

## 이중실관 생물 반응기에서의 구연산 생산과 Scale-up

장호남 · 지동진\* · 심상준

한국과학기술원 화학공학과 생물공정연구센터

\*금호연구소

### Citric Acid Production and Scale-up in Dual Hollow Fiber Bioreactor

Ho Nam Chang, Dong Jin Ji\*, and Sang Jun Sim

Bioprocess Engineering Research Center and Department of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daeduk Science Town, Taejon 305-701, Korea.

\*Research & Development Center, Kumho & CO., INC

**요 약 :** 여러 크기의 이중실관 생물 반응기에서의 *Aspergillus niger* (KCTC 1232)를 이용한 구연산 생산 실험을 수행하였다. 최종 세포농도는 세포 성장구간 기준으로 300g/l에 달하였다. 공기와 산소의 공급 조건하에서의 단위 용적당의 생산성은 각각 0.63, 0.02g/l.h였고 이는 회분식 발효에 대해 10, 16배 증가한 결과이다. 공급배지의 초기 pH는 구연산의 생산에 중요한 요소이며 pH가 낮을수록 높은 구연산 생산수율을 얻을 수 있었다. Scale-up의 가능성을 알아보기 위해 반응기 unit와 배지의 공급속도를 변화시킨 결과 반응기 unit와 배지 공급속도의 증가는 기질의 높은 소비속도로 인해 생산성의 증가를 가져왔다.

**Abstract:** A study on the citric acid production was performed in various size dual hollow fiber bioreactors with immobilized *Aspergillus niger* (KCTC 1232). The final dry cell mass density reached 300g/l based on the space volume available for cell growth. Under air and oxygen aeration the volumetric productivity reached 0.63 and 1.02g/l.h, which corresponded to 10 and 16 fold over those of batch fermentation, respectively. The initial pH of the medium was a critical factor and the lower value resulted in higher citric acid yield. The increase in the feeding rate of medium or the number of reactor unit resulted in the improvement of the productivity due to higher consumption rate of substrate.

### 1. 서 론

막분리 공정은 입자의 크기 및 전하 등 물질의 성질과 세공의 크기, 기능성기의 존재 유무 등 막 자체의 특성을 이용하며 막을 중심으로 양쪽 사이의 농도차나 압력차, 전위차 등의 추진력을 통하여 기상 또는 액상의 혼합물을 분리, 농축 및 정제하는 공정이다. 이러한 막 분리 공정은 막의 안정성 및 투과도, 선택도의 영향을 크게 받으며 한외여과의 중요성이

부각됨에 따라 특히 투과도 개선에 대한 연구가 활발히 진행되었다. 막의 투과량은 단위 용적당 접촉면적의 크기와 막의 두께, 막의 물성에 의해 직접 결정되므로 용적이 크고 channeling 현상이 생기던 초기의 평판막, 원통형 막, 나선형 막으로부터 단위 용적당 표면적이 가장 큰 실관막이 개발되었고 막의 구조 역시 기체 분리에 쓰이던 비다공성 막으로부터 미세 다공성 막으로 발전되고 미세 다공층 표피를 지닌 비대칭성 막이 개발되었다. 최근에는 투과도가 서로 다른

막들을 겹쳐서 제작한 혼성 막과 매우 얇은 막이 개발되어 투과성과 선택도에 있어서 혁신적인 발전이 이루어졌다.

생물공학 분야에서도 효소나 생체를 고정화하는 방법의 하나로 실관 반응기를 이용하는 연구가 진행되었다. 1971년 Rony[1]가 실관막 내부에 효소를 고정화하고 외부의 기질 용액을 교반하여 효소반응을 실시한 것을 시작으로 1972년 Knazek[2]는 실리콘 관다발을 이용한 산소 전달 촉진기를 실관 반응기에 연결하여 산소가 충분히 포화된 배지를 공급함으로써 실관막의 shell층에서 동물세포를 배양하였고 1974년 Waterland 등[3]은 실관의 다공성 지지 부분에 효소를 충전하고 실관의 내부에 기질 용액을 연속 공급하였다. 1982년 Kim과 Chang은 기질 용액 흐름에 맥동류를 가하여 환외여과시키는 조업방식을 제안하였다[4-5].

