

포도당(100 g/l)을 공급하여 잔류 포도당이 계속 존재하였기 때문에 추측된다. 이로써, 앞에서 거론했던 바와 같이 D-isomer의 증가는 균체가 starvation 상황을 겪을 경우 가장 크게 일어나는 것으로 생각된다. 또한 Hjörleifsdottir 등(15)이 지적했듯이 Mattiasson 등(12)의 실험에서는 peristaltic pump에 의한 균체 재순환 과정에서 균체에 가해지는 mechanical stress를 피할 수 없었고, 본 실험에서는 diaphragm pump를 사용했으므로 위와 같은 요인이 많이 완화되었을 것으로 생각한다. 초반에 D-isomer의 비율이 높았던 것은 플라스크에서의 seed culture 과정이 균체에 나쁜 환경을 조성해 주었기 때문으로 생각되며, 차츰 전반적으로 비율이 감소하는 경향을 보이고 있다. 134시간에서 176시간까지의 세 data를 제외하고는 아세트산 생성 곡선과 D-lactate 비율 곡선이 매우 유사한 모양을 나타내고 있으며, 이로써 아세트산의 생성과 D-lactate의 비율은 밀접한 관계가 있음을 알았다.

요 약

젖산균의 회분식 발효를 통해 균체 성장 및 젖산 생산은, 생산되는 젖산에 의한 생산물 저해 현상과 배지 중의 복합질소원 농도, 이 두가지 요인에 크게 좌우됨을 확인했다. 따라서 이를 개선하기 위한 방법으로 균체 재순환에 의한 연속발효를 시도했으며 특히 기존의 균체 재순환 연구에 비해, 생산되는 젖산의 농도를 높이고자 했다. 포도당 100 g/l, yeast extract 15 g/l의 배지를 이용한 완전 균체 재순환 발효에서 균체 농도는 145 g/l, 젖산 농도는 85 g/l, 생산성은 73 g/lhr까지 올라갔으며 이는 같은 농도의 yeast extract를 사용한 회분식 발효보다 균체 농도는 16배, 생산성은 23배 정도 높은 값이다. 또한 희석율을 0.2로 일정하게 유지시켰을 때 전체적으로 10일 이상 연속 조업할 수 있었고, 이때 젖산 농도는 70 g/l 정도로 높게 유지되었다. 그러나 yeast extract 농도를 3 g/l로 감소시켰을 때 균체 농도는 거의 정상상태를 보였지만 젖산 농도는 약간 감소하여 50~55 g/l의 값에서 유지되었다. 생산되는 젖산의 광학 특성을 검토해 봤을 때 포도당 제한에 의해 D-lactate의 비율이 늘어나는 것으로 생각되며, 따라서 포도당 제한이 안 걸리는 경우의 완전 균체 재순환 발효에서 D-lactate의 비율 증가는 없었다. 또한 D-lactate의 생성은 acetate 생성과 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다.

참고문헌

1. Vick Roy, T.B. 1985. Lactic acid, Pp. 761-776. In M. Moo-Young(ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, Pergamon Press.
2. Lipinsky, E.S. and R.G. Sinclair. 1986. Is lactic acid a commodity chemical? *Chem. Eng. Progress*. August: 26-32.
3. Stenroos, S.L., Y. Linko, and P. Linko. 1982. Production of L-lactic acid with immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotech. Lett.* 4: 159-164.
4. Vick Roy, T.B., H.W. Blanch, and C.R. Wilke. 1982. Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a hollow fiber fermenter. *Biotech. Lett.* 4: 483-488.
5. Stieber, R.W. and P. Gerhardt. 1981. Dialysis continuous process for ammonium lactate fermentation. *Biotech. Bioeng.* 23: 535-549.
6. Sortland, L.D. and C.R. Wilke. 1969. Growth of *Streptococcus faecalis* in dense culture. *Biotech. Bioeng.* 11: 805-841.
7. Vick Roy, T.B., D.K. Mandel, D.K. Dea, H.W. Blanch, and C.R. Wilke. 1983. The application of cell recycle to continuous fermentative lactic acid production. *Biotech. Lett.* 5: 665-670.
8. Mehaia, M.A. and M. Cheryan. 1986. Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. *Enzyme. Microb. Technol.* 8: 289-292.
9. Ohleyer, E., H.W. Blanch, and C.R. Wilke. 1985. Continuous production of lactic acid in a cell recycle reactor. *Appl. Biochem. Biotech.* 11: 317-332.
10. Bibal, B., Y. Vayssier, G. Goma, and A. Pareilleux. 1991. High-concentration cultivation of *Lactococcus cremoris* in a cell-recycle reactor. *Biotech. Bioeng.* 37: 746-754.
11. De Man, J.C., M. Rogosa, and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
12. Mattiasson, B., S. Hjörleifsdottir, and O. Holst. 1990. Continuous culture with cell recycling as a means to produce cell mass and/or low molecular weight substances. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 613: 227-233.
13. Leudeking, R. and E.L. Piret. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.* 1: 393-412.
14. Major, N.C. and A.T. Bull. 1985. Lactic acid productivity of a continuous culture of *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotech. Lett.* 7: 401-405.
15. Hjörleifsdottir, S., O. Holst, and B. Mattiasson. 1991. Effects on product formation in *Lactococcus lactis* 65.1 in continuous culture with complete cell recycling. *Bioprocess Eng.* 6: 29-34.

(Received March 11, 1994)

