

Acetobacter xylinum BRC5에 의한 미생물 셀룰로오스의 발효 특성

박상훈 · 양영국 · 황정욱 · 이창승 · 변유량*
연세대학교 생명공학과 · 생물산업소재연구센터

Microbial Cellulose Fermentation by Acetobacter xylinum BRC5. Sang Hoon Park, Young Kook Yang, Jung Wook Hwang, Chang Seung Lee and Yu Ryang Pyun*. Department of Biotechnology, Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea - The characteristics of cell growth and cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 were studied in shaking flasks and jar fermentors. Of the substrates tested, the highest cellulose yield was obtained from the fructose medium. Some inductive cultivation was observed and then cellulose was produced with cell growth. When glucose alone or mixture of glucose and fructose was used as the carbon source, cellulose could be biosynthesized under the glucose limitation. Corn steep liquor (CSL), as a low-cost nitrogen source, was a good substitute for yeast extract. In a jar fermentor experiment, 4.14 g/l of disintegrated cellulose was obtained from 8% CSL medium containing 0.5% glucose and 1.5% fructose.

셀룰로오스는 지구상에 가장 풍부하게 존재하는 고분자 다당류로서 glucose의 β -1,4 결합에 의하여 이루어진 물질이다. 셀룰로오스는 고등식물의 주요 구성성분으로 광합성에 의하여 매년 재생산되는 biomass로서 특히 펄프자원으로 종이 제조에 주로 이용되어 왔으며, 일부 산업적 용도로 이용되고 있다(1). 그러나, 1886년 Brown (2)에 의하여 초산균이 셀룰로오스를 생산한다는 사실이 밝혀졌으며, 최근에 이르러서 미생물 유래 셀룰로오스는 신 소재로서 새로이 연구되고 있다. 미생물 셀룰로오스는 식물 셀룰로오스와는 달리 리그닌이나 헤미셀룰로오스가 전혀 없는 순수한 셀룰로오스 상태로 생산되며, 섬유 결정도, 습윤성 및 흡수성 등이 높기 때문에 산업적으로 여러 용도로 개발되고 있다. 최근에는 난소화성, 고점성을 이용한 식이 섬유 등 식품소재로서 용도가 개발되고 있다(3).

미생물 셀룰로오스 생산 균주로는 *Acetobacter*속, *Rhizobium*속 그리고 *Agrobacter*속 등이 보고되고 있으며, 그 중에서 우수한 균주는 *Acetobacter*속으로서, 특히 *Acetobacter xylinum*이 지금까지 미생물 셀룰로오스 연구의 대상이 되어 왔다(4). *A. xylinum*을 호기적 조건에서 정지 배양하면 배양액 표면에서 얇은 막(pellicle)의 형태로 3차원 망상조직의 셀룰로오스가 형성되며, 이 pellicle내에서 균체가 증식하는 특성을 보인다. 그러나, *A. xylinum*은 일반적으로 교반 배양에서는 전단력에 의하여 셀룰로오스를 생산하지 못하는 cellulose negative mutant

(cel⁻)를 생성하는 생리적인 특성을 가지고 있다(5). 미생물이 균체외로 셀룰로오스를 생성하는 것은 단순 대사 산물이라기보다는 *A. xylinum*은 호기성 균주이므로 배양액 표면에 뜨기 위해 또는 환경 변화에 균체 자신을 보호하기 위한 것으로 추정되고 있으나 아직 명확하지 않다(6, 7).

정지배양은 비효율적이고 생산성이 낮기 때문에 교반 배양에 의하여 미생물 셀룰로오스를 대량 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. Weyerhaeuser사는 교반 배양에서 안정한 균주를 자연계에서 선별하고, 변이를 통하여 부산물인 gluconic acid의 생성을 감소시켜 셀룰로오스 생산을 증대시킬 수 있는 변이주를 선별하였으며, 대규모 발효조에서 0.2 g cellulose/g glucose의 생산 수율을 얻었다(8). ICI사는 glucose농도가 0.5 g/l 이하로 유지되도록 조절하면서 유가 배양하여 gluconic acid 생산을 최소화하였으며, 이를 통하여 0.18 g cellulose/g glucose의 수율을 얻었다(9). 일본의 BPR社에서는 교반 배양에서 안정한 *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR 2001 균주를 선별하고(10), corn steep liquor (CSL)를 질소원으로, fructose를 탄소원으로 하여 발효조 배양하여 fructose 44 g/l에 대하여 9.7 g/l의 셀룰로오스를 생산하였다(11). 그러나, 미생물 셀룰로오스의 생산성 향상과 최적화에 기초가 되는 생리적인 배양 특성에 대한 동력학적 연구는 아직 미미한 실정이다. 이는 생산 균주가 갖는 독특한 특성 즉, 생산물이 pellicle 형태 또는 펠렛 형태로 생산되기 때문에 배양액이 불균질하고 대부분의 균체가 pellicle 내에 존재하므로 배양 해석이 어렵기 때문인 것으로 생각된다.

본 연구자는 플라스크 교반 배양에서 비교적 안정하고

*Corresponding author

Tel. 82-2-361-2883, Fax. 82-2-312-6821

E-mail: yrpyun@bubble.yonsei.ac.kr

Key words: *Acetobacter xylinum*, Microbial cellulose, Fermentation

생산성이 높은 *Acetobacter xylinum* BRC5를 선별한 바 있다(12). 따라서 본 연구에서는 *A. xylinum* BRC5 균주를 플라스크에서 cellulase 첨가하여 배양하였을 때 균체 증식 특성을 연구하고, 셀룰로오스를 생산하는데 적합한 기질 및 배지의 조건성을 검토하였으며, 발효조 배양에서 셀룰로오스 발효특성을 연구하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지 조성

본 실험에 사용한 균주는 Lee(12)에 의하여 자연계에서 분리, 동정된 *Acetobacter xylinum* BRC5이다. 셀룰로오스 생산배지는 Hestrin & Schramm (HS)(14)배지를 사용하였으며, 그 조성은 yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, Na_2HPO_4 0.27%, citric acid 0.115%, glucose 2.0%(pH 6.0)이다.

균주 배양

전 배양은 500 ml 삼각 플라스크에 70 ml HS배지를 넣고, 균체를 활발히 증식시키기 위하여 셀룰로오스 분해 효소인 Celluclast(Novo Nordisk Co., Denmark)를 1% (v/v) 첨가하여 진탕 배양기(KSI-400L, Korea Instrument Co.)에서 30°C, 150 rpm으로 38시간 동안 배양하였다. 배양액은 4°C, 8000×g에서 30분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하고 동량의 새로운 HS배지를 첨가하여 균 현탁액을 조제하여 접종균으로 사용하였다.

본 배양은 플라스크 배양 및 발효조 배양으로 구분하여 행하였다. 먼저, 플라스크 배양에서는 500 ml 삼각 플라스크에 70 ml HS배지를 넣고 상술한 접종액 5%를 첨가하고 진탕 배양기에서 30°C, 150 rpm으로 6일간 배양하였다. 균체증식 특성을 연구하기 위해서는 생성된 셀룰로오스를 분해하기 위하여 1% cellulase를 넣고 배양하였다. 또한, 발효조 배양에서는 5 l jar fermentor (KMJ-5C, Mitsuwa Co., Japan)에 2 l의 생산 배지를 넣고, pH 5.0, 30°C, 통기량 0.25 vvm으로 80~120시간 회전 배양하였다. 교반 속도는 셀룰로오스의 생성 형태에 영향을 미치므로 배양 초기의 유도기에는 500 rpm, 대수 증식기부터는 1000 rpm으로 조절하였다.

균체량 측정

Cellulase를 첨가하고 배양한 경우에는 바로 시료의 흡광도를 분광 광도계(U-1100, Hitachi, Japan)를 사용하여 660 nm에서 측정하였다. 발효조 배양의 경우에는 얻어진 시료에 5%의 cellulase를 첨가하고 진탕 배양기(Julabo SW-21C, Germany)에서 50°C, 120 rpm으로 30분간 반응시킨 후에 흡광도를 측정하였다. 흡광도로부터 건조 균체 중량으로 환산은 흡광도치에 환산계수 0.316(g

dry cell/OD₆₆₀)을 곱하여 계산하였다.

