

Gluconacetobacter sp. gel_SEA623-2를 이용한 Bacterial Cellulose 생산에 초산농도 및 유산균 혼합배양이 미치는 영향

김경민 · 김지현 · 양경월*

(주)제주사랑농수산

Effect of Acetic Acid Concentration and Mixed Culture of Lactic Acid Bacteria on Producing Bacterial Cellulose Using *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2

Kyung min Kim, Jihyeon Kim, and Kyong Wol Yang*

Jeju Love Co., Ltd, Jeju-do 695-975, Republic of Korea

(Received September 5, 2014 / Accepted September 19, 2014)

In this study, *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2 isolated from citrus that produces bacterial cellulose was used to examine the effect of initial concentration of acetic acid and mixed culture inoculated with *Lactobacillus plantarum* KCCM 80077 on productivity of bacterial cellulose. In mixed culture added with 0.5% acetic acid, the viable cell count increased from 2.4×10^6 CFU/ml to 1.1×10^7 CFU/ml after 14 days of culture, and total acidity was about 0.3% higher than single culture added with 0.5% acetic acid, which implies that additional lactic acid was produced by *L. plantarum* KCCM 80077. In single culture, although bacterial cellulose productivity was higher when the initial concentrations of acetic acid were 0.0% and 0.5%, than when it was 1.0%, there was no significant difference. However, in mixed culture, adding 0.5% acetic acid resulted in dry weight of 37.83 ± 6.81 g/L and thickness of 10.33 ± 0.58 mm, showing a significant difference from that of single culture added with 1% acetic acid, 28.40 ± 1.23 g/L and 7.50 ± 0.50 mm ($P < 0.05$).

Keywords: *Gluconacetobacter* sp., bacterial cellulose, fermentation, lactic acid bacteria, mixed culture

Cellulose는 자연계에서 가장 풍부하게 존재하는 천연 고분자이며 재생 가능 자원으로서 D-glucose가 β -1,4 결합에 의하여 중합된 사슬 상의 다당류이다. 주로 식물에 의해 생성되나 일부 algae, fungi 그리고 *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* 속 등 다양한 세균에서 생합성이 확인되었으며(Matthysse *et al.*, 1981; Ko *et al.*, 2000), 그 중에서도 당으로부터 초산발효를 통해 식초를 만드는 초산균인 *Acetobacter* 속이 cellulose 생산력이 가장 우수하다고 보고된 바 있다(Ko *et al.*, 2000; Son *et al.*, 2000).

Bacterial cellulose (BC)를 생성하는 초산균으로는 *A. xylinum*, *G. hansenii* 등이 알려져 있으며 특히, *Acetobacter xylinum* 의해 생산되는 cellulose가 대표적이고 cellulose 생산력이 가장 우수한 균주로 많은 연구가 진행되어왔다(Matsuoka *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005). BC 생성균으로 *Gluconacetobacter* sp.의 분리는 비교적 최근에 연구가 진행되고 있으며 16S rRNA 염기서열을 이용하여 분자계통 분류학적으로 *Acetobacter* 속으로부터 재

분류 되었다(Lee *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2004). BC는 식물유래 cellulose와는 달리 lignin, hemicellulose가 전혀 포함되지 않는 순수상태로 생성되며(Klemm *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2003) 강도, 보수성 및 결합성이 높아 화학적으로 안정하고 독성이 낮은 특성으로 인하여 고강도용 공업재료, 복합섬유 및 의약품 재료 등 다양한 용도로 활용이 가능하다(Jeon *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2014). BC의 생산성 향상을 위해 유전적으로 안전한 미생물의 분리, 균주개량, 최적배지 및 배양조건에 관련된 연구가 보고되고 있으며(Lee *et al.*, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010), pH 3-4의 배양액으로 30-35°C 정치배양이 유리하다는 점은 대체적으로 일치하고 있다(Choi *et al.*, 2004). 또한 glucose, fructose 등의 탄소원과 TCA cycle에 관여하는 lactate, pyruvate, succinate 등을 기본배지에 첨가하여 BC의 생산량을 증가시키는 연구가 보고되고 있으며(Matsuoka *et al.*, 1996; Naritomi *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2004) *A. xylinum*의 경우 fructose 이외에 lactate를 배지에 첨가하여 BC 생산성을 증가시켰다고 보고되었으나(Matsuoka *et al.*, 1996; Naritomi *et al.*, 1998) *G. hansenii*의 경우에는 lactate의 농도가 높아지면 생산량을 감소시키며 succinate 또한 BC 생산에 거의 영향을 미치지

