

정치배양에서 *Acetobacter* sp. A9에 의한 셀룰로오스 생산특성

†손 홍 주·이 오 미·김 용 균·¹박 연 규·²이 상 준
밀양대학교 생물공학과, ¹환경공학과, ²부산대학교 미생물학과
(접수 : 2000. 8. 21., 게재승인 : 2000. 10. 23.)

Characteristics of Cellulose Production by *Acetobacter* sp. A9 in Static Culture

Hong-Joo Son†, O-Mi Lee, Yong-Gyun Kim, Yeon-Kyu Park¹, and Sang-Joon Lee²

Department of Biotechnology, ¹Department of Environmental Engineering, Miryang National University, Miryang, Kyungnam 627-702, Korea

²Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received : 2000. 8. 21., Accepted : 2000. 10. 23.)

The optimum fermentation conditions for the production of cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 were determined in static cultures. The strain was able to produce cellulose at 25-30°C with a maximum at 30°C. Cellulose production occurred at pH 6.5-8.0 with a maximum at pH 6.5. The optimal culture medium was found to consists of 1.0% glucose, 1.0% yeast extract, 0.7% polypeptone, 0.15% acetic acid and 0.02% succinic acid. Cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 followed the growth curve. Highest cellulose production, under optimum conditions, was 24.1 g/m², although this strain typically produced only 12.1 g/m² in the basic medium. Cellulose production also depended on the depth and volume of the medium.

Key Words : *Acetobacter* sp., bacterial cellulose, static culture

서 론

셀룰로오스는 지구상에서 가장 풍부하게 존재하는 재생가능한 천연다당류이자 고등식물의 주요 구성성분으로서 현재 제지, 펄프 및 방적산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있다. 셀룰로오스의 소비가 급증함에 따라 그 원료로 사용되는 목재에 대한 수요도 갈수록 높아지고 있으나 원료공급과 환경문제로 인하여 제지 대체물질에 대한 연구가 절실한 형편이다(1,2). 따라서 미생물에 의하여 생성되는 셀룰로오스(bacterial cellulose; BC)에 대한 관심이 높아지고 있는데, BC는 식물유래 셀룰로오스에서는 찾아볼 수 없는 독특한 성질로 인하여 새로운 기능성 재료로서 기대를 모으고 있다(3).

BC는 주로 *Acetobacter* strains을 이용한 정치배양에 의하여 가-액 계면에 젤라틴성의 membrane (pellicle)의 형태로 생산되는데, lignin이나 hemicellulose가 전혀 없는 순수한 상태로 합성되기 때문에 독성 폐기물의 동반없이 환경친화적으로

정제할 수 있다(4). 또한 BC는 높은 신장강도, 보수성을 가지고 있으므로 고성능 진동판, 고품질 제지 및 식이식품으로서 이용되고 있으며 지혈대, 인공피부, 한외여과막, 포도당 바이오센스를 위한 cover-membrane, 포유동물세포의 배양기질, 페인트나 잉크를 위한 binder 및 접착제 등의 용도로서도 개발 가능성이 아주 높다(5). 정치배양에 의한 BC 생산은 많은 노동력 및 부지를 필요로 하므로 산업적 관점에서 보면 다소 비효율적인 과정이다(5). 따라서 BC의 생산성 향상을 위하여 교반배양을 이용하는 공정이 필요하나 교반배양시에는 셀룰로오스를 생산하지 않는 돌연변이체(Cel⁻)가 생성되는 단점이 있으므로(6) 최근 이에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

그러나 정치배양에 의하여 생산된 BC는 지혈대나 화상치료용 등 의학적 용도로 사용하기 용이한 pellicle의 형태(7)인 동시에 이 pellicle로 제조한 sheet는 15 GPa 이상의 극단적으로 높은 탄성계수를 가지므로(8) 정치배양에 의한 BC 생산조건 확립도 필요한 실정이다. 이러한 연구의 일환으로 최근 Kojima 등(9)은 정치배양에서 sucrose로부터 BC 생산능이 우수한 *Acetobacter xylinum* subsp. *nonacetoxidans* subsp. Nov.를 분리한 바 있다. 최근 저자들은 정치 및 교반배양에서 BC를 생산하는 *Acetobacter* sp. A9를 부패한 사과로 부터 분리, 동정하여 보고한 바 있다(10).

