

*Rhizopus oryzae*를 이용한
푸마르산 생산에 있어서 탄소원과 질소원의 영향

김진남 위영중, 류화원

전남대학교 화학공학부, 전남대학교 생물산업기술 연구소,
전화 (062) 530-1842, FAX (062) 530-1849

Abstract

The production of fumaric acid in shaken flask cultures by *Rhizopus oryzae* KCTC 6946 was studied. The effects of various carbon and nitrogen sources on fumaric acid production were investigated. The strain fermented starch (or glucose) and corn steep liquor (or polypepton) better than other carbon and nitrogen sources to fumaric acid. When C/N ratio of carbon and nitrogen source was 41.7, the concentration of fumaric acid produced with 2N NaOH as a neutralizing agent was more than 10 g/L after 3 days.

서론

푸마르산은 세포대사 경로의 중간 산물로서, 4개의 탄소가 1개의 이중결합으로 연결되어 2개의 카르복실기를 갖고 있어 산업적으로 합성수지와 생분해성 고분자의 제조, 종이, 의약품, 식품 산업 등에 그 응용성이 매우 큰 유기산이다.

미생물에 의한 발효는 산업적 규모로 푸마르산을 생산할 수 있지만 경제적인 이유에 의해 좀더 생산비용이 적게 드는 발암성 물질인 벤젠의 산화에 의해 생성되는 말레산의 산-축매 이성질화에 의해 푸마르산을 생산하고 있다. 따라서 의약품이나 식품산업에서는 그 사용에 있어서 많은 제약을 받아왔다^{1,2}. 그러나 좀더 값이 싸고 쉽게 이용할 수 있는 기질의 사용에 의한 생물공학적인 대체 방안의 개발로 인해 발효에 의한 푸마르산의 생산이 가능하게 되었다.

푸마르산을 생산할 수 있는 미생물은 대부분 곰팡이 종으로서 Wright 등(1996년)은 ¹⁴C 방사선 동위원소를 사용하여 *Rhizopus oryzae*로부터 2개의 구별된 피루브산 대사경로를 통해 미토콘드리아와 시토플라스마에서 푸마르산이 생성된다고 보고하였으며³, Petruccioli 등(1996년)은 폴리우레탄에 고정화시킨 균주를 사용하여 푸마르산을 생산하였다¹.

새로운 형태의 반응기인 RBC (rotary biofilm contactor)를 이용한 발효는 부착된 균사체를 재 사용할 수 있고 기포가 생성되지 않으며 교반탱크 발효조에 비해 무엇보다도 공기와의 접촉이 용이하여 발효속도가 매우 빠르다는 장점이 있다. Cao 등(1997년)은 이러한 RBC를 사용하여 75%의 수율로 74 g/L의 푸마르산을 생산하였다⁴. 이에 본 연구에서는 *R. oryzae*를 이용하여 최적 탄소원과 질소원을 탐색하고

탄소원과 질소원의 비율 조사함으로써 RBC를 이용한 푸마르산 발효를 위한 기초자료를 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 보관

Rhizopus oryzae KCTC 6946은 한국과학기술원 부설 생명공학연구원 유전자원센터 유전자은행에서 분양 받았으며, PDA 배지에 분양 받은 균주를 항온배양기를 이용하여 32°C에서 5일 배양한 후 0.1% Tween 60을 포함한 0.05M 인산염 완충액(pH 6.8)으로 현탁하여 수확한 포자를 글리세롤과 1:1로 혼합하여 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

배지조성 및 배양

배지조성은 0.25 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.088 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g/L KH_2PO_4 를 기본으로 하여 탄소원 종류별로 각각 50 g/L, 질소원 종류별로 1.0 g/L이었다. 250 mL erlenmeyer 플라스크에 포자현탁액을 조업액의 5%를 접종하고 2N NaOH를 사용하여 pH 5.5로 조절하면서 진탕배양기 (KCM-8480 SF, Vision Co., Korea)에서 35°C, 200 rpm으로 3일 동안 배양하였다.

