

Enterobacter sp.의 다당 생산에 미치는 통기·교반의 단계적 증가 효과

Stepwise Increasing Effects of Agitation and Aeration on Exopolysaccharide Production by *Enterobacter* sp.

이 신 영*, 이 주 하**
Lee, Shin-Young Lee, Ju-Ha

Abstract

The effects of agitation and aeration for exopolysaccharide(EPS) production through batch cultivation of an *Enterobacter* sp. isolated from the composter were investigated. During the EPS fermentation under conditions of constant agitation speed from 200 to 900 rpm and constant aeration rate of 0.5-2.5 vvm, the low yields of EPS(4.8-5.2g/L) was observed as the viscosity increase of culture broth. With the stepwise increases in agitation speed and aeration rate, the EPS production and the viscosity of EPS were increased 1.3~1.4 times and 2.3~3.6 times higher than those of the fixed conditions, respectively. Therefore, these stepwise increases were considered as the key operating parameters for enhancing EPS production. The max. EPS(6.8g/L) and viscosity(14,000cp) were obtained when the agitation speed was increased from 300 to 900 rpm for 54hrs at 1.5 vvm.

키워드 : *Enterobacter* sp., 단계적 통기 및 교반, 세포외 다당 생산

Keywords : *Enterobacter* sp., stepwise aeration and agitation, exopolysaccharide production

1. 서론

유당(lactose)은 우유 중에 다량 함유되어 있는 이당류로서, β -galactosidase (EC 3.2.1.23)에 의하여 glucose와 galactose로 분해된다. 하지만 Stauffer와 Leeder[1]에 의하면 대부분의 미생물들은 유당으로부터 다당을 합성하지 못하며, *Zoogloea ramigera*만이 높은 수율로 다당을 합성한다고 하였다. 저자 등[2]은 유기성 폐기물의 composting에 사용하였던 토양 유래의 미생물 복합체로부터 분리한 *Enterobacter* sp.의 한 균 종이 분자량 약 3.7×10^5 dalton의 mannose, galactose 및 galacturonic acid로 구성된 hetero 다당류를 생

성함을 보고한 바 있다. 이 균주는 lactose, galactose, glucose, fructose 등의 여러 탄소원을 이용하는 것으로 확인되었으나, 특히 유당을 탄소원으로 할 때 최대의 다당 생성을 보였다. 이와 같이, 유당을 분해하여 다당을 생성하는 균주는 매우 드물다는 점을 고려할 때 본 균주에 대한 검토의 필요성이 큰 것으로 판단되었는데, 특히 이 균주는 발효 중 분비된 다당류 농도의 증가에 따른 겔보기 점도의 현저한 증가로 기체-액체간의 산소 전달 속도가 감소되고 배양액을 균일하게 혼합하기가 어려워 결과적으로 발효 수율이 떨어지는 문제점이 관찰되었다[3].

일반적으로 높은 점성과 의가소성의 성질을 나타내는 세포외 다당 발효의 경우, 그 생산성을 높이기 위해서는 배양액 내의 효율적인 물질전달을 위한 적절한 교반 및 통기가 매우 중요하다[4,5,6]. 따라서 본 연구에서는 *Enterobacter* sp.를 이용한

* 강원대학교 바이오산업공학부 교수, 공학박사

** 가농바이오(주) 연구원, 공학석사

다당 발효에서 고점성의 다당 형성으로 인한 물질 전달의 저해를 최소화하는 최적 통기 및 교반 조건을 조사하였으며, 이로부터 산업적 응용의 대량 생산 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 유기성 폐기물의 composting에 사용하였던 토양 유래의 복합 발효 미생물제제로부터 분리, 동정한 *Enterobacter* sp.[2]이다. YM broth agar plate에서 24시간 배양하고, 점성을 나타내는 colony를 단리하여 보존용 배지(glucose 10g/L, malt extract 3g/L, peptone 5g/L, yeast extract 3g/L, agar 15g/L)에서 30℃로 24시간 배양한 후, 4℃에서 보존하였고, 4주마다 계대배양하여 실험에 사용하였다.

