

*Aspergillus niger*를 이용한 글루콘산 나트륨의 생산

이 현 철 · †정 봉 우 · 김 춘 영 · *김 대 혁 · **나 병 국
전북대학교 화학공학부, *전북대학교 유전공학연구소, **알천산업(주)

The Production of Sodium Gluconate by *Aspergillus niger*

Hyun-Chul Lee, Bong-Woo Chung[†], Chun-Yeong Kim,
Dae-Hyuk Kim*, and Byung-Kuk Ra**

Dept. of Chemical Engineering & Technology, Chonbuk National University, 560-756, Korea
*Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University, 560-756, Korea
**Alchun Industry Co., Ltd. Seochun 325-800, Korea

ABSTRACT

Sodium gluconate was produced by neutralization of gluconic acid formed during the submerged culture fermentation of glucose with *Aspergillus niger* ACM 7. The fermentation characteristics of *Aspergillus niger* ACM 7 were investigated quantitatively according to the change of the initial glucose concentrations and the initial pHs of fermentation broth. The maximum specific growth rate was estimated to be 0.20hr^{-1} at $95\text{g}/\ell$ of initial glucose concentration. The maximum fermentability of sodium gluconate was 95% at the initial glucose concentration of $26\text{g}/\ell$. However, the maximum sodium gluconate productivity was $1.18\text{g}/\ell/\text{hr}$ when the initial glucose concentration was $110\text{g}/\ell$. The optimum pH was found to be 5.5 for both the cell growth and the sodium gluconate production.

With optimized culture conditions, the productivity of sodium gluconate in a fed-batch culture (production fermentor, $16,000\ell$) increased up to $7.1\text{g}/\ell/\text{hr}$.

서 론

포도당 산화 방법에 의해 만들어지는 글루콘산, glucono- δ -lactone, 그리고 글루콘산의 유도체들은 다양한 물성을 지니고 있어 식품, 의약품 및 화학공업의 기초 원료로 광범위하게 사용되고 있다(1-6). 이들 중 글루콘산나트륨 알칼리 수용액은 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리토금속염의 석출(scale 형성)을 방지하는데 탁월한 효과가 있어 기계, 기구, 용기 등의 세척과 녹의 방지 등 여러 방면에 글루콘산나

트륨의 수요가 증가하고 있으며 최근에는 시멘트 분산제, 또는 응고 지연제로 사용되어 콘크리트의 강도를 크게 증가시키는데 사용되고 있다.

글루콘산 유도체의 상업적인 생산 방법은 전기 화학적 산화 방법(7), 촉매 산화법(8-10), 미생물을 이용한 발효법(11-14), 고정화 효소를 이용한 방법(15-18) 등의 네 가지의 포도당 산화 방법이 있는데 이들 중 하나의 방법을 선택하는 것은 많은 기술적, 경제적 요소에 의존하며 현재는 미생물을 이용한 생산 방법이 산업적으로 가장 많이 채택되고 있다.

1878년에 Boutroux(19)에 의해 미생물의 산화 작용에 의해 포도당으로부터 일종의 비휘발성산이

† Corresponding Author

생성된다는 사실이 발견된 이래로 현재는 *Aspergillus niger*를 이용한 액침 배양 방식(submerged culture mode)에 의하여 글루콘산을 생산하고 있다.

그러나 발효가 진행됨에 따라 생성된 글루콘산에 의해 배양액의 pH가 낮아져 최적반응 pH범위를 벗어남으로써 글루콘산의 생산성이 떨어지는 문제점으로 인하여 어려움을 겪고 있다.

