

산소공급이 캡슐고정화 *Aspergillus niger*의 구연산 생산에 미치는 영향

†박 중 곤·정 금 식
경북대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 1999. 11. 26., 게재승인 : 1999. 12. 17.)

The Effect of Oxygen Supply on the Production of Citric Acid from Encapsulated *Aspergillus niger*

Joong-Kon Park† and Geung-Sik Jeong
Department of Chemical Engineering, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
(Received : 1999. 11. 26., Accepted : 1999. 12. 17.)

Encapsulated *Aspergillus niger* was prepared in order to inspect the effect of oxygen supply on the production of citric acid. *A. niger* cells which had been immobilized in the calcium alginate capsule grew and mycellia penetrated through the capsule membrane after two days of cultivation and covered over all of the capsule after eight days. The mycellia became loose when the nitrogen source was sufficient or oxygen was deficient. The larger amount of encapsulated cells were put into a given growth medium, the smaller quantity of citric acid was produced. The increase of volumetric oxygen transfer coefficient from 1.8 hr⁻¹ to 2.55 hr⁻¹ in the flask culture accelerated cell growth rate but did not influence the production of citric acid. The high oxygen supply rate(k_La: 150 hr⁻¹) in the concentric air lift reactor hastened the growth of cells and hindered the production of the citric acid. The reduction of nitrogen source level in the growth medium in the concentric air lift reactor increased citric acid production by 40 percent of that of flask cultivation and the culture period was shortened by 3 days. The variation of the geometry of the concentric air lift reactor did not influence the growth rate of encapsulated cells and production rate of citric acid.

Key Words : encapsulated *Aspergillus niger*, citric acid, oxygen supply

서 론

발효조의 생산성을 높일 수 있는 한 방법으로 균체를 고정화하는 방법이 있다. 미생물의 고정화 방법은 폴리우레탄이나 셀라이트 등의 담체에 미생물을 부착시키거나, alginate, chitosan, collagen 등에 미생물을 섞어서 담체를 제조하고 담체내의 미생물을 배양하거나(1), hollow fiber나 capsule 속에 미생물을 가두어서 배양하는 방법이 있다(2). 균체를 담체속에 고정화하는 방법이 현재까지는 가장 효과적인 방법으로 간주된다. 그러나, 담체내에 고정화된 미생물이 배양중에 배양액상으로 씻겨져 나오거나 담체내에 미생물 함유량이 많아지면 담체가 부서지며 담체의 중심부에는 산소나 영양분의 결핍으로 미생물이 자라지 못하는 단점이 있다(3). 최근에는 캡슐내부에 미생물을 고정화하는 방법이 개발되고 있다. Wang 등에 의하여 개발된 1단계 캡슐 제조법(4)을 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae*가 calcium alginate

캡슐에 고정화 배양되었다(5). 캡슐제조시 surfactant를 첨가하여 캡슐막을 통한 이산화탄소의 투과속도를 1.7배 향상시킴으로써 *S. cerevisiae*의 고정화 배양시 발생하는 이산화탄소 개스로 말미암아 캡슐이 파괴되는 현상이 방지되었다. 배양을 통하여 캡슐내부에 축적되는 *S. cerevisiae*의 건조중량은 300 g/L이었고 *Corynebacterium glutamicum*의 캡슐내부에 축적된 건조중량은 200 g/L, 캡슐내부에 축적된 *E. coli*의 건조중량은 각각 120 g/L이었다(6, 7). 캡슐내부에 축적된 *E. coli*의 전세포 β -galactosidase의 활성은 30회 이상 사용하여도 초기의 활성이 그대로 유지되었으며 capsule 고정화 전세포 β -galactosidase의 최고 반응계수 V_m의 값은 free whole cell β -galactosidase의 값과 같은 값을 유지하는 장점을 보였다. Bead 고정화 *S. cerevisiae*의 whole cell invertase의 활성은 17 batch 사용후 급격히 감소하였으나 capsule 고정화 whole cell invertase의 활성은 25 batch 사용후에도 초기 값과 같이 일정한 값을 유지하는 탁월성을 보였다(8).

