

젖산 생산을 위한 배지 최적화

조운경* · 조규홍 · 홍승서 · 이현수
삼양그룹 선일연구소, 발효연구실

Optimization of Medium Components for Lactic Acid Production

Yun-Kyung Cho*, Kyu-Hong Cho, Seung-Suh Hong and Hyun-Soo Lee

Fermentation group, Sun Hill Lab., Sam Yang Group R and D Center,
63-2, Hwaam-dong, Yousung-gu, Taejeon 305-348, Korea

Abstract — Medium components for lactic acid production were optimized with a strain of *Lactobacillus* sp., isolated by our Lab. Nitrogen source was the key component and manganese ion was also important for lactic acid production in this strain. Optimal concentration of manganese ion was 0.03 g/l as $MnSO_4 \cdot 4 \sim 5 H_2O$ base. Other mineral elements, however, had little effect on it. Among the nitrogen sources we examined, yeast extract showed the highest productivity. Yeast extract, the excellent but very expensive medium component, could be partially replaced by soytone until 60% dry base with higher productivity, or by tryptone enforced with vitamins and nucleic acids. In order to replace yeast extract completely, we examined several inexpensive nitrogen sources and their enzymatic hydrolyzates. The hydrolyzate of vital wheat gluten was the best of them.

젖산(Lactic acid)은 일찍부터 sour milk의 신맛 성분으로 알려진 유기산으로 그 풍미가 부드러워 산미제 및 보존제로 이용되는 식품첨가물이다. 뿐만 아니라 그 구조에 히드록실기 및 카복실기를 가지고 있어 유화제 등 여러 분야에 널리 사용되고 있는 물질이기도 하다(1). 특히 최근 들어 석유화학 플라스틱에 대한 환경문제의 심각성이 널리 제기되고 있는 가운데 분해성 플라스틱인 폴리락타이드의 원료로 젖산이 이용되기 때문에 이에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다. 이에 따라 젖산의 생산에 대한 연구가 많이 진행되고 있어 연속배양(2), cell recycling system(3,4), 젖산 생산 및 회수의 동시 시스템(4,5), 고정화 세포에 의한 젖산 생산(6) 등이 보고되고 있다. 젖산생산 균주로 보고되고 있는 것을 보면 간혹 *Rhizopus* 등의 곰팡이가 보고되고 있으나 대부분이 유산균으로서 *Lactobacillus* 속의 균주가 주종을 이루고 있다(1).

Lactobacillus 속의 균주들은 영양요구가 상당히 까다로운 것으로 알려져 있기 때문에(7) 젖산생산을 위해서는 좋은 균주를 분리하는 것과 영양소를 어떻게 최적화 하느냐가 중요한 문제이다. 배지의 선택에

있어서 정제과정을 고려하지 않을 수 없으므로 가능한 불필요하거나 정제에 부담을 주는 성분의 선택을 줄여야 함은 물론 적은 양으로 젖산의 생산성이 높은 배지 성분을 선택하는 것은 당연하다(1).

본 연구에서는 우리사에서 자체적으로 분리한 젖산생산 균주(*Lactobacillus* 속)에 대한 배지 최적화를 실시하였다. 본 배지 최적화 연구의 기본 방향은 배지성분을 단순화하여 정제사의 부담을 줄이고 배지 비용을 줄이면서 생산성이 좋은 배지성분을 찾는 것이었다 따라서 그 동안 젖산생산 연구에서 사용해 왔던 각 배지성분의 젖산생산 효과를 파악하고 배지 비용을 줄이기 위한 새로운 배지성분들의 젖산생산 효과를 파악하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 *Lactobacillus* 속의 균주로 젖산생산을 위해 자체적으로 분리하였으며 20% glycerol 용액에 균을 현탁하여 deep freezer(-80°C)에 보관하다가 필요할 때마다 실온에서 녹여 사용하였다.

시약 및 배지

염을 제외한 일반 배지성분은 Difco 사 제품을 사

Key words: Lactic acid, medium optimization, hydrolyzate of vital wheat gluten

*Corresponding author

용하였으며 염이나 비타민 및 핵산은 시약급을 사용하였다. 포도당 및 corn steep liquor(CSL)은 선일포도당(주)의 것을 사용하였으며 유기질소원으로 사용한 카제인 및 카제이나트륨은 독일 Meggle 사의 ACID CASEIN EDIBLE 110 Mesh 및 CASINELLA QN을, 분리대두단백과 농축대두단백은 브라질 SANBRA 사의 SAMPROSOY 90NB 및 이스라엘의 SOLPRO를 사용하였다.

활성소맥글루텐은 독일의 VITAL WHEAT GLUTEN "SPL"을, yeast cell로는 프랑스 bel industries의 PROTIBEL POWDER를 사용하였다. 이들 유기질소원은 그대로 사용하거나 NOVO 사 protease로 가수분해하여 사용하였다. 젖산생산용 배지에 비타민과 핵산을 보강한 실험에서는 Ledesma 등이(8) 고안한 synthetic medium 성분중 아미노산을 제외한 비타민군과 핵산군의 성분내용을 그대로 사용하였다.

젖산발효

균의 activation이나 seed 배양용 배지로는 MRS 배지를 사용하였으며 seed size는 5%로 하였다. 모든 발효실험은 플라스크 수준에서 이루어졌으며 배지부피는 100 ml로 250 ml 삼각플라스크를 사용하였다. 포도당은 최종 100~150 g/l로 따로 멸균하여 첨가하였고 모든실험에서 질소원의 배지내 함량은 5 g/l(건물기준)로 하였으며 pH 조절을 위해 CaCO₃를 사용하였다. 발효기간은 72시간으로 하였다.

발효액의 분석

발효액은 적당하게 희석하여 포도당은 포도당분석기(YSI 사), 젖산은 젖산분석기(YSI 사)를 사용하여 분석하였다.

