

## 기포탑 및 막 재순환 생물반응기에서의 *Saccharomycopsis lipolytica* 에 의한 구연산 생산

조대철<sup>1</sup> · 정봉현<sup>2</sup> · 장호남<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>한국과학기술연구원 화학공학부, <sup>2</sup>유전공학센터, <sup>3</sup>한국과학기술원 화학공학과

## Citric Acid Production by *Saccharomycopsis lipolytica* in Air-lift and Membrane Recycle Bioreactors

Cho, Dae-Chul<sup>1</sup>, Bong-Hyun Chung<sup>2</sup> and Ho-Nam Chang<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Chemical Engineering, <sup>2</sup>Genetic Engineering Center, Korea Institute of Science and Technology

<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul, Korea

A study on the citric acid production using *Saccharomycopsis lipolytica* (NRRL Y7576) was carried out in shake-flasks, air-lift and membrane recycle bioreactors. The cells entrapped in Ca-alginate beads were used in shake-flasks and air-lift reactor. Repeated batch fermentation in shake-flasks was successfully performed for 34 days and resulted in a yield of 54%. Increased yield (63%) was obtained in the air-lift reactor operation using nitrogen deficient medium (NDM). In the membrane recycle bioreactor operation, the maximal dry cell mass concentration was 39 g/l at a dilution rate of 0.02 h<sup>-1</sup> and the yield with NDM was higher than that with growth medium. In addition, the yield and volumetric productivity with pure oxygen supply were greatly improved compared with those with air supply.

발효공정에서 생산성을 향상시키기 위해 사용되어 지는 방법의 하나가 균체의 고정화이다. 고정화는 특히 연속공정에서의 균체 wash-out 의 방지, 분리정제, 공정의 단순화 등 많은 장점을 지니고 있다. 구연산 발효에 이용된 고정화 사례를 보면 *Aspergillus niger* 의 경우, collagen membrane 이나 calcium alginate 에 고정화하였고 *Candida* 류의 효모균에는 polyacrylamide, calcium alginate, wood chip 등이 고정화 담체로써 이용되어 왔다(1-5).

또한 생산성을 높이기 위한 또다른 방법은 반응기 구조 및 조업방식을 개선하는 것이다. 최근에 이러한 목적으로 개발된 반응기 중에 실관반응기와 막 재순환 생물반응기가 있다. 이 가운데서도 막 재순환 생물반응기는 선택적 투과성을 지닌 막(membrane)을 이용, 생체촉매나 균체는 막 내부에서 순

환되도록 하고 기질만 여과, 배출되도록 하여 고농도배양은 물론 생체촉매나 균체의 재사용도 가능케 해 주었다. Cheryan and Mehaia(6)는 본 시스템을 에탄올 발효에 적용하여 높은 생산성을 얻었고, Anderson(7) 등은 *E. coli* 의 고농도 배양을 성공적으로 수행하였다. 최근 Lee and Chang(8)은 실관막 재순환 반응기를 이용, 에탄올 발효균주인 *Saccharomyces cerevisiae* 를 210g/l 까지 고농도 배양하는데 성공한 결과를 보고하였다.

본 연구에서는 *A. niger* 보다 높은 산 생성능과 다루기 쉬운 이점으로 인해 1960년대 이후(9) 구연산 발효에 많이 사용되고 있는 효모균을 Ca-alginate gel에 고정화하여 반복회분식 조업, aeration 기능을 강화한 기포탑 반응기 조업과 고농도 배양을 위해 막 재순환 생물반응기에서 연속조업한 결과를 비교

Key words: Air-lift reactor, membrane recycle bioreactor, repeated batch, nitrogen-deficient medium

\*Corresponding author

**Table 1. Media composition.**

Components	Growth	Production*
Glucose	40g	100g
Yeast extract	20g	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5g	0.5g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25g	0.25g
Thiamine-HCl		100g
CaCO <sub>3</sub>	10g	
Distilled water	1l	1l

\*production medium = nitrogen deficient medium

검토하였다.

**재료 및 방법**

**사용균주**

본 연구에 사용된 균주는 *Saccharomycopsis lipolytica* (NRRL Y7576)였다.

