

Aspergillus niger를 이용한 글루콘산 나트륨 생산 생변환 공정의 최적화

박부수·조병관·²이상윤·¹임승환·²김동일·†김병기
서울대학교 공과대학 생물화학공학 협동과정 및 서울대학교 유전공학연구소
¹알천산업주식회사, ²인하대학교 공과대학 생물공학과
(접수 : 1999. 3. 15., 게재승인 : 1999. 5. 3.)

Optimization of Biotransformation Process for Sodium Gluconate Production by *Aspergillus niger*

Bu-Soo Park, Byung-Kwan Cho, Sang-Yoon Lee², Seong-Hwan Lim¹, Dong-Il Kim² and Byung-Gee Kim[†]
Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology, The Institute for
Molecular Biology & Genetics, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
¹Alchun Industry, Co., Choongnam 325-900, Korea
²Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 1999. 3. 15., Accepted : 1999. 5. 3.)

In order to produce high concentration of sodium gluconate, optimization of the fermentation conditions, such as glucose concentration, inoculum size, dissolved oxygen concentration and glucose feeding method, was examined. When the glucose concentration was maintained in the range of 30~50 g/L during the batch fermentation, glucose conversion yield and productivity were 92.2% and 6.0 g/L/hr, respectively. In the case of the low concentration below 30 g/L, the yield decreased by about 25%. As the inoculum size increased above 20%(w/v), lag phase was shortened but the productivity decreased. The dissolved oxygen level of 60~70% was shown to be the threshold point for 75% of increase in the productivity of sodium gluconate. Finally, optimal glucose feeding rate was determined using various feeding methods such as exponential feeding, feeding based on the average glucose consumption rate and on the oxygen uptake rate and etc. Our result shows that glucose feeding based on the oxygen uptake rate is a very simple, efficient and robust method, especially when oxygen is consumed as a substrate for the bioconversion. Using the above glucose feeding strategy under the optimized condition, 255 g/L of sodium gluconate concentration, 12 g/L/hr of productivity and 95% of glucose conversion yield were achieved with *A. niger* ACM53

Key Words : *Aspergillus niger*, Sodium gluconate, Gluconic acid, Fermentation, Optimization, Oxygen uptake rate

서 론

글루콘산은 부드러운 신맛을 내는 산미제로서 각종 음료 및 식품에 사용되고 있으며, 식품산업의 배관용 세척제로서 황산이나 질산을 대체하여 그 사용이 점차 확대되고 있다. 또한 고순도의 글루콘산을 칼슘, 철, 마그네슘 등과 같은 금속 이온과 결합시킨 경구용 약품이 이미 미국 등에서 개발되어 그 효능이 입증되고 있으며, 특히 고순도 글루콘산 칼슘염은 골다공증 치료를 위한 주사제로까지 개발되어 있다. 따라서 사람이나 가축이 위에 열거한 금속이온들을 소화 흡수하기 위한 운반체로서 글루콘산의 유용성을 찾을 수 있으며, 더불

어 초고순도 글루콘산은 정밀전자 제품이나 반도체의 세정용으로 일본에서 개발중이며 현재 사용중인 초고순도 황산이나 초고순도 염산과 비교할 때 세정력은 비슷하지만 제품의 손상이 적어 전자 반도체 산업의 발전에도 기여할 수 있을 것이다.

글루콘산 및 관련 유도체들은 발효, 무기촉매, 전기화학적 방법 또는 효소를 이용한 포도당의 신화과정을 통하여 생산할 수 있지만 경제성을 비롯한 여러 요인들로 인하여 현재까지의 대량생산은 미생물을 이용하여 이루어지고 있다(1-3). 포도당을 이용하여 배양액에 글루콘산을 축적하는 미생물로서 *Acetobacter aceti*가 알려진 이래 *Pseudomonas*, *Gluconobacter* 등의 박테리아와 *Aspergillus*, *Penicillium* 등의 곰팡이 등이 이와 같은 메커니즘을 갖고 있는 것으로 알려져 있다(4). 글루콘산 생산균주 중에서는 *Aspergillus niger*가 다른 유기산 생성이 적고 비교적 발효 효율이 높으며 발효액으로부터 균체제거가 용이하다는 등의 장점들로 인하여 공업적인 생산에 주로 이용되고 있다. 그러나 글루콘산 생산에 이용되고 있는 회분식 발효는 초기에 고농도의 포도당을

† Corresponding Author · The Institute of Molecular Biology & Genetics and Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Tel : 02-880-6774, Fax : 02-874-1206
e-mail : byungkim@plaza.snu.ac.kr

