

전처리된 섬유소계 바이오매스로부터 Lactic acid 생산

안수진* · Roent Dune Cayetano** · 김태현** · 김준석*†

*경기대학교 화학공학과
443-760 경기도 수원시 영통구 광교산로 154-42
**국립공주대학교 환경공학과
330-717 충남 천안시 서북구 천안대로 1223-24
(2014년 5월 15일 접수, 2014년 6월 2일 수정본 접수, 2014년 6월 7일 채택)

Lactic acid Production from Hydrolysate of Pretreated Cellulosic Biomass by *Lactobacillus rhamnosus*

Su Jin Ahn*, Roent Dune Cayetano**, Tae Hyun Kim** and Jun Seok Kim*†

*Department of Chemical Engineering, Kyonggi University, 154-42 Gwanggyosan-ro, Yeongtong-gu, Suwon 443-760, Korea

**Department of Environmental Engineering, Kongju National University,

1223-24 Cheonan-daero, Seobuk-gu, Cheonan, Chungnam 330-717, Korea

(Received 15 May 2014; Received in revised form 2 June 2014; accepted 7 June 2014)

요 약

Lactic acid(젖산)는 가장 널리 사용되는 Hydroxy-carboxylic acid로서 일반적으로 식품, 화장품, 의약품 및 화학산업의 원료로 사용된다. 하지만 다양한 분야의 적용과 대량생산의 광범위한 잠재력에도 불구하고 원재료의 높은 가격으로 인하여 Lactic acid 생산의 주된 문제가 된다. Lactic acid는 발효 또는 화학적 합성에 의하여 얻어진다. 최근, 자연적으로 생산되는 Lactic acid의 시장 수요가 증가하여 미생물 발효 방법에 의한 Lactic acid 생산을 일반적으로 사용한다. 일반적으로 Lactic acid 생산의 원재료는 순수한 전분 또는 글루코오스를 이용한다. 이의 경제적인 원재료의 대안으로, 지구상에서 가장 풍부한 재생가능 자원인 바이오매스를 가수분해물로 전환하여 이용한다. 본 연구에서는 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863을 이용하여 전처리 된 가수분해물로부터 발효 방법에 의해 L(+)-Lactic acid를 생산하였다. 전처리 된 가수분해물은 암모니아 침출 공정(AP) 후 효소 당화에 의하여 얻었다. 효과적으로 Lactic acid 생산 수율과 전환율을 높이기 위하여 순수 글루코오스 조건에서 배지, 온도, 글루코오스 농도를 조절하여 수행하였다. 발효 최적조건에서 순수 글루코오스와 가수분해물의 Lactic acid 생산을 비교하였다.

Abstract – Lactic acid, the most widely occurring hydroxy-carboxylic acid, has traditionally been used as food, cosmetic, pharmaceutical, and chemical industries. Even though it has tremendous potential for large scale production and use in a wide variety of applications, high cost lactic acid materials are primarily problems. Lactic acid can be obtained on either by fermentation or chemical synthesis. In recent years, the fermentation approach has become more successful because of the increasing market demand for naturally produced lactic acid. Generally, lactic acid was produced from pure starch or from glucose. As an alternative, biomass which is the most abundant renewable resources on earth have been considered for conversion to readily utilizable hydrolysate. In this study, we conducted the fermentation method to produce L(+)-lactic acid production from pretreated hydrolysate was investigated by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. The hydrolysate was obtained from pretreatment process of biomass using Ammonia percolation process (AP) followed by enzymatic hydrolysis. In order to effectively enhance lactic acid conversion and product yield, controlled medium, temperature, glucose concentration was conducted under pure glucose conditions. The optimum conditions of lactic acid production was investigated and compared with those of hydrolysate.

Key words: Lactic Acid, *Lactobacillus rhamnosus*, Cellulosic Biomass, Pretreatment

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jskim84@kyonggi.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

Lactic acid는 가장 널리 사용하는 Hydroxy-carboxylic acid로서 보존성과 신맛을 주기 때문에 식품 방부제와 산성제로 이용되고 있으며 그 밖의 의약품, 화장품 및 각종 유기화합물의 원료로 광범위하게 사용되고 있다. 또한 최근에 Lactic acid는 재생 가능한 탄소 원료로서 생분해성 및 생체활성 고분자 등의 기능성 고분자 합성을 위해 이용하며 빠른 시간 내에 자연적으로 분해되는 능력을 가지는 생분해성 고분자의 원료로 이들의 시장 수요는 몇 년간 기하급수적으로 성장하고 있다[1].