결 과

유산균 배지 및 젖산 생산용 배지

Lactobacillus 속의 유산균 배지로 알려진 MRS 배지와 젖산 생산용 배지로 여러 연구(9, 10)에서 사용되고 있는 배지는 다음의 Table 1과 같다.

MRS 배지는 *Lactobacillus* 속균의 생육을 위한 배지로서 양질의 질소원이 풍부하고 상대적으로 탄소원의 함량이 적어 젖산의 생산을 억제할 수 있는 성분으로 이루어져 있는 반면 젖산 생산용 배지는 정도의 차이는 있으나 질소원을 제한하여 탄소원이 cell의 생육으로 가기 보다는 젖산의 생산쪽으로 가도록 하는 배지 성분으로 되어 있다. 이 때 여러 염들은 균의 영양적 필요에 의해서 혹은 배지의 Buffering을 위해서 첨가되고 있다.

젖산 생산용 배지내의 염들의 효과

젖산 생산용 배지내의 각 염들의 젖산생산 효과를 알아보기 위해 각 성분이 배제된 배지에서의 젖산 생산성을 파악한 결과는 Fig. 1과 같다.

Manganese sulfate를 제외시켰을 경우 젖산생산이 현저하게 줄었는데 이는 *Lactobacillus casei* 계통의 균주에서 망간이온이 *Lactate dehydrogenase*를 활성화시키는 것으로 보아 본 균주도 *Lactobacillus casei* 계통의 균주일 가능성이 높다 하겠다.

그러나 그 밖의 염류는 젖산생산에 큰 영향을 미치지 못한 것으로 나타난 점은 뜻밖의 결과였다. 특히 Manganese sulfate를 제외한 경우는 모든 염류를 제외한 경우보다 젖산생산성이 낮게 나왔는데 이는 재실험을 통해 확인된 결과이다. 이는 다른 염류에 의해 *Lactate dehydrogenase*가 영향(저해)을 받고 있음을 보여주는 것으로 이 효소를 저해하고 있는

Table 1. Compositions of MRS medium and lactic acid production medium that is conventionally used(9, 10)

MRS Medium		Medium for Lactic acid production	
Glucose	20 g	Glucose	50~150 g
Yeast extract	5 g	Yeast extract	5~20 g
Beef extract	10 g	Magnesium sulfate	0.6 g
Protease peptone	10 g	Ferrous sulfate	0.03 g
Tween 80	20 g	Manganese sulfate	0.03 g
Ammonium citrate	2 g	Sodium acetate	1 g
Sodium acetate	5 g	Dipotassium phosphate	0.5 g
Magnesium sulfate	0.1 g	Monopotassium phosphate	0.5 g
Manganese sulfate	0.05		
Dipotassium phosphate	2 g	pH controlled by CaCO ₃	

