

미생물 셀룰로오스의 생산 및 특성에 관한 연구

강진하[†] · 박성철^{*1}

(2007년 6월 30일 접수: 2007년 8월 24일 채택)

Production and Characteristics of Cellulose from *Saprolegnia ferax*

Jin-Ha Kang[†] and Seong-Cheol Park^{*1}

(Received June 30, 2007; Accepted August 24, 2007)

ABSTRACT

This study was carried out to examine the optimum culture condition for the production of cellulose from *Saprolegnia ferax* and its physical characteristics. Conclusions obtained from the results of this study were as follows:

In producing the cellulose from *S. ferax*, optimal pH and temperature were 7.0 and 26~30°C with a maximum of 26°C, respectively. And, optimal culture period was 11 days. WHC and OHC of biocellulose were 3.2(25.04 g/g) times and 3.5(25.75 g/g) times higher than those of commercial α-cellulose(7.57, 7.25 g/g) respectively. The viscosity of biocellulose is lower than that of commercial α-cellulose. And the effect of rpm on the viscosity of biocellulose was more than on the that of α-cellulose.

Keywords : *biocellulose, Saprolegnia ferax, water holding capacity, oil holding capacity, viscosity*

1. 서 론

목재 펄프로 제조되는 종이는 일반적으로 인쇄 및 정보 기록 용지, 위생용지, 복합신소재로 이용되고 있는데 산업기술의 발달로 더 좋은 고품질의 제품이 요구되고 있으며 이에 따른 제지기술도 빠른 속도로 발전하고

있다. 이러한 측면에서 기존의 목재 펄프와는 다른 성질을 가지고 있는 미생물 셀룰로오스에 대한 관심이 높아지고 있다.^{1,2)}

특히 식물에는 셀룰로오스 외에 리그닌이나 헤미셀룰로오스 등이 존재하지만 미생물 셀룰로오스는 이러한 구성성분이 전혀 없는 순수한 상태의 고순도 셀룰로

• 전북대학교 농업생명과학대학 산림과학부 (Division of Forest Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

*1 전북대학교 농업과학기술연구소(Institute of Agricultural Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

† 주저자 (Corresponding author) : E-mail ; kjh@chonbuk.ac.kr

오스를 생산할 수 있다. 따라서 식물에서 셀룰로오스를 제외한 기타 물질을 제거하는데 소요되는 대량의 에너지와 화학약품의 소비 측면과 환경문제에서도 비교적 자유롭다.

최초 미생물 셀룰로오스를 생산하는 세균은 1886년 Brown^{3,4)}에 의해서 식초발효과정이나 양조과정에서 오염균으로서, 형성된 피막이 셀룰로오스를 규명한다. 이 때 그 생합성 과정 및 특성에 대해서 많은 연구가 이루어져 왔다. Biopolymer인 cellulose는 glucose가 β -1,4 결합에 의해 이뤄진 고분자 물질이며, 식물체뿐만 아니라 algae(Vallonia), fungi(*Dictyostelium discoideum*) 및 *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Alcaligenes* 등에 의해서 생산된다고 알려져 있다.⁵⁾ 특히 *Acetobacter*속은 식초생산을 위해 산업적으로 매우 중요하여 새로운 균주의 분리와 함께 초산균의 개량을 위해 유전자 재조합 기술을 이용한 효소의 클로닝과 spheroplast fusion을 이용한 돌연변이체 획득에 대해서도 연구되고 있다.⁶⁾ 한편 난강균으로 *Saprolegnia*속, *Pythium*속, *Phytophthora*속 균주에서도 셀룰로오스를 생산하는 것으로 알려져 있는데, 이들 균주가 생산하는 셀룰로오스에 대해서는 낮은 결정화도로 인하여 아직까지 그 구조가 명확하게 밝혀지지 않았지만 IV₁형 또는 I_B형으로 추정하고 있다.⁷⁾

*Saprolegnia*속은 수중이나 습지의 토양이나 담수에서 서식하며 식물의 병원성이며 어류 등에 기생한다. 박 등⁸⁾의 보고는 형태학적으로는 완전 수생균으로 합성배지에서 방사상으로 영양체 성장을 하며 환경에 따라 유주자를 생산하여 번식하는 무성생식 단계와 난포자를 형성하는 유성생식 단계 등을 정리한 바 있고, *Saprolegnia*속 균주를 이용하여 β -amylase를 생산하고 그 특성을 연구하여 보고한 경우도 있다.⁹⁾

