

Optimization of supplemented whey medium composition for maximum viable cell count of *L. crispatus* KLB 46

남보현, 장정은, 김승철¹, 윤현식, 소재성

인하대학교 생물공학과, 이화여자대학교 목동병원 산부인과¹

Tel (032) 860-8751, Fax (032) 875-0827

Abstract

Lactobacillus crispatus KLB 46 isolated from Korean woman was grown on supplemented whey medium and medium compositions were optimized for maximum viable cell count. Among the nitrogen sources tested, beef extract yielded the highest viable cell number. When corn steep liquor was applied as an additional nitrogen source, the viable cell number was highest (3.11×10^9 CFU/ml) in the medium containing 50g/l corn steep liquor and 10g/l beef extract. The highest viable cell count (5.00×10^9 CFU/ml) was obtained from the supplemented whey medium that contains beef extract (10g/l), corn steep liquor (50g/l), tween 80 (0.1%, v/v) and trace amounts of sodium acetate (5g/l), dipotassium phosphate (2g/l), magnesium sulfate (0.1g/l), and manganese sulfate (0.05g/l).

Introduction

Lactobacillus spp.는 인간이 이용할 수 있는 유용한 미생물중 한 종류로서 오래 전부터 각종 발효식품, 유제품, 장류, 주류, 가축 사료 등으로 널리 이용되어져 왔으며, 또한 이들 *Lactobacillus* spp.는 인간의 구강계, 소화계와 비뇨생식기계를 건강하게 유지하기 위한 중요한 정상세균총으로도 알려져 있다⁽¹⁾. 특히 여성에게 있어서 *Lactobacillus* spp.는 질내의 pH를 4.5 이하의 강한 산성으로 유지시켜주고 과산화수소(H₂O₂) 및 bacteriocin을 비롯한 많은 미생물 성장 억제물질을 생성하여 다른 미생물에 의한 감염을 최소화한다. 그러나 어떠한 원인에 의해 세균성 질염이 발생하면 우점균인 *Lactobacillus* spp.가 감소하고 혐기성 세균인 *Gardenerella vaginalis*가 증가하는 상태가 되면서 분비물이 심한 악취를 띠고, 산도가 증가하게 된다⁽²⁾. 이러한 세균성 질염은 일반적으로 항생제를 경구 투여하거나 직접 질 내에 연고, 질정을 투여하는 방법으로 임상에서는 치료를 하고 있다. 그러나 항생제를 이용한 치료의 경우, 질염을 일으키는 병인성 미생물은 물론 질 내의 정상세균총을 파괴하게 되어 만성적으로 질염이 발생할 수 있다. 항생제 사용으로 인한 부작용을 극복하기 위한 대안으로 외국의 경우 질내의 정상세균총 중의 하나인 *Lactobacillus* spp.을 이용한 유용 생균제

를 질 내에 투여함으로써 유해한 균총에 의해 파괴된 정상균총을 상대적으로 회복시켜 질염을 치료하는 방법이 주목을 받고 있다. 따라서 세균성 질염의 치료에 있어서 원인균의 제거는 물론, *Lactobacillus* spp.을 우점균으로 하는 정상세균총의 정착이 관건이라 하겠다⁽³⁾. 이러한 질염 치료용 생균제제의 이용을 위해 한국 여성의 질내 정상 세균총 중 우점균주인 *Lactobacillus* spp.를 분리하고, 분리된 균주 중 미생물 성장 억제 활성이 뛰어난 균주들을 골라 strain 수준에서 분리 동정한 연구가 이미 선행되었다⁽⁴⁾. 그러나 기존의 MRS 배지를 이용하여 생균제제를 위한 균주를 생산할 경우, 생산원가에서 오는 가격의 상승으로 인해 치료용 약제의 가격은 매우 높을 것으로 예상된다. 이 때문에 생균제제용 배지의 선택은 경제성을 우선적으로 생각해야 한다.

치즈 생산시 원료유의 85~90%가 부산물로 생산되는 whey에는 40~50g/l의 lactose와 1.3g/l 정도의 단백질 뿐 아니라 수용성 비타민, 무기질 등의 유용한 성분들을 함유하고 있어 발효산업의 배지로도 많이 연구되고 있다. 그러나 현재 우리 나라에서는 일부만 사료로 이용될 뿐 나머지는 그대로 방류되고 있어, 유기물로 인한 폐수를 처리하기 위해 많은 시설투자와 비용이 요구되고 있다⁽⁵⁾.