2.2. 배지 조성 및 조제

전 배양 및 본 배양의 배지는 각각 lactose 10g/L, Bacto-peptone 5g/L, malt extract 3g/L 및 yeast extract 3g/L를 함유한 pH 7.0의 MYM (Modified Yeast Malt) broth 배지이었다[2]. 탄소원과 질소원은 각각 분리하여 121℃에서 15분간 가압 멸균한 후 혼합하여 사용하였고, pH는 멸균 전에 1N HCl 또는 1N NaOH로 조절하였다.

2.3. 배양

배양은 2.6L의 jar-fermentor(Marubishi, MD-250)를 사용하였으며, 온도 30℃, 초기 pH 7.0, 배지 액량 1.5L, 접종비 4%(v/v)로 하였다. 이때 초기 pH는 1N HCl과 1N NaOH를 사용하여 조절하였고, 발생하는 거품은 Antifoam 289 (Sigma Co.) 1%(v/v) 용액을 사용하여 제거하였다. 이 때, 교반 및 통기 속도의 영향은 교반 속도는 200~900rpm, 그리고 통기 속도는 0.5~2.5vvm으로 변화시키면서 균체 및 다당 생성량의 경시변화를 조사하여 검토하였다.

2.4. 균체량의 측정

20시간 전당배양한 배양액을 45,000×g에서 40분간 원심분리하여 얻은 균체를 증류수로 2회 수세한 후, UV/Vis Spectrophotometer (Perkin-Elmer, 552S)를 이용하여 660nm에서 OD(Optical Density)를 측정하였고, 균체량과 OD에 대한 표준곡선으로부터 건조 균체 중량으로 환산하였다.

2.5. 다당 및 잔존당의 정량

다당의 생성량은 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 다음, 배양여액에 2.5배의 acetone을 가하고 침전된 침전물의 양을 70℃에서 12시간 건조한 후,

desiccator에서 항량이 되었을 때의 중량을 건조 중량으로 하였다.

한편, 잔존당은 균체 및 생성물을 제거한 배양 여액을 회전증발기에서 최종 부피가 3ml가 되도록 조절한 후, Biochemistry Analyzer(YSI, Model 2700)를 사용하여 lactose, glucose 및 galactose를 각각 측정하였다.

2.6. 점도 측정

배양액을 원심분리(45,000×g)한 후, 배양여액을 시료로 사용하였다. 일정량의 시료를 개량형 Ostwald 점도계(Cannon Co. No. 120)에 넣고, 측시구 안의 시료가 모세관을 통해 흘러내리는 시간을 2~3회 반복 측정한 다음, 이들의 평균치를 구하여 다음 식에 의하여 시료의 절대점도를 구하였다. 이 때 표준액으로는 증류수를 사용하였으며, 표준액의 점도 및 밀도는 handbook의 자료를 참조하였다[7].

$$\eta_1 = \eta_2 \times [p_1 \times t_1 / p_2 \times t_2]$$

여기서 η_1 은 시료의 절대점도(cP) η_2 는 증류수의 절대점도(cP) p_1 및 t_1 은 각각 시료의 밀도(g/L) 및 시료의 유하시간(sec), p_2 및 t_2 는 각각 증류수의 밀도(g/L) 및 유하시간(sec)이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 다당생성의 물질전달에 미치는 교반속도 영향

1 vvm의 일정 통기속도하에서 교반속도를 200~900rpm으로 변화시키면서 배양 40시간 후의 세포 외 다당류 점도 및 균체 생산량을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다.

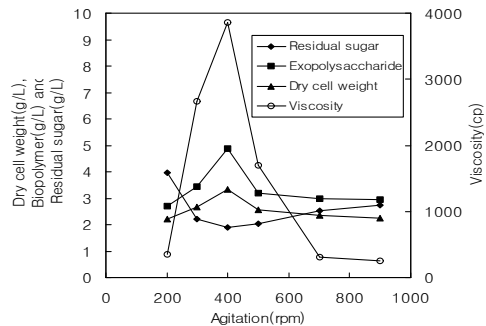


Fig. 1 Effect of agitation speed on dry cell weight and biopolymer production during batch cultivation(at 1 vvm).

