

식품부산물로부터 유기산의 대량생산공정에 관한 연구

- 세포재순환식 연속발효를 이용한 유기산의 대량 생산 -

주 윤 상 · 진 선 자 · 황 필 기 · † 최 철 호 · ¹이 의 상
관동대학교 환경공학과, ¹상명대학교 환경공학과
(접수 : 2004. 12. 2., 게재승인 : 2004. 12. 23.)

Production of Organic Acids from Food By-Products

- Mass Production of Organic Acids by Continuous Flow Cell Recycling Fermentation -

Yun-Sang Ju, Sun-Ja Jin, Pil-Gi Hwang, Chul-Ho Choi†, and Eui-Sang Lee¹

Department of Environmental Engineering, Kwandong University, Yangyang 215-802, Korea,

¹Department of Environmental Engineering, Sangmyung University, Cheonan 330-180, Korea

(Received : 2004. 12. 2., Accepted : 2004. 12. 23.)

Fermentation studies were conducted in batch and continuous flow cell-recycle reactors with food by-products as substrates. The genus *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 was utilized in the production of organic acids. Good performance was achieved in the batch fermentation using hydrol as a carbon source and corn steep liquor (CSL) as nitrogen and vitamin sources. Product yields and productivity based on maximum values were 0.80 g total acids/g glucose and 0.26 g total acids/L/h, respectively, when 3% (w/v) of hydrol and 2.5% (w/v) of CSL were utilized. Continuous fermentation with cell-recycling system using the optimum amounts of substrates resulted in dramatic increase in cell concentration (X) and maximum productivity (P). Compared to the batch fermentation, X and P were increased by as much as 21 and 13 times, respectively, at the dilution ratio of 0.2 hr⁻¹, indicating that cell recycling fermentation of food by-products provides valuable means for the mass production of organic acids as well as utilizing cell mass as good nutrient resources.

Key Words : *Propionibacterium acidipropionici*, food by-products, organic acids, CSL (corn steep liquor), hydrol, cell-recycling fermentation

서 론

화학원료나 연료를 생산하는 기술은 현재까지 석유자원을 이용한 화학적 합성공정에 의존하였으나 이로 인한 환경문제 및 자원고갈 등의 문제가 대두된 지 오래다. 따라서 이러한 공해 유발형 또는 고에너지 소비형 화학원료 생산 공정을 재생 가능한 자원인 바이오매스 (biomass)를 이용한 발효공정으로 대체하여 저공해의 청정생물공학기술 (green-biotechnology)을 발전시키려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 국내에서는 1970년대 초부터 대학과 연구소를 중심으로 연구를 시작하여 1988년부터 대체에너지개발 촉진법에 따라 정부차원에서 기술개발을 시도하고 있다. 기술개발 동향은 1990년대까지 바이오에탄올, 메탄가스화

기술개발 위주로 추진되었으며 그 이후 LFG 이용기술, 바이오 수소생산 기술개발 등이 주요 분야로 추가되고 있다 (1). 특히 1970년대 후반 이래로 여러 종류의 바이오매스를 이용한 발효를 통해 유기산을 생산하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 최근에는 생산원가 절감을 위해 식품공장에서 발생하는 부산물 (by-products)을 원료 (feed stocks)로 사용하고 있다(2-5).

옥수수를 가수분해하여 전분당을 생산하는 공정에서 부산물로 발생하는 hydrol, raffinate 등은 풍부한 양의 글루코오스를 함유하고 있어서 유기산 발효에 있어 당원으로 사용되며, 또한 옥침수라 불리는 corn steep liquor (CSL)는 탄수화물, 아미노산, 단백질, 지방산, 락트산, 비타민, 그 밖의 무기 이온을 다량 함유하고 있어 유기산 발효 시 단백질원과 비타민원으로 사용이 되며, 또한 고가의 yeast extract나 peptone 등을 대체할 수 있어 경제적인 부산물로서 발효산업에 큰 각광을 받고 있다(6). Quesada-Chanto 등 (7)은 *Propionibacterium shermanii*를 이용하여 비타민과 질소원에 따른 생산성을 비교하였는데, yeast extract, CSL,