**사용배지**

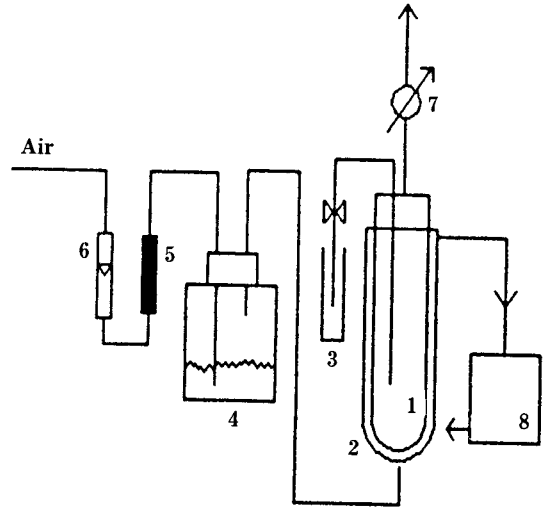
본 연구에서 사용된 배지는 Table 1 과 같다. 배지는 세포배양을 위한 배지 (growth medium)와 구연산 생산을 위한 배지 (production medium)로 분리되어 사용되었다. 질소원으로서 yeast extract를 포함한 배지로 세포배양을 한 후 생산단계에 가서는 질소원 결핍배지 (Nitrogen-deficient medium, NDM)로 전환하여 구연산 생산을 하였다.

**균체 고정화**

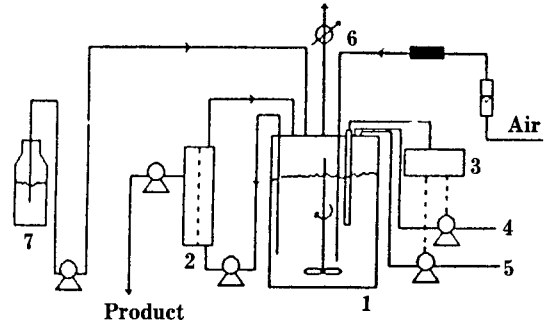
반복회분식 조업 및 기포탑 반응기에서의 구연산 생산은 고정화 균체를 이용하여 수행하였다. 균체 고정화를 위한 담체는 Ca-alginate gel을 이용하였다. 24 시간 배양된 균체를 원심분리하여 4% (w/v) sodium alginate 용액과 혼합한 후 주사기로 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 용액에 적하하여 직경 3-3.5 mm의 bead를 만들었다. 이렇게 만들어진 bead를 배지부피의 20% (v/v)되게 하여 실험하였다.

**Shake-flask 에서의 반복회분식 조업**

Shake-flask 에서의 반복회분식 (repeated batch) 조업은 100 ml 액체배지 (고정화 균체 포함)를 포함하는 500 ml flask에서 수행하였다. 발효조건은 300 rpm의 교반속도 및 온도 30℃를 유지하였다. 24 시간 동안 growth medium에서 균체를 성장시킨 후 질소원 결핍배지인 production medium으로 교환해



**Fig. 1. Experimental set-up of air-lift reactor system.** (1. bubble column, 2. water jacket, 3. sample bottle, 4. humidifier, 5. air filter, 6. rotameter, 7. condenser, 8. water circulator).



**Fig. 2. Experimental set-up of membrane recycle bioreactor system.** (1. fermentor, 2. hollow fiber membrane filter, 3. pH controller, 4. 2N NaOH, 5. 2N HCl, 6. condenser, 7. medium bottle)

준 다음 구연산 생산실험을 수행하였다.

**기포탑 반응기**

본 실험에서 사용한 기포탑 반응기 (air-lift reactor) 및 실험장치는 Fig.1과 같다. 반응기는 내경 6 cm, 높이 25 cm 크기의 유리관으로 제작되었으며 공기분산을 위해서 sintered glass filter가 사용되었다. 온도조절을 위하여 30℃ 물을 water jacket으로 순환시켰으며, 조업시 배양액의 부피는 300 ml, superficial gas velocity는 0.88 cm/s였다.