이와 같이 실관 반응기에 대한 연구가 진행되면서 미생물의 고농도 배양에 이를 이용하려는 이른바 이중실관 반응기에 대한 연구가 최근 진행되고 있다. 일반적으로 생화학 반응은 미생물 자체가 효소와 같은 고상과 배지의 액상, 기상으로서의 공기나 산소가 공존하는 상태에서 일어나는데 액상에서의 확산계수는 기상에서의 그것보다 10만배나 낮고 산소용해도도 대단히 낮으므로 반응기내에서의 산소전달을 원활히 해주기 위해 기상과 액상간의 접촉면적을 증대시키는 것이 대단히 중요하다. 1970년대의 산소전달 촉진 장치를 시초로 하여 1985년 Kim과 Robertson은 기존의 실관 반응기가 고상, 기상의 3상 반응에 적용시키기 어렵다는 단점을 보완하기 위해 실관막 내부에 실리콘막 내부에 실리콘관을 삽입시킨 이중실관 반응기를 개발하고 실리콘막과 실관막 사이에 미생물을 고정화한 후 산소와 기질 용액을 실리콘막과 실관막을 통하여 각각 공급함으로써 *Streptomyces aureofaciens* 균체를 고농도로 배양하였으며 테트라사이클린의 생산성이 플라스크 진탕 발효시보다 30배 이상 높았다고 보고하였다[6-7]. 그러나 성장배지 대신 생산배지로 교체 공급한 후 3일만에 생산성이 크게 감소하였으며 이러한 결점을 개선하기 위해 1987년 Chung과 Chang은 실리콘 관내에 폴리프로필렌 실관을 삽입한 새로운 형태의 이중실관 반응기를 제안하여 *Nocardia mediterranei* 균체를 550g/L의 고농도로 배양하고 rifamycin B를 50일 이상 생산하는데 성공하였으며 생산성을 플라스크 진탕 발효시보

다 26배 이상 올릴 수 있었다[8]. 또한 *Asperillus niger*를 이용한 구연산 연속 생산 실험에서는 이와 같은 반응기를 이용하여 생산성을 30배 증가시켰다[9]. 그러나 이와 같은 이중실관 반응기의 조업 결과는 단일 크기 반응기의 결과이고 이의 scale-up 가능성에 대한 연구가 필요하다.

본 실험은 이중실관 반응기의 scale-up을 위해 반응기의 직경과 길이의 변화에 따른 구연산 생산 특성을 살펴보고자 하였다.

## 2. 실 험

### 2.1. 사용 균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 *Aspergillus niger* (KCTC 1232)로서 한국과학기술연구원 산하 유전공학 연구소에서 분양받았으며 균주의 활성 유지를 위하여 potato dextrose agar 배지에서 2개월마다 1회씩 계대배양하였다. 사용한 기본 배지의 조성은 sucrose 60g/L,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2.5g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.00024g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0011g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0065g/L이고 pH의 조절에는 0.5N-NaOH용액을 이용하였다. 이 기본배지의 조성은 Shu와 Johnson의 실험결과에 따른 것이다[10].

### 2.2. 반응기 재료

본 실험에서 이용한 실관막으로는 서독 Enka사의 제품으로 내경이 0.033cm이고 외경이 0.065cm인 isotropic polypropylene 실관막으로서 세공의 크기는 0.4~0.6 $\mu\text{m}$  정도이고 porosity는 80~90%이다. 실리콘막으로는 미국 Dow Corning사의 제품으로 내경이 0.147cm이고 실리콘관으로서 산소 투과도는 6.26  $\times 10^{-8}$ ( $\text{cm}^3 \cdot \text{cm} / \text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cm Hg}$ )이다.