이러한 미생물 셀룰로오스는 1개월 이내에 토양에서 완전히 분해되는 생분해성, 신문용지의 수습배 또는 아라미드 섬유 수수에 이르는 높은 기계적 강도 및 보수보유능 등 독특한 구조와 성질을 가지는 긍정적인 측면도 있지만, 실용화를 위해 요구되는 높은 생산수율과 이들 미생물 셀룰로오스에 대한 정량적 접근은 부족한 것이 현실이다.

이에 따라 본 연구에서는 미생물 셀룰로오스를 얻기 위해 *Saprolegnia ferax*를 대상으로 셀룰로오스 생산의 최적 조건을 구명하고, 생산된 셀룰로오스의 다양한 특

성을 구명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시균주

공시균주로 사용한 *Saprolegnia ferax* ATCC 36051은 전남 소재의 대학에서 분양받았으며, 균주의 보관을 위해서 YG배지(0.25% yeast extract, 1% glucose, 2% agar)에 접종 후 25°C에서 7일간 배양하여 균체의 증식 정도를 확인하고 4°C에서 냉장 보관하였고, 2개월마다 계대배양 하였다.

2.2 셀룰로오스의 생산을 위한 최적배양조건의 구명

셀룰로오스를 최대 생산할 수 있는 균주의 최적 생육조건을 구명하기 위하여 본배양 전에 YG배지에 보관중인 균주를 YPSS배지(0.4% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 1.5% soluble starch)에서 25°C, 48시간 정치배양으로 전배양 하였다. 본배양은 YPSS배지에 전배양액 1%를 접종하고 pH, 온도, 배양기간 등을 변화시켜가면서 균체량 및 셀룰로오스 함량을 측정하여 최적 배양조건을 구명하였다.

셀룰로오스와 셀룰로오스를 제외한 순수 균체량의 측정은 배양액을 여과지(Whatmann No. 2)로 충분히 여과시킨 후 105°C에서 6시간 동안 건조시켜 균이 포함된 셀룰로오스의 중량을 측정하였고, 순수한 셀룰로오스 함량은 고 등¹⁰⁾의 방법에 따라 생산된 셀룰로오스 펄리클을 증류수로 표면을 2-3차례 세척하고 10배량의 2% NaOH를 가하여 1시간 동안 수조에서 끓인 후 증류수로 세척하였다. 중화를 위하여 acetic acid 용액을 가한 후 다시 증류수로 세척하고 105°C 건조기에서 완전 건조 후 셀룰로오스 중량을 측정하였다. 균이 포함된 셀룰로오스의 건조중량과 순수 셀룰로오스의 건조중량의 차이로 균체량을 구하였다.

2.2.1 Initial pH

초기 pH를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9로 조절(0.1N NaOH, 0.1N HCl)하여 25°C, 7일의 배양조건으로 정치배양하여 균체량 및 셀룰로오스 함량을 측정하여 최적 pH를 구명하였다.

2.2.2 배양온도

배지를 구명된 최적 pH로 조절하고 배양온도를 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34°C로 각각 7일동안 정치배양한 후 균체량 및 셀룰로오스 함량을 측정하여 최적 배양온도를 구명하였다.

2.2.3 배양기간

구명된 최적 pH 및 배양온도의 조건에서 1 - 16일로 배양기간을 연장하면서 균체량 및 셀룰로오스 함량을 측정, 최적 배양기간을 구명하였다.

2.3 셀룰로오스의 물성측정

*Saprolegnia ferax*로부터 2.2의 방법으로 생산되고, 정제된 미생물 셀룰로오스를 동결건조시켜 다음과 같이 물성을 측정하였다. 이때 비교시료는 α-셀룰로오스 (bulk density: 3.1~4.3, 35mesh-retained 20%, 100 mesh-passing 50%, 200mesh-passing 35%, Aldrich Chemical Company, Inc)를 사용하였다.

