

맥주발효 폐액을 이용한 미생물 셀룰로오스 생산

박종곤[†] · 현승훈 · 안원술*

경북대학교 화학공학과
701-701 대구시 북구 산격동 1370
*계명대학교 화학공학과
704-706 대구시 달서구 신당동 1000
(2005년 11월 30일 접수, 2006년 2월 2일 채택)

Production of Bacterial Cellulose Using Waste of Beer Fermentation Broth

Joong Kon Park[†], Seung Hoon Hyun and Won Sool Ahn*

Department of Chemical Engineering, Kyungpook National University, 1370, SanKyuk-dong, Buk-gu, Daegu 701-702, Korea

*Department of Chemical Engineering, Kyemyung University, 1000, Shindang-dong, Dalseo-gu, Daegu 704-706, Korea

(Received 30 November 2005; accepted 2 February 2006)

요 약

에탄올과 함께 탄소, 질소원을 함유한 맥주 폐 발효액을 저렴한 대체배지로 사용하고 *Gluconacetobacter hansenii* PJK(KCTC 10505 BP) 균주를 이용하여 미생물셀룰로오스를 생산하였다. 맥주 폐 발효액은 기본배지보다도 탄소원과 질소원이 풍부하였으며 미량의 황과 4% 이상의 에탄올을 함유하였다. 진탕배양에서 맥주 폐 발효액을 사용하여 생산된 셀룰로오스량은 기본배지를 사용하여 생산된 셀룰로오스량과 필적하였다. 교반배양에서는 셀룰로오스 생산균주(*Cel*⁺ 균주)가 셀룰로오스를 생산하지 못하는 균주(*Cel*⁻ 돌연변이주)로 전환되는률은 낮았지만 셀룰로오스 생산량은 감소하였다.

Abstract – Bacterial cellulose (BC) was produced by *Gluconacetobacter hansenii* PJK (KCTC 10505 BP) strains using the waste of beer fermentation broth. It contained more C and N than a basal medium with a small amount of S and more than 4% ethanol. The amount of BC produced in a shaking culture using the waste of beer fermentation broth was nearly the same as that of a basal medium. The production of BC decreased in a shear stress field in a jar fermenter although the conversion of cellulose producing (*Cel*⁺) cells to non-cellulose producing (*Cel*⁻) mutants was not severe. This study showed that the waste of beer fermentation broth is an inexpensive carbon, nitrogen source with ethanol and thus a worthy substitute for the conventional medium for BC production.

Key words: Bacterial Cellulose, Glucuronacetobacter Hansenii Pjk, Beer Fermentation Broth

1. 서 론

1886년 Brown[1]에 의해 초산균이 순수한 셀룰로오스를 생산한다는 사실이 밝혀진 이래, 일부 algae, fungi 그리고 *Acetobacter*, *Agrobacteria*, *Rhizobia*, *Pseudomonas*, *Sarcina* 등과 같은 미생물도 합성할 수 있다는 것으로 보고되었다[2-4]. BC는 hemicellulose, pectin, lignin 등을 함유하는 식물 셀룰로오스와는 달리 다른 불순물 없이 순수한 셀룰로오스로 구성되어있다[5, 6]. 따라서 유해한 부산물 없이 소량의 에너지와 약품으로 고순도의 셀룰로오스를 정제할 수 있다[7]. BC는 매우 미세한 마이크로 피브릴로 되어 있으며, 마이크로 피브릴은 3차원 망상구조를 가지며 각 섬유의 두께는 0.1 μm 정도로서 침엽수(32~43 μm), 활엽수(20~30 μm) 및

비목재 펄프(linter, 20 μm) 보다 상당히 미세한 구조로 되어 있다. 이와 같은 미세한 망상구조는 아주 큰 표면적을 가지며 높은 water retention value, moldability, crystallinity 그리고 강한 인장 강도를 가진다[8, 9]. 특히 BC로 만든 시트는 종이와 비교해서 인장강도 5배, 탄성률 6배 정도의 높은 값을 나타내며[10], cotton linter 보다 약 17배 높은 water retention value를 가지는 것으로 보고된바 있다[9].

이러한 우수한 특성으로 인하여 BC는 고강도 고탄력의 방탄조끼, 방독면 등을 제조하는 방위 산업과 인공피부, 창상 피복제 등을 제조하는 의료 제약분야에서 사용된다. 또한, 콘택트 렌즈, 인공관절, 인공근육, 인조혈관, 생리활성제, 반투막 제조 등에 이용될 수 있다[11-15]. 인공피부로써 특허가 인정되어 BioFill[®]로 상업화 된 사례가 있다[16]. 음향 산업 분야에서는 pellicle을 그대로 사용하는 고음질 오디오와 스피커의 diaphragm 제조, 기타 공업제품 분야에서

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: parkjk@knu.ac.kr

는 종이의 도공액 첨가제, 탄소 섬유, 정보기록 용지, 고부가가치 용지 제조 등에 활용되고 있다[17-19]. 특히 일본 Sony사에서는 BC를 이용한 스피커 음향 진동판으로 고성능 헤드폰을 제작하여 시판 중에 있다[20]. 식품분야에서는 식품의 증량제, 선도 유지제, 조직감 향상, 소포체, 액상식품의 분산성, 유화성, 안정성 개선제로 이용될 수 있으며, 필리핀에서는 nata de coco란 이름으로 이미 생산·수출하고 있다[20, 21].

