

## *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145를 이용한 Bacterial Cellulose 및 초산발효에 미치는 Ethanol의 영향

이오석 · 장세영\* · 정용진\*†

계명대학교 전통 미생물자원개발 및 산업화연구센터  
\*계명대학교 식품가공학과

### Effect of Ethanol on the Production of Cellulose and Acetic Acid by *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145

Oh-Seuk Lee, Se-Young Jang\* and Yong-Jin Jeong\*†

Dept. of TMR Center, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea  
\*Dept. of Food Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

#### Abstract

We investigated the effect of ethanol on the production of cellulose and acetic acid fermentation by *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145. Results showed that bacterial cellulose productivity was highest when 2% ethyl alcohol was added to apple-juice medium. For acetic acid production, 7% ethyl alcohol was needed. Optimal concentration of ethyl alcohol was 5% for simultaneous production of bacterial cellulose and acetic acid. For simultaneous production of bacterial cellulose and acetic acid, optimal nitrogen source and optimal concentration were corn steep liquor and 15% (w/v), respectively. Optimal culture time for simultaneous production of bacterial cellulose and acetic acid was 14 days. At the optimal condition, *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145 produced 7.55 g/L of bacterial cellulose (dry weight).

**Key words:** *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145, bacterial cellulose, static culture, vinegar, ethanol

#### 서 론

식초는 전분질과 알콜을 원료로 생산하는 양조식초와 빗초산, 물, 향신료 및 착색료 등을 사용하여 제조하는 합성식초로 구분된다. 양조식초는 원료를 쌀, 주박, 레몬, 감, 사과, 포도식초 등을 사용하여 양조하는데 초산발효에 의해 생성되는 초산이 주성분으로 함유되어 있으며, 소량의 휘발성 또는 비휘발성의 유기산, 당류, 아미노산 및 그 ester 등이 함유된 특유한 방향과 신맛을 가진 대표적인 발효식품이다(1,2). 식초의 국내 규격은 감식초는 초산함량이 2.6 이상, 기타 식초는 4.0~20.0로 되어 있으나 유럽 등에서는 초산 4.0 이상의 양조식초만을 식용하도록 되어 있다(1). 식초시장은 1970년 산업화의 영향으로 빗초산을 희석하여 만든 산도가 높고 값싼 합성식초의 소비가 급격히 증가되었으나, 1980년대부터 주정을 희석하여 과즙, 무기염을 일부 첨가하여 생산되고 있는 양조식초의 소비가 급격히 증가하여 현재 주로 소비되고 있다(1,2).

양조식초 제조과정에서 종종 피막을 형성하여 오염균으로 알려진 초산균은 "곤약균 또는 vinegar plant"라는 이름으로 매우 오래 전부터 알려져 왔다(3). 1886년 Brown에 의해서 이

균이 *Acetobacter xylinum*이며, 형성된 피막성분이 식물 세포벽을 구성하는 cellulose와 동일한 것으로 보고되면서(4,5) 초산균이 bacterial cellulose를 생산한다는 사실이 널리 알려지게 되었다. 초산균에 의해 합성된 bacterial cellulose(이하 BC)는 microfibril이 수소결합에 의한 3차원적 망상구조를 이루고 있으며 결정도가 매우 높고, 보수성, 흡착성이 우수하고 원하는 형태로 성형이 가능하며, 특히 고강도 고탄력의 특징을 가지고 있다(6-9). 이러한 특성 때문에 산업적으로 여러 용도로 연구, 개발 및 이용되고 있다. 그 응용분야로는 방위산업 분야에서 방탄조끼, 의료분야에서는 인공피부, 창상 피복제, 인공관절 및 미세한 섬유구조를 이용한 반투막 제조, 음향산업 분야에서는 고음질의 스피커 진동판(cone paper)제조, 제지 분야에서는 종이의 도공액 첨가제, 정보기록용지 및 탄성유, 인장강도 등이 향상된 고품질의 종이제조에 이용할 수 있다. 또한 BC는 난소화성, 고점성의 특성을 가지고 있기 때문에 식품의 증량제, 선도 유지제 및 조직감 향상에 이용할 수 있어, 식이 섬유의 식품 소재로 개발되고 있다(6-9).

