

고정화 *Aspergillus niger* 세포를 이용한 우유공장 폐수로부터 구연산 생산의 최적 조건

이용희* · 서명교¹ · 노호석² · 이동환 · 정경태³ · 정영기³

동의대학교 기초과학연구소 및 자연과학대학 화학전공, ¹동의공업대학 환경정보시스템,
²하창식품(주), ³동의대학교 자연과학대학 생명응용화학전공

Optimal Condition for Citric Acid Production from Milk Factory Waste Water by Using the Immobilized Cells of *Aspergillus niger*. Lee, Yong-Hee*, Myung-Gyo Suh¹, Ho-Seok Roh², Dong-Hwan Lee, Kyung-Tae Chung³, and Young-Kee Jeong³. Research Institute of Basic Sciences & Chemistry Major, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ¹Department of Environment & Bio-Engineering, Dong-Eui Institute of Technology, Busan 614-715, Korea, ²Department of R&D, Whachang Food Co., Ltd., Kyungnam, 660-761, Korea, ³Life Science and Biotechnology Major, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – Immobilized cells of *Aspergillus niger* was employed to produce citric acid by fermentation of milk factory waste water. *A. niger* ATCC 9142 as a citric acid production strain was cultured for 3 days and was entrapped with Ca-alginate bead about 2.5~3.5 mm. The optimal pH and temperature were estimated to be 3.0 and 30°C, respectively. Dilution rate for fermentation was calculated to be 0.025 h⁻¹. Maximum amount of citric acid was obtained at 4.5 g/l with the optimized fermentation condition. The yield of citric acid produced by immobilized *A. niger* ATCC 9143 was 70.3%. The yield was increased by 20% with immobilized cell, compared to that of the shake flask culture. Hence, the milk factory waste water is worthy to be used for the substrate of citric acid fermentation.

Key words: *Aspergillus niger*, citric acid, milk factory waste water, immobilization

구연산은 TCA(tricarboxylic acid) 회로의 중간체로서 레몬 주스에서 분리되어 calcium citrate로 결정화되기 시작했다. 구연산은 뛰어난 감미성으로 식품공업에서 널리 쓰일 뿐만 아니라 높은 용해도, 낮은 독성 등의 특징으로 인하여 약제 산업에서도 그 이용 가치가 매우 높다. 구연산의 생산은 주로 곰팡이, 효모, 박테리아 등의 미생물을 이용한 발효에 의한 방법이 널리 쓰이고 있다. 그 중에서도 *Aspergillus niger*를 이용한 방법이 가장 널리 쓰이는 방법 중의 하나이다. 구연산 발효의 성분으로서 glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose 등의 당과 그 외에 폐기물인 감귤과피, carob pod[13], corn[6], pineapple[4] 등을 이용한 방법들이 보고되고 있다. 따라서 폐기물을 발효원으로 이용하여 각종 biomass의 생산과 오염방지의 두 가지 목적을 이루기 위한 실험들도 이루어지고 있다. 폐수를 이용한 발효로서는 감자 식품공장 폐수를 이용한 single cell protein (SCP)의 생산[11]과 치즈 가공시에 나오는 부산물인 유청을 이용한 젖산과 구연산[2] 생산이 보고되어 있다. 우유공장폐수는 다량의 당과 단백질이 함유되어 있으므로 오염도가 높아서 물론 희석해 배출할 경우에 많은 비용이 드는 문제점이 따른다. 따

