

L-라이신 발효에 있어서 당밀전처리의 영향

신현철* · 김성준 · 성진석 · 전영중 · 이재홍
제일제당(주) 종합연구소

The Effect of Cane Molasses Pretreatment on L-Lysine Fermentation. Hyun-Chul Shin*, Seong-Jun Kim, Jin-Suck Sung, Yeong-Joong Jeon and Jae-Heung Lee. R and D Center, Cheiljedang Co. 522-1, Dokpyong-Ri, Majang-Myun, Ichon-Si Kyonggi-Do 467-810, Korea — Cane molasses, the most widely used carbon source for the industrial fermentation of L-lysine, usually contains a high concentration of calcium ions which tend to cause scaling problem in the recovery process. To remove the calcium ions, cane molasses was pretreated with sulfuric acid by adjusting the pH to 2.5~3.5. When the pretreated solution was directly heat-sterilized and used in the fermentation, a significant reduction in L-lysine production was observed. In this paper, we proved that sucrose is a superior substrate for L-lysine fermentation to that of glucose or fructose and that the above-mentioned decrease of L-lysine production was caused by the hydrolysis of sucrose in the molasses when the molasses was heat-sterilized at a low pH. The problem was overcome by adjusting the pH of molasses to neutral before sterilization.

L-라이신은 옥수수의 제1제한 아미노산으로써 사료 첨가용으로 메치오닌 다음으로 수요가 큰 아미노산이다. 공업적으로는 당밀 및 전분 분해물등의 탄소원을 사용하여 대량 생산하고 있는데 그 대표적 회사가 일본의 Kyowa Hakko Kogyo(1), Ajinomoto(2), 미국의 ADM, 국내의 (주)세원 및 제일제당의 인도네시아 법인인 PT. CSI이다.

한편, L-라이신 발효의 원료로 쓰이는 당밀(3)은 그 주성분이 sucrose(35~40%, w/w), glucose(약 8~10%, w/w), fructose(약 8~10%, w/w)이며 그밖의 유기물 및 무기물로 구성되어 있다. 그런데 무기물의 많은 부분을 차지하고 있는 Ca^{++} (3)은 정제시 수지에 흡착되거나 침전되어 수율을 저하시킬 뿐 아니라 농축관 및 기타 수송관(pipe line)에 scale로 침착되어 막대한 지장을 초래한다. 따라서 공업적 규모에서는 Ca^{++} 을 제거하고자 황산등을 사용하여 $CaSO_4$ 로 침전시킨후 그 상등액을 사용하는데 이때의 pH는 2.5~3.5가 되어 그대로 멸균하면 당밀내의 sucrose가 glucose 및 fructose로 100% 분해된다. 본 보에서는 L-라이신 생산균주인 *Corynebacterium glutamicum* KFCC10821을 사용하여 발효를 시행 할 경우 탄소원으로 사용되는 당밀내의 sucrose가 glucose와 fructose로 분해되어 사용되어지면 동량의 sucrose 사용시보다 L-라이신의 발효농도와 대당수율이 저하된다는 사실을 발견하고 그 원인 및 해결방안에 관한 연구결과를 간략하게 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 균주 *Corynebacterium glutamicum* KFCC10821은 L-루이신 및 L-스레오닌, L-메치오닌 요구성을 가지며 라이신의 유사체(analogue)인 S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methyllysine 내성 및 L-아르지닌 누출형(leaky) 특성을 지닌 변이균주이다.

배지 및 배양조건

플라스크를 이용한 발효배지로는 증류수 1리터당 sucrose 100 g(또는 glucose, fructose 각 100 g), $(NH_4)_2SO_4$ 27 g, 옥수수 침지액 100 g, urea 5 g, L-루이신 0.2 g, L-스레오닌 0.1 g, L-메치오닌 0.1 g, KH_2PO_4 1 g, NaCl 3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 30 mg, biotin 300 μ g, thiamine·HCl 500 μ g, $CaCO_3$ 40 g(pH 7.0)를 500 ml 배플플라스크(baffled flask)에 50 ml의 배지를 넣고 회전식 진탕기에서 30°C, 60~65시간 배양한 후 발효 상등액의 L-라이신을 정량분석하였다.

