HWAHAK KONGHAK Vol. 22, No. 4, August 1984, pp. 213-223
(Journal of the Korean Institute of Chemical Engineers)

유동층 회분반응기 방식에 의한 시트르산 생산

임동준* · 최차용

* 영남대학교 공과대학 공업화학과
서울대학교 공과대학 공업화학과

(1984년 2월 27일 접수, 1984년 5월 31일 채택)

Production of Citric Acid in Fluidized-Bed Batch Reactor System

Dong Joon Lim* and Cha Yong Choi

* *Department of Industrial Chemistry, College of Engineering, Yeung Nam University, Kyong San, Korea*
Department of Chemical Technology, College of Engineering, Seoul National University, Seoul 151, Korea

(Received 27 February 1984; accepted 31 May 1984)

요 약

칼슘 알지네이트 담체에 *Candida lipolytica* MX 9-11 R 3 세포를 포괄시켜 고정화 효모 세포를 만들었다. 유동층 회분 반응기에서 고정화 효모 세포를 사용하여 포도당으로 부터 시트르산 생성에 관한 연구를 하였다. 세포량 증가에 필요한 다른 영양소는 넣지 않고 포도당만 사용함으로써 세포 증식을 다소 막을 수 있었다. 유동층 회분 반응기에서 시트르산 생산성은 반응온도, pH, 공기 유량속도에 크게 영향을 받았다. 시트르산 생산의 최적 조건은, 균일계에서는 26℃ (Tabuchi), 30℃ (Nakanishi)와 pH 5 (Marchal), pH6.5 (Nakanishi)였으나, 여기서는 28℃, pH 6 이었다 공기 유량속도를 증가시키면 시트르산 생산이 증가되었는데 이것은 용존 산소의 증가와 물질전달 저항의 감소에 기인한 것 같다.

유동층 회분 반응기에 공급되는 공기중에 CO_2를 어느정도 혼입시켰을 때 시트르산의 생산성이 증가하였다. 최적 CO_2의 함량은 16% (V/V)였다.

Abstract—Immobilized yeast cell (Candida lipolytica MX 9-11 R3) was prepared by entrapping the whole cell in calcium alginate matrix. The fermentative production of citric acid from gulcose was studied using this immobilized yeast cell in a fluidized-bed batch reactor. One could more or less prevent the cell growth using glucose as the sole nutrient and thus eliminating other nutrients necessary for the cell mass doubling. The productivity of citric acid was remarkably influenced by reaction temperature, pH, and air flow rate in fluidized-bed batch reactor. The optimal conditions for the citric acid production were found to be 28°C and pH 6 as compared with those of homogeneous case, i.e. 26°C (Tabuchi), 30°C (Nakanishi), and pH 5 (Marchal), pH 6.5 (Nakanishi). The increased air flow rate resulted in an enhanced citric acid production possibly due to the increased dissolved oxygen concentration and the decrease in mass transfer resistance.

The intentional addition of CO_2 gas into the air supply to the fluidized-bed batch reactor gave a better citric acid productivity in certain concentration ranges. The optimal CO_2 content was found to be 16% (v/v).

서 론

시트르산은 1920년대 말까지만 하더라도 과일에서 부터 분리하여 생산하였으나, 오늘날에는 대부분 미생물 발효에 의하여 생산되고 있다. 1893년 Wehmer[1]가 설탕과 탄산칼슘의 용액에서 곰팡이에 의해 시트르산이 생성되어짐을 처음으로 본 이래 1952년에는 액체 배양 공정[2]으로 상업화될 수 있었다. 곰팡이에 의한 시트르산 생성에 관해서는 오래전부터 최근까지 많은 연구[1~20]가 계속 되어 왔으며 국내에서도 이와 박[21], 성등[22]에 의해서 보고된 바 있다. 효모에 의한 시트르산 생성에 관한 연구는 1968년 Tabuchi등[23]에 의해 처음으로 발표된 이래 지금까지 다수의 연구[24~42]가 보고되어지고 있다. 효모는 Aspergillus속의 경우와는 달리 이소시트르산을 부생시키나, 기질로는 탄수화물 이외에도 글리세롤, 천연유, 지방산, 초산, 낙산, 어유, n-paraffin등을 사용할 수 있다 이소시트르산 생성은 monofluoroacetate[29]나 N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine[33]을 사용하여 변이주를 만들어서 억제시킬 수 있었다.

한편 근래에는 세포를 고정화시켜서 반응을 수행하는 데에 많은 관심을 가지게 되었는 바 그것은 세포를 고정화함으로써 고정화되지 않은 세포에 비해 많은 장점을 지닐 수 있기 때문이다. 미생물 세포의 entraptment에 의한 물리적인 고정화는 agar[43, 44], polyacrylamide gel, carrageenan gel, alginate gel등을 당체로 사용하고 있다. polyacrylamide gel[45~47]에 의한 방법은 널리 이용되어 왔으나 중합시 많은 열을 발생시켜 세포의 효소 활성을 저해하며, 세포에 상당히 독성을 끼치고 불규칙한 형태를 취하는 등 단점이 많으며, carrageenan gel[48, 49]은 세포 고정화 공정중 비교적 높은 온도가 요구되므로 저온에서 증식하는 세포에는 이용되기 어렵고 또한 담체에 세포를 많이 포함시킬 수 없는 단점이 있다. Alginate gel[50, 51]은 고정화 공정이 간단하고 세포에 독성을 끼치지 않으며, 값이 싸고 기질 용액의 높은 주입속도에 대해서도 내압축성 내마모성이 크며, 고정화 세포에 기질의 접근을 쉽게 하는 등 여러가지 장점을 지니고 있다.

본 연구는 효모인 *Candida lipolytica* MX9-11 R3을 사용하여 calcium alginate[51]로 세포를 고정화시켜서 반응을 수행하였다 이때 기질용액은 세포 증식에는 소비되지 않고 시트르산 생성에 주로 이용되도록 다른 영양소는 넣지 않고 포도당만을 사용하여, 유동층 회분 반응기 방식으로 반응을 수행하여 보았다 시트르산 생성의 최적 조건을 알아보기 위해서 유동층 회분 반응기에 기질농도, 온도, pH등의 조건을 변화시켜서 반응을 수행해 보았으며, 시트르산 생성에 필수적인 산소의 원활한 공급을 위해서 반응기내로 유입되는 공기의 유량속도를 변화시켜 보았다. 또한 시트르산 생성을 증대시킬 목적으로 반응기에 공급되는 공기중에 탄산가스를 혼입시켜서 실험하여 보았다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 실험재료

2-1-1. 사용균주

일본 오사까대학 발효공학과의 Aiba교수로 부터 분양받은 *Candida lipolytica* MX9-11 R3를 사용하여 실험하였다.