곰팡이류는 호기성 균주이며 균사를 형성하며 자란다. 호기성 균주는 배양중의 미생물 성장 및 생산 속도가 공급되는 산소전달량에 크게 의존된다. 박테리아의 경우에서도 이러한 현상은 종종 나타난다. 혐기성 상태에서 *E. coli*의 비성장속도는 호기성 상태에서의 비성장속도의 6-17%에 불과하며 *E. coli*에 의하여

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
Tel : 053-950-5621, Fax : 053-950-6615,
E-mail : parkjk@kyungpook.ac.kr

생산되는 β -galactosidase의 volumetric activity는 용존산소의 농도에 따라 증가한다. 그러나 *E. coli*에 의하여 생산되는 β -galactosidase의 specific activity는 용존산소의 농도에 따라 감소한다고 보고되었다(9). Calcium alginate capsule에 고정화된 *E. coli*에 의하여 생산된 β -galactosidase의 생산은 산소공급 속도의 증가에 따라 증가하였으며, air lift reactor 내에서의 β -galactosidase의 생산은 reactor 내에서의 캡슐 이동속도에 크게 의존하였다(10). Calcium alginate bead에 고정화된 *Pseudomonas putida*, *S. cerevisiae*, *A. niger* 등의 미생물을 calcium alginate bead에 고정화하는 경우, 비산소섭취속도는 bead에 고정화된 cell 양이 증가할수록 감소한다고 알려져 있다(11). 뿐만 아니라 calcium alginate에 고정화된 *A. niger*는 bead 표면에서 균사가 자라며 20시간 이상 배양하면 bead가 서로 엉기는 현상이 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 citric acid를 생산하는 *A. niger*를 calcium alginate capsule에 고정화하고 캡슐 내부에 고정화된 *A. niger*의 성장양태, 배지 용액내의 capsule loading과 반응기내의 산소공급속도가 *A. niger*의 성장 및 citric acid 생산에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

사용된 균주는 *Aspergillus niger*(KCTC 1232)이며 배지의 조성은 sucrose 60 g/L, NH_4NO_3 2.5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g/L 이다. 배지용액중 암모니아 성분이 구연산 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NH_4NO_3 의 농도는 2.5, 1.0, 0.5, 0.3 g/L의 4가지를 사용하였다.

미생물 고정화 캡슐 제조 및 배양

미생물 고정화 캡슐의 제조 및 배양과정은 전술된 바와 유사하며(12) Figure 1에 나타내었다. 30°C, 120 rpm의 shaking incubator에서 48시간 동안 *A. niger*를 현탁배양한 후 배양액 3 mL을 채취하여 3600 rpm으로 원심분리를 한 후 하부의 균주액을 분리해 낸다. 하부 균주액상의 dry cell density는 235 g/L에 달하였다. 하부 균주액 1 mL을 50 mL의 calcium chloride 용액에 섞는다. Calcium chloride 용액의 조성은 $CaCl_2$ 13 g/L, xanthan gum 0.324 g/L, nonionic surfactant(Nonoxynol $C_9H_{19}C_6H_4(OCH_2CH_2)_nOH$) 0.5 g/L 이다. 잘 회전되고 있는 0.6%(w/v) sodium alginate 용액에 혼합 calcium chloride 용액을 방울 방울 떨어뜨려서 *A. niger* 균주가 점종된 calcium alginate 캡슐을 제조한다. 캡슐의 제조와는 달리 *A. niger* 고정화 bead는 sodium alginate 용액에 하부 균주액을 섞은 혼합 sodium alginate 용액을 회전하고 있는 calcium chloride 용액에 방울 방울 떨어 뜨려 제조한다. 미생물 고정화 캡슐을 배양액에 투입하고 120 rpm의 shaking incubator나 concentric air lift reactor에서 30°C로 14일간 배양하며 citric acid를 생산한다. Concentric air lift reactor는 Figure 2에 나타낸 바와 같이 직경 4 cm의 바깥 tube와 직경이 1.5, 2.0, 2.5 cm이고 높이가 5 cm인 내부 draft tube로 이루어져 있다. Draft tube 의 1 cm 바로 아래에 있는 직경 2 cm의 sintered glass plate를 통하여 공기가 공급된다. 캡슐내부에 축적된 미생물의 건조중량은 미생물을 고정화하여 배양한 캡슐과 미생물을 고정화하지 않은 캡슐을 100°C의 항온 건조기에서 무게의

