

## 식물성 배지에서 *Lactobacillus plantarum*의 배양을 위한 배지 최적화

정은지<sup>1</sup>, 문대원<sup>1</sup>, 오준석<sup>1</sup>, 문진석<sup>2</sup>, 엄현주<sup>2</sup>, 최혜선<sup>3</sup>, 김창섭<sup>4</sup>, 한남수<sup>2\*</sup>

### Composition Optimization of Cabbage Extract Medium for Cell Growth of *Lactobacillus plantarum*

Eun Ji Jeong<sup>1</sup>, Dae Won Moon<sup>1</sup>, Joon Suk Oh<sup>1</sup>, Jin Seok Moon<sup>2</sup>, Hyun Ju Eom<sup>2</sup>, Hye Sun Choi<sup>3</sup>, Chang Sup Kim<sup>4</sup>, and Nam Soo Han<sup>2\*</sup>

접수: 2012년 11월 20일 / 게재승인: 2012년 12월 21일  
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** This study was conducted to optimize the composition of CEM (cabbage extract medium) and cryoprotectants on the growth of *Lactobacillus plantarum*, a probiotics growing in plant and milk. For this, we analyzed the growth characteristics of *Lb. plantarum* in CEM and subsequently optimized the medium composition by addition of carbon, nitrogen sources and buffering agents. Among carbon sources, glucose showed the best result to increase the cell density after dilution of CEM. When 0.5% yeast extract and 1% soy peptone were supplemented in the diluted CEM, *Lb. plantarum* grew up to the maximum cell density. Addition of buffering agents in CEM was not significantly effective to increase the cell density. Meanwhile, addition of 12% skim milk, 5% sucrose and 0.5% glycerol showed a

cryoprotective effect against cell damage of *Lb. plantarum* during freeze drying process showing high survival rate after 150 days. This optimized CEM can be used for economical production of bacterial cells particularly originated from a plant-related ecosystem.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*, cabbage extract medium, survival rate, cryoprotectant

#### 1. 서론

식물성 유산균은 Plant Originated Lactic Acid Bacteria (POLAB)로 지칭되어 일반 유산균과 차별적으로 취급되고 있으며, 예로부터 섭취하던 식물 원료의 발효 식품에서 분리된 유산균을 말한다 [1]. 이러한 식물성 유산균은 일반 유산균보다 1) 훨씬 척박한 환경, 적은 영양소가 포함되어 있는 상황에서 생육하기 때문에 영양소를 분해, 섭취하는 능력이 뛰어나며, 2) 천연의 항균, 항진물질을 생성하고 다양한 생리활성물질들을 생산하며, 3) 다양한 미생물 환경 속에 경쟁적으로 우점종을 이루어 살아남기 때문에 그 생존력도 우수한 것으로 알려져 있다 [2,3].

김치를 비롯한 전통발효식품에 주로 존재하는 *Lactobacillus plantarum*을 비롯한 유산균은 발효 중 젖산을 생성하여 유해한 미생물의 성장을 저해하고, 발효식품의 풍미를 증진시키며, 다양한 생리활성물질을 생산하는 것으로 알려져 있다 [4]. *Lb. plantarum*은 현재 식품의약품안전청에서 건강기능성 프로바이오틱스로 분류되어 인체 건강에 유익한 영향

<sup>1</sup>주식회사 토비코

<sup>1</sup>TOBICO Inc. # 4104 Beonyoungwan, Chungnam TechnoPark Cheonan Valley, 506 Sameun-ri Jiksan-eup, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, 331-858, Korea

<sup>2</sup>충북대학교 식품공학부

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, 361-763, Korea  
Tel: +82-43-261-2567, Fax: +82-43-271-4412  
e-mail: namsoo@cbnu.ac.kr

<sup>3</sup>농촌진흥청 국립농업과학원

<sup>3</sup>National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

<sup>4</sup>한밭대학교 화학생명공학과

<sup>4</sup>Department of Chemical & Biological Engineering, Hanbat National University, Daejeon 305-719, Korea

