

## 배지조성이 *Gluconacetobacter hansenii* PJK의 Bacterial Cellulose의 교반 생산에 미치는 영향

정재용 · <sup>1</sup>장호남 · †박중곤  
경북대학교 화학공학과, <sup>1</sup>한국과학기술원 생명화학공학과  
(접수 : 2004. 9. 21., 게재승인 : 2004. 11. 10.)

### Medium Composition Affecting Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK in an Agitated Culture

Jae Yong Jung, Ho Nam Chang<sup>1</sup>, and Joong Kon Park†  
Department of Chemical Engineering, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea,  
<sup>1</sup>Department of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST, Daejeon 305-701, Korea  
(Received : 2004. 9. 21., Accepted : 2004. 11. 10.)

The effects of variation in composition of the medium on the conversion of *Gluconacetobacter hansenii* PJK cells producing cellulose (*Cel*<sup>r</sup>) to non-cellulose producing (*Cel*<sup>f</sup>) mutants and the production of bacterial cellulose (BC) in an agitated culture were investigated.

The impeller speed greater than 500 rpm was required to decrease the population of *Cel*<sup>f</sup> mutants to minimum in a basal medium containing 1.5% ethanol because the optimum impeller speed to minimize the population of *Cel*<sup>f</sup> mutants increased with the concentration of ethanol added to a basal medium. Ethanol fed-batch culture could not increase the BC production in an agitated culture unlike that of a shaking culture. The amount of BC produced in a basal medium containing 1% ethanol was 39% more than that of the same medium with 0.27% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Increase in the concentration of acetic acid in a basal medium decreased the BC production. The pH control of the culture broth increased the cell mass in the batch culture and improved the production yield of water-soluble polysaccharide (WSPS), but did not affect the production of BC.

**Key Words** : *Gluconacetobacter hansenii* PJK, bacterial cellulose, ethanol, *Cel*<sup>f</sup> mutants

#### 서론

Cellulose는 고등식물의 세포벽의 주성분으로 길고 가지가 없는 β-1, 4 결합에 의해 이루어진 고분자 다당류이다. 자연계에서 석탄에 이어 다량으로 존재하는 유기화합물이며, 공업적으로 중요한 자원으로 현재 제지와 펄프 그리고 의류산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있을 뿐만 아니라 상업적 응용분야가 매우 넓어 그 소비량이 크게 증가되고 있다. Cellulose는 식물 뿐만 아니라 *Acetobacter*와 같은 초산균도 생산한다고 밝혀진(1) 이후 일부 algae, fungi, 그리고 *Agrobacteria*, *Rhizobia*, *Sarcina* 등과 같은 미생물도 합성할 수 있는 것으로 보고 되었다(2). 그 중

*Acetobacter xylinum*이 생산하는 bacterial cellulose (BC)는 식물유래 cellulose와 달리 독특한 특성으로 인하여 식이섬유 뿐만 아니라 고부가가치 신소재로써 새롭게 부각되고 있다(3-5). 식물 cellulose는 hemicellulose, pectin, lignin을 포함하는 heteropolysaccharide로 이루어져 있는 반면, BC는 microfibril이 수소결합 하여 3차원적 망상구조를 이루고 있는 순수한 cellulose로만 이루어져 있기 때문에(4) 정제가 쉬우며 높은 water retention value와 moldability 그리고 강한 인장 강도를 가진다(6, 7). BC의 이러한 우수한 물리학적 특성으로 인하여 스피커 진동판, 지혈대, 식이섬유 등의 실용화 소재로의 연구가 진행되고 있으며, 화학적으로 안정하고 독성이 낮은 특성으로 인하여 화장패드, 인공피부, 인조혈관, paint나 ink의 thickener 등에 사용되고 있다(4, 6-9). 이상과 같이 *Acetobacter* strain이 생성하는 BC는 산업용 소재, 식품 소재 등에 다양하게 활용될 수 있으며, 특히 단기간에 대량생산이 가능한 미생물 생산의 장점을 가지고 있으며 환경 친화적 소재라는 점은 산업용 신소재

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea  
Tel : +82-53-950-5615, Fax : +82-53-950-6615  
E-mail : parkjk@kyungpook.ac.kr

생산 및 기능성 식품소재로 개발이 기대된다.