*For correspondence. E-mail: rainant@naver.com; Tel.: +82-64-803-2012; Fax: +82-64-803-2013

Table 1. Mixing ratio of single culture and mixed culture

	Acetic acid (%)	Citrus juice (%)	Ethanol (%)	10% Sugar solution (%)
SC ^a	1.0	10.0	1.0	88.0
	0.5	10.0	1.0	88.5
	0.0	10.0	1.0	89.0
MC ^b	1.0	10.0	1.0	88.0
	0.5	10.0	1.0	88.5
	0.0	10.0	1.0	89.0

^a SC, single culture (inoculated with 1% preculture : *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2)

^b MC, mixed culture (inoculated with 1% preculture : *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2 and *L. plantarum* KCCM 80077)

않는다는 연구가 보고되어(Jung et al., 2003; Jang and Jeong, 2005) 차이를 나타내고 있다.

본 연구는 비상품 감귤을 이용한 다양한 가공식품 개발의 일환으로 제주산 감귤착즙액을 이용한 BC를 생산하는데 있어서 초기 초산농도에 따른 BC 생성량을 비교하여 최적 배합비를 결정하고자 하였다. 추가적으로 lactate 첨가에 따라 BC의 생산성이 증대되었다는 연구결과(Matsuoka et al., 1996; Naritomi et al., 1998)를 바탕으로 높은 산도의 환경에서도 다량의 젖산을 생성하는(Sim et al., 1995; Cho et al., 2007) 김치에서 분리된 *Lactobacillus plantarum* KCCM 80077 유산균을 혼합배양(mixed culture)하여 BC 생산성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 전 배양액의 제조

본 연구에 사용한 BC 생성균은 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 분양 받은 *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2를 이용하였으며(Lee et al., 2011) 균주 혼합배양 실험에 이용된 유산균은 김치에서 분리한 *L. plantarum* KCCM 80077을 이용하였다. 유산균의 동정은 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 위하여 27F와 1492R 2개의 primer를 사용하여 PCR를 수행하였고 결정된 염기서열은 GenBank 데이터베이스와 비교 검색하여 유사도가 가장 높은 유산균으로 동정되었다.

BC를 생성하는 gel_SEA623-2는 먼저 G10 agar (glucose 100 g/L, yeast extract 10 g/L, calcium carbonate 20 g/L, agar 15 g/L)에 접종하고 30°C에서 4일간 배양하여 주변에 투명환이 생성된 colony를 전 배양액(감귤착즙액 10%, sucrose 8.8%, ethanol 1%, acetic acid 1%, 정제수 79.2%)에 접종하고 배양병 입구를 살균된 filter paper (HYUNDAI Micro)로 덮은 후 30°C에서 5일간 정치배양하여 본 배양을 위한 종균(Seed)으로 사용하였다.

혼합배양을 위한 유산균인 *L. plantarum* KCCM 80077은 BCP plate count agar (yeast extract 2.5 g/L, peptone 5 g/L, dextrose 1 g/L, Tween 80 1 g/L, L-cysteine 0.1 g/L, bromocresol purple 0.04 g/L, agar 15 g/L)에 접종하고 35°C에서 2일간 배양하여 주변에 형광색 환이 생성된 colony를 MRS broth (mixed peptones 10 g/L, yeast extract 5 g/L, meat extract 10 g/L, glucose 20 g/L,

potassium phosphate 2 g/L, sodium acetate 5 g/L, magnesium sulphate 0.2 g/L, magnase sulphate 0.05 g/L, Tween 80 1.08 g/L, ammonium citrate 2 g/L)에 접종하고 35°C의 온도에서 150 rpm의 속도로 24시간 동안 진탕배양하여 lactic acid를 생성하는 종균(Seed)으로 사용하였다.

Single culture 및 mixed culture의 제조

BC를 생성하는 최적조건을 알아보기 위한 single culture는 전 배양액과 동일하게 10%의 감귤착즙액, 1%의 Ethanol 및 10% 농도(w/w)의 설탕물 88-89% 비율로 제조하여 이용하였으며 본 배양액 조성에 있어 초기 초산 농도에 따른 BC 생산성 차이를 비교하기 위해 초산을 0.5-1.5% 비율로 첨가하였고 cellulose 생산을 위한 전 배양액을 각각 1%(v/v)씩 접종하여 30°C의 온도에서 14일 동안 배양하면서 BC 생성량을 비교하였다. 대조군은 분양 받은 gel_SEA623-2로서 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 BC를 제조하는 배합비를 기준으로 결정되었으며 초산이 1% 첨가된 single culture이다.

