

Application of Response Surface Methodology in Medium Optimization to Improve Lactic Acid Production by *Lactobacillus paracasei* SRCM201474

Gwangsu Ha, JinWon Kim, Sua-Im, Su-Jin Shin, Hee-Jong Yang and Do-Youn Jeong*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Korea

Received February 17, 2020 / Revised March 13, 2020 / Accepted March 13, 2020

The aim of this study was to establish the optimal medium composition for enhancing L(+)-lactic acid (LLA) production using response surface methodology (RSM). *Lactobacillus paracasei* SRCM201474 was selected as the LLA producer by productivity analysis from nine candidates isolated from kimchi and identified by 16S rRNA gene sequencing. Plackett-Burman design was used to assess the effect of eleven media components on LLA production, including carbon (glucose, sucrose, molasses), nitrogen (yeast extract, peptone, tryptone, beef extract), and mineral (NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄, MnSO₄) materials. Glucose, sucrose, molasses, and peptone were subsequently chosen as promising media for further optimization studies, and a hybrid design experiment was used to establish their optimal concentrations as glucose 15.48 g/l, sucrose 16.73 g/l, molasses 39.09 g/l, and peptone 34.91 g/l. The coefficient of determination of the equation derived from RSM regression for LLA production was mathematically reliable at 0.9969. At optimum parameters, 33.38 g/l of maximum LLA increased by 193% when compared with MRS broth as unoptimized medium (17.66 g/l). Our statistical model was confirmed by subsequent validation experiments. Increasing the performance of LLA-producing microorganisms and establishing an effective LLA fermentation process can be of particular benefit for bioplastic technologies and industrial applications.

Key words : Lactic acid, *Lactobacillus paracasei*, optimization, polylactic acid, response surface methodology

서 론

생분해성 플라스틱은 자연계에서 미생물이나 수분에 의해 이산화탄소와 물로 완전 분해되기 때문에 환경보호 차원에서 그 중요성이 크게 부각되고 있으며, 특히 석유 원료를 사용하지 않고 천연원료를 사용하여 인체 적합성이 우수한 고분자 플라스틱 소재를 개발하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다[12]. 그 중 폴리락타이드(PLA, poly lactic acid)는 분해속도를 조절할 수 있으며, 생체적합성이 뛰어나 안전하다는 점이 알려지면서 생체흡수성 봉합사 또는 의료용 지지체, 인공장기 등의 의료용 소재와 약물 전달용 서방출형 제형을 개발하는데 이용되어지고 있다[12, 15]. 젖산은 미국 Food and Drug Administration (FDA)에 의하여 Generally Recognized as Safe (GRAS)로 승인되어 식품 보존제, 향미제 등 식품 관련 산업에 널리 이용되고 있으며[25], PLA 생산을 위한 단량체 원료로 그 이용성이 증가하고 있는 추세에 있다[24]. 일반적으로

로 화학 합성법에 의해 생산된 젖산은 D(-) 및 L(+)-형의 라세미 혼합물 형태로 생산되므로 목적으로 하는 젖산을 순수하게 생산하기 어려우나, 생물학적 발효공정은 미생물에 따라 D(-)형 또는 L(+)-형 젖산을 선택적으로 생산할 수 있다는 장점이 있어 산업적으로 이용되는 젖산은 대부분 미생물 발효를 통해 생산되고 있다[19, 24]. 하지만 L(+)-형 젖산은 lactic dehydrogenase (EC 1.1.1.27)에 의해 간에서 pyruvate로 전환되어 쉽게 산화되지만, D(-)-형 젖산은 대사가 느리게 진행되어 포유동물에 산독증 또는 단장 증후군(short-bowel syndrome)을 일으키는 것으로 알려져 식품 및 의학 분야에 특이적으로 L(+)-형 젖산 생산을 위한 공정을 개발하는데 연구가 진행되고 있다[6, 11].

반응표면분석법(RSM, response surface methodology)은 여러 독립변수간의 복잡한 상호작용으로 인한 효과를 측정하여 결과의 최대치와 최소치를 얻기 위한 변수들의 최적값을 확인할 수 있는 효과적인 방법[4]으로 생물공학에서 균체 및 다양한 목적하는 물질을 생산하기 위한 배지 최적화 수행시 주로 사용되고 있다[3, 8].

본 연구에서는 전국에서 수집한 김치로부터 선택적으로 L(+)-형의 젖산을 생산하는 것으로 알려진 젖산균을 분리, 동정하여 선발하였으며, 통계학적 기법인 반응표면분석법을 이용하여 젖산의 생산에 영향을 미치는 배지 성분을 조사하고 선별된 성분들의 젖산 생산을 위한 최적 농도를 설정하여 산업적 배지조건을 확립하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2000, Fax : +82-63-650-9590

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.

재료 및 방법

미생물 분리 및 배양

젖산균 분리를 위한 시료로 전국에서 김치 20종을 수집하였으며, Bang 등의 방법[2]을 응용하여 수집한 김치 시료 1 g을 9 ml의 0.85% NaCl 용액에 현탁하여 단계희석하고, 각 희석액 100 µl을 0.5% calcium carbonate (sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)가 포함된 MRS (Difco, Sparks, MD, USA) 배지에 도말하여 30°C 배양기에서 48시간 배양하였다. 배지 위에 형성된 집락의 주변에 투명한 환이 형성된 콜로니를 형태학적 차이를 통해 선별하여 순수 분리하였다.

분리균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

20종의 김치 시료로부터 0.5% calcium carbonate가 포함된 MRS 배지에서 투명한 환을 형성하는 균주 121주를 선별하였다. 각 분리 균주를 동정하기 위해 27F forward primer (5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3')와 1492R reverse primer (5'-GGTACCTTGTACGA CTT-3')를 이용하여 16S ribosomal DNA 서열을 증폭하였으며, Genbank의 database에 등록된 표준균주들과 상동성을 분석하였다. Mega 7.0.26 program을 사용하여 근린결합법(neighbor joining method) [18]을 기반으로 계통도를 분석하여 L(+)-형의 젖산을 선택적으로 고생산하는 것으로 알려진 *Lactobacillus paracasei* 균주를 선별하였다[23].

