



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월10일

(11) 등록번호 10-1508210

(24) 등록일자 2015년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/56 (2006.01) **C12P 19/14** (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0107449
 (22) 출원일자 2013년09월06일
 심사청구일자 2013년09월06일
 (65) 공개번호 10-2015-0029777
 (43) 공개일자 2015년03월19일
 (56) 선행기술조사문헌
 Process Biochemistry. 1999, Vol.35,
 pp.367-375*
 Biomass and Bioenergy. 2012, Vol.39,
 pp.120-127*
 JP2012016290 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국화학연구원
 대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
 (72) 발명자
김진철
 대전 유성구 가정로 63, 102동 1505호 (신성동,
 럭키하나아파트)
응우웬 마이 끄엥
 대전광역시 유성구 신성동 19
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

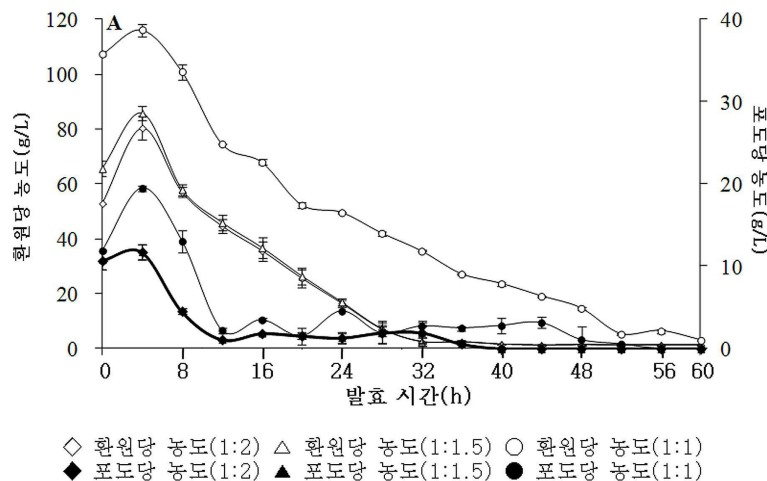
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **고구마로부터 동시 당화 및 발효를 통한 젖산 생산 방법**

(57) 요약

본 발명은 고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam)를 바이오매스로 하여 동시 당화 및 발효(simultaneous saccharification and fermentation; SSF) 공정을 통한 젖산의 생산 방법에 관한 것으로, 고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam)를 바이오매스로 하여 알파-아밀라아제(α -amylase) 및 아밀로글루코시다아제(amyloglucosidase)를 혼합한 당화 효소 혼합물, 질소원으로 효모 추출물(yeast extract) 및 펩톤(peptone)의 혼합물을 젖산 발효 균주인 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104) 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)과 함께 첨가하여 수행하는 동시 당화 및 발효 공정은 효율적으로 L- 또는 D-젖산을 생산할 수 있으므로, 상기 동시 당화 및 발효 공정은 고구마로부터 고 농도의 젖산을 생산하는 공정으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

최경자

대전 유성구 엑스포로 448, 208동 1403호 (전민동, 엑스포아파트)

최용호

대전 유성구 가정로 63, 105동 801호 (신성동, 럭키하나아파트)

장경수

대전 유성구 장대로71번길 34, 107동 1003호 (장대동, 장대푸르지오)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1304-B0
부처명 산업기술연구회
연구관리전문기관 산업기술연구회
연구사업명 기관고유사업
연구과제명 천연물 기반 그린바이오 작물보호소재 개발
기여율 1/2
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1307-B4
부처명 산업기술연구회
연구관리전문기관 산업기술연구회
연구사업명 기관고유사업
연구과제명 미개척 메타게놈 유전자원을 활용한 신규 작물보호제 선도물질 탐색기술 개발
기여율 1/2
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam) 100 내지 250 g/ℓ에, 당화 효소 혼합물로서 알파-아밀라아제(α -amylase) 및 아밀로글루코시다아제(amyloglucosidase)가 1:2 내지 1:1(v/w)로 혼합된 당화효소 혼합물을 사용하되, 여기서 상기 당화효소 혼합물을 고구마에 대하여 0.075 내지 0.4%(v/w)로 첨가하고, 질소원으로 효모 추출물(yeast extract) 및 펩톤(peptone)으로 혼합물의 농도가 5 내지 15 g/ℓ, 및 젖산 발효 균주를 첨가하여 동시 당화 및 발효(simultaneous saccharification and cofermentation; SSF)를 수행하는 단계를 포함하는 고구마로부터 젖산의 생산 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 고구마는 133.36 내지 219.51 g/ℓ로 포함되는 것을 특징으로 하는 고구마로부터 젖산의 생산 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 당화 효소 혼합물은 고구마에 대하여 0.075 내지 0.2%(v/w)로 첨가하는 혼합물인 것을 특징으로 하는 고구마로부터 젖산의 생산 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 질소원은 7 내지 15 g/ℓ의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 고구마로부터 젖산의 생산 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 젖산 발효 균주는 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104) 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)인 것을 특징으로 하는 고구마로부터 젖산의 생산 방법.

청구항 9

1) 고구마 100 내지 250 g/ℓ, 0.025%(v/w) 알파-아밀라제, 0.05%(v/w) 아밀로글루코시다제, 효모 추출물 3 g/ℓ, 펩톤 5 g/ℓ 및 락토바실러스 파라카제이 LA104 균주를 첨가하여 SSF를 수행하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 산물에서 L-젖산을 수득하는 단계를 포함하는 고구마로부터 L-젖산의 대량 생산 방법.

청구항 10

1) 고구마 100 내지 250 g/l, 0.025%(v/w) 알파-아밀라제, 0.025%(v/w) 아밀로글루코시다제, 효모 추출물 7 g/l, 펩톤 3 g/l 및 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 첨가하여 SSF를 수행하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 산물에서 D-젖산을 수득하는 단계를 포함하는 고구마로부터 D-젖산의 대량 생산 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam)를 바이오매스로 하여 동시 당화 및 발효(simultaneous saccharification and fermentation; SSF) 공정을 통한 젖산의 생산 방법을 제공하는 것이다.

배경기술

[0002] 젖산(Lactic acid; LA)은 바이오매스에서 수득된 30 종의 화학적 구성 물질 중 하나인 주요 유기산으로, 식품, 의약, 화장품 및 다른 화학적 산업에서 넓게 사용되고 있다. 식품 및 식품-관련의 산업에서 전체 젖산 생산의 약 80%를 사용하며, 비-식품 관련 산업에서는 15%만을 차지한다. 최근에, 석유화학 산업으로 인한 환경오염 및 석유화학 원료의 고갈로 인해, 재생 가능 물질로부터 얻은 생분해 및 생체 적합성의 화학물질인 폴리젖산(poly(lactic acid); PLA)이 특징 및 적용 가능성 때문에 세계적으로 관심을 얻고 있다. PLA의 잠재적 시작은 이의 원재료가 되는 젖산의 단가가 감소함에 따라 점차적으로 증가하고 있다(R. P. John et al., 2009; Werpy and Petersen, 2004).

[0003] 젖산은 자연적으로 두 종류의 거울상이성질체(enantiomers)로 존재하여 L-이성질체, D-이성질체 및 라세믹(racemic) DL-젖산의 3 종류로 나타난다. 상업적으로 젖산은 미생물의 발효 또는 화학적 합성에 의해서 생산될 수 있다. 라세믹 혼합물만을 생산하는 화학적인 방법에 반해, 미생물과 같은 생물학적 방법은 미생물, 기질 및 성장 조건을 알맞게 선택하였을 때 광학적으로 순수한 젖산을 수득할 수 있고, 화학적 방법에 비해 저렴한 원재료를 사용한다는 장점을 나타낸다(J Y.J. Wee et al., 2006; M.A. Abdel-Rahman et al. 2011). 젖산의 광학적 순수도는 폴리(L-젖산)[poly(L-lactic acid); PLLA] 및 폴리(D-젖산)[poly(D-lactic acid); PDLA] 중합체의 순도 높은 중합체는 PLLA 및 PDLA의 혼합으로 생산된 폴리 젖산의 입체복합체(stereocomplex)가 그들 각각의 순수 중합체보다 약 50°C 높은 녹는점을 가지는 것에 비해, 온도에 민감하며, 더욱 생분해가 가능한 물리적인 특징을 결정하는 주요 요소로서, 섬유 및 필름(film)과 같은 상업적 적용이 성장하고 있다(K. Fukushima et al., 2007).

