

Gluconacetobacter hansenii TF-2를 이용한 감귤과즙으로부터의 셀룰로스 겔 생산의 최적화

최경호^{1*} · 정지숙¹ · 문철호² · 김미림²

¹대구가톨릭대학교 식품영양학과

²경북과학대학 전통식품연구소

Optimization of Culture Condition of *Gluconacetobacter hansenii* TF-2 for Cellulose Gel Production

Kyoung-Ho Choi^{1*}, Ji-Suk Jeong¹, Chul-Ho Moon² and Mi-Lim Kim²

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Hayang 712-702, Korea

²Dept. of Traditional Food Institute, Kyongbuk College of Science, Gyeongbuk 718-850, Korea

Abstract

Gluconacetobacter hansenii TF-2, an isolate from black tea fungus, was statically cultivated to ferment cellulose gel from citrus juice. The juice prepared by press filtering of peeled citrus fruit contained 135.5 mg of total sugar/mL, 1.23% of total acid, and average pH of the juice was 3.98. The bacterium produced cellulose gel optimally on the surface of culture broth containing 17% of citrus juice and 10° Brix of total sugar. The optimum temperature was 30°C for producing acetic acid and gel formation. The bacterium could not produce acetic acid on gel formation at 40°C. The optimum pH was 3.0~4.0 but was not significantly different between pH 3.0~4.0. The cultivation for 18 days under optimal conditions produced gel as 14.2±0.6 mm of thickness and acids equivalent to 1.90±0.22% of acetic acid. The pH of culture broth was stabilized at 2.6~2.8 during the cultivation. Remaining sugar content was 27.1±4.2 mg/mL of total sugar and 6.9 mg/mL of reducing sugar. The gel productivity was 137.8±9.7 g/L.

Key words: citrus gel production, tea fungus, bacterial cellulose, *Gluconacetobacter hansenii* TF-2

서 론

Tea fungus는 *Acetobacter*를 주축으로 한 다양한 세균과 효모로 이루어져 있으며, 다양한 탄소원으로부터 겔을 생성한다(1,2). Tea fungus 배양액의 표면에 생성된 겔은 망상구조물인 셀룰로오스로서 bacterial cellulose로도 알려져 있으며, Brown(3)에 의해 식초산균이 셀룰로스를 생산하는 것으로 보고된 이후, bacterial cellulose 생합성균으로 *Acetobacter* 이외에도 *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Agrobacterium* 및 *Rhizobium* 등 다양한 미생물에서 셀룰로스 생합성이 확인되고 있다(4-6). 그 중에서도 *Acetobacter xylinum*은 셀룰로스 생산 능력이 뛰어나 주된 연구대상이 되어왔다(7-11). Bacterial cellulose는 일반 식물체가 생산한 cellulose에 비하여 결정화도가 높고 기계적 강도와 흡착성, 보수성, 현탁 안정성, 결합성 등의 물리적인 성질이 우수하여(12,13) 식품첨가제, 공업용 재료, 의료용 재료 등 다양한 분야(13-17)에서 소재의 실용화가 진행되고 있다. 이에 따라 정치배양에서 셀룰로스 수율이 높은 균주(18,19) 및 통기배양에 적합한 균

주(20,21)를 개발하는 등으로 생산성을 높이기 위한 연구가 진행되고 있다.

세균이 생산한 겔을 직접 식품으로 이용하는 경우로는 코코넛 과즙을 발효한 coconut gel이 섬유질 상의 건강식품으로 세계적으로 널리 이용되고 있으며(22), 국내에서도 근간홍차를 위시한 다류 또는 과즙을 이용한 겔 생산에 관한 연구(1,23-25)가 진행되고 있으나 아직 그 예가 드물다. 감귤의 국내생산량은 연간 약 680만톤으로서 단일 과일로는 국내 최대 생산량에 달하였으며, 거의 대부분이 제주도에 생산되는 관계로 지역 경제에 심각한 영향을 미치고 있다. 이런 견지에서 본 논문에서는 제주산 감귤과즙을 이용하여 식용 겔을 생산할 목적으로 과즙의 농도, 발효온도, 당 농도 등 기본적인 발효성상을 검토하였다.