L(+)-형 젖산 고생산 균주 선별

젖산균은 Embden-Meyerhof 경로(EM or EMP pathway)를 통해 glucose를 이용하여 젖산을 생산하는 것으로 알려져[16] 있으므로, 계통분석을 통해 L(+)-형 젖산을 고생산하는 것으로 알려진[22, 23] 9종의 *Lactobacillus paracasei* 균주를 탄소원으로 glucose를 포함하고 있는 MRS 액체배지에 접종하여 진탕배양기에서 30°C, 150 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 각 젖산균 배양액을 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 0.45 µm syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany)를 통해 제공한 상등액을 HPLC분석에 사용하였다.

선별균주의 배양시간에 따른 젖산 생산 및 균주 성장 조사

젖산 생산의 배지조성 최적화를 위한 젖산 고생산균주로 최종 선별한 *Lactobacillus paracasei* SRCM201474 균주를 100 ml의 MRS 액체배지에 전배양액 1%를 접종하여 48시간 동안 진탕배양기에서 30°C, 150 rpm으로 배양하였으며, 4시간마다 배양액을 회수하여 생균수와 glucose 소비량 및 젖산 생산량을 조사하였다. 배양 시간별 배양액 내의 glucose 소비량을 측정하기 위한 HPLC column으로 ZORBAX carbohydrate column (Agilent, USA)을 사용하였으며, column oven은 30°C로 설정하였다. 이동상으로는 1.4 ml/min의 유속으로 75%

acetonitrile을 흘려주었으며, 시차굴절 검출기(Agilent 1260 Infinity Refractive Index Detector, Agilent, USA)를 사용하였다. 젖산 생산량을 분석하기 위한 column으로는 Aminex HPX-87H (Bio-Rad, California, USA)를 사용했으며, column 온도는 50°C로 설정하였다. 이동상으로는 5 mM sulfuric acid를 0.6 ml/min의 유속으로 흘려주었으며, 자외선-가시광선 검출기(Agilent 1200 UV-Vis Detector, Agilent, USA)를 사용하여 검출하였다.

통계학적 분석법을 이용한 젖산 생산배지 성분의 선별

최종선별 균주 SRCM201474를 이용한 젖산 생산에 영향을 미치는 배지성분을 선별하기 위해 방법으로 2개의 수준(+1, -1)으로 주효과를 나타내는 성분을 선별할 수 있는 Plackett-Burman design (PBD)를 사용하였다[9]. 본 연구에서는 *Lactobacillus* 속 미생물의 성장과 젖산 생산에 영향을 미치는 것으로 알려진 3개의 탄소원(glucose, sucrose, molasses), 4개의 질소원(yeast extract, peptone, tryptone, beef extract), 4개의 무기원소원(NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄, MnSO₄)를 독립변수로 구성하였으며[3, 5, 20, 24], 각 성분의 고농도 수준(+1)과 저농도 수준(-1)으로 설정하여 독립변수별 젖산 생산에 미치는 영향을 산출하였다(Table 1). 각 실험구의 종속변수는 젖산 생산량(Y, g/l)을 설정하였으며, 실험계획과 통계분석에는 Design expert 12 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) program을 사용하였다.

젖산 생산에 영향을주는 배지성분의 농도 최적화

PBD 설계에 의한 실험결과를 통해 젖산 생산에 주효과를 나타내는 4개의 독립변수로 glucose, sucrose, molasses, peptone이 선별되었으며, 선별된 4개 변수들의 최적 농도를 분석하기 위해 적은 실험수로도 추정하고자 하는 값을 분석할 수 있는 통계학적 기법[17]인 hybrid design을 선택하여 실험 모형을 설계하였다. 선별된 4개의 각 독립변수 glucose (X₁), sucrose (X₂), molasses (X₃), peptone (X₄)을 -α, -1, 0, +1, +α의 5개의 수준으로 구성하였으며, 3개의 중심점 포함한 19개의 실험구를 설정하였다. SRCM201474 균주의 전배양액 1%를 각 실험구에 접종하여 배양하였으며, 젖산 생산을 위한 4개의 변수에 대한 2차 회귀방정식은 다음과 같다.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Y는 종속변수로 젖산 생산량(g/l)을 나타내며, X_i와 β₀는 각각 독립변수와 상수계수를, β_i, β_{ii}, β_{ij}는 각 독립변수간의 상호작용 계수를 나타낸다[7]. 회귀분석에 의해 산출된 식은 Design expert 12 program을 이용하여 예측하였으며, 분산분석을 통해 실험모델의 통계적 유의성을 검정하고 젖산의 최대 생산을 위한 4개의 독립변수들의 최적 농도를 예측하였다.

Table 1. Matrix of the Plackett-Burman design experiments on eleven variables with response values

Factors	Symbol (unit)	Level of coded variables		
		-1	0	+1
Glucose	X ₁ (g/l)			
Sucrose	X ₂ (g/l)	2	5	8
Molasses	X ₃ (g/l)			
Yeast extract	X ₄ (g/l)			
Peptone	X ₅ (g/l)	2	4	6
Tryptone	X ₆ (g/l)			
Beef extract	X ₇ (g/l)			
NaCl	X ₈ (g/l)			
K ₂ HPO ₄	X ₉ (g/l)	0.1	0.3	0.5
MgSO ₄	X ₁₀ (g/l)			
MnSO ₄	X ₁₁ (g/l)			

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	lactic acid (g/L)	
												predicted	Observed
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	12.5416	12.5416
2	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	11.059	11.059
3	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	8.7015	8.7015
4	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	13.8566	13.8566
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	11.6554	11.6554
6	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	12.1667	12.1667
7	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	13.0699	13.0699
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.9543	12.6382
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.9543	12.0957
10	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	12.4138	12.4138
11	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	6.06286	6.06286
12	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	13.1096	13.1096
13	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	5.2903	5.2903
14	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	11.5248	11.5248
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.9543	12.357

X₁-X₁₁ represent respective assigned variables and response values. Predicted represents predicted response value by PBD design. Observed represents the experimental response value.

