

Lactic acid production from cereal-derived materials

Hurok Oh^{1,2,3}, Jong-Sun Yun^{1,2}, Young-Jung Wee^{1,2}, Hwa-Won Ryu^{1,2}

Faculty of Applied Chemical Engineering¹, Institute of Bioindustrial Technology², Chonnam

National University, Korea Petroleum Quality Inspection Institute³

TEL: +82-62-530-1842, FAX: +82-62-530-1849 E-mail : hwryu@chonnam.ac.kr

Abstract

In this study, batch production of lactic acid from cheap raw material such as barley, wheat, and corn, was tried to lower the total production cost of lactic acid. Although no nutrients were supplemented, lactic acid productivities were achieved up to 0.88 g/(L·hr) from barley, wheat and corn enzymatic hydrolysate. By adding corn steep liquor to corn and wheat hydrolysate media, relatively high lactic acid productivities(4.14 g/(L·hr)) were obtained.

서론

미생물을 이용한 산업적인 젖산생산에 있어서 젖산균의 까다로운 영양요구성 및 배지내의 축적된 젖산에 의한 생산물저해 이 두 가지는 젖산의 산업적인 생산에 있어서 가장 큰 장애요인으로 지적되고 있다¹. 젖산균은 생육에 필수적인 아미노산 및 비타민 B군의 생합성능력이 결여되어 있어 효모추출물, 펩톤 등의 고가의 복합질소원을 요구하며, 통상 효모추출물은 그 중에서도 균체생산성 및 젖산생산성에 탁월한 효과를 주는 질소원으로 판명되었다. 그러나 Tejayadi 등²에 따르면 질소원의 비용은 총생산비용의 35-38%에 해당된다고 하였으며, 여러 연구팀에 의해 이러한 고가의 질소원 비용은 산업화에 있어서 가장 큰 장애요인으로 지적되고 있다. 이러한 이유에서 저렴한 대체질소원의 개발 및 효율적인 발효공정에 관한 연구가 진행되고 있는 추세이다.

이런 관점에서, 본 연구에서는 저렴한 영양원인 밀, 옥수수등의 당화액과 옥수수침지액을 이용하여 젖산을 생산하는 방법에 관하여 살펴보았다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서는 통성 혐기 세균으로 동형 젖산 발효를 수행하며 고수율로 L(+)형 젖산만을 생산하는 *Enterococcus faecalis* RKY1³(KCTC 8890P)을 사용하였다. 전배양 배지에서 6시간 동안 배양한 후 6 mL 바이얼에 배양액과 글리세롤을 1 : 1로 혼합하여 -20°C에서 보관하였으며 1개월마다 계대배양하였다.

배지 및 배양 조건

전배양은 전배양 배지(glucose 30 g/L, yeast extract 10 g/L, K₂HPO₄ 5g/L, NaCl 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L)를 탄소원과 질소원을 분리하여 121°C, 15 psi에서 15분간 멸균하였으며 pH 7.0으로 조절된 성장배지 14 mL가 들어있는 부틸 고무마개로 밀봉된 20 mL 바이얼에 냉동보관된 균주 2 mL 주입하여 진탕배양기(KMC-8480SF, Vision Scientific Co., Korea)에서 38°C, 200 rpm으로 12시간 동안 배양하였다. 접종액은 각각의 본배양배지의 조성 과 같은 성장배지 38 mL가 들어있는 부틸 고무마개로 밀봉된 50 mL 바이얼에 전배양액 2 mL 주입하여 동일한 조건 하에서 6시간 동안 배양하여 본배양 발효조에 접종하였다. 젖산 생산을 위한 본배양 발효는 온도 및 pH가 자동으로 조절되는 2.5 L 발효조(KF-2.5L, Korea Fermenter Co., Korea)를 사용하였으며, 중화제로서 10 N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조절하면서 38°C, 200 rpm으로 배양하였다. 액화와 당화는 각각 Thermamyl 120L, Type LS(Novonordisk A/S, Denmark), AMG 300 L(Novonordisk A/S, Denmark)를 사용하여 실시하였다. 먼저 잘게 마쇄된 보리, 밀, 옥수수 가루를 적당한 농도로 수돗물에 현탁한 후 NaOH와 젖산을 이용하여 용액의 pH를 6.0으로 조정 한 다음, Thermamyl 120L, Type LS을 0.3 mL 첨가하고 97°C에서 30분간 액화를 진행하였다. 액화액을 다시 pH를 4.5로 조정하고 AMG 300 L 0.3 mL를 첨가하여 55°C에서 24 시간 동안 교반시키면서 곡물의 당화를 진행하였으며, 얻어진 당화액은 필요에 따라 pH를 7.0으로 다시 조절하여 121°C에서 끓여내거나 혹은 얻어진 당화액을 바로 6 µm 여과지를 이용하여 여과한 후 필요에 따라 다른 영양분을 보강하여 발효를 실시하였다.

