

Statistical Optimization of Culture Conditions of Probiotic *Lactobacillus brevis* SBB07 for Enhanced Cell Growth

Su-Ji Jeong[†], Hee-Jong Yang[†], Myeong Seon Ryu, Ji Won Seo, Seong-Yeop Jeong and Do-Youn Jeong*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 595-804, Korea

Received April 3, 2018 / Revised April 10, 2018 / Accepted April 23, 2018

We recently reported the potential probiotic properties of *Lactobacillus brevis* SBB07 isolated from blueberries. The present study investigates the effect of culture conditions such as temperature, initial pH, culture time, and medium constituent for industrial application. The ingredients of the medium to improve cell growth were selected by Plackett-Burman design (PBD) and central composite design (CCD) within a desirable range. The PBD was applied with 19 factors: seven carbon sources, six nitrogen sources, and six microelements. Protease peptone, corn steep powder (CSP), and yeast extract were found to be significant factors for the growth of SBB07. The CCD was then applied with three variables found from the PBD at five levels, and the optimum values were decided for the three variables: protease peptone, CSP, and yeast extract. In the case of the growth of SBB07, the proposed optimal media contained 2.0% protease peptone, 2.5% CSP, and 2.0% yeast extract, and the maximum dried-cell weight was predicted to be 2.93963 g/l. By the model verification, it was confirmed that the predicted and actual results are similar. Finally, the study investigated the effects of incubation temperature and initial pH at the optimized medium. It was confirmed that the dried-cell weight increased from 2.2933±0.0601 g/l to 3.85±0.0265 g/l when compared to the basal medium at 37°C and initial pH 8.0. Establishing the optimal culture condition for SBB07 provides good potential for applications in probiotics and can serve as the foundation for the industrialization of materials.

Key words : Cell growth, industrialization, *Lactobacillus brevis*, probiotic, statistical optimization

서론

사람의 장내에는 약 10^{14} CFU/g 수준의 미생물이 존재하고 있고, 그 종류는 *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 및 *Proteus* 속 등 약 500여 종 이상이 존재하고 있으며, 이들의 장내 균형에 따라 감염성 질병이나 인체 대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[15]. 장내 미생물의 불균형은 알레르기, 아토피 피부염, 설사 및 염증성 질환 등을 유발하는 요인으로 알려져 있으며, 특히 체내 면역에 있어 매우 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다[6]. 최근에는 이러한 장내 미생물의 중요성이 부각되면서 면역 관련 질병의 예방 및 치료를 위해 부작용의 우려가 없는 다양한 프로바이오틱스 소재를 활용하여 제품화한 의약품이나 건강기능식품이 크게 주목을 받고 있다.

FAO와 WHO [5]에서는 '충분한 양을 섭취하였을 때 숙주

에게 유익을 주는 살아있는 유기체'로 프로바이오틱스를 정의하였고, 최근에는 살아있는 상태뿐만 아니라, 건조 세포나 발효 산물의 형태로 투여하여도 숙주의 장내 균총을 개선하여 유익한 영향을 주는 단일 또는 복합 형태의 소재로 범위가 확장되고 있으며[24], GRAS (Generally recognized as safe) 미생물로 그 안전성 또한 입증되어 섭취시 안전하다고 알려져 있다[14]. 프로바이오틱스는 일반적으로 *Lactobacillus* spp. 또는 *Bifidobacterium* spp.과 같은 유산균이 속하며, 대부분 건강한 동물이나 사람의 장관에서 주로 발견된다. 프로바이오틱스 유산균은 항생제 내성 미생물에 의한 과다성장 억제와 박테리아 감염에 의해 발생하는 병원성 설사[2], *Helicobacter pylori* 감염에 의한 위장 감염[22], 염증성 장질환 예방[19]과, 면역력 증강[13], 콜레스테롤 저하[7]에 효과가 있다고 알려져 있으며, 궤양성 대장염 및 크론병[18]에 대한 연구가 현재 진행 중에 있다. 또한 유산균은 질병 이외에도 유기산, 박테리옌과 같은 항균 물질을 생산하여 병원성 미생물의 성장을 저해하는 작용을 하며[17], 내산성 및 내담즙성이 우수하여 구강을 통해 섭취하여도 위액 및 각종 효소가 존재하는 위와 담즙이 존재하는 십이지장을 거쳐 장까지 안전하게 도달하여 장내 균총을 개선하는 역할을 수행한다[20].

산업적으로 이러한 유용 미생물을 효율적으로 활용하기 위해서는 미생물의 탐색 및 분리와 동정 이외에도 배양이 용이해야 하며, 대량 배양시 소모되는 시간과 비용이 적고, 보존

[†]Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-63-653-9579, Fax : +82-63-653-9590

E-mail : jdy2534@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

기간 또한 고려해야 될 중요 사항 중 하나이다. 하지만 최근 국내 발효 기술의 비약적 발전에도 불구하고 산업화와 관련된 기술은 해외 선진국 대비 미흡한 실정이며, 유산균의 경우 일반적으로 배양에 MRS 배지가 사용되는데 이는 다른 배지에 비해 고가이므로 이를 대체할 수 있는 저가의 배지 개발이 필요한 실정이다[3]. 일반적으로 미생물은 배양 조건과 배지의 영양 성분에 의해 미생물의 증식과 대사산물의 생산에 영향을 받으므로 탄소원, 질소원, 무기질 등과 같은 필수 에너지원과 영양소의 적절한 공급이 발효 생산성에 있어 매우 중요하게 작용하며[26], 산업적 적용을 위해서는 각 미생물 마다 영양 요구성 및 생육 특성이 다르기 때문에 각각의 미생물의 생육 특성을 파악하고 최적 배지 조성 및 대량 생산에 대한 연구가 추가로 반드시 필요하다.

