

Erythritol을 이용한 Bifidobacteria의 생존력과 저장안정성 증대를 위한 세포포집

임 태 빈·백 인 걸·정 찬 섭·류 지 성·¹지 근 익·허 병 기·†허 태 련
인하대학교 공과대학 생물공학과, ¹서울대학교 생활과학대학 식품영양학과
(접수 : 2002. 11. 4., 게재승인 : 2002. 12. 18.)

Cell Entrapment for Bifidobacteria to Increase Viability and Preservative Stability using Erythritol

Tae-Bin Yim, In-Girl Baek, Chan-Seop Jeong, Ji-Sung Ryu, Geun-Eog Ji¹, Byung-Ki Hur, and Tae-Ryeon Heo†
Department of Biological Engineering and Institute of Industrial Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea
¹Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received : 2002. 11. 4., Accepted : 2002. 12. 18.)

In this study, we attempted to increase the survivability of bifidobacteria in simulated gastric juices and bile salts after cell entrapment with alginate and various food additives, such as erythritol, isomalt, palatinose, skim milk, xanthan gum, isomalto-oligosaccharide, fructo-oligosaccharide, galacto-oligosaccharide, pectin, and mono-sodium glutamate. Additionally, the stability of bifidobacteria during storage was investigated by measuring survival rate at different temperatures, i.e. at 4°C, 25°C and -20°C. Bifidobacteria were immobilized in alginate beads and the survival rate was monitored. It was found that bifidobacteria entrapped with 2.5% alginate showed the highest survival rate at 12%. After addition of the various protective agents, erythritol(1%) showed the best protective efficiency with a survival rate of 56.0% among the additives tested when exposed to simulated gastric juices for 3 h. Immobilized cells suspended in 5% skim milk and stored at 4°C survived significantly more than cells stored at 25°C and -20°C. Consequently, the study shows that the survival rate of bifidobacteria immobilized in combination with 2.5% alginate beads and 1% erythritol may be significantly increased in simulated gastric juices and bile salts.

Key Words : Bifidobacteria, entrapment, erythritol, sodium alginate

서 론

Bifidobacteria는 그람양성 혐기성 세균으로서 모유 영양아의 장관뿐만 아니라 성인의 장내에서 우세 균총을 형성하고 있으며, 건강한 성인의 분변 미생물 중 25%를 점유하고 있는 인체에 유익한 균이다(1). Bifidobacteria는 대사과정 중에 초산 및 유산의 생성을 통하여 장내 pH를 저하시켜 유해 물질을 생성하는 병원성 및 부패성 미생물의 생육을 억제할 뿐만 아니라, 정장작용, 변비방지, 면역증강, 항암, 항종양, 콜레스테롤 저하, 항생제 장애의 예방 및 치료에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(2,3). 이에 따라 숙주 동물의 건강에 이로운 영

향을 미치는 요구르트와 치즈 등의 유제품뿐만 아니라 생균제, 정장제, 건강보조식품 등 식품이나 의약품으로서의 이용성이 증가된 다양한 probiotic 제품의 개발과 소비가 날로 증가되고 있으며, 관련 제품군의 시장규모가 점차 확대되고 있는 추세에 있다(4-7).

그러나 섭취된 bifidobacteria의 활성은 항생제, 노화, 스트레스와 식이 등으로 인해 감소하고(8,9), 특히 약한 내산성으로 인하여 위와 소장에서 분비되는 위산과 담즙산에 의해 장관을 통과하는 동안 생존력을 잃게 되며, 발효 유제품에 첨가되었을 때 유당 발효로 생성된 유기산에 의해 생존율이 크게 영향을 받게 된다(10). 따라서 bifidobacteria를 이용한 probiotic 제품의 제조과정과 저장 및 유통기간 동안 활성이 유지된 생균 상태로 보존하고, 섭취 후 위산이나 담즙산 등의 소화기 분비물에 대하여 내성이 있으며, 장내에서 증식할 수 있는 조건을 충족시키는 등 궁극적으로 bifidobacteria의 생존율을 향상시킬 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

현재 식품산업계에서는 다양한 내, 외부 환경조건내의

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, #253 Yonghyun-dong, Nam-ku, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-7511, Fax : +82-32-875-0827

