limited because *Bifidobacterium* spp. are sensitive to acidic pH due to organic acid produced by themselves and various conditions. The objective of this study was to establish new method for improvement of *Bifidobacterium* viability by entrapment in calcium alginate beads. We have a plan to select the most suitable polymer through the comparison with acid tolerance, oxygen tolerance and theological properties of polymer. Increase of the viable number of *Bifidobacterium* induced increasing acid tolerance and oxygen tolerance through the development of entrapment technique. The 4%, 3.30mm diameter) sodium alginate beads led to the best survivability under acid condition. Especially, addition of 6% mannitol, 6% glycerol or 6% sorbitol to the sodium alginate helped a beneficial effect on viability against acid, bile salt, hydrogen peroxide and cold storage. The number of viability of entrapped cells by retreatment was 96 fold higher than non-entrapped cells after 5 hours of storage under pH 3 acidic condition. These experimental data clearly demonstrate that a whole cell immobilization by entrapment in calcium alginate beads is an important survival mechanism which enable to withstand environmental stresses such as the acidic condition, hydrogen peroxide toxicity and frozen state.

Key Words : *Bifidobacterium*, entrapment cell, sodium alginate

#### 서론

*Bifidobacterium* 속의 서식처는 사람과 동물의 장관으로 신생아와 영아뿐만 아니라 건강한 성인의 장에서 우세 균총을 형성하고 있다. *Bifidobacterium*은 대사과정 중에 생성되는 초산(acetic acid)과 유산(lactic acid)으로 인하여 장내 pH에 영향을 미침으로써 위해 물질을 생성하는 병원성 및 부패성 미생물의 생육을 억제하고 인체에 이용 가능한 L(+)-lactic acid를 생산하는 등의 생리작용과 정장작용, 변비방지, 면역증강, 항암작용 및 항종양 활성, 콜레스테롤 저하작용, 항생제 장애의 예방 및 치료에 효과가 있다고 보고되고 있다(1). 최근 *Bifidobacterium*이 스트레스, 질병, 암, 노화 등과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 밝혀짐에 따라 *Bifidobacterium*을 포함하는 제품이 건강에 유익하다고 인정되어 이를 이용한 제품의 생산과 소비가 증가되고 있다(2). *Bifidobacterium*이 제품에 포함되어 효능을 발휘하기

위해서는 식품의 제조공정과 저장기간동안 생균 상태로 생존해야 하며, 소화기 분비물인 위산과 담즙에 내성이 있고 장내에서 증식할 수 있어야 하는 기준을 충족시켜야 한다(3). 그러나 *Bifidobacterium*은 영양요구성이 복잡하고 산성조건에 약하며 성장에 혐기적인 환경을 필요로 하므로 일반 식품에서는 생존 조건이 적합하지 못하여 생존기간을 연장시키기 위한 많은 시도가 이루어지고 있다. 따라서 *Bifidobacterium*의 생균수 증대를 위한 세포포집기술을 개발하여 *Bifidobacterium*의 여러 가지 환경조건에 내성이 있는 생균력 증가에 이 연구의 목적이 있다. 세포를 고정화시킴으로써 균체의 활성에 저해를 유발하는 물질을 격리시키며, 환경물질의 독성을 감소시키고, 고정화된 내부물질을 외부의 물리적 충격으로부터 보호해주며, 물질의 표면성질을 변화시켜 줄뿐만 아니라 물질의 해리를 조절할 수 있는 장점이 있다. 이러한 세포고정화법을 식품산업에 이용하기 위해서는 먼저 고정화물질이 식용이 가능하고 식품의 풍미를 변화시키지 않기 위하여 자체 맛을 가지고 있지 않아야 한다(4). 또한 고정화 물질을 선택할 경우 용해도, 막 형성능, 확산력, 생산 단가 그리고 내·외부물질의 물리화학적 성질 등을 고려하여 내·외부물질과 반응성이 없어야 한다. 따라서 균체를 포집시키기 위한 물질로 사용할 때는 물에 불용

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-701, Korea  
Tel : 032-860-7511  
e-mail : heotaery@dragon.inha.ac.kr

성인 재료를 사용하여야 한다. 이러한 물질들은 식이 섬유로서의 기능에 의한 자체 보수성으로 분변량의 증가, 장내의 체류 시간의 단축, 대장 내용물의 생리 화학적 작용 외에 *Bifidobacterium*을 선택적으로 증식하게 하는 등 장내 균총의 구성과 장내 대사산물에도 영향을 미치고 있다고 알려져 있다(5). 따라서 본 연구는 *Bifidobacterium*을 포집시켜 내산성, 내산소성과 내담즙성 등의 외부 환경에 대한 저항성을 개선시켜 균의 생존력 증대에 의한 식품이나 의약품으로서의 이용성을 증가시키는 것을 목적으로 하고 있다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양방법

본 실험에서 사용된 균주는 한국과학기술연구원 생명공학연구소에서 분양받은 *Bifidobacterium breve* ATCC 15700으로 10% glycerol과 15% 탈지분유를 냉동보호제로 사용하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 균주를 TPY 배지 및 modified MRS 배지에서  $\text{CO}_2$  가스를 이용하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 혐기 배양한 후 냉장 저장하면서 1주마다 계대배양하여 사용하였다(3).

