

## L(+)-Lactic Acid 생산을 위한 *Enterococcus faecalis* RKY1의 유가식 배양

<sup>1</sup>위 영 중 · <sup>2</sup>김 진 남 · <sup>3</sup>윤 종 선 · <sup>1</sup>박 돈 희 · <sup>1</sup>김 도 만 · <sup>1</sup>† 류 화 원  
<sup>1</sup>전남대학교 생명과학기술학부, <sup>2</sup>물질 · 생물화학공학과, <sup>3</sup>바이오헬릭스  
(접수 : 2004. 10. 2., 게재승인 : 2004. 10. 24.)

### Fed-batch Culture of *Enterococcus faecalis* RKY1 for L(+)-Lactic Acid Production

Young-Jung Wee<sup>1</sup>, Jin-Nam Kim<sup>2</sup>, Jong-Sun Yun<sup>3</sup>, Don-Hee Park<sup>1</sup>, Doman Kim<sup>1</sup>, and Hwa-Won Ryu<sup>1</sup>†

<sup>1</sup>School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>2</sup>Department of Material Chemical and Biochemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>3</sup>BioHelix, Naju, Jeonnam 520-811, Korea

(Received : 2004. 10. 2., Accepted : 2004. 10. 24.)

Fed-batch cultures of *Enterococcus faecalis* RKY1 were performed to maximize the L(+)-lactic acid concentration in the bioreactor. The highest lactic acid concentration was obtained at around 225 g/L by intermittent feeding the concentrated glucose media containing 500 g/L of glucose and 15 g/L (or 75 g/L) of yeast extract. However, in all fed-batch cultures, volumetric productivities of lactic acid gradually decreased due to the inhibitory effect of lactic acid produced during the fermentation. The highest value of lactic acid concentration obtained in this work corresponded to around 1.5-fold increase compared with conventional batch fermentation.

**Key Words** : Lactic acid, fed-batch, fermentation, *Enterococcus faecalis*

### 서 론

젖산은 인류가 미생물의 존재를 인식하기 이전인 기원전 2,300년경 이집트인이 사용하던 치즈 찌꺼기가 발견되어 최소한 4-5천년 전부터 발효와 음식물의 보존에 널리 이용되어 오다가, 1857년 Pasteur에 의하여 미생물에 의한 발효 대사산물임이 밝혀졌다(1). 젖산은 인체에 독성이 없어 미국 식품의 약청 FDA에 의하여 GRAS (generally recognized as safe)로 승인되어, 향미제, 산미제, 보존제 등으로 식품 관련 산업에 약 70% 정도가 이용되고 있다. 또한 환경친화 용매, 세정제, pH 조절제, 흡습제, 보습제, 피부미백제, 정맥주사액, 투석액, 치석 제거제, 칼슘보강제, 빈혈치료제, 여드름 및 무좀 치료제 등의 용도로서 화장품, 제약, 화학, 금속, 전자, 페인트, 잉크, 직물, 염색, 피혁공업 등에 폭넓게 응용되고 있는 공업적

으로 중요한 유기산이다(2, 3). 특히 젖산은 생분해성 고분자인 폴리락타이드 (PLA)의 원료로서 그 이용성이 점차 증가하고 있는 추세이며, 최근 PLA를 이용한 제품들이 상용화됨에 따라서 이에 대한 원료인 젖산의 수요 역시 급격히 증가하고 있다(3-5).

젖산은 석유화학적 합성공정 및 생물공학적 발효공정에 의하여 생산되고 있으며, 생물공학적 발효공정을 통한 젖산 생산방법은 일반적으로 재생가능한 자원을 원료로 하여 상온 · 상압의 조건에서 박테리아나 곰팡이에 의해 젖산을 생산하는 환경친화적인 공정이다(6). 석유화학적 합성공정에 의해 생산된 젖산은 D(-)형 젖산과 L(+)-형 젖산이 각각 50%씩 섞여 있는 라세미 혼합물 (racemic mixture)을 형성하기 때문에 젖산의 응용 면에 많은 제약이 있는 반면, 생물공학적 발효공정은 다양한 바이오매스 자원을 원료로 하여 발효에 사용한 미생물에 따라서 D(-)형 또는 L(+)-형 젖산을 선택적으로 순수하게 생산할 수 있다는 장점이 있다(6, 7). 이와 같은 젖산의 광학적 특성은 중합시 PLA의 물성에 큰 영향을 미치는 데, 광학적으로 순수한 L(+)-형 또는 D(-)형 젖산을 단량체로 사용하여 중합한 폴리락타이드는 각각 PLLA (poly-L-lactide)와 PDLA (poly-D-lactide)로 중합되며 이 두 중합체는 용융점