교반속도가 200에서 400rpm으로 증가함에 따라 균체량 및 다당 생성량은 증가하였으나, 500 rpm이

이상에서는 급격히 감소하였다. 이와 더불어 기질 소비도 증가하였는데, 400rpm에서 가장 많은 기질이 소비되었다. 400rpm의 경우, 생성된 다당량은 약 4.8g/L 이었으며, 그 때의 점도는 약 3,900cp로 다당 생성량과 점도 사이에는 비교적 높은 상관관계($R^2=0.822$)를 보였다. 자료화하지는 않았지만, 40시간 이후에는 각 교반속도에서 배양액의 점도의 급격한 증가로 교반 날개의 주위만 교반되었으며, 발효조의 나머지 부분은 거의 유동이 없는 상태가 되었다. 이와 같이, 점도의 증가로 인해 교반 효과가 저하되어 다당 생성량도 크게 떨어졌으므로, 배양 16시간 이후부터 교반속도를 점차적으로 증가(300~900rpm)시켰고, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

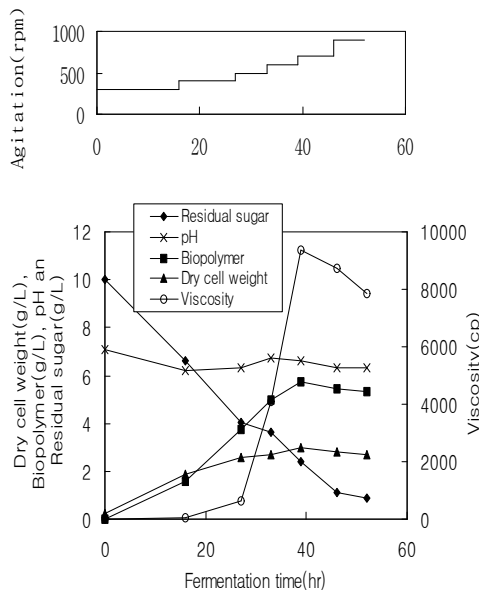


Fig. 2 Profiles of dry cell weight and biopolymer production by shifting-up the agitation speed(from 300 to 900rpm) during batch cultivation(at 1vvm).

배양 40시간에서 교반속도를 점차적으로 증가시켰을 경우 균체량은 400rpm으로 고정하였을 경우와 거의 비슷하였으나, 다당 생성량은 약 1.4배의 증가를 나타냄과 동시에 점도도 생성된 다당량에 비례($R^2=0.9237$)하여 최고 약 9,400cp까지 증가하였다. 그림에서 보는 바와 같이, 배양 40시간 이후에 균체 및 다당의 생성량은 점차 감소하는 경향을 보였는데, 교반속도의 증가에도 불구하고 점도의 급격한 증가로 인해 물질전달이 저해되어 생긴 결과로 추정되었다. 그러나 생성 다당의 재이용[8]도 일어났을 것으로 생각되었다. 결국 교반속도의 점

차적인 증가로 인하여 기질소비는 400rpm으로 고정시켜 교반한 경우보다 더욱 증가되었지만, 이 때의 균체량은 비슷하였으므로, 소비기질은 주로 다당 생성에 이용된 것으로 생각되었다.

