*Actinobacillus succinogenes*의 혐기성배양에 의해 생합성 되는 숙신산의 생산성 향상을 위한 통계적 생산배지 최적화

박상민, 전계택*

Statistical Optimization of Production Medium for Enhanced Production of Succinic Acid Produced by Anaerobic Fermentations of *Actinobacillus succinogenes*

Sang-Min Park and Gie-Taek Chun*

접수: 2014년 5월 1일 / 게재승인: 2014년 5월 22일

© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Statistical medium optimization has been carried out for the production of succinic acid in anaerobic fermentations of *Actinobacillus succinogenes*. Succinic acid utilized as a precursor of many industrially important chemicals is a four-carbon dicarboxylic acid, biosynthesized as one of the fermentation products of anaerobic metabolism by *A. succinogenes*. Through OFAT (one factor at a time) experiments, corn steep liquor (CSL), a very cheap agricultural byproduct, was found to have significant effects on enhanced production of succinic acid, when supplemented along with yeast extract. Hence, using these factors including glucose as a carbon/energy source, interactive effects were investigated through 2ⁿ full factorial design (FFD) experiments, showing that the concentration of each component (i.e., glucose, yeast extract and CSL) should be higher. Further statistical experiments were conducted along the steepest ascent path, followed by response surface method (RSM) in order to find out optimal concentrations of each constituent. Consequently, optimized concentrations of glucose, yeast extract and CSL were observed to be 180 g/L, 15.08 g/L and 20.75 g/L respectively (10 g/L of NaHCO₃ and 100 g/L of MgCO₃ to be supplemented as bicar-

bonate suppliers), with the estimated production level of succinic acid to be 92.9 g/L (about 3.5 fold higher productivity as compared to the initial medium). Notably, the RSM-estimated production level was almost similar to the amount of succinic acid (92.9 g/L vs. 89.1 g/L) produced through the actual fermentation process performed using the statistically optimized production medium.

Keywords: Statistical medium optimization, Anaerobic fermentation, Succinic acid, *Actinobacillus succinogenes*, response surface method

1. INTRODUCTION

숙신산 (succinic acid)은 곧은 사슬의 dicarboxylic acid로 구성되어 있는 유기산으로, 식물, 동물 그리고 미생물들에 의해 생합성 되는 공통된 대사산물이며 다양한 혐기성 미생물들이 그들의 에너지 대사활동의 주요 최종산물로서 숙신산을 생합성 한다 [1]. 숙신산은 식품의 감미료, 의약품, 계면활성제, 생분해 플라스틱, 사료첨가제와 같이 다양한 용도로 사용되는 유기산이며, 최근에는 1,4 butanediol, tetrahydrofuran, -butyrolactone, adipic acid, n-methylpyrrolidone 등과 같은 다양한 석유화학 제품의 원료로 사용될 수 있어 바이오리파이너리 (biorefinery) 산업에서 큰 관심을 끌고 있다 [1-3]. 특별히 숙신산은 2004년에 미국 에너지성 (US DOE)이 발표한 미

강원대학교 의생명과학대학 분자생명과학과
College of Biomedical Science, Kangwon National University, Korea
Tel: +82-33-250-8547, Fax: +82-33-241-4627
e-mail: gtchun8547@gmail.com

래의 대체 화학물질들 중에서, 화학적 자료, 시장 데이터, 특성, 효율성 등을 정밀 검토한 후 선정한 12개의 잠재적인 후보군에 포함되어 있을 정도로 시장성이 매우 높은 고부가가치 화학물질이다 [3].

숙신산은 화학적 방법 또는 미생물 발효를 통한 생물학적 방법을 적용하여 생산할 수 있다. 숙신산의 산업적인 생산을 위해서 maleic acid를 수소 치환하는 화학적인 방법이 주로 적용되어 왔으나, 이 경우 화학반응 시 수반되는 여러 부산물로 인해 최근에는 미생물의 발효에 의한 생물공정으로 급속히 대체되고 있다 [1,2]. 숙신산을 생합성할 수 있는 미생물 균주로 *Mannheimia succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* 등이 보고된 바 있다 [4-10]. 본 연구에서 사용한 균주는 통성혐기성세균인 *Actinobacillus succinogenes*로서, 이 균주의 특징은 호기성 환경에서는 전형적인 해당과정과 TCA cycle 및 전자전달계를 통해 에너지 합성과 균체의 증식이 이루어지나, 반면에 혐기성과 이산화탄소 존재하의 환경에서는 phosphoenolpyruvate에서 이산화탄소의 고정에 의해 에너지를 생합성하는 경로로 대사과정이 전환되는데, 이 때 최종 산물로서 숙신산이 생합성 된다 [1]. *Actinobacillus succinogenes*가 균체의 성장이 빠르고, 비교적 고농도의 탄소원 농도 하에서도 고밀도 배양이 가능한 점과, 이산화탄소의 공급이 풍부한 혐기성 조건에서 고농도로 숙신산을 생합성할 수 있는 능력이 있는 것으로 알려져 있다. [1,2].

*Actinobacillus succinogenes*는 숙신산 이외에도, acetic acid, formic acid, ethanol 등 다양한 부산물들을 생합성하는데, 이 부산물들은 숙신산 경로와는 달리, pyruvate로부터 생합성되는 것으로 알려져 있다 [1].

숙신산과 같은 미생물 유래의 대사산물을 대량 생산하기 위해서는 생산균주의 배양 생리적 특성을 최대한으로 이용하기 위해 배양조건에 대한 조절, 특히 생산배지의 조성은 특별히 생산성에 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다 [11-14]. 본 연구에서는 *Actinobacillus succinogenes*의 혐기성배양을 통한 숙신산 (succinic acid)의 대량생산 공정을 개발하기 위한 첫 단계로서, 통계적 방법을 적용하여 저가의 산업용 복합배지를 개발하고자 하였다. 이를 위해 숙신산의 생산성에 큰 영향을 미치는 주요 배지성분들을 우선 찾아내고, 각 성분들의 교호작용을 분석하기 위해 효율적인 통계적 방법을 순차적으로 적용한 후, 최종적으로 반응표면분석법 (Response surface method) (RSM)을 적용하여 숙신산의 생산성이 최대인 최적 배지조성을 찾아내고자 하였다. 가능한 한 넓은 범위에서 각 배지성분들을 조사하고자, 모든 최적화 연구는 낮은 glucose 농도 (low-glucose level)의 경우와, 높은 glucose 농도 (high-glucose level)의 경우에 대해, 두 가지 방향으로 각각 별도로 수행되었다. 생산균주로서 본 연구팀이 개발한 숙신산 고생산성 변이주인 *Actinobacillus succinogenes* SM23균주를 이용하여 통계적 배지최적화 연구를 수행하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 사용균주 및 배양배지

본 연구에 사용된 균주는 *Actinobacillus succinogenes* (ATCC 55618)를 모균주로 하여 본 연구팀이 rational screening 방법을 적용하여 개발한 *Actinobacillus succinogenes* SM23 고생산성 변이주를 사용하였다. 이 변이주는 다량의 single colony들로부터 다단계 선별과정을 통해 획득된 균주로서 비교적 고농도의 숙신산을 안정적으로 생산하는 균주이다. 이 균주를 통상적으로 고체배지인 TSA ((Tryptic soy agar: pancreatic digest of casein 15 g/L, papaic digest of soybean 5 g/L, sodium chloride 5 g/L, agar 15 g/L) (Difco, USA)) plate에 접종하여 1 일 동안 38°C에 solid stock으로 보관하였으며 liquid stock으로 만들 때에는 20% glycerol이 함유된 증류수로 -80°C deep freezer에 냉동 보관하여 필요시마다 꺼내어 사용하였다 (고체배지는 SGM으로 명명함).

