

전분당 부산물로부터 유기산 생산 및 농축에 관한 연구 :  
II. 유기산의 대량생산을 위한 연속발효 및 액-액 추출

김대식, 최철호, 이의상\*

관동대학교 환경공학과 생물공정연구실, 상명대학교 환경공학과\*

전화(0396)670-3357, FAX (0396)670-3369

**Abstract**

Organic acids were produced from wastes streams in food industries by cell-recycle fermentation using *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965. As a results of continuous fermentation, maximum productivity was 3.32g organic acid/L/hr at the dilution rate of 0.2/hr. Compared to batch fermentation, maximum productivity was improved by as much as 13 times and cell mass production was increased by as much as 22 times. The diluted organic acids in the fermenter were selectively separated by liquid-liquid extraction using 30%(w/w) trioctylamine(TOA) dissolved in methylisobutylketone(MIBK). The degree of extraction was reached above 90% for both acetic and propionic acid through repeated extraction of organic acids in fermentation broth.

**서 론**

생물량은 부가가치성 상품 생산에 유용한 원료가 되고 있다. 고갈되어 가는 화석연료를 대체하기 위하여 유기산을 생산하는 발효공정 연구가 활발히 진행되고있으며, 특히 식품공장에서 발생하는 부산물은 유기산 발효시 미생물에 필요한 영양분을 가지고있어 이에 대한 관심이 증가하고 있다.<sup>1,2)</sup> 따라서, 본 연구는 corn 정제시 부산물인 hydrol을 당원으로 사용하고, corn steep liquor(CSL)을 단백질원과 비타민원으로 사용하여 세포 재순환식 연속발효를 통해 유기산을 대량생산 하였다. 또한, 액-액 추출법을 통해 희석상태(보통 2-3%w/w)의 유기산(Acetic와 Propionic acid)을 분리 및 농축하였다. 액-액 추출은 유기산간의 분배계수의 차이를 이용한 방법으로 수용액상에 존재하는 유기산을 추출제와 complex를 형성하여 유기 용매로 추출하여 분리해내는 공정이다.<sup>3)</sup> 유기산 추출에 효과적인 추출제로는 amine계가 알려져있으며, 일반적으로 1차, 2차 amine 보다 3차 amine이 더 높은 추출력을 나타낸다. 추출제와 유기산의 complex 형성시 해리되지 않은 유기산이 반응에 참가하므로 유기산의 pKa에 관련하여 pH에 대한 추출력의 차이는 크다고 할 수 있다. 생성된 유기산의 최대 추출력과, 추출제의 최대 추출력의 평가는 발효액 및 추출제의 반복 적용을 통해 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 전처리

사용된 유기산 균주는 *Propionibacterium acidipropionici* ATCC4965 이며, 배지로는 Corn steep liquor(CSL), Hydrol을 업체로부터 공급받아 사용하였다. 분석 결과 CSL의 고형물 함량은 50%, Hydrol의 당 함유량은 68%로 나타났다.

### 회분식 발효

발효 배지로는 hydrol 3%에 CSL을 0.5-3.0 %(w/v)로 0.5%씩 증가시켰고, Bench-Top Fermenter System(Virtis. Co)를 사용하여 30℃에서 pH는 6으로 유지하며, N<sub>2</sub> 가스를 연속적으로 주입하여 혐기성 상태를 유지하였다.

### 세포 재순환식 연속발효

연속발효에서는 hydrol 3%, CSL 2.5%를 혼합하여 배지로 사용하였고, pH6.0, 30℃로 시작하여 약 80hr이후부터 희석률 0.1/h, 0.15/h, 0.2/h, 0.25/h로 연속 발효를 실시하였다. 연속발효장치는 Quixstand benchtop system에 고정시킨 공극 0.1 $\mu$ m의 UF Module(SAM-BO gloval)과 맥동펌프(Watson Marlow 313)를 이용하여, 세포를 재순환시키고, 발효액만을 분리하여 유기산 추출에 사용하였다.