하지만, 기존의 미생물에 의해 생산되는 BC는 생산성이 낮을 뿐만 아니라 원료 물질인 배지가 고가이기 때문에 BC의 경제성을 높이기 위해서는 저가의 배지 대체 물질의 개발이 필요하다. 뿐만 아니라 BC를 생산하기 위한 배지에 ethanol을 첨가함으로써 *Cel⁻ mutants*의 발생이 억제되어 균체의 성장과 BC 생산성이 향상된다[22, 25]. 따라서 본 연구에서는 BC 생산을 위한 배지 대체 물질로써 질소원이 풍부하고 ethanol이 다량 함유되어 있는 맥주 공장에서 발생하는 맥주 폐 발효액을 이용하여 *G. hansenii* PJK를 진탕배양 및 교반배양 함으로써 BC 생산을 위한 기초자료를 확보하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2-1. 사용 균주 및 배지조성

셀룰로오스를 생산하는 균주는 Park 등[22]이 부패한 사과로부터 분리한 *Gluconacetobactor hancenii* PJK(KCTC 10505 BP)와 교반 배양으로부터 유래한 BC 생산균주(*Cel⁻*) 균주를 실험에 사용하였다. 미생물 배양을 위한 기본배지(MA 배지)로는 Son 등[23]이 사용한 배지를 사용하였으며 배지의 조성은 glucose 10 g/L, yeast extract 10 g/L, peptone 7 g/L, acetic acid 1.5 mL/L, succinate 0.2 g/L이며, 배지의 pH는 HCl과 NaOH를 사용하여 5.0으로 보정하였다. MA 배지는 MA 배지에 1%의 에탄올이 추가로 함유되어 있다. 균주보관을 위한 고형배지는 기본배지 조성에 agar 15 g/L를 첨가하였다.

맥주 폐 발효액은 증류수로 희석하여 사용하였으며 희석비는 다음과 같이 정의하여 사용하였다.

$$DR(\text{dilution ratio}) = \frac{V_{WB}}{V_{total}} = \frac{V_{WB}}{V_{WB} + V_{DW}}$$

V_{WB} = volume of waste of beer fermentation broth

V_{DW} = volume of distilled water

2-2. 배양조건

50 mL의 배지가 함유된 250 mL 용량의 삼각 플라스크에 고형배지에서 보존 중인 균주를 백금이로 접종하여 30 °C에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양액은 멸균된 mesh(38 μm)로 여과하여 균일한 세포 현탁액을 얻은 후 세포 현탁액 5%를 본 배양액 50 mL가 함유된 250 mL 용량의 conventional flask에 접종하여 30 °C에서 200 rpm으로 진탕배양 하였다.

진탕배양액을 멸균된 mesh(38 μm)로 여과하여 균일한 세포 현탁액을 얻은 후 세포 현탁액 5%를 3 L의 본 배양액이 함유된 5 L jar fermentor에 접종하여 30 °C에서 300, 500 그리고 600 rpm, 1.0 vvm의 조건으로 배양하였다. Jar fermentor는 5 L jar fermentor(Kobiotech Co.)를 사용하였으며 impeller는 6 flat-blade turbine impeller를 사용하였다.

2-3. 균체량 및 BC의 정량

진탕배양의 경우 배양액 50 mL, 교반배양의 경우 배양액 10 mL를 3,580 g로 20분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 증류수 세척 및 원심분리(3,580 g, 20분) 과정을 2회 거치고 일정한 무게가 될 때까지 동결건조(-50 °C) 시켜 균이 포함된 BC의 건조중량을 먼저 구하였다. 그 후 균이 포함된 BC에 20 mL의 0.3 M NaOH를 첨가하여 5분간 끓임으로써 세포를 모두 용해했으며 filter paper (No. 2, Whatman Co.)가 장착된 filter flask를 사용하여 용액을 제거하였다. Filter paper에 걸러진 BC에 과량의 증류수를 투과하여 중성이 될 때까지 세척한 후 동결 건조하여 순수한 BC의 건조중량을 측정하였다. 균이 포함된 BC의 건조중량과 순수한 BC의 건조중량과의 차이로 균체의 건조중량을 측정하였다.

2-4. Glucose 농도 측정

배양액 내 탄소원으로 공급된 glucose의 잔존량은 glucose reagent kit(Sigma no. 510-A)를 사용하여 측정하였다. 배양액을 3,580 g로 20 분간 원심 분리하여 상등액을 회수한 후 50배 희석하고, 희석된 용액 0.5 mL와 combined enzyme-color reagent solution 5 mL를 혼합하여 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 반응한 용액은 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu 1201)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 glucose 표준용액의 표준곡선을 이용하여 glucose 농도로 환산하였다.

2-5. *Cel⁻ mutants*의 측정

배양액 내부에 발생하는 *Cel⁻ mutants*의 발생률을 확인하기 위하여 colony forming unit(CFU)를 측정하였다. 배양액을 멸균된 sieve (pore size : 38 μm)로 여과한 후 0.1 mL를 채취하여 0.85% saline 용액에 단계적으로 희석한 후 희석액 0.1 mL를 고형배지에 도말하여 colony가 형성될 때까지 30 °C에서 배양하였다. Smooth-type colony를 형성하는 cell을 BC 생산불능 돌연변이주(*Cel⁻*)로 정하고 mucous and rough-type colony를 형성하는 cell을 *Cel⁺* cells로 정하였다[24].