†Corresponding Author : Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea
Tel : +82-55-350-5484, Fax : +82-55-350-5484
E-mail : shjoo@arang.miryang.ac.kr

따라서 본 연구에서는 먼저 정치배양에서 *Acetobacter* sp. A9에 의한 BC 생산특성과 BC 생산에 영향을 미치는 영양인자들에 대하여 조사함으로써 BC 생산성을 향상시키고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 손 등(10)에 의하여 부패된 사과로부터 분리 및 동정된 *Acetobacter* sp. A9이었다. 기본배지의 조성은 glucose 2.0%, yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.675% 및 citric acid monohydrate 0.115%(pH 6.0)이었으며, 기본배지에 기초하여 BC 생산용 배지를 확립하였다. 전배양은 50 ml의 기본배지가 함유된 250 ml 용량의 conical flask에 평판천배지에서 보존중인 균주 한 백금이를 접종하여 30℃에서 48 시간동안 정치배양하였다. 형성된 pellicle로부터 세포를 유리시키기 위하여 10분간 강하게 진탕한 후, 멸균된 거즈로 여과하였다. 이 세포현탁액 5%(v/v)를 본배양액 50 ml (표면적 = 50.2 cm²)가 함유된 250 ml 용량의 conical flask에 접종하여 30℃에서 7일간 정치배양하였다. 정치배양에서 배지의 부피, 깊이 및 표면적에 따른 BC의 생산특성을 검토하기 위하여 동일직경의 배양용기를 사용함으로써 배지의 표면적을 일정하게 유지시키고 배지량과 배지 깊이의 변화에 따른 BC 생산량을 검토하였다. 또한 직경이 서로 다른 배양용기를 사용함으로써 배지량을 일정하게 유지시키면서 배지의 표면적과 깊이 변화에 따른 BC 생산량을 검토하였다.

분석방법

균체생육은 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었다. 즉 배양액을 homogenizer (EGS-8, Sunbow Co., Korea)로 10분간 파쇄하여 pellicle내에 존재하는 세포들을 유리시킨 후, 6층의 거즈로 여과한 세포현탁액의 흡광도를 측정하였다. BC의 정제는 Embuscado 등(11)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 배양액으로부터 회수된 pellicle을 증류수로 세척하여 배양액 성분을 제거한 후, 0.5N NaOH에 담구어 90℃에서 1 시간동안 처리함으로써 세포를 용해시켰다. 이 pellicle을 중성이 될 때까지 증류수로 세척한 후, 105℃에서 향량이 될 때까지 건조하여 건조중량을 측정하였다. BC의 생산량은 g/petri dish 또는 g/m²로 나타내었다. Glucose 및 gluconic acid의 농도는 각각 glucose reagent kit(Sigma cat. no. 510-DA) 및 gluconic acid analysis kit(Boehringer Mannheim cat. no. 428 191)로 측정하였다.

결과 및 고찰

배양온도 및 pH의 영향

기본배지를 이용하여 배양온도를 각각 25-40℃로 조절한 후 배양한 결과, BC 생산능은 30℃에서 가장 우수하였으며 35℃ 이상의 온도에서는 BC가 거의 생산되지 않았다 (미제시). 한편 배지의 초기 pH를 3.0-9.0으로 조절하여 배양한 결과, pH 6.5-8.0에서 우수한 BC 생산능을 보였으며, pH 6.5에

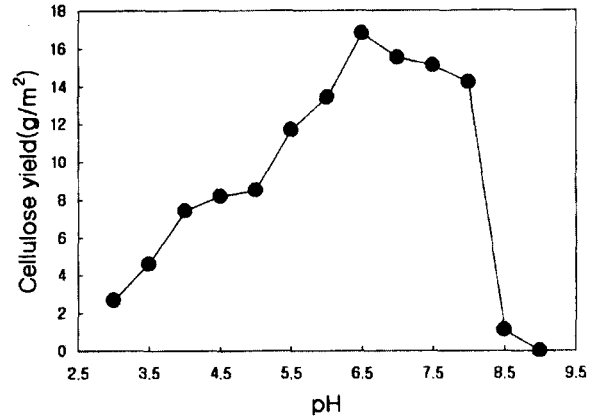


Figure 1. Effect of initial pH on cellulose production by *Acetobacter* sp. A9. Cells were cultivated for 7 days in the basic medium. Culture volume = 50 ml, culture surface-area = 50.2 cm².

