

Screening of Effective Medium Composition for the Cultivation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus reuteri* Using Statistical Methods

Dong Woon Kim^{1*}, Sang Buem Cho², Young Hwa Kim¹, Sung Daw Lee¹, Hyun Jung Jung¹, Sang Ho Kim¹, Kyu Ho Cho¹, Soo Jin Sa¹, In Cheul Kim¹, Mi-Young Won³, Su-Ok, Kim³ and Soo-Ki Kim^{3*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan, 330-801, Korea

²Department of Animal Science, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

³Department of Animal Science and Environment, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Received November 10, 2011 / Revised February 17, 2012 / Accepted April 24, 2012

This study was conducted to develop an economical optimum medium composition for the mass production of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus reuteri*, livestock probiotics. Medium ingredient factors were selected on the basis of MRS broth composition, and the 15 ingredient variables were as follows: sucrose, glucose, molasses, yeast extract, corn steep liquor, soy peptone, dipotassium phosphate, manganese chloride, magnesium chloride, tween 80, sodium chloride, sodium acetate, ammonium citrate, sodium sulphate, and ferrous sulphate. The Plackett Burman design, consisting of 20 runs, was employed for the analysis of ingredient effects on cell growth of *L. plantarum* and *L. reuteri*. As a result, sucrose, glucose, molasses, yeast extract, corn steep liquor, soy peptone, sodium acetate, and ammonium citrate positively influenced the growth of *L. plantarum*. Additionally, yeast extract, soy peptone, K₂PHO₄, and tween 80 positively influenced the growth of *L. reuteri*. Positive effects were found from sucrose, yeast extract, and soy peptone in the integrated analysis of the effects of both *L. plantarum* and *L. reuteri*. Finally, effective medium components for both strains were found as follows: sucrose (20.0 g/l), glucose (5.0 g/l), soy peptone (11.0 g/l), yeast extract (5.0 g/l), K₂HPO₄ (0.2 g/l), CH₃COONa (2 g/l), and MgCl₂ (0.02 g/l).

Key words : Screening effective medium, *L. plantarum*, *L. reuteri*, statistical method, Plackett-Burman design

서 론

항생제는 가축의 질병치료뿐만 아니라 생산성 향상을 위한 목적으로 널리 사용되어 왔다. 그러나 최근 축산물의 항생제 잔류 또는 항생제 오남용으로 인한 항생제 내성 세균의 출현 우려가 보고됨에 따라서 항생제의 사용규제가 강화되어 2011년 7월부터 배합사료내 첨가가 금지되고 있다. 현재 항생제를 대체할 수 있는 미생물제제, 유기산제제, 허브추출물 등 다양한 후보물질들이 개발되어 왔으며, 이 중 생균제(probiotics)가 널리 이용되고 있다[11]. 생균제란 가축에게 직접 급여되는 살아있는 미생물을 의미하며, 주요 기능으로는 장내 미생물 균총 유지, 장내 유해 미생물의 억제, 면역력 향상, 질병 저항성 증진 등이 있는 것으로 보고되었다[16,20]. 세균, 효모 및 곰팡이 등 다양한 미생물들이 생균제로 사용되고 있으며[3,7,8], 이들 중에서 젖산 생성능력이 우수한 유산균들을 많이 이용되고

있다[1-4]. 유산균 중에서 *Lactobacillus plantarum*은 김치 발효에도 많이 관여하는 것으로 알려져 있고, 생육효율과 젖산 생산량이 우수하여 생균제 균주로 널리 이용되고 있다[6]. *Lactobacillus reuteri*는 소화관 내 환경개선을 통한 장 건강개선 효능이 우수한 것으로 알려져 있고, 인체용 생균제뿐만 아니라 가축용 생균제로 널리 활용되는 균주이다[12]. 이와 같은 유산균은 가축의 생산성 향상, 소화기관 관련 질병예방 목적으로 많이 사용되고 있다. 그러나 유산균 생산 배지는 다른 균종에 비하여 가격이 비싸므로 유산균을 농업분야에 널리 보급하는데 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 달라진다. 따라서 탄소원, 질소원 그리고 무기물원을 포함하는 배지성분의 경제적 도출은 발효의 생산성에 있어 매우 중요한 요인으로 작용한다[4]. 이러한 경제적 배지의 도출을 위하여 다양한 방법들이 개발되어 왔다[1,2,5]. 검토하여야 할 배지성분이 많은 경우에는 부분요인설계(fractional factorial design)가 가장 효과적일 수 있다. 만약 배지성분들의 2가지 수준만을 고려하여 발효의 효율성에 미치는 효과를 분석할 경우 부분요인설계의 일종인 Plackett-Burman design (PBD)이 매우 효과적이라고 할 수 있다[4,17].

