전분을 이용한 itaconic acid의 생산

[1]정상윤, [2]나 영 [2]이종일
전남대학교, [1]물질생물화공과, [2]화학공학부, 생물공정기술연구실
전화 (062)530-0847, Fax (062)530-1847

Abstract

Itaconic acid has been produced during the cutivation of *Aspergillus terreus* DSMZ 5770 by using several starchs as carbon sources. The starchs were pretreated by partial hydrolysis with some acids at various pH conditions. The highest yield for the production of itaconic acid has been found when rice starch was pretreated by sulfonic acid at pH 2.5 and utilized for the cultivation. Using the results from shaker fermentation *A. terreus* has been cultivated in 2.5 L bioreactor for the production of itaconic acid and its on-line monitoring.

서론

Itaconic acid (methylene succinic acid)는 *Aspergillus terreus*와 같은 사상 곰팡이로부터 생산되는 불포화 디카르복시산으로 폴리에스테르 수지나 N-치환 pyrrolidones 등과 같은 고분자 물질의 중요한 전구체로 사용된다. Glucose를 기질로 사용하여 itaconic acid를 수율 50% 이상으로 생산하였다는 보고가 있으나, 상업적인 생산에서 탄소원으로써 glucose나 sucrose는 원료단가가 너무 높다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 옥수수 전분이나 당밀, 쌀 전분을 이용하여 itaconic acid를 생산하려는 연구가 많이 시도되고 있다. 그러나 itaconic acid 생산에 주로 이용되는 *A. terreus*는 전분을 분해하는 능력이 뛰어나지 않기 때문에 새로운 균주를 개발하거나 전처리가 필요하게 된다. 녹말을 전처리할 때는 흔히 amylase 같은 효소 또는 산이나 알카리를 사용하여 가수분해한다. 본 연구에서는 *A. terreus*로 itaconic acid를 생산하기 위해 각종 전분을 사용하였고 전분의 양과 전분의 산처리에 필요한 pH에 따른 생산성을 살펴보았다. 또한, 진탕배양을 통해 얻은 결과를 2.5 L 교반형 생물 반응기에 적용하여 itaconic acid를 생산하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

균주로는 *Aspergillus terreus* DSMZ 5770(Germany)를 사용하였으며 접종포자는

potato agar 배지에서 세차례 도말한 것을 소금 완충액(0.9%)으로 현탁하여 사용하였다. 전 배양 배지의 조성은 (g/L): glucose, 20; $(NH_4)_2SO_4$, 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.04; KH_2PO_4, 0.02; NaCl, 0.015; $CaCl_2$, 0.025; 미량원소, 0.1 %(v/v) 이고 접종량은 1 %로 하였다. 미량원소의 조성은 (mg/L): $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 40; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1100; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 250; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 160 으로 하였다. 본 배양 배지의 실험 변수 및 배지는 표 1과 같고, 본 배양에 들어가는 염의 조성은 전 배양 배지의 탄소/암모니아/인산 ; 1 : 0.0106 : 0.0002276 (g/g) 비율을 계산하여 가감하였다. 단 질산처리시에는 별도의 질소원과 인산원을 넣어주지 않았다.

Table 1. Experimental parameters for shaker fermentation

	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
pH	1(A_1), 1.5(B_1), 2(C_1), 2.5(D_1,F_1), 3(E_1)	2.5	2.5
Kinds of carbon sources	potato starch	soluble starch(A_2, B_2, C_2, F_2), rice starch(D_2), potato starch(E_2)	rice starch
Weight of carbon source (g/L)	25	15(A_2), 25(B_2, D_2, E_2, F_2), 35(C_2)	50(A_3), 60(B_3), 70(C_3), 80(D_3), 90(E_3), 100(F_3)
Acid	HNO_3(F_1), H_2SO_4	H_2SO_4	H_2SO_4

2. 배양

전 배양은 포자현탁액 1 %를 250 mL Erlenmeyer flask(working volume 50~100 mL)에 접종하여 35 ℃, 180 rpm으로 진탕배양기(Jeio tech. Co., Korea)에서 이틀간 배양하였다. 본 배양(working volume 200 mL)은 앞서 배양한 전 배양액 1 %를 접종하여 35 ℃, 170 rpm으로 배양하였다(500 mL Erlenmeyer flask). 2.5 L 생물반응기 배양(working volume 1 L)에 사용되는 배지는 진탕 배양 실험의 결과를 이용하여 결정하였으며, 실험장치 및 조건은 전보와 같다(1).

3. 분석 방법

배양 실험에서 채취한 시료는 filter paper (Whatman, No. 2)에 걸러 상등액만을 취한 후 상등액 중의 itaconic acid 농도와 총탄소원의 농도, 암모니아 및 인산 농도를 각각 측정하였으며 분석 방법은 전보와 같다(1).

