

## Pilot Scale의 박테리아 셀룰로오스 생산 및 그의 물성

김 성 준 · 송 효 정 · <sup>1</sup>장 미 화 · <sup>1†</sup> 최 창 남

전남대학교 환경공학과, <sup>1</sup>전남대학교 섬유공학과

(접수 : 2007. 2. 2., 게재승인 : 2007. 4. 16.)

## Production of Bacterial Cellulose by Pilot Scale and Its Properties

Seong Jun Kim, Hyo Jeong Song, Mi Hwa Chang<sup>1</sup>, and Chang Nam Choi<sup>1†</sup>

Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>1</sup>Department of Textile Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2007. 2. 2., Accepted : 2007. 4. 16.)

The saccharogenic liquid (SFW) obtained by the enzymatic saccharification of food wastes was used as a medium for production of bacterial cellulose (BC). The enzymatic saccharification of food wastes was carried out by the cultivation supernatant of *Trichoderma inhamatum* KSJ1 culture. *Acetobacter xylinum* KJ1 was employed for the BC production culture. Under the scaled-up aeration condition of 1.0 vvm, 5.64 g/L of BC was produced in 3 days cultivation in 50 L air circulation bioreactor using SFW medium with addition of 0.4% agar. The productivity was similar to that of 10 L air circulation bioreactor (5.84 g/L). This cultivation method with 50 L air circulation bioreactor decreasing shear stress and increasing oxygen transfer coefficient ( $k_{L}a$ ) was very useful in BC mass production. The physical properties, such as morphology, molecular weight, crystallinity, and tensile strength of BC produced by the static culture (A), the air circulation culture using 10 L bioreactor (B) and 50 L bioreactor (C) were investigated. The number average molecular weight of BCs produced under the different culture conditions (A-C) showed 2,578,000, 1,975,000, and 1,809,000, respectively. Tensile strength was 1.72 kg/mm<sup>2</sup>, 1.19 kg/mm<sup>2</sup>, and 1.18 kg/mm<sup>2</sup>, respectively. All of the BCs had a form of cellulose I representing pure cellulose. The relative degree of crystallinity showed the range of 86.2~87.8%. BC production by the air circulation culture mode brought more favorable results in terms of the physical properties and its ease of scale-up. Therefore, it is expected that the new BC production method, the air circulation culture using SFW, would contribute greatly to BC-related manufacturing.

**Key Words :** Saccharification of food wastes (SFW), bacterial cellulose (BC), 50 L air circulation bioreactor, physical properties

### 서 론

미생물인 *Acetobacter xylinum*에 의해 만들어지는 박테리아 셀룰로오스 (BC)는 일반 식물 셀룰로오스와는 다르게 헤미셀룰로오스, 페틴, 및 리그닌 등 불순물이 함유되지 않은 순수한 셀룰로오스 집합체이다. 이 BC는 목재 펄프에 비해 결정화도가 높으며, 섬도가 약 0.1 미크론 정도의 섬세한 섬유들이 그물 모양으로 엉킨 구조로 되어 있다. 따라서 BC는 비표면적이 넓고, 보수율이 높으며, 성형성이 좋고, 인장강력이 우수하다. 이와 같이 우수한 성질을 이

용하여 BC를 스파커 막, 다이어트 섬유 등으로 이용하려는 연구가 진행되고 있다. 또한 BC는 독성이 낮고 화학적으로 안정하기 때문에 인공혈액용기 및 분리막 등으로 제조하려는 연구가 진행되고(1, 2). 특히 BC는 환경친화적인 물질이기 때문에 다양한 분야에 널리 이용될 것으로 기대되고 있다.

BC의 생산과 관련하여 배양 중 *Acetobacter xylinum*에 전단력이 가해지면 셀룰로오스 생산을 방해하는 Cel<sup>-</sup> 돌연변이가 발생하여 BC 생산이 심각하게 줄어든다. 이와 같은 이유 때문에 전단력이 가해지지 않는 정치 배양 (static cultivation) 방법이 생산성이 낮고, 배양 시간이 길고, 노동력이 많이 드는 단점에도 불구하고, BC를 생산하는데 계속 사용되어 왔다. 정치배양의 단점을 극복하면서, BC의 생산성을 높이고, 공업화를 위하여 많은 연구가 행해져 왔다. 유전학적으로 안정한 미생물을 선택하거나, 배지를 개량하거나, 배

<sup>†</sup> Corresponding Author : Department of Textile Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea.