2-1-2. 사용배지

균체 보관용으로 사용한 사면배지의 조성은 Table 1에 나타내었으며, 균체 증식에 사용한 배양액의 조성[38]은 Table 2에 나타내었다.

Table. 1. Medium Composition for Slant Culture

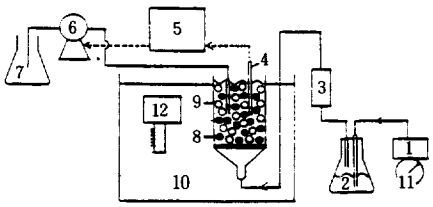
Yeast Extract	1 W/V%
Peptone	2
Glucose	2
Agar	2

2-1-3. 표준 기질 용액

4 %(W/V)의 포도당 용액에 고정화bead의 안정제인 $CaCl_2$가 10mM농도가 되게 포함된 용액을 표준기질 용액으로 사용하였다.

2-1-4. 실험장치

본 실험에 사용된 유동층 회분 반응기는 반응기내의 밑바닥을 유리필터로 구성하여 내경 4.2 cm × 높이 25cm의 원통형 유리컬럼을 만들어서 반응기의 밑부분에서부터 반응기 내부로 공기를 불어 넣을 수 있도록 하였다. 반응기내로 넣어주는 공기의 공급은 기포발생기(Cheongtap Electric Co.)를 사용



1. Air Generator
2. Air Filtration Chamber
3. Air Flow Meter
4. pH Probe
5. pH Controller
6. Micro Tubing Pump
7. Solution (1M HCl or 1M NaOH) for pH Control
8. Beads with immobilized Yeast Cells
9. Air Bubbles
10 Water Bath
11. Voltage Regulator
12. Thermostat and Circulator

Fig. 1. A Schematic Diagram of Fluidized-bed Bach Reactor System with pH Control

하였으며, 공기 유량속도의 조절은 스라이닥스를 사용하였으며, 반응 도중 일정한 pH를 유지하여야 할 때는 pH조절기(Tokyo Rikakikai Co. Model Fc-1)를 사용하였다. 반응용액중의 용존산소는 용존산소계(Denki Kagaku Keiki, Model DO-31)를 사용하여서 측정하였다. 본 실험의 반응계의 개략도를Fig 1과 Fig. 2에 나타내었는데 Fig. 1은 유동층 화분 반응기 방식으로 반응을 수행하되 인위적으로 반응기내의 용액을 일정한 pH로 유지시키면서 반응을 수행하는 것이며, Fig. 2는 유동층 회분 반응기 방식으로 반응을 수행하되 반응기내에 공급되는 공기중에 탄산가스를 혼입시켜 반응을 수행하는 개략도이다.

2-2. 실험방법

2-2-1. 미생물배양

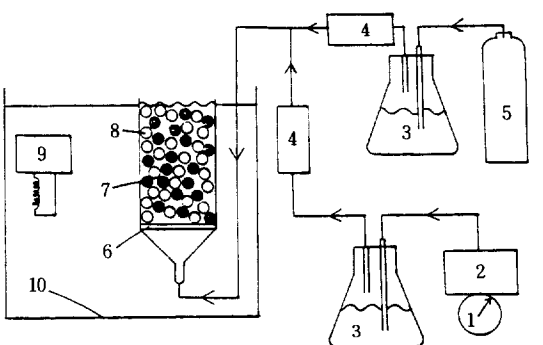
Candida lipolytica MX 9-11 R3는 Table 1에 표시된 조성의 사면 배지에 28℃에서 24시간 배양된 후 4℃에 보관되었으며, 1달에 1번씩 계대배양시켜 보관하였다. 500ml용 삼각 플라스크에 Table 2에 표시된 배지를 포도당과 그 외의 성분으로 분리하여 각각 120℃에서 20분간 멸균시킨 후 28℃이하로 충분히 냉각되었을 때 서로 합하여 100ml 되게 하였다. 여기에 *Candida lipolytica*를 접종시켜서 28℃에서 36시간 진탕 배양시켜서 세포 고정화에 사용하였다.

2-2-2. 세포 고정화 과정

배양된 세포를 3000rpm에서 5분간씩 원심분리하여 모은 세포를 증류수로 세척하고 다시 원심분리하는 과정을 3회에 걸쳐 반복한 후 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 증류수로 희석한 후 Sodium alginate용액과 충분히 섞어서 주사기에 넣고 압출하여서 0.1M $CaCl_2$용액에 적합하여 calcium alginate로 세포가 고정화된 bead를 만들 수 있었다. 이 염화칼슘 용액을 4℃에서 2시간 숙성시킨 후 고

Table. 2. Medium Composition for Shake Culture

Glucose	40*g/l*
$(NH_4)_2SO_4$	3*g/l*
KH_2PO_4	0.5*g/l*
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5*g/l*
NaCl	0.1*g/l*
Yeast Extract	1*g/l*
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1*mg/l*
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2*mg/l*
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2*mg/l*
Thiamine-HCl	50μ*g/l*
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	50μ*g/l*



1. Voltage Regulator
2. Air Generator
3. Air Filtration Chamber
4. Air Flow Meter
5. CO_2 Cylinder
6. Support. (Sintered Glass Filter)
7. Beads with Immobilized Yeast Cells
8. Air Bubbles
9. Thermostat and Circulator.
10. Water Bath

Fig. 2. A Schematic Diagram of Fluidized-bed Batch Reactor System with Inlet Air Mixed with CO_2 Gas

정화 bead를 끄집어 내어 증류수로 세척하여 0.025 M $CaCl_2$용액에 넣어서 보관하였다. 이 때 사용된 주사바늘은 23게이지를 사용하였으며, 만들어진bead의 크기는 직경이 2.4mm이었다. 세포 고정화 과정을 Fig. 3에 나타내었다.

2 - 2 - 3. 분석법

시트르산 분석은 Marier와 Boulet방법[52] 으로 수행하였으며, 이소시트르산 분석은 Stern[53]에 의한 효소 방법으로 수행하였다.

