

Enterococcus sp. JA-27에 의한 가용성 전분으로부터 L형 젖산의 생산

김경아 · 김미경 · 장경린 · 전흥기*
부산대학교 자연과학대학 생명과학부

Production of L-Lactic Acid from Soluble Starch by *Enterococcus* sp. JA-27. Kim, Kyung-A, Mi-Gyeong Kim, Kyung-Lib Jang, and Hong-Ki Jun*. Division of Biological Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea - Lactic acid bacteria with amylolytic and acid producing activities can ferment starch directly to lactic acid thereby producing a monomer for the production of biodegradable poly lactic acid (PLA). In this study, the strain producing L-lactic acid from soluble starch was isolated from Nuruk. The isolated strain was identified as *Enterococcus* sp. through its morphological, cultural, biochemical characteristics as well as the 16S rDNA sequence analysis, and named *Enterococcus* sp. JA-27. *Enterococcus* sp. JA-27 produced exclusively L-lactic acid from soluble starch as a carbon source. The optimal conditions for the maximum production of L-lactic acid from *Enterococcus* sp. JA-27 were 30°C, pH 8, 1.5 % soluble starch as a substrate and 3.5 % tryptone as a nitrogen source, 0.1 % K₂HPO₄, 0.04 % MgSO₄ · 7H₂O, 0.014 % MnSO₄ · 4H₂O, 0.004 % FeSO₄ · 7H₂O. Batch and fed batch culture were carried out and the former was more effective. L-Lactic acid production in the optimum medium was significantly increased in a 7 L jar fermenter, where the maximum L-lactic acid concentration was 3 g/L. For the purification of lactic acid in fermented broth, two stage ion-exchange column chromatographies were employed and finally identified by HPLC.

Key words: Poly lactic acid, L-lactic acid, *Enterococcus* sp.

최근 석유화학 플라스틱에 대한 환경문제의 심각성이 널리 제기됨에 따라 생분해성 플라스틱에 대한 관심이 높아지고 있다. 생분해성 플라스틱은 사용하는 원료에 따라 천연계 고분자, 화학합성 고분자, 미생물 고분자 및 천연계 고분자와 화학합성 고분자의 혼용 등 크게 4가지의 형태로 분류된다. 한편 화학합성 고분자 가운데 완전 생분해성 플라스틱의 하나로 물성이 폴리에틸렌과 거의 유사하고 대량생산이 가능한 Poly Lactic Acid(PLA)는 환경친화적이어서 기존의 플라스틱을 대신하는 새로운 물질로 주목을 받고 있다[2].

생분해성 플라스틱, 약물전달, 생체대체재료 등에 효과적으로 사용되는 PLA(Poly Lactic Acid)의 원료는 lactic acid로서 식품과 화학제품, 피혁공업 등 전반에 걸쳐 널리 사용되고 있다[2, 16]. Lactic acid는 바이오메스를 원료로 한 미생물 발효법[7, 13] 혹은 화학적 합성법[9]에 의해 생산된다. 미생물 발효법은 전체 lactic acid 생산의 절반을 차지하여 cellulose, hemicellulose, starch와 같은 저가의 원료를 사용함으로써 제품의 원가를 절감할 수 있는 동시에 한 가지의 이성질체만을 생산하는 젖산균을 사용하여 원료의 순도를 높여 poly lactic acid의 물성을 높일 수 있는 장점이 있다 [11].

젖산은 비대칭 탄소를 가지고 있어 광학적으로 D-, L-, DL-lactic acid로 존재한다. 이들 모두가 polymerization이 가능하기에 조성에 따라 다른 성질을 가진 polymer의 생산이 가능하다. 그러나 L-lactic acid는 인체에서 쉽게 흡수되어 lactic dehydrogenase(EC 1.1.1.27)에 의해 pyruvate로 전환되어 TCA cycle로 들어가 산화되지만, D-와 DL-lactic acid는 체내에서 쉽게 산화되지 못하고 대사가 느리게 진행되어 혈액에 축적되므로 산독증을 일으킬 위험이 있다[6,15]. 그러므로 식품 산업과 biomedical 분야 등에 주로 L-lactic acid가 요구되어 특이적으로 L-form의 생산에 더 효과적인 공정을 개발하는데 지속적인 연구가 진행되고 있는 실정이다[3, 5, 13, 17].

