

고정화 효소를 사용한 시트르산 생성에 있어서 미량원소의 영향

임동준* · 최차용

* 영남대학교 공과대학 공업화학과

서울대학교 공과대학 공업화학과

(1984년 6월1일 접수, 1984년 9월26일 채택)

Effect of Minor Elements on Citric Acid Production Using the Immobilized Yeast

Dong Joon Lim* and Cha Yong Choi

*Department of Industrial Chemistry, College of Engineering, Yeung Nam University,
Kyong San, Korea; Department of Chemical Technology, College of Engineering,

Seoul National University, Seoul 151, Korea

(Received 1, June 1984; accepted 26 September 1984)

요 약

고정화된 효소세포 *Candida lipolytica* MX 9-11R3를 세포 자체를 칼슘 알지네이트 겔에 포
괄시켜 만들었다. 이들 고정화된 효모세포를 사용하여 유동층 반응기 내에서 시트르산을 생산할때
의 미량원소의 영향을 연구하였다.

배양액 조성 가운데 포도당 이외의 다른 성분들을 제거함으로써 세포증식을 정지시킬 수 있었다.
이 포도당 용액에 황산 제 1 철을 가하였을 때는 시트르산 수율의 감소를, 그리고 포도당용액의
황산 암모니움의 초기농도를 증가시켰을 때는 시트르산 생산수율의 향상을 가져왔다.

시트르산 생성을 위한 황산아연과 황산구리의 최적농도는 각각 5 mg / liter, 0.05mg / liter였다
황산망간이나 염화칼슘의 포도당용액에의 첨가는 시트르산 생산에 대해서 뚜렷한 효과가 없다

Abstract — Immobilized yeast cells (*Candida lipolytica* MX9-11 R3) were prepared by entrapping the
whole cells in calcium alginate gel. The effects of minor elements on citric acid production were studied
using the immobilized yeast cells in a fluidized-bed batch reactor.

One could more or less prevent the cell growth using glucose as the sole nutrient in the medium and
thus removing other nutrients from the recipe for complex medium necessary for cell mass doubling.

When ferrous sulfate was added into glucose solution, the yield of citric acid was decreased whereas
increasing the initial concentration of ammonium sulfate in the glucose solution resulted in the enhance-
ment of the citric acid yield.

The optimal concentrations of zinc sulfate and cupric sulfate for citric acid production were found to
be 5mg/l, 0.05mg/l respectively. Addition of either manganese sulfate or calcium chloride into the glucose
solution had no appreciable effect on the citric acid production.

1. 서 론

시트르산은 자연성분이며 식물과 동물의 물질대사로써 식품과 약품분야에 가장 널리 이용되는 유기산의 한가지이다. 시트르산은 1784년 Scheele에 의해 레몬즙으로 부터 결정형태로 분리된 이래 1920년대 말까지만 하더라도 과일에서 분리하여 생산하였으나 오늘날에는 대부분 미생물 발효에 의해 생산되고 있다. 1893년 Wehmer는 설탕용액에서 곰팡이에 의해 시트르산이 생성됨을 보았으며 1917년 Currie [1]는 *Aspergillus niger*가 설탕과 염들로 구성된 용액의 표면에서 자랐을때 시트르산이 상당히 생성되어짐을 본 이래 곰팡이에 의한 시트르산 생성에 관해서는 많은 연구 [2~12]가 계속되어 왔다. 효모에 의한 시트르산 생성에 관한 연구는 1968년 Tabuchi등 [13]에 의해 처음으로 발표된 이래 지금까지 다수의 연구 [14]~[25]가 보고되고 있다. 효모는 *Aspergillus* 속의 경우와는 달리 이소시트르산을 부생시키나, 기질로는 탄수화물 이외에도 글리세롤, 천연유, 지방산, 초산, 낙산, 어유 n-paraffin 등을 사용할 수 있다. Tabuchi등 [17]은 n-alkane을 기질로한 복합배지에 NH_4Cl 과 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 변화시켜 시트르산과 이소시트르산 및 세포의 생성량을, Nakanishi등 [18]은 n-paraffin을 기질로한 균일계 복합배지에 있어서의 NH_4NO_3 농도의 영향을, Hattori등 [19]은 균일계에서 복합배지의 조성 변화가 시트르산과 세포의 생성량에 미치는 영향을, 그리고 Hamissa등 [25]은 포도당을 기질로한 균일계 복합배지에 있어서의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 농도의 영향을 조사하여 시트르산 생성에 대한 최적 농도가 1.2 g/l인 것을 알아내는등 여러가지 연구가 수행되어 왔다.