셀룰로오스 생산량 측정

플라스크 배양에서 생성된 덩어리 형태의 셀룰로오스를 증류수로 세척한 후 0.25 N NaOH 용액 100 ml에 침지시켜 하루동안 방치한 후, 동량의 0.25 N acetic acid를 넣어 중화시켰다. 이것을 다시 증류수로 세척하여 80°C dry oven에서 건조시켜 항량이 되었을 때의 건조 중량을 측정하였다(15). 발효조 배양의 경우에는 분산 형태의 셀룰로오스를 함유한 배양액 시료 10 ml를 취하여 0.25 N NaOH 용액 10 ml를 넣고 100°C에서 20분간 끓인 후 동량의 0.25 N acetic acid를 넣어 중화시키고 이것을 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액은 버리고 다시 증류수로 현탁한 후 재차 원심 분리를 한 다음 얻어진 미생물 셀룰로오스의 건조 중량을 측정하였다(10).

당 및 gluconic acid 측정

배양액 중에 잔존하는 glucose, fructose 및 sucrose 농도는 배양액 시료로부터 균체 또는 셀룰로오스를 제거한 상등액을 0.2 µm syringe filter(Gelman Sciences Co., USA)로 여과한 후 HPLC(Waters Co., USA)로 측정하였다. Column은 carbohydrate column(4.6×250 mm, WATO 44355, Waters Co.)을 사용하였고, 이동상은 80% acetonitrile, 유속 2.0 ml/min, detector는 시차굴절계(410, Waters Co.)를 사용하여 측정하였다. Gluconic acid 함량은 당정량에서 같은 방법으로 전 처리한 후 HPLC로 측정하였다. Column은 Aminex HPX-87H column(7.8×300 mm, Bio-rad Co., USA)을 사용하였고, 이동상은 4 mM sulfuric acid, 유속 0.6 ml/min, detector는 흡광도 검출계(Waters 486)를 사용하여 UV 210 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

A. xylinum BRC5의 생육특성

A. xylinum BRC5를 HS 배지에서 교반 배양한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 균체는 약 24시간의 유도기가 지난 후부터 약 48시간까지 급격히 증식하였으며, 그 이후에는 완만히 증가하는 경향을 나타내었다. 배양 48시간에 배양액 중에 축적된 gluconic acid는 약 15 g/l로서 배양액의 pH가 4.0이하로 저하되므로 이후에는 부분적으로 생육 저해를 받는 것으로 생각된다. 대수 증식기의 비증식 속도 μ 는 0.068 h⁻¹이었으며, 배양 120시간 후 균체 농도는 0.31 g/l로서 낮은 농도를 나타내었다. 탄소원인 glucose는 유도기 이후에 균체 증식과 더불어 급격히 감소되는 동시에 gluconic acid가 배양액 중에 급격히 축적되어 배양 60시간 후에 최대 농도 17.5 g/l에 도달하였다.

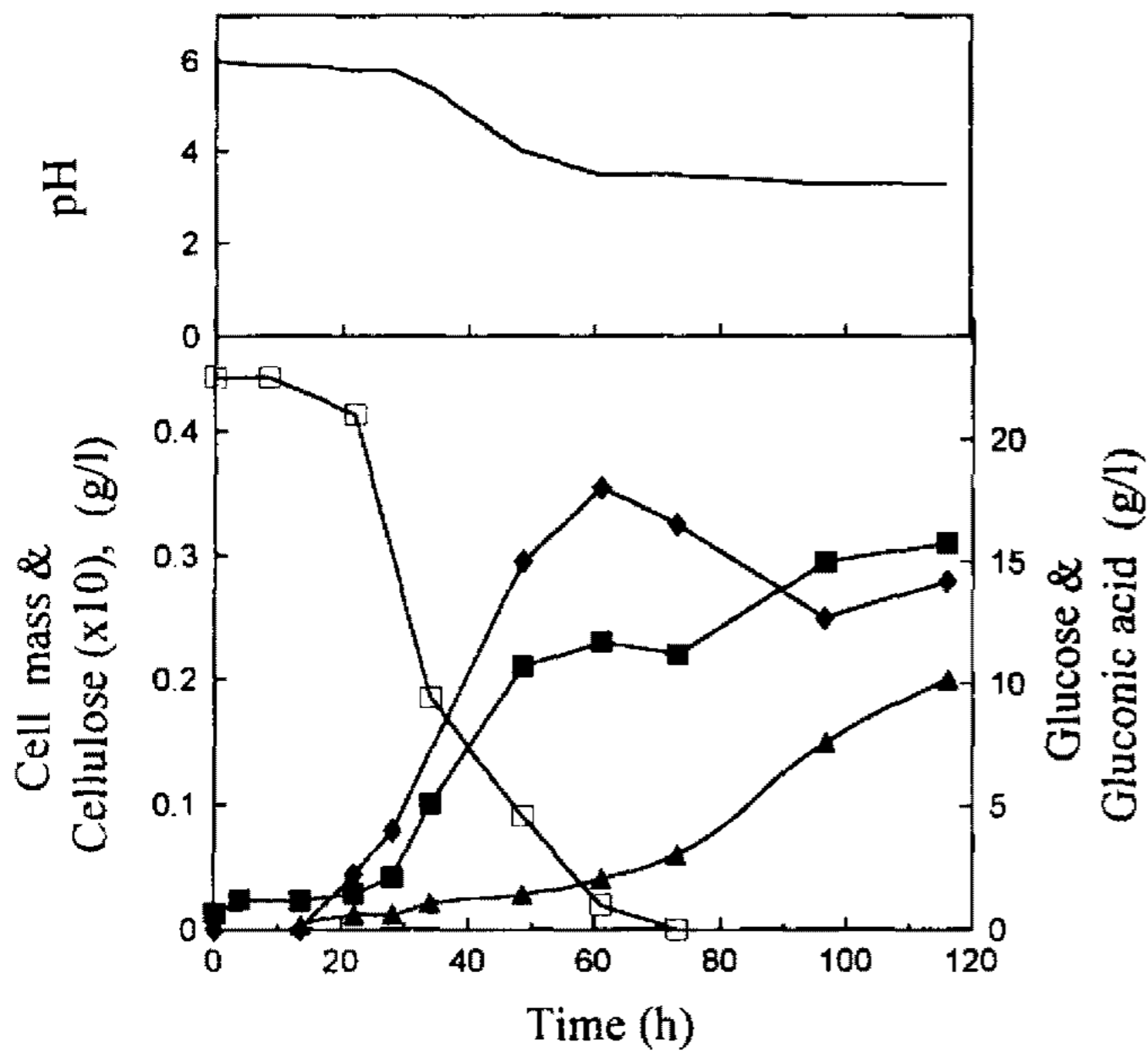


Fig. 1. Typical course of flask shaking culture of *Acetobacter xylinum* BRC5.

(-■-) Cell mass concentration; (-□-) Glucose concentration; (-◆-) Gluconic acid concentration; (-▲-) Cellulose production; - pH.

Gluconic acid의 소비된 glucose에 대한 수율은 약 90%로 대부분의 glucose가 gluconic acid생산에 이용되었음을 알 수 있다. 배양액의 pH는 초기 6.0에서 유도기인 배양 24시간까지는 일정하였으나 배지 중에 축적되는 gluconic acid에 의하여 낮아지기 시작하여 배양 48시간 후에는 3.5로 낮아졌다.

셀룰로오스는 유도기 이후 서서히 생성되기 시작하여 배지중의 glucose가 거의 소비된 60시간부터 생성량이 현저히 증가되기 시작하여 배양 120시간 후에 2.0 g/l의 낮은 농도에 도달하였다. 셀룰로오스는 배지중의 glucose가 거의 고갈된 상태에서 축적된 gluconic acid를 소비하면서 균체와 거의 비슷한 경향으로 증가하였다. Gluconic acid를 유일한 탄소원으로 *A. xylinum* BRC5를 배양했을 때 gluconic acid를 자화하여 cellulose를 생산한다는 것을 확인한 바 있다(17).