per 1 l

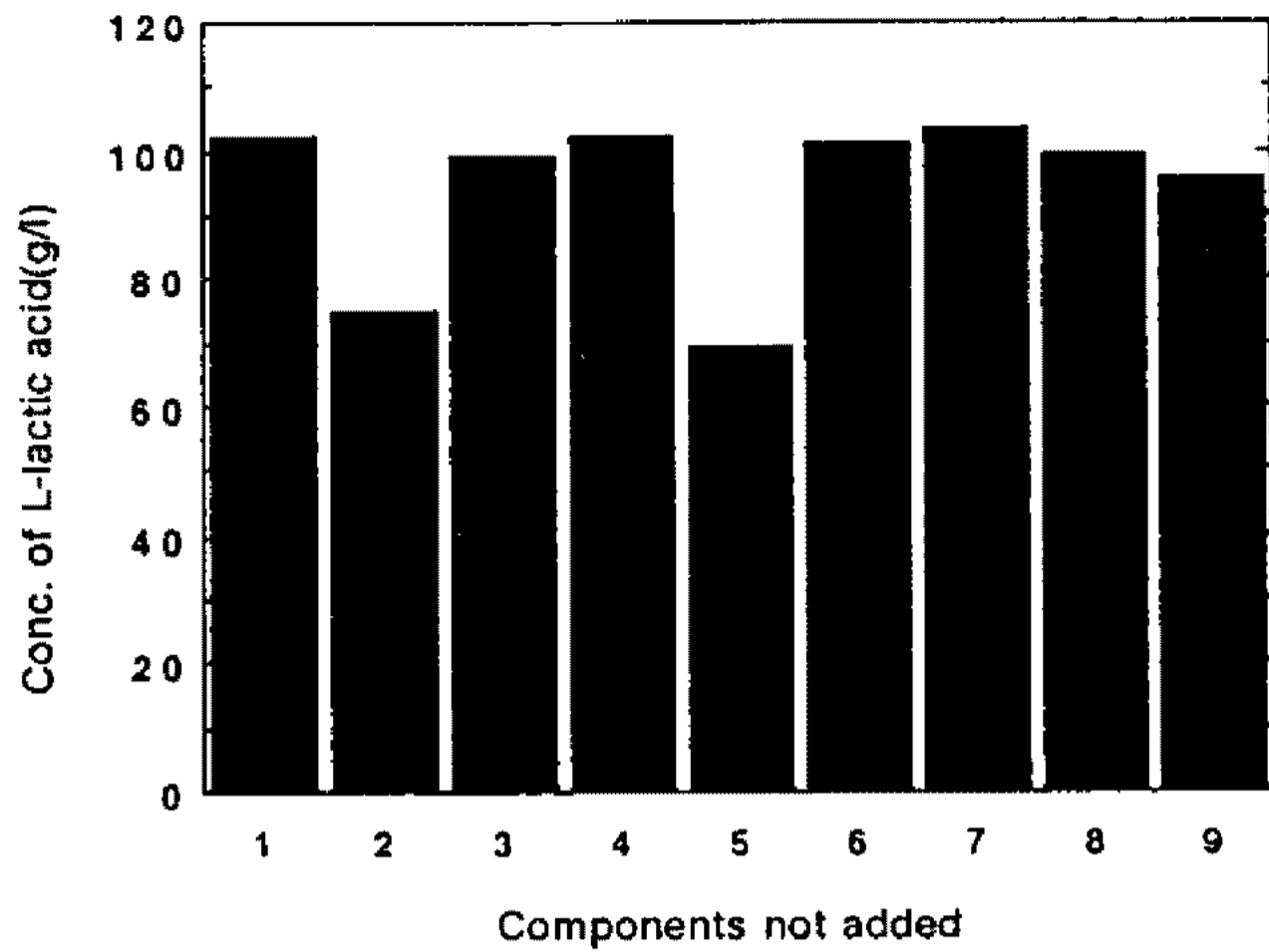


Fig. 1. Effect of each medium component on lactic acid production using yeast extract as nitrogen source.

1: Control (all contained), 2: not added all mineral, 3: Na-acetate, 4: FeSO₄, 5: MnSO₄, 6: K₂HPO₄, 7: KH₂PO₄, 8: K₂HPO₄ and KH₂PO₄, 9: MgSO₄

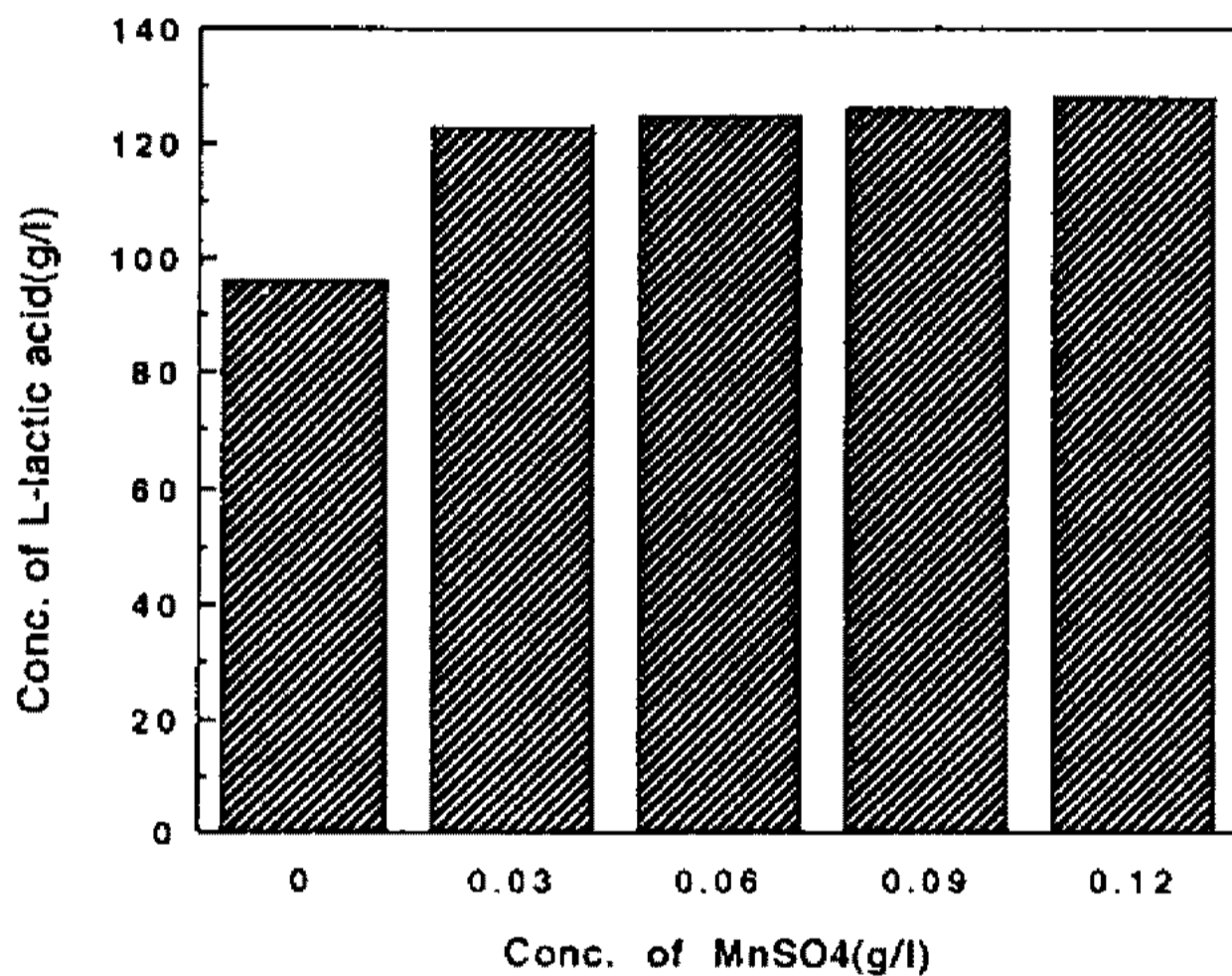


Fig. 2. Effects of MnSO₄ concentrations on lactic acid productions.

염류는 ferrous sulfate나 monopotassium phosphate 일 가능성이 높는데 이는 이들을 제외시켰을 경우 오히려 control보다 생산성이 높게 나타나기 때문이다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 manganese sulfate 외의 다른 염 성분들은 오히려 배지에 첨가하지 않는 편이 정제시의 부담을 줄여주어 유리할 것으로 판단된다.

Manganese sulfate의 농도별로 젖산생산 효과를 본 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.03 g/l 이상에서는 그 효과가 크지 않은 것으로 판단된다.