한편 근래에는 많은 종류의 미생물들이 고정화되어 반응이 수행되고 있는데, 세포를 고정화 함으로써 고정화되지 않은 세포에 비해 많은 장점을 지닐 수 있기 때문이다. 미생물 세포의 물리적인 결합에 근거를 둔 entapment에 의한 고정화는 agar, polyacrylamide, carrageenan, alginate등을 사용하고 있다. polyacrylamide gel에 의한 방법은 중합시 많은 열을 발생시켜 세포의 효소활성을 저해하며, 세포에 상당히 독성을 끼치며, 불규칙한 형태를 가지는

단점이 있으며, carrageenan gel은 세포 고정화 공정중 비교적 높은 온도가 요구되므로 저온에서 증식하는 세포에는 이용되기 어려우며, 담체에 세포를 많이 포괄시킬 수 없는 단점이 있다. Alginate gel [26, 27]에 의한 방법은 고정화 공정이 간단하며, 세포에 독성을 끼치지 않으며, 값이 싸고 기질 용액의 높은 주입속도에 대해서도 내압축성, 내마모성이 크다는등 여러가지 장점을 지니고 있다.

본 연구는 효모인 *Candida lipolytica* MX9-11R3 세포를 calcium alginate로 고정화시켜서 유동층 회분 반응기에서 기질인 포도당 용액에 미량원소를 첨가하여 반응을 수행하여 미량원소의 농도변화가 시트르산 생성에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 이때 기질용액은, 이미 증식된 세포를 고정화하여 사용함으로써, 세포증식에 더 이상 소비되지않고 시트르산 생성에만 주로 이용될 수 있도록 다른 영양소는 첨가하지않고 포도당만으로 되어있으며, 미량원소의 영향을 보기 위해서는 이 용액에 단일 성분의 미량원소만 첨가하였다. 이 결과와 이미 보고 [17, 18, 19, 25]된 균일계에서의 시트르산생성에 있어서 복합배지중의 미량원소의 영향을 비교하여 보았다.

2. 실험

2-1. 사용균주 및 배양

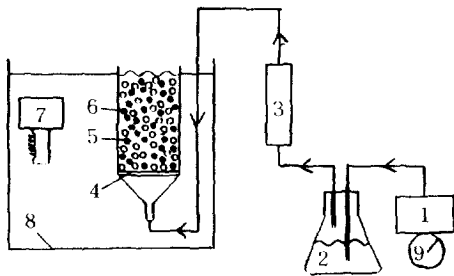
Aiba교수로 부터 분양받은 *Candida lipolytica* MX9-11 R3를 이미 보고한 방법 [28]에 의해 36시간 진탕배양하여 세포 고정화에 사용하였다.

2-2. 세포 고정화

배양된 세포를 이미 보고한 방법 [28]에 따라 calcium alginate gel에 포괄시켜 직경이 2.4mm인 bead를 만들었다.

2-3. 실험장치

본 실험에 사용된 유동층 회분 반응기는 밑부분을 유리필터로 구성하여 내경 4.2cm×높이 2.5cm의 원통형 유리컬럼을 만들어서 반응기의 밑부분에서 부터 내부로 공기를 불어 넣을 수 있도록 하였다. 반응기 내로 넣어 주는 공기의 공급은 기포발생기



1. Air generator
2. Air filtration chamber
3. Air flow meter
4. Support (sintered glass filter)
5. Beads with Immobilized cells
6. Air bubbles
7. Thermostat and circulator
8. Water bath
9. Voltage regulator

Fig. 1. A schematic diagram of fluidized-bed batch reactor system.

를 사용하였으며, 공기의 유량 속도 조절은 슬라이드스를 사용하여 수행하였다. 본 실험장치의 구성을 Fig. 1에 나타내었다.

2-4. 분석법

시트르산은 Marier와 Boulet 방법 [29]으로 하였으며, 이소시트르산은 Stern에 의한 효소 방법으로 수행하였다.

2-5. 고정화 bead내의 세포수 측정

고정화 bead내의 세포수는 이미 보고한 방법 [28]에 따라 haemocytometer로 측정하였다.