Table 1. Effect of carbon sources on cellulose production by *Acetobacter* sp. A9

Carbon sources	Cellulose yield(g/m ²)
Glucose	15.5
Fructose	13.0
Sucrose	2.6
Maltose	2.8
Lactose	2.1
Trehalose	13.2
Mannitol	17.1
Sorbitol	3.9
Acetic acid	1.7
Lactic acid	6.4
Fumaric acid	0
Succinic acid	0.6
Gluconic acid	12.9
Malic acid	0
Pyruvic acid	1.1

Various carbon sources were added at the final concentration of 2%(w/v or v/v) to the basic medium containing 0.5% yeast extract and 0.5% polypeptone as the nitrogen source. Cells were cultivated for 7 days. Culture volume = 50 ml, culture surface-area = 50.2 cm².

서 16.8 g/m²로 최대의 생산능을 나타내었다. 또한 pH 4.0-6.0에서 7.4-13.4 g/m²의 BC가 생산되었으며, pH 9.0에서는 BC가 전혀 생산되지 않았다(Figure 1). 일반적으로 *A. xylinum*에 의한 BC 생산 최적 pH 영역은 4.0-7.0인 것으로 알려져 있는데, Masaoka 등(12)은 pH 4.0-6.0에서, Vandamme 등(13)은 pH 5.5에서 BC 생산이 최대라고 보고하였다. 본 균주의 경우, 이들 보고와는 달리 pH 6.5-8.0에서 높은 BC 생산능을 나타내는 특성을 가지고 있었다.

탄소원의 영향

탄소원이 BC 생산능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 각종 탄소원을 2.0%씩 첨가하여 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 즉 glucose, fructose, trehalose, mannitol 및 gluconic acid 등이 우수한 BC 생산능을 나타내었으며 특히, mannitol (17.1 g/m²)은 glucose (15.5 g/m²)보다

Table 2. Effect of nitrogen sources on cellulose production by *Acetobacter* sp. A9

Nitrogen sources	Cellulose yield(g/m ²)
Yeast extract	9.5
Casamino acid	0
Polypeptone	6.0
Tryptone	5.1
Malt extract	1.7
Beef extract	7.5
Corn steep liquor	6.3
Casein enzymatic hydrolysate	6.6
NH ₄ Cl	0
NH ₄ H ₂ PO ₄	0
NH ₄ NO ₃	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0
KNO ₃	0
NaNO ₂	0
NaNO ₃	0
None	0

Cells were cultivated for 7 days in the glucose medium with an initial nitrogen source concentration of 0.5%(w/v). Culture volume = 50 ml, culture surface-area = 50.2 cm².

생산능이 높았다. 이 결과는 정치배양의 경우, glucose보다 mannitoli이 BC 생산에 더 효과적이라는 Oikawa 등(14)의 보고와 일치하였다. 그러나 정치배양에 있어 BC 생산에 이용되는 일반적인 탄소원은 glucose로 알려져 있다(2). 경제성을 고려하여 glucose를 최적 탄소원으로 선정하여 7일간 배양 후, BC 생산을 위한 최적농도를 조사한 결과, 1.0% (15.9 g/m²)로 결정되었는데 이때, 배양액의 최종 pH는 4.3이었다. 3-10%의 glucose를 첨가한 경우, 배양 7일 후 배양액의 pH가 모두 2.6 이하로 감소하였으며, 3-14 g/l의 glucose가 잔존하였다. 따라서 배양시간을 연장하였으나 BC 생산능은 더 이상 증가하지 않았다(미제시). 이것은 아마 배지의 pH가 *Acetobacter* sp. A9의 생육을 저해하는 산도까지 감소된 것에 기인한 것으로 판단된다. 한편 Masaoka 등(12)은 glucose 농도 증가에 비례하여 BC 생산이 감소하므로, glucose의 초기농도를 저농도로 하여야 한다고 하였으며, Schramm 등(15)은 glucose를 탄소원으로 공급하였을 때, glucose의 일부가 gluconic acid로 전환되어 배지의 pH를 감소시킨다고 하였다.