7L 발효조 실험은 당 및 기타 추가되는 배지성분을 발효중간에 첨가하는 유가식발효(fed-batch fermentation)로 온도 30°C, 교반속도 700~800 rpm, 통기량 1 vvm의 조건에서 NH_4OH 로 pH를 7.0으로 유지하면서 55~60시간 발효를 실시하였다. 사용배지는 공정수(tap water) 1리터당 전처리당밀(pretreated cane molasses) 250 g, 옥수수 침지액 100 g, $(NH_4)_2SO_4$ 32 g, KH_2PO_4 0.7 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 7 mg, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 7 mg, L-루이신 1.2 g, L-스레오닌 0.5 g, L-메치오닌 0.5 g였다.

*Corresponding author.

Key words: L-Lysine fermentation, cane molasses, pretreatment, heat-sterilization

전처리당밀의 제조

본 실험에 사용된 전처리된 당밀은 우선 사용량만큼의 당밀을 적당량 취한 다음 당밀무게의 20~30%에 해당되는 공정수를 가하고 스팀으로 60~80°C까지 가온시킨다. 온도가 상승되면 진한 황산을 서서히 가하면서 pH 2.5~3.5로 조정한다. 전처리가 잘 될 수 있도록 1~2시간 교반시킨다. 이렇게 교반된 전처리액을 당밀 침전조에 넣고 상온에서 24~36시간 방치시키면 CaSO₄가 주성분인 침전물과 전처리된 당밀상등액을 분리할 수 있다.

당류 및 총당의 분석

당류는 HPLC(High Performance Liquid Chromatography, Waters 기종)를 사용하여 분석하였고 총당은 공지의 방법인 Bertrand법(4)에 의해 분석하였다.

L-라이신 농도분석

L-라이신 농도의 분석은 산성 다킨(Ninhydrin)법(5)과 HPLC(Waters 기종)로 정량분석하였다.

결과 및 고찰

pH 조정에 따라 멸균된 전처리당밀을 사용한 L-라이신 발효

플라스크 발효의 탄소원으로써 KOH, NaOH 및 NH₄OH 등으로 pH 조정(7.0)후 멸균한 전처리당밀과 pH를 조정하지 않고 그대로 멸균한 전처리 당밀을 사용하여 발효를 실시한 결과 전자의 경우 L-라이신 생산농도가 후자에 비해 10% 이상 증대되었음을 알 수 있었으며 (Table 1) 이를 7L 발효조에서 재확인하기 위해 동등한 방법으로 7L 발효조에서 실험을 행하였다. 그 결과 예

상했던대로 pH를 7.0으로 조정한 후 멸균한 당밀을 사용했을 때 L-라이신 생산농도가 5% 이상 증가했음을 확인했고(Table 2) 동일한 전처리 당밀을 원료로 사용하더라도 멸균전 pH(2.5~3.5)를 pH 7.0으로 조정하여 멸균함으로써 sucrose의 가수분해를 최소화시켜 L-라이신 생산농도를 증대시킬 수 있었다.

황산으로 전처리된 당밀의 멸균전 pH 조정이 당분해에 미치는 영향

앞에서도 설명했듯이 산업적인 규모에서의 L-라이신 발효의 원료로서 황산으로 전처리된 당밀을 주로 사용한다. 보통 전처리된 당밀의 pH는 2.5~3.5이므로 이런 조건에서의 멸균이 당밀내의 당분해에 미치는 영향을 검토하기 위해 임의로 전처리당밀(Bertrand법으로 약 100 g/l)을 취하여 121°C, 15분 멸균 실험을 행하였다. 그 결과 pH를 조정하지 않고 멸균한 경우에 sucrose가 모두 glucose 및 fructose로 분해되었음을 확인할 수 있었다(Table 3).

