

## Xanthan Gum 발효에 있어서 물질전달의 영향

임병연 · 유영제\*

서울대학교 공과대학 화학공학과

## Mass Transfer Effects in Xanthan Gum Fermentation

Lim, Byung-Yun, and Young-Je Yoo\*

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Seoul National University,  
Seoul 151-742, Korea

**Xanthan gum is a biopolymer produced by *Xanthomonas campestris*. In xanthan gum fermentation, the fermentation broth changes to highly viscous non-Newtonian fluid as xanthan gum concentration increases. Maximum xanthan gum concentration is limited by high viscosity of the broth since mass transfers of nutrient and oxygen are inhibited. In this study the mass transfer effects were investigated in batch and fed-batch fermentations at various agitation speeds and by separate oxygen transfer experiments. Xanthan gum production rate was observed to be largely dependent on oxygen transfer coefficient; while cell growth rate was not affected highly by this factor.**

Xanthan gum은 *Xanthomonas campestris* 균주에 의해 생산되는 생물고분자이다. 생물고분자라고 하면 단백질, 핵산, 다당류(polysaccharides) 등을 포함하는 자연적으로 제조회 거대분자를 말하는데 가공성이 우수하며 생체적합성 등의 특성이 있기 때문에 최근 생물공학기술의 급속한 진보에 힘입어 많은 생물고분자 제품이 기존의 합성고분자제품을 대체하여 의료용 및 산업용으로 사용되고 있으며 이들을 생산하는 미생물에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다. 이들 중에서 특히 다당류는 Gram 양성, Gram 음성세균, fungi, algae 등에 의해서 생산되는 gums으로서 물성과 구조에 있어서 독특하고 다양한 특성을 가지고 있기 때문에 유화제, 안정제, 접착제, 윤활제 등으로 식품, 의약 및 화학공업분야에서 폭넓게 응용되고 있다(1).

생물고분자제품으로서 수요가 제일 많으며 산업적으로 중요한 것의 하나는 세포의 다당류(extracellular polysaccharide)인 xanthan gum이다. Xanthan gum 수용액은 낮은 농도에서 높은 점도를 가지며 넓은 온도범위(10-70°C)와 pH의 변화(pH 6-9) 그리

고 전해질의 농도에 대해서도 점성이 거의 일정하게 유지되는 특성이 있다(2, 3). 이러한 독특하고 뛰어난 유변학적 특성 때문에 xanthan gum은 식품 및 제약, 화학공업 등의 산업에서 현탁액의 안정제, 농후제 그리고 식품의 교화제 등으로 사용된다(4). 특히 염에 의해서도 영향을 적게 받기 때문에 3차원 유희수공정에 쓰일 수 있는데 이는 잠재성이 가장 큰 시장이라 할 수 있다(5).

Xanthan gum은 회분식, 유가식 또는 연속식 배양에 의해 생산되는데 생산공정 중 대개 알콜을 이용하여 침전분리하는 회수공정이 많이 이용된다(6). 이때 요구되는 알콜의 양은 배양액의 부피에 의하여 주로 결정되기 때문에 xanthan gum의 경제성을 높이기 위해서는 최종 생산농도를 높이는 것이 요구된다. Xanthan gum 생산의 최종 농도를 제한하게 되는 주된 인자는 xanthan gum 농도 증가로 인한 고점도 배양액 내에서 교반과 물질전달이 제한되는 것이라 할 수 있다(7). *Xanthomonas campestris* 균주는 배양액 내에서 질소원 등의 영양분이 제한받게 될 경우 탄소원을 다당류(xanthan gum)로 전환하

Key words: Xanthan gum, fermentation, mass transfer effect, *Xanthomonas campestris*, biopolymer

\*Corresponding author

여 주변에 점액 (slime)을 형성하게 되는데 이는 일정하게 확산되는 특성이 있어서 배양액이 고점도의 non-Newtonian 유체로 변하게 되면서 영양분과 산소의 물질전달이 제한을 받게 된다(1). 그러므로 이러한 물질전달의 영향을 고려하여 생물반응기를 운전하게 되면 생산성을 크게 향상시킬 수 있다.

