

Optimization of the Indole-3-Acetic Acid Production Medium of *Pantoea agglomerans* SRCM 119864 using Response Surface Methodology

Ho Jin Jeong, Gwangsu Ha, Su Ji Jeong, Myeong Seon Ryu, JinWon Kim, Do-Youn Jeong and Hee-Jong Yang*

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

Received September 13, 2022 / Revised October 21, 2022 / Accepted October 21, 2022

In this study, we optimized the composition of the indole-3-acetic acid (IAA) production medium using response surface methodology on *Pantoea agglomerans* SRCM 119864 isolated from soil. IAA-producing *P. agglomerans* SRCM 119864 was identified by 16S rRNA gene sequencing. There are 11 intermediate components known to affect IAA production, hence the effect of each component on IAA production was investigated using a Plackett-Burman design (PBD). Based on the PBD, sucrose, tryptone, and sodium chloride were selected as the main factors that enhanced the IAA production at optimal L-tryptophan concentration. The predicted maximum IAA production (64.34 mg/l) was obtained for a concentration of sucrose of 13.38 g/l, of tryptone of 18.34 g/l, of sodium chloride of 9.71 g/l, and of L-tryptophan of 6.25 g/l using a the hybrid design experimental model. In the experiment, the nutrient broth medium supplemented with 0.1% L-tryptophan as the basal medium produced 45.24 mg/l of IAA, whereas the optimized medium produced 65.40 mg/l of IAA, resulting in a 44.56% increase in efficiency. It was confirmed that the IAA production of the designed optimal composition medium was very similar to the predicted IAA production. The statistical significance and suitability of the experimental model were verified through analysis of variance (ANOVA). Therefore, in this study, we determined the optimal growth medium concentration for the maximum production of IAA, which can contribute to sustainable agriculture and increase crop yield.

Key words : Indole-3-acetic acid, optimization, *Pantoea agglomerans*, response surface methodology

서 론

농림축산식품부의 농림축산식품 주요통계에 따르면 2020년 기준 대한민국 식량자급률은 45.8%, 곡물자급률은 20.2%로 OECD 국가 중 가장 낮은 수치를 보였으며 [22], 2021년 식량안보순위는 세계 113개국 중 32위 수준을 기록했다[10]. 이는 이상기후 및 코로나19 등의 돌발적 위기 상황 발생시 식량 안보에 영향을 미칠 수 있으며, 세계적 식량 위기가 다가오면 큰 피해를 입을 가능성이 높다는 것을 의미한다[3]. 2020년 이후로 코로나19의 확산과 국제 경제 분쟁 등 다양한 요인으로 많은 해외국가들의 일시적 수출 규제가 일어났으며, 이러한 수출 규제에 인해 식량 물가 상승 및 식품원료의 중대한 공급 부족의 문제를 초래하였다[9]. 국토 이용률은 높고 농경 면적은

협소한 우리나라의 경우 계절적 환경 영향으로 기존의 농업 방식을 통한 생산성 향상은 어렵지만, 농업 환경 개선과 작물의 생육 증진을 위해 석탄회를 이용한 토양개질제[21], 액비[8], 미생물제제[17] 등의 연구가 지속적으로 진행되고 있다.

농업 분야에서의 미생물제제는 식물생장촉진미생물(PGPR, plant growth-promoting rhizobacteria)을 활용한 제제로 탄소의 배출을 줄일 수 있고 친환경적인 수단이라는 이점을 갖고있어 지속가능한 농업의 일환으로 무기농업에서 유기농업 전환을 기대하는 현대의 농업 발전 방향에 부합할 것으로 예상된다[2, 16]. 현재까지 알려진 식물생장촉진 미생물은 *Acinetobacter* 속, *Agrobacterium* 속, *Bacillus* 속, *Pantoea* 속, *Pseudomonas* 속 등이 있으며, 인산 및 양분 가용화, 질소고정, 식물병원균과의 길항작용, indole-3-acetic acid (IAA), gibberelins, cytokinins 같은 식물호르몬의 생산 등 다양한 기작을 통해 식물생장을 직, 간접적으로 보조하는 것으로 알려져있다[4, 13, 15, 18, 31].

특히 IAA는 식물체 내에서 자연적으로 합성되며 세포 분열과 신장, 조직 분화, 주광성 및 굴지성 등 식물의 발달 과정에서 중요하게 작용하는 중요한 auxin 호르몬으로[4], Kwon과 Song [19]은 IAA를 생산하는 *Acinetobacter* sp. SW5

*Corresponding author

Tel : *** - **** - **** Fax : +82-63-650-9590

E-mail : godfiltss@naver.com

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.

균주를 토마토에 처리하였을 때, 새싹 길이, 뿌리 길이 및 습윤중량이 각각 26.3, 33.3, 105.3% 증가하였다는 연구결과를 보고하였고, Kang 등[14]은 IAA를 생산하는 *Rhodobacter sphaeroides* KE149 균주의 상등액을 꺾은 채 처리하였을 때, 새싹의 길이와 중량, 뿌리의 길이와 중량, 직경이 일반, 홍수 및 가뭄 스트레스 조건에서 모두 증가할 뿐만 아니라 chlorophyll 함량과 Ca, K, Mg와 같은 양이온 함량이 향상됨을 조사를 통해 보고하였다.

농업 생산성 향상에 기여할 수 있는 유용물질인 IAA를 산업화에 적용하기 위해서는 대량생산이 필수적이며, 미생물이 생산하는 대사산물은 물리적 조건이나 배양 시간 및 배지 조성 등의 변화를 통해 생산효율을 향상시킬 수 있어 대량생산을 위한 생산배지 최적화 연구가 필요하다[12]. 기존 IAA 생산배지 최적화 방법은 전통적인 최적화 방법인 OFAT법(One factor at a time method)을 통한 연구가 대부분이며[4, 20, 29], OFAT법은 다양한 독립변수들 간의 상관관계를 파악하기 어려우며, 많은 시간과 비용이 소비되는 단점을 가지고 있어 이를 보완한 방법으로는 통계학적 기법인 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)이 있다[6].

