

Streptococcus sp. JEJ-6에 의한 가용성 전분으로부터 L-Lactic Acid 생성에 관한 연구

조영배 · 전은주 · 백형석 · 전홍기[†]

부산대학교 미생물학과

Study on the Production of L-Lactic Acid from Soluble Starch by *Streptococcus* sp. JEJ-6

Young-Bae Jo, Eun-Joo Jun, Hyung-Suk Baik and Hong-Ki Jun[†]

Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

The strain producing L-lactic acid from starch was isolated from *kimchi*. The isolated strain was identified as a homofermentative *Streptococcus* sp. through its morphological, cultural, biochemical characteristics, and named *Streptococcus* sp. JEJ-6. Lactic acids are of two types, one L-specific and the other D-specific form in a stereospecific form. *Streptococcus* sp. JEJ-6 produced selectively L-lactic acid from all of the tested carbon sources. The optimum conditions for the L-lactic acid production from the isolated microorganism were determined. For the maximum yield of L-lactic acid from *Streptococcus* sp. JEJ-6, the cell should be harvested at the early stationary phase, and the growth temperature, pH, and NaCl concentration should be 37°C, pH 7.0 and 0.1%, respectively. 4% Soluble starch as substrate and organic nitrogen sources such as peptone and yeast extract should be used for the best yield. The optimum pH of the nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)-dependent and NAD-independent lactate dehydrogenase(LDH) activities was pH 8.5 and pH 7.0, respectively.

Key words: *Streptococcus* sp. JEJ-6, soluble starch, L-lactic acid, lactate dehydrogenase(LDH)

서 론

젖산은 식품 및 음료공업에서 산미료 및 방부제로 이용될 뿐만 아니라 우수한 수용성으로 인해 피혁의 탈회에 사용되며 직물 및 세탁업에도 이용되고 있다(1).

L-Lactic acid을 선택적으로 생성해 내는 젖산균주로서 *Streptococcus*속과 일부의 *Lactobacillus*속이 알려져 있고 일부 *Bacillus*속 중에서도 lactic acid을 생성하는 것이 보고되어 있다(2). 상당한 수의 lactic acid 생성 균주가 알려져 있음에도 불구하고 L-lactic acid를 생성하는 균주는 단 몇 균주에 지나지 않는다. 잘 알려진 homofermentative lactic acid bacteria인 *Lactobacillus delbrueckii*나 *L. bulgaricus* 등은 D-lactic acid를 생성하고 *L. acidophilus*는 DL-lactic acid를 생성한다. *Lactococcus lactis*나 *L. cremoris* 등은 L-lactic acid를 생성하지만 상대적으로 낮은 온도에서 발효를 하기 때

문에 배양온도 유지를 위해 고가의 운영비가 소모되어 공업적으로 바람직하지 못하다(3). 또한 가격의 저렴성으로 인해 탄소원으로 주로 곡물, 즉 전분을 이용하게 되는데 전분을 직접적으로 이용하지 못하는 경우 전분을 당화시켜 발효기질로 이용하거나 병행발효법(4,5)으로 당화와 발효를 병행하는 방법들을 사용하기도 한다(1). 혹은 유전자 재조합을 통해 전분 이용능을 인공적으로 부여(6)하는 경우도 있다(2,6-8). 하지만 전분을 직접 이용해 L-lactic acid를 선택적으로 생산할 수 있는 균을 분리해서 이용하면 더 안정적으로 불필요한 부산물이 적은 L-lactic acid를 쉽게 얻을 수 있을 것으로 생각되어진다. 현재 동물의 소화관(9)이나 식물폐기물 등에서 발견된 전분을 이용해서 젖산을 생성하는 균주들로는 *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *Lactobacillus amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. cellobiosus*와 *L. plantarum* 등의(10) 몇몇 균

[†]To whom all correspondence should be addressed

주가 있긴 하지만 여전히 L-lactic acid의 생산성이 우수한 균주의 확보가 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 가용성 전분으로부터 직접 L-lactic acid를 선택적으로 생성하는 균주를 분리하고자 전분이 풍부하고 각종 젖산균이 많이 함유된 전통식품인 김치를 분리원으로 하였으며 그 결과 L-lactic acid 생산성이 뛰어난 균주를 분리하였다. 뿐만 아니라 분리 균주의 형태학적, 생리학적, 및 생화학적 성질을 검토해서 동정하였으며 L-lactic acid의 최적 생산 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