따라서 본 연구에서는 통계학적 기법인 반응표면분석법(Response surface methodology, RSM)을 적용하여 산업적 적용이 가능한 배지 성분을 대상으로 배양 조건 및 균체량 증가를 위한 최적의 배지 조성을 확립하고, 배양 온도 및 초기 pH에 의한 균체량의 영향에 대하여 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주의 배양 및 실험 재료

본 연구에 사용된 유산균은 앞서 블루베리에서 분리한 *L. brevis* SBB07 (KCCM 12102P)를 사용하였다[25]. 균주 보존을 위하여 균 배양액에 20% glycerol (JUNSEI chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)과 5% skim milk (Difco™, MI, USA)가 포함된 용액에 현탁 후 -80℃에 보관하였으며, 유산균의 배양을 위해 Lactobacilli MRS broth (Difco™) 또는 Lactobacilli MRS agar (Difco™) 배지를 이용하여 37℃ shaking incubator (VS-1209P3V, Vision Scientific Co. Ltd., Daejeon, Korea)에서 48시간 배양하여 연구에 사용하였다.

실험에 사용한 glucose, lactose, sucrose, fructose, tween80, urea 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), peptone, tryptone, protease peptone, CSP, yeast extract, beef extract 등은 Difco™에서, molasses, glycerol, CH₃COONa, K₂HPO₄, KNO₃, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄ 등은 JUNSEI에서 구입하여 사용하였으며, 그 외의 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

균체성장조사

배양 시간에 따른 유산균의 성장 정도를 조사하기 위해 MRS broth (Difco™) 배지에 5% 균주를 접종하여 37℃ shaking incubator (Vision Scientific Co. Ltd.)에서 72시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양 한 후 건조 균체량(DCW, dried cell weight) 및 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하였다. 배양 시간에 따른 균주의 생육 정도를 조사하기 위해 4시간 간격으로 배양액을 회수하여 실험에 사용하였다. 건조 균체량의 측정은 배양액

10 ml을 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 한 후 멸균 증류수로 3회 세척하여 80℃에서 항량이 달할 때까지 건조 한 후 그 무게를 측정하였고, 흡광도는 회수한 배양액 1 ml을 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 한 후 멸균 증류수로 3회 세척하였고, 멸균 증류수 1 ml에 재부유하여 UV/VIS spectrophotometer (SPECORD 200, Analytic Jena, Jena, Germany)를 이용하여 600 nm에서 OD값을 측정하였다.

최적 배지 성분의 선별을 위한 Plackett-Burman design (PBD) 설계

SBB07의 최적 배지 성분 및 최적 농도를 확립하기 위한 방법으로는 통계학적 분석 방법인 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)을 이용하여 수행하였다. 먼저 최적 배지 성분을 결정하기 위해 산업적으로 사용되고 있는 배지 성분 및 선행연구를 통해 균체 성장에 영향을 주는 배지 성분과 미량으로 첨가되는 주 성분 등을 조사하였다. 2수준으로 주 효과만을 고려할 수 있는 실험계획법인 Plackett-Burman design (PBD)을 통해 배지 성분들의 조합이 균체의 성장에 미치는 영향을 조사하였으며, 균체 성장에 영향을 줄 수 있는 요인으로 탄소원 7종(glucose, molasses, lactose, sucrose, fructose, tween 80, glycerol), 질소원 6종(peptone, tryptone, protease peptone, CSP, yeast extract, beef extract), 기타 미량원소 6종(urea, CH₃COONa, K₂HPO₄, KNO₃, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄) 등 총 19종을 설정하였다. 실험구(Run)의 구성은 20개로 높은 수준(+1)과 낮은 수준(-1) 각각의 성분을 2가지 수준으로 나누어 실험에 적용하였다. 모든 실험구는 3회 반복 측정을 통해 수행하였고, 최종적으로 Plackett-Burman design에 의한 실험 계획, 데이터 분석 및 최적화 분석은 Design expert 9.0 (Version 9.0.3.1, Stat Ease Inc., Minneapolis, USA) program을 사용하였으며, 균체 성장을 위한 배지 성분에 대한 모델의 변수와 수준은 Table 1에 나타내었다.

중심합성계획법(CCD, Central composite design)을 이용한 최적의 배지 성분 농도 결정

앞서 Plackett-Burman design을 통해 선별된 배지 성분의 각각의 농도에 따른 최적 조건 확립을 위해 중심합성계획법(CCD, central composite design)을 이용하여 분석하였다. 선별된 독립변수 protease peptone (g/l, X₁), CSP (g/l, X₂), yeast extract (g/l, X₃)을 대상으로 중심합성계획법을 설정하였고, 실험 계획의 구성은 3개의 중심점을 포함한 17개의 실험구로 PBD 결과를 기반으로 하여 중심값과 실험 범위를 각각 -2, -1, 0, 1, 2로 5단계로 나누어 설정하여 중심합성계획법을 실시하였다. 독립 변수에 따른 종속변수(Y)는 건조균체량을 측정하여 회귀분석에 사용하였으며, 종속변수와 독립변수의 사이의 상관관계를 얻기 위한 2차 회귀 모형에 대한 식은 다음과 같다.

Table 1. Range of different variables for the Plackett-Burman design

Source	Factor	Symbol (unit)	Coded values	
			-1	+1
Carbon source	Glucose	X ₁ (g/l)	10	30
	Molasses	X ₂ (g/l)		
	Lactose	X ₃ (g/l)		
	Sucrose	X ₄ (g/l)		
	Fructose	X ₅ (g/l)		
	Tween 80	X ₆ (g/l)	2	10
	Glycerol	X ₇ (g/l)		
Nitrogen source	Peptone	X ₈ (g/l)	5	20
	Tryptone	X ₉ (g/l)		
	Protease peptone	X ₁₀ (g/l)		
	Corn steep powder	X ₁₁ (g/l)		
	Yeast extract	X ₁₂ (g/l)		
	Beef extract	X ₁₃ (g/l)		
Microelement	Urea	X ₁₄ (g/l)	1	8
	CH ₃ COONa	X ₁₅ (g/l)		
	K ₂ HPO ₄	X ₁₆ (g/l)		
	KNO ₃	X ₁₇ (g/l)		
	MgSO ₄	X ₁₈ (g/l)	0.5	1.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	X ₁₉ (g/l)		

Y는 종속변수이고, X₁, X₂, X₃은 각각의 독립변수, β₀은 절편, β_x는 회귀계수이다. 중심합성계획법을 통해 얻어진 결과는 Design Expert 9.0 program (Stat Ease Inc.)을 이용하여 회귀분석에 의한 모델식을 예측하였으며, ANOVA 분석을 실시하여 오차의 독립성과 정규성, 등분산성 등의 실험 모델에 대한 유의성을 검토하였다. 회귀분석 결과를 바탕으로 균체 성장에 영향을 주는 배지 성분의 최적 농도를 결정하였으며, 이후 예측된 배지 성분의 최적 농도를 이용하여 최적 조건에서의 건조 균체량 분석을 실시하여 실험 결과의 재현성을 확인하였다.

