

*Anaerobiospirillum succiniciproducens*에 의한 유기산 생성에 미치는 pH의 영향

강 귀 현 · 류 화 원 · *장 호 남

전남대학교 생물화학공학과 · *생물공정연구센터

Effect of pH on Organic Acid Production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*

Kui-Hyun Kang, Hwa-Won Ryu[†] and Ho-Nam Chang*

Dept. of Biochemical Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757

*Bioprocess Engineering Research Center, KAIST, Taejeon 305-343

ABSTRACT

To investigate the effect of pH on organic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, an anaerobic fermentation was carried out by maintaining the pH of the fermentation broth at 5.8, 6.0, 6.4, 6.8, and 7.2. At various pHs, the concentrations of cell were 1.0~1.9g/ℓ which were two to three times higher than those of the other worker's results, and the maximum was obtained at pH 5.8. Substrate consumption was increased by increasing the pH in the range of pH 6.0 to 6.8, while the sugar consumption rate at both pH 5.8 and 7.2 was very slow. The total amount of 2M Na₂CO₃ added for adjustment of pH change due to organic acid production was maximum at pH 6.8. Changes of conductivity of the fermentation broth was very similar to those of 2M Na₂CO₃ added at various pHs. Therefore, it is suggested that determination of the amount of organic acid in a broth can be possible by measuring the conductivity. The maximum production yield of lactate based on glucose was 64% for pH 7.2 and 32% for pH 6.8, respectively.

서 론

유기산은 처음에는 자연계의 동·식물체에서 추출하였으나 이후로 미생물에 의한 발효법으로 공업적 생산이 시도되어 현재 약 60여종이 생산되고 있으며 식음료 기호성과 식생활 패턴의 변화로 인스턴트 식품등의 가공식품 분야 및 음료용료의 수요가 증가되고 있다. 뿐만 아니라 의약품으로 또는 피부관리 등의 위생제로의 개발이 이루어지고 있으며 합성수

지 및 도료 등의 공업용료의 수요도 계속 늘어날 것으로 전망된다(1). 예로서 lactic acid의 경우 50% 이상이 산미료와 방부제로서 식품에 이용되고, 나머지는 의약품을 비롯하여 피혁산업등에 널리 사용되고 있다.

TCA 회로에서 생산되는 모든 유기산은 미생물에 의해 높은 수율로 생성되며, 혐기성 세균은 glucose 대사에 의한 최종산물로서 lactate, acetate, butylate, propionate, succinate, formate등의 다양한 유기산을 생성한다(2). 특히 citrate, lactate와

[†] Corresponding Author

acetate는 상업적으로 발효에 의해 대량 생산되고 있으며, lactate와 propionate를 높은 수율로 생성하는 혐기균의 대사에 관한 연구는 꾸준히 행해지고 있다(3).

혐기성 rumen 세균과 *Escherichia coli*, *Cytophaga succinicans*, *Wolinella succinogenes* 등의 세균을 이용한 혐기 발효는 그 공정이 매우 희석된 용액에서 이루어져 일반적으로 낮은 수율의 다양한 유기산이 생성된다고 보고되고 있다(4, 5, 6). 이에 대해 최근에 Datta 등(7, 8, 9), Samuelov 등(10, 11)은 혐기성 세균인 *A. succiniciproducens*를 이용하여 높은 수율의 유기산을 얻을 수 있다고 보고하였으며, 더 높은 pH 7.2에서는 lactate, 더 낮은 pH 6.2에서는 다량의 succinate가 생성됨을 밝혔다.

발효에 의한 유기산 생산공정이 경제성을 갖기 위하여는 저렴한 원료와 영양물질을 사용하여 높은 수율 및 높은 농도의 유기산을 생성해야 한다. 따라서 높은 수율의 유기산을 생성하는 균주를 이용한 최적 배양 조건 실험이 이루어져야 하며, 또한 pH 조건에 따라 최종 생성물로서 생성되는 유기산의 수율에 상당한 영향을 미치므로 최적 pH 조건을 확립하고 pH의 영향을 알기 위해서는 pH를 일정한 값으로 고정시킨 고정 pH 실험이 필수적이라 하겠다.