*Actinobacillus succinogenes*의 액상 성장 배양에서 사용된 배지 (LGM)는 TSB (tryptic soy broth: 15 g/L pancreatic digest of casein, 5 g/L papaic digest of soybean, 2.5 g/L dextrose, 5 g/L sodium chloride, 2.5 g/L dipotassium phosphate)를 사용하였다. 액상 생산배양용 생산배지 (LPM으로 명명함)는 glucose 60 g/L (Daejung, Korea), yeast extract 25 g/L (Difco, USA), sodium bicarbonate 10 g/L (Duksan, Korea), magnesium carbonate 60 g/L (Sigma, USA)의 조성을 사용하였다. LPM을 기초로 하여 각 배지들에 대한 최적화 연구를 진행하였으며 결과 3.1에 제시된 25가지의 다양한 질소원 (Table 1)은 yeast extract를 제외하고 모두 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 배지 멸균은 침전과 갈변현상을 방지하기 위하여 당과 질소원, 무기염류를 분리하여 121°C에서 15분간 수행하였으며, 경우에 따라 0.45 (μm)의 filter를 이용하여 멸균을 수행하였다.

2.2. 액상 성장배양 및 생산배양

액상배양은 SGM에 균을 접종한 후 38°C에서 24시간 배양하여 seed로 사용하였으며 액상 성장배양은 LGM을 이용하여 50 mL culture-tube에서 5~7 mL의 조업부피로, 38°C에서 9시간 동안 150~200 rpm의 교반속도로 배양하였다. 생산배양은 상기 생산배지 (LPM)의 조성을 기본으로 하여 100 mL serum-bottle (조업부피 30 mL)을 이용하여 수행하였다. 성장배양으로부터 접종액 1% (v/v)를 취하여, 38°C에서 200~250 rpm으로 2일간 진탕배양을 수행하였다.

2.3. 당 및 숙신산 정량분석

배양액 내 당의 정량분석은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석하기 전에 시료를 12,000 rpm (12074.4 g, RCF)에서 10분간 3회 원심분리 (VS 15000CFN II, Vision, Korea)하였다. 채취한 상등액을 0.45 μm 여과지를 이용하여 여과한 후 HPLC에 주입하였다. 검출기는 RI detector (Younglin, Korea)를 사용하였고 Amine column (250 mm × 46 mm) (RS Tech, Korea)을 이용하여 분석하였다. 40°C 온도에 아세토니트릴 : 물 =

75:25 (v/v)로 조합된 이동상을 유속 1.2 mL/min의 속도로 이동시켰으며 시료 20 μ L를 투입시켜 분석하였다.

배양액 내 숙신산 농도 측정 역시 HPLC (HPLC 9500 system, Younglin, Korea)로 분석하였으며 이를 위해 적당한 농도로 희석한 시료를 0.45 μ m 여과지를 이용하여 2번 여과한 후 시료로 사용하였다. 검출기는 UV detector (UV7255, Younglin, Korea)를 사용하였고 Organic acid column (Aminex HPX 87H) (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 시료는 20 μ L를 투입시켰고 25°C에 0.01 N H₂SO₄를 0.8 mL/min의 속도로 이동시키며 분석하였다.

2.4. 통계적 생산배지 최적화 방법

통계적 배지 최적화 방법을 수행하기 전에 우선적으로 하나의 요인을 여러 수준으로 놓고 나머지 요인들을 고정시켜 실험하는 “one factor at a time (OFAT) method”에 의해 다양한 배지 성분이 숙신산의 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 OFAT 방법에서는 확인할 수 없는 각 성분 간의 상호작용의 정도를 확인하는 통계적인 방법인 full factorial design (FFD) 방법을 이용해서 숙신산의 생산성 증가에 긍정적인 효과를 보이는 최적의 배지 성분을 선정하는 연구를 수행하였다.

한편 FFD의 실험에 의해 선별된 배지성분을 이용해서 각 배지성분의 최적 농도를 선정하기 위한 반응표면분석법 (response surface method, RSM)을 곧바로 실행할 경우, 어느 정도의 농도 범위에서 최적의 농도가 존재하는지를 추정하기가 매우 어려운 문제점이 존재한다. 따라서 Fig. 1에 체계적으로 제시한 바와 같이, 최종적인 RSM 실험을 수행하기 전에 최적 농도가 존재하는 근사치를 추정하기 위해서 최급상승법 (steepest ascent method, SAM)을 이용한 배양실험을 먼저 수행하였다. 그 후 선별된 배지성분의 최적 농도를 최종적으로 결정하기 위해 배지성분 각각의 농도 변화가 숙신산 생산성에 미치는 영향을 반응표면분석법을 이용하여 통계적으로 분석하였다. 이를 위한 실험계획법으로 중심합성계획법 (central composite design, CCD)을 이용하였다. 중심

Fig. 1. Schematic diagram of the steepest ascent method (SAM).

합성계획법에서는 중심점 (n_0)의 수는 제한이 없으며 (본 실험에서는 6개의 중심점을 사용), 축점 (a)의 수는 $2k$ 로서 (본 실험의 3가지의 배지성분 농도를 조사한 경우를 예를 들면) 총 6개의 축점 실험을 수행하였다. 따라서 3가지 성분의 농도를 최적화시키는 경우, 총 실험횟수는 $2^k + 2k + n_0 = 2^3 + (2 \times 3) + 6$ 가 되므로 20개의 선정된 조건에서 실험을 수행하였다 (Fig. 2).

중심합성계획법에 의거해 얻은 배양결과를 Design-Expert 6.0 program을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 배지성분들에 대한 상호 영향을 분석하고, 이 결과를 바탕으로 최고 생산성을 위한 각 배지성분의 최적 농도를 결정하였다. 이 때 전체 model에 대한 유의성은 ANOVA 분석 시 주어지는 P값에 의해 결정되며, P값이 0.05 보다 작을 때 그 유의성이 인정된다고 간주하였다. 최적 배지 농도는 2차 다항식의 Y값인 숙신산의 생산농도가 최대로 되는 지점을 3차원 반응표면도와 contour plot을 이용하여 결정하였다.

가능한 한 넓은 범위에서 각 배지성분들을 조사하고자, 모든 최적화 연구 (즉 FFD, SAM 및 RSM)는 낮은 glucose 농도

Fig. 2. Central composite design (CCD) for statistical medium optimization through response surface method (RSM).

(low-glucose level)의 경우와, 높은 glucose 농도 (high-glucose level)의 경우에 대해, 두 가지 방향으로 각각 별도로 수행되었다 (연구결과에 상세히 제시).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. OFAT (One Factor At a Time) 전략을 이용한 질소원 선별

숙신산의 산업화 공정 개발 시 가장 기본적인 요소는 저렴한 산업용 복합 생산배지 개발이다. 배지 최적화 단계 이전에 사용되고 있던 생산배지의 질소원 성분인 yeast extract가 비교적 고가이므로, yeast extract를 대체하거나 양을 줄이기 위한 목적으로 다양한 질소원을 이용하여 플라스크 배양을 수행하였다 (연구 초반에 사용된 생산배지는 최적화되기 이전 배지이며, 이 배지성분에 근거해서 하기에 고찰한 바와 같이 생산배지 조성의 통계적 최적화가 이루어졌음). 25가지의 질소원으로 OFAT (One Factor At a Time) 실험을 수행하였는데, 각각의 플라스크 배양의 배지조성은 다음과 같다: glucose 60 g/L, sodium bicarbonate 10 g/L, magnesium carbonate 60 g/L 및 각각의 질소원 농도 25 g/L.