*Corresponding author : Dong Woon Kim

Tel : +82-41-580-3449, Fax : +82-41-580-3459

E-mail: dwkim9405@korea.kr

*Corresponding author : Soo-Ki Kim

Tel: +82-2-450-3728, Fax : +82-2-458-3728

E-mail: sookikim@konkuk.ac.kr

이에 본 연구에서는 가축용 생균제로서 널리 이용되고 있는 *L. plantarum*과 *L. reuteri* 균주의 경제적 배양에 대한 자료를 구축하고자 공통적으로 이용될 수 있는 배지원료들을 통계적인 방법으로 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에서는 가축용 생균제로 사용되고 있는 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus reuteri*를 사용하였다. 각 균주들의 종균 배양은 MRS broth를 사용하였고, 30°C 진탕배양기에서 150 rpm으로 24시간 동안 배양하였다.

균체 성장효율의 분석

균체의 배양 효율에 대한 결과는 분광광도계(Shimadzu, Japan)를 이용하여 600 nm에서의 흡광도로 평가하였다. 최종 배지의 효율분석을 위한 상업용 배지와 비교실험에 있어서는 각 배지에서 성장한 균체를 연속 희석 방법을 이용한 생균수 평가법을 사용하였다. 생균수의 표기는 \log_{10} (CFU/ml)로 하였다.

배지성분들의 설정 및 실험 설계

균주들의 배양효율에 미치는 배지성분 인자들로는 sucrose, glucose, molasses, yeast extract, corn steep liquor, soy peptone, dipotassium phosphate, manganese chloride, magnesium chloride, tween 80, sodium acetate, ammonium citrate, sodium sulphate 및 ferrous sulphate 등 총 15가지를 선택하였으며, 성분들의 선택기준은 일반적으로 사용되고 있는 MRS broth의 성분으로 하였다. 각 성분들의 효과 분석을 위한 실험은 PBD 방법에 따라서 설계하였다[4]. 각각의 성분들의 2가지 수준, 즉 높은 수준(+1)과 낮은 수준(-1)으로 나누어서 실험에 적용하였고, 각 성분들에 해당하는 수준들은 Table 1에서 보는 것과 같다. 총 15가지의 성분들을 2가지 수준별로 조합하여 총 20가지의 실험들(runs)을 구성하였으며 자세한 실험설계 및 각 실험에서 얻어진 결과들은 Table 2에서 보는 것과 같다.

표준 정규분포를 이용한 통합적 반응의 산출

본 실험은 *L. plantarum*과 *L. reuteri*에 대하여 공통적으로 적용이 가능한 배지성분을 도출하기 위한 목적을 가지고 있다. 따라서 *L. plantarum*과 *L. reuteri*에 관한 실험들에서 얻어진 결과들을 통합하여 효과를 분석하여야 한다. 이에 본 실험에서는 표준정규분포를 이용한 표준화 수치를 적용하였다[18].

