

실관 생물반응기에 고정화된 *Enterococcus faecalis* RKY1에 의한 숙신산 생산특성

위 영 중 · 윤 종 선 · 류 화 원
전남대학교 화학공학부, 생물산업기술연구소
(접수 : 2002. 2. 26., 게재승인 : 2002. 4. 20.)

Characteristics of Succinic Acid Production by *Enterococcus faecalis* RKY1 Immobilized in a Hollow Fiber Bioreactor

Young-Jung Wee, Jong-Sun Yun, and Hwa-Won Ryu†
Faculty of Chemical Engineering, Institute of Bioindustrial Technology, Chonnam National University, Gwangju
500-757, Korea
(Received : 2002. 2. 26., Accepted : 2002. 4. 20.)

Enterococcus faecalis RKY1 cells were immobilized in an asymmetric hollow fiber bioreactor for application to the continuous production of succinic acid. The media was fed into shell-side of the module using a peristaltic pump, and the products were collected through lumen-side outlet. The number of hollow fibers within the module did not affect the bioreactor efficiency in the transverse operated hollow fiber bioreactor. The steady state at the outlet of hollow fiber bioreactor was reached after 24 hr cultivation at flow rate of 0.25 mL/min, 12 hr at 0.5 mL/min, and 9 hr at 1.0 mL/min, respectively. The succinate and fumarate concentrations within the hollow fiber bioreactor, however, were as changeful as increasing the flow rate. During continuous operation with the flow rates between 0.5 and 2.0 mL, the productivity of succinate was 8.0-10.9 g/L · hr at 30 g/L fumarate, 4.9-14.9 g/L · hr at 50 g/L fumarate, and 7.2-17.1 g/L · hr at 80 g/L fumarate, respectively.

Key Words : *Enterococcus faecalis*, succinic acid, fumaric acid, bioconversion, hollow fiber bioreactor

서 론

숙신산 (HOOCCH₂CH₂COOH)은 세포대사과정 중의 TCA 회로 (tricarboxylic acid cycle) 상에 존재하는 중간체로서 식품, 의약품, 향생제, 직물, 도금 및 가스세정 등에 응용되는 매우 폭 넓은 용도를 지니고 있는 C₄-화합물이다(1-3). 특히 1,4-butanediol, tetrahydrofuran, γ -butyrolactone 등의 고부가가치 화학원료 합성에 유용한 전구물질로서 널리 이용되고 있다(4,5). 또한 숙신산은 계면활성제, ion chelator, 식품 (acidulant, flavoring agent, anti-microbial agent), 건강관련 제품 (의약품, 향생제) 등 네 가지의 주요 시장을 형성하고 있으며, 전세계적으로 연간 약 \$ 4억 정도의 시장을 형성하고 있다(6). 현재 산업적으로 생산되는 숙신산의 경우 n-butane으로부터 maleic anhydride로 산화하고 이 maleic anhydride를 maleic acid로

가수화시킨 후 다시 수소화 반응을 거쳐 합성되는 석유화학 적 합성공정에 기초하여 생산되고 있으나, 생물공학 적 공정에 의한 숙신산 생산에 관한 산업화의 예는 거의 없는 실정이다. 하지만, 원유의 고갈 및 환경문제 유발 등 여러 가지 이유로 인하여 석유화학 적 합성공정에 의한 숙신산 생산공정을 미생물을 이용한 생물공학 적 생합성 공정으로 대체하기 위한 연구에 관심이 집중되고 있다(6,7). 지금까지 미생물을 이용한 숙신산 생산에 널리 이용되고 있는 균주로서 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*(8-10)가 알려져 있지만, 이 균주는 매우 엄격한 혐기세균으로 조작시 많은 문제점을 안고 있을 뿐만 아니라 발효원료액 중에는 숙신산 외에 아세트산, 포름산 및 젖산 등 여러 부산물이 동시에 생성되어 숙신산 회수 및 정제공정을 복잡하게 만드는 단점을 가지고 있어 숙신산 생산공정을 산업화하는데 큰 애로사항이 있는 실정이다(3,11). 최근에는 'Michigan Biotechnology Institute'에서 숙신산을 생산할 수 있는 통성 박테리아인 *Actinobacillus succinogenes* 130Z를 분리한 바 있으며(12), 본 연구에서와 유사한 생물전환 공정으로서 Wang 등(13)은 fumarate reductase 활성을 증폭시킨 재조합 *Escherichia coli*를 이용하여 푸마르

†Corresponding Author : Faculty of Chemical Engineering,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1842, Fax : +82-62-530-1849
E-mail : hwryu@chonnam.ac.kr

산으로부터 숙신산을 생산한 바 있다. 본 연구에 사용된 *Enterococcus faecalis* RKY1은 수소수용체로서 푸마르산의 존재하에 수소공여체로서 글리세롤을 대사시킴으로서 푸마르산으로부터 숙신산을 고수율로 생물전환할 수 있는 능력이 탁월한 균주이다(11,14). 또한 *E. faecalis* RKY1을 이용한 숙신산 생물전환 공정은 기질인 푸마르산을 거의 순수한 형태의 숙신산으로 환원시키기 때문에 숙신산 회수 및 정제에 큰 장점을 갖는다(14).

