

*Zoogloea ramigera*의 회분식, 유가배양, 연속배양에 의한 생물고분자 생산

안대희 · 정윤철*

한국과학기술연구원 환경연구센터 수질환경연구실

Biopolymer Production of *Zoogloea ramigera* in Batch, Fed-Batch and Continuous Culture Processes

Ahn, Dae-Hee and Yun-Chul Chung*

Water Pollution Control Lab., Environment Research Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul, Korea

Abstract — *Zoogloea ramigera* 115 was selected for the production of viscous microbial polysaccharide for biofloculants usage. Batch, fed-batch, and continuous culture processes were examined with regard to the high biopolymer production. Several carbon sources were tested, including glucose, lactose, molasses, and cheese whey. The C/N ratio of 90 was most effective for biopolymer production from glucose, while the C/N ratios of 30 for lactose and 60 for both molasses and cheese whey substrate gave a maximum production. Fed batch culture proved more effective to increase final biopolymer concentration than batch culture. Continuous fermentation with two stages modifying C/N ratio increased the productivity. The production rates were a maximum at dilution rate of 0.048 hr^{-1} for molasses and at 0.096 hr^{-1} for cheese whey.

최근 생명공학의 발달과 함께 구미, 일본 등지에서는 미생물에 의하여 분해되는 생분해성고분자(Biopolymer) 생산을 위하여 연구개발에 많은 인력과 비용을 투자하고 있다. 생물고분자는 생분해성, 원료로서 재생가능한 자원의 사용, 구조의 다양성 등의 장점을 가지고 있어 그 용도가 크게 증가할 것으로 예상된다. 대표적인 제품으로는 PHB, Xanthan gum, Pullulan 등을 들 수 있다.

선진국에서는 생분해성의 점성이 강하고 중금속 흡착능력이 높은 생물고분자를 폐수처리에 사용되는 기존 수처리제 대용 및 중금속 흡착제로 사용하려는 연구가 진행되고 있다(1-3). 현재 사용중인 응집제의 경우 무기응집제와 고분자응집제로 크게 나눌 수 있는데, 투여 후 처리수 중에 잔류하는 합성고분자 응

집제의 생체에 미치는 영향의 불확실성과 무기응집제에 의한 과량의 침전물 형성 등의 이차적인 공해 문제를 야기시킨다.

그러나 생물고분자를 응집제로 사용할 경우에 응집력이 높을 뿐만 아니라 유출수에 잔류되는 생물고분자는 자연적인 분해로 이차공해를 유발하지 않는 특성을 갖는다(4-7). 기존 수처리제를 대체할 수 있는 생분해성 고분자로는 생물응집제, 중금속 흡착제로 사용가능한 *Z. ramigera* 등에 생성되는 점성의 세포외 다당류, 슬러지의 탈수 및 중금속 흡착제로 사용될 수 있는 chitosan 및 alginate류, superabsorbent로 유망시 되는 천연 polypeptide류를 들 수 있다(8-10).

Zoogloea ramigera 115에 의하여 생성된 고분자 물질은 아직 정확한 구조가 밝혀져 있지 않지만 대개 glucose, galactose, pyruvate 등으로 구성되어 fibrillar cellulose 형태인 *Zoogloea ramigera* I-16-M 종류와 달리 수용성 capsule 형태의 다당류인 것으로 알려져

Key words: *Zoogloea ramigera*, biofloculant, biopolymer, fermentation

*Corresponding author

있다(4, 5). 생성된 고분자는 높은 점도와 분자량, 그리고 pH, 열, 기계적 전단응력에 대하여 매우 안정한 것으로 알려져 있어 여러 문헌에서 새로운 미생물산 응집제로의 사용가능성이 제시되고 있다(4-8).

본 연구에서는 glucose, lactose, molasses, cheese whey를 기질로 *Zoogloea ramigera* 115를 이용한 생물고분자의 최적 생산을 위하여 회분식 배양방법, 유가식 발효방법, 2단계 연속 발효방법을 수행하여 각각의 발효 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

대표적 floc 생성균인 *Zoogloea ramigera* 115(ATCC 25935)를 미국 ATCC로부터 구입 사용하였다. *Zoogloea ramigera* 115의 보관을 위하여는 arginine medium(arginine hydrochloride 0.5 g/l, alanine 1.0 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l, K₂HPO₄ 2.0 g/l, KH₂PO₄ 0.5 g/l, glucose 5~25 g/l, vitamin B₁₂ 1.5×10⁻⁶ M)을 사용하였고(11), 균체 배양을 위한 기질의 조성은 다음과 같다(2). Glucose 25 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, NaNO₃ 0.5~1.0 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l, yeast extract 0.01 g/l.

회분식 발효

보관중인 균주 중 single colony를 분리하여 접종용 배지를 넣은 250 ml Erlenmeyer flask에 접종하여 26 °C로 유지한 incubator에서 72시간 배양한 후 발효조에 접종하였다.

접종량은 5%(v/v)로 접종하였으며 발효조건은 다음과 같다. Working volume 3l, 온도 26°C, aeration

1 vvm, stirring 300~800 rpm 특히 발효가 진행되는 과정에서 점도의 증가로 인해 교반속도는 초기 300 rpm에서 최대 800 rpm까지 증가시켰다.

기질은 glucose, lactose, molasses, cheese whey를 사용하였다. 기질로 사용한 molasses는 glucose 8%, fructose 11%, sucrose 36%의 조성을 갖는 것으로 total sugar는 molasses 총량의 55%이다. 기질로 사용한 cheese whey는 35%(w/v)의 lactose를 함유하고 있다.

