

Application of a *Undaria pinnatifida* for industrial cultivation of *Lactobacillus*

Bo Yoon Chang¹, Ji Hye Han¹, Ju-Hee Kim², Bum-Suk Cha², Sung-Ho Ann²,
Sung Yeon Kim^{1*}

¹Institute of Pharmaceutical Research and Development, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

²Young Science Scharlau Korea, Jeonnam Biotechnology Research Center, Hwasung 519-801, Korea

유산균의 산업적 배양을 위한 미역의 유용성 평가

장보윤¹ · 한지혜¹ · 김주희² · 차범석² · 안성호² · 김성연^{1*}

¹원광대학교 약학대학 약품연구소, ²영사이언스살라우코리아

Abstract

To optimize the medium composition of *Undaria pinnatifida* as a pH modulator the growth of *Lactobacillus plantarum* industrial scale, we analyzed the pH and growth characteristics of *L. plantarum* in basal medium. Subsequently, the medium compositions addition of carbon, nitrogen sources and buffering agents were optimized. When 0.5% yeast extract and 2% glucose, *L. plantarum* grew to maximum cell density in experimental condition. However, the growth of *L. plantarum* rapidly pH 4.0 in basal medium. A high alkali-ash value and low cost-effective utilization in the waste part as examined. Addition of *U. pinnatifida* extract alleviated the serious decrease. Among them, juice of *U. pinnatifida* was most helpful for the growth of *L. plantarum* (36.3 ± 1.810^8 CFU/mL). These results show that *U. pinnatifida* be large-scale cultivation of *L. plantarum*. This optimized *U. pinnatifida* medium can be used for safe and economical production of *Lactobacillus*.

Key words : *Lactobacillus*, medium, *Undaria pinnatifida*, industrial cultivation.

서 론

유산균은 직접 혹은 간접적으로 식품에 첨가되어 식품의 풍미와 조직을 개선하기 때문에 동서양을 막론하고 유제품 및 발효식품의 가공에 유용한 보조 수단으로 이용된다. 기능적인 측면으로는 배변 촉진, 위 자극에 대한 보호, 면역기능 강화 및 기타 특정 장 기관의 기능 강화 등의 효과가 입증 되었다. 이러한 과학적 근거를 바탕으로 유산균 시장은 기능성식품, 의약품, 화장품, 생균제(probiotics) 및 동물 사료에 이르기까지 그 응용범위가 넓어지고 있으며, 성장

가능성이 매우 큰 시장으로 평가되고 있다(1,2).

유산균은 실험실과 같이 소규모로 배양하는 경우, 편의를 위하여 Man, Rogosa, Shapre(MRS) 같이 제조회사에서 미리 조성을 맞춘 배지를 사용한다. 그러나 이러한 시판 배지는 대량배양에 적용하기에는 단가가 높아 산업 규모에서 배지의 가격대비 효율성을 높이기 위해 질소원, 단백질, 펩타이드, 영양 성분 및 미량의 무기물을 기본량으로 첨가하여 사용한다.

또한, 유산균을 고농도 배양하기 위해서는 배지 내의 pH를 일정 수준 이하로 떨어지지 않게 NaOH, 또는 NH₄OH 등과 같은 알칼리를 첨가하여 일정 pH를 유지시켜 주거나 신선한 배지로 계속 치환해주는 등 여러 가지 방법을 사용하고 있다(3,4).

그러나 이러한 pH 조절제의 사용은 배양액 내 이온강도를 지속적으로 증가시켜 균의 활력과 증식을 감소시킬 뿐만 아니라 많은 양의 알칼리 용액의 첨가로 인하여 배양액이

*Corresponding author. E-mail : sungykim@wonkwang.ac.kr
Phone : 82-63-850-6806, Fax : 82-63-853-6821
Received 6 February 2015; Revised 26 March 2015; Accepted 30 March 2015.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

희석되므로 균의 생화학적 환경변화를 가져올 수 있다(5). 따라서 이와 같은 pH 조절 방법을 이용할 경우 유산균의 효율적인 고농도 균체를 얻는데 한계가 있다.

김, 미역, 다시마와 같은 해조류에는 칼륨 이온이 많이 함유되어 있어 우수한 알칼리 식품으로 활용되고 있다. 그 중 미역은 우리나라에서 생산되는 양은 가식부를 기준으로 연간 약 50만여 톤에 이르고 있으나, 가식부 양의 약 40~50%에 이르는 뿌리, 줄기, 어린잎, 포자엽 등은 미역 폐기물로서 그대로 바다에 투기되고 있다(6,7).

