

추출발효에 의한 구연산 생산

조 중 응 · *이 진 석 · 홍 석 인

고려대학교 화학공학과, *한국에너지기술연구소 바이오매스팀

Citric Acid Production by Extractive Fermentation

Joong-Woong Cho, *Jin-Suk Lee and Suk-In Hong

Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

*Biomass Laboratory, Korea Institute of Energy Research, Daejeon, Korea

ABSTRACT

An extractive fermentation process was developed to produce citric acid from glucose. Citric acid is a strong inhibitor to this fermentation. A mixture of tertiary amine and oleyl alcohol was used to selectively extract citric acid from the fermentation broth, hence enhancing the productivity by over 200%. Although the toxicity of the solvent was significant in the range of higher than 30% of amine, immobilization in polyurethane foam was useful to protect the cells from the toxicity of the solvent.

서 론

식품첨가물로 많이 사용되는 구연산은 발효방법에 의해 대량생산되는 대표적인 제품이다. 구연산은 *A. niger* 종에 의해 생산되는데 발효가 진행됨에 따라 축적된 구연산은 발효액의 pH를 떨어뜨려 *A. niger*의 성장속도를 둔화시킬 뿐만 아니라 균체내로 기질이 유입되는 것을 억제하여 발효 생산성을 저하시키는 것으로 보고되어 있다(1, 2). 또한 현재 발효에 의해 생산된 구연산은 균체분리 등 4단계 공정을 거쳐 회수하며 그 결과 회수비용도 높다(3). 이와 같은 문제는 대부분의 유기산 발효공정에서 나타나며 문제해결을 위해 다양한 연구가 진행되고 있다(4-7).

발효생성물을 분리회수하는 다양한 공정 중 용매 추출방법은 생성물에 대한 높은 선택도와 scale-up이 용이하다는 장점이 있어 유기산의 회수공정으로 많이 사용되고 있다(8, 9). 그러므로 용매추출방법을 구연산 발효공정에 적용한다면 발효액 내에 축적

되는 생성물 농도를 낮게 유지할 수 있어 구연산에 의한 발효 억제효과를 줄일 수 있으며 생산성을 높일 수 있을 것으로 기대된다. 추출발효를 효율적으로 수행하기 위해 사용될 용매는 용매상에서 생성물의 높은 분포계수와 선택성, 수용액에 대한 용매의 낮은 용해도, 균체에 대한 무독성 및 가격이 저렴해야 한다. 구연산과 같이 비교적 작은 분자량의 유기산은 단순 추출공정으로는 회수율이 낮으므로 용매상으로 이동하는 구연산을 염으로 만든 후 생성된 염을 용해시켜 추출하는 반응추출공정을 사용하는 것이 효과적이다(11). 그러므로 구연산의 추출발효 공정에서는 적어도 두 가지 물질이 섞인 혼합용매가 필요하다.

구연산의 추출발효에 적합한 용매를 선택하기 위해 Laane등(10)에 의해 제안된 무독성 기준인 Log P 4 이상을 적용하여 기준에 부합하는 oleyl alcohol을 추출용매로, 실제 산업체에서 구연산을 회수하기 위해 사용하고 있는 3차 아민인 Alamine 336(12)을 반응용매로 각각 사용하였다. 즉 Alamine 336에

있는 강염기성인 아민기는 구연산의 이온화 형태인 citrate와 반응하여 산-아민 유기성 염을 형성하게 되고 이는 유기용매인 oleyl alcohol에 대해 높은 친화성을 가져 구연산을 직접 oleyl alcohol로 추출하는 경우에 비해 추출효율을 크게 높일 수 있다(11). 그러나 Alamine 336은 미생물에 대해 독성이 있는 것으로 보고되어 있어(13) 구연산의 추출발효시 미생물의 활성저하로 인한 생산성의 감소가 예상된다. 그러므로 구연산의 추출발효공정에서는 구연산 축적에 의한 pH 감소와 추출용매의 첨가에 따른 독성 증가에 따른 미생물의 활성 저하가 예상되며 두 인자는 상충관계를 갖는다. 따라서 구연산의 추출능 극대화과 용매첨가에 따른 독성문제를 최소화할 수 있는 용매의 조성비를 결정하는 것이 중요하다.

