



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월11일  
(11) 등록번호 10-1517585  
(24) 등록일자 2015년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12P 19/14 (2006.01) C12P 7/56 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0097462  
(22) 출원일자 2013년08월16일  
심사청구일자 2013년08월16일  
(65) 공개번호 10-2015-0021593  
(43) 공개일자 2015년03월03일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR100464597 B1\*  
KR1020090001116 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)  
최경자  
대전 유성구 엑스포로 448, 208동 1403호 (전민동, 엑스포아파트)  
(74) 대리인  
이원희

전체 청구항 수 : 총 5 항

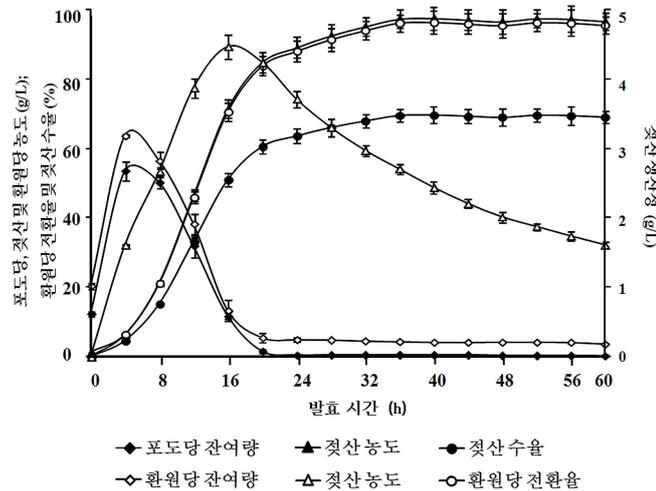
심사관 : 한지혜

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

(57) 요약

본 발명은 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*)로부터 당화효소 혼합물을 사용하는 당 생산 방법 및 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주를 상기 당화효소 혼합물과 동시에 사용하여 젖산(lactic acid)을 생산하는 동시 당화 및 발효(Simultaneous saccharification and cofermentation; SSCF)에 관한 것으로, 구체적으로 울금 폐기물을 바이오매스로 하여 당화효소 혼합물을 통한 당화(saccharification) 또는, 상기 당화효소 혼합물, 질소원 및 락토바실러스 속 균주를 통한 SSCF 공정은 저렴한 단가와 재생가능한 바이오매스를 사용하여 고농도의 당 또는 젖산을 생산하므로, 상기 당화 또는 SSCF 공정은 울금 폐기물로부터 고농도의 당 생산 방법 또는 젖산의 생산 방법에 효과적으로 적용하여 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

**최용호**

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

**장경수**

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

**응우웬 마이 쑹**

대전시 유성구 신성동 19

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1304-B0

부처명 산업기술연구회

연구관리전문기관 산업기술연구회

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 천연물 기반 그린바이오 작물보호소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

삭제

#### 청구항 2

1) 울금 폐기물 90 내지 140 g/ℓ 에, 당화효소 혼합물로서 셀룰라아제, 셀로비아제, α-아밀라아제 및 아밀로 글루코시다아제가 2:2:2:2, 2:2:1:2, 2:2:2:1 또는 2:2:1:1로 혼합된 당화효소 혼합물을 사용하되, 여기서 상기 당화효소 혼합물을 울금폐기물에 대하여 4 내지 8%(v/w)로 첨가하고, 질소원으로서 효모추출물, 펩톤, 대두박, 효모추출물과 펩톤의 혼합물 및 쇠고기 추출물로 구성된 군으로부터 선택된 질소원이 10 내지 30 g/ℓ, 및 젖산 발효 균주를 첨가하여 동시 당화 및 발효(Simultaneous saccharification and cofermentation; SSCF)를 수행하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 산물에서 젖산(lactic acid)을 수득하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 젖산의 생산 방법.

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 당화효소 혼합물은 셀룰라아제, 셀로비아제, α-아밀라아제 및 아밀로글루코시다아제를 2:2:1:1의 비율(v/w)로 혼합된 것을 특징으로 하는 젖산의 생산 방법.

#### 청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 울금 폐기물은 90 내지 160 g/ℓ 로 포함되는 것을 특징으로 하는 젖산의 생산 방법.

#### 청구항 7

제 2항에 있어서, 상기 단계 1)의 젖산 발효 균주는 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104) 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)인 것을 특징으로 하는 울금 폐기물로부터 젖산의 생산 방법.

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

제 2항에 있어서, 상기 단계 1)에서 동시 당화 및 발효를 위한 배지는 무기염을 포함하는 것을 특징으로 하는 울금 폐기물로부터 젖산의 생산 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 울금 폐기물(waste Curcuma longa)로부터 당화효소 혼합물을 사용하여 당을 생산하는 당화(saccharification) 과정 및 락토바실러스(Lactobacillus) 속 균주를 상기 당화효소 혼합물과 동시에 사용하여 젖산(lactic acid)을 생산하는 동시 당화 및 발효(Simultaneous saccharification and cofermentation; SSCF)에 관한 것이다.

**배경 기술**

[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. 최근에, 재생 가능 물질로부터 얻은 생분해 및 생체 적합성의 화학물질인 폴리젖산(polylactic acid)은 특징 및 적용 가능성 때문에 세계적으로 관심을 얻고 있다(Wee et al., 2006; Werpy and Petersen, 2004).

[0003] 젖산은 석유화학적 산업에서 부산물과 같이 화학적으로 합성되거나 또는 미생물의 발효에 의해서 제조될 수 있다. 석유화학적 산업으로 야기된 석유자원의 급속한 감소 및 환경 오염으로 인해, 합성 공정으로 인해 얻어지는 방법이 아닌 높은 광학적 순도를 가지는 젖산으로부터 폴리젖산을 생산하는 발효를 통해 젖산의 과잉 생산이 대두되었고, 현재 전세계적으로 연간 생산되는 젖산의 약 90%가 발효공정에 의해 생산되고 있다(Nolasco-Hipolite et al., 2002). 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 가능하다. 결과적으로 L- 및 D- 젖산의 비율은 결과된 폴리-젖산의 특성 및 생분해능에 영향을 미친다(Datta and Henry, 2006; John et al., 2007; John et al., 2009; Wang et al., 2011).

[0004] 중합체의 생산과 같은 산업적인 사용은 대부분 비교적 낮은 단가로부터 많은 젖산 생산량을 요구하기 때문에, 저렴하며, 진분, 농공업용 잔여물 또는 (녹조류 및 나무와 같이) 다른 리그노셀룰로오스 물질을 포함하는 재생 가능한 물질이 경제성 있는 젖산의 생산에 필수적으로 요구된다(Moldes et al., 2001; Nguyen et al., 2012a,b; Wee et al., 2006). 매년 전세계적으로 약 350억 톤 가량의 농산업 폐기물이 생산되며, 이는 특히 탄수화물 공급원료(feedstock)로서 사용된다. 농산업 폐기물은 탄수화물을 많이 가지고 있기 때문에, 이를 이용하는 것에는 낮은 단백질 함량 및 소화율에 의해 제한을 받는다 (John et al., 2007).

[0005] 탄수화물이 다당류로 분해될 때, 무기산 또는 효소 촉매에 의한 발효당으로 분해되어야만 한다. 효소 촉매의 잘 알려진 단점으로는 가수분해 단계에서 포도당 또는 젖산에 의한 효소 활성의 저해 및 상업적 이용에서 효소의 높은 단가를 들 수 있다. 그러나, 동시 당화 및 발효(simultaneous saccharification and fermentation; SSCF) 공정에서 효소 억제가 예방될 수 있음이 보고되었다( Abdel-Rahman et al., 2011; John et al., 2009). 추가로, 현대 생명공학의 발전은 바이오매스의 가수분해를 위한 효소를 제작함으로써 단가를 절감할 수 있게 하였다.

[0006] 따라서, 가수분해 효소는 산업에서 액상화(liquefaction) 및 당화 공정을 수행하기 위해 관심을 받고 있다 (Schafer et al., 2007). 리그노셀룰로오스 물질을 분해하기 위해서는, 탄수화물-리그닌(lignin) 복합체의 형성을 차단하여 가수분해 효소가 탄수화물에 접근하는 것이 용이하도록 하는 전처리 단계가 요구된다. 바이오매스에서, 리그닌은 바이오매스가 화학적 및 생물학적 분해되는 것을 억제하므로 발효 기질로 사용되는 것이 불가능하다 (Abdel-Rahman et al., 2011).

[0007] 울금은 땅속 줄기(rhizomatous) 또는 초본(herbaceous) 식물작물로서, 식물학적으로 커큐마 롱가(Curcuma longa)로도 불린다. 울금의 뿌리 줄기(rhizomes) 또는 지하경(underground stems)은 고대(antiquity)부터 조

미료(condiments), 염색료 및 다양한 의학 분야에서 방향성 흥분제(aromatic stimulant)로 사용되어 왔다. 또한, 울금은 인도 및 동남 아시아에서 매우 중요한 향신료로 사용된다. 2007년 인도에서 생산된 울금의 양은 약 900,000 톤으로, 세계 울금 생산량의 78%이 인도에서 생산되며, 이는 세계 수출액 비율의 60%를 차지하는 것으로 보고된다.

[0008]

울금의 조성에서, 다가페놀 색소(polyphenolic pigments)인 커큐미노이드(Curcuminoid)는 울금의 조성 중 3 내지 6%를 차지하며, 울금 내의 천연 커큐미노이드는 인간에서 항산화제, 항-염증 특성, 항-암 효과 및 혈당강화 효과(hypoglycemic effect)를 가지므로, 민간요법(folk medicines)에서 사용되고 있다(Cherubino and Alves 2005). 울금 폐기물은 커큐미노이드 생산 공정에서 발생하는 부산물이며, 전분을 주로 포함하는, 높은 다당류 조성을 함유하고 있다. 커큐미노이드 분리 공정에서, 올레오레진(oleoresin)은 아세톤(acetone), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 클로로포름(chloroform), 메탄올(methanol) 또는 에탄올(ethanol)과 같은 유기용매에 의해서 추출된다. 총 추출 수율은 용매, 바이오매스(material) 및 분리 조건에 따라 15.45 내지 21.55%(g 추출물/g 바이오매스)이며, 폐기 폐기물은 78.45 내지 84.55% (w/w)이다(Revathy et al., 2011). 울금은 60 내지 70% 탄수화물, 2 내지 7% 섬유질, 3 내지 7% 무기물질 및 6 내지 8% 단백질로 구성되며, 이는 커큐미노이드 추출 공정 후 폐기물에 남아있게 된다(Balakrishnan, 2007). 따라서, 울금 폐기물은 탄소 및 질소원이 풍부하여 전처리 과정을 필요로 하지 않는 젖산 생산에 효과적이다. 그러나, 울금 폐기물로부터 젖산을 생산하는 공정에 관하여는 아직까지 보고된 바가 없다.

