

특집 : 식초산업의 현황

초산균이 생산하는 Cellulose의 이용 전망 A View of Utilizing Cellulose Produced by *Acetobacter* Bacteria

정용진, 이인선 (Yong-Jin Jeong, In-Seon Lee)

계명대학교 응용과학부 식품가공학과

서 론

식초는 주로 조미료로 이용되었으나 최근에 식초 생산 과정에서 형성되는 피막을 이용한 신소재 개발에 관심이 높아지고 있다. 현재까지 알려져 있는 다당류 생산은 전통적으로 식물과 해초에서 얻었으며 대량생산에 많은 어려움이 있었다. Cellulose는 자연계에 가장 풍부한 bio-mass 자원으로 초산균이 cellulose를 생성한다는 사실은 식품으로서 뿐만 아니라 고부가가치 신소재로서 산업으로 매우 중요한 과제가 되고 있다. 초산균이 cellulose를 생산한다는 것은 약 100년 전부터 보고되어 왔다. 이 cellulose는 식물 cellulose와 달리 hemicellulose나 lignin을 전혀 함유하지 않은 고순도의 cellulose이며, 간단한 cellulose합성제로 생화학적 연구의 대상이 되었으며, 또 물리화학적 성질이 매우 우수하여 실용화 소재로의 연구가 진행되고 있다. 그 중 코코넛을 이용한 나타데 코코는 주 생산국인 필리핀의 과실가공식품으로 수출액의 31%를 차지하며, 96%가 일본으로 수출되었다. 일본에서는 cellulose를 이용한 음향진동판 스피커가 연간 10만조 이상 판매되었으며 특히, 환경 친화적으로 재생 가능한 자원으로 각광을 불러일으키고 있다. 또한 일본 통상성은 bio polymer research (BPR)사를 설립하여 새로운 용도개발을 목표로 활발한 연구가 진행되어 100건 이상의 특허가 출원되었다.

초산균이 생성하는 cellulose는 bio-polymer라 불리며 고강도, 보수성, 유화 현탁 안정성 그리고 결합성 등의 특징을 가짐은 물론, 다양한 용도로 활용이 가능하여 21세기 첨단 소재산업으로 이용될 전망이다. 이에 따른 cellulose 생성균주, 배양, 특징 그리고 이용분야에 관하여 설명하고자 한다.

Cellulose 생산균

Cellulose를 생산하는 초산균은 양조식초 제조과정에서 종종 오염균으로 나타나 피막을 형성하며 일본에서는

“곤약균” 또는 “Vinegar Plant”라는 이름으로 매우 오래 전부터 알려져 왔다. Brown은 1886년 초산균(*Bacterium aceti*)을 포도당 배지에서 배양하면 배지 표면에 얇은 막이 생기는 것을 발견하였고, 이 막은 식물 세포벽을 구성하고 있는 cellulose와 동일 한 것이라는 확신을 얻었다. 초산균이 생산하는 cellulose는 세균 cellulose 또는 bio-polymer라고 불린다. 이는 식물의 골격구조를 형성하고 식물세포의 성장기에 생합성되는 식물세포벽 cellulose와 50~70% 정도로 비슷한 경향을 보인다.

오늘날 cellulose를 생산하는 초산균은 표 1에서와 같이 *A. xylinum* 또는 *A. pasteurianus*, *A. hansenii* 등이 알려져 있으나, 최근 분류학적 동정 결과가 재분류되고 있으며, 국내에서도 cellulose생성력이 우수한 *Gluconaceterbacter hansenii* JK21, *Acetobacter pasteurianus*의 다당류 생산성에 관한 보고가 있다.

이와 같이 초산균은 순도 높은 cellulose를 생성하는 균주의 특징은 그림 1과 같이 장간균 형태의 내산성력이 약한 세균으로 균체에서 cellulose를 분비한다.

