

## 평판형 막 생물 반응기를 이용한 구연산의 생산

심 상 준·장 호 남\*  
한국과학기술원 화학공학과, 생물공정연구센터

### Production of Citric Acid in a Flat-type Membrane Bioreactor

Sang Jun Sim and Ho Nam Chang\*

Bioprocess Engineering Research Center and Department of Chemical Engineering, Korea advanced Institute of Science and Technology, Daeduk Science Town, Taejeon 305-701, Korea.

#### ABSTRACT

A flat-type membrane bioreactor(FMBR) for aerobic whole cell immobilization was developed and its performance for the citric acid production was investigated using *Aspergillus niger* (KCTC 1232). The reactor consisted of three layers. The top layer contained flowing air for oxygen supply, the middle layer had stationary cells, and the bottom layer had flowing aqueous nutrients. The initial pH of the culture medium played an important role in citric acid production and the lower initial pH of the culture medium resulted in a higher citric acid yield. Under air and pure oxygen aerations the volumetric productivity reached 0.20 and 0.40 g/Lh. Furthermore, the productivity improved with the increase of the culture medium feed rate.

#### 서 론

TCA (Tricarboxylic acid) 회로에 속하는 유기산들은 생물학적 발효공정을 통하여 높은 수율로 얻어진다(1). 그 중에서도 구연산은 거의 생물학적 방법으로 생산되고 있는 유기산으로 레몬, 파인애플, 배 등의 천연성분이기도 하며 동, 식물의 대사산물이다. 구연산의 사용범위는 매우 광범위하여 식품, 음료수에 75%, 의약품에 10%, 산업용으로 15% 가량의 수요를 갖고 있다. 식품첨가제로서 구연산은 식품의 맛과 향 유지에 탁월한 효과를 내며 철과 이온등의 중금속과 complex를 형성하는 능력이 있어 기름과 지방성분의 안정제로 널리 쓰인다. 또한 구연산은 sequestering action을 하므로 의약품에 사용되는 데 ascorbic acid의 안정화가 대표적인 예이며 carbonates, bicarbonates등과 결합하여 비등하는 성질때문에 antacid와 용해성 아스피린 제조에 이용되고 있다.

평판형 막 생물반응기는 실관형에 비해 단위용적당의 표면적이 작아 생산성은 떨어지나 막 사이의 세포공간과 그에 따른 배지와 세포의 접촉거리가 쉽게 조절될 수 있고 시스템을 반복함으로써 세포공간의 접촉이 가능하며 세포를 필요에 따라 대체하는 것도 가능하다. 더불어 실관막에 비해 시스템이 간단하여 시스템분석이 용이하고 제작도 간단하며 막의 가격이 저렴하여 반응기 설치 비용면에서 실관막에 비해 유리하다. 또한 단일 반응기에 대한 scale-up도 실관형에 비해 용이하다. 최근에는 막 사이의 압력 변환(pressure cycling)을 통한 확산저항의 극복으로 평판형도 실관형과 높은 생산성이 가능하다는 보고도 있다(2-4).

Chang과 Chung(5)에 의한 이중 실관 생물 반응기를 이용한 구연산 생산의 결과에 따르면 생산성 및 수율에 있어서 현재까지 보고된 여타 생물 반응기보다 우수한 성능을 가지고 있음을 알 수 있다. 그

러나 단일 크기 반응기의 scale-up 실험에서는 길이가 증가함에 따라 생산성이 떨어짐을 보였다. 본 실험에서는 이러한 이중실관 반응기의 한계를 극복하기 위해 제작이 간단하고 운전이 용이한 평판형의 반응기를 개발하였다. 이와같이 개발된 반응기를 이용하여 여러가지 생산조건을 변화시켜, 구연산의 최적 생산조건을 살펴보고 새로운 고농도 생물 반응기의 가능성을 확인하는데 본 실험의 목적이 있다. 이는 효과적인 물질 전달 및 확산 저항의 극복을 위한 보다 효과적인 반응기의 설계를 위해 필요하다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *Aspergillus niger* (KCTC 1232)로서 한국과학기술연구원 산하 유전공학 연구소에서 분양받았으며, 균주의 활성유지를 위하여 potato dextrose agar 배지에서 2개월마다 계대배양하였다. 사용한 기본 배지의 조성은 sucrose 60 g/L,  $NH_4NO_3$  2.5 g/L,  $KH_2PO_4$  1.0 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25 g/L,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.00024 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0011 g/L,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0065 g/L이고 pH의 조절은 0.5N-NaOH용액을 이용하였다. 이 기본배지의 조성은 Shu와 Johnson(6)의 실험결과에 따른 것이다.