온도 및 초기 pH에 따른 배양 조건 확립

온도 및 초기 pH에 따른 최대 균체량 생산을 위한 배양 조건을 확립하기 위해 중심합성계획법을 통하여 예측된 최적 배지를 제조하여 분석에 사용하였다. 온도에 따른 배양 조건 최적화를 위해 예측된 최적 배지에 균주를 접종(10⁶ CFU/ml)하여 각각의 배양 온도 25℃, 30℃, 37℃ shaking incubator (Vision Scientific Co. Ltd.)에서 36시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양 한 후 건조 균체량을 측정하여 조사하였다. 초기 pH에 따른 배양 조건은 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 (in 0.1N HCl or 0.1M NaOH (Sigma-Aldrich))로 조정된 예측된 최적 배지에 균주를 접종(10⁶ CFU/ml)하여 37℃ shaking incubator (Vision Scientific Co. Ltd.)에서 36시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양 한 후 건조 균체량을 측정하여 초기 pH에 따른 최적

균체량을 확인하였다.

결과 및 고찰

배양 시간에 따른 균체성장조사

SBB07의 배양 시간에 따른 균체 성장을 조사하기 위해 MRS broth (Difco™)에 접종하여 37℃ shaking incubator (Vision Scientific Co. Ltd.), 150 rpm에서 72시간 동안 배양하였으며, 4시간 간격으로 배양액을 회수하여 각각의 시간 별 흡광도와 건조균체량을 측정하였다. 배양 시간에 따른 흡광도와 건조 균체량을 비교 분석한 결과 유사한 세포 성장을 보였으며, 배양 12시간에서 28시간까지 균체가 급속도로 증식하는 대수기를 나타내었다. 배양 32시간 이후에는 균체 증식 속도가 점차 느려지기 시작하여 36시간 이후 정지기에 들어갔다(Fig. 1). SBB07은 배양 36시간에 흡광도 1.8505(OD_{600nm})와 건조 균체량 2.4090 g/l로 가장 높은 세포 성장을 보여 SBB07의 균체 성장의 최적 배양 시간을 대수기에서 정지기로 들어가는 36시간으로 결정하였다. 김치에서 분리한 *L. brevis* UC-22의 경우 37℃에서 16시간이 경과하였을 때 최대 균체량을 생성한다고 보고하였고[22], 이외의 연구에서도 일반적으로 *L. brevis* 균주는 약 16시간에서 24시간 이내 최대 균체량을 생성하는 것을 확인하였다[10, 12]. 하지만 *L. brevis* SBB07의 경우에는 동일한 *L. brevis* 종이지만 36시간에 최대 균체량에 도달하는 것으로 나타나 기존 균주와는 다른 차이점을 지닌 것을 확인하였다. 이는 동일한 미생물 종이라 하더라도 배양 방법 및 초기 접종량 등 외부 요인에 의한 차이와 각각의 균주마다 갖는 특성이 다르기 때문에 배양 시간에서도 차이를 나타내는 것으로 판단된다.

Plackett-Burman design (PBD)를 통한 배지 조성 인

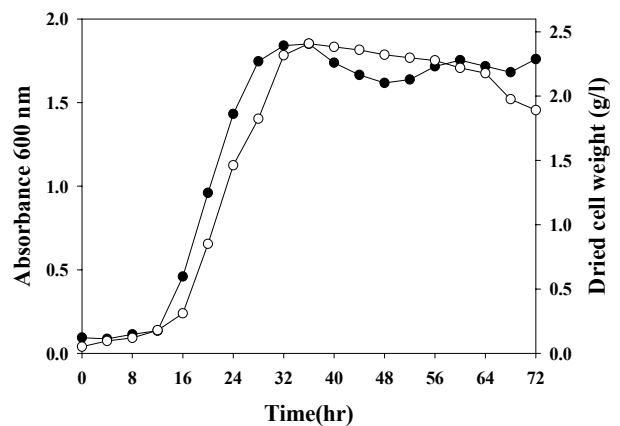


Fig. 1. The time course profile for cell growth of SBB07. Time course profiles of absorbance and dried cell weight for SBB07 cultivated in MRS medium (as basal medium) at 150 rpm, 37℃(○, dried cell weight; ●, absorbance 600 nm).

자의 영향력 확인

SBB07의 최대 균체량 생성을 위한 배지 조성 인자를 선별하기 위해 Plackett-Burman design (PBD)을 이용하여 실험 계획을 설계하였다(Table 1). 실험 설계에 따라 20개의 실행수 (Run)에 대한 반응값(Y)을 3회 반복 측정하여 평균값을 이용하여 통계분석에 사용하였다(Table 2). 각각의 실험 변수에 따라 균체량에 주는 영향을 분석한 plot은 Fig. 2와 같았으며, 각각 요인의 수준이 증가할수록 균체량이 증가하는 요인으로 탄소원은 glucose, fructose, tween 80, 질소원으로는 peptone, tryptone, protease peptone, CSP, yeast extract, beef extract가 예측되었고, 미량 원소로는 CH₃COONa, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄가 예측되었다. 하지만 이의 변수의 경우에는 수준이 증가할수록 균체량이 감소하는 경향을 나타내었다. 균체량 증가에 대한 반응값의 영향, 모델 계수, F-value, p-value 및 신뢰수준에 대한 분석결과는 Table 3에 나타내었고, PBD의 통계 분석 결과 molasses 91.74%, lactose 92.37%, sucrose 92.20%, protease peptone 95.87%, CSP 98.40%, yeast extract 96.09%, urea 90.08%, K₂HPO₄ 93.31%, KNO₃ 96.08%, (NH₄)₂SO₄ 93.95% 등 10종이 균체량 증가에 대한 중요 인자로 선정하였다. 최종적으로 실험 변수의 수준과 균체량에 대한 일원 요인 분석을 통하여 변수의 수준이 증가함에 따라 균체량이 동시에 증가하는 요인과 신뢰 수준 결과를 기반으로 하여 균체량 증가에 중요한 성분으로 protease peptone, CSP, yeast extract를 최적의 배지 조성으로 선별하였다. 특히 CSP의 경우 균체량 증가를 위해 산업적으로 빈번하게 사용되는

