

## Alginate에 고정화된 Calcium Carbonate를 이용한 Buffer System에서 비드 크기에 따른 *Bifidobacterium*의 배양에 대한 효과

이기용 · 허태련\*  
인하대학교 생물공학과

### Particle Size Effects in Buffer System using Calcium Carbonate Bead Immobilized with Alginate for the Cultivation of *Bifidobacterium*

Ki-Yong Lee and Tae-Ryeon Heo\*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon, 402-751, Korea

#### Abstract

The characteristics of the reaction of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) immobilized with alginate as buffer system for the high concentration cultivation of bifidobacteria in fermenter are described by the mathematical model, and tested for the reusing possibility of the used  $\text{CaCO}_3$  beads. When  $\text{CaCO}_3$  beads with the various diameters were reacted in 0.1 M of the mixed organic acids (0.6 M of acetic acid and 0.4 M lactic acid) and in fermenter inoculated *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, the change of bead diameters can be calculated with the amount of the decreased  $\text{CaCO}_3$  from the surface of bead using the mathematical model. These values was similar to the directly measured bead diameter by a micrometer. Therefore, it was considered that the mathematical model could be used for explaining the reaction characteristics of the  $\text{CaCO}_3$  bead reacted with the organic acids. When *Bifidobacterium longum* was incubated at 37°C for 20 hours in fermenter with  $\text{CaCO}_3$  beads, the buffering effect of  $\text{CaCO}_3$ , the reduce rate of the bead diameter, and the growth rate of *Bifidobacterium longum* were higher at the smaller beads than beads with the larger diameters. Also, when *Bifidobacterium longum* was incubated in fermenter with the mixed beads which were added new beads to the recovered beads in order to equalize with the total surface area of initial beads, the buffering effect of  $\text{CaCO}_3$  bead and the growth rate of *Bifidobacterium longum* were very corresponded with the results of the fermentation using the only initial beads. Therefore, it is expected that the used beads can be reused by adding the initial beads.

Key words:  $\text{CaCO}_3$  bead, buffer system, bifidobacteria, particle size, cultivation

#### 서 론

비피더스는 요구르트를 비롯한 여러 가지 낙농유제품에 종균으로 사용되고 있으며 인공영양아를 위한 조제분유의 제조와 사람과 가축에 대한 치료제 및 예방제로서의 생균제 등에 광범위하게 이용되고 있다<sup>(1,3)</sup>. 그럼에도 불구하고 현재 산업적으로 이용되어지는 비피더스균의 고농축 종균 및 생균제제의 대부분은 전량 수입에 의존하고 있으며, 그 가격은 다른 유산균주와 비교하여 매우 높다. 이러한 이유는 비피더스균이 복잡한 영양요구체로서 증식에 있어 고가의 복잡한 배지를 필요로 하고<sup>(4)</sup>, 다른 유산균에 비하여

분열 증식 시간이 길어 생산비용이 증가하기 때문이다<sup>(5,6)</sup>. 또한 비피더스균은 산소에 민감한 혐기성균주로서 일반적으로 다루기가 어려우며 낮은 pH 환경에서 급격히 사멸하는 등의 특성으로 인하여 고농도 배양에 어려움이 있기 때문이다<sup>(7,8)</sup>. 산업적인 측면에서 농축된 종균 및 생균제제는 회분식 배양후 배양액을 여과공정, 원심분리, 분무건조 또는 동결건조 등의 방법을 이용하여 제조되어지고 있다<sup>(9,11)</sup>. 그러므로 종균 및 생균제제용 비피더스균의 균체량 생산을 향상시키기 위해서는 우선적으로 회분식배양에 의하여 효율적인 고농도 배양이 이루어져야 한다. 비피더스균을 비롯한 유산균들은 배양공정중 당발효 부산물로 생성되는 유기산에 의하여 배양액내 pH가 낮아지게 되어 균생장이 저해되고 사멸하게 된다. 일반적으로 유산균

Corresponding author: Tae-Ryeon Heo, Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

배양에 이용되어지는 배양액들의 자체 완충능력은 배양액내 pH를 조절하기에 충분하지 못하기 때문에 유산균의 고농도 배양을 위해서는 NaOH, 또는 NH<sub>4</sub>OH 등과 같은 알칼리용액을 지속적으로 첨가하여 주는 pH 조절 방법이 요구된다. 그러나 이러한 중화제를 사용하는 pH 조절은 배양액내 이온강도를 지속적으로 증가시켜 균의 활력과 증식을 감소시킬 뿐만 아니라 첨가되어지는 중화제의 농도가 높을 경우 발효기의 교반시간과 pH 전극의 낮은 반응 시간(response time) 등으로 인하여 배양액내 큰 pH 변동과 극부적으로 높은 pH를 유발하게 되고, 낮은 농도의 알칼리용액이 사용될 경우는 많은 양의 알칼리 용액의 첨가로 인하여 배양액이 희석되므로 균의 생화학적 환경변화를 가져올 수 있다<sup>(12)</sup>. 따라서 이와 같이 pH 조절방법을 이용할 경우 비피더스균의 효율적인 고농도 균체를 얻는데 한계가 있다.

분말의 calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>)는 산과 반응하여 칼슘염과 이산화탄소 및 물을 생성함으로써 수용액내의 수소이온을 제거시키는 특성이 있어 대량발효공정 최종단계에서 배양액내 다량의 산을 중화시키는 중화제로 종종 이용된다. 그러나 수용액내에서 불용성인 특성으로 인하여 배양과정중 pH 조절용 완충제로 직접 사용하기에는 어려움이 있고, 배양액으로부터 균체와 잔여 CaCO<sub>3</sub>를 분리하기 쉽지 않다. 이러한 CaCO<sub>3</sub>의 특성을 고려하여 선행된 연구에서는 비피더스균의 효율적인 회분식배양을 위한 완충제로써 alginate를 이용한 고정화된 CaCO<sub>3</sub> 비드를 배양액에 도입하여 pH 조절장치와 혐기장치를 사용하지 않는 배양공정의 가능성을 보고하였다<sup>(11)</sup>.

