

회분식 및 연속배양에 있어서 고농도 젖산의 생산을 위한 공업용 배지연구

김 양 훈 · 이 기 범 · 문 승 현

광주과학기술원 환경공학과

(접수 : 1998. 11. 25., 게재승인 : 1999. 3. 15.)

A Study on Industrial Media for Production of Lactic acid in Batch and Continuous Fermentations

Yang Hoon Kim, Ki Beom Lee, and Seung-Hyeon Moon†

Dept. of Environmental Science and Engineering, Kwangju Institute of Science & Technology, Kwangju 500-712, Korea

(Received : 1998. 11. 25, Accepted : 1999. 3. 15.)

We have investigated industrial media for lactic acid fermentation to reduce the cost of nitrogen sources. Corn steep liquor (CSL) was successfully used at 5% (v/v) in batch fermentations. Use of soluble CSL improved the productivity about 20% with an advantage of clearer fermentation broth. Yeast extract-complemented CSL media further increased the productivity. It was found that 3.1 g/L yeast extract and 5% CSL could be an effective substitute for 15 g/L yeast extract in 10% glucose medium. Brewing yeast was also used as a sole nitrogen source equivalent to 5% CSL. A continuous culture coupled with cell-recycle by microfiltration at the dilution rate of 0.05-0.065 h⁻¹ led to the highest lactic acid productivity. Lactic acid was recovered by electro dialysis from the cell free broth. Depleted cell free broth supplemented with 5-10 g/L of yeast extract performed reasonably in batch and continuous cultures. Reuse of the fermentation broth may reduce the cost of raw materials as well as minimize the fermentation wastes.

Key Words : lactic acid, nitrogen sources, cell-recycle, continuous culture, broth reuse, industrial media

서 론

전세계적으로 젖산은 식품, 의약품, 화학약품 및 피혁산업 등에 널리 이용되어 왔으며, 최근 들어 환경 친화적인 유기용매와 생분해성 고분자의 원료로써 젖산 유도체가 주목받기 시작하면서 젖산 및 그 유도체의 시장 잠재력이 매년 증가하고 있다(1). 젖산 생산에 있어 미생물 발효공정은 원하는 형태의 L(+), D(-)-이성질체를 얻을 수 있다는 장점이 있으며, 현재 젖산 총 생산량의 50% 이상을 발효공정으로 생산하고 있다(2). 발효공정 도입 이래, 젖산 생산성 향상을 위한 기존 회분발효 공정 개선, 유기식 공정, 세포고정화 및 세포 재순환에 의한 연속발효 공정 등 지속적인 공정 연구와 우수한 균주 개발이 활발하게 진행되어 왔다(3, 4, 5, 6). 일반적인 젖산 균주는 영양요구량이 높아 저렴한 원료 사용에 의해 생산원가를 낮춤으로써 젖산 발효의 경제성을 향상시키는 것이 중요한 과제이다. 원료비의 상당부분을 차지하는 질소원에 있어, yeast extract가 우수하다고 알려져 있지만 대규모 생산에 있어 그 비용은 막대하다. 1940년대 페니실린 대량 발효에 처음 사용된 전분 제조의 부산물,

corn steep liquor(CSL)는 다량의 영양분을 함유하고 원료비용이 낮아 대량 발효공정에서 공업용 질소원으로 사용되어지고 있다(7). 그러나 yeast extract에 비하여 발효시간이 길고, 함유 불순물에 의한 후속 정제 및 분리 비용 상승 등의 단점이 있으며, 문제 해결을 위한 배지 성분의 최적화 연구가 다양하게 진행되어지고 있다(8, 9).

최근 강화되는 환경규제와 발효폐액 처리비용 상승은 제품 경쟁력을 떨어뜨리는 원인이 된다. Ye(10) 등은 이온교환수지 공정에서 배출되는 발효폐액 일부를 사용하여 재발효시에도 높은 생산성을 얻을 수 있었음을 보고하였다. 그러나 이온교환법에 의한 발효폐액은 이온교환수지 재생을 위한 고농도 염을 함유할 뿐 아니라, 젖산 발효폐액 재활용에 대한 체계적인 연구가 미비한 실정이어서 지속적인 젖산 발효폐액의 자원화 연구가 필요하다.

본 연구에서는 CSL의 낮은 젖산 생산성 및 높은 정제비용을 극복하기 위하여, 다양한 혼합질소원에 대한 회분발효 실험을 수행하여 질소원의 최적조성을 조사하였다. 또한, 회분발효 실험을 바탕으로 젖산 생산성을 향상시키기 위한 세포 재순환 연속 발효의 최적 조건 연구를 수행하였다. 한편, 대체 질소원으로 맥주 생산에서 발생하는 폐효모의 자원화 가능성을 조사하였고, 젖산 정제 공정 후 발생하는 발효폐액을 회분발효 및 연속발효에 재사용함으로써 원료비 절감에 의한 경제성 향상을 제고하고 발효폐기를 최소화에 의한 환경 친화적 공정운전의 가능성을 검토하였다.

† Corresponding Author : Dept. of Env. Sci. & Eng.,
K-JIST, Kwangju 500-712, Korea
Tel : 062-970-2435, Fax : 062-970-2434
e-mail : shmoon@kjst.ac.kr

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용된 균주는 Argonne National Laboratory (USA)로부터 분양받은 복합균주 LBM5였다. 이는 일정비율의 *L. delbrueckii sup. lactis* (ATCC 12315), *L. casei* NRRL-B1445, *L. delbrueckii* NRRL-B445, *L. helveticus* NRRL-B1937, *L. casei* NRRL-B1922로 이루어져 있으며, 다른 균주에 비하여 높은 젖산생산성을 가지고 있다고 알려져 있다(11).

