

정치배양을 이용하여 *Acetobacter* sp. V6의 셀룰로오스 생산 최적화 및 구조 분석

김정도 · 정호일 · 정진하 · 박기현 · 전영동 · 황대연 · 이충열 · 손홍주*

부산대학교 생명자원과학대학

한국 전통발효식초로부터 분리된 *Acetobacter* sp. V6에 의한 bacterial cellulose (BC) 생산을 위한 최적 배지조성을 정치배양을 이용하여 조사한 후, 생성된 BC의 구조적 특성을 검토하였다. 탄소원으로 glucose 3%, 질소원으로 soytone 3%가 선정되었다. 또한 인산염은 K_2HPO_4 0.8%였으며, 추가로 첨가한 NaH_2PO_4 와 KH_2PO_4 는 BC 생산 증가를 나타내지 못하였다. 보조탄소원으로 ethanol 0.4%에서 가장 높은 BC 생산성을 나타내었다. 최적 배지조성하에서 배양 8일만에 최대 44.7 g/m²의 BC가 생산되었으며, 배양 8일경, BC pellicle의 두께는 약 1 cm였다. BC의 구조는 Fourier-transform infrared spectroscopy 및 X-ray diffractometer를 이용하여 조사하였다. 최적배지에서 생성된 BC는 전형적인 cellulose type I임을 알 수 있었으며, 식물성 셀룰로오스와 성분의 차이가 없었다. 또한 독특한 미세망상구조로 이루어져 있었고, 높은 결정성을 나타내어 식물유래 셀룰로오스와 다른 독특한 물성을 나타내는 것으로 추정되었다.

Key words □ *Acetobacter* sp., bacterial cellulose, cellulose type I, static culture

셀룰로오스는 자연계에서 가장 풍부한 재생 가능한 자원으로 glucose가 β-1, 4 결합에 의해 이루어진 고분자 다당류이다. 현재 제지, 펄프산업을 비롯한 다양한 분야에서 사용되고 있을 뿐만 아니라 산업적으로 응용분야가 매우 넓어 그 소비량이 크게 증가되고 있다. 셀룰로오스는 화학약품 및 미생물 침식에 대한 저항성이 강해서 종이, 의류의 원료로 사용되고 있으며, 또한 에테르 유도체는 레이온, 니트로에스테르는 화약의 원료로서 응용되고 있다(1, 10, 20). 현재 원료물질인 목재에 대한 수요도 갈수록 높아지고 있으나 원료 공급과 환경문제로 인하여 대체물질의 개발에 대한 연구가 점차 활발해지고 있다(4, 21).

셀룰로오스는 육상식물 뿐만 아니라 *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* 및 *Acetobacter* 속 등 세균에서도 그 생성능이 확인되었으며, 그중 *Acetobacter* spp.에서 셀룰로오스 생성능이 가장 우수한 것으로 보고되었다(1). 이러한 세균유래 셀룰로오스(bacterial cellulose; BC)는 식물유래 셀룰로오스에서는 찾아 볼 수 없는 독특한 물성을 가지고 있어 연구자들의 관심이 높아지고 있으며, 또한 새로운 기능성 소재로 활용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(2, 9, 26).

BC는 식물유래 셀룰로오스와는 달리 hemicellulose, pectin, lignin 그리고 biogenic product와 같은 불순물을 전혀 포함하지 않은 순수한 셀룰로오스이므로 소량의 에너지와 약품으로 고순도의 셀룰로오스를 정제할 수 있다(15, 25). 그리고 BC는 20~50 nm의 microfibril이 수소결합에 의해 3차원 망상구조를 이