[0004] 현재, 풍부한 탄수화물 자원인 다양한 종류의 바이오매스-유사((biomass-like) 농업 부산물(by-products) 또는 작물을 젖산으로 전환하는 생물학적 공정이 대두되고 있다. 전분, 당밀(molasses) 및 셀룰로오스 물질과 같은 값싼 원재료는 젖산-생산 공정에서 순수 당을 대체하여 사용될 수 있다(L. Wang et al., 2010, H. Oh et al., 2005, C.M. Nguyen et al., 2012). 상기 원재료는 효소 또는 무기 산의 촉매 작용에 의해 발효 당으로 분해되어야 한다. 효소 촉매의 높은 가격과 포도당 또는 젖산에 의한 효소활성의 저해와 같은 대표적인 효소 촉매의 단점은 산업적인 이용에 장애가 되며, 이를 극복하기 위한 방법이 요구되고 있다.

[0005] 동시 당화 및 발효(simultaneous saccharification and fermentation; SSF) 공정은 효소 활성의 저해를 예방할 수 있는 방법으로서 제시되었다(Abdel-Rahman et al., 2011; John et al., 2009). 리그노셀룰로즈 가수분해의 경제적인 측면에서 셀룰로오스 분해 효소의 단가가 주요 장애요인이 되므로, 전분은 젖산 생산에서 더욱 중요한 기질로 주목받고 있다(R. Anuradha et al., 1999).

[0006] 고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam)는 건조시 89 내지 93%의 탄수화물을 포함하는 전분이 풍부한 자원으로 탄수화물 산업에 있어서 효과적이고 중요한 작물로서 알려져 있다(L. Zhang et al., 2011; C.H. Lay et

al., 2012). 국제연합식량농업기구(United Nations Food and Agriculture Organization; FAO) 통계국(Statistics Division)의 2011년 조사에 따르면, 고구마의 세계적 생산량 및 면적은 약 102.3백만 톤 및 8.2백만 헥타르로 추정되며, 2011년에 약 1.4백만 톤의 고구마가 베트남 148,500헥타르에서 재배(약 9.4 톤/헥타르) 되는 것으로 보고된 바 있다(베트남 통계청). 그러나, 녹말 분해성(amylolytic) 미생물을 사용하여 원재료 고구마로부터 젓산을 생산하는 공정에 대한 보고는 매우 적으며, 낮은 젓산 생산 농도 및 생산성만이 보고되었다(S.H. Panda et al., 2008; H.W. Yen et al., 2010, H.W. Yen et al., 2010).

[0007]

이에, 본 발명자들은 풍부한 탄수화물 자원을 포함하는 바이오매스 작물로부터 젓산을 효율적으로 생산하는 공정을 개발하기 위해 노력한 결과, 고구마에 알파-아밀라아제(α -amylase) 및 아밀로글루코시다아제(amyloglucosidase)를 혼합한 당화 효소 혼합물, 질소원으로 효모 추출물(yeast extract) 및 펩톤(peptone)의 혼합물을 젓산 발효 균주인 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104) 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)과 함께 첨가하여 동시 당화 및 발효를 수행한 결과, 상기 동시 당화 및 발효를 통해 고구마로부터 L- 또는 D-젓산을 효과적으로 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008]

- (비특허문헌 0001) L. Wang et al., Biores. Technol. 101 (2010) 7895-7901.
- (비특허문헌 0002) R. Anuradha et al., Process Biochem. 35 (1999) 367-375.
- (비특허문헌 0003) S.H. Panda et al., J. Sci. Indus. Res. 67 (2008) 531-537.
- (비특허문헌 0004) H.W. Yen et al., Bioprocess and Biosyst. Eng. 33 (2010) 1017-1023.
- (비특허문헌 0005) R. P. John et al., Biochem. Eng. J. 36 (2007) 262-267.
- (비특허문헌 0006) Md. Altaf et al., Biores. Technol. 98 (2007) 498-503.
- (비특허문헌 0007) J. Narita et al., J. Bios. Bioeng. 97 (2004) 423-425.
- (비특허문헌 0008) J.P. Guyot et al., J. Appl. Microbiol. 88 (2000) 176-182.
- (비특허문헌 0009) S.D. Yuwono et al., Biochem. Eng. J. 40 (2008) 175-183.
- (비특허문헌 0010) K. Shibata et al., Enzym Microb. Technol. 41 (2007) 149-155.
- (비특허문헌 0011) K. Okano et al., Appl. Environ. Microbiol. 75 (2009) 462-467.
- (비특허문헌 0012) R.P. John et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 134 (2006) 263-272.
- (비특허문헌 0013) Y.J. Wee et al., J. Chem. Technol. Biotechnol. 83 (2008) 1387-1393.
- (비특허문헌 0014) Y.Y. Linko et al., Enzyme Microb. Technol. 19 (1996) 118-123.
- (비특허문헌 0015) K. Hofvendahl and B. Hahn-H, Enzyme Microb. Technol. 20 (1997) 301-307.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009]

