

Calcium Alginate로 고정화된 *Acetobacter aceti*에 의한 식초생산

유 익 제 · 박 기 문 · *유 언 우 · 최 춘 언
오투기 중앙연구소
*아주대학교 공과대학 생물공학과

Vinegar Production by *Acetobacter aceti*
Cell Immobilized in Calcium Alginate

Yik Je Yoo, Ki Mun Park and Yeon Woo Ryu*, Chun Un Choi
Ottogi Research Center, Ottogi Food Co.,
*Department of Biotechnology, Ajou University

ABSTRACT

This study is to investigate for obtaining the operating conditions of continuous vinegar production using fluidized bed reactor by *Acetobacter aceti* cell immobilized in Ca-alginate gel.

The optimum conditions obtaining by batch fermentation using fluidized bed reactor were as follows: The fermentation temperature and aeration rate were 30°C and 1.0VVM and the initial concentration of ethanol and acetic acid in medium were 33 g / l and 27 g / l, respectively. The amount of bead used was 25%(w/v). The overall acetic acid productivities of batch fermentations by free cell and immobilized cell were 0.31 g / l-hr and 0.48 g / l-hr, respectively, at the final acetic acid concentration of 50 g / l. In the continuous vinegar production using fluidized bed reactor by immobilized cell under optimum conditions, it was possible to produce 23 g / l acetic acid continuously up to 90 days with maximum acetic acid productivity of 2.76 g / l-hr at dilution rate 0.12 hr⁻¹.

서 론

최근들어 초산생산성을 높이고 고농도의 초산을 얻기 위하여 균체고정화 방법에 의한 식초생산 연구가 다양하게 이루어지고 있다(1, 2). 균체고정화 방법을 이용한 초산발효의 장점으로는 높은 균체농도를 얻을 수 있고 높은 dilution rate에서 연속적인 발효가 가능한 점 이외의 생성물의 분리가 쉽고 product의 생산성이 높으며 미생물의 안정성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 미생물을 고정화 시킴으로써 발효시 확산저항이 커지며 고정화로 인한 대사작용의 변화가능성 및 균체 고정화시 담체의 종류에 따라서는 많은 비용이 든다는 단점을 가지고 있다. 지금까지 연구된 균체 고정화 방법

에 의한 초산발효에서 Ghommidh 등(3)은 cordierite monolith 에 초산균을 고정화하여 초산생산성의 향상을 시도하였으며 그 결과 초산 생산성은 심부발효에 비해 향상되었으나 초산농도는 20~34 g / l로서 낮은 수준이었다. 또한 Kennedy 등(4)은 hydrous titanium oxide 에 초산균을 흡착, 고정화시켜 tower형 fermentor에 충전한 후 연속적인 초산발효를 약 3개월간 안정적으로 수행하였으며 dilution rate 0.08hr⁻¹ 조건하에서 발효시 초산생산성도 높았고 발효 후 초산농도는 69 g / l 정도로 높은 수준이었다. 이 외에도 Nanba 등(5, 6)은 hollow fibres에 초산균을 고정화시켜 연속적인 초산발효를 실시하였으며 Okuhara(7)는 polypropylene fiber를 이용하였고 Osuga 등(8)과 Mori 등(9)은 K-carrageenan gel에 초산균을

고정화하여 연속적인 초산발효를 실시하였다. 이와같이 초산균을 고정화시킨 담체의 종류에 따라 균체의 활성도와 발효공정 효율 등에 상당한 영향을 주게되므로 여러가지 면을 고려하여 고정화 담체를 선정하여야 한다. 즉 담체의 선택기준으로서는 균체의 활성도가 높아야 하고 담체로 쓰이는 물질을 다량으로 구입할 수 있어야 한다는 점 이외에 고정화시 비용이 적고 scale up 시키기 쉬워야 하며 기계적인 강도가 높아야 한다는 점이다.