순수배지 및 재사용 배지

종균 배양시 배지로 MRS배지(12)를, 발효조 배양에서는 IK1 배지(13)를 사용하였으며 기본적인 배지의 조성은 Table 1에 나타난 바와 같다. 발효실험을 위한 질소원으로 yeast extract, CSL, 정제 CSL, 정제 CSL에 일정 혼합비의 yeast extract를 첨가한 혼합 질소원, 그리고 농양백주(주) 광주공장에서 배출되는 폐효모를 사용하여 배지를 재구성하였다. 정제 CSL은 증류수에 녹인 CSL을 교반속도 4000 rpm(Marathon 10K, Fisher Scientific, USA)에서 30 분간 원심분리한 상등액으로 사용하였다. 순수배지는 121°C, 15 psig에서 15~50 분간 멸균하였고, 배지의 침전 및 갈변화 반응을 방지하기 위하여 포도당, 질소원, 무기염별로 나누어 실시하였다. 전기투석을 통하여 젖산을 분리 후 남게 되는 발효폐액은 포도당 100 g/L, 초기 yeast extract 첨가량의 1/3 및 영양염류를 첨가하여 회분발효를 위한 재사용 배지를 구성하였고 연속 배양을 위한 재사용배지는 포도당 100 g/L과 초기 yeast extract 2/3만을 첨가하여 발효에 사용하였다. 재사용배지는 순수배지와 동일하게 멸균 후 발효실험에 사용되었다.

Table 1 Compositions of MRS and IK1 media.

Composition	MRS (g/L)	IK1 (g/L)
Glucose	20	100-120
Bacto Yeast Extract	-	15
Bacto Protease Peptone No.3	10	-
Bacto Beef Extract	10	-
Tween 80	1	-
K ₂ HPO ₄ (di basic)	2	0.5
KH ₂ PO ₄ (Mono basic)	-	0.5
CH ₃ COONa · 3H ₂ O	5	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	0.5
MnSO ₄ · H ₂ O	0.05	0.05
Ammonium Citrate	2	1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	-	0.03

종균배양

회분 및 연속발효의 종균배양은 먼저 플라스크 배양 부피의 10% (v/v) 배지가 담긴 시험관에 균주를 접종하여 42°C에서 18

시간 동안 120 rpm으로 진탕 배양하여 사용하였다. 배지의 초기 pH는 6.3로 조절하였고 탄산 칼슘 (CaCO₃)을 사용하여 pH 5.5를 유지하였다. 삼각 플라스크배양은 발효조 배양 부피의 10% (v/v)의 배지를 무균적으로 분주하고 미리 전배양한 20 mL를 접종하여 42°C에서 18시간 동안 120 rpm으로 발효시켰다.

회분 및 연속발효

회분발효 실험은 3.7 L 발효조(Bioengineering, Sweden)를 사용하여 배양액량 2 L, 교반속도 200 rpm으로 48~70 시간 배양하였다. 연속발효의 전체공정은 Figure 1에서 나타난 것과 같으며, 연속발효 실험에서는 1.25 L 발효조(New brunswick scientific, USA)를 사용. 운전부피 500 mL, 교반속도는 60 rpm에서 24 시간 회분배양 후 472 시간 연속배양 하였다. 이 때, 발효조 조업부피는 440 mL을 유지되었고, 재순환 액량은 60 mL이었다. 정밀여과막(CFP-1-E-4A 0.1 μm 18063F03, 440 cm, AG Tech, USA)을 사용하여 발효액으로부터 젖산을 연속적으로 분리함으로써 균에 대한 성장 저해를 막아주는 동시에 활성 균은 발효조내로 다시 재순환하여 고농도 연속발효를 수행하였다. 정밀여과막은 121°C에서 30분 동안 멸균하였으며, 정밀여과막의 연결관은 121°C에서 15분 동안 멸균된 후 무균실에서 각 부위를 연결하였다. 배양액량의 10% (v/v) 종균액을 발효조에 접종한 후 초기 pH 6.3, 42°C 조건에서 배양하였으며, 발효 중 pH는 10N NaOH를 사용하여 pH 5.5로 유지하였다.

전기투석에 의한 젖산 회수

발효액으로부터 젖산 분리에 있어, 기존 이온교환법의 폐액 및 폐수처리에 따른 문제점을 해결하기 위해 이온교환막을 통해 특정 이온을 분리, 정제하는 전기투석법을 이용하였다(14, 15). 본 실험에서 전기투석장치는 Tokuyama사의 TS-2-10(16)이었으며, 같은 회사 제품인 양이온 교환막 CM-1과 음이온 교환막 AM-1의 10 쌍으로 구성을 하였다. 초기 유입액으로는 정밀 여과를 거친 발효액을 넣었고 초기 회수액에는 젖산(Sigma 98%, density=1.154 g/mL)에 NaOH를 가하여 pH가 5.5가 되도록 만든 Na-lactate 2 L를 넣었다. 또한 전극용액은 6% Na₂SO₄를 순환 시켰다. 실험 중에 유입액과 회수액의 유량은 3.0 L/min이었으며, 실험 시작 후 전기투석조 전압이 20 V에 도달할 때까지 5 A의 일정 전류로 유지 시켜 주었고, 20 V 이후 일정 전압으로 전환하였다. 전기투석실험은 100 분 동안 진행되었으며, 전기투석 후 남게 되는 발효폐액은 최소한의 영양분만을 보충 후 재사용 배지로 이용하였다.