따라서 본 연구는 농업 생산 향상에 기여할 수 있는 식물생장촉진물질인 IAA 생산성이 탁월한 미생물을 분리하고, 통계학적 기법인 반응표면분석법을 기반으로 IAA 생산에 영향을 미치는 배지 성분을 결정하고, 선별된 배지 성분들의 IAA를 생산하기 위한 최적 농도를 조사하여 산업화를 위한 배지조건 및 기초자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

미생물의 분리과 보관

미생물 분리를 위해 전국에서 토양 10종을 수집하였고, 0.85% sodium chloride 용액 9 ml에 수집한 시료 1 g을 현탁하여 단계희석을 하였으며, 각 희석액 100 μ l를 Nutrient Agar (NA, DifcoTM, MI, USA) 배지에 평판도말하여 30°C 조건에서 24 hr 배양하였다. 배양 후 평판배지 위에 형성된 각각의 단일집락을 선별하여 희석도말을 통해 순수분리한 후, 멸균된 20% glycerol에 균체를 현탁하여 -80°C에서 보관하여 다음 연구에 사용하였다.

IAA 생산균주의 동정 및 계통학적 분석

분리한 IAA 생산 균주의 동정을 위하여 27F forward primer (5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3')와 1492R reverse primer (5'-GGTTACCTTGTTACGA CTT-3')를 사용하여 16s rRNA 서열을 증폭시켰으며, 미국 국립생물정보센터(NCBI, national center for biotechnology information)의 nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)로

부터 높은 유사도를 나타내는 표준균주들의 16S rRNA 유전자 서열을 확보한 뒤, Clustal W 2.0 (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, UK)을 이용하여 표준균주들과 염기서열 간 상동성 분석을 수행하였다. 분석 결과를 토대로 Mega 7.0.26 program을 이용하여 근린결합법(Neighbor joining method) [25]을 통해 계통수를 작성하였다.

IAA 고생산 균주의 선별

IAA 생산량이 높은 균주를 선별하기 위하여 IAA의 전구체로 알려진 L-tryptophan (Sigma-aldrich, MO, USA) [27]을 Nutrient broth (NB, DifcoTM, MI, USA) 배지에 0.1%가 되도록 용해시켜 멸균하였다. 각 분리균주를 NB 배지에 배양하여 흡광도가 0.2가 되도록 조정된 뒤 0.1% L-tryptophan 함유 NB 배지에 1% 접종하여 30°C, 150 rpm 및 암조건[28]에서 24 hr 진탕배양하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였으며, 0.2 μ m syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany)로 여과한 상등액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다.

SRCM 119864의 배양시간에 따른 IAA 생산량 및 균주 성장 조사

IAA 고생산 균주로 최종 선별한 *Pantoea agglomerans* SRCM 119864 균주의 성장 및 IAA 생산량을 조사하기 위해 0.1% L-tryptophan이 함유된 100 ml의 NB 배지에 흡광도를 0.2로 조정된 전배양액을 1% 접종하여 30°C, 150 rpm 및 암조건에서 48 hr 동안 진탕 배양하였으며, 4 hr 마다 배양액을 회수하여 흡광도와 IAA 생산량을 조사하였다. 흡광도의 측정은 배양액을 회수하여 microplate reader (Elisa reader, Infinite 200, Tecan, GD, AUT)를 사용하여 600 nm에서 측정하였고, IAA 생산량 측정을 위한 HPLC (Agilent Technologies 1200 series, CA, USA)를 사용하였으며, HPLC column으로 CAPCELL PAK C18 UG120 S5 (Shiseido, TK, JPN, 5 μ l \times 4.6mm.I.D \times 250mm)을 이용하였으며, column의 온도는 40°C로 설정하였다. 이동상은 Methanol, Acetic acid, Water를 각각 58, 0.3, 41.7 비율로 혼합한 용매를 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 흘러주었다. 시료 20 μ l를 injection한 이후 30분 간 형광검출기(FLD, Fluorescence detector, G1321A, Agilent Technologies 1200 series, CA, USA)을 사용하여 emission 230 nm, excitation 360 nm 조건에서 IAA 검출하였다.

Plackett-Burman design (PBD) 설계를 통한 IAA 생산 배지 성분의 선별

P. agglomerans SRCM 119864의 IAA 최적 생산을 위한 배지 성분을 선별하기 위하여 Plackett-Burman design (PBD)을 설계하였다. IAA의 전구체로 알려진 L-tryptophan 이외에 IAA 생산에 영향을 주는 성분으로 조사된[1, 4, 20, 23]

배지 성분 glucose, sucrose, galactose, yeast extract, peptone, tryptone, beef extract, sodium nitrate, potassium nitrate, ammonium sulfate, sodium chloride 11종을 독립변수로 선정하고, *P. agglomerans* SRCM 119864의 IAA 생산에 주요한 효과를 가지는 구성성분을 조사하기 위해 3개의 수준(-1, 0, +1)으로 고농도, 중심점, 저농도 수준을 설정하였다. 3개의 중심점을 포함하여 L-tryptophan이 0.1% 포함된 15개의 실험구를 구성하였으며, 종속변수로써 IAA 생산량(Y, mg/l)을 설정하였다(Table 2). 실험계획과 통계분석은 Design expert 12 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) program을 이용하여 수행하였다.

Hybrid design을 활용한 IAA 생산 배지 성분의 농도 최적화

설계된 PBD 실험 결과를 통해 IAA 생산에 주요한 효과를 가지는 3개의 독립변수로 sucrose, tryptone, sodium chloride로 선별되었으며, 선별된 3개의 독립변수와 L-tryptophan의 최적 농도를 조사하기 위해 통계학적 분석법 [24]인 hybrid design을 통해 실험 모형을 설계하였다. 4개의 각 독립변수 sucrose (X_1), tryptone (X_2), sodium chloride (X_3), L-tryptophan (X_4)를 5개의 수준(- α , -1, 0, +1, + α)으로 고농도, 중심점, 저농도 수준을 설정하였으며, 3개의 중심점을 포함하여 19개의 실험구를 구성하였다. 각각의 실험구에 흡광도를 0.2로 조정된 *P. agglomerans* SRCM 119864의 전배양액 1%를 접종하여 배양하였으며, *P. agglomerans* SRCM 119864의 IAA 생산에 대한 4개의 독립변수의 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 IAA 생산량(mg/l)을 나타내는 종속변수, X_i 는 각 독립변수, β_0 는 상수계수, β_i , β_{ii} , β_{ij} 는 각 독립변수간의 상

호작용 계수를 나타낸다[11]. 회귀분석에 의한 실험 모형식은 Design expert 12 program을 사용하여 예측하였으며, ANOVA 분석을 통해 실험 모형의 통계적 유의성을 검증하고 IAA의 최대 생산을 위한 4개의 변수들의 최적 농도를 예측하였다.