폐기되는 이러한 미역의 활용 예는 극히 드물고, 미생물, 특히, 유산균 배양용 배지에 사용한 사례 또한 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 폐기되는 미역을 미생물 배양용 배지, 특히, 유산균 배양용 배지에 있어 종래 pH 조절을 위해 완충액으로 첨가되는 합성 화학물질을 대체하여 활용할 수 있는 방안을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

미역 첨가물 제조

전라남도 완도군에서 2013년 3월에 생산된 건조 상태의 미역(*U. pinnatifida*)을 사용하였다. 미역 추출물은 분쇄한 미역을 1%로 물과 혼합한 후 미역의 점성이 추출되지 않는 온도 조건인 60, 80°C에서 각각 30분 또는 60분 동안 가열 후, 원심분리하여 상등액을 사용하였다. 미역 착즙액은 분쇄한 미역을 1, 5, 10%로 물과 혼합한 후 80°C에서 30 분간 가열 후 착즙 후 원심분리 하였다. 미역분말은 건미역을 분쇄기를 이용하여 40 mesh의 입자크기로 분쇄하였다.

추출액과 착즙액은 액상 상태의 용매로 사용하였으며, 분말의 경우에는 분말의 상태로 첨가하였고 배지 제조시 용매는 증류수를 사용하였다.

균주 및 배지

연구에 사용한 *L. plantarum* 균주는 한국 미생물보존센터(KCCM 11322, ATCC 8014)으로부터 분양 받았고, MRS 배지에서 3회 이상 계대배양을 거쳐 glycerol stock법으로 -70°C에 균주를 보관하였다. 배양배지는 공개되어 있는 기존 유산균 생산업체의 자료를 기본으로 고가의 성분을 제외한 기본 영양배지 제조 후(Table 1) 탄소원, 질소원 및 미역의 조성을 달리하여 제조한 배지를 사용하였다. 모든 배지는 121°C에서 15분간 멸균하였다.

유산균 증식

균수의 배양시간에 따른 증식을 조사하기 위해 생균수, 흡광도, 및 pH 변화를 배양 0, 6, 12, 18, 24시간에 측정하였다. 생균수는 균배양액을 0.1% 생리식염수로 10배씩 연속적으로 희석시키고, 그 희석액 1 mL에 plate count agar 9

mL을 혼합하여 pour method로 확인하였다. 흡광도 측정은 spectrophotometer를 이용하여 일정시간에 따라 채취한 배양액을, 생리 식염수를 이용하여 10배 희석한 후 600 nm에서 측정하였다. 배양에 따른 pH는 변화를 측정하기 위하여 10% 암모니아수로 pH를 5로 조절한 배지 및 pH 보정없이 미역이 첨가된 배지들의 배양하면서 pH를 측정하였다.

Table 1. Effect of various culture media composition on the cell growth of *L. plantarum*

Components (%)	Basal medium	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Glucose	2.0	2.0	1.0	1.0	2.0
Yeast extract	1.5	1.0	1.0	0.5	0.5
Casein	1.0	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25
KH ₂ PO ₄	2.0	0.1	0.1	0.1	0.1
K ₂ HPO ₄	2.0	0.1	0.1	0.1	0.1
MgSO ₄	0.01	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	1.0	0.05	0.05	0.05	0.05
Vitamin C	0.8	-	-	-	-
Tween 80	0.1	0.05	0.05	0.05	0.05
CFU/mL (10 ⁸)	4.2±0.2	3.9±0.6	1.9±0.4	2.3±0.9	5.0±1.5

5 L 발효조 배양

최적화 배지의 산업적 유용성을 평가하기 위하여 5 L 발효조(Kobiotech, Incheon, Korea)를 사용하여 *L. plantarum*를 배양하였다. Working volume을 4 L로 제조하였다. MRS 액체배지에 접종하여 전 배양 시킨 유산균을 10%로 본 배양배지에 접종하였다. 배양온도 37°C, 교반속도 180 rpm으로 24시간 후 균을 채취하여 생균수를 확인하였다.