분석방법

채취한 발효액의 탁도는 UV-Spectrophotometer(Perkin Elmer Lambda12, USA)를 사용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 건조균체량의 측정은 배양시간 별로 채취한 배양액 5 mL를 1200 rpm에서 25 분간 원심분리 및 상등액 제거 후 0.85% NaCl 용액으로 1 회, 증류수로 2 회 세척 후 건조기에 105°C, 12 시간 건조하여 균체 현탁액의 탁도와 건조균체량과의 표준곡선을 작성하여 이로부터 간접적으로 측정하였다. 젖산의 농도는 Aminex HPX-87H(Bio-Rad)컬럼이 장착된 HPLC (Water 410)를 사용하여 정량하였다. 전류 포도당은 영동 제약의 포도당 측정용 시약(효소법, Glucose-E kit)을 이용하여

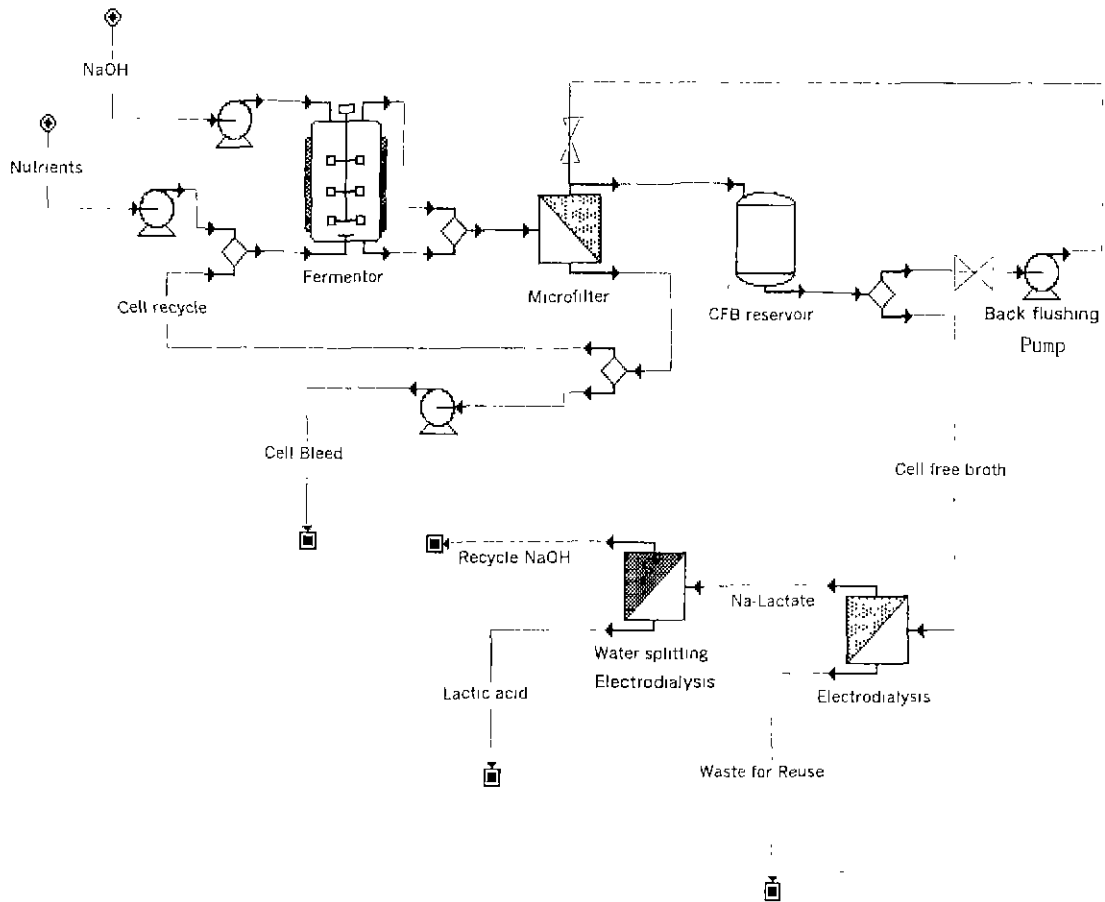


Figure 1. A conceptual process for continuous production of lactic acid by fermentation and electrodiolysis

505 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 하였으며, Protein 농도는 BCA total protein assay법을 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

**다양한 질소원을 이용한 회분식 발효
CSL 농도 변화에 따른 영향**

대규모 발효의 질소원으로 사용되는 CSL은 전분 제조 공정에 따라 물성 및 조성의 차이가 있으나 일반적으로 갈색의 점성용액으로 다량의 단백질과 기타 아미노산, 비타민 및 무기염류 등을 함유하고 있다(17). 그러나 CSL은 많은 불순물을 함유하고 있어 발효제품의 회수 정제 공정에서 비용을 증가시키기 때문에 최적 농도선택이 필요하다. 본 연구에서는 고품질 함량이 50%인 CSL(Sigma, USA)를 사용하였으며, Figure 2는 yeast extract 15 g/L와 CSL 농도에 따른 포도당 소모량 및 젖산 생산량을 나타낸 것이다. Yeast extract 15 g/L를 질소원으로 사용한 발효의 경우, 24 시간 이후 대부분의 포도당이 소모되었고 40 시간 이후 완전히 소모되었다. 한편 농도에 따른 CSL을 각각 회분 발효한 결과, 68 시간 이후에도 완전한 당소모가 어려웠고 당 이용율은 CSL 3%의 경우 1.18 g/L/h에서 5%일 때

