

## 고체발효에서 반응표면분석법을 이용한 구연산 생산 최적화

김진우<sup>†</sup>

맥길대학교 바이오시스템공학과  
21111 레이크로드 세인트앤드벨라부시 퀘벡주, H9X 3V9  
(2012년 3월 10일 접수, 2012년 4월 20일 채택)

### Response Surface Optimization of Fermentation Parameters for Citric Acid Production in Solid Substrate Fermentation

Jin-Woo Kim<sup>†</sup>

Department of Biosystems Engineering, McGill University, Ste Anne de Bellevue, Canada, H9X 3V9  
(Received 10 March 2012; accepted 20 April 2012)

#### 요 약

본 실험에서는 *Aspergillus niger* NRRL 567의 고체배양을 이용한 구연산 생산 시, 물리/화학적 발효 조건인 배양 온도, 배지 pH, 접종 농도 및 수분 함량이 구연산 생산에 미치는 영향을 단일변수(one-factor-at-a-time)와 반응표면 분석법(surface response methodology)을 이용하여 순차적 최적화를 수행하였다. 단일변수 최적화의 경우, *A. niger*에 의한 구연산 생산은 물리/화학적 발효 조건에 의해 영향을 받으며, 발효 온도 30 °C, 영양 배지 pH 7.1, 수분 함량 75%와 접종 농도  $4.0 \times 10^6$  spores/ml에서 최대 구연산 생산인 98.2 g/kg DPM (dry peat moss)을 보였다. 단일변수 최적화에 근거하여 반응표면 분석법을 도입하여 2차 최적화를 수행했을 경우, 배지 pH와 수분 함량이 구연산 생산에 유의한 영향을 주었으며 온도 26.5 °C, 영양 배지 pH 9.9, 수분 함량 75.1%와 접종 농도  $6.0 \times 10^6$  spores/ml에서 최대 구연산 생산인 118.8 g/kg DPM가 얻어졌다. 이는 최적화 이전의 대조군에 비해 구연산 생산이 1.6배 증가한 결과이다.

**Abstract** – In this present study, *Aspergillus niger* NRRL 567 was cultivated on an inert support material and the effects of various fermentation parameters including temperature, nutrient solution pH, inoculation level, and moisture content were observed and optimized by one-factor-at-a-time (OFAT) and response surface methodology (RSM), sequentially. It was found that the incubation temperature of 30 °C with 75% moisture content, nutrient solution pH of 7.1 and inoculation level of  $4.0 \times 10^6$  spores/ml were the most favorable. Again, fermentation parameters were optimized using RSM. The determined optimum condition is 26.5 °C, pH 9.9, 75.1%, and  $6.0 \times 10^6$  spores/ml. Under this optimized condition, *A. niger* NRRL 567 produced 118.8 g citric acid/kg dry peat moss at 72 hr. Maximum citric acid production of optimized condition by RSM represented a 1.6-fold increase compared to that obtained from control experiment.

Key words: Response Surface Optimization, Citric Acid, *Aspergillus niger*, Solid Substrate Fermentation

#### 1. 서 론

다양한 곰팡이 균들은 구연산, 옥살산 유산 및 숙신산과 같은 다양한 유기산을 생산한다고 알려져 있으며 이들은 식품, 의약품, 그리고 화장품 등 다양한 부분에서 사용되고 있다. 특히, 최근에는 생분해성 고분자의 전구체 또는 원료로서 유기산의 수요가 급격하게 증가되고 있어 다양한 및 발효 방법을 이용한 유기산 생산 증대와 관련된 연구분야에 관심이 크게 증가하고 있다. 여러 유기산 중, 구연산 생산은 2010년 기준으로 180 만 톤에 이르며, 대부분은 *Aspergillus niger*를 이용한 액체 배양법을 통해 생산된다[1-3]. 또한, 구연산 소비는 연간 5%로 크게 증가하고 있어 기존의 액체배지를 이용한 생

산에 비해 보다 경제적인 발효 공정의 도입이 필요하다 하겠다[4-7].

고체배양법은 목질계 농부산물 및 산업부산물 등을 사용하여 free flowing water가 최소화 된 상태에서 곰팡이 균과 같은 미생물을 배양하는 발효 법으로 기존의 액체배양법에 비해 오염이 적고, 용수 절감이 가능하며, 고농도 산물생산이 가능하여 운전, 분리 및 정제 비용 절감에 많은 장점을 지닌다. 또한, *A. niger*와 같은 곰팡이 균의 경우, 볏짚, 옥수수대, 감자 껍질, 오렌지 껍질 및 맥주 생산 부산물(spent brewers grains) 등과 같은 고체배지로 활용이 가능해 부산물 재활용이 가능하다는 점에서 많은 연구가 진행되고 있다[8-11].

