[UCI]I804:24011-200000232686

2006년 8월

碩士學位論文

EPS 생산 및 *Helicobacter pylori* urease에 억제효과가 있는 김치유산균 발효공정 최적화

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

조 림

EPS 생산 및 *Helicobacter pylori* urease에 억제효과가 있는 김치유산균 발효공정 최적화

Optimization of fermentation process on the producing EPS and inhibition of *Helicobacter pylori* urease by lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*

2006년 8 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

조 림

EPS 생산 및 *Helicobacter pylori* urease에 억제효과가 있는 김치유산균 발효공정 최적화

지도교수 이 중 헌

이 논문을 공학석사학위신청 논문으로 제출함.

2006 년 4 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

조 림

조 림의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 차 월 석 인

위 원 조선대학교 교수 권 규 혁 인

위 원 조선대학교 교수 이 중 헌 인

2006 년 5 월

조 선 대 학 교 대 학 원

목 차

ABSTRACT ····· 1

서 론 ····· 4

Ⅰ. *EPS(Exo-polysaccharide)*생산 김치유산균 발효공정 최적화

Ⅰ-*1.* 서 론 ····· 7

Ⅰ-*2.* 실험 재료

1. 균주 및 보관 방법 ····· 9

2. 시약 및 기기 ····· 9

3. 배지조성

가. 탄소 원 종류 및 농도에 따른 영향 ····· 10

나. 질소원 종류 및 농도에 따른 배양 ····· 10

다. 기타 배지성분 농도에 따른 영향 ····· 11

라. 온도에 따른 영향 ····· 11

마. *pH* 조건에 따른 영향 ····· 11

바. 정치배양과 교반속도의 영향 ····· 11

Ⅰ-*3.* 실험 방법

1. 배양방법 ····· 14

2. 분석방법 ····· 14

2-1. 흡광도 및 EPS 농도 측정 ····· 14
2-2. 탄소 원 농도 측정 ····· 14
Ⅰ-4. 실험결과 및 고찰
1. 탄소 원 종류 및 농도에 따른 생장 특성 ····· 17
2. 질소원 종류 및 농도에 따른 배양 특성 ····· 20
3. 미량 원소 농도에 따른 생장 특성 ····· 25
4. 온도변화에 따른 배양특성 ····· 28
5. pH 조건에 따른 생장 특성 ····· 32
6. 정치배양 및 교반속도에 따른 생장 특성 ····· 34
7. 회분 식 및 유가 식 배양공정 최적화
7-1. 회분 식 배양 공정 ····· 36
7-2. 유가 식 배양공정 초기화 ····· 36
7-3. 교반속도에 따른 유가 식 배양 ····· 37
Ⅰ-5. 결 론 ····· 42
Ⅱ. *Helicobacter pylori urease*에 억제효과가 있는 김치 유산균 발효공정 최적화 및 억제효과 연구
Ⅱ-1. 서 론 ····· 45
Ⅱ-2. 실험 재료
1. 균주 및 보관방법 ····· 47
2. 시약 및 기기 ····· 47

Ⅱ-3. 실험 방법

1. 배양 방법 ····· 47
2. 분석방법
2-1. 세포 농도, 단백질 농도 및 *glucose* 농도 측정 ····· 49
2-2. *urease* 측정 ····· 49
2-3. 유산균 발효액에 의한 *urease* 억제효과 ····· 49

Ⅱ-4. 결과 및 토론

1. 배양 공정 최적화 ····· 50
1-1. 탄소 원 농도에 따른 생장 특성 ····· 50
1-2. 질소원 농도에 따른 생장 특성 ····· 53
1-3. 미량 원소 농도의 영향 ····· 57
1-4. 온도 및 *pH*에 따른 영향 ····· 60
1-5. 정치배양 및 교반속도에 따른 영향 ····· 63
1-6. 회분 식 및 유가 식 배양 공정 최적화 ····· 65
2. *urease* 반응 매개변수 결정 ····· 69
3. *urease* 효소활성에 대한 발효액의 억제효과 ····· 71
4. 발효 배양액을 이용한 *urease* 저해 제 측정 ····· 74
5. 유가 식 발효를 이용한 *urease* 저해제인 단백질 생산물 ····· 76

Ⅱ-5. 결 론 ····· 78

참고 문헌 ····· 79

List of Tables

Table 1. Medium composition for lactic acid bacteria isolated from *kimchi* ····· 13

Table 2. Determination of urease inhibition coefficient by changing inhibitor concentration ····· 73

List of Figures

Fig. 1. Generalized diagram of the conversion of lactose, galactose and glucose to EPS in lactic acid bacteria ····· 8
Fig. 2. Standard curve for the determination of sucrose concentration ····· 16
Fig. 3. Effect of Carbon source on cell growth (30℃, pH 6.5) ····· 18
Fig. 4. Effect of Sucrose concentration on the lactic acid bacteria (isolated from Kimchi) and EPS(exo-polysaccharide) production using batch fermentation ····· 19
Fig. 5. Effect of ammonium source on cell growth (30℃,pH6.5) ····· 21
Fig. 6. Effect of Ammonium citrate concentration on cell growth using micro plate reader (30℃) ····· 22
Fig. 7. Effect of peptone concentration on cell growth (30℃) ····· 23
Fig. 8. Effect of yeast extract concentration on cell growth(30℃) ····· 24
Fig. 9. Effect of sodium acetate concentration on cell growth using micro plate reader(30℃) ····· 26
Fig. 10. Effect of potassium phosphate concentration on cell growth using micro plate reader(30℃) ····· 27
Fig. 11. Lactic acid bacteria fermentation at 25℃(pH6.5) ····· 29
Fig. 12. Lactic acid bacteria fermentation at 30℃(pH 6.5) ····· 30
Fig. 13. Lactic acid bacteria fermentation at 37℃(pH 6.5) ····· 31
Fig. 14. Effect of pH on cell growth(30℃) ····· 33
Fig. 15. Effect of agitation speed of fermenter on cell growth.(30℃, pH6.5) ····· 35
Fig. 16. Batch cultivation of producing EPS of lactic acid bacteria isolated from Kimchi(30℃,pH6.5) ····· 38
Fig. 17. Schematic diagram of fed batch fermentation process with stirred

tank (37℃, pH 6.0) ····· 39
Fig. 18. Time course of the fed batch cultivation with lactic acid bacteria isolated from Kimchi(37℃,pH6.0) ····· 40
Fig. 19. Time courses of the cell growth using fed batch with lactic acid bacteria isolated from Kimchi(37℃,pH6.0) ····· 41
Fig. 20. Effect of glucose decrease on cell growth(30℃, pH6.0) ····· 51
Fig. 21. Effect of cell mass on cell growth (30℃, pH6.0) ····· 52
Fig. 22. Effect of peptone concentration on cell growth(30℃) ····· 54
Fig. 23. Effect of yeast extract on cell growth (30℃) ····· 55
Fig. 24. Effect of ammonium citrate concentration on cell growth(30℃) ··· 56
Fig. 25. Effect of dipotassium phosphate concentration on cell growth (30℃) ····· 58
Fig. 26. Effect of sodium acetate concentration on cell growth(30℃) ····· 59
Fig. 27. Effect of temperature on cell growth (pH6.0) ····· 61
Fig. 28. Effect of pH on cell growth (30℃) ····· 62
Fig. 29. Effect of agitation speed of fermenter on cell growth ····· 64
Fig. 30. Batch cultivation of lactic acid bacteria isolated from Kimchi(37℃, pH6.0) ····· 67
Fig. 31. Time courses of the lactic acid bacteria growth using fed batch cultivation(37℃, pH6.0) ····· 68
Fig. 32. (a) The changes of initial urea degradation rate with the changes of urea concentration. (b) LineweaverBurk plots for determining urease V_m and K_m values. The initial urea degradation rate was measured at 30°C, pH 6.8. The enzyme concentration was 6.667 mg/L. Where, the slope of linear least square fit is 38.14 and y intercept is 148.3 ····· 70
Fig. 33. LineweaverBurk plots for inhibition of *Lactobacillus* culture broth

on urease for the degradation of urea at 30°C, pH 6.8. Concentration of protein in culture broth for curves was 0, 1, 2, and 4 mg/L, respectively; the enzyme concentration 6.667 mg/l. The inset represents the plot of apparent Michaelis constant (K_m) versus the concentration of protein in culture broth for determining the inhibition constant. The line was drawn using linear least-squares fit 72

Fig. 34. The changes of ammonium concentration by urease for different urease inhibitor concentration. Lines represent the computer simulation value and symbols experimentally measured ammonium concentration after 15 min. The inset represents the plot of linear relation between urease inhibitor and produced ammonium concentration. The line was drawn using linear least-squares fit 75

Fig. 35. Time courses of the *lactic acid bacteria* growth using fedbatch cultivation 77

ABSTRACT

*Optimization of fermentation process on the producing EPS and inhibition of **Helicobacter pylori** urease with **Lactic acid bacteria** Isolated from Kimchi*

Joe lim

Advisor : Prof. Lee, Jung-Heon, Ph.D.

Department of Chemical Engineering.

Graduate School of Chosun University

The pro-biotic lactic acid bacteria used to produce EPS (Exo-polysaccharide) and inhibited *Helicobacter pylori* urease. Many thesis didn't report optimization of fermentation process using MRS broth components. Some thesis used industrial broth, optimized the culture conditions for lactic acid bacteria isolated from Kimchi.

In this research tried to optimize MRS broth components for improving production and decreasing the broth cost at laboratory. We used two finds of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. The one is producing EPS(Exo-polysaccharide) with lactic acid bacteria isolated from Kimchi. We were already optimized culture conditions using MRS broth components. The optimal broth components were peptone 1 g/L, yeast extract 0.5 g/L, ammonium citrate 2 g/L, sodium acetate 1 g/L, dipotassium phosphate 1 g/L and optimal temperature and pH for growth and EPS production in batch cultivation were found to be 30℃ and 6.5, respectively. There was 100rpm agitation and the optimum aeration was between the 1.0~2.0 vvm. The suitable sucrose concentration was 30 g/L for both lactic acid bacteria

growth and EPS production. Using these conditions the maximum cell mass and EPS production were 5.12 g/L and 0.5 g/L in the batch cultivation. Using these conditions we started fed batch cultivation. The feeding medium was condensed by 10times, and we supplied substrate by 1 mL/min after 12hr. The cell growth and exo-polysaccharide production have been improved as cultivation time goes by. We increase the agitation speed between 100~150 rpm, because of decreasing oxygen concentration in a fermenter. These conditions were fit in cell growth and exo-polysaccharide production. The maximum cell growth was 13.6 g/L and exo-polysaccharide was 7.21 g/L. For considering substrate decreases, we used DO stat method.

At the second research we have been studied inhibition of *Helicobacter pylori* urease of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Using batch reactor and micro plate reader, we have found out optimal conditions for second *lactic acid bacteria*. In the batch reactor system, the optimum aeration rate was 1vvm at the initial pH 6.0 and 37℃. For the agitation speed, we have used stational cultivation. The maximum cell mass was 5.16 g/L. With these conditions we have developed fed batch fermentation. Using DO stat control method, we were supplied substrate by 5 mL/min after 16hr, and condensed medium by 10times. There was no agitation speed, just controlled aeration between 1~2vvm. The maximum cell growth was 10.9 g/L.

At the third research we have been found the *Lactobacillus* strains isolated from fermented Kimchi produced *H. pylori* urease inhibitor which is not known by far. The inhibition types of enzymes kinetics was competitive inhibition with substrate urea and the inhibition constant was estimated from experimental data. The enzyme kinetic parameters of urease were 6.743 x 10^{-3} mM/min for

Vm and 0.257 mMfor Km. With the increase of protein concentration in culture broth, the enzyme reaction was decreased. The change of Km was proportional to inhibitor concentration and we determined that the enzyme kinetics follows competitive inhibition and its inhibition constant Ki is 7.57 mg/l. The *H. pylori* urease inhibitor production with *Lactobacillus* fermentation was 46 mg/l and its production was greatly improved with fed batch fermentation.

서 론

유산균은 인류의 생활과 밀접한 관계를 가지고 있으며 사람, 동물의 소화관이나 질에 상재 균 총으로서 분포되어 있다. 특히 최근에 장내 균 총의 연구가 비약적으로 진보됨에 따라 사람이나 동물의 건강에 있어서 유산균의 역할이 점차 밝혀지게 되고 발효유, 유산균음료 등 유산균을 함유한 기능성 식품이 주목받고 있다.

한국에서는 대표적인 전통 발효식품인 김치의 독특한 맛과 장기간의 보존을 위하여 유산균이 사용되어왔다. 한국인 식생활에 중요한 식품이며 유산균과 효소에 의해 김치특유의 풍미, 석이 섬유소, 비타민, 무기질 등을 공급해주는 우수한 식품이다.(박,1995). 김치 유산균은 크게 *Leuconostoc*과 *Lactobacillus*의 두 가지 속으로 나뉜다. *Leuconostoc*은 동그란 구형의 모양을 하고 있는 유산균으로서 대표적으로 *Leuconostoc mesenteroides*라는 균종이 발효의 주 균으로 알려져 있다. 이 균종은 김치가 맛있다고 느껴질 때까지 발효를 주도하는 유산균으로 알려져 있고 김치 발효초기에는 *Leuconostoc*속에 속하는 다양한 균종인 *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc lactis* 등이 존재한다. 이러한 *Leuconostoc*속의 균종의 특징이라면 dextran이라는 식이섬유를 스스로 만들어 내는 것이다. 이러한 성질을 이용하여 외국에서는 혈관이 막힌 곳을 뚫어주는 혈전용 해제로 사용하고 있기도 하고 기능성 식품에도 응용하고 있다. 한국 전통음식의 하나인 깍두기에 있는 끈적끈적한 국물이 바로 dextran이다. 이렇게 생성된 식이섬유는 변비에 도움이 된다고 보도되었다. 김치 유산균의 다른 하나의 대표적인 균주로서 우리가 잘 알고 있는 막대기 보양의 *Lactobacillus*이다. 김치에는 대표적으로 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus brevis*라는 유산균으로 알려져 있다. 이런 균주들은 김치 발효가 많이 되어 신맛이 날 때 생장하는 균으로서 내 산성이 강하고 내 담즙성이 강하다. 김치 유산균의 이러한 특성을 이용하여 최근에 와서는 각종 기능성 식품개발과 김

치발효에 이용되고 있고 산업적으로 활발히 진행되고 있다. 비록 산업적으로 김치유산균에 대한 대량 생산을 진행하여 각종 기능성 식품에 이용하고 있지만 최적배양 조건에 있어서 대량 생산이 가끔씩 중요한 문제로 나서고 있다. 그것에는 배양조건에 따른 비용과 대량 생산 조건 등 원인들이 존재한다. 현재 실험실에서 유산균 배양에 사용되고 있는 MRS broth는 고가의 배양배지로서 최적배양조건을 찾아내어 저가의 배양조건으로 고부가가치의 대량 배양하는 방법을 고려해볼 가치가 있는 것이다.

본 연구에서는 EPS 생성 및 *Helicobacter pylori* urease에 억제효과가 있는 김치유산균의 최적배양조건을 알아보려고 한다. 김치유산균에 의해 생산되는 EPS (Exo-polysaccharide)는 다당류의 일종으로서 그것에 대한 연구는 제품 내 다당류 공급원을 미생물 다당류로 대체한 이후부터 활발히 이루어져 왔다.[1,2] 특히 연구결과 중에 상당수의 유산균들 중에 미생물 다당류를 생산하고 있다고 사실이 밝혀 진 바 있고 특히 북부유럽제국들에서는 점질 물 생산 유산균들이 매우 오래 전부터 사용되어 왔다.[3] 이들 점질 물 생성균주들은 Nordic ropy 발효유제품들과 코카서스지방의 kefir 및 북유럽 국가들의 villii, piima, langfil, taette 등의 전통적인 점성 발효유제품에 사용되었고[4] 이들 제품 중의 점성 물질은 생성균주들의 협막, 균체 등 다당류 생성에 의해 유래된 것으로 그 균종에 따라 구성당의 종류와 비율이 서로 다르다는 것이 밝혀진 바 있다.[5-12] 최근에는 김치EPS생산 김치유산균은 중요한 유산균 일종으로서 다른 유산균에 비하여 다당류 생산이 우수한 특성을 갖고 있으며 유산균에 의해 생성된 EPS는 자체로는 에너지원으로 이용되는 것은 아니지만, 건조, 식 균 작용, 원생동물의 습식, 항체, 독성 화합물, 삼투압 스트레스 등으로부터 자신을 보호하는 작용을 한다. 유산균의 EPS 생성량은 화학적 발효조건(배지조성, 초기 유당 함량, 탄소와 질소 비율)과 물리적 조건(온도, pH, 통기 량)이 중요하게 작용한다. 이로부터 다당류를 생산하는 유산균을 개발해왔고 그것이 유래한 다당류들이 항암효과가 있다고 보고되었다. 항암효과에 특이하게 작용하는 유산균으로서 본 연구에서 다루는 다른 한 가지 김치유산균은 *Helicobacter pylori* urease에

억제효과 있는 *Lactobacillus* 이다. 1983년 Warren과 Marshall에 의해 위장에서 campylobacter와 유사한 세균이 발견된 이후[13] 이 균주에 대한 생화학적, 미생물학적 연구가 진행되었으며, Goodwin 등[14]에 의해 *Helicobacter pylori*로 명명되었다. 대부분의 만성위염, 위궤양, 소화성궤양, 위암 등의 발생과 밀접하게 관련되는 것으로 알려지면서 *Helicobacter pylori*에 대한 연구가 크게 주목을 받게 되었고 감염 치료 에 대한 치료제를 각종 계열의 항생제로 사용하던 것을 프로바이오틱 유산균을 복용하면 *Helicobacter pylori* urease에 억제효과가 있다는 임상실험결과가 보도되었다. 이러한 유산균들은 기본적으로 항균 활성, 정착성, 내산성, 유산 생성 능, 요소 분해효소의 활성 저하 능 등이 우수한 균주로서 최근에 와서 많은 관심과 연구를 하고 있다. 이러한 기능성 유산균의 배양조건을 최적화함으로서 짧은 시간 내에 생산성을 극대화시키는데 가능할 것이고 기능성 식품 개발에도 응용이 가능할 것이다. 이러한 연구는 아직도 연구 중이고 개발 중이다. 특히 실험실에서의 기초적인 실험은 더욱 필요한 것이다.

본 연구에서는 EPS 생성 및 *Helicobacter pylori* urease에 억제효과 있는 김치유산균의 발효공정을 최적화하여 대량 생산에 필요한 경제비용을 줄이고 고부가가치의 기능성제품 개발 및 응용에 기여하고자 한다.

Ⅰ. *EPS(Exo-polysaccharide)*생산 김치유산균 발효공정 최적화

Ⅰ-*1* 서 론

EPS생산 김치유산균은 중요한 유산균 일종으로서 다른 유산균에 비하여 다당류 생산이 우수한 특성을 갖고 있으며 유산균에 의해 생성된 EPS는 자체로는 에너지원으로 이용되는 것은 아니지만, 건조, 식 균 작용, 원생동물의 습식, 항체, 독성화합물, 삼투압 스트레스 등으로부터 자신을 보호하는 작용을 한다. 유산균의 EPS 생성량은 화학적 발효조건(배지조성, 초기 유당 함량, 탄소와 질소 비율)과 물리적 조건(온도, pH, 통기 량)이 중요하게 작용한다. 1960년대 말부터 발효유에 대한 안정제 첨가를 법적으로 규제해 오고 있어 그 대체효과를 위한 제품 내 다당류 공급원으로서 미생물다당류에 대한 연구가 활발히 이루어져 왔다. 발효유제품을 제조하는데 있어 사용되는 많은 유산균이 세포 외 다당류를 생산할 수 있다고 밝혀졌다. EPS 는 세포벽밖에 위치하며 협 막 형태로 세포벽에 흡착하거나 슬라 임 형태로 세포 외 환경으로 분비되는데, 이것의 중합체는 우유의 점도를 증가시키고 syneresis와 graininess를 억제하고 제품에 천연 탁 도를 주어 발효유의 유동작용 및 조직에 중요한 역할을 하므로, 발효유의 안정제 대체제로 널리 사용되고 있다.[15,16]유산균 발효실험에 있어서 기본 배지인 MRS broth는 가격이 비싸므로 발효에 직접 사용되지 않고 있으며 많은 논문 자료들을 보면 가격이 싼 산업용 영양배지를 이용하고 있다. 아직까지 MRS broth 배지를 최적화하여 유산균 발효를 최적화에 대한 논문 자료는 극히 적다.

본 연구에서는 MRS broth 배지를 최적화하여 유산균 발효에 필요한 탄소 원, 질소 원 및 기타 주요성분을 알아냈고 Micro plate reader를 이용하여 최적농도를 알아보았으며 회분 식 발효공정을 진행하여 pH, 온도, 통기 량 조건들을 알아보았다.

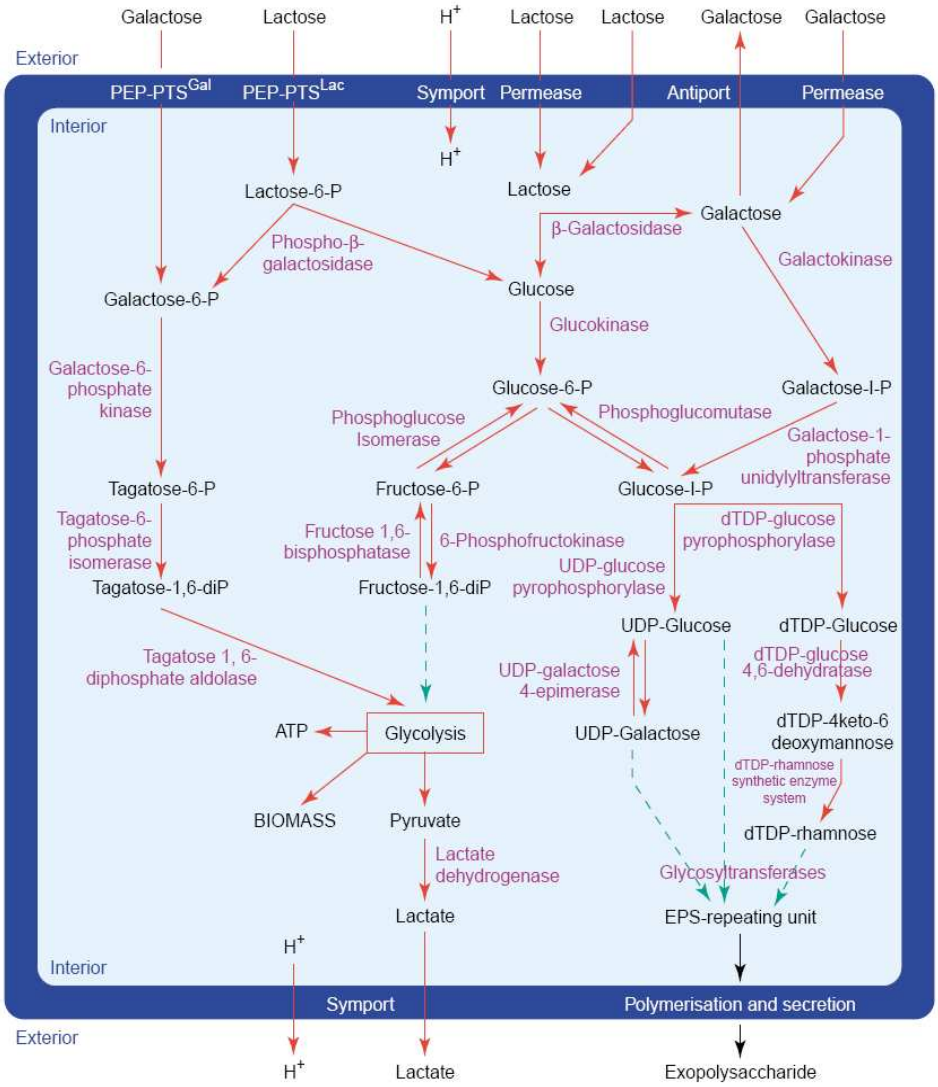


Figure 1. Generalized diagram of the conversion of lactose, galactose and glucose to EPS in lactic acid bacteria

Ⅰ-2. 실험 재료

1. 균주 및 보관방법

본 연구에서 사용한 균주는 기능성 고분자를 생성하는 *Leuconostoc* Kimchii GJ2를 사용하였으며, long term stock법(유산균배양 영양배지인 MRS broth를 이용하여 300 ml 플라스크에 100 ml 배양액을 만든 후 30℃에서 O.D(600nm)가 1이 될 때까지 정치배양한 후 배양액을 1 ml씩 취하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 거쳐 상등 액을 버리고 0.9% NaCl용액 1 ml를 넣고 잘 섞어준 후 멸균한 증류수로 2회 세척과정을 거쳐 상등 액을 버리고 순수한 세포만 취한 후 0.5 ml의 MRS 배양과 50% glycerol 0.5 ml를 넣고 잘 섞은 후 -70℃에 보관)을 이용하여 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

본 연구에서는 미생물 성장에 주요 성분인 탄소원성분과 질소원성분에 대하여 알아보았다. 회분 식 배양에 있어서 탄소 원으로 Glucose, Sucrose, Maltose를 사용하였고 질소원으로는 $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ (Junsei), NH_4Cl (Junsei), $(NH_4)_2SO_4$ (Junsei) 등을 사용하였으며 기타 성분으로는 Yeast extract(Difco), Peptone (Difco), $NaC_2H_3O_2$(Junsei), $MgSO_4$(동양), $MnSO_4$(동양), HK_2O_4P(동양)을 이용하여 본 배양액을 2L를 제조하여 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. pH는 8 N NaOH와 1 N HCl를 사용하여 조절하였고 소포제로 antifoam204(sigma)를 사용하였으며 5 L 발효 조(Biotron Co.)를 사용하였다. 최적 농도조건을 알아보기 위하여 Micro plate reader를 이용하였다.

