

*Aspergillus niger*를 이용한 유청으로부터 구연산의 생산에 있어서 온도와 pH의 영향

이정훈 · 윤현식*

인하대학교 공과대학 생물공학과

Effects of Temperature and pH on the Production of Citric Acid from Cheese Whey by *Aspergillus niger*

Jung-Hoon Lee and Hyun Shik Yun*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT: Effects of temperature and initial pH of the medium on production of citric acid from cheese whey permeate by *Aspergillus niger* were investigated. *A. niger* was cultivated at four different temperatures (27, 30, 33, 36°C) and four different pHs (2, 3, 4, 5) for 15 days. During the fermentation the concentrations of lactose and citric acid in the culture broth were measured. The maximum production of citric acid which was 33.9 g/l (68.26% yield based on lactose utilized) was obtained at 33°C and pH 3. The production of citric acid was not much affected by shaking speed. However, the shaking speed was found to influence the form of pellets during cell growth.

KEYWORDS: Citric acid, Cheese whey, *Aspergillus niger*

구연산(citric acid 또는 2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid)은 TCA 회로의 중간산물로서 동물과 식물 군에서도 무독성임이 확인되어 청량음료의 산미료, 잼, 젤리 제조시의 응고촉진제, 그리고 다른 식품 및 의약품 산업에 널리 이용되고 있다. 균류인 *Aspergillus niger*로부터 구연산 생산에 대한 연구는 오래 전부터 수행되어왔으며 사탕무우당밀을 기질로 한 고체배양법과 사탕무우 또는 사탕수수당밀, 포도당, 자당을 기질로 한 액체배양법이 가장 실용화되어 있다. Citric acid의 활용분야가 넓어짐에 따라 기존의 화학적 합성에 의해 생산되던 citric acid는 점차 생물학적 생산으로 발전되어 가고 있는데, 현재 citric acid의 대부분은 식품, 과자 및 음료(75%), 의약품(10%), 산업용(15%)에 널리 이용되고 있다.

유청(whey)은 치즈제조 시에 생기는 부산물로서 4~5%의 유당(lactose)을 함유하고 있다. 유청은 93%의 물, 0.7%의 단백질, 0.3%의 지방, 4~5%의 유당, 0.5~0.6%의 염으로 이루어져 있으며 우유를 생산하는 동물에 따라 그 구성에 약간의 차이가 있다. 유청중에는 우유의 영양분의 절반이상이 남아있으며 유당은 탄소원으로, 단백질은 질소원으로 사용될 수 있기 때문에 유청은 미생물을 배양하는데 양질의 배지로 사용될 수 있다. 유청이 처리되지 않고 유출될 경우 높은 화학적 산소요구량 때문에 주위환경에 심각한 환경오염 문제를 일으키게 된다(Mawson, 1994). 이와 같은 문제는 치즈생산량이 증가함에 따라 유청의 생산량이 증가하고, 공장

에서 배출되는 물질에 대한 행정적인 규제가 강화됨에 따라 점점 큰 문제가 되어가고 있다. 지금까지 유청을 이용하여 유용한 생산물을 만드는 연구는 주로 에탄올 생산(Janssens 등, 1984; Moulin 등, 1980; Gawel와 Kosikowski, 1978), 단세포 단백질 생산(Amundson, 1967; Wasserman, 1960), 유당분해효소(lactase) 생산(Barbosa 등, 1985; Rao와 Dutta, 1977)에 이루어져 왔다.

Citric acid 생산에 있어서는 값싸고 수율이 좋은 탄소원의 이용이 중요한 데 지금까지의 연구에는 당밀, 전분, glucose syrups 등이 사용되어 왔으며 최근에는 환경오염 문제의 중요성이 인식되면서 cheese제조시 부산물인 whey에 관심을 갖기 시작하였다. Whey를 한외여과법(ultrafiltration)에 의해 deproteinization시킬 경우 영양분의 약 96%를 처리할 수 있어 유청 처리의 새로운 방법으로 그 가능성이 있지만 deproteinized whey는 처리 후에도 원래 lactose양(40~50%)의 97%, 유기산, 저분자량의 단백질, 비타민(thiamine, niacin, panthotenic acid, riboflavin, folic acid, vitamin B₁₂), 무기물을 포함한다(Hargrove 등, 1976).

