

## ARTICLE

***Bacillus subtilis* FWC1, *B. amyloliquefaciens* NAAS1 및 *Pichia farinosa* NAAS2의 산업적 생산을 위한 배양 조건**유희섭<sup>1,2</sup> · 윤용희<sup>1,2</sup> · 오세종<sup>2\*</sup><sup>1</sup>㈜정농바이오, <sup>2</sup>전남대학교 동물자원학부**Growth Media Conditions for Large-Scale Fermentation of *Bacillus subtilis* FWC1, *B. amyloliquefaciens* NAAS1, and *Pichia farinosa* NAAS2**Heeseop Yoo<sup>1,2</sup>, Yonghee Yoon<sup>1,2</sup>, and Sejong Oh<sup>2\*</sup><sup>1</sup>JNBIO, Jeongeup, Korea<sup>2</sup>Division of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju, KoreaReceived: August 26, 2021  
Revised: September 15, 2021  
Accepted: September 17, 2021\*Corresponding author :  
Sejong Oh  
Division of Animal Science, Chonnam  
National University, Gwangju, Korea  
Tel : +82-62-530-2116  
Fax : +82-62-530-2129  
E-mail : soh@jnu.ac.krCopyright © 2021 Korean Society of  
Dairy Science and Biotechnology.  
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.

## ORCID

Heeseop Yoo  
<https://orcid.org/0000-0003-2905-6676>  
Yonghee Yoon  
<https://orcid.org/0000-0003-4886-5479>  
Sejong Oh  
<https://orcid.org/0000-0002-5870-3038>**Abstract**

This study analyzed and compared growth characteristics under large-scale fermentation at 35°C of three microorganisms with the ability to reduce odor-producing substances in livestock. The three microorganisms (*Bacillus subtilis* FWC1, *Bacillus amyloliquefaciens* NAAS1, and *Pichia farinosa* NAAS2) evaluated in this study have been proven effective in reducing odor-inducing substances. *Bacillus subtilis* FWC1 exhibited the highest viable cell count when using 2% maltodextrin as carbon source, 0.05% soy-peptone as nitrogen source, and 0.3% yeast extract. The optimum media composition for *B. amyloliquefaciens* NAAS1 was 1.2% modified-starch with 0.8% yeast extract. The spore formation rate in the mass production of the *Bacillus* strains was over 90%, indicating that optimal growth medium compositions have been identified. In the case of *P. farinosa* NAAS2, our optimized growth medium [2% (w/v) glucose and 1% (w/v) yeast extract] improved biomass production.

**Keywords**optimum medium, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pichia farinosa***서론**

최근 낙농 및 축산업에 사용되는 미생물은 가축생산의 질적 향상을 위한 중요한 소재로 취급되고 있으며, 악취 저감, 생산성 향상, 질병 예방 등 다양한 기능성 미생물에 대한 연구 및 산업화가 이루어지고 있다[1].

미생물을 산업적으로 이용하기 위해서는 미생물의 특성을 규명함과 동시에 대량생산을 위한 배지 조성 정립이 절대적으로 필요하다. 유용 미생물 생산을 위한 대량생산 배지 정립은 경제적인 측면과 생산성을 효과적으로 증진시킬 수 있다는 이유에서 다양한 방법으로 수행되어 왔다. 배양 배지는 여러 개의 성분의 혼합으로 이루어져 있으며, 이들 성분의 혼합량보다는 각 성분의 혼합비율이 중요하다.

실험계획법(experimental design)은 여러 성분의 혼합물에 관한 실험에서 어떠한 성분이 최종 반응변수에 유의한 영향을 미치며, 반응을 최대 또는 최소로 만드는 최적 혼합비율을 찾고자 하는 방법이다. 배지 최적화에 적용할 수 있는 방법에는 여러 성분들간의 실험 계획법에서 혼합물 설계(mixture design)를 사용하는데, 이는 반응표면방법론의 범주에 속한다[2].

유산균과 같이 영양요구성이 높은 미생물은 여러 종류의 배지 성분들을 혼합한 배지를 사용하기

때문에 상대적으로 값이 비싼 것이 특징이다. 반응표면방법론을 활용한 배지 최적화는 *Lactobacillus casei* YIT9018, *L. plantarum* JNU2116, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* JNU306 등의 probiotics를 대량생산하기 위하여 연구되었으며, 상업적으로 판매되는 배지보다 경제적으로 probiotics를 생산할 수 있었다[3-5].

