(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년08월30일
(11) 등록번호 10-2572565
(24) 등록일자 2023년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A21D 8/04* (2017.01)
C12N 15/01 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A21D 8/045 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0157660
(22) 출원일자 2022년11월22일
심사청구일자 2022년11월22일
(56) 선행기술조사문헌
KR101551836 B1
KR101551839 B1

(73) 특허권자
에스피씨 주식회사
경기도 성남시 중원구 사기막골로31번길 18 (상대원동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
국민대학교산학협력단
서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)
(72) 발명자
이승호
서울시 관악구 관악로 1, 203동 501호
심상민
서울특별시 관악구 관악로 1, 203동 501호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

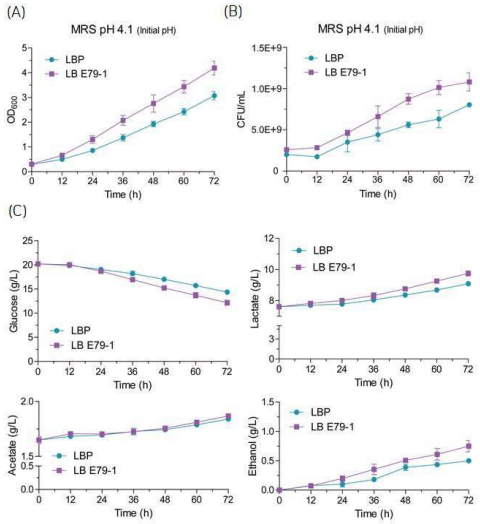
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **사우어도우 발효용 유산균 변이주 및 이의 배양방법**

(57) 요 약

본 발명은 사우어도우 발효용 유산균 변이주 및 이의 배양방법에 관한 것으로, 실험적 진화기법(adaptive laboratory evolution, ALE)을 이용하여 내산성이 향상된 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)를 제공할 수 있다. 또한, 상기 균주를 비동물성 원료를 사용한 배지에 배양함으로써 고농도로 배양할 수 있다. 이를 통해 인체 내 장 건강을 위한 비건성 유산균의 고농도 생산 가능성을 높일 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12N 15/01 (2013.01)
C12R 2001/01 (2021.05)
(72) 발명자
송성봉
서울특별시 관악구 관악로 1, 203동 501호
천성원
서울특별시 관악구 관악로 1, 203동 501호
김경헌
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 생명과학대학 식품공학과
한나리
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 생명공학과 대학원
유소라
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 생명과학대학 식품생의학안전연구소
변정아
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 생명공학과 대학원
박용철
서울특별시 성북구 정릉로 77, 국민대학교 과학기술대학 바이오발효융합학과
유호선
서울특별시 성북구 정릉로 77, 국민대학교 과학기술대학 바이오발효융합학과

명 세 서

청구범위

청구항 1

락테이트(lactate) 생산능, 아세테이트(acetate) 생산능 및 에탄올(ethanol) 생산능이 우수하며, 소고기 추출물(beef extract) 대신 소이 펩톤(soy peptone)을 포함하는 비건(vegan) 배지에서 생장가능한 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP).

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항의 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)를 첨가하여 제조한 제빵용 밀가루 반죽.

청구항 4

제3항의 반죽을 베이킹하여 제조된 것을 특징으로 하는 제빵.

청구항 5

말토오스(maltose), 효모 추출물(yeast extract) 및 소이 펩톤(soy peptone)을 포함하는 배지에 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)를 배양하되, 상기 배지는 글루코오스(glucose) 대신 말토오스(maltose)를 포함하고, 소고기 추출물(beef extract) 대신 소이 펩톤(soy peptone)을 포함하는 것을 특징으로 하는 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3의 비건(vegan) 방식의 배양 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 배양 방법은,

말토오스(maltose) 25~27 g/L, 효모 추출물(yeast extract) 17~18 g/L 및 소이 펩톤(soy peptone) 12~14 g/L을 포함하는 배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3의 비건(vegan) 방식의 배양 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 사우어도우 발효용 유산균 변이주 및 이의 배양방법에 관한 것으로, 더 구체적으로는 사우어도우의 제작에 이용되는 유산균을 실험적 진화기법(adaptive laboratory evolution, ALE)을 이용하여 내산성의 특징을 보유하도록 개량하고, 이를 비동물성 원료를 사용한 배지에서 고농도 배양하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 유산균은 식품 및 음료 발효, 식품 첨가물과 의약품 제조에 이용되는 화합물 생산에 이르기까지 다양한 산업에

적용되고 있다. 유산균의 발효산물 중 하나인 젖산이 축적될 경우, 세포 성장과 유용 발효 산물의 생성이 억제된다. 실제적인 산업 현장에서 유산균을 사용하여 발효할 경우, 고농도 배양이 필수적이며 이때, 유산균의 내산성이 필요하다.

[0003] 유전공학적 개량(genetic modification) 기술로 개발한 GMO(genetically modified organism)는 의학적으로 인체에 피해를 준다는 입증된 결과는 없지만, 동물실험에서 일부 장기 기형이나 이상소견과 같은 부정적인 결과를 보이기도 한다. 이러한 GMO의 검증되지 않은 안정성 문제로 식품 산업에 직접적으로 활용되기에는 어려움이 크다. 따라서 안전한 식품의 섭취를 추구하는 소비자의 요구를 충족시킬 수 있는, 균주의 자연적인 변화 유도를 통해 형질을 개량시키는 non-GMO 종균화 전략이 필요한 실정이다.

[0004] 한편, 유산균의 고농도 배양을 위해 여러 배양기법에 대한 연구가 활발하게 이루어져왔으며, 대부분의 레비락토바실러스 브레비스(학명변경 전: 락토바실러스 브레비스) 배양연구는 소고기 추출물(beef extract)의 동물성 질소원을 주원료로 이용한 MRS(De Man, Rogosa and Sharpe) 배지를 배양배지로 이용하고 있고, 대부분 발효식품 중 유제품과 김치 생산용 유산균의 생산에 초점이 맞추어져 있다. 이에 다양한 식품의 생산을 위한 레비락토바실러스 브레비스의 맞춤형 배양기술 개발에 대한 보고는 미미한 실정이다.

[0005] 대부분의 유산균은 혐기성 미생물로 세포 내의 대사단계가 완벽하게 구성되어 있지 않은 영양요구성(auxotroph)의 특징을 보유하고 있어 다수의 대사과정이 유실되어 있다. 이에 따라 유실된 대사과정의 최종산물을 배지의 주요성분으로 추가해주어야만 유산균이 성장이 가능하게 된다. 이에 질소원과 기타 영양성분이 무기염류만으로 이루어진 제한배지(defined medium)를 제조하기가 매우 까다롭다. 대표적인 유산균 배양용 범용 배지인 MRS 배지는 효모 추출물(yeast extract), 펩톤(peptone), 소고기 또는 고기 추출물 (beef (or meat) extract)와 같은 유기질소원을 다량 함유하고 있고, 무기염류를 일부 포함하고 있는 복합배지이다.

[0006] 유산균의 복잡한 영양요구성을 맞추기 위해서 다양한 아미노산과 핵산, 성장인자가 함유된 유기질소원을 첨가해주기 때문에, 대장균과 효모와 같이 무기염류로 조성된 제한배지를 이용한 정확한 세포성장의 조절은 유산균을 이용할 경우 매우 어렵다. 또한, 시중에 판매중인 유산균 배양용 범용 배지 MRS 배지의 가격은 고가이기 때문에 상업적으로 이용하기가 어렵다. 또한, 식물성 원료만으로 이루어진 비건(vegan) 프로세스에 대한 사회적 요구성의 증가에 따라, 유산균 배양에 첨가되는 동물성 원료(예로, Bacto-peptone, beef or meat extract 등)를 제거한 비건성 유산균의 생산에 대한 필요가 높은 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1674553호(등록일자: 2016.11.03)는, 유산균의 고농도 배양을 위한 배지 조성물에 관한 것으로, 락토바실러스 플란타룸, 락토바실러스 락티스, 락토바실러스 브레비스의 배양을 위해 포도당을 탄소원으로 이용하고 소고기 추출물 등을 포함한 유기질소원으로 첨가하여 구성한 배지를 제조함에 대해 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 안전한 식품의 섭취를 추구하는 소비자의 요구를 충족시킬 수 있도록 균주의 자연적인 변화 유도를 통해 형질을 개량시키는 실험적 진화기법(adaptive laboratory evolution, ALE)을 이용하여 유산균을 개량하였고, 이를 통해 내산성이 향상된 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)를 개발하여 제공하고자 한다. 또한, 상기 개량한 균주를 비건 프로세스를 따르고자 비동물성 원료를 사용한 배지에 배양함으로써 고농도로 배양하는 방법을 개발하여 제공하고자한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)을 제공한다.

[0010] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) E77-E3은, 바람직하게 락테이트(lactate) 생산능이 우수한 것일 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)를 첨가하여 제조한 제빵용 밀가루 반죽을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 반죽을 베이킹하여 제조된 것을 특징으로 하는 제빵을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 말토오스(maltose), 효모 추출물(yeast extract), 소이 펩톤(soy peptone)으로 구성된 배지에 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)를 배양하는 것을 특징으로 하는 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3의 배양 방법을 제공한다.

[0014] 한편, 본 발명의 배양 방법에 있어서, 상기 배양 방법은, 바람직하게 말토오스(maltose) 25~27 g/L, 효모 추출물(yeast extract) 17~18 g/L, 소이 펩톤(soy peptone) 12~14 g/L으로 구성된 배지에 배양하는 것이 좋다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 실험적 진화기법(adaptive laboratory evolution, ALE)을 이용하여 내산성이 향상된 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)를 제공할 수 있다. 또한, 상기 균주를 비동물성 원료를 사용한 배지에 배양함으로써 고농도로 배양할 수 있다. 이를 통해 인체 내 장 건강을 위한 비건성 유산균의 고농도 생산 가능성을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 다양한 pH 조건(pH 3.5~6.5)에서 모균주 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2의 생장곡선을 나타낸 결과이다.

도 2는 초기 ALE를 pH 4.4에서 진행하다가 pH 4.2와 pH 4.1로 낮추어 진행하는 동안의 진화에 따른 레비락토바실러스 브레비스의 OD_{600} 변화를 나타낸 결과이다.

도 3은 MRS 배지(pH 4.2)에서 모균주 레비락토바실러스 브레비스 SPC-SNU 70-2와 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E26-3, E36-3, E46-3, E51-3, E56-3의 생장곡선을 비교한 결과이다.

도 4는 MRS 배지(pH 4.2)에서 배양한 모균주 레비락토바실러스 브레비스 SPC-SNU 70-2와 중간 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3의 (A) OD_{600}, (B) 세포수농도(CFU/mL), (C) 글루코오스(glucose), 락테이트(lactate), 아세테이트(acetate), 에탄올(ethanol)을 비교한 결과이다.

도 5는 MRS 배지(pH 4.4)에서 배양한 모균주 레비락토바실러스 브레비스 SPC-SNU 70-2와 중간 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3의 (A) OD_{600}, (B) 세포수농도(CFU/mL), (C) 글루코오스, 락테이트, 아세테이트, 에탄올을 비교한 결과이다.

도 6은 MRS 배지(pH 4.1)에서 배양한 모균주 레비락토바실러스 브레비스 SPC-SNU 70-2와 최종 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E79-1(SPC 77-E3)의 (A) OD_{600}, (B) 세포수농도(CFU/mL), (C) 글루코오스, 락테이트, 아세테이트, 에탄올을 비교한 결과이다.