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, Kwandong University, Yangyang 215-802, Korea
Tel : +82-33-670-3357, Fax : +82-33-670-3369
Email : chchoi@kd.ac.kr

soy brand를 비교 대상으로 하여 검토해본 결과 CSL의 프로피온산 생산성이 가장 높은 것으로 나타났다. Kadam 등 (8)은 CSL, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, urea를 첨가한 저가 배지와 peptone, yeast extract를 사용한 고가 배지를 만든 후 각각 알코올 발효를 실시하여 발효 성능의 차이를 비교해 본 결과 두 배지 모두 80% 이상의 에탄올 생산량을 보였다. 또한 CSL이 0.45% (v/v) 이상일 때에는 (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, urea를 첨가하지 않아도 생산물 생산성이 비슷한 것을 밝힌 바 있다.

바이오매스 발효를 통해 여러 가지 제품을 생산할 때 많은 경우 원료비용이 제품가격의 80%까지 차지하기 때문에 저가의 부산물을 발효용 원료로 이용함으로써 원가절감에 큰 효과를 기대할 수 있다(9). 그러나 대량생산 단계에 들어가면 균주의 성장 조건 (pH, 온도 등)을 최적으로 제어하여 생산성을 높이고, 대사산물의 특성에 맞는 연속 발효공정의 개선을 통해 다량의 생산물을 효율적으로 생산하는 것이 중요해진다.

세포재순환식 연속발효공정은 반응기의 생산성 향상을 위한 한 가지 방법으로 생산물과 세포를 교차흐름 여과장치를 통하여 분리하고, 세포를 재순환시킴으로서 발효조 내에 높은 세포 농도를 유지하여 생산성을 증가시킬 수 있다. 이 공정은 유기산 균주와 같이 성장이 끝난 균주가 2차대사산물로 생성물을 배출할 경우에 특히 적합하며, 유기산에 의한 생성물 저해 현상도 최소화시킬 수 있는 이점이 있다. 세포재순환식 연속 공정에서 세포생산성은 회석률이 증가함에 따라 증가하여 최대값에 도달하게 된다. 그러나 세포농도가 현저히 증가할 경우 세포들 사이의 과잉 응집과 영김으로 인하여 영양물의 전달속도가 감소되어 생산성을 격감시키는 제한요소로 작용할 수 있다(10).

따라서 본 연구에서는 식품 부산물을 원료로 사용하여 회분식 발효를 통한 유기산의 생산성을 검토하고 세포재순환식 연속발효를 통해 유기산의 대량생산을 위한 기초 자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

유기산 균주

유기산을 생성하는 박테리아 균주로서 *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965를 미국 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하였다. 종균 (seed culture)으로 사용하기 위해 냉동 건조된 박테리아를 수차례에 걸쳐 계대 (transfer)한 후, 신선한 배지가 담긴 1.7 mL microtube에 접종하여 -70°C 냉동고에 저장하였다.

시료 및 전처리

실험에 사용되는 배지로는 (주)대상에서 입수한 옥침수 (Corn steep liquor, CSL)와 당원으로 Hydrol을 사용하였다. CSL은 각종 영양성분과 무기물 등이 풍부하여 발효산업에서 단백질원이나 비타민원 등으로 사용되고 있으며, 고형물 함량은 50% (w/w)로 측정되었다. 또한 HPLC를 사용하여 Hydrol의 글루코오스 함량을 측정한 결과 68% (w/v)로 나타났다.

회분식 발효

발효 배지로는 당원으로 글루코오스 함량이 약 3% (이하 w/v)가 될 수 있도록 hydrol을 환산하여 사용하였으며, CSL을 고형성분 중심으로 0.5~3.0% (이하 w/v)까지 0.5% 씩 증가시키면서 발효를 실시하였다.