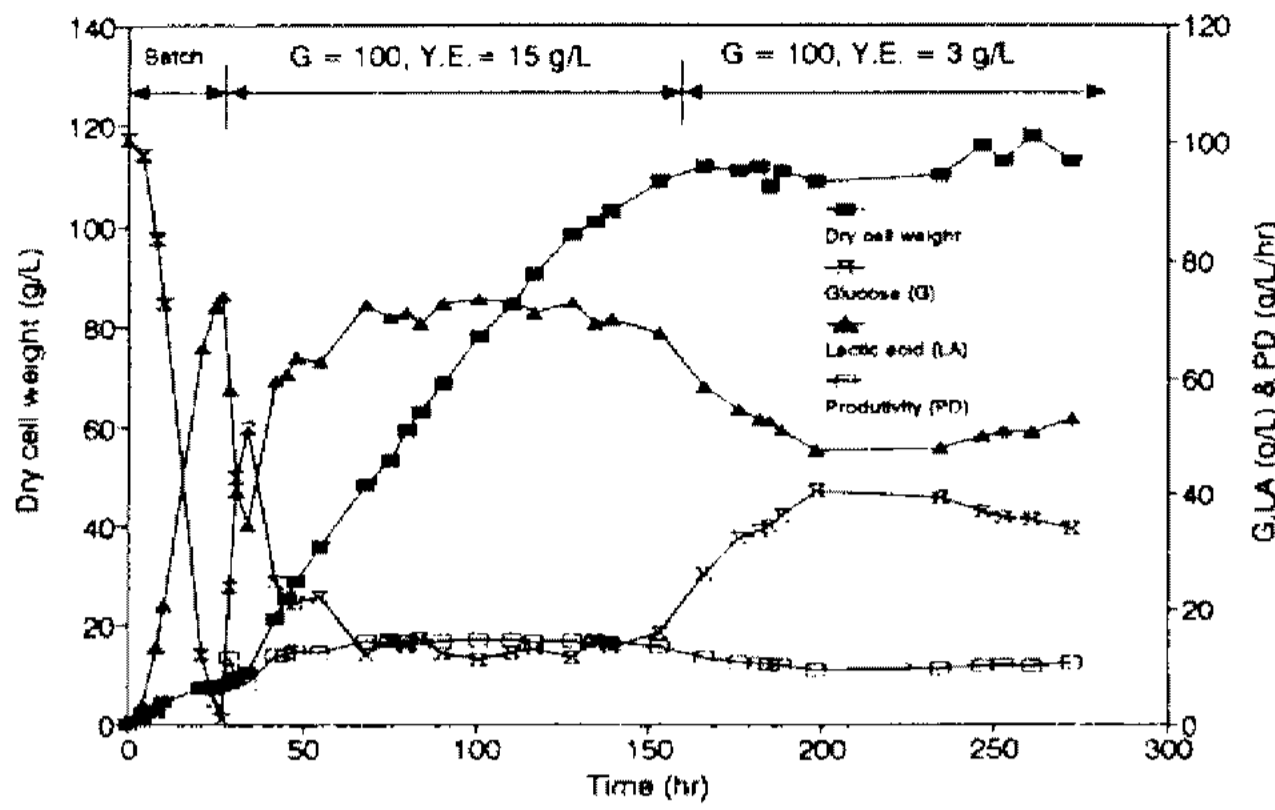


Fig. 6. Total cell recycle culture of *Lactobacillus delbrueckii* at constant dilution rate(0.2 h^{-1}).

보았다. 특히 본 실험의 결과는, 공급 포도당의 농도를 적절히 증가시켜 기질 소비를 100%로 하면서 고농도의 젖산을 생산하고 있음을 알 수 있다.

본 실험에서는 Vick Roy 등(7), Ohleyer 등(9)이 제안했던 바와 같이 균체 재순환시 diaphragm pump를 이용하여 mechanical stress에 의한 cell viability 감소를 완화시키고자 했다. 57시간 이후에는 높은 균체 농도로 인하여 필터에 무리가 가해져서 균체의 완전 재순환을 중지하였다. Ohleyer 등(9)은 본 실험과 같은 균주를 가지고 균체 재순환 발효를 했을 때 정상 상태에서 젖산 농도는 60 g/l를 넘지 못했다고 발표했다. 따라서 앞에서 85 g/l까지 젖산 농도를 올릴 수 있었던 것은 비 정상 상태에서의 균체 성장이 계속됨에 따라 growth-associated 형태로 대부분의 젖산 생산이 이루어졌기 때문에 높은 젖산 농도를 얻을 수 있었던 것으로 생각한다.

다음에는, 100 g/l 포도당과 15 g/l yeast extract 배지를 사용하여 처음부터 희석율을 계속 일정하게 유지하여 균체 재순환 실험을 해보았다. Fig. 6에서 희석율 0.2 hr^{-1} 로 100 g/l 포도당 배지를 공급했을 때, 34시간까지는 포도당 농도가 증가하다가 차츰 감소하여 70시간 이후에는 비교적 일정해지는 것을 알 수 있다. 약 160시간까지 cell bleed는 전혀 없이(단, 1회 sampling에 5 ml 정도의 sample을 뽑아냄) 완전 재순환을 하였는데, 균체 농도가 약 100 g/l에 이를 때까지는 균체의 성장 속도가 $0.01 \sim 0.1 \text{ hr}^{-1}$ 정도의 범위였고, 100 g/l 이상에서는 0.005 hr^{-1} 이하로 약간 둔화되는 경향을 보였다. 160시간 이후에도 같은 농도의 기질을 공급하며 균체를 재순환시켰다면 미미하나마 균체 성장은 계속될 것으로 추측되며, 이는 Ohleyer 등(9)이 주장한 바와는 틀린 결과인데, 그들은 bleed는 전혀 없이 완전 균체 재순환을 했을 때 정상 상태를 얻을 수 있었다고 주장했다. 약 60시간