결과 및 고찰

L(+)-형 젖산 고생산 균주 선발

20종의 김치 시료로부터 분리한 미생물의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과 9종의 L(+)-형 젖산을 선택적으로 생산하는 것으로 알려진 *Lactobacillus paracasei* 균주를 분리하였으며, MRS 배지에서 48시간 배양하여 균주의 성장에 따른 젖산 생산량과 glucose 소비량을 분석하여 glucose로부터의 전환율을 분석하였다(Table 2). 48시간 배양액의 glucose 농도 분석결과 9균주 모두 100%에 가까운 glucose 소비량을 보였으나 젖산 생산량과 균주 성장대비 젖산 생산량에서 차이를 보였으며, 9주 중 *L. paracasei* SRCM201474 균주가 젖산 생산량 및 glucose로부터의 전환율, 성장대비 생산량이 가장 우수한 것으로 나타났다. 이는 같은 *Lactobacillus paracasei* 종이라도 유전

체의 크기와 보유한 plasmid의 수가 달라 유전학적 특성이 다를 수 있으며, 배지조성 등의 성장환경에 따라 성장의 차이가 나타나기 때문으로 판단된다[21].

SRCM201474의 16S rRNA 유전자 서열을 통한 계통분석

1,505 bp의 SRCM201474 균주의 16S ribosomal DNA 유전자 염기서열 분석결과를 GenBank에 등록된 표준균주들의 염기서열과 비교한 결과 *L. paracasei* strain R094, *L. paracasei* strain NBRC 15889 균주와 각각 99.93%, 99.87%의 상동성을 보여 *L. paracasei* SRCM201474로 명명하였다. 계통분석을 위해 근린결합법을 사용하여 evolutionary distance를 추론하였으며, bootstrap을 1,000회 시행하여 계통도의 신뢰도를 확보하였다(Fig. 1). *L. paracasei*는 96-98%의 순도 높은 L(+)-형 젖산을 고효율로 생산하는 것으로 알려져[14, 23] 의학 산업 분야에

Table 2. Results of lactic acid production and conversion rate from glucose by 10 isolates of *L. paracasei* strains in MRS medium

Microorganisms	Cmtl. (g/l)	Ymtl. (%)	Y/OD ₆₀₀
<i>Lactobacillus paracasei</i> SRCM201471	16.0068	80.034	7.2351
<i>Lactobacillus paracasei</i> SRCM201474	17.6570	88.285	8.8878
<i>Lactobacillus paracasei</i> SRCM201478	15.5097	77.5485	7.3602
<i>Lactobacillus paracasei</i> SRCM201485	16.5549	82.7745	8.1359
<i>Lactobacillus paracasei</i> SRCM201496	17.3729	86.8645	8.5411
<i>Lactobacillus paracasei</i> SRCM201498	16.7112	83.5560	7.9186
<i>Lactobacillus paracasei</i> SRCM201499	16.7055	83.5275	7.5519
<i>Lactobacillus paracasei</i> SRCM201500	17.4752	87.3760	7.9913
<i>Lactobacillus paracasei</i> SRCM201502	15.2882	76.4410	7.6511

Cmtl.: lactic acid concentration accumulated, Ymtl.: lactic acid yield from glucose, Y/OD₆₀₀: lactic acid concentration per optical density of samples at 600 nm.

적용하기 위한 안전성 높은 젖산 생산에 적합한 미생물자원으로 판단된다.

SRCM201474의 배양시간에 따른 젖산생산 및 균주 성장 조사

젖산 생산 배지최적화를 수행하기 위해 최종 선발된 SRCM201474 균주의 배양시간에 따른 젖산 생산과 균주 성장을 조사하기 위해 MRS 액체배지 100 ml에 접종하여 48시간 동안 30 °C, 150 rpm 진탕배양기에서 배양하였으며, 4시간마다 배양액을 회수하였다. SRCM201474는 배양 8시간까지 급격히 성장하는 대수기를 지나 8시간 이후 점차 성장이 느려져 24시간부터 정지기에 도달하는 것으로 나타났으며, 균주가 성장함에 따라 젖산 생산량도 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 배양 32시간에 도달했을때 배양액 내의 glucose를 모두 소비하

여 균주의 최고 성장과 젖산의 최대생산량을 나타내 SRCM201474를 이용한 젖산생산을 위한 배양시간을 32시간으로 설정하였다.

통계학적 분석법을 이용한 젖산 생산배지 성분의 선별

미생물자원을 산업적으로 이용시 목적하는 물질의 생산량을 최대화 하는 동시에 생산비용을 절감하기 위해서는 배지최적화가 필수적이다[8]. 이에 따라 11개의 배지성분 중 3개의 탄소원으로 선정된 탄소원(glucose, sucrose, molasses)은 중심값으로부터 높은 수준과 낮은 수준을 5±3 g/l로, 질소원(yeast extract, peptone, tryptone, beef extract)은 4±2 g/l로, 무기원소원(NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄, MnSO₄)는 0.3±0.2 g/l로 설정하여 통계학적 기법으로 PBD를 설계하여 각 독립변수의 젖산생산에 미치는 영향을 분석하였다. 각 15개 실험구의 반