플라스크 배양에서 미생물 셀룰로오스는 배양 초기에 소량이 펠렛형태로 생산되어 분산되어 있으나 농도가 증가하면서 펠렛형태가 덩어리 형태로 뭉쳐져서 배양 120시간 후에는 약 10 cm이상의 타원형의 덩어리 형태로 생산되었다. 대부분의 균체는 이러한 덩어리 형태의 셀룰로오스 안에 존재하였으며, 배양액에서는 소량의 균체만이 관찰되었다.

초기 배양 조건의 검토

HS 배지에서 초기 접종량, 배지 액량 및 pH의 최적 조건을 플라스크 배양으로 검토하였으며, 각 조건에서 6일

Table 1. Effects of initial culture conditions on the cellulose production by *A. xylinum* BRC5

Initial conditions		Cellulose produced (g/l)
Inoculum size	1	1.51
	3	1.84
	5	2.33
	10	2.27
	20	2.10
Medium (ml)	70	2.10
	100	2.45
	200	0.34
	300	0.38
	600	0.38
pH	3	1.04
	4	1.84
	5	2.18
	6	2.03

동안 배양한 후 미생물 셀룰로오스 생산량을 Table 1에 나타내었다. 접종량의 영향을 보면 5%에서 셀룰로오스 생산량이 2.33 g/l로 가장 높았으나, 5% 이상에서는 큰 차이를 나타내지 않았다.

배지 액량의 영향은 배양액이 100 ml 일때 2.45 g/l으로 가장 높은 셀룰로오스 생산량을 나타내었다. 여기서 주목할 만한 것은 200 ml이상의 배지 액량에서는 셀룰로오스가 덩어리 형태로 뭉치지 않고 펠렛형태로 생성되는 것을 확인할 수 있었다. *A. xylinum*은 호기성 미생물로서 플라스크에서 배지 액량이 100 ml이하 일 때가 산소 공급이 원활하여 생산량이 높은 것으로 생각되었고, 200 ml 이상일 때는 산소 공급이 부족하여 셀룰로오스 생산이 감소되는 것으로 판단되었다.

회전 진탕기에서 플라스크 배양 할 때 배양액의 회전에 의하여 전단이 형성되므로 배양조건은 균체 및 셀룰로오스 생산에 영향을 미친다. Lee(13)는 *A. xylinum* ATCC 23769를 250 ml 플라스크에 배양했을 때 배지의 부피 분율이 0.25이하일 때는 셀룰로오스 생산량이 일정하였으나 0.25 이상 일 때는 부피분율이 증가할수록 감소한다고 하였다. 또한 부피분율이 0.2이하 일때는 회전속도를 50~250 rpm까지 증가시키면 따라 셀룰로오스 생산량이 증가하였으나 350 rpm 이상에서는 감소하였다고 보고하였다. 이러한 이유는 진탕 배양할 때 전단에 의한 cellulose-negative(cel^-) mutant 즉, 셀룰로오스를 생성하지 않는 자연 돌연 변이주의 생성과 산소공급과 관계가 있는 것으로 보고하였다. Hestrin과 Scharmm(14) 역시 *A. xylinum*을 회전진탕기에서 배양했을 때 소용돌이에 의하여 생성되는 전단력의 영향을 받아 cel^- 가 형성되는 것으로 보고하였다. 본 실험에서는 배지액량 100 ml 이하의 온화한 조건에서는 cel^- 가 관찰되지 않았는데 *A. xylinum* BRC5 균주는 상술한 균주들 보다 비교적 안정한 균주이기 때문인 것으로 생각된다.

초기 pH를 달리하였을 때 셀룰로오스 생산량은 대체

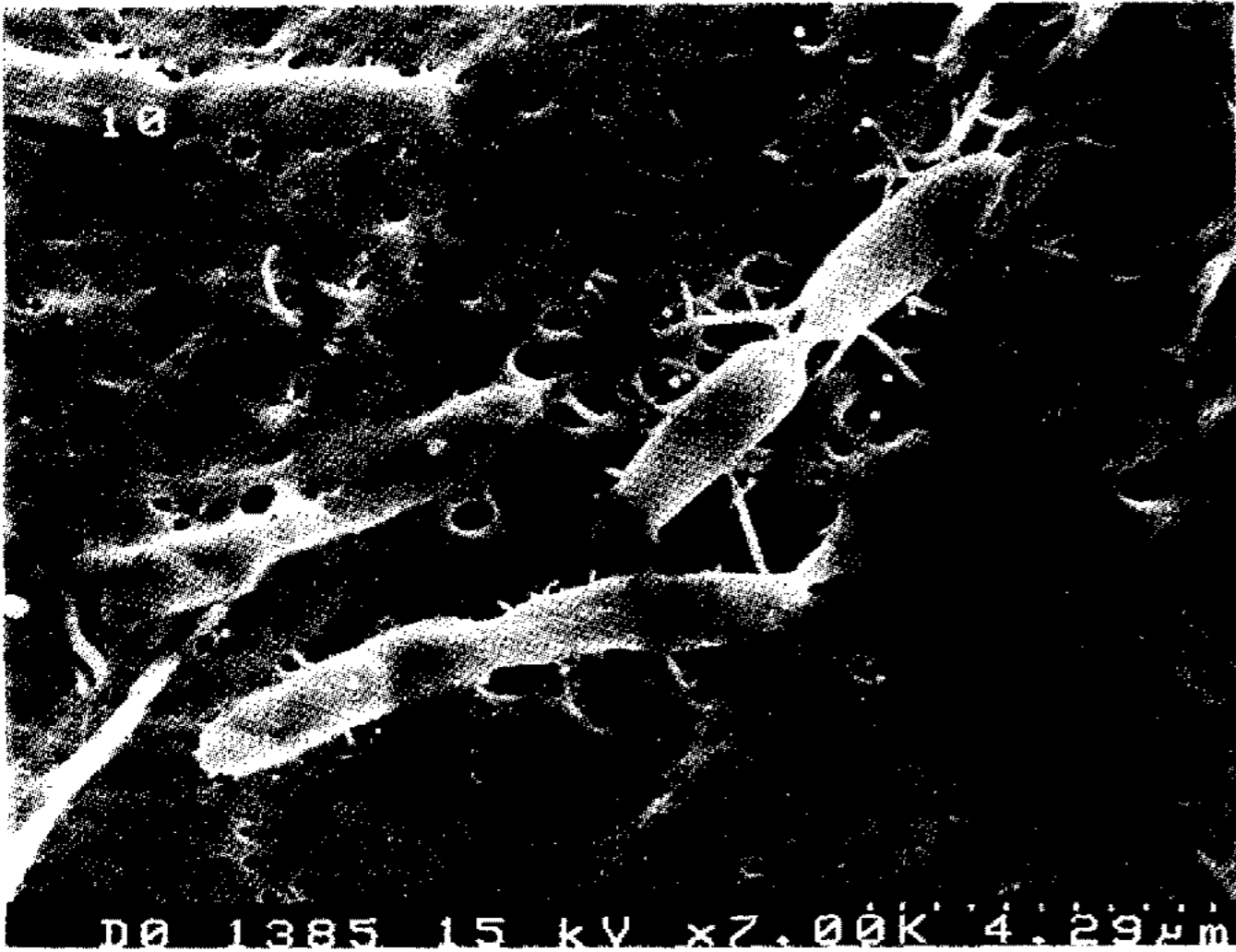


Fig. 2. Scanning electron micrograph of cellulose produced by *A. xylinum* BRC5 under flask shaking culture.

로 pH 4~6 범위에서 높았으며, pH 5에서 2.18 g/l로서 가장 높아, Masaoka 등(15)의 실험과 동일한 결과를 얻었다. 일반적으로 *Acetobacter*는 pH4 이하에서 생육저해를 받는 것으로 보고되고 있다.

*Acetobacter*속 균주를 glucose 배지에서 교반 배양하여 셀룰로오스를 생산할 때 가장 문제되는 것은 gluconic acid의 생성과 cel⁻ mutant의 생성인 것으로 지적되고 있다. 따라서 자연계로부터 또는 변이 등에 의하여 gluconate-negative(glc A⁻) mutant를 선발하는 것이 중요한 과제이며, 또한 교반조건에서 자발적으로 cel⁻ mutant를 생성하지 않는 유전적으로 안정한 균주의 육종을 위하여 많은 연구가 추진되고 있다(4, 10).

