

## 고생산성 젖산생성균 분리 및 배양 최적화

조규홍\* · 조윤경 · 홍승서 · 이현수

삼양그룹 선일연구소, 발효연구실

### Isolation of Microorganism with High Productivity and Cultivation Optimization for Lactic Acid Production

Kyu-Hong Cho\*, Yun-Kyung Cho, Seung-Suh Hong and Hyun-Soo Lee

Fermentation group, Sun Hill Lab., Sam Yang Group R and D Center,  
63-2, Hwaam-dong, Yousung-gu, Taejeon 305-348, Korea

**Abstract** — In order to screen microorganism producing lactic acid with high productivity from nature, we used a medium containing 100 g/l glucose and selected several microorganisms producing more than 80 g/l L-lactic acid. We investigated their physiological characteristics and compared them. The best microorganism was identified as *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. The optimum pH for growth and production of lactic acid was 6.0 and this strain showed the highest growth rate at around 30°C, but the optimum temperature for lactic acid production was 45°C. The growth was inhibited proportionally from 50 g/l to 300 g/l of glucose and the maximal cell mass increased according to increasing the concentration of corn steep liquor (CSL) protein up to 30 g/l. In batch fermentation for lactic acid production, we produced 128 g/l L-lactic acid with 20 g/l CSL protein and 150 g/l glucose in 35 hours. In pH-stat fed-batch fermentation, we were able to produce 183 g/l L-lactic acid.

젖산(Lactic acid, 2-hydroxy propionic acid)은 자연계에 널리 존재하는 유기산으로 1881년 미국에서 유기산중 처음으로 발효법에 의해 상업적으로 생산되었다(1). 현재에는 발효에 의한 생물공학적인 방법과 화학적인 합성에 의해 제조되고 있으며 1991년 세계적 생산량은 59,000톤 규모로 이중 약 70%가 발효법에 의해 생산되어지는 것으로 추정되어진다(2). 그 동안 식품첨가물용 산미제, 공업용 및 의약 화장품 원료로 사용되어 왔으나 최근 생분해성 플라스틱인 polylactide의 원료로서 재인식되어 효율적인 생산을 위하여 많은 연구가 진행되고 있으며 세계적인 생산량도 급증하는 추세에 있다(3, 9).

젖산생산 균주로 보고되고 있는 것을 보면 대부분 *Lactobacillus* 속의 젖산균으로서 영양요구성이 까다로운 반면 높은 수율로 lactic acid 만을 생산할 수 있어 좋은 연구 대상이었다(1). 이 때에 경제적인 배지선택을 위하여 산업부산물을 이용하고자 하는 노력들이 있어 왔으며 특히 미국과 유럽에서는 cheese 산업의 부산물인 유청을 이용하고자 하는 많은 연구

결과가 있었다(4, 5).

본 논문에서는 비교적 연구가 되어있지 않은 전분당 제조 부산물인 corn steep liquor(CSL)를 사용시에도 높은 생산성을 지닌 젖산균을 자연계로부터 분리하고 그 특성을 조사한 후 경제적인 젖산생산을 위하여 배양조건을 확립하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 배지

토양유산균 선별용 배지는 0.04% bromo cresol purple(BCP)을 첨가한 DIFCO 사 MRS 배지(BCP-MRS 배지)를 사용하였고 접종을 위한 seed 배양용으로 MRS 배지를 사용하였으며 고농도 젖산생산균 선별을 위하여는 젖산생산용배지 I(Table 1)을 사용하였다. 선별된 균주를 사용한 1l 이상의 배양에서는 선일포도당(주)의 CSL이 첨가된 젖산생산용배지 II(Table 2)를 사용하였다.

#### 균의 분리

토양에서 채취한 검체를 멸균 생리 식염수로 10배씩 단계적으로 희석한 후 BCP-MRS 배지에서 40°C

**Key words:** Lactic acid, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, isolated strain, corn steep liquor

\*Corresponding author

**Table 1. The compositions of lactic acid production media I**

Elements	Content (g/l)
Glucose	100
Yeast extract	5
Sodium acetate	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.6
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.03
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
CaCO <sub>3</sub>	60

**Table 2. The compositions for lactic acid production media II.**

Elements	Content (g/l)
Glucose	150
CSL protein	20
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.03
CaCO <sub>3</sub>	90

CSL of Sunhill glucose company was used and protein of CSL was analyzed by Lowry method.