이에 본 연구는 alginate에 고정화된 다양한 직경의 CaCO<sub>3</sub> 비드를 제조하여 유기산에 대한 비드의 반응특성과 비드 크기에 따른 완충효과를 검토함으로써 비피더스균의 고농도 배양시 배양액내 완충제로써 CaCO<sub>3</sub> 비드를 효율적으로 활용하기 위한 방안과 사용된 비드의 재활용 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 다양한 크기의 CaCO<sub>3</sub> 비드의 제조

다양한 크기의 CaCO<sub>3</sub> 비드 제조는 sodium alginate acid를 2% (w/v)가 되도록 증류수에 넣어 교반기를 이용하여 충분히 녹인 후 CaCO<sub>3</sub>를 15% 또는 18%가 되도록 첨가하여 충분히 섞일 때까지 교반하였고, 충분히 섞인 혼합 콜로이드액은 compressor를 사용하여 4 kg/cm<sup>2</sup>의 압축공기로 다양한 크기의 노즐을 통하여

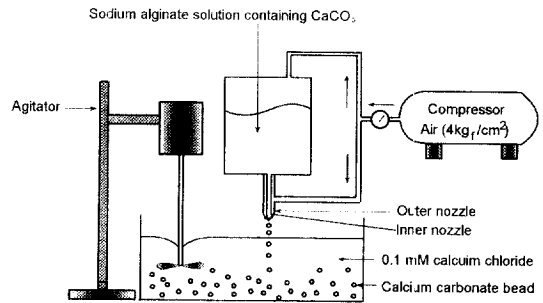


Fig. 1. The schematic diagram of the simple device to prepare CaCO<sub>3</sub> beads.

혼합 콜로이드액을 100 mM CaCl<sub>2</sub> 용액에 떨어뜨려 비드를 제조하였으며(Fig. 1), 제조한 비드는 증류수로 3회 세척한 후 사용하였다.

### 비드의 질량 및 직경의 크기측정

비드의 습윤중량은 비드를 나이론 망사 주머니에 넣어 가정용 탈수기를 이용하여 비드들 사이에 잔존하는 수분을 제거한 후 무게를 측정하였고, 건조중량은 105°C dry oven에서 무게의 변화가 없을 때까지 건조한 후 무게를 측정하였다. 비드 직경의 크기는 현미경하에서 micrometer를 사용하여 측정하였다.

### 비드에 함유된 CaCO<sub>3</sub> 질량

제조한 비드에 함유된 CaCO<sub>3</sub>의 질량은 습윤비드(비드 사이의 잔존하는 수분이 제거된 비드) 10 g을 105°C dry oven에서 건조시켜 비드의 전체 건조중량을 구하고, 같은 질량의 습윤비드를 1 mole의 lactic acid 200 mL에 넣고 충분히 반응시켜 비드 내에 존재하는 CaCO<sub>3</sub>를 유기산과 반응시켜 모두 제거시킨 후 남은 alginate 격자부분의 건조중량을 측정하여 비드의 전체 건조중량과 alginate의 질량과의 차이 값으로부터 구하였다. 유기산 반응 후 비드의 감소된 CaCO<sub>3</sub>의 양은 비드를 증류수로 세척한 후 건조중량을 측정하여 반응초기의 비드의 건조중량과의 차이 값으로부터 구하였다.

### 유기산에 대한 CaCO<sub>3</sub> 비드의 반응 특성과 완충효과

젖산과 초산을 각각 0.4 그리고 0.6 mole씩 1,000 mL 증류수에 넣어 산 농도가 전체적으로 0.1 mole인 혼합 유기산 용액을 제조한 후, 이 혼합 유기산 용액 100 또는 200 mL에 습윤중량 10 g의 CaCO<sub>3</sub> 비드를 첨가하여 200±10 rpm으로 교반하면서 반응시간에 따른 pH 변화와 비드의 질량변화 및 직경의 크기변화 등

을 측정하였다.

#### 유기산에 대한 CaCO<sub>3</sub> 비드의 반응모델

Alginate 격자에 고정화된 CaCO<sub>3</sub>는 수용액내 유기산과 반응할 경우 반응시간에 따라 구형의 비드의 표면으로부터 CaCO<sub>3</sub>가 분해되므로 비드 입자의 질량이 감소하게 되고, 비드 표면으로부터 CaCO<sub>3</sub>를 포함하는 비드 입자의 직경 크기가 감소하게 됨으로 유기산에 대한 CaCO<sub>3</sub> 비드의 반응모델은 습윤입자의 미생물학적 리칭 반응모델을 이용하여 다음과 같이 설정하였다<sup>(14)</sup>.

$$kp_1^3 = kp_0^3 - \frac{s \cdot kp_0^3}{f \cdot C_0}$$

Kp<sub>0</sub>: 초기 비드 입자의 직경(mm)

Kp<sub>1</sub>: 반응한 비드의 직경(mm)

f: 비드 질량에 대한 CaCO<sub>3</sub>의 무게분율

C<sub>0</sub>: 단위 부피당 비드의 초기 질량(g/L)

s: 전체 비드 표면으로부터 CaCO<sub>3</sub> 감소율(g/L·h)

#### 균주

동결 건조된 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707을 trypticase-proteose peptone-yeast extract (TPY) 액체 배지에 접종하여 37°C 혐기배양조에서 배양한 후 계대 배양하여 사용하였다.

다양한 직경의 CaCO<sub>3</sub> 비드를 완충제로 이용한 bifidobacteria 배양

발효기(2.5 L)에 phosphate를 포함하지 않는 2.5% glucose가 들어있는 TPY 배지 1,000 mL와 직경이 다른 CaCO<sub>3</sub> 비드를 각각 20% (w/v)가 되게 넣고, 121°C에서 15분간 가압멸균한 후 계대 배양된 bifidobacteria 배양액을 발효기 전체 배양액에 2% (v/v)가 되도록 접종하여 37°C에서 200±10 rpm으로 교반하여 배양하였고, 연속 pH 조절배양(pH-controlled culture)은 phosphate가 포함된 2.5% glucose가 들어있는 1,000 mL TPY 배양액에 bifidobacteria 배양액을 발효기 전체 배양액에 2% (v/v)가 되도록 접종한 후, 질소가스를 주입시켜 혐기적으로 배양하면서 멸균된 2 N NaOH를 이용하여 발효기의 배양액 pH가 지속적으로 5.5가 되도록 조절하였다.