Cellulase 첨가 배양

A. xylinum BRC5의 배양의 경우 Fig. 2에서 볼 수 있는 것처럼 균체가 셀룰로오스 망상 구조 내에서 자라므로 균체 자체의 증식 특성을 연구하기는 곤란하다. 따라서, 배양액에서 분산된 상태에서 균체 증식 특성을 측정하기 위하여 배양액에 cellulase를 첨가하여 셀룰로오스가 생산되면서 분해되도록 하였다(16).

Cellulase 첨가 배양에서, 배양에 따른 균체 및 gluconic acid 농도의 경시 변화를 나타낸 Fig. 3과 Fig. 1을 비교하여 볼 때, 비록 유도기와 생성된 균체 및 gluconic acid농도에서 다소 차이를 보였지만 전체적으로 발효양상은 비슷하였다. Fig. 3에서 보는 것과 같이 유도기 이후 glucose가 급격히 소비되면서 거의 동량의 gluconic acid로 전환되었으며, 배양 18시간 이후부터 glucose는 Fig. 1에 비하여 비교적 원만히 감소하여 배양 50시간 이후에 약 4 g/l가 잔존하였다. 이는 생성된 셀룰로오스가 첨가된 cellulase에 의하여 분해되어 glucose로 전환되었기 때문인 것으로 판단되었다. 한편 배양시간

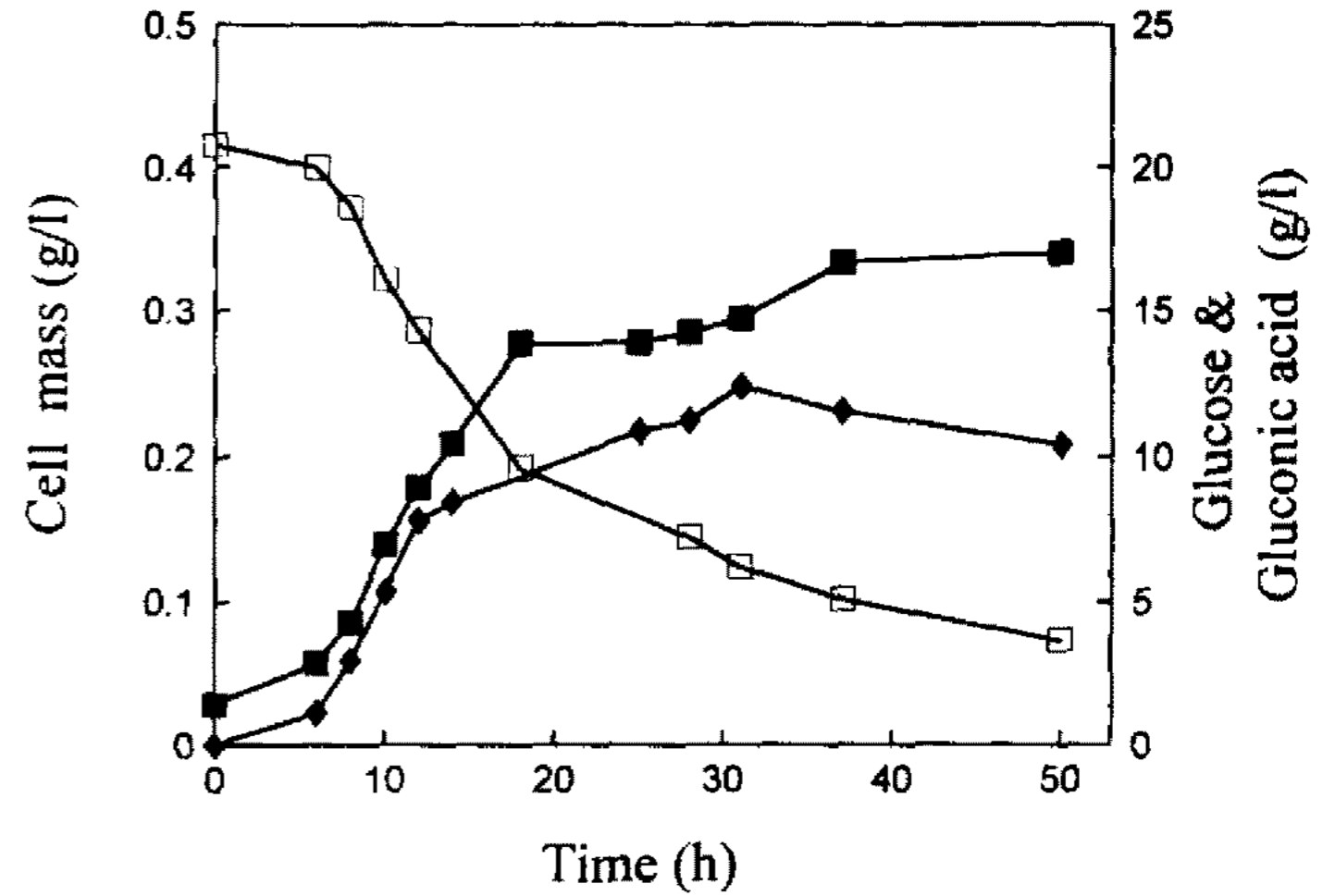


Fig. 3. Time course of flask shaking culture of *A. xylinum* BRC5 with cellulase addition.

(-■-) Cell mass concentration; (-□-) Glucose concentration; (-◆-) Gluconic acid concentration.

18시간 이후 gluconic acid는 Fig. 1에서 감소하는 것과 달리 서서히 증가하는 경향을 보였는데 이는 배지 중에 상당량의 glucose가 잔존하고 있기 때문인 것으로 생각된다. 최고 균체량은 약 0.3 g/l로 cellulase를 첨가하지 않은 경우와 거의 동일하였으나 비증식 속도는 0.122 h⁻¹로 약 2배 빨랐다. 이와 같은 점으로 미루어 보아 cellulase 첨가 배양으로 *A. xylinum* BRC5의 배양 특성을 비교적 용이하게 검토할 수 있는 가능성을 확인하였다. 따라서 cellulase 첨가 배양을 통하여 탄소원과 질소원이 균체 생육에 미치는 영향을 검토하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 배양 약 18시간 후에 상당한 양의 glucose가 배양액에 잔존하여 있음에도 불구하고 균체의 증식은 거의 정지되었으며 glucose가 gluconic acid로 전환되지 않았다. 이와 같은 결과는 탄소원 이외 배지중의 어떤 성분이 제한인자로 작용하기 때문인 것으로 추정된다.

균체 증식에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향

탄소원으로서 glucose, fructose 및 sucrose를 각각 2% 첨가한 HS 배지에 cellulase를 첨가하고 배양한 결과를 Fig. 4A에 나타내었다. 최종 균체량은 fructose가 0.40 g/l, sucrose 0.41 g/l로서 glucose 0.32 g/l보다 높은 값을 보였다. Fructose와 sucrose는 gluconic acid로 전환되지 않는데 비하여 glucose는 *A. xylinum* BRC5에 의하여 gluconic acid를 생성하는데 우선적으로 이용되기 때문에 fructose와 sucrose보다 균체 수율이 낮은 것으로 생각되었다(17).