### 포집방법 및 포집원료

TPY 액체배지에서 20시간 배양한 *B. breve*에 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%와 8%(w/v) sodium alginate solution(Jiwon Technical Co., Ltd.)을 각각 혼합한 후 0.05 M  $\text{CaCl}_2$  용액을 이용하여 calcium alginate beads를 제조하였다. Screen cup 150 mesh sieve(Sigma S4042)를 이용하여 bead를 회수한 후 생리식염수에 세척하여 실험에 사용하였다. 또한 보호효과를 증진시키기 위한 실험에서는 alginate에 6% glycerol, 6% sorbitol과 6% mannitol 등을 첨가하여 bead를 제조하였다. 제조된 bead 평균직경은 20개의 bead를 측정 후 평균치로 산출하였다.

### *Bifidobacterium* 검출

Beads내에 존재하는 균수를 측정하기 위하여 potassium phosphate (0.1 M, pH 6.6), sodium phosphate(0.1 M, pH 6.4), sodium citrate[1%(w/v), pH 8.15]와 sodium citrate 용액[10%(w/v), pH 8.4]에 stomacher lab blender 400 Unit (Seward Medical, London, Ontario, Canada)를 이용하여 균일하게 용해시킨 후(6) TPY 한천배지에 십진희석법으로 도달한 후 혐기 배양하여 균수를 계수 하였다.

### 안정성 조사

*B. breve*가 포집된 bead 1 g를 acetic acid와 lactic acid를 3:2의 비율로 첨가하여 pH가 2.0, 3.0, 4.0과 5.0으로 조절된 각각의 TPY 액체배지 10 mL에 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하면서 1시간 간격으로 생존력을 측정하였다. 같은 조건에서 포집시키지 않은 *B. breve* (free cell)의 내산성을 조사하여 비교하였고, 담즙산에 대한 안정성 조사는 TPY 배지에 0.6% bile salt를 첨가하여 내산성과 같은 방법으로 측정하였으며, 산소에 대한 저항성은 hydrogen peroxide를 TPY 배지에 100 ppm 첨가하여 조사하였다.

### 저장 중의 안정성 조사

냉장실험을 위해 *B. breve*가 포집된 bead 1 g를 TPY 액체 배지 10 mL에 첨가하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 1주일 간격으로 생존수를 측정하였다. 냉동실험은 bead 1 g를 10% skim milk 용액 10 mL에 넣어 deep freezer(Vision co, korea)에서 냉동하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였고 동결건조는 동결된 bead를 동결건조기(FD-1, ELEYA, japan)에서 12시간 동안 동결건조하여 상온에서 보관하고 1주일 간격으로 생존수를 측정하였다.

### Retreatment 실험

세포 포집기술에 의해서 만들어진 beads를 skim milk 10% (w/v)에 yeast extract 0.5%(w/v), L-cysteine-HCl 0.05% (w/v)를 혼합한 용액에 30분 동안 침지시켜서 retreatment시켰다. Retreatment된 beads는 screen cup 150 mesh sieve (Sigma S4020)를 이용하여 수거한 후, 다시 0.85%(w/v) 멸균 생리식염수에 세척한 후 사용하였고 retreatment 시키지 않은 beads와의 비교 실험을 위해 bead 1 g를 acetic acid(Shinyo. Co.)와 lactic acid(Junsei chemical Co.)를 3 : 2의 비율로 첨가하여 pH가 3.0으로 조절된 각각의 TPY 배지 10 mL에 접종하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면서 1 시간 간격으로 생존수를 측정하였으며 free cell의 경우도 같은 조건에서 접종하여 생존수를 측정하였다.

### 전자현미경 관찰

제조한 beads에서 포집된 *B. breve*를 확인하기 위하여 전자 주사현미경인 SEM(S-700, Hitachi, Japan)을 이용하였다. Beads의 양단면을 절단하여 열풍기로 건조시킨 후 beads의 표면을 백금으로 coating하여 가속전압이 10 kV인 조건에서 확인하였다.

### 포집된 *B. breve*의 대사과정 측정

*B. breve*가 포집된 bead 1 g를 TPY 액체배지 10 mL에 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 혐기배양 하였다. 1시간 간격으로 배양액의 pH를 pH meter (654 Series Metrohm, Swiss made)로 측정하였으며 bead를 수거하여  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정하였다. free cell의 경우에도 같은 조건에서 2% 접종하여 비교 실험하였다.

$\beta$ -Galactosidase의 활성은 *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG)(7) 방법을 이용하여 분석하였다. 균체를 0.01 M  $\text{MgSO}_4$ 와 0.05 M  $\beta$ -mercaptoethanol을 포함하는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)로 희석한 후 1 mL를 취하였다. Chloroform과 0.1% sodium dodecyl sulfate를 첨가하여 균체를 파쇄시켜 0.2 mL ONPG(4 mg/mL)(Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo)를 가한 후  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분 동안 반응시켰다. 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 첨가하여 반응을 정지시키고 spectrophotometer (Perkin-Elmer, Lambda 3B)로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.  $\beta$ -Galactosidase의 1 unit는 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\beta\text{-Galactosidase (units/mL)} = 1000 \times \frac{A}{tv}$$