생물화학공정 중에서 가장 널리 이용되고 있는 발효공정은 연속조업 도중 미생물이 회석되며 생성물의 분리 및 정제가 어려운 문제점을 지니고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위한 중요한 결실의 하나가 고정화 미생물을 이용한 공정이며, 그 중에서 실관 생물반응기 (hollow fiber bioreactor, HFBR)를 이용한 미생물의 고정화는 다른 고정화 방법에 비하여 많은 장점을 갖는다(15). 즉, HFBR은 미생물이 lumen-side 흐름과 막을 사이에 두고 분리된 상태로 존재하므로 생산물로부터 미생물을 분리하는 공정이 필요 없으며, 단위 부피당 큰 반응표면적을 가지므로 효소(16), 미생물(17,18) 및 동·식물 세포(19)의 고정화 반응기로서 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 불용성 기질을 사용할 경우 막의 기공이 막힘으로서 장기간 조업이 어려워지고, 유기용매의 사용이 다소 제한되며, 막의 재질에 따라 고온·고압일균 조치가 불가능하다는 단점을 가지고 있다. 또한 반응기의 구조상 기체의 원활한 공급이 어렵기 때문에 산소 소비속도가 빠른 호기성 미생물 배양을 위해서는 이중실관 생물반응기 등의 특수한 설계가 필요하며(20,21), 반응기 내에서의 세포성장 및 산물의 분포양상 등에 대해서는 직접적인 측정이 불가능하다(15). 따라서 본 연구에서는 숙신산의 연속생산을 위하여 본 연구진에 의하여 분리된 바 있는 *E. faecalis* RKY1을 HFBR의 shell-side에 고정화시켜 숙신산 생산특성에 관하여 연구하였으며, HFBR 내에서의 숙신산 및 푸마르산 분포를 조사함으로써 반응기 내의 생물전환 형태를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 보관

사용균주는 본 연구진에 의하여 분리 및 동정된 바 있는 통성의 그람양성 박테리아인 *E. faecalis* RKY1(3,11,14)으로서 한국과학기술원 부설 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행에 KCTC 8890P의 수탁번호로 기탁되어 있다. 균주는 실험에 사용하기 전 2일 동안 12시간 간격으로 glycerol 및 fumarate를 포함하는 배지에서 적용 배양시켰으며, 균주의 혐기적인 보관을 위해서 고무마개로 밀봉된 6 mL 바이얼에 배양액 1 mL과 glycerol 1 mL을 혼합하여 -20℃에서 보관하였으며 매달 계대하여 사용하였다.

배지 및 배양

E. faecalis RKY1 배양을 위한 배지의 조성은 glycerol (Yakuri Chemicals Co., Osaka, Japan) 10 g/L, fumarate 30 g/L, yeast extract (Difco, Detroit, USA) 15 g/L, K₂HPO₄ (Yakuri) 10 g/L, NaCl (Yakuri) 1 g/L, MgCl₂ · 6H₂O 0.05 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g/L이다. 배지성분 중에서 fumarate의 경우는

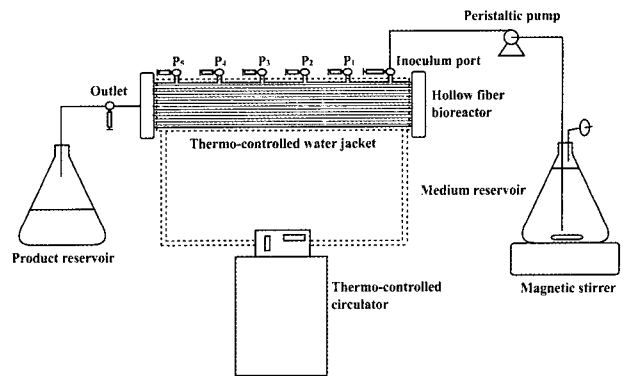


Figure 1. Experimental setup diagram for bioconversion of fumarate to succinate using hollow fiber bioreactor. [P₁, P₂, P₃, P₄, P₅; sampling port of shell side]

fumaric acid (Yakuri)를 Na₂CO₃ (Yakuri)로 중화하여 사용하였으며, 그 외 시약들은 모두 시약등급을 사용하였다.

혐기적인 배양을 위해서 고무마개로 밀봉할 수 있는 바이얼을 사용하였으며, glycerol 냉동보관 균주 0.6 mL를 배양배지 14.4 mL를 포함하고 있는 20 mL 바이얼에 접종하여 12시간 간격으로 3회 계대 배양하였다. 20 mL 바이얼을 이용하여 계대한 배양액 1.6 mL를 배양배지 38.4 mL를 포함하고 있는 50 mL 바이얼에 접종하여 12시간 배양한 배양액을 HFBR 실험의 접종균으로서 사용하였다. 배지의 초기 pH는 7.0으로 조정하였으며, 배양온도 38℃ 및 교반속도 200 rpm의 조건으로 진탕배양기 (KMC-8480S, Vision Scientific Co., Korea)를 이용하여 실험하였다.