본 연구에서는 글루콘산 및 그 유도체 생산에 관한 기초자료를 얻기 위하여 일차적으로 글루콘산나트륨의 생산조건에 대하여 실험하였다. 발효가 진행됨에 따라 생성되는 글루콘산을 수산화나트륨을 이용하여 중화시킴으로써 글루콘산나트륨으로 전환시켰으며 이때 초기 당 농도 및 pH의 영향을 정량적으로 검토하여 생산성을 비교하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용한 균주는 글루콘산의 생산성이 우수한 *Aspergillus niger* ACM7이며 사면 배지에 냉장 보관된 균주를 Yeast extract 3g/l, Malt extract 3g/l 인 YM 액체 배지에 계대하여 30±2°C에서 7일간 배양하여 포자를 완전히 형성시킨 후 5°C 저온실에서 보존하여 사용하였다.

배지 및 배양

균체의 배양에 사용된 배지의 조성은 Table 1과 같다. Seed culture는 배지가 들어 있는 250ml Erlenmeyer flask에 접종시켜 진탕 배양기를 이용하여 30±2°C, pH 5.5에서 28시간 동안 배양한 후 발효를 위하여 100ml의 배지가 들어 있는 500ml Erlenmeyer flask에 10ml 접종하여 플라스크 배양을 수행하였다.

유가식 배양 장치는 산업체 발효조에서 공기 유입 속도 1v/v/min, 교반속도 120rpm으로 조절하여 실시하였으며 최종 조업부피는 16,000l 이었다.

발효실험

균주를 삼각 플라스크 내의 배양배지에 접종한 후 진탕배양기를 이용하여 30±2°C, pH 5.5에서 28시간 동안 배양한 후 발효를 위하여 준비된 삼각 플라스크 내의 기질에 접종시켰다. 이때 접종된 균주액은 10%(v/v)가 되도록 하였다. 기질의 초기 농도 변화에 따른 균주의 발효 특성을 규명하기 위하여 이용된 기질의 농도는 26, 45, 70, 95, 110, 120g/l

Table 1. Media composition for culture of *Aspergillus niger*.

Components	Growth medium (g/l)	Production medium (g/l)
Glucose	30	20-110
K ₂ HPO ₄	0.6	0.6
KH ₂ PO ₄	0.4	0.4
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3	0.3
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.3	0.3
NH ₄ Cl	0.4	0.4
CaCO ₃	0.4	0.4
Antifoam*(ml/l)	0.06	0.06

* Neolin : Union Carbide Co.

이었으며 30±2°C, pH 5.5에서 총 36시간 동안 발효시켰다.

본 연구의 발효 실험은 크게 두 가지로 나누어 실시하였다. 각 기질의 농도에서 발효시간에 따른 글루콘산나트륨의 생성량, 균체 생성량, 기질의 감소량을 측정하기 위하여 발효 시작 후 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36 시간마다 시료를 채취하여 각 시료의 글루콘산나트륨, 균체 및 기질의 농도를 측정하였다.

기질의 초기 pH가 발효 특성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 기질의 당농도를 26, 45, 70, 95, 110, 120g/l로 하고 각 기질에 대한 초기 pH값을 3.0, 5.5, 7.0, 9.0으로 고정시킨 후 온도 30 ± 2°C에서 총 36시간 동안 발효시키면서 시간에 따른 pH의 변화, 글루콘산나트륨, 균체 및 기질의 변화량을 측정하였다.

발효배지의 pH는 1N HCl과 1N NaOH용액을 사용하여 조절하였다.

시료분석 및 Kinetic parameter 계산

시료 채취후, 4,000rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 상등액은 잔당과 글루콘산나트륨의 농도분석에, 침전물은 균체농도 분석에 사용하였다. 포도당 농도는 Shaffer-Somogi 방법(20)에 의거 정량하였는데 시료 10ml에 당분석용 시약을 철차에 의해 가하고 Na₂S₂O₃ · 5H₂O-Na₂CO₃ 용액을 사용하여 적정하였으며 글루콘산나트륨의 농도는 perchloric acid를 기준 물질로 하여 gas chromatography (Hewlett Packard, HP 5890A, Column : IOA-1000, 300mm × 7.8mm)를 사용 분석하였다.