또한 mixed culture는 single culture와 동일한 배합비를 바탕으로 내산성이 강한 유산균인 *L. plantarum* KCCM 80077를 추가로 1%(v/v)씩 접종하여 배양하였으며 균주의 혼합배양을 통해 추가적으로 BC 생성량에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 초기 초산 농도에 따른 single culture 및 mixed culture의 배합비율은 Table 1에 나타내었다.

균수 측정

gel_SEA623-2 전 배양액의 세포수는 hemocytometer (Marienfeld)를 이용한 세포 계수법을 활용하여 측정하였으며 *L. plantarum* KCCM 80077 전 배양액과 배양 일수에 따른 본 배양액의 생균수는 심진희석법을 이용한 표준평판배양법을 토대로 BCP plate count agar를 이용하여 35°C의 온도에서 48시간 배양 후 형광색 환을 형성하는 colony의 수를 계수하였다.

pH 및 총 산도 측정

배양액의 pH는 pH meter (Starter3000, OHAUS)를 이용하였다. 배양액 중에 유기산 함량은 AOAC법(1990)에 따라 측정하였으며 100 ml 비이커에 배양액 시료 10 ml를 취한 후 phenolphthalein 용액을 2-3방울을 가하고 0.1 N-NaOH 표준용액으로 적정하여 소비된 양을 토대로 total acidity (%)를 산출하였다.

BC 생성량의 측정

BC 생성량은 먼저 배양액 상층에 형성된 백색의 겔 두께(thickness)를 기준으로 평가하였으며 가장 두꺼운 부분과 가장 얇은 부분 두 곳을 측정하여 평균 값으로 나타내었고 배양일에 따라 mm 단위로 측정하였다.

또한 생성된 BC의 건조중량(dry weight)을 측정하기 위해 세척 후 건조기(OF-22, 팜스웰바이오)에 넣고 60°C의 온도에서 24시간 건조하여 남은 건조체의 중량을 기준으로 미세저울(FX-300i, AND)을 이용하여 소수점 둘째 자리까지 측정하였다.

```

1  GTCACCTTAG GCGGCTGGTT CCTAAAAGGT TACCCACCG ACTTTGGGTG TTACAAACTC
61  TCATGGTGTG ACGGGCGGTG TGTACAAGGC CCGGGAACGT ATTCACCGCG GCATGCTGAT
121 CCGCGATTAC TAGCGATTCC GACTTCATGT AGGCGAGTTG CAGCCTACAA TCCGAACTGA
181 GAATGGCTTT AAGAGATTAG CTTACTCTCG CGAGTTCGCA ACTCGTTGTA CCATCCATTG
241 TAGCACGTGT GTAGCCCAGG TCATAAGGGG CATGATGATT TGACGTCATC CCCACCTTCC
301 TCCGGTTTGT CACCGGCAGT CTCACCAGAG TGCCCAACTT AATGCTGGCA ACTGATAATA
361 AGGGTTGCGC TCGTTGCGGG ACTTAACCCA ACATCTCACG ACACGAGCTG ACGACAACCA
421 TGCACCACCT GTATCCATGT CCCCAGAGGG AACGTCTAAT CTCTTAGATT TGCATAGTAT
481 GTCAAGACCT GGTAAGGTTT TTCGCGTAGC TTCGAATTAA ACCACATGCT CCACCGCTTG
541 TCGGGGCCCC CGTCAATTCC TTTGAGTTTC AGCCTTGCGG CCGTACTCCC CAGGCGGAAT
601 GCTTAATGCG TTAGCTGCAG CACTGAAGGG CGGAAACCCT CCAACACTTA GCATTCATCG
661 TTTACGGTAT GGACTIONCAG GGTATCTAAT CCTGTTGCT ACCCATACTT TCGAGCCTCA
721 GCGTCAGTTA CAGACCAGAC AGCCGCCTTC GCCACTGGTG TTCTTCCATA TATCTACGCA
781 TTTACCGCT ACACATGGAG TTCACCTGTC CTCTTCTGCA CTCAGTTTC CCAGTTTCCG
841 ATGCACCTTCT TCGGTTGAGC CGAAGGCTTT CACATCAGAC TTAATAAACCC GCCTGCGCTC
901 GCTTTACGCC CAATAAATCC GGACAACGCT TGCCACCTAC GTATTACCGC GGCTGCTGGC
961 ACGTAGTTAG CCGTGACTTT CTGGTTAAAT ACCGTCAATA CCTGAACAGT TACTCTCAGA
1021 TATGTTCTTC TTTAACAACA GAGTTTACG AGCCGAAACC CTTTCTCACT CACGCGGCGT
1081 TGCTCCATCA GACTTTCGTC CATTGTGGAA GATTCCCTAC TGCTGCCTCC CGTAGGAGTT
1141 TGGGCCGTGT CTCAGTCCCA ATGTGGCCGA TTACCCTCTC AGGTGGGCTA CGTATCATTG
1201 CCATGGTGAG CCGTTACCNC ACCATCTAGC TAATACGCCG CGGGACCATC CAAAAGTGAT
1261 AGCCGAAGCC ATCTTTCAAA CTCGGACCAT GCGGTCCAAG TTGTTATGCG GTATTAGCAT
1381 GCCACTCACT CAAATGTAAT TCATGATGCA AGCACCAATC AATACCAGAG TTCGTTCCAG
1441 TGCANTATAG CA
    
```