2-6. Elemental analyzer (EA) 측정

시료를 3,580 g로 20분간 원심 분리하여 상등액을 회수한 뒤 양량이 될 때까지 80 °C 항온 건조기에서 건조해 막자와 막자사발을 이용하여 균일하게 분쇄하여 원소 분석(EA 1108 CHNS-O, Fisons)을 실시하였다. 원소분석법의 원리는 시료를 연소시켜 조성 원소별로 분석이 용이한 특정 기체 분자로 전환하고, 전환된 기체 분자를 정량 분석하여 구성 유기 원자의 함량비를 측정된 후 이로부터 실험식을 결정한다. 정확한 실험식을 결정하기 위해서는 시료의 정확한 무게 측정, 특정 기체 분자로의 100% 전환 그리고 특정 기체들의 완벽한 분리 및 무게 측정이 필요하다. 원소 분석시에 미량의 시료를 사용하므로 정확한 무게 측정이 요구되므로 액체상태의 시료는 휘발 및 증발하는 단점이 있어 고체상태의 시료를 준비하여 유기 화합물의 주성분인 C, H, N, S 그리고 O의 조성 성분비를 측정하였다.

2-7. Gas chromatography (GC) 분석

맥주 폐 발효액의 ethanol과 acetic acid의 농도 분석은 내부표준법을 이용하여 gas chromatography로 측정하였다. Gas chromatography

는 (주)도남 인스트루먼트 DS 6200을 이용하였으며 column은 J & W Scientific의 DB-5 capillary column이 사용되었다. 그리고 oven Temp. 180 °C, injection Temp. 240 °C, detector Temp. 210 °C, carrier gas로는 N₂를 사용하였다. 또한, detector는 carrier gas 중의 불순물에 의해서 감도에 특별한 영향을 주지 않고 고감도 검출기로서 중심이 되며 광범위하게 실용화된 FID(flame ionization detector)를 사용하였다. 본 실험에서는 정량분석으로 내부표준법을 선택하였으며 내부표준물질로는 N-Buthanol을 사용하였다.

2-8. XRD 측정

시료를 항량이 될 때까지 동결건조(-50 °C) 시킨 후 5°~40° 2θ 범위에서 Cu-target을 이용하여 X-Ray Diffractometer(X' Pert-APD, PHILIPS)로 40 KV, 30 mA에서 X-ray diffractogram을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 맥주 폐 발효액의 성분분석

맥주 발효 효모는 사용횟수에 따라 효모의 상태와 발효액의 성분이 달라지기 때문에 filtering 공정을 통해 효모 및 원료의 잔류물을 제거하여 맥주를 대량 생산하는 맥주 공장에서는 보통 7회 정도를 이용하고 폐기하고 있으며, 소규모로 매장 내에서 자체 맥주제조 설비를 갖추고 맥아, 호프, 효모 등의 원료와 고유의 제조방법으로 맥주를 직접 생산하여 판매하는 하우스맥주 전문점에서는 맥주의 발효 정도에 따라 효모를 교체하거나 더 첨가한다. 따라서 맥주 폐 발효액을 BC 생산을 위한 배지로 사용하기 위해서 폐 발효액의 조성을 조사할 필요가 있다.

맥주 폐 발효액(waste of beer fermentation broth)의 조성을 알아보기 위해 기본 배지(MA)와 비교하여 elemental analyzer(EA 1108 CHNS-O, Fisons)로 C, H, N, S 그리고 O의 성분을 조사하여 보았다.

Table 1에서 보는 바와 같이 MA 배지와 맥주 폐 발효액의 성분에는 C와 O가 약 80% 정도를 차지하고 있으나 맥주 폐 발효액에는 MA 배지에는 없는 S가 미량 포함되어 있다. 건조중량을 비교해 보면 4회 이용 후 H사의 맥주 폐 발효액에는 기본배지 보다 C는 약 2.22배, N은 약 1.41배 많았으며 7회 이용 후 H사의 맥주 폐 발효액에는 기본배지 보다 C는 약 8.63배, N은 약 12.11배 많은 것을 알 수 있다. 이는 맥주 발효 효모의 사용횟수가 증가할수록 맥주 폐 발효액의 성분비와 건조중량이 변한다는 것이다. 그리고 A사로부터 가져온 맥주 폐 발효액의 건조중량은 기본배지 보다 C는 약 2.09배, N은 약 2.08배 많은 것을 알 수 있다. 또한, C, H, N, S, O 이외에 Na,

Table 2. The concentration of ethanol and acetic acid in the waste of beer fermentation broth by gas chromatography

	Composition (V/V %)	
	Ethanol	Acetic acid
MA medium*	0	0.15
MAE medium*	1	0.15
H Co. 4 gene.	4.58	0
H Co. 7 gene.	12.42	13.82
A Co.	5.42	0.11

*: Not analyzed

K, Fe, Ca, Mg, P 등의 무기염류가 미량 함유되어 있음을 ICP-Atomic Emission Spectrometer(JY 38 Plus, Jobin-Yvon)를 통해서 확인하였다. 맥주 폐 발효액에 함유되어 있는 ethanol과 acetic acid의 농도를 구하여 Table 2에 나타내었다.