### 액-액 추출

추출 용매로 o-xylene, m-xylene p-xylene, n-butyl acetate, methyl isobutyl ketone, chloroform 과 추출제로 선정된 octylamine, dioctylamine, trioctylamine과 trioctyl-methyl-ammonium-chlorid 을 사용하였으며, 순수유기산의 추출력은 Acetic acid 1%와 Propionic acid 2%의 혼합용액과 추출상을 동일 부피로하여 약 30분간 mixing을 하고, 2hr 정도 방치한후, 농도를 분석하였다. pH 조절은 NaOH와 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다. 동일한 방법으로 발효액의 추출력을 평가하였고, 또한, 수용액만 또는 추출액만을 교체하여, 반복적용 실험을 5cycle까지 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 회분식발효

CSL을 0.5-3.0 %(w/v)로 0.5%씩 증가시키면서 회분식 발효를 실시하였으며 그중 2.5%의 결과를 Fig. 1에 나타내었다. CSL 1%일때보다 2%일 때 글루코스의 대사 시간(약 113hr)은 차이가 없었으나, 최종 유기산 생산량은 6.6g acids/L정도 높았으며, 3%일때는 2%일 때 보다 생산성에는 별 차이가 없었으나, 발효 속도에서 30 ~ 40hr 정도 더 빠른 것으로 나타났다, 또한, 유기산 수율의 비교 결과 2.5%일 때 가장 높게 나타나 최적 배지 조성으로 결정되었다.

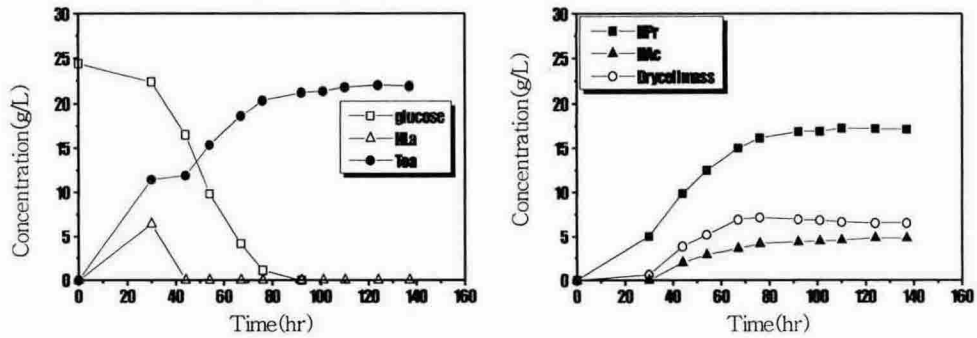


Figure 1. Organic acid production by batch fermentation of *P. acidipropionici* ATCC 4965 at 2.5% CSL

### 세포재순환식 연속 발효

희석률(D)에 따른 결과를 Table 1에서 비교하였으며 그중 희석률 0.2/hr일때의 발효 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 희석률 0.1/hr에서 동일조성의 경우, 회분식발효보다 세포 생산량은 약 10배정도, 유기산 생산성도 약 8배정도 높게 나타났다, 또한 희석률 0.2/hr 일때 0.1/hr에서 보다 최대 세포생산량의 경우 2.34배, 유기산 생산성은 1.39배 높았다.

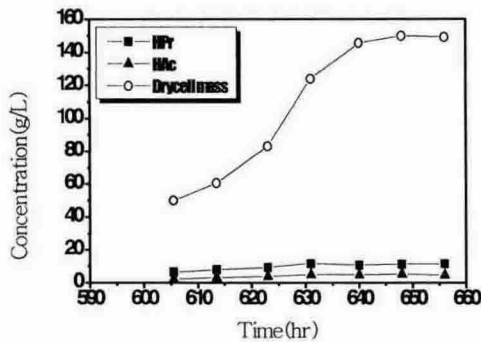


Figure 2. Cell-recycling fermentation of food by-products using ATCC 4965. (Sugar: Hydrol 3%, pH6, 30°C, D=0.2/hr)