따라서 본 연구에서는 이러한 담체의 조건을 충족시키면서 균체 및 효소의 고정화 담체로 많이 이용되고 있는 sodium alginate를 사용하여 초산균을 고정화한 후 반응기를 이용한 회분식 발효를 통하여 발효최적조건들을 검토하였고, 또한 연속발효에 의한 식초생산 가능성에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지조성

본 연구에 사용한 균주는 오투기식품 중앙연구소에 보관중인 *Acetobacter aceti* OLS-130을 사용하였다.

균주의 보존은 glucose 30 g, yeast extract 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2 g, acetic acid(빙초산) 20ml, ethanol(95%) 50ml, agar 20 g 에 증류수 1 l 을 첨가하여 제조한 slant 에 보관하였고, 1개월마다 새로운 배지에 옮겨주었다.

접종용 균주배지는 glucose 1.1 g, yeast extract 0.2 g, peptone 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 0.14 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, acetic acid(빙초산) 21 g, ethanol(95%) 42 g 에 증류수 1 l 를 첨가하여 제조하였다. 초산발효 배지는 glucose 2.2 g, yeast extract 0.2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 0.14 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, seed vinegar (acidity 10%) 270ml, ethanol(95%) 35ml 에 증류수 69 5ml를 첨가하여 제조하였다. 배지제조시 휘발성 물질인 acetic acid와 ethanol은 배지 멸균후 60℃로 냉각한 다음 첨가하였다.

초산발효 방법

접종용 균주의 배양은 300ml baffle flask에 배지 50 ml를 넣고 멸균한 후 백금니로 균을 접종하여 회전식 진탕배양기(Lab-line Instruments Inc., 미국)에서 200rpm으로 진탕하면서 30℃에서 48시간 배양하였다. 초산균 고정화를 위한 균체의 배양은 2 l -jar fermentor (LH-Fermentation LTD., 영국)에 초산발효용 배지 1 l 를 넣고 멸균한 후 접종용 배양액 50ml를 넣고 500rpm으로 진탕하고, 1.0VVM으로 통기하면서 30℃에서 48시간

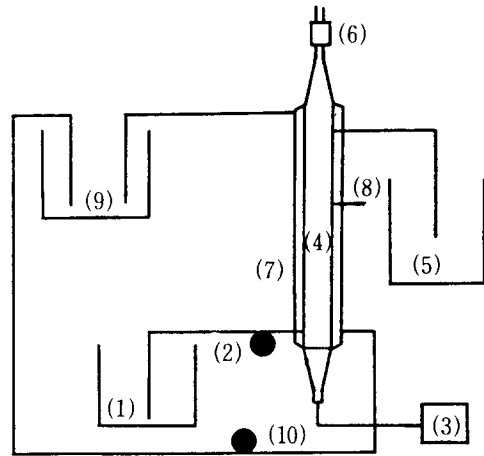


Fig. 1. Schematic diagram of fluidized bed reactor.

- (1) : Reservoir
- (2) : Peristaltic pump
- (3) : Air pump
- (4) : Bioreactor
- (5) : Effluent reservoir
- (6) : Condenser
- (7) : Water jacket
- (8) : Sampling port
- (9) : Water bath
- (10) : Water circulation pump

배양하였다.

초산발효는 Fig. 1과 같은 유동층 반응기를 사용하였다. 발효기의 구조는 높이 150cm, 직경 6cm인 경질초자로 제작하였으며 내부 발효온도를 조절하기 위하여 8cm인 2중관을 설치하여 온수를 순환시켰다. 발효기 하단 부분에는 glass filter를 설치하여 공기방울의 크기를 줄여 배지내에 용존산소량 증가와 bead가 모이는 것을 방지하였다. 유동층 반응기에서의 working volume은 배지와 bead부피의 합이고, 통기량(VVM)은 1분당 단위 working volume당 통과된 단위 공기의 부피로 정의하였다.

균체 고정화

생균수의 농도가 2.0×10^8 cell / ml인 대수증식기 말기의 균체 배양액과 4% sodium alginate 용액을 동일한 양으로 혼합한 후, 혼합용액을 0.1M CaCl_2 용액에 사출시켜 초산균이 고정화된 직경 3mm 정도의 Ca-alginate bead를

제조하였다. 제조된 bead 1g은 거의 1ml였다.