루고 있으며 높은 신장강도, 보수성, Young's modulus를 가지고 있으므로 고성능 진동판, 고품질 제지, 화장품 및 식이 식품 등으로 이용되고 있다. 무엇보다 BC는 환경친화적 소재이기 때문에 무한한 개발 가능성과 다양성을 내포하고 있다(16, 17). 최근에는 생물의학 소재 분야에서 빠른 발전이 이루어지고 있는데, 천연 중합체와 합성 중합체를 이용하여 창상 피복제, drug delivery systems 등 다양한 응용이 시도되고 있다. 몇몇 세균에 의해 생산된 BC는 물리적 및 생물학적 특성이 우수하여 다양한 생물의학적 응용에 특히 유용하며, *A. xylinum*에 의해 생산된 BC는 일찍이 생물공학 분야에서 고부가가치 생산물로서 가치를 인정받아 화상 치료 피복제로서 상당한 성과를 이루고 있다(3).

Acetobacter 속 균주는 정치배양에 의하여 기-액 계면에 pellicle 형태로 셀룰로오스를 생성하며, 그 pellicle 속에서 세포가 증식한다. Williams와 Cannon (24)은 *A. xylinum*에 있어서 BC의 역할에 대해 보고하였는데 셀룰로오스는 호기성 환경으로 세포를 이동시키며, 자외선의 치사 효과로부터 세포를 방어한다고 하였다. 또한 *A. xylinum*의 집락을 형성케 해주어 영양원으로 동일 기질을 사용하는 경쟁자에 대하여 비교우위를 가지며, 세포에 수분을 공급하여 건조를 막는다고 하였다.

정치배양에 의한 BC 생산은 많은 부지와 노동력을 필요로 하므로 산업적 관점에서 보면 대단히 비효율적이다. 따라서 BC 생산성을 높이기 위하여 교반배양을 이용하는 공정이 필요하며, 이에 대한 연구가 현재 꾸준히 진행되고 있다. 한편, *Acetobacter* 속 균주들은 유전적으로 불안정하여 교반배양을 하면 전단력에 의해 BC를 생산하지 못하는 cellulose negative mutant (cel⁻)가 생성되는 단점이 있으므로 교반배양에서도 안정한 균주의 분리

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-55-350-5540, Fax: 82-55-350-5540
E-mail: shjoo@pusan.ac.kr

및 특성에 대한 연구도 진행되고 있다(23). 정치배양에 의하여 생산된 BC는 화상치료용 인공피부나 지혈대 등 의학적 용도로 이용하기 용이한 pellicle 형태(7)로 생산되기 때문에 점차 그 소비가 확대될 것으로 예측되고 있으나 정치배양에 의한 BC 생산에 대한 연구는 점차 감소되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 의학적 응용 분야가 넓고 소비량이 많은 BC의 생산을 위하여 BC 생성능이 확인된 *Acetobacter* sp. V6를 공시균주로 선정하여 정치배양에서 BC 생산조건을 조사하고, 구조 분석을 실시함으로써 BC의 대량생산과 용도 개발을 위한 기초 자료를 획득코자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 손 등(19)에 의하여 한국의 전통 식초로부터 분리, 동정된 *Acetobacter* sp. V6이었다. 균주의 보존, 전배양 및 BC 생산을 위한 기본배지는 Hestrin과 Schramm (HS) 배지이었다(8). HS 배지의 조성은 glucose 2%, yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.675% 및 citric acid monohydrate 0.115% (pH 6)이었다. 전배양은 50 ml의 HS 배지가 함유된 250 ml 용량의 conical flask에 평판한천배지에서 보존중인 균주 한 백금이를 접종하여 30°C에서 72시간 동안 정치배양하였다. 전배양 후 형성된 pellicle로부터 세포를 유리시키기 위하여 10분간 강하게 진탕한 후, 멸균된 거즈로 여과하여 세포현탁액을 회수하였다(20). 이 세포현탁액 5% (v/v)를 본 배양액 50 ml가 함유된 bottle (단면적 9 cm²)에 접종하여 30°C에서 7일간 정치배양 하였다.