그러나 배지조성이 복잡하지 않은 경우에는 하나의 요인을 여러 수준으로 놓고 나머지 요인들을 고정시켜 실험하는 change-one-factor-at-a-time 방법을 사용하여 최적배지 조건을 정립할 수 있는데, 비록 반응치(생균수)에 영향을 주는 요인(배지성분)의 특성을 살펴볼 수 없으나, 어떠한 실험 처리조합에서 최대의 반응치를 얻을 수 있는가를 판단할 수 있다.

본 연구에 사용된 미생물인 *Bacillus subtilis* FWC1는 음식물 침출수에서 분리하였으며, *B. amyloquifaciens* NAAS1과 *Pichia farinosa* NAAS2는 각각 토양과 된장에서 분리하였다. 선행연구에서 음식물 폐기물 및 축산 폐기물에 *B. subtilis* FWC1, *B. amyloquifaciens* NAAS1 및 *P. farinosa* NAAS2 균주를 처리시 악취유발 원인물질인 암모니아, 황화수소 및 아민가스의 발생을 감소시키는 것을 확인하였다[6,7].

*Bacillus subtilis* FWC1은 tryptic soy(TS) broth(BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 배양시 높은 생균수를 나타냈으며, *B. amyloquifaciens* NAAS1과 *P. farinosa* NAAS2는 각각 Luria-Bertani(LB) broth(BD Difco)와 YM broth(BD Difco)에서 우수한 생육양상을 보였으나, 가격이 비싸 대량생산 배지로 사용하기에는 어려운 실정이다. 또한, 선행연구에서 이들 미생물의 생산을 위한 배지조성을 확립하였으나, 배양시간이 72-120시간으로 실제 생산에 적용하기 어려운 점이 있었다.

따라서 본 연구는 *B. subtilis* FWC1, *B. amyloquifaciens* NAAS1 및 *P. farinosa* NAAS2 균체 생산시 효과적인 산업적 생산을 위한 대량생산배지를 개발하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 스타터 배양액 제조

본 실험에 사용된 약취저감 미생물 3종, *B. subtilis* FWC1, *B. amyloquifaciens* NAAS1 및 *P. farinosa* NAAS2는 농업기술실용화재단에서 분양받아 사용하였다. *Bacillus subtilis* FWC1과 *B. amyloquifaciens* NAAS1은 각각 TS broth와 LB broth에서 35°C, 24시간 진탕배양 후 스타터로 사용하였으며, *P. farinosa* NAAS2는 YM broth에서 30°C, 48시간 진탕배양하여 스타터로 사용하였다.

### 2. 대량배양 조건 탐색

생균수가 높은 배지 조성 탐색을 위하여 선행연구에서 얻어진 결과를 바탕으로 탄소원, 질소원, 미량원소 등 각각의 원료를 첨가하여 생육에 도움을 주는 배지성분들을 토대로 새로운 조성의 배지 탐색하였다. *B. subtilis* FWC1의 경우에는 maltodextrin 또는 soy-peptone을 첨가하여 생균수를 비교하였으며, *Bacillus amyloquifaciens* NAAS1은 glucose, fructose, maltodextrin을 각각 혼합한 배지로 최종 생균수를 비교하였다. 또한, *Pichia farinosa* NAAS2는 무기염류 대신에 yeast extract를 혼합한 배지를 제조하여 각각 최종 생균수를 비교하였다. Table 1은 선행연구[6,7]에서 확립된 생산배지 조성을 나타낸 것으로 본 연구에서는 대조구로 사용하였다.