Xanthan gum 생산과 관련하여 xanthan gum의 생합성에 미치는 영양분의 영향(8, 9), xanthan gum 생산에 미치는 교반이나 통기속도 등 조작변수의 영향(10, 11), 생산농도를 높이기 위한 2단계 CSTR 등 장치의 개선(12, 13), 그리고 배양액의 유변학적 특성과 수학적 모델링 등에 관한 것들이 보고되었지만 미생물의 성장과 xanthan gum의 생합성에 미치는 물질전달영향은 보고되지 않았다. 본 연구에서는 회분식 및 유가식 배양실험, 그리고 산소전달계수 측정실험을 통해 미생물의 성장과 xanthan gum 생합성에 미치는 주된 인자들의 영향을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 균 주

*Xanthomonas campestris* NRRL B1459 균주를 xanthan gum 생산을 위한 배양에 사용하였고 agar slant(Difco nutrient agar+1% w/v glucose) 상에서 4°C로 보관하였다.

### 배 양

배지는 탄소원으로 glucose(20g/l)를 사용하였고 질소원으로는 복합성분의 peptone(5g/l)을 사용하였다. 그의  $K_2HPO_4$ (5g/l),  $MgSO_4$ (0.6g/l)을 사용하였다. 배지의 pH를 7.0으로 조절한 다음 autoclave에 넣어 121°C, 15 psig에서 20분간 멸균하여 사용하였다.

### 배양장치 및 방법

플라스크 배양의 경우 agar slant의 균주 1 loop를 250 ml 삼각플라스크에 넣은 멸균된 100 ml 배지에 접종하여 rotary shaker에서 150 rpm, 30°C를 유지하여 배양하였다. 회분식 및 유가식 배양에서는 5l fermentor(Marubishi, Model MD300)를 사용하였다. 온도와 pH는 각각 30°C와 7.0으로 유지하였고 교반속도는 300-700 rpm으로 변화시켰다. 통기속도는 1 vvm을 유지하였고 소포제로는 2% silicone 용액을 사용하였다. 유가식 배양의 경우 glucose가 고갈되었을 때 glucose 20-30g을 간헐적으로 공급하여 그 효과를 관찰하였다.

### 산소전달계수 측정

산소전달계수 측정은 xanthan gum이 담겨 있는 발효조에 통기를 중단하고  $N_2$ 를 공급하여 용존산소 농도가 0이 되도록 한 다음 일정한 속도로 통기하여 용존산소농도의 변화를 DO recorder로 기록하였다. DO probe로는 galvanic membrane type DO 전극을 사용하였고 xanthan gum의 농도와 교반속도를 변화시켜가면서 실험하였다. 산소전극의 응답시간지연은  $k_L a$ 의 계산에 있어 크게 영향을 미치지 않으므로 무시하였다. 미생물에 의한 산소 소비가 없는 경우 xanthan gum 수용액에서 용존산소농도(DO)의 변화는 다음식으로 주어진다(14).

$$\frac{d(DO)}{dt} = k_L a [(DO)^* - (DO)] \quad (1)$$

여기서,  $(DO)^*$ 는 포화상태의 산소농도이다. 윗식에서  $-\ln[(DO)^* - (DO)]$  값을 시간에 대하여 도시하고 그 기울기로부터 산소전달계수,  $k_L a$ 의 값을 구하였다.

### 분석방법

세포농도는 분광광도계(Bausch and Lomb, Spectronic 20)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하고 보정곡선으로부터 결정하였다.

Glucose 농도는 DNS method(15)에 의하여 측정하였으며 xanthan gum의 농도는 시료를 원심분리하여 미생물을 제거한 상등액에 에탄올을 1:1 비율로 가하여 침전시키고 이 침전이 생긴액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 60°C에서 무체가 일정해질 때까지 건조하여 구하였다.

Xanthan gum 배양액의 점도는 Brookfield 점도계(LVF형)로 spindle 4를 이용하여 30 rpm에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 배지의 영향

배지의 적정조성을 찾기 위해 플라스크 배양을 하였다. Peptone을 질소원으로 하는 복합배지에서 배양을 하였을 때는  $(NH_4)_2SO_4$ 를 질소원으로 하는 제한배지의 경우에 비해 지연시간(lag time)이 1/4 정도로 줄어들었다. 또한  $MgSO_4$ 를 0.1g/l 이하로 하여 배양을 하였을 때는 xanthan gum이 거의 생산되지 않았지만 0.2g/l 이상일 경우에는  $MgSO_4$  농도에 관계없이 xanthan gum의 생산량이 대체로 비슷하게 나타났다. 따라서 본 연구에서는 peptone 및

