

Anaerobiospirillum succiniciproducens에 의한 숙신산 생성에 미치는 pH의 영향

강귀현 · 류화원 · 장호남*

전남대학교 생물화학공학과 · 생물공정연구센터*

Effect of pH on Succinic Acid Production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*

Kui Hyun Kang · Hwa-Won Ryu · Ho Nam Chang*

Dept. of Biochemical Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757

Bioprocess Engineering Research Center, KAIST, Taejon 305-343*

서론

숙신산과 그 유도체들은 고분자, 식품, 의약품 및 화장품등의 용용에 필요한 특수화학품으로서 널리 사용되고 있으며, 특히 숙신산은 1,4-butanediol, tetra-hydrofuran 및 gamma-butyrolactone 등의 정밀화학품의 생산에도 유용하다. Succinate는 많은 혐기성 미생물의 대사경로에 혼한 중간물질이지만 단지 낮은 수율과 낮은 농도로서 생산될 뿐이어서 대량으로 또는 높은 수율로 succinate를 생산하는 균주 및 배양조건의 확립이 절실히 요구된다. 그리고 숙신산발효를 비롯한 혐기성발효는 중성이나 중성에 가까운 pH에서 이루어져 산 그 자체보다는 유기산의 염이 생성되므로, 이 때 조절된 배양물의 pH는 glucose발효경로의 최종생성물로서 succinate를 결정하는 중요한 인자로서 작용한다.

따라서 본 연구에서는 혐기적 조건하에서 배지의 pH를 다르게 조절했을때 발효생성물의 종류와 농도를 LC로 분석하고, 발효진행에 따른 배양액내의 기질소모, 세포 성장 및 첨가된 Na_2CO_3 양과 전기전도도와와의 관계를 비교하여 최적 pH 조건을 구하고자 한다.

이론

많은 종류의 혐기성 박테리아가 glucose대사를 통해 succinate를 생성하지만 높은 수율의 succinate를 생성하는 균주는 몇가지 중에 불과하다. 예를 들면 succinate는 propionate를 생성하는 박테리아에 의한 혐기발효에서 주요한 중간대사산물이지만 매우 낮은 수율과 농도로서 생산될 뿐이며, 또한 혐기성 rumen bacteria는 propionate를 생산하는 bacteria보다는 높은 수율의 succinate를 생성하기는 하지만 보고된 문헌에 의하면 매우 희석된 용액에서 이루어졌으며 일반적으로 낮은 수율의 다양한 생성물을 생성한다고 보고된 바 있다. 유사한 결과들은 *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Cytophaga succinicans*, *Wolinella succinogenes* 등의 bacteria에서도 관찰되었다.

최근에 다른 succinate생성 혐기균과는 다르게 최종생성물로서 CO_2 존재시 칼슘염 발효배지로부터 높은 농도와 수율로 succinic acid를 빠르게 생산하는 *A. succiniciproducens*의 혐기발효에 대한 연구가 보고된 바 있다.

Datta, Glassner의 연구에 의하면 *A. succiniciproducens*, *B. amylophilus* 및 *B. ruminicola* 등의 여러 혐기성 박테리아 중 혐기발효를 통해 *A. succiniciproducens* 균주가 숙신산 생성에 있어 더 우수함을 밝힌 바 있다. 이용된 다양한 탄수화물

농도는 약 20에서 100g/L 사이였으나 40에서 80 g/L가 적당하며 약 100g/L 이상의 탄수화물 농도는 유기물이 잘 자랄 수 없는 높은 삼투압을 갖는 용액이 되게 하고, 약 20g/L 이하의 탄수화물 농도에서는 유기물의 증식은 관찰되지만 생성물 농도는 회수를 못할 정도로 매우 낮다고 보고하였으며 Na⁺이온을 함유한 배지와 최소한 10ppm의 tryptophan을 함유하는 배지상에서 유기물이 잘 증식함을 보여 주었다. 또한 높은 생산성의 succinate염 생성물을 얻기 위하여 배지의 pH는 약 5.8에서 6.6이며 pH값이 더 높을 경우 주요 생성물은 succinate보다 lactate가 더 많고, 반면에 pH값이 더 낮을 경우 발효가 저해됨을 밝혔다. 그리고 약 20에서 49°C사이의 온도조건의 연구를 통해 최적온도는 39°C이고, 위와 같은 최적조건하에서 succinate 생성균으로 탄수화물 발효를 함으로써 높은 수율 (50%이상)의 succinic acid와 succinate의 생성에 대한 발효공정이 제시되었다.

또한 Samuelov등은 *A. succiniciproducens* 에 의한 succinate생산을 위해 pH와 CO₂-HCO₃⁻의 영향을 연구한 결과 pH 7.2에서는 pH 6.2에서의 증식과 비교하여 세대시간이 거의 두배이고, 대량의 lactate가 형성되므로 pH 6.2와 과잉의 CO₂-HCO₃⁻ 조건에서 높은 수율의 succinate가 생성됨을 밝혔다.