재료 및 방법

과즙 및 배지

2001년 12월에 온주밀감(제주, 서귀포산)을 구입하여 박

*Corresponding author. E-mail: khchoi@cu.ac.kr
Phone: 82-53-850-3521, Fax: 82-53-850-3521

피하고 압착하여 착즙한 후 부직포와 filter paper(Whatman No.2)로 여과한 여액(이하 감귤과즙으로 약함)을 재료로 사용하였다.

감귤과즙 25 mL에 멸균증류수를 가하여 총량을 150 mL로 희석한 다음 시판 백설탕과 0.1 N NaOH를 가하여 최종 당도를 10°Brix로, pH를 3.98로 조정하고 용량 180 mL의 발효병(내경: 47 mm)에 85 mL씩 분주하여 사용하였다. 특히 pH가 겔 생성에 미치는 영향은 최소배지(sucrose 20 g, acetic acid 25 mL, peptone 5.0 g, vitamin mix. 0.5 g, mineral mix. 0.5 g/L)를 사용하여 조사하였다.

발효균

Tea fungus로부터 분리한 겔 발효균 *Gluconacetobacter hansenii* TF-2를 감귤과즙에 수회 반복배양한 후 과즙 표면에 형성된 두께 약 10 mm의 겔(이하 seed gel로 약함)을 종균으로 사용하였다.

발효 및 최적조건 설정

전 배양한 겔 5%(w/v)를 접종하고 발효병 입구를 살균 filter paper(Watman No.2)로 덮은 다음 30°C의 배양실에서 정치배양하였다. 18일간의 배양과정 중 경과일수에 따라 발효액의 pH, 총산도, soluble solid 및 겔의 두께 변화를 측정하였으며 겔 두께 및 산도를 기준으로 최적조건을 선정하였다.

산도 측정

배양액 중 총산 함량은 AOAC법(26)에 따라 삼각 flask에 배양액 10 mL를 취한 다음 bromothymol blue 2~3방울을 가하고 0.01 N 또는 0.1 N NaOH로 중화적정하였으며 acetic acid 농도(% , w/v)로 표시하였다.

pH, 당도 및 잔당 분석

배양액의 pH는 pH meter(Toledo 340, Mettler, Swiss)를, 당도는 굴절당도계(ATC-1E, Atago, Japan)를 사용하여 측정하였다. 잔당은 배양액을 syringe filter(MFS 25, Advantec, Japan)로 여과한 후 Somogyi-Nelson의 방법(27)에 따라 환원당을 분석하였으며, 총당은 0.2 N HCl로 100°C에서 30분간 가수분해한 후 환원당 검출법으로 정량하였다.

겔 생성량 측정 및 품질 평가

겔 생성량은 배양액의 표면에 형성된 겔의 백색 부분의 두께를 기준으로 평가하였으며, 겔 두께는 발효병에 눈금 모눈 종이를 부착하여 발효 경과일수에 따라 mm단위로 측정하였다. 겔의 품질은 표면의 평활도, 색상 및 이물질 부착 등을 기준으로 평가하였다.

통계처리

실험결과는 SAS package를 이용하여 평균치와 표준편차를 산출하였고 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

감귤과즙 첨가량에 따른 변화

공시한 과즙은 평균당도 13.2°Brix로서 mL당 비환원성당 102.2 mg(sucrose로 환산), 환원당 33.3 mg(glucose로 환산)을 함유하였으며 평균산도 1.23%(acetic acid로 환산), pH 3.98을 나타내었다.