실관 생물반응기

HFBR은 Sambo Globe Co. (Korea)의 GUF-Lab 모델을 사용하였으며, 이 HFBR의 MWCO (Molecular Weight Cut-Off)는 20 kDa, module 크기는 1"∅×600 mm, 실관의 내경은 0.9 mm, 그리고 외경은 1.6 mm이다. 실관의 재질은 폴리스ulfone (polysulfone)이며 모듈은 PVC 재질로 구성되어 있고, 실관은 모듈 내에 에폭시 (epoxy)를 사용하여 고정되었다. 이와 같은 HFBR을 이용하여 숙신산을 연속생산하는 개략적인 실험장치를 Figure 1에 나타내었다. Figure 1에서 보는 바와 같이 HFBR 내의 분포양상을 알아보기 위하여 반응기 외부에 등간격 (10 cm)으로 다섯 개의 port를 구성하였으며, HFBR의 항온 유지를 위하여 외부에 자켓을 설치하여 실험하였다. HFBR의 멸균조작은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 0.1 N NaOH를 이용하여 12시간 동안 세척한 후 200 ppm NaOCl을 사용하여 12시간 동안 살균하였으며 미생물을 접종하기 전에 잔존 NaOH 및 NaOCl의 제거를 위하여 멸균된 증류수를 사용하여 12시간 동안 세척하였다. 이와 같은 세척 및 살균조작은 연동펌프 (MP-3N, Eylea Co., Japan)를 이용하여 2 mL/min의 유속으로 실시하였다. HFBR의 내부를 배양배지로 충전시킨 후 shell-side의 접종 port를 통하여 12시간 배양한 배양액 15 mL를 접종한 후 같은 port를 통하여 배지를 공급하였으며, HFBR 내에서 전환된 숙신산은 미생물과 분리되어 막을 투과하여 lumen-side로 방출되는 transverse mode로 조업하였다.

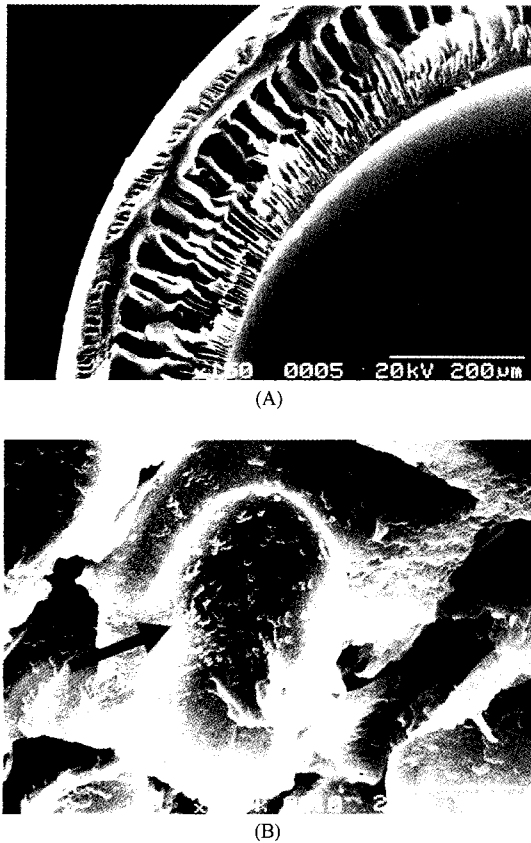


Figure 2. Scanning electron micrograph of a cross sectional hollow fiber unit (A) and *E. faecalis* RKY1 immobilized in the fiber matrix of hollow fiber bioreactor (B).

분석방법

HFBR에 내재되어 있는 실관의 형태 및 미생물의 고정화 양상을 관찰하기 위하여 약 5 mm 정도의 길이로 면도칼을 이용하여 절단한 후 48시간 동안 건조하였다. 이와 같이 건조한 시료들은 금으로 코팅 (두께: 14 nm)한 후 주사전자현미경 (SEM, S-2400, Hitachi, Japan)을 이용하여 20 kV 전압 하에서 적당한 배율로 검경하였다.

기질 및 생성 유기산은 HPLC (Waters Ltd., USA)를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 컬럼으로서 Aminex HPX-87H ion-exclusion column (300×7.8mm, Bio-Rad, USA)을 사용하였으며, 이동상은 5 mM H₂SO₄, 유량은 0.6 mL/min, 검출기는 UV 210 nm, 컬럼온도는 35°C로 유지하여 분석하였다. 정량화를 위한 표준물질로서 disodium fumarate (MW 160.04) 및 disodium succinate · 6H₂O (MW 270.14) 등의 유기산염을 사용하였다.