Tel : +82-62-530-1772, Fax : +82-62-530-1779

E-mail : cnchoi@chonnam.ac.kr

지에 lactate, pyruvate, ethanol 등을 첨가하여 제조하는 방법 등이 시행되기도 하였다(3, 4). 그러나 아직까지 BC 생산은 아직 매우 낮고, 공업용으로 사용하기 위한 제조단계도 매우 높은 수준이다. 우리는 음식 폐기물에 포함된 섬유상 고분자 물질을 가수분해시켜 값싸게 당화액 배지를 제조하여 다양한 배양방법으로 제조한 BC와 기존의 상업 배지인 HS 배지로 제조한 BC와의 물성을 비교하여, 물성차이가 크지 않은 것을 확인하였으며, 이 때문에 BC 제조 단계를 크게 줄이는 기술을 개발하였다(5).

본 연구에서는 BC의 대량생산 기술개발과 관련하여, BC 생산 배지원으로써 음식폐기물을 이용하기 위해 섬유소분해효소로 음식폐기물을 당화하여 사용하고, 낮은 전단력의 높은 산소전달능력을 갖는 대량생산 배양기술을 개발하기 위해 공기순환배양기를 10 L에서 50 L로 규모확대하여 BC생산성과 제반물성을 검토하여 본 scale-up 생산방법의 타당성을 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### BC의 제조

#### 음식물쓰레기 당화용 섬유소 분해효소 생산 및 효소학적 당화

전배양은 100 ml의 YM EB (yeast extract 4g, malt extract 10 g, glucose 4 g, distilled water 1.0 L) 배지에 높은 효소생산성을 갖는 *Trichoderma inhamatum* KSJ1을 접종하여 30°C, 120 rpm에서 3일간 배양하였다. 본 배양은 10 L Jar fermenter (BioG, Hamil R&G Co., Korea)에 Mandel's medium(6)에서 탄소원으로 이용되는 CMC와 avicel 대신에 섬유소 폐기물 (볏짚, 펠트)를 기질로 각각 1%씩 사용하였으며, 전배양액 2%를 접종하여 온도 30°C, 교반속도 200 rpm, 공기량 0.6 vvm, pH는 조절하지 않은 상태로 4일간 배양한 배양액을 음식물쓰레기 당화공정의 효소액으로 사용하였다. 효소학적 당화는 30 L fermenter에서 섬유소분해효소 생산 배양액과 기질 즉 음식물 쓰레기를 혼합하여 50°C, 150 rpm, 10시간으로 반응 시켜 BC 생산용 배지로 사용할 당화액을 얻었다. 여기서 사용한 음식물쓰레기의 조성은 C: 44.5 ± 0.3, N: 2.4 ± 0.2 이었다.

### BC 생산 배양방법

**500ml flask 정치배양:** 전전 배양은 100 mL의 당화액 배지가 함유된 500 mL flask에 고체배지에서 보존중인 BC 생산균주 *Acetobacter xylinum* KJ1를 백금이로 접종하여 30°C에서 36시간 정치배양한 후 상등액 4%를 각각 전 배양의 접종액으로 사용하여 30°C에서 36시간 정치배양하였다. 배지 100 mL가 함유된 500 mL flask에 전배양액 내의 BC을 Homogenizer Nissei, A-7 (10,000 rpm, 1 min)에 의해 분쇄한 후 4%를 접종하여, 30°C, pH 5.25, 3일 동안 정치배양하였다.

**10 L 공기순환배양:** 전전 배양 및 전 배양은 500 ml flask 정치배양과 동일하게 하였으며, 전배양액을 Homogenizer (10,000 rpm, 1 min)에 의해 BC을 분쇄한 후 200 mL를 본 배양의 접종액으로 사용하였다. 5 L의 당화액 배지에서 1.2

vvm (6 L/min)의 통기 조건으로 30°C에서 3일간 배양하였다.