E-mail : theo@inha.ac.kr

bifidobacteria의 생존을 및 생균수 증대를 위한 세포포집 기술로서 세포고정화방법에 대한 연구가 활발하며, 이는 세포를 고정화시킴으로써 균체의 활성에 저해를 유발하는 물질로부터 보호되며, 외부 환경물질의 독성을 감소시키고, 고정화된 내부 물질을 외부의 물리적 충격으로부터 보호해 주며, 물질의 표면성질을 변화시켜줄 뿐만 아니라 물질의 해리를 조절할 수 있는 장점이 있기 때문이다. 따라서 세포고정화법이 식품산업에 이용되기 위해서는 고정화 물질이 식용 가능하고 식품의 풍미를 변화시키지 않아야 하며, 나아가 용해성과 내, 외부 물질과의 반응성 등이 고려되어야 한다. 일반적으로 이와 같은 세포 포집물질들은 그들의 재질과 격자 형성 조건에 따라 다양한 형태의 다공성 격자 구조를 형성하므로 이들 물질을 이용하여 bifidobacteria를 포집할 경우 격자의 세공을 통하여 위액, 담즙염, 유기산 및 과산화 수소등과 같은 균 생존에 영향을 미치는 요인들이 격자내 침투가 가능하기 때문에 비드에 포집된 bifidobacteria의 생존력에 영향을 줄 수 있다(15). 유제품내의 유산균 및 bifidobacteria를 위산과 담즙산의 영향으로부터 보호하기 위하여 alginate, chitosan, *K*-carageenan, gellan gum, xanthan gum 등과 같은 다양한 고분자 물질을 이용한 세포포집 기술이 보고되고 있다(11-14). 특히 alginate는 비독성이고, 식품 첨가물로 이용될 뿐만 아니라 낮은 온도에서도 비드의 제조가 가능하기 때문에 세포 및 효소 등의 고정화에 많이 이용되고 있다(16,17).

저자 등은 전보에서 bifidobacteria의 식품이나 의약품으로서 이용성을 증대할 목적으로 내산성, 내담즙성과 내산소성 등의 외부 환경에 대한 저항성이 개선된 세포포집 기술과, 우수한 포집재료를 간편하게 선별하는 기술을 개발하여 보고 하였다(18-20). 따라서 본 연구에서는 bifidobacteria의 저장 안정성 증대와 발효 유제품에 적용이 가능하게 할 목적으로 균을 포집시켜 내산성이나 내담즙산성 등의 외부환경에 대한 저항성을 개선시킨 후, 세포포집시 생기는 다공성을 채우기 위한 새로운 첨가물질을 탐색하고 이를 이용한 bifidobacteria의 생존력과 저장 안정성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양방법

본 실험에 사용된 *Bifidobacterium longum* (ATCC 15707), *Bifidobacterium infantis* (ATCC 25962)와 *Bifidobacterium adolescentis* (ATCC 15703)은 한국과학기술연구원 생명공학연구실에서 분양받았으며, *Bifidobacterium longum* HLC 3742와 *Bifidobacterium infantis* FBL은 본 연구실에서 한국인 유아로부터 분리 동정한 것을 사용하였다. 실험에 사용하기 위해서 bifidobacteria는 TPY-broth가 담긴 10 mL 시험관에 2% 접종한 후 37°C에서 3회 계대배양하여 활성을 얻었다. Bifidobacteria의 고농도 배양은 2.5 L jar에 working volume 1 L TPY-broth에 2% 접종하여 20시간 배양을 한 후 고농도의 균체수를 회수하여 사용하였다.

Alginate와 기타 식품첨가물

Bifidobacteria의 포집에 사용된 alginate는 Sigma Co.와 Jiwon Co.의 제품으로서 기타 첨가물질들과 함께 세포 현탁액에 혼

합하기 전에 85°C에서 30분간 살균하여 사용하였다.

포집 방법

실험에 사용한 bifidobacteria는 발효기에서 37°C/20시간 동안 배양하여 3,172 × g에서 원심분리하여 사용하였다. 회수한 세포 현탁액을 살균 처리된 비닐팩에 넣고 살균된 sodium alginate 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%를 첨가한 후 혼합기 (Stomacher 400, Seward Co., UK)를 이용하여 alginate 혼합액을 만들었다. Erythritol, isomalt, xylitol, palatinose, skim milk, xanthan gum, isomalto-oligosaccharide, fructo-oligosaccharide, galacto-oligosaccharide, pectin, mono-sodium glutamate와 같은 식품첨가물을 사용하는 경우에는 alginate와 같이 0.6%를 첨가한 후 85°C에서 30분간 살균 처리한 후 세포 현탁액과 함께 살균 비닐팩에 넣어 혼합하였다. 이러한 alginate 혼합액을 5 μm, 1 μm 그리고 0.5 μm 필터를 가진 air compressor (2.3 kg/cm²)를 이용하여 0.1 M CaCl₂ 수용액에 needle을 이용하여 적하시켜 비드를 제조하였다.

비드의 생균수 측정

비드 10개를 0.1 M sodium citrate 5 mL 수용액에 넣은 후 vortex mixer를 이용하여 비드가 용해되어 균이 나올 수 있도록 충분히 녹여 주었다. 이러한 수용액을 생균수 측정에 이용하였으며, 생리식염수를 사용하여 심진회석을 한 후에 TPY-agar 배지에 도말한 후, 혐기조건으로 37°C에서 48시간 배양하고 colony를 계수하여 생균수를 측정하였다.