유가배양식 발효

Molasses를 기질로 한 유가배양식 실험은 먼저 회분식 발효법으로 working volume 1l, aeration 1 vvm, 온도 26°C, 교반속도 300 rpm의 반응조건에서 40시간 발효시켰다. 이 때 발효액의 조성은 다음과 같다. Molasses 11.35 g/l, NaNO₃ 1.01 g/l, K₂HPO₄ 1 g/l, KH₂PO₄ 0.5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/l, 40시간 이후부터 molasses의 농도를 달리해 가면서, 외부로부터 발효조에 연속적으로 feeding하여 발효조의 working volume이 3.2 L가 될 때까지 발효를 진행시켰다. 발효시간 40시간 이후부터 공급해 준 발효액의 조성은 다음과 같다. Molasses 22.7 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l. 즉 세포의 생물고분자 생산을 유도하기 위해서 공급해 주는 공급액에서는 질소원을 사용하지 않았다.

2단계 연속 발효

Molasses를 기질로 한 2단계 연속 배양방법은 다음과 같다.

Growth phase용 2.5l와 production phase용 5l의 jar fermentor를 사용하여, 먼저 유가배양 방법으로

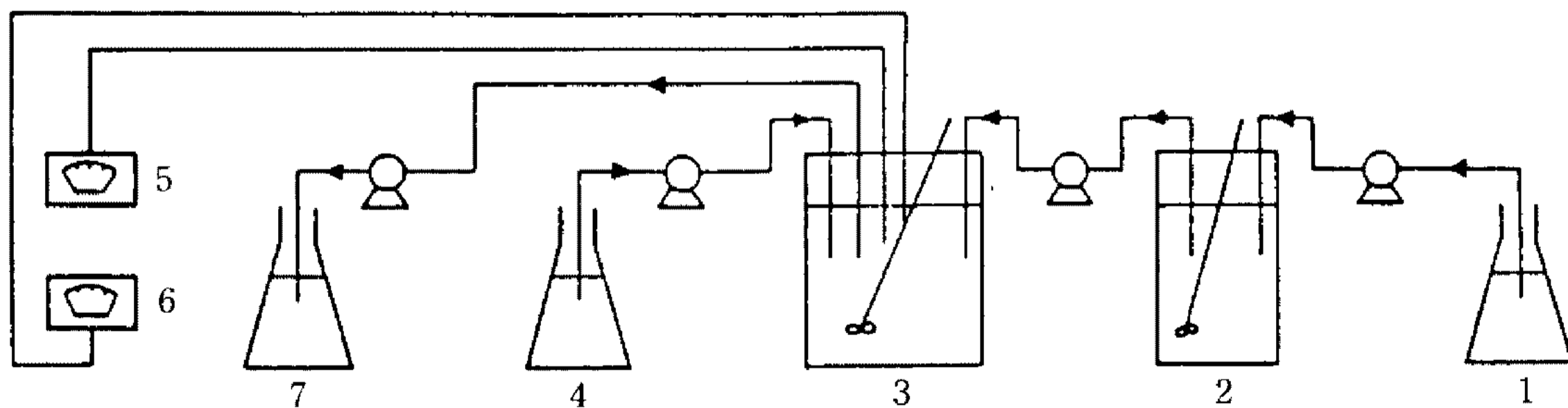


Fig. 1. Schematic diagram of two-stage continuous culture system. (1: feeding broth, 2: fermentor using growth phase, 3: fermentor using production phase, 4: feeding broth, 5: pH controller, 6: DO indicator, 7: effluents)

각각 working volume 1.5l, 2.5l, aeration 1 vvm, temp. 26°C, stirring speed 300 rpm의 반응조건에서 53시간 발효시켰다. 이때 발효액의 조성은 다음과 같다. Growth phase용, production phase용 공히 molasses 11.35 g/l, NaNO₃ 1.01 g/l, K₂HPO₄ 1 g/l, KH₂PO₄ 0.5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/l이다. 53시간 이후 연속 배양시 공급해 준 발효액의 조성은 다음과 같다. Growth phase용 발효조에 공급한 발효액의 조성은 다음과 같다. Molasses 45.45 g/l, NaNO₃ 1.908 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l이고, production phase용 발효조에는 외부로부터 질소원이 제거된 공급액과 growth phase용 발효조에서의 발효액을 같이 공급해 주었다(Fig. 1).

생성된 생물고분자 및 건조 세포 정량

생성된 생물고분자는 autoclave 방법과 ultrasonification과 high speed centrifuge 방법을 병행하여 추출하였으며 그 방법은 아래와 같다(2).

시료를 autoclave에서 10분간 steaming한 후 시료를 20초간 3번에 걸쳐서 sonicate한다. Sonicate된 시료와 증류수를 1:3의 비율로 섞은 다음 12,000g에서 40분간 원심분리하며 pellet은 제거하고 상등액만 채취한다. 채취된 상등액을 2차 centrifuge하여 pellet은 제거하고 남은 상등액만 채취하여 KCl을 함유한 propanol과 1:2의 비율로 섞은 후 4°C 냉장고에서 1시간 이상 보관한다. 응집된 물질은 55°C vacuum oven에서 일정한 무게가 될 때까지 건조시켜서 그 값을 측정한다. 위 과정에서 생성된 pellet에 원래의 volume만큼 증류수를 첨가한 후 20초간 3번에 걸쳐서 sonicate 한다. 위 과정중 시료와 증류수를 1:3의 비율로 섞는 것에서부터 55°C vacuum oven에서 건조시키는 과정을 반복하여 생물고분자량을 측정한다. 생성된 pellet은 105°C에서 2시간 동안 desiccation시킨 후 0.2 μm의 pore size를 갖는 membrane filter를 사용한 다음 건조시켜 측정된 무게를 dry cell weight로 결정하였다.

위의 과정 중 발효기질로서 complex modium을 사용하는 경우에는 생성된 pellet이 세포만으로 이루어져 있지 않기 때문에 생성된 pellet을 autoclave와 ultrasonification 방법을 사용하여 세포를 분쇄한 다음 세포의 protein양을 modify된 Lowry 방법(12)으로 측정하여 발효 중의 세포의 변화를 간접적으로 추정

하였다.

잔류기질의 농도측정

발효 중 잔류기질의 농도는 HPLC를 사용하여 측정하였다. 사용한 HPLC의 조건은 다음과 같다.