유기 질소원의 영향

전술한 바와 같이 *Lactobacillus* 속의 유산균은 양질의 질소원을 요구하기 때문에 젖산을 생산하기 위한

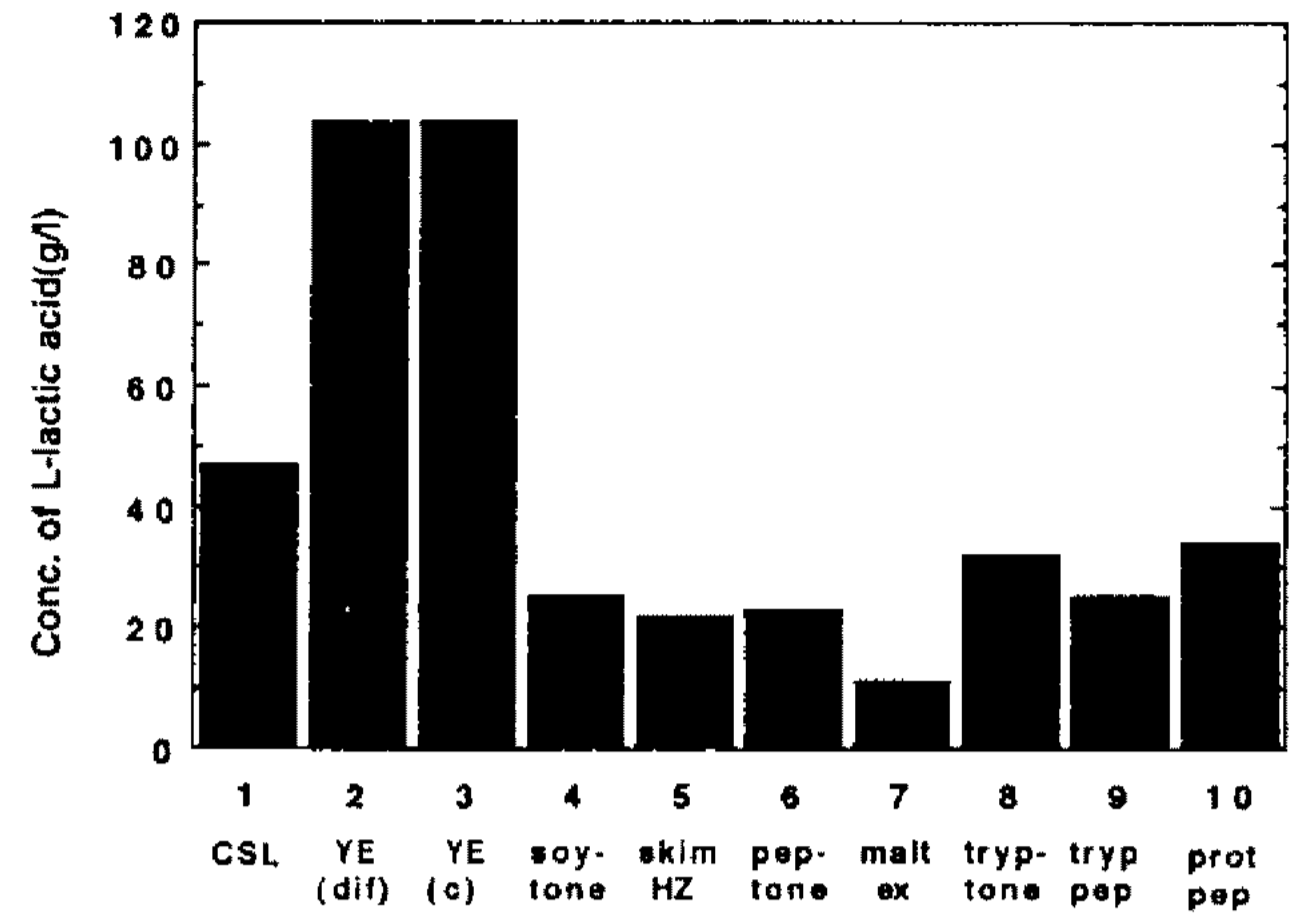


Fig. 3. Effects of various nitrogen sources on lactic acid production (0.5% level as dry base).

발효배지에서도 역시 질소원의 선택은 중요하다. 현재까지 알려진 질소원들을 보면 효모엑기스를 비롯하여 유청, CSL, malt extract 등을 들 수 있겠다.

그러나 질소원이 정제공정에 가장 많은 영향을 미치기 때문에 그 양이나 질에 있어서도 고려를 해야 한다. Fig. 3에서는 여러가지 실험실에서 사용하고 있는 유기질소원들이 젖산생산에 미치는 영향을 조사하였다. 예상대로 같은 처리농도에서는 효모엑기스가 종류에 관계없이 가장 우수하였으며 그 외에는 효과가 현저히 떨어지는 것으로 나타났다.

CSL은 비록 효과는 효모엑기스에 못미치나 양적으로 값싸게 구입할 수 있으므로 다량 넣었을 경우 효과가 향상되리라 판단되어 정제상의 문제만 없다면 젖산생산용 질소원으로 손색이 없을 것으로 보인다. 그러나 기타의 유기질소원들은 가격도 비쌀 뿐더러 효모엑기스를 제외하면 효과도 미미한 것으로 보인다.

Fig. 4에서 보면 효모엑기스는 어느 정도까지는 soytone에 의해 대체가 가능한 것으로 나타났다. 특히 soytone으로 20% 및 40%의 효모엑기스를 대체한 경우는 효모엑기스 단독 처리한 경우보다 높은 젖산생산성을 보인 바 젖산생산에 효모엑기스와 soytone이 상승효과를 나타냈다. 그러나 tryptone의 경우는 이와 다르게 상승효과가 없는 것으로 나타났다. 다만 tryptone도 효모엑기스가 20% 정도로 적게 존재할 경우 나름대로의 효과는 가지고 있는 것으로 보인다 (Fig. 5).

