

## 포집된 Bifidobacteria의 생존력 증대를 위한 세포포집재료의 선별기술 개발

이 기 용 · 우 창 재 · 배 기 성 · †허 태 련  
인하대학교 생물공학과  
(접수 : 1998. 8. 27., 게재승인 : 1999. 7. 20.)

### Development of the Selection Technique of Entrapment Materials for the Viability Improvement of Entrapped Bifidobacteria

Ki-Yong Lee, Chang-Jae Woo, Ki-Sung Bae, and Tae-Ryeon Heo†  
Department of Biological Engineering, Inha University  
(Received : 1998. 8. 27., Accepted : 1999. 7. 20.)

The diffusion effect of simulated gastric juices into the various alginate vessel containing each biopolymer such as 0.3% soluble starch, whey, corn starch, agar, locust bean gum, guar gum, gum arabic, pectin, gelatin and 0.15% xanthan gum was tested by measuring the change of pH in the vessel. The degree of viability of bifidobacteria entrapped in each bead containing biopolymers was corresponded with the degree of diffusion inhibition of hydrogen into the each vessel. Therefore, The determination of diffusion inhibition of simulated gastric juices into the various vessel by measuring the change of pH in the vessel may be effectively used as the simple method to select the optimal entrapment lattice for the improvement of bifidobacteria viability. Bifidobacteria entrapped in alginate bead containing 0.15% xanthan gum whose lattice showed the lowest hydrogen diffusion were more significantly tolerant against bile salts and hydrogen peroxide than untrapped bifidobacteria. It was also observed that the viability of bifidobacteria entrapped in bead was not nearly changed in milk adjusted pH 4.5 with organic acids at 4°C for 10 days. Therefore, use of alginate containing 0.15% xanthan gum as a cell matrix for entrapping bifidobacteria was expected to improve the viability of bifidobacteria in fermented milk products and develop the high value-added products.

**Key Words** : bifidobacteria, entrapment materials, viability, alginate vessels, xanthan gum

#### 서 론

유산균들 중에서도 장내에 서식하는 bifidobacteria에 대한 새로운 인식과 중요성이 최근 점점 대두되고 있다. Bifidobacteria는 모유영양아의 장관뿐만 아니라 건강한 성인의 장내에서 유익균으로써 장내균총을 형성하고 있으며, 건강한 성인 분변 미생물 중 25%를 점유하고 있다(1). Bifidobacteria는 장내 부패 세균의 증식을 억제하고(2, 3), 비타민류의 합성, 유당 및 단백질의 소화증진, 칼슘의 체내 흡수 촉진, 혈중 콜레스테롤의 감소 효과 및 항암작용(4-6) 등 인체의 건강에 많은 유익한 역할들을 하는 것으로 알려짐에 따라 bifidobacteria를 이용한 유제품의 시장규모가 확대되어 가고 있는 추세이다(7). 혐기성 미생물인 bifidobacteria는 발효유제품이나

생균제제의 제조과정중 산소에 노출될 경우 생존력에 영향을 받게되며, 발효유제품의 경우 bifidobacteria를 비롯한 유산균들의 유당 발효작용으로 생성된 유기산에 의하여 제품내 pH가 저하됨으로 유통기간중 발효유제품내 bifidobacteria의 생존율이 크게 영향을 받게 된다 또한, 발효유제품을 섭취할 경우 이들 제품에 함유된 bifidobacteria는 위와 소장을 거쳐 대장으로 운반되어야 하는데 유제품내 함유된 bifidobacteria의 대부분은 위의 낮은 pH(1~3) 환경에서 그 생존력을 잃는 것으로 보고되고 있다(8). 따라서 유제품에서 bifidobacteria의 생존을 감소를 억제하고, 유제품 섭취시 위와 소장을 거치는 동안 위액과 소장내 담즙산의 영향으로부터 bifidobacteria를 보호하기 위한 방안으로 cellulose acetate phthalate(CAP)등과 같은 약물전달물질 또는 gellan gum,  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum 및 alginate 등과 같은 다양한 biopolymer들을 이용한 세포고정화방법이 보고되고 있다(9-13) 이러한 포집재료중 비독성이고 식품첨가제로 사용되는 alginate는 다른 포집재료들과는 달리 비드제조에 대한 안전성과 낮은 온도에서도 비드의 제조가 가능하기 때문에 세포 및

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel : 032-860-7511  
E-mail : keataozy@dragon.inha.ac.kr

효소 등의 고정화에 많이 이용되고 있다(14, 15) 일반적으로 이와 같은 세포포집재료들은 그들의 제질과 격자 형성 조건에 따라 다양한 형태의 다공성 격자 구조를 형성하므로 이들 물질을 이용하여 bifidobacteria를 포집할 경우 이들 격자의 세공을 통하여 위액, 담즙염, 유기산 및 과산화수소등과 같은 균 생존에 영향을 미치는 요인들이 격자내 침투가 가능하기 때문에 비드에 포집된 bifidobacteria의 생존력에 영향을 줄 수 있다(16).

이 연구에서는 식품첨가제로 사용되는 alginate에 다양한 biopolymer들이 첨가된 격자들의 산투과 효과를 조사하므로써 우수한 포집재료를 간편하게 선별하는 기술을 개발하고, 발효유제품내 bifidobacteria의 높은 생존력을 유지시키는 고부가가치 상품화를 위한 세포포집기술을 개발하기 위하여 산과 담즙염 및 산소등과 같은 bifidobacteria의 균생존력에 영향을 미치는 요인들에 대하여 선별된 포집재료에 포집된 bifidobacteria의 생존력 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

생명공학연구소(The Korea Collection for Type Cultures, KCTC, Genetic Resource Center, Taejeon)에서 냉동 건조된 상태로 분양 받은 *Bifidobacterium longum* KCTC 3128을 0.5% glucose가 들어있는 trypticase-proteose peptone-yeast extract (TPY) 액체배지에 2% (v/v) 접종한 후 37°C 혐기배양기(Forma Scientific, Inc., USA)에서 2-3회 계대배양하여 균의 활력을 증대시킨 후 멸균된 1,000 mL TPY 배양액이 들어있는 2.5 L 발효기에 2% 접종하고 20 시간 혐기배양하여 세포포집에 사용하였다.

