한국생물공학회지 제18권 제2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 18, No. 2, 127-132(2003)

알콜류가 Bacterial Cellulose의 생산에 미치는 영향

정 재 용 · 박 연 희 · †박 중 곤
경북대학교 화학공학과
(접수 : 2003. 3. 3., 게재승인 : 2003. 4. 28.)

Effects of Alcohols on the Production of Bacterial Cellulose

Jae Yong Jung, Youn Hee Park, and Joong Kon Park†
Department of Chemical Engineering, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
(Received : 2003. 3. 3., Accepted : 2003. 4. 28.)

The effect of 4 kinds of alcohols was investigated on the production of bacterial cellulose (BC) by *Gluconacetobacter hansenii* PJK. The addition of alcohols and acetic acid to medium caused the pellets of bacterial cellulose to aggregate into a lump, which could be easily separated from the culture medium. The growth rate of cells and the production yield of BC increased in the medium containing ethanol. Other alcohols in the medium decreased cell growth and the cellulose production rate, because of their toxic effects. The addition of ethanol depressed the conversion of a Cel^+ cell to a Cel^- mutant in shaking culture. Cells subcultured three times in a medium containing ethanol produced BC without any loss of BC production yield.

Key Words : Bacterial cellulose, *Gluconacetobacter hansenii* PJK, alcohols, Cel^- mutants

서 론

Cellulose는 자연계에서 가장 풍부한 생물자원으로써 식물과 microbial extracelluar polymer의 주요구성성분으로 잘 알려져 있다. 특히 *Acetobacter, Agrobacteria, Rhizobia, Sarcina* 등과 같은 미생물이 합성하는 bacterial cellulose(BC)는 D-glucose unit가 β-1, 4 glucosidic bond로 이루어진 homopolysaccharide로 식물 유래 cellulose와 화학조성은 같으나 식물 유래 cellulose에서는 찾아볼 수 없는 독특한 물리적 특성으로 인하여 식품으로서 뿐만 아니라 고부가가치 신소재 산업에서 매우 중요한 화제가 되고 있다(1-4). BC를 생산하는 *Acetobacter* strain은 양조과정이나 식초발효과정에서 오염균으로서 발효액의 표면에 피막을 형성하거나 불쾌한 냄새를 유발시키는 세균으로 인식되어 왔으나 1886년 Brown(5)이 피막의 성분이 cellulose임을 규명한 이래 *Acetobacter* strain이 생산하는 cellulose는 고부가가치 신소재로서 많은 연구가 진행되어 왔다.

BC는 식물 유래 cellulose와는 달리 hemicellulose, pectin, lignin 그리고 biogenetic product와 같은 불순물을 전혀 포함하지 않은 순수한 cellulose로써 20~50 nm의 microfibril이 수소결합에 의해 3차원적 망상구조를 이루고 있으며 높은 신장강도, 보수성, young's modulus를 가지고 있으므로 고성능 진동판, 고품질 제지, 화장품, 인공피부 및 식이식품 등으로 이용되고 있으며(3, 4, 6) 환경 친화적 소재라는 점은 무한한 개발 가능성과 다양성을 내포하고 있다. 이러한 BC를 대량으로 생산하기 위해서 BC의 합성 대사 경로와 합성 조절 메카니즘에 대한 연구가 계속 진행되어 왔으며(7, 8) 이를 바탕으로 발효공정의 최적화 연구 및 경제적 생산을 위한 발효조의 scale up에 대한 연구가 계속 되고 있다(9-11). 그러나 *Acetobacter* strain은 배양 중 shear rate를 가하게 되면 cellulose를 생산하지 않는 Cel^- mutation이 발생하기 때문에 (12) *Acetobater* strain을 이용한 BC의 생산은 과거에는 생산성이 매우 낮지만 긴 배양시간과 많은 노동력을 필요로 하는 정치배양법을 사용하여 고순도의 cellulose를 얻었다. 그러나 최근 일본의 Bio Polymer Research (BPR)사 뿐만 아니라 국내에서도 자연계로부터 교반배양에서도 BC를 생산할 수 있는 균주를 분리하여 교반배양 조건에서의 BC 생산에 대한 많은 연구가 보고되었으나 BC를 생산함에 있어 미생물이 유전적으로 불안정하고 BC를 대량생산 및 상용화하기에는 아직 생산성이 낮다(13, 14). 따라서 미생물에 의해 생산되어지는 BC를 산업화하기 위해서는 진탕 및 교반배양 하에서도 안정적으로 BC를 생산할 수 있는 미생물의 분리가 필요하며 이러한 미생물을 이용하여 BC의 생산성을 높일 수 있는 배