고정화 균체는 유리세포 배양에 비해 균체농도가 높고 연속배양의 경우 높은 희석률에서도 안정성을 유지할 수 있어 높은 생산성을 얻을 수 있다. 또한 유리 곰팡이 균체를 이용한 발효에서 흔히 발견되는 발효액의 높은 점도로 인한 물질전달 제한문제(14)를 부분적으로 해결할 수 있다. 특히 균체 고정화계에서는 담체가 자양분, 생성물의 이동 등에 대해 확산적으로 작용하는 문제점도 있지만 외부 환경으로부터 균체를 보호하는 역할도 하여 추출발효공정에서 용매의 독성으로 인한 균체의 활성저하문제를 완화시킬 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 *A. niger*를 이용하여 구연산 추출 발효를 수행하였다. 앞에 언급한 oleyl alcohol과 Alamine 336의 조성비에 따른 구연산 추출능과 균체에 대한 독성 등을 측정하여 적합한 용매조성을 도출하였다. 또한 추출발효공정에서의 고정화 세포와 유리 세포에 의한 발효공정의 생산성을 비교하므로서 각 세포배양에서 적합한 발효조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주

A. niger ATCC11414를 bacto-yeast malt extract agar배지에 접종하여 30°C에서 일주일 배양하여 4°C에서 보관하며 사용하였고 1개월마다 계대배양하였다.

시약 및 재료

Alamine 336은 Henkel Corp.(U. S. A.)로부터 공급받았으며 기타 실험에 사용한 모든 시약은 Junsei, Wako사의 시약급 제품이였다. 균체 고정화

담체로는 polyurethane foam(HR40, Bridge Stone Co., Japan)을 사용하였으며 사용 담체의 기공 크기는 47~53 pore/inch였다.

배지 조성 및 배양 조건

종균 배양배지의 조성은 nutrient broth 8g/l, 포도당 10g/l 이었다. 구연산 생산배지로는 포도당 50, NH_4NO_3 0.2, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g/l의 조성배지를 사용하였다.

균체의 고정화는 이등의 연구(15)에 따라 적절한 크기(약 2mm)의 멸균된 polyurethane foam 약 15ml와 배지 85ml가 들어 있는 500ml 삼각 플라스크에 포자용액(1×10^8 /ml) 5ml을 넣어 4시간 정지한 후 진탕배양기에서 배양하였다. 48시간 배양 후 고정화 균체를 100ml의 생산 배지가 들어 있는 500ml 삼각 플라스크에 옮겨 발효를 수행하였다. 생산배지의 pH는 5.0, 온도 30°C, 교반속도는 150rpm으로 각각 조절하였다.

추출 실험

서론에서 기술한 바와 같이 구연산과 같은 저분자량의 유기산을 효율적으로 추출하기 위해서는 유기산을 염으로 만드는 반응용매와 염을 추출하는 추출용매의 동시 사용이 필요하다. 본 연구에서는 유기산의 추출에 많이 사용되고 있는 반응용매인 Alamine 336과 무독성인 oleyl alcohol을 추출용매로 혼합 사용하였다.

조성에 따른 용매의 추출능을 결정하기 위해 균이 없는 상태에서 oleyl alcohol에 대한 Alamine 336의 부피비가 15, 30, 50%인 용매 10ml을 구연산 농도 10g/l 인 용액 10ml와 50ml 삼각플라스크에 넣고 약 5분간 혼합 후 상분리가 되도록 10분간 정지후 10ml 주사기를 사용하여 수용액상에서 2ml의 시료를 취하여 구연산 농도를 분석하였고 물질수지에 의해 유기상에 추출된 구연산 농도를 계산하였다. 용매의 분배계수(K)는 다음과 같이 정의하였다.

$$K = \frac{\text{유기용매상의 구연산 농도}}{\text{수용액상의 구연산 농도}}$$

추출발효는 멸균배지 95ml이 들어 있는 500ml 삼각플라스크에 활성화된 균체 5ml을 넣고 3일간 배양후 실험조건에 따라 준비된 추출용매 100ml을 첨가하여 수행하였다.

분석 방법

세포의 건조중량은 발효액을 0.45 μm 멤브레인을

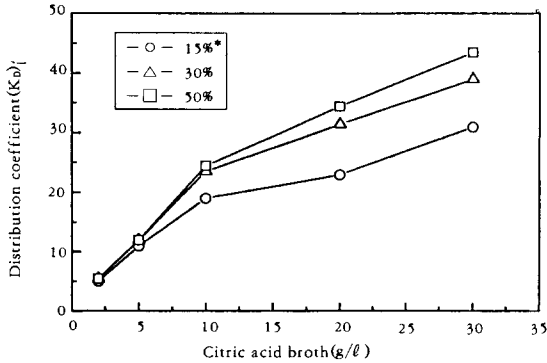


Fig. 1. Extraction of aqueous citric acid by Alamine 336. *: % of Alamine 336 in oleyl alcohol.