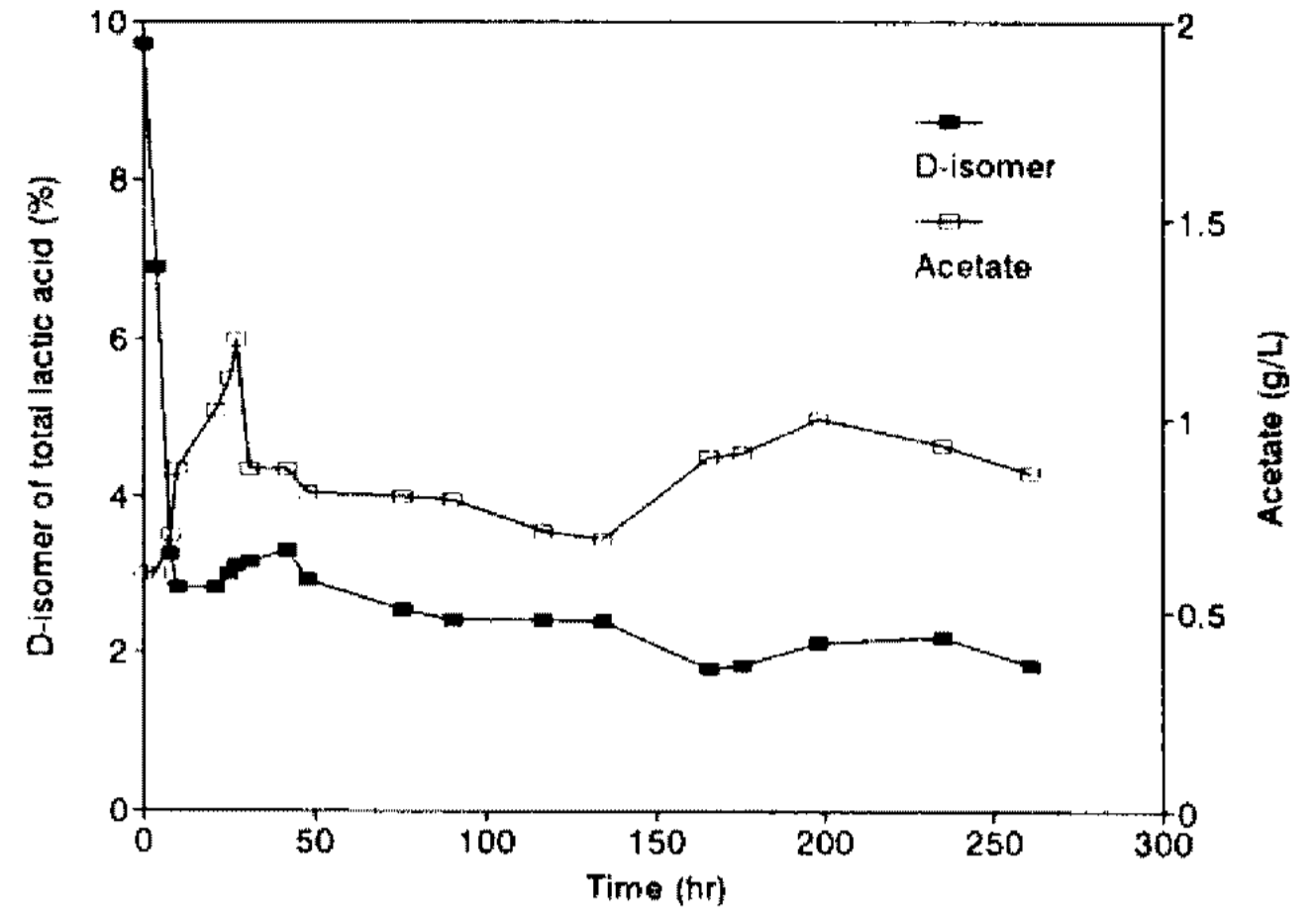


Fig. 7. D-lactate formation in continuous fermentation with complete cell recycling.

에서 160시간까지 균체 성장은 계속되었지만 젖산 농도는 70 g/l 근처에서, 잔류 포도당 농도는 11~13 g/l, 생산성은 14 g/lhr 정도로 일정하게 유지되었다.

160시간 이후에 포도당은 계속 100 g/l로 하고 yeast extract만 3 g/l로 감소시킨 배지를 공급하여 재순환을 계속했다. 균체 농도는 거의 비슷하게 유지되었고 190시간 이후 젖산은 약 50~55 g/l, 포도당은 30~40 g/l로 대체로 정상상태를 보였다. 즉 초기에는 균체 성장의 비정상 상태가 계속되면서 growth-associated 형태로 대부분의 젖산 생산이 이루어졌기 때문에 70 g/l 정도로 Ohleyer 등(9)이 주장한 60 g/l보다 높은 젖산 농도를 얻을 수 있었지만, yeast extract 농도를 감소시킨 이후에는 균체 농도의 정상 상태가 만들어지면서 젖산 생산 속도가 감소되었다. 더 이상 실험을 계속할 수 없었던 것은 필터의 성능이 떨어졌기 때문인데, cell viability를 본 실험에서는 측정해 보지 않았지만 sample을 원심분리했을 때 실험 후반부에서 cell lysis 현상을 관찰할 수 있었고 실험하는 동안 필터에 back flushing을 한번도 해주지 않았기 때문에 필터 내부에 균체가 점차 축적됐기 때문인 것으로 생각한다.

Fig. 6에서 얻은 결과에 대해, 생산된 젖산중 D-isomer가 차지하는 비율과 아세트산 농도를 Fig. 7에 나타내었다. Mattiasson 등(12)은 완전 재순환 발효에서 D-isomer의 비율이 10% 정도로 회분식보다 2배 이상 증가했다고 했는데, 본 실험의 결과는 2~3%로 회분식과 별 차이가 없었으며 오히려 실험 후반부가 가면 더 감소하는 듯한 양상마저 보였다. 이러한 현상은 Mattiasson 등(12)의 경우, 25 g/l 포도당 배지를 0.4 hr^{-1} 의 희석율로 공급하여 발효조 내에 포도당 제한이 일어났기 때문이며, 본 실험에서는 고농도의

까지의 생산성을 비교해 보면 yeast extract 7.5, 15, 30 g/l일 때 각각 2.3, 3.2, 4.2 g/lhr로 비례적으로 증가하였다.

Fig. 4에는 앞에서 얻은 결과중에서 실험 종결시의 sample과 그 바로 전의 sample에 대하여, 생산된 젖산 중 D-lactate가 차지하는 비율을 나타냈다. 대체적으로 3% 근방의 값을 나타냈는데 이것은 다른 연구 논문의 결과와 비슷하다(7). 특징적인 점은 D-lactate의 비율이 모두 조금씩이나마 증가하는 경향을 나타낸다는 것이다. Mattiasson 등 (12)의 연구에 따르면 젖산 발효중 균체에 포도당이 제한되어 'starvation' 상황이 일어날 경우 D-lactate의 생성이 증가한다고 했는데 그 이유를 명확히 설명하지는 못했다. 본 실험의 경우도 특히 포도당 100 g/l일 때가 가장 D-lactate 증가율이 큰 것을 알 수 있다.

균체 재순환 발효

회분식 배양에서 젖산 생산은 yeast extract 농도에 상관없이 생산성이 모두 5 g/lhr 미만이었다. 따라서 본 실험에서는 균체재순환 필터를 이용하여 발효조

내의 균체 농도를 높게 유지시켜 생산성을 높이고자 했다. 두 가지로 기질 공급 방법을 다르게 조업했는데, 한번은 포도당 농도와 희석율을 적절히 바꿔가면서 발효조 내 균체 성장 속도를 높게 유지하고자 했고, 또 한번은 균체 성장 속도는 좀 느리더라도 처음부터 일정한 희석율로 일정한 농도의 포도당을 공급하여 보았다.