*Acetobacter* strain은 배양 중 shear rate를 가하게 되면 cellulose를 생산할 수 없는 non-cellulose producing (*Cel*) mutants가 발생되어(10) BC 생산성을 감소시키므로 생산효율이 낮으나 전통적으로 정치배양을 이용하여 BC를 생산하였다. 따라서 이러한 문제점을 최소화 하고자 최근 shear stress가 있는 배양 환경에서도 비교적 안정적이며 BC 생산능이 우수한 균주를 분리하는 연구가 활발히 진행 중이며 본 연구실에서도 정치배양보다 진탕배양에서 BC 생산수율이 더 높은 *Gluconacetobacter hansenii* PJK를 분리한 바 있다(11). *G. hansenii* PJK의 경우 에탄올이 1% 첨가된 배지에서 진탕배양을 하면 *Cel* mutant의 발생없이 안정적으로 BC 생산수율이 높아지나(12) 교반배양과 같은 강한 shear stress 환경 하에서는 에탄올을 첨가하더라도 *Cel* mutant가 다량 발생하여 BC의 생산수율이 감소되었다(11). 그러나 후속연구에서 교반 배양기내에서 발생하는 shear stress를 적절히 조절함으로써 교반배양 하에서도 *Cel* mutants의 발생 없이 BC 생산성을 높일 수 있는 최적 교반속도를 확보한 바 있다(13). 따라서 본 연구에서는 고농도 미생물 배양에 의한 BC 생산의 기반 연구로서 shear stress가 *Cel* mutant에 미치는 영향과 더불어 기타 배양조건이 교반 배양시 BC의 생산성 및 *Cel* mutants의 발생에 미치는 영향을 검토하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지조성

Cellulose를 생산하는 균주는 Park 등(11)이 부패한 사과로부터 분리한 *Gluconacetobacter hansenii* PJK (KCTC 10505 BP)를 실험에 사용하였다. 미생물 배양을 위한 기본배지의 조성은 glucose 10 g/L, yeast extract 10 g/L, peptone 7 g/L, acetic acid 1.5 mL/L, succinate 0.2 g/L이며 pH는 5.0로 보정하였다. 균주보관을 위한 고형배지는 기본배지 조성에 agar 15 g/L을 첨가하였다.

### 배양조건

50 mL의 배지가 함유된 250 mL 용량의 삼각 플라스크에 고형배지에서 보존 중인 균주를 백금이로 접종하여 30°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 그 후 배양액 5%를 3 L의 본 배양액이 함유된 5 L jar fermentor에 접종하여 30°C에서 500 rpm, 1.0 vvm의 조건으로 배양하였다. Jar fermentor는 5 L jar fermentor (Kobiotech Co.)를 사용하였으며 impeller는 6 flat-blade turbine impeller를 사용하였다

### 균체량, BC의 정량 및 glucose 농도 측정

배양액 10 mL를 3580 g로 20분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 증류수 세척 및 원심분리 (3580 g, 20분) 과정을 2회 거치고 일정한 무게가 될 때까지 동결건조 (-50°C)시켜 균이 포함된 BC의 건조중량을 먼저 구하였다. 그 후 균이 포함된 BC에 20 mL의 0.3 M NaOH를 첨가하여 5분간 끓임으로써 세포를 모두 용해시켰으며 filter paper (No. 2, Whatman Co.)가 장착된 filter flask를 사용하여 용액을 제거

하였다. Filter paper에 걸러진 BC에 과량의 증류수를 투과하여 중성이 될 때까지 세척한 후 동결 건조하여 순수 BC의 건조중량을 측정하였다. 균이 포함된 BC의 건조중량과 순수 BC의 건조중량과의 차이로 균체의 건조중량을 측정하였다. Glucose의 농도는 glucose reagent kit (510-A, Sigma Co.)로 측정하였다.

