

다양한 생물반응기에서 이타콘산의 생산

박승원 · 김승욱* · 이진석¹

수원대학교 유전공학과, ¹한국에너지기술연구소

Production of Itaconic Acid at Various Bioreactors

Park, Seung-Won, Seung-Wook Kim* 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 — A suitable culture method and bioreactor type for itaconic acid production were chosen by comparing the maximal concentration of itaconic acid produced in various systems. In batch culture, the maximal concentration of itaconic acid produced in a bubble column reactor was about 5% greater than that produced in stirred-tank or external-loop airlift reactor. These results were thought to be due to lower shear force and higher mass transfer efficiency in a bubble column reactor in comparison with other reactors. Moreover, the fed-batch mode in a bubble column was found to be a suitable one, producing about 25% higher concentration of itaconic acid compared to batch mode.

이타콘산은 폴리에스터 수지와 다른 고분자 물질의 제조에 필요한 중간물질이다. 곰팡이에 의한 이타콘산 생산에 대한 첫 연구는 일본의 Kinoshita(1)에 의해 시도되었다. 이타콘산은 *Aspergillus niger*, *A. itaconicus*, *A. terreus* 등의 곰팡이와 *Candida* 속에 속하는 효모균에 의해 생산되는 것으로 알려져 있다. 현재 미생물에 의한 이타콘산 생산은 주로 *A. terreus*에 의해 고체 또는 액체배지 배양에 의해 이루어지고 있다.

현재 산업적으로 가장 많이 사용되고 있는 교반식 생물반응기는 기계적인 교반에 의해 혼합이 일어나므로 전단응력에 민감한 균체에 충격을 주는 단점이 있다. *A. terreus*를 이용한 이타콘산의 발효에서 균체는 균사형으로 자라므로 발효액의 점도가 증가하고 물질전달효율이 떨어지게 되어 배지내 산소 고갈현상이 나타나게 된다. 물질전달을 증가시키기 위해 교반속도를 높이면 전단응력으로 인해 균체 morphology의 변형이 일어나며 생산성은 급격히 떨어지게 된다. 이와 같은 교반식 생물반응기에서 문제점을 해결하기 위해 균체를 고정화 하거나(2-5), 전단응력이 보다 작은 bubble column, air-lift 생물반응기를 사

용하는 연구가 일부 연구자들에 의해 수행되었다(5-7). Horitsu 등(2)은 polyacrylamide gel에 *A. terreus*를 고정화하여 컬럼반응기에서 연속 배양에 의한 이타콘산 생산 연구를 수행하였다. Kautola 등(5)은 유리 균체와 polyurethane foam에 고정화한 균체를 사용하여 회분식 발효를 반복하는 실험을 통해 생산성을 비교한 결과 고정화 균체를 이용한 발효의 최종 이타콘산 농도가 유리균체를 이용한 발효에 비해 두배 가량 높음을 보고하였다. 또한 Kautola(6)는 *A. terreus*를 고정화하여 air-lift 반응기에서 연속발효시 공급 공기 유량에 따른 이타콘산의 생산성을 조사하였으며 0.6 vvm에서 가장 높은 생산성을 가짐을 보고하였다. 연속발효공정은 높은 생산성을 갖는 장점이 있으나 생성물의 농도가 낮아 분리, 정제 비용이 높아지는 문제점이 있다.

앞에 기술한 바와 같이 다양한 생물반응기에서 이타콘산의 생산에 대한 연구가 수행되었으나 연구자에 따라 각기 다른 발효조건을 사용하여 생물반응기 성능의 직접 비교가 어렵다. 그러므로 본 연구에서는 현재 가장 많이 사용하는 교반식 반응기와 전단응력이 작은 bubble column, 외부순환식 air-lift 생물반응기를 사용하여 이타콘산 생산 실험을 수행하고, 반응기에 따른 이타콘산의 생산량을 비교하고, 앞에서 지적된 연속발효의 낮은 생성물농도 문제를 해결하기 위해 유가식 발효공정의 타당성을 검토하고자 한다.

Key words: Itaconic acid, *Aspergillus terreus*, bioreactors

*Corresponding author

재료 및 방법

실험재료

Aspergillus terreus NRRL 1960을 이타콘산 생산 균주로 사용하였으며 보관용 배지는 malt extract agar 배지를 사용하여 37°C에서 7일간 배양한 후 4°C에서 보관하였다.