2 - 2 - 4. 고정화 bead내의 세포수 측정

0.2M의 Sörensen's citrate완충용액(pH 6)20ml에 고정화 bead 10개를 넣어서 ice bath위에서 2시간 동안 저어서 완전히 녹인 후 hemacytometer 로 세포수를 측정하였다.

2 - 2 - 5. 유동층 회분 반응기에서 시트르산 생성 방법

유동층 회분 반응기에 고정화 bead를 900개씩 넣고 표준 기질 용액을 100ml씩 채운 후 반응기내로 공급되는 공기의 유량 속도를 1.2 l/min로 하여 28 ℃에서 반응을 수행하였다.

2 - 2 - 6. 기질 용액중의 pH조절

반응 초기부터 반응이 종료될 때까지 반응용액의 pH를 일정하게 유지하기 위해서는 Fig. 1에 도시한 바와 같이 pH조절기를 사용하여 pH를 조절하였다. 이 때 pH조절을 위해서 사용된 용액은 1M NaOH 용액과 1 M HCl용액을 사용하였다.

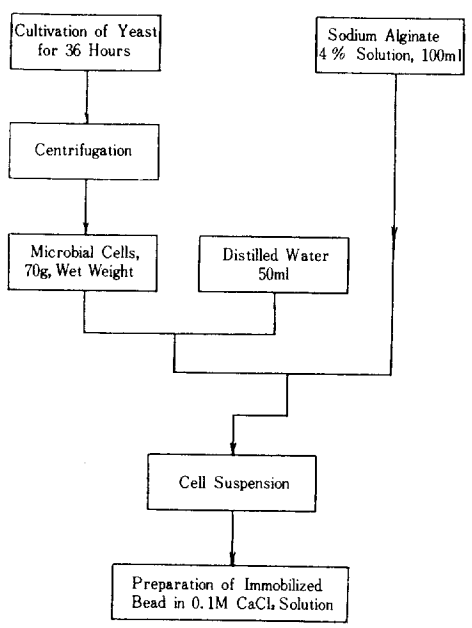


Fig. 3. The Procedure for Immobilization

2 - 2 - 7. 유동층 회분 반응기에 공급되는 기체중의 탄산가스의 함량 조절

유동층 회분 반응기내로 공급되는 기체중의 탄산가스 함량의 변화는 Fig. 2에 도시된 개략도 처럼 하였다. 즉, 탄산가스는 탄산가스 봄베를 사용하여 발브를 조절하면서 로타메타로 탄산가스의 유량 속도를 변화시켜 공급하였고, 공기는 기포발생기를 전원에 바로 연결하지 않고 스라이닥스에 연결하여 전압을 변화시켜 가면서 공급하여, 혼합기체중의 탄산가스의 함량이 각각 8, 16, 24, 32% (V/V)가 되도록 하여 반응기에 공급하였다. 이 때 반응기에 공급되는 혼합 기체의 유량 속도는 1.2 l/min로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3 - 1. 시트르산 생성 활성에 있어서 기질 농도의 영향

기질인 포도당의 농도가 시트르산 생성 속도에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해서, Michaelis 상수(Km)와 최대 반응속도(Vm)와 기질 저해 상수(Kis)를 조사하여 보았다. 유동층 회분 반응기에서 포도당의 농도를 각각 달리하여 반응을 수행하였으며, 이들 용액중에는 bead의 안정제로써 10mM $CaCl_2$가 포함되어 있다. 반응이 진행됨에 따른 pH 변화의 영향을 배제하기 위하여 반응 완료시까지 pH 6으로 조절하여 반응을 수행하였다. 반응 초기 2시간마다 시료를 5 ml씩 채취함과 동시에 고정화 bead를 45개씩 채취하였다. 이것은 유동층 회분 반응기내에서 시료만 채취하고 고정화 bead는 채취하지 않고 반응을 계속 수행하면 bead당 반응 용액의 양이 줄어들므로, 반응기내에서 반응용액과 고정화 bead의 조성비율을 일정하게 유지하여 반응을 계속 수행할 수 있도록 하기 위해서였다. 이렇게하여 채취한 시료중에 생성된 시트르산을 분석하여 초기 시트르산 생성 속도를 측정함으로써 고정화 *Candida lipolytica*세포의 시트르산 생성의 상대활성을 구할 수 있었다. 이 결과를 Fig. 4에 나타내었는데, 포도

당 용액의 농도가 8%(W/V) 이상에서는 기질 저해 현상이 일어나서 고정화 bead의 시트르산 생성 활성이 감소하였다. 포도당 용액이 20%(W/V) 정도의 비교적 높은 농도에서는 최대의 시트르산 생성 활성의 약 80% 정도를 보였다. Lineweaver-Burk plot으로부터 Michaelis 상수와 최대 반응속도를 구할 수 있으며, Fig. 5에서 부터 Km과 Vm 의 값은 각각 0.045M, 0.14μM/bead.hr이었다. 기질 저해 현상이 일어나는 경우의 매카니즘과 반응속도

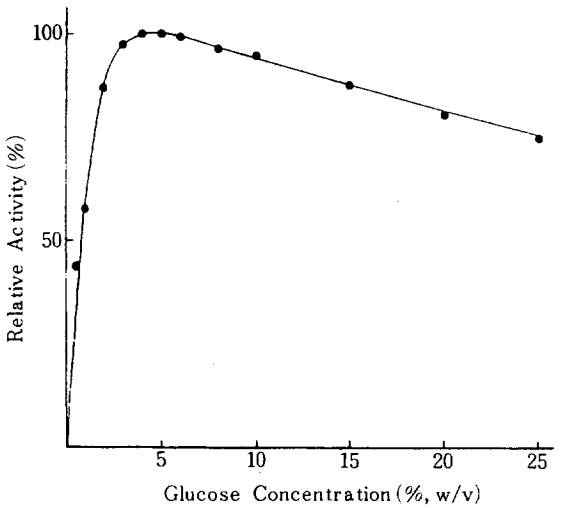


Fig. 4. Effect of Substrate Concentration on Bead Activity;
Absolute Activity at Maximum=0.024g/l·hr

식은 일반적으로 다음과 같이 나타낼 수 있다.

해리상수

$$E+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \qquad K_1$$

$$ES+S \underset{k_{-2}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES_2 \qquad K_2$$

$$ES \xrightarrow{k_3} E+P$$

$$V=\frac{Vm}{1+K_1/[S]+[S]/K_2}$$

여기서 K_2=Kis이며, 기질의 농도가 크면

$$\frac{1}{V}=\frac{1}{Vm}+\frac{[S]}{Vm\cdot Kis}$$ 이 된다.