감귤과즙 첨가량을 달리하여 발효시킨 결과 18일간의 발효에 의하여 Fig. 1과 같이 배지의 상층부에 두께 12~16 mm의 겔을 생성하였다. 과즙 첨가량 25% 이상(2 및 4배 희석)의 시험구에서는 겔의 아래쪽에 황색의 이물질이 부착되었고 겔의 위쪽 표면도 평활하지 못하였다. 외관상 백색으로 나타난 겔 부위의 두께는 Fig. 2와 같이 과즙 11%(9배 희석) 첨가구는 4.5 ± 2.3 mm, 17%(6배 희석) 첨가구는 15.0 ± 2.8 mm, 25%(4배 희석) 첨가구는 12.0 ± 3.6 mm로 17% 첨가구가 가장 두꺼웠으나 과즙농도 11~25% 사이에 유의성은 없었다. 첨가량 17% 이하에서는 이물질이 거의 부착되지 아니하였으며 표면의 평활도도 높았다.

산도는 발효 12일까지는 전 시험구에서 변화의 폭이 적었으나 12일 이후로 급격히 증가하여 발효 18일에는 11% 첨가구는 약 0.9%에 달하였고 17% 및 25% 첨가구는 약 1.8%에 달하였다. 발효 18일째의 산도를 기준으로 하였을 때 17%와 25% 첨가구는 유의적인 차이가 없었으나 11% 첨가구와는 유의적인 차이가 있었다($p < 0.05$). 한편, 발효액의 pH는 0일째 3.90에서 발효 18일째는 2.75~2.30으로 점차적으로 저하되었으며 첨가량 25% 이하의 시험구 사이에 유의적인 차이는 없었다.

발효온도에 따른 발효성상

배양 온도에 따른 발효계의 변화는 Fig. 3과 같다. 발효경과 18일째의 피막 두께는 25°C에서는 13.4 mm, 30°C에서는 13.0 mm로 차이가 없었으나, 35°C에서는 10.8 mm로 다소 얇아졌으며 40°C 이상에서는 겔이 생성되지 아니하였다. 겔 표면의 평활도는 30°C에서 가장 높았다.

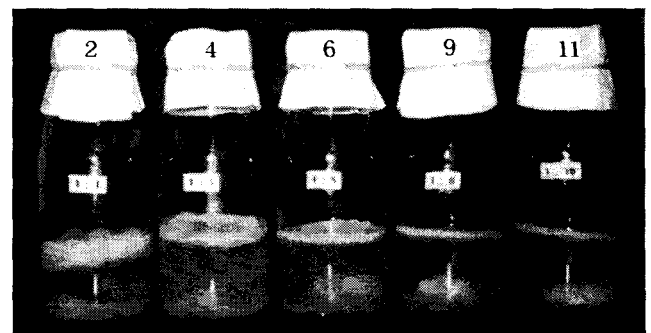


Fig. 1. Gel fermentation systems by *Gluconacetobacter hansenii* TF-2.

Gels were produced by static culture of citrus juice for 18 days at 30°C with inoculation of seed gel. Numbers at the top of bottles in the plate indicate dilution fold of the citrus juice.

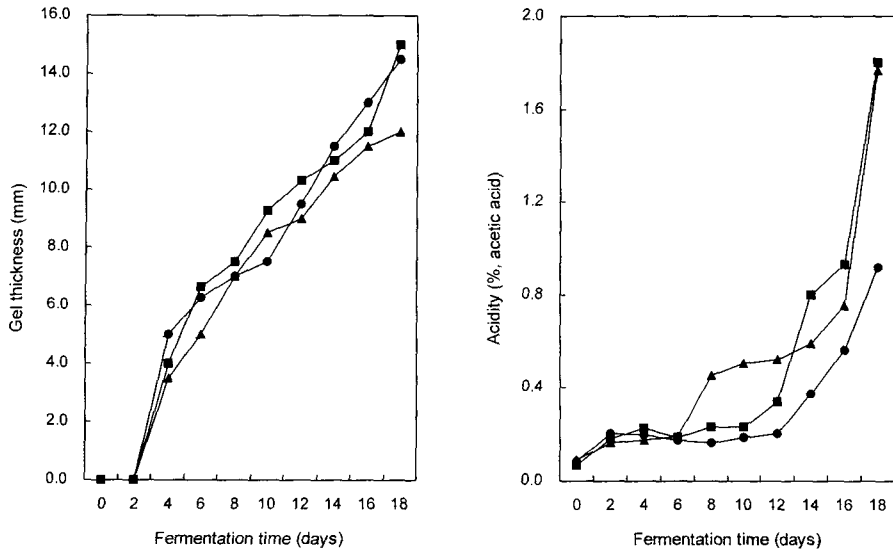


Fig. 2. Effect of citrus juice concentrations on changes in gel thickness and acidity of the culture broth during the gel fermentation by *G. hansenii* TF-2.