현재 지구환경 보존이라는 사회적 요구로 등장한 생분해성 플라스틱은 가격이 대체로 기존 플라스틱의 가격에 비해 1.6~4배 이상으로 고가이므로 그 종류와 기능이 제한되어 있는 실정인데 쓰레기 매립 법안, 재활용 부담금, 퇴비화 기반 시설의 개발 등의 요인으로 생분해성 고분자의 수요가 유럽 뿐 아니라 국내에서도 꾸준히 증가할 것으로 전망된다. 따라서 본 연구에서는 poly lactic acid의 원료가 되는 L-lactic acid의 생산을 위해 자연계에 풍부한 가용성 전분을 동시에 당화, 발효하여 선택적으로 L-lactic acid를 생산할 수 있는 젖산균을 분리하여 배지의 최적화를 조사, 생산원가의 절감을 모색하였다. 또한 L-lactic acid의 대량생산 공정을 위하여 회분 및 유기배양을 검토하였고 이온교환법으로 정제하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-51-510-2270, Fax: 82-51-513-4532

E-mail: hkjun@pusan.ac.kr

재료 및 방법

균주의 분리

시판 중인 누룩을 종류에 관계없이 수집하여 마쇄한 후 멸균한 0.85% 식염수로 10⁵~10⁸ 정도로 희석하였다[8]. 희석액을 soluble starch(Junsei Chemical Co., Ltd.)가 탄소원으로 첨가된 분리용 평판배지(Lactobacillus용 APS 배지 변형; 1% soluble starch, 0.2% peptone, 0.1% yeast extract, 0.1% sucrose, 0.1% tween 80, 0.1% K₂HPO₄, 0.5% sodium citrate, 0.5% NaCl, 0.08% MgSO₄ · 7H₂O, 0.014% MnSO₄ · 4H₂O, 0.004% FeSO₄ · 7H₂O, 1.5% agar, pH 6.8-7.0)에 도말하여 37°C에서 3~4일간 배양한 후 평판배지에서 요오드 증기로 염색하여 clear zone이 나타나는 colony들 중 starch 분해능이 뛰어난 균주를 일차적으로 선별하였으며, 이들 균주를 다시 1.5% CaCO₃-MRS 배지에 배양하여 colony 주위의 투명한 생성유무를 조사하였다. Colony 주위에 clear zone을 형성한 균주에 대해 L-lactic acid 생산성을 검토하여, 그 생산성이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선별하였다. 최종적으로 선정된 균주는 2% soluble starch, 1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% NaCl, 0.04% MgSO₄ · 7H₂O, 0.014% MnSO₄ · 4H₂O, 0.004% FeSO₄ · 7H₂O의 조성으로 이루어진 배지를 기본배지로 사용하였다.

균주의 동정

분리균주의 전자현미경 관찰을 통한 형태학적 특성 및 각종 배지에서의 배양상의 특성을 검토하고 균주의 생리학 및 생화학적 특성을 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 제 9판[4]과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2[12]에 준하여 동정하였다.

균주의 starch 분해 확인

배양액을 4°C에서 원심분리(10,000 rpm, 10 min)하여 상등액 20 µl와 요오드 solution(요오드 stock solution(5% KI, 5% I₂) 25 ml을 1 ml의 5 M HCl을 첨가한 500 ml 증류수와 혼합) 1 ml에 증류수 1 ml과 반응시켜 620 nm에서 흡광도를 측정하였다[10]. 배양 전 배지의 흡광도와 비교하여 그 감소한 값으로 starch의 분해를 확인하였다.

L-Lactic acid 생산량 측정

전처리 - 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 그 상등액 700 µl와 perchloric acid solution 700 µl를 잘 혼합하여 ice에서 10분간 방치한 후 원심분리(13,000 rpm, 15 min, 4°C)하였다. 상등액 700 µl를 취하여 3 N KOH를 사용하여 pH=3.5로 조정한 후 ice에서 15분간 방치한 후 그 상등액을 사용하였다.

반응 - Hydrazine-glycine buffer(pH 9) 1 ml에 NAD 80 µl와 전 처리한 sample 80 µl를 넣은 후 340 nm에서 흡

광도(E_{S1})를 측정한다. 흡광도를 측정한 액에 L-LDH 혹은 D-LDH(L-lactic acid 생산량 측정에는 L-LDH, D-lactic acid 생산량 측정에는 D-LDH를 각각 사용) 5 µl를 넣어 37°C에서 30 min 반응시킨 후 다시 340 nm에서 흡광도(E_{S2})를 측정한다. Blank는 sample대신 perchloric acid 용액 80 µl를 넣어 E_{B1}과 E_{B2}를 측정한다.

Lactic acid 생산량 계산[1]

$$C = \frac{\Delta E \times V \times M \cdot W}{\epsilon \times d \times v} \times F \quad [\mu\text{g/ml}]$$

C: concentration,

ΔE: extinction change,

$$\Delta E = \Delta E_S - \Delta E_B, \quad \Delta E_S = E_{S2} - E_{S1},$$

$$\Delta E_B = E_{B2} - E_{B1}$$

d: light path(cm),

M · W: µg/µmol (lactic acid M · W: 90.08),

V: assay volume(ml),

v: volume of sample used in assay(ml),

ε: extinction coefficient(cm²/µmol),

NADH의 ε(340 nm)=6.22 cm²/µmol,

F: dilution factor of the sample.