† Corresponding Author : School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1842, Fax : +82-62-530-1869

E-mail : hwryu@chonnam.ac.kr

이 약 180°C 정도인 결정형 고분자 물질로 기계적 강도, 투명성, 필름, 섬유 등 가공성이 우수한 반면, DL-젖산으로 중합한 PDLA (poly-DL-lactide)는 용융점이 낮아 무정형 고분자 물질이 되는 단점을 가지고 있다(5, 8).

회분식 젖산 발효공정을 통하여 생산 가능한 발효조 내의 젖산 농도는 일반적으로 100 - 150 g/L 수준이다(6, 9, 10). 발효배지 중 고농도 glucose를 사용하여 배양할 경우 기질저해로 인하여 미생물 성장이 저해되고 생산성이 감소하며, 저농도 glucose를 기질로 하여 배양할 경우에는 생산성은 증가시킬 수 있으나, 최종 산물인 젖산 농도가 낮아 분리정제 비용 증가를 초래하게 된다. 따라서 분리정제 비용을 감소시키기 위해서는 발효액 내에 포함된 최종 산물의 농도를 최대화시킬 필요가 있다. 유가식 발효의 경우 최종산물의 저해효과로 인하여 통상적인 유가식 배양에 의한 발효 연구가 다양하게 이뤄지지 않았지만, 젖산발효의 경우 Bai 등(11, 12)이 *Lactobacillus lactis* 균주를 이용한 유가식 젖산발효를 수행하여 glucose로부터 210 g/L의 젖산을 생산한 바 있으며, *Rhizopus oryzae* 균주를 이용한 유가식 젖산발효를 통하여 옥수수대 당화액 (corn cob hydrolyzate)을 기질로 사용하여 132.4 g/L의 젖산을 생산한 바 있다. 또한 Tay와 Yang(13)은 rotating fibrous bed bioreactor를 이용한 *R. oryzae*의 유가식 배양을 통하여 corn starch로부터 127 g/L의 젖산을 생산한 바 있지만, *R. oryzae* 균주의 경우 젖산생산 속도가 느려 생산성이 낮아지는 단점이 있다.

본 연구에서는 glucose를 기질로 사용하고 젖산발효 미생물인 *Enterococcus faecalis* RKY1을 이용한 유가식 배양방법을 통하여 젖산생산을 시도하였다. 특히, 다양한 형태의 유가식 배양방법을 이용하여 젖산발효 미생물을 이용한 젖산발효에 있어서 발효액 내의 젖산 농도를 최대화시키고자 하였으며, 이 때의 젖산발효 특성을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

본 연구에 사용한 균주는 통성의 그람 양성 박테리아인 *E. faecalis* RKY1이며, 이 균주는 glycerol 및 fumaric acid를 대사하여 succinic acid를 생산할 수 있는 생물전환 특성을 가지고 있을 뿐만 아니라(14-16), glucose를 대사하여 고수율로 L(+)-젖산을 생산할 수 있는 발효특성을 보인다(6, 9, 10, 17). *E. faecalis* RKY1은 실험에 사용하기 전 2일 동안 12시간 간격으로 전배양 배지를 포함하는 바이얼에서 적용 배양시켰으며, 균주의 혐기적인 보관을 위하여 부틸고무마개로 밀봉된 6 mL 바이얼에 배양액 1 mL과 glycerol 1 mL을 혼합하여 -20°C에서 보관하였으며, 매달 계대하며 사용하였다.