비드에 포집된 bifidobacteria의 유사위액 및 담즙염 내성 측정

*Bifidobacterium spp.*의 포집은 2.5% alginate와 1% erythritol을 이용하여 상기 포집 방법과 동일하게 포집하였다. 이렇게 제조된 비드는 pH 2의 유사위액에서 3시간 동안, 담즙액 (0.6% Oxgall)에서 6시간 동안 각각 반응시킨 후, TPY-agar에 도말하여 37°C에서 48시간 배양 후 colony를 계수하여 생존율을 측정하였다.

Bifidobacteria가 포집된 비드의 크기에 따른 영향 측정

비드의 크기에 따른 영향을 알아보기 위해 2.5% alginate를 기본으로 하고 erythritol은 0.8%, 1.0%, 1.2%, 1.4%의 농도로 하여 비드를 제조하였으며, 비드의 크기는 4가지의 다른 크기의 needle을 이용하여 각기 다른 크기의 비드를 제조하였다. 이렇게 제조된 비드는 마이크로미터를 이용하여 크기를 측정하였으며, 각각 유사위액에 3시간 반응 시키는 동안 1시간 마다 시료를 채취하였다. Sample은 상기방법과 동일하게 생균수를 측정하여 생존율을 비교하였다.

비드의 저장조건 측정

생산된 비드를 섭취하기 전까지 비드내 세포의 활성 및 일정한 농도를 유지하기 위해 제조된 비드를 세 가지 저장용액에 10주간 저장하면서 1주일 간격으로 시료를 채취하여 균의 저장 안정성을 확인하였다. 각각의 저장조건은 5% skim milk 수용액, 10% isomalto-oligosaccharide 수용액, TPY-broth 그리고 대조군은 공기가 접하지 않는 용기에 비드만을 넣어 저장하

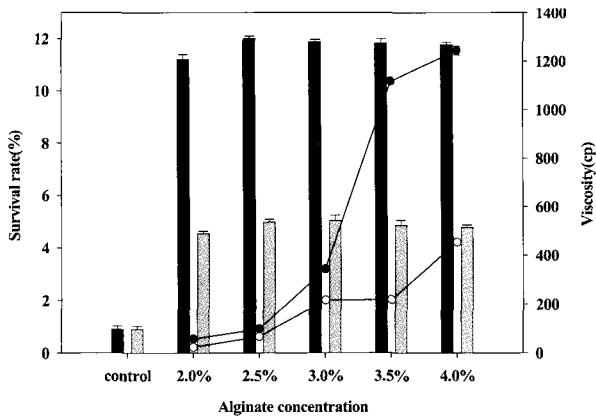


Figure 1. Effect of sodium alginate concentration on survival rate of entrapped *B. longum* after exposure to simulated gastric juices for 3 h. control: untrapped cell, ●: viscosity of different sodium alginate concentrations(Jiwon Co.), ○: viscosity of different sodium alginate concentrations(Sigma Co.), ■: survival rate of sodium alginate bead(Jiwon Co.), ▨: survival rate of sodium alginate bead(Sigma Co.).

였다. 저장온도는 실온(25℃), 저온(4℃), 냉동(-20℃)의 세 가지 온도에서 실시하였다. 저장기간 중 시료채취 시 초래될 수 있는 비드의 저장상태의 균일성을 위해 각 저장조건과 저장 온도에 맞춰 10개씩의 시료를 준비하였다. 이렇게 저장된 비드의 생존율은 10주간 상기 생균수 측정방법과 동일하게 측정하였다.

결과 및 고찰

포집물질 및 최적 농도 측정

2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0% 농도의 alginate로 bifidobacteria를 포집한 실험결과는 다음과 같다(Figure 1). 대조군으로 사용한 포집되지 않은 시료는 반응 후 생존율이 1%에도 미치지 못하였다. Sigma Co.의 alginate로 포집된 bifidobacteria는 각 농도별로 4.6%, 5.0%, 5.0%, 4.9%, 4.8%로 평균 약 5%의 생존율을 보였으며, Jiwon Co.의 alginate로 포집된 bifidobacteria는 각 농도별로 11.2%, 12.0%, 11.9%, 11.8%, 11.8%로 평균 약 12%에 달하는 생존율을 보이며 우수하였다. 최적 농도를 선별하는 과정에서 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%로 모두 근소한 차이를 보였으나, 그중 생존율이 가장 높은 것은 Jiwon Co.의 2.5% alginate(생존율 12.0%)이고, 또한 alginate의 농도가 2.5%를 넘는 경우에는 세포를 포함한 alginate 혼합액의 점도가 300cp가 넘게 되며, 이는 비드 제조상 용이하지 못한 조건(21)이기에 bifidobacteria의 생존율과 제조과정을 고려하여 alginate의 농도는 2.5%를 최적농도로 결정하여 비드를 제조하였다.