3. 배지조성

가. 탄소 원 종류 및 농도에 따른 영향

본 연구에서 EPS 생산 김치유산균의 종 배양은 300ml 플라스크 두개에 각각100ml의 MRS broth배양액을 만들어서 121℃에서 15분간 멸균한 후 균을 접종하였다. 다양한 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 Sucrose, Glucose, Maltose 농도를 각각 30 g/L로 하고 나머지 성분은 Yeast extract 5 g/L, Peptone 10 g/L, $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ 2 g/L, $NaC_2H_3O_2$ 5 g/L, $MgSO_4$ 0.1 g/L, $MnSO_4$ 0.1 g/L, HK_2O_4P 2 g/L로 초기 pH 6.5로 회분 식 반응을 진행하였다. 반응기의 pH 조절은 1 N HCl, 8 N NaOH를 사용하였다. 농도변화에 따른 영향을 알아보기 위하여 최적 탄소 원 성분 농도를 각각 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L로 하고 Yeast extract 5 g/L, Peptone 10 g/L, (NH4)2C6H6O7 2 g/L, NaC2H3O2 5 g/L, $MgSO_4$ 0.1 g/L, $MnSO_4$ 0.1 g/L, HK_2O_4P 2 g/L로 사용하였으며 초기 pH는 6.5로 하였다. 2 L의 배지용액을 만든 후 121℃에서 15분간 멸균하여 온도 30℃와 통기 량 1 vvm으로 정치배양을 진행하였다.

나. 질소원 종류 및 농도에 따른 배양

유산균성장의 중요성분인 질소원의 영향을 알아보기 위하여 질소원으로 (NH4)2C6H6O7, Ammonium sulfate, Ammonium chloride를 사용하였고 기타 성분으로는 Glucose 30 g/L, Yeast extract 5 g/L, Peptone 10 g/L, $NaC_2H_3O_2$ 5 g/L, $MgSO_4$ 0.1 g/L, $MnSO_4$ 0.1 g/L, HK_2O_4P 2 g/L을 사용하여 본 배양 배지로 사용되었고 초기 pH는 6.5로 하고 반응기 pH는 1 N HCl, 8 N NaOH로 조절하였다. 최적 농도실험에 있어서 질소원 농도를 각각 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L 로 변화시키고 나머지 배지조성은 위에 농도와 같게 하고 Micro plate reader를 사용하여 최적 질소원 농도를 알아보

았다. 발효는 정치배양과 통기 량 1 vvm으로 하고 진행하였다.

다. 기타 배지성분 농도에 따른 영향

질소원, 탄소 원을 제외한 MRS broth 성분인 Yeast extract, Peptone, $NaC_2H_3O_2$, HK_2O_4P의 최적 농도는 Micro plate reader를 사용하여 측정하였다. 온도는 30℃로 하였고 정치반응을 진행하였으며 통기 량은 0 으로 하였다.

라. 온도에 따른 영향

본 연구에서는 종 배양을 MRS broth배지를 이용하였고 초기 pH는 6.5로 하였으며 본 배양 배지 조성은 Glucose 30 g/L, Yeast extract 5 g/L, Peptone 10 g/L, $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ 2 g/L, $NaC_2H_3O_2$ 5 g/L, $MgSO_4$ 0.1 g/L, $MnSO_4$ 0.1 g/L, HK_2O_4P 2 g/L이고 온도를 각각 25℃, 30℃, 37℃로 하고 최적 온도를 알아보았다. 배지는 121℃에서 15분간 멸균한 후에 사용하였으며 초기 pH는 6.5로 하였고 통기 량을 1 vvm으로 조절하고 정치배양을 진행하였으며 반응기의 pH는 1 N HCl와 8 N NaOH로 조절하였다.

마. *pH* 조건에 따른 영향

본 연구에서는 종 배양배지를 MRS broth를 이용하였고 초기 pH는 6.5로 하였으며 본 배양 배지조성은 Glucose 30 g/L, Yeast extract 5 g/L, Peptone 10 g/L, $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ 2 g/L, $NaC_2H_3O_2$ 5 g/L, $MgSO_4$ 0.1 g/L, $MnSO_4$ 0.1 g/L, HK_2O_4P 2 g/L이고 pH를 각각 6.0, 6.5, 7.0 으로 변화를 주어 최적 pH 조건을 알아보았다. 반응에서 온도는 30℃으로 조절하였고 통기 량은 1 vvm으로 하였으며 정치배양을 진행하였다.

바. 정치배양과 교반속도의 영향

본 연구에서 사용된 종 배양 배지는 MRS broth이고 초기 pH는 6.5로 하였으며 본 배양 배지 조성은 Glucose 30 g/L, Yeast extract 5 g/L, Peptone 10 g/L, $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ 2 g/L, $NaC_2H_3O_2$ 5 g/L, $MgSO_4$ 0.1 g/L, $MnSO_4$ 0.1 g/L, HK_2O_4P 2 g/L이고 반응 조건에서 pH는 6.5로 하고 온도 30℃로 하였으며 정치배양 및 교반속도를 각각 100 rpm, 200 rpm으로 반응을 진행하여 최적조건을 알아보았다.

Table 1. Medium composition for lactic acid bacteria isolated from *kimchi*

Component	*Concentration (g/L)*
Sucrose	30
Yeast extract	5
Peptone	10
$(NH_4)_2C_6H_6O_7$	2
$NaC_2H_3O_2$	5
$MgSO_4$	0.1
$MnSO_4$	0.1
HK_2O_4P	2
Initial pH 6.5	

Ⅰ-3. 실험 방법

1. 배양방법

본 연구에서는 본 배양 발효의 10%인 접종 원을 300 mL 플라스크 두 개에 각각 100 mL씩 만들어 121℃에서 15분간 멸균한 후 초기 pH를 6.5로 하고 균을 접종하여 Shaking incubator(30℃,정치배양)에서 20시간 배양한 후 1.8L의 본 배양에 접종하였다. 발효기는 pH를 6.5, 온도 30℃, 통기 량 1 vvm 으로 조절하여 정치 배양하였다. 반응에 있어서 pH는 1 N HCl와 8 N NaOH를 이용하여 조절하였다.

2. 분석방법

2.1 흡광도 및 *EPS* 농도 측정

서로 다른 조건에서 유산균의 성장조건을 알아보기 위하여 4시간 간격으로 sample를 각각 1 mL씩 취하여 UV-vis 흡광광도계(Dong-il SHIMADZU)를 이용하여 파장 600 nm에서 O.D(optical density)를 측정하였고 EPS 농도를 측정하기 위하여 1 mL sample를 원심 분리하여 얻은 상등 액에 4 mL 99% ethanol를 가하여 4℃에서 24시간 보관하여 생성된 침전물을 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 회수하였고 이를 50℃에서 24시간동안 건조시킨 후 항량이 될 때까지 항온조에 방치하여 건조중량을 측정하였다.

2.2 탄소 원 농도 측정

본 연구에서 사용한 Sucrose 농도는 dinitrosalicylic acid(DNS)방법을 이용하여 측정하였다.[12] DNS시료는 NaOH 10 g, DNS 10 g, Phenol 2 g,

Na_2SO3 0.5 g, $C_4H_4KNaO6 \cdot 4H_2O$(Rechelle salt) 200 g를 증류수 500 mL에 녹여 제조하였다. Glucose는 직접 DNS법으로 측정이 가능하나 Sucrose는 불가능하기에 Sample 1 mL에 3N HCl를 0.02 mL를 넣고 100℃ water bath에서 15분간 반응시켜 Sucrose를 Glucose로 완전히 전환시킨 후 DNS 방법을 사용하였다. DNS 법을 사용하기 위하여 HCl과 반응시킨 sample 용액에 제조한 DNS 시료 3 mL를 넣고 잘 혼합한 후 또 다시 100℃ water bath에서 15분간 반응시킨 후 냉각 시켜 UV-vis 흡광광도계(Dong-il SHIMADZU)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 탄소원의 흡광도와 농도사이 관계식을 얻기 위하여 1 g/L sucrose 용액을 사용하여 농도를 각각 0 g/L, 0.1 g/L, 0.2 g/L, 0.3 g/L, 0.4 g/L, 0.5 g/L 으로 변화시켜 DNS 법으로 흡광도를 측정하여 표준곡선을 만들어 sample 의 sucrose 농도 측정에 사용되었다. Standard curve는 Figure 2.에 나타내었다.

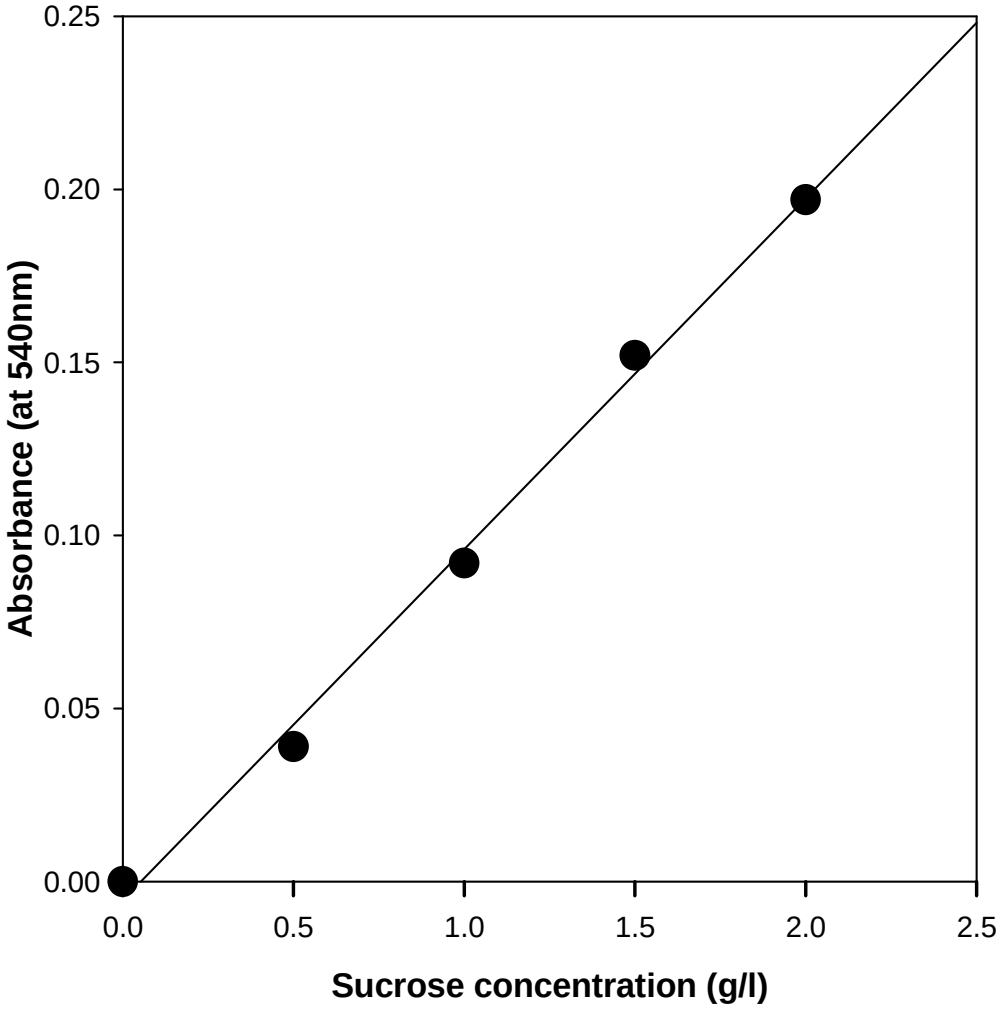


Figure 2. Standard curve for the determination of sucrose concentration

Ⅰ-4. 실험결과 및 고찰

1. 탄소 원 종류 및 농도에 따른 생장 특성

5 L 교반 발효 조에서 탄소 원 종류에 따른 유산균 발효 결과는 Figure 3.와 같다. 온도 30℃, 통기 량을 1 vvm으로 pH 6.5로 한 후 정치배양을 진행한 결과 탄소원의 배양 최적 성분 중에서 sucrose를 탄소 원으로 하였을 때 가장 잘 자랐다. 이는 Mozzi 등[17]의 보고에 의하면 *L. casei*의 경우 다당류 생산성에 탄소원이 미치는 영향에서 sucrose 가장 좋았다는 보고와 유사하였다. 그러나 Cerning 등[18]의 *L. casei* CG11 균주에서와 Kang 등[19]의 *Lb. acidophilus* CH-2와 *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB12의 EPS 생산에서 glucose가 최고의 탄소 원이였다는 결과와 상이하였다. 이에 따른 sucrose 농도 균체생장, EPS 생성 및 sucrose 농도의 감소변화는 Figure 4.과 같다. 4시간 간격으로 sample의 흡광도를 측정하여 균체생장을 알아보았을 때 처음 8시간 동안은 큰 변화가 없었고 10시간 지난 후부터는 일정한 변화를 보여주었다. 반응이 진행됨에 따라 초기 sucrose 농도가 20 g/L인 균체 생장이 28시간 발효과정을 보면 가장 낮았고 다음으로 40 g/L이고 초기농도가 30 g/L로 시작한 균체 생장이 가장 높게 활발히 진행되어 최고흡광도 11.8에 도달하였다. 탄소 원 기질 감소량에 있어서 반응이 28시간 진행되어 20 g/L인 경우 18.9 g/L, 30 g/L인 경우 22.8 g/L, 40 g/L에서는 21.2 g/L이 소비되었다. 균체의 생장이 활발한 만큼 30 g/L에서 탄소 원 기질 농도 감소가 20 g/L, 40 g/L에 비하여 많음을 알 수 있다. EPS (exo- polysaccharide)의 생성량을 보면 처음 8시간 동안은 생성변화가 비슷하지만 10시간 이후부터 변화를 가져왔다. 역시 균체 생장이 빠르고 탄소 원 기질 소비가 많은 30 g/L에서 28시간 반응을 거쳐 최대 생성량 0.62 g/L을 나타내었다.

실험으로부터 본 연구에 사용된 김치유산균의 최적 탄소 원 농도는 30 g/L로서 발효과정에 저해현상이 없이 균체의 증식 및 EPS 생성에 이용된 것

으로 사료된다.

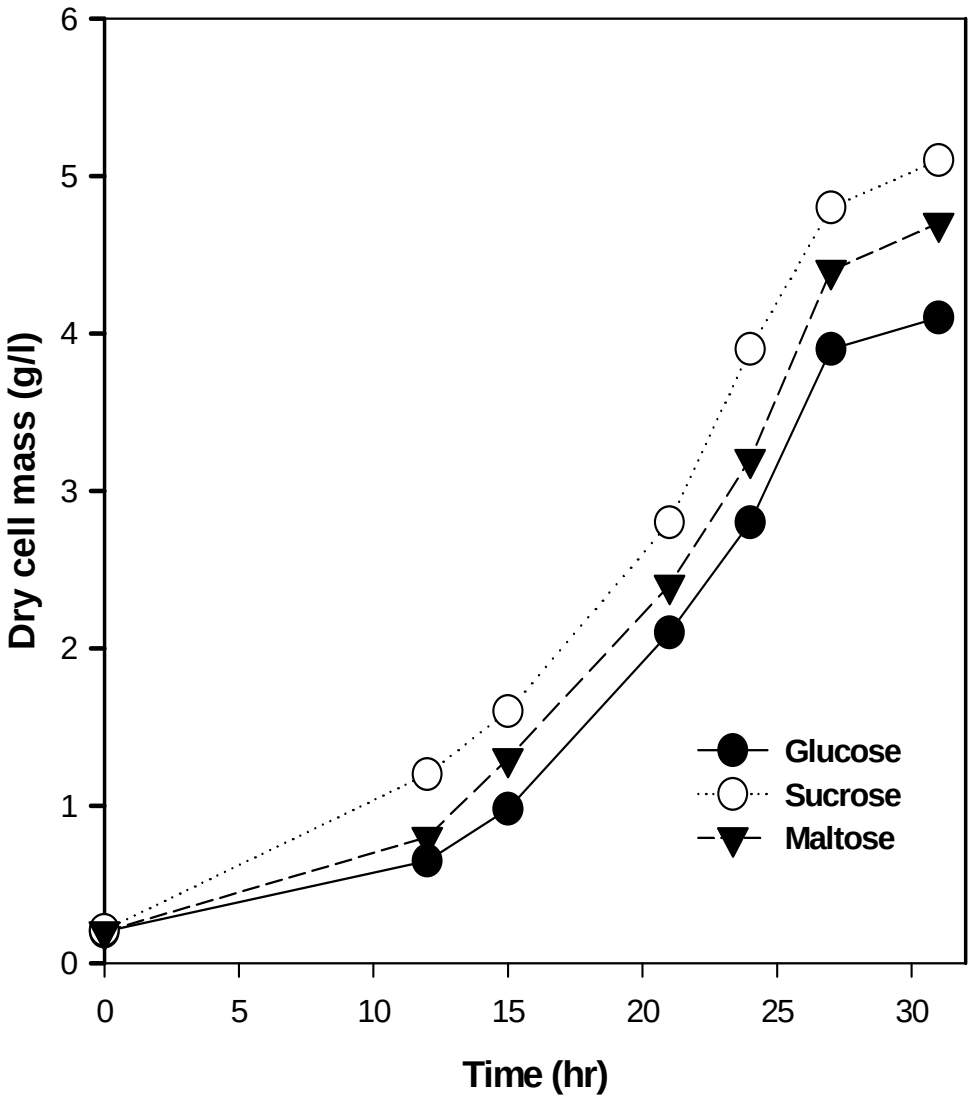


Figure 3. Effect of Carbon source on cell growth (30℃, pH 6.5)

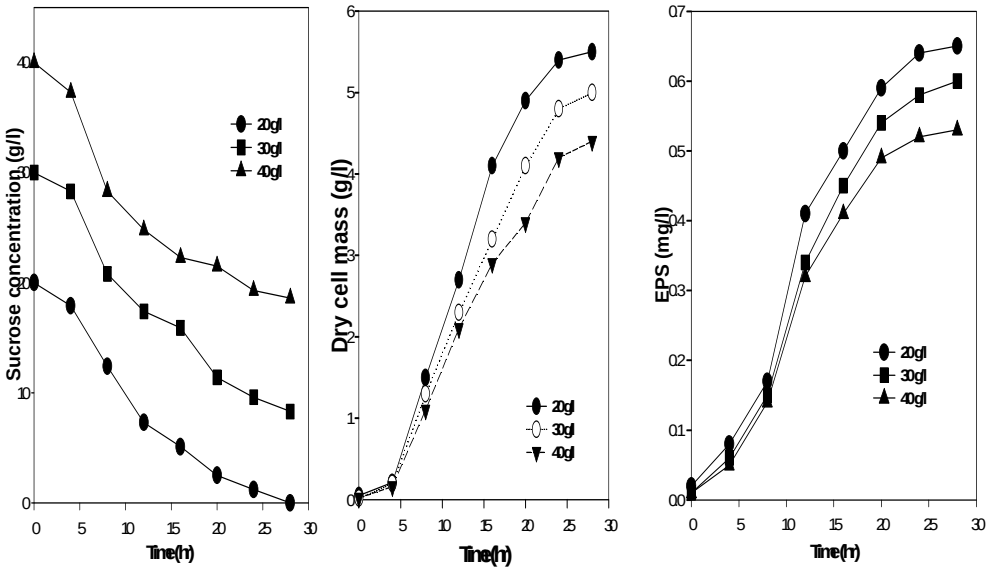


Figure 4. Effect of Sucrose concentration on the lactic acid bacteria (isolated from Kimchi) and EPS(exo-polysaccharide) production using batch fermentation

2. 질소원 종류 및 농도에 따른 배양 특성

본 연구에서는 무기질소원으로 $(NH_4)_2C_6H_6O_7$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl를 사용하였고 유기질소원으로는 peptone, yeast extract를 사용하였다. 무기질소원의 영향을 알아보기 위하여 같은 조건하에서 서로 다른 무기질소원을 사용하여 회분 식 반응을 진행한 결과 Figure 5. 와 같이 $(NH_4)_2C_6H_6O_7$을 질소원으로 하였을 때 가장 우수하였고 NH_4Cl가 가장 늦게 자랐다. 무기질소원을 선정한 후 최적농도를 알아내기 위하여 Micro plate reader를 이용하여 $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ 농도를 각각 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L로 변화를 주어 생장 변화를 알아보았다. 측정 결과 농도 2 g/L로 하였을 때 가장 잘 자랐다. 이런 결과는 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl와 같은 무기 질소원은 반응에 각종 염을 생성하는 주된 원인으로 되어 균체 생장을 억제하는 역할을 한다고 사료된다. 대신 $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ 는 염을 생성하지 않고 반응에서 구연산을 대량으로 생산하여 유산균 발효에 있어서 염이 미치는 영향보다 적게 된다. 그 결과는 Figure 6.와 같다. 유기질소원으로 peptone과 yeast extract의 최적 농도를 알아보기 위하여 반응에서 peptone 농도를 각각 0 g/L, 0.5 g/L, 1 g/L, 1.5 g/L, 2 g/L 로 변화시켜 측정해보았고 Yeast extract 농도도 마찬가지로 0 g/L, 0.5 g/L, 1 g/L, 1.5 g/L, 2 g/L 로 변화를 주어 Micro plate reader를 이용하여 김치 유산균 생장과정을 측정하였다. 측정 결과 peptone의 최적 농도는 1 g/L로 나타났고, yeast extract에서는 0.5 g/L에서 생장이 가장 효과 적으로 나타났다. 이는 Auer와 Seviour[20]와 Aslop [21] 및 Sutherland[22]가 질소원의 제한이 미생물의 생장 및 다당류생성을 촉진하였다는 보고와 유사하였고 질소원의 양이 너무 적어도 안 되고 많아도 생장억제가 생기는 원인으로 된다는 것을 알 수 있다. 본 연구에서 무기질소원으로는 $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ 2 g/L과 유기질소원으로 peptone 1 g/L, yeast extract 0.5 g/L이 균체 생장에 가장 적합한 무기질소농도로 측정되었다. 그 결과는 Figure 7. 8. 에 나타내었다.