도 7은 MRS 배지(약 pH 6.5)에서 배양한 모균주 레비락토바실러스 브레비스 SPC-SNU 70-2와 중간 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3, 최종 진화균주 E79-1(SPC 77-E3)의 (A) OD_{600}, (B) 세포수농도(CFU/mL), (C) 글루코오스, 락테이트, 아세테이트, 에탄올을 비교한 결과이다.

도 8은 유산균 배양의 범용 배지 MRS 배지와 후보 탄소원으로서 글루코오스(glucose)를 말토오스(maltose)로 대체하였을때의 유산균 배양 결과이다. ●: OD (600 nm)(좌), 글루코오스, 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH ◆: 락테이트 (g/L).

도 9는 소고기 추출물을 제외한 유산균의 배양 결과로, 배양에 있어 질소원의 농도는 3%로 유지해 주었고, 이를 효모 추출물로 대체하였다. ●: OD (600 nm)(좌), 글루코오스, 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH ◆: 락테이트 (g/L).

도 10은 질소원의 농도에 따른 유산균의 배양 결과로, 효모 추출물과 소이 펩톤의 비율을 2:1로 유지하여 농도를 조절해주었다(위에서부터 아래로 1, 2, 3, 4, 5%). ●: OD (600 nm)(좌), 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH ◆: 락테이트 (g/L).

도 11은 교반 속도(agitation speed)에 따른 유산균의 배양 결과로, 50, 500 rpm에서는 1.0 L jar에 워킹 볼륨(working volume) 0.5 L, 1,200 rpm에서는 3.0 L jar에 1.0 L 워킹 볼륨으로 진행하였다. ●: OD (600 nm)(좌), 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH ◆: 락테이트 (g/L).

도 12는 서로 다른 3가지 다른 환경의 pH에서의 유산균 배양 결과이다(위에서부터 아래로 pH 5, 6, 7). ●: OD (600nm)(좌), 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ■: 에탄올 (g/L), ▲: pH, ◆: 락테이트 (g/L).

도 13은 모균주인 레비락토바실러스 브레비스 SPC-SNU 70-2(위)와 중간 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3(아래)를 배양한 결과이다. ●: OD (600nm)(좌), 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH, ◆: 락테이트 (g/L)

도 14는 25℃(위), 30℃(아래)에서의 중간 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3의 배양 결과이다. ●: OD (600nm)(좌), 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH, ◆: 락테이트 (g/L).

도 15는 반응표면회귀 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 3가지 주요 인자들의 서로 다른 농도에 따른 RSM 인자를 확보한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 확보된 RSM 주요 인자들간의 표면도를 나타낸 것이다.

도 18은 확보된 RSM 주요 인자들을 삽입하여 얻어진 최적화 모델을 나타낸 것이다.

도 19는 RSM 기반 최적배지조성을 검증하기 위한 플라스크(flask) 기반 중간 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3의 회분식 배양 결과이다. ●: OD (600nm)(좌), 말토오스 (g/L)(우), ■: CFU/mL, ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH, ◆: 락테이트 (g/L).

도 20은 RSM 기반 최적배지조성을 이용한 배양기 기반 중간 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3의 호기성 회분식 배양 결과이다. ●: OD (600nm)(좌), 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH, ◆: 락테이트 (g/L).

도 21은 RSM 기반 최적배지조성을 이용한 배양기 기반 중간 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3의 pH 조절 및 호기성 회분식 배양 결과이다. ●: OD (600nm)(좌), 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH, ◆: 락테이트 (g/L).

도 22는 RSM 기반 최적배지조성을 이용한 배양기 기반 중간 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3의 pH 조절 및 혐기성 회분식 배양 결과이다. ●: OD (600nm)(좌), 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH, ◆: 락테이트 (g/L).

도 23은 RSM 기반 최적배지조성을 이용한 배양기 기반 30L 규모에서 중간 진화균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3의 호기성 회분식 배양 결과이다. ●: OD (600nm)(좌), 말토오스 (g/L)(우), ■: 세포수농도(CFU/mL), ▼: 아세테이트 (g/L), ▲: pH, ◆: 락테이트 (g/L).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 안전한 식품의 섭취를 추구하는 소비자의 요구를 충족시킬 수 있도록 균주의 자연적인 변화 유도를 통해 형질을 개량시키는 non-GMO 종균화 전략을 이용하여 새로운 유산균을 개량하는데 필요성이 증가하고 있다. 또한, 비건 프로세스에 대한 사회적 요구성의 증가에 따라 비건성 유산균의 생산에 대한 필요성도 증가하고 있다.

[0018] 이에 본 발명은 실험적 진화기법(adaptive laboratory evolution, ALE)을 이용하여 내산성이 향상된 유산균을 개발하였으며, 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)을 제공한다. 본 발명은 모균주 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2와 실험적 진화기법을 이용한 진화 균주들의 발효 특성을 비교 분석하였으며, 최종 진화균주인 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) E79-1(SPC 77-E3)은 모균주와 중간 진화 균주 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) E56-3에 비해 배가시간(doubling time)이 짧아지면서 성장율(growth rate)과 세포수농도(CFU/mL)는 증가하였으며, 글루코오스 소비속도, 락테이트 생산속도, 아세테이트 생산량, 에탄올 생산속도가 모두 증가하는 양상을 나타냈다. 이에 상기 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC

77-E3(KCTC 15037BP)는, 락테이트(lactate), 아세테이트(acetate), 에탄올(ethanol) 생산능이 우수한 것일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)를 첨가하여 제조한 제빵용 밀가루 반죽을 제공한다.

[0020] 본 발명에서 밀가루 반죽은 통상적으로 밀가루에 물 등을 첨가하여 만든 것이라면 어느 것이나 사용할 수 있는데, 필요에 따라 소금(바람직하게 정제염), 정백당, 쇼트닝 등을 첨가하여 만든 것을 사용할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 반죽을 베이킹하여 제조된 것을 특징으로 하는 제빵을 제공한다.

[0022] 본 발명에서 '베이킹'은 통상적으로 빵으로 구워내는 과정을 의미하는데, 구체적으로 오븐 안에서 건식열로 굽는 방법을 지칭한다. 통상적으로 두꺼운 케이스에 반죽을 담아 오븐에 굽는 방법을 많이 사용할 수 있으며, 본 발명에서도 통상적인 방법을 사용할 수 있으며 구체적인 기재는 생략한다.

[0023] 한편, 본 발명에서 사용하는 '제빵'이라는 용어는 '빵' 제품을 의미하는 것으로 본 발명에서 '빵'의 의미로 혼용해서 사용하기로 한다.

[0024] 또한, 본 발명은 말토오스(maltose), 효모 추출물(yeast extract), 소이 펩톤(soy peptone)으로 구성된 배지에 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)를 배양하는 것을 특징으로 하는 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3의 배양 방법을 제공한다. 이때, 상기 배지는 비건 프로세스를 따르고자 유산균 배양에 첨가되는 동물성 원료의 제거를 통해서 비건성 유산균의 생산을 위한 것이다.

[0025] 한편, 본 발명의 배양 방법에 있어서, 상기 배양 방법은, 바람직하게 말토오스(maltose) 25~27 g/L, 효모 추출물(yeast extract) 17~18 g/L, 소이 펩톤(soy peptone) 12~14 g/L으로 구성된 배지에 배양하는 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는말토오스(maltose) 26.4 g/L, 효모 추출물(yeast extract) 17.6 g/L, 소이 펩톤(soy peptone) 12.9 g/L으로 구성된 배지에 배양하는 것이 좋다. 한편, 본 발명의 배양방법은 질소원의 농도를 3~4%로 하는 것이 바람직하다. 이를 통해 본 발명의 유산균의 고농도 배양이 가능하게 된다.

[0026] 한편, 본 발명의 배양 방법에 있어서, 본 발명의 배양 조건은 바람직하게 호기적 조건에서 약 pH 5, 30℃ 조건에서 배양하는 것이 좋으며, 이를 통해 유산균의 고농도 배양을 가능하게 할 수 있다.

[0027] 한편, 하기 실험에 의하면, 본 발명은 산성 조건에서 실험적 진화기법(adaptive laboratory evolution, ALE)을 진행하여 모균주인 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC-SNU 70-2에 비해 배가시간(doubling time)이 짧아지면서 성장율(growth rate)과 세포수농도(CFU/mL)은 증가하였으며, 글루코오스 소비속도, 락테이트 생산속도, 아세테이트 생산량, 에탄올 생산속도가 모두 증가하는 양상을 나타내는 중간 진화 균주 레비락토바실러스 브레비스 E56-3과 최종 진화 균주 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)을 개발하였다. 이는 최종 진화 균주에서 가장 두드러진 특성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0028] 한편, 탄소원으로 대사속도가 빠른 말토오스를 설정하고, 동물성원료 대신 식물성 소이 펩톤(soy peptone)으로 대체하고, 질소원의 농도를 3~4%로 설정하는 것이 유산소의 고농도 배양을 위한 조건으로 적합하였다. 또한, 호기적 조건에서 유산균의 생장이 유리하였으며, pH 5와 30℃에서 유산균의 생장이 유리하였다. 또한, 반응표면분석 기법을 기반으로 최적배지조성을 찾은 결과, 말토오스(maltose) 25~27 g/L, 효모 추출물(yeast extract) 17~18 g/L, 소이 펩톤(soy peptone) 12~14 g/L으로 구성된 배지에서 유산균의 생장이 유리하였다. 이와 같이 본 발명에서는 실험적 진화기법을 이용하여 내산성이 향상된 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3(KCTC 15037BP)를 개발하였고, 이를 비동물성 원료를 사용한 배지의 최적 조성에 배양함으로써 고농도로 배양하는 방법을 제공할 수 있다. 이를 통해 인체 내 장 건강을 위한 새로운 비건성 유산균의 고농도 생산 가능성을 높이는데 이용될 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0032] **[실시예 1: 실험적 진화기법(adaptive laboratory evolution, ALE)을 이용한 산성 조건에서 생장능이 우수한 신규 유산균의 개발]**

[0033] 본 실시예에서는 ALE 방법을 이용한 산성 조건에서 생장능이 우수한 신규 유산균을 개발하였다.

[0034] **1) ALE 방법 계대 조건 설정**

[0035] ALE 방법을 진행하며 계대배양을 할 때, 지속적으로 돌연변이(mutation)이 생기도록 하기 위해 대수기(exponential phase)에서 계대배양하는 것이 중요하다. 따라서 계대 조건을 설정하기 위해 레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*, 하기 *Lb. brevis*로 기재) SPC-SNU 70-2를 다양한 pH (pH 3.7-6.5)에서 생장곡선을 비교했다. 그 결과, 도 1과 같이 24시간 마다 계대배양을 하기 위해 균주의 배가시간(doubling time)이 2-3시간이 되는 pH를 찾았고, 결과적으로 pH 4.4에서 배가시간이 2.10시간으로 ALE를 진행할 조건으로 선택했다.