본 발명의 목적은 고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam)를 바이오매스로 하여 동시 당화 및 발효(simultaneous saccharification and fermentation; SSF) 공정을 통한 젓산의 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam)에 당화 효소 혼합물 및 젖산 발효 균주를 첨가하여 동시 당화 및 발효(simultaneous saccharification and cofermentation; SSF)를 수행하는 단계를 포함하는 고구마로부터 젖산의 생산 방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은
- [0012] 1) 고구마 100 내지 250 g/l, 0.025%(v/w) 알파-아밀라제(α -amylase), 0.05%(v/w) 아밀로글루코시다제(amyloglucosidase), 효모 추출물(yeast extract) 3 g, 펩톤(peptone) 5 g 및 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104) 균주를 첨가하여 SSF를 수행하는 단계; 및
- [0013] 2) 상기 단계 1)의 산물에서 L-젖산을 수득하는 단계를 포함하는 고구마로부터 L-젖산의 대량 생산 방법을 제공한다.
- [0014] 아울러, 본 발명은
- [0015] 1) 고구마 100 내지 250 g/l, 0.025%(v/w) 알파-아밀라제, 0.025%(v/w) 아밀로글루코시다제, 효모 추출물 7 g, 펩톤 3 g 및 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600) 균주를 첨가하여 SSF를 수행하는 단계; 및
- [0016] 2) 상기 단계 1)의 산물에서 D-젖산을 수득하는 단계를 포함하는 고구마로부터 D-젖산의 대량 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명의 고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam)를 바이오매스로 하여 알파-아밀라아제(α -amylase) 및 아밀로글루코시다아제(amyloglucosidase)를 혼합한 당화 효소 혼합물, 질소원으로 효모 추출물(yeast extract) 및 펩톤(peptone)의 혼합물을 젖산 발효 균주인 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104) 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)과 함께 첨가하여 수행하는 동시 당화 및 발효 공정은 효율적으로 L- 또는 D-젖산을 생산할 수 있으므로, 상기 동시 당화 및 발효 공정은 고구마로부터 고농도의 젖산을 생산하는 공정으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam) 바이오매스 및 증류수의 1:2, 1:1.5 또는 1:1 첨가 비율에 따른 고구마로부터 L-젖산을 생산하기 위한 동시 당화 및 발효(simultaneous saccharification and fermentation; SSF) 공정을 보이는 그래프를 나타낸다;
 도 1A는 환원당(reducing sugar) 및 포도당(glucose)의 농도를 나타내며;
 도 1B는 L-젖산의 생산 농도 및 생산성(productivity) 효과를 나타내고; 및
 도 1C는 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104)의 성장곡선 및 L-젖산의 생산 수율(yield)을 나타낸다.
- 도 2는 고구마 바이오매스 및 증류수의 1:2, 1:1.5 또는 1:1 첨가 비율에 따른 고구마로부터 D-젖산을 생산하기 위한 SSF 공정을 보이는 그래프를 나타낸다;
 도 2A는 환원당 및 포도당의 농도를 나타내며;
 도 2B는 D-젖산의 생산 농도 및 생산성 효과를 나타내고; 및
 도 2C는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)의 성장곡선 및 D-젖산의 생산 수율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명은 고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam)에 당화 효소 혼합물 및 젖산 발효 균주를 첨가하여 동시 당화 및 발효(simultaneous saccharification and cofermentation; SSF)를 수행하는 단계를 포함하는 고구마로부터 젖산의 생산 방법을 제공한다.
- [0021] 상기 당화 효소는 셀룰라아제(cellulase), 셀로비아제(cellobiase), 베타-글루코시다제(β -glucosidase), 베타-아가라제(β -agarase), 베타-갈락토시다제(β -galactosidase), 엔도-1,4- β -글루카나제(endo-1,4- β -glucanase), 알파-아밀라아제(α -amylase), 베타-아밀라아제(β -amylase), 아밀로글루코시다아제(amyloglucosidase), 라미나리아아제(laminarinase), 알파-D-글루코시다아제(α -D-glucosidase), 베타-D-글루코시다아제(β -D-glucosidase), 수크라아제(sucrase), 말타아제(maltase), 이소말타아제(isomaltase), 락타아제(lactase), 트리할라제(trehalase) 및 울바나아제(ulvanase)로 이루어진 군으로부터 하나 또는 둘 이상의 혼합물인 것이 바람직하며, 구체적으로는 알파-아밀라아제 및 아밀로글루코시다아제 중 하나 또는 이들의 혼합물인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0022] 상기 당화효소 혼합물은 고구마 건조물 중량에 대하여 0.025 내지 0.4%(v/w)로 첨가되는 것이 바람직하며, 구체적으로는 0.025 내지 0.075%(v/w)로 첨가되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0023] 상기 당화 효소 혼합물은 고구마에 대하여 알파-아밀라아제 및 아밀로글루코시다아제가 1:2 내지 1:1의 비율(v/w)로 혼합된 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 상기 당화효소 혼합물은 알파-아밀라아제 및 아밀로글루코시다아제가 고구마 건조물 중량에 대하여 0.2% 및 0.2%, 0.1% 및 0.1%, 0.05% 및 0.05%, 0.05% 및 0.025%, 0.025% 및 0.05%, 또는 0.025%(v/w) 및 0.025%(v/w)의 비율로 혼합되어 첨가되거나, 아밀로글루코시다아제가 고구마 건조물 중량에 대하여 0.2%, 0.1% 또는 0.05%(v/w)로 첨가되는 것이 바람직하며, 구체적으로는 알파-아밀라아제 및 아밀로글루코시다아제가 0.025% 및 0.05% 또는 0.025%(v/w) 및 0.025%(v/w)의 비율로 혼합되어 첨가되는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0025] 상기 고구마는 100 내지 250 g/l로 포함되는 것이 바람직하며, 구체적으로는 136.36 내지 219.51 g/l로 포함되는 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 동시 당화 및 발효공정에서 상기 고구마가 250 g/l 보다 높은 양으로 포함되는 경우에는 생산 및 축적된 젖산에 의해서 당화 효소 혼합물의 활성이 영향을 받으며 기질의 점도가 상승하게 되어 효과가 없고, 배지의 부피가 증가함에 따라 당화 효소 혼합물의 첨가량이 증가하므로 공정의 단가가 상승하는 원인이 될 수 있다.
- [0026] 상기 젖산 발효 균주는 락토코커스속(*Lactococcus*), 락토바실러스속(*Lactobacillus*), 스트렙토코커스속(*Streptococcus*), 류코노스톡속(*Leuconostoc*), 페디오코쿠스속(*Pediococcus*), 에로코쿠스속(*Aerococcus*), 카노박테리움속(*Carnobacterium*), 엔테로코커스속(*Enterococcus*), 오에노코커스속(*Oenococcus*), 테트라제노코쿠스속(*Tetragenococcus*), 바고코쿠스속(*Vagococcus*), 와이셀라속(*Weissella*), 리조푸스속(*Rhizopus*)을 포함하는 당업계에 발효를 통하여 젖산을 생산하는 것으로 공지된 모든 균주인 것이 바람직하고, 락토바실러스속 균주인 것이 보다 바람직하며, 구체적으로 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104) 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 상기 SSF에는 질소원으로 효모 추출물(yeast extract), 펩톤(peptone), 대두박(soybean meal; SM), 옥수수 침전액(corn steep liquor; CSL), 쇠고기 추출물(beef extract), 카제인 가수분해물(casein hydrolysate), 황산암모늄(ammonium sulfate), 요소(urea), 엿기름(malt sprouts) 및 스킴밀크(skim milk)로 이루어진 군으로부터 하나 또는 그 이상을 추가적으로 포함하는 것이 바람직하며, 구체적으로는 효모 추출물 및 펩톤 중 하나 또는 이들의 혼합물인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 젖산 생산 공정에서 보다 저렴한 대체 질소원을 사용할 수 있으나, 배지 내의 불순물 농도가 상승하게 되어 산물인 젖산을 분리하기 위한 추가 과정이 요구되므로, 결과적인 젖산의 생산 농도 및 수율이 감소되어 상대적인 손실 및 공정 시간을 증가시킬 수 있으므로 효과가 없다.
- [0028] 상기 질소원은 3 내지 15 g/l의 농도로 포함되는 것이 바람직하고, 5 내지 12 g/l의 농도로 포함되는 것이 더욱 바람직하며, 7 내지 10 g/l의 농도로 포함되는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [0029] 상기 동시 당화 및 발효를 위한 배지는 무기염을 포함하는 것이 바람직하고, 구체적으로는 황산망간($MnSO_4$)을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 무기염을 포함하지 않는 경우에도 동일한 효과를 가지는 젖산 발효 균주의 경우에는 무기염을 포함하지 않을 수 있다.
- [0030] 상기 동시 당화 및 발효를 통해 수득한 산물에서 젖산을 수득하는 단계를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 원재료인 고구마를 준비하여 이를 바이오매스로 하고 알파-아밀라아제 및 아밀로글루코시다제 혼합물을 당화 효소로 첨가하여 L. 파라카제이 LA104 또는 L. 코리니포르미스 ATCC 25600를 이용한 동시 당화 및 발효공정을 수행하여 L- 또는 D-젖산을 생산한 결과(표 1 참조), 고구마 건조물에 대하여 알파-아밀라아제 및 아밀로글루코시다제가 0.025% 및 0.05% 또는 0.025%(v/w) 및 0.025%(v/w)의 비율로 첨가되었을 때 가장 효율적으로 L- 또는 D-젖산이 생산되는 것과 동시에 효소의 단가를 저렴하게 하는 것을 확인하였다(표 2 및 3 참조).
- [0032] 또한, 본 발명자들은 고구마를 바이오매스로 하여 젖산을 생산하는 SSF 공정에서 최적의 질소원을 탐색하기 위하여, 효모 추출물(yeast extract; YE) 및 펩톤 혼합물을 질소원으로 하여 젖산의 생산 효과를 확인한 결과, L. 파아카제이 LA104의 경우에는 YE 3 g 및 펩톤 5 g을 첨가하였을 때 최대 L-젖산 생산량 및 수율을 나타내었으며, L. 코리니포르미스 ATCC 25600의 경우에는 YE 7 g 및 펩톤 3 g의 혼합 비율에서 최대의 D-젖산 생산량 및 수율을 나타내는 것을 확인하였다(표 4 및 5 참조).
- [0033] 또한, 본 발명자들은 무기염의 유무에 따른 고구마로부터 젖산의 생산 효과를 확인한 결과, L. 파아카제이 LA104 균주는 무기염의 유무가 L-젖산의 생산에 유의적인 영향을 미치지 않는 반면, L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주는 황산망간을 무기염으로 포함할 때 효과적으로 D-젖산을 생산하는 것을 확인하였다(표 6 및 7 참조).
- [0034] 또한, 본 발명자들은 최적화된 조건 하에서 고구마로부터 젖산을 생산하기 위하여 작업량(working volume)을 발효기 수준으로 규모를 확대하여 SSF 공정을 수행한 결과, 초기에 빠른 당화 과정이 일어나며 이후 효과적으로 젖산이 생산되는 것을 확인하였으며(도 1 및 2 참조), 상기 결과는 이전에 공지된 전분성 물질(starchy materials)로부터 젖산을 생산하기 위한 SSF 및 분리 당화 및 발효(separate hydrolysis and fermentation; SHF) 공정과 비교하였을 때 젖산이 유의적으로 생산되는 결과임을 확인하였다(표 8 참조).
- [0035] 따라서, 본 발명의 고구마를 바이오매스로 하여 당화 효소 혼합물 및 질소원을 젖산 발효 균주와 함께 첨가하여 수행하는 동시 당화 및 발효 공정은 효율적으로 젖산을 생산할 수 있으므로, 상기 동시 당화 및 발효 공정은 고구마로부터 고농도의 젖산을 생산하는 공정으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명은
- [0037] 1) 고구마 100 내지 250 g/l, 0.025%(v/w) 알파-아밀라제, 0.05%(v/w) 아밀로글루코시다제, 효모 추출물 3 g/l, 펩톤 5 g/l 및 락토바실러스 파라카제이 LA104 균주를 첨가하여 SSF를 수행하는 단계; 및
- [0038] 2) 상기 단계 1)의 산물에서 L-젖산을 수득하는 단계를 포함하는 고구마로부터 L-젖산의 대량 생산 방법을 제공한다.
- [0039] 아울러, 본 발명은
- [0040] 1) 고구마 100 내지 250 g/l, 0.025%(v/w) 알파-아밀라제, 0.025%(v/w) 아밀로글루코시다제, 효모 추출물 7 g/l, 펩톤 3 g/l 및 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 첨가하여 SSF를 수행하는 단계; 및
- [0041] 2) 상기 단계 1)의 산물에서 D-젖산을 수득하는 단계를 포함하는 고구마로부터 D-젖산의 대량 생산 방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 고구마를 바이오매스로 하는 동시 당화 및 발효 공정에서 초기 고구마 농도는 100 내지 250 g/l로 하고, 고구마에 대하여 알파-아밀라제 및 아밀로글루코시다제를 각각 0.025% 및 0.05% 또는 0.025% 및 0.025%(v/w)로 혼합한 당화 효소 혼합물, 효모 추출물 3 또는 5 g/l, 펩톤 5 또는 3 g/l, 및 L. 파라카제이 LA104 또는 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 첨가하는 조건에서 저렴한 단가와 재생가능한 바이오매스를

사용하여 높은 젖산 수율 및 생산성을 나타내므로, 상기 조건은 동시 당화 및 발효를 통한 고구마로부터 고농도의 젖산의 생산 방법에 적용하여 사용될 수 있다.