또한, bactopectone, casamino acid, polypeptone 및 yeast extract의 각 질소원을 0.5%씩 첨가한 HS 배지에서 cellulase 첨가 배양을 행하였다(Fig. 4B). 각 질소원에 대한 최종 균체량은 bactopectone이 0.47 g/l, casa-

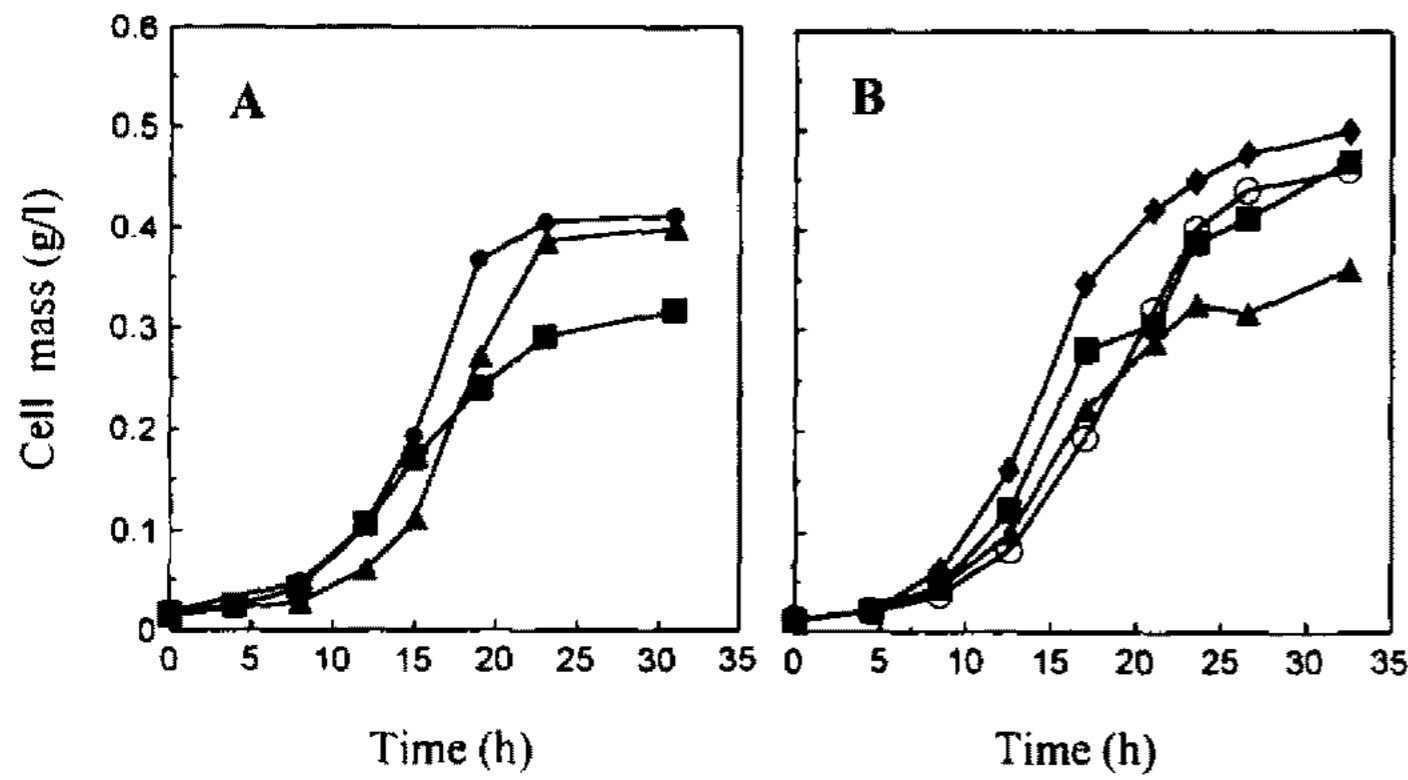


Fig. 4. Effects of carbon and nitrogen sources on the cell growth of *A. xylinum* BRC 5 in cellulase added cultivation.

A: (-●-) Sucrose; (-▲-) Fructose; (-■-) Glucose
B: (-○-) Casamino acid; (-▲-) Polypeptone; (-■-) Bacto-peptone; (-◆-) Yeast extract.

mino acid가 0.46 g/l, polypeptone이 0.36 g/l, yeast extract가 0.50 g/l로서 yeast extract가 다른 질소원보다 약간 높았다.

균체 증식에 미치는 탄소원 농도의 영향

배지중의 glucose 농도를 0.5에서 4.0%로 변화시켰을 때 균체와 셀룰로오스 생산량의 경시 변화를 Fig. 5에 나타내었다. Glucose 농도가 증가함에 따라 균체량도 약간 증가하였으나 약 0.3 g/l로서 거의 차이를 나타내지 않았다. 한편, 셀룰로오스 생산량은 glucose 농도가 0.5%일 때는 1.05 g/l였으나 1.0%에서는 2.2 g/l로 증가하였으며, 그 이상 glucose 농도에서는 증가되지 않고 일정한 생산량을 보였다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 HS 배지에서는, 탄소원인 glucose 농도가 1.0% 이상 일 때는 *A. xylinum* BRC5의 증식과 셀룰로오스 생산은 glucose 농도에 영향을 받지 않고 다른 영양성분이 제한기질로 작용

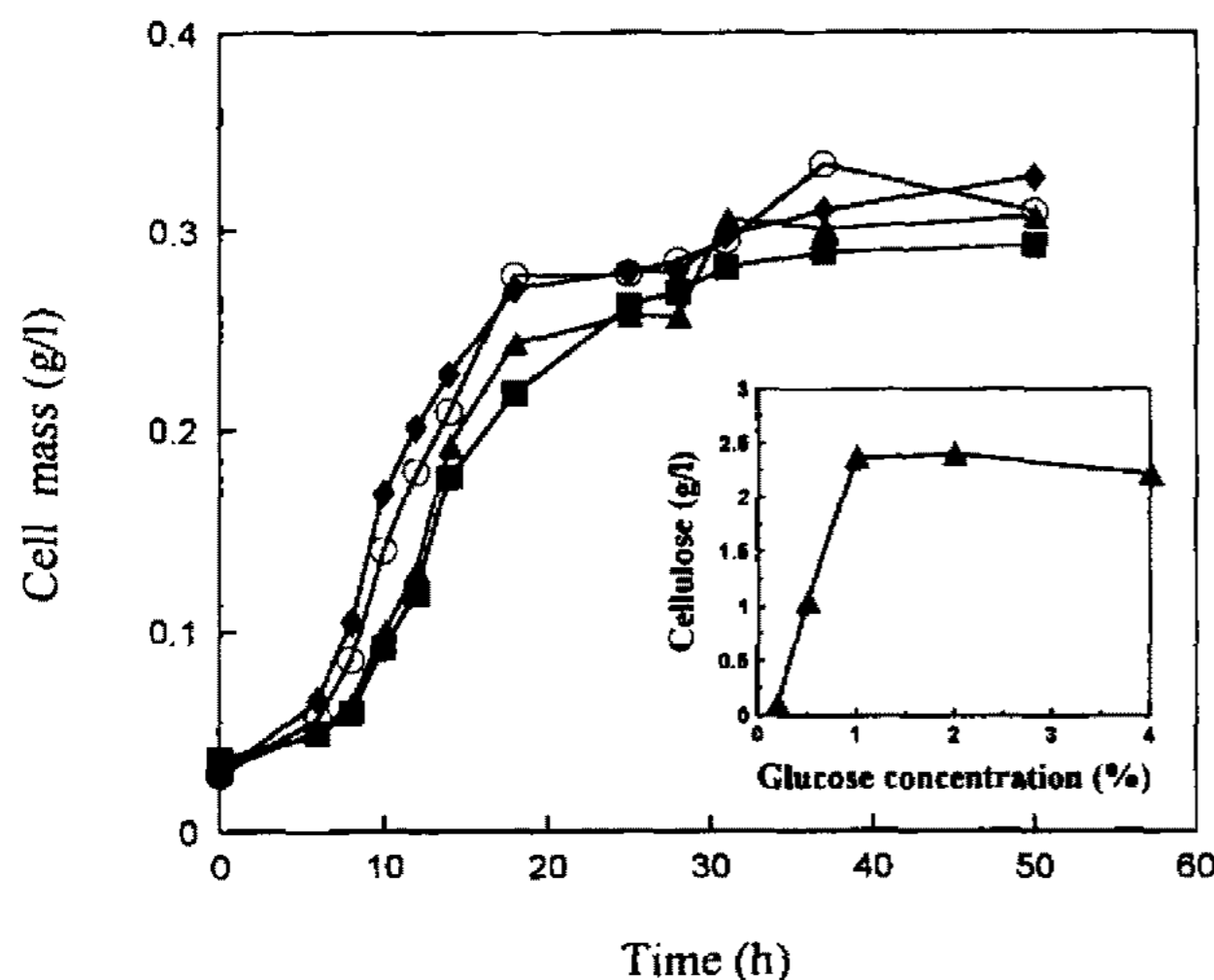


Fig. 5. Effects of glucose concentration on the cell growth and cellulose production by *A. xylinum* BRC5.

(-■-) 0.5%; (-▲-) 1.0%; (-○-) 2.0%; (-◆-) 4.0%.

하는 것으로 판단하였다.