결과 및 고찰

산업용 기본배지 조성

산업 규모에서 배지의 가격대비 효율성을 높이기 위한 기본배지 조성 결정을 위해 탄소원과 질소원의 농도에 따른 유산균의 증식을 비교하였다. MRS 배지 조성을 기본화한 후, 질소원을 1%로 고정하고, 탄소원인 glucose의 함량은 2%에서 1%로 낮췄을 때 3.9±0.6×10⁸ CFU/mL에서 1.9±0.4×10⁸ CFU/mL로 유산균 증식률이 52% 줄어들었다. 그러나 탄소원을 1%로 고정하고 질소원인 yeast extract을 1.5%에서 0.5%로 줄여도 질소원에 의한 변화는 1.9±0.4×10⁸ CFU/mL와 2.3±0.9×10⁸ CFU/mL로 질소원에 의한 유산균 증식률의 변화는 없었다. 이러한 결과를 통해 본 조건하에서 유산균의 증식에는 탄소원의 영향이 큰 것으로 판단하여, 질소원의 함량을 0.5%로 줄이는 기본배지 조성 Test 4를 기본배지 조성으로 결정하였다.

유산균 배양에 따른 pH 및 유산균 증식능 변화

유산균 배양 중 pH 변화에 따른 유산균 증식능의 변화를 알아보기 위해 pH를 조절하지 않은 기본 배지, 암모니아수로 pH 5.0를 조절한 기본배지 및 pH를 조절하지 않은 미역 첨가배지에 대하여 배양 0, 6, 12, 18, 24 시간에 pH 및 흡광도를 측정하였다.

그 결과, pH를 조절하지 않은 기본 배지의 경우 pH가 배양 6시간까지 급격히 저하되고, 12 시간 이후 pH가 4 이하까지 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 배양 12 시간 이전에는 유산균의 증식을 나타내는 흡광도 값이 지속적으로 증가하였으나, pH의 저하는 생육 저해로 이어져 배양 12시간 이후에는 더 이상의 흡광도의 증가 없이 일정한 수준에 머무는 것을 관찰할 수 있었다.

반면, 배양 중 pH 5로 유지한 배지에서 균의 증식은 지속적으로 이루어져 관찰최종 시간인 배양 24시간에는 흡광도 23의 값이 관찰 되었다.

미역첨가 배지의 경우, pH 유지를 위한 알칼리용액의 첨가없이도 12 시간 배양 후에 pH는 4.9에서 4.1까지 유지 되었으며, 유산균의 증식도 계속 이루어져 흡광도 값은 15에서 23까지 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는, 인위적으로 pH를 5로 조절한 기본배지 결과와 유사하다(Fig. 1).

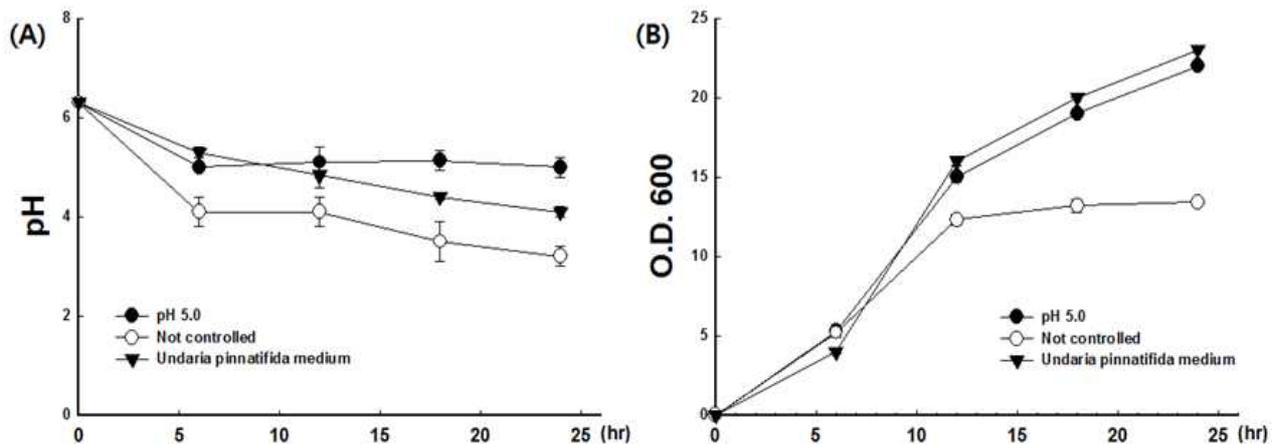


Fig. 1. Effects of *Upinnatifida* in the pH-stat controlled 5 L-jar cultivation of *L. plantarum*.

