

Factorial design에 의한 *Acetobacter xylinum* KJ1의 Bacterial cellulose 생산조건의 최적화

이지은, 정상기, 이용운, 정선용, 김성준
전남대학교 공과대학 환경공학과
전화 (062)530-0853, FAX (062) 530-0864

Abstract

Acetobacter xylinum KJ1 efficiently producing bacterial cellulose(BC) in shaking culture was isolated from a rotten grape. The strain was used to investigate optimum operating conditions for increasing BC production and factorial design model was employed for the optimization. The results of experiments were statistically analyzed by SAS program. Reciprocal effects of each factors(carbon source concentration, shaking speeds(rpm), oxygen pressure, and CSL concentration) and culture condition of BC production were examined by getting regression equation of the dependent variable. Comparisons between experimental results and predicted results about BC concentration were done in total 24 experiments by combination of each factors using SAS program, and the correlation coefficients of BC concentration and BC yield were 0.91 and 0.81, respectively. The agitated cultures were performed in various operation conditions of factors which affected considerably to BC production in jar fermentor. The results showed that BC concentration was 11.67g/L in 80 hours cultivation under the condition of carbon source concentration : shaking speeds(rpm) : oxygen pressure : CSL concentration = 4% : 460rpm : 0.28 : 6%. On the other hand BC yield was 0.42g/g in 80 hours cultivation under the condition of carbon source concentration : shaking speeds(rpm) : oxygen pressure : CSL concentration = 4% : 564rpm : 0.21 : 2%. The BC production could be enhanced up to more than 65.3% by factorial design. The result of a verifying experiment under the optimal conditions determined by the factorial design to the BC production showed that the model was appropriate by obtaining BC concentration of 11.02g/L in the optimum condition

서 론

1886년 Brown에 의해 초산균이 셀룰로오스를 생산한다는 사실이 보고된 이래, 미생물에 의해 생산되는 셀룰로오스(Bacterial Cellulose; BC)는 신소재로서 끊임없는 연구 대상이 되어왔다. 미생물 유래의 셀룰로오스는 식물 유래의 셀룰로오스와는 달리 리그닌이나 헤미셀룰로오스가 전혀 포함되지 않은 순수상태로 생산되며, 높은 기계적 강도와 고보습성, 고결정성 등의 BC만이 가지는 독특한 장점 때문에 다양한 산업분야에서 여러 가지용도로 개발되고 있다.

일반적으로 BC는 정치배양 상태에서 배양액 표면에 얇은 pellicle 형태로 생산되지만, 정치배양은 인력과 배양시간 등의 산업적 측면에서 효율적이지 못하므로 교반배양을 통한 BC의 대량생산에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(1). 그러나 BC를 생산하는 대표적인 미생물인 *Acetobacter xylinum*은 교반배양에서 전단력에 의해 셀룰로오스를 생산하지 못하는 cellulose negative mutant(cel⁻)를 생성하기 때문에, 교반 배양에 의해 BC를 대량생산하기 위해서는 자연계에서 유전적으로 안정한 균주를 선별하거나, 형질 전환 등의 분자유종 방법으로 교반배양에 안정한 균주의 개발이 선행되어야 한다.

본 연구에서는 이전의 연구를 통해 본 실험실에서 분리한(2) 교반배양에 비교적 안정한 균주인 A.

xylinum KJ1을 사용해 BC 생산을 위한 최적운전조건을 조사하기 위한 실험을 수행하였다. BC생산에 가장 큰 영향을 미친다고 생각되는 네 가지 factor(탄소원 농도, 교반속도, 산소분압, 질소원 농도)를 결정하고 각 factor의 조합에 따라 jar fermentor상에서 교반배양을 실시하여 BC 생산성을 최대화시키기 위해 factorial design model을 도입하여 최적 BC 생산조건을 결정하였다.