본 논문에서는 *Aspergillus niger*를 이용한 구연산 생산시 영향을 주는 온도와 초기 pH의 영향과 pellet 형성에 영향을 주는 shaking speed에 대하여 고찰하였다.

재료 및 방법

균주

균주로는 citric acid를 생산하는 *Aspergillus niger* 6144

*Corresponding author

(KCTC)를 사용하였으며, spore inoculum은 potato dextrose agar slant에서 30°C로 5일 동안 배양한 후 멸균된 증류수 10 ml에 Tween 80(0.05%)을 가한 후 충분히 섞어 준비하였다.

배지

Bovine milk로부터 spray drying에 의해 얻어진 whey powder(lactose 65%, Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 증류수에 녹여 90°C에서 15분간 가열하여 단백질을 denaturation시켰다. Whey powder를 이용할 경우 보관이 용이하며, 필요시 적당량을 준비하여 사용할 수 있는 이점이 있다. 가열 처리된 용액을 m.w. cut off가 3,000인 Spiral-wound ultrafiltration system(Amicon CH2PRS, U.S.A.)을 이용하여 ultrafiltration한 후, lactose 농도를 일반적인 whey의 lactose 농도인 50 g/l가 되도록 물로 희석시켜 whey를 재구성하였으며 pH는 각각 2, 3, 4, 5가 되도록 lactic acid를 가하여 조절하였다.

배양

50 ml의 배지가 포함된 250 ml Erlenmeyer flask에 surfactant로 500 μ l의 10% Tween 80을 첨가한 후 121°C에서 15분간 멸균하였다. 배지를 식힌 후 flask에 spore inoculum을 각각 1 ml씩 접종하여 shaking incubator(Vision Scientific Co., Korea)에서 15일간 배양 하였다.

분석

48시간마다 각각의 flask에서 1 ml씩 sampling하여 filtering한 후 HPLC(LC-10A, Shimadzu, Japan)로 분석하였다. Column은 Aminex HPX-87H(Bio-rad, U.S.A.)를 사용하였으며 column 온도는 45°C로, flow rate는 0.4 ml/min으로 설정하였다. HPLC의 용리액으로는 0.005 M H₂SO₄를 사용하였다. Lactose의 소비량은 RI detector(RID-10A, Shimadzu, Japan)로, citric acid의 생산량은 210 nm에서 UV detector(SPD-10A, Shimadzu, Japan)로 분석하였다.

결과 및 고찰

*Aspergillus niger*는 whey 내의 lactose를 탄소원으로 사용하여 성장하였으며 citric acid의 생산은 cell의 성장과 동시에 이루어졌다. 또 citric acid 생산량은 배양 후 11~13일에 가장 높은 수치를 나타내었으며 이후 citric acid의 농도는 점차적으로 감소하였다(Fig. 1). 배지내의 주 탄소원인 lactose의 농도가 매우 낮아지면서 citric acid의 농도가 감소하기 시작하며 이는 citric acid가 대사과정에 사용되는 것으로 사료된다(Kontopidis 등, 1995). Shaking speed의 영향을 알아보기 위해 150, 200, 250 rpm에서 각각 실험한 결과, shaking speed는 배지 내에서 pellet 형성 형태에 영향을 주었으나 citric acid 생산량에는 크게 영향을 주지 않았다. 150 rpm에서는 pellet들이 불규칙하게 모여서 뭉쳐 자랐으며 200 rpm 이상에서는 pellet 형태를 이루었고 200 rpm 보