미역의 전처리 방법에 따른 유산균 증식능

산업적 이용을 위해 5 L 발효조에 기본배지를 바탕으로 미역의 첨가방법에 따른 유산균의 증식능을 확인하고자 미역을 추출, 착즙, 분말 상태로 기본배지에 첨가하고 유산균을 배양 후 유산균수를 측정하였다.

1% 미역 추출의 조건을 60°C에서 30, 60분 그리고 80°C에서 동일 시간으로 설정하고 유산균 증식에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 추출시간에 따른 유산균 증식능의 변화는 관찰되지 않았으며, 80°C, 30분 조건에서 추출 후 제조된 배지에서 $11 \pm 0.8 \times 10^8$ CFU/mL로 가장 많은 유산균

이 배양됨을 확인하였다(Table 2). 미역착즙액의 경우, 1, 5, 10% 농도의 착즙은 유산균 증식에 있어 농도의존적인 효과가 나타나지 않았다. 미역 분말을 농도별로 첨가한 배지 중, 0.5%, 1%와 1.5% 첨가시에는 각각 12.6 ± 1.7 ,

Table 2. Effects of different methods of extracting *U.pinnatifida* on the growth of *L. plantarum* in a basal medium

<i>Undaria pinnatifida</i> extract CFU/mL (10^8)	30 min	60 min
60°C	7.5 ± 0.4	5.5 ± 0.4
80°C	11 ± 0.8	4.8 ± 0.2

Table 3. Effect of *U. pinnatifida* juice on the growth of *L. plantarum* in a basal medium

<i>Undaria pinnatifida</i> juice	1%	5%	10%
CFU/mL (10^8)	36.3 ± 1.8	35.2 ± 0.2	34.4 ± 2.7

Table 4. Effect of *U. pinnatifida* powder on the growth of *L. plantarum* in a basal medium

<i>Undaria pinnatifida</i> powder	0.5%	1%	1.5%	2%
CFU/mL (10^8)	12.6 ± 1.7	14.8 ± 3.4	18.1 ± 2.8	0.1 ± 0.04

14.8 ± 3.4 과 18.1 ± 2.8 (10^8 CFU/mL)의 유산균 증식을 나타내었으나, 2%로 첨가된 배지에서는 사용된 다른 농도에 비해 100분의 1 수준으로 증식능 저하되는 현상이 관찰되었다(Table 4). 미역 첨가 비율 1%를 기준으로 80°C, 30분 추출, 착즙, 분말 첨가 배지의 유산균수를 비교해 보았을 때 각각 11.0 ± 0.8 , 36.3 ± 1.8 과 14.8 ± 3.4 (10^8 CFU/mL)로 착즙으로 배지에 첨가시 가장 많은 유산균 수를 나타내었다(Fig. 2).

유산균 중에서, 김치 발효 등에 많이 관여하는 것으로 알려져 있는 *L. plantarum*은 생육효율과 젖산 생산량이 우수하여 생균제 균주로 널리 이용되고 있다(8). 그러나 유산

균 생산 배지는 다른 균종에 비하여 가격이 비싸므로 유산균을 다양한 산업적 분야에 널리 보급하는 데 제한요인이 될 수 있다. 실제로 생균제의 효과적이고 경제적인 이용을 위해서는 최적 배지 조성의 결정이 매우 중요하다(9). 미생물을 이용한 발효과정의 생산성은 배지의 영양성분에 따라서 그 효율이 달라지기 때문에 탄소원, 질소원 그리고 무기물원을 포함하는 배지성분의 경제적 도출은 발효의 생산성에 있어 매우 중요한 요인으로 작용한다(10). 이러한 경제적 배지의 도출을 위하여 다양한 방법들이 개발되어 왔다(11-13).

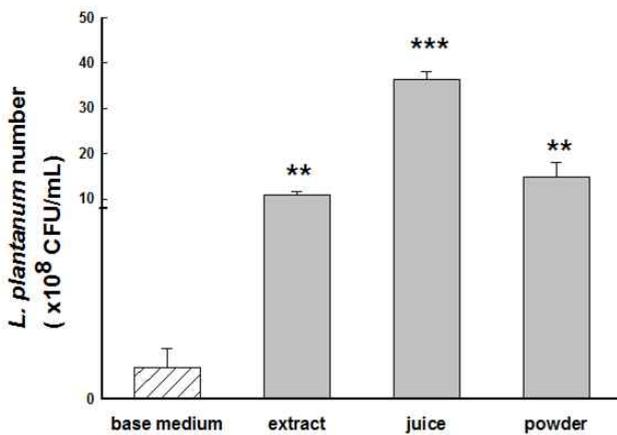


Fig. 2. Effect of *U. pinnatifida* on the growth of *L. plantarum* in a basal medium.

