

## Air Lift Fermentor에서 Sisomicin 발효시에 발효유사액을 이용한 산소전달속도 예측

김성룡 · 신철수\*

연세대학교 공과대학 식품생물공학과 및 생물산업소재연구센터

### Prediction of Oxygen Transfer Rate During Sisomicin Fermentation Employing Air Lift Fermentor

Kim, Seong-Yong and Chul-Soo Shin\*

Department of Food and Biotechnology, College of Engineering and Bioproducts Research Center,  
Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

**Abstract** — In order to predict gas hold-up and oxygen transfer rate during sisomicin fermentation employing air lift fermentor, simulated media similar to fermentation broths in rheological properties were prepared and used. Rheological properties of fermentation broths from 40 hours and 60 hours of cultivation were analyzed by applying to Power's Law equation. Regardless of addition and no addition of  $MgSO_4$ , the tendencies, that  $n$  value was decreased and  $K$  value was increased as aeration rate was increased, were shown. Simulated media of twelve different fermentation broths were formulated in a range of 0.7 to 2.1% CMC, and the values of gas hold-up and  $k_La$  depending on superficial air velocity were measured using these simulated media. And the relationships,  $\epsilon = \alpha U_{Gr}^\beta$ ,  $k_La = \gamma U_{Gr}^\delta$ , were obtained, and these equations are thought to be used to predict the values of gas hold-up and  $k_La$  during fermentation.

아미노글라이코사이드계 항생물질에 속하는 sisomicin은 발효중에 생산되어 균체내에 대부분이 축적되기 때문에 균체내의 항생물질 농도는 짧은 시간내에 고농도에 도달하게 된다(1, 2). 이러한 경우 product inhibition이 심하게 일어나 항생물질 생산속도가 감소되어 전체 항생물질 수율은 낮아진다(1). 이러한 문제를 해결하는 방법으로 발효중에 염이온 특히  $MgSO_4$ 을 고농도로 첨가하여 균체내에 축적되는 항생물질을 균체외로 유리시켜 항생물질 수율을 증가시킨다고 보고되었다(3).

Sisomicin 생산균은 균사 형태로 증식하며, 특히 균체내 sisomicin을 균체외로 유리시키기 위해 고농도의  $MgSO_4$ 을 첨가하는 경우 stirred fermentor에서는 shear stress와 아울러 극심한 삼투압이 작용하여 균사체가 손상된다. Sisomicin 생산은 균사체의 손상에 의하여 감소하게 되며 이러한 이유에서 stirred fermentor보다는 air lift fermentor가 sisomicin 발효에 보다 적합한 것으로 밝혀졌다(4, 5). Air lift

fermentor의 경우 mechanical agitation이 없어 산소 전달에 문제가 있을 수 있으며, 산소전달효과의 유무를 보통  $k_La$  값을 구하여 판단한다. 그러나 본 실험에서와 같이 균사체 형태로 증식하는 발효에서 산소전달속도의 주요 인자인  $k_La$  값을 정확히 구하기는 용이하지 않다. 발효중 균체 증식으로 인한 발효액 점도의 증가로 DO-meter가 정상적으로 작동하는지도 문제가 된다.  $k_La$  값을 정확하게 구하기 위해서는 정확한 DO 값의 측정이 선행되어야 한다. 이러한 경우 발효액과 유사한 발효유사액(simulated media)을 조제하고 sulfite 방법을 이용하여  $k_La$  값을 구하므로써 이들 발효의 산소전달속도에 대하여 간접적으로 예측할 수 있다.

본 실험에서는 air lift fermentor를 이용하는 sisomicin 발효시에 배양시간 및  $MgSO_4$ 의 첨가 유무 조건하에서 발효액의 물성을 측정하고, 이들 발효액의 물성과 비슷한 발효유사액(simulated media)을 제조하였다. 이들 발효유사액을 이용한 air lift fermentor 내에서 superficial air velocity 변화에 따른 gas hold-up과  $k_La$  값을 측정하여 실제 발효액에서의 공기공급속도에 따른 이들 값을 예측하였다.

**Key words:** Sisomicin, fermentation, air lift fermentor, oxygen transfer rate  
\*Corresponding author

## 재료 및 방법

### 사용 균주

Sisomicin 생산균은 *Micromonospora inyoensis* IFO 13156을 사용하였고, 항생물질농도 측정을 위한 피검균은 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P를 사용하였다.

### 배지

증식배지는 0.3% beef extract, 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.15% dextrose, 2.4% starch 및 0.2% calcium carbonate를 증류수에 용해시켜 pH를 8로 조절한 후 살균하여 사용하였으며, 발효배지는 5% starch, 0.7% calcium carbonate, 3.5% soybean meal 및 16.8  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ 를 증류수에 용해시켜 pH를 8로 조절하여 살균하였다.

피검균배지는 0.15% beef extract, 0.3% yeast extract, 0.4% casitone, 0.6% peptone 및 0.1% dextrose를 증류수에 용해시켜 pH를 6.6으로 조절하여 살균하였다.

### 배양 조건

균체의 증식은 두 단계로 이루어졌다. 증식배지 20 ml를 포함하는 250 ml 용 shake flask에 *M. inyoensis* 균주를 보존 slant로부터 접종하고 28°C, 150 rpm에서 3일간 진탕 배양하였다. 다음, 증식배지 100 ml을 포함하는 1l shake flask에 위 배양액 10 ml을 접종하고 28°C, 150 rpm에서 3일간 진탕 배양하였다.