결과 및 고찰

IAA 생산을 위한 균주 선발과 16S rRNA 유전자 서열 분석을 통한 동정

IAA의 생산은 여러 세균에서 발견되며 대부분 L-tryptophan을 전구체로 하여 tryptophan side-chain oxidase, amino transferase, tryptamine decarboxylase 등 다양한 효소들에 의한 여러 대사경로를 통해 생성되는 것으로 알려져 있다[27]. 수집한 10종의 토양 시료로부터 근권세균을 순수 분리하였으며, 분리균주를 L-tryptophan이 0.1%가 함유된 NB 배지에서 30°C, 150 rpm 및 암조건에서 24 hr 배양하여 IAA의 총 생산량과 균주 성장에 따른 IAA 생산량을 분석하였다. 28주의 배양상등액에 IAA가 검출되었으나 이 중 26주는 IAA 생산량이 6 mg/l 이하로 나타났다. IAA 생산이 가능한 균주 중 SRCM 119864 균주가 총 생산량과 균주 성장 대비 생산량이 각각 44.05, 384.13 mg/l로 가장 높아 해당 균주를 최종 선발하였다(Table 1). 최종 선발한 SRCM 119864 균주의 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열 1,474 bp를 이용하여 NCBI의 GenBank에 등록된 표준 균주들 간의 염기서열 상동성을 비교한 결과, *Pantoea agglomerans* DSM3493가 99.59%의 가장 높은 유사도를 보여주었다. 그리고 근린결합법 기반의 evolutionary distance 추론을 통해 계통학적 분석을 진행하였고 계통수의 신뢰도를 높이기 위하여 1,000회 bootstrap을 수행하였으며, 최종 선발균주를 *Pantoea agglomerans* SRCM 119864로 명명

Table 1. Results of IAA production by superior 10 isolates of soil sample in NB supplemented with 1 g/l of L-tryptophan medium

Microorganisms	Isolation source (soil)	NB supplemented with 1 g/l of L-tryptophan		
		Y (mg/l)	O.D ₆₀₀	Y/O.D ₆₀₀
<i>Pantoea agglomerans</i> SRCM 119864	Spinach	44.05	0.11	384.13
<i>Leclercia adecarboxylata</i> SRCM 116119	Forest poppy	18.78	0.13	147.18
<i>Bacillus megaterium</i> SRCM 120246	Ginseng	5.75	0.28	20.80
<i>Bacillus megaterium</i> SRCM 120095	Soybean	4.84	0.19	24.93
<i>Bacillus megaterium</i> SRCM 119768	Peony root	4.72	0.22	21.32
<i>Bacillus megaterium</i> SRCM 120269	Ginseng	4.63	0.25	18.88
<i>Bacillus megaterium</i> SRCM 116713	Onion	4.10	0.23	17.64
<i>Bacillus megaterium</i> SRCM 120061	Sankes beard	3.87	0.18	21.72
<i>Bacillus megaterium</i> SRCM 116716	Onion	3.72	0.28	13.15
<i>Bacillus megaterium</i> SRCM 116708	Blueberry	3.66	0.21	17.14

Y: Accumulated IAA concentration

O.D₆₀₀: Absorbance at 600 nm

Y/O.D₆₀₀: IAA concentration pre optical density of sample at 600 nm

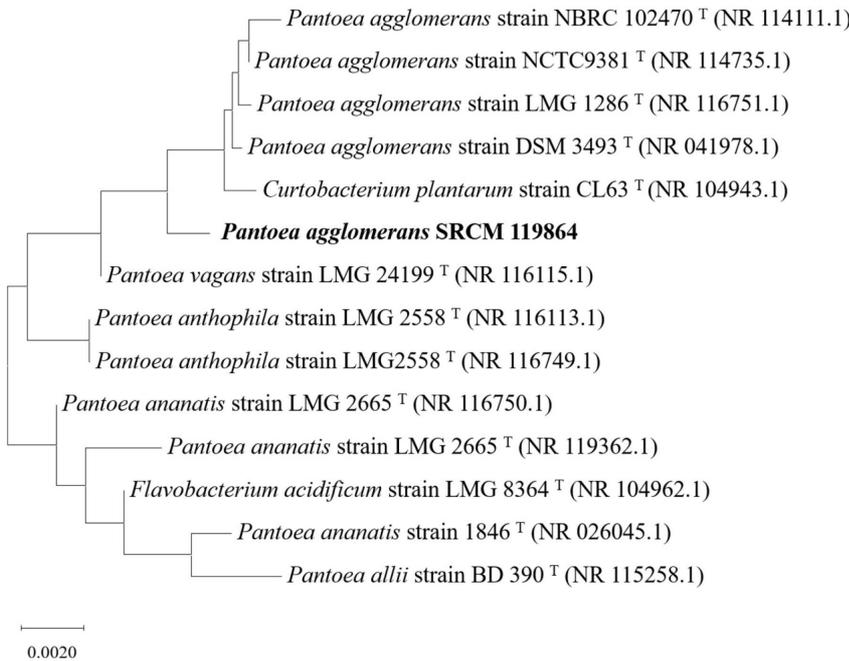


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree constructed using 16S rRNA gene of *P. agglomerans* SRCM 119864. The bootstrap values were calculated based on 1,000 replications of maximum-likelihood analysis to estimate the topological robustness.

하였다(Fig. 1).

***P. agglomerans* SRCM 119964의 배양시간에 따른 IAA 생산량 및 균주 성장 조사**

P. agglomerans SRCM 119864 균주를 L-tryptophan이 0.1% 포함된 NB 액체배지 100 ml에 접종하여 48 hr 동안 30°C, 150 rpm 및 암조건에서 배양하였으며 4 hr 마다 배양액을 회수하여 균주 성장과 IAA 생산량을 조사하였다(Fig. 2). 균주 성장의 경우, 배양 8 hr까지 급격한 성장을 보여주는 대수기를 나타내었고 12 hr 이후로 점차 성장이 느려져 24 hr 이후 사멸기에 도달하는 것으로 조사되었다. IAA 생산량 또한 균주 성장과 유사하게 배양 8 hr까지

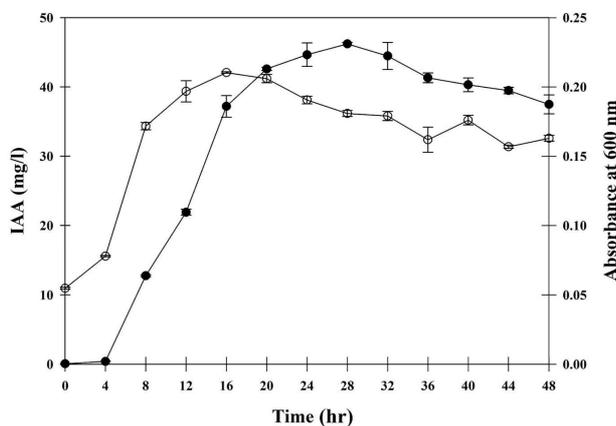


Fig. 2. Time course profile of IAA production by *P. agglomerans* SRCM 119864 in NB with 0.1% L-tryptophan. ●: IAA (mg/l), ○: Absorbance at 600 nm.

