

## 배지 분사형 고정층 배양기를 이용한 푸마르산 생산

노원균<sup>3</sup>, 김진남<sup>1,2</sup>, 류화원<sup>1,2</sup>전남대학교 화학공학부<sup>1</sup>, 생물산업기술연구소<sup>2</sup>, 물질·생물화학공학부<sup>3</sup>

전화 (062) 530-1842, FAX (062) 530-1849

## Abstract

The production of fumaric acid in a novel fixed-layer fermenter using *Rhizopus oryzae* KCTC 6946 was studied. When yeast extract and corn steep liquor were used as nitrogen sources, fumaric acid produced was 6.4 g/L and 6.8 g/L, respectively. Compared with the flask cultivation, fumaric acid concentration was about 200% when yeast extract was used as a nitrogen source, but reached to 93% when corn steep liquor was used.

## 서론

푸마르산은 비흡습성, 무독성이며 화학적으로 안정한 유기산으로 산미증진 및 향산 화제로 식품공업에 이용되며, 푸마르산 포르모테롤, 푸마르산 제1철 등이 제약산업에서 이용된다. 또한 열·화학 저항성이 우수한 polyester, 기계적 강도가 높은 alkid수지, styrene 단량체 등의 기초원료로 사용되고 있다. 현재 푸마르산의 생산은 벤젠의 접촉 기상산화로부터 회수한 무수 말레인산을 촉매로 가수분해하여 직접 결정으로 생산하는 방법이 주로 이용되고 있지만<sup>(1)</sup>, 환경오염, 화석원료의 고갈 등의 원인으로 인하여 점차 미생물 발효에 의한 생산하는 방법이 제시되고 있다. 특히, *Rhizopus*속 곰팡이가 호기 조건에서 높은 농도로 푸마르산을 생산한다고 알려져 있다. 최근에는 bubble column reactor<sup>(2)</sup>, rotary biofilm contactor<sup>(3)</sup> 등이 교반탱크 발효조에 비해 균사체와 산소의 접촉이 원활하므로 고농도의 푸마르산 생산방법으로 제시되었다. 본 실험에서는 기존 배양장치보다 높은 호기조건을 구성할 수 있는 배양기로서 고정층 배양기(fixed layer fermenter)를 이용하여 푸마르산을 생산하고자 하였다. 액체 배양액에 침지된 기존의 배양방법과 비교하여, 본 장치는 배양액의 작은 액적과 공기를 배양체에 직접 분사하여 배양체와 공기간의 전달저항을 최소화할 수 있는 장점이 있다. 실험에서는 고정층 배양기를 이용하여 질소원 및 고정화, 중화제 첨가에 따른 영향을 조사하였으며, 플라스크 배양에서의 푸마르산 생산을 비교하였다.

## 재료 및 방법

균주 및 보관 *Rhizopus oryzae* KCTC 6946은 한국과학기술원 부설 생명공학연구원

유전자원센터 유전자은행에서 분양받아 실험에 사용하였다. 실험에 사용하기 위해서 균주는 PDA 배지에 접종하여 35°C에서 7일간 배양한 후 멸균 증류수로 포자를 세척, 현탁하여 5°C 이하에서 보관하며 사용하였다.

배지조성 및 배양 전배양 배지조성은 30 g/L glucose, 3 g/L yeast extract, 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.088 g/L ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 였으며, 본배양 배지는 두 종류의 질소원으로 yeast extract(YE), corn steep liquor(CSL)을 2 g/L 이용하였다<sup>(3)</sup>. 고정화 bead를 이용한 실험을 위하여 25%의 포자현탁액을 포함한 2% Ca-alginate bead를 제조하였고, 35 g의 고정화 bead를 48시간 전배양 한 후 본배양에 사용하였다. 유리 균사체 실험을 위하여 조업액의 2%에 해당하는 포자현탁액 포함한 전배양 배지를 48시간 전배양 후, 형성된 유리 균사체를 이용하였다. 본배양에서 pH는 별도로 조정되지 않았으며, 중화제 첨가로 인한 효과를 관찰하기 위해서 CaCO<sub>3</sub> 17 g/L를 각 실험별로 첨가하였다. 플라스크를 이용한 본배양은 200 rpm 및 35°C로 조업하였고, 고정층 배양장치는 공기유량은 2.2 L/min, 배양액의 순환유량은 21 mL/min으로 설정하여 운전하였다.