일반가정에서 식용되는 김치 중 전분이 첨가된 김치를 종류에 관계없이 수집하여 내용물 전체를 마쇄한 후 멸균거즈로 여과하고 멸균수로 $10^6 \sim 10^8$ 정도로 희석하였다. 희석액을 가용성 전분이 탄소원으로 첨가된 분리용 평판배지(*Lactobacillus*용 APS 배지변형 ; 1% soluble starch(Yakuri pure chemicals co.), 0.2% peptone, 0.1% yeast extract, 0.1% sucrose, 0.1% tween 80, 0.1% K_2HPO_4 , 0.5% sodium citrate, 0.5% NaCl, 0.08% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.014% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.004% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5% agar, pH 6.8~7.0)에 도말하여 37°C에서 3~4일간 배양하였다. 배양 후 평판배지를 요오드 증기로 염색(10,11)하여 clear zone이 나타나는 colony들 중 전분 분해능이 뛰어난 균주를 일차적으로 선별하였으며, 이들 균주를 다시 1.5% $CaCO_3$ -MRS배지에 배양하여 colony 주위의 투명한 생성유무를 조사하였다. Colony 주위에 clear zone을 형성한 균주에 대해 L-lactic acid 생산성을 검토하여, L-lactic acid 생산성이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선별하였다. $CaCO_3$ 이 첨가된 배지는 산을 생산하는 균주의 colony 주위에 투명환을 형성하므로 유기산 생산균주의 분리에 용이하다. 최종적으로 선정된 균주는 2% 가용성 전분, 1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl, 0.04% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.014% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.004% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 조성으로 이루어진 배지를 기본배지로 사용하여 이후의 실험을 행하였다.

균주의 동정

분리균주에 대한 전자현미경 관찰을 통한 형태학적 특성 및 각종 배지에서의 배양상의 특성을 검토하고 균주의 생리적 및 생화학적 특성을 Bergey의 Determin-

ative Bacteriology Manual 제 8판(12)과 Bergey의 Systematic Bacteriology Manual Vol. 2(13)에 준하여 동정하였다.

균주의 전분 분해 확인

배양액을 4°C에서 원심분리(10,000rpm, 10min)하여, 그 상등액 20μl를 7μl의 요오드 stock(5% KI, 0.5% I_2)이 첨가된 50mM HCl용액 1ml에 넣어 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양전 액과 비교한 흡광도의 감소로 starch의 분해를 확인하였다(14).

L- 및 D-lactic acid 생산량 측정

전처리

배양액을 원심분리(10,000rpm, 10min, 4°C)하여 그 상등액 700μl와 perchloric acid solution 700μl를 잘 혼합하여 ice에 10분간 방치한 후 원심분리(3,000rpm, 15min, 4°C)한다. 상등액 700μl를 취하여 3N KOH를 사용하여 pH 3.5로 조정한 후 ice에 15분간 방치하여 상등액을 사용한다(5,15-20).

반응

Hydrazine-glycine buffer(pH 9.0) 1ml에 NAD 80μl와 전처리한 sample 80μl를 넣은 후 340nm에서 흡광도(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) 8μl를 넣어 37°C, 30min 반응시킨 후 다시 340nm에서 흡광도(E_{S2})를 측정한다. Blank는 sample 대신 perchloric acid 용액 80μl를 넣어 E_{B1} 과 E_{B2} 를 측정한다.

Lactic acid 생산량은 다음과 같이 계산하였다(21).

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

C: concentration

ΔE : extinction change

d: light path(cm)

MW : $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ (lactic acid MW : 90.08)

V: assay volume(ml)

v: volume of sample used in assay(ml)

ϵ : extinction coefficient($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)

NADH의 $\epsilon(340\text{nm})=6.22\text{cm}^2/\mu\text{mol}$

F: dilution factor of the sample

$\Delta E_S = E_{S2} - E_{S1}$, $\Delta E_B = E_{B2} - E_{B1}$

$\Delta E = \Delta E_S - \Delta E_B$

aL-Lactic acid의 최적 생산 조건 검토

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

NAD 의존성 및 NAD 비의존성 lactate dehydrogenase 활성 측정

전처리

분리균주를 37°C, pH 7.0에서 72시간 배양한 배양액(250ml)을 원심분리(10,000rpm, 10min, 4°C)한 후 상등액을 취하였다. 상등액을 4°C에서 50%(NH₄)₂SO₄로 분획하여 하룻밤 방치한 후 원심분리(10,000rpm, 20min, 4°C)하여 상등액만 모았다. 모은 상등액을 70% (NH₄)₂SO₄로 포화시켜 방치한 후 원심분리(10,000rpm, 20min, 4°C)하여 침전물에 10ml의 2mM L-lactic acid가 포함된 5mM Tris-maleate buffer(pH 7.5)를 첨가 후 잘 혼합한다. 그 액에 3ml의 2% protamine sulfate solution(pH 4.0)을 첨가하여 잘 섞은 후 원심분리(12,000rpm, 15min, 4°C)하여 상등액만 취하여 실험에 사용하였다(21,22).