### 3. 생균수 측정

*Bacillus subtilis* FWC1, *B. amyloquifaciens* NAAS1 및 *P. farinosa* NAAS2의 생균수 측정



**Table 1.** Composition of control medium for tested strains

Component	<i>Bacillus subtilis</i> FWC1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NAAS1	<i>Pichia farinosa</i> NAAS2
	Concentration (% w/v)		
Glucose	1.8	-	1.2
Soluble starch	-	1.2	-
Yeast extract	0.6	0.8	-
Soybean flour	-	-	0.4
NaCl	-	0.1	-
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	-	-	0.02

은 동일한 방법으로 시행하였으며, 액상배양액 1 mL를 멸균 생리식염수로 희석 후, 희석된 시료를 TS agar, LB agar 및 YM agar에 도말하여 30°C(*P. farinosa* NAAS2)와 35°C(*B. subtilis* FWC1 및 *B. amyloliquefaciens* NAAS1)에서 각각 48시간 동안 배양하여 집락을 계수하였다.

#### 4. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였으며, 결과 값에 대한 통계분석은 SAS 프로그램(SAS 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 유의한 차이가 있는 경우, 사후검정으로 Duncan’s multiple range test를 실시하여 유의적인 차이를  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. *Bacillus subtilis* FWC1의 대량생산 배양 조건

선행연구에 보고된[6], *Bacillus subtilis* FWC1의 배지인 glucose-yeast extract medium과 비교하여 생육속도와 포자 형성 완료 후의 생균수 비교를 통해 산업용 최적배지를 탐색하였다. 탄소원으로 glucose, maltodextrin, fructose, sucrose 및 modified starch를 1%-5% 수준으로 각각 설정하였으며, 질소원으로 soy peptone과 yeast extract를 각각 0.01%-0.05%와 0.3%-1% 수준으로 설정하여 배지를 제조하였다. 대량생산 배지 조성별 최종 생균수는 Table 2에 제시하였다. 실험결과, *Bacillus subtilis* FWC1은 탄소원 2% 이하, 질소원 약 0.3%의 조성으로 35°C에서 24시간 배양하면 산업적 생산이 가능한 것으로 나타났다.

Kwon et al.(2007)은 *B. subtilis* S37-2는 TS 배지에서 양호한 생육상태를 나타냈으며, 30°C보다 37°C에서 배양시 4배 이상의 균체 생성량을 보였으며, peptone과 tryptone을 첨가한 배지보다 yeast extract를 첨가한 배지에서 균체 생성량이 양호하다고 보고하였다[8]. 본 실험결과, *B. subtilis* FWC1의 경우 탄소원의 함량을 2% 높였을 때 오히려 세포분열이 감소하였으며, yeast extract 함량이 증가함에 따라 세포분열이 증가하는 것을 보였다(data were not shown). 또한, 배양온도에서도 30°C보다 35°C 배양시 생육속도가 증가함을 확인하여 기존의 연구와 유사한 배양 특성을 나타냈다. 그러나 yeast extract의 함량이 0.3% 이상부터는 세포분열 및 균체 생성량이 큰 차이를 보이지 않았다(data were not shown).

#### 2. *B. amyloliquefaciens* NAAS1의 대량생산 배양 조건

*Bacillus amyloliquefaciens* NAAS1 대량생산을 위한 배지성분은 탄소원으로 glucose, maltodextrin, soluble-starch, modified-starch를 각각 1%-5% 수준으로 설정하였으며, 질소원으로 soy peptone, yeast extract 및 soybean flour를 각각 0.01%-0.05%, 0.3%-1% 및 0.1%-1% 수준으로 첨가하여 평가하였다.

**Table 2.** Viable cells of *B. subtilis* FWC1 with different culture media

Component	Amount (%; w/v)	<i>B. subtilis</i> FWC1 (log CFU/mL)
Glucose	1	
Maltodextrin	1	9.05±0.02 <sup>b</sup>
Yeast extract	0.3	
Glucose	1	
Fructose	1	9.25±0.04 <sup>a</sup>
Soy peptone	0.05	
Yeast extract	0.3	
Maltodextrin	2	
Soy peptone	0.05	9.02±0.01 <sup>b</sup>
Yeast extract	0.3	
Glucose	1	
Fructose	1	9.28±0.01 <sup>a</sup>
Soy peptone	0.05	
Yeast extract	1	
Maltodextrin	2	
Soy peptone	0.05	9.2±0.05 <sup>a</sup>
Yeast extract	1	

<sup>a,b</sup> Means with different superscripts indicate significant difference within a column ( $p < 0.05$ ).