통계 분석

실험설계 및 통계분석(정규성분석, 분산분석, 주효과분석)

Table 1. Used variables and their levels

Variables	Levels	
	Low (-1)	High (+1)
X_1 , Sucrose	1.0	10.0
X_2 , Glucose	1.0	10.0
X_3 , Molasses	1.0	10.0
X_4 , Yeast extract	1.0	10.0
X_5 , Corn steep liquor	1.0	10.0
X_6 , Soy peptone	1.0	10.0
X_7 , K_2HPO_4	0.5	5.0
X_8 , $MnCl_2$	0.05	0.5
X_9 , $MgCl_2$	0.05	0.5
X_{10} , Tween 80	0.1	1.0
X_{11} , NaCl	0.5	5.0
X_{12} , Sodium acetate	0.5	5.0
X_{13} , Amminium citrate	0.2	2.0
X_{14} , Sodium sulphate	0.2	2.0
X_{15} , $FeSO_4$	0.005	0.05

은 모두 MINITAB (version 14, USA) 프로그램을 사용하였다. 각 실험에서 얻어진 결과들(responses)은 정규분포성을 분석한 후에, 정규성이 인정되는 경우에만 효과분석과 분산분석을 수행하였다. 최종 배지성분의 효율 분석을 위한 비교실험결과는 일반선형모형(general linear model)을 이용하여 비교하였으며, 사후검정은 Duncan 방법이 적용되었다. 사용된 통계프로그램은 SPSS (version 18)이다.

결과 및 고찰

총 15가지의 배지성분을 이용하여 20개의 실험들을 분석한 결과, *L. plantarum*의 경우, 세포성장 결과로 나타난 흡광도가 0.78에서 4.17로 매우 다양하게 나타났으며, *L. reuteri*의 경우 1.12에서 3.33으로 다양하게 나타났었다(Table 2). 실험결과로 얻어진 반응들의 정규성을 분석하였고 그 결과 *L. plantarum* ($p=0.252$)과 *L. reuteri* ($p=0.952$) 모두 정규분포로 구성된 것으로 확인 되었다. 분산분석을 수행한 결과 *L. plantarum*, *L. reuteri* 및 통합적 효과에서 각각 0.028, 0.102 및 0.031의 p -value가 나타났었다(Table 3). 서로 다른 산포도나 절대값 범위를 가지고 있는 변인들을 통합하여 효과에 반영하는 방법으로 표준정규분포화를 들 수 있다. 즉 두 가지 변인(*L. plantarum*과 *L. reuteri*)의 세포성장 결과들을 모두 평균이 0이고 표준편차가 1인 Z 점수로 변환하면 각각의 변인들을 동일하게 비교 평가할 수 있게 된다[18]. *L. plantarum*과 통합적인 효과에서는 95% 이상의 유의성들이 나타났으나, *L. reuteri*의 경우에는 89.8%의 유의성이 나타났다. 본 실험에서 사용된 배지성분들은 *L. reuteri* 보다는 *L. plantarum*에서 보다 큰 차이를 나타내고 있음을 알 수 있었으며, 통합적인 효과에서는 *L. plantarum*의 결과가 좀 더 많은 가중치를 가지고 반영되었음을 알 수 있었다. 각 배지

Table 2. Configuration of 20 runs Plackett-Burman design and their responses and sum of standardized response

Runs	Variables															Responses ¹		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	Lp	Lr	SS ²
1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	3.13	1.88	1.09
2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	2.90	1.92	1.05
3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	2.88	1.73	0.99
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	2.20	2.73	1.15
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	2.97	2.19	1.15
6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	2.30	1.72	0.86
7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	2.50	2.49	1.14
8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	2.77	2.36	1.16
9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	3.04	2.15	1.15
10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	4.17	2.55	1.51
11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	3.16	3.33	1.53
12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	3.21	1.78	1.07
13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	3.21	2.21	1.20
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1.65	1.44	0.64
15	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	1.63	2.59	0.99
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1.06	1.58	0.56
17	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	2.72	2.05	1.05
18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	1.90	1.28	0.65
19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	2.12	1.26	0.69
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.78	1.12	0.36

¹Responses were cell turbidity from *Lactobacillus plantarum* (Lp) and *Lactobacillus reuteri* (Lr) and the turbidity was measured spectrophotometrically at 600 nm.

²SS means sum of standardized responses of Lp and Lr.