L-Lactic acid의 최적 생산 조건 검토

공시균에 의한 L-lactic acid 최적 생산 조건을 설정하기 위해 탄소원, 질소원, 초발 pH, 배양온도 및 배양시간 등이 L-lactic acid 생산량과 균의 생육에 미치는 영향을 측정하여 비교, 검토하였다.

회분 및 유기배양

1 L 삼각플라스크에 상기에서 결정된 최적배지 500 ml을 넣어서 멸균하였다. 종배양액을 5%(v/v) 접종하여 회분배양을 실시하면서 경시적으로 생육 및 L-lactic acid의 생성량을 조사하였다. 유기배양의 경우 6시간마다 10 N NaOH로 pH를 약 7.0으로 조정하고 잔존 soluble starch의 농도가 5 g/L 이하가 될 때마다 soluble starch를 공급하였다. L-lactic acid의 대량생산을 위해 7 L 용량의 발효조(B. BRAUN No. 664-668)에서 상기에서 결정된 최적배지 3 L를 넣은 후 121°C에서 15분간 멸균하였다. 배양중 pH는 5 N NaOH로 pH 7.0으로 자동조절하였고 균질화를 위해 50 rpm으로 교반하면서 배양하였다.

L-Lactic acid의 정제

배양액 250 ml을 원심분리(12,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 그 상등액을 약 1/10의 부피로 농축한 후 이온교환칼럼 크로마토그래피(ion-exchange column chromatography)를 실시하였다[14]. 농축한 배양 상등액을 strong anion exchange

resin인 Dowex 1×8-200(carbonate form)로 채워진 column (1.5×15 cm)에 수지 부피의 1/10으로 loading한 후 물로 충분히 washing하였다. 5% ammonium carbonate solution으로 1 ml/min의 유속으로 elution하여 얻은 fraction을 전술한 효소학적 방법으로 L-lactic acid량을 정량하였고 HPLC (Waters associates)로 정성분석하였다. 상기의 L-lactic acid가 elution된 fraction을 농축하여 strong cation exchange resin인 Amberlite 200(hydrogen form)이 채워진 column (1.5×15 cm)에 loading하여 1 ml/min의 유속의 물로 얻은 fraction을 HPLC로 분석하였다. 분석조건은 다음과 같다: column, Waters Nova pak C18(3.9×150); detector, UV (210 nm); 이동상, 0.02N H₂SO₄; 유량, 0.5 ml/min.

결과 및 고찰

L-Lactic acid 생산균의 분리 및 동정

전분이 첨가된 김치와 누룩을 수집하여 soluble starch가 첨가된 분리용 배지에 도말하여 3~4일간 배양한 후 요오드 증기로 염색하였을 때 clear zone을 형성하는 colony를 젖산균 선택배지인 MRS-CaCO₃ plate에 toothpicking하여 배양하였다. 그 결과, 산을 생성하여 colony 주위에 투명환을 형성한 균주들을 선택하였다. 균주의 starch 분해능을 확인하기 위해 1.0%의 soluble starch가 함유된 분리용 배지에 배양하여 clear zone의 형성을 확인하였다(Fig. 1). 분리된 균주 가운데 homofermenter이고 starch 분해능이 우수하며 L-lactic acid를 선택적으로 생성하는 strain No. 27을 본 실험의 공시균주로 최종 선정하였으며 편의상 JA-27로 명명하였다.

공시균주의 JA-27의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 제반 특성은 Table 1과 같다. 그 결과, 공시균 JA-27은 구균이며 운동성이 없고 통성혐기성으로 Gram 염색 양성의 세균이었으며 전자현미경상(Fig. 2)에서 포자를 형성하지 않았고, 포도당 배지에서 gas를 생성하지 않은 반면 산은 잘 생성하는 특성을 나타내었다. 또한 6.5% NaCl broth와 pH 9.6 broth에서 잘 생육하였다.

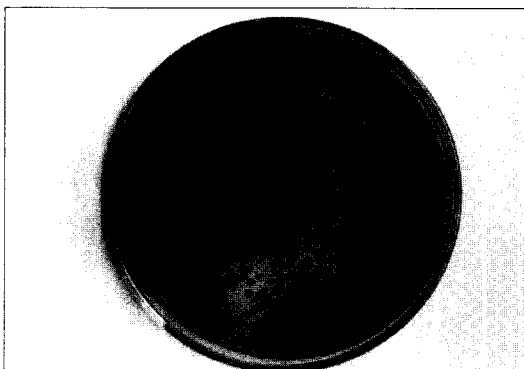


Fig. 1. Photograph of the isolated strain, JA-27 degrading soluble starch.

Table 1. Taxonomical characteristics of the isolated strain JA-27.