라서 우유공장 폐수내에 포함된 다량의 당을 구연산 발효 배지로 이용한다면 오염방지와 발효배지 이용이라는 일석이조의 효과가 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 발효배지로서 우유공장폐수를 이용하고 구연산 생산균주로서는 *A. niger* ATCC 9142를 사용해서 수행하였다. 3일간 전배양시킨 균주를 Ca-alginate를 이용하여 포획해서 약 2.5~3.5 mm 크기의 beads를 제조하였으며, 희석률은 0.045 h⁻¹로 하였다. 연속식 생산을 위하여 균체를 고정화하였으며, 균체의 고정화로 가장 널리 쓰이는 방법인 monomer suspension을 copolymer solution에 적하시켜 가면서 겔(gel) beads 형태를 만드는 것으로, Eikmeier[5] 등은 *A. niger* ATCC 11414를 Ca-alginate에 고정화하였고, Tsay[15] 등은 *A. niger* TMB 2022를 3% Ca-alginate에 고정화한 것들이 있다. 그 외에 disk surface[1]에 고정화한 실험도 보고되어 있다. 본 실험의 목적은 고정화한 *A. niger*를 이용하여 연속적인 구연산 생산 공정에서 최적의 pH와 온도, 그리고 희석률 등의 조건을 결정하는데 있으며, 연속식 실험의 결과를 플라스크 발효 실험결과와 비교하고자 하는데 있다.

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2129, Fax: 82-51-891-7740

E-mail: lyh202@deu.ac.kr

재료 및 방법

사용 미생물

구연산 생산 균주로서는 ATCC에서 분양받은 *A. niger* ATCC 9142를 이용하였다. 균은 활성을 유지하기 위하여 potato dextrose agar(PDA)배지에 2개월에 한번씩 계대배양하여 1주일 동안 30°C에서 배양한 후, 4°C에서 보관하며 사용하였다. PDA배지(Difco Lab., Detroit, U.S.A.)의 조성은 potato 200 g, dextrose 20 g, agar 15 g이었다.

우유공장폐수의 전처리

배지는 우유공장폐수를 사용하였다. 우유공장폐수의 성상은 Table 1과 같다. 우유공장폐수에 4N-염산을 첨가하여 pH 4.3에서 단백질 성분을 침전시켜 여과한 후에 활성탄과 섞고 다시 섞은 뒤에 또 다시 여과(Watman paper No. 1)해서 질소성분의 제한상태를 유지한다. 그 후에 당 농도를 5%로 조정해서, 이를 다시 pH로 맞추어서 121°C에서 15분 동안 멸균시켜서 사용하였다.

고정화

본 실험에서는 500 ml 삼각플라스크에 멸균한 우유공장폐수 100 ml를 넣은 다음 PDA배지로부터 포자를 접종해서 shake-incubator로 30°C, 72시간 동안 배양시켰다. 그 후에

Table 1. Physical and chemical properties of milk factory waste water.

Items	waste water
pH	7.0~7.2
BOD ₅ (mg/l)	20,000
COD (mg/l)	17,000
Total reducing sugars (g/l)	10
Total nitrogen (mg/l)	575
Total phosphorous (mg/l)	2.1

균주를 원심분리하여 4% Na-alginate와 혼합(균 : alginate = 1 : 10, w/w)한 후에, 주사기를 이용해서 2% CaCl₂ 용액에 첨가하여, 직경 2.5~3.5 mm의 bead를 만들었다. 고정화된 균은 반응기 부피의 30%되게 증진시켰다.

배양

연속 배양: 본 실험에서 사용된 연속식 반응기는 Fig. 1과 같다. 반응기는 내경 2.5 cm, 높이 30 cm, 반응기 부피 250 ml 크기의 유리관으로 제작되었으며 온도조절을 위하여 2중 관으로 제작, water bath로부터 물을 공급받아 순환시켰다. 공기공급은 공기여과기(0.45 μm air filter)를 부착한 air pump를 사용하였으며, 공기분산을 위해서 glass filter를 사용하였다.

Shake-flask 배양: 500 ml 삼각 플라스크에 고정화시킨 균과 멸균한 우유공장폐수 배지를 1 : 2 비율로 하여 플라스크에 총 150 ml가 되게끔 부어서 30°C, 200 rpm의 조건으로 회전식 항온 배양기에서 배양하였다.