Table 3. Analysis of variance for cell growth of *L. plantarum* and *L. reuteri* and their sum of standardized responses

Responses	Sources	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F value	P value
<i>L. plantarum</i>	Main effect	15	12.31	0.82	8.16	0.028
	Residual error	4	0.40	0.10		
	Total	19	12.71			
<i>L. reuteri</i>	Main effect	15	5.58	0.37	3.83	0.102
	Residual error	4	0.39	0.09		
	Total	19	5.97			
Sum of standardized responses	Main effect	15	1.62	0.11	7.49	0.031
	Residual error	4	0.06	0.01		
	Total	19	1.68			

성분들의 주 효과는 Fig. 1에서 보는 것과 같다. Fig. 1A에서는 배지성분들이 *L. plantarum*의 성장에 미치는 영향을 나타내고 있다. *L. plantarum*의 성장에 있어서는 sucrose, glucose, molasses, yeast extract, corn steep liquor, soy peptone, sodium acetate, ammonium citrate 등이 수준간의 격차가 큰 긍정적인 효과(positive effect)를 나타내었다. *L. reuteri*의 경우에는 yeast extract, soy peptone, K₂PHO₄, tween 80에서 수준간의 격차가 큰 긍정적인 효과가 나타났(Fig. 1B). 두 가지 균주들에서 얻어진 표준화된 통합적 효과의 주 효과를 분석한 결과, sucrose, yeast extract, soy peptone에서 수준간의 격차가 큰 긍정적인 효과가 나타났(Fig. 1C). 배지성분들이 *L. planta-*

*rum*과 *L. reuteri*의 성장에 미치는 효과에 대한 통계적 유의성을 조사하여, 유의적으로 긍정적 효과를 나타내는 배지성분들을 도출하였다(Fig. 2). 그 결과 *L. plantarum*의 경우에는 yeast extract, sucrose, soy peptone, ammonium citrate, molasses, corn steep liquor 및 glucose가 유의적으로 긍정적 효과를 나타내었다(Fig. 2A). *L. reuteri*의 성장에 있어서는 yeast extract와 soy peptone이 유의적인 긍정적 효과가 나타났(Fig. 2B). 두 균주에 대한 표준화된 통합적 효과에 있어서는 yeast extract, soy peptone, sucrose 및 molasses가 유의적인 긍정적 효과를 나타내었다(Fig. 2C). Sucrose와 glucose는 유산균들의 주요 탄소원으로 이용되며, *L. plantarum*의 경우 세포성장 뿐

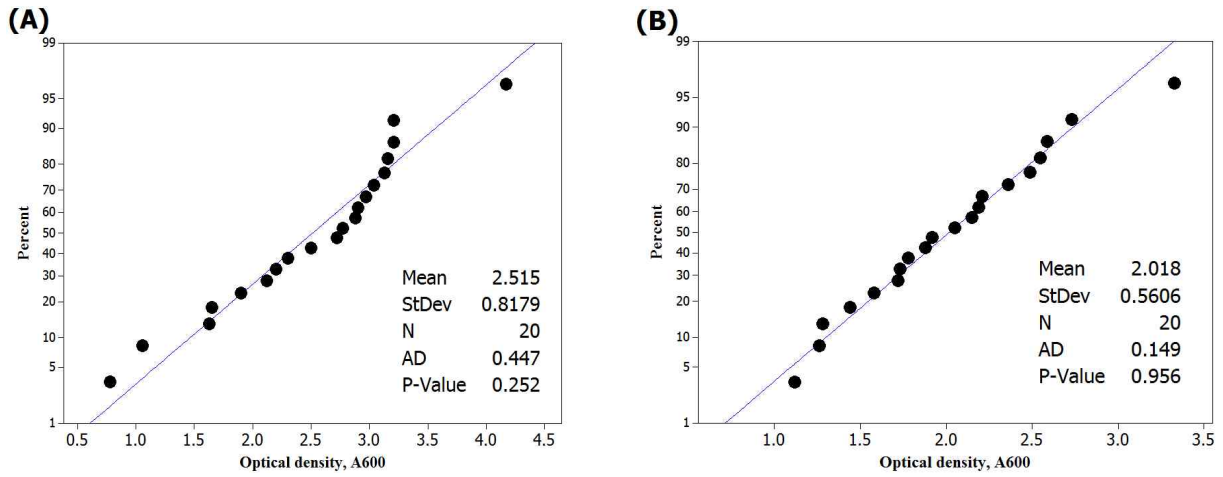


Fig. 1. Probability plots of the responses of *L. plantarum* (A) and *L. reuteri* (B) for normality test.