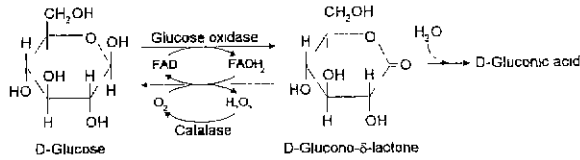


Figure 1 Biochemistry of gluconic acid formation

사용함으로써 기질 저해 및 유도기가 길어진다는 단점이 있기 때문에 총 발효시간은 균체의 제사용이나 적당한 포도당 공급방법에 의해 단축될 수 있다 또한 글루콘산 발효는 Figure 1에서 보는 바와 같이 산화공정이므로 글루콘산의 생산성은 발효액중의 용존산소 농도에 의해 크게 영향을 받는다. 본 연구에서는 글루콘산의 생산성, 수율 및 포도당으로부터의 전환수율 등을 향상시키기 위하여 유가식 배양방법을 선택하고 포도당농도 등의 발효조건을 최적화하고 효과적이고 조절이 용이한 포도당 공급방법을 제시하여 생산성 및 발효효율을 향상시키고자 하였다

재료 및 방법

균주 및 배지조성

본 연구에서 이용된 균주는 일천산업주식회사로부터 제공받은 *A. niger* ACM53이며 2일간 배양 후에 pellet의 형태가 작고 균일한 것을 선별하여 사용하였다. 선별된 균체가 포함된 매지를 10% 글리세롤과 동량 혼합하여 -70°C 에서 보관하여 사용하였고 보관된 균체를 제사용 할 때는 seed culture용 배지가 50 mL 들어 있는 250 mL 플라스크에 접종하여 2일간 배양 후 계대배양하였다. 배지의 조성은 전발효의 경우 포도당 50 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2 g/L, urea 5 g/L, corn steep liquor 20 mL, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 2 g/L 이고 seed culture의 경우는 기본적으로는 전발효의 배지조성과 같고 다만 CaCO_3 10 g/L를 첨가하여 주었다. 본발효의 경우는 포도당 60 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.2 g/L, KH_2PO_4 0.2 g/L, K_2HPO_4 0.7 g/L, MgSO_4 0.2 g/L, FeSO_4 0.006 g/L, MnSO_4 0.006 g/L의 조성을 사용하고 초기 pH는 6.0으로 조정된 후에 이를 가압 증기 멸균하여 사용하였다(5)

분석방법

세포농도의 측정을 위해서는 긴직적인 측정방법으로 사용되는 packed mycelium volume (PMV)을 사용하였다. PMV는 발효 중인 배지 7 mL을 1500 rpm에서 15분간 원심 분리하여 전체 부피에 대한 침전된 균체의 부피의 백분율로 표시하였다 정확한 세포의 양을 측정하기 위하여 세포 건조 중량을 다음과 같이 측정하였다. 무게를 알고 있는 원심분리용 시험관에 시료를 취하여 1500 rpm에서 10분간 원심 분리하고 상등액을 제거한 후 잔당에 의한 오차를 줄이기 위하여 충분한 양의 증류수로 세척을 하여 다시 위와 같은 조건으로 원심 분리하였다. 세척을 4회 이상 반복한 뒤 상등액을 제거하여 이를 80°C 에서 48시간이상 건조시킨 후 세포 건조 중량을 측정하였다 글루콘산 나트륨, 시트르산 나트륨, 옥살산 나트륨, 아세트산 나트륨 등의 분석은 Waters사의 HPLC 900 system을 사용하

였고 칼럼으로는 Amnex™ HPX-87H(300 mm×7.8 mm, Bio-Rad, USA)를 사용하였으며 이동상으로는 5 mM의 H_2SO_4 용액을 35°C 에서 유속 0.6 mL/min으로 하여 220 nm에서 흡광도를 측정하여 수행하였다. 포도당 분석은 시료채취 후 7000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 헥소키나아제를 이용하는 포도당 분석용 시약(SIGMA, USA) 혹은 포도당 분석기(YSI 2700, Yellow Springs Instrument Co., Inc USA)를 이용하여 분석하였다