L-라이신 발효에 있어서 탄소원으로써 당밀, sucrose 및 glucose가 미치는 영향

당밀중에는 발효성당(sucrose, glucose, fructose)으로써 당밀 전체 고형분 함량을 기준으로 50~60% 밖에 함유되어 있지 않기 때문에 산업체에서는 값싼 당밀에 부탄소원으로써 원당 또는 전분당(옥수수 또는 타피오카 전분당)을 혼합 사용하여 L-라이신 발효농도를 높임으로써 경제성을 극대화하고 있다. 한편, 최근에는 국제 원당가격의 급등으로 원당보다는 전분액당을 사용하는 업체가 증가하고 있는데 특히 전분액당을 사용하는 경우는 그 주성분이 glucose이기 때문에 glucose에

Table 1. The L-Lysine production using pretreated cane molasses (PCM) in flask

Contents	L-Lysine ·HCl (g/l)	Yield (%)	Remarks
PCM			
pH was adjusted to 7.0 before sterilization	38.7	38.7	Total sugar; 100 g/l
pH was not adjusted before sterilization	35.1	35.1	The mixing ratio of carbon source (PCM:Glucose = 70:30)

Table 2. The L-Lysine production using pretreated cane molasses (PCM) in 7L fermentor

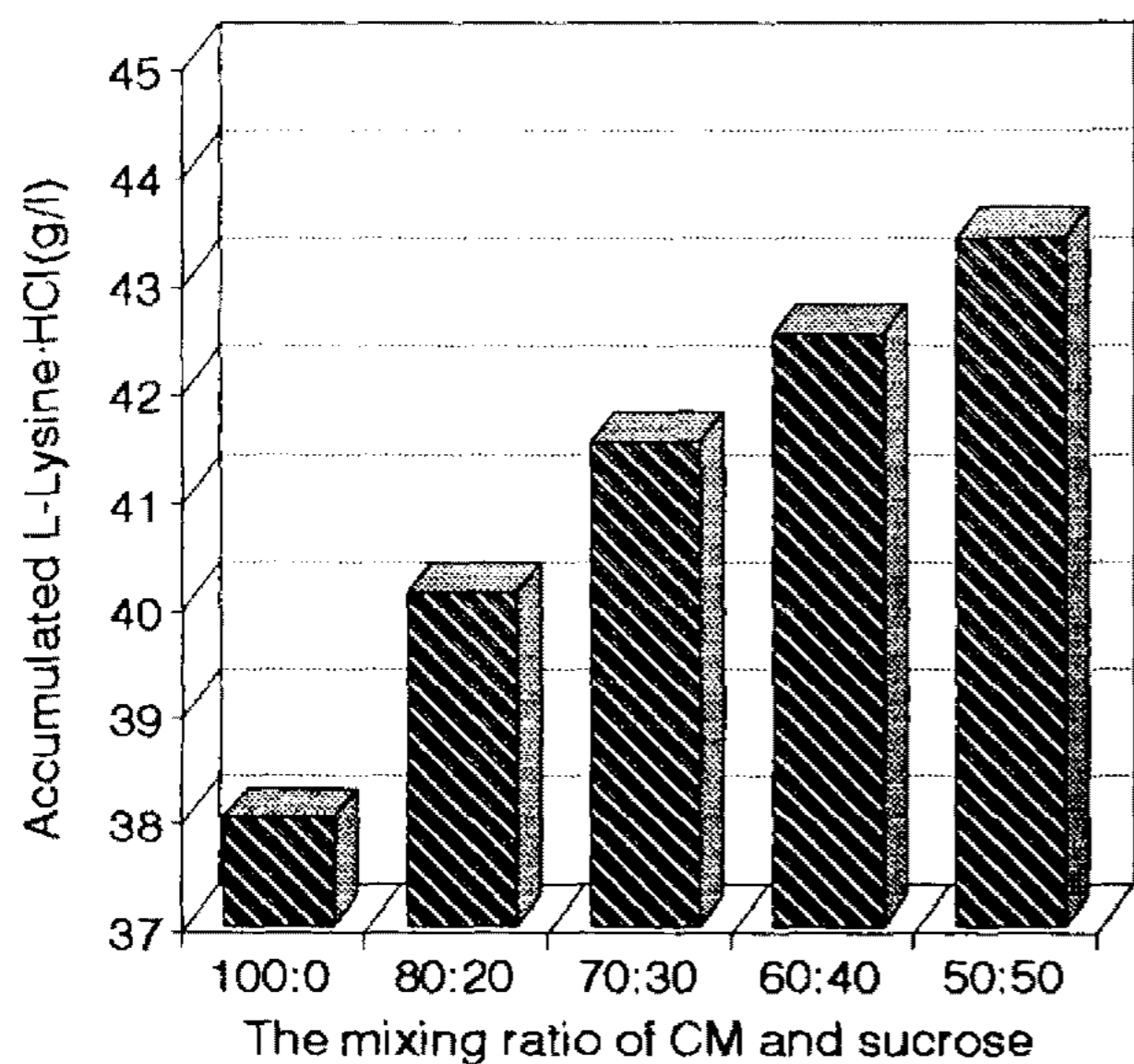
Contents	L-Lysine ·HCl (g/l)	Yield (%)	Culture time (hr)	Total sugar (g/l)	Remarks
PCM					
pH was adjusted to 7.0 before sterilization	93.3	37.3	61	250	The mixing ratio of carbon source
pH was not adjusted before sterilization	88.3	35.3	60	"	(PCM:Glucose = 70%:30%)