**50 L 공기순환배양:** 전단력을 최소화하고 산소전달능력을 높일 수 있는 공기순환 및 airlift-type 배양기를 전체용적 50 L, 유효용적 30 L 규모 (전체높이 838 mm, 구형의 안지름 460 mm)의 시스템으로 scale-up 하여 구축한 배양기(Fig. 2)를 사용하였다. 500 ml flask에서 정치배양한 전배양액 600 ml을 Homogenizer (10,000 rpm, 1 min)로 분쇄하여 30 L 당화액의 본 배양 접종액으로 사용하였다. 온도, pH, 배양시간은 10 L 공기순환배양기의 조건과 동일하게 하였다. 10 L 공기순환배양기의 실험에서 최적 통기조건인 1.2 vvm을 선속도 ( $v_s$ )로 전환하여 선속도와  $k_{La}$ 와의 관계를 해석하여 50 L에서의 최적 통기조건 약 30 L/min (1.0 vvm)로 결정하여 이 통기조건에서 배양하였다.

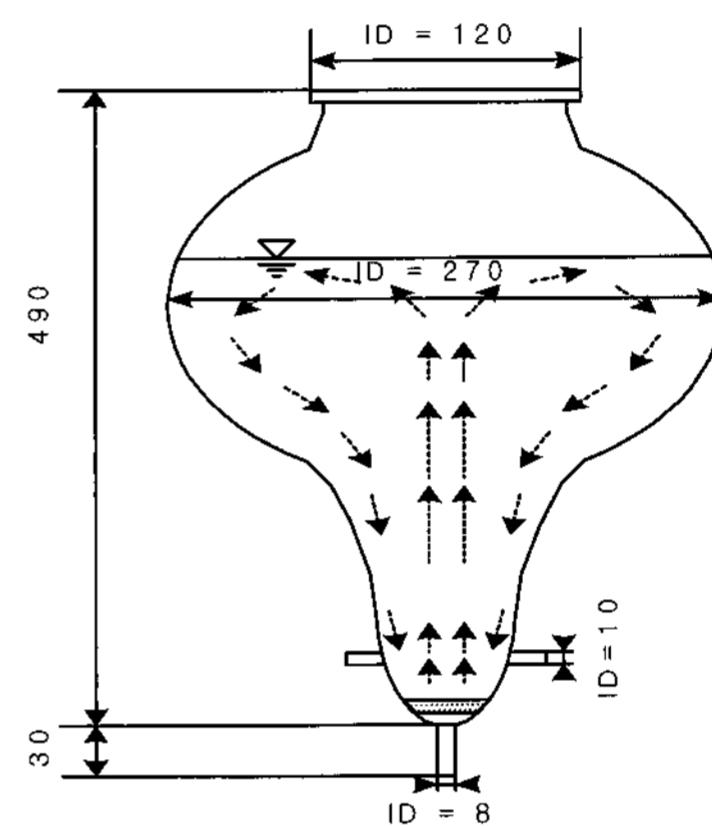


Figure 1. Shape and measure of 10 L air circulation bioreactor (unit; mm, arrow; flow direction of liquid).