Symbols represent dilution folds of the citrus juice as ●: 8 folds (11%), ■: 6 folds (17%) and ▲: 4 folds (25%).

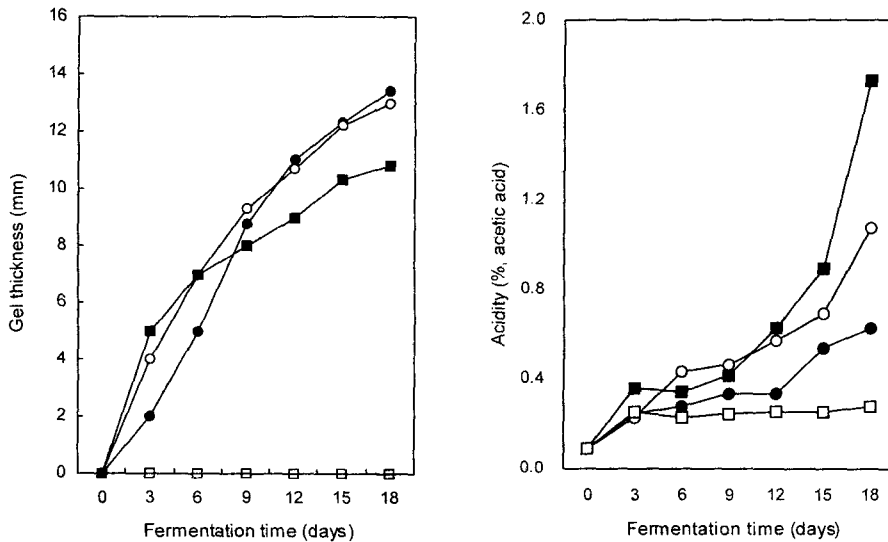


Fig. 3. Effect of temperature on changes in gel thickness and acidity of culture broth during fermentation by *G. hansenii* TF-2.

Symbols represent the fermentation temperature as ●: 25°C, ○: 30°C, ■: 35°C and □: 40°C.

발효 18일째의 총산도는 25°C가 0.63%, 30°C는 1.08%, 35°C는 1.73%로 발효온도가 높을수록 산도도 증가되었다. 그러나 발효가 정지된 40°C에서는 발효 3일에 0.22%로 증가한 후 발효 18일까지 변화가 없었다. 25~35°C에서 발효한 발효액의 pH는 0일째 pH 3.96에서 점차적으로 낮아져서 발효 18일째는 pH 2.3~2.4를 나타내었으나 40°C는 3.57로 거의 변화가 없었다.

이상의 결과는 겔이 25~35°C의 범위에서 발효될 수 있으며 생성된 겔의 평활도와 산도를 감안할 때 30°C가 최적 온도임을 나타내고 있다. Choi 등(23)도 tea fungus를 이용한 음료 발효시 30°C를 최적 온도로 보고하였으며, Jung 등(28)

과 Jonas와 Farah(29)는 각각 *G. hansenii* PJK와 *A. xylinum* 을 이용한 bacterial cellulose 발효시 30°C가 최적 온도로 보고 하였다. 한편, Lee 등(25)은 *G. persimmonus*를 이용한 cellulose 발효시 최적 발효온도를 35°C로 보고한 반면에 Son 등(30)은 *Acetobacter* sp.를 이용한 cellulose 발효에서 35°C 이상에서는 발효가 정지된다고 하였으며, Choi 등(23)은 35°C에서는 oxalic acid가 과량 생성되며 40°C 이상에서는 발효가 정지되는 것으로 보고하였다.