#### 막 재료

본 실험에서는 세포의 고정화를 위해 친수성막과 소수성 막을 각각 사용하였다. 친수성 막은 서독의 Sartorius사의 제품으로 포자가 충분히 고정화되도록 세공의 크기가  $0.45\mu m$ 인 nylon-6, 6 재질의 평판막을 사용하였으며, 평균 유속은 27-40 mL/min이다. 소수성 막은 동양나일론에서 개발한 nylon-6와 polyurethane의 접합체를 사용하였는데 세공의 크기는  $0.1-3\mu m$ , 밀도는  $3/100\mu m^2$ 이다.

#### 평판형 막 반응기(Flat-type Membrane Bioreactor, FMBR)의 제작

완성된 평판형 막 생물 반응기의 측면도는 Fig. 1에 나타내었다. Channeling 현상을 방지하기 위해서 배지의 흐름은 S자형으로 흐르도록 하였다. 균주인 *Aspergillus niger*는 친수성 막과 소수성 막 사이에 주사기로 접촉하였으며 이때 세포 및 포자의 크기가 최소  $5\mu m$  이상으로 알려져 있으므로 쉽게 고정되었다. 산소는 소수성 막을 통하여 확산되어 균

체로 전달되며 배지용액은 친수성 막의 내부로 공급해 주는데 농도차에 의한 확산과 한외여과에 의한 대류에 의한 친수성 막 투과로써 전달된다. 이와같이 영양분이 공급됨으로써 균체의 자기증식 및 생축대반응이 진행되며 이때의 생성물은 다시 평판 막을 통하여 외부로 전달된다.

#### 실험장치의 구성

실험장치의 구성은 Fig. 2와 같다. 전체 시스템의 온도는  $30^\circ C$ 로 고정되는 항온조에 위치하며 배지는 peristaltic pump를 이용하여 일정한 유속으로 공급하였으며 공기나 산소는 bubbler를 통하여 수분으로 포화시킨 다음 공급하였다. 배지의 공급속도는 약 1-3mL/h 정도이며 산소원은 약 200mL/min 정도로 공급되었으며 배지 또한 공기에 포화시켜 공급하였다.

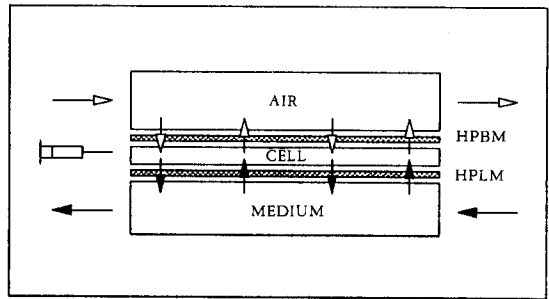


Fig. 1. Detailed structure of flat-type membrane bioreactor(FMBR). (HPBM:Hydrophobic membrane; HPLM:Hydrophilic membrane)

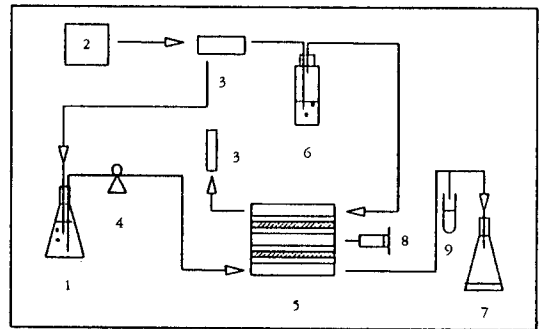


Fig. 2. Schematic diagram of the experimental set-up.  
1: medium reservoir; 2: oxygen source;  
3: filter; 4: pump; 5: FMBR;  
6: humidifier; 7: effluent reservoir;  
8: inoculum port; 9: sampling port.