[0009]

따라서, 본 발명자들은 울금 폐기물로부터 젖산을 효율적으로 생산하는 공정을 개발하기 위해 노력한 결과, 울금 폐기물에 셀룰라아제(cellulase), 셀로비아제(cellobiase),  $\alpha$ -아밀라아제( $\alpha$ -amylase) 및 아밀로글루코시다아제(amyloglucosidase)를 혼합한 당화효소 혼합물을 첨가하여 효율적으로 당을 생산하였으며, 아울러, 상기 당화효소 혼합물을 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104) 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)와 함께 울금 폐기물에 첨가하고 질소원으로 대두박(soybean meal; SM)을 사용하여 동시 당화 및 발효를 동시에 수행한 결과, 상기 동시 당화 및 발효를 통해 L- 또는 D-젖산을 효과적으로 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0010]

- (비특허문헌 0001) Adsul, M.G et. al, Green Chem. 9, 58-62, 2007.
- (비특허문헌 0002) Budhavaram, N.K., Fan, Z., Bioresour. Technol. 100, 5966-5972, 2009.
- (비특허문헌 0003) Iyer, P.V., Lee, Y.Y., Biotechnol. Lett. 21, 371-373, 1999.
- (비특허문헌 0004) John, R.P. et. al, Appl. Biochem. Biotechnol. 134, 263-272, 2006a.
- (비특허문헌 0005) John, R.P. et. al, Biotechnol. Lett. 28, 1823-1826, 2006b.
- (비특허문헌 0006) Li, Z. et. al, Biotechnol. J. 1, 1453-1458, 2006.
- (비특허문헌 0007) Maas, R.H.W. et. al, Appl. Microbiol. Biotechnol. 78, 751-758, 2008.
- (비특허문헌 0008) Moldes, A.B. et. al, J. Chem. Technol. Biotechnol. 76, 279-284, 2011.
- (비특허문헌 0009) Nguyen, C.M. et. al, Bioresour. Technol. 110, 552-559, 2012a.
- (비특허문헌 0010) Nguyen, C.M. et. al, Biotechnol. Lett. 34, 2235-2240, 2012b.
- (비특허문헌 0011) Romani, A. et. al, Bioresour. Technol. 99, 4247-4254, 2008.
- (비특허문헌 0012) Shen, X., Xia, L., World J. Microbiol. Biotechnol. 22, 1109-1114, 2006.
- (비특허문헌 0013) Wang, L. et. al, Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 1009-1017, 2011.
- (비특허문헌 0014) Watanabe, M. et. al, J. Biosci. Bioeng. 115(4), 449-452, 2013.

(비특허문헌 0015) Zhou, S.D. et. al, Appl. Biochem. Biotechnol. 57-58, 517-527, 1995.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0011] 본 발명의 목적은 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*)을 바이오매스로 하여 당화(saccharification) 과정을 통한 당의 생산 방법, 및 동시 당화 및 발효(Simultaneous saccharification and cofermentation; SSCF)를 통한 젖산의 생산 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0013] 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*)에 당화효소 혼합물을 첨가하여 당화(saccharification)하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 당의 생산 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은

[0015] 1) 울금 폐기물에 당화효소 혼합물, 질소원 및 젖산 발효 균주를 첨가하여 동시 당화 및 발효(Simultaneous saccharification and cofermentation; SSCF)를 수행하는 단계; 및

[0016] 2) 상기 단계 1)의 산물에서 젖산(lactic acid)을 수득하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 젖산의 생산 방법을 제공한다.

**발명의 효과**

[0017] 본 발명의 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*)을 바이오매스로 하여 당화효소 혼합물을 통한 당화(saccharification) 또는, 상기 당화효소 혼합물, 질소원 및 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주를 통한 동시 당화 및 발효(Simultaneous saccharification and cofermentation; SSCF)는 효율적으로 당 또는 젖산을 생산할 수 있으므로, 상기 당화 또는 동시 당화 및 발효를 통해 울금 폐기물로부터 고농도의 당 또는 젖산을 생산할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0018] 도 1은 효소 혼합물 첨가에 따른 환원당(reducing sugar) 잔여 농도 및 생산된 젖산(lactic acid)의 농도를 비교하는 그래프를 나타낸다.

도 2는 효소 혼합물 첨가에 따른 환원당 전환율(conversion) 및 젖산의 수율(yield)를 비교하는 그래프를 나타낸다.

도 3은 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*; WCL)의 초기 농도에 따른 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104; L. 파라카제이 LA104) 균주의 L-젖산 생산 효과를 보이는 그래프를 나타낸다.

도 4는 울금 폐기물의 초기 농도에 따른 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600; L. 코리니포르미스 ATCC25600) 균주의 D-젖산 생산 효과를 보이는 그래프를 나타낸다.

도 5는 자 발효기(jar fermentator)에서 울금 폐기물로부터 L-젖산을 생산하기 위한 당화 및 발효(Simultaneous saccharification and cofermentation; SSCF) 공정의 L. 파라카제이 LA104 생장곡선 및 L-젖산의 광학적 순수도(optical purity)를 보이는 그래프를 나타낸다.

도 6은 자 발효기에서 울금 폐기물로부터 D-젖산을 생산하기 위한 SSCF 공정의 L. 코리니포르미스 ATCC25600 생

장곡선 및 D-젖산의 광학적 순수도를 보이는 그래프를 나타낸다.

도 7은 자 발효기에서 L. 파라카제이 LA104를 통한 SSCF 공정의 L-젖산 생산 효과를 보이는 그래프를 나타낸다.

도 8은 자 발효기에서 L. 코리니포르미스 ATCC25600를 통한 SSCF 공정의 D-젖산 생산 효과를 보이는 그래프를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0019]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020]

본 발명은 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*)에 당화효소 혼합물을 첨가하여 당화(saccharification)하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 당의 생산 방법을 제공한다.

[0021]

아울러, 본 발명은

[0022]

1) 울금 폐기물에 당화효소 혼합물, 질소원 및 젖산 발효 균주를 첨가하여 동시 당화 및 발효(Simultaneous saccharification and cofermentation; SSCF)를 수행하는 단계; 및

[0023]

2) 상기 단계 1)의 산물에서 젖산(lactic acid)을 수득하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 젖산의 생산 방법을 제공한다.

[0024]

상기 당화효소는 셀룰라아제(cellulase), 셀로비아제(cellobiase), β-글루코시다제(β-glucosidase), β-아가라제(β-agarase), β-갈락토시다제(β-galactosidase), 엔도-1,4-β-글루카나제(endo-1,4-β-glucanase), α-아밀라아제(α-amylase), β-아밀라아제(β-amylase), 아밀로글루코시다아제(amyloglucosidase), 라미나리나아제(laminarinase), α-D-글루코시다아제(α-D-glucosidase), β-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, 셀룰라아제, 셀로비아제, α-아밀라아제 및 아밀로글루코시다아제로 이루어진 군으로부터 하나 또는 둘 이상의 혼합물인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0025]

상기 당화효소 혼합물은 울금 폐기물에 대하여 4 내지 8 %(v/w)로 첨가되는 것이 바람직하며, 5 내지 7%(v/w)로 첨가되는 것이 보다 바람직하고, 6%(v/w)로 첨가되는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0026]

상기 당화효소 혼합물은 셀룰라아제, 셀로비아제, α-아밀라아제 및 아밀로글루코시다아제로 이루어진 군으로부터 하나 또는 그 이상의 효소가 각각 1 내지 2의 비율로 혼합되는 것이 바람직하고, 구체적으로는 2:2:2:2, 1:1:2:2, 2:0:2:2, 0:2:2:2, 2:2:1:2, 1:1:1:2, 2:2:2:1, 1:1:1:1, 0:0:2:2 또는 2:2:1:1(v/w)의 비율로 혼합되는 것이 보다 바람직하며, 더욱 구체적으로는 2:2:1:1(v/w)의 비율로 혼합되는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0027]

상기 울금 폐기물은 90 내지 160 g/l로 포함되는 것이 바람직하며, 120 내지 150 g/l로 포함되는 것이 보다 바람직하고, 140 g/l로 포함되는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 동시 당화 및 발효공정에서 상기 울금 폐기물이 140 g/l 보다 높은 양으로 포함되는 경우에는 생산 및 축적된 젖산에 의해서 당화효소 혼합물의 활성이 영향을 받으며 기질의 점도가 상승하게 되어 효과가 없다.

[0028]

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 울금으로부터 커큐미노이드(curcuminoid)를 추출한 후의 부산물인 울금 폐기물을 수득하여 조성을 확인하였으며(표 1), 이를 바이오매스로 하는 당화 과정에서 최적의 조건이 되는 당화효소 혼합물의 조성을 확인하기 위하여 다양한 비율의 당화효소 혼합물 및, 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104) 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)를 이용한 동시 당화 및 발효공정을 수행하여 젖산을 생산한 결과(표 2 참조), 울금 폐기물 증량에 대하여 셀룰라아제, 셀로비아제, α-아밀라아제 및 아밀로글루코시다아제를 각각 2%, 2%, 1% 및 1%의 비율로 첨가하였을 때 가장 효율적으로 젖산이 생산되는 것과 동시에 효소의 단가를 저렴하게 하는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조).