대체 유기 질소원으로 60~70%의 단백질이 함유되어 있어 미생물 성장에 필요한 영양분이 풍부하며, *Agrobacterium tumefaciens* 변이주에 의한 coenzyme Q₁₀의 경우 생산량이 CSP의 첨가에 따라 약 57.5배 증가되는 결과를 초래하였고, 균체량 또한 2.5배 이상 증가하는 것으로 보고되고 있어[11], 균체량 뿐만 아니라 기능성 물질의 생성에도 중요한 역할을 하는 대체 유기 질소원으로 산업적 적용이 매우 유용한 성분 중 하나이다. 따라서 PBD 결과에 따라 선택된 최종 3가지 요인을 대상으로 CCD 적용을 위한 요인으로 실험을 진행하였다.

최적 배지 성분 농도 조사를 위한 중심합성계획법

PBD 결과에 따라 선별된 배지 성분의 최적 농도를 결정하기 위하여 선정된 독립변수 protease peptone (X₁), CSP (X₂), yeast extract (X₃) 3가지 요인 변수를 대상으로 CCD 분석을 실시하였다. CCD 분석을 위한 요인 변수를 대상으로 5단계 수준에서 중심점 3개를 포함한 총 17개의 구간을 대상으로 실험 계획을 수립 후 반응값(Y, 건조균체량)을 측정하였으며, 모든 실험구는 3회 반복 실험을 실시해 평균값을 통계에 적용하여 반응값을 도출하였다. 각각의 독립변수에 대한 종속변수 (Y, 건조균체량)의 수준 및 반응값은 Table 4에 나타내었다. 반응값에 대한 데이터 분석 및 모델식 예측은 Design expert 9.0 program을 사용하였으며, 결과를 반영한 건조 균체량에 대한 회귀 방정식은 아래와 같다.

분산분석 결과 R-square는 1에 가까운 0.9641로 실험 유의성에 적합함을 확인하였고, 전체 모델에 대한 유의 확률이

Table 2. Experimental design and results using the Plackett-Burman method to improve the biomass production

Runs	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	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	X ₁₉	Response ^a Y (g/l)
1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	2.85333
2	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1.85
3	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1.87
4	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1.98667
5	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	2.45
6	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	0.556667
7	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1.74667
8	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	2.55333
9	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	2.12333
10	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	0.716667
11	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	2.73333
12	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	2.41333
13	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1.88667
14	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	2.06667
15	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	2.11333
16	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	2.45667
17	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.59667
18	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	2.68
19	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1.81333
20	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	2.54

Dried cell weight by *Lactobacillus brevis* SBB07 cultivated at 150 rpm, 37°C for 36 hr. The experiments were carried out in triplicate. ^aResponse was dried cell weight (DCW) from *Lactobacillus brevis* SBB07.

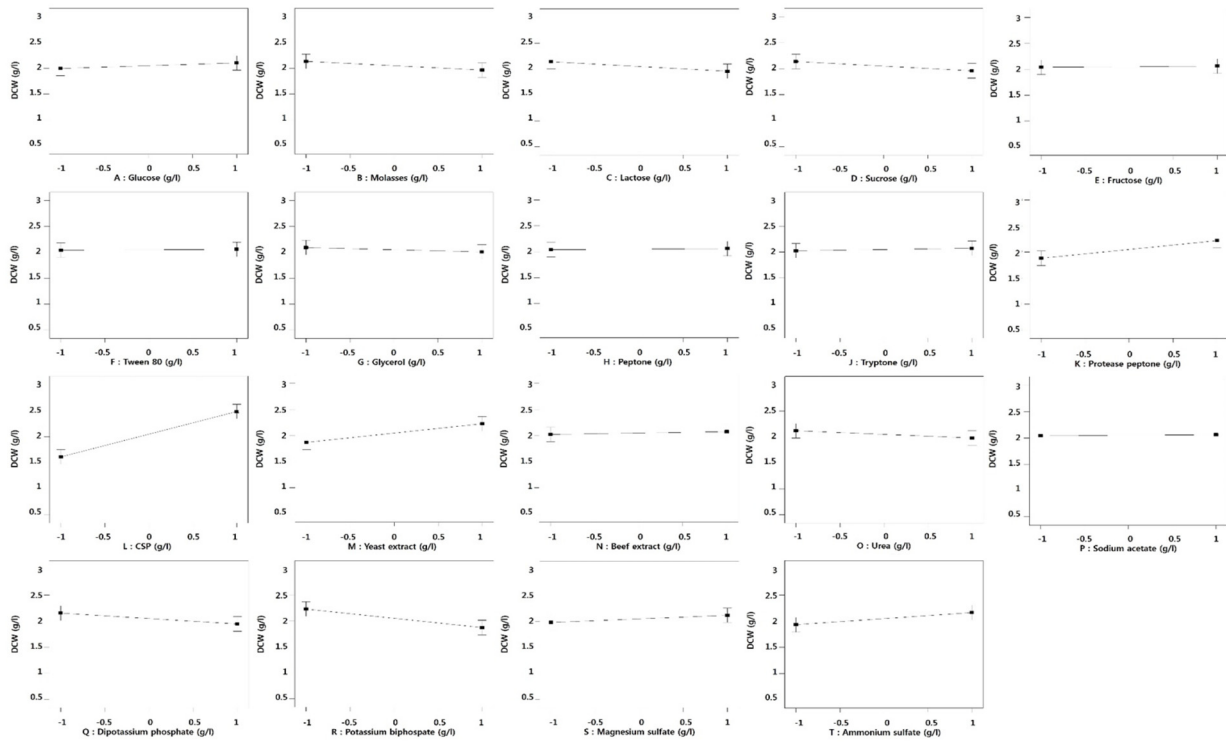


Fig. 2. Main effect plot for variables on biomass production of SBB07. The greater the slope of the line in the main effects plot the greater that factor's influence on biomass production. The plot indicates that biomass production is maximized with protease peptone, CSP, and yeast extract.