급격히 증가하였으나, 12 hr 이후로 균주 성장이 느려진 것과 달리 IAA 생산량은 20 hr까지 생산량 증가가 유지되었고 24 hr부터 IAA 생산량의 증가가 서서히 감소하다 28 hr에 최고 생산량을 보여주었다. 따라서 IAA 최적 생산을 위한 *P. agglomerans* SRCM 119864의 배양시간을 28 hr으로 설정하였다.

Plackett-Burman design (PBD)을 이용한 IAA 생산 배지의 성분 선별

P. agglomerans SRCM 119864 균주의 IAA 생산에 전구체인 L-tryptophan 이외에 영향을 미치는 배지의 조성 성분을 조사하기 위해 PBD를 이용하여 실험을 설계하였다. L-tryptophan 이외에 IAA 생산에 영향을 미치는 것으로 조사된 11개의 독립변수들의 각각의 중심값으로부터 고농도와 저농도 수준을 glucose, sucrose, galactose는 1.1±1 g/l로, yeast extract, peptone, tryptone, beef extract는 3.6±3.5 g/l로, sodium nitrate, potassium nitrate, ammonium sulfate는 0.6±0.5 g/l로, sodium chloride는 2.6±2.5 g/l로 설정하였으며, 설계된 모든 실험구에 L-tryptophan이 0.1% 함유되도록 구성된 뒤, 독립변수 별로 IAA 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 3개의 중심점을 포함한 15개의 실험구에 대한 IAA 생산량(Y, mg/l)을 Table 2에 나타내었으며, 각 독립변수 별로 농도별 수준에 따라 IAA 생산에 미치는 영향을 보여주는 plot을 Fig. 3에 나타내었다. 농도 수준 설정 범위 내에서 sucrose, peptone, tryptone, sodium chloride의 농도 수준이 증가함에 따라 *P. agglomerans* SRCM 119864의 IAA 생산량이 증가하는 추세를 나타내었고, 다른 성분들은 농도 수준이 올라갈수록 *P. agglomerans* SRCM

Table 2. 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)	0.1	1.1	2.1
Calactose	X ₃ (g/l)			
Yeast extract	X ₄ (g/l)			
Peptone	X ₅ (g/l)			
Tryptone	X ₆ (g/l)	0.1	3.6	7.1
Beef extract	X ₇ (g/l)			
NaNO ₃	X ₈ (g/l)			
KNO ₃	X ₉ (g/l)	0.1	0.6	1.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	X ₁₀ (g/l)			
NaCl	X ₁₁ (g/l)	0.1	2.6	5.1

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	IAA (mg/l)	
												Predicted	Observed
1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	11.53	11.53
2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	54.51	54.51
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30.29	31.19
4	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	49.06	49.06
5	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	26.20	26.20
6	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	57.82	57.82
7	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	25.13	25.13
8	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	21.20	21.20
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30.29	30.78
10	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	13.33	13.33
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30.29	29.98
12	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	28.09	28.09
13	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	13.05	13.05
14	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	24.93	24.93
15	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	38.67	38.67

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

119864의 IAA 생산량이 감소하는 것으로 나타내었다. 종속변수에 대한 독립변수들의 영향과 유의성 등의 통계분석 결과를 Table 3에 나타내었으며, 해당 결과를 바탕으로 IAA 생산에 주요한 효과를 가지는 배지 성분으로 sucrose (X₂, 99.75%), tryptone (X₆, 99.6%), sodium chloride (X₁₁, 99.43%)를 선별하였다. 탄소원과 질소원의 경우, 같은 종이라도 균주에 따라 선호하는 배지 성분이 다양하였으나 [1, 29], Silini-Chérif 등[26]과 Bhise와 Dandge [5]에 의하면 기존에 연구된 다른 *Pantoea agglomerans* 균주의 경우 내염성 및 호염성을 가져 sodium chloride의 존재 하에 인산 가용화 및 IAA 생산 등 식물생장촉진활성이 향상된다고 보고하였으며, 이번 연구결과 또한 농도 수준 설정 범위 내에서 sodium chloride의 농도 수준이 올라갈수록 IAA 생산에 긍정적인 영향을 미치는 것이 확인할 수 있었다.

Hybrid design을 활용한 배지 성분의 농도 최적화

PBD 통계분석을 통해 얻은 결과를 기반으로 선별한 sucrose, tryptone, sodium chloride 3종과 전구체인 L-tryptophan의 농도를 최적화기 위해 hybrid design [24]을 선택하여 실험 모형을 설계하였다. 3개의 중심점을 포함한 19개의 실험구에 대한 IAA 생산량을 Table 4에 정리하였으며, Design expert 12 program을 사용하여 각 독립변수와 종속변수에 대한 회귀방정식을 다음과 같이 예측하였다.

$$\begin{aligned}
 Y = & -79.15865 + 2.82781 \times \text{sucrose} + 5.61240 \times \text{tryptone} \\
 & + 13.34502 \times \text{sodium chloride} + 2.66589 \times L - \text{tryptophan} \\
 & - 0.004891 \times \text{sucrose} \times \text{tryptone} - 0.014612 \times \text{sucrose} \\
 & \times \text{sodium chloride} + 0.114957 \times \text{sucrose} \times L \\
 & - \text{tryptophan} + 0.018940 \times \text{tryptone} \times \text{sodium chloride} \\
 & - 0.016429 \times \text{tryptone} \times L - \text{tryptophan} + 0.038493
 \end{aligned}$$

