

다양한 고정화 방법에 의한 이타콘산 생산

김승욱* · 박승원 · 이진석¹

수원대학교 유전공학과, ¹한국에너지기술연구소

Production of Itaconic Acid by Various Immobilization Methods

Kim, Seung-Wook*, Seung-Won Park, and Jin-Suk Lee¹

Department of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon P.O. Box 77, Korea

¹Korea Institute of Energy Research, Daejeon, Korea

Abstract — *Aspergillus terreus* NRRL 1960 was immobilized on various alginate gel beads, Celites, and polyurethane foam cubes, and the comparisons were made for the production of itaconic acid according to the types and sizes of each carrier. The levels of itaconic acid produced from Ca-alginate and Sr-alginate were similar, and the addition of bentonite to Ca- and Sr-alginate resulted in an increase of itaconic acid. The addition of 1.67% bentonite and 0.33% starch to Sr-alginate (SABS bead) produced higher level of itaconic acid (11.59 g/l) than other gel beads. A decrease in the size of Celite increased the itaconic acid production, and the smallest size of Celites, R-634, produced 6.37 g/l of itaconic acid. Among various types of polyurethane foam cubes, HR 08 (2×2×2 cm) produced about 19 g/l of itaconic acid, which was more efficient than other carriers. In a repeated batch culture using immobilized cells on polyurethane foam cubes (HR 08, 2×2×2 cm), the stability of itaconic acid production was maintained up to 4 batches. Also, the possibility of itaconic acid production by continuous culture was shown in a packed-bed reactor.

이타콘산은 녹는 점이 167°C 인 불포화 dicarboxylic acid로서 수지, 방수제, 전기 절연체의 코팅 등에 널리 사용되는 물질이다. 생물학적 방법에 의한 이타콘산의 생산연구는 Kinoshita(1)가 *Aspergillus itaconicus*의 이타콘산 생산 능력을 확인한 이후 본격적으로 시작되었다.

한편 고정화 균체계는 현탁세포 배양에 비해 균체 농도가 높고 연속 배양의 경우 높은 희석률에서도 안정성을 유지할 수 있어 높은 생산성을 얻을 수 있다. 특히 곱팡이에 의한 발효계에서는 배지의 높은 점도 때문에 물질전달이 원활하지 못한 문제점이 자주 나타난다. 따라서 현탁세포배양의 문제점을 최소화하기 위해, 고정화 균체를 사용하여 발효공정에서 원활한 물질전달로 보다 긴 반감기를 얻을 수 있다.

균체 고정화의 대표적 방법으로는 담체 표면에 미생물을 고정화시키는 흡착 방법과 담체의 매트릭스 내에 균체를 가두는 가둠 방법이 있다. 흡착 방법에 의해 고정화된 미생물을 사용하는 발효공정에서 생산성을 높이기 위해서는 적절한 담체를 선택하는 것이 중요하다. 균체의 흡착 고정화에 적합한 담체의 조

건으로는 적절한 pore 크기, 공극율, 담체 크기 등을 들 수 있다. 따라서 균체 고정화에 적합한 물리적 특성을 갖는 담체를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

고정화 균체로부터 이타콘산의 생산에 관한 최초 연구는 Horitsu 등(2)에 의해 이루어 졌는데, 이들은 polyacrylamide gel에 *Aspergillus terreus*를 고정화하여 이타콘산의 생산을 시도하였다. Kautola 등(3)은 xylose와 포도당을 기질로 celite, agar, Ca-alginate에 균체를 각각 고정화하여 이타콘산 생산에 대한 연구를 수행하였으며 celite에 고정화한 균체를 이용한 발효에서 가장 높은 생산성을 얻을 수 있음을 보고하였다. 또한 Kautola 등(4, 5)과 Vassilev 등(6)은 polyurethane foam을 담체로 사용하여 반복 회분식 및 연속배양에 의한 이타콘산 생산을 시도하였다.