Morphological characteristics	
Shape	coccus
Cell size	1.5-2
Mortality	nonmortality
Gram stain	positive
Cultural characteristics	
Colonies	circular, convex
Colony surface	smooth
Colony color	milky color
Colony opacity	opaque
Biochemical characteristics	
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	+
Catalas test	-
Urease test	-
Citrate utilization	-
Esculin hydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Acid production from glucose	+
Gas production from glucose	-
Growth at 10°C	+
45°C	+
pH 9.6	+
Growth on 6.5 % NaCl broth	+
0.1 % methylene blue milk	+
Growth on 10 % bile agar	+
40 % bile agar	+
Survive of 60°C for 30 min	-

+: positive, -: negative

분리 균주 JA-27로부터 genomic DNA를 분리한 후 27f-1492r primer를 사용하여 16S rDNA 부위를 PCR로 증폭시켜 auto-sequence를 이용해 염기서열을 결정하고 균주의 결정된 425개의 염기서열을 Gene bank database와 비교한 결과 *Enterococcus faecium*와 100%의 상동성을 보였다. JK-56 균주의 형태학적, 배양학적, 생화학적 특징 및 partial 16S rDNA sequencing 결과 등의 제반 분류학적 특징들을 비교한 결과, 본 균주를 *Enterococcus faecium*로 동정하고 편의상 *Enterococcus* sp. JA-27로 명명하였다.

L-Lactic acid 생산 최적 조건 검토

1.5%의 soluble starch, 3.5%의 tryptone이 함유된 기본배지의 pH를 8.0으로 조정하고 30°C에서 3시간 간격으로 42 시간동안 균의 생육, 균의 생육도, L-lactic acid의 생성량을 검토한 결과 *Enterococcus* sp. JA-27은 L-lactic acid를 선택적으로 생산하며 배양 후 30시간째 가장 높은 생성능을 보였다(Fig. 3). 또한 배양시간이 경과함에 따라 D형 젖산의 생성량이 증가됨을 알 수 있었다(Table 2).

본 연구에서는 L-lactic acid의 대량생산을 위하여 자연계에

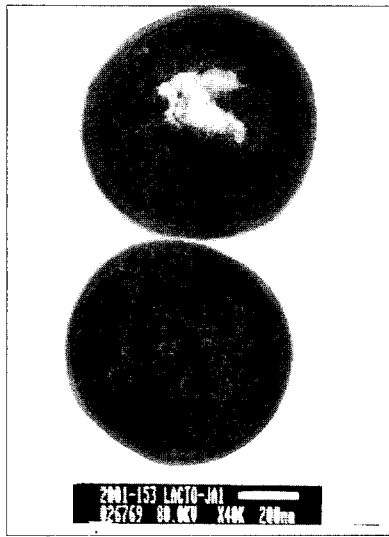


Fig. 2. Transmission electron micrograph of the strain JA-27.

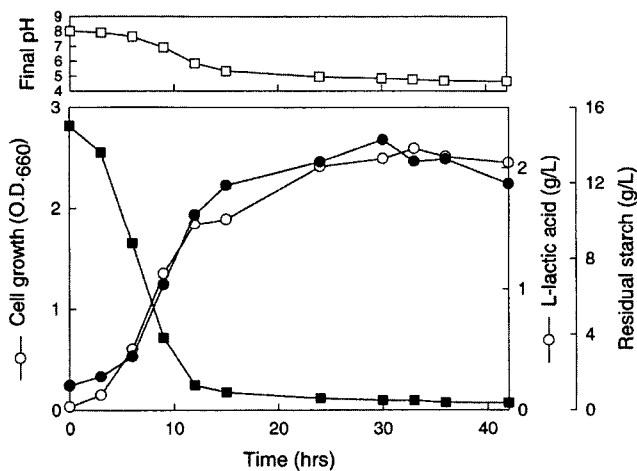


Fig. 3. Time courses for the production of L-lactic acid. Cultures were carried out in a screw cap tube containing 10 ml of production medium at 30°C.

풍부하고 가격이 저렴한 soluble starch를 탄소원으로 사용하였다. Soluble starch 농도에 따른 공시균의 생육도와 L-lactic acid 생성량을 검토한 결과 공시균은 1.5%에서 L-lactic acid의 생성량이 가장 높았고 2% 이상에서 약간 감소하는 경향을 보였다. 균의 생육은 1% 이상에서 큰 변화를 보이지 않았다.

각종 질소원을 2% 농도로 첨가하여 배양한 후 균의 생육도 및 L-lactic acid 생성량을 측정된 결과 JA-27은 대개의 젖산균과 마찬가지로 무기질소원에서는 잘 생육하지 못하였으며 tryptone, yeast extract에서 잘 생육하였고 L-lactic acid 생성량도 가장 높게 나타났으며 질소원의 농도가 높아질수록 균의 생육과 L-lactic acid의 생성량이 비례하여 tryptone 농도가 3.5%일 때까지 L-lactic acid의 생성이 증가하였다. 최적생산 배지는 Table 3과 같다.

Table 2. L(+)- and D(-)- isomer production by *Enterococcus* sp. JA-27.