HPLC : Varian 2510, Column : Merck, Licrosorb NH₂ (10 μm), Detector : Varian RI-40, flow rate : 1 ml/min.

생물고분자 분석

기질에 따라서 *Z. ramigera*가 생산한 생물고분자를 IR, DSC, SEM을 사용하여 분석하였다.

IR : Analect FS-6160 FT IR spectrophotometer 사용

DSC : DSC V 4.08 OB Dupont 2000 사용
scanning rate : 20°C/min.

SEM : Hitachi company의 scanning electron microscope (S-510)

용액상의 점도측정

기초실험에서 낮은 점도의 경우 상온에서 Cannon Fenske 점도계를 이용하여 측정하였고, 발효조 실험시는 Brookfield helipath stand type 점도계를 사용하였다.

결과 및 고찰

회분식 발효

Zoogloea ramigera 115를 이용하여 생물고분자를 생산하는 방법에 있어서 C/N 비가 높은 경우가 C/N 비가 낮은 경우에 비하여 생물고분자 생산이 훨씬 잘 일어나며, 또한 발효시간 150시간 되었을 때 세포벽으로부터 capsule이 분리되어 발효액의 점도를 높이는 것으로 알려져 있다. 그리고 지금까지의 연구는 C/N 비 38 이하에서 총 발효시간을 200시간 정도로 하는 조건에서 실험되어졌다. 따라서 본 실험에서는 C/N 비를 38 이상으로 올렸을 경우의 생물고분자 생산추이와, 아울러 발효시간을 단축시킬 수 있는 가능성을 검토하기 위해서 기초실험을 바탕으로 C/N 비를 30, 60, 90으로 높여가면서 생물고분자 생산실험을 수행하였다.

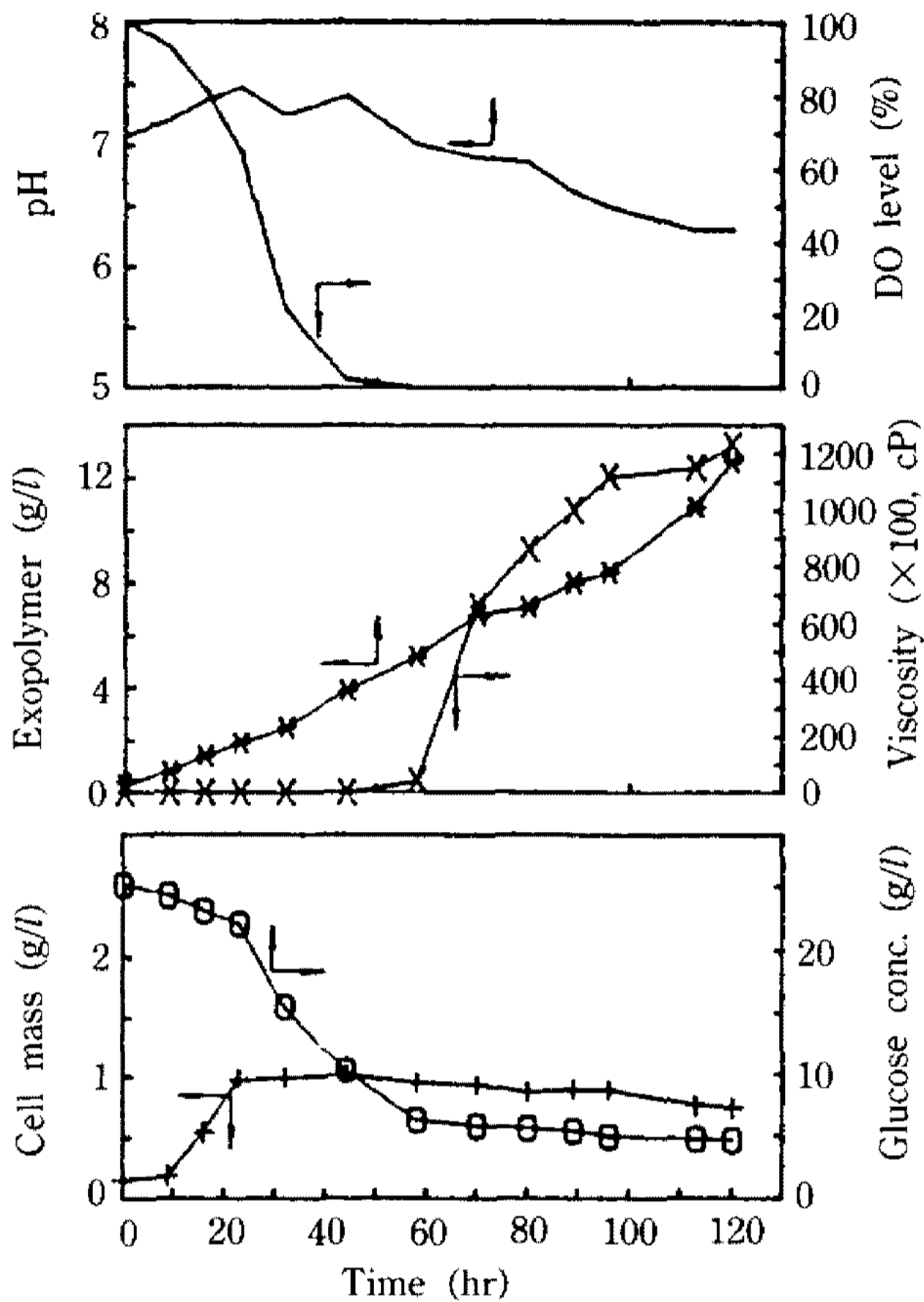


Fig. 2. Growth and exopolymer production of *Z. ramigera* 115 using glucose as substrate during batch culture in the fermentor (C/N 90).