당 농도에 따른 발효성상

발효액의 초기 당도를 5°~20°Brix로 조정 한 뒤 30°C에서 정지배양하면서 경과일수에 따른 겔 두께를 측정 한 결과,

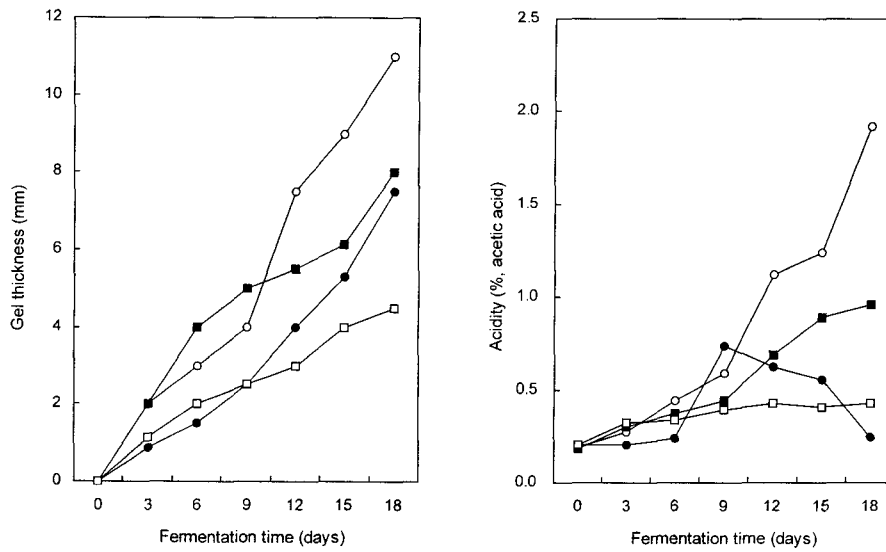


Fig. 4. Effect of sugar concentrations on gel thickness and acidity of the culture broth during gel fermentation by *G. hansenii* TF-2. Symbols represent initial sugar concentrations as ●: 5°, ○: 10°, ■: 20° and □: 30°Brix.

Fig. 4와 같이 5°Brix에서 8.8 mm, 10°에서 12.7 mm, 20°에서 8.8 mm, 30°에서 4.5 mm 두께의 겔이 생성되어 10°Brix에서 가장 두껍고 30°Brix에서 가장 얇게 생성되었다. 발효 18일째의 산도는 0.24%(5°Brix)~1.93%(10°Brix)로 변화의 폭이 컸었다. 특히 5°Brix 첨가구는 배양 9일까지 증가하다가 이후로는 감소되는 특이한 양상을 나타내었으며, 발효액의 pH는 0일의 pH 3.74~4.0에서 점차적으로 낮아져서 18일째에는 1.92(20°Brix)~3.16(5°Brix)를 나타내었다.

Bacterial cellulose 생산시에 glucose, fructose, sucrose, sorbitol, pyruvate 등 여러 가지 물질이 탄소원으로 이용되고 있으며 균주와 부재료의 첨가 여부에 따라 탄소원의 농도에 변화의 폭이 커서 직접비교는 어려우나, Lee 등(25)은 *G. persimmonus*의 배양에 10°Brix의 사과과즙이 유용한 것으로 보고하였고 Choi 등(23)도 tea fungus를 이용한 음료 발효시 10% sucrose가 가장 효과적인 것으로 보고하였다.

초기 pH가 겔생성에 미치는 영향

발효액의 초기 pH가 겔 두께에 미치는 영향은 Fig. 5와 같이 pH 2.0 이하에서는 발효가 정지되었으며 5.0 이상에서는 겔 두께가 현저히 감소되었다. 최적 pH는 3.0으로 나타났으나 3.0~4.0에서는 유의적인 차이는 없었다.