Table 3은 산업용 대량배양 배지조성을 정립하기 위하여 여러 배지성분 조합으로 35°C에서 24시간 배양하여 최종 생균수를 나타낸 것이다. 배지조성을 maltodextrin 1%, soluble-starch 1%, soy peptone 0.5% 및 yeast extract 0.6%로 하였을 때 9.4에 이르는 높은 생균수를 보였다.

*Bacillus amyloliquifaciens* NAAS1는 72시간 배양 후, 현미경상 2%보다 높은 함량의 탄소원 첨가 시 세포분열이 감소하여, 균체 향상을 저해하는 것으로 나타났으며, 질소원 함량이 증가함에 따라 세포분열이 증가하였다. 경제성 대비 생균수가 비교적 우수한 modified starch 1%-1.5%, yeast extract 0.5%-1% 수준의 조성이 산업용 배지로 가장 적합한 것으로 보여, *B. amyloliquifaciens* SKU-78보다 낮은 함량의 영양원으로 배양이 가능함을 확인하였다.

Kim and Cho(2014)는 *B. amyloliquifaciens* SKU-78은 48시간 배양에서 탄소원으로써 옥수

**Table 3.** Viable cells of *Bacillus amyloliquifaciens* NAAS-1 with different culture media

Component	Amount (%; w/v)	<i>B. amyloliquifaciens</i> NAAS1 (log CFU/mL)
Maltodextrin	2	
Soy peptone	0.05	9.21±0.02 <sup>b</sup>
Yeast extract	0.3	
Modified starch	1.2	9.13±0.04 <sup>b</sup>
Yeast extract	0.8	
Glucose	2	
Maltodextrin	0.5	8.03±0.02 <sup>c</sup>
Yeast extract	0.3	
Modified starch	1.2	
Yeast extract	0.8	9.15±0.05 <sup>b</sup>
Soybean flour	1	
Maltodextrin	1	
Modified starch	1	9.4±0.01 <sup>a</sup>
Soy peptone	0.05	
Yeast extract	0.6	

<sup>a-c</sup> Means with different superscripts indicate significant difference within a column ( $p < 0.05$ ).



수전분과 유당에서 높은 생장을 보였으며[9], 질소원으로 미강과 soybean flour를 사용하였을 때 균체 성장이 가장 높다고 보고하였다. 또한, soybean flour의 농도에 따라 균체 밀도는 증가하였으나 5% 이상에서는 큰 차이를 보이지 않았는데, 5% soybean flour에 탄소원으로 옥수수전분, 포도당, soluble starch 3%를 각각 첨가하여 배양 시 5% soybean flour에 탄소원으로 옥수수전분을 첨가한 처리구만 탄소원을 첨가하지 않은 5% soybean flour 단일 배양 시보다 균체 향상을 보였다고 하였다[9].

### 3. *Pichia farinosa* NAAS2의 대량생산 배양 조건

예비실험에서 *P. farinosa* NAAS2를 YM 배지와 Potato-dextrose 배지(BD)에서 생육특성을 비교한 결과 30°C에서 YM 배지에서 배양시 더 높은 생균수를 보였다(data were not shown). 기존에 보고된 *P. farinosa* NAAS2 생산배지인 glucose-soybean medium과 비교하여 생육속도와 생균수 비교를 통해 산업용 최적배지를 탐색하였다(Table 4). *Pichia farinosa* NAAS2는 2% glucose와 1% yeast extract로 구성된 배지에서 배양 24시간에 생균수가 가장 높았다. Kwon and Kim(2016)은 *P. farinosa* MBY/L1569 균주는 초기 pH 7.0, 포도당 5%, 배양온도 37°C에서 가장 빠른 성장속도를 보였다고 보고하였으나[10], 본 실험결과 *P. farinosa* NAAS2 균주의 경우 성장속도에 있어서는 35°C가 조금 더 빠르게 나타났으나, 균체 생산에 있어서는 30°C에서 가장 우수하였다.