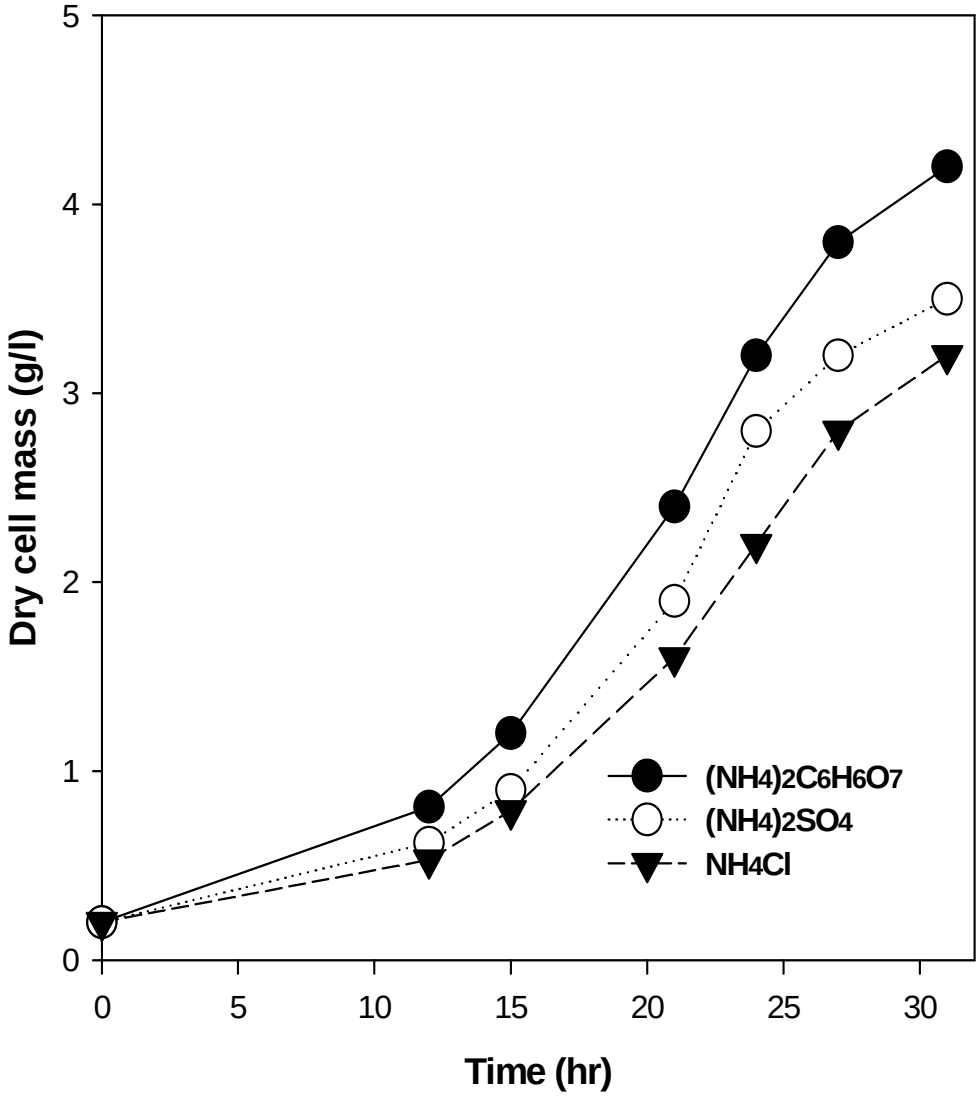


Figure 5. Effect of ammonium source on cell growth (30℃,pH6.5)

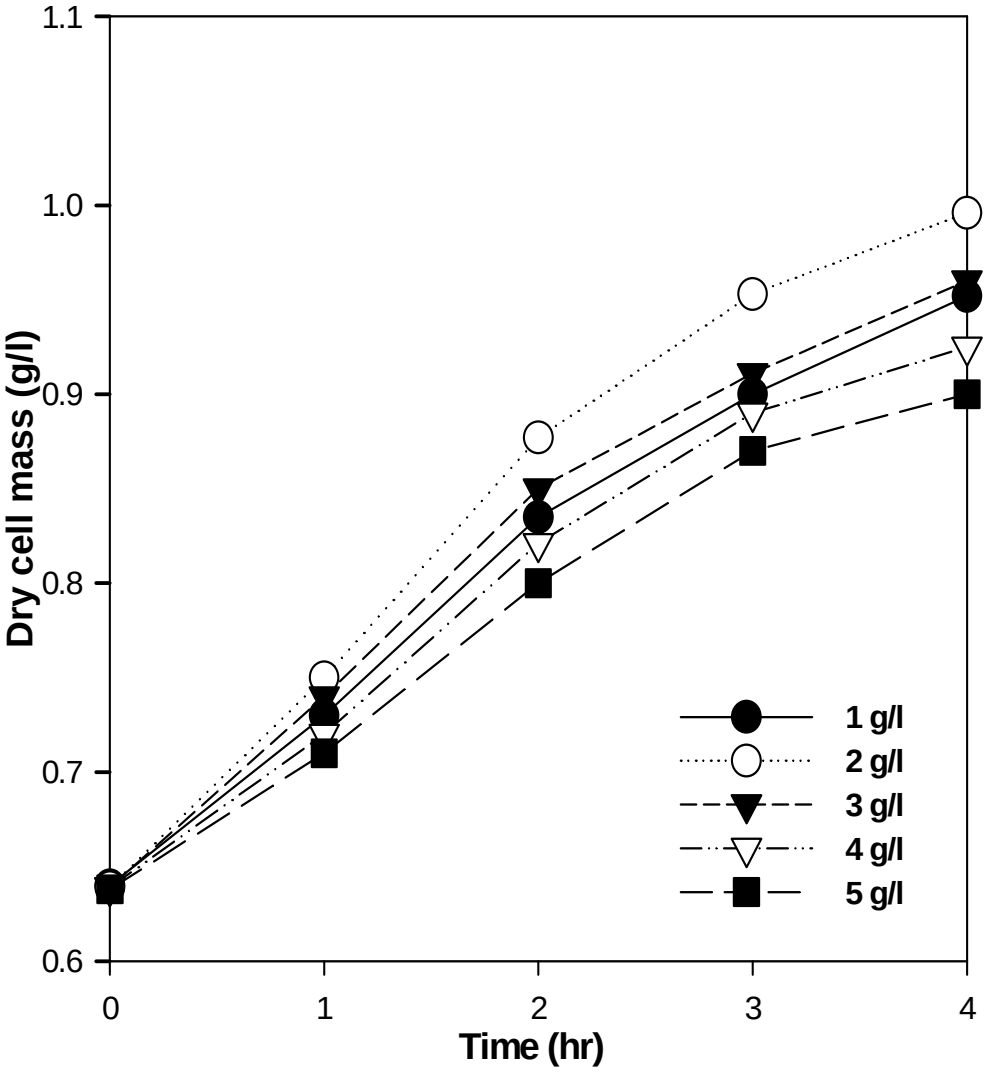


Figure 6. Effect of Ammonium citrate concentration on cell growth using micro plate reader (30℃)

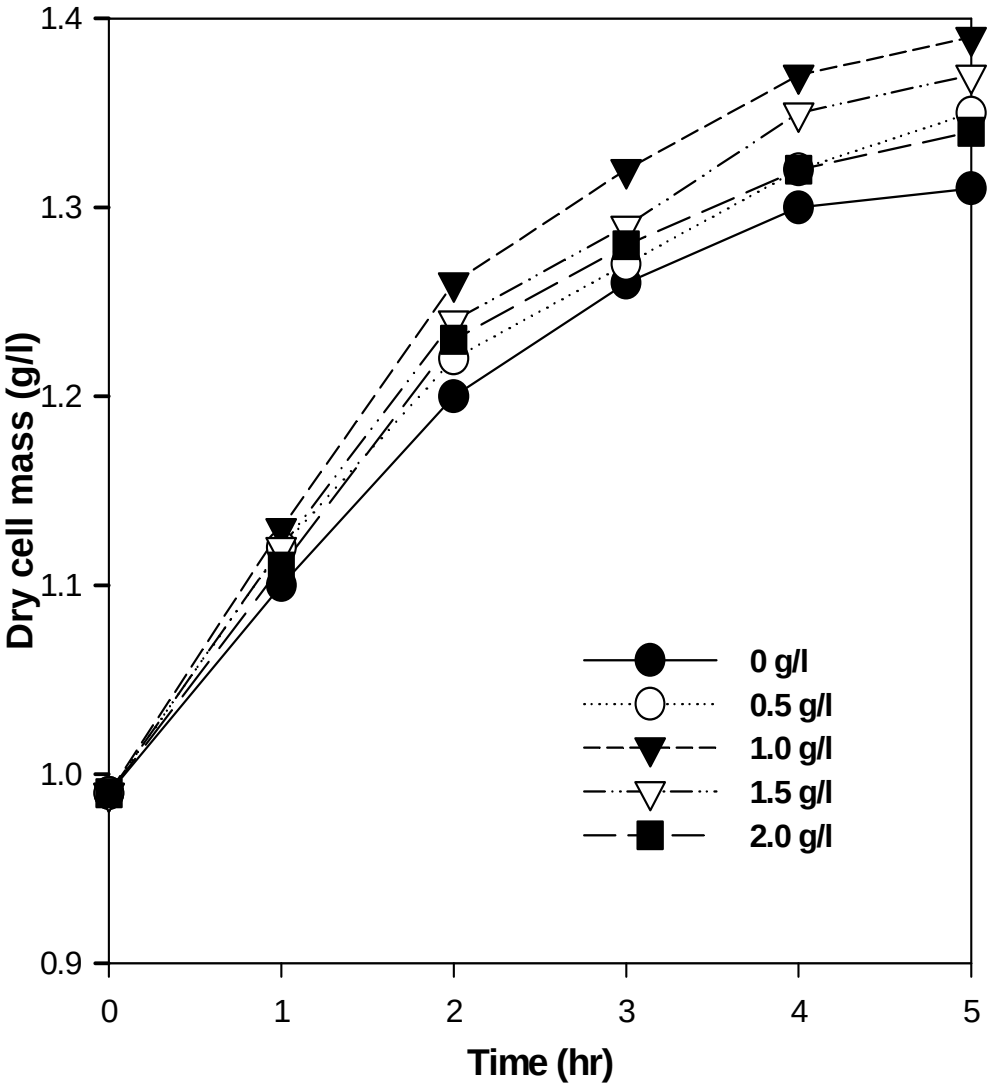


Figure 7. Effect of peptone concentration on cell growth (30℃)

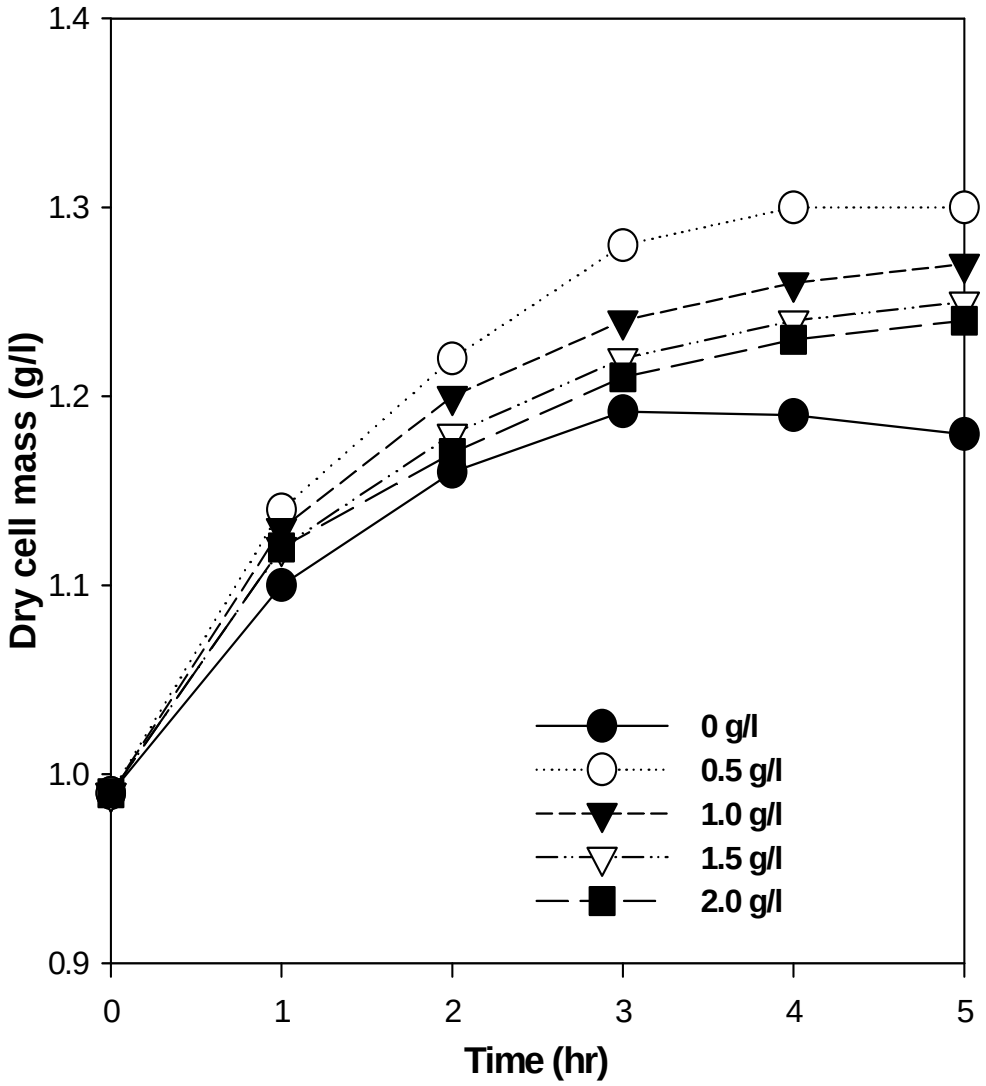


Figure 8. Effect of yeast extract concentration on cell growth(30℃)

3. 미량 원소 농도에 따른 생장 특성

염류 및 금속이온의 미량성분은 미생물생장과 다당류 생성의 임계요소로 알려져 있어 이들의 다당류 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 미량 원소 성분으로 $NaC_2H_3O_2$ 을 선정하였는데 이는 수용액 중 알칼리성질을 나타내어 유산균 발효에 있어서 발효액의 pH를 중화 시키는 역할을 하여 보다 좋은 발효 조건을 마련하였다. HK_2O_4P를 선정 한 것은 중요 한 인산염으로서 유산균 생장에 필요한 탄수화물을 생성하며 또한 생성 된 인산은 유기물 촉매로도 사용된다. 이러한 특징을 갖고 있는 두 가지 물질의 유산균 발효에 있어서의 최적 배양 농도조건을 알아보기 위하여 $NaC_2H_3O_2$ 농도 및 HK_2O_4P 농도도 각각 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L 로 하고 Micro plate reader를 사용하여 균체 생장을 알아보았다. 측정에서 온도 30℃을 유지했고 정치배양을 진행하였다. $NaC_2H_3O_2$ 2 g/L, HK_2O_4P 1 g/L 일 때 가장 잘 자랐다. 이는 미량 원소로서 미생물 생장에 없어서는 안 되고 많아서도 안 되는 성분으로서 그 중요성을 나타내고 있다. 본 연구에서 사용된 미량 원소는 일부 인산이나 미량 성분이 EPS 생합성에 필수적이라는 보고와 일치하였다. $NaC_2H_3O_2$와 HK_2O_4P의 최적농도 결과는 Figure 8. 9. 에 나타내었다.

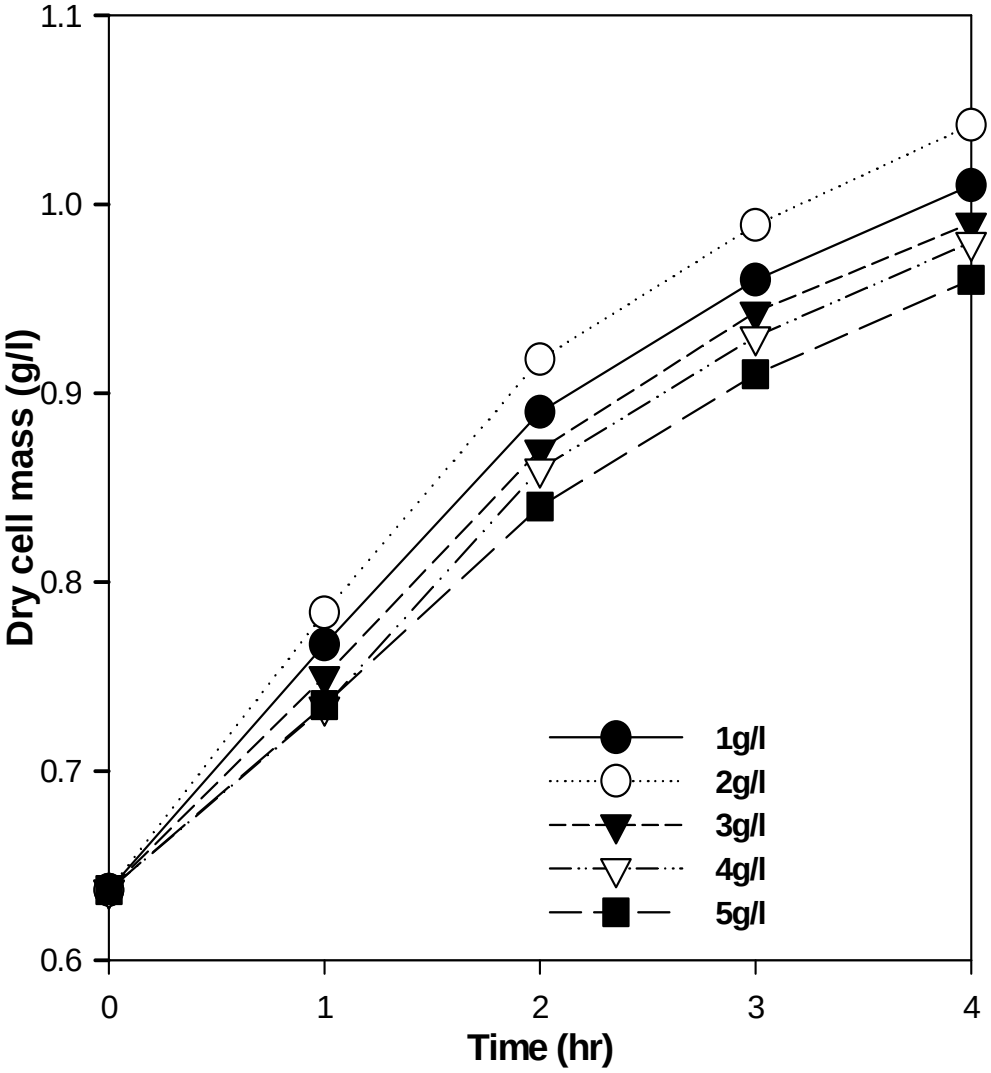


Figure 9. Effect of sodium acetate concentration on cell growth using micro plate reader(30℃)

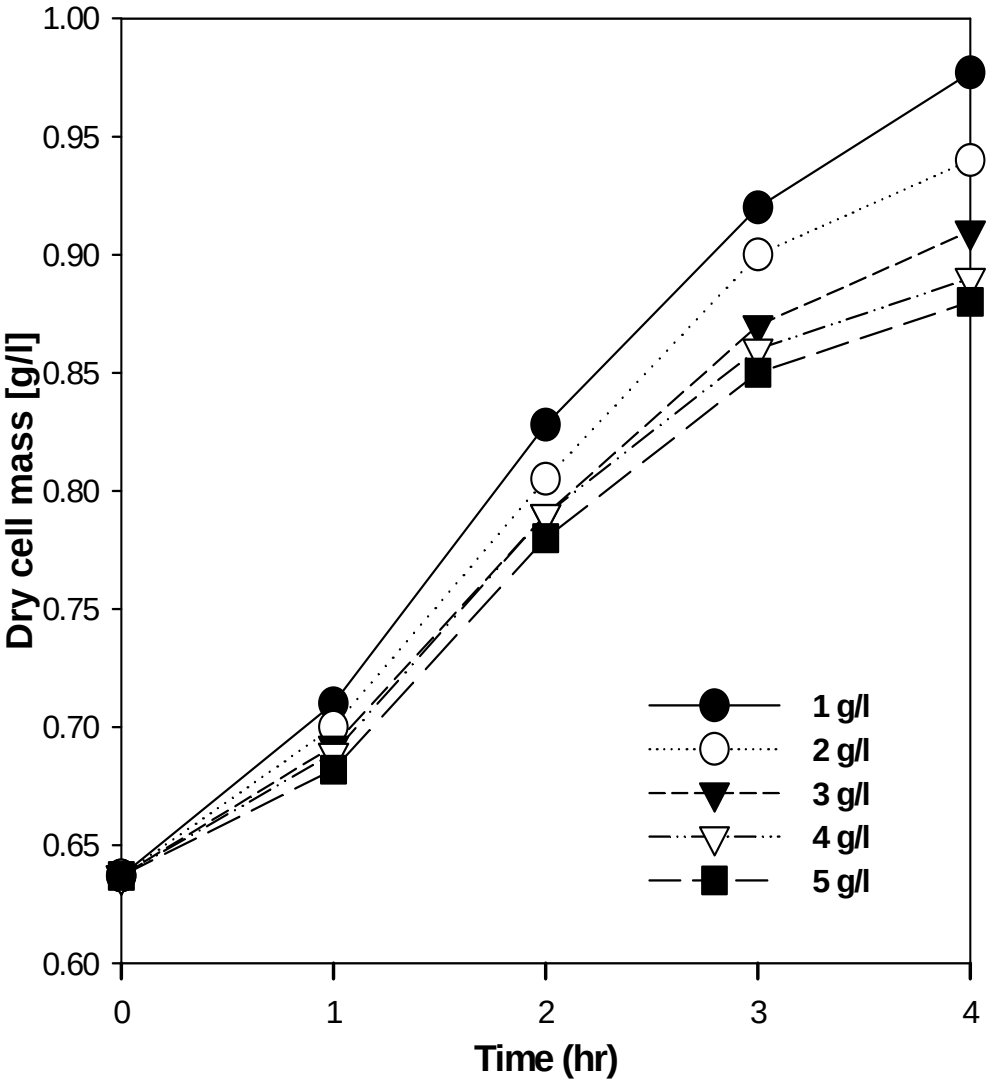


Figure 10. Effect of potassium phosphate concentration on cell growth using micro plate reader(30℃)

4. 온도변화에 따른 배양특성

온도변화에 따른 배양효과를 알아보기 위하여 반응기 3개 반응 온도를 각각 25℃, 30℃, 37℃으로 설정하였고 기타 조건 pH 6.5, 통기 량 1 vvm으로 하고 정치배양을 진행하여 균체 생장 및 기질 소모, EPS 생성량을 알아보았다. 실험결과는 Figure 10. 11. 12. 과 같다. 실험 결과로부터 균체 생장에 있어서 세 가지 온도 조건에서 생장 차이를 흡광도 측정결과로부터 보면 25℃에서 생장이 최고로 5.8, 30℃에서는 9.2와 37℃에 있어서 7.8로 30℃에서 가장 잘 생장하였다. 비록 30℃와 37℃를 비교해보면 처음 반응에서 성장이 비슷하게 보이지만 일정한 시간이 지난 후부터는 그 차이를 알 수 있었다. 탄소 원 기질 소비에 있어서도 32시간 반응이 진행된 후 25℃에서는 17.8 g/L sucrose 이 소비되었고 비록 30℃와 37℃에서 모두 20 g/L 소모되었지만 30℃일 때 변화가 더 많아 비록 sample은 32시간에 했지만 32시간 전에 이미 탄소원이 고갈된 것으로 사료된다. EPS 생성량도 30℃에서 0.51 g/L 가장 많이 생성되었다. 37℃에서 0.39g/L, 25℃에서는 0.23 g/L로 차이를 볼 수 있었다. Mozzi 등[32]의 *L. acidopilus* 의 경우 30℃와 37℃에서 가장 좋은 EPS 생산성을 나타내었으며, 이는 Rasic과 Kurmann[3]이 점질 성 유산균이 낮은 온도에서 점성물질의 생성이 증가된다는 보고와 유사하였다.