고체발효는 free flowing water가 최소화 된 고체배지에서 발효가 수행되지만 세포 성장 및 산물 생산은 고체배지의 수분 함량에 크게 영향을 받는다고 알려져 있다[12]. 고체배지의 수분 함량은 수분 공급, 영양 성분 용해, 기체 용해, 열전도 및 고체배지의 swelling에 영

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: kimjw1028@hotmail.com

향을 미친다고 알려져 있다[13,14]. 과육 껍질 또는 바나나 부산물을 고체배지로 *A. niger* DS 1과 *A. niger* EB3을 이용한 고체배양의 경우, 수분 함량이 65~75%일 때 최대 구연산 생산을 얻을 수 있었으며 40과 80% 수분조건에서 생산량이 각각 51과 38% 감소하였다[15,16]. 또한, 벗짚 부산물과 같은 고체배지에서 *A. niger*를 이용한 리파아제 생산에 있어 고체배지 수분 함량 70~80%가 최적조건임이 보고되었다[16,17]. 고체배지의 경우, 열 전도율이 낮고 교반이 없는 정체배양으로, 발효 중에 발생하는 열이 고체배지 내에서 비 균일하게 분포하여 국지적으로 축적되는 문제를 가진다[18,19]. 고체발효 중, 적정 수준 이상의 온도는 효소 불활성 및 수분 증발을 가져와 세포 성장 및 산물 생산에 저해 효과를 보이는 반면, 낮은 배양온도는 미생물의 대사기능을 떨어뜨려 낮은 세포성장을 저해시킨다[20]. 일반적으로 곰팡이 균은 mesophilic으로 최적의 성장온도가 25~35 °C 이나 *A. niger* ATCC 10577과 *A. niger* V. Tiegham을 이용한 글루콘산 생산은 40 °C에서 최대 세포성장과 생산성을 가진다고 보고되었다[21-24]. 고체배지의 pH는 세포성장 및 산물생산에 유의한 영향을 미친다고 알려져 있다. 대부분의 곰팡이 균은 약산성 또는 pH 3~6 조건에서 최적성장을 한다고 보고되었으나, 일부 곰팡이 균은 박테리아와 경쟁에서 우위를 점하기 위해 pH 2 이하에서 성장이 가능하다. Roukas [16] 는 고체발효에서 *A. niger*를 이용한 구연산과 글루콘산 생산에 있어 고체배지의 초기 pH가 7일 때 가장 생산성이 좋았다고 보고하였고, 고체발효에서 *A. niger* LPB B3 이용한 구연산 생산에 있어 pH 5.5 조건이 최적 조건임을 밝혔다. Kamini 등은 [25] *A. niger* ATCC 10577과 MTCC 259를 이용한 리파아제 생산에 있어 최적 pH를 7로 보고하였다.

위의 연구 내용에서 보는 바와 같이, 고체발효를 이용한 구연산 생산의 경우에 최적 생산 조건은 균주, 당 종류, 배양 방법 및 조건에 따라 크게 차이가 난다. 고체 발효에서 산물생산 증대를 위해서는 사용하는 균주, 고체배지 및 산물에 따라 발효 조건의 최적화가 필요하다고 하겠다. 본 연구는 inert한 고체배지인 peat moss를 사용하여 *A. niger*를 이용한 구연산 생산 증대를 위한 최적의 물리/화학적 발효 조건을 탐색하는데 있다. *A. niger* NRRL 567을 이용한 구연산 생산을 최적화하기 위해 단일변수 최적화를 우선 수행하여 주요 독립변수를 선별하였으며, 이에 근거하여 반응표면 분석법을 이용한 2차 최적화를 통해 독립 변수 상호간의 영향을 파악하고 최적 발효 조건을 도출하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2-1. 재료

*A. niger* NRRL 567는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) 에서 분양 받아 사용하였다. *A. niger*의 spores 생산을 위해 고체배지인 potato dextrose agar plates (PDA, Sigma,

St. Louis, MO, USA)에서 30 °C 조건에서 배양하였다. PDA는 2주간격으로 계대배양 했으며, 배양 후 7일 된 plate에서 0.1% Tween 80 (sigma, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 사용하여 PDA의 표면에서 spore를 회수하여 0.25~4.0×10<sup>6</sup> spores/ml로 농도를 조절하여 접종에 사용하였다.

### 2-2. 고체발효용 배지

고체발효 실험을 위해 글루코오스와 영양성분을 공급한 peat moss (Schultz Company, Mississauga, Ontario, Canada)를 inert 고체배지로 사용하였다. 글루코오스와 액체배지를 peat moss와 혼합하여 고체배지로 사용하였다. 고체배지의 성분은 아래와 같다(kg dry peat moss): 967.9 g glucose, 15.4 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 43.9 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 4.0 g NaCl.

### 2-3. 고체발효

글루코오스를 포함한 액체배지 각 28 ml을 7 g의 건조 peat moss에 혼합하여 250 ml Erlenmeyer flask에 분주하고 foam stopper로 밀폐한 후, 121 °C에서 15분간 멸균하였다. Tween 80로 회수한 1 ml의 spore 용액을 접종하여 13~42 °C 조건에서 48과 72시간 동안 고체발효를 수행하였다. 각 flask에서 고체시료를 채취하여 증류수에 현탁시켜 구연산과 글루코오스 농도를 측정하였다. 단일 변수 최적화를 위한 기본 발효조건은 수분 함량 80%, 배양 온도 30 °C, 액체배지 pH 4.3, 접종 농도 1.0×10<sup>6</sup> spores/ml이며, 각각의 변수를 Table 1과 같이 변화시키며 각각의 조건이 구연산 생산에 미치는 영향을 파악하였다.