본 연구에서는 혐기적 조건하에서 배지의 pH를 다르게 조절하여 발효 생성물의 종류와 농도를 LC로 분석하고, 발효 진행에 따른 배양액내의 기질 소모, 세포 성장 및 첨가된 Na_2CO_3 양 및 산 생성 속도와 전기전도도와와의 관계를 비교하고 유기산 생산성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지조성

본 실험에서 사용한 균주는 *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC 29305 이다. 혐기 조건은 Cysteine·HCl- $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 환원제와 Gaspak Anaerobic System(BBL)에서 유지하였다. 보존배지는 전 배양배지에 2% (w/v) agar를 첨가한 한천배지를 사용하여 39°C에서 3일간 배양한 후 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다. 전 배양배지와 발효 배양배지의 조성은 Table 1과 같다.

배양 방법

전 배양은 Anaerobic glove box내에서 100ml 중

Table 1. Composition of medium.

(Unit: g/l)

Components	Maintenance	Fermentation
	medium	culture medium
dextrose	20	50
polypeptone	10	10
yeast extract	5	5
K_2HPO_4	3	1
NaCl	1	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	—
NH ₄ Cl	—	0.4
$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2	0.2
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2	0.2
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	1ppm(as Fe)

균 배양배지가 포함되어 있는 250ml Erlenmeyer flask에 0.03M Na_2CO_3 1.0ml와 0.18M H_2SO_4 0.15ml를 첨가하여 pH를 6.8로 조절하였다. Cysteine·HCl- $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 환원제 0.5ml를 가하고 20분 후 환원된 flask에 한 백금이의 균주를 접종하여 shaking incubator에서 온도 39°C, 교반속도 200rpm으로 24시간 배양하였다.

발효조 실험은 2.5ℓ 발효조(KF-2.5ℓ)의 1ℓ 배양액에 3M Na_2CO_3 10ml와 Conc. H_2SO_4 1.5ml를 첨가하여 pH를 6.8로 조절하고 환원제액 5ml를 가하여 배지를 환원하였다. 전 배양액 100ml를 발효 배양액에 집중한 후 39°C, 200rpm, 100% CO_2 조건에서 CO_2 를 0.1vvm으로 공급하면서 pH를 5.8, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2로 고정하여 발효를 행하고 발효 중의 pH는 2M Na_2CO_3 멸균액을 첨가함으로 일정하게 유지하였다.

분석 방법

숙신산은 HPLC(Waters Ltd.)를 사용하여 정량하였으며, 사용 컬럼은 C_{18} μ -Bondapak (Waters, USA), 용매는 0.012N H_2SO_4 , 유량은 1.2ml/min, Detector는 refractive index detector를 사용하였다. 세포농도는 UV-분광광도계 660nm에서 optical density를 측정하고 검량선을 사용하여 건조 균체 질량으로 환산하였다. Glucose농도는 Miller의 DNS법을 사용하여 측정하였다. 전기전도도는 Conductivity meter(Cole-Parmer)로 측정하였다.

결과 및 고찰

세포성장에 미치는 pH의 영향

발효 배양액의 pH를 5.8, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2로 고

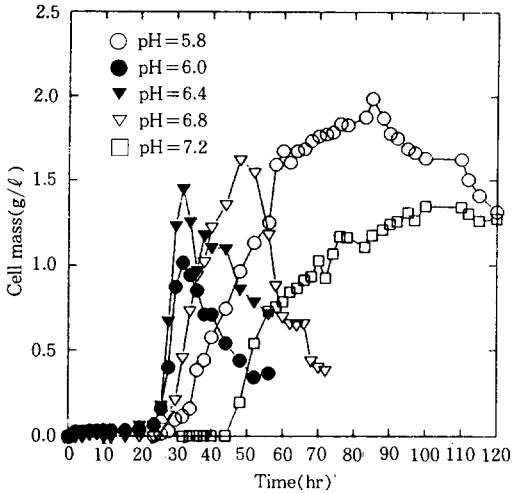


Fig. 1. Changes of cell growth with time at various pHs.

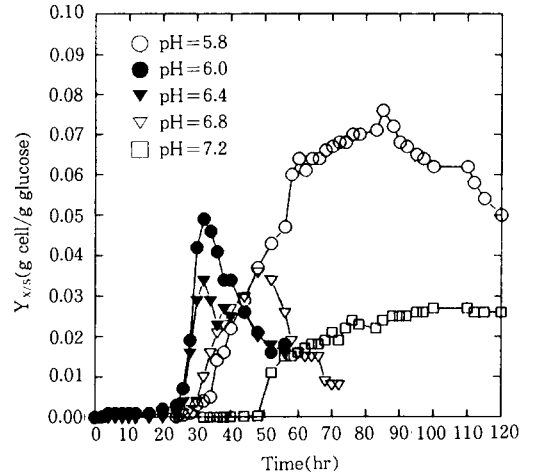


Fig. 2. Changes of cell yield based on glucose at various pHs.