분석방법

BC의 생성량은 다음과 같이 조사하였다. 생성된 BC를 회수하여 물로 충분히 세척한 후, 0.5 N NaOH 용액에 침지하여 90°C에서 2시간 동안 처리함으로써 세포를 용해시켰다. 이들을 중성이 될 때까지 증류수로 세척한 후, 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하여 건조중량을 측정하였다(5). 균체생육은 UV-visible spectrophotometer (Ultrospec 4000, Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었다. 즉 BC가 함유된 배양액을 homogenizer로 10분간 파쇄하여 pellicle 내에 존재하는 세포들을 유리시킨 후, 거즈로 여과하여 세포현탁액의 흡광도를 측정하였다(20). BC의 생산량은 g/m²로 나타내었다. 따로 언급하지 않은 한 모든 실험은 두 번 반복하였으며, Table 및 Figure에 나타난 결과는 그 평균값이었다.

BC의 미세구조 관찰

BC의 미세구조는 주사전자현미경(JEOL JSM-6390, JEOL TECHNIC LTD., Japan)으로 관찰하였다. 즉 생성된 BC pellicle을 회수 및 동결건조하여 2.5% glutaraldehyde 용액에 침지하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. BC pellicle을 1× phosphate buffered saline으로 반복하여 세척한 후, 70, 80, 90, 100%

ethanol을 각각 15분씩 처리하였다. Isoamyl acetate와 100% ethanol을 각각 0.5:1.5, 1:1, 1.5:0.5 비율로 혼합하여 만든 용액을 순차적으로 15분씩 처리한 후, 100% isoamyl acetate 용액에 20분간 침지 및 건조하였다. 이것을 ion coating (gold coating)하여 관찰하였다.

Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR)

BC pellicle을 여과지로 압착한 후, sheet 형태로 조제한 다음 이것을 유리판에 놓은 상태에서 105°C에서 12시간 동안 건조시켰다. 상기 시료를 FT-IR Spectrophotometer (IRAffinity-1, Shimadzu Corp., USA)를 이용하여 400~4000 cm⁻¹에서 측정하였다. 시료는 KBr powder를 사용하여 파우더 법으로 측정하였다.

X-ray diffraction (XRD)

XRD는 X-ray Diffractometer (Rigaku III, Rigaku Corp., Japan)를 이용하여 측정하였다. 즉 BC pellicle을 여과지로 압착하여 sheet 형태로 조제한 다음 이것을 유리판에 놓은 상태에서 105°C, 12시간 동안 건조시켰다. 상기 시료를 40 kV, 30 mA 조건에서 Cu K α radiation에 의한 반사식 측정법으로 $2\theta = 5^\circ\text{--}40^\circ$, scan speed는 10°/min로 측정하였다. Crystallinity index (Cr.I.)는 다음 식으로 구하였다.

$$\text{Cr.I.} = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100$$

여기서 I_{002} 는 $2\theta = 22.8^\circ$ 에서 (002)면에 상응하는 회절 peak의 최대 강도(intensity)이며, I_{am} 는 $2\theta = 18^\circ$ 에서 회절 강도이다(6).

결과 및 고찰

탄소원에 따른 BC 생산

탄소원이 BC 생산능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본 배지인 HS 배지에 각종 탄소원을 2.0%씩 첨가하여 30°C에서 7일간 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. Glucose, fructose 및 mannitol이 첨가된 배지에서 BC 생산능이 우수하였

Table 1. Effect of carbon sources on cellulose production by *Acetobacter* sp. V6

Carbon source	Cellulose yield (g/m ²)
Glucose	26.1
Fructose	22.2
Lactose	2.2
Sucrose	2.4
Maltose	3.0
Mannitol	21.2

Various carbon sources were added at the final concentration of 2% (w/v) to the basic medium containing 0.5% yeast extract and 0.5% polypeptone as the nitrogen source. Cells were cultivated for 7 days at 30°C. Culture volume = 50 ml, culture-surface area = 9 cm².