### 실험 방법

반응기의 전처리로 반응기의 살균은 5%의 포름알데히드로 반응기를 멸균시킨 다음 증류수로 충분히 세척시켰다. Seed culture는 500mL의 삼각플라스크에 배지를 100mL 정도 넣고 120°C에서 15분 동안 멸균한 후 무균실에서 agar slant로부터 포자를 접종하여 30°C, 300rpm의 조건으로 environmental incubator shaker에서 3-4일동안 배양하였다. 이렇게 종자 배양한 것을 10배 희석한 후 반응기에 접종했다. 성장배지를 일정유속으로 공급하여 균체를 고농도 배양한 후 생장이 본격화되는 단계에서 질소원을 포함하지 않은 구연산 생산 배지로 교체하여 공급했다. 유출액중 일부를 매일 채취하여 구연산 및 sucrose의 농도와 pH등을 측정했다.

### 분석 방법

균체에 의하여 아직 흡수되지 않은 sugar의 농도 측정은 DNS 방법으로 수행하였다(7). 구연산의 분석은 Marier와 Boulet의 방법을 이용하였다(8).

## 결과 및 고찰

### 공급배지의 pH 변화에 따른 영향

분양 받은 *Aspergillus niger* KCTC 1232의 구연산 생산 특성을 알아보기 위해 flask 배양을 수행하였다. Shaking incubator의 속도는 200rpm이며 발효온도는 30°C로 하였다. 초기 pH는 4.0으로 하였고 배지의 sucrose 농도는 120g/L였다. 12일 경과 후 구연산은 11.2g/L가 생성되었으며 pH는 4.0에서 계속 떨어져 2.0까지 낮아졌다. 구연산의 평균 수율은 12%였고 단위 용적당 생산성은 0.042 g/Lh로 나타났다(Fig. 3).

FMBR을 조절하여 공급 배지의 pH를 변화시켰을 때의 생산 특성을 검토해 보았다. 배지의 공급 속도는 1mL/h이었으며 공급배지의 pH는 3.0, 초기 sucrose의 농도는 30g/L였다. 성장단계에서는 질소원인 질산암모늄을 2.5 g/L의 농도로 공급하였으며 세포층 내의 세포성장이 어느 정도 이루어졌을 때 질소원을 포함하지 않는 배지로 교대 공급하였다. 공급배지의 pH를 3.0, 6.0, 5.0 등으로 변화시켜 조절한 결과, 공급속도는 1mL/h로 유지하였고 구연산 생산 속도가 일정 수준에 도달한 점종 11일 이후 pH를 5.0으로, 15일 이후로 6.0으로 교체 공급하였다(Fig. 4). 반응기에서 유출되는 구연산의 평균 농도는 각각 7.3, 3.8, 4.6 g/L 이었고 평균 구연산

수율에서도 각각 39, 25, 34%로 pH가 낮을수록 유리하였다. 성공적인 구연산 발효를 위해서는 pH 값을 낮게 유지하는 것이 매우 중요함을 알 수 있었다.

일반적으로 pH가 3.0 이하일 때 발효 생성물이 주로 구연산이 되며 그 이상에서는 상당량의 oxalic acid와 gluconic acid가 생성된다고 알려져 있다(9).

성장배지는 질소원으로 첨가한 질산암모늄 성분중 암모늄이온만이 균체내로 흡수되고 nitrate이온은 배지내에 남아 낮은 pH의 완충 용액 역할을 하지만 질소원을 넣지 않은 성장 배지를 공급시에는 생성된 구연산에 의하여 pH가 거의 결정되므로 성장배지보다 더욱 낮은 pH를 갖는 구연산 생산 배지를 사용하는 것이 적합하다.