분석

환원당은 dinitrosalicylic acid(DNS) 법[10]으로 측정하였다. 0.25 g의 3,5-dinitrosalicylic acid와 75 g의 Rochelle salt를 2 M NaOH 50 ml에 첨가해서 녹인 다음, 증류수로 250 ml가 되도록 희석해서 DNS 시약을 제조하였다. 1 ml의 시료에 제조한 DNS 시약을 1 ml 혼합하여 100°C에서 10분간 발색하여 실온으로 급냉한 다음, 자외선 분광광도계(Shimadzu, Model U-3210, Japan)을 이용하여 흡광도(570 nm)를 구하고, 검량선을 이용해서 정량하였다. 구연산은 Marier와 Boulet의 방법으로 측정하였다[9]. 시료 1 ml에 1.3 ml의 pyridine을 넣고, 여기에 다시 5.7 ml의 무수초산을 넣고 교반 후, 항온수조에서 1시간동안 반응시켜 발색시켰다. 자외선 분광광도계를 이용하여 흡광도(420 nm)를 구하고 검량선을 이용해서 정량하였다. 질소성분 분석에 있어서 질소원의 양은 일반적인 Kjeldahl 법을 이용해서 측정하였다.

결과 및 고찰

발효를 위한 배지조성

일반적으로 구연산의 생산은 낮은 질소원 농도배지에서 유리하고 높은 질소원 농도 배지에서는 균 성장이 유리한 것으로 알려져 있다. Kim[7] 등은 생산균주의 세포활성을 최상의 조건으로 유지하기 위해서는 질소가 제한된 배지를 이용해야 한다고 했으며, Tanaka[14] 등은 높은 질소원 농도에서는 고정화된 겔(gel) 표면에 균사막이 형성됨으로 인하여 고정화된 겔 내에서는 세포의 대사가 더욱 활발해지기 때문에 alginate gel의 확산 제한 이상의 발달로 인하여 구연산 생산이 극히 제한된다고 하였다. 따라서 본 실험에서는 우유공장폐수의 질소원 농도를 감소시키기 위해서 배지를 활

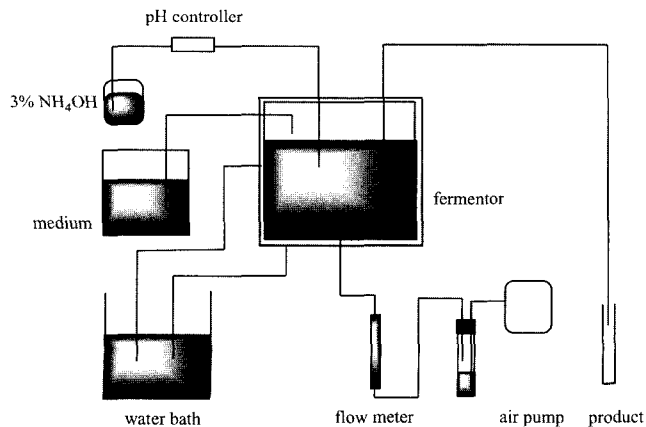


Fig. 1. Diagram of continuous reactor.

Table 2. Nitrogen concentration of milk factory waste water.

	Nitrogen (mg/l)
Milk factory waste water	575
After pH variation	320
After activated charcoal treatment	24.5

성탄에 통과시켰다. Table 2는 배지의 각종 전처리 후의 질소원 농도를 나타낸 것으로 활성탄 통과 후에 배지의 질소원 농도가 pH 침전시보다 약 1/13로 줄어들었다.