탄소원이 glucose인 경우, C/N 60의 경우는 C/N 30에 비하여 질소원이 상대적으로 부족하여 균체량의 양은 C/N 30의 경우보다 낮았으나, 당 소모 또한 C/N 30에 비하여 천천히 이루어지고, 생물고분자가 생산되는 구간에서도 계속 소모되는 것으로 보아, 당 소모가 C/N 30에 비하여 세포성장 또는 세포의 유지에 이용되기 보다는 생물고분자 생산에 많이 이용되는 것으로 추측된다. 또한 53시간 이후부터의 점도의 급격한 증가로 보아 capsule이 세포벽으로부터 분리되는 시간도 C/N 30에 비하여 질소원이 훨씬 제한된 C/N 60 경우가 더 빠른 것으로 나타났다.

C/N 90의 경우, C/N 30, C/N 60의 경우보다 질소원이 훨씬 제한되어 균체량은 낮았지만, 고분자의 생산은 C/N 30, C/N 60의 경우보다 훨씬 짧은 발효시간에서부터 시작되어 계속 활발하게 이루어지는 것으로 나타났다. 따라서 질소원이 제한됨으로 인하여 세포의 활동이 생물고분자 생산방향으로 빨리 전환되었음을 알 수 있다. Glucose의 농도를 25 g/l로 하고 C/N 비를 90으로 했을 경우의 실험결과는 Fig. 2에 나타내었다. 기질이 lactose의 경우는 C/N 비가 30일 때, 기질이 molasses의 경우는 C/N 비가 60일 때,

Table 1. Results of exopolymer production in the batch culture

Carbon Source	NaNO ₃ (g/l)	C/N ratio	Biopolymer (g/l)	Cell (g/l)	Apparent viscosity (cP)	Y _{p/s}	Y _{x/N}	Productivity (g/l/h)	비고
Glucose (25 g/l)	2 g/l	30	8.8	3.16	64,000	0.35	9.6	0.073	
	1 g/l	60	11.4	1.53	100,000	0.46	9.3	0.095	
	0.68 g/l	90	12.6	0.99	103,000	0.50	8.9	0.105	
Lactose (25 g/l)	2 g/l	30	10.9	3.3	129,000	0.44	10.0	0.091	
	1 g/l	60	8.4	1.63	132,000	0.34	9.9	0.070	
	0.68 g/l	90	4.5	0.96	14,700	0.18	8.6	0.036	
Molasses (total sugar 25 g/l)	1.9 g/l	30	7.8	1.86	6.8	0.31	5.9	0.065	
	0.95 g/l	60	10.0	0.9	19.3	0.41	5.7	0.086	
	0.64 g/l	90	7.2	0.66	9.1	0.29	6.3	0.060	
Cheese whey (lactose 35 g/l 함유)	2.83 g/l	30	11.7	2.94	34	0.33	6.4	0.098	
	1.41 g/l	60	19.62	1.47	380	0.56	6.3	0.164	
	0.94 g/l	90	5.6	0.85	9.1	0.16	5.5	0.047	
Molasses 22.7 g/l (total sugar 12.5 g/l)	0.5 g/l	60	7.2	0.47	11.3	0.58	5.7	0.06	
Molasses 90 g/l (total sugar 49.5 g/l)	1.98 g/l	60	10.0	1.31	13.3	0.20	4.0	0.083	

*When molasses and cheese whey were used as carbon sources, cell concentration and Y_{x/N} represented protein concentration and Y_{protein/N} respectively.

