

***Gluconacetobacter hansenii* PJK의 bacterial cellulose 생산**

정재용, 박연희, 박중곤  
경북대학교 화학공학과 생물화공 연구실

**Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK**

Jae Yong Jung, Youn Hee Park, Joong Kon Park  
Department of Chemical Engineering, Kyungpook National University

**서론**

Cellulose는 지구상에서 가장 풍부하게 존재하는 고분자 다당류이며 고등식물의 주요 구성성분으로, 현재 제지, 펄프산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있어 소비량이 크게 증가하고 있다. 이렇게 cellulose의 소비가 급증함에 따라 그 원료로 사용되는 목재에 대한 수요도 갈수록 높아지고 있으나 원료공급과 환경문제로 인하여 제지 대체물질에 대한 연구가 절실한 형편이다. 현재까지 알려져 있는 다당류 생산은 전통적으로 식물과 해초에서 이루어져왔기 때문에 대량생산에 많은 어려움이 있었다. 따라서 미생물에 의하여 생성되는 cellulose에 대한 관심이 높아지고 있으며, 특히 *Acetobacter* strain이 생산하는 bacterial cellulose (BC)는 식물유래 cellulose에서는 찾아볼 수 없는 독특한 특성으로 인하여 식품으로서 뿐만 아니라 고부가가치 신소재 산업에서 매우 중요한 화제가 되고 있다 [1].

1886년 Brown에 의해서 최초 보고된 *Acetobacter* strain이 생산하는 BC는 hemicellulose, pectin, lignin 그리고 biogenetic product를 전혀 함유하지 않아 식물유래 cellulose처럼 펄프화 과정에서 대량의 에너지와 화학약품이 소비되는 문제점이 없다 [2]. 또한 BC fibril의 크기는 wood fibril보다 300배 적은 0.1  $\mu\text{m}$  정도이므로, 이 같은 그물 모양의 BC fibril 구조는 아주 큰 표면적을 가지며 높은 보수성과 moldability 그리고 강한 인장 강도를 가지게 된다 [3, 4]. Jayme 와 Rothamal에 의하면 BC는 cotton linter 보다 약 17배 높은 water retention value를 가진다고 보고하였다 [5]. BC의 이러한 우수한 물리학적 특성으로 인하여 스피커 진동판, 지혈대, 식이섬유 등의 실용화 소재로의 연구가 진행되고 있으며, BC막이 겔상태에서 피부에 촉감이 좋고 신체표면에 쉽게 용화되고 게다가 보수능력이 높으며, 피부표면을 일정한 보습상태로 유지할 수 있기 때문에 의료용 패드나 화장패드, 인공피부 등에 사용되고 있다 [6]. 또한 BC막은 효소의 고정화 담체 소재로 이용할 경우 유효면적이 크고, 다른 소재보다 수십 배의 효소 고정이 가능할 뿐만 아니라 내구성도 우수하다는 것이 발견되었으며 BC를 형성하고 있는 섬유를 각각 분해하여 20%의 펄프와 혼합하여 종이를 만들면 종이의 강도나 탄성률이 대조군에 비하여 2.5배 증가되는 특성도 밝혀졌다 [7].

이상과 같이 *Acetobacter* strain이 생성하는 BC는 산업용 소재, 식품 소재 등에 다양하게 활용될 수 있으며, 특히 환경 친화적 소재라는 점은 무한한 개발 가능성과 다양성을 가지고 있다. 그러나 *Acetobacter* strain은 배양 중 shear stress를 가하게 되면 cellulose를 생산하지 않는  $\text{Cel}^-$  mutation이 발생하고,  $\text{Cel}^-$  mutant는 BC 생산균주보다 증식속도가 빠르기 때문에 연속적인 통기 교반 배양에서는 생산주가 도태되어 비생산주가 배양의 주체로 되는 특성[8]으로 인하여 종래에는 생산성이 매우 낮지만 긴 배양시간과 많은 노동력을 필요로 하는 정치배양을 이용하여 BC를 생산하였다[9]. BC의 생산성을 향상시키기 위한 시도로 교반배양 조건에서도 효과적으로 BC를 생산할 수 있는 균주를 선별하고 BC의 생산에 영향을 미치는 영양인자에 대한 연구가 계속되고 있지만 여전히 산업화하기에는 그 생산성이 매우 낮다. 따라서 이러한 문제를 해결하고 다량의 BC를 생산하기

위해서는 교반배양 하에서도  $Cel^-$  mutant가 생기지 않는 유전적으로 안정한 미생물의 분리와 배양조건의 검토에 대한 연구가 절실한 형편이다.