Fig. 1. 16S rRNA sequence of *L. plantarum* KCCM 80077.

통계처리

실험 결과는 SPSS 12.0 통계분석 프로그램을 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였으며, 분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 실시하여 $P < 0.05$ 수준에서 BC 건조중량과 두께의 유의적 차이를 검증하였다.

결 과

유산균의 동정결과

김치로부터 분리된 유산균은 BCP agar에서 형광색 환을 나타내는 colony를 단독 분리하여 얻었고 16S rRNA 염기서열분석을 통해 Fig. 1과 같은 염기서열을 확인하였다. 상동성을 비교한 결과 *L. plantarum*과 99.8%의 상동성을 보인 최종 균주로서 한국미생물보존센터에 기탁 후 *L. plantarum* KCCM 80077로 명명하였다.

전 배양액의 균수 측정 결과

BC 생산을 위한 gel_SEA623-2 전 배양액의 총 균수는 hemocytometer (Marienfeld)를 이용한 세포 계수법을 토대로 측정하였으며 2.5×10^7 CFU/ml의 균수가 확인되었다. 또한 유산균 혼합배양에 따른 BC 생산성 비교를 위해 *L. plantarum* KCCM 80077 배양액의 생균수는 표준평판배양법을 이용하여 계수하였고 2.9×10^8 CFU/ml의 생균수가 확인되었다.

배양 일수 별 pH 및 BC 생산성 비교

Single culture에서 초기 초산농도에 따른 배양일 별 pH와 건조중량으로 측정된 BC 생산성을 Fig. 2에 나타내었다. 배양 초기

초산을 첨가하지 않은 SC-0.0 배양액의 pH는 3.91에서 배양 중기인 7일 후 2.90으로 감소하였으며 배양 종료시점인 14일 이후에는 2.45까지 감소하였다. 초산을 첨가한 SC-0.5와 SC-1.0 배양액은 초기 3.20과 3.04에서 시작하여 중기에는 각각 2.74, 2.72로 감소하고 종료시점에는 2.35와 2.63까지 감소하였다. 이는 pH가 3.66-3.86에서 배양 14일 후 2.26-2.74까지 감소하였다는 보고(Choi *et al.*, 2004)와 비슷한 경향을 보였으며 BC를 생성함과 동시에 호기적인 조건에서 초산이 생성됨에 따라 pH가 낮아지는 것으로 보여진다. 또한 BC의 건조중량을 토대로 생산성을 비교한 결과에서는 배양 7일 후 SC-0.0 배양액의 BC가 28.10 ± 1.60 (g/L)의 생성량으로 가장 많은 생산성을 보인 반면 배양 14일 후에는 SC-0.5 배양액의 BC 생성량이 32.50 ± 4.80 (g/L)으로 가장 높은 평균 값을 나타내었다.

