

식품부산물로부터 유기산의 대량생산공정에 관한 연구 - *Propionibacterium acidipropionici*의 발효 특성 -

진 선 자 · 주 윤 상 · 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 - Fermentation Characteristics of *Propionibacterium acidipropionici* -

Sun-Ja Jin, Yun-Sang Ju, Pil-Gi Hwang, Chul-Ho Choif, 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.)

The optimum fermentation conditions of *Propionibacterium acidipropionici* were determined for the maximum production of organic acids. Three strains of *P. acidipropionici*, ATCC 25562, 4875, 4965 were selected to test the productivity of organic acids in the batch fermentation. Nutrients and environmental conditions on cell growth were defined by series of experiments, and the optimum amounts of peptone, yeast extract were determined to be 1.5% (w/v), 0.75% (w/v), respectively. The yields and productivity were highest at pH 6 among the ranges of 5.0~7.5, and ATCC 4965 was determined to be the best strain compared to the others by getting total productivity of 0.29 g total acids/L/h. Approximately 1.60~2.34 moles of propionic acid and 0.74~1.05 moles of acetic acid were produced from 1.5 moles of glucose.

Key Words : *Propionibacterium acidipropionici*, organic acids, growth condition, productivity

서 론

프로피온산 박테리아는 산업적 공정에서 비타민 B₁₂, 효소 생산뿐 아니라 방부제, 제초제 및 방향제 등의 제조에도 이용되어 왔으며 또한 swiss cheeses에서 특별한 맛과 모양의 개발에 중요한 역할을 하고 있어서 치즈 산업에서도 그 상업적 가치를 주도하고 있다(1-3).

이들 박테리아의 이점은 프로피온산 자체가 세균 및 곰팡이 발육 저지 약품이기 때문에 오염을 줄일 수 있고 또한 대부분의 경우 혐기성 조건하에서 세포 성장을 하므로 많은 에너지를 필요로 하지 않으며, 기질에 대한 편애 정도가 적어 많은 종류의 당을 소화해 낼 수 있다(4, 5). 이들의 성장은 30°C~37°C의 온도 조건과 pH 7 근처에서 가장 왕성하다. 대부분의 균주들이 혐기성 조건에서 가장 잘 자라지만 호기성 조건에서도 성장이 지속된다. 이들 박테

리아는 다형태의 막대 모양으로 크기는 0.5~1 µm이며 한 쪽은 둥글고 다른 쪽은 가느다란 곤봉 모양을 형성한다. 또한 운동성이 없고 포자를 형성하지 않으며, 혐기성 및 호기성 조건하에서도 잘 자라는 통성 혐기성의 특성을 가진다(5).

*Propionibacterium acidipropionici*는 글루코스와 자일로스를 이용하여 pH 4.1~4.9과 같이 낮은 pH에서도 고농도 프로피온산과 아세트산을 생성하므로 산에 대한 저항성이 강하다. 이론적으로 1.5몰의 글루코스를 사용한다면 2몰의 프로피온산과 1몰의 아세트산(2.47 : 1 질량비)을 생산하게 된다(6, 7). 프로피온산 생산에 있어 *P. acidipropionici*는 같은 실험조건에서 *P. freudenreichii*에 비해 거의 두 배의 프로피온산을 생산해 냈으며, 회분식 발효에서 글루코스 g 당 프로피온산과 아세트산의 총 생산량이 각각 0.48 g, 0.13 g이 생산되었다(6).

초산과 프로피온산 등 유기산은 석유의 정제과정에서 분리된 올레핀 가스를 원료로 하여 제조하고 있으며, 연간 생산량은 미국의 경우 약 140만 톤에 이르고 있다(8). 유기산은 현재까지 석유나 천연가스 등 화석원료에만 의지해 왔으나 이러한 합성 유기산은 가격이 비쌀 뿐 아니라 그

† 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

많은 수요를 조달하기에는 양이 충분치 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 회분식 발효 공정을 이용하여 *Propionibacterium acidipropionici*의 발효 특성을 연구하고 우수한 발효 균주의 선별을 통해 유기산 대량 생산을 위한 기초자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

유기산 균주

유기산을 생성하는 박테리아 균주로서 초산과 프로피온산의 생산성이 우수한 *Propionibacterium acidipropionici* 균주 3종 (ATCC 4875, 4965, 25562)을 미국 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하였다. 종균 (seed culture)으로 사용하기 위해 냉동 건조된 박테리아를 수차례에 걸쳐 계대 (transfer)한 후 사용하였다.