- [0029] 또한, 본 발명자들은 울금 폐기물을 90 내지 160 g/l로 포함하는 동시 당화 및 발효공정을 수행하여 젖산을 생산한 결과, 상기 울금 폐기물이 140 g/l 이하로 포함될 때 젖산의 생산량은 울금 폐기물의 농도에 의존적으로 증가하나, 150 g/l 이상으로 환원당 전환율 및 젖산의 수율이 감소하므로, 본 발명의 울금 폐기물을 바이오매스로 하는 당화 또는 동시 당화 및 발효 공정에서 최적의 초기 울금 폐기물 농도는 140 g/l임을 확인하였다(도 3 및 도 4 참조).
- [0030] 따라서, 본 발명의 울금 폐기물을 바이오매스로 하는 당화 또는 동시 당화 및 발효 공정에서 최적의 초기 울금 폐기물 농도는 140 g/l를 하고 울금 폐기물 중량에 대하여 셀룰라아제, 셀로비아제, α-아밀라아제 및 아밀로 글루코시다아제를 각각 2%, 2%, 1% 및 1%의 비율로 혼합한 혼합물을 최적의 당화효소 혼합물로 사용하였을 때 높은 환원당 전환율 및 젖산 생산량을 나타내므로, 상기 울금 폐기물 농도 및 당화효소 혼합물은 당화 또는 동시 당화 및 발효를 통한 울금 폐기물로부터 고농도의 당 또는 젖산의 생산 방법에 적용하여 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0031] 상기 단계 1)의 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 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 상기 단계 1)의 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), 황산 암모늄(ammonium sulfate), 요소(urea), 엿기름(malt sprouts) 및 스킵밀크(skim milk)로 이루어진 균으로부터 하나 또는 그 이상을 포함하는 것이 바람직하며, 효모 추출물, 펩톤, 대두박, 쇠고기 추출물 및 카제인 가수분해물로 이루어진 균으로부터 하나 또는 그 이상을 포함하는 것이 더욱 바람직하고, 대두박을 포함하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 상기 질소원은 5 내지 30 g/l의 농도로 포함되는 것이 바람직하고, 5 내지 15 g/l의 농도로 포함되는 것이 더욱 바람직하며, 10 내지 15 g/l의 농도로 포함되는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 질소원이 30 g/l의 농도 이상인 경우에는 젖산 생산량이 유의적으로 증가하지 않아 상대적으로 공정 단가가 상승한다.
- [0034] 상기 단계 1)에서 동시 당화 및 발효를 위한 배지는 무기염을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 무기염을 포함하지 않는 경우에도 동일한 효과를 가지는 젖산 발효 균주의 경우에는 무기염을 포함하지 않을 수 있다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 최적의 초기 울금 폐기물 농도 및 당화효소 혼합물의 조건에서 최적의 질소원을 선별하기 위하여 L. 파라카제이 LA104 또는 L. 코리니포르미스 ATCC 25600를 이용하여 다양한 질소원에 따른 동시 당화 및 발효공정을 수행하여 젖산을 생산한 결과, 대두박을 사용하였을 때 저렴한 단가와 높은 생산량의 효과를 나타내는 것을 확인하였다(표 4 및 표 5 참조).
- [0036] 또한, 본 발명자들은 최적의 대두박 농도에 따른 젖산의 생산 효과를 확인하기 위하여 0 내지 30 g/l의 농도에 따른 동시 당화 및 발효공정을 수행하여 젖산을 생산한 결과, L. 파라카제이 LA104 균주의 경우에 10 g/l의 농도 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600의 경우에는 15 g/l의 농도에서 최대 젖산 생산량을 나타내는 것을 확인하였다(표 6 및 표 7 참조). 상기 결과는 이전에 공지된 대두박을 질소원으로 하는 젖산 발효 공정과 비교하였을 때 상대적으로 적은 대두박 농도로 높은 젖산 수율을 나타내는 것을 확인하였다(표 8 참조).
- [0037] 또한, 본 발명자들은 무기염의 유무에 따른 울금 폐기물로부터 젖산 생산 효과를 확인하기 위하여 배지를 조성하여 동시 당화 및 발효공정을 수행한 결과, L. 파라카제이 LA104 또는 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주는 무기염의 유무가 젖산의 생산에 유의적인 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다(표 9 참조).
- [0038] 또한, 본 발명자들은 최적화된 조건 하에서 울금 폐기물로부터 젖산을 생산하기 위하여 울금 폐기물 140 g/l,

울금 폐기물에 대하여 셀룰라아제, 셀로비아제, α-아밀라아제 및 아밀로글루코시다아제를 각각 2%, 2%, 1% 및 1%(v/w)의 비율로 혼합한 당화효소 혼합물, 대두박 10 또는 15 g/l, 및 L. 파라카제이 LA104 또는 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 첨가하여 동시 당화 및 발효를 수행하여 L- 또는 D- 젖산을 생산한 결과, 초기에 빠른 당화 과정이 일어나며 이후 효과적인 젖산의 생산이 수행되는 것을 확인하였으며(도 5 내지 도 8), 상기 결과는 이전에 공지된 농산업 잔여물(agroindustrial residue) 및 셀룰로오스 물질(cellulistic material)로부터 젖산 및 이의 유도체를 생산하기 위한 동시 당화 및 발효공정과 비교하였을 때 젖산이 유의적으로 생산되는 결과임을 확인하였다(표 10).

[0039] 따라서, 본 발명의 울금 폐기물을 바이오매스로 하는 동시 당화 및 발효 공정에서 최적의 초기 울금 폐기물 농도는 140 g/l 를 하고 울금 폐기물에 대하여 셀룰라아제, 셀로비아제, α-아밀라아제 및 아밀로글루코시다아제를 각각 2%, 2%, 1% 및 1%의 비율(v/w)로 혼합한 당화효소 혼합물, 대두박 10 또는 15 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 울금 폐기물로부터 고농도의 젖산의 생산 방법에 적용하여 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0041] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0042] <실시예 1> 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*; WCL)의 제조

[0043] 본 발명에서 당화(Saccharification) 또는 동시 당화 및 발효(Simultaneous saccharification and cofermentation; SSCF) 공정의 바이오매스로 사용하기 위해, 커큐미노이드(curcuminoid) 생산의 부산물(by-product)인 울금 폐기물을 제조하였다.

[0044] 구체적으로, 약 1200 톤 재료물질/연 크기의 커큐미노이드 추출물 발효조(pilot)(베트남 공업대학 식물화학과, 하노이, 베트남)에 총 1000 kg의 울금 분말(turmeric powder)과 함께 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 첨가하고, 환류식 장치(reflux apparatus)를 이용해 8 시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 에틸 아세테이트 층을 수득하여 커큐미노이드를 결정화 및 정제하였고, 울금 폐기물은 2.5 기압의 수증기를 이용해 에틸 아세테이트를 제거한 후 2 일간 햇볕에서 건조하여 수득하였으며, 한국 식품공전 규격(Korea Food Standard Codex)에 기재된 바를 따라 울금 폐기물의 조성을 분석한 후, 사용 전까지 비닐팩에 담아 4℃에서 보관하였다.

[0045] 그 결과, 1000 kg의 울금 분말로부터 총 850 kg의 울금 폐기물을 수득하였으며, 하기 [표 1]에서 나타난 바와 같은 조성을 포함하는 것을 확인하였다(표 1). 커큐미노이드 및 정유(essential oils)는 추출 공정을 거치면서 제거되었으며, 인(phosphorous), 철분(iron), 칼륨(potassium), 티아민(thiamine), 리보플라빈(riboflavin), 니아신(niacin) 및 아스코르브산(ascorbic acid)을 포함하는 젖산-생산 미생물의 생장에 필수적으로 보고된 화합물(Balakrishnan. K.V., Danvers, pp. 193-256, 2007)은 울금 잔여물 내에 남아있는 것을 확인하였다.

표 1

울금 잔여물의 조성

[0046]

| 조성               |              | 함유량<br>(%; w/w) |
|------------------|--------------|-----------------|
| 수분(moisture)     |              | 20.8            |
| 단백질              |              | 11              |
| 재(ash)           |              | 9.1             |
| 지질               |              | 0.1             |
| 탄수화물             | 총 탄수화물       | 76.5            |
|                  | 전분(starch)   | 50              |
|                  | 과당(fructose) | 0.1             |
|                  | 포도당(glucose) | 0.1             |
|                  | 설탕(sucrose)  | 0.6             |
| 올레오레진(oleoresin) |              | 2.58            |

[0047] <실시예 2> 효소 혼합물의 제조

[0048] 울금 폐기물을 바이오매스로하여 젖산을 생산하는 당화 또는 SSCF 공정을 수행하기 위하여, 당화 과정에 필요한 효소 혼합물을 제조하였다.

[0049] 구체적으로, 셀룰라아제(cellulase)인 셀루클라스트(Celluclast) Con BG(노보자임 사, 덴마크; 제품 번호: CC100133)는 고체 상태에서 385 FPU(filter paper unit)/g의 활성을 가지는 효소 파우더 1 g을 pH 4.8인 1 M 구연산 완충용액(citrate buffer) 5 ml에 녹여 64 FPU/ml의 활성을 가지는 효소 용액을 'E1' 으로 명명하였다. 아스퍼길러스 나이거(*Aspergillus niger*) 유래 셀로비아제(cellobiase)(시그마-알드리치 사, 미국; 제품 번호: C6105)의 베타-글루코시다이스( $\beta$ -glucosidase) 활성은 311 U/ml이며, 'E2' 로 명명하였다. 아스퍼길러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)유래의 알파-아밀라아제( $\alpha$ -amylase)인 편가밀 800L(Fungamyl 800L)(노보자임 A/S 사 제조, 시그마-알드리치 사 구입; 제품 번호: A-8220)은 800 FAU/g의 1,4- $\alpha$ -D-글루칸 글루카노하이드롤레이즈(1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolase; EC 3.2.1.1) 활성을 가지며, 이를 'E3' 으로 명명하였다. 아스퍼길러스 나이거 유래의 아밀로글루코시다제(amyloglucosidase)(노보자임 사 제조, 시그마-알드리치 사 구입)는 300 U/ml의 활성을 가지며, 이를 'E4' 로 명명하였다. 그런 다음, E1 내지 E4를 하기 [표 2]의 비율로 혼합하여 효소 혼합물 S1 내지 S10을 제조하였다.

표 2

효소 혼합물의 구성비율

[0050]

|     | 효소 첨가 비율* (%; v/v/v/v) |    |    |    |
|-----|------------------------|----|----|----|
|     | E1                     | E2 | E3 | E4 |
| S1  | 2                      | 2  | 2  | 2  |
| S2  | 1                      | 1  | 2  | 2  |
| S3  | 2                      | 0  | 2  | 2  |
| S4  | 0                      | 2  | 2  | 2  |
| S5  | 2                      | 2  | 1  | 2  |
| S6  | 1                      | 1  | 1  | 2  |
| S7  | 2                      | 2  | 2  | 1  |
| S8  | 1                      | 1  | 1  | 1  |
| S9  | 0                      | 0  | 2  | 2  |
| S10 | 2                      | 2  | 1  | 1  |

[0051] \* 효소의 첨가 비율은 건조 바이오매스의 중량에 따른 효소 용액 부피의 백분율을 나타낸다(v/w).

[0052] <실시예 3> 당화효소 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(homofermentative) D-젖산을 생산하는 균주로 알려진 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600; L. 코리니포르미스 ATCC25600) 균주를 사용한 SSCF 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 3]의 조성으로 배지 1 또는 2를 제조한 후, 200 ml를 각각 500 ml 에rlenmeyer 플라스크(Erlenmeyer flasks)에 첨가한 다음, 배지 1에 L. 파라카제이 LA104(기탁 균주번호: KCTC 11883BP)를 접종하여 150 rpm, 37°C에서 24 시간 동안 종배양하였고, 배지 2에 L. 코리니포르미스 ATCC 25600를 접종하여 150 rpm, 34°C에서 24 시간 동안 종배양하였다.