NAD 의존성 lactate dehydrogenase 활성 측정

100μl 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7~9) 또는 0.2M glycine-NaOH buffer(pH 8~11)에 30μl NAD(13mM), 60μl L-lactic acid(0.3M)와 800μl 증류수를 넣는다. 이 혼합액에 전처리된 LDH 5~10μl를 첨가하여 365nm에서 흡광도(E₁)를 측정하고, 처음 1분간 변화된 흡광도(E₂)를 측정하여 그 차이로 volume activity를 계산하였다(23,24).

NAD 비의존성 lactate dehydrogenase 활성 측정

100μl 0.2M Tris-maleate buffer(pH 5~9)에 30μl dichloroindophenol(0.26mg/ml)(25), 60μl L-lactic acid(0.3M)와 800μl 증류수를 넣는다. 이 혼합액에 5~10μl의 전처리된 LDH를 첨가하여 처음 1분간의 변화된 흡광도의 차이로 volume activity를 계산하였다. 흡광도는 578nm에서 측정하였다.

Volume activity 계산

전처리된 LDH의 volume activity를 계산한 후, 전처리 전의 배양상등액 LDH volume activity로 환산하였다.

NAD 의존성 lactate dehydrogenase의 volume activity는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{volume activity} = \frac{V \times 1000}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta E / \Delta t \text{ [U/L]}$$

Δt : interval between measurements(min)

NADH $\epsilon(365\text{nm})=3.4\text{cm}^2/\mu\text{mol}$

NAD 비의존성 lactate dehydrogenase의 volume activity는 0.001의 흡광도 변화를 1unit/ml로 정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선정

전분이 첨가된 김치를 분리용 평판배지에 도말하여 37°C, 3일간 배양한 후 요오드 증기로 염색하여 colony 주위에 clear zone을 형성하는 균주들 중 전분 분해능이 뛰어난 87개의 균주들을 선별하였다. 일차적으로 선별된 87개 균주들을 1.5% CaCO₃-MRS배지에서 3일간 배양하여 colony 주위에 형성된 투명환으로 산의 생성유무를 우선적으로 확인하였다. 투명환을 형성한 각각의 균주에 대해 L-lactic acid 생산성을 검토하여 L-lactic acid를 생산하는 12개의 균주들을 선별하였다. 이들 중 전분 분해능이 뛰어나고 L-lactic acid 생산성이 가장 우수한 1개 균주를 최종적으로 선별하여 편의상 JEJ-6이라 명명하고, 이를 본 실험의 공시균주로 선정하였다.

공시균주의 동정

공시균주 JEJ-6의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 제반 특성은 Table 1과 같다. 그 결과 공시균 JEJ-6은 구균이며 운동성이 없고 통성혐기성으로 gram 염색양성의 세균이었으며 전자현미경상(Fig. 1)에서 포자를 형성하지 않았고, 포도당 배지에서 gas 생성은 하지 않는 반면 산은 잘 생성하는 특성을 나타냈다. 또한 colony는 둥근형으로 wet하며 중앙부가 볼록한 convex형이었으며, 색깔은 불투명한 우유빛이었다. Bergey의 Systematic Bacteriology Manual Vol. 2에 의하면 그람 양성구의 포자를 형성하지 않으면서 운동성이 없는 화학 종속 영양균인 통성혐기성균들로, glucose에서 CO₂를 생성하지 않고 catalase-negative이며 growth factor 요구성을 보이며 glucose에서 주로 젖산을 생성하는 homofermentative lactic acid bacteria를 *Streptococcus*속으로 정의하고 있다. 본 실험에 사용된 공시균 JEJ-6은 상기의 *Streptococcus*속의 특징을 가지고 있었고, 그 외 배양적, 생화학적인 여러 가지 특성을 조사하여 Bergey의 Determinative Bacteriology Manual 제 8판 Bergey의 Systematic Bacteriology Manual Vol. 2와 비교 검토한 결과, *Streptococcus*속으로 동정되어 편의상 *Streptococcus* sp. JEJ-6이라고 명명하였다.