[0043]

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0044]

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0045]

<실시예 1> 고구마(sweet potato; *Ipomoea batatas* Lam) 바이오매스의 준비

[0046]

본 발명에서 동시 당화 및 발효(Simultaneous saccharification and cofermentation; SSF) 공정의 바이오매스로 사용하기 위해, 원재료인 고구마를 준비하였다.

[0047]

구체적으로, 고구마의 신선한 뿌리(fresh root)(하노이, 베트남)를 입수하여 수도물(tap water)로 세척한 다음, 1 mm 크기로 절단하여 사용 전까지 비닐팩에 담아 영하 20℃에서 보관하였다. 보관한 고구마의 수분 함유량은 63 %였다.

[0048]

<실시예 2> 당화 효소의 준비

[0049]

고구마를 바이오매스로하여 젖산을 생산하는 SSF 공정을 수행하기 위하여, 당화 과정에 필요한 효소를 준비하였다.

[0050]

구체적으로, 아스퍼길러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 유래의 알파-아밀라아제(α -amylase)인 펀가밀 800L(Fungamyl 800L)(노보자임 A/S사 제조, 시그마-알드리치 사 구입; 제품 번호: A-8220) 및 아밀로글루코시다제(amyloglucosidase)(시그마-알드리치 사 구입; 제품 번호: A7095)을 준비하여 판매자의 제품 설명서에 기재된 바에 따라 효소의 활성을 측정하였다.

[0051]

그 결과, 알파-아밀라아제 및 아밀로글루코시다제의 활성은 800 FAU/g 및 300 U/ml인 것을 확인하였다.

[0052]

<실시예 3> 당화 효소 혼합물 첨가에 따른 젖산 생산 효과의 비교

[0053]

<3-1> 젖산 생산 균주의 종배양(seed culture)

[0054]

호모발효성(homofermentative) L-젖산을 생산하는 균주로 알려진 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104; L. 파라카제이 LA104) 균주 및 호모발효성 D-젖산을 생산하는 균주로 알려진 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600; L. 코리니포르미스 ATCC25600) 균주를 사용한 SSF 공정(Nguyen, C.M. et. al, Bioresour. Technol. 110, 552-559, 2012; Nguyen, C.M. et. al, Biotechnol. Lett. 34, 2235-2240, 2012)을 수행하기 위해, 상기 두 균주를 종배양 수준에서 배양하였다.

[0055]

구체적으로, 하기 [표 1]의 조성으로 배지 1 또는 2를 제조한 후, 200 ml를 각각 500 ml 에rlenmeyer 플라스크(Erlenmeyer flasks)에 첨가하였고, 2M 황산(H₂SO₄)로 pH 6.0을 맞춘 다음, 배지 1에 L. 파라카제이 LA104(기탁 균주번호: KCTC 11883BP)를 접종하여 150 rpm, 37℃에서 24 시간 동안 종배양하였고, 배지 2에 L. 코리니포르미스 ATCC 25600를 접종하여 150 rpm, 34℃에서 24 시간 동안 종배양하였다.

표 1

[0056]

SSF를 위한 L. 파라카제이 LA 104 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 종배양 배지의 조성

	배지 1	배지 2
포도당(glucose)	20	20
황산 마그네슘(MgSO ₄)	0.2	0.05
제 1 인산 칼륨(KH ₂ PO ₄)	1.5	
제 2 인산 칼륨(K ₂ HPO ₄)	1.5	2
초산 나트륨(sodium acetate)	1.5	5

황산망간 수화물(MnSO ₄ ·H ₂ O)	0.05	0.2
구연산 삼암모늄(triammonium citrate)		2
트윈80(Tween 80)	1	1

[0057] * 상기 조성은 증류수 1 ℓ에 첨가하는 중량(g)을 나타낸다.

[0058] * 상기 조성에서 포도당, 효모 추출물, 펩톤은 유기염이며, 황산 마그네슘, 제 1 인산 칼륨, 제 2 인산 칼륨, 초산 나트륨, 황산 망간 수화물, 구연산 삼암모늄, 트윈 80은 무기염(mineral salts)이다.

[0059] <3-2> 당화 효소의 첨가에 따른 젖산 생산 효과의 비교

[0060] 고구마를 바이오매스로 하는 SSF 공정에 필요한 최적화된 당화 효소의 첨가 비율을 확인하기 위하여, SSF 공정에서 알파-아밀라제 및 아밀로글루코시다제의 첨가에 따른 젖산 생산 효과를 비교하였다.

[0061] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 제조한 고구마 바이오매스를 증류수에 1:2의 비율로 혼합하기 위하여 증류수 1ℓ에 상기 고구마 바이오매스 건조물 136.36 g 및 상기 [표 1]에 기재된 배지 1 또는 2의 무기염 조성을 첨가해 배지 3 또는 4를 제조하였고, pH를 조절하기 위한 탄산칼슘(CaCO₃)을 고구마 바이오매스 건조물에 대해 50%(w/w)를 첨가하였다. 그런 다음, 배지 3을 30 ml씩 분주한 50 ml 에rlenmeyer 플라스크 10 개를 준비한 후, 상기 실시예 <3-1>에서 종배양한 L. 파라카제이 LA 104 균주를 포함하는 배지 3 ml을 접종하였고, 하기 [표 2]의 비율로 혼합한 알파-아밀라제 및 아밀로글루코시다제 혼합물을 각각 첨가하여 37℃, 220 rpm 및 혐기 조건 하의 비닐 혐기성 챔버(vinyl anaerobic chamber; 코이 래버러토리 프로덕트 사, 미시간주, 미국)에서 총 72 시간 동안 배양하였다. 또한, 배지 4를 30 ml씩 분주한 50 ml 에rlenmeyer 플라스크 10 개를 준비한 후, 상기 실시예 <3-1>에서 종배양한 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 포함하는 배지 3 ml을 접종하고, 하기 [표 3]의 비율로 혼합한 알파-아밀라제 및 아밀로글루코시다제 혼합물을 각각 첨가한 다음, 상기 L. 파라카제이 LA 104와 동일한 방법으로 34℃에서 배양하였다. 배양을 개시한 72 시간 후에 각각의 배지를 수득하고, 즉시 100℃의 끓는 물을 포함하는 수조에 5 분간 담가 효소 활성을 중지한 후, 자이로젠 1730MR 온도-조절 마이크로원심분리기(temperature-controlled microcentrifuge)를 사용해 37℃에서 5720 ×g로 20 분 동안 원심분리하여 상등액을 수득하였고, 공지된 방법에 따라 배지에 포함된 환원당(reducing sugar; RS)의 잔여량, 젖산의 생산량, 젖산의 수율(yield) 및 젖산의 광학적 순수도(optical purity)를 확인하였다(Nguyen, C.M. et. al., Bioresour. Technol. 110, 552-559, 2012). 젖산의 수율은 하기 [수학식 1]로 계산하여 나타내었다. 모든 실험은 각각 두 번씩 수행하여 평균값으로 나타내었다.

표 2

당화효소 혼합물 첨가에 따른 L-젖산 생산 효과의 비교

알파-아밀라제*	아밀로 글루코시다제**	환원당 농도 (g/l)	젖산 생산농도 (g/l)	젖산 수율 (%)	광학적 순수도 (%)
0.2	0.2	4.27±0.52	123.44±1.99	90.52±1.46	94.83±0.02
0.1	0.1	3.94±0.20	123.18±1.53	90.33±1.12	95.39±0.36
0.05	0.05	3.49±0.01	123.48±3.18	90.55±2.34	95.16±0.12
0.05	0.025	3.55±0.01	118.44±0.67	86.85±0.49	95.09±0.09
0.025	0.05	2.75±0.04	122.90±2.13	90.12±1.56	95.55±0.01
0.025	0.025	2.68±0.03	117.56±1.32	86.21±0.97	95.29±0.08
0	0.2	3.91±0.13	114.11±2.36	83.68±1.73	95.55±0.16
0	0.1	3.81±0.09	111.42±1.62	81.71±1.19	95.23±0.24
0	0.05	2.83±0.30	112.33±1.60	82.38±1.18	95.12±0.15
0	0	2.98±0.03	38.85±2.85	28.49±2.09	94.00±0.65

[0063] * 건조 고구마 바이오매스 100 g에 첨가하는 알파-아밀라제의 부피(ml)를 나타낸다.