분석 방법

배양액의 초산농도 측정은 시료 5ml를 증류수로 희석하고 1%의 phenolphthalein 지시약을 첨가한 후 1/6N NaOH용액으로 적정한 다음 acetic acid로 환산하여 표시하였다(10).

배양액의 ethanol 정량은 Osuga 등(8)의 방법에 따라 시료 20ml를 증류수로 희석하여 100ml로 하고 이것을 증류하여 50ml로 정량한 후 21.7℃로 향온 유지된 향온 조내에서 immersion refractometer(Prism L, nd=1.3254~1.3664, Carl Zeiss)로 굴절율을 측정하여 알콜농도에 따른 refractometer의 표준값으로부터 알콜농도를 계산하였다.

생균수의 측정은 초산균이 고정화된 bead를 약 5g 취하여 멸균 생리식염수로 2회 세척하고 Homogenizer로 균질화한 후 일정비율로 희석하고 균주보관용 배지 상에 도말하여 30℃에서 48시간 배양후 나타난 colony 수를 측정하여 생균수로 하였다.

결과 및 고찰

회분식 발효에 의한 초산 생산

유동층 반응기에 *Acetobacter aceti* OLS-130 free cell 을 접종한 후 30℃에서 1.0VVM으로 통기하면서 초산발

효를 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. 발효 20시간까지 산도 및 생균수의 변화는 거의 없었으며 20시간 이후부터 산도 및 생균수의 증가가 관찰되었다. 발효 80시간 후 초산농도는 53g/l 생균수는 2.0×10^8 cell/ml로 최고수준을 유지하였을 때 기질인 ethanol농도는 2g/l 이하 이었고 최대비성장 속도(μ_{max})는 $0.069hr^{-1}$ 이었으며 overall productivity는 $0.31g/l-hr$ 로서 낮은 수준이었다.

고정화 균체를 이용한 발효 최적 조건

초산 발효에서 초산균의 ethanol과 초산에 대한 내성은 발효조건과 사용균주 특성 등에 의해 크게 달라지는 것으로 알려져 있으며 고정화 초산균을 이용한 초산 발효에서 높은 초산생성속도로 고농도의 초산을 생산하면서 안정된 발효상태를 유지하기 위한 대표적인 발효 조건들로서는 초산균 고정화담체의 종류, 발효기내 고정화 초산균 bead양, 통기량, 고정화된 초산균의 열안정성, 발효배지의 조성, 배양조건 및 균주의 유전적 특성 등이 있다(1, 2). 따라서 고정화 초산균을 이용한 초산 발효에서 초산의 생산성에 미치는 여러가지 영향들에 대한 최적화를 위하여 유동층 반응기를 이용한 회분식 발효를 실시하였다.

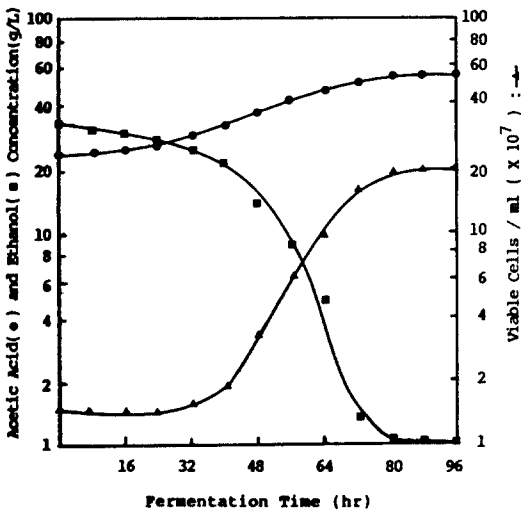


Fig. 2. Change of acetic acid, ethanol concentration and cell growth in free cell culture during the fermentation time.