2-6. 미량원소의 영향측정 방법

유동층 회분 반응기에 고정화 bead를 900개씩 넣고, 40% (w/v)의 포도당 용액에 고정화 bead의 안정제인 CaCl_2 가 10mM 되게 포함한 용액중에 한가지 미량원소만을 농도가 각각 다르게 첨가한 용액을 100ml씩 채운 후, 공기 유량 속도를 1.2ℓ/min로 하여 28℃에서 반응을 수행하였다. 이때 반응용액중에는 포도당과 염화칼슘 및 첨가된 단일 미량원소 이외의 다른 성분은 포함되어 있지 않다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 시트르산 생성에 있어서 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 농도의 영향

유동층 회분 반응기에서 기질인 포도당 용액에 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 각각 0~20mg/l 되게 첨가한 용액으로 24시간 반응을 수행하였다. 이 결과를 Fig. 2에 나타내었는데, 여기서 시트르산과 이소시트르산의 생성량은 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 전혀 넣지 않았을 때 가장 많았으며 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 전해질수록 감소되었으나, bead내의 세포수는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 전해질수록 증가되었음을 볼 수 있다.

한편, 세포를 고정화하지 않은 균일계에서 Tabuchi등 [17]은 n-hexadecane을 기질로한 복합배지에 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 각각 0.1, 10mg/l로 하여 300ml Erlenmeyer 플라스크에서 *Candida lipolytica* No. 6-20을 배양하였다. 시트르산의 생성량은 2일째에는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 1mg/l일 때 가장 많았으나 6일째에는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 증가할수록 감소하였으며, 이소시트르산의 생성량은 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 전해질수록 증가하였으며, 세포량은 2일째에는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 1mg/l 이상에서 일정한 값에 도달하였으나 4일째에는 $\text{FeSO}_4 \cdot$

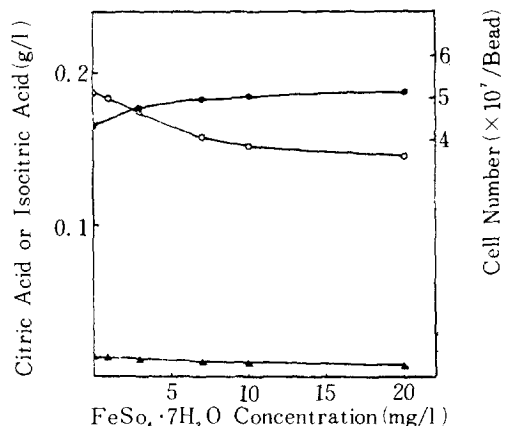


Fig. 2. Acid productions and cell number after 24 hours of reaction at various $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration in fluidized-bed batch reactor.

○ : Citric acid ▲ : Isocitric acid
● : Cell number per bead

$7H_2O$ 의 농도에 관계없이 균일하였으며 또한 최대치에 도달하였다. Hattori 등 [19]은 *n*-paraffin을 기질로 한 복합배지에 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도를 각각 0, 0.2, 2.0, 20.0 mg/l로 하여 300ml Erlenmeyer 플라스크에 *Candida zeylanoides* KY6161을 6일간 배양하였다. 시트르산과 이소시트르산의 생성량은 $FeSO_4$ 의 농도가 0.1 mg/l일 때 가장 많았으며 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도가 증가할 수록 감소되었으며, 세포량은 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도가 증가할 수록 많아졌음을 보고하였다.

본 실험에서 세포에 관해서는, Hattori 등의 data와는 같은 경향을 보였으나 Tabuchi 등의 4일째와는 달랐다. Hattori 등과 Tabuchi 등의 차이점은 탄소원의 동화속도의 차이 즉 세포증식 속도의 차이에 기인한 것으로 사료되며, 본 실험의 경우에는 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도가 증가할 수록 aconitase의 활성을 증가시켜 TCA 회로를 원활히 수행함으로써 세포증식 속도를 촉진시켜 세포수가 증가한 것으로 사료되나 반응용액 중에는 세포증식에 필요한 질소원이 포함되어 있지 않기 때문에 세포내에 존재하는 일부 영양소를 이용하여 세포수는 증가되었으나 세포의 total mass는 변하지 않았을 가능성이 있다.

시트르산에 관해서는, Tabuchi 등의 6일째 data와 Hattori 등의 data 중 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도가 0.1 mg/l 이상인 경우에는 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도가 증가할 수록 시트르산의 생산량이 감소되는 경향을 보였는데, 이것은 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도 증가로 aconitase의 활성을 증가시켜 시트르산의 축적을 감소시킨 것으로 사료된다.

이소시트르산에 관해서는, Tabuchi 등의 data와는 전혀 달랐으며, Hattori 등의 data 중 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도가 0.1 mg/l 이상인 경우와는 같은 경향을 보였으나 Fig. 2에 보듯이 이소시트르산이 시트르산에 비하여 아주 적게 생성되었다. 한편 시트르산의 생성량이 감소할 때 이소시트르산의 생성량도 함께 감소하는 경향은 Hattori 등의 경우와 같았다. 이소시트르산의 생산에 관한 이런 차이점들은 균주의 종류가 달라서, 일률적으로 설명하기에는 곤란한 것으로 생각된다.