발효단계에서 1.5l의 발효배지로 채워진 air lift fermentor(external loop type, 2.5" riser dia. and 1.2" downcomer dia., Fig. 1)에 2차 균체증식 배양액 80 ml을 접종하고 28°C에서 배양하였다. 공기의 공급은

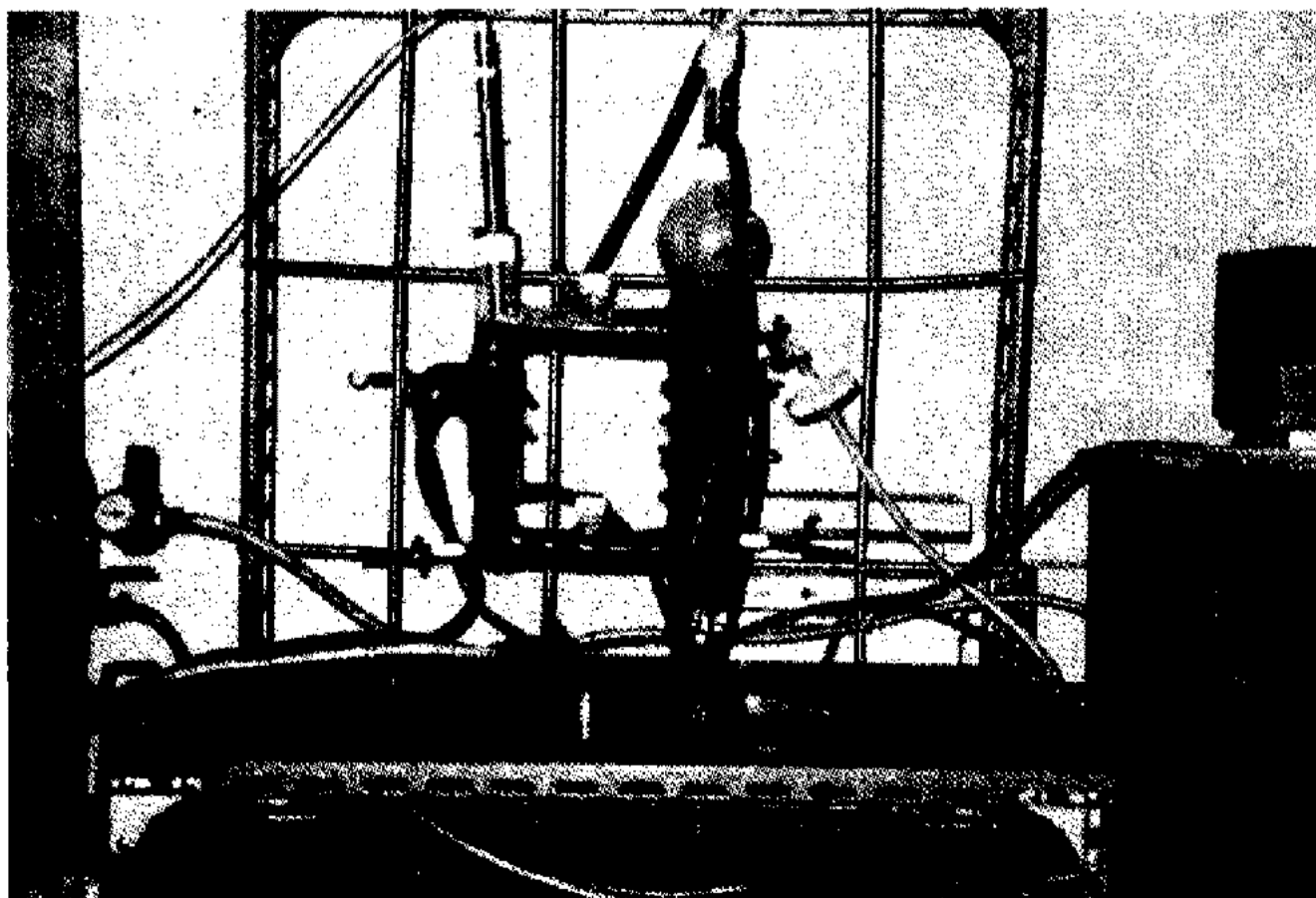


Fig. 1. Experimental setup of airlift fermentor.

riser의 perforated sparger을 통하여 이루어졌으며, 공급속도는 1.0~1.5 vvm에서 변화시켰다.

### 항생물질 추출(1, 2) 및 농도 측정

발효액 5 ml을 취하여 6 N 황산으로 pH 2로 조절한 후 15분간 천천히 교반하면서 균체로부터 항생물질의 추출을 유도한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻는다. 이 상등액을 암모니아수를 가하여 pH 7로 조정하고  $\text{Ca}^{2+}$ 을 제거하기 위해 충분한 양의 oxalic acid를 첨가하여  $\text{Ca}^{2+}$ 을 침전시킨다. 그 후 원심분리하여 상등액을 취하고 다시 pH 7로 조정하여 얻은 용액을 항생물질 농도 측정에 사용하였다.

발효액에서 추출한 sisomicin의 농도분석은 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P을 피검균으로 이용하여 cylinder 방법(6, 7)으로 수행하였다.  $\text{MgSO}_4$ 를 함유한 시료는 ammonium phosphate를 첨가하여  $\text{MgSO}_4$ 를 침전시킨 후 측정하였다(3).

### 균체량 측정

발효액 5 ml을 취하여 저속(1,000 rpm, 1분)에서 원심분리하여 발효액 중의 soybean meal을 일차적으로 제거하고, 상등액 만을 모아 다시 재원심분리하여(3,000 rpm, 10분) 균체를 침전시켰다. 여기에 증류수를 가해 헹타시킨 후 원심분리하는 과정을 2회 반복하여 잔존하는 전분을 제거하고 105°C 오븐에서 건조시켜 균체의 건조중량을 구하였다.