Table 1. Taxonomical characteristics of the isolated strain JEJ-6

Morphological characteristics	
Shape	Coccus
Cell size	1.5~2µm
Mortality	Nonmortality
Gram stain	+ ¹⁾
Cultural characteristics	
Colonies	Circular, convex
Colony surface	Smooth
Colony color	Milky color
Colony opacity	Opaque
Biochemical characteristics	
Optochin	+
Hemicellulase test	+
Glucose(acid-production)	+
Esculine hydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Arginine decarboxylase test	+
Urease test	-
Tetrazolium Red	+
Gas production on glucose	-
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	+
Catalase test	-
Beta-hemolysis	-
Growth at 10°C	-
Growth at 45°C	+
Growth on peptone base	+
bacitracin	+
6% sodium chloride	-
10% bile	+
40% bile	+
novobiocin, salicin	+

¹⁾ +: Positive, -: Negative

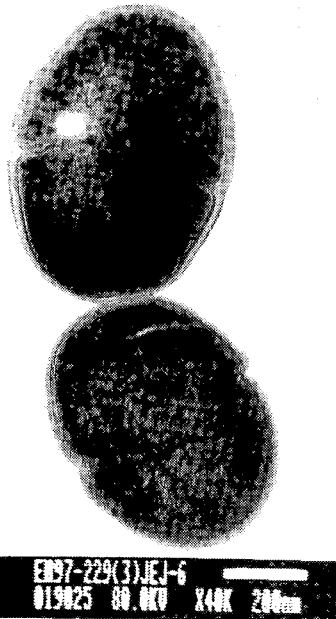


Fig. 1. TEM(Transmission Electron Micrograph) of the isolated strain JEJ-6.

L-Lactic acid 생산 최적 조건 검토

배양시간에 따른 균의 증식 및 L-lactic acid의 생산량 기본배양배지와 가용성 전분 대신 일반적으로 사용되는 glucose를 탄소원으로 첨가한 배지에 *Streptococcus* sp. JEJ-6을 1% 농도로 접종하여 두 조건에서의 시간 변화에 따른 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육도, L-lactic acid생산량 및 배양액의 pH 변화를 조사하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 배양시간이 경과함에 따라 L-lactic acid 생산성이 대수증식기와 더불어 비례적으로 증가하다가 정지기를 경과하면서 L-lactic acid의 생산성은 더 이상 증가하지 않는 경향을 나타내었다. *Streptococcus* sp. JEJ-6이 생산하는 L-lactic acid의 영향으로 배양액의 pH는 배양시간이 경과함에 따라 점점 낮아지게 되는데 이러한 pH의 강하는 균의 생육을 저해하게 되어 결과적으로 L-lactic acid의 생산성에도 영향을 미치게 된다. 따라서 본 공시균주가 생산하는 L-lactic acid는 배양액의 pH와 밀접한 관련이 있는 것으로 보여지며 이러한 pH 강하에 의한 L-lactic acid 생산성의 감소는 배지에 CaCO₃을 첨가함으로써 어느 정도 해결될 수 있으리라 생각된다.

탄소원의 영향

Streptococcus sp. JEJ-6의 기본 배양배지에 각종 탄소원을 2%씩 첨가하여 탄소원에 따른 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육도, L-lactic acid 생산성 및 lactic acid

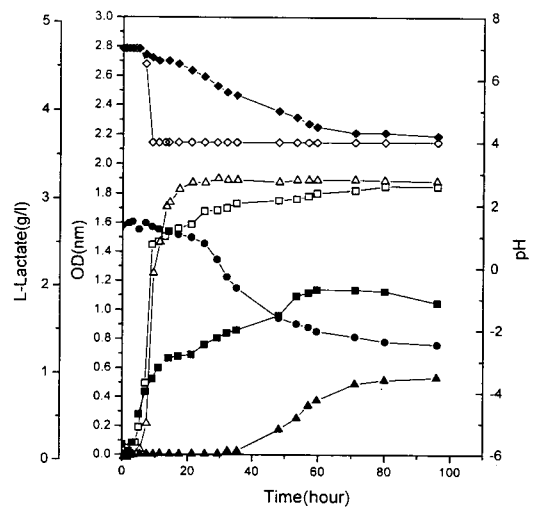


Fig. 2. Effect of cultural time on the production of L-lactic acid and the cell growth.
 Solid: soluble starch, Hollow: glucose
 —■—, —□— Growth(600nm)
 —●— Residual starch (620nm)
 —▲—, —△— L-Lactate, —◆—, —◇— pH

의 광학순도를 비교, 검토하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 예상한 바와 같이 전분보다 maltose, fructose 및 glucose 등의 당당류에서 보다 높은 균생육과 L-lactic acid 생산성을 나타냈다. L 및 D-lactic acid 생산량을 조사한 결과 모든 탄소원에서 L-lactic acid를 선택적으로 생산하였으며 이로서 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 광학순도가 높다는 것이 확인되었다. 특히 광학순도는 폴리젖산의 물성에 영향을 주며, 광학순도가 높을수록 결정성이라든지 융점은 높고, 융해열은 커지게 된다. 본 연구에서는 L-lactic acid를 산업적으로 이용할 경우 저렴한 가격으로 다량구입 가능한 원료를 기질로 하는 것이 유용하다는 것에 초점을 맞추어 전분을 탄소원으로 하였다. 전분의 농도에 따른 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육도와 L-lactic acid 생산성에 대해 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 균의 생육은 2%에서부터 큰 변화가 없었고 L-lactic acid 생산량은 4%에서 최대를 나타내었다.