발효조 배양에서의 균체 증식과 셀룰로오스 생산

발효조에서의 배양 조건 일반적으로 5 l 규모의 실험 실용 발효조에는 터어빈 형 교반날개가 2개 설치되어있다. 예비적으로 일반구조의 발효조를 사용하여 500 rpm, 0.25 vvm으로 6일 동안 회분 배양한 결과, 셀룰로오스는 덩어리 또는 띠 형태로 발효조의 방해판이나 교반 축에 휘어 감긴 형태로 생산되어 정상적인 발효가 이루어지지 않았다.

발효조에서 분산 형태로 셀룰로오스를 생산하기 위하여 교반속도 및 교반날개의 개수를 변화시켜 생성되는 셀룰로오스의 변형 및 절단 여부를 검토하였다. 먼저, 교반 속도를 500, 800 및 1000 rpm으로 증가시켜도 발효 형태는 크게 개선되지 않았다. 다음은 보다 강력한 전단력을 주어 cellulose 덩어리를 배양액에 분산시키기 위하여 교반날개의 개수를 2개에서 3개로 증가시키고 그 간격을 축소시킨 상태에서 각 교반속도에 따라 생성물을 관찰하였다. 교반속도 1000 rpm에서는 셀룰로오스가 분산된 형태로 생성되었다. 따라서 배양초기의 강력한 전단력으로 인한 균체의 손상을 고려하여, 배양초기 약 20시간 동안은 500 rpm으로 배양하고 셀룰로오스가 생성되는 시기부터 1000 rpm으로 증가시키므로써 성공적으로 분산 배양이 가능하였다(17). Ben-Bessat 등(8)은 망상구조의 셀룰로오스를 생산하기 위하여 고속도로 장시간 교반 배양하는 발효법을 고안하였다.

교반 속도 1000 rpm에서 배양후 분산된 형태의 셀룰로오스를 회수하여 후처리를 한 후 건조시킨 결과 분산 셀룰로오스는 재결합되어 필름을 형성하였다. 전자 현미경으로 그 성상을 관찰한 결과 플라스크에서 생성된 셀룰로오스 덩어리의 뾰뚱한 필름 형상구조(Fig. 2)와 대조적으로 느슨한 구조가 관찰되었으며, 0.3~0.8 μm의 직경으로 3차원의 망상구조로 얽힌 형태였다(Fig. 6)

CSL 농도 변화에 대한 영향

전술한 플라스크 배양의 결과에 의하면 HS배지에 *A. xylinum* BRC5를 배양한 경우 탄소원이 제한 기질이 아니라 다른 유기 영양원에 의하여 균체 생육과 셀룰로오스 생산이 제한 받는 것으로 추정되었으며 yeast extract(YE)가 가장 우수하였다. 그러나 YE는 고가이므로 상업적 생산을 위하여 보다 저렴한 유기 영양원에 대하여 검토할 필요가 있다. 따라서, 미생물 셀룰로오스 생산에서 우수한 유기 영양원인 것으로 보고된(18) corn steep liquor (CSL)의 첨가 영향을 검토하였다. 발효조에서 CSL의 농도 변화에 따른 배양 특성을 조사하기 위하여 HS 배지의 유기 영양원 대신에 CSL를 2, 4, 6, 8 및 10% 첨가하여 회분 배양한 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

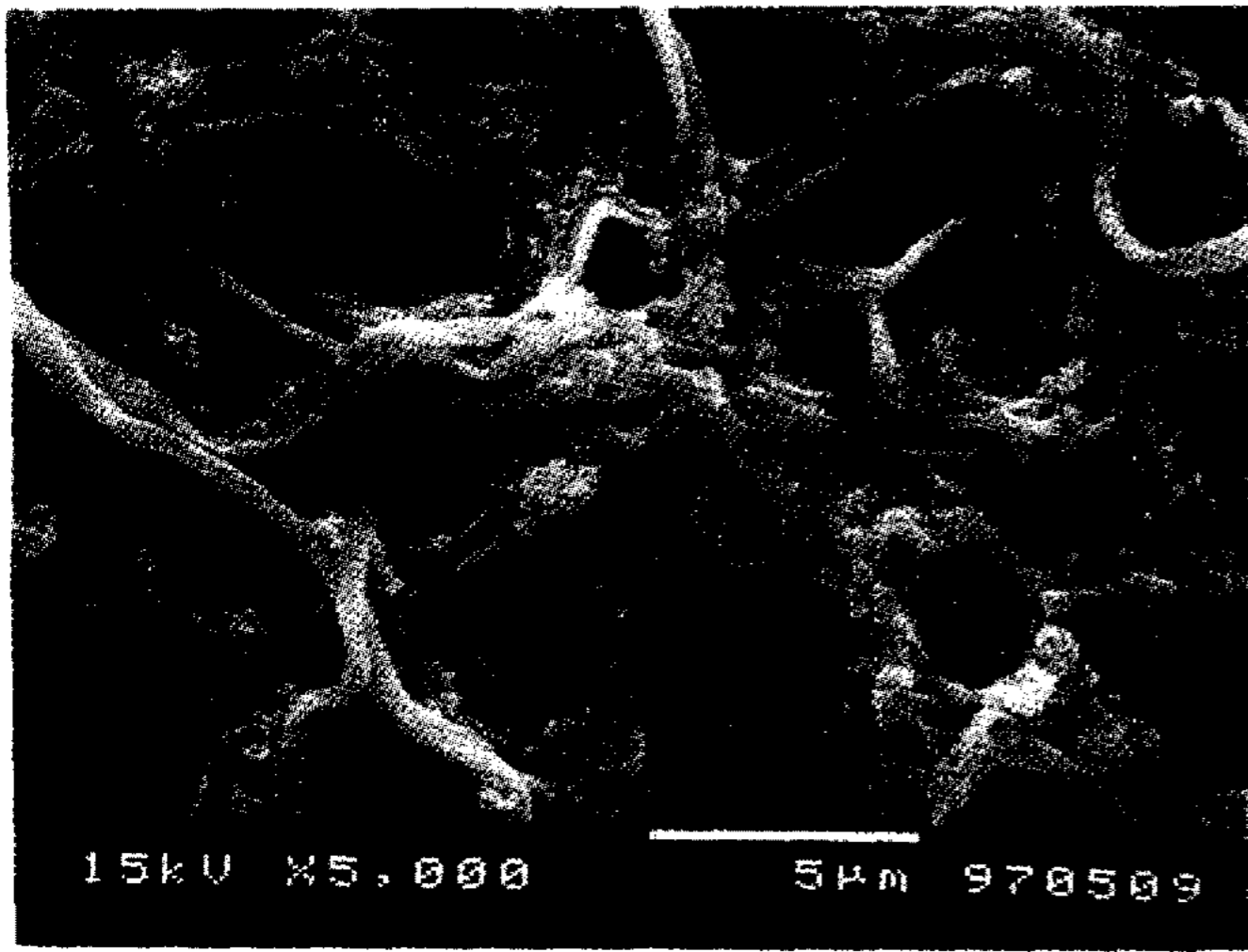


Fig. 6. Scanning electron micrograph of cellulose produced by *A. xylinum* BRC5 in jar fermentor.