### Alginate와 alginate에 첨가물질 혼합된 vessel 제조

Alginate vessel 제조는 sodium alginate(Sigma Chemical Co., USA) 농도를 각각 2, 3 그리고 4% (w/v)로 변화하여 alginate 용액을 제조한 후, 밀 부분이 막힌 glass tube에 코팅 횟수를 각각 변화시켜 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 용액에 1~2 시간 동안 담가두어 두께가 다양한 alginate 막을 제조하였다. 제조한 각각 막은 vernier caliper(Mitutoyo Co., Japan)로 막의 전체적 평균 두께를 측정하여 두께 크기가 0.5, 1.0, 1.5 mm를 갖는 alginate vessel을 선별하여 사용하였다. Alginate에 첨가물질이 혼합된 vessel의 제조는 3% alginate 용액에 각각 0.3% (w/v)의 soluble starch, whey, insoluble starch, agar, locust bean gum, guar gum, gum arabic, pectin, gelatin과 0.15%의 xanthan gum이 포함되도록 용액을 제조한 후 같은 방법으로 막의 두께가 0.5 mm인 vessel를 제조하였다.

### 산 침투 효과 측정

다양한 종류의 각각의 vessel을 Figure 1과 같은 방법으로 glass column에 고정시켜 5 mL의 증류수를 채운 후, pH electrode를 장착하고 Rao(9) 등의 방법에 따라 펌프가 제거된 0.2% (w/v) NaCl과 0.08 M HCl이 포함된 pH 1.55인 용액으로 제조된 유사위액과 반응시켰다. 각각의 vessel의 산 침투 효과는 pH meter에 연결된 X/Y 기록계(1 cm/min)를 이

용하여 반응시간에 따른 vessel 내 pH 변화를 통하여 측정하였다.

### Bifidobacteria가 포집된 비드 제조

비드 포집용 bifidobacteria 균액은 발효조에서 20시간 배양된  $1.5 \times 10^9$  cfu/mL의 생균수를 갖는 *Bifidobacterium longum* 배양액 100 mL를 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 균체만을 얻은 다음 멸균 생리식염수로 세척하고, 제차 원심분리하여 상등액을 제거한 후 50 mL 멸균 생리식염수에 현탁하여 제조하였다. 이와 같이 제조된 균현탁액에 1, 1.5, 그리고 2 g의 sodium alginate(Sigma Co., USA)를 분말 상태로 12 1°C에서 15 분간 멸균하여 멸균 bag에 담아 stomacher 400(Seward Co., UK)을 이용하여 고루 섞어 bifidobacteria가 현탁된 alginate 용액을 제조하였다. Bifidobacteria가 현탁된 첨가물 함유 alginate 용액은 50 mL bifidobacteria 균액에 분말상태로 멸균된 1.5 g sodium alginate를 넣고, 각각 분말상태로 멸균된 soluble starch, whey, insoluble starch, agar, locust bean gum, guar gum, gum arabic, pectin 그리고 gelatin등은 150 mg을 xanthan gum의 경우는 75 mg을 첨가하여 bifidobacteria가 현탁된 alginate 용액 제조와 같은 방법으로 제조하였다. 각각의 균 현탁 alginate 용액과 첨가물이 함유된 alginate 용액은 멸균된 통에 담고, 5  $\mu$ m, 1  $\mu$ m, 0.22  $\mu$ m air filter를 장착한 air compressor를 이용하여 4 kg/cm<sup>2</sup>의 압력으로 멸균된 주사바늘을 통하여 멸균 조건이 유지되는 clean bench내에서 멸균된 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 용액에 분사하여 일정한 크기의 비드를 제조하였다. 다양한 크기의 비드는 분사되는 공기량 조절과 주사 바늘의 크기를 달리하여 제조하였고, 제조된 비드들은 CaCl<sub>2</sub> 용액에 약 2시간 방치한 후 0.85% NaCl 생리식염수로 세척하여 사용하였다. 제조된 각각의 비드의 크기는 micrometer가 장착된 microscope( $\times 100$ )를 이용하여 100 개 비드의 가로, 세로 지름을 평균 내어 평균 지름을 산출하였다.

### 비드의 생균수 측정

멸균된 스폰을 이용하여 bifidobacteria가 포집된 비드 10개를 취한 후, 멸균 생리식염수로 세척하여 50 mL의 0.01 M sodium citrate(Shimyo Pure Chemicals Co. Japan) 용액이 들어 있는 멸균 disposable bag에 넣고, stomacher 400(Seward Co., UK)을 이용하여 10 분 동안 현탁하여 비드의 격자를 용해하였다. 비드가 용해된 균현탁액 1 mL를 취하여 멸균 생리식

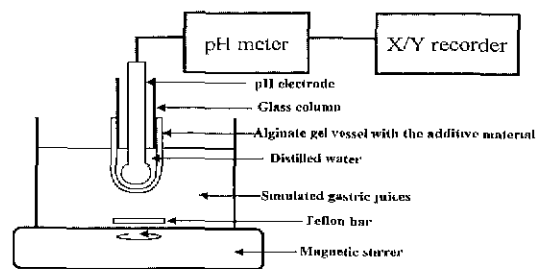


Figure 1. Schematic representation of recording the penetration of simulated gastric juices into the mixed alginate gel vessel with the additives.

염수로 침전회석하고, TPY agar 배지에 표면 도달한 후 75% 질소, 10% 수소, 5% 이산화탄소로 구성되어 있는 혼합가스로 채워진 37°C anaerobic system(Forma scientific, Inc., USA)에서 48 시간 동안 배양하여 생성된 균집락수를 계수 하였다.

#### 비드에 포집된 bifidobacteria의 내산성

산에 대한 비드에 포집된 bifidobacteria의 생존을 변화는 Rao(9) 등의 방법에 따라 펩신이 제거된 0.2% (w/v) NaCl과 0.08 M HCl을 포함한 pH 1.55인 유사위액 10 mL에 bifidobacteria가 포집된 비드 100개씩을 넣고, 37°C에서 3시간 동안 반응시키면서 반응시간에 따라 10개씩 비드를 채취하여 멸균 생리식염수로 세척한 후 비드를 용해하여 bifidobacteria의 생존수를 측정하였다. 대조구로서 비드에 포집되지 않은 bifidobacteria의 유사위액에 대한 생존을 변화는 TPY 액체배지에서 20시간 배양된 10 mL 균배양액을 3,000 rpm, 10 분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 10 mL 유사위액을 첨가하여 현탁시킨 후 37°C에서 반응시간에 따라 생존수변화를 조사하였다.