### 배지 및 배양조건

균주의 성장을 위한 전배양 배지의 조성은 glucose 30 g/L, yeast extract 10 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/L이며, 회분식 배양을 위한 배지의 조성은 glucose 100 g/L, yeast extract 15 g/L이다. 균주의 전배양은 pH를 7.0으로 조절한 전배양 배지 14 mL를 포함하는 20 mL 바이얼에 보관균주 2 mL를 접종하여 진탕 배양기 (KMC-8480SF, Vision Scientific Co., Daejeon, Korea)

에서 38°C 및 200 rpm 조건으로 배양하고 2일 동안 12시간 간격으로 전배양 배지를 포함하는 20 mL 바이얼에서 적용 배양시켰으며, 발효조에 접종하기 전 전배양 배지 40 mL를 포함하는 50 mL 바이얼에서 6시간 배양시킨 후 젖산발효의 접종액으로 사용하였다.

발효조 배양은 2.5 L 발효조 (KF-2.5L, Kobiotech Co., Incheon, Korea)를 사용하여 38°C 및 200 rpm 조건으로 수행하였으며, 발효가 진행되는 동안 pH는 10 M NaOH를 사용하여 7.0으로 조절하였다. 유가식 배양을 위하여 첨가한 배지의 조성은 glucose 500 g/L, yeast extract 15 g/L를 사용하였으며, 질소원이 제한되지 않은 조건을 위하여 glucose 500 g/L, yeast extract 75 g/L를 사용하여 실험을 수행하였다. 유가식 배양은 회분식 젖산발효 개시 후 9 - 12시간 사이에 개시하였으며, 다음과 같은 네 가지 형태의 유가식 배양방법 즉, 1) 조업용량 1.35 L로 회분식 발효 개시 12시간 후 발효액 450 mL를 제거하고 새로운 배지를 450 mL 공급하는 유가식 배양 (fed-batch I), 2) 조업용량 1.35 L로 회분식 발효 개시 12시간 후 발효액 150 mL를 3회 간헐적으로 제거하고 새로운 배지 150 mL를 3회 간헐적으로 공급하는 유가식 배양 (fed-batch II), 3) 조업용량 0.9 L로 회분식 발효 개시 9시간 후 새로운 배지를 0.3 mL/min 유속으로 연속 공급하는 유가식 배양 (fed-batch III), 4) 조업용량 1.35 L로 회분식 발효 개시 9시간 후 발효액 150 mL를 3회 간헐적으로 제거하고 질소원이 제한되지 않은 새로운 배지 150 mL를 3회 간헐적으로 공급하는 유가식 배양방법 (fed-batch IV)을 통하여 실험을 수행하였다.

### 분석방법

세포성장은 분광광도계 (UV-160A, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 660 nm에서 광학밀도 (optical density)를 측정하였으며, 미리 작성된 보정곡선에 의하여 건조세포중량 (dry cell weight, g/L)으로 환산하여 나타내었다. 1 OD unit은 0.8 g-DCW/L에 해당한다. 젖산은 HPLC (Waters Co., Milford, MA, USA)를 사용하여 Aminex HPX-87H ion-exclusion column (300 × 7.8 mm, Bio-Rad, CA, USA), 이동상 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 유속 0.6 mL/min, 컬럼온도 35°C, 검출 UV 210 nm 등의 조건으로 분석하였다. Glucose는 효소키트 (YD Diagnostics, Seoul, Korea)를 사용하여 glucose oxidase-peroxidase법을 이용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

발효에 의한 젖산생산에 있어서 최종 젖산 농도를 증가시킬수록 분리정제 비용을 감소시킬 수 있으나, 일반적인 회분식 젖산발효를 통해서도 고농도 기질에 대한 저해로 인하여 100 - 150 g/L 정도의 젖산생산이 가능한 것으로 알려져 있다(6, 9, 10). 따라서 발효조 내의 젖산 농도를 최대화시키기 위하여 유가식 배양방법을 적용하여 이에 대한 발효특성을 알아보았다. 발효조 내 조업용량을 1.35 L로 하여 회분식 발효를 진행하다가 12시간 후 배양액 450 mL를 제거하고 glucose 500 g/L 및 yeast extract 15 g/L를 포함하는 새로운 배지 450 mL를 발효조에 공급하여 유가식 배양을 실시하였