발효기는 Omni-Culture Bench-Top Fermenter System (Virtis, Co.)를 사용하여 온도 및 교반 속도를 조절하고 유기산 생성 시 pump를 통해 3.0 N NaOH를 자동 주입하여 적정 pH를 유지하였으며, 혐기성 상태를 유지하기 위해 가스 주입구에 N₂가스를 간헐적으로 주입하였다. 또한 발효조 내의 정확한 온도 유지를 위해 온도계를 이용하여 발효기의 setting value와 실제 온도 값의 오차를 조절하였다. 발효가 시작되면 일정 시간별로 시료를 추출, 증류수로 25배 희석하고 0.45 μm 여과지 (Gelman Science)로 여과한 후 분석을 위해 냉장고에 보관 하였다.

세포 재순환식 연속발효

전분당 부산물을 이용한 연속발효에서는 hydrol 44.1 mL (최종 글루코오스 3%)와 CSL 50 g (최종 고형성분 2.5%)를 증류수에 혼합하여 1 L를 제조한 후 121°C에서 15분간 살균하여 배지로 사용하였다. 먼저 pH 6.0, 30°C에서 회분식 발효를 실시하였으며, 발효 80시간 후 발효액의 반 정도를 유출 (breeding)시키고 신선한 배지로 같은 양 만큼 교체한 후 회석률 0.1 hr⁻¹로 세포 재순환식 연속 발효를 시작하였다. 발효조 내의 세포량과 유기산량이 거의 정상상태 (steady state)에 도달되는 시기에 다시 발효액의 반 정도를 신선한 배지로 교체한 후 회석률을 0.15 hr⁻¹, 0.2 hr⁻¹로 전환시켜 가며 연속 발효를 실시하였으며 약 8시간 간격으로 시료를 뽑아 세포량과 당소모량, 그리고 유기산의 농도를 측정하였다. 회석률 (D)은 유량 (F)에 발효조의 부피 (V)를 나누어 산출하였다.

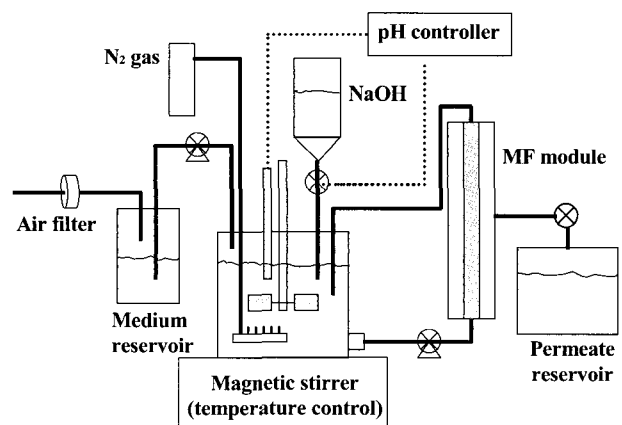


Figure 1. Cell-recycling fermentation system.

발효장비는 회분식 발효장치에 공극 0.1 μm의 MF Module (SAMBO global)이 장착된 교차흐름식 여과장치를 사용하였으며, 맥동펌프 (Watson Marlow 313)를 이용하여 생성물은 통과시키고 고형물만 발효조 내로 재순환시킴으로서 세포농도를 높게 유지시켰다. 세포재순환식 연속발효

장치는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 연속발효 시에 발생하는 거품으로 인한 발효액과 세포의 유실을 방지하기 위해 Antiform A (SIGMA, A-5758)를 사용하였다.

