

## Acetobacter xylinum BRC5의 fed-batch 배양에 의한 셀룰로오스의 고농도 생산

황정욱·이창승·박상훈·양영국·†변유량  
연세대학교 생명공학과 및 생물산업소재센터  
(접수 : 1999. 2. 1., 게재승인 : 1999. 6. 1.)

### Production of High Concentration Cellulose by *Acetobacter xylinum* BRC5 in Fed-Batch Culture

Jung Wook Hwang, Chang Sung Lee, Sang Hoon Park, and Yu Ryang Pyun†  
Department of Biotechnology and Bioproducts Reserch Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea  
(Received : 1999. 2. 1., Accepted : 1999. 6. 1.)

Glucose fed-batch culture was studied to improve cellulose productivity by *Acetobacter xylinum* BRC5. When initial glucose concentrations in batch cultures were less than 20 g/L, yield coefficients of cellulose ( $Y_{p/s}$ ) remained a constant value of 0.21 g cellulose/g glucose. But a low yield coefficient,  $Y_{p/s}=0.13$  was obtained from an initial glucose concentration of 40 g/L. Since initial high glucose concentrations in batch culture resulted in low yields of cellulose, constant fed-batch cultures were carried out. The optimal feed rate for fed-batch culture was 2.22 g glucose/L · h. In constant fed-batch culture without DO control, 10 g/L of cellulose was obtained from 40 g/L of glucose with this feed rate, which was approximately two fold higher than that of the batch culture with the same initial glucose concentration. In DO stat plus fed-batch culture, the highest cellulose productivity could be obtained when dissolved oxygen level was controlled at 10% of air saturation, and cellulose productivity increased about 1.5 times compared with that of the culture without DO control.

Key Words : microbial cellulose, *Acetobacter xylinum*

#### 서론

셀룰로오스는 glucose의  $\beta$ -1,4 결합에 의하여 이루어진 고분자 물질이며 목재·종이 등으로 각종 산업과 일상 생활에서 중요한 위치를 차지하고 있다(1). 이와같은 셀룰로오스가 식물뿐만 아니라 초산균등의 미생물에 의해서도 생산되며, 이를 미생물 셀룰로오스 (microbial cellulose)라 한다. 식물 셀룰로오스가 결정질과 비결정질 두 가지 상태로 존재하면서 헤미셀룰로오스나 리그닌을 포함하는 heteropolysaccharide인 반면에 미생물 셀룰로오스는 순수한 상태이며, 식물 셀룰로오스에 비해 보수성, 흡착성 및 포괄성이 크며, 결정도가 높아 산업용 재료로 뿐 만 아니라 기능성 소재로 사용될 수 있을 것이라 기대된다(2). 미생물 셀룰로오스를 생산하는 대표적인 미생물은 *Acetobacter xylinum*으로 gram 음성이고 호기성 균으로서 *A. xylinum*을 정지 배양하면 셀룰로오스는 얇은 막의 형태 (pellicle)로 배양액의 표면에서 생산되고, 그 막 속에서 균이 증식하는 특징을 가지고 있다. 그러나 정지배양하면 최소 1주일의 소요되어 생산성이 낮

기 때문에 미생물 셀룰로오스를 대량 생산하기 위해서 교반배양에 의한 발효의 가능성이 연구되고 있다(3-5). *A. xylinum*을 교반배양할 때 문제점은 셀룰로오스 생산균은 전단력에 의하여 셀룰로오스를 생산하지 못하는 cellulose-negative mutant ( $Cel^-$ )로 전이되는 특성이 있으므로  $Cel^-$ 가 생성되지 않는 유전학적으로 안정한 균주의 선발 또는 변이주를 개발하고자 하는 연구가 활발히 추진되고 있다. 또한 *A. xylinum*을 glucose 배지에 배양하면 glucose는 gluconic acid로 산화되고 일부의 glucose만이 셀룰로오스로 전환되므로 셀룰로오스 수율이 감소되며, 배양액의 pH 저하로 균체생육이 저해된다.

최근 일본의 Biopolymer Research사에서는 교반배양에서 셀룰로오스를 다량 생산하는 균주를 선발하고 *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans* BPR2001이라 명명하였으며 jar fermentor에서 생리적, 생화학적인 특징을 연구하였고, 최적 배지를 개발하였다(6-7). 또한 위의 균주로부터 gluconic acid를 생성하지 않는 돌연변이를 유도하여 셀룰로오스 생산수율을 증가시켰다(8).

본 연구자들은 교반배양에서 비교적 안정하며 셀룰로오스 생산성이 높은 *Acetobacter xylinum* BRC5를 선발하였다. BRC5 균주는 현재까지 보고된 셀룰로오스 생산균주와는 달리 1차적으로 glucose를 대부분 gluconic acid로 전환한 다음에 gluconic acid를 소비하면서 고수율로 셀룰로오스를 생합성하는 특징을 가지고 있다. BRC5의 플라스크 배양에서의 생리적 특징을 연구

† Corresponding Author Department of Biotechnology and Bioproducts Reserch Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea  
Tel : 82-2-361-2883, Fax : 82-2-312-6821  
e-mail : yrpyun@bubble.yonsei.ac.kr

하였으며 jar fermentor에서 분산된 상태의 셀룰로오스를 생산하는 데 성공하였다. 질소원인 CSL (corn steep liquor) 농도별 실험에서 CSL이 8%일 때에 0.5% glucose와 15% fructose를 탄소원으로 하여 4.13 g/L의 셀룰로오스를 생산하였다(9-10).