Kwon 등[9]은 *Bacillus polymyxa* KS-1의 배양에서, 교반속도를 400rpm 이상으로 조절할 경우에도 다당류 생산량이 더 이상 증가하지 않는 이유는 다당류 생산이 어느 교반 수준을 넘으면 점성의 증가에 따라 channelling 현상이 일어나 배지내의 물질이동이 저하되기 때문이라고 보고하고 교반속도 조절의 필요성을 언급하였다. Smith 등[10]도 *Penicillium chrysogenum*을 이용한 penicillin 생산에 있어서 교반상태의 중요성을 보고하였으며, 최적 교반속도는 물질 전달이나 교반의 저해를 방지하는데 있어서 필요한 최소한의 요건이라고 하였다. 또 Peters 등[11]도 *Xanthomonas campestris*를 이용한 xanthan 생산에 있어서, xanthan 생성량은 교반속도의 증가와 밀접한 관계를 가지며, xanthan 회분 발효에서의 낮은 교반속도는 산소 공급의 저해를 가져왔다고 하였다. 아울러 Ashtaputre 등[12]도 본 연구에서와 마찬가지로 점도의 증가로 인한 물질 전달의 장애를 교반속도의 조절(500~800rpm)로 극복한 바 있다. 즉, 일정 통기하에서 교반속도의 단계적 증가는 산소의 전달을 더 촉진한다고 볼 수 있는데, Brivonese와 Sutherland[13]는 *Azotobacter vinelandii*의 회분배양에서 교반속도의 감소로 인해 PHB(polyhydroxy butyrate) 생산이 감소하였음을 보고하였고, 산소 전달이 제한을 받았음을 시사하였다. 그러므로 본 발효 중 교반 속도의 단계적 증가는 영양물질의 확산을 저해하는 slime layer의 감소, 미생물 배양액의 교반 효과의 증대 및 산소이동속도의 증가 등에 큰 영향을 미치는 것으로 판단하였다.

3.2. 다당생성의 물질전달에 미치는 통기속도 영향

교반속도를 400 rpm으로 고정된 후, 통기속도를 0.5~2.5 vvm으로 변화시켜 배양 40시간 후의 균체량, 다당 생성량 및 잔존당을 조사하여 Fig. 3에 나타내었다.

통기속도 0.5~1.5 vvm 범위에서 균체량, 생성 다당량 및 점도는 통기속도의 증가와 함께 증가하였으며, 그 이상의 범위에서는 감소하였다. 잔존당 역시 1.5 vvm에서 초기 10 g/L에서 약 2.4 g/L까지 감소하였으며, 그 외의 통기속도에서는 대체로 이 보다 더 많은 양의 당이 남아 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 1.5 vvm을 본 균주의 최적 통기속도로 정하였다.

한편, 1 vvm에서 1.5 vvm으로 상승시킬 경우, 균체량은 다당류 생산량의 증가수준에는 미치지 못하였으나 다소 증가하는 경향으로 보아 본 균주를 이용한 다당류의 생산시 통기량이 생산량에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

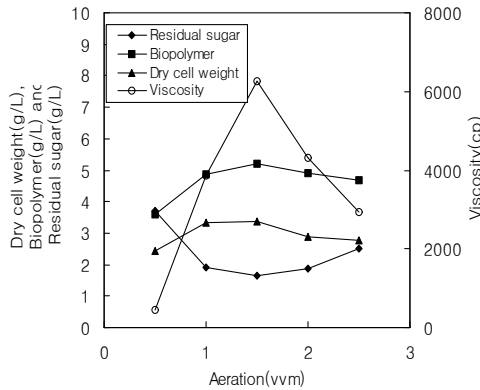


Fig. 3 Effect of different aeration rate on dry cell weight and biopolymer production during batch cultivation(at 400 rpm).

Lee 등[14]은 질소 고정세균인 *A. chroococcum*의 PHB 생산에서 보통질소원의 고갈 및 통기가 제한될 때 생산되는 것과는 달리, 질소원과 공기를 공급함으로써 PHB가 더 잘 생산되었다고 보고하였다. 또 Tanzer 등[15], Jeans 등[16], Pace와 Righelato[4]도 다당류의 생성이 대부분 산화반응에 의하여 증합되므로 점도의 증가로 인한 산소전달의 결핍으로 대사작용이 저해된다고 하였다. Fig. 3에서 다당류의 생산은 균체의 증식 양상과 대체로 일치하며, 균체 증식 및 다당 생성이 둔화된 후에는 점도가 감소하는 것을 볼 수 있는데, 이러한 현상은 적정 통기량을 중심으로 하여 이의 전후에서 대칭적으로 뚜렷이 나타나는 경향을 보였다.