다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 초기 회분식 배양 기간인 12 시간 이후에 glucose가 거의 소모되어 96.6 g/L의 젖산이 생산되었으며, 배양액 450 mL를 제거하고 glucose 500 g/L가 포함된 새로운 배지 450 mL를 공급하였을 경우 발효조 내의 glucose 농도는 약 156 g/L로 증가하였음을 알 수 있다. 미생물 성장의 경우 회분식 발효 9시간 이후 정상상태에 머무르다가 유가식 배양을 위한 배지를 공급한 후 점차 증가하여 최대 27.9 g/L까지 성장하여 20시간 이후에는 거의 일정한 수준으로 유지되는 양상을 나타내었다. 유가식 배양을 위한 배지를 공급한 이후 젖산생산 속도는 감소하는 경향을 보였는데, 이는 발효조 내에 생성된 젖산에 의한 생성물 저해로 인한 결과로 생각되지만 발효 100시간째 생산된 젖산의 농도는 최대 212.7 g/L까지 증가하였다. 이 유가식 배양의 경우 (fed-batch I) 발효가 완전히 종료되는 데에는 약 100시간이 소요되어 젖산에 대한 총괄 수율은 0.80 g/g, 비생산속도는 0.079 g/g·hr, 그리고 부피생산성은 2.1 g/L·hr로 얻을 수 있었다.

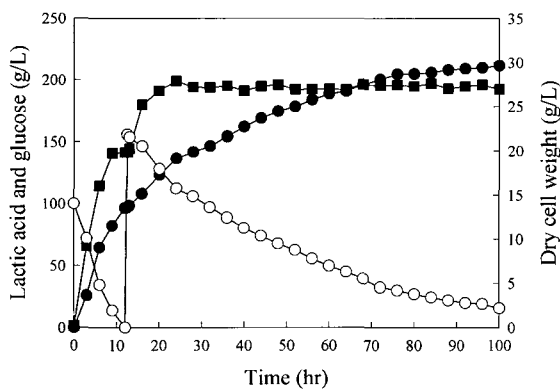


Figure 1. Fed-batch fermentation profiles with feeding the media containing 500 g/L of glucose and 15 g/L of yeast extract (fed-batch I). ● : lactic acid produced, ○ : residual glucose, ■ : dry cell weight.

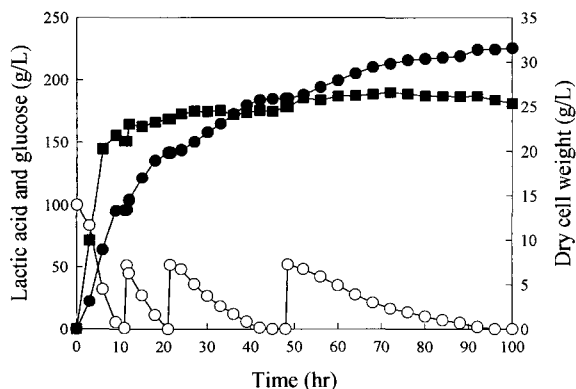


Figure 2. Fed-batch fermentation profiles with intermittent feeding the media containing 500 g/L of glucose and 15 g/L of yeast extract (fed-batch II). ● : lactic acid produced, ○ : residual glucose, ■ : dry cell weight.

발효조 내 조업용량을 1.35 L로 하여 회분식 발효를 진행하다가 11시간, 21시간, 48시간 후 각각 배양액 150 mL를 제거하고 glucose 500 g/L 및 yeast extract 15 g/L를 포함하