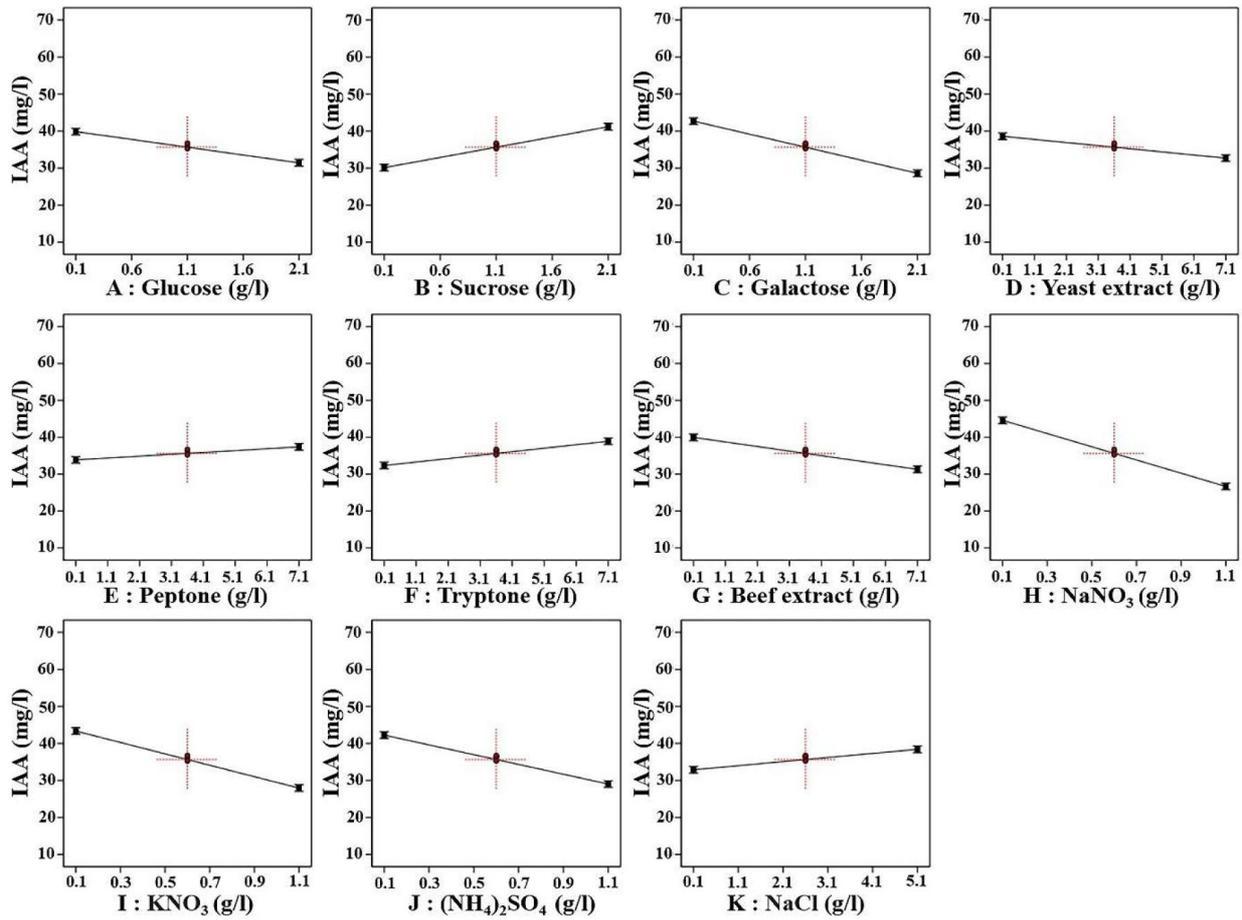


Fig. 3. Main effect plot for each variable on IAA production by *P. agglomerans* SRCM 119864. Steeper slope in the line shows the greater magnitude of the main effect.

Table 3. ANOVA variance analysis for coefficients of Plackett-Burman design affecting IAA production

Variables (X_i)	Effect (E_{xi})	Coefficient (β_i)	Sum of squares	F-value	P-value	Confidence level (%)
Model	71.28	35.64	3962.80	685.14	0.0015**	99.85
Glucose	-8.44	-4.22	213.60	406.23	0.0025**	99.75
Sucrose	11.04	5.52	365.91	695.89	0.0014**	99.86
Galactose	-14.10	-7.05	596.87	1135.13	0.0009***	99.91
Yeast extract	-5.90	-2.95	104.09	197.96	0.0050**	99.50
Peptone	3.52	1.76	37.18	70.71	0.0138*	98.62
Tryptone	6.56	3.28	129.29	245.89	0.0040**	99.6
Beef extract	-8.66	-4.33	224.86	427.65	0.0023**	99.77
NaNO ₃	-17.92	-8.96	963.38	1832.16	0.0005***	99.95
KNO ₃	-15.4	-7.70	712.03	1354.15	0.0007***	99.93
(NH ₄) ₂ SO ₄	-13.22	-6.61	524.08	996.71	0.0010**	99.90
NaCl	5.52	2.76	91.50	174.02	0.0057**	99.43

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

× sodium chloride × L - tryptophan - 0.123937
 × sucrose × sucrose - 0.153479 × tryptone × tryptone
 - 0.707166 × sodium chloride × sodium chloride
 - 0.342142 × L - tryptophan × L - tryptophan

ANOVA 분석 결과를 통해 실험 모형의 p-value 값이 0.0001보다 낮아 높은 통계적 유의성을 가진 것이 확인 되었으며, 결정계수(R-square)의 값이 0.9996로 산출되어 설계된 실험 모형이 높은 적합도를 나타내었다(Table 5).