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea.
Tel : +82-53-950-5615, Fax : +82-53-950-6615
E-mail : parkjk@kyungpook.ac.kr

양방법을 모색해야 한다. 최근 본 연구실에서는 진탕배양하에서도 BC를 생산할 수 있는 *Gluconacetobacter hansenii* PJK를 분리 및 동정하였으며 배양초기에 ethanol을 1% 첨가함으로써 shear rate에 의한 Cel^- mutant의 발생억제에 대한 연구를 수행하였다(15). 따라서 본 연구에서는 그 후속 연구로써 *G. hansenii* PJK를 이용하여 진탕배양하에서도 Cel^- mutant의 발생없이 안정적으로 BC를 생산할 수 있는 배양방법과 BC 합성의 대사경로에 대한 연구의 일환으로서 배지내에 alcohol류가 첨가된 경우의 bacterial cellulose의 생산 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지조성

Cellulose를 생산하는 균주는 Park 등(15)이 부패한 사과로부터 분리한 *Gluconacetobacter hansenii* PJK를 실험에 사용하였다. 미생물 배양을 위한 배지의 조성은 glucose 10 g/L, yeast extract 10 g/L, peptone 7 g/L, acetic acid 1.5 mL/L, succinate 0.2 g/L이며 배지의 pH는 5.0으로 보정하였다. 균주보관을 위한 고형배지는 배지 조성에 agar 15 g/L를 첨가하였다.

배양조건

50 mL의 배지가 함유된 250 mL 용량의 삼각 플라스크에 고형배지에서 보존중인 균주를 백금이로 접종하여 30℃에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양액은 멸균된 mesh (38 ㎛)로 여과하여 균일한 세포 현탁액을 얻은 후 세포 현탁액 5%를 본 배양액 50 mL가 함유된 250 mL 용량의 삼각 플라스크에 접종하여 30℃에서 200 rpm으로 진탕배양 하였다.

균체량, BC의 정량 및 glucose 농도 측정

배양액 50 mL를 3580 ×g로 20분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 증류수 세척 및 원심분리(3580 ×g, 20분) 과정을 2회 거치고 항량이 될 때까지 영하 50℃에서 동결건조 시켜 균이 포함된 BC의 건조중량을 먼저 구하였다. 그 후 균이 포함된 BC에 20 mL의 0.3 N NaOH를 첨가하여 5분간 끓임으로써 세포를 모두 용해시켰으며 세포가 제거된 순수 BC는 중성이 될 때까지 충분히 세척한 후 동결 건조하여 건조중량을 측정하였다. 균이 포함된 BC의 건조중량과 순수 BC의 건조중량과의 차이로 균체의 건조중량을 측정하였다. Glucose의 농도는 glucose reagent kit (Sigma no. 510-A)로 측정하였다.