### Water-soluble polysaccharide의 정량

*G. hansenii* PJK는 배양 중 BC 뿐만 아니라 부산물로 glucuronic acid만으로 구성된 homopolysaccharide인 water-soluble polysaccharide (WSPS)도 생산한다(13). WSPS의 생산량은 Valla와 Kjosbakken(14)의 방법을 일부 수정하여 건조중량으로 측정하였다. 배양액을 3580 g로 20분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후 상등액의 5배에 해당하는 에탄올을 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응용액을 3580 g로 20분간 원심 분리하여 침전물을 얻은 후, 이를 증류수에 완전히 현탁하였다. 앞에서 언급된 방법으로 반응용액에 다시 에탄올로 반응시켜 원심 분리한 후 침전물은 항량이 될 때까지 60°C 항온 건조기에서 건조시켜 WSPS의 건조중량을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 에탄올의 공급 형태에 따른 BC 생산

*G. hansenii* PJK를 기본 배지에서 200 rpm으로 진탕 배양할 경우 배양 초기에 첨가되는 에탄올의 농도가 1%일 때 최대 BC 생산량을 나타내었다(12). 그러나 교반 배양의 경우 500 rpm의 빠르게 회전하는 impeller로 인하여 배양액이 진탕 배양의 경우에 비해 복잡한 흐름 형태로 교반되고 배양기 바닥에 있는 air sparger를 통하여 air가 연속적으로 공급되므로 배양 중 에탄올의 손실이 진탕 배양의 경우보다 클 것이다. 따라서 본 연구에서는 배양 중 에탄올의 손실을 고려하여 배양 초기에 1.0%와 1.5% 에탄올을 각각 첨가하여 에탄올 농도의 변화에 따른 균체의 성장 및 BC의 생산량을 측정하였다.

**Table 1.** Effect of concentration of ethanol on production of BC. Cells were cultivated in a 5 L jar fermentor in a basal medium containing 1.0% ethanol and 1.5% ethanol, respectively, at aeration rate of 1 vvm, agitation rate of 500 rpm and working volume of 2 L for 44 hours.

|      | Dry weight (g/L)             |      |
|------|------------------------------|------|
|      | Concentration of ethanol (%) |      |
|      | 1.0                          | 1.5  |
| BC   | 1.42                         | 1.01 |
| Cell | 2.39                         | 3.05 |
| WSPS | 0.60                         | 0.20 |

Table 1에서 보는 바와 같이 에탄올의 농도가 1.0%에서 1.5%로 증가하면 균체의 양은 약 11% 증가하였으나 BC와 WSPS의 생산량은 각각 약 38%, 67% 감소하였다. 진탕배양의 경우에도 배지에 첨가되는 에탄올의 농도를 1.0%에서 1.5%로 증가시키면 균체는 약 4%, BC는 약 13% 감소하였다(12). 따라서 교반 배양시 500 rpm의 교반속도로 배양을

하더라도 배양 초기에 1.5% 에탄올을 첨가하는 것은 BC생산에 효과적이지 않다는 것을 알 수 있다. 또한 1% 에탄올이 첨가된 경우 배양 52시간까지 *Cel* mutant가 전혀 나타나지 않았으나(13) Table 2에서 보는 바와 같이 1.5% 에탄올이 첨가된 경우 배양 52시간 후 최대 7.8%의 *Cel* mutant가 발생하여 비록 1% 에탄올이 첨가된 경우보다 균체의 전체 양은 더 많아도 BC의 생산량은 적은 것으로 판단된다.

**Table 2.** Time course of the conversion of cellulose producing (*Cel*<sup>+</sup>) cells into *Cel* mutants. Cells were cultivated in a 5 L jar fermentor in a basal medium containing 1.5% ethanol at aeration rate of 1 vvm, agitation rate of 500 rpm and working volume of 2 L. The experimental data are mean values of the triplicate experiments

| Culture time (h) | CFU/mL               | <i>Cel</i> mutants/total cells |
|------------------|----------------------|--------------------------------|
| 20               | 5.5×10 <sup>6</sup>  | 0.036                          |
| 24               | 6.9×10 <sup>6</sup>  | 0.014                          |
| 30               | 5.72×10 <sup>7</sup> | 0.019                          |
| 44               | 9.58×10 <sup>5</sup> | 0.013                          |
| 48               | 3.54×10 <sup>5</sup> | 0.017                          |
| 52               | 3.21×10 <sup>4</sup> | 0.078                          |