본 연구자들은 재래식 감식초에서 BC 생성능이 우수하며, 알콜내성이 높은 *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145

†Corresponding author. E-mail: yjjeong@kmu.ac.kr  
Phone: 82-53-580-5557. Fax: 82-53-580-5162

를 분리·동정한 바 있으며, BC를 생성하기 위한 최적배지를 설정하여 보고하였다(10). *G. persimmonensis* KJ145는 사과 과즙배지에 탄소원으로 pyruvate, lactate, 에탄올을 첨가하였을 때 BC 생산성이 크게 증가하였으며, 그 중 pyruvate가 BC 생산에 최적 탄소원이었으나 경제성이 떨어진다(10). 그러나 에탄올을 사용할 경우 BC의 생산성 증가와 초산발효를 병행할 수 있을 것으로 기대되었다. 따라서 본 연구에서는 탄소원 중 비교적 가격이 저렴하면서 BC 생산성이 우수한 에탄올을 사용하여 BC와 초산의 동시 발효조건을 설정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지조성

본 연구에 사용한 균주는 연구소에 보관중인 *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145(KCCM 10354, KCTC 10175BP)를 사용하였다(10). 종배양은 Lee 등(10)의 방법으로 yeast extract 0.5%, peptone 0.5%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.27%, citric acid 0.115%, glucose 2.0%(pH 6.0)으로 구성된 Hestrin and Schramm(이하 HS)배지를 사용하였으며, 30°C에서 250 rpm의 속도로 진탕배양한 후 사용하였다(11). BC 생산용 배지는 사과 농축액(50°Brix)을 4°C에 보관하면서 10°Brix로 희석한 후 각 실험에서 필요한 탄소원 및 질소원을 첨가하여 사용하였다.

### 균주배양 및 BC배양조건

종배양은 100 mL 삼각 플라스크에 20 mL HS배지를 넣고 121°C에서 15분간 살균하여 공기균주를 접종한 후 30°C, 250 rpm의 속도로 진탕하면서 48시간 동안 배양하였다. 배양액은 4°C에서 18000 rpm의 속도로 10분간 원심 분리하여 균체를 회수한 후 동량의 생리식염수를 첨가하여 2번 세척한 후 동량의 생리식염수에 재현탁하여 사용하였다.

본 배양은 100 mL 삼각 플라스크에 각 실험에서 설정된 탄소원 및 질소원을 첨가한 사과즙배지(10°Brix, pH 6.0) 20 mL를 넣고 생리식염수에 현탁된 균체현탁액 2%(v/v)첨가하여 30°C에서 정지배양하였다.

### 배양조건의 영향

초산 및 BC 생산에 미치는 초기 에탄올농도의 영향을 조사하기 위하여 사과과즙배지(10°Brix, pH 6.0)에 에탄올을 1~10%(v/v)를 농도별로 첨가하여 30°C에서 6일간 정지배양한 후 생성된 BC 및 총산을 조사하였으며, 질소원의 영향은 에탄올 3%(v/v)를 첨가한 사과과즙배지에 여러 가지 질소원을 0.5%(w/v)되게 첨가하여 조사하였다. 또한 corn steep liquor (CSL)를 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20%(w/v)까지 첨가하여 BC와 초산생산에 미치는 CSL농도의 영향은 조사하였다.

BC와 초산의 동시생산에 미치는 배양시간의 영향은 사과과즙배지(10°Brix, pH 6.0)에 에탄올 3%, CSL 15%를 첨가하여 35°C에서 20일동안 정지배양하면서 2일마다 BC생산량과

균체량을 조사하였다.

### BC 생산량 측정

생성된 BC 생산량은 전보에 보고한 방법(10)과 같이 BC를 증류수로 충분히 세척한 후 0.25 N NaOH용액에 침지시켜 하루동안 정치한 다음 동량의 0.25 N acetic acid를 넣어 중화시켰다. 다시 증류수로 충분히 세척하여 배지성분 및 균체와 불순물을 제거한 다음 80°C dry oven에서 건조시켜 건조중량을 측정하였다.

### 균체량 측정

균체의 생육정도는 Lee 등(10)의 방법에 따라 cellulase를 5%(v/v)되게 첨가하여 50°C에서 2시간 반응시켜 membrane 형태의 BC를 완전히 분해한 후 UV-visible spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### pH 및 총산의 측정

pH는 pH meter(Metrohm 691, Swiss)를 사용하여 측정하였으며, 총산은 1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH용액으로 중화적정하여 초산함량으로 환산하였다(10).