재료 및 방법

사용균주와 배지조성 및 배양방법

본 실험에 사용한 균주는 Son이 자연계에서 분리, 동정한 *Acetobacter xylinum* KJ1이다. 균주 접종물을 얻기 위하여 Hestrin & Schramm(HS)배지(glucose 20g, bacto peptone 5g, yeast extract 5g, Na₂HPO₄ 2.7g, citric acid monohydrate 1.2g, distilled water 1L, pH 5.25) 100ml가 들어 있는 500ml 플라스크에 *A. xylinum* KJ1을 접종하여 3일간 정치배양 시켰다. BC 생산을 위한 생산배지는 HS배지를 기본으로 하여, BC 수율을 높이기 위해 탄소원인 glucose를 fructose와 glucose를 3:1의 비율로 혼합한 혼합당으로 대체하였고, 질소원인 bacto peptone과 yeast extract는 corn steep liquor(CSL; Sigma, U.S.A.)로 대체하여 10L jar fermentor(BioG, Hanil R&D Co., Korea)에 생산배지 5L를 넣고, 접종액으로 정치배양에서 얻어진 상등액 1%를 접종하여 Table 2에 나타난 각각의 실험 조건으로 30℃에서 80시간 배양하였다. 배양액의 pH는 2N NaOH 및 2N HCl을 이용하여 5.0으로 제어하였다.

Jar fermentor 내의 산소 공급 및 산소 분압(pO₂)의 측정

Jar fermentor로 공급되는 기체는 air pump를 통해 공급된 공기와 blender를 통해 공급된 순수산소가 혼합된 혼합기체이다. Air pump를 통해 공급된 공기는 air filter를 통과시켜 수분과 잡균을 제거하고 0.4vvm으로 일정하게 공급하였고, bomb에서 공급된 산소는 99.9%의 순수 산소를 blender를 통해 air filter를 통과시켜 fermentor 내로 주입하였다. 주입된 혼합기체의 산소 분압은 다음 식(3)에 의하여 계산되었다.

$$pO_2 = \frac{p(21 \cdot I_a + cO \cdot r_o)}{(I_a + r_o)} \times \frac{1}{100}$$

p : operating pressure(atm) I_a : air flow rate(ℓ /min)
 cO : concentration of oxygen(% v/v) supplied by oxygen bomb
 r_o : oxygen flow rate(ℓ /min)

균체량 측정 및 BC 정량

Jar fermentor에서 배양시켜 생성된 BC를 homogenizer(HMZ-20ND, Matsushita co., Japan)로 완전히 분쇄시켜 얻어진 균질화된 용액을 균체량 측정 및 BC 정량에 사용하였다. 균체량을 측정하기 위해 균질화된 용액에 0.1%(w/v)의 cellulase(*Trichoderma reesei*, Sigma, U.S.A.)를 첨가한 후 50℃에서 2시간 반응시켜 BC를 분해 한 후 660nm에서 분광광도계를 사용해 O.D.(Optical density)를 측정하였다. BC 정량은 위의 균질화된 용액 100ml를 취해 10,000×g, 18분간 원심분리 후 상등액은 버리고 pellicle만 취해 0.1N NaOH 용액에 넣고 80℃에서 20~30분간 교반하여, 이 용액을 filter paper(Whatman, England)에 여과시킨 후 80℃ dry oven에서 8시간 건조시켜 데시게이터에서 방냉, 항량이 되었을 때 건조중량을 측정해 BC생산량을 측정하였다.

Residual reducing sugar 과 glucose 정량

배양액 내에 잔존하는 total sugar 및 glucose농도를 정량하기 위하여 배양액을 0.45 μ m syringe filter(Whatman, England)로 여과시켜 균체와 셀룰로오스를 제거시켰다. Glucose농도는 enzymatic method(Glucose-E Kit, Young Dong, Korea)에 의해 측정하였고, total sugar농도는 DNS method를 사용해 glucose농도로 환산하여 측정하였다. *A. xylinum* KJ1을 jar fermentor에서 80시간 동안 배양할 때의 일반적인 BC 생산에 관한 특성을 Fig. 1에 나타내었다.