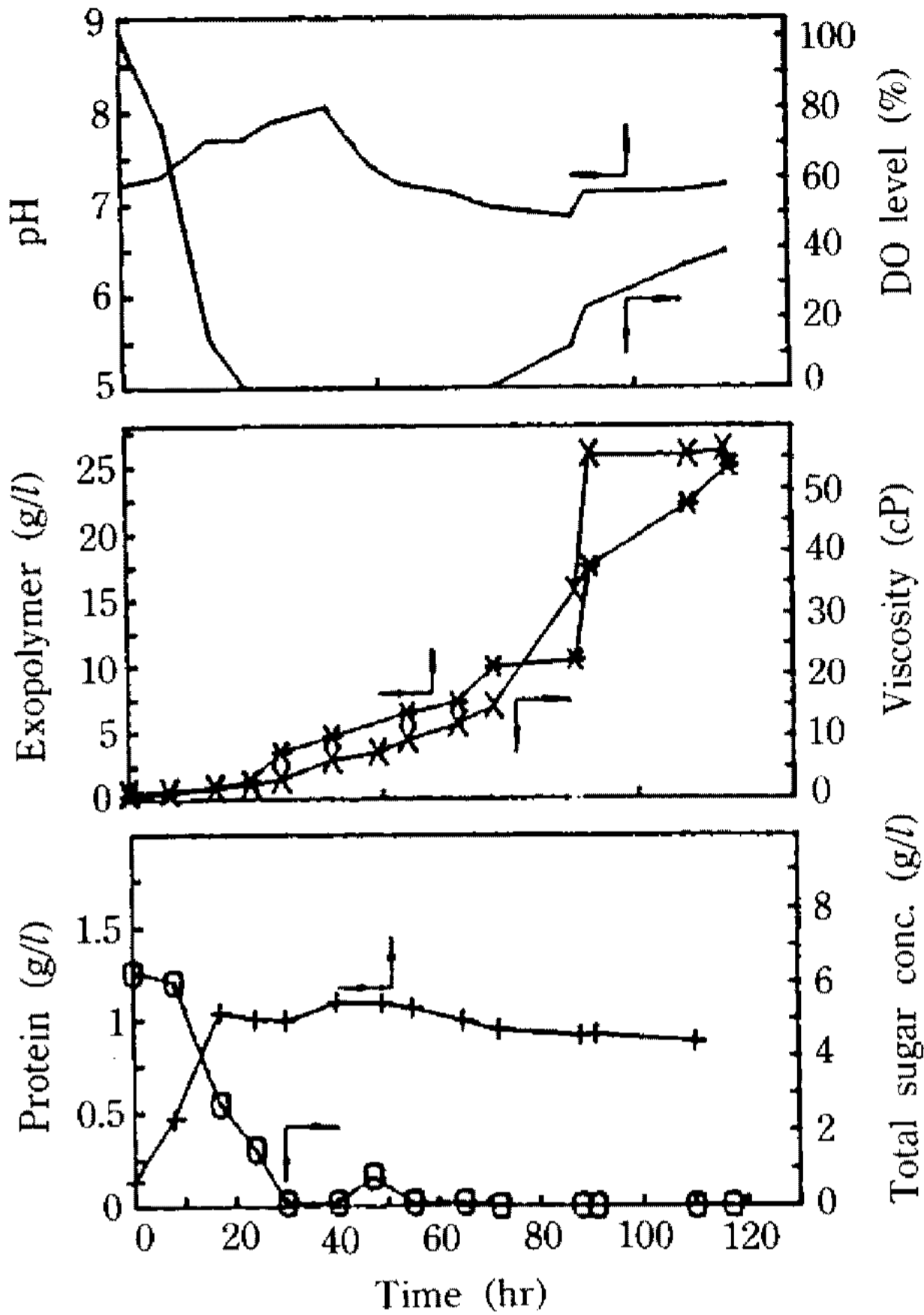


Fig. 3. Growth and exopolymer production of *Z. ramigera* 115 using molasses as substrate during fed-batch culture.

기질이 cheese whey인 경우는 C/N 비가 60일 때, 생물고분자 생산이 가장 높았다. 실험결과 molasses나 cheese whey를 기질로 사용할 경우에는 용액상의 접도가 glucose나 lactose를 탄소원으로 사용했을 때 보다 현저히 낮았다. 실험결과는 Table 1에 나타내었다.

유기배양식 발효

유기배양식 발효실험결과를 Fig. 3에 나타내었다. Molasses를 기질로 하여 실험한 결과, 세포성장을 돕고 기질의 저해현상을 줄인 유기식 발효 방법으로 인하여 molasses 22.7 g/l를 사용한 회분식 발효보다 생산성이 3.5배 증가됨을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 세포의 성장이 빨리 일어나도록 질소원을 많이 공급해 준 다음, 외부로부터 공급해 주는 공급액에는 질소원을 제한시킴으로써 기질이 세포의 성장보다는 고분자를 생산하는 방향으로 이용된 결과로 생각된다.

2단계 연속발효

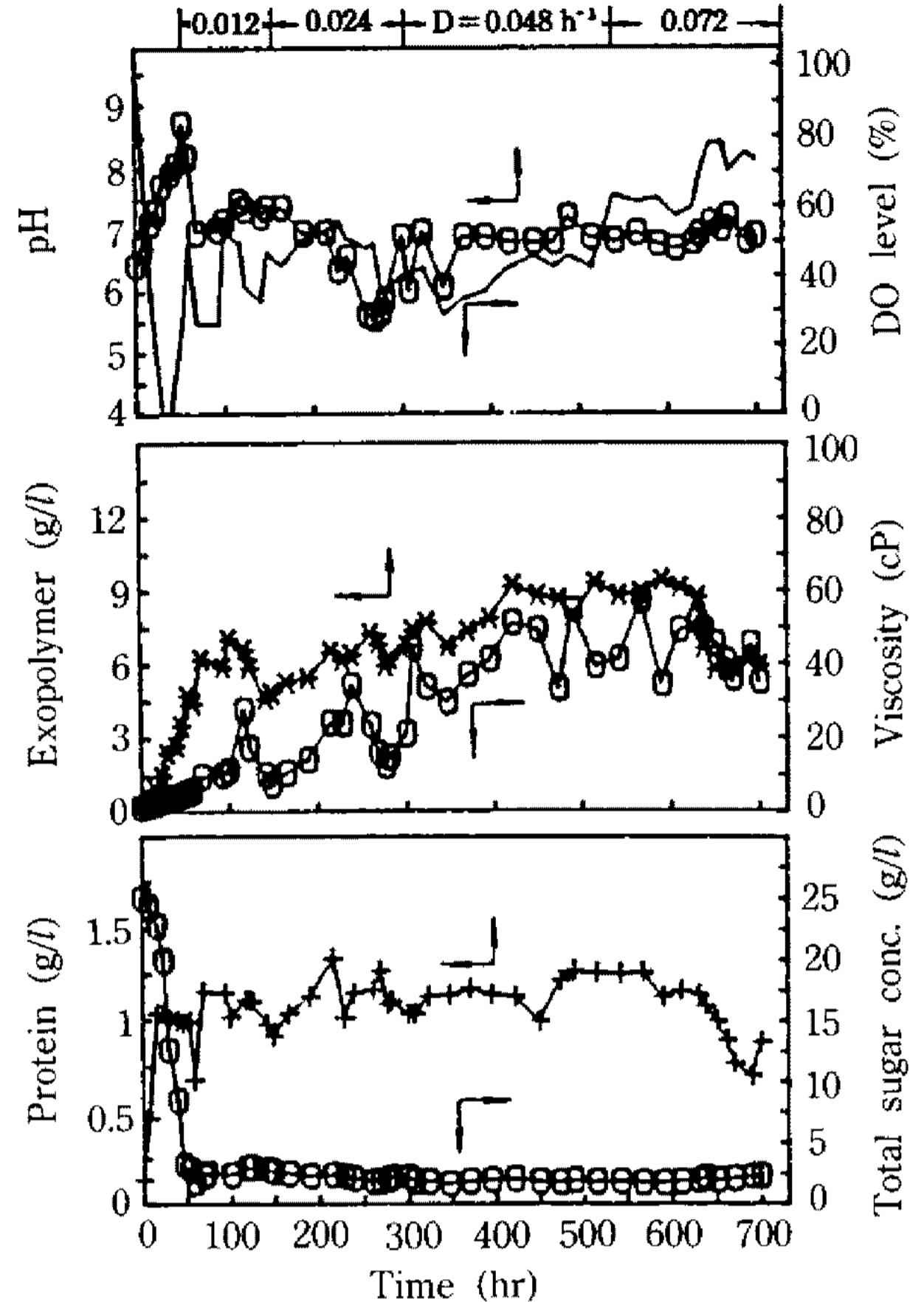


Fig. 4. Growth and exopolymer production of *Z. ramigera* 115 using molasses as substrate during two-stage continuous culture.

