

수용성 이상계에서의 젖산과 *Lactobacillus helveticus* 세포의 분배특성

안한군 · 권윤중*

경기대학교 식품생물공학과

Partitioning of *Lactobacillus helveticus* Cells and Lactic Acid in Aqueous PEI/HEC Two-Phase Systems. An, Han Kun and Yun Joong Kwon*. Department of Foods and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea - For an ideal extractive bioconversion in aqueous two-phase systems, the product has to be preferentially partitioned into the phase opposite to the one in which the biocatalyst is located. Partitioning behaviors of *Lactobacillus helveticus* IAM 11090 and lactic acid in aqueous two-phase systems composed a polycation, poly(ethylenimine) (PEI), and an uncharged polymer (hydroxyethyl)cellulose (HEC) were investigated. *L. helveticus* cells were preferentially partitioned to the HEC-rich top phase while about 85% of lactic acid was partitioned to the PEI-rich bottom phase. These results indicate that extraction of charged, low molecular weight products in an aqueous two-phase systems can be promoted by using an oppositely charged polymer as one of the phase-forming polymer. By the ideal partitioning of the cells and lactic acid, an aqueous PEI/HEC two-phase system can be used as a potential system for the extractive lactic acid fermentation of cheese whey.

Key words: extractive bioconversion, aqueous two-phase system, *Lactobacillus helveticus*, lactic acid

추출 생물전환(extractive bioconversion) 또는 *in situ* 생성물 분리는 생물공정의 문제점인 생성물 저해와 낮은 생산성을 극복하기 위하여 제안된 기술로써 생산 후 공정(downstream processing)의 첫째 단계인 추출과정이 발효과정 중에 일어나게 하는 방법이다[13, 19]. 이러한 추출전환에는 막분리 공정, 고체 흡착제를 이용한 추출 및 유기용매나 수용성 이상계를 이용한 추출전환 등이 있다.

수용성 이상계(aqueous two-phase system)는 poly(ethylene glycol)(PEG)과 dextran 같은 서로 섞이지 않는 고분자를 포함하는 두 상 사이에서 효소와 같은 가용성 단백질이나 생성물의 표면물성의 특성을 이용하여 한쪽 상에 우세하게 분배시켜 추출하는 방법으로써 생물체에 적합한 환경 때문에 단백질 추출에 많이 적용되고 있는 공정이다[2]. 수용성 이상계는 낮은 계면장력 때문에 쉽게 형성되는 미세한 에멀전 방울에 의하여 두 상 사이의 접촉면적이 매우 클 뿐만 아니라 기질과 생성물의 확산속도가 크기 때문에 추출전환에 이상적인 시스템이다[10]. 수용성 이상계에 의한 추출전환은 전분의 가수분해[11], 카제인의 가수분해[15], cellulose의 가수분해[18], *Sacchromyces cerevisiae*에 의한 에탄올 발효[8], *Clostridium acetobutricum*에 의한 아세트산-부탄올발효[14], hydrocortisone에서 prednisolone으로의 생물변환[7], 그리고 젖산발효[6] 등에 응용된 바 있다.

추출전환이 수용성 이상계에서 성공적으로 수행되기

위해서는 생성물은 촉매가 분리되는 반대쪽에 우세하게 분배되어야 한다(Fig. 1). 일반적으로 세포나 효소는 절대적으로 한쪽 상에 우세하게 분배되지만 저 분자량의 생성물들은 두 상에 균일하게 분배된다. 따라서 상을 형성하는 polymer의 분자량과 농도, pH, 이온조성 등을 조절하여 생성물을 한쪽 상에 우세하게 분배시키거나 한쪽 상의 체적을 증가시켜 가능하면 많은 양의 생성물을 추출할 수 있도록 하여야 한다.

젖산발효는 생성물에 의한 저해를 받는 대표적인 공정으로써 생성물의 제거를 위한 여러 가지 방법들이 제안되었다[5, 6, 12, 17]. 다가 음이온인 poly(ethylenimine)(PEI)은 발효중에 생산되는 젖산의 좋은 추출제로 작용할 수 있기 때문에 PEI로 구성되는 수용성 이상계는 젖산의 추출발효에 이용될 가능성이 높다는 연구결과가 최근에 보고되었다[9]. 유당으로 부터의 젖산생산의 우수한 균주로 알려진 *Lactobacillus helveticus*[16]를 이용한 치즈유청으로부터의 젖산생산을 PEI와 (hydroxyethyl)cellulose(HEC)로 구성된 수용성 이상계에서 추출발효를 수행할 경우 젖산의 생산성이 향상될 것으로 기대된다.