2.3.1 표면구조

미생물 셀룰로오스와 α-셀룰로오스의 표면구조는 주사형 전자현미경(Hitachi SEM model S-4300, Japan)으로 관찰하였다. 각 셀룰로오스 시료를 양면 접착 테이프에 얇게 분산시킨 후, Au로 진공증착(100 Å 두께)하여 1,000-5,000배로 촬영하여 관찰하였다.

2.3.2 보수력(Water holding capacity; WHC)

각각의 셀룰로오스 시료를 AACCC의 방법¹¹⁾을 사용하여 시료 5 g을 칭량하여 미리 칭량한 50 ml 원심분리관에 넣고, 각 시료에 증류수를 소량 가한 후 유리봉으로 저어주었다. 혼합물이 완전히 젖은 후 2000 g에서 10분간 원심분리 후 상등액 액체의 양을 측정하였고, 수분보유능(시료 고형분 g당 물의 g)을 다음 식으로 구하였다.

$$WHC = (W_2 - W_1)/W_0$$

여기서 W_0 는 건조시료 중량(g), W_1 은 관과 시료의 무게(g), W_2 는 관과 침점물의 무게(g)이다.

2.3.3 보유력(Oil holding capacity; OHC)

보유능은 Chakraborty의 방법¹²⁾에 따라 각각의 셀

룰로오스 시료 1 g을 칭량하여 미리 칭량된 50 ml 원심분리관에 넣고 10 ml의 soybean oil과 혼합한 후 시료와 오일 혼합물을 1600 g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 관 무게를 측정하였으며, 오일 흡수능(시료 고형분 1g당 오일 g)을 다음과 같이 계산하였다.

$$OHC = (W_2 - W_1)/W_0$$

여기서 W_0 는 건조시료 중량(g), W_1 은 관과 시료의 무게(g), W_2 는 관과 침점물의 무게(g)이다.

2.3.4 점도특성

셀룰로오스 대비 20%의 CMC(Carboxymethyl cellulose)를 혼합한 셀룰로오스를 0.5, 1.0, 1.5%(w/v)로 분산시켜 60°C로 가온하고 다시 30°C로 냉각하여 회전점도계(Brookfield DV-II+, Brookfield Eng. Labs Inc., USA)의 spindle No.1으로 점도계의 회전속도에 따라 이들 셀룰로오스의 점도 변화를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 최적 배양조건의 구명

3.1.1 Initial pH

배지의 초기 pH를 3.0~9.0로 조절하고 25°C, 7일의 조건으로 배양하고 균체량 및 셀룰로오스 생산량을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

배지의 pH에 따른 *S. ferax*의 균체량 및 셀룰로오스

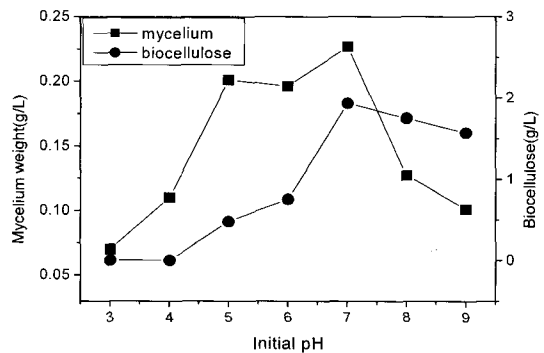


Fig. 1. Effects of initial pH on mycelium weight and biocellulose produced from *Saprolegnia ferax*.

생산량은 pH 7.0에서 가장 높게 나타났다. 균체량의 경우 pH 5.0~7.0에서 비교적 높았고 이후 감소하는 경향이었으나, 셀룰로오스 생산량은 pH 7.0 이후 즉 pH 7.0~9.0의 경우가 약산성보다 높은 생산량을 나타내어 pH 7.0에서 가장 높은 균체량 및 셀룰로오스 생산량을 나타내었다.

이와 같은 결과는 박 등⁸⁾과 이 등¹³⁾이 *S. ferax*의 생리학적 특성에 대한 연구에서 밝힌바와 같이 최적 생육 pH는 각각 5.8, 6.0이라는 결과와는 다소 차이가 있었다. 한편 손 등¹⁴⁾과 고 등¹⁰⁾의 연구에서는 박테리아인 *Acetobacter* sp.에서 셀룰로오스 생산의 최적 생육 pH는 각각 6.5, 5.0으로 발표하여 초산균의 경우는 pH 5.0~6.5 사이에서 셀룰로오스 생산량이 최대이었다.

