

박테리아 셀룰로오스의 생산 및 개질*¹

민두식*², 조남석*², 최태호*²

Production of Bacterial Cellulose and Its Modification*¹

Du-Sik Min*², Nam-Seok Cho*² and Te-Ho Choi*²

SUMMARY

The bacterial celluloses are very different in its physical, chemical and morphological structures compared to wood cellulose. These fibers have many unique properties that are potentially and commercially beneficial. This study was aimed to elucidate the production of bacterial celluloses and to improve their physical properties by chemical pretreatment.

Bacterial celluloses produced by static culture had gel-like pellicle structure. The pellicle thickness was increased with the increasing time, and its layer was about 1.8cm after one-month incubation. The pellicles extruded from the cells of *Acetobacter* had a non-crystalline structure during initial growing stages, gradually getting crystallized with the incubation time elapse, and eventually turned to the cellulose I crystals.

Young's modulus of bacterial cellulose sheet was increased with increasing NaOH concentration, and resulted in the highest at 5% NaOH concentration. Similar results with NaClO₃ pretreatment can be observed. Too concentrated alkali solutions induced the destruction of cellulose fibrils and changed the mechanical properties of the sheets. These alkaline pretreatment have removed non-cellulosic components(NCC) from the bacterial cellulose, and enhanced inter-fibrillar bonding by direct close contact among cellulosic fibrils.

Keywords: bacterial cellulose, Young's modulus, *Acetobacter*, pellicle, pretreatment

*1 접수

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구과제(93-0500-05-01-3, 박테리아셀룰로오스의 복합시트제조 및 기능성 사이즈 연구 (제1보)) 연구비 지원에 의해 수행됨.

*2 충북대학교 농과대학, College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

1. 서 언

문명의 발달과 비례하여 종이의 수요가 계속적으로 증대되고 있어, 종이의 소비량이 문명의 바로메타라고도 일컬어지고 있음이 현실이다. 종이는 우리 인간 생활에 없어서는 안될 필요불가결의 재료로서, 기록, 포장 및 구조용등 다종 다양한 용도로서 이용되고 있으며, 최근에 와서는 첨단 통신매체와 컴퓨터 기술의 보급으로 인하여 종이의 수요는 오히려 가속적으로 증가되고 있다. 아울러 종이의 표면특성에 관한 특성의 요구도 또한 더욱 다양화되어가고 있다.

지금까지 목재를 비롯한 목질계 바이오메스로부터 유래된 식물성 셀룰로오스 자원으로 부터 종이 가 대량으로 만들어져 보급되고 있다. 이와같이 셀룰로오스자원은 식물로부터만 얻을 수 있다고 하는 사실이 1886년 Brown¹⁾ 에 의해 식초발효과정에서 초산균에 의해 생성되는 펠리클(pellicle)상의 피막 성분이 셀룰로오스라는 것이 처음으로 밝혀졌다. 이후 미생물을 이용한 박테리아 셀룰로오스의 성질에 관한 많은 연구²⁻⁵⁾ 가 이루어져 왔으며, 생산 및 이용⁶⁻¹³⁾ 에도 관심이 집중하게 되었다. 최근들어 특히 각광을 받게 된 이유는 다각도로 이용되는 종이에 기능성을 부여하기 위하여 새로운 소재의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 박테리아셀룰로오스를 이용하여 식물성 셀룰로오스에서는 찾아볼 수 없는 새로운 기능성재료의 개발이 기대되고 있다. 근년, 박테리아셀룰로오스의 고탄성율을 이용한 스피커의 진동판, 의료용 매트, 고결합능을 이용한 고기능성 시트의 제조, 높은 흡수력을 이용한 농축제, 팽윤제등으로 이용¹⁴⁾ 과 관련된 실용화 및 개발연구가 보고되고 있다. 이러한 특수 기능을 가지고 있는 박테리아셀룰로오스를 제지용 원료로 이용한 예는 그다지 많지 않으며, 제지분야에 사용하여 탄성율과 인장강도를 현저히 향상시킨다는 보고¹⁵⁻¹⁶⁾ 들이 있으며, 도공용 및 기타 충진제와 혼초한 종이의 제조연구¹⁷⁻¹⁸⁾ 등이 있다.

본 연구에서는 박테리아셀룰로오스의 생산과 관련된 박테리아셀룰로오스의 특성을 파악하고, 박테

리아셀룰로오스의 물성향상을 위한 전처리방법에 대하여 조사코자 하였다.