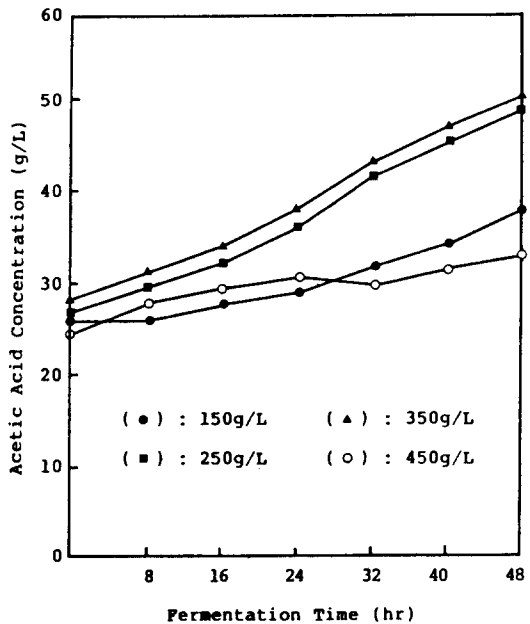


Fig. 3. Acetic acid production in terms of the amount of bead.

Bead내에 포함될 수 있는 초산균의 수는 bead당 최대 약 2.0×10^6 cells로 일정하고 발효시 수용액 중의 균수는 10^6 cells/ml이기 때문에 초산의 최적 생성을 위한 초산균수는 반응기내의 bead 사용량으로 조절되어야 한다. 고정화 초산균을 이용한 초산발효시 bead의 사용량에 따른 초산생성 효과를 비교하기 위하여 working volume 1 l 당 bead 사용량을 150 g, 250 g, 350 g, 450 g 으로 하고 30°C에서 0.1VVM으로 통기하면서 발효시간에 따른 초산의 생산량을 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 실험결과 150 g의 bead를 사용한 경우 발효 48시간에는 초산농도가 38 g/l로서 낮은 수준이었으나 1 l 당 250 g의 bead 사용시에 48시간이 경과했을 때 50 g/l 이상의 초산이 생산되었으며, 350 g의 bead를 사용했을 경우 bead 250 g 사용시와 동일한 초산생성을 나타내었다. 반면 450 g의 bead 사용시에는 초산 생성속도는 오히려 감소하였는데, 이는 관찰된 결과로서 과량의 bead 사용에 따라 bead의 유동화정도 감소와 상호간의 충돌 및 마찰에 의해 bead의 파괴속도가 빨라져 배양액내의 점도증가로 인한 용존 산소량이 감소하기 때문으로 사료된다. 따라서 반응기내의 bead 사용량은 1 l 당 250~350 g 정도가 초산생성을 위한 최적조건이었다.

초산발효시 배양 최적온도는 발효방법 및 조건에 따라 submerged culture의 경우에는 28~30°C, surface culture의 경우에는 이보다 약간 높은 30~34°C로 알려져 있다. Submerged culture의 경우 비교적 초산농도가 낮은 발효초기에 비하여 비교적 초산농도가 높은 발효말기에는 발효온도를 저하시킴으로써 초산생성속도를 떨어뜨리지 않고 고산도까지 안정된 발효를 실시할 수 있는 연구결과가 보고된 바 있다(11).

따라서 고정화된 초산균의 발효온도에 따른 초산생성 속도 변화를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 즉 35°C에서는 발효 2일만에 빠른속도로 초산이 생성되어 약 50 g/l 까지 도달하였으나, 그 이후로는 초산농도가 감소하였으며 30°C에서는 발효 3일까지 초산 생성이 증가하여 약 52 g/l에 도달한 후 약간씩 감소하였다. 반면 20°C와 25°C에서는 발효 6일까지 매우 느리게 초산이 생성되어 각각 28 g/l, 41 g/l의 초산농도를 나타내었다. 결국 초산생성 속도는 온도증가에 따라 30°C까지 증가하였는데, 이는 온도의 증가에 따라 균주의 성장속도 및 초산생성 속도가 증가하였기 때문인 것으로 추정할 수 있다. 따라서 발효온도에 따라 bead내의 생균수를 측정할 결과, Fig. 5와 같이 생균수 증가경향은 온도에 따른 초산생성 형태와 거의 동일하였다. 즉 발효온도에 따른 초산균 고정화 bead 1ml당 생균수 증가는 발효온도 증가에 따라 30°C까지 증가하였고, 35°C에서는 약간

