

Production of fumaric acid with rotary biofilm contactor
by *Rhizopus oryzae* KCTC 6946

김진남, 위영중, 윤중선, 류화원
전남대학교 응용화학공학부, 생물산업기술연구소
전화 (062) 530-1842, FAX (062) 530-1849

Abstract

In this study, biological production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* KCTC 6946 using rotary biofilm contactor was investigated. In study of neutralizing agent on fumaric acid production, Na_2CO_3 was more effective than NaOH . After 24 hr of incubation with a rotating speed of 10 rpm at 35°C , biofilm was grown on and around the surface of the disks. The yield and volumetric productivity of rotary biofilm contactor were 33.8% and $0.595 \text{ g/L} \cdot \text{h}$, respectively, with the optimum effective disk surface area of $1,583 \text{ cm}^2/\text{L}$.

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-촉매 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 생물공학적 대체 방안의 개발로 인해 발효에 의한 푸마르산의 생산이 가능하게 되었다.

일반적으로 곰팡이 균주는 매우 호기성이기 때문에 곰팡이 균주를 이용한 발효에서는 산소 전달이 필수적이지만, *Rhizopus*속을 포함한 곰팡이 균주는 포자가 발아하여 균사를 형성할 때 그 응집력이 매우 크기 때문에 산소전달이 어렵게 된다. 이러한 산소전달 문제를 해결하기 위하여 여러 가지 고정화방법이 연구되었다. Petruccioli 등³과 Kautola 등⁴은 폴리우레탄을 이용한 고정화를 통해 푸마르산과 젖산을 각각 생산하였으나 이러한 고정화에 의한 산소 전달은 배지내의 용존산소에 의존하기 때문에 이보다 더 뛰어난 산소전달 시스템의 도입이 요구되었으며 회전식 생물막 접촉 반응기 (RBC, rotary biofilm contactor)가 고안되었다.

Cao 등⁵은 이러한 RBC 시스템을 이용한 *Rhizopus oryzae* ATCC 20344 균주의 생물막 형성을 통해 고농도의 푸마르산을 생산한 바 있으며, Jianlong⁶은 RBC를 통한 *Aspergillus niger*를 이용해 시트르산을 생산하였다.

이러한 RBC를 이용한 발효는 생물막을 형성한 균사체를 재 사용할 수 있고 배지내에 기포가 생성되지 않으며 교반탱크 발효조에 비하여 무엇보다도 공기와의 접촉이 용이하여 산소전달이 매우 뛰어나다는 장점이 있다.

따라서 본 연구는 산업적으로 매우 중요한 여러 유기산중 석유화학적 합성공정에 의한 푸마르산 생산을 대체할 수 있는 방안으로써 매우 풍부하고 재생가능한 전분으로부터 산소전달이 매우 뛰어난 회전식 생물막 접촉 반응기를 이용한 생물공학적 발효공정에 의한 푸마르산을 생산하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

균주 및 보관

Rhizopus oryzae KCTC 6946은 한국과학기술원 부설 생명공학연구소 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 성장배지에서는 탄소원으로 30 g/L의 전분과 질소원으로 2.0 g/L의 우레아를 사용하였으며, 생산배지에서는 전분 80 g/L, 옥수수 침지액 1.0 g/L를 각각 탄소원과 질소원으로 사용하였다.

성장배지와 RBC를 고온가압멸균기를 이용하여 121°C, 15 psi에서 15분간 멸균한 후 포자현탁액을 접종하였으며, 공기공급속도 1.5 vvm, 35°C, 10 rpm, pH 5.5로 24시간 동안 배양하여 회전판에 균사에 의한 생물막을 형성시켰다. 그후 멸균한 생산배지를 연동펌프를 이용하여 교체한 후 공기 공급속도 1.5 vvm, 35°C, 15 rpm으로 발효를 수행하였다.