3.1.2 배양온도

배지의 pH를 7.0으로 조절하고 배양온도를 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34°C로 각각 7일동안 정치배양한 후 균체량 및 셀룰로오스 생산량을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

배양온도에 따른 *S. ferax*의 균체량의 경우 26~30°C의 범위에서 비교적 높았고, 26°C에서 가장 높은 균체량을 나타내었으나 32°C 이후에서는 급격히 감소하여 34°C에서는 거의 성장하지 못하였다. 셀룰로오스 생산은 22~32°C의 범위에서 큰 차이가 없었으나, 균체량의 경우에서와 같이 26°C에서 가장 높은 생산량을 기록하였고 34°C에서는 펠리클이 형성되지 않았다.

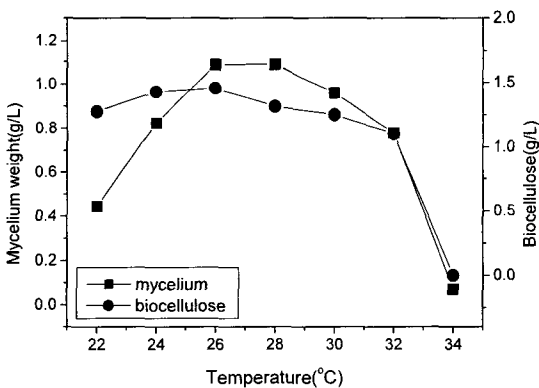


Fig. 2. Effects of temperatures on mycelium weight and biocellulose produced from *Saprolegnia ferax*.

박 등⁸⁾은 *Saprolegnia* sp.의 생육최적 온도는 30°C로 25~30°C에서 왕성한 성장 결과를 얻었고, 배 등⁹⁾도 *S. ferax*의 최적 생장온도는 25°C라 밝힌 바 있어 본 연구 결과와 상당히 유사하였다. 한편 박테리아인 *Acetobacter* sp.에 의한 셀룰로오스 생산 최적온도는 30°C로 본 연구의 *S. ferax*보다 약간 높았다.

3.1.3 배양기간

배지의 pH를 7.0, 배양온도를 26°C로 조절하여 1~16일로 배양기간을 연장하면서 균체량 및 셀룰로오스 함량을 측정, 최적 배양기간을 구명한 결과는 Fig. 3과 같다.

배양기간에 따른 *S. ferax*의 균체량 및 셀룰로오스 생산량은 배양 초기에 급격히 증가하다가 균체량의 경우 배양 14일째 급격히 감소하였고, 셀룰로오스 생산량은 배양 12일째 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 이 결과는 박 등⁸⁾과 이 등¹³⁾의 연구에서 *S. ferax*의 생장이 72시간 이후 최고로 도달하여 이후 정지기 및 사멸기라는 결과를 나타낸 것과 상당한 차이를 나타내었다. 그러나 위의 연구는 셀룰로오스 생산보다 균체의 성장에 초점이 맞추어져 있어 본 연구와 단순 비교할 수 없었다. 또한 박테리아에서 셀룰로오스를 생산하는데 있어서 고 등¹⁰⁾은 *Acetobacter xylinum*의 최대 균체량과 셀룰로오스 생산량이 각각 7~8일 및 8~9일로서 본 연구의 *S. ferax*보다 약간 빨랐고, 이 등¹⁵⁾이 *Gluconacetobacter persimmonus*를 이용한 연구에서

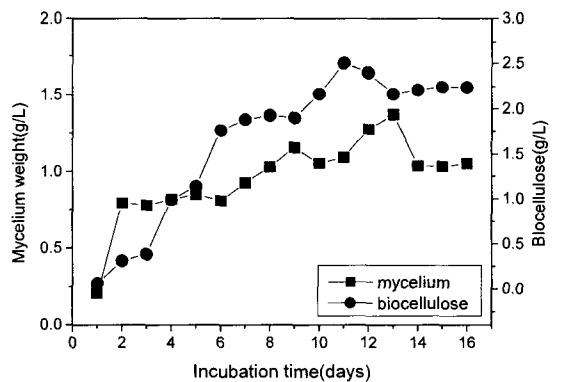


Fig. 3. Effects of incubation periods on mycelium weight and biocellulose produced from *Saprolegnia ferax*.