A: 420 nm에서 흡광도, t: 반응시간, v: 시료량

**결과 및 고찰**

***Bifidobacterium* 생균수 측정 및 검출**

정확한 생균수 측정을 위하여 calcium alginate beads를 용해시키는 용액에 의한 *B. breve*의 저해 정도 및 방출되는 균체수의 변화 정도를 조사하였다. 시간별로 방출된 균체수를 계수한 결과 실험에 사용한 4 종류의 용액에서 모두 10분 이내에 beads가 용해되었으며 sodium phosphate(0.1M, pH 6.4) 용액과 sodium citrate[10%(w/v), pH 8.4] 용액은 포집된 *B. breve*에 대한 저해를 나타내었고(Table 1.), sodium citrate[1% (w/v), pH 8.15] 용액에서 용해시킨 bead의 균주가 free cell(포집시키지 않은)과 가장 근접한 균체수를 나타내었다. 0.85% 생리식염수로 계수한 free cell의 균체수는  $6.4 \times 10^6$  CFU/mL이었으며, 1% sodium citrate 용액에 포집시킨 *B. breve*를 10분 동안 용해시켰을 때의 균체수는  $6.4 \times 10^6$  CFU/mL를 나타내어 가장 근접한 균체수를 나타내었다. 10% sodium citrate 용액에서는 10분 경과 후에는  $4.0 \times 10^6$  CFU/mL, 0.1 M potassium phosphate 용액은  $6.0 \times 10^6$  CFU/mL, 그리고 0.1 M sodium phosphate 용액은  $5.5 \times 10^6$  CFU/mL이었으나 20분 경과시  $4.1 \times 10^6$  CFU/mL로 감소하여 시간이 경과할수록 *B. breve*에 대한 저해작용을 나타내었다. 따라서 본 실험에서는 보다 안정되고 free cell과 가장 근접한 균체수를 나타내는 sodium citrate[1% (w/v), pH 8.15]용액으로 beads를 용해시켜 생균수를 측정하였다.

**Sodium alginate 농도가 *B. breve*의 안정성에 미치는 영향**

Sodium alginate 농도에 따른 안정성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. Sodium alginate의 농도를 1~8%로 조절하여 beads를 제조한 후 균주의 생균력을 조사하였다. pH 3.0인 TPY 배지에서 sodium alginate의 농도가 낮은 1%, 2%와 3%(w/v)에서는 사멸이 빠르게 진행되었고, alginate 농도가 높아질수록 사멸속도가 감소하였다. 초기에는 sodium alginate 농도에 따른 생존율의 차이를 나타내지 않았으나 시간이 경과됨에 따라 free cell과 2% sodium alginate로 포집시킨 균주는 2시간 이후에 생존율이 7.58%와 11.13%이었으며 4%, 6%와 8%는 각각 31.61%, 35.38%와 48.54% 이었다. 그리고 3시간 경과 후에는 free cell과 2% sodium alginate beads의 *B. breve*의 생존율이 1.29%와 2.74%이었으며, 4%, 6%와 8% beads에서의 생존율은 30.65%, 12.70%와 14.35%로 4%농도일 때 가장 보호 효과가 우수하였다. 이 결과는 낮은 농도보다 높은

Table 2. Effect of concentration of sodium alginate on survival rate of entrapped *B. breve* at pH 3.

Conditions	Time				
	1 hour	2 hour	3 hour	4 hour	5 hour
Free cell	44.3%	7.58%	1.29%	0.003%	0.002%
1% sodium alginate	22.5%	9.87%	0.90%	0.008%	0.004%
2% sodium alginate	34.8%	11.13%	2.74%	0.01%	0.007%
3% sodium alginate	54.6%	12.90%	8.76%	0.01%	0.004%
4% sodium alginate	82.0%	31.61%	30.65%	0.7%	0.09%
5% sodium alginate	90.1%	35.00%	10.00%	0.11%	0.0015%
6% sodium alginate	90.1%	35.38%	12.70%	0.03%	0.02%
8% sodium alginate	90.1%	48.54%	14.35%	0.1%	0.0015%

은 농도에서의 균체 소실이 낮다는 것을 알 수 있었다.

또한 3시간 이후에는 alginate의 농도가 4%인 경우보다 5%, 6%와 8%(w/v)의 sodium alginate beads에 포집된 *B. breve*의 사멸율이 증가됨을 알 수 있는데 이러한 현상은 비록 초기에는 균체 소실이 낮았지만 낮은 pH에 의한 보호효과가 시간이 경과될수록 감소되기 때문인데 이는 alginate로 bead를 제조할 때 발생하는 다공성의 조직에 의한 영향으로 추정된다. 따라서 4% sodium alginate로 포집된 *B. breve*가 가장 우수한 생존율을 나타내었으므로 본 실험에서는 4%(w/v) sodium alginate 농도를 최적조건으로 선택하여 실험을 진행하였다.

**Bead의 크기가 *B. breve*의 안정성에 미치는 영향**

Bead의 크기에 있어서 크기가 클수록 포집된 균체에 대한 보호효과가 큰 것으로 알려져 있다(8). Free cell과 직경이 0.29 mm인 bead에 존재하는 *B. breve*는 사멸속도가 빨랐다. 3시간 이후에 free cell과 0.29 mm 크기의 bead의 *B. breve*의 생존율

Table 1. Optimum conditions for solubilization of beads.