종균 배양배지로는 2%(w/v) malt extract를 사용하였다. 이타콘산 생산배지로는 5% 포도당, 0.5% NH₄Cl, 0.2%(w/v) yeast extract, 0.1%(w/v) CaCl₂, 0.1% MgSO₄, 0.2% NaCl의 조성배지를 사용하였으며 초기 pH는 2.5로 조정하였다. 접종 균체량은 배지 양의 5%(v/v)이었고 배양온도는 37°C이었다.

실험방법

이타콘산은 HPLC(Waters Ltd.)를 사용하여 정량하였으며 사용 컬럼은 C₁₈ μ -Bondapak(Waters, USA), 용매는 5% acetonitrile, 유량은 1 ml/min이었다. UV-detector를 사용하여 214 nm에서 측정하였다. 배지의 포도당 농도는 DNS 방법(8)을 사용하여 측정하였다. 575 nm에서 분광광도계 Spectronic 20(Bausch and Lomb Inc, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하여 정량하였다. 배양액중의 유리 균체량은 배양액을 6500 \times g에서 10분간 원심분리 후 세척, 여과하여 얻은 균체를 80°C에서 24시간 건조하여 무게를 측정하여 정량하였다.

교반식 생물반응기에서의 이타콘산 생산 실험은 유리 균체와 고정화 균체 배양 두가지로 수행하였다. 유리 균체의 배양은 2%(w/v) malt extract 배지 100 ml가 들어 있는 250 ml 삼각플라스크에 포자 현탁액을 접종하여 2일간 활성화시켰다. 배양액을 접종균체로 하여 3l의 발효기에 5%(v/v)가 되도록 접종하였다. 반응기 운전조건은 0.5 vvm의 통기량과 200 rpm의 교반속도를 사용하였고, 배지의 부피는 2l로 조절하여 이타콘산의 생산을 비교하였다. 고정화 균체의 배양은 polyurethane foam HR08(2 \times 2 \times 2 cm, Scott Inc., USA)에 포자현탁액을 고정화하여 2일간 2% malt extract 배지에서 배양한 후 활성화된 균체를 발효기에 접종하였다. 배양액 부피는 2.3l이었고 기타 조건은 유리균체의 경우와 동일하였다.

Bubble column 반응기에서의 이타콘산 생산실험은 활성화된 균체 5%(v/v)를 0.8l의 배지에 접종 후 공급 공기유량을 0.5 vvm으로 유지하며 수행하였다. 유가식 발효는 초기 부피 0.8l로 8일간 배양 후 2일 간격으로 50 ml의 배지를 공급하며 배지 부피가 1l에 이를 때까지 수행하였다.

외부 순환식 air-lift 생물반응기는 bubble column 반응기에서와 동일한 조건에서 접종한 후 발효를 수행하였으며 배지 부피는 1.4l, 공급 공기유량은 0.5 vvm이었다. 유가식 발효에서는 9일간 배양 후 2일 간격으로 80 ml의 배지를 공급하며 1.96l가 될 때까지 진행시켰다.

결 과

교반식 반응기에서 이타콘산의 생산

플라스크 배양을 통해 얻은 최적조건 하에서 *A. terreus*를 교반식 발효기에서 배지 부피를 2l로 하여 배양한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 균체농도가 배양 시작 후 8일까지 계속 증가하였으며 그 이후 cell lysis 등에 의해 균체농도가 서서히 감소하였다. 이타콘산의 최고 농도는 15.2 g/l로 배양 8일째 나타났다. 이 실험에서 균체의 성장이 반응기 표면에서 관찰되었으며, 이와같은 현상은 균체가 성장하며 발생하는 거품 등에 의한 것으로 판단된다. 따라서 균체의 반응기 표면에서 성장을 막기 위해서는 antifoam의 첨가와 충분한 양의 공기 공급이 필요한 것으로 생각된다. 교반식 생물반응기에서는 *A. terreus*의 성장이 균사형태로 이루어지므로 교반시 발생하는 전단응력에 의해 영향을 받아 이타콘산의 생산이 저해되었을 것으로 판단되어 균체를 전단응력으로부터 보호하기 위한 균체 고정화와 전단응력이 적은 air-lift 생물반응기와 bubble column 반응기를 사용하는 방안을 검토하였다.