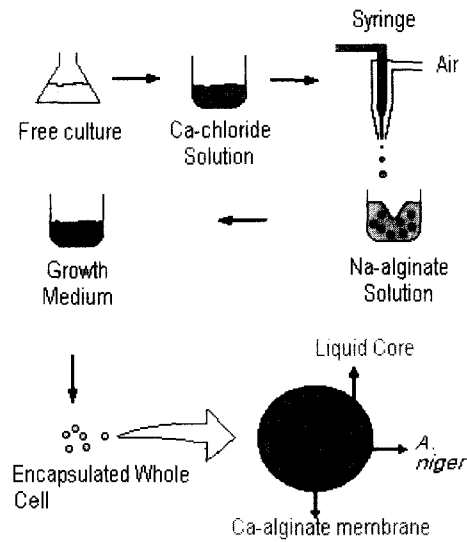


Figure 1. Schematic presentation of the capsule formation system.

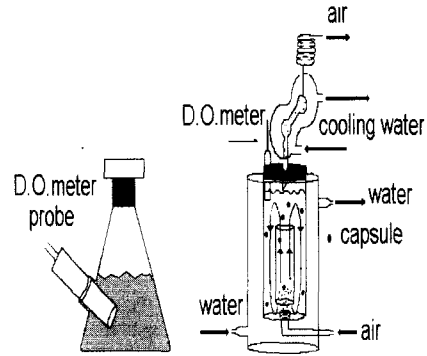


Figure 2. Schematic presentation of the concentric air lift bioreactor.

변화가 더 이상 없을 때까지 건조시켜 두 캡슐의 무게 차이를 캡슐 고정화 미생물의 건조중량으로 하였다.

설탕 및 구연산의 농도 측정

Citric acid의 농도는 Marier와 Boulet의 방법을 이용하여 측정하였다(13). 1 mL의 시료에 1.3 mL의 pyridine을 넣어 1분간 세게 섞어준 후 5.7 mL의 acetic anhydride를 추가로 넣고 교반한 후 30°C의 항온조에서 30분간 반응시켜 발색시킨다. 발색된 시료의 OD(흡광도)를 UV-VIS spectrometer(Shimadzu 1201)로 파장 420 nm에서 측정하여 검량곡선으로부터 citric acid의 농도를 환산하였다. Sucrose의 농도는 Dubois의 방법을 이용하여 측정하였다(14). Sucrose가 포함된 sample 2 mL에 phenol 0.05 mL과 H_2SO_4 5 mL을 넣어 충분히 섞는다. 30°C의 항온조 내에 20분간 보관한 후 시료의 OD(흡광도)를 UV-VIS spectrophotometer로 파장 490 nm에서 측정하여 검량곡선으로부터 sucrose의 농도를 환산하였다.

결과 및 고찰

캡슐고정화 미생물의 성장

100 mL의 배양액에 직경 2.5 mm의 캡슐 100개를 투입하고

para film으로 밀봉한 후, 30°C, 120 rpm의 shaking incubator에서 배양하면, 2일 후 캡슐이 약 3 mm로 팽창하였다. 배양 4일 후 균사가 캡슐 막을 뚫고 막외부로 나와 솜털처럼 자란다. 배양 6일 후 캡슐 내부에서 성장하는 곰팡이로 인하여 캡슐의 직경이 약 9 mm 정도로 팽창을 하였으며 캡슐 전체가 곰팡이 균사로 뒤덮여 하나의 큰 곰팡이 pellet처럼 보였다. 캡슐막내의 tortuous pore의 직경은 약 2-3 μm이며(5) 일반적으로 곰팡이의 길이는 50-500 μm, 반경은 5-150 μm로서 곰팡이는 캡슐 내부에 갇혀서 성장하여야 할 것이다. 그렇지만 곰팡이 균사가 캡슐막 밖으로 나오는 것은 균사의 성장시 미세한 어린 균사의 끝이 막의 pore를 뚫고 나와 자란 것으로 사료된다. 배양 14일 후의 캡슐을 파괴하여 캡슐내부를 현미경으로 250배 확대하여 관찰하면 균사사이의 수많은 *A. niger* conidium(포자)를 관찰할 수 있었다. 멸균된 배지 100 mL에 고정화캡슐을 500개 투입하고 14일간 배양하면 캡슐의 크기가 5mm 정도로 커졌으며 1000개를 투입할 경우 캡슐의 크기는 초기와 큰 차이가 없이 3-3.5mm에 불과하였다. 또한 캡슐의 개수가 증가할수록 균사의 형태는 덩어리가 아닌 솜털모양을 띠고 있었다. 배양 14일 동안 sucrose의 소모된 양은 100개의 경우 초기 투입 sucrose양의 70%, 1000개의 경우 84%가 소모되어 거의 비슷하지만 캡슐의 개수가 증가할수록 citric acid의 생산성은 감소하였다. 즉 배양 14일간에 걸친 sucrose의 소모량은 비슷하다더라도 1000개의 경우는 초기 증식에 sucrose가 거의 대부분 소모되어, 소모된 sucrose의 무게에 대한 생산된 citric acid의 무게로 나타낸, 생산 yield가 0.33%에 불과하지만 100개의 경우는 생산 yield가 5.85%에 달하였다.