### 2.3. 반응기 구조

Fig. 1은 완성된 이중실관 생물반응기의 측면도이다. 본 실험에서 제작하여 이용한 기본 크기를 갖는 반응기의 유리관 몸체는 내경이 0.8cm이고 외경이 1.0cm이다. 이 기본 반응기 외에 외경이 1.6, 2.0cm인 반응기를 제작하였다. 이들의 유효 이중실관 길이는 모두 14cm이며, 각 실리콘관에는 두개의 폴리프로필렌 실관을 삽입하였으며 기본 반응기는 8개의 실리콘관으로 구성되고 이를 1unit로 하여 1.6cm 반

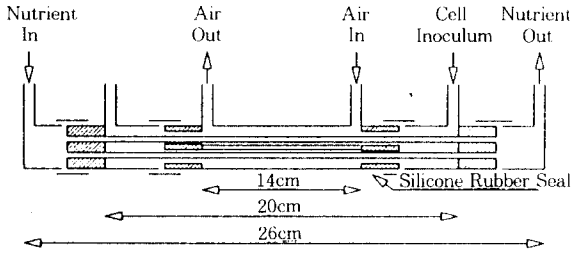


Fig. 1. Detailed structure of dual hollow fiber bioreactor.

응기에는 3units(24 실리콘관)을, 2.0cm인 반응기에는 5units(40 실리콘관)을 삽입하였다. 또한, 기본 반응기와 직경은 같으나 유효 이중실관 길이가 24cm인 반응기도 제작하였다.

균주인 *Aspergillus niger*는 실리콘막과 폴리프로필렌 실관 막 사이에 접촉하며 cell 및 포자의 크기가 최소 5 $\mu$ m 이상이므로 여기에 고정된다. 산소는 실리콘막을 통하여 확산되어 균체로 전달되며 배지용액은 실관의 내부로 공급해 주는데 농도차에 의한 확산과 한외여과에 의한 실관막 투과로써 절달된다. 이와 같이 영양분이 공급됨으로써 균체의 자기증식 및 생육 때 반응이 진행되며 이때의 생성물은 다시 실관막을 통하여 외부로 전달된다.

2.4. 실험장치의 구성

실험장치의 구성은 Fig. 2와 같다. 전체 시스템의

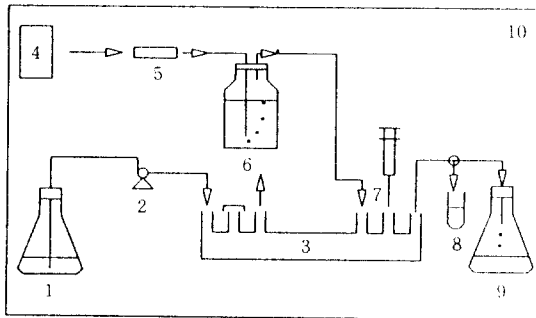


Fig. 2. Schematic diagram of the experimental setup 1. medium reservoir, 2. pump, 3. reactor, . oxygen source, 5. filter, 6. humidifier, 7. inoculum port, 8. sampling port, 9. effluent reservoir, 10. temperature controlled chamber.

온도는 30 $^{\circ}$ C로 고정되는 항온조내에 위치하며 배치는 peristaltic pump를 이용하여 일정 유속으로 공급 하였으며 공기 또는 산소는 bubbler를 통하여 수분으로 포화시킨후 공급하였다.

2.5. 실험 방법

반응기의 전처리로서 반응기내의 폴리프로필렌 실관은 소수성이므로 50% 에탄올 용액으로 wetting 및 한외여과시켜 친수성으로 변화시킨다. 반응기의 살균은 5%의 포름알데히드로 반응기를 멸균시킨 다음 증류수로 충분히 세척시켰다. 접종은 250ml의 삼각 플라스크에 성장배지를 50ml 정도 넣고 멸균시킨 후 무균실에서 agar slant로부터 포자를 접종하여 30 $^{\circ}$ C, 300rpm의 조건으로 environmental incubator shaker에서 3~4일동안 배양했다. 이렇게 종자 배양한 것으로 무균적으로 10배 희석한 후 1회용 주사기를 이용하여 반응기에 접종했다. 성장배지를 일정 유속으로 공급하여 균체를 고농도로 배양한 후 생성이 본격화되는 단계에서 질소원을 포함치 않은 구연산 생산 배지로 교체 공급하되, 주기적으로 유출액중 일부를 채취하여 구연산 및 sucrose의 농도와 pH 등을 측정하였다.

2.6. 분석방법

균체에 의하여 아직 흡수되지 않은 sugar의 농도 측정은 DNS 방법으로 수행하였다[11]. 구연산의 분석은 Marier와 Boulet의 방법을 이용하였다[12].