Fig. 5는 발효조 내 포도당 농도 변화를 관찰하면서 희석율과 공급 기질의 농도를 적절히 변화시킨 결과이다. 포도당 50 g/l, yeast extract 15 g/l의 배지에서 포도당 농도가 거의 0으로 떨어지는 시간(12 hr)까지 회분식 배양을 한 후 균체 재순환을 시작하였다. 재순환 시작 후 초반에는 낮은 농도의 포도당(50 g/l)을 공급하여 발효조 내의 젖산 농도를 낮게 유지시킴으로써 젖산에 의해 균체 성장이 저해받는 현상을 완화시키고자 했다. 즉 균체의 성장 속도는 발효조 내의 젖산 농도 증가에 따라 급격히 감소하므로 어느 정도 균체 농도가 올라갈 때까지는 성장 속도를 높게 유지시키고자 했던 것이다. 따라서 처음에는 50 g/l 포도당 배지를 이용하여 0.48 hr⁻¹의 희석율로 여과액을 뽑아내다가, 18시간후 발효조 내의 포도당이 제한받는 것을 방지하기 위해 희석율을 0.9로 상승시켜 보았지만 잠깐 동안 포도당 농도가 증가하다가 곧 고갈되기 시작했다. 그 다음 27시간 이후에는 포도당 100 g/l 배지를 0.5 hr⁻¹의 희석율로 공급하기 시작했는데 이 때의 균체 농도는 이미 70 g/l를 넘어서서 공급되는 포도당을 거의 모두 소비하였다. 그래서 32.5시간 이후 희석율을 0.86 hr⁻¹로 올렸지만 47.5시간 이후 포도당 농도는 거의 0으로 유지되었다. 실험 시작 후 57시간째에 이르러 균체 농도는 약 145 g/l에 이르렀고 생산되는 젖산 농도는 85 g/l, 생산성은 73 g/lhr에 이르렀다. Table 1에는 젖산발효에 대한 기존 연구 논문들의 결과를 본 실험의 경우와 간략히 비교하여

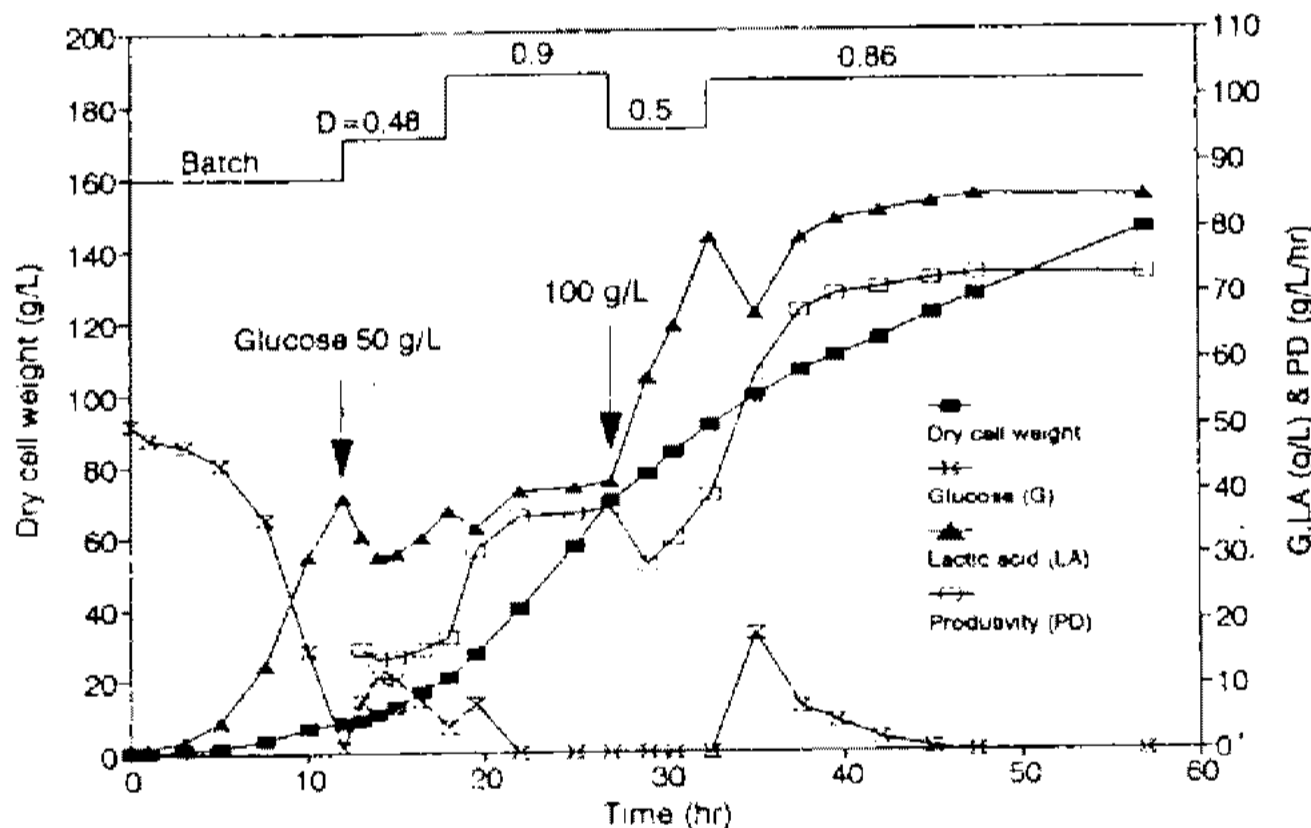


Fig. 5. Fermentation profile of lactic acid production in a CSTR with cell recycle.

Table 1. Comparison of lactic acid fermentation systems

System	Organism	Lactic acid (g/l)	Cell conc. (g/l)	Substrate utilization (%)	Productivity (g/lhr)	Reference
Batch	<i>L. delbrueckii</i>	45	7-8	99	1-2	(13)
Continuous	"	25	1.4	66	8.9	(14)
Immobilized	"	46	67	100	3	(3)
Hollow fiber	"	2	350	4	100	(4)
Cell recycle CSTR	"	35	54	100	76	(7)
"	"	57	140	98	150	(9)
"	"	85	145	100	73	This work
"	<i>L. bulgaricus</i>	43	60	99	85	(8)