질소원의 영향

Streptococcus sp. JEJ-6의 실험에 사용한 기본 배양배지에서 질소원을 달리하여 조사한 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육도와 L-lactic acid 생산성에 대한 결과는 Table 3과 같다. 무기질소원에서는 잘 생육하지 못하였으며 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육은 peptone과 yeast extract가 포함되어 있는 기본배지조성에서, L-lactic acid 생산성은 peptone과 tryptone에서 가장 높게 나타났다.

NaCl 농도에 따른 영향

NaCl이 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육도와 L-lactic acid 생산성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 4과 같다. 0.1% NaCl 농도에서 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육도와 L-lactic acid 생산성이 가장 우수하였다. 반면 2%이상의 NaCl 농도에서의 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육과 L-lactic acid 생산성은 비례적으로 감

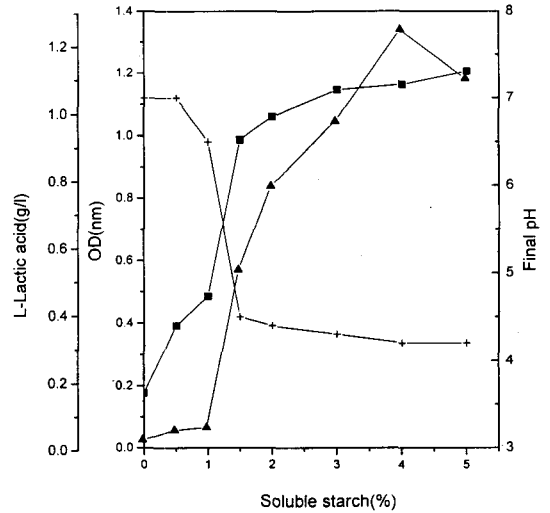


Fig. 3. Effect of the concentration of starch on the production L-lactic acid and the cell growth. —■— Growth(600nm), —▲— L-Lactate, —+— pH

소하였다.

배양온도의 영향

15~50°C까지 배양온도를 변화시켜서 조사한 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육도와 L-lactic acid 생산량의 변화는 Fig. 5와 같다. 일반적인 젖산균의 최적배양온도와 마찬가지로 37°C에서 최대의 성장을 보였고, 저온에서는 최적배양온도와 비슷하게 성장하였으나 40°C이상에서는 생육이 억제되었다. L-Lactic acid 생산량은 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육도와 마찬가지로 37°C에서 가장 높았다. 생육이 저온에서 거의 변화가 없었던 반면에 저온에서의 L-lactic acid 생성량은 낮게 나타났다.

초기 pH의 영향

초기 pH에 따른 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 생육도와 L-lactic acid 생산성은 Fig. 6과 같다. *Streptococ-*

Table 2. Effect of carbohydrate source on the production of L-lactic acid of *Streptococcus* sp. JEJ-6

Carbohydrate source	Growth(600nm)	L-Lactate(g/L)	D-Lactate(g/L)	Ratio of L-form : D-form
Soluble starch	1.036	1.068	0.035	96.8 : 3.2
Potato starch	0.570	0.193	0.008	96.0 : 4.0
Corn starch	0.311	0.174	0.006	96.7 : 3.3
Amylopectin	1.752	1.828	0.005	99.8 : 0.2
Dextrin	1.703	1.906	0.016	99.2 : 0.8
Maltose	1.563	2.934	0.007	99.8 : 0.2
Sucrose	1.761	2.454	0	100 : 0
Lactose	1.056	0.276	0.001	99.6 : 0.4
Fructose	1.598	2.955	0.016	99.5 : 0.5
Cellulose	1.822	2.283	0	100 : 0
Glucose	1.694	2.909	0.013	99.6 : 0.4

Table 3. Effect of nitrogen source on the production of L-lactic acid and the growth of *Streptococcus* sp. JEJ-6

Nitrogen source	Cell Growth (600nm)	Residual starch (620nm)	L-Lactic acid (g/L)
Bacto peptone	0.755	1.038	0.703
Poly peptone	0.882	0.907	0.949
Peptone	0.818	0.862	1.242
Beef extract	0.079	1.425	0.153
Yeast extract	1.146	0.754	0.996
Tryptone	0.926	0.828	1.063
NH ₄ Cl	0.065	1.635	0.048
NH ₄ NO ₃	0.076	1.545	0.055
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.064	1.553	0.064
KNO ₃	0.067	1.602	0.141
NaNO ₃	0.081	1.594	0.109
Ammonium citrate	0.071	1.533	0.227
No nitrogen	0.153	1.442	0.230
Control	1.262	0.758	0.950