분석방법

세포건조중량은 발효가 끝난 후 균사를 제외한 다른 잔류물질들과의 오차를 줄이기 위하여 발효액을 1.3%의 묽은 염산과 증류수로 세척한 후 필터에 여과하여 vacuum dry oven (Jcio Tech. Co., Korea)에서 80°C로 항량이 될 때까지 건조시켜 건조중량을 측정하였다. 탄소원 측정은 DNSA법과 페놀-황산법에 의해 분광광도계 (UV-160, Shimadzu Co., Japan)를 이용하였으며 푸마르산은 HPLC (Waters Ltd., USA)를 이용하여 분석하였다. 사용된 컬럼은 Aminex HPX-87H ion-exclusion column (Bio-Rad Co., USA)이고 이동상은 5mM H_2SO_4 , 유량은 0.6 mL/min, 검출기 (Waters 486, Waters Ltd., USA)는 UV 210 nm, 컬럼 온도는 35°C이었다.

결과 및 고찰

푸마르산 생산에 대한 최적 탄소원을 알아보기 위하여 전분, 글루코스, 말토스, 갈락토스, 프룩토스를 기질로 하여 배양하였다. 이때 초기 pH는 5.5로 하였으며 4시간 간격으로 pH를 조사하여 2N NaOH로 pH를 조절하였다. Fig. 1에서 전분을 기질로 하였을 때 약 9 g/L의 푸마르산이 생성되어 이들 탄소원 중 가장 높은 푸마르산을 생성하였다. 이는 *Rhizopus*속의 균체의 효소인 당화효소가 전분을 글루코스로 분해하여 대사과정에 이용했기 때문이며 7.8 g/L의 생산량을 나타낸 글루코스보다 높은 이유는 글루코스와 같은 농도의 전분을 사용했을 때 전분으로부터 분해된 글루코스 농도가 더 많았기 때문으로 사료된다. Fig. 2에 최적 탄소원으로 판명된 전분 농도에 따른 푸마르산 생성량을 나타내었다. 80 g/L의 전분에서 가장 높은 푸마르산을

생성하였으며 낮은 농도의 질소에서는 기질의 부족으로 인하여 푸마르산 생성량이 약 50%로 감소하였으며 고농도의 기질에서는 기질저해에 따라 푸마르산 생성량이 감소하였다. Fig. 3은 여러 가지 질소원에 대한 푸마르산 생성을 나타낸 것이다. 폴리펩톤을 질소원으로 사용했을 때 가장 많은 푸마르산을 나타내었으며 그 다음으로 옥수수 침지물(CSL)이었다. 맥아추출물을 제외하고 복합질소원을 사용했을 때 무기질소원보다 대체적으로 더 많은 푸마르산을 생성하는 것으로 나타났다. *Rhizopus*속은 일반적으로 배지내의 질소원이 고갈되었을 때 성장을 멈추고 생산물을 생성하는 2차 대사과정을 나타낸다. 그러므로 최적의 탄소원과 질소원의 비를 알아보기 위하여 탄소원은 50 g/L로 고정하고 질소원으로써 CSL의 농도를 달리하여 Fig. 4에 나타내었다. C/N 비가 41.7일 때 10.3 g/L의 푸마르산이 생성되었으며 그 이상의 C/N 비에서는 질소원의 부족으로 인하여 균사가 성장하지 못해 푸마르산 생산이 점차적으로 감소한 것으로 나타났으며, 41.7이하의 C/N 비에서는 질소원이 고갈되지 않아 균사체가 계속 성장하는 과정에 있으므로 푸마르산 생성이 낮은 것으로 사료된다. Fig. 5는 시간에 따른 푸마르산 발효를 나타낸 것이다. 약 10시간 정도의 유도기를 나타낸 이후 발효 80시간일 때 최대의 푸마르산을 생성하였으며 그 이후부터는 점차 감소하였다. 이는 축적된 푸마르산을 균사체가 대사 시킴으로써 나타난 결과로 사료된다. 균사체 성장은 발효 10시간 이후부터 40시간까지 급격히 증가하다가 그 이후부터 성장속도가 매우 느린 점으로 보아 역시 2차 대사과정을 나타내었다.

