

*Bacillus sp.*에 의한 생물 고분자의 발효 중 배양액의 유변학적 특성 변화

†이 신 영 · 이 주 하

강원대학교 환경·생물공학부, 연세대학교 생물산업소재연구센터

Changes in Rheological Properties of Culture Broth During the Biopolymer Production by *Bacillus sp.*

Shin-Young Lee[†] and Ju-Ha Lee

Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University,
Chunchon, Kangwon 200-701, Korea
Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT

Variations of rheological properties of culture broth during the production of biopolymer by an alkali tolerant *Bacillus sp.* were investigated. Correlations among the rheological characteristics of culture broth, cell growth and biopolymer production were examined. Rheology of the culture broth changed in the course of fermentation. The culture broth showed a non-Newtonian flow behavior, as the viscosity and pseudoplasticity increased during the cultivation. The rheological parameters such as flow index, consistency index, yield stress and apparent viscosity during the cultivation were not influenced by the cell growth, but significantly related to the biopolymer synthesis. Changes in the rheological parameters of the broth were affected not only by the biopolymer concentration, but also by the progress of fermentation. Some rheological parameters showed maximum values just before the completion of biopolymer production and substrate consumption. Hence, it was shown that the rheological characteristics of the culture broth could be used as a good indicator for the detection of the progress or completion of fermentation.

서 론

미생물 배양액은 미생물의 종류나 형태 및 균체 생성물의 영향을 받아 배양경과 중 점차 복잡한 유변학적 거동을 나타낸다(1-7). 일반적으로 균사체 미생물의 경우는 균체농도의 증가로 배양액의 유변학적 성질이 비뉴톤 유체로 바뀌고, 의가소성 거동

을 나타낸다(2-8). 반면, 비균사체 미생물에서는 균체의 영향은 거의 무시되지만 대량의 고분자가 생성될 경우는 역시 의가소성의 비뉴톤 유체거동을 나타내게 되는데(1, 2, 9, 10), 통상 이러한 유변학적 거동은 배양액의 교반과 기체-액체간의 산소전달 속도 및 열전달 속도에 크게 영향을 미치므로 전체적으로 배양액계의 생산효율을 감소시키며, 발효공정의 분석과 조절을 어렵게 한다(2, 4, 7, 10). 따라서 효율적인 발효공정의 설계나 성능향상, 발효운전 조

† Corresponding Author

작 조건의 최적화 및 scale-up에 대한 열이나 물질 전달의 효과를 평가를 위해서는 배양액계의 유변학적 성질을 파악하는 것이 매우 중요하다.

대표적 생물 고분자인 다당류의 발효에서는 다당의 분자량이 수백만에 달하는 매우 큰 분자이므로 발효 중에 배양액의 점도가 현저하게 증가하는 등 더욱 복잡한 유변학 거동을 나타낸다(2, 9, 10). 그러므로 다당류 및 이들 유도체의 발효에서는 배양액계의 특성 규명이나 반응기의 설계 및 조작의 향상을 위해 배양액계의 유변학적 연구의 필요성이 더욱 높다. 특히 배양액계의 유변학 자료는 빠르고 신빙성 있는 발효완료 시점의 평가지표나 연속적인 감시 또는 조절의 수단을 제공할 수 있음이 보고되고 있으므로 발효공정의 분석이나 조절을 위해서도 매우 필요한 분야이다(7-10). 그러나 아직은 극히 일부 미생물의 다당에 국한되어 보고되었으므로 미흡한 점이 많으며, 이에 대한 검토의 필요성은 매우 높다.