3. 결과 및 고찰

3.1. 산소원의 영향(1unit 실리콘관 사용시)

분양받은 *Aspergillus niger* (KECT 1232)의 생산 특성을 알아보기 위해 초기 pH를 6.0으로 하여 삼각 플라스크를 이용한 회분식 배양을 수행한 결과 구연산의 최고 생성 농도는 15g/L였으며 생산성은 0.063g/L · h였다.

외경 1cm, 유효 이중실관 길이 14cm인 기본 크기의 반응기를 조업하여 산소원을 교체 공급하였을 경우의 구연산 생산 특성을 살펴보았다. 배지의 공급속도는 0.9ml/h이었으며 공급배지의 pH는 3.0이었다. 최초에는 질소원인 질산암모늄 2.5g/L이 포함된 성장배지를 공급하였으며 실리콘관 및 폴리프로필렌 실관 사이의 균체 성장 공간에서의 생장이 충분히 이루어

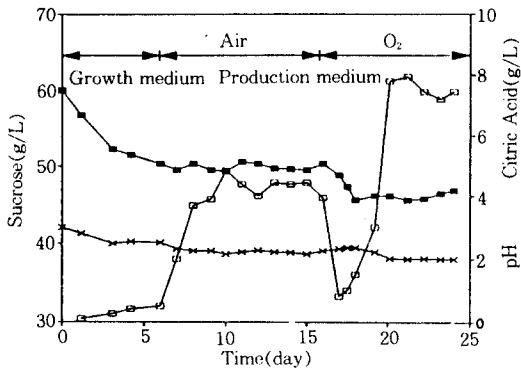


Fig. 3. Effect of oxygen source switch from air to pure oxygen on the production of citric acid production during one unit reactor operation. (medium feeding rate=0.9mL/h) □: citric acid, ■: sucrose, X: pH.

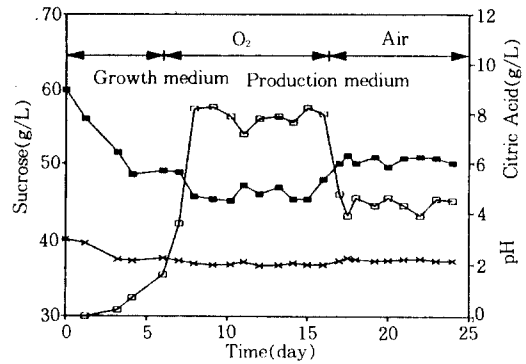


Fig. 4. Effect of oxygen source switch from pure oxygen to air on the production of citric acid production during one unit reactor operation. (medium feeding rate=0.9mL/h) □: citric acid, ■: sucrose, X: pH.

어진 후 질소원이 포함되지 않은 구연산 생산 배지로 교체 공급하였다. 접종액중의 pellet이 클 경우에는 균일한 성장이 이루어지지 않고 군데군데에서 독립적인 pellet이 형성되는 현상을 확인할 수 있었으며 접종용 배지중의 균체 성장이 완전히 진행되기 전에 접종하는 것이 좋다. 3, 4일간의 성장이 적합한 접종액의 조건을 제공하였다. 또한, 배지 공급시 입구쪽부터 균체가 성장해 가는 현상을 보였는데 이는 배지의 신선도와 관련하는 고속 성장에 근거하므로 1일 간격으로 배지의 공급 방향을 교체해 줌으로써 전체 반응기 내에서의 균일한 성장을 도모하였다. 본 실험에서는 발효 시작 6.4일후 생산 배지로 교체하였다.

Fig. 3는 최초의 산소 공급원을 공기로 하고 생산 단계 도중인 16.3일 후부터 순수 산소로 교체하여 조업한 결과이다. 구연산 생산 단계에서 공기 및 산소 사용시의 구연산의 유출농도는 각각 4.3, 7.4g/L이었다. 따라서 반응기의 유효 유리관부의 내부 용적 7.0ml를 기준으로 한 단위용적당 생산성은 0.55 및 0.95g/L.h로서 산소를 공급했을 경우 생산성이 70% 이상 상승하였다. 구연산의 생산수율에 있어서도 산소를 사용했을 경우가 평균 52%로서 공기 사용시보다 20%정도 높았다. 액침 발효에 있어서도 통기 속도를 증가시키에 따라 구연산 생산이 촉진되며 산소를 사용하면 수율이 증가됨이 보고된 바 있다. 산소 교체시 sucrose 소비량의 증가에도 불구하고 생산되는 구연산의 농도는 오히려 감소하는 이유는 산소 결