Table 4. Hybrid design quadratic polynomial model for IAA production and response values

Factors	Symbol (unit)	Level of coded variables				
		- α	-1	0	+1	+ α
Sucrose	X ₁ (g/l)	2.3407	7	16	25	29.6593
Trytone	X ₂ (g/l)	1.04645	7	18.5	30	35.95355
NaCl	X ₃ (g/l)	2.4115	5	10	15	17.5885
L-tryptophan	X ₄ (g/l)	0.6514	6.1156	8	12.2315	20.1219

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	IAA (mg/l)	
					Predicted	Observed
1	-1	-1	+1	+1	4.53	5.09
2	-1	+1	+1	+1	4.12	3.54
3	-1	-1	-1	+1	7.50	6.92
4	0	0	0	0	62.90	62.34
5	0	0	0	0	62.90	63.00
6	+1	+1	+1	+1	2.36	2.92
7	0	0	0	0	62.90	64.00
8	+1	-1	+1	+1	4.79	4.21
9	0	0	0	+ α	1.86	1.85
10	-1	+1	-1	+1	2.74	3.30
11	0	0	+ α	- α	5.25	5.27
12	- α	0	0	- α	45.59	45.60
13	0	+ α	0	- α	4.79	4.81
14	+ α	0	0	- α	10.07	10.09
15	+1	+1	-1	+1	3.61	3.03
16	0	- α	0	- α	3.60	3.62
17	0	0	0	-1	63.36	62.72
18	+1	-1	-1	+1	10.39	10.95
19	0	0	- α	- α	15.21	15.23

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

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

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
Model	11074.32	14	791.02	694.11	< 0.0001
X ¹	211.52	1	211.52	185.60	0.0002***
X ²	12.51	1	12.51	10.98	0.0296*
X ³	44.03	1	44.03	38.63	0.0034**
X ⁴	487.21	1	487.21	427.52	< 0.0001
X ¹ X ²	2.05	1	2.05	1.80	0.2509
X ¹ X ³	3.46	1	3.46	3.04	0.1564
X ¹ X ⁴	419.63	1	419.63	368.22	< 0.0001
X ² X ³	9.49	1	9.49	8.33	0.0448*
X ² X ⁴	13.99	1	13.99	12.28	0.0248*
X ³ X ⁴	14.52	1	14.52	12.74	0.0234*
X ₂ ¹	1028.20	1	1028.20	902.24	< 0.0001
X ₂ ²	4203.38	1	4203.38	3688.41	< 0.0001
X ₂ ³	3188.82	1	3188.82	2798.15	< 0.0001
X ₂ ⁴	2514.56	1	2514.56	2206.49	< 0.0001
Residual	4.56	4	1.14		
Lack of fit	3.16	2	1.58	2.25	0.3075
Pure error	1.40	2	0.7008		
Cor total	11078.88	18			

Standard deviation	1.07	Press	8673.06
Mean	19.92	R-squared	0.9996
Coefficient of variation (%)	5.36	Adjusted R-squared	0.9981

X₁: Sucrose, X₂: Tryptone, X₃: Sodium chloride, X₄: L-tryptophan
 *: significant at $p < 0.05$, **: significant at $p < 0.01$, ***: significant at $p < 0.001$

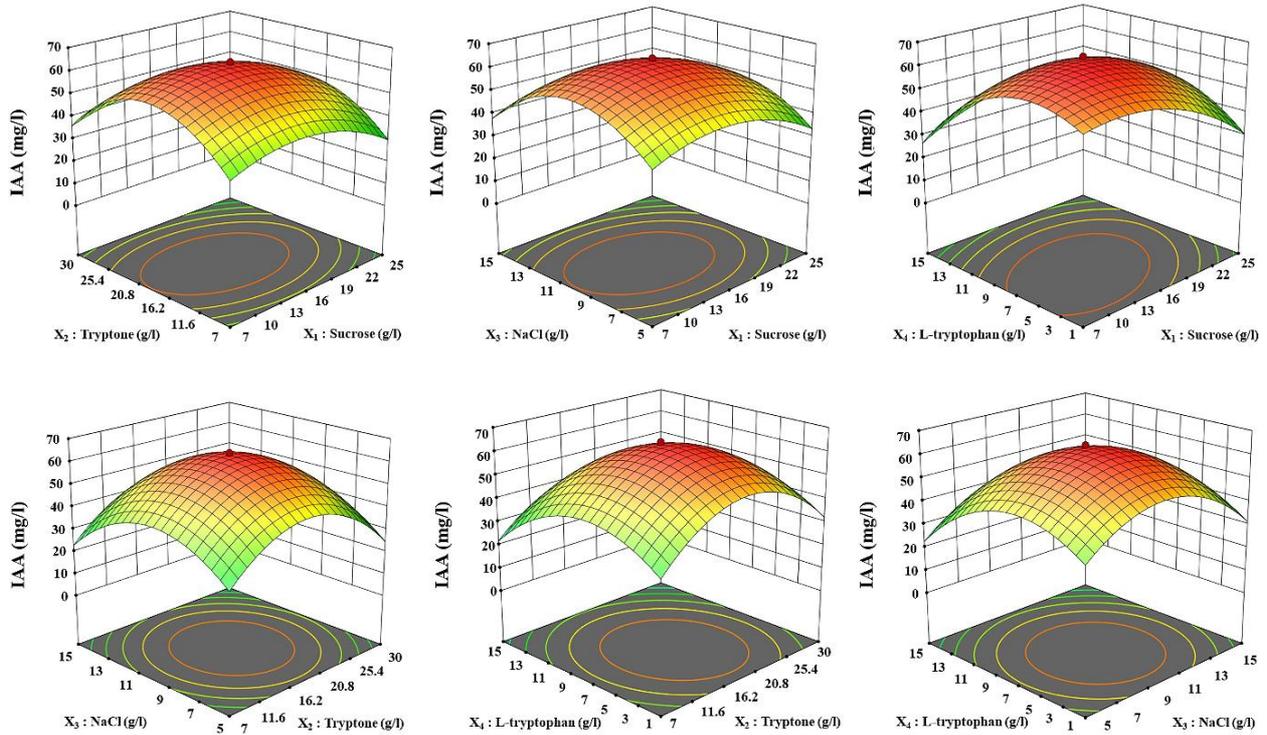


Fig. 4. Three dimensional response surface plots of IAA production as predicted by the quadratic model. The effects of two independent variables on IAA production are simultaneously demonstrated.

회귀방정식의 검정 방법으로 적합성 결여(lack of fit)의 *p*-value를 확인하였으며, 값이 0.3075로 유의성을 판단하는 기준인 0.05보다 높아 실험모형의 회귀방정식의 적합성 결여가 유의하지 않음을 나타내어 설계된 실험 모형이 회귀 모형을 설명하는데 적합한 것으로 분석되었다[11]. IAA 생산의 최적화를 위해 선별된 배지성분인 sucrose, tryptone, sodium chloride, L-tryptophan의 상호작용을 분석하기 위한 3차원 반응표면도를 Fig. 4에 나타내었다. 4가지 독립변수에서 조합된 6개의 3차원 반응표면도를 통해 설정 범위 내에서 IAA 생산에 가장 큰 영향을 미치는 변수는 전구체인 L-tryptophan로 확인되었으며, 그 다음으로 sucrose, sodium chloride, tryptone 순으로 나타났다. 또한 모든 독립변수 간 반응표면도의 임계점이 중간에 가깝게 위치하여 설정범위 내 독립변수 간 상호작용을 면밀히 조사할 수 있었으며, 반응표면분석법을 통해 예측된 IAA 최대 생산량은 64.34±1.07 mg/l로 나타났고 이 때의 배지 조성은 sucrose 13.38 g/l, tryptone 18.34 g/l, sodium chloride 9.71 g/l, L-tryptophan 6.25 g/l로 분석되었다.