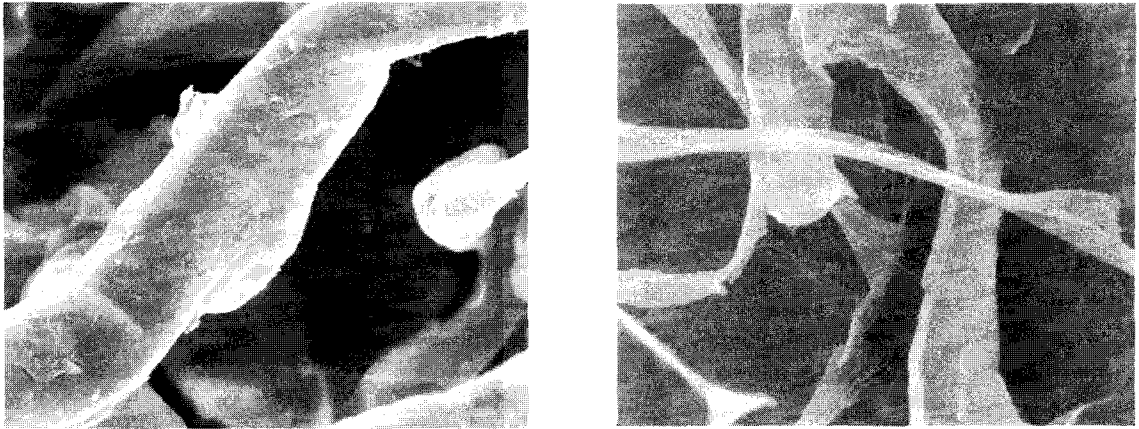


Fig. 4. Scanning electron micrograph of α -cellulose(left, x2,000) and biocellulose(right, x3500).

는 균체량과 셀룰로오스 생산량의 최적 배양기간이 각각 10일 및 16일로 보고한 바 있어 각 균주마다 상당한 차이를 보였다.

3.2 셀룰로오스의 물성측정

3.2.1 표면구조

미생물 셀룰로오스 및 α -셀룰로오스의 표면구조를 주사형 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다.

α -cellulose와 biocellulose를 각각 2,000, 3,500배 확대하여 관찰한 결과 정도의 차이는 있었지만 두 시료 모두 섬유상의 형태를 보였다. 특히 biocellulose는 얇은 막의 형태와 피브릴과 같은 형태를 나타내어 섬유패드 제작 시 높은 결합강도를 나타낼 것으로 보여진다. 이는 통상 미생물 배양 중 교반배양에서는 전단력에 의해 섬유 형태가 얻어지고 정지배양에서 공기/액체 계면에서 셀룰로오스의 젤라틴 막이 형성되는데 기인하는 것으로 사료된다.

3.2.2 보수력 및 보유력

*S. ferax*에서 생산된 셀룰로오스의 보수력 및 보유력을 살펴보기 위해 α -셀룰로오스와 비교한 결과는 Fig. 5와 같다.

셀룰로오스의 보수 및 보유력의 특성은 식이섬유원으로 이용되고 있는 식품산업, 특수기능지에 이용되는 제지산업, 의용 pad, 화장용 pad 또는 인공피부 등에 응용에 상당히 중요한 부분을 차지하고 있다. 미생물 셀

룰로오스의 동결건조 분말의 보수력을 α -셀룰로오스와 비교하면 약 3배 이상의 높은 결과를 나타내었고, 보유력도 약 3배 이상의 결과를 나타내어 미생물 셀룰로오스가 α -셀룰로오스보다 월등히 높은 보수보유력을 가지는 것으로 나타났다. 또한 미미한 수준이지만 α -셀룰로오스는 보수력이, 미생물 셀룰로오스는 보유력이 약간 높았다. 한편 이 등¹⁶⁾은 *Acetobacter xylinum*에 의해 생산된 셀룰로오스의 보수 및 보유력이 각각 9.26 g/g과 7.46 g/g으로서 본 연구 결과가 상당히 높은 수준이었다.