그러나 현재까지 수행된 연구는 담체 물질의 종류에 따른 이타콘산 생산량 측정에 국한되었다. 다양한 담체에 고정화된 균체를 발효공정에 사용하는 경우에는 앞에서 언급한 바와 같이 담체의 종류 뿐만 아니라 담체의 물성(pore의 크기, 담체크기)에 따라 큰 영향을 미치며 그 결과 발효공정의 생산성이 현저하게 달라질 수 있다. 그래서 본 연구에서는 alginate에

Key words: Itaconic acid, immobilization

*Corresponding author

다양한 첨가제와 가교제를 첨가하여 개량된 alginate를 제조한 후, 기존에 많이 사용되었던 Ca-alginate와 비교하고, celite와 polyurethane foam은 담체의 종류 또는 크기에 따른 이타콘산의 생산을 비교하여 적합한 담체를 도출하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

Aspergillus terreus NRRL 1960을 이타콘산 생산 균주로 사용하였으며 보관용 배지는 malt extract agar 배지를 사용하여 37°C 에서 7일간 배양한 후 4°C 에서 보관하였다. 종균 배양배지로는 2%(w/v) malt extract를 사용하였다. 생산 배지의 조성은 포도당 5%, NH₄Cl 0.5%, yeast extract 0.2%, CaCl₂ 0.1%, MgSO₄ 0.1%, NaCl 0.2%이고, 초기 pH는 2.5로 조절하였으며 온도는 37°C 이었다.

고정화 방법

균체 고정화용 담체로는 sodium alginate(Sigma Chemical Co.)와 다양한 크기와 pore를 갖는 celite (Manville, USA), 그리고 polyurethane foam(Bridgestone Co.)을 구입하여 사용하였다. Sodium alginate에 bentonite 및 polyethyleneimine, pectin, starch, glutaraldehyde 등을 증류수 30 ml에 용해하여 만든 용액과 일정 농도(1×10^9 /ml)의 포자 현탁액을 잘 섞은 후, 250 ml Erlenmeyer 플라스크에 포함되어 있는 100 ml의 0.1 M CaCl₂ 또는 SrCl₂ 용액과 반응시켜 일정한 크기의 bead를 형성한 다음 4°C 에서 최소한 2시간 이상 방치하였다.

Celite의 경우는 완전히 멸균된 다양한 pore를 갖는 celite(Table 1) 5g에 일정 농도의 포자 현탁액을 접종하여 2~3시간 정도 잘 섞으면서 흡착시켰다.

Polyurethane foam은 다양한 pore를 갖는 polyurethane foam(Table 2) 5g을 다양한 크기로 만든 후, 증류수가 포함된 250 ml Erlenmeyer 플라스크에 넣

고 멸균하여 멸균수로 세척한 후 일정농도의 포자 현탁액을 접종하였다.

이렇게 준비된 고정화 담체들을 종균 배양배지에서 37°C, 200 rpm으로 48시간 동안 활성화시켜, 이를 생산배지에 옮겨 같은 조건으로 7일간 배양하였다.

분석방법

이타콘산은 HPLC(Waters Ltd., USA)를 사용하여 정량하였으며 사용 컬럼은 C₁₈ μ -Bondapak(Waters, USA), 용매는 5% acetonitrile, 유량은 1 ml/min, 주입 시료량은 10 μ l이었다. UV-detector를 사용하여 214 nm에서 측정하였다. 포도당은 DNS 방법(7)을 사용하여 정량하였다.

다양한 alginate에 고정화된 균체량은 일정 부피의 alginate bead를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) 용액 30 ml에 용해시킨 후 6500 g에서 원심분리하여 균체를 분리하였다. 분리된 균체는 증류수로 세척 후 원심분리하여 80°C 에서 24시간 건조하여 측정하였다. Celite와 polyurethane foam에 고정화된 균체량은 80°C 에서 24시간 건조 후 무게차이로 결정하였다.

반복회분식 배양

반복회분식 배양은 100 ml의 생산배지가 포함된 250 ml Erlenmeyer 플라스크에서 수행되었다. Polyurethane foam HR 08(2×2×2 cm)에 고정화된 균체에 매 7일마다 새로운 생산배지를 바꾸어 주었다.

연속배양

Polyurethane foam HR 08(2×2×2 cm)에 고정화되어 2%(w/v) malt extract에서 활성화된 균체를 충전탑 반응기에 접종하여 연속배양 하였다. 충전탑 반응기에서의 조업부피는 0.3 l이었으며, 통기속도는 0.5 vvm이었고, 온도는 37°C 를 유지하였다. 회석률은 0.05 h⁻¹과 0.15 h⁻¹로 조절하여 실험하였다.