균 배양액의 pH와 흡광도 및 생균수 측정

*Bifidobacterium longum*을 발효기에 접종한 후 2시간 간격으로 배양시료를 10 mL 채취하여 pH meter로

pH를 측정하였고, 균중식도는 UV/VIS spectrophotometer (Perkin-Elmer, Lambda 3B)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정한다. 배양액의 생균수는 시료를 10배 희석방법으로 희석한 후 TPY 한천배지에 도말하여 혐기적조건에서 37°C로 배양하여 생성된 콜로니의 수를 계수하였다.

## 결과 및 고찰

#### 제조한 비드의 크기 및 질량

직경이 다른 5종류의 CaCO<sub>3</sub> 비드가 다양한 크기의 노즐을 통하여 제조되었다(Fig. 2). 제조된 비드의 직경을 현미경하에서 micrometer를 사용하여 측정한 결과 15%의 CaCO<sub>3</sub>가 함유된 비드의 평균 직경은 1.10, 1.53, 1.75, 2.00 mm이고 18%의 CaCO<sub>3</sub>가 함유된 비드의 평균 직경은 1.12 mm로 측정되었다. 탈수기를 이용하여 비드 사이에 존재하는 수분을 제거한 후 비드의 질량을 측정할 결과와 105°C dry oven에서 수분을 완전히 제거한 건조중량을 비교한 결과 Fig. 3과 같이

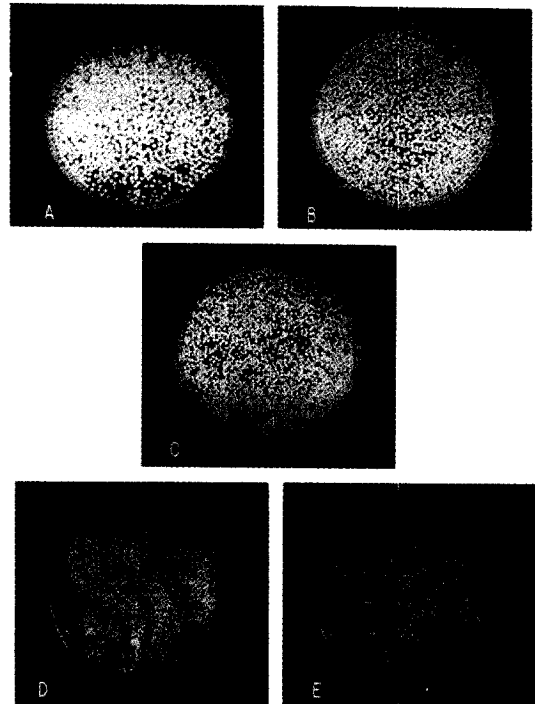


Fig. 2. The photographs of CaCO<sub>3</sub> beads immobilized with Ca-alginate. A: 2.00 mm diameter with 15% CaCO<sub>3</sub>, B: 1.75 mm diameter with 15% CaCO<sub>3</sub>, C: 1.53 mm diameter with 15% CaCO<sub>3</sub>, D: 1.10 mm diameter with 15% CaCO<sub>3</sub>, E: 1.12 mm diameter with 18% CaCO<sub>3</sub>.

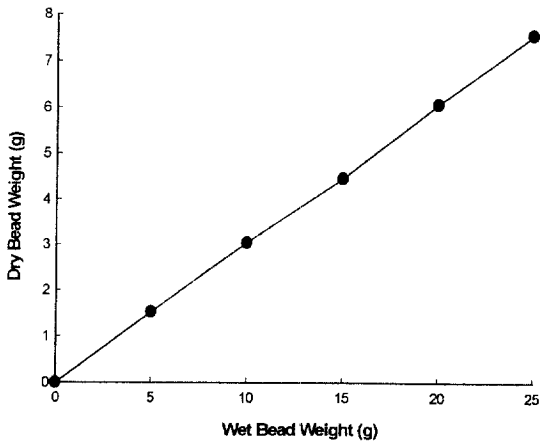


Fig. 3. Plot of dry weight vs. wet weight of 1.10 mm diameter  $\text{CaCO}_3$  beads.

습윤질량이 증가함에 따라 건조중량이 비례적으로 증가함을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 제조된 비드의  $\text{CaCO}_3$ , alginate 함량 및 수분함수율이 비드에 일정하게 고루 분포함을 의미하므로 제조된 비드는 일정한 밀도를 갖는 입자임을 알 수 있다.

**$\text{CaCO}_3$  비드의 유기산 반응 특성**

유기산 용액(0.1 mol) 200 mL에 1.10 mm 직경을 갖는  $\text{CaCO}_3$  비드의 양을 달리하여 10분간 유기산 용액의 pH 변화를 측정된 결과 Fig. 4와 같이 비드의 양이 증가함에 따라 유기산 용액의 pH가 더 높이 증가함을 알 수 있다. 이와 같이 유기산과 반응하는 비드의 양

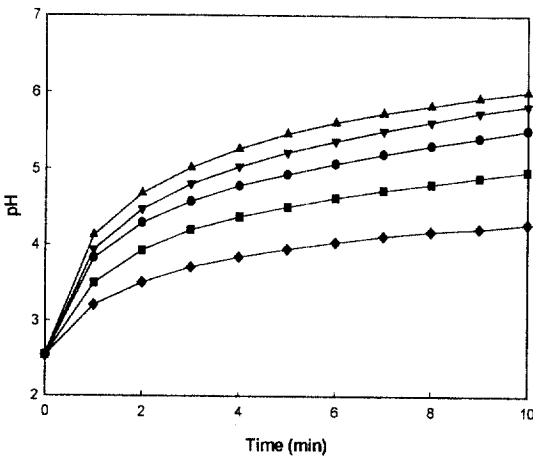


Fig. 4. The change of pH in the one mole complex organic acid solution with the various amounts of  $\text{CaCO}_3$  beads. ◆◆: 5 g  $\text{CaCO}_3$ , ■■: 10 g  $\text{CaCO}_3$ , ●●: 15 g  $\text{CaCO}_3$ , ▼▼: 20 g  $\text{CaCO}_3$ , ▲▲: 25 g  $\text{CaCO}_3$ .