Soluble extracellular polysaccharide의 건조중량 측정

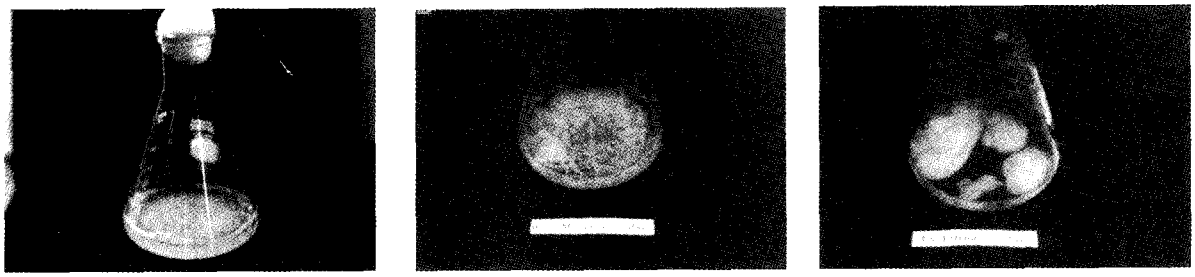
Valla와 Kjosbakken(12)의 방법을 일부 수정하여 soluble extracellular polysaccharide의 건조중량을 측정하였다. 배양액 50 mL를 3580 ×g로 20 분간 원심분리하여 상등액 5 mL를 회수한 후 ethanol 25 mL를 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응용액을 3580 ×g로 20 분간 원심 분리하여 침전물을 얻은 후, 이를 5 mL의 증류수에 완전히 현탁 하였다. 앞에서 언급된 방법으로 반응용액에 다시 ethanol로 반응시켜 원심 분리한 후 침전물은 항량이 될 때까지 80℃ 항온 건조기에서 건조시켰다.

결과 및 고찰

Ethanol에 의한 BC 생산성 향상

BC 생산균주는 acetic acid를 생산할 수 있는 것으로 알려져 있으며 이 acetic acid bacteria는 cytoplasmic membrane의 periplasmic side에 위치하는 primary dehydrogenase를 이용하여 여러 가지 alcohol과 sugar를 산화시킬 수 있다(16). 특히 식초생산 균주인 *Acetobacter aceti*는 탄소원 및 에너지원으로 ethanol, glucose, 그리고 glycerol을 사용할 수 있는 것으로 보고된 바 있다(17, 18). 또한 *G. hansenii* PJK는 ethanol 첨가시 bacterial cellulose 생산량 증가 뿐만 아니라 shear stress의 존재 하에서 Cel^- mutant로 전환되는 것을 억제하는 효과가 있었다(15). 따라서 본 연구에서는 여러 alcohol 중 methanol, ethanol, 2-methyl-1-propanol, n-butanol을 기본배지 조성에 각각 1%씩 첨가하여 5일간 배양한 후 alcohol이 BC 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

G. hansenii PJK를 진탕배양 조건에서 배양하면 배양 3일 이후부터 Cel^- mutant가 발생하여 배양액에 탁도가 나타나기 시작하나(19) 배지에 각종 alcohol을 첨가해 준 경우 배양 5일이 되어도 배양액의 탁도는 전혀 나타나지 않았으며 pellet 형태로 생성된 BC가 배양 2일째부터 엉기는 현상이 나타났다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양 5일째 기본배지에서 생성된 BC는 pellet 형태를 유지하고 있으나 methanol이 첨가된 배지에서는 생성된 BC pellet 중 일부가 뭉쳐져 덩어리를 형성하였으며 ethanol이 첨가된 배지에서는 Park 등(15)의 보고



(A) (B) (C)

Figure 1. Effect of alcohols on the shape of BC produced by *G. hansenii* PJK. Cells were cultivated at 30℃ for 5 days in the basal medium (A), methanol-supplemented medium (B), and ethanol-supplemented medium (C).

와 마찬가지로 BC pellet이 전부 뭉쳐져 덩어리를 형성하였다. 2-methyl-1-propanol와 n-butanol이 각각 첨가된 배지에서는 BC pellet이 전부 뭉쳐져 덩어리를 형성하였으나 크기가 매우 작았다(그림 미제시). 최종 생산된 BC가 덩이형태로 이루어지면 생산물의 분리정제 과정이 용이하게 되는 장점이 있을 수 있다. 따라서 BC가 뭉쳐지는 현상이 균체의 성장 및 BC 생산의 변화에 미치는 영향을 검토하기 위해서 methanol, 공업용 methanol (D. C. Chemical), ethanol, 2-methyl-1-propanol, n-butanol을 기본배지 조성에 각각 1%씩 첨가하여 5일간 배양한 후 미생물과 BC의 건조중량을 측정해 보았다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 ethanol을 첨가해준 경우 alcohol을 첨가하지 않거나 다른 alcohol을 첨가해 준 경우에 비하여 균체의 성장 및 BC의 생산량이 가장 높게 나타났다. Methanol을 첨가해 준 경우 시약용과 공업용 methanol에 의한 균체의 성장 및 BC의 생산량은 거의 차이를 나타내지 않았다.