시료 분석방법

발효조 내의 유기산 (젖산, 프로피온산 및 초산)과 소모된 글루코스 농도는 HPLC (JASCO LC-900 Series)를 사용하여 분석하였다. 칼럼은 HPX-87H (Bio-Rad)를 항상 50℃로 유지하며 사용하였다. 먼저 UV/ VIS Detector를 이용하여 유기산의 농도를 분석하였으며 당 농도 측정 시에는 UV/VIS Detector회로를 RI (Refractive Index)에 연결시켜 사용하였다. Pump의 유속과 압력은 0.6 mL/min, 50 kg/cm²으로 하였고, 이동상 용매로는 0.005 M H₂SO₄를 초 순수 여과하여 사용하였다. Biomass 측정에는 건조 중량법을 사용하여 시료마다 분광광도계 (Shimadzu, UV-1201)를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 구하였다.

결과 및 고찰

회분식 발효

전분당 부산물의 최적 조건을 알아보기 위해 CSL의 고형성분을 0.5~3.0%까지 변화시키며 발효실험을 실시한 결과

중 일부를 도시하였다. CSL이 1.0%일 때는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 113시간 만에 글루코스가 모두 소비되었으며, 같은 시간대에 총유기산 생산량 (Toa)도 평형에 도달하였다. 세포량은 발효 76시간 만에 최대로 성장하였으며 발효 종료 후까지 건강한 상태를 지속적으로 유지하였다. 중간 대사산물인 젖산 (HLA)은 발효 초반에 약간 측정되다가 곧 소모되어 초산 (HAc)과 프로피온산 (HPr)으로 전환되었다. 최종 초산, 프로피온산의 양은 각각 3.56 g acetic acid/L, 14.02 g propionic acid/L로 나타났다.

Fig. 3은 CSL이 2.5%일 때의 발효 실험 결과로서 글루코스가 90시간 전후에 완전히 소비되어 CSL 1.0%일 때에 비해 대사 속도가 약 20시간 이상 빨라짐을 알 수 있었다. 또한 비슷한 시간대에 유기산 생산량도 평형에 도달하여 최종 초산과 프로피온산 농도가 각각 4.85 g acetic acid/L, 17.19 g propionic acid/L로 나타났다. 세포량은 발효 70시간을 전후해서 최대로 측정되었으며 발효 종료 후까지 건강한 상태가 지속되었다. CSL 1.0% 발효 결과와 비교해 볼 때 발효 속도 면에서는 약 20% 이상 단축 되었으며 최종 유기산 생산량도 25% 이상 증산되었다.

CSL 농도 변화에 따른 세포 수율과 유기산 생산성을 비교 검토하여 Table 1에 나타내었다. 초기 당 농도를 고려해볼 때에 CSL 함량이 증가함에 따라 세포 수율은 증가하여 2.5%

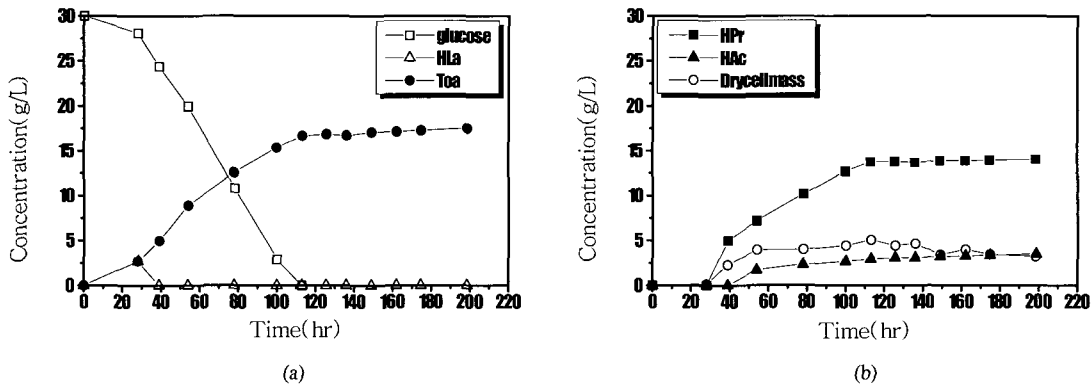


Figure 2. Batch fermentation of strain *P. acidipropionici* ATCC 4965 with 1.0% (w/v) CSL and hydrol glucose (30°C, pH 6.0). Toa, Total organic acids; HLa, Lactic acid; HAc, Acetic acid; HPr, Propionic acid