Table 1. Physical characteristics of Celite (adapted from the technical bulletin of Manville Company)

Celite, No.	Size (mm)	Pore size (μ m)	Pore volume (cm ³ /g)
R-636	3.9~6.7	6.6	1.45
R-633	0.29~0.53	6.5	1.47
R-634	0.15~0.29	5.0	1.08

Table 2. Physical characteristics of polyurethane foams (adapted from the technical bulletin of Bridgestone Company)

Polyurethane foam, No.	Pore size (Pore/inch)	Hardness (Kgf/cm ²)
HR 08	6~10	7~13
HR 13	11~16	7~13
HR 20	17~23	7~13
HR 30	27~33	11~17
HR 40	47~53	11~17

Table 3. Effect of immobilization by various alginate gel beads on the production of itaconic acid

Beads	Final pH	Dry wt. (g/l-gel)	Itaconic acid (g/l)
Ca-alginate	2.01	12.3	2.89
Sr-alginate	1.99	7.2	2.81
CAB	1.96	33.3	6.78
SAB	1.92	22.4	4.91

All measurements were made at 7 days cultivation, CAB; Ca-alginate+1.67% (w/v) bentonite, SAB; Sr-alginate+1.67% (w/v) bentonite

결과 및 고찰

Alginate gel beads에 의한 균체 고정화

Calcium alginate(Ca-alginate)와 strontium alginate(Sr-alginate) 및 bentonite가 첨가된 Ca- 또는 Sr-alginate에 균체를 고정화하여 이타콘산의 생산에 미치는 영향을 연구하였다(Table 3). Sr-alginate bead와 Ca-alginate bead에 의한 이타콘산 생산은 거의 비슷하였고, bentonite를 첨가했을 때 생산량이 증가함을 알 수 있다.

Alginate에 의한 고정화방법을 이용했을 때 bead 밖의 배지에서 자라는 균체를 상당수 발견할 수 있었는데, 이용된 bead 중 bentonite가 첨가된 Ca-alginate(CAB bead)를 이용했을 때 배지에서 자란 균체의 농도가 가장 낮았고 생산된 이타콘산의 농도도 가장 높았다. 이는 Kim 등(8)이 에탄올 생산에서 효모를 효율적으로 고정화하기 위해 bentonite를 사용하여 좋은 결과를 얻었는데, 이를 *A. terreus* 고정화에 응용했을 때 역시 기존의 Ca-alginate보다 우수한 것으로 나타났다. 이는 bentonite에 의해 균체가 흡착됨과 동시에 bead 내에 가두어 짐으로써 고정화 효율성이 높아져 Ca-alginate에 비해 균체량은 약 2.7배, 이타콘산의 생산은 약 2.3배가 증가하였으며, 유출되는 균체량도 급격히 감소하였다.

다양한 가교제가 첨가된 alginate bead에 의한 균체 고정화

앞에서 첨가제로서 bentonite를 첨가했을 때 Ca-alginate에 비해 좋은 결과를 얻었고, 이 bead의 안정도를 높이기 위해 다양한 가교제 및 고분자 물질을 첨가하여 보았다. Ca- 또는 Sr-alginate와 bentonite가 첨가된 Ca- 또는 Sr-alginate에 polyethyleneimine, pectin, glutaraldehyde, 그리고 starch와 같은 가교제 및 고분자물질을 첨가하여 균체를 고정화하였다. 이

Table 4. Effect of immobilization by various alginate gel beads on the production of itaconic acid

Beads	Final pH	Dry wt. (g/l-gel)	Itaconic acid (g/l)
SABPE	1.89	21.7	0.384
SABP	1.97	19.7	2.45
CABPG	1.60	26.97	8.55
SABS	1.61	30.90	11.59

All measurements were made at 7 days cultivation, SABPE; Sr-alginate+1.67% bentonite+0.33% polyethyleneimine, SABP; Sr-alginate+1.67% bentonite+0.33% pectin, CABPG; Ca-alginate+1.67% bentonite+0.33% glutaraldehyde+0.33% pectin, SABS; Sr-alginate+1.67% bentonite+0.33% starch

Table 5. Effect of immobilization by various types of Celite

Type of Celite	Final pH	Residual Glucose (g/l)	Itaconic acid (g/l)
R-630	1.52	15.93	0.72
R-633	1.50	11.09	1.45
R-634	1.51	7.59	6.37

All measurements were made at 7 days cultivation.