Matsuoka 등(20)은 *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR3001A의 경우 배지 조성에 첨가된 ethanol은 cell의 성장을 향상시키고 BC의 생산성도 증가시킨다고 보고하였으며 Naritomi 등(21)은 첨가된 ethanol이 ATP의 농도를 증가시켜 fructose metabolism의 두 경로 중 BC 합성에 관여하는 fructose hexokinase의 활성을 증가시키고 pentose phosphate 경로에 관여하는 glucose 6-phosphate dehydrogenase의 활성을 저해함으로써 BC의 생산수율을 높일 수 있다고 보고하였다. *G. hansenii* PJK는 BC 생산에 대한 탄소원으로서 fructose보다는 glucose가 효과가 높았으므로 (15) 탄소원으로 fructose가 아닌 glucose를 사용하였다. 따라서 배양 초기에 첨가된 ethanol이 대사과정 중 ATP의 농도를 증가시켜 pentose phosphate 경로에 관여하는 glucose 6-phosphate dehydrogenase의 활성을 저해함으로써 BC의 생산성이 높아진 것으로 추측된다.

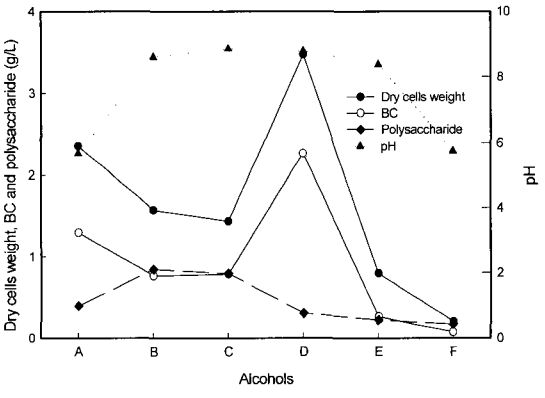


Figure 2. Effect of alcohols on BC production by *G. hansenii* PJK. Cells were cultivated at 30 ℃ for 5 days. A: Without alcohol (basal medium), B: 1% addition of methanol, C: 1% addition of methanol (industrial chemicals), D: 1% addition of ethanol, E: 1% addition of 2-methyl-1-propanol, F: 1% addition of n-Butanol.

배양 초기에 각종 alcohol을 첨가하면 BC를 생산하지 않는 Cel^- mutant는 발생하지 않았으나 Fig. 2에서 보는 바와 같이 ethanol을 제외한 나머지 alcohol류가 첨가된 배지에서 배양된 미생물은 균체의 성장 및 BC의 생산량이 낮은 것을 알 수 있다. 일반적으로 acetic acid bacteria는 여러 가지 alcohol을 산화시킬 수 있으나(18) 본 실험에서 사용된 *G. hansenii* PJK의 경우 ethanol만 산화시킬 수 있는 능력을 가지고 있으며 나머지 alcohol들은 미생물의 성장에 저해하는 효과만 가지는 것으로 추측된다. 배양 5일 후 배양액의 pH를 측정해 본 결과 methanol을 첨가해준 경우 pH가 약 9이었으며 나머지 alcohol은 pH가 약 4~5 범위에 있었다. 배지에 ethanol을 첨가해준 경우 *G. hansenii* PJK는 배지 성분 중 acetic acid를 산화시켜 배양액의 pH를 높여주나 한편 일반 acetic acid bacteria처럼 ethanol을 acetic acid로 산화시켜 배양액의 pH를 낮추기 때문에 배양 5일이 되어도 배양액의 pH는 거의 초기 pH와 유사한 것으로 추측된다. 2-methyl-1-propanol과 n-butanol를 첨가해준 경우 이들 alcohol의 독성으로 인하여 균체의 성장이 저해되어 배지 성분 중 acetic acid를 거의 분해할 수 없었을 뿐만 아니라 대사과정 중 glucose 일부가 gluconate로 전환되어(22) 배양액의 pH를 감소시킨 것으로 추측된다.