Table 1에 각각의 질소원에 대한 숙신산의 생산성을 제시하였다. 초기생산배지 (LPM)와 배지성분이 같은 yeast extract만 첨가된 배지에서의 숙신산의 생산량은 29.11 g/L로 나타났다으나, 여러 번의 반복 배양 결과, 숙신산의 평균 생산량은 약 25 g/L인 것으로 관찰되었다. 따라서 25 g/L의 생산량을 이후에 진행될 통계적 배지 최적화 실험의 비교지표로 사용하였다. 제시된 Table 1의 실험결과 중 corn steep liquor에서 매우 높은 생산량이 나타났는데, 이 배지성분은 가격이 매우 저렴하여 산업용 배지 성분으로 이용될 수 있다는 점에서 주목할 만하다 [22-24]. Corn steep liquor는 옥수수에서 전분과 오일을 추출한 후 얻어지는 매우 부산물 성분인데, 여기에 다양한 비타민과 무기염류가 다량 함유되어 있어서 yeast extract의 역할을 상당히 보완하고 있는 것으로 판단된

다. 이후 실험은 yeast extract와 corn steep liquor가 상호 조합된 배지로 진행하였는데, Table 2에 제시한 바대로 yeast extract가 제공해주는 각종 vitamin이나 미량원소들이 숙신산 생산성 증가에 중요한 요소로 판단되었기 때문이다. 즉, yeast extract와 corn steep liquor를 동시에 첨가하였을 경우가, corn steep liquor 만을 단독 첨가한 경우에 비해 숙신산의 생산량이 점차로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Table 2의 3번 조합 이후의 결과). 이 결과에 근거하여 corn steep liquor를 질소원 일부 대체성분으로 결정한 후, yeast extract와 corn steep liquor의 최적 농도조합을 조사하는 실험을 수행하였다 (즉 5가지 수준의 corn steep liquor의 농도에 대해, 11가지 수준의 yeast extract 농도 수준으로 질소원을 첨가함) (Table 2). 배양 결과 yeast extract의 농도가 증가할수록 숙신산의 생산성도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 잔류 glucose에 대한 실험결과는 yeast extract의 농도가 증가함에 따라 특히 3 g/L 이상일 때, 생산 균주가 배지내의 glucose를 완전히 소모한 것으로 나타났다. 대략적으로 yeast extract의 농도가 약 4 g/L 이상으로 첨가된 경우, 모든 배양 조건에서 숙신산의 생산성이 크게 차이나지 않고 (42~49 g/L), glucose도 모두 다 소비되는 것으로 관찰되었다. 질소원 조사를 위한 OFAT 실험 결과, 다양한 비타민과 cofactor를 함유하고 있는 yeast extract가 숙신산 생산에 있어 매우 중요하므로, yeast extract를 완전히 대체하는 것보다 첨가량을 줄인 저가의 산업용 복합배지를 개발하는 전략이 합리적이라고 판단되었다.

한편 Table 3에 제시한 바와 같이, glucose에 대한 숙신산의 이론수율 대비 관찰수율 (observed yield/theoretical yield based on glucose consumption)이 약 0.6에 도달하는 배지조합도 관찰되었음은 주목할 만하다. 생산균주가 탄소원인 glucose를, 세포성장, 숙신산 생합성 및 maintenance (기초대사) 에너지로 소비하는 배양 생리적 특성에 근거할 때, 이 결과는 첨가된 60 g/L의 glucose에서 생산될 수 있는 숙신산 양이 매우 높은 값에 도달했음을 제시해 준다. 이로부터 숙신산의 생산성을 더욱 증가시키기 위해서는 탄소원의 농도를 증가시켜야 하며, 이에 따라 질소원 및 다른 배지성분들의 농도 또한 변

Table 1. Investigation of variable nitrogen sources for production of succinic acid

No.	Nitrogen source	SA (g/L)	No.	Nitrogen source	SA (g/L)
1	Ammonium chloride	0	14	Fish meal	0
2	Ammonium nitrate	0	15	Glutamic acid	1.18
3	Ammonium phosphate (mono)	12.68	16	Gelatin	0
4	Ammonium phosphate (di)	0	17	Peptonized milk	15.89
5	Ammonium tartrate	0	18	Bacto peptone	0
6	Casamino acid	0	19	Pharmamedia (cottonseed flour)	0
7	Casitone	0	20	Soybean flour	3.14
8	Casein enzymatic hydrolysate	0	21	Skim milk	32.24
9	Casein acid enzymatic hydrolysate	9.96	22	Soytone	0
10	Corn steep liquor	39.55	23	Soybean meal	0
11	Yeast extract	29.11	24	Tryptone	0
12	Cottonseed flour	0	25	Urea	0
13	Cottonseed enzymatic hydrolysate	0			

※ SA: Amount of produced succinic acid.

Table 2. Production of succinic acid according to various combination of yeast extract and corn steep liquor

		corn steep liquor (g/L)				
		10	12.5	15	17.5	20
Yeast extract (g/L)	0	7.44	7.50	7.55	7.66	7.69
	1	12.75	15.10	19.22	25.92	26.68
	2	31.47	27.54	29.97	32.66	33.54
	3	40.28	38.67	42.07	41.84	44.23
	4	43.09	43.92	44.22	45.92	42.85
	5	42.09	41.72	45.36	45.66	44.91
	6	45.26	46.05	44.59	49.65	47.63
	7	43.49	42.98	40.72	43.83	47.84
	8	43.87	47.00	42.59	46.63	49.60
	9	40.56	46.92	47.86	47.93	48.66
	10	46.52	44.83	49.24	45.66	43.22

Table 3. The ratio of observed yield to theoretical yield (yield ratio, i.e., observed yield/theoretical yield) of succinic acid based on glucose consumption according to combination of yeast extract and corn steep liquor

		Corn steep liquor (g/L)				
		10	12.5	15	17.5	20
Yeast extract (g/L)	0	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	1	0.16	0.19	0.25	0.33	0.34
	2	0.40	0.35	0.38	0.42	0.43
	3	0.52	0.50	0.54	0.54	0.57
	4	0.55	0.56	0.57	0.59	0.55
	5	0.54	0.53	0.58	0.59	0.58
	6	0.58	0.59	0.57	0.64	0.61
	7	0.56	0.55	0.52	0.56	0.61
	8	0.56	0.60	0.55	0.60	0.63
	9	0.52	0.60	0.61	0.61	0.62
	10	0.60	0.58	0.63	0.59	0.55

화되어야 하므로 배지조성의 최적화가 필수적임을 유추할 수 있었다. 따라서 생산배지의 성분 및 농도가 숙신산의 생산성에 미치는 영향을 분석하기 위해 다음과 같은 통계적 배지 최적화 실험을 체계적으로 수행하였다.

3.2. Full factorial design (FFD) 방법을 적용한 생산배지 최적화: 두 종류의 glucose 수준 (level)을 이용한 접근법 (low-glucose level FFD와 high-glucose level FFD)

가능한 한 다수의 배지성분을 조사해서 중요한 인자를 신속하게 선별하기 위해서는 각 배지성분의 주요 효과와 각각의 상호작용에 대한 논리적인 분석이 필요하다. 특히 실험의 규모를 줄이면서 동시에 많은 요인에 대한 정보를 획득하여야 한다. 이를 위해 본 연구에서는 우선적으로 2ⁿ full factorial design (FFD) 실험법을 적용하여 배지 최적화 연구를 수행하였다. FFD 실험을 포함한 이후의 일련의 통계적 배지 최적화 연구 (SAM 및 RSM)는 낮은 glucose 농도 (Low glucose level)의 경우와, 높은 glucose 농도 (High glucose level)의 경우에 대해 각각 별도로 수행되었다.