표 3

[0056] SSCF를 위한 L. 파라카제이 LA 104 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 종배양 배지의 조성

|  | 배지 1 | 배지 2 |
|--|------|------|
| 포도당(glucose)                                   | 20   | 20   |
| 효모 추출물(yeast extract; YE)                      | 10   | 10   |
| 펩톤(peptone; Pep)                               | 10   | 10   |
| 황산 마그네슘(MgSO <sub>4</sub> )                    | 0.2  | 0.05 |
| 제 1 인산 칼륨(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )    | 1.5  |      |
| 제 2 인산 칼륨(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )    | 1.5  | 2    |
| 초산 나트륨(sodium acetate)                         | 1.5  | 5    |
| 황산 망간 수화물(MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> 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> 당화효소 혼합물 첨가 비율에 따른 젖산 생산 효과의 비교

[0060] 울금 폐기물을 바이오매스로 하는 당화 또는 SSCF 공정에 필요한 최적화된 당화효소의 혼합 비율을 확인하기 위하여, SSCF 공정에서 S1 내지 S10 효소 혼합물 첨가에 따른 젖산 생산 효과를 비교하였다.

[0061] 구체적으로, 1 ℓ의 증류수에 상기 <실시예 1>에서 제조한 울금 폐기물 100 g, YE 10 g, Pep 10 g, 탄산칼슘(CaCO<sub>3</sub>) 40 g 및 상기 [표 3]에 기재된 배지 1 또는 2의 무기염 조성을 첨가하여 배지 3 또는 4를 제조하였고, 121℃에서 21 분 동안 멸균하였다. 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, 상기 <실시예 2>에서 제조한 S1 내지 S10 효소 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 접종한 다음, L. 파라카제이 LA 104와 동일한 방법으로 34℃에서 배양하였다. 배양을 개시한 24, 48 및 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, 환원당의 전환율(conversion), 젖산의 수율(yield) 및 젖산의 광학적 순수도(optical purity)를 확인하였다(Nguyen, C.M. et. al., Bioresour. Technol. 110, 552-559, 2012). 환원당의 전환율은 하기 [수학식 1]로 계산하였으며, 젖산의 수율은 하기 [수학식 2]로 계산하여 나타내었다.

**수학식 1**

[0062] 
$$\text{환원당 전환율(\%)} = \frac{\text{생산된 젖산(g)}}{\text{환원당(g)}} \times 100$$

**수학식 2**

[0063] 
$$\text{젖산 수율(\%)} = \frac{\text{생산된 젖산(g)}}{\text{원재료(g)}} \times 100$$

- [0064] 그 결과, 도 1 및 도 2에서 나타난 바와 같이 S1 내지 S10를 첨가한 SSCF 공정의 72 시간 후 환원당 전환율, 젖산 수율 및 젖산 생산량 범위는 L. 파라카제이 LA 104에서 각각 79.17 내지 87.93%, 57.23 내지 63.56% 및 57.23 내지 63.56 g/l 였으며, L. 코리니포르미스 ATCC 25600에서 79.17 내지 87.93%, 57.23 내지 63.56% 및 57.23 내지 63.56 g/l 인 것을 확인하였다(도 1 및 도 2).
- [0065] 아울러, S1, S5, S7 및 S10 효소 혼합물을 첨가한 경우 L. 파라카제이 LA 104에서 93%, 67% 및 67 g/l, 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600에서 88%, 63%, 63 g/l 의 높은 환원당 전환율, 젖산 수율 및 젖산 생산량을 각각 나타내며, 특히 S10 효소 혼합물의 경우에 L. 파라카제이 LA 104에서 93.23%, 67.39% 및 67.39 g/l, 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600에서 87.18%, 63.02%, 63.02 g/l 의 높은 환원당 전환율, 젖산 수율 및 젖산 생산량을 각각 나타내므로, 울금 폐기물을 바이오매스로 하여 L. 파라카제이 LA 104 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600을 이용한 SSCF 공정에서 S10 효소 혼합물이 사용된 효소의 단가 및 젖산 생산량에서 가장 효율적인 조성인 것을 확인하였다(도 1 및 도 2).
- [0066] 상기 결과는 그물말 레티클레이툼(*Hydrodictyon reticulatum*) 균을 이용한 SSCF 공정(Nguyen et al., 2012a, b)과 효소 혼합 비율 및 젖산의 생산량을 비교하였을 때, 유사한 젖산의 생산량을 나타내는 효소 혼합 비율에서 L. 코리니포르미스 ATCC 25600에 의한 D-젖산 생산의 경우에 셀로비아제의 양이 100% 증가하였으나, L-젖산을 생산하는 L. 파라카제이 LA 104 공정에서 아밀로글루코시다제의 양이 50% 감소하여 본 발명의 SSCF으로 인한 L-젖산 생산 방법이 효과적인 것을 확인하였다.
- [0067] **<실시예 4> SSCF에서 울금 폐기물의 양에 따른 젖산 생산 효과의 비교**
- [0068] 울금 폐기물을 바이오매스로하여 젖산을 생산하는 SSCF 공정에서 최적화된 바이오매스의 양을 확인하기 위하여, SSCF을 개시할 때 배지에 첨가하는 울금 폐기물의 농도에 따른 젖산 생산 효과를 비교하였다.
- [0069] 구체적으로, 1 l의 증류수에 YE 10 g, Pep 10 g 및 상기 [표 2]에 기재된 배지 1 또는 2의 무기염 조성을 첨가하고, 상기 <실시예 1>에서 제조한 울금 폐기물 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 또는 160 g을 첨가한 후, pH 조절을 위해 울금 폐기물 중량의 40% 무게의 탄산칼슘을 각각의 배지에 첨가하여 배지를 제조한 후, 121℃에서 21 분 동안 멸균하였다. 그런 다음, S10 효소 혼합물을 사용하여 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 SSCF를 수행한 후, 배지를 수득하여 환원당 잔여량, 젖산 생산량, 환원당 전환율 및 젖산 수율을 확인하였으며, 포도당의 잔여량을 공지된 방법에 따라 확인하였다(Nguyen, C.M. et. al., Bioresour. Technol. 110, 552-559, 2012).
- [0070] 그 결과, 도 3 및 도 4에서 나타나는 바와 같이 최종 젖산의 생산량은 울금 폐기물의 초기 농도에 의존적으로 증가하여 L. 파라카제이 LA 104는 101.53 g/l 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600는 97.87 g/L의 최대 젖산 생산량을 나타내는 것을 확인하였다(도 3, 4). 초기 울금 폐기물 농도 150 g/l 미만에서 L. 파라카제이 LA 104는 92% 및 67%의 환원당 전환율 및 젖산 수율을 나타내며, L. 코리니포르미스 ATCC 25600는 87% 및 63%를 나타내어 비슷한 수준을 유지하나, 초기 울금 폐기물 농도 150 g/l 이상에서 기질이 증가함에 따라 젖산의 생산량 역시 증가함에도 불구하고 L. 파라카제이 LA 104의 환원당 전환율은 91.97%에서 87.79%로 감소하였으며, L-젖산 수율은 66.48%에서 63.46%로 감소하는 것을 확인하였다(도 3). 이와 유사하게, L. 코리니포르미스 ATCC 25600의 환원당 전환율 및 D-젖산 수율 또한 87.32%에서 84.63% 및 63.11%에서 61.17%로 감소하는 것을 확인하였다(도 4).
- [0071] 배지 내의 기질의 양이 증가하였을 때, 당분해효소에 의해 분리되어 발효될 수 있는 당의 양 또한 증가하나, 기질의 양이 배지의 10% 이상으로 증가하는 경우, 기질의 점도가 상승하여 당화작용이 억제되는 것이 보고되어 있으므로(Iyer and Lee, 1999; Rosgaard et al., 2007), 상기 결과는 분해 효소(degrading enzyme) 활성에 대한 축적된 자유 젖산 및 젖산 칼슘(calcium lactate)의 억제 효과 및/또는 기질의 점도가 증가하므로, 울금 폐기물의 최적 초기 농도는 140 g/l임을 확인하였다.
- [0072] **<실시예 5> SSCF에서 질소원에 따른 젖산 생산 효과 확인**
- [0073] **<5-1> 질소원의 종류에 따른 L-젖산 생산 효과 확인**
- [0074] 경제적인 분석의 측면에서 산업적인 발효 공정 단가에 영향을 미치는 두 가지 요소로 YE이 생산 단가의 87%를 차지하며, 탄소원이 생산 단가의 6%를 차지하는 것으로 보고되었다(Sikder, J. et. al, Biochem. Eng. J. 63,

81-87, 2012). 따라서, 저렴한 질소원 중에서 본 발명의 SSCF 공정에서 YE를 대체할 수 있는 최적의 질소원을 탐색하기 위하여, 다양한 질소원을 포함하는 배지에 따른 L-젖산 생산 효과를 비교하였다.

[0075]

구체적으로, 1 l의 증류수에 상기 [표 2]에 기재된 배지 1의 무기염 조성, 울금 폐기물 140 g 및 탄산칼슘 56 g을 첨가하고, 질소원으로 YE, Pep, 대두박(soybean meal; SM), YE+Pep(1:1), 옥수수 침전액(corn steep liquor; CSL), 쇠고기 추출물(beef extract), 카제인 가수분해물(casein hydrolysate), 황산 암모늄(ammonium sulfate), 요소(urea), 엿기름(malt sprouts) 또는 스킵밀크(skim milk)를 질소원 양이 배지의 0.198%가 되도록 첨가하여 배지를 제조한 후, 121°C에서 21 분 동안 멸균하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 L. 파라카제이 LA 104 균주를 배양한 종배양 및 상기 <실시예 2>에서 제조한 S10 효소 혼합물을 각각 배지에 6% 및 10%의 양으로 첨가한 후, 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 SSCF를 수행하였고, 72 시간 배양 후 배지를 수득하여 포도당 농도, 환원당 잔여량, 젖산 생산량, 환원당 전환율 및 젖산 수율을 확인하였다. 음성 대조군으로 상기 배지와 동일한 조성에서 질소원을 포함하지 않는 배지를 제조하여, 상기와 동일한 방법으로 L-젖산 생산 효과를 확인하였다.