Table 3. Variables as medium constituents, their effects, coefficients, sum of squares, t-values, probability due to chance and confidence levels obtained by analyzing the experimental data for the Plackett-Burman design used for screening of medium components for biomass production by *Lactobacillus brevis* SBB07

Variable (Xi)	Effect (Exi)	Coefficient (β_i)	Sum of squares	F-value	p-value	Confidence level (%)
Model	-	2.05	6.93	159.13	0.0623	93.77
Glucose	0.11	0.053	0.057	23.51	0.1295	87.05
Molasses	-0.17	-0.084	0.14	58.78	0.0826	91.74
Lactose	-0.18	-0.091	0.17	68.94	0.0763	92.37
Sucrose	-0.18	-0.089	0.16	65.95	0.0780	92.20
Fructose	0.023	0.011	0.002569	1.06	0.4905	50.95
Tween 80	0.016	0.008	0.00128	0.53	0.5997	40.03
Glycerol	-0.083	-0.042	0.035	14.35	0.1643	83.57
Peptone	0.019	0.009667	0.001869	0.77	0.5410	45.90
Tryptone	0.048	0.024	0.012	4.76	0.2736	72.64
Protease peptone	0.34	0.17	0.59	236.98	0.0413	95.87
Corn steep powder	0.87	0.44	3.81	1575.86	0.0160	98.40
Yeast extract	0.36	0.18	0.64	264.8	0.0391	96.09
Beef extract	0.053	0.027	0.014	5.88	0.2491	75.09
Urea	-0.14	-0.07	0.098	40.5	0.0992	90.08
CH ₃ COONa	0.022	0.011	0.00242	-	-	-
K ₂ HPO ₄	-0.21	-0.1	0.22	89.96	0.0669	93.31
KNO ₃	-0.36	-0.18	0.64	262.83	0.0392	96.08
MgSO ₄	0.14	0.069	0.094	38.97	0.1011	89.89
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.23	0.12	0.27	109.93	0.0605	93.95
Standard deviation		0.049		Press ^a		0.97
Mean		2.05		R-squared		0.9997
Coefficient of variation		2.40		Adjusted R-squared		0.9934

^aPress, The predicted residual sum of squares for the model.

Table 4. Detailed design parameters from the experiment for central composite design

Factor	Symbol (unit)	Coded values				
		-2	-1	0	+1	+2
Protease peptone	X ₁ (g/l)	2	8	14	20	26
Corn steep powder	X ₂ (g/l)	10	15	20	25	30
Yeast extract	X ₃ (g/l)	2	8	14	20	26
Runs	X ₁	X ₂	X ₃	Response ^a , Y(g/l)		
1	0	0	0	1.82		
2	-1	1	1	2.16333		
3	1	1	1	3.14		
4	-1	-1	-1	1.19333		
5	0	0	2	2.17667		
6	0	2	0	2.48333		
7	0	-2	0	1.31		
8	0	0	0	1.72333		
9	1	-1	-1	1.71667		
10	-2	0	0	1.60667		
11	1	1	-1	2.22667		
12	-1	-1	1	1.4		
13	-1	1	-1	1.87		
14	0	0	-2	1.51667		
15	2	0	0	2.54333		
16	0	0	0	1.97		
17	1	-1	1	2.02		

Dried cell weight by *Lactobacillus brevis* SBB07 cultivated at 150 rpm, 37°C for 36 hr. The experiments were carried out in triplicate. ^aResponse was dried cell weight from *Lactobacillus brevis* SBB07.

0.0003으로 0.05 보다 작아 가정된 실험 모형이 적합함을 확인하였다. 변동계수(CV, Coefficient of variation)는 7.36으로 낮은 수치를 나타내어 균체량 생산에 변수들의 독립적인 영향뿐만 아니라 변수간의 상호작용도 매우 높았음을 확인하였다 (Table 4). 특히 3가지 변수 모두 일차식에서 유의성이 (+) 값을 나타내고 있어 이들의 첨가는 건조 균체량의 증가에 긍정적인 효과를 주는 것을 확인할 수 있다. 또한, 각각의 변수 별로 건조 균체량의 증가에 미치는 영향을 확인하기 위하여 총 3개의 변수 중 하나의 독립변수를 최적점에 고정하고 나머지 2개

의 변수를 이용해 3차원의 형태로 교호작용을 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 3가지 변수 모두 첨가량이 증가할수록 건조 균체량도 증가하였으며, 특히 protease peptone과 CSP의 경우 첨가량이 증가할수록 건조 균체량도 크게 증가하는 것으로 예측되었다. 최종적으로 중심합성계획법을 통하여 최대균체량은 2.93963 g/l로 예측되었고, 이때 각 변수의 최적 농도는 protease peptone 2.0%, CSP 2.5%, yeast extract 2.0%로 확인하였다.

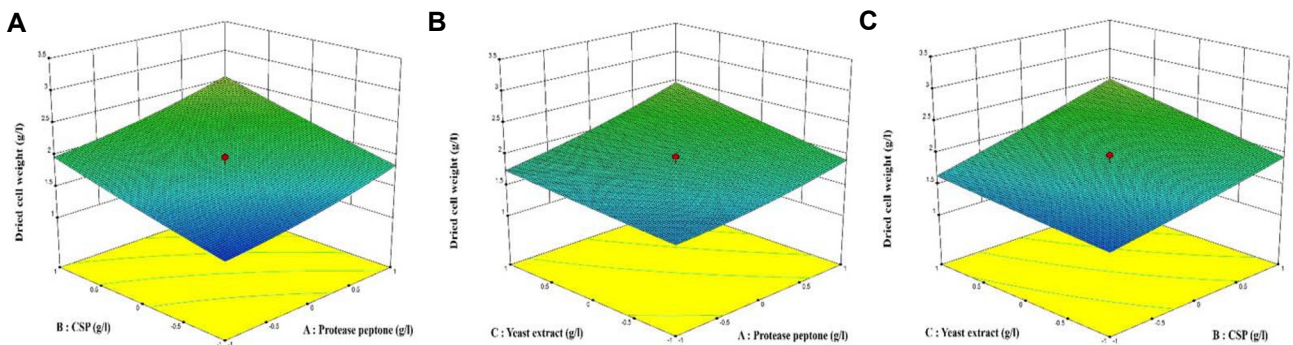


Fig. 3. Three-dimensional response surface of maximal dried cell weight showing the interactions between protease peptone, CSP and yeast extract concentration. Interaction of (A) protease peptone (X₁) and CSP (X₂), (B) protease peptone (X₁) and yeast extract (X₃), and (C) CSP (X₂) and yeast extract (X₃), when other factors are kept at their optimum.