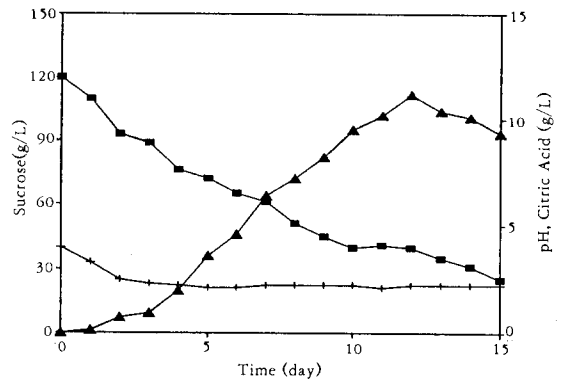


Fig. 3. Result of the shake flask fermentation with a medium containing 2.5 g/L ammonium nitrate (■); sucrose, (▲); citric acid, (+); pH.

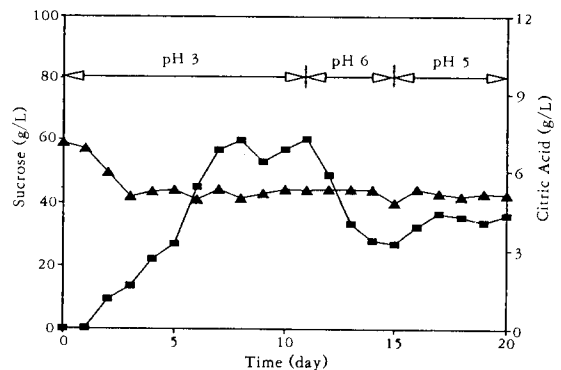


Fig. 4. Result of FMBR operation showing the effect of medium pH. (pure oxygen aeration, medium feeding rate = 1.0 mL/h).

**질소원의 변화에 따른 영향**

구연산은 탄소원이 축적되고 질소원이 제한된 상태에서 생산되는데, 질소 공급 단계에서 세포의 성장이 일어나고 구연산 생산은 저조하다(9, 10). 질소가 완전히 소모되면 세포 성장이 멈추고 구연산 생산이 일어난다. 그러므로 생산성을 증가시키고 반응기의 장기 조업을 위해 생산 단계에서의 질소 공급의 제어가 필요하다.

Fig. 5는 질소원인 질산암모늄의 농도를 달리하여 조업한 결과이다. 배지 공급속도는 1mL로 하였고 초기 pH는 3.0, 초기 sucrose 농도는 30g/L로 하였다. 접종 11일, 14일, 16일에 각각 질산암모늄의 양을 2.5g, 1.5g, 0g으로 하였을 때 구연산 평균 유출 농도는 각각 5.2, 5.8, 7.5 g/L로 증가하는 양상을 보였고 평균 수율면에서는 27, 30, 36%로 약간 증가하였다. 또한 질소원의 농도가 증가함에 따라 수율과 생산성 모두 감소했다. Kristiansen과 Sinclair (10)의 보고에 의하면 chemostat 배양에 의해 구연산을 연속 생산하여 최적 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>농도는 약 0.8g/L로 보고되어 있다(11). 그러나 세포고정화에 의한 연속 생산에서는 세포의 wash-out이 거의 일어나지 않기 때문에 질소 결핍 배지를 공급하는 것이 더 효과적인 것으로 나타났다(12).

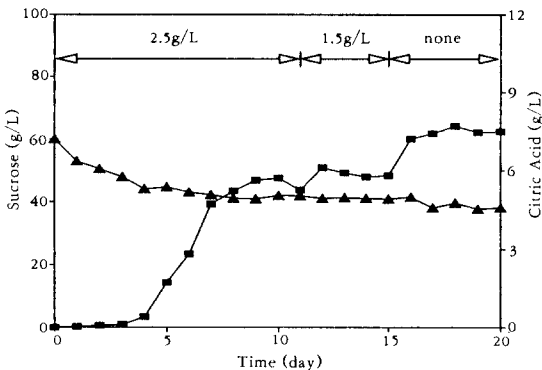


Fig. 5. Result of FMBR operation showing the effect of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> concentration:(▲); sucrose (■); citric acid. (pure oxygen aeration, medium feeding rate = 1.0 mL/h).