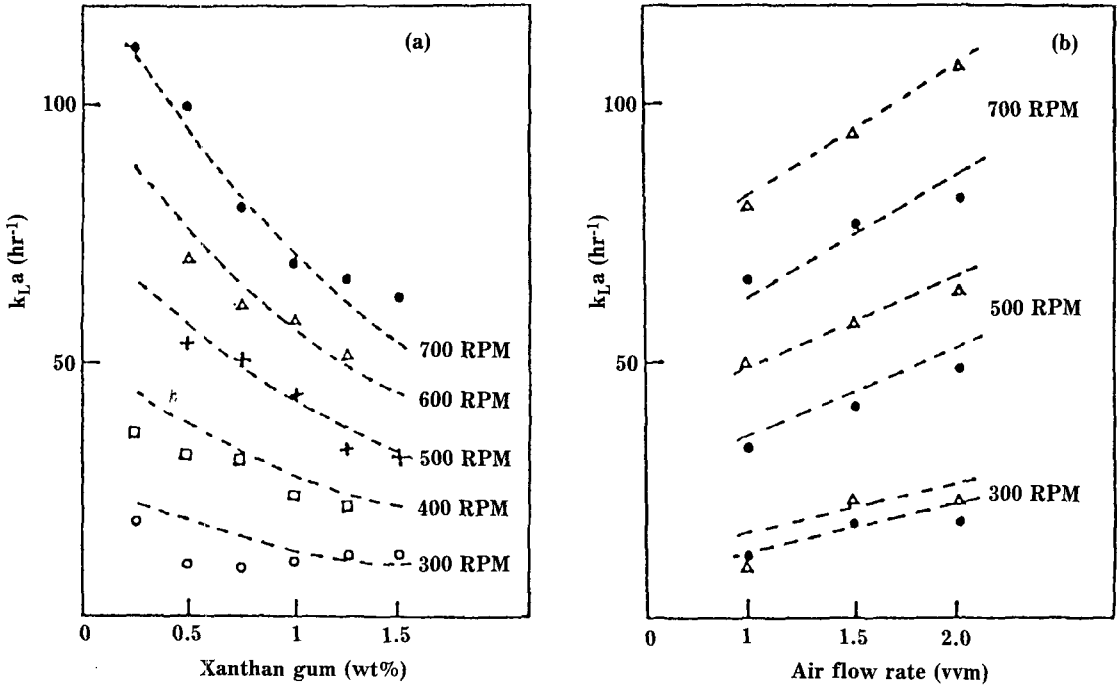


Fig. 1. The dependence of oxygen transfer coefficient on (a) agitation speed and xanthan gum concentration, and (b) agitation speed and air flow rate. (a) ● 700 RPM, △ 600 RPM, + 500 RPM, □ 400 RPM, ○ 300 RPM (air flow rate = 1 vvm) (b) xanthan gum concentration: △ 0.75 wt%, ● 1.25 wt%

MgSO<sub>4</sub>를 포함하는 배지를 사용하였다.

산소전달계수 분석

Fig.1 에는 산소전달계수 (oxygen transfer coefficient),  $k_{La}$ 의 측정실험결과를 나타내었다. Fig.1로부터 교반속도가 낮고 xanthan gum의 농도가 높을수록  $k_{La}$  값은 감소하고 통기속도가 증가할수록  $k_{La}$  값이 비례하여 증가함을 알 수 있다.

회분식배양

*Xanthomonas campestris* 균주의 성장과 xanthan gum의 생합성에 미치는 물질전달의 영향을 조사하기 위해 교반속도를 300-700 rpm으로 변화시켜가면서 회분식 배양을 하였다. 700 rpm에서 회분식 배양을 하였을 경우 Fig.2에서와 같이 xanthan gum은 배양 후 15시간 정도 지났을 때 생산되기 시작했으며 30시간을 전후하여 glucose가 거의 다 소모되었을 때 배양액은 최대 점도 4900 cp에 이르렀으며 xanthan gum의 수율(g of product/g of glucose)은 0.77로 나타났다.