3.2.3 점도

20%의 CMC를 혼합한 각각의 셀룰로오스 0.5~

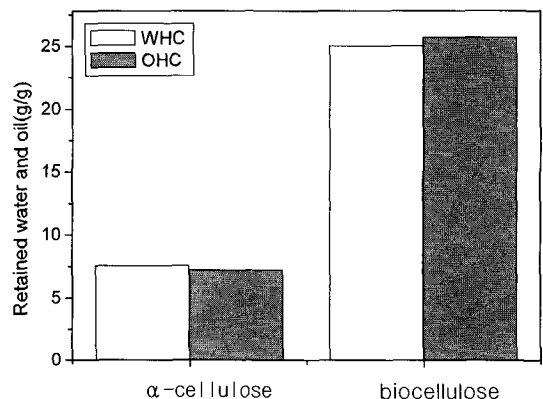


Fig. 5. Water and oil holding capacities of α -cellulose and biocellulose.

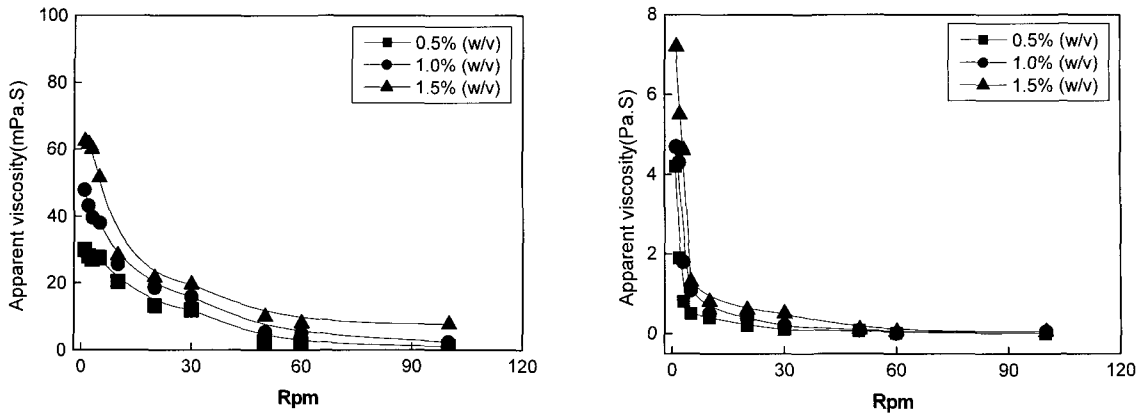


Fig. 6. Apparent viscosity vs. viscometer speed of α -cellulose(left) and biocellulose(right) dispersions containing CMC(20%) solution in the different concentrations.

1.5%(w/v)의 분산액을 회전점도계의 회전속도에 따라 이들 셀룰로오스의 점도 변화를 측정된 결과는 Fig. 6과 같다.

점도를 갖는 식이성 셀룰로오스는 소화관 내에서의 이동속도 및 흡수에 영향을 주고, 기타 산업에서는 관의 이송에 커다란 영향을 미친다. 회전 속도에 따른 점도를 살펴보면 α -셀룰로오스와 미생물 셀룰로오스 분산액의 점도는 회전속도의 증가에 따라 급격히 감소할 뿐만 아니라 농도의 증가에 따라서도 영향을 받는 것으로 나타났다. 특히 미생물 셀룰로오스가 α -셀룰로오스보다 회전속도에 의한 영향이 컸으며, 전반적으로 점도가 크게 낮았다.

이 등¹⁶⁾이 *Acetobacter xylinum*의 셀룰로오스를 이용한 연구결과 셀룰로오스의 농도가 0.5%에서 1.5%로 증가함에 따라 점도는 무려 5배가 증가한다고 보고하여 본 연구 결과와는 차이가 있었다.

4. 결론

본 연구는 *Saprolenia ferax*로부터 셀룰로오스를 얻기 위해 셀룰로오스 생산의 최적 배양조건을 구명하고, 생산된 셀룰로오스의 다양한 특성을 구명하기 위하여 수행되었고 얻은 결론은 다음과 같다.