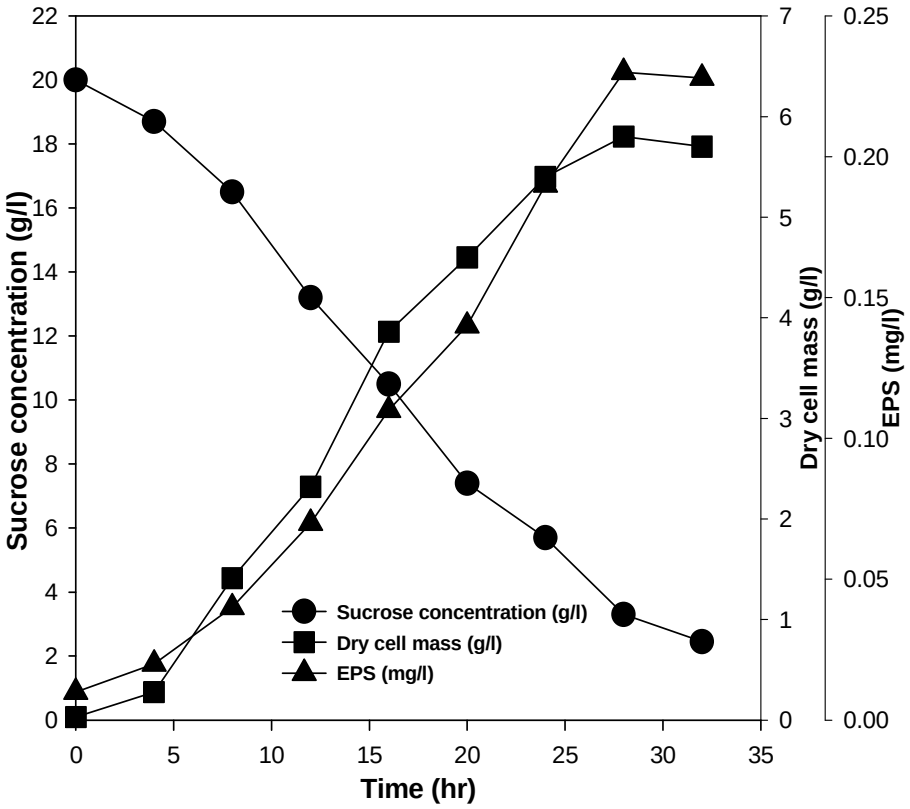


Figure 11. Lactic acid bacteria fermentation at 25℃ (pH6.5)

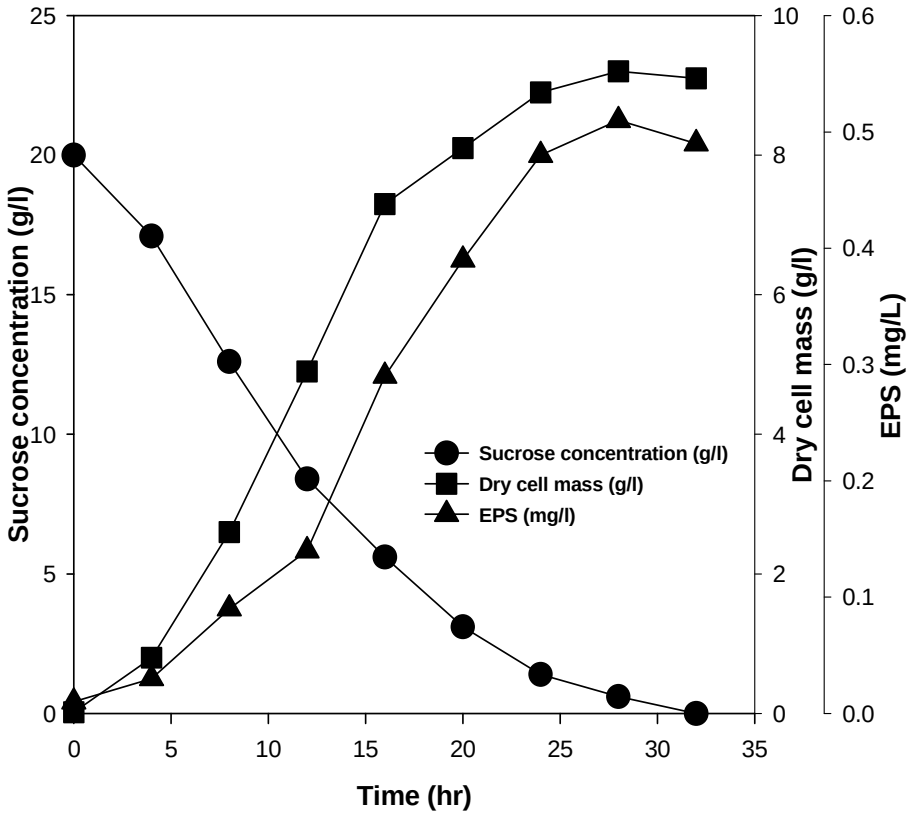


Figure 12. Lactic acid bacteria fermentation at 30℃(pH 6.5)

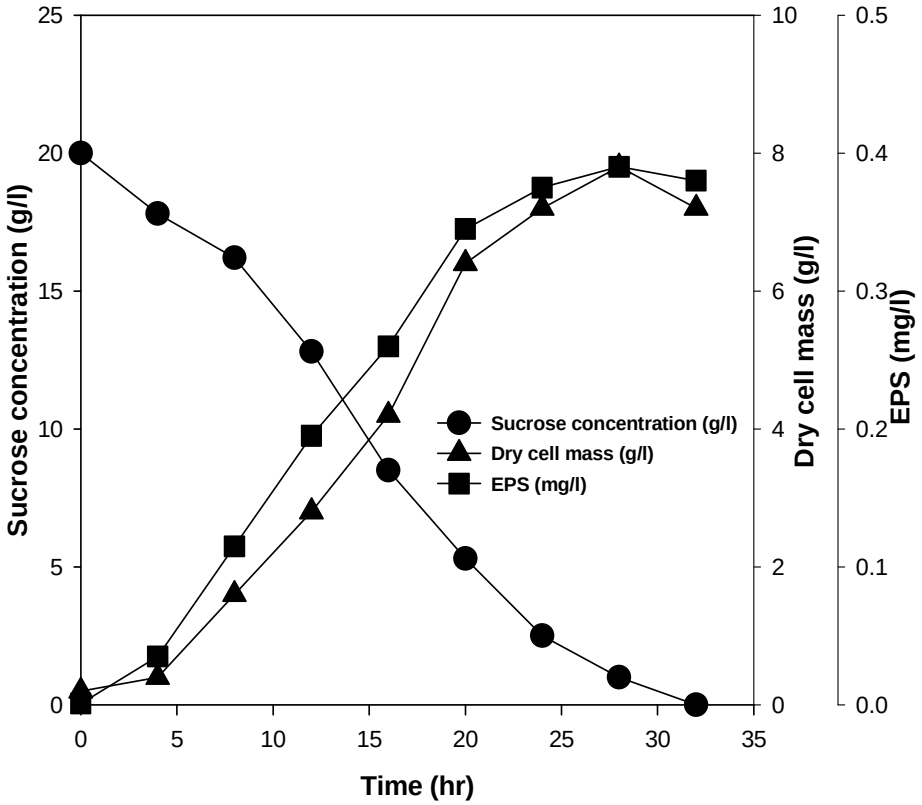


Figure 13. Lactic acid bacteria fermentation at 37℃ (pH 6.5)

5. *pH* 조건에 따른 생장 특성

발효기 pH를 각각 6.0, 6.5, 7.0으로 조절하고 온도 30℃, 교반속도를 0 rpm으로 통기 량을 1 vvm으로 정하고 30시간 배양한 결과 pH 6.5에서 성장 속도가 가장 빠른 것으로 나타났다. 따라서 가장 최적인 pH는 6.5로 선택하였다. 시간에 따른 세포농도의 증가는 Figure 11.과 같다. 많은 경우 유산균은 산도가 높은 경우 성장 속도가 증가하는 경향이 있으나 본 균주의 경우에는 pH 6.5정도에서 최적을 나타냈다. 세포를 최대로 생산하기 위해 pH를 제어하는 경우 유산균이 산을 많이 생성하기 때문에 NaOH의 소모량이 많은 것으로 나타나 전체적인 공정의 경제성을 고려할 때 pH를 6.0이나 이하로 제어하는 것도 고려해봐야 한다. 그러나 본 연구에의 실험결과 최적 세포성장은 pH 6.5인 것으로 나타났다. 이는 Mozzi 등[32]의 *L. casei* CRL 87의 경우 pH 5.0에서 가장 좋은 EPS 생성량을 나타낸 것과는 상이하였다. 하지만 EPS 생산 *lactobacillus* ssp. SCU-M의 최적 pH가 6.5로 나온 자료[33]와 유사하였다.

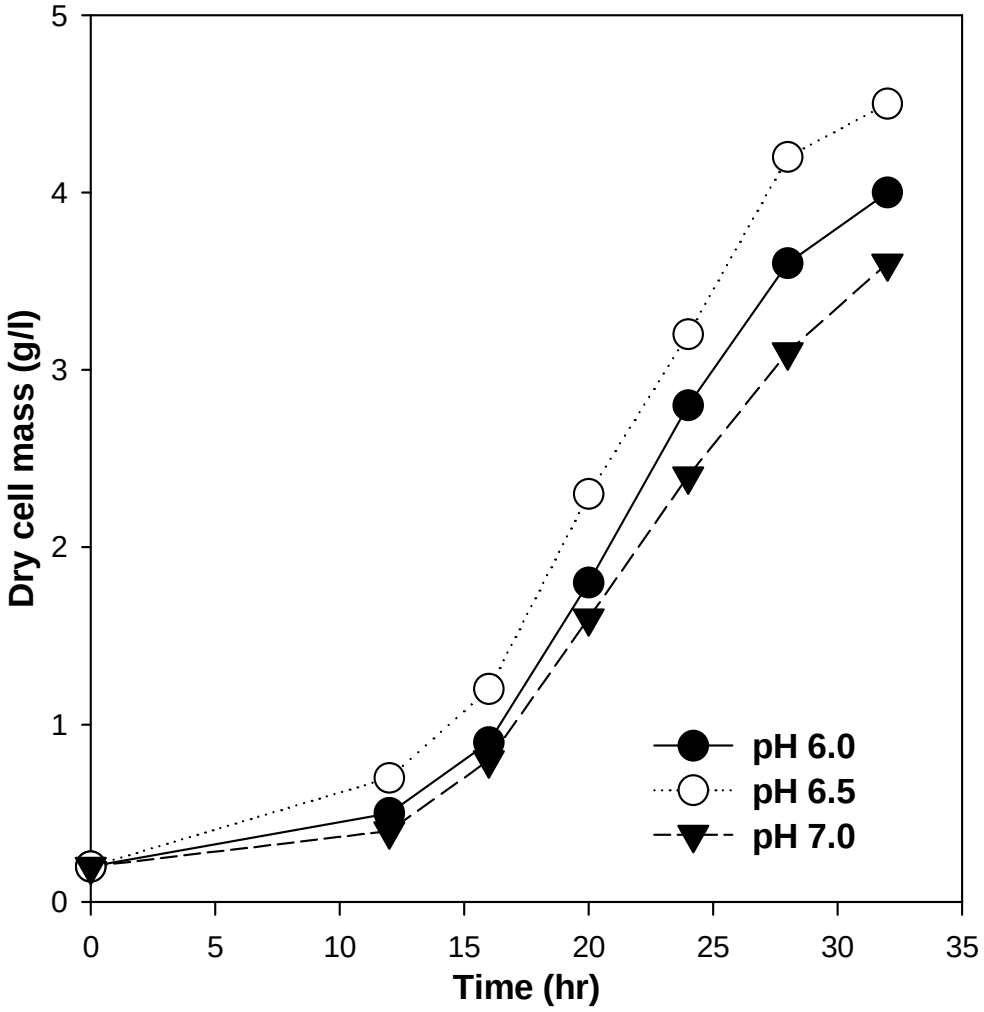


Figure 14. Effect of pH on cell growth(30℃)

6. 정치배양 및 교반속도에 따른 생장 특성

회분 식 발효 조를 이용한 유산균 배양에서 정치배양 및 교반속도에 따른 생장 특성을 알아보았다. 반응기 온도를 30℃로 하고 pH를 6.5로 설정하였으며 통기 량을 1 vvm으로 설정하여 정치배양을 진행하였을 경우 발효 종료시까지 최대 균체 생산량은 3.9g/L얻고 교반속도를 100 rpm으로 하였을 때 최대 균체 생산량은 5.5 g/L이었으며 200 rpm으로 조절하여 진행하였을 때 최대 균체 생산량은 2.95 g/L이었다. 정치배양과 교반속도의 영향에 의한 발효시간에 따른 세포농도 증가는 Figure 12.와 같다. 본 연구에서 사용한 김치 유산균은 다당류를 생산하는 균주로서 정치 배양의 경우에는 세포 성장 시 산소의 고갈로 성장속도가 늦은 것으로 나타났고 교반 속도를 200 이상으로 증가 시킬 경우 전단응력에 의해 세포가 stress를 받아 성장 속도가 저해되는 것으로 판단되었다. 이러한 결과로부터 교반속도를 100 rpm으로 조절하였을 때 생장속도가 가장 효과적 이였다.

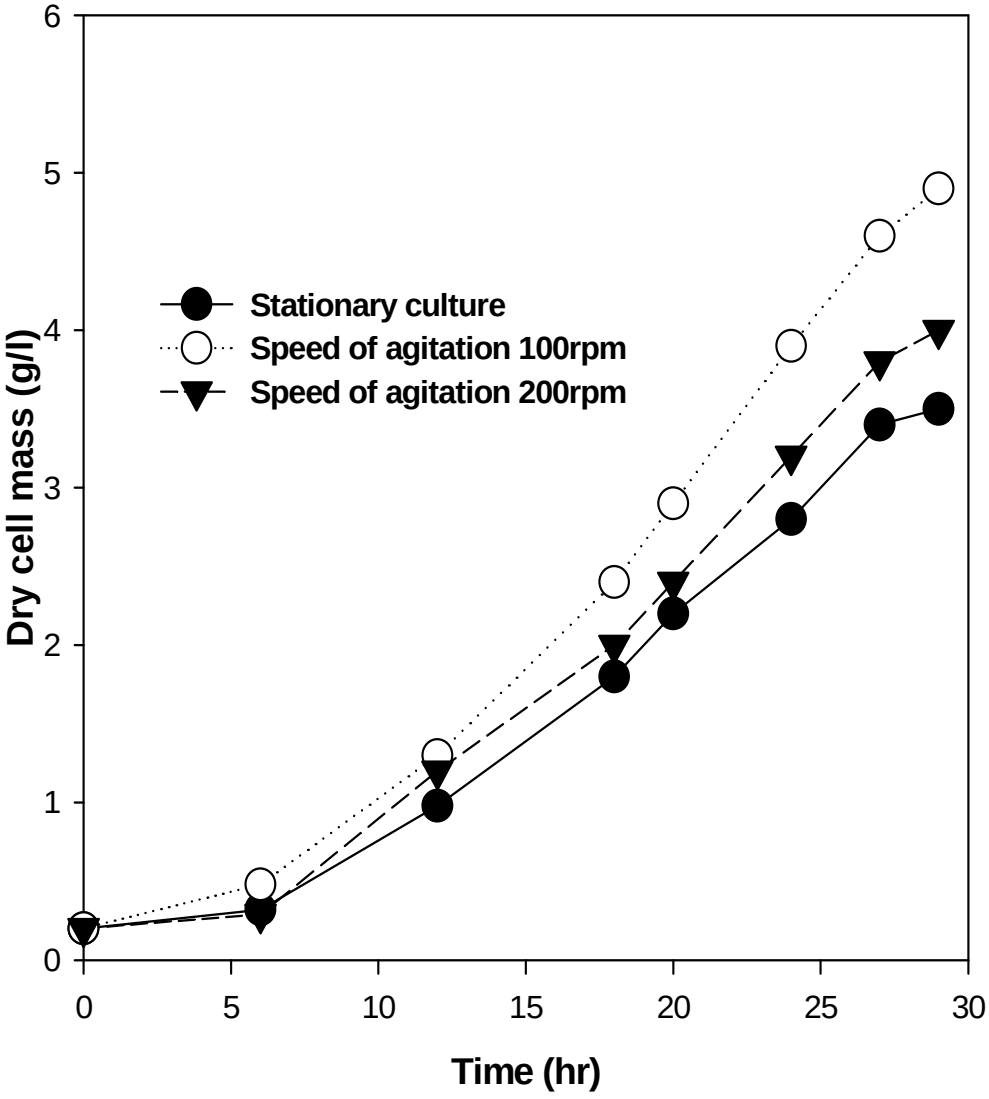


Figure 15. Effect of agitation speed of fermenter on cell growth. (30℃, pH6.5)

7. 회분 식 및 유가 식 배양공정 최적화

7-1. 회분 식 배양 공정

EPS 생산 김치유산균의 최적 배지와 최적 조건을 사용하여 회분 식 배양을 실시하였다. 기존의 최적화 된 연구 논문들에 따르면 김치 유산균의 EPS 생성 능은 배지조성에 크게 영향을 받는데 높은 비율의 탄소 원/질소원에서 EPS의 생산이 촉진된다고 보고되어 있다. 또한 세포활성이 최대로 나타내는 조건하에서 많은 산소소모량을 필요로 하고 있다. 다당류가 합성되는 속도는 균체생육의 Exponential Phase에서 가장 빠르며 그 후로 점차 감소하게 된다고 알려져 있다.

Figure 16. 에서와 같이 회분 식 배양에서는 앞에서 측정한 최적 배양 조건을 이용하여 32시간 만에 5.12 g/L의 균체 량을 얻었고 0.5 g/L의 EPS를 생산하였으며, 반응이 진행함 에 따라 배양액의 점성의 증가에 의해 용존 산소량의 부족을 방지하기 위하여 교반속도를 100rpm~150rpm으로 적당히 조절하여 대량 생산 목적에 도달하였다. 이러한 요인은 유가 식 배양에서도 극복해야 할 조건이라고 생각 된다.

7-2. 유가 식 배양공정 초기화

본 연구에서는 sucrose의 농도변화에 따른 유가 식 배양의 특성을 알아보았다. 처음에 회분 식 배양에서의 최적 sucrose 농도를 30 g/L로 시작하여 12시간부터는 10배 농축기질을 1ml/min 일정한 속도로 공급하였다. 배양 시간이 지남에 따라 균체 성장 및 EPS (Exo-polysaccharide)의 생성량이 회분 식 배양에 비하여 증가하여 발효 종료 시까지 최대 균체 량은 8.4 g/L이고, EPS(Exo-polysaccharid e)의 양은 4.34 g/L이였다. 하지만 기질 소모측면으로 볼 때 실제 기질의 소모속도에 비해 유입기질 속도가 느려 feed rate를 1

mL/min 보다 높게 조절해야 할 필요성이 있음을 알 수가 있었다. 이는 반응기내의 용존산소제어법인 DO stat을 통하여 반응기내의 용존 산소 양을 일정하게 유지시켜주면서 기질공급을 조절할 필요가 있는 것으로 판단되었다. 실험 결과는 Figure 18. 과 같다.

7-3. 교반속도에 따른 유가 식 배양

유가 식 배양을 진행함에 있어서 기질 공급양은 3 mL/min로 유지하여 세포성장에 영양을 주지 않았고 sucrose 농도는 10~15 g/L을 유지하였다. 세포성장이 높아지고 EPS(Exo-polysaccharide)의 양도 증가하면서 배양액의 점도 증가를 피면하기 위하여 교반속도를 100~150rpm으로 조절하였다. 이는 세포에 과다한 stress를 주지 않는 범위 내에서 산소전달 효율과 배양액 혼합이 잘 되어 최종 생산물의 수율이 우수하였다. 최종적으로 최대 균체 량은 13.6 g/L을 얻었고 exo-polysaccharide의 생산량은 7.21 g/L을 얻었다. 이러한 결과는 발효 배양 중 미생물에 따라 교반 시 발생하는 과도한 전단력 때문에 미생물이 손상을 받아 생산량이 감소하는 경우도 있고 교반속도의 증가에 따른 산소전달이 용이하여 EPS 생산을 증가시켰다는 연구가 보도되었는데 본 연구에 쓰인 김치유산균은 교반 시에 과도하지 않은 범위 내에서 stress를 줌으로써 균사체의 대량생산과 EPS(Exo-polysaccharide)의 생산효율을 높여주었다. 또한 DO stat를 통한 유입기질을 조절하여 넣은 결과 균체 성장 및 exo-polysaccharide의 생산에서 더 우수함을 확인 할 수 있었다. 교반속도에 따른 유가 식 배양 결과는 Figure 19. 과 같다.

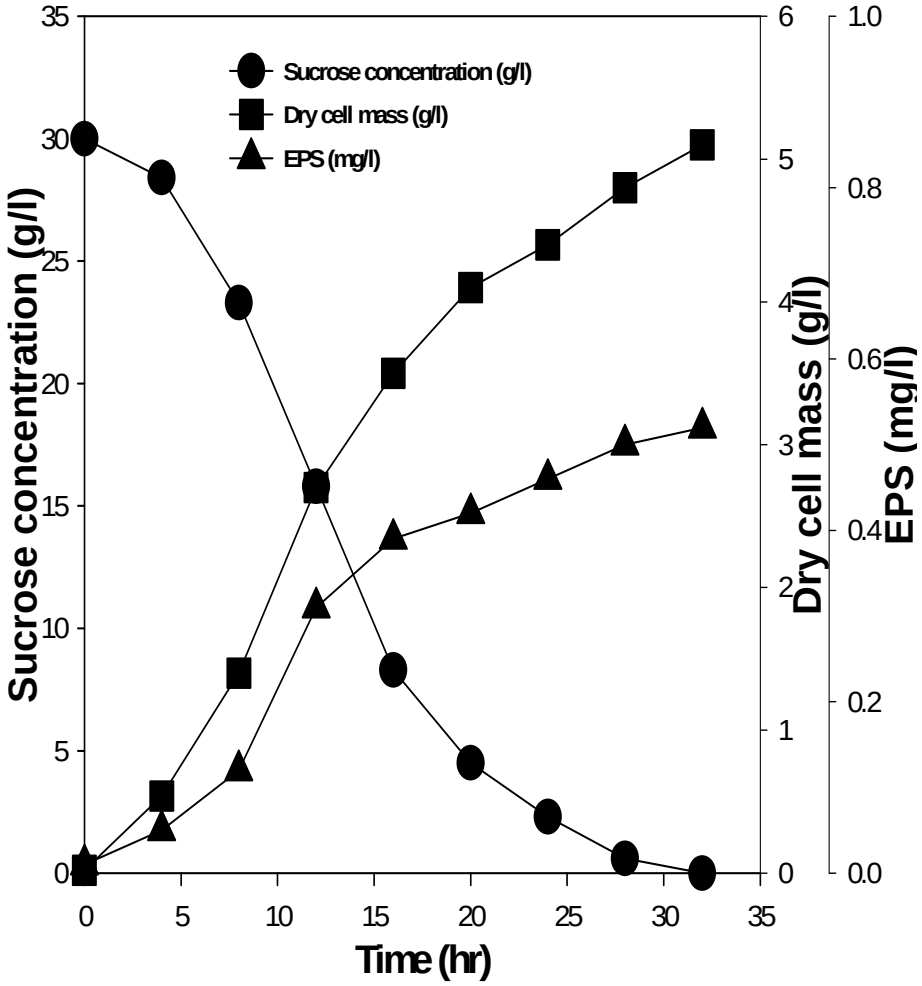


Figure 16. Batch cultivation of producing EPS of lactic acid bacteria isolated from Kimchi(30℃,pH6.5)

Figure 17. Schematic diagram of fed batch fermentation process with stirred tank (37℃, pH 6.0)