표 1. 초산균이 생산하는 Cellulose

Bio-polymer	구성당	생산균주
Cellulose	Glucose	<i>A.xylinum</i>
Dextrin	Glucose	<i>A.capsulatum</i>
Levan	Fructose	<i>A.suboxydans</i>
$\beta(1\rightarrow2)$ -Branch $\beta(1\rightarrow4)$ glucan	Glucose	<i>A.xylinum</i>
Branch $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucan	Glucose	<i>A.xylinum</i>
	Ramnose	
	Maltose	
	Gluconic acid	
$\beta(1\rightarrow2)$ -D-Glucan	Glucose	<i>A.xylinum</i>
Branch $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucan	Glucose	<i>A.xylinum</i>
	Galactose	
	Mannose	
	Glucronic acid	



그림 1. Cellulose를 생성하는 초산균(장간균)의 형태

Cellulose 생성기구

Cellulose의 세포 합성

Cellulose를 생산하는 초산균을 탄수화물이나 단백질을 함유한 복합배지에서 pH 6.8, 28°C로 배양하면 균은 영양원을 세포내로 끌어들이고, 대사과정에서 생긴 다른 노폐물과 함께 cellulose를 세포 밖으로 배출한다. 균의 증식이 필요한 경우에는, 유전자의 구성원소로 불가결한 질소를 함유한 단백질이 필요하지만 cellulose를 합성시키는 경우에는 glucose배지에서도 잘 증식된다. 최초의 세균 cellulose는 그 반복단위가 glucose이며, glucose를 영양원으로 하여 초산균이 cellulose를 합성하기 때문에, 균이 glucose를 결합하는 촉매작용을 하는 것이 아닐까 하고 생각되었다. 그러나 glucose의 특정위치의 탄소에 그 동위원소(탄소의 질량수는 12이나, 13이나 14인 것이 있어 이것을 동위원소라 한다)가 들어가 cellulose를 합성하는데, 이 동위원소가 표시된 glucose로 초산균을 배양시켜 생긴 cellulose에서 glucose의 동위원소 위치가 조사되었다. 그 결과 세포내에서 얻은 glucose는 한번 분해되어 새로운 glucose가 합성되고, cellulose 분자가 중합되는 것이 밝혀졌다.

그 후 세균 cellulose는 1970년대 중반까지 다른 노폐물과 함께 저분자 물질의 형태로 배출되어, 그것이 세포와 관계없이 반응하여 합성된다고 생각되어 왔다. 그러나, 그 후 그림 2와 같이 cellulose 분자는 초산균으로부터 직접 밀려나와 하나의 섬유를 형성하고 이들 섬유가 다시 모여 cellulose막을 형성한다는 것이 밝혀지게 되었다. Cellulose 합성 중에 초산균을 진공동결 건조한 시료를 전자현미경으로 관찰하면, 그 세포막에는 cellulose분자를 합성하고 있는 입자 균이 세포의 장축방향으로 나란히 배열되어 있는 것이 발견되었으며, cellulose의 말단

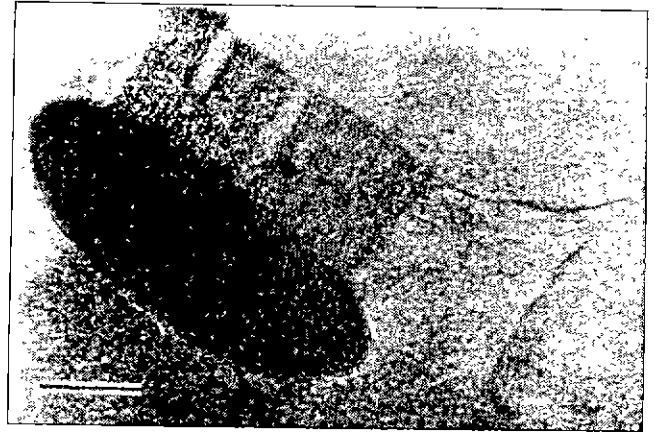


그림 2. *Acetobacter xylinum*의 cellulose 생성

이 있는 모양이 되어 이들 입자가 cellulose 합성장치인 것이 규명되었다.