*S. ferax*에서 셀룰로오스를 생산하기 위한 최적 배양 조건으로 초기 pH는 7.0에서 가장 높은 셀룰로오스 생산량을 나타내었고, 배양온도의 경우에는 26~30°C의

범위에서 셀룰로오스를 생산할 수 있었으며 26°C에서 최대 생산능을 나타내었다. 배양기간은 11일에서 가장 높은 셀룰로오스 생산량을 보인 후 정체기에 이르렀다. 미생물 셀룰로오스의 보수력 및 보유력은 각각 25.04, 25.75 g/g으로 α -셀룰로오스(7.57, 7.25 g/g)보다 보수력은 약 3.2배, 보유력은 약 3.5배의 높은 수준으로 미생물 셀룰로오스가 α -셀룰로오스보다 월등히 높은 보수 보유력을 가지는 것으로 나타났다. 또한 미생물 셀룰로오스의 점도는 α -셀룰로오스보다 크게 낮았으며, 회전 속도에 의한 영향이 큰 것으로 나타났다.

사 사

이 논문은 2005년도 전북대학교 지원 연구비(연구기반조성 2005-3)에 의하여 연구되었음.

인용문헌

1. Shigenori Kuga, Bacterial Cellulose-The Possibility of Raw Material for Paper making Fiber, Mokchae Konghak. 20(2): 3-8 (1992).
2. Jeong Yong-Jin and In-Seon Lee, A New of Utilizing Cellulose Produced by *Acetobacter* Bacteria, Food Industry and Nutrition 5(1): 25-29 (2000).
3. Brown, A. J., On an acetic ferment which forms cellulose, J. Chem. Soc. 49: 172-186 (1886).
4. Brown, A. J., An acetic ferment which forms cellulose,

- J. Chem. Soc. 49: 432-439 (1886).
5. Delmer, D. P., Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study, *Ann. Rev. plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 245-276 (1999).
 6. Robert, E. C., and M. A. Steven. Biogenesis of bacterial cellulose, *Microbiol.* 17: 435-447 (1991).
 7. Helbert W., J. Sugiyama, M. Ishihara, and S. Yamanaka, Characterization of native crystalline cellulose in the cell walls of Oomycota, *J. of Biotechnology* 57: 29-37 (1997).
 8. 박동철, 이형환, 이지열, 담수로부터 分離한 *Saprolegnia* sp.의 生理 및 生殖의 特性, *한국균학회지* 17(1): 21-26 (1989).
 9. 배석, 조남철, 전순배, *Saprolegnia ferax*에 의한 β -amylase의 생산 및 특성, *한국산업미생물학회지* 25(2): 109-114 (1997).
 10. 고정연, 신공식, 윤병대, 최우영, Cellulose를 생산하는 *Acetobacter xylinum* GS11의 분리 · 동정, *한국산업미생물학회지* 28(3): 139-146 (2000).
 11. American Association of Cereal Chemists(AACC), Method for water hydration capacity of plant protein material, *Cereal Foods World.* 26: 291-293 (1981).
 12. Chakraborty, P., Coconut protein isolate by ultra-filtration, In *Food Engineering and Process Applications*. Lemeguer, M., Jelen, P., Eds., Elsevier Applied Science Publishers, New York, pp. 308-315 (1986).
 13. 이근광, 김영길, 이민웅, 이형환, 양식 가물치 (*Channa argus*)에 대한 *Saprolegnia* sp.의 병리학적 특성과 물곰팡이의 생장을 제어하는 정유의 영향, *한국균학회지* 27(1): 32-38 (1999).
 14. 손홍주, 이오미, 김용균, 박연규, 이상준, 정치배양에서 *Acetobacter* sp. A9에 의한 셀룰로오스 생산특성, *한국생물공학회지* 15(6): 573-577 (2000).
 15. 이오석, 장세영, 정용진, *Gluconacetobacter persimmonus* KJ145를 이용한 Bacterial Cellulose 생산조건, *식품공학회지* 31(4): 572-577 (2002).
 16. 이신영, 전정륜, 양영국, *Acetobacter xylinum* 유래 Biocellulose의 물성기능 특성, *식품공학회지* 9(3): 182-191 (2005).