

실관 생물반응기를 이용한 푸마르산으로부터 숙신산 생물전환
(Bioconversion of fumaric acid to succinic acid
using hollow fiber bioreactor)

위영준,¹ 윤종선,² 민나영,³ 김진남,⁴ 류화원

전남대학교 화학공학부, 의공학협동과정,¹ 공업화학과,² 화학공학과,³ 물질·생물화학공학과⁴
전화 (062) 530-1842, FAX (062) 530-1849

Abstract

Succinic acid was produced by *Enterococcus faecalis* RKY1 cells immobilized in hollow fiber bioreactor as an alternatively immobilized culture in bioconversion of fumaric acid to succinic acid. The feed was pumped through the shell side. As the flow rate of the feed was increased, the steady state was obtained more quickly. The steady state was reached after 24 hr cultivation in 0.25 ml/min, 12 hr in 0.5 ml/min, and 9 hr in 1.0 ml/min, respectively. The effect of medium pH on succinate production was also investigated. By changing the medium pH of 8.0, the succinic acid produced was increased about 16% than that of pH 7.0.

서론

숙신산 (HOOCCH₂CH₂COOH)은 식품, 의약품, 항생제, 직물, 도금 및 가스세정 등에 응용되는 매우 폭 넓은 용도를 지니고 있는 C₄ 화합물로서, 특히 1,4-butanediol, tetrahydrofuran, γ -butyrolactone 등 고부가가치 물질의 원료로서 각광받고 있다.^{1,2)} 그러나 숙신산은 현재 상업적으로 석유화학에 기초한 합성공정에 의해서만 생산되고 있는 실정이므로 향후 석유자원 고갈에 따른 대책의 일환으로서 생물공학적인 공정에 의한 숙신산 생산에 관심이 집중되고 있다. 숙신산의 생물학적 생산을 위한 미생물로서 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*가 이용되고 있지만 이 미생물은 엄격한 혐기성이므로 실제 산업화에 많은 애로점을 가지고 있다. 이에 반해 *Enterococcus faecalis* RKY1은 통성 미생물로서 글리세롤을 수소공여체로 하여 푸마르산으로부터 숙신산을 고수율로 생산할 수 있는 탁월한 균주이다.³⁾ 따라서 본 연구에서는 *E. faecalis* RKY1을 이용한 숙신산 생산성 증진을 위하여 미생물 고정화의 한 방법으로서 실관 생물반응기 (HFBR)를 도입하였다. HFBR을 이용한 미생물의 고정화는 다른 고정화법에 비해 많은 장점을 갖는다. 일반적으로 HFBR은 미생물이 lumen side 흐름과 막을 사이에 두고 존재하므로 미생물을 분리하는 공정이 필요 없으며, 단위부피당 큰 반응표면적을 가지므로 효소, 미생물 및 동·식물 세포 등의 고정화에 용이하다.⁴⁾ 또한 HFBR을 이용한 미생물의 고정화는 부피생산성의 극대화, 회석 (wash-out)효과 제거, 고농도 세포배양, scale-up시 에너지 소모가 적다는 등의 여러 가지 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 이와 같이 많은 장점을 지니는 HFBR을 이용하여 *E. faecalis* RKY1의 고정화를 통한 숙신산의 연속생산 가능성을 모색하였을 뿐만 아니라 반응기 조업시 영향을 미치는 인자, 즉 기질공급속도, pH 및 온도 등의 영향을 조사하여 반응기 조업조건을 최적화하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 보관 본 연구실에서 새로이 분리된 *Enterococcus faecalis* RKY1이 숙신산 생물전환을 위하여 사용되었으며, 균주는 본배양에 이용하기전 2일동안 12시간 간격으로 글리세롤 및 푸마르산염을 포함하는 전배양 배지에서 적응배양시켰다. 균주의 혐기적인 보관을 위해서 고무마개로 밀봉된 6 ml 바이얼에 배양액 1 ml과 글리세롤 1 ml을 혼합하여 -20℃에서 보관하였으며, 매달 계대하여 사용하였다.