Cellulose 섬유의 형성기구

세포에서 분리된 cellulose는 처음엔 비결정성이지만 차츰 결정화하여 식물세포벽을 형성하고 있는 천연 cellulose와 공통인 cellulose 결정을 형성한다. 이 메카니즘은 cellulose 분자 쇠사슬이 겹쳐진 sheet 모양으로 세포에서 밀려나와 이 sheet간에 수소결합이 발생하여 결정화하기 때문이라는 것이 밝혀졌다. 세균 cellulose는 직경 약 40Å (1Å는 1×10^{-8} cm)의 섬유가 기본단위로 되어있고, 이것은 세포막에서 발견된 입자균의 중앙에 꼭 맞는 구멍(약 35Å)의 직경에 거의 대응하고 있다. 이들 기본 섬유가 모여 보다 큰 단위의 섬유(직경 약 70~100Å)를 형성하고, 이 섬유가 모여 cellulose 막을 만들고 있다. 세균 cellulose 섬유의 신장 속도는 최적배양 조건에서 매분 약 2.6μm이다. 이 섬유의 길이는 10μm 정도까지 측정 가능하나 그 이상 길게 되면 섬유간의 조합이 일어나기 때문에 실제의 길이는 불분명하다. 이 섬유의 신장 속도는 glucose가 매분 약 5,000개가 연결되고 있다는 것을 의미하고 있다. 그러나 세균 cellulose의 중합도(1개의 cellulose 분자에 연결되어 있는 glucose의 수)는 의외로 작고 측정결과에 따라 다소 다르지만 약 2,000~6,000개로 하고 있다.

Cellulose의 구조와 성질

초산균을 복합배지에서 정치배양하면, 배지표면에 cellulose 막이 형성된다. 막을 형성하고 있는 섬유는 random한 그물모양 배열을 한다. 이런 cellulose막에서는 종종 구정(球晶-섬유가 서로 특별한 방향으로 나란히

구상구조를 만들고 있는 경우를 말하고 이것을 형광 현미경으로 보면 색을 띠고 있다)이 함유되어 있다. 이 구성은 한 개의 균체가 세포분열하여 하나의 균체를 만들 경우에 가능하다는 것이 밝혀졌다. 이 건조되지 않은 막은 친수성용매, 예를 들면 아세톤이나 초산 등으로 세척하여 유리판 위에서 건조시키면 막 표면으로 배열하려는 성향이 한층 강해지고, 반대로 소수성용매 등으로 세척한 경우에는 배열하려는 성향이 저하되는 것으로 밝혀졌다. 이것은 결정면에 친수성의 OH기가 나란히 있기 때문에 일어나는 현상이다.

따라서 cellulose는 고탄성이며, 기계적 강도도 높은 것이지만 이 섬유가 모여서 된 섬유 즉, 한 개의 균체가 생산한 섬유가 무작위로 배열하고, 일반적으로 섬유간의 수소결합이 약하기 때문에 막의 기계적 강도가 반드시 높은 것은 아니다. 반대로 이 상태는 막이 건조되지 않은 상태에서는 다량의 수분이나 친수성물질을 함유할 수 있는 성질을 주고 있다. 따라서 이 막에 함유되어 있는 cellulose 이외의 성분을 제거하여 이것을 압착하면 고탄성의 cellulose막을 얻을 수 있다는 것을 알 수 있다. 왜냐하면 섬유간에 다수의 수소결합이 발생하기 때문이다. Cellulose는 초산균의 배양방법에 따라 여러가지의 크기, 형상, 두께가 있는 막의 그물구조에 주목이 집중되어 현재 각 방면에서 효과있는 이용에 관한 연구 개발이 활발히 진행되고 있다.

Cellulose의 생산방법

초산균을 이용한 cellulose생산은 지금까지 정치배양으로 배양액 표면에서 불용성으로 생성되는 배양액으로부터 회수하여 약알칼리 용액에 축적된 균체를 용해시킴으로써 고순도의 cellulose를 얻을 수 있으며, 정제된 cellulose는 수분함량이 97%정도로 대부분이 물이다. 정치배양에서 glucose를 탄소원으로 하는 경우 당에 대한 회수율은 10%정도로 고가의 원인 중 하나가 되고 있다. 그러나 수용성 cellulose의 경우에는 50% 이상의 회수율을 보이므로 회수율 향상의 가능성은 충분하다고 생각된다. 생산방법의 개량으로는 균주개량과 배양장치 reactor의 개발 두 가지가 있으며, 배양장치의 개발 등 대량생산 산업화를 위하여 많은 연구가 요구되고 있는 분야는 다음과 같이 요약된다.