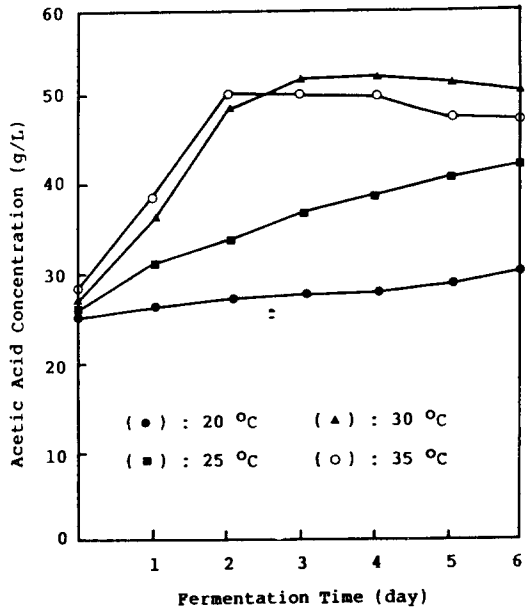


Fig. 4. Effect of fermentation temperature on acetic acid production.

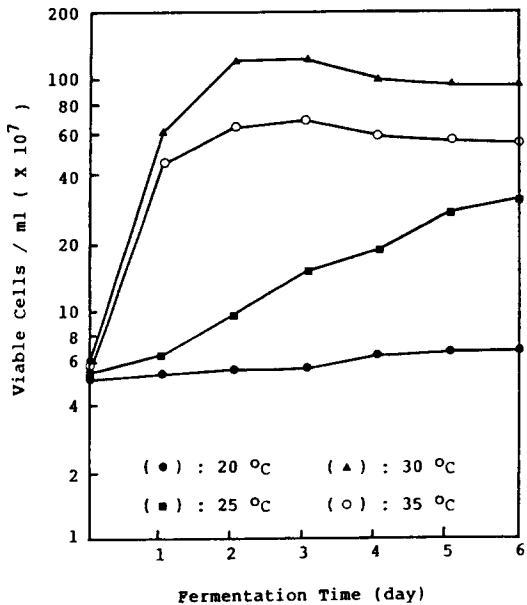


Fig. 5. Effect of fermentation temperature on cell growth in gel bead.

감소하였다. 또한 30°C이하의 발효온도에서는 온도감소에 따라 생균수 증가속도가 감소하는 것을 알 수 있었다. 고정화 초산균의 경우 발효온도에 따른 생균수 및 초산생산성 조사에서 Yasui 등(12)은 온도상승에 따라 초산생산성이 향상된다고 보고하였으나, 본 연구에서는 발효온도 30°C에서 생균수와 초산농도가 최대값을 나타내었으며, 초산생성은 35°C에서 최대값을 나타내었다.

본 실험에 사용한 *Acetobacter aceti*는 obligate aerobes로서 ethanol을 이용한 초산생성에서 산소는 필수적인 영양분으로 작용한다. 따라서 발효시 통기량에 따른 초산생산량에 대한 실험결과는 Fig. 6과 같다. 즉 통기량이 1.0VVM과 1.25VVM일 경우 초산생성 속도는 거의 동일한 수준으로 배양 48시간 이후에 초산농도는 약 50 g / l이었으나, 0.75VVM에서는 40 g / l 정도 이었고 0.5VVM의 경우에는 34 g / l 정도로 1.0VVM 이하에서는 통기량 감소에 따른 초산생성 속도도 감소되었으므로 sodium alginate를 담체로 초산균을 고정화한 발효에서는 1.0VVM이상 통기하는 것이 초산생성에 적합함을 알 수 있었다.