분석방법 환원당의 측정은 DNSA법에 의해 정량하였다. 채취된 시료는 발색 처리한 후, 분광광도계(UV-160A, Shimadzu Co., Japan)로 545 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 푸마르산의 정량은 HPLC (Waters 510, Waters Ltd., USA)를 이용하여 분석하였다. 사용된 컬럼은 Aminex HPX-87H ion-exclusion column (Bio-Rad Hercules, CA 94547)이고 이동상은 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 유량은 0.6 mL/min, 검출기 (Waters 486, Waters Ltd., USA)는 UV 210 nm, 컬럼 온도는 35°C였다.

Table.1 The denotation of fermentation condition.

Fermenter	K: flask	L: Fixed layer
Cell fixed	B: bead	F: free cell
Neutralizing agent	N: with	U: without
Nitrogen source	Y: yeast extract	C: corn steep liquor

## 결과 및 고찰

플라스크 배양 플라스크 배양기에서 고정화, CaCO<sub>3</sub>를 첨가한 경우(KBN\_)가 푸마르산 생산량이 가장 높았다. 반면 유리 균사체를 이용한 실험(KF\_)에서는 사용된 질소원 모두에서 생산량이 저조하였다. 고정화 - CaCO<sub>3</sub> 처리한 경우(KBNY)에서 푸마르산 생산량은 3.2 g/L, CSL을 이용한 경우(KBNC) 7.3 g/L의 생산량을 나타내었다. 특히 고정화는 유리 균사체보다 약 2배의 생산성의 향상을 나타내고 있다. 이는 고정화를 통하여 얻을 수 있는 균사체의 성장억제효과와 푸마르산 방출이 용이하여

진 결과로 보여진다. 또한  $\text{CaCO}_3$  중화제 첨가를 통하여 2배의 생산성이 증가하게 되는데, 생성 유기산이  $\text{Ca}$ 이온에 의해 중화되어 pH 저하와 self-inhibition의 역제가 있었기 때문이다.

**고정층 배양기** 고정층 배양기에서도  $\text{CaCO}_3$  첨가한 경우(LBN\_)가 그렇지 않은 쪽(LF\_)보다 약 3배의 높은 생산량을 보여주었다. 질소원으로 YE를 사용한 경우 유리 균사체(LFNY)와 고정화(LBNY)의 푸마르산 생산량이 각각 6.3 g/L, 6.4 g/L의 근소한 차이를 나타내었다. 당소모도 역시 두 조건(L\_NY)에서 비슷한 시각에 소모되었다. CSL에서는 고정화한 경우(LBNC)가 6.8 g/L로 유리 균사체(LFNC)보다 2.5배의 생산성을 나타내었다. 같은 고정화에서도 중화제의 첨가는 플라스크 실험에서와 같이 중요한 결과를 나타내었는데, 중화한 경우(LBNC) 6.8 g/L의 푸마르산을 생산한 반면, 중화제를 첨가하지 않은 경우(LBUC)에서는 0.12 g/L로 명확한 대조를 이루었다

### 감사

본 연구는 한국과학재단 목적 기초연구(R02-2000-00175)지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. <http://www.iin.co.kr>, 25 September 2001. [last date accessed]
2. Du, J., N. Cao, and G.T. Tsao, 1998, "Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* in a bubble column fermenter", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **74-75**:481~495.
3. Cao, N., J. Du, C. chen, C.S. Gong, and G.T. Tsao, 1997, "Poduction of fumaric acid by immobilized *Rhizopus* using rotary biofilm contactor" *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63-65**:387~394

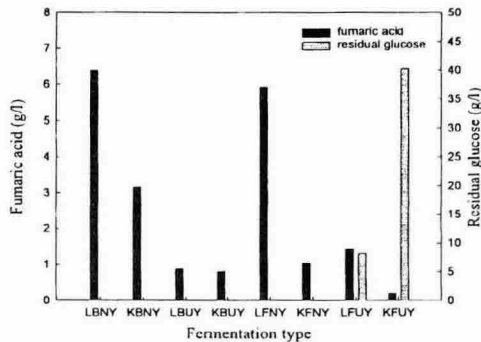


Fig.1 Comparison of flask and fixed layer fermentation using yeast extract as a nitrogen source.