이상계에서 치즈유청으로부터의 젖산 추출발효가 효율적으로 이루어지기 위해서는 세포는 HEC-rich 상부상에, 그리고 생성물인 젖산은 PEI-rich 하부상에 우세하게 분배되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 PEI/HEC로 구성되는 수용성 이상계에서 *L. helveticus*의 세포분배 및 젖산분배에 미치는 다가 음이온의 농도, pH 및 배지의 농도 등의 영향을 검토하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-331-249-9651, Fax. 82-331-253-1165
E-mail: yjkwon@kuic.kyonggi.ac.kr

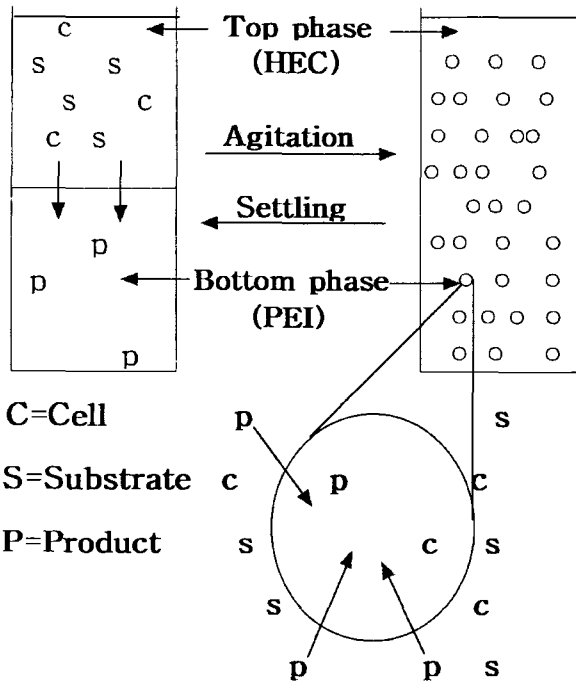


Fig. 1. Principle of extractive bioconversion in aqueous PEI/HEC two-phase systems.

재료 및 방법

시약

Poly(ethyleneimine)(50% w/v, 분자량 50,000~60,000)은 Sigma Chemical Co. 제품을, (Hydroxyethyl)cellulose는 Hercules BV사(The Netherlands)로부터 기증 받은 Natural 250 LR(viscosity 0.1~0.18 Pa·s of 5% solution in water)이라는 상품명인 제품을 사용하였다. Skim milk, yeast extract는 Difco 제품을 사용하였으며, 그 외 시약은 일급 이상의 분석용 시약을 사용하였다. 9% PEI(w/w), 6% HEC(w/w) stock solution은 증류수에 용해시켜서 제조하였으며, 4°C에서 보관하였다. HEC을 용해하기 위해서는 약간의 가열이 필요하며, PEI 용액은 20%(v/v) 황산용액으로 pH 6으로 적정하였다.

사용균주 및 배지

Lactobacillus helveticus IAM 11090을 젖산 생산균주로 사용하였으며, 10% skim milk에서 배양하여 -20°C에서 보관하였다. 본 실험의 기본배지는 lactose 20 g/l, yeast extract 20 g/l, sodium acetate 1 g/l, MgSO₄ 0.6 g/l, K₂HPO₄ 0.5 g/l, KH₂PO₄ 0.5 g/l, FeSO₄ 0.03 g/l, MnSO₄ 0.03 g/l의 LS(lactose synthetic) 배지를 사용하였다. Skim milk에 보관중인 *L. helveticus* 현탁액 2 ml를 기본배지 50 ml를 함유한 100 ml Erlenmeyer flask에 접종한 후 42°C에서 20시간 정제 배양한 것을 전 배양액

(inoculum)으로 사용하였다.