본 연구에서는 *A. xylinum* BRC5의 교반배양에 의한 셀룰로오스 생산수율을 향상시키기 위하여 glucose를 탄소원으로 하여 fed-batch 배양을 하였으며, 또한 용존산소 제어에 의한 셀룰로오스의 고농도 발효연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지조성

본 실험에서 사용한 균주는 국내 식초공장의 초막에서 분리, 동정한 *Acetobacter xylinum* BRC5 (KCCM 10100)이다.

종균 배양을 위한 배지는 Hestrin & Schramm (HS)배지(11)를 사용하였으며, 배지의 조성은 yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.7 g/L, citric acid 1.15 g/L, glucose 20 g/L (pH 5.0)이다. 본 배양을 위한 기본 CSL 배지 조성은 CSL 80 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.7 g/L, citric acid 1.15 g/L, glucose 20 g/L이다.

### 배양

전배양은 500mL 삼각 플라스크의 100mL HS 배지에 *A. xylinum* BRC5를 접종하여 진탕배양기 (Model KSI-400L, Korea Instrument Co)에서 30°C, 150rpm으로 38시간 배양하였다. 이때 균체가 활발히 증식되도록 하기 위하여 cellulase (Cellulclast 1.5L, Novo Nordisk Co., Denmark)를 배지에 1%(v/v) 첨가하였다. 배양 종료 후 배양액은 4°C, 8,000 rpm에서 30분간 원심 분리한 후, 상등액을 제거하고 동량의 HS배지를 첨가하여 균 현탁액을 조제하여 접종균으로 사용하였다.

발효조에서 교반배양은 5 L jar fermentor (KMJ-5C, Mitsuwa Co., Japan)를 사용하였다. 발효조에 2 L의 CSL 배지를 넣고 상기 전배양액을 5% 접종하여 30°C, 0.25 vvm으로 배양하였다. 교반속도는 초기 2시간동안에는 500 rpm, 대수기 이후로는 1000 rpm으로 조절하였다. 발효조에서 배출되는 이산화탄소와 산소의 농도는 gas analyzer (FOCA-1, TOA Electronics Ltd)를 이용하여 측정하였다. 배양액 내의 용존산소량은 DO meter (CE 8950M, TOA Co., Japan)로 측정하였으며, 용존산소량은 DO controller (MDO-3C, Mitsuwa Co., Japan)에 의하여 공기와 순수 산소의 공급량을 제어하여 조절하였다. 회분배양에서 pH는 발효조에 설치된 pH controller에 의하여 2 N-NaOH와 2 N-HCl을 공급하여 조절하였다.

Fed-batch배양에서는 농축 glucose 용액 (266.67 g/L)을 peristaltic pump로 일정량 공급하였다. 즉 배기가스 중의  $\text{CO}_2$  분압이 증가하는 시점부터 일정한 유량으로 glucose 농축액을 공급하였다. 이때 추가적으로 공급되는 glucose 량은 20~40 g/L 배양액이며, 농축 glucose 용액을 공급하여 glucose 용액의 공급에 의한 배양액량의 증가를 최소화하였다.

### 균체농도, 셀룰로오스 및 아세트산 생산량 측정

균체농도를 측정하기 위해서 발효액 시료에 5%의 cellulase를

첨가하고 진탕배양기 (Julabo SW-21C, Germany)에서 50°C, 200 rpm으로 1시간 반응시켜 시료중의 셀룰로오스를 완전히 분해한 후에 분광 광도계 (Hitachi U-1100, Japan)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값에 균체 환산계수 0.316 ( $\text{g-dry cell}/\text{OD}_{660}$ )을 곱하여 건조 균체량으로 하였다.

셀룰로오스 생산량은 배양액 시료 15 mL을 취하여 4°C, 8,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 분산 형태의 셀룰로오스 침전물을 20 mL의 0.25 N-NaOH에 현탁하여 끓는 물에서 1시간 증탕한 후 동량의 0.25 N-acetic acid를 넣어 중화시키고, 이것을 4°C, 8,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액은 비리고 침전물의 건조중량으로 측정하였다(11).

아세트산은 phenol-sulfuric method를 이용하여 정량하였다(12). 셀룰로오스의 정량시 1차 원심분리 한 상등액 1 mL를 2% KCl 1 mL과 99.9% ethanol이 들어 있는 vial에 첨가하여 반응시킨 후, 4°C, 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전물을 회수한 후, 이를 1 mL의 증류수에 완전히 현탁하였다. 위의 시료를 적당히 희석한 후, 1 mL을 취하여  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5mL과 5% phenol 1 mL의 혼합액에 첨가하여 30 분간 반응시킨 후, 470 nm에서 흡광도를 측정하여 glucose 표준용액의 표준곡선에 내삽하여 정량하였다.

### Glucose, gluconic acid 및 lactic acid 의 정량

Glucose, gluconic acid 및 lactic acid 농도는 배양액 시료로부터 균체 또는 셀룰로오스를 4°C, 12,000 rpm에서 원심 분리하여 제거한 상등액을 syringe filter (0.2  $\mu\text{m}$ , Gelman Sciences Co)로 여과한 후 HPLC (Water Co., USA)로 측정하였다. Column은 Aminex HPX-87H column (7.8 × 300 mm, Bio-Rad Co.)을 사용하였고, 이동상으로는 4 mM sulfuric acid를 사용하였고, 유속은 0.6 mL/min이며, detector는 시차굴절계 (Waters 410)와 흡광도검출계 (Waters 486)로 210 nm에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 초기 glucose 농도의 영향