### Viscosity parameter 측정(8, 9)

회전점도계인 Haake Rotoviscometer(Model RV 12)를 사용하여 측정하였다. 측정은 시료를 30°C로 시료를 유지한후 시료액 40 ml를 MV cup(I.D.=4.2 cm)에 취하여 chamber에서 점도계 본체와 연결시킨 뒤 10분간 열평형시키고 회전속도에 따른 torque를 측정하여 Power's Law 식에 적용하여 계산하였다.

$$\tau = K \gamma^n$$

여기에서  $\tau$ =shear stress(Pa),  $\gamma$ =shear rate( $\text{s}^{-1}$ ),  $n$ =flow behavior index,  $K$ =consistency index ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^{-n}$ )이다.

### 발효유사액 제조(10)

발효중의 공기공급속도 1.0, 1.5, 2.0 vvm, 80 mM  $\text{MgSO}_4$ 의 첨가 유무, 발효 40, 60시간 등 12가지 다른 조건하에서 발효액들의 물성을 Power's Law를 이용하여 물성 parameter인  $n$ ,  $K$  값을 구한다. 한편, CMC (carboxy methyl cellulose)용액의 CMC 농도를 조절

하여 앞에서 분석한 12가지의 발효액과 유사한 n, K 값을 나타내는 발효유사액(simulated media)을 제조하였다.

**k<sub>La</sub> 측정**

산소전달속도상수인 k<sub>La</sub> 값을 구하는데 sodium sulfate method(11)를 이용하였다. 준비된 발효유사액에 sodium sulfate를 가하여 최종 10 mM 되게 조절하여 시간에 따른 산소와 반응하여 소비된 sodium sulfate량을 측정하여 k<sub>La</sub> 값을 계산하였다. 이 경우 반응하지 않은 sodium sulfate는 50 mM I<sub>2</sub>-KI 용액으로 적정하였으며, 남아 있는 I<sub>2</sub>는 50 mM sodium thiosulfate로 역적정하였다.

**Gas hold-up 측정**

Volume expansion method(10)을 이용하였다. 공기가 공급되지 않고 교반이 정지된 상태에서의 액상의 높이(h<sub>L</sub>) 및 공기가 공급되고 교반하는 상태에서의 액상의 높이(h<sub>P</sub>)를 측정하여 아래와 같이 gas hold-up을 계산하였다.