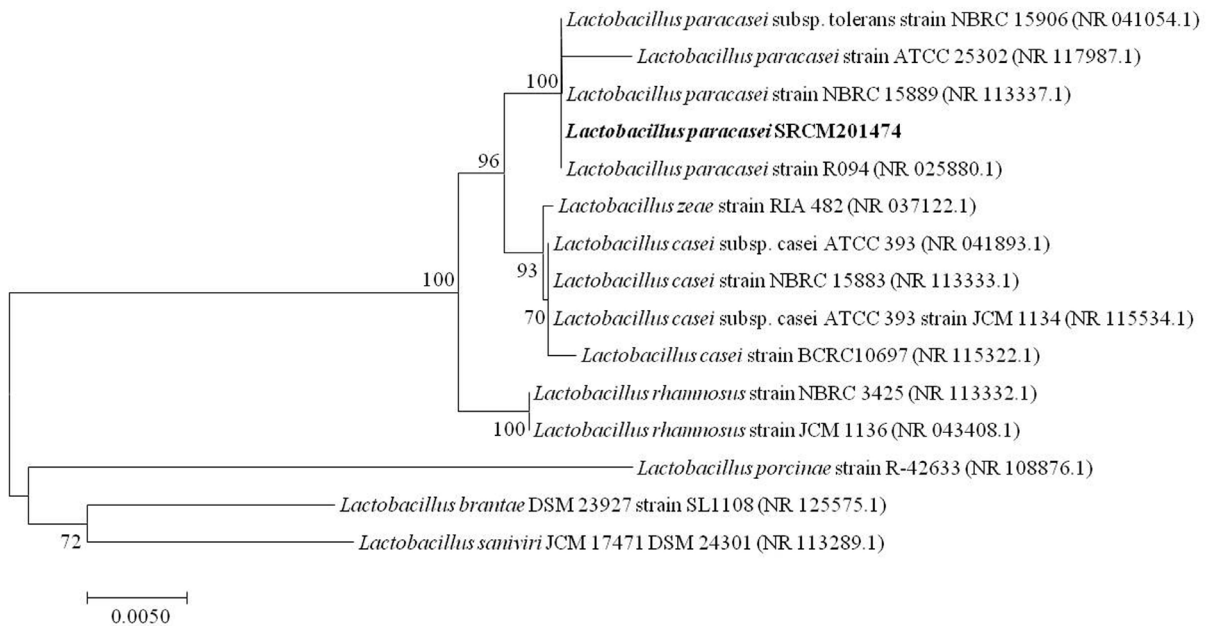


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree constructed using 16S rRNA gene of *L. paracasei* SRCM201474. The tree scale (0.005) represents evolutionary distance in units of base substitutions computed by Maximum composite likelihood method.

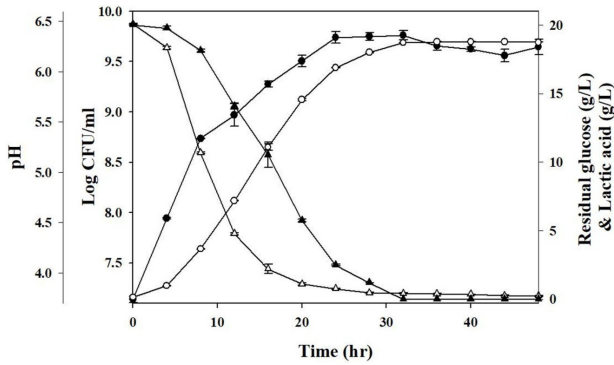


Fig. 2. Time course profile of lactic acid production by *L. paracasei* SRCM201474 in MRS broth as unoptimized medium. ●: Log CFU/ml, ○: lactic acid (g/l), ▲: glucose (g/l), △: pH.

응답인 젖산 생산량을 Table 1에 나타내었으며, 각 독립변수의 수준에 따른 젖산 생산량을 나타내는 plot을 Fig. 3에 나타내었다. 각 독립변수들의 영향 및 모델 계수와 같은 통계분석 결과는 Table 3에 나타내었으며, 통계분석 결과를 바탕으로 젖산 생산에 가장 큰 영향을 미치는 배지 조성으로 glucose (X_1 ,

99.06%), sucrose (X_2 , 99.68%), molasses (X_3 , 99.64%), peptone (X_5 , 99.49%)을 선별하였다. 일반적으로 젖산균은 EM 경로를 통해 젖산을 생산하기 위한 탄소원으로 glucose를 이용하며 [16], sucrose와 peptone은 *Lactobacillus* 속 미생물을 이용하여 젖산 생산을 위한 배지조성으로 큰 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다[3, 24]. 특히 molasses는 sucrose 제조 시 발생하는 부산물로 sucrose와 미생물 성장에 필요한 미네랄이 풍부한 동시에 합성배지에 비해 경제적이므로 산업적 이용면에서 매우 중요하다고 할 수 있으며[8, 24], 생물학적 젖산 생산 공정의 원료로서 연구가 진행되고 있다[5, 20].

Hybrid design을 이용한 배지성분의 농도 최적화

PBD 통계분석 결과에 의해 11개 배지성분 중 젖산 생산에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로 glucose, sucrose, molasses, peptone을 선정하였으며, 각 조성의 농도 최적화를 위한 방법으로 적은 실험으로 추정 하고자하는 모든 항을 추정할 수 있는 hybrid design [17]을 선택하여 설계하였다. 3개의 중심점을 포함한 19개 실험구에 의한 반응값을 Table 4에 나타내었으며, Design expert 12 program을 이용하여 각 독립변수와