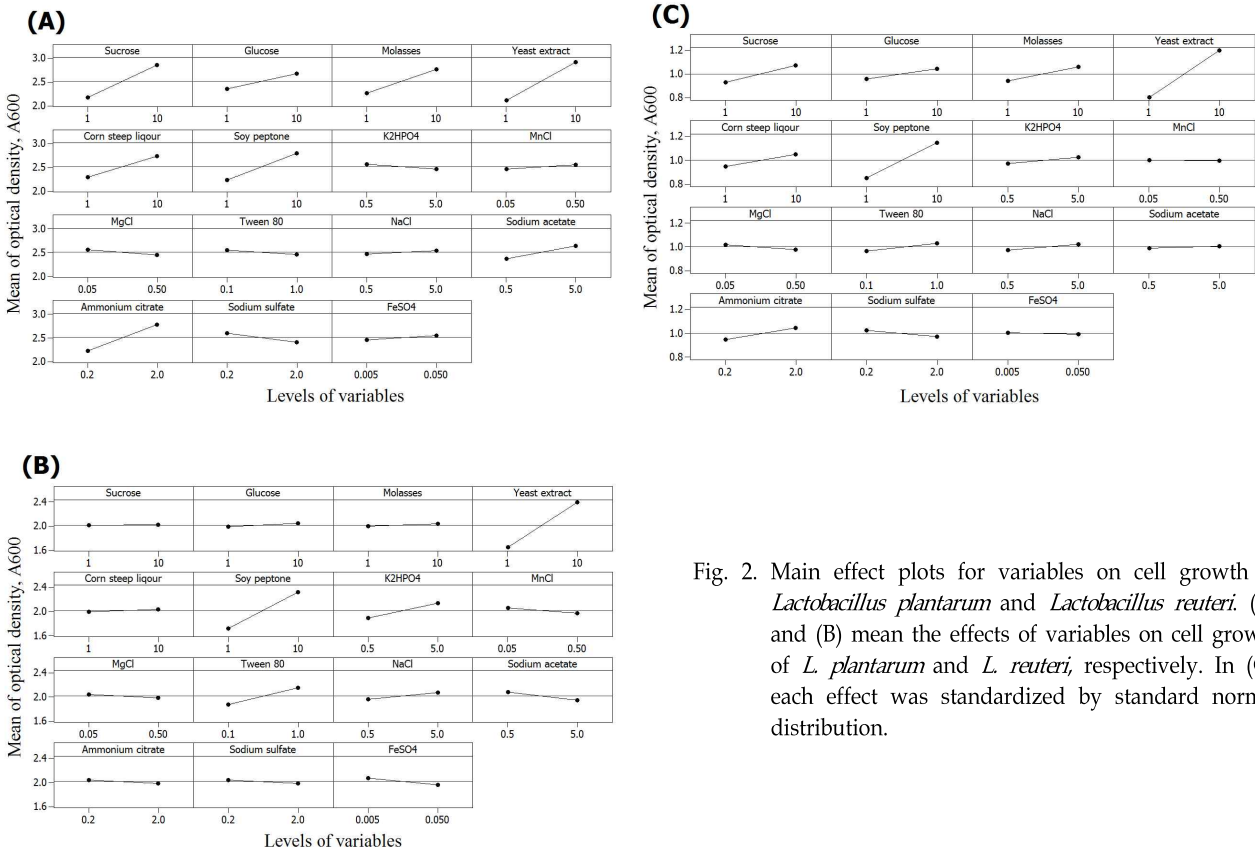


Fig. 2. Main effect plots for variables on cell growth of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus reuteri*. (A) and (B) mean the effects of variables on cell growth of *L. plantarum* and *L. reuteri*, respectively. In (C), each effect was standardized by standard normal distribution.