정하여 혐기 발효를 행하였을 때 각 조건에서의 세포 성장 곡선을 Fig. 1에 나타내었다. 최대값은 각각 1.9, 1.0, 1.4, 1.6, 1.3g/ℓ로 다른 연구자들의 결과와 비교할 때 대체로 2~3배 정도 세포 성장이 더 높았으며 (12) pH 5.8에서 가장 높았고, 6.0에서 가장 낮았다. pH 6.0과 6.4에서는 배양시간 32시간에서 최대값에 도달하여 다른 여러 조건과 비교하여 더 빠른 세포 성장을 하였으며 최대 성장을 이룬 후 세포는 급격히 사멸하였다. 반면에 pH 5.8과 7.2에서는 각각 86시간, 110시간에서 최대 세포 성장을 보였으며, 조성된 pH에 적응하는 기간만큼 세포 성장이 지연되어 다른 조건에 비해 더 긴 유도기를 거치고 대체로 완만한 성장 곡선을 보이면서 배양 말기까지 세포가 거의 사멸되지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 발효는 매우 느려 pH 6.4와 비교하여 최대 성장기까지 약 2.5~3.5배 정도의 긴 세대 시간을 갖는 것을 알 수 있었다.

Fig. 2는 기질에 대한 세포 증식 수율($Y_{x/s}$)을 보인 것이다. 여러 pH에서의 최대 세포 증식 수율은 각각 7.6, 4.9, 3.4, 3.6, 2.6 % 로서 전반적으로 낮았으며, 세포 성장과 마찬가지로 pH 5.8에서 가장 높았고, 반면에 pH 7.2에서 가장 낮았다. Fig. 1에서의 세포 성장과 비교할 때 대체로 pH가 높아질수록 세포 성장에 많은 양의 기질이 이용되는 것을 알 수 있었다. 한편 pH 5.8 이하의 조건에서는 발효는 매우 느리고 기질은 거의 소모되지 않아 발효가 억

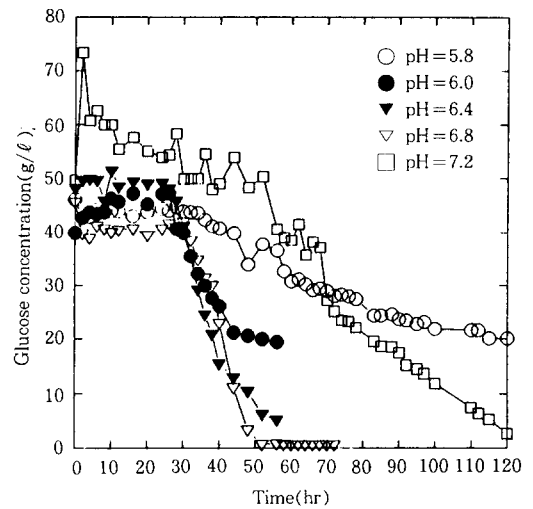


Fig. 3. Changes of sugar consumption with time at various pHs.

제됨을 관찰할 수 있었다.

탄소원 이용에 미치는 pH의 영향

Glucose의 소모량을 Fig. 3에 나타내었다. pH 5.8, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2에서의 초기 glucose 양을 각각 46, 40, 48, 46, 50g/ℓ로 하였을 때 발효 배양동안 기질로서 이용된 glucose 양은 각각 약 26, 21, 43,

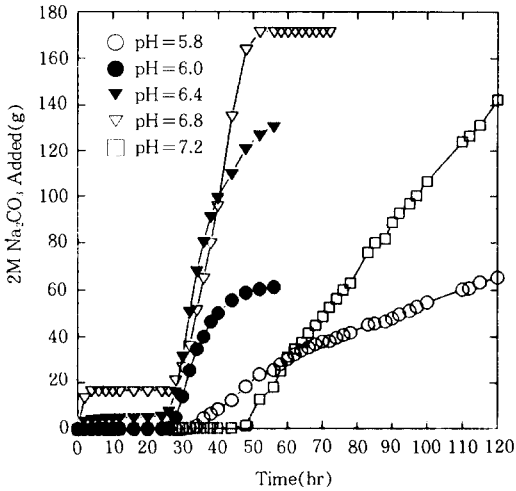


Fig. 4. Changes of accumulative 2M Na₂CO₃ added at various pHs.