의 증가는 결국 유기산과 반응하는 비드의  $\text{CaCO}_3$  전체 표면적의 증가를 가져오게 되어 단위시간당 유기산과 반응하는  $\text{CaCO}_3$ 의 상대적 증가를 가져오기 때문이다. 그러므로 유기산과 반응하는  $\text{CaCO}_3$  비드의 양의 증가는 반응액내 완충효과의 증가를 가져오게 된다. 유기산 반응후 비드의 직경을 각각 조사하여 초기 비드의 직경분포와 비교한 결과 Fig. 5와 같이 반응 전 초기비드가 갖는 직경의 분포에 비하여 직경이 작은 비드의 분포가 증가하는 것을 볼 수 있으며, 또한 유기산 용액에 첨가된 비드의 양이 적을수록 반응후 보다 작은 직경을 갖는 비드의 분포가 증가한 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 유기산 용액의 단위 부피당 반응하는 비드 입자의 수가 적음으로 비드 입자당 유기산과 반응하는  $\text{CaCO}_3$ 의 상대적 반응 비율이 증가하여 비드로부터 더많은  $\text{CaCO}_3$ 의 감소를 가져오기 때문이다. 그러므로 유기산에 대한  $\text{CaCO}_3$  비드의 반응은 비드표면으로부터 일어나기 시작하여 비드 내부로 진행됨을 알 수 있다. 직경이 1.53 mm인 비드 10 g을 100 mL 유기산 용액에 첨가한 후 유기산 용액의 pH가 7.0에 도달하는 동안 비드의  $\text{CaCO}_3$  감소량과 pH 변화 및 비드의 직경의 변화를 조사한 결과 Fig. 6과 같이 초기 비드 입자의 직경에 대한 반응 비드 입자의 직경의 변화는 비드의  $\text{CaCO}_3$  감소량의 증가와 반응 유기산 용액의 pH 증가에 대조적으로 감소하는 형태를 나타내었고, 반응시간에 따른 유기산과 반응한 비드의  $\text{CaCO}_3$  감소량을 반응모델을 적용하여 이론적 비드의 직경을 검토한 결과 micrometer로 비드의 직경을 측정된 실험 값과 큰 차이가 없음을 보여주고 있다. 그러므로 유기산에 대한  $\text{CaCO}_3$  비드입자의 반응이 설정된 반응모델에 잘 적용되고 있음을 알 수 있다.

**유기산에 대한  $\text{CaCO}_3$  비드의 완충효과**

Fig. 7은 유기산에 대한  $\text{CaCO}_3$  비드의 완충효과가 비드 직경의 크기에 따라 변화되는 것을 보여주고 있다. 유기산과 반응하는 동안 사라지는 비드가 없다고 가정하면 전체 비드의 표면으로부터  $\text{CaCO}_3$ 의 감소율(s)는 유기산과 반응할 수 있는 단위체적당  $\text{CaCO}_3$ 의 표면적에 대한 함수가 되며, 또한  $\text{CaCO}_3$  비드의 표면적은 비드 직경의 제곱에 비례하므로 비드의  $\text{CaCO}_3$ 의 감소율은 비드 직경의 함수가 된다. 따라서 비드의 직경이 작아지게 되면 단위 부피당 비드의 표면적이 증가하게 되어 단위 시간당 유기산과 반응하는 비드의  $\text{CaCO}_3$ 가 상대적으로 증가하게 되고, 결국 반응액의 높은 완충효과를 갖게 한다(Table 1). 또한, 비드의 질량에 대한 무게분율(f)을 크게한 18%의  $\text{CaCO}_3$ 가 함

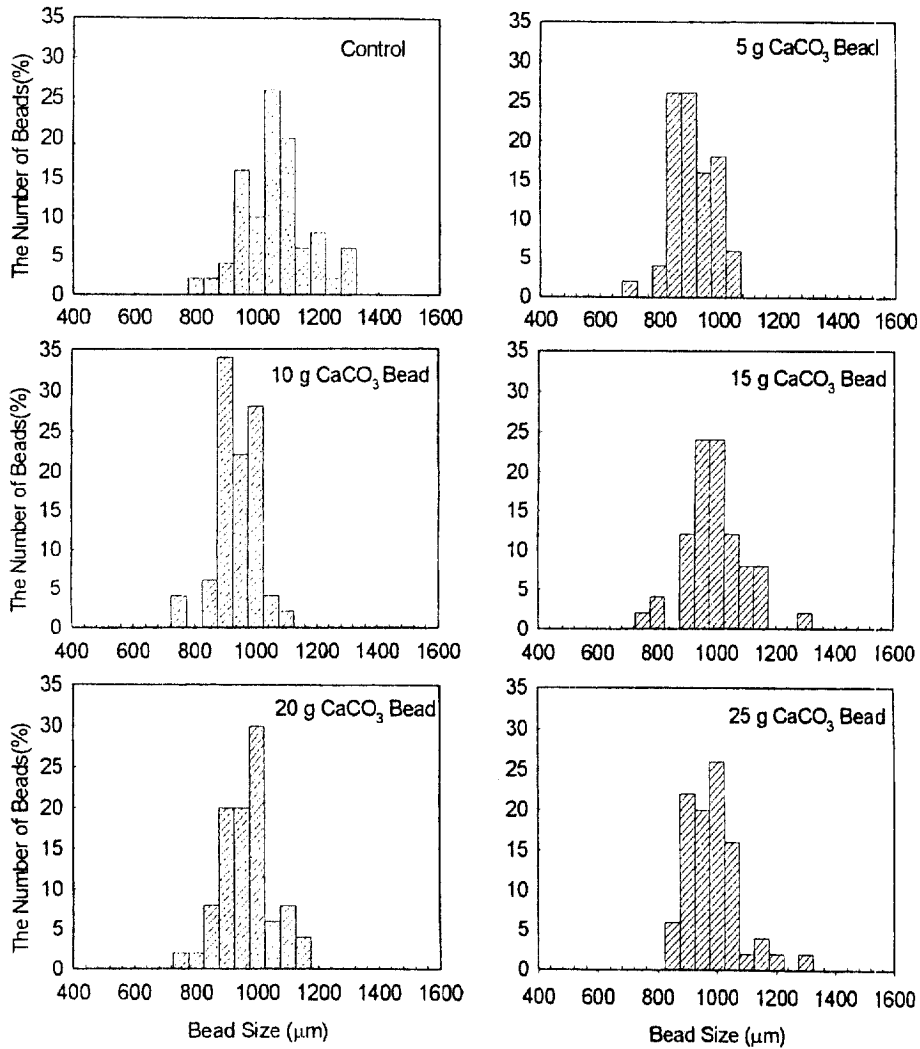


Fig. 5. The size distribution of  $\text{CaCO}_3$  beads before and after organic acid reaction.