발효배지의 초기 초산농도가 27 g / l일 때 각각의 ethanol 농도에서 발효시간별 초산생성을 조사한 결과 Fig. 7과 같다. 초기 ethanol 농도가 33 g / l일 때는

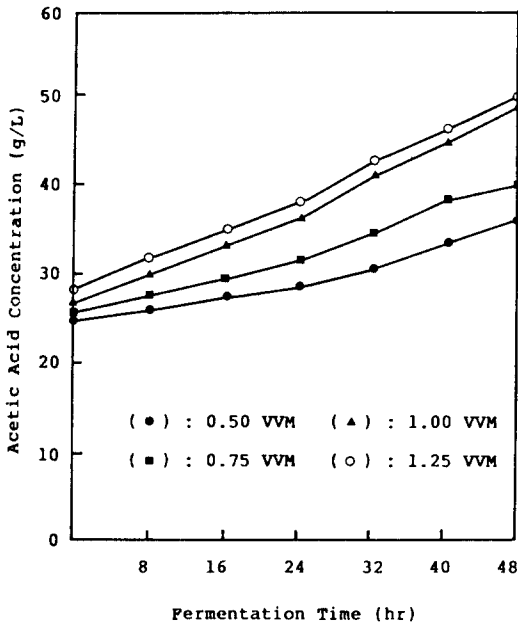


Fig. 6. Effect of aeration rate on acetic acid production.

빠른 속도로 초산이 생성되어 발효 2일만에 50 g / l 까지 도달하여 overall productivity는 0.48 g / l-hr였으며, ethanol 농도가 43 g / l 때는 발효 5일후 60 g / l 에 도달하여 overall productivity는 0.28 g / l-hr였다. 반면 ethanol 농도가 53 g / l 와 63 g / l 일 경우에는 발효 8일까지 각각 40 g / l 이상에서 초산의 생성속도가 현저히 낮아지는 것은 기질의 저해작용 때문이라고 사료된다(1, 2).

따라서 고정화 초산균을 이용한 유동층 반응기의 회분식 초산발효의 최적조건에서 overall acetic acid productivity는 0.48 g / l-hr로서 free cell을 이용했을 때 보다 productivity가 약 1.5배 증가하였다.

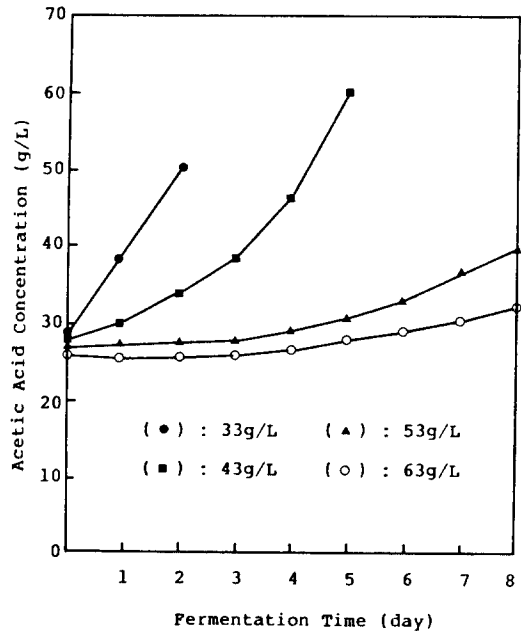


Fig. 7. Acetic acid concentration as a function of fermentation time for various initial ethanol concentration.

유동층 반응기를 이용한 연속발효

고정화된 초산균을 이용하여 위에서 얻은 발효최적조건인 발효온도 30°C, 통기량 1.0VVM, bead량 250 g / l, 초기초산 및 ethanol농도 27 g / l 와 33 g / l 인 초산발효 배지에서 연속발효를 수행하면서 dilution rate에 따른 초산, ethanol 및 productivity를 조사한 결과

Fig. 8과 같다. 초산농도는 dilution rate 증가에 따라 약간씩 감소하다가 dilution rate 0.12hr^{-1} 이상에서부터 급격히 감소하였으며, 기질인 ethanol 농도는 dilution rate 증가에 따라 약간씩 증가하다가 dilution rate 0.12hr^{-1} 에서 급격히 증가하기 시작하였다. 반면 productivity는 dilution rate의 증가에 따라 증가하다가 dilution rate 0.12hr^{-1} 에서 2.96 g/l-hr 의 최대값을 나타낸 후 급격히 감소하였다.