구연산 생산에서 pH의 효과

구연산 생산에서 pH는 세포막의 투과성 및 기질의 소모와 관계있는 효소 등에 영향을 미친다. *A. niger*에 의한 구연산 생산은 pH 3.0 이하일 때 생성물이 구연산이 되며, 그보다 높은 pH에서는 상당량의 oxalic acid와 gluconic acid가 생산되는 것으로 알려져 있다[12]. 본 실험에서는 공급배지의 pH를 2, 3, 4 등으로 변화시키고, 회석률은 0.045 h⁻¹로 일정하게 유지하도록 해서 구연산 생산이 일정수준에 도달한 9일째의 결과를 Fig. 2에서 볼 것 같으면 pH 3에서 구연산 생산이 3.86 g/l로 최고로 나타났으며, 수율 또한 58.9%로 최고였다. 특히 pH 2에서는 당의 소모량이 아주 컸는데 이러한 이유는 낮은 pH에서 당이 세포막에 침투가 용이하거나, 그렇지 않으면 pH 2 근처에서 ATCC 9142의 β-galactosidase의 활성이 크기 때문일 것으로 생각된다.

구연산 생산에서 배양효과

온도는 구연산 생산에서 매우 중요한 환경요인이며, *A. niger*는 일반적으로 28~33°C에서 생산성이 좋은 것으로 알려져 있다. 높은 온도에서는 발효과정이 매우 빠르고 많은 균 성장이 일어나므로 인해서 당 소모율이 매우 크며 수율이 낮은 반면, 낮은 온도에서는 높은 수율이 가능해진다. Eikmeier[5] 등의 연구에서는 30°C가 최적온도였으며,

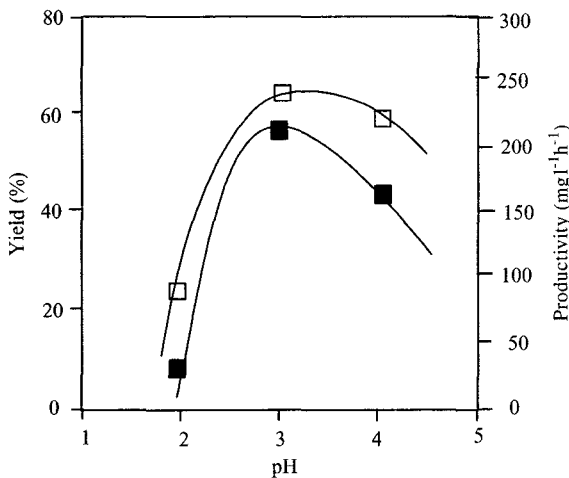


Fig. 2. Effect of pH values on the citric acid production. (after 9 days, 30°C, 0.045 h⁻¹), □: Productivity, ■: Yield.

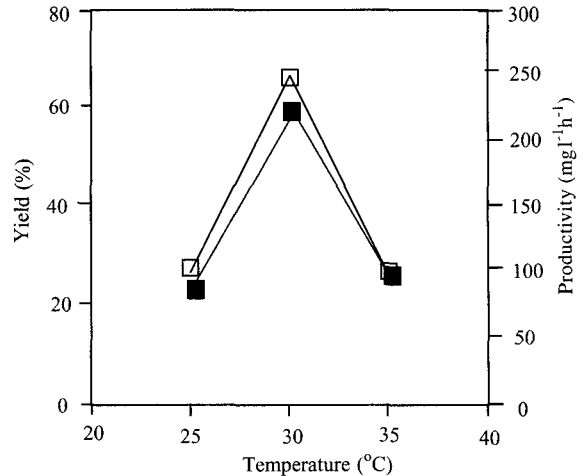


Fig. 3. Effect of temperature on the citric acid production. (after 9 days, 30°C, 0.045 h⁻¹), □: Productivity, ■: Yield.

Roukas[13] 등도 30°C에서 최대의 구연산 생산을 보였다. 따라서 본 실험을 25~35°C의 온도범위에서 실험한 결과 Fig. 3에서 보듯이 30°C에서 최고의 수율을 나타냈다.