결과 및 고찰

전자현미경 관찰

HFBR에 내재되어 있는 폴리술폰 재질의 실관막 구조를 확인하기 위하여 SEM을 이용하여 실관의 단면을 150배 확대하여 관찰한 결과, Figure 2(A)에서 보는 바와 같이 외부표면, 내부표면, 그리고 그 사이에 비대칭성 구조의 스폰지 형태를 이루고 있음을 알 수 있었다. 일반적으로 실관막의 형

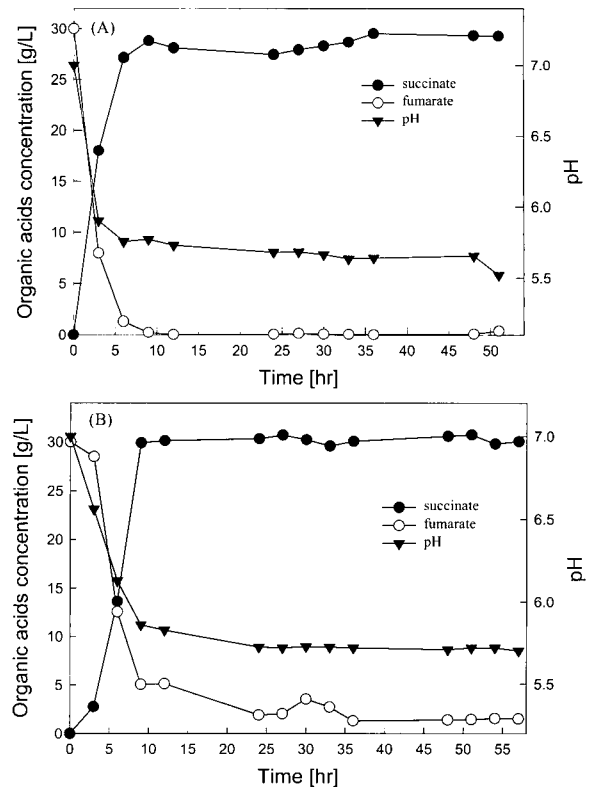


Figure 3. Effect of the number of hollow fibers on the succinate production and pH change by *E. faecalis* RKY1 immobilized in a hollow fiber bioreactor. [A; number of hollow fibers 50, B; number of hollow fibers 200, initial fumarate; 30 g/L, flow rate; 1.0 mL/min, temperature; 38°C]

태별로 대칭성 및 비대칭성 실관막으로 구분하며 미생물의 고정화에는 주로 비대칭성 실관막이 사용된다(15,22). 따라서 HFBR을 이용한 미생물 배양은 스폰지형 구조로 이루어진 부분과 막의 표면에서 고정화가 이루어지게 되며 일종의 표면배양 방법의 한 형태라고 할 수 있다. 이러한 HFBR 내에 미생물이 부착되어 있는 형태를 관찰하기 위하여 막의 스폰지 구조에 부착된 미생물을 SEM을 이용하여 1,500배 확대하여 촬영한 사진을 Figure 2(B)에 나타내었다. 사진에서 보는 바와 같이 실관막의 스폰지형 부분에 *E. faecalis* RKY1 균주가 고정화되어 있는 것 (화살표로 표시)을 관찰할 수 있었으며, 따라서 HFBR을 이용한 고정화미생물 배양방법은 *E. faecalis* RKY1을 효과적으로 고정화하여 숙신산을 연속생산하는데 응용할 수 있는 적절한 반응기로 생각된다.

실관가닥 수에 따른 영향

HFBR 내에 내재되어 있는 실관가닥 수에 따른 영향을 알아보기 위하여 실관이 50가닥 및 200가닥 포함되어 있는 반응기를 사용하였다. 반응기 내로 배지의 공급유속은 1 mL/min였으며 공급배지의 pH는 7.0, 그리고 온도는 외부자켓을 통하여 38°C로 유지하였다. 또한 배지의 공급은 HFBR의 shell-side로 공급하여 생산물은 미생물과 분리되어 lumen-side로 유출되는 transverse mode로 조업하였다. 실관가닥 50개 및 200개일 때의 기질소비, 숙신산 생산 및 pH 변화에 대한 결과를 Figure 3에 나타내었다. 배지 공급속도 1 mL/min에서