3 - 2. 시트르산 생성에 있어서 $(NH_4)_2SO_4$ 농도의 영향

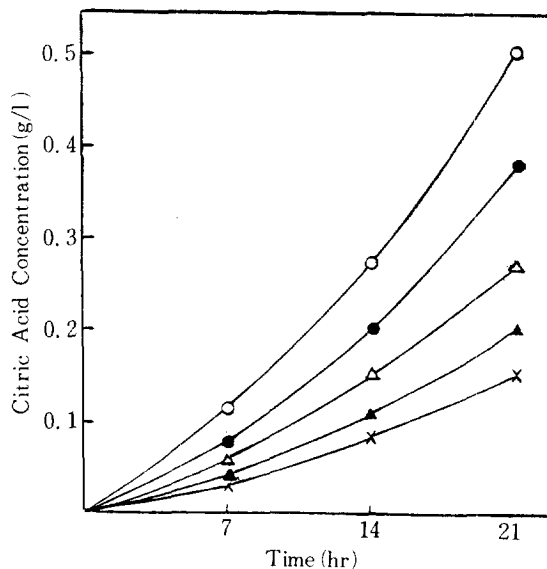


Fig. 3. Effect of initial $(NH_4)_2SO_4$ concentration on citric acid production in fluidized-bed batch reactor.

○ : $(NH_4)_2SO_4$ concentration; 10g/l
 ● : $(NH_4)_2SO_4$ concentration; 6g/l
 △ : $(NH_4)_2SO_4$ concentration; 3g/l
 ▲ : $(NH_4)_2SO_4$ concentration; 1.5g/l
 × : $(NH_4)_2SO_4$ concentration; 0g/l
 initial glucose concentration = 40g/l

유동층 회분반응기에서 기질인 포도당에 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도가 각각 0~10g/l 되게 함유한 용액으로 반응을 수행하면서 7시간마다 3ml씩 시료를 채취하여 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었으며, 또한 21시간 반응된 후의 고정화 bead내의 세포수를 측정하는 것을 Fig. 4에 나타내었다. 이 결과, 반응 용액 중에 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도가 증가할 수록 시트르산의 생성량이 증가하였으며 bead당 세포수도 증가하였다.

한편 균일계에서, Nakanishi 등 [18]은 *n*-paraffin을 기질로한 복합배지에 NH_4Cl 의 농도를 각각 1~6g/l로 하여 회분식으로 6일간 배양하였을 때 NH_4Cl 의 농도가 4g/l까지는 시트르산의 생성량이 증가하다가 그이상에서는 감소하였으며 세포량은 NH_4Cl 의 농도가 증가할 수록 증가되었음을 보고하였다. Aiba 등 [21]은 *n*-alkane을 기질로한 복합배지에 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도를 0.5g/l에서 4g/l까지 변화시켜서 회분식으로 배양하였을 때 시트르산의 생성량은 $(NH_4)_2SO_4$

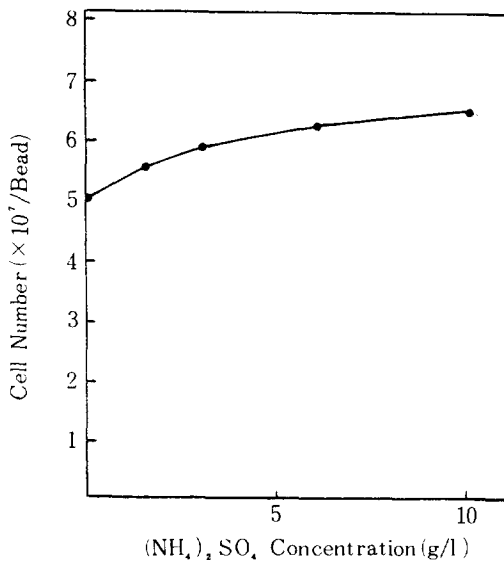


Fig. 4. Cell number after 21 hours of reaction at various initial (NH₄)₂SO₄ concentration in fluidized-bed batch reactor.

SO₄의 농도가 증가할 수록 더욱 증가하였음을 보고하였다. Hattori 등 [19]은 n-paraffin을 기질로한 복합배지에 NH₄Cl의 농도를 2g/l에서 50g/l까지 변화시켜서 80시간 배양하였을 때 NH₄Cl의 농도가 4g/l까지는 시트르산의 생성량이 증가하다가 그 이상에서는 서서히 감소하였으며, 세포량은 NH₄Cl의 농도가 진해질 수록 증가되었음을 보고하였다. Marchal 등 [20]은 회분식으로 반응을 수행할 때 초기에는 시트르산은 생성되지 않고 세포만 증식된 후 세포량이 거의 최대값에 도달한 다음 시트르산이 생성되기 시작하며, 세포증식을 결정하는 성분이 암모늄이온이라고 하였다.