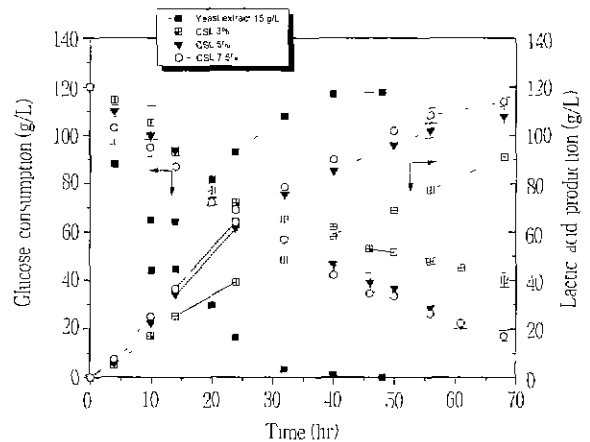


Figure 2. Glucose utilization and lactic acid production in batch fermentations with yeast extract 15 g/L and various CSL concentrations.

1.52 g/L/h로 증가하였다. 그러나 CSL 7.5%의 경우, 첨가농도의 증가에도 불구하고 당 이용율은 1.56 g/L/h로, CSL 5%에서와 큰 차이를 보이지 않았다 이는 CSL에 특정영양소가 결핍되

어 있거나 CSL에 함유되어 있는 불순물이 기질저해를 유발하여 균체 성장속도를 저하하는 요인이 되는 것으로 사료된다

Yeast extract와 CSL 혼합질소원에 의한 영향

선행된 실험에서 나타난 CSL의 생산성 한계를 극복하기 위해 CSL 5%에 일정 비율의 yeast extract를 첨가하여 혼합배지를 구성하였다. 각각에 대하여 48 시간 회분발효 후 분석 결과를 토대로 yeast extract와 CSL(Y : C)의 최적 구성비를 조사하였으며 각 비율에 따른 발효결과는 Figure 3에서 나타난 것과 같다. 먼저 yeast extract 833 g/L에 CSL 5%를 첨가하여 1 : 3 비율로 만든 혼합질소원의 경우, 높은 yeast extract첨가 비율에도 불구하고 포도당소모 및 젖산생산량에 있어서 1 : 8 비율의 결과와 매우 유사하였다. 한편, 정제공정에서 문제되는 CSL 사용량을 3%로 줄이는 대신 yeast extract와의 혼합비율 1 : 6으로 증가시켜 그 효과를 관찰한 결과, Figure 2에서의 CSL 5%만을 사용한 것보다는 우수하지만 다른 혼합 질소원에 비하여는 낮은 결과를 나타내었다. 본 실험을 통하여 yeast extract 31 g/L와 CSL 5%(혼합비 1 : 8)에서 복합균주의 젖산 생산능력이 가장 우수하였고 앞서 실시한 CSL 5%에 비하여 20 시간 이상 발효시간을 단축할 수 있었다. 또한, Cornelius(9) 등이 yeast extract와 CSL 혼합 질소원 배지에서 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014를 이용한 발효실험에서 보고한 혼합최적비 1 : 3 보다 높은 비율의 혼합비에서 우수한 젖산 전환율을 갖음으로써 고가의 yeast extract 사용량 감소에 의한 생산 원가 절감을 예상할 수 있었다.

CSL과 정제 CSL을 이용한 발효 비교

CSL의 함유 불순물을 제거하여 발효제품의 순도를 높이고 후속 정제 공정의 부담감을 줄이기 위하여 정제 CSL을 질소원으로 사용하였다. Lawford(7) 등은 에탄올 발효실험에 있어 CSL 상등액을 이용함으로써 에탄올 생산성이 1.33 배 증가되었다고 보고하였다. 본 연구에서 CSL을 원심분리하여 침전물을 제거 후 CSL 상등액을 이용하여 발효실험을 수행한 결과는 Figure 4에서 나타난 바와 같으며 순수 CSL 5%의 젖산 생산성 1.60 g/L/h와 비교한 결과 24% 증가한 1.98 g/L/h를 얻었다. 이 실험에서 CSL을 이용한 젖산 생산성 향상 및 정제 정제 비용 최소화를 위한 전처리가 질소원의 손실없이 이루어졌음을 확인하였다.

폐효모를 이용한 발효

맥주발효 경우, brewing yeast를 첨가하여 당을 알코올과 탄산가스로 분해한 후 여과공정을 거쳐 순수 맥주를 생산하며, 이때 다량의 발효폐기물이 배출되고 있다. 일본 아사히 맥주의 연간 총 폐기물 4 만 6 천톤 중 85%가 발효폐기물이 차지하고 있어, 발효폐기물 처리비용 최소화 및 재활용 방안이 중요한 과제로 대두되었다.麒麟, 아사히 등 일본 맥주 제조회사들은 2010년을 목표로 에너지 사용량 절감 및 100% 폐기물 자원화 연구를 진행하는 것으로 알려져 있다(18, 19).

