

고정화 *Aspergillus niger* Bead를 이용한 포도당과 호박으로부터 구연산 생성

방 병 호

서울보건대학 보건과학연구소

Citric Acid Production from Glucose and Pumpkin by Using Immobilized Bead of *Aspergillus niger*

Byung-Ho Bang

Institute of Health Research, Seoul Health College, Sungnam, 461-713, Korea

Abstract

The spore of *Aspergillus niger* KCTC-6144 was immobilized on alginate gel beads. When pumpkin powder was used with glucose for a medium of citric acid fermentation by *Aspergillus niger* beads, the beaded *Aspergillus niger* grew up inside the bead and mycelia penetrated through the pore of the bead membrane. The bead size became largely from 2.0~2.5mm to 6~8mm after growing at 30°C for 4 days. Studies of optimum culture conditions on citric acid fermentation using *Aspergillus niger* beads on pumpkin medium (pumpkin powder 1% + glucose 9%, pH 6.0) were carried out in submerged cultures on 250ml Erlenmeyer flask. As a result, it was found that to reinforce 12% as carbon source was good for citric acid production and that 1% pumpkin powder was good as nitrogen and mineral source in orbital shaker (150rpm) at 30°C for 5 days. The optimum initial pH on citric acid production was pH 6.0 and it was found that 100 beads of immobilized *Aspergillus niger* was adequate for citric acid production in a 250ml Erlenmeyer flask containing 50ml of pumpkin medium solution with orbital shaker at 30°C for 5 days. We also found that maximal production of citric acid was 23.5g/ℓ at optimal condition (at 30°C for 5 days, pH 6.0, and 100 beads and medium containing 1% pumpkin powder plus 12% glucose).

Key words : citric acid, pumpkin, immobilization, *Aspergillus niger*, bead.

서 론

구연산은 자연성분으로 동물과 식물의 대사산물로서 청량음료, 제약, 식품첨가물 등으로 가장 수요가 많은 유기산의 일종이다. 구연산의 이용범위는 광범위하며 또한 식품의 맛과 향 유지에 탁월한 효과를 내고 용해성이 높아 해마다 그 수요가 늘어가고 있다¹⁾.

구연산은 1920년대까지만 하더라도 과일에서 분리하여 생산하였으나, 오늘날에는 대부분 미생물발효에 의해 생산되고 있으며 그 기질로는 주로 포도당, 당밀, 설탕, 전분 등과 같은 탄수화물이 이용되고, 미생물로는 Currie에 의해 *Aspergillus niger*가 설탕과

엿들로 구성된 용액의 표면에 자랐을 때 구연산이 상당히 생성되어짐을 안 이래 *Aspergillus niger*에 의한 구연산 생성은 오늘에 이르기까지 가장 널리 공업용 균으로 이용되고 있다^{2~4)}.

공업용으로 사용되는 *Aspergillus niger*는 극단의 pH에서도 잘 생육하며 독성물질을 생성치 않고 또한 aflatoxin을 파괴하는 능력이 있는 균으로 알려져 있다⁵⁾. 기질로 이용되는 당류 중 특히 설탕의 부산물인 당밀이 가장 많이 이용되어 왔는데, 최근에는 설탕제련기술의 발달로 당밀 중의 당농도가 낮아 발효능이 떨어지고 있다. 그러므로 최근에는 구연산 생성의 기질로 전분의 가수분해물이 제안되고 있다⁶⁾.

* Corresponding author : Byung-Ho Bang

설탕, 과당 및 포도당은 *Aspergillus niger*에 의해 잘 발효되는 당으로 주로 잘 익은 과일의 구성성분으로 존재한다. 그러므로 구연산 발효의 기질로 탄소원으로서는 잘 익은 과일이 기질로 부상되고 있다⁷⁻¹⁰).

구연산 발효에 주로 이용되는 *Aspergillus niger* 계통의 fungi는 균사들이 3차원적으로 얽혀서 자라기 때문에 발효액의 점도가 높아 aeration 및 agitation이 무척 어렵고 그에 따라 산소전달도 좋지 않아 실제 조업시 많은 어려움을 겪는다. 이러한 곰팡이의 결점을 개선하기 위한 방법의 하나로 균사를 고정화하여 배양액 중의 균사의 suspension을 억제하고 또한 균체를 고농도로 하여 생산성을 높일 수 있는 방법으로 고정화하는 방법이 연구·시도되고 있다¹¹).