Time(hrs)	L(+) (%)	D(-) (%)
30	100	0
48	99.7	0.3
72	99.7	0.3
96	99.2	0.8

Cultures were carried out in a flask containing 100 ml of production medium (soluble starch 15 g/L) at 30°C.

Table 3. Optimal conditions for L-lactic acid production.

Components	%
Soluble starch	1.5
Tryptone	3.5
K ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.014
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.004

Other conditions	
Initial pH	8.0
Temperature	30°C
Culture time	30hrs

발효조건 검토

접종량에 의한 영향 - 젖산은 성장 관련성 산물(growth-associated type)이므로 균체량이 증가할수록 많은 양의 젖산을 생산할 것으로 사료된다. 그러나 발효조 내의 균체량의 증가는 종배양액의 균체량에 비례하지만, 종배양액을 적당량 이상 접종하면 배지내의 각종 영양원이 희석될 뿐만 아니라, 종배양액 내에 축적된 노폐물이 많이 혼입되어 세포의 노화를 촉진하게 되므로 성공적인 배양을 수행할 수 없다. 따라서 발효시 종균의 접종량에 의한 균체의 생육 및 L-lactic acid의 생성량의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다.

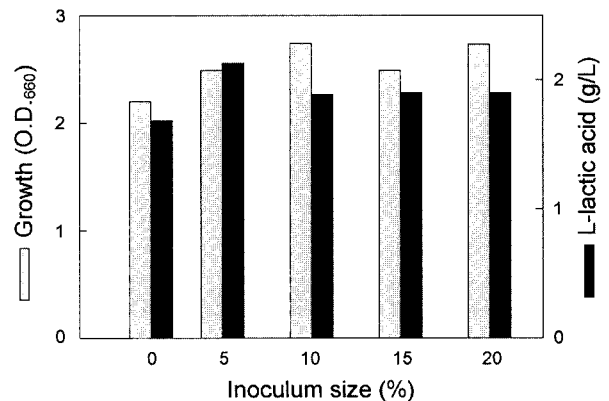


Fig. 4. Effect of inoculum size on the production of L-lactic acid and cell growth. Cultures were carried out in a flask containing 100 ml of production medium at 30°C.

1%(v/v)의 종균을 접종한 경우 약간의 유도기가 관찰되었으나 5%(v/v) 이상의 종균을 접종하였을 때에는 유도기가 관찰되지 않고 접종과 동시에 곧바로 대수증식기로 이행되었다. 균체의 생육은 접종량이 많을수록 증가하였으나 L-lactic acid의 생성량은 접종량이 5%일 때 가장 많았고 접종량이 5%보다 많을 경우 L-lactic acid의 생성량의 다소 떨어졌다. 이는 접종량이 많아짐에 따라 배양초기에 soluble starch를 비롯한 각종 영양원을 거의 소비하게 된 결과에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 최적 종균 접종량은 5%(v/v)로 결정하였다.

회분배양 - 1 L 용량의 Erlenmeyer 플라스크에 탄소원으로 soluble starch가 1.5%, 질소원으로 tryptone이 3.5% 함유된 생육최적배지 500 ml을 첨가한 후 121°C, 15 min간 고압멸균하여 5%(v/v)의 종균을 접종하여 30°C에서 회분배양하면서 균체의 생육도, L-lactic acid의 생성량을 경시적으로 측정된 결과는 Fig. 5(A)와 같다. 배양 6시간 내에 균체의 생육은 대수증식기가 끝나고 정지기에 들어갔으며 배양 20시간까지 L-lactic acid의 생성이 증가하였다. 이것은 생리 활성이 가장 활발한 시간대의 종균을 접종하였기 때문에 새로운 배지에 곧바로 적응하여 대수증식기로 이행되었고 L-lactic acid의 생산에 소모된 시간도 단축되었다고 사료된다. 탄소원으로 soluble starch 대신 corn starch를 첨가하였을 경우

거의 동일한 시간내에 비슷한 양의 L-lactic acid를 생산하였다(Fig. 5(B)).

유기배양 - 유기배양은 배양하는 동안 최적 기질농도를 유지하도록 각종 영양원을 발효조 내에 공급하면서 배양하는 방법으로 기질의 고갈이나 기질 또는 대사산물에 의한 생육 저해작용을 방지할 수 있어서 고농도 세포배양에 많이 사용되고 있다. 젖산을 생산함에 있어 회분배양을 더 많이 선호하지만, 젖산 생성이 생육과 연계되어 있으므로 고농도의 세포배양에 효율적인 유기배양을 실시하여 L-lactic acid의 생성량을 검토하였다. 1 L 용량의 Erlenmeyer 플라스크에 탄소원으로 soluble starch가 1.5%, 질소원으로 tryptone이 3.5% 함유된 생육최적배지 500 ml을 첨가한 후 121°C, 15 min간 고압멸균하여 5%의 종균을 접종하고 30°C에서 유기배양하였다. 배양액 내의 soluble starch의 농도가 거의 고갈되었을 때마다 고농도의 soluble starch 용액을 배지에 공급하였다. 균체의 생육은 soluble starch의 공급으로 20시간까지 계속 증가하였으나 이후 정지기에 들어갔으며 30시간 이후부터 균체의 생육이 감소하였다(Fig. 6). 탄소원의 공급은 원활하였으나 계속된 배양으로 질소원, 무기염류 등 영양원이 고갈되고 노폐물이 배지 중에 축적된 것에 기인한 것으로 생각된다. 유기배양은 회분배양보다 약간 더 많은 L-lactic acid를 생산하였으나 소비된 탄소원에 대한 L-lactic acid의 생산은 오히려 감소하였다.