질소원으로써 사용가능 여부를 판단하기 위하여 분쇄된 폐효모 15 g을 증류수 1L에 녹여 용액내의 총 단백질량을 측정하였다. 폐효모 12.5 g/L 내에 존재하는 총 단백질량은 순수 yeast extract 14 g/L와 유사한 수치를 나타내었다. Figure 5는 폐효모를 사용한 68 시간 회분 발효 실험 결과를 나타낸 것이며, Figure 2의 CSL 5%와 yeast extract 15 g/L의 결과와 비교하

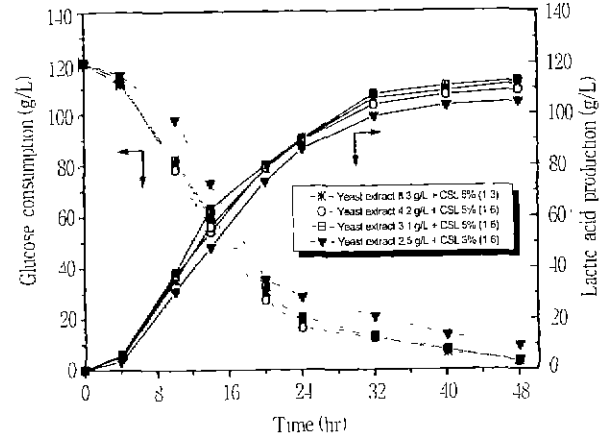


Figure 3. Glucose utilization and lactic acid production in fermentations using yeast extract supplemented CSL media [() : Ratio of yeast extract to CSL(w/w)]

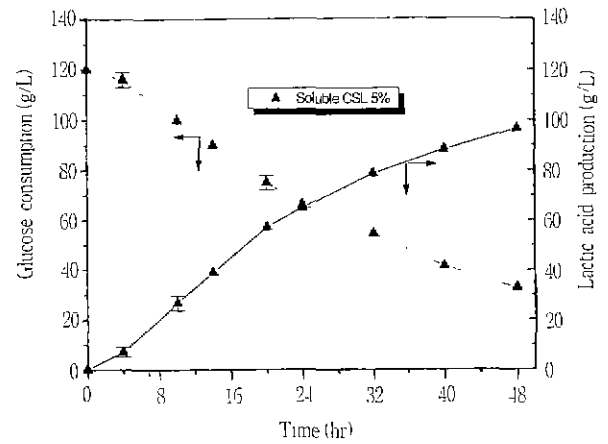


Figure 4. Glucose utilization and lactic acid production in batch fermentation using soluble CSL 5%.

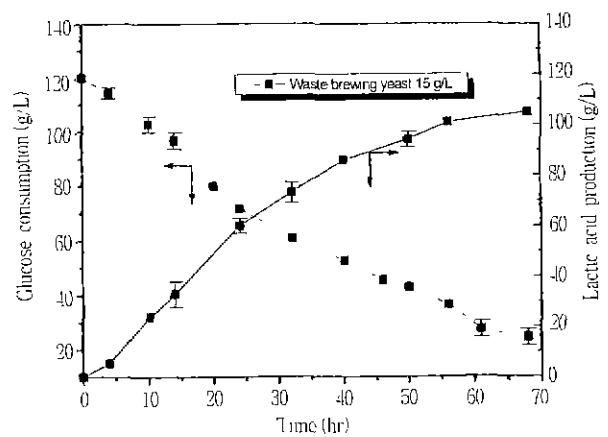


Figure 5. Glucose consumption and lactic acid production with waste brewing yeast.

면 당 이용율은 CSL 5%의 152 g/L/h보다 다소 낮은 140 g/L/h였으나 젖산 생산성은 1.55 g/L/h로 CSL 5%의 1.60 g/L/h와 유사한 경향을 나타내었다. 그러나 유사한 단백질 농도

에도 불구하고 yeast extract 15 g/L에 비하여 크게 못 미치는 결과를 볼 수 있었는데, 이는 맥주 폐기물 속의 유기물 및 염 등이 균 성장을 저해하는 것으로 사료된다. 그러나 본 실험을 통하여 젖산발효에 있어 폐효모에 대한 효과적인 정제가 이루어진다면 대체 질소원으로 충분히 사용할 수 있음을 확인하였다.

회분발효에서의 재사용 배지에 의한 영향

본 연구에서는 고가의 배지인 yeast extract 발효액을 재사용함으로써 원료비 및 폐기물처리 비용의 절감에 따른 제품의 원가절감 가능성을 검토하였다. 재사용 배지의 실험에 앞서, 순수 배지의 조성은 포도당 100 g/L, yeast extract 15 g/L였으며 초기 단백질농도는 29~30 g/L로 측정되었다. 48 시간의 순수 배지 발효 결과, 포도당은 완전 소모되었고 단백질농도는 16.7 g/L로 감소하였다 순수배지 발효 후 얻은 발효액 4.2 L는 전기투석의 막오염을 방지하기 위하여 정밀여과막으로 전처리를 하였으며 최종적으로 3.8 L를 얻었다 전기투석에 의하여 균체가 제거된 발효액 3 L로부터 97% 이상의 젖산을 회수하였으며, 최종적으로 1.9 L의 발효폐액이 남게 되었다. 이때 발효폐액의 잔류 단백질농도는 18~19 g/L였다.

재사용배지에 대한 보충 yeast extract양을 결정하기 위하여 yeast extract 0, 2, 5, 10, 15 g/L를 발효폐액에 첨가하여, 40 시간동안 200 mL 플라스크 배양하였으며 순수배지에서의 미성장속도 결과인 0.166 h⁻¹와 비교하였다. 5 g/L 첨가 시 0.161 h⁻¹로 0, 2, 10 g/L일 때 각각 0.092, 0.149, 0.158 h⁻¹보다 빠른 성장속도를 관찰할 수 있었고, 15 g/L의 경우 0.147 h⁻¹로 오히려 낮은 결과를 보였다 따라서 재사용 배지의 보충 yeast extract양은 초기첨가량의 1/3인 5 g/L로 결정하였다

Figure 6은 순수배지와 재사용배지의 발효결과를 비교한 것이다. 재사용배지의 초기 protein 농도는 27 g/L로 순수배지에 비하여 3 g/L 낮았으나, 실험중절 후 18.8 g/L로써 순수배지 발효 후 16.7 g/L에 비하여 높아 단백질 소모량이 더 적음을 알 수 있었다. 젖산생산성에 있어 2.18 g/L/h로 순수배지시 2.22 g/L/h와 거의 유사한 것으로 관찰되었다 결과적으로 최소한의 영양분만을 보충하여 준 발효폐액을 재사용 발효하였을 때 순수 배지에서의와 마찬가지로 높은 젖산 생산성을 얻을 수 있었다.