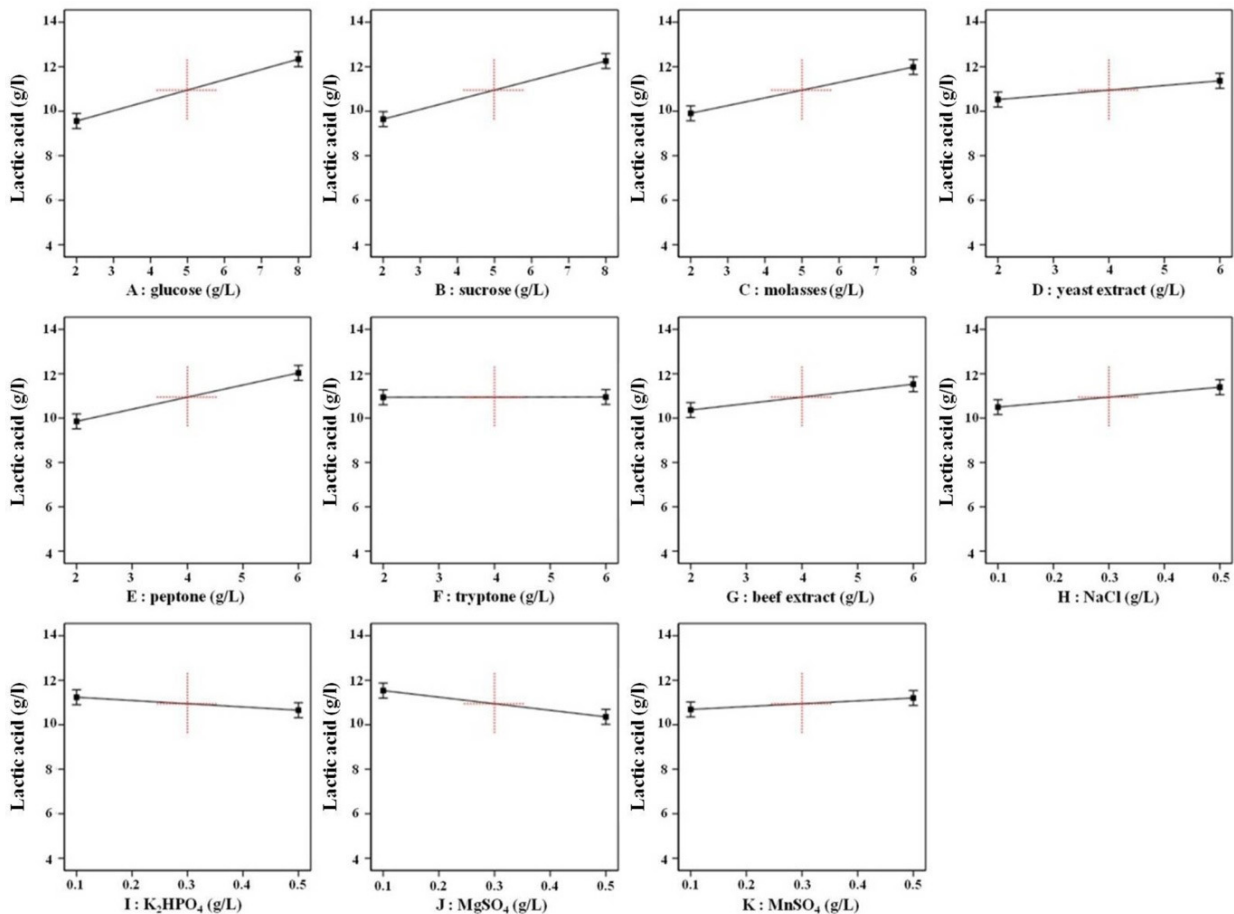


Fig. 3. Main effect plot for each variable on lactic acid production by *L. paracasei* SRCM201474. Stepper slope in the line illustrates the greater magnitude of the main effect.

Table 3. ANOVA (analysis of variance) for the experimental parameters of Plackett-Burman design affecting lactic acid production

Variables (Xi)	Effect (Exi)	Coefficient (βi)	Sum of squares	F-value	P-value	Confidence level (%)
Model	21.9	10.95	85.57	105.69	0.0094**	99.06
Glucose	2.78	1.39	23.2	315.13	0.0032**	99.68
Sucrose	2.62	1.31	20.47	278.09	0.0036**	99.64
Molasses	2.08	1.04	12.97	176.17	0.0056**	99.44
Yeast extract	0.8436	0.4218	2.13	29.00	0.0328*	96.72
Peptone	2.18	1.09	14.31	194.43	0.0051**	99.49
Tryptone	0.0104	0.0052	0.0003	0.0044	0.9530	4.7
Beef extract	1.1664	0.5832	4.08	55.45	0.0176*	98.24
NaCl	0.8994	0.4497	2.43	32.97	0.0290*	97.1
K2HPO4	-0.5822	-0.2911	1.02	13.82	0.0654	93.46
MgSO4	-1.1796	-0.5898	4.17	56.72	0.0172*	98.28
MnSO4	0.514	0.257	0.7929	10.77	0.0816	91.84

* : significant at $p < 0.05$
 ** : significant at $p < 0.01$

반응값(Y, lactic acid g/l)에 대한 회귀방정식을 아래와 같이 예측하였다.

$$Y = 3.24044 - 0.06419 * \text{glucose} - 0.021912 * \text{sucrose} + 0.401965 * \text{molasses} + 1.08803 * \text{peptone} - 0.000187 * \text{glucose} * \text{sucrose} - 0.000024 * \text{glucose} * \text{molasses} - 0.000399 * \text{glucose} * \text{peptone} - 0.000058 * \text{sucrose} * \text{molasses} - 0.000336 * \text{sucrose} * \text{peptone}$$

Table 4. Hybrid design quadratic polynomial model for lactic acid production an response values

Factors	Symbol (unit)	Level of coded variables				
		- α	-1	0	+1	+α
Glucose	X ₁ (g/l)	2.0575	15	40	65	77.9425
Sucrose	X ₂ (g/l)	2.0575	15	40	65	77.9425
Molasses	X ₃ (g/l)	2.0575	15	40	65	77.9425
peptone	X ₄ (g/l)	4.253	15.962	20	29.0675	45.9755