발효조 배양 - 7L 용량의 발효조에 탄소원으로 soluble starch가 1.5%, 질소원으로 tryptone이 3.5% 함유된 생육최적배지 3 L을 첨가한 후 121°C, 15 min 멸균하여 5%의 종균을 접종하고 30°C에서 배양하면서 5 N NaOH로 pH를 7로 자동조절하였고 균질화를 위해 50 rpm으로 교반하였다. 균체의 생육도, L-lactic acid의 생성량을 경시적으로 측정된

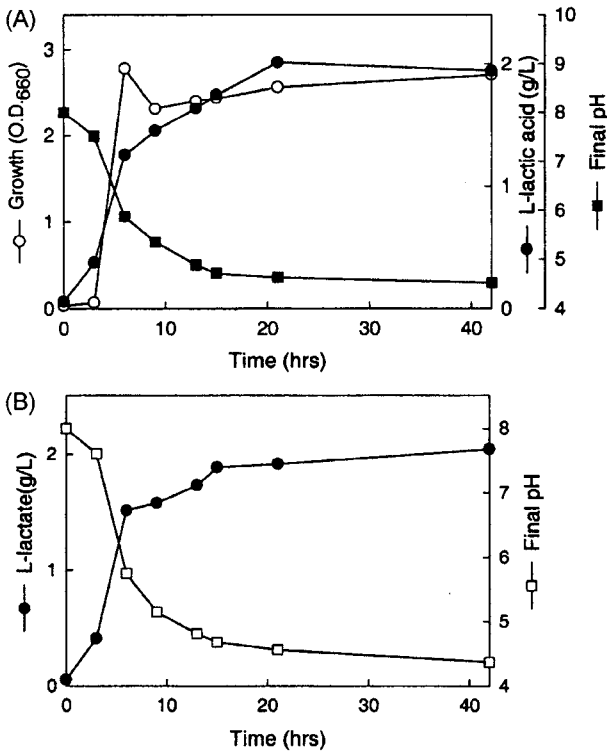


Fig. 5. Time course of batch culture of *Enterococcus* sp. JA-27. Cultures were carried out in a flask containing 100 ml of production medium at 30°C. (A), soluble starch 1.5% and tryptone 3.5%; (B), corn starch 1.5% and tryptone 3.5%.

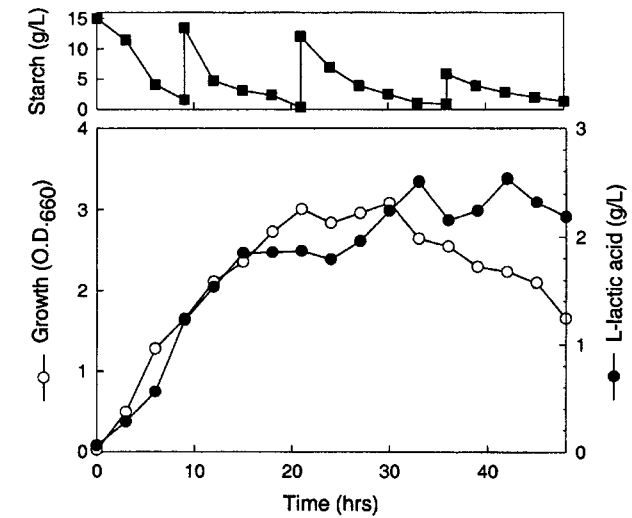


Fig. 6. Time course of intermittent feeding fed-batch culture of *Enterococcus* sp. JA-27. Culture was carried out in a flask containing 1 L of production medium (soluble starch 15 g/L) at 30°C. Soluble starch stock solution was fed intermittently.

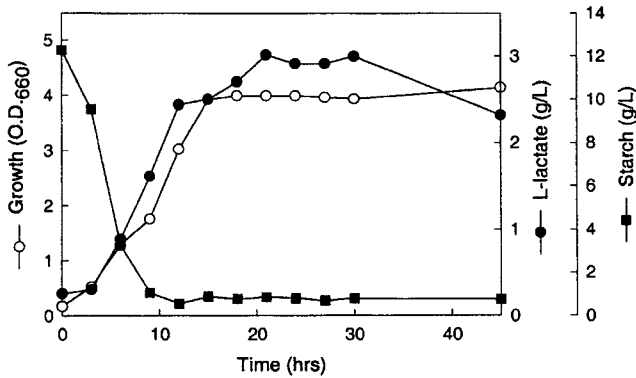


Fig. 7. Time course of Jar-fermentor culture of *Enterococcus* sp. JA-27. Cultures were carried out in a 7 L Jar-fermentor containing 3 L of production medium (soluble starch 15 g/L) at 30°C. pH was controlled to 7.0 automatically.