본 실험에서는, 균일계의 경우와는 달리 반응 초기부터 세포증식과 함께 시트르산이 생성되었으며 (NH₄)₂SO₄의 농도가 증가할 수록 시트르산의 생성량이 증가하였음을 보였다. 반응 초기부터 세포증식과 함께 시트르산이 생성된 것은, 고정화 bead로 반응을 수행할 때 균일계와는 달리 이미 증식된 세포를 이용함으로써 반응 초기부터 시트르산을 생성시킬 수 있으며, 반응용액중에는 세포 증식에 필요한 다른 영양소가 없으므로 세포내에 존재하는 일부 영양소를 이용하여 bead내의 세포수를 증가시킨 것으로 사료된다. (NH₄)₂SO₄의 농도가 증가할 수록 시

트르산의 생성량이 계속 증가된 것은, 고정화에 의하여 NH₄⁺이온에 대한 세포막 투과능이 저하했거나 gel matrix가 NH₄⁺이온에 대하여 완충작용을 하여 bead내에 NH₄⁺이온의 농도를 낮게 유지시키므로 균일계에서처럼 시트르산의 생성량이 최대치에 도달하지 않았는데 기인한 것으로 생각해 볼 수 있다. 또한 NH₄⁺이온은 glycolysis pathway상의 fructose 6-phosphate에서 fructose 1, 6-diphosphate로 이행되는 과정에 작용하는 phosphofructokinase의 활성을 증가 [10, 31]시키며, α-ketoglutarate dehydrogenase의 활성을 억제시킬 수 있다고 보고된 바 있으므로 본 실험에서는 세포증식에 필요한 일부 영양소를 갖지 않고 반응을 수행함으로써 (NH₄)₂SO₄가 세포증식보다는 오히려 시트르산의 생성 활성을 증가시킨데 기인한 것으로도 사료되어 진다.

3 - 3. 시트르산 생성에 있어서 MgSO₄ · 7H₂O 농도의 영향

유동층 회분 반응기에서 기질인 포도당에 MgSO₄ · 7H₂O의 농도가 각각 0~2g/l 되게 함유한 용액으로 24시간 반응을 수행하였다. 이 결과를 Fig. 5에 나타내었는데, 여기서 시트르산의 생성량은 반응 용액중에 함유된 MgSO₄ · 7H₂O의 농도에 관계없이 거의 비슷하였다.

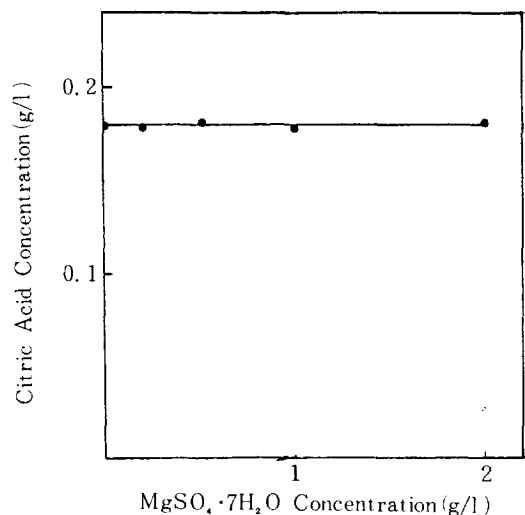


Fig. 5. Citric acid production at various concentration levels of MgSO₄ · 7H₂O in fluidized-bed batch reactor; reaction time=12 hours.

한편, 균일계에서 Hamissa등 [25]은 400ml Baxter 플라스크에서 포도당을 기질로 한 복합배지에 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 0g/l에서 1.8g/l까지 변화시켜서 *Candida lipolytica* Y-1095로 6일간 배양한 결과, 반응 용액중에 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 1.2g/l로 증가될 수록 시트르산의 생성량은 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 첨가되지 않은 경우보다 약 15% 정도로 증가되었으며, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 1.8g/l로 더욱 증가되면 시트르산의 생성량은 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 첨가되지 않은 경우와 비슷한 수준으로 감소되었음을 보고하였다.

본 실험에서는 Hamissa등과는 달리 시트르산의 생성량이 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도에 전혀 영향을 받지 않았는데, 이는 세포를 고정화함으로써 균일계로 반응을 수행한 경우보다 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 영향을 적게 받은 것으로도 생각되나, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 세포를 증식시키는 데는 필요하지만 세포가 증식된 후 시트르산의 생성에는 더 이상의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 필요하지 않은 것으로 사료된다.