Table 3. The effect of sterilizing pH condition on the hydrolysis of sugar with pretreated cane molasses (PCM)

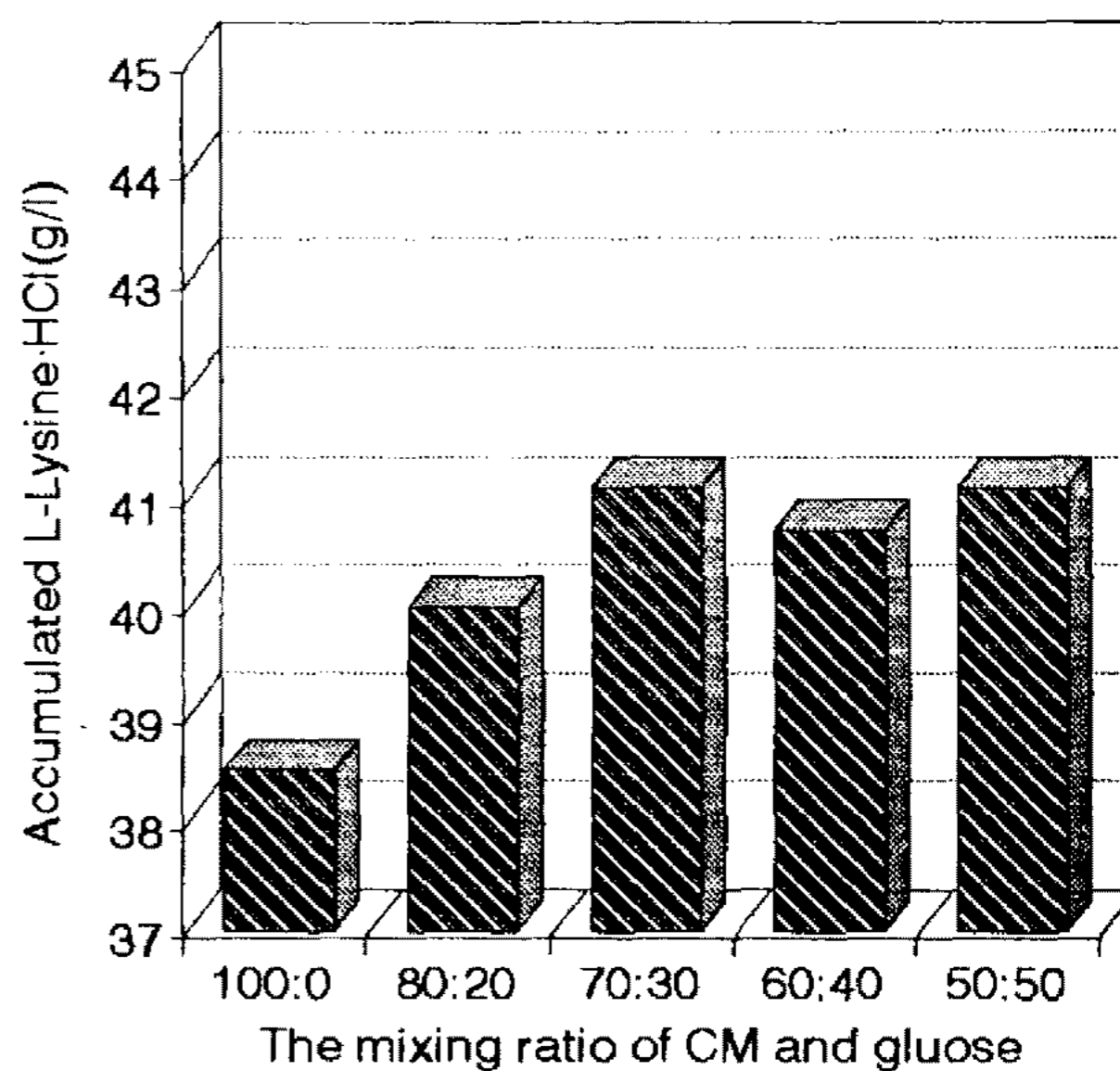
Sample	Sugar	Total (g/l)	Sucrose (g/l)	Glucose (g/l)	Fructose (g/l)	Remarks
PCM before sterilization (pH 2.5~3.5)		107.4	62.4	21.0	24.0	
PCM which was sterilized after adjusting to pH 7.0		106.2	52.4	26.3	27.5	Sterilization condition: 121°C, 15 min
PCM which was sterilized at pH 2.5~3.5		107.5	0	52.2	55.3	