비드의 안정성 증대를 위한 첨가물질 탐색

Ca-alginate 비드는 고분자물질의 결합으로 다공성 구조를 나타내며, bifidobacteria 포집에 있어서 다공성으로 인한 혐기적조건 조성 유지의 어려움과 장관 내에서의 위액, 담즙염에 대한 침투를 허용할 수 있다. 이러한 환경들은 bifidobacteria의 성장이나 활력에 큰 영향을 줄 수 있으므로(22) 비드의 다공

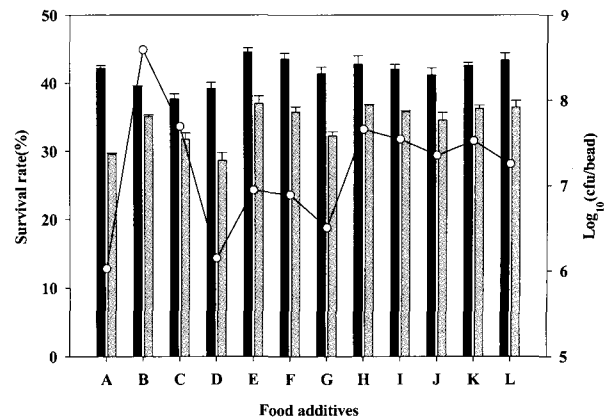


Figure 2. Survivability of *B. longum* entrapped with various food additives in combination with alginate exposure to simulated gastric juice for 3 h. A: control(alginate ; Jiwon Co.), B: erythritol, C: skim milk, D: palatinose, E: xylitol, F: mono-sodium glutamate, G: isomalt, H: isomalto-oligosaccharide, I: fructo-oligosaccharide, J: galacto-oligosaccharide, K: pectin, L: xanthan gum, alginate concentration: 2.5%, food additives concentration: 0.6%, ■: control, ▨: After reaction with simulated gastric juices(3 h), ○: survival rate(%)

성을 채워줄 수 있는 첨가물의 선별을 하게 되었다. 이러한 첨가물들은 이미 비드 보호효과가 보고된(18-20) erythritol, isomalt, xylitol, palatinose, skim milk, xanthan gum, isomalto-oligosaccharide, fructo-oligosaccharide, galacto-oligosaccharide, pectin 및 mono-sodium glutamate 등이다. 그 중 자연계에 존재하는 천연 4탄당 알코올인 erythritol을 첨가한 비드의 경우 생존율은 약 48.9%로 나타났으며, skim milk는 33.7%, isomalto-oligosaccharide는 33.2%, pectin은 31.5%로 다른 첨가물질들보다 erythritol을 첨가한 비드가 가장 우수하였다. 이는, Jiwon Co.의 alginate만으로 포집했을 때 보다 약 3.5배가 넘는 생존율이며, 우수한 첨가물로 보고되었던 skim milk보다 약 15% 높은 생존율이다(Figure 2). 이러한 효과를 보이는 erythritol은 열 및 산에 안정하고, 흡습성이 낮고 취급이 용이하며, 다른 당류에 비해 삼투압이 높은 저칼로리 당알코올로서, 현재 유제품이나 음료 등 다양한 식품에 첨가되고, 와인, 치즈, 장유 등의 발효식품 및 버섯, 메론 등에 존재하며, 포도당을 효모로 발효하여 생산하므로 비드에 첨가하여 사람이 섭취하기에 안전한 것으로 알려져 있다(23).

Erythritol 농도에 따른 bifidobacteria의 생존율 측정

본 실험결과 11종의 식품첨가물 중 선별된 erythritol은 기 실험자에 의해 생존율이 가장 좋았던 0.6% skim milk에 준하여 모든 첨가물의 농도를 0.6%로 하여 선별된 것이며, 이는 각 첨가물의 농도 차에 의한 생존율의 변화가 10%를 넘지 않는 범위이기에 선별 농도로 정하였다(18,19). 이러한 이유로 0.6%에서 높은 생존율을 보였던 erythritol의 최적농도를 결정하는 실험을 하였다. 유사위액에 3시간 반응시킨 후 생균수를 측정된 결과 erythritol 1.0%에서 56%에 달하는 생존율로 가장 높았으며, erythritol의 첨가농도가 1.2%, 1.4% 등 1.0%가 초과될 시 생존율이 조금씩 증가되는 경향을 보였으나 1%보다 높은 생존율을 보이는 경우에도 erythritol이 첨가된 alginate 혼합

Table 1. Survivability of *Bifidobacterium spp.* entrapped with erythritol in combination with alginate after exposure to simulated gastric juices(3 h) and bile salts(6 h)