배지 및 시약 본 실험에 사용된 배지의 조성은 glycerol (Yakuri, Osaka, Japan) 20 g/l, sodium fumarate 30~80 g/l, yeast extract (Difco, Michigan, USA) 15 g/l, K₂HPO₄ (Yakuri) 10 g/l, NaCl 1 g/l, MgCl₂ · 6H₂O 0.05 g/l, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g/l 이다. 그 외 모든 시약은 시약등급으로서 사용하였다.

실관 생물반응기 HFBR은 Sambo Globe 사의 GUF-Lab 모델을 구입하여 사용하였으며, 반응기 모듈의 크기는 2.54 cm × 60 cm, 실관의 내경은 0.9 mm 및 외경은 1.6 mm이다. 실관의 재질은 polysulfone이며 20,000 MWCO를 갖는다. 또한 실관의 형태는 스폰지형 층을 갖는 비대칭성이며, 이에 대한 SEM을 이용한 사진을 Fig. 1에 나타내었다. 반응기의 멸균은 0.1 N NaOH를 사용하여 12시간동안 세척한 후, 200 ppm NaOCl을 사용하여 12시간동안 실시하였으며 미생물을 접종하기전 잔존 NaOH 및 NaOCl의 제거를 위하여 멸균증류수를 이용하여 12시간 동안 세척하였다. 이와 같은 멸균 및 세척 조작은 연동펌프 (MP-3N, Eyela, Japan)를 이용하여 2 ml/min 유속으로 실시하였다. 실관반응기 배양은 shell side의 접종 port를 통하여 12시간동안 배양한 전배양액 15 ml을 접종한 후, 같은 port를 통하여 배지를 공급하였으며 반응기 내에서 *E. faecalis* RKY1에 의해 전환된 숙신산은 실관막을 투과하여 lumen side로 유출되는 방식 (transverse mode)으로 조업하였다. 실험장치에 대한 개략도를 Fig. 2에 나타내었다.

분석방법 실관형태의 관찰을 위하여 약 5 mm 정도의 길이로 실관을 절단 및 48시간 건조한 후, gold coating (두께: 14 nm) 처리하여 주사전자현미경 (S-2400, Hitachi Co., Japan)을 이용하여 20 kV 전압하에서 적당한 배율로 검경하였다. 숙신산 및 푸마르산은 HPLC (Waters Ltd., USA)에 의하여 컬럼으로서 Aminex HPX-87H ion-exclusion 컬럼 (Bio-Rad Co., USA, 300 × 7.8 mm), 이동상 5 mM H₂SO₄, 유량 0.6 ml/min, 검출기 UV 210 nm 및 컬럼온도 35℃의 조건하에서 분석하였다. 정량화를 위한 표준물질로서 sodium fumarate (FW 160.04) 및 sodium succinate · 6H₂O (FW 270.14) 등의 유기산염을 사용하여 보정하였다.

결과 및 고찰

실관 생물반응기에 내재되어 있는 실관의 가닥수에 따른 영향을 알아보기 위하여 50 및 200 가닥을 갖는 반응기를 이용하였다. 반응기 내로의 배지공급속도는 1 ml/min (60 ml/hr)였으며 pH 7.0 및 38℃로 조업하였다. 실관 가닥이 50 및 200개일 때의 기질소비, 숙신산 생산 및 pH 변화에 대한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 배양 6시간째 50가닥 실관 반응기의 경우 27.2 g/l 숙신산염이 생성되었지만, 200가닥 실관 반응기의 경우 13.7 g/l 숙신산염이 생성되어 배양초기에는 다소 차이를 보였지만 정상상태에 도달한 시간은 모두 9시간으로서 거의 유사한 경향을 나타냈다. Vick Roy 등³⁾은 *Lactobacillus delbreuckii*를 실관 반응기에 고정화하여 glucose로