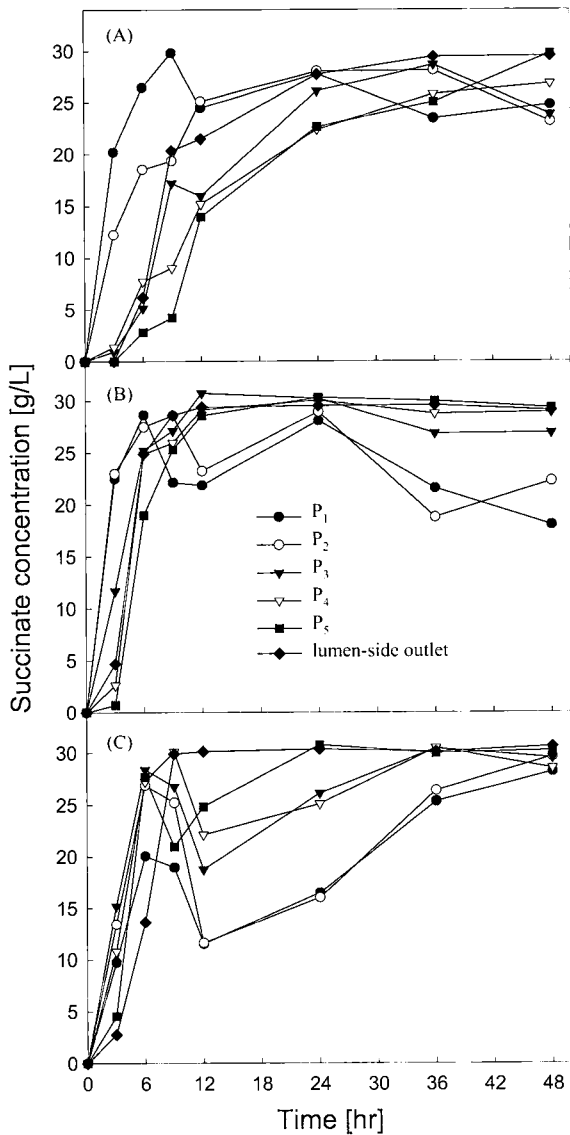


Figure 4. Distribution profiles of succinate at each port during bioconversion of fumarate to succinate using hollow fiber bioreactor. [A; 0.25 mL/min, B; 0.5 mL/min, C; 1.0 mL/min, number of hollow fibers; 200, initial fumarate; 30 g/L, temperature; 38 °C]

조업한 결과, 실관가닥이 50개일 경우와 200개일 경우의 결과가 거의 유사한 경향을 보였다. 즉, 실관가닥 50개일 경우 정상상태에 도달하는데 9시간이 소요되었으며 51시간 이상 정상상태를 유지하였고 pH는 5.6 정도로 유지되었다. 실관가닥이 200개일 경우 초기 전환속도는 다소 느렸지만 정상상태에 도달한 시간은 50개의 경우와 마찬가지로 약 9시간 후였으며 pH는 약 5.7 정도를 유지하였다. VickRoy 등(23)은 *Lactobacillus delbreuckii* 균주를 HFBR에 고정화하여 glucose로부터 lactic acid 생산시 실관가닥의 수가 증가할수록 생산성이 증가한다고 보고한 바 있다. 그러나 그들이 사용한 반응기 조업방식은 direct mode로서 본 실험에 채택된 transverse mode와는 조업방식이 다르다. VickRoy 등의 연구와 같이 direct mode로 조업할 경우에는 배지가 lumen-side로 공급되어 lumen-side로 유출되기 때문에 실관가닥 수가 증가할수록 생산속도가 향상하였지만, 본 실험에서와 같은 transverse mode

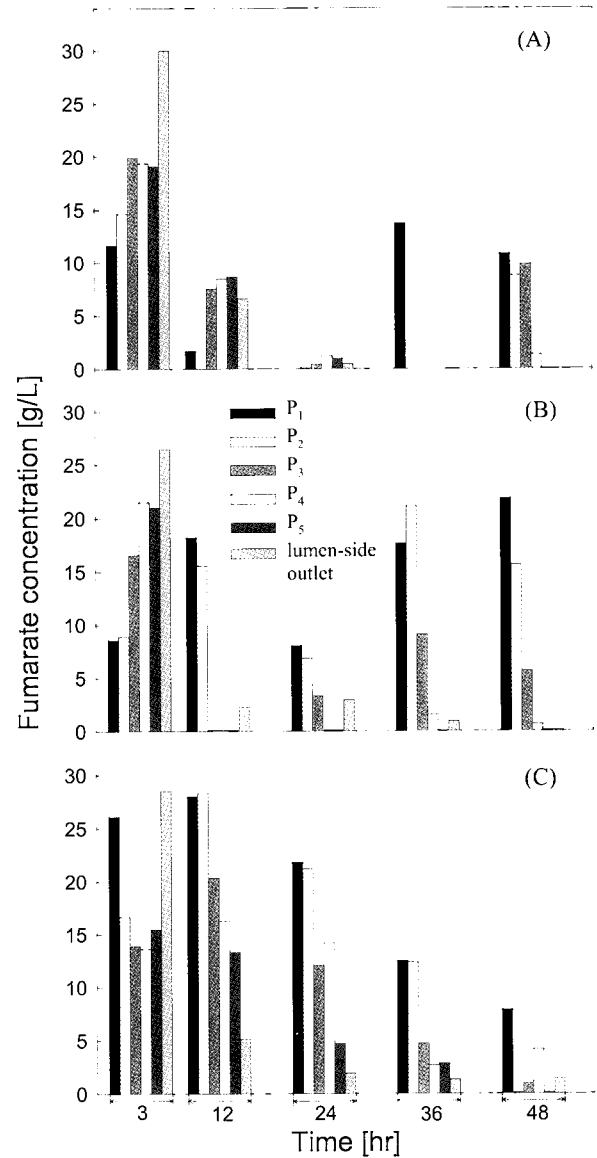


Figure 5. Distribution profiles of fumarate at each port during bioconversion of fumarate to succinate using hollow fiber bioreactor. [A; 0.25 mL/min, B; 0.5 mL/min, C; 1.0 mL/min, number of hollow fibers; 200, initial fumarate; 30 g/L, temperature; 38 °C]

로 조업할 경우에는 배지가 shell-side로 공급되어 lumen-side로 유출되므로 shell-side에서 반응이 주로 이루어지기 때문에 실관가닥의 수는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