45, 47g/l로 일반적으로 pH가 높을수록 더 높아 pH 7.2에서 가장 많은 양의 기질이 소모되었다. 여러 조건에서 동일하게 glucose는 세포가 유도기를 지나 대수증식기에 이르면서 소모되기 시작하였으며 배양 말기에 소모되지 않고 유지되는 glucose양을 비교해 보면 각각 20.1, 19.5, 5.2, 0.7, 2.7g/l로서 pH가 낮아질수록 기질 이용이 억제되어 특히 pH 5.8에서 약 44 %의 많은 양이 소모되지 않음을 알 수 있었다. 그리고 pH를 6.8로 고정했을 때에는 배양 약 50시간 동안에 약 98%의 glucose를 기질로서 가장 빠르게 또한 완전하게 이용하였음을 알 수 있었다. 또한 pH 5.8과 7.2와 같이 낮은 pH와 높은 pH에서는 기질 이용 속도가 매우 느렸으나 낮은 pH인 5.8의 경우 약 120시간에서 다량의 기질이 소모되지 않은 반면에 높은 pH인 7.2에서는 동일한 배양시간에 기질이 거의 소모되었음이 관찰되었다.

첨가된 Na₂CO₃ 총량에 미치는 pH의 영향

Fig. 4는 여러 pH 조건에서 발효공정동안 첨가된 2M Na₂CO₃ 양을 나타낸 것이다. 유기산 발효에 있어 발효배지의 pH는 생산된 유기산에 의해 점차 낮아지고 따라서 유기산 생산 세균은 저해를 받게된다. 그러므로 수용액에서 가수분해하여 센 알칼리성을 보이는 Na₂CO₃를 Na이온의 공급 및 pH 조절용으로 첨가하여 적정 pH를 유지하였으며 이 때 첨가된 Na₂CO₃ 총량으로 유기산 생성량의 보정이 가능

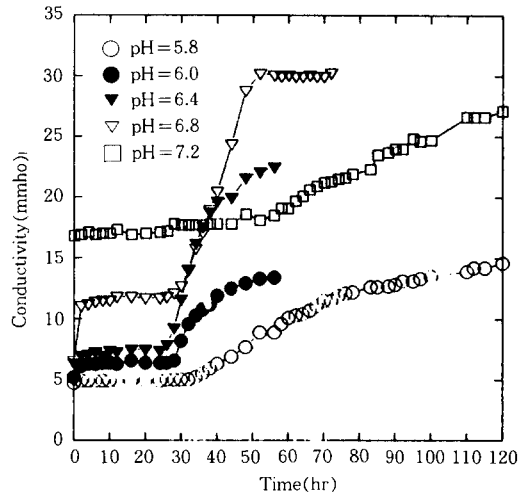


Fig. 5. Changes of conductivity with time at various pHs.

하였다. pH 6.0, 6.4, 6.8에서 첨가된 2M Na₂CO₃ 총량은 총 배양 시간을 기준으로 각각 61, 131, 171g로서 pH가 높을수록 첨가량이 많아지는 경향을 보여 pH 6.8에서 최대값을 보였다. 그러나 pH 5.8, 7.2에서와 같이 낮은 pH 또는 높은 pH에서는 다른 pH 조건에서의 급격한 증가와 비교하여 배양 말기까지 완만한 증가 경향을 보였으며 특히 pH 5.8에서는 세포 성장과는 상관없이 산 생성이 억제되어 여러 조건 중 가장 낮은 값을 보임을 알 수 있었다. 따라서 pH 6.8의 조건에서 첨가된 2M Na₂CO₃ 총량이 발효 50시간 후 171g으로 최대값을 보이므로 여러 pH 조건 중에서 유기산 생성량이 가장 많음을 알 수 있었다.