The values were presented as mean±SD ** p<0.01, ***p<0.001 significantly different from the untreated group.

본 연구에서도 단가가 낮으면서 유산균 배양이 충분이 이루어져 산업적 규모로 활용이 가능한 배지를 개발하고자 하였다.

기본 배지는 탄소원으로 glucose, 질소원으로 yeast extract, 무기염류로는 ammonium sulfate를 활용하여 선정하였다(Table 1). 탄소원을 포함하는 유산균 배양용 배지 조성물에 있어서, 균주가 성장하는 동안 탄소원 으로부터 전환된 유산, 초산, 개미산 등에 의해 배양액의 pH가 저하되며, 균체 성장에 영향을 미치게 된다. 이를 보완하기 위해서는 pH-stat 조절 방식으로 화학물질을 투입하여 일정한 pH를 유지시켜 균체를 배양한다(14-16). 하지만, 유산균은 균체를 동결건조하여 바로 제품화하기 때문에 pH 조절에 사용되는 화학물질의 종류나 사용량이 제한적이다. 특히, 열기성 화학물질의 추가 첨가는 유산균의 발효 식품으로의 이용이라는 기능적 용도에 결코 바람직하지 않은 문제가 있다.

그렇기 때문에 본 연구에서는 식품으로 이용이 가능한 알칼리 성분의 해조류를 활용하여 유산균 배양배지를 제조하였다. 해조류는 바이오매스가 풍부한 해양생물자원으로

알려져 있으며, 대량 양식 기술의 개발로 수산물 생산량의 약 20%를 차지하고 있다. 해조류는 식용, 약용 사료 또는 해조공업의 원료로 이용되어왔으며, 종류 또한 갈조류 135종 남조류 48종, 홍조류 355종으로 다양하다. 이중 식생활에 이용되는 종류는 약 70종이며, 가장 흔히 이용되고 있는 해조류 중 갈조류에 속하는 미역은 100 kg당 단백질 6.8 kg, 당질 43.8 g 섬유질 7.5 g 칼슘을 함유 하고 있다(5,6,17,18). 또한 김, 미역, 다시마의 pH를 측정해 보았을 때 미역이 가장 높은 pH를 나타냄에 따라 미역을 유산균 배양 배지의 첨가물로서 선정하였다.

미역의 최적의 첨가 방법을 찾고자 추출, 착즙, 분말의 형태로 배지를 제조하여 유산균 증식능을 평가하였을 때 미역의 첨가를 통해 pH의 보정없이 유산균 증식능이 증가 되는 것을 확인하였으며 이러한 실험 결과를 통해, 폐기되어 환경오염원이 되는 가식부 외 미역부분을 첨가함으로써 종래 pH 조절을 위해 완충액으로 첨가되는 합성 화학물질을 대체하여 활용될 수 있음을 확인하였다.

미역을 활용한 최적화 배지의 산업용 활용을 위해 5 L 발효조를 이용하여 *L. plantarum*을 배양하였을 때, 따로 pH 조절이 필요 없이도 균체 성장 및 pH가 암모니아수를 통해 pH를 5.0으로 유지시킨 시험군과 비슷하게 유지되는 결과를 확인하였다.

미역첨가 기본배지 선정에 따라 산업용으로 사용되어지는 배지 단가를 2.4배 절감효과와 높은 균체 수율 등 충분한 경제적 장점을 기대할 수 있다. 이러한 연구결과는 미역을 유산균 배양에 이용함으로써 해조류의 식이섬유 등이 갖는 정장작용에 유산균이 시너지 효과를 나타낼 뿐만 아니라 폐기되는 천연 식물자원을 활용함으로써 새로운 부가가치 창출과 환경오염을 예방하는 효과를 기대할 수 있다.