[0076]

그 결과, 하기 [표 4]에 나타난 바와 같이 L. 파라카제이 LA 104 균주를 이용하고 YE, Pep, SM, YE+Pep, 쇠고기 추출물 및 카제인 가수분해물을 질소원으로 첨가하여 SSCF를 수행하였을 때 다른 질소원에 비하여 L-젖산의 생산량이 증가하였고, SM의 경우에 젖산 생산량, 환원당 전환율 및 수율은 각각 92.59 g/l, 91.50% 및 66.13%인 것을 확인하였다(표 4). 반면, 질소원으로 CSL, 황산 암모늄, 요소, 엿기름 및 스킵밀크를 첨가한 배지에서는 음성 대조군보다 낮은 젖산 생산량을 나타내는 것을 확인하였다(표 4).

**표 4**

[0077]

질소원의 종류에 따른 L-젖산 생산 효과 확인

| 질소원       | 포도당 농도<br>(g/l) | 환원당 농도<br>(g/l) | 젖산 생산농도<br>(g/l) | 환원당 전환율<br>(%) | 젖산 수율<br>(%) |
|-----------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|--------------|
| YE        | 0.60±0.42       | 3.92±0.01       | 93.97±3.49       | 92.87±3.45     | 67.12±2.50   |
| Pep       | 1.00±0.28       | 4.07±0.10       | 92.52±1.32       | 91.43±1.30     | 66.08±0.94   |
| SM        | 1.20±0.28       | 3.56±0.02       | 92.59±1.25       | 91.50±1.24     | 66.13±0.89   |
| YE+Pep    | 1.00±0.28       | 3.91±0.05       | 93.95±3.58       | 92.84±3.54     | 67.10±2.56   |
| CSL       | 1.65±0.07       | 3.67±0.11       | 83.40±0.36       | 82.42±0.36     | 59.57±0.26   |
| 소고기 추출물   | 1.10±0.42       | 3.66±0.00       | 92.43±1.20       | 91.34±1.19     | 66.02±0.86   |
| 카제인 가수분해물 | 1.15±0.35       | 4.19±0.13       | 92.87±2.15       | 91.77±2.13     | 66.33±1.54   |
| 황산 암모늄    | 1.45±0.21       | 5.65±0.17       | 76.98±1.27       | 76.08±1.25     | 54.99±0.91   |
| 요소        | 1.55±0.07       | 6.85±0.26       | 81.35±2.18       | 80.40±2.15     | 58.11±1.56   |
| 엿기름       | 1.76±1.79       | 5.44±1.22       | 76.86±0.50       | 75.95±0.49     | 54.90±0.35   |
| 스킵밀크      | 1.45±0.21       | 7.35±0.86       | 77.51±1.26       | 76.60±1.25     | 55.37±0.90   |
| 음성대조군     | 1.90±0.57       | 6.11±1.24       | 84.44±1.87       | 83.44±1.85     | 60.31±1.34   |

[0078]

**<5-2> 질소원의 종류에 따른 D-젖산 생산 효과 확인**

[0079]

저렴한 질소원 중에서 본 발명의 SSCF 공정에서 YE를 대체할 수 있는 최적의 질소원을 탐색하기 위하여, 다양한 질소원을 포함하는 배지에 따른 D-젖산 생산 효과를 비교하였다.

[0080]

구체적으로, 1 l의 증류수에 상기 [표 2]에 기재된 배지 2의 무기염 조성, 울금 폐기물 140 g 및 탄산칼슘 56 g을 첨가한 후, 상기 실시예 <5-1>과 동일한 질소원을 첨가하여 배지를 제조하였으며, L. 코리니포르미스 ATCC 25600를 상기 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 배양 및 수득하여 D-젖산 생산 효과를 비교하였다. 음성 대조군으로 상기 배지와 동일한 조성에서 질소원을 포함하지 않는 배지를 제조하여, 상기와 동일한 방법으로 D-젖산 생산 효과를 확인하였다.

[0081]

그 결과, 하기 [표 5]에서 나타난 바와 같이 YE, Pep, YE+Pep 및 쇠고기 추출물을 질소원으로 사용하였을 때 90 g/l의 최대 젖산 농도를 수득하였고, SM을 첨가한 배지에서 젖산 생산량이 87.35 g/l인 것을 확인하였다(표 5). 다른 질소원을 첨가한 배지에서는 젖산 생산량이 최소 32.75 g/l까지 감소하였으며, 카제인 가수분해물 및 음성 대조군 사이에 유의적인 효과를 나타내지 않으므로, 균주 생장에 요구되는 대부분의 질소원이 울금 폐기물로부터 공급되는 것을 확인하였다.

**표 5**

질소원의 종류에 따른 D-젖산 생산 효과 확인

[0082]

| 질소원       | 포도당 농도<br>(g/l) | 환원당 농도<br>(g/l) | 젖산 생산농도<br>(g/l) | 환원당 전환율<br>(%) | 젖산 수율<br>(%) |
|-----------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|--------------|
| YE        | 0.53±0.04       | 4.89±0.20       | 89.79±1.39       | 88.74±1.37     | 64.14±0.99   |
| Pep       | 2.94±0.93       | 7.54±0.99       | 88.86±1.16       | 87.82±1.14     | 63.47±0.83   |
| SM        | 4.09±0.89       | 7.80±0.84       | 87.35±1.76       | 86.32±1.74     | 62.39±1.26   |
| YE+Pep    | 1.69±1.41       | 6.10±1.50       | 89.04±0.44       | 87.99±0.43     | 63.60±0.31   |
| CSL       | 50.48±1.45      | 57.67±1.06      | 32.75±0.01       | 32.36±0.01     | 23.39±0.01   |
| 소고기 추출물   | 0.49±0.02       | 4.24±0.13       | 89.06±0.83       | 88.01±0.82     | 63.61±0.59   |
| 카제인 가수분해물 | 8.93±2.65       | 14.60±2.74      | 74.35±2.61       | 73.48±2.58     | 53.11±1.86   |
| 황산 암모늄    | 9.96±1.18       | 19.14±2.96      | 61.86±2.95       | 61.13±2.91     | 44.18±2.10   |
| 요소        | 18.40±0.57      | 29.41±0.26      | 59.44±1.18       | 58.74±1.16     | 42.46±0.84   |
| 엿기름       | 23.68±0.40      | 36.40±3.69      | 59.02±0.92       | 58.32±0.91     | 42.15±0.66   |
| 스킵밀크      | 29.08±0.04      | 36.44±0.21      | 58.00±0.93       | 57.32±0.92     | 41.43±0.66   |
| 음성대조군     | 14.11±3.69      | 22.18±1.06      | 73.42±3.44       | 72.55±3.40     | 52.44±2.45   |

[0083]

<실시예 6> SSCF에서 SM의 농도에 따른 젖산 생산 효과의 확인

[0084]

<6-1> SM의 농도에 따른 L-젖산 생산 효과의 확인

[0085]

본 발명의 SSCF 공정에 질소원으로 SM을 적용하기 위하여, SM의 농도에 따른 L-젖산 생산 효과를 비교하였다.

[0086]

구체적으로, 1 l의 증류수에 상기 [표 2]에 기재된 배지 1의 무기염 조성, 울금 폐기물 140 g 및 탄산칼슘 56 g을 첨가한 후, 0, 5, 10, 15, 20, 25 또는 30 g/l의 SM을 질소원으로 첨가하여 상기 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 L. 파라카제이 LA 104 균주를 이용한 SSCF를 수행하였고, 72 시간 배양 후 배지를 수득하여 포도당 농도, 환원당 잔여량, 젖산 생산량, 환원당 전환율 및 젖산 수율을 확인하였다. 음성 대조군으로 상기 배지와 동일한 조성에서 질소원을 포함하지 않는 배지를 제조하여, 상기와 동일한 방법으로 L-젖산 생산 효과를 확인하였다.

[0087]

그 결과, 하기 [표 6]에서 나타난 바와 같이 10 g/l까지의 SM 농도에서 L-젖산의 생산량, L-젖산 수율 및 환원당 전환율은 SM 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(표 6).

**표 6**

SM의 농도에 따른 L-젖산 생산 효과의 확인

[0088]

| SM 농도<br>(g/l) | 포도당 농도<br>(g/l) | 환원당 농도<br>(g/l) | 젖산 생산농도<br>(g/l) | 환원당 전환율<br>(%) | 젖산 수율<br>(%) |
|----------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|--------------|
| 0              | 1.30±0.28       | 2.04±0.38       | 75.85±2.29       | 74.96±2.27     | 54.18±1.64   |
| 5              | 0.70±0.28       | 2.02±0.20       | 88.04±0.88       | 87.00±0.87     | 62.88±0.63   |
| 10             | 0.95±0.21       | 2.16±0.29       | 92.73±2.07       | 91.64±2.04     | 66.23±1.48   |
| 15             | 0.70±0.14       | 2.21±0.07       | 92.82±1.16       | 91.73±1.15     | 66.30±0.83   |
| 20             | 0.80±0.14       | 2.32±0.17       | 92.93±2.09       | 91.84±2.06     | 66.38±1.49   |
| 25             | 0.65±0.21       | 2.20±0.00       | 93.11±0.30       | 92.02±0.29     | 66.51±0.21   |
| 30             | 0.75±0.21       | 2.37±0.10       | 92.84±2.48       | 91.75±2.45     | 66.32±1.77   |

[0089]

<6-2> SM의 농도에 따른 D-젖산 생산 효과의 확인

[0090]

본 발명의 SSCF 공정에 질소원으로 SM을 적용하기 위하여, SM의 농도에 따른 D-젖산 생산 효과를 비교하였다.

[0091]

구체적으로, 1 l의 증류수에 상기 [표 2]에 기재된 배지 2의 무기염 조성, 울금 폐기물 140 g 및 탄산칼슘 56 g을 첨가한 후, 0, 5, 10, 15, 20, 25 또는 30 g/l의 SM을 질소원으로 첨가하여 상기 실시예 <5-2>과 동일한 방법으로 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 이용한 SSCF를 수행하였고, 72 시간 배양 후 배지를 수득하여 포도당 농도, 환원당 잔여량, 젖산 생산량, 환원당 전환율 및 젖산 수율을 확인하였다. 음성 대조군으로 상기 배지와 동일한 조성에서 질소원을 포함하지 않는 배지를 제조하여, 상기와 동일한 방법으로 D-젖산 생산 효과를

확인하였다.

[0092] 그 결과, 하기 [표 7]에서 나타난 바와 같이 15 g/l 까지의 SM 농도에서 L-젖산의 생산량, L-젖산 수율 및 환원당 전환율은 SM 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(표 7).