Molasses를 기질로 하여 발효를 두 단계로 나누어, 첫단계에서는 세포의 성장을 극대화시키고 다음 단계에서 질소원을 제한하여 생물고분자 생성을 높이는 2단계 연속발효 실험결과, protein의 양은 회석속도를 0.048 hr⁻¹까지 증가시켜도 회석속도에 관계없이 거의 일정한 값을 나타내었고, 회석속도가 증가함에 따라 생물고분자의 배출농도는 증가하였으며, 이로 인하여 생물고분자의 생산성은 회석속도 0.048 hr⁻¹에서 0.402 g/l로 최대였다. 전환수율 또한 회석속도 0.048 hr⁻¹에서 33.52%로 최대였다. 회석속도를 0.072 hr⁻¹로 증가시켰을 때에는 세포의 wash out 현상이 일어나며 생산성도 감소하였다(Fig. 4).

생물고분자의 분석

IR 분석 : Glucose를 기질로 하여 생산한 생물고분자의 IR 분석 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Glucose를 기질로 하여 생산한 생물고분자와 molasses를 기질로 하여 생산한 생물고분자의 IR 흡수가 거의 유사하게 나타났는데, 1734 cm⁻¹에서의 peak는 carbo-

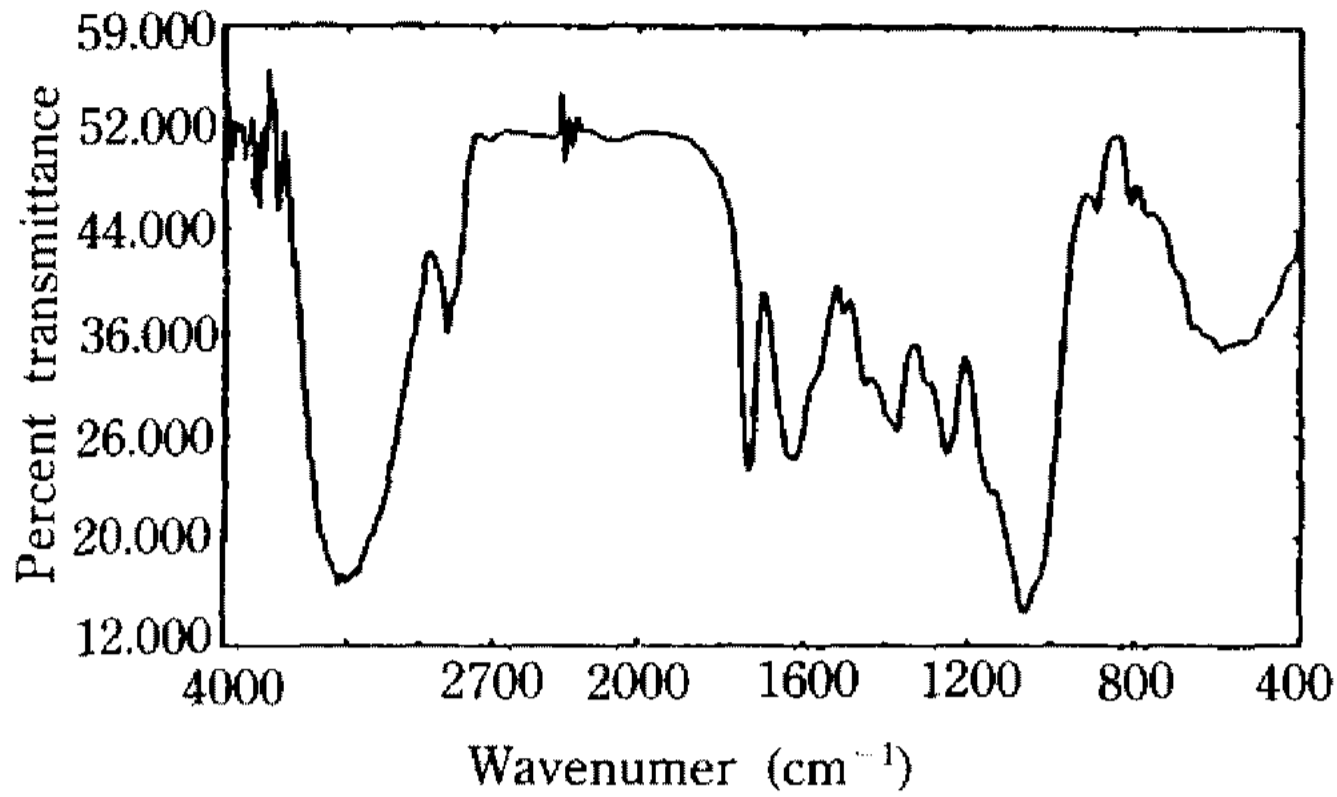


Fig. 5. I.R. absorption spectrum of exopolymer using glucose as substrate.