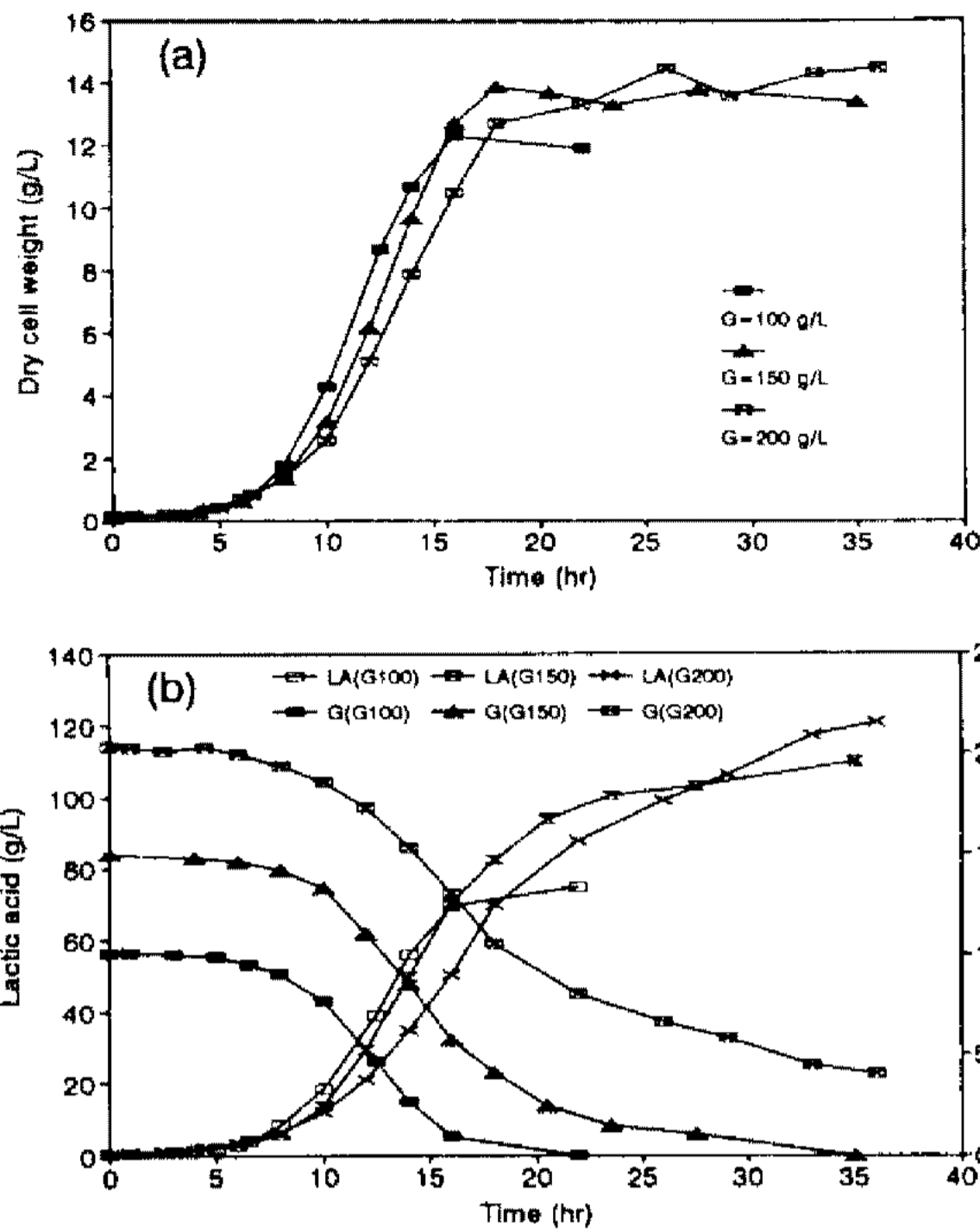


Fig. 2. Time course of batch fermentations with respect to the variation of glucose concentrations. (a) Dry cell weight. (b) Lactic acid and glucose. G=glucose, LA=lactic acid

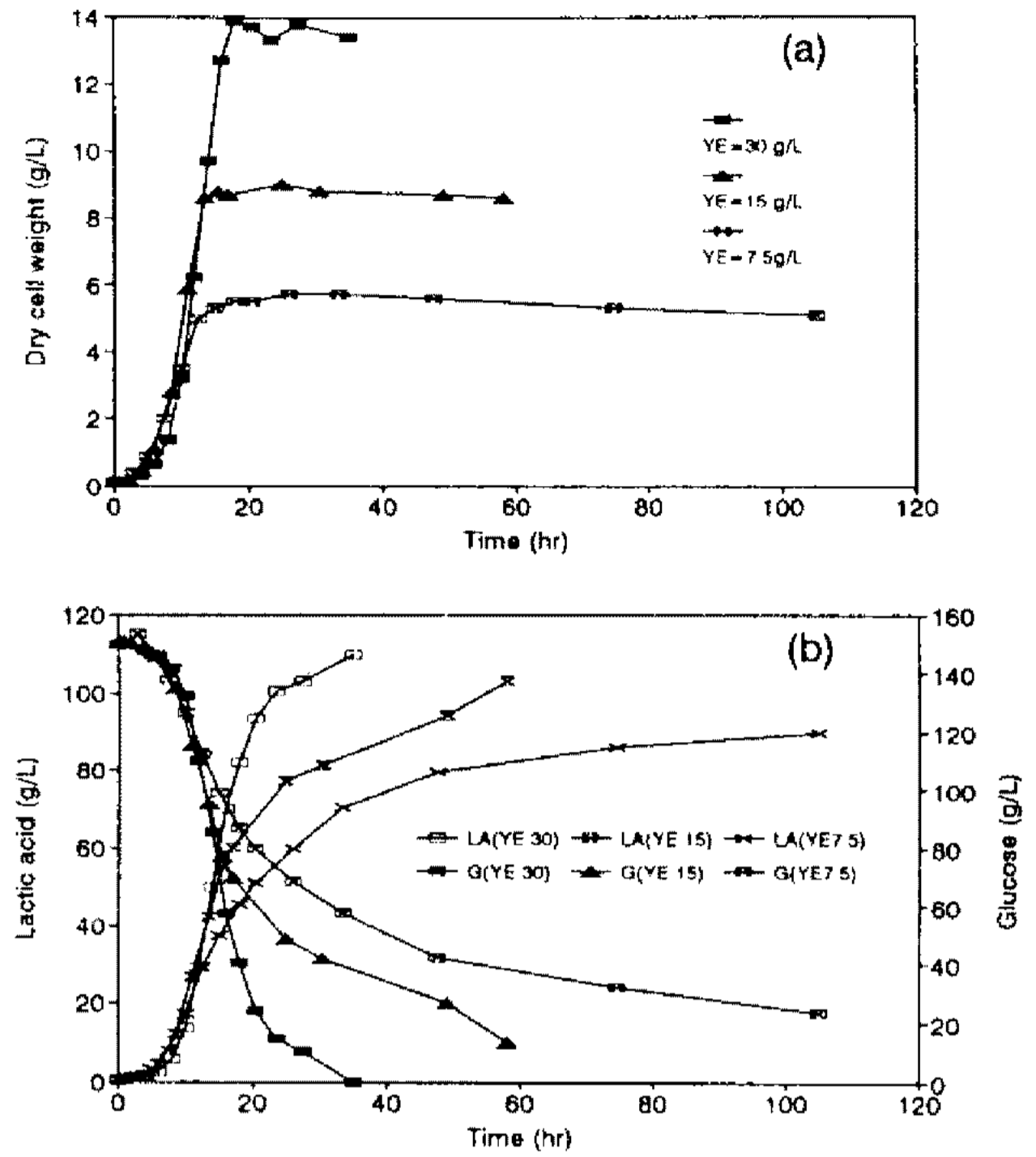


Fig. 3. Time course of batch fermentations with respect to the variation of yeast extract concentrations. (a) Dry cell weight. (b) Lactic acid and glucose. G=glucose, LA=lactic acid, YE=yeast extract