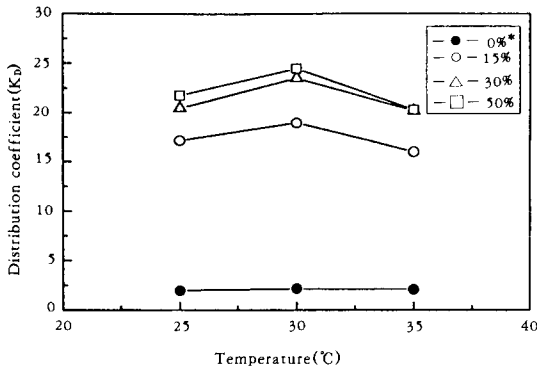


Fig. 2. Effect of temperature on the extraction of citric acid with Alamine 336 in oleyl alcohol. *: % of Alamine 336 in oleyl alcohol.

(Millipore, U. S. A.)을 사용하여 여과 후 80°C에서 24시간 건조 후 측정하여 결정하였다. 발효액 중 포도당 농도는 포도당 측정용 시약(영동제약)을 사용하여 발색 후 505nm에서 Spectronic 20(Bausch & Lomb, USA)을 사용하여 측정하였다(16). 발효배지 중 구연산은 Marier의 방법(17)에 따라 발색 후 420nm에서 Spectronic 20을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

용매의 추출능 실험

Alamine 336 농도가 15, 30, 50%인 추출용매를 사용하여 구연산 농도가 2, 5, 10, 20, 30g/l 인 용액에서 구연산 추출실험한 결과를 Fig. 1에 나타냈

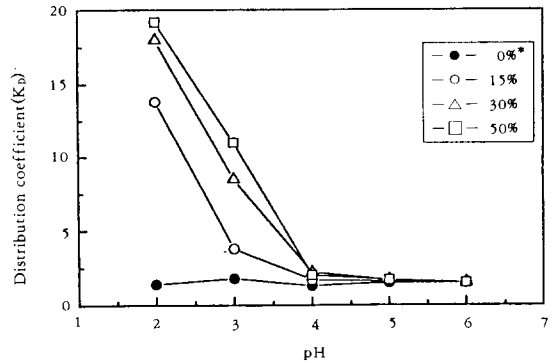


Fig. 3. Effect of pH on the extraction of citric acid with Alamine 336 in oleyl alcohol. *: % of Alamine 336 in oleyl alcohol.

다. 그림에서 보는 바와 같이 초기 구연산 농도가 5g/l 이하에서는 Alamine 336 농도변화에 따른 분배계수의 차이가 거의 없었지만 구연산 농도가 증가함에 따라 모든 추출용매에서 추출능은 비례 증가하였으며 Alamine 농도가 15%에서 50%로 증가함에 따라 분배계수는 증가하였다. 그러나 Alamine 농도가 30% 이상인 경우 Alamine 336 농도의 증가에 따른 추출능 차이가 대단히 작아 추출용매의 Alamine 336농도는 30%가 적합한 것으로 나타났다.

추출발효에 적합한 온도와 pH를 결정하기 위해 용매의 구연산 추출능에 대한 온도와 pH의 영향을 실험한 결과를 Fig. 2와 Fig. 3에 각각 나타냈다. 추출온도는 최적 발효온도인 30°C를 기준으로 그보다 낮은 25°C와 높은 35°C를 대상 온도로 하였다. 100% oleyl alcohol을 추출용매로 사용한 경우를 제외한 모든 조성의 추출용매에서 공히 30°C일 때 분배계수가 다른 온도의 추출분배계수에 비해 10% 이상 높았다. 또한 100% oleyl alcohol을 추출용매로 사용한 경우 분배계수 값은 약 2로 Alamine 336을 반응용매로 첨가한 경우 얻은 분배계수 15-25에 비해 현저히 낮아 구연산의 추출에는 반응용매의 첨가가 필요함을 보여준다. 본 용매의 구연산 추출에 적합한 온도는 30°C로 발효온도와 동일하여 온도 조절면에서 큰 장점을 가졌다. 초기 구연산 농도가 10g/l 인 배지의 pH를 1N HCl과 1N NaOH로 2, 3, 4, 5, 6으로 조절한 후 온도 실험에서의 동일한 방법으로 추출실험을 수행하였다. pH 2에서 분배계수는 첨가된 Alamine 336 농도에 따라 14~19 사이의 값을 가져 가장 높았으며 pH가 증가함에 따라 급격히