전기전도도에 대한 pH의 영향

전기전도도에 대한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. pH 5.8, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2에서의 초기 전기전도도 값은 각각 4.7, 5.2, 6.4, 6.6, 16.8mΩ⁻¹으로서 높은 pH 조건일수록 초기 배양액내의 전기전도도가 높았다. 또한 배양말기의 측정치를 관찰한 결과 14.6, 13.4, 22.5, 30.3, 28.3mΩ⁻¹으로서 역시 높은 pH 조건일수록 대체로 전기전도도가 높은 경향을 보였다. pH 5.8과 7.2에서는 발효 배양동안 완만한 증가 곡선을 보였으며 이에 비하여 pH 6.4와 6.8에서는 배양 초기값이 세포 유도기를 거치는 동안 일정하게 유지되다가 급격히 증가하기 시작하여 배양

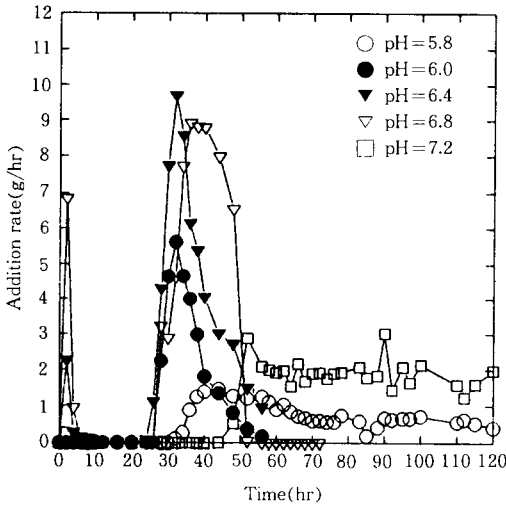


Fig. 6. Addition rate of 2M Na₂CO₃ at various pHs.

말기에 높은 전기전도도를 보였다. 특히 pH 6.8에서는 30.3mΩ⁻¹으로 가장 높은 전기전도도 값을 보였다. 배양액의 전기전도도 변화는 2M Na₂CO₃ 첨가량의 변화(Fig. 4)와 동일한 경향을 보였다. 유기산 발효에서는 이용된 혐기 세균이 유기산을 생산하여 배지로 배출함으로써 배지의 pH를 감소시키고 전기전도도를 증가시키는데 이러한 경향은 발효되는 동안 유기산염 이온의 축적에 기인한다. 따라서 발효 배양액의 전기전도도를 측정함으로써 산 생성량을 간접적으로 측정하는 것이 가능하리라 사료된다.

산생성속도에 대한 pH의 영향

Fig. 6은 산생성속도를 단위 시간당 주입된 2M Na₂CO₃ 용액의 질량(g)을 기준으로 나타낸 결과이다. 최대 산생성속도는 여러 pH 조건에서 각각 시간당 1.5, 5.6, 9.7, 8.9, 2.9g이었으며 pH 6.0과 6.4에서는 세포 성장곡선과 거의 일치하는 경향을 보였다. 특히 pH 6.4의 경우 배양 32시간에서 시간당 약 10g이 첨가됨으로 여러 조건 중 산생성속도가 가장 높았으며 pH 6.8인 경우는 대수 증식기에서의 산생성속도가 가장 높았다. 또한 다른 pH 조건에서 다량의 산이 생성된 후 급격히 감소한 것에 비해 pH 5.8과 7.2에서와 같은 낮은 pH 또는 높은 pH에서는 발효말기까지 산이 낮은 속도로 계속 생성됨을 관찰할 수 있었다.

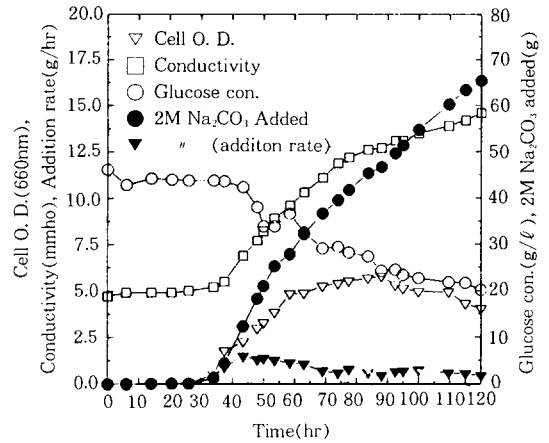


Fig. 7. Time course behavior of cell growth, sugar consumption, conductivity, accumulative 2M Na₂CO₃ added, and addition rate of 2M Na₂CO₃ at pH of 5.8.