균체 농도는 약간씩 포도당 농도 증가에 따라 증가 하였지만 큰 차이는 없었다. 또한 균체 성장 속도 및 젖산 생산 속도의 경우, 그다지 큰 차이는 보이지 않았지만, 포도당 농도 증가에 따라 약간은 저해 받는 양상을 볼 수 있다. 포도당 100, 150 g/l일 때의 실험에서는 포도당이 모두 소비되었고 최종 젖산 농도는 각각 74.5, 110 g/l이었다. 포도당 200 g/l인 경우는 36 시간 후에 실험을 끝냈는데 그 때의 잔류 포도당은 40 g/l, 젖산은 120.5 g/l이었다. 물론 시간을 연장했을 경우 약간의 젖산 생산은 더 기대되지만 생산 속도는 상당히 느렸을 것이다. Specific growth rate를 계산해 보면 발효 초기에 최대 약 0.5 h^{-1} 에서 70 g/l 이상의 젖산 농도에서는 0.1 h^{-1} 이하로 감소하는 것을 알 수 있으며 200 g/l의 포도당이 완전히 소모되지 못하는 사실과 더불어 product inhibition 현상을 알 수 있다.

포도당은 모두 150 g/l로 하고 yeast extract를 7.5, 15, 30 g/l의 세가지로 했을 때 결과가 Fig. 3에 있다. 최종 dry cell weight, 젖산 생산 속도 모두 yeast extract 양에 직접적으로 비례하였고, yeast extract 7.5, 15, 30 g/l일 때 dry cell weight는 각각 5.5, 8.8, 13.8 g/l까지 올라갔다. 즉 균체의 성장은 거의 복합질소원 농도에 의해 결정됨을 알 수 있다. 젖산 생산에 대해 살펴보면 yeast extract 30 g/l 일 때는 35시간 만에 포도당이 완전 소비되면서 젖산 농도는 110 g/l까지

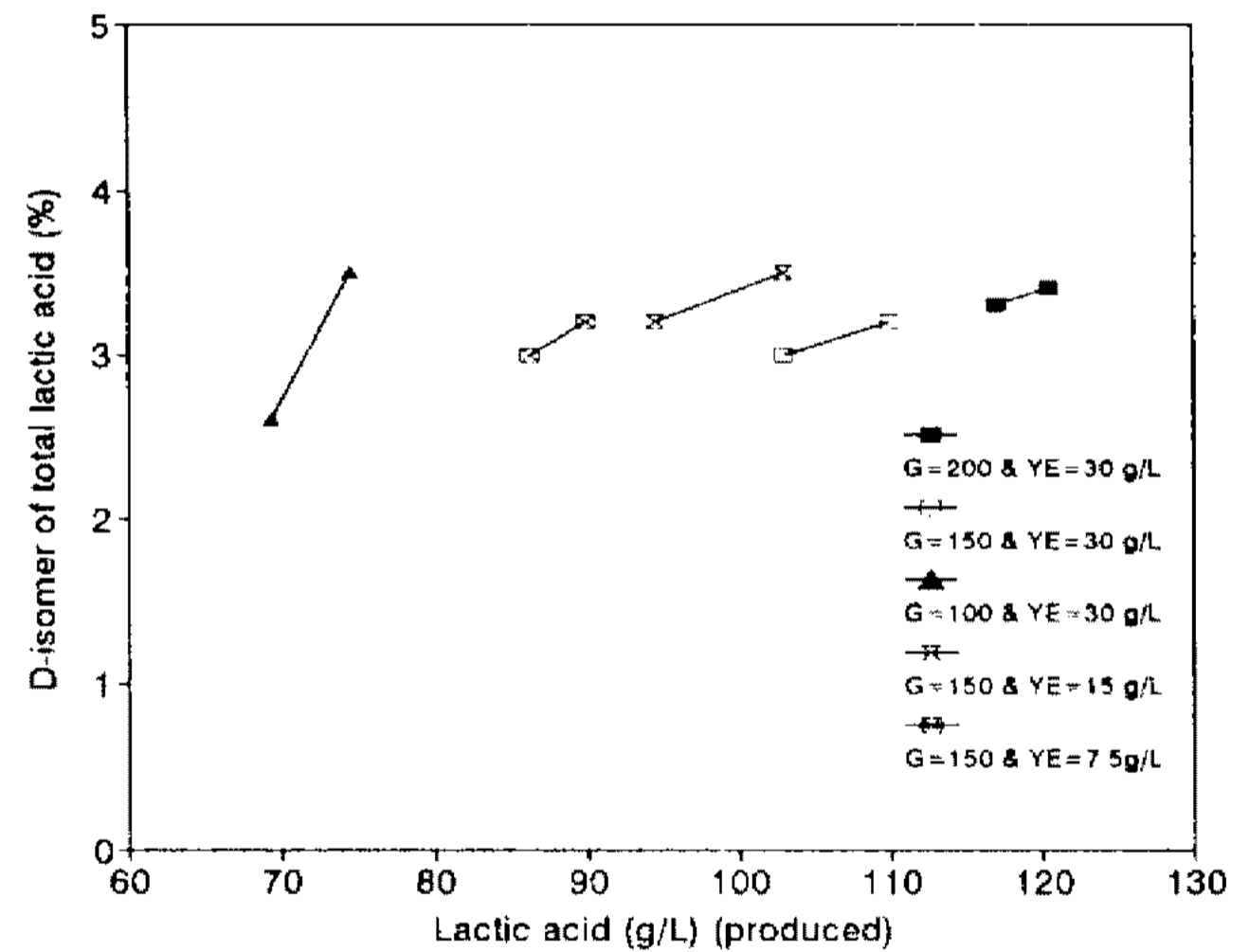


Fig. 4. Percentage as D-lactate in batch cultivation of *Lactobacillus delbruekii*. G=glucose, YE=yeast extract