균체농도는 균체시료를 3회 세척한 후 105°C로

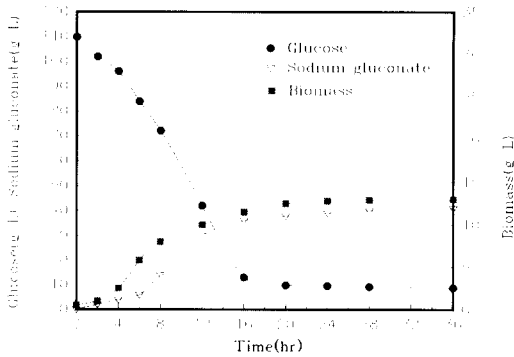


Fig. 1. Sodium gluconate production in the initial glucose concentration of 110g/l by the shake-flask culture using *Aspergillus niger*.

유지된 건조기에서 24시간 이상 건조하면서 무게를 측정하여 시간에 따른 무게가 항량일 때를 균체량값으로 하였다.

본 실험에서 추정된 kinetic parameter는 *Aspergillus niger*의 비성장속도(specific growth rate, μ), 균체 수율(cell mass yield, $Y_{x/s}$), 글루콘산나트륨 수율(sodium gluconate yield, $Y_{p/s}$), 및 총괄 글루콘산나트륨 생산성(overall sodium gluconate productivity, Q) 등이었으며 계산 방법은 Michael L. Shuler 등(21)에 따랐다.

결과 및 고찰

초기 당농도가 발효 특성에 미치는 영향

Fig. 1은 초기 당농도가 110g/l 일때 36시간 동안의 포도당, 글루콘산나트륨 및 균체량의 변화를 발효시간에 따라 나타난 결과이다.

초기 pH는 탄산칼슘을 이용, pH 5.5로 하였으며 발효가 진행됨에 따라 수산화나트륨을 첨가함으로써 pH를 5.5로서 유지하였다. 발효진행시간 16시간 이후 부터는 글루콘산나트륨 형성이 둔화되었으며 이때의 잔당의 농도는 10g/l 이하로 또한 감소경향이 매우 완만함을 관찰할 수 있었다. 잔당의 농도는 10g/l 이하일때 감소경향이 매우 완만해짐은 다른 초기 당농도의 변화의 실험에서도 같은 경향을 나타냈으며, 또한 36시간 배양후 최대 세포 농도는 13g/l 이었다. 이는 기질의 고갈로 인한 글루콘산 나트륨의 생산이 둔화되었다고 판단된다.

Fig. 2는 초기 당농도의 변화에 따른 비성장속도

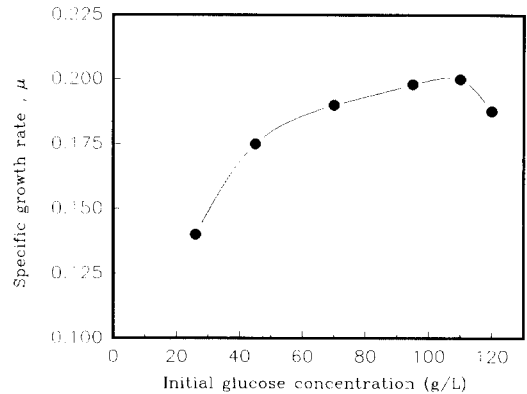


Fig. 2. Result of the specific growth rate at various initial glucose concentrations.

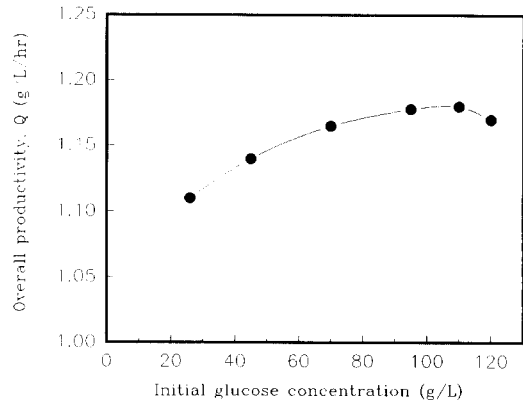


Fig. 3. Result of the overall sodium gluconate productivity at various initial glucose concentrations.