는 새로운 배지 150 mL를 발효조에 공급하여 간헐적인 공급 방식 (intermittent feeding)의 유가식 배양을 실시하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 회분식 배양 기간인 11시간 후 glucose가 완전히 소모되어 96.2 g/L의 젖산이 생산되었으며, 배양액 150 mL를 제거하고 glucose 500 g/L가 포함된 새로운 배지 150 mL를 공급하였을 경우 발효조 내의 glucose 농도는 51 g/L까지 증가하였다. 3회에 걸쳐서 새로운 배지를 공급한 경우 발효조 내의 glucose 농도는 약 51 - 52 g/L로 유지할 수 있었다. 미생물 성장의 경우 새로운 배지를 첨가할 때마다 다소 증가하는 경향을 보였으나 최대 26.6 g/L까지 증가하여 거의 일정한 수준을 유지하였다. 이 경우도 fed-batch I의 경우와 마찬가지로 유가식 배양을 위한 배지를 공급한 이후 젖산생산 속도가 점차 감소하는 경향을 보였는데, 이는 발효조 내에 생성된 젖산에 의한 생성물 저해로 인한 결과로 생각되지만 발효 100시간째 생산된 젖산의 농도는 최대 225.5 g/L까지 증가하였다. 이 유가식 배양의 경우 (fed-batch II) 발효가 완전히 종료되는 데에는 약 100시간이 소요되어 젖산에 대한 총괄 수율은 0.84 g/g, 비생산속도는 0.089 g/g·hr, 그리고 부피생산성은 2.3 g/L·hr로 얻을 수 있었다.

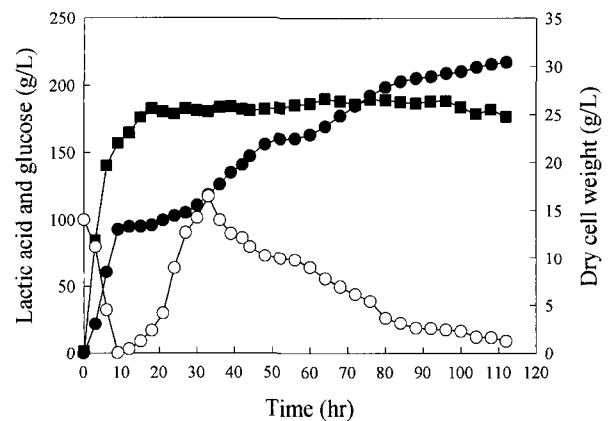
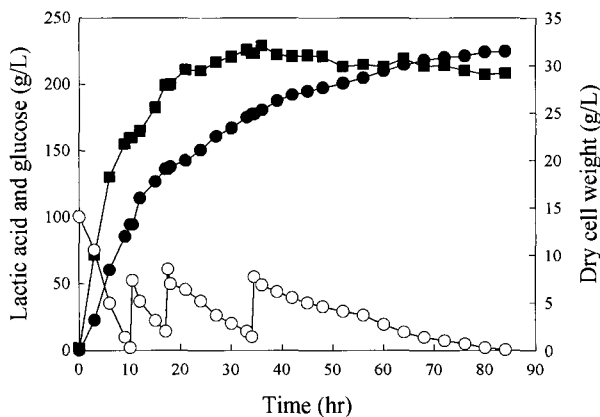


Figure 3. Fed-batch fermentation profiles with constant feeding the media containing 500 g/L of glucose and 15 g/L of yeast extract (fed-batch III). ● : lactic acid produced, ○ : residual glucose, ■ : dry cell weight.

발효조 내 조업용량을 0.9 L로 회분식 발효를 개시하여 발효를 진행하다가 9시간 후 glucose 500 g/L 및 yeast extract 15 g/L를 포함하는 새로운 배지 450 mL를 발효조에 0.3 mL/min의 일정한 유속으로 공급하는 방식 (constant feeding)의 유가식 배양을 실시하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 회분식 배양 기간인 9시간 후 glucose가 거의 소모되어 92.8 g/L의 젖산이 생산되었으며, glucose 500 g/L가 포함된 새로운 배지를 0.3 mL/min 유속으로 발효 34시간째까지 공급하였을 경우 발효조 내의 glucose 농도는 33시간째 최대 117.4 g/L까지 증가하다가 젖산이 생산됨에 따라 점차 감소하였다. 미생물 성장의 경우 18시간 동안 지속적으로 증가하다가 최대 26.5 g/L까지 성장하여 거의 일정한 농도로 유지되었다. 새로운 배지를 공급하기 시작한 9시간 이후에 젖산 생산속도가 감소하였다가 27시간 이후에 증가하는 경향을 보였으며