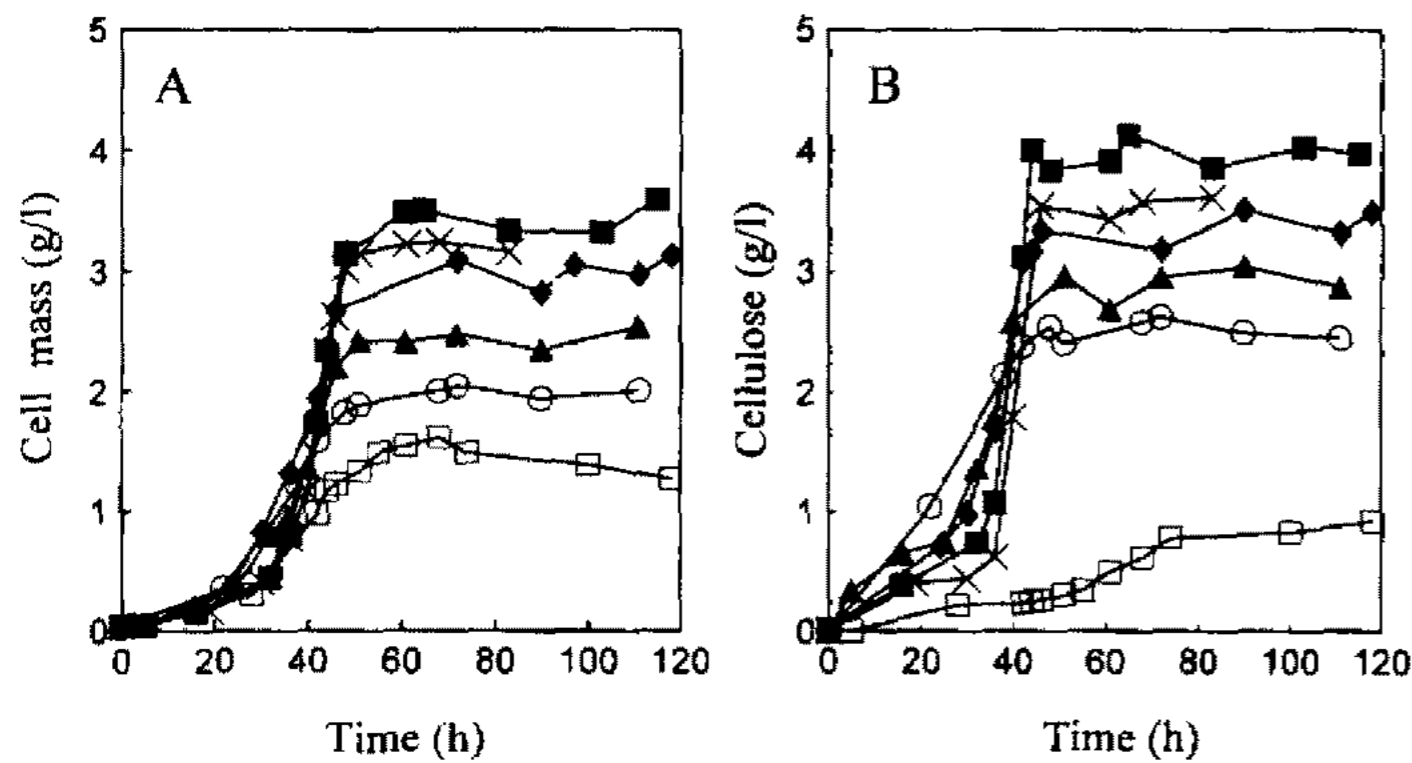


Fig. 7. Effects of CSL concentration on the cell growth and cellulose production by *A. xylinum* BRC5 in jar fermentor. A: Cell mass, B: Cellulose, (-□-) Control, (-○-) CSL 2%, (-▲-) CSL 4%, (-◆-) CSL 6%, (-■-) CSL 8%, (-×-) CSL 10%.

CSL농도가 2%에서 8%까지 증가됨에 따라 균체농도는 2.05 g/l에서 3.49 g/l로 증가되었으며, 10%에서는 3.22 g/l로 약간 감소하였다. CSL의 첨가량에 관계없이 증식 시간은 거의 일정하여 약 50시간 후에 증식이 완료되었으나, 증식기의 비증식 속도 μ 값이 0.080 h⁻¹에서 0.097 h⁻¹로 약간 증가되는 경향을 보였다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때, CSL에 함유된 어떤 성분이 균체 증식을 촉진하며 균체 생육에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

Mastuoka등(18)은 CSL중의 lactate가 균체생육과 셀룰로오스 생산을 촉진하며, 특히 배양초기 생육을 촉진하므로 생육을 위한 에너지 생산과 호흡쇄와 관계가 있는 것으로 추정하였다. 한편, 셀룰로오스 생산량도 균체량과 비슷한 양상을 보여 CSL 농도가 증가됨에 따라, 즉, 균체량의 증가에 비례하여 증가하였다. 결국 셀룰로오스 생산량은 8% CSL농도에서 4.13 g/l로서 최대값을 나타내었으며, HS 배지에 비하여 약 2배 증가되었다.

이상의 결과를 종합하여 동력학적 수치와 함께 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 보는 바와 같이 CSL 첨가량이 2%에서 8%로 증가됨에 따라 $Y_{P/X}$ 값은 약간 감소하였으나, $Y_{P/S}$ 와 $Y_{X/S}$ 값은 증가하였다. 즉, CSL을 저 농도로 첨가한 배지에서 균체량에 대한 셀룰로오스 생산 수율은 약간 높으나 상대적으로 탄소원에 대한 균체 및 셀룰로오스 수율이 낮으므로 비교적 고농도로 CSL를 8% 첨가하는 것이 균체 및 생산물 수율을 최대로 얻을 수 있다. 더욱이 CSL은 공업적으로 부산물로서 다량으로 얻어지는 값싼 질소원이므로 경제적인 면에서 유리하다.

발효조에서의 *A. xylinum* BRC5의 생육특성

플라스크 배양에서 당종류와 최적농도를 검토한 결과 glucose 0.5%, fructose 1.5%가 가장 우수하였다(17). 따라서 혼합당과 CSL을 첨가한 배지 조건으로 발효조에서 *A. xylinum* BRC5의 생육 특성을 검토하였다. 분산 배양을 위한 교반속도는 초기 약 20시간의 유도기에는 500 rpm을 유지하였고, 대수 증식기부터는 1000 rpm으로 배양하였다. Fig. 8에 나타낸 것과 같이 배양초기 25시간 동안은 유도기로서 이 기간 동안에 배양액중의 glucose는 거의 전부 gluconic acid를 전환되었으며, fructose는 거의 이용되지 않았다. Glucose가 거의 소비된 후부터 fructose를 이용하면서 균체와 셀룰로오스는 지수 함수적으로 증가하였으며 fructose가 거의 소비된 48시간에 각각 2.67 및 3.09 g/l에 도달하여 일정한 값을 유지하였다. 배지 중에 축적된 gluconic acid는 증식기 동안에 fructose와 함께 완만히 감소하였으며, 48시간 이후 약 3.0 g/l의 일정한 농도를 유지하였다.

한편 발효조와 플라스크 배양에서 균체량은 현저히 다른 양상을 나타내었다. 발효조에서 균체량은 플라스크에

Table 2. Effect of CSL concentrations on kinetic data of cellulose fermentation by *A. xylinum* BRC5

CSL concn. (%)	X (Cell mass, g/l)	P (Cellulose, g/l)	$Y_{P/X}$ (g-cellulose /g-cell)	$Y_{P/S}$ (g-cellulose /g-glc,frc consumed)	$Y_{X/S}$ (g-cell/g-glc, frc consumed)	μ (1/hr)
2	2.05	2.62	1.278	0.131	0.103	0.080
4	2.48	3.04	1.226	0.152	0.124	0.083
6	2.97	3.49	1.175	0.175	0.149	0.085
8	4.39	4.13	1.183	0.207	0.175	0.097
10	3.22	3.61	1.121	0.181	0.161	0.094