#### 비드에 포집된 bifidobacteria의 담즙염 내성

담즙산에 대한 포집된 bifidobacteria의 생존을 변화는 Oxgall(Dilco Co., USA)이 0.6% (w/v) 함유되도록 제조한 멸균된 담즙산 용액 10 mL에 비드 100개를 넣어 37°C에서 6시간 동안 반응시키면서 시간에 따라 반응한 비드를 10 개씩 채취하여 멸균 생리식염수로 세척한 후, 비드를 용해하여 비드내 bifidobacteria의 생존수를 측정하였다. 대조구로서 비드에 포집되지 않은 bifidobacteria의 담즙산에 대한 생존을 변화는 TPY 액체배지에서 20 시간 배양된 10 mL 균배양액을 3,000 rpm, 10 분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 10 mL 담즙산 용액을 첨가하여 현탁시킨 후 37°C에서 반응시간에 따라 생존수변화를 조사하였다.

#### 비드에 포집된 bifidobacteria의 내산소성

산소에 대한 비드에 포집된 bifidobacteria의 생존을 변화는 과산화수소(30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 희석하여 과산화수소의 농도가 1,000 ppm이 되도록 제조한 용액 10 mL에 비드 100개를 넣어 4°C에서 3시간 동안 반응시키면서 시간에 따라 반응한 비드를 10개씩 채취하여 멸균 생리식염수로 세척한 후 비드를 용해하여 비드 내 bifidobacteria의 생존수를 측정하였다. 대조구로서 비드에 포집되지 않은 bifidobacteria의 산소에 대한 생존을 변화는 TPY 액체배지에서 20시간 배양된 10 mL 균 배양액을 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 과산화수소의 농도가 1,000 ppm인 10 mL 과산화수소 용액을 첨가하여 현탁시킨 후 4°C에서 반응시간에 따라 생존수변화를 조사하였다.

#### 비드의 구조 관찰

Alginate와 biopolymer가 첨가된 비드를 각각 건조시킨 후 절단하여, 비드 표면과 단면을 백금으로 코팅시켜 전도성을 갖게 한 다음 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, Hitach S-700, Japan)을 사용하여 가속전압 10 kV, 3000배의 배율로 각 비드의 표면과 절단면을 관찰하였다.

유제품에서의 저장기간에 따른 비드내 bifidobacteria 안정성 가공하지 않은 신선우유 1 L를 100°C에서 30분 동안 멸균한 후, acetic acid와 lactic acid가 3 : 2의 몰 비로 혼합된 용액으로 멸균된 우유의 pH를 4.5로 조정하였다. 이와 같이 제조된 유제품에 bifidobacteria가 포집된 비드를 첨가하여 4°C에서 저장하면서 3, 5, 7 그리고 10일 간격으로 비드를 채취하여 비드내 생존수를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Alginate 격자의 산 투과 효과

Alginate 농도에 따른 alginate 비드의 산 투과 효과를 조사하기 위하여 alginate 농도가 2%, 3%, 4% (w/v)인 평균 막 두께 0.5 mm vessel을 유사위액에 잠기게 한 후의 vessel내 pH 변화를 관찰한 결과 Figure 2와 같이 반응 초기 약 2~3분 동안은 vessel내 pH가 약간 증가한 후 완만히 감소하는 경향을 나타내어 초기 vessel내 pH 수준을 유지하였으나 이후 급격한 pH 감소가 일어나는 것을 알 수 있다. 또한, vessel내 pH가 3 이하로 떨어지는데 2% alginate 격자의 경우 약 8분이 경과한 반면 3%와 4%인 격자의 경우 약 10분 그리고 12분이 경과되어 격자를 이루는 alginate 농도가 증가하면 격자 내부로 침투하는 산의 양이 감소하는 경향을 나타낸 것을 알 수 있다. 그러나 격자의 alginate 농도가 증가하더라도 격자 부분을 통과하는 산의 전체적인 침투효과는 대체적으로 매우 빠르게 일어나는 것을 알 수 있는데 이는 분자량이 적은 물질은 alginate 격자 부분을 비교적 자유로이 이동할 수 있는 것을 의미한다. Betty와 Stephanopoulos(17)에 의하면 alginate 농도가 증가한다는 것은 alginate 격자의 구멍크기가 작아지기보다는 구멍의 수가 줄어들거나 구멍의 길이가 증가하는 것을 의미한다고 보고하였고, 또한 격자내 물질 이동은 단순히 물질의 농도 차에 의한 확산이외에도 구멍의 길이에 의한 확산저해현상도 고려되어야 한다고 보고하였다. 따라서 3%의 같은 농도를 갖는 alginate 격자의 두께를 달리 하여 산 침투효과를 조사한 결과 Figure 3과 같이 10분만에 0.5 mm 두께를 가진 alginate vessel은 pH 3으로 급격히 감

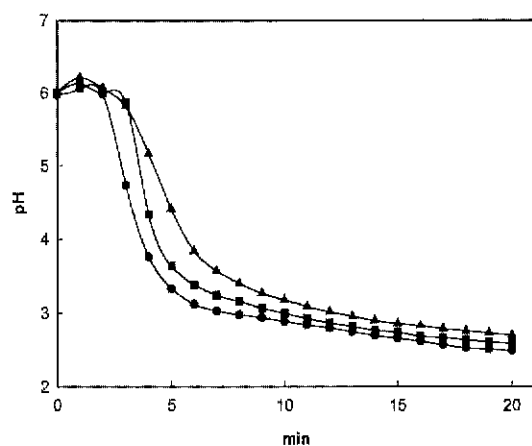


Figure 2. The changes of pH of the alginate gel vessels with the different alginate concentration in simulated gastric juices. ●, 2% alginate gel vessel; ■, 3% alginate gel vessel; ▲, 4% alginate gel vessel

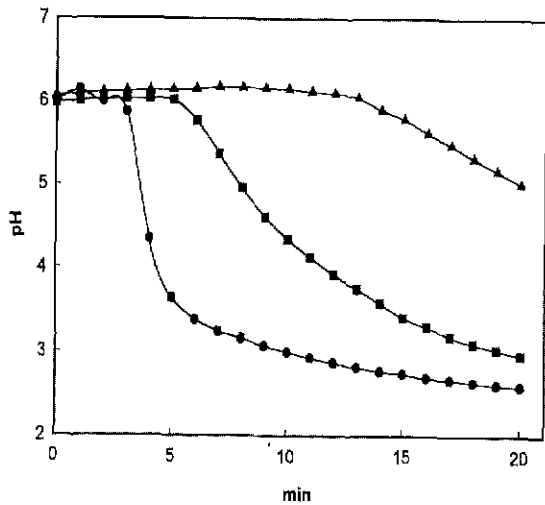


Figure 3. The changes of pH of the alginate gel vessels with the different thickness in simulated gastric juices. ●, 0.5 mm diameter vessel; ■, 1.0 mm diameter vessel; ▲, 1.5 mm diameter vessel