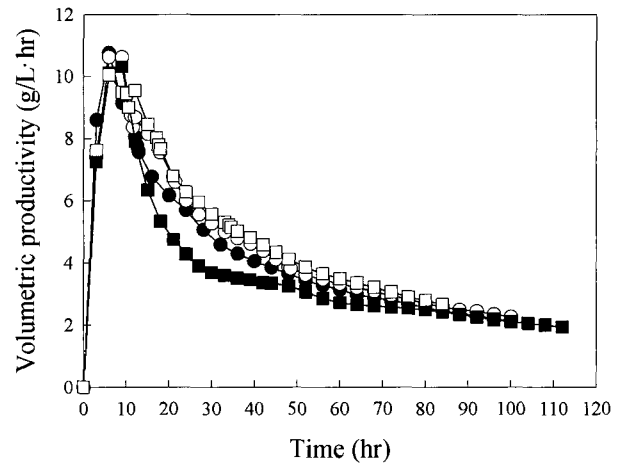
발효 112시간째 최대 217.3 g/L의 젖산이 생산되었다. 이 경우 발효가 종료되는데 fed-batch I과 fed-batch II의 경우에 비하여 12시간 정도 더 지연되었는데, 이는 회분식 배양 후 새로운 배지를 일정 유속으로 공급하였기 때문에 발효 9시간부터 27시간까지 충분한 기질이 공급되지 못하였기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 이 유가식 배양의 경우 (fed-batch III) 발효가 완전히 종료되는 데에는 약 112시간이 소요되어 젖산에 대한 총괄 수율은 0.81 g/g, 비생산속도는 0.078 g/g·hr, 그리고 부피생산성은 1.9 g/L·hr로 얻을 수 있었다.



**Figure 4.** Fed-batch fermentation profiles with intermittent feeding the media containing 500 g/L of glucose and 75 g/L of yeast extract (fed-batch IV). ● : lactic acid produced, ○ : residual glucose, ■ : dry cell weight.

유가식 배양 시 공급되는 배지의 yeast extract 농도를 glucose 농도 증가량에 비례하여 75 g/L로 증가시켜 질소원이 제한되지 않은 조건에서의 유가식 젖산발효 특성을 알아 보았다. 이 경우 비생산속도 및 생산성에 있어서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었던 fed-batch II 방식을 사용하여 발효조 내 조업용량을 1.35 L로 하여 회분식 발효를 진행하다가 10시간, 17시간, 34시간 후 각각 배양액 150 mL를 제거하고 glucose 500 g/L 및 yeast extract 75 g/L를 포함하는 새로운 배지 150 mL를 발효조에 공급하여 간헐적인 공급방식 (intermittent feeding)의 유가식 배양을 실시하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 회분식 배양 기간인 10시간 후 glucose가 거의 소모되어 94.5 g/L의 젖산이 생산되었으며, 배양액 150 mL를 제거하고 glucose 500 g/L가 포함된 새로운 배지 150 mL를 공급하였을 경우 발효조 내의 glucose 농도는 52 g/L까지 증가하였다. 3회에 걸쳐서 새로운 배지를 공급한 경우 발효조 내의 glucose 농도는 약 52 - 60 g/L로 유지할 수 있었다. 미생물 성장의 경우 36시간째까지 지속적으로 증가하여 최대 32.1 g/L까지 성장하여 fed-batch I, II, III의 경우보다는 더 높은 결과를 얻을 수 있었다. 발효 84시간 만에 glucose가 완전히 소모되어 젖산으로 대사되어 앞선 실험들의 경우보다 더 빠르게 젖산발효가 진행되었음을 알 수 있지만, 배지 첨가 횟수가 증가할수록 glucose 소모속도는 점차 감소하는 경향을 나타내었으며 발효 84시간째 생산된 젖산의 농도는 최대 224.8 g/L까지 증가하였다. 이 유가식 배양의 경우 (fed-batch IV) 젖산에 대한 총괄 수율은 0.84 g/g, 비생산속

도는 0.092 g/g·hr, 그리고 부피생산성은 2.7 g/L·hr로 얻을 수 있었다.