**산소원 교체에 따른 영향**

FMBR을 이용하여 막 사이에서의 *Aspergillus niger*의 성장 특성을 알아본 결과 포자는 반응기내의 측면에서 많이 생성되는 양상을 보였으며 이것은 배지의 흐름 양상이 균일하게 분포되지 않았음을 나

타낸다. 또한 배지의 입구쪽에 비해 출구쪽이 세포 성장이 불량한 점으로 미루어 입구 부분의 배지의 상태에 비해 출구쪽의 배지의 영양상태가 안 좋은 것으로 나타났다. 또한 세포층 외곽의 세포에 포자가 많이 생긴 점으로 미루어 산소 공급 상태가 좋지 못함을 알 수 있다. Fig. 6은 산소원으로 공기와 산소를 각각 사용하여 조업한 결과이다. 산소의 공급속도는 200mL/min로 유지시켰다. 배지의 공급속도는 1mL/h로 하였고 배지의 초기 pH는 3.0으로 공급하였다. 구연산의 평균 생산 농도는 각각 3.7, 8.0 g/L정도였고 최대 구연산 농도는 4.2g/L였다. 생산 단계에서의 생산성은 각각 0.198, 0.441 g/Lh로 생산성에 있어서도 2배이상 증가하였다. 공기를 공급할 때보다 순수 산소의 공급시 구연산 생산이 현저히 증가한 것은 산소의 투과 깊이가 증가하여 산소공급을 받는 균체가 많아지는데 기인한다고 보여지며 이때 산소가 전달되지 않는 위치에서의 균체들은 자체 분해등의 경로를 거치게 된다.

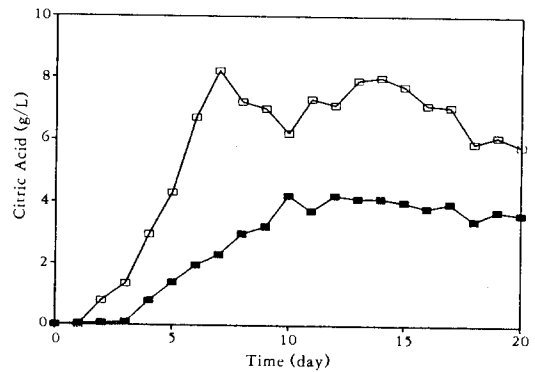


Fig. 6. Citric acid profiles during the operation using air and pure oxygen:(■); air (□); pure oxygen. (medium feeding rate = 1.0 mL/h).

**배지 공급속도의 영향**

Fig. 7은 배지의 공급속도를 달리하여 구연산 생산을 시도한 결과이다. 산소원으로는 순수 산소를 사용하였으며 성장배지의 공급속도는 1mL/h이었고 pH는 3.0으로 유지시켰다. 접종 11일, 15일 후 배지 공급속도를 1, 2, 3mL/h로 증가시켰다. 평균 구연산 농도는 각각 7.4, 4.2, 2.4 g/L이었다. 평균 구연산 수율은 각각 42, 29, 25%로 감소하였으나 단위용적당의 생산성 면에서는 각각 0.401, 0.406, 0.449 g/Lh로 다소 증가하였다. 공급속도가 증가할수록 생산성 면에서 유리함을 알 수 있었다. 낮은 속도

에서 구연산 수율이 높은 이유는 생산 구연산 농도의 증가에 따른 pH 저하로 생산 조건이 더욱 유리해지는데 기인한다. 즉, 앞에서 언급한 바와 같이 pH가 낮게 되면 부산물이 생성되는 확률이 적어지고 주요 생성물이 구연산이 되는 것으로 볼 수 있다. 그러나 생산성 면에서는 높은 공급속도에서 높은 생산성을 나타내었고 공급속도가 그 이상이면 오히려 떨어지는 현상을 볼 수 있다. 공급속도가 증가하면 평판 내에서의 압력 강하가 증가하여 생촉매와 기질간의 접촉이 향상되어 생산성의 증가를 가져온다고 보여진다.