Solutions for solubilization	Time				
	0 min.	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.
Free cell	$7.0 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$	$6.4 \times 10^6$	$6.4 \times 10^6$	$6.5 \times 10^6$
Potassium phosphate 0.1M/pH 6.6	$7.0 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$6.0 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$
Sodium phosphate 0.1M/pH 6.4	$7.0 \times 10^6$	$5.7 \times 10^6$	$5.5 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$
Sodium citrate 1%/pH 8.15	$7.0 \times 10^6$	$6.1 \times 10^6$	$6.4 \times 10^6$	$6.4 \times 10^6$	$6.5 \times 10^6$
Sodium citrate 10%/pH 8.4	$7.0 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$3.6 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$

이 0.14%와 0.1%인 반면에 bead의 직경이 3.30 mm, 4.90 mm와 7.70 mm인 bead의 생존율은 9.78%, 35.4%와 53.37%로 bead의 크기가 클수록 보호작용이 우수하였으며 5시간 이후에 free cell과 0.29 mm 크기의 의 생존율이  $8.4 \times 10^{-5}\%$ 와  $4.24 \times 10^{-4}\%$ 인 반면 3.30 mm, 4.90 mm와 7.70 mm의 bead 크기에서는 모두 0.3%의 생존율을 나타내었다.

이러한 결과는 표면적이 적은 beads보다 넓은 beads에서의 균체 소실율이 감소되기 때문인데 이것은 Dobрева의 연구(9)와 같은 결과를 보이고 있다. 따라서 Figure 1에서와 같이 직경이 평균 4.90 mm의 alginate beads에 의해 포집된 균체가 근소한 차이로 높은 생존율을 나타내었지만 유제품에 사용할 경우에 beads의 크기가 클수록 소비자들의 기호성에 적합하지 않는다는 점과 생존율에 있어서 근소한 차이를 나타내는 점 때문에 본 실험에서는 직경이 3.30 mm인 sodium alginate beads를 최적 조건으로 선택하였다.

**B. breve 및 bead의 조직 관찰**

주사전자현미경으로 관찰한 bead의 조직은 Figure 2와 같다. B. breve가 sodium alginate bead내에 분포되어 있으나 bead가 다공성 조직의 구조를 보이고 있다. Alginate로 포집한 균주

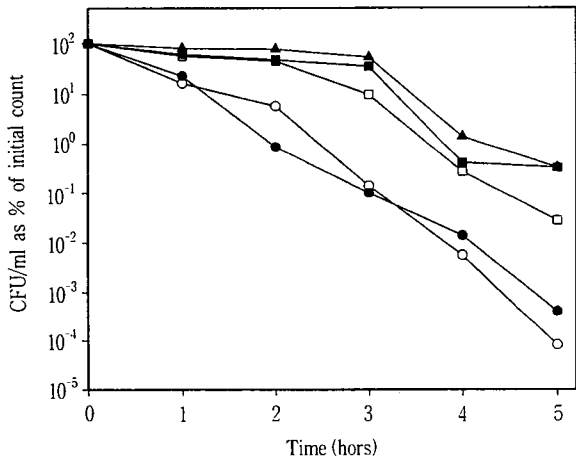


Figure 1. The effect of size of sodium alginate bead on entrapped *B. breve*. ; (○) free cell, (●) 0.29 mm bead, (□) 3.30 mm bead, (■) 4.90 mm bead, (▲) 7.70 mm bead.

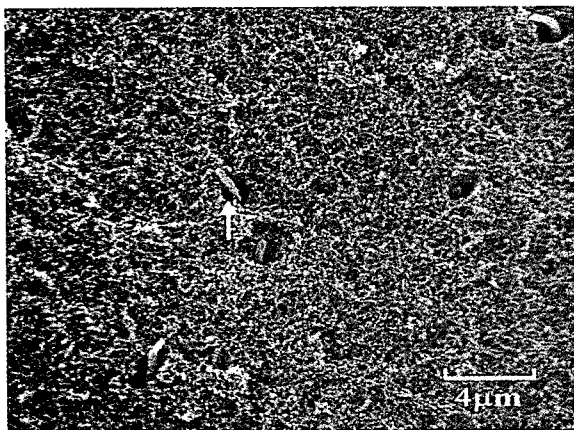


Figure 2. Scanning electron microscopy of entrapped *B. breve* by sodium alginate.

를 불리한 환경에 노출시킨 경우에 처음에는 보호효과가 있었으나 시간이 경과됨에 따라 보호효과가 저하되는 결과는 이러한 bead의 다공성 조직 때문임을 알 수 있었다.