HFBR 내에서의 푸마르산 및 숙신산 분포

HFBR 내부에서의 푸마르산 및 숙신산 분포를 알아보기 위하여 모듈 외부에 등간격 (10 cm)으로 sampling port를 구성하여 각 지점에서의 반응양상에 대해서 조사하였다. 일반적으로 HFBR 내에서 미생물 배양시 반응기 내의 거동에 관한 연구는 반응기 내의 압력분포에 관한 연구가 대부분이었으나 (24,25) 본 연구에서는 반응기 내의 기질 및 생성물 분포를 직접 측정하여 확인하고자 하였다. 배지 공급속도를 0.25 mL/min, 0.5 mL/min, 1.0 mL/min 등으로 달리하여 port별 숙신산 및 푸마르산 분포에 관하여 Figure 4 및 Figure 5에 각각 나타내

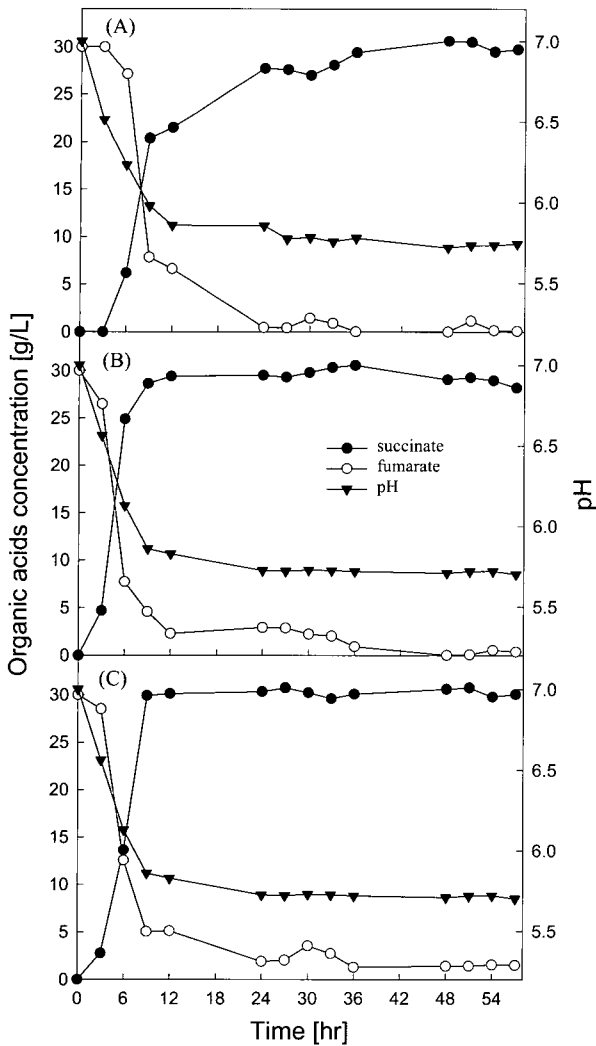


Figure 6. Time profiles of bioconversion of fumarate to succinate by *E. faecalis* RKY1 immobilized in a hollow fiber bioreactor. [A; 0.25 mL/min, B; 0.5 mL/min, C; 1.0 mL/min, number of hollow fibers; 200, initial fumarate; 30 g/L, temperature; 38°C]

었다. Figure 4에서 보는 바와 같이 배지 공급속도가 0.25 mL/min 인 경우보다는 0.5 mL/min인 경우에 있어서 각 port에서 정상상태에 도달하는 시간이 단축되었음을 알 수 있지만, 배지

공급속도 1 mL/min의 경우 초기에 배지가 공급되는 부분의 port (P₁)는 정상상태에 도달하는 시간이 상당히 지연되는 것을 알 수 있다. 이는 유속의 증가로 인하여 초기에 도입된 푸마르산이 배지 공급 부분에서는 완전히 전환되지 못하였지만 HFBR을 통과하면서 점차 숙신산으로 전환되어 간다는 것을 의미한다. Figure 5에서 보면, 배지 공급속도 0.25 mL/min의 경우 3시간째에는 배지공급 부위에서 멀리 떨어진 port (P₃)에 푸마르산이 다량 잔류하였다. 그러나 24시간째에는 모든 port에서 푸마르산이 거의 소비되었다가, 그 후에는 P₁에서의 푸마르산 농도가 다시 증가하는 양상을 보였다. 배지 공급속도 0.5 mL/min의 경우 초기 3시간째에는 0.25 mL/min의 경우와 비슷한 양상을 보였으며 36시간 및 48시간째에는 각 port에 푸마르산이 더 많이 잔류하고 있음을 알 수 있다. 또한 배지 공급속도 1.0 mL/min의 경우 초기에 P₁ 및 P₂에서는 푸마르산의 소비가 느렸지만 시간이 지남에 따라 전반적으로 감소하는 경향을 보였다. 또한 위와 같은 조건들로 실험된 결과로서 lumen-side로 유출된 배지 및 pH의 시간에 따른 변화에 관하여 Figure 6에 나타내었다. Figure 6에서 보는 바와 같이 배지의 공급속도가 증가할 수록 정상상태에 도달하는 시간이 단축되었다. 즉, 0.25 mL/min의 경우 36시간, 0.5 mL/min의 경우 12시간, 1.0 mL/min의 경우 9시간 등으로 공급유속이 증가할수록 정상상태에 도달하는 시간은 단축되었다. 이와 같이 HFBR을 transverse mode로 조업한 경우에는 shell-side 내에서의 기질 및 생성물의 분포가 유속에 따라 여러 형태로 나타났지만 lumen-side로 유출되는 최종산물의 농도 및 기질의 농도는 정상상태에 도달한 뒤에 거의 변화가 없는 것으로 확인되었다. 이는 공급된 푸마르산이 shell-side 내에 고정화되어 있는 *E. faecalis* RKY1과 직접 접촉하면서 HFBR의 lumen-side를 통하여 유출된다는 것을 의미한다.