Table 2를 보면 본 연구에 사용한 맥주 폐 발효액의 ethanol 및 acetic acid의 농도 또한 사용횟수와 종류에 따라 다르게 나타났다. 4회를 이용한 H사의 맥주 폐 발효액에는 ethanol이 약 4.58% 함유되어 있었고 acetic acid는 없었으나 7회를 이용한 H사의 맥주 폐 발효액에는 ethanol 및 acetic acid 농도가 각각 약 12.42%와 약 13.82%로 가장 높았으며, 하우스 맥주 전문점인 A사의 맥주 폐 발효액에는 ethanol 및 acetic acid 농도가 각각 약 5.42%와 약 0.11% 함유되어 있었다. 기본배지(MA 배지)에 1% 에탄올이 함유된 MAE 배지가 BC 생산의 최적배지였던 점을 감안하면 에탄올의 농도가 높은 편이다.

G. hanseni PJK를 이용하여 진탕배양 초기에 기본배지에 1% ethanol을 첨가함으로써 배양 중에 생성되는 BC가 영기는 현상이 나타났으며, *Cel⁻* mutants의 발생억제 효과로 BC의 생산성 증가와 미생물의 성장을 향상시켰다. 맥주 폐 발효액에는 다량의 탄소원과 질소원이 존재하고, 또한 진탕배양에서 *Cel⁻* mutants의 발생억제 효과가 있는 ethanol이 함유되어 있다. 그러므로 맥주 폐 발효액은 BC를 생산하는 데 필요한 상업용 배지를 대체할 수 있는 충분한 가능성이 있을 것이라고 판단된다.

3-2. 진탕배양에 의한 BC 생산

Acetic acid 없이 ethanol만 약 4.58% 함유되어 있는 4회 이용한 H사의 맥주 폐 발효액을 이용하여 conventional flask에서 wild type의 *G. hanseni* PJK를 진탕배양 하였다. 맥주 폐 발효액에 포함된 ethanol의 영향으로 생성된 BC가 영기는 현상은 나타났으나 MAE 배지에 서처럼 표면에 pellicle 형태의 새로운 피막이 생성되지는 않았다.

Table 1. The element analysis of MA medium and waste of beer fermentation broth

	Element (%)					Total (%)
	C	H	N	S	O	
MA medium	39.01[10.63]	6.17[1.68]	7.32[2.00]	0[0]	42.02[11.45]	94.52[25.76]
MAE medium*	39.01[10.65]	6.19[1.69]	7.33[2.00]	0[0]	41.97[11.45]	94.50[25.79]
H Co. 4 gene.	41.35[23.64]	6.26[3.58]	4.91[2.81]	0.28[0.16]	44.01[25.38]	97.21[55.57]
H Co. 7 gene.	41.14[91.71]	7.09[15.81]	10.86[24.21]	0.69[1.54]	38.87[86.65]	98.65[219.92]
A Co.	34.55[22.20]	5.68[3.65]	6.46[4.15]	0.37[0.24]	44.74[28.75]	91.8[58.99]

[]: Dry weight (g/L)

*: Calculated value

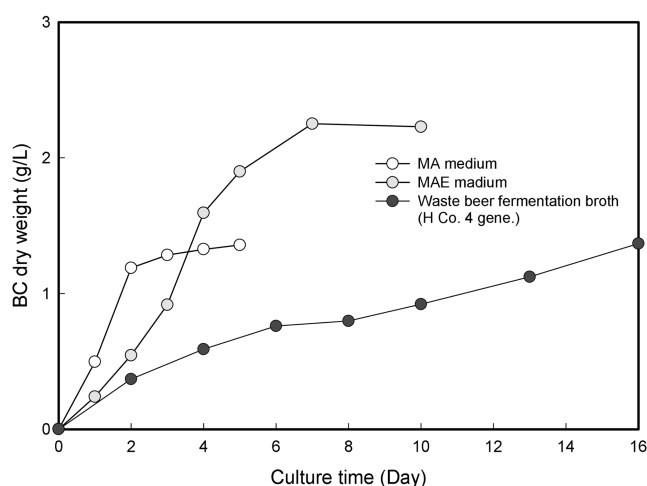


Fig. 1. Effects of media on the production of BC by *G. hansanii* PJK. Cells were cultivated in a conventional flask shaken at 200 rpm at 30 °C.