낮은 glucose 농도로 시작한 FFD (이후 low-glucose level FFD로 명명함)의 경우에는 기존의 생산배지인 5가지 성분들 (즉 glucose, yeast extract, corn steep liquor, NaHCO₃, MgCO₃)중 탄소원과 질소원으로 사용되는 3가지 배지 성분

(glucose, yeast extract, 및 corn steep liquor)들에 대해 조사가 이루어졌다. 각각의 성분에 대해 상하한 값 (-1,1)을 설정한 후 (glucose 65~85 g/L, yeast extract 3~7 g/L, corn steep liquor 10~20 g/L) (Table 4), 이들을 서로 조합한 8개의 배양조건 및 4개의 중점 (0,0)을 포함하는 총 12 종류의 배양조건 (Table 5)에 대해서 숙신산의 생산성을 조사하였으며, 그 결과를 제시하였다 (Table 5). 8번 조합에서 숙신산 생산성이 65.7 g/L로서 가장 높았고, 7번 조합에서 가장 낮게 나타났다 (45.7 g/L). 이 두 조합을 비교해 보았을 때 두 조합 모두 yeast extract (B)와 corn steep liquor (C)가 높은 농도로 첨가되었고, 단지 glucose (A)가 다른 농도로 첨가된 실험조합이다. 이 실험결과로부터 숙신산의 생합성 경향은 세 가지 요인의 농도가 모두 증가함에 따라 함께 증가함을 알 수 있었다 (8번 조합).

더욱 자세히 분석하기 위해 상기의 12가지의 배양조건에서 얻은 결과를 full factorial model에 적용시켜 분석한 ANOVA 결과, Full factorial model에 대한 P-value는 0.0002 수준으로

Table 4. Definition and trial levels of factors in the low-glucose level full factorial design (FFD)

Factor	Variable	-1	0	1
A	Glucose (g/L)	65	75	85
B	Yeast extract (g/L)	3	5	7
C	Corn steep liquor (g/L)	10	15	20

Table 5. Experimental matrix for the low-glucose level full factorial design (FFD)

Exp. No.	A	B	C	SA (g/L)
1	-1	-1	-1	48.03
2	1	-1	-1	47.85
3	-1	1	-1	52.94
4	1	1	-1	54.77
5	-1	-1	1	54.81
6	1	-1	1	55.32
7	-1	1	1	45.67
8	1	1	1	65.70
9	0	0	0	54.47
10	0	0	0	54.89
11	0	0	0	54.14
12	0	0	0	54.81

통계적으로 매우 유의한 것으로 확인되었고, R^2 이 0.9987로 실제 실험값과 요인 모델이 예상한 값과 거의 일치하는 것으로 나타났다. 숙신산 생산성 증가면에서 볼 때, 단독효과가 가장 높았던 배지성분은 glucose로 분석되었다 (기여도 26%). 또한 glucose와 yeast extract가 동시에 미치는 효과 (AB)와, glucose와 corn steep liquor가 동시에 미치는 효과 (AC)의 경우, 그 기여도가 각각 16%와 19%로서 꽤 높은 것으로 나타났다. Fig. 3에 이 3가지 배지성분들의 농도 변화에 따른 숙신산 생산성의 변화 정도를 cube graph를 이용하여 나타내었다. 실제 실험결과에서 이미 유추한 바와 같이, ANOVA 분석에서

Table 6. Definition and trial levels of factors in the high-glucose level full factorial design (FFD)

Factor	Variable	-1	0	1
A	Glucose (g/L)	70	90	110
B	Yeast extract (g/L)	6	8	10
C	Corn steep liquor (g/L)	15	20	25
D	Sodium bicarbonate (g/L)	12	14	16
E	Magnesium carbonate (g/L)	75	85	95

도 세 가지의 배지 성분 모두가 증가하여야 숙신산의 생산성이 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 glucose와 yeast extract, glucose와 corn steep liquor, yeast extract와 corn steep liquor의 상호작용에 대한 contour 그래프 결과로부터도, 각 성분의 농도가 모두 증가할 때, 숙신산의 생산성도 같이 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 3). 주목할 점은 단독효과 뿐만 아니라 복합효과 면에서도, corn steep liquor가 숙신산 생산성 향상 측면에서 매우 긍정적인 효능을 보여주었다는 점이다. 이 결과는 저가의 산업용 복합배지 성분인 corn steep liquor를 배지에 첨가해 줌으로써 고가의 배지 성분인 yeast extract의 첨가량을 비교적 큰 폭으로 줄일 수 있음을 암시해 준다.

한편 높은 glucose 농도에서 시작한 FFD (이후 high-glucose level FFD로 명명함) 실험은 glucose의 농도를 70~110 g/L (yeast extract 6~10 g/L, corn steep liquor 15~25 g/L, sodium bicarbonate 12~16 g/L, magnesium carbonate 75~95 g/L)의 범위에서 수행하였다 (Table 6). Corn steep liquor의 경우, yeast

Fig. 3. Interaction graphs of the medium components derived from the ANOVA analysis of the low-glucose level full factorial design (FFD) experiment.

extract와는 대조적으로 높은 농도를 적용하였는데, 그 이유는 산업용 생산배지 개발을 위해, 매우 저렴한 복합배지 성분인 corn steep liquor를 가능한 한 증가시키기 위함이었다. 한편 high-glucose level FFD의 경우, 5가지 배지성분 모두를 조사하였는데, 그 이유는 탄소원의 양이 큰 폭으로 증가되었으므로, 그에 따른 이산화탄소의 공급과 pH 조절을 위해 sodium bicarbonate와 magnesium carbonate의 역할이 중요하다고 판단되었기 때문이다. High-glucose level FFD 실험에 대한 38종류의 배지조합 (6개의 중점 (0,0)을 포함하는 32종류의 배지조합)과, 각 배양조건에서의 숙신산의 생산성을 제시하였다 (Table 7).

배양 결과 32종류의 배지조합에 따른 숙신산의 생산성은 약 27~53.5 g/L의 범위에서 넓게 분포하는 것으로 나타났는데, 이는 배지의 농도구배가 커서 각 요인들의 효과가 좀 더 크게 작용한 것으로 판단된다 (Table 7). 24번 배지조성 (glucose +1, yeast extract +1, corn steep liquor +1, sodium bicarbonate 0, magnesium carbonate +1)에서 숙신산의 생산성이 가장 높게 나타났으며, 11번 조합에서 가장 낮게 나타났다. 이와 같이 배지조성의 차이로 인해 숙신산의 생산성이 약 2 배 정도로 차이가 났음은 주목할 만하다.