## 결과 및 고찰

### 에탄올 농도의 영향

BC 생산과 초산의 생산에 미치는 에탄올 농도의 영향을 조사한 결과 Fig. 1 및 Table 1과 같다. *G. persimmonensis* KJ145는 에탄올 2%를 배지 중에 첨가할 경우 BC를 가장 많이 생산하였으며, 에탄올을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 601%로 높게 나타났다. 에탄올의 농도가 높아질수록 BC의 생산량은 조금씩 감소하였으나 총산은 에탄올 농도에 비례하여 증

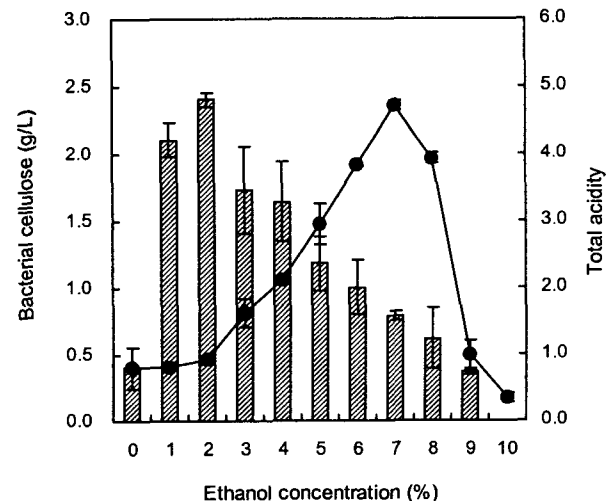


Fig. 1. Effect of ethanol concentration on bacterial cellulose production in static culture.

Data were presented as mean  $\pm$  SD (n=3).

▨: Bacterial cellulose, ●: Total acidity.

**Table 1. Effect of ethanol concentration on bacterial cellulose production in static culture**

Ethanol (%)	Relative cellulose production (%)	Total Acidity	Final pH	Final Brix
Blank <sup>1)</sup>	100	0.81 ± 0.01	2.19 ± 0.01	9.8 ± 0.3
1	526 ± 0.634 <sup>2)</sup>	0.82 ± 0.05	2.38 ± 0.13	10.2 ± 0.2
2	601 ± 0.270	0.09 ± 0.03	2.40 ± 0.04	9.3 ± 0.8
3	433 ± 1.622	1.63 ± 0.21	2.56 ± 0.05	10.6 ± 0.3
4	411 ± 1.473	2.12 ± 0.01	2.55 ± 0.06	10.3 ± 0.9
5	295 ± 1.005	2.95 ± 0.30	2.51 ± 0.05	11.0 ± 0.3
6	251 ± 1.001	3.83 ± 0.01	2.52 ± 0.01	11.2 ± 0.4
7	198 ± 0.184	4.72 ± 0.07	2.63 ± 0.04	11.7 ± 0.4
8	155 ± 1.141	3.94 ± 0.08	3.11 ± 0.36	11.6 ± 0.1
9	94 ± 0.125	1.00 ± 0.22	3.81 ± 0.24	11.6 ± 0.2
10	0 ± 0	0.34 ± 0.08	5.02 ± 0.32	11.7 ± 0.1

<sup>1)</sup>Blank: apple juice medium, 10 °Brix, Initial pH 6.0, not added ethanol.

<sup>2)</sup>Data were presented as mean ± SD (n=3).

가하였다. 그러나 에탄올 농도가 8%이상에서는 BC와 총산 모두 저해를 받아 감소하였다. 특히 10%이상에서는 균의 생육이 거의 관찰되지 않았으며, 총산의 생산량은 에탄올이 2%까지는 비슷한 경향을 나타내었으나 3%부터는 급격히 증가하여 7% 일 때 가장 많은 5.0이었다. 따라서 BC만을 대량 생산하고자 할 때에는 2%의 에탄올을 배지 중에 첨가하는 것이 가장 좋은 결과를 기대할 수 있을 것으로 생각되지만, BC 및 초산을 동시에 생산하기 위해서 5% 내외의 에탄올을 첨가하여 배양하는 것이 가장 좋을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 Naritomi 등 (12)과 Lee 등(13)이 보고한 BC의 생산에는 에탄올 농도가 1%가 최적이라는 연구결과와 Son 등(14)이 보고한 1.4%(v/v)이라는 연구결과와 조금 달랐다. 이러한 결과는 균주의 차이 및 배양방법의 차이 때문인 것으로 생각된다.

*G. persimmonensis* KJ145는 사과과즙배지에 pyruvate를 탄소원으로 첨가하였을 때 BC 생산성이 가장 좋지만 pyruvate가 다른 탄소원들에 비해 상대적으로 고가이고, 많은 양의 발효여액을 산업폐기물로 발생한다는 점에서 실제로 plant 규모에서 사용하는 데 어려움이 있다. 이와는 달리 에탄올을 탄소원으로 사용할 경우 *G. persimmonensis* KJ145는 BC의 생산성은 낮았으나 초산발효를 동시에 함으로써 부산물 즉, 발효여액을 저산도 식초로 사용할 수 있어 경제성이 높을 것으로 기대되었다.