Fig. 1에 MA 배지, MAE 배지 그리고 4회 이용한 H사의 맥주 폐 발효액을 이용하여 conventional flask에서 wild type의 *G. hansanii* PJK 균주를 진탕배양하여 생산된 BC의 결과를 나타내었다. 맥주 폐 발효액에는 탄소원과 질소원이 풍부하고 ethanol이 포함되어 있음에도 BC의 생산량은 MA 배지(1.54 g/L)의 약 89%, MAE 배지(2.24 g/L)의 약 61%인 1.37 g/L이었다. *G. hansanii* PJK 균주는 탄소원으로 glucose를 사용하는데 맥주 폐 발효액에는 맥주발효과정에서 효모에 의해 발효성 당분이 분해되어 ethanol과 CO₂가 형성되므로 glucose가 거의 없고, 기본배지에 포함되어 있는 acetic acid가 없기 때문에 단기간에는 BC 생산량이 적다고 추측된다. 하지만, MA 배지에서는 최대생산량이 2일 배양에서 이루어졌고 MAE 배지에서는 7일 이후에 최대생산량이 얻어졌지만 맥주폐발효액에서는 11일 후에 얻어진 BC의 생산량이며 Fig. 1에 나타나 있듯이 11일 이후에도 지속적으로 증가하는 추세를 보이고 있으므로 발효기간이 증가하면 최대생산량은 MA배지를 이용한 최대생산량을 초과할 수도 있음을 보여준다. 또한, 맥주 폐 발효액이 맥주 공장에서 발생하는 산업 폐기물임을 감안한다면 BC를 생산하는 상업용 배지를 대체할 수 있는 충분한 가능성이 있다고 판단된다.

MA 배지 보다 C는 약 8.63배, N은 약 12.11배 많고, ethanol 및 acetic acid 농도가 각각 약 12.42%와 약 13.82%로 가장 많이 함유되어 있었던 7회 이용한 H사의 맥주 폐 발효액을 이용하여

conventional flask에서 wild type의 *G. hansanii* PJK를 진탕배양 하였다. MA 배지에 비하여 고농도의 ethanol 및 acetic acid가 포함되어 있기 때문에 7회 이용한 H사의 맥주 폐 발효액을 증류수로 희석하여 희석비에 따른 BC의 생산량을 검토해보았다.

7회 이용한 H사의 맥주 폐 발효액에서도 포함되어 있는 ethanol의 영향으로 생성된 BC가 영기는 현상은 나타났으나 MAE 배지에 서처럼 표면에 pellicle 형태의 새로운 피막이 생성되지는 않았다.

원액(DR=1.00)을 사용한 경우와 1:1로 희석한 용액(DR=0.50)을 사용한 경우에는 BC의 건조중량이 각각 0.003 g/L과 0.047 g/L로 생산성이 희박하였다. 이는 고농도의 ethanol 및 acetic acid가 포함되어 있기 때문에 그 독성으로 인하여 균체의 성장이 저해 받았기 때문이라고 판단된다[25].

7회 이용한 H사의 맥주 폐 발효액을 증류수로 희석을 하여 배양한 경우에는 원액을 이용한 경우와 달리 BC의 건조중량이 DR=0.33에서는 0.43 g/L, DR=0.25에서는 0.55 g/L, DR=0.20에서는 0.50 g/L 그리고 DR=0.17에서는 0.46 g/L이었다. 이는 초기 ethanol 및 acetic acid 농도가 각각 약 12.42%와 약 13.82%이던 것을 희석을 통하여 농도가 감소하므로 ethanol에 의한 독성이 감소하여 균체의 성장을 저해하는 효과가 줄었기 때문이라 판단된다. 또한, DR=0.25에서 BC의 건조중량이 0.55 g/L로 가장 높은 것을 알 수 있는데 이는 DR=0.33에서도 ethanol 및 acetic acid 농도가 균체가 성장하기에는 높기 때문이며 DR=0.20 이하에서는 희석으로 인하여 미생물이 이용할 수 있는 질소원과 같은 영양분이 감소하였기 때문인 것으로 추측된다. 7회 사용한 폐효모액은 희석과 함께 외부의 탄소원이 추가될 필요가 있음을 알 수 있다. pH의 변화는 기본배지에서와 같이 미생물에 의한 ethanol의 산화로 산성의 acetic acid가 생성되어 배양 초기에 감소하였다가 증가하는 현상이 나타났다.

Table 3을 보면 희석비가 감소할수록 CFU의 수치가 0이 되는 시기가 빨라짐을 알 수 있는데 이는 앞서 언급한 것과 같이 미생물이 이용할 수 있는 영양분이 감소하였기 때문인 것으로 추측된다.

MA 배지와 맥주 폐 발효액에서 생산된 BC의 구조가 동일한지 알아보기 위하여 XRD를 측정하였다. Fig. 2에 MA 배지와 1:4로 희석(DR=0.20)해 7회 이용한 H사의 맥주 폐 발효액에서 생산된 BC를 X-Ray Diffractometer를 이용하여 X-ray diffractogram을 측정하여 결과를 나타내었다. 보는 바와 같이 유사한 profile을 나타내고 있으며, XRD 결과로부터 기본배지와 맥주 폐 발효액에서 생성된 BC는 동일하다고 할 수 있다.