[0064] ** 건조 고구마 바이오매스 100 g에 첨가하는 아밀로글루코시다제의 부피(ml)를 나타낸다.

표 3

당화효소 혼합물 첨가에 따른 D-젖산 생산 효과의 비교

알파-아밀라제*	아밀로 글루코시다제**	환원당 농도 (g/l)	젖산 생산농도 (g/l)	젖산 수율 (%)	광학적 순수도 (%)
0.2	0.2	6.56±1.48	120.94±1.97	88.69±1.44	99.34±0.01
0.1	0.1	5.72±0.46	120.40±0.13	88.29±0.10	99.30±0.02
0.05	0.05	5.45±0.08	121.05±1.29	88.77±0.95	99.36±0.03
0.05	0.025	5.71±0.05	120.81±1.36	88.59±1.00	99.35±0.01
0.025	0.05	4.39±0.08	121.12±3.10	88.82±2.28	99.35±0.03
0.025	0.025	4.65±0.02	121.02±3.06	88.75±2.24	99.36±0.02
0	0.2	5.73±0.34	121.68±1.93	89.23±1.41	99.31±0.04
0	0.1	5.05±0.09	116.43±1.80	85.39±1.32	99.30±0.01
0	0.05	4.63±0.15	114.14±0.09	83.70±0.06	99.29±0.01
0	0	13.02±1.09	35.01±1.02	25.67±0.75	98.21±0.13

* 건조 고구마 바이오매스 100 g에 첨가하는 알파-아밀라제의 부피(ml)를 나타낸다.

** 건조 고구마 바이오매스 100 g에 첨가하는 아밀로글루코시다제의 부피(ml)를 나타낸다.

수학식 1

$$\text{젖산 수율}(\%) = \frac{\text{생산된 젖산}(g)}{\text{원재료}(g)} \times 100$$

그 결과, 상기 [표 2] 및 [표 3]에서 나타난 바와 같이 아밀로글루코시다제를 단독으로 배지에 첨가한 경우에 비해 알파-아밀라제 및 아밀로글루코시다제의 혼합물을 첨가하여 SSF를 수행하였을 때 젖산의 수율이 증가하는 것을 확인하였다(표 2 및 3). L. 파라카제이 LA 104를 통한 L-젖산의 생산에서, 0.05%(v/w) 알파-아밀라제 및 0.025%(v/w) 아밀로글루코시다제의 혼합 비율 및 0.025%(v/w) 알파-아밀라제 및 0.025%(v/w) 아밀로글루코시다제의 혼합 비율을 제외한 모든 경우에서 L-젖산의 수율이 90%를 초과하는 것을 확인하였으며, L-젖산의 생산량 및 상기 효소의 가격을 고려할 때, 122.9 g/l의 젖산 생산량, 2.75 g/l의 환원당 생산량 및 90.12%의 젖산 수율을 나타내는 0.025%(v/w) 알파-아밀라제 및 0.05%(v/w) 아밀로글루코시다제의 혼합 비율이 최적의 효소 혼합 비율인 것을 확인하였다(표 2).

아울러, D-젖산의 생산 역시 아밀로글루코시다제를 단독으로 배지에 첨가한 경우에 비해 알파-아밀라제 및 아밀로글루코시다제의 혼합물을 첨가하여 SSF를 수행하였을 때 젖산의 수율이 증가하여, 120.40 g/l의 D-젖산 생산량 및 88.29%의 젖산 수율의 유사한 수준을 나타내는 것을 확인하였다(표 3). D-젖산의 생산량 및 상기 효소의 가격을 고려할 때, 121.02 g/l의 젖산 생산량, 4.65 g/l의 환원당 생산량 및 88.75%의 젖산 수율을 나타내는 0.025%(v/w) 알파-아밀라제 및 0.025% 아밀로글루코시다제의 혼합 비율이 최적의 효소 혼합 비율인 것을 확인하였다(표 3).

<실시예 4> 질소원에 따른 젖산 생산 효과 확인

<4-1> 질소원에 따른 L-젖산 생산 효과 확인

본 발명의 젖산 생산 공정에서 최적의 질소원을 탐색하기 위하여, 효모 추출물(yeast extract; YE) 및 펩톤의 질소원 혼합 비율에 따른 L-젖산 생산 효과를 비교하였다.

구체적으로, 1 l의 증류수에 상기 <실시예 1>에서 제조한 고구마 바이오매스 136.36 g 및 상기 [표 1]에 기재된 배지 1의 무기염 조성을 첨가하고, 질소원으로 하기 [표 4]에 기재된 바와 같이 YE 및 펩톤을 혼합하여 배지에 첨가한 후, pH를 5.2 내지 5.5로 조절하기 위한 탄산칼슘을 고구마 바이오매스 건조물에 대해 50%(w/w)로 첨가하여 배지를 제조하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 L. 파라카제이 LA 104 균주를 배

양한 종배양 10%(v/v), 0.025%(v/w) 알파-아밀라제 및 0.05%(v/w) 아밀로글루코시다제를 첨가한 후, 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 SSF를 수행하였고, 72 시간 배양 후 배지를 수득하여 포도당 농도, 환원당 잔여량, 젖산 생산량, 환원당 전환율 및 젖산 수율을 확인하였다.

표 4

질소원에 따른 L-젖산 생산 효과 확인

질소원 첨가량(g)		환원당 농도 (g/ℓ)	젖산 생산농도 (g/ℓ)	젖산 수율 (%)	광학적 순수도 (%)
YE	펩톤				
3	0	2.95±0.14	113.92±1.50	83.54±1.10	95.68±0.05
3	3	2.78±0.01	117.40±1.13	86.10±0.83	95.59±0.11
3	5	2.92±0.07	122.63±0.63	89.93±0.46	95.67±0.06
5	0	2.82±0.12	122.38±1.82	89.75±1.33	95.87±0.05
5	3	2.69±0.27	123.53±0.55	90.59±0.40	95.83±0.01
5	5	2.81±0.07	123.35±0.40	90.46±0.29	95.91±0.04
7	0	3.03±0.17	122.76±4.21	90.03±3.09	95.75±0.17
7	3	2.86±0.12	122.53±2.85	89.85±2.09	95.81±0.02
7	5	2.88±0.29	123.07±0.50	90.25±0.37	95.76±0.13
10	5	2.84±0.38	123.40±1.11	90.49±0.82	95.75±0.01

그 결과, 상기 [표 4]에 나타난 바와 같이 YE 및 펩톤을 다양한 비율로 혼합한 질소원을 첨가하여 SSF를 수행하였을 때 젖산의 생산량은 질소원의 농도에 의존적으로 증가하였으며, YE 3 g 및 펩톤 5 g의 혼합 비율에서 최대의 L-젖산 생산량 및 수율을 나타내는 것을 확인하였다(표 4).

<4-2> 질소원에 따른 D-젖산 생산 효과 확인

본 발명의 젖산 생산 공정에서 최적의 질소원을 탐색하기 위하여, 효모 추출물 및 펩톤의 질소원 혼합 비율에 따른 D-젖산 생산 효과를 비교하였다.

구체적으로, 1 ℓ의 증류수에 상기 <실시예 1>에서 제조한 고구마 바이오매스 136.36 g 및 상기 [표 1]에 기재된 배지 2의 무기염 조성을 첨가하고, 질소원으로 하기 [표 5]에 기재된 바와 같이 YE 및 펩톤을 혼합하여 배지에 첨가한 후, pH를 5.2 내지 5.5로 조절하기 위한 탄산칼슘을 고구마 바이오매스 건조물에 대해 50%(w/w)로 첨가하여 배지를 제조하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 배양한 종배양 10%(v/v), 0.025%(v/w) 알파-아밀라제 및 0.025%(v/w) 아밀로글루코시다제를 첨가한 후, 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 SSF를 수행하였고, 72 시간 배양 후 배지를 수득하여 포도당 농도, 환원당 잔여량, 젖산 생산량, 환원당 전환율 및 젖산 수율을 확인하였다.