세포배양

-70°C 에서 보관중인 균체를 37°C 에서 녹인 후 이를 100 mL 플라스크에서 20 mL 배양부피의 seed culture용 배지에 접종하여 회전식 진탕 배양기에서 37°C , 120 rpm으로 1일간 배양하여 이를 다시 100 mL의 동일한 배지가 들어 있는 500 mL 플라스크에 접종하고 동일한 조건으로 60시간 배양하여 이를 본발효를 위한 접종균체로 사용하였다. 2.5 L jar fermenter (BioFLOIIc, New Brunswick Scientific, Co, USA)를 이용하여 회분식 배양을 할 경우에는 2 L 배양부피, 33°C , 500 rpm의 배양조건을 사용하였고 유가식 배양의 경우에는 초기 배양부피를 1.5 L로 하여 통기량 2~3 vvm, 500~900 rpm, 33°C 의 배양조건을 사용하였다

결과 및 고찰

포도당 농도의 영향

*A. niger*의 경우 포도당의 세포내 이동이 촉진확산 메커니즘으로 일어남이 잘 알려져 있기 때문에 발효 도중 포도당의 농도는 글루콘산 나트륨의 생산에 매우 중요한 영향을 미칠 것으로 예상할 수 있다(6). 초기 당농도를 60 g/L로 일정하게 하고 세포가 대수증식에 들어가는 시기에 포도당의 농도를 각각 10~30, 30~50, 50~70 g/L로 나르게 유지하면서 발효 수율과 생산성을 비교하였다. 포도당의 첨가방법은 농도 400 g/L의 멸균된 포도당용액을 시간에 따른 당농도의 변화를 관찰하면서 적정시간에 간헐적으로 첨가하여 발효기간 동안 당농도가 목적인 범위를 유지하도록 하였다 Table 1에서 보는 바와 같이 위에 세 가지 경우 모두 5.4~6.0 g/L/hr로 비슷한 생산성을 나타내었지만, 발효 수율은 30~50 g/L로 유지시켜 주는 경우 92.2%를 나타내어 30 g/L이하로 유지시키는 경우와 비교하여 약 25%의 높은 수율을 나타내었다 당농도를 30 g/L이하로 유지시키는 경우는 다른 경우에 비해 세포의 증식속도가 빠른 것으로 미루어 보아(data not shown) 포도당이 글루콘산 생산이 아닌 세포의 증식에 상대적으로 많이 사용됨으로서 질적으로 발효 수율에 영향을 주는 것으로 생각된다. 상기한 결과는 글루콘산 발효에서 고농도의 포도당이 존재할 때와 질소원이 고갈된 시점에서 포도당 산화효소의 발현이 증가하며 당전환 수율이 증가한다는 기존의 결과와 부합하였다(15). 글루콘산 생산 균주인 *A. niger*는 고농도의 포도당 조건하에서도 성장저해를 받지 않았으며 실제의 생산에서도 250 g/L의 초기 당농도에서 글루콘산의 생산이 이루어진다는 점을 고려할 때, 초기 당농도를 최적화하고 발효기간 중 포도당의 첨가방법을 개선한다면 글루콘산 당전환 수율뿐만 아니라 생산성을 더욱 개선할 수 있을 것으로 사료된다

Table 1. Effect of glucose concentration on the production of sodium gluconate.

glucose concentration (g/L)	productivity (g/L/hr)	Y_{gluc}^a (%)	final product concentration (g/L)
10~30	5.4	64.0	130.3
30~50	6.0	92.2	162.0
50~70	5.7	85.3	159.6

a. product yield $Y_{gluc} = \frac{\Delta \text{sodium gluconate}}{\Delta \text{glucose}}$