소규모로 대장 내에서 자체 맥주제조 설비를 갖추고 맥아, 호프, 효모 등의 원료와 고유의 제조방법으로 맥주를 직접 생산하여 효모

Table 3. The conversion of *G. hansanii* PJK into *Cel^r* mutants during cultivation in a diluted waste of beer fermentation broth(H Co. 7 gene.) in a conventional flask shaken at 200 rpm at 30 °C. Culture broth was 10⁵ times diluted with saline water, spread onto an agar medium, and then incubated at 30 °C

Culture time (day)	CFU/mL				<i>Cel^r</i> mutants/total cells			
	DR=0.33	DR=0.25	DR=0.20	DR=0.17	DR=0.33	DR=0.25	DR=0.20	DR=0.17
1	5.3×10 ⁶	7.2×10 ⁶	2.21×10 ⁷	4.55×10 ⁷	0	0.014	0.018	0.011
2	2.30×10 ⁷	1.55×10 ⁷	6.6×10 ⁶	1.15×10 ⁷	0.004	0.194	0.106	0.044
3	2.46×10 ⁷	2.0×10 ⁶	0	0	0.004	0.050	-	-
4	5.25×10 ⁵	0	0	0	0.002	-	-	-
5	6.85×10 ⁴	0	0	0	0.001	-	-	-
7	0	-	-	-	-	-	-	-

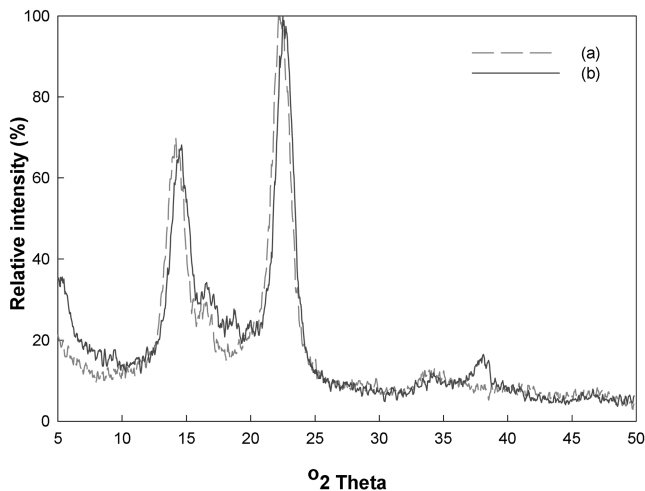


Fig. 2. A X-ray diffractogram of BC produced by *G. hanseni* PJK. (a) MA medium, (b) waste of beer fermentation broth (H Co. 7 gene., DR=0.20). Cells were cultivated in a conventional flask shaken at 200 rpm at 30 °C.

가 살아있는 상태로 판매하는 하우스맥주 전문점인 A사로부터 가져온 맥주 폐 발효액의 건조중량은 MA 배지 보다 C는 약 2.09배, N은 약 2.08배 많고, ethanol 및 acetic acid 농도는 각각 약 5.42%와 약 0.11% 함유되어 있었다.

하우스맥주 전문점인 A사의 맥주 폐 발효액을 증류수로 희석하여 conventional flask에서 wild type의 *G. hanseni* PJK를 진탕배양한 결과 맥주 폐 발효액에 포함되어 있는 ethanol의 영향으로 생성된 BC가 엉기는 현상이 나타났으며, 미약하지만 H사 맥주 폐 발효액에서는 MAE 배지에서처럼 BC 덩이 표면에 pellicle 형태의 새로운 피막이 생성되었다.

A사의 맥주 폐 발효액을 증류수로 희석을 하여 10일간 배양한 경우에는 BC의 건조중량이 DR=0.50에서는 0.92 g/L, DR=0.33에서는 0.93 g/L, DR=0.25에서는 0.60 g/L 그리고 DR=0.20에서는 0.55 g/L이었다. 그러나 균체의 건조중량은 DR=0.50에서 가장 많았으며 pH의 변화는 앞의 경우와 같이 감소하였다가 증가하는 현상이 나타났다.

3가지 종류의 맥주 폐 발효액에서의 BC 최대 생산량을 비교해보면 A사의 맥주 폐 발효액을 희석하여 사용한 경우 DR=0.33에서의 BC의 건조중량은 7회 이용한 H사의 맥주 폐 발효액(DR=0.25)에서 생산된 양보다는 약 1.69배 많았지만, 희석하지 않고 4회 이용한 H사의 맥주 폐 발효액에서 생산된 양보다는 약 32% 감소한 것을 알 수 있다.

3.3. 교반배양에 의한 BC 생산

BC의 생산 단가를 줄이고 대량 생산을 하기 위해서는 *G. hanseni* PJK 균주를 교반 배양하는 것이 유리하지만 배양 시 강한 shear stress 환경 하에서는 다량의 *Cel⁻* mutants가 발생하여 BC의 생산수율을 감소시키는 원인이 된다고 알려졌다[22, 25].

진탕배양 시 발생하는 shear stress가 *G. hanseni* PJK를 *Cel⁻* mutants로 전환하는 것으로 알려졌다나, 앞에서 고찰한 바와 같이 진탕배양을 하더라도 1% ethanol을 배지에 첨가하면 *Cel⁻* mutants

Table 4. Effect of reactors on the production of BC and cells by *G. hanseni* PJK in a waste of beer fermentation broth (H Co. 4 gene.)

Dry weight (g/L)	Conventional flask	Fermenter		
	Shaking rate (rpm)	Agitation rate (rpm)		
	200	300	500	600
BC	1.37	0.30	0.40	0.35
Cell	5.35	1.55	1.89	2.07

의 발생을 억제 시켜 BC의 생산량이 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 탄소원, 질소원 그리고 ethanol이 다량 함유되어 있으며, conventional flask를 이용하여 진탕배양 시 BC의 생산량이 가장 많았던 4회 이용한 H사의 맥주 폐 발효액을 이용하여 교반배양 시 impeller의 회전속도에 따른 BC의 생산성을 검토해 보고자 한다.