Fig. 6에서 보듯이 효모엑기스가 존재하지 않아도 tryptone과 비타민 및 핵산 complex가 존재하면 젖산생산능이 회복되는 것으로 보아 질소원이 한정된 상황에서도 비타민 및 핵산 등의 미량원소가 젖산생산에 매우 중요한 요인임을 알 수 있다. 그러나 tryptone에 의한 효모엑기스의 대체실험에서도 알 수 있

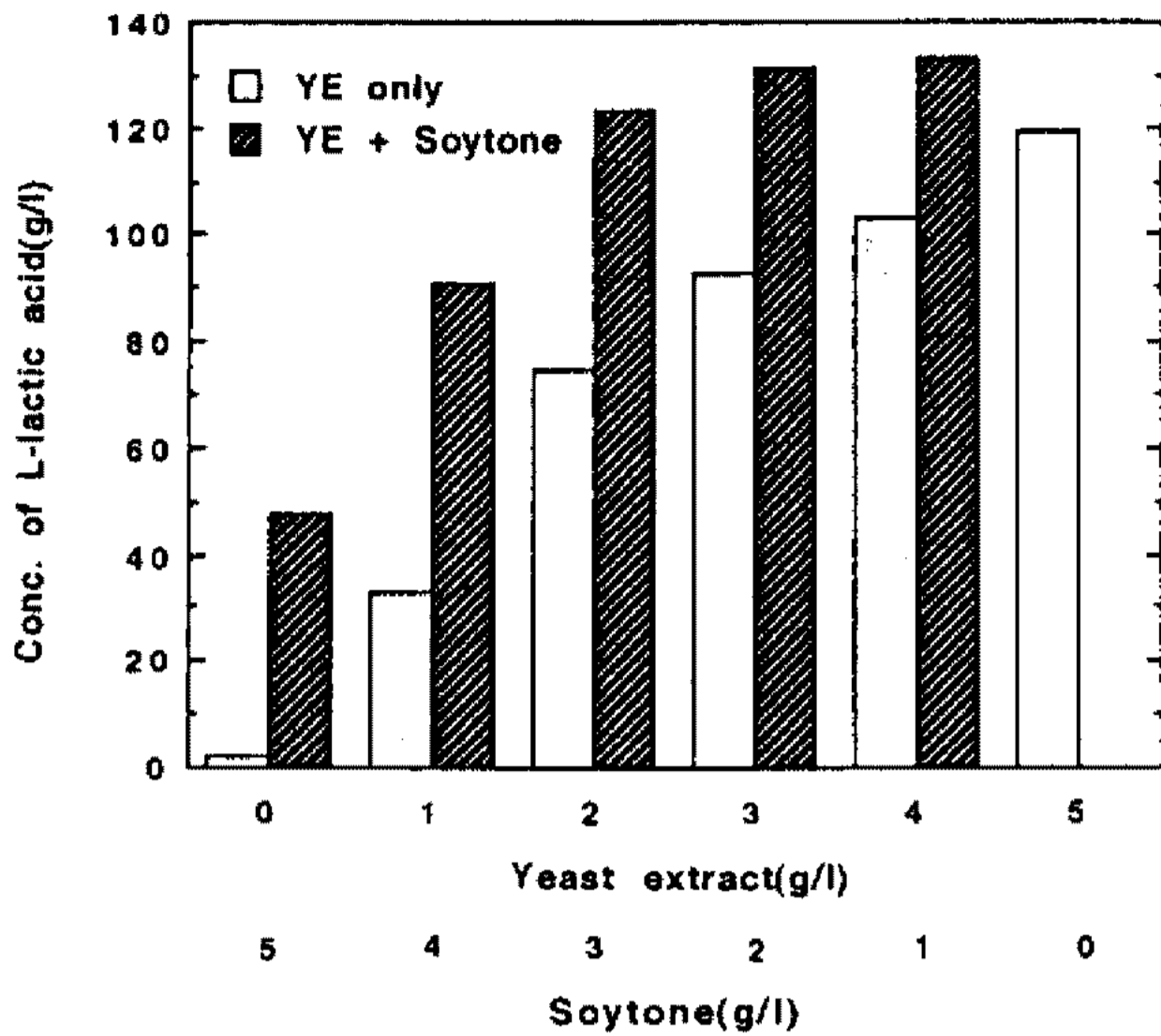


Fig. 4. Effects of soytone substitution for yeast extract on lactic acid production.