균주개량에 의한 생산성 향상

Cellulose를 생산하는 경우, 탄소원으로는 glucose, fructose 및 sucrose 이외에 sorbitol, mannitol 같은 당알콜 또는 초산으로부터의 생산이 보고되었다. Cellulose

의 생합성 경로는 식물과 같은 모양으로 추정되고 있다.

Glucose의 경우 인산화에 의해 활성화되어 전구체인 UDP-glucose로 합성되며 최종적으로는 cellulose합성효소의 작용에 의해 중합화되어 cellulose 분자로 된다 (그림 3).

이 cellulose 합성효소는 막의 한 부분에 존재하는 단백질로서 원형질막 바깥 표면상에서 중합이 진행되어 균체 밖으로 배출된다고 생각된다. 따라서 지금까지의 균주개량은 생합성계의 강화가 아닌 부 반응을 억제하는 방향으로 진행되고 있다. 그 한 가지는 gluconic acid를 생성하지 않는 변이주의 개발이며, 또 한 가지는 통기교반 배양에 적합한 균주의 육종이다.

초산균은 에탄올의 산화능력이 강한 것으로 알려져 있지만, 당에 대한 산화능력도 강력하다. 탄소원으로 glucose나 sucrose를 사용하면 우선 glucose 산화가 일어나 gluconic acid로 변화한다. 이것은 glucose의 산화효소가 세포질 막의 표면에 존재해서 세포와 glucose가 접촉하면 먼저 gluconic acid가 되고, 다시 한번 대사 되기 때문에 최종적으로는 glucose가 되지만, 생산량 감소나 생산속도의 저하로 이어진다. 따라서 gluconic acid 생성 억제는 회수율 향상으로 이어진다. 통기교반 배양에 적합한 균주에 대해서는 지금까지는 정치배양에서 생산이 검토되어 왔는데, 이것은 통기교반하면 cellulose를 생산할 수 없는 세포수의 비율이 증가하기 때문이다. 이런 cellulose를 생산 할 수 없는 균주는 자연변이에 의해 일어나고, 생산균주보다도 증식속도가 빠르기 때문에 연속적인 통기교반 배양으로 생산주가 도태되어 비생산주가 배양의 주체로 되어버리기 때문이라고 알려져 있다.

최근 BPR사에서는 통기교반 배양이 가능한 균주를 검색하여 통기교반 배양에 적합한 고생산주의 분리에 성공하였으며, 이러한 연구에 의해 대형 발효조 장치를 이용한 단기간 대량생산이 가능 할 것으로 기대하고 있다.

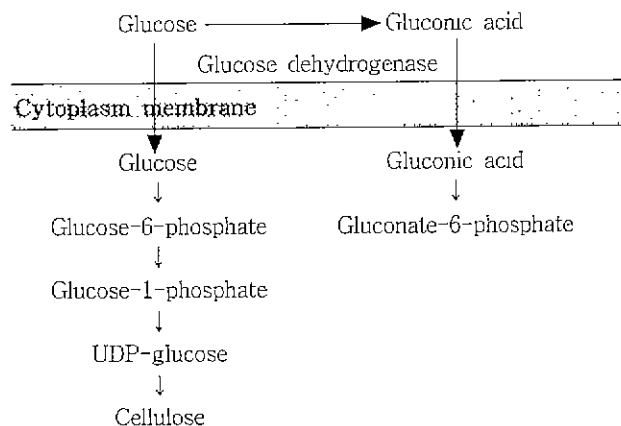


그림 3. Cellulose의 생합성 경로

유전자 교환에 의한 육종

상기의 균주 선택이나 변이주 외에 유전자 교환에 의한 개량도 시도되고 있다. 유전자 교환에 의한 개량을 시행하기 위해서는 cellulose생산균의 숙주-벡터계의 개발 및 cellulose생합성에 관여하는 유전자의 클로닝이 필요하다. 이들 연구에서는 초산균에서 개발된 기술이나 지식이 활용되고 있고, 현재까지 활발한 연구가 진행중에 있다.

배양조건의 검토

그 외에 배지나 배양 조건의 검토가 진행되고 있다. 배지에 관해서는 젖산이나 methionine의 효과, 완전 합성 배지 등에 관한 보고가 있다. 그러나 초산균은 일반적으로 완전 합성 배지에서의 생육이 나쁘고, 영양요구성이나 약제 내성 등이 일반 유전자 marker를 부여한 변이주의 개발이 어려워 기초적인 방법의 개발이 필요할 것이다.