균체 접종농도의 영향

세포를 접종한 뒤 대수증식기에 이르기까지의 균체 성장 유도기의 단축은 상업적인 생산에서는 생산성과 직결되는 중요한 부분이며 유도기를 단축시키기 위해서 일반적으로 접종량을 늘려주는 방법을 사용한다. 접종농도에 따른 유도기의 시간과 전체적인 글루콘산 나트륨의 생산경향을 비교하기 위해 2일간 seed culture한 균체를 각각 5, 10, 20%(v/v)로 다르게 접종하여 유가식 발효를 진행하였고 포도당의 첨가는 미리 멸균한 농도 400 g/L의 포도당용액을 1 mL/min의 속도로 첨가하여 포도당의 농도를 30~50 g/L로 유지하였다. 예상할 수 있는 바와 같이 접종농도를 크게 할수록 유도기간이 단축되었고 발효기간 동안 균체의 농도가 높게 유지되었으며 20%의 접종량으로 발효를 수행한 경우가 5%의 경우보다 유도기가 약 6시간 가량 단축되었으며 발효시간에 따른 균체생장은 Figure 2에 나타내었다. 글루콘산 나트륨의 생산은 발효 전반부에는 균체농도에 비례하여 생산량이 증가하였으나 16시간 이후의 후반부에는 접종량이 20%인 경우는 다른 두 가지 경우와 비교하여 균체의 양이 충분함에도 불구하고 생산속도가 현저히 감소되는 것이 관찰되었으며 26시간에는 오히려 접종량이 적은 경우보다 생산된 글루콘산 나트륨의 농도가 낮았다 특히 20%로 접종한 경우에는 발효 후반부에 배지 내에 존재하는 포도당이 거의 소비되지 않았다. 결과적으로 고농도의 포도당이 남게 되므로 수율이 낮아지며 상업적인 생산에서는 후처리 공정한 결정화 단계에서 문제를 야기할 수 있다. 또한 20%의 접종농도로 발효를 수행한 경우에 초기에는 높은 균체농도로 인해 글루콘산 나트륨의 생산속도가 가장 빠르지만 후반부에는 높은 균체농도로 인해 오히려 생산성이 저해되는 것으로 관찰되었다 이는 발효초내에 적정 농도 이상의 균체가 존재함으로써 포도당과 산소가 2:1 mole비로 참여하는 글루콘산 나트륨의 전환반응에 중요한 산소의 전달이 원활하지 않아 생산이 저해되기 때문이라 생각된다. 이러한 현상은 산소전달속도가 제한조건이 되는 미생물 고농도 발효에서 일반적으로 발생하는 현상이지만 이 경우는 산소가 반응의 직접적인 기질의 하나이기 때문에 영향이 훨씬 큰 것으로 생각된다

용존산소량의 영향

*A. niger*를 이용한 글루콘산 나트륨의 생산에 있어서 중요한 인자인 용존산소량의 영향을 살펴보았다. Table 2에서와 같이 각각의 경우에 발효수율 및 생산성은 용존산소량과 비례함을 알 수 있다 용존산소량을 30%로 유지하는 경우보다 70%로 유지한 경우가 약 75%정도 높은 생산성을 갖는다(7) 또한 용존산소량을 조절하지 않은 기존의 회분식 발효의 경우에는 균체농도의 증가로 용존산소량의 제한을 받아 잔당을 제거하기 위해서 8시

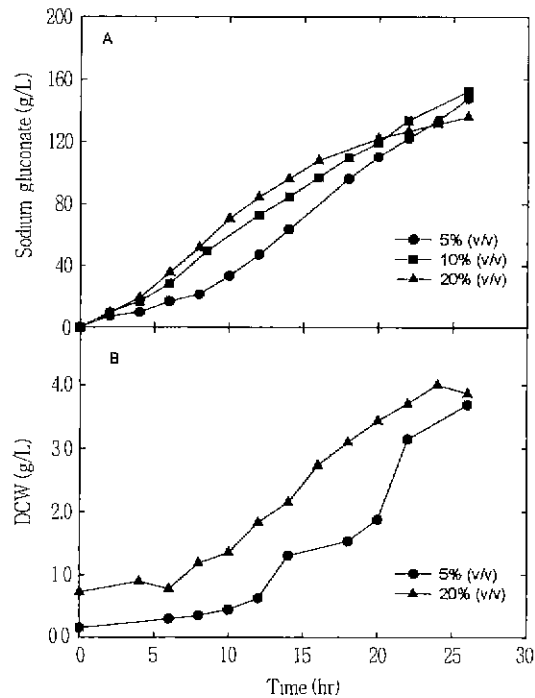


Figure 2 Effect of inoculum size on the sodium gluconate production(A) and growth(B) of *A. niger*

간 이상 필요하였지만 용존산소량을 30%이상으로 유지시켜주는 경우에는 30분내에 잔당이 소비되는 것을 일 수 있었다 *A. niger*의 경우는 산소가 포도당 전환 반응의 기질이므로 RQ값이 0.01~0.02로 매우 낮고 따라서 대부분의 산소가 글루콘산의 생산에 이용되는 것을 알 수 있으며 용존산소량이 높을수록 산소 소모속도가 증가하는 것을 알 수 있었다.