푸마르산 농도에 따른 숙신산 연속생산

실관 생물반응기를 이용하여 숙신산을 연속생산하는데 있어서 기질인 푸마르산의 농도에 대한 영향을 알아보기 위하여 푸마르산 농도 30, 50, 80 g/L를 포함하는 배지를 이용하여 배지 공급속도를 0.5, 1.0, 2.0 mL/min로 변화시키면서 실험하였다. 이에 대한 결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보는 바와 같이 푸마르산 농도 30 g/L 및 배지의 공급 유속 0.5, 1.0, 2.0 mL/min의 경우 각각 29.7, 28.5, 27.2 g/L

Table 1. Continuous production of succinate using *E. faecalis* RKY1 immobilized in hollow fiber bioreactor.

Fumarate concentration [g/L]	Flow rate [mL/min]	Succinate produced [g/L]	Yield [g/g] ^a	P _{Shell} [g/L · hr] ^b	P _{Total} [g/L · hr] ^c
30	0.5	29.7	0.99	14.9	3.0
	1.0	28.5	0.95	28.5	5.7
	2.0	27.3	0.91	54.5	10.9
50	0.5	49.3	0.98	24.7	4.9
	1.0	45.2	0.90	45.1	9.0
	2.0	37.2	0.75	74.5	14.9
80	0.5	72.1	0.90	36.1	7.2
	1.0	55.6	0.69	55.6	11.1
	2.0	42.8	0.54	85.6	17.1

^ayield, succinate produced (g) / initial fumarate (g), ^bvolumetric productivity based on the shell side volume, ^cvolumetric productivity based on the total reactor volume

의 숙신산이 생성되어 유속 2.0 mL/min까지 수율에 큰 차이는 보이지 않았다. 하지만, 푸마르산 농도가 50 및 80 g/L일 경우에는 유속이 증가할수록 숙신산 수율은 감소하였다. 최대 숙신산 생산성은 푸마르산 농도 80 g/L의 경우에 얻어졌으며 반응기 총 부피 기준으로 17.1 g/L·hr (shell-side 부피 기준으로 85.6 g/L·hr)였지만, 배지 공급유속을 증가시킬수록 미반응 푸마르산이 증가하기 때문에 과잉의 배지 공급은 수율의 감소를 초래한다. 즉, 푸마르산 농도 30 g/L의 경우에는 수율은 높았지만 최종 생산물인 숙신산의 농도가 낮았고, 푸마르산 농도 80 g/L의 경우에는 부피생산성은 높았지만 수율이 낮은 결과를 보이므로 수율 및 부피생산성을 동시에 고려한 최적 조업조건은 푸마르산 농도 50 g/L 및 공급유속 1.0 mL/min로 생각된다. 이 조건하에서 숙신산 생산성은 반응기 총 부피 기준으로 9.0 g/L·hr (sell-side 부피 기준으로 45.1 g/L·hr)로 얻어졌다. 이와 같이 실관 생물반응기 조업시 배지의 공급 유속이 증가할수록 미반응 기질이 증가하는 경향은 Mehaia와 Cheryan(17)에 의하여 보고된 실관 생물반응기를 이용한 에탄올 생산에서도 관찰할 수 있다. 따라서 실관 생물반응기를 이용하여 푸마르산으로부터 숙신산을 생산하는 공정은 회분식 생물전환공정(14)에 비하여 높은 생산성을 가지며, 일차적인 분리공정을 단축시킬 수 있는 등 다양한 장점을 가져 생물학적인 숙신산 생산이 가능할 것으로 사료된다.

요 약

푸마르산으로부터 숙신산 생물전환을 위하여 *E. faecalis* RKY1을 HFBR에 고정화하여 연속생산 공정에 대한 가능성을 모색하였다. *E. faecalis* RKY1은 실관의 spongy 부분에 효과적으로 고정화되었으며, transverse mode로 HFBR 조업시 실관가닥이 50개 및 200개일 경우 거의 비슷한 경향을 나타냈다. 또한 배지의 공급속도를 0.25, 0.5, 1.0 mL/min로 증가시키면서 조업한 결과, 정상상태에 도달하는 시간이 각각 24, 12, 9시간으로서 유속이 증가할수록 정상상태에 도달하는 시간은 단축되었지만, 반응기 내의 기질 및 생성물 분포는 그 변화가 심하였다. 실관 생물반응기를 이용하여 숙신산 생물전환시 배지의 공급 유속이 증가할수록 숙신산 생산성은 증가하였지만 전환수율이 감소하여 미반응 푸마르산은 증가하였다. 최대 숙신산 생산성 및 이 때의 수율은 푸마르산염 농도 80 g/L 및 배지 공급 유속 2.0 mL/min일 때 17.1 g/L·hr 및 0.54 g/g이었으며, 최적 숙신산 생산성 및 이 때의 수율은 푸마르산염 농도 50 g/L 및 배지 공급 유속 1.0 mL/min일 때 9.0 g/L·hr 및 0.90 g/g으로서 회분식 생물전환의 경우보다 더 우수하였다.