이에 따른 여분의 산소 공급에 의하여 균체의 성장이 다시 시작되기 때문이라 보여진다. Fig. 4는 앞의 경우와는 반대로 초기에는 산소를 공급하고 접종 6.4일 후 공기로 교체하여 조업한 결과이다. 이 경우는 앞의 경우와는 달리 구연산 생산 농도의 일시적 감소는 없었으며 구연산 농도는 공기 공급시의 평균 8.0g/L로부터 4.4g/L까지 단순한 하락을 보이고 있다. 반응기의 단위 용적당의 구연산 생산성은 1.02g/L.h로부터 0.56g/L.h로 감소하였으며 수율도 55%에서 44%로 낮아졌다.

### 3.2. 공급배지의 pH 변화에 따른 영향(3 unit 실리콘 관 사용시)

Fig. 5는 3unit의 실리콘관 bundle이 삽입되어 있는 외경 1.6cm, 유효 이중실관 길이 14cm의 반응기를 통한 pH 변화에 따른 구연산 생산 실험 결과이다. 산소원으로는 공기를 사용하였으며 배지 공급속도는 1ml/h이며 성장 배지의 pH는 3.0으로 하였다. 균체 성장이 충분히 이루어진 접종 8.2일후 pH 3.0인 구연산 생산 배지로 교체하였고 13.3일째에 pH 6.5의 배지로, 17.3일째에는 pH 5.5인 배지로 교체 공급하였다. pH가 3.0, 5.5, 6.5인 배지 공급시 반응기에서 유출되는 구연산의 평균농도는 각각 8.6, 7.0, 5.6g/L이었으며 평균 구연산 수율은 각각 45, 37, 29%로서 pH가 낮을수록 구연산 생산에 유리하였다. 1unit의 반응기를 기준으로 했을때 3unit 반응

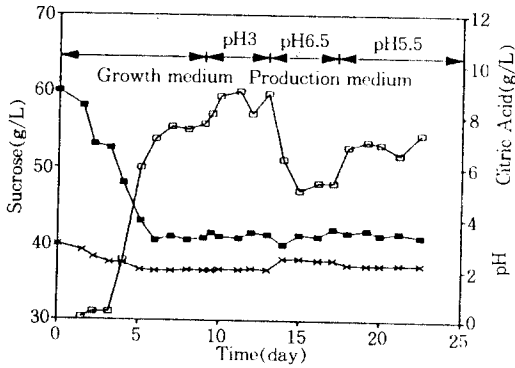


Fig. 5. Result of three unit reactor operation showing the effect of medium pH (air aeration, medium feeding rate=1.0mL/h) □: citric acid, ■: sucrose, X: pH.

기의 내부용적은 21ml가 되며 단위 용적당 구연산 생산성은 각각 0.40, 0.33, 0.26g/L·h이었다. Unit당 sucrose의 평균 소비속도는 0.063g/L·unit로서 큰 변화는 없었다.

3.3. 배지 공급속도의 영향(5unit 실리콘관 사용시)

Fig. 6은 5unit의 실리콘관 bundle이 삽입되어 있는 외경 2.0cm, 유효 이중실관부 길이 14cm의 반응기를 통한 배지 공급속도 변화에 따른 구연산 생산 실험 결과이다. 산소원으로는 공기를 사용하였고 성장 배지의 공급속도는 1ml/h이며 공급배지의 pH는 3.0이었다. 접종 10.8일후 pH가 3.0인 구연산 생산 배지로 교체 공급하기 시작하였다. 이 반응기의 경우 40개의 실리콘관이 삽입되어 있고 배지가 저속으로 공급되었기 때문에 일부의 실리콘관은 균체의 과도한 성장에 의하여 팽창이 현저하였다. 접종 20.2일후 배지 공급속도를 1ml/h로부터 2ml/h, 5ml/h로 증가시켰을 경우 유출액중의 평균 구연산 농도는 각 속도 범위에서 11.3, 7.5, 4.1g/L에 이르렀다. Sucrose의 소비율은 37%에서 28%, 17%로 감소하고 평균 수율 또한 51%에서 44%, 39%로 완만한 감소를 보였다. 낮은 속도에서의 높은 구연산 수율은 구연산 생산 농도의 증가에 따른 pH의 감소로 생산 조건이 보다 좋아졌기 때문이라 보여진다. 그러나 sucrose의 평균 소비속도는 유속의 증가에 따라 증가하고 이에 따라 구연산의 생산성도 0.35g/L·h로부터 0.45 및 0.63g/L·h로 증가하고 있다. 기질의 공급속도가 커

