

미생물 발효를 통한 셀룰로오스 생산

박중곤, 김연지, 윤남식*

경북대학교 화학공학과, *경북대학교 섬유시스템공학과

1. 서 론

Cellulose는 고등식물의 세포벽의 주성분으로 길고 가지가 없는 β -1, 4 결합에 의해 이루어진 고분자 다당류이다. 자연계에서 석탄에 이어 다량으로 존재하는 유기화합물이며, 공업적으로 중요한 자원으로 현재 제지와 펄프 그리고 의류산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있을 뿐만 아니라 상업적 응용분야가 매우 넓다.

1886년 A. J. Brown에 의해 초산균이 순수한 cellulose를 생산한다는 사실이 밝혀진 이래, 일부 algae, fungi 그리고 *Acetobacter*, *Agrobacteria*, *Rhizobia*, *Pseudomonas*, *Sarcina* 등과 같은 미생물도 합성할 수 있다고 보고되었다. 미생물 셀룰로오스는 hemicellulose, pectin, lignin 등을 함유하는 식물 cellulose와는 달리 다른 불순물 없이 순수한 cellulose로 구성되어있다. 따라서 유해한 부산물 없이 소량의 에너지와 약품으로 고순도의 cellulose를 정제할 수 있다. 미생물 셀룰로오스는 매우 미세한 마이크로 피브릴로 되어 있으며, 마이크로 피브릴은 3차원 망상구조를 가지며 각 섬유 두께는 $0.1 \mu\text{m}$ 정도로서 침엽수($32\sim 43 \mu\text{m}$), 활엽수($20\sim 30 \mu\text{m}$) 및 비목재 펄프(linter, $20 \mu\text{m}$) 보다 상당히 미세한 구조를 가지고 있다. 이와 같은 미세한 망상구조는 아주 큰 표면적을 가지며 높은 water retention value, moldability, crystallinity 그리고 강한 인장 강도를 가진다. 특히 BC로 만든 시트는 종이와 비교해서 인장강도 5배, 탄성을 6배 정도의 높은 값을 나타내며, cotton linter 보다 약 17배 높은 water retention value를 가지는 것으로 보고된 바 있다.

BC의 이러한 우수한 특성으로 인하여 고강도 고탄력의 방탄조끼, 방독면의 제조 등과 같은 방위 산업, 의료 제약분야에서는 화상치료에 사용하는 인공피부, 창상 피복제, 콘택트 렌즈, 인공관절, 인공근육, 인조혈관, 생리활성제, 미세한 섬유구조 및 공극구조를 이용한 반투막 제조 등에 이용될 수 있으며, 실제로 인공피부로서 특허가 인정되어 BioFill[®]로 상업화 된 사례가 있다. 음향 산업 분야에서는 pellicle을 그대로 사용하는 고음질 오디오와 스피커의 diaphragm 제조, 기타 공업제품 분야에서는 종이의 도공액 첨가제, 탄소 섬유, 정보기록용지, 종이의 탄성율(young's modulus), 인장강도, 치수 안정성 등을 향상시킨 고품위, 고부가가치의 용지제조 등에 활용되고 있다. 특히 일본 Sony사에서는 BC를 이용한 스피커 음향 진동판으로 고성능 헤드폰을 제작하여 시판 중에 있다. 식품분야에서는 식품의 증량제, 선도 유지제, 조

직감 향상, 소포체, 액상식품의 분산성, 유화성, 안정성 개선제로 이용될 수 있으며, 필리핀에서는 nata de coco란 이름으로 이미 생산·수출하고 있다.

발표에서는 본 연구실에서 분리 동정한 *Gluconacetobacter hansenii* PJK 균주를 이용하여 연구된 미생물 셀룰로오스를 생산하는 과정을 소개하고 제반 배양조건이 미생물셀룰로오스 생산에 미치는 속도에 미치는 영향을 소개하고자 한다.

2. 실험

Cellulose를 생산하는 균주는 본연구실에서 사과로부터 분리한 *Gluconacetobacter hansenii* PJK (KCTC 10505 BP)를 실험에 사용하였다. 미생물 배양을 위한 기본배지의 조성은 glucose 10 g/L, yeast extract 10 g/L, peptone 7 g/L, acetic acid 1.5 mL/L, succinate 0.2 g/L이며 pH는 5.0로 보정하였다.

50 mL의 배지가 함유된 250 mL 용량의 삼각 플라스크에 고형배지에서 보존중인 균주를 백금이로 접종하여 30°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 그 후 배양액 5%를 3 L의 본 배양액이 함유된 5 L jar fermentor에 접종하여 30°C에서 500 rpm, 1.0 vvm의 조건으로 배양하였다.