부터 lactic acid 생산시 실관 가닥수가 증가할수록 생산성이 증가하였다고 보고한 바 있지만, 이 때의 반응기 조업방식은 lumen side로 기질을 공급하여 lumen side로 유출시키는 direct mode로서 본 연구에서의 조업방식인 transverse mode의 경우에는 실관 가닥의 수에 큰 영향을 받지 않는 것으로 사료된다. 실관 반응기 내부에서의 시간에 따른 숙신산 분포를 알아보기 위하여 반응기의 모듈상에 등간격 (10 cm)으로 sampling port를 구성하여 실험하였다. 배지공급 속도를 0.25, 0.5, 1.0 ml/min 등으로 달리하여 sampling port별 숙신산 분포에 관하여 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 보는바와 같이 배지공급속도가 0.25 ml/min인 경우보다는 0.5 ml/min일 경우에 있어서 각 port별로 정상상태에 도달하는 시간이 단축되었지만 1 ml/min의 경우 배지가 공급되는 port에 가까울수록 정상상태에 도달하는 시간이 지연되었다. 이와 같은 결과는 배지공급속도가 증가할수록 배지가 반응기내 한 지점에서 체류하는 시간이 짧아지기 때문에 배지가 공급되는 port에 가까울수록 기질소비가 느리지만 lumen side 유출구로 갈수록 미생물에 의해 기질이 소비되어 숙신산으로 전환되는데 기인하는 것으로 생각된다. 공급배지의 pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 초기 pH를 7.0으로 조업을 개시하여 32시간 배양후 pH 6.0인 배지로 교체하여 72시간째까지 공급하였으며, 그 후 pH 8.0인 배지로 교체하여 108시간째까지 배양하였다. Fig. 5에서 보는바와 같이 pH 7.0으로 배양한 경우 약 24시간째에 43.2 g/l 숙신산염을 생성하였으며, pH 6.0인 배지로 교체시 최대 숙신산염 농도는 41.6 g/L, pH 8.0인 배지로 교체시 49.8 g/l의 숙신산염이 생성되었다. 이는 배양하는 동안 반응기 내의 pH는 약 5.6~5.7까지 감소하기 때문에 세포의 활성이 저하되어 숙신산 생산이 낮았지만 pH 8.0인 배지가 연속적으로 공급될 경우 반응기 내 pH의 상승으로 인하여 숙신산염 생산이 증가한 것으로 사료된다. 따라서 *E. faecalis* RKY1을 고정화한 실관 생물반응기 조업시 초기 pH를 7.0으로 하여 약 24시간 정도 배양한 후 pH가 8.0인 배지로 교체하는 방식이 숙신산 생산에 용이할 것으로 사료된다.

감사

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

참고문헌

1. Ryu, H.W., K.H. Kang, and J.S. Yun, "Bioconversion of fumarate to succinate using glycerol as a carbon source" (1999), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **77-79**, 511-520
2. Zeikus, J.G., M.K. Jain, and P. Elankovan, "Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products" (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 545-552
3. Ryu, H.W., J.S. Yun, and K.H. Kang, "Isolation and characterization of *Enterococcus* sp. RKY1 for biosynthesis of succinic acid" (1998), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**(6), 545-550
4. Bunch, A.W., "The uses and future potential of microbial hollow-fibre bioreactors" (1988), *J. Microbiol. Meth.*, **8**, 103-119
5. Vick Roy, T.B., H.W. Blanch, C.R. Wilke, "Lactic acid production by *Lactobacillus delbreuckii* in a hollow fiber fermenter" (1982), *Biotechnol. Lett.*, **4**(8), 483-488

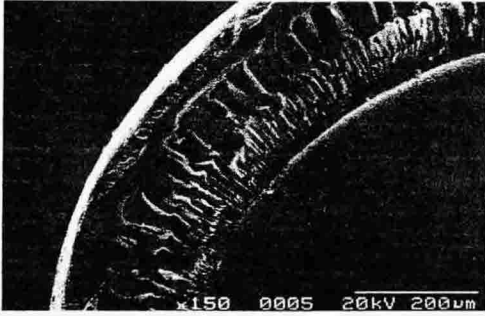


Fig. 1. Scanning electron micrograph of cross sectional hollow fiber.