만 아니라 다양한 bacteriocin의 생성 및 extrapolymerized saccharide 생성에 있어서도 주요한 기질로 작용한다고 하였다[5]. Yeast extract는 미생물 성장에 있어 중요한 질소원으로 사용되며, 특히 유산균의 성장과 bacteriocin 합성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[19]. Potassium phosphate는 세균의 인산 공급원으로 작용할 뿐만 아니라 유산균에 배양에 있어서는 완충제의 기능도 수행하는 것으로 알려져 있으며[21], magne-

sium은 *Lactobacillus*의 당 대사과정에 관여하는 주요 효소들의 cofactor로 작용한다고 보고되었으며, 일부 연구에서는 bacteriocin과 같은 대사산물 합성에도 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다[22]. *L. plantarum*과 *L. reuteri*, 두 균주에게 공통적으로 적용할 수 있는 배지로, sucrose (20.0 g/l), glucose (5.0 g/l), soy peptone (11.0 g/l), yeast extract (5.0 g/l), K₂HPO₄ (0.2 g/l), CH₃COONa (2 g/l) 및 MgCl₂ (0.02 g/l)를 선택하였

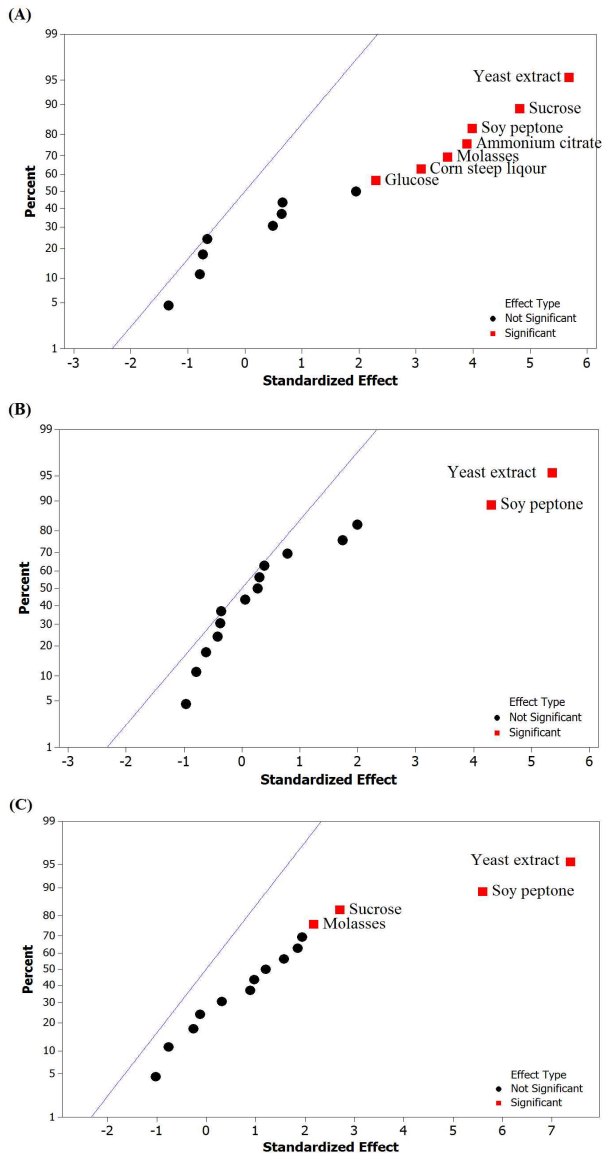


Fig. 3. Significant variables of medium ingredients on the growth of *L. plantarum* (A) and *L. reuteri* (B) and their standardized common effects (C). Squared ingredients mean significantly positive effects on the growth under 90% significant levels.