### 2-3. 구연산 및 당 분석

구연산 정량은 pyridine과 acetic anhydride를 첨가한 후, 420 nm에서 발색 법으로 수행하였다[26]. 고체배지에 포함된 글루코오스 농도는 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA)를 이용한 발색 법으로 측정하였다. 측정된 구연산과 글루코오스는 단위 건조 고체배지(DPM, dry peat moss) 기준으로 농도로 환산하여 표시하였다. 구연산 수율과 글루코오스 소모율은 아래와 같이 정의된다:

$$\begin{aligned} \text{구연산 수율}(\%) &= 100 \times [\text{생산 구연산}(\text{g/l}) / \text{소모 글루코오스}(\text{g/l})] \\ \text{글루코오스 소모율}(\%) &= 100 \times [\text{소모 글루코오스}(\text{g/l}) / \text{초기 글루코오스}(\text{g/l})] \end{aligned}$$

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. 초기 수분 함량에 따른 영향

Fig. 1에 보는 바와 같이 고체배지로 사용된 peat moss의 초기 수분 함량은 고체발효에서 구연산 생산에 유의한 영향을 미침을 알 수 있다. 수분 함량 75와 80%에서 78.4와 76.2 g/kg DPM를 각각 얻을

Table 1. Physico-chemical conditions tested for OFAT optimization

Conditions	Unit	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Initial MC	%	60	70	75	80	85
pH*		2.08 <sup>a</sup> (4.06 <sup>b</sup> )	3.00 <sup>a</sup> (4.26 <sup>b</sup> )	4.28 <sup>a</sup> (4.37 <sup>b</sup> )	7.10 <sup>a</sup> (5.12 <sup>b</sup> )	- -
Temperature	°C	13	25	30	35	42
Inoculation	×10 <sup>6</sup> spores/ml	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0

Note: MC: moisture content

<sup>a</sup>Nutrient solution initial pH; <sup>b</sup>pH of solid substrate after autoclaving

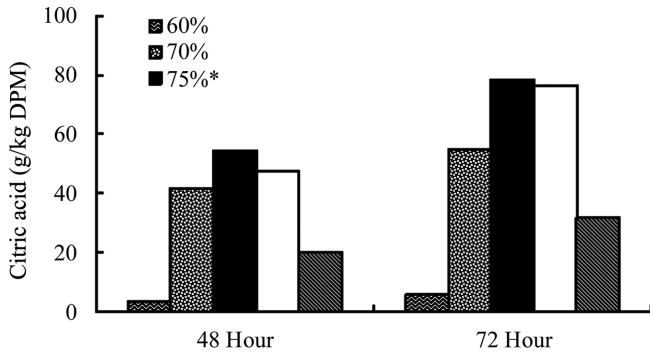


Fig. 1. Citric acid production using various initial moisture contents at 48 and 72 h of fermentation. The other variables were fixed at the basal conditions as followings: 30 °C, nutrient solution initial pH of 4.3, inoculation level of 1.0×10<sup>6</sup> spores/ml, 100% PM with particles smaller than 2.0 mm. All values were averaged from duplicate tests and an asterisk (\*) identifies the control experiment.

수 있어, 최적 수분 함량이 75~80% 부근에 존재함을 예측할 수 있었다. 반면 수분 함량 70과 85%에서는 구연산 생산 농도가 수분 함량 75% 대비 크게 감소함을 볼 수 있다. 특히, 수분 함량이 65% 보다 낮은 경우에 구연산 생산이 크게 감소해 5.7 g/kg DPM에 불과함을 볼 수 있다. 일반적으로 고체배양에 있어서 수분은 고체배지의 swelling이 발생시키며 이는 균사체의 표면 정착 및 성장에 도움을 준다. 또한, 고체배지 내의 수분은 영양성분의 용해와 확산을 도와 미생물 성장을 증진시킨다 알려져 있다[21]. 초기 수분 함량 80% 이상인 경우, 48과 72시간 발효에 있어 구연산의 생산이 크게 감소하게 되는데, 이는 첨가 수분이 고체배지의 수분 함유 한계를 넘어 잉여 수분(free flowing water)이 발생하여 통기를 제한, 산소공급 저해, 균사체 성장 저해 및 미생물 오염 증대의 원인이 된다고 알려져 있다[11].