Fig. 6에서 부터 기질 저해 상수를 구할 수 있으며 Kis의 값은 2.97M 이었다.

3-2. 시트르산 생성 활성에 있어서 온도의 영향

시트르산 생성에 대한 온도 의존성을 보기 위해서 유동층 회분 반응기내의 온도를 각각 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34℃로 하였으며 반응 완료시까지 pH 6으로 조절하여 반응을 수행하였다. 이 때 반응시간은 6시간으로 하였으며 온도 변화에 따른 시트르산 생성의 상대 활성을 구하여 Fig. 7에 나타내었다. 한편 세포를 고정화하지 않은 균일계 반응에서 Tabuchi[27]는 26℃, Nakanishi[28]는 30℃가 시트르산 생성의 최적 반응 온도임을 보고한 바 있으나, 본 실험에서는 28℃에서 고정화 효

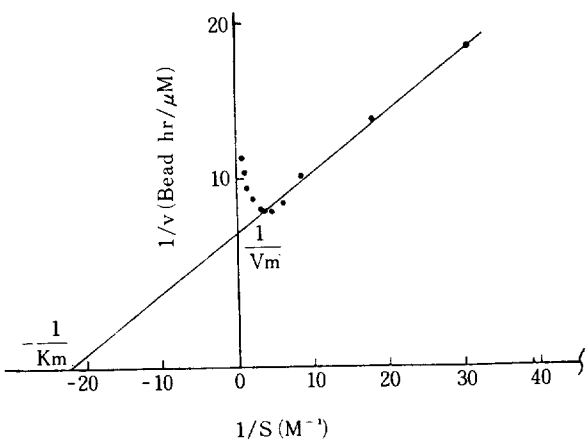


Fig. 5. Lineweaver-Burk Plot(left);
Vm=0.14 (μM/Bead. hr), Km=0.045 (M)

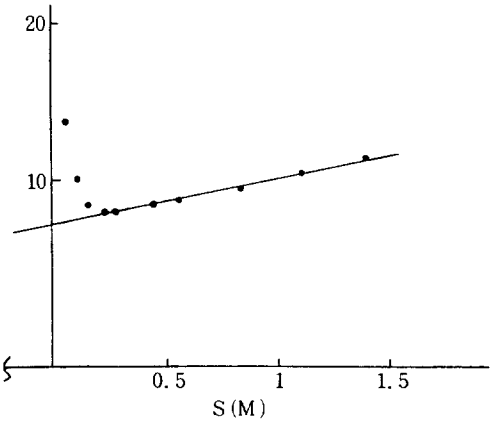


Fig. 6. Determination of Substrate Inhibition Constant(right);
Slope= 1 /Kis·Vm, Kis=2.97 (M)

모 세포가 가장 좋은 시트르산 생성 활성을 보였으며, 그 이상의 온도 영역에서는 반응 온도가 조금씩 상승함에 따라 급격히 시트르산 생성 활성이 떨어짐을 볼 수 있다.

고정화 bead에 의한 시트르산 생성에 대한 온도 영향을 다음과 같은 Arrhenius방정식으로 나타낼 수 있으며

$$\ln V = \ln A - \frac{Ea}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

여기서 V ; 반응온도
Ea; 활성화 에너지
T ; 절대온도
R ; 기체상수
A ; 상수

위의 식에 따라 재정리한 것을 같은 그림에 나타내었다. 고정화 *Candida lipolytica*세포의 시트르산 생성에 대한 활성화 에너지는 낮은 온도 영역에서 24.6Kcal/mol이었다.

3 - 3. 시트르산 생성 활성에 있어서 pH의영향

시트르산 생성에 있어서 pH의 영향을 보기 위해 유동층 회분 반응기에서 기질 용액의 pH를 각각 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8로 일정하게 유지하면서 24시간 반응시켰다. 이 결과를 Fig. 8에 나타내었는데, pH 6인 용액에서 반응하였을때 시트르산과 이소시트르산의 생성량이 가장 많았으며 bead당 세포수도 가장 많이 측정되었다. pH 6의 용액에서 부터 멀어질수록 시트르산 및 이소시트르산의 생성량이 급격히 줄어듬을 볼 수 있으며 또한 bead당 세포수도 적게 측정되었다. 한편 세포를 고정화하지 않은 균일계 반응에서 Nakanishi등[28]은 pH6.5에서, Marchal등[34]은 pH 5에서 시트르산과 이소시트르산의 생산성이 최대가 됨을 보고한 바 있으나, 본 실험에서는 pH 6에서 시트르산과 이소시트르산의 생산성이 가장 좋게 나타났다.

이번에는 본 그림에서 시트르산의 생성 농도가 0.6*g/l* 정도임을 볼 수 있는데 이것은 24시간 동안 반응을 수행했을 경우에 관한 얘기이고 본 연구자들이 수행한 또 다른 연구[55]에서는 150시간 반응을 수행했을 때 3*g/l*까지 나왔다. 그러나 이것도 bead의 크기를 줄인다든지 또는 반응기내의 bead의 갯수를 늘려서 더 많은 양의 생산을 도모할 수 있

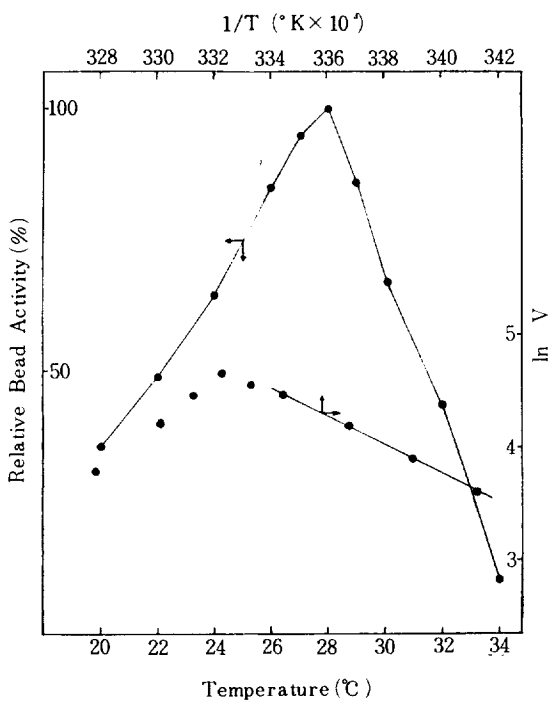


Fig. 7. Citric Acid Production at Various Temperature;
Absolute Activity at Maximum = 0.028g/l·hr