수용성 이상계에서 *L. helveticus*의 세포분배 측정

기본배지 50 ml를 포함하는 100 ml의 Erlenmeyer flask에 전 배양액 2 ml를 접종한 후 42°C에서 20시간 배양한 후 10 ml를 채취하여 6000 rpm에서 10분간 원심분리 후 증류수로 1번 세척하여 다시 같은 조건으로 원심분리하였다. 원심분리시킨 세포에 대해 PEI와 HEC stock solution과 완충용액(1M sodium phosphate, pH 6.0)이나 배지(10배 농축액)를 기한 후 증류수로 희석하여 원하는 농도의 이상계를 준비하였다. 튜브를 20회 정도 상하로 혼합한 후 상이 완전히 분리될 때까지 정치하였다. 각 상의 체적을 튜브 눈금으로부터 측정하여 상 체적비(상부상의 체적/하부상의 체적, V_i/V_b)를 구하였다. 하부상의 세포농도는 하부상에서 일정량의 시료를 취한 후 6000 rpm에서 원심분리하고 증류수로 희석하여 OD₆₀₀ 값으로 구하였으며, 하부상으로 분배되는 세포의 양(C_b)은 각 상의 체적, 전체 세포농도 및 하부상의 세포농도값으로부터 계산하였다.

수용성 이상계에서 젖산의 분배 측정

수용성 이상계에서 젖산분배의 측정은 세포대신에 젖산(1% w/w)을 첨가하는 것 이외에 세포분배 측정방법과 동일하다. 5% PEI/1% HEC 이상계에서 상이 분리된 후 각 상에서 시료를 취하여 젖산농도를 측정하였으며, 젖산 분배상수(K)는 상부상의 젖산농도에 대한 하부상의 젖산 농도비로 결정하였다.

분석방법

시료를 6000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 균체를 증류수로 1번 세척하고, 다시 같은 조건으로 원심분리한 후, 0.8% NaCl로 적당히 희석하여 600 nm에서 O.D. 값을 측정하였다. 균체농도는 건조중량과 OD₆₀₀ 값의 상관관계로부터 구하였다. 젖산 농도는 Sigma Diagnostics kit(procedure no. 735)을 이용하여 정량하였다.

결과 및 고찰

Phosphate와 sulfate 농도의 영향

PEI/HEC 이상계에서 젖산은 주로 PEI 상에 분배하게 되므로 가능하면 세포는 HEC을 함유하는 상부상에 분배되어야 한다. 최근 연구결과에 의하면, PEI 같은 다가전 해질과 강하게 작용하는 phosphate나 sulfate 같은 음이온들이 PEI/HEC 이상계의 성질에 영향을 미친다고 알려졌다[3]. 따라서 배지중에 많이 함유된 phosphate와 sulfate 이온의 농도가 세포 분배에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 2에 나타낸 것과 같이 phosphate 농도가 증가함에 따라 상 체적비(V_i/V_b)는 증가하였으며, 하부상

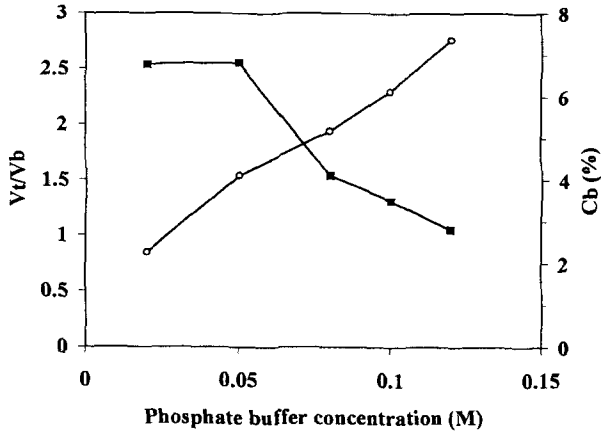


Fig. 2. Effect of phosphate concentration on the phase volume ratio (V_t/V_b , ○) and percentage of the cells found in bottom phase (C_b , ■) in 5% PEI/1% HEC two-phase system (pH 6.0).

에 분배되는 세포의 양(C_b)은 감소하였다. PEI의 효율적인 상대이온으로 작용하는 phosphate 음이온수의 증가는 PEI 상의 물을 배제시킴으로서 PEI 상의 체적을 감소시켜 이상계의 상부상의 체적을 증가시켰다. 결과적으로 PEI 상 체적의 감소와 phosphate와 같은 음이온이 세포에 대해 음이온 교환수지로 작용하여 하부상에 분배되는 *L. helveticus* 세포의 농도를 감소시켰다. 높은 polymer의 농도, 음이온 및 세포등의 존재로 상은 비교적 빨리 형성되었으며 phosphate 농도와 관계없이 대략 40분 정도 정치 후에 분리되었다.