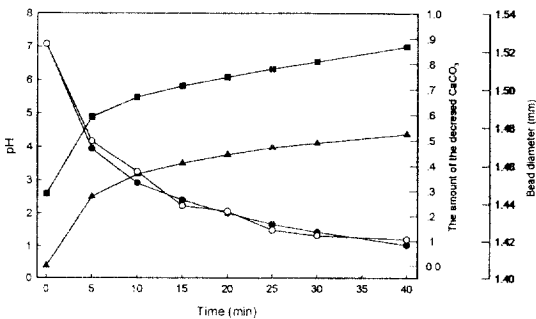


Fig. 6. The change of  $\text{CaCO}_3$  bead diameter as the amount of the decreased  $\text{CaCO}_3$  in 0.1 M 100 mL organic acid. ■—■: pH, ▲—▲: the amount of the decreased  $\text{CaCO}_3$ , ●—●: the calculated bead diameters using the mathematical model, ○—○: experimental bead diameter using a microscope.

유된 직경 1.12 mm의 비드의 경우 유기산과의 반응이 15%  $\text{CaCO}_3$ 가 함유된 직경 1.1 mm의 비드에 비하여 단위 부피당 비드의 표면적과 유기산과 반응후 비드 직경의 감소율이 적음에도 불구하고 비드의  $\text{CaCO}_3$  감소량은 오히려 증가하여 더 높은 완충효과를 나타내는데 이러한 결과는 유기산과 반응할 수 있는 비드 표면의  $\text{CaCO}_3$  함량의 증가가 결국 유기산과 반응할 수 있는  $\text{CaCO}_3$  표면적의 증가를 가져오기 때문이다. 직경의 크기가 1.53 mm인 비드 10 g을 0.1 M 100 mL 혼합 유기산과 20분 동안 반응시킨 후 비드를 증류수로 3번 세척하고 다시 0.1 M 혼합 유기산 용액에 첨가하여 반응액내 pH 변화를 조사하여 보면 Fig. 8과 같이 재사용 비드의 유기산에 대한 반응이 재 사용된 횟수에 따라 일정한 크기로 감소되었다. 일련의 유기산

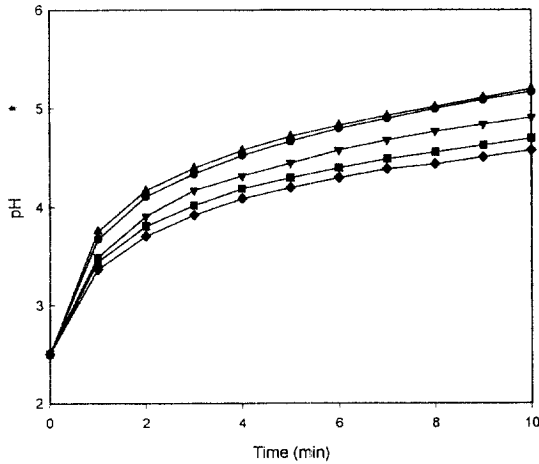


Fig. 7. Buffering effect of  $\text{CaCO}_3$  beads in 0.1 M 200 mL organic acid solution.  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ : 1.12 mm diameter with 18%  $\text{CaCO}_3$ ,  $\bullet$ — $\bullet$ : 1.10 mm diameter with 15%  $\text{CaCO}_3$ ,  $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$ : 1.53 mm diameter with 15%  $\text{CaCO}_3$ ,  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ : 1.75 mm diameter with 15%  $\text{CaCO}_3$ ,  $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$ : 2.00 mm diameter with 15%  $\text{CaCO}_3$ .

반응에서 사라지는 입자가 없다고 가정한다면 반응액 내 비드의 개수는 항상 일정한 수를 유지하게 되고, 유기산과의 반응 횟수가 증가함에 따라 비드 표면으로부터의  $\text{CaCO}_3$ 의 감소량의 증가로 인하여 비드의 직경이 감소하게 되어 전체 비드의 표면적의 크기가 크게 감소하게 되기 때문이다.

유기산 반응 후 감소한 비드의  $\text{CaCO}_3$  양을 측정하여 반응모델에 적용하면 반응 후 감소한 비드의 직경을 구할 수 있고, 감소한 비드의 직경으로부터 반응후 전체비드의 표면적을 구할 수 있다. 그러므로 유기산과 반응한 비드의 전체표면적을 산출하여 초기 사용한 비드 전체의 표면적 크기와 같게 새로 만들어진 비

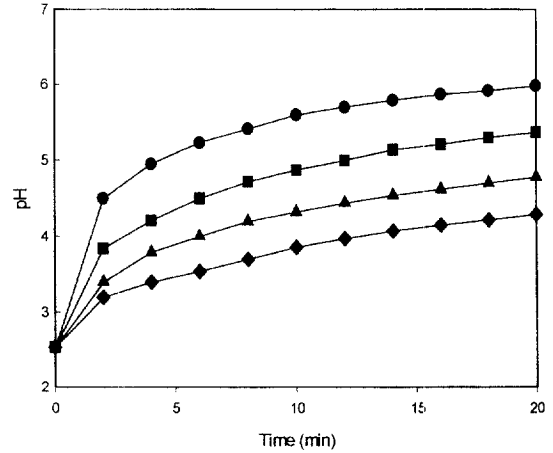


Fig. 8. The change of pH in 0.1 M 100 mL organic acid solution by the reused number of  $\text{CaCO}_3$  beads.  $\bullet$ — $\bullet$ : initial used  $\text{CaCO}_3$  beads,  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ : second used  $\text{CaCO}_3$  beads,  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ : third used  $\text{CaCO}_3$  beads,  $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$ : fourth used  $\text{CaCO}_3$  beads.