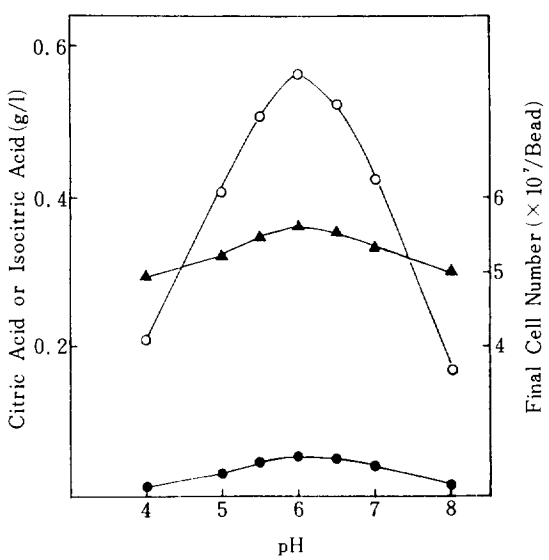


Fig. 8. Acid Concentration and Final Cell Number as Functions of pH Held Constant by a pH Controller; Reaction Time = 24Hours
○ ; Citric Acid ● ; Isocitric Acid
▲ ; Cell Number per Bead.

을 것이다. 이 수치는 Tanaka등[26]이 균일계에서 150시간 발효하여 얻은 40g/l보다 적은 수치로 나온 것이나 앞서 얘기한 방법상 개선으로 성취할 수 있으리라 생각되며 또한 본 연구에서는 일단 일반 공학적 변수에 대한 영향을 고려한 것이다. 또한 덧붙여야 될 것은 배양액에 탄산칼슘을 넣지 않았다거나 배양액내의 탄소원 기질로써 n-paraffin을 쓰지 않고 포도당으로 대체했다거나 하는 여러가지 차이점 때문에 기인된 것으로 보인다. Briffaud 와 Engasser[39]는 *Saccharomycopsis lipoltica*를 사용한 발효에서 95g/l의 시트르산을, 그리고 Ogawa 와 Fazeli[12]는 *Aspergillus niger*를 사용한 150시간 발효에서 120g/l의 시트르산 생산을 보고하고 있다.

3-4. 유동층 회분 반응기내로 유입되는 공기의 유량속도 변화에 따른 시트르산 생성 특성

TCA회로의 중간 생성물인 시트르산 생성을 위해서는 공기의 공급이 중요한 요소로 작용함은 이미 보고[34]된 바 있고 *Candida lipolytica* 세포가 산소를 획득하여 포도당을 산화시켜 에너지를 얻음으로써 세포의 생존을 유지할 수 있는 것은 다른 미생물 세포에서와 마찬가지이며 잘 알려진대로 다음식으로 표시될 수 있다.

(시트르산 생성 반응)

$C_6H_{12}O_6+1.5O_2\rightarrow C_6H_8O_7+2H_2O$

(포도당 산화 반응)

$C_6H_{12}O_6+6O_2\rightarrow 6CO_2+6H_2O$

이 식에서 보면 시트르산 생성을 위해서는 반드시 산소가 공급되어져야 하는데, 이것은 Fig. 9의 포도당에서 부터 시트르산 생성에 관한 개략적인 대사도에서부터 설명되어질 수 있다. 이 그림에서 보면, 반응(Ⅰ)~(Ⅳ), (Ⅵ)에서 NAD^+가 NADH 로 변하며, 반응(Ⅴ)에서 FAD가 $FADH_2$로 변하는 것을 볼 수 있다. 여기서, 생성된 NADH는 flavo단백질에 전자와 H^+를 넘겨주고 flavo단백질은 전자와 H^+를 ubiquinon에 넘겨주며, 또한 생성된 $FADH_2$도 전자와 H^+를 ubiquinon에 넘겨준다. ubiquinon은 전자를 cytochrome b에 넘겨주며, H^+는 전자 전달계 밖으로 유리된다. 전자는 여러 단계를 거쳐 cytochrome a_3에 전달된다. cytochrome a_3는 반응 용액중에 있는 전자 수용체인 산소를 환원시켜 O^{2-} 가

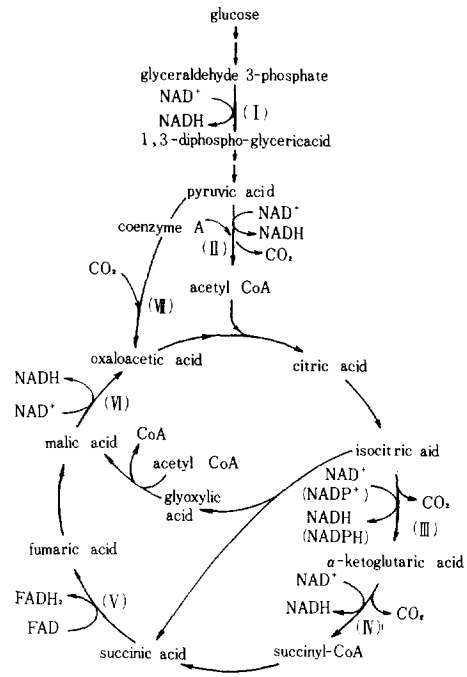


Fig. 9. Simplified Metalolic Scheme in Citric Acid Production from Glucose

되게하여 ubiquinon에서 유리된 $2H^+$와 결합하여 H_2O이 생성된다. 이와 같이, 생성된 NADH, $FADH_2$가 NAD^+, FAD로 변하는 과정에서 산소가 환원되어 물이 생성되고 또한 미트콘드리아 격막의 양측에 H^+의 농도 구배가 형성된다. 한편 ATP는 이때 생성된 H^+농도 구배를 기전력으로 하여 ATPase complex에 의하여 생성된다. 이때 생성된 ATP는 TCA 회로 앞단계의 glycolysis경로를 원활하게 움직이게 한다. 이와 같은 일련의 과정을 수행하기 위해서는 산소가 공급되어져야 한다.