구연산 생산에서 회석률의 효과

Kristiansen[8] 등이 각종 다양한 회석률에서 실험한 결과를 보면 0.075 h⁻¹에서 최고의 수율이 나타난다고 보고하였으며, Dawson[3] 등에게서는 낮은 회석률인 0.017 h⁻¹에서 최대 수율이 나타난다고 보고하였다. 9일까지의 발효에서 각 회석률에서의 수율과 생산성을 Fig. 4에 나타냈다. 구연산의 생산은 회석률이 감소할수록 증가하여 0.025 h⁻¹에서 최대의 수율을 나타냈고, 더 작은 회석률인 0.01 h⁻¹에서는 오히려 수율이 아주 낮았는데, 이러한 이유는 낮은 회석률에서 보면 당의 적은 유입량으로 인하여 발효의 이용률이 상당히 저하되었기 때문일 것으로 생각된다.

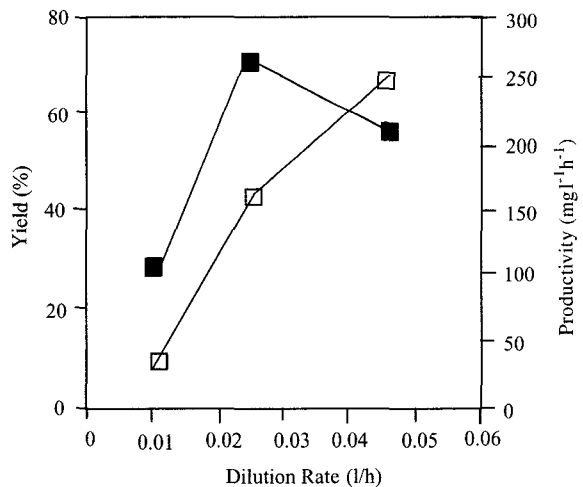


Fig. 4. Effect of dilution rate on the citric acid production. (after 9 days, 30°C, 0.045 h⁻¹), □: Productivity, ■: Yield.

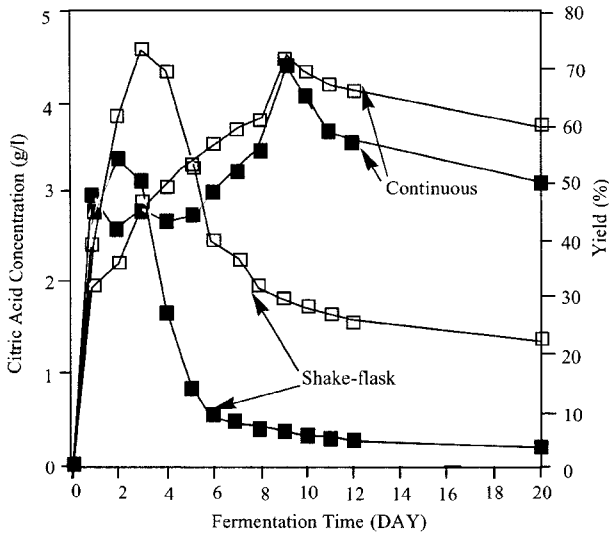


Fig. 5. Comparison of continuous and shake-flask cultures on the citric acid production. (after 9 days, 30°C, 0.045 h⁻¹), □: Productivity, ■: Yield.

회분식 및 연속반응기에서의 구연산 생산 비교

Dawson[3] 등은 *A. niger*를 이용한 구연산의 생산에서 연속적인 배양이 회분식에 비해 2배의 생산성을 나타낸다고 했으며, Yang[16] 등은 whey permeate을 이용한 propionate 생산에서는 연속식이 회분식의 생산성에 비해 10배의 증가를 보였다. Fig. 5는 우유공장폐수를 이용한 구연산 발효실험에서 20일까지의 Shake-flask와 연속식의 결과를 나타내었다. Shake-flask 배양은 발효 3일째 최대 수율에 이르러 계속적으로 수율 감소를 나타냈으며, 20일째 구연산 농도는 1.38 g/l, lactose농도는 8.85 g/l에 이르렀다. 반면에 연속적인 배양은 9일째 최대 수율을 나타내고 있으며, 그 뒤로 20일째까지는 급격한 수율의 저하를 나타내지 않음으로서 안정된 발효과정의 결과를 보여주었다. 구연산 생산에 대한 Shake-flask와 연속적인 생산성의 비교에서 Shake-flask 배양은 volumetric productivity(구연산 농도를 retention time으로 나눔)가 63. mg l⁻¹ h⁻¹이고, 연속적인 배양은 160 mg l⁻¹ h⁻¹로 약 2.5배 높게 나타났다.