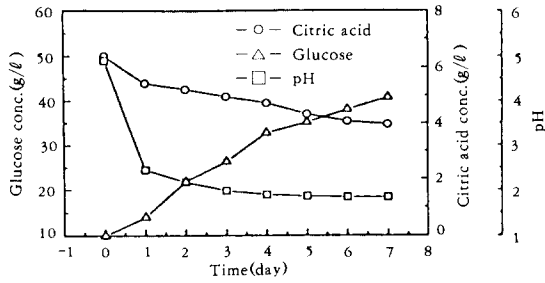


Fig 4. Citric acid fermentation by free cell culture.

감소하여 pH 4 이상에서의 분배계수는 약 2로 거의 일정하였다.

구연산 발효의 특성

구연산 발효에 대한 많은 연구(1-2, 18-20)가 진행되었으므로 여기서는 추출발효의 타당성 검토에 초점을 맞추어 기본 실험을 수행하였다. 유리세포에 의한 구연산 발효한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 발효 시작 3일 후 대수증식기가 시작되었고 구연산 생성 속도와 포도당 소모속도가 완만하게 증가하였다. 그러나 발효시작 7일 후에도 대부분의 포도당은 미전환 상태로 남았으며 생성 구연산 농도는 5g/l로 매우 낮았고 구연산 생산도 중지되었다. 배지의 pH는 발효가 진행됨에 따라 급격히 떨어져 발효시작 1일 후 pH는 약 2.3 그리고 완만하게 계속 감소하여 7일 후 발효배지의 pH는 약 1.9에 도달했다. 이와 같이 낮은 pH에서 구연산은 이온화되지 않은 상태로 존재하며 강력한 균체성장 억제효과를 가져 균체의 성장이 실질적으로 중지되었고 그 결과 구연산 생산도 거의 중지된 것으로 생각된다. 이같은 추론에 대한 직접적인 증거는 없으나 락트산 발효의 경우 이온화되지 않은 락트산 농도가 5g/l가 넘으면 균체 성장이 거의 중지된다(13)는 것과 구연산 발효가 growth-associated 형태를 갖는다(18)는 사실로도 간접 뒷받침된다. 그러므로 구연산 발효의 생산성을 높이기 위해서는 우선 발효액의 pH를 균체성장 억제효과가 비교적 적은(1-2) 구연산의 이온화 형태인 citrate로 존재하도록 조절하는 것이 중요하다. 실제 산업체에서 얻는 구연산 농도인 100g/l 이상의 발효에서는 citrate에 의한 발효억제효과도 높아 지므로(1-2) pH 조절에 의한 구연산 생산성 향상 방법도 한계를 가지므로 근본적인 해결책이 될 수 없으며 구연산을 배지에서 제거하는 추출발효가 필

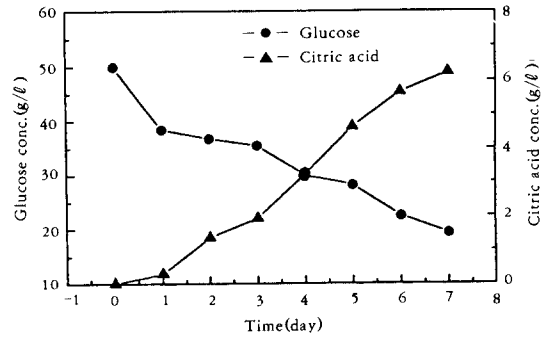


Fig 5. Citric acid fermentation by immobilized cell culture.

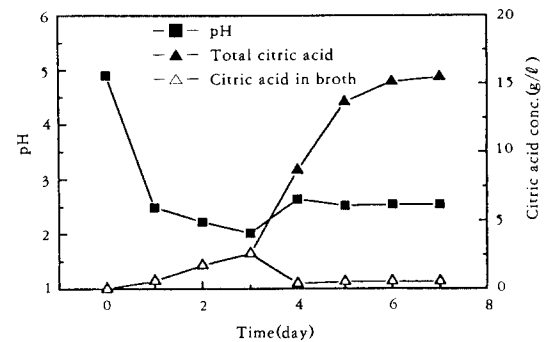


Fig 6. Extractive fermentation with 30% Alamine 336 in oleyl alcohol.