유가식 배양에서의 포도당 주입 방법의 비교

글루콘산 염의 생산을 위한 유가식 배양에서 포도당의 농도를 유지시키는 방법은 세포 성장 및 기질의 소모 속도를 모델식을 이용하여 계산 후 포도당을 주입하는 방법, 대수증식기의 포도당 소모속도를 평균하여 포도당을 주입하는 방법, 포도당분석을 통한 피드백 제어방법, 배양기간동안 기질인 산소의 소모속도를 측정하여 이를 포도당 농도로 환산하여 포도당을 공급하는 방법으로 생각할 수 있다. 세포 성장 모델식을 기초로 포도당을 주입하는 방법의 경우는 세포의 대수증식기에 맞추어 포도당 주입속도를 지속적으로 증가시킬 수 있다는 장점이 있고(8) 간단한 모델식을 기초로 설명하면 다음과 같다.

Table 2. Effect of dissolved oxygen level on the production of sodium gluconate.

dissolved oxygen level (%)	productivity (g/L/hr)	Y_{gluc}^a (%)	final product concentration (g/L)
30	8.0	80	157.3
50	8.5	86	157.5
70	10.6	89	180.5

a : product yield $Y_{gluc} = \frac{\Delta \text{sodium gluconate}}{\Delta \text{glucose}}$

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu XV, \mu = \mu(S) \tag{1}$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = \left[-\frac{1}{Y_{xs}} - \frac{1}{Y_{ps}}(\alpha\mu + \beta) \right] XV + S_F F \tag{2}$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = (\alpha\mu + \beta) XV \tag{3}$$

발효액 내의 최적 기질 농도를 S_{opt} 라고 하고 이 농도로 일정하게 유지하려고 한다면 S_{opt} 에서 $\frac{dS}{dt} = 0, \mu = \mu(S_{opt}) = constant$ 이므로 최적의 기질속도는 식 (1), (2), (3)으로부터 다음과 같이 된다

$$F = \frac{\left[\frac{1}{Y_{xs}} \mu + \frac{1}{Y_{ps}} (\alpha\mu + \beta) \right] X_0 V_0 e^{\mu t}}{S_F - S} \tag{4}$$

최적의 포도당 공급속도를 결정하기 위해서는 식 (4)의 각 파라미터들을 연속배양을 통해 정확히 측정하여야 한다 하지만 *A. niger*의 경우 발효 중 세포가 발효기의 표면에 흡착되는 등의 이유로 세포 성장이 균일하지 못하기 때문에 연속배양에 관한 문헌보고가 부족하여 정확한 값을 알 수 없었다. 따라서 대수증식기의 포도당의 소모속도를 평균하여 공급속도를 정하여 주었는데 Figure 3에서와 같이 4시간의 유도기를 지나 발효 후 7시간 정도면 원하는 포도당 농도인 30~40 g/L가 되므로 대수증식기로 판단되는 시점부터 결정된 기질 공급속도로 포도당을 공급하여 주었다 하지만 이 경우에도 발효 후반에는 포도당이 과다하게 공급되었으며 이와 같은 현상의 이유는 포도당을 제외한 기질의 고갈 및 세포 성장에 따른 세포농도의 증가 및 발효액의 점도증가로 인한 산소전달의 저하로 포도당 소모속도가 감소하는 것으로 생각할 수 있다. 하지만 생산성은 10.4 g/L/hr, 발효효율은 90%이상으로 포도당의 농도를 고농도로 유지하는 것이 유리하다는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 세포성장 모델식과 대수증식기의 포도당 소모속도를 기준으로 포도당의 공급속도를 조절하는 것은 연속발효를 통한 정확한 모델식의 파라미터를 결정하지 못하여 최적농도를 유지시킬 수 없었다. 세 번째 방법으로 포도당의 농도를 일정한 시간 간격으로 분석하여 포도당의 공급속도를 결정하여 주는 경우, 포도당의 농도가 미생물의 생리적 상태에 영향을 미친다는 점에서 가장 바람직한 방법이다. 또한 *A. niger*의 경우 비증식속도가 일정하지 못하므로 최적의 포도당 공급속도를 결정하기가 매우 어렵다. 따라서 포도당 분석기를 이용하여 시료채취 후 5분 이내의 분석을 통해

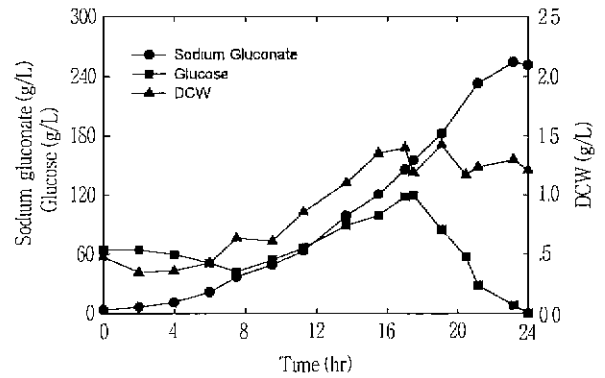


Figure 3 Time course of glucose concentration, sodium gluconate and cell growth in a fed-batch fermentation using glucose feeding based on average glucose consumption rate in the exponential phase