의 변화 경향을 도시한 것이다. 본 실험 결과에 의하면 *Aspergillus niger*의 비성장속도의 최대값은 기질의 초기 농도가 110g/l 일 때 $0.20hr^{-1}$ 로써 가장 큰 값을 나타내었으며 당의 농도가 증가함에 따라서 그 값이 감소하는 경향을 나타내었다. *Aspergillus niger*의 비성장속도는 초기 당농도 110g/l 까지는 기질의 저해 영향을 받지 않으나 그 이상에서는 기질의 저해 영향이 있음을 알 수 있었다. *Aspergillus niger*의 경우 대부분 당농도가 120g/l 이상이 되면 기질의 저해 영향이 나타나며 175g/l 이상이 되면 균체 성장에 많은 지장을 초래하는 것으로 보고되고 있다.

Fig. 3은 초기 당농도의 변화에 따른 총괄 글루콘산나트륨 생산성의 변화 경향을 도시한 것이다. 총

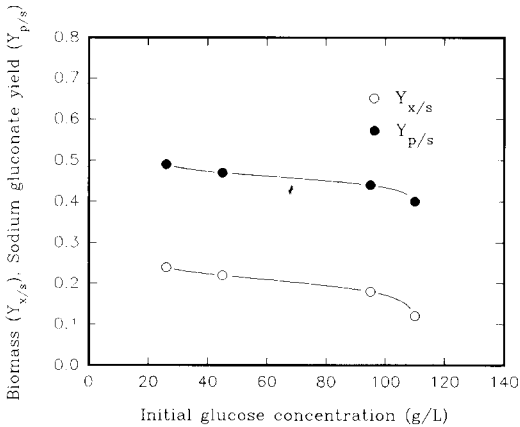


Fig. 4. Result of the biomass yield and sodium gluconate yield at various initial glucose concentrations.

괄 글루콘산나트륨 생산성은 초기 당농도가 110g/l 일 때 1.18g/l/hr로서 가장 높은 값이었다. 최대 비성장속도, μ_{max} 에 대한 최적 초기 당농도와 총괄 글루콘산나트륨생 산성, Q에 대한 최적 초기 당농도는 110g/l로 일치함을 보였다. 이것은 글루콘산나트륨 생성이 균체의 성장속도에 비례함을 나타내고 있다.

Fig. 4는 초기 당농도 변화에 따른 균체 수율($Y_{x/s}$)과 글루콘산나트륨 수율($Y_{p/s}$)를 도시한 것이다. 균체수율은 당 농도가 가장 묽은 26g/l에서 최대값 0.24를 나타내었으며 당 농도의 증가에 따라 감소 경향을 보였다. 당 농도가 묽은 환경에서 균체수율이 높은 것은 기질의 저해 작용이 없을 뿐만 아니라 생성된 글루콘산나트륨에 의한 성장 저해 작용이 적기 때문으로 해석된다.

글루콘산나트륨 수율 또한 초기 당농도가 26g/l 일 때 0.49로서 최대값을 나타내었으며 당농도의 증가에 따라 감소 현상을 나타내었다. 그러나 이 감소 현상은 균체 수율에 비하여 훨씬 완만하게 변해감을 알 수 있었으며 초기 농도 26g/l에서 110g/l 사이에는 수율값이 0.4와 0.5사이에 분포되었다.

초기 pH가 발효 특성에 미치는 영향

초기 pH가 *Aspergillus niger*의 발효 특성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 기질의 농도를 45g/l, 95g/l, 110g/l로 하고 각 기질의 초기 pH를 3.0, 5.5, 7.0, 9.0으로 하여 발효 시간에 따른 총당, 글루콘산나트륨 및 균체량을 측정하였다.