을 미치는 유산균으로 간주되고 있다. *Lb. plantarum* PH04를 고지혈 마우스에 급여한 결과, 분변에서 유산균수가 증가하였고 혈청 내 콜레스테롤 수치를 약 10% 정도 감소되었으며 [5], *Lb. plantarum* MA12균주 분말과 고콜레스테롤 식이를 흰쥐에 급여한 결과 혈청콜레스테롤 감소효과를 보였다 [7]. 또한, *Lb. plantarum* AF1이 생성하는 항균 물질에 의한 항미생물 활성 범위를 측정된 결과, 항진균 활성 외에도 식육독균주를 포함한 그람 양성 및 음성 세균들에 강한 저해 활성을 나타내었다 [8].

발효기술을 이용하여 프로바이오틱스를 대량생산하기 위해서는 저렴하면서 위생적이고 동시에 고농도배양이 가능한 산업용 배지가 절대적으로 필요하다. 하지만, 유산균 배양에는 오랫동안 MRS broth (Difco, Detroit, MI, USA)와 같은 고가의 상업용 배지가 전통적으로 사용되어 온 반면, 식물성 유산균 (POLAB)을 위한 효율적인 맞춤형 배지의 개발은 미흡하였다.

따라서 본 연구에서는 식물 원료의 발효 식품에서 유래된 유산균인 *Lb. plantarum*을 그 본연의 특성을 잘 살릴 수 있도록 배추즙을 이용한 배지 (CEM, cabbage extract medium)에서 배양하고 그 조성을 최적화 하려는 목적으로 수행하였다. 이를 위해, 먼저 100% CEM을 이용하여 균주 배양 특성을 조사하고, 원재료 비용을 줄이기 위해 일정 농도 희석한 CEM 배지에 다양한 탄소원과 질소원을 보강한 조건에서의 생육 특성을 비교하였다. 또한, 생성된 산들에 의한 저해 스트레스를 줄이고자 완충제 첨가 효과를 비교하였고 동결건조에 대한 균체 손상을 줄이기 위한 동결보호제 첨가효과를 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 사용 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 생명자원센터에서 분양 받은 *Lactobacillus plantarum* KCTC3104 (이하 *Lb. plantarum*)를 사용하였다. 균체 배양을 위해 배추조성물 배지 (cabbage extract medium, 이하 CEM), MRS broth 또는 agar (Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였고, 균주의 보존을 위하여 균배양액에 glycerol이 25% (v/v)가 되도록 조성하여 -70°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. CEM 배지는 배추를 상온에서 마쇄 후 착즙한 배추추출액을 얻은 뒤, 다양한 효소 등을 불활성화 시키기 위해 80°C에서 1시간 열처리를 시키고, 최종적으로 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다 [9,10].

**2.2. CEM 배지 중 *Lactobacillus plantarum* 배양액의 당분석**  
위에서 얻은 CEM에 *Lb. plantarum*를 접종하고 37°C에서 배양하면서 당의 변화를 분석하였다. 배양액 30 mL을 12,000 rpm에서 20분 원심분리 (SUPRA 22k, Hanil Science Industrial co., Ltd. Korea)하여 그 상등액을 0.22 µm filter (Sartolab RF 500 Rilter system sterile, USA)를 사용하여 필터링 한 뒤 분석하였다. 포도당, 과당 및 설탕 등의 표준품은 Sigma (St. Louis, MO) 제품을 사용하였다. HPLC 분석

(Acme 9000, YOUNGLIN, Korea)은 Asahipak NH2P-50 4E 컬럼을 사용하였으며, 이동상으로는 acetonitrile/water (85/15, v/v), 용매속도는 분당 1.0 mL, peak는 RI detector로 검출하였다 [11].