요 약

고정화된 *Aspergillus niger* 세포가 우유공장폐수에서 발효로 구연산을 생산하는데 이용되었다. 구연산 생산균주로서 *A. niger* ATCC 9142가 3일간 전배양되었으며, 약 2.5~3.5 mm Ca-alginate beads로 포획되었다. 최적의 pH와 온도는 각각 3.0과 30°C였다. 발효에 대한 최적 희석률은 0.025 h⁻¹인 것으로 계산되었다. 구연산의 최대 생산량은 최적화된 발효조건과 함께 4.5 g/l에서 얻어졌다. 고정화된 *Aspergillus niger* ATCC 9142에 의해 생산된 구연산의 수율은 70.3%였다. Shake-flask 배양실험에 비해 연속식 배양실험 결과가 고정화

세포에 의해 20% 증가되었다. 따라서 우유공장폐수는 구연산 발효기질로서의 이용가치가 있다고 볼 수가 있겠다.

REFERENCES

- Anderson, J. G., J. A. Blain, M. Divers, and J. R. Todd. 1980. Use of the disc fermenter to examine production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* **2**: 99-104.
- Chen, A., P. H. Liao, and K. V. Lo. 1990. Citric acid production from cheese whey *Aspergillus niger*. *Can. Agric. Eng.* **32**: 329-334.
- Dawson, M. W. and I. S. Maddox. 1988. Application of fed-batch culture to citric acid production by *Aspergillus niger*; The effects of dilution rate and dissolved oxygen tension. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 220-226.
- De Lima, V. L. A. G., T. L. M. Stamford, and S. A. Amorim. 1995. Citric acid production from pineapple waste by solid state fermentation using *Aspergillus niger*. *Arg. Biol. Technol.* **38**: 773-778.
- Eikmeier, H. and H. J. Rehm. 1984. Production of citric acid with immobilized *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 365-370.
- Hang, Y. D. and E. E. Woodams. 1998. Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* **65**: 251-259.
- Kim, E. K. and R. S. Roberts. 1991. Stable fermentation of citric acid using immobilized *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 130-135.
- Kristiansen, B. and C. G. Sinclair. 1979. Production of citric acid in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 297-315.
- Marier, J. R. and M. Boulet. 1958. Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method. *J. Dairy Sci.* **41**: 1683-1692.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **28**: 350-352.
- Park, E. Y., D. L. Crawford, R. A. Korus, and R. C. Heimisch. 1991. Yeast single-cell protein production using potato processing waste water. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 212-219.
- Röhr, M., C. P. Kubicek, and J. Kominek. 1983. Citric acid, pp. 420-454. In Rehm, H. J. and G. Reed (ed.), *Biotechnology*, vol. III, Verlag Chemie, Weinheim.
- Roukas, T. and P. Carob. 1987. A new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **74**: 43-49.
- Tanaka, H. and S. Irie. 1998. Preparation of stable alginate gel beads in electrolyte solutions using Ba²⁺ and Sr²⁺. *Biotechnol. Tech.* **2**: 115-120.
- Tsay, S. S. and K. Y. To. 1987. Citric acid production using immobilized conidia of *Aspergillus niger* TMB 2022. *Biotechnol. Bioeng.* **29**: 297-304.
- Yang, S. T., H. Zuh, and Y. Li. 1994. Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 1124-1130.

(Received Feb. 3, 2004/Accepted June 3, 2004)