3-2. 배양온도에 따른 영향

구연산 생산에 미치는 온도의 영향을 평가하기 위해 기본 발효 조건을 유지한 상태에서 온도를 13~42 °C로 변화시켜 실험을 수행하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 발효 48시간에 있어 구연산 생산 최적 온도는 35 °C임을 알 수 있다. 발효 72시간의 경우 배양 온도 25~35 °C 범위에서 최대 수준인 75~78 g/DPM 생산되어 최적 온도 구

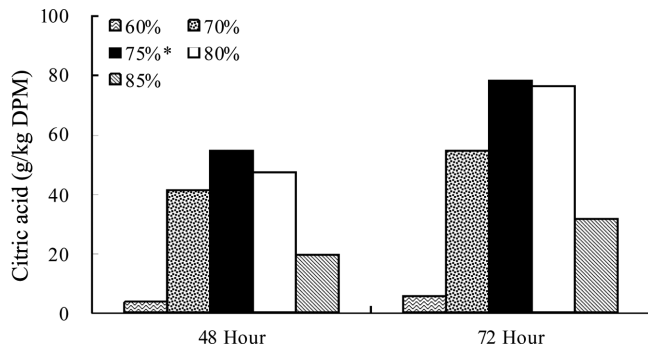


Fig. 2. Citric acid production under various temperatures at 48 and 72 h of fermentation. The other variables were fixed at basal conditions.

간이 25~35 °C임을 알 수 있다. 반면, *A. niger*를 13과 42 °C에서 배양했을 경우, 구연산 생산이 크게 감소함을 볼 수 있다. Nampoothiri 등에 따르면 저온 또는 고온 조건에서 유기산 생산 저하는 spore germination 감소, 세포 활성 감소, 효소 불활성 등이 이유가 된다고 보고하고 있다[20].

3-3. 초기 pH에 따른 영향

액체배지의 pH를 NaOH 또는 HCl을 첨가하여 조절한 후, 고체배지와 혼합하여 액체배지의 pH가 구연산 생산에 미치는 영향을 평가하였다. 액체배지의 pH는 2.1, 3.0, 4.3과 7.1로 각각 조절되었다. 고체배지인 peat moss (pH=4.4)와 액체배지를 혼합하였을 때, 고체배지의 초기 pH는 4.1, 4.3, 4.4와 5.1로 변화했다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 액체배지의 pH가 증가함에 따라 구연산 생산은 비례하여 증가함을 볼 수 있다. 액체배지 pH 7.1에서 최대 구연산 생산농도인 63.7과 91.0 g/kg DPM를 48과 72시간에 각각 얻었다.

각 발효시간에 고체배지 pH 변화를 Fig. 4에 나타냈다. 발효가 진행됨에 따라 고체배지 pH는 감소하는 경향을 보인다. 감소 폭은 구연산 생산이 가장 많았던 액체배지의 pH 7.1에서 가장 컸으며, 구연산 생산이 상대적으로 낮았던 pH 2.1에서 가장 적었다. 결과로 유추해 볼 때, 고체배지의 pH 감소는 *A. niger*에 의해 생산되는 유기산에 의한 것이며 *A. niger*는 여러 유기산 중 구연산이 주로 생산한다고 알려져 있으므로 배지 내 pH의 감소는 구연산 생산량과 비례관계가 있다고 하겠다. 이와 같이 *A. niger*를 이용한 고체발효에서 pH 감소는 구연산에 의해 주로 발생하며, 이는 구연산 생산의 간접 지표가

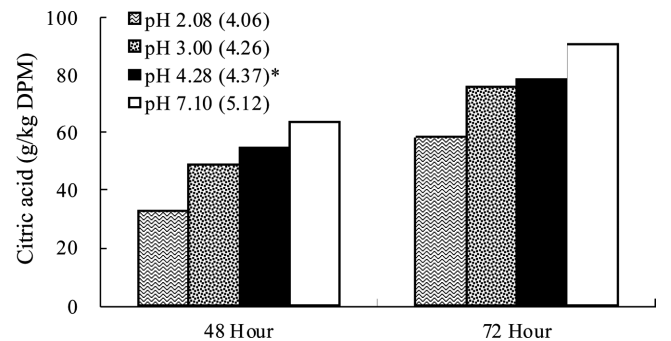


Fig. 3. Citric acid production under various initial pHs at 48 and 72 h. The other variables were fixed at basal conditions.

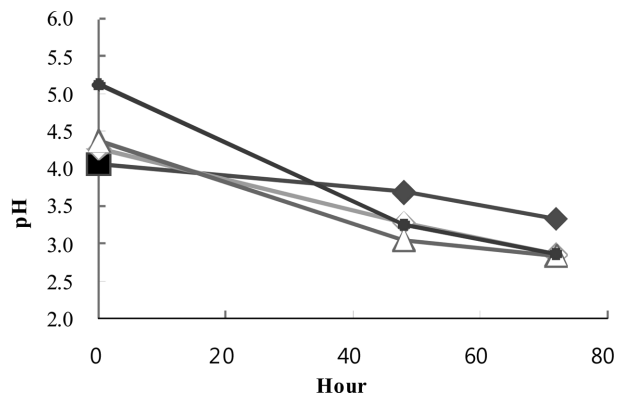


Fig. 4. Profile of pH changes in peat moss by *A. niger* NRRL 567 at different initial pH of nutrient solution [■: pH 2.1 (4.1); ◇: pH 3.0 (4.3); △: pH 4.3 (4.4); ●: pH 7.1 (5.1)].