**막 재순환 생물반응기**

막 재순환 생물반응기(membrane recycle bioreactor)의 장치도는 Fig.2와 같다. 500 ml의 조업부피를 가진 발효조(Bioflo C30, NBS, USA)에 실관막(hollow fiber membrane)을 연결하고 peristaltic pump에 의하여 발효액이 순환되도록 하였다. 새로운 배지는 연속공급되고 발효생성물은 막을 통해 연속제거된다. 실관막은 molecular cut-off가 50,000이고 내경 1.5 mm, 외경 2.5 mm인 asymmetric type이며 재질은 polyamide로써 서독 Berghof사 제품이다. 실관막 module은 직경 3 cm, 길이 22 cm의 아크릴관에 실관 다발을 넣은 후 polyurethane으로 potting하여 제작하였다. 실관막 module은 75% 에탄올 용액으로 멸균한 뒤 멸균 증류수로 세척한 후에 장치에 연결하였다. Growth medium에서 배양한 seed 50 ml을 production medium 450 ml에 접종하여 온도 30°C, aeration rate 1 vvm, 교반속도 800 rpm의 조건에서 회분식 조업을 수행하였고 3-4일 후 연속조업으로 전환하였다. 배양액의 pH는 2M 농도의 HCl과 NaOH 용액을 이용하여 5.0으로 조절하였다.

## 분 석

포도당은 glucose analyzer(YSI model 23A, USA)로, 구연산은 Marier와 Boulet 방법(10)으로, 그리고 iso-구연산은 Stern의 효소법(11)으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### Shake-flask에서의 반복회분식 조업

Briffaud와 Engasser(5)에 의하면 구연산 생산은 배지내 또는 세포내의 질소원 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 즉 구연산 생성시기는 배지내 질소원 결핍시기와 거의 일치하며 또한 세포내 질소함량의 감소시기와도 비슷한 것으로 밝혀졌다. 세포성장기에 질소원은 반드시 필요하지만 구연산 생성시기에 들어서면 질소원은 오히려 구연산 생성의 억제인자로서 작용하게 된다. 이러한 이중적인 대사작용을 이용, 세포성장기와 구연산 생성기를 분리함으로써 효율적인 구연산 생산을 할 수 있는 반복회분식 조업을 시도해 보았다(Fig.3), 즉 질소원으로 yeast extract를 20 g/l 넣은 성장배지로 24시간 동안 고정화 균체를 배양한 후 균체로 가득찬 beads만 남기고 배양액은 모두 제거한 뒤 질소원 결핍 배지로 교환해 주었다. 12일 조업 후 구연산 생성량은 1차 41g/l, 2차 56.5g/l, 3차 33g/l였다. 각

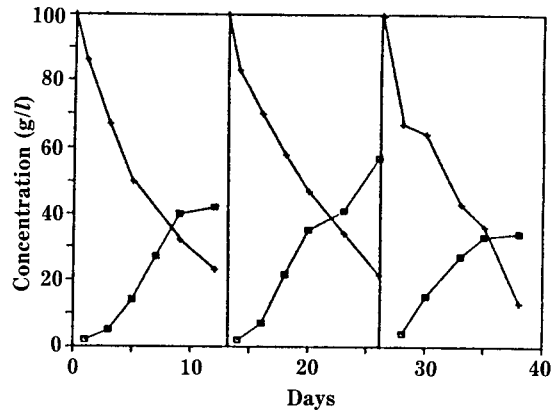


Fig. 3. Citric acid production by repeated batch fermentation in a shake-flask. (□, citric acid; +, glucose)

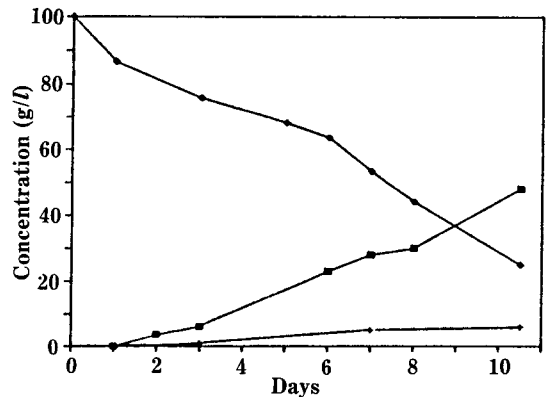


Fig. 4. Citric acid production in an air-lift reactor. (□, citric acid; +, isocitric acid; ◇, glucose)

batch 간에는 deactivation된 균체들을 재활성화시키기 위하여 24시간 동안 질소원 포함배지에서 배양하는 시기를 두었다.

본 조업방식은 고정화 담체에 loading된 고농도 균체에 의해 높은 생산성을 얻을 수 있으며, 또한 질소원이 결핍된 상태이므로 더 이상의 균체증식을 억제하여 배양액 중으로 균체들의 leakage를 최소화함으로써 회수처리 공정을 간편하게 할 수 있다는 장점을 갖는다.