Table 1. Performance comparisons of cell-recycling fermentation

|  | Dilution Rate(D, 1/hr) |      |      |
|--|------------------------|------|------|
|  | 0.1                    | 0.15 | 0.2  |
| Maximum cell Yield (g drycellmass/L)       | 64.1                   | 74.1 | 150  |
| Product Yield (g organic acid/g glucose)   | 0.79                   | 0.58 | 0.55 |
| Maximum Productivity (g organic acid/L/hr) | 2.38                   | 2.59 | 3.32 |

### Liquid-liquid extraction

Figure 3은 수용액상을 반복적용 하였을때 추출력을 나타낸 것으로 1cycle에서 순수 유기산의 추출실험을 통해 30%w/w TOA/MIBK일때 acetic acid 75.7%, propionic acid 94.25%의 추출력을 얻었다. 또한 TOA 20%w/w에서 TOA 1 분자에 대한 유기산 분자의 complex가 1 : 2.84 이상이 가능함을 확인하였으나, 5cycle 후에 더 이상의 반복적용은 에멀전 형성과 추출제의 유실등의 문제가 있었다. 이상의

순수 유기산 추출의 결과를 발효액에 적용한 결과 순수 유기산의 경우 보다는 다소 낮은 추출력(acetic acid 53.47%, propionic acid 66.7%)을 얻었으나, Figure 4에 나타난 바와같이 추출제의 3번 반복 적용을 통해 Acetic acid 89%, Propionic acid 92% 까지 추출력을 향상시켰다.

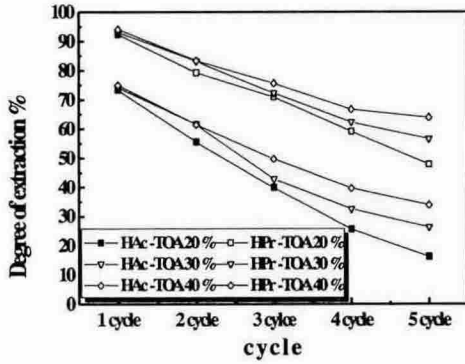


Figure 3. Repeated applications of TOA with organic acids in aqueous phase

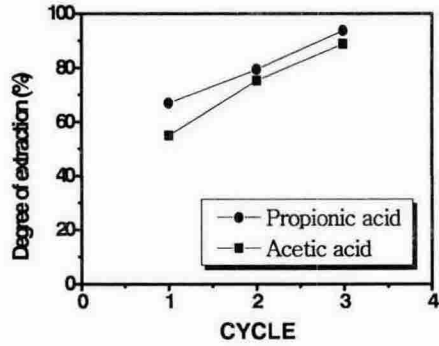


Figure 4. Repeated extraction of organic acids in fermenter with TOA < TOA(30w/w%)/MIBK >

### 요 약

본 연구의 목적은 식품부산물로부터 유기산 생산 및 분리 농축에 있다. 회분식 발효를 실시하여 균주의 최적 발효조건을 구하여 세포 재순환식 연속 발효공정에 적용한 결과, CSL의 최적 함량은 2.5%로 나타났으며 수율과 생산성은 각각 0.80g total acid/g glucose, 0.26g total acid/L/h로 향상 되었다. 세포 재순환식 연속발효 결과, 최대 유기산 생산성은 희석률 0.2/h에서 3.32g organic acid/L/h로 회분식 발효와 비교해 볼 때 최대 생산성으로는 13배, 세포량으로는 22배 증가한 것으로 나타났다. 또한, 최적 추출시스템은 30%w/w TOA/MIBK로 나타났으며, 발효액내의 유기산을 약 90%까지 분리 및 농축할 수 있음을 확인하였다.

### 참고문헌

1. Choi, C.H. and A.P. Mathews, "Fermentation metabolism and kinetics in the production of organic acids by *Propionibacterium acidipropionici*"(1994), *Biochem. Biotechnol.* 44 271-285.
2. Woskow, S.A. and Glatz, B.A. "Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation"(1991), *Environ. Microbiol.* 57 2821-2828.
3. Qader. A and Hughes. M. A "Interfacial Kinetics of the Stripping of Acetic and Citric Acids from Tri-n-octylamine Complexes"(1996), *Separation sci. and tech.* 31(12), 1707-1720.