

5.1 미생물 이용의 역사

인류는 발효의 의미를 알지 못하던 시절부터 이미 미생물을 이용한 자연발효를 실생활에 이용해왔다. 구약성경의 창세기편에 롯이 술을 마신 이야기가 등장하며 우리 조상들은 먼 옛날부터 김치, 간장 등을 발효에 의해 만들어 사용하였다.

미생물은 네덜란드의 레벤후크(Leeuwenhoek)에 의해 1676년 처음 발견된 후 이 미생물이 발효, 부패, 전염병 등의 원인임이 파스퇴르(Pasteur)와 코크(Koch)에 의해 밝혀지기까지 200여 년의 시간이 소요되었다. 파스퇴르는 프랑스 포도주 양조자들의 고충인 포도주 산패를 해결하기 위하여 연구하던 중 발효는 효모의 생활작용이며 부패는 잡균에 의해 일어난다는 것을 발견하였다. 그리고 플라스크의 목을 가늘고 길게 한 장치를 사용하여 ‘생명현상은 생명으로부터’라는 사실을 입증하였고 저온살균법(pasteurization)의 발명, 광견병 백신(vaccine)에 대한 면역 개념도입, 발효현상의 학문적 해명 등 많은 업적을 남겼다. 코크는 현미경을 통하여 탄저균의 포자(spore)를 발견하고 생활상을 밝혔으며 감자질편을 이용한 미생물 순수분리(1880년), 폐결핵균의 발견 등의 업적을 남겼다. 한편 부흐너(Buchner)는 효모 추출액으로부터 알코올발효과정을 입증함으로써 생명현상은 생물체에 함유된 효소에 의해 이루어진다는 가설을 주장하였다(1897년). 그 후 플레밍(Fleming)은 1928년 푸른곰팡이로부터 페니실린을 발견하였고, 스텐리(Stanley)의 바이러스 발견(1935년), 크렙스(Krebs)의 산소호흡 대사과정 규명(1954년)을 거치며 생명현상에 대한 많은 연구가 이루어졌다. 1944년 그리피스(Griffith)는 폐렴균에 의한 형질전환실험에서 유전물질의 존재를 확인했고 에버리(Avery)에 의해 유전물질의 본질이 DNA임이 밝혀졌다. 그리고 1950년에 와트슨(Watson)과 크릭(Crick)에 의한 DNA 이중나선구조의 규명은 현

대 분자생물학(molecular biology)의 근간을 이루게 되었다.

5.2 미생물 이용의 장단점

미생물을 공업적 생산수단으로 이용할 때 화학공정에 비하여 장단점이 있다.

5.2.1 미생물 이용의 장점

미생물을 이용한 생산공정의 장점은 그 내부에 있는 효소의 촉매로서의 장점과 관련이 있다. 즉, 다양한 기질을 이용할 수 있고 반응에 특이성이 있다. 미생물은 또한 동·식물세포에 비하여 증식이 빠르므로 사용에 유리하다.

- 1) 다양한 기질(substrate)의 이용 : 다양한 기질의 이용이 가능하여 공업적 생산이나 환경적인 측면에서 미생물 이용이 효과적일 수 있다.
- 2) 반응의 특이성(specificity) : 미생물 특유의 생리적 활성으로 화학공정을 통한 화학합성보다 비교적 쉽게 생산물을 얻을 수 있다.
- 3) 빠른 증식성 : 한 세대(generation)가 약 30분에서 수 시간 안에 분열을 함으로써 빠른 증식이 가능한데 이는 단위시설에 대한 생산성(productivity)이 중요시되는 공업에서 대단히 유리하다.
- 4) 변이주(mutant)를 인공적으로 만들기 용이 : 유용한 미생물 변이주 육성이 유전자 조작을 통하여 가능하다.
- 5) 생화학적 반응 : 화학공정과 달리 상온과 상압에서 반응이 진행되어 효율면에서 유리하다.