최근의 흥미로운 연구로는 cellulase의 첨가가 생산효율을 높인다는 사실과, 그 중 하나는 미리 묽은 농도의 cellulase를 배지에 첨가하여 균체를 배양한 다음 cellulase가 첨가되지 않은 생산 배지에서 얻은 균체를 옮기는 2단계 배양으로, 2단계의 cellulase 생산 배양에서 균체 농도를 높여 생산 속도를 높인다고 하였다. 또 하나는 호열성 cellulase를 첨가함으로써 생산성을 높이는 방법이다. 활성이 없는 cellulase가 어떻게 수율을 높일 수 있는가에 대해서는 의문시 되지만 다른 효소 단백질에도 촉진효과가 있는 것으로 추정되어 연구가 시작되었다. 이와 관련하여 cellulase 생산균이 cellulase를 생산하고 있다는 연구결과도 있다. 또 초산균 육종의 목적으로서 유전자를 교환해서 cellulase 생산능력을 부여한 균의 육종이 시도되고 있다.

Cellulose의 이용 분야

초산균 cellulose는 기본적으로 β -D-1,4-glucan으로, 분자 수준에서는 식물과 같다. 만약 천연펄프 cellulose로 불가능한 것이 초산균 cellulose로 가능하게 되면 보다 광범한 용도의 개발이 기대된다. 그 한가지 방법으로 배지중의 cellulose 분자와 상호작용을 보이는 polymer를 첨가해서 배지에 첨가한 polymer와 생성되는 cellulose 분자가 복합소재를 만드는 실험이 이루어지고 있다. Polymer로는 carboxymethyl cellulose 등의 cellulose 유도체와 chitin 유도체가 보고되고 있다.

표 2와 같이 세균 cellulose의 그물 구조와 보수성을

표 2. 초산균 cellulose의 용도와 관련된 특허

용도	예
식품	저칼로리 유화안정화 현탁안정화
공업재료	고강도재료 음향진동판 분피막 효소고정화 크로마토그래피 담체
종이	고기능 sheet
기계 플라스틱	복합섬유 생분해성
의료용재료	창상보호제 피부대용제 동물세포배양기 인공혈관 화장용 pad
광업	선광

이용한 예로 의료용 패드나 화장패드, 또 인공피부에의 응용 등이 있다. 세균 cellulose막은 겔상태에서 피부에 촉감이 좋고 신체표면에 쉽게 용화되고 게다가 의약품이나 화장재료 성분의 보수능력이 높으며, 피부표면을 일정한 보습상태로 유지할 수 있다. 적당한 두께가 되도록 초산균을 배양하여 얻은 cellulose막을 정제하여 cellulose 이외의 성분을 제거하고 여기에 의약품이나 화장재료를 함유시켜 이용한다. 또한 분리막이나 효소의 고정담체 소재 등이 있는데 세균 cellulose막을 분리막으로 응용할 경우에는 초산균의 배양법이나 막의 정제법, 건조법 등을 고려하여 그것을 막의 표면과 표면의 구조가 다른 경우 등으로 하거나, 화학처리하여 cellulose의 OH기를 다른 치환기로 바꾸어서 분리막으로 이용하여 용액중의 특정 분자물을 분리하는 시도가 이루어지고 있다. 세균 cellulose막은 효소의 고정화담체 소재로 이용한 경우 이 막은 유효 면적이 크고, 다른 소재 보다 수십 배의 효소 고정 가능성이 있을 뿐만 아니라 내구성도 우수하다는 것이 발견되었다. 세균 cellulose막을 5%의 NaOH 또는 0.5%의 NaCl로 처리하여 cellulose 성분 이외의 물질을 제거한 후 이것을 압착하면 고탄성막으로 된다고 밝혀졌으며, 일본의 Sony사에서는 스피커 음량 진동판에 응용하여 고성능 헤드폰으로 시판하고 있다. 세균 cellulose의 높은 결정화 성질을 이용하여 다른 소재와 복합시킨 여러 기능성 복합재료나 고역학 성형 소재들의 제조가 시도되고 있다. 세균 cellulose막을 형성하고 있는 섬유를 각각 분해하여 20% 펄프와 혼합하여 종이를 만들면 종이의 강도나 탄성률이 대조군에 비하여 2.5배 증가된다.