2. 실험방법

2.1 박테리아 셀룰로오스의 발효적 생산

Table 1. Cultural medium for seed broth of *Acetobacter xylinum*

Ingredients	Content
Yeast extract	0.5 g/dl
Peptone	0.3 g/dl
Mannitol	2.5 g/dl

사용한 균주는 초산박테리아 *Acetobacter xylinum* GS 11 으로서 표 2의 배양액에 표 1의 조성을 추가하여 만든 배양액을 멸균처리한 다음, 시험관 사면배지에서 30℃, pH 6.0의 조건에서 7일간 배양하였다. 배양된 종균은 표 2의 조성을 가진 배양액에 접종하고, pH 5.0, 30℃에서 30일간 정지배양하였으며, 생성된 박테리아 셀룰로오스를 공시하였다. 이렇게 하여 얻어진 펠리클(pellicle, 발효생성물을 의미하는 것으로서, 여기에서는 박테리아셀룰로오스로 이루어진 막을 뜻한다)을 Yamanaka 등(1989)의 방법¹²⁾에 따라 흐르는 물로 충분히 세척한다음, 박테리아세포 및 다른 성분들을 제거하기 위하여 2% NaOH 용

Table 2. Cultural medium for fermentative production of bacterial cellulose

Ingredients	Content
Sucrose	50 g
Yeast extract	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
Water	1 l
pH	5.0

액에서 1시간 끓인후, 중성이 될때까지 세척하였다. 셀룰로오스의 함량은 105±2℃에서 함량이 될 때까지 건조시켜 중량법으로 측정하였다.

2.2 결정화도의 측정

박테리아 셀룰로오스 및 펄프시료를 X-ray Diffractometer(Rikaku Model Max 30)을 사용하여 Ni-filter, Cu-target, 30kv, 15mA, 회절각은 0 - 60 의 측정조건에서 실시하였으며 계산은 Segal식¹⁹⁾에 의해 산출하였다.

$$\text{결정화도} = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100$$

I_{002} : 22.5°에 의한 간섭강도

I_{am} : 18.5°에 의한 간섭강도

2.3 박테리아셀룰로오스의 개질

2.3.1 가성소다 처리

1, 3, 5, 7, 9, 11%의 NaOH 수용액을 조제하여 충분히 세척한 박테리아셀룰로오스를 상온에서 15시간 침지처리하였다. 처리가 끝난 박테리아셀룰로오스는 충분히 세척 후 공시하였다.

2.3.2 아염소산염 처리

1, 3, 5, 7, 9%의 NaClO₃ 수용액을 조제하여 상기의 NaOH 처리와 마찬가지로 충분히 세척한 박테리아셀룰로오스를 침지하고, 상온에서 15시간 처리하였다. 처리가 끝난 셀룰로오스는 충분히 세척한 후 공시하였다.

2.4 박테리아 셀룰로오스를 이용한 시트 제조

2.4.1 박테리아셀룰로오스의 해섬

박테리아셀룰로오스를 물로 잘 세척하고 10배량의 1% NaOH용액중에서 1시간 끓인 다음, 중성이

될때까지 세척하고, Tappi 표준 해리기로 1시간 해리한다음 사용하였다. 경우에 따라서는 가정용 믹서를 사용하여 분산처리하였다.

2.4.2 수초지 제조

박테리아셀룰로오스 시트를 만들기 위하여 수초지기로서 membrane filter unit를 이용한 간이 수초지기를 제작하여, 초지 하였으며, 셀룰로오스 시트와 membrane 간의 접착을 막기 위하여 20 mesh 나이론천을 스크린으로 사용하였다.

2.5 종이의 물성시험

제조된 시트는 관계습도 65%, 20±2℃에서 24시간 조습처리한 다음, Tensilon UTM-III을 사용하여 정적 탄성율(Young's Modulus)을 측정하였다. 종이의 지름이 75mm 밖에 되지 아니하였으므로 span 길이를 30mm로 하였고, 인장속도도 3mm/min.으로 하였다. 정적탄성율(Young's modulus)은 (tensile stress)/(tensile strain)로 나타내며, 계산은 F/(b x t).1/ε (F: force, b: width, t: thickness, ε: strain)로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 배양시간에 따른 박테리아셀룰로오스 펠리클의 두께

배양시간이 경과 함에 따른 박테리아셀룰로오스 펠리클의 두께는 그림 1에서 보는 바와 같이 초기에는 소폭 증가하다가 3일이 지나면서 급속히 증가되었으며, 10일이 경과되면서 점차 증가정도가 낮아지는 경향을 보여 주었다. 1개월이 경과한 의의 폭은 1.8 cm 였다. 이들 박테리아셀룰로오스 펠리클은 리본상의 마이크로피브릴들이 서로 엉켜있거나, 겹쳐진 수많은 피브릴로 이루어지며, 매우 유연한 성질을 가지고 있었다.