표 5

질소원에 따른 D-젖산 생산 효과 확인

질소원 첨가량(g)		환원당 농도 (g/ℓ)	젖산 생산농도 (g/ℓ)	젖산 수율 (%)	광학적 순수도 (%)
YE	펩톤				
3	0	6.58±1.45	85.86±3.63	62.96±2.66	99.45±0.14
3	3	5.26±0.29	97.23±1.61	71.30±1.18	99.52±0.06
3	5	5.03±0.02	107.74±2.25	79.01±1.65	99.55±0.02
5	0	5.12±0.11	91.54±3.85	67.13±2.82	99.44±0.03
5	3	4.63±0.11	106.61±1.25	78.18±0.92	99.58±0.04
5	5	4.68±0.09	115.07±2.98	84.39±2.19	99.57±0.01
7	0	4.77±0.12	98.00±3.68	71.86±2.70	99.56±0.03
7	3	4.09±0.12	122.23±0.32	89.64±0.24	99.62±0.01
7	5	4.37±0.09	122.65±1.21	89.94±0.89	99.61±0.01
10	5	3.84±0.08	121.84±0.37	89.35±0.27	99.63±0.00

그 결과, 상기 [표 5]에 나타난 바와 같이 YE 및 펩톤을 다양한 비율로 혼합한 질소원을 첨가하여 SSF를 수행하

였을 때 젖산의 생산량은 질소원의 농도에 의존적으로 증가하였으며, YE 7 g 및 펩톤 3 g의 혼합 비율에서 최대의 D-젖산 생산량 및 수율을 나타내는 것을 확인하였다(표 5).

[0082] <실시에 5> 무기염 유무에 따른 고구마로부터 젖산 생산 효과 확인

[0083] <5-1> 무기염 유무에 따른 고구마로부터 L-젖산 생산 효과의 확인

[0084] 본 발명의 고구마로부터 젖산을 생산하는 SSF 공정에서 무기염의 효과를 비교하기 위하여, 무기염의 유무 농도에 따른 L-젖산 생산 효과를 비교하였다.

[0085] 구체적으로, 1 ℓ의 증류수에 상기 <실시에 1>에서 제조한 고구마 바이오매스 136.36 g 및 황산망간 0.05 g의 무기염 조성에 YE 3 g 및 펩톤 5 g을 혼합하여 배지에 첨가한 후, pH를 5.2 내지 5.5로 조절하기 위한 탄산칼슘을 고구마 바이오매스 건조물에 대해 50%(w/w)로 첨가하여 배지를 제조하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 L. 파라카제이 LA 104 균주를 배양한 종배양 10%(v/v), 0.025%(v/w) 알파-아밀라제 및 0.05%(v/w) 아밀로글루코시다제를 첨가한 후, 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 SSF를 수행하였고, 72 시간 배양 후 배지를 수득하여 포도당 농도, 환원당 잔여량, 젖산 생산량, 환원당 전환율 및 젖산 수율을 확인하였다. 양성 대조군으로 상기 [표 1]에 기재된 배지 1의 무기염 조성을 첨가하고, 음성 대조군으로 무기염 조성을 첨가하지 않은 배지를 제조한 다음, 상기와 동일한 방법으로 SSF를 수행하였다.

[0086] 그 결과, 하기 [표 6]에 나타난 바와 같이 최적의 질소원 농도 및 효소 혼합물의 조건 하에서 무기염을 첨가하지 않은 음성 대조군의 L-젖산 생산 농도 및 수율은 122.51 g/ℓ 및 89.84%를 나타내어 무기염의 유무가 젖산 생산에 유의적인 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다(표 6).

표 6

[0087] 무기염 유무에 따른 L-젖산 생산 효과의 확인

무기염 첨가	환원당 농도 (g/ℓ)	젖산 생산농도 (g/ℓ)	젖산 수율 (%)	광학적 순수도 (%)
황산망간	2.90±0.15	122.46±2.09	89.81±1.53	95.62±0.10
양성 대조군	2.92±0.07	122.63±0.63	89.93±0.46	95.67±0.06
음성 대조군	2.70±0.14	122.51±0.60	89.84±0.44	95.58±0.11

[0088] <5-2> 무기염 유무에 따른 고구마로부터 D-젖산 생산 효과의 확인

[0089] 본 발명의 고구마로부터 젖산을 생산하는 SSF 공정에서 무기염의 효과를 비교하기 위하여, 무기염의 유무 농도에 따른 D-젖산 생산 효과를 비교하였다.

[0090] 구체적으로, 1 ℓ의 증류수에 상기 <실시에 1>에서 제조한 고구마 바이오매스 136.36 g 및 황산망간 0.05 g의 무기염 조성에 YE 7 g 및 펩톤 3 g을 혼합하여 배지에 첨가한 후, pH를 5.2 내지 5.5로 조절하기 위한 탄산칼슘을 고구마 바이오매스 건조물에 대해 50%(w/w)로 첨가하여 배지를 제조하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 배양한 종배양 10%(v/v), 0.025%(v/w) 알파-아밀라제 및 0.05%(v/w) 아밀로글루코시다제를 첨가한 후, 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 SSF를 수행하였고, 72 시간 배양 후 배지를 수득하여 포도당 농도, 환원당 잔여량, 젖산 생산량, 환원당 전환율 및 젖산 수율을 확인하였다. 양성 대조군으로 상기 [표 1]에 기재된 배지 2의 무기염 조성을 첨가하고, 음성 대조군으로 무기염 조성을 첨가하지 않은 배지를 제조한 다음, 상기와 동일한 방법으로 SSF를 수행하였다.

[0091] 그 결과, 하기 [표 7]에 나타난 바와 같이 최적의 질소원 농도 및 효소 혼합물의 조건 하에서 무기염으로 황산망간을 첨가하였을 때 D-젖산의 생산 농도 및 수율은 121.95 g/ℓ 및 89.43%를 나타내어 L.코리니포르미스 ATCC 256000 균주를 이용한 D-젖산의 생산을 위한 SSF 공정에서 황산망간이 유의적인 영향을 미치는 것을 확인하였다(표 7).

표 7

[0092]

무기염 유무에 따른 D-젖산 생산 효과의 확인

무기염 첨가	환원당 농도 (g/ℓ)	젖산 생산농도 (g/ℓ)	젖산 수율 (%)	광학적 순수도 (%)
황산망간	4.09±0.12	122.23±0.32	89.64±0.24	99.62±0.01
양성 대조군	3.44±0.22	121.95±0.70	89.43±0.52	99.63±0.01
음성 대조군	5.34±0.63	118.34±0.33	86.78±0.25	99.62±0.00

[0093]

<실시예 6> 최적화 조건 하에서 고구마 바이오매스로부터 젖산의 생산

[0094]

<6-1> 최적화 조건 하에서 L-젖산의 생산

[0095]

L-젖산의 생산을 위한 SSF 공정에서 작업량을 발효기 수준의 규모로 확대하기 위해, 상기 <실시예 3> 내지 <실시예 5>에서 최적화된 조건 하에서 고구마 바이오매스의 첨가 비율에 따른 L-젖산을 생산하기 위한 SSF 공정을 자 발효기에서 수행하였다.

[0096]

구체적으로, 고구마 바이오매스를 증류수에 1:2, 1:1.5 또는 1:1의 비율로 혼합하기 위하여 증류수 1 ℓ 당 상기 <실시예 1>에서 제조한 고구마 바이오매스 건조물 136.36, 168.22 또는 219.51 g 씩 첨가하고, YE 3 g 및 펩톤 5 g을 혼합하여 배지에 첨가한 후, 121℃에서 21 분간 멸균하여 1.8 ℓ의 배지를 제조하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 L. 파라카제이 LA104 균주를 배양한 종배양 200 ml, 0.025%(v/w) 알파-아밀라제 및 0.05%(v/w) 아밀로글루코시다제를 첨가한 후, 37℃에서 450 rpm으로 교반하면서 SSF를 수행하였다. 배지의 pH는 28% 암모니아 수용액(NH₄OH)을 자동으로 첨가하여 pH 6.0을 유지하였으며, 용존 산소를 0.5 ppm으로 유지하기 위해 발효기 내로 질소 가스를 주입하면서 총 60 시간 배양하였으며, 4 시간 간격으로 배지를 수득하여 포도당 잔여 농도, 환원당 잔여 농도, 젖산 생산 농도 및 젖산 생산성(productivity)을 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 확인하였으며, 균주의 생장은 희석 도말 평판법(dilution spread plate method)을 따라 수득한 배지를 10⁻⁵ 내지 10⁻⁸로 희석하여 MRS(Man, Rogosa and Sharpe) 한천 배지 위에 도말하여 배양한 후, 집락 형성 단위(colony-forming units; CFU)를 계수하여 수득한 배지의 1 ml 당 CFU 수를 Log10을 사용하여 나타내었다.