Table 1은 교반속도변화에 따른 최대 세포농도,

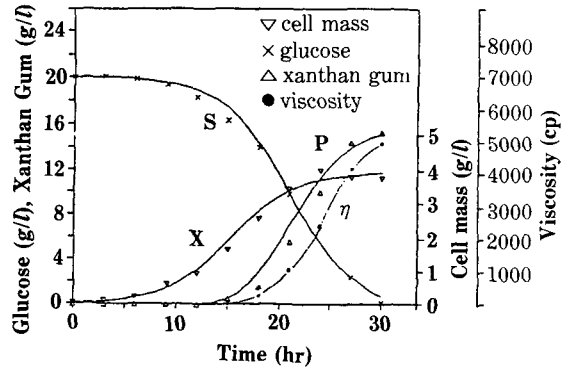


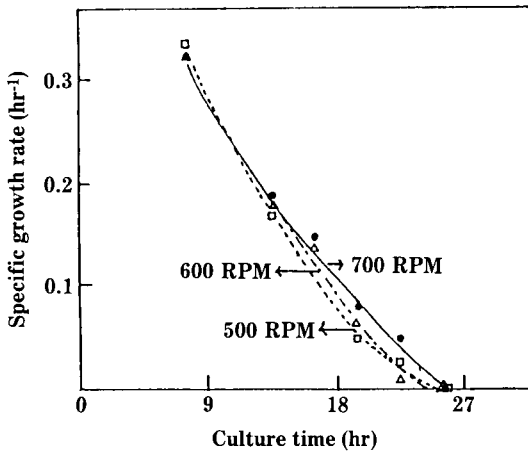
Fig. 2. Time courses of batch fermentation at 700 RPM.

최대 점도, 최대 xanthan gum 농도, 최대 비성장속도 (maximum specific growth rate) 그리고 최대 xanthan gum 비생산속도 (maximum specific production rate)를 비교하여 나타낸 것이다. 교반속도가 증가할수록 최대 xanthan gum 농도, 최대 세포농도, 최대 점도 그리고 최대 비생산속도는 증가했지만 미생물의 최대 비성장속도는 별다른 차이를 보

**Table 1. Results from batch fermentation ( $X_{max}$ : maximum cell concentration,  $\eta_{max}$ : maximum viscosity,  $P_{max}$ : maximum product concentration,  $\mu_{max}$ : maximum specific growth rate,  $\epsilon_{max}$ : maximum specific production rate).**

RPM	$X_{max}$ (g/l)	$\eta_{max}$ (cp)	$P_{max}$ (g/l)	$\mu_{max}$ (hr <sup>-1</sup> )	$\epsilon_{max}$ (g/g-hr)	Remarks
300	3.50	2400	10.0	0.31	0.14	oxygen limiting
500	3.60	3600	13.5	0.33	0.32	
600	3.70	4100	14.5	0.33	0.41	
700	3.95	4900	15.3	0.32	0.46	

(initial glucose concentration = 20g/l)

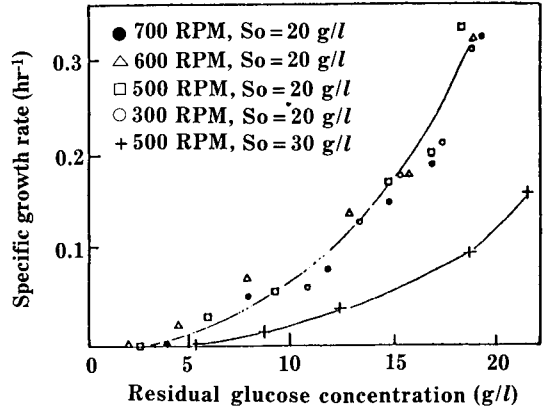


**Fig. 3. Specific growth rates at different agitation speeds.**

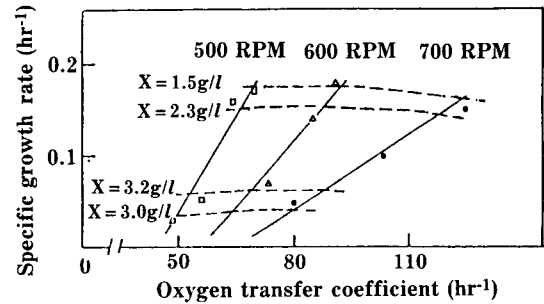
이지 않았다. 300 rpm 에서 회분식 배양을 한 경우에는 미생물의 성장도중 산소가 제한되었으므로 물질전달의 영향은 500 rpm 이상의 발효결과에 대하여만 검토하였다.