소한 반면, 1.0 mm 두께를 가진 vessel은 pH 4.34로 완만히 감소하였고, 1.5 mm 두께를 가진 vessel은 pH 변화가 거의 없었다. 20분 후의 pH는 0.5 mm vessel의 경우 2.59, 1.0 mm의 경우는 2.96으로 감소하였으나 1.5 mm의 경우는 5.01로 나타나 0.5, 1.0 mm vessel에 비하여 산의 침투 효과가 매우 낮음을 알 수 있었다. 그러므로 격자의 두께가 증가하면 격자내 구멍의 길이 증가에 따른 확산저해현상이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 alginate 격자의 산 침투효과를 감소시키기 위해서는 alginate 농도 증가에 따른 격자내 구멍의 수를 감소시키거나 격자의 두께를 증가시키는 방안이 요구된다고 사료된다.

첨가물이 혼합된 alginate 격자의 산 침투 효과

3% (w/v) alginate 용액에 soluble starch, whey, corn starch, agar, locust bean gum, guar gum, gum arabic, pectin, gelatin을 각각 0.3%, xanthan gum은 0.15%가 포함되도록 제조된 혼합 alginate vessel을 산 용액인 유사위액과 반응시킨 결과 Figure 4와 같이 alginate에 혼합된 첨가물의 종류에 따라 초기의 pH는 다양한 값을 나타내었다. 첨가물이 혼합되지 않은 alginate, soluble starch, whey, insoluble starch등이 혼합된 alginate는 pH 6 근처의 값을 나타내었고, xanthan, agar, locust bean gum, guar gum, gum arabic, gelatin등이 혼합된 alginate는 pH 5.1~5.3의 값을 나타내었으며, pectin이 혼합된 alginate는 pH 4.45로 가장 낮은 값을 나타내었다. 반응 시간에 따른 각 격자내 pH 변화는 gum arabic이 함유된 alginate에서 가장 크게 나타났으며 그 밖의 첨가물이 함유된 alginate에서는 비교적 완만한 pH 변화를 나타내었다. 산 용액과 20분간 반응한 후 vessel내 pH 변화는 xanthan gum, soluble starch 그리고 whey가 각각 첨가된 경우가 첨가물이 혼합되지 않은 경우에 비하여 작게 나타났으며, 특히 xanthan gum의 경우는 soluble starch나 whey의 경우보다도 높은 산에 대한 침투저해효과를 나타내었다. Gelatin과 gum arabic을 비롯하여 그 밖의 첨가물이 혼합된 경우는 오히려 alginate로만

구성된 격자보다 높은 산 침투효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 alginate에 첨가된 물질들이 alginate 격자의 구조적 특성을 변화시켜 물질 확산을 촉진시키거나 저해시키는 것으로 사료된다.

산에 대한 포집된 bifidobacteria의 생존율 변화

비드의 지름은 같게 하고 alginate 농도를 달리하여 bifidobacteria를 포집시킨 비드와 alginate 비드에 포집되지 않은 bifidobacteria를 유사위액인 산 용액에 3시간 반응시킨 후 균생존율을 조사한 결과 Table 1과 같이 비드에 포집되지 않은 bifidobacteria의 경우는 초기균수가  $1.3 \times 10^9$  cfu/mL에서  $10^2$  cfu/mL 이하로 대부분의 bifidobacteria가 생존력을 잃은 반면 비드에 포집된 bifidobacteria의 경우 약 0.15%에서 0.82%까지 균생존율을 유지함을 알 수 있었으며, 비드 격자의 alginate농도가 증가할수록 포집된 bifidobacteria의 산에 대한 생존율 감소가 억제되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 alginate 농도에 따른 격자의 산 침투 효과의 결과와 일치함을 나타내며 산에 대한 포집된 bifidobacteria의 생존율 향상을 위해서는 alginate의 농도를 증가시켜야 함을 의미한다. 그러나 alginate는 수용액 상태에서 높은 점도를 갖는 물리적 특성 때문에 높은 농도 이상의 용액을 제조하여 비드 제조 과정에 사용하기에는 어려움이 있다. 그러므로 포집된 bifidobacteria의 산에 대한 높은 생존율 향상을 위한 방법으로 alginate 농도를 증가시키는 데는 한계가 있다. Alginate 농도를 3%로 같게 하고 비드 직경의 크기를 달리하여 bifidobacteria를 포집시킨 비드를 유사위액인 산 용액에 3시

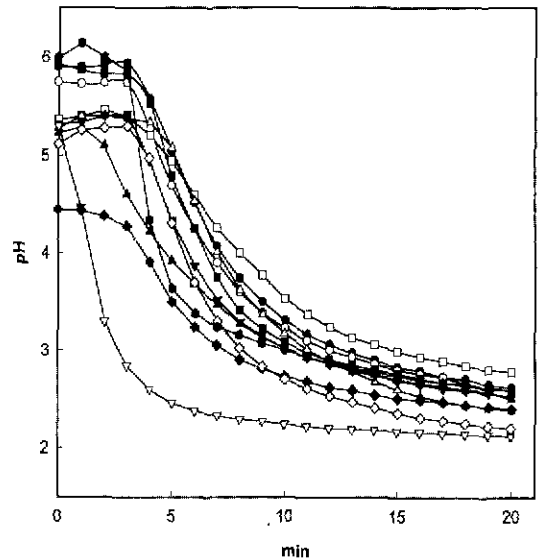


Figure 4. The changes of pH of the various alginate gel vessels in simulated gastric juices ●, 3% (w/v) alginate vessel; ●, 3% (w/v) alginate + 0.3% (w/v) soluble starch vessel; ○, 3% (w/v) alginate + 0.3% (w/v) whey vessel; ■, 3% (w/v) alginate + 0.3% (w/v) insoluble starch vessel; □, 3% (w/v) alginate + 0.15% (w/v) xanthan gum vessel; ▲, 3% (w/v) alginate + 0.3% (w/v) agar vessel; △, 3% (w/v) alginate + 0.3% (w/v) locust bean gum vessel; ▼, 3% (w/v) alginate + 0.3% (w/v) guar gum vessel; ▽, 3% (w/v) alginate + 0.3% (w/v) gum arabic vessel; ◆, 3% (w/v) alginate + 0.3% (w/v) pectin vessel. ◇, 3% (w/v) alginate + 0.3% (w/v) gelatin vessel

Table 1. Survival of *Bifidobacterium longum* in 3% alginate beads with or without the various additives after reaction with simulated gastric juices.