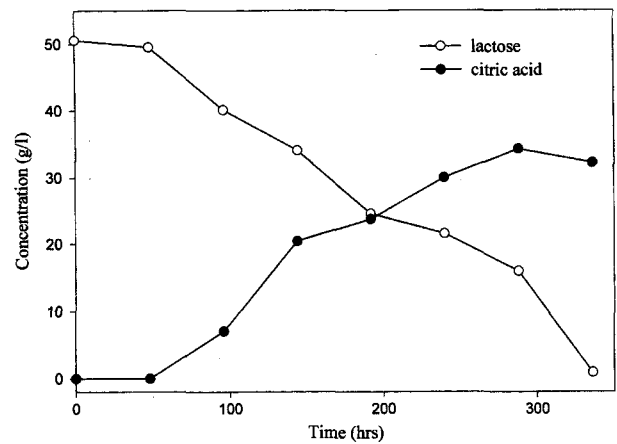


Fig. 1. Time course citric acid fermentation by *Aspergillus niger* 6144(KCTC).

다 250 rpm에서 pellet이 좀 더 작게 형성되었다. 이는 shaking speed가 pellet의 형성에 영향을 미치는 것을 나타내며 agitation이 강할수록 pellet이 작아진다는 Elmayergi (1973)의 결과와 일치하였다.

pH 2에서는 *A. niger*가 전혀 성장하지 않았으며 pellet의 형태는 주로 pH 4와 5에서 compact한 형태를 나타내었고, pH 3에서는 다른 pH에서 보다 작고 fluffy한 형태를 나타내었고 그 수도 많았다. pH는 citric acid의 생산과 pellet의 형성에 크게 영향을 미치는 것으로 나타났으며 pH가 높을수록(pH 5) pellet의 형태가 뚜렷하였다. pH와 온도가 citric acid에 미치는 영향을 분석한 결과 온도는 33°C에서 그리고 pH는 3에서 가장 많은 양의 citric acid가 생산되었다(Fig. 2). 이는 pH 3에서 pellet이 작고 fluffy한 형태이기 때문에 pellet 안쪽까지 산소 및 영양분의 투과가 용이하며, pH 5에서 형성되는 pellet 보다 크기가 작으면서 그 수가 많아 citric acid의 생산 수율을 높이는 데 기여한 것으로 사료된다. 이때 HPLC로 분석한 결과 TCA 회로상의 다른 유기산(oxalic acid, succinic acid, malic acid)의 형성은 거의 측정되지 않았다. 본 실험결과 얻어진 citric acid 생산량은 citric

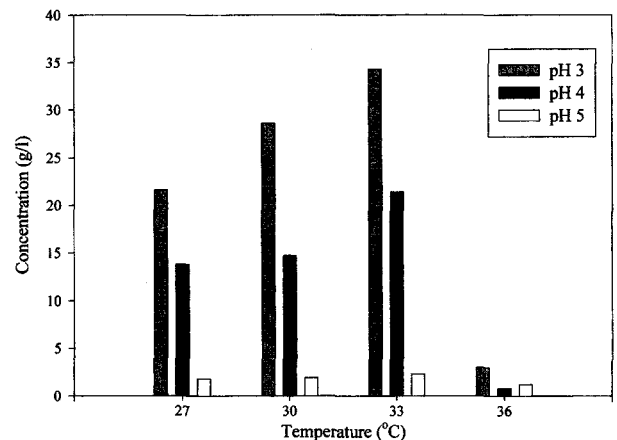


Fig. 2. Production of citric acid at different temperatures and pHs.

acid 생산에 있어서 원료물질로 많이 사용되는 당밀을 이용해서 얻어지는 citric acid 양(100 g/l, 수율 80%)만큼 크지는 않았으나(Lockwood, 1975), 지금까지 발표된 whey를 이용하여 생산된 citric acid 생산량보다는 많은 양을 나타내었다(Chen 등, 1990; El-Samragy 등, 1996; Hossain 등 1983). Kristansen과 Sinclair(1978)에 의하면 nitrogen-limiting 조건이 citric acid 생산에 좋은 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 본 실험에서 사용된 ultrafiltration membrane의 m.w. cut off가 3,000으로 다른 논문에서 deproteination시킨 경우보다 많은 양의 protein이 whey로부터 제거되어 높은 수율의 citric acid를 생산하는데 기여한 것으로 사료된다.