### 기포탑 반응기 조업

Fig.4는 기포탑 반응기에서 구연산 생산결과를 보여준다. Shake-flask 조업에서와 같이 24시간 동안 고정화 균체배양 후 질소원 결핍배지로 교환해 준 다음 구연산 생산을 수행하였다. Shake-flask에서 보다 조업시간이 2-3일 단축되면서도 48g/l의 높은 구연산 생산을 보여주었다. 산물의 수율(product

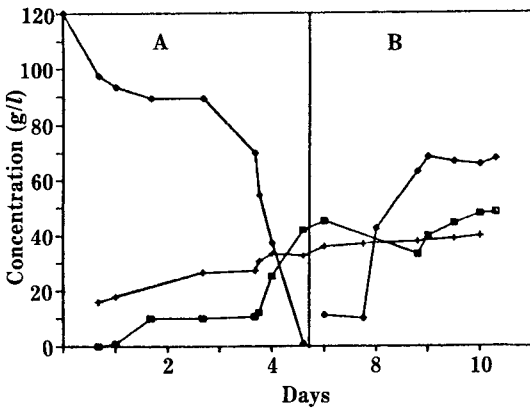


Fig. 5. Citric acid production in membrane recycle bioreactor with air supply (A: batch, B: continuous). (□, citric acid; ◇, glucose; +, cell mass)

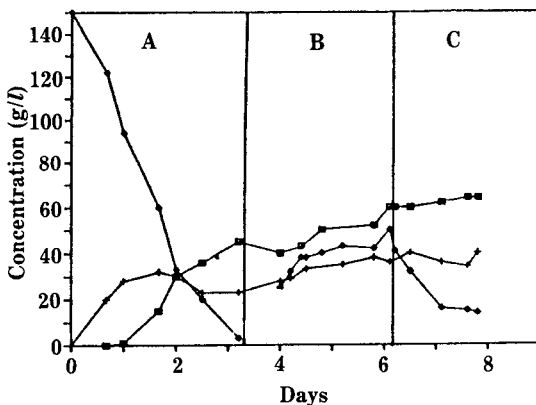


Fig. 6. Citric acid production in a membrane recycle bioreactor with pure oxygen supply (A: batch, B, C: continuous). (□, citric acid; ◇, glucose; +, cell mass)

yield)은 63%로 shake-flask 조업에 비해 10% 정도 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 기포탑 반응기에서의 향상된 결과는 flask에서 보다 산소전달 측면에서 유리하였기 때문인 것으로 판단되었다. 즉, sintered glass를 통하여 공기가 잘 분산됨으로써 기포의 표면적이 증가하여 균체에의 산소공급이 향상되었기 때문이다. 그러나 5일 이후 심한 공기유동으로 깨어진 bead에서 균체들이 새어나와 자람으로써 sintered glass의 pore를 막게 되어 공기분사가 불균일해 지는 문제가 발생하였다. 따라서 본 반응기의 보다 성공적 조업을 위해서는 공기분사 filter 및 반응기 구조의 개선이 필요할 것으로 판단되었다.

막 재순환 생물반응기 조업

Table 2. Comparison of various reactor operation results.

Bioreactor	Fermentation or residence time(h)	Final citric acid conc. (g/l)	Yield (%)	Volumetric productivity (g/l-h)
Shake-flask (NDM)	288	41	53.9	0.14
Air-lift (air, NDM)	252	48	63.1	0.19
HFMRR (air, NIM)*	50	45.2	23.2	0.90
HFMRR (O <sub>2</sub> , NIM)*	50	57.5	38.4	1.15
HFMRR (O <sub>2</sub> , NDM)*	50	61.7	69.3	1.23