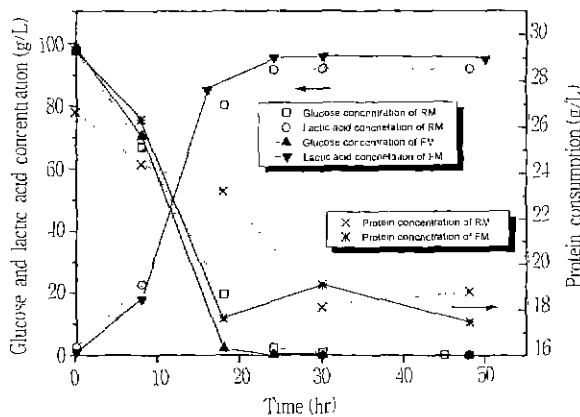


Figure 6. Glucose, protein utilization and lactic acid production in batch fermentations with reuse and fresh medium (RM: reused medium, FM: fresh medium).

정밀여과막을 이용한 세포 재순환 연속 발효 희석율(D)에 따른 영향

24 시간동안 회분 발효한 후 발효조건을 바꾸어 연속발효를 실시하였다 Figure 7과 8은 연속발효에 있어 희석율 변화에 따른 영향 및 균체량 변화를 시간에 따라 나타낸 것이다. 또한 연속 발효의 운전조건에 따른 잔류 포도당과 단백질의 농도, 당 전환율 및 젖산 생산성을 Table 2에 요약하였다. 연속발효의 초기 희석율 0.1 h⁻¹에서 48 시간 이후 정상상태를 보였으며, 이때 잔류 포도당농도는 13.5~17.9 g/L였다. 젖산 생산성에 있어서 7.24~8.52 g/L/h로 회분발효 2.20 g/L/h에 비하여 3.3 배 이상 증가하였다

연속발효에 앞서 선행된 회분발효의 미성장속도를 구한 결과, 과거 순수배지를 사용한 두 번의 회분발효에서의 구한 0.072 h⁻¹, 0.068 h⁻¹보다 낮은 0.049 h⁻¹의 수치를 얻었다. 따라서 희석율을 0.05 h⁻¹로 낮춘 후 일정시간마다 발효액을 분석하였다. 90 시간 후 8.75 g/L만의 포도당이 발효조에 존재하였으며 90.3%의 전환율을 나타내었다 발효 184 시간 이후 대부분의 당은 소모되었으며 전환율도 95% 이상을 보였다. 184 시간의 건

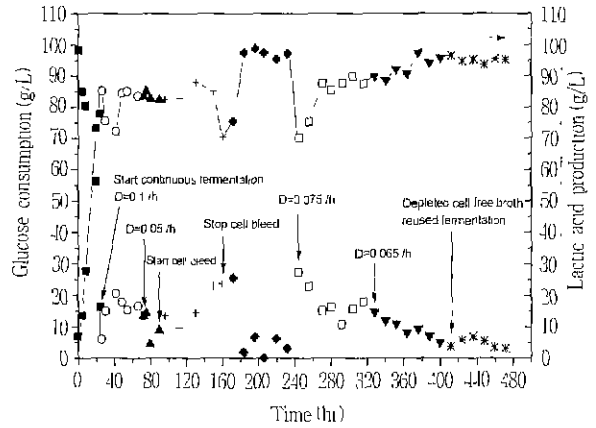


Figure 7. Profiles of lactic acid production and glucose consumption during the cell recycle continuous fermentation (D: dilution rate).

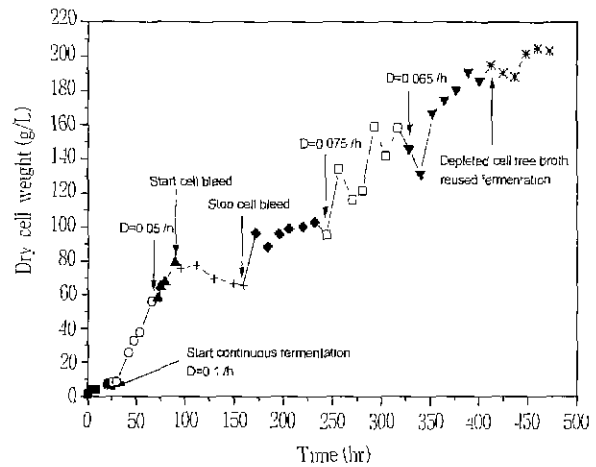


Figure 8. Change of the dry cell weight according to time courses in the cell recycle continuous fermentation (D: dilution rate).

Table 2 Effect of operating conditions on lactic acid production in the cell recycle continuous fermentation.

