

목질계 바이오매스의 당화액을 이용한 젓산의 생물공학적 생산

위영중, 윤종선, 박돈희, 김도만, 류화원
전남대학교 응용화학공학부, 생물산업기술연구소
전화 (062) 530-1842, FAX (062) 530-1849

Abstract

The possible inhibitory effect of wood hydrolyzate in lactic acid fermentation was partially decreased by adaptation of *Enterococcus faecalis* RKY1 to wood hydrolyzate-based medium. The strain RKY1 grown on wood hydrolyzate-based medium was tolerant to wood hydrolyzate medium with fermentation efficiency being improved to approximately 20% higher than that obtained with the strain RKY1 grown on glucose-based medium.

서론

기존의 비분해성 플라스틱은 심각한 환경문제들을 야기하고 있는 실정이므로, 전세계적으로 이를 대체할 수 있는 생분해성 고분자의 개발에 연구가 집중되고 있다.¹⁾ 현재까지 개발된 생분해성 고분자들 중에서 실용화 가능성이 가장 높게 평가되는 polylactic acid(PLA)는 젓산을 단량체로 하여 중합이 가능하다. 미국의 Cargill-Dow LLC는 'NatureWorks™'라는 상표로 2002년에 이미 년산 140,000톤 규모의 PLA 생산 공장을 가동하기 시작하여, 이에 대한 젓산의 수요가 급증할 것으로 예상된다.²⁾

국내에는 현재까지 상업화된 젓산 생산시설이 전무한 실정이며, 이는 젓산 생산을 위한 고효율 미생물 및 경제성을 갖는 원료가 개발되지 않았기 때문이다. 현재까지 연구된 젓산 생산공정의 경우, 탄소원으로서 주로 전분계 바이오매스를 이용한 예가 거의 대부분이었으며, 목질계 바이오매스를 이용한 젓산 생산에 관한 연구는 미미한 실정이다. 목질계 바이오매스는 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 리그닌 등으로 구성되어 있다. 목질계 바이오매스로부터 발효가 가능한 당을 제조하기 위해서는 물리적 및 화학적 전처리 과정이 필수적이다. 일반적으로 목질계 바이오매스의 전처리 과정에서 발생하는 여러 저해물질들(예: 아세트산, 당 분해산물, 리그닌 분해산물 등)은 미생물 발효에 심각한 저해효과를 나타낸다.³⁾ 따라서, 본 연구에서는 목질계 바이오매스의 당화액을 이용하여 젓산을 생물공학적으로 생산하는데 있어서 저해물질들에 대한 젓산발효 저해를 극복하여 생산성을 증가시키고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 보관 젖산 생산균주는 *E. faecalis* RKY1^{1,4,5}을 사용하였으며, 전배양 배지에서 6시간 배양한 후 6 ml 바이얼에 배양액 2 ml과 글리세롤 2 ml을 혼합하여 -20℃에서 보관하였으며 1개월마다 계대하여 사용하였다.

배지 및 배양조건 미생물 성장을 위한 전배양 배지는 배지-I(glucose 30 g/l, yeast extract 10 g/l, K₂HPO₄ 5 g/l)과 배지-II(glucose 30 g/l를 포함한 목질계 당화액, yeast extract 10 g/l, K₂HPO₄ 5 g/l)를 사용하였다. 젖산 발효를 위한 본배양 배지의 조성은 목질계 당화액(glucose 25-100 g/l) 및 yeast extract 15 g/l이었다. 전배양은 배지 14 ml가 포함되어 있는 20 ml 바이얼에 냉동보관 균주 1 ml을 주사기로 주입하여 진탕배양기에서 38℃, 200 rpm으로 배양하였다. 성장배지 38 ml가 포함되어 있는 50 ml 바이얼에 접종액 2 ml를 주사기로 주입하여 동일한 배양조건으로 6시간동안 배양하여 발효조 배양을 위한 접종액으로 사용하였다. 발효조 배양은 발효배지 960 ml를 포함하고 있는 2.5 l 발효조(KF-2.5L, Korea Fermenter Co., Korea)에 접종하고 10 N NaOH를 사용하여 pH를 7.0으로 조절하면서 38℃, 200 rpm으로 배양하였다.