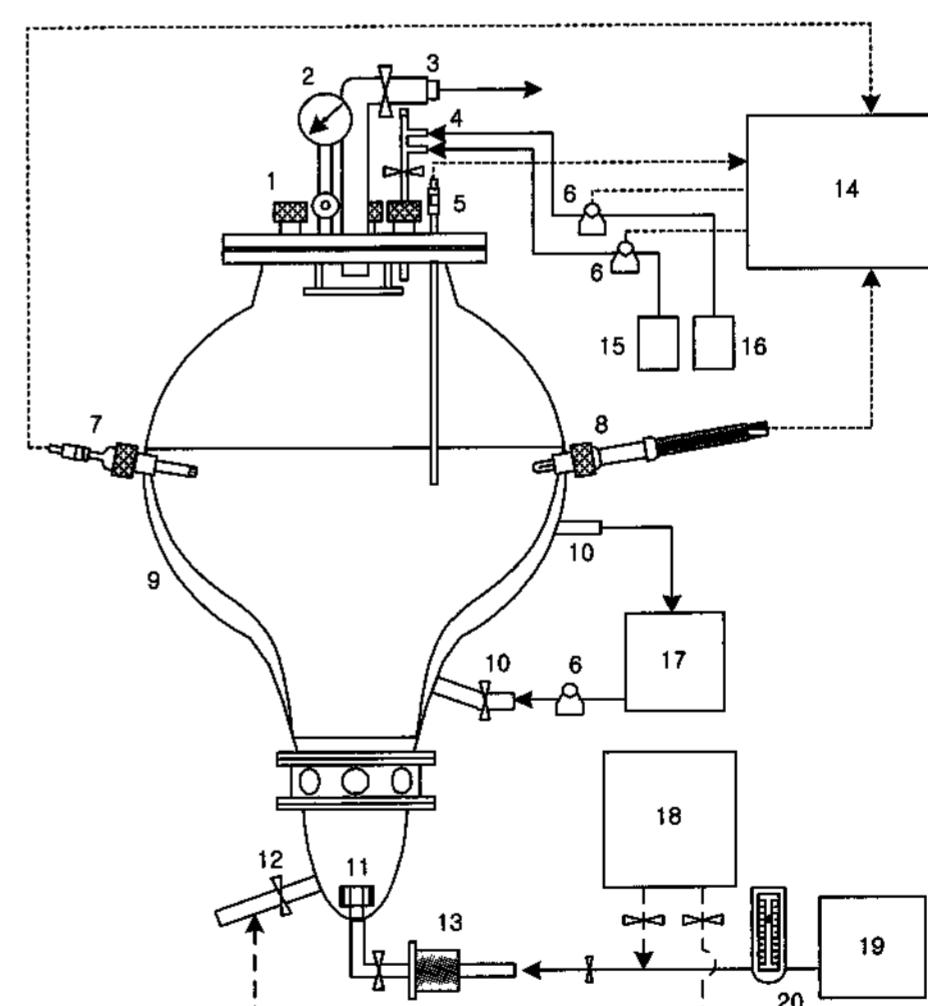


Figure 2. Apparatus of 50 L air circulation bioreactor (1. nozzle for inoculation; 2. steam manometer; 3. air outflow; 4. nozzle for injection of acid and alkali inlet; 5. thermometer; 6. a transfer pump; 7. DO electrode; 8. pH electrode; 9. water jacket; 10. water jacket inflow · outflow; 11. air inlet; 12. sampling nozzle; 13. air filter; 14. control box; 15. acid storehouse; 16. alkali storehouse; 17. a constant-temperature water bath; 18. steam boiler; 19. compressor; 20. air flow meter).

## BC의 물성 분석

### 형태학적 고찰

제조된 BC의 형태는 주사전자현미경 (JSM-5400, Japan)을 사용하여 시료에 백금을 친공증착한 후 10,000배로 확대하여 관찰하였다.

### 분자량

GPC (gel permeation chromatography, Viscotek GPCmax) 방법으로 측정하였다. GPC를 측정하기 위해서는 고분자를 용매에 용해시켜야 한다. 그러나 세룰로오스는 용매에 대한 용해성이 우수하지 못하므로, 질산 유도체로 제조하여 실험 하였다(7). 먼저 90% 질산 25 cc에 phosphorous pentoxide 10.1 g을 천천히 녹여서 질산화 용액을 제조한다. 이 질산화 용액 4 cc에 BC 0.1 g을 넣고 20°C에서 20분간 처리하였다. 질산화된 세룰로오스를 중류수로 여러번 세척하여 질산화 용액을 제거한 후, 5% sodium carbonate 용액으로 세척하여 시료를 중화시켰다. 다시 중류수로 3번 정도 세척한 다음, 20분 정도 교반하면서 끓여주었다. 그 후에 질산화된 BC를 에탄올에 10분정도 담가둔 후에 중류수로 세척하여 진공건조 시킨 후에, 테트라히드로퓨란에 용해하여 0.5% 용액으로 하여 측정하였다. 표준물질로는 polystyrene을 사용하였으며, RI-detector를 사용하여 측정하였다.

### 결정화도

X-선 회절기 (Rigaku, D-Max 1200)로 Cu-K<sub>α</sub>선을 사용하여 측정하였다. 상대 결정화도는 Segal 법으로 다음식으로 부터 결정하였다(8).

$$Cr\ I = 1 - h_{am} / h_{cr} = 1 - h_{am} (h_{tot} - h_{am})$$

여기서  $h_{cr}$ 는 2theta가 22.5°에서 나타나는 (002)면에 상당하는 피크 강도이고,  $h_{am}$ 는 2theta가 18°에서 나타나는 무정형 부분에 상당하는 피크 강도이며,  $h_{tot}$ 는 전체 높이이다.