이전의 연구(13)에서 교반배양 시 에탄올이 첨가되지 않은 기본배지에서는 300 rpm의 교반속도에서 발생하는 shear stress로 *Cel* mutant를 죽임으로써 *Cel* mutant의 발생을 효과적으로 억제할 수 있었으나 배지에 1.0% 에탄올이 첨가되면 *Cel* mutant이 발생율이 증가하기 때문에 교반속도를 500 rpm으로 증가시켜야 *Cel* mutant의 발생을 줄일 수 있었다. 또한 1%의 에탄올이 첨가된 경우 80 rpm에서는 배양 20시간에 *Cel* mutant의 발생율이 30%에 달하였다(13). 따라서 500 rpm의 교반속도에서 발생하는 shear stress가 *Cel* mutant를 죽이기도 하지만 첨가되는 에탄올의 농도가 1.0%에서 1.5%로 증가함에 따라 *Cel* mutant로의 전환율이 높아져 500 rpm의 교반속도에서는 배양 초기에 효과적으로 *Cel* mutant를 죽이지 못하기 때문에 Table 2에서 보는 바와 같이 배양 20시간째에는 *Cel* mutant의 발생율이 3.6%에 달하며 배양 시간이 증가함에 따라 불규칙적인 *Cel* mutant 발생율을 나타내지만 전체적으로는 감소하는 경향이 있다. 하지만 BC의 증가량이 많아 임펠러에서 형성된 shear stress가 *Cel* mutant를 효과적으로 죽이지 못하는 배양 후기에는 *Cel* mutant의 비율이 7.8%로 다시 증가하는 경향을 보인 것으로 판단된다. 결과적으로 에탄올은 배양 중 균체를 자극하여 *Cel* mutant의 전환율을 높이기 때문에 배지에 첨가되는 에탄올의 농도가 높을수록 교반속도를 더 증가시켜야 *Cel* mutant의 발생율을 줄이고 BC 생산량을 증가시킬 수 있다는 것을 예측할 수 있다.

진탕 배양의 경우 배양 초기에 1.0% 에탄올을 첨가하여 배양하는 것보다 0.25%씩 분할 공급함으로써 BC 생산량을 10% 증가시킬 수 있었다. 따라서 본 실험에서도 배양 초기에 0.25% 에탄올을 첨가한 후 배양 36시간까지 12시간마다 0.25% 에탄올을 첨가하여 균체의 성장 및 BC의 생산량을 측정하였다. 에탄올을 분할 공급한 경우 배양 초기에 1.0% 에탄올을 첨가한 경우에 비해 균체는 25% 증가하였으나 BC는 11% 감소하였다(Table 3). 또한 Table 4에서 보는 바와 같이 에탄올을 분할공급하면 *Cel* mutant의 발생율은 소량 증가하

나 균체의 생존기간이 더 길어진 것을 알 수 있다. 따라서 진탕배양의 경우와 달리 교반배양에서는 에탄올을 분할공급하면 배양 초기에 1.5% 에탄올을 첨가한 경우처럼 균체를 *Cel* mutant로의 전환율을 높이기 때문에 BC 생산량을 증가시키기 위해서는 교반속도를 더 증가시켜야 한다는 것을 예측할 수 있다.

**Table 3.** Effect of ethanol fed-batch culture on production of BC. Cells were cultivated in a 5 L jar fermentor at aeration rate of 1 vvm, agitation rate of 500 rpm and working volume of 3 L for 43 hours. 0.25% ethanol was initially fed and 0.25% ethanol was fed every 12 hours for 36 hours

|      | Dry weight (g/L)      |                           |
|------|-----------------------|---------------------------|
|      | Ethanol batch culture | Ethanol fed-batch culture |
| BC   | 1.63                  | 1.45                      |
| Cell | 2.97                  | 3.71                      |
| WSPS | 0.30                  | 0.35                      |

**Table 4.** Effect of ethanol fed-batch culture on the conversion of *Cel*<sup>+</sup> cells into *Cel* mutants. Cells were cultivated in a 5L jar fermentor at aeration rate of 1 vvm, agitation rate of 500 rpm and working volume of 3L. 0.25% ethanol was initially fed and 0.25% ethanol was fed every 12 hours for 36 hours. The experimental data are mean values of the triplicate experiments

| Culture time (h) | Ethanol fed-batch culture |                                | Ethanol batch culture |                                |
|------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
|                  | CFU/mL                    | <i>Cel</i> mutants/total cells | CFU/mL                | <i>Cel</i> mutants/total cells |
| 24               | 1.02×10 <sup>8</sup>      | 0.010                          | 1.65×10 <sup>7</sup>  | 0                              |
| 37               | 1.77×10 <sup>7</sup>      | 0.028                          |                       |                                |
| 39               |                           |                                | 1.05×10 <sup>7</sup>  | 0                              |
| 43               | 5.21×10 <sup>6</sup>      | 0.012                          | 5.7×10 <sup>6</sup>   | 0                              |
| 48               | 3.59×10 <sup>6</sup>      | 0.011                          | 5.51×10 <sup>5</sup>  | 0.002                          |