*Acetobacter xylinum* BRC5의 본배양 배지인 CSL배지중의 초기 glucose 농도가 셀룰로오스의 생산에 미치는 영향을 Figure 1에 나타내었다. 초기 glucose 농도가 10 및 20 g/L일 때는 약 50시간 발효 후의 최종 셀룰로오스 농도는 각각 2.05 및 4.1 g/L이었다. 즉, 초기 glucose 농도가 2배 증가함에 따라 셀룰로오스 생산량도 2배 증가하여 공급한 당에 대한 셀룰로오스의 수율( $Y_{PS}$ )은 0.21로 동일하였다. 한편 초기 glucose 농도가 40 g/L일 때 셀룰로오스 생산량은 5.3 g/L로 증가하였으나  $Y_{PS}$ 는 0.13으로 현저히 감소하였다. 이와 같이 glucose가 고농도일 때 셀룰로오스의 수율이 감소하는 것은 부산물로서 수용성 당류인 아세트산의 생성량이 증가하기 때문인 것으로 생각된다. Figure 1에 나타난 것과 같이 glucose 농도가 증가할수록 acetan 생성량이 증가하였으며 glucose 농도 10 및 20 g/L일 때 acetan 생성량이 0.6 및 1.4 g/L인데 비하여 특히 40 g/L일 때는 3.8 g/L로 현저히 증가하였다. 즉 BRC5 균주는 초기 glucose 농도가 낮을 때 acetan 생성량은 소비된 glucose의 6~7%였으나, 고농도일 때는 약 10%로 증가하였다. 셀룰로오스

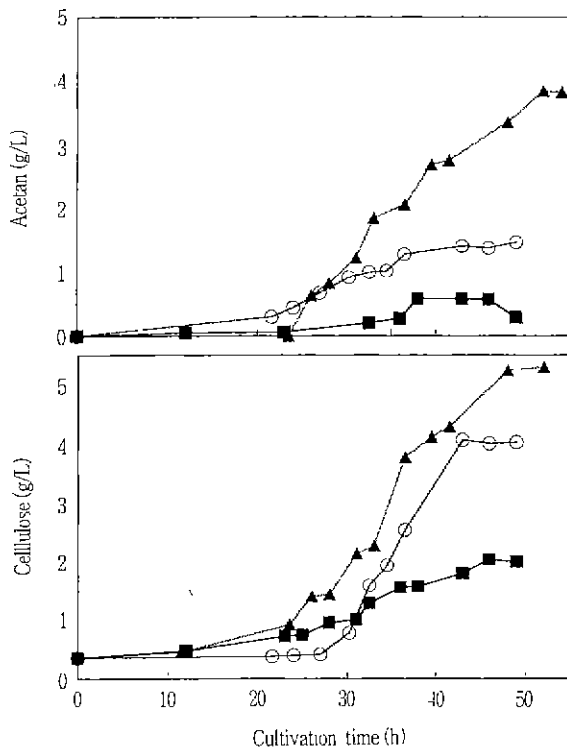


Figure 1. Effect of initial glucose concentration on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated batch culture at pH 5.0.  
 ■ : 10 g glucose/L, ○ : 20 g glucose/L, ▲ : 40 g glucose/L

를 생성하는 *Acetobacter* 균주는 수용성 다당류인 acetan을 부산물로 생성하는 것으로 알려져 있다(13).

**Fed-batch 배양**

초기 glucose 농도가 높을수록 셀룰로오스 수율이 감소하므로 생산수율을 증가시키기 위하여 fed-batch 배양을 하였다. 전술한 회분배양 결과에 의하면 초기 glucose 농도 20 g/L까지는  $Y_{p/s}=0.21$ 로 일정하므로 초기 glucose 농도 20 g/L인 CSL 배지를 사용하여 회분배양을 시작하였으며, glucose가 거의 소비된 29~30시간부터 20 g/L의 glucose를 추가적으로 공급하여 fed-batch하였다. 이때 배양액이 2L이므로 40g의 glucose를 고농도용액으로 조제한 후 동일량으로 분할하여 1시간 또는 2시간 간격으로 4회 간헐적으로 추가 첨가하였다. Figure 2(A)에 나타난 것과 같이 회분배양기간 동안에 배지중의 glucose는 대부분 gluconic acid로 전환되었으며, BRC5 균주는 glucose가 거의 소비된 후부터 배지중에 축적된 gluconic acid를 소비하면서 생육하는 동시에 셀룰로오스를 생산하였다. Glucose를 추가적으로 첨가함에 따라 gluconic acid는 약 15 g/L에서 21.7 g/L로 증가하였으며 4회째 glucose를 첨가 완료한 직후부터 gluconic acid는 급격히 감소하였다. 발효 45시간 후 최종 셀룰로오스 농도는 8.4 g/L였으며, 균체농도는 4.6 g/L였다. 한편 Figure 2(B)의 2시간 간격으로 glucose를 4회 첨가한 경우에는 gluconic acid는 감소하기 시작하다가 glucose를 첨가함에 따라 약간 증가하며 fed-batch 배양기간 동안 약 14 g/L를 유지하였으며, glucose 공급 종료 후 감소하였다. 이 경우 배양 45시간