Crueger[17]에 의하면, 기포는 agitator blade 후면과 같은 negative pressure를 받는 곳에서 다시 채워지는데, 통기속도의 증가에 따라 여러 조건이 생긴다고 하였다. 또 생물 반응기의 통기속도가 낮을 경우, turbine blade 뒤쪽에는 큰 기포가 점유되며, 좀 더 작은 기포들은 blade의 회전 원심력에 의해 영양분대로 즉시 녹아들어 간다고 하였다. 그러나 통기속도를 증가시키면, 기포들은 blade 뒷면에 계속 쌓이게 되어 공급 에너지는 무통기 시스템보다 약 1/3 가량 적게 소비된다고 하였고, 이 중간 단계의 통기속도에서 가장 기포의 분산이 좋다고 하였다. 그리고 매우 높은 통기속도의 경우는 큰 기포들이 서로 합쳐져 impeller는 기포로 휩싸이게 되며, 결과적으로 기포의 분산성이 저해되므로 최적 통기가 필요하다고 강조하였다.

한편, Wang과 Fewkes[18]은 균체 자체도 산소전달에 저해를 주는 barrier로서의 영향을 줄 수 있

지만, 생성 다당으로 인한 점도 상승이 균체 및 다당 생산의 산소전달에 영향을 줌으로써, 세균의 다당 발효나 사상균 발효에서와 같은 비뉴톤 유체에서는 임계 산소농도가 발효조건(작업 용량, 교반날개 직경, 교반날개 속도, 임계 산소농도)에 따라 변한다고 하였다. 따라서 배양시간이 경과함에 따라 배양액의 점도가 급상승하는 것에 대응하여 통기 속도에 구배를 주어 증가시킴으로써 물질 전달에 좋은 효과가 있을 것으로 추측된다.

이러한 관점에서 회분배양 중 통기속도를 1 vvm에서 5 vvm까지의 구배를 주어서 배양 경시 변화를 조사한결과는 Fig. 4와 같다.

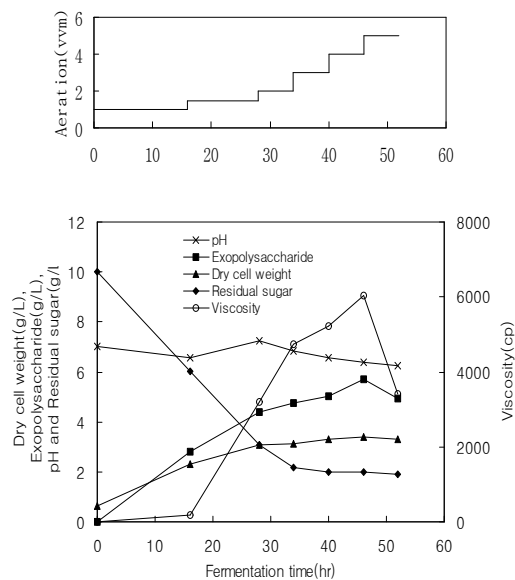


Fig. 4 Profiles of dry cell weight and biopolymer production by shifting-up the aeration rate (from 1 to 5 vvm) during batch cultivation(at 400 rpm).

균체량과 점도는 1.5 vvm 및 400 rpm에서 회분배양을 행하였을 때와 거의 비슷하였으나, 생성된 다당은 약 1.3배 증가되어 다소의 효과를 확인할 수 있었다. 그러나 34시간 이후의 잔존당 농도는 약 2 g/L로 일정한 값을 나타내어 다당 생성량의 증가로 인한 slime layer 형성으로 물질전달이 저해받은 것으로 생각되었다.