이와 같이 높은 수율을 갖는 균주를 이용한 succinate생산을 위한 배양배지 및 배양조건에 관한 연구가 이루어져 왔으나 그 연구의 범위가 한정되어 있고 최적 배양조건의 결정을 위해서는 더욱 폭넓은 연구가 이루어져야만 한다. 또한 pH조건에 따라 최종생성물로서 생성되는 유기산의 수율에 상당한 영향을 미치므로 최적pH 조건을 확립하고 pH조절용 시약에 따른 생성물의 수율을 조사하는 것도 선행된 연구의 검토와 더불어 succinate 최적발효공정을 위해 꼭 필요한 연구이다.

실험

Anaerobiospirillum succiniciproducens ATCC 29305를 균주로 사용하였으며, 혐기 발효는 dextrose 50g/l, polypeptone 10g/l, yeast extract 5g/l, K₂HPO₄ 1g/l, NH₄Cl 0.4g/l, MgCl₂·6H₂O 0.2g/l, CaCl₂·2H₂O 0.2g/l, FeSO₄·7H₂O 1ppm(as Fe)를 기본배지로 하여 2.5L 발효조(KF-2.5L)에서 배양액 1L로 행하였다. 3M Na₂CO₃ 10ml과 Con. H₂SO₄ 1.5ml를 가하여 초기 pH를 6.8로 조절하고, 발효진행동안의 배양액의 pH는 2M Na₂CO₃로 조절하였다. 환원제로서 Cystein·HCl-Na₂S·9H₂O 5ml를 첨가하였고, 39°C, 200rpm, 100% CO₂로 환원된 발효배지에 전배양액 100ml을 접종하였다. pH조건은 5.8, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2로 조절하였다. 숙신산은 HPLC(Waters Ltd.)를 사용하여 정량하였으며, 배지의 glucose농도는 DNS방법을 사용하였고, 세포농도는 UV분광광도계(Shimadzu Co. UV-160A)로 660nm에서 측정하였으며, 전기전도도는 Conductivity meter(Cole-Parmer:1481-90)로 측정하였다.

결과 및 토론

배양물의 조성을 pH 5.8, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2로 고정하여 발효를 행하였을 때 최대 세포 성장치는 5.98, 3.12, 4.4, 5.0, 4.05로 대체로 세포 성장이 활발하여 여러 pH 조건에서 최대치는 거의 비슷하였으나, 특히 pH 5.8에서 가장 높았고, 6.0에서 가장 낮았다. 또한 pH 6.0과 6.4에서는 배양시간 32 시간제에 최대치에 도달 함으로 다른 여러 조건과 비교하여 빠른 세포성장을 하였다. 반면에 pH 5.8과 7.2에서는 각각 85.7 시간, 122 시간에서 최대 세포성장을 보였으며, 조성된 pH에 적응하는 기간만큼 세포성장이 지연되어 긴 유도기를 거치고 대체로 완만한 성장곡선을 보이면서 배양말기까지 세포가 거의 사멸되지 않는 것을 관찰할 수 있었고, pH 6.4와 비교하여 약 두배 정도 더 긴 배양시간을 갖는 것을 알 수 있었

다.

발효공정동안 발효배지에 첨가된 2M Na_2CO_3 총량은 pH 5.8, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2에서 각각 65.39, 61.29, 130.78, 171.54, 155.32 g으로 pH 값이 높을 수록 첨가량이 많은 경향을 보였으며, 낮은 pH 일수록 세포성장과는 상관없이 산 생성이 억제됨을 관찰할 수 있었다. 특히 pH 6.8에서는 첨가된 Na_2CO_3 총량이 171.54 g으로 최대치를 보였으며, 여러 pH 조건 중에서 산 생성량이 가장 많음을 추정할 수 있었다.

여러 pH 조건에서 전기전도도를 측정된 결과 pH 값이 높을 수록 배양액 내의 전기전도도가 높았으며, 전반적으로 발효배지에 첨가된 Na_2CO_3 총량과 증가 곡선이 거의 흡사하였다. 따라서 발효배양액의 전기전도도를 측정함으로써 생성된 산을 측정하는 것이 가능하리라 사료된다.

Glucose 소모량을 여러 pH 조건에서 비교해 보면 pH 6.4인 경우 약 60 시간, pH 6.8인 경우 약 50 시간에서 glucose가 거의 소모되었다. 이에 비하여 pH 5.8에서는 최대 세포 성장 이후 발효가 종료되는 120 시간까지 약 20g/L의 glucose가 소모되지 않고 유지되었으며, pH 7.2에서는 약 120 시간에서 거의 소모되었다.