감 사

이 논문은 1999년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Gottschalk, G (1986), *Bacterial Metabolism*, 2nd ed., p242, Springer, New York.
- Ghose, T. K. (1989), *Bioprocess Engineering, The First Generation*, p366, Ellis Horwood Ltd., England.
- Ryu, H.W., J. S. Yun, and K. H. Kang (1998), Isolation and Characterization of the *Enterococcus* sp. RKY1 for Biosynthesis of Succinic Acid, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**(6), 545-550.
- Varadarajan, S. and D.J. Miller (1999), Catalytic Upgrading of Fermentation-Derived Organic Acids, *Biotechnol. Prog.*, **15**, 845-854.
- Davison, B and G. Kulesa (1995), Biologically Produced Succinic Acid: A New Route to Chemical Intermediates, *Alternative Feedstocks Program*, U.S. Department of Energy.
- Zeikus, J. G., M. K. Jain, and P. Elankovan (1999), Biotechnology of Succinic Acid Production and Markets for Derived Industrial Products, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 545-552.
- Wilke, D. (1999), Chemicals from Biotechnology: Molecular Plant Genetics Will Change the Chemical and the Fermentation Industry, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 135-145.
- Datta, R. (1992), Process for the Production of Succinic Acid by Anaerobic Fermentation, *U.S. Pat.*, No. 5,143,833
- Nghiem, N. P., B. H. Davison, B. E. Suttle, and G. R. Richardson (1997), Production of Succinic Acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63/65**, 565-576.
- Lee, P. C., W. G. Lee, S. Y. Lee, and H. N. Chang (1999), Effect of Medium Components on the Growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and Succinic Acid Production, *Proc. Biochem.*, **35**, 49-55.
- Kang, K. H., J. S. Yun, and H. W. Ryu (2000), Effect of Culture Conditions on the Production of Succinate by *Enterococcus faecalis* RKY1, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**(1), 1-7.
- Guettler, M. V., D. Rumler, and M. K. Jain (1999), *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a Novel Succinic Acid-Producing Strain from Bovine Rumen, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 207-216.
- Wang, X., C. S. Gong, and G. T. Tsao (1998), Bioconversion of Fumaric Acid to Succinic Acid by Recombinant *E. coli*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **70/72**, 919-928.
- Ryu, H. W., K. H. Kang, and J. S. Yun (1999), Bioconversion of Fumarate to Succinate Using Glycerol as a Carbon Source, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **77/79**, 511-520.
- Bunch, A. W. (1988), The Uses and Future Potential of Microbial Hollow-Fibre Bioreactors, *J. Microbiol. Meth.*, **8**, 103-119.
- Kitano, H. and N. Ise (1984), Hollow Fiber Enzyme Reactors, *Trends Biotechnol.*, **2**(1), 5-7.
- Mehaia, M. A. and M. Cheryan (1984), Ethanol Production in a Hollow Fiber Bioreactor Using *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 100-104.
- Lloyd, J. R. and A. W. Blanch (1996), The Physiological State of an Ethylogenic *Escherichia coli* Immobilized in Hollow-Fiber Bioreactors, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 113-120.
- Piret, J. M. and C. L. Cooney (1990), Mammalian Cell and Protein Distributions in Ultrafiltration Hollow Fiber Bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 902-910.
- Robertson, C. R. and I. H. Kim (1985), Dual Aerobic

- Hollow Fiber Bioreactor for Cultivation of *Streptomyces aureofaciens*, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1012-1020.
21. Chung, B. H. and H. N. Chang (1987), Aerobic Fungal Cell Immobilization in a Dual Hollow Fiber Bioreactor: Continuous Production of Citric Acid, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 205-211.
 22. Giorno, L. and E. Drioli (2000), Biocatalytic Membrane Reactors: Applications and Perspectives, *Trends Biotechnol.*, **18**, 339-349.
 23. VickRoy, T. B., H. W. Blanch, and C.R. Wilke (1982), Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbreuckii* in a Hollow Fiber Fermenter, *Biotechnol. Lett.*, **4**(8), 483-488.
 24. Tharakan, J. P. and P. C. Chau (1986), Operation and Pressure Distribution of Immobilized Cell Hollow Fiber Bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1064-1071.
 25. Linton, E. A., G. Hogton, C. J. Knowles, and A. W. Bunch (1989), Monitoring of Microbial Growth in a Hollow-Fiber Reactor Using an Electronic Pressure Sensor, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 283-288.