3 - 4. 시트르산 생성에 있어서 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 농도의 영향

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 각각 0~20mg/l 되게 함

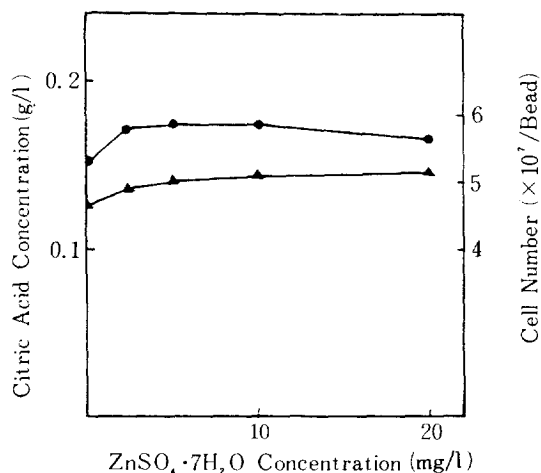


Fig. 6. Effect of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration on citric acid production and cell number after 24 hours of reaction in fluidized-bed reactor.

● : Citric acid
▲ : Cell number per bead

유한 용액으로 24시간 반응시킨 결과를 Fig. 6에 나타내었는데, 여기서 시트르산의 생성량은 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 5mg/l로 진해질 수록 증가하다가 그이상의 농도에서는 조금씩 감소되었으며, 24시간 반응한 후의 bead당 세포수는 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 진해질 수록 증가되었다.

한편 균일계에서, Hattori등 [19]은 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 각각 0.2, 2.0, 20.0mg/l로 한 복합배지에서 6일간 배양하였을 때, 시트르산의 생성량은 반응용액중에 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 2mg/l인 경우가 0.2mg/l인 경우보다 약 80% 정도 증가되었으며 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 20mg/l로 더욱 증가하면 약간 감소되었음을 보였으나, 세포량은 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 진해질 수록 증가되었음을 보고하였다.

본 실험에서는, 균일계로 반응을 수행하였을 때보다 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도 변화에 비교적 영향을 적게 받았으나, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도에 따른 시트르산의 생성량과 세포수에 관해서는 Hattori등의 보고와 비슷한 경향을 보였다. 이런 경향은 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 세포를 증식시키는 데 상당히 기여하였으며 세포 증식에 의하여 시트르산의 생성이 증가된 것으로 생각되어지며 또한 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 시트르산 생성 활성을 증가시킨 것으로 사료된다. 그러나 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 더욱 증가하면 오히려 세포당 시트르산 생성 활성이 줄어들어서 시트르산 생성량이 점차 감소한 것으로 사료된다.

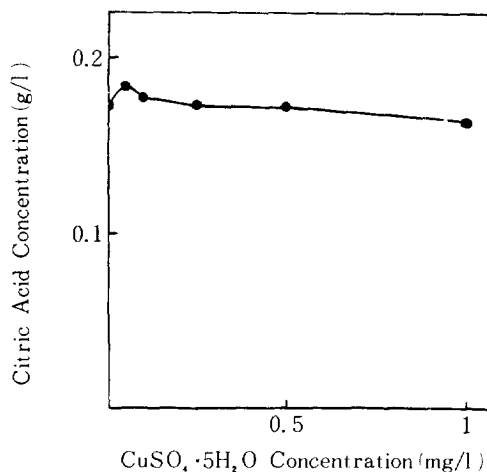


Fig. 7. Citric acid production at various concentration levels of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in fluidized-bed batch reactor; reaction time=24 hours.

3-5. 시트르산 생성에 있어서 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 농도의 영향

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 각각 0~1mg/l 되게 함유한 용액으로 24시간 반응시킨 결과를 Fig. 7에 나타내었는데, 여기서 시트르산의 생성량은 반응 용액중에 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 0.05mg/l일 때가 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하지 않았을 때보다 조금 많았으며 그 이상의 농도에서는 조금씩 줄어들었음을 볼 수 있다. 한편, Hattori등 [19]은 균일계에서 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도 변화가 시트르산 생성에 민감한 영향을 보였는데 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 0.05mg/l에서 0.01mg/l로 증가하였을 때 시트르산의 생성량은 반으로 감소되었음을 보고하였다. 본 실험에서는 균일계와는 달리 시트르산의 생성량이 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도 변화에 비교적 영향을 받지 않았는데, 이것은 고정화에 의하여 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 에 대한 세포막의 투과능이 저하했거나 alginate담체의 Cu^{++} 이온에 대한 완충효과 또는 기질에 대한 물질 전달 저항의 간접적인 결과등에 기인한 것으로 생각되어진다.