질소원의 영향

질소원이 BC 생산능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1.0% glucose가 함유된 기본배지에 각종 질소원을 0.5%씩 첨가하여 배양한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 즉 질소원을 첨가하지 않은 경우와 casamino acid 및 무기질소원을 첨가한 경우에는 BC가 전혀 생산되지 않았으며, yeast extract, polypeptone, beef extract, corn steep liquor(CSL) 및 casein enzymatic hydrolysate에서 BC 생산능이 우수하였다. 따라서 yeast extract 등 복합질소원에 함유되어 있는 아미노산, 비타민 등이 본 균주에 의한 BC 생산에 필수적일 것으로 추정되었다. 최적 질소원으로 yeast extract를 선정하여 최적농도를 조사한 결과 1.0%에서 BC 생산능이 최대(12.6 g/m²)였으며, 0.7%의 polypeptone을 추가적으로 첨가하였을 때 BC 생산능이 증가(14.8 g/m²)하였다(미제시). 한편, 0.5%의 CSL은 6.3 g/m²

Table 3. Effect of secondary substrates on cellulose production by *Acetobacter* sp. A9

Compounds(0.1%, v/v or w/v)	Cellulose yield(g/m ²)
Ethanol	13.9
Acetic acid	17.8
Lactic acid	14.8
Citric acid	14.9
Fumaric acid	16.9
Succinic acid	17.1
Malic acid	17.1
Pyruvic acid	14.3
None	14.1

Cells were cultivated in the glucose medium for 7 days. Culture volume = 50 ml, culture surface-area = 50.2 cm².

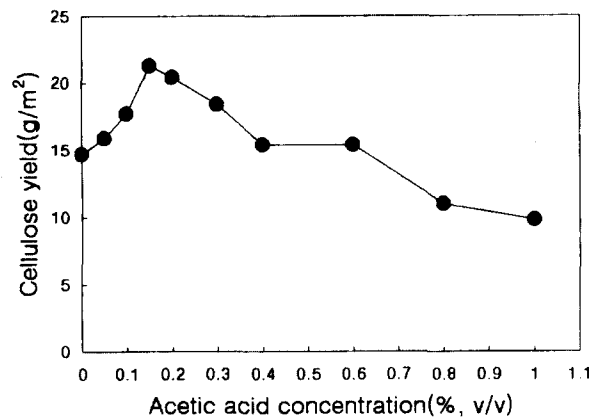


Figure 2. Effect of acetic acid concentrations on cellulose production by *Acetobacter* sp. A9. Cells were cultivated for 7 days in the glucose medium. Culture volume = 50 ml, culture surface-area = 50.2 cm².

의 BC를 생산하였으므로 고가의 yeast extract 대체 질소원으로서의 가능성에 대한 계속적인 연구가 요구되었다.