Lee와 Kim(24)은 tea fungus를 이용한 곰부차 발효시에 pH 3.0 이하에서 발효계가 안정화된다고 본 실험과 비슷한 결과를 보고한 반면에 Ko 등(31)과 Vandamme 등(13)은 *A. xylinum*을 이용하여 bacterial cellulose를 생산하고 각각 pH 5.0과 5.5를 최적 pH로 보고하였다. 한편, 본 실험에서 사용한 균주와 동일한 *Gluconacetobacter* 속에서도 Jung 등(28)은 pH 4.5~6.0을, Lee 등(25,32)은 pH 6.0을 최적 pH로 보고하는 등으로 균주와 배지의 종류에 따라 최적 pH에 상당한 차이가 있었다.

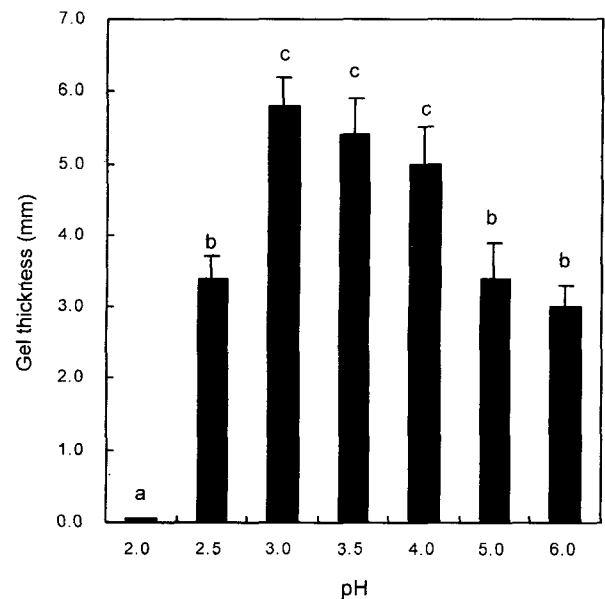


Fig. 5. Effect of initial pH of the culture broth on thickness of the gel by static cultivation of *G. hansenii* TF-2. Values were mean ± SD and those with different letters were significantly different at p<0.05.

시험발효

이상 검토된 최적조건들(과즙 17%, 당도 10°Brix, pH 3.0)을 적용하여 30°C에서 18일간 배양한 결과 Fig. 6과 같이 배양 3일 후부터 배양액의 표면에 겔이 형성되기 시작하였으며 배양 18일에는 14.2±0.6 mm로 성장하였다. 한편 배양액의 산도는 1.90±0.22%로 개별 시험시보다 다소 높게 생성되었다. pH는 2.6~2.8에서 안정되었으나 가용성 고형분은 배양 개시 후 연속적으로 증가되었다. 당도는 배양 개시시의 총당 100.3 mg/mL로부터 경시적으로 감소되어 배양 종료시에는