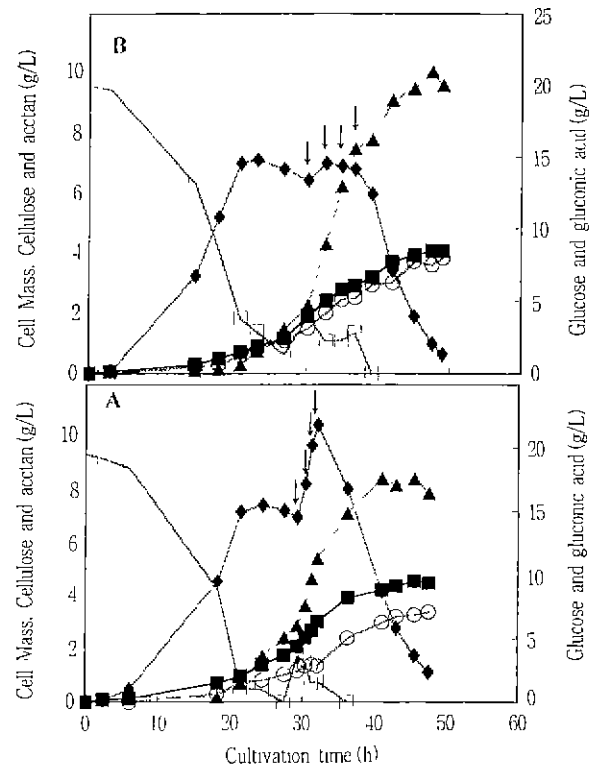


Figure 2. Time course of cellulose production by *A. xylinum* BRC5 in 8% CSL medium containing 20 g/L glucose with intermittent addition of 5 g/L glucose four times  
 ■ : Cell mass, □ : Residual glucose, ○ : Acetan, ◆ : Gluconic acid, ▲ : Cellulose

Table 1. Effect of glucose feeding rate on cellulose production by *A. xylinum* BRC5 in fed-batch culture

Parameter	Batch culture ( $S_0 = 40$ g/L)	Glucose feeding rate (g/L · h)			
		1.58	2.22	2.86	6.66
X (cell mass, g/L)	4.25	4.60	4.44	4.23	3.52
P (cellulose, g/L)	5.3	7.8	6.10	9.5	8.51
$Y_{p/s}$ (g cellulose/g glucose)	0.13	0.197	0.25	0.238	0.213
$Y_{x/s}$ (g cell/g glucose)	0.11	0.115	0.111	0.105	0.088
$\mu$ ( $h^{-1}$ )	0.076	0.057	0.069	0.06	0.057
$Q_p$ (g cellulose/L · h)	0.102	0.19	0.26	0.23	0.21

Initial glucose concentration in batch culture was 20 g/L, and 20 g/L of glucose was additionally added during fed-batch culture with different feed rates.

후 셀룰로오스 생산량은 9.4 g/L, 균체 농도는 3.6 g/L였다. 이와같은 결과로 미루어 볼 때 fed-batch 배양에서 기질의 공급속도가 셀룰로오스 생산에 미치는 영향이 큰 것으로 생각된다. 따라서 간헐적으로 glucose를 공급하는 대신에 일정량의 기

질을 연속적으로 공급하는 constant fed-batch 배양을 하였으며 glucose 공급속도가 셀룰로오스 생산에 미치는 영향을 Table 1에 정리하여 나타내었다. 배양액 기준으로 2.22 g/L·h의 속도로 약 9시간동안 20 g/L의 glucose를 첨가했을 때 셀룰로오스 생산량이 10.0 g/L로서 가장 높았으며  $Y_p/s=0.25$  g cellulose/g glucose였다. 이는 초기 glucose 농도 40 g/L로 배양한 회분배양의 셀룰로오스 생산량 5.3 g/L에 비하여 약 2배 수율이 향상된 결과이다. 또한 셀룰로오스의 평균 생산성은 0.26 g/L·h로서 회분배양의 0.102 g/L·h에 비하여 2.5배 향상되었다.

교반배양에 의한 cellulose의 대량생산에 대해서는 Cetus/Weyerhaeuser와 Imperial Chemical Industry (ICI)에서 연구하였다(14) Weyerhaeuser사에서는 모균주보다 gluconate 생산이 50배 감소된 변이주를 개발하고 fed-batch 배양에 의하여  $Y_p/s=0.2$  g cellulose/L glucose 이상을 얻었다고 보고하였다. 한편 ICI사에서는 균주를 변이시키지 않고 배양액 중의 glucose 농도를 0.5 g/L 이하가 유지되도록 fed-batch 배양하여  $Y_p/s=0.18$  g cellulose/g glucose를 얻었으며 draw-and-fill 방법으로 생산성을 현저히 향상시켰다고 보고하였다(14)

Figure 3에 최적 기질 공급속도일 때 발효특성을 나타내었다. Figure 2와 동일한 조건으로 회분배양을 시작하여 배출가스 중의 CO<sub>2</sub>양이 감소하는 시점부터 glucose를 2.22 g/L·h로 9시간 첨가하였다. Figure 3에서 보는 것과 같이 CO<sub>2</sub> 발생량이 감소하는 순간 glucose를 첨가하면 곧바로 CO<sub>2</sub> 발생량이 다시 증가하기 시작하였으며 glucose 첨가가 중단되면 CO<sub>2</sub> 발생량은 급격히 감소하였다. 아울러 용존산소 농도는 CO<sub>2</sub> 발생량과 반대 경향으로 변하여 CO<sub>2</sub> 발생량이 감소하는 순간 증가하기 시작하였으며 glucose를 공급하면서 급격히 감소하기 시작하였다. 이와 같은 경향으로 판단해 볼 때 배출가스중의 CO<sub>2</sub>는 fed-batch 배양할 때 용존산소의 제어신호로 성공적으로 사용할 수 있음을 의미한다. 최적속도로 기질을 공급한 경우 fed-batch 배양 중에 배양액 중에 glucose는 검출되지 않았으며, 회분배양중에 축적되었던 gluconic acid도 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 배양액의 용존산소도 지속적으로 감소하여 fed-batch 중반인 35시간부터 거의 0에 접근하였으며 이때부터 균체생육속도가 감소하는 경향을 나타내어 용존산소가 균체증식의 제한 인자로 작용하는 것으로 생각된다. 한편 셀룰로오스는 회분배양의 후기부터 축적된 gluconic acid를 소비하면서 생성되기 시작하여 fed-batch 기간에도 계속하여 급속히 축적되었으며 glucose 공급이 중단되면서 감소하였다. 배양 39시간 후부터 생성된 셀룰로오스가 감소하는 것은 균체중의 cellulase에 의하여 셀룰로오스가 분해되기 때문인 것으로 생각된다. 셀룰로오스를 생산하는 *A. xylinum*은 그 역할은 명확하지 않으나 셀룰로오스를 가수분해하는 CMCx활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다 (15).