발효배지의 초기 초산농도가 27 g/l 일 때 기질인 ethanol의 초기농도를 각각 33 g/l , 43 g/l , 53 g/l , 63 g/l 로 하여 dilution rate에 따른 productivity 변화를 검토한 결과 초기 ethanol 농도의 증가에 따라 maximum acetic acid productivity는 급격히 감소함을 보여주었다(Fig. 9). 결국 초기 ethanol의 증가에 따른 초산생산성의 급격한 감소는 기질인 ethanol이 초산균의 성장 및 초산생성을 억제하기 때문인 것으로 추정된다.

따라서 유동층 반응기에 의한 연속발효에서 초산생산성에 대한 최적조건은 초기 ethanol 농도 33 g/l 에서 dilution rate 0.12hr^{-1} 였으며, 이 경우 maximum acetic acid productivity는 2.76 g/l-hr 로 회분식발효에서 고정화 세포를 이용한 경우의 overall productivity인 0.48 g/l-hr 보다 약 5.8배, free cell을 이용한 경우의 0.31 g/l 보다 약 8.9배 더 높았다.

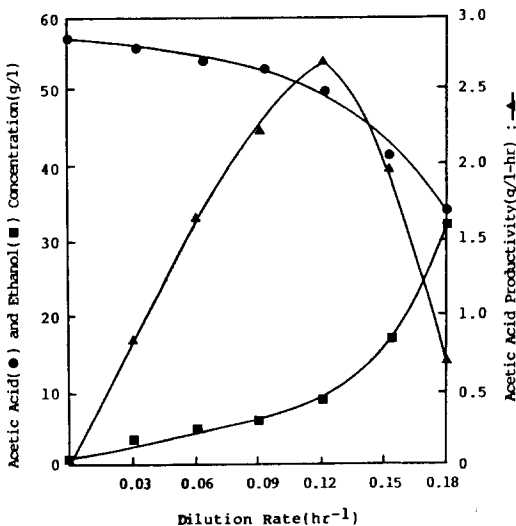


Fig. 8. Effect of dilution rate on acetic acid, ethanol concentration and acetic acid productivity at initial ethanol concentration of 33 g/l .

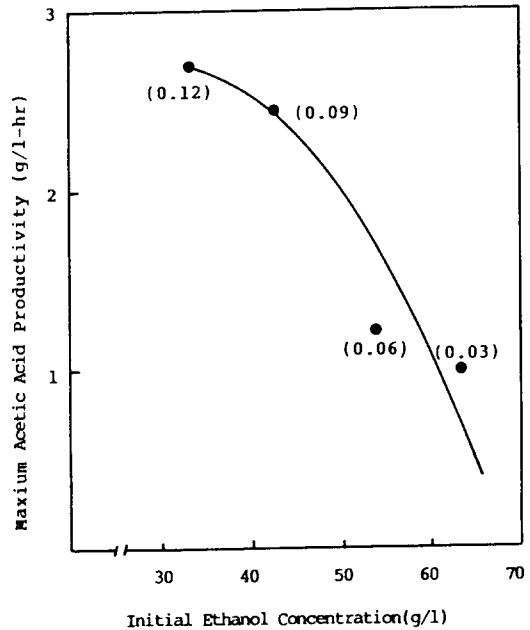


Fig. 9. effect of initial ethanol concentration on the maximum acetic acid productivity. The numbers in parenthesis indicates the dilution rate (hr^{-1}) for maximum acetic acid productivity at each initial ethanol concentration.

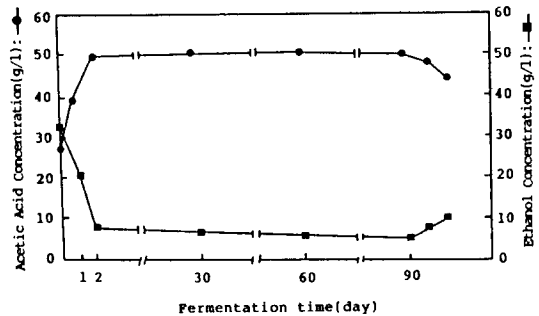


Fig. 10. Change of acetic acid and ethanol concentration in continuous fermentation.