그 동안 저자들은 미생물에 의한 유용 생물고분자의 생산 및 이의 용도개발 연구의 일환으로 토양으로부터 생물고분자 생성균주로서 알카리 내성 *Bacillus* sp.의 한 균주를 분리동정하였고(11), 알카리 발효의 생물물질로서 고점성의 생물고분자 생산조건의 최적화를 행하였는데(12), 이 생물고분자는 pH 10의 알카리성에서 발효생산되는 점, 그리고 높은 단백질량을 함유하며, uronic acid를 함유하지 않는 산성의 생물 고분자라는 점에서 이미 알려진 *Bacillus* 속 균주의 다당류와는 다른 특성을 나타낼 것으로 판단되었다. 또 이 알카리 내성 *Bacillus* sp.가 생산하는 생물 고분자를 분리 정제한 결과, 생물 고분자는 γ -PGA(polyglutamic acid)와 1,3 결합의 oligo당이 결합한 일종의 당단백질(glycoprotein)인 것으로 추정되었고, 중화 당량은 약 171로 γ -PGA의 1.3 잔기당 1개의 음이온이 존재하였으며, 분자량은 약 5×10^5 dalton이었다(13). 특히, 이 알카리 내성 *Bacillus* sp.가 전분질을 기질로 하여 생산한 biopolymer는 고유점도가 약 42dl/g나 되는 매우 높은 점성의 요인성분이었다. 본 연구에서는 이 알카리 내성 *Bacillus* sp.에 의한 생물고분자의 발효 중 배양액의 유변학적 성질의 경시변화를 조사, 검토하였다. 아울러 균체중식 및 생물 고분자의 생산과 유변학 특성 변화와의 상관관계를 규명하였으며, 이로부터 발효진행의 지표로서의 유효성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 이 등(11)이 토양으로부터 순수분리하였던 biopolymer 생산능이 있는 알카리 내성의 *Bacillus* sp.이다. 균주는 Horikoshi 등(14)이 보고한 호알카리성 미생물의 분리용 배지인 한천 사면배지에서 계대배양하였고, 4°C에서 보존하면서 사용하였다.

한편, 본 실험의 배양용 배지는 이 등(12)이 biopolymer 생산의 최적 배지로 보고한 pH 10의 soluble starch 8%, yeast extract 0.75%, NaNO_3 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% 및 Na_2CO_3 1%의 조성을 갖는 배지이다. 121°C에서 15분간 가압살균하여 사용하였고, 이때 Na_2CO_3 는 살균시 배지 중 염의 침전을 방지하기 위하여 별도로 살균한 다음 상온으로 냉각하여 혼합하였다. pH는 살균후 2N NaOH 또는 2N HCl로 조절하였다.

배양방법

전배양은 250mL의 삼각 플라스크에 액체배지 50mL를 넣고 여기에 한천 사면배지에 보존하였던 균주를 백금이로 2~3회 접종한 후 30°C에서 32시간 진탕배양하였다. 본 배양은 biopolymer 생산배지(pH 10) 50mL를 함유한 250mL의 삼각 플라스크에 전배양액을 3%(v/v) 접종한 후 30°C, 120rpm에서 진탕배양하였다.

균체량의 측정

36시간 진탕배양한 배양액을 27,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 균체를 회수하고 이를 24시간 동결건조시켰다. 이 건조균체를 배양액에 현탁시켜 여러 농도로(0~100 μ g) 희석한 다음, 660nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였고, 이로부터 균체량을 구하였다(12).

Biopolymer의 분리 및 정량

배양액을 27,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 얻은 다음, 여기에 2배량의 acetone을 첨가하여 침전을 얻었으며, 이를 다시 증류수로 용해시켰다. 다시 acetone으로 침전시킨 다음 drying oven에서 105°C로 향량이 될 때까지 건조시켜 biopolymer의 농도로 하였으며, 건조중량으로 정량하였다(12).

전분의 정량

진탕배양한 배양액을 27,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 회수하고 여기에 증류수를 가하여 5mL로 적당히 희석한 다음, 끓는 물에서 20분간 가열하였다. 여기에 냉각한 증류수 20mL를 첨가하여 20°C에서 25분간 방치한 후 요오드 용액(0.2% I₂~2% KI) 0.2mL를 넣고 교반하였다. 30분 후에 520nm에서의 흡광도를 측정하고 표준곡선으로부터 전분량을 구하였다(15). 이때 표준곡선은 여러 농도의 가용성 전분 용액을 끓는 물에서 20분간 가열 호화시켜서 작성하였다.

배양액의 유변학적 특성 측정 및 특성값의 산출

배양액의 유변학적 특성은 회전 점도계(Brabender Viscotron model No.803401)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다.