Polyurethane foam HR08(2 \times 2 \times 2 cm)에 *A. terreus*를 고정화하여 교반식 반응기에서 13일간 배양하였으며 실험결과는 Fig. 2에 나타냈다. 그림에서 보

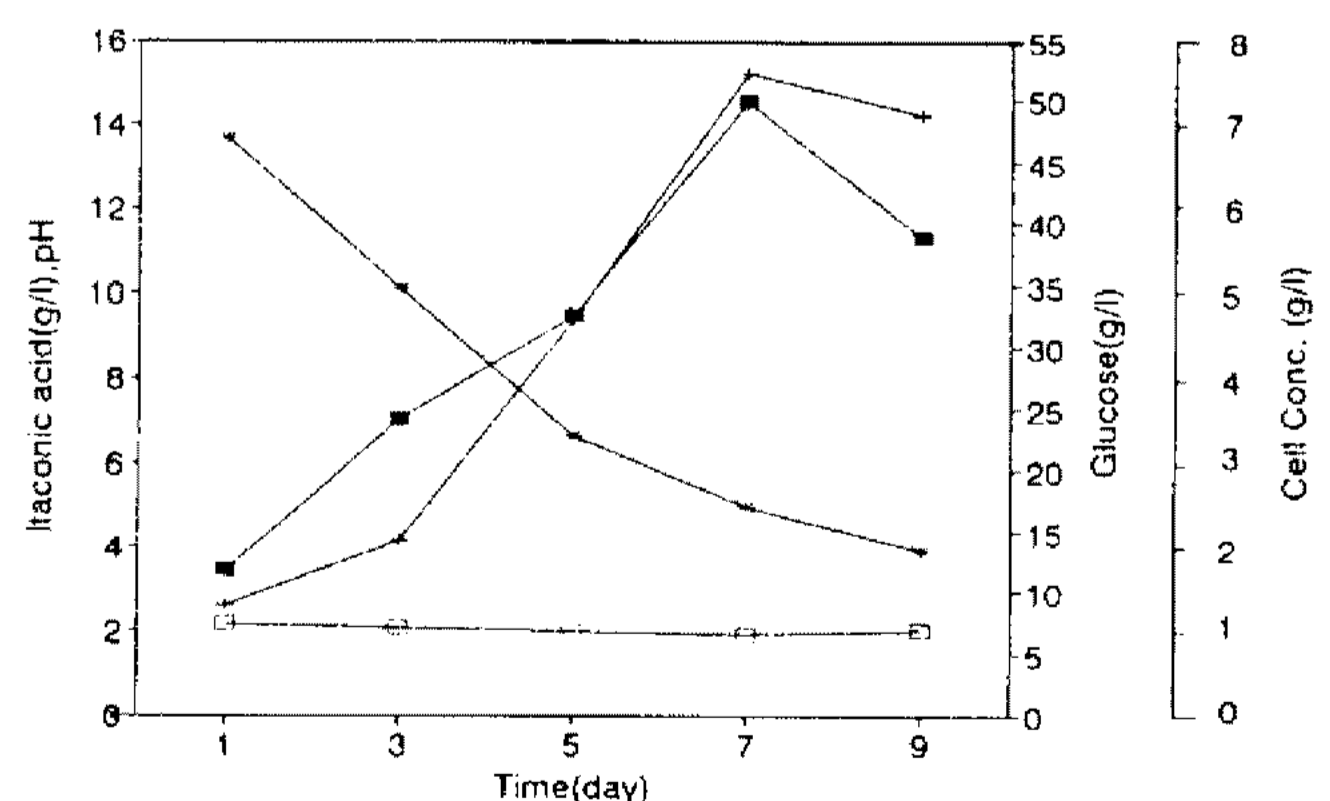


Fig. 1. Batch itaconic acid production with free *A. terreus* mycelium in a stirred-tank reactor.

-+- Itaconic acid(g/l), -□- pH, -■- Cell conc.(g/l), -*- Glucose(g/l)