Mixed culture를 통해 얻어진 BC의 건조중량과 배양일 별 배

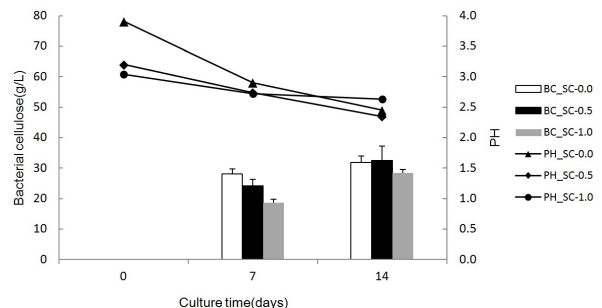


Fig. 2. Effect of culture days on bacterial cellulose production and pH in single culture.

Table 2. Effect of culture days on viable cell count in mixed culture

	Actic acid concentration (%)	Culture time (days)		
		0	7	14
MC-V ^a (CFU/ml)	1.0	2.2×10^6	1.3×10^7	0.8×10^6
	0.5	2.4×10^6	1.6×10^7	1.1×10^7
	0.0	2.3×10^6	3.3×10^7	1.4×10^6

^aMixed Culture Viable Cell Count

양액의 pH 값은 Fig. 3에 나타내었으며, 배양 초기 초산을 첨가하지 않은 MC-0.0 배양액의 pH는 3.94였고 배양 최종일에는 2.42까지 감소하여 single culture와 큰 차이를 나타내지는 않았다. 초산을 첨가한 MC-0.5와 MC-1.0 배양액도 single culture와 마찬가지로 배양 초기에는 초산농도에 따른 pH의 차이가 있었으나 배양 종료시점에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 그리고 BC 생산성은 배양 중기(7일 후) MC-0.0 배양액에서 생산된 BC가 24.20±0.60 (g/L)로 가장 많은 생산성을 보였으나 배양 종료시점(14일 후)에는 MC-0.5 배양액에서 생성된 BC가 37.8±6.80 (g/L)으로 가장 높은 생산성을 나타내어 single culture와 유사한 경향을 나타내었다.

배양일 별 총 산도의 변화

Single culture를 통해 얻어진 배양액의 total acidity를 배양 단계별로 측정된 결과 배양 초기 SC-0.0는 0.10%에서 배양 중기(7일 후)에는 0.40%까지 높아졌다가 배양 종료시점(14일 후)까지 0.40%로 유지되는 경향을 보였으며 SC-0.5와 SC-1.0는 배양 종료시점에 산도가 일부 감소하는 경향을 보였다. 이렇듯 배양 종료시점에 산도가 일부 감소하는 것은 BC 생성균에 의해 생성된 초산이 배양일이 길어짐에 따라 과산화 된 것으로 보이며 (Jung et al., 2003; Kim and Choi, 2005) 초기 산도가 높을수록 감소되는 산 함량이 높은 경향을 보이고 있다.

Mixed culture를 통해 얻어진 배양액의 total acidity는 전체적으로 single culture 보다 높은 값을 보이고 있으며 이는 유산균에 의해 생성된 젖산의 농도가 높아짐에 따른 영향을 받은 것으로 보인다. 배양 초기 MC-0.0는 0.10%에서 배양 중기(7일 후)에는 0.80%까지 높아졌다가 배양 종료시점(14일 후)에는 0.74%로 약간 감소하는 경향을 보였고 이는 MC-0.5와 MC-1.0도 마

찬가지의 결과를 나타내고 있으며 MC-1.0 배양액의 경우 배양 7일 후 최대 1.52%의 산도를 나타내었다가 배양 종료시점에는 1.10%까지 감소하였다(Fig. 4).

배양일 별 mixed culture의 유산균 생균수 변화

생균수가 2.9×10^8 CFU/ml 수준인 전 배양액을 초산 첨가량에 따른 mixed culture에 각 1%씩 접종하여 배양 단계 별로 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. 초기 초산 첨가농도가 균주의 접종단계에 영향을 미치지 않아보기 위해 접종 직후의 생균수를 측정하였는데 $2.2-2.4 \times 10^6$ CFU/ml 수준의 생균수가 확인됨에 따라 초기 산도는 영향을 미치지 않는 것으로 보여진다. 하지만 1.0%의 초산을 첨가한 MC-배양액에서는 배양 중기(7일 후)에 생균수가 1.3×10^7 CFU/ml 수준까지 증가하였다가 배양 말기(14일 후)에는 0.8×10^6 CFU/ml까지 감소하여 가장 적은 생균 활성을 나타냈다. 반면에 배양 중기에 가장 많은 생균수를 보인 배양액은 초산을 첨가하지 않은 배양액이었으며 배양 말기에는 오히려 0.5%의 초산을 첨가한 배양액에서 1.1×10^7 CFU/ml 수준까지 생균 활성을 유지함에 따라 BC 생산성을 나타내는 값인 dry weight (g/L)이 MC-0.5에서 37.8±6.80 (g/L)으로 가장 높은 값을 보였다는 본 연구의 실험 결과와 일치하는 것으로 보아 배양액 중 *L. plantarum* KCCM 80077의 생균활성이 BC 생산에 영향을 미치는 것으로 보여진다.