**표 7**

[0093] SM의 농도에 따른 D-젖산 생산 효과의 확인

| SM 농도 (g/l) | 포도당 농도 (g/l) | 환원당 농도 (g/l) | 젖산 생산농도 (g/l) | 환원당 전환율 (%) | 젖산 수율 (%)  |
|-------------|--------------|--------------|---------------|-------------|------------|
| 0           | 9.71±0.12    | 14.98±0.16   | 76.81±0.28    | 75.91±0.28  | 54.87±0.20 |
| 5           | 1.76±0.53    | 3.07±0.27    | 85.25±0.87    | 84.25±0.86  | 60.90±0.62 |
| 10          | 0.33±0.01    | 2.29±0.01    | 86.56±1.80    | 85.54±1.78  | 61.83±1.29 |
| 15          | 0.32±0.04    | 2.42±0.02    | 88.67±2.03    | 87.62±2.00  | 63.33±1.45 |
| 20          | 0.35±0.00    | 2.55±0.10    | 89.09±2.39    | 88.04±2.36  | 63.63±1.71 |
| 25          | 0.35±0.01    | 2.60±0.03    | 88.82±1.51    | 87.78±1.50  | 63.45±1.08 |
| 30          | 0.34±0.00    | 2.63±0.02    | 89.35±1.72    | 88.30±1.70  | 63.82±1.23 |

[0094] 아울러, 하기 [표 8]에서 나타난 바와 같이 본 발명의 울금 폐기물을 바이오매스로 하여 젖산을 생산하기 위한 SSCF 공정은 이전 공지된 SM을 질소원으로 하는 젖산 생산 공정에 비교하였을 때 적은 농도를 필요로 하면서 높은 젖산 수율을 나타내므로, 본 발명의 SSCF 공정은 유의적인 효과가 있음을 확인하였다(표 8).

**표 8**

[0095] SM을 질소원으로 하는 젖산 생산 공정의 비교

| 발효 균주  | 바이오매스      | SM 첨가량 (g/l)      | 수율 (%) | 생산량 (g/l) | 시간 (h) | 출처                 |
|--|------------|-------------------|--------|-----------|--------|--------------------|
| L. 펜토시스 B-227 (L. pentosus B-227)              | DMSWH      | 28                | 85%    | 77.1      | 72     | Zhou et al. (1995) |
| 스포로락토바실러스 종 CASD (Sporolactobacillus sp. CASD) | 포도당 90 g/l | 42                |        | 50        |        | Wang et al. (2011) |
| L. 카제이 LA-04-1                                 | CSL        | 24.3 <sup>a</sup> |        | 110       | 96     | Li et al. (2006)   |
| L. 파라카제이 LA 104                                | 울금 폐기물     | 10                | 66.23  | 92.73     | 72     | 본 발명               |
| L. 코리니포르미스 ATCC 25600                          | 울금 폐기물     | 15                | 63.33  | 88.67     | 72     | 본 발명               |

[0096] L.: 락토바실러스(Lactobacillus); CSL: 옥수수 침전액; 및 DSMSW: 이당체 도시 고탄폐기물 가수분해물(double sugar municipal solid waste hydrolysate).

[0097] <sup>a</sup> 질소원으로 대두분 산 가수분해물(acid hydrolysate of soybean meal; AHSM)을 첨가하였다.

[0098] <실시예 7> 무기염 유무에 따른 울금 폐기물로부터 젖산 생산 효과 확인

[0099] 본 발명의 울금 폐기물로부터 젖산을 생산하는 SSCF 공정에서 무기염의 효과를 비교하기 위하여, 무기염의 유무 농도에 따른 젖산 생산 효과를 비교하였다.

[0100] 구체적으로, L. 파라카제이 LA 104 균주를 이용하기 위해 상기 실시예 <6-1>과 동일한 조성 및 SM 10g/l의 농도를 포함하는 배지를 제조하여 동일한 방법으로 SSCF 공정을 수행하였으며, L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 이용하기 위해 상기 실시예 <6-2>과 동일한 조성 및 SM 15g/l의 농도를 포함하는 배지를 제조하여 동일한 방법으로 SSCF 공정을 수행하였다.

[0101] 그 결과, 하기 [표 9]에서 나타난 바와 같이 울금 폐기물 농도, 질소원 농도 및 효소 혼합물의 조건 하에서 무기염의 유무가 젖산 생산에 유의적인 영향을 미치지 않으므로, L. 파라카제이 LA 104 균주 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주의 생장에 요구되는 무기염 전부가 바이오매스인 울금 폐기물에 존재하는 것을 확인하였다

(표 9).

표 9

무기염에 따른 울금 폐기물로부터 젖산 생산 효과 확인

| SM 농도<br>(g/l)  | 무기염<br>유무 | 포도당 농도<br>(g/l) | 환원당 농도<br>(g/l) | 젖산 생산농도<br>(g/l) | 환원당 전환율<br>(%) | 젖산 수율<br>(%) |
|-----------------|-----------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|--------------|
| 10 <sup>a</sup> | 첨가        | 0.95±0.21       | 2.16±0.29       | 92.73±2.07       | 91.64±2.04     | 66.23±1.48   |
|                 | 무첨가       | 0.70±0.28       | 1.76±0.01       | 92.73±1.72       | 91.64±1.70     | 66.24±1.23   |
| 15 <sup>b</sup> | 첨가        | 0.32±0.04       | 2.42±0.02       | 88.67±2.03       | 87.62±2.00     | 63.33±1.45   |
|                 | 무첨가       | 0.30±0.01       | 2.32±0.05       | 89.06±1.15       | 88.01±1.14     | 63.61±0.82   |

<sup>a</sup> L. 파라카제이 LA 104 균주를 이용한 L-젖산의 생산을 나타낸다.

<sup>b</sup> L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 이용한 D-젖산의 생산을 나타낸다.

<실시에 8> 최적화 조건 하에서 울금 바이오매스로부터 젖산의 생산

작업량(working-volume)을 발효기 수준으로 규모를 확대하여 SSCF 공정을 수행하기 위해, 상기 <실시에 3> 내지 <실시에 7>에서 최적화된 조건 하에서 울금 폐기물을 바이오매스로 하여 젖산을 생산하기 위한 SSCF 공정을 자 발효기에서 수행하였다.

구체적으로, 1726 ml의 증류수에 울금 폐기물 353.54 g(수분 함량 20.8%)을 첨가한 후, SM 20 g 또는 30 g을 첨가하고 121℃에서 21 분 동안 멸균하여 배지 5 또는 6을 2 l 씩 제조하여 7 l 규모의 자 발효기에 첨가했다. 그런 다음, 상기 <실시에 2>에서 제조한 S10 효소 혼합물 16.8 ml 및 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 종 배양한 L. 파라카제이 LA 104 균주를 포함하는 배지 200 ml을 배지 5에 접종하였고, L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주를 포함하는 배지 200 ml을 배지 6에 접종하였다. L. 파라카제이 LA 104 균주는 37℃에서 200 rpm으로 교반하고, L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주는 34℃에서 200 rpm으로 교반하였다. 배지의 pH는 28% 암모니아 수용액(NH<sub>4</sub>OH)을 자동으로 첨가하여 pH 6.0으로 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, 환원 잔여 농도, 젖산 생산 농도, 환원당 전환율, 젖산 수율, 젖산 생산성(productivity) 및 젖산의 광학적 순수도를 상기 <실시에 3-2>와 동일한 방법으로 확인하였으며, 균주의 생장은 희석 도말 평판법(dilution spread plate method)을 따라 수득한 배지를 10<sup>-5</sup> 내지 10<sup>-8</sup>로 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.

그 결과, 도 5 및 6에서 나타내는 바와 같이 L. 파라카제이 LA 104 균주 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주 모두 배양 개시 이후 4 시간 안에 유도기(lag phase)를 거쳐 두 균주 모두 CFU가 급격하게 상승하여, 8 시간 이후에 정지기(bacterial stationary phase)가 유지되는 것을 확인하였다(도 5 및 도 6). 또한, L. 파라카제이 LA 104 균주로 생산되는 L-젖산의 광학적 순수도는 배양 초기에 배지에 존재하는 D-젖산으로 인해 89.24%에서 96.74%로 급증하였다가, 젖산의 라세미화(racemization)로 인해 D-젖산이 L-젖산으로 전환되면서(Goffin et al., 2005), L-젖산의 광학적 순수도가 점차적으로 감소하여 60 시간 후에는 91.08%을 나타내는 것을 확인하였다(도 5). 한편, L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주로 생산되는 L-젖산은 90.41%에서 99.5%로 증가하여 계속 유지되는 것을 확인하였다(도 6).

또한, 도 7 및 도 8에서 나타내는 바와 같이 L. 파라카제이 LA 104 균주 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주 모두 배양 개시 후 4 시간 동안 효소 혼합물의 빠른 당화 속도로 인해 포도당 및 환원당 농도가 급격하게 상승하였으며, 상승한 환원당 및 포도당은 즉시 젖산으로 전환되어 20 시간 후에 환원당 및 포도당 농도가 매우 낮은 것을 확인하였다(도 7 및 도 8). 젖산은 배양 초기에 활발하게 생산되어 L. 파라카제이 LA 104 균주는 36 시간 동안에 97 g/l의 젖산을 생산하여, 배양 60 시간 이후 최종 젖산 생산 농도, 환원당 전환율 및 젖산 수율은 97.13 g/l, 95.99% 및 69.38%로 나타나는 것을 확인하였다(도 7). L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주는 배양 개시 44 시간 후에 젖산의 생성된 농도 및 수율은 96.61 g/l 및 65.43%이며, 시간 당 2.08 g/l의 생산성

을 나타내는 것을 확인하였다(도 8).

[0110]

아울러, 하기 [표 10]에서 나타난 바와 같이 이전에 공지된 농산업 잔여물(agroindustrial residue) 및 셀룰로오스 물질(cellulosic material)로부터 젖산 및 이의 유도체를 생산하기 위한 SSCF 공정과 비교하였을 때 본 발명의 울금 폐기물을 바이오매스로 하여 젖산을 생산하기 위한 SSCF 공정은 저렴한 단가와 재생 가능한 바이오매스를 사용하여 높은 젖산 수율 및 생산성을 나타내므로, 본 발명의 SSCF 공정은 유의적인 효과가 있음을 확인하였다(표 10).