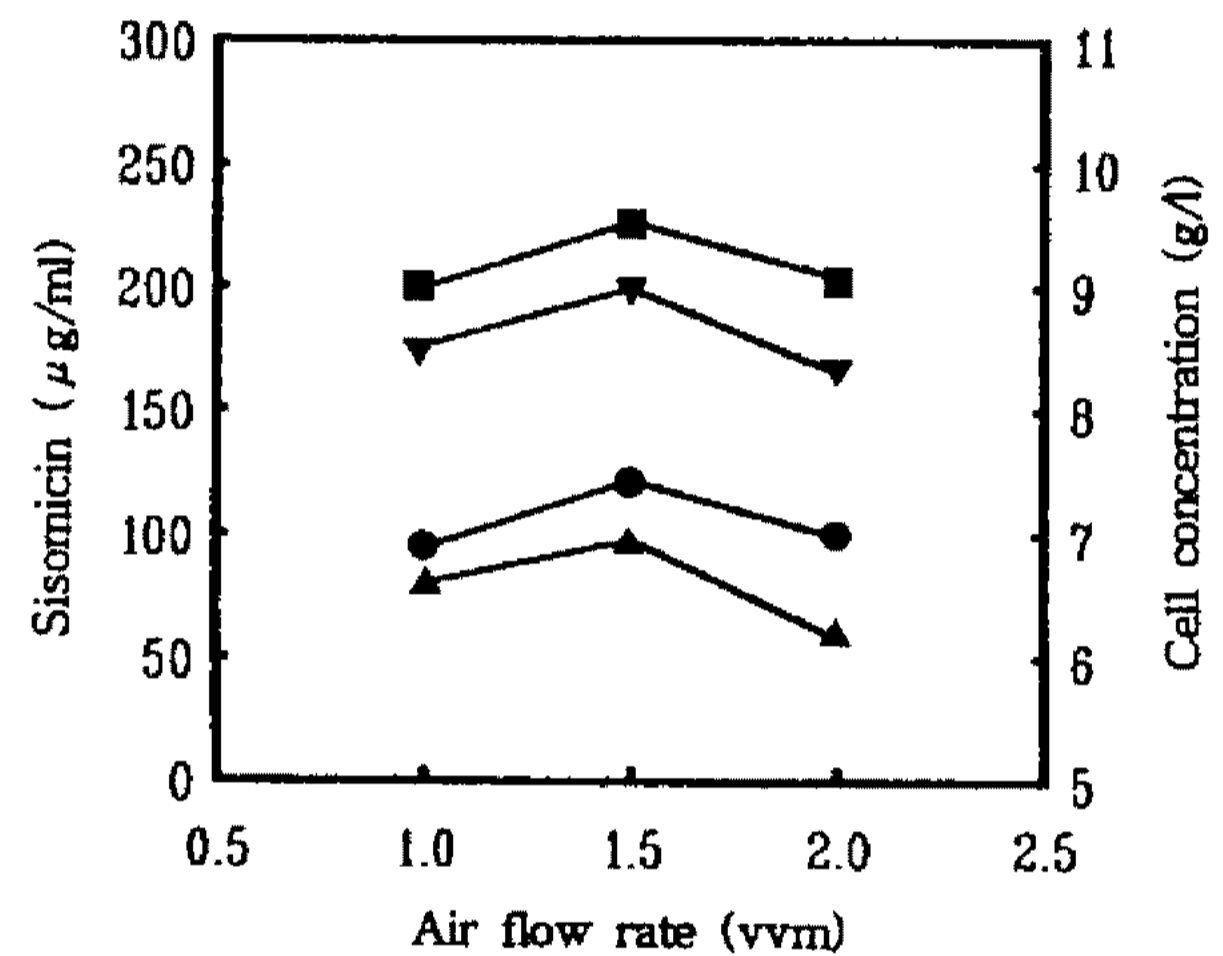
$$\epsilon = (h_P - h_L) / h_P$$

**결과 및 고찰**

Air lift fermentor에서 sisomicin 발효생산시 첨가하는 MgSO<sub>4</sub>의 최적농도는 80 mM이며, 이러한 조건하에서 발효종료 후 얻어지는 sisomicin 수율은 MgSO<sub>4</sub>가 첨가되지 않은 대조구에 비하여 상당히 증가한 것으로 나타났다(4). Air lift fermentor의 장점으로서는 stirred fermentor에 비하여 shear stress를 매우 낮게 유지시키며 산소전달속도를 높게 유지할

수 있는 것이다. 본 연구에서는 우선적으로 air lift fermentor에서 발효시에 공기공급속도가 균체증식과 sisomicin 생산에 미치는 영향을 분석하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 MgSO<sub>4</sub>의 첨가시와 비첨가시 모두 1.5 vvm의 공기공급속도에서 최대 균체증식과 sisomicin 생산이 이루어졌다. Sisomicin 수율은 80 mM MgSO<sub>4</sub> 첨가시에 첨가되지 않은 대조구(control)에 비교하여 2배 이상 증가하였으며, 반면 균체증식은 MgSO<sub>4</sub> 비첨가시에 높게 얻어졌다. 이러한 결과는 MgSO<sub>4</sub> 첨가에 의해 균체내 sisomicin을 균체외로 유출시키는데 기인한다는 사실을 확인한 것이다.

본 실험에서는 발효중 sisomicin이 생성되는 초기인



**Fig. 2. Effects of air flow rate on cell growth and sisomicin production in an air lift fermenter.**

■: cell conc. (control, no MgSO<sub>4</sub> was added.), ●: cell conc. (80 mM MgSO<sub>4</sub> was added.), ▲: sisomicin conc. (control, no MgSO<sub>4</sub> was added.), ▼: sisomicin conc. (80 mM MgSO<sub>4</sub> was added.)

\*The data were the results after 96 hours of cultivation.

**Table 1. Comparison of consistency and flow behavior indices of CMC solutions and *Micromonospora inyoensis* broths**

Time (h)	1.0 vvm		1.5 vvm		2.0 vvm	
	n	K	n	K	n	K
Control	40	0.83(0.80) (0.8% CMC)	0.87(0.85) (0.7% CMC)	0.05(0.1)	0.8 (0.79) (1.0% CMC)	0.13(0.19)
	60	0.72(0.7) (1.4% CMC)	0.32(1.18)	0.57(0.56) (2.1% CMC)	4.8 (7.6)	0.59(0.58) (2.0% CMC)
MgSO <sub>4</sub> 80 mM	40	0.85(0.85) (0.7% CMC)	0.83(0.83) (0.8% CMC)	0.07(0.13)	0.82(0.82) (0.9% CMC)	0.12(0.16)
	60	0.59(0.58) (2.0% CMC)	1.3 (5.75)	0.56(0.56) (2.1% CMC)	3.15(7.6)	0.56(0.56) (2.1% CMC)

\*The values in parentheses indicate the rheology parameters of CMC solutions.

배양 40시간, sisomicin이 활발하게 생성되고 균체의 산소흡수속도가 가장 높은 시기인 배양 60시간대의 배양액, MgSO<sub>4</sub>을 첨가하지 않은 경우(control)와 80 mM MgSO<sub>4</sub>를 첨가한 경우, 그리고 공기공급속도 1.0, 1.5, 2.0 vvm 등 전체적으로 12가지 조건하에서 얻어진 발효액의 물성을 측정하였다(Table 1). 일반적으로 널리 이용되는 Power's Law( $\tau = K \dot{\gamma}^n$ )을 적용하여 fluid consistency index(K) 및 flow behavior index(n) 값을 각각 구하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 MgSO<sub>4</sub>가 첨가되지 않은 대조구(control)와 80 mM MgSO<sub>4</sub>를 첨가한 경우 비슷하게 발효시간의 경과에 따라, 또한 공기공급속도가 증가함에 따라 n 값이 감소하고 K 값은 증가하는 경향을 나타내었다. 이들 결과를 바탕으로 하여 이들의 물성과 비슷한 성질(즉, 비슷한 n, K 값)을 나타내는 12가지 발효유사액(simulated media)을 CMC(carboxy methyl cellulose)를 이용하여 조제하였다(Table 1). 팔호안의 값은 발효유사액 성분인 CMC의 농도와 물성인자 n, K 값을 나타낸 것이다. 경우에 따라 약간의 차이는 있으나 대체적으로 0.7~2.1% CMC 농도범위에서 실제 발효액과 비슷한 물성을 나타내었다.