초산농도에 따른 single culture와 mixed culture의 BC 생산성 비교

1% 초산을 첨가한 single culture를 control로 결정하고 초산 농도의 차이와 추가로 접종한 유산균과 혼합 배양시킨 mixed culture에서 생성된 BC의 생산성, total acidity 및 pH를 배양 중

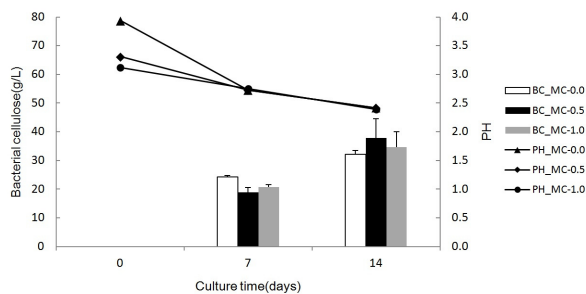


Fig. 3. Effect of culture days on bacterial cellulose production and pH in mixed culture.

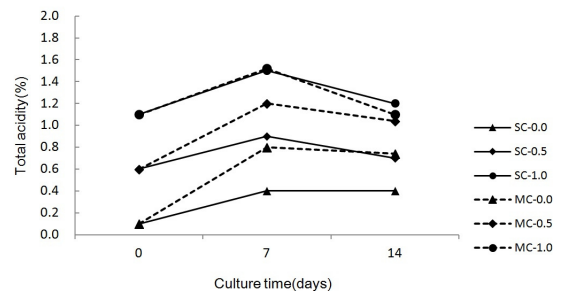


Fig. 4. Effect of culture days on total acidity in single and mixed culture.

Table 3. Effect of acetic acid concentration and mixed culture on bacterial cellulose production after culture during 14 days

	Actic acid concentration (%)	Bcterial cellulose		Total acidity (%)	pH
		DW (g/L) ¹⁾	Thickness (mm)		
Control ²⁾	1.0	28.40±1.23 ^{a,5)}	7.50±0.50 ^a	1.16±0.35	2.36±0.01
SC ³⁾	0.5	32.57±4.83 ^{ab}	8.50±1.32 ^{ab}	0.74±0.35	2.36±0.01
	0.0	31.93±1.96 ^{ab}	9.00±1.00 ^{abc}	0.42±0.00	2.45±0.02
MC ⁴⁾	1.0	34.73±5.44 ^{ab}	9.67±1.15 ^{bc}	1.10±0.35	2.39±0.03
	0.5	37.83±6.81 ^b	10.33±0.58 ^c	1.04±0.35	2.42±0.05
	0.0	32.27±1.17 ^{ab}	9.33±0.58 ^{bc}	0.74±0.35	2.42±0.01

¹⁾ DW, dry weight

²⁾ Control, single culture solution contained in acetic acid of 1.0%

³⁾ SC, Single culture (*Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2)

⁴⁾ MC, Mixed culture (*Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2 and *L. plantarum* KCCM 80077)

⁵⁾ Values are mean±SD and those with different subscripts are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

료 후 비교한 결과는 Table 3과 같다. 먼저 1%의 초산을 첨가한 control은 가장 낮은 2.36±0.01의 pH와 1.16±0.35 (%)의 total acidity를 나타내었고 BC의 dry weight와 thickness는 28.40 ±1.23 (g/L)와 7.50±0.50 (mm)으로 가장 낮은 생산성을 나타내었다. 그리고 SC에서는 0.0 및 0.5%의 초산 첨가 배양액 모두 평균적으로 조금 높은 BC 생산성을 보이기는 하였으나 통계학적으로 유의적인 차이를 나타내지는 못하였다. 하지만 0.5%의 초산을 첨가한 MC 배양액에서는 2.42±0.05의 pH와 1.04±0.35 (%)의 total acidity와 함께 BC 생산성은 37.83±6.81 (g/L)의 dry weight 와 10.33±0.58 (mm)의 thickness로 가장 높은 값을 나타내었으며 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$).