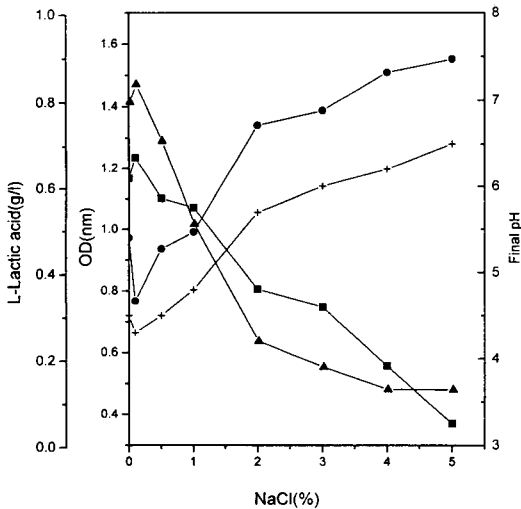


Fig. 4. Effect of NaCl on the production of L-lactic acid and cell growth.
 ■ Growth(600nm), ● Residual starch(620nm)
 ▲ L-Lactate, +-+ pH

cus sp. JEJ-6의 생육도와 L-lactic acid 생산량의 최적 pH는 7이었다.

LDH의 pH에 따른 NAD 의존성 및 NAD 비의존성 lactate dehydrogenase 활성 측정

Homofermenter들의 활성최적 pH범위가 7.8~8.8이라는 보고에 근거(23)하여 *Streptococcus* sp. JEJ-6의 LDH활성을 pH 범위에 따라 측정한 결과 NAD 의존성

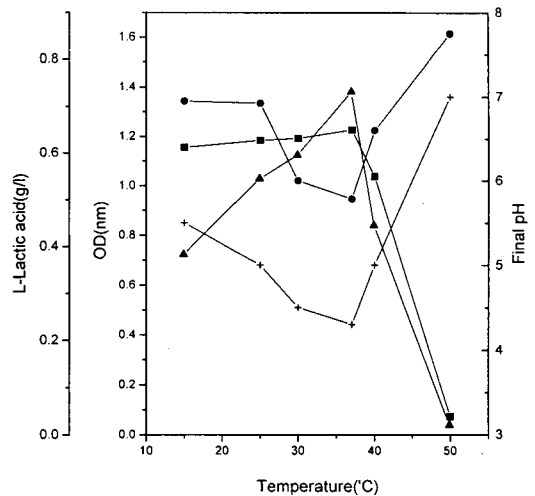


Fig. 5. Effect of temperature on the production of L-lactic acid and the cell growth.
 ■ Growth(600nm), ● Residual starch(620nm)
 ▲ L-Lactate, +-+ pH

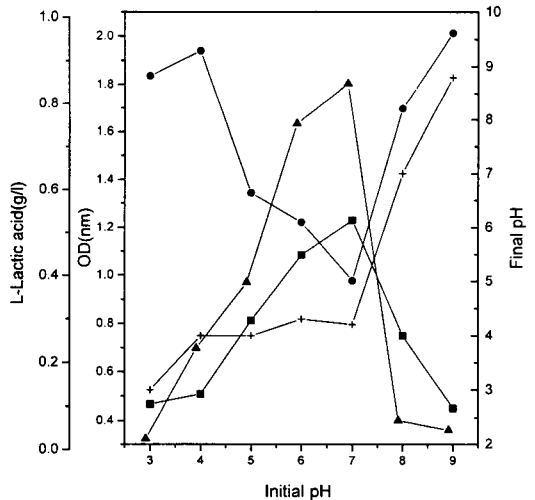


Fig. 6. Effect of initial pH on the production of L-lactic acid and the cell growth.
 ■ Growth(600nm), ● Residual starch(620nm)
 ▲ L-Lactate, +-+ pH

lactate dehydrogenase의 최적 pH는 0.1M Tris-HCl과 0.2M glycine-NaOH buffer 모두에서 8.5였으며(Fig. 7) 이로써 *Streptococcus* sp. JEJ-6이 homofermenter라는 것을 확인할 수 있었다. 반면 LDH의 활성 pH 범위 내에서 실험한 NAD 비의존성 lactate dehydrogenase의 최적 pH는 7.0이었다(Fig. 8).