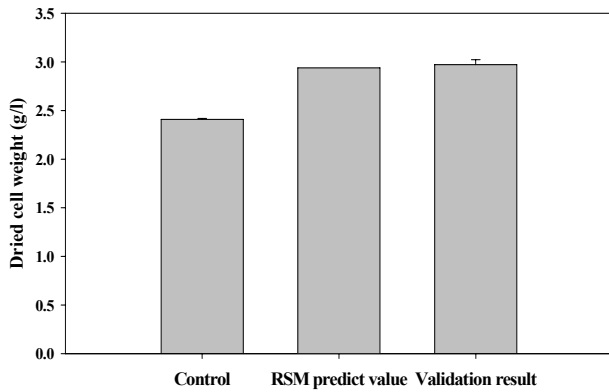


Fig. 4. The comparison of MRS broth (as basal medium) and optimal culture broth after incubation for 36 hr. The experiments were carried out in triplicate ($p < 0.05$).

실험 계획 모델의 유효성 검사

PBD와 CCD를 통하여 선정된 최적화 배지에서 *L. brevis* SBB07의 검증을 위해 최적 배지에 SBB07 배양액(10^6 CFU/ml)을 접종하여 건조 균체량을 조사하였다. 예측값과 실제값의 비교를 위한 대조구로는 유산균 배양에 일반적으로 사용되는 MRS 배지에 동일한 조건하에 배양하여 비교하였다(Fig. 4). 실험 계획 모델을 통해 예측된 조건에서 발효하여 건조 균체량을 조사한 결과 SBB07은 2.9722 ± 0.0512 g/l로 측정되어 앞선 예측값 2.93963 g/l와 비교해 유사한 결과값을 보여 반응

표면분석법을 실시하여 예측된 실험 모델의 결과값이 신뢰할 수 있는 수준임을 확인하였다. 또한 최적화 실시 전의 일반 배양 배지에서의 2.4090 ± 0.01 g/l 보다 약 1.23배 증가함을 확인하였다. 일반적으로 유산균의 산업화를 위한 배지 조성 연구에 lactic acid의 생산량 증가를 위해 질소원을 CSP로 대체하여 사용하고 있으며, 최적화 수행 결과 lactic acid 이외에도 균체량 또한 증가한다고 보고되고 있다[8, 27]. 특히 Yu, L. 등[27]의 보고에 따르면 *L. rhamnosus* CGMCC1466 균체량이 일반 배지에서 발효한 결과보다 corn steep liquor (CSL)를 사용한 결과에서 약 140%의 균체량이 증가하였으며, 본 결과와 유사한 비율로 균체량이 증가하여 CSP가 유산균의 균체량 증가에도 효율적인 산업화 소재임을 확인하였다.

온도 및 초기 pH에 따른 최적 조건 확립

앞서 확립한 최적 배지를 사용하여 SBB07의 균체량 증가에 대한 배양 온도 및 배지 초기 pH의 영향을 조사하였다. 먼저 배양 온도에 따른 균체량의 변화는 급증하거나 급감하지는 않고 소폭 변화하여 결과값의 큰 차이를 보이지는 않았다. 25 °C와 30 °C에서 배양한 경우 2.0967 ± 0.0689 g/l와 2.0 ± 0.0473 g/l로 유사한 균체량을 보였지만, 37 °C에서 배양한 결과 2.2933 ± 0.0601 g/l로 가장 높은 균체량의 증가를 확인하였다(Fig. 5A). Chin 등[4]은 30 °C에서 *L. plantarum* Y21을 배양하였을 때 균 성장속도가 가장 빠르다고 보고하였고, *L. salivarius*

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for central composite design of *Lactobacillus brevis* SBB07

Source	Coefficient estimate	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	Standard error	F-value	p-value Prob > F ^a
Model	1.86	3.80	9	0.42	0.079	20.87	0.0003
X ₁ -protease peptone	0.27	1.18	1	1.18	0.036	58.38	0.0001
X ₂ -corn steep powder	0.34	1.83	1	1.83	0.036	90.52	< 0.0001
X ₃ -yeast ext.	0.19	0.58	1	0.58	0.036	28.45	0.0011
X ₁ X ₂ ^b	0.024	0.004512	1	0.004512	0.050	0.22	0.6513
X ₁ X ₃	0.090	0.064	1	0.064	0.050	3.17	0.1183
X ₂ X ₃	0.087	0.061	1	0.061	0.050	2.99	0.1271
X ₁ ²	0.062	0.073	1	0.073	0.032	3.63	0.0986
X ₂ ²	0.017	0.005593	1	0.005593	0.032	0.28	0.6155
X ₃ ²	0.004493	0.000391	1	0.000391	0.032	0.019	0.8934
Residual	-	0.14	7	0.020	-	-	-
Lack of fit	-	0.11	5	0.022	-	1.44	0.4590
Pure error	-	0.031	2	0.015	-	-	-
Cor. total ^c	-	3.95	16	-	-	-	-
Standard deviation		0.14		Press ^d		0.95	
Mean		1.93		R-squared		0.9641	
Coefficient of variation		7.36		Adjusted R-squre		0.9179	
				Adequate precision		15.507	

Response model was suggested quadratic model through the lack of fit tests.

^ap-value, probability distribution value. p-value less than 0.05 indicate that the term is significant.

^bX₁X₂, X₁X₃, X₂X₃ represent the interaction effect of variables X₁, X₂, and X₃. X₁², X₂², and X₃² are the squared effects of the variables.

^cCor Total, Sum of squares total corrected for the mean.

^dPress, The predicted residual sum of squares for the model.