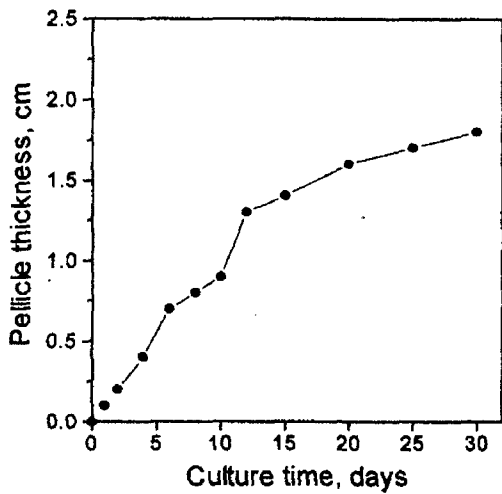


Fig. 1. Change of pellicle thickness with culture time.

3.2 배양시간과 셀룰로오스함량과의 관계

그림 2는 배양시간에 따른 펠리클이 함유하고 있는 셀룰로오스함량을 나타낸 것으로서, 배양시간이 증가되면서 셀룰로오스의 생성·신장과 함께 셀룰로오스함량이 급격히 증가되었으며, 이러한 증가는 배양 10일만에 안정되어 0.7% 수준에서 포화되는 것으로 나타났다. 이러한 셀룰로오스함량이 더 이

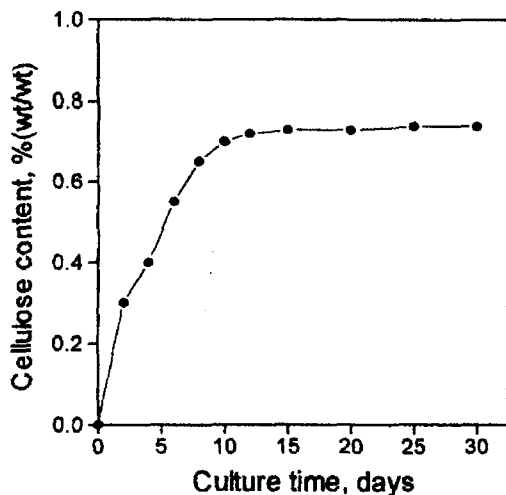


Fig. 2. Change of cellulose content of pellicle with culture time.

상 증가되지 않는 것은 배양액중의 박테리아가 합성에 필요한 배양액의 성분결핍 및 pH의 감소때문인 것으로 생각되며, 계속적으로 활발한 셀룰로오스의 합성능을 유지하기 위해서는 영양원의 보충 및 pH를 최적으로 조정해 주어야 한다.

3.3 박테리아셀룰로오스의 특성

3.3.1 마이크로 피브릴의 형태

Table 3. Microfibril width of various natural cellulose

Cellulose	Microfibril width (Å)
Bacteria cellulose	70 - 100
Valonia cellulose *	250 - 300
Cotton cellulose *	50 - 60
Ramie cellulose *	50 - 60
Cambium cellulose(wood) *	15
Plant cellulose(P) *	20 - 25
Wood cellulose(SW) *	50 - 100

* Takai M. 1992. Sen-i Gakkaishi 48(4):153-157

식물 및 목재중에 존재하는 셀룰로오스는 D-glucose가 β -1,4-glycoside로 결합된 직쇄형의 고분자로서 자연계에서는 이러한 모양의 분자들이 다수 다발로 이루어져 물리적 구조의 기본단위인 마이크로 피브릴, 피브릴로 형성되면서 셀룰로오스섬유와 같은 최종적인 구조를 갖게 된다.

박테리아셀룰로오스를 구성하는 마이크로 피브릴은 전자현미경 관찰에 의하면 폭이 70-100 Å의 균일한 폭을 가지는 리본상의 형태를 가지며, 이와같은 마이크로 피브릴은 박테리아균체로부터 직접 압출된 것으로 보고^{22,23)} 되고 있다. 참고로 각종 천연셀룰로오스의 마이크로 피브릴 폭¹³⁾은 표 3과 같다.