Fig. 5는 BC의 두께(thickness)를 배양 중기인 7일과 배양 종료시점인 14일에 측정된 결과를 종합적으로 보여주고 있으며 배양 중기에는 초산을 첨가하지 않은 SC-0.0와 MC-0.0 배양액에서 높은 BC의 thickness를 나타내고 있고 SC와 MC 배양액간에 유의적인 차이를 보이지 않고 있다. 하지만 배양 14일 이후에는 그 차이가 점차 증대되고 있으며 대조군과 비교하여 MC-배양액 모두에서 유의적인 차이를 나타내었다($P<0.05$). 이는 내산성이 강한 유산균이 배양 종료시점까지 생육활성을 나타냄을 본 실험을 통해 확인 할 수 있었고 대조군 및 SC-배양액과 비교하여 MC-배양액에서 높은 산도를 보이는 것은 유산균이 생성한 젖산

의 영향으로 판단되며 이를 통해 BC의 생산성이 증대되는 것으로 보여진다.

고찰

본 연구에서는 BC를 생성하는 gel_SEA623-2를 이용하여 배양 초기 초산농도와 *L. plantarum* KCCM 80077 유산균의 혼합 배양을 통해 얻어지는 BC 생산량을 dry weight과 thickness를 기준으로 평가하였다. Single culture에서 초기 초산농도가 0.0 및 0.5%일 때 1.0%와 비교하여 상대적으로 높은 BC 생산량을 나타내었으며 이때 초기 pH는 3.91과 3.20였고 BC 생성의 배양 초기 최적 pH가 3.0-4.0으로 확인되었다는(Choi *et al.*, 2004) 연구결과와 비슷한 결과를 나타내었다. Mixed culture의 경우 유산균의 생균수가 배양 종료시점에 1.1×10^7 CFU/ml 수준까지 가장 많이 유지된 0.5% 초산 첨가구(MC-0.5)에서 가장 높은 BC 생산성을 보였으며 이는 BC 생성단계에 lactate를 첨가한 실험구에서 높은 생산성을 보였다는(Matsuoka *et al.*, 1996; Naritomi *et al.*, 1998)결과와 일치하고 있으며 total acidity가 single culture에서는 0.74±0.34로 측정되었으나 mixed culture에서는 1.04±0.35로 측정된 바로 미루어보아 유산균에 의한 추가적인 젖산생성이 BC 생산성에 영향을 미친 것으로 여겨진다. 이렇듯 본 연구를 통해 젖산을 생성하는 *L. plantarum* KCCM 80077이 배양 단계에 초산에 대한 내성을 유지할 수 있다면 BC 생산성 향상에 도움이 될 수 있다는 것을 확인 할 수 있었으며 차후 다른 종의 유산균을 이용한 혼합배양 실험과 BC의 물성특성에 관한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

적요

본 연구에서는 bacterial cellulose를 생산하는 감귤에서 분리된 *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2를 이용하여 초기 초산농도 및 *Lactobacillus plantarum* KCCM 80077 유산균을 접종한 mixed culture가 bacterial cellulose 생산성에 미치는 영향을 알아보았다. 0.5%의 초산을 첨가한 mixed culture의 경우 초기 생균수가 2.4×10^6 CFU/ml에서 14일 동안 배양한 이후에 $1.1 \times$

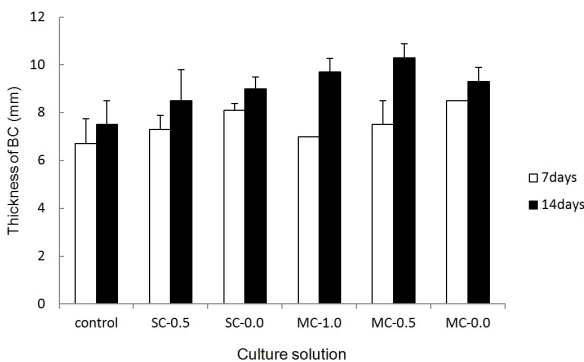


Fig. 5. Comparison of BC-thickness cultured by single and mixed culture. Control, single culture solution contained in acetic acid of 1.0%.

