

반복회분식 배양을 통한 젖산생산에 관한 연구

오후록, 위영중, 정선옥, 윤종선¹, 류화원전남대학교 화학공학부, 동신대학교 생물자원산업화지원센터¹

전화 (062) 530-1842, FAX (062) 530-1849

E-mail: hwryu@chonnam.ac.kr

Abstract

In this study a repeated batch production of lactic acid was investigated for the purpose of reducing amount of yeast extract dosage. First batch operation was performed with nutrient rich media(glucose 100-150 g/l, and high yeast extract contents; 15 g/l), and subsequential batch operations were performed with nutrient poor media(glucose 100-150 g/l, and reduced yeast extract contents; 4-5 g/l). Volumetric productivities(6.03-6.20 g/l · h) and substrate conversion rate(94-98%) of every subsequential batch operation were maintained with the same level of first batch operation(6.19 g/l · h, and 99%, respectively), when concentrations of glucose and yeast extract were 100, and 4 g/l respectively.

서론

1)젖산균의 까다로운 영양요구성, 2)배지내의 축적된 젖산에 의한 생산물저해, 이 두 가지는 미생물을 통한 젖산의 산업적인 생산에 있어서 가장 큰 장애요인으로 지적되고 있다¹. 1)은 젖산균의 생육에 필수적인 아미노산 및 vitamin B군의 생합성능력의 부재에 기인하는데, 단순히 아미노산 및 무기질소원의 첨가만으로는 부족하여, yeast extract, peptone등의 고가의 복합질소원을 요구하며 yeast extract는 그 중에서도 균체생산성 및 젖산생산성에 탁월한 효과를 주는 질소원임은 여러 연구자들에 의해 판명되었다². 그러나 Tejayadi등³에 따르면 총생산비용의 35-38%에 해당하는 이러한 질소원 비용은 산업화에 있어서 가장 큰 걸림돌이 되고 있다고 하며 이러한 이유에서 저렴한 대체 질소원에 대한 연구 및 기 생산된 세포를 재사용 하는 방안 에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 1회의 통상적인 회분발효 수행후 막 여과장치를 이용하여 반응기내의 세포를 재사용 하여 회분발효를 수 회 반복함으로써 별도의 고정화장치 없이 반복회분식배양을 통하여 세포를 재사용 하는방법에 관한 연구를 수행하였으며 주요한 목적은 1)최초의 회분발효의 기질전환율 및 젖산의 부피생산성을 유지하는 최적의 탄소원 농도의 탐색 및 2)배지내에 첨가되는 yeast extract 농도를 최소화하는

것 이다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 에서는 통성혐기세균으로 동형 젖산발효를 수행하며 고수율로 L(+)형 젖산만을 생산하는 *Enterococcus faecalis* RKY1¹(KCTC 8890P)을 사용하였다. 전배양 배지에서 6시간동안 배양한후 6 ml 바이얼에 배양액과 글리세롤을 1:1 로 혼합하여 -20℃에서 보관하였으며 1개월마다 계대배양하였다.

배지 및 배양조건

전배양은 성장배지(g/L; glucose 30, yeast extract 10, K₂HPO₄ 5, NaCl 1, MgSO₄ · 7H₂O 0.2)를 탄소원과 질소원을 분리하여 121℃, 15 psi에서 15분간 멸균하였으며 pH 7.0으로 조절한 성장배지 14 ml가 들어있는 부틸고무마개로 밀봉된 20 ml 바이얼에 냉동보관 균주 2 ml주입하여 진탕배양기 (KMC-8480SF, Vision Scientific Co., Korea)에서 38℃, 200 rpm으로 12시간 동안 배양하였다. 접종액은 성장배지 37 ml가 들어있는 부틸고무마개로 밀봉된 50 ml 바이얼에 전배양액 3 ml 주입하여 동일한 조건으로 6시간 동안 배양하였다. 반복회분배양은 2.5 ℓ 발효조(KF-2.5L, Korea Fermenter Co., Korea)를 사용하여 조업부피 1 ℓ 에 최초 glucose 100-150 g/ℓ, yeast extract 15 g/ℓ를 함유한 배지에 접종액 4%(v/v)를 접종하였고, 10 N NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 조절하면서 38℃, 200 rpm으로 배양하였다. 첫 번째 회분배양중 첨가된 중화제의 부피 및 잔류당의 농도를 파악하여 탄소원의 고갈상태가 관찰되는 때에 막분리장치(SKUF-103-0830, MWCO 30,000, 유효막면적 0.06m²)를 이용 세포를 포함한 반응기내의 발효액의 부피가 초기부피의 10%에 도달할 때까지 발효액을 제거 해 난후 각각의 실험에 요구되는 영양원의 농도(glucose 100-150 g/ℓ, yeast extract 3-5 g ℓ)를 함유하는 배지를 보충하여 최초조업부피 1 ℓ를 유지하면서 연속적으로 반복회분발효를 수행하였다. 막은 사용 후 증류수 와 1 M NaOH용액으로 세척한 후 1000 ppm NaClO solution으로 멸균한 후 멸균수로 씻어서 재사용 하였다.