**외부 환경에 대한 보호효과**

4% alginate로 *B. breve*을 포집하여 외부환경에 대한 보호효과를 생존력으로 비교해본 결과 pH 4에서 5시간 저장 후 free cell의 생존력이 1.3%인데 비하여 sodium alginate로 포집시킨 균주는 생존력이 9.4%로 보호효과가 있음을 알 수 있었다. 그러나 sodium alginate만으로 포집한 균주보다는 alginate에 6% glycerol, 6% mannitol이나 6% sorbitol을 첨가시킨 후 bead를 제조하여 생존력을 조사한 결과 alginate만으로 bead를 제조한 경우보다 보호효과가 2.2~8.2배 증가함을 알 수 있었다. Alginate에 6% glycerol을 첨가하여 포집시킨 *B. breve*의 생존력은 pH 4에서 5 시간 후 74%, 6% mannitol은 77.3%, 6% sorbitol을 첨가한 경우에는 20.8%로 상당한 보호효과를 나타내었다(Figure 3). 이러한 보호효과는 pH뿐만 아니라 bile salt와 hydrogen peroxide에 대해서도 glycerol, mannitol 또는 sorbitol을 첨가하여 bead를 제조한 경우에도 포집된 균주의 생존력이 증가하였다. 그 중에서도 산에 대한 보호효과는 6% mannitol을 첨가하였을 때 가장 우수하였고, bile salt에 대한 보호효과는 6% glycerol을 첨가하여 제조한 bead가, hydrogen peroxide에 대한 보호효과는 6% sorbitol을 첨가하였을 때 가장 높았다(Figure 4, 5). Seiichi(10)와 Park(11)의 실험에 의하면 *Bifidobacterium*을 호기성 환경에서 배양을 하거나 hydrogen peroxide를 첨가한 배지에서 배양하였을 때 증식이 되지 않고 사멸속도가 빠른 결과에 비하여 포집시킨 균주는 사멸속도가 느리게 나타났다.

**Entrapment cell의 저장성 조사**

포집시키지 않은 free cell은 냉장저장 1주 이후에 생존율이 0.19%로 거의 사멸하는 반면에 alginate로 포집시킨 는 16%, alginate와 6% glycerol로 포집시킨 균주는 31.1%, alginate와 6% mannitol로 포집시킨 균주는 28%, alginate와 sorbitol로 포집시킨 균주는 생존율이 100%로 bead제조 직후의 생존력을 그대로 유지하였다(Figure 6). 포집시키지 않은 균주보다는

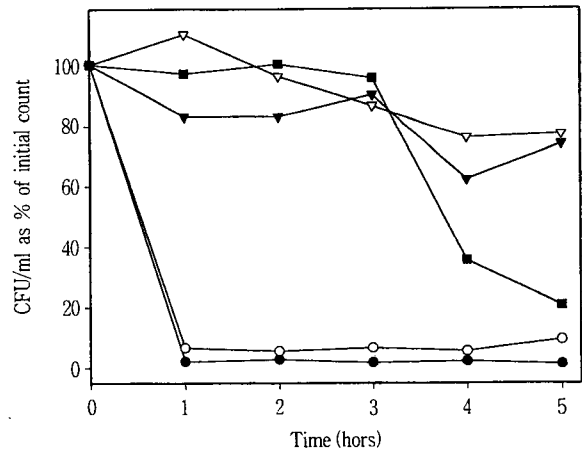


Figure 3. The viability of entrapped *B. breve* at pH 4 ; (●) free cell, (○) alginate, (▼) alginate + glycerol, (▽) alginate + mannitol, (■) alginate + sorbitol.

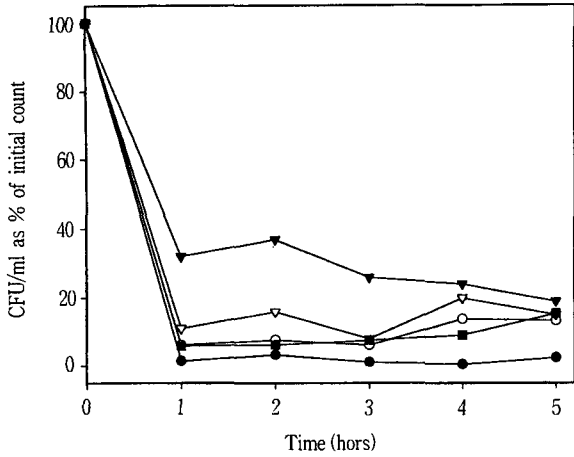


Figure 4. The viability of entrapped *B. breve* at 0.6% bile salt ; (●) free cell, (○) alginate, (▼) alginate + glycerol, (▽) alginate + mannitol, (■) alginate + sorbitol.

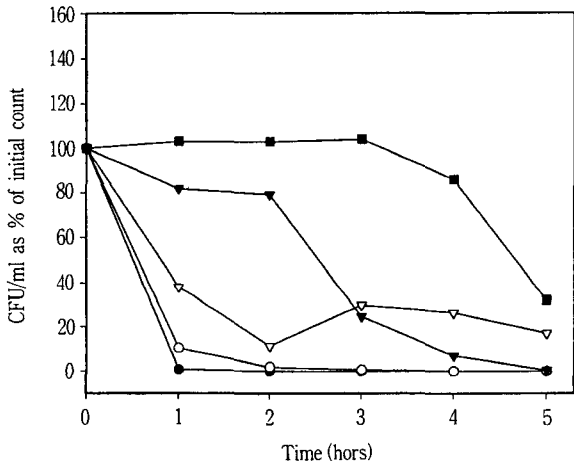


Figure 5. The viability of entrapped *B. breve* at 100ppm hydrogen peroxide ; (●) free cell, (○) alginate, (▼) alginate + glycerol, (▽) alginate + mannitol, (■) alginate + sorbitol.