세포의 고정화 방법은 1970년 초기부터 효소 고정화 기술의 발달과 함께 급속히 발전하기 시작하여 대부분의 연구가 주로 세균과 효모에 대한 것이었고 1980년대에 와서 filamentous fungi의 고정화도 관심을 끌어들였다¹²⁻¹⁴).

본 연구의 목적은 *Aspergillus niger* 포자를 alginate로 고정화, bead를 만들어 실험실 규모에서 호박을 구연산 발효의 기질로써의 이용 가능성을 검토하고자 1차로 잘 익은 호박을 분말형태로 하여 탄소원으로 포도당을 보충하고 질소원과 무기질원으로 사용하여 구연산 생성의 최적 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

1. *Aspergillus niger* 포자의 준비

엿기름 찌꺼기 20g을 100ml 플라스크에 담아 105°C에서 건조한 후 여기에 다시 수돗물 30ml를 첨가하여 솜가개를 한 뒤 121°C에서 15분간 살균 후 식힌 다음 미리 감자배지에서 사면배양해 둔 *Aspergillus niger* 포자를 접종하여 30°C에서 1주간 배양하여 포자를 생성시켰다. 살균증류수를 적당량 첨가하여 균질화 한 후 여과하고 3,000rpm에서 3회 원심분리하여 *Aspergillus niger* 포자를 얻었다.

2. 미생물과 배지

Aspergillus niger KCTC 6144는 생명공학연구소에서 분주받아 감자배지에서 1주일 간격으로 계대배양하여 사용하였다. 발효용 배지로는 9% 포도당과 1% 호박가루를 사용하여 구연산 최적 배양조건을 검토하였다. 배지로 사용된 호박은 경기도 성남시 오야동에서 구입한 잘 익은 재래종 호박으로 잘라서 껍질을 벗기고 속의 씨를 제거한 후 육질 부분만 잘게 썰어 40

°C에서 3일간 열풍건조시켜 10,000rpm에서 Ace homogenizer(NIHONSEIKI KAISHA Ltd.)로 분쇄한 후 40 mesh(0.35mm)의 체로 친 후 그 분말을 배지로 사용하였다.

3. 진탕배양

250ml Erlenmeyer flask에 발효배지 50ml를 넣고 121°C에서 15분 살균 후 식히고 여기에 고정화한 *Aspergillus niger* bead 100개를 접종하고 30°C, 150rpm에서 진탕 배양하였다.

4. Alginate bead의 조제

Alginate bead의 제조방법은 Fig. 1에서와 같다. 즉, Sodium alginate 1g(w/v)을 살균 증류수 90ml에 녹히고 미리 준비해둔 *Aspergillus niger* 포자 현탁액 10ml과 혼합하였다. 이 때 포자의 최종농도는 107~109 spores/ml가 되도록 하였다. 이 alginate-포자현탁액을 peristaltic pump를 사용하여 주사바늘(15 gauge)을 통해 250 ml Erlenmeyer flask에 포함되어 있는 2% (w/v) calcium chloride 용액 150ml에 떨어뜨려 직경이 2~2.5mm의 bead를 제조하였다. Bead의 크기는 외부 주사바늘(12 gauge)로 압축공기를 통과시킴으로서 조절하였다. 생성된 bead는 완전한 겔화를 위하여 실온에서 1시간 동안 2%(w/v) calcium chloride 용액에 보관한 후 살균 증류수로 여러번 씻고 다시 이것을 경화용액에 넣어 5°C에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

5. 분석방법

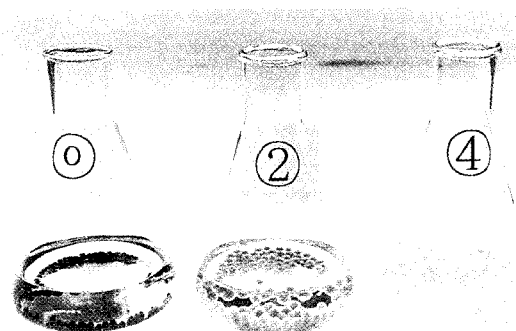


Fig. 1. The growth of *Aspergillus niger* at the inside of bead. ① : growth of *A. niger* beads for 0 days(wet weight : 1.4g/100 bead) ② : growth of *A. niger* beads for 2 days(wet weight : 1.4g/100 bead) ④ : growth of *A. niger* beads for 4 days(wet weight : 1.4g/100 bead)

구연산의 정량은 Marier and Boulet 법¹⁵⁾, 그리고 포도당은 dinitrosalicylic acid법¹⁶⁾으로 정량하였다.