**미생물의 비성장속도 분석**

미생물의 성장에 미치는 물질전달의 영향 및 기질의 영향을 조사하기 위하여 회분식 배양의 결과로부터 기질농도, 세포농도, 그리고 생성물의 농도의 순간 변화량을 구하여 이들을 배양조건과 관련시켜 분석하였다. Fig.3은 교반속도변화에 따른 미생물의 순간 비성장속도(이하 비성장속도라고 표기함)의 변화를 시간에 대해 나타낸 것이다. 500-700 rpm 으로 배양한 경우 최대 비성장속도는 0.32-0.33 hr<sup>-1</sup>로 비슷했고 시간이 경과할수록 미생물의 비성장속도는 감소되었으며 교반속도가 높을 경우 미생물의 비성장속도가 다소 높은 경향을 보였지만 큰 차이를 나타내지는 않았다. Fig.4에는 미생물의 비성장속도를 기질의 농도에 대하여 나타내었다. Glucose 초기 농도가 20g/l 인 경우에는 교반속도의 차이에 관계없이



**Fig. 4. Specific growth rates as a function of substrate concentration.**



**Fig. 5. Specific growth rates as a function of oxygen transfer coefficient at different agitation speeds.**

기질농도가 같은 경우에 거의 비슷하게 나타나 기질 농도에 의존하는 듯한 경향을 보였으나, 500 rpm 에서 glucose 초기농도를 30g/l로 하여 배양한 실험결과와 비교한 결과 같은 기질농도에 대하여 미생물의 비성장속도가 각기 다르게 나타나 미생물의 성장은 기질농도와 무관한 것으로 판단된다. 이러한 분석은 glucose 초기 농도를 30g/l로 하여 배양한 경우 산소 및 질소원이 모두 non-limiting 상태이었으므로 배양결과는 limiting nutrient인 glucose 농도 및 세

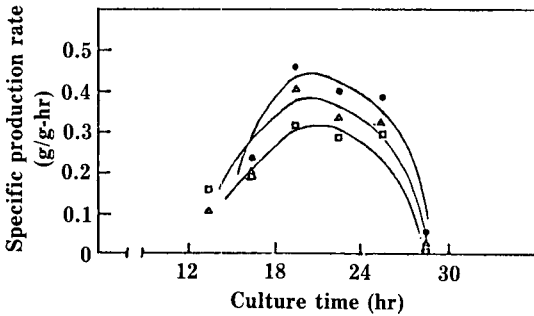


Fig. 6. Specific production rates at different agitation speeds.

●: 700 RPM, △: 600 RPM, □: 500 RPM

포농도에 의하여만 영향을 받는 것으로 가정한 것에 근거를 둔 것이다. Fig.5는 미생물의 비성장속도를 산소전달계수에 대하여 나타내 물질전달의 영향을 분석한 것이다. 산소전달계수는 Fig.1의 결과로부터 동일한 배양조건을 갖는 경우에 해당하는 값을 취하였다. 세포농도가 높을 경우 오차가 다소 높을 것으로 예상되나 본 실험의 경우에는 세포농도가 낮아 큰 차이를 보여주지 않아 Fig.1의 결과를 직접 사용하였다. 같은 rpm에서는  $k_{La}$ 의 값이 감소함에 따라 미생물의 비성장속도가  $k_{La}$ 에 무관한 것으로 판단된다. 그러나 세포농도가 같은 점에서는 각기 다른 배양조건일 경우에도 비성장속도값이 거의 일정하게 나타나며 1.5g/l로부터 3.6g/l로 높아짐에 따라 비성장속도는 감소하는 경향을 보이는데 이러한 결과는 logistic equation으로 표현되는 기존의 연구 결과(16)와 잘 일치한다.

**Xanthan gum의 비생산속도 분석**

Xanthan gum은 미생물의 성장단계와 비성장단계 모두에서 생산되었으며 xanthan gum의 순간 비생산속도(이하 비생산속도라고 함)는 배양조건에 따라 다르게 나타났다. Fig.6은 교반속도 변화에 따른 xanthan gum의 비생산속도를 시간에 따라 도시한 것이다. 교반속도가 높을수록 비생산속도가 높게 유지되며, 각각의 경우 xanthan gum의 비생산속도가 최대가 되는 점이 존재함을 알 수 있다. Xanthan gum 생산에 미치는 물질전달의 영향을 알아보기 위해 Fig.7과 같이 xanthan gum의 비생산속도를 세포농도가 같은 경우에 대해  $k_{La}$  값의 변화에 따라 도시하였다(각각의 cata point 옆에 표기된 숫자는 배양액의 기질농도를 나타낸다). 세포농도가 같을 때에는 교반속도에 관계없이 기질농도가 거의 유사한 값을 나타내었는데 이렇게 세포농도와 기질농도