한편 glucose를 6.66 g/L·h의 빠른 속도로 첨가한 경우 (Figure 4), Figure 2(A)의 경우에서의와 같이 fed-batch 기간에 배양액 중에 glucose가 잔존하였으며, gluconic acid가 다시 급격히 증가하였다. Glucose를 급속히 첨가한 Figure 2와 Figure 4에서 셀룰로오스의 생성속도를 살펴보면 fed-batch 배양기간 동안에는 셀룰로오스 생산속도가 빠르나 glucose 공급이 종료된 후 축적된 gluconic acid를 소비하면서 셀룰로오스를 생산하는 기간에는 생산속도가 현저히 감소하였다. 그러나 Figure 3에서

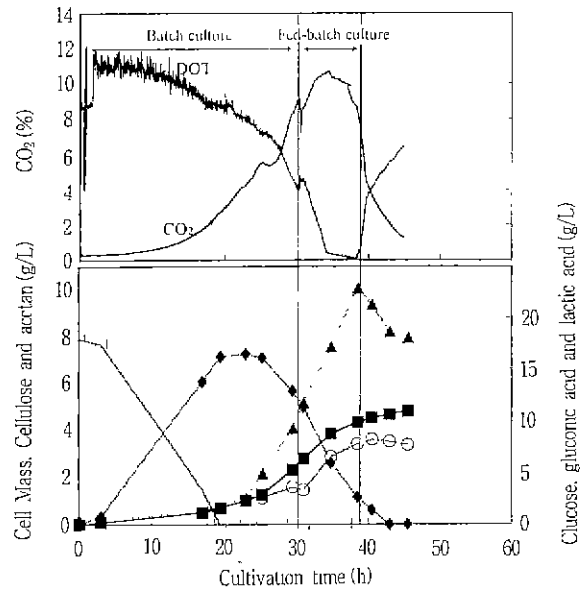


Figure 3 Time course of cellulose production by *A. xylinum* BRC5 in 8% CSL medium containing 20 g/L glucose 20 g/L of glucose was additionally added during cellulose production phase with a feeding rate of 2.22 g glucose/L·h for 9 h  
 ■ : Cell mass, □ : Residual glucose, ○ : Acetan, ◆ : Gluconic acid, △ : Cellulose

와 같이 적절한 양의 glucose를 서서히 첨가한 경우에는 fed-batch 기간에 glucose를 첨가함에도 회분배양 기간에 축적된 gluconic acid가 지속적으로 감소하면서 셀룰로오스 생산속도도 빨랐다. 이와같은 점으로 미루어 볼 때 셀룰로오스의 생산속도를 빠르게 유지하기 위해서는 배양액에서 glucose가 검출되지 않는 glucose 제한상태를 유지하면서 적절한 양의 glucose를 공급하여주어야 하는 것으로 생각되나 이점에 대해서는 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. *A. xylinum*이 glucose로부터 셀룰로오스를 생합성하는 대사과정은 glucose-6-phosphate를 거쳐 셀룰로오스 생합성의 직접적인 전구체인 UDP-glucose로 되는 경로와 gluconate로 전환되어 pentose phosphate경로는 거치는 과정이다. 일반적으로 보고되고 있는 셀룰로오스 생산균인 *A. xylinum*은 주로 전자의 경로에 의하여 셀룰로오스를 생산하는 것과 달리 *A. xylinum* BRC5 균주는 대부분의 glucose를 우선적으로 gluconic acid로 전환시킨 후 gluconic acid를 소비하면서 셀룰로오스를 생산하는 특징이 있어 본균주의 셀룰로오스 생합성 경로에 대한 상세한 연구가 앞으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

#### 용존산소제어 배양

Constant fed-batch 배양에 의하면 셀룰로오스의 수율을 현저히 향상시킬 수 있는 것으로 기대되었다. 따라서 셀룰로오스 생산성을 향상시키기 위하여, 초기 glucose 농도 20 g/L의 CSL 배지로 회분배양을 시작하여 fed-batch 기간에 첨가하는 glucose 양을 20 g/L에서 40 g/L로 증가시켜 배양하였다. Fed-batch 기간에 glucose는 2.22 g/L·h로 18시간 공급하였으며, 이때 셀룰로오스의 최종 생성량은 10.7 g/L였다. 이 결과를 glucose 20g/L를 첨가한 Figure 3과 비교해 볼 때 셀룰로오스