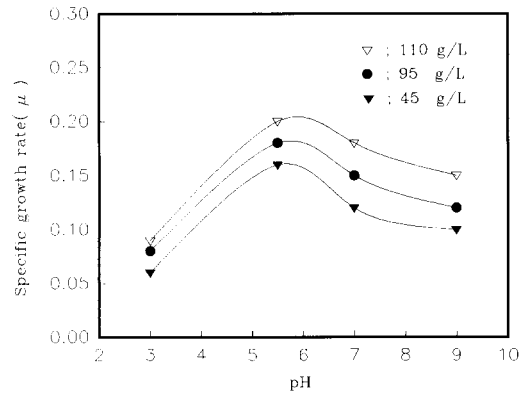


Fig. 5. Result of the specific growth rate at various initial pHs.

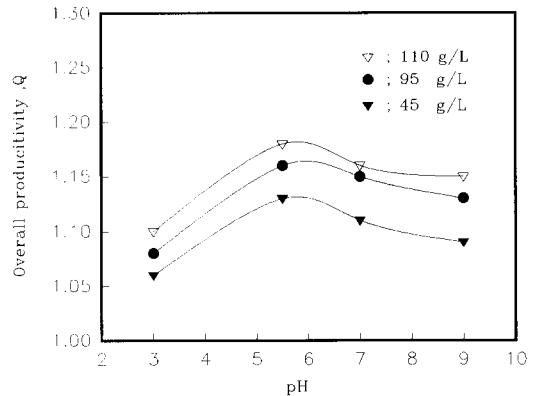


Fig. 6. Result of the the overall sodium gluconate productivity at various initial pHs.

Fig. 5는 초기 당농도 45g/l, 95g/l, 110g/l 일 때 초기 pH변화에 따른 최대 비성장속도를 도시한 것이며 Fig. 6은 초기 pH와 글루콘산나트륨의 생산성간의 관계를 나타낸 것이다.

비성장속도의 최대값은 pH 5.5일 때 초기 당농도 45, 95, 110g/l 각각의 경우 0.13, 0.18, 0.20hr⁻¹ 등으로 나타났으며, 총괄 글루콘산나트륨 생산성 또한 pH 5.5일 때 0.55, 1.06, 1.18g/l/hr로 최대값을 보였다. 균체 및 글루콘산 나트륨 수율 역시 활성이 최적인 pH 5.5에서 최대값을 나타내었고 이 조건에서 36시간후의 잔당 농도는 5g/l 미만이었다.

유가식 배양

플라스크 배양을 통하여 얻은 균주에 대한 반응 특성과 환경 인자 등을 최적화한 발효 조건을 조업

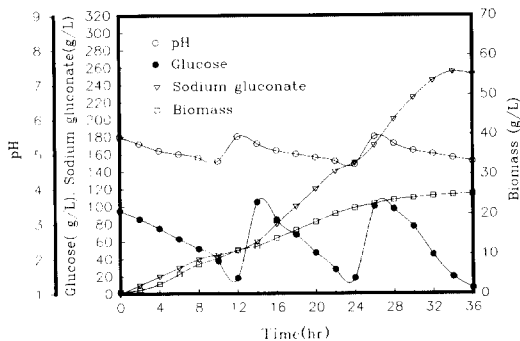


Fig. 7. Sodium gluconate production, glucose consumption and pH profile in the fed-batch fermentation using *Aspergillus niger*.

부피 16,000ℓ 인 산업체 발효조에 적용 하였다

Fig. 7은 글루콘산나트륨의 생산량을 증가시키기 위하여 기질인 포도당액, G-60(60w/w)을 11~12 시간 경과 후에 새로운 포도당을 첨가하는 간헐첨가 회분배양(intermittent feeding fed-batch)의 결과를 나타내었다. 포도당 농도는 원료가격이 제품에 미치는 영향을 고려하여 초기농도를 95g/ℓ 로 하였다.