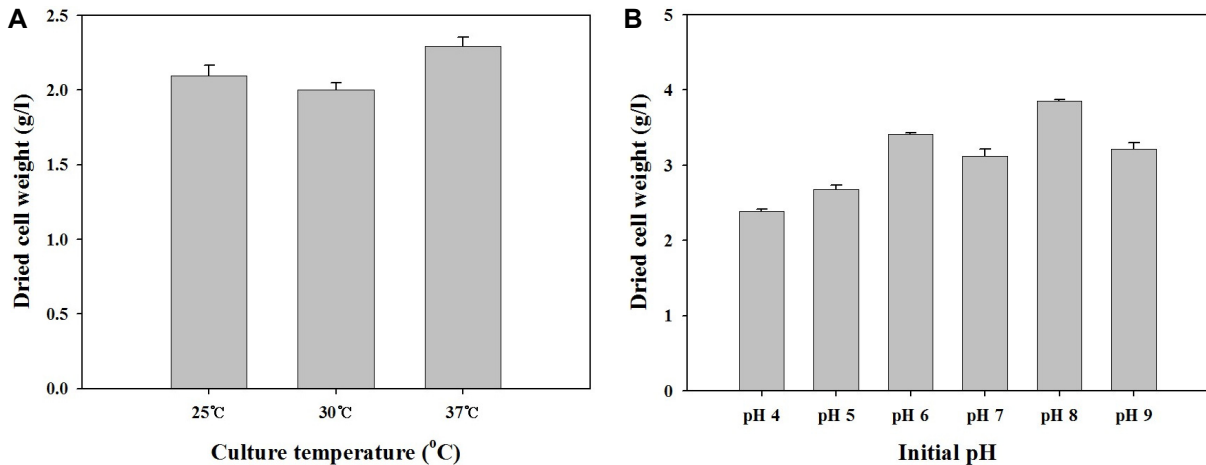


Fig. 5. Dried cell weight according to culture temperature (A) and dried well weight according to various initial pH from 4.0 to 9.0 (B) of *Lactobacillus brevis* SBB07. The experiments were carried out in triplicate ($p < 0.05$).

CRL1328은 MRS 배지에 접종하여 37°C에서 배양한 경우 균 성장이 최대에 이르렀다고 보고하였고[9], *L. brevis* BK11의 경우 SBB07과 동일하게 37°C에서 가장 우수한 균체 성장을 보였다 [17]. 즉, 배양 온도는 배지 내 산소 용해성과 분자의 운동에 너지 및 세포 내 반응 속도에 영향을 미쳐 결국 균체량 및 항생물질 생산에 영향을 주게 되어 각각의 균주별 배양 온도의 확립이 중요시 되고 있다[1].

L. brevis SBB07의 균체량에 대한 배지 초기 pH의 영향을 살펴본 결과는 Fig. 5B와 같다. 확립된 최적 배지 조성에 SBB07을 접종한 후 37°C에서 배양한 결과 건조 균체량은 pH를 조정하지 않은 최적 배지(대조구, 2.2933±0.0601 g/l)를 기준으로 pH 4에서 2.3833±0.0296 g/l로 가장 낮은 균체량을 보였으나 대조구와 비교해서 큰 차이가 없었으며, pH 5.0, 6.0, 7.0, 9.0은 2.6767~3.4100 g/l의 범위내 균체량을 나타내어 크게 증가하는 경향을 보이지는 않았다. 하지만 pH가 8.0인 실험군에서는 3.85±0.0265 g/l로 대조구 대비 약 1.68배 증가함을 확인하였다. 배지의 pH는 유산균의 성장 및 항생물질 생산에 영향을 미치는 주요 인자 중 하나로 알려져 있으며 일반적으로 pH 7~8 범위가 최적 조건으로 알려져 있고[17], SBB07 역시 pH 8.0에서 가장 높은 성장률을 보였다. 하지만 *L. sakei* CTC 494의 균 성장률은 pH 5.5와 6.5에 최대에 이르렀고[21], 동일 종인 *L. brevis* BK11은 pH 6.0에서 가장 높은 성장률을 보였다 [17]. 즉, 앞선 온도와 초기 pH의 결과에서 보듯이 동일한 종의 유산균이라 하더라도 각각의 종류에 따라 배양 조건이 상이함을 확인할 수 있으며, 균체량의 증가에 따라 다양한 기능 성분의 생성에도 영향을 받게 되므로 무엇보다도 최적 배양 조건의 확립은 중요한 고려 사항이라고 판단된다.

결론적으로 전보에서 프리바이오틱스 소재의 특성을 조사하였고, 본 연구를 통해 산업화를 위한 배지 조성 및 농도, 배양 조건의 확립을 통해 향후 프리바이오틱스 소재로 활용 가능성이 높은 *L. brevis* SBB07 균주를 활용하기 위한 기반을

조성한 것으로 판단되며, 향후 SBB07을 활용하여 다양한 제형의 연구 및 제품 개발 관련 연구를 추가한다면 국내 토종 발효 유산균을 활용한 다양한 프로바이오틱스 소재로 활용될 가능성이 높은 소재로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 순창군 향토건강식품명품화사업의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

- Al-Jumaily, E., Raheema, R. H. and Abdul-Ratha, H. A. 2014. Optimal conditions for acidocin production from *Lactobacillus acidophilus* isolate. *World J. Pharm. Res.* **3**, 1773-1785.
- Bang, M., Lee, S. D. and Oh, S. 2012. Probiotics and intestinal health. *Kor. J. Dairy Sci. Technol.* **30**, 139-143.
- Chang, C. E., Koo, J. R., So, J. S. and Yun, H. S. 2011. Production of viable *Lactobacillus crispatus* by using whey based medium. *KSBB J.* **26**, 529-532.
- Chin, H. S., Shim, J. S., Kim, J. M., Yang, R. and Yoon, S. S. 2001. Detection and antibacterial activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Sci. Biotechnol.* **10**, 461-467.
- Food and Agriculture Organisation, World Health Organisation. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO/WHO Guidelines.
- Ha, E. M. 2015. Growth rate and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* reacting with bacterial culture supernatant. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**, 187-194.
- Huang, Y. and Zheng, Y. 2010. The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* **103**, 473-478.
- Hwang, C. F., Chang, J. H., Hwang, J. Y., Tsai, C. C., Lin,

