

생균제로서 *Pichia anomala*의 pilot scale 배양조건 및 동결건조의 최적화

윤지용 · 이용호 · 최유진 · 성장근¹ · 한규범²

(주) 대덕바이오 부설연구소, 충남대학교 식품공학과¹, 헨슨바이오텍²

전화 (041) 854-7872, FAX (041) 854-7879

Abstract

Probiotics can form profitable microorganisms in human or animal internal organs. When it is fed at domestic animals, can bring the rise of weight and prevention of disease. *Pichia anomala* by new probiotics have antibiotic effect and odor reducing effect. we researched about optimal condition of pilot scale fermentation and freeze-dry of *pichia anomala*.

서론

생균제는 사람이나 동물의 장내에서 유익한 미생물 균총을 만들수 있는 것으로, 사료내 첨가시 가축의 성장촉진, 사료이용효율 증대, 장이상발효나 설사방지 역할을 하는것으로 알려졌다¹⁾. 따라서 가축사육시 사료에 일부분을 첨가하여 증체량 향상및 질병예방효과를 위해 사용되고 있다. 현재 생균제로 사용되고 있는 균주로 세균으로는 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium butylicum*, *Bacillus* 등이 있고, 효모로는 *Saccaromyces*, 곰팡이로는 *Aspergillus*등이 생균제로 많이 연구되고 실제로 사용되고 있다^{2) 3)}. 본 연구에 이용된 효모인 *Pichia anomala*는 돼지 분변에서 직접 분리한 장내 미생물중 항균력과 암모니아 제거효과가 우수한 균주중에서 선별한 것이며 현재 사료 첨가제로 생산중에 있다. 특히 축사내 대표적 악취물질인 암모니아는 가축의 호흡기 질환 및 체중감소의 원인으로 보고되어 졌다⁴⁾. 따라서 암모니아가스를 저감시켜 축사내 환경을 개선하고 각종 호흡질환을 예방하는 점에서 생균제의 기능을 한층더 부가 시킬것으로 사료된다. 본 연구는 생균제로 새로이 개발된 *Pichia anomala*의 대량생산을 위한 Pilot Scale Fermenter에서의 배양특성을 연구하였고, 아울러 동결건조를 통한 균주의 장기보관및 장기 생존에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1) 균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 충남대 식품공학과 발효공학연구실에서 직접순수 분리한

Pichia anomala 균주(특허균주)를 이용하였다. 본 균주는 PDB 24g/L 200mL에 액체배양하였고, 15% glycerol에 stock하여 -80°C deep freezer에 보관하였다.

2) 종균 배양

초기 종균배지로는 PDB(MERCK)24g/L를 baffle이 달린 flask로 working volum 1.5L로 24시간 배양하였고, 2차로 30L Fermenter(Kobiotech)에 working volume 20L로 CSL 4%(삼양사), glucose 3%(삼양사)를 이용하여 2차종균을 배양하였다. pH는 28% 암모니아수를 이용해 initial pH 5.5로 조절하였고, 100rpm, 1vvm으로 18시간 배양후 접종라인을 통해 3ton Fermenter로 접종하였다.

3) Pilot scale Fermenter배양 조건

Pilot scale fermenter로는 3000L Fermenter(Kobiotech)를 이용하였고, 배지 조성은 CSL 4%, glucose 5%로 batch배양을 하였으며, 30L와 마찬가지로 초기 pH는 5.5로 조절하였고, 100rpm, working volume은 2000L으로하여 40시간 배양하였다.

4) 동결건조 조건

40시간 배양후 나온 배양액을 원심분리하여 안정제 skim milk (2%, 4%)와 sucrose (2%, 4%)를 혼합하여 -60°C deep freezer로 12시간 얼린 후 동결건조 하였다.

동결건조기조건은 초기 -40°C에서 -4°C까지 6시간, -4°C에서 14시간 -4°C에서 20°C까지 6시간, 20°C에서 14시간 총 40시간을 건조 하였고, 진공압력은 0.07 Torr를 유지하였다.

5) 생균수 측정

OD는 UV-visible spectrophotometer(Simadzu UV-1601)로 측정하였으며, 생균수는 PDA (Potatodextrose Agar, MERCK)에서 평판개수법으로 3배수 측정하여 나온 평균으로 결정하였다. glucose 정량은 DNS법을 사용하여 실시간 정량하였다.

결과 및 고찰

*Pichia anomala*를 Fermenter를 이용해서 대량배양하기 위해서는 저렴한 배지에서 많은 수의 cell을 수거하는것이 관건이다. 따라서 배지 성분중 가장 많은 가격비중을 차지하는 유기질소원실험을 수행하여 경제적이면서 최적의 배지성분을 결정하는 실험을 수행하였다. 유기질소원으로는 Yeast extract(5g/L, 10g/L, 15g/L, 20g/L, 30g/L)와 CSL(10g/L, 20g/L, 40g/L, 60g/L, 80g/L)을 이용 비교실험하였고, glucose는 각각 20g/L로 고정하여 배양하였다. 배양 결과는 Fig 1에 나타나 있다. 전체적으로 볼때 Yeast extract에 비해 CSL이 균주생육에 문제가 없었으며, Yest extract보다 더 우수한 생육을 보였다. 이것은 CSL이 Yeast extract보다 가격면에서 50배 이상 저렴한 잇점으로 볼때 대량배양을 위해서는 CSL사용이 대안으로 확인 되었다. CSL 40g/L와 glucose 50g/L를 넣고 3ton 발효조에서 batch배양한 결과(Fig. 2) 최대 OD 58까지 배양되었고, 배양 20시간째 OD 53에서 최대 viable cell number(1.03×10^{10} cfu/g) 를 얻을 수 있었다. 따라서 batch배양에서 harvest 시점은 20시간째가 가장 적절한 시간으로 생각되어 진다. pH의 경우 14시간째부터 상승되는 추이를 보여 특별한 pH control은 필요치 않는것으로 생각되어 지며