드를 첨가하고 이를 유기산 용액과 반응시킨 결과 Fig. 9와 같이 최초에 사용한 비드의 완충효과와 유사한 완충효과를 나타내었다. 그러므로 사용한 비드의 재활용도 가능하다고 사료되었다. 한편 직경의 크기가 다르게 제조된 각각의 비드를 전체비드의 표면적이 같게 비드의 양을 조정하면 후 유기산과 반응시킨 결과 모두 같은 pH 변화율을 나타낼 수 있었다 (Fig. 10). 따라서 제조된 비드의 직경이 다르더라도 비드의 전체표면적을 같게 비드의 양을 조정하면 같은 완충효과를 나타낼 수 있었으며,  $\text{CaCO}_3$  비드가 유기산 용액과 반응할 때 사라지는 비드가 없는 범위의 비드 크기 이상에서 가능한 한 비드의 직경을 작게 하고, 비드내  $\text{CaCO}_3$  함량을 높여 비드를 제조하면

Table 1. Properties of  $\text{CaCO}_3$  bead size fraction before and after reaction in 0.1 M 200 mL organic acid solution

Bead Diameter (mm)	$\text{CaCO}_3$ Conc. <sup>1)</sup> (%)	Bead Numbers <sup>2)</sup>	Bead Weight <sup>3)</sup> (mg)	Surface Area <sup>4)</sup> (mm <sup>2</sup> )	Decrease of $\text{CaCO}_3$ <sup>5)</sup> (mg)	Bead Diameter (mm)	
						Calculative <sup>6)</sup>	Experimental <sup>7)</sup>
2.00	15	175	5.71	2198	0.524	1.861	1.854
1.75	15	268	3.73	2578	0.552	1.621	1.634
1.53	15	404	2.48	2969	0.637	1.398	1.395
1.10	15	1268	0.79	4818	0.755	0.986	0.977
1.12	18	1108	0.90	4366	0.766	1.014	1.045

<sup>1)</sup>  $\text{CaCO}_3$  concentration of bead.

<sup>2)</sup> The number of bead per gram.

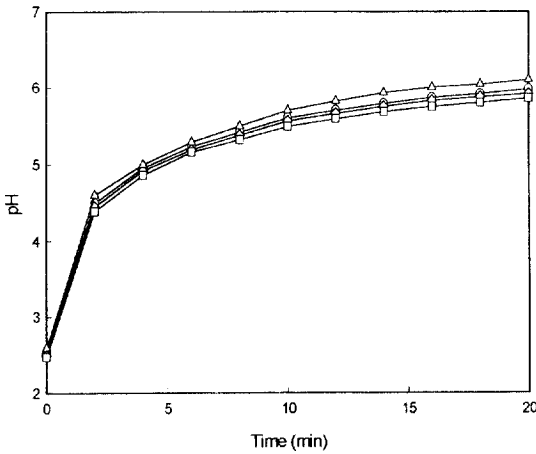
<sup>3)</sup> The weight of one bead.

<sup>4)</sup> Surface area of beads per gram.

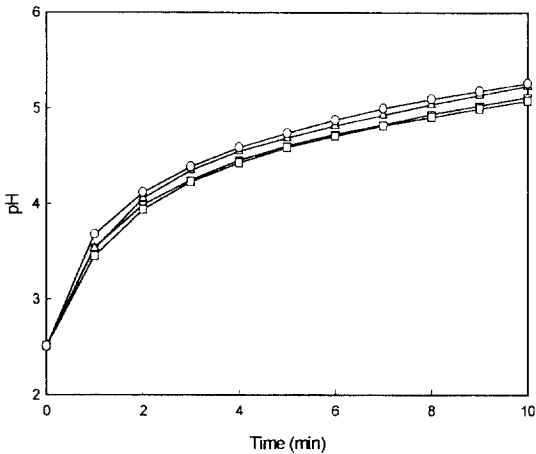
<sup>5)</sup> The amount of the decreased  $\text{CaCO}_3$  per 10 g bead after 10 minutes reaction in 0.1 M 200 mL organic acid solution.

<sup>6)</sup> The calculated bead diameters using the mathematical model after 10 minutes reaction in 0.1 M 200 mL organic acid solution.

<sup>7)</sup> Experimental bead diameter using a microscope after 10 minutes reaction in 0.1 M 200 mL organic acid solution.



**Fig. 9.** pH change of the reused  $\text{CaCO}_3$  beads adjusted to the same as the total surface area of the initial  $\text{CaCO}_3$  beads in 0.1 M 100 mL organic acid solution. ○—○: initial used  $\text{CaCO}_3$  beads, △—△: second used  $\text{CaCO}_3$  beads, ◇—◇: third used  $\text{CaCO}_3$  beads, □—□: fourth used  $\text{CaCO}_3$  beads.

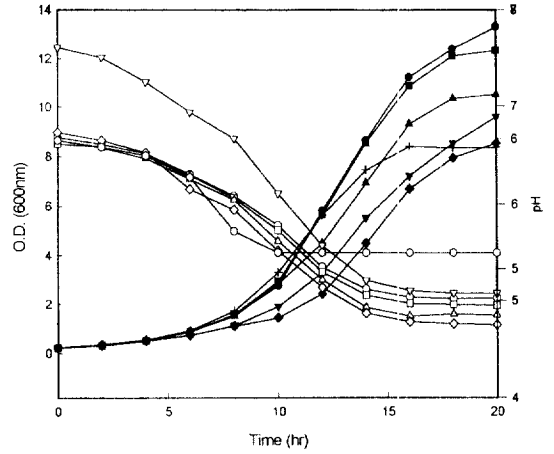


**Fig. 10.** pH change of the various diameter beads with the same total surface area by weight control in 0.1 M 100 mL organic acid solution. ▽—▽: 1.10 mm beads, △—△: 1.53 mm diameter beads, □—□: 1.75 mm diameter beads, ○—○: 2.00 mm diameter beads.

단위 부피당 넓은 표면적과 높은 완충효과를 가지는  $\text{CaCO}_3$  비드를 얻을 수 있다고 사료되었다.