Table 4. Comparison of cell growth efficiency

Medium	<i>L. plantarum</i>	<i>L. reuteri</i>
	Viable cell count, log ₁₀ (CFU/ml)	
Optimized medium	9.69 ^b	8.82 ^a
Commercial medium	9.54 ^a	9.17 ^b
MRS medium	9.49 ^a	9.31 ^c
SEM	0.005	0.002

¹Different superscripts in same column mean significantly difference ($p < 0.05$)

Table 5. Cost of optimized medium¹

Medium	Cost, KRW/kg	g/l for use	KRW/l
Optimized medium			
1) Sucrose	5,000	20	100
2) glucose	5,000	5	25
3) soy peptone	50,000	11	550
4) yeast extract	50,000	5	250
5) K ₂ HPO ₄	5,000	0.2	1
6) CH ₃ COONa	5,000	2	10
7) MgCl ₂	5,000	0.02	0.1
Total			936.1

¹Cost for purchase of individual medium ingredients was calculated approximately.

고, 실험용 MRS 배지와 국내에서 생산 판매되고 있는 유통 유산균 배지를 대상으로 균체성장 효율을 분석하였으며 그 결과는 Table 4에서 보는 것과 같다. *L. plantarum*의 경우 두 가지 비교배지보다 더 많은 균체를 생산하여 효율성이 우수한 것으로 나타났으나, *L. reuteri*의 경우에는 비교배지보다 낮은 균체성장 결과를 나타내었다.

MRS 배지의 경우 보통 10가지의 원료들이 포함되어 있으나 본 실험에서 얻어진 배지 성분들은 총 7가지로 MRS 배지에 비하여 원료 개수가 적으며, 배양액 1 l를 제조하는 데에 936원의 배지 비용이 소요된다(Table 5). 따라서 본 개발 배지는 *L. plantarum*의 균체성장에서는 비교배지에 비하여 우수하며 경제적이라고 판단 된다.

References

1. Abdel-Fattah, Y. 2002. Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. using Box-Behnken experimental design. *Biotechnol. Lett.* **24**, 1217-1222.
2. Bas, D. and Boyaci, I. 2007. Modeling and Optimization I : Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* **78**, 836-845.
3. Beharka, A. A. and Nagaraja, T. G. 1998. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.* **81**, 1591-1598.
4. Chauhan, K., Trivedi, U. and Patel, K. C. 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.
5. Chhaya, U. and 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.
6. Cho, J. K., Li, G. H., Cho, S. J., Yoon, Y. C., Hwang, S. G., Heo, K. C. and Choe, I. S. 2007. The identification and physiological properties of *Lactobacillus plantarum* JK-01 isolated from Kimchi. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **27**, 363-370.