산소공급효과

Shaking flask내에서 배양이 일어나며 산소전달이 배양액의 계면에서 이루어지는 경우, 배양액의 양에 따라 부피산소전달계수, $k_L a$ 의 값이 달라진다. 체적 250 mL의 flask에 배양액 100 mL이 채워진 경우 배양액 단위체적당 산소전달면적의 비표면적은 0.442 cm^2 로서 50 mL이 채워진 경우 1.01 cm^2 보다 2.3 배 작았다. 플라스크의 입구를 솜마개로 막고 Figure 1에 보여진 장치를 사용하여 측정하면 부피산소전달계수 $k_L a$ 의 값은 1.8 hr^{-1} 에서 2.5 hr^{-1} 로 증가하였다. 배양 flask내에 배양액 50 mL에 미생물 고정화캡슐 30개를 투입하여 배양하는 경우와 배양액 100 mL에 캡슐 60개를 투입하고 배양하는 경우의 citric acid 생산양태를 Figure 3과 4에 나타내었다. 50 mL에 캡슐 30개를 투입한 경우 배양초기 3-5일의 미생물 비성장속도, μ 가 100 mL에 캡슐 60개를 투입한 경우의 비성장속도보다 1.6배정도 증가한 것으로 나타났다. 그러나 배양시간이 10일 정도로 지나면 캡슐당의 미생물 성장량은 두 경우 큰 차이가 없었으며 citric acid 생산속도(g citric acid/L-day)도 배양기간 10일에 걸쳐 두 경우 거의 같은 값을 보이고 있다. 이는 50 mL에 30개를 투입한 경우가 100 mL에 60개를 투입한 경우보다 부피산소전달계수 $k_L a$ 가 크기 때문에 초기에는 미생물의 성장이 활발하였기 때문으로 사료된다. 그러나 배양시간이 4-5일 경과하면 flask 내에 미생물이 높은 농도로 성장하여 배양액의 양에 상관없이 용존 산소량이 부족한 상태가 되어 캡슐내부의 미생물농도나 citric acid 생산속도가 큰 차이가 나지 않는 것으로 사료된다.

내부 draft tube의 직경이 2 cm이고 air를 10 mL/sec로 공급한 경우 air lift reactor 내의 부피산소전달계수 $k_L a$ 는 150 hr^{-1} 이었다.

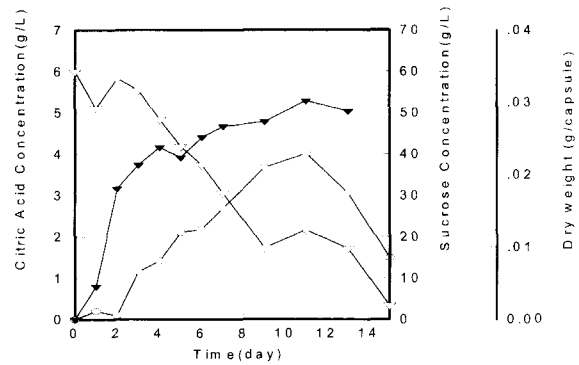


Figure 3. Citric acid production, sucrose consumption and cell growth in the shake flask incubator filled with 50 mL of medium and 30 capsules. (▽ sucrose consumption, ▼ dry cell weight of a capsule, ○ citric acid production).