시트르산 생성에 있어서 산소의 공급이 중요한 요소임을 고려하여 다음과 같은 실험을 하였다. 즉 유동층 회분 반응기에 공기의 유량 속도가 각각 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0 l/min 되게 공급하면서, 인위적인 pH 조절은 하지 않고 24시간 반응을 수행하였으며, 반응기 내에서 반응 용액의 용존산소를 측정하여 보았다. 이 실험 결과를 Fig. 10에 나타내었는데, 여기서 반응기내에 공급되는 공기의 유량 속도가 1.0 l/min까지는 증가할수록

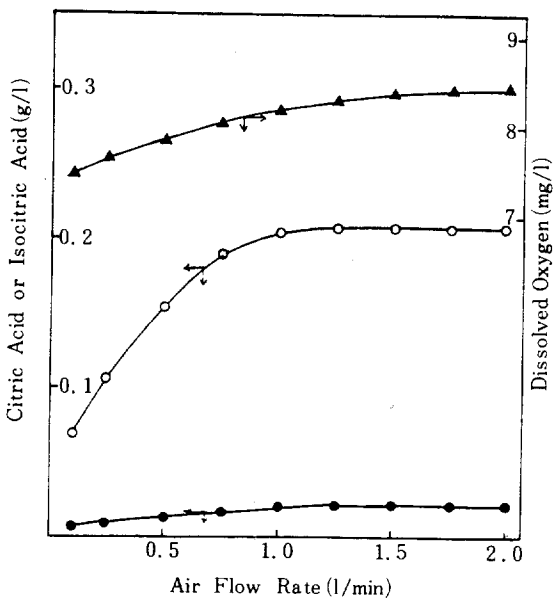


Fig. 10. Acid Concentration and Dissolved Oxygen as Functions of Air Flow Rate at 28℃ in Fluidized-bed Batch Reactor after 24 Hours of Operation

○; Citric Acid ●; Isocitric Acid
▲; Dissolved Oxygen

시트르산의 생산성이 더 증가하지 않고 거의 포화 상태에 도달하였음을 볼 수 있다. 또한 용존산소는 공기 유량 속도가 증가함에 따라 점차 증가하는 것을 볼 수 있으나, 시트르산 생산성은 용존산소가 8.3mg/l 이상에서는 더 이상 증가되지 않아서 시트르산 생성에는 용존산소가 8.3mg/l 정도만 하더라도 충분한 효과를 거둠을 볼 수 있다. 그러나 여기서 사용한 공기 유량 속도의 전 영역에 걸쳐서 용존산소의 농도변화가 10% 정도인데 비하여 시트르산 생산성 자체는 2배 이상 증가한 것을 감안한다면 용존산소 농도의 증가만이 시트르산 생산 농도 증가에 기여했다고 보기 어렵고, 그외에 공기 유량 속도 증가에 따른 turbulence의 증가 및 교반효과의 증가와 bead 외부의 물질 전달 저항의 감소등도 상당한 역할을 하였으리라 추정된다. 이러한 복합인자들의 영향을 개별적으로 연구하는 방법으로 기체중의 산소 농도를 임의로 변화시킨 artifcial air 의 사용등을 생각할 수 있으며 Fig. 11의 결과가 이런 의미에서 다소 참작이 될 수 있겠으나 좀더 명확한 결과를 위해서는 탄산가스 대신에 질소를 사용하여 산소 농도를 변화시킨 artificical air에 의한 연구가 장래에 자세히 연구되어야 할 것이다.

한편, Marchal등[34]은 세포를 고정화하지 않은 균일계 반응에서 2l용 발효조에 공기 공급 속도를 1 vvm으로 하였을 때 시트르산 생산성이 최대에 도달하였음을 보고하였으나, 본 유동층 회분 반응기 방식으로 고정화 bead를 사용하였을 때는 공기 유량 속도를 1.25l/min, 즉 11vvm에 해당되는 속도로 공급하였을 때 시트르산의 생산성이 최대에 도달하였음을 보였다. 이것은 세포를 고정화한 비균일계 방식이 균일계 방식보다 *Candida lipolytica*세포에 산소 및 기타 용존 물질의 전달을 원활하게 수행하지 않기 때문에 반응기에 공급되는 공기의 유량 속도를 균일계보다 약 11배 증가시켰을 때 시트르산의 생산성이 최대에 도달한 것으로 사료된다.

3-5. 공급 기체중에 함유된 탄산가스 농도 변화에 따른 시트르산 생성 특성

TCA회로의 중간 생성물인 시트르산 생성에 있어

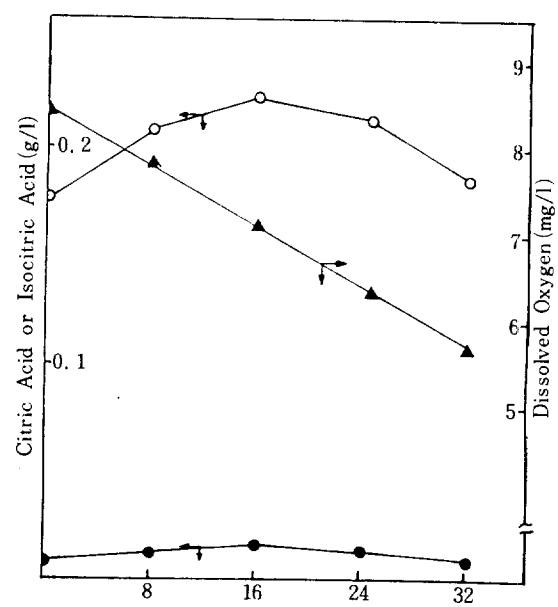


Fig. 11. Effect of CO_2 Concentration in the Inlet Gas on Acid Production and Dissolved Oxygen after 24 Hours of Reaction