Air lift fermentor에서 공기공급속도가 gas hold-up에 미치는 영향을 분석하기 위하여 12가지의 발효유사액 상에서 superficial air velocity( $U_G$ , air lift

fermentor의 riser 면적당 공기공급속도)에 따른 발효조내에서의 gas hold-up( $\epsilon$ )을 측정하였다(Fig. 3). Fig. 3에서 보는 바와 같이 발효유사액의 gas hold-up은 superficial air velocity가 증가함에 따라 전체적으로 증가하는 경향을 보였으며, MgSO<sub>4</sub> 무첨가시와 40시

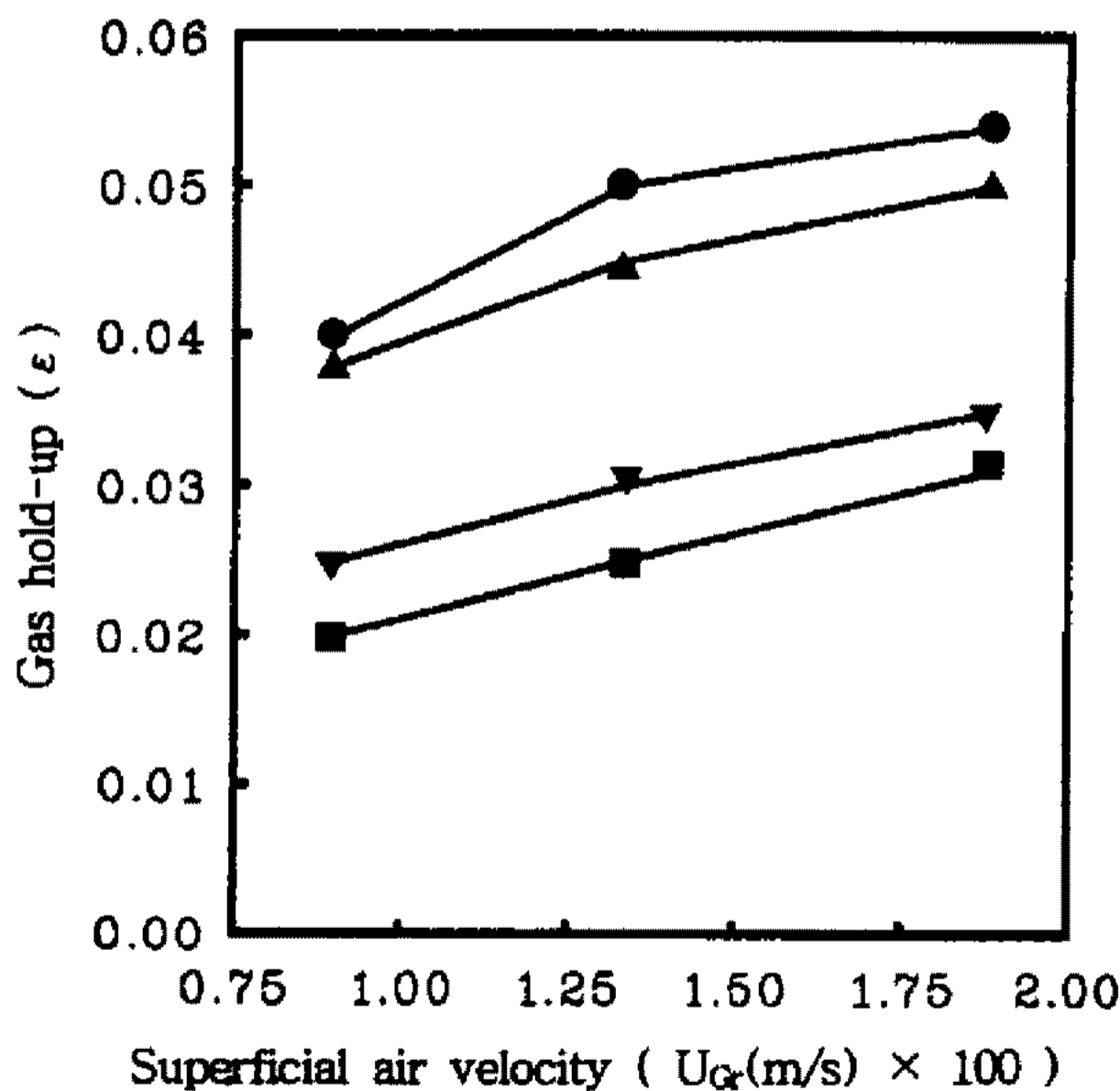


Fig. 3. Variation of gas holdup depending on superficial gas velocity in simulated media.

Twelve media simulated with CMC solutions have the rheologies of the following cultures (see Table 1).

- : 40 hours cultivated broth without MgSO<sub>4</sub>, ▲: 40 hours cultivated broth with 80 mM MgSO<sub>4</sub>, ▼: 60 hours cultivated broth without MgSO<sub>4</sub>, ■: 60 hours cultivated broth with 80 mM MgSO<sub>4</sub>