Kinds of beads	Alginate concentration (%)	Additives concentration (%)	Average diameter of beads (mm) <sup>1)</sup>	Viable cell counts (cfu/bead)				
				Time(hr)	0	1	2	3
Untrapped bifidobacteria <sup>2)</sup>					$1.28 \times 10^9$	$1.99 \times 10^3$	$<10^3$	$<10^3$
	2	N <sup>3)</sup>	$3.14 \pm 0.23$		$1.71 \times 10^7$	$2.88 \times 10^6$	$2.60 \times 10^5$	$2.60 \times 10^4$
	3	N	$1.06 \pm 0.05$		$7.82 \times 10^5$	$<10^3$	$<10^3$	$<10^3$
Alginate	3	N	$1.70 \pm 0.09$		$3.15 \times 10^6$	$8.02 \times 10^4$	$<10^3$	$1.25 \times 10^5$
	3	N	$3.17 \pm 0.22$		$2.88 \times 10^7$	$3.93 \times 10^6$	$1.03 \times 10^6$	$1.26 \times 10^5$
	4	N	$3.13 \pm 0.15$		$2.71 \times 10^7$	$8.99 \times 10^6$	$2.33 \times 10^6$	$4.94 \times 10^5$
Alginate + Soluble starch	3	0.3	$3.18 \pm 0.13$		$2.20 \times 10^7$	$9.38 \times 10^6$	$2.33 \times 10^6$	$3.93 \times 10^5$
Alginate + Whey	3	0.3	$3.15 \pm 0.28$		$1.32 \times 10^7$	$3.90 \times 10^6$	$6.81 \times 10^5$	$3.11 \times 10^5$
Alginate + Insoluble starch	3	0.3	$3.11 \pm 0.31$		$2.73 \times 10^7$	$2.98 \times 10^6$	$5.85 \times 10^5$	$1.05 \times 10^5$
Alginate + Xanthan gum	3	0.15	$3.14 \pm 0.15$		$2.50 \times 10^7$	$1.14 \times 10^7$	$5.70 \times 10^6$	$3.71 \times 10^6$
Alginate + Agar	3	0.3	$3.10 \pm 0.21$		$5.66 \times 10^6$	$7.73 \times 10^5$	$6.95 \times 10^4$	$6.03 \times 10^3$
Alginate + Locust bean gum	3	0.3	$3.19 \pm 0.23$		$3.26 \times 10^7$	$2.58 \times 10^6$	$2.63 \times 10^5$	$3.68 \times 10^4$
Alginate + Guar gum	3	0.3	$3.18 \pm 0.24$		$6.46 \times 10^6$	$7.26 \times 10^5$	$1.31 \times 10^5$	$1.16 \times 10^4$
Alginate + Gum arabic	3	0.3	$3.09 \pm 0.21$		$3.13 \times 10^6$	$2.39 \times 10^4$	$<10^3$	$<10^3$
Alginate + Pectin	3	0.3	$3.12 \pm 0.25$		$2.29 \times 10^7$	$9.73 \times 10^5$	$3.79 \times 10^4$	$1.98 \times 10^3$
Alginate + Gelatin	3	0.3	$3.14 \pm 0.18$		$1.58 \times 10^7$	$7.78 \times 10^4$	$2.21 \times 10^3$	$<10^3$

<sup>1)</sup>Each value represents mean diameter based on 100 beads.  
<sup>2)</sup>Viable cell counts of untrapped bifidobacteria were written as cfu/mL.  
<sup>3)</sup>No add a additive.

간 동안 반응시키면서 반응시간에 따른 포집된 bifidobacteria의 생균수를 조사한 결과 평균 비드의 직경이 1.06 mm인 경우 반응시간에 따라 대수적으로 감소하여 90분 이후에는 포집된 bifidobacteria의 생균수가 거의 모두 사멸한 것을 관찰할 수 있었으며, 비드의 직경이 1.70 mm인 경우에는 180분 후 비드에 포집된 bifidobacteria가 대부분 사멸하는 것으로 조사되었다. 반면 alginate 농도가 3%이고 지름이 3.17 mm인 비드의 경우는 반응 180분 후 포집된 bifidobacteria의 생균수가 반응초기에 비하여 약 0.44% 생존하여 비드의 직경의 크기가 증가할수록 포집된 bifidobacteria의 생존율이 비례적으로 증가하는 것을 알 수 있다. 따라서 이와 같은 결과는 alginate vessel의 두께에 따른 산침투효과의 결과에서와 같이 비드내 포집된 bifidobacteria의 생존을 증가는 alginate 격자의 두께 증가에 따른 비드내 산의 확산 저해효과에 의한 것임을 알 수 있다. Alginate 3% (w/v)에 0.3% (w/v) soluble starch, whey, insoluble starch, agar, locust bean gum, guar gum, gum arabic, pectin, gelatin 그리고 0.15% (w/v) xanthan gum 등을 각각 첨가하여 같은 직경으로 bifidobacteria를 포집한 비드를 산용액과 3시간 반응시킨 후 비드내 생균수변화를 조사한 결과 alginate에 첨가된 물질에 따라 다양한 생균수 변화를 나타내었다. Soluble starch가 혼합된 비드에 포집된

bifidobacteria의 경우 1.63%, whey는 2.36%, xanthan gum은 14.84%의 생존율을 나타내어 alginate만으로 제조된 비드의 생존율 0.44%에 비하여 높은 생존율을 나타낸 반면 insoluble starch는 0.38%, guar gum은 0.18%, agar와 locust bean gum은 각각 0.11% 그리고 pectin은 0.008%의 생존율을 나타내었고, gum arabic과 gelatin의 경우에는 포집된 bifidobacteria의 대부분이 사멸하는 것으로 조사되어 가장 낮은 보호효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 또한 첨가물이 혼합된 alginate 격자의 산침투효과를 pH 변화로 조사한 Figure 4의 결과와 일치하는데 이는 비드의 구조적 변화가 산의 비드내 침투에 영향을 줌으로써 포집된 bifidobacteria의 생존을 변화를 가져온 것을 알 수 있다. 따라서 세포포집기술을 이용한 bifidobacteria의 생존을 향상을 위해서는 산침투효과가 적은 포집재료를 선별하는 것이 중요하다고 사료되며 다양한 포집재료들로부터 우수한 포집재료를 간편하게 선별하는 방법으로 포집재료의 vessel을 제조하여 산투과효과를 pH 변화로 조사하는 기술이 매우 유용하리라 사료되었다.