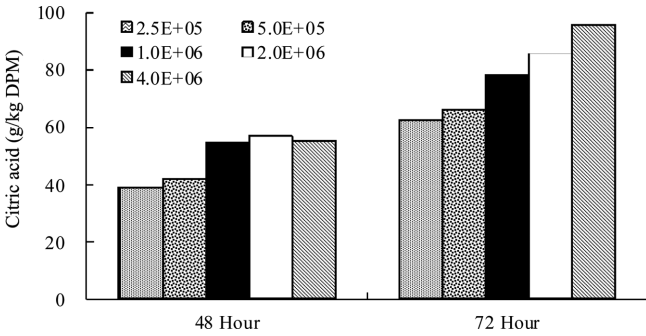


Fig. 5. Citric acid production using various inoculation levels after 48 and 72 h. The other variables were fixed at basal conditions.

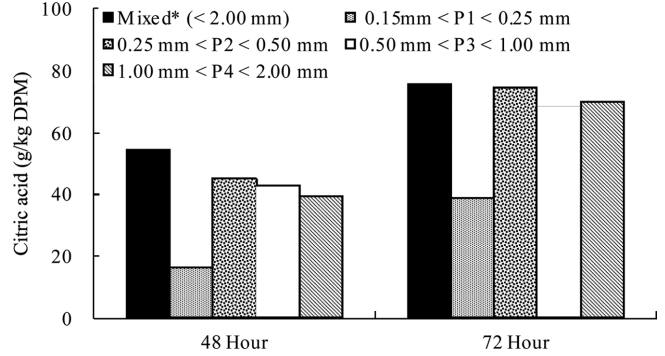


Fig. 6. Citric acid production using various particle size ranges for PM at 48 and 72 h. The other variables were fixed at basal conditions.

될 수 있다고 하겠다[28].

3-4. 초기 접종 농도에 따른 영향

Fig. 5에서 보는 바와 같이, 초기 접종 농도는 구연산 생산에 유의한 효과를 보이며, 접종 농도가 증가함에 따라 구연산 생산이 비례하여 증가함을 알 수 있다. 발효 72시간에서 초기 접종 농도를 4.0×10<sup>6</sup>/ml로 하였을 때, 구연산 최대 생산농도 95.8 g/kg를 얻을 수 있었으며 이는 기본 발효 조건인 1.0×10<sup>6</sup>/ml 접종 농도에 비해 1.2배 증가한 결과이다.

3-5. 고체배지의 입자 크기에 따른 영향

고체배양에서 사용되는 고체배지로는 입엽/농엽/산엽부산물물 리그노셀룰로오스가 주성분인 목질계 부산물과 당을 포함하는 과육 부산물로 크게 나눌 수 있겠다. 이들 부산물들은 반 건조 또는 완전 건조된 상태로 고체배지로 사용되며, 고체배지의 입자 크기는 고체배양 중 통기율, 가스 교환, 열 교환, 수분 함유 및 미생물 고정 등에 영향을 미친다고 알려져 있다. 본 실험에서는 목질계 또는 과육 부산물의 입자 크기가 구연산 생산에 미치는 영향을 평가하기 위해 peat moss를 inert한 고체배지로 하여 필요한 당과 영양성분을 첨가하여 실험을 진행하였다. 기본 발효 조건에 입자 크기를 달리하여 실험한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 입자 크기 0.15~0.25 mm를 제외한 모든 실험 군에서 차이가 크지 않은 것으로 보아 0.25 mm이하의 미세한 입자 크기에서는 통기율 감소, clogging 문제, 낮은 미생물 고정, 수분 함유 감소에 따라 구연산 생산이 감소된다고 유추할 수 있다.

3-6. 통계학적 최적화

위 실험에서는 기본 발효 조건에 하나의 독립변수를 변화하는 단일변수 변화(one-factor-at-a-time)을 이용해 최적화를 진행하였다. 하지만 이러한 단일변수 최적화법은 각 독립변수가 종속변수에 미치는 통계학적 유의성을 판단하기 어려우며, 독립변수 상호간의 상관관계를 파악하는데 한계가 있고, 상호영향을 고려하여 최적조건을 예측

하는데 어려움이 있다는 단점이 있다[29,30]. 이러한 단점을 극복하고자 본 실험에서는 단일변수 최적화를 1차 최적화 기법으로 이용하여 통계학적 최적화 기법의 일종인 반응표면 분석법을 도입하여 2차 최적화를 진행하였다. Table 2에서 보여지는 바와 같이 반응표면 분석법 설계에 따라 3개의 독립변수를 변화시켜 17회 독립실험을 통해 통계적으로 분석되는 종속변수(구연산 생산)에 대한 2차 회귀 방정식을 아래와 같이 발생시켰다. 발효 조건에 따른 독립변수간 상호작용 및 최대 구연산 생산을 예측하였다.