배양액 10 mL를 3580 g로 20분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 증류수 세척 및 원심분리(3580 g, 20분) 과정을 2회 거치고 일정한 무게가 될 때까지 동결건조(-50°C) 시켜 균이 포함된 BC의 건조중량을 먼저 구하였다. 그 후 균이 포함된 BC에 20 mL의 0.3 M NaOH를 첨가하여 5분간 끓임으로써 세포를 모두 용해시켰으며 filter paper (No. 2, Whatman Co.)가 장착된 filter flask를 사용하여 용액을 제거하였다. Filter paper에 걸러진 BC에 과량의 증류수를 투과하여 중성이 될 때까지 세척한 후 동결 건조하여 순수 BC의 건조중량을 측정하였다. 균이 포함된 BC의 건조중량과 순수 BC의 건조중량과의 차이로 균체의 건조중량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

Acetobacter strain은 배양 중 shear rate를 가하게 되면 cellulose를 생산할 수 없는 non-cellulose producing (*Cel*) mutants가 발생되어 BC 생산성을 감소시키므로 생산효율이 낮으나 전통적으로 정치배양을 이용하여 BC를 생산하였다. 따라서 이러한 문제점을 최소화 하고자 최근 shear stress가 있는 배양 환경에서도 비교적 안정적이며 BC 생산능이 우수한 균주를 분리하는 연구가 활발히 진행 중이며 본 연구실에서도 정치배양보다 진탕배양에서 BC 생산 수율이 더 높은 *Gluconacetobacter hansenii* PJK를 분리하였다. *G. hansenii* PJK의 경우 에탄올이 1% 첨가된 배지에서 진탕배양을 하면 *Cel* mutant의 발생 없이 안정적으로 BC 생산수율이 높아지나 교반배양과 같은 강한 shear stress 환경 하에서는 에탄올을 첨가하더라도 *Cel* mutant가 다량 발생하여 BC의 생산수율이 감소되었지만 교반 배양기내에서 발생하는 shear stress를 적절히 조절함으로써 교반배양 하에서도 *Cel* mutants의 발생 없이 BC 생산성을 높일 수 있는 최적 교반 배양조건을 확보하였다.

4. 결 론

Gluconacetobacter hansenii PJK를 이용하여 교반배양에서도 효율적으로 미생물 셀룰로오스를 생산할 수 있다.

감사의 글

연구의 일부가 2005년 경북대학교 연구교수 프로그램의 지원에 의하여 이루어졌음으로 감사드립니다.

참고문헌

1. Klemm D., Schumann, D., Udhard, U. and Marsch, S., "Bacterial Synthesized Cellulose - Artificial Blood Vessels for Microsurgery", *Prog. Polym. Sci.*, **26**, 1561-1603 (2001).
2. Park J. K., Jung, J. Y. and Park, Y. H., "Cellulose Production by *Gluconacetobacter hansenii* in a Medium Containing Ethanol", *Biotechnol. Lett.*, **25**, 2055-2059 (2003).
3. Chanliud E. and Gidley, M. J., "In vitro Synthesis and Properties of Pectin/*Acetobacter xylinus* Cellulose Composites", *Plant J.*, **20**, 25-35 (1999).
4. Ponyi T., Szabo, L., Nagy, T., Orosz, L., Simpson, P. J. Williamson M. P. and Gilbert, H. J., "Trp22, Trp24 and Tyr8 Play a Pivotal Role in the Binding of the Family 10 Cellulose-Binding Module from *Pseudomonas xylanase A* to Insoluble Ligands", *J. Biochem.*, **39**, 985-991 (2000).
5. Raghothama S., Simpson, P. J., Szabo, L., Nagy, T., Gilbert, H. J. and Williamson, M. P., "Solution Structure of the CBM10 Cellulose Binding Module from *Pseudomonas xylanase A*", *J. Biochem.*, **39**, 978-984 (2000).
6. Jeong, Y. J. and Lee, I. S., "A View of Utilizing Cellulose Produced by *Acetobacter* Bacteria", *Food Industry and Nutrition*, **5**, 25-29 (2000).
7. Park J. K., Park, Y. H. and Jung, J. Y., "Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK Isolated from Rotten Apple", *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, **8**, 83-88 (2002).
8. Son, H. J., Lee, O. M., Kim, Y. G., Park, Y. K. and Lee, S. J., "Characteristics of Cellulose Production by *Acetobacter* sp. A9 in Static Culture", *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 573-577 (2000).