**비드의 구조 변화**

산에 대한 가장 높은 생존율을 나타낸 xanthan gum 함유 alginate 비드와 alginate로만 제조된 비드의 표면과 절단면을

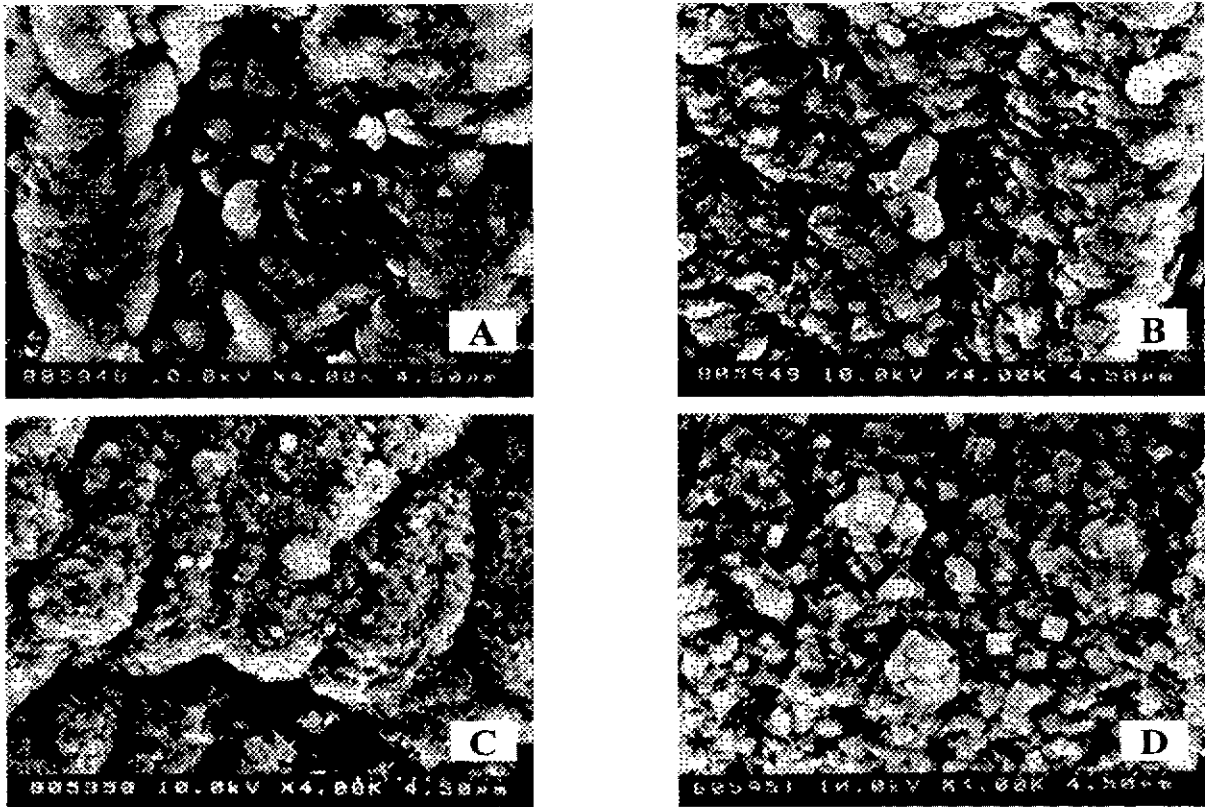


Figure 5. Scanning electron microscopy photographs of the surface and inner structure of beads.

A, surface structure of 3% alginate bead containing 0.15% xanthan gum; B, inner structure of 3% alginate bead containing 0.15% xanthan gum; C, surface structure of 3% alginate bead, D, inner structure of 3% alginate bead

전자현미경으로 관찰한 결과 Figure 5에서와 같이 alginate로만 구성된 격자의 표면과 절단면은 정사각면체들이 조밀하게 배열된 구조를 가지는 것을 알 수 있으며 xanthan gum 함유 alginate 비드의 경우에는 gel 성분과 같은 물질에 의해 코팅된 것과 같은 구조를 나타내어 두 종류의 격자 구조가 상이한 형태를 가지는 것으로 조사되었다. Alginate는  $\beta$ -D-manuronic acid(M) 단위체와  $\alpha$ -L-glucuronic acid(G) 단위체가 1 $\rightarrow$ 4-glycosidic bond에 의하여 이루어진 heteropolymer carboxylic acids로서 이들의 주요 성분인  $\beta$ -D-manuronic acid(M) 단위체와  $\alpha$ -L-glucuronic acid(G) 단위체가 polymeric blocks를 형성하여 사슬을 따라 배열되는 특성 때문에 격자가 정사각면체들의 조밀한 배열 구조를 갖는다(18). Alginate가 비드를 형성할 때 xanthan gum이 존재하게 되면 정사각면체들이 조밀하게 배열된 alginate 격자부분을 덮어 격자의 구멍을 크기를 감소시킴으로써 alginate로만 제조된 격자에 비하여 산침투효과가 감소하게 되는 것으로 사료된다. 그러나 alginate로만 구성된 격자를 비롯하여 첨가물이 혼합된 alginate 격자의 산침투효과의 결과에서도 알 수 있듯이 bifidobacteria가 포집된 비드들은 산에 노출될 경우 산은 비교적 빠른 시간에 비드내로 확산되어 비드 내부의 pH를 낮추는 것을 알 수 있다. Tanaka(16) 등은 Ca-alginate gel bead의 물질확산에 관한 연구에서 glucose, L-tryptophan 등과 같이  $2 \times 10^4$  MW 이하의 작은 분자량을 갖는 물질들은 alginate 격자의 pores에 의하여 방해받지 않고 격자를 자유로이 통과