인산염 및 보조기질의 영향

인산염이 BC 생산능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 Na₂HPO₄ · 12H₂O를 0-1%의 농도로 각각 조절하여 배양한 결과, 인산염을 첨가하지 않았을 때 BC 생산능이 가장 높았으며, 농도가 높아질수록 생산능이 감소하였다(미제시). 기본배지에 함유된 citric acid대신 각종 유기산 및 에탄올을 0.1%씩 첨가하여 배양한 결과, 에탄올을 첨가한 경우 무첨가 대조구보다 BC 생산능이 약간 감소하였으나 첨가된 모든 유기산은 기본배지에 citric acid를 제거한 경우보다는 BC 생산능을 증가시켰다(Table 3). 특히 acetic acid를 첨가한 경우, BC 생산능이 가장 우수하였으며, 0.15%에서 최대 21.3 g/m²의 BC가 생산되었다(Figure 2). BC 생산능을 증가시켰던 유기산중 0.02%의 succinic acid를 추가적으로 첨가함으로써 BC 생산능은 더욱 증가(22.7 g/m²)되었다(미제시). BC를 생산하는 *Acetobacter* strains는 glucose로부터 BC 합성을 위한 전구체를 생산할 수 있는 uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase 활성이 높은 특성을 가지고 있다(16). 따라서 glucose는 BC를 합성하는데 주로 이용되며, 생육에 필요한 에너지를 생산하는데는 거의 이용되지 않는다(13). Matsuoka 등(17)은 보조기

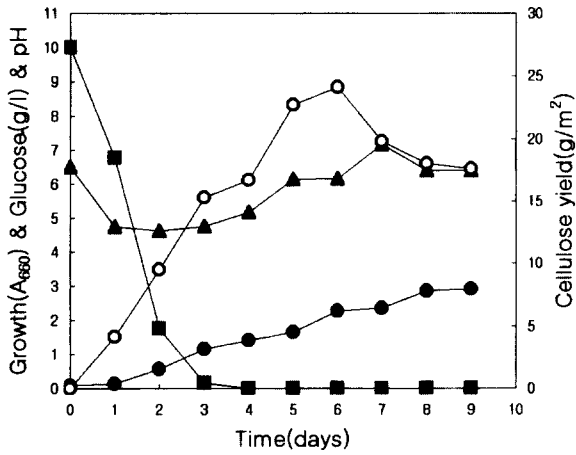


Figure 3. Time course of cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in flask culture. Cells were cultivated in optimal medium containing 1.0% glucose at 30°C, pH 6.5 and static condition. Culture volume = 50 ml, culture surface-area = 50.2 cm². ■, glucose; ▲, pH; ●, cell growth; ○, cellulose.

질로 첨가한 lactic acid는 glucose의 대사흐름을 BC 합성에서 TCA cycle로 전환시킴으로써 균체생육이 촉진되고, 균체생육 증가에 따라 결과적으로 BC 생산성도 증가한다고 하였다. 또한 TCA cycle의 중간산물들과 acetic acid 등도 ATP 공급원으로 작용함으로써 *A. xylinum*의 생육을 촉진하고, 이에 따라 BC의 생산성도 증가되는 것으로 보고되어 있다(18). 본 실험에 사용된 유기산들은 모두 TCA cycle과 연계되어 있는 물질들이므로 아마 lactic acid와 동일한 기능을 가졌으리라 추정되었다.

최적조건하에서 BC 생산

상기 결과에 기초하여 확립된 BC 생산 최적배지조건은 glucose 1.0%, yeast extract 1.0%, polypeptone 0.7%, acetic acid 0.15%, succinic acid 0.02% (30°C 및 pH 6.5)였다. 최적 배양조건에서 conical flask를 이용하여 회분배양을 실시한 결과는 Figure 3에서 보는 바와 같다. 균체 생육은 유도기없이 배양 9일까지 증가하였다. BC 생산은 균체생육과 비례하여 배양 6일경에 24.1 g/m²까지 증가하였으나 그 이후부터는 감소하였다. 이러한 결과는 본 균주에 의한 BC의 생산형태는 “growth-associated type”임을 의미하는데, Vandamme 등(13)의 보고와는 일치하였으나 Kamide 등(19)의 보고와는 달랐다. *A. xylinum* KU-1의 경우, glucose를 탄소원으로 하여 정치배양시 1.2 g/l의 BC가(14), *Acetobacter* sp. M의 경우 sodium phytate를 stimulator로 첨가시 1.48 g/l의 BC가 생산(21)되었으나 본 연구의 결과와는 직접 비교할 수 없었다. 배양 1일 후부터 gluconic acid가 검출되다가 배양 6일부터 검출되지 않았다(미제시). 따라서 배양액의 pH도 감소되었다가 다시 증가하는 현상이 나타났다. 배양 6일 후부터 BC의 생산량이 감소하는 이유는 gluconic acid가 고갈됨에 따라 균체생육을 위하여 BC가 분해된 것에 기인한 것으로 추정되며, 이러한 현상은 *A. xylinum* KU-1에 있어 보고(21)된 바 있다.