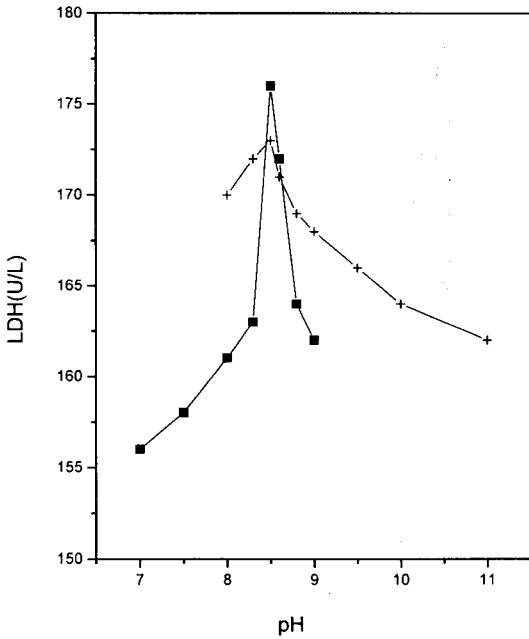


Fig. 7. Effect of pH on the NAD-dependent activity of lactate dehydrogenase.
 -■- 0.1M Tris-HCl, -+- 0.2M Glycine-NaOH

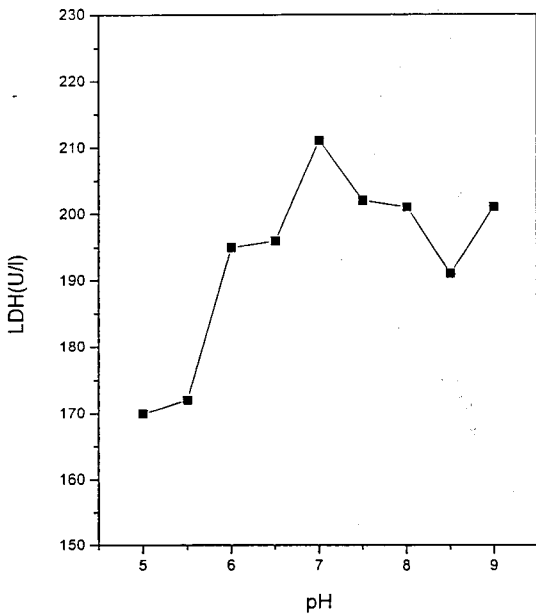


Fig. 8. Effect of pH on the NAD-independent activity of lactate dehydrogenase.

요약

상당수의 젖산 생성 균주가 알려져 있지만 실제로

L-Lactic acid를 생성하는 균주는 단지 몇 균주에 지나지 않는다. 그 중에서도 공업적으로 L-lactic acid를 생산하기 위해 이용되는 젖산균은 homofermenter이어야 하며 이러한 조건을 만족하는 균주는 Streptococcus속과 일부 Lactobacillus속의 균주만이 알려져 있을 뿐이다. 전분질의 곡물이 젖산을 생산하기 위한 원료로서 주로 사용되는데, 전분의 분해는 젖산균이 일반적으로 가지고 있는 성질이 아니므로 전분을 이용하지 못하는 젖산균을 공업적 발효균주로 이용할 경우 전분을 당화시켜 발효기질로 이용하거나 병행복합발효법으로 당화와 발효를 병행하는 방법을 이용하는 등의 불편한 점이 있다. 따라서 직접 전분을 이용해 젖산을 생성하는 균주를 분리하여 이러한 균주를 L-lactic acid 생산균주로 이용한다면 더 간단하고 안정적으로 순수한 젖산을 생산해낼 수 있을 것이다. 이러한 목적으로 본 연구에서는 전분이 기질로 첨가된 김치를 분리원으로 사용하여 상기의 목적에 부합되는 균주를 분리해냈으며, 분리균주의 배양적, 형태학적 및 생화학적 성질을 검토하여 Streptococcus sp. JEJ-6으로 동정하였다. L-Lactic acid를 생성하는 분리균주인 Streptococcus sp. JEJ-6의 생육 최적 조건과 L-lactic acid 생산 최적 조건을 검토한 결과, 0.1% NaCl, pH 7.0, 37°C, 1% peptone, 0.5% yeast extract가 첨가된 배지에서 균의 생육도와 L-lactic acid 생산량이 모두 높았다. 각 탄소원별로 D와 L-lactic acid 생산성을 비교, 검토한 결과 실험에 사용한 모든 탄소원들에서 L-lactic acid를 선택적으로 생성하여 높은 광학 순도의 L-lactic acid를 생산하는 것이 확인되었다. 그리고 L-lactic acid 생성에 관여하는 효소인 lactate dehydrogenase를 전처리하여 성질을 검토한 결과 LDH의 NAD 의존성 활성의 최대 활성 pH는 pH 8.5였으며 homofermenter들의 LDH의 최적 활성 pH가 7.8~8.8이라는 보고와 일치하였다. 반면 NAD 비 의존성 활성의 최대 활성 pH는 7이었다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 기초과학연구소 학술연구조성비(과제번호 : BSRI-96-4410)에 의한 연구결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