이외에도 다양한 부산물이 다른 목적으로 재사용이 가능하고 미생물배양시 방출되는 열을 이용할 수 있으며 몇 단계의 화학반응을 단일반응과 같은 조작으로 달성할 수 있는 장점이 있다.

5.2.2 미생물 이용의 단점

미생물을 이용한 생산공정이 화학공정에 비해 갖는 두드러진 단점은 무엇보다도 오염의 문제이다. 왜냐하면 목적하는 생성물을 만들어 내는 균주 이외의 오염균의 침입은 전 공정을 무효화하는데, 공기, 물, 흙 등 도처에 이러한 오염균이 존재하기 때문이다.

- 1) 오염문제 : 철저한 관리로 잡균이나 파아지(phage)에 의한 오염을 방지하고 항상 최적의 배양 조건을 유지하여야 한다.

- 2) 생산물 분리정제의 어려움: 배양액 중에 다양한 성분이 있으므로 특정 산물의 정제 (purification)에 적합한 방법을 강구하여야 한다.
- 3) 균주의 변이: 종균(inoculum)을 연속적으로 사용할 경우 자연적인 돌연변이에 의해 성질이 변할 수 있다.
- 4) 반응 최적화의 어려움: 미생물반응은 시시각각으로 변하여 최적화(optimization)가 어려워 자동제어에 의한 방법이 강구된다.

5.3 미생물을 이용한 산업분야

미생물을 이용한 발효산업이 주류 및 발효식품 분야에는 예전부터 이용되었다. 근래에는 의약품 및 각종 고부가가치 생산물을 얻기 위하여 여러 분야로 발효산업의 발전 폭이 넓어지고 있다.

표 5.1 미생물을 이용한 산업분야

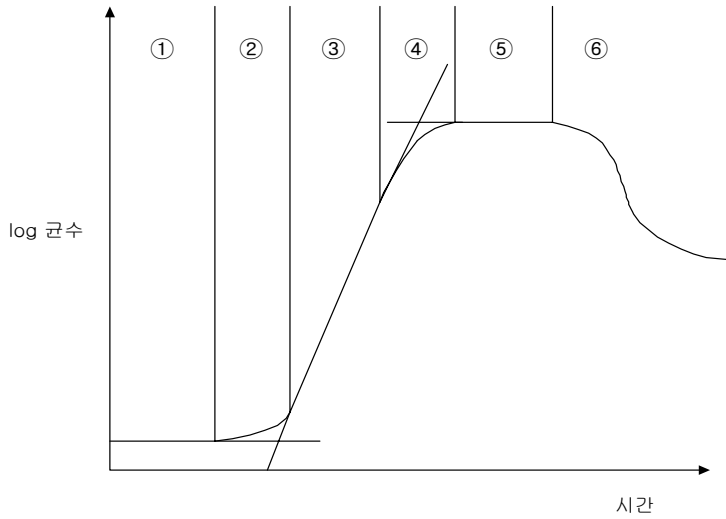
분 야	생 산 물
알코올 제조 및 주류	포도주, 맥주, 소주, 주류용 주정
발효식품	간장, 된장, 김치, 빵효모, 치즈, 요구르트
의약	penicillin, streptomycin 등
아미노산 발효공업	라이신(lycine)과 같은 각종 아미노산
효소산업	amylase, protease 등
생리활성물질	비타민류, 호르몬
균체제조업	효모균체 생산(single cell protein, SCP)
기타 분야	미생물에 의한 환경정화, 대체에너지(알코올, 메탄, 수소)의 생산 등

5.4 미생물의 생육속도론

미생물을 특정 배양조건(culture condition)에서 배양하는 경우 시간에 따른 균체농도(cell concentration)의 증가 및 배양액 중의 기질(탄소원, 질소원, 인 등) 감소 등을 정량화하여 표현함으로써 배양과정을 속도론(kinetics)적으로 해석할 수 있다.

5.4.1 증식속도(growth rate)

미생물을 회분식으로 증식시킬 경우 시간에 따른 균체의 변화를 보면 다음과 같다.