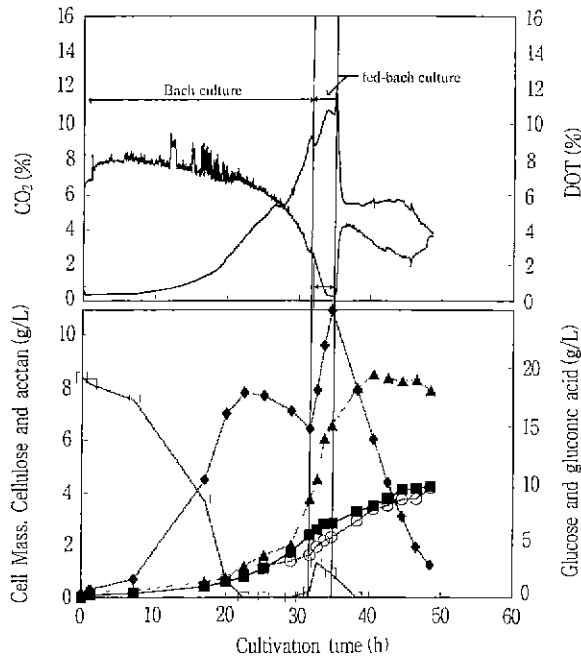


Figure 4. Time course of cellulose production by *A. xylinum* BRC5 in 8% CSL medium containing 20 g/L glucose. 20 g/L of glucose was additionally added during cellulose production phase with a constant feed rate of 6.66 g/L · h for 3 h. ■ : Cell mass, □ : Residual glucose, ○ : Acetan, ◆ : Gluconic acid, ▲ : Cellulose

생산량이 0.7 g/L만이 증가하였다. 충분한 양의 glucose를 계속 첨가하였음에도 셀룰로오스 생산량이 증가하지 않는 것은 전환한 바와 같이 *A. xylinum*은 호기성 균이므로 산소공급 부족 때문인 것으로 생각된다

Fed-batch 배양 중 용존산소의 고갈을 막기 위해서 공기에 순수한 산소를 혼합하여 공급하는 방법으로 dissolved oxygen tension (DOT)을 일정한 수준으로 유지하면서 배양하였다. 셀룰로오스 발효는 교반속도에 큰 영향을 받으며, 교반속도를 증가시키면 산소전달에는 유리하나 과도한 교반은 오히려 셀룰로오스 microfibril의 생성을 저해하므로 교반속도를 1000 rpm으로 고정한 상태에서 공기와 혼합되는 순수한 산소의 공급량을 조절함으로써 DOT를 조절하였다. DOT 수준을 2~15% 포화 범위에서 일정하게 유지하면서 fed-batch 배양한 결과를 Table 2에 정리하여 나타내었다. DOT를 10%로 유지하였을 때 셀룰로오스 생산량과 수율은 각각 15.3 g/L와  $Y_{p/s}=0.26$ 으로 가장 높았으며, DOT 7 및 15% 일때는 약간 낮았으나 10%일 때와 비슷한 수준의 셀룰로오스 생산성을 보였다. 한편 Figure 5에서 DOT 수준에 따른 셀룰로오스 발효특성을 살펴보면 셀룰로오스 농도 약 10 g/L 이하일 때는 셀룰로오스 생산속도 및 균체 생육속도가 용존산소 농도에 영향을 받지않고 동일하였다. 그러나 셀룰로오스 10 g/L 이상일 때 균체 생육보다는 셀룰로오스 생산속도가 용존산소 농도에 크게 영향을 받았다. 즉, DOT 2%일 때는 셀룰로오스 농도는 10.2 g/L 이상 증가하지 않았으며, DOT 7%일 때는 서서히 증가하며 발효 49.5시간후에 최고 농도 14.6 g/L에 도달하였다. DOT 10와 15% 일때는 지속적으로 증가하며 fed-batch 중반기에 약 15.0 g/L에 도달한 후 더 이

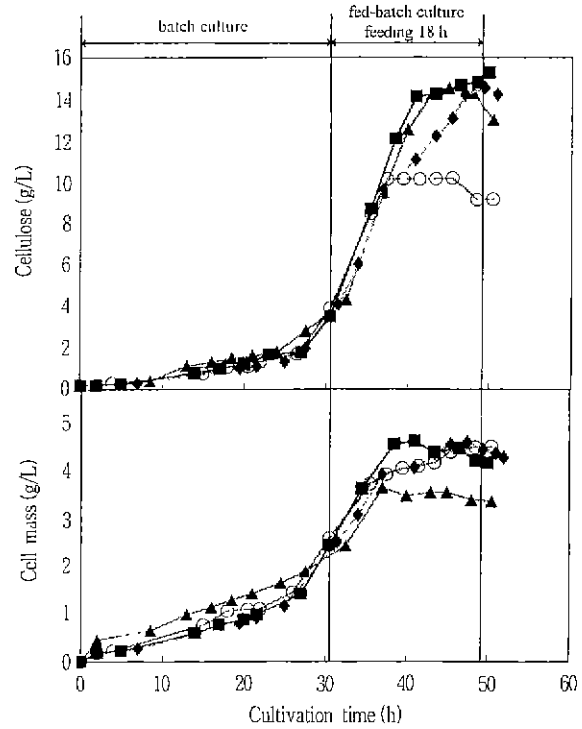


Figure 5. Effect of DOT on cell mass and cellulose production by fed-batch culture of *A. xylinum* BRC5 in 8% CSL medium containing 20 g/L glucose. 40 g/L of glucose was additionally added during cellulose production phase with a feed rate of 2.22 g/L · h for 18h. ○ : 2% DOT, ◆ : 7% DOT, ■ : 10% DOT, ▲ : 15% DOT

Table 2. Effect of DOT level on cellulose production by *A. xylinum* BRC5 in 8% CSL medium containing 2 g/L glucose.