*A. xylinum*은 배양 중 insoluble polysaccharide인 BC뿐만 아니라 부산물로써 glucose, rhamnose, mannose, 그리고 glucuronic acid로 이루어진 soluble extracellular polysaccharide도 생산하는데(23, 24) Chao 등(23)은 BC 생산성을 높이기 위해서는 soluble extracellular polysaccharide의 생산량을 최소화해야 하며 Valla와 Kjosbakken(24)은 *A. xylinum*의 cellulose negative strain이 soluble extracellular polysaccharide를 생산한다고 보고하였다. *G. hansenii* PJK를 배양한 경우에도 배양액에 soluble extracellular polysaccharide가 생성되었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 ethanol을 첨가하여 BC의 생산량이 많아지면 상대적으로 soluble extracellular polysaccharide의 생산량이 적어지는 것을 알 수 있다. 따라서 위 결과로부터 미생물의 성장 및 BC의 생산성을 높이기 위해서 Chao 등(8)의 보고처럼 *G. hansenii* PJK에 의한 soluble extracellular polysaccharide 생산을 억제시키면 효과가 있을 것임을 예측할 수 있다. 그러나 2-methyl-1-propanol과 n-butanol를 첨가해준 경우에는 이들 alcohol의 독성으로 인하여 미생물의 성장을 저해하기 때문에 soluble extracellular polysaccharide의 생산량이 낮은 것으로 추측된다.

Methanol이 BC 생산에 미치는 영향

2-methyl-1-propanol과 n-butanol은 미생물의 성장을 저해하지만 methanol은 균체의 성장과 BC의 생산량에는 큰 영향을 미치지 않고 BC의 엉김현상을 유도하였다. 따라서 methanol의 첨가량에 따른 BC의 생산특성을 조사하기 위하여 기본배지 조성에 methanol을 농도별로 첨가하여 *G. hansenii* PJK를 5일간 배양한 후 균체의 성장과 BC의 생산량을 측정하였다. Methanol을 첨가하여 *G. hansenii* PJK를 배양한 경우 Figure 3에서 알 수 있듯이 첨가되는 methanol의 농도가 높을수록 균체의 성장 및 BC의 생산량이 감소하는 것을 알 수 있으며 soluble extracellular polysaccharide의 생산량은 거의 변화가 없었다. Methanol이 첨가된 배지에서 배양된 미생물은 배양 5일이 지나도 Cel^- mutant는 발생하지 않았으나 methanol의

독성으로 인하여 균체의 성장 및 BC의 생산량이 감소한 것으로 추측된다. 또한 Jung 등(19)의 보고에서도 언급했듯이 *G. hansenii* PJK를 기본배지에서 배양하는 경우 배양액의 최종 pH는 약 9가 되었으며 methanol을 첨가하더라도 최종 pH는 약 9를 나타내었으나 0.5% methanol을 첨가해준 경우에만 약 4를 나타내었다. *Methylophilus* W3A1과 같은 미생물은 methanol dehydrogenase를 이용하여 methanol을 산성을 띠는 formaldehyde로 분해할 수 있는데(25) 본 실험에서 사용된 *G. hansenii* PJK도 methanol dehydrogenase의 활성을 가지고 있어 첨가되는 methanol의 농도가 0.5%가 되면 *G. hansenii* PJK가 methanol을 분해하여 산성을 띠는 formaldehyde를 생산하므로 배양액의 pH가 감소한 것으로 추측된다. 그러나 첨가되는 methanol의 농도가 1.0% 이상이 되면 methanol dehydrogenase의 활성이 감소되어 methanol을 분해할 수 없기 때문에 배양액의 pH는 methanol을 첨가하지 않은 경우와 유사한 값을 나타내는 것으로 추측된다.