균주의 최적 성장 조건

유기산 균주의 최적 성장조건을 알아보기 위해 pH를 5.0~7.5까지 변화시키고 peptone (Acumedia, Inc)과 yeast extract (Difco Co.)의 양을 변화시키면서 발효를 실시하였다. 각각의 실험조건은 Table 1에 나타나 있다.

삼각플라스크 (250 mL)에 100 mL 정도의 배지를 넣고 121°C에서 15분간 멸균한 후 종균을 접종하고 37°C에서 Uni Thermo Shaker (EYELA NTS-1300)를 이용하여 교반시키면서 배양하였다. 발효 기간 중에는 2개의 구멍이 뚫린 실리콘 마개를 사용하여 N₂ 가스를 주기적으로 공급하였다. 또한 유기산 생산으로 인하여 pH가 떨어질 때마다 1~2시간 간격으로 3.0 N NaOH를 사용하여 pH를 조절하였다.

Table 1. Fermentation conditions

Factor	Content, % (w/v)			
Peptone (%)	0.5	1.0	1.5	2.0
Yeast extract (%)	0.25	0.5	0.75	1.0
pH	5.0	5.5	6.5	7.5

회분식 발효

발효용 배지로는 glucose 30 g/L, peptone 15 g/L, yeast extract 0.75 g/L, K₂HPO₄ 0.25 g/L, KH₂PO₄ 0.25 g/L, MnSO₄ 0.05 g/L를 사용하였다.

Omni-Culture Bench-Top Fermenter System (Virtis. Co)를 사용하여 온도 및 교반 속도를 조절하고 유기산 생성 시 유량 펌프를 통해 3.0 N NaOH를 자동 주입하여 적정 pH를 유지하였으며, 혐기성 상태를 유지하기 위해 가스 주입구에 N₂ 가스를 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 보관하였다.

분석방법

발효조 내의 유기산 (젖산, 프로피온산 및 초산)과 소모당 당 (글루코스) 농도는 HPLC (JASCO LC-900 Series)를 사용하여 분석하였다. 사용된 칼럼은 HPX-87H (Bio-Rad)이며 칼럼내의 온도는 항상 50°C로 유지하였다. 먼저 UV/VIS Detector를 이용하여 유기산의 농도를 분석하였으며 당 농도 측정 시에는 Column과 연결된 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. 세포량 측정에는 건조 중량법을 사용하여 시료마다 분광광도계 (Shimadzu, UV-1201)를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 구하였다.

결과 및 고찰

균주의 최적 성장 조건

유기산 균주의 최적 성장조건을 규명하기 위하여 영양분 조성과 pH 등을 조정하며 발효를 실시하였다. *P. acidipropionici* ATCC 25562를 이용한 배양시험에서, 발효 개시 70시간 이후에는 프로피온산 (HPr)과 아세트산 (HAc)이