HFMRR=hollow fiber membrane recycle bioreactor

공기와 순수 산소를 사용한 막 재순환 생물반응기 조업결과를 각각 Fig.5와 6에 도시하였다. A 조업은 회분식 배양(포도당 200g/l, yeast-extract 10g/l)이며 B는 질소원 포함배지에서 연속배양, 그리고 C조업은 질소원 결핍배지에서 연속배양한 결과이다. 낮은 회석속도(0.02 h<sup>-1</sup>) 때문에 A에서 B로 전환 후 1-2일 경과한 후에 정상상태의 배양이 이루어졌다. 회분식 조업이나 연속식 조업에 상관없이 균체량은 큰 변화가 없어 34-39g/l 정도으로써 이와 같은 시스템을 이용한 *Saccharomyces cerevisiae*의 고농도배양에서 최고 210g/l의 높은 균체량을 보인 것에 비하여 (8) *S. lipolytica*는 고농도배양에 한계가 있는 것으로 나타났다. 즉 *S. cerevisiae*가 facultative한 균인데 반하여 *S. lipolytica*는 strictly aerobic이기 때문에 산소전달에 제한을 받는 것으로 보여졌다(12). 구연산 생성량과 수율은 조업상태에 따라 많은 차이를 보였는데 즉, 공기를 공급한 연속배양(Fig.5, B)에서는 구연산 생성농도가 42.2g/l에 수율 23%, 순수한 산소를 사용한 연속배양(Fig.6, B)에서는 44.3g/l와 수율 38%를 나타내었고 질소원 결핍배지로 연속배양을 수행한 C조업의 경우는 생성량 및 수율이 각각 61.7g/l, 69.3%였다. 이러한 결과로써 순수 산소배양이 공기에 의한 배양보다 균체의 산소이용에 유리함을 알 수 있었고 배지내 질소원의 제거가 막 재순환 생물반응기에서도 수율 향상의 큰 요인으로 작용하였다.

반응기별 생산성 및 수율비교

본 실험에서 사용한 반응기들의 조업결과를 산 생성량과 수율, 생산성을 기준으로 비교하여 보았다 (Table 2).

막 재순환 생물반응기가 각 부문에서 가장 높게 나타났는데 이것은 고농도 세포배양이 가능했던 것과 고정화 균체와는 달리 free cell 상태여서 산소 전달저항이 가장 작았기 때문으로 생각된다. 또한 같은 막 재순환 반응기에서도 질소원 결핍배지를 사용했을 경우 질소원 포함배지의 경우보다 수율이 1.8 배나 높아졌으며 부피당 생산성도 7% 증가하였고, 산소를 사용한 배양이 공기공급에만 의존한 경우보다 1.6 배 향상시켰다.

### 결 론

효모균주인 *Saccharomycopsis lipolytica* (NRRL Y7576)를 이용하여 진탕 플라스크, 기포탑 반응기 및 막 재순환 생물반응기에서의 구연산 생산성을 고찰하였다. 플라스크 진탕배양과 기포탑 반응기 실험의 경우에는 균체를 Ca-alginate 로 고정화시켜 사용하였다. 플라스크 진탕배양에서의 반복회분식 발효 결과 34 일간의 장기 조업이 성공적으로 수행되었고 구연산 수율은 평균 54% 였다. 수율의 향상을 위하여 기포탑 반응기 조업을 한 결과 수율이 63% 로 증가되었으며 균체의 대량증식이 가능한 막 재순환 생물반응기의 조업으로 최대 균체량을 39g/l(회석속도 0.02 h<sup>-1</sup>)까지 올렸으며 이 때에 질소원 결핍배지를 사용한 경우가 성장용 배지에 비해 구연산 수율이 높음을 확인하였다. 또한 순수한 산소를 공기 대신 공급해 주었을 때 수율 및 단위부피당 생산성이 크

게 향상되었다.

### 참고문헌

1. Vieth, W.R. and K. Venkatasubramanian: *Enzyme Eng.*, **4**, 307 (1978).
2. Linko, P.: *Adv. Biotechnol.*, **1**, 711 (1981).
3. Stottmeister, U.: *Z. Allg. Mikrobiol.*, **19**, 763 (1979).
4. Lim, D.J.: Ph. D. Thesis, Seoul National University (1985).
5. Briffaud, J. and M. Engasser: *Biotech. Bioeng.*, **21**, 2093 (1979).
6. Cheryan, M. and M. Mehaia: *Proc. Biochem.*, **19**, 204 (1984).
7. Anderson, K.W., E. Grulke and P. Gerhart: *Bio/Technol.*, **2**, 894 (1984).
8. Lee, C.W. and H.N. Chang: *Biotech. Bioeng.*, **29**, 1105 (1987).
9. Tabuchi, T. and M. Abe: Japanese Patent 6820707 (1968).
10. Marier, J.R. and M. Boulet: *J. Dairy Sci.*, **41**, 1683 (1958).
11. Stern, J.R.: *Methods in Enzymology*, Ch.3, p.425, Academic Press (1957).
12. Enzinger, J.D. and J.A. Asenjo: *Biotechnol. lett.*, **8**(1), 7 (1986).

(Received October 13, 1989)