pH 5.8에서의 발효 배양

Fig. 7은 발효 배양액을 pH 5.8로 고정하였을 때의 배양 결과이다. 세포는 배양 32시간에서 유도기를 지나 성장하기 시작하여 약 85시간에서 O.D. 5.9 (660nm)로 최대 성장을 하였고 그 후 감소하여 배양말기인 120시간에서 O.D. 4.0으로 세포는 거의 사멸하지 않는 경향을 보였으며 성장곡선은 대체로 완만하였다. 기질로서 이용된 glucose는 세포 성장에 따라 매우 느린 속도로 소모되어 배양말기에는 초기 46g/l 중 약 26g/l가 소모되어 56%의 이용율을 보였다. 전기전도도와 2M Na₂CO₃ 첨가량은 세포의 대수 증식기에서 일정한 증가를 보이기 시작하여 세포의 최대 성장 이후에는 세포 성장과 상관없이 산생성에 따라 거의 동일한 형태로서 발효말기까지 완만한 증가를 보였다. 발효가 진행되는 동안 pH 조절을 위하여 총 65 g의 2M Na₂CO₃가 첨가되었으며 전기전도도는 14.6mΩ⁻¹으로 다른 pH 조건과 비교하여 낮은 값을 보였다. 또한 산생성속도는 전체 발효 기간 중 대수증식기에서 단위 시간당 약 1.5 g으로 가장 높았으며 느린 세포 성장과 마찬가지로 발효 배양 동안 전반적으로 낮았지만 배양 말기까지 거의 일정한 속도를 보였다.

pH 6.8에서의 발효 배양

Fig. 8은 pH 6.8에서의 배양 결과이다. 배양 26

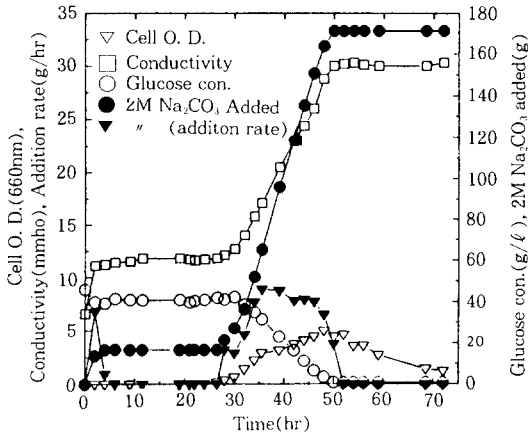


Fig. 8. Time course behavior of cell growth, sugar consumption, conductivity, accumulative 2M Na₂CO₃ added, and addition rate of 2M Na₂CO₃ at pH of 6.8.

시간에서 다른 pH 조건과 비교하여 더 짧은 유도기를 지나 약 46g/l의 glucose를 이용하여 세포 성장이 시작되었다. 대수 증식기 동안에 약 98%의 모든 기질이 소모되었으며 배양 50시간에서 세포는 O. D. 5.0 (660nm)로서 최대 성장을 이룬 후 서서히 감소하여 배양 말기에는 거의 사멸하였다. 산생성속도는 대수 증식기 동안에 약 9g/h의 대체로 높은 생성속도를 보인 후 세포 사멸과 동시에 급격히 저하하여 배양 말기까지 산생성은 억제되었다. 또한 전기전도도와 2M Na₂CO₃ 첨가량은 세포가 유도기를 지나면서 급격히 증가하기 시작하여 배양 약 50시간에서 기질의 완전 소모 및 최대 세포 성장과 일치하여 각각 30.3mΩ⁻¹과 171g 값으로 최대값을 보인 후 배양 말기인 72시간까지 안정된 pH 값을 보이며 일정하게 유지되었다. 따라서 pH 6.8의 조건에서는 세포 성장과 산 생성이 기질 이용에 직접적으로 관련되어 기질이 완전히 소모된 이후에는 세포 성장과 산생성이 억제됨을 관찰할 수 있었다.