요할 것으로 생각된다.

고정화균체와 유리세포의 구연산 생산성을 비교하기 위해 추출용매를 첨가하지 않고 발효한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 배양시작 4일까지는 유리세포 배양의 생성 구연산 농도가 고정화세포 배양의 경우에 비해 높았으나 발효 후기에는 고정화세포에서의 구연산농도가 높았다. 이같은 현상은 발효초기에 고정화균체의 경우 물질전달면에 있어 유리세포에 비해 불리하여 구연산 생산속도가 낮았지만 발효가 진행됨에 따라 구연산 축적으로 인한 pH 저하로 pH에 대한 안정성이 높고 축적 구연산으로부터 균체의 일부가 보호될 수 있는 고정화 균체에 의한 발효가 높은 생산성을 보인 것으로 풀이된다.

추출발효

용매의 추출능 실험에서 적합한 용매조성으로 결정된 oleyl alcohol 70%, Alamine 336 30%의 혼합

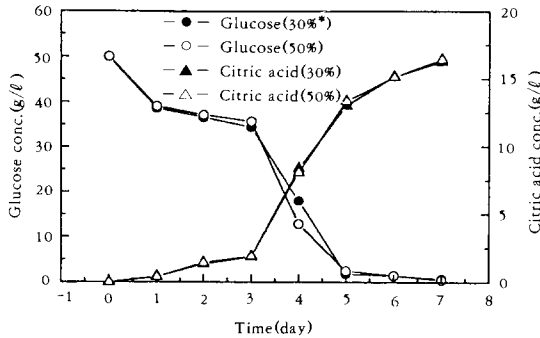


Fig 7. Extractive fermentation with 50% Alamine 336 in oleyl alcohol.

용매를 사용하여 추출발효한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 미생물에 대한 독성효과를 줄이기 위해 균체가 충분히 활성화되는 배양시작 3일째 100ml의 추출용매를 첨가하였다. 추출용매를 첨가한 발효에서의 pH는 용매를 첨가하기 전인 3일째까지는 pH가 2.0까지 떨어지지만 용매첨가 후 pH는 증가하여 2.5로 계속 유지되었다. 추출발효에서 생산된 구연산 양은 용매를 첨가한 배양 3일째부터 급격히 증가하여 발효 시작 7일 경과시에는 15.2g/l에 도달했고 포도당 소모속도도 비슷한 형태로 증가하여 발효 시작 5일 후에는 잔류 포도당 농도가 약 3g/l 이하로 줄었다. 실험결과로부터 구연산의 추출발효에서 다음과 같은 특징이 발견되었다. 추출발효 중에도 배지의 pH는 2.5로 매우 낮지만 구연산 생산속도는 거의 변화하지 않았다는 점으로 구연산 발효에서는 pH보다 구연산에 의한 발효억제효과가 중요함을 나타낸다. 또한 30% Alamine 336 용매를 사용하면 용매의 독성에 의한 발효억제효과보다 구연산 추출에 의한 발효생산성 향상 효과가 커 용매를 첨가하지 않은 발효의 최종 구연산농도보다 3배 높았다. 추출발효의 전환 수율은 약 30%로 전환수율이 이같이 낮은 이유는 구연산 발효가 growth-associated 형태(18)이어서 기질의 상당 부분이 균체 성장에 사용되었기 때문으로 생각된다. 용매의 조성에 따른 구연산 생산성을 측정하기 위해 Alamine 336 농도를 50%로 증가시켜 추출발효를 수행한 결과를 Fig. 7에 나타냈다. Alamine 336 농도 증가로 구연산 추출능이 향상되었음에도 불구하고 포도당 소모속도와 구연산농도는 감소하여 용매의 독성효과가 주 영향인자임을 알 수 있다.

균체고정화에 의한 용매의 독성으로부터 보호효과

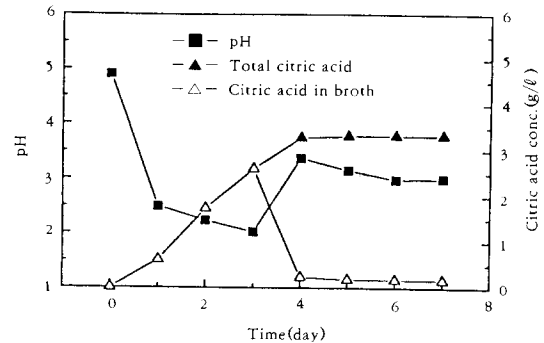


Fig 8. Effect of solvents on immobilized cell fermentation. *: % of Alamine 336 in oleyl alcohol.