요 약

산업적 유산균 배양의 가격대비 효율성을 높이기 위하여 질소원, 탄소원 및 무기염류를 기본량으로 기본배지를 제조하고, 효율적인 고농도 유산균체를 수득하기 위하여 pH 조절제로서 따로 첨가되어지는 합성 화학물질을 대신하여 미역을 실험에 사용하였다. 미역의 최적의 첨가 방법을 찾고자 추출, 착즙, 분말의 형태로 배지를 제조하여 유산균 증식능 평가한 결과, 착즙의 형태에서 유산균 증식능이 가장 큰 것으로 확인되었다. 이러한 실험 결과를 통해, 폐기되어 환경오염의 원인이 되는 가식부 외 미역을 유산균 배양배지에 착즙형태로 첨가함으로써 종래 pH 조절을 위해 완충액으로 첨가되는 합성 화학물질을 대체하여 활용될 수 있음을 확인하였다. 또한 미역첨가 기본배지 선정에 따른 배지 단가를 절감하면서 높은 균체 수율을 얻는 등 충분한 경제적 장점을 기대할 수 있다. 이러한 연구결과는 미역을 이용한

으로써 배양 시 해조류의 식이섬유 등이 정장작용에 유산균의 시너지 효과뿐만 아니라 폐기되는 천연 식물자원을 활용함으로써 새로운 부가가치 창출과 환경오염을 예방하는 효과를 기대할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 “산업통상자원부”, “한국산업기술진흥원”, “호남지역사업평가원”의 “광역경제권 선도산업 육성사업” R0002194로 수행된 연구결과입니다.

References

- Vijayakumar M, Ilavenil S, Kim DH, Arasu MV, Priya K, Choi KC (2015) In-vitro assessment of the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* KCC-24 isolated from Italian rye-grass (*Lolium multiflorum*) forage. *Anaerobe*, 32, 90-97
- Shen X1, Yi D, Ni X, Zeng D, Jing B, Lei M, Bian Z, Zeng Y, Li T, Xin J (2014) Effects of *Lactobacillus plantarum* on production performance, immune characteristics, antioxidant status, and intestinal microflora of bursin-immunized broilers. *Can J Microbiol*, 60, 193-202
- Ha DM (2002) Food microbiology. Shinkwang Publishing Co, Seoul, Korea, p 221-272
- Christian C, Madec MN, Patrick B (1992) Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. *J Chem Technol Biotechnol*, 53, 189-198
- Open U, Thames P (1992) The effect pH on growth. In vitro cultivation of microorganisms, Jordan Hill, Utterworth-Heinemann Ltd Linacre House, Oxford, UK, p 35-36
- Kim KH, Kim CS (1982) Studies on the manufacture of *Underia pinnatifida* laver and it's physicochemical properties - I. Histochemical properties. *Korean J Food Sci Technol*, 14, 336-341
- Kim HS (2004) Studies on extracts processing of a by-products of *Undaria pinnatifida* and growth response to horticultural crops treated with seaweed materials. MS Thesis, Sunchon National University, Korea, p 36-38
- Erdene G, Eom HJ, Kim BS, Ko JH, Han NS (2011) Mannitol production by *Leuconostoc citreum* KACC 91348P isolated from kimchi. *J Microbiol Biotechnol*, 21, 968-971
- Gao X, Qiao S, Lu W (2009) Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology. *Lett Appl Microbiol*, 49, 556-561
- Hauhan K, Trivedi U, Patel KC (2007) Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus sp.* KCP01 using date juice. *Bioresour Technol*, 98, 98-103
- Abdel-Fattah Y (2002) Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus sp.* using Box-Behnken experimental design. *Biotechnol Lett*, 24, 1217-1222
- Bas D, Boyaci I (2007) Modeling and optimization I : usability of response surface methodology. *J Food Eng*, 78, 836-845
- Chhaya U, Gupte A (2010) Optimization of media components for laccase production by litter dwelling fungal isolate *Fusarium incarnatum* LD-3. *J Basic Microbiol*, 50, 1-9
- Adamberg K, Kask S, Laht TM, Paalme T (2003) The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria : a pH-auxostat study. *Int J Food Microbiol*, 85 171-183
- Herbert D, Elsworth R, Telling R C (1956) The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *J Gen Microbiol*, 14, 601-622
- Janet R Stein (1975) Handbook of phycological methods, culture Methods and growth measurements. Cambridge University Press 8, 24-48
- Takai M, Miyazaki Y, Tachibana H, Yamada K (2014) The enhancing effect of fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* on immunoglobulin production by mouse spleen lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 78, 1743-1747
- Itoh M, Kashiwagi M, Arimochi H, Morita K (2012) In vitro cytotoxic effect of ethanol extract prepared from sporophyll of *Undaria pinnatifida* on human colorectal cancer cells. *Phytother Res*, 26, 191-196