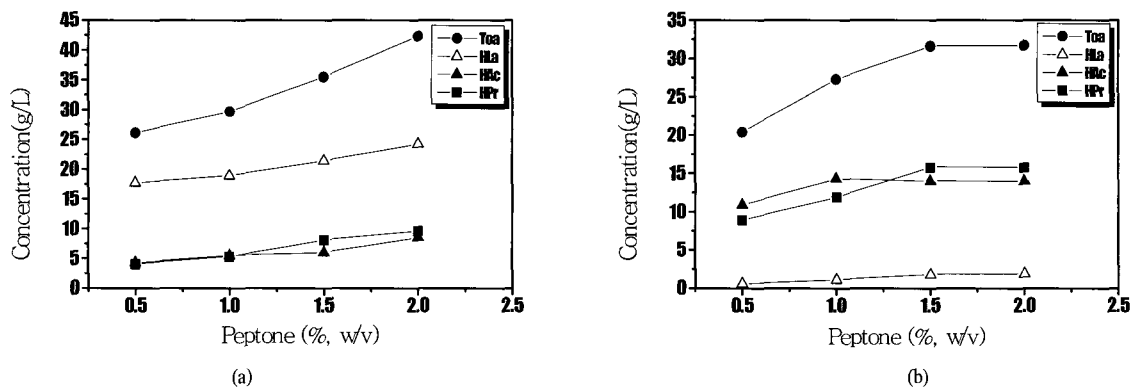


Figure 1. Organic acids production by variation of peptone content using *P. acidipropionici* ATCC 25562 (37°C, pH 7.0, glucose 30 g/L). Toa, Total organic acids; HLa, Lactic acid; HAc, Acetic acid; HPr, Propionic acid (a) 70 hours of fermentation; (b) 170 hours of fermentation

소량 생성되기 시작했으며, 전체적으로 중간 대사산물인 젖산 (HLA)의 양이 모두 높게 나타난 것으로 보아 대사반응이 한창 진행 단계에 있음을 알 수 있다(Fig. 1a). 그러나 170시간 이후에는 발효조 내의 젖산이 거의 다 소모되었으며 프로피온산과 아세트산의 생산량은 70시간 발효의 두 배 이상으로 증가하여 발효가 거의 종료되었음을 보여주고 있다(Fig. 1b). 전반적으로 peptone 함량이 0.5~2.0% (w/v)로 증가함에 따라 총유기산 (Toa) 생산량도 20.4~31.7 g acids/L로 증가하였으며, 1.5% (w/v)까지는 유기산 생산량이 뚜렷한 증가세를 보이다가 그 이후에는 거의 비슷한 값을 보여 경제성을 고려한 최적 peptone 함량이 1.5% (w/v)인 것으로 나타났다.

Yeast extract 주입량에 따른 발효 실험 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 발효 100시간 이후에는 yeast extract 주입량의 증가에 따라 프로피온산과 초산의 생산량이 조금씩 증가하는 경향을 나타내었으나 젖산의 소비는 주입량에 따라 불규칙적인 현상을 보이다 210시간 이후에는 생성된 젖산이 거의 소비되며 프로피온산과 초산으로 전환된 것을 볼 수 있었다. 젖산을 포함한 유기산 생산량은 yeast extract 함유량이 0.25~0.75% (w/v)까지 증가세를 보이다 0.75% (w/v)에서 총유기산이 약 32 g acids/L로 최대치를 나타내고 그 이후에는 감소하기 시작하였다.

유기산 균주의 최적 pH 조건을 구하기 위해 발효조 내의 pH를 5.0에서 7.5까지 변화시키며 유기산 생산성을 검토하였다(Fig. 3). 발효 개시 후 90시간에는 pH가 높아질수록 젖산 생산량이 증가하는 것으로 보아 높은 pH에서 발효 속도가 빨라지며 pH 5.5 이하에서는 프로피온산의 생성율이 현저히 떨어지는 것을 알 수 있다. 200시간 발효 후에는 생성된 젖산이 거의 다 소모되고 프로피온산과 초산으로 전환되었다. 최종 유기산 생산량은 pH 5.0에서 가장 낮았으며 pH 5.5~7.5에서 비슷한 수치를 보여주고 있으나 프로피온산의 생성율은 pH가 높아질수록 증가하는 경향이 있었다.

균주별 회분식 발효

환경제어 회분식 발효를 통하여 *P. acidipropionici* 세종류 균주의 발효 특성을 비교하여 보았다. 최초 당의 농도를 30 g/L, 온도를 37°C로 고정하고 pH 6과 7에서 실험을 실시하였다. Fig. 4는 pH 6.0에서 ATCC 25562 균주의 발효 실험 결과로서, 발효조 내의 모든 글루코스는 75시간이 경과하는 동안에 모두 소비되었고 그 이후에 생성된 젖산도 75시간 전후에서 22 g lactic acid/L로서 최대 생산량을 보이다가 220시간의 발효기간 동안 서서히 소모되었다. 초산과 프로피온산은 젖산이 고갈되는 시점을 전후해서 거의 모든 양이 생산되었