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	lactic acid (g/L)	
					predicted	Observed
1	0	0	0	0	25.7868	24.5378
2	0	0	1.518	-1.050	17.5737	17.5507
3	1	-1	-1	0.605	26.7422	26.9407
4	-1	1	-1	0.605	28.3441	28.5427
5	0	0	-1.518	-1.050	5.69556	5.67256
6	0	-1.518	0	-1.050	16.4489	16.4259
7	1.518	0	0	-1.050	14.6425	14.6198
8	0	0	0	0	25.7868	25.7989
9	0	0	0	0	25.7868	26.1568
10	-1.518	0	0	-1.050	17.7782	17.7552
11	0	1.518	0	-1.050	15.5628	15.5398
12	-1	-1	1	0.605	30.9174	31.116
13	-1	-1	-1	0.605	29.0385	28.8665
14	0	0	0	-0.269	23.6044	24.4867
15	1	1	-1	0.605	25.5791	25.407
16	1	1	1	0.605	27.2534	27.452
17	-1	1	1	0.605	30.0781	29.906
18	0	0	0	1.732	32.8207	32.8372
19	1	-1	1	0.605	28.5614	28.3893

X₁-X₄ represent respective assigned variables and response values.
 Predicted represents predicted response value by PBD design.
 Observed represents the experimental response value.

$$0.004876 * \text{molasses} * \text{peptone} + 0.000411 * \text{glucose} * \text{glucose} + 0.000269 * \text{sucrose} * \text{sucrose} - 0.002768 * \text{molasses} * \text{molasses} - 0.008985 * \text{peptone} * \text{peptone}$$

분산분석 결과 가정된 모델의 Prob>F 값이 0.0003으로 높은 유의성을 나타내었으며, 결정계수(R-square) 값이 0.9969로 실험모형의 적합도를 아주 잘 만족하는 것으로 나타났다(Table 5). 본 연구에서는 회귀방정식을 검증하기 위한 방법으로 적합성결여(lack of fit)를 사용하고 있으며, 적합성결여의 *p-value*가 0.5250으로 나타나 유의성을 판단하는 기준인 0.05보다 높아 적합성결여 결과가 유의하지 않으므로 실험모델이 회귀모형을 설명하는데 적합하다고 판단되었다[10]. 젖산 생산을 위한 배지조성으로 선별된 glucose, sucrose, molasses, peptone의 교호 효과를 분석하기 위해 3차원 반응표면도를 구하여 각 독립변수와 젖산 생산 사이의 상호관계를 평가하였다(Fig. 4). 설정범위 내에서 젖산 생산에 가장 큰 영향을 미치는 변수는 peptone이었으며, peptone과 molasses의 농도가 높아질수록 젖산 생산량이 증가하는 결과를 얻었다. 반응표면분석법으로 예측된 정상점을 안장점(saddle point)으로 젖산 최대 생산량을 예상한 결과 33.38 g/l로 분석되었으며, 이때의 각 배지조성별 농도는 glucose 15.48 g/l, sucrose 16.73 g/l, molasses

38.09 g/l, peptone 34.91 g/l로 나타났다.

실험모델의 검증

반응표면분석법에 의해 산출된 이론적 젖산 생산량을 검증하기 위해 실험모델에 의해 예측된 젖산 생산을 위한 최적 배지에 SRCM201474 균주를 접종하여 배양한 후 젖산 생산량을 측정하였다. 실제 최적조건하에서 3회 반복실험을 통한 젖산 생산량은 34.03±0.97 g/l로 이론적 예측값인 33.38 g/l와 매우 유사함을 확인하였으며, 이는 대조군으로 사용된 MRS에서 얻어진 농도의 193%의 증가를 보였다(Fig. 5). 생물학적 공정을 이용한 젖산 이성질체의 형태, 생산량 및 순도는 젖산 생산을 위한 미생물 또는 원료에 따라 크게 달라질 수 있는 것으로 알려져 산업적 사용 목적에 따라 다양한 젖산균과 원료를 이용한 연구가 진행되고 있다[1, 3, 11, 13]. 본 연구에서는 L(+)-젖산을 선택적으로 고생산하는 것으로 알려진 *L. paracasei* 균주를 선별하였으며, 통계학적 분석법을 활용하여 젖산 생산을 위한 배지 최적화를 수행하였다. 향후 산업적 적용을 위한 배양 온도 및 pH 등의 물리적 요인에 대한 추가적인 연구가 진행된다면 더 높은 젖산 생산이 가능할 것으로 판단된다.

Table 5. ANOVA for experimental results of the hybrid design (quadratic model)

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	p-value, Prob>F
Model	885.46	14	63.25	91.83	0.0003
X ₁	17.85	1	17.85	25.92	0.0070
X ₂	2.27	1	2.27	3.30	0.1436
X ₃	50.11	1	50.11	72.75	0.0010
X ₄	721.08	1	721.08	1046.90	0.0001
X ₁ X ₂	0.1098	1	0.1098	0.1594	0.7101
X ₁ X ₃	0.0018	1	0.0018	0.0026	0.9619
X ₁ X ₄	0.1787	1	0.1787	0.2594	0.6373
X ₂ X ₃	0.0105	1	0.0105	0.0152	0.9077
X ₂ X ₄	0.1273	1	0.1273	0.1848	0.6894
X ₃ X ₄	26.75	1	26.75	38.84	0.0034
X ₁ ²	0.6718	1	0.6718	0.9753	0.3793
X ₂ ²	0.2873	1	0.2873	0.4172	0.5535
X ₃ ²	30.53	1	30.53	44.33	0.0026
X ₄ ²	36.57	1	36.57	53.09	0.0019
Residual	2.76	4	0.6888		
Pure error	1.45	2	0.7233		
Cor total	888.21	18			
Residual	2.76	4	0.6888		
Lack of fit	1.31	2	0.6543	0.9047	0.5250
Pure error	1.45	2	0.7233		
Standard deviation		0.8299	Press		16069.09
Mean		23.58	R-squared		0.9969
Coefficient of variation (%)		3.52	Adjusted R-squared		0.9860

X₁: Glucose, X₂: Sucrose, X₃: Molasses, X₄: Peptone.