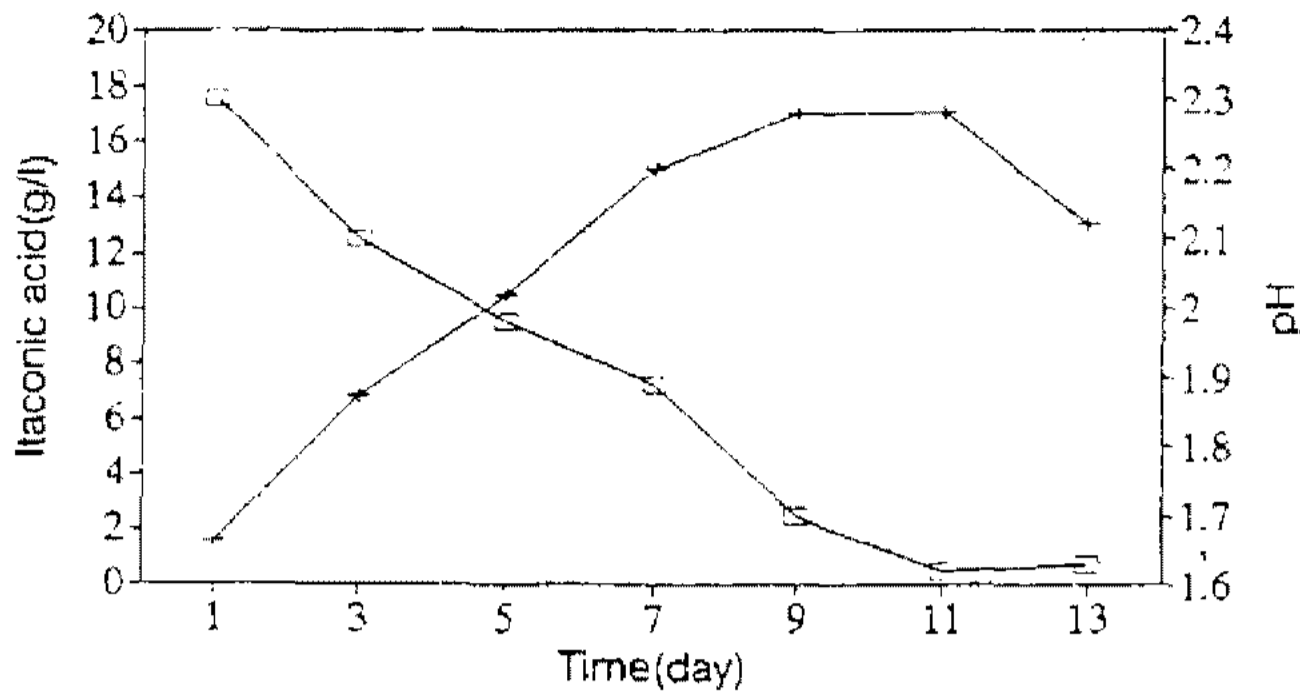


Fig. 2. Batch itaconic acid production with immobilized *A. terreus* mycelium in a stirred-tank reactor.
 -+- Itaconic acid(g/l), -□- pH