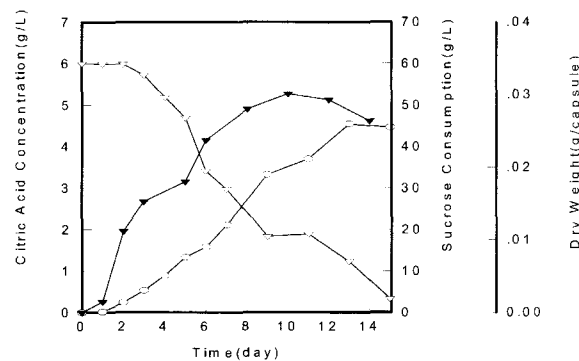


Figure 4. Citric acid production, sucrose consumption and cell growth in the shake flask incubator filled 100 mL of medium and 60 capsules. (▽ sucrose consumption, ▼ dry cell weight of a capsule, ○ citric acid production).

shaking flask내에 배양액 100 mL에 캡슐 60개, 배양액 50 mL에 캡슐 30개, air lift reactor내에 배양액 부피에대한 캡슐의 수를 shaking flask의 경우와 같은 비율로 투입하고 3개의 reactor를 동시에 배양한 결과 미생물의 성장속도를 Figure 5에 나타내었다. Air lift reactor내에서 *A. niger*를 배양할 경우 진탕배양기에서보다 훨씬 풍부한 산소를 공급받아 배양초기에 많은 성장을 하였다. 초기 2일까지는 배양액 50 mL이 들어 있는 flask에서의 비성장 속도가 비슷하였으나 산소공급량이 절대적으로 크기 때문에 배양 5일째에는 고정화 미생물의 양이 약 40% 정도 증가하였다. 그러나 약 4,5일이 경과하면 sucrose가 거의 다 소모되었고 초기성장애 sucrose가 너무 많이 소모되어 citric acid의 생산량은 2.5 g/L로 오히려 약간 감소하였다.

질소원공급에 따른 효과

Citric acid는 탄소원이 축적되고 질소원이 제한된 상태에서 생산되는데 질소원 공급상태에서 세포의 성장이 일어나고 citric acid 생산은 저하된다(15, 16). 질소원이 완전히 소모되면 세포의 성장이 멈추고 citric acid 생산이 일어난다. 앞 절에서 살펴본 바와 같이 일정한 초기 질소원 농도에서 산소원의 공급속도에 따라 미생물의 성장속도가 크게 달라짐을 알 수있다. 그러므로

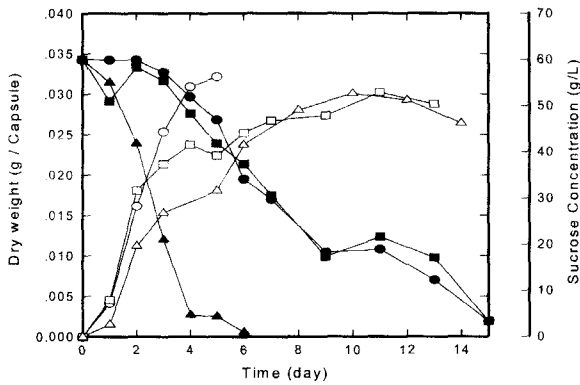


Figure 5. Dry weight of *A. niger* in the concentric airlift bioreactor and the shake flask incubator. (concentric air lift reactor: ○ dry weight, ● sucrose; shake flask 30 capsules/50 mL: □ dry weight, ■ sucrose; shake flask 50 capsules/100 mL: △ dry weight, ▲ sucrose)

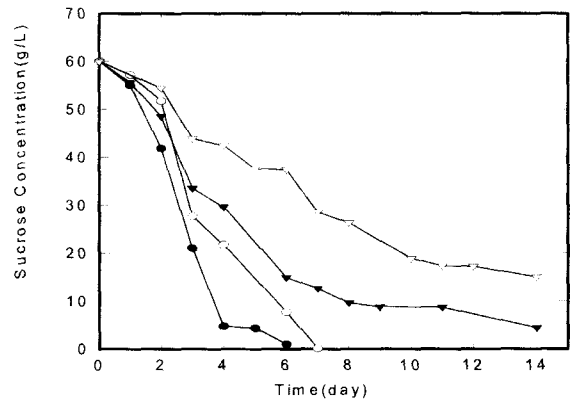


Figure 7. The effect of NH_4NO_3 level on sucrose consumption in the concentric air lift bioreactor containing encapsulated *A. niger* (● 2.5 g/L, ○ 1.0 g/L, ▼ 0.5 g/L, ▽ 0.3 g/L).