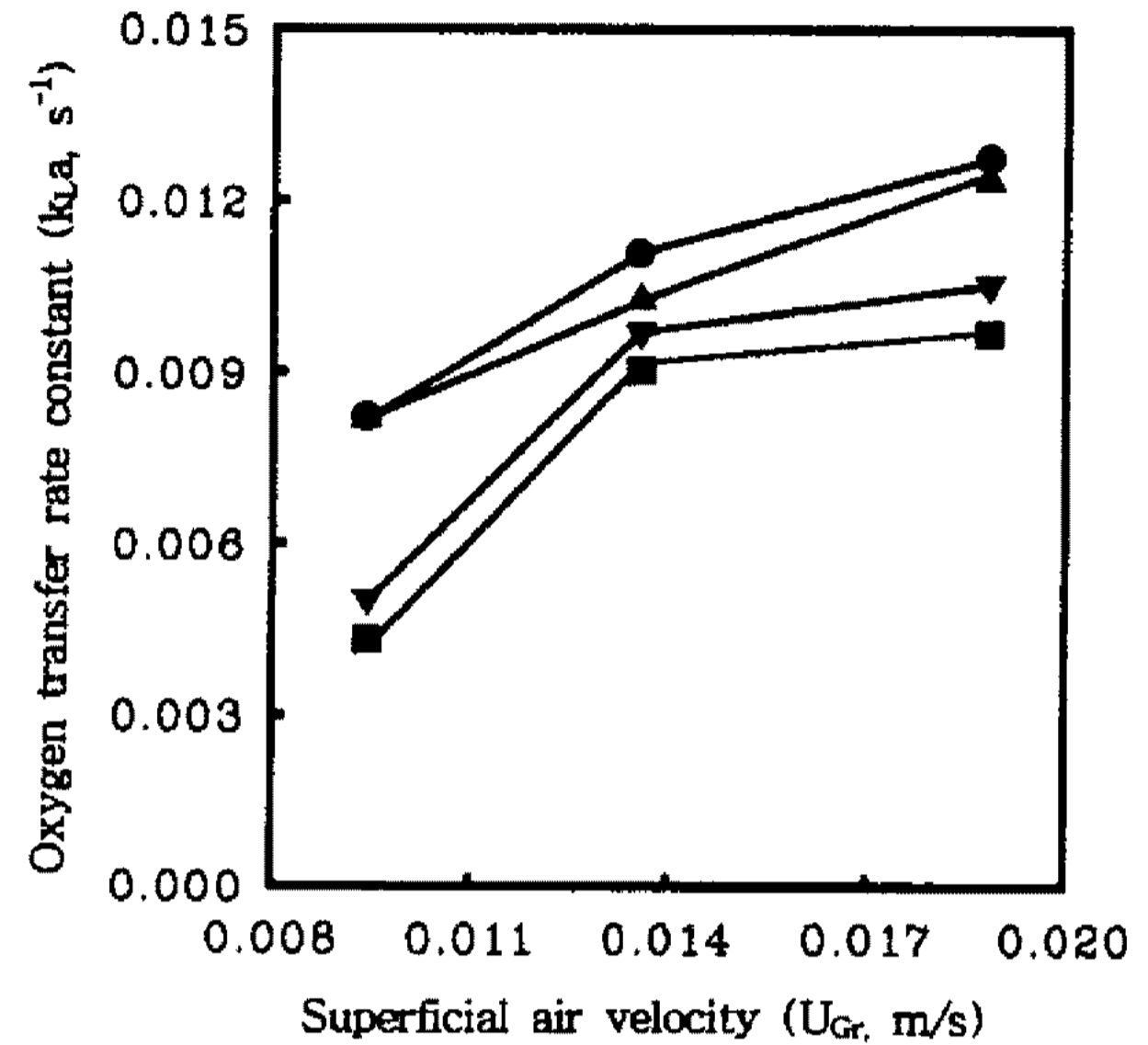


Fig. 4. Variation of oxygen transfer rate constant depending on superficial gas velocity in the twelve simulated media.

- : 40 hours cultivated broth without MgSO<sub>4</sub>, ▲: 40 hours cultivated broth with 80 mM MgSO<sub>4</sub>, ▼: 60 hours cultivated broth without MgSO<sub>4</sub>, ■: 60 hours cultivated broth with 80 mM MgSO<sub>4</sub>