【표 10】

농산업 잔여물 및 셀룰로오스 물질로부터 젖산 및 이의 유도체를 생산하기 위한

SSCF 공정의 비교

| 원재료  | 질소원 <sup>M</sup>               | 발효 균주  | 공정방법  | 젖산 생산농도 (g/L)      | 젖산 생산성 (g/L/h) | 젖산 수율 <sup>d</sup> (%) | 출처                         |
|--|--------------------------------|--|-------|--------------------|----------------|------------------------|----------------------------|
| 그물말레티쿨레이툼 ( <i>Hydrodictyonreticulatum</i> ) | 5 g YE                         | L. 파라카제이 LA104                                 | 회분 배양 | 37.1 <sup>a</sup>  | 1.03           | 0.46                   | Nguyen et al. (2012a)      |
| 그물말 레티쿨레이툼                                   | 3 g YE, 3 g Pep                | L. 코리니포르미스 ATCC25600                           | 회분 배양 | 36.6 <sup>b</sup>  | 1.02           | 0.46                   | Nguyen et al., (2012b)     |
| 셀룰로오스 생물침전물 (Cellulosic biosludge)           | 4 g YE, 8 g ME, 10 g Pep       | L. 람노시스 CBCT-288 (L. rhamnosus CBCT-288)       | 회분 배양 | 42 <sup>a</sup>    | 0.87           | 0.38                   | Romani et al. (2008)       |
| 종이 슬러지 (Paper sludge)                        | 10 g TP, 5 g YE                | B. 코아글란 균주 36D1 (B. coagulans strains 36D1)    | 반연속공정 | 92.0 <sup>c</sup>  | 0.96           | 0.77 <sup>a</sup>      | Budhavaram and Pan, (2009) |
| 사탕수수 찌꺼기 폐기물 (Waste sugarcane bagasse)       | 8 g YE                         | L. 델브뤼키이 변이체 Uc-3 (L. delbrueckii mutant Uc-3) | 회분 배양 | 67 <sup>a</sup>    | 0.93           | 0.83                   | Adsul et al. (2007)        |
| 유칼립투스 나무 (Eucalyptus globules wood)          | 5 g YE, 10 g Pep               | L. 델브뤼키이 NRRL-B445                             | 유기 배양 | 108                | 0.94           | 0.65                   | Moldes et al. (2001)       |
| 옥수수대 잔여물 (Corn cob residue)                  | 5 ml WEH, 5 g YE               | L. 델브뤼키이 ZU-S2                                 | 회분 배양 | 55.6               | 0.927          | 0.56                   | Shen and Xia (2008)        |
| 옥수수대 잔여물                                     | 5 ml WEH, 5 g YE               | L. 델브뤼키이 ZU-S2                                 | 유기 배양 | 107.6              | 1.345          | 0.51                   | Shen and Xia (2008)        |
| 알파-셀룰로오스 (α-Cellulose)                       | 5 g YE                         | L. 델브뤼키이 NRRL-B445                             | 유기 배양 | 75                 | 0.35           | 0.63                   | Iyer and Lee (1999)        |
| 카사바 바가스 (Cassava bagasse)                    | 5 g YE, 5 g NH <sub>4</sub> Cl | L. 카제이 NCIMB3254 (L. casei NCIMB3254)          | 회분 배양 | 83.8 <sup>a</sup>  | 1.4            | 0.54                   | John et al. (2008a)        |
| 라임-처리 밀짚 (Lime-treated wheat straw)          | 21 g YE                        | B. 코아글란 DSM2314                                | 유기 배양 | 40.7 <sup>a</sup>  | 0.74           | 0.26                   | Maas et al. (2008)         |
| 쌀겨 (rice bran)                               | 질소원 무첨가                        | L. 람노시스 M-23                                   | 회분 배양 | 59 <sup>a</sup>    | 1.23           | 0.85 <sup>**</sup>     | Watanabe et al. (2013)     |
| 단백질분해효소 처리 밀기울 (Protease treated wheat bran) | 1 g YE                         | L. 델브뤼키이 및 L. 카제이                              | 회분 배양 | 123 <sup>a</sup>   | 2.3            | 0.62                   | John et al. (2008b)        |
| 울금 잔여물                                       | 10 g SM                        | L. 파라카제이 LA104                                 | 회분 배양 | 97.13 <sup>a</sup> | 2.7            | 0.69                   | 본 발명                       |
| 울금 잔여물                                       | 15 g SM                        | L. 코리니포르미스 ATCC25600                           | 회분 배양 | 91.61 <sup>b</sup> | 2.08           | 0.65                   | 본 발명                       |

[0111]

[0112]

L.: 락토바실러스(Lactobacillus); B.: 바실러스(Bacillus); YE: 효모 추출물(yeast extract); ME: 쇠고기 추출물(meat extract); WEH: 밀기울 가수분해물(wheat bran hydrate); 및 SM: 대두분(soybean meal).

[0113]

<sup>a</sup> L-젖산; <sup>b</sup> D-젖산; 및 <sup>c</sup> L- 및 D-젖산의 생산을 나타낸다.

[0114]

<sup>d</sup> 생산된 젖산의 양(g)/ 초기 바이오매스 중량(g)으로 계산한다.

[0115]

<sup>N</sup> 질소원의 종류 및 1 ℓ 당 첨가되는 양을 나타낸다.

[0116]

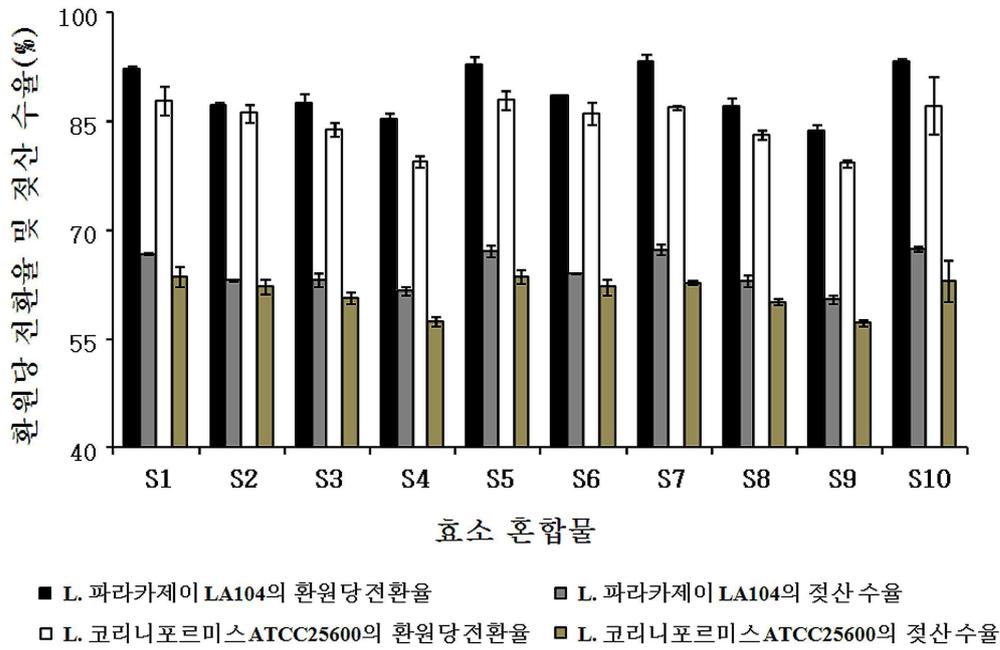
\* 포도당 및 자일로오스(xylose) 소비양에 기반하여 계산하였다.

[0117]

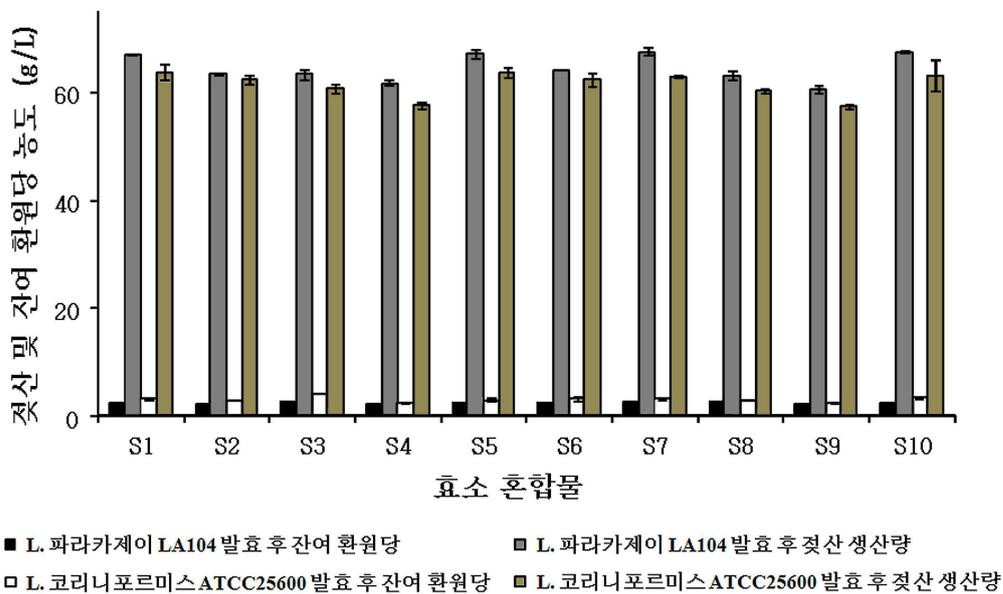
\*\* 당 당량(equivalent)을 기준으로 하여 계산한 값이다.