적절한 공급속도를 결정하여 주었다. 기질의 물질수지식은 식 (5)와 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_F - Vr_C \tag{5}$$

식 (5)를 기질농도의 변화율에 대하여 정리하면 식 (6)이 된다.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{V} [F(S_F - S)] - r_C \tag{6}$$

S 가 S_{opt} 에서 고정될 때, 기질의 최적주입속도는 식 (7)로 나타낼 수 있고 이를 식 (6)에 대입하면 비정상상태의 식 (8)을 유도할 수 있다

$$F^* = \frac{r_C V}{[S_F - S_{opt}]} \tag{7}$$

$$F = F^* - \frac{V}{[S_F - S]} \frac{dS}{dt} \tag{8}$$

이 방식은 미생물의 생리상태를 직접 알 수 있어서 최적의 조건유지가 유리하지만 분석을 일정한 시간간격으로 수행해야 하므로 매우 번거롭다. 공급시작은 발효시작 후 유도기가 지나 지수성장기가 시작되는 약 7시간 후부터 시작하였고 약 17시간 후부터는 포도당의 소모속도가 감소하여 공급속도가 감소하는 것

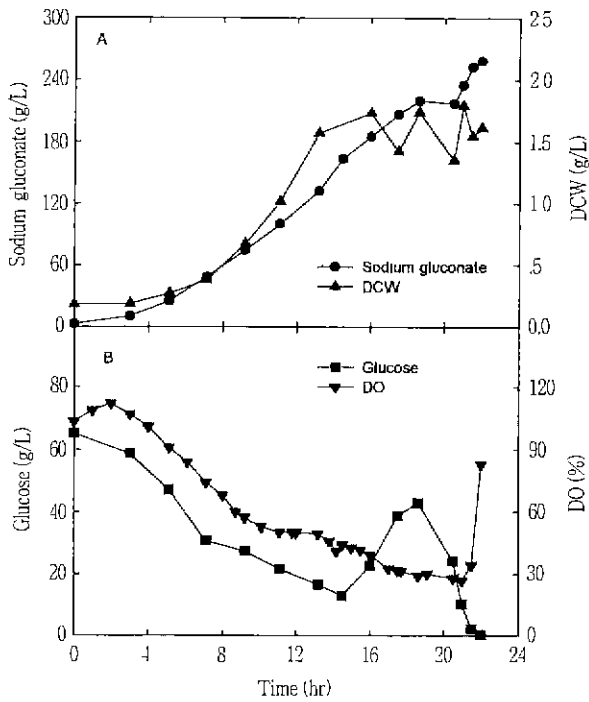


Figure 4 Time course of sodium gluconate(A), cell growth (A), glucose concentration(B) and dissolved oxygen level(B) in a fed-batch fermentation using glucose feeding based on feedback control by the glucose analysis.

을 알 수 있었다. Figure 4에서 보는 바와 같이 포도당의 농도가 충분한데도 세포가 더 이상 성장하지 못하는 이유는 포도당을 제외한 나머지 기질의 고갈이 원인으로 생각되며 용존산소를 50%로 유지하여 주었지만 발효가 진행될수록 세포농도가 증가하고 세포의 형태가 필라멘트 형태로 변하면서 산소전달이 현저히 감소하여 용존산소가 약 30%로 감소하는 것을 알 수 있었다. 생산성은 11.7 g/L/hr 이었고 발효 효율은 90% 이상이였다.