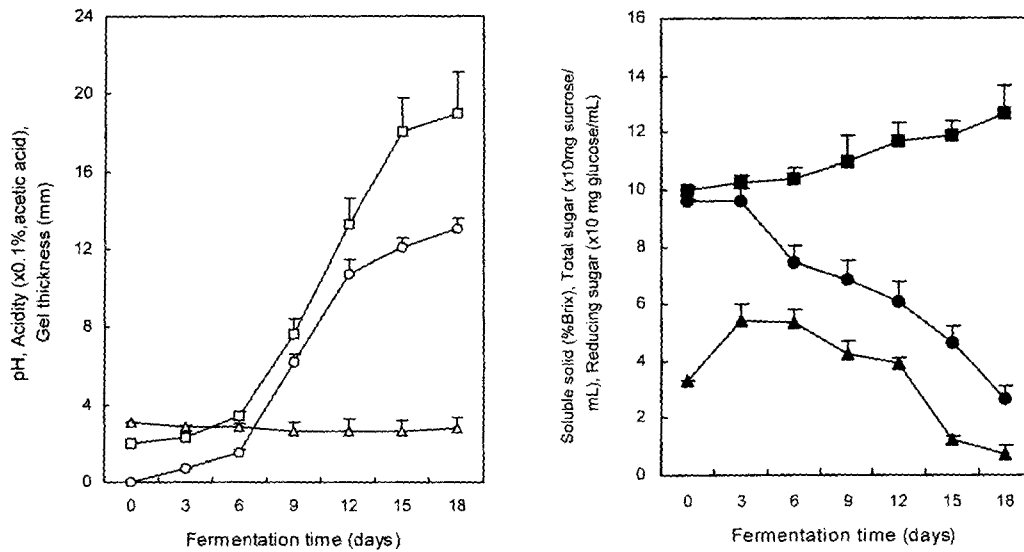


Fig. 6. Progress of gel fermentation with adoption of some examined optimal conditions and changes in residual sugar content during the gel fermentation by *G. hansenii* TF-2. Culture broth contained 17% of citrus juice and 10°Brix of sugar. Initial pH of the broth was adjusted to 3.0. Symbols are ○: gel thickness, □: acidity, △: pH, ■: soluble solid, ●: total residual sugar and ▲: reducing sugar.

27.1±4.2 mg/mL가 잔존하였다. 환원당은 초기의 33.3±2.2 mg/mL로부터 배양 3일째에는 54.2±5.9 mg/mL로 일시적으로 증가하였으며, 이 후 경시적으로 감소되어 배양 18일에는 6.9±1.2 mg/mL가 잔존하였다.

한편, 휴대형 당도계로 측정된 가용성 고형분은 실제의 당도와는 무관하게 배양개시 후 계속 증가하였다. 이는 발효에 의하여 배양액 중에 미세한 결정성 물질이 다량 생성됨을 의미하는 것으로서, Lee 등(32)도 *G. persimmonensis*의 배양 과정 중 총 셀룰로스량이 증가함에 따라 가용성 고형분도 증가하는 것으로 보고하였다.

요 약

셀룰로스성 겔을 생산할 목적으로 tea fungus로부터 분리한 *Gluconacetobacter hansenii* TF-2와 제주산 감귤과즙을 이용하여 겔 생산을 위한 최적 배양조건을 검토하였다. 발효 균은 가당한 홍차의 표면에 생성된 tea fungus로부터 분리하였으며, 과즙은 제주산 감귤을 박피하고 압착하여 착즙한 후 여과하였다. 과즙은 135.5 mg/mL의 총당과 1.23%의 산을 함유하였으며 평균 pH 3.98을 나타내었다. *G. hansenii*는 과즙 17% 희석액에 정백당을 첨가하여 초기당도를 10°Brix로 조정한 것을 가장 잘 발효하였다. 최적 발효온도는 30°C였으며 40°C 이상에서는 겔이 생성되지 아니하였다. 최적 pH는 3.0으로 판정되었으나, pH 3.0~4.0 사이에 유의적인 차이는 없었다. 검토한 조건들을 조합하여 18일간 정치배양함으로써 두께 14.2±0.6 mm의 백색 겔이 형성되었다. 이 과정에서 배양액에 1.90±0.22%의 산이 생성되었으며 pH는 2.75±0.09로 저하되었다. 발효 종료 후 배양액 중에는 총당 27.1±4.2

mg/mL, 환원당 6.9±1.2 mg/mL이 잔존하였다. 겔 수율은 137.8±9.7 g/L로 분석되었다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 농림기술지원센터 연구비 지원에 의한 연구결과와 일부이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Choi MA, Choi KH, Kim JO. 1996. Microflora occurring in the fermentation by tea fungus. *Korean J Life Science* 6: 56-65.
2. Choi KH, Choi MA, Kim JO. 1997. Flavor of fermented black tea with tea fungus. *Korean J Life Science* 7: 309-315.
3. Brown AJ. 1886. An acetic ferment which forms cellulose. *J Chem Soc* 49: 432-439.
4. Ross P, Mayer R, Benziman M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* 55: 35-58.
5. Rober EC, Steven MA. 1991. Biogenesis of bacterial cellulose. *Microbiol* 17: 435-447.
6. Matthysee AG, Holmes KV, Gurlits HG. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cell. *J Bacteriol* 145: 583-595.
7. Mastuoka M, Tsuchida K, Matwushita O, Yoshinaga F. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* sub sp. *sacrofermentans*. *Biosci Biotech Biochem* 60: 575-579.
8. Ko JY, Shin KS, Yoon BD, Choi WY. 2000. Isolation and identification of *Acetobacter xylinum* GS11 producing cellulose. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 28: 139-146.
9. Lee JE, Chung SK, Lee YW, Kim SJ. 2002. Optimization for the bacterial cellulose production of *Acetobacter xylinum* KJ1 by factorial design. *Korean J Biotechnol Bioeng* 17: 228-234.