발효생성물에 미치는 pH 영향

Fig. 9는 pH 7.2의 조건에서 발효종료 160시간의 발효 배양액을 HPLC로 분석한 결과이다. 10μl의 샘플 주입 후 3.5분 대에 lactate, 5.8분 대에 succinate가 검출되었다. pH 7.2와 같이 높은 pH 조건에서의 대당수율(Y_{p/s})은 lactate의 경우 64%로

RT(min)	Name	Area %	Y _{p/s}
2.45	-	34.13	-
2.75	Glucose	1.74	-
3.50	Lactate	62.80	0.64
5.84	Succinate	1.30	0.024

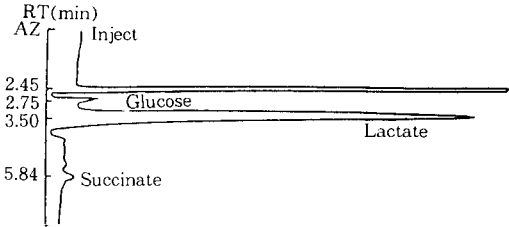


Fig. 9. Chromatogram of fermentation broth at 160 hr under pH 7.2.

(HPLC: Waters, U.S.A., Column: μ-Bondapak C₁₈, Mobile phase: 0.012 N H₂SO₄, Flow rate: 1.2ml/min, Detector: refractive index).

다량을 얻을 수 있었으며 이에 비해 succinate는 2.4%로 낮은 수율을 보였다. 또한 첨가된 Na₂CO₃량이 가장 높아 산생성량이 가장 많을 것으로 추정된 pH 6.8의 조건에서는 lactate 32%, succinate 5.7%로서 pH 7.2와 비교하여 succinate 수율은 약간 증가하였으나 lactate의 수율은 상당히 낮았다. 한편 pH 6.8에서 succinate 36.3%, lactate 37.0%, pH 7.2에서 succinate 25.6%, lactate 68.9%의 수율을 보인 Datta(7)의 연구결과와 비교해 볼때 succinate량은 상당히 낮았으나 lactate의 경우 거의 유사한 값을 보임을 알 수 있었다.

요 약

*Anaerobiospirillum succiniciproducens*에 의한 유기산 생성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 발효 배양액의 pH를 5.8, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2로 유지하여 혐기 발효 실험을 수행하였다. 세포 농도는 여러 pH 조건에서 1.0~1.9g/l로 다른 연구자들의 결과와 비교할 때 2~3배 정도 더 높았으며 pH 5.8에서 가장 높았다. pH 6.0~6.8의 범위에서 기질 소모량은 pH가 높을수록 증가하였으며 반면에 pH 5.8과 7.2에서의 당 소비 속도는 매우 느렸다. 유기산 생성으로 인한 pH 변화의 조절을 위하여 첨가된 2M Na₂CO₃의 총량은 pH 6.8에서 최대였다. 여러 pH조건에서 발효액의 전기전도도의 변화는 첨가된 2M Na₂CO₃의 변화와 매우 유사한 경향을 보였고 따라서 발효액내의 유기산의 정량은 전기전도도를 측정함으로 구할 수 있음을 알 수 있었다. pH 7.2의 조건에

서 기질에 대한 lactate의 최대 생산 수율은 64%, pH 6.8의 경우 32% 였다.

감 사

본 연구는 생물공정연구센터의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. 임억규(1992), 생물산업, **5**(2), 60-75.
2. J. G. Zeikus(1980), *Annu. Rev. Microbiol.*, **34**, 423-464.
3. R. K. Thauer, K. Jungermann and K. Decker (1977), *Bacteriol. Rev.*, **41**, 100-180.
4. D. Caspari and J. M. Macy(1983), *Arch. Microbiol.*, **135**, 16-24.
5. D. R. Caldwell, M. Keeney and P. J. V. Soest (1969), *J. Bacteriol.*, **98**(2), 668-676.
6. R. L. Anderson and E. J. Ordal(1961), *J. Bacteriol.*, **81**, 139-146.
7. R. Datta(1992), *U. S. Pat.*, No. 5,143,833.
8. D. A. Glassner and R. Datta(1992), *U. S. Pat.*, No. 5,143,834.
9. D. A. Glassner, R. Datta, M. K. Jain and J. R. V. Roy(1991), *Eur. Pat.*, No. 405,707.
10. N. S. Samuelov, R. Lamed, S. Lowe and J. G. Zeikus(1991), *Appl. and Environmental Microbiology*, **57**(10), 3013-3019.
11. N. S. Samuelov, R. Datta, M. K. Jain and J. G. Zeikus(1990), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **589**, 697-704.