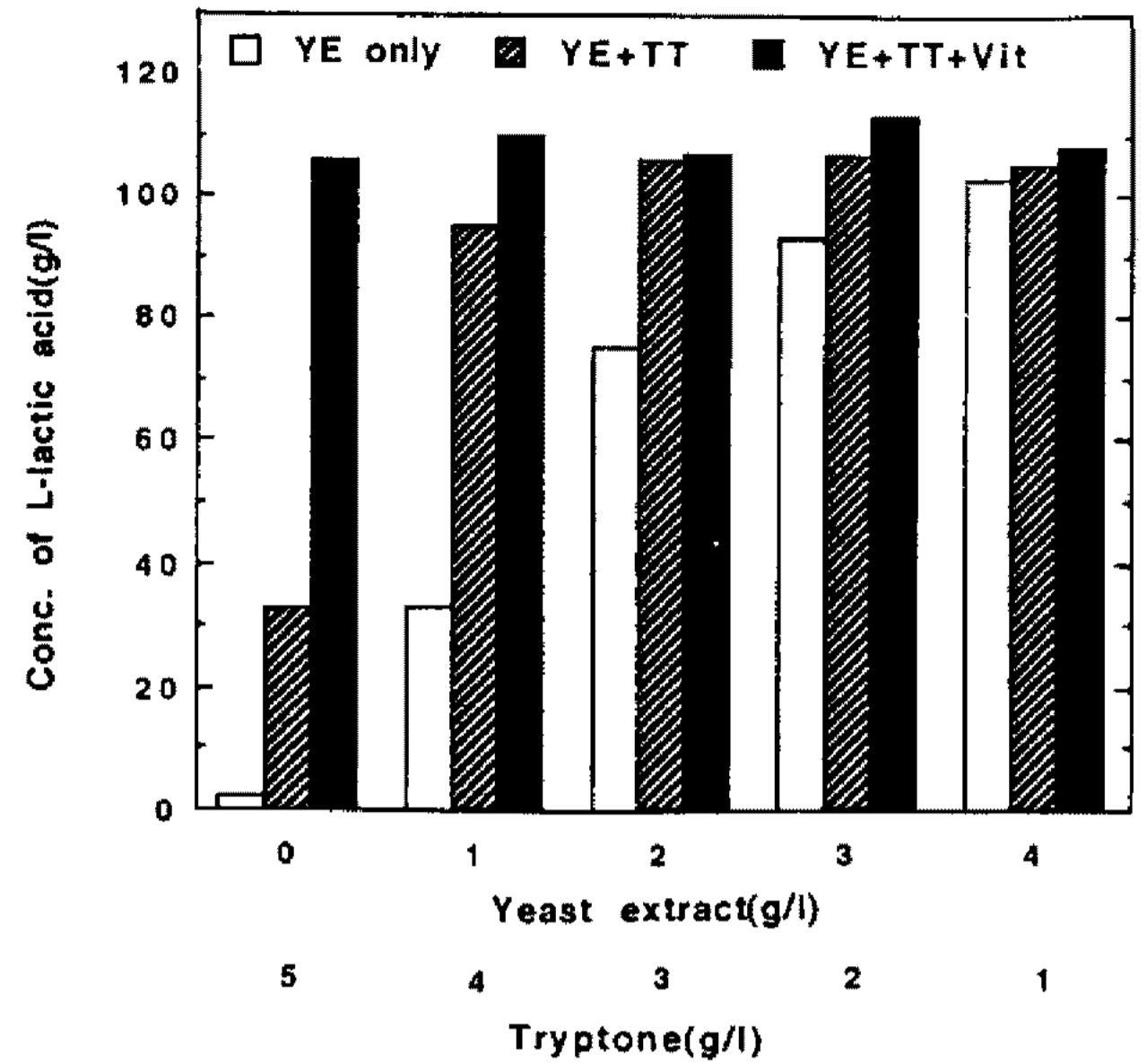


Fig. 6. Effects of tryptone substitution for yeast extract with or without enforcing the vitamin complexes on lactic acid production.