Fig. 5는 통기속도를 1.5 vvm으로 고정한 상태에서 교반속도를 점차적으로 증가(300~900 rpm)시켜 회분배양을 실시한 결과이다. 전 배양 후 이를 새 배지에 접종하여 다시 배양할 때, 균이 그 배지에 적응하는 시기가 유도기인데, 본 균주는 유도기가 없이 바로 대수기로 진행되는 특징을 나타내었다.

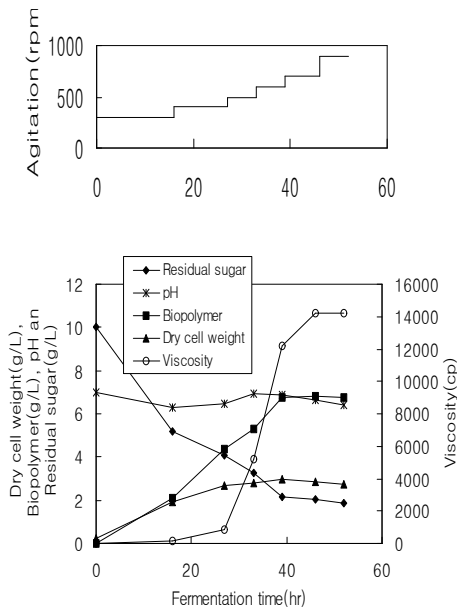


Fig. 5 Profiles of dry cell weight and biopolymer production by shifting-up the agitation speed (from 300 to 900vvm) during batch cultivation(at 1.5 vvm).

다당 생산은 균체 생육이 약 2 g/L가 되는 배양 16시간 이후부터 균체량과 비례하여 급격히 증가하였으며, 배양 52시간 이후에 거의 일정한 최대값(약 6.8 g/L)에 도달하였다. 이 때의 점도는 약 14,000 cp로, 배양말기 생성 다당량과 점도사이에는 높은 상관관계($R^2=0.9808$)가 성립하였다. pH는 배양초기(0~16시간)에 유기산의 생성으로 감소한 뒤 배양 16시간 이후부터 소폭의 변화를 보이면서 균체의 초기 정지기까지 점차로 증가하였고, 이에 따라 다당의 생성도 증가하였다. 그러나 이후부터 pH는 감소하는 경향을 나타내었고, 균체 증식도 점차 감소되었는데, 이는 점도 상승으로 인한 영양물질 이동의 저해로 생각되었다[19]. 따라서 정지기 이후 다당의 생산이 최대값에 도달한 이후에 pH가 감소한 것은 생성된 다당이 산성당을 함유하는 것(2)과 관계되는 것으로 생각되었다. 그러나 배양액의 급격한 점도증가로 용존 산소 농도가 급격히 감소하여 산소 부족으로 유기산이 축적됨으로써 pH가 다시 감소하는 것도 하나의 요인으로 생각되었다.

4. 결론

유기성 폐기물의 composting에 사용된 토양 유래

의 복합 발효 미생물 제제로부터 분리, 동정된 *Enterobacter* sp.를 이용하여 다당 발효에 미치는 통기교반에 의한 물질전달의 효과를 조사하였다. 배양시간의 경과에 따라 다당의 생성과 함께 배양액의 점도는매우 높게 되고 물질 전달을 저해하였으므로, 통기 속도를 1 vvm으로 고정한 후 여러 교반 속도(200~900 rpm)에서의 다당 생성량을 검토한 결과, 400 rpm에서약 4.8 g/L의 최대 다당 생성량을 보였으며, 이 때의 점도는 약 3,900 cp 이었다. 또 교반 속도를 400 rpm으로 고정한 후 통기 속도(0.5-2.5 vvm)를 달리하여 다당 생성량을 검토한 결과, 1.5 vvm에서 최대의 다당 생성량을 나타내었으며, 점도는 약 6,000 cp 이었다. 한편, 교반 또는 통기 속도에 구배를 주어 점차적으로 증가시켰을 경우는 이들을 고정시켜 배양한 경우보다 각각 약 40 및 30%의 다당 생성량의 증가를 보여, 교반 및 통기 속도 등, 물질 전달의 영향 인자가 다당 생산에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났다. 특히, 통기속도를 1.5 vvm으로 고정한 후, 교반속도에 구배(300~900 rpm)를 주었을 때는 약 6.8 g/L의 최대 다당 생성량을 나타내었으며, 이 때의 점도는 약 14,000 cp까지 증가하였다.