상기의 32가지의 배양조건에서 얻은 결과를 full factorial model에 적용시켜 얻은 ANOVA 분석 결과는 P-value는 0.0007의 수준으로 통계적으로 매우 유의성 있는 결과를 확인할 수 있었으며, R^2 값이 0.9700로 요인 모델이 예상한 값이 실제 실험값과 거의 일치함을 알 수 있었다. 숙신산 생산성 증가에 대한 단독 요인의 효과는 전체 배지성분 중에서 glucose (A)가 가장 높은 것으로 분석되었으며 (기여도 51.75 %). 그 외에 yeast extract (B)와 corn steep liquor (C)에서도 높은 효과가 나타났는데, 이는 low glucose-level의 FFD에서의 얻은 결과와 동일한 경향이다. 반면에 NaHCO_3 (D)와 MgCO_3

(E)의 농도변화가 succinic acid의 생산성 증가에 미치는 영향은 별로 없는 것으로 분석되었는데, 이로부터 high-glucose level FFD 실험을 위한 배양 중에 각각의 serum bottle 내로 용존 이산화탄소가 충분히 공급되고 있음을 유추할 수 있었다. Fig. 4에 glucose, yeast extract 및 corn steep liquor 각 배지 성분들의 농도 변화에 따른 숙신산 생산성의 변화 경향을 cube graph와 contour plot을 이용하여 제시하였다. 상기에서 이미 분석한 바대로 glucose와 yeast extract, corn steep liquor의 농도가 증가함에 따라 숙신산의 생산성이 증가하는 경향을 보여주고 있다. 결론적으로, low- 또는 high-glucose level FFD 분석 결과, 탄소원인 glucose가 숙신산의 생산성에 미치는 영향이 가장 크고, glucose의 농도는 더욱 증가해야 하는 쪽으로, 동시에 yeast extract와 corn steep liquor 첨가 농도 역시 더 높여주어야 함을 알 수 있었다. 이 결과에서도 주목할 점은 단독효과 뿐만 아니라 복합효과 면에서도, corn steep liquor가 숙신산 생산성 향상을 위해 yeast extract를 어느 정도 대체해 줄 수 있는 훌륭한 복합 질소원으로 확인되었다는 점이다.

3.3. 통계적 배지 최적화 방법인 최급상승법 (steepest ascent method (SAM)) 방법을 적용한 생산배지 성분의 농도 최적화: 두 종류의 glucose level을 이용한 접근법 (low-glucose level SAM과 high-glucose level SAM)

FFD에 의해 선별된 배지성분을 이용해서 각 배지성분의 최적농도를 선정하기 위해 곧바로 반응표면분석법 (response surface method, RSM)을 실행할 경우, 어느 정도의 농도 범위에서 최적의 농도가 존재하는지를 추정하기가 매우 어려운 문제점이 존재한다. 따라서 Fig. 2에 체계적으로 제시한 바와 같이 최종적인 RSM 실험을 수행하기 전에 최적농도가 존재하는 근사치를 추정하기 위해서 SAM 설계법을 이용한 실험

Table 7. Experimental matrix for the high-glucose level full factorial design (FFD)

Exp. No.	A	B	C	D	E	SA(g/L)	Exp. No.	A	B	C	D	E	SA(g/L)
1	1	-1	1	-1	-1	31.91	20	1	1	-1	-1	1	35.63
2	-1	-1	1	-1	-1	40.27	21	-1	-1	1	-1	1	33.32
3	-1	1	1	-1	-1	31.33	22	1	-1	1	-1	1	37.69
4	-1	1	1	1	-1	44.53	23	-1	1	1	-1	1	32.02
5	1	-1	1	-1	1	32.17	24	1	1	1	-1	1	53.48
6	-1	-1	-1	1	-1	43.23	25	-1	-1	-1	1	1	28.07
7	1	-1	1	1	1	30.03	26	1	-1	-1	1	1	30.39
8	-1	-1	1	-1	1	43.15	27	-1	1	-1	1	1	36.10
9	1	1	-1	1	-1	30.01	28	1	1	-1	1	1	44.48
10	-1	-1	-1	1	1	39.83	29	-1	-1	1	1	1	28.45
11	-1	-1	1	1	1	27.04	30	1	-1	1	1	1	31.33
12	1	1	1	1	-1	37.45	31	-1	1	1	1	1	33.32
13	-1	1	1	-1	1	39.20	32	1	1	1	1	1	50.15
14	-1	-1	-1	-1	-1	48.41	33	0	0	0	0	0	37.16
15	0	0	0	0	0	31.89	34	0	0	0	0	0	37.32
16	-1	1	-1	-1	1	44.59	35	0	0	0	0	0	37.22
17	1	-1	-1	1	-1	28.16	36	0	0	0	0	0	37.57
18	1	1	1	-1	1	45.74	37	0	0	0	0	0	37.67
19	-1	1	-1	1	1	34.94	38	0	0	0	0	0	37.30

Fig. 4. Interaction graphs of the medium components derived from the ANOVA analysis of the high-glucose level full factorial design (FFD) experiment.

을 먼저 수행하는 것이 바람직하다 [18,22]. 따라서 상기의 full factorial 실험의 ANOVA 분석에서 얻은 1차 모델식을 근거로 하여 가장 가파른 경사도를 보여주는 기울기를 구하여, 숙신산의 생산성이 최대를 보여주는 근사적인 지점을 찾고 자 측차실험을 수행하였다 (steepest ascent method, SAM). 이전의 FFD 실험에서와 같이 low-glucose level과 high-glucose level의 SAM 실험을 각각 별도로 수행하였으며, 실험의 분석결과에 근거해서 low-glucose level과 high-glucose level 모두 3종류의 배지성분 (glucose, yeast extract, corn steep liquor)의 농도를 모두 증가시키는 방향으로 SAM 실험을 수행하였다.

Low-glucose level SAM 실험의 경우, 이전 FFD 모델식에 따라 r값과 new step값을 구해준 결과, glucose는 75~159 g/L까지, yeast extract는 5~15.55 g/L까지, corn steep liquor는 15~42.35 g/L까지 증가시키는 방법으로, 총 11조합의 실험을 수행하였다 (Table 8). 각각의 배지 조합으로 배양한 결과, 세 가지 배지성분의 농도가 증가할수록 숙신산의 생산량도 증가하는 경향을 보이다가, 10번 조합부터는 숙신산 생산량이 감소하는 현상이 나타났다 (Table 8). 9번 조합까지 숙신산의 생산성이 증가하는 것으로 보이지만, glucose에 대한 숙신산의 이론수율 대비 관찰수율 (observed yield/theoretical yield based on glucose consumption)을 분석하여 보면, 7번 조합이 55.7%로 가장 높고 이후 점차 감소하는 경향을 보이는 것을

관찰할 수 있다 (Table 8). 이로부터 8번 조합 이후의 배양 조건에서는 과도하게 공급된 영양분이 숙신산 생합성 쪽으로 효과적으로 이용되지 못하고, 오히려 균주의 성장이나 대사 과정에 저해 요인으로 작용하는 것을 알 수 있었다. 따라서 low-glucose level SAM의 실험에서 최적 조합은 7번 조합 (glucose 134.09 g/L, yeast extract 12.39 g/L, corn steep liquor 34.14 g/L)인 것으로 확인되었으며, 이 때 숙신산 생산량은 64.3 g/L, 이론수율 대비 관찰수율 (관찰수율/이론수율)은 약 55.7%로 나타났다.