Parameter	DOT (%) uncontrol culture	DOT (%) control culture			
		2	7	10	15
X (cell mass, g/L)	4.51	4.51	4.59	4.68	3.57
P (cellulose, g/L)	10.7	10.2	14.6	15.3	14.5
$Y_{p/s}$ (g cellulose/g glucose)	0.18	0.17	0.24	0.26	0.24
$Y_{x/s}$ (g cell/g glucose)	0.075	0.075	0.076	0.078	0.060
$Q_p$ (g cellulose/L · h)	0.228	0.224	0.294	0.306	0.322

40 g/L of glucose was additionally added during cellulose production phase with a feed rate of 2.22 g/L · h for 18h.

상 거의 증가하지 않았다.

한편 균체 생육은 셀룰로오스 농도가 10 g/L에 도달한 배양 시간 37시간 이후에는 매우 완만히 증가하거나 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 발효특성을 나타내는 것은 셀룰로오스 발효액의 고점성 특성 때문인 것으로 생각된다. *A*

*xylinum*에 의한 셀룰로오스의 생성은 Figure 6에 나타난 것과 같이 세포주변에서 microfibril 형태로 형성되어 망상구조를 이루게 된다. 따라서 교반배양 상태 일지라하더라도 셀룰로오스의 생성량이 증가하면 발효액의 점도가 증가하며 세포는 자신이 생성한 셀룰로오스에 포괄된 상태로 발효액 속에 분산되어 있으므로 내부의 세포는 산소공급의 제한을 받기 때문에 생육속도가 매우 느려지는 것으로 생각되며, 셀룰로오스의 생합성에 필요한 세포활성을 유지하기 위한 최소한의 산소를 공급하기 위해서는 셀룰로오스 fibril의 외부 배양액의 DOT를 10% 수준 이상으로 유지하여야 하는 것으로 생각된다

셀룰로오스 발효액의 유동특성을 측정한 결과 Figure 7에 나타난 것과 같이 전형적인 pseudoplastic fluid의 특성을 나타내었으며, apparent viscosity는 셀룰로오스 농도에 거의 비례하였다 특히 셀룰로오스 농도가 12 g/L에 도달하면 발효액의 점도가 약 100p까지 증가하였으며, 이때부터 공기방울이 분산되지 않고 큰 방울을 형성하기 시작하였으며, 셀룰로오스 농도가 약 14 g/L 이상이 되면 큰 공기방울의 불균일체를 형성하여 정상적인 통기 교반 발효가 불가능하였다. Figure 5에서 볼 수 있는 것 같이 DOT가 10~15% 유지됨에도 불구하고 셀룰로오스 농도가 14~15 g/L 이상 증가하지 않는 것은 발효액의 고점성 때문이며, turbine impeller가 설치된 표준형 발효조에서는 약 15 g/L가 최대 농도인 것으로 생각된다. Kouda 등(16)은 셀룰로오스의 생산성을 향상시키기 위하여 교반기의 구조와 교반조건에 대하여 연구하여 Maxblend형 또는 터빈이 냉설된 gate형 임펠러가 고정성 셀룰로오스의 발효액의 교반에 효과적이었다고 보고하였다 또한 순수한 산소를 혼합한 공기를 공급했을 때 셀룰로오스 생산속도는 임펠러의 교반 속도를 감소시켜도 영향을 받지 않았으며, 이는 셀룰로오스 생산속도는 shear rate에 영향을 거의 받지 않는다는 것을 의미하는 것으로 셀룰로오스는 물에 불용성이므로 세포주변의 물질 이동에 큰 영향을 미치지 않는 것이라 해석하였다. 그러나 BRC5균주는 fed-batch 후기에 셀룰로오스 생산량의 약 40~50%에 달하는 상당량의 acetan을 생성한다. Acetan은 수용성 고분자이므로 셀룰로오스 발효액의 점성을 더욱 상승시키며 산소전달저항이 커지는 것으로 생각된다. 따라서 acetan을 생성하지 않는 변이주의 개발은 셀룰로오스의 수율 향상뿐만 아니라 산소전달속도의 향상을 위해서 중요한 것으로 생각된다.

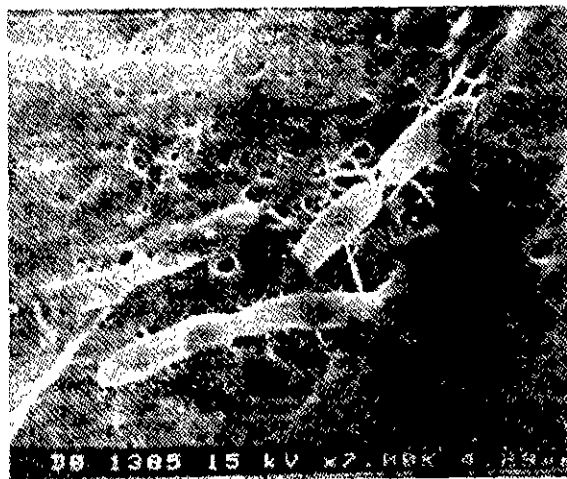


Figure 6. Scanning electron micrograph of cellulose produced by *A. xylinum* BRC5 in agitated culture.