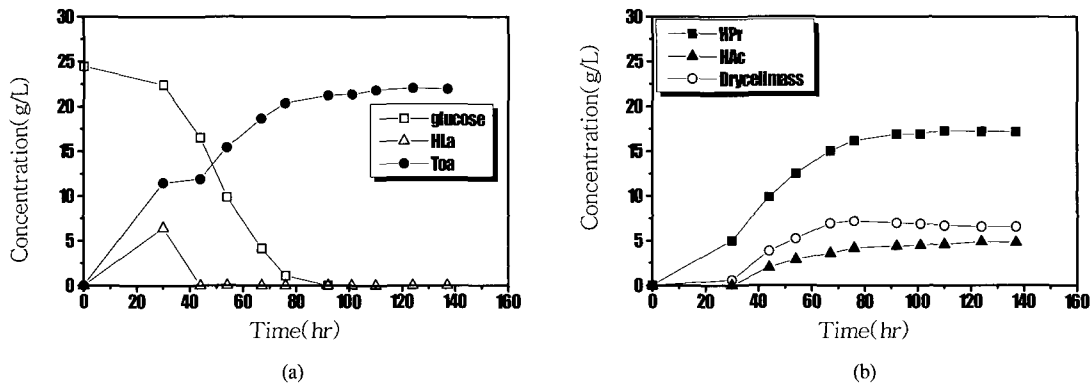


Figure 3. Batch fermentation of strain *P. acidipropionici* ATCC 4965 with 2.5% (w/v) CSL and hydrol glucose (30°C, pH 6.0). Toa, Total organic acids; HLa, Lactic acid; HAc, Acetic acid; HPr, Propionic acid

Table 1. Performance comparison in batch fermentation

		CSL (% w/v)					
		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
	Hydrol glucose(g/L)	32	30	28.6	32	24.4	29.2
	Maximum cell yield(g drycell/g glucose)	0.15	0.17	0.23	0.25	0.29	0.26
Acid conc. (g/L)	Propionic acid	11.44	14.02	17.67	18.81	17.19	19.54
	Acetic acid	4.52	3.56	4.8	5.37	4.85	5.43
	Lactic acid	0	0	0	0	0	0
	Total acid production	15.96	17.58	22.47	24.18	22.04	24.97
	Product yield(g total acid/g sugar)	0.50	0.53	0.71	0.69	0.80	0.78
	Maximum productivity(g total acid/L/h)	0.05	0.14	0.16	0.15	0.26	0.26

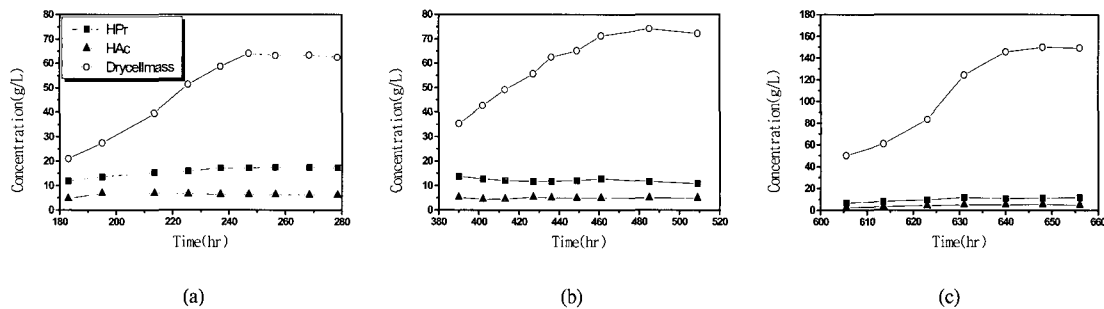


Figure 4. Cell-recycling fermentation of strain *P. acidipropionici* ATCC 4965 with 2.5% (w/v) CSL and 3% (w/v) hydrol glucose (30°C, pH 6). HAc, Acetic acid; HPr, Propionic acid
(a) Dilution ratio(D) = 0.1 hr⁻¹; (b) D = 0.15 hr⁻¹; (c) D = 0.2 hr⁻¹