Species	Kinds of beads ^a	Reaction in simulated gastric juices(3h) ^b		
		Before(log cfu/bead)	After(log cfu/bead)	Survival rate(%)
<i>B. longum</i>	Alginate(A)	8.3475 ± 0.690	7.3557 ± 0.076	10.2 ± 0.7
ATCC 15707	A+E	8.4728 ± 0.086	7.8412 ± 0.171	31.5 ± 1.2
<i>B. infantis</i>	Alginate(A)	8.3174 ± 0.008	7.2519 ± 0.011	8.6 ± 0.8
ATCC 25962	A+E	8.3831 ± 0.017	7.4926 ± 0.068	13.1 ± 0.7
<i>B. adolescentis</i>	Alginate(A)	7.8847 ± 0.014	6.9987 ± 2.160	13.0 ± 0.8
ATCC 15703	A+E	7.9715 ± 0.151	7.4714 ± 0.250	31.4 ± 0.7
<i>B. longum</i>	Alginate(A)	7.9182 ± 0.032	7.0024 ± 0.381	12.1 ± 1.3
HLC 3743	A+E	8.0241 ± 0.081	7.5903 ± 0.540	36.8 ± 0.3
<i>B. infantis</i>	Alginate(A)	8.2779 ± 0.200	7.2857 ± 0.026	10.2 ± 0.1
FBL	A+E	8.2467 ± 0.071	7.8405 ± 0.038	39.3 ± 0.3

Species	Kinds of beads ^a	Reaction in bile salts(6h) ^b		
		Before(log cfu/bead)	After(log cfu/bead)	Survival rate(%)
<i>B. longum</i>	Alginate(A)	8.2518 ± 0.005	7.4957 ± 0.820	17.6 ± 0.6
ATCC 15707	A+E	8.2857 ± 0.081	7.8984 ± 0.129	41.0 ± 1.2
<i>B. infantis</i>	Alginate(A)	8.1987 ± 0.003	7.5423 ± 0.151	22.1 ± 1.0
ATCC 25962	A+E	8.0289 ± 0.038	7.6995 ± 0.007	46.8 ± 0.4
<i>B. adolescentis</i>	Alginate(A)	7.6972 ± 0.004	7.2898 ± 0.085	12.3 ± 0.1
ATCC 15703	A+E	7.8274 ± 0.045	7.3215 ± 0.079	31.2 ± 0.7
<i>B. longum</i>	Alginate(A)	8.1024 ± 0.540	7.5158 ± 0.044	25.2 ± 0.6
HLC 3743	A+E	8.0069 ± 0.630	7.6398 ± 0.520	43.0 ± 0.3
<i>B. infantis</i>	Alginate(A)	8.0367 ± 0.006	7.8106 ± 1.280	27.8 ± 0.4
FBL	A+E	7.9865 ± 0.016	7.6322 ± 0.013	44.2 ± 1.9

^aalginate concentration: 2.5%, erythritol concentration: 1.0%

^bData are mean values ± standard deviations

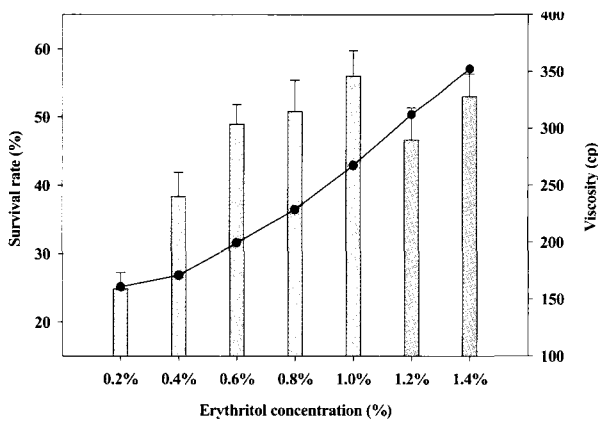


Figure 3. Survival rate of *B. longum* ATCC 15707 entrapped with alginate containing different erythritol concentrations after exposure to simulated gastric juices for 3 h. All bead based on 2.5% alginate ●: viscosity of 2.5% alginate plus different erythritol concentrations

액의 점도가 300cp을 넘게 되므로 비드 제조가 용이하지 못하였기에 erythritol의 첨가 농도를 1%로 정하였다(21)(Figure 3).

산과 담즙염에 대한 *Bifidobacterium spp.* 가 포함된 비드의 생존율 변화

*Bifidobacterium spp.*를 alginate와 erythritol을 이용하여 포집시킨 후 유사위액 및 담즙액에 반응시켜 다음과 같은 결과를 얻었다(Table 1). 이 반응에서 *B. longum* 뿐 아니라 기타 표준

균주 및 유이분변에서 분리된 균주 모두가 2.5% alginate만으로 포집한 비드보다 erythritol 1%를 첨가한 경우 pH 2인 유사위액에서 3시간 동안의 반응 후에는 약 2.8배, 담즙액(0.6% oxgall)에서 6시간 동안의 반응 후에는 약 2.1배로 생존율이 높게 나타났다. 다만 *B. infantis* ATCC 25962의 경우 유사위액이나 담즙액 모두에서 다른 *Bifidobacterium spp.* 보다 약 10% 낮은 생존율을 보였으나 이 또한 alginate만으로 포집한 bifidobacteria보다 생존율이 우수한 것으로 나타났다.