3.3.2 X-Ray diffraction 특성

박테리아 셀룰로오스는 균체로부터 셀룰로오스 체인이 압출되어 잠시동안은 비결정상태를 유지하

고 있지만, 표 4에서 보는바와 같이 시간이 경과함에 따라 점차 결정화도가 증가되어, 균체는 셀룰로오스 체인을 단분자층 시트의 형태로 세포로부터 압출하게 되며²⁰⁾, 최종적으로는 셀룰로오스 특유의 X-선 회절을 나타내는데 그 모양이 셀룰로오스 I의 결정구조를 갖는다. 그러나 천연셀룰로오스와 다른점은 특정한 미결정면이 생성되는면에 평행으로 배열하는 선택적인 면배향구조를 취하고 있다는 것이다.

Table 4. Crystallinity of wood pulp and bacterial cellulose

	Crystallinity, %
Hardwood bleached K P.	78
Bacterial cellulose	
3 days	82
6 days	84
9 days	86
12 days	87
15 days	86

리본상으로 생성되는 마이크로 피브릴이 선택적인 면배향구조를 가지고 있으며, 막전체의 면배향성은 이들 리본상의 마이크로 피브릴들의 배열방식에 따라 결정된다고 생각된다. 다시말해 리본상의 마이크로 피브릴면에 평행하게 배열할수록 면배향성이 높게 된다. 따라서 배지중에 생성되는 셀룰로오스 막을 재생시키는 방법에 따라 면 배향도가 다른 막을 제조할 수 있을 것으로 판단된다.

3.4 박테리아셀룰로오스 시트의 물성

3.4.1 NaOH 처리효과

전술한 바와 같이 박테리아 셀룰로오스의 마이크로 피브릴 면배향구조를 재생시키는 방법에 따라 면배향도가 다른 셀룰로오스 제조가 가능할것으로 예상되어농도를 달리하는 NaOH 용액에 상온에서 15시간 침지시킨 다음, 충분히 세척하고, 젤모양의 펠리클을 2매의 스테인레스 스틸판에 끼워 탈수한

다음, 120℃에서 건조시켜 시트를 제조하여, 정적 탄성계수를 측정 한 결과는 그림 3과 같다.

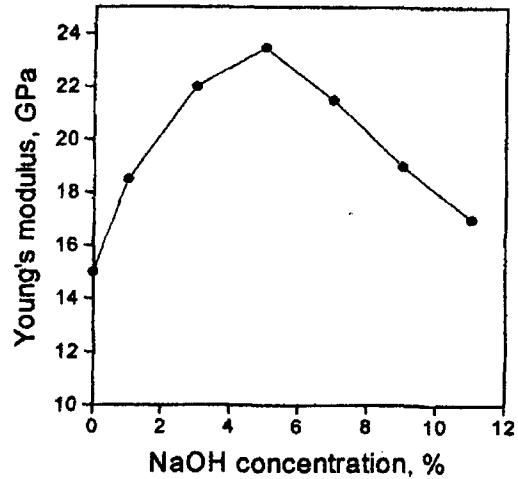


Fig. 3. Young's modulus of bacterial cellulose sheet with NaOH treatment.

시트의 탄성계수는 알칼리의 농도가 높아짐에 따라 증가하였으며, 5% NaOH 농도에서 최대의 탄성계수를 결과하였고, 5% 이상의 알칼리농도에서는 오히려 감소되는 경향으로 나타났다. 이와같이 초기의 농도가 낮은 NaOH 처리로 박테리아셀룰로오스의 강도증가가 일어나는 현상은 알칼리처리를 함으로서 박테리아 셀룰로오스 중의 비셀룰로오스 성분(Non-cellulosic components, NCC)을 녹이기 때문으로 생각된다. 비셀룰로오스 성분은 박테리아의 세포 및 배양액으로부터 유도된 단백질 및 핵산과 같은 질소를 포함하는 화합물로 이루어진 것으로 보고¹³⁾ 되고 있다. 이와같은 NCC 성분이 박테리아셀룰로오스로부터 제거되면 셀룰로오스 피브릴들이 직접 혹은 간밀히 접촉하게 되므로 강한 분자내 혹은 분자간 수소결합이 형성하게 되어 영계수가 증가되지만, 너무 높은 농도의 알칼리는 셀룰로오스의 수축과 심한 curl 현상을 일으키게 되며, 더욱 알칼리 농도가 높아지면 심한 변형까지도 일어나게 된다. 실제로 박테리아셀룰로오스를 NaOH로 처리한 용액을 UV 분광계로 측