○; Citric Acid ●; Isocitric Acid
▲; Dissolved Oxygen

서, CO_2가 TCA회로 주변 경로에서 반응 물질내지 생성 물질로써 존재하며, 생체 세포에 있어서의 탄산가스 흡수는 CO_2의 형태[54]로 주로 흡수되어지고 세포내에서는 pH가 통상 중성 가까이 유지되며 HCO_3^-와 CO_2가 평형으로 공존하고 있다는 사전 지식에 근거하여 이들 제반 현상을 수반하는 CO_2 가 시트르산 생성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 하였다. 즉 유동층 회분 반응기에 탄산가스의 함량이 각각 8, 16, 24, 32% (V/V)인 혼합기체를 1.2 l/min의 속도로 주입하면서 인위적인 pH 조절은 하지 않고 24시간 반응을 수행하였으며, 반응기내에서 반응 용액중의 용존산소를 측정하여 보았다. 이 실험 결과를 Fig. 11에 나타내었으며, 유동층 회분 반응기에서 24시간 반응한 후 bead를 끄집어 내어 bead당 세포수를 측정한 것을 Fig. 12에 나타내었다. 본 실험에서 공급 기체중에 탄산가스의 함량이 16% (V/V)일 때 시트르산과 이소시트르산이 가장 많이 생성되었으며, 탄산가스가 전혀 혼입되지 않았을 때 보다 약 20% 정도의 시트르산 생산 농도의 증가를 보였다. 이것은 Fig. 9 의 TCA회로중에 반응(Ⅰ), (Ⅲ), (Ⅳ)에서 CO_2가 발생하는데, 공급 공기중에 탄산가스가 혼합되면 Le Chatelier원리에 의해 이들 반응을 어느 정도 억제시킨 결과라고 생각될 수도 있으나 이 반응 단계들은 모두가 상당히 비가역적이기 때문에 이 반응 단계들의 평형의 역방향에의 다소간 이동이 본 실험 결과에 주된 기여를 했으리라고 보기 어렵고, 단지 pyruvic acid에서 oxaloacetic acid 로 가는(Fig. 9 의 반응(Ⅶ)) anaplerotic pathway는 가역적인 것으로 알려져 있기 때문에 이 반응 단계가 CO_2농도 증가로 인하여 보다 호의적인 방향으로 진행되었을 가능성은 있다. 그 외에 CO_2농도 변화에 따른 다른 chemical species의 농도 변화 및 그에 수반된 여러가지 regulatory 현상등을 생각해 볼 수 있으나 복잡할 것으로 생각되며 앞으로 좀더 본격적인 연구가 필요하다.

한편, 용존산소량은 Fig. 11에 보듯이 탄산가스가 혼합되지 않았을 때 보다 상당히 감소되었음에도 불구하고 시트르산의 생성량이 증가한 것은 결과적으로 공기중에 탄산가스를 혼합하여 반응시킴으로써 용존산소의 감소로 인하여 시트르산의 생성량이 감소됨을 보상하고도 더욱 시트르산의 생성량이 증가

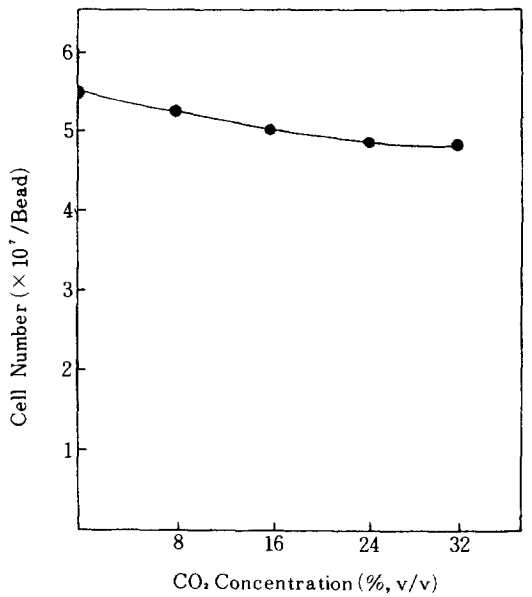


Fig. 12. Effect of CO_2 Concentration in the Inlet Gas on Final Cell Number after 24 Hours of Reaction

된 것이다. 혼합 기체중에 탄산가스의 함량이 더욱 증가하면 시트르산의 생성량이 줄어듬을 볼 수 있는데, 이는 Fig. 11에서 보듯이 탄산가스의 함량이 증가할수록 용존산소가 더욱 감소하여서 시트르산 생성에 필요한 산소를 원활히 공급해 주지 못하는데 기인한 것으로 사료된다. 한편 bead당 세포수는 Fig. 12에 보듯이 탄산가스의 함량이 증가할수록 세포수가 적게 측정되었는데, 이것은 용존산소가 더욱 줄어들어서 세포의 증식이 별로 이루어지지 않은 것으로 사료되나, 공급기체중에 탄산가스의 함량이 증가함에 따라 탄산가스가 TCA 회로를 원활히 수행시키는 것을 방해하기 때문에 NADH 및 FADH의 생성 감소가 일어나고 따라서 세포의 생합성 능력이 줄어든 것도 그 중요 이유에 포함될 수 있을 것이다.

4. 결 론

효모 *Candida lipolytica* MX 9-11 R3 세포를 calcium alginate로 고정화시켜 만든 bead를 포도당을 기질로 하여 유동층 회분 반응기에서 반응을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 고정화 효모의 최적 반응 온도는 28℃였다.

이것은 고정화되지 않은 효모에서 Tabuchi [27] 는 26℃, Nakanishi[28]는 30℃에서 최적 반응 온도라고 보고된 경우와는 달랐으나 큰 차이는 보이고 있지 않다. 활성화 에너지는 24.6 Kcal/mol이었다.

2. 고정화 효모는 pH 6에서 최대의 시트르산 생성 활성을 나타내었다. 이것은 고정화되지 않은 효모에서 Marchal[34]은 pH 5, Nakanishi[28]는 pH 6.5에서 최대의 활성을 보인 경우와는 달랐다.

3. 기질인 포도당의 농도가 8 %(w/v) 이상에서는 기질 저해 현상이 일어났으며 Km, Vm, Kis 의 값은 각각 0.045M, 0.14μM/bead·hr, 2.97M 이었다.

4. 유동층 회분 반응기내로 유입되는 공기의 유량 속도를 1.25 l/min로 하였을 때 시트르산 생산성이 최대에 도달하였으며, 세포를 고정화하지 않은 균일계로 반응을 수행하였을 때 1 vvm[34]에서 시트르산 생산성이 최대값에 도달한데 비해, 11vvm에 해당되는 공기를 주입할 필요가 있었다.

5. 반응기에 공급되는 공기중에 탄산가스를 혼합하였을 경우 탄산가스의 함량이 16%(v/v) 정도일 때 시트르산이 가장 많이 생성되었으며, 탄산가스의 함량이 증가할수록 bead내의 세포수는 적게 측정되었다. 이것은 인위적인 탄산가스 공급이 탄산가스가 관련된 반응 단계들에서 평형에 영향을 주었거나 또는 다른 종류의 regulatory 영향의 결과로 사료된다.