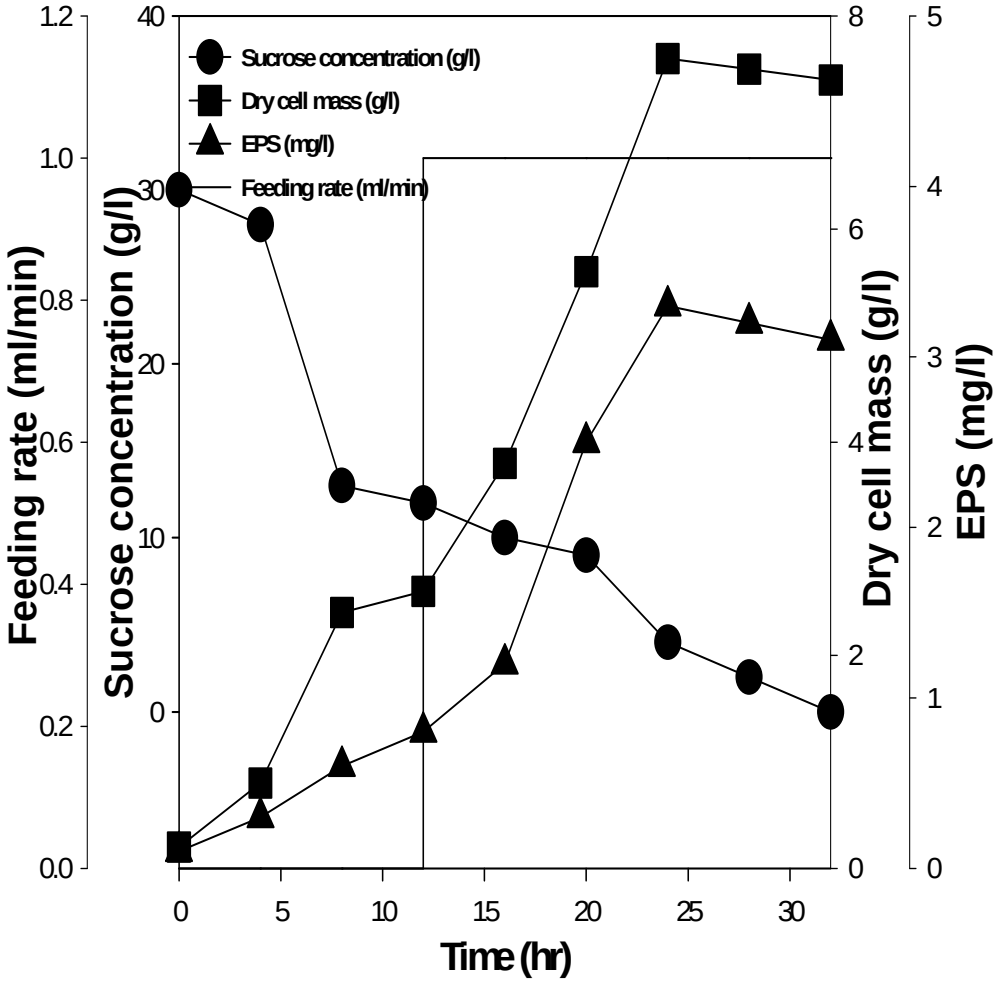


Figure 18. Time course of the fed batch cultivation with lactic acid bacteria isolated from Kimchi(37℃,pH6.0)

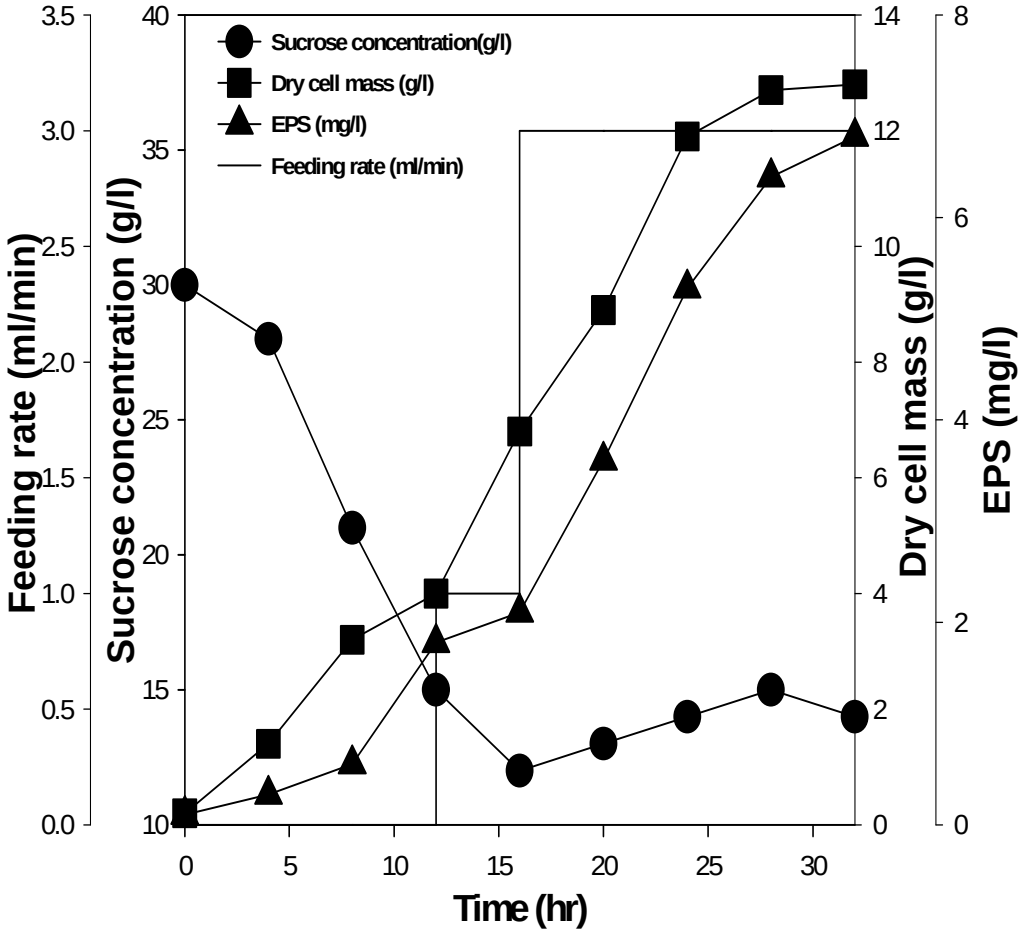


Figure 19. Time courses of the cell growth using fed batch with lactic acid bacteria isolated from Kimchi(37℃, pH6.0)

Ⅰ-5. 결 론

1. 탄소 원 종류 및 농도에 따른 생장 특성

탄소 원 종류에서 최적 탄소 원을 측정한 결과 sucrose를 사용하였을 때 가장 좋은 생장결과를 얻었고 서로 다른 탄소원의 농도에 따라 생장 특성을 조사한 결과 농도를 30 g/L 로 하였을 경우 가장 높은 수율을 보였으며, 균체 생장 및 EPS생성이 높았고 기질소모도 다른 농도에 비하여 많았으며 40 g/L인 경우 비록 20 g/L 보다 높은 수득 율을 보였으나 고농도의 기질에 의해 균체 성장에 영향을 미친 것으로 생각되었다.

이로부터 발효 시 기질에 의한 저해 현상도 없고 균체 증식과 EPS 생성에 이용된 30 g/L의 농도가 김치유산균이 필요로 하는 최적 탄소 원 농도임을 알 수 있었다.

2. 질소원 종류 및 농도에 따른 배양 특성

질소원 종류에서는 $(NH_4)_2C_6H_6O_7$을 사용하였을 때 수득 율이 가장 높았고 농도 측정에서는 2 g/L 일 때 가장 좋은 실험결과를 얻었다. 비록 탄소원에 비해 양은 적지만 유산균 생장에 있어서 없어서는 안 되는 중요한 성분이라고 생각한다. 질소원으로서 $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ 2 g/L을 최적 질소원농도로 정하였다.

3. 기타 배지 성분 농도에 따른 생장 특성

영양배지인 peptone, yeast extract 와 같은 성분은 가격이 비싼 것으로서 본 실험을 진행하여 최적농도 1 g/L과 3 g/L을 얻었고 MRS broth에 있는 농도 5 g/L과 10 g/L 에 비해 최소화를 시켰고 기타 성분들 $NaC_2H_3O_2$ 2

g/L, HK_2O_4P 1g/L 로 최적화 시켰다. 이는 낮에 가격으로도 배양이 가능할 수 있게 하였다.

4. 온도변화에 따른 생장 특성

온도변화에 있어서 실험을 진행해 본 결과 30℃와 37℃에서 비록 탄소 원 농도 변화는 비슷하였지만 30℃에서 EPS 생성량이 더 많았음을 알 수 있었다. 그것은 균체 량의 성장이 30℃에서 더 높았으며 기질 소비 변화도 빨리 나타나 더욱 우수한 생산 효율을 보인 것으로 생각된다. 한편 37℃에서도 25℃에 비해 더욱 높은 생산 효율을 나타냈다.

5. pH 조건에 따른 생장 특성

미생물 생장에 있어서 pH는 중요한 인소이다. 본 연구에서 pH 6.5였을 때 최대 균체 량 4.8 g/L이고 pH 6.0일 때는 균체 량이 최대로 4.2 g/L로서 비슷한 결과를 나타냈다. 이는 유산균이 생산하는 각종 산에 의해 pH가 내려가는 한편 반응초기 pH 6.5를 유지하기 위하여 NaOH 가 일정하게 들어가서 유산균 생장을 억제하는 염을 생성하게 된다. 이로부터 발효를 일정하게 진행한 후부터는 pH를 조금 낮추어서 진행하는 것도 균체 량 대량 생산에 유익하다고 볼 수 있다.

6. 정치배양 및 교반속도에 따른 생장 특성

교반속도의 증가에 따라 유산균의 생장은 늦어졌고 교반속도를 100rpm으로 하였을 때 생장효과가 가장 좋았다. 이는 다당류 생산 균주로서 발효가 활발히 진행됨에 따라 용존산소량이 필요함을 알 수 있다.

7. 회분 식 및 유가 식 배양공정 최적화

회분 식 배양공정으로 24시간 동안 온도 37℃, pH 6.0 그리고 통기 량을 1vvm으로 정치배양으로 EPS 생성 김치 유산균 발효를 진행하여 균체 량 g/L을 얻었고 EPS g/L을 얻었으며 유가 식 초기 배양 조건에서 교반속도를 100rpm 유지하고 기질 유입속도를 1ml/min로 유지한 결과 반응 32시간 진행 하여 8.4g/L의 균체 량과 4.34g/L EPS를 생산하였다. 교반 속도를 100~150rpm으로 조절하여 유가 식 배양에서 보다 더 좋은 결과를 얻었다. 반응이 진행 되어 32시간 후 균체 량을 최대로 13.6g/L을 얻었고 EPS를 7.21g/L을 생산하였다. 이러한 결과는 EPS 생성 김치 유산균 발효를 진행함에 있어서 다당류의 생성과 균체 생장에 미치는 영향을 고려하여 발효 시 교반 속도를 적당히 조절할 필요가 있음을 알 수 있었다.

Ⅱ. *Helicobacter pylori urease*에 억제효과가 있는 김치 유산균 발효공정 최적화 및 억제효과 연구

Ⅱ-1. 서 론

*Helicobacter pylori*는 위궤양, 위암을 초래하는 음성의 나선모양의 간균으로 알려져 왔다. [13,14]최근에 와서 사람은 궤양, 위궤양의 원인이 *H.pylori* 영향으로 일어나는 원인을 알게 되었다. *Helicobacter pylori*는 요소분해효소(urease)를 생산하여 미생물 생존 환경에 아주 열악한 위에서 생존이 가능하다. 이기작은 위 점막에 존재하는 소량의 요소를 요소분해효소(urease)로 분해하여 중탄산염과 암모니아를 발생하여 균 주변을 중성화시켜 낮은 pH를 유지하는 위에서 생존할 수 있다. [15,16]이러한 발생된 암모니아는 근처 십이지장점액조직을 손상시키는데 직접적인 영향을 미친다. [17] 프로바이오틱 유산균은 사람의 위장관이나 장내 균형을 조절하는 특성을 가지고 있다고 알려져 왔고 이러한 유산균은 상업용 배지로 배양한 내용이 보고되어 왔다.

항생제를 이용한 *H.pylori* urease에 의한 만성 위염과 위궤양으로 앓고 있는 환자에 대한 치료는 진행 되어왔다.[18,19,20,21] *Helicobacter pylori* 치료를 위해서 항생제를 장기간 투여하는 것은 이에 따른 부작용은 물론, 항생제 내성 균주를 증가시킨다는 심각한 문제가 발생하게 된다. 그러나 프로바이오틱 유산균은 *Helicobacter pylori*에 직접적으로 작용하거나, 항생제와 수반된 임상적 부작용을 저하시키면서 *Helicobacter pylori*에 대한 치료 역할을 하게 된다. 이외에도 기능성 식품뿐만 아니라 장내노화를 예방하는 등 여러 가지 특성을 가지고 있어 이에 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 보고에 의하면 김치거나 청국장과 같은 유산균 발효 식품이 만성 위염과 위궤양의 발생 율을 낮춘다고 하였다. [22,23] 비록 저해 제 성분은 알려지지 않았지만 김치 유산균이 *Helicobacter pylori*에 대한 억제효과는 보고되고 있다. [24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34]하지

만 구체적인 저해 제 메카니즘과 반응은 아직 연구되지 않았다.

본 연구에서는 *Helicobacter pylori* urease에 억제효과가 있는 김치유산균을 발효 공정을 최적화 하여 urease 효소활성실험에 이용되었으며 저해 제 메카니즘 연구에 있어서 기초를 마련하였다.

Ⅱ-2. 실험 재료

1. 균주 및 보관방법

본 연구에서 사용한 균주는 *Lactobacillus sakei* SI3을 사용하였으며, long term stock법(유산균배양 영양배지인 MRS broth를 이용하여 300 mL 플라스크에 100 mL 배양액을 만든 후 30℃에서 O.D(600nm)가 1이 될 때까지 정치배양한 후 배양액을 1 mL씩 취하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 거쳐 상등 액을 버리고 0.9% NaCl용액 1 mL를 넣고 잘 섞어준 후 멸균한 증류수로 2회 세척과정을 거쳐 상등 액을 버리고 순수한 세포만 취한 후 0.5 mL의 MRS 배양과 50% glycerol 0.5 mL를 넣고 잘 섞은 후 -70℃에 보관)을 이용하여 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

본 실험에서는 MRS broth 기본 배지 성분인 Glucose(Junsei), Yeast extract (Difco), Peptone(Difco), $NaC_2H_3O_2$(Junsei), $MgSO_4$(동양), $MnSO_4$(동양), HK_2O_4P(동양), $(NH_4)_2C_6H_6O_7$(Junsei)를 사용하였고 소포제로 antifoam 204(sigma)를 사용하였다. 발효 조는 pH 센서와 D.O 센서를 장착한 한국발효기(Bio-tron)를 사용하였다.

Ⅱ-3. 실험 방법

1. 배양 방법

본 연구에서는 본 배양 발효의 10%인 접종 원을 300 mL 플라스크 한 개에 100 mL 만들어 121℃에서 15분간 멸균한 후 초기 pH를 6.0로 하고 균을 접종하여 Shaking incubator(30℃,정치배양)에서 18시간 배양한 후 Micro plate reader 배양에 접종하였다. 온도 30℃에서 정치 배양하였다. 반응기 실험실에는 본 배양 발효의 10%인 접종 원을 두 개의 300 mL 플라스크에 각각 100 mL씩 만들어 멸균 후 본 배지에 접종하였다. 본 배양의 pH는 6.0으로 하였고 온도는 30℃로 하였다. 교반속도는 100~200 rpm 으로 하였고 통기량은 0~1 vvm으로 조절하여 배양하였다.

2. 분석방법

2-1. 세포 농도, 단백질 농도 및 *glucose* 농도 측정

세포 농도는 UV/VIS 스펙트럼광도계(UV-1601PC; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).을 이용하여 600nm에서 측정하였다. 흡광도 값 1.0에 대응 되는 건 체량 0.76g/l 관계식을 이용하여 건 체량을 측정하였다. 발효 샘플은 1ml를 취하여 원심분리하여 사용하였으며 탄소 원 농도는 DNS(dinitrosalicylic acid)법을 이용하였고bovine serum albumin을 이용하여 표준 단백질곡선을 만들어 Lowry법을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 농도에서 흡광도는 280nm로 하였다.

2-2. *urease* 측정

Fluka(Germany)로부터 31 U/mg 고체 urease(EC 3.5.1.5, from Jack Beans)를 얻었다. HEPES, urea 그리고 2-ketoglutaric산은 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO로부터 구하였고 glutamate dehydrogenase와 NADH는 Boehringer-Mannheim으로부터 얻었으며 *Helicobacter pylori* urease는 Dr H. Mobley of the University of Maryland, School of Medicine, Baltimore, MD로부터 구하였다.

Urease 활성은0.02M HEPES (N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N′-2-ethanesulfonic acid)buffer(pH 7.2, 37℃) 0.8ml에 10mM a-ketoglutarate, 25 mg/mL glutamate dehydrogenase 40uL, 250 uM NADH 와 1 mM urea를 혼합하여15분간 반응 시킨 후 생성 된 암모니아 농도 indophenol법(Srienc et al., 1984)을 이용하여 측정했다. Urease 활성은 주어진 pH에 따라 urea(2-450mM)와 붕산(0-2mM)을 이용하여 측정하였다. 초기 효소반응에 있어서 urease는 0.25ml(2.5mg/mL)를 사용하였고 반응 액에 있는 암모니아 농도는 phenol-hypochlorite 법을 이용하여 625nm에서 측정하였고 반응 농도를 변화시켜 표준곡선을 얻었다. 초기 반응 속도 율 V_0은 5분간 반응시켜 감소된 기질 농도를 이용하여 측정하였다. 반응에서 온도는 22 ± 1℃ 을 유지하였다. 저해제가 없을 때Urease에 의한 urea의 가수분해 반응은 아래와 같다. $(NH_2)_2CO + H_2O = 2NH_3 + CO_2$, 유산균 배양액에 의한 저해반응은 20mM HEPES, pH 7.0, 온도 25℃에서 진행되었다. 배양액에 의한 저해반응은 2가지 실험 시스템을 이용하여 구하였다. 첫 번째 시스템에 있어서 urea에 저해 제, urease ($0.0125mg/cm^3$)을 넣고 반응을 초기화 하였다. 두 번째 시스템에 있어서 효소를 저해제와 섞은 후 20분간 25℃에서 반응 시킨 후 적은 양의 urea(50mM)을 넣어 반응시켰다. 두 가지 시스템에서 초기 반응 시간을 같게 t=0으로 시작하였고 반응 성분농도도 서로 같게 20mM HEPES pH 7.0, urease농도 $0.0125mg/cm^3$, urea 농도 50mM를 사용하였으며 전체 반응 부피를 $100cm^3$로 맞추어 저해 제 농도를 선택하였다. 반응은 일정한 시간 간격으로 phenol-hypochlorite법을 이용하여 상등 액에 있는 암모니아 농도를 측정하였다. Sigma plot 9.0 프로그램을 이용하여 도표화한 생산 물 농도와 실험시간 데이터는 방정식 (1)에 부합되었다.

2-3. 유산균 발효액에 의한 *urease* 억제효과

배양액을 이용한 urease 억제효과를 측정하기 위하여1ml 배양액을 원심 분리 하여 상등 액을 취한 후 상등 액에 있는 암모니아 농도는 indophenol법(Srienc et al., 1984)법을 이용하여 측정하였다. Urease(1pg in 50)는 유산균 배양액과 15분간 30℃에서 96개 홀이 있는 micro title plate를 이용하여 반응 시킨 후 100 u1의 반응

액을 취하여 100 u1 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5, 100 mM urea 와 0.005% phenol red 포함)와 30분간 상온 온도 하에서 반응 시킨 후 micro plate reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ⅱ-*4.* 결과 및 토론

1. 배양 공정 최적화

1-1. 탄소 원 농도에 따른 생장 특성

5 L 발효 조에서 탄소 원 농도에 따른 균사체 생육을 살펴보면 Figure 20. 21.과 같다. 통기 량을 1 vvm 으로 하고 정치배양을 진행하였으며 pH 6.0으로 온도는 30℃로 하였다. 반응을 보면 glucose 농도를 30 g/L 로 하였을 24시간에 균체 량을 최대로 4.8g/L까지 도달하였다. 하지만 20 g/L 일 때에는 20시간 때 최대로 3.2 g/L 까지 도달 후 감소하였다. 탄소 원 농도를 40 g/L로 하였을 때 균체 량을 최대로 3.5 g/L을 얻었고 20시간 이후부터는 역시 감소하였다. 그리고 증식속도가 느리게 나타났다. 많은 자료들에서는 탄소 원을 glucose로 사용하여 시작농도를 40 g/L로 시작하였지만 유산균 최대 생산량에 도달하였을 때 잔여 탄소 원 농도가 많고 20 g/L로 하였을 때 탄소 원의 고갈로 인해 유산균 최대 생산에 영향을 받게 되어 있다. 또한 당 농도의 높음으로 하여 균체 생장에 저해 작용을 일으키는 현상이 있으므로 일반적으로 12%의 당 농도를 넘지 않는다는 자료로 나와 있다. 본 연구에서는 glucose 농도를 30 g/L일 때 최적 당 농도임을 확인 할 수 있었다.