러한 방법으로 고정화된 *Aspergillus terreus*를 배양했을 때 Table 4에서 보는 바와 같이, bentonite와 starch가 첨가된 Sr-alginate(SABS)에서 11.59 g/l의 이타콘산을 생산함으로써 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 bentonite와 polyethyleneimine이 첨가된 Sr-alginate에서는 이타콘산이 거의 생산되지 못하였고, pectin을 첨가한 Sr-alginate에서도 2.45 g/l로 낮은 생산을 보였다. 그러나 bentonite, glutaraldehyde, pectin 등을 혼합한 Ca-alginate에서는 8.55 g/l의 이타콘산을 생산해 연속배양의 담체로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

Celite에 의한 균체 고정화

각각 pore의 크기가 다른 celite R-630, R-633, 그리고 R-634에 *Aspergillus terreus*를 고정화하여 이타콘산의 생산을 비교하였다. 그 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 pore의 크기가 가장 작은 celite R-634에서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

담체의 크기가 감소할수록 생성되는 이타콘산의 농도는 비례 증가하였으며 가장 작은 담체인 celite R-634에 균체를 고정화 한 경우에 가장 높은 이타콘산 농도인 6.37 g/l를 얻었다. 이 값은 가장 큰 담체인

Table 6. Effect of immobilization by polyurethane foams (PUF) on the production of itaconic acid

Type of PUF	Cube size (cm ³)	Final pH	Residual glucose (g/l)	Dry wt. (g/l)	Itaconic acid (g/l)
HR 08	0.125	1.57	10.0	11.81	7.62
	1.0	1.58	18.27	62.6	4.51
	4.0	1.49	4.55	57.5	16.52
	8.0	1.40	2.11	11.7	19.22
HR 13	0.125	1.49	26.79	11.9	6.55
	1.0	1.45	6.70	17.5	12.03
	4.0	1.48	10.13	14.5	5.17
	8.0	1.46	1.89	16.4	8.21
HR 20	0.125	1.54	21.16	19.8	7.09
	1.0	1.53	5.42	28.8	5.51
	4.0	1.48	1.91	17.9	6.16
	8.0	1.51	1.15	20.9	6.17
HR 30	0.125	1.55	2.98	11.9	5.40
	1.0	1.50	1.57	18.1	10.93
	4.0	1.54	4.17	13.8	2.99
	8.0	1.53	0.2	16.7	5.22
HR 40	0.125	1.50	11.41	3.3	6.06
	1.0	1.52	2.47	15.9	9.29
	4.0	1.57	3.21	17.5	6.55
	8.0	1.54	6.96	16.1	8.04

All measurements were made at 7 days cultivation.

celite R-630에 균체 고정화를 하여 발효시켜 얻은 이타콘산의 농도 0.72 g/l에 비해 약 9배 증가한 값이다. 비교 담체의 pore 크기와 부피가 비슷한 점을 고려할 때 담체의 크기가 고정화 균체를 이용한 발효공정의 생산성 향상에 중요한 인자임을 알 수 있다.

Celite R-630과 R-633에 고정화 했을 때는 균체가 담체에 흡착은 되지만 성장은 제대로 하지 못하였고, 반면에 celite R-634에서는 균체가 celite에 흡착되어 2~3 mm 정도의 pellet 형태로 성장함을 관찰하였다. 그럼에도 불구하고 균체가 흡착되지 않은 celite도 많이 발견되었다.

다양한 polyurethane foam에 의한 균체 고정화

*Aspergillus terreus*를 다양한 크기와 pore를 갖는 polyurethane foam에 고정화했을 때 이타콘산의 생산에 미치는 영향을 연구하였다. 다양한 pore를 갖고 있는 polyurethane foam HR 08, HR 13, HR 20, HR 30, HR 40을 각각 다른 크기로 자른 후 포자를 고정화하였다.