에서 3일간 평판배양하였다. 산생성에 의해 적색을 나타내는 colony를 다시 BCP-MRS 배지에 streaking 하여 균을 순수 분리한 후 catalase test를 실시하여 이중 음성인 colony 만을 40°C, 24시간 MRS 배지에서 액침배양하였다. 이렇게 얻어진 균들을 젖산생산용 배지 I에 접종하여 80 g/l 이상의 젖산을 생산하는 균주를 선별하였다(Fig. 1).

**미생물 보존**

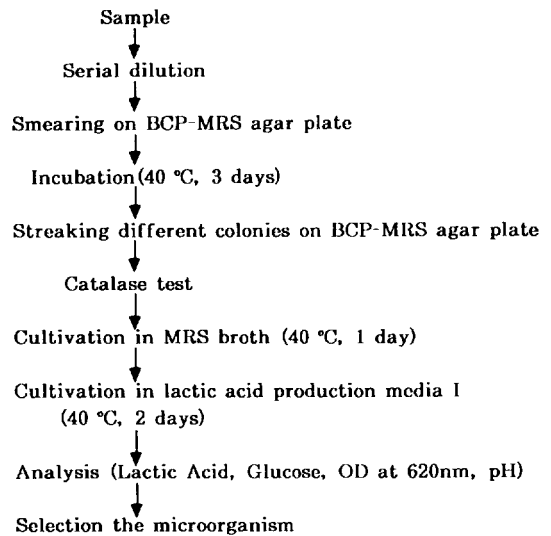
MRS 배지에서 배양한 균체를 20% glycerol 용액에 현탁하여 deep freezer(-80°C)에 넣어 보관하였다.

**분리균의 동정 실험**

기본적인 방법은 Bergey's manual을 따랐으며 분리균의 당발효 실험은 API 사(프랑스)의 CHL50 당 test kit를 이용하여 공급회사의 실험방법에 따라 37°C에서 48시간 동안 배양하면서 색변화를 관찰하였다.

**발효액의 분석**

상대적인 균의 농도를 측정하기 위하여 spectrophotometer(Kontron 사 Uvikon 941)를 사용하여 620 nm에서 optical density를 측정하였다. 포도당 및 L-lactic acid의 분석을 위하여 YSI 사(미국)의 생화학



**Fig. 1. Procedure for isolation of microorganisms producing large amount of lactic acid.**

**Table 3. The conditions of HPLC analysis for organic acid**

Item	Condition
Instrument	Waters HPLC
Column	Bio-rad Aminex HPX 87H
Column temp.	41°C
Detector	UV detector (436 nm)
Eluent	0.006 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sol'n
Flow rate	0.6 ml/min.
Post column reagent	BTB 0.2 mM pH 10.0

분석기(YSI 2700)를 사용하여 분석하였으며 다른 유기산 및 D-lactate가 포함된 전체 lactic acid를 분석하기 위하여 HPLC를 사용하였고 분석 조건은 Table 3에 정리하였다.

**결과 및 고찰**

**토양에서의 고생산성 젖산 생성균 분리**

수원 근교에서 토양샘플을 채취하여 젖산균 선별에 이용하였다. BCP-MRS 평판배지에서 젖산균으로 추정되는 200 여 균락에 대하여 젖산생산용 배지 I에 접종하여 80 g/l 이상의 젖산을 생산한 균주를 1차로 선별하였다. 이들을 CSL이 함유된 젖산생산용 배지 II에서 배양하여 젖산 생산성을 조사하고 세포 성장 및 젖산 생성에 대한 온도효과를 살펴 본 후 최종적으로 1균주를 선별하여 동정하였다.