Table 4. The effect on L-lysine production of sucrose, glucose and fructose

Contents	L-Lysine ·HCl (g/l)	Yields (%)	Residual sugar (g/l)	Remarks
Sugar				
Sucrose	45.5	45.5	0	Total sugar: 100 g/l
Glucose	42.1	42.1	0	Culture Time: 60 hr
Fructose	36.7	36.7	0	

**Fig. 1.** The effect of cane molasses (CM) and sucrose mixing ratio on L-lysine production.

대한 발효성 검토실험 및 원당의 주성분인 sucrose에 대해서도 대비 실험을 병행하였다. 우선 공지의 L-라이신 생산균주인 *C. glutamicum* KFCC10821를 사용하여 sucrose, glucose, fructose를 각각의 탄소원으로 하여 당종류에 따른 L-라이신 발효성 검토실험을 행한 결과 sucrose, glucose, fructose 순으로 L-라이신 발효 농도 및 대당수율이 낮게 나타났다(Table 4). 둘째, 주

**Fig. 2.** The effect of cane molasses (CM) and glucose mixing ratio on L-lysine production.

탄소원인 당밀에 sucrose와 glucose를 혼합할 경우 이들의 비율이 L-라이신 생산농도에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 sucrose의 경우 그 혼합비율이 높아짐에 따라 생산농도가 비례적으로 증가되었지만 glucose는 혼합비율을 증가시켜도 그 비율만큼 생산농도가 증가되지 않았다(Fig. 1, 2). 따라서 glucose의 경우 L-라이신 발효의 부탄소원으로써 당밀과 일정량 혼합사용하면 그 발효농도를 향상시킬 수 있어 경제성을 높일 수 있으나 단독 사용하거나 혼합비를 일정농도 이상 사용하면 발효농도 향상효과보다는 오히려 원가가 상승되어 원당(sucrose)에 비해 경제성이 많이 감소된다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 L-라이신 생산에 대해 sucrose가 glucose에 비해 월등히 좋은 탄소원임을 알 수 있었으며 지금까지 연속발효(Continuous culture), 고정화 미생물, 반연속유가배양(Recycled fed-batch culture)등 발효공정을 통한 생산성 향상 방법에 비해 간단할 뿐 아니라 향후 우량 균주개발에도 많은 도움을 주리라 판단된다.

참고문헌

1. Kinoshita, S., K. Nakayama, and S. Kitada. 1958. L-lysine production using microbial auxotroph. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**: 128-129.
2. Sano, K. and I. Shio. 1967. Microbial production of L-lysine. I. Production by auxotrophs of *Brevibacterium flavum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 349-358.
3. 兵口榮次郎, 河本正彦 共譯. 1967. 糖蜜 핸드ブック, 日本精糖工業會.
4. 한국생화학회, 교재편찬위원회. 1983. 실험생화학. Pp. 208-212.
5. Tosaka, O., H. Enei, and Y. Hirose. 1983. The production of L-lysine by fermentation. *Trend Biotechnol.* **1**: 70-74.

(Received 5 May 1995)