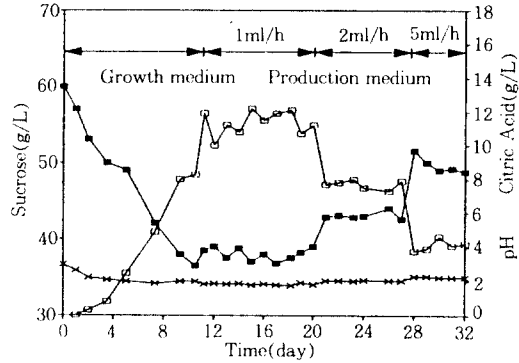


Fig. 6. Result of five unit reactor operation showing the effect of medium feeding rate(aeration) □: citric acid, ■: sucrose, X: pH.

지면 반경방향에서의 기질의 농도기울기 및 실관에서의 압력강하가 커지므로 균체층으로의 기질의 한외여과량이 증가하게 됨으로써 생촉매와 기질간의 접촉이 향상되는 것이다. 따라서 반응기의 크기가 일정할 때 배지의 공급속도를 증가시키는 것이 구연산의 생산성 측면에서는 유리하다고 보여진다. 그러나 유속의 증가는 미반응 sucrose의 증가를 초래하기 때문에 경제적인 측면에서의 고려가 선행되어야 하며 기질의 소비속도의 최대값은 균체 농도에 의해 결정되므로 필요 이상의 공급속도의 증가는 무의미하다. 구연산의 축적은 균체의 성장과는 부분적으로만 관련되며 따라서 기질인 sucrose가 최대한 이용되어야 한다.

3.4. 반응기의 길이에 따른 영향

Fig. 7은 외경이 1.0cm이고 유효 이중실관부의 길이가 24cm인 반응기를 이용한 구연산 생산 실험의 결과이다. 이 반응기는 내부 용적이 12.0ml로서 길이 14cm인 기본 반응기보다 약 70% 정도 크다. 산소원으로는 공기를 사용하였으며 성장 및 구연산 생산배지의 pH는 3.0으로 조절하였고 공급속도는 0.9ml로 유지하였다. 반응기의 길이가 증가함에 따라 입구쪽의 균체 성장이 현저하였고 성장 배지의 교체 공급은 접종 9.8일 후에 실시하였는데 이는 14cm 길이의 반응기에서의 6.4일보다 성장이 오래 지속되었다. 구연산 생산기에서 유출액중의 평균 구연산 농도는 5.3g/L로서 기본 반응기의 4.4g/L보다 12% 정도 높았으며 소비된 기질의 양은 10.4g/L보다 30% 정도 증가된 14.2g/L이었다. Fig. 8은 유효 이중실관부

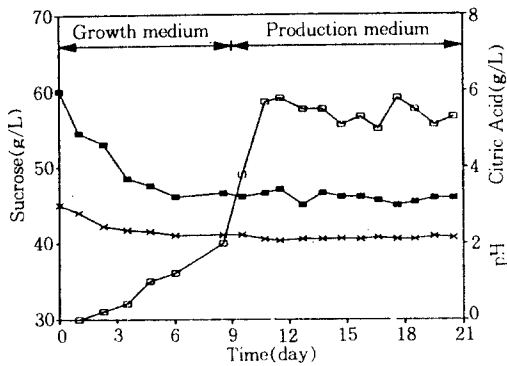


Fig. 7. Result of 24cm effective length reactor operation (e. g. aeration with air, medium feeding rate=0.9mL/h) □: citric acid, ■: sucrose, X: pH.

