

Enterococcus faecalis RKY1의 희분식 발효를 통한 수크로스로부터 L(+)-Lactic acid의 생산

위영중, 윤종선, 정상원¹, 한승호¹, 류화원
전남대학교 응용화학공학부 및 생물산업기술연구소, ¹(주)대한제당 중앙연구소
전화 (062) 530-1842, FAX (062) 530-1849

Abstract

Lactic acid fermentation from sucrose as a carbon source was experimented. *E. faecalis* RKY1 metabolized sucrose efficiently into lactic acid through homolactic fermentation pathway. The optimal sucrose concentration for lactic acid production was found to be 150 g/l with the yield and productivity of 0.97 g/g and 3.7 g/l · h, respectively. Lactic acid produced from sucrose was almost L(+)-lactic acid up to 98% based on total lactic acid produced. Therefore, sucrose was thought to be potential carbon source for L(+)-lactic acid production using *E. faecalis* RKY1.

서론

젖산(CH_3CHOH) 및 그 유도체들은 식품, 의약품, 피혁 및 섬유산업 등에 매우 폭넓은 용도를 갖는다.^{1,2)} 최근에는 석유자원으로부터 제조되는 합성플라스틱을 대체할 수 있는 생분해성 고분자인 polylactic acid(PLA)를 생산하기 위한 단량체로서 젖산에 대한 관심과 연구가 증가하고 있는 추세이다.³⁾ 일반적으로 석유화학 합성법에 의하여 제조된 젖산은 L(+) 및 D(-)형 젖산이 약 50%씩 혼합된 상태인 라세미 혼합물을 형성하므로 산업적인 이용가치가 한정적인 반면에, 미생물을 이용한 발효공정을 통한 젖산의 제조방법은 L(+)형 또는 D(-)형 젖산만을 거의 순수하게 생산할 수 있어 산업적인 이용가치가 높다. 특히, PLA를 합성하는데 있어서 단량체로 사용되는 젖산의 광학적 순도에 따라 PLA의 물성이 크게 좌우되어 광학적 순도가 높은 젖산이 요구되므로 발효공정을 통한 젖산 생산이 화학 합성방법에 비하여 더 많은 장점을 갖는다.^{1,3)}

현재까지 연구된 젖산 발효공정의 경우 탄소원으로서 정제된 글루코스 및 전분을 이용한 예가 거의 대부분이며, 경제적인 젖산 발효공정에 대한 연구로서 유청, 당밀 등의 부산물들을 이용할 수 있는 가능성들이 제시되어 왔다.⁴⁾ 국내의 경우 본 연구에서 탄소원으로 사용된 수크로스로부터 젖산을 생산한 연구는 거의 없는 실정이다. 하지만, 설탕 제조 시 발생하는 부산물인 당밀은 수크로스가 대부분인 많은 양의 당을

함유하고 있으므로 수크로스로부터 젖산을 생산하는 발효공정은 당밀의 산업적인 이용면에 있어서도 상당히 중요하다고 할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 당밀에 과량 함유되어 있는 수크로스를 이용하기 위한 기초 연구로서 글루코스, 프럭토스 및 말토스 등에서 고농도 및 고수율로 젖산을 생산할 수 있는 *Enterococcus faecalis* RKY1⁵⁾을 이용하여 수크로스로부터 젖산 생산을 시도하였으며, 그 발효특성에 관하여 연구하였다.

재료 및 방법

균주 및 보관 젖산발효 균주로서 *E. faecalis* RKY1을 사용하였으며, 이 균주는 통성의 그람양성 구균으로서 1 μm 정도의 크기를 갖는다. 전배양 배지에서 6시간 배양한 후 6 ml 바이얼에 배양액 2 ml과 글리세롤 2 ml을 혼합하여 -20°C에서 보관하였으며 1개월마다 계대하여 사용하였다.

배지 및 배양조건 미생물 성장을 위한 전배양 배지의 조성은 sucrose 30 g/l, yeast extract 10 g/l, K_2HPO_4 5 g/l였으며, 젖산 발효를 위한 본배양 배지의 조성은 sucrose 50-200 g/l 및 yeast extract 20 g/l였다. 전배양은 pH를 7.0으로 조절한 성장배지 14 ml가 포함되어 있는 20 ml 바이얼에 냉동보관 균주 1 ml을 주사기로 주입하여 진탕배양기 (KMC-8480S, Vision Scientific Co., Korea)에서 38°C, 200 rpm으로 12시간 간격으로 24시간 동안 배양하였다. 성장배지 38 ml이 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°C, 200 rpm으로 배양하였다.

분석방법 젖산 등의 유기산은 HPLC (Waters Ltd., USA)를 사용하여 Aminex HPX-87H ion-exclusion column (300×7.8 mm, Bio-Rad Lab., USA), 이동상 5 mM H_2SO_4 , 유량 0.6 ml/min, UV 검출기 (Waters 486, Waters Ltd., USA) 210 nm, 컬럼온도 35°C의 조건에서 분석하였다. L(+)형 및 D(-)형 젖산은 Sigma Co.의 효소 키트를 사용하여 정량하였다. 수크로스의 농도는 phenol-sulfuric acid법으로 분광광도계 (UV-160A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 세포성장은 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 광학밀도를 측정하여 보정곡선으로부터 건조균체량을 산출하였다.