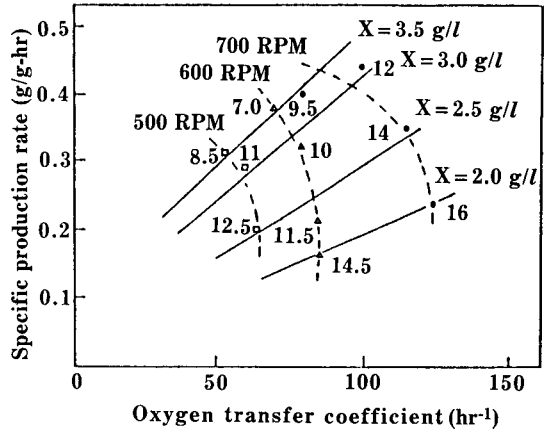


Fig. 7. The dependence of specific production rate on oxygen transfer coefficient at different cell mass and substrate concentration. The figure beside each symbol indicates the value of substrate concentration (g/l).

가 일정할 때는 교반속도가 증가함에 따라 즉  $K_{La}$  값이 증가할수록 xanthan gum의 비생산속도가 비례하여 증가함을 알 수 있었다. 이러한 회분식 배양에서의 분석결과가 유가식 배양에서도 적용되는가를 살펴보기 위해 600 rpm에서 회분식배양이 끝난 후 glucose가 소모되었을 때 두 차례에 걸쳐서 glucose 20g을 주입하여 배양을 한 결과 산소전달계수가 높을수록 비생산속도값이 높게 나타나 회분식 배양의 분석결과와 일치하는 경향을 보임을 알 수 있었다.

**사 사**

본 연구는 1988년도 문교부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비 및 호남석유화학(주)으로부터 기초연구비지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사사를 드립니다.

**요 약**

*Xanthomonas campestris*에 의한 생물고분자 xanthan gum 생산의 경우 배양액은 xanthan gum의 농도가 증가하면서 고점도의 non-Newtonian 유체로 변하게 되는데 이로 인하여 영양분과 산소의 물질전달이 저해를 받아 미생물의 성장과 xanthan gum의 생합성이 제한을 받게 된다. 본 연구에서는 교반속도를 변화시켜 가면서 회분식 및 유가식 배양을 하였으며 산소전달계수 측정실험을 하여 물질전달의 영향을 조사하였다. 미생물의 성장속도는 산소전달

전달계수 변화에 대해 크게 영향을 받지 않았지만 xanthan gum의 생산속도는 산소전달계수값에 크게 의존하였다.

### 참고문헌

1. Magaritis, A. and G.W. Pace: Comprehensive Biotechnology, (M. Moo-Young, ed.) Pergamon Press, New York, 1st ed., 3, 1005 (1985).
2. Cottrell, I.W. and K.S. Kang: *Microbial Technology*, 2, 417 (1979).
3. Moraine, R.A. and P. Rogovin: *Biotech. Bioeng.*, 15, 225 (1973).
4. Rogovin, P., W. Alblecht and V. Sohns: *Biotech. Bioeng.*, 7, 161 (1965).
5. Sandvick, E.I. and J.M. Maerker: Extracellular Microbial Polysaccharides, P.A. Sanford and A. Laskin, ed., *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 45, 242 (1977).
6. Smith, I.H. and G.W. Pace: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 32, 119 (1982).
7. Blanch, H.W. and S.M. Bhavaraju: *Biotech. Bioeng.*, 18, 745 (1976).
8. Souw, P. and A.L. Demain: *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 1186 (1979).
9. Pinches, A. and L.J. Pallent: *Biotech. Bioeng.*, 28, 1484 (1986).
10. Funashashi, H. and M. Maehara: *J. Chem. Eng. Japan*, 20, 16 (1987).
11. Funashashi, H., M. Maehara and H. Taguchi: *J. Ferment. Technol.*, 66, 103 (1988).
12. Banks, G.T. and P.D. Browning: USP 4, 692, 408 (1987).
13. Vashitz, O., S. Ulitzur and M. Sheintuch: *Chem. Eng. Science*, 43, 1883 (1988).
14. Bandyopadyay, B. and A.E. Humphrey: *Biotech. Bioeng.*, 9, 533 (1967).
15. Miller, G.: *Anal. Chem.*, 31, 426 (1959).
16. Weiss, R.M. and D.F. Ollis: *Biotech. Bioeng.*, 22, 859 (1980).

(Received April 6, 1989)