$$Y_{48\text{ hr}} = 20.0 + 0.95\chi_1 + 13.85\chi_2 + 7.15\chi_3 - 3.38\chi_1^2 + 2.93\chi_2^2 - 0.19\chi_3^2 - 7.17\chi_1\chi_2 + 21.01\chi_1\chi_3 - 11\chi_2\chi_3$$

$$Y_{72\text{ hr}} = 78.7 + 4.6\chi_1 + 23.0\chi_2 + 25.5\chi_3 - 16.1\chi_1^2 + 2.9\chi_2^2 - 5.8\chi_3^2 - 14.0\chi_1\chi_2 + 17.1\chi_1\chi_3 + 2.9\chi_2\chi_3$$

발효 48과 72시간에서 회귀계수 값은 각각 0.975와 0.988이며 이는 실험값과 회귀방정식에 의한 예측 치가 잘 일치함을 보여주고 있다. 발효 48과 72시간 모두에서 구연산 생산에 미치는 pH와 수분 함량의 영향이 크다는 것을 알 수 있다. 반면 배양온도에 있어서는 실험기간 내에서 유의한 영향을 받지 않음을 알 수 있다(Table 3). 구연산 생산을 48과 72시간에서 최대화 시키고 독립변수 인 배양 온도 20~50 °C, pH 2~10과 수분 함량 60~90%로 범위를 확장시켜 구연산 생산의 최적 조건을 탐색해 보았다. 위와 같은 제한조건에서 반응표면 분석법을 이용하여 최적 발효조건을 예측했을 때, 배양 온도 26.5 °C, pH 9.9와 수분 함량 75.1%에서 최대 구연산 생산인 123.4 g/kg DPM를 얻을 수 있었다(Fig. 7).

3-7. 구연산 생산 검증 실험

*A. niger* NRRL을 이용한 구연산 생산 증대를 위해 기존의 단일변수 최적화와 반응표면 분석법을 이용하여 단계적 최적화를 수행하였다. 먼저, 단일변수 최적화를 통해 얻은 최적 조건은 배양 온도 30 °C, 영양 배지 pH 4.28 수분 함량 80%, 접종 농도 4.0×10<sup>6</sup> spores/ml로

Table 2. Coded values used in RSM to optimize the physico-chemical fermentation conditions for citric acid production

Parameter	Unit	Coded and actual level				
		-2	-1	0	+1	+2
X <sub>1</sub>	Temperature	20	25	30	35	40
X <sub>2</sub>	Nutrient solution pH	2	4	6	8	10
X <sub>3</sub>	Moisture content	65	70	75	80	85

Table 3. Regression analysis for the model and ANOVA results at 48 and 72 h of fermentation

	Citric acid production					
	48 hr			72 h		
	Sum of Squares	F value	P level	Sum of Squares	F value	P level
Model	5913.75	32.06	<0.0001	2916.84	47.25	<0.0001
X <sub>1</sub>	7.14	0.35	0.5695	158.48	2.76	0.1319
X <sub>2</sub>	1536.24	74.94	<0.0001	4058.72	68.99	<0.0001
X <sub>3</sub>	408.98	19.95	0.0016	5205.06	84.32	<0.0001
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	252.15	12.30	0.0066	5700.91	92.35	<0.0001
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	247.86	8.13	0.0463*	3.57	0.058	0.8152
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	220.73	10.77	0.0095	639.95	10.37	0.0105
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	177.36	8.65	0.0164	429.63	6.96	0.0270
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1853.95	90.44	<0.0001	1328.42	21.52	0.0012
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	568.42	27.78	0.0005	77.40	1.25	0.2918

X<sub>1</sub>-incubation temperature; X<sub>2</sub>-nutrient solution pH; X<sub>3</sub>-initial moisture content

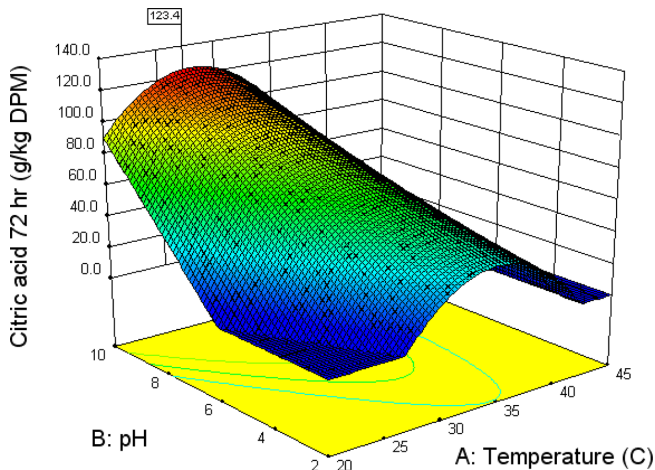


Fig. 7. Predicted optimum fermentation conditions with constrains of maximum citric acid production at 48 and 72 hrs.