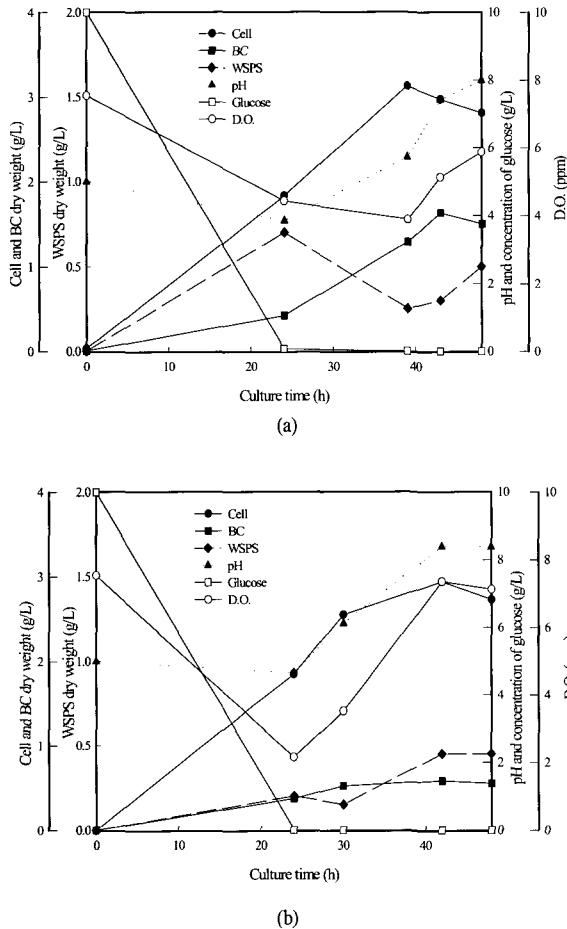
**Table 5.** Effect of the concentration of acetic acid in a basal medium containing 1% ethanol on the conversion of *Cel*<sup>+</sup> cells into *Cel* mutants. Cells were cultivated in a 5 L jar fermentor at aeration rate of 1 vvm, agitation rate of 500 rpm and working volume of 3 L.

| Culture time (h) | Concentration of acetic acid (%) |                                |                      |                                |
|------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------|--------------------------------|
|                  | 0.15                             |                                | 1.0                  |                                |
|                  | CFU/mL                           | <i>Cel</i> mutants/total cells | CFU/mL               | <i>Cel</i> mutants/total cells |
| 24               | 1.65×10 <sup>7</sup>             | 0                              | 3.4×10 <sup>7</sup>  | 0                              |
| 30               |                                  |                                | 2.11×10 <sup>8</sup> | 0.009                          |
| 39               | 1.05×10 <sup>7</sup>             | 0                              |                      |                                |
| 42               |                                  |                                | 1.48×10 <sup>4</sup> | 0.020                          |
| 43               | 5.7×10 <sup>6</sup>              | 0                              |                      |                                |
| 48               | 5.51×10 <sup>5</sup>             | 0.002                          | 0                    | -                              |

**고농도의 아세트산 및 phosphate ion의 공급이 BC 생산에 미치는 영향**

Jung 등(15)은 *G. hansenii* PJK를 진탕배양 할 경우 배지의 조성 중 acetic acid의 농도를 0.15%에서 1.0%로 높여주면 BC 생산량은 11% 감소하나 균체의 양은 89% 증가한다고 보고하였다. 단위 부피 당 균체의 수가 많아지면 균체에 의해 생성되는 생산물의 양도 증가할 것이다. 본 실험의 경우에도 교반 배양기 내에서 *Cel* mutant의 발생없이 균체의 수가 증가하면 BC의 생산성도 높아질 가능성이 있다. 1% 에탄올이 포함된 배지에서 배양기 내 impeller의 agitation rate를 500 rpm으로 조절함으로써 *Cel* mutant의 발생을 억제시킬

수 있었다(13). 따라서 본 실험에서는 1.0% 에탄올이 포함된 배지에 acetic acid의 농도를 0.15%에서 1.0%로 증가시켜 500 rpm의 교반속도에서 배양시간에 따른 균체의 성장 및 BC의 생산량을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 균체의 건조중량은 3.0 g/L로 유사하나 BC의 생산량은 약 64% 감소하였다. 또한 acetic acid의 농도가 1%일 경우 0.15%일 경우에 비해 용존 산소의 변화폭이 크며 감소 및 증가하는 기울기가 급하게 나타났다.