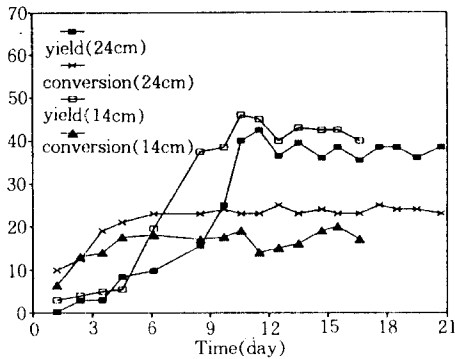


Fig. 8. Comparison of 24cm reactor operation result with that of 14cm reactor under the same conditions (with air, pH 3.0 medium, feeding rate 0.9mL/h).

부의 길이가 14 및 25cm일 경우의 구연산 생산수율과 sucrose 소비율을 나타낸다. 길이가 증가함에 따라 기질 소비율은 18%에서 24%로 증가하였으나 구연산의 생산 수율은 42%에서 37%로 오히려 떨어졌다. 반응기의 단위 용적당의 구연산 생산성은 기본 반응기보다 30% 가량 낮아진 0.40g/L·h이었다. 이는 배지가 실관축 방향으로 흘러가면서 반응에 의하여 기질이 계속 감소하는 결과로 균체에 의한 기질 소모속도가 저하되어 균체의 maintenance energy가 차지하는 비율이 증가하기 때문이라 보여진다.

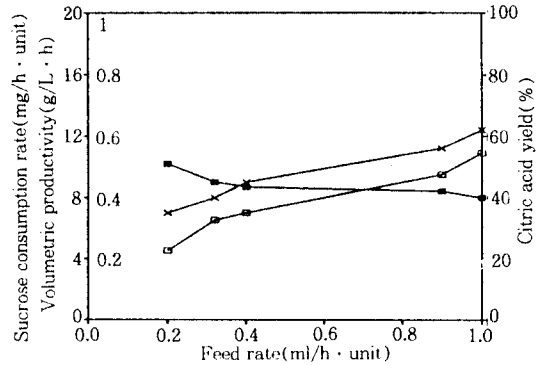


Fig. 9. Effect of medium feeding rate per one unit on the sucrose consumption rate, citric acid yield and volumetric productivity (air aeration, pH 3.0 medium) □: sucrose consumption rate, X: volumetric productivity, ■: citric acid yield.

Table 1. Yields and volumetric productivities in the shake-flask fermentation and in various DHFBR fermentation modes

fermentation modes	ferm. time or feed rate per one unit	citric acid conc. (g/l)	average yield (%)	volumetric productivity* (g/l·h)
1) shake-flask	240h	15.0	20	0.063
2) DHFBR				
A. air, 1 unit	0.9 ml/h	4.4	44	0.56
B. O <sub>2</sub> , 1 unit	0.9 ml/h	8.0	55	1.02
C. air, 3 unit	0.33 ml/h	8.6	45	0.40
D. air, 5 unit	0.2 ml/h	11.3	51	0.35
	0.4 ml/h	7.5	44	0.45
	1.0 ml/h	4.1	39	0.63
E. air, 24cm	0.9 ml/h	5.3	37	0.40

\*volumetric productivities are based on the effective glass tube volume of one unit reactor(7.0ml)

### 3. 5. 반응기의 반경에 따른 영향

앞에서 유효 이중실관부의 길이가 모두 14cm이고 외경이 1.0, 1.6 및 2.0cm인 반응기를 사용하여 조업한 결과를 보였다. 8개의 실리관 bundle을 1unit로 기준하였을때 이들은 각각 1, 3, 5 unit로 구성된 반응기에 해당한다. 산소원으로 공기를 사용하고 구연산 생산배지의 pH가 3.0인 경우의 unit당 배지 공급유속에 대한 구연산 생산수율 및 생산성, sucrose 소비속도의 관계를 Fig. 9에 나타내었다. 유속의 증가에 따라 sucrose의 소비속도가 증가하고 구연산의 생산성 또한 증가하고 있음을 알 수 있다.

이는 배지의 공급유속이 증가하면 반경방향의 기질 농도 기울기가 커지고 실관내의 압력강하가 커지는 등의 이유로 보다 고농도의 기질이 충분히 균체 층에 전달되기 때문이다. 유속 증가에 따른 구연산의 생산수율의 감소는 그리 크지 않다. 한편 반응기의 반경의 영향을 살펴보면 배지의 공급유속이 일정할 경우 체류시간이 짧은 작은 반응기가 구연산의 생산성 측면에서 유리함을 알 수 있다. 이는 유속증가에 따른 결과와 같은 경향을 보인다.