마지막으로 기질의 하나인 산소의 소모속도를 분석하여 포도당의 소모속도로 전환하여 이를 기준으로 포도당의 공급속도를 결정하여 주었다. 이 방법은 측정 가능한 매개변수들을 이용하여 간접적으로 현 세포의 상태를 추정하여 기질공급을 제어하는 방식이며 사용 가능한 매개변수로는 용존산소, pH, RQ, 에탄올과 같은 연속적으로 측정 가능한 대사 산물의 농도 등이 있다. 예를 들어, 용존산소의 경우에는 기질이 소모되어 기질의 농도가 감소하면 비례하여 용존산소가 증가되는 것을 측정하여 이를 기질 소모속도로 환산하여 기질의 공급속도를 결정하는 방법이다. 또한 발효 중 배출되는 가스의 분석, 특히 이산화탄소 생성속도 및 산소소비속도를 통하여 미생물의 생리상태를 간접적으로 분석하는 방식이 많이 사용되고 있는데 *A. niger*의 경우 글루콘산 발효에 포도당 1mol이 소모될 때 산소 0.5mol이 소모되므로 포도당의 소모속도를 쉽게 계산할 수 있다. Figure 5에서와 같이 포도당의 공급속도를 산소의 소모속도를 측정하여 간접적인 방식으로 제어했을 때 앞서 언급한 다른 방법과 비교하여 효과적으로 최적 포도당농도를 유지시킬 수 있었으며 생산성은 12.0g/L/hr, 발효수율은 95%를 얻을 수 있었다. 본 결과는 매우 흥미로운 것으로 보통의 발효에서는 산소소모속도의 계산 내지

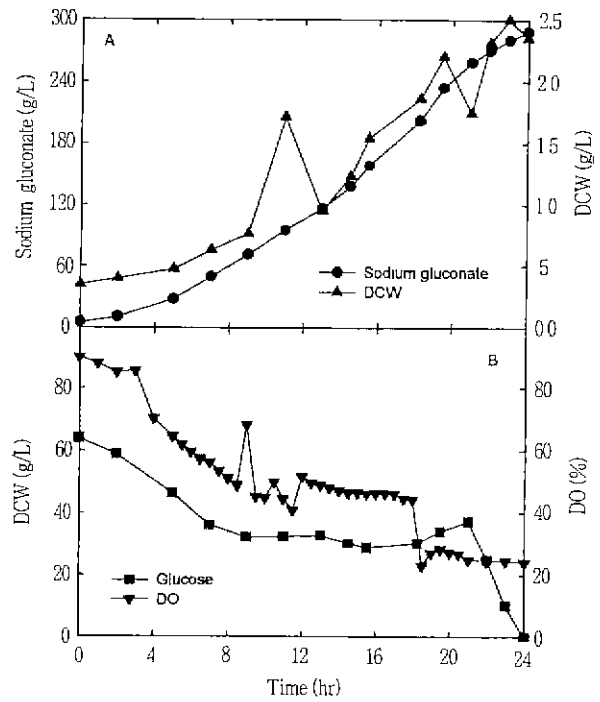


Figure 5. Time course of sodium gluconate(A), cell growth (A), glucose concentration(B) and dissolved oxygen level(B) in a fed-batch fermentation using glucose feeding based on oxygen uptake rate

는 측정이 용존산소의 정확한 측정이 필요하기 때문에 이산화탄소의 생성속도 측정보다 상대적으로 부정확하며 제어변수로서 잘 사용되지 않는 경향이 있는데, 이 경우는 산소의 소모속도가 이산화탄소의 생성속도 보다 훨씬 좋은 조절변수임을 입증해 주었다. 또한 글루콘산 생성시기에서는 세포의 성장이 거의 일어나지 않기 때문에 이산화탄소의 생성속도가 포도당기질속도에 의해 민감하게 변화하지 않는다는 단점도 관찰하게 되어 이산화탄소의 생성속도는 이 경우 발효조절변수로서는 그다지 좋지 않음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 앞서서 언급하였지만 글루콘산 생성시기의 반응기질로 사용되는 산소의 소모속도는 세포에 의한 산소소모속도 보다는 바로 글루콘산의 생산량 및 수율과 직접적인 관계를 갖고 있기 때문이라고 사료된다.

요 약

*Aspergillus niger*를 이용하여 글루콘산 나트륨을 생산하는데 있어서 발효조건을 최적화하기 위해 포도당 농도의 영향을 조사한 결과 포도당의 농도를 30~50 g/L로 유지시키는 유가식 발효를 통해 92.2%의 수율과 6.0 g/L/hr의 생산성을 얻을 수 있었다. 반면, 30 g/L이하로 유지시킨 경우 발효수율이 25% 낮아졌으며 이는 탄소원인 포도당을 글루콘산 나트륨의 생산이 아닌 세포생장에 사용하기 때문인 것으로 생각된다. 균체의 집중농도에 따른 영향에 있어서는 20%의 집중농도에서 유도기를 6시간 가량 단축시키는 효과가 있었으나 발효 후반에는 과도한 균체농도로 인해 포도당이 더 이상 소비되지 않아 상당량이 배지 내에 남게 되는 등의 문제점이 관찰되었다. 이러한 현상은 과도한 균