Sulfate 농도에 따른 세포분배 및 상 체적비를 살펴본 결과는 Fig. 3과 같다. Sulfate 농도의 증가에 따른 PEI 상 체적의 감소효과는 거의 없었으나 HEC를 함유하는 상부상으로 *L. helveticus* 세포분배는 sulfate 농도 증가에 따라 조금씩 증가하였다. 그러나 그 영향은 phosphate에

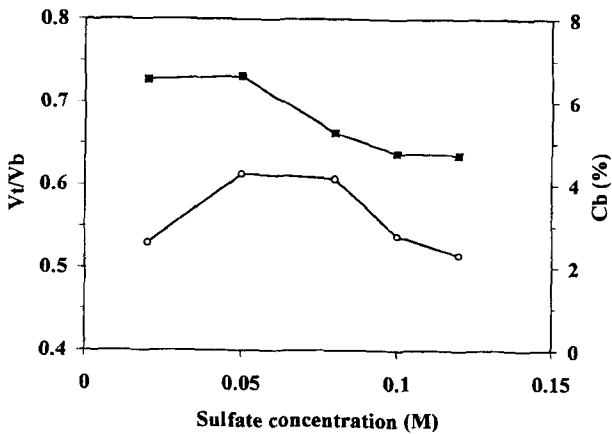


Fig. 3. Effect of sulfate concentration on the phase volume ratio (V_t/V_b , ○) and percentage of the cells found in bottom phase (C_b , ■) in 5% PEI/1% HEC two-phase system (pH 6.0).

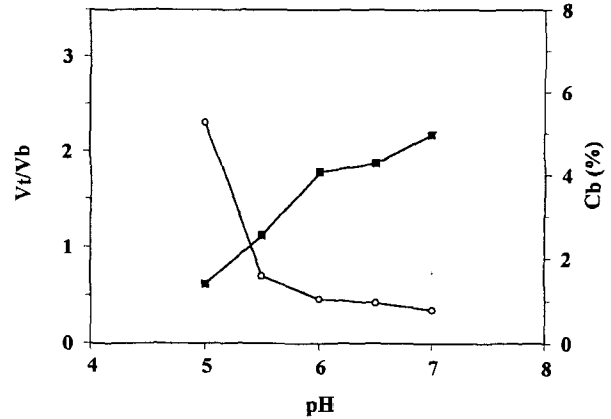


Fig. 4. Effect of pH on the phase volume ratio (V_t/V_b , ○) and percentage of the cells found in bottom phase (C_b , ■) in 5% PEI/1% HEC two-phase system. PEI stock solutions used were titrated to different pH with H_2SO_4 .

비하여 작았다.

pH의 영향

PEI/HEC 이상계의 pH를 조절하기 위해서는 PEI를 산으로 적정하여야 하는데, 이 때 가해지는 음이온은 PEI의 상대이온으로 작용하기 때문에 이상계의 성질에 영향을 미칠 수 있다. 또한 이상계의 pH는 PEI의 전하밀도를 변화시켜 이상계의 상 체적비 등의 성질에 영향을 미치게 된다. 따라서 이상계의 pH가 상 체적비와 세포의 분배에 미치는 영향을 검토하였다(Fig. 4). 먼저 황산에 의해 여러 pH 값으로 제조한 PEI stock solution을 이용하여 PEI/HEC의 이상계를 준비한 후, 상 체적비와 세포 분배를 측정하였다. 낮은 pH에서는 PEI의 전하밀도가 증가되어 PEI에 결합되는 상대이온수의 증가로 PEI 상의 체적이 감소되어 상 체적비가 증가하였다. 따라서 pH가 증가됨에 따라 하부상에 분배되는 세포의 양은 증가하였는데 5% 미만이었다.

수용성 이상계중의 생육배지 농도의 영향

L. helveticus 생육배지에는 phosphate나 sulfate 이온이 존재하므로 이상계중에 첨가한 배지농도의 영향을 검토하였다. Phosphate buffer 대신에 여러 농도의 생육배지(0.5~1.5배)를 첨가했을 때의 상 체적비와 세포의 분배를 측정한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 2, 3과 비교했을 때, 배지중의 다가 음이온의 농도가 훨씬 낮기 때문에 상 체적비가 상대적으로 낮았다. 배지농도가 증가됨에 따라 상 체적비는 조금씩 증가하였으며, HEC를 함유하는 상부상으로 세포분배 또한 조금씩 증가하였으나 phosphate 농도의 영향에 비하여 배지농도의 영향은 상대적으로 낮았다.