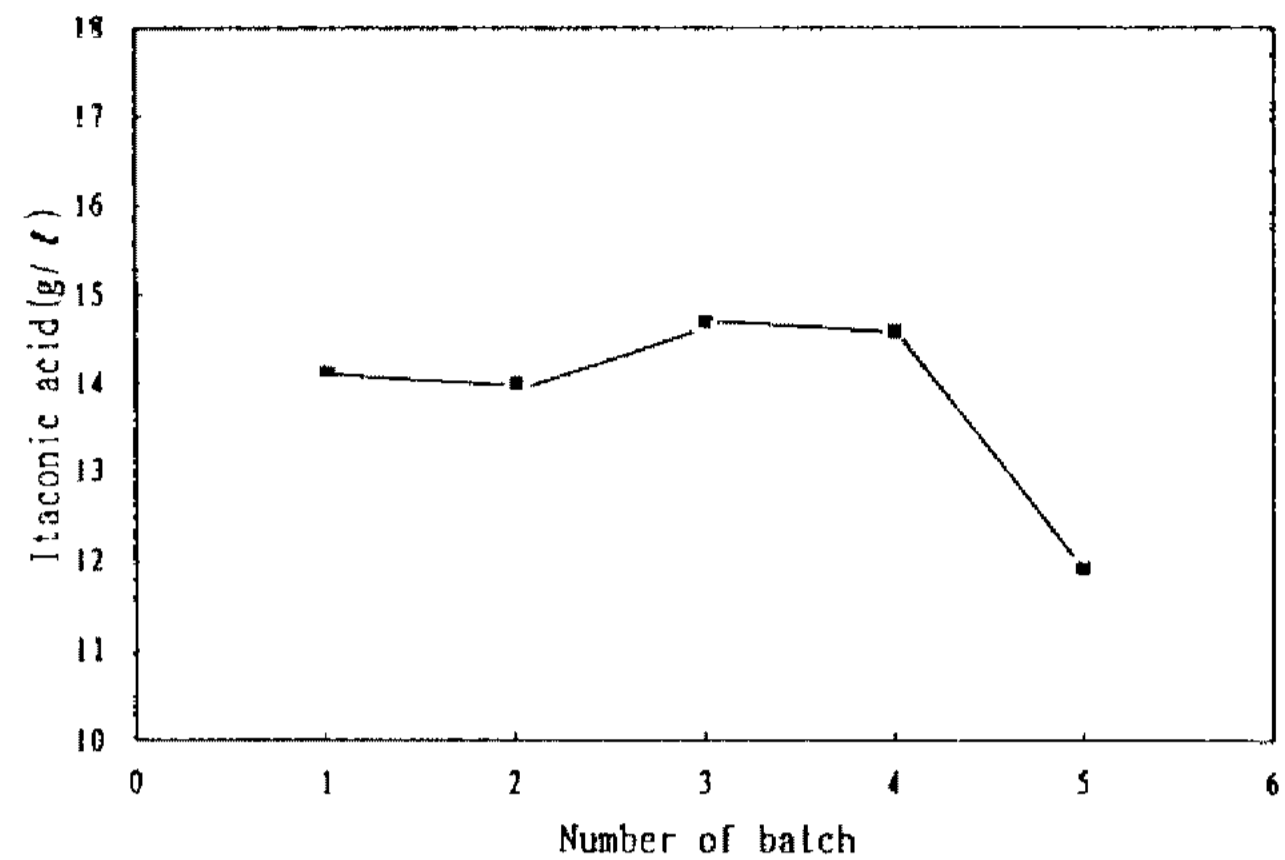


Fig. 1. Itaconic acid production in repeated batch culture by immobilized cell.

Table 6에서 보는 바와같이 polyurethane foam HR 08(2×2×2 cm)에서 가장 높은 19.22 g/l의 이타콘산을 생산함을 알 수 있었다. 이때 나타나는 특징적인 사실은 앞서서의 여러 고정화 방법과는 달리 담체 밖에서 자라는 균체가 거의 없이 완전히 고정화 되었음을 알 수 있었고, 같은 크기의 polyurethane foam에서 HR40을 제외하고는 pore의 크기가 클수록 높은 이타콘산을 생산함을 알 수 있었다.

결과적으로 이타콘산 생산에 있어서 polyurethane foam에 의한 고정화가 alginate bead나 celite의 경우보다 더 효율적이라는 사실을 알 수 있었다.

반복 회분식 배양

Polyurethane foam에 고정화된 균체를 이용하여 반복 회분식 배양을 하였다. Fig. 1은 polyurethane foam(HR 08, 2×2×2 cm)에 고정화된 균체를 반복 회분식 배양한 결과를 보여준다. 이타콘산의 생산은 4 batch까지 안정하다가, 5 batch에서 급격히 감소함을 알 수 있다.