[0037] **2) ALE를 통한 내산성이 우수한 유산균 개발**

[0038] ALE 계대 조건으로 설정한 pH 4.4, 30° C에서 24시간 마다 계대배양을 진행하였다. 이때 배지 pH는 MRS 배지(glucose: 20 g/L, beef extract: 10 g/L, yeast extract: 5 g/L, polypeptone: 10 g/L, tween80 : 1 mL/L, ammonium citrate : 2 g/L, sodium acetate : 5 g/L, $MgSO_4$: 0.1 g/L, $MnSO_4$: 0.05 g/L, K_2HPO_4 : 2 g/L)에 D,L-젖산을 첨가하여 조절하였다. 초기 OD_{600}은 0.1로 맞추었고, 24시간 마다 계대배양시 큐벳을 사용한 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 이용하여 OD_{600}을 측정하였다. 2주마다 ALE를 진행한 균주와 모균주의 생장곡선을 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Biotek)를 이용하여 비교하였고, OD_{600}에서 차이가 있는지 중간점검을 진행하였다. 24시간 후 계대배양 시 측정한 진화균주의 OD_{600}이 더 이상 증가하지 않을 때, 산성 스트레스를 높이기 위해 배지의 pH를 4.2로 낮추어 계대배양을 진행하였다. 마찬가지로 pH 4.2에서 ALE를 진행하면서 중간점검을 진행한 후 OD_{600}이 더 이상 증가하지 않을 때, pH를 4.1로 낮추고 초기 OD_{600}은 0.3으로 늘린 후 계대배양 하는 시간 또한 48시간으로 늘려서 ALE를 진행하였다.

[0039] 그 결과, 도 2와 같이 초반 24시간 OD_{600}이 약 1.10에서 ALE를 진행할수록 증가하는 양상을 보였다. 중간 진화균주인 *Lb. brevis* E26의 경우 24시간 OD_{600}이 1.44로 모균주와 비교하여 약 1.3배 증가하였다. 이에 따라, 배지의 pH를 4.2로 낮추고 *Lb. brevis* E26 균주의 ALE를 진행하였고, *Lb. brevis* E26에서 *Lb. brevis* E56-3으로 가면서 24시간 OD_{600}이 약 0.84에서 0.92로 약 1.1배 증가하였다. 한번 더 배지 pH를 4.1로 낮추고 OD_{600}은 0.3으로, 계대배양 시간은 48시간으로 늘려서 ALE를 진행하여 최종 진화균주인 *Lb. brevis* E79-1을 얻었다. *Lb. brevis* E58에서 *Lb. brevis* E79-1로 가면서 48시간 OD_{600}이 약 1.2에서 1.71로 약 1.4배 증가하였다.

[0040] ALE 진행 완료 후, 모균주 *Lb. brevis* SPC-SNU 70-2 (LB parental로 표시)와 중간 진화균주의 OD_{600}을 마이크로플레이트 리더(Biotek)를 이용하여 비교했다. 그 결과, 도 3과 같이 모든 실험에서 *Lb. brevis*는 초기에 천천히 자라다가 중간에 급격하게 증가하는 특유의 생장곡선을 나타내는데, 급격하게 증가하는 구간 전후를 구간 1, 구간 2로 임의로 나누어 각 균주별로 배가시간과 비성장속도(specific growth rate)을 구하여 비교했다. 먼저 pH 4.2에서 발효 72시간 후 OD_{600}이 모균주는 0.55, 중간 진화균주 *Lb. brevis* E56-3 (LB E56-3으로 표시)은 1.77으로 약 2.1배 증가했다.

[0041] 또한, 배가시간과 비성장속도를 비교할 때, 구간 1에서는 모균주와 진화균주에서 큰 차이를 보이지 않았지만, 구간 2에서는 모균주에 비해 중간 진화균주 *Lb. brevis* E56-3의 배가시간은 7.7시간에서 1.5시간으로 약 5.1배 짧아졌고, 비성장속도는 0.090 h^{-1}에서 0.475 h^{-1}로 약 5.3배 증가했다. 이를 통해, 산성 조건에서 ALE를 진행하면서 낮은 pH로 인해 자연적인 진화가 일어나 낮은 pH에서의 생장능이 향상되었다고 생각된다.

[0043] **3) 신규 개발 유산균의 발효 특성 규명**

[0044] **3-1) pH 4.2에서 모균주 *Lb. brevis* SPC-SNU 70-2와 중간 진화균주 *Lb. brevis* E56-3의 발효 특성 비교**

[0045] ALE를 진행한 최종 pH인 pH 4.2에서 모균주 *Lb. brevis* SPC-SNU 70-2 (LBP로 표시)와 중간 진화균주 *Lb. brevis* E56-3의 발효 특성을 비교하였다. 50 mL flask에서 20 mL의 pH 4.2 MRS 배지에 OD_{600} 0.1로 접종하여 30 ℃에서 96시간동안 배양하였으며 그 결과는 도 4 및 표 1과 같았다.

표 1

[0046]

	Specific growth rate (h^{-1})	Doubling time(h)	Final OD_{600} at 96h	Cell number concentration (CFU/mL) at 36h
LBP	0.0247	28.0	6.027	1.21×10^9
LB E56-3	0.0249	27.9	6.210	1.40×10^9

[0048] 도 4의 (A)와 같이 발효 96시간 후 OD_{600}은 모균주와 *Lb. brevis* E56-3은 각각 6.02, 6.21로 큰 차이를 보이지 않았다. 모균주와 *Lb. brevis* E56-3의 비성장속도도 각각 0.0247 h^{-1}, 0.0249 h^{-1}로 차이가 없었다. 앞서 마이크로플레이트 리더를 이용하여 얻은 OD_{600}과 비성장속도는 *L. brevis* 모균주와 *Lb. brevis* E56-3 사이에 차이를 보였지만(도 2), 큐벳을 사용하는 스펙트로포토미터를 이용한 본 실험 결과에서는 차이가 없는 결과를 보였다. 도 4의 (B)와 같이 세포수농도는 *Lb. brevis* E56-3이 24시간까지는 모균주와 비슷한 양상을 보이다가 24시간 이후부터 증가하는 모습을 볼 수 있다. 특히 36시간에서는 세포수농도가 2.21×10^9 CFU/mL으로 모균주 1.92×10^9 CFU/mL과 비교하여 1.15배 증가한 값을 나타냈다. 도 4의 (C)와 같이 모균주와 *Lb. brevis* E56-3의 글루코오스(glucose) 소비속도, 락테이트(lactate), 아세테이트(acetate), 에탄올(ethanol) 생산량을 비교하였다. 먼저 글루코오스 소비속도는 모균주가 0.142 g/L*h, *Lb. brevis* E56-3이 0.152 g/L*h로, *Lb. brevis* E56-3에서 글루코오스를 1.08배 더 빨리 소비하여 락테이트 생산량은 1.03배 증가한 양상을 관찰했다. 아세테이트와 에탄올 생산량은 유의미한 차이가 없었다.

[0050] **3-2) pH 4.4에서 모균주 *Lb. brevis* SPC-SNU 70-2와 중간 진화균주 *Lb. brevis* E56-3의 발효 특성 비교**

[0051] ALE를 진행한 초기 pH인 pH 4.4에서 모균주와 진화균주 *Lb. brevis* E56-3의 발효 특성을 비교하였다. 50 mL flask에서 20 mL의 pH 4.4 MRS 배지에 OD_{600} 0.1로 접종하여 30℃에서 96시간동안 배양하였으며, 그 결과는 도 5 및 표 2와 같았다.

표 2

[0052]

	Specific growth rate (h^{-1})	Doubling time(h)	Final OD_{600} at 96h	Cell number concentration (CFU/mL) at 36h
LBP	0.061	11.3	7.583	1.92×10^9
LB E56-3	0.066	10.4	8.147	2.21×10^9

[0054] 도 5의 (A)와 같이 24시간 이후부터 *Lb. brevis* E56-3의 OD_{600}이 모균주에 비해 약 1.12배 증가하는 모습을 보였다. 모균주와 *Lb. brevis* E56-3의 비성장속도는 각각 0.0612 h^{-1}, 0.0664 h^{-1}로 약 1.08배 증가하였다. 도 5의 (B)와 같이 세포수농도는 모균주에 비해 *Lb. brevis* E56-3이 36시간 이후부터 약 1.15배 증가하기 시작하다가 정체기(stationary phase)에 들어서면서 조금씩 감소하여 모균주와 비슷해지는 양상을 볼 수 있었다. 도 5의 (C)와 같이 모균주와 *Lb. brevis* E56-3의 글루코오스 소비속도가 각각 0.206 g/L*h, 0.208 g/L*h로 큰 차이는 볼 수 없었고, 락테이트, 아세테이트, 에탄올 생산량에서도 차이가 없었다. *Lb. brevis*의 ALE를 진행한 조건은 24시간 동안 *Lb. brevis*의 생장이 어느 정도 꽤 일어날 수 있었기 때문에, 진행한 ALE 조건이 *Lb. brevis*에게 매우 높은 산성 조건은 아니었다고 생각되었다. 이에 더 낮은 pH 조건에서 배양 시간을 늘려서 ALE를 진행한 결과, 최종 진화균주인 *Lb. brevis* E79-1을 얻었다. 하기에서는 최종 진화균주 또한 중간균주 *Lb. brevis* E56-3과 마찬가지로 모균주와 발효 특성을 비교해보았다.

[0056] **3-3) pH 4.1에서 모균주 *Lb. brevis* SPC-SNU 70-2와 최종 진화균주 *Lb. brevis* E79-1의 발효 특성 비교**

[0057] ALE를 진행한 최종 pH인 pH 4.1에서 모균주와 최종 진화균주 *Lb. brevis* E79-1의 발효 특성을 비교하였다. 50

mL flask에서 20 mL의 MRS 배지에 OD_{600} 0.3으로 접종하여 30℃에서 72시간동안 배양하였으며, 그 결과는 도 6 및 표 3과 같았다.

표 3

[0058]

	Specific growth rate (h^{-1})	Doubling time(h)	Final OD_{600} at 96h	Cell number concentration (CFU/mL) at 36h
LBP	0.0476	14.5	3.07	8.03×10^8
LB E79-1	0.0529	13.1	4.19	1.08×10^9

[0060] 도 6의 (A)와 같이 모균주와 *Lb. brevis* E79-1의 OD_{600}이 12시간부터 차이가 나기 시작하여 24시간과 36시간에는 모균주에 비해 약 1.5배씩 증가한 모습을 보이다가 최종 72시간에는 약 1.4배 증가하였다. 비성장속도는 모균주와 *Lb. brevis* E79-1이 각각 0.0476 h^{-1}, 0.0529 h^{-1}로 약 1.1배 증가한 모습을 보였다. 도 6의 (B)와 같이 세포수농도는 24시간 이후로 차이가 나기 시작하더니 60시간에서 모균주에 비해 *Lb. brevis* E79-1이 약 1.6배 증가하여 가장 차이가 많이났고, 72시간에서 최종 세포수농도가 모균주에 비해 약 1.3배 증가한 모습을 보였다. 모균주와 *Lb. brevis* E79-1의 글루코오스 소비속도는 각각 0.079 g/L*h, 0.109 g/L*h로 약 1.39배 높은 값을 보여 *Lb. brevis* E79-1이 더 많은 양을 더 빨리 소비한다는 것을 알 수 있었고, 락테이트, 아세테이트, 에탄올 생산량에서는 모균주와 비교했을 때 락테이트는 약 1.44배, 아세테이트는 1.13배, 에탄올 생산량이 약 1.5배 증가한 것을 확인하였다.