참 고 문 헌

- [1] Stauffer, K. R. and J. G. Leeder (1978), "Extracellular microbial polysaccharide production by fermentation on whey or hydrolyzed whey", *J. Food Sci.*, **43**, 756-758.
- [2] Kim, D.J. and S.Y. Lee (2001), "Isolation of the exopolysaccharide producing *Enterobacter* sp. and some physicochemical properties of the polysaccharide produced by this strain", *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**(4), 370-375.
- [3] Lee, J. H. and S.Y. Lee (2002), "Rheological properties of culture broth during exo-polysaccharide fermentation of *Enterobacter* sp.. *Food Engineering Progress*". **6**(1), 10-16.
- [4] Pace, G.W. and R.C. Righelato (1980), "Production of extracellular microbial polysaccharides", *Adv. Biochem. Eng.*, **15**, 41-70.
- [5] Zaidi, A. P. Ghosh, A. Schumpe, and W.D. Deckwer (1991), "Xanthan production in a plunging jet reactor", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 330-333.
- [6] Moles, J., M. Griot, J. Keller, E. Heinzle, I.

- J. Dunn, and J. R. Bourne (1985), "A microbial culture with oxygen-sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport", *Biotechnol. and Bioeng.*, **28**, 482-489.
- [7] Dean, J.A. (1984), "Lange's Handbook of Chemistry", 13th ed., McGraw-Hill, New York.
- [8] Haggstrom, L. and C. Forberg (1986), "Significance of an extracellular polymer for the energy metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: A hypothesis", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 234-239.
- [9] Kwon, G.S., B.D. Yoon, and H.K. Joo (1995), Cultural conditions of exo-polysaccharide KS-1 produced by *Bacillus polymyxa* KS-1, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**(4), 441-448.
- [10] Smith, J.J., M. D. Lilly and R. I. Fox (1990), "The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*", *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1011-1023.
- [11] Peters, H.U., H. Herbst, G. Paul. M. Hesselink, H. Lunsdorf, A. Schumpe, and W.D. Deckwer (1989), "The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas Campestris*", *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1393-1397.
- [12] Ashtaputre, A.A. and A.K. Shah (1995), "Studies on a viscous", gel-forming exo-polysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(3), 1159-1162.
- [13] Brivonese, A.C. and I.W. Sutherland (1989), "Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 97-102.
- [14] Lee, I. Y., E.M. Stegantseva, L. Savenkova and Y. H. Park (1995), "Effects of nitrogen and oxygen supply on production of poly- β -hydroxybutyrate in *Azotobacter chroococcum*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, **5** (2), 100-104.
- [15] Tanzer, J. M., W. I. Krichevsky (1970), "Linear growth kinetics of plaque-forming *Streptococci* in the presence of sucrose", *J. Gen. Microbiol.*, **58**, 125-133.
- [16] Jeans, A. (1974), "New hydrocolloid of interest to the food industry", *Food Technol.*, May, 34-40.
- [17] Crueger, W. and Crueger, A. (1984), "Biotechnology : Text Book of Industrial Microbiology", pp288-291, Science Tech. Inc. Madison.
- [18] Wang, D. I. C. and R. D. J. Fewkes (1977), "Effect of operating and geometry parameters on the behavior of non-Newtonian mycelial antibiotic fermentations". In *Developments in Industrial Microbiology*. L.A. Underkofler Ed., pp39-56, American Institute of Biological Science, Washington.
- [19] Pinches, A. and L.J. Pallent (1986), "Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media", *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1484-1496.