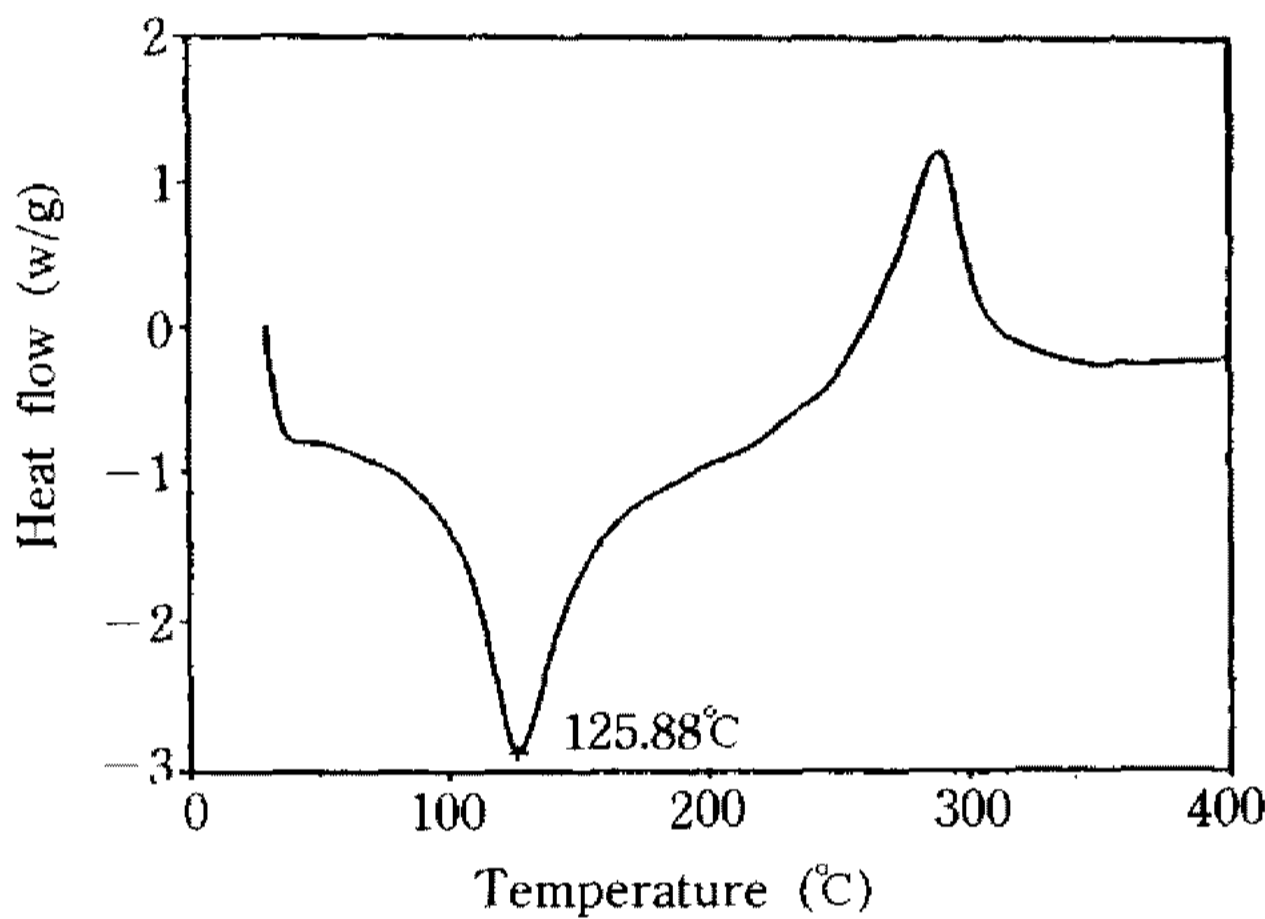


Fig. 6. DSC thermogram of exopolymer using lactose as substrate.

xyl group의 carbony기의 흡수 peak로 추정되며 3400 cm^{-1} 에서는 hydroxy기의 흡수 peak로 판단된다. Lactose를 기질로 하여 생산한 생물고분자는 cheese whey를 기질로 하여 생산한 생물고분자와 유사한 흡수 peak를 나타내었다. 더 자세한 구성당의 성분 분석과 구조해석의 확인이 필요한 것이다.

DSC 분석 : Lactose를 기질로 하여 생산된 생물고분자의 DSC 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 용해는 126 $^{\circ}\text{C}$ 에서 일어나고, 220 $^{\circ}\text{C}$ 이후 분해가 일어나는 것으로 관측된다.

SEM 분석 : Fig. 7의 (A), (B), (C) SEM 사진은 용액상의 점도가 낮았던 경우인 cheese whey를 기질로 했을 때 생성된 고분자(Fig. 7(A))와 이를 생물고분자 추출방법에 의하여 분리한 이후의 고분자(Fig. 7(B), (C))의 SEM 사진이다. (A)의 경우 고분자 표면에 cell capsule로 생각되는 물질이 나타나 있고, (B)의 경우 세포가 빠져나간 자리라고 생각되는 pore들이 관찰되었다. (C)의 경우 추출한 다음의 고