[0062] **3-4) 초기 pH 6.5에서 모균주 *Lb. brevis* SPC-SNU 70-2와 중간 진화균주 *Lb. brevis* E56-3, 최종 진화균주 *Lb. brevis* E79-1의 발효 특성 비교**

[0063] 마지막으로 pH를 조절하지 않은 MRS 배지(약 pH 6.5)에서 모균주와 진화균주 *Lb. brevis* E56-3, *Lb. brevis* E79-1의 발효 특성을 비교하였다. 50 mL flask에서 20 mL의 MRS 배지에 OD_{600} 0.1로 접종하여 30℃에서 36시간동안 배양하였으며, 그 결과는 도 7 및 표 4와 같았다.

표 4

[0064]

	Specific growth rate (h^{-1})	Doubling time(h)	Final OD_{600} at 96h	Cell number concentration (CFU/mL) at 36h
LBP	0.153	4.5	7.50 (21h)	6.23×10^9
LB E56-3	0.188	3.7	7.84 (21h)	6.97×10^9
LB E79-1	0.290	2.4	8.52 (18h)	7.97×10^9

[0066] 도 7의 (A)와 같이 가장 먼저 *Lb. brevis* E79-1이 6시간 이후로 대수기에 들어서면서 9시간 OD_{600}가 모균주와 *Lb. brevis* E56-3에 비해 각각 약 2.4배, 2.0배 증가한 모습을 보였다. 이어서 *Lb. brevis* E56-3이 9시간 이후로 대수기에 들어서면서 12시간 OD_{600}가 모균주에 비해 *Lb. brevis* E56-3과 *Lb. brevis* E79-1이 각각 약 1.4배, 2.3배 증가한 모습을 보이다가 모균주보다 먼저 정체기에 들어섰다. 비성장속도는 모균주와 *Lb. brevis* E56-3, *Lb. brevis* E79-1이 각각 0.153 h^{-1}, 0.188 h^{-1}, 0.290 h^{-1}로 모균주에 비해 *Lb. brevis* E56-3과 *Lb. brevis* E79-1이 각각 1.23배, 1.9배 증가하였다. 도 7의 (B)와 같이 세포수농도도 $OD6_{600}$과 마찬가지로 *Lb. brevis* E79-1이 6시간 이후로 급격히 증가하기 시작했고, 15시간에는 모균주가 1.31×10^9 CFU/mL, *Lb. brevis* E56-3이 2.12×10^9 CFU/mL, *Lb. brevis* E79-1이 5.47×10^9 CFU/mL으로 모균주 대비 2.0배, *Lb. brevis* E56-3 대비 1.7배 증가하였다. 도 7의 (C)와 같이 모균주와 *Lb. brevis* E56-3, E79-1의 글루코오스 소비속도가 각각 0.833

g/L*h, 0.952 g/L*h, 1.053 g/L*h로 모균주 대비 *Lb. brevis* E56-3는 1.14 배, *Lb. brevis* E79-1은 1.26배 증가한 모습을 보였다. 락테이트 생산속도는 모균주 대비 *Lb. brevis* E56-3는 1.15 배, *Lb. brevis* E79-1은 1.36 배 증가하였다. 아세테이트 생산량은 모균주 대비 *Lb. brevis* E79-1이 약 3.56배 증가하였고, 에탄올 생산속도는 모균주 대비 *Lb. brevis* E79-1이 약 1.8배 증가하였다.

[0067] 이러한 상기 *Lb. brevis* E79-1를 '레비락토바실러스 브레비스(*Levilactobacillus brevis*) SPC 77-E3'으로 명명하고, 기탁기관인 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2022년 7월 18일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC 15037BP를 부여받았다.

[0069] **[실시예 2: 유산균의 고농도 배양을 위한 비동물성 배지 조성 개발]**

[0070] 본 실시예에서는 유산균의 고농도 배양을 위한 비동물성 배지 조성을 개발하였다.

[0071] **1) 유산균의 고농도 배양을 위한 후보 탄소원의 설정**

[0072] "Annabelle Vera et al., Comparative study of culture media used for sourdough lactobacilli, Food Microbiology, Volume 26, Issue 7, 2009, Pages 728-733"은 사우어도우용 유산균의 배양을 위해 MRS 배지에서 사용한 탄소원인 글루코오스를 말토오스(maltose)로 대체하여 만든 배지를 'Maltose MRS'라고 명명하였으며, 이의 조성은 표 5와 같았다. Maltose MRS 배지를 기본 배지를 이용한 비동물성 배지를 개발하기 위해서, 모균주인 *Lb. brevis* SPC70-2를 MRS 배지와 Maltose MRS 배지에 배양하여 세포 성장을 비교하였다.

표 5

[0073]

Component	Maltose MRS (농도: g/L)
Glucose	-
Maltose	20
Beef extract	10
Yeast extract	5
Polypeptone	10
Soy peptone	-
Tween80	1 (mL/L)
Ammonium citrate	2
Sodium acetate	5
$MgSO_4$	0.2
$MnSO_4$	0.05
K_2HPO_4	2

[0075] 실험을 위해 *Lb. brevis* SPC70-2 균주를 10 ml 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 15시간 동안 배양을 하였다. 이를 100 mL 배지부피로 500 mL baffled flask 에 3%(v/v) 접종을 하여 30℃, 200 rpm의 조건으로 24시간 배양하였으며 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 8 및 표 6과 같이 말토오스의 대사속도가 글루코오스 대사속도보다 높았으며 최종세포수 농도는 두 경우 유사하였다.

표 6

[0076] 탄소원별 *Lb. brevis* SPC70-2 회분식 배양 결과

Media	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed glucose /maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate productivity (g/L · hr)
MRS	5.75(±0.3) x 10^9	18.25	21.28	3.26	0.76
Maltose MRS	5.94(±0.5) x 10^9	17.07	23.60	2.52	1.42

[0078] **2) 동물성 원료인 소고기 추출물(Beef extract)의 *Lb. brevis* 성장 영향**

[0079] 비건성 식품 제조를 위해 동물성 원료를 제외하고자 소고기 추출물 유무에 따른 유산균 세포성장을 확인하기 위해서 MRS 배지와 소고기 추출물을 제외한 MRS 배지에서 배양을 진행하였으며 이의 배지를 'MRS-B$^-$'라 명명하였으며 이의 조성은 표 7과 같았다.

표 7

[0080]

Description	MRS-B$^-$ (농도: g/L)
Glucose	20
Maltose	-
Beef extract	-
Yeast extract	20
Polypeptone	10
Soy peptone	-
Tween80	1 (mL/L)
Ammonium citrate	2
Sodium acetate	5
$MgSO_4$	0.2
$MnSO_4$	0.05
K_2HPO_4	2

[0082] 실험을 위해 *Lb. brevis* SPC70-2 균주를 10 ml 배양액에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 15시간 동안 배양을 진행하였다. 이를 100 ml 배양액 부피로 500 mL baffled flask 에 3%(v/v) 접종하였으며 30℃, 200 rpm의 조건으로 24시간 배양하였다. 6시간 마다 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 9 및 표 8과 같이 세포수농도를 비교하였을 때, 소고기 추출물을 첨가한 것보다 소고기 추출물을 제외하였을 때 1.14배의 높은 세포수농도를 얻었다. 포도당 소모와 젖산 생산에 대한 영향은 없는 것으로 분석되었다.

표 8

[0083] 소고기 추출물의 유무에 따른 *Lb. brevis* SPC70-2 회분식 배양 결과

Media	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed glucose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)
MRS	6.15(±0.5) x 10^9	18.17	21.28	3.27	1.09
MRS-B$^-$	7.01(±0.4) x 10^9	17.66	21.56	3.11	0.98

[0085] 상기 실험을 기반으로 MRS 배지에 탄소원으로 말토오스, 질소원을 동물성 원료인 소고기 추출물과 프로테아제 펩톤(Protease peptone)을 제외하고 식물성 원료인 소이 펩톤(Soy Peptone)으로 대체한 배지를 'MRS-M'배지라고 명명하였으며, 이의 조성은 표 9와 같았고 향후 실험은 이 배지를 기반으로 유산균 배양을 하였다.

표 9

[0086]

Description	MRS-M (농도: g/L)
Glucose	-

Maltose	20
Beef extract	-
Yeast extract	20
Polypeptone	-
Soy peptone	10
Tween80	1 (mL/L)
Ammonium citrate	2
Sodium acetate	5
$MgSO_4$	0.2
$MnSO_4$	0.05
K_2HPO_4	2

[0088] **3) 질소원의 농도에 따른 *Lb. brevis* 성장 영향**

[0089] 질소원의 농도에 따른 *Lb. brevis* 세포성장의 영향을 조사하기 위해서 'MRS-M'배지에서 효모 추출물(Yeast extract), 소이 펩톤의 중량기준 농도를 2:1 비율로 조성하여 1, 2, 3, 4, 5%(도 10의 좌측에서 우측 순)의 서로 다른 농도로 배양을 진행하였으며 이들을 'MRS-MN1, 2, 3, 4, 5 '라고 명명했으며 이의 조성은 표 10과 같았다.

표 10

[0090]

Description	MRS-MN1 (농도: g/L)	MRS-MN2 (농도: g/L)	MRS-MN3 (농도: g/L)	MRS-MN4 (농도: g/L)	MRS-MN5 (농도: g/L)
Glucose	-	-	-	-	-
Maltose	20	20	20	20	20
Beef extract	-	-	-	-	-
Yeast extract	6.66	13.33	19.98	26.66	33.33
Polypeptone	-	-	-	-	-
Soy peptone	3.34	6.67	10.02	13.33	16.55
Tween80	1 (mL/L)	1 (mL/L)	1 (mL/L)	1 (mL/L)	1 (mL/L)
Ammonium citrate	2	2	2	2	2
Sodium acetate	5	5	5	5	5
$MgSO_4$	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
$MnSO_4$	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
K_2HPO_4	2	2	2	2	2

[0092] 실험을 위해 *Lb. brevis* SPC70-2 균주를 10 ml의 MRS-M 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양을 진행하였다. 이를 다섯 가지 서로 다른 질소원의 농도를 가진 배지에 0.1 L의 부피로 0.5 L baffled flask 에 1% 접종을 하여 30℃, 200 rpm 의 조건으로 24시간 배양하였으며 pH의 조절을 위해 5N HCl, 28% 암모니아수(Ammonia water)를 사용하였으며, 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 10 및 표 11과 같이 질소원의 농도에 따라(1, 2, 3, 4, 5%) 2.58, 3.30, 3.60, 4.21, 4.11 x 10^9 CFU/mL 의 생균수를 얻었다. 질소원의 최대 젖산의 생산량이 변함없는 것을 고려하였을 때, 젖산의 축적은 탄소원의 소비량에 따라 생산되는 것이 확인되었다. 최종적으로 유산균의 고농도 배양을 위해서는 질소원의 농도를 3~4%로 결정하였다.