## 결론

가축 사료첨가제 및 가축분뇨의 부숙 촉진 역할이 가능한 *B. subtilis* FWC1, *B. amyloliquefaciens* NAAS1 및 *P. farinosa* NAAS2균주의 산업적 대량생산 조건을 탐색한 결과, *B. subtilis* FWC1과 *B. amyloliquefaciens* NAAS1은 신규 정립된 대량생산배지에서 각각 9.28과 9.4의 생균수(log CFU/mL)를 보여 기존 배지보다 우수한 것으로 나타났다(Table 5). *P. farinosa* NAAS2는 신규 대량 생산배지로 배양한 결과, 배양 24시간에 생균수가 8.63(log CFU/mL)으로 나타났으나, 기존 배양배지의 경우 배양 120시간에 생균수가 8.73(log CFU/mL)으로 배양시간을 1/5로 단축시킬 수 있었다(Table 5). 산업적 생산을 위한 경제성 있는 배지로 확인되었지만, 이는 500 L 용량의

**Table 4.** Effect of glucose and yeast extract concentrations on the growth of *P. farinosa* NAAS2

Component	Amount (%; w/v)	<i>P. farinosa</i> NAAS2 (log CFU/mL)
Glucose	1	8.11±0.05 <sup>b</sup>
Yeast extract	0.5	
Glucose	2	8.63±0.03 <sup>a</sup>
Yeast extract	1	
Glucose	1	8.59±0.03 <sup>a</sup>
Soybean flour	0.5	

<sup>a,b</sup> Means with different superscripts indicate significant difference within a column ( $p < 0.05$ ).

**Table 5.** Comparison of viable cells with optimum media

	Control medium		Optimization medium	
	Final incubation time (h)	Viable cell count (log CFU/mL)	Final incubation time (h)	Viable cell count (log CFU/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> FWC1	72	9.12±0.05	24	9.28±0.01
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NAAS1	96	9.09±0.07	24	9.4±0.01
<i>Pichia farinosa</i> NAAS2	120	8.73±0.05	24	8.63±0.03

배양탱크에서 실험한 결과로 이보다 용량이 큰 배양탱크에서의 생균수 평가가 추가적으로 필요한 것으로 생각된다.

결론적으로 *B. subtilis* FWC1은 maltodextrin, soy peptone, yeast extract가 첨가된 배지에서 우수한 결과를 보였으며, *Bacillus amyloliquefaciens* NAAS1은 modified-starch와 yeast extract가 첨가된 배지에서 높은 생균수를 나타내었다. *Pichia farinosa* NAAS2는 glucose와 yeast extract가 첨가된 배지에서 배양시 우수한 균체생성을 보여, 본 연구에서 확립된 배지조성이 효율적인 대량생산에 적합한 배지임을 확인할 수 있었다.

## Conflict of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korea government (2021R1A4A1031220).

## References

1. Lee EY. Problems and verification system of probiotics as livestock-environment improving agent produced and circulated. *Microbiol Biotechnol Lett.* 2008;36:87-95.
2. Montgomery CD. Response surface methodology. In: Montgomery CD, editor. *MoDesign and analysis of experiments*. 3rd ed. New York, NY: John Wiley & Sons; 1991. p. 521-568.
3. Oh S, Rheem S, Sim J, Kim S, Baek Y. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:3809-3814.
4. Yoo H, Rheem I, Rheem S, Oh S. Optimizing medium components for the maximum growth of *Lactobacillus plantarum* JNU 2116 using response surface methodology. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2018;38:240-250.
5. Dang TD, Yong CC, Rheem S, Oh S. Optimizing the composition of the medium for the viable cells of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* JNU306 using response surface methodology. *J Anim Sci Technol.* 2021;63:603-613.
6. Yoo JH, Park IC, Kim WK. Material treating for production of malodor. Korea patent 10-1465093. 2014.
7. Yoo JH, Park IC, Kim WK, Kim JS. Material treating for production of malodor, Korea patent 10-1549191. 2015.
8. Kwon JS, Weon HY, Suh JS, Kim WG, Jang KY, Noh HJ. Plant growth promoting effect and antifungal activity of *Bacillus subtilis* S37-2. *Korean J Soil Sci Fert.* 2007; 40:447-453.
9. Kim SD, Cho HB. Fermentation of a potential biocontrol agent, *Bacillus amyloli-*



- quefaciens SKU-78 strain. Korean J Microbiol. 2014;50:84-86.
10. Kwon HJ, Kim MD. Isolation of stress-tolerant *Pichia farinosa* from nuruk. Microbiol Biotechnol Lett. 2016;44:349-354.