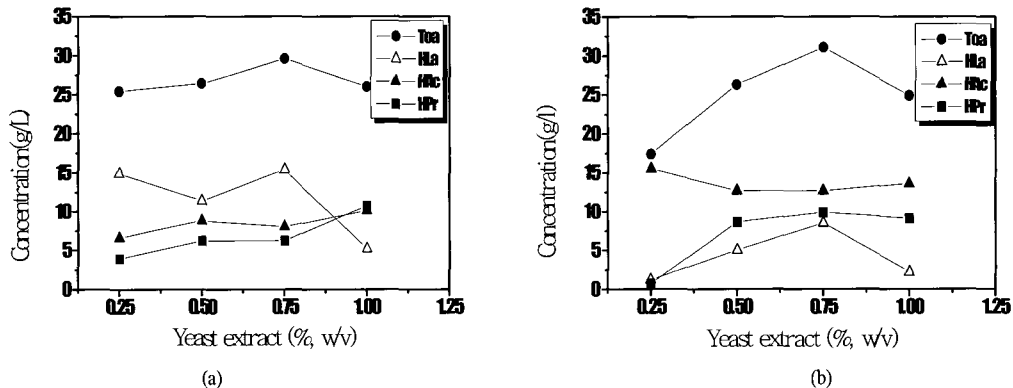


Figure 2. Organic acid production by variation of yeast extract using *P. acidipropionici* ATCC 25562 (37°C, pH 7.0, glucose 30 g/L). Toa, Total organic acids; HLa, Lactic acid; HAc, Acetic acid; HPr, Propionic acid (a) 100 hours of fermentation; (b) 210 hours of fermentation

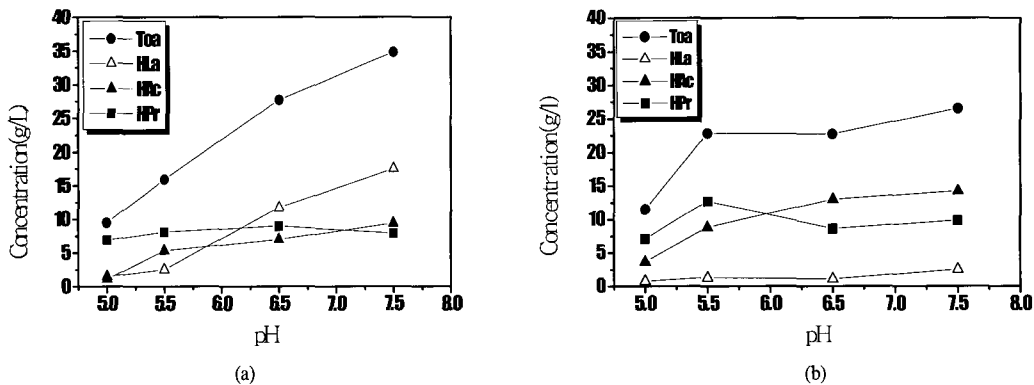


Figure 3. Organic acid production by pH variation using *P. acidipropionici* ATCC 25562 (37°C, glucose 30 g/L). Toa, Total organic acids; HLa, Lactic acid; HAc, Acetic acid; HPr, Propionic acid (a) 90 hours of fermentation; (b) 200 hours of fermentation

고 최종 생산량은 각각 6.4 g acetic acid/L, 19.7 g propionic acid/L로 나타났다. 세포 성장은 발효기간 내내 저조하였으며 220시간 경과 후에 3.0 g drycell/L로 그 생산량이 최대에 이르렀다.

같은 pH 6.0 조건에서 ATCC 4875 균주의 발효 결과는 Fig. 5에서 보는바와 같이 70시간 만에 글루코오스가 모두 소비되었으며 같은 시간대에 세포성장이 3.6 g drycell/L로 최

대에 이르고 유기산 생산량도 평형상태에 도달하였다. 젖산의 생산량은 49시간만에 10.69 g lactic acid/L로 최대에 도달하였으며 100시간까지 서서히 소모되었다. 또한 아세트산과 프로피온산의 최종 생산량은 각각 4.93 g acetic acid/L, 17.15 g propionic acid/L로 나타났다.