표 11

[0093] 다른 질소원의 농도별 *Lb. brevis* SPC70-2 회분식 배양 결과

Media	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)
MRS-MN1	$2.58(\pm0.1)x10^9$	15.89	20.61	2.93	0.66
MRS-MN2	$3.30(\pm0.5)x10^9$	15.32	20.89	2.79	0.64
MRS-MN3	$3.60(\pm0.5)x10^9$	15.45	19.30	3.04	0.64
MRS-MN4	$4.21(\pm0.2)x10^9$	15.37	22.47	2.60	0.64
MRS-MN5	$4.11(\pm0.2)x10^9$	16.64	22.48	2.81	0.69

[0095] **4) 회분식 배양을 통한 환경 및 배양 방법 개발**

[0096] **4-1) 다양한 교반속도 rpm(50, 500, 1200 rpm)에서의 유산균의 성장 영향**

[0097] 교반속도(agitation speed) 조절을 통한 산소공급에 따른 유산균의 성장영향을 알아보기 위해서 3가지 조건의 rpm과 1 vvm의 공기주입속도를 이용한 회분식 배양을 하였다. *Lb. brevis* SPC70-2 균주를 10 ml의 MRS-M 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양을 진행하였다. 이를 MRS-M 배지 0.1 L의 부피로 0.5 L baffled flask 에 1% 접종하여 30℃, 200 rpm의 조건으로 9시간동안 배양하였으며 이를 MRS-M 배지 0.5 L 부피로 1.0 L jar에(50, 500rpm), MRS-M 배지 1.0L 부피로 3.0L jar 에 1% 접종을 해 30℃, 1200rpm, 1 vvm 의 조건으로 24시간 배양을 진행하였다. 배양을 진행하는 동안 pH를 5로 조절을 해 주었고 이의 조절을 위해 5N HCl, 28% 암모니아수를 사용하였으며, 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 11 및 표 12와 같이 교반속도 50, 500, 1,200 rpm에서(도 11의 위에서 아래 순) 각각 5.33×10^9 CFU/mL, 5.40×10^9 CFU/mL, 6.56×10^9 CFU/mL의 생균수를 얻었다. 교반속도가 증가하여 산소전달속도가 증가될수록 세포 성장이 증가하고 최종적으로 높은 생균수의 유산균 배양액을 얻을 수 있었다. 다만, 발효기 운전의 효율성 및 산업화 공정을 고려하였을 때, 향후 실험에서 호기적 조건인 500 rpm을 이용하여 발효를 진행하였다.

표 12

[0098] 교반속도에 따른 *Lb. brevis* SPC70-2 회분식 배양 결과

Agitation speed (rpm)	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)
50	$5.33(\pm0.5)$ $x10^9$	31.83	35.97	3.36	1.33
500	$5.40(\pm0.2)$ $x10^9$	36.58	42.46	3.27	2.03
1200	$6.56(\pm0.3)$ $x10^9$	36.55	39.66	3.50	1.52

[0100] **4-2) 다양한 pH(5, 6, 7)에서의 유산균의 성장 영향**

[0101] pH에 대한 유산균 성장 영향을 규명하기 위해서 *Lb. brevis* SPC70-2 균주를 10 ml의 MRS-M 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양을 하였다. 이를 MRS-M 배지 0.1 L의 부피로 0.5 L baffled flask 에 1% 접종하여 30℃, 200 rpm의 조건으로 9시간동안 배양하였으며 이를 MRS-M 배지 0.5 L 부피로 1.0 L jar 에 1% 접종을 해 30℃, 500 rpm, 1 vvm의 조건으로 24시간 배양을 진행하였다. pH의 조절을 위해 5N HCl, 28% 암모니아수를 사용하였으며, 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농

도를 분석하였다. 그 결과, 도 12 및 표 13과 같이 pH 5, 6, 7(도 12의 위에서 아래순)에서 각각 5.40 x 10^9 CFU/mL, 3.82 x 10^9 CFU/mL, 2.55 x 10^9 CFU/mL의 생균수를 얻었다. pH 5의 조건에서 최대 생균수의 결과를 얻었기 때문에 향후 pH 5에서 배양을 진행하였다.

표 13

[0102] pH에 따른 *Lb. brevis* SPC70-2 회분식 배양 결과

pH	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)
5	5.40(±0.2)x10^9	36.58	42.46	3.27	1.52
6	3.82(±0.5)x10^9	35.29	39.26	3.42	1.47
7	2.55(±0.5)x10^9	41.64	42.56	3.72	1.74

[0104] **4-3) *Lb. brevis* SPC70-2 균주와 *Lb. brevis* E56-3 균주의 회분식 배양의 비교**

[0105] ALE를 이용해 선별한 내산성 균주 *Lb. brevis* E56-3(중간 진화균주)와 모균주 *Lb. brevis* SPC 70-2의 세포 성장 및 유기산 생성을 비교하였다. 40 g/L 말토오스를 이용한 배지에서 배양을 진행하였으며 40 g/L 말토오스를 이용한 MRS-M배지를 'MRS-MM'이라고 명명하였으며, 이의 조성은 표 14와 같았다.

표 14

[0106]

Description	MRS-MM (농도: g/L)
Glucose	-
Maltose	40
Beef extract	-
Yeast extract	20
Polypeptone	-
Soy peptone	10
Tween80	1 (mL/L)
Ammonium citrate	2
Sodium acetate	5
$MgSO_4$	0.2
$MnSO_4$	0.05
K_2HPO_4	2

[0108] *Lb. brevis* E56-3와 *Lb. brevis* SPC70-2 균주를 10 ml의 MRS-M 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양을 진행하였다. 이를 MRS-M 배지 0.1 L의 부피로 0.5 L baffled flask 에 1% 접종하여 30℃, 200 rpm의 조건으로 9시간 동안 배양하였으며 이를 MRS-MM 배지를 이용하여 0.5 L 부피로 1.0 L jar 에 1% 접종을 해 30℃, 500 rpm, 1 vvm 의 조건으로 24시간 배양을 진행하였다. pH의 조절을 위해 5N HCl, 28% 암모니아수를 사용하였으며, 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 13 및 표 15와 같이 *Lb. brevis* E56-3(8.0 x 10^9 CFU/mL), *Lb. brevis* SPC 70-2(5.8 x 10^9 CFU/mL)만큼의 생균수가 확인되었다. 곧, *Lb. brevis* E56-3 균주가 모균주인 *Lb. brevis* SPC 70-2에 비해서 38% 증가된 최종 생균수를 보여, 동일한 젖산 생산에도 불구하고 ALE를 통한 내산성의 증가로 *Lb. brevis* E56-3의 높은 세포성장을 확인하였다. 이후 내산성 *Lb. brevis* E56-3 균주를 이용한 배양환경 최적화를 진행하였다.

표 15

[0109] *Lb. brevis* SPC70-2와 *Lb. brevis* E56-3의 회분식 배양 결과

Strain	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)
Lb. brevis SPC70-2	5.82(±0.3) x10^9	26.64	33.54	3.02	1.11
Lb. brevis E56-3	8.01(±0.3) x10^9	27.28	35.68	2.91	1.14

[0111] **4-4) 온도(25, 30℃)에 따른 유산균 성장 영향**

[0112] 온도에 따른 유산균의 최종 생균수 변화에 대한 조사를 위해 두 가지의 온도(25, 30℃)를 설정하여 회분식 배양을 실시하였다. *Lb. brevis* E56-3 균주를 10 ml의 MRS-M 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양을 하였음. 이를 MRS-M 배지 0.1 L의 부피로 0.5 L baffled flask 에 1% 접종하여 30℃, 200 rpm의 조건으로 9시간동안 배양하였으며 이를 MRS-M 배지를 이용하여 0.5 L 부피로 1.0 L jar에 1% 접종을 한 이후 30℃, 500 rpm, 1 vvm 의 조건으로 24시간 배양을 진행하였다. 배양을 진행하는 동안 pH를 5로 조절을 해 주었고 이의 조절을 위해 5N HCl, 28% 암모니아수를 사용하였으며, 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 14와 표 16과 같이 25℃, 30℃에서 각각 3.04 x 10^9 CFU/mL, 3.35 x 10^9 CFU/mL의 생균수를 확인하였으며, 이를 통해 30℃가 25℃에 비하여 약 10%의 세포성장 증가를 확인하였다.

표 16

[0113] 온도에 따른 *Lb. brevis* E56-3 회분식 배양 결과

Temp(℃)	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)
25	3.04(±0.2) x10^9	8.16	11.4	2.72	0.34
30	3.35(±0.4) x10^9	6.50	12.1	1.94	0.27

[0115] **5) 반응표면분석법(Response surface methodology, RSM)을 이용한 고농도 유산균 배양방법 개발**

[0116] **5-1) 배지 조성의 최적화를 위한 RSM 방법의 실험인자 확보**

[0117] 유산균의 최대 생균수를 얻기 위한 배지조성 최적화를 위해 Minitab 프로그램을 사용하여 RSM을 진행하였다. x1: 말토오스(maltose), x2: 효모 추출물(yeast extract), x3: 소이 펩톤(soy peptone)를 3가지 주요 인자로 설정을 하였고, 수준은 말토오스 (10-40g/L), 효모 추출물 (0-10g/L), 소이 펩톤 (0-10g/L)으로 설정하였으며, 인자가 3개일 때 가장 효과적이라고 알려져 있는 Box-Behnken 설계를 이용하였다. 회기분석 결과, 도 15와 같이 유산균의 고농도 배양을 위해선 탄소원인 말토오스의 농도가 유의미한 값임을 나타냈다(p-value값이 0.05 이하의 값을 가지는 인자들이 유의미한 값임). 도 16은 3가지 주요 인자들의 서로 다른 농도에 따른 RSM 인자를 확보한 결과를 나타낸 것이고, 도 17은 확보된 RSM 주요 인자들간의 표면도를 나타낸 것이며, 도 18은 확보된 RSM 주요 인자들을 삽입하여 얻어진 최적화 모델을 나타낸 것이다.

[0119] **5-2) RSM 기반 최적배지 조성을 검증하기 위한 플라스크(flask) 기반 회분식 배양**

[0120] RSM 방법을 이용해 구해진 최적화된 탄소원과 질소원들의 농도(26.4g/L 말토오스, 17.6g/L 효모 추출물, 12.9g/L 소이 펩톤, 도 18)를 사용한 MRS-M 배지를 'MRS-MR1'이라 명명하였으며 조성은 표 17과 같았다.

표 17

[0121]

Description	MRS-MR1 (농도: g/L)
Glucose	-
Maltose	26.4
Beef extract	-
Yeast extract	17.6
Polypeptone	-
Soy peptone	12.9
Tween80	1 (mL/L)
Ammonium citrate	2
Sodium acetate	5
$MgSO_4$	0.2
$MnSO_4$	0.05
K_2HPO_4	2

[0123] 상기와 같은 통계적 기법 RSM으로 결정된 최적화 조건을 실제 배양과의 유사도를 확인하기 위해서 회분식 배양을 시행하였다. *Lb. brevis* E56-3 균주를 10 ml의 MRS-M 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양을 하였다. 이를 MRS-MR1 배지를 이용하여 0.1 L의 부피로 0.5 L baffled flask 에 1% 접종하여 30℃, 200 rpm의 조건으로 24시간동안 배양하였으며 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 19 및 표 18와 같이 7.49 x 10^9 CFU/mL을 확인하였으며, RSM 결과 예상되었던 6.23 x 10^9 CFU/mL보다(도 19) 1.2배 높은 결과를 얻었기 때문에, RSM으로 결정한 배지조성을 향후 발효공정에 이용하였다.