[0097]

그 결과, 도 1A 및 1C에서 나타내는 바와 같이 알파-아밀라제 및 아밀로글루코시다제에 의하여 고구마가 당화되어 포도당을 수득하였으며, 수득한 포도당은 다시 L. 파라카제이 LA104 균주에 의해 젖산으로 전환되는 것을 확인하였다(도 1). L. 파라카제이 LA104 균주의 배양 개시 이후 4 시간 안에 유도기(lag phase)를 거쳐서 CFU가 급격하게 상승하여, 당화 속도가 발효 속도보다 높아 환원당 및 포도당의 농도가 가장 높은 수준으로 상승하는 것을 확인하였다(도 1A). 배양 개시 4 시간 이후에 당화 속도가 감소하며 세포가 성장하여 12 시간 이후에 정지기(bacterial stationary phase)가 유지되면서 환원당 및 포도당의 농도가 감소하는 것을 확인하였다(도 1A 및 1C).

[0098]

또한, 도 1B에서 나타난 바와 같이 고구마 바이오매스의 첨가량에 의존적으로 L-젖산의 생산 농도 및 생산량이 증가하나 수율에는 영향을 미치지 않은 것을 확인하였으며, 고구마 바이오매스 및 물의 비율이 1:2, 1:1.5 또는 1:1 일 때, L. 파라카제이 LA104 균주 배양 개시 36, 40 또는 52 시간 이후에 환원당의 대부분이 L-젖산으로 전환되어 90.13, 91.17 또는 90.34%의 유사한 젖산 생산 수율을 나타내고, 시간 당 3.41, 3.83 또는 3.81 g/ℓ의 생산량을 나타내는 것을 확인하였다(도 1B).

[0099]

<6-2> 최적화 조건 하에서 D-젖산의 생산

[0100]

D-젖산의 생산을 위한 SSF 공정에서 작업량을 발효기 수준의 규모로 확대하기 위해, 상기 <실시예 3> 내지 <실시예 5>에서 최적화된 조건 하에서 고구마 바이오매스의 첨가 비율에 따른 D-젖산을 생산하기 위한 SSF 공정을 자 발효기에서 수행하였다.

[0101]

구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 제조한 고구마 바이오매스를 증류수에 1:2, 1:1.5 또는 1:1의 비율로 혼합하기 위하여 증류수 1 ℓ 당 상기 고구마 바이오매스 건조물 136.36, 168.22 또는 219.51 g 씩 첨가하고, YE 7 g 및 펩톤 3 g을 혼합하여 배지에 첨가한 후, 121℃에서 21 분간 멸균하여 1.8 ℓ의 배지를 제조하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 배양한 종배양 200 ml, 0.025%(v/w) 알파-아밀라제 및 0.025%(v/w) 아밀로글루코시다제를 첨가한 후, 37℃에서 450 rpm으로 교반하면서

상기 실시예 <6-1>과 동일한 방법으로 SSF를 수행한 다음, 4 시간 간격으로 배지를 수득하여 포도당 잔여 농도, 환원당 잔여 농도, 젖산 생산 농도 및 젖산 생산성(productivity)을 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 확인하였으며, 균주의 성장을 상기 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 확인하였다.

[0102] 그 결과, 도 2에서 나타나는 바와 같이 당화 속도 및 *L. 코리니포르미스* ATCC 25600 균주의 성장 속도는 *L. 파라카제이* LA104 균주의 배양과 유사한 양상을 나타내어 배양 개시 4 시간 내의 유독시에 알파-아밀라제 및 아밀로글루코시다제에 의하여 고구마로부터 환원당 및 포도당을 수득하였으며, 12 시간 이후에 정지기가 유지되면서 상기 수득한 환원당 및 포도당은 *L. 코리니포르미스* ATCC 25600 균주에 의해 D-젖산으로 전환됨에 따라 감소하는 것을 확인하였다(도 2A 및 2C).

[0103] 또한, 도 2B에서 나타난 바와 같이 D-젖산의 생산은 고구마 바이오매스의 첨가량에 영향을 받는 것을 확인하였으며, 고구마 바이오매스 및 물의 비율이 1:2일 때 *L. 코리니포르미스* ATCC 25600 균주 배양 개시 48 및 52 시간 이후에 시간 당 2.55 및 2.92 g/l의 젖산 생산성, 122.49 및 151.59 g/l의 젖산 생산 농도 및, 89.83 및 90.11%의 수율을 나타내는 것을 확인하였고, 고구마 바이오매스 및 물의 비율이 1:1일 때 *L. 코리니포르미스* ATCC 25600 균주 배양 개시 60 시간 후의 젖산 생산성을 시간 당 3.11 g/l로 상승하나, 수율은 84.98%로 감소하는 것을 확인하였다(도 2B).

[0104] 아울러, 하기 [표 8]에서 나타난 바와 같이 이전에 공지된 전분성 물질(starchy materials)로부터 젖산을 생산하기 위한 SSF 및 분리 당화 및 발효(separate hydrolysis and fermentation; SHF) 공정과 비교하였을 때 본 발명의 고구마를 바이오매스로 하여 젖산을 생산하기 위한 SSF 공정은 단순 배지 내에서 저렴한 단가와 동시에 높은 젖산 수율 및 생산성을 나타내므로, 본 발명의 SSF 공정이 유의적인 효과가 있음을 확인하였다(표 8).

【표 8】

전분성 물질로부터 젖산을 생산하기 위한 SSF 및 SHF 공정의 비교

원재료	질 소원 (g/l)	발효 균주	공정방법	젖산 생산농도 (g/l)	젖산 생산성 (g/l/h)	젖산 수율 (%)	출처
카사바 분말 (Cassava powder)	5 g YE 5 g NH ₄ Cl	<i>L. rhamnosus</i> CASL	회분배양 -SSF	175.4 ^a	1.83	0.64	L. Wang <i>et al.</i> (2010)
감자 전분 (Potato starch)	5 g YE 5 g Ure	<i>L. delbrueckii</i>	회분배양 -SSF	189 ^a	1.89	0.76	R. Anuradha <i>et al.</i> (1999)
고구마 가루 (Sweet potato flour)	10 g Pep 5 g YE, 10 g BE	<i>L. plantarum</i> MTCC 1407	회분배양 -SSF	23.86 ^a	0.2	0.24	S.H. Panda and R.C. Ray (2008)
고구마 전분 (Sweet potato starch)	10 g BE 5 g YE	<i>L. amylophilus</i> BBRC 14055	유가배양 -SSF	43.7 ^a	0.75 ^a	0.76	H.W. Yen and J.L. Kung (2010)
카사바 버개스 (Cassava bagasse)	7.5 g YE 3 g NH ₄ Cl	<i>L. casei</i> and <i>L. delbrueckii</i>	회분배양 -SSF	81 ^a	1.35	0.54	R. P. John <i>et al.</i> (2007)
전분	8 g RL 10 g BYC	<i>L. amylophilus</i> GV6	회분배양 -SSF	13.5 ^a	0.28	0.89	M. Altaf <i>et al.</i> (2007)
비가공 옥수수전분 (Raw corn starch)	5 g pep 5 g BE, 5 g YE	<i>S. bovis</i> 148	회분배양 -SSF	14.7 ^a		0.74	J. Narita <i>et al.</i> (2004)
생전분 (Raw starch)	10 g Pep 5 g YE, 10 g BE	<i>L. manihotivorans</i> LMG 18010 ^f	회분배양 -SSF	12.6 ^a	0.5	0.67 ^{***}	J.P. Guyot <i>et al.</i> (2000)
신선한 카사바 뿌리 (Fresh cassava roots)	20 g Pep	<i>S. bovis</i> JCM 5802	회분배양 -SSF	43.3 ^a	3.29	0.87	S.D. Yumoto and T. Kobayashi (2008)
사고 전분 (Sago starch)	10 g Pep 8 g BE, 4 g YE	<i>E. faecium</i> No. 78	회분배양 -SSF	16.6 ^a	1.11	0.83	K. Shibata <i>et al.</i> (2007)
비가공 옥수수전분	10 g Pep 5 g YE	<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826 1dhL1::amyA	회분배양 -SSF	73.2 ^b	1.53	0.73	K. Okano <i>et al.</i> (2009)
카사바 버개스	5 g YE	<i>L. casei</i> NCIMB 3254	회분배양 -SSF	83.8 ^a	1.36	54	R.P. John <i>et al.</i> (2006)
옥수수 전분				129.9 ^a	1.5	1.04	
타피오카 전분 (Tapioca starch)	1g YE	<i>E. faecalis</i> RKY1	회분배양 -SHF	126.7 ^a	1.5	1.01	Y.J. Wee <i>et al.</i> (2008)
감자 전분	30 g CSL			123.3 ^a	1.7	0.99	
밀 전분 (Wheat starch)				123.2 ^a	1.4	0.99	
보리 전분 (Barley starch)	10 g YE 10 g Pep	<i>L. casei</i> NRRL B-441	회분배양 -SSF	162 ^a	3.45	0.95	Y.Y. Linko and P. Javanainen (1996)
밀가루 (Wheat flour)	5 g YE	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> ATCC 9649	회분배양 -SHF	109 ^a	1.09	0.91 ^{***}	E. Høvdahl and E. Hahn-Baggerdal (1997)
신선한 고구마	3 g YE 5 g Pep	<i>L. 파라카제이</i> LA104	회분배양 -SSF	122.91 ^a	3.41	0.9	본 발명
				153.38 ^a	3.83	0.91	
				198.32 ^a	3.81	0.9	