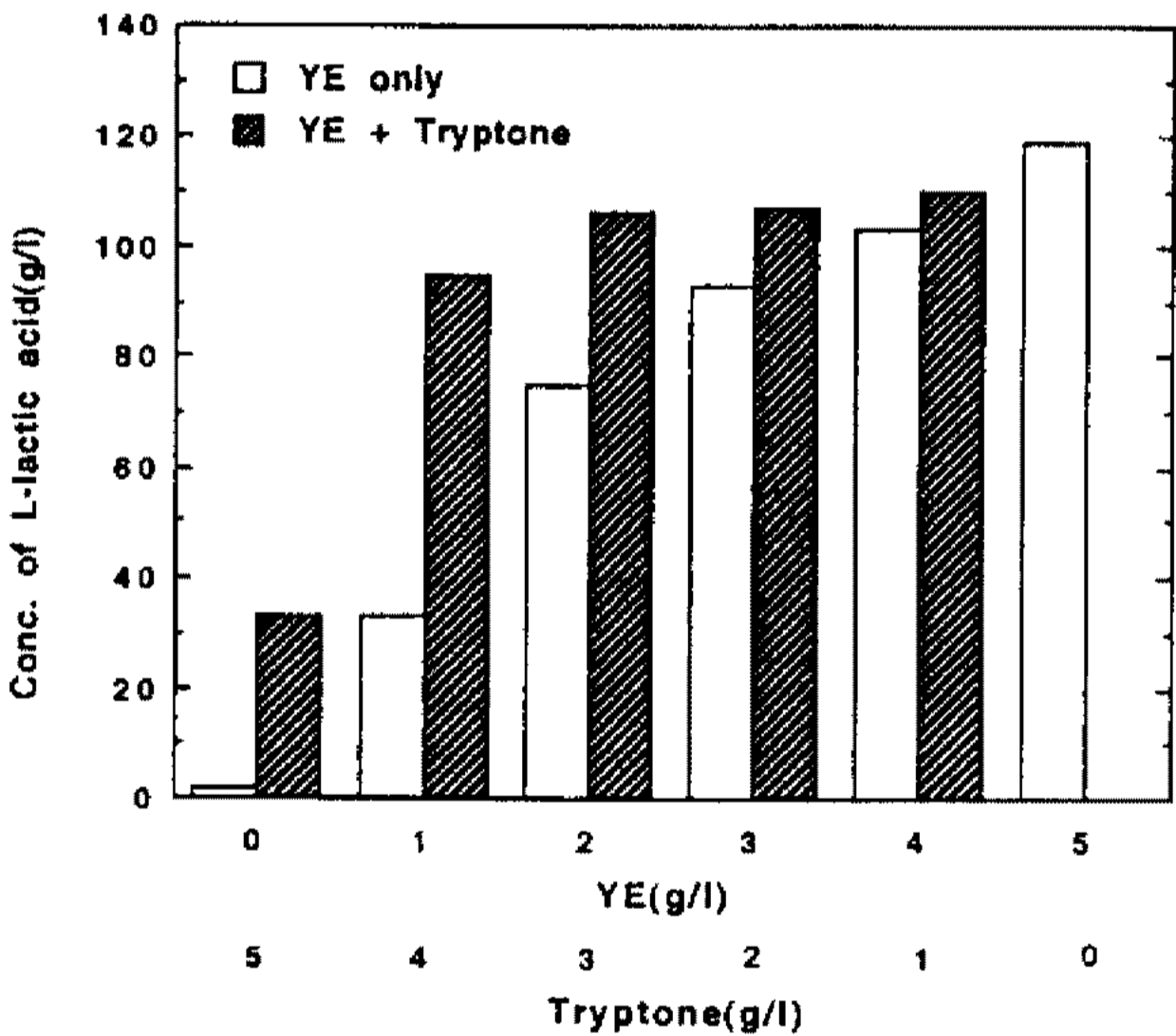


Fig. 5. Effects of tryptone substitution for yeast extract on lactic acid production.

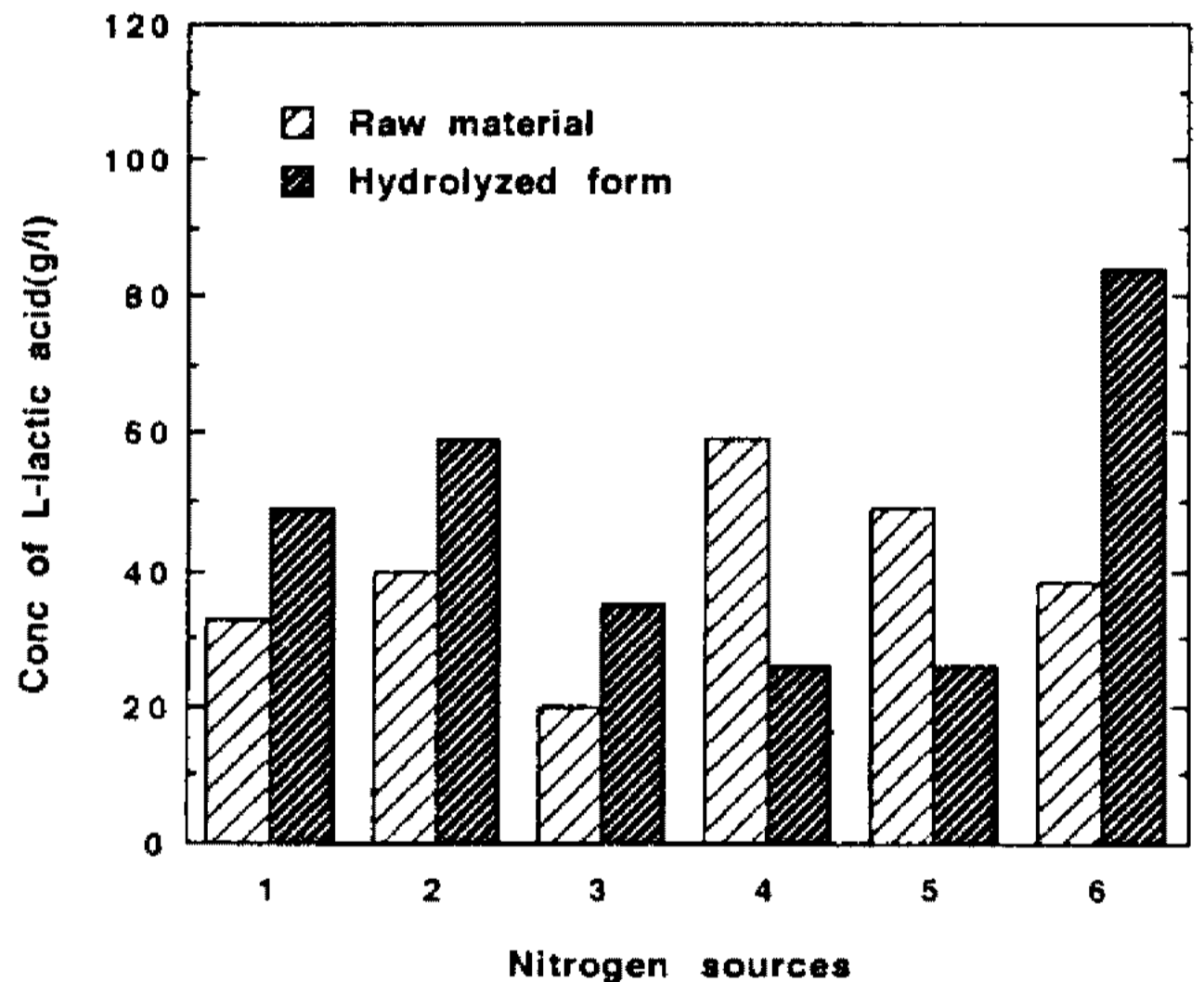


Fig. 7. Effects of inexpensive nitrogen sources on lactic acid production. 1: Yeast biomass, 2: Casein, 3: Na-caseinate, 4: Soyprotein isolate, 5: Soyprotein concentrate, 6: Vital wheat gluten

듯이 질소원이 보충되면 젖산생산성이 현저하게 증가하는 것으로 보아 본 실험에서와 같이 질소원의 배지내 함량이 5g/l로 제한된 경우에는 유기질소원이나 비타민 등의 미량원소가 모두 젖산생산에 중요한 제한요소임은 분명하다.