표 18

[0124] RSM기반 최적배지 농도를 이용한 0.1 L 규모의 *Lb. brevis* E56-3 플라스크 기반 회분식 배양 결과

Strain	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)
Lb. brevis E56-3	7.49(±0.3) x10^9	15.64	25.57	2.32	0.65

[0126] **5-3) 최적배지 조성을 이용한 배양기 기반 호기성 회분식 배양**

[0127] MRS-MR1 배지를 이용하여 0.1 L 규모의 배양을 0.5 L 규모로 부피를 늘려 호기성 회분식 배양을 진행하였다. *Lb. brevis* E56-3 균주를 10 ml의 MRS-M 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양을 하였다. 이를 MRS-M 배지 0.1 L의 부피로 0.5 L baffled flask에 1% 접종하여 30℃, 200 rpm의 조건으로 9시간 동안 배양하였으며 이를 MRS-MR1 배지를 이용하여 0.5 L 부피로 1.0 L 배양기에 1% 접종을 해 30℃, 500 rpm, 1 vvm 의 조건으로 24시간 배양을 진행하였다. 단, 초기 pH 조절 이후에 발효과정 중에 pH를 유지하지 않았다. 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 20 및 표 19와 같이 8.15 x 10^9 CFU/mL의 최종 생균수를 얻었고, 이는 플라스크 배양보다 1.08배 증가한 수치이고, RSM 예상 생균수보다 1.31배 증가한 결과였다.

표 19

[0128] RSM기반 최적배지 농도를 이용한 0.5 L 규모의 *Lb. brevis* E56-3 회분식 배양 결과

Strain	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)
Lb. brevis E56-3	8.15(±0.9) x10^9	18.02	27.55	2.49	0.75

[0130] **5-4) 최적배지 조성을 이용한 배양기 기반 호기성 회분식 배양(pH 조절)**

[0131] 이전 회분식 배양에서 초기 pH를 조정한 이후 배양과정에서 pH 조절을 하지 않아서, 초기 pH보다 낮은 pH로 배양이 진행되었다. 이에 배양과정 전체의 산도를 pH5.0으로 유지한 호기성 회분식 배양을 실시하였다. *Lb. brevis* E56-3 균주를 10 ml의 MRS-M 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양을 진행함. 이를 MRS-M 배지 0.1 L의 부피로 0.5 L baffled flask 에 1% 접종하여 30℃, 200 rpm의 조건으로 9시간동안 배양하였으며 이를 MRS-MR1 배지를 이용하여 0.5 L 부피로 1.0 L jar에 1% 접종을 해 30℃, 500 rpm, 1 vvm 의 조건으로 24시간 배양을 진행하였다. pH의 조절을 위해 5N HCl, 28% 암모니아수를 사용하였으며, 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 21 및 표 20와 같이 8.07 x 10^9 CFU/mL의 생균수를 얻어서, pH를 조절하거나 조절하지 않은 결과 모두 오차범위 내 동일한 결과를 얻었기 때문에 향후 배양공정의 안정성을 유지하기 위해서 pH5.0을 유지하였다.

표 20

[0132] MRS-MR1 배지를 이용한 pH5.0 환경에서의 *Lb. brevis* E56-3 호기성 회분식 배양 결과

Strain	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)
Lb. brevis E56-3	8.07(±0.1) x10^9	16.52	23.5	2.67	0.70

[0134] **5-5) 최적배지 조성을 이용한 배양기 기반 혐기성 회분식 배양(pH 조절)**

[0135] Fu 등(Wenge Fu, A.P. Mathews, Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum* : kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen, Biochemical Engineering Journal 3(3): 163-170, 1999"에 의하면, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 락토오스(lactose) 탄소원을 사용한 배양연구에서 유산균 세포 성장과 젖산의 생산을 위한 최적의 pH는 5에서 6 사이였으며 혐기의 조건에서 호기조건 대비 2.3배 많은 양의 젖산을 얻을 수 있었으나 호기 대비 세포의 양은 80% 수준인 것으로 나타났다. 상기의 결과를 본 실험에 활용하기 위해서, *Lb. brevis* E56-3 균주를 10 ml의 MRS-M 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양을 하였다. 이를 MRS-M 배지 0.1 L의 부피로 0.5 L baffled flask 에 1% 접종하여 30℃, 200 rpm의 조건으로 9시간동안 배양하였으며 이를 MRS-M1 배지를 이용하여 0.5 L 부피로 1.0 L jar에 1% 접종을 한 이후 30℃, 50 rpm의 조건으로 24시간 배양을 진행하였다. 공기를 주입하지 않았고 pH 5.0을 유지하기 위해 5N HCl, 28% 암모니아수를 사용하였으며, 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 22 및 표 21와 같이 5.95 x 10^9 CFU/mL의 생균수를 얻었는데, 호기성 회분식 배양 결과(도 20, 표 19)가 혐기성 배양결과보다 1.37배 높은 결과를 얻었기 때문에 향후 호기적 조건의 배양을 하였다.

표 21

[0136] MRS-MR1 배지를 이용한 pH5.0 환경에서의 *Lb. brevis* E56-3 혐기성 회분식 배양 결과

Strain	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)

Lb. brevis E56-3	5.95(±0.1) x10^9	17.70	21.84	3.08	0.74

[0138] **5-6) 30L 규모의 *Lb. brevis* E56-3의 호기성 회분식 배양**

[0139] 상기의 연구결과를 바탕으로 최적화된 배지조성의 이용가능성을 확인하기 위해 30L 규모의 발효기를 사용하여 호기성 회분식 배양을 진행하였다. *Lb. brevis* E56-3 균주를 10 ml의 MRS-M 배지에 접종 후, 30℃, 200 rpm의 조건으로 12시간 동안 배양을 하였다. 이를 MRS-M 배지 0.1 L의 부피로 0.5 L baffled flask 에 1% 접종하여 30℃, 200rpm의 조건으로 9시간 동안 배양하였으며 이를 MRS-MR1 배지를 이용하여 20 L 부피로 30 L 배양기에 1% 접종을 해 30℃, 500 rpm, 1 vvm 의 조건으로 24시간 배양을 진행하였다. 6시간 마다의 샘플을 채취하여 OD_{600nm}, pH, 세포수농도(CFU/mL), 당류와 유기산류 농도를 분석하였다. 그 결과, 도 23 및 표 22과 같이 7.20 x 10^9 CFU/mL의 최종 생균수를 얻었다.

표 22

[0140] MRS-MR1 배지를 이용한 30 L 규모에서의 *Lb. brevis* E56-3 호기성 회분식 배양 결과

Strain	Cell number concentration (CFU/mL)	Lactate (g/L)	Consumed maltose (g/L)	Yield (mol lactate/ mol sugar)	Lactate Productivity (g/L·hr)
Lb. brevis E56-3	7.02(±0.2) x10^9	17.8	26.21	0.68	0.74

수탁번호

[0142]

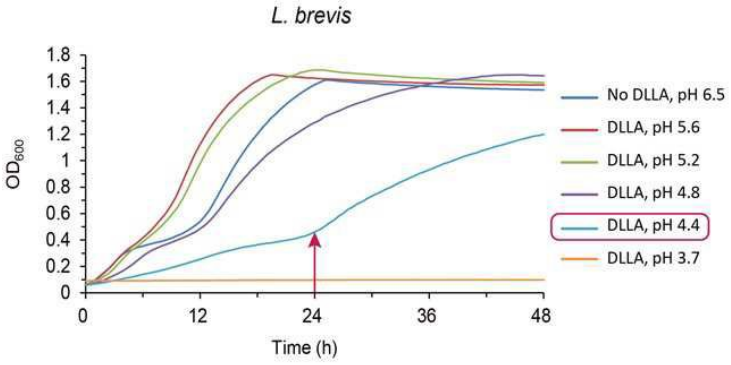
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15037BP