배양액을 27,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 측정용 컵(E₁₇)의 스피들 표선에 일치하도록 넣고, 30~60°C 범위의 일정온도로 5분간 열평형시킨 후에 회전속도를 0~128rpm으로 변화시키면서 대응하는 토오크값의 변화를 X-Y-t 기록계로 자동 기록하였다.

유변학적 특성값의 산출은 Herschel-Bulkley식 및 Casson식을 적용하여 구하였고, 전단속도에 따른 겔보기 점도 μ₀(Pa·s)의 변화는 다음 식으로 계산하였다(16, 17).

$$\mu_0 = K \cdot D^{n-1}$$

여기서 K는 점도도지수(Pa·sⁿ), D는 전단속도(sec⁻¹), n은 유동지수(-)이다.

결과 및 고찰

배양경시변화

Biopolymer를 생산하는 알카리 내성 *Bacillus* sp.의 배양경시 변화를 최적 생산배지에서 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 균체생육은 배양초기 pH의 감소 및 기질인 전분의 소비와 더불어 활발히 진행되어 배양 32시간 이후 거의 일정값에 도달하였다. 또 biopolymer의 생산은 배양 10시간 이후 균체의 생육과 비례하여 생산되었고, 역시 배양 32시간 후 최대의 생산량을 나타내었으며, 이때의 biopolymer 생산량은 약 39.69g/L이었다.

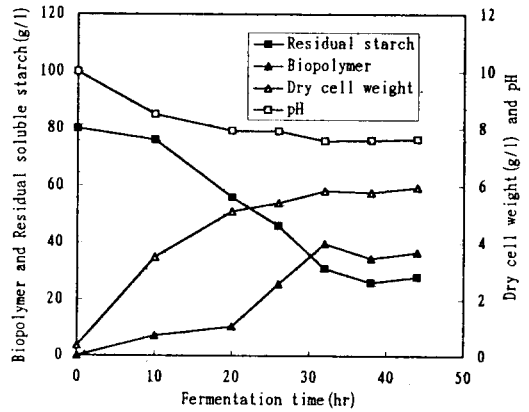


Fig. 1. Time course of *Bacillus* sp. cultivation.

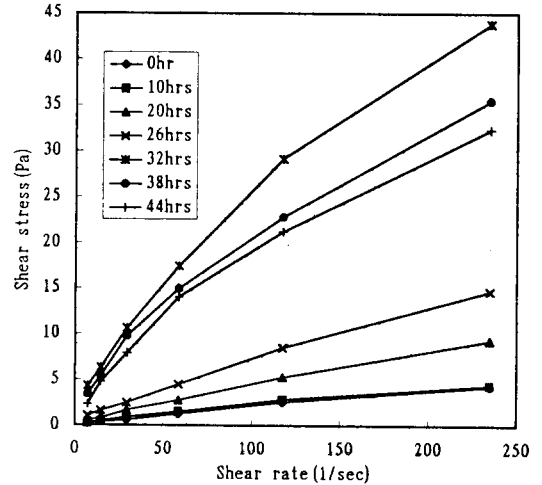


Fig. 2. Flow curves of culture broth during the biopolymer fermentation by *Bacillus* sp.

배양액의 유변학적 특성의 경시변화

Bacillus sp.에 의한 biopolymer 배양액의 유동거동을 알아 보기 위하여 다당 발효 중의 경과시간을 매개변수로 하여 배양액의 전단응력에 대한 전단속도의 관계를 살펴 보았으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 배양액의 전단응력과 전단속도의 관계는 발효 경과시간에 관계없이 모두 비직선적인 증가경향을 보여서 비뉴턴유체의 거동을 나타내었다. 또 비직선적인 증가 경향은 발효시간이 경과할수록 더 심하였다.

이들 비뉴턴유체의 거동을 보다 정량화하기 위하여 Fig. 2의 자료로부터 Casson식에 적용하여 항복

Table 1. Changes in rheological parameters of culture broth during the biopolymer fermentation by *Bacillus* sp.