참고문헌

1. Wehmer, C. : Bull. Soc. Chim., **9**, 199 (1983).
2. Martin, S. M. and Waters, W. R.: Ind. Eng. Chem., **44**, 2229 (1952).
3. Currie, J. N. : J. Biol. Chem., **31**, 15 (1917).
4. Amelung, H. : Chem. Ztg., **54**, 118 (1930).
5. Perlman, D., Dorell, W. W. and Johnson, M. J. : Arch. Biochem., **10**, 131 (1946).
6. Martin, S. M. : Can. J. Microbiol., **1**, 644 (1955).
7. Woronick, C. L. and Johnson. M. J. : J. Biol. Chem., **235** (1), 9 (1960).
8. Noguchi, Y. and Johnson, M. J. : J. Bacteriol., **12**, 901 (1961).
9. Horitsu, H. and Clark, D. S. : Can. J. Micrbiol., **12**, 901 (1966).
10. Palacios, R. and Rolz, C. : Biotech. Bioeng., **11**, 103 (1969).
11. Wold, W. S. M. and Suzuki, I. : Biochim. Biophys., Res. Comm., **50**, 237 (1973).
12. Ogawa, T. and Fazeli, A. : J. Ferment. Technol., **54**, 63 (1976).
13. Chaudhary, K., Ethiraj, S., Lakshminarayana, K. and Tauro, P. : J. Ferment. Technol., **56**, 554 (1978).
14. Kristiansen, B. and Sinclair, C. G. : Biotech. Bioeng., **21**, 297 (1969).
15. Kubicek, C. P. and Röhr, M. : Biochem. Biophy. Acta., **615**, 499 (1980).
16. Szczodrak, J. : Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech., 13, 107 (1981).
17. Singh, V. K., Vadehra, D. V. and Gupta, J. K. : Enzyme Microbiol. Technol., 3, Oct., 341 (1981).
18. Sodeck, D., Modl, J., Kominek, J. and Salzbrum, W. : Process Biochem., 16, Oct. /Nov., 9 (1981).
19. Röhr, M. and Kubicek, C. P. : Process Biochem., 16, Jun. /Jul., 34 (1981).
20. Bonatelli, J. R. and Azevedo, J. L. : Biotechnol. Lett., **4**, 761 (1982).
21. 이상선, 박무영 : 한국산업 미생물학회지, **16**, 161 (1978).
22. 성낙계, 김명찬, 심기환, 정덕화 : 한국산업 미생물학회지, **8**, 47 (1980).
23. Tabuchi, T., Tanaka, M. and Abe, M. : J. Agr. Chem. Soc. Japan, **42**, 420 (1968).
24. Tabuchi, T., Tanaka, M. and Abe, M : J. Agr. Chem. Soc. Japan, **43**, 154 (1969).
25. Abe, M. Tabuchi, T. and Tanaka, M. : J. Agr. Chem. Soc. Japan, **44**, 493 (1970).
26. Tanaka, M., Tahara, Y., Tabuchi, T. and Abe, M. : J. Agr. Chem. Soc. Japan, **44**, 499 (1970).
27. Tabuchi, T., Tanaka, M., Tahara, Y. and Abe, M. : J. Agr. Chem. Soc. Japan, **44**, 562 (1970).
28. Nakanishi, T., Yamamoto, M., Kimura, K. and Tanaka, K. : J. Ferment Technol., **50**, 855 (1972).
29. Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao, Y. and Fukuda, H. : Agr. Biol. Chem., **37**, 879 (1973).

30. Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao, Y. and Fukuda, H. : Agr. Biol. Chem., **37**, 885 (1973).
31. Tabuchi, T. and Hara, S. : J. Agr. Chem. Soc. Japan, **48**, 417 (1974).
32. Hattori, K., Yokoo, S. and Imada, O. : J. Ferment. Technol., **52**, 542 (1974).
33. Ikeno, Y., Masuda, M., Tanno, K., Oomori, I. and Takahashi, N.: J. Ferment. Technol., **53**, 752 (1975).
34. Marchal, R., Chaud' e, O. and Metche, M. : Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech., **4**, 111 (1977).
35. Gutierrez, J. R. and Erickson, L. E. : Biotech. Bioeng., **20**, 1833 (1978).
36. Aiba, S. and Matsuoka, M. : Eur. J. Microbiol. Biotech. **5**. 247 (1978).
37. Hyun, H. H., Aiba, S. and Matsuoka, M. : Annual Reports of Cooperative Research and Development in Microbial Engineering, **1**, 227, Faculty of Engineering Osaka University (1978).
38. Aiba, S. and Matsuoka, M. : Biotech, Bioeng., **21**, 1373 (1979).
39. Briffaud, J. and Engasser, M. : Biotech. Bioeng, **21**, 2083 (1979).
40. Briffaud, J. and Engasser, M. : Biotech. Bioeng., **21**, 2093 (1979).
41. Hamissa, F. A. and Abou-Zeid, A. Z. A. : Agr. Wasters, **3**, 21 (1981).
42. Terasawa, M. and Takahashi, J. : Agr. Biol. Chem., **45**, 2433 (1981).
43. Toda, K. and Shoda, M. : Biotech. Bioeng., **17**, 481 (1975).
44. Toda, K. : Biotech. Bioeng., **17**, 1729 (1975).
45. Yamamoto, K., Sato, T., Tosa, T. and Chibata, I. : Biotech. Bioeng., **16**, 1589 (1974).
46. Chibata, I., Tosa, T. and Sato, T. : Appl. Microbiol., **27**, 875 (1974).
47. Larsson, P. O., Ohlson, S. and Mosbach, K. : Nature, **263**, 796 (1976).
48. Wada, M., Kato, J. and Chibata, I. : Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech., **8**, 241 (1979).
49. Katata, I., Yamamoto, K., Tosa, T. and Chibata, I. : Enzyme Microbiol. Technol., 2, Jan., 30 (1980).
50. Kierstan, M. and Bucke, C. : Biotech. Bioeng., **19**, 387 (1977).
51. Cheetham, P. S. J., Blunt, K. W. and Bucke, C. : Biotech. Bioeng., **21**, 2155 (1979).
52. Marier, J. R. and Boulet, M. : J. Daily Sci., **41**, 1863 (1958).
53. Stern, J. R. "Methods in Enzymology", Vol. **3**, 425, Academic Press, New York (1957).
54. Jones, R. P. and Greenfield, P. F. : Enzyme Microb. Technol, **4**, 210 (1982).
55. Lim, D. J. : Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1983).