결론적으로 *Acetobacter* sp. A9에 의한 BC 생산 최적조건을 확립하였으며, 최적조건하에서 배양 6일경 최대 24.1 g/m²

Table 4. Effect of culture volume and depth on the production of cellulose in petri dishes at a constant surface-area of 268.7cm²

Culture volume (ml)	Culture depth (cm)	Cellulose yield	
		g/petri dish	g/m ²
134.4	0.5	0.18	6.7
268.8	1	0.40	14.9
537.6	2	0.55	20.5
806.4	3	0.57	21.2
1075.2	4	0.58	21.6
1344.0	5	0.43	16.0

Table 5. Effect of culture surface-area and depth on the production of cellulose in petri dishes of various diameters

Surface area (cm ²)	Culture depth (cm)	Cellulose yield	
		g/petri dish	g/m ²
151.7	1.32	0.77	50.8
213.7	0.94	0.76	35.6
268.7	0.75	0.91	33.9

Culture volume = 200ml.

의 BC가 생산되어 기본배지에서의 BC 생산량(12.1 g/m²)보다 2배정도의 생산능 향상이 이루어졌다.

배지의 부피, 표면적 및 깊이의 영향

배지의 부피와 깊이가 BC의 생산능에 미치는 영향을 검토하기 위하여 일정한 표면적(268.7 cm²)을 가진 페트리 접시를 사용하여 배지의 양과 깊이를 각각 조절하여 배양한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 즉 배지 깊이 4 cm까지는 배지량이 많을수록, 깊이가 깊을수록 페트리 접시당 생산된 BC의 양은 증가하였으며, g/m²로 환산하여도 BC의 양은 증가하였다. 그러나 깊이 5 cm에서는 BC의 생산량이 모두 감소하였다. Okiyama 등(22)은 배지의 깊이가 1.1-4.5 cm인 경우 BC 생산에 큰 차이를 나타내지 않았고 9.1 cm 이상일 때 BC 생산능이 감소한다고 하였으며, Masaoka 등(12)은 배지의 부피와 깊이는 BC 생산에 아무런 영향을 미치지 않는다고 하였다. 한편 배지의 표면적과 깊이가 BC의 생산능에 미치는 영향을 검토하기 위하여 직경이 서로 다른 페트리 접시에 각각 일정량의 배지(200 ml)를 넣어 깊이를 변화시켜 배양한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. 즉 표면적이 증가할수록 페트리 접시당 생산된 BC의 양은 증가하였으나 g/m²로 환산시 오히려 BC의 양은 감소하였다. Masaoka 등(12)은 배지의 표면적 증가에 비례하여 BC 생산능도 증가한다고 하였으나 이들은 BC 생산능을 g/flask로만 나타내어 본 결과와 직접 비교할 수는 없었다. 결론적으로 본 균주의 BC 생산능은 배지의 표면적에 의해서도 영향을 받았으나 배지량과 배지의 깊이가 더 중요한 인자임을 알 수 있었으며, 이것은 최적 배지량과 배지의 깊이를 결합함으로써 BC 생산능을 더욱 향상시킬 수 있음을 시사한다.

요 약

부패된 사과로부터 새롭게 분리된 *Acetobacter* sp. A9에 의한 BC 생산조건을 정치배양에 의하여 검토하였다. 본 균주는

25-30℃에서 BC를 생산할 수 있었으며, 30℃에서 최대 생산능을 나타내었다. 또한 본 균주는 배지의 초기 pH 6.5-8.0에서 BC를 생산할 수 있었으며, pH 6.5에서 최대 생산능을 나타내었다. BC 생산을 위한 최적 배지조건은 glucose 1.0%, yeast extract 1.0%, polypeptone 0.7%, acetic acid 0.15% 및 succinic acid 0.02%였다. *Acetobacter* sp. A9에 의한 BC 생산은 "growth-associated type"이었다. 최적 배양조건하에서 배양 6일만에 최대 24.1 g/m²의 BC가 생산되어 기본배지보다 약 2배의 생산성 향상이 이루어졌다. BC 생산능은 배지의 표면적보다는 배지량과 배지의 깊이에 크게 영향을 받았다.