Culture Time(hrs)	Rheological parameters		
	Consistency index, K(Pa·s ⁿ)	Flow index, n(-)	Yield stress, τ _y (Pa)
0	0.030	0.911	0.008
10	0.035	0.908	0.036
20	0.077	0.880	0.047
26	0.158	0.822	0.145
32	0.694	0.777	0.952
38	0.577	0.798	0.587
44	0.381	0.891	0.152

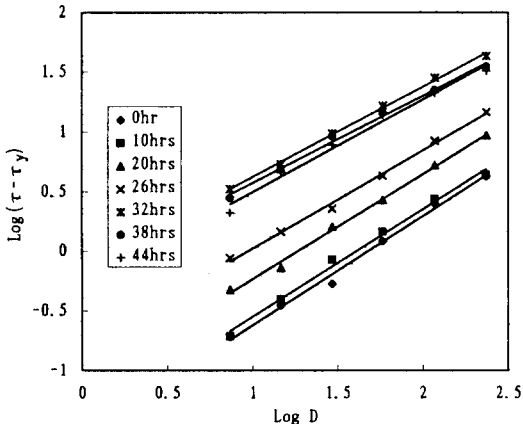


Fig. 3. Logarithmic plot of shear stress and shear rate for the culture broth by *Bacillus* sp. cultivation.

응력을 구하였으며, 이 값을 고려하여 서로 다른 배양시간에서 얻은 각 배양액 시료에 대한 전단응력과 전단속도의 관계를 양대수 좌표에 도시한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

그림에서 보는 바와 같이 $\log(\tau - \tau_y)$ 와 $\log D$ 는 직선관계를 나타내어 각 배양액의 유변학 특성이 Herschel-Bulkley식에 잘 따름을 알 수 있었다. Herschel-Bulkley 및 Casson 식에 의하여 유변학적 특성값인 유동지수 n , 점조도 지수 K 값 및 항복응력 τ_y 값을 구한 결과는 Table 1과 같으며, 이들 n , K 및 τ_y 값은 발효경과시간에 따라 변화하는 특징을 보였다. 즉 이들 값의 경시변화를 도시한 결과인 Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 K 와 τ_y 는 발효경과에 따라 서서히 증가하다가 배양말기 급격히 증가하여

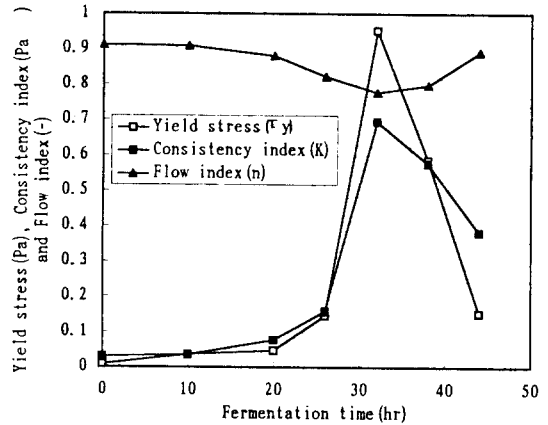


Fig. 4. Changes in rheological parameters of the culture broth during fermentation of *Bacillus* sp.

배양 32시간에 최대값을 보인 후 다시 급격히 감소하였다. 또 비뉴턴유체거동을 나타내는 지표인 n 값도 발효경과에 따라 서서히 감소하여 의가소성이 증가함을 보였으나 배양 32시간 이후에는 다시 증가하고 뉴턴유체화됨을 보였다. 이러한 발효 중의 배양액 유변학적 성질의 변화는 Fig. 1의 균체 생육이나 다당의 축적에 기인하였다고 볼 수 있으므로 이들 변화를 Fig. 1의 경시변화 자료와 상관시켜 관찰해보면, K 및 τ_y 값의 경향은 균체 및 다당 생산의 경시변화와 잘 일치하였다.