결과 및 고찰

1. *Aspergillus niger*의 bead에서 생육 상태

Calcium alginate 젤 bead 내에서 *Aspergillus niger* 포자를 고정화하여 bead의 상태와 곰팡이의 생육상태를 관찰하기 위하여 재료 및 방법에서와 같은 방법으로 제조한 고정화 bead 100개를 발효배지에 접종 후 진탕배양하여 포자를 발아, 성장시켰다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 2일 경과 후 곰팡이 균사는 bead 내부로부터 밖으로 많이 뻗어 나와 있으며 이때 bead의 크기는 4mm 정도로 커졌으며 4일 후에는 균사의 정도가 더 길어져서 6.5~8mm로 커졌다. 시간이 경과함에 따라 bead에서 계속 균사는 자라났지만 진탕으로 균사가 끊어지기 시작하여 6일 이후에는 배양액에 끊어진 균사가 좁쌀 모양으로 엉기기 시작하였다. 배지중에 호박의 농도를 2% 이상으로 하면 bead는 10mm 정도로 커졌지만 구연산의 생성은 거의 없었고 배양액 내에서 균사의 suspension이 형성되고, bead의 점성이 증가되어 서로 엉기는 현상이 나타났다.

*A. niger*의 균사가 bead막의 공간을 통하여 곰팡이가 마치 심어진 것처럼 자라게 되며 캡슐형태로 고정화하더라도 벽을 뚫고 캡슐 밖을 둘러싸고 자라게 된다. 그래서 곰팡이의 고정화는 효모의 고정화와 달리 bead막을 뚫고 밖으로 뻗어 균사가 자라므로 구연산의 생성에 이들 균사가 상당한 역할을 할 것으로 사료된다.

2. 포도당 농도의 영향

*A. niger*를 이용하여 구연산 발효시 탄소원으로 보통 많이 이용되는 sucrose, glucose, fructose 및 maltose 등을 각각 9%로 하고 질소원 및 무기질원으로 호박가루를 1%로 한 배지 50ml를 250 ml Erlenmeyer flask에 넣고 살균 후 식히고 *A. niger* 고정화 bead 100개를 접종하여 30°C, 150 rpm에서 5일간 배양 후 구연산을 정량한 결과는 Table 1에서와 같이 포도당, 설탕, 과당 및 maltose 순으로 양호하였다.

또한 포도당의 최적 농도를 조사하기 위하여 Fig. 2에서와 같이 3%에서 18%까지 3%씩 증가하여 구연산의 생성량을 측정한 결과 5일 배양 후 12%에서 약 25g/l으로 생성량이 가장 양호하였다.

3. 호박가루의 농도의 영향

Table 1. Effect of carbon sources on the production of citric acid

Carbon sources	Citrate (g/l)	Residual sugar (%)	pH
Sucrose	15.4	4.4	1.48
Glucose	16.3	4.5	1.50
Fructose	15.4	4.6	1.57
Maltose	14.4	4.0	1.45

In a 250 ml Erlenmeyer flask, 50 ml of fermentation medium(containing each carbon source of 9% and pumpkin powder 1% and immobilized *A. niger* 100 beads) were incubated in orbital shaker at 150 rpm and 30°C for 5 days.

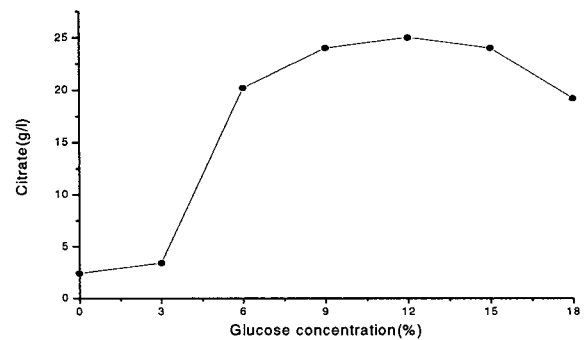


Fig. 2. Effect of glucose concentration on the citrate production. In a 250ml Erlenmeyer flask, 50ml of fermentation medium(containing 1% pumpkin power, each glucose concentration of 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18% immobilized *A. niger* 100 beads) were incubated in orbital shaker at 150 rpm and 30°C for 5 days.