**Figure 5.** Time courses of lactic acid productivities during fed-batch fermentations. ● : fed-batch I, ○ : fed-batch II, ■ : fed-batch III, □ : fed-batch IV.

각각의 유가식 배양에 있어서 시간에 따른 젖산의 부피생산성 변화에 대하여 Fig. 5에 나타내었다. 네 가지 형태의 유가식 배양을 통하여 얻어진 젖산의 부피생산성 변화는 거의 유사한 양상을 나타내었는데, 회분식 배양 6 - 9시간 사이에 최대 생산성을 보이다가 그 이후에는 점차 감소하는 양상을 나타내었다. 이는 발효가 진행되는 동안 생산된 젖산에 기인한 생성물 저해의 결과로 생각된다. 생성물 저해는 기질저해와 함께 발효공정에서 생산성을 저하시키는 주요 원인으로 작용한다. 특히, 젖산발효의 경우 세포막에 존재하는 해리되지 않은 젖산과 해리된 젖산이 세포막을 산성화시켜 양성자 구동력이 파괴되면서 영양원 수송이 저해되어 젖산생산에 의하여 얻어진 에너지가 미생물 성장에 이용되지 못하고 세포의 pH 항상성을 유지하는데 소모되어 미생물 성장이 저해된다(18, 19). 또한 세포 내부로부터 H<sup>+</sup>과 젖산의 공동수송의 감소에 의해 세포 내부에 젖산이 축적되어 세포막의 산성화가 야기되고, 이에 따라 세포 내부의 pH가 5.0 이하가 되면 pH에 민감한 enolase의 활성이 크게 감소하여 해당과정 (glycolytic pathway)이 정지한다고 보고된 바 있다(20, 21). 이와 같은 젖산의 생성물 저해로 인하여 젖산의 부피생산성은 크게 감소하였지만, 일반적인 회분식 젖산발효에서는 심한 기질저해로 인하여 150 g/L 이상의 젖산생산이 불가능하지만 본 연구의 유가식 배양을 통하여 발효조 내의 젖산농도를 최대 225 g/L까지 증가시킬 수 있었다.

본 연구에서 얻은 유가식 젖산발효 결과와 기존 보고된 유가식 젖산발효 결과를 Table 1에 비교하였다. *L. lactis*를 이용하여 glucose로부터 최대 210 g/L의 젖산을 생산한 Bai 등(11)의 연구결과와 비교하여 본 연구에서 사용한 *E. faecalis* RKY1은 약 225 g/L의 젖산을 생산하는 것이 가능하였으며, 젖산 부피생산성 면에서도 *L. lactis*(11) 및 *R. oryzae*(12, 13) 균주들과 비교하여 더 높은 결과를 얻을 수 있었다. 이와 같이, 본 연구에서는 유가식 배양에 의한 젖산발효를 통하여

최종 젖산의 농도를 220 g/L 이상으로 증가시킬 수 있었으나 생성물 저해로 인하여 생산성이 감소되므로, 발효를 진행하는 동안 전기투석, 이온교환, 추출 등을 통하여 *in situ*로 젖산을 분리함으로써 젖산 생산성을 향상시킬 수 있는 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

**Table 1.** Data reported on fed-batch fermentations for lactic acid production

Microorganism	Substrate	Lactic acid (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/L · hr)	Reference
<i>Lactobacillus lactis</i> BME5-18M	Glucose	210.0	0.97	2.2	(11)
<i>Rhizopus oryzae</i> HZS6	Corn cob	132.4	-	1.4	(12)
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	Corn starch	127.0	1.00	1.7	(13)
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	Glucose	224.8	0.84	2.7	this work

Yield : g-lactic acid produced/g-substrate consumed.