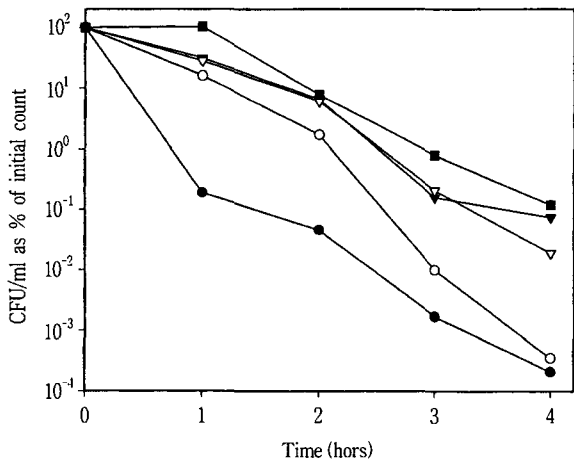


Figure 6. The viability of entrapped *B. breve* during cold storage ; (●) free cell, (○) alginate, (▼) alginate + glycerol, (▽) alginate + mannitol, (■) alginate + sorbitol.

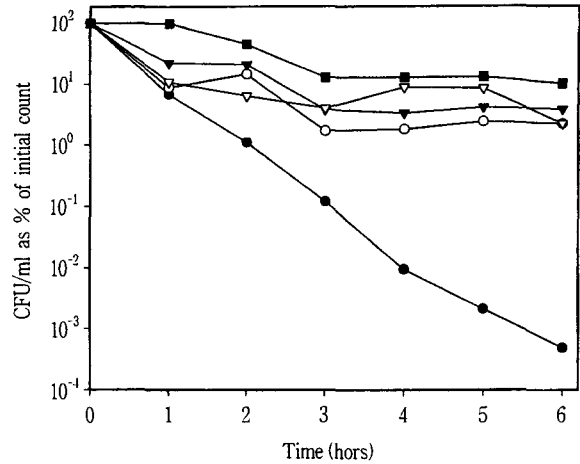


Figure 7. The viability of entrapped *B. breve* during -20°C storage ; (●) free cell, (○) alginate, (▼) alginate + glycerol, (▽) alginate + mannitol, (■) alginate + sorbitol.

alginate로 포집시킨 균주의 생존력이 우수하였다. 또한 보호제인 glycerol, mannitol이나 sorbitol을 첨가하여 제조한 bead의 균주가 생존율이 높았으며 sorbitol을 첨가하여 제조한 경우에 가장 보호효과가 높았다. 4주 저장 후에도 같은 경향을 나타내어 sorbitol을 첨가한 경우의 균주가 가장 생존율이 높았다.

냉동저장 후 생존율을 조사한 실험에서도 냉장실험에서의 같이 sorbitol의 보호효과가 가장 우수하였다(Figure 7). 1주 후 생존율은 포집시키지 않은 균주는 6.8%, alginate로 포집시킨 균주는 14.4%, alginate와 6% glycerol로 포집시킨 균주는 22%, alginate와 6% mannitol로 포집시킨 균주는 10.8%, alginate와 sorbitol로 포집시킨 균주는 생존율이 98%이었다. 이로서 냉장과 냉동 저장시 alginate와 sorbitol로 포집시켰을 때 저온에 대한 보호효과가 우수함을 알 수 있었다.

**동결건조시 보호효과 조사**

동결건조시킨 후 실온에서 저장기간동안 생존력을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 동결건조직후 4% alginate로 포집한 균주의 생존력은 free cell에 비하여 생존력이 약 20배 증가하였으나 glycerol, mannitol이나 sorbitol을 첨가하여 bead를 제조한 경우에 보호효과가 더욱 높았다. 이는 이러한 물질들이 alginate만으로 bead를 제조할 경우 생기는 세공이 여러 가지 미생물의 성장을 저해시키는 물질의 유입으로 생존율이 낮아지는 단점을 보완하며 또한 동결건조시 glycerol, mannitol과 sorbitol이 냉동보호제 역할을 하여 동결건조나 냉동 저장시에 세포벽에 보호효과가 있어 세포의 생존력을 높여준다는 Leslie(12)와 Carpenter(13)의 실험결과로부터 이러한 효과를 추측할 수 있다.

**Retreatment의 보호 효과**

생성된 sodium alginate beads는 기질과 생성물의 전달을 위한 충분한 공극을 가지면서도 동시에 완전한 세포고정화 능력을 확보할 수 있는 3차원 그물구조를 만들 수 있는 장점이 있지만 (14), 낮은 pH 환경 속에서는 단점이 될 수 있는 이러한 세공을 보완해주기 위한 retreatment에 의한 보호효과를 조사하였다.

Table 3. Viability of free and entrapped *B. breve* during freeze-drying and storage.