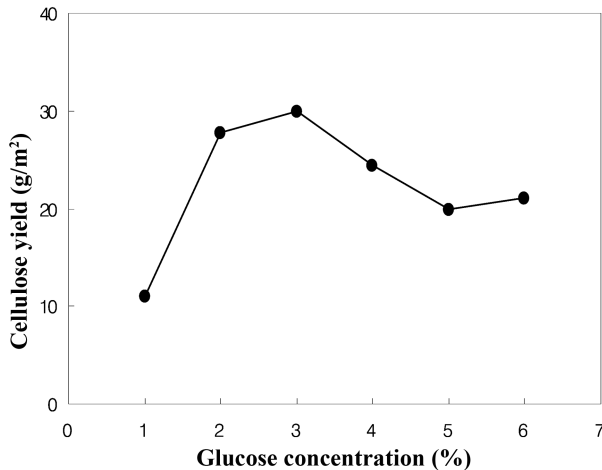


Fig. 1. Effect of glucose concentrations on cellulose production by *Acetobacter* sp. V6. Cells were cultivated for 7 days at 30°C in the basic medium. Culture volume = 50 ml, culture-surface area = 9 cm².

으며, 특히 glucose를 첨가한 배지에서 BC 생산량이 26.1 g/m²로 가장 높았다. 이러한 결과는 정치배양에 있어 glucose보다 mannitol이 BC 생산량을 더 증가시킨다는 Oikawa 등(13)의 보고와는 상이하였으나, 정치배양에 있어 BC 생산에 이용되는 일반적인 탄소원은 glucose로 알려져 있는 것과 일치하였다(21). 한편, glucose는 대사과정을 통하여 BC 합성에 필요한 에너지를 제공하고 동시에 BC의 중합을 위한 monomer로서 역할을 한다고 보고된 바 있어(22), 다른 탄소원 보다 glucose가 BC 합성에 더 효율적인 것으로 판단되었다. Glucose를 최적 탄소원으로 선정하여 7일간 배양 후 BC 생산을 위한 최적 농도를 조사한 결과, 3.0% glucose에서 BC 생산능(30.0 g/m²)이 가장 높았다(Fig. 1).

질소원에 따른 BC 생산

질소원이 BC 생산능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3.0% glucose가 함유된 배지에 각종 질소원을 0.5%씩 첨가하여 30°C에서 7일간 배양한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. Soytone이 첨가된 배지에서 가장 많은 BC (33.3 g/m²)가 생산되었고,

Table 2. Effect of nitrogen sources on cellulose production by *Acetobacter* sp. V6

Nitrogen source (0.5%)	Cellulose yield (g/m ²)
Yeast extract	26.8
Polypeptone	11.0
Tryptone	16.3
Malt extract	8.0
Corn streep liquor	21.2
Soytone	33.3
None	1.7

Cells were cultivated for 7 days at 30°C in the medium containing glucose with an initial nitrogen source concentration of 0.5% (w/v). Culture volume = 50 ml, culture-surface area = 9 cm².

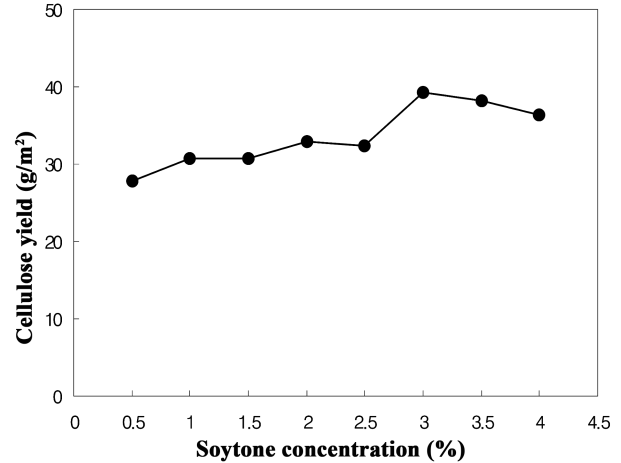


Fig. 2. Effect of soytone concentrations on cellulose production by *Acetobacter* sp. V6. Cells were cultivated in the medium containing glucose for 7 days at 30°C. Culture volume = 50 ml, culture-surface area = 9 cm².