할 수 있다고 보고하였고, Betty와 Stephanopoulos(17)는 glucose의 직경은 72 Å 정도로 alginate 격자의 표면 pore 직경보다 매우 작아 alginate 격자내로 아주 빠르게 확산될 수 있다고 보고하였다. 그러므로 위액의 주성분인 HCl의 분자량(36.46 MW)은 glucose(180 MW)의 분자량보다 훨씬 작으므로 glucose 보다 쉽게 alginate 격자내로 확산될 수 있다. 따라서 비드에 포집된 bifidobacteria의 산에 대한 안정성은 격자의 세공수의 감소, 세공의 크기 감소 및 세공의 길이 증가에 따른 비드내 산의 확산속도 감소만으로는 설명하기 어렵다. Krisch와 Szajani(19)는 alginate에 포집된 세포는 세포의 생리적 변화가 일어나 외부물질에 대한 저항력이 생기는 것으로 추정하였고 Hilge-Rotmann과 Rehm(20)은 alginate에 포집된 세포가 포집되지 않은 세포에 비하여 높은 포화지방산을 가진다고 보고하였으며, Del-castillo-Agudo(21)는 ethanol에 대한 저항성이 큰 *Saccharomyces* 균주가 저항성이 없는 균주에 비하여 낮은 불포화지방산을 갖는다고 보고하였다. 그러므로 포집된 bifidobacteria의 산에 대한 안정성은 비드 격자의 물리적 특성과 포집된 세포의 생리적 변화가 복합적으로 작용하는 것으로 사료된다.

#### Xanthan gum이 함유된 alginate 비드에 포집된 bifidobacteria의 담즙염 내성

우수한 포집재료로 선별된 0.15% xanthan gum이 함유된 3% alginate 비드에 포집한 bifidobacteria와 포집되지 않은

free bifidobacteria를 인체 소장으로부터 분리되는 담즙염과의 반응성을 검토하기 위하여 인체의 담즙염 조성파 유사한 0.6% oxgall 용액과 반응시켜 반응시간에 따른 bifidobacteria의 생균수를 측정된 결과 Figure 6의 (A)에서와 같이 비드에 포집되지 않은 bifidobacteria의 경우 반응초기 생균수가  $1.09 \times 10^9$  cfu/mL에서 반응 6 시간 후  $3.63 \times 10^5$  cfu/mL로 급격히 감소하여 약 0.033%의 생존율을 나타내었다. 반면 0.15%

xanthan gum이 함유된 3% alginate 비드에 포집한 bifidobacteria의 경우에는 비드당 초기균수가  $2.50 \times 10^7$  cfu/bead에서 반응시간에 따라 대수적으로 감소하여 반응 6 시간 비드당  $1.02 \times 10^7$  cfu/bead로 감소하여 약 40.8%의 생존율을 나타내어 비드에 포집되지 않은 free bifidobacteria 보다 매우 높은 담즙염 안정성을 나타내었다. 따라서 0.15% xanthan gum이 함유된 3% alginate가 소장내 담즙염에 대해서도 bifidobacteria의 생존율을 향상을 위한 우수한 포집재료임을 알 수 있었다.

**Xanthan gum이 함유된 alginate 비드에 포집된 bifidobacteria의 내산소성**

우수한 포집재료로 선별된 0.15% xanthan gum이 함유된 3% alginate 비드에 포집한 bifidobacteria와 포집되지 않은 free bifidobacteria의 내산소성을 간접적으로 조사하기 위하여 1,000 ppm 농도로 희석된 과산화수소 용액과 반응시켜 과산화수소에 대한 저항성을 검토한 결과 Figure 6의 (B)에서와 같이 비드에 포집되지 않은 bifidobacteria의 경우 반응초기 생균수가  $1.06 \times 10^9$  cfu/mL에서 반응 1 시간 이내에  $10^3$  cfu/mL 이하로 급속히 감소하였고, 반응 2 시간 이후에는 생균수를 검출할 수 없었다. 반면 0.15% xanthan gum이 함유된 3% alginate 비드에 포집한 bifidobacteria의 경우에는 3시간 반응한 후에도 비드당 생균수가 초기균수의 0.1%에 달하여 비드에 포집되지 않은 free bifidobacteria 보다 산소에 대한 매우 높은 저항성을 갖는 것으로 사료되었다.

**유제품에서의 저장기간에 따른 xanthan gum이 함유된 alginate 비드에 포집된 bifidobacteria의 안정성**

Bifidobacteria가 함유된 발효유제품의 고부가가치 상품화를 위한 세포포집기술을 적용하기 위하여 우수한 포집재료로 선별된 xanthan gum이 함유된 alginate에 bifidobacteria를 포집시킨 비드를 유기산으로 pH 4.5로 조정된 우유에 첨가하여 냉장보관하면서 저장기간에 따른 비드내 생균수 변화를 측정 한 결과 Figure 6의 (C)에서와 같이 비드내 생균수는 저장 10일 동안 거의 변화가 없는 것으로 조사되었다. 반면 비드에 포집되지 않은 free bifidobacteria는 저장초기 생균수가  $2.23 \times 10^9$  cfu/mL에서 냉장저장 10 일후  $4.48 \times 10^8$  cfu/mL로 약 80% 생균수 감소가 일어난 것으로 조사되었다. 그러므로 xanthan gum이 함유된 alginate에 bifidobacteria를 포집시킨 비드를 발효유제품에 적용할 경우 기존의 발효유제품보다 유통저장 기간중 발효유제품내 bifidobacteria의 생존력 향상이 기대되며 발효유제품 섭취시 위와 소장에서 bifidobacteria의 생존력 향상에 도움이 될 것으로 사료된다.

**요 약**

Alginate에 0.3% soluble starch, whey, insoluble starch, agar, locust bean gum, guar gum, gum arabic, pectin, gelatin 과 0.15% xanthan gum등과 같은 biopolymers가 함유된 격자들의 유사위액 침투효과를 pH 변화로 측정하는 방법이 시도 되었다. 이와 같은 biopolymer가 함유된 격자들의 산투과도와 이들 각각의 격자에 포집된 bifidobacteria의 유사위액에 대한 생존력을 조사한 결과 이들 격자들의 산투과 억제 정도