Table 1은 같은 균주를 사용하여 산소원과 배지의 공급속도를 변화시켰을 경우 FMBR의 구연산의 생성 농도와 생산성을 이중 실관 반응기(Dual Hollow Fiber Bioreactor, DHFBR)(13)의 경우와 비교하여 본 결과이다. 같은 조건에서 FMBR의 생산

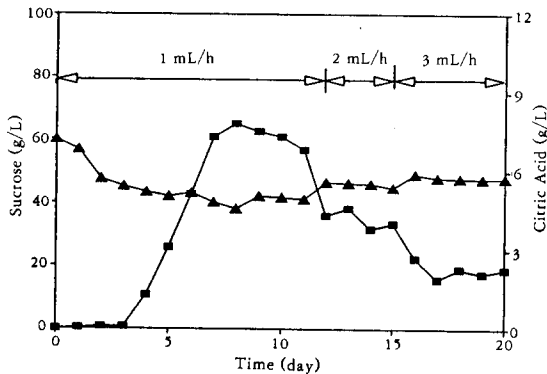


Fig. 7. Result of reactor operation showing the effect of feeding rate:(▲); sucrose (■); citric acid(pare oxygen aeration)

Table 1. Citric acid concentration and volumetric productivities in Dual hollow fiber bioreactor and flat type membrane bioreactor.

fermenta- tion mode	fermentation time (h) or feed rate (mL/h)	citric acid conc. (g/L)	volumetric productivity (g/L h)
DHFBR(13) (O <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>	0.9	8.0	1.020
FMBR (Air) <sup>a</sup>	1.0	3.7	0.198
(O <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>	1.0	7.5	0.401
(O <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>	2.0	3.8	0.406
(O <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>	3.0	2.8	0.449

a) oxygen source supplement

성이 DHFBR의 경우에 비해 떨어짐을 알 수 있다. 순수 산소를 사용하고 배지의 공급 속도가 3mL/h 였을 경우 FMBR에서의 생산성은 0.449 g/Lh 였다.

앞에서 언급한 바와 같이 FMBR은 DHFBR에 비해 단위 용적당의 표면적이 낮은 관계로 단위 용적당의 높은 생산성을 얻기는 힘들다. 보다 효과적인 물질 전달을 위해 공급배지와 반응기의 액위 변화이라든가 반응기내의 각 층에서의 교대 압력 변환등의 연구가 바람직하다.

## 요 약

호기성 미생물 고정화를 위해 새로 개발한 평판형 막 생물 반응기(FMBR)을 개발하여 *Aspergillus niger*(KCTC 1232)로부터의 구연산 생산을 연구하였다. 반응기는 삼단으로 구성되어 있으며 상층부에는 산소 공급을 위한 공기흐름이 있고 중층부에는 미생물이 고정화되어 있으며 하층부에는 배지가 연속적으로 공급된다. 배지의 초기 pH는 구연산 생성에 있어 중요한 영향을 미치며 pH가 낮을수록 구연산 생산 수율이 높았다. 산소원으로 공기와 순수 산소를 이용하여 생산성은 각각 0.20, 0.40 g/Lh에 달하였다. 또한 배지의 공급속도가 높을수록 생산성이 어느 정도 증가함을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. W. Crueger and A. Crueger (1984), *Biotechnology*, Sinauer Sci. Tech, 113.
2. D. E. Steinmeyer and M. L. Shuler (1990), *Biotechnol. Prog.* 6, 286.
3. D. E. Steinmeyer and M. L. Shuler (1990), *Biotechnol. Prog.* 6, 362.
4. J. A. Lang, K. H. Yoon and J. E. Prenosil (1990), *Biotechnol. Prog.* 6, 447-451.
5. H. N. Chang and B. H. Chung (1990), U. S. Patent 4, 910, 139.
6. P. Shu and M. J. Johnson (1978), *Biotechnol. Bioeng.* 20, 217.
7. G. L. Miller (1959), *Anal. Chem.* 31, 426.
8. J. R. Marier and M. Boulet (1958), *J. Dairy Sci.* 41, 1683.
9. M. Rohr and C. P. Kubicek (1981), *Biochem. J.* 209, 669.

10. B. Kristiansen and C. G. Sinclair (1978),  
*Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1711.
11. B. Kristiansen and C. G. Sinclair (1979),  
*Biotechnol. Bioeng.* **21**, 297.
12. J. Vaija, Y. Y. Linko and P. Linko (1982),  
*Appl. Biochem. Biotechnol.* **7**, 51.
13. D. J. Ji (1989), MS thesis KAIST, 76.