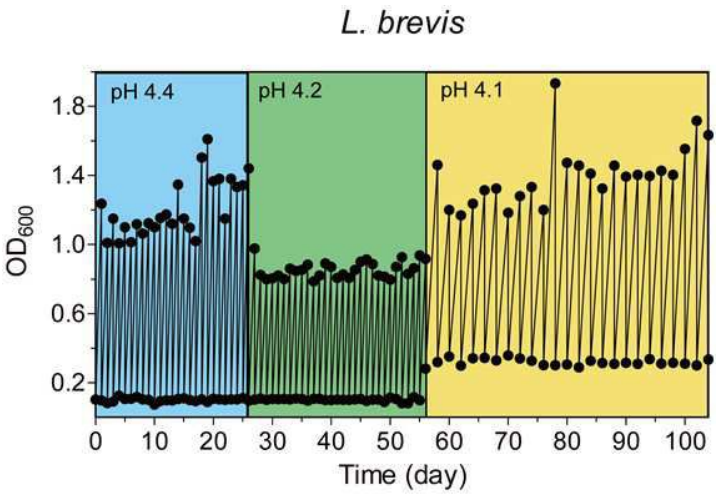
수탁일자 : 20220718

도면

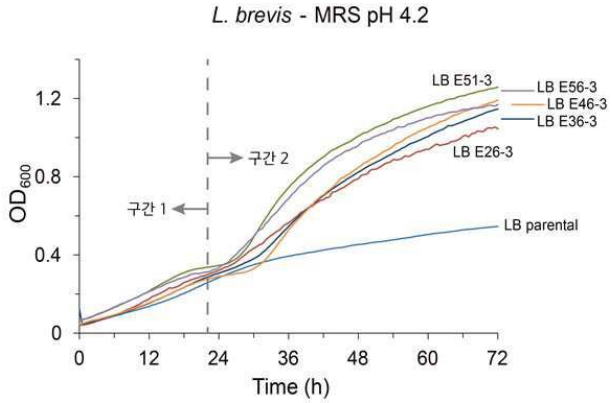
도면1



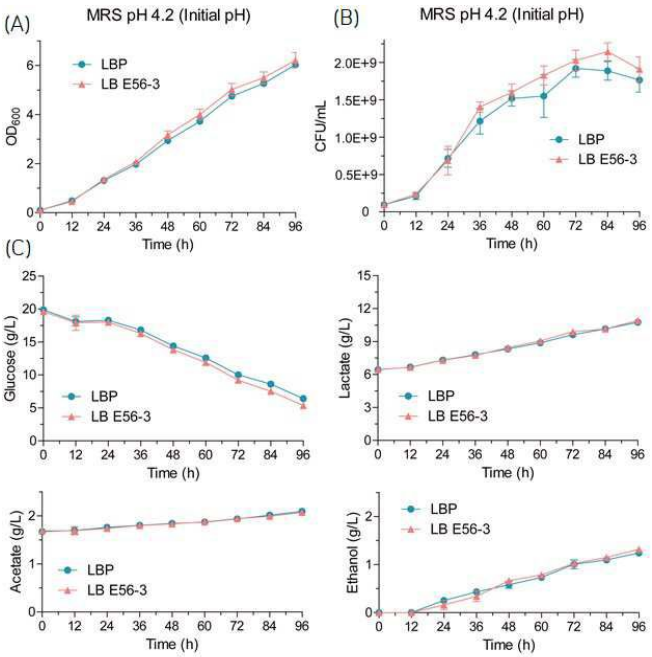
도면2


L. brevis
pH 4.4
pH 4.2
pH 4.1
OD600
Time (day)

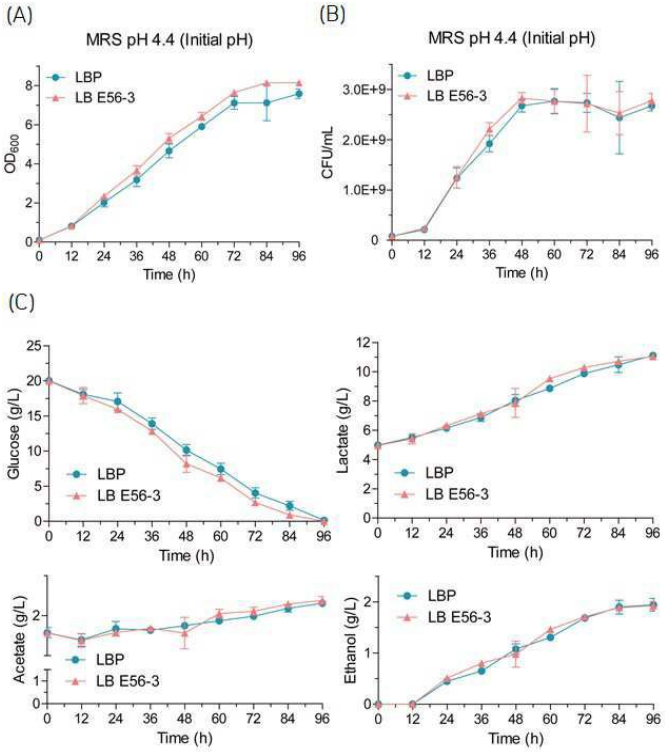
도면3


L. brevis - MRS pH 4.2
LB E51-3
LB E56-3
LB E46-3
LB E36-3
LB E26-3
LB parental
구간 1
구간 2
OD600
Time (h)

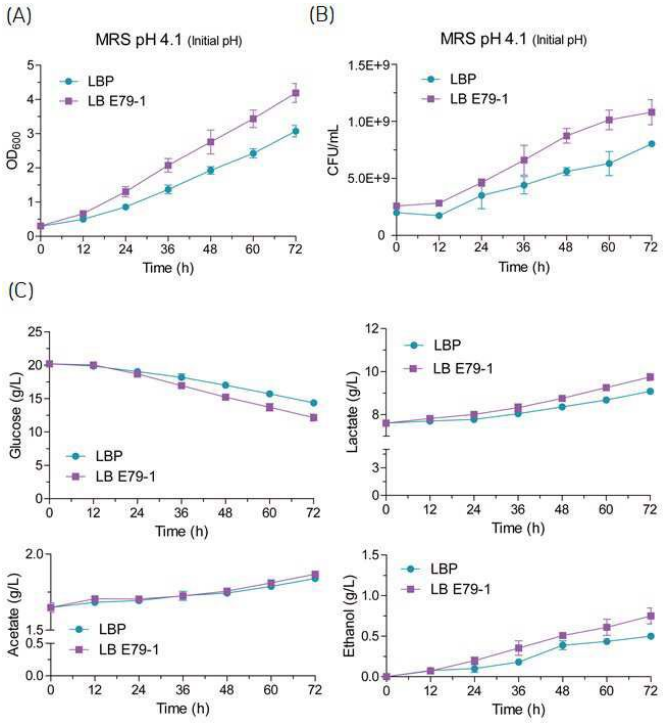
도면4


(A)
MRS pH 4.2 (Initial pH)
LBP
LB E56-3
OD600
Time (h)
(B)
MRS pH 4.2 (Initial pH)
CFU/mL
(C)
Glucose (g/L)
Lactate (g/L)
Acetate (g/L)
Ethanol (g/L)

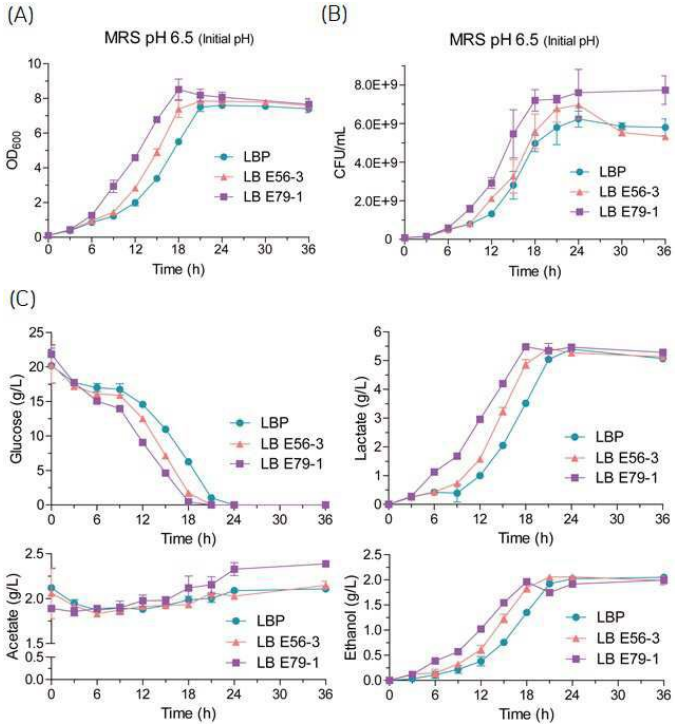
도면5


(A)
MRS pH 4.4 (Initial pH)
LBP
LB E56-3
OD600
Time (h)
(B)
MRS pH 4.4 (Initial pH)
LBP
LB E56-3
CFU/mL
Time (h)
(C)
Glucose (g/L)
LBP
LB E56-3
Time (h)
Lactate (g/L)
LBP
LB E56-3
Time (h)
Acetate (g/L)
LBP
LB E56-3
Time (h)
Ethanol (g/L)
LBP
LB E56-3
Time (h)

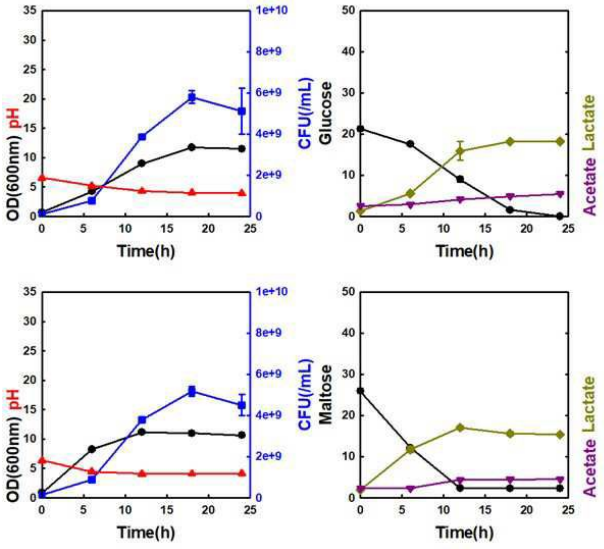
도면6


(A)
MRS pH 4.1 (Initial pH)
LBP
LB E79-1
OD600
Time (h)
(B)
MRS pH 4.1 (Initial pH)
LBP
LB E79-1
CFU/mL
Time (h)
(C)
Glucose (g/L)
LBP
LB E79-1
Time (h)
Lactate (g/L)
LBP
LB E79-1
Time (h)
Acetate (g/L)
LBP
LB E79-1
Time (h)
Ethanol (g/L)
LBP
LB E79-1
Time (h)

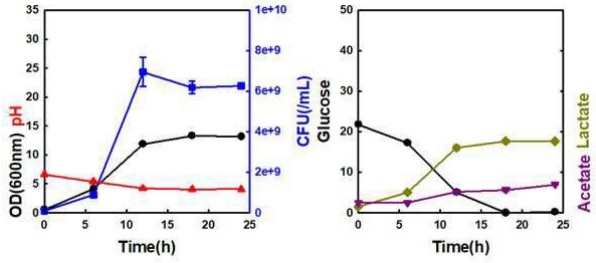
도면7


(A)
MRS pH 6.5 (Initial pH)
OD600
Time (h)
LBP
LB E56-3
LB E79-1
(B)
MRS pH 6.5 (Initial pH)
CFU/mL
Time (h)
LBP
LB E56-3
LB E79-1
(C)
Glucose (g/L)
Lactate (g/L)
Acetate (g/L)
Ethanol (g/L)
Time (h)
LBP
LB E56-3
LB E79-1

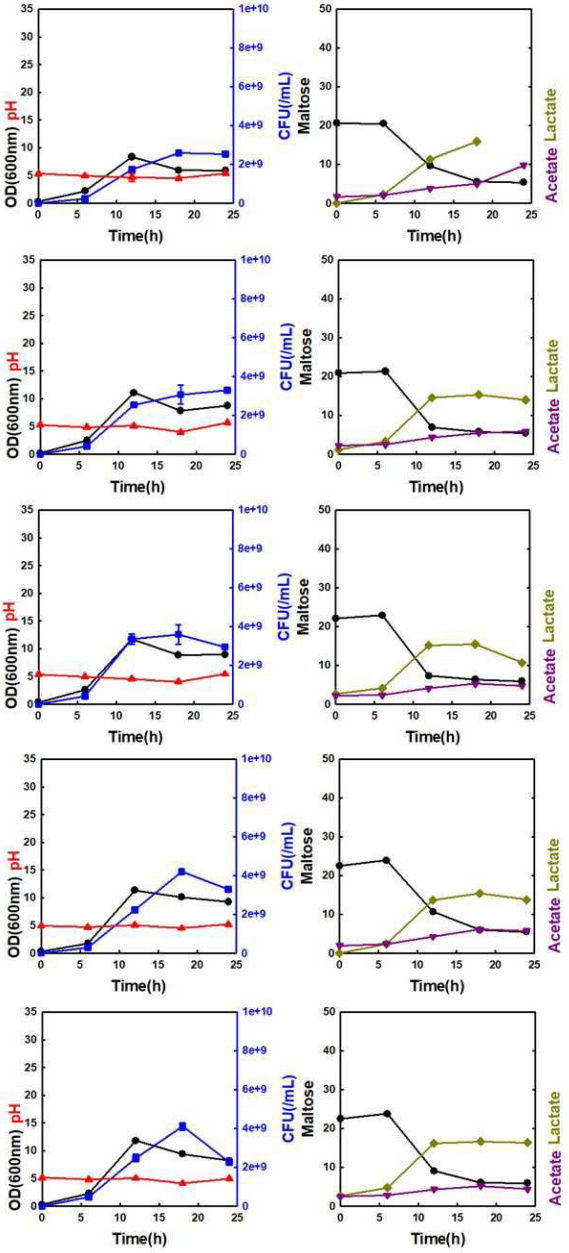
도면8


OD(600nm) pH
CFU/(mL)
Glucose
Acetate Lactate
Time(h)
OD(600nm) pH
CFU/(mL)
Maltose
Acetate Lactate
Time(h)

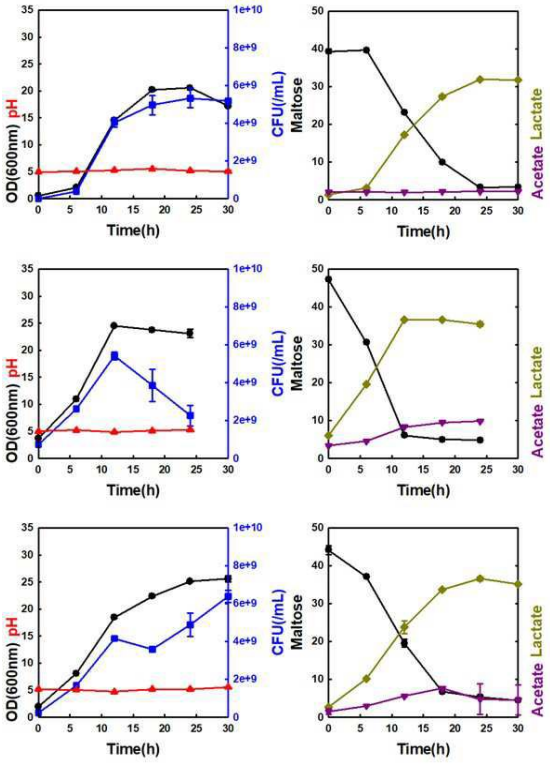
도면9


OD(600nm) pH
CFU/(mL)
Glucose
Acetate Lactate
Time(h)