멸균된 맥주 폐 발효액 3 L를 6 flat-blade turbine impeller가 있는 5 L jar fermentor에 채우고 aeration rate 1 vvm, 30 °C 조건에서 pH controller를 사용하여 발효액의 pH를 4.5~5.5로 제어(8 M H₂SO₄, 8 M NaOH)하며 배양하였다.

배양기간에 따라 균체의 건조중량은 증가하는데 반해 BC의 건조중량은 크게 변화가 없었으며, impeller 회전속도가 300 rpm에서는 0.30 g/L, 500 rpm에서는 0.40 g/L 그리고 600 rpm에서는 0.35 g/L의 BC가 생산되었다. WSPS의 건조중량은 impeller 회전속도가 증가할수록 증가하였으며, 배양초기에 감소하였다가 증가하는 현상이 나타났다.

G. hanseni PJK를 4.58% ethanol이 포함된 맥주 폐 발효액에서 300 rpm의 교반속도로 교반배양을 하는 경우, 배양기 내부에서 발생하는 강한 shear stress로 *Cel⁻* mutant로의 전환이 촉진되기 때문에 BC의 생산량이 진탕배양의 경우에 비해 매우 낮게 나타났다. 진탕배양 시 conventional flask 내부의 배양액은 uni-directional circular flow field가 형성되어 회전만 하는 흐름 형태를 나타내지만 실제로 교반배양에서는 회전하는 6 flat-blade turbine impeller의 가장자리에서 발생하는 와류로 인하여 격렬한 lateral mixing과 vertical mixing이 동반되는 흐름 형태를 나타내기 때문에 jar fermentor 내에서 강한 shear stress가 생성된다. BC의 생산량은 conventional flask 보다 jar fermentor에서 감소하는 것으로 추측된다.

일반적으로 공장폐수는 물리적, 화학적 그리고 생물학적인 처리 방법에 의해 불순물(오염물질)을 제거하고 있다. 이 중 생물학적 처리 방법은 폐수 내에 존재하는 유기물 중에서 생물에 의해서 분해 가능한 유기물을 미생물로 제거하는 방법이다. 본 실험에서는 산업 폐액인 맥주 폐 발효액을 BC 생산을 위한 배지로 사용하기 때문에 맥주 폐 발효액에 존재하는 유기물이 제거되는 효과가 있을 것으로 예상된다. *G. hanseni* PJK 균주에 의한 유기물 제거 정도를 확인하기 위하여 과망간산칼륨(KMnO₄)법으로 화학적 산소 요구량(COD)을 측정하여 보았다. 4회 이용한 H사 맥주 폐 발효액을 5 L jar fermentor에서 600 rpm으로 교반배양 전과 후의 배양 상등액을 취하여 COD를 측정한 결과 배양 전 맥주 폐 발효액은 59,500 mg/L이었으며, 배양 후에는 35,235 mg/L이었다. 이러한 수치는 하천 수질 등급 기준, 방류수 수질 기준 그리고 폐수 배출 허용 기준보다는 상당히 높았으나 미생물 발효과정 중 약 41%의 COD가 감소하는 효과를 얻을 수 있었다.

4. 결 론

기존의 미생물에 의해 생산되는 BC는 생산성이 낮을 뿐만 아니라 원료 물질인 배지가 고가이기 때문에 BC의 경제성을 높이기 위해서는 저가의 배지 대체 물질의 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 BC 생산을 위한 배지 대체 물질로써 질소원이 풍부하고 ethanol이 다량 함유되어 있는 맥주 공장에서 발생하는 맥주 폐 발효액을 이용하여 *G. hansenii* PJK를 진탕배양 및 교반배양 함으로써 BC 생산을 위한 최적의 조건을 찾았자 하였다. EA(elemental analyzer)와 GC(gas chromatography)를 이용하여 본 연구에 사용된 3가지 종류의 맥주 폐 발효액을 분석한 결과 기본배지 보다 탄소원(C) 및 질소원(N)이 다량 존재하였고, 기본배지에는 없는 황(S)이 미량 포함되어 있었으며 *Cel⁻* mutants의 발생억제에 효과가 있는 ethanol을 4% 이상 함유하고 있었다. 하지만, 맥주발효과정에서 효모에 의해 발효성 당분이 분해되어 ethanol과 CO₂가 형성되므로 glucose가 거의 없기 때문에 탄소원으로 glucose를 사용하는 *G. hansenii* PJK 균주에 의한 BC 생산량은 기본배지에서 생산된 양보다는 작았다. 그럼에도 맥주 폐 발효액이 산업 폐기물임을 감안한다면 BC를 생산하는 상업용 배지를 대체할 수 있는 충분한 가능성이 있다.

Impeller의 회전속도가 증가함에 따라 CFU 수치는 증가하고 *Cel⁻* mutants의 발생비율은 감소하지만 [data not shown] 특이하게도 BC의 생산량은 300, 500 그리고 600 rpm의 impeller 회전속도 중 500 내지 600 rpm의 교반조건에서 가장 높게 나타났다. 이는 맥주 폐 발효액 내에는 고농도의 ethanol 및 미지의 배지성분이 존재하므로 600 rpm에서의 BC 생산 저하에 대한 원인은 현재로서는 불명확하며 앞으로 이에 대한 연구가 더 필요하다고 판단된다.