생육배지의 영향

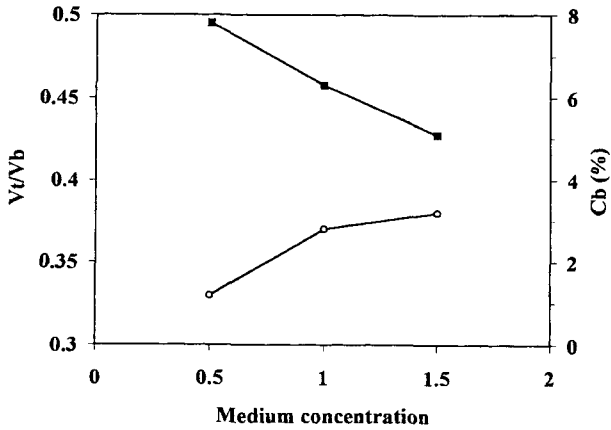


Fig. 5. Effect of medium concentration on the phase volume ratio (V_t/V_b , ○) and percentage of the cells found in bottom phase (C_b , ■) in 5% PEI/1% HEC two-phase system. Different concentrations of the medium used have been given in relation to basal medium concentration, which is taken as 1.0.

Anderson과 Hahn-Hägerdal[1]은 정상배지와 20% PEG를 함유한 배지에서 자란 세포 사이에는 이상계에서 분배특성에 큰 차이가 있었다고 보고하였다. 따라서 이상계에서 생육한 *L. helveticus*의 세포가 분배특성에 미치는 영향을 검토하였다. 20 g/L의 lactose를 함유한 기본배지와 5% PEI/1% HEC의 수용성 이상계 배지에서 각각 젖산균을 배양한 후 원심분리하여 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 새로운 배지가 포함된 새로운 5% PEI/1% HEC의 수용성 이상계에서 분배시킨 결과 Table 1에 나타난 것과 같이, 이상계에서 자란 세포는 정상배지에서 자란 세포에 비하여 PEI 상에 약간 더 분배되었다. 이 결과는 이상계에서 오랜 시간 배양된 세균세포의 표면 성질변화에 기인된 것으로 생각되는데, 그 차이는 그렇게 크지 않았으며, 두 경우 모두 95% 가량의 세포가 상부상에 분배되었다.

수용성 이상계에서의 젖산분배

PEI/HEC 이상계에서 젖산의 추출발효가 효과적으로 진행되기 위해서는 생성물(젖산)이 PEI 상에 최대한으로 추출되어야 한다. PEI와 같은 다가 양이온은 phosphate와 sulfate 같은 음이온과 상호 강하게 결합을 하여 단백질의 분배상수에 영향을 미친다고 보고되었다[3, 4].

Table 1. Partitioning behavior of *L. helveticus* cells in fresh 5% PEI/1% HEC two-phase medium (pH 6.0)

Culture time (h)	Volume ratio (V_t/V_b)	Cells in bottom phase
12 ^a	0.40	4.30
12 ^b	0.43	6.90
40 ^b	0.49	7.20

^aCulture was incubated in basal medium.

^bCulture was incubated in 5% PEI/1 % HEC two-phase medium.

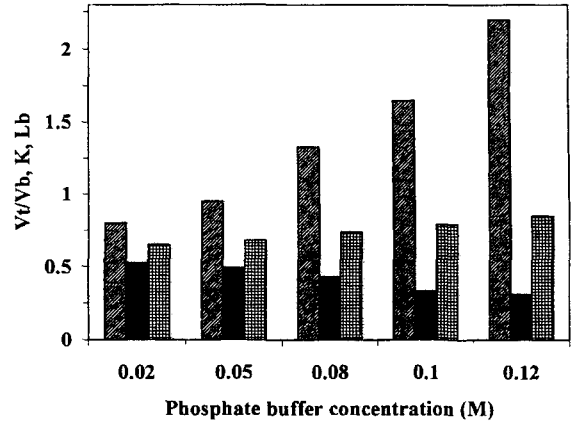


Fig. 6. Effect of phosphate concentration on the phase volume ratio (V_t/V_b , ▨), partition coefficient (K , ■) of lactic acid, and L_b (▤) in 5% PEI/1% HEC two-phase system. L_b is the relative proportion of total lactic acid in bottom phase. The concentration of lactic acid used for partitioning was 1% (w/v).