### 2.3. CEM 농도의 최적화

100% CEM과 40, 60 그리고 80%로 희석한 CEM에 전배양한 *Lb. plantarum*을 1%씩 각각 접종하였고, 24시간 동안 생육변화를 관찰하였다. 흡광도 (optical density, OD) 값은 spectrophotometer (JENWAY 6300, CM6 3LB, England)로 660 nm에서 측정하였으며, pH는 pH meter (Jenway 3510 pH meter, CM6 3LB, England)로 측정하였으며, 총산 측정은 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 배양액 10 mL에 0.1 N NaOH로 당량점까지 적정하여 소비된 NaOH 용액의 mL수를 젯산함량 (%)으로 환산하여 나타내었다 [8]. 균수의 측정은 30~300개 정도의 집락이 생기도록 멸균생리수로 십배수 희석법에 따라 희석하였으며, 그 희석액 0.1 mL를 취하여 MRS 한천평판배지에 도말 한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 나타난 집락수를 세어 mL당 총 생균수로 계수하였다.

### 2.4. 탄소원과 질소원의 첨가 효과

위에서 얻은 최적의 CEM에 *Lb. plantarum*의 고농도 배양을 위한 배지최적화를 위하여 다양한 탄소원과 질소원을 추가로 첨가하여 균체 농도를 측정하였다. 추가적으로 넣은 탄소원은 과당 (Daejung, Korea), 포도당 (Daejung, Korea) 그리고 설탕 (CJ, Korea)을 사용하였다. 최적 CEM에 각각의 탄소원을 각각 0.5, 1.0 그리고 1.5% (w/v) 첨가하고 멸균한 다음, 전배양한 *Lb. plantarum*을 1% 접종하고, 24시간 동안 배양하면서 OD, pH 그리고 총산의 변화를 측정하였다.

다음으로 질소원으로써 soy peptone ((주)샘표식품, Korea), yeast extract (Leiber GmbH, Germany), fish peptone ((주)비전바이오킴, Korea)을 사용하였으며, 추가적인 질소원 첨가는 최적 CEM에 각각의 질소원을 첨가하고 멸균하였다. 전배양한 *Lb. plantarum*을 1% (v/v) 접종하고, 24시간 배양 후 생균수를 측정하였다. 아울러 복합질소원 첨가는 60% CEM에 yeast extract (Y)와 soy peptone (S)를 네 가지 조합 (0.5%Y + 0.5%S, 0.5%Y + 1%S, 1%Y + 0.5%S 그리고 1%Y + 1%S)의 배지를 만들어 균주접종 후 배양 24시간 후에 생균수를 측정하였다.

### 2.5. 완충액 첨가 효과

위에서 얻은 최적의 CEM에 대해 균주 생육 중 급격히 감소하는 pH 변화를 방지하기 위하여 sodium hydroxide와 암모니아수를 첨가하고 배양 시 pH 변화를 관찰하였다. 또한, 다양한 인산염 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)을 사용하여 다양한 농도에서의 단일 사용과 혼합사용을 통하여 균체의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

### 2.6. 동해방지제 첨가 효과

최적 CEM배지에서 배양한 *Lb. plantarum* 균체를 원심분

**Table 1.** Growth profile of *Lactobacillus plantarum* in 100% CEM

Time	Fructose (%)	Glucose (%)	OD (660 nm)	Total acid (%)	pH	Cell counts (CFU/mL)
CEM <sup>1)</sup>	0.44	0.67	0.051	0.27	5.22	-
0 h	0.44	0.66	0.089	0.27	5.13	2.23 × 10 <sup>7</sup>
6 h	0.38	0.45	0.294	0.27	5.31	7.65 × 10 <sup>7</sup>
9 h	0.37	0.43	0.866	0.27	4.72	3.12 × 10 <sup>8</sup>
12 h	0.40	0.33	1.134	0.54	4.08	8.55 × 10 <sup>8</sup>
15 h	0.35	0.38	1.227	0.90	3.91	1.14 × 10 <sup>9</sup>
18 h	0.28	0.18	1.268	0.90	3.75	1.24 × 10 <sup>9</sup>
24 h	0.25	0.06	1.280	1.26	3.72	1.04 × 10 <sup>9</sup>

<sup>1)</sup>CEM: Cabbage Extract Medium.