250 ml Erlenmeyer flask에 각 9% 포도당과 호박가루 0.5%, 1%, 2%, 3%, 및 4%까지로 한 배지 50ml를 넣고 살균 후 *A. niger* 포자 고정화 bead 100개를 접종하여 30°C, 150 rpm에서 5일간 진탕배양 후 구연산을 정량한 결과는 Table 2에서와 같이 1%에서 구연산 생성이 가장 좋았다.

일반적으로 질소의 양이 충분하면 균증식은 양호하나 발효산물은 최고에 달하지 못한다³⁾. 본 결과에서도 1%에서는 구연산 생성량 18.2g/l가, 2%에서는 10.6g/l으로 뚜렷 떨어졌다. 반면에 bead 표면의 균사 신장은 2% 이상에서는 상당히 양호하였고 또한 균사 밀도에서도 훨씬 좋았지만 구연산의 생성량은 호박가루의 증가와 더불어 점점 감소하였으며 또한 포도당의 소모도 상대적으로 많았으나 구연산의 생성은 적었다.

Table 2. Effect of pumpkin powder concentration on the citrate production

Pumpkin concentration	0.5%	1%	2%	3%	4%
Citrate(g/l)	10.6	18.2	10.6	4.8	2.4
Residual sugar(%)	4.8	4.5	2.8	2.2	2.2
pH	1.48	1.42	1.56	2.68	3.80

In a 250 ml Erlenmeyer flask, 50ml of fermentation medium (containing 9% glucose and each concentration of pumpkin powder(0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0%) and immobilized *A. niger* 100 beads) were incubated in orbital shaker at 150 rpm and 30°C for 5 days.

4. 초기 pH와 calcium alginate bead 수의 영향

포도당 9%와 호박가루 1%로 하여 pH를 2, 3, 4, 5, 6, 및 7로 조절하고 30°C에서 5일간 배양 후 구연산을 측정된 결과는 Fig. 3에서와 같이 pH 6에서 구연산의 생성이 가장 좋았다. 앞으로의 실험에서는 pH를 더 이상 조절하지 않았다.

본 실험의 결과는 지¹⁷⁾의 결과와 잘 일치하였으며 초기 pH는 발효에 아주 중요한 역할을 한다. 그리고 보통 고정화 효소와 균체는 pH에 broad한 경향을 나타내나¹⁸⁾ 본 결과에서는 고정화하지 않은 *A. niger*로부터 구연산 생성조건에서와 같이^{7,8)} 최적 pH범위가 5.5~6으로 좁았다. 효소와 효모 등은 고정화시 bead 내부에서 어느 정도 외부환경으로부터 보호를 받아 pH에 대해 민감성이 떨어지는 경향을 나타낸다고 볼 수 있다. 그러나 곰팡이는 주로 bead 내부에 있는 균

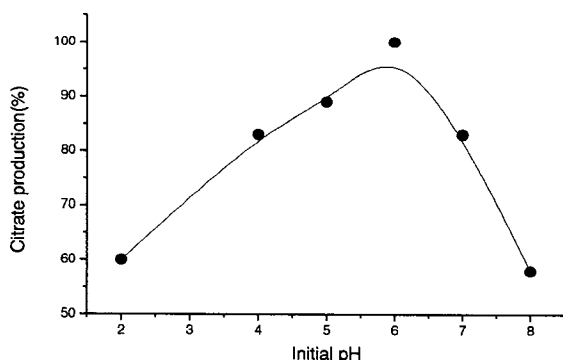


Fig. 3. Effect of initial pH on the citrate production. In a 250ml Erlenmeyer flask, 50ml of fermentation medium (containing 9% glucose, 1% pumpkin powder and immobilized *A. niger* 100 beads) were incubated in orbital shaker at 150 rpm and 30°C for 5 days.