또 합성고분자 섬유, 방향제 폴리아미드나 폴리아미드단 섬유에 5~20% 첨가해서 시트를 만들면 합성섬유의 경우에 비해 강도, 열 안정성, 형태 안정성 등이 우수한 시트를 얻을 수 있다. 또 유리 섬유에 cellulose 섬유를 혼합하여 시트형태로 만들면 공기여과용 필터, 프린트 배선 기판, 바닥 재료 등에 응용이 연구되고 있다. 알미늄, 동, 철, 아연 등의 금속이나 섬유를 혼합하여 시트를 만들면 전도성이나 열전도성을 가진 시트의 제조가 가능하며, 산화티탄, 탄산칼슘, 고령토, 운모, 알루미늄 등의 무기물질과 혼합하여 시트를 만들면 그 종류에 따라 내열성이나 절연성이 우수한 시트를 얻을 수 있다.

식품에 세균 cellulose 섬유의 겔 형성능과 보수성을 이용한 예는 주로 고형식품에의 응용이 시도되어 두부, 어묵, 소세지, 국수, 빵 등에 각각 세균 cellulose 섬유를 0.1~2% 정도 첨가하면 식감이나 보형성이 우수한 식품을 얻을 수 있다. 그 대표적인 예가 코코넛을 이용한 나타데 코코이며, 최근 국내에서도 과실 등을 이용한 cellulose 생산균주, 방법 등이 개발되어 단기간에 일정한 품질을 대량생산이 가능한 산업화를 시도하고 있으며, 가공용 과실(블랑파)을 이용한 cellulose의 대량생산은 다이어트 식품소재로 다양한 기능성 식품에 활용 될 것으로 기대 되고 있다.

이상과 같이 초산균이 생성하는 cellulose는 산업용 소재, 식품 소재 등에 다양하게 활용될 수 있으며, 특히 환경친화적 소재라는 점은 무한한 개발 가능성과 다양성을 가지고 있다.

결 론

초산균이 생성하는 cellulose는 과거에는 식초생산 과정에서 피막을 형성하여 수율이 떨어지는 문제점으로 대두되었으나, 최근 일본을 중심으로 유전학적 연구 등 첨단 소재로 활용하는 새로운 측면의 연구가 진행되었다.

Cellulose 산업은 환경친화적이며, 단기간에 대량생산이 가능한 미생물 생산의 장점을 가지고 있어 산업용 신소재 생산 및 기능성 식품 소재로 개발이 기대 된다. 그러나 cellulose의 대량생산에 따른 원가절감, 중합도의 개선은 앞으로의 과제이다. 국내 식품산업 분야에서도 사과, 포도 등의 주스를 활용한 신소재 개발 및 제품의 다양화를 위하여 초산균 cellulose의 활용이 요망되며 이는 다이어트 및 정장작용 등이 있는 신제품 개발로 신수요 창출이 가능하여 국내산 과실의 소비 증대에 기여할 수 있다.

문 헌

1. 柳田藤治 · 酢의 機能性について 日本醸造協會誌, 8, 134 (1990)
2. 餘山實, 大塚滋 編 · 酢의 科學. 朝倉書店(1989)
3. Lawrence, J.D · The vinegar(1989)
4. Dong, S.K. and Beung, H.R. : Antitumor effect of polysaccharide produced from a mutant of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5. *Korean J. Food Sci Technol*, 23, 405(1991)
5. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoko, F. : Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) Sing (an edible mushroom). *Cancer Res.*, 30, 2776(1970)
6. Kanayama, H., Togami, M., Adachi, N., Fukai, Y. and Okumoto, T. · Studies on the antitumor active polysaccharides from the mycelia of *Poria cocos* Wolf. III. Antitumor activity against mouse tumors. *Yakugaku Zasshi*, 106, 307(1986)
7. Okutani, K and Morikawa, N : Purification and characterization of the polysaccharide obtained from squid internal shell. *Bull. Japan Soc Sci. Fish.*, 44, 749(1978)
8. Shioda, A., Kaneko, Y. and Dio, S · Studies on the production of polysaccharide by microorganisms. *J. Ferment. Technol.*, 47, 623(1969)