36시간 경과 후의 글루콘산나트륨의 농도는 255g/ℓ 을 얻을 수 있었으며 발효시간이 지속됨에 따라 점차로 균체의 활성이 저하되어 글루콘산나트륨 생산 또한 감소함을 알 수 있었다. 플라스크 배양에 경우에 비하여 현저히 생산성이 증가(6배)하는 이유는 포기(aeration)와 교반에 따른 세포농도의 증가에 기인하며, 유가식 배양방식이 매우 적절하다고 사료된다.

요 약

본 연구에서는 글루콘산 및 그 유도체 생산에 관한 기초자료를 얻기 위하여 일차적으로 글루콘산나트륨의 생산조건에 대하여 실험하였다. 발효가 진행됨에 따라 생성되는 글루콘산을 수산화나트륨을 이용하여 중화시킴으로써 글루콘산나트륨으로 전환하였으며 이때 초기 당농도 및 pH의 영향을 정량적으로 검토하여 생산성을 비교하였다.

*Aspergillus niger*를 이용한 글루콘산나트륨 발효에서 초기 농도 및 초기 pH가 발효 특성치에 미치는 영향은 실험 결과를 종합하면 최대비생성속도는 초기 당농도 110g/ℓ 에서 0.20hr⁻¹로서 가장 높은 값을 나타내었으며 균체 및 글루콘산나트륨 수율은

저농도 기질인 당농도 26g/ℓ 에서 0.24, 0.49로서 최대값을 나타내었고 잔당 농도는 5g/ℓ 미만이었다. 또한 총괄 글루콘산나트륨 생산성은 고농도 기질인 110g/ℓ 에서 1.18g/ℓ/hr로서 가장 높았다. 그리고 발효를 위한 최적 pH는 5.5이었다. 산업체 발효조 적용, 간헐 첨가 회분배양(intermittent feeding fed-batch)의 결과, 36시간 경과 후의 글루콘산나트륨의 농도는 255g/ℓ 이었으며 산업적 생산이 가능한 수준이었다.

감 사

이 논문은 전북대학교 유전공학연구소의 지원으로 가능하였으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. G. B. Stone (1950), *Drug Cosmetic Ind.*, **67**, 192.
2. F. J. Prescott, J. K. Shaw, J. P. Bilello, and G. O. Cragwall (1952), *Ind. Eng. Chem.*, **45**, 338.
3. Charles Pfizer and Co. (1955), *Technical Bulletin* No. **33**.
4. 알천산업(주) (1993), 글루콘산 및 그 유도체, 기술자료 ACTM-9301.
5. Charles Pfizer and Co. (1957), *Technical Bulletin* No. **93**.
6. J. C. L Resuggan (1957), *Dairy Ind.*, **22**, 331.
7. H. S. Isbell, H. L. Frush and F. J. Bates (1932), *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 375-378.
8. Charles Pfizer and Co. (1957), *Br. Pat.* 786, 288.
9. G. J. K. Acres and A. E. R. Budd (1970), *Br. Pat.* 1,208,101.
10. H. G. J. de Wilt (1972), *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **11**, 370-378.
11. K. Yamata (1976), *Fermentation and Industry (Japan)*, **34**, 9, 661.
12. S. K. J. Bose (1947), *Indian Chem. Soc.*, **24**, 327-337.
13. D. Keilin and E. F. Hartree (1948), *J. Biochem.*, **42**, 221-337.
14. Y. Ichikawa (1960), *Yakugaku (Japan)*, **32** (2), 23-31.

15. D. L. Baker (1953), *US Pat.* 2,651,592.
16. CPC International Inc. (1972), *Br. Pat.* 1,276, 245.
17. G. Richter and H. Heineckert (1979), *Starch/Staerke*, **31**, 418-422.
18. W. Hartmeier and G. Tegge (1979), *Starch/Staerke*, **31**, 348-353.
19. L. Boutroux and C. R. Hebd (1880), *Seances Acad. Sci.*, **91**, 236-238.
20. W. Holowitz (1975), *Method of Analysis of A. O. A. C.*, p. 574.
21. M. L. Shuler and Fikret Kargi (1992), *Bioprocess Engineering*, p 148, Prentice-Hall, Inc., New Jersey.