리하여 시럽상태로 얻어내고, 동해방지제 (Skim milk 12%, Sucrose 5%, Glycerol 0.5%)와 1:1로 혼합 후 동결건조한 뒤, 4°C 냉장보관하면서 시간이 진행됨에 따라 생존율을 측정하였다 [12,13].

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. CEM 배지에서 *Lactobacillus plantarum* 생육 특성

천연배지인 CEM 에서 *Lb. plantarum*의 생육 특성을 조사하기 위하여 배양과정 중 균체농도와 배지의 당농도 변화를 측정하였다. 그 결과, Table 1과 같이 초기 100% CEM에는 과당과 포도당이 함유되어 있으며 그 함량은 배양 6시간 후부터 꾸준히 감소하였다. 배양 24시간에는 균체의 흡광도(OD)와 생균수가 각각 1.280 및 1.04 × 10<sup>9</sup> CFU/mL로 증가하였고 총산도는 1.26%, pH는 3.72가 되었다.

최적 CEM 농도를 알아보고자 100% CEM과 80, 60 그리고 40%로 희석한 CEM에 *Lb. plantarum* 균주를 배양하면서 생육변화를 관찰한 결과 (Table 2), 희석을 하지 않은 배지 100% CEM에서는 배양 24시간째에 균체농도가 1.10 × 10<sup>9</sup> CFU/mL 였으며 80%와 60% CEM에서도 유사한 균체량을 얻은 반면, 40% CEM에서는 총균수가 30% 이상 감소하였다. pH의 경우는 네가지 실험구 모두 3.5로 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 열처리와 멸균공정을 거친 CEM 성분을 생육에 별다른 차이를 보이지 않으면서 원료비를 절감 할 수 있는 농도는 60% 임을 알게 되었다.

**Table 2.** Growth profile of *Lactobacillus plantarum* along with dilution ratio

CEM <sup>1)</sup>	OD (660 nm)	Sugar Conc. (%)	pH	Cell counts (CFU/mL)
100%	1.264	3.27	3.54	1.10 × 10 <sup>9</sup>
80%	1.185	2.63	3.51	9.58 × 10 <sup>8</sup>
60%	1.178	1.97	3.51	1.03 × 10 <sup>9</sup>
40%	0.952	1.30	3.45	7.15 × 10 <sup>8</sup>

<sup>1)</sup>CEM: Cabbage Extract Medium.

#### 3.2. 고농도 배양을 위한 추가된 탄소원과 질소원의 최적화

60%로 희석한 CEM에 대해 배지조성 최적화를 위해 과당, 포도당, 설탕의 탄소원을 보충한 뒤 *Lb. plantarum*을 배양하면서 OD, pH 그리고 총산을 측정하였다. 그 결과 당을

첨가한 모든 실험구에서 70~80%의 증가된 OD값을 나타내었다 (Table 3). pH의 경우는 모든 실험구에서 3.6으로 당을 추가적으로 첨가하지 않는 곳과 거의 유사한 경향을 나타내었으나, 총산 함량의 경우 과당을 첨가한 실험구에서 높은 수치를 나타내었다. 따라서 본 실험결과를 종합적으로 고려할 때, OD값은 높고 총산도는 낮은 0.5% 포도당 첨가군이 가장 최적의 배지조성으로 판단되었다.