Table 4. Biochemical characteristics of isolated strain

Characteristics	Results
*Growth in 0.02% NaN <sub>3</sub>	-
*Catalase test	-
*Gram staining	+
*Gas from glucose	-
*Major fermentation product from carbohydrate	Lactic acid
*Lactic acid configuration	L(+)-form
*Growth at 15°C	+
*Growth at 45°C	+
*Carbohydrate fermentation test	
Glycerol	-
Erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	-
Ribose	+
D-xylose	-
L-xylose	-
Adonitol	-
β-methylxyloside	-
Galactose	+
D-glucose	+
D-Fructose	+
D-mannose	+
L-sorbose	+
Rhamnose	+
Dulcitol	-
Inositol	±
Mannitol	+
Sorbitol	+
α-methyl-D-mannoside	-
α-methyl-D-glucoside	+
N-acetylglucosamine	+
Amygdalin	+
Arbutin	+
Esculin	+
Salicin	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	+
Melibiose	-
Sucrose	+
Trehalose	+
Inulin	-
Melezitose	+
D-raffinose	-
Amidon	-
Glycogen	-
Xylitol	-
β-gentiobiose	+
D-turanose	+
D-lyxose	-
D-tagatose	+
D-fucose	-
L-fucose	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Gluconate	±
2-Ketogluconate	-
5-Ketogluconate	-

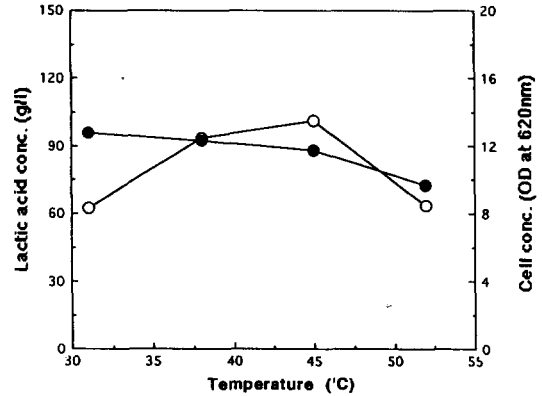


Fig. 2. Effect of temperature on lactic acid production and cell growth. Fermentation was carried out in production media I for 24 hours.

○— Lactic acid concentration  
●— Cell concentration

#### 균주의 동정

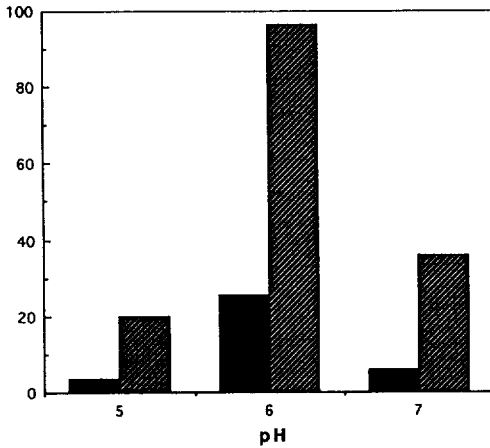
최종적으로 선별된 균주는 미호기성이며 catalase 음성이고 포자가 없는 그람양성 간균이었고 유산생성 대사는 동형발효로서 다른 유기산을 생산하지 않았다. 동정 시험결과는 Table 4에 나타내었다. 이 균은 생리학적 특성으로부터 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*로 동정되었다. 동정은 Bergey's manual 및 API 사의 당 test kit의 identification table에 근거하였다.

#### 젖산생성에 미치는 온도 및 pH 영향

분리균주 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*의 젖산생성 및 균의 생육에 관한 온도효과를 Fig. 2에 나타내었다. 세포의 생육은 30°C 부근에서 가장 왕성하였고 온도가 증가할수록 생육은 감소하는 것으로 나타나 전형적인 streptobacterium 임을 알 수 있었다. 젖산 생성은 45°C 까지 온도가 증가할 수록 좋은 결과를 나타내었으나 52°C에서는 생성능이 급격히 떨어짐을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 상대적으로 낮은 세포농도에서 높은 생산성으로 젖산을 생성시키고자 할 때에는 45°C가 적정온도임을 알 수가 있었다. pH 효과를 관찰하기 위하여 1l jar fermentor에서 ammonium hydroxide 용액(14.8 N)으로 pH 조절을 하면서 배양하였다. 젖산생성 및 균의생육에 대한 최적 pH는 6.0이었다(Fig. 3).