① 지연기, ② 가속성장기, ③ 지수성장기, ④ 감속성장기, ⑤ 정지기, ⑥ 사멸기

그림 5.2 미생물의 성장곡선

대수증식기의 균체 증가가 전체 성장의 핵심부분에 해당되므로 대수증식기 동안의 세포 증식에 관하여 수식으로 표현하면 다음과 같다.

$$N = N_0 \times 2^n \quad (5.1)$$

여기서

N : n 세대 후의 세포 수, N_0 : 최초의 세포 수, n : 세대 수

그러나 배지 중의 영양물질의 소모, 세포 성장을 저해하는 대사산물의 축적 등으로 인하여 이와 같은 대수증식기를 오래 지속시킬 수는 없다. 이 문제를 부분적으로 해결하기 위해서는 유가식(fed-batch) 배양에 의해 배지를 일부 제거하고 새로운 배지를 조금씩 추가함으로써 세포 성장을 지속시킬 수 있다.

5.4.2 비증식속도(specific growth rate)

단위시간당 배양조건의 효율을 나타내는 것으로 세포의 비증식속도를 사용한다. 시간 t 에 대한 균체량 X 의 평균변화율, 즉 미소시간 dt 동안에 증식하는 균체량 dX 는 그 시점에 존재하는 균체량 X 에 정비례한다고 생각하면 다음 식으로 표시된다.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (5.2)$$

또는

$$\mu \equiv \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (5.3)$$

여기서 μ : 비증식속도(h^{-1})
 X : 균체량(건조균체량 또는 흡광도로 표시)
 t : 시간(h)

예를 들어, 비증식속도(μ)가 $0.1 h^{-1}$ 이면 시간당 10% 증식함을 의미하며 비증식속도 값이 클수록 증식속도가 크다. 이 비증식속도는 미생물의 경우 대개 $0.2 \sim 1.0 h^{-1}$ 이다. 이것은 다음 절에서 설명되는 증배시간이 대개 30분에서 수시간 이내인 것과 연관된다.

5.4.3 증배시간(doubling time)

미생물을 배양하여 원래 균체량의 2배가 되는 시간을 증배시간(t_d)이라 하고 비증식속도에 관한 식 (5.3)을 적분하여 증배시간을 알아낼 수 있다.

식 (5.3)을 적분하기 위하여 변형하면

$$\frac{dX}{X} = \mu dt, \quad t=0 \text{일 때 } X = X_0 \quad (5.4)$$

식 (5.4)를 적분하면

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (5.5)$$

여기서 X : 시간 t 에서의 균체량
 X_0 : $t=0$ 에서의 균체량

식 (5.5)에서 미생물의 질량이 두 배로 증가하면 좌변은 $\ln 2$ 이므로

$$\ln 2 = \mu t_d \quad (5.6)$$

t_d : 세포의 증배시간

$$\therefore t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \quad (5.7)$$

식 (5.7)에서 세포의 증배시간은 비증식속도에 의해서 결정됨을 알 수 있다. 그리고 미생물의 경우 증배시간은 대개 30분에서 수 시간 이내이다. 대수성장 기간에는 X 를 시간에 대하여 반로그 플롯(semilogarithm plot)을 했을 때 직선이 되며 이때 그 직선의 기울기가 비증식속도이다.

5.5 미생물의 영양과 배지

미생물은 생장을 위하여 무기 또는 유기 영양물질을 섭취해서 에너지원으로 이용하거나 세포 구성 성분을 합성한다. 대표적인 영양원으로 탄소원, 질소원, 미량 영양소 또는 비타민과 같은 생육인자, 그리고 에너지원 등으로 나눌 수 있다. 무기원소 중 P, S, Mg 및 K는 비교적 다량이 필요하고, Ca, Mn, Co, Cu, Zn 등이 미량금속 원소로서 요구된다. 그리고 비타민류, 핵산 등과 같은 생육인자는 단순히 증식촉진 효과뿐만 아니라 대사조절 물질로서 생산물의 양에 영향을 미치는 경우가 있어서 최적의 농도로 조절할 필요가 있다. 세포가 필요로 하는 영양소에 대해서는 제1장에 자세히 설명되어 있다.