분석방법

세포건조중량은 발효가 끝난 후 균사를 제외한 다른 잔류물질들과의 오차를 줄이기 위하여 1.3%의 묽은 염산과 증류수로 생물막을 세척한 후 vacuum dry oven (Jeio Tech. Co., Korea)에서 80°C로 항량이 될 때까지 건조시켜 건조중량을 측정하였다. 탄소원 측정은 DNSA법과 페놀-황산법에 의해 분광광도계(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, 컬럼온도는 35°C이었다.

결과 및 고찰

성장배지에서 포자현탁액을 접종하여 6 시간 후에 포자가 발아하기 시작하였으며 배양 12 시간 정도에 디스크 표면에 얇은 막을 형성하기 시작하여 24시간 후에 완전한 생물막을 형성하였다. 그 후 배지를 생산배지로 교체하여 발효를 수행하였다. Fig. 1(A)에서 볼 수 있듯이 발효 44시간만에 최대의 푸마르산 (18.1 g/L)을 생산하였으며 회전식 생물막 접촉 반응기를 이용한 배양에서 수율은 24.86%, 부피생산성은 0.411 g/L·h였다. Fig. 1(B)는 중화제

로서 Na_2CO_3 를 사용한 결과로 비록 NaOH 를 사용했을 때 보다 생산된 푸마르산(16.9 g/L)은 조금 낮았지만 발효시간이 매우 단축됨으로써 수율은 23.74%, 부피생산성은 0.545 g/L·h였다. 따라서 이후의 실험부터는 5 N Na_2CO_3 를 중화제로 사용하였다. 다음은 균사체가 부착할 수 있는 디스크 유효표면적에 대한 영향을 알아보았다. Fig. 2(A)와 Fig. 2(B)는 유효 디스크 표면적이 각각 1,583 cm^2 (7 disks), 2,034.7 cm^2 (9 disks)인 결과를 나타낸 것으로서 발효 39시간에 최대 푸마르산 (23.2 g/L)을 생산하였으며 수율은 33.38%, 부피생산성은 0.595 g/L·h였고, Fig. 2(B)의 경우 36시간에 20.2 g/L의 푸마르산을 생산함으로써 수율 29.97%, 부피생산성은 0.561 g/L·h로 나타났으며 Table 1에 정리하였다. 이러한 결과는 1997년 Akihiko 등⁷이 회전식 디스크 반응기 (RDC)를 이용한 시트르산 생산에서 비생물막 면적 (specific biofilm area)이 증가할수록 시트르산의 생산속도도 증가한다는 결과와 대체적으로 유사하였다. 이러한 결과로 곰팡이 균주를 이용한 푸마르산 발효에서 균사체가 부착할 수 있는 유효 디스크 표면적에 많은 영향을 받음을 알 수 있었고 이는 표면적이 증가함으로써 균사체와 산소와의 접촉면적이 증가함에 따라 산소전달이 더 원활히 이루어졌다는 것을 의미하며 최적 유효 표면적은 1,583 cm^2 로 나타났다.

감사의글

본연구는 한국과학재단 목적기초연구 [R02-2000-00175] 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

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. Petruccioli, M., E. Angiani, and F. Federici, "Semi-continuous fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus* immobilized in polyurethane sponge." , (1996), *Proc. Biochem.*, 31:463-469.
4. Kautola, H. and Linko, Y.Y., "Fumaric acid production from xylose by immobilized *Rhizopus arrhizus* cells." , (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31:448-452.
5. Cao, N., J. Du, C.S. Gong, and G.T. Tsao, "Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and adsorption column." , (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2926-2931.
6. Jianlogn, W., "Production of citric acid by immobilized *Aspergillus niger* using a rotating biological contactor (RBC).", (2000), *Biores. Technol.*, 75:245-247.
7. Sakurai, A., H. Imai, Y. Takenaka, and M. Sakakibara, "Simulation of citric acid production by rotating disk contactor.", (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 56:689-696.