도면

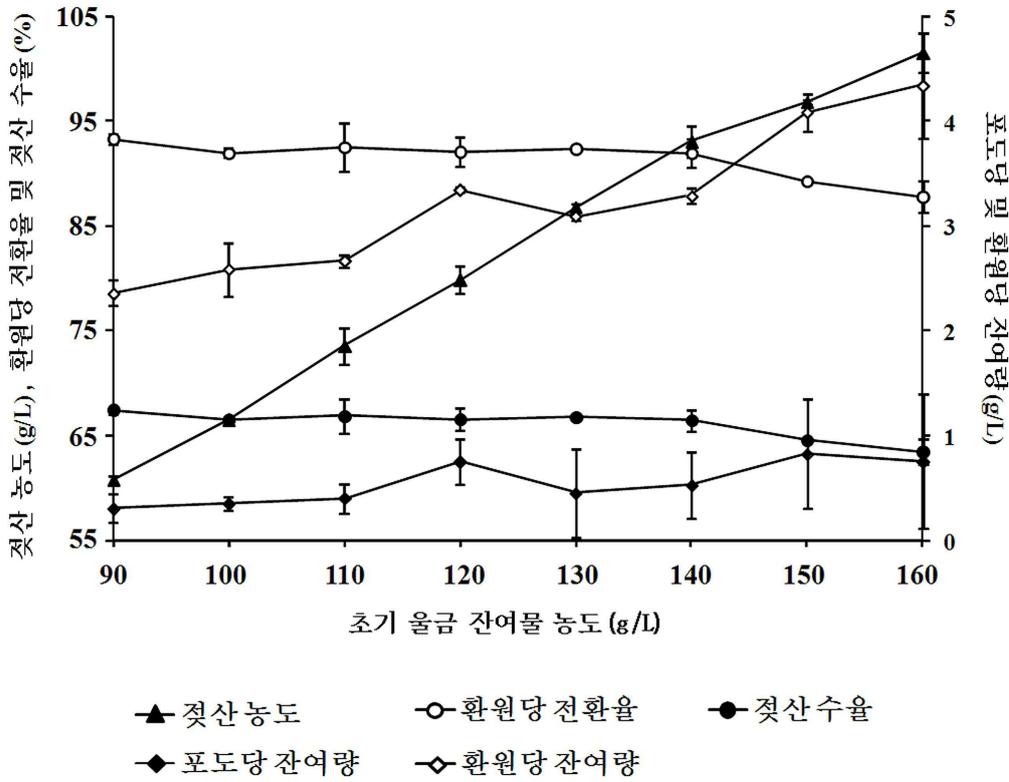
도면1



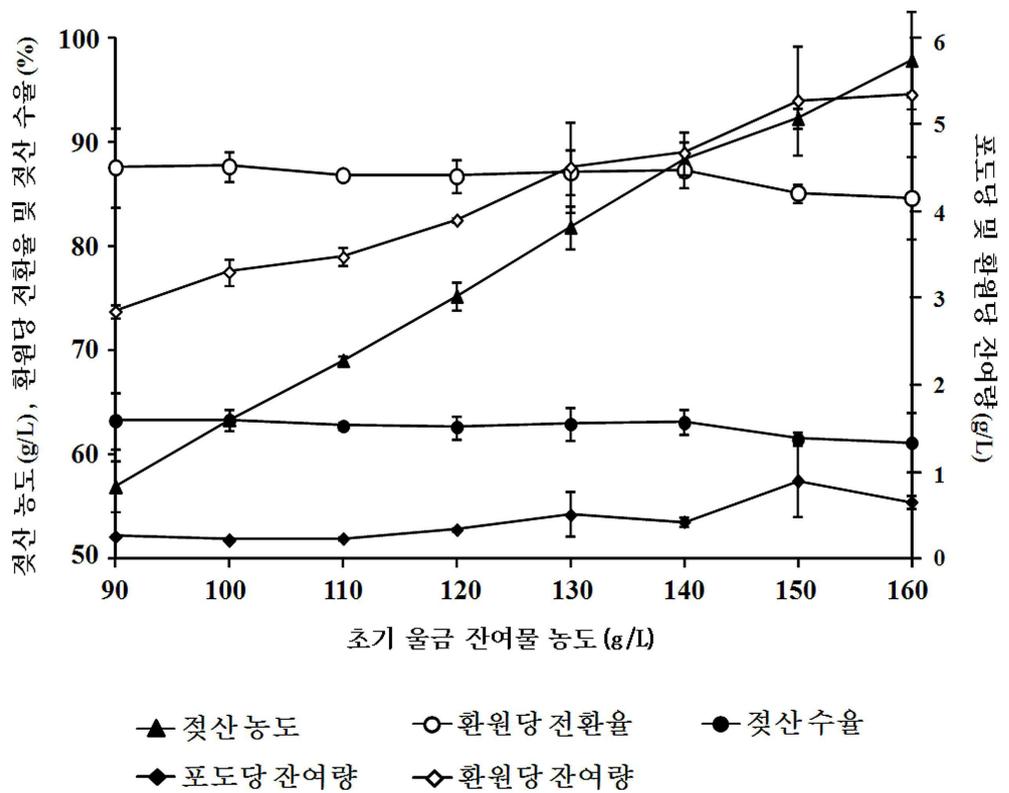
도면2



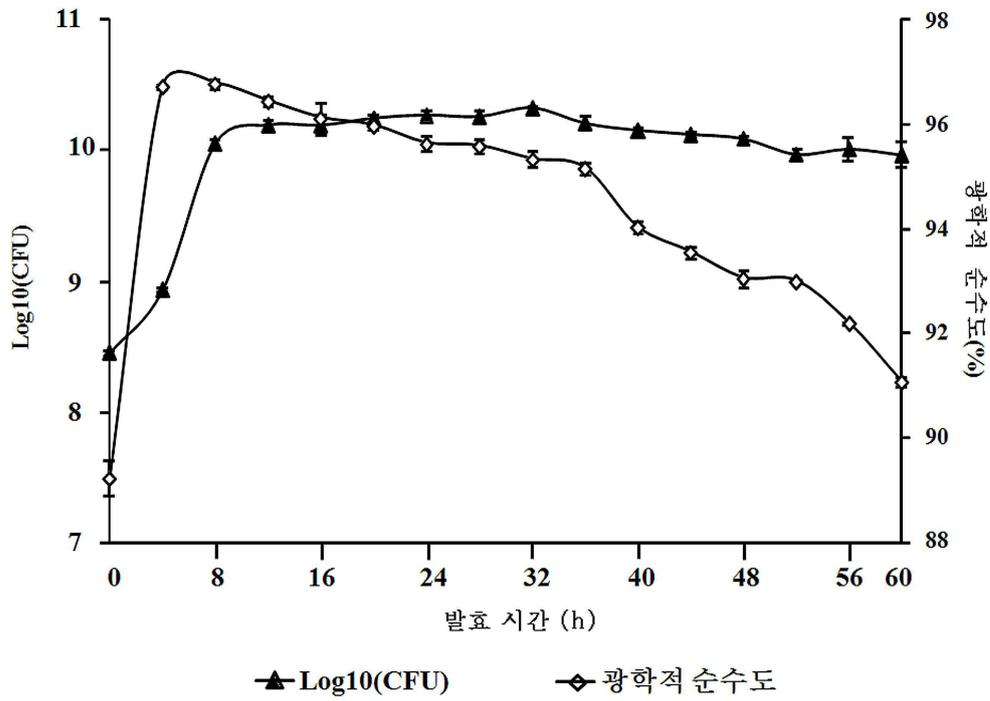
도면3



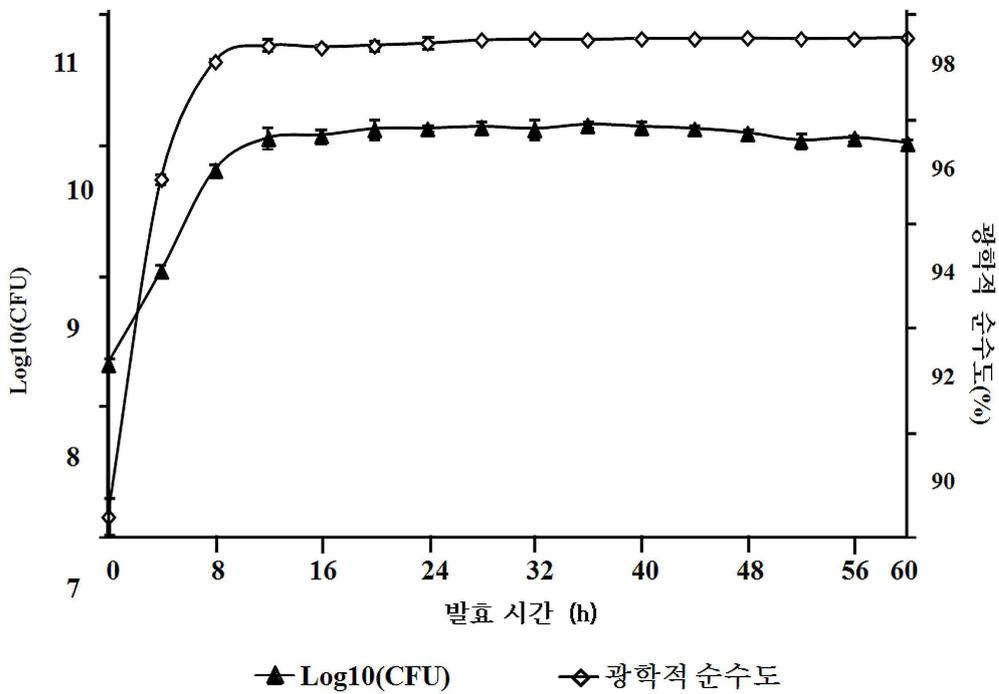
도면4



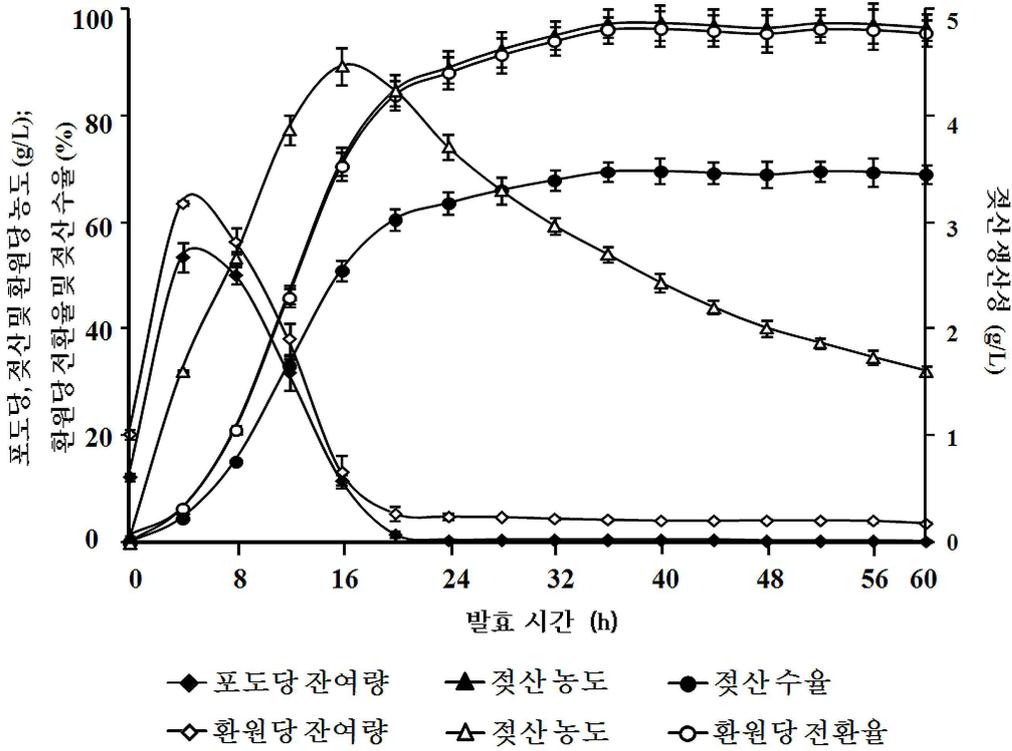
도면5



도면6



도면7



도면8