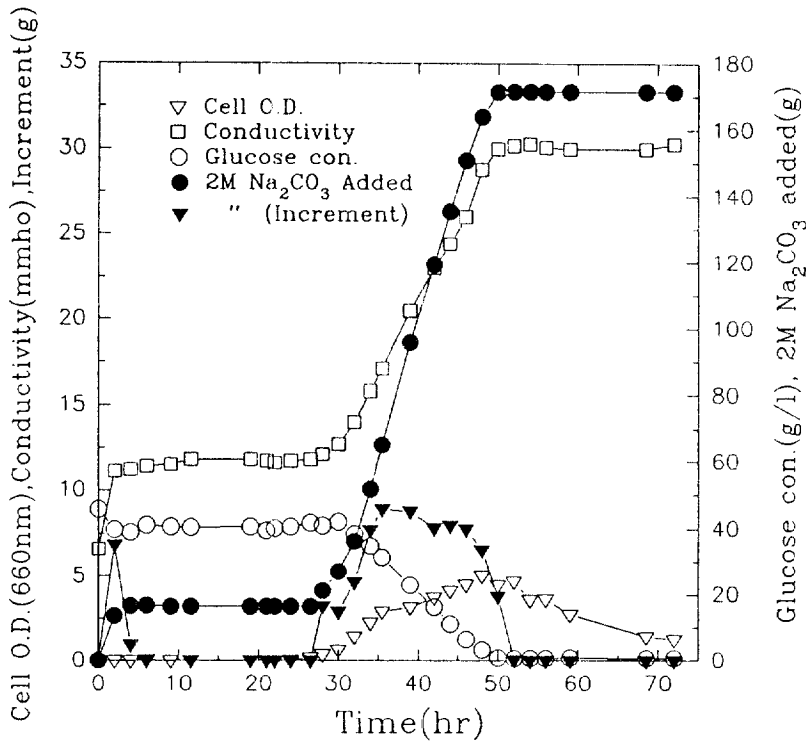


Fig. 1. Time course behavior of cell growth, sugar consumption, conductivity, increment and 2M Na_2CO_3 added at pH of 6.8.

배양시간에 따른 산 생성속도는 pH 6.0과 6.4에서는 세포 성장과 거의 일치하는 경향을 보이고 있으나 pH 6.8인 경우는 대수증식기에서 산 생성 속도가 매우 높았으며, 또한 pH 5.8과 7.2에서와 같은 낮은 pH 또는 높은 pH에서는 산 생성속도가 낮음을 관찰할 수 있었다.

Fig. 1.은 pH 6.8에서의 배양시간에 따른 세포 성장, 기질 소모, 전기전도도, 산 생성 속도와 첨가된 2M Na₂CO₃ 양을 보인 것이다. 그림에서 볼 수 있듯이 약 30 시간에서 기질소모와 동시에 세포성장이 시작되며 이 때부터 전기전도도와 Na₂CO₃ 첨가량은 급격히 증가하기 시작하여 약 50 시간에서 기질은 완전 소모되고, 세포는 최대 성장을 이루며, 전기전도도와 첨가된 2M Na₂CO₃ 총량도 최대치를 보인 후 발효 종료 시간인 72 시간까지 일정하게 유지되면서 세포는 기질 고갈로 인해 급격히 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다.

참고문헌

1. Shoshindo, Hirohisa Sahara and Shohei Koshino, "Relationship of production of succinic acid and methyl citric acid pathway during alcohol fermentation with Immobilized yeast.", *Biotechnology Letters*, 15(1):51-56(1993).
2. Datta, Rattin, "Process for the production of succinic acid by anaerobic fermentation.", *U.S. Pat. No. 5,143,833*(1992).
3. Zeikus, J. G., "Chemical and fuel production by anaerobic bacteria.", *Annu. Rev. Microbiol.*, 34:423-464(1980).
4. David A. Glassner, Rathin Datta, "Process for the production and purification of succinic acid.", *U. S. Pat. No. 5143834*(1992).
5. Hopgood, M. F., and D. J. Walker, "Succinic acid production by rumen bacteria. I. Isolation and metabolism by *Ruminococcus flavefaciens*.", *Aust. J. Biol. Sci.*, 20:165-182(1967).
6. Hopgood, M. F., and D. J. Walker, "Succinic acid production by rumen bacteria. II. Radioisotope studies on succinate production by *Ruminococcus flavefaciens*.", *Aust. J. Biol. Sci.*, 20:183-192(1967).
7. Kroger, A., "Bacterial electron transport to fumarate.", In C. J. Knowles(ed.), *DIVERSITY OF BACTERIAL RESPIRATORY SYSTEMS*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 2-17(1980).
8. Samuelov, N. S., R. Datta, M. K. Jain, and J. G. Zeikus, "Microbial decarboxylation of succinate to propionate. Kinetic studies.", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 589:697-704(1990).
9. Samuelov, N. S., R. Lamed, S. Lowe, and J. G. Zeikus, "Influence of CO₂-HCO₃⁻ levels and pH on growth, succinate production, and enzyme activities, of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*.", *App. Environ. Microbiology*, 57(10):3013-3019(1991).