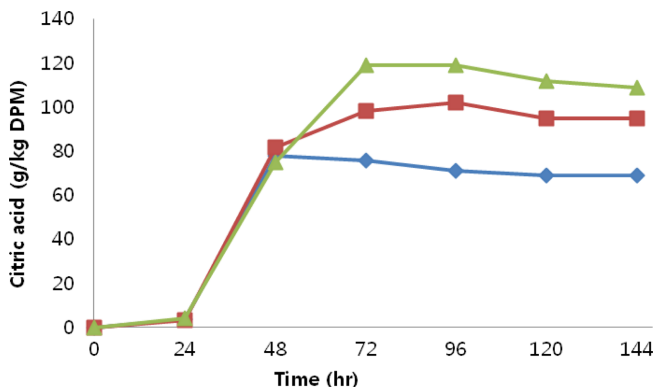


Fig. 8. Time course behavior of citric acid production by *A. niger* NRRL 567 using control condition (80% moisture content, nutrient solution pH of 4.3, 30 °C,  $1.0 \times 10^6$  spores/ml), OFAT optimized condition (80%, pH 7.1, 30 °C,  $4.0 \times 10^6$  spores/ml) and response surface methodology optimized condition (75.1%, pH 9.9, 30 °C,  $6.0 \times 10^6$  spores/ml). The data shown is averaged from duplicate tests; (◆: control, ■: OFAT optimized, ▲: RSM optimized).

최대 구연산 생산 농도는 95.8 g/kg DPM를 얻을 수 있었다. 반면, 반응표면 분석법을 이용한 최적화의 경우, 배양 온도 26.5 °C, pH 9.9와

수분 함량 75.1%, 접종 농도  $6.0 \times 10^6$  spores/ml 에서 최대 구연산 생산인 123.4 g/kg DPM가 예측되었다. 실험에 사용된 최적화 결과의 유효성과 재현성을 확인하기 위해 *A. niger* NRRL 567을 이용해 발효를 수행하였다. 단일변수 최적화에서는 각 개별 최적화에서 확보된 최적화 조건을 적용하였으며 반응표면 분석법을 이용한 최적화의 경우는 반응표면 방정식을 이용하여 예측된 최적 조건을 적용하여 비교 실험을 수행하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이, 발효 72시간에 있어 단일변수 최적화와 반응표면 분석법의 최적 조건을 적용했을 때, 각각 98.2와 118.8 g/kg DPM를 얻을 수 있었다. 이는 반응표면 분석법을 이용한 구연산 예측치인 123.4 g/kg DPM과 매우 근접한 수치로 반응표면 분석법을 이용한 조건 최적화 및 최대농도 예측이 유효함을 보여준다 하겠다.

#### 4. 결 론

기존의 최적화 방법인 단일변수 최적화 방법과 통계학적 최적화 방법인 반응표면 분석법을 순차적으로 이용하여 고체 발효법을 이용한 구연산 생산을 효과적으로 증대시킬 수 있었다. 1차 최적화로 단일변수 최적화 방법을 적용하여 각 발효조건을 개별적으로 최적화를 수행하였다. 구연산 생산농도는 98.2 g/kg DPM로 최적화 이전 수준인 75.8 g/kg DPM에 비해 1.3배 증가함을 확인할 수 있었다. 1차 최적화에서 얻은 최적 조건을 기반으로 배양 조건의 범위를 확장하여 반응표면 분석법을 적용하여 최적화를 수행하였다. 구연산 생산량은 118.8 g/kg DPM로 최적화 이전 수준과 비교하여 구연산 생산이 1.6배 증가함을 보였다. 통계학적 최적화 기법인 반응표면 분석법을 이용하여 구연산 생산에 유의한 효과를 주는 독립변수를 규명할 수 있었으며, 이 독립변수를 통제하여 구연산 생산을 향상시킬 수 있었다. 이러한 순차적 최적화를 통해 구연산 생산농도 증대, 고체발효 시간 감소와 영양성분 사용 절감 등의 효과가 기대되며 단일변수 최적화와 반응표면 분석법 최적화의 순차적 사용을 통해 보다 효과적인 발효 조건 최적화의 방법을 제시하였다.

#### 참고문헌

1. Haq, I., Khurshid, S., Ali, K., Ashraf, H., Qadeer, M. A. and Rajoka, I., "Mutation of *Aspergillus niger* for Hyperproduction