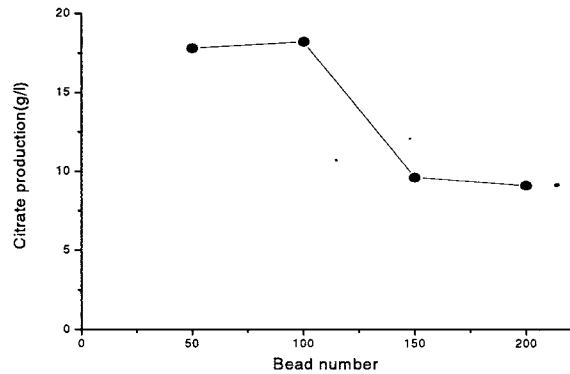


Fig. 4. Effect of number of Ca-alginate bead on the citrate production. In a 250ml Erlenmeyer flask, 50ml of fermentation medium (containing 9% glucose and 1% pumpkin powder, each number of immobilized *A. niger* beads) were incubated in orbital shaker at 150 rpm and 30°C for 5 days.

사보다는 bead 외부로 뺏어 나와 있는 균사에 의해 구연산의 생성이 좌우되는 것으로 추정할 수 있다.

Bead수를 달리하여 같은 조건에서 구연산의 생성을 검토한 결과는 Fig. 4에서와 같이 50, 100개의 bead에서는 구연산 생성이 각각 17g/l, 18g/l로 나타났다. 그리고 Fig. 4에서는 나타내지 않았지만 bead 50개, 100개에서는 배양액의 최종 pH도 2.1, 최종 당소모도 1.5% 정도로 모두 비슷하였으나 그러나 50개의 bead에서는 bead의 주위에 균사가 너무 신장하여 bead의 형태가 잘 보이지 않았으며 균사끼리 서로 엉켜 배양액의 여과에 어려운 점이 있었다. 150개 이상에서는 구연산 생성율이 50%정도 떨어졌고 당소모도 또한 적었으며 bead의 크기가 100개에서는 보통 7~8mm정도였으나 150개 이상에서는 4~4.5mm 정도로 작았으며 bead의 표면이 마치 곰팡이 균사가 솟털모양으로 하고 있었다. 결국 bead의 수가 150개 이상에서는 bead가 차지하는 공간의 부족과 산소의 부족현상이 심화되어 bead의 크기가 100개와 비교하여 서로 다르게(작게) 나타났으며 또한 구연산의 생성량이 뚜렷 떨어지는 것으로 사료된다.

5. 구연산 생성에 있어서 배양시간의 영향

지금까지 검토된 최적조건으로 시간별 구연산의 생성량을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 즉, 250 ml Erlenmeyer flask에 포도당 12%, 호박가루 1%, pH 6.0 그리고 *Aspergillus niger* KCTC 6144 bead 100개로 하여 30°C에서 진탕배양(150rpm)으로 1일에서 8

Table 3. Effect of time course on the citrate production

Cultured time (day)	1	2	3	4	5	6	7	8
Residual glucose(%)	11.8	11.0	10.8	10.2	8.8	8.6	8.4	8.6
pH	3.49	2.20	2.00	1.97	1.88	1.86	1.78	1.78
Citrate(g/ℓ)	0.5	7.2	14	14.4	23.5	22.6	20.6	20.2

In a 250 ml Erlenmeyer flask, 50 ml of fermentation medium(containing 12% glucose and 1% pumpkin powder and immobilized *A. niger* 100 beads) were incubated in orbital shaker at 150 rpm and 30°C for each given days.

일까지 1일 간격으로 구연산 생성량, 잔당 및 pH 등을 조사한 결과이다. Table 3에서 보는 바와 같이 구연산의 최대 생성은 120g의 포도당과 10g의 호박가루로부터 발효 5일만에 23.5 g이 얻어졌다. 구연산의 수율은 포도당 g당 0.261g의 구연산이 생성되었으며 호박가루 g당 2.35g의 구연산이 생성되었다. 발효가 6일을 지나면서 구연산의 생성은 서서히 감소하여 발효 8일 경에는 20.2g으로 구연산 생성량이 최고인 5일에 비해 3.3g/ℓ 이 감소하였다.

*Aspergillus niger*로 구연산 발효시 보통 발효 시간이 10일 이상으로 긴 것이 특징이나^{11,19)} 본 발효에서는 최고 생성 일수가 5일로, 5일이나 단축되었다. 발효 시 배양 일수를 줄이는 것은 발효산업에서 경제적으로나 시간적으로 대단히 중요하다는 것은 말할 필요가 없다.