값싼 여러 유기 질소원들의 젖산생산 효과

이상의 결과로 *Lactobacillus* sp.를 이용하여 젖산을 생산할 경우 효모엑기스가 상당히 효과가 좋은 질소원임이 밝혀졌다. 그러나 효모엑기스는 고가의 배지 성분으로 실제 공정에서 사용하기 어려운 문제가 있기 때문에 이를 완전히 대체하고자 하는 연구를 실시하였다. 이를 위해서 Fig. 7에서 보는 바와 같이 여러

질소원들을 그대로 혹은 효소로 가수분해하여 사용하여 본 바 예상대로 효소가수분해물의 생산성이 대부분 높게 나타났다. 반면 대두단백질의 경우에는 분리대두단백이나 농축대두단백 모두에서 반대의 결과가 나타난 것은 흥미로운 사실이다. 여러 단백질 원료중 활성소맥글루텐의 효소 가수분해물이 가장 좋은 결과를 보였는데 활성소맥글루텐은 사용한 질소원중 비용이 가장 저렴하기 때문에 장점이 있는 것으로 판단된다.

고 찰

여러 연구에서 젖산생산용 배지로 일반적으로 사용하고 있는 성분중에 망간이온을 제외한 다른 염들은 젖산생산에 큰 영향을 주지 못하며 오히려 젖산생산을 저해하기 때문에 이들은 첨가하지 않는 것이 바람직 하리라 판단된다. 특히 이들은 이온정제공정에 부담을 줄 수 있는 성분이기 때문에 이들을 첨가하지 않는 것은 젖산 회수시에도 유리할 것으로 판단된다. 본 *Lactobacillus* 속 균주로 젖산을 생산할 경우 질소원으로 효모엑기스가 좋은 결과를 보인 것은 그것이 양질의 질소원을 가지고 있을 뿐만 아니라 비타민이나 핵산 등 필요한 미량원소가 함유되어 있기 때문인 것으로 판단된다. 왜냐하면 카제인 분해물인 tryptone보다는 대두분 분해물인 soytone이 효모엑기스를 대체하는데 효과가 좋았으며 tryptone 단독으로 사용하더라도 비타민이나 핵산을 보강해 주면 생산성이 높아지기 때문이다. 여러 값싼 유기 질소원중에 활성소맥글루텐이 가장 좋은 결과를 보인 것은 다른 *Lactobacillus* 균에서도 마찬가지로의 결과를 보인 것으로 보아(데이터는 실지 않음) 그것이 영양적 가치가 높거나 가수분해시 균이 자화하기에 유리하게 분해된다고 추측할 수 있다. 결과적으로 활성소맥글루텐이 효모엑기스를 완전히 대체할 수 있는 질소원임은 확실하나 효모엑기스보다 생산성이 낮은 것은 비타민이나 핵산 등의 필요한 미량원소가 없기 때문이다. 따라서 이들 미량원소중에 균이 필요로 하는 성분을 찾아 활성소맥글루텐과 같이 첨가해 주면 더욱 유리 하리라 생각된다.

요 약

우리사에서 젖산생산을 위해 분리한 *Lactobacillus* sp.에 대한 배지 최적화 실험을 실시하였다. 배지로 사용되는 염중에서는 $MnSO_4$ 가 젖산생산을 크게 향상시켰으며 종래에 사용되었던 다른 염들은 젖산생산에 관여하지 않거나 오히려 젖산생산을 저해하였다. 질소원으로는 효모엑기스가 가장 좋은 것으로 나타났는데 그 이유는 단지 질소원 뿐만 아니라 기타 비타민이나 핵산 등의 미량원소가 함유되었기 때문인 것으로 실험결과 추측할 수 있었다. 효모엑기스는 soytone에 의해 약 60%까지 대체할 수 있었으며 soytone이 20% 및 40% 대체한 경우는 오히려 효모엑기만으로 발효시킨 것보다 높은 젖산 생산성을 보였다. Tryptone은 효모엑기스를 대체했을 때 soytone 처럼 상승효과는 없었으며 Tryptone에 비타민과 핵산

등을 첨가시키면 효모엑기스를 완전히 대체시킬 수 있는 것으로 보아 질소원 이외에 미량원소들도 같이 존재하면 젖산생산성을 더욱 높일 수 있으리라 판단된다. 가격이 저렴한 기타 유기질소원을 가수분해하여 본 젖산생산에 질소원으로 이용해 본 결과 활성소맥글루텐이 가정 효과가 좋은 것으로 나타나 배지비용을 현저히 줄일 수 있으리라 판단된다. 활성소맥글루텐의 효소가수분해물은 순수한 질소원으로 여기에 필요한 비타민이나 핵산을 강화한다면 훨씬 높은 젖산 생산성을 보일 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Vickroy, T.B. 1985. *Lactic acid*, Pp. 761-776. Comprehensive biotechnology. Vol. 1, Pergamon Press Ltd.
2. Childs, C.D. and B. Welsby. 1966. Continuous lactic fermentation. *Process Biochemistry*. Nov. 441-444.
3. Ohleyer, E., H.W. Blanch, and C.R. Wilke. 1985. Continuous production of lactic acid in a cell recycle reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 11: 317-332.
4. Raucourt, A., D. Girard, Y. Prigent, and P. Boyaval. 1989. Lactose continuous fermentation with cell recycled by ultrafiltration and lactate separation by electro dialysis: modelling and simulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 521-527.
5. Yabannavar, V.N. and D.I.C. Wang. 1991. Extractive fermentation for lactic acid production. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 1095-1100.
6. Boyaval, P. and J. Goulet. 1988. Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca-albinate-entrapped *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 725-728.
7. Sneath, H.A. et al. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 2, Baltimore: The Williams & Wilkins Co.
8. Ledesma, O.V., A.P. De Ruiz Holgado, and G. Oliver. 1977. A synthetic medium for comparative nutritional studies of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology* 42: 123-133.
9. Roy, D., J.G. Anh, and LeDuy. 1986. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 206-213.
10. Goncalves, L.M.D., A.M.R.B. Xavier, J.S. Almeida, and M.J.T. Carrondo. 1991. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 314-319.

(Received 23 September 1994)