glucose는 14시간 이후에 거의 소진됨을 볼때 glucose 추가feeding time은 배양 14시간이 후가 적절한 것으로 판단되었다. 배양된 cell을 원심분리 후 동결건조 하였을 때 안정제의 종류 및 량에 따라 viable cell number의 차이를 확인할 수 있었다(Fig 3). 최대 viable cell number는 skim milk 2%와 Sucrose 2%를 첨가한 것이 가장 많은 수를 나타내었고, 이는 안정제를 전혀 넣지 않는 cell (control)보다 85%이상 생존율을 확보할 수 있을 것으로 판단되었다.

요 약

생균제로 새로이 개발된 효모인 *Pichia anomala*를 대량 생산하기 위한 배양 실험으로 가격이 저렴하고 균주 생육에 적절한 질소원으로의 CSL실험을 실시한 결과 Yeast extract에 비해 보다 우수한 생육을 보였고, CSL을 이용한 3ton fermenter 에서의 batch 실험결과 최대 OD 58까지 배양되었고, batch 배양시 harvest시점은 가장 많은 viable cell 을 얻을 수 있는 시점인 배양 후 20시간으로 결정되었다. 또한 원심분리후 동결건조시 안정제에 따른 동결건조시의 생존에 대한 실험을 실시한 결과 skim milk 2%, scrose 2% 에서 가장많은 생균수를 얻을 수 있었다.

참고 문헌

1. Underdahl, N. R., Torres-Medina, A. and Doster, A. R, "Effect of Streptococcus faecium C-68 in control of *Escherichia coli*-induced diarrhea in gnotobiotic pigs" , (1982). *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 2227
2. 박홍석, 이선희, 엄태봉 , "생균제로서 가능성이 있는 미생물의 선별 및 특성", (1998) 한국식품영양학회지, 27(3), 433-440
3. Cornway, P. L., Gorbach, S. L. and Goldin, B. R., "Survival of Lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells", (1987). *J. Dairy Sci.*, 70, 1
4. Cole, D. J. A., Schuerink, G. and Koning, W. J., "Ammonia in pig building in the Netherlands", (1996) *Pig News and Information*. Vol.17 53-56

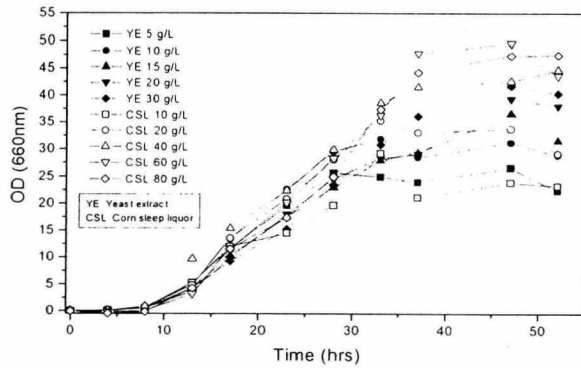


Fig. 1 Profiles of cell growth during shaking culture on medium with yeast extract or corn steep liquor as nitrogen sources.

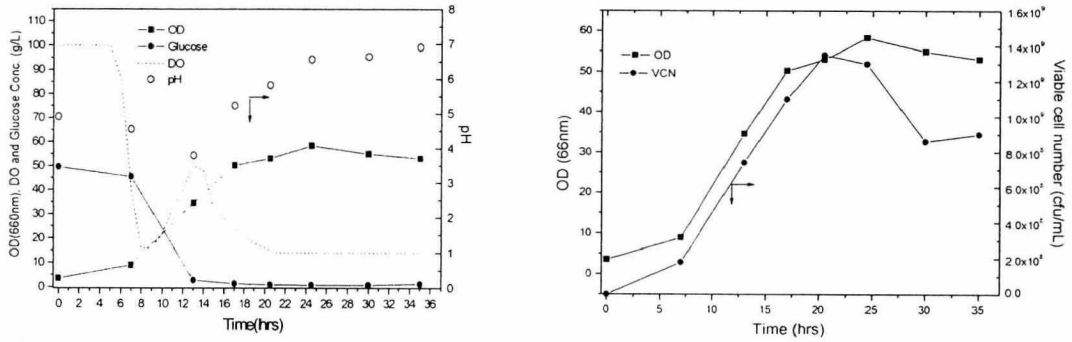


Fig. 2 Profiles of pH DO, cell growth, glucose concentration and viable cell number during pilot scale fermentation.

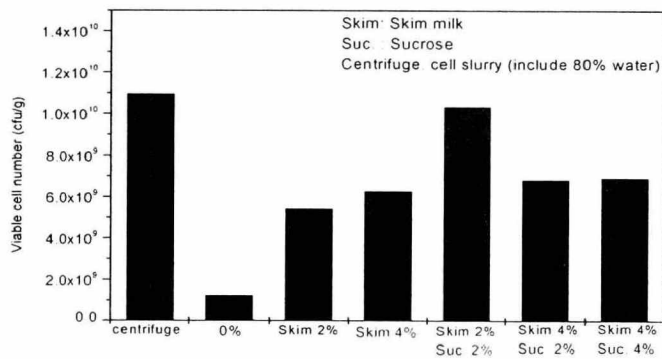


Fig. 3 Viable cell number of *Pichia anomala* after freeze-dry in various safety agents.