한편, high-glucose level SAM 실험도 세 가지 배지 성분 모두가 증가하는 경향성을 보여주었으므로 상기 FFD 실험에서의 주어진 모델식을 이용하여 r 값과 new step값을 계산하였다. 그 결과 glucose는 90~236.86 g/L, yeast extract는 8~11.8 g/L, corn steep liquor는 20~30.53 g/L의 범위로 증가시키는, 총 11개의 배지조합조건으로 SAM 실험을 수행하였으며 그 결과를 제시하였다 (Table 9). 세 가지의 배지성분의 농도가 증가할수록 숙신산의 생산량도 증가하는 경향을 보이나, 6번 조합부터 생산량이 감소하다가 10번 조합에 이르러서는 감소량이 매우 큰 것을 확인할 수 있다. 이는 앞서 논의한 바와 같이 고농도 배지성분이 생산균주의 대사 저해요인으로 작용한 것으로 판단된다. 배양 결과 4번 배지조합 (glucose 144.11 g/L, yeast extract 9.4 g/L, corn steep liquor 23.88 g/L)이 가장 적합한 것으로 판명되었고, 이 때 숙신산의 생산

Table 8. Run table for the low-glucose level SAM experiments (serum-bottle cultures) and the resulting succinic acid production and production yield (CSL: Corn steep liquor, SA: Succinic acid)

	Glucose	Yeast	CSL	SA conc. (avg., g/L)	*Yield ratio (observed/theoretical)
New step	8.44	1.06	2.73		
center	75.00	5.00	15.00	33.42	0.49
1	83.44	6.06	17.73	39.62	0.52
2	91.88	7.11	20.47	43.80	0.51
3	100.32	8.17	23.20	47.20	0.51
4	108.76	9.22	25.94	49.73	0.50
5	117.20	10.28	28.67	56.93	0.53
6	125.65	11.33	31.41	64.27	0.56
7	134.09	12.39	34.14	64.27	0.56
8	142.53	13.44	36.88	64.47	0.49
9	150.97	14.50	39.61	67.00	0.48
10	159.41	15.55	42.35	63.64	0.43

*Yield ratio means the ratio of observed yield to theoretical yield of succinic acid based on glucose consumption.

Table 9. Run table for the high-glucose level SAM experiments (serum-bottle cultures) and the resulting succinic acid production and production yield (CSL: Corn steep liquor, SA: Succinic acid)

	Glucose	Yeast	CSL	SA conc. (avg., g/L)	*Yield ratio (observed/theoretical)
New step	15.46	0.4	1.1		
center	90.00	8.0	20.00	46.76	0.40
1	97.73	8.2	20.55	44.53	0.35
2	113.19	8.6	21.66	61.72	0.42
3	128.65	9.0	22.77	63.81	0.38
4	144.11	9.4	23.88	69.91	0.37
5	159.57	9.8	25.00	71.50	0.34
6	175.03	10.2	26.10	55.92	0.24
7	190.49	10.6	27.21	30.33	0.12
8	205.95	11.0	28.32	35.76	0.13
9	221.40	11.4	29.43	30.22	0.10
10	236.86	11.8	30.53	26.00	0.08

*Yield ratio means the ratio of observed yield to theoretical yield of succinic acid based on glucose consumption.

량은 69.9 g/L, 이론수율 대비 관찰수율 (관찰수율/이론수율)은 37%로 관찰되었다 (Table 9).

상기의 두 종류 SAM 실험에서 지나치게 높은 탄소원을 배지성분으로 첨가할 경우, 오히려 균체의 성장이나 대사과정이 저해되는 현상이 공통적으로 관찰되었는데, 특별히 glucose의 증가폭이 컸던 high-glucose level SAM에서 이와 같은 현상이 더욱 확연하게 관찰되었음은 주목할 만하다.

3.4. 통계적 배지 최적화 방법인 response surface method (RSM) 방법을 적용한 생산배지 성분의 최적 농도 결정: 두 종류의 glucose level을 이용한 접근법 (low-glucose level RSM과 high-glucose level RSM)

상기의 두 번의 SAM 실험에 의해 glucose level에 따른 각각의 배지조합의 최적농도를 근사적으로 찾아낼 수 있었다 (Table 8의 7번, Table 9의 4번 배지조건). 따라서 이 부근에서 통계적 반응표면분석 (response surface method, RSM)을 적용하여 생산배지를 최적화시키기 위하여, FFD와 SAM에서 중요한 요인으로 확인된 glucose, yeast extract, corn steep liquor의 세 가지 배지성분을 이용하여 중심합성계획 (central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. 반응표면분석의 목

적은 독립변수인 배지성분의 각각의 농도 변화에 따라 종속변수인 숙신산의 생산량의 변화관계를 설명해주는 함수관계를 구함으로써, 숙신산의 생산량이 최대가 되는 각 배지성분들의 최적 농도를 찾고자 함이다.

Table 10과 Table 12에 제시한 바와 같이, 중심합성계획에 사용된 실험중점은 상기 SAM에서 최적 조건으로 나타난 농도를 사용하였으며, 독립변수인 세 가지 배지성분의 농도에 대해 (-a, -1, 0, 1, a) 등 5단계로 부호화하고, 3개의 요인으로 설계한 배지조건 14가지의 배지조건과 6개의 중점을 합하여 총 20가지 종류의 배양조건을 결정하였다. 즉 6개의 중점 (0, 0)과 6개의 축점 (-a, a, 0의 조합), 8개의 요인실험점 (-1, 1의 조합)으로 RSM 실험을 수행하였다. 또한 각 배지성분의 농도 변화에 따른 숙신산 생산농도에 대한 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 2차 회귀모형식 모델을 적용하였다.

Low-glucose level RSM의 경우, glucose 117.18~150.82 g/L, yeast extract 9.04~15.76 g/L, corn steep liquor 27.47~40.93 g/L (Table 10)의 다양한 배지조건에서 실험한 결과, 숙신산의 생산성이 41.0~71.6 g/L의 범위인 것으로 나타났다 (Table 11). 이와 같이 얻은 숙신산의 생산농도를 central composite de-

Table 10. Coding and assigned concentrations (g/l) of variables of different levels of the central composite design ($\alpha=1.682$) in the low-glucose level response surface design (RSM) experiments

Factor	Variable	Coded levels				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A	Glucose (g/L)	117.18	124	134	144	150.82
B	Yeast extract (g/L)	9.04	10.4	12.4	14.4	15.76
C	Corn steep liquor (g/L)	27.47	30.2	34.2	38.2	40.93

Table 11. Experimental design and the results of low-glucose level response surface method by the central composite design

Exp. No.	A	B	C	SA (g/L)	Exp. No.	A	B	C	SA (g/L)
1	-1	-1	-1	40.96	11	0	$-\alpha$	0	70.48
2	1	-1	-1	59.27	12	0	α	0	65.36
3	-1	1	-1	55.36	13	0	0	$-\alpha$	54.42
4	1	1	-1	54.70	14	0	0	α	46.22
5	-1	-1	1	51.06	15	0	0	0	65.84
6	1	-1	1	72.54	16	0	0	0	71.61
7	-1	1	1	64.77	17	0	0	0	66.88
8	1	1	1	65.06	18	0	0	0	67.41
9	$-\alpha$	0	0	43.49	19	0	0	0	65.20
10	α	0	0	45.20	20	0	0	0	59.13

Table 12. Coding and assigned concentrations (g/l) of variables of different levels of the central composite design ($\alpha=1.682$) in the high-glucose level response surface design (RSM) experiments

Factor	Variable	Coded levels				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A	Glucose (g/L)	106.36	120	140	160	173.64
B	Yeast extract (g/L)	1.59	5	10	15	18.41
C	Corn steep liquor (g/L)	16.59	20	25	30	33.41

sign에 의해 선정된 이차함수의 형태로 표현하였다. 이차다항식의 각 항에 대한 회귀계수는 Design-Expert 6.0 S/W을 사용하여 다중 회귀분석하였으며, 그 결과 얻어진 최종 모델식을 아래에 제시하였다. 여기서 A는 glucose, B는 yeast extract, C는 corn steep liquor를 뜻하여 AB, BC, AC 등의 부호는 이들 성분 간의 교호작용을 의미한다.

$$Y = \text{숙신산 생산량} = 3.10A + 0.54B + 2.15C - 6.71A^2 + 1.62B^2 - 4.60C^2 - 5.02AB + 0.51AC - 0.45BC \quad (1)$$