그러나 배양경과에 따른 배양 여액에 건조 균체를 현탁시킨후 균체농도에 따른 겔보기 점도의 변화를 전단속도 7.34sec^{-1} 에서 조사한 Fig. 5를 살펴 보면 균체농도의 증가에 따른 점도의 증가효과는 매우 적었다. 즉 20시간의 배양구에서 직선의 기울기 값은 약 0.002, 그리고 최대 생성물을 얻었던 32시간의 배양구에서도 기울기 값이 0.006으로 균체농도의 증가에 따른 점도의 증가는 거의 무시할 수 있는 것으로 생각되었다. 따라서 본 균주의 경우 배양액의 겔보기 점도 변화의 주요 결정인자는 미생물 생산물인 biopolymer라고 볼 수 있는데, 균체의 영향이 무시되는 것은 잔탄검, 덱스트란 등의 생산에서도 관찰되었다(2, 10). 통상 생물 반응기에서 나타나는 세포농도 범위에서 단세포 미생물은 반응기내 배양액의 유동특성에 거의 영향을 주지 않으나, 균사체 미생물인 사상균은 비교적 낮은 균체농도에서도 높은 점성의 현탁액을 만들어 유변학적 성질에 영향을 미친

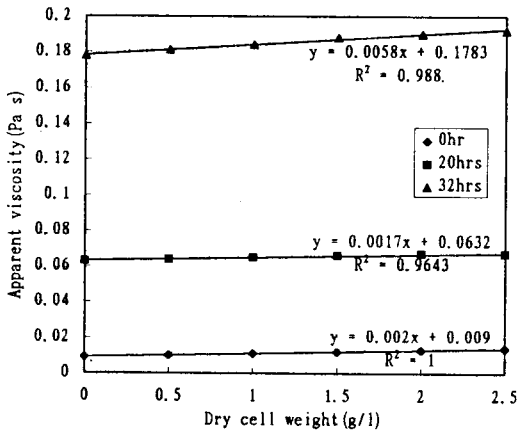


Fig. 5. Relationships between the apparent viscosity and dry cell weight in culture broth.

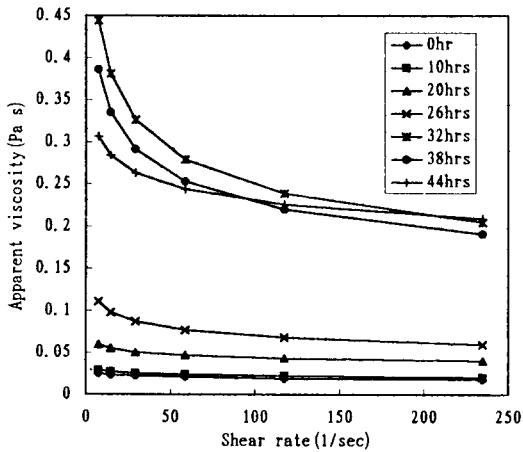


Fig. 6. Variations in apparent viscosities of culture broth at different culture times.

다(2, 3, 5).

한편, 뉴턴유체로 되돌아가는 경향은 역시 Fig. 1의 경시변화에서 발효말기의 낮은 기질농도에서 다당의 생합성 속도가 낮아지는 경향이나 균체 생육속도가 실질적으로 느려진 경향과 잘 일치하였다. 즉 biopolymer 생산이 시작되는 배양 10시간 이후부터 n 값이 감소하고 배양 32시간에서 0.78로 최소값을 보여서 발효가 진행됨에 따라 biopolymer의 생산으로 발효액의 의가소성 성질은 더욱 커짐을 알 수 있었다. 그러나 32시간 이후 기질이 거의 소비되고 균체생육 및 다당합성이 느려지면서 그 경향은 반대가 되어 뉴턴 유체화되었다. 통상 무세포 용액에서는

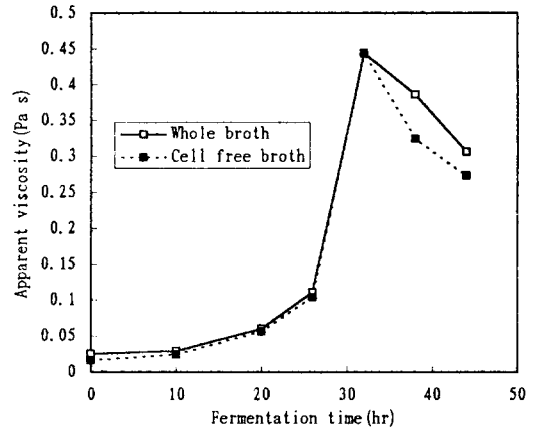


Fig. 7. Changes in apparent viscosities of the cell free and whole broth during fermentation of *Bacillus* sp.