가장 흔히 사용되는 실험실용 배지에는 Beef Extract medium, Corn Steep Liquor medium, Glucose-Yeast Extract medium, Mineral Salt Agar medium 등이 있다. 이 중에 Glucose-Yeast Extract 배지의 조성은 다음과 같다.

Yeast extract	5.0 g
Peptone	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
NaCl	1.0 g
증류수	950.0 mL
Noble agar	13.0 g

이 배지의 pH를 6.8로 조정하고 121℃에서 15분간 멸균한다. 그리고 10%의 포도당을 별도로 멸균하여 50 mL를 가한다.

산업용으로 사용되는 미생물 배지의 탄소원으로는 사탕수수 폐당밀(sugar cane molasses), 사탕무 폐당밀(sugar beet molasses), 옥수수 폐기물(corn waste) 등이 있다. 또한 산업용 질소원으로는 암모늄염, 요소, 질산염, 옥수수 침출액(corn steep liquor), 콩가루(soya bean meal) 등이 있다.

5.6 미생물의 생장온도와 pH

5.6.1 온 도

미생물은 생장 가능한 온도의 범위에 따라 저온균, 중온균 및 고온균으로 분류된다. 저온균은 -10℃에서도 증식하는가 하면 고온균은 85℃에서도 생장이 가능하다. 그러나 이 온도 범위는 무기 촉매에 의한 반응에서 사용하는 온도 범위에 비하여 좁으며 특히 고온 부분의 온도가 일반적인 화학반응에 비하여 훨씬 낮다. 미생물의 성장속도는

표 5.2 미생물의 증식온도

구 분	증 식 온 도 (°C)			균 주
	최 저	최 적	최 고	
저온균 (Psychrophile)	-10~0	10~20	20~30	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Cladosporium</i> 균종 일부
중온균 (Mesophile)	5~15	25~40	40~55	대부분의 세균, 방선균, 곰팡이, 효모
고온균 (Thermophile)	25~40	50~60	75~85	<i>Thermus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> 균종 일부, 고 온성 곰팡이

가능한 온도 범위 내에서는 온도에 따라 지수적으로(exponentially) 증가한다. 이것은 세포의 대사과정에 관여하는 효소의 반응속도가 온도에 따라 지수적으로 증가하기 때문이다. 그러나 그 범위를 초과하면 성장속도는 급격히 저하되는데 그 이유는 세포를 구성하는 단백질과 세포구성 물질이 열변성(thermal degradation)되기 때문이다.

5.6.2 pH

미생물의 증식 및 대사반응에 대한 pH의 영향은 매우 크며 생산물의 생성속도에도 많은 영향을 미친다. 박테리아나 방선균은 pH 5~9, 효모나 곰팡이는 pH 1.5~9 에서 생육하지만 그 최적 pH는 각각 6.5~7.5 와 4~6 으로 알려져 있다. 그러나 *Thiobacillus thiooxidans* 처럼 강한 산성인 pH 0.5~1에서 생육하거나 *Nitrobacter*, *Nitrosomonas* 등 처럼 강한 알칼리성인 pH 13에서도 생육할 수 있는 미생물도 알려져 있다. 일반적인 박테리아라도 유산균(lactic acid bacteria)이나 초산균 등과 같이 산을 생산하는 균은 낮은 pH에 대해서 저항성이 있다. 미생물의 생장이 pH에 의존하는 것은 세포 내 효소의 활성이 pH에 따라 변하기 때문이다.

5.7 기본 발효공정

미생물의 발효공정은 다음과 같은 6가지 기본적인 단계로 구성되어 있다(그림 5.2).