정한 결과, 280nm 및 260 nm 에서 상대흡광도비에 따라 단백질 및 핵산의 용탈을 확인할 수 있었다. 상기 불순물을 Warbury-Christian (A_{280}/A_{260}) 법²¹⁾ 으로 측정하여 상대흡광도의 비에 따른 단백질 및 핵산량을 계산하였으며, 그 결과는 표 5 와 같다.

Table 5. Components of NCC from bacterial cellulose by alkali extraction

	NCC	
	Protein(mg/l)	Hexane(%)
0	0.15	7.5
1	0.42	12.5
2	0.43	13.7
3	0.43	11.5
4	0.42	11.5
5	0.42	11.0

표에서 보는바와 같이 무처리의 경우는 매우 적은량의 단백질 및 핵산이 용출되는데 비하여, NaOH 처리에 의해 단백질 및 핵산량이 NCC 중에 급증함을 볼 수 있으며, NaOH의 농도가 1% 이상으로 높아지더라도 용출량이 증가되지 않았다. 이러한 결과로부터 박테리아 셀룰로오스를 1% NaOH 만으로 처리하여도 불순물이 충분히 제거가 가능함을 알 수 있었다.

3. 4. 2 NaClO₃ 처리효과

농도를 달리하는 NaClO₃ 용액에 상온에서 15시간 침지시킨 다음, 충분히 세척하고, NaOH 처리에서와 동일한 방법으로 시트를 제조하여, 정적탄성계수를 측정된 결과는 그림 4 와 같다.

이 결과도 NaOH 처리와 거의 유사한 결과로 나타났는데, NaClO₃ 5 % 가 가장 높은 탄성계수를 보여주었으며, 그 이상 농도가 증가하더라도 강도 증가에는 효과가 없었다. 이와같이 박테리아셀룰로오스의 강도가 NaClO₃ 처리로 증가되는 것은 NaOH 처리와 마찬가지로 NaClO₃ 와 같은 산화제

처리가 박테리아셀룰로오스중의 비셀룰로오스 성분(Non-cellulosic components, NCC)을 녹이기 때문으로 생각된다. 이와같은 NCC 성분이 박테리아셀룰로오스로 부터 제거되면 셀룰로오스 피브릴들이 직접 혹은 긴밀히 접촉하게 되므로서 강한 분자내 혹은 분자간 수소결합이 형성하게 되어 탄성계수가 증가하게 되며, 너무 높은 농도의 약액처리를 받게 되면 셀룰로오스 피브릴의 파괴를 가져와 강도가 오히려 감소되는 것으로 생각된다.

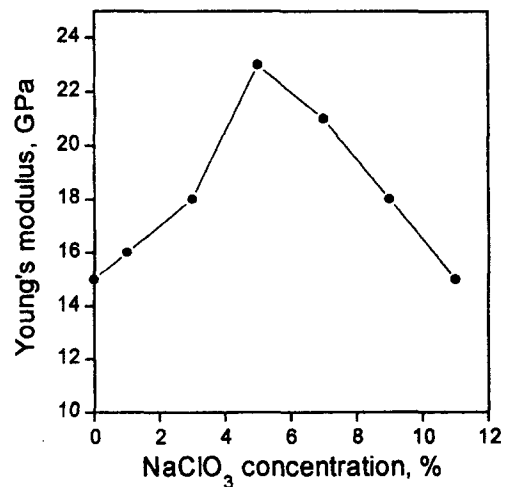


Fig. 4. Young's modulus of bacterial cellulose sheets with NaClO₃ treatment.

4. 결론

배양시간이 경과함에 따라 박테리아셀룰로오스 펠리클의 두께는 초기에는 소폭 증가하다가 시간경과와 함께 급속히 증가되었으며, 10일이후는 점차 증가정도가 낮아지는 경향을 보여 주었다. 1개월후 폭이 1.8 cm 되었다. 배양시간에 따라 펠리클이 함유하고 있는 셀룰로오스함량은 배양시간에 따라 급격히 증가되었으며, 10일이 경과되면서 일정수준을 유지하였다.