yeast extract에서도 높은 BC 생산능을 나타내었다. 한편, 손 등(20) 및 Matsuoka 등(11)은 정치배양에서 yeast extract가 가장 우수한 질소원이라고 보고한 바 있어 본 실험 결과와 상이하였으나, yeast extract와 같이 soytone 또한 단순한 질소원 뿐만 아니라 각종 아미노산, 비타민 등 미량성분이 존재하여 BC 생산에 필수적인 것으로 추정되었다. Soytone을 최적 질소원으로 선정하여 7일간 배양한 후 BC 생산을 위한 최적 농도를 조사한 결과, 3.0% soytone에서 BC 생산능(39.2 g/m²)이 가장 높았다(Fig. 2).

인산염에 따른 BC 생산

인산염이 BC 생산능에 미치는 영향을 조사하기 위해 배지에 Na₂HPO₄·12H₂O와 K₂HPO₄를 0~1.0%의 농도로 각각 조절하여 30°C에서 7일간 배양한 결과, 0.8% K₂HPO₄에서 BC 생산량(41.3 g/m²)이 가장 높았다(자료 미제시). 0.8%의 K₂HPO₄가 함유된 배지에 추가적으로 NaH₂PO₄ 및 KH₂PO₄를 0~1.0%의 농도로 각각 조절하여 배양한 결과, 이들의 첨가는 BC 생산에 어떠한 영향도 미치지 못하였다(자료 미제시).

보조탄소원에 따른 BC 생산

보조탄소원이 BC 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3% glucose와 3% soytone이 첨가된 배지에 각종 유기산과 ethanol을 0.1%씩 첨가하여 30°C에서 7일간 배양한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. Ethanol에서 가장 높은 BC 생산능(43.4 g/m²)을 나타내었으며, 나머지 보조탄소원들도 비슷한 생산량을 보였으나 ethanol 보다는 낮았다. 한편, ethanol은 세포 생육을 위한 ATP의 농도를 증가시키고, pentose phosphate 경로에 관여하는 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성을 저해함으로써 BC의 생산수를 높일 수 있다고 보고된 바 있다(12). Ethanol을 최적 보조탄소원으로 선정하여 최적 농도를 조사한 결과, 0.4%에서 44.2 g/m²로 BC 생산능이 최대였다(자료 미제시).

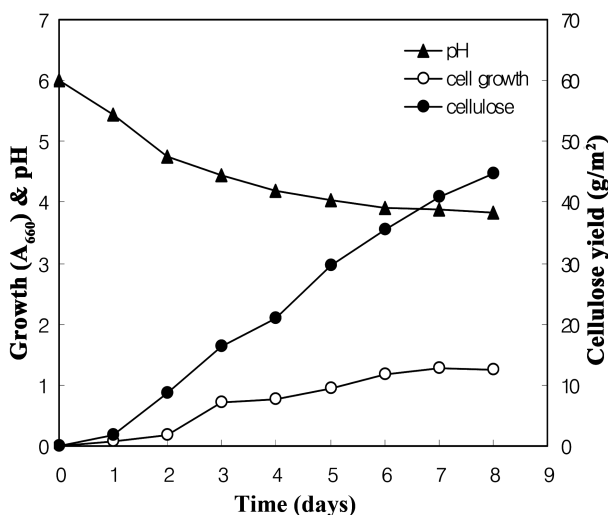
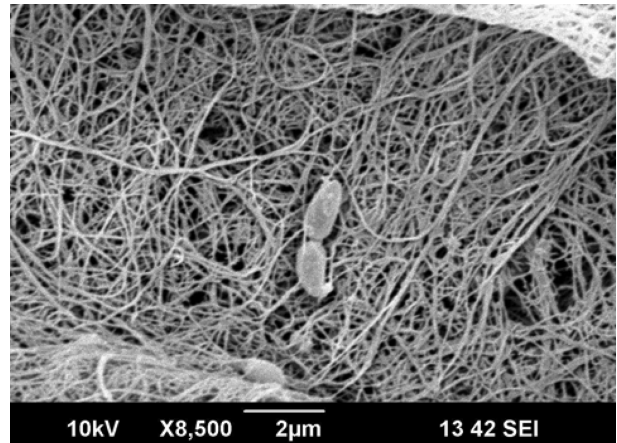
Table 3. Effect of secondary substrates on cellulose production by *Acetobacter* sp. V6