### 인장강도

ASTM D638 방법으로 측정하였다. BC를 두께가 약 0.25 mm인 습식부직포 (종이) 형태로 성형한 다음, 넓이 8 mm, 길이 8 cm의 리본 형태로 만들었다. 이 시료를 파지거리 2 cm, 하강속도 1.0 mm/min로 하여 인장시험기 (United, STM-5)로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 배양방법에 따른 BC 생산성

배양 방법에 따른 BC 생산성의 비교를 Table 1에 나타내었다. 당화액 배지를 이용하여 500 mL flask에서 정치배양 한 경우 5.67 g/L가 생산되었고, 당화액에 0.4%의 agar를 첨가한 배지를 이용한 10 L 공기순환배양에서는 5.84 g/L, 50 L 공기순환배양에서는 5.64 g/L의 BC가 생산되었다. BC 생산균주는 전단력에 민감하므로 전단력을 낮추는 것이 BC 생산에 있어 중요하다. 따라서, 본 연구에서도 당화액 배지에 agar를 넣어 실험을 수행하였으며, agar와 같은 다당류 첨가에 의한 점도의 증가가 BC 응집의 형성을 방지하고 전단력 감소에 의해 Cel균주로의 전환율을 낮추어, BC 생산성을 높였다고 추측할 수 있다.

Table 1. Comparison of BC concentration according to cultivation condition

Cultivation condition	BC Concentration (g/L)
500 mL flask static	5.67
10 L air circulation	5.84
50 L air circulation	5.64
50 L Internal-Loop airlift (Japan, Shoda Lab.)	5.10

\*SFW: Saccharified food wastes, CSL-Fru: Corn steep liquor-fructose

일본 동경 대학 Shoada 연구실에서는 최적화 복합배지인 Corn steep liquor-fructose (CSL-Fru)에 agar를 첨가하여 배지로 사용하여 50 L Internal-Loop Airlift Reactor에서 67시간 동안 배양하여 5.10 g/L의 BC 생산 농도를 얻었다고 보고하였다(9). 이는 본 연구의 BC 생산성과 비슷한 농도를 보임을 알 수 있었다. 그러나 airlift reactor를 사용하여 BC생산의 규모 확대를 시도하였으나 BC고형물 괴가 액순환부에 축적됨으로써 유동효과가 떨어져 고농도 배양이 어려운 문제점이 발생하여 대규모의 생산에는 적합한 방법이라 할 수 없다.

본 연구에서는 10 L 공기순환배양기에서 얻어진 BC 농도가 50 L로 규모 확대한 배양기에서도 동등하게 얻어져 BC 생산 배양에 효과적일 것으로 판단된다. 따라서, 점성이 충분한 다당류를 첨가하여 배양하게 되면 BC 생산에

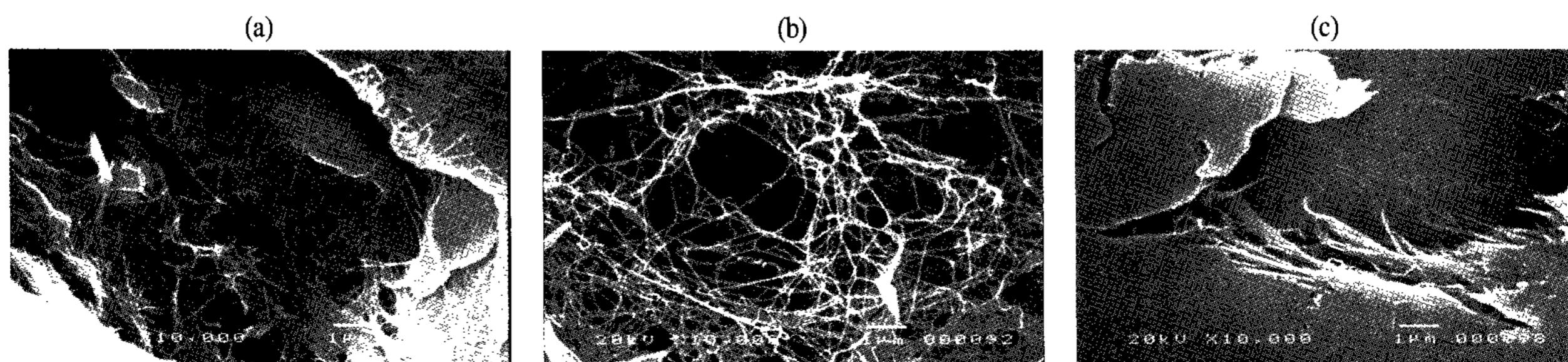


Figure 3. SEM micrograph (x10,000) of bacterial cellulose produced at various culture conditions using SFW ((a): 10 L air circulation, (b): 50 L air circulation, (c): Static cultivation).