를 결정하기 위해 고정화균체를 이용한 추출발효를 수행하여 그 결과를 Fig. 8에 나타냈다. 유리세포의 추출발효와는 달리 Alamine 336 농도가 30%에서 50%로 증가하여도 포도당 소모와 구연산 생산속도에는 거의 차이가 없었으며 흡착에 의한 고정화도 가동방법(21)과 동일한 균체보호 효과를 갖는 것으로 나타났다. 따라서 고정화 균체발효를 하면 실제 산업체에서 사용하는 고농도 구연산발효의 경우 용매에 의한 독성문제 없이 보다 높은 추출능의 용매를 사용할 수 있어 구연산에 의한 발효억제효과를 줄여 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

용매추출에 의한 구연산발효를 시도하였다. 발효 배지내 구연산 농도와 추출용매의 독성이 구연산의 생산성을 결정하는 주 인자였다. 특히 이온화되지 않은 구연산은 강력한 발효억제효과를 가져 구연산 농도가 5g/l 이상이면 구연산 생산은 거의 중지되었다. 구연산 추출효율을 높이기 위해 3차 아민과 oleyl alcohol의 혼합액을 용매로 사용하였다. 구연산의 추출발효에 적합한 용매조성은 30% 아민-70% oleyl alcohol로 밝혀졌다. 이 조건에서 추출발효 시 구연산농도는 15.2g/l로 동일한 조건에서 용매를 첨가하지 않고 발효하여 얻은 구연산농도 5g/l에 비해 3배 이상 높았다. 아민 농도가 30%를 넘으면 추출능은 향상되나 용매의 독성효과로 생산성은 오히려 감소하였다. 균체에 대한 용매의 독성효과는 균체를 polyurethane foam에 고정화함으로써 현저

하게 줄일 수 있었다.

참고 문헌

1. H. Mischak, C. P. Kubicek and M. Rohr (1984), *Biotech. Lett.*, **6** (7), 425.
2. M. Legisa and J. Kidric (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 453.
3. P. A. Belter, E. L. Cussler and W. S. Hu (1988), *Bioseparations*, p. 7, Wiley & Sons Inc., New York.
4. P. J. Evans and H. Y. Wang (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 393.
5. S. Seevaratnam, O. Holst, S. Hjorleifsdottir and B. Mattiasson (1991), *Bioprocess Eng.*, **6**, 35.
6. V. P. Lewis and S. T. Yang (1992), *Biotechnol. Prog.*, **8**, 103.
7. J. Hartl and R. Marr (1993), *Separation Sci. Technol.*, **28**, 805.
8. N. L. Ricker, E. F. Pittman and C. J. King (1980), *J. Separ. Proc. Technol.*, **1** (2), 23.
9. N. L. Ricker, J. N. Michaels and C. J. King (1979), *J. Separ. Proc. Technol.*, **1** (1), 36.
10. C. Laane, S. Boeren and K. Vos (1985), *Trends in Biotechnol.*, **3** (10), 251.
11. R. Wennersten (1983), *J. Chem. Biotechnol.*, **33b**, 85.
12. C. W. Jonaitis (1992), Personal Communication.
13. V. M. Yabannavar and D. I. C. Wang (1987), *Ann. NY. Acad. Sci.*, **506**, 523.
14. M. Berovic, A. Cimerman, W. Steiner and T. Koloini (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 579.
15. 이용희 (1986), 석사학위 논문, 한국과학기술원.
16. 포도당 측정용 시약 사용설명서, 영동제약.
17. J. R. Marier and M. Boulet, *J. Dairy Sci.*, **41**, 1683 (1958).
18. M. Rohr and C. P. Kubicek (1983), *Biotechnology* (H. J. Rehm and G. Reed eds), Vol. 3, No. 419, Verlag Chemie, Weinheim.
19. J. Vaija, Y. Y. Linko and P. Linko (1982), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**, 51.
20. F. A. Hamissa, M. S. E. Abyad and A. S. Gad (1992), *Biores. Technol.*, **39**, 209.
21. V. M. Yabannavar and D. I. C. Wang (1991), *Biotech. Bioeng.*, **37**, 716.