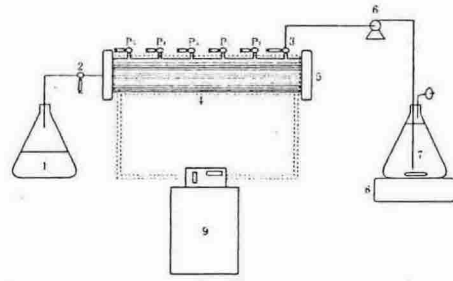


Fig. 2. Experimental setup for bioconversion of fumarate to succinate using hollow fiber bioreactor.

1, product reservoir; 2, sampling port of lumen side; 3, inoculum port; 4, thermocontrolled water jacket; 5, hollow fiber bioreactor; 6, peristaltic pump; 7, medium reservoir; 8, magnetic stirrer; 9, water circulator; P1, P2, P3, P4, P5, sampling port of shell side

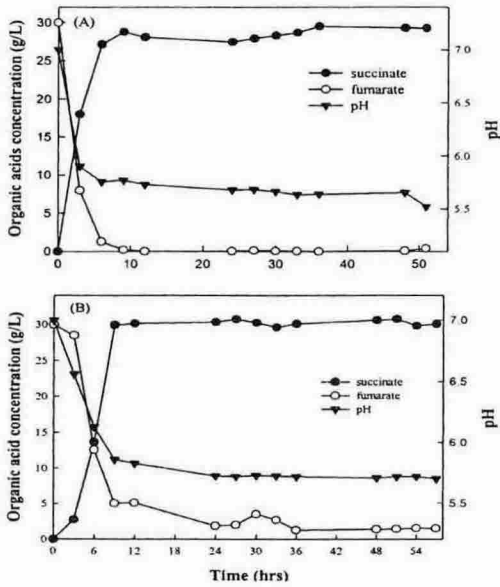


Fig. 3. Effect of a number of hollow fiber on the succinate production and pH change by *E. faecalis* RKY1 immobilized in a hollow fiber bioreactor. A: 50 ea, B: 200 ea

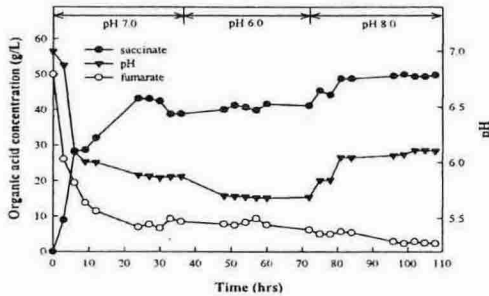


Fig. 5. Effect of medium pH on the succinate production and residual fumarate using hollow fiber bioreactor.

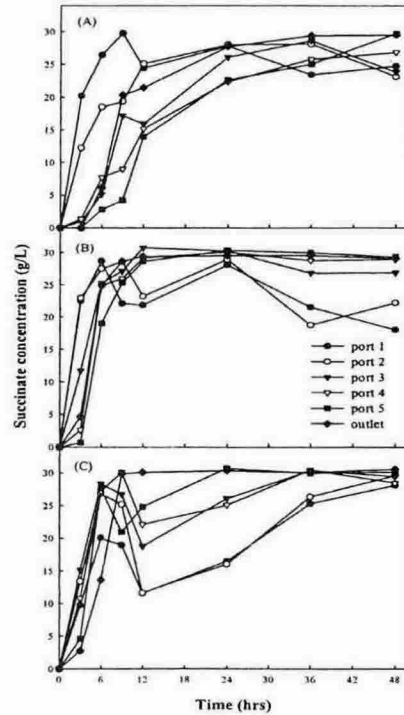


Fig. 4. Distribution profiles of succinate at the each port during bioconversion of fumarate to succinate using hollow fiber bioreactor.

A: 0.25 ml/min, B: 0.5 ml/min, C: 1.0 ml/min, initial fumarate 30 g/L