따라서 *L. helveticus* 배양배지중에 존재하는 주된 다가 음이온인 phosphate의 농도가 5% PEI/1% HEC 이상계 중의 젖산 분배에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 6에 나타난 것과 같이 phosphate 이온의 농도 증가에 따라 상 체적비는 증가되었고 젖산분배 상수는 감소하는 경향을 보였다. 즉, 음이온수의 증가는 PEI 상의 물을 배제시켜 체적을 감소시켜 상 체적비를 증가시켰다. 또한 PEI의 증가된 전하밀도는 PEI와 젖산간의 이온쌍(ion pair) 결합을 촉진시켜 PEI 상에 젖산의 축적을 촉진시켰다. Phosphate 농도 0.12 M에서 PEI 상에 약 85%까지 젖산이 축적되었다. 배지농도에 따른 젖산의 분배특성을 검토한 결과(Fig. 7), 배지농도(0.5~1.5배)의 증가

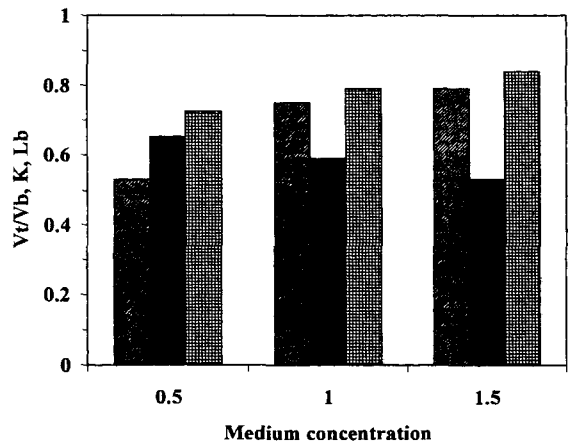


Fig. 7. Effect of medium concentration on the phase volume ratio (V_t/V_b , ▨), partition coefficient (K , ■) of lactic acid, and L_b (▤) in 5% PEI/1% HEC two-phase system. L_b is the relative proportion of total lactic acid in bottom phase. The concentration of lactic acid used for partitioning was 1% (w/v). Different concentrations of the medium used have been given in relation to basal medium concentration, which is taken as 1.0.

에 따라 배지중의 음이온수의 증가로 인해 상 체적비의 증가와 젖산분배 상수는 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 Fig. 6에 비해 배지 중의 음이온수가 훨씬 낮기 때문에 상대적으로 낮은 상 체적비와 PEI 상에 낮은 젖산 축적을 보였다. 배지농도 1.5배에서 PEI 상에 약 84%까지 젖산이 축적되었다. 젖산분배 상수는 0.4~0.5로써 PEI 상의 젖산농도가 세포가 주로 분배되는 상부상의 농도의 2배 가량되기 때문에 젖산에 의한 저해를 최소화할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