다당용액이 농도의 증가에 따라 의가소성이 계속 증가하므로 이는 배양액제에서 나타나는 특징이라 볼 수 있다.

Fig. 6은 배양액의 전단속도($7.34 - 234.88\text{sec}^{-1}$)에 대한 겔보기 점도의 변화를 검토한 결과이다. 전단속도의 증가에 따라 겔보기 점도도 감소하였으며, 그 감소정도는 대체로 배양시간이 길어질수록 더욱 심하여 배양 32시간 이후 급격한 점도의 감소경향을 보였다. 이러한 shear thinning 거동은 의가소성으로 설명되므로 배양기간이 길어 질수록 배양액의 의가소성이 강해짐을 알 수 있었다. 통상 의가소성 거동의 결과를 초래하는 요인은 액체 중에 고분자 또는 고형분의 존재이므로(18), 빠른 균체 생육 및 다당의 축적이 모두 발효 배양액의 점도상승이나 비뉴턴유체 거동의 증가를 일으켰다고 생각할 수 있다. 그러나 본 biopolymer 발효 배양의 경우는 겔보기 점도의 변화를 전단속도 7.34sec^{-1} 에서 측정된 결과인 Fig. 7에서 볼 수 있는 바와 같이 균체를 함유한 배양액과 균체를 제거한 배양여액의 겔보기 점도는 시료차이를 보이지 않아서 균체는 배양액의 겔보기 점도에 영향을 미치지 않음을 보였다.

한편, Fig. 7에서 겔보기 점도는 배양 10시간에 29cp이던 것이 배양시간의 증가에 따라 증가하여서 배양 32시간에 444cp로 최대값을 보였으며, 이후 다시 급격히 감소였다. 이와 같은 배양시간의 증가에 따른 겔보기 점도의 변화 현상은 Fig. 4에서 K 및 τ_c 값의 경시변화과도 잘 일치하였는데, 발효 중기

까지의 겔보기 점도 증가는 배양시간에 따른 biopolymer 생산의 결과와 잘 일치하여서 발효 중 겔보기 점도의 변화가 biopolymer 생산과 밀접한 관련을 가짐을 보였다. 그러나 발효 후기에는 겔보기 점도가 급격히 감소하고 겔보기 점도의 최대값이 기질의 소비 및 다당의 합성 완료 바로 직전에 나타나는 특징을 보였다. 이와 같은 발효말기 점도의 저하는 일반적으로 더 많은 분지구조(branched structure)를 갖는 다당의 생산 또는 세포의 자가분해로 유리된 효소에 기인한 다당의 가수분해 때문에 일어난다고 제안되기도 하였다(19, 20). 또 덱스트란의 경우는 용액 중에 고분자 응집물의 크기를 감소시키면서 세포벽으로부터 다당분자를 유리시키기 때문이라고 추론되었다(10). 이러한 점도저하 현상은 일반적으로 무세포 다당 용액에서는 나타나지 않는 경향으로 배양액계의 특징이라 할 수 있는데, 방선균과 같은 균사체 미생물의 배양액계에서는 발효말기 배양액의 K값 저하가 세포의 lysis 및 균사의 단편화에 기인하며, 이에 따라 n값이 증가하고 뉴톤 유체화한다고 알려지고 있다(8).

따라서 이들 배양액계의 점도변화 결과는 다당 농도만의 함수가 아니고 발효의 진행을 반영함을 보여주는 사실로서, 배양액계의 점도변화의 경향을 감지함으로써 다당합성의 완료에 대한 양호한 지표로 제공할 수 있음을 알 수 있으며, 이는 덱스트란에 대한 보고 결과와도 잘 일치하였다. 즉 무세포 덱스트란 용액에서 의가소성과 점도의 증가는 덱스트란 분자의 응집물 형성에 기인하며, 발효 배양액에서 기질인 설탕이 소모될 때, 응집물 크기의 감소는 그의 점성과 비뉴톤 거동을 둘다 감소시켜서 결국 덱스트란 배양액의 유변학 변화는 기질인 설탕의 고갈을 지적하며, 또 발효지표를 제공한다고 보고된 바 있다(10).

