

## 진탕배양에서 *Acetobacter* sp. A9로부터 셀룰로오스 생산에 대한 완충성분 및 Bead의 효과

박근태<sup>1</sup> · 손홍주\* · 김근기 · 김한수 · 김용균 · 이상준<sup>1</sup>

밀양대학교 생물공학과, <sup>1</sup>부산대학교 미생물학과

## Effect of Buffering Agent and Bead on Bacterial Cellulose Production from *Acetobacter* sp. A9 in Shaking Culture

Geun-Tae Park<sup>1</sup>, Hong-Joo Son\*, Keun-Ki Kim, Han-Soo Kim, Yong-Gyun Kim  
and Sang-Joon Lee<sup>1</sup>

Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

### Abstract

*Acetobacter* strains are bacteria that can synthesize cellulose when grown on an undefined medium containing glucose. Several culture conditions affecting cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 were examined by cultivating cells under shaking cultures. The addition of buffering agents, such as 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) and CaCO<sub>3</sub>, increased cellulose production. It suggests that pH of culture medium is important to an economical mass cellulose production. Addition of bead ( $\phi$ 10 mm) to culture medium stimulated 'disintegrated bacterial cellulose' production.

**Key words** – *Acetobacter* sp., buffering agent, cellulose

### 서 론

셀룰로오스는 지구상에서 가장 풍부하게 존재하는 재생 가능한 천연다당류이자 고등식물의 주요 구성성분으로서 제지, 펄프 및 방직산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있다[4]. 최근, 미생물에 의하여 생성되는 셀룰로오스

(bacterial cellulose; BC)에 대한 관심이 높아지고 있는데, BC는 식물유래 셀룰로오스에서는 찾아볼 수 없는 독특한 성질로 인하여 고성능 진동판, 고품질 제지, 지혈대, 인공 피부, 한외여과막, 포도당 바이오센스를 위한 cover-membrane, 포유동물세포의 배양기질 및 식이식품 등 새로운 기능성 재료로서 기대를 모으고 있다[3,13].

BC는 주로 *Acetobacter* strains을 이용한 정지배양에 의하여 기-액 계면에 젤라틴성의 pellicle 형태로 생산된다[2]. 그러나 정지배양에 의한 BC 생산은 많은 노동력 및 부지

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 055-350-5484, Fax : 055-350-5484  
E-mail : shjoo@arang.miryang.ac.kr

를 필요로 하므로 산업적 관점에서 보면 비효율적인 과정이다[16]. 따라서 BC의 생산성 향상을 위하여 진탕배양을 이용하는 공정이 필요하나 진탕배양시에는 셀룰로오스를 생산하지 않는 돌연변이체가 나타나는 단점이 있다[8].

최근, 저자들은 정치 및 진탕배양에서 BC를 생산하는 *Acetobacter* sp.를 부패된 사과 및 양조식초 등으로부터 분리, 동정한 후, 각 배양법에 있어 BC 생산특성을 보고한 바 있다[9-11]. 본 연구에서는 배지에 완충성분 및 bead의 첨가가 BC 생산에 미치는 영향을 검토함으로써 BC 생산효율 및 disintegrated BC의 생산 가능성에 대해 파악하고자 하였다.

### 재료 및 방법

사용균주는 *Acetobacter* sp. A9이었으며, 기본배지의 조성은 glucose 2.0%, yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.675%, citric acid monohydrate 0.115% 및 ethanol 1.4%(pH 6.5)이었다. 전배양은 50 ml의 기본배지가 함유된 250 ml 용량의 conical flask에 평판한천배지에서 보존중인 균주 한 백금이를 접종하여 30°C에서 72 시간동안 정치배양하였다[9]. 형성된 pellicle로부터 세포를 유지시키기 위하여 10분간 강하게 진탕한 후, 멸균된 거즈로 여과하였다[11]. 이 세포현탁액 5%(v/v)를 배지 75 ml가 함유된 250 ml 용량의 conical flask에 접종하여 30°C, 200 rpm에서 7일간 회전진탕배양하였다. BC의 정제 및 균체 생육도 측정은 각각 Embuscado 등[5] 및 Son 등[10]의 방법에 따랐다. 모든 실험은 triplicates로 실시하였으며, 나타난 각 결과들은 이들의 평균값이었다.

### 결과 및 고찰

본 균주는 탄소원인 glucose로부터 대량의 gluconic acid를 생성하여 배양액의 pH를 2.5 이하로 감소시키는 것으로 보고되어 있다[9]. 따라서 배양액의 pH가 BC 생산성에 중요한 인자로 작용한다는 가정하에, 기본배지에 완충성분으로 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) 및  $\text{CaCO}_3$ 를 0-0.5%씩 첨가하여 균체 생육도 및 BC 생산량을 검토하였으며, 그 결과는 Table 1 및 Fig. 1에서 보는 바와 같다. MOPS를 첨가한 경우, 농도 증가에 따라 균체

Table 1. Effect of buffering agent on cell growth of *Acetobacter* sp. A9.