**질소원의 영향**

BC와 식초의 동시 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과 Table 2와 같이 BC 생산에 corn steep liquor(CSL), yeast extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, peptone, trypton이 효과적인 질소원이었으며, 가장 생산성이 높은 질소원은 CSL이었다. 질소원 종류에 따른 총산의 변화는 그다지 크지 않았으며, 다만 CSL를 첨가하였을 때 총산의 함량이 다소 감소하였다. 이러한 결과는 Son 등(14)이 BC 생산에 가장 효과적인 질소원이 yeast extract라고 보고한 것과는 다른 결과이지만, Ishikawa 등(15)과 Matsuoka 등(16)이 CSL이 모든 질소원을 고려할 때 CSL이

**Table 2. Effect of nitrogen sources on bacterial cellulose production in static culture**

Nitrogen source	Bacterial cellulose (g/L)	Total acidity	Final pH	Final Brix
Blank <sup>1)</sup>	1.74	0.93	3.03	10.1
Trypton	2.11	1.06	3.25	10.6
Peptone	2.23	1.08	3.20	10.2
Casamino acid	1.47	0.96	3.17	10.2
CSL	3.48	0.65	3.14	9.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1%	2.80	0.96	2.95	10.0
Yeast extract	2.99	0.85	2.29	10.4

<sup>1)</sup>Blank: apple juice medium, 10 °Brix, pH 6.0, ethanol 3%, not added nitrogen source.

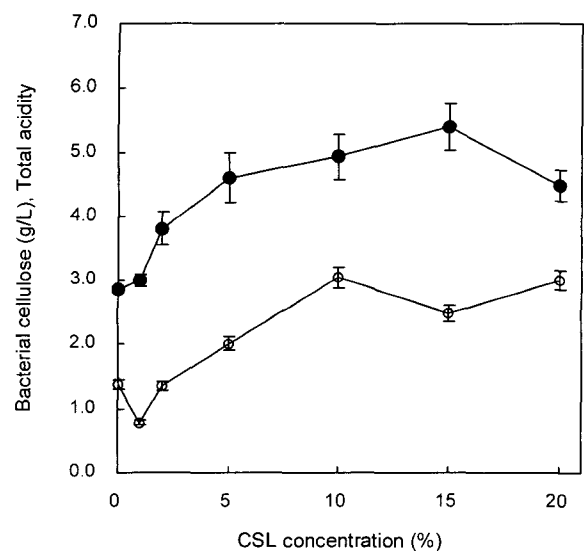
가장 효과적인 질소원이라는 연구결과와 일치하였다.

**CSL농도의 영향**

BC 및 식초생산에 미치는 CSL농도의 영향을 조사한 결과, Fig. 2와 같이 CSL 최적농도는 15%(w/v)이었으며, 이때 생산되는 BC 생산량은 질소원을 첨가하지 않은 대조구에 비해 189%까지 증가된 5.4 g/L를 생산할 수 있었다. 또한 총산은 CSL를 첨가하지 않을 경우 1.38이었으나 CSL를 10% 첨가할 경우에는 3.04로 증가하였다. 따라서 CSL의 적정 첨가량은 15%인 것으로 생각되었다. 이러한 결과는 Naritomi 등(12)이 사용한 4%(v/v)보다는 많은 양의 CSL이 요구되었으며, Lee 등(10)이 보고한 10%와는 유사한 결과였다.

**배양기간의 영향**

BC생산에 미치는 배양시간의 영향을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타낸 것과 같이 배양 4일째부터 생산량이 급격하게 증가하여 14일에 가장 높게 나타났다. 균의 증식에 있어서는 배양 2일째부터 대수증식기를 시작하여 8일째에 거의 정지기에 도



**Fig. 2. Effect of CSL concentration on bacterial cellulose production in static culture.**

*Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145 was cultured 6 days at 30°C. ●: Bacterial cellulose, ○: Total acidity.

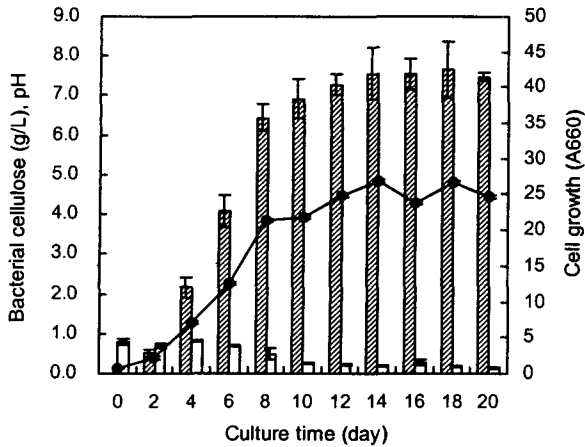


Fig. 3. Effect of culture time on the bacterial cellulose production in static culture.