## 요약

*E. faecalis* RKY1을 사용한 유가식 배양을 통하여 기질저해를 받지 않도록 하여 발효조 내의 젖산 농도를 최대화시키고자 하였다. 유가식 배양에 의한 젖산발효는 생성물인 젖산으로 인한 저해가 심하여 부피생산성이 감소하였지만, 네 가지 형태의 유가식 배양을 실험한 결과 발효 도중에 발효액을 수회 제거하고 질소원이 제한되지 않은 배지를 수회 공급하는 간헐적인 유가식 배양의 경우에 가장 나은 결과를 얻을 수 있었으며, 이 경우 발효 84시간째 생산된 젖산의 농도는 최대 224.8 g/L까지 증가하였고 젖산에 대한 총괄 수율은 0.84 g/g, 비생산속도는 0.092 g/g · hr, 그리고 부피생산성은 2.7 g/L · hr로 얻을 수 있었다.

## REFERENCES

- Davison, B. E., R. M. Llanos, M. R. Cancilla, N. C. Redmann, and A. J. Hillier (1995), Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria, *Int. Dairy J.* **5**, 763-784.
- Benninga, H. (1990), A History of Lactic Acid Making, pp. 1-59, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Datta, R., S. P. Tsai, P. Bonsignore, S. H. Moon, and J. R. Frank (1995), Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives, *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 221-231.
- Wilke, D. (1999), Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and the fermentation industry, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 135-145.
- Vink, E. T. H., K. R. Rábago, D. A. Glassner, and P. R. Gruber (2003), Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide(PLA) production, *Polym. Degrad. Stabil.* **80**, 403-419.
- Yun, J. S., Y. J. Wee, and H. W. Ryu (2003), Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1, *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 416-423.
- VickRoy, T. B. (1985), Lactic acid, In *Comprehensive Biotechnology Vol. 3*, Moo-Young M., Ed., pp. 761-776, Pergamon Press, New York.
- Lunt, J. (1998), Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers, *Polym. Degrad. Stabil.* **59**, 145-152.
- Yun, J. S. and H. W. Ryu (2001), Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1, *Process Biochem.* **37**, 235-240.
- Oh, H., Y. J. Wee, J. S. Yun, and H. W. Ryu (2003), Lactic acid production through cell-recycle repeated-batch bioreactor, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **105/108**, 603-613.
- Bai, D. M., Q. Wei, Z. H. Yan, X. M. Zhao, X. G. Li, and S. M. Xu (2003), Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid, *Biotechnol. Lett.* **25**, 1833-1835.
- Bai, D. M., S. Z. Li, and F. Q. Lin (2004), Production of ammonium lactate by fed-batch fermentation of *Rhizopus oryzae* from corn cob hydrolyzate, *Chem. Res. Chin. Univ.* **20**, 403-406.
- Tay, A. and S. T. Yang (2002), Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 1-12.
- Ryu, H. W., K. H. Kang, and J. S. Yun (1999), Bioconversion of fumarate to succinate using glycerol as a carbon source, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77/79**, 511-520.
- Ryu, H. W., K. H. Kang, J. G. Pan, and H. N. Chang (2001), Characteristics and glycerol metabolism of fumarate-reducing *Enterococcus faecalis* RKY1, *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 119-124.
- Wee, Y. J., J. S. Yun, and H. W. Ryu (2002), Characteristics of succinic acid production by *Enterococcus faecalis* RKY1 immobilized in a hollow fiber bioreactor, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 182-188.
- Wee, Y. J., J. S. Yun, D. H. Park, and H. W. Ryu (2004), Biotechnological production of L(+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*, *Biotechnol. Lett.* **26**, 71-74.
- Fu, W. and A. P. Mathews (1999), Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen, *Biochem. Eng. J.* **3**, 163-170.
- Goncalves, L. M. D., A. Ramos, J. S. Almeida, A. M. R. B. Xavier, and M. J. T. Carrondo (1997), Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 346-350.
- Assinder, S., L. V. J. Eynstone, R. P. Shellis, and G. H. Dibdin (1995), Inhibition of acid production in *Streptococcus mutans* R9: inhibition constants and reversibility, *FEMS Microbiol. Lett.* **134**, 287-292.
- Magni, C., D. Memndoza, W. N. Konings, and J. S. Lolkema (1999), Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: resistance against lactate toxicity at low pH, *J. Bacteriol.* **181**, 1451-1457.