**Table 3.** Effect of carbon sources on cell growth of *Lactobacillus plantarum* in CEM

	carbon source (%)	O·D (660nm)	pH	Total acid (%)
Glucose	0.5	1.800	3.59	0.396
	1.0	1.766	3.60	0.396
	1.5	1.743	3.63	0.396
Fructose	0.5	1.771	3.61	0.396
	1.0	1.723	3.59	0.432
	1.5	1.705	3.60	0.396
Sucrose	0.5	1.775	3.59	0.396
	1.0	1.758	3.65	0.360
	1.5	1.752	3.60	0.432

*Lb. plantarum*의 생육에 미치는 추가 질소원의 영향을 조사하고자 yeast extract, soy peptone 그리고 fish peptone을 60% CEM에 예비실험과 참고문헌을 통해서 정한 농도를 단일 첨가하여 생균수를 측정하였다. 그 결과, Fig. 1에서와 같이 60% CEM인 대조군에 비해 다양한 질소원을 첨가한 시료들에 있어 전반적으로 높은 균수를 보였다. 질소원 중에서는 1% yeast extract > 0.5% soy peptone > 1% soy peptone > 0.5% yeast extract > 0.25% fish peptone > 0.125% fish peptone > 대조군 순으로 무첨가군 보다 더 높은 수치를 나타냈다. 위 결과에 따라 CEM에 질소원의 단일 첨가에 따른 균 생장의 증감을 파악하여 최적 복합질소원의 첨가비율을 정할 수 있었다.

단일 질소원 첨가 결과를 토대로 질소원들을 혼합하여 첨가하였을 때 균 생육에 미치는 영향을 조사하고자, 60% CEM에 yeast extract (Y)와 soy peptone (S)를 네 가지 조합 (0.5%Y + 0.5%S, 0.5%Y + 1%S, 1%Y + S, 0.5%Y + 1%Y + 1%S)으로 첨가한 배지에서 배양 한 후 생균수를 측정하였다. 그 결과, 단일질소원 첨가 결과와 마찬가지로 질소원첨가군의 생균수가 대체적으로 높았으며, 특히 0.5%Y + 1%S 복합 첨가물이 1.00 × 10<sup>9</sup> CFU/mL로 가장 높은 수치를 나타

났다 (Fig. 2). 결론적으로 질소원 첨가가 *Lb. plantarum* 생육에 도움을 주며 특히 yeast extract와 soy peptone을 복합으로 첨가하는 것이 효과적으로 나타났다.

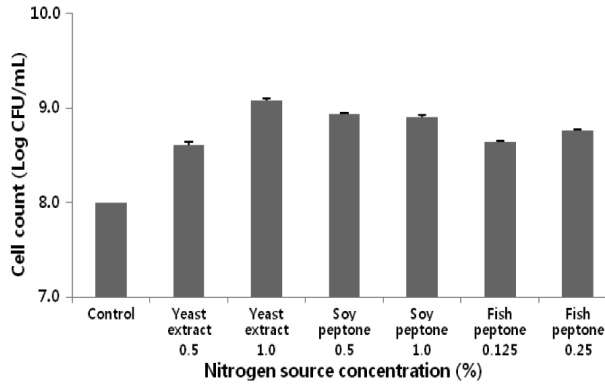


Fig. 1. Effect of nitrogen sources on cell growth of *Lactobacillus plantarum* in CEM. Y: Yeast extract, S: Soy peptone, F: Fish peptone.

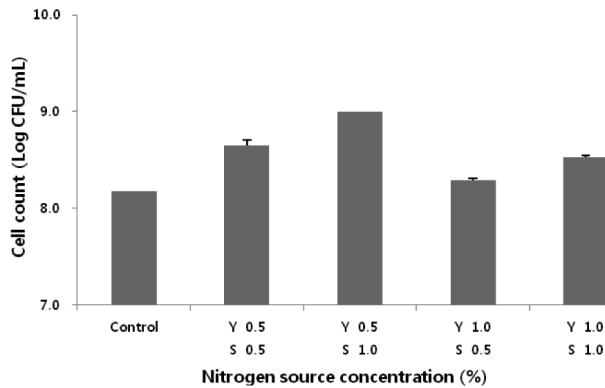


Fig. 2. Effect of mixed nitrogen sources on cell growth of *Lactobacillus plantarum* in CEM. Y: Yeast extract, S: Soy peptone.