ATCC 4965 균주의 경우 pH 6.0에서 68시간 만에 글루코오스가 모두 소비되었으며 또한 비슷한 시간대에 유기산 생

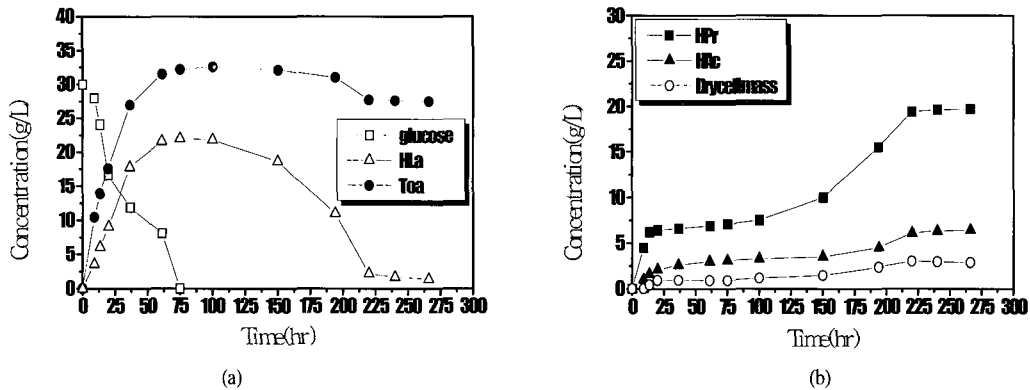


Figure 4. Batch fermentation of *P. acidipropionici* ATCC 25562 (37°C, pH 6). Toa, Total organic acids; HLa, Lactic acid; HAc, Acetic acid; HPr, Propionic acid

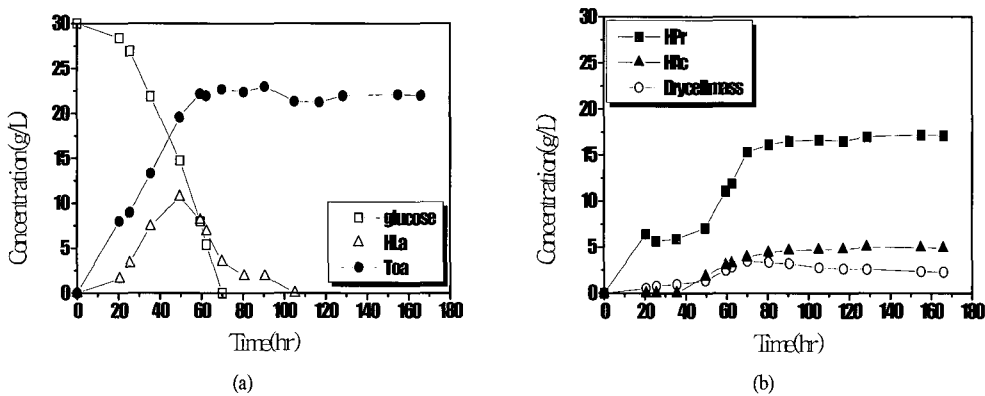


Figure 5. Batch fermentation of *P. acidipropionici* ATCC 4875 (30°C, pH 6). Toa, Total organic acids; HLa, Lactic acid; HAc, Acetic acid; HPr, Propionic acid

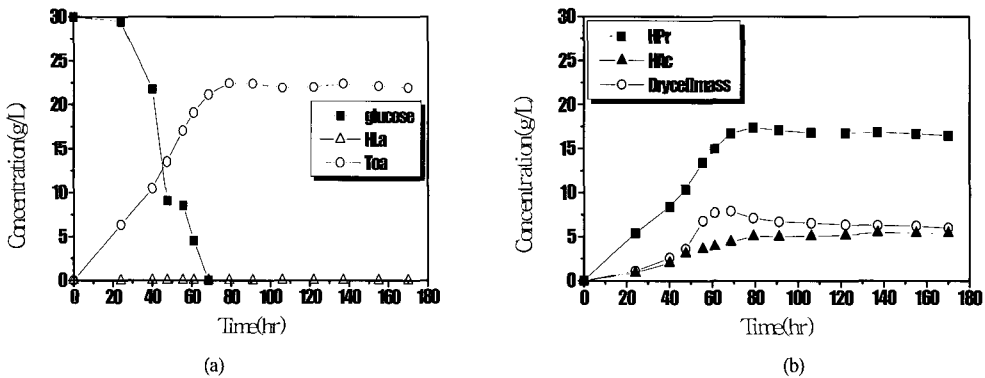


Figure 6. Batch fermentation of *P. acidipropionici* ATCC 4965. (30°C, pH 6) Toa, Total organic acids; HLa, Lactic acid; HAc, Acetic acid; HPr, Propionic acid