3-6. 시트르산 생성에 있어서 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 농도의 영향

유동층 화분 반응기에서 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 각각 0~20mg/l 되게 함유한 용액으로 24시간 반응시킨 결과를 Fig. 8에 나타내었는데 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 의

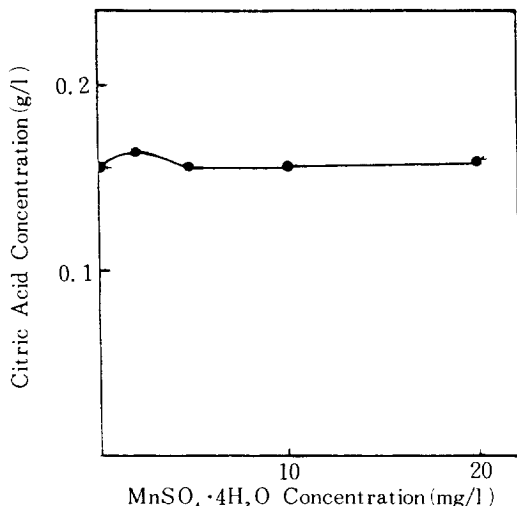


Fig. 8. Citric acid production at various concentration levels of $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in fluidized bed batch reactor; reaction time=24hours.

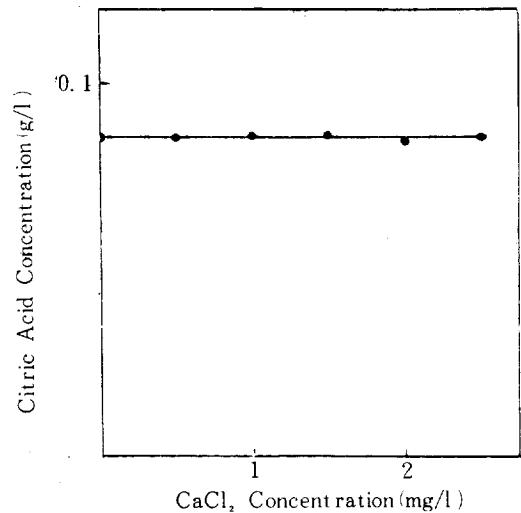


Fig. 9. Citric acid production after 12hours of reaction at various CaCl_2 concentration in fluidized-bed batch reactor.

농도가 2mg/l일 때 시트르산의 생성량이 약간 증가하였으나 그이외의 농도에서는 거의 일정하였다.

한편 균일계에서 Hattori등 [19]은 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 각각 0.2, 2.0, 20.0mg/l인 용액에서 실험한 결과 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 0.2mg/l에서 2.0mg/l로 증가함에 따라 시트르산의 생성량은 약 40% 증가하였으나 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 20.0mg/l일 때는 0.2mg/l때 보다 시트르산의 생성량이 오히려 10% 정도 감소되었음을 보고하였다.

본 실험에서는 균일계의 경우와는 달리 시트르산의 생성량이 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 의 농도 변화에 거의 영향을 받지 않았는데 이것은 alginate담체가 Mn^{++} 이온에 대하여 완충작용을 하여서 gel에 흡착 내지 평형을 유지시켜 bead내의 Mn^{++} 이온의 농도를 낮게 또한 일정하게 유지함으로써 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 의 농도에 따른 시트르산 생산성에 거의 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

3-7. 시트르산 생성에 있어서 CaCl_2 농도의 영향

고정화 bead의 안정제로 들어가는 CaCl_2 가 시트르산 생성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해서, 기질인 포도당 용액에 CaCl_2 의 농도가 각각 0~2.5g/l 되게 첨가한 용액으로 12시간 반응시켰다. 이 결과를 Fig. 9에 나타내었는데 반응용액중의 CaCl_2 의 농

도에 관계없이 시트르산의 생성량은 거의 일정하였다. 이것은 bead의 안정제로 들어가는 ClCa_2 가 시트르산 생성에 전혀 영향을 끼치지 않는다는 것으로 간주될 수 있는 결과이다.