목질계 당화액 제조 셀룰로스 49.3%(w/w), 헤미셀룰로스 25.9%(w/w), 리그닌 21.7%(w/w)로 구성된 목재를 2×4 mm로 세절하여 0.5%(w/v) H₂SO₄ 용액에 24시간 동안 침적시킨 후, 215℃에서 5분간 증기폭쇄 하였다. 폭쇄된 목재는 당화효소인 Celluclast 1.5L(Novo Nordisk A/S, Denmark)과 Novozym 188 (Novo Nordisk A/S)을 사용하여 당화시킨 후, 고형분은 원심분리하여 제거하였다. 이와 같이 제조된 목질계 당화액 내에 포함된 glucose의 농도는 약 88 g/l 이었다.

분석방법 젖산은 HPLC(Waters Ltd., USA)를 사용하여 Aminex HPX-87H ion-exclusion column (300×7.8 mm, Bio-Rad Lab., USA), 이동상 5 mM H₂SO₄, 유량 0.6 ml/min, UV 검출기 (Waters 486, Waters Ltd., USA) 210 nm, 컬럼온도 35℃의 조건에서 분석하였다. L(+)형 및 D(-)형 젖산은 Sigma Co.의 효소 키트를 사용하여 정량하였으며, glucose의 농도는 영동제약의 효소키트를 사용하여 정량하였다. 미생물 성장은 분광광도계(UV-160A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 660 nm에서 optical density를 측정하여 보정곡선으로부터 건조균체량을 산출하였다.

결과 및 고찰

목질계 바이오매스의 당화액의 저해효과를 완화시키기 위하여 당화액을 포함한 배지(배지-II)에 *E. faecalis* RKY1을 적응배양하였다. 배지-I을 사용하여 전배양한 경우와 젖산발효 양상을 비교한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 배지-I에서 전배양한 경우

에는 상당한 저해효과를 보여 젖산생산 및 미생물 성장이 전반적으로 지연된 반면, 배지-II에 적응배양한 경우에는 이러한 저해효과가 완화되어 발효성능이 향상된 것을 알 수 있다. 배지-I에서 전배양한 경우와 배지-II에서 적응배양시킨 경우의 젖산 생산성은 각각 $2.6 \text{ g/l} \cdot \text{h}$ 와 $3.1 \text{ g/l} \cdot \text{h}$ 로서, 미생물을 목질계 당화액을 포함한 배지에 적응배양시킬 경우 생산성이 약 1.2배정도 향상됨을 알 수 있다. 목질계 당화액 내에 포함된 여러 저해물질들을 물리적 또는 화학적으로 제거하는 방법들이 보고되었지만, 이러한 방법들은 젖산 생산공정을 복잡하게 하고 생산단가 상승을 초래하므로 미생물을 목질계 당화액에 직접 적응배양시킴으로써 이러한 단점들을 어느 정도 극복할 수 있을 것으로 생각된다.

목질계 바이오매스의 당화액 내에 포함된 glucose 농도에 따른 젖산생산에 대한 영향을 알아보기 위하여 당화액을 희석 및 농축하여 glucose 농도가 25-100 g/l가 되게 조정하여 발효조 배양을 실시하였다. Fig. 2에서 보는바와 같이 당화액 내의 glucose 농도가 증가할수록 최종 생산된 젖산의 농도 또한 증가하였다. Glucose 100 g/l가 포함된 당화액을 사용한 경우에 최대 젖산농도(93.0 g/l)를 얻을 수 있었으며, 실험한 모든 glucose 농도에서 93% 이상을 젖산 수율을 얻을 수 있었다. 미생물 성장은 당화액 내에 포함된 glucose 농도가 증가함에 따라 증가하였으며, 최대 미생물 농도는 glucose 100 g/l 당화액을 사용한 경우에 8.7 g/l까지 증가하였다. 목질계 당화액 내의 glucose 농도가 50 g/l 이상에서는 젖산 생산성이 급격히 감소하였는데, 이는 당화액 내의 glucose 농도가 증가함에 따라 저해물질들의 농도 또한 증가하기 때문인 것으로 생각된다. Glucose 50 g/l를 포함한 목질계 당화액을 사용하여 $3.2 \text{ g/l} \cdot \text{h}$ 의 최대 생산성을 얻을 수 있었다. 또한, 생산된 젖산의 약 96% 이상이 L(+)-젖산으로서 PLA 중합에 적합한 광학적 순도를 갖는 젖산을 목질계 당화액으로부터 생산할 수 있었다.