본 연구에서는 whey를 기본 배지로 하여 *Lactobacillus* spp. 균주의 최대 생균수를 가장 경제적인 방법으로 얻기 위한 배지 최적화를 실시하였다. 배지 최적화의 기본 방향은 whey를 기본 배지로 하여 기존의 MRS 배지 성분 중 생균수에 영향이 큰 성분과 농도를 찾아 공급하여주고, 배지 비용을 줄이기 위한 새로운 배지성분들이 *Lactobacillus* spp. 생균수에 미치는 효과를 파악하였다. 또한 배지의 선택에 있어서 정제과정을 고려하지 않을 수 없으므로 가능한 한 불필요하거나 정제에 부담을 주는 성분은 배지제조 과정에서 충분히 배려를 하였다.

Material and method

Microorganism

본 실험에 사용된 균주는 *Lactobacillus crispatus* KLB 46 균주로서, 한국 여성의 질내 정상 세균총 중 우점균주를 자체적으로 분리 동정하여 사용하였으며⁽⁴⁾, 20% glycerol 용액에 균을 현탁하여 deep freezer(-70°C)에 보관하였다가 필요할 때마나 실온에서 녹여 사용하였다.

Effect of MRS components

Whey(Sigma Co.)는 121°C 15분간 멸균 후에 침전물을 제거하고, 5% lactose 농도로 조절하여 사용하였다. Glucose(Quantum) 20g/l, peptone No.3(Difco) 10g/l, beef extract(Difco) 10g/l, yeast extract(Difco) 5g/l를 각각 공급하였다. Static incubator에서 37°C, 30시간동안 배양하였다.

Effect of each elements

Whey에 공급될 모든 배지와 염은 고농도로 제조하여, 85%(v/v) phosphoric acid와 50%(v/v) NH₄OH로서 초기 pH 5.5로 조절한 후, 121°C 15분간 멸균한 후에 사용하였다. 일반 배지는 Difco Co.의 제품을 사용하였으며 trace elements는 Shinyo Chemical Co.을, 그리고 corn steep liquor는 Sigma Co.의 것을 사용하였다.

Viable cell count

생균수 측정 방법으로는, 배양액을 열 배씩 serial dilution 시킨 희석 액을 MRS agar plate 에 $5\mu\text{l}$ 씩 spot으로 접종하고, 37°C 에서 24시간 정도 anaerobic 조건에서 배양한 후, 한 spot 당 colony 수가 10에서 100사이가 되는 희석배수의 spot에서 colony를 계수 하여 희석비율을 곱하여 순수 배양액의 생균수를 계산하는 spot colony count방법을 사용하였다⁽⁴⁾.

Results and discussion

Whey를 기본 배지로 한 실험에서 공급할 첨가물의 선택은 MRS 배지 성분을 우선하였다. Fig 1. 은 MRS 배지 성분 중 가장 농도가 높은 4가지 성분을 whey 배지에 공급하였을 때 각 성분별 생균수를 알아본 것이다. Glucose에 비하여 질소 원을 공급했을 때 보다 높은 생균수를 얻을 수 있었다.

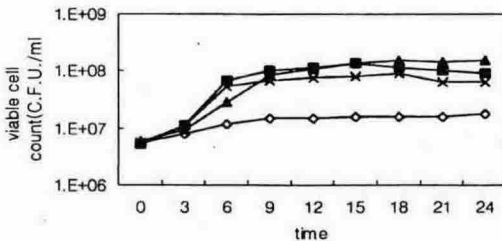


Fig. 1. Effects of MRS medium components (glucose 20g/l, peptone 10g/l, beef extract 10g/l, yeast extract 5g/l) on viable cell count; ◆:glucose, ■: peptone No.3, ▲:beef extract, ×:yeast extract

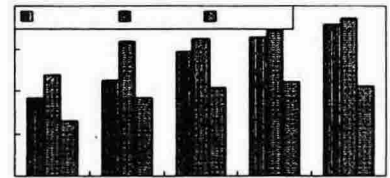


Fig. 2. Effects of various nitrogen sources and their (peptone No.3, beef extract, yeast extract) sources on viable cell count