감 사

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 지원(KRF-99-003-G00027)되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Dudman, W. F. (1959), Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp., *J. Gen. Microbiol.* **21**, 312-326.
- Sutherland, I. W. (1998), Novel and established applications of microbial polysaccharides, *TIBTECH* **16**, 41-46.
- Delmer, D. P. and Y. Amor (1995), Cellulose biosynthesis, *The Plant Cell* **7**, 987-1000.
- Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman (1991), Cellulose biosynthesis and function in bacteria, *Microbiol. Rev.* **55**, 35-58.
- Yoshino, T., T. Asakura, and K. Toda (1996), Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane, *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 32-36.
- Valla, S. and J. Kjosbakken (1982), Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*, *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1401-1408.
- 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. Narciso, J. A. Eichara, and L. F. X. Farah (1990), *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute, *Appl. Biochem. Biotech.* **24/25**, 253-264.
- Nishi, Y., S. Yamanaka, K. Watanabe, N. Kiamura, M. Iguchi, and S. Mitsuhashi (1990), The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose, *J. Mat. Sci.* **25**, 2997-3001.
- Kojima, Y., A. Seto, N. Tonouchi, T. Tsuchida, and F. Yoshinaga (1997), High rate production in static culture of bacterial cellulose from sucrose by a newly isolated *Acetobacter* strain, *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1585-1586.
- Son, H. J., O. M. Lee, Y. G. Kim, and S. J. Lee (2000), Isolation and identification of cellulose-producing bacteria, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 134-138.
- Embuscado, M. E., J. N. BeMiller, and J. S. Marks (1996), Isolation and partial characterization of cellulose produced by *Acetobacter xylinum*, *Food Hydrocolloids* **10**, 75-82.
- Masaoka S., T. Ohe, and N. Sakota (1993), Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*, *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 18-22.
- Vandamme E. J., S. De Baets, A. Vanbaelen, K. Joris, and P. De Wulf (1998), Improved production of bacterial cellulose and its application potential, *Polymer Degradation and Stability* **59**, 93-99.
- Oikawa T., T. Ohtori, and M. Ameyama (1995), Production of cellulose from D-mannitol by *Acetobacter xylinum* KU-1, *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 331-332.
- Schramm M., Z. Gromet, and S. Hestrin (1957), Role of hexose phosphate in synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*, *Nature* **179**, 28-29.
- Ross P., Y. Aloni, H. Weinhouse, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, and M. Benziman (1986), Control of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. A unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase, *Carbohydrate Research* **149**, 101-117.
- Matsuoka M., T. Tsuchida, K. Matsushita, O. Adachi, and F. Yoshinaga (1996), A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*, *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 575-579.
- Dudman W. F. (1959), Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* in defined medium. *J. Gen. Microbiol.* **21**, 327-337.
- Kamide K., Y. Matsuda, H. Iijima, and K. Okajima (1990), Effects of culture conditions of acetic acid bacteria on cellulose biosynthesis, *British Polymer J.* **22**, 167-171.
- Fontana, J. D., C. G. Joerke, M. Baron, M. Maraschin, A. G. Ferreira, I. Torriani, A. M. Souza, M. B. Soares, M. A. Fontana, and M. F. Guimaraes (1997), *Acetobacter* cellulosic biofilms search for new modulators of cellulogenesis and native membrane treatments, *Appl. Biochem. Biotech.* **63/65**, 327-338.
- Oikawa, T., M. Takagi, and M. Ameyama (1994), Detection of carboxymethyl cellulase activity in *Acetobacter xylinum* KU-1, *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 2102-2103.
- Okiyama A., H. Shirae, H. Kano, and S. Yamanaka (1992), Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*, *Food Hydrocolloids* **6**, 471-477.