**Figure 1.** Effect of concentration of acetic acid on BC production. Cells were cultivated in a 5 L jar fermentor in a basal medium containing 1% ethanol at aeration rate of 1 vvm and agitation rate of 500 rpm and working volume of 3 L. The concentration of acetic acid in a basal medium was 0.15% (a) and 1.0% (b).

일반적으로 배양 중 *Cel* mutant가 발생하면 BC 생산량이 감소하는 것으로 알려져 있으나 본 실험의 경우 Table 5에서 보는 바와 같이 *Cel* mutant는 거의 없으나 BC 생산량은 크게 감소하였다. 이는 1.0% acetic acid가 첨가된 배지에서는 *G. hansenii* PJK가 BC를 생산하기보다는 WSFS 등 다른 물질의 생산에 배지의 영양분을 대부분 소모하기 때문에 생종 균수도 거의 비슷하지만 BC의 생산량이 감소한 것으로 추측된다. 즉, *G. hansenii* PJK는 배지의 영양성분을 균체의 성장과 BC 생산에 대부분 이용하나 고농도의 acetic acid가 있는 배양 환경 하에서는 균체의 성장과 WSFS 등의 생산에 대부분을 이용하기 때문에 균체의 건조중량은 유사하나 BC

생산량이 감소되었으며 이 과정에서 BC를 생산하는데 필요한 산소보다 더 많은 산소를 필요로 하기 때문에 용존 산소량이 급격하게 감소된 것으로 추측된다. 고농도의 acetic acid가 있는 배양 환경 하에서는 0.15% acetic acid가 있는 배양 환경에 비해 생균수가 더 빨리 감소되었으며(Table 5) 이로 인해 배양 24시간 이후부터 용존 산소가 계속 증가하는 것으로 추측된다.

일반적으로 BC 생산배지로 잘 알려진 BSH 배지 (20 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 2.7 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.15 g/L citric acid  $\cdot$   $\text{H}_2\text{O}$ ) (16)는 본 실험에서 사용된 배지조성과 달리  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 와 citric acid가 포함되어있다. 이중 phosphate ion은 미생물이 생산하는 exopolysaccharide의 생산량에 중요한 영향을 미치며 phosphate ion의 농도가 증가할수록 *Agrobacterium tumefaciens*가 생산하는 succinoglycan이나 *Pseudomonas* strain이 생산하는 alginate와 같은 exopolysaccharide의 생산량이 증가하는 것으로 보고된 바 있다(17, 18). 따라서 본 실험에서는 1.0% 에탄올을 포함하는 기본배지에 BSH 배지에 포함되어있는  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 의 농도와 동일한 0.27%의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 를 첨가하여 phosphate ion이 *G. hansenii* PJK가 생산하는 exopolysaccharide인 BC의 생산 및 균체의 성장에 미치는 영향을 확인하였다. Table 6에서 보는 바와 같이  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 를 첨가한 경우 첨가하지 않은 경우에 비해 균체는 27% 증가하였으나 BC는 29% 감소하였고 WSFS의 생산량은 동일하였다. 또한 Table 7에서 알 수 있듯이 배지에  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 를 첨가한 경우 동일한 배양기간 동안 첨가하지 않은 경우에 비해 생균수는 많으나 반면에 *Cel* mutants의 발생율이 높아졌다. 따라서 *G. hansenii* PJK의 경우 배양 중 phosphate ion은 *Cel* mutants의 발생율은 높지 않지만 BC 생산보다는 균체의 성장을 촉진시킨다는 것을 알 수 있다.