Data were presented as mean  $\pm$  SD (n=3).

▨: Bacterial cellulose, □: Total acidity, ●: Cell mass.

달하는 경향을 나타내었다. 총산은 배양 4일째까지 거의 변화가 없었으나 8일째부터는 조금씩 감소하여 배양 12일경에는 최저치에 도달하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 BC를 대량 생산하기 위해서는 14~18일정도 배양하는 것이 최적인 것으로 생각되었다. 이때 생산되는 BC의 생산량은 7.55 g/L로 최적 배지인 pyruvate를 사용한 생산량의 90%에 상당하는 양이었다. 한편, 이상의 결과를 미루어 볼 때 부산물로 식초를 사용하기 위해서는 배양초기에 첨가되는 알코올의 함량이 3% 이상이 되어야만 할 것으로 사료되며, 알코올량을 증가하였을 때 생성되는 식초의 품질 및 규격에 관한 연구가 요망되었다.

## 요 약

*G. persimmonensis*-KJ145를 사용하여 BC 생산과 식초 생산에 미치는 에탄올의 영향을 조사하였다. 그 결과 사과즙스배지에 에탄올을 2%(v/v) 첨가하였을 때 BC의 생산성이 가장 좋았으며, 7%(v/v)를 첨가하였을 때 총산의 함량이 가장 높았다. BC와 식초를 동시 생산하기 위해서는 에탄올을 5%(v/v) 첨가하는 것이 가장 좋을 것으로 생각되며 발효과정 중의 식초 품질 변화에 대한 보다 자세한 연구가 요구되었다. BC와 식초 생산에 가장 효과적인 질소원은 CSL인 것으로 조사되었고 최적 농도는 15%(w/v)이었다. 배양시간의 영향을 조사한 결과 14일간 배양하는 것이 가장 많은 양의 BC를 생산하였으며, 최적조건에서 생산되는 BC 생산량은 7.55 g/L이었다.

## 감사의 글

본 연구는 계명대학교 전통미생물 자원개발 및 산업화연구센터(RRC)의 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

1. 식품의약품. 2000. 식품공전. 한국식품공업협회. p 382.
2. Jeong YJ, Lee MH. 2000. A view and prospect of vinegar industry. *Food Industry and Nutrition* 5: 7-12.
3. Lee OS, Jeong YJ. 2001. Industrial application and biosynthesis of bacterial cellulose. *Food Industry and Nutrition* 6: 10-14.
4. Brown AJ. 1886. On an acetic ferment which forms cellulose. *J Chem Soc* 49: 172-186.
5. Brown AJ. 1886. An acetic ferment which forms cellulose. *J Chem Soc* 49: 432-439.
6. Jonas R, Farah LF. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polym Degrad Stab* 59: 101-106.
7. Vandamme EJ, Baets SD, Vanbaelen A, Joris K, Wulf PD. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym Degrad Stab* 59: 93-99.
8. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* 26: 1561-1603
9. Jeong YJ, Lee IS. 2000. A view of utilizing cellulose produced by *Acetobacter* bacteria. *Food Industry and Nutrition* 5: 22-29.
10. Lee OS, Jang SY, Jeong YJ. 2002. Culture condition for the production of bacterial cellulose with *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 572-577.
11. Hestrin S, Schramm M. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: 1. Micro-method for the determination of cellulose. *Biochem* 58: 345-352.
12. Naritomi T, Kouda T, Yano H, Yoshinaga F. 1998. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *J Ferment Bioeng* 85: 598-603.
13. Lee HC, Zhao X. 1996. The optimal medium composition for the production of microbial cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Kor J Biotechnol Bioeng* 11: 550-556.
14. Son HJ, Heo MS, Kim YG, Lee SJ. 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 33: 1-5
15. Ishikawa A, Matuoka M, Tsuchida T, Yoshinaga F. 1995. Increase in cellulose production by sulfaguanidine-resistant mutants derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans*. *Biosci Biotech Biochem* 59: 2259-2262.
16. Matsuoka M, Tsuchida T, Matushita K, Adachi O, Yshinaga F. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans*. *Biosci Biotech Biochem* 60: 575-579.

(2002년 11월 14일 접수; 2003년 2월 19일 채택)