- 1) 배지의 조제: 균의 증식이나 발효생산물을 만들기 위하여 필요한 각종 영양분을 용해시켜 배지를 만든다. 이때 균의 증식을 위한 배지와 발효를 위한 배지는 그 구성성분에 차이가 있는 것이 보통이다.
- 2) 설비의 살균: 발효장비 및 배지를 살균한다. 보통 15 psi 수증기로 121°C에서 15~30 분 간 멸균하는데 멸균시간은 배지의 양이 많을수록 증가시켜야 한다.
- 3) 종균의 준비: 주발효에 사용할 종균(inoculation)을 slant나 동결건조 상태에서 취하여

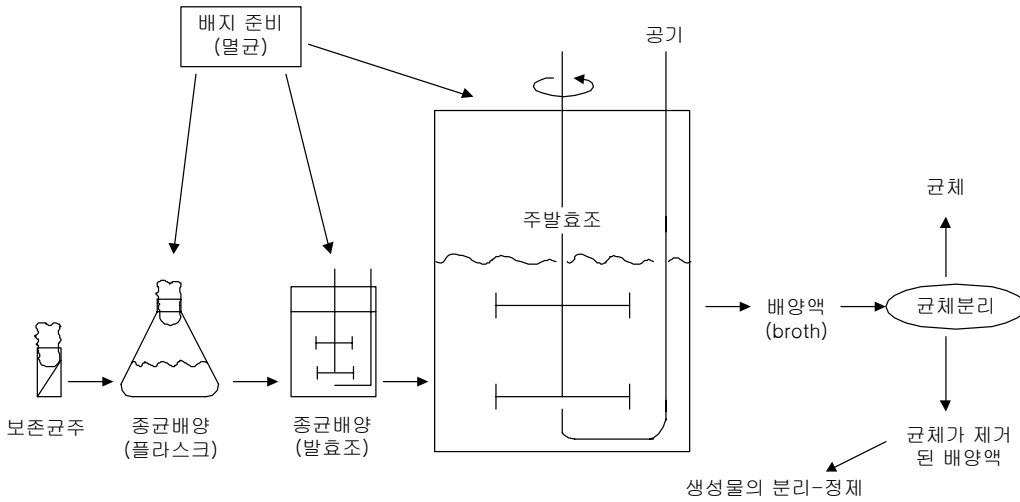


그림 5.2 세포의 생성물(extracellular product)에 대한 미생물 발효공정 단계

플라스크 진탕배양과 소규모 종배양 발효조에서 증식시킨다.

- 4) 균의 증식: 주발효조 내에서 배양조건을 최적화하여 박테리아를 증식시킨다.
- 5) 생산물의 추출과 정제: 배양액에서 균체를 분리한다. 생성물이 세포 외부로 자연적으로 유출되는 경우에는 균체가 제거된 배양액을 분리정제하는 공정이 사용된다. 그러나 생성물이 세포 내부에 갇혀 있는 경우에는 우선 세포를 파쇄하고나서 그것으로부터 생성물을 분리정제해야 한다.
- 6) 발효 폐기물의 처리

표 5.3 미생물의 성장속도에 영향을 주는 인자

구 분	고 려 사 항
배 지	<ul style="list-style-type: none"> · 영양원의 종류와 농도 탄소원, 질소원, 무기염류, 필수영양소 등 · 물리적 성상 - 고체, 액체, 점도 · 그 외의 첨가물 - 전구물질, 소포체 등 · 경제성(저렴한 원료의 사용)
온 도	<ul style="list-style-type: none"> · 미생물마다 요구하는 최적온도를 사용
산 소	<ul style="list-style-type: none"> · 호기성균의 경우 - 배양기의 종류, 교반속도, 통기량, 공기의 압력 등 · 혐기성균의 경우 - 산소를 제거한다.
접 종 균	<ul style="list-style-type: none"> · 배양조건, 접종량
pH	<ul style="list-style-type: none"> · 미생물마다 요구하는 최적 pH 사용