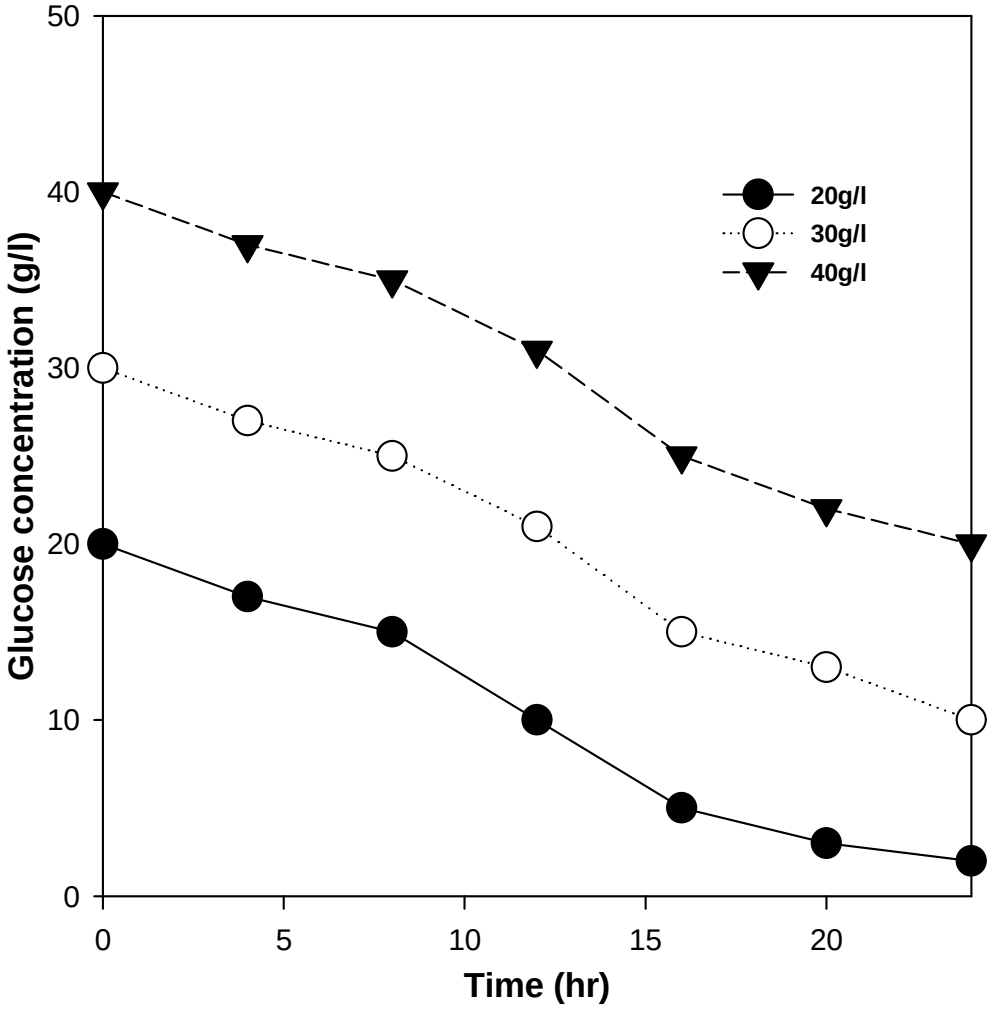


Figure 20. Effect of glucose decrease on cell growth (30℃, pH6.0)

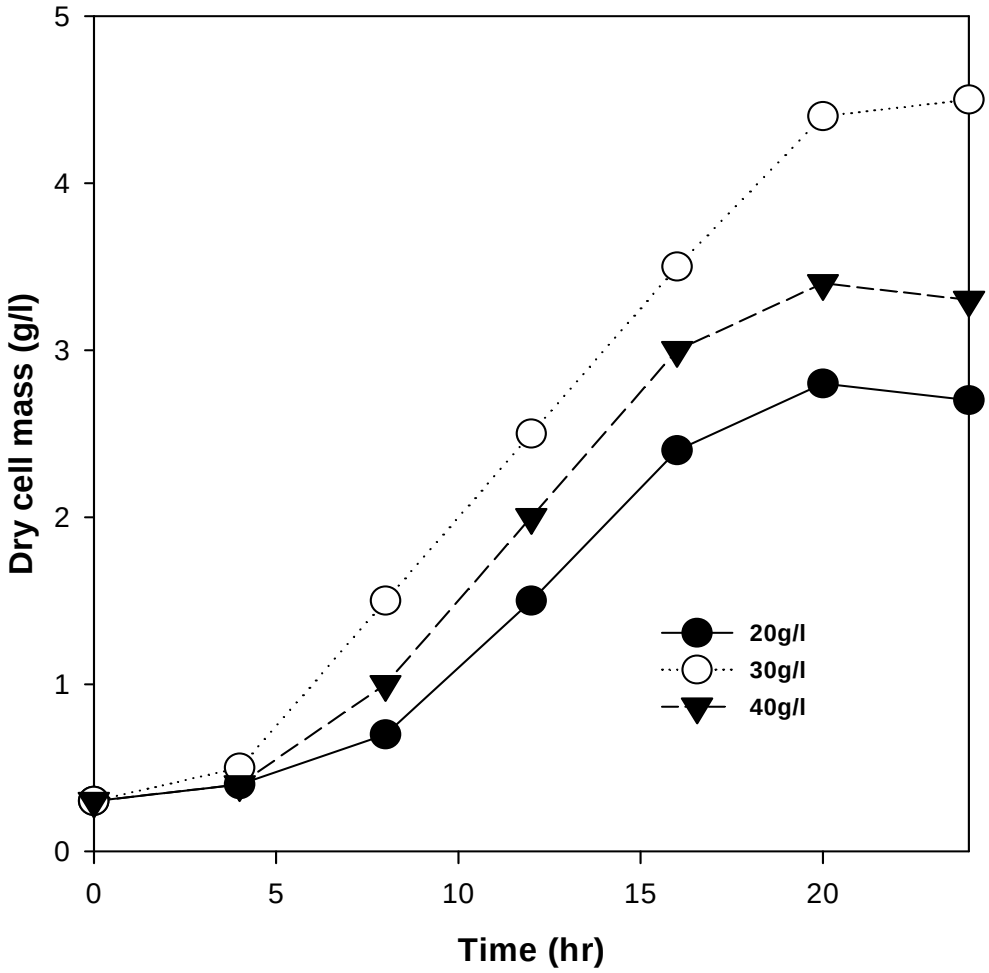


Figure 21. Effect of cell mass on cell growth (30℃, pH6.0)

1-2. 질소원 농도에 따른 생장 특성

미생물 생장에 있어서 중요한 인자인 질소원 성분의 농도에 따른 생장 특성을 알아보았다. 유기질소원으로 peptone과 yeast extract의 농도의 영향을 알아본 결과는 Figure 22. 23. 과 같다. peptone의 농도변화를 알아보기 위하여 Micro plate reader 기기를 이용하여 온도 30℃에서 농도를 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L 로 변화를 주어 최적 농도조건을 알아보았다. 최소 배지 양을 가지고 반응을 진행하였을 때 4시간 때에 2 g/L일 때 흡광도가 0.95로서 가장 높았고 peptone 농도를 5 g/L로 하였을 때 흡광도가 0.85로서 가장 낮았다. 이는 최적 peptone의 농도가 2 g/L일 때 본 연구에서 사용 된 유산균 생장에 가장 적합함을 알 수 있다. 이 결과는 Eon-Hwan Sihn[33] 사용한 peptone 6 g/L로 김치유산균 발효를 진행 한 결과에 비하여 적은 농도의 peptone으로 대량 생산 목적에 도달하였다. 다른 유기질소원의 yeast extract의 농도의 영향을 알아보기 위하여 Micro plate reader를 사용하여 온도 30℃에서 농도를 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L 로 변화를 주어 600nm에서 흡광도를 측정하여 유산균의 생장 특성을 알아보았다. 반응이 4시간 진행되어 3 g/L에서 가장 높은 흡광도 1.1을 얻었고 1 g/L에서 가장 낮은 흡광도를 얻었다. 이는 Eon-Hwan Sihn[33] 김치 유산균 발효에서 사용 된 최적 yeast extract 농도 3 g/L과 유사하였고 600 nm에서 측정 된 결과 보다 우수하였다. 무기 질소원 (NH4)2C6H6O7를 질소원으로 사용하여 유산균배양에 있어서의 최적농도를 알아보았다. Figure 24. 에서와 같이 볼 수 있는바 암모늄염의 농도가 2 g/L이상부터는 성장속도가 느리게 나타났다. 0.5 g/L과 1 g/L일 때 비교하면 성장효율이 1 g/L이 좋은 결과가 나타났고 질소원의 농도를 1 g/L로 선택하였다.

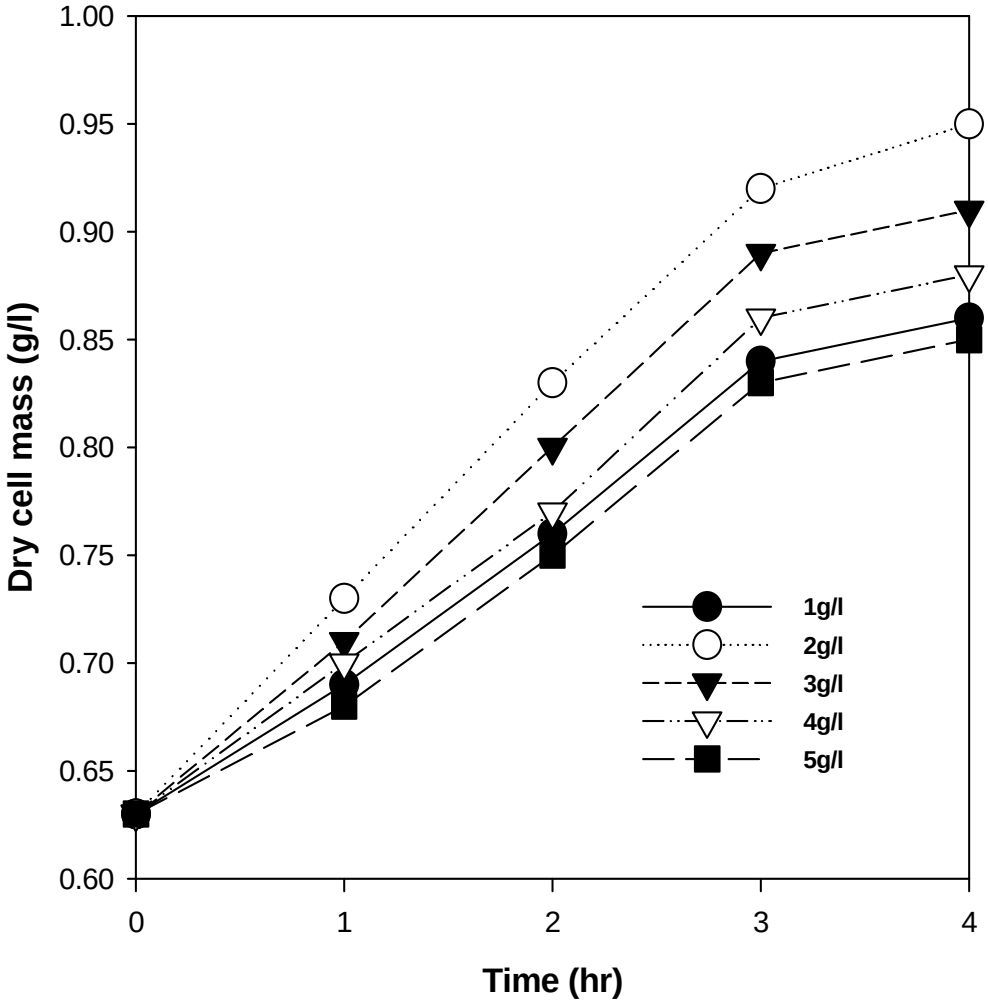


Figure 22. Effect of peptone concentration on cell growth(30℃)

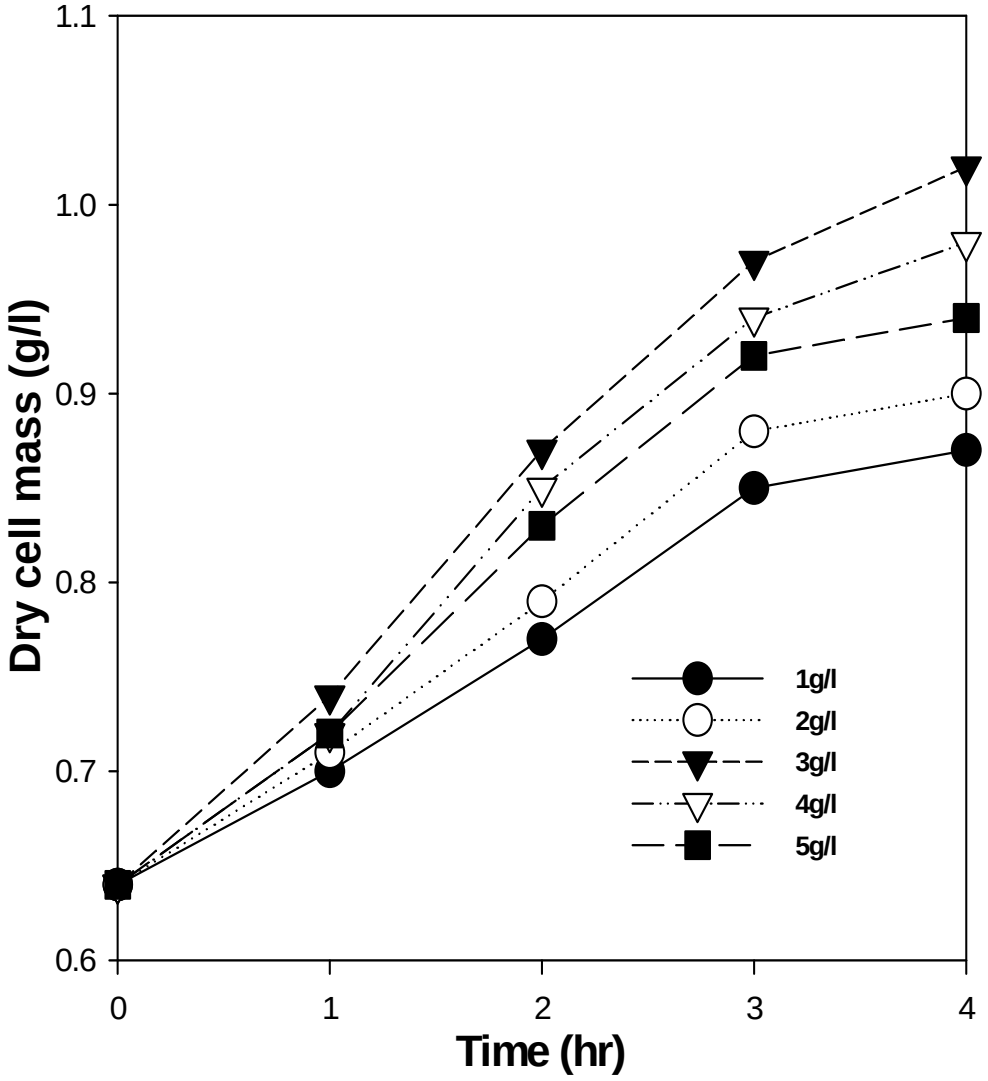


Figure 23. Effect of yeast extract on cell growth (30℃)

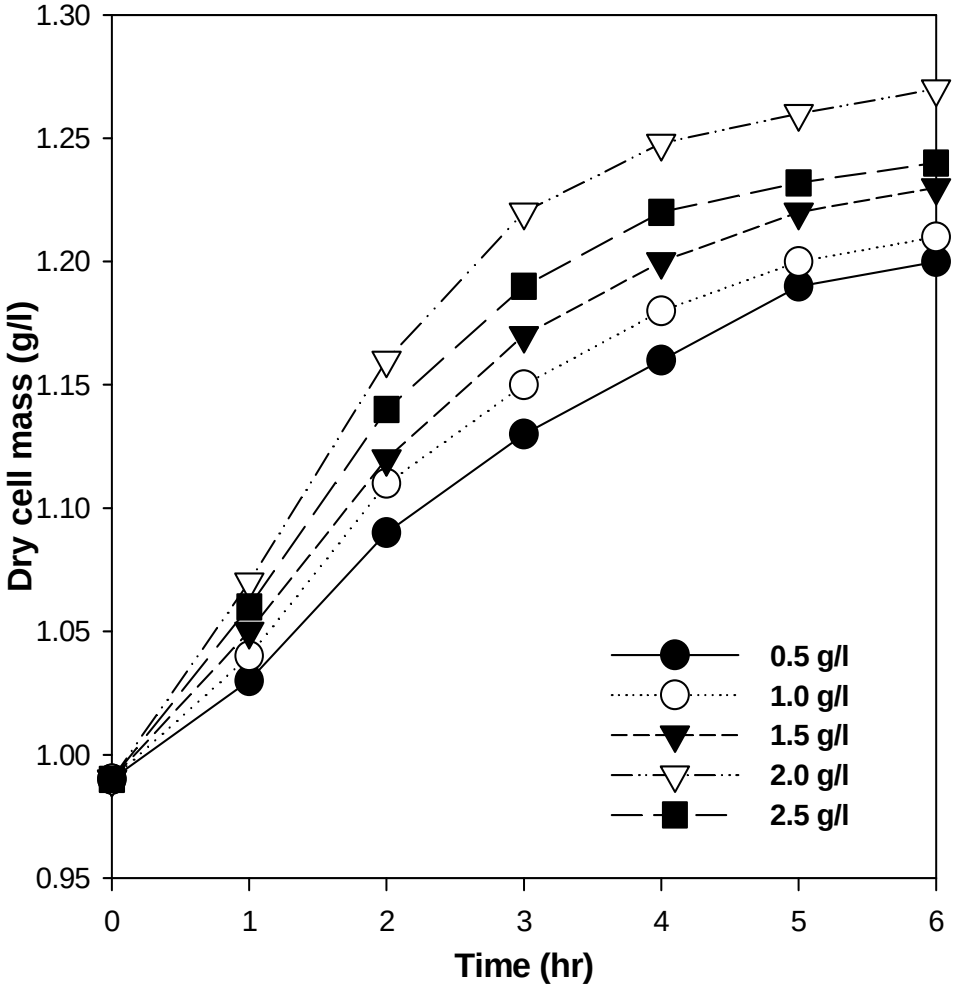


Figure 24. Effect of ammonium citrate concentration on cell growth(30℃)

1-3. 미량 원소 농도의 영향

미량 원소 농도의 영향을 알아보기 위하여 최적 농도를 알아보았다. 결과는 Figure 25.26. 과 같다. 본 연구에서는 배지 조성 중 인산염과 아세트산나트륨의 최적농도를 Micro plate reader를 이용하여 30℃에서 정치 배양을 진행하였고 생장곡선을 흡광도 600 nm로 측정하여 비교하였다.

인산염의 서로 다른 농도 하에서의 성장변화곡선은 Figure 25.에서 볼 수 있는 바와 같이 최적 배양 농도는 1.5 g/L 농도 하에서 가장 우수하게 자랐음을 알 수 있다. 아세트산나트륨의 최적 배양농도를 볼 때 1 g/L로 최적 농도로 나타내었다. 이러한 결과로부터 알 수 있는바 미생물의 생육에 필요한 무기 원소와 미량금속원소가 필수성분으로 요구 된다는 자료내용과 비슷하였다.

본 실험은 대량 발효 공정 시 미량원소의 저해 작용을 감소시키고 상대적으로 원가 비용도 줄였으며 균사체의 생산을 목적으로 공정 시에는 최적 배양 농도로 사용될 수 있다고 생각되었다.

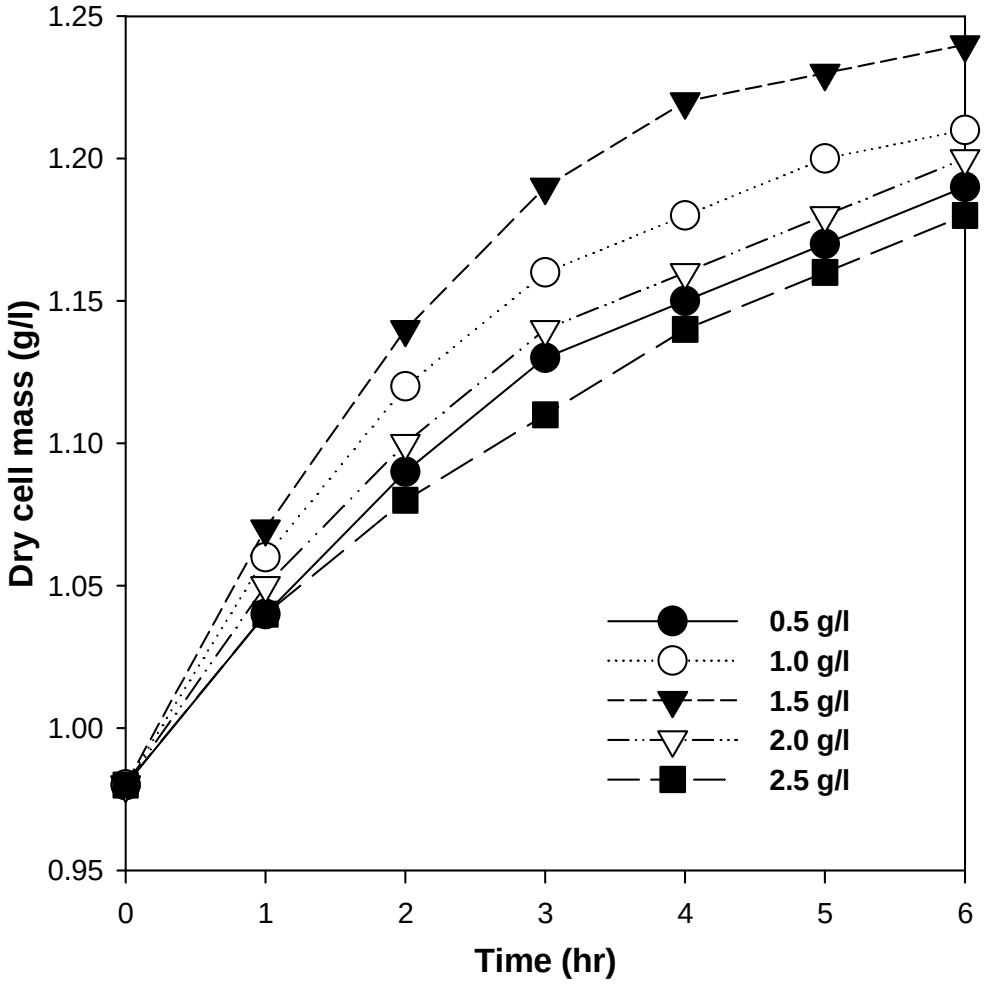


Figure 25. Effect of dipotassium phosphate concentration on cell growth (30℃)

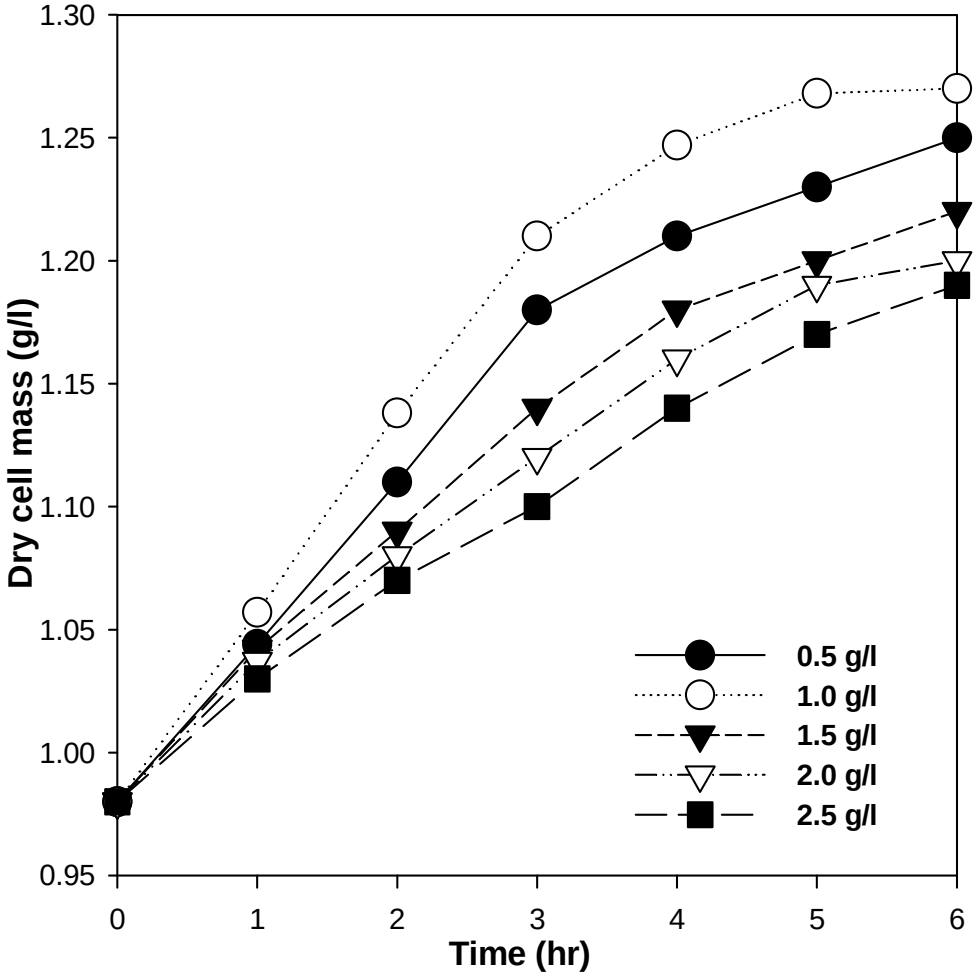


Figure 26. Effect of sodium acetate concentration on cell growth(30℃)

1-4. 온도 및 *pH*에 따른 영향

김치 유산균 발효에서 최적 반응온도와 pH 영향을 알아보기 위하여 회분식 반응을 이용하여 최적 조건을 알아보았다. 그 결과는 Figure 27. 28. 와 같다. 최적 반응 온도를 알아보기 위하여 회분 식 배양을 진행하였으며 반응기 온도를 각각 30℃,37℃, 40℃로 하였고 초기 pH는 6.0, 통기 량은 1vvm으로 정치배양을 진행하였다. 24시간 발효를 진행 한 결과 30℃에서는 20시간 때 최고로 균체 량 3.01 g/L을 얻었고 37℃에서는 24시간까지 쭉 자라 4.78 g/L의 균체 량을 얻었으며 40℃로 반응 시켰을 때 16시간 때부터 생장 속도가 느려져 24시간 때에는 3.4 g/L의 균체 량을 얻었다. 이러한 결과는 *Lactobacillus* 균주 중 최적 생육온도 범위 37~45℃의 정상 젖산균으로서 산업적으로 가장 중요한 젖산균에 속해 있다는 보고와 비슷하였다. 본 연구에서 최적 배양 온도는 37℃로 나타내었다.

반응에 있어서 중요한 인자인 pH의 영향을 알아보기 위하여 초기 온도를 30℃로 하고 통기 량을 1vvm으로 하였으며 pH를 각각 5.5, 6.0, 6.5 로 하고 회분 식 배양을 진행하였다. Figure 28.에서 볼 수 있는 바와 같이 pH 6.0일 때 최대로 균체 량을 4.78 g/L을 얻었고 pH 6.5에서는 20시간 때 최대로 균체 량을 3.25 g/L를 얻었으며 pH 5.5에서 24시간 때 2.8 g/L의 균체 량을 얻었다. 이로부터 본 연구에서 김치 유산균 발효 중 최적 pH는 6.0임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 유산균 최적 발효 및 생육 pH가 5.5~6.0 사이이면 pH 5.0 이하부터는 발효가 강하게 억제된다는 보고와 유사하였다.