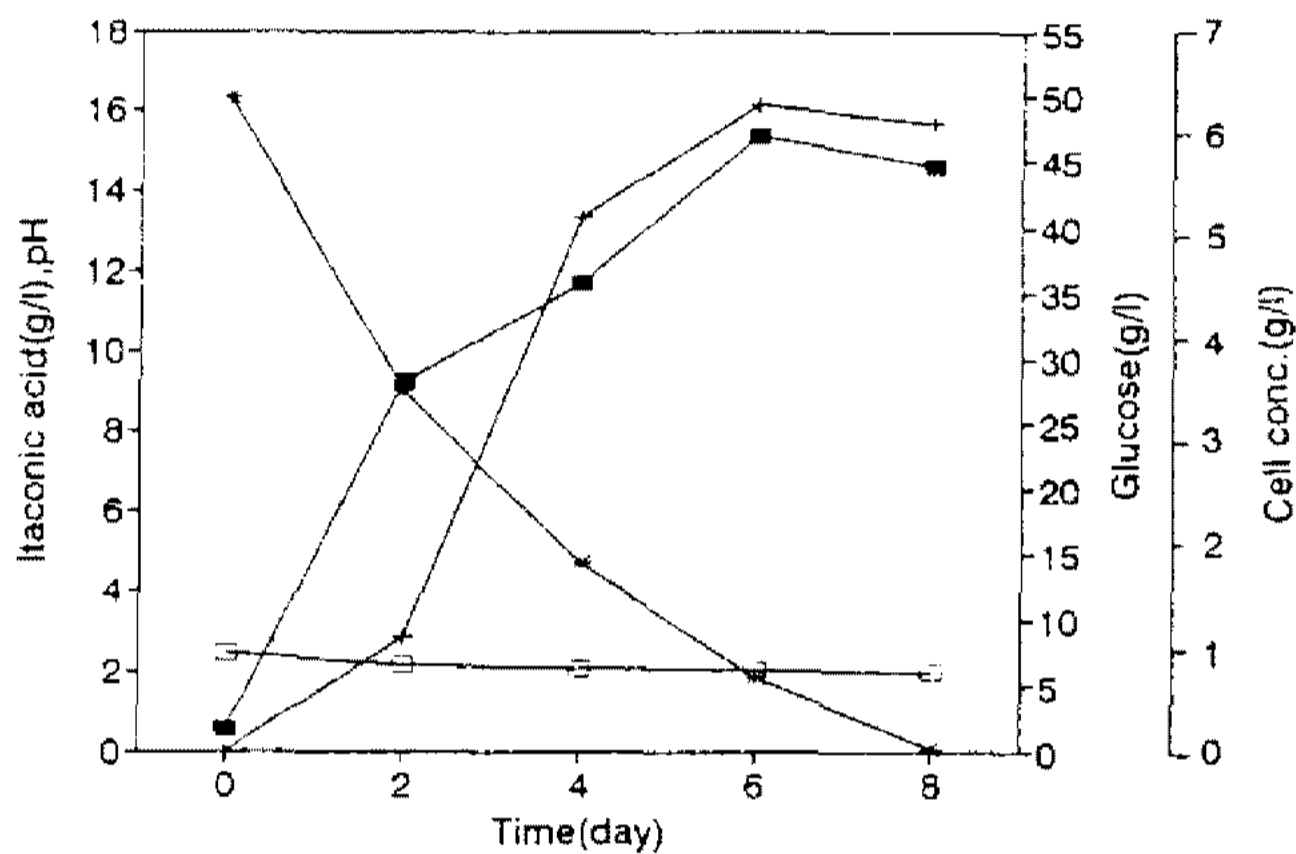


Fig. 3. Batch itaconic acid production by free *A. terreus* in a bubble column reactor with aeration rate of 0.5 vvm.
 -+- Itaconic acid(g/l), -□- pH, -■- Cell conc.(g/l), -*- Glucose(g/l)

는 바와 같이 발효가 진행됨에 따라 이타콘산의 농도는 증가하여 9일째 가장 높은 농도인 17.2 g/l를 나타냈다. 따라서 고정화 균체를 사용한 발효에서의 이타콘산 농도는 유리 균체를 사용한 경우에 비해 약 13% 가량 높았으며 이 같은 최고 이타콘산 농도의 증가는 고정화에 의해 임펠러에 의한 전단응력으로부터 균체가 부분적으로 보호되었다는 점과 고정화에 의해 균체 농도가 높아짐에 따른 것으로 해석된다.

Bubble column 반응기에서 이타콘산의 생산

전단응력이 적은 bubble column 반응기에서 유리 균체를 사용하여 이타콘산 발효실험의 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 배양 후 6일째 가장 높은 균체량을 나타냈고 이타콘산 농도도 16.6 g/l로 최대값을 보였다. 교반식 반응기의 발효에서 얻은 15.2 g/l에 비해 약 5% 높아 그 차이는 크지 않았다. 그러므로 교반식 반응기에서 고정화균체를 사용하여 얻은 이타콘산의 최고 농도 증가는 고정화에