Whey 배지에 공급된 질소 원들이 최대 생균수에 미치는 영향을 Fig. 2. 에 나타내었다. 특히 beef extract의 효과가 뛰어난 것으로 나타났으며, 20g/l 이후의 생균수 변화가 크게 감소된 것을 볼 수 있다. 그러므로 beef extract 20g/l 이 가장 효율적인 질소 원임을 알 수 있다. 그러나 beef extract는 고가의 배지 성분으로 실제 공정에서 사용하기엔 어려운 문제가 있기 때문에 값싼 배지로 대체하는 연구가 필요했다. Corn steep liquor는 매우 값싼 질소 원으로서 미생물 성장에 필요한 많은 성분들을 함유하고 있다. Corn steep liquor 만을 질소 원으로 공급하였을 경우 가장 최적이라고 생각되는 40g/l 에서 8.0×10^8 CFU/ml 정도의 생균수를 얻었다. 그러므로 단독으로 쓰이기보다는 beef extract의 보조적인 역할로서 쓰여지는 것이 바람직할 것이다. Table 1.은 beef extract(10g/l, 20g/l)와 corn steep liquor(from 10g/l to 60g/l)를 각각 공급하였을 때의 최대 OD₆₀₀ 와 생균수 및 종말 pH를 나타낸 것이다. Beef extract 10g/l 와 corn steep liquor 50g/l 에서 가장 높은 생균수(3.11×10^9 CFU/ml)를 나타냈다.

Table 1. Effect of corn steep liquor on the maximum viable cell count

BE/CSL ^a	CFU ^b	OD ₆₀₀	Final pH
10/20	1.40 × 10 ⁹	7.066	3.89
10/30	1.90 × 10 ⁹	7.632	3.92
10/40	2.38 × 10 ⁹	7.725	3.95
10/50	3.11 × 10 ⁹	7.925	3.97
10/60	3.00 × 10 ⁹	8.269	4.00
20/0	1.25 × 10 ⁹	4.810	3.96
20/10	1.41 × 10 ⁹	6.731	3.93
20/30	1.71 × 10 ⁹	7.455	3.96
20/40	2.24 × 10 ⁹	8.013	3.99

^a BE, Beef Extract; CSL, Corn Steep Liquor; in g/ℓ

^b Maximum viable cell count in CFU/ml

이상의 결과에서, whey 배지를 기본으로 한 최종적인 배지 조성은 whey(5% lactose), beef extract 10g/ℓ, tween 80 0.1%, corn steep liquor 50g/ℓ and trace amounts of salts (sodium acetate 5g/ℓ, dipotassium phosphate 2g/ℓ, magnesium sulfate 0.1g/ℓ, manganese sulfate 0.05g/ℓ)이고, maximum viable cell count 5.00 × 10⁹ CFU/ml를 얻을 수 있었다. 본 연구 조성된 배지에서 얻은 생균수는 기존의 MRS 배지(1.50 × 10⁹ CFU/ml)에서 보다 매우 높은 것으로 나타났다.

References

1. Kim, W. J., S. S. Hong, and S. K. Cha. "Selection of human-originated *Lactobacillus acidophilus* for production of probiotics".(1994) J. Microbiol. Biotech. **4**: 151-154
2. Zhong W., K. Millsap, H. B. Hobrzancka. "Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing".(1998) Appl. Environ. Microbiol. **64**: 2418-2423.
3. Hughes, V. L., and S. L. Hillier. "Microbiologic characteristics of *Lactobacillus* products used for colonization of the vagina"(1990). Obstet. Gynecol. **75**: 244-248.
4. Yun, H. S., C. E. Chang, S. C. Kim, and J. S. So. "Isolation and cultivation of *Lactobacillus* spp. from human vagina for the ecological treatment of bacterial vaginosis."(1999) Proc. Korea Society of Biotechnology and Bioengineering 1999, kang-won, pp 84-87
5. Arasaratnam, V., A. Senthuran, and K. Balasubramaniam. "Supplementation of with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*."(1996) Enzyme and Microbial Technol. **19**: 482-486.