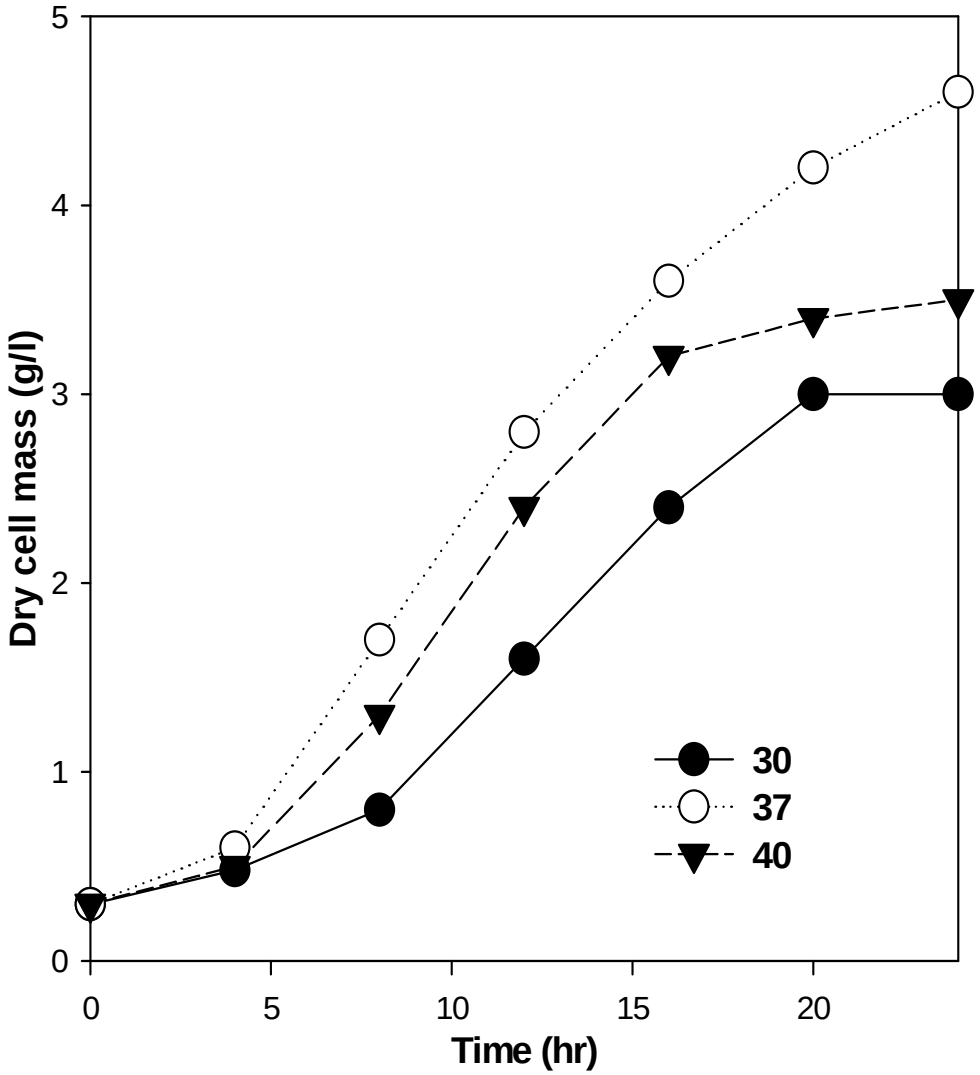


Figure27. Effect of temperature on cell growth (pH6.0)

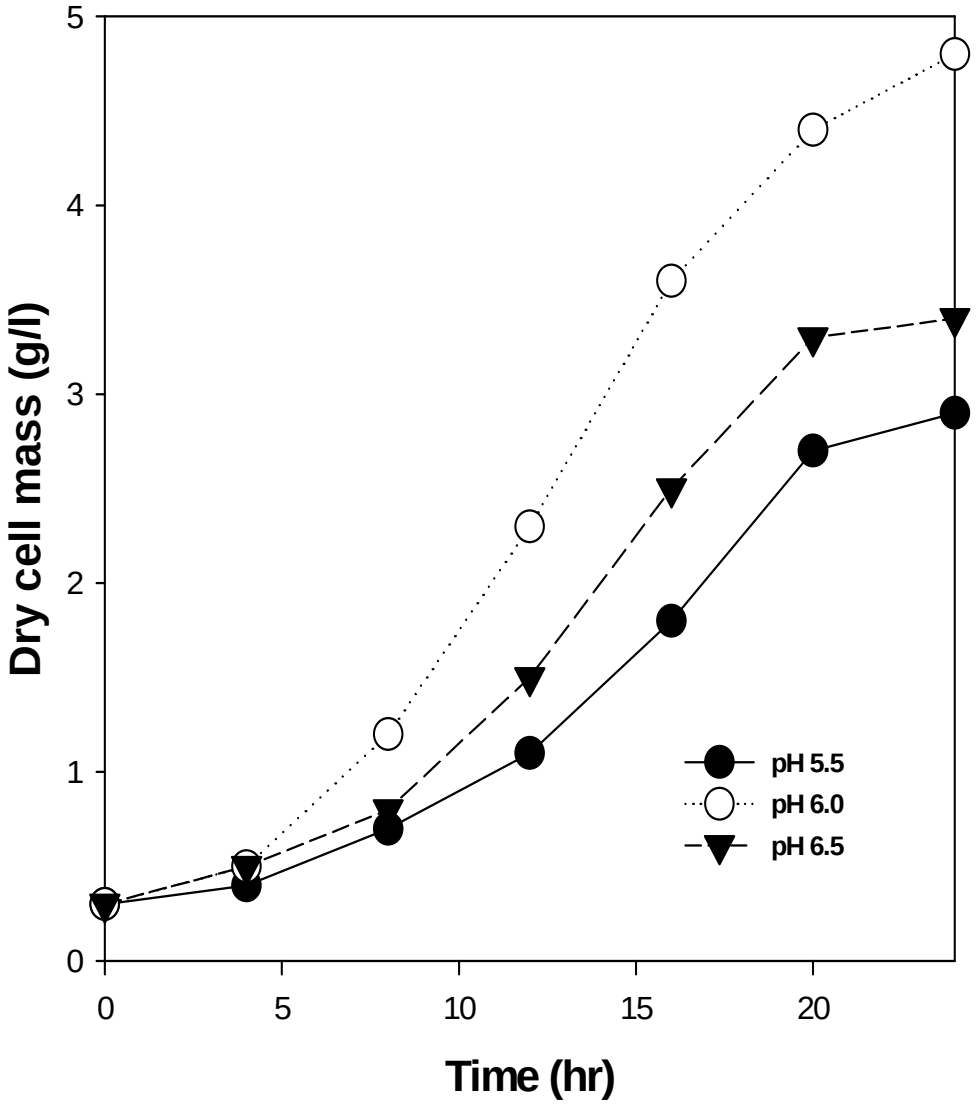


Figure 28. Effect of pH on cell growth (30℃)

1-5. 정치배양 및 교반속도에 따른 영향

유산균의 생장에 있어서 대량 생산 목적에 도달하려면 기계의 특성을 고려하여야 하면 특히 미 호기성인 유산균인 경우에 있어서는 적당량의 산소 공급이 발효에 미치는 영향이 중요한 것으로 알려져 있다. 이러한 문제점을 가지고 본 연구에서는 본 연구에서 사용 된 김치유산균의 교반속도에 대한 영향을 알아보았다. 그 결과는 Figure 29. 에 나타내었다. 회분 식 배양을 이용하여 초기 pH 6.0, 온도 30℃로 하고 통기 량을 1 vvm으로 하였으며 정치배양 및 교반속도를 100 rpm, 200 rpm으로 정하여 반응 효과를 알아본 결과 24시간 배양 후 정치 배양에서 가장 높은 균체 량 4.7 g/L을 얻었고 다음으로 100 rpm 일 때 3.2 g/L을 얻었으며 200 rpm으로 반응 시켰을 때 균체량을 2.7 g/L을 얻었다. 이로부터 알 수 있는 바 본 연구에서 사용 된 김치유산균은 미 호기성 균주로서 교반속도에 의한 영향을 크게 받음을 알 수 있었다. 이는 또한 유산균 종류 중 많이 사용 되고 있는 균주가 통성 미 혐기성인 특성을 가진 균이라는 보고와 유사하였다.

이로부터 본 연구에서 교반 속도에 의한 영향을 알아보았고 본 연구에서 사용 된 유산균의 최적 배양조건은 정치배양이고 미량의 통기 량을 수요함을 알 수 있었다.

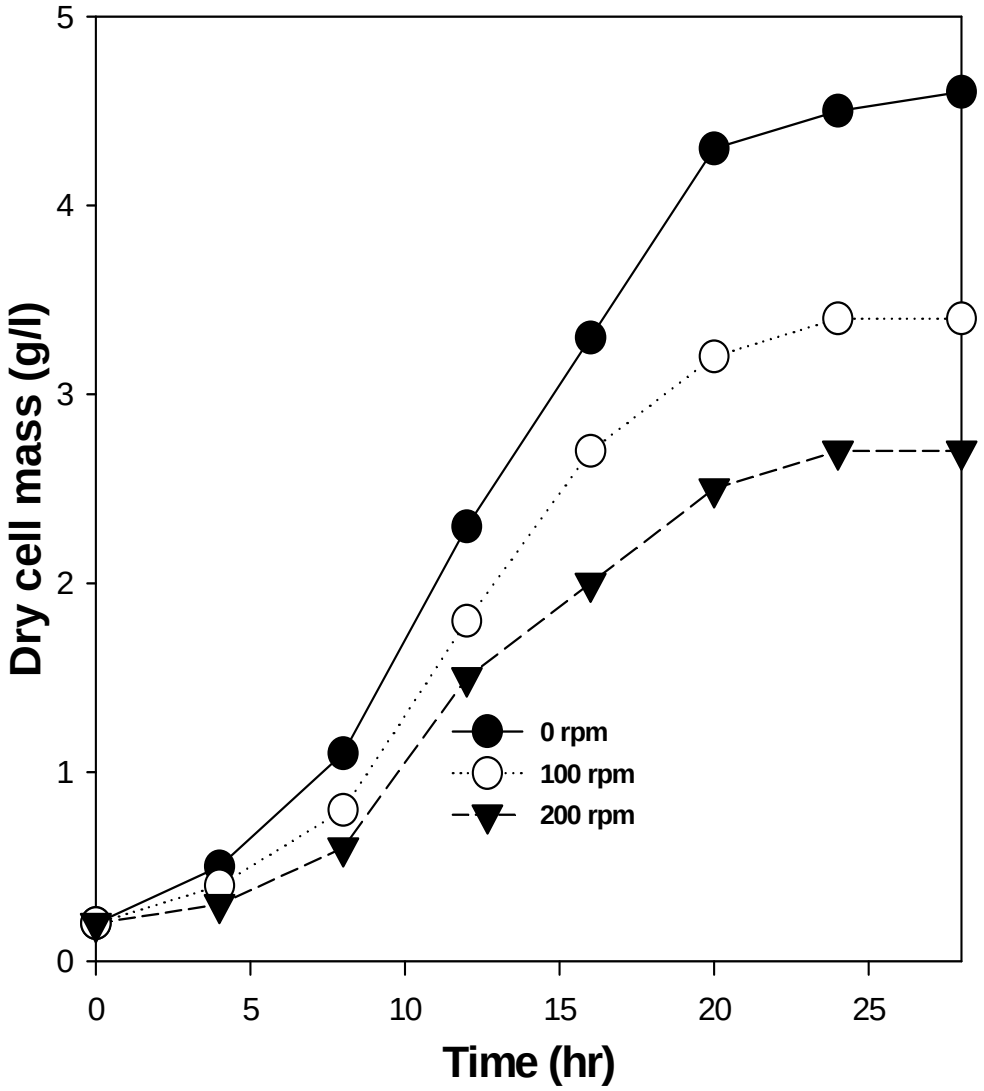


Figure 29. Effect of agitation speed of fermenter on cell growth.

1-6. 회분 식 및 유가 식 배양 공정 최적화

Helicobacter pylori urease에 억제효과가 있는 김치 유산균의 최적 조건을 이용하여 회분 식 배양을 실시하였다. 유산균을 대량 함유한 배양액을 대량 생산하기 위하여서는 기계의 특성이 고려되어야 하며 특히 반응기 내의 산소 공급이 미치는 영향이 가장 중요한 것으로 알려져 있다. 이러한 문제점과 최적 배양 조건을 이용하여 회분 식 배양에서는 24시간 만에 5.16g/L의 균체량을 얻었고 발효가 활발히 진행됨에 따라 용존 산소량을 조절하기 위하여 통기 량을 1vvm~1.5vvm으로 일정하게 조절하여 균체 생장을 높여주었다. Figure 30.에서 볼 수 있는 바와 같이 24시간이 지난 후 영양물질의 고갈로 더 이상 성장을 하지 못하게 되었다. 이는 유가 식 배양을 진행 하여 농축 배지를 넣어줌으로써 세포 생장을 더 높여 줄 수 있음을 알 수 있다. 유산균 배양 공정 중 회분 식 배양공정에서는 최적 배양 조건들을 알아보았고 탄소원이 고갈 되는 조건에서 유가 식 배양을 진행하였다.

먼저 회분 식 공정으로 세포가 최대 활성을 갖게 되는 16시간 동안 세포 배양을 실시하였고 정치배양으로 통기 량을 1vvm로 조절하였으며 용존산소량을 20% 정도로 유지하여 주었다. 배양 16시간 이후 세포농도가 6g/L로 되었을 때 유량펌프를 이용하여 기질 주입속도를 5ml/min으로 유지하였고 통기 량을 1~2vvm으로 조절하여 배양하였다. 결과는 Figure 27. 에 나타내었다. 유가 식 배양을 진행함에 있어서 DO stat 법을 이용하여 최적 배양 조건을 유지하였으며 대량 생산 목적에 도달하였다. 반응이 진행함에 따라 대량의 유기산과 염의 생성으로 인해 최종 반응을 32시간 진행 하였으며 그 이후부터는 생장이 감소되기 시작하였다. 실험 결과 균체 생장은 18시간 이후부터 안정화되어 정상상태를 유지하는 경향을 보였으며, 최대 균체농도는 10.9g/L로 되었다.

이를 통해 *Helicbacter pylori* urease에 억제효과 있는 김치유산균 발효의 유가 식 배양공정에서 기질 유입속도와 탄소 원의 소모 속도를 일정하게 유지시킴으로서 최적 제어 조건을 확립할 수 있었다. 이와 같은 유가 식 배양공정을 최적화 하여 적은 양의 영양물질을 이용하여 전체적인 생산성을 증가시켜 김치유산균의 대량 생산 가능성을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 유기산의 대량 생산 발효액을 만들어 내어 *Helicobacter pylori* urease에 대한 억제효과 실험에 조건을 마련하였고 또한 실험실에서의 배양 조건으로부터 산업체에서의 대량 생산 공정에 적용 가능성을 확인 하였다.

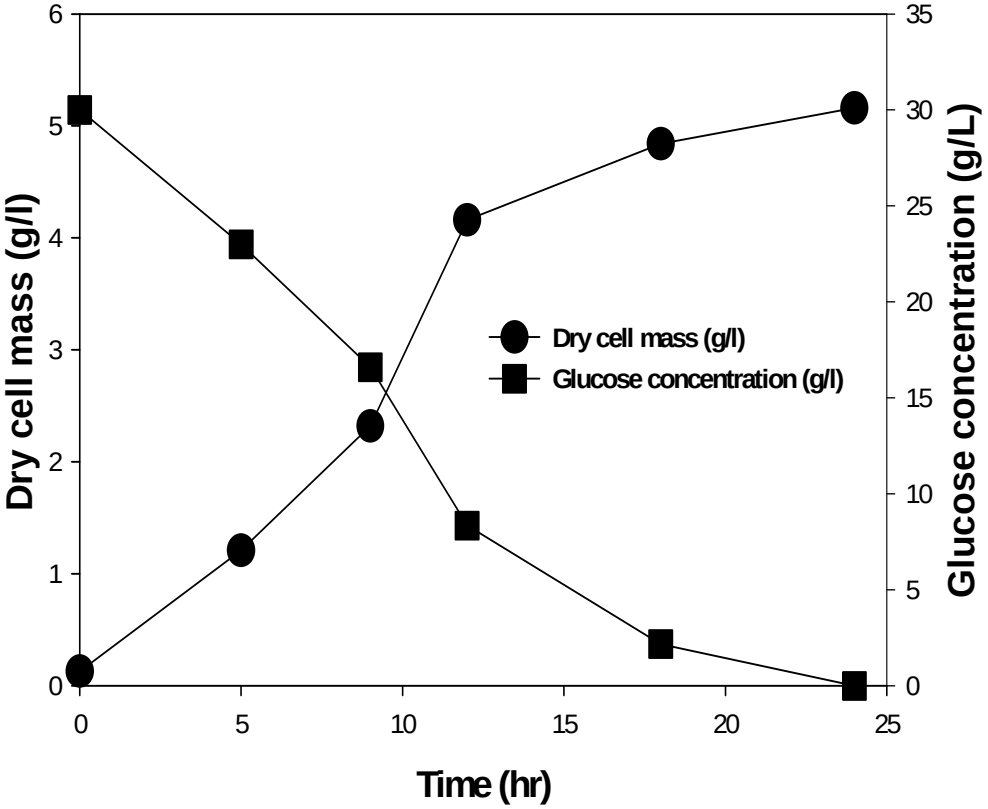


Figure 30. Batch cultivation of lactic acid bacteria isolated from Kimchi(37℃, pH6.0)

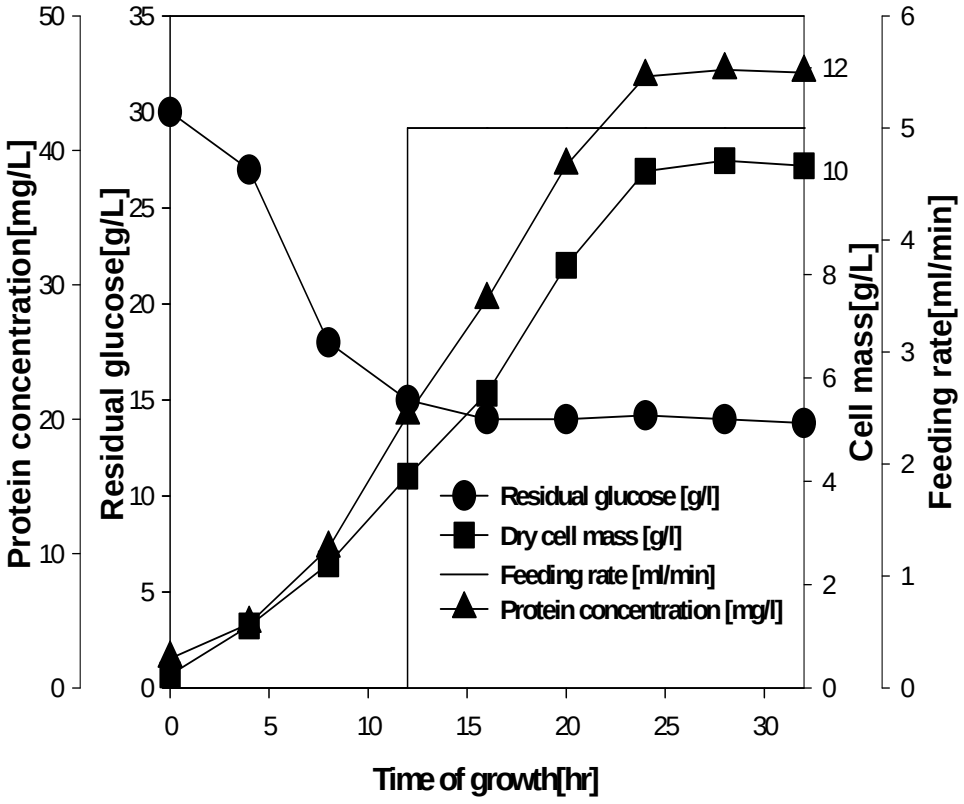


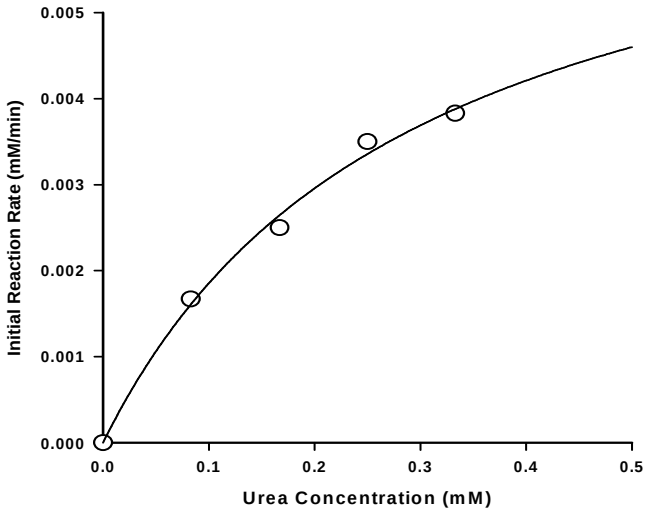
Figure 31. Time courses of the lactic acid bacteria growth using fed batch cultivation(37℃, pH6.0)

2.*urease* 반응 매개변수 결정

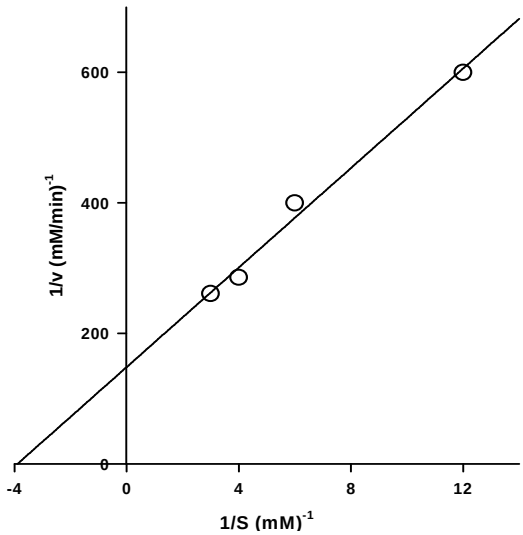
Figure 31.(a)에서는 urease의 초기 반응 속도를 나타내었다. Urea의 초기 농도의 증가와 함께 효소반응 속도는 urea 농도[15]의 최대 포화 농도 치와 함께 규칙적 으로 증가하였다. Urea 가수분해 반응 데이터는 Michaelis-Menten(eq. [1])식에 적용되었다.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \qquad (1)$$

Figure 32. 에서 볼 수 있는바 기울기 1/[S] 곡선은 urease 반응 매개변수와 함께 측정되었다. 초기 urea 감소율은 온도 30℃, pH 6.8에서 측정하였으며 urease 농도는 6.667mg/L였다. 그림에서 기울기는 38.14이고 y축 절편은 148.3였다. 이로부터 urease 효소반응 속도상수 Vm 값은 6.743 X 10^{-3}mM/min이고 Km 값은 0.257mM을 구하였다.



(a)



(b)

Figure 32. (a) The changes of initial urea degradation rate with the changes of urea concentration. (b) LineweaverBurk plots for determining urease V_m and K_m values. The initial urea degradation rate was measured at 30°C, pH 6.8. The enzyme concentration was 6.667 mg/l. Where, the slope of linear least square fit is 38.14 and y intercept is 148.3.