감사의글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R02-2000-00175)지원으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Petruccioli, M., E.Agniani, and F.Federici, "Semi-continuous fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus* ummobilized in polyurethane."(1996), *Proc. Biochem.*, **31(5)**, 463-469.
2. Gangl, I.C., W.A. Weigand, and F.A. Keller, "Economic comparison of calcium fumarate and sodium fumarate, production by *Rhizopus arrhizus*."(1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/25**, 663-677.
3. Wright, B.E., A. Longacre, and J. Reimers, "Models of metabolism in *Rhizopus oryzae*."(1996), *J. Theor. Biol.*, **182**, 453-457.
4. Cao, N., J. Du, C. Chen, C.S. Gong, and G.T. Tsao, "Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus* using rotary biofilm contactor."(1997), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63-65**, 387-394.

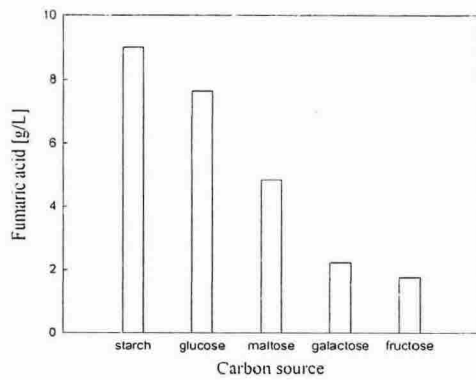


Fig. 1. Effect of various carbon source on the production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae*. [carbon source 50 g/L, nitrogen source 1 g/L CSL, 35°C, 200 rpm, 3 day]

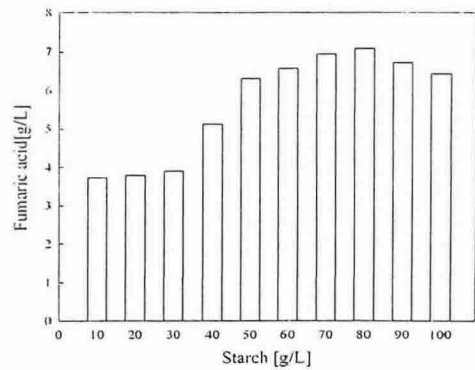


Fig. 2. Effect of the starch concentration on fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*.

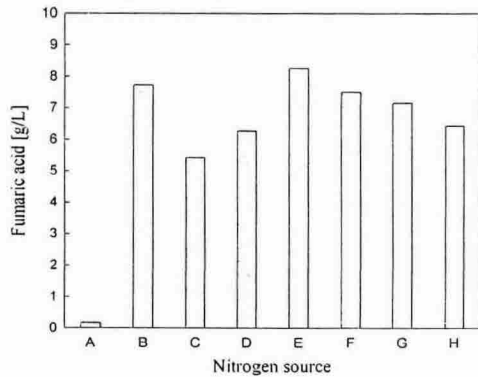


Fig. 3. Effect of various nitrogen source on the production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae*. [(A) malt extract, (B) CSL, (C) ammonium chloride, (D) ammonium sulfate, (E) polypepton, (F) bactopecton, (G) yeast extract, (H) urea]

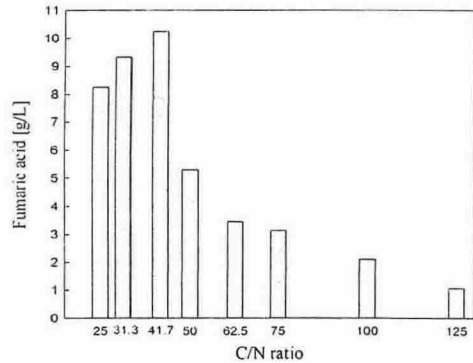


Fig. 4. Fumaric acid production as a function of C/N ratio.

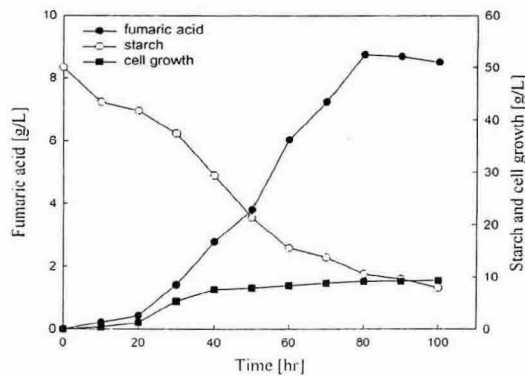


Fig. 5. Profiles of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* KCTC 6946.