비드의 크기와 농도에 따른 안정성 조사

비드의 크기와 농도에 따른 안정성조사 실험에서는 각 크기별로 1 g씩의 비드를 유사위액에 3시간 동안 반응시켰으며, erythritol의 농도 0.8%의 경우 1.5 mm bead-36.2%, 2.0 mm bead-49.9%, 2.5 mm bead-46.1%, 3.0 mm bead-41.6%, 1.0%의 경우 1.5 mm bead-46.2%, 2.0 mm bead-54.9%, 2.5 mm bead-43.2%, 3.0 mm bead-42.3%, 1.2%의 경우 1.5 mm bead-39.5%, 2.0 mm bead-47.3%, 2.5 mm bead-44.7%, 3.0 mm bead-44.9%, 그리고 1.4%의 경우 1.5 mm bead-40.5%, 2.0 mm bead-47.0%, 2.5 mm bead-52.4%, 3.0 mm bead-41.4%의 생존율을 보였다. 2.0 mm bead는 다른 3.0 mm bead, 2.5 mm bead, 1.5 mm bead보다 erythritol의 농도 0.8%, 1.0%, 1.2%(w/v)에서 각각 약 3-13%가 넘는 생존율을 보이며 최적의 크기가 2 mm bead임을 알아냈으며, erythritol의 농도 1.4%에서만 2.5 mm bead가 다른 크기의 비드보다 5-12%가 넘는 생존율을 보이며 최적으로 나타났다(Figure 4). 이는 이 등(20)에 의해 크기가

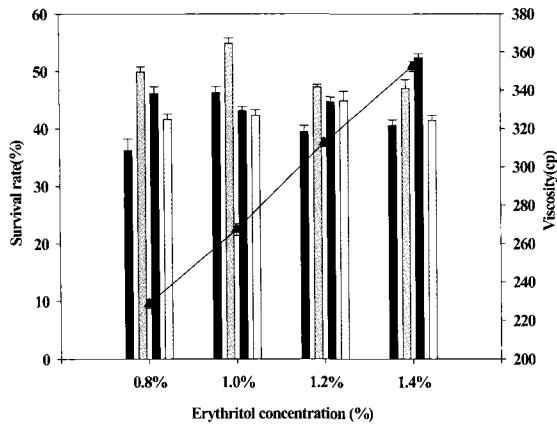


Figure 4. Survival rate of *B. longum* entrapped in four different bead sizes with 2.5% alginate containing various erythritol concentrations after reaction with simulated gastric juices for 3 h. All beads based on 2.5% alginate, ■: 1 mm bead, ■: 2.0 mm bead, ■: 2.5 mm bead, □: 3.0 mm bead, ▲: viscosity of 2.5% alginate plus different erythritol concentrations

클수록 포집된 균체에 대한 보호효과가 크다는 결과와는 다소 차이를 보였다. 이러한 결과는 크기가 큰 비드들의 경우 g 당 비드의 수도 적으며, 크기가 크더라도 비드내 그에 상응하는 세포의 수를 갖지는 못하였으며 유사위액이나 담즙염에 그다지 큰 내성이 없음을 나타냈다. 이는 비드 제조시 크기에 따른 비드 내부까지의 경화상의 어려움과 alginate 비드 형성시 크기에 따른 다량의 다공성으로 인한 공기 함유로 유사위액 및 담즙액 반응시 산 침투의 영향이 더욱 커 bifidobacteria의 사멸을 촉진시키는 것으로 나타났다.

비드의 저장 안정성 증대에 대한 조사

Bifidobacteria가 포집된 비드의 저장성을 증진시키기 위해 다양한 수용액 중에 첨가하여 실온(25°C), 저온(4°C), 냉동(-20°C)에서 10주간 저장하며 생존율을 비교하였다. 이에 사용한 수용액은 5% skim milk 수용액, 10% isomalto-oligosaccharide 수용액 그리고 TPY-broth이며, 이들 수용액에 비드를 침지시켜 저장하였다. 10주간의 저장기간 동안 대조군의 경우 저장 초기 균수는 2.81×10^8 cfu/mL로 실온 저장에서는 6주만에 비드내 세포가 검출되지 않았으며, 저온 저장에서는 10주 후 1.59×10^6 cfu/mL로 0.6%의 생존율을 보였고, 냉동 저장에서는 1.48×10^4 cfu/mL으로 0.005%의 생존율을 보였다(Figure 5, A). 5% skim milk 수용액의 경우 저장초기 균수는 2.91×10^8 cfu/mL로 실온저장에서는 8주만에 비드내 세포가 검출되지 않았으며, 저온 저장에서는 10주 후 1.52×10^7 cfu/mL로 5.2%, 냉동 저장에서는 5.48×10^5 cfu/mL으로 0.2%의 생존율을 보였다(Figure 5, B). 10% isomalto-oligosaccharide 수용액의 경우 저장초기 균수는 3.08×10^8 cfu/mL로 실온 저장에서는 7주만에 비드내 세포가 검출되지 않았으며, 저온 저장에서는 10주 후 1.46×10^7 cfu/mL으로 4.8%의 생존율을 보였고, 냉동저장에서는 3.04×10^4 cfu/mL로 0.01%의 생존율을 보였다(Figure 5, C). 마지막으로 TPY-broth의 경우 저장초기 균수는 2.99×10^8 cfu/mL로 실온저장의 경우 5주만에 비드내 세포가 검출되지 않았으며, 저온저장에서는 4.93×10^6 cfu/mL로 1.64%의 생존율을 보였고, 냉동저장에서는 4.03×10^3 cfu/mL로 0.001%의 생존율을 보였다(Figure 5, D). 각각의 저장조건 중 5% skim milk 수용액의 경우 실온, 저온, 냉동의 세가지 저장온도에서 모두 생존율이