문헌

1. 이종갑, 정지훈, 박윤정, 성낙계 : 신판발효공학(수정판). 형설출판사, p. 233(1995)
2. 전흥기, 이재동, 坂井拓夫 : 생분해성 플라스틱과 지구환경. 생활미생물학(개정증보판), 녹문당(1997)

3. Ayaaki, I. and Ohta, T. : Batch culture kinetics of L-lactate fermentation employing *Streptococcus* sp. IO-1. *J. Fermentation and Bioengineering*, **67**, 46(1989)
4. Kurosawa, H., Ishikawa, H. and Tanaka, H. : L-Lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*. *Biotech Bioengin.*, **31**, 183(1988)
5. Tanaka, H., Kurosawa, H. and Murakami, H. : Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*. *Biotech Bioengin.*, **28**, 1761(1986)
6. Tsukagoshi, N., Iritani, S., Sasaki, T., Takemura, T., Ihara, H., Idota, Y., Yamagata, H. and Udaka, S. : Efficient synthesis and secretion of a Thermophilic α -amylase gene. *J. Bacteriol.*, **164**, 1182(1985)
7. Pascal, H., Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N. and Delcour, J. : Use of homologous expression-secretion signals and vector-free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for α -amylase and levanase expression. *Applied Environ. Microbiol.*, **60**, 1401(1994)
8. Fitzsimons, A., Hols, P., Jore, J., Leer, R. J., O'connell, M. and Delcour, J. : Development of an amyolytic *Lactobacillus amylovorus* α -amylase gene. *Applied Environ. Microbiol.*, **60**, 3529(1994)
9. Cotta, M. A. : Amyolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Applied Environ. Microbiol.*, **54**, 772(1988)
10. Eric, G., Brauman, A., Keteke, S., Lelong, B. and Raimbault, M. : Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 379(1991)
11. Trees, S., Mahillon, J., Joos, H., Dhaese, P. and Michiels, I. : Integration and expression of α -amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. *Appl. Environ. Microbiology*, **55**, 2130(1989)
12. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., The William and Wilkams Co., U.S.A.(1974)
13. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharphe, M. E. and Holt, J. G. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2., The William and Wilkams Co., U.S.A.(1984)
14. Moraes, L. M. P., Astolfi-filho, S. and Oliver, S. G. : Development of yeast strains for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs fusion proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 1067(1995)
15. Gutmann, I. and Wahlefeld, A. W. : L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. In "*Methods in enzymatic analysis*" Bergeyer, H. U. (ed.), Germany, Vol. 3, p.1464(1974)
16. Cunha, M. V. and Foster, M. A. : Sugar-glycerol fermentations in *Lactobacilli* : the fate of lactate. *J. Bacteriol.*, **174**, 1013(1992)
17. Wienhausen, G. and Deluca, M. : Bioluminescent assays of picomole levels of various metabolites using immobilized enzymes. *Analytical Biochem.*, **127**, 380(1982)
18. Billot-Klein, D., Gutmann, L., Sable, S., Guittet, E. and Heijenoort, J. V. : Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J. Bacteriol.*, **176**, 2398(1994)
19. Lianos, R. M., Harris, C. J., Hillier, A. J. and Davidson, B. E. : Identification of a novel operon in *Lactococcus lactis* encoding three enzymes for lactic acid synthesis : phosphofructokinase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase. *J. Bacteriol.*, **175**, 2541(1993)
20. Gawehn, K. and Bergmeyer, H. U. : D-(-)-lactate. In "*Methods in enzymatic analysis*" Germany, Vol. 3, p.1492(1974)
21. Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Grassl, M. and Michal, G. : Evaluation of experimental results. In "*Methods in enzymatic analysis*" Germany, Vol. 1, p.309(1974)
22. Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Grassl, M. and Michal, G. : Biochemical reagents. In "*Methods in enzymatic analysis*" Germany, Vol. 1, p.545(1974)
23. Doelle, H. W. : Nicotinamide adenine dinucleotide-dependent and nicotinamide adenine dinucleotide-independent lactate dehydrogenase in homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, **108**, 1284(1971)
24. Machida, M., Yokoyama, S., Matsuzwa, H., Miyazawa, T. and Ohta, T. : Allosteric effect of fructose 1,6-bisphosphate on the conformation of NAD⁺ as bound to L-lactate dehydrogenase from *Thermus caldophilus* GK24. *J. Biol. Chem.*, **260**, 16143(1985)
25. Armstrong, J. M. : The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biochim. Biophys. Acta.*, **86**, 194(1964)

(1998년 1월 15일 접수)