분석방법

유기산의 정량은 HPLC(Waters Ltd., USA)를 사용하여 아래와 같은 조건하에서 수행하였다. column은 Aminex HPX-87H ion-exclusion column(300×7.8 mm, Bio-Rad Lab, USA), 이동상은 0.008 N H₂SO₄을 사용하였고 이동상의 유속은 0.6 ml/min으로 하였다. 검출기는 Waters 486(Waters Ltd., USA)을 사용하였으며 파장은 210nm였다. 글루코스의 농도는 Glucose E-kit(Yeong-Dong pharmaceutical Co., Korea)를 사용하여 505nm에서 흡광도를 측정하고, 농도를 알고있는 샘플로부터 얻

어진 보정곡선에 의해 환산하여 분석하였다. 건조세포중량은 분광광도계를 사용하여 660nm에서 흡광도를 측정하고 보정곡선으로부터 미리 건조된 세포를 통해 얻어진 보정곡선을 통해 환산하였다.

결과 및 고찰

글루코스 농도와 yeast extract 농도를 각각 150, 15 g/l로 하여 첫 번째 발효를 수행한 후 동일한 글루코스 농도를 함유하는 새로운 배지에 yeast extract 농도를 5 g/l로 하여 반복회분배양을 수행한 결과를 Fig.1에 나타내었다. 첫 번째 회분 발효 시 24 시간만에 138.26 g/l의 젖산을 생산하여 부피생산성은 5.76 g/l · hr 이었으나 두 번째 회분발효부터는 젖산의 부피생산성이 점점 낮아지는 경향(이후의 배치 순서로 각각 4.54, 3.74, 3.44, 3.25 g/l · hr)을 보였다. 따라서 글루코스 농도를 100 g/l로 낮추고 위와 동일한 방법으로 실험한 결과를 Fig.2에 나타내었다. 그림에서도 알 수 있듯이 두 번째 이후의 회분배치에서도 발효시간이 지연되지 않았으며, 젖산의 부피생산성은 6.15-6.30 g/l · hr인 상태가 지속되었고 세 번째 회분발효부터는 12시간이후 첫 번째 회분발효보다도 젖산의 생산속도가 빨라지는 것으로 사료되어 yeast extract의 첨가량을 4 g/l로 하여 다음의 실험을 수행하였다. Fig.3은 두 번째의 회분발효부터 배지내의 글루코스 농도 100 g/l, yeast extracts 농도 4 g/l를 첨가하여 실험한 결과이다. 이때의 최고의 세포농도는 21.68 g/l이었으며 각각 부피생산성은 6.03-6.20 g/l · hr 값을 보였으며, 이는 개개의 회분발효를 다섯 번 반복수행 하였을 때의 yeast extract 첨가량의 47%에 해당하는 yeast extract만을 공급함으로써 동일한 효과(부피생산성 및 기질전환율)를 얻은 것이다.

감사

본 연구는 2000년도 산업기반기술개발사업 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Amrane, A. and Pringent, Y., "Influence of yeast extract concentration on batch culture of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling", (1998), *World j. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 529-534.
2. Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B., "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable sources", (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 87-107
3. Tejayadi, S. and Cheryan, M., "Lactic acid from whey permeate. Productivity

and economics of a continuous membrane bioreactor", (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 242-248.

4. Hwa-Won Ryu, Kui-Hyun Kang, Jae-Gu Pan, Ho-Nam Chang, "Characteristics and glycerol metabolism of fumarate-reducing *Enterococcus faecalis* RKY1", (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 119-124.

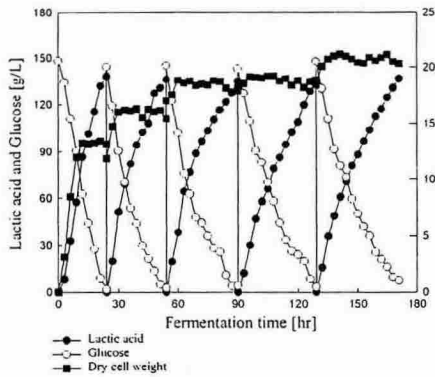


Fig. 1 fermentation profile of repeated batch fermentation [concentration of glucose: 150 g/ℓ, yeast extract in poor medium: 5 g/ℓ]

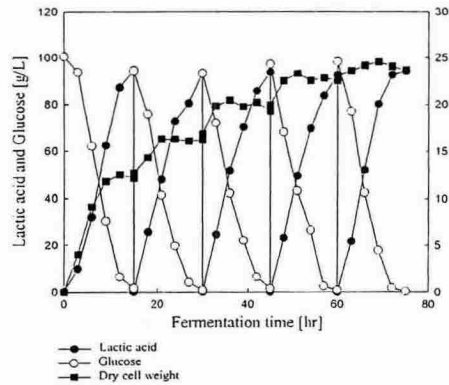


Fig. 2 fermentation profile of repeated batch fermentation [concentration of glucose: 100 g/ℓ, yeast extract in poor medium: 5 g/ℓ]

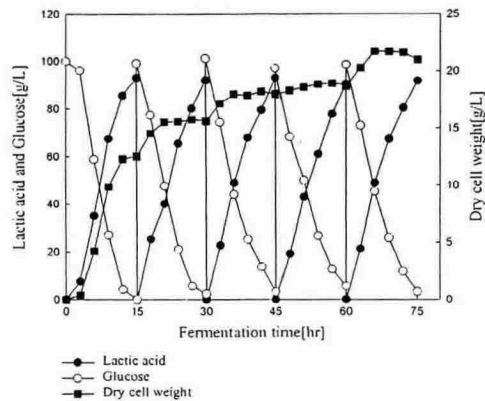


Fig. 3 fermentation profile of repeated batch fermentation [concentration of glucose: 100 g/ℓ, yeast extract in poor medium: 4 g/ℓ]