Concentration(%)	Cell growth( $A_{660}$ )	
	$\text{CaCO}_3$	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
None	1.231	1.235
0.05	1.244	1.382
0.1	1.424	1.437
0.15	1.595	1.639
0.2	1.835	1.786
0.3	1.902	1.534
0.4	1.809	1.292
0.5	1.327	1.253

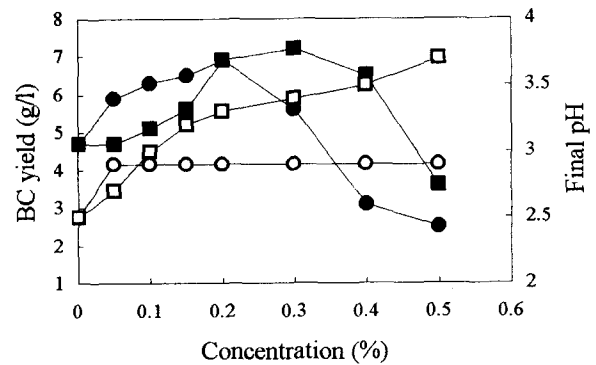


Fig. 1. Effect of buffering agent on cellulose production by *Acetobacter* sp. A9.

●, BC yield in MOPS; ○, final pH in MOPS; ■, BC yield in  $\text{CaCO}_3$ ; □, final pH in  $\text{CaCO}_3$ .

생육도 및 BC 생산량도 증가하였으나 0.3% 이상의 농도에서는 모두 감소하는 경향을 나타내었다. MOPS를 첨가하지 않은 대조구의 경우 4.7 g/l의 BC가 생성되었으며, 0.2%의 MOPS가 첨가된 경우, 6.9 g/l의 BC가 생성되었다. 대조구의 최종 pH는 2.5였으며, 모든 실험구의 최종 pH는 2.9로 일정하였다.  $\text{CaCO}_3$ 를 첨가한 경우, 농도 증가에 따라 균체 생육도 및 BC 생산량도 증가하였으나 0.4% 이상의 농도에서는 모두 감소하였으며, 0.3%의  $\text{CaCO}_3$ 가 첨가되었을 때 7.2 g/l의 BC가 생산되었다. 실험구의 최종 pH는  $\text{CaCO}_3$  농도증가에 따라 pH 감소폭이 적었다. 그리고, 첨가된 두 완충성분 모두 균체 생육을 저해하는 임계농도가 존재하고, 이에 따라 BC 생산량이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

배지에 MOPS 또는 CaCO<sub>3</sub> 등의 완충성분을 첨가함으로써 물질 생산성을 증가시킨 예로 *Catharanthus roseus*로부터 tabersonine의 생산[6], *Streptomyces griseofuscus*로부터 physostigmine의 생산[17], *Rhizopus oryzae*로부터 lactic acid 생산[18] 등이 있다. *Acetobacter* spp.는 pH 2.6 이하에서 생육이 저해되는 것으로 알려져 있다[1]. 따라서, 본 연구결과는 배지성분으로 완충성분을 첨가하여 배양액의 급격한 pH 변동을 지연 및 최소화시킴으로서 균체 생육이 부양되고, 결과적으로 BC 생산량이 증가됨을 시사하며, 본 균주에 의한 BC 생산은 cell growth-associated type이라는 이전 보고[10]를 다시 한 번 확인할 수 있었다. 결론적으로, BC의 대량생산을 위해서는 배양액의 pH 조절이 필수적임을 알 수 있었다.

BC는 mechanical homogenization에 의하여 disintegrated-또는 fragmented fibrils를 함유한 suspension (disintegrated BC)으로 가공할 수 있다. 아직까지 disintegrated BC를 생성할 수 있는 배양방법은 보고되어 있지 않다. 따라서 bead의 첨가가 생성된 BC의 형태에 미치는 영향을 조사하기 위하여 직경 3 mm, 6 mm, 10 mm의 유리 bead를 각각 10 g씩 기본배지에 첨가하여 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 2 및 Table 2에서 보는 바와 같다. 직경 3 mm 및 6 mm의 bead를 첨가한 경우, 각각 한 개의 큰 덩어리 및 몇 개의 작은 덩어리 형태로 BC가 생성되었으나 10 mm의 bead를 첨가한 경우, 매우 미세한 pellet 형태로 배양액 전체에 골고루 분산된 disintegrated BC가 생성되었다. 직경 10 mm 이상의 bead를 첨가하여 진탕배양시, 원심력에 의해 bead와 배양용기 벽면과의 마찰이 발생하고, 이에 따라 세포로부터 생성되고 있는 BC의 microfibril이 신속하게 절단됨으로서 disintegrated BC가 생성되는 것으로 판단되나 정확한 기작을 이해하기 위해서는 향후 계속적인 실험이 요구되었다. BC 생산량은 직경 6 mm > 10 mm > 3 mm의 순서로 높았으나 큰 차이를 나타내지는 않았다.