실험계획 및 통계분석

본 실험의 각 factor들의 중심값으로 탄소원 농도 2%, 교반속도 500rpm, 산소분압 0.25atm, 질소원 (CSL)농도 4%가 사용되었다. 이를 바탕으로 Table 2와 같이 각각의 실험인자(factor)를 설정하고, 이들 실험인자들의 조합에 의해 Table 3과 같이 24번의 실험을 수행하였다. 각각의 실험인자 변화에 따른 BC 생산성의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 아래와 같은 2차 다항식을 사용하였다(4).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Y : Response variable β_0 : Intercept
 β_i, β_{ij} : Regression coefficients X_i, X_j : Independent variables

실험결과는 SAS(Statistical analysis system)를 이용하여 통계적으로 분석하여 종속변수(탄소원 농도, 교반속도, 산소 분압 그리고 질소원 농도)에 대한 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 반응조건들에 대한 상호영향 및 최적 BC 생산을 위한 배양조건을 구하였다.

결과 및 고찰

반응표면 분석

본 실험에 이용한 중심합성계획은 Table 1에 보는 바와 같이 표준화된 값을 사용하였다. BC 생산 결과를 다중회귀분석을 통하여 반응표면방정식 계수 및 상관 계수를 결정하였다. BC생산량 및 수율에 관한 상관계수(R^2) 값은 각각 0.91 및 0.81 이었고, 또한 유의성 검증, 적합결여 및 잔차분석 등을 해석한 결과 모든 실험자료들이 독립변수인 탄소원 농도, 교반속도, 산소분압, CSL농도 변화에 따른 BC 생산량 및 수율에 대해 적절하게 설명되고 있음을 알 수 있었다. 각각의 독립변수에 관한 factor들의 상관성을 살펴보았는데, 탄소원 및 CSL 농도의 상관성과 교반속도, 산소분압의 상관성을 비교한 결과를 3차원 반응표면으로 분석한 결과를 Fig. 2에서 보여주고 있다.

최적조건 결정

전체 24개의 실험계획에서 각각의 factor의 조합에 의한 BC 생산성에 관한 결과 및 예측값을 Table 2에 나타내었다. 실험값과 factorial design에 의해서 얻어진 예측값 모두 Run No. 22에서 10.79g/L와 10.71g/L로 최대 BC 생산량을 보여주었다. 이때의 BC 생산을 위한 조건은 4% 탄소원, 교반속도 500rpm, 산소분압 0.28atm, CSL 농도 6%이었다.

A. xylinum KJ1을 이용한 BC 생산에서 가장 큰 영향을 주는 네 가지 factor에 관해 SAS 프로그램을 이용하여 최적값을 예측한 결과를 Table 3에 나타내었다. 최적 BC 생산을 위한 각 factor들은 탄소원 농도 4%, 교반속도 460rpm, 산소분압 0.28atm, CSL 농도 6%에서 11.67g/L의 BC 생산이 가능한 것으로 예측되었다. 수율면에서 최적 배양조건이 탄소원 농도 4%, 교반속도 564rpm, 산소분압 0.21atm, CSL 농도 2%일 때 최적의 수율 0.42g/g를 얻을 수 있을 것으로 예측되었다. 결정된 최적 조건에서의 실증 실험 결과 11.02g/L의 BC 생산량을 얻을 수 있었으며, 이는 기존의 실험에 비해 65.3% 향상된 결과이다. 이상의 연구에서 최적 BC 생산을 위한 배양 조건이 결정되었고, 최적화에 관련된 자료들은 산업적으로 BC를 생산하고자 할 때 유용하게 응용될 수 있을 것이다.

요 약

Factorial design model을 이용하여 *A. xylinum* KJ1의 BC생산을 위한 최적 배양조건을 결정하였다. 반응표면 분석을 위한 실험 계획법으로는 중심합성법 계획법을 이용하였으며, 주요 실험인자인 탄소원 농도, 교반속도(rpm), 산소분압, CSL의 농도의 네 가지 factor의 영향에 의한 BC생산량의 변화를

측정하였다.