10^7 CFU/ml까지 증가하였고 total acidity가 0.5%의 초산을 첨가한 single culture와 비교하여 0.3% 가량 높게 측정되어 유산균에 의해 추가적으로 젖산이 생성된 것으로 판단된다. Single culture에서는 초기 초산농도가 0.0 및 0.5%일 때 1.0% 농도와 비교하여 상대적으로 높은 bacterial cellulose 생산성을 나타내는 하였으나 유의적인 차이는 보이지 못하였다. 하지만 mixed culture에서는 0.5%의 초산을 첨가하였을 때 37.83 ± 6.81 g/L의 dry weight과 10.33 ± 0.58 mm의 thickness를 나타냄으로써 1%의 초산을 첨가한 single culture의 28.40 ± 1.23 g/L와 7.50 ± 0.50 mm의 생산량과 비교하여 유의적인 차이를 나타내었다($P < 0.05$).

감사의 말

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ00951003)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- AOAC. 1990. Official methods of analysis, p. 180. 13th ed. Association of official analytical chemists, Washington, D.C., USA.
- Cho, K.S., Lee, S.M., Jeong, S.Y., Park, G.T., Lee, H.S., Hwang, D.Y., Jung, Y.J., and Son, H.J. 2014. Static culture condition for production of bacterial cellulose, environment-friendly functional material, by acetic acid bacteria. *J. Environ. Sci. Intl.* **23**, 895-902.
- Cho, J.K., Li, G.H., Cho, S.J., Yoon, Y.C., Hwang, S.G., Heo, K.C., and Choe, I.S. 2007. The identification and physiological properties of *Lactobacillus plantarum* JK-01 isolated from kimchi. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **27**, 363-370.
- Choi, K.H., Jeong, J.S., Moon, C.H., and Kim, M.L. 2004. Effect of carbon source supplement on the gel production from citrus juice by *Gluconacetobacter hansenii* TL-2C. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 170-175.
- Jang, S.Y. and Jeong, Y.J. 2005. Effect of lactate and corn steep liquor on the production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter persimmonis* KJ145. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 561-565.
- Jeon, S., Park, J.W., and Kim, H.J. 2013. Manufacturing and applications of bacterial cellulose. *KIC News* **16**, 37-45.
- Jung, J.Y., Park, Y.H., and Park, J.K. 2003. Effect of medium composition on the bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* PJK. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 94-99.
- Kim, M.L. and Choi, K.H. 2005. Sensory characteristics of citrus vinegar fermented by *Gluconacetobacter hansenii* CV1. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **21**, 263-269.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., and Marsch, S. 2001. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1561-1603.
- Ko, J.Y., Shin, K.S., Yoon, B.D., and Choi, W.Y. 2000. Isolation and identification of *Acetobacter xylinum* GS11 producing cellulose. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 139-146.
- Lee, O.S., Jang, S.Y., and Jeong, Y.J. 2002. Culture conditions for the production of bacterial cellulose with *Gluconacetobacter persimmonis* KJ145. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 572-577.
- Lee, O.S., Jang, S.Y., and Jeong, Y.J. 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.
- Lee, S.Y., Jeon, J.R., and Yang, Y.K. 2005. Characteristics of the physical function of biocellulose from *Acetobacter xylinum*. *Food Engineer. Prog.* **9**, 182-191.
- Lee, S.Y., Park, K.J., Park, S.M., Kim, S.S., and Choi, Y.H. 2011. Production of bacterial cellulose using juice medium with *Gluconacetobacter* sp. SEA623-2. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **29**, 145.
- Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, A., and Yoshinaga, F. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. sucrofermentans. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 575-579.
- Matthysse, A.G., Holmes, K.V., and Gurtz, R.H.G. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J. Bacteriol.* **81**, 583-595.
- Mikkelsen, D., Flanagan, B.M., Dykes, G.A., and Gidley, M.J. 2009. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC53524. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 576-583.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., and Yoshinaga, F. 1998. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *J. Ferment. Bioeng.* **85**, 89-95.
- Park, S.M., Yoon, S.J., Son, H.J., Lee, C.Y., and Kim, H.S. 2010. Properties of bacterial cellulose produced in agitated culture using three kinds of medium. *Textile Sci. Engineer.* **47**, 266-271
- Sim, J.H., Oh, S.J., Kim, S.K., and Baek, Y.J. 1995. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic-acid-bacteria species isolated from lactic acid fermented products. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 101-104.
- Son, H.J., Lee, O.M., Kim, Y.G., Park, Y.K., and Lee, S.J. 2000. Characteristics of cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in static culture. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 573-577.