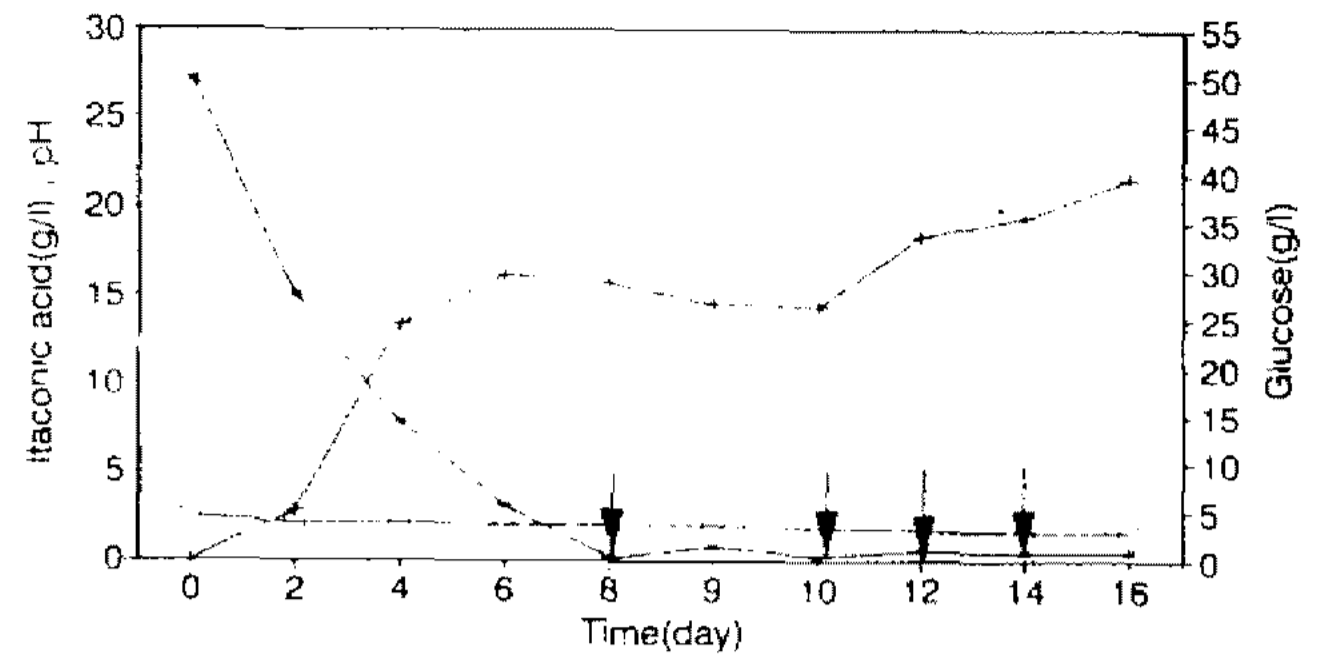


Fig. 4. Fed-batch itaconic acid production with free *A. terreus* mycelium in a bubble column reactor with aeration rate of 0.5 vvm.
 The medium was supplied every 2 days(↓ Feeding time with fresh medium).
 -+- Itaconic acid(g/l), -□- pH, -*- Glucose(g/l)

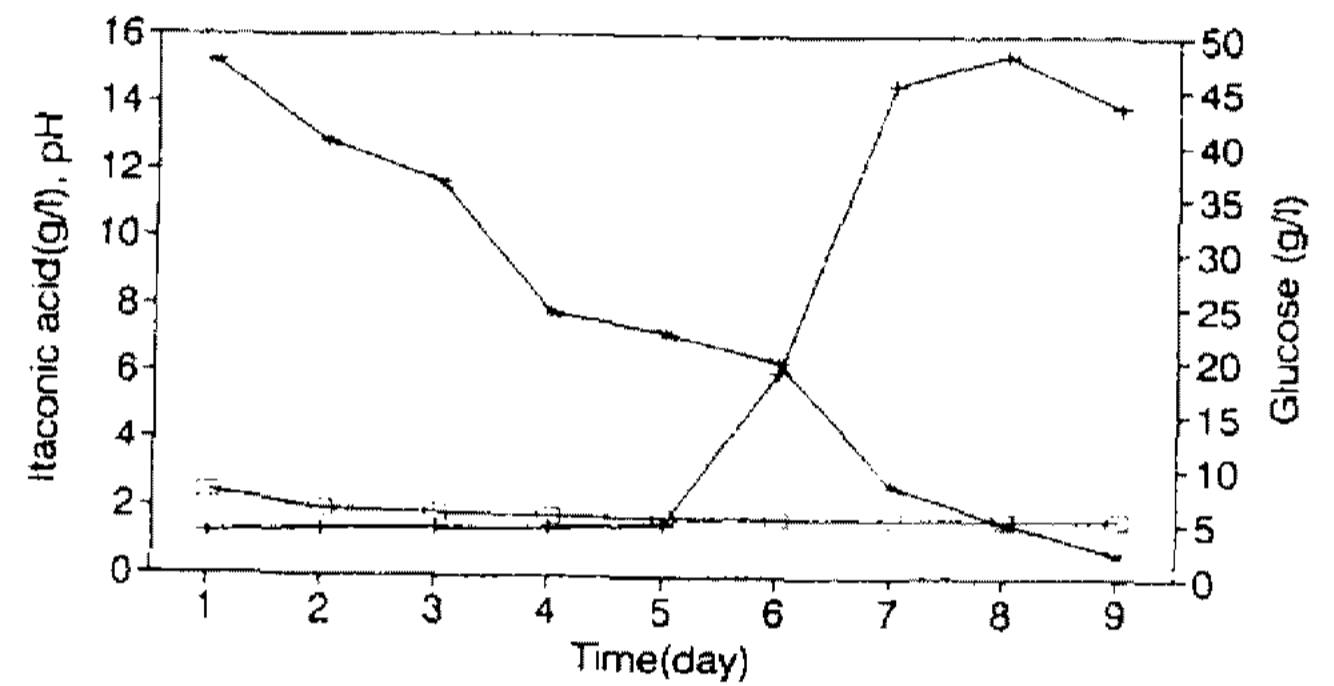


Fig. 5. Batch itaconic acid production with free *A. terreus* mycelium in an air-lift reactor with aeration rate of 0.5 vvm.
 -+- Itaconic acid(g/l), -□- pH, -*- Glucose(g/l)