SAS 프로그램을 이용하여 전체 24개의 실험계획에서 각각의 factor의 조합에 의한 BC 생산성에 관한 결과 및 예측값을 비교한 결과 BC 생산량 면에서는 상관계수(R^2)가 0.91으로 이었고, 수율면에서는 상관계수(R^2)는 0.81이다. 최적 BC 생산을 위한 각 factor들이 탄소원의 농도 4%, 교반속도 460rpm, 산소분압 0.28atm, CSL 농도 6%일 때, 이때의 BC 생산량은 11.67g/L로 예측되었다. 그리고 BC 생산 수율면에서 최적 배양조건이 탄소원 농도 4%, 교반속도 564rpm, 산소분압 0.21atm, CSL 농도 2%일 때 최적의 수율 0.4244g/g를 얻을 수 있을 것으로 예측되었다. 결정된 최적 조건에 의한 실증실험 결과 BC 생산량은 기존 조건에 비해 65%이상 향상된 결과를 얻을 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-00350) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Toyosaki, H., T. Naritomi, A. Seto, M. Matsuoka, T. Tsuchida and F. Yoshinaga (1995), Screenshot of bacterial cellulose producing *Acetobacter* strains suitable for agitate culture, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1498-1502
2. Son, C. J. (2002), Isolation and Cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing Bacterial Cellulose in shaking and agitated culture, M. S. Thesis, Dept. of Environmental Engineering, Chonnam National University, Kwangju
3. Kouda T, T. Naritomi, F. Yoshinaga (1997), Effects of Oxygen and Carbon-Dioxide Pressures on Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter* in Aerated and Agitated Culture, *J. Fer. and Bioeng.*, **84**(2), 124-127
4. Yoon S. J., B. D. Ye, S. H. Park, and E. Y. Lee (2000), Optimization of cometabolic trichloroethylene degradation conditions by response surface analysis, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 393-397

Table 1. Standardization in three levels of factors in various culture conditions.

| Factors | Sym-bols | Culture conditions | | | Standardized levels | | |
|-------------------------------|----------------|--------------------|------|------|---------------------|--------|----|
| Carbon conc. (%) | X ₁ | 1.6 | 2.0 | 4.0 | -1 | -0.833 | +1 |
| Shaking speed(rpm) | X ₂ | 350 | 500 | 600 | -1 | +0.4 | +1 |
| O ₂ pressure (atm) | X ₃ | 0.21 | 0.25 | 0.28 | -1 | +0.428 | +1 |
| CSL conc. (%) | X ₁ | 2.0 | 4.0 | 6.0 | -1 | 0 | +1 |

Table 3. Predicted optimum conditions by factorial design.

| Factors | BC concentration (g/L) | BC yield (g/g) |
|-----------------|------------------------|----------------|
| X1 | 4.0 | 4.0 |
| X2 | 460 | 564 |
| X3 | 0.28 | 0.21 |
| X4 | 6.0 | 2.0 |
| Predicted value | 11.672 | 0.4244 |

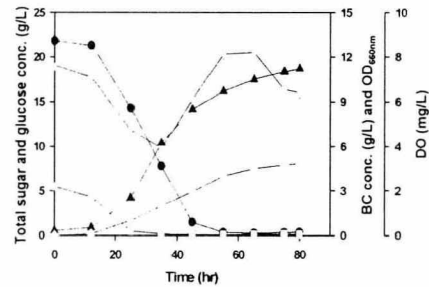


Figure 1. The changes of parameters related in BC production by *A. xylinum* KJ1 in agitated culture. The cultivation conditions was carbon source concentration of 2%, shaking speeds of 500rpm, oxygen pressure of 0.25atm and CSL concentration of 4%. Symbols: BC concentration(◇), OD_{600nm}(▲), glucose conc.(□), total sugar conc.(●), DO(▽)

Table 2. Experimental results under various culture conditions.