비드 직경에 따른 *bifidobacteria* 배양액의 완충효과 및 균 증식도

직경이 각각 다르게 제조된  $\text{CaCO}_3$  비드를 2.5% glucose가 들어 있는 m-TPY 배지에 각각 20% 씩 첨가하여 *bifidobacteria*를 20시간 배양하면서 균증식에



**Fig. 11.** The growth of *Bifidobacterium longum* and pH change in TPY broth with the various diameter beads. ●—●: growth of *bifidobacteria* with 1.12 mm beads, ■—■: growth of *bifidobacteria* with 1.10 mm beads, ▲—▲: growth of *bifidobacteria* with 1.53 mm beads, ▼—▼: growth of *bifidobacteria* with 1.75 mm beads, ◆—◆: growth of *bifidobacteria* with 2.00 mm beads, +—+: growth of *bifidobacteria* by pH control with 2 N NaOH, ○—○: pH change with 1.12 mm beads, □—□: pH change with 1.10 mm beads, △—△: pH change with 1.53 mm beads, ▽—▽: pH change with 1.75 mm beads, ◇—◇: pH change with 2.00 mm beads, : pH change by pH control with 2 N NaOH.

다른 배양액내 완충효과를 조사한 결과와 배양액내 완충제로써 2 N NaOH 용액을 이용하여 pH가 5.5가 되도록 pH 조절 배양한 결과를 비교한 결과 Fig. 11과 같이 NaOH를 완충제로 이용한 pH 조절 배양의 경우 최대 균증식도가 흡광도(600 nm) 8.39로  $\text{CaCO}_3$  비드를 완충제로 이용한 배양보다 최대 37% 까지 낮은 균증식도를 나타냄을 관찰할 수 있었으며, 완충제로 이용한 비드의 직경의 크기가 작을수록 균증식도가 증가하는 반면 배양액내 최종 pH는 오히려 높게 유지되었다. 그러므로 *bifidobacteria* 배양을 위한 완충제로는 NaOH용액을 이용하는 것보다  $\text{CaCO}_3$  비드를 완충제로 이용하는 것이 더 효과적이며, 비드의 직경의 크기가 작을수록 배양액내 완충효과가 증가하여 균증식에 효율적인 배양환경을 제공하여 주는 것으로 사료되었다. 따라서 *bifidobacteria*의 고농도 배양에  $\text{CaCO}_3$  비드를 효과적으로 이용하기 위해서는 균증식에 따라 생성되는 유기산과 반응하는  $\text{CaCO}_3$  비드가 유기산과 반응하는 동안 비드입자가 사라지지 않는 범위의 직경을 갖는 가능한 한 작은 직경의 비드를 사용하는 것이 바람직하나 alginate에 고정화된 일정한 크기의 매우 작은 직경을 갖는  $\text{CaCO}_3$  비드를 다량으로 제조하

**Table 2. Comparison calculated bead diameter with experimental bead diameter after bifidobacteria incubation for 20 hours in 1 L TPY broth**

Bead Diameter (mm)	CaCO <sub>3</sub> Conc. <sup>1)</sup> (%)	Decrease of CaCO <sub>3</sub> <sup>2)</sup> (g)	Bead Diameter (mm)	
			Calculative <sup>3)</sup>	Experimental <sup>4)</sup>
2.00	15	22.6	1.67	1.69
1.75	15	28.1	1.36	1.31
1.53	15	31.9	1.13	1.12
1.10	15	38.5	0.72	0.69
1.12	18	41.2	0.76	0.79

<sup>1)</sup>CaCO<sub>3</sub> concentration of bead.

<sup>2)</sup>The amount of the decreased CaCO<sub>3</sub> per 200 g bead after incubation of bifidobacteria for 20 hours in 1 L TPY broth.

<sup>3)</sup>The calculated bead diameters using the mathematical model after incubation of bifidobacteria for 20 hours in 1 L TPY broth.

<sup>4)</sup>Experimental bead diameter using a microscope after incubation of bifidobacteria for 20 hours in 1 L TPY broth.

**Table 3. Buffering effects of the reused CaCO<sub>3</sub> beads and the growth of the bifidobacteria in 1 L TPY broth**

Bead Diameter <sup>1)</sup> (mm)	CaCO <sub>3</sub> Conc. <sup>2)</sup> (%)	Surface Area <sup>3)</sup> (m <sup>2</sup> )	The Amount of Beads <sup>4)</sup> (g)	pH <sup>5)</sup>	Cell Growth	
					OD (600 nm)	Viable Cell (cfu/ml)
1.67	15	0.3065	60.56	4.68	8.25	4.12 × 10 <sup>9</sup>
1.36	15	0.3113	79.25	4.76	9.57	4.35 × 10 <sup>9</sup>
1.13	15	0.3240	90.87	4.89	11.12	5.05 × 10 <sup>9</sup>
0.72	15	0.4128	114.32	5.01	12.56	6.76 × 10 <sup>9</sup>
0.76	18	0.4019	107.95	5.11	13.48	6.81 × 10 <sup>9</sup>

<sup>1)</sup>The calculated CaCO<sub>3</sub> bead diameters using the mathematical model.

<sup>2)</sup>CaCO<sub>3</sub> concentration of bead.

<sup>3)</sup>Calculated total surface area of beads after incubation of bifidobacteria for 20 hours in 1 L TPY broth.

<sup>4)</sup>The amount of added initial CaCO<sub>3</sub> beads in order to adjust to the same as the total surface area of initial beads.

<sup>5)</sup>The final pH of culture broth after incubation of bifidobacteria for 20 hours in 1 L TPY broth.

는데는 제조공정상 어려움이 있고, 또한 사용한 비드의 직경이 너무 작을 경우 균배양 후 배양액내 균체로부터 완전히 회수하는데 어려움이 있으므로 어느 정도 큰 직경을 갖는 비드를 배양액내 완충제로서 사용하는 것이 더 효율적이라고 사료되었다. 비드의 CaCO<sub>3</sub> 함량이 18%이고 직경이 크기가 1.12 mm인 비드의 경우 CaCO<sub>3</sub> 함량이 15%인 1.10 mm 직경의 비드보다 직경이 약간 크에도 불구하고 bifidobacteria 고농도 배양시 배양액내 완충효과와 균중식도에서 보다 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과는 비드의 질량에 대한 무게분율(f)을 크게함으로써 유기산 용액에 대해서 더 높은 완충효과를 나타낸 Table 1의 결과와 일치함을 관찰할 수 있었다. 20시간 동안 균배양에 사용한 각각의 비드에 대한 건조중량을 조사하고 비드의 감소한 CaCO<sub>3</sub>량을 산출한 후 이를 반응모델에 적용하여 반응한 비드의 이론적 직경값과 micrometer를 이용하여 실제 반응한 비드의 직경값을 서로 비교한 결과 일치하는 것으로 확인되었다(Table 2). 균배양후 감소한 비드의 직경으로부터 비드입자의 표면적을 구하여 초기 사용한 비드의 전체표면적과 같게 배양액에 새로운 비드를 첨가하고 비피더스균을 접종하여 20시간