**Table 6.** Effect of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  supplementation on production of BC. Cells were cultivated in a basal medium containing 1% ethanol in a 5 L jar fermentor at agitation rate of 500 rpm, aeration rate of 1.0 vvm and working volume of 3 L for 43 hours

|      | Dry weight (g/L) |                                 |
|------|------------------|---------------------------------|
|      | Supplementation  |                                 |
|      | None             | 0.27% $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ |
| BC   | 1.63             | 1.15                            |
| Cell | 2.97             | 3.77                            |
| WSFS | 0.30             | 0.30                            |

**Table 7.** Effect of supplementation of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  on the conversion of *Cel*<sup>r</sup> cells into *Cel* mutants. Cells were cultivated in a basal medium containing 1% ethanol in a 5 L jar fermentor at agitation rate of 500 rpm, aeration rate of 1.0 vvm and working volume of 3 L

| Culture time (h) | Supplementation    |                                |                                 |                                |
|------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                  | None               |                                | 0.27% $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ |                                |
|                  | CFU/mL             | <i>Cel</i> mutants/total cells | CFU/mL                          | <i>Cel</i> mutants/total cells |
| 24               | $1.65 \times 10^7$ | 0                              | $1.65 \times 10^8$              | 0                              |
| 30               |                    |                                |                                 |                                |
| 39               | $1.05 \times 10^7$ | 0                              |                                 |                                |
| 42               |                    |                                |                                 |                                |
| 43               | $5.7 \times 10^6$  | 0                              | $1.20 \times 10^8$              | 0.030                          |
| 48               | $5.51 \times 10^5$ | 0.002                          | $3.68 \times 10^7$              | 0.076                          |

**Table 8.** Effect of pH control on production of BC in a medium containing 1% ethanol. Cells were cultivated in a 5 L jar fermentor at pH 4.5~5.5, the aeration rate of 1 vvm, agitation rate of 500 rpm and working volume of 3 L

|      | Dry weight (g/L)   |                 |
|------|--------------------|-----------------|
|      | Without pH control | With pH control |
| BC   | 1.63               | 1.60            |
| Cell | 2.97               | 3.34            |
| WSPS | 0.30               | 2.30            |

**Table 9.** Effect of pH control on the conversion of *Cel*<sup>+</sup> cells into *Cel*<sup>-</sup> mutants. Cells were cultivated in a medium containing 1% ethanol in a 5 L jar fermentor at pH 4.5~5.5, the aeration rate of 1 vvm, agitation rate of 500 rpm and working volume of 3 L

| Culture time (h) | Without pH control   |   | With pH control      |   |
|------------------|----------------------|---|----------------------|---|
|                  | CFU/mL               | <i>Cel</i> <sup>+</sup> mutants/total cells | CFU/mL               | <i>Cel</i> <sup>+</sup> mutants/total cells |
| 24               | 1.65×10 <sup>7</sup> | 0   | 2.60×10 <sup>7</sup> | 0   |
| 39               | 1.05×10 <sup>7</sup> | 0   |                      |   |
| 43               | 5.7×10 <sup>6</sup>  | 0   |                      |   |
| 44               |                      |   | 2.40×10 <sup>7</sup> | 0.004                                       |
| 48               | 5.51×10 <sup>5</sup> | 0.002                                       | 8.5×10 <sup>6</sup>  | 0.012                                       |
| 54               |                      |   | 2.47×10 <sup>6</sup> | 0.004                                       |

### pH 제어가 BC 생산에 미치는 영향

Park 등(12)은 *G. hansenii* PJK를 진탕 배양하는 경우 발효 배지의 초기 pH가 4에서 6.5의 범위에서는 BC의 생산량이 거의 동일한 것으로 보고하였다. 그러나 BC 생산능이 있는 또 다른 균주인 *Acetobacter xylinum*의 경우 BC 생산을 위한 최적 pH는 4~7으로 알려져 있다(16). 따라서 본 연구에서는 pH controller를 사용하여 발효액의 pH를 5 (4.5~5.5)로 일정하게 맞춰 pH 제어가 균체의 성장 및 BC 생산에 미치는 영향을 확인하였다. Table 8에서 보는 바와 같이 교반배양에서 배양액의 pH를 제어한 결과 pH를 제어하지 않은 경우에 비해 균체의 건조중량은 약 12% 증가하였으나 BC의 생산량은 큰 변화가 없었다. 하지만 pH를 제어하면 생균수가 증가하였고(Table 9), WSPS의 생산량은 2.3 g/L로 제어하지 않은 경우 (0.5 g/L)에 비해 4.6배나 증가하였다. 따라서 배양액의 pH 제어는 균체의 바람직한 생존 환경을 유지하지만 BC 생산에는 거의 영향을 미치지 않고 WSPS의 생산성을 향상시킨다는 것을 알 수 있다.