실험모델의 검증

반응표면분석법을 통해 산출된 이론적 IAA 생산량을 검증하기 위해 실험 모형에 의해 예측된 IAA 생산을 위한 최적배지와 기존 선별 배지인 0.1% L-tryptophan NB 배지에 SRCM 119864 균주를 접종하여 배양한 뒤 IAA 생산량

을 측정하였다. 최적조건 상에서 3회 반복 실험을 통해 측정된 실제 IAA 생산량은 65.40±0.20 mg/l로 실험 모형에서 예측한 IAA 생산량인 64.34±1.07 mg/l의 오차범위 내에 존재하였으며, 기존 선별 배지였던 0.1% L-tryptophan NB 배지의 IAA 생산량인 45.24±0.49 mg/l 보다 44.56% 향상된 결과를 나타내었다(Fig. 5). 지속가능한 농업의 일환으로 높은 함량의 IAA를 생산하는 식물생장촉진미생물을

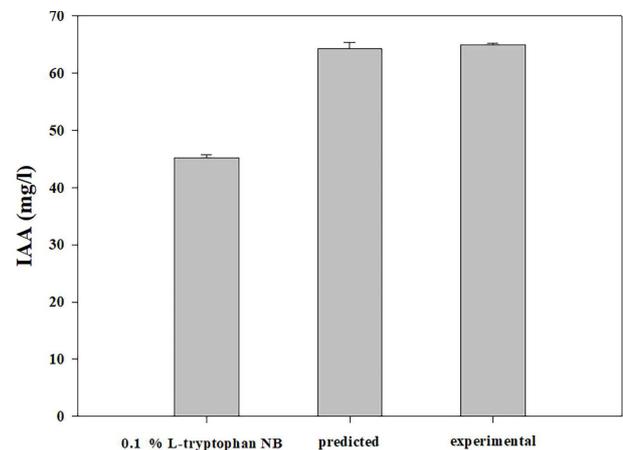


Fig. 5. Comparison of IAA production in different media, NB with 0.1% L-tryptophan as well as comparing the model to experimental value. Data are presented as the mean ± SD.

통한 작물의 길이 및 중량 증가 등의 생산성 향상 방안이 지속적으로 보고되어 왔으며, 가뭄 및 염류집적 등 이상 기후 환경에서 작물의 생장을 돕는 미생물에 대한 다양한 연구들이 계속되어 진행되어 오고 있다[5, 7, 14, 19, 30]. 본 연구는 지속가능한 농업에 기여하기 위해 다양한 작물이 심어진 토양에서 분리된 근권세균 중 IAA를 고생산하는 균주를 선별하였으며, 통계학적 분석방법을 이용하여 IAA 최적 생산을 위한 배지 성분 최적화를 수행하여 산업화에 적용하기 위한 기초자료를 확보하였다. 이후 배양 온도 및 시간 등의 물리환경적 요인과 경제적인 대량생산을 위한 조건 수립, 실제 현장에서의 실증 실험 등의 추가적인 연구의 수행을 통해 산업 및 농업 분야에 적용되면 다양한 작물의 보조제 개발 및 생산량 증대에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2022년 농림축산식품부 농축산·식품마이크로바이옴 통합 바이오뱅크구축사업의 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

1. Apine, O. A. and Jadhav, J. P. 2011. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1235-1244.
2. Bamdad, H., Papari, S., Lazarovits, G. and Berruti, F. 2022. Soil amendments for sustainable agriculture: microbial organic fertilizers. *Soil Use Manag.* **38**, 94-120.
3. Bang, S. H. 2021. Re-examine of non-traditional security in the time of covid19 : china's food security in the new era and south korea's strategy. *KJPS* **3**, 219-244.
4. Bharucha, U., Patel, K. and Trivedi, U. B. 2013. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agric. Res.* **2**, 215-221.
5. Bhise, K. K. and Dandge, P. 2019. Alleviation of salinity stress in rice plant by encapsulated salt tolerant plant growth promoting bacteria *Pantoea agglomerans* strain KL and its root colonization ability. *Arch. Agron. Soil Sci.* **65**, 1955-1968.
6. Bong, K. M., Kim, K. M., Seo, M. K., Han, J. H., Park, I. C., Lee, C. W. and Kim, P. I. 2017. Optimization of medium for the carotenoid production by *Rhodobacter sphaeroids* PS-24 using response surface methodology. *Kor. J. Org. Agric.* **25**, 135-148.
7. Brito, A., Rocha, M., Kaššovský, J., Vieiral, J., Vieiral, C. P., Ramos, V., Correia, M., Santos, M., Mota, R., Roque, J., Pissarra, J., Melo, P. and Tamagnini, P. 2022. A new cyanobacterial species with a protective effect on lettuce grown under salinity stress: envisaging sustainable agriculture practices. *J. Appl. Phycol.* **34**, 915-928.
8. Byeon, J. E., Lee, H. J., Ryoo, J. W. and Hwang, S. C. 2021. Effect of different liquid manure anaerobic digestates on the growth and yield of rice and the optimum application concentration. *Kor. J. Crop Sci.* **66**, 97-104.
9. Choi, H. S. 2020. A study on the spread of covid-19 and the export restrictions of food and other goods. *Jeonbuk Law Review* **63**, 517-544.
10. Economist impact. 2021. Global food security index 2021. Economist impact. London, United kingdom.
11. Ha, G. S., Kim, J. W., Im, S. A., Shin, S. J., Yang, H. J. and Jeong, D. Y. 2020. Application of response surface methodology in medium optimization to improve lactic acid production by *Lactobacillus paracasei* SRCM201474. *J. Life Sci.* **30**, 522-531.
12. 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.
13. Kang, H. Y., Park, D. J., Lee, J. C., Kwon, M. K., Kim, S. B. and Kim, C. J. 2012. Isolation of *Agrobacterium* sp. BE516 from the root of *Micanthus sacchariflorus* and its plant growth promoting activity. *J. Appl. Biol. Chem.* **55**, 129-133.
14. Kang, S. M., Adhikari, A., Lee, K. E., Khan, M. A., Khan, A. L., Shahzad, R., Dhungana, S. K. and Lee, I. J. 2020. Inoculation with indole-3-acetic acid producing rhizospheric *Rhodobacter sphaeroids* KE149 augments growth of adzuki bean plants under water stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 717-725.
15. Kim, H. S., Lee, S. M., Oh, K. Y., Kim, J. Y., Lee, K. H., Lee, S. H. and Jang, J. S. 2021. Biochemical and cultural characteristics of mineral-solubilizing *Acinetobacter* sp. DDP346. *J. Appl. Biol. Chem.* **64**, 333-341.
16. Kim, J. A., Song, J. S., Jeong, M. H., Park, S. Y. and Kim, Y. S. 2021. Biocontrol of rice diseases by microorganisms. *Res. Plant Dis.* **27**, 129-136.
17. Kim, Y. S., Cho, S. H., Lee, H. S. and Lee, G. J. 2021. Growth effects of microbial fertilizer containing *Bacillus amyloliquefaciens* in lettuce. *J. Korea Org. Resour. Recycl.* **29**, 15-24.
18. Kim, Y. S., Kim, S. Y., An, J. H., Sang, M. K., Weon, H. Y. and Song, J. Y. 2018. Changes in resident soil bacterial communities in response to inoculation of soil with beneficial *Bacillus* spp.. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **46**, 253-260.
19. Kwon, H. D. and Song, H. G. 2014. Interactions between indole-3-acetic acid producing *Acinetobacter* sp. SW5 and