에서 0.29 g drycell/g glucose로 최대치를 보여주었다. 유기산 수율 및 생산성도 CSL 함량이 증가함에 따라 대체로 증가하는 경향을 보였다. 발효시간을 고려한 유기산 생산성을 볼 때 CSL 0.5%의 경우 0.05 g total acids/L/h로 가장 낮았으며 CSL 2.5%와 3.0%에서는 0.26 g total acids/L/h로 가장 높게 나타났다. 또한 CSL 1.0%, 1.5%, 2.0%에서는 뚜렷한 변화 없이 서로 비슷한 경향을 보였다. 그러나 유기산 수율에 있어 CSL 2.5%가 0.8 g total acids/g glucose로 가장 높게 나타나 연속발효를 위한 최적 함량으로 결정되었다.

세포 재순환식 연속발효

회분식 발효를 통해 선정된 CSL의 최적함량을 기초로 하여 유기산의 대량생산 가능성을 타진하기 위해 세포 재순환식 연속발효를 실시하였다. 먼저 회분식 발효를 통하여 일정 농도의 세포량을 확보한 후 회석률을 0.1~0.2 hr⁻¹로 변화시키며 약 660시간 운전한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 회석률이 0.1 hr⁻¹인 경우에는 약 250시간을 전후해서 세포량이 정상 상태에 도달했으며, 이후 회석률이 증가함에 따라 정상 상태에 이르는 시간도 줄어들어 0.15 hr⁻¹에서는 70시간 만에, 0.2 hr⁻¹에서는 40시간 만에 발효조 내의 세포량이 최고치에 도달하였다. 또한 세포 생산량도 급격히 증가하여 회석률이 0.1 hr⁻¹, 0.15 hr⁻¹, 0.2 hr⁻¹일 때 최대 세포량은 각각 64.1 g drycell/L, 74.1 g drycell/L, 150 g drycell/L에 도달하여 회석률이 증가하면서 세포량이 급격하게 증가하는 것으로 나타났다. 이 결과들은 같은 영양조건에서 회분식 발효와 비교해 볼 때 9~21배 증가된 것이다.

전분당 부산물을 이용한 세포 재순환식 연속발효를 통해 얻어진 회석률별 유기산 수율과 생산성을 Fig. 5에서 비교하여 보았다. 그 결과 주어진 실험실 조건에서는 회석률이 증

가하면서 유기산 수율은 감소하는 반면 유기산 생산성은 증가하는 것으로 나타났다. 유기산 수율이 감소하는 이유는 세포 생산량이 증가하면서 더 많은 글루코스가 세포 생산 및 유지에너지로 사용된 때문인 것으로 보이며, 회석률이 증가하면서 생산된 유기산이 즉시 발효조 밖으로 유출되어 생성물 저해효과가 줄어들고 신선한 배지가 빠른 속도로 공급됨으로 인하여 발효조의 환경조건이 개선되어 유기산 생산성은 증가하는 것으로 판단된다. 유기산 수율은 주어진 회석률에서 0.79~0.55 g total acids/g glucose로서 같은 조건의 회분식 발효에 비해 70~100%이지만 최대 생산성은 2.38~3.32 g total acids/L/h로서 9~13배까지 향상되었다. 따라서 세포 재순환식 연속발효공정을 scale-up함으로서 유기산 생산뿐만 아니라 biomass 자원으로서 세포량의 대량생산도 가능할 것으로 판단된다.