Secondary substrate (0.1%)	Cellulose yield (g/m ²)
Gluconic acid	26.8
Lactic acid	35.1
Succinic acid	33.7
Acetic acid	35.0
Fumaric acid	30.3
Formic acid	36.0
Malic acid	30.7
Citric acid	41.9
Ethanol	43.4
Pyruvic acid	38.6
None	30.1

Cells were cultivated in the medium containing glucose for 7 days at 30°C. Culture volume = 50 ml, culture-surface area = 9 cm².

최적 배지에서 BC 생산

상기 결과에 기초하여 확립된 BC 생산 최적배지 조성은 glucose 3.0%, soytone 3.0%, K₂HPO₄ 0.8% 및 ethanol 0.4%였다. 최적 배지조성하에서 회분배양을 실시한 결과, 균체 생육과 BC 생산은 모두 배양시간에 비례하여 증가하였으며, 이에 따라 BC 생산과 균체 생육은 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 배양 8일 후 생성된 BC 생산량은 44.7 g/m²이었다. pH는 배양 경과에 따라 점차적으로 감소하기 시작하여 배양 8일 경, pH 3.8로 감소하였다(Fig. 3).

**Fig. 3.** Time course of cellulose production by *Acetobacter* sp. V6 in an optimized medium. Cells were cultivated in the optimized medium for 8 days at 30°C. Culture volume = 50 ml, culture-surface area = 9 cm².**Fig. 4.** Scanning electron micrograph of cellulose produced by *Acetobacter* sp. V6.

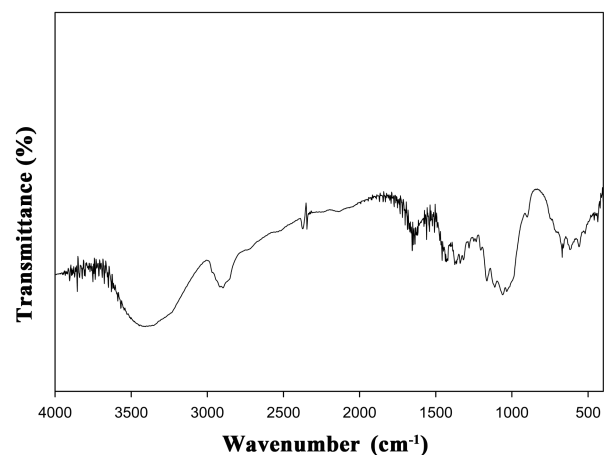
생산된 BC의 미세구조

최적 배지에서 생산된 BC의 두께를 관찰한 결과, 배양 8일에 약 1 cm 두께의 BC pellicle이 생성되었다(자료 미제시). 이 후, 배양시간을 연장하였으나 pellicle의 두께는 더 이상 증가하지 않았다.