Conditions	Time				
	After culture	After freeze-drying	2 week	4 week	6 week
Free cell	$3.7 \times 10^8$ (100%)	$5.5 \times 10^5$ (0.14%)	$4.3 \times 10^3$ (0.0011%)	$1.2 \times 10^2$ (0.00032%)	$2.3 \times 10$ (0.00062%)
4% Alginate	$3.7 \times 10^8$ (100%)	$1.0 \times 10^7$ (2.7%)	$8.9 \times 10^4$ (0.024%)	$3.2 \times 10^4$ (0.0086%)	$4.0 \times 10^4$ (0.0108%)
4% Alginate + 6% glycerol	$3.7 \times 10^8$ (100%)	$8.0 \times 10^6$ (2.1%)	$2.0 \times 10^5$ (0.054%)	$4.8 \times 10^4$ (0.012%)	$4.1 \times 10^4$ (0.011%)
4% Alginate + 6% mannitol	$3.7 \times 10^8$ (100%)	$5.8 \times 10^6$ (1.5%)	$1.2 \times 10^5$ (0.032%)	$2.0 \times 10^3$ (0.00054%)	$2.4 \times 10^4$ (0.0064%)
4% Alginate + 6% sorbitol	$3.7 \times 10^8$ (100%)	$2.2 \times 10^7$ (5.9%)	$1.2 \times 10^4$ (0.0032%)	$8.5 \times 10^3$ (0.0022%)	$9.0 \times 10^3$ (0.0024%)

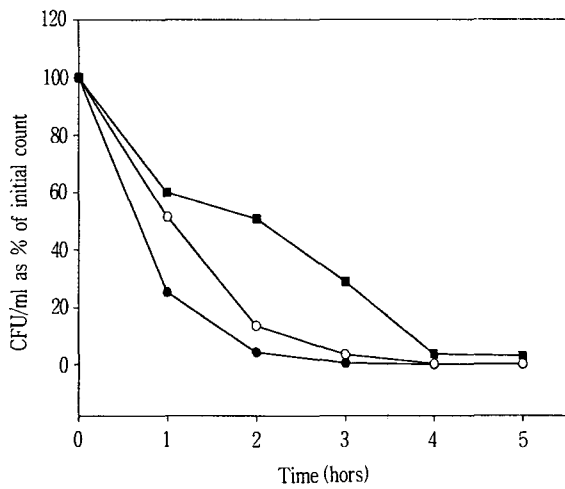


Figure 8. The effect of retreatment on the viability of entrapped *B. breve* at pH 3 ; (●) free cell, (○) entrapped cell, (■) retreatment cell.

보호효과는 Figure 8에서 나타난 결과와 같이 pH 3.0으로 조절된 TPY 액체배지에서, 포집후 다시 retreatment된 *B. breve*의 생존율은 3시간 이후에 50.86%이었고 retreatment하지 않은 포집된 *B. breve*의 생존율은 3.45%이었으며, free cell의 생존율은 0.53%이었다. 5시간 이후에 free cell의 생존수는  $2.4 \times 10^4$  CFU/mL이었고 retreatment되지 않은 포집된 *B. breve*의 생존수는  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL이었으며, retreatment된 포집된 *B. breve*의 생존수는  $2.3 \times 10^6$  CFU/mL로 free cell에 비해 약 100배의 생존수의 증가를 보였다. pH 3에서 4시간까지는 보호효과가 월등히 우수하였다.

**Bead내의 pH 변화와 포집에 의한 대사과정에 미치는 영향**

편성혐기성균인 *B. breve*를 alginate beads로 세포 포집시켰을 때 그들의 대사과정 및 성장특성은 free cell과 유사한 증식을 하였다. 10시간 배양 후 alginate beads안에서의 *B. breve*가 부산물로 생산하는 유기산들의 일부가 beads 밖으로 유출되면서 free cell의 배양액과 포집된 균주 배양액의 pH는 모두 약 2.70정도의 pH 저하를 나타내었다. 배양 30시간이 지난 후에는 사멸기에 있는 free cell의 배양액 및 포집된 *B. breve*의 배양

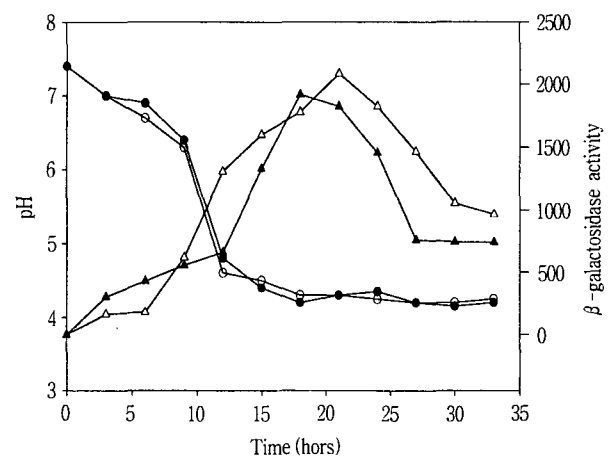


Figure 9. The change of pH and β-galactosidase activity of entrapped *B. breve* during incubation in TPY media ; (●) pH of free cell, (○) pH of entrapped cell, (▲) β-galactosidase activity of free cell, (△) β-galactosidase activity of entrapped cell.

액의 pH는 각각 4.38 및 4.34로서 저하되었다. 이로서 free cell과 포집된 균주의 산 생성능력은 거의 유사함을 알 수 있었다.

β-galactosidase 활력에 대한 결과는 배양 초기에는 free cell의 효소 활성이 우수하였으나 18시간 배양 후 free cell의 효소 활성은 급격히 감소하는 반면 포집된 *B. breve*의 경우 활력의 감소 정도가 free cell에 비하여 낮았다(Figure 9).