결과 및 고찰

전분을 이용한 itaconic acid의 생물학적인 최적 생산조건을 알아보고 이를 이용하여 생물반응기 배양을 하였다. 전분을 배지로 이용하기 전에 산으로 전처리하였으며, 전처리한 배양액의 pH 및 탄소원의 종류와 양 그리고 전분의 전처리에 필요한 산의 종류를 달리하여 실험을 수행하였다. 산처리된 전분을 탄소원으로 한 경우의 생산 효율은 glucose를 탄소원으로 했을 때와 큰 차이가 없었다. 한편 전분의 전처리를 위한 pH 조건을 달리 하였을 때, pH가 낮을수록 전분의 가수분해는 잘 이루어 졌으나 itaconic acid 생산은 pH 2.5 부근에서 가장 잘 이루어졌다. 전분의 종류에 따른 생산면에서는 쌀 전분, 감자 전분, 용해성 전분 순으로 itaconic acid의 생산율이 좋았다. 그리고 전분의 양이 많을수록 수율도 좋아지지만, 많은 전분을 이용하면 전분이 호화되어 죽과 같은 상태가 되며 이는 산소전달을 방해하여 균의 성장 저해를 초래한다. 그리고 질산으로 가수분해 하여 배양한 경우 질소원을 따로 넣어 주지 않는다는 장점이 있지만 본 실험에서는 정확한 탄소/질소 비율이 필요하므로 질산으로 처리한 경우 높은 수율을 얻을 수 없었다(Figure 1.).

진탕배양 실험 결과를 이용하여 생물반응기에서 itaconic acid 생산 실험을 수행하였다. 진탕 배양 실험과 유사한 itaconic acid 생산수율을 얻었지만 교반 및 산소전달이 잘 이루어지는 반응기 실험에서 생산 속도 및 균체 성장이 매우 빠르고, 온라인 모니터링과 배양 중 pH 및 용존산소의 농도 제어가 가능하다는 장점이 있다 (Figure 2.).

요약 및 전망

전분을 이용하여 itaconic acid 배양 실험을 하였으며 전분을 산으로 전처리하여 배양할 때 pH 및 탄소원의 종류와 양 등에 따른 itaconic acid의 생산수율을 살펴보았다. Itaconic acid는 쌀 전분을 H_2SO_4를 이용하여 pH 2.5로 처리하였을 때 itaconic acid 생산이 잘 되었으며 생물반응기 실험에서는 매우 빠른 성장과 생산속도를 나타냈다.

향후 itaconic acid의 생산수율을 높이기 위해 생물반응기를 이용하여 실험을 수행하고자하며 특히 산소전달 속도 및 교반속도가 itaconic acid 생산에 미치는 영향을 살펴보고자 한다. 또한, 유가 배양 및 연속 배양에서 itaconic acid의 생산특성을 연구하고 공정을 모니터링하는 기술을 개발하고자 한다.

감사

본 연구는 2000년 과학재단 지역대학 우수과학자 지원연구 (과제번호 R02-2000-00326)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 정상윤, 이종일, 2001, Monitoring of itaconic acid production by a 2-dimensional fluorescence sensor, 한국생물공학회 추계발표대회, P110, 270-273

2. Yahiro, K., Shibata, S.J., Jia, S.R., Park, Y.S., Okabe, M., 1997, Efficient itaconic acid production from raw corn starch, *J. Fermen. Bioeng.*, **84**, 375-377

3. Petruccioli, M., Pulci, V., Federici, F., 1999, Itaconic acid production by *Aspergillus terreus* on raw starchy materials, *Lett. Appl. Microbiol.*, **28**, 309-312

4. Xu, D.B., Madrid, C.P., Röhr, M., Kubicek, C.P., 1989, The influence of type and concetration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 553-558

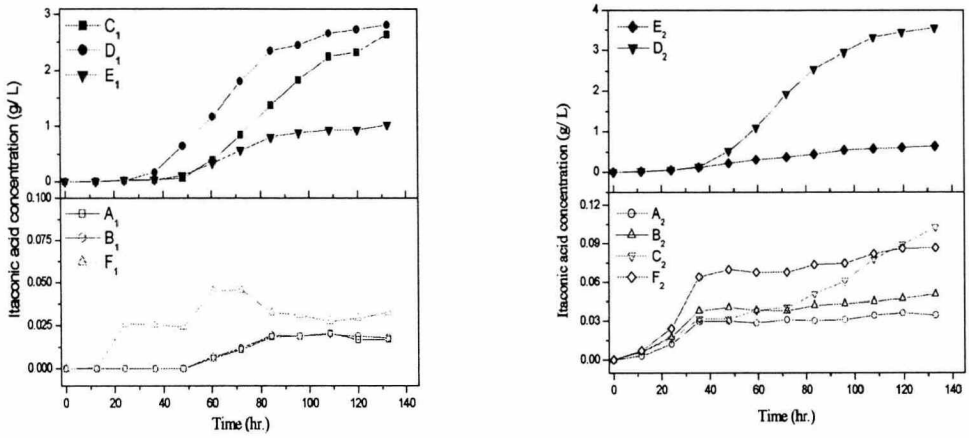

Figure 1. Time courses of itaconic acid production of Exp. 1 and Exp. 2.

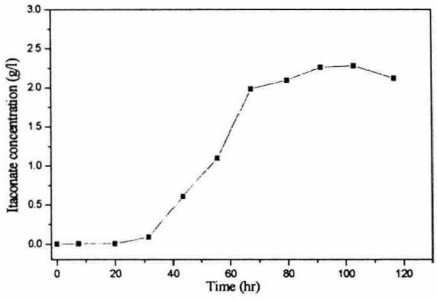

Figure 2. Time course of itaconic acid production in 2.5 L bioreactor.