* : significant at *p*<0.05, ** : significant at *p*<0.01, ***: significant at *p*<0.001.

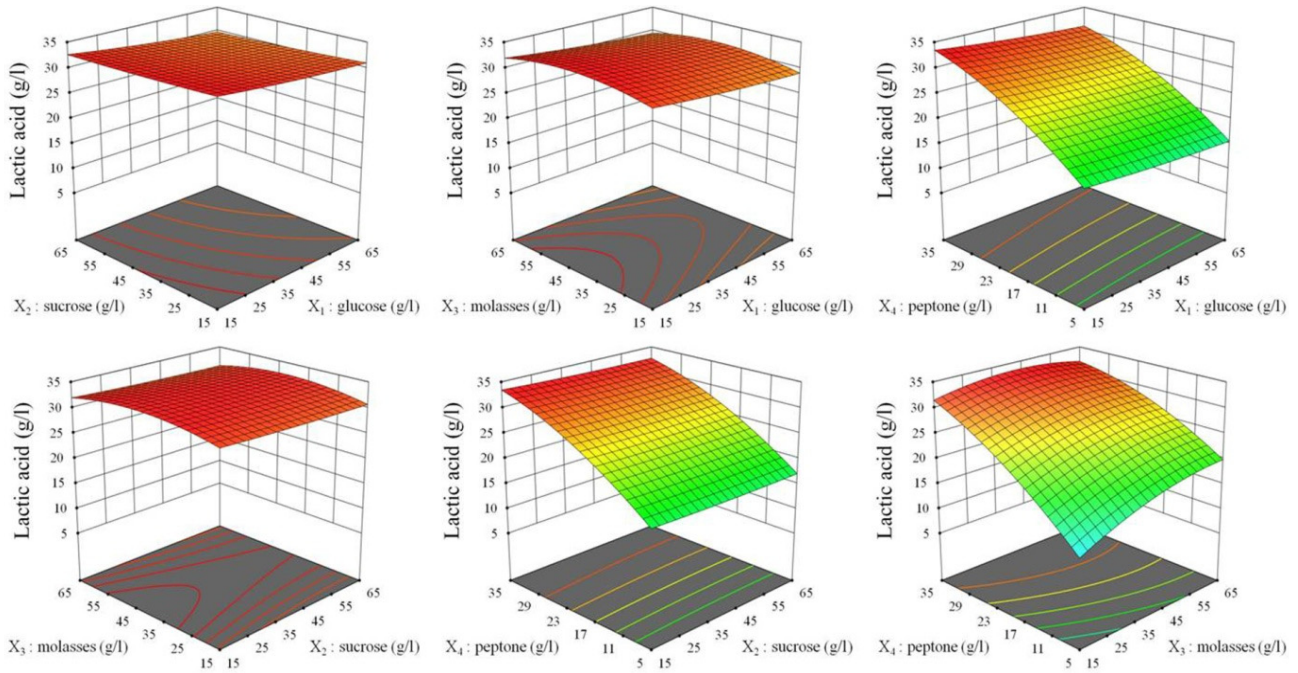


Fig. 4. The three-dimensional response surface plots of lactic acid production as predicted by the quadratic model. The effects of two independent variables on lactic acid production are simultaneously demonstrated.

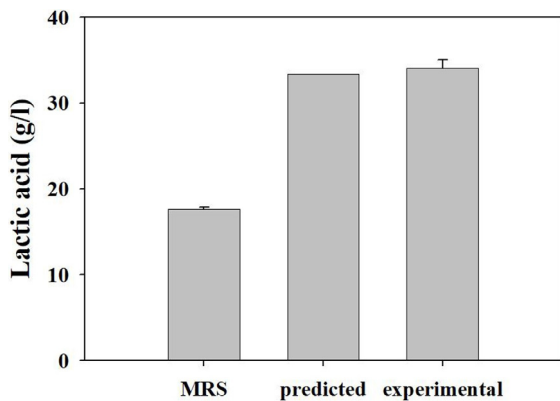


Fig. 5. Comparison of lactic acid production in different media, MRS (unoptimized medium) as well as comparing the model to experimental value. Data are presented as the mean ± SD.

감사의 글

본 연구는 2020년 산업통상자원부 산업기술거점기관지원 (한국형 유용균주, 과제번호: R0007073) 사업의 지원에 의해 수행된 것입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Ahn, S. J., Cayetano, R. D., Kim, T. H. and Kim, J. S. 2015. Lactic acid production from hydrolysate of pretreated cellulosic biomass by *Lactobacillus rhamnosus*. *Kor. Chem. Eng. Res.* **53**, 1-5.
- Bang, J. H., Shin, H. J., Choi, H. J., Kim, D. W., Ahn, C. S., Jeong, Y. K. and Joo, W. H. 2012. Probiotic potential *Lactobacillus* isolates. *J. Life Sci.* **22**, 251-258.
- Chauhan, K. T. and Patel, K. C. 2006. Application of response surface methodology for optimization of lactic acid production using date juice. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 1410-1415.
- Choi, J. I., Lee, H. S., Choi, S. K., Kim, J. H., Kim, J. K., Misawa, N., Byun, M. W. and Lee, J. W. 2009. Optimization of medium for axtaxanthin production by *Paracoccus* sp. using response surface methodology. *KSBB J.* **24**, 321-326.
- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J. and Gokhale, D. 2008. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 333-335.
- Ewaschuk, J. B., Naylor, J. M. and Zello, G. A. 2005. D-lactate in human and ruminant metabolism. *J. Nutr.* **135**, 1619-1625.
- Ha, G. S., Shin, S. J., Jeong, S. Y., Yang, H. Y., Im, S. A., Heo, J. H., Yang, H. J. and Jeong, D. Y. 2019. Optimization of medium components using response surface methodology for cost-effective mannitol production by *Leuconostoc mesenteroides* SRCM201425. *J. Life Sci.* **29**, 861-870.