의한 균체의 부분 보호에 의한 것이라기 보다는 고정화에 의한 균체농도 증가에 기인한 것으로 판단된다. Bubble column 반응기에서는 배양시작 2일째부터 균체는 pellet 형태로 급격히 성장하는 것이 관찰되었으며 6일 이후에는 pellet이 풀어져 균사 형태로 되었다. 따라서 *A. terreus*는 균사형태를 가질 때 이타콘산을 생산함을 알 수 있었다. Bubble column 반응기에서 회분식 배양과 동일한 조건에서 유가식 배양한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 그림에 나타낸 바와 같이 배양 후 18일째 가장 높은 21.61 g/l의 이타콘산 농도를 나타냈으며 이 값은 회분식 배양에서 얻은 최고 이타콘산 농도 16.6 g/l에 비해 약 25% 이상 높은 값이다. 그러므로 bubble column 반응기에서의 이타콘산 생산은 유가식 배양이 회분식에 비해 효과적임을 알 수 있다. 이 실험에서도 회분식 발효에서 관찰된 바와 같이 균체는 발효초기에 pellet 형태로 성장하고 배양 시작 12일째부터 pellet이 거의 풀려 균사 형태로 자랐다.

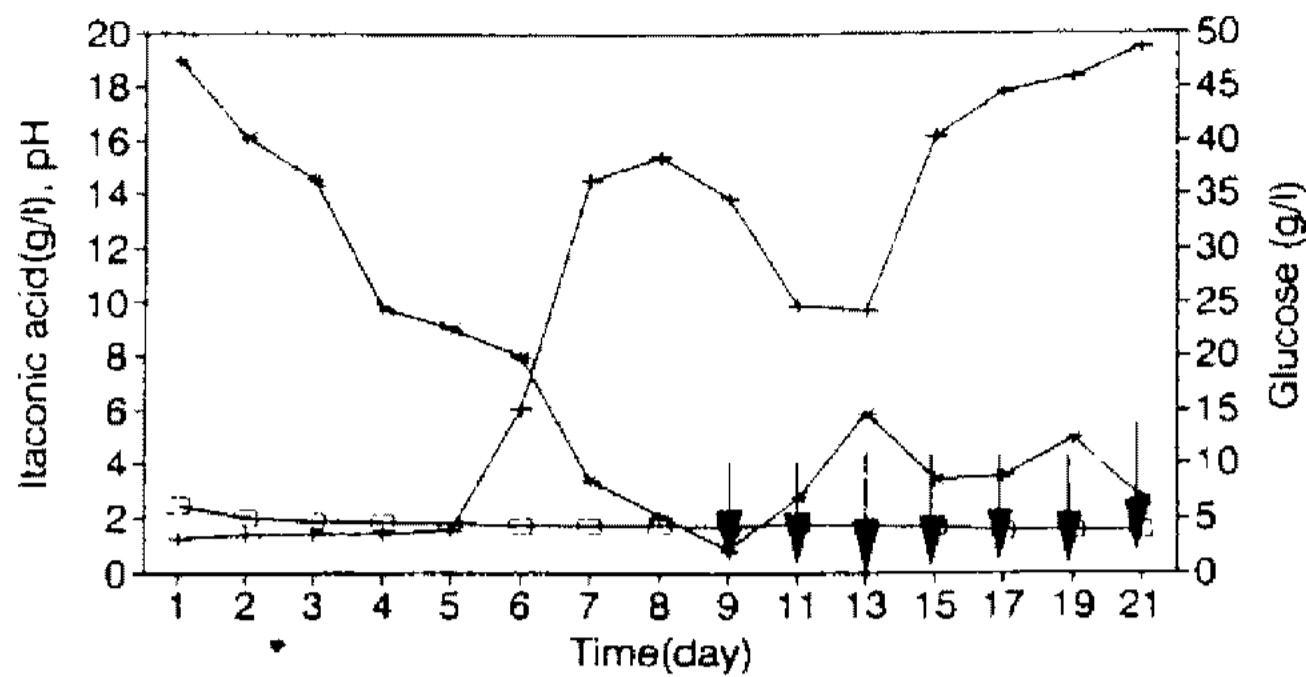


Fig. 6. Fed-batch itaconic acid production with free *A. terreus* in an air-lift reactor with aeration rate of 0.5 vvm.

The medium was supplied every 2 days (↓ Feeding time with fresh medium).