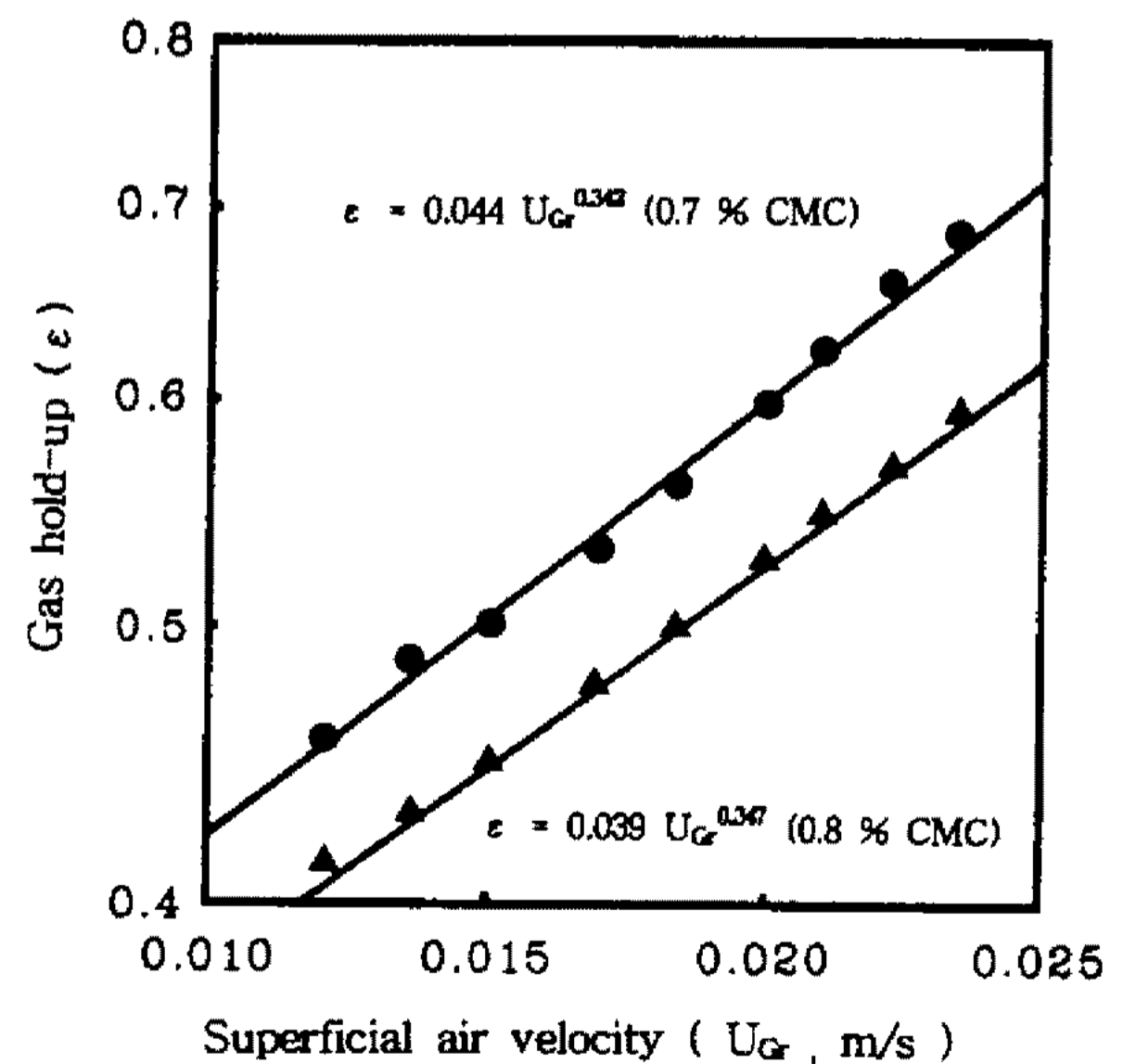


Fig. 5. A model for dependence of gas hold up on superficial gas velocity in the two simulated media.

The solid lines indicate the predicted values, whereas the circles and triangles denote the experimental values.

- : 0.7% CMC solution, ▲: 0.8% CMC solution

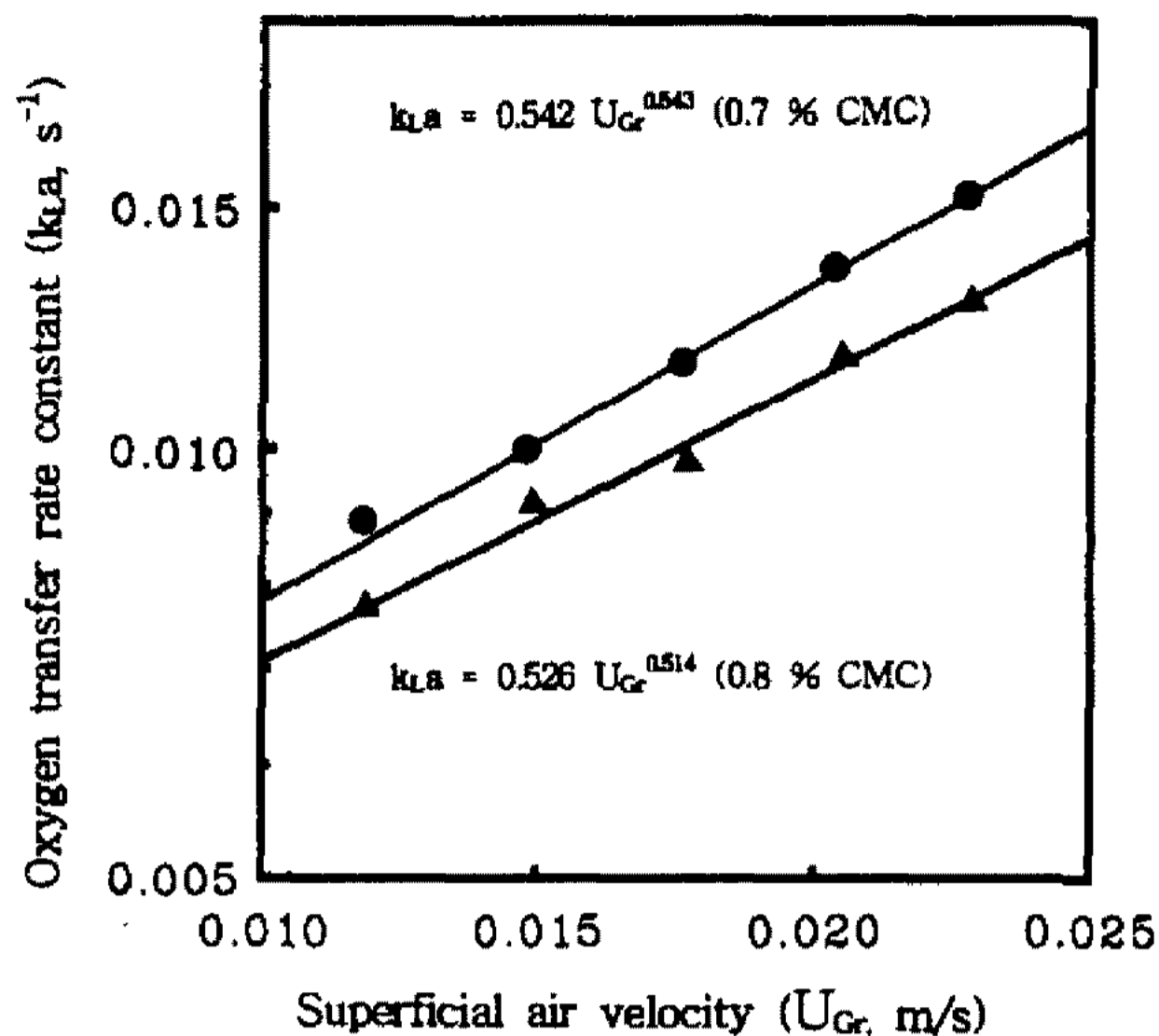


Fig. 6. A model for dependence of  $k_{La}$  on superficial air velocity in the two simulated media.

The solid lines indicate the predicted values, whereas the circles and triangles denote the experimental values.