ANOVA 분석 결과, P-value는 0.0362로써 통계적으로 매우 유의함을 확인할 수 있었다. 또한 요인변화량 (CV)은 11.40으로 실험의 정확성과 신뢰도가 높으며, R^2 값은 0.9715로서 숙신산의 생산량에 대한 실험값과 모델식이 예측한 값이 거의 일치한다는 것을 알 수 있었다. 상기의 모델식을 이용해서 3가지 성분의 최적 조합을 찾기 위해 2차원 반응표면 분석을 수행한 결과인 glucose, yeast extract, corn steep liquor의 농도 변화에 따른 숙신산의 생산성 변화 경향을 Fig. 5에 제시하였다. 숙신산의 최적 생산조건은 glucose 143.74 g/L, yeast extract 8.42 g/L, corn steep liquor 35.35 g/L인 것으로 분석되었고, 이 배지농도에서의 숙신산의 생산성은 72.88 g/L로 예측되었다. 한편, low-glucose level RSM 실험 및 분석에 의해 예측된 상기의 최적 배지조성 (상기의 glucose, yeast extract, corn steep liquor 및 10 g/L의 NaHCO_3 및 100 g/L의

MgCO_3 포함)에서 실제 serum bottle 배양을 수행한 결과, 숙신산 생산량이 RSM 예측치와 거의 비슷한 73.2 g/L로 관찰되었는데 (Fig. 7), 이로부터 지금까지 수행한 일련의 통계적 배치최적화 방법이 올바르게 수행되었음을 확인할 수 있었다. 주목할 점은 반응표면분석에 의해 추정된 각 배지성분의 최적 농도를 앞서 실험한 최급상승법의 축차실험을 통해 근사적으로 얻은 배지조성과 비교하였을 때, 매우 저렴한 질소원 성분인 corn steep liquor 농도는 조금 더 늘어나는 방향으로 (34.14에서 35.35 g/L로 증가), 반면에 고가의 질소원인 yeast extract는 줄어드는 방향 (12.39 g/L에서 8.42 g/L로 감소)으로 나타났다. 이는 점이다.

한편 high-glucose level RSM의 경우에는, 각 배지성분의 농도차를 더 크게 함으로써, low-glucose level RSM에서 예측한 최적점 이외에 존재하는 또 다른 최적점을 찾고자 하였다 (Table 12). Glucose 106.36~173.64 g/L, yeast extract 1.59~18.41 g/L, corn steep liquor 16.59~33.41 g/L에 달하는 넓은 범위의 배지조합 조건에서 실험한 결과, 숙신산의 생산성도 17.7~84.2 g/L의 넓은 범위에 분포하는 것으로 관찰되었다 (Table 13). 특히 가장 낮은 17.7 g/L의 숙신산 생산량을 보인 11번 배지조합 (glucose 140 g/L, yeast extract 1.59 g/L, corn steep liquor 25 g/L)의 결과로 부터 yeast extract가 숙신산 합성에 매우 중요하므로, 일정량 이상 공급되어야만 한다는 것을 확인할 수 있었다. 상기 실험 결과를 적용하여 각 배지 성분량에 따른 숙신산의 생산농도를 다음과 같은 이차함수

Fig. 5. Succinic acid production as represented by 3D-dimensional graphs as a function of medium components in low-glucose level RSM.

Fig. 6. Succinic acid production as represented by 3D-dimensional graphs as a function of medium components in high-glucose level RSM.

식으로 표현할 수 있었다.

$$Y = \text{숙신산 생산량} = 4.29A + 11.02B - 1.23C - 2.48A^2 - 8.91B^2 + 0.51C^2 + 8.99AB - 0.71AC - 0.75BC \quad (2)$$

ANOVA 분석 결과를 살펴보면, 통계적으로 매우 유의하고 (P-value: 0.0001), 실험의 정확성과 신뢰도가 높을 뿐만 아니라 (요인변화량 (CV): 10.76), 숙신산의 생산량에 대한 실험 값과 모델식이 예측한 값이 거의 일치 (R^2 값: 0.9530)함을 알

Fig. 7. Enhancement in succinic acid production during the sequential application of the statistical medium optimization process such as FFD, SAM and RSM (About 4-fold increase in succinic acid production compared to the original medium).

수 있다. 본 모델을 적용해서 얻은, 3가지 성분에 대한 2차원 반응표면 분석 결과 (glucose, yeast extract, corn steep liquor의 농도 변화에 따른 숙신산의 생산량 변화 경향)를 Fig. 6에 나타내었다. High-glucose level RSM 실험 결과, glucose 180 g/L, yeast extract 15.08 g/L, corn steep liquor 20.75 g/L의 배지조합에서 숙신산의 생산성이 최댓값인 92.9 g/L에 달하는 것으로 예측되었다. 한편, high-glucose level RSM 실험 및 분석에 의해 예측된 최적 배지조성 (상기의 glucose, yeast extract, corn steep liquor 및 10 g/L의 NaHCO_3 및 100 g/L의 MgCO_3 포함)에서 실제 serum bottle 배양을 수행한 결과, 숙신산 생산량이 89.1 g/L로서 high-glucose level RSM 예측치의 약 96%에 해당하는, 매우 양호한 결과를 얻을 수 있었는데, 이로부터 RSM 실험을 통한 배지조성 최적화 전략이 매우 효율적이었음을 확인할 수 있었다.

주목할 점은 본 연구에서 사용한 생산균주가 고농도의 탄소원에 대한 내성이 강한 특성이 있어, 배지성분들의 수준이 매우 높은 농축된 산업용 복합배지를 개발하고자 하였으나,

glucose 농도가 지나치게 높은 약 180 g/L 이상의 농도에서는 오히려 심각한 기질저해 (substrate inhibition) 현상으로 인해 세포대사는 물론 숙신산의 생산성도 큰 폭으로 감소했다는 점이다. 그 결과 high-glucose level RSM 실험을 통해 통계적으로 예측된 배지조성 (glucose 180 g/L, yeast extract 15.08 g/L, corn steep liquor 20.75 g/L)이 궁극적으로 low-glucose level RSM을 통해 예측된 최적 배지조성 (glucose 143.74 g/L, yeast extract 8.42 g/L, corn steep liquor 35.35 g/L)에 꽤 근접한 수준으로 최적화되는 것을 확인할 수 있었다.

한편, Fig. 7에 저가의 산업용 복합배지를 개발하기 위해, 일련의 통계적 방법인 OAFT, FFD, SAM 및 RSM 실험을 통한 상기의 배지 최적화 과정 동안 실제 배양을 통해 얻은 숙신산의 생산성을 요약 제시하였다. High-glucose level RSM을 통해 예측된 최적 배지조성에서 숙신산의 생산성이 89.1 g/L로 가장 높았는데, 이는 배지 최적화 이전 단계에서 사용하던 초기 생산배지의 생산성 (25 g/L) 비해 약 3.5배 정도 큰 폭으로 증가된 고무적인 결과이다. 또한 본 연구를 통하여 높은 농도의 탄소원 (glucose)의 조건 하에서, yeast extract를 가능한 한 적은 양 첨가하고 (약 52% 감소), 그 대신 corn steep liquor의 첨가농도를 최대한 증가시킨, 매우 경제적인 저가의 산업용 복합배지를 개발할 수 있었다.