Culture conditions	Residual glucose concentration (g/L)	Maximum glucose conversion	Lactic acid productivity (g/L/h)	Residual protein concentration (g/L)
D= 0.1 h ⁻¹	13.5 - 17.9	0.87	7.24 - 8.52	7.6 - 8.9
D= 0.05 h ⁻¹	0.01 - 6.80	0.99	4.12 - 4.26	5.0 - 12.9
D= 0.05 h ⁻¹ (during cell bleed ^a)	8.75 - 23.1	0.88	ND	9.9 - 20.8
D= 0.075 h ⁻¹	10.70 - 17.94	0.90	6.43 - 6.73	9.2 - 15.2
D= 0.065 h ⁻¹	3.78 - 7.02	0.97	6.16 - 6.57	8.6 - 10.3
Depleted CFB ^b reused fermentation	3.07 - 6.95	0.98	6.21 - 6.34	7.79 - 10.21

^a Cell bleed rate : 5 mL/h

^b CFB: cell free broth.

조 균체량은 88.4 g/L였고, 젖산 생산성에 있어서 4.12-4.26 g/L/h로써 회석을 0.1 h⁻¹의 7.24-8.52 g/L/h에 비하여 생산성은 감소되었으나 당 소모 및 생성 젖산농도에 있어서는 우수한 결과를 나타내었다.

상업공정에서 젖산의 생산성 향상은 경제성에 직접적인 영향을 미치는 중요한 인자가 된다. 232 시간의 건조 균체량이 102.99 g/L임에도 불구하고 정밀여과막은 안정되게 운전되었으며, LBM5가 이용 할 수 있는 기질의 부하율을 증가시켜 균체의 젖산 생산성을 높이고자 회석율을 0.05 h⁻¹에서 0.075 h⁻¹로 높여주었다. 270 시간에 젖산생산성이 6.73 g/L/h으로 0.05 h⁻¹에 비하여 최대 1.6 배 증가하였으나 전환율은 87-89%로써 이는 10 일 이상의 운전에 따른 균주의 활성 저하로 보인다. 당 소모를 최대로 하기 위하여 0.065 h⁻¹으로 낮춘 후 발효한 결과 352 시간에 92% 전환율을 보였으며, 이후 계속적으로 증가하여 최고 97.4% 전환율을 얻을 수 있었다. 젖산 생산성에 있어서 6.2~6.3 g/L/h로 회분발효에 비하여 2.1 배 이상 증가하였다. 잔류포도당은 5~7 g/L로 나타났으며, 장기 운전에 따른 당의 완전 소모가 어려웠던 것으로 사료된다. 376 시간의 건조균체량은 180.3 g/L이었으며 정밀여과막의 오염현상은 역시 나타나지 않았다. 472 시간동안의 연속발효결과, 발효초기 최적의 회석율은 0.05 h⁻¹이었으며 균체량의 증가로 회석율 0.065 h⁻¹에서도 높은 효율을 얻을 수 있었다.

균체 방출에 따른 영향

90 시간 이후 활성 균체량 유지 및 정밀여과막 오염 최소화를 위해 균체방출율(bleed rate, 0.01 h⁻¹)과 회석율(0.05 h⁻¹)의 비로 정의되는 방출비를 0.2로 설정하고 균체 방출을 실시하였다. 그러나 시간의 증가에 따라 건조균체량의 급격한 감소 및 잔류 포도당이 계속적으로 증가 현상을 볼 수 있었다(Figure 8). 이는 정밀여과막의 장기운전은 가능하게 하지만, 낮은 발효율 및 불필요한 원료 사용에 따른 높은 경비로 효율적이지 못하므로 160 시간 이후 균체 방출을 중단하였다. 방출비에 대한 최적화 연구가 이루어진다면 단기적인 젖산 생산성 면에서는 무방출 세포 재순환 방식에 비하여 불리할 수 있으나, 장기 운영면에서는 균의

활성이 일정하게 유지되고 정밀여과막의 원활한 운전(20)에 있어서 유리할 것으로 예상된다.

연속발효에 있어 재사용배지에 의한 영향

회분발효와 마찬가지로 연속발효에 있어서 발효폐액의 사용가능성을 알아보기 위하여 순수배지를 이용한 연속발효 400 시간 이후 재사용배지를 사용하여 계속적으로 연속발효를 수행하였다. 실험결과 순수배지에서와 마찬가지로 95% 이상의 높은 젖산 발효율과 6.34 g/L/h의 젖산생산성을 얻을 수 있었다. 건조 균체량 측정에서 Figure 8에서 나타난 것과 같이 증가가 완만한 것을 볼 수 있었는데 배지조성 변화에 따른 영향으로 사료된다. 단백질 소모량에 있어서 재사용 회분발효에서와 결과와 유사한 경향을 나타내어, 순수배지의 경우 21.7 g/L가 소모된 반면 재사용 배지의 경우 19.2 g/L로써 조금 낮은 소모량을 나타내었다. 또한 재사용배지 연속발효에 있어 영양 염류의 보충이 없음에도 불구하고 높은 발효율을 얻을 수 있었는데, 균의 활성이 충분히 이루어진 배지에서는 더 이상의 임과 MnSO₄·H₂O 및 FeSO₄·7H₂O 등을 이용하지 않아도 충분한 발효가 이루어질 수 있다는 것을 관찰할 수 있었다. 결과적으로 회분발효와 마찬가지로 연속발효에서도 발효폐액은 우수한 재사용배지로써 사용할 수 있었다. 발효 폐액의 계속적인 재사용에 있어서의 젖산 수율의 변화와 재사용으로 나타날 수 있는 저해 물질 축적이 발효율에 미치는 영향에 대한 지속적인 연구가 이루어지면 더욱 효율적인 젖산 발효공정이 개발될 것이다.