따라서 본 연구에서는 교반배양 조건에서도 BC 생산력을 잃지 않는 유전적으로 안정한 *Acetobacter hansenii* PJK를 이용하여 BC 생산특성과 BC 생산에 영향을 미치는 배양조건에 대하여 조사함으로써 BC 생산성을 향상시키고자 한다.

## 실험

### 균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 부패한 사과로부터 분리한 *Gluconacetobacter hansenii* PJK를 사용하였으며, 균주배양을 위한 기본 배지의 조성은 glucose 10 g/L, yeast extract 10 g/L, peptone 7 g/L, acetic acid 1.5 ml/L, succinic acid 0.2 g/L이며 배지의 pH는 5.0으로 보정하였다. 균주보관을 위한 고형배지는 기본배지 조성에 agar를 첨가하였다.

### 배양조건

50 mL의 배지가 함유된 250 mL 용량의 삼각 플라스크에 고형배지에서 보존중인 균주를 백금으로 접종하여 30°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양액은 멸균된 mesh(400, 38  $\mu$ m)로 여과하여 균일한 세포 현탁액을 얻은 후 세포 현탁액 5%를 본 배양액 50 mL가 함유된 250 mL 용량의 삼각 플라스크에 접종하여 30°C에서 5일간 200 rpm으로 진탕배양 하였다.

### 균체량 및 BC 생산량 측정

배양액 50 mL를 4000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 2회에 걸친 증류수 세척 및 원심분리 과정을 거치고 동결건조(-50°C) 시켜 균이 포함된 BC의 건조중량을 먼저 구하였다. 그 후 균이 포함된 BC에 20 mL의 0.3 N NaOH를 첨가하여 5분간 끓임으로써 세포를 모두 용해시켰으며 세포가 제거된 순수 BC는 중성이 될 때까지 충분히 세척한 후 동결 건조하여 건조중량을 측정하였다. 균체의 건조중량은 균이 포함된 BC의 건조중량과 순수 BC의 건조중량과의 차이를 이용하였다.

## 결과

- 1) 배양 3일 이후에 정지기를 나타내었으며 cell과 BC의 건조중량은 각각 약 2.3 g/L, 1.3 g/L을 나타내었다.
- 2) BC의 생산량을 높이기 위해서는 배양 중 생성된 BC 표면의 cell을 접종하는 것보다 상등액의 cell을 접종하여 200 rpm의 진탕 속도로 배양하는 것이 더 효과적인 것으로 나타났다.
- 3) 배지의 초기 pH를 4.5~6.5로 조절하여 배양한 결과, pH 4.5~6.0에서 비슷한 BC 생산능을 보였으며, pH 5.0에서 1.37 g/L로 최대의 BC 생산능을 나타내었다.