[0105]

[0106]

L.: 락토바실러스(Lactobacillus); *S.*: 스트렙토코커스(Streptococcus); *E.*: 엔테로코커스(Enterococcus); SSF: 공동 당화 및 발효; SHF: 분리 당화 및 발효; YE: 효모 추출물(yeast extract); Pep: 펩톤(Peptone); BE: 쇠고기 추출물(Beef extract); RL: 붉은 렌즈콩(red lentil); BYC: 빵 효모 추출물(Baker's yeast extract);

CSL: 옥수수 침전액(corn steep liquor).

[0107]

^a L-젖산; 및 ^bD-젖산의 생산을 나타낸다.

[0108]

^c 생산된 젖산의 양(g)/ 초기 바이오매스 중량(g)으로 계산한다.

[0109]

* 젖산 생산성의 최대값을 나타낸다.

[0110]

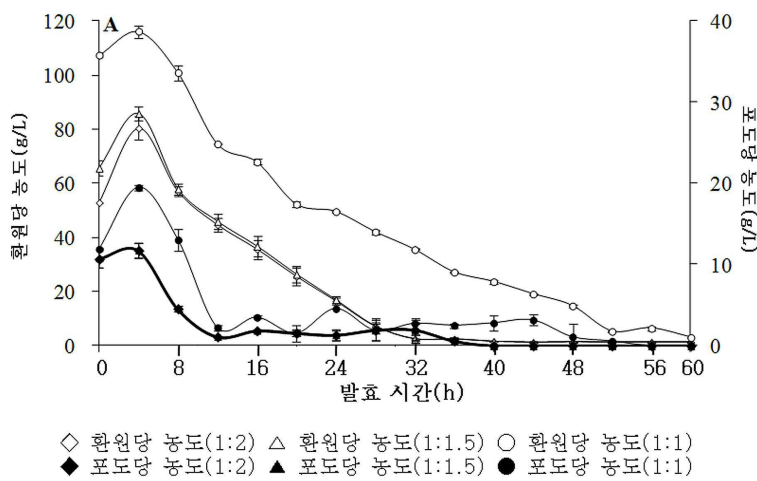
** 생산된 젖산의 양(g)/ 소비된 포도당의 양(g)으로 계산한 값이다.

[0111]

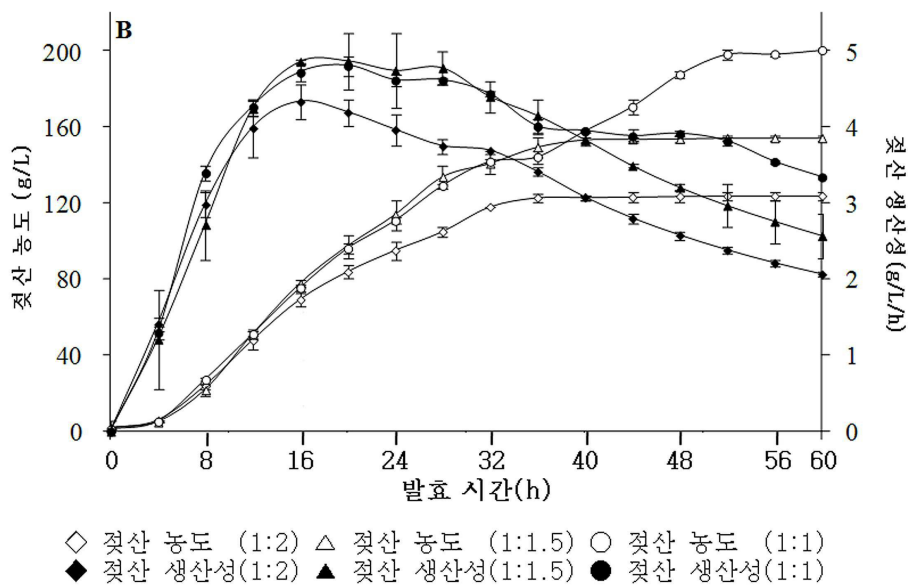
*** 생산된 젖산의 양(g)/ 초기 포도당의 양(g)으로 계산한 값이다.

도면

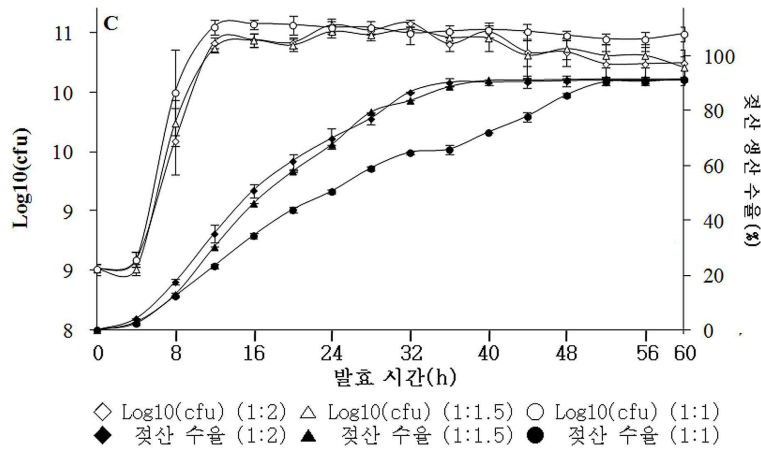
도면1a



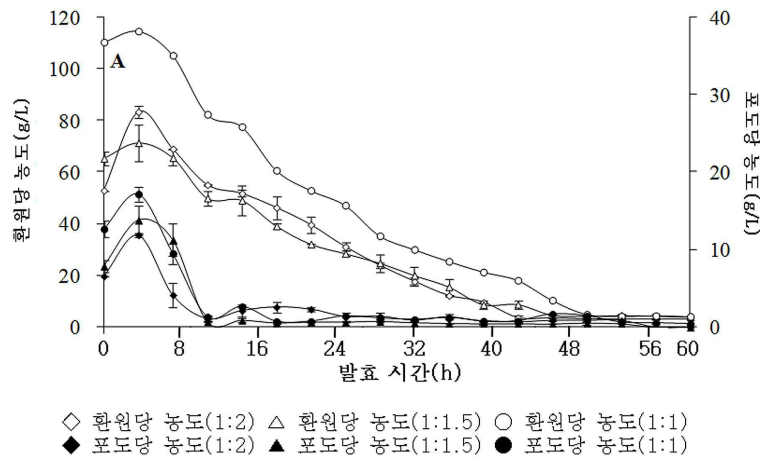
도면1b



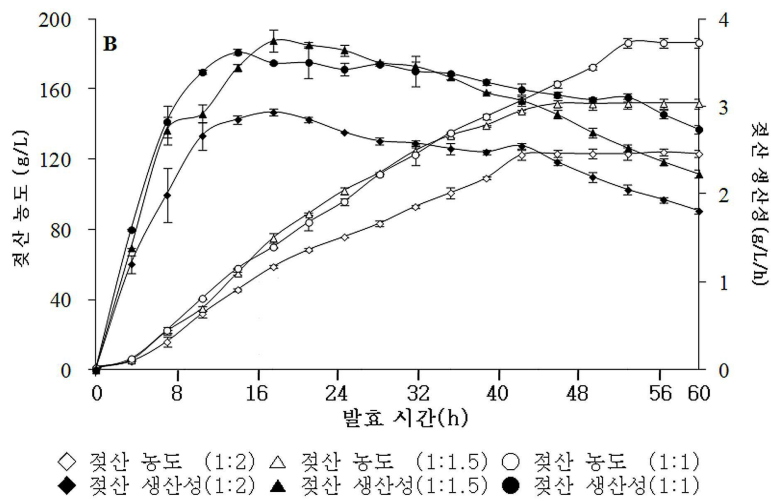
도면1c



도면2a



도면2b



도면2c