결국 배양액계의 점도자료는 배양액의 정확한 회수 또는 수확시점을 선택할 수 있게 하는 등 다당 발효의 중요한 자료분석 수단으로 사용될 수 있음을 알 수 있는데, 배양액의 전처리를 포함하지 않으며, 또 시료 채취나 분석으로 인한 오차를 피할 수 있는 장점을 갖는다. 특히 배양액계의 점도 변화 측정은 매우 간단하고, 또 on-line 점도계 위에서 단일 전단 속도에서의 겔보기 점도를 연속적으로 측정할 수 있으므로 공정의 감시 또는 조절수단으로도 유효하게 사용될 수 있으므로 차후 검토의 필요성이 매우 높다고 생각된다.

요 약

고점성을 갖는 미생물 생물 고분자에 대한 발효 공정 분석 및 조절 연구의 일환으로 알카리 내성 *Bacillus* sp.를 사용한 생물고분자의 발효 중 배양액의 유변학적 성질에 대한 경시변화를 조사하였으며, 균체생육 및 생물 고분자의 생산과 유변학 특성 변화와의 상관관계를 검토하였다.

배양액의 유변학은 배양시간 경과에 따라 현저하게 변화하여 더욱 점성이 있고, 또 의가소성이 증대하면서 비뉴톤 유체로서 거동하였다. 발효 중 유동지수, 점도도지수, 항복응력 및 겔보기 점도 등 유변학 특성값은 균체증식에는 거의 영향을 받지 않고, biopolymer의 합성과 밀접한 상관성을 보였다. 또 유변학적 특성값의 변화는 생물고분자 농도만의 함수가 아니고 발효진행과 상관성을 보였고, 생물고분자의 생성이나 기질 소비의 완료 직전에 최대값을 나타내었다. 따라서 이들 변화의 특성화는 발효경과 또는 완료에 대한 양호한 지표를 공급할 수 있음을 시사하였다.

참고 문헌

1. H. Taguchi(1971), *Advances in Biochemical Engineering*, 1, 1.
2. M. Charles(1978), *Advances in Biochemical Engineering*, 8, 1.
3. B. Metz, N. W. F. Kossen, and J. C. van Sunijdam(1979), *Advances in Biochemical Engineering*, 11, 103.
4. A. Leduy, A. A. Marsan, and B. Coupal (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 6174.
5. G. W. Pace(1980), *Fungal Biotechnology*, J. E. Smith, D. R. Berry, and B. Kristiansen eds., 95, Academic Press, New York.
6. J. A. Roles, J. van den Berg, and R. M. Voncken(1974), *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 181.
7. Z. Kembrowski and B. Kristiansen(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1474.
8. S. J. Warren, E. Keshavarz-Moore, P. A. Shamlou, and M. D. Lilly(1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 80.
9. Y. Fujio, T. Satoyama, and S. Ueda(1981), *J. Ferment. Technol.*, 59, 173.
10. R. S. Landon, R. C. S. Law, and C. Webb

- (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 251.
11. 이신영, 이범수, 신원철, 권익부, 유주현(1991), 한국식품과학회지, **23**, 161.
 12. 이신영, 이범수, 이근억(1991), 한국식품과학회지, **23**, 167.
 13. 이신영, 원숙, 김진영, 유주현(1991), 식품과학과 산업, **24**, 145.
 14. K. Horikoshi and T. Akiba(1982), *Alkalophilic Microorganisms : A New Microbial World*, 1, Japan Scientific Soc. Press, Tokyo.
 15. M. Nedeltscha, G. Stoilkov, and S. Popova (1975), *Stärke*, **27**, 298.
 16. S. D. Holdsworth(1971), *J. Text. Studies*, **2**, 393.
 17. N. Casson(1959), *Rheology of Disperse Systems*, C. C Mill ed., p. 84, Pergammon Press, London.
 18. H. W. Blanch and S. M. Bhavaraju(1976), *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 745.
 19. L. Choplin and J. Sabatie(1986), *Biotechnol. Lett.*, **6**, 425.
 20. V. B. Veljovic, M. L. Lazie, and D. U. Skaia (1988), *Enz. Microb. Technol.*, **10**, 686.