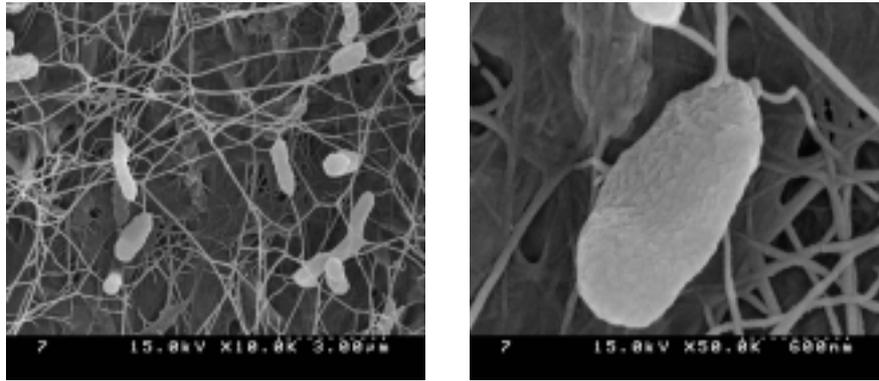


Figure 1. SEM of the BC and cell produced by *Gluconacetobacter hansenii* PJK

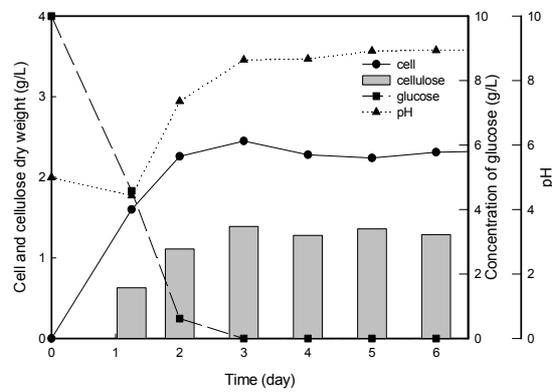


Figure 2. Time course of cellulose production

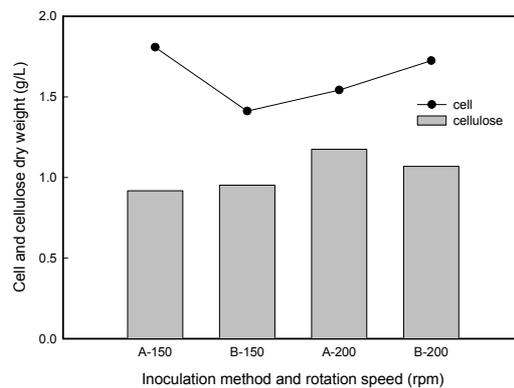


Figure 3. Effects of inoculation method and rotation speed on cellulose production  
 A: inoculated with cells of supernatant, B: inoculated with cells of cellulose surface

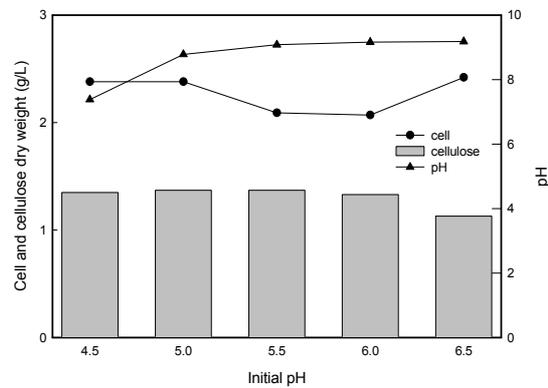


Figure 4. Effect of initial pH on cellulose production

### 감사

이 논문은 2002년도 경북대학교특성화사업팀(KNURT) 연구비에 의하여 연구되었음.

### 참고문헌

1. Delmer, D. P. and Amor, Y.: *Plant Cell*, **7**, 987(1995).
2. Jayme, G. and Rothamal, G.: *Papier* (Darmstadt), **2**, 7(1948).
3. Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K. and De Wulf, P.: *Polym. Degrad. Stabil.*, **59**, 93(1998).
4. Valla, S. and Kjosbakken, J.: *J. General Microb.*, **128**, 1401(1981).
5. Embuscado, M. E., BeMiller, J. N. and Marks, J. S.: *Food Hydrocoll.*, **10**(1), 75(1996).
6. Toda, K., Asakura, T., Fukaya, M., Entani, E. and Kawamura, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **84**(3), 228(1997).
7. Tomoyuki, Y., Tomoko, A. and Kiyoshi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **81**(1), 32(1996).
8. Dieter, K., Dieter, S., Ulrike, U. and Silvia, M.: *Prog. Polym. Sci.*, **26**, 1561(2001).
9. Yang, Y. K., Park, S. H., Hwang, J. W., Pyun, Y. P. and Kim, Y. S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**(3), 312(1998).