- of Citric Acid from Black Strap Molasses," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 35(2001).
2. Pazouki, M., Felse, P. A., Sinha, J. and Panda, T., "Comparative Studies on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* and *Candida Lipolytica* Using Molasses and Glucose," *Bioprocess Eng.*, **22**, 353(2000).
  3. Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R., Pandey, A. and Lebeault, J. M., "Solid-state Fermentation for the Synthesis of Citric Acid by *Aspergillus niger*," *Bioresour. Technol.*, **74**, 175(2000).
  4. Hang, Y. D., Luh, B. S. and Woodams, E. E., "Microbial Production of Citric Acid by Solid State Fermentation of Kiwifruit Peel," *J. Food Sci.*, **52**, 226, 175(1987).
  5. Alvarez-Vasquez, F., Gonzalez-Alco, C. and Torres, N. V., "Metabolism of Citric Acid Production by *Aspergillus niger*," *Biotechnol. Bioeng.*, **70**, 82(2000).
  6. Wasay, S. A., Barrington, S. F. and Tokunaga, S., "Efficiency of GAC Treatment of Leachate from Soil Washing Process," *Water Air Soil Pollut.*, **116**, 449(1999).
  7. Barrington, S., Kim, J. S., Wang, L. and Kim, J. W., "Optimization of Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 567 Grown in a Column Bioreactor," *Korean J. Chem. Eng.*, **26**, 422 (2008).
  8. Xu, D. B., Kubicek, C. P. and Roch, M., "Comparison of Factors Influencing Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Grown in Submerged Culture and on Filter Paper," *App. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 444(1989).
  9. Prado, F. C., Vandenberghe, L. P. and Soccol, C. R., "Citric Acid Production by Solid-state Fermentation on a Semi-pilot Scale Using Different Percentages of Treated Cassava Bagasse," *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **48**, 29(2005).
  10. Kim, J. W. and Barrington, S., "Response Surface Optimization of Medium Components for Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 567 Grown in Peat Moss," *Bioresour. Technol.*, **99**, 368(2008).
  11. Battaglin, R. A., Huergo, M., Pilodof, A. M. R. and Bartholomai, G. B., "Culture Requirements for the Production of Protease by *Aspergillus Oryzae* in Solid States Fermentation," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 292(1991).
  12. Wen, Z. Y. and Chen, F., "Application of Statistically-based Experimental Designs for the Optimization of Eicosapentaenoic Acid Production by the Diatom *Nitzschia laevis*," *Biotechnol. Bioeng.*, **75**, 159(2001).
  13. Pintado, J., Torrado, A., González, M. P. and Murado, M. A., "Optimization of Nutrient Concentration for Citric Acid Production by Solid-state Culture of *Aspergillus niger* on Polyurethane Foams," *Enzym. Microb. Tech.*, **23**, 149(1998).
  14. Ellaiah, P., Srinivasulu, B. and Adinarayana, K., "Optimization Studies on Neomycin Production by Mutant Strain *Streptomyces Marinensis* in Solid State Fermentation," *Process Biochem.*, **30**, 529(2004).
  15. Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M. and Tyagi, R. D., "Enhanced Solid-state Citric Acid Bio-production Using Apple Pomace Waste Through Surface Response Methodology," *J. Appl. Microbiol.*, **110**, 1045(2011).
  16. Roukas, T. J., "Citric and Gluconic Acid Production from Fig by *Aspergillus niger* Using Solid-state Fermentation," *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 298(2000).
  17. Javed, S., Asgher, M., Sheikh, M. A., Nawaz, H. and Jamil, A., *Bioresour. Technol.*, **74**, 175(2000).
  18. Mahadik, N. D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M. and Gokhale, D. V., "Production of Acidic Lipase by Culture Requirements for the Production of Protease by *Aspergillus niger* NCIM 1207 in Solid State Fermentation," *Process Biochem.*, **38**, 715(2002).
  19. Kumar, D., Verma, R. and Bhalla, T. C., "Citric Acid Production by *Aspergillus niger* van. Tieghem MTCC 281 Using Waste Apple Pomace as a Substrate," *J. Food Sci Technol*, **47**, 458(2010).
  20. Nampoothiri, M. K., Baiju, T. V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G. and Pandey, A., *Process Biochem.*, **11**, 1583(2003).
  21. Bari, N., Alam, Z., Muyibi, S. A., Jamal, P. and Mamuna, A., *Bioresour. Technol.*, **100**, 3113(2009).
  22. Tengerdy, Solid state fermentation, R. P., *Trends Biotechnol.*, **3**, 96(1985).
  23. Reid, I. D., "Solid State Fermentation for Biological Delignification," *Enz. Microbiol. Technol.*, **11**, 786(1989).
  24. Rezaei, P., Darzi, G., Shafaghath, H., Optimization of the Fermentation Condition and Partial Characterization for Acido-thermophilic  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger* NCIM 548," *Korean J. Chem. Eng.*, **27**, 919(2010).
  25. Kamini, N. R., Mala, J. G. S., Puvanakrishnan, R., "Lipase Production from *Aspergillus niger*, by Solid-state Fermentation Using Gingelly Oil Cake," *Process. Biochem.*, **28**, 505(1998).
  26. Fawole, O. B. and Odunfa, "Some Factors Affecting Production of Pectin Enzymes by *Aspergillus niger*," S.A., *Int. Biodeterior.*, **51**, 223(2003).
  27. Goes, A. P. and Sheppard, J. D., "Effect of Surfactant on  $\alpha$ -amylase Production in a Solid Substrate Fermentation Process," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **73**, 709(1999).
  28. Hang, Y. D. and Woodams, E. E., "Production of Citric Acid from Corncobs by *Aspergillus niger*," *Bioresour. Technol.*, **65**, 251(1998).
  29. Kim, K. S. and Kim, J. S., "Optimization of Ammonia Percolation Process for Ethanol Production from *Miscanthus Sinensis*," *Korean Chem. Eng. Res. (HWAHAK KONGHAK)*, **48**, 704(2010).
  30. Kim, J. W., Barrington, S., Sheppard, J. and Lee, B., "Nutrient Optimization for the Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* NRRL 567 Grown on Peat Moss Enriched with Glucose," *Process Biochem.*, **41**, 1253(2006).