●: 0.7% CMC solution, ▲: 0.8% CMC solution

간 발효유사액(CMC 용액)에서 더욱 높게 유지되었다. 즉, gas hold-up은 고농도의  $MgSO_4$  용액과 점성이 높은 발효유사액에서 감소하였다. 한편, 공기공급속도가 산소전달속도에 미치는 영향을 분석하기 위하여 superficial air velocity에 따른 발효유사액에서의 산소전달속도상수  $k_{La}$ 의 변화를 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이  $k_{La}$  값은 superficial air velocity 증가에 따라 급격히 증가하였으나,  $MgSO_4$  첨가시에 그리고 배양시간이 경과함에 따라 감소하였다. 이들 결과는 superficial air velocity에 따른 gas hold-up의 결과와 거의 유사한 경향을 나타내었다.

이와같이 gas hold-up과  $k_{La}$ 는 superficial air velocity의 함수로써  $\epsilon = \alpha U_{Gr}^\beta$ ,  $k_{La} = \gamma U_{Gr}^\delta$  형의 일반식으로 나타낼 수 있다. 40시간 발효액에 80 mM  $MgSO_4$ 의 첨가와 비첨가를 한 경우의 물성에 대응하는 CMC-발효유사액 상에서 gas hold-up 및  $k_{La}$ 와 superficial air velocity와의 상관관계의 계수를 계산하였다(Fig. 5, 6). Gas hold-up의 경우,  $MgSO_4$  무첨가의 40시간 발효유사액(0.7% CMC 용액)에 있어서  $\alpha$ 와  $\beta$  값은 각각 0.044, 0.342였으며, 80 mM  $MgSO_4$  첨가 40시간 발효유사액(0.8% CMC 용액)의 경우 각각 0.039, 0.347이었다. 한편,  $k_{La}$ 와 superficial air velocity 사이의 상관계수인  $\gamma$ ,  $\delta$  값은  $MgSO_4$  무첨가 40시간 발효유사액의 경우 0.542, 0.543이었고, 80 mM  $MgSO_4$  첨가 40시간 발효유사액의 경우 0.526, 0.514였다. 결론적으로, gas hold-up과  $k_{La}$ 는 superficial air

velocity의 함수로 잘 표현되며, 이들 상관관계를 이용하여 실제 발효중에 공기공급속도에 따른 발효조내의 gas hold-up과  $k_{La}$ 의 값을 예측할 수 있다.

## 요 약

Air lift fermentor를 이용한 sisomicin 발효중에 발효액의 물성과 비슷한 발효유사액을 이용하여 산소전달속도 및 gas hold-up을 예측할 수 있는 방법을 제시하였다. 공기공급속도 1.0, 1.5, 2.0 vvm 및 80 mM  $MgSO_4$ 의 첨가유무의 조건에서, sisomicin 생성 초기인 배양 40시간 및 균체증식속도가 최대인 배양 60시간대의 발효액인 12가지 각각의 물성을 Power's Law 식을 이용하여 분석하였다.  $MgSO_4$  첨가유무의 두 경우 비슷하게 발효시간의 경과와 공기공급속도의 증가에 따라  $n$  값이 감소하고  $K$  값은 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 이들 발효액과 유사한 물성을 지닌 발효유사액을 0.7~2.1% CMC 용액으로 제조하였으며, 이들 용액을 이용하여 superficial air velocity에 따른 gas hold-up과 산소전달속도상수( $k_{La}$ )를 측정하였으며,  $\epsilon = \alpha U_{Gr}^\beta$ ,  $k_{La} = \gamma U_{Gr}^\delta$ 의 일반적인 상관관계가 얻어져 실제 발효액에 대한  $\epsilon$  및  $k_{La}$ 를 공기공급속도에 따라 예측할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 1992년 한국과학재단 연구비(921-1000-015-2)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Shin, C.S., B.W. Ahn, S.H. Lee, S.U. Kim, and S.H. Bok. 1988. Liberation of sisomicin from cells by sodium chloride. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 37-38.
- Shin, C.S., S.H. Han, and S.H. Lee. 1989. Effect of mineral salts on the improvements of sisomicin yield. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 247-251.
- Han, S.H. 1991. *Analysis of the Effects of Magnesium Sulfate on the Improvement of Sisomicin Yield*. M.S. Thesis, Dept. of Food Engineering, Yonsei University, Seoul.
- Shin, C.S., S.Y. Kim, and J.Y. Yu. 1994. Characteristics of sisomicin fermentation supplemented with  $MgSO_4$  in stirred and air lift fermentors. *Biotechnol. Lett.* **16**: 251-256.
- Kim, S.Y. 1993. *Characteristics of Sisomicin Fermentation Using Air Lift Fermentor*. M.S. Thesis, Dept.

- of Food Engineering, Yonsei University, Seoul.
6. Han, S.H. and C.S. Shin. 1992. Effect of magnesium sulfate on sisomicin fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 213-218.
  7. Hewitt, W. 1977. *Microbiological Assay*, Academic Press, New York.
  8. Metz, B., N.W.F. Kossen, and J.C. Van Suijdam. 1979. The rheology of mould suspensions, Pp. 103-156. *In* T.K. Ghose, A. Fiechter, and N. Blackbrough(eds.), *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 11, Springer-Verlag, New York.
  9. van Suijdam, C. and B. Metz. 1981. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 111-148.
  10. Chisti, M.Y. 1989. *Air Lift Bioreactors*, Elsevier Applied Science, London.
  11. Wang, D.I.C., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunnill, A.E. Humphery, and M.D. Lilly. 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*, Pp. 175-178. John Wiley and Sons, New York.

(Received October 10, 1994)