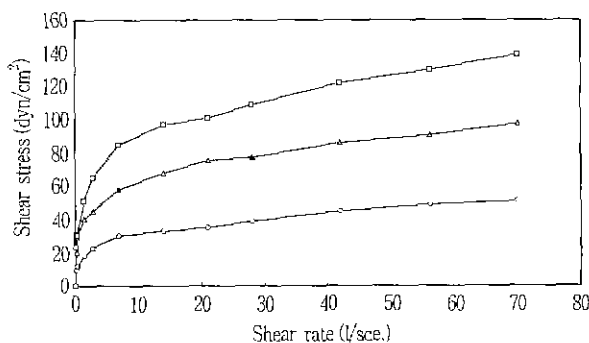


Figure 7 Flow curves for cellulose fermentation broth  
 ○ : 5.1 g cellulose/L ▲ : 7.5 g cellulose/L, ■ : 9.3 g cellulose/L

요 약

우수한 셀룰로오스 생산 균주인 *Acetobacter xylinum* BRC5의 교반배양에 의한 셀룰로오스 생산성을 향상시키기 위하여 fed-batch 배양을 하였으며, 기질공급속도, 기질 공급량 및 용존산소의 영향을 검토하였다.

초기 glucose 양을 변화시켜 회분배양하였을 때 glucose 농도가 10 및 20 g/L인 경우 셀룰로오스 생산량은 각각 2.05와 4.10 g/L이었으며 glucose에 대한 셀룰로오스 수율 ( $Y_{p/s}$ )은 0.21이었다 초기 glucose 농도 40 g/L일 때 셀룰로오스 생산량은 5.3 g/L,  $Y_{p/s}$ 는 0.13으로 감소하였다 따라서 셀룰로오스 수율을 향상시키기 위해서 초기 glucose 농도 20 g/L에서 회분배양을 시작하여 glucose가 gluconic acid로 완전히 전환된 시점부터 추가적으로 glucose를 공급하여 fed-batch 배양하였다. Fed-batch 배양기간에 glucose 공급속도는 셀룰로오스 생산성에 큰 영향을 미쳐 20 g/L의 glucose를 2.22 g/L·h의 속도로 9시간 첨가하여 fed-batch 배양한 결과 셀룰로오스 생성량이 10 g/L로 가장 우수하여 초기 glucose 농도 20 g/L로 회분배양하였을 때 비하여 약 2배 증가하였으며,  $Y_{p/s}$ 도 0.26으로 현저히 향상되었다. 또한 동일조건으로 fed-batch 배양하면서 glucose 공급량을 증가시켜 40 g/L의 glucose를 추가적으로 첨가한 경우 셀룰로오스 생산량은 10.7 g/L로 거의 증가되지 않았으며,  $Y_{p/s}$ 가 0.18로 감소하였다. 이는 셀룰로오스 농도가 증가함에 따라 산소 공급이 부족하기 때문이므로 용존산소 (DOT)를 2~15% 포화범위에서 조절하여 fed-batch 배양했을 때 DOT 10%일 때 셀룰로오스 수율이 가장 높았다. DOT를 10% 수준으로 유지하면서 fed-batch 배양기간에 40 g/L의 glucose를 추가공급 했을 때 셀룰로오스 생성량은 15.3 g/L로 증가되었고 이때  $Y_{p/s}$ 는 0.26로 향상되었다 이는 DO를 제어하지 않는 경우에 비하여 셀룰로오스 생성량이 1.5배 증가한 결과이다.

## 감 사

본 연구는 1995년도 연세대학교 학술연구비의 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제번호 95035)

## 참 고 문 헌

- Engelhardt, J. (1995), Sources, industrial derivatives and commercial application of cellulose, *Carbohydrates In Europe*, 12, 5-14.
- Delmer, D. P. (1983), Biosynthesis of cellulose, *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.*, 41, 105-153
- Okuyama, A., H. Shirae, H. Kano, and S. Yamanaka. (1992), Bacterial cellulose I Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*, *Food Hydrocolloids*, 6, 471-477.
- 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.
- Kouda, T., H. Yano, F. Yoshinaga, M. Kaminoyama, and M. Kamtawano (1996), Characterization of non-Newtonian behavior during mixing of bacterial cellulose in a bioreactor, *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 382-386.
- Ishikawa, A., M. Matsuoka, T. Tsuchida, and F. Yoshinaga (1995), Increase in cellulose producing by sulfaguanidine-resistant mutants derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 259-2262.
- Matsuoka, M., T. Tsuchida, K. Matsushita, O. Adachi, and F. Yoshinaga (1996), A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 575-579.
- Yoshinaga, F., N. Tonouchi, and K. Watanabe (1997), Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 219-224
- Park, S. H., Y. K. Yang, J. W. Hwang, C. S. Lee, and Y. R. Pyun (1997), Microbial cellulose fermentation by *Acetobacter xylinum* BRC5, *Kor. J. Appl. Microbial Bioeng.*, 25(6), 598-605
- Yang, Y. K., S. H. Park, J. W. Hwang, Y. R. Pyun and Y. S. Kim (1998), Cellulose production by *Acetobacter Xylinum* BRC5 under agitated condition, *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 312-317
- Hestrin, S. and M. Schramm (1954), Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. I. Micromethod for the determination of cellulose, *Biochem. J.*, 56, 162-166.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Robers, and F. Smith (1956), Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- Couso, R. O., L. Ielpi, R. C. Garcia, and M. A. Dankent (1982), Biosynthesis of polysaccharides in *Acetobacter xylinum*, *Eur. J. Biochem.*, 123, 617-627.
- Byron, D. (1991), Microbial cellulose, Biomaterial (Byron, D. ed.) p.263-284, Stockton Press, New York.
- Koo, H. M., S. H. Song, Y. R. Pyun, and Y. S. Kim (1998), Express and characterization having  $\beta$ -1,4 endoglucanase activity from *Acetobacter xylinum*, *Biochem. Mol. Biol.*, 31(1), 53-57.
- Kouda, K., H. Yano, and F. Yoshinaga (1997), Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. *J. Ferment. Bioeng.*, 83 (4), 371-376.