요 약

젖산 생산에 큰 비중을 차지하는 원료비용 절감을 위한 다양한 공업적 질소원의 이용 가능성을 조사하였다. CSL를 사용하여 회분 발효한 결과, CSL 5%배지 발효시 높은 생산성을 보였으며, 정제 CSL을 사용한 배지에서 젖산 생산성은 CSL보다 약 1.21 배 증가율을 보였다. Yeast extract와 CSL 혼합질소원의 배지조성을 변화시켜 LBM5의 젖산 생성정도를 알아본 결과, 조성비율 1 : 8 일 때 우수한 발효율을 관찰할 수 있었다. 발효

폐기물의 대체 질소원 사용가능성을 조사하기 위하여 맥주공장에서 부산물로 배출되는 폐효모를 이용하여 발효시에도 CSL 5%와 비슷한 발효율을 얻었다. 연속발효 수행결과, 최적의 희석율은 $0.05\sim 0.065\text{ h}^{-1}$ 였으며 젖산 생산성에 있어서 회분발효보다 1.9~3.0 배 증가하였다.

한편 초기 순수매지에 들어가는 yeast extract양의 1/3 - 2/3를 발효폐액에 첨가하여 회분발효 및 연속발효 실험을 수행하여 높은 젖산 생산성을 얻으므로써 공정상 원료비 절감효과를 기대할 수 있었으며 잔류 영양분을 재사용함으로써 폐액량 감소에 따른 처리비용 절감이라는 이중적인 효과를 얻게 되었다.

감사의 글

본 연구는 과학재단 우수연구센터인 한국과학기술원 생물공정 연구센터의 일부 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 연속 발효실험에 도움을 주신 광주과학기술원 환경공학과 구만복 교수님께 감사드립니다

참 고 문 헌

- Datta Rathm, S. T. Tsai, P. Bonsignore, S. H. Moon, and J. R. Frank(1995), Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives, *FEMS Microbiology Reviews.*, **16**, 221-232.
- Gatje Gunther and Gerhard Gottschalk (1991), Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*, *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 446-449
- Senthuran. A., V. Senthuran, B. Mattiasson, and R Kaul (1996). Lactic acid Fermentation in a Recycle Batch Reactor Using Immobilized *Lactobacillus casei*, *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 841-853.
- Yang Xiaoping and G. T. Tsao (1995), Enhanced Acetone-Butanol Fermentation Using Repeated Fed-Batch Operation Coupled with Cell Recycle by Membrane and Simultaneous Removal of Inhibitory Products by Adsorption, *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 444-450.
- Yoo. I. K., H. N. Chang, E. G. Lee, Y. K. Chang, and S. H. Moon (1997), By-product formation in cell-recycled continuous culture of *Lactobacillus casei*, *Biotechnology Letter*, **19**, 237-240.
- Tsai S. P and S. H. Moon (1998), An Integrated Bio-conversion Process for Production of L-Lactic Acid from Starchy Potato Feedstocks, *Appl Biochem. Biotechnol.*, **70/72**, 417-428
- Lawford. H. G and J. D. Rousseau (1997), Corn Steep Liquor as a Cost-Effective Nutrition Adjunct in High-Performance *Zymomonas Ethanol* Fermentations, *Appl Biochem. Biotechnol.*, **63/65**, 287-304.
- Sreenath. H. K and T. W. Jeffries (1996), Effect of Corn Steep Liquor on Fermentation of Mixed Sugars by *Candida shehatae* FPL-702, *Appl Biochem. Biotechnol.*, **57/58**, 551-561
- Cornelius. C, Th. Erpicum. Ph. Jacques, and Ph. Thonart (1996), Comparison of Fermentation Industrial Components such as Corn Steep and Yeast Extract for Lactic Bacteria Production, *Med Fac. Landbouww Univ. Gent.*, **61/4a**, 1461-1463.
- Ye. Kaiming, S. Jun, and K Shimizu (1996), Cell recycle Broth Reuse Fermentation with Cross-Flow Filtration and Ion-Exchange Resin, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **66**, 223-226.
- U. S Patent 5,464,760 (Nov. 7, 1995). Tsai. S. P., S. H. Moon, and R. Coleman. De. Man, J. C, Rogosa. M. and Sharpe. M. E (1960), A Medium For the Cultivation of *Lactobacillii*, *J. appl. Bact.* **23**.
- Yoo. I. K. (1996), Lactic acid production and By-products Formation by High Density Culture of *Lactobacillus casei*, Ph.D. Thesis, Dept. of Chemical eng. KAIST.
- Oh. S. J and S. H. Moon (1997), Ammo acid recovery From Fermentation broth by electrodialysis, *Clean Tech.* **3**, 28-30.
- Winston Ho. W. S and Kamalesh K. Sirkar (1992). Membrane Handbook, p.217-255, Van Nostrand Reinhold, New York.
- Moon, S. H, J. H. Choi, (1998), A feasibility study on recovery of salt from Kimchi processing waste water by electrodialysis, *J. KSEE*, **20**, 811-821.
- Ronald M. Atlas (1995), Handbook of Media for Environmental Microbiology, p.124-125, CRC Press, New York.
- Benitez. T and J. M. Gasent-Ramirez, F. Castrejon, and A. C. Codon (1996), Development of New Strains for the Food Industry. Review, *Biotechnol. Prog.*, **12**, 149-163.
- International trade (1997), Korea International Trade Association(KITA).
- Xavier. A. M. R. B., L. M. D. Goncalves, J. L. Moreira, and M. J. T. Carrondo (1994), Operational Patterns Affecting Lactic acid Production in Ultrafiltration Cell Recycle Bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 320-327