수용성 이상계에서 효율적인 추출발효를 수행하기 위해서는 생체축매와 생성물이 서로 반대 상에 우세하게 분배되어야 한다. 일반적으로 분자량이 낮은 생성물은 양쪽 상에 비슷하게 분배되므로, 상의 조성 등을 조절하여 한쪽 상의 체적을 증가시켜 최대한으로 생성물을 추출하여야 한다. 본 연구에서는 PEI와 HEC으로 구성된 수용성 이상계에서 *L. helveticus*와 젖산의 분배에 미치는 다가 음이온의 농도, pH, 배지의 농도 및 생육배지 농도 등의 영향을 검토하였다. PEI의 상대 이온으로 작용하는 phosphate, sulfate 음이온수의 증가는 PEI 상의 체적을 감소시켜 하부상에 분배되는 세포의 양(Cb)을 감소시켰으며, sulfate 농도의 영향은 phosphate에 비해 적었다. 검토한 범위에서 대략 93% 이상의 세포가 HEC-rich 상부상에 분배되었다. 이상계에 생육배지 농도를 달리하여 첨가했을 때 배지중에 존재하는 phosphate와 sulfate 농도에 따라 비슷한 경향을 나타냈지만 낮은 농도로 인하여 그 영향은 크지 않았다. Phosphate 농도에 따른 젖산분배를 검토한 결과 농도가 증가 할 수록 분배계수는 감소하였으며, 대략 85% 가량의 젖산이 PEI의 하부상에 분배되었다. 이 결과로부터 수용성 이상계에서 전하를 띤 저 분자량의 생성물의 추출은 반대 전하를 띤 폴리머를 하나의 상형성 폴리머로 사용함으로써 증진되었음을 알 수 있었다. 따라서 *L. helveticus* 세포는 95% 정도가 상부상에 분배되고 젖산은 85% 정도가 하부상에 우세하게 분배되므로 PEI/HEC 이상계는 치즈유청으로 부터의 젖산의 추출발효에 가능성이 높은 시스템으로 응용될 수 있는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 경기대학교 교내 연구비에 의하여 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Andersson, E. and B. Hahn-Hägerdal. 1988. High con-

- centrations of PEG as a possible uncoupler of the proton motive force: a amylase production with *Bacillus amyloliquefaciences* in a aqueous two-phase systems and PEG solutions. *Enz. Microb. Technol.* **29**: 329-336.
2. Cong, L., R. Kaul, U. Dissing, and B. Mattiasson. 1995. A model study on eudragit and polyethyleneimine as soluble carriers of α -amylase for repeated hydrolysis of starch. *J. Biotechnol.* **42**: 75-84.
3. Dissing, U. and B. Mattiasson. 1993. Poly(ethyleneimine) as a phase forming polymer in aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**: 15-21.
4. Dissing, U. and B. Mattiasson. 1994. Partition of protein in polyelectrolyte-neutral polymer aqueous two-phase systems. *Bioseparation* **4**: 335-336.
5. Honda, H., Y. Toyama, H. Takahashi, T. Nakazeko, and T. Kobayashi. 1995. Effective lactic acid production by two-stage extractive fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 589-593.
6. Katzbauer, B. 1994. Extractive lactic acid fermentation. Ph. D. Dissertation, Graz University of Technology, Austria.
7. Kaul, R. and B. Mattiasson. 1986. Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 259-265.
8. Kuhn, I. 1980. Alcoholic fermentation in an aqueous two-phase system. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 2392-2398.
9. Kwon, Y. J., R. Kaul, and B. Mattiasson. 1996. Extractive lactic acid fermentation in poly(ethyleneimine)-based aqueous two-phase system. *Biotechnol. Bioeng.* **50**: 280-290.
10. Larsson, M. 1989. Applications of aqueous two-phase systems in biotechnology, Ph. D. Dissertation, University of Lund, Lund, Sweden.
11. Larsson, M., V. Arasaratnam, and B. Mattiasson. 1989. Integration of bioconversion and downstream processing: Starch hydrolysis in an aqueous two-phase system. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 758-766.
12. Major, N. C. and A. T. Bull. 1989. The physiology of lactate production by *Lactobacillus delbreuckii* in a chemostat with cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 592-599.
13. Mattiasson, B. and O. Holst. 1991. *Extractive Bioconversions*, Marcel Dekker, New York.
14. Mattiasson, B. and M. Larsson. 1985. Extractive bioconversions with emphasis on solvent production. *Biotechnol. Gen. Rev.* **3**: 134-137.
15. Mukataka, S., C. A. Haynes, J. M. Prausnitz, and H. W. Blanch. 1992. Extractive bioconversions in aqueous two-phase system: Enzymatic hydrolysis of casein proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 195-206.
16. Norton, S., C. Lactroix, and J. C. Vuillemand. 1994. Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Enz. Microb. Technol.* **16**: 457-466.
17. Srivastava, A., P. K. Roychoudhury, and V. Sahai. 1992.

- Extractive lactic acid fermentation using ion-exchange resin. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 607–613.
18. Tjerneld, F., L. Persson, and J. M. Lee. 1991. Enzymatic cellulose hydrolysis in an attrition bioreactor combined with an aqueous two-phase system. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 876–882.
19. Wang, H. Y. 1983. Integrating biochemical separation and purification steps in fermentation process. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **413**: 323–321.

(Received October 11, 1997)