유동층 반응기의 발효시간에 따른 performance을 검토하기 위하여 working volume 2L에 초산균이 고정화된

bead 500 g 을 충전하고, 발효온도 30℃와 통기량 1.0 VVM 에서 48시간 회분식 배양을 한 후 초산농도가 50 g / l 에 이르렀을 때부터 dilution rate 0.12hr⁻¹로 초기 초산농도 27 g / l, 초기 ethanol 농도 33 g / l 가 포함된 초산 발효배지를 주입하여 연속적인 초산발효를 진행하면서 초산농도 및 ethanol 농도를 측정 한 결과는 Fig. 10과 같다. 연속발효는 평형상태를 유지하면서 발효 90일까지 초산농도는 50 g / l 이상 및 ethanol 농도 5 g / l 이하의 수준을 계속 유지 하였으며, 90일 이후 부터는 초산균이 고정화된 bead가 부분적으로 파괴되기 시작하면서 배양액의 혼탁과 초산농도의 감소 및 ethanol 농도의 증가가 관찰되었다. 이때 bead의 부분적인 파괴는 배지 중에 인산염의 존재에 의한 약화 때문인 것으로 추정된다(13, 14).

요 약

Acetobacter aceti OLS-130 cell을 Ca-alginate gel에 고정시킨 후 유동층 반응기를 이용한 연속적인 식초생산 가능성을 검토하였다.

Working volume 2L 규모의 유동층 반응기를 사용한 회분식발효를 발효온도 30℃, 통기량 1.0VVM에서 초기 ethanol 및 초산농도 33 g / l 와 27 g / l 에서 수행한 결과 free cell인 경우 발효 80시간 경과 후 23 g / l 의 초산이 생성되었으며, 이때 overall productivity는 0.31 g / l ·hr였고, 고정화 초산균의 bead를 250 g / l 로 하여 발효를 수행한 결과는 발효 48시간 경과 후 23 g / l 의 초산이 생성되어 overall productivity는 0.48 g / l ·hr로서 free cell일 때보다 약 1.5배 높았다.

위의 초산발효조건에서 배양 48시간 이후부터 연속발효를 실시한 결과 배양 90일까지 초산함량 50~55 g / l 의 식초를 연속적으로 생산하는 것이 가능하였으며, 이때 dilution rate는 0.12hr⁻¹로서 초산생산성은 약 2.7 g / l ·hr로 최대값을 유지하였으며 회분식 발효에서 free cell인 경우보다는 초산생산성이 약 8.9배, 고정화 세포인 경우보다 약 5.8배 더 높았다.

참 고 문 헌

1. A. Mori, (1985), *Process Biochemistry*, **6**, 65
2. A. Mori, (1986), 일본양조협회지, **81**(11), 789
3. G. Ghommidh, J. M. Navarro and G. Durand, (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 605
4. J. F. Kennedy, J. D. Humphrey, S. A. Barker and R. N. Greenshields, (1980), *Enzyme Microbiol. Technol.*,

2, 209

5. A. Nanba, A. Tamura and S. Nagai, (1984), *J. Ferment. Technol.*, **62**(6), 501
6. A. Nanba, K. Kiyoyuki and S. Nagai, (1985), *J. Ferment. Technol.*, **63**(2), 175
7. A. Okuhara, (1985), *J. Ferment. Technol.*, **63**(1), 57
8. J. Osuga, A. Mori and J. Kato, (1984), *J. Ferment. Technol.*, **62**(2), 139
9. A. Mori, N. Matsumoto and G. Imai, (1989), *Biotechnol. Lett.*, **11**(3), 183
10. 박원기 등, (1985) 식품화학실험, 수학사
11. US patent, (1978), No. 4076844
12. Y. Yasui, Y. Suneya and A. Mori, (1978), *J. Ferment. Technol.*, **56**(4), 266
13. J. H. T. Luong and M. C. Tseng, (1984), *Appl. Microbiol. Technol.*, **19**, 207
14. S. Birbaum, R. Pendleton and P. Larsson, (1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**, 393

(Received; July 30, 1990, Accepted: August 30, 1990)