- C. K. and Tsen, H. Y. 2012. Optimization of medium composition for improving biomass production of *Lactobacillus plantarum* Pi06 using the Taguchi array design and the Box-Behnken method. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **48**, 337-342.
9. Juarez Tomas, M. S., Ocana, V. S., Wiese, B. and Nader-Macias, M. E. 2003. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **52**, 1117-1124.
 10. Kim, D. H., Dasagrandhi, C., Park, S. K., Eom, S. H., Huh, M. K., Mok, J. S. and Kim, Y. M. 2018. Optimization of gamma-aminobutyric acid production using sea tangle extract by lactic acid bacterial fermentation. *LWT-Food Sci. Technol.* **90**, 636-642.
 11. Kim, J. K., Won, Y. B., Lee, K. M. and Koo, Y. M. 2009. Influence of organic, inorganic nitrogen sources and amino acids on the biosynthesis of coenzyme Q₁₀ by *Agrobacterium tumefaciens* mutant. *KSBB J.* **24**, 75-79.
 12. Kimoto-Nira, H., Suzuki, S., Suganuma, H., Moriya, N. and Suzuki, C. 2015. Growth characteristics of *Lactobacillus brevis* KB290 in the presence of bile. *Anaerobe* **35**, 96-101.
 13. Kim, Y. G., Toshihisa, O., Takuya, T., Akira, K., Koji, N., Teruo, Y., Nobuhiko, O. and Hirofumi, D. 2006. Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF- κ B and p38 MAP kinase signaling pathways. *Microbes Infect.* **8**, 994-1005.
 14. Kim, Y. H., Choi, C. Y. and Chun, T. 2016. The preventive and therapeutic effects of probiotics in allergic diseases via immune modulation. *J. Food Hyg. Saf.* **31**, 141-152.
 15. Lee, K. E., Choi, U. H. and Ji, G. E. 1996. Effect of *Kimchi* intake on the composition of human large intestinal bacteria. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**, 981-986.
 16. Leroy, F. and De Vuyst, L. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 974-981.
 17. Lim, E. S. 2015. Optimal conditions and effects of prebiotics for growth and antimicrobial substances production of *Lactobacillus brevis* BK11. *Kor. J. Microbiol.* **51**, 288-299.
 18. Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M. and Isolauri, E. 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's Disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. *Ann. Nutr. Metab.* **40**, 137-145.
 19. McCarthy, J., O'mahony, L., O'callaghan, L., Sheil, B., Vaughan, E. E., Fitzsimons, N. and Shanahan, F. 2003. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* **52**, 975-980.
 20. Otero, M. C., Ocana, V. S. and Nadar-Macias, M. E. 2004. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. *Methods Mol. Biol.* **268**, 435-440.
 21. Parente, E. and Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 628-638.
 22. Shin, E. H. 2002. Studies on growth characteristics of *Lactobacillus brevis* isolated from Kimchi - Optimization of nutrient composition in Sourdough media. *Kor. J. Food Nutr.* **15**, 215-219.
 23. Wang, K. Y., Li, S. N., Liu, C. S., Perng, D. S., Su, Y. C., Wu, D. C., Jan, C. M., Lai, C. H., Wang, T. N. and Wang, W. M. 2004. Effects of ingesting *Lactobacillus*-and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 737-741.
 24. Wasilewski, A., Zielinska, M., Storr, M. and Fichna, J. 2015. Beneficial effects of probiotics, prebiotics, synbiotics and psychobiotics in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 1674-1682.
 25. Yang, H. J., Jeong, S. J., Jeong, S. Y., Ryu, M. S. and Jeong, D. Y. 2018. Isolation of biogenic amine non-producing *Lactobacillus brevis* SBB07 and its potential probiotic properties. *J. Life Sci.* **28**, 68-77.
 26. Yoon, S. J., Shin, W. S., Chun, G. T. and Jeong, Y. S. 2007. Optimization of production medium by response surface method and development of fermentation condition for *Monascus purpureus* culture. *KSBB J.* **22**, 288-296.
 27. Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X. and Feng, Y. 2008. Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochem. Eng. J.* **39**, 496-502.

초록 : 프로바이오틱 *Lactobacillus brevis* SBB07의 균체량 증가를 위한 배양 조건 최적화

정수지 · 양희종 · 류명선 · 서지원 · 정성엽 · 정도연*

((재)발효미생물산업진흥원)

본 연구는 전보의 블루베리로부터 분리하여 프로바이오틱스 특성이 우수한 *Lactobacillus brevis* SBB07의 기능성에 관한 연구에 이어, 산업적 적용을 위한 배양 시간, 배양용 배지의 성분 및 농도, 초기 pH, 배양 온도의 영향 등을 조사하였다. SBB07의 균체량 증진을 위한 배지 최적화를 수행하였고 이를 위해 통계적 방법인 Plackett-Burman design (PBD)와 central composite design (CCD)를 이용하여 배지의 성분 및 최적 농도를 확인하였다. PBD의 경우 탄소원 7종, 질소원 6종, 기타 미량 원소 6종을 이용 총 19가지 요소를 적용하였으며, 이 중 protease peptone, corn steep powder (CSP), yeast extract가 SBB07의 균성장에 중요 인자로 확인하였다. PBD에서 선정된 3가지 인자를 CCD에 적용하였으며 이를 통해 균체 성장을 위한 최적 농도로 protease peptone 2.0%, CSP 2.5%, yeast extract 2.0%로 이때 최대 균체량은 2.93963 g/l가 예측되었다. 모델의 검증 실험을 통해 예측 모델과 실제 결과가 동일함을 확인하였으며, 확립된 최적 배지를 사용하여 배양 온도 및 초기 pH에 따른 영향을 조사한 결과 기본배양조건과 비교하였을 때 37℃, 초기 pH 8.0에서 균체량이 2.2933±0.0601 g/l에서 3.85±0.0265 g/l로 약 1.68 배 증가함을 확인하였다. 따라서, 본 연구를 통해 프로바이오틱스 소재로서 우수한 기능성을 갖는 *L. brevis* SBB07의 배양 조건 확립을 통해 향후 소재의 산업화를 위한 기반을 확립하였다.