Kautola 등(4)은 pore의 크기가 1.5~1.7 mm이고, 크기가 1 cm인 polyurethane foam에 *Aspergillus terreus*를 고정화하여 반복 회분식 배양을 하였는데 역시 4 batch까지 안정하다고 보고하였다.

충진탑 반응기에서의 연속배양

충진탑 반응기에서 이타콘산의 생산에 가장 적합한 고정화 담체인 polyurethane foam HR 08(2×2×2 cm)에 균체를 고정화하여 연속배양 하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 희석률을 0.05 h⁻¹로 조절하여 배양했을 때, 이타콘산의 생산량은 차츰 증가하여 10일째 17.65 g/l까지 증가하다가 감소하여 약 12~14 g/l의 이타콘산을 생산함을 알 수 있었다. 그러나 희석률을

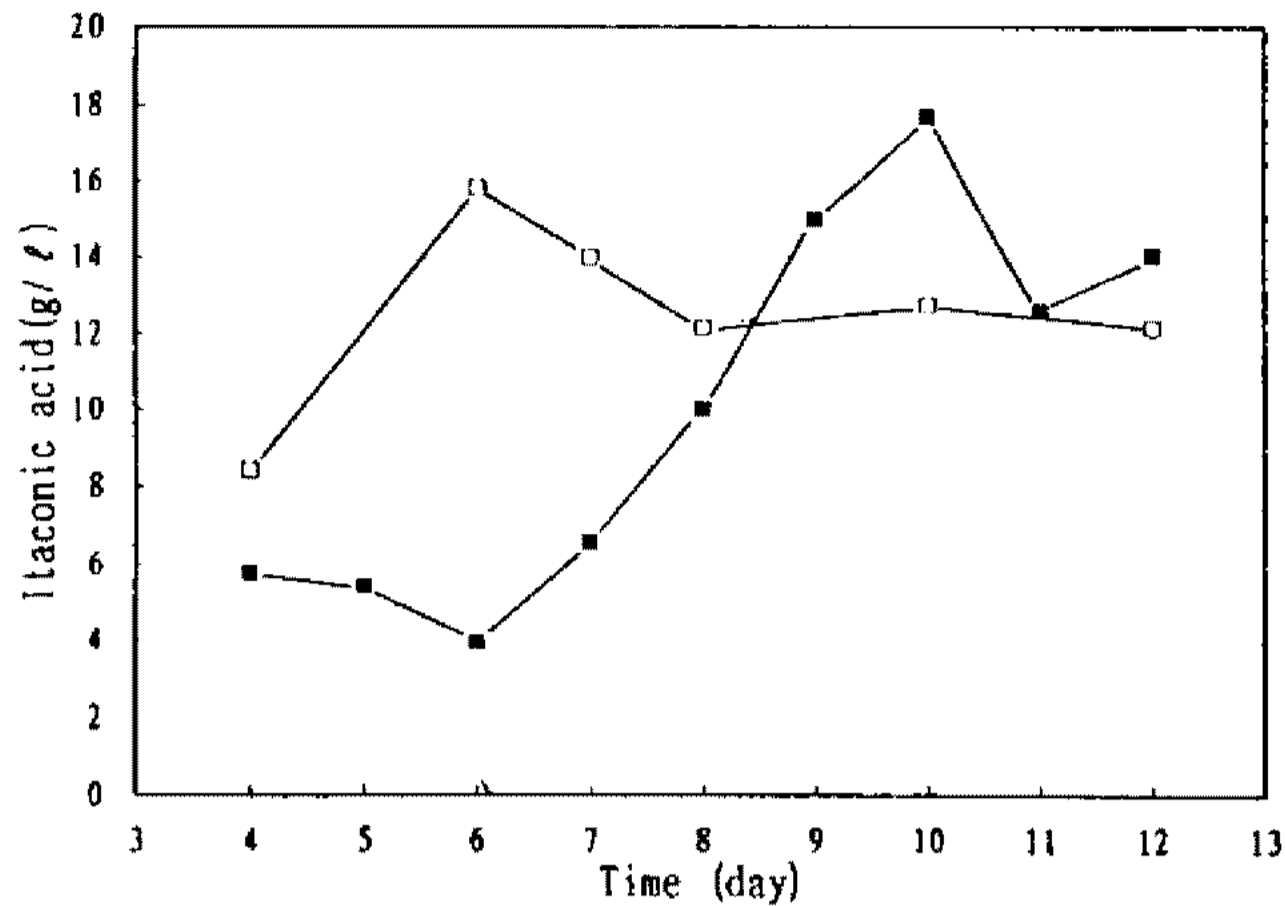


Fig. 2. Itaconic acid production by immobilized cell in the packed-bed reactor.