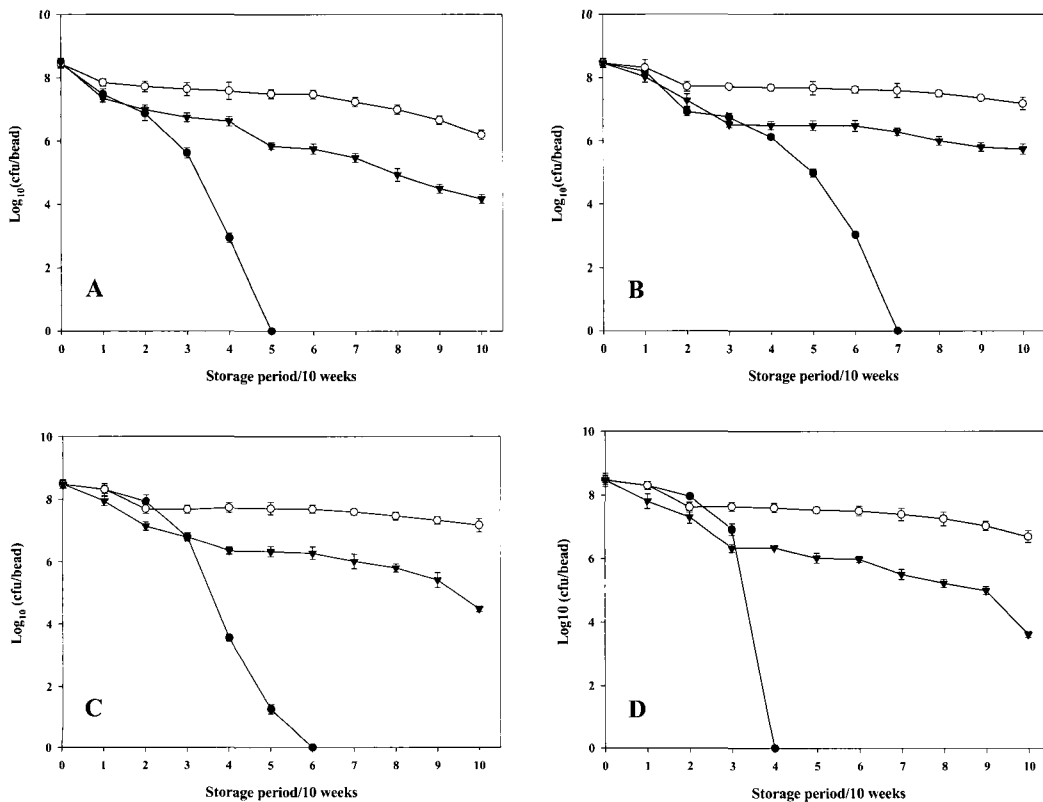


Figure 5. Survivability of *B. longum* entrapped with 2.5% alginate in combination with 1% erythritol at various storage condition. A: only beads, B: 5% skim milk solution, C: 10% isomalto-oligosaccharide solution, D: TPY-broth, ●: stored at room temp.(25°C), ○: stored at 4°C, ▼: stored at -20°C

우수하게 나타났다. 또한 저장조건에 따른 실험에서도 어떤 수용액내에 보관되는가에 관계없이 4℃의 저온 저장상태가 실온이나 냉동 저장보다 bifidobacteria의 생존율이 우수하였다.