결과는 Fig. 7과 같다. 배양 20시간 후 가장 높은 L-lactic acid 생성량(3.0 g/L)을 나타내었다.

L-Lactic acid의 정제

배양액을 원심분리하여 배양상등액을 농축하였다. Strong anion exchange resin인 Dowex 1×8-200을 1 M NaOH 처리 후 증류수로 washing한 후 1 M sodium carbonate로 처리하여 carbonate form으로 재생한 후 칼럼에 채우고 농축한 배양상등액을 loading하여 수지가 시료중의 젖산을 수집시키고 증류수로 충분히 washing하였다. 그후 5% ammonium carbonate solution을 흘리면서 젖산을 ammonium salt형으로 elution한 후 각각의 fraction을 전술한 효소적 방법으로 L-lactic acid의 양을 정량하였다(Fig. 8). 다음 과정을 위해 L-lactic acid가 elution된 fraction을 vaccum evaporator로 농축하였다. Strong cation exchange resin인 Amberlite 200은 5% NaOH와 5% HCl을 번갈아 처리하여 hydrogen form으

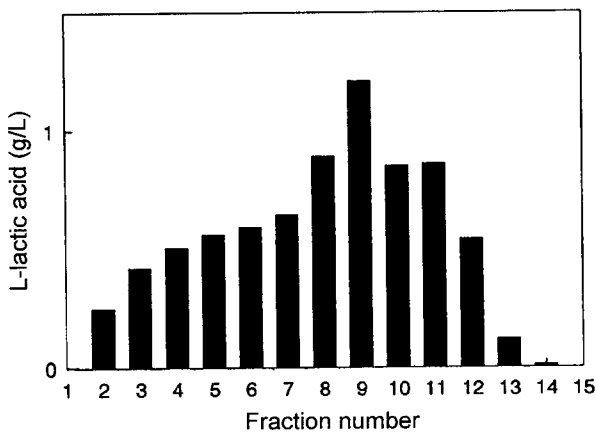


Fig. 8. Lactic acid recovery : concentration of the different fractions. The data for the recovery of lactic acid from the anionic resin by eluting with 5% ammonium carbonate solution.

Table 4. Recovery and purification of L(+)-lactic acid from *Enterococcus* sp. JA-27 culture broth.

Steps	Volume (ml)	Concentration of lactic acid (g/L)	Yield ^a (%)
Broth	250	3.00	100.0
Dowex 18-200	450	1.49	89.4
Amberlite 200	550	1.17	86.1
Evaporation	10	64.01	85.3

^a Based on lactic acid in broth

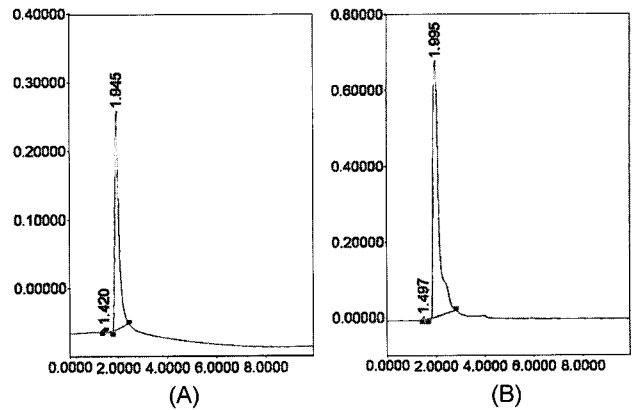


Fig. 9. HPLC chromatogram of the L-lactic acid recovered from fermented broth by *Enterococcus* sp. JA-27. (A), standard L-lactic acid; (B), recovered L-lactic acid.

로 재생하여 칼럼에 채우고 농축한 전단계의 시료를 loading한 후 물로 elution하여 그 fraction을 HPLC로 분석하여 정제 순도를 검토하였다. 일련의 정제 과정을 통하여 배양액 중의 L-lactic acid 정제 수율은 약 85% 정도로 나타났다 (Table 4). 정제된 산물은 L-lactic acid의 standard와 동일한 retention time에서 peak가 관찰되었으며 99.7%의 순도로 정제되었다(Fig. 9).