3. *urease* 효소활성에 대한 발효액의 억제효과

유산 균 발효액을 증류수에 희석하여 효소반응에 사용하였고 배양 액 농도를 변화 시켜 억제반응을 측정하였다. 배양액에 있는 단백질 단위 농도를 선택 하였고 Ki 값을 선정하였다. Michaelis-Menten식을 이용하여 구한 효소반응속도상수 Km과 Vm 값을 Lineweaver-Burk분석법에 적용시켜 Ki 값을 구하였다. 실험 결과로부터 알 수 있는바 경쟁적인 저해반응으로서 Km 값 증가와 함께 저해 제 농도도 증가하였다. 이러한 결과는 단백질 분자가 경쟁적 저해 반응에 있어서 urea의 분해를 저해하는 것을 알 수 있었다.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{V_m[S]}{K_m(1+\frac{[I]}{K_i})+[S]} \qquad (2)$$

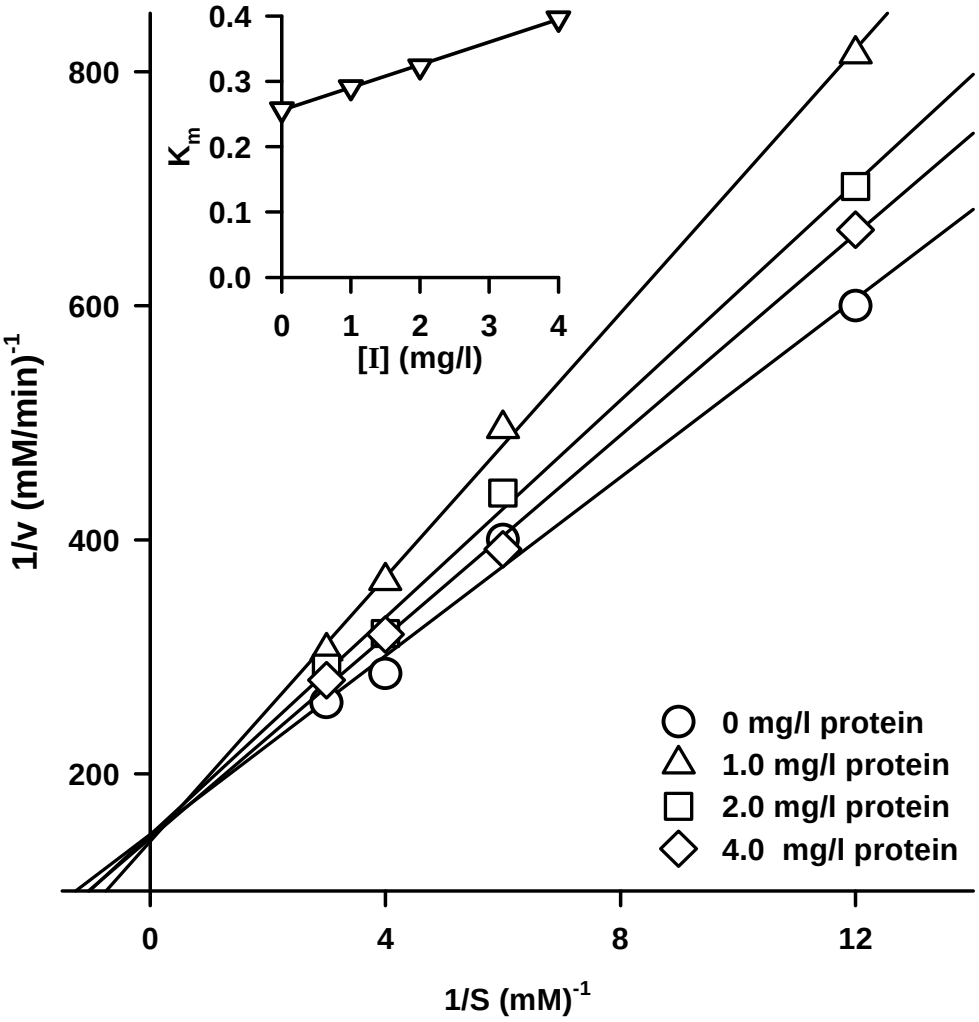


Figure 33. LineweaverBurk plots for inhibition of *Lactobacillus* culture broth on urease for the degradation of urea at 30°C, pH 6.8. Concentration of protein in culture broth for curves was 0, 1, 2, and 4 mg/l, respectively; the enzyme concentration 6.667 mg/l. The inset represents the plot of apparent Michaelis constant (K_m) versus the concentration of protein in culture broth for determining the inhibition constant. The line was drawn using linear least-squares fit.

Table 2. Determination of urease inhibition coefficient by changing inhibitor concentration.

	No inhibitor	1 mg/l protein	2 mg/l protein	4 mg/l protein
Intercept($1/V_m$)	148.3	145.1	147.9	142.4
Slope($K_{m'}/V_m$)	38.1	42.2	47.8	56.4
$K_{m'}$	0.257	0.291	0.323	0.396
$[i]/K_i$	0	0.132	0.258	0.540
K_i	-	7.56	7.75	7.41
Average K_i	7.57 mg/l (protein base)			

$K_{m'}$: Apparent Michaelis constant

Figure 32. 는 urease에 대한 경쟁적 저해반응에 대한 억제반응을 보여주고 있다. 효소 반응 상수 Km 값은 저해 제 농도 변화에 따라 변화되었고 최종 평균값 7.57mg/l(배양 액 중 단백질 농도 4mg/l을 단위로)을 얻었다. 이러한 결과로부터 urease 저해제는 단백질 조성성분이거나 유도체로 추측되었다. 또한 분자 내 반응[14]을 저해하고 활성을 감소시키는 일종의 물질이라고 추측되었다.

4. 발효 배양액을 이용한 *urease* 저해 제 측정

urease 저해 제 효과 측정을 이용하여 반응 상수 Vm, Km 및 Ki 값으로부터 저해 제 농도를 계산할 수 있었다. 저해 제 농도에 따른 암모니아 농도 변화는 Figure 33. 과 같다. 저해 제 농도는 15분간 효소반응을 시켜 측정한 암모니아 농도를 이용하여 계산하였다. 가운데 작은 그림은 15분간 효소반응을 시킨 후 생성 된 암모니아 농도와 저해제인 단백질 농도와의 관계를 도표화 하였다. 저해제 농도의 증가에 따라 생성 되는 암모니아 농도는 감소를 보여주었다.

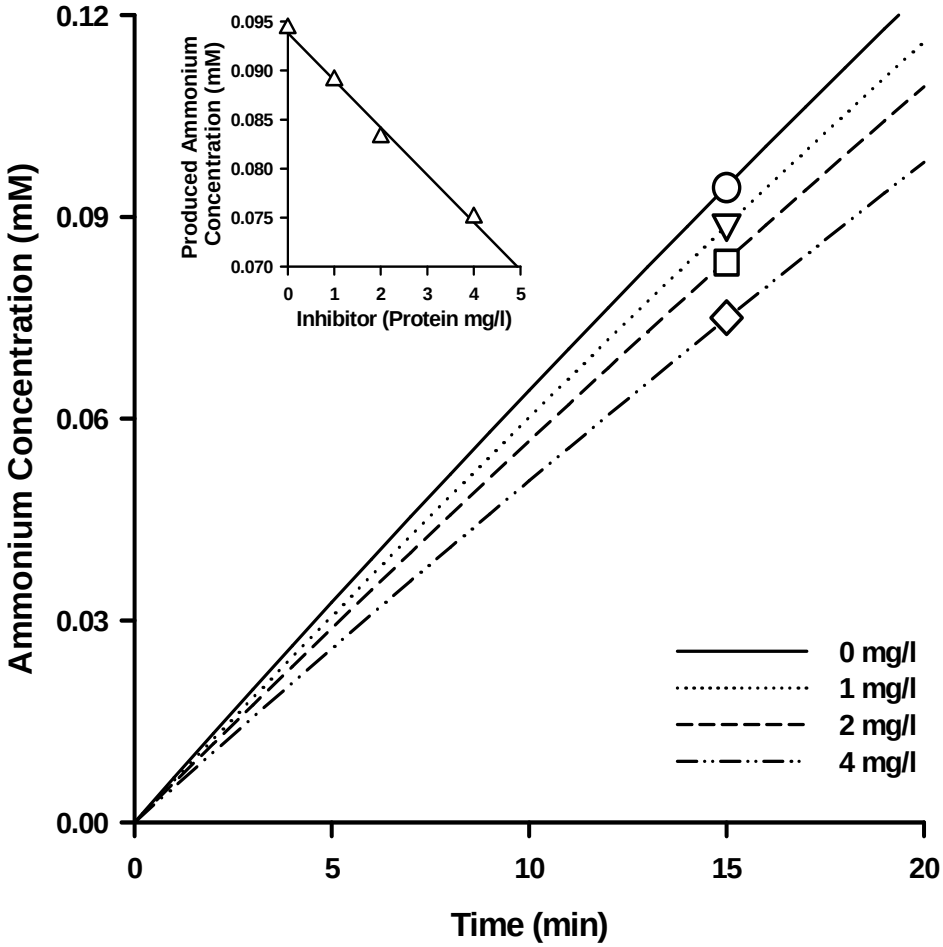


Figure 34. The changes of ammonium concentration by urease for different urease inhibitor concentration. Lines represent the computer simulation value and symbols experimentally measured ammonium concentration after 15 min. The inset represents the plot of linear relation between urease inhibitor and produced ammonium concentration. The line was drawn using linear least-squares fit.

5. 유가 식 발효를 이용한 *urease* 저해제인 단백질 생산물

회분 식 배양과 연속 식 배양 공정의 장점을 이용한 유가 식 배양은 산업적 분야에 많이 이용되고 있는 공정이다. 초기 회분 식 배양을 진행하였고 기질농도를 일정하게 유지하기 위하여 외부로부터 기질을 일정한 속도로 공급하면서 유가 식 발효 공정을 진행하였으며 최대 균 체량과 저해 제 산물을 얻었다. 32시간 배양 후, 건 체량을 10.9g/L을 얻었다. (회분 식 배양에서는 6g/l을 얻었음.) 유가 식 배양에 있어서 공급 된 탄소 원 농도는 60g/L였다. (Figure 35.) 회분 식 배양에 비하여 건 체량은 크게 증가하다가 32시간 이후부터는 증가를 보이지 않았다. 균 체 생장 기간에 저해 제 농도도 증가하였고 반응이 32hr 진행된 후 최대로 46mg/L(단백질 농도)을 얻었다.

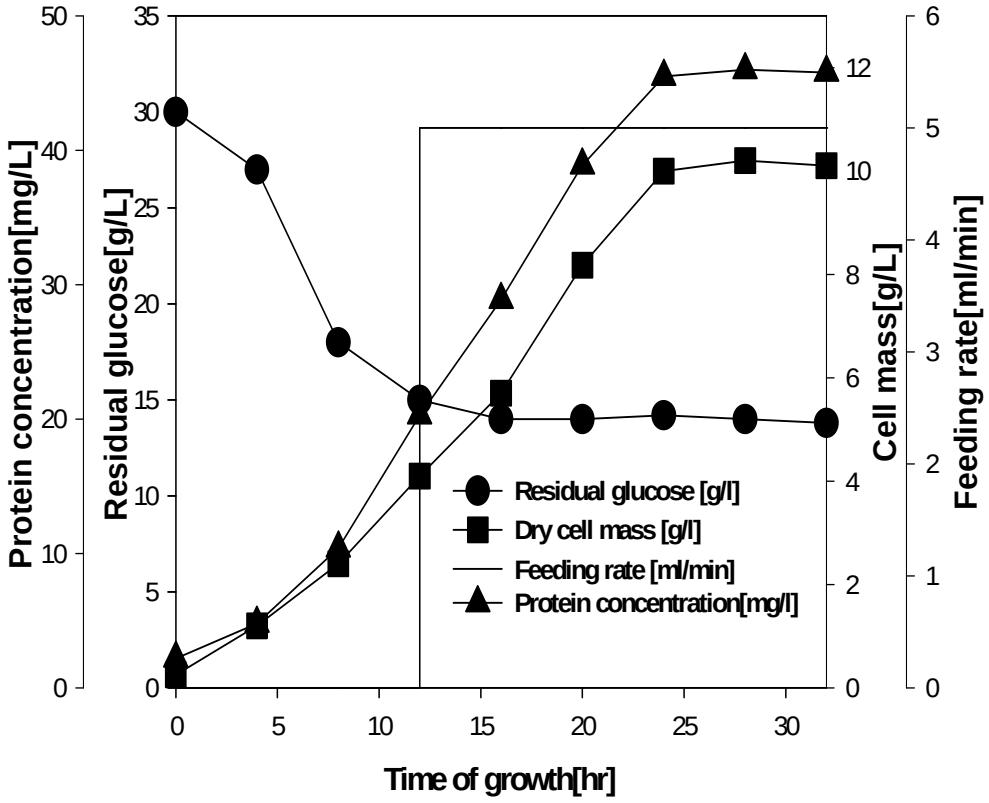


Figure 35. Time courses of the *lactic acid bacteria* growth using fedbatch cultivation (pH6.0, 37℃)

Ⅱ-5. 결 론

많은 연구자들이 *H.pylori* urease에 대한 관심 정도는 효소가 위염, 위궤양 등 질병의 주요 원인이라고 간주하고 있다. 본 연구에서는 유산균의 배양조건을 알아보았고 최적조건을 이용하여 유가 식 배양을 진행하였으며 urease에 대한 저해 제 농도를 증가시켰다. 유가 식 배양공정은 회분 식 배양과 연속 식 배양의 많은 장점을 갖고 있어 배양 조건과 미생물 발효에 대한 것을 쉽게 이해 할 수 있었다. 기질의 공급은 회분 식 배양 공정에서 기질 고갈과 영양물질 공급을 유지하여 세포 생장에 유리하였다. 비록 본 연구에서 실제로 복잡한 효소조성으로 인해 저해제가 무엇인지 결정하지 않았지만 저해제 메커니즘과 반응상수를 결정하였다. 본 연구에서는 발효액을 2~4배 정도 희석하여 사용하였으며 단백질 농도 4mg/L을 기초로 저해 제 유형을 알아냈고 저해 상수 Ki 값을 계산하였다. 이후에 연구에 있어서 urease 저해제에 대한 분리 및 특성에 관한 연구가 필요하다. 또한 생화학분야연구에 있어서 urease 억제 단백질 구조와 조성을 알아내고 활성변화를 조사가 필요하다. 저해 제 농도에 따른 실험 데이터로부터 Vm 과 Km 값의 변화를 계산하였다. 또한 Vm 값이 거의 변하지 않는 조건하에서 저해제 농도에 따른 Km 값을 변화를 Lineweaver Burk 그래프를 이용하여 계산하였다. 저해제 연구에 있어서, urease에 대한 경쟁적 저해 제 메커니즘을 이해하기 위하여 *Klebsiella aerogenes* [45]로부터 도입한 모델링을 이용하였으며 *H.pylori urease*에 대한 단백질 반응효과를 알게 되었다.

참고문헌

1. Zourari, A., J. P. Acocolas, and M. J. Desmaze(1992), Metabolism and Biochemical Characteristic of Yoghurt bacteria. a review, *Lait*. 72, 1-34.

2. Schllhaass, S. M. and H. A. Morris(1985), Rheological and Scanning Electron Microscopic Examination of Skim Milk gels obtaines by Fermenting with ropy and non-ropy strains of Lactic acid Bacteria, *Food Microstructure*. 4, 279-287.

3. Rasic, J. L. and J. L. Kurmann(1978), Yoghurt-Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations. p61, 99-137, Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark.

4. Macura, D. and P. M. Townsley(1984), Scandinavian Ropy Milk: Identification and characterization of endogenerous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion, *J. Dairy Sci.* 67, 735-745.

5. Sundman, V.(1953), On the Protein Character of a Slime produced by Streptococcus cremoris in Finnish ropy sour milk, *Acta Chem. Scand.* 7, 558.

6. Sharpe, M. E., I. E. Gravie, and R. H. Tilbury(1972), Some slime forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus, Appl. Microbiol.* 23, 389-397.

7. La Riviere, J. W. M., P. Koomin, and K. Smidt(1967), Kefiran, a Novel Polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis, Arch.*

Mikrobiol. 59, 269-278.

8. Ceming, J., C. Bouillanne, M. Landon, and M. Desmazeaud(1992), Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from slim-forming mesophilic lactic acid baceria, *J. Dairy Sci.* 75, 692-699.

9. Nakajima, H. and T. Hirota(1992), Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495, *Cabohydr. Res.* 224, 245-253.

10. Gruter, M., B. R. Leeflang, J. Kuiper, J. P. Kamerling, and J. F. G. Vliegenthart(1992), Structure of the Exopolysaccharide produced by *Latococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk, *Carbohr. Res.* 231, 273-291.

11. Gruter, M., B. R. Leeflang, J. Kuiper, J. P. Kamerling, and J. F. G. Vliegenthart(1993), Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbruckii* subspecies *bulgaricus* it grown in skimmed milk, *Carbohr. Res.* 239, 209-226.

12. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426-428, 1959

13. Akada, J. K., M. Shirai, et al. (2000). "Identification of the urease operon in Helicobacter pylori and its control by mRNA decay in response to pH." Molecular Microbiology ***36***(5): 1071-1084.

14. Amtul, Z., M. Rasheed, et al. (2004). "Kinetics of novel competitive inhibitors of urease enzymes by a focused library of oxadiazoles/thiadiazoles and

triazoles." Biochemical and Biophysical Research Communications ***319***(3): 1053.

15. Arkhypova, V. N., S. V. Dzyadevych, et al. (2001). "Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances." Talanta ***55***(5): 919.

16. Avonts, L. and L. De Vuyst (2001). "Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria." Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet ***66***(3b): 543-50.

17. Brzozowski, T., P. C. Konturek, et al. (2006). "Effect of probiotics and triple eradication therapy on the cyclooxygenase (COX)-2 expression, apoptosis, and functional gastric mucosal impairment in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils." Helicobacter ***11***(1): 10-20.

18. Canducci, F., F. Cremonini, et al. (2002). "Probiotics and Helicobacter pylori eradication." Digestive and Liver Disease ***34***(Supplement 2): S81.

19. Cano, P. G. and G. Perdigon (2003). "Probiotics induce resistance to enteropathogens in a re-nourished mouse model." J Dairy Res ***70***(4): 433-40.

20. Cats, A., E. J. Kuipers, et al. (2003). "Effect of frequent consumption of a Lactobacillus casei-containing milk drink in Helicobacter pylori-colonized subjects." Aliment Pharmacol Ther ***17***(3): 429-35.

21. Chapat, L., K. Chemin, et al. (2004). "Lactobacillus casei reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation." Eur J Immunol ***34***(9): 2520-8.

22. Chen, W., D. Shu, et al. (2001). "Helicobacter pylori infection: mechanism of colonization and functional dyspepsia Reduced colonization of gastric mucosa by Helicobacter pylori in mice deficient in interleukin-10." J Gastroenterol Hepatol ***16***(4): 377-83.

23. Coconnier, M. H., V.Lievin, et al. (1998). "Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB." Appl Environ Microbiol ***64***(11): 4573-80.

24. Cruchet, S., M. C. Obregon, et al. (2003). "Effect of the ingestion of a dietary product containing Lactobacillus johnsonii La1 on Helicobacter pylori colonization in children." Nutrition ***19***(9): 716.

25. Faraci, W. S., B. V. Yang, et al. (1995). "Inhibition of Helicobacter pylori Urease by Phenyl Phosphorodiamidates: Mechanism of Action." Bioorganic & Medicinal Chemistry ***3***(5): 605.

26. Fedwick, J. P., T. K. Lapointe, et al. (2005). "Helicobacter pylori activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability." Infect Immun ***73***(12): 7844-52.

27. Felley, C. and P. Michetti (2003). "Probiotics and Helicobacter pylori." Best Practice & Research Clinical Gastroenterology ***17***(5): 785.

28. Gorbach, S. L. (2002). "Probiotics in the third millennium." Digestive and Liver Disease ***34***(Supplement 2): S2.

29. Hamilton-Miller, J. M. T. (2003). "The role of probiotics in the treatment and prevention of Helicobacter pylori infection." International Journal of Antimicrobial Agents ***22***(4): 360.

30. Houimel, M., J. P. Mach, et al. (1999). "New inhibitors of Helicobacter pylori urease holoenzyme selected from phage-displayed peptide libraries." Eur J Biochem ***262***(3): 774-80.

31. Hudault, S., V. Lievin, et al. (1997). "Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by Lactobacillus casei (strain GG) against Salmonella typhimurium C5 infection." Appl Environ Microbiol ***63***(2): 513-8.

32. Iizumi, T., S. Yamanishi, et al. (2005). "Augmentation of Helicobacter pylori urease activity by its specific IgG antibody: implications for bacterial colonization enhancement." Biomed Res *26*(1): 35-42.

33. Ito, Y., K. Shibata, et al. (1998). "Ecabet sodium, a locally acting antiulcer drug, inhibits urease activity of Helicobacter pylori." European Journal of Pharmacology *345*(2): 193.

34. Lee, Y. and T. S. Lee (2005). "Enhancement in ex vivo phagocytic capacity of peritoneal leukocytes in mice by oral delivery of various lactic-acid-producing bacteria." Curr Microbiol *50*(1): 24-7.

35. Matsuzaki, T. (1998). "Immunomodulation by treatment with Lactobacillus casei strain Shirota." Int J Food Microbiol *41*(2): 133-40.

36. McGee, D. J., C. A. May, et al. (1999). "Isolation of Helicobacter pylori Genes That Modulate Urease Activity." J. Bacteriol. *181*(8): 2477-2484.

37. Moayyedi, P., C. Wason, et al. (2000). "Changing patterns of Helicobacter pylori gastritis in long-standing acid suppression." Helicobacter *5*(4): 206-14.

38. Mukai, T., T. Asasaka, et al. (2002). "Inhibition of binding of Helicobacter pylori to the glycolipid receptors by probiotic Lactobacillus reuteri." FEMS Immunology and Medical Microbiology *32*(2): 105.

39. Naidu, A. S., X. Xie, et al. (2002). "Reduction of sulfide, ammonia compounds, and adhesion properties of Lactobacillus casei strain KE99 in vitro." Curr Microbiol *44*(3): 196-205.

40. Nakao, K., I. Imoto, et al. (1997). "Relation of lactoferrin levels in gastric mucosa with Helicobacter pylori infection and with the degree of gastric inflammation." Am J Gastroenterol *92*(6): 1005-11.

41. Nomura, S., H. Suzuki, et al. (2005). "Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on Helicobacter pylori infection in Mongolian gerbils." Helicobacter ***10***(1): 43-52.

42. Peetsalu, M., J. Valle, et al. (2005). "Changes in the histology and function of gastric mucosa and in Helicobacter pylori colonization during a long-term follow-up period after vagotomy in duodenal ulcer patients." Hepatogastroenterology ***52***(63): 785-91.

43. Rektorschek, M., A. Buhmann, et al. (2000). "Acid resistance of Helicobacter pylori depends on the UreI membrane protein and an inner membrane proton barrier." Molecular Microbiology ***36***(1): 141-152.

44. Sgouras, D., P. Maragkoudakis, et al. (2004). "In vitro and in vivo inhibition of Helicobacter pylori by Lactobacillus casei strain Shirota." Appl Environ Microbiol ***70***(1): 518-26.

45. Song, H. K., S. B. Mulrooney, et al. (2001). "Crystal Structure of Klebsiella aerogenes UreE, a Nickel-binding Metallochaperone for Urease Activation." J. Biol. Chem. ***276***(52): 49359-49364.

46. Spanhaak, S., R. Havenaar, et al. (1998). "The effect of consumption of milk fermented by Lactobacillus casei strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans." Eur J Clin Nutr ***52***(12): 899-907.

47. Todd, M. J. and J. Gomez (2001). "Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity?" Analytical Biochemistry ***296***(2): 179.

48. van Zanten, S. J., T. Kolesnikow, et al. (2003). "Gastric transitional zones, areas where Helicobacter treatment fails: results of a treatment trial using the Sydney strain mouse model." Antimicrob Agents Chemother ***47***(7): 2249-55.

49. Wang, K. Y., S. N. Li, et al. (2004). "Effects of ingesting Lactobacillus- and Bifidobacterium-containing yogurt in subjects with colonized Helicobacter pylori." Am J Clin Nutr ***80***(3): 737-41.

50. Wendakoon, C. N., A. B. Thomson, et al. (2002). "Lack of therapeutic effect of a specially designed yogurt for the eradication of Helicobacter pylori infection." Digestion ***65***(1): 16-20.

51. Zhang, C., N. Yamada, et al. (2005). "Comparison of Helicobacter pylori infection and gastric mucosal histological features of gastric ulcer patients with chronic gastritis patients." World J Gastroenterol ***11***(7): 976-81.