결과 및 고찰

젖산발효의 형태는 발효산물의 분포에 따라 크게 동형 및 이형발효로 구분할 수 있는데, 이형 젖산발효는 부산물이 과량 생성되어 정제과정을 복잡하게 하는 등의 단점이 있어 부산물이 거의 생성되지 않는 동형 젖산발효 특성을 갖는 균주가 요구된

다. 따라서, 본 연구에 사용된 젖산 발효균주인 *E. faecalis* RKY1의 수크로스를 탄소원으로 한 동형 젖산발효 여부를 확인하기 위하여 수크로스 100 g/l를 기질로 하여 발효를 수행한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 27시간 발효 후의 생산물이 거의 젖산이며 포름산 및 아세트산이 소량 생성되어 수크로스를 탄소원으로 하여 동형 젖산발효가 가능함을 확인하였다. 따라서, 탄소원으로 사용된 수크로스의 농도에 따른 영향을 알아보기 위하여 초기 수크로스 농도를 50 g/l-200 g/l로 조정하여 발효를 진행한 후의 젖산생산 및 세포성장에 대한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 젖산생산 및 세포성장에 있어서 최적의 수크로스 농도는 150 g/l임을 알 수 있었다. Table 1에서 보는 바와 같이 수크로스를 탄소원으로 하여 젖산발효를 수행한 결과 기질농도 50 g/l-200 g/l의 경우 모두 90% 이상의 수율을 얻을 수 있었으며, 최적의 농도로 확인된 수크로스 150 g/L의 경우 수율 97% 및 부피생산성 3.0 g/l·h로 효율적인 젖산발효 특성을 확인할 수 있었다. 젖산의 용도에 있어서 산업적으로 더 많은 용도를 가지기 위해서는 L(+)-젖산의 순도가 높아야 하는데, 본 연구에 사용된 *E. faecalis* RKY1에 의해 수크로스를 탄소원으로서 생산된 젖산의 광학적 순도를 분석한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 98% 이상이 L(+)-젖산으로서 산업적인 응용면에 있어서도 탁월함을 알 수 있었다.

E. faecalis RKY1 균주는 탄소원으로서 글루코스, 프럭토스, 말토스 이외에도 본 연구에 사용된 수크로스를 이용하여 광학적 순도가 높은 젖산을 고수율로 생산하는 발효특성을 나타내었으며, 이와 같은 결과는 당 제조시에 다량 발생하는 부산물을 탄소원으로서 사용하여 젖산을 제조할 수 있는 가능성을 갖는 것으로 생각된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구사업 (과제번호: R05-2000-000-00175-0) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Varadarajan, S. and D.J. Miller, "Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids"(1999), *Biotechnol. Prog.*, **15**, 845-854.
2. Wilke, D., "Chemicals from biotechnology: Molecular plant genetics will challenge the chemical and the fermentation industry"(1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 135-145.
3. 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.
4. Hogvindhahl, K. and B.H. Hägerdal, "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources"(2000), *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 87-107.

5. 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.

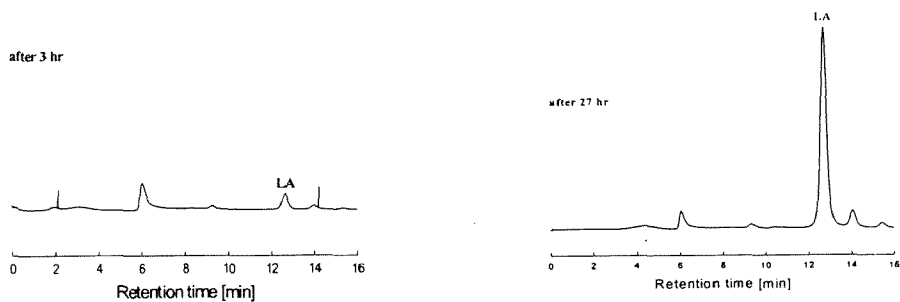


Fig. 1. HPLC chromatograms of metabolites in lactic acid fermentation using sucrose as a carbon source by *E. faecalis* RKY1. [initial sucrose 100 g/l, LA: lactic acid]

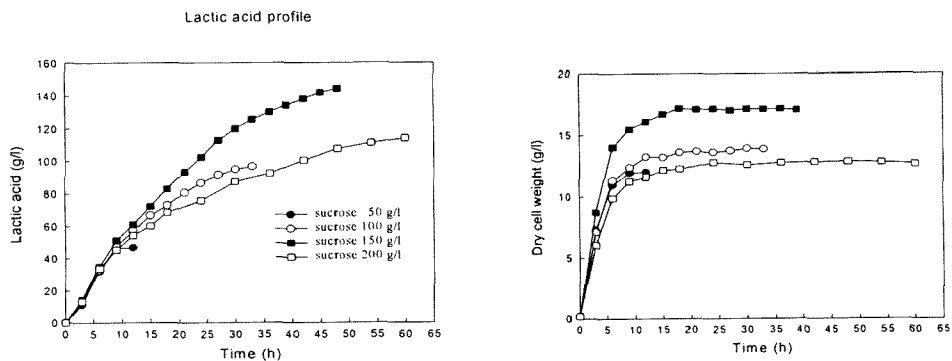


Fig. 2 Time courses of lactic acid produced and cell growth in lactic acid fermentation from sucrose by *E. faecalis* RKY1.

Table 1. Effect of sucrose concentration on lactic acid production, L(+)-lactic acid content, yield, and productivity by *E. faecalis* RKY1

| Initial sucrose (g/l) | Fermentation time (h) | Lactic acid (g/l) | L(+)-Lactic acid content (%) | Yield ^a | Productivity (g/l · h) |
|-----------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------|--------------------|------------------------|
| 50 | 12 | 46.7 | 98.1 | 0.96 | 3.89 |
| 100 | 33 | 96.4 | 98.7 | 0.98 | 2.92 |
| 150 | 48 | 144.2 | 98.9 | 0.97 | 3.00 |
| 200 | 60 | 114.0 | 98.4 | 0.93 | 1.90 |

^ayield : g-lactic acid produced/g-sucrose consumed