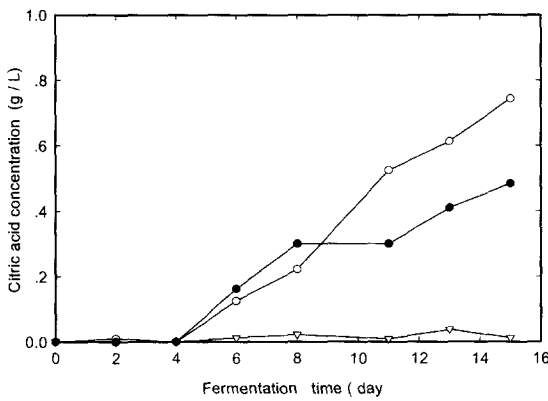


Figure 6. The effect of ammonium nitrate on citric acid production using encapsulated *A. niger* (○ 2.5 g/L NH_4NO_3 , ● 1.5 g/L NH_4NO_3 , ▽ 0.0 g/L NH_4NO_3).

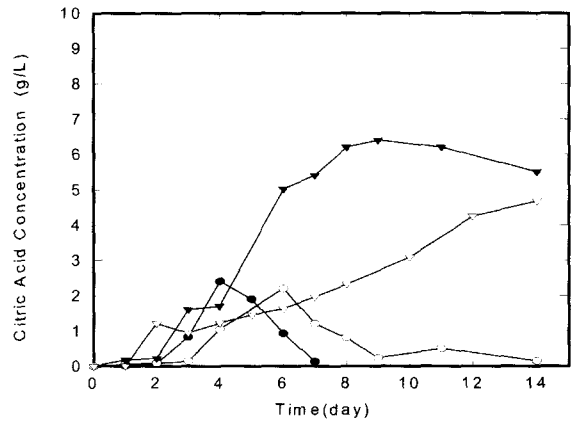


Figure 8. The effect of NH_4NO_3 level on the citric acid production in the concentric airlift bioreactor containing encapsulated *A. niger* (● 2.5 g/L, ○ 1.0 g/L, ▼ 0.5 g/L, ▽ 0.3 g/L).

산소공급속도가 다른 경우의 최적 질소원 농도에 관하여 고찰할 필요가 있다.

Aspergillus niger 균주가 접종된 캡슐 50 개를 50 mL의 배양액에 투입하고 para film으로 밀봉하고 shaking incubator에서 배양하였다. NH_4NO_3 의 농도가 2.5 g/L인 배지에서 배양하는 경우의 citric acid 생산량이 NH_4NO_3 의 농도가 1.5 g/L인 배지에서 생산되는 양보다 많으며 NH_4NO_3 의 농도가 0 g/L인 배지에서는 citric acid의 생산도 균체의 성장도 확인되지 않았다. Figure 6에서 볼 수 있듯이 질소원의 농도가 1.5 g/L로 낮은 경우 배양 8일까지는 질소원의 농도가 2.5 g/L로 높은 경우보다 citric acid의 생산량이 약간 많지만 배양 8일 후부터는 질소원의 농도가 높은 경우 citric acid의 생산량이 많아서 15일 배양 후에는 약 40% 정도의 citric acid 생산량 증가가 확인된다. 질소원은 성장에 필요한 요소이므로 충분히 높은 질소 농도에서 성장이 많이 이루어진 후 생산성이 높아짐을 알 수 있다.

공기 공급속도가 매우 큰 air lift reactor 내에서는 초기 질소원의 농도가 2.5 g/L로 높을 경우 초기 성장속도는 매우 크지만 배양 5일 후 sucrose가 모두 소모되고 citric acid의 생산량이 flask 배양의 경우보다 감소함을 알 수 있었다. 따라서 초기 질소원의 농도를 0.3 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L 및 2.5 g/L로 각각 달리