4. 결 론

고정화 효모 세포를 유동층 회분 반응기에 넣어 포도당만으로 이루어진 기질 용액에 한 성분의 미량 원소만 첨가하여 반응시킨 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 증가할 수록 시트르산과 이소시트르산의 생성량은 감소하였으나 고정화 bead내의 세포수는 증가하였다.
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도가 증가할 수록 시트르산의 생성량과 고정화 bead내의 세포수는 증가하였다.
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도 변화에 관계없이 시트르산의 생성량은 거의 일정하였다.
4. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 5mg/l 으로 증가할 수록 시트르산의 생성량은 증가하다가 그이상의 농도에서는 조금씩 감소하였으며, bead내의 세포수는 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 증가할 수록 많아졌다.
5. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 0.05mg/l 일 때 시트르산의 생성량이 조금 증가되었으나 그 이상의 농도에서는 조금씩 줄어들었다.
6. $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 2mg/l 일 때 시트르산의 생성량이 약간 증가하였으나 그 이외의 농도에서는 거의 일정하였다.
7. CaCl_2 의 농도 변화에 관계없이 시트르산의 생성량이 일정하였는데, 이것은 bead안정제인 CaCl_2 가 시트르산 생성에 아무런 영향을 끼치지 않은 것을 의미한다.

REFERENCES

1. Currie, J.N. : J. Biol. Chem., **31**(1), 15 (1917).
2. Amelung, H.: Ehcm. Ztg., **54**, 118 (1930).
3. Perlman, D., Dorrell, W.W. and Johnson, M. J. : Arch. Biochem., **10**(3), 131 (1946).
4. Karow, E.O. and Waksman, S.A. : Ind. Eng. Chem., **39**, 821 (1947).
5. Tomlinson, V., Campbell, J.J.R. and Trussell, P.C. : J. Bact., **59**, 517 (1950).
6. Clark, D.S. : Biotech. Bioeng., **8**, 465 (1966).
7. Sanchez-Marroquin, A., Carreno, R. and Ledezma, M.: Appl. Microbiol., **20**, 888 (1970).
8. Verhoff, F.H. and Spradlin, J.E. : Biotech. Bioeng., **18**, 425 (1976).
9. Kristiansen, B. and Sinclair, C.G. : Biotech. Bioeng., **21**, 297 (1979).
10. Rohr, M. and Kubicek, C.P.: Process Biochem., **16**, Jun./Jul., 34 (1981).
11. Singh, V.K., Vadehra, D.V. and Gupta, J.K.: Enzyme Microb. Technol., **3**, Oct., 341 (1981).
12. Sodeck, D., Modl, J., Kominek, J. and Salzbrum, W. : Process Biochem., **16**, Oct./Nov., 9 (1981).
13. Tabuchi, T., Tanaka, M. and Abe, M.: J. Agr. Chem. Soc. Japan, **42**, 420 (1968).
14. Tabuchi, T., Tanaka, M. and Abe, M.: J. Agr. Chem. Soc. Japan, **43**, 154 (1969).
15. Abe, M., Tabuchi, T. and Tanaka, M.: J. Agr. Chem. Soc. Japan, **44**, 493 (1979).
16. Tanaka, M., Tahara, Y., Tabuhi, T. and Abe, M.: J. Agr. Chem. Soc. Japan, **44**, 499 (1979).
17. Tabuchi, T., Tanaka, M., Tahara, Y. and Abe, M. : J. Agr. Chem. Soc. Japan, **44**, 562 (1970).
18. Nakanishi, T., Yamamoto, M., Kimura, K. and Tanaka, K., J. Ferment. Technol., **50**(12), 855 (1972).
19. Hattori, K., Yokoo, S. and Imada, O.: J. Ferment. Technol., **52**, 542 (1974).
20. Marchal, R., Chaude, O., and Metche, M.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech., **4**, 111 (1977).
21. Hyun, H.H., Aiba, S. and Matsuoka, M.: Annual Reports of International Center of Cooperative Research and Development in Microbial Engineering, **1**, 227,

- Faculty of Engineering Osaka University (1978).
22. Aiba, S. and Matsuoka, M.: Eur. J. Microbiol. Biotech., **5**, 247 (1978).
 23. Briffaud, J. and Engasser, M. : Biotech. Bioeng., **21**, 2083 (1979).
 24. Aiba, S. and Matsuoka, M.: Biotech. Bioeng., **21**, 1373 (1979).
 25. Hamissa, F.A. and Abou-Zeid, A.Z.A. : Agr. Wasters, **3**, 21 (1981).
 26. Kierstan, M. and Bucke, C.: Bioetch. Bioeng., **19**, 387 (1977).
 27. Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W. and Bucke, C. : Biotech. Bioeng., **21**, 2155 (1979).
 29. Marier, J.R. and Boulet, M. : J. Dairy Sci., **41**, 1683 (1958).
 30. Stern, J.R.: "Methods in Enzymology Vol.3", P. 425 Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., ed., Academic Press, New York (1957).
 31. Yoshino, M. and Murakami, K. : J. Biol. Chem., **257**, 10644 (1982).