박테리아셀룰로오스는 균체로부터 압출된 초기에는 비결정상태를 유지하고 있지만 시간이 경과함

에 따라 점차 결정화도가 증가되며, 최종적으로는 셀룰로오스 특유의 X - 선 회절을 나타내는데 그 모양이 셀룰로오스 I의 결정구조를 갖는다.

박테리아셀룰로오스 시트의 물성과 관련하여 NaOH 및 NaClO₃처리에 따른 박테리아셀룰로오스 시트의 물성은 두처리 모두 알칼리 농도 5%에서 최대의 탄성계수를 나타내었으며, 그 이상의 처리농도에서는 감소하였다. 이러한 강도의 증가는 알칼리처리가 박테리아셀룰로오스중의 비셀룰로오스 성분(Non-cellulosic components, NCC)을 제거하여 셀룰로오스 피브릴들이 직접 혹은 긴밀하게 접촉하여 분자간 강한 수소결합을 형성시키기 때문인 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Brown, A.J. 1886. J. Chem. Soc. 49:432-441
2. Muhlethaler, K. 1949. The structure of bacterial cellulose. Biochemica et Biophysica Acta 3:527-535
3. Brown, R.M.Jr. 1985. Cellulose microfibril assembly and orientation: Recent developments. J. Cell. Sci. Suppl. 2:13-32
4. Akira, K. and K. Tomoki. 1985. The structure and time evolution of a cellulose sheet in the nascent fibril produced by *Acetobacter xylinum*. Makromol. Chem. 186(12):2609-2614
5. Akira, K. and K. Tomoki. 1985. The structure of a cellulose sheet in the nascent fibril produced by *Acetobacter xylinum*. Chem. Lett., 5:607-610
6. Johnson and Johnson Products. 1984. Japan Pat. Showa 59-120159
7. 工業技術院. Sony(株). 味ノ素. 1989. 日本公開特許 昭和 61-281800
8. 味ノ素. 三菱製紙. 1989. 日本公開特許 平 1-156600
9. Kai, Akira. 1989. Present prospect and problems of study on bacterial cellulose. Japan Tappi 43(5):1-13
10. Watanabe, K. and S. Yamanaka. 1991. Petrotech 14(5):42-45
11. Takai M. 1992. Biosynthesis and application of bacterial cellulose. Sen-i Gakkaishi 48(4):153-157
12. Yamanaka, K. Watanabe, N. Kitamura, M. Iguchi, S. Mitsunashi, Y. Nishi, M. Uryu. 1989. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. J. Mat. Sci. 24:3141-3145
13. Y. Nishi, M. Uryu, Yamanaka, K. Watanabe, N. Kitamura, M. Iguchi, S. Mitsunashi, 1989. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. Part 2. Improvement of the mechanical properties of sheets and their applicability to diaphragms of electroacoustic transducers. J. Mat. Sci. 25:2997-3001
14. Shibazaki H., S. Kuga, and F. Onabe. 1994. Mechanical properties of papersheet containing bacterial cellulose. Japan Tappi 48(12):93-102
15. Cannon, R., E. Steven, and M. Anderson. 1991. Biogenesis of bacterial cellulose. Crit. Rev. Microbiol. 17(6):435-437
16. Kai, A., and X. Ping. 1990. structure of bacterial cellulose - brightner complex from aspect of behavior of its mercerization. Polym. J. 22: 955-961
17. Johnson, D.C. and A.R. Winslow. 1990. Bacterial cellulose has potential application as new paper coating. Pulp Paper 5:105-107
18. Kitamura, N. and T. Katsura. 1989.

- Preparation of sheet substrates containing bacterial cellulose additives. Jpn Kokai Tokkyo Koho 5
19. Segal, L., J.J. Creely, A.E. Martin, Jr. and C.M. Conrad. 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Res. J.* 29:786-794
 20. Kai, A. 1985. Sheet structure of bacterial cellulose in nascent fibril during initial synthetic stage. *The Proc. Ann. Conf. Japan Mokuzaigakkaishi* 35:258
 21. 한국 생화학회 교재편찬위원회. 1994. *신판 생화학*. 탐구당. 258-259
 22. Ross, P., R. Mayer and M. Benzamin. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Review* 5:35-38(1991)
 23. Novel, T.P. and S.H. Zeronian. 1985. *Cellulose Chemistry and Its Application*. Ellis Horwood Ltd., 67-78