3.3. 완충액을 이용한 CEM 배지의 최적화

유산균은 성장하면서 많은 유기산들을 배지에 분비하여 다른 잡균의 생성을 억제하지만 또한 자신의 생존에도 위협을 받게 된다. 따라서 본 실험에서는 천연배지인 CEM에 다양한 완충제로 pH를 보정한 뒤 유산균의 생육을 관찰하기로 하였다. Sodium hydroxide로 pH 보정 후 배양하면서 pH 변화를 관찰한 결과, 초기 pH를 5.90으로 높여줌으로써 pH가 천천히 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며 배양이 끝날 쯤에 pH가 3.72로 떨어졌다. 또한 10% 암모니아수를 이용하여 배양 전 적정 pH로 보정한 다음 배양한 결과, 초기 pH를 기존 pH 6.50에서 pH 7.24로 높여 줌으로써 배양 10시간까지 pH 7.06으로 유지되면서 천천히 감소하였으나, 배양이 끝날 쯤에 pH가 3.74로 현저하게 떨어졌다. 또한 생균

수는 각각 무첨가군  $1.31 \times 10^9$  CFU/mL와 완충액 첨가군인  $1.03 \times 10^9$  CFU/mL로 큰 차이는 없었다.

마지막으로 CEM배지에 여러 종류의 인산염을 다양한 농도로 단독 또는 혼합으로 첨가하여 최적의 배양조건을 찾고자 하였다.  $KH_2PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ 를 각각 0.20%, 0.10%, 0.05% 첨가 및 혼합 첨가하여 시간별 흡광도를 측정하였다. 대조군의 OD값은 0.913에 반해 다른 네가지 인산염을 단독 또는 혼합 첨가한 것은 모두 1이상의 OD값을 보였으며, 특히 단독 처리군에서는 0.1%  $Na_2HPO_4$  처리구가, 혼합 처리군에서는 0.1%  $K_2HPO_4$  + 0.1%  $NaH_2PO_4$  처리구가 높은 수치를 나타냈다 (Fig. 3). 본 혼합처리구의 생균수 역시 16 h에서 대조구에 비하여 약간 높았으나 그 차이는 유의미하게 크지는 않았다. 따라서 sodium hydroxide, 암모니아수 그리고 몇가지 인산염을 다양한 농도로 단일첨가 또는 혼합 첨가하여도 *Lb. plantarum*의 균체농도는 크게 증가하지 않는 것으로 판단된다.

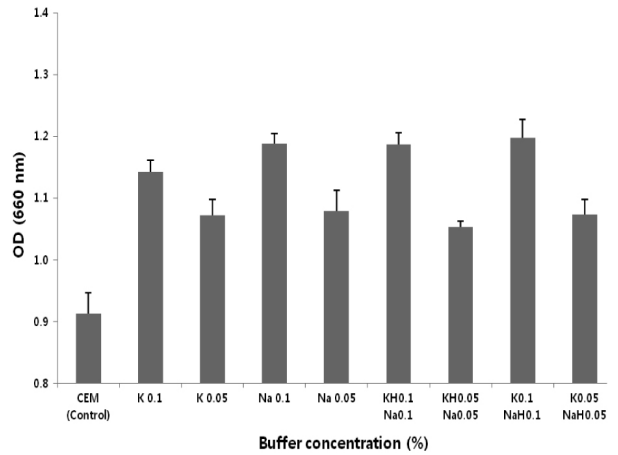


Fig. 3. Effect of various salts on cell growth of *Lactobacillus plantarum* in CEM. K:  $K_2HPO_4$ , KH:  $KH_2PO_4$ , Na:  $Na_2HPO_4$ , NaH:  $NaH_2PO_4$ .