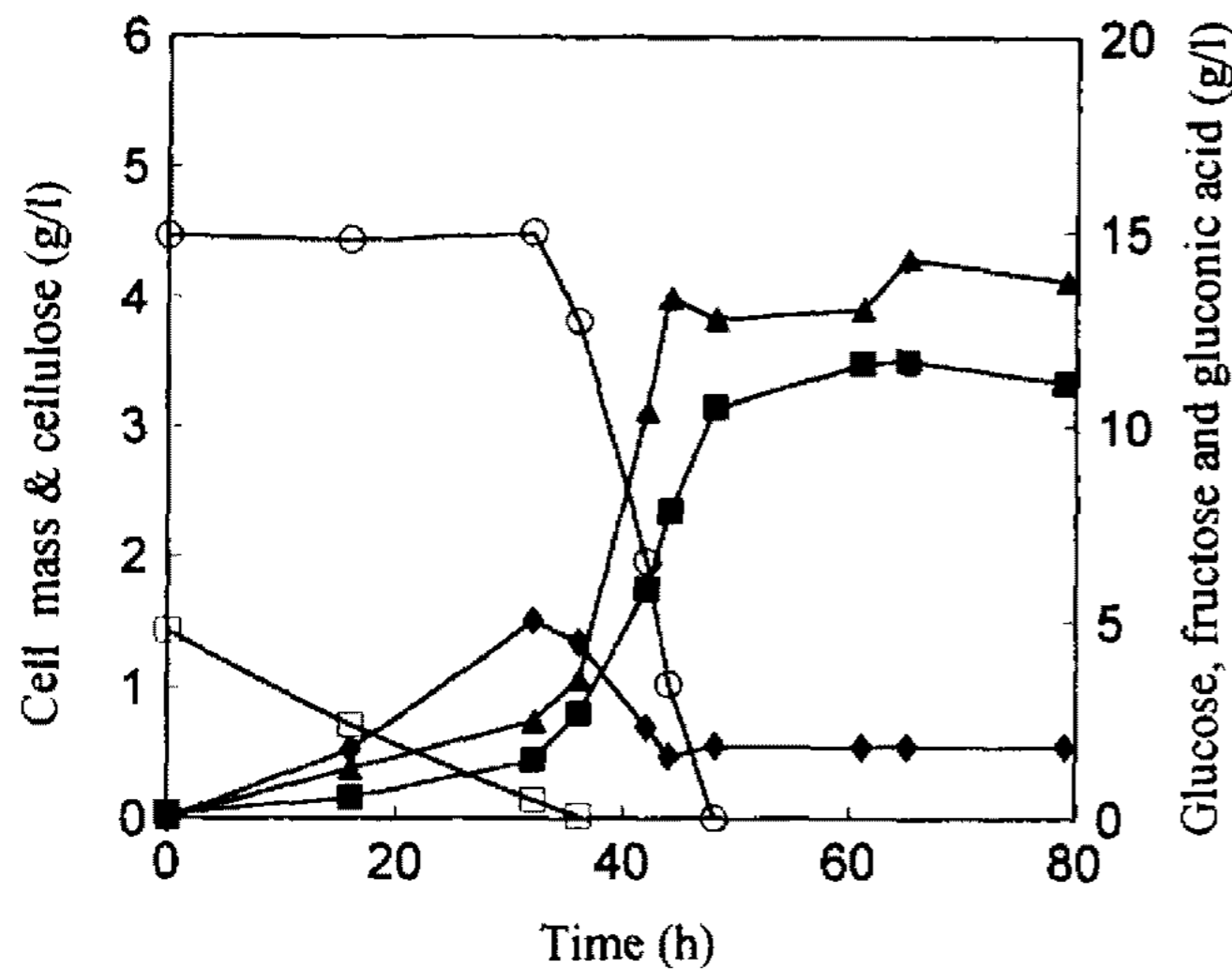


Fig. 8. Typical course of cellulose production by *A. xylinum* BRC5 in jar fermentor.

(-■-) Cell mass concentration, (-□-) glucose concentration, (-○-) fructose concentration, (-◆-) Gluconic acid concentration, (-▲-) Cellulose production.

비해 약 10배 증가한 3.0 g/l였다. 이와 같이 플라스크와 발효조에서 배양 특성이 다른 것은 발효조 배양에서 대수증식기의 세포의 약 50% 이상이 셀룰로오스를 생성하지 않는 cel^- 로 전이된 것으로 추정되었다. Valla 등(5)에 의하면 cel^+ 세포는 대부분 셀룰로오스 덩어리에 포집된 상태에서 자라므로 영양성분, 산소 등의 전달속도에 제한을 받아 증식속도가 느린 반면에, cel^- 세포는 배양액 중에 분산된 형태로 자라며 증식속도가 빠르므로 배양시간이 경과함에 따라 cel^- 세포의 비율이 증가하며 전체적으로 균체 농도가 높아진다고 보고하였다. 배양과정 중 cel^+ 와 cel^- 세포의 배양동역학에 대해서는 보다 깊이 있는 연구가 필요하다.

결론

셀룰로오스 생산균주인 *Acetobacter xylinum* BRC5의 교반조건에서의 생육 특성을 플라스크와 발효조 배양을 통하여 검토하였다. 기본 HS 배지를 사용하여 glucose, fructose 및 sucrose를 각각 탄소원으로 사용했을 때, 셀룰로오스 생산량은 fructose는 3.25 g/l, glucose는 2.55 g/l, sucrose 1.0 g/l로 fructose가 가장 우수한 탄소원이었다. 저렴한 질소원인 CSL은 yeast extract에 대하여 좋은 대체 효과를 나타내었으며, 발효조에서 교반 배양했을 때는 CSL을 8% 첨가했을 때 셀룰로오스 최대 생산량 4.14 g/l를 얻었다. 또한, 발효조에서 셀룰로오스를 분산 상태로 생산하기 위해서는 3개의 impeller를 설치하고 1000 rpm의 고속으로 교반해 줄 필요가 있었다. Glucose를 기질로 하였을 때 *A. xylinum* BRC5 균주의 발효양상을 보면 유도기 및 증식기 초기에 거의 모든 glu-

cose가 gluconic acid로 전환되며, glucose가 거의 고갈된 시점부터 축적된 gluconic acid를 소비하면서 셀룰로오스를 생산하였다. 한편 glucose와 fructose가 1:3으로 공존하는 경우에는 유도기동안에 거의 대부분의 glucose가 gluconic acid로 전환되고 glucose가 고갈된 시점부터 fructose를 소비하면서 증식연동형으로 셀룰로오스를 생성하였다.

감사의 글

본 연구는 연세대학교 생물산업 소재 연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구 우수센터 지원에 의하여 행하였으며 이에 감사드립니다.(94K3-0407-0101-6)

참고문헌

- Engelhardt, J. 1995. Sources, industrial derivatives and commercial application of cellulose. *Carbohydrates In Eruope*, **12**: 5-4.
- Brown, A. J. 1886. An acetic ferment which forms cellulose. *J. Chem., Soc.*, **49**: 432-439.
- Pszezola, D. E. 1997. High technology: taking ingredients to a new level, *Food Techonol.*, **51**: 79-80.
- Byrom, D. 1991. Microbiol cellulose, p 263-284. In D. Byrom(ed.) *Biomaterials*, Stockton process, New yock.
- Valla, S. and J. Kjosbakken. 1982. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1401-1408.
- Ross P., R. Mayer and M. Benzman. 1991. Cellulose bio-synthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**: 35-58.
- Aloni, Y., D. P. Delmer and M. Benziman. 1982. Achievement of high rates of in vitro synthesis of 1,4- β -D-glucan: Activation by cooperative interaction of the *Acetobacter xylinum* enzyme system with GTP, polyethylene glycol and protein factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**: 6448-6452.
- Ben-Bassat, A., R. Bruner, S. Shoemaker, Y. Aloni, H. Wong, D. C. Johnson and A. N. Neogi. 1992. Reticulated cellulose and methods and microorganisms for the production thereof. *US Patent*, US 5079162, 7 Jan.
- Byrom, D. 1989. Process for the production of microbial cellulose. *European Patent*, EP 323717, 12 Jul.
- Toyosaki, H., T. Naritomi, A. Seto, M. Matsuoka, T. Tsuchida and F. Yoshinaga. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitate culture. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**: 1498-1502.
- Ishikawa, A., M. Matsuoka, T. Tsuchida and F. Yoshinaga. 1995. Increase in cellulose production by sulfagu-anidine-resistant mutant derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**: 2259-2262.

12. 이진혁. 1996. 유전적으로 안정한 *Acetobacter xylinum*의 선별에 관한 연구. 석사학위논문, 연세대학교 식품생물공학과.
13. Lee, H. C. 1996. Directional shear stress enhances the production of microbial cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Proceedings of YADEC '96 sym, Kyoto, Japan*, p. 80-81.
14. Hestrin, S. and M. Schramm. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: I. Micromethod for the determination of cellulose. *Biochem. J.* **56**: 163-166.
15. Masaoka, S., T. Ohe and N. Sakota. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**: 18-22.
16. Brown, R. M. 1988. Use of cellulase preparations in the cultivation and use of cellulose-producing microorganisms. *European Patent*, EP 258038.
17. 박상훈. 1997. *Acetobacter xylinum* BRC5에 의한 미생물 셀룰로오스의 발효 특성, 석사학위 논문, 연세대학교 식품생물공학과.
18. Matsuoka, M., T. Tsuchida, K. Matsushita, O. Adachi and F. Yoshinaga. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**: 575-579.

(Received 18 August 1997)