BC의 미세구조를 조사하기 위하여 주사전자현미경을 사용하여 관찰한 결과, 최적 배지에서 생산된 BC는 독특한 미세망상구조로 이루어져 있었으며, 그 속에 세포가 포획되어 있었다(Fig. 4). 일반적으로 식물성 셀룰로오스는 셀룰로오스 fibre가 평행구조를 이루고 있으며, 미세망상구조는 나타나지 않는다. 따라서 세균유래 셀룰로오스의 미세망상구조로 인하여 BC가 높은 신장강도, 보수성 등을 가질 수 있는 것으로 추정되었다.

FT-IR

일반적으로 식물성 셀룰로오스는 1250~1450 cm⁻¹ 영역에서 5개의 peak 분리를 나타내며, 1000~1200 cm⁻¹ 영역에서 4개의

**Fig. 5.** FT-IR spectrum of cellulose produced by *Acetobacter* sp. V6.

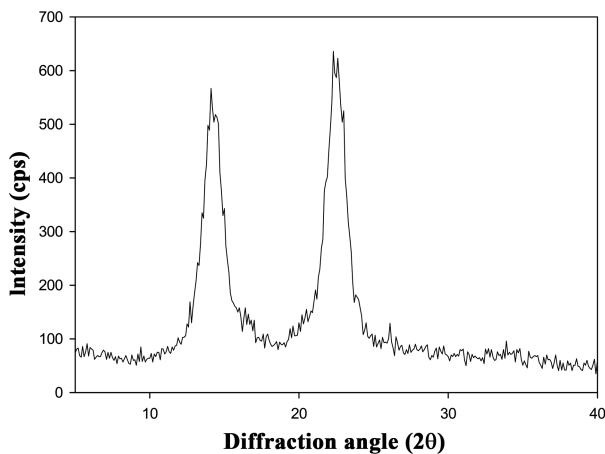


Fig. 6. X-ray diffraction pattern of cellulose produced by *Acetobacter* sp. V6.

peak 분리를 나타낸다. 또한 식물성 셀룰로오스는 893 cm^{-1} 에서 CH_2 변형에 의한 진동, 1430 cm^{-1} 에서 CH_2 의 대칭성 굽힘 진동, 2900 cm^{-1} 에서 CH_2 의 신축진동, 3400 cm^{-1} 에서 OH의 신축진동을 나타낸다(18). 최적배지에서 생성된 BC의 FT-IR spectrum을 측정 한 결과, 일반적인 식물성 셀룰로오스에서 나타나는 진동흡수대가 나타났다(Fig. 5). 따라서 최적배지에서 획득한 BC는 식물성 셀룰로오스와 조성의 차이가 없음을 알 수 있었다.