3.4. 동해방지제 첨가 효과

CEM 배지에서 배양한 *Lb. plantarum* 균체를 상품화하거나 장기간 보존하기 위해 동결건조시켰을 때 그 재생율을 높이기 위하여 동해방지제의 첨가 효과를 분석하였다. 동해방지제는 skim milk, sucrose, 그리고 glycerol를 사용하였으며 농도조건은 예비실험과 문헌조사를 통하여 결정하였다. CEM에서 배양한 *Lb. plantarum*를 원심분리하여 얻은 뒤 동결건조 시 12% skim milk, 5% 설탕 그리고 0.5% glycerol을 같이 넣어 건조시키고, 냉장온도에서 저장하면서 재생물을 조사하였다. 그 결과, 90일 경과 후에는 98% 이상의 생존율을 보였고, 150일 이후에도 83% 이상 생존율을 나타냈다 (Table 4). 단백질 수용액으로 사용한 skim milk는

Table 4. Effect of cryoprotectants on survival rate of *Lactobacillus plantarum* after freeze drying and thawing

Cryoprotectant	Step	Step		
		0days	90 days	150 days
Skim milk 12% + Sucrose 5% + Glycerol 0.5%	Cell count (CFU/mL)	$1.22 \times 10^{11}$	$1.20 \times 10^{11}$	$1.02 \times 10^{11}$
	Survivability rate (%)	100%	98%	83%

원심분리시 균체와 함께 침적되어 균체를 포집 및 포괄하는 작용을 하였고, 동결건조 후에는 건조균체의 세포벽과 결합하여 코팅을 형성시킨 것으로 판단된다 [14]. 본 동해방지제 조성을 증가시키며 동일한 실험을 수행한 결과, 위 조성 농도 이상의 조건에서는 동해 방지 효과가 증가하지 않은 반면에 점성이 증가하고 분리되는 경향이 나타났다 [15].

본 연구결과는 배추즙을 이용하여 저렴하게 제조한 CEM이 *Lb. plantarum* 유산균이 잘 생육할 수 있는 배지이고 미량의 포도당과 질소원 보충으로 균체 생산성을 향상시킬 수 있음을 보여준다. 특히 CEM은 식품 원료인 배추를 이용하여 제조하므로 다른 배지에 비해 안전성 측면에서 장점을 보이며 기능성식품인 프로바이오틱스의 대량생산에 적합하다. 반면에 배추즙 제조 후 빠른 오염 미생물의 증식이 관찰되었는데 이를 방지하기 위하여 배추즙 제조 후 살균과정과 무균 저장공정이 필요하였다. 또한, 배추의 생산시기에 따른 당도의 차이가 실험구 별로 큰 편차를 초래하였는데 이는 CEM 배지의 표준화를 어렵게 하는 요소로 작용하였다. 이는 제조한 배추즙 별로 당도를 측정하여 포도당 보정을 통한 표준화 과정을 통해 어느정도 극복이 가능하였으나 천연식물성 원료를 이용한 실험인 만큼 최소한의 편차가 반복 실험구에서 계속 관찰되었다. 위 문제점들에도 불구하고, 본 연구에서 시도한 식물성 배지 제조기술과 최적화된 CEM 조성은 지속적인 추가 실험을 통해 다양한 프로바이오틱스의 산업적 생산에 광범위하게 이용될 것으로 기대된다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 식물 원료의 발효 식품에서 유래된 유산균인 *Lactobacillus plantarum*를 식물성 유산균 본연의 특성을 잘 살릴 수 있도록 배추즙을 이용한 배지 (CEM, Cabbage extract medium)인 식물성 배지를 최적화하는 목적으로 연구하였다. 식물성 배지인 CEM과 *Lb. plantarum* 배양하는 동안 상등액에서 당분석 및 배양 패턴 분석을 통해 *Lb. plantarum* 배양 시 필요한 성분을 비교 분석하여 희석한 CEM에 부족한 성분을 첨가하여 경제적이고 고농도 배양을 위한 배지 최적화를 하였다.