효과적일 것으로 보여지며, 본 연구의 공기순환방식은 효율적인 BC 생산 방법 중 하나가 되리라 사료된다.

### 형태학적 관찰

BC의 정확한 형태 (모폴로지)를 조사하기 위하여 주사전자현미경 (SEM, JSM-5400, Japan)을 사용하여 관찰해 보았다. Fig. 3에 BC의 주사전자현미경 사진을 나타내었다. (a), (b)는 공기순환방식으로 제조한 BC의 전자현미경 사진이고, (c)는 정치한 상태에서 제조한 BC의 전자현미경 사진이다. 그림을 보면 공기순환하면서 제조한 경우에는 직경이 약 0.1~0.2 미크론수준의 섬유가 잘 발달되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이와같은 직경의 섬도는 일반적으로 16~22 미크론 정도 (평균 약 20 미크론)의 섬도를 가지는 면 섬유에 비하여 극히 섬세한 특성을 나타내지만, 서로 얹혀져 있는 망목상의 연결구조를 가지고 있었다.

한편, 정치한 상태로 제조한 BC의 전자현미경 사진에서도 미세한 섬유조직이 보이지만 공기순환방식으로 제조한 경우에 비하여 뭉쳐져 있는 상태였다. 이는 제조과정 중에 전단력이 없이 정치된 상태로 BC가 형성되기 때문에 망목상의 구조가 중첩되어 뭉쳐져 있는 것으로 생각되었다.

### 분자량

고분자 물질의 분자량은 가장 중요한 기본 물성이다. BC의 분자량을 확인하기 위하여 GPC (gel permeation chromatography) 방법으로 측정하였다. GPC는 SEC (size-exclusion chromatography) 방법으로써 시료의 크기가 팽윤된 겔의 최대 구멍 (pore)보다 클 때는 겔 내부로 투과하지 못하고 정지상 입자 사이의 공간을 통하여 흘러나오고, 시료의 크기가 팽윤된 겔의 구멍보다 작을 때는 내부로 진입하여 겔 내부를 거쳐서 흘러나오기 때문에 분자의 크기가 큰 시료가 먼저 용출되어 나오게 된다. 서로 다른 배양조건에서 제조한 BC 및 면섬유소의 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었다. 정치 배양하여 제조한 BC, 당화액 배지를 사용하여 10리터 배양기에서 제조한 BC, 당화액 배지를 사용하여 50리터 배양기에서 제조한 BC, 면섬유소의 retention volume은 각각 14.77, 14.82, 14.88, 15.33으로써 전체적으로 BC가 면섬유소에 비하여 빠르게 유출되는 것으로부터 분자량이 크다는 것을 알 수 있었다. 폴리스티렌을 기준물질로하여 작성한 검량선으로부터 구한 각종 BC 및 면섬유소의 평균 분자량과 polydispersity를 Table 2에 나타내었다.

예상한 바와 같이 BC의 분자량이 면 섬유소에 비하여 훨씬 크며, BC 중에서도 정치배양하여 제조한 BC의 경우에 평균분자량이 큰 것을 알 수 있었다. 일반적으로 BC를 제조할 때 *A. xylinum*에 전단력이 가해지면 BC와 함께 아세탄 (acetan) 또는 자일란 (xylan)과 같은 수용성 고분자가 생성되고, 이 수용성 고분자는 성장하는 마이크로피브릴 사이의 수소결합을 방해하여 마이크로피브릴의 성장을 억제하기 때문에 생성되는 BC는 분자량이 낮아지는 것으로 알려져 있다(10). Moon등(5)에 의하면 교반 배양 (shaking cultivation) 방식으로 BC를 제조할 때 중합도가 상당히 낮은 BC가 생산되는 것을 보고하고 있다. 본 실험에서는 공

기순환법 (air circulation)으로 당화액 배지를 사용 하여 50 L의 대형 배양기에서 제조한 BC의 경우에도 면섬유소보다는 분자량이 대단히 크고, 10 L의 소형 배양기에서 제조할 때와 거의 비슷한 분자량을 가지는 BC가 제조되는 것을 알 수 있었다.