Table 2. Performance comparison in batch fermentation

		Strain(<i>P. acidipropionici</i>)					
		ATCC 25562		ATCC 4875		ATCC 4965	
pH		6	7	6	7	6	7
Glucose(g/L)		30	30	30	30	30	30
Maximum cell yield(g drycell/g glucose)		0.10	0.06	0.12	0.05	0.26	0.09
Propionic acid		19.7	17.95	17.15	15.09	17.39	13.24
Acids conc. (g/L)	Acetic acid	6.4	5.9	4.93	7.04	5.05	6.07
	Lactic acid	2.2	1.18	0	0	0	0
Total acid production		28.3	25.03	22.08	22.13	22.44	19.31
Product yield(g total acid/g sugar)		0.94	0.83	0.74	0.74	0.75	0.64
Maximum productivity(g total acid/L/h)		0.13	0.11	0.28	0.22	0.29	0.26

산량도 평형을 이루었다(Fig. 6). 세포량도 60시간대에 7.8 g drycell/L로 최대에 이르러 다른 유기산 균주에 비해 성장속도가 빠르고 왕성한 것으로 나타났다. 발효가 진행되는 동안 젖산의 농도가 관측되지 않는 것으로 보아 균주 체내에서 생성되는 즉시 빠른 속도로 소모되어 초산과 프로피온산으로 전환되는 것으로 보인다. 또한 초산 및 프로피온산의 최종 생산량은 각각 5.05 g acetic acid/L, 17.39 g propionic acid/L로 나타났다.

균주별 생산성 비교

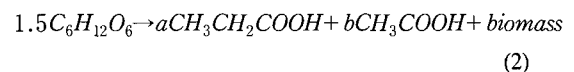
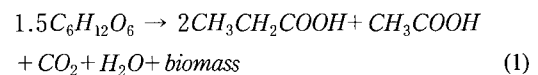
프로피온산 균주의 대사과정을 살펴보면 발효 초기단계에 젖산을 생성한 후에 생성된 젖산을 효율적으로 소화하며 초산과 프로피온산을 생산하게 된다. 또한 글루코스를 탄소원으로 하여 세포가 성장하지만 글루코스가 다 소모된 이후에도 건강한 상태를 유지하여 소량이지만 지속적으로 성장하게 된다. 우수 균주의 선정을 위해 Table 2에 pH에 따른 균주간의 생산성을 비교 분석하여 보았다. 세 균주 모두 최종 유기산 수율 및 생산성이 pH 6.0에서 더 높은 것으로 나타났으며 최대 세포량 역시 pH 6.0에서 더 높게 관찰되었다. 또한 pH 6.0에서 균주간의 생산성을 비교해 본 결과 ATCC 25562 균주가 0.94 g total acids/g sugar로 유기산 수율은 가장 높지만 발효에 소모되는 시간이 220시간 이상으로 ATCC 4875, ATCC 4965 균주에 비해 대사 속도가 2배 이상 늦어 유기산 생산성을 고려해 볼 때 효율이 상당히 떨어짐을 알 수 있었다. ATCC 4965, ATCC 4875 균주에서는 생산성이 각각 0.29 g total acids/L/h, 0.28 g total acids/L/h로서 ATCC 4965 균주가 유기산 생산성이 가장 높은 것으로 판명되었다.