### 요 약

교반배양시 배지에 첨가되는 에탄올의 농도가 증가할수록 *Cel*<sup>-</sup> mutant의 발생률이 증가하므로 1.5% 에탄올이 첨가된 배지의 경우 500 rpm보다 높은 교반속도를 유지해야 효과적으로 *Cel*<sup>-</sup> mutant의 발생이 억제되고 BC 생산량을 증가시킬 수 있다. 교반 배양과 같은 강한 shear stress의 배양환경 하에서는 진탕배양의 경우와 달리 1.0% 에탄올을 분할공급하더라도 BC 생산의 효율성을 높일 수 없었다. Phosphate ion이 첨가된 배지보다 첨가되지 않은 배지에서 BC 생산량이 더

높았다. 배지조성 중 아세트산의 농도를 1.0%로 증가시키면 균체의 건조중량은 변화가 없었으나 BC 생산량이 감소되었다. 배양액의 pH 제어는 BC의 생산에는 영향을 미치지 않았으나 균체의 성장과 WSPS의 생산을 향상시켰다.

### 감 사

이 논문은 2003년도 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2003-042-D00050).

### REFERENCES

- Brown, A. J. (1886), An acetic acid ferment which forms cellulose, *J. Chem. Soc.* **49**, 432-439.
- Delmer, D. P. (1999), Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 245-276.
- Delmer, D. P. and Y. Amor (1995), Cellulose biosynthesis, *Plant cell* **7**, 987-1000.
- Yamanaka, S., K. Watanabe, N. Kitamura, M. Iguchi, S. Mitsuhashi, Y. Nishi, and M. Uryu (1989), The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose, *J. Mat. Sci.* **24**, 3141-3145.
- Cannon, R. E. and S. M. Anderson (1991), Biogenesis of bacterial cellulose. *Crit. Rev. Microbiol.* **17**, 435-447.
- Embuscado, M. E., J. S. Marks, and J. N. BeMiller (1994), Bacterial cellulose. II. Optimization of cellulose production by *Acetobacter xylinum* through response surface methodology, *Food Hydrocoll.* **8**, 419-430.
- Klemm, D., D. Schumann, U. Udhard, S. Marsch (2001), Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery, *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1561-1603.
- Fontana, J. D., A. M. De Souza, C. K. Fontana, I. L. Torriani, J. C. Moreschi, B. J. Gallotti, S. J. De Souza, G. P. Narcisco, J. A. Bichara, and L. F. X. Farah (1990), *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**, 253-264.
- Vandamme, E. J., S. De Baets, A. Vanbaelen, K. Joris, and P. De Wulf (1998), Improved production of bacterial cellulose and its application potential, *Polym. Degrad. Stabil.* **59**, 93-99.
- Schramm, M. and S. Hestrin (1954), Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*, *J. Gen. Microbiol.* **11**, 123-129.
- Park, J. K., Y. H. Park, and J. Y. Jung (2003), Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **8**, 83-88.
- Park, J. K., J. Y. Jung, and Y. H. Park (2003), Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol, *Biotechnol. Lett.* **25**, 2055-2059.
- Jung, J. Y., J. K. Park, and H. N. Chang (2004), Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells, *Enzyme Micorb. Technol.* submitted for publication.
- Valla, S. and J. Kjosbakken (1981), Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. *J. General Microb.* **128**, 1401-1408.
- Jung, J. Y., Y. H. Park, and J. K. Park (2003), Effect of medium composition on the bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* PJK, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 94-99.

16. Hestrin, B. and M. Schramm (1954) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose, *Biochem. J.* **58**, 345-352.
17. Stredansky, M., E. Conti, C. Bertocchi, M. Matulova, and F. Zanetti (1998), Succinoglycan production by *Agrobacterium tumefaciens*, *J. Ferment. Bioeng.* **85**, 398-403.
18. Conti, E, A. Flaibani, M. O'Regan, and I. W. Sutherland (1994), Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties. *Microbiol.* **140**, 1125-1132.
19. Jung, J. Y., Y. H. Park, and J. K. Park (2003) Effect of medium composition on the bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* PJK, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 94-99.
20. Jonas, R. and L. F. Farah (1998), Production and application of microbial cellulose, *Polym. Degrad. Stabil.* **59**, 101-106.