#### 분리균의 전분유래 당 이용성

*L. casei* subsp. *rhamnosus*의 전분유래 당 이용성 test를 실시한 결과 Table 5와 같았다. 표에서 나타난



**Fig. 3. Effect of pH on lactic acid production and cell growth.** Fermentation was carried out in 1 liter fermentor at 45°C for 24 hours. pH was controlled by ammonium hydroxide solution.  
 ■ Cell conc. (OD at 620 nm)  
 ▨ Lactic acid conc. (g/l)

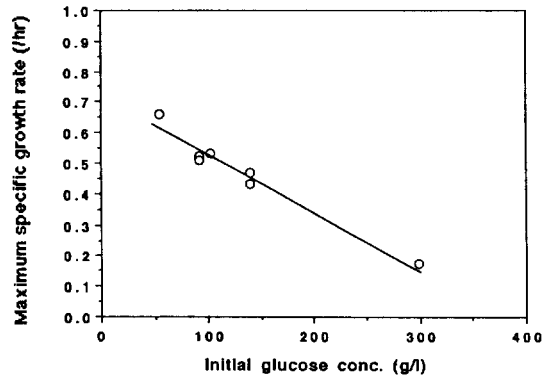
**Table 5. The carbohydrate fermentation test for starch sugar**

Carbohydrate	Results
Glucose	+
Fructose	+
Maltose	+
Isomaltose	+
Pannose	-
Maltotriose	-
Maltotetraose	-
Maltopentaose	-

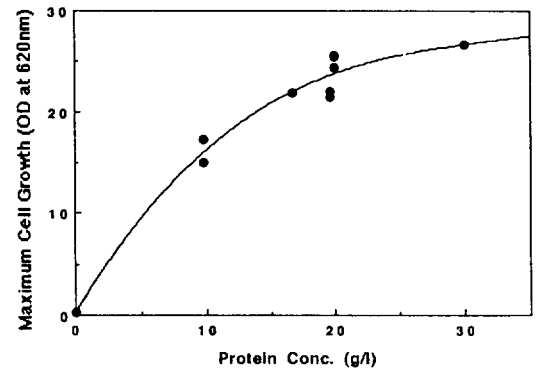
바와 같이 2당류까지는 이용이 가능하였으나 3당류 이상은 발효를 하지 못하였다. 포도당을 탄소원으로 사용할 경우 92% 수율로 젖산이 생성되었으며 대부분이 L(+)-lactic acid로서 D(-)-lactic acid는 2~3% 정도였다. 전분당 공업에서 포도당 결정과정 중 생기는 부산물인 hydrol을 젖산생산시의 탄소원으로 사용할 경우 위의 당이용성 결과로 볼 때 성분중 96% 이상을 이용할 수 있음을 알 수 있었다.

**균의 생육에 미치는 초기 포도당 및 CSL 농도 효과**

젖산은 젖산균이 에너지를 얻기 위하여 생성하는 1차 대사산물이므로 균의 성장 속도 및 최대 균체량은 젖산 생성속도에 큰 영향을 미친다. 초기의 고농도 포도당이 균의 생육을 저해한다는 사실은 잘 알려진



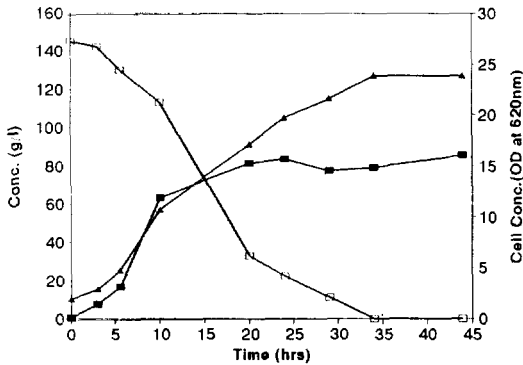
**Fig. 4. Inhibitory effect of glucose on cell growth.** Fermentation was carried out in 1 liter fermentor at 45°C, pH 6.0.