요 약

폴리 젖산의 원료가 되는 젖산은 D-, L-의 광학이성질체로 존재하는데 L-젖산 폴리머와 라세미 폴리머는 결정성과 녹는점이 다르므로 플라스틱으로서의 만족할 만한 물성을 기대하기 위하여 원료로서 광학적으로 순수한 L-lactic acid가 요구된다. 이를 위하여 한 종류의 이성질체만을 선택적으로 생산하는 젖산균주를 탐색하여 분리함으로써 광학적으로 순수한 산물을 얻을 뿐만 아니라 이러한 발효법에 의한 젖산생산은 자연계에 풍부한 starch나 cellulose, 음식물쓰레기와 같은 재생 가능한 자원을 기질로 사용하여 젖산발효에서 전분의 당화 공정에 필요한 시간과 노력을 최소화하며 젖산 생산에 드는 전체적인 비용을 절감할 수 있다. 전분을 직접 이용하는 것은 젖산균의 일반적인 성질이 아니므로 전분

이 풍부한 누룩을 수집하여 직접적으로 전분을 분해하여 젖산발효를 수행하는 균주를 누룩에서 분리하였다. 분리균주는 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성 및 16s rDNA 분석을 통하여 *Enterococcus* sp.으로 동정되어 *Enterococcus* sp. JA-27로 명명하였다. 생육에 따른 L-lactic acid의 최적 생산 조건을 검토한 결과, 최적 배양조건은 탄소원으로 1.5% soluble starch, 질소원으로 3.5% tryptone, 그 외의 다른 조성들은 0.1% K_2HPO_4 , 0.04% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.014% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.004% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 이었고 최적 배양조건은 30°C, pH 8이었다. 대량생산을 위한 기초자료를 제공하기 위하여 회분배양과 유가배양을 실시하였고, 회분배양이 L-lactic acid의 생산수율(0.134 g, L-lactic acid/g, soluble starch)이 더 높게 나타나 효과적이었다. 7 L 발효조 배양시 pH를 control한 결과, L-lactic acid 생산이 삼각플라스크에 비해 1.5배 더 증가하였다. 배지 중의 젖산을 정제하기 위한 방법으로 이온교환 칼럼크로마토그래피(ion-exchange column chromatography)를 사용하였고 일련의 정제 과정을 통하여 배양액 중의 L-lactic acid 정제 수율은 약 85% 정도로 나타났으며 HPLC로 분석한 결과 99.7%의 순도를 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 Brain Busan 21 Project(2002)에 의한 연구 결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bergmeyer, H. U., E. Bernt, M. Grassl, and G. Michal. 1974. *Evaluation of experimental results, Methods in enzymatic analysis*, 1: 309-317.
- Datta, R., S. P. Tsai, P. Bonsignore, S. H. Moon, and J. R. Frank. 1995. Technolical and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 221-231.
- Gonzalez-Varayr, A., D. Pinelli, M. Rossi, D. Fajner, F. Magelli, and D. Matteuzzi. 1996. Production of L(+) and D(-) lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* subsp. *casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004 in continuous fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **81**: 548-552.
- Halt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staleg, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. William and Wilkams. Baltimore, U.S.A.
- Jehanno, D., D. Thuault, and C. M. Bourgeois. 1992. Development of a method for detection of lactic acid bacteria producing exclusively the L-(+)-isomer of lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 4064-4067.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Ant. Leeuwenh.* **49**: 209-224.
- Kurosawa, H., H. Ishikawa, and H. Tanaka. 1988. L-Lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 183-187.
- Lee, J. H. and T. S. Yu. 2000. Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from Nuruk. *Korean J. Biotechnol. bioeng.* **15**: 359-365.
- Miyoshi, R., N. Hashimoto, K. Koyanagi, Y. Sumihiro, and T. SaKai. 1996. Biodegradable poly(lactic acid) with high Molecular weight. *Intern. Polymer Processing* **4**: 320-328.
- Moraes, L. M. P., S. Astolfi-filho, and S. G. Oliver. 1995. Development of yeast strains for the efficient utilization of starch : evaluation of constructs fusion proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 1067-1076.
- Schmidt, S. and N. Padukone. 1997. Production of lactic acid from wastepaper as a cellulosic feedstock. *J. ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 10-14.
- Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, William and Wilkams, Baltimore, U.S.A.
- Tanaka, H., H. Kurosawa, and H. Murakami. 1986. Ethanol production from starch by a Coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 1761-1768.
- Vaccari, G., A. R. Gonzalez-Varay, A. L. Campi, E. Dosi, P. Brigidi, and D. Matteuzzi. 1993. Fermentative production of L-lactic acid by *Lactobacillus casei* DSM 20011 and product recovery using ion exchange resins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 23-27.
- Vickroy, T. B. 1985. *Lactic acid*, pp. 761-776. *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 1, Pergamon Press Ltd.
- Wehrenberg, R. H. 1981. Lactic acid polymers: strong, degradable thermoplastics. *Mater. Eng.* **94**: 63-66.
- Yoo, I. K., H. N. Chang, E. G. Lee, Y. K. Chang, and S. H. Moon. 1996. Effect of pH on the production of lactic acid and secondary products in batch cultures of *Lactobacillus casei*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 482-486.

(Received March 8, 2003/Accepted May 1, 2003)