하여서 sucrose의 소모량과 citric acid의 생산량을 Figure 7 과 8에 나타내었다. Air lift reactor내의 풍부한 산소공급에 따라 초기 질소원의 농도가 높은 경우일수록 배양초기에 빠른 성장을 하여 sucrose를 빨리 소모하였고 sucrose의 농도가 약 10 g/L이하가 되면 citric acid의 생산이 중단되고 미생물에 의하여 소모되었다. 질소원의 초기 농도가 1.0 g/L 이상이 되면 빠른 성장에 sucrose가 대부분 소모되어 citric acid의 생산량이 2.5 g/L 이하로 매우 작다. 또한 초기 질소원의 농도가 0.3 g/L로 낮으면 풍부한 산소의 공급에도 불구하고 미생물의 성장이 완만하며 citric acid의 생산량도 배양시간에 따라 완만하게 증가하며 배양 14일 후 4.5 g/L에 이른다. 초기 질소원의 농도를 0.5 g/L로 하였을 경우 배양 11일 후에 sucrose의 농도가 10 g/L로 떨어지고 이때의 citric acid의 생산량은 6.4 g/L에 달하였다. 이는 shaking flask의 배양에서 얻은 최대 citric acid의 양 4.5 g/L보다 약 40% 증가한 값이다. 부피공기 전달계수를 2.5 hr⁻¹에서 150 hr⁻¹으로 증가시킴으로써 초기 질소원의 농도를 2.5 g/L에서 0.5 g/L로 줄일 수 있었고 최대 citric acid 생산량을 얻을 수 있는 배양시간을 3일 단축시킬 수 있었으며 citric acid의 최대생산량을 40% 증가시킬 수 있었다.

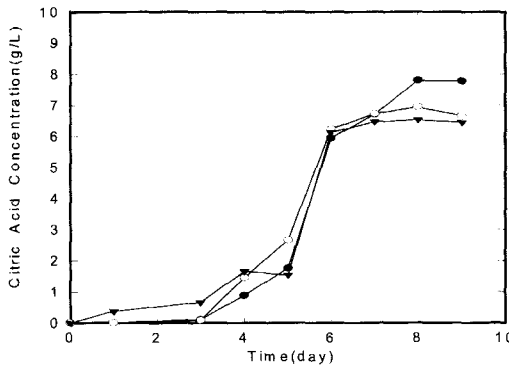


Figure 9. Effect of Di/Do ratio on the citric acid production in the concentric airlift bioreactor according to the ratio of Di/Do (Do 4 cm; ● Di 1.5 cm, ○ Di 2.0 cm, ▼ Di 2.5 cm).

공기공급 반응기의 구조에 따른 효과

Airlift reactor의 geometry에 따라 일정한 공기 공급속도에서 캡슐의 이동속도가 변화하였다. 캡슐고정화 *E. coli*를 airlift 반응기에서 배양하면서 β-galactosidase를 생산하는 경우 캡슐의 이동속도에 비례하여 β-galactosidase의 생산량이 증가하였다(10). 캡슐고정화 *C. glutamicum*을 airlift reactor 내에서 배양하는 경우 캡슐이동속도의 제곱에 비례하여 L-lysine의 생산량이 증가하였다(17). *A. niger*를 캡슐에 고정화하여 배양하는 경우 airlift reactor의 geometry에 따른 citric acid 생산량의 변화를 살펴보고 draft tube의 지름이 각각 1.5, 2.0, 2.5 cm인 bioreactor를 사용하였다. 각각의 bioreactor 내에서 동시에 캡슐고정화 *A. niger*를 배양하는 경우 citric acid의 생산량은 Figure 9에서 보는 바와 같이 배양 8일동안 반응기의 지름이 작을수록 약간의 증가가 있기는 하지만 그 값은 encapsulated whole cell β-galactosidase의 경우(10)와 비교하여 미미하다고 할 수 있다. 이는 *E. coli*나 *C. glutamicum*이 캡슐내부에 갇혀 있는데 반하여 *A. niger*는 배양 3-4일 후이면 캡슐밖으로 스며 나와 캡슐을 감싸면서 성장하기 때문에 사료된다. 즉 airlift bioreactor 내부에서는 산소공급이 풍부하여 항상 일정한 농도의 용존산소가 존재하므로 캡슐막을 통한 산소전달은 캡슐의 회전속도에 큰 영향을 받는다. 그러나 *A. niger*는 캡슐밖에 존재하여 배양액과 직접 접촉을 하고 있으므로 산소전달의 문제에 있어서는 풍부한 용존산소 속에 있는 free cell과 같은 상태이므로 캡슐의 이동속도, 즉 reactor의 geometry에 영향을 받지 않는 것으로 사료된다.