탄소원의 첨가로 보완한 결과, 포도당 첨가가 가장 적합하였고 질소원인 yeast extract 0.5%와 soy peptone 1.0% 복합 첨가 시, 생균수가 가장 높은 수치인  $1.00 \times 10^9$  CFU/mL로 경제적으로도 우수하면서 본 유산균을 고농도 배양할 수 있는 배지 최적화를 하였다. 또한 배양조건 최적화를 위해 배양 전에 CEM을 다양한 완충제로 pH 보정하면 *Lb. plantarum* 배양 시, 탄소원과 질소원의 첨가에 비하여 고농도 배양을 위한 결과를 얻지는 못했다. 최종적으로 이번 연구로 개발한 CEM에서의 *Lb. plantarum*에 대한 배지 최적화와 배양 최적화를 하였고 동결 건조시, 12% skim milk, 5% 설탕 그리고 0.5% glycerol의 동결보호제 조성물이 동결에 대한 damage를 줄여 150일 경과 후에도 높은 생존율을 확인할 수 있었다.

#### 감사

본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술개발 공동연구사업으로 국립농업과학원 농업기술연구 개발사업 과제 (20120201-302-501-001-05-00)의 지원에 의한 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

#### References

1. Kumagai, T. (2009) Application of plant origin lactic acid bacteria to food. *Food Style* 21: 13.
2. Igarashi, T. (2007) Development of beverage and food using plant origin lactic acid bacterium. *Bioindustry* 24: 32-39.
3. Huang, C. J., M. L. Wang, and C. Y. Kuo (2008) Studies on the cholesterol removal ability of plant origin lactic acid bacteria. *J. Taiwan Libestock Res.* 41: 267-274.
4. Ammor, M. S. and B. Mayo (2007) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Sci.* 16: 138-1462.
5. Nguyen, T. D., J. H. Kang, and M. S. Lee (2007) Characteristics of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 358-361.
6. Wang, Y., N. Xu, A. Xi, Z. Ahmed, B. Zhang, and X. Bai (2009) Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefit on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 341-347.
7. Yang, E. J. and H. C. Jang (2008) Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 4: 276-284.
8. Bae, M. S. and S. C. Lee (2008) Preparation and characteristics of Kimchi with added styela clava. *Korean J. Food Cookery Sci.* 24: 573-579.
9. Saguir, F. M. and M. C. de Nadra (2007) Improvement of a chemically defined medium for the sustained growth of *Lactobacillus plantarum*: nutritional requirements. *Curr Microbiol.* 54: 414-418.
10. Park, H. G. and I. C. Jeon (2004) Culture medium for lactic acid bacteria prepared from chinese cabbage wastes, *Korea Patent*, 10-2004-0062743.
11. Otgonbayar, G. E, H. J. Eom, B. S. Kim, J. H. Ko, and N. S. Han (2011) Mannitol production by *Leuconostoc citreum* KACC 91348P isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 968-971.
12. Ko, Y. T. and J. H. Kang (2000) Effects of freeze drying protectant added to lactic acid bacteria fermented food prepared from milk or egg white powder on growth and organoleptic properties. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 192-199.
13. Bang, K. H, G. J. Kim, D. H. Oh, and Y. H. Rhee (1999) High-density Cultivation and cryopreservation of *Saccharomyces cerevisiae* hansen CBS5926. *Korean J. Microbiology* 35: 302-306.
14. Cell, Biotech Co., Ltd. (2011) Lactic acid bacteria having multi coating layers and preparing method thereof. *Korea Patent*, 10-2011-0093074.
15. Kolon, Industries INC. (1998) Method for manufacturing freeze-dried mycelium having excellent storageability and composition of freeze-drying protection agent therefor. *Korea Patent*, 10-1996-0078399.