| Run No. | Experimental conditions | | | | Experimental results | | Predicted results | |
|---------|-------------------------|-------|--------|-------|----------------------|----------------|-------------------|----------------|
| | X_1 | X_2 | X_3 | X_4 | BC conc. (g/L) | BC yield (g/g) | BC conc. (g/L) | BC yield (g/g) |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1.57 | 0.09 | 2.05 | 0.13 |
| 2 | -1 | -1 | +0.428 | 0 | 3.43 | 0.21 | 2.34 | 0.15 |
| 3 | -1 | +0.4 | -1 | +1 | 2.88 | 0.18 | 4.05 | 0.22 |
| 4 | -1 | +0.4 | +0.428 | 0 | 4.33 | 0.27 | 5.14 | 0.27 |
| 5 | -1 | +0.4 | +1 | +1 | 6.01 | 0.37 | 5.36 | 0.33 |
| 6 | -1 | +1 | -1 | 0 | 4.11 | 0.25 | 3.65 | 0.23 |
| 7 | -1 | +1 | +0.428 | +1 | 2.17 | 0.13 | 2.66 | 0.18 |
| 8 | -1 | +1 | +1 | 0 | 2.71 | 0.17 | 1.98 | 0.16 |
| 9 | -0.833 | -1 | -1 | +1 | 1.85 | 0.09 | 1.25 | 0.07 |
| 10 | -0.833 | -1 | +1 | 0 | 1.73 | 0.08 | 2.29 | 0.12 |
| 11 | -0.833 | +0.4 | -1 | 0 | 5.44 | 0.27 | 5.13 | 0.24 |
| 12 | -0.833 | +0.4 | +0.428 | 0 | 4.83 | 0.24 | 5.15 | 0.23 |
| 13 | -0.833 | +0.4 | +1 | 0 | 3.534 | 0.17 | 4.47 | 0.21 |
| 14 | -0.833 | +1 | -1 | 0 | 4.03 | 0.20 | 3.64 | 0.19 |
| 15 | -0.833 | +1 | +0.428 | 0 | 3.405 | 0.17 | 2.96 | 0.15 |
| 16 | -0.833 | +1 | +1 | -1 | 3.23 | 0.16 | 3.19 | 0.15 |
| 17 | +1 | -1 | -1 | 0 | 2.67 | 0.06 | 3.14 | 0.07 |
| 18 | +1 | -1 | +0.428 | -1 | 3.20 | 0.08 | 2.76 | 0.04 |
| 19 | +1 | -1 | +1 | +1 | 9.16 | 0.22 | 9.79 | 0.25 |
| 20 | +1 | +0.4 | -1 | +1 | 9.19 | 0.23 | 8.86 | 0.22 |
| 21 | +1 | +0.4 | +0.428 | 0 | 9.96 | 0.24 | 8.13 | 0.23 |
| 22 | +1 | +0.4 | +1 | +1 | 10.74 | 0.27 | 10.71 | 0.27 |
| 23 | +1 | +1 | +0.428 | 0 | 3.83 | 0.09 | 6.03 | 0.16 |
| 24 | +1 | +1 | +1 | +1 | 8.30 | 0.20 | 7.71 | 0.15 |

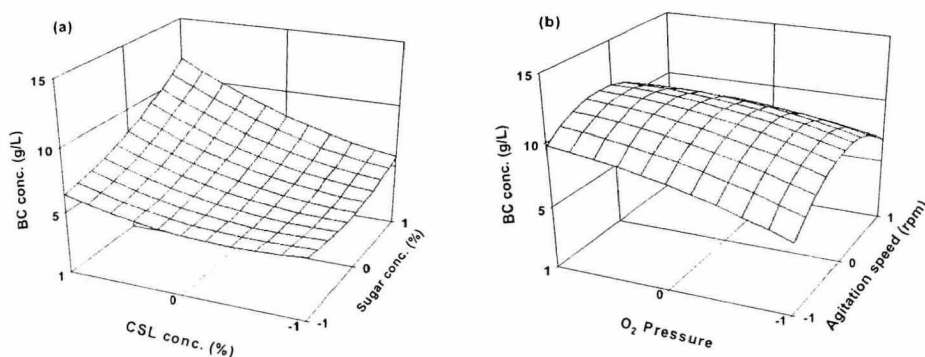


Figure 2. 3-D response surface in second scanning to the BC concentration according to the variation of carbon source concentration and CSL concentration(a) and shaking speed and oxygen pressure(b). The values of X_2 and X_3 were fixed as -0.18 and 1.00 (a) and X_1 and X_4 were fixed as 1.00 and 1.00 (b), respectively, as shown in Table 5.