-+- Itaconic acid(g/l), -□- pH, -*-* Glucose(g/l)

외부순환식 air-lift 반응기에서 이타콘산의 생산

Bubble column 반응기를 변형한 외부순환식 air-lift 반응기에 *A. terreus*를 배양한 실험결과를 Fig. 5에 나타냈다. 이타콘산의 농도는 발효시작 5일까지는 서서히 증가하였으며 그 이후 8일까지 급격히 증가하여 8일째 가장 높은 15.4 g/l의 값을 가졌다. 이같은 이타콘산 농도는 교반식 반응기의 15.2 g/l에 비해서는 약간 높지만 bubble column 반응기에서 얻은 16.16 g/l에 비해서는 다소 낮은 값이다. 이와 같이 air-lift 반응기에서 bubble column에 비해 낮은 이타콘산 농도를 갖는 이유는 air-lift 반응기에서의 산소전달 효율이 bubble column 반응기에 비해 낮았기 때문으로 풀이된다. 즉 air-lift 반응기에서 발효시 배양 후 2일째부터 형성되는 균체의 평균 pellet 크기가 bubble column 반응기에 비해 크고 배양 후 6일째부터 균사와 pellet가 공존하여 발효액의 점도를 증가시켰으며 그 결과 발효기내 기체체류량과 K_{La} 값을 감소시킨 것으로 판단된다. 9일간 회분식으로 배양 후 2일 간격으로 배양액을 첨가하며 21일 동안 발효를 수행한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 최고 이타콘산 농도는 배양 21일째 19.43 g/l로 회분식 배양시 최고 농도인 15.4 g/l에 비해 25% 가량 높았으나 bubble column 반응기에서 얻은 최고농도인 21.61 g/l에 비해 약간 낮은 값이다.

고 찰

교반식 발효기에서 고정화 균체를 이용한 이타콘산 발효의 최고 이타콘산 농도는 17.2 g/l로 유리세포 배양의 이타콘산 농도 15.2 g/l에 비해 약 13% 높았으며 이러한 현상은 고정화균체를 이용한 발효에서

균체농도가 높았기 때문인 것으로 생각된다. 동일한 발효조건에서 bubble column 반응기는 다른 반응기에 비해 약 5% 이상 높아 가장 적합한 반응기로 결정되었다. Bubble column과 air-lift 반응기에서의 발효 실험 결과는 유리균체를 사용하여 얻은 것이므로 고정화 균체의 사용시보다 높은 생산성을 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 마지막으로 모든 생물반응기에서 반응기 형태에 따라 차이는 있었으나 유기식 발효시 최고 이타콘산 농도가 회분식 발효에서 얻은 농도에 비해 현저하게 높아 유기식 발효가 적합한 것으로 나타났다.

요 약

배양방법 및 생물반응기의 형태에 따라 생산된 이타콘산의 최고농도를 비교하여 이타콘산의 발효에 적합한 배양방법과 생물반응기를 도출하였다. 생물반응기의 형태에 따른 이타콘산 발효연구에서는 회분식 배양시 bubble column 반응기가 교반식 반응기와 외부순환식 air-lift 반응기에 비해 최종 이타콘산 농도가 5% 이상 높아 가장 적합한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 bubble column 반응기가 타 반응기에 비해 전달응력이 작고 물질전달 효율이 높았기 때문인 것으로 판단된다. 또한 동일 반응기에서는 유기식 배양이 회분식 배양에 비해 이타콘산 농도가 25% 이상 높아 유기식 발효가 바람직한 것으로 나타났다.

감사의 말

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. Horitsu, H., Y. Takahashi, S. Adachi, R. Xioa, T. Hayashi, K. Kawai, and H. Kautola. 1988. Production of organic acids by immobilized cells of fungi. Pp. 287-300. In M. Moo-Young (ed.), *Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells: Fundamentals and*

- Applications*. Elsevier Applied Science, Essex.
4. Ju, N. and S. Wang. 1986. Continuous production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* Immobilized in a porous disk bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 311-314.
 5. Kautola, H., N. Vassilev, and Y.Y. Linko. 1989. Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* on sucrose medium. *Biotechnol. Lett.* **11**: 313-318.
 6. Kautola, H. 1990. Itaconic acid production from xylose in repeated-batch and continuous bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 7-11.
 7. Kautola, H., N. Vassilev, and Y.Y. Linko. 1990. Continuous itaconic acid production by immobilized biocatalysts. *J. Biotechnol.* **13**: 315-323.
 8. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.

(Received April 18, 1994)