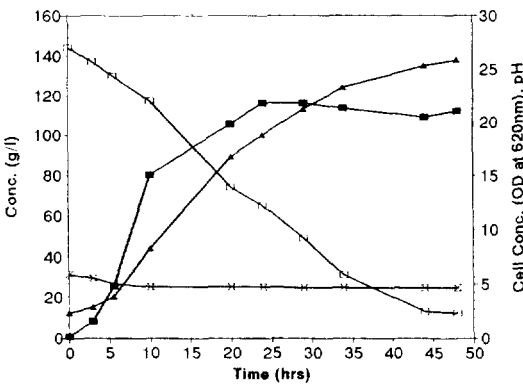
**Fig. 5. Effect of CSL protein concentration on cell growth.** Fermentation was carried out in 1 liter fermentor at 45°C, pH 6.0. Protein of CSL was analyzed by Lowry method.

사실이다(6). 분리균주의 경우에도 Fig. 4에 나타난 바와 같이 50 g/l 이상의 농도에서는 포도당 농도가 증가할수록 비례적으로 세포생장이 저해되어 문헌(7)의 결과와 잘 일치함을 알 수 있었다. 질소원 및 기타 미량원소 공급원으로 CSL을 사용시 CSL의 농도에 따른 최대균체량을 Fig. 5에 나타내었다. 이 때 사용한 배지는 기본적으로 젖산생성 배지 II로서 CSL 첨가량은 Lowry method로 측정된 protein 함량을 기준으로 하였다. 배지내 여러 성분들의 CSL 대체실험에서 질소원 및 무기염류, 비타민 등의 미량원소는 CSL로서 대체가 가능하였으나 *L. casei*의 allosteric enzyme인 L-LDH(L-lactate dehydrogenase)의 activator의 하나인 망간이온(8)은 적당량 첨가하여 주어야만 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

**pH 조절제에 따른 회분배양의 효과**



**Fig. 6.** Trends in batch culture using ammonium hydroxide for pH adjustment. pH was controlled at 6.   
 -■- Cell, -□- Glucose, -▲- L-Lactate

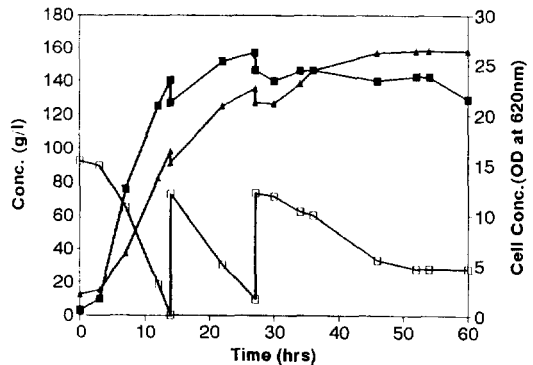


**Fig. 7.** Trends in batch culture using calcium carbonate for pH adjustment.   
 -■- Cell, -□- Glucose, -▲- L-Lactate, -x- pH

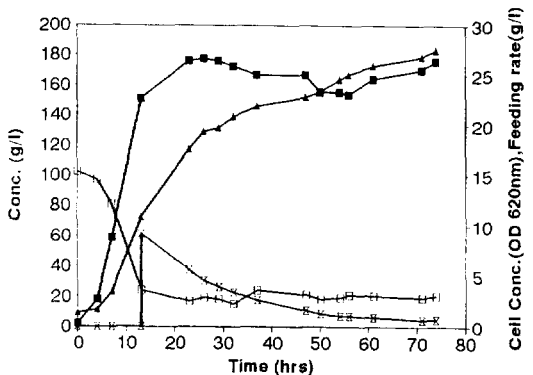
pH 조절을 ammonium hydroxide와 calcium carbonate로 각각 조절하면서 회분식 배양을 수행하였다. Ammonium hydroxide 용액으로 pH를 조절시(Fig. 6)에는 pH 6.0으로 하였으며 calcium carbonate의 경우(Fig. 7)에는 초기의 배지 pH를 6.0으로 하였으나 젖산이 생성됨에 따라 pH가 낮아져 배양 10시간 후에는 pH가 4.8까지 낮아졌다. 초기의 균의 성장속도 및 젖산생성 속도는 두 경우가 비슷하였으나 배양 후기에는 calcium carbonate로 pH를 조절한 경우에 젖산생성 속도가 훨씬 떨어짐을 알 수 있었다. Ammonium hydroxide 용액으로 pH 조절시에는 전체적인 배양액의 부피가 12% 정도 늘어났으며 35시간 만에 128 g/l L-lactate를 얻을 수 있었다.