XRD

셀룰로오스의 결정구조는 처리 방법에 따라 Cel I, II, III, IV 등의 여러 구조를 지닌다. 셀룰로오스의 일반적인 결정구조는 Cel I로, $2\theta = 14.6^\circ$ 와 16.4° 에서 각각 (101)면과 (10 $\bar{1}$)면의 회절 peak가 중첩으로 나타나며, $2\theta = 22.6^\circ$ 에서 (002)면의 회절 peak가 나타난다(14). 최적배지에서 생성된 BC의 XRD를 측정 한 결과, 전형적인 Cel I임을 알 수 있었으며(Fig. 6), Crystallinity index는 82%로 나타나 결정성이 매우 높음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Byrom, D. 1991. Microbial cellulose, pp. 263-284. In D. Byrom (ed.), Biomaterials, Stockton Press, New York, N.Y., USA.
- Cannon, R.E. and S.M. Anderson. 1991. Biogenesis of bacterial cellulose. *Crit. Rev. Microbiol.* 17, 435-447.
- Czaja, W.K., D.J. Young, M. Kawecki, and R.M. Brown, Jr. 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromol.* 8, 1-12.
- Dudman, W.F. 1959. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp. *J. Gen. Microbiol.* 21, 312-326.
- Embuscado, M.E., J.N. BeMiller, and J.S. Marks. 1996. Isolation and partial characterization of cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Food Hydrocoll.* 10, 75-82.
- Focher, B., M.T. Palma, M. Canetti, G. Torri, C. Cosentino, and G. Gastaldi. 2001. Structural differences between non-wood plant celluloses: evidence from solid state NMR, vibrational spectroscopy and X-ray diffractometry. *Ind. Crops Prod.* 13, 193-208.
- 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. Narcisoo, J.A. Bichara, and L.F.X. Farah. 1990. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25, 253-264.
- Hestrin, S. and M. Schramm. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Biochem. J.* 58, 345-352.
- Klemm, D., D. Schumann, U. Uthard, and S. Marsch. 2001. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* 26, 1561-1603.
- Ko, J.Y., K.S. Shin, B.D. Yoon, and W.Y. Choi. 2002. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* GS11. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 57-62.
- Matsuoka, M., T. Tsuchida, K. Matsushita, O. Adachi, and F. Yoshinaga. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 575-579.
- Naritomi, T., T. Kouda, H. Yano, and F. Yoshinaga. 1998. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *J. Ferment. Bioeng.* 85, 598-603.
- 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.
- Paek, H.S., J.S. Park, S.M. Jo, W.S. Lee, and K.J. Kim. 1993. The effects of preparation conditions of cellulose/N-methylmorpholine-N-oxide solutions on physical properties of fibers. *J. Korean Fiber Soc.* 30, 569-577.
- Rainer, J. and F.F. Luiz. 1986. Production and application of microbial cellulose. *Polym. Degrad. Stab.* 58, 101-106.
- Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, and M. Benziman. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325, 279-281.
- 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. *Carbohydr. Res.* 149, 101-117.
- Sakran, M.A. 1996. Mechanism of cellulose polymer reactions with some cation-exchanged montmorillonite catalysts. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 213, 87-98.
- 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.
- Son, H.J., O.M. Lee, Y.G. Kim, Y.K. Park, and S.J. Lee. 2000. Characteristics of cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in static culture. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 15, 573-577.
- Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Tibtech.* 16, 41-46.
- Toda, K., T. Asakura, M. Fukaya, E. Entani, and Y. Kawamura. 1997. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. *J. Ferment. Bioeng.* 84, 228-231.
- Valla, S. and J. Kjosbakken. 1982. Cellulose negative mutants of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 1401-1408.
- Williams, W.S. and R.E. Cannon. 1989. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2448-2452.
- Yamanaka, S. and K. Watanabe. 1998. Applications of bacterial cellulose in cellulosic polymers, pp. 207-215. In R. Gillbert (ed.),

- Cellulosic polymers - Blends and composites, Hanser Inc., Cincinnati, OH, USA.
26. 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.

(Received August 28, 2009/Accepted September 22, 2009)

ABSTRACT : Production and Structural Analysis of Cellulose by *Acetobacter* sp. V6 Using Static Culture

Jeong-Do Kim, Ho-Il Jung, Jin-Ha Jeong, Ki-Hyun Park, Young-Dong Jeon, Dae-Youn Hwang, Chung-Yeol Lee, and Hong-Joo Son* (College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Republic of Korea)

The optimal medium compositions for the production of bacterial cellulose (BC) by a *Acetobacter* sp. V6, which was isolated from the traditionally fermented vinegar in Korea, were investigated in static cultures. The optimum medium compositions for BC production were 3% glucose, 3% soytone, 0.8% K_2HPO_4 , and 0.4% ethanol, respectively. Adding NaH_2PO_4 or KH_2PO_4 had not shown the increase in BC production. Under the optimum medium compositions, the highest BC production was 44.67 g/m^2 in 8 days and the thickness of BC pellicle was about 1 cm. Structural properties of BC produced in the optimal medium were studied using Fourier-transform infrared spectroscopy and X-ray diffractometer. BC from the optimal medium was found to be of cellulose type I, the same as typical native cellulose. No difference in the compositions between bacterial and plant celluloses, but BC showed unique micro-network structure and high crystallinity (82%).