요 약

Aspergillus niger KCTC 6144 포자를 alginate bead로 고정화하여 호박배지(포도당 9%, 호박가루 1%, pH 6)를 이용하여 구연산 발효를 수행하였다. 고정화된 *A. niger* 포자가 bead 내에서 발아하여 균사가 bead를 뚫고 자라났으며 30°C에서 4일간 배양 후 그 크기는 2.0~2.5mm에서 6~8mm로 커졌다.

30°C에서 5일간 진탕배양(150rpm)으로, 50ml 호박배지가 든 250ml 삼각 flask를 사용하여, 구연산 생성의 최적 발효 조건을 검토한 결과는 다음과 같다. 탄소원으로 포도당을 12%로 올렸을 때 구연산의 생성이 최고에 달하였고, 질소 및 무기질원으로 1%의 호박가루가 구연산 생성에 가장 알맞는 농도였다. 초기 pH는 6.0, bead의 수가 100개로 하였을 때 구연산 생성이 가장 좋았으며, 포도당 12%, 호박가루 1%로 한 최적 배양 조건에서, 5일만에 구연산이 23.5g/ℓ로 최고로 생성되었다.

참고문헌

- Rohr, M., Kubicek, C. P. and Komineck, J. : Citric acid. In *Biotechnology*, Vol. 3, Biomass, Microorganism for Special Applications, Microbial Products I, Energy from Renewable Sources, ed. Dellweg, H., Weinheim: VCH Verlag Chemie, p. 420~454 (1983).
- Prescott, S. C and Dunn, C. G. : *Industrial Microbiology*. McGraw Hill Co. Inc., N. Y., p. 533~577. (1959).
- Prosser, J. I. and Tough, A. J. : Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Biotechnology*, 10, 253~274 (1991).
- Berovic, M., Cimerman, A., Steimer, W., and Koloini, T. : Submerged citric acid fermentation: rheological properties of *Aspergillus niger* broth in a stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 579~581 (1991).
- Mislivich, P. H.: Mycotoxin production by conidial fungi. In *Biology of Conidial Fungi*, ed. G. T. Cole & B. Kendrick. Academic Press, New York, p. 37~74 (1981).
- Verhoff, F. H. : Citric acid. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial chemistry*, 5th edn, Vol. A7. VCH, Weinheim, p. 103~108 (1986).
- Hossain, M., Brooks, J. D. and Maddox, I. S. : The effect of the sugar source on citric acid production by *A. niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 1792~1801 (1984).
- Pallares, J., Rodriguez, S. and Sanroman, A. : Citric acid production in submerged and solid state culture of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering*, 15, 31~33 (1996).
- Tran, C. T., Sly, L. I. and Mitchell, D. A. : Selection of a strain of *Aspergillus* for the production of citric acid from pineapple waste in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 399~404 (1998).
- Sassi, G., Ruggeri, B., Specchia, V. & Gianetto, A. : Citric acid production by *A. niger* with banana extract. *Bioresource Technology*, 37, 259~269 (1991).
- 이용희 : 고정화 *A. niger*에 의한 구연산 생산, 한국과학기술원 석사학위논문 (1986).

12. Eikmeier, H. and Rehm, H. J. : Production of citric acid with immobilized *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 363~370 (1984).
13. Mittal, Y., Mishra, I. M. and Varshney, B. S. : Characterization of metabolically active developmental stage of *Aspergillus niger* cells immobilized in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Lett.* 15, 41~46 (1993).
14. Chung, B. H. and Chang, H. N. : Aerobic fungal cell immobilization in a dual hollow-fiber bioreactor. Continuous production of citric acid. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 205~212 (1988).
15. Marier, J. R. and Boulet, M. : Direct determination of citric acid in milk and improved pyridine-acetic acid anhydride method. *J. Dairy Sci.*, 41, 1683~1692 (1958).
16. Bernfeld, P. D. : Enzymes of starch degradation and synthesis. *Adv. Enzimol.*, 12, 379~427 (1951).
17. 지동진 : Production of citric acid in dual hollow fiber bioreactor with immobilized *Aspergillus niger*, 한국과학기술원 석사학위논문 (1989).
18. 이희숙, 신지현, 최언호 : *Kluyveromyces marxianus* FO43의 alginate 고정화와 에탄올 발효 특성. *한국농화학회지*, 38(1), 20~25 (1995).
19. Cheong, S. H., Lee, T. J., Park, J. K. and Chang, H. N. : Citric acid production using encapsulated *Aspergillus niger*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 10(1), 78~88 (1995).

(2000년 7월 31일 접수)