- growth of tomato plant. *Kor. J. Microbiol.* **50**, 302-307.
20. Lee, J. C. and Whang, K. S. 2016. Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Bacillus megaterium* BM5. *Kor. J. Soil Sci.* **49**, 461-468.
 21. Lee, J. C., Oh, S. J., Kang, M. O., Kim, Y. H., Kim, D. J. and Lee, S. S. 2021. Improvement of salt accumulated soil and crop growth using coal ash. *Kor. J. Environ. Agric.* **40**, 83-91.
 22. MAFRA. 2021. Major agricultural and livestock statistics 2021. MAFRA, Sejong, Korea.
 23. Myo, E. M., Ge, B., Ma, J., Cui, H., Liu, B., Shi, L., Jiang, M. and Zhang, K. 2019. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC Microbiol.* **19**, 155-168.
 24. Roquemore, K. G. 1976. Hybrid designs for quadratic response surfaces. *Technometrics* **18**, 419-423.
 25. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
 26. Silini-Chérif, H., Silini, A., Ghoul, M. and Yadav, S. 2012. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* Ima2. *Pak. J. Biol. Sci.* **15**, 267-276.
 27. Song, H. G. and Kim, W. J. 2012. Interactions between biosynthetic pathway and productivity of IAA in some rhizobacteria. *Kor. J. Microbiol.* **48**, 1-7.
 28. Takashi, Y., Osamu, K., Kunio, I., Shigeaki, K., Tohru, K. and Yasuji, M. 1979. Stability of indole-3-acetic acid to autoclaving, aeration and light illumination. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 879-880.
 29. Walpola, B. C., Noh, J. G., Kim, C. K., Kyung, K. C., Kong, W. S. and Yoon, M. H. 2013. Optimization of indole-3-acetic production by phosphate solubilization bacteria isolated from waste mushroom bed of *Agaricus bisporus*. *J. Mushroom Sci. Prod.* **11**, 53-62.
 30. Yoo, S. J., Lee, S. A., Weon, H. Y., Song, J. Y. and Sang, M. K. 2021. Assessment of rhizosphere microbial community structure in tomato plants after inoculation of *Bacillus* species for inducing tolerance to salinity. *Kor. J. Environ. Agric.* **40**, 49-59.
 31. Yun, C. Y. and Cheong, Y. H. 2016. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria *Pantoea* species as a plant growth promoting rhizobacteria. *J. Life Sci.* **26**, 1163-1168.

초록 : 반응표면분석법을 활용한 *Pantoea agglomerans* SRCM 119864의 Indole-3-acetic acid 생산 배지 최적화

정호진 · 하광수 · 정수지 · 류명선 · 김진원 · 정도연 · 양희종*
 ((재)발효미생물산업진흥원)

본 연구에서는 토양으로부터 분리한 Indole-3-acetic acid (IAA) 고생산 균주인 *Pantoea agglomerans* SRCM 119864의 IAA 생산량을 증가시키기 위해 반응표면분석법을 활용하여 배지 조성 최적화를 수행하였다. Plackett-Burman design (PBD)을 이용하여 전구체인 L-tryptophan 이외의 IAA 생산에 영향을 주는 배지 성분 11개의 영향을 조사하였으며, 통계학적 분석을 통해 IAA 최적생산을 위한 배지 인자로 sucrose, tryptone, sodium chloride를 선정하였다. PBD에서 선정된 3가지 인자와 L-tryptophan의 농도 최적화를 수행하기 위해 적은 실험수로도 최적값을 분석할 수 있는 hybrid design을 설계하였다. 실험 모형에서 예측한 *P. agglomerans* SRCM 119864 균주의 IAA 최적 생산을 위한 배지 조성과 농도는 sucrose 13.38 g/l, tryptone 18.34 g/l, sodium chloride 9.71 g/l, L-tryptophan 6.25 g/l로 분석되었으며, 이때의 IAA 생산량은 64.34±1.07 mg/l로 예측되었다. ANOVA 분석을 통하여 실험 모형의 통계학적 유의성과 적합성을 검증하였으며, 설계한 최적 조성 배지에서 모델 검증실험을 수행하여 IAA 생산량을 측정된 결과, 예측된 IAA 생산량과 매우 유사함을 확인하였으며, 최종 최적화 수행을 통해 IAA 생산량을 기본 배지 대비 44.56% 증가시켰다. 본 연구를 통하여 토양에서 IAA를 고생산하는 균주를 선별하여 배지 조성 최적화를 수행하였으며, 이를 바탕으로 지속가능한 농업 및 작물 생산량 증대를 위한 산업화 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.