배양한 후 균중식도와 배양액내 최종 pH를 조사한 결과를 Fig. 11의 결과와 비교해 보면 20 시간 균배양후의 균중식도가 거의 같은 수준을 나타내었고, 배양액내 완충효과도 같은 수준으로 유지됨을 확인할 수 있었다(Table 3). 따라서 bifidobacteria의 고농도 배양에 완충제로 사용한 CaCO<sub>3</sub> 비드가 균 배양 후 일정한 직경의 크기를 가진다면 새로운 비드를 첨가하여 사용한 비드의 재활용도 가능하다고 사료되어 졌다.

## 요 약

Bifidobacteria의 고농도 배양을 위한 배양액내 완충제로써 CaCO<sub>3</sub> 비드를 효율적으로 이용하기 위하여 유기산에 대한 비드의 반응특성과 유기산과 반응한 비드의 재사용 방안을 수학적 모델을 적용하여 검토하였다. 각각 다른 크기의 CaCO<sub>3</sub> 비드를 0.1 M의 혼합 유기산 용액과 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707이 접종된 배양액에 각각 첨가하여 반응시킨 후, 비드 표면으로부터 감소한 CaCO<sub>3</sub> 양을 수학적 모델에 의하여 산출한 비드의 직경값과 micrometer를 이용하여 반응한 비드의 직경을 직접 측정된 값을 비교한 결과 서



로 일치하였다. 그러므로, 수학적 모델이 유기산과 반응하는  $\text{CaCO}_3$  비드의 반응특성을 설명하는데 유용하게 이용되어 질 수 있음을 확인하였다. 각각 다른 크기의  $\text{CaCO}_3$  비드를 완충제로 사용한 배양액에 *Bifidobacterium longum*을 접종하여 37°C로 20시간 배양한 후,  $\text{CaCO}_3$  비드의 완충효과와 직경의 변화 및 *Bifidobacterium longum*에 대한 증식도를 측정된 결과 비드의 직경이 작을수록 더높은 완충효과와 균증식도를 나타내었으며, 또한 비드의 직경이 크게 감소하였다. 균배양액으로부터 회수한 비드의 직경을 조사하여 반응된 비드의 전체표면적을 산출한 후 초기 사용한 비드의 전체표면적과 같도록 새로운 비드를 첨가하여 bifidobacteria를 배양한 결과 초기 사용한 비드의 완충효과와 유사한 결과를 나타내었으며, 또한 배양액내 균증식도도 같은 수준으로 증식되었음을 알 수 있었다.

따라서 bifidobacteria 배양에 완충제로 이용된 비드를 균배양에 완충제로 재차 이용할 경우 비드가 일정한 크기를 갖고, 감소한 표면적과 같은 양의 새로운 비드를 첨가한다면 사용된 비드의 재활용 가능성도 있다고 사료되었다.

## 감사의 글

본 논문은 1997년도 한국과학재단의 산학협동과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문헌

1. Rasic, J.L. and Kurmann, J.A.: Bifidobacteria and their role, In *Experientia Supplementum*, Vol. 39, Birkäuser Verlag (1983)
2. Norio, I. and Seiichi, S.: Bifidobacteria, research and development in Japan, *Food Technol.*, 126-134 (1993)
3. Tomotari, M.: Bifidobacteria and their role in human

- health, *J. Ind. Microbiol.*, 6, 263-268 (1990)
4. Sykes, G. and Skinner, F.A.: Actinomycetales: characteristics and practical technique for the isolation and characterization of *Actinomyces* and *Bifidobacterium* species. Report of a panel discussion, In *Soc. Appl. Bact. Symp. Series No. 2*, Academic Press, London, p. 327-333 (1973)
5. Gilliland, S.E.: Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J. Food Prot.*, 42, 164-167 (1979)
6. Christion, C., Marie-Nèlle, M. and Patrick, B.: Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*, *J. Chem. Tech. Biotech.*, 53, 189-194 (1992)
7. Seiichi, S., Fumiaki, A., Norio, I., Hirochi, M., Tomoko, Y., Tomoko, A. and Mamour, T.: Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium species*, *J. Dairy Sci.*, 75, 3296-3306 (1992)
8. Desjardins, M.L., Denis, R., Christian, T. and Jacques, G.: Uncoupling of growth and acid production in *Bifidobacterium sp.*, *J. Dairy Sci.*, 73, 1478-1484 (1990)
9. Stadhouders, J., Jansen L.A. and Hup, G.: Preservation of starters and mass production of starter bacteria, *Neth. Milk Dairy J.*, 23, 182-193 (1969)
10. Claudine, P., Christian, C. and Patrick, B.: Production of concentrated *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* by coupling continuous fermentation and ultrafiltration, *J. Dairy Res.*, 55, 569-577 (1988)
11. Bernard, B., Yves, V., Gerard, G. and Alain, P.: High-concentration cultivation of *Lactococcus cremoris* in a cell-recycle reactor, *Biotech. Bioeng.*, 37, 746-754 (1991)
12. Open, U. and Thames P.: The effect of pH on growth. In *in vitro Cultivation of Microorganisms*. Butterworth-Heinemann Ltd., Linacre House. Jordan Hill, Oxford, p. 35-36 (1992)
13. Lee, K.Y., Hwang, I.B. and Heo, T.R.: Enhancement of cultivation efficiency of *Bifidobacterium longum* using calcium carbonate buffer system (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(1), 126-132 (1997)
14. Blancerte-zurita, M.a., Branion, R.M.R. and Lawrence, R.W.: Particle size effects in the microbiological leaching of sulfide concentrates by thiobacillus ferrooxidans. *Biotech. Bioeng.*, 28, 751-755 (1985)

(1997년 12월 10일 접수)