요 약

캡슐고정화 *Aspergillus niger*를 이용하여 산소공급이 구연산의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 칼슘알지네이트 캡슐에 고정화된 *A. niger*는 배양중 성장하여 2일 후에는 균사가 캡슐막을 뚫고 나왔으며 배양 8일 후에는 균사가 캡슐전체를 뒤덮었다. 배양액중의 질소원이 충분하거나 산소가 부족한 경우 균사가 느슨해졌다. 일정한 성장용액의 양에 미생물고정화 캡슐의 양이 많이 투입될 수록 구연산의 생산량은 감소하였다. 플라스크 배양의 경우 부피산소전달계수(k_{La})가 1.8 hr⁻¹에서 2.55 hr⁻¹로 증가하면 미생물의 성장속도는 증가하지만 구연산의 생산량에는 큰 영향이 없었다. 축중심 공기 부양반응기 내에서의 산소전달 속

도증가($k_{La} = 150 \text{ hr}^{-1}$)는 미생물의 성장속도는 크게 촉진시켰지만 구연산의 생산량은 오히려 감소시켰다. 그러나 중심축 공기 부양 반응기내에서 성장배지 중의 질소원 농도를 감소시키면 플라스크 배양의 생산량보다 약 40%이상 증산할 수 있었다. 뿐만 아니라 최대생산량을 얻는 최적 발효기간도 3일 정도 단축시킬 수 있었다. 캡슐고정화 미생물의 성장이나 구연산 생산량은 중심축 공기 부양반응기의 구조변화에 큰 영향을 받지 않았다.

REFERENCES

- Kierstan, M. and C. Bucke (1977), The immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 387-397.
- Ku, K., M. J. Kuo, J. Delente, B. S. Wildi, and J. Feder (1981), Development of a hollow-fiber system for large-scale culture of mammalian cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 79-95.
- Buchhoz, K. (1979), Characterization of immobilized biocatalysis, *Dechema monographs*, **86**, Verlag chmie, Weinheim.
- Nigam, S. C., I. F. Tsao, A. Sakoda, and H. Y. Wang (1988), Techniques for preparing hydrogel membrane capsules. *Biotechnol. Techniques*, **2**, 271-278.
- Cheong, S. H., J. K. Park, B. S. Kim, and H. N. Chang (1993), Microencapsulation of yeast cells in the calcium alginate membrane, *Biotechnol. Technique*, **7**, 879-884.
- Cheong, S. H., T. J. Lee, J. K. Park, and H. N. Chang (1995), L-Lysine production using encapsulated *Corynebacterium glutamicum*, *J. KICChE*, **33**, 105-112.
- Lee, B. H. and J. K. Park (1996), Encapsulation of whole cell β-Galactosidase of *Escherichia coli*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 398-404.
- Chang, H. N., G. H. Seong, I. K. Yoo, J. K. Park, and J. H. Seo (1998), Method for immobilization of whole microbial cells in calcium alginate capsules, *US Patent* 5 766 907.
- Li, X., J.W. Robbins Jr, and K.B. Taylor (1992), Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains. *J. Ind. Microbiol.*, **9**, 1-10.
- Park, J. K., G. S. Jeong, and H. N. Chang (1997), The Effect of Oxygen Transfer on the Activity of encapsulated whole cell β-Galactosidase, *Bioproc. Eng.*, **17**, 197-202.
- Gosmann, B., and H. J. Rehm (1986), Oxygen uptake of microorganisms entrapped in Ca-alginate, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 163-167.
- Cheong, S. H., T. J. Lee, J. K. Park, and H. N. Chang (1995) Citric acid production using encapsulated *Aspergillus niger*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 78-88.
- Marier, J. R., and M. J. Boulet (1958), Direct determination of citric acid in milk with unproved pyridine acetic anhydrous method, *J. Dairy Sci.*, **41**, 1683-1692.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and M. Fred (1956), Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- Kristiansen, B., and C. G. Sinclair (1979), Production of citric acid in continuous culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 297-315.
- Vaija, J., Y.Y. Linko, and P. Linko (1982), Citric acid production with alginate bead entrapped *Aspergillus niger* ATCC9142, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**, 51-54.
- Jeong, G.S. (1996), The effect of oxygen supply on the activity of microbial cells. M.S. Thesis, Dept. of Chem. Eng., Kyungpook Nat. Univ., Taegu, Korea.