위의 실험 결과를 Table 2에 나타내었다. 구연산의 생산성은 공기를 산소원으로 이용한 경우 최고 0.63g/L·h이며 순수산소를 공급한 경우 최고 1.02g/L·h로서 이는 희분식 조업에 비해 각각 10배 및 16배에 해당하는 높은 값이다.

#### 4. 결 론

다양한 크기의 이중실관 반응기(DHFBR)를 이용한 고정화된 *Aspergillus niger*(KCTC 1232)로부터의 구연산 생성실험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 산소원으로서 공기와 순수산소를 교체 공급 한바에 의하면 순수산소 공급시 구연산 생산성이 공기 사용시보다 70% 이상 높았으며 구연산 수율에 있어서도 약 20% 높음을 확인하였다. 그러나 공기에서 산소로 교체 공급하였을 경우 산소 투과 깊이 에 따른 비활성 균체 공간에서의 균체의 성장 재개로 구연산 생산성이 심하게 감소하였으며 이러한 성장이 완료된 후 정상상태의 구연산 생산조건에 도달하였다.

(2) 공급배지의 pH를 변화시킨 결과 pH값이 3.0 일 경우의 구연산 생산성은 6.5일 경우에 비해 50% 이상 높았으며 이중실관 생물반응기에 있어서 낮은 pH의 구연산 생산배지의 공급이 매우 중요함을 확인하였다.

(3) 배지의 공급속도를 변화시킨 결과 속도가 증가하면 반경방향에서의 기질의 농도기울기 및 실관에서의 압력강하가 커지는 이유 등으로 기질의 소비 속도가 증가하고 따라서 구연산의 생산성이 증가하였다.

(4) 반응기의 길이를 달리한 실험에서는 저속의 배지 공급시 반응기가 길면 생산되는 구연산 농도는 증가하였으나 구연산의 생산성은 상당히 감소하였다. 반응기가 길면 실리콘관 내에 두개의 폴리프로필렌 실관을 삽입하기 어려운 문제도 제기되었으며 하나의 실관만을 삽입하였을 경우에는 기질층의 확산 투과 깊이 증가와 축 방향에서의 기질 농도 기울기의 전개 등에 의하여 입구로부터 먼 균체일수록 심한 기질 제한 상태에 이르는 것으로 보인다.

(5) 반응기의 반경에 따른 영향을 보면 일정한 유속을 공급할 경우 반경이 작을수록 생산성이 좋았으나 반경의 증가에 따른 유속의 증가를 이용하여 scale-up의 가능성을 확인할 수 있었다.

#### 참고문헌

1. P. R. Rony, *Biotech. Bioeng.*, **13**, 431(1971)
2. R. A. Knazek, P. M. Gullino, P. O. Koehler and R. L. Dedrick, *Science*, **178**, 65(1972)
3. I. R. Waterland, C. R. Robertson and A. S. Michaels, *AIChE J.*, **20**, 50(1974)
4. I. H. Kim and H. N. Chang, *AIChE J.*, **29**, 910 (1983)
5. I. H. Kim and H. N. Chang, *AIChE J.*, **29**, 645 (1983)
6. W. L. Chick, A. A. Like, V. Lauuris, P. M. Galletti, P. D. Richardson, P. Panol, T. W. Mix and C. K. Colton, *Trans., Amer. Soc. Artif. Intern. Organs.*, **21**, 8(1975)
7. I. H. Kim and C. R. Robertson, *Biotech. Bioeng.*, **27**, 1012(1985)
8. B. H. Chung, H. N. Chang and I. H. Kim, *Enz. Microbiol. Technol.*, **9**, 345(1987)
9. H. N. Chang and B. H. Chung, U. S. Patent 4, 910, 139(1990)
10. P. Shu and M. J. Johnson, *Ind. Eng. Chem.*, **40**, 1202(1948)
11. G. L. Miller, *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959)
12. J. R. Marier and M. Boulet, *J. Dairy Sci.*, **41**, 1683(1958)