올라갔지만, yeast extract 15, 7.5 g/l일 때는 실험을 끝내는 시간까지 잔류 포도당이 있음을 알 수 있다. 그러나 포도당 소비곡선을 볼 때 yeast extract 15, 7.5 g/l일 때도 시간을 연장했을 경우 젖산 농도는 어느 정도 더 올라갔을 것으로 생각된다. 소비된 포도당에 대한 젖산 생산 수율은 yeast extract 농도 증가에 따라 각각 81, 83, 80%였다. 집중 후 24시간

American Type Culture Collection으로부터 분양받았다. 균주의 보관은 Difco Co.(USA)의 MRS 배지(11)에 15 g/l agar를 첨가한 plate에서 계대배양하여 실험에 이용하였다.

사용 배지

균주 접종 및 성장을 위한 seed culture에는 MRS 배지를 이용하였고, 회분식 및 연속배양 실험에는 $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l, K_2HPO_4 0.5 g/l, KH_2PO_4 0.5 g/l, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/l, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/l, glucose, yeast extract의 조성에서 glucose와 yeast extract의 농도를 변화시켜 가며 사용하였다. 멸균은 121°C에서 15분간 하였는데, 다음과 같이 A, B, C의 3 가지로 나누어 따로 멸균한 후, 상온에서 혼합하여 사용하였다(A. glucose, B. yeast extract, $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , C. $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

배양 조건

250 ml 삼각 플라스크에 50 ml의 MRS 배지를 넣은 후 42°C, 150 rpm에서 12시간 진탕배양하여 접종에 이용하였다. 접종은 모든 실험을 통해 working volume의 5%(v/v)로 하였다. 본 실험은 2.5 L 발효조(KFC, Korea Fermentor Co., Korea)를 이용하였고, 42°C, 250 rpm, pH는 28% 암모니아수 원액을 사용하여 6.2로 유지시켰다. 또한 배양하는 동안 N_2 gas를 조금씩 불어 넣어 혐기 조건이 유지되도록 하였다.

균체 재순환 연속 발효

전체적인 재순환 장치의 개략도는 Fig. 1에 나타내었다. 접종한 후 충분한 균체 농도에 도달할 때까지

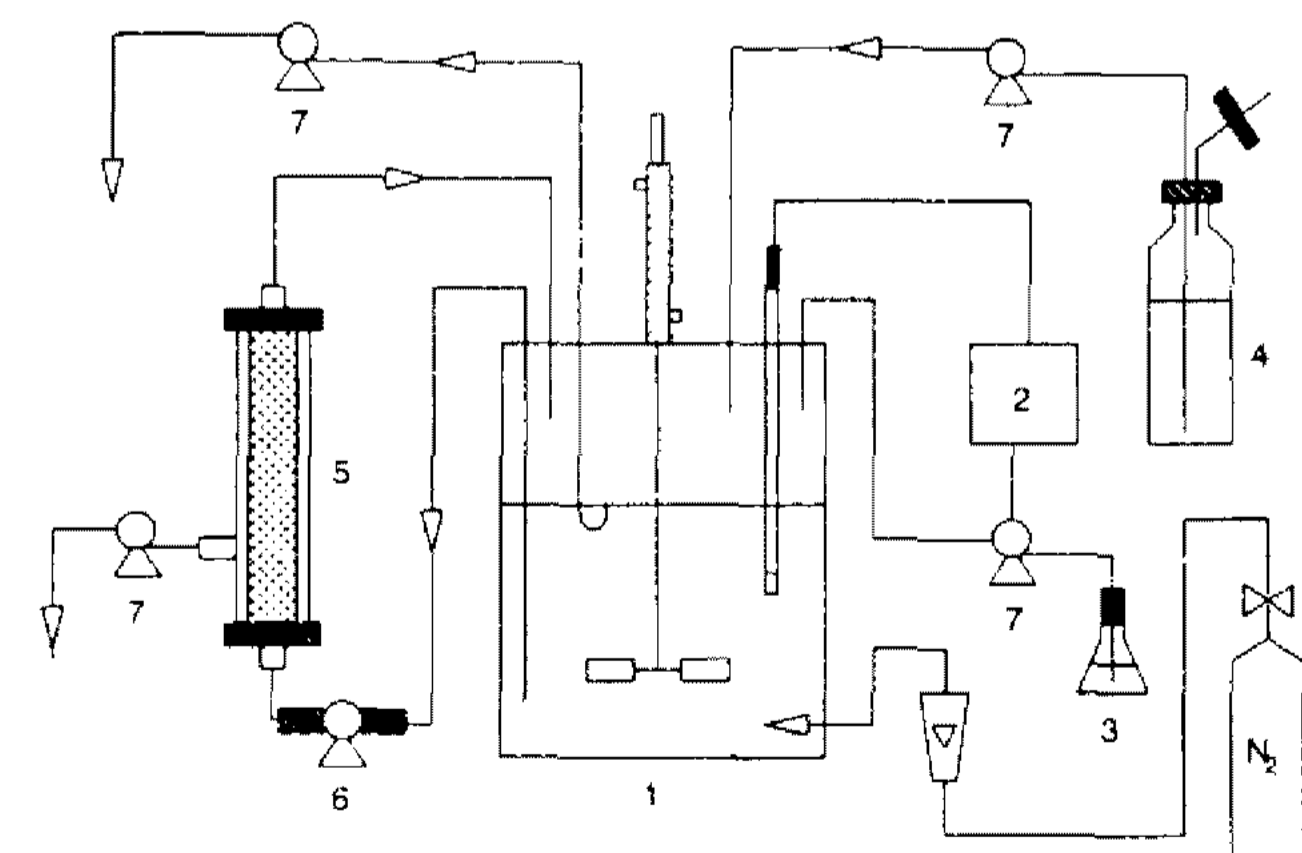


Fig. 1. Schematic diagram of a fermentation system with cross-flow filtration.