감 사

본 연구는 에너지관리공단 바이오에너지기술개발사업에 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Yun, J.S. and H.W. Ryu, "Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1"(2001), *Proc. Biochem.*, **37**(3), 235-240.
2. Datta, R., S.P. Tsai, P. Bonsignore, S.H. Moon, and J.R. Frank, "Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives"(1995), *FEMS Microbiol. Rev.*, **16**,

221-231.

3. Palmqvist, E., B. Hahn-Hägerdal, "Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates. I: inhibition and detoxification"(2000), *Bioresour. Technol.*, **74**, 17-24.
4. Ryu H.W., K.H. Kang, J.S. Yun, "Bioconversion of fumarate to succinate using glycerol as a carbon source"(1999), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **77/79**, 511-520.
5. Ryu H.W., K.H. Kang, J.G. Pan, H.N. Chang, "Characteristics and glycerol metabolism of fumarate-reducing *Enterococcus faecalis* RKY1"(2001), *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 119-24.

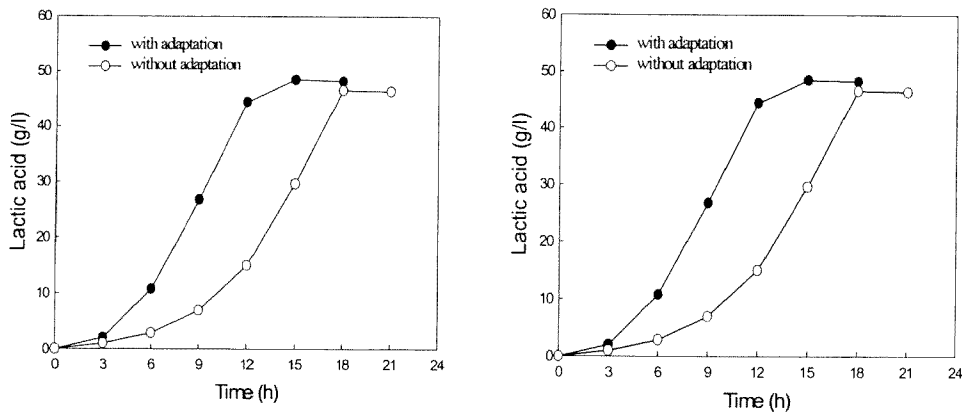


Fig. 1. Time courses of lactic acid production and cell growth in batch fermentation of wood hydrolyzate by *Enterococcus faecalis* RKY1 with and without adaptation to wood hydrolyzate-based medium.

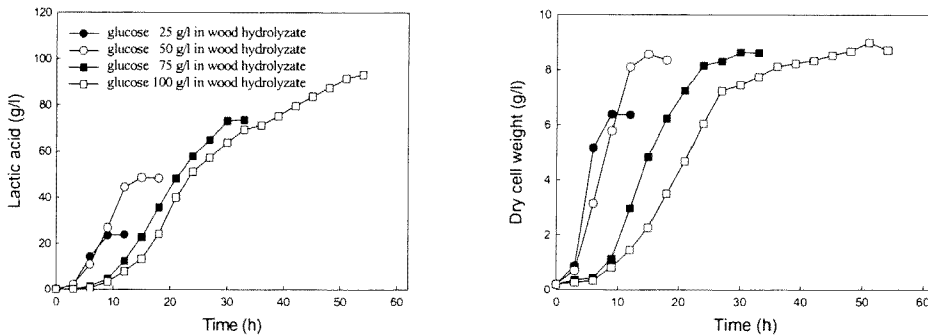


Fig. 2. Effect of initial glucose concentrations in wood hydrolyzate on lactic acid production and cell growth by *Enterococcus faecalis* RKY1 adapted to wood hydrolyzate-based medium.