7. Davis, M. E., Parrott, T. D., Brown, C., de Rodas, B. Z., Johnson, Z. B., Maxwell, C. V. and Rehberger, T. 2008. Effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **86**, 1459-1467.
8. Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Bertin, G., Duvaux-Ponter, C. and Sauvant, D. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* **92**, 1620-1632.
9. Gao, X., Qiao, S. and Lu, W. 2009. Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology. *Let. Appl. Microbiol.* **49**, 556-561.
10. Jang, Y. D., Oh, H. K., Piao, L. G., Choi, H. D., Yun, J. H. and Kim, Y. Y. 2009. Evaluation of probiotics as an alternative to antibiotic on growth performance, nutrient digestibility, occurrence of diarrhea and immune response in weaning pigs. *J. Anim. Sci. Technol. (Kor.)* **51**, 25-32.
11. Jung, J. H., Hong, S. M., Kim, H. J., Meng, Q. W. and Kim, I. H. 2010. Effect of probiotics in diet on growth performance, nutrient digestibility, fecal microbial count, noxious gases emission from the feces, and blood profile in early-finishing pigs. *J. Anim. Sci. Technol. (Kor.)* **52**, 23-28.
12. Kim, J. R., Jung, H. Y., Lee, N. K., Rhim, S. L. and Paik, H. D. 2006. Isolation, identification, and probiotic properties of *Lactobacillus reuteri* HY701 from human feces. *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 677-682.
13. Kim, D. W., Kim, J. H., Kang, G. H., Kang, H. K., Lee, S. J., Lee, W. J. and Kim, S. H. 2008. Study on intestinal viability and optimum feeding method of *Lactobacillus* in broiler chickens. *J. Anim. Sci. Technol.* **50**, 807-818.
14. Kim, S. H., Kim, D. W., Park, S. Y., Kim, J. H., Kang, G. H., Kang, H. K., Yu, D. J., Na, J. C. and Lee, S. J. 2008. Effect of dietary *Lactobacillus* on growth performance, in testinal microflora, development of ileal villi, and intestinal mucosa in broiler chickens. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **50**, 667-676.
15. Krehbiel, C. R., Rust, S. R., Zhang, G. and Gilliland, S. E. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.* **81(E.Suppl.2)**, E120-E132.
16. Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Nadeau, E., Matte, J. J., Goulet, J. and Fairbrother, J. M. 2009. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *J. Anim. Sci.* **87**, 922-934.
17. Miller, A. and Sitter, R. R. 2001. Using the folded-over 12-run plackett-burman design to consider interactions. *Technometrics* **43**, 44-55.
18. Moon, S. B. 2010. *Structural Equation Modelling*, pp. 84-85, Hwak Ji Sa. Seoul, Korea.
19. Powell, J., Witthuhn, E., Todorov, R. C. and Dicks, L. N. T. 2007. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *Int. Dairy J.* **17**, 190-198.
20. Swyers, K. L., Burk, A. O., Hartsock, T. G., Ungerfeld, E. M. and J. L. Shelton. 2008. Effects of direct-fed microbial supplementation on digestibility and fermentation end-products in horses fed low- and high-starch concentrates. *J. Anim. Sci.* **86**, 2596-2608.
21. Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, M. C. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res. Microbiol.* **154**, 705-712.
22. Verellen, T. L. J., Bruggeman, G., Reene, C. A., Dicks, L. M. T. and Vandamme, E. J. 1998. Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 174-179.

초록 : 통계적 방법을 이용한 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus reuteri*의 유효 배지 성분의 탐색

김동운¹ · 조상범² · 김영화¹ · 이성대¹ · 정현정¹ · 김상호¹ · 조규호¹ · 사수진¹ · 김인철¹ · 원미영³ · 김수옥³ · 김수기^{3*}

(¹국립축산과학원, ²전북대학교 동물소재공학과, ³건국대학교 동물생산·환경학전공)

본 연구는 가축용 생균제로서 이용성이 우수한 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus reuteri*의 대량생산을 위한 경제적 최적 배지조성을 도출하기 위하여 수행되었다. 두 균주의 배양을 위한 배지성분 요인들은 유산균 배지로 알려진 MRS broth를 기준으로 하여, sucrose, glucose, molasses, yeast extract, corn steep liquor, soy peptone, dipotassium phosphate, manganese chloride, magnesium chloride, tween 80, sodium chloride, sodium acetate, ammonium citrate, sodium sulphate 및 ferrous sulphate 등 총 15가지를 선택하였다. 각 배지성분들이 각 균주들의 세포 성장에 미치는 요인분석은 20개의 실험으로 구성된 Plackett-Burman design 방법을 이용하여 분석하였다. 그 결과 *L. plantarum*의 성장에 있어서는 sucrose, glucose, molasses, yeast extract, corn steep liquor, soy peptone, sodium acetate, ammonium citrate 등이 긍정적인 효과(positive effect)를 나타내었다. *L. reuteri*의 경우, yeast extract, soy peptone, K₂PHO₄, tween 80에서 수준간의 격차가 큰 긍정적인 효과가 나타났다. 두 가지 균주들에서 얻어진 표준화된 통합적 효과의 주 효과를 분석한 결과, sucrose, yeast extract, soy peptone에서 긍정적인 효과가 나타났다. 최종적으로 *L. plantarum*과 *L. reuteri* 두 균주에 공통적으로 적용할 수 있는 유효 배지 성분들로 sucrose (20.0 g/l), glucose (5.0 g/l), soy peptone (11.0 g/l), yeast extract (5.0 g/l), K₂HPO₄ (0.2 g/l), CH₃COONa (2 g/l) 및 MgCl₂ (0.02 g/l)를 선택하였다.