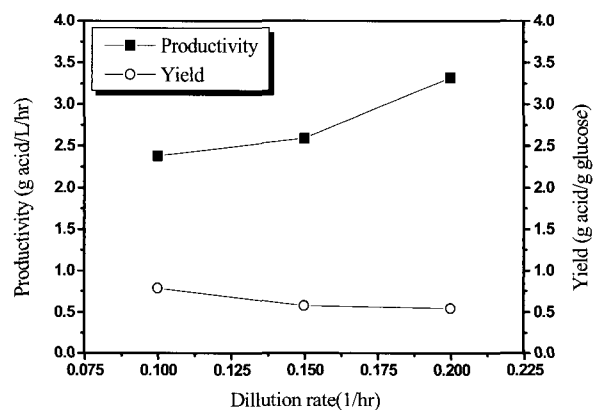


Figure 5. Product yield and productivity in cell-recycling fermentation.

요 약

본 연구에서는 식품부산물을 원료로 사용하여 회분식 발효를 통한 *Propionibacterium acidipropionici*의 유기산 생산성을 검토하고 세포재순환식 연속발효를 통해 유기산의 대량생산을 위한 기초자료를 마련하고자 하였다. CSL의 함유량에 따른 회분식 발효를 실시하여 균주의 생산성이 최대가 되는 발효조건을 구하여 연속 발효공정에 적용하였다. 회석률을 0.1~0.2 hr⁻¹로 변화시키며 세포재순환식 연속발효를 실시한 결과 0.2 hr⁻¹에서 최대 세포량은 150 g drycell/L으로 회분식 발효에 비해 21배 증가하였으며, 유기산의 최대 생산성은 3.32 g total acids/L/h로서 13배가 향상된 것으로 나타났다. 따라서 이 발효공정을 scale-up한다면 유기산뿐만 아니라 바이오매스 자원으로서 세포량의 대량생산도 가능할 것으로 판단된다.

감 사

본 연구는 1997~2000년도 환경부 G-7 환경공학기술개발과제의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. http://racer.kemco.or.kr/inc/index_frame/ (2003)
2. Choi, C. H. and A. P. Mathews (1994), Fermentation metabolism and kinetics in the production of organic acids by *Propionibacterium acidipropionici*, *Biochem. Biotechnol.* **44**, 271-285.
3. Lewis, V. P. and S. T. Yang (1992), Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*: effect of growth substrate, *Microbiol. Biotechnol.* **37**, 437-442.
4. Solichien, M. S., D. O'Brien, E. G. Hammond, and C. E. Glatz (1995), Membrane-based extractive fermentation to produce propionic and acetic acids : toxicity and mass transfer considerations, *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 23-31.
5. Woskow, S. A. and B. A. Glatz (1991), Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation, *Environ. Microbiol.* **57**, 2821-2828.
6. Hull, S. R., B. Y. Yang, D. Venske, K. Kulhavy, and R. Montgomer (1996), The composition of corn steep water during steeping, *J. agricul. food chem.* **44**, 1857-1863.
7. Quesada-Chanto, A., A. G. Schroeder, A. C. Schmid-Meyer, J. A. Lopez (1997), Organic acid production by *Propionibacterium shermanii*, *Z. Naturforsch.* **52**, 193-196.
8. Kadam, K. L. and M. M. Newman (1997), Development of a low-cost fermentation medium for ethanol production from biomass. *Microbiol. biotechnol.* **47**, 625-629.
9. Chollar, B. H. (1984), Federal highway administration research on calcium magnesium acetate an alternative deicer, *Public Roads* **47**, 113-118.
10. Ju, Y. S. (1999), A Study on the Process Kinetics in the Production of Organic Acids from Organic By-products, M. S. Thesis, Dept. of Environmental Engineering, Kwandong University, Yangyang.