분석 방법

젖산은 HPLC(Waters486, Millipore Co., MA)를 이용하여 정량 하였다. Column (Aminex HPX-87H ion-exclusion column)의 온도는 35°C로 유지하였으며 이동상은 0.008N H₂SO₄, 이동상의 유속 0.6 mL/min, 검출기는 UV detector(210 nm)를 사용하였다. 글루코스는 Glucose oxidase-peroxidase 분석법을 이용하여 505 nm에서 흡광도를 측정하고, 보정곡선을 통해 환산하였다. 건조세포중량은 분광광도계를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하고 보정곡선을 통해 환산하였다.

결과 및 고찰

보리, 밀, 그리고 옥수수 200 g/L(분쇄된 가루기준)를 효소가수분해하여 얻어진 당화액을 단일영양원으로 사용한 회분식 발효에 있어서 젖산의 부피생산성 및 최대세포성장은 각각 0.51-0.88 g/L·hr 및 1.67-2.25 g/L로 나타났다.

Fig. 1은 옥수수 200 g/L, 효모추출물 2 g/L를 함유한 배지에 있어서 CSL의 첨가량에 따른 젖산생산 및 세포성장의 영향을 살펴본 것으로 고형성분 기준으로 10 g/L의 CSL이 첨가되었을 때 36시간만에 108 g/L가 생산되었으며 가장 큰 부피생산성(3.00 g/L·hr)을 얻었다. 15 g/L이상의 효모추출물이 첨가된 배지에서는 초기 6-9시간동안 세포성장 및 젖산생산이 진행되지 않았으나 9 시간 이후에는 세포성장속도 및 젖산생산속도가 가속되었으며 세포성장의 경우 효모추출물의 함량에 비례하여 증가하여 25 g/L의 CSL이 첨가된 배지에서 최고 13.4 g/L의 세포성장을 기록하였다. 이처럼 15 g/L이상의 CSL이 포함된 배지에서 배양초기 6-9시간동안 발효가 지연되는 현상은 복잡한 성분으로 구성되어 있는 CSL내부에 포함되어있는 발효를 저해하는 인자가 일정농도 이상이 되어 저해하는 것으로 사료되며 일정시간 이후에 세포는 그 환경에 적응하면서 급속도로 성장하고 이에 따라 젖산생산속도 또한 증가하는 것으로 사료된다.

Table 1은 밀당화액 및 옥수수침지액을 배지로 사용하였으며 14일 이상 15 g/L의 CSL배지에 적용된 균주를 사용하여 젖산배양을 실시한 결과로서 4.14 g/L·hr의 높은 젖산생산성을 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 에너지관리공단 바이오에너지기술개발사업에 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Amrane, A. and Pringent, Y., Influence of yeast extract concentration on batch culture of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling(1998), *World journal of Microbiology & Biotechnology* **14**:529-534.
2. Tejayadi, S. and Cheryan, M. Lactic acid from whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor(1995), *Appl. Microbial Biotechnol.*, **43**:242-248.

3. Hwa-won Ryu, Kui-Hyun Kang, and Jong-Sun Yun, Bioconversion of fumarate to succinate using glycerol as a carbon sources(1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77-79: 511-520.

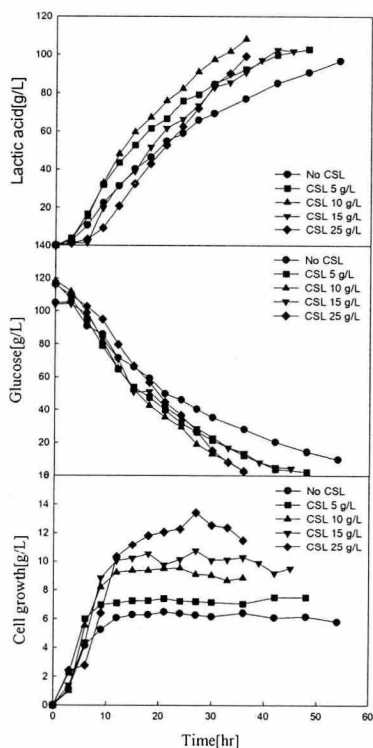


Fig. 1 Effect of CSL dosage on batch cultivation of *E. faecalis* RKY1 (compositions of media: corn 200 g/L, yeast extract 2 g/L, CSL 0-25 g/L).

Table 1. Effect of CSL concentrations in batch cultivation of *E. faecalis* RKY1 on lactic acid fermentation using whole wheat flour¹

CSL content (g/L)	Fermentation time (hr)	Substrate conversion ² (%)	Lactic acid (g/L)	Maximal cell growth (g/L)	Lactic acid productivity (g/L-hr)
0	78	96.7	94.4	7.15	1.21
5	39	96.9	96.8	7.75	2.48
10	30	96.9	103.1	12.42	3.43
15	27	99.0	102.7	11.07	3.80
25	24	98.9	99.4	12.8	4.14

¹Composition of media: 200 g/L of wheat hydrolyzate and 0-25 g/L of CSL (sterilized by filtration).

²Final glucose(g)/initial glucose(g)×100