체의 성장으로 인한 산소전달이 저해 받기 때문이라 생각된다. 용존산소의 영향에서는 60~70%로 조절하여 주었을 때가 30%로 조절하였을 때보다 75%정도 높은 생산성을 나타내었다. 즉, 고농도의 산소수준을 유지하는 것이 글루콘산 생산에 도움이 되는 것을 알 수 있었다. 배양 중 포도당의 농도를 유지하기 위해 다양한 포도당 주입방법을 사용하였으나 기질을 사용하는 산소의 소비속도를 측정하여 이를 당소비속도로 환산한 후 당을 공급하여 주는 것이 매우 효과적이고 간편하여 실패가 적은 방법임을 증명할 수 있었다. 이와 같은 포도당 제어 방법은 산소를 반응기질로 사용하는 미생물 생물전환 공정에 일관적으로 유용하게 사용될 수 있을 것이라 사료된다. 상기한 조건에서 포도당을 사용하여 본 *A. niger* ACM53을 통해 글루콘산 나트륨을 생산할 경우 글루콘산 나트륨 농도 255g/L, 최대 생산성 12.0 g/L/hr 및 당전환수율 95%를 달성할 수 있었다.

Nomenclature

X	Cell mass, g/L
V	volume, L
μ	Specific growth rate, hr ⁻¹
S	Substrate concentration, g/L
F	Feed rate, L/min
F^*	Optimum feed rate, L/min
P	Product concentration, g/L
t	Time, min
Y	Yield coefficient
α	constant
β	constant
r_c	glucose consumption rate, g/L/hr

참 고 문 헌

1. Isbell, H. S., S. L. Frush, and F. J. Bates (1932), Manufacture of calcium gluconate by electrolytic oxidation of dextrose, *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 375
2. De Wilt, H. G. J. (1972), Oxidation of glucose oxidase to gluconic acid, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **11**, 370.
3. Yamata, K. (1976), Production of organic acids by fermentation, *Fermentation and Industry (Japan)*, **34**, 661
4. Michael, T., Gulam, N. Q., Rainer, B., and Ulfert, O. (1992), Influence of Constant and Oscillating Dissolved Oxygen Concentration on *Aspergillus niger*, *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 282.
5. M. Muller (1986), Gluconate accumulation and enzyme activities the extremely nitrogen-limited surface cultures of *Aspergillus niger*, *Arch. Microb.*, **144**, 151
6. N. V. Torres, J. M. Riol-Cimas, M. Volschek, and C. P. Kubicek (1996), Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 790.
7. R. H. Wijffels, R. M. Butelaar, C. Bucke, and J. Tramper (Eds) *Immobilized Cells: Basics and Applications*(1996) Elsevier Science B.V. Effect of dissolved oxygen concentration on pH-controlled fed-batch gluconate production by immobilized *Aspergillus niger*
8. J. M. Modak, H. C. Lim, and Y. J. Tayeb (1988), General Characteristics of Optimal Feed Rate Profiles for Various Fed-Batch Fermentation Processes, *Biotech. Bioeng.*, **38**, 1396
9. T. Yamane, M. Matsuda, and E. Sada (1981), Application of Porous Teflon Tubing Method to Automatic Fed-Batch Culture of Microorganisms II Automatic Constant-Value Control of Fed Substrate(Ethanol) Concentration in Semibatch culture of Yeast, *Biotech. Bioeng.*, **23**, 2509
10. D. G. Hatzinikolaou and B. J. Macris (1995), Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*, *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 530
11. C. F. B. Witteveen, M. Veenhuis, and J. Visser (1992), Localization of Glucose Oxidase and Catalase Activities in *Aspergillus niger*, *Appl. Environ. Microb.*, **58**, 1190.
12. K. Hellmuth, S. Pluschkell, J.-A.K. Jung, E. Ruttkowski and U. Rinas (1995), Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* genetic and process-engineering techniques, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 978
13. B. Chaudhuri, J. M. Modak (1998), Optimization of fed-batch bioreactor using neural network model, *Bioprocess Engineering*, **19**, 71
14. M. Moresi, E. Parente, and A. Mazzatura (1991), Effect of dissolved oxygen concentration on repeated production of gluconic acid by immobilized mycelia of *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 320
15. Mullin, H. M. (1986), Gluconate accumulation and enzyme activities in extremely nitrogen-limited surface cultures of *Aspergillus niger*, *Arch. Microbiol.*, **144**, 151.