Disintegrated BC는 ultrafine network으로 구성되어 있기 때문에 수분 보유력이 뛰어나며, disintegrated BC suspension 역시 높은 수분 보유력 및 점성 등의 우수한 물리적 특성을 나타냄으로서 다양한 현탁물질의 thickener, disperser, emulsifier 및 stabilizer로 이용가능하다[15]. 또한, disintegrated BC는 강력한 binding ability를 가지고 있으므로 다른 섬유성 물질과 혼합시 다양한 조성의 sheet

Table 2. Effect of bead addition on cellulose production by *Acetobacter* sp. A9

Bead	Final pH	BC yield(g/l)
Addition of $\phi$ 3 mm	2.6	4.4
Addition of $\phi$ 6 mm	2.5	4.7
Addition of $\phi$ 10 mm	2.5	4.5

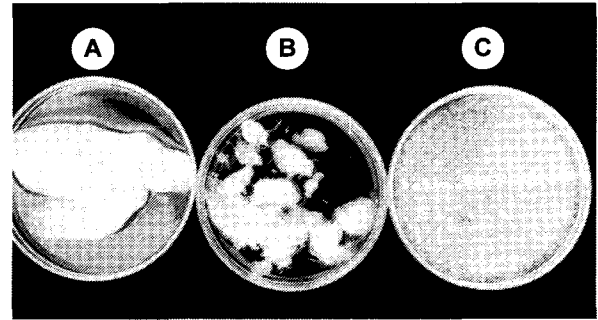


Fig. 2. Effect of bead addition on shape of cellulose produced by *Acetobacter* sp. A9. A,  $\phi$ 3 mm; B,  $\phi$ 6 mm; C,  $\phi$ 10 mm.

가 용이하게 제조된다[15]. 지금까지 homogenizer를 이용한 disintegrated BC의 제조[14]나 homogenizer에 의하여 만들어진 disintegrated BC의 fibril 구조[7]에 대한 연구는 있으나 배양중 disintegrated BC의 생산에 관련된 보고는 본 논문이 최초이며, 에너지 측면에서 효율적인 신기능성 BC 생산공정 확립에 좋은 기초자료가 될 것으로 판단된다.

## 요 약

*Acetobacter* strains는 포도당을 함유한 복합배지에서 셀룰로오스를 합성할 수 있는 세균이다. 본 연구에서는 *Acetobacter* sp. A9에 의한 셀룰로오스 생산에 영향을 미치는 몇 가지 배양 환경요인을 진탕배양을 통하여 조사하였다. 배지에 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS)와 CaCO<sub>3</sub> 등과 같은 완충성분의 첨가는 *Acetobacter* sp. A9에 의한 셀룰로오스 생산량을 증가시켰다. 따라서 배양 시간 경과에 따른 배양액의 수소이온농도 조절이 경제적인 셀룰로오스 대량생산에 중요한 요인임을 알 수 있었다. 배지에 직경 10 mm의 bead를 첨가함으로써 다양한 기능을 가진 'disintegrated bacterial cellulose'가 생산되었다.

## 참 고 문 헌

1. Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer. 1992. *The Prokaryotes* Vol. 3. Springer-Verlag, New York, U.S.A.
2. Byrom, D. 1989. Process for the production of microbial cellulose. *European Patent* EP 323717.
3. Delmer, D. P. and Y. Amor. 1995. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 987-1000.
4. Dudman, W. F. 1959. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp. *J. Gen. Microbiol.* **21**, 312-326.
5. 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.
6. Morgan, J. A., C. S. Barney, A. H. Penn and J. V. Shanks. 2000. Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy roots. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 262-265
7. Ougiya, H., K. Watanabe, T. Matsumura and F. Yoshinaga. 1998. Relationship between suspension properties and fibril structure of disintegrated bacterial cellulose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1714-1719
8. Ross, P., R. Mayer and M. Benziman. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 35-58.
9. Son, H. J and H. S. Kim. 2001. Effect of culture conditions on microbial cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *J. Life Sci.* **11**, 11-13.
10. Son, H. J., M. S. Heo, Y. G. Kim and S. J. Lee. 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **33**, 1-5.
11. 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.
12. Son, H. J., O. M. Lee, Y. G. Kim, Y. G. Park and S. J. Lee. 2000. Characteristics of cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in static culture. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 573-577.
13. Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *TIBTECH* **16**, 41-46.
14. 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. Mater. Sci.* **24**, 3141-3145
15. Yoshinaga, F., N. Tonouchi, and K. Watanabe. 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.
16. Yoshino, T., T. Asakura and K. Toda. 1996. Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 32-36.
17. Zhang, J., C. Marcin, M. A. Shifflet, P. Salmon, T. Brix, R. Greasham, B. Buckland and M. Chartrain. 1996. Development of a define medium fermentation process for physostigmine production by *Streptomyces griseofuscus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 568-575
18. Zhou, Y., J. M. Dominguez, N. Cao, J. Du and G. T. Taso. 1999. Optimization of L-lactic acid production from glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC52321. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77-79**, 401-407

(Received July 10, 2002; Accepted September 25, 2002)