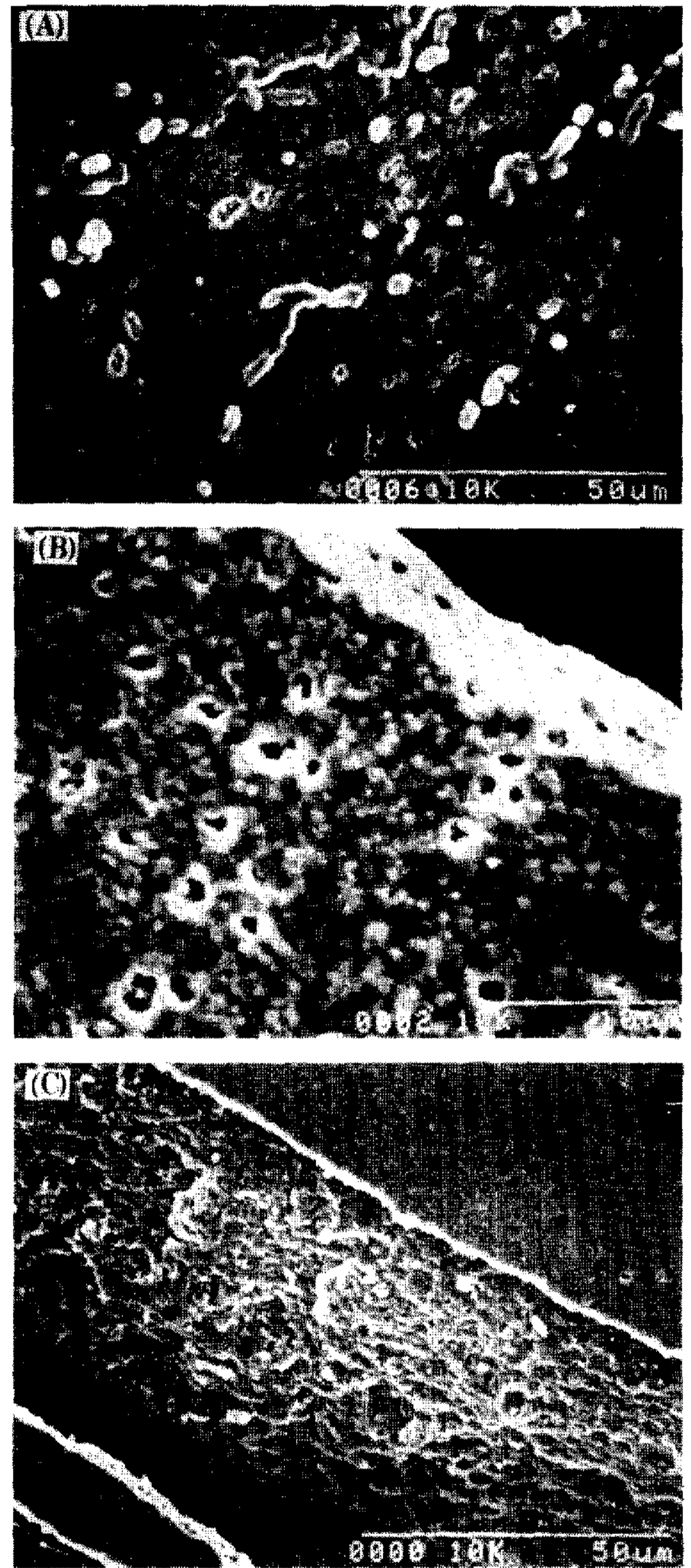


Fig. 7. SEM photograph of exopolymer using cheese whey as substrate.

(a) before, treatment, $\times 1000$, (b) after treatment, $\times 3000$ (surface), (c) after treatment, $\times 1000$ (cross section)

분자의 단면을 찍은 사진이다. 사진에서 나타나는 것처럼 pore가 많이 관찰되었다.

요 약

Zoogloea ramigera 115를 사용하여 생물응집제로서 사용되는 생물고분자생산 실험을 하였다. 생물고분자

생산을 높이기 위하여 회분식, 유가배양, 연속배양방법을 사용하였다. 탄소원으로는 포도당, 유당, 당밀, 유청을 사용하였다. 기질이 포도당의 경우에는 C/N배 98일 때 생물고분자 생산 효과가 가장 좋았으며, 유당의 경우에는 C/N비 30, 당밀과 유청의 경우에는 C/N비 60일 때 생물고분자 생산이 가장 좋았다. 유가배양 방법이 회분식 배양방법 보다 최종 생물고분자 생산이 우수하였다. C/N비를 달리한 2단계 연속 배양방법으로 생산성을 향상시켰다. 당밀의 경우 0.048 hr^{-1} 의 회석속도에서, 유청의 경우 0.096 hr^{-1} 에서 생산성이 가장 좋았다.

참고문헌

1. Crabtree, K. and W. Boyle *et al.* 1966. A mechanism of floc formation by *Zoogloea ramigera*. *J. Water Pollut. Control Fed.* **38**: 1968-1980.
2. Norberg, A.B. and S. Enfors. 1982. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1231-1237.
3. Parker, D.S. *et al.* 1971. Physical conditioning of activated sludge floc. *J. Water Pollut. Control Fed.* **43**: 1817-1833.
4. Cooper, T.A., *et al.*, 1989. Exopolysaccharide production from lactose by wild-type and polyhydroxybutyrate minus strains of *Zoogloea ramigera*. presented as poster paper at ACS 198th National Meeting, Miami, USA.
5. Sinskey, A. *et al.* 1986. Biopolymers and modified polysaccharides, In Harlander S.K., and T.P. Labuza (ed.), *Biotechnology in Food Processing*, Noyes Publ., New Jersey Pp. 73-114.
6. Nakamura, T. *et al.* 1987. Solution properties of polysaccharide flocculant produced by *Zoogloea ramigera* 115, In Y.A. Attia (ed.), *Flocculation in Biotechnology and Separation Systems*, Elsevier Science Publ., Amsterdam.
7. Esser, K. and U. Kues. 1983. Flucculation and its Implication for Biotechnology. *Process Biochem.* **18**: 21-23.
8. Magaritis, A. and G.W. Pace. 1985. Microbial Polysaccharide, Pp. 1005 In M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology* Vol. 3, Pergamon Press, New York.
9. Brown, M.J. and J.N. Lester. 1980. Comparison of Bacterial Extracellular Polymer Extraction Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 179-185.
10. Norberg, A. and S. Rydin. 1984. Development of a Continuous Process for Metal Accumulation by *Zoogloea ramigera*. *Biotech. Bioeng.*, **26**: 265-268.
11. Parsons, A.B. and P.R. Dugan. 1971. Production of Extracellular Polysaccharide matrix by *Zoogloea ramigera*. *Appl. Microbiol.* **21**: 657-661.

(Received January 11, 1992)

1. Crabtree, K. and W. Boyle *et al.* 1966. A mechanism of floc formation by *Zoogloea ramigera*. *J. Water Pollut. Control Fed.* **38**: 1968-1980.
2. Norberg, A.B. and S. Enfors. 1982. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1231-1237.
3. Parker, D.S. *et al.* 1971. Physical conditioning of activated sludge floc. *J. Water Pollut. Control Fed.* **43**: 1817-1833.
4. Cooper, T.A., *et al.*, 1989. Exopolysaccharide production from lactose by wild-type and polyhydro-