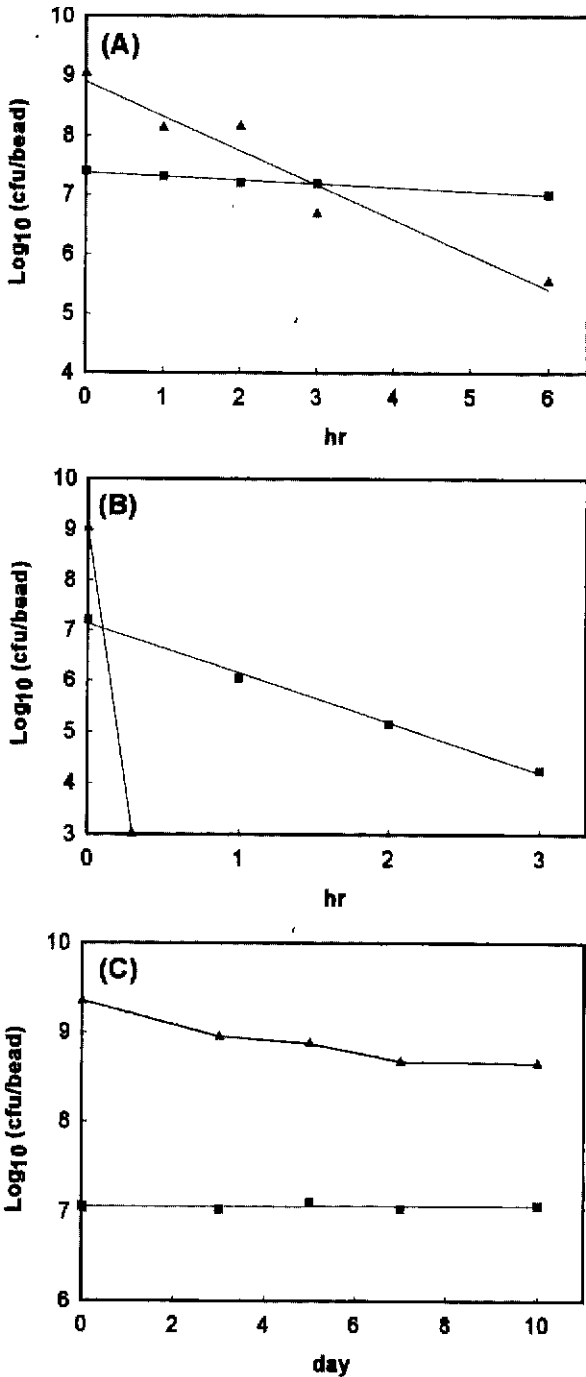


Figure 6. Stability of *Bifidobacterium longum* entrapped in 3% alginate bead containing 0.15% (w/v) xanthan gum after reaction with (A) bile salts, (B) hydrogen peroxide, and (C) milk adjusted pH 4.5. ■, 3% alginate containing 0.15% xanthan gum bead; ▲, untrapped *Bifidobacterium longum*

에 따라 이들 격자에 포집된 bifidobacteria의 유사위액에 대한 생존을 향상 정도가 일치하는 것을 알 수 있었다. 그러므로 다양한 포집격자들의 산투과도를 pH 변화로 측정하는 방법은 bifidobacteria의 생존을 증대를 위한 포집재료의 선별에 매우 유용한 방법으로 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다. 가장 높은 산투과 억제효과를 나타낸 0.15% xanthan gum이 함유된 alginate 격자에 포집된 bifidobacteria는 담즙염, 과산화수소에 대한 저항성이 포집되지 않은 free cell에 비하여 매우 높게 나타났으며, 또한 유기산으로 pH 4.5로 조정된 우유에서 저장기간에 따른 생균수 변화도 거의 없는 것으로 조사되었다. 따라서 xanthan gum이 함유된 alginate를 세포포집재료로 사용하여 bifidobacteria를 포집한 비드를 발효유제품에 적용할 경우 bifidobacteria의 생존력이 향상된 고부가가치적 상품화가 기대된다.

### 감 사

본 연구는 1999년도 인하대학교 교수연구진흥비 지원에 의해 수행 되었으며 이에 감사드립니다

### REFERENCES

1. Klupsch, H. J von (1985), Man and microflora, *N. Eur. Dairy Sci. J.* **51**, 221-226
2. Carrillo, M., E. Estada, and T. C. Hazen (1985), Survival and enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed, *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 468-476
3. Gilliland, S. E (1990), Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 175-188.
4. Rasic, J. L., I. F Vujcic, M. Skrinjar, and M. Vulic (1992), Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnol. Lett.* **14** (1), 39-44.
5. Modler, H. W., R. C. Mckeller, and M. Raguchi (1990), Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **23**, 29-41.
6. Havenaar, R., J. H. J. Huisin't veld (1992), Probiotics : A general view, In B. J. B. Wood (ed), *The lactic acid bacteria*, Vol. 1. The lactic acid bacteria in health and disease. pp.151-171, Elsevier Applied Science, London
7. Hughes, D. B., D. G. Hoover (1991). Bifidobacteria : Their potential for use in American dairy products, *Food Technol.* **44**(4), 74-83.
8. Gianella, R. A, S. A. Broitman, and N. Zamcheck (1972), Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man : Studies *in vivo* and *in vitro*, *Gut* **13**, 251-256.
9. Rao, A V, N. Shiwnarain, and I. Maharj (1989), Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **22**(4), 345-349.
10. Camelin, I., C Lacroix, C. Paquin, H. Prevost, R. Cachon, and C. Divies (1993), Effect of chelatants on gellan gel rheological properties and setting temperature for immobilization of living bifidobacteria, *Biotechnol. Prog.* **9**, 291-297.
11. Arnaud, J. P., and C. Lacroix (1991), Diffusion of lactose in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped growing lactic acid bacteria, *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 1041-1049.
12. Manolov, R J, M. S. Kambourova, and E. I Emanuilova (1995), Immobilization of *Bacillus stearothermophilus* cells by entrapment in various matrices, *Proc. Biochem.* **30** (2) 141-144.
13. Dobreva, 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.
14. Lim, F. and R. D Moss (1981), Microencapsulation of living cells and tissues, *J Pharm. Sci.* **70**, 351-353.
15. 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.
16. Tanaka, H., M. Matsumura, and I. A. Veliky (1984), Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads, *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 53-58.
17. Betty, J M. H., G. Stephanopoulos (1986), Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes, *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 829-835
18. Klein, J and K. D. Vorlop (1985), *Comprehensive Biotechnology* In Moo-Young, M. B (Ed.), pp.203-223, Oxford: Pergamon Press
19. Krisch, J, and B Szajani (1997), Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*, *Biotechnol. Lett.* **19**(16), 525-528.
20. Hilge-Rotmann, B. and H. Rehm (1991), Relationship between fermentation capability and fatty acid composition of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 502-508.
21. Del Castillo Agudo, L. (1992), Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 647-651.