**유기식 배양에 의한 젖산의 생산**

고농도의 젖산을 생산하기 위하여 유기식 배양을



**Fig. 8.** Results of fed-batch fermentation with intermittent feeding method. Fermentation was carried out at 45°C, pH 6.0. CSL protein (20/5/5 g/l) was fed with glucose.   
 -■- Cell, -□- Glucose, -▲- L-Lactate



**Fig. 9.** Results of fed-batch fermentation with pH-stat method. Fermentation was carried out at 45°C, pH 6.0. CSL protein (30 g/l) was fed at initial time.   
 -■- Cell, -□- Glucose, -▲- L-Lactate, -x- Fed Glc.

시도하였다. 초기에 균이 비교적 잘 자라는 것을 감안하여 포도당 농도를 100 g/l로 하고 포도당이 소모됨에 따라 70 g/l의 포도당을 간헐적으로 넣어 주는 방법(Fig. 8)과 젖산생성에 의해 pH가 낮아짐에 따라 소모되는 포도당 함량을 계산하여 pH 조절제인 ammonium hydroxide 용액과 함께 넣어 주는 pH-stat 방법(Fig. 9)을 사용하였다. 간헐적으로 포도당을 주입하는 경우에는 포도당을 넣어 줄 때마다 유산생성 속도가 현저히 느려짐을 확인할 수 있었다. 이를 극복하기 위하여 pH-stat을 이용하여 포도당 함량을 20 g/l로 유지한 경우에는 유산 생성속도가 완만하게 감소하여 183 g/l L-lactate를 얻을 수 있었다.

## 요 약

토양샘플로부터 높은 생산성을 지닌 유산생성 균주를 탐색하기 위하여 100 g/l 포도당이 함유된 배지에서 80 g/l 이상의 젖산을 생산하는 균주를 선별한 후 질소원으로 CSL을 사용한 배지에서 젖산생산에 적합한 우수균주 1주를 선발하였다. 당 이용성 test 방법으로 동정한 결과 선발균주는 *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*로 확인되었다. 이 균의 세포성장 및 젖산 생성의 최적 pH는 6.0이었다. 30°C 부근에서 가장 좋은 세포 성장을 보였으나 젖산의 생산은 45°C 에서 가장 좋았다. 배양시 초기 포도당 농도 50 g/l에서 300 g/l까지 비례적으로 세포 성장이 저해를 받았다. CSL protein 첨가량이 증가할 수록 최대 균체량은 증가하여 CSL protein 30 g/l에서 최대치를 나타내었다. 회분배양에서는 20 g/l CSL protein과 150 g/l 포도당을 함유한 배지에서 35시간에 128 g/l L-lactate를 생산할 수 있었고 pH-stat을 이용한 유가식 배양에서는 183 g/l L-lactic acid를 얻을 수 있었다.

## 참고문헌

1. Vick Roy, T.B. 1984. *Lactic acid*. Pp. 761-776. In Moo-Young (ed.), *Comprehensive biotechnology*, Vol. 3, Pergamon press, Oxford.
2. *Lactic acid and its derivatives: A global review*, HRA Inc. 1992.
3. *Chemical marketing reporter*, Vol. 239, No. 24. 1991.
4. Roy, D., J. Goulet, and A. LeDuy. 1986. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 206-213.
5. Boyaval P. and J. Goulet. 1988. Optimal conditions for production of lactic acid -from cheese whey permeate by Ca-alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 725-728.
6. Luedeking, R. and E.L. Piret. 1959. Transient and steady state in continuous fermentation, theory and experiment. *J. Biochem. Microb. Tech. Eng.* **1**: 431-459.
7. Goncalves, L.M.D., A.M.R.B. Xavier, J.S. Almeida, and M.J.T. Carrondo. 1991. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 314-319.
8. Hansel, R., U. Mayr, K.O. Stetter, and O. kandler. 1977. Comparative studies of lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* and *Lactobacillus curvatus*. *Arch. Microbiol.* **112**: 81-93.
9. Lipinsky, E.S. 1981. Chemicals from biomass: petrochemical substitution options. *Science.* **212**: 1465-1471.

(Received 23 September 1994)