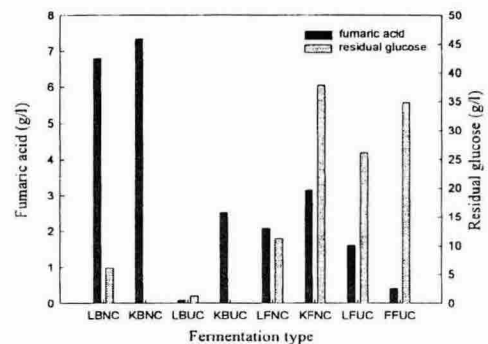


Fig.2 Comparison of flask and fixed layer fermentation using CSL as a nitrogen source.

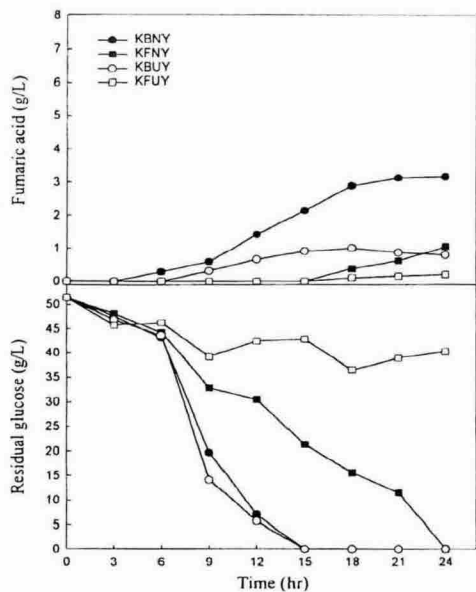


Fig.3 Time course of flask cultivation using yeast extract as a nitrogen source.

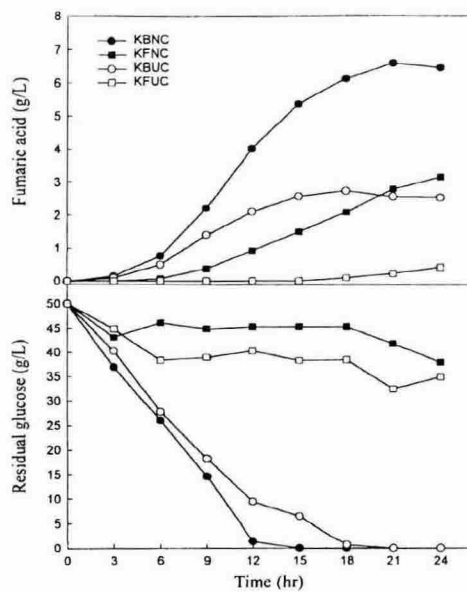


Fig.4 Time course of flask cultivation using CSL as a nitrogen source.

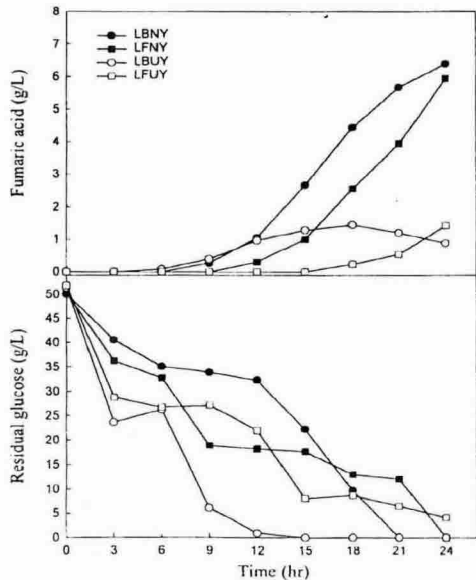


Fig.5 Time course of fixed laryer cultivation using yeast extract as a nitrogen source.

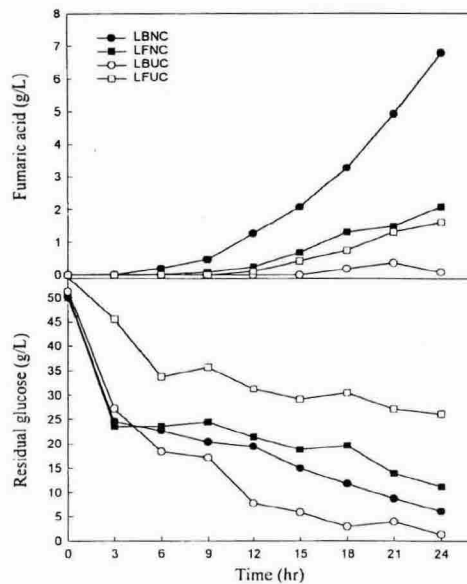


Fig.6 Time course of flask cultivation using CSL as a nitrogen source.