이론적으로 볼 때에 유기산 박테리아는 EMP (Embden-Meyerhoff-Parnas) 경로만을 고려하면 식 (1)과 같이 1.5몰의 글루코오스는 dicarboxylic pathway를 통하여 2몰의 프로피온산과 1 몰의 초산을 생성하고 그 외 CO₂와 H₂O가 생성되며 나머지 일부는 세포량으로 합성된다. 그러나 프로피온산 형성 시 복잡한 대사경로가 개입되기 때문에 실제

발효에 있어 이러한 이론비는 거의 이루어지지 않는다. 이론값과 비교한 계수의 차이점은 실제 상황에 개입된 여러 가지 변수들에 의해 설명될 수 있다. 예를 들면 주위 환경 조건의 변화로 인한 호흡 및 세포보수에 따른 에너지 소모 작용의 차이 등으로 발생할 수 있으며, 특히 pH변화는 박테리아의 대사에 영향을 줌으로서 최종 산 생산에 강하게 영향을 끼친다. 또한 글루코스로부터 피루브산 형성 시 HMP (Hexose Monophosphate) 경로의 개입은 전체적 수율에 영향을 미치게 되는데, Papoutsakis 등(9)은 *P. arabinosum*, *P. pentosaceum* 대사에서 HMP 경로가 60% 정도 개입된다고 보고한 바 있다.

식 (2)의 초산과 프로피온산의 화학양론 계수를 통하여 *P. acidipropionici* 균주들 간의 실제적인 생산비를 비교하여 Table 3에 나타내었다. 세 균주 모두 pH에 따라 프로피온산 대 초산 생산 비율이 다양하게 나타났으나, 1.5몰의 글루코스로부터 대략 1.60~2.34몰의 프로피온산과 0.74~1.05몰의 초산을 생산하였다.

Stoichiometric Equation

Table 3. Stoichiometric coefficients of strain *P. acidipropionici*

pH	strain					
	ATCC 25562		ATCC 4875		ATCC 4965	
	a	b	a	b	a	b
6	2.34	0.98	2.08	0.74	2.11	0.75
7	2.18	0.88	1.90	1.05	1.60	0.90

요 약

본 연구를 통하여 유기산 생산을 위한 *Propionibacterium acidipropionici*의 발효 특성을 규명하여 보았다. *P. acidipropionici* ATCC 25562, 4875, 및 4965 등 세 균주를 선별하여 발효 실험에 의한 최적 성장조건을 규명한 결과, peptone 1.5% (w/v), yeast extract 0.75% (w/v)에서 유기산 생산성이 최대로 나타났다. 또한 주어진 영양 조건에서 온도, pH 등 환경을 제어하며 회분식 발효를 실시한 결과 세 균주 모두 pH 6.0에서 유기산 수율과 생산성이 가장 높았으며, 그 중에서도 *P. acidipropionici* ATCC 4965 균주가 유기산 생산성이 0.29 g total acids/L/h로 가장 우수한 것으로 판명 되었다. 세 균주의 화학양론적인 유기산 생산비를 비교해본 결과 1.5몰의 글루코오스로부터 1.60~2.34몰의 프로피온산과 0.74~1.05몰의 초산을 생산하는 것으로 나타났다.

감 사

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

REFERENCES

1. Hsu, S. T. and S. T. Yang (1981), Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: effect of pH, *Biotechnol.* **38**, 571-578.
2. Paik, H. D. and B. A. Glatz (1994), Propionic acid production by immobilized cells of a propionate tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*, *Microbiol. Biotechnol.* **42**, 22-27.
3. Lewis, V. P. and S. T. Yang (1992), A novel extractive fermentation process for propionic acid production from whey lactose, *Biotechnol.* **8**(2), 104-110.
4. Carrondo, M. J. T., J. P. S. G. Crespo, and M. J. Mora (1988), Production of propionic acid using a xylose utilizing *Propionibacterium*. *Biochem.* **17**, 295-312.
5. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H.A. Sneath, J. T. Staley, S. T. Williams (1994), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th Ed., Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A.
6. Hendricks, B., R. A. Korus, and R. C. Heimsch (1985), Propionic acid production by bacterial fermentation, *Biotechnol.* **15**, 241-245.
7. Allen, S. H. G., R. W. Kellermeyer, R. L. Stjernholm, and H. G. Wood (1964), Purification and properties of enzymes involved in the propionic acid fermentation, *J. Bacteriol.* **87**(1), 171-187.
8. Seri (1981), Fermentation chemicals and biomass, II. Solar energy research institute, Seri/TR-754.
9. Papoutsakis, E. T. and C. L. Meyer (1985), Fermentation equations for propionic acid bacteria and production of assorted oxychemicals from Various Sugars, *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 67-80.