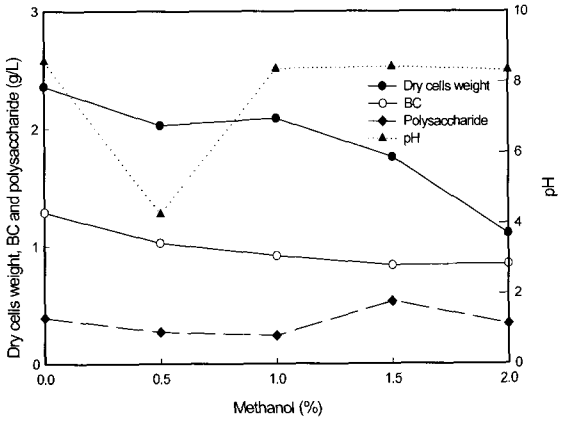


Figure 3. Effect of concentration of methanol on BC production by *G. hansenii* PJK. Cells were cultivated at 30 ℃ for 5 days.

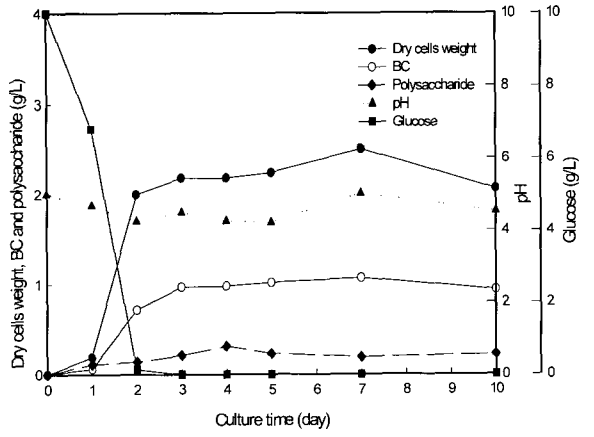


Figure 4. Time course of BC production in methanol-supplemented medium.

기본배지 조성에 methanol을 0.5% 첨가하여 배양시간에 따른 균체의 성장과 BC의 생산량을 검토하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 균체가 성장함에 따라 BC의 생산량도 증가하는 growth-associated type의 특성을 나타내었다. 또한 기본배지 조성에 methanol을 첨가한 경우 균체의 성장과 BC의 생산량 및 곡선형태는 기본배지 조성만으로 *G. hansenii* PJK를 배양한 경우와 매우 유사한 결과를 나타내었다(19). 배양액의 pH는 methanol이 첨가된 경우 미생물이 배지 성분 중 산성을 띠는 acetic acid도 소비하지만 methanol을 분해하여 산성을 띠는 formaldehyde를 생산하므로 배양시간에 따른 pH는 거의 변화가 없는 것으로 추측된다.

배양시간에 따른 BC 생성 형태의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. Methanol이 첨가된 배지에서 생성된 BC는 모두 배양 2일째부터 작은 구형의 BC pellet이 서서히 뭉쳐져 배양 7일째가 되면 ethanol이 첨가된 배지에서 3~4일째와 같은 정도로 생산된 BC가 뭉쳐짐을 알 수 있다. 배양 10일이 되면 하나의 큰 덩어리를 형성하였다. 그러나 Fig. 2에서도 알 수 있듯이 ethanol과 methanol을 첨가한 두 가지 경우 모두 하나의 BC 덩어리를 형성하였으나 BC의 경도는 ethanol이 첨가된 배지에서 생성된 것이 더 큰 것을 알 수 있었다.