Table 2. Molecular weight and its distribution of bacterial cellulose produced by various culture conditions using SFW

sample	Mn	Mw	Mz	polydispersity
BC (static)	2,578,000	3,410,000	4,287,000	1.323
BC (10 L)	1,975,000	2,928,000	4,134,000	1.482
BC (50 L)	1,809,000	2,743,000	3,719,000	1.516
cotton cellulose	875,891	2,487,000	3,917,000	2.839

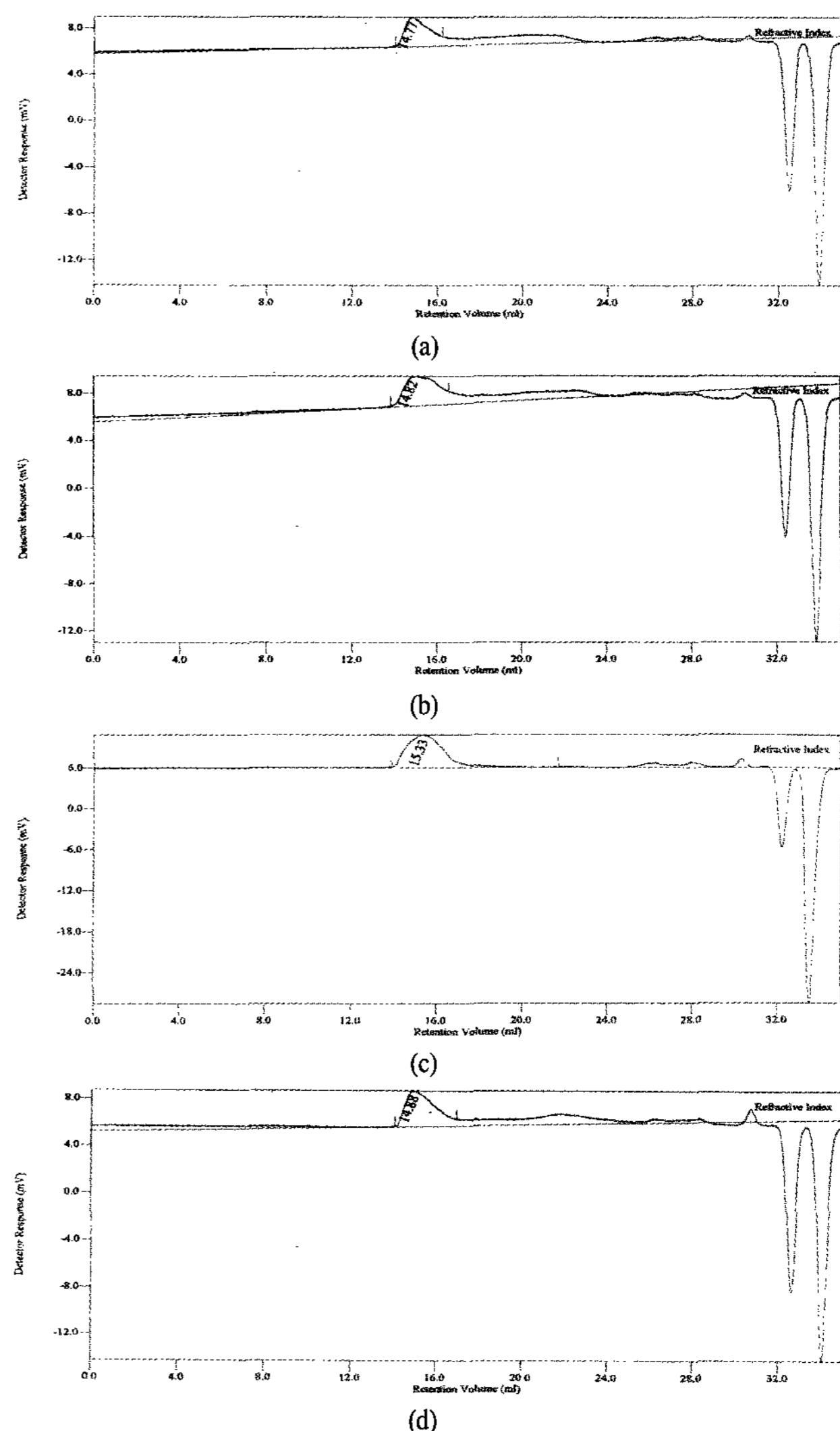