8. Ha, G. S., Yang, H. J., Jeong, S. J., Ryu, M. S., Kim, J. W., Yang, H. Y., Shin, S. J., Im, S. A., Seo, J. W., Jeong, S. Y. and Jeong, D. Y. 2018. Medium optimization for enhanced growth of *Bacillus subtilis* SRCM102046 possessing antibacterial activity using response-surface methodology. *Kor. J. Food Preserv.* **25**, 613-624.
9. Jeong, S. J., Yang, H. J., Ryu, M. S., Seo, J. W., Jeong, S. Y. and Jeong, D. Y. 2018. Statistical optimization of culture conditions of probiotic *Lactobacillus brevis* SBB07 for enhanced cell growth. *J. Life Sci.* **28**, 577-586.
10. Kim, D. S. and Park, Y. S. 2014. Optimization of gas mixing-circulation plasma process using design of experiments. *J. Environ. Sci. Int.* **23**, 359-368.
11. Kim, K. A., Kim, M. G., Jang, K. L. and Jun, H. K. 2003. Production of L-lactic acid from soluble starch by *Enterococcus* sp. JA-27. *J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 250-256.
12. Lee, K. W., Park, H. S. and Kim, Y. H. 2010. Crystallization behavior and thermal property of poly(D-lactic acid-b-L-lactic acid). *Text. Sci. Eng.* **47**, 406-413.
13. Mirdamadi, S., Sadeghi, H., Sharafi, N., Fallahpour, M., Mohseni, F. A. and Bakhtiari, M. R. 2002. Comparison of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains. *Iran. Biomed. J.* **6**, 69-75.
14. Moon, S. K., Wee, Y. J. and Choi, G. W. 2012. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 155-159.
15. Oh, E. J., Yang, J. A., Yang, S. Y., Kim, J. K. and Han, S. K. 2007. Drug delivery system for protein drugs. *Polym. Korea* **18**, 444-449.
16. Papagianni, M. 2012. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **3**, e201210003.
17. Roquemore, K. G. 1976. Hybrid designs for quadratic response surfaces. *Technometrics* **18**, 419-423.
18. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
19. Sim, H. S. and Kim, M. D. 2015. Characteristics of lactic acid production by *Lactobacillus buchmeri* isolated from Kimchi. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**, 286-290.
20. Srivastava, A. K., Tripathi, A. D., Jha, A., Poonia, A. and Sharma, N. 2015. Production, optimization and characterization of lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 from utilizing agro-industrial byproduct (cane molasses). *J. Food Sci. Technol.* **52**, 3571-3578.
21. Stefanovic, E. and McAuliffe, O. 2018. Comparative genomic and metabolic analysis of three *Lactobacillus paracasei* cheese isolates reveals considerable genomic differences in strains from the same niche. *BMC Genomics* **19**, 205.
22. Vijayakumar, J., Aravindan, R. and Viruthagiri, T. 2008. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **22**, 245-264.
23. Vodnar, D. C., Venus, J., Schelder, R. and Socaciu, C. 2010. Lactic acid production by *Lactobacillus paracasei* 168 in discontinuous fermentation using lucerne green juice as nutrient substitute. *Chem. Eng. Technol.* **33**, 468-474.
24. Wee, Y. J., Kim, J. N., Yun, J. S., Park, D. H., Kim, D. M. and Ryu, H. W. 2004. Fed-batch culture of *Enterococcus faecalis* RKY1 for L(+)-lactic acid production. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 410-414.
25. Yun, J. S., Moon, S. K., Wee, Y. J. and Ryu, H. W. 2003. Biotechnological production and industrial applications of lactic acid. *KSBB J.* **4**, 64-68.

초록 : 반응표면분석법을 이용한 *Lactobacillus paracasei* SRCM201474의 생산배지 최적화

하광수 · 김진원 · 임수아 · 신수진 · 양희중 · 정도연*

((재)발효미생물산업진흥원)

본 연구는 반응표면분석법을 이용하여 L(+)형 젖산 생산향상을 위한 배지조성을 확립하기 위해 수행되었다. L(+)형 젖산을 선택적으로 고생산하는 것으로 알려진 9종의 *Lactobacillus paracasei* 균주를 전국에서 수집한 김치 시료로부터 선별하였으며, 젖산 생산량과 glucose로부터의 전환률 분석을 통하여 젖산 생산 배지 최적화를 수행하기 위한 균주로 SRCM201474를 선발하였다. 선택된 11개의 배지 조성 중 젖산 생산에 가장 큰 영향을 미치는 요인을 분석하기 위한 방법으로 Plack-Burman design (PBD)을 설계하였으며, 통계분석을 통해 탄소원으로는 glucose, sucrose, molasses, 질소원으로는 peptone을 최종 선정하였다. 젖산 생산 배지 최적화를 위한 각 변수들의 농도 최적화를 수행하기 위한 방법으로 반응표면분석법 중 적은 실험수로도 최적값을 산출할 수 있는 hybrid design 설계 하였다. 실험 모델에 의한 *L. paracasei* SRCM201474 균주를 이용한 젖산 생산배지 조성의 최적 농도는 glucose 15.48 g/l, sucrose 16.73 g/l, molasses 39.09 g/l, peptone 34.91 g/l로 나타났으며, 이때의 젖산 생산량은 33.38 g/l로 예측되었다. ANOVA 분석을 통해 가정된 실험 모델의 적합성과 유의성을 확인하였으며, 최종적으로 분석된 최적배지에서의 반복실험을 통한 젖산 생산량을 측정하여 모델에 의해 예측된 젖산생산량과 동일함을 검증하였다. 본 연구를 통해 L(+)형 젖산을 선택적으로 고생산하는 균주를 선발하였으며, 배지 최적화를 수행하여 생분해성 플라스틱 생산을 위한 산업적 젖산 생산에 적용할 수 있는 연구자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.