1. fermentor, 2. pH controller, 3. NH_4OH solution, 4. reservoir for fresh medium, 5. filtration unit, 6. diaphragm pump, 7. peristaltic pump

회분식으로 배양하다가 새로운 배지를 peristaltic pump(Cole Parmer, USA)에 의해 연속적으로 공급하면서 연속 조업으로 전환하였다. 이 때 발효액을 순환시키는 diaphragm pump(Vario HM 15-122pp, Prominent, Germany)를 가동시키고 필터로부터 peristaltic pump의 suction에 의해 여과액을 뽑아냈다. 재순환 회로에 채워지는 발효액 부피는 약 350 ml이었고 발효조 내의 부피는 650 ml, 따라서 전체적인 working volume은 1 L였다. 발효액의 순환 속도는 1.4 l/min로 유지하였고 조업중 antifoamer(Silicon oil, Sigma Co.)를 필요에 따라 소량 첨가하였다. 1회 조업이 끝난 필터는 분리하여 1 N NaOH 용액을 순환시킨 후 증류수로 back flushing하여 세척하였다. 그리고 formaldehyde 용액(3.7 wt%)을 순환시켜 멸균하고, 멸균한 증류수로 충분히 씻은 후 다시 재사용하였다. 사용한 필터는 pore size 0.45 μm , 유효 표면적 1300 cm^2 , ceramic 재질의 제품인 Millipore Co. (USA)의 'Ceraflo'였다.

분석 방법

균체 농도는 620 nm에서 optical density를 측정하여 미리 작성된 보정식에 의해 dry cell weight(DCW)로 나타내었다. 포도당, 젖산, 아세트산의 농도는 모두 HPLC(Hitachi Co., Japan)에 의해 측정하였다. 사용한 column은 Aminex HPX-87H(Bio-Rad Co., USA)였으며 eluent는 0.01 N H_2SO_4 를 0.4 ml/min의 유속으로, detector는 refractive index detector를 이용하였다. D-lactate의 농도는 D-lactate/l-lactate 효소분석 kit(Boehringer Mannheim Co., Germany, cat. no. 11 12821)에 의해 측정하였다.

결과 및 고찰

회분식 발효

앞서 발표된 많은 젖산 발효 연구들은 대부분 5% 혹은 10% 이하의 낮은 농도의 포도당을 사용했으므로 생산되는 젖산의 농도도 비교적 낮은 범위에서 형성되었다. 물론 젖산의 농도가 높아질 수록 균체 성장 및 젖산 생산에 심각한 저해 현상이 일어나긴 하지만 젖산의 농도를 높이는 것은 그 만큼의 정제 비용 감소를 의미한다. 따라서 첫번째 실험으로 yeast extract를 30 g/l의 과량으로 첨가하여 영양소 제한이 걸리는 현상이 없도록 하고 포도당 농도를 100, 150, 200 g/l로 변화시켰을 때 균체가 생산할 수 있는 최대 젖산 농도를 살펴보고자 하였다. Fig. 2에 균체 농도, 젖산의 생산, 포도당 소비 곡선을 나타내었다. 최종

균체재순환 반응기에서의 젖산 생산

유익근 · 장호남*

한국과학기술원 생물공정연구센터/화학공학과

Production of Lactic Acid in a Cell Recycle Bioreactor

Yoo, Ik-Keun and Ho-Nam Chang*

Bioprocess Engineering Research Center and Department of Chemical Engineering,
KAIST, Daeduk Science Town, Taejeon 305-701, Korea

Abstract — In batch cultures of *Lactobacillus delbrueckii*, cell growth and lactic acid production were affected by two main factors, inhibition by lactic acid and limitation by nutritional components. In order to increase the productivity significantly, a continuous stirred tank reactor with cell recycle was employed. A cell density of 145 g dry weight/l and a volumetric productivity of 73 g/l·h were obtained with an effluent concentration of 85 g/l lactic acid. The productivity achieved by this system was 23-fold higher than those obtained by the corresponding batch cultivations. Once the lactic acid concentration reached the steady state, lowering the yeast extract concentration caused the reduction of the lactic acid concentration without affecting the biomass concentration. Finally, the formation of D-lactate was investigated. During the various cultures, a small amount of D-lactate always formed, even though a majority of lactate was L-isomer. It was supposed that the relative amount of the D-lactate was affected by glucose limitation, and there seems to exist a certain relationship between the concentration of D-lactate and acetate.

젖산은 자연계에 널리 존재하는 유기산이다. 현재까지의 젖산 용도는 식품관련 산업에 70% 이상이 이용되고 있지만 최근에 와서 생분해성 플라스틱인 폴리락타이드의 중합 원료로서 관심이 고조되고 있다 (1-2).

재래의 회분식 젖산 발효 방법은 생산물 저해 현상에 따른 낮은 균체 농도 때문에 생산성이 낮게 제한되었다. 미생물의 생촉매적인 기능에서 보면 발효조 내에 균체 농도를 높게 하여 기질 전환 속도를 빠르게 하는 것이 생산성을 높일 수 있는 하나의 방법이므로 저해 산물인 젖산을 제거해 주는 연속 공정이 필요하다. 균체 농도를 증가시키기 위해 연구되어 온 배양 방법에는 균체 고정화(3), 실관 반응기(4), 연속식 투석(5), 회전 여과 발효기(6), 균체 재순환 반응기(7-10) 등이 있다. 이 중에서 가장 좋은 결과를 보였던 반응기는, 대체로 고분자 재질의 membrane filter를 이용한 균체 재순환 반응기였다. 그러나 대부분의 연구에서 생산성은 회분식에 비해 최대 20배 이상

올라갈 정도로 많이 개선시켰지만, 생산되는 젖산의 농도는 모두 낮은 범위의 값이었다. 이것은 비교적 낮은 농도의 기질을 공급하여 발효조 내의 젖산 농도를 낮게 유지함으로써 생산성 개선에만 연구의 초점을 두었기 때문이다. 또한 yeast extract 등의 복합 질소원의 농도를 과량으로 첨가하여 균체 성장 속도를 최대한으로 유지하고자 했는데(대부분의 균체 재순환 젖산 발효 연구에서 사용한 yeast extract의 농도는 30 g/l이다.), 이러한 연구는 발효배지의 비용 문제 때문에 현실성이 떨어지는 결과이다.

본 연구에서는 균체재순환 발효에서의 생산성 향상은 물론 생산물인 젖산의 농도를 좀 더 높여보고자 했다. 또한 첨가되는 yeast extract 농도를 줄였을 때의 효과 및 생산되는 젖산의 광학특성에 대해 검토해 보았다.

재료 및 방법

사용 균주

균주는 *Lactobacillus casei* ssp. *ramnosus*, ATCC 10863(=*Lactobacillus delbrueckii*, NRRL B-445)였고,

Key words: Lactic acid, cell recycle, high density cell culture

*Corresponding author