Ethanol에 의한 Cel⁻ mutant 발생 억제

Methanol과 ethanol을 각각 0.5%, 1.0%씩 배지에 첨가시켜 *G. hansenii* PJK를 5일간 진탕배양 시킨 후 상등액으로 계대배양을 연속적으로 실시하여 상등액의 탁도로 Cel⁻ mutant의 발생여부를 검토하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 기본배지만을 사용하거나 methanol이 첨가된 배지를 사용한 경우 계대배양 2회 이후부터 배양액 중에 Cel⁻ mutant가 발생하여 BC가 전혀 생성되지 않았으나 ethanol을 첨가한 경우 계대배양 3회까지 BC가 생산되었다. 일반적으로 *A. xylinum*은 진탕배양에서 반복적으로 계대배양될 경우 자연적으로 Cel⁻ mutant가 발생하고(12) Cel⁻ mutant는 BC 생산균주보다 증식속도가 빠른 특성(26)을 지니고 있다. 따라서 *G. hansenii* PJK를 연속적으로 계대배양할 경우 배양 중 생성된 Cel⁻ mutant가 배양의 주체가 되어 계대배양 2회 이후부터 BC를 전혀 생산할 수 없는 것으로 추측된다. 배양 초기에 ethanol을 첨가한 경우 계대배양 3회까지도 BC가 생산되는 것은 배양 중 ethanol이 Cel⁻ mutant의 발생빈도 및 증식속도를 낮추는 역할을 했기 때문인 것으로 추측된다.

Table 1. Effect of additives added in the medium at the beginning of cell cultivation on induction of Cel⁻ mutants. Cells were cultivated at 30 ℃ for 5 days

Additives	The number of subculture (times)			
	1	2	3	4
None	+	-	-	-
Methanol	+	-	-	-
Ethanol	+	+	+	-

+: Cellulose-producing wild type strains (Cel⁺), -: Cel⁻ mutant

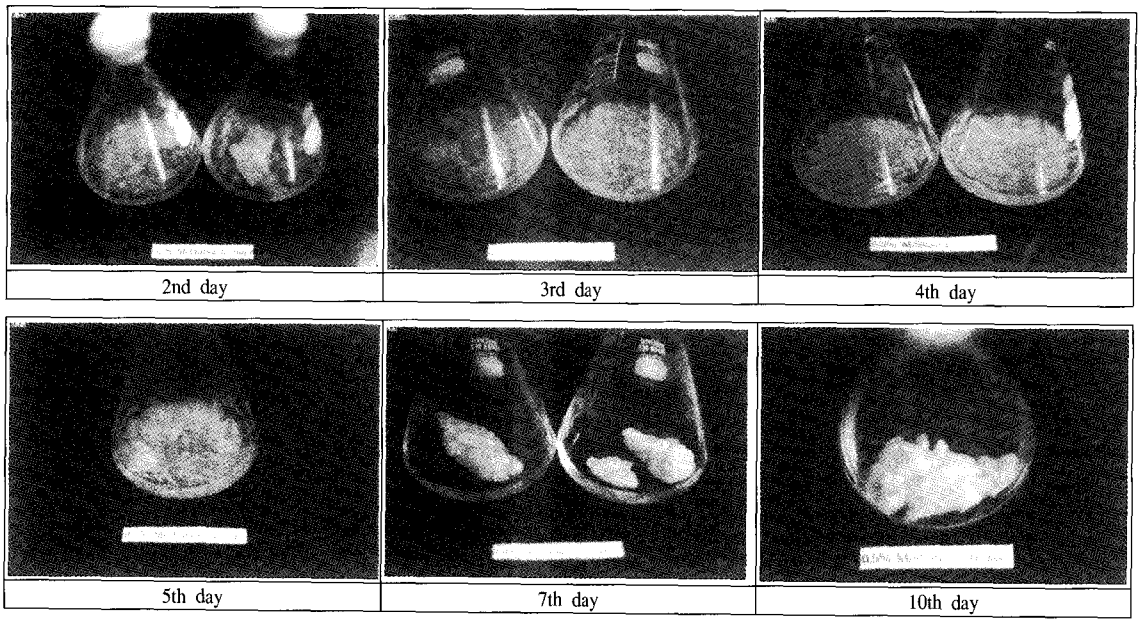


Figure 5. Appearances of BC produced in methanol-supplemented medium according to the cultivation time.