요 약

본 연구는 포집된 bifidobacteria의 위산과 담즙산에 대한 bifidobacteria의 생존율을 증가시키는 것을 목적으로 하였다. Bifidobacteria의 포집을 위한 alginate 선별 실험은 유사위액에 3시간 반응 후 생존율을 측정하여 결정하였다. 2.5%의 Jiwon Co.의 alginate로 포집한 비드에서의 생존율이 Sigma Co.의 alginate로 포집한 비드나 2.0%, 3.0%, 3.5%, 4.0%의 농도에 비해 우수하게 나타났다. Bifidobacteria의 생존율을 향상시키기 위해 2.5% alginate와 함께 보호 효과를 가져올 수 있는 11종의 식품 첨가물질을 가지고 실험을 하였다. 이 실험에서는 erythritol-alginate 비드가 다른 첨가물질들 보다 높은 생존율을 보였다. 또한 erythritol의 최적농도 결정을 위한 실험으로 유사위액에 3시간 반응 후 생존율을 측정한 결과 erythritol의 농도는 1.0%일 때 56%로 가장 우수하게 나타났다. 2.5% alginate와 1.0% erythritol의 농도로 결정지어진 비드의 크기에 따른 영향 실험에서는 2.0 mm 비드가 다른 크기의 비드보다 bifidobacteria의 생존율이 가장 높았다. Erythritol-alginate 비드는 포집하지 않은 bifidobacteria나 alginate만으로 포집한 bifidobacteria보다 유사위액이나 담즙액에서의 생존율이 높았다. 이러한 비드의 저장성은 5% skimmilk 수용액 상에서 10주간 저온저장을 하였을 경우에 10^7 이상의 균수를 유지시킬 수 있었다. 결과적으로 erythritol-alginate비드는 bifidobacteria의 생존율과 저장 안정성에 있어서 다른 첨가물을 이용한 세포 포집의 경우에서보다 이용가치가 높다고 할 수 있다.

감 사

본 연구는 산업자원부 산업기술개발 위탁과제(과제번호: A11-29-03)로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Klupach, H. J. (1985), Man and microflora, *N. Eur. J. Dairy Sci.* **51**, 221-226.
- Shah, N. P. (1997) Bifidobacteria: Characteristics and potential for application in fermented milk products. *Milchwissenschaft* **52**, 16-21.
- Rasic, J. L. and J. A. Kurmann (1983), Bifidobacteria and Their role. p. 154, Birhauser.
- Hughes, D. B. and D. G. Hoover (1991), Bifidobacteria : Their potential for use in america, dairy products. *Food Tech.* **45**, 74-80.
- Fuller, R. (1992), Probiotics: the scientific basis. London: Chapman & Hall, UK.
- Fuller, R. (1989), A review: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
- Sun, W. and W. Griffiths (2000), Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *Int. J. Food Microbiol.* **61**, 17-25.
- Walker, W. A. and L. C. Duffy (1998), Diet and bacterial colonization : role of probiotics and prebiotics. *J. Nutr. Biochem.* **9**, 668-675.
- Mitsuoka T. and K. Hayakawa (1972), Die farkalflora bei menschen: I. Mitteilung: Die zusammensetzung der faekalflora der verschiedenen altersgruppen. *Zentralbl. Bakteriolk. Hyg. I. Abt. Orig.* **A223**, 333-342.
- Marteau, P., M. Minekus, R. Havenarr, and J. H. J. Huis In't Veld (1997), Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy Sci.* **80**, 1031-1037.
- Rao, A. V., N. Shwinarain, and J. Maharaj. (1989), Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **22**, 345-349.
- Arnaud, J. P. and C. Lacroix (1991), Diffusion of lactose in κ-carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped growing lactic acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 1041-1049.
- Camelin, I., C. Lacroix, C. Paquin, H. Prevost, R. Cachon, and C. Divies (1993), Effect of chelantans on gellan gel rheological properties and setting temperature for immobilization of living bifidobacteria. *Biotechnol. Prog.* **9**, 291-297.
- Kim, I. K., Y. J. Baek, and Y. H. Yoon (1996), Effect of rehydration and immobilization in Ca-alginate on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*. *Korean J. Dairy Sci.* **18**, 193-198.
- Tanaka, H., M. Matsumura, and I. A. Veliky (1984), Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 53-58.
- Lim, F. and R. D. Moss (1981), Microencapsulation of living cells and tissues, *J. Pharm. Sci.* **70**, 351-353.
- Prevost, H. and C. Divies (1988), Continuous pre-fermentation of milk by entrapped yoghurt bacteria. I Development of the process, *Milchwissenschaft* **43**(10), 621-625.
- Park, H. K., K. S. Bae, and T. R. Heo (1999), Development of cell technology for the improvement of bifidobacteria viability. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**(4), 389-395.
- Yu, W. K., T. B. Yim, and T. R. Heo (2001), Effect of skim milk-alginate beads on survival rate of bifidobacteria. *Biotechnol. Biopro. Eng.* **6**, 133-138
- Lee, K. Y., C. J. Woo, K. S. Bae, and T. R. Heo (2000), Development of the selection technique of entrapment materials for the viability improvement of entrapped bifidobacteria. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 1-8.
- Seifert, D. B. and J. A. Phillips (1997), Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol. Prog.* **13**, 562-568.
- Gianella, R. A., S. A. Brotiman, and N. Zamcheck (1972), Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man : Studies in vivo and in vitro, *Gut*, **13**, 251-256.
- No, B. S. and S. Y. Kim (2000), The property and application of polyols. p. 63-65, Bolak company limited · The Asian Culture Press, Seoul.