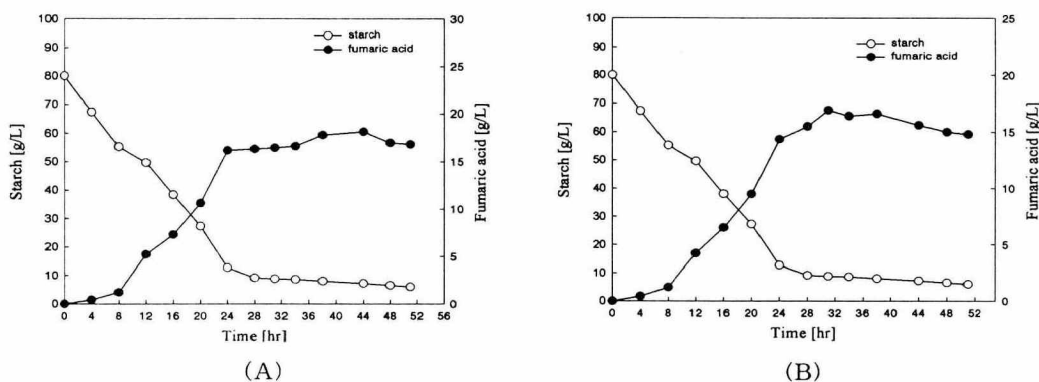


Fig. 1. Time course of fumaric acid production using RBC by *R. oryzae* KCTC 6946. [effective surface area 1,130.4 cm², neutralizing agent 2 N NaOH (A), 5 N Na₂CO₃ (B)]

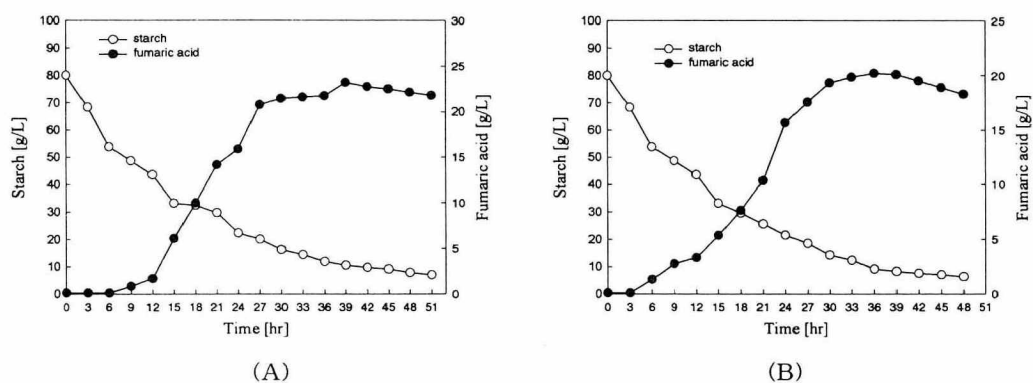


Fig. 15. Effect of disk surface area on fumaric acid production by *R. oryzae* KCTC 6946 using an RBC. [effective surface area 1,583 cm²(A), 2,034.7 cm²(B), neutralizing agent 5 N Na₂CO₃]

Table 1. Effect of disk surface area on fumaric acid production, yield, and productivity by *Rhizopus oryzae* KCTC 6946 using an RBC

Effective surface area [cm ²]	Neutralizing agent	Time [h]	Fumaric acid [g/L]	$Y_{F/(So-S)}$ [%]	P [g/L · h]	Cell mass [g/L]
1,130.4	2 N NaOH	44	18.1	24.86	0.411	2.91
1,130.4	5 N Na ₂ CO ₃	31	16.9	23.74	0.545	3.05
1,583	"	39	23.2	33.38	0.595	3.10
2,034.7	"	36	20.2	27.97	0.561	3.32

* F, fumaric acid; So, initial starch; S, residual starch