10. Embuscado ME, BeMiller JN, Marks JS. 1996. Isolation and partial characterization of cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Food Hydrocol* 10: 75-82.
11. Benziman M, Haigler CH, Brown Jr, RM, White AR, Coop KM. 1980. Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6678-6682.
12. Chung Y, Shyu Y. 1999. The effect of pH, salt, heating and freezing on the physical properties of bacterial cellulose-nata. *International J Food Sci Technol* 34: 23-26.
13. Vandamme EJ, Baets SD, Vanbaelen A, Joris K, Wulf PD. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability* 59: 93-99.
14. Cho SH, Lee JY, Choi YS, Choi KH. 2002. Dietary effects of fiber produced from *Gluconoacetobacter hansenii* on digestive tract and lipid metabolism in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 802-807
15. Sutherland IW. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Tibtech* 16: 41-46.
16. Chung BW, Kim CY, Kang SK, Park BN. 1998. Characteristics of Korean traditional paper containing bacterial cellulose. Chonbuk National University, The Research Institute of Industrial Technology 29: 47-51.
17. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* 26: 1561-1603.
18. Kojima Y, Seto A, Tonouchi N, Tauchida T, Yoshinaga F. 1997. High rate production of bacterial cellulose in static culture strain. *Biosci Biotech Biochem* 61: 1585-1586.
19. Ishikawa A, Masuoka M, Tsuchida T, Yoshinaga F. 1995. Increase in cellulose production by sulfaguanidine-resistant mutants derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Biosci Biotech Biochem* 59: 2259-2262.
20. Yoshinaga F, Tonouchi N, Watanabe K. 1997. 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.
21. Toyosaki H, Naritomi T, Seto A, Masuoka M, Suchida T, Yoshinaga F. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. *Biosci Biotech Biochem* 59: 1489-1502.
22. TED Case Studies. 2002. Nata de coco boom and the Philippines. BPI report. Philippines.
23. Choi MA, Kim JO, Choi KH. 1996. Effects of saccharides and incubation temperature on pH and total acidity of fermented black tea with tea fungus. *Korean J Food Sci Technol* 28: 405-410.
24. Lee SP, Kim CS. 2000. Characterization of kombucha beverages fermented with various teas and tea fungus. *Korean J Food Sci Nutr* 5: 165-169.
25. Lee OS, Jang SY, Jeong YJ. 2002. Culture conditions for the production of bacterial cellulose with *Gluconacetobacter persimmonus* KJ145. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 572-577.
26. AOAC. 1980. *Official methods of analysis*. 13th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC. p 180.
- 27.還元糖の定量法. 1973. 福井作藏. 東京大學出版會, 東京. p 10-13.
28. Jung JY, Park YH, Park JK. 2003. Effect of medium composition on the bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* PJK. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 94-99.
29. Jonas R, Farah LF. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability* 59: 101-106.
30. Son HJ, Lee OM, Kim YG, Park YK, Lee SJ. 2000. Characteristics of cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in static culture. *Korean J Biotechnol Bioeng* 15: 573-577.
31. Ko JY, Shin KS, Lee JS, Choi WY. 2002. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* GS11. *Korean J Microbiol Biotechnol* 30: 57-62.
32. Lee OS, Jang JY, Jeong YJ. 2003. Effect of ethanol on the production of cellulose and acetic acid by *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 181-184.

(2003년 8월 12일 접수; 2003년 12월 10일 채택)