**요 약**

*Bifidobacterium*은 인체에 유익한 생리학적 기능이 있어 *Bifidobacterium*이 첨가된 생균제제나 유제품은 인체의 건강증진에 그 가치가 크게 평가되고 있다. 그러나 제품 내에서 균 자체가 생성하는 유기산으로 인한 pH의 급격한 감소와 기타 여러 가지 요인으로 실제 제품에서는 *Bifidobacterium*의 생존수가 급속히 감소할 수 있으며 또한 *Bifidobacterium*이 유제품에 이용시 대부분 다른 유산균과 함께 이용됨으로서 생존율이 감소되어 이에 대한 문제점이 제기되고 있다. 그러므로 본 실험에서는

sodium alginate beads에 의한 *Bifidobacterium*의 포집방법을 통하여 제품에서 *Bifidobacterium*의 생존력을 증가시키는 조건을 조사 연구하였다. Sodium alginate로 포집된 균주의 외부환경에 대한 저항성 등을 비교, 조사하여 최적의 조건을 조사하였다. 스타터나 유산균 제제 제품에 *Bifidobacterium*이 효율적으로 이용되기 위해서는 산과 산소에 내성이 있으며 저온저장에서도 안전성이 우수하여야 하기 때문에 alginate beads에 의하여 고정화 된 균주에 대하여 내산성, 내산소성 및 저온에서 저장실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 직경이 평균 3.30 mm이고 농도가 4%(w/v)로 만들어진 beads가 외부환경에 대한 저항성이 우수하고 제품에 이용 시에 최적조건임을 알 수 있었다. Sodium alginate로 포집시킨 균주의 생존력이 free cell에 비하여 모든 조건에서 우수한 생존력을 나타내었다. 또한 alginate에 6% mannitol, 6% glycerol이나 6% sorbitol을 첨가하여 제조한 bead의 균주가 alginate만으로 포집시킨 균주보다 외부환경에 대한 보호능력이 우수하였다. 또한 retreatment한 균주는 산에 대한 저항성에서 free cell의 생존율보다 약 96배의 증가를 보여 포집된 균주의 보호효과를 극대화 할 수 있었다. 또한 내산소성 실험을 통해서도 유사한 결과를 얻었으며 저장효과도 우수함을 알 수 있었다. 따라서, calcium alginate beads에 의해 고정화된 *B. breve*는 산, hydrogen peroxide 및 저온 등의 저해요인에 대하여 보호 효과가 있음을 알 수 있었다.

## 감 사

본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구비(971-0604-026-1) 및 1998년도 인하대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Rasic, J. L. and J. A. Kurmann (1983), *Bifidobacteria and Their role*, p. 154, Birkhauser Verlag. Basel · Boston · Stuttgart.
- Hughes, D. B. and D. G. Hoover (1991), *Bifidobacteria : Their Potential for Use in America*, dairy products, *Food Tech.* **45**, 74-80.
- Bezkorovainy, A. and R. M. Catchpole (1989), *Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria*, CRC Press, Inc.
- George, R. S. and R. C. Clark (1983), Laboratory-Produced Microbial Polysaccharide Has Many Potential Food Applications as a Gelling, Stabilizing, and Texturizing Agent, *Food Tech* **4**, 63-70.
- Modler, H. W., R. C. Mckellar and M. Yaguchi (1990), *Bifidobacteria and Bifidogenic Factors*, *Can. Inst. Food Sci. Technol.* **23**, 29-41.
- Claude, P. C., G. Nancy, and D. France (1994), Increasing the Stability of Immobilized *Lactococcus lactis* Cultures Stored at 4°C, *J. Ind. Microbiol.* **13**, 367-370.
- Hekmat, S. and J. McMahon (1992), Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Ice Cream for Use as a Probiotic Food, *J. Dairy Sci.* **75**, 1415-1422.
- Audet, P. and C. Lacroix (1989), Two-phase Dispersion Process for the Production of Biopolymer Gel Beads : Effect of Various Parameters on Bead Size and Their Distribution, *Process Biochemistry.* **12**, 217-223.
- Dobрева, E., V. Ivanova, A. Tonkova and E. Radulova (1996), Influence of the Immobilization Conditions on the Efficiency of  $\alpha$ -Amylase Production by *Bacillus licheniformis*, *Proc. Biochem.* **31**(3), 229-234.
- Seiichi, S., A. Fumiaki, I. Norio, M. Hiroshi, Y. Tomako, A. Tomako, and T. Mamoru (1992), Relationship between Oxygen Sensitivity and Oxygen Metabolism of *Bifidobacterium* species, *J. Dairy Sci.* **75**, 3296-3305.
- Park, H. K., J. S. So, and T. R. Heo (1995), Acid Adaptation Promotes Survival of *Bifidobacterium breve* against Environmental Stress, *Food and Biotechnol.* **4**, 226-230.
- Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, and L. M. Crowe (1995), Trehalose and Sucrose Protect both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3592-3597.
- Carpenter, J. F., J. H. Crowe, and T. Arakawa (1990), Comparison of Solute-Induced Protein Stabilization in Aqueous Solution and in the Frozen and Dried states, *J. Dairy Sci.* **73**: 3627-3636.
- Sheu, T. Y., and R. T. Marshall (1993), Improving Survival of Culture Bacteria in Frozen Desserts by Microentrapment, *J. Food Sci.* **76**, 1902-1907.