날로 크게 늘어나는 유제품 특히 치즈의 생산 증가와 함께 부산물로 생산되는 cheese whey의 양도 크게 늘어나고 있으며, whey를 배지로 하여 여러 유용한 물질을 생산하는 연구들이 환경오염 문제의 해결과 더불어 중요한 역할을 하리라 사료된다. 치즈생산과정에서 부산물로 얻어지는 유청을 미생물 발효의 원료물질로 잘 이용할 경우 유가공 공장의 폐기물을 처리함과 동시에 폐기물의 효과적인 이용을 이룰 수 있다는 이점이 있다.

적 요

Cheese 제조시 부산물로 생성되는 whey를 배지로 사용하여 *Aspergillus niger*를 이용하여 citric acid를 생산하는데 영향을 미치는 여러 가지 요인 중 중요한 요인인 온도와 pH의 영향에 대하여 고찰하였다. 15일간 27, 30, 33, 36°C와 pH 2, 3, 4, 5에서 각각 배양하면서 소비된 lactose의 양과 생산된 citric acid의 양을 측정하였다. 생산된 citric acid의 최대 농도는 33.9 g/l(구연산 생산에 쓰여진 유당을 기준으로 할 때 68.26%)이었으며, shaking speed는 citric acid 생산에 직접 영향을 주기보다는 pellet 형성시 그 형태에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 배양 온도가 33°C, pH는 3일 때 가장 많은 양의 citric acid가 생산되었다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 인하대학교 교내연구비의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Amundson, C. H. 1967. Increasing protein content of whey.

- Am. Dairy Rev.* **29**(7): 22-23, 96-99.
- Barbosa, M. F. S., Silva, D. O., Pinheiro, A. J. R., Guimaraes, W. V. and Borges, A. C. 1985. Production of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, grown in cheese whey. *J. Dairy Sci.* **68**: 1618-1623.
- Chen, A., Liao, P. H. and Lo, K. V. 1990. Citric acid production from cheese whey by *Aspergillus niger*. *Can. Agric. Eng.* **32**: 329-330.
- El-Samragy, Y. A., Khorshid, M. A., Foda, M. I. and Shehata, A. E. 1996. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*. *Inter. J. Food Microbiol.* **29**: 417-421.
- Gawel, J. and Kosikowski, F. V. 1978. Improving alcohol fermentation in concentrated ultrafiltration permeates of cottage cheese whey. *J. Food Sci.* **43**: 1717-1719.
- Hargrove, R. E., McDonough, F. E., LaCroix, D. E. and Alford, J. A. 1976. Production and properties of deproteinized whey powders. *J. Dairy Sci.* **59**: 25-33.
- Hossain, M., Brooks, J. D. and Maddox, I. S. 1983. Production of citric acid from whey permeate by fermentation using *Aspergillus niger*. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **18**: 161-168.
- Janssens, J. H., Bernard, A. and Bailey, R. B. 1984. Ethanol from whey: Continuous fermentation with cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 1-5.
- Kontopidis, G., Matthey, M. and Kristiansen, B. 1995. Citrate transport during the citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1101-1106.
- Kristiansen, B. and Sinclair, C. G. 1978. Production of citric acid in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **20**: 1711-1722.
- Lockwood, L. B. 1975. Organic acid production. Pp 140-157. In: Smith, J. E. and Berry, D. R. Eds. The filamentous fungi. Edward Arnold Ltd. London.
- Mawson, A. J. 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Biores. Technol.* **47**: 195-203.
- Moulin, G., Guillaume, M. and Galzy, P. 1980. Alcohol production by yeast in whey ultrafiltrate. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 1277-1281.
- Rao, M. V. and Dutta, S. M. 1977. Production of β -D-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 185-188.
- Wasserman, A. E. 1960. Whey utilization. II. Oxygen requirements of *Saccharomyces fragilis* growing in whey medium. *Appl. Microbiol.* **8**: 291-297.