요 약

Alcohol류를 배양액 속에 첨가하면 배양 중에 생성되는 BC가 엉기는 현상이 나타났다. 생성된 BC의 엉김은 생산배지로부터의 cellulose의 분리회수를 손쉽게 할 수 있는 장점이 있다. 이 중에서 ethanol을 사용하는 경우에는 BC의 생산성과 미생물의 성장속도가 증가하였다. Ethanol 이외의 alcohol류는 BC의 엉김현상에는 효과가 있었으나 그 독성으로 인하여 미생물의 성장과 BC의 생산성을 감소시켰다. Ethanol과 다른 alcohol 모두 BC의 엉김효과는 있으나 ethanol만 진탕배양에서 Cel^- 균주의 출현 방지에 효과가 있었다.

감 사

이 논문은 2002년도 경북대학교 특성화 사업팀(KNURT) 연구비에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

1. Delmer, D. P (1999), Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 245-276.
2. Delmer, D. P. and Y. Amor (1995), Cellulose biosynthesis, *Plant Cell* **7**, 987-1000.
3. 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.
4. Cannon, R. E. and S. M. Anderson (1991), Biogenesis of bacterial cellulose, *Crit. Rev. Microbiol.* **17**, 435-447.
5. Brown, A. J. (1886), An acetic acid ferment which forms cellulose, *J. Chem. Soc.* **49**, 432-439.
6. Klemm D., D. Schumann, U. Udhard, and S. Marsch (2001), Bacterial synthesized cellulose - artficial blood vessels for microsurgery, *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1561-1603.
7. 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, *Carbohyd. Res.* **149**, 101-117.
8. 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.
9. Kouda, T, T. Naritomi, H. Yano, and F. Yoshinaga (1997), Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture, *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 124-127.
10. Chao, Y., T. Ishida, Y., Sugano, and M. Shoda (2000), Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor, *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 345-352.
11. Chao, Y., M. Mitarai, Y. Sugano, and M. Shoda (2001), Effect of addition of water-soluble polysaccharides on bacterial cellulose production in a 50-L airlift reactor, *Biotechnol. Prog.* **17**, 781-785.
12. Valla. S. and J. Kjosbakken (1981), Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*, *J. General Microb.* **128**, 1401-1408.
13. Toyosaki, H., T. Naritomi, A. Seto, M. Matsuoka, T. Tsuchida, and F. Yoshinaga (1995), Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture, *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1498-1502.
14. 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.
15. Park, J. K., Y. H. Park, and J. Y. Jung (2003), Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* in press.
16. Frebortova, J., K. Matsushita, and O. Adachi (1997), Effect of growth substrates on formation of alcohol dehydrogenase in *Acetobacter methanolicus* and *Acetobacter aceti*, *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 21-25.
17. Ohmori, S., T. Uozumi, and T. Beppu (1982), Loss of acetic

acid resistance and ethanol oxidizing ability in an *Acetobacter* strain, *Agric. Biol. Chem.* **46**, 381-389.

18. Adachi, O., E. Miyagawa, E. Shinagawa, K. Matsushita, and M. Ameyama (1978), Purification and properties of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*, *Agric. Biol. Chem.* **42**, 2331-2340.
19. Jung, J. Y., Y. H. Park, and J. K. Park (2003), Effect of medium composition on the bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* PJK, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* submitted for publication.
20. Matsuoka, M., T. Tsuchida, K. Matsushita, O. Adachi, F. Yoshinaga (1996), A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 575-579.
21. 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.
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, *Polym. Degrad. Stabil.* **59**, 93-99.
23. Chao, Y., M. Mitarai, Y. Sugano, and M. Shoda (2001), Effect of addition of water-soluble polysaccharides on bacterial cellulose production in a 50-L airlift reactor, *Biotechnol. Prog.* **17**, 781-785.
24. Valla. S. and J. Kjosbakken (1981), Isolation and characterization of a new extracellular polysaccharide from a cellulose negative strain of *Acetobacter xylinum*, *Can. J. Microbiol.* **27**, 599-603.
25. Colby, J. and A. J. Blakey (1995), Effect of growth conditions on the activities of methylotrophic enzymes in *Methylophilus* W3A1, *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 333-337.
26. Schramm, M. and S. Hestrin (1954), Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*, *J. General Microb.* **11**, 123-129.