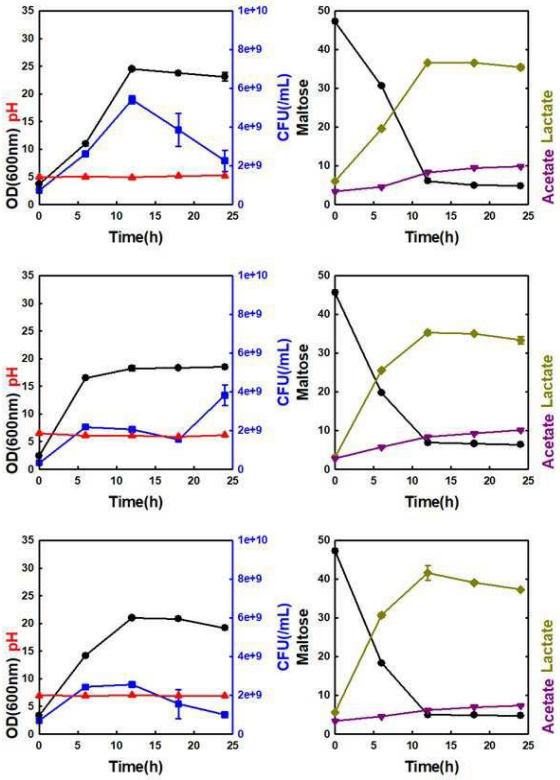
도면10



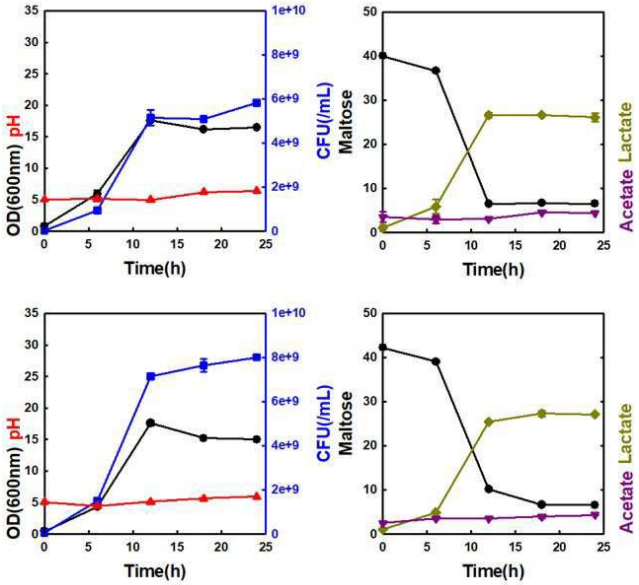
도면11


OD(600nm) pH
CFU(/mL)
Maltose
Acetate Lactate
Time(h)

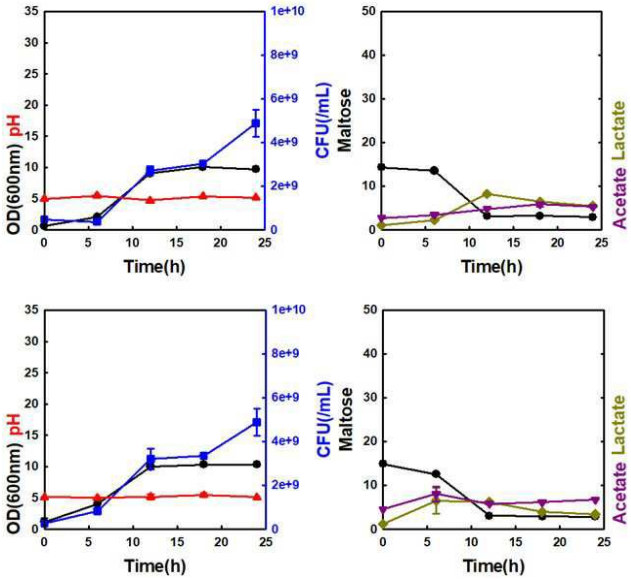
도면12


OD(600nm) pH
CFU(/mL)
Maltose
Acetate Lactate
Time(h)

도면13


OD(600nm) pH
CFU(/mL) Maltose
Acetate Lactate
Time(h)

도면14


OD(600nm) pH
CFU(/mL) Maltose
Acetate Lactate
Time(h)

도면15

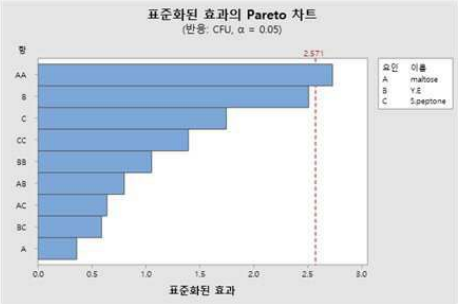
반응 표면 회귀: CFU 대 maltose, Y.E, S.peptone

코드화된 계수

항	계수	SE 계수	T-값	P-값	VIF
상수	5646666667	796591349	7.09	0.001	
maltose	-175000000	487810585	-0.36	0.734	1.00
Y.E	1225000000	487810585	2.51	0.054	1.00
S.peptone	852500000	487810585	1.75	0.141	1.00
maltose*maltose	-1962083333	718037739	-2.73	0.041	1.01
Y.E*Y.E	-757083333	718037739	-1.05	0.340	1.01
S.peptone*S.peptone	-1002083333	718037739	-1.40	0.222	1.01
maltose*Y.E	552500000	689868345	0.80	0.460	1.00
maltose*S.peptone	442500000	689868345	0.64	0.549	1.00
Y.E*S.peptone	-407500000	689868345	-0.59	0.580	1.00

모형 요약

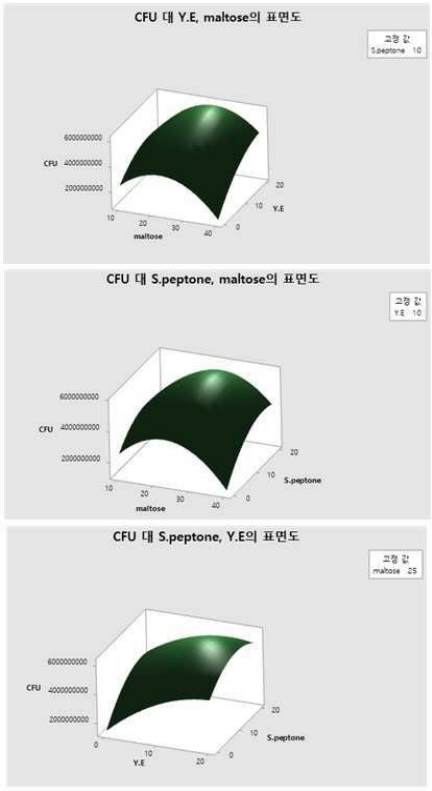
S	R-제곱	R-제곱(수정)	R-제곱(예측)
1379736690	80.28%	44.78%	0.00%



도면16

+	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
	표준 순서	런 순서	점 유형	블록	maltose	Y.E	S.peptone	CFU
1	3	1	2	1	10	20	10	3570000000
2	12	2	2	1	25	20	20	6900000000
3	13	3	0	1	25	10	10	5430000000
4	10	4	2	1	25	20	0	4780000000
5	5	5	2	1	10	10	0	2540000000
6	15	6	0	1	25	10	10	5710000000
7	9	7	2	1	25	0	0	60000000
8	2	8	2	1	40	0	10	1180000000
9	11	9	2	1	25	0	20	3810000000
10	6	10	2	1	40	10	0	2350000000
11	8	11	2	1	40	10	20	3710000000
12	4	12	2	1	40	20	10	3280000000
13	14	13	0	1	25	10	10	5800000000
14	7	14	2	1	10	10	20	2130000000
15	1	15	2	1	10	0	10	3680000000

도면17



도면18

반응 최적화: CFU

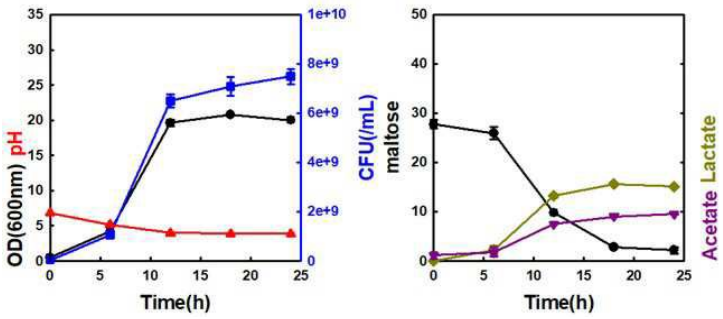
파라미터

반응	목적	하한	목표값	상한	가중치	중요도
CFU	최대값	60000000	1.00000E+10		1	1

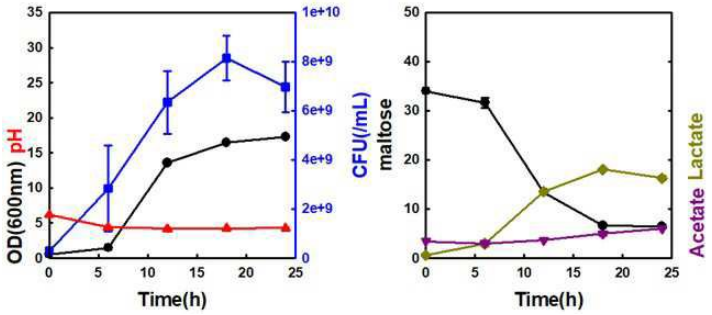
솔루션

솔루션	maltose	Y.E	S.peptone	CFU 적합치	종합 만족도
1	26.3636	17.5758	12.9293	6231206042	0.620846

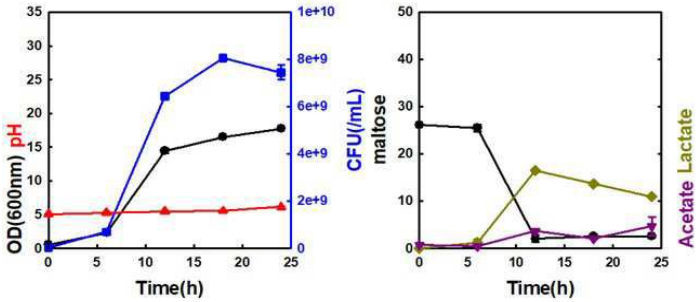
도면19



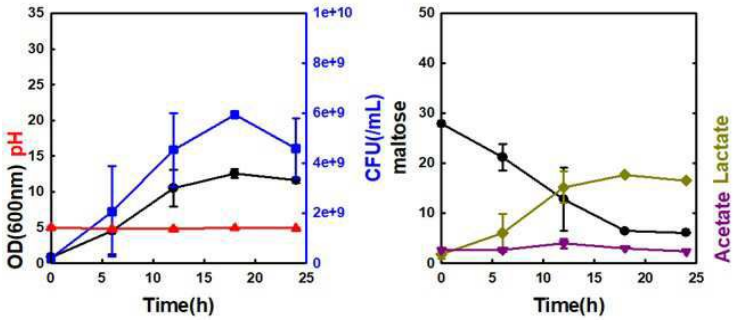
도면20



도면21



도면22



도면23