4. CONCLUSION

*Actinobacillus succinogenes*의 혐기성배양을 통한 숙신산 (succinic acid)의 대량생산 배양공정 개발하기 위한 첫 단계로 저가의 산업용 복합배지를 통계적 방법을 적용하여 개발하는 연구를 수행하였다. 우선 OFAT (one factor at a time) 실험을 통해 25가지의 질소원 성분이 숙신산 생산성에 미치는 영향을 조사하였으며, 이를 통해 가격이 매우 저렴하여 산업용 배지성분으로 이용될 수 있는 corn steep liquor가 고가의 yeast extract를 어느 정도 대체할 수 있음을 확인하였다. 이후 동시에 많은 요인에 대한 정보를 획득하기 위해 2ⁿ 전체요인설계법 (full factorial design (FFD) 실험을 적용하여 배지성분 상호간의 관계를 분석하는 연구를 수행하였다. FFD 실험을 포함한 이후의 일련의 통계적 배지 최적화 연구는 낮은 glucose

Table 13. Experimental design and the results of the high-glucose level response surface method by the central composite design

Exp. No.	A	B	C	SA (g/L)	Exp. No.	A	B	C	SA (g/L)
1	-1	-1	-1	58.57	11	0	$-\alpha$	0	17.67
2	1	-1	-1	49.34	12	0	α	0	77.31
3	-1	1	-1	51.84	13	0	0	$-\alpha$	73.05
4	1	1	-1	84.19	14	0	0	α	75.19
5	-1	-1	1	53.59	15	0	0	0	71.05
6	1	-1	1	47.12	16	0	0	0	64.09
7	-1	1	1	49.47	17	0	0	0	72.99
8	1	1	1	73.34	18	0	0	0	75.66
9	$-\alpha$	0	0	60.32	19	0	0	0	68.14
10	α	0	0	71.04	20	0	0	0	71.63

농도 (low-glucose level)의 경우와, 높은 glucose 농도 (high-glucose level)의 경우에 대해, 두 가지 방향으로 각각 별도로 수행되었다. Low- 및 high-glucose level FFD 실험 결과, 탄소 원인 glucose가 숙신산의 생산성에 미치는 영향이 가장 크고, glucose의 농도는 더욱 증가해주는 쪽으로, 동시에 yeast extract와 corn steep liquor 첨가 농도 역시 더 높여주어야 하는 것으로 관찰되었다. FFD의 1차 모델식을 근간으로 하여 최 급상승법 (steepest ascent method, SAM)을 적용하여 glucose, yeast extract와 corn steep liquor의 최적 농도로 향하는 가장 가파른 기울기를 구함으로써, 신속하고 효율적으로 최적 농도지점에 대한 정보를 얻고자 하였다. 각각의 배지 조합으로 배양한 결과, 세 가지 배지성분의 농도가 증가할수록 숙신산의 생산량도 증가하는 경향을 보이지만, glucose가 과다하게 공급되는 배지조성에서는 영양분들이 숙신산 생합성 쪽으로 효과적으로 이용되지 못하고, 오히려 균주의 성장이나 대사과정에 저해 요인으로 작용하는 것을 확인할 수 있었다. SAM이 제시해주는 농도 부근에서 반응표면분석 (response surface method, RSM)을 적용하여 3가지 배지성분 (glucose, yeast extract와 corn steep liquor)의 농도를 최적화시키기 위해 중심합성계획 (central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. 그 결과 glucose 180 g/L, yeast extract 15.08 g/L, corn steep liquor 20.75 g/L의 배지조합에서 숙신산의 생산성이 최댓값인 92.9 g/L에 달하는 것으로 예측되었다. 이 예측치를 실제 배양을 통해 검증한 결과, 숙신산 생산량이 89.1 g/L로서 예측치의 약 96%에 해당하는, 매우 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 궁극적으로 일련의 통계학적 방법인 OAF, FFD, SAM 및 RSM 연구를 통해, 숙신산 생산성이 기존의 생산배지의 생산성 (25 g/L) 비해 약 3.5배 증가된 생산성을 보여주는 저가의 산업용 복합배지를 개발할 수 있었다.

Acknowledgements

본 연구는 대한민국 산업통상자원부의 산업소재핵심기술개발사업 (과제번호: 10031912) 및 강원대학교 생명공학연구소의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Cornils, B. and P. Lappe (2006) "Dicarboxylic Acids, Aliphatic" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. p. 525-526. Published Online: 15 Jun 2000. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, USA.
- Zeikus, J. G., M. K. Jain, and P. Elankovan (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *APPL. Microbiol. Biotechnol.* 51: 545-552.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap, and D. P. Clark (2007) Brock, Biology of microorganisms. 12th edition. Benjamin Cummings, San Francisco, US.
- McKinlay, J. B., C. Vieille, and J. G. Zeikus (2007) Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 727-740.
- Song, H. and S. Y. Lee (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 352-361.
- Bechthold, I., K. Bretz, R. Kopitzky, A. Springer, and S. Kabasci (2008) Succinic acid: a new platform chemical for biobased polymers from renewable resources. *Chem. Eng. Technol.* 31: 647-654.
- Werpy, T. A. and Petersen (Ed) Top value added chemicals from biomass, for the U.S. Department of Energy (DOE) by National Renewable Energy Laboratory (NREL). <http://www.osti.gov/bridge> (2004).
- Guettler, M. V., D. Rumler, and M. K. Jain (1999) *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 207-216.
- Lee, P. C., S. Y. Lee, S. H. Hong, and H. N. Chang (2002) Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 663-668.
- Lee, P. C., W. G. Lee, S. Y. Lee, and H. N. Chang (2001) Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 41-48.
- Lin, H., G. N. Bennett, and K. Y. San (2005) Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate. *Biotechnol. Bioeng.* 89: 148-156.
- Nghiem, N. P., B. H. Davison, B. E. Suttle, and G. R. Richardson (1997) Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 565-576.
- Oh, I. J., H. W. Lee, C. H. Park, S. Y. Lee, and J. W. Lee (2008) Succinic acid production by continuous fermentation process using *Mannheimia succiniciproducens* LPK7. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 908-912.
- Wu, H., Z. M. Li, L. Zhou, and Q. Ye (2007) Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* PflB ldhA double mutant as a result of enhanced anaplerotic activities in the preceding aerobic culture. *Appl. Environ. Microb.* 73: 7837-7843.
- Donnelly, M. I., C. S. Millard, D. P. Clark, M. J. Chen, and J. W. Rathke (1998) A novel fermentation pathway in an *Escherichia coli* mutant producing succinic acid, acetic acid, and ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70: 187-198.
- Corona-González, R. I., A. Bories, V. González-Álvarez, and C. Pelayo-Ortiz (2008) Kinetic study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* ZT-130. *Process Biochem.* 43: 1047-1053.
- McKinlay, J. B., Y. S. Hill, J. G. Zeikus, and C. Vieille (2007) Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of 13 C-labeled metabolic product isotopomers. *Metabolic Engineering* 9: 177-192.
- Hong, H. P., Y. S. Jeong, and G. T. Chun (2010) Statistical optimization of solid growth-medium for rapid and large screening of polysaccharides high-yielding mycelial cells of *Inonotus obliquus*. *KSBB J.* 25: 142-154.

19. Box, G. E. P. and J. S. Hounter (1957) Multi factor experimental design for exploring response surface. *Ann. Math. Stat.* 28: 195-242.
20. Kleijnen, J. P. C., D. D. Hertog, and E. Angn (2004) Response surface methodology's steepest ascent and step size revisited. *Eur. J. Operational Res.* 159: 121-131.
21. Liu G. W. and X. L. Wang (2008) Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 78-83.
22. Agarwal, L., J. Isar, G. K. Meghwanshi, and R.K. Saxena (2006) A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 100: 1348-1354.
23. Lee, P. C., S. Y. Lee, S. H. Hong, and H. N. Chang (2003) Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBE L55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 26: 63-67.
24. Lee, P. C., W. G. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, and Y. K. Chang (2000) Fermentative Production of Succinic Acid from Glucose and Corn Steep Liquor by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5: 379-381.