참고문헌

1. Brown A. J., "An Acetic Acid Ferment Which forms Cellulose," *J. Chem. Soc.*, **49**, 432-439(1886).
2. Delmer, D. P., "Cellulose Biosynthesis: Exciting Times for a Difficult Field of Study," *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 245-276(1999).
3. Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M., "Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria," *Microbiol. Rev.*, **55**, 35-58(1991).
4. Matthyse, A. G., "Role of Bacterial Cellulose Fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* Infection," *J. Bacteriol.*, **154**, 906-915(1983).
5. Rainer, J. and Luiz, F. F., "Production and Application of Microbial Cellulose," *Polym. Degrad. Stab.*, **58**, 101-106(1998).
6. Yamanaka, S. and Watanabe, K., "Applications of Bacterial Cellulose in Cellulosic Polymers," pp. 207-215. In R. Gilbert (ed), *Cellulosic Polymers, Blends and Composites*, Hanser Inc., Cincinnati, OH, USA.
7. Embuscado, M. E., Marks, J. S. and BeMiller, J. N., "Bacterial Cellulose. II. Optimization of Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Through Response Surface Methodology," *Food Hydrocoll.*, **8**, 419-430(1994).
8. Yoshino, T., Asakura, T. and Toda, K., "Cellulose Production by *Acetobacter pasteurianus* on Silicone Membrane," *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 32-36(1996).
9. Klemm, D., Schumann, D., Udhard, U. and Marsch, S., "Bacte-

- rial Synthesized Cellulose - Artificial Blood Vessels for Microsurgery," *Prog. Polym. Sci.*, **26**, 1561-1603(2001).
10. Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y. and Uryu, M., "The Structure and Mechanical Properties of Sheets Prepared from Bacterial Cellulose," *J. Mat. Sci.*, **24**, 3141-3145(1989).
11. Chanliud, E. and Gidley, M. J., "In vitro Synthesis and Properties of Pectin/*Acetobacter xylinus* Cellulose Composites," *Plant J.*, **20**, 25-35(1999).
12. Bettocchi, C., Delneri, D., Signore, S., Weng, Z. and Bruschi, C. V., "Characterization of Microbial Cellulose from a High-Producing Mutagenized *Acetobacter pasteurianus* Strain," *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 211-217(1997).
13. Park, S. H., Yang, Y. K., Hwang, J. W., Lee, C. S. and Pyun, Y. R., "Microbial Cellulose Fermentation by *Acetobacter xylinum* BRC5," *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 598-605(1997).
14. Ponyi, T., Szabo, L., Nagy, T., Orosz, L., Simpson, P. J. Williamson, M. P. and Gilbert, H. J., "Trp22, Trp24 and Tyr8 Play a Pivotal Role in the Binding of the Family 10 Cellulose-Binding Module from *Pseudomonas* xylanase A to Insoluble Ligands," *J. Biochem.*, **39**, 985-991(2000).
15. Shibasaki, H., Kuga, S., Onabe, F. and Usuda, M., "Bacterial Cellulose Membrane as Separation Medium," *J. Appl. Polym. Sci.*, **50**, 965-969(1993).
16. Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K. and De Wulf, P., "Improved Production of Bacterial Cellulose and Its Application Potential," *Polym. Degrad. Stab.*, **59**, 93-99(1998).
17. Raghothama S., Simpson, P. J., Szabo, L., Nagy, T., Gilbert, H. J. and Williamson, M. P., "Solution Structure of the CBM10 Cellulose Binding Module from *Pseudomonas* xylanase A," *J. Biochem.*, **39**, 978-984(2000).
18. Sieger, C. H. N., Kroon, A. G. M., Batelaan, J. G. and Van Ginkel, C. G., "Biodegradation of Carboxymethyl Celluloses by *Agrobacterium* CM-1," *Carbohydr. Polym.*, **27**, 137-143(1995).
19. Yu, X. C. and Atalla, R. H., "Production of Cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the Presence of 2,6-dichlorobenzonitrile," *J. Biological. Macromolecules*, **19**, 145-146(1996).
20. Jeong, Y. J. and Lee, I. S., "A View of Utilizing Cellulose Produced by *Acetobacter* Bacteria," *Food Industry and Nutrition*, **5**, 25-29(2000).
21. Yoshinaga, F., Tonouchi, N. and Watanabe, K., "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(1997).
22. Park, J. K., Park, Y. H. and Jung, J. Y., "Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK Isolated from Roten Apple," *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, **8**, 83-88(2002).
23. Son, H. J., Lee, O. M., Kim, Y. G., Park, Y. K. and Lee, S. J., "Characteristics of Cellulose Production by *Acetobacter* sp. A9 in Static Culture," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 573-577(2000).
24. Valla, S. and Kjosbakken, J., "Cellulose-Negative Mutants of *Acetobacter xylinum*," *J. General Microb.*, **128**, 1401-1408(1981).
25. Park, J. K., Jung, J. Y. and Park, Y. H., "Cellulose Production by *Gluconacetobacter hansenii* in a Medium Containing Ethanol," *Biotechnol. Lett.*, **25**, 2055-2059(2003).