Dilution rate: ■; 0.05 h⁻¹, □; 0.15 h⁻¹

0.15 h⁻¹로 조절했을 때 6일째 이타콘산이 15.8 g/l까지 증가하다가 감소하여 약 12 g/l의 이타콘산이 유지되는 것을 알 수 있었다. 여기에서 data는 보여주지 않지만 희석률을 0.05 h⁻¹로 조절했을 때 12일 이후에도 계속 약 12~14 g/l의 이타콘산을 유지하였으나, 희석률을 0.15 h⁻¹로 조절했을 때 12일 이후부터 약간의 blocking 문제가 발생함으로써 본문에서는 12일까지만 비교하였으며, 이러한 결과는 polyurethane foam에 균체를 고정화하여 적절한 희석률에서 이타콘산을 장기간 연속적으로 생산할 수 있음을 보여준다.

요 약

Aspergillus terreus NRRL 1960을 다양한 alginate gel beads, celite 및 polyurethane foam cube에 고정화하였고, 각 담체의 종류 및 크기에 따른 이타콘산의 생산을 비교하였다.

Ca-alginate와 Sr-alginate에 의해 생산된 이타콘산의 농도는 비슷하였고, bentonite를 첨가했을 때(CAB bead) 생산량이 증가함을 알 수 있었다. 다양한 가교제를 alginate에 첨가했을 때 1.67% bentonite와 0.33% starch가 첨가된 Sr-alginate(SABS bead)의 경우가 다른 경우에 비해 높은 농도의 이타콘산(11.59 g/l)을 생산하였다. Celite의 크기가 감소할 수록 이타콘산의 생산이 증가하였으며 가장 작은 담체인 celite R-634에 균체를 고정화한 경우에 6.37 g/l를 얻

었다. 다양한 크기와 pore를 갖는 polyurethane foam cube를 사용했을 때, HR 08(2×2×2 cm)로부터 약 19 g/l의 이타콘산을 얻을 수 있었고, 다른 종류의 담체에 비해 효율적이었다.

Polyurethane foam cube에 고정화된 균체에 의한 반복 회분식 배양에서 4 batch까지 이타콘산을 안정하게 생산하는 것을 알 수 있었다. 또한 충전탑 반응기에서 연속배양의 가능성도 보여 주었다.

감사의 글

본 연구는 생물공정연구센터의 지원(1992)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kinoshita, K. 1932. Uber die production von itaconsaure and mannit durch einen neuen schimmelpilz *Aspergillus itaconicus*. *Acta Phytochimica* 5: 271-287.
2. Horitsu, H., Y. Takahashi, J. Tsuda, K. Kanai, and Y. Kawano. 1983. Production of itaconic acid by *A. terreus* immobilized in polyacrylamide gels. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 358-360.
3. Kautola, H., M. Vahvaselka, Y.-Y. Linko, and P. Linko. 1985. Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* from xylose and glucose. *Biotechnol. Lett.* 7: 167-172.
4. Kautola, H., N. Vassilev, and Y.-Y. Linko. 1989. Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* on sucrose medium. *Biotechnol. Lett.* 11: 313-318.
5. Kautola, H., N. Vassilev, and Y.-Y. Linko. 1990. Continuous itaconic acid production by immobilized biocatalysts. *J. Biotechnol.* 13: 315-323.
6. Vassilev, N., H. Kautola, and Y.-Y. Linko. 1992. Immobilized *Aspergillus terreus* in itaconic acid production from glucose. *Biotechnol. Lett.* 14: 201-206.
7. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
8. Kim, E.Y., S.W. Kim, and K. Kim. 1993. Ethanol production by a new method of alginate immobilization. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 373-380.

(Received July 28, 1994)