Lactic acid는 일반적으로 화학적 합성 또는 미생물 발효로 생산된다. 화학적 합성법으로는 Racemic lactic acid 형태로 L-lactic acid와 D-lactic acid의 이성질체 혼합물로 생산되기 때문에 물성을 자유롭게 조절하는데 어려움이 따르는 반면 미생물 발효 방법에 의한 Lactic acid 생산은 공해문제가 적고 한 가지 형태인 L-(+)-lactic acid로 생산되어 인체의 몸에서 생물학적으로 분해된다. 이에 의해 Lactic acid는 주로 미생물 발효 방법으로 제조되고 있다[2].

일반적으로 미생물 발효 방법에 의한 Lactic acid 생산에 가장 많이 사용되는 원료는 순수한 전분 또는 가용성 탄소원인 글루코오스(Glucose)이다. 하지만 순수한 전분 또는 글루코오스의 높은 가격으로 인하여 Lactic acid 공정의 원료비를 높이고 있다. 그러므로 경제적인 Lactic acid 생산을 위하여 저렴하고 재생 가능한 대체원료인 바이오매스를 이용하여 Lactic acid를 생산하는 연구에 관심이 증가되고 있다[3-7].

바이오매스는 일반적으로 Cellulose, Hemicellulose, Lignin으로 구성되어 있다. 효율적인 발효를 위하여 최근에는 Lignin의 함량을 줄인 전처리 된 가수분해물을 이용하여 경제적으로 Lactic acid를 생산하는 연구가 진행되고 있으며 본 논문에서는 Lignin 제거에 가장 효과적인 암모니아 침출 공정(AP)을 이용하여 전처리 하였다[8-11].

전처리 된 가수분해물은 Lactic acid 생산을 위한 저렴하고 친환경적 공급원으로서 글루코오스로 구성되어 있고 독성물질이 없기 때문에 미생물을 이용한 발효방법에 용이한 장점을 갖고 있다.

본 논문에서는 암모니아 침출 공정을 통한 전처리 된 바이오매스를 효소 가수분해하여 글루코오스로 전환하고 이를 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863을 이용하여 발효방법에 의해 Lactic acid를 생산하였다.

Lactobacillus rhamnosus ATCC 10863은 일반적으로 혐기성 조건에서 L-(+)-Lactic acid를 선택적으로 생산하는 균주이다[12].

2. 실험재료 및 방법

2-1. 사용균주

본 연구에 사용된 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863은 한국 미생물 보존센터에서 분양 받았으며 MRS배지를 이용하여 배양 온도 37 °C, 110 rpm, 72시간 배양하였고 이의 보존은 Glycerol stock으로 냉동 보관하였다. MRS배지는 Protease peptone No. 3 : 10.0 g, Beef extract: 10.0 g, Yeast extract : 5.0 g, Glucose: 20.0 g(DIFCO, USA), Ammonium citrate : 2.0 g, Sodium acetate : 5.0 g, K₂HPO₄ : 2.0 g, MgSO₄ · 7H₂O : 0.1 g, MnSO₄ · 4H₂O : 0.05 g(Sam-chun Chemicals, Korea)으로 구성되어 있다.

Table 1. Medium optimization composition

| | A (g/L) | B (g/L) | C (g/L) | D (g/L) |
|---------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| Glucose | 15 | 15 | 15 | 15 |
| Protease peptone No. 3 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Beef extract | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Yeast extract | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Ammonium citrate | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Sodium acetate | 5 | 5 | 5 | 5 |
| K ₂ HPO ₄ | 2 | 2 | 2 | 2 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| MnSO ₄ · 4H ₂ O | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | | 0.02 | 0.1 | 0.02 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | | | | 0.1 |

2-2. 발효조건

2-2-1. 배지최적화

MRS배지에 FeSO₄, CaCl₂ 성분을 첨가하여 조성이 다른 4종류의 배지로 실험하였다. 삼각플라스크 혐기발효로 진행하였으며 글루코오스 농도를 15 g/L로 조절 하였다. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863을 접종 한 후 40 °C, 110 rpm에서 120시간 배양하였을 때의 Lactic acid 생산량을 측정 비교 하였다. 배지의 조성은 Table 1에 나타내었다.

2-2-2. 발효온도

최적의 발효 온도를 찾기 위하여 배지최적화를 통해 얻은 최적의 D배지를 이용하였다. 삼각플라스크 혐기 발효로 수행하였으며 발효 온도 30 °C, 40 °C, 50 °C에서 110 rpm, 96시간 동안 배양하였을 때 생성되는 Lactic acid 생성량을 비교하여 최적의 발효온도를 도출하였다.

2-2-3. 글루코오스 농도

효율적인 발효를 위하여 글루코오스 농도에 따른 Lactic acid 생산량을 비교하였다. 배지최적화와 최적의 발효온도인 D배지, 40 °C 조건에서 삼각플라스크 혐기 조건으로 실험을 진행하였다. 글루코오스 농도를 각각 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L로 조절한 후 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863을 접종, 110 rpm, 72시간 배양하였을 때의 Lactic acid 생산량을 비교 분석 하였다.

2-3. 가수분해물 발효

2-3-1. 전처리

본 연구에 사용된 바이오매스는 농업 부산물 계열의 벃짚(Rice straw), EFB (Empty Fruit Bunch), 돼지감자줄기(Jerusalem artichoke)를 사용하였으며 16%(v/v) 암모니아수에 의한 침출 공정((AP; Ammonia percolation process)을 통하여 전처리 하였다[9].

기질과 용액을 1:10의 비율로 혼합하여 170 °C, 20분 반응하였다. 전처리 후 깨끗한 물로 세척 하였고 오븐에서 45 °C로 건조하여 잔류 수분을 제거하였다. 전처리 전 바이오매스의 구성성분을 Table 2에 나타내었다.

2-3-2. 효소당화

전처리 된 가수분해물의 당화는 삼각플라스크에서 진행하였다. 당화는 전처리된 기질을 삼각플라스크에 넣고 sodium citrate buffer solution(0.5 M, pH 4.8)와 혼합한 후 180 rpm의 진탕 배양기에서

Table 2. Major Compositions of various biomass

| | Rice straw | EFB | Jerusalem artichoke |
|-------------|------------|------|---------------------|
| Glucose (%) | 38.4 | 37.1 | 41.7 |
| Xylose (%) | 17.9 | 25.3 | 19.2 |
| Lignin (%) | 12.4 | 21.1 | 20.9 |
| Others (%) | 31.3 | 16.4 | 18.3 |

진행하였다. 당화 조건은 온도 50 °C, 기질 농도 5% (w/v)이다. 효소는 Celluclast (Cellulase, Novo Co., Denmark) 1.5 L와 Novozyme-188 (β -glucosidase, Novo Co., Denmark)을 사용하였다. 효소의 평균 비활성도는 Filter paper activity는 65FPU/ml, β -glucosidase activity는 32CBU/ml이다.

2-3-3. 발효

전처리 된 가수분해물로부터 Lactic acid 생성량을 비교하여 분석하였다. 각각의 당화액은 121 °C에서 30분 동안 멸균한 후 상온에서 냉각하였다. 그 후 각 당화액을 50 mL로 조절 후 삼각플라스크 혐기 발효로 진행하였다. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863을 접종, 110 rpm, 72시간 배양하였을 때의 Lactic acid 생산량을 비교 분석 하였다.

2-4. 분석방법

발효 후 당 분석 및 발효액의 분석은 HPLC(Waters, USA)를 사용하였다. 성분분석에 사용된 Column은 Biorad사의 Aminex HPX-87P column을 사용하였다. 당화액 및 발효액의 분석은 Aminex HPX-87H를 사용하였다. 검출에 사용된 Detector는 Waters 410 RI detector(Waters, USA)를 사용하였다. 이동상은 5 mM의 H₂SO₄를 사용하였고 유속을 0.6 ml/min으로 운전하였다. 각 column과 detector의 온도는 HPX-87H는 60 °C, HPX-87P는 85 °C, RI detector는 50 °C이다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 배지최적화

발효배지의 최적조건을 설정하기 위하여 MRS배지에 FeSO₄, CaCl₂ 함량에 따라 4종류의 배지로 나눈 후 40 °C에서 5일간 혐기 발효 한 결과 Table 3에 나타내었다.

발효결과 순수 MRS배지인 A, FeSO₄가 첨가된 B, CaCl₂가 첨가된 C에 비하여 FeSO₄, CaCl₂ 모두 첨가한 D배지에서 가장 많은 Lactic acid를 생성하였다. 또한 A, B, C, D배지 모두 48~72시간에서 최대 Lactic acid를 생성하였다. 결과로부터 FeSO₄, CaCl₂는 발효에 긍정적인 영향을 주는 요소임을 확인하였으며, 최적의 배지로 D배지를 선택한 후 실험에 적용하여 수행하였다[6].

Table 3. Lactic acid production from glucose

| Time (h) | A (g/L) | B (g/L) | C (g/L) | D (g/L) |
|----------|---------|---------|---------|---------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 5.26775 | 4.45875 | 4.44321 | 4.91137 |
| 48 | 5.06993 | 5.99486 | 4.93313 | 6.30363 |
| 72 | 5.38597 | 3.13566 | 2.04566 | 5.93742 |
| 96 | 3.80982 | 1.58805 | 1.54902 | 3.50092 |
| 120 | 1.05222 | 0.65182 | 0.64005 | 2.28868 |

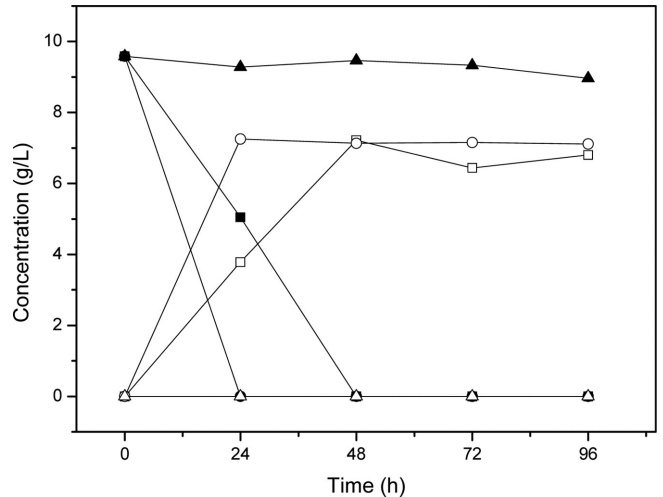


Fig. 1. Effect of temperature on lactic acid production from 1 wt% of glucose. Glucose (■, 30 °C; ●, 40 °C; ▲, 50 °C); Lactic acid (□, 30 °C; ○, 40 °C; △, 50 °C).

3-2. 발효온도

글루코오스 농도 10 g/L, D배지를 사용하여 96시간 동안 발효하였다. 서로 다른 발효온도에 따라 글루코오스의 상대적인 Lactic acid 생산량에 대해 조사하였다.

발효에 적합한 최적의 배양온도를 선정하기 위하여 각각의 온도 30 °C, 40 °C, 50 °C로 실험한 결과 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서 30 °C, 40 °C의 배지는 반응 시간이 증가함에 따라 모든 글루코오스를 소비하였다. 반면 50 °C의 배지는 글루코오스 소비와 Lactic acid를 생성하지 않는다는 사실을 확인하였다. 이로부터 50 °C의 온도에서 발효가 정상적으로 이루어지지 않는다는 결과를 얻었다. 또한 최적의 발효온도를 얻기 위하여 두 온도를 비교하였다. 30 °C의 그래프를 확인해보면 24시간부터 48시간이 될 때 가장 많은 글루코오스를 소비하였다. 가장 많은 Lactic acid는 48시간에서 7.21 g/L로 수율 75.2%를 얻었다. 반면 40 °C 그래프를 확인해보면 24시간에서 모든 글루코오스를 소비하고 최대 Lactic acid 생성량 7.25 g/L, 수율 75.6%를 얻었다. Volumetric productivity를 비교 하였을 때 30 °C, 40 °C에서 각각 0.15 g/L/h, 0.3 g/L/h의 값을 얻었다. 이로부터 40 °C의 온도에서 발효가 가장 효과적임을 확인하였다.

3-3. 글루코오스 농도

초기 글루코오스 농도에 따른 Lactic acid 생산을 비교하였다. 최적의 D배지와 최적온도 40 °C로 고정된 후 글루코오스 초기 농도 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L 로 달리하여 72시간 발효한 후 글루코오스의 감소량과 Lactic acid의 생성량을 확인하였다. 이에 따른 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에서 글루코오스 10 g/L는 24시간에서 모든 글루코오스를 소비하고 최대 Lactic acid량 7.25 g/L를 생성하였다. 또한 글루코오스 20 g/L는 48시간에서 모든 글루코오스를 소비하고 최대 Lactic acid량 13.85 g/L를 생성하였다. 반면 가장 높은 농도인 글루코오스 30 g/L의 경우 72시간 동안 모든 글루코오스를 소비하지 못하였으며 이 때의 글루코오스 잔류량은 5.21 g/L였고 Lactic acid 생성량은 20.22 g/L이다. 이에 따른 Lactic acid 생성 수율은 각각 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L에서 75.6%, 73%, 71.7%로 글루코오스 10 g/L의

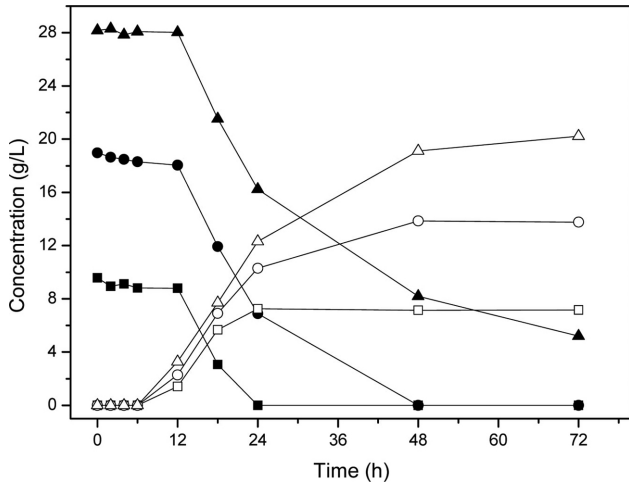


Fig. 2. Time course of lactic acid production from various concentration of glucose at 40 °C. Glucose (■, 1 wt%; ●, 2 wt%; ▲, 3 wt%); Lactic acid (□, 1 wt%; ○, 2 wt%; △, 3 wt%).

Table 4. Major compositions of AP-treated biomass

| | Rice straw | EFB | Jerusalem artichoke |
|-------------|------------|------|---------------------|
| Glucose (%) | 38.1 | 36 | 34.9 |
| Xylose (%) | 17.0 | 21.5 | 9.4 |
| Lignin (%) | 4.2 | 7.4 | 8.8 |
| Others (%) | 11.6 | 1.1 | 5.6 |

수율이 가장 높음을 확인하였다. 이로부터 생산속도와 수율을 비교하였을 때 글루코오스 농도 10 g/L에서 가장 효율적임을 확인 하였다.

3-4. 가수분해를 발효

전처리 된 바이오매스를 효소당화를 거쳐 얻어진 가수분해 당화액을 이용하여 Lactic acid 생산량을 확인하여 비교하였다. 세 종류의 바이오매스 Rice straw, EFB, Jerusalem artichoke를 암모니아 침출 공정을 이용하여 전처리 한 후 각 바이오매스의 구성성분을 Table 4에 나타내었다.

각 바이오매스의 전처리 전, 후 성분분석을 비교하였을 때 세 종류의 바이오매스 모두 글루코오스와 Xylose 함유율의 손실이 거의 없는 것으로 나타났다. 반면 Lignin 함유율은 감소하였으며 이에 따른 감소율은 각각 Rice straw의 경우 12.4%에서 4.2%로 66.13% 감소하였고 EFB는 21.1%에서 7.4%로 64.93% 감소하였으며 Jerusalem artichoke는 20.9%에서 8.8%로 57.9% 감소하였다. 이로부터 암모니아 침출 공정에 의한 전처리 공정은 Lignin 제거에 효율적임을 알 수 있다.

각 바이오매스 가수분해물의 시간에 따른 글루코오스와 Lactic acid의 농도를 Fig. 3에 나타내었다. Rice straw, EFB, Jerusalem artichoke의 초기 글루코오스 농도는 각각 17.24 g/L, 24.66 g/L, 17.01 g/L로 단위 부피당 당 농도를 비교 하였을 때 EFB의 당 농도가 가장 높은 값을 알 수 있다.

Rice straw는 발효 후 48시간에서 모든 글루코오스를 소비하였으며 72시간에서 가장 많은 Lactic acid를 생산하였다. 반면 EFB와 Jerusalem artichoke의 경우 24시간에서 모든 글루코오스를 소비하였으며 72시간에서 최대 Lactic acid를 생산하였다.

Rice straw, EFB, Jerusalem artichoke의 최대 Lactic acid 농도는

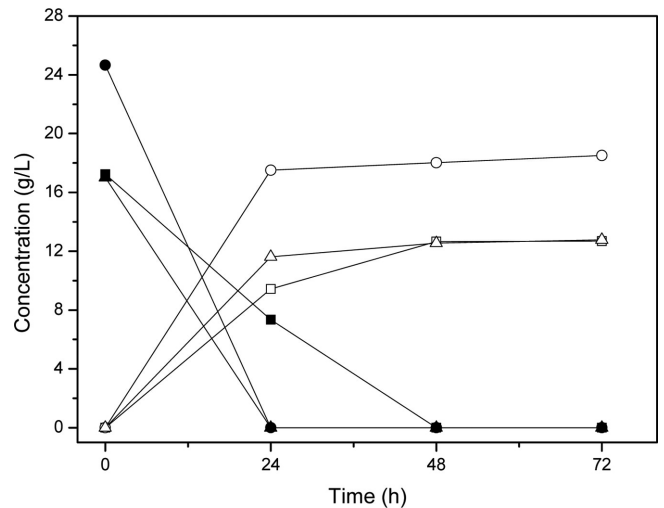


Fig. 3. Lactic acid production from pretreated hydrolysate. Glucose (■, Rice straw; ●, EFB; ▲, Jerusalem artichoke); Lactic acid (□, Rice straw; ○, EFB; △, Jerusalem artichoke).

각각 4.23 g/L, 6.17 g/L, 4.31 g/L임을 확인하였고 이에 따른 수율은 각각 73.6%, 75%, 75.8%를 나타내었다.

암모니아 침출 공정에 의한 전처리 된 바이오매스 세 종류와 순수 글루코오스의 발효를 비교하였을 때 수율은 거의 비슷한 값인 73~76%를 나타내었다. 그러므로 Lactic acid 발효의 원재료로 순수한 글루코오스 대신 전처리 된 바이오매스를 사용하여 경제적으로 높은 효과를 얻을 수 있다는 결론을 내릴 수 있다.

감 사

본 연구는 2013년도 산업통상자원부의 재원으로 한국에너지기술평가원(KETEP)의 지원을 받아 수행한 연구 과제(No. 20134030200230)입니다.

References

- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. and Branduardi, P., "Microbial Production of Organic Acids: Expanding the Markets," *Trends Biotechnol.*, **26**, 100-108(2008).
- Lu, Z., He, F., Shi, Y., Lu, M. and Yu, L., "Fermentative Production of L(+)-Lactic Acid Using Hydrolyzed Acorn Starch, Persimmon Juice and Wheat Bran Hydrolysate as Nutrients," *Bioresour. Technol.*, **101**, 3642-3648(2010).
- Phruksawan, P., Kulpreecha, S., Sooksai, S. and Thongchul, N., "Direct Fermentation of l(+)-Lactic Acid from Cassava Pulp by Solid State Culture of *Rhizopus Oryzae*," *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **35**(8), 1429-1436(2012).
- Saito, K., Hasa, Y. and Abe, H., "Production of Lactic Acid from Xylose and Wheat Straw by *Rhizopus Oryzae*," *J. Biosci. Bioeng.*, **114**(2), 166-169(2012).
- Adsul, M. G., Varma, A. J. and Gokhale, D. V., "Lactic Acid Production from Waste Sugarcane Bagasse Derived Cellulose," *Green Chem.*, **9**, 58-62(2007).
- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J. and Gokhale, D., "Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production

- by *Lactobacillus Delbrueckii* Subsp. *Delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation,” *Appl. Environ. Microbiology*, **74**, 333-335 (2008).
7. Timbuntam, W., Sriroth, K. and Tokiwa, Y., “Lactic Acid Production from Sugarcane Juice by a Newly Isolated *Lactobacillus* sp”, *Biotechnol. Lett.*, **28**, 811-814(2006).
 8. Kumar, R. and Wyman, C. E., “Effect of Xylanase Supplementation of Cellulase on Digestion of Corn Stover Solids Prepared by Leading Pretreatment Technologies,” *Bioresour. Technol.*, **100**(18), 4203-4213(2009).
 9. Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C. S. and Lee, Y. Y., “Pretreatment of Corn Stover by Aqueous Ammonia,” *Bioresour. Technol.*, **90**, 39-47(2003).
 10. Kim, K. S. and Kim, J. S., “Characterization of Pretreatment for Barley Straw by Alkaline Solutions,” *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**(1), 18-24(2012).
 11. Han, M., Kim, Y., Kim Y., Chung, B. and Choi, G. W., “Bioethanol Production from Optimized Pretreatment of Cassava Stem,” *Korean J. Chem. Eng.*, **28**(1), 119-125(2011).
 12. Hujanen, M., Linko, S., Linko, Y. Y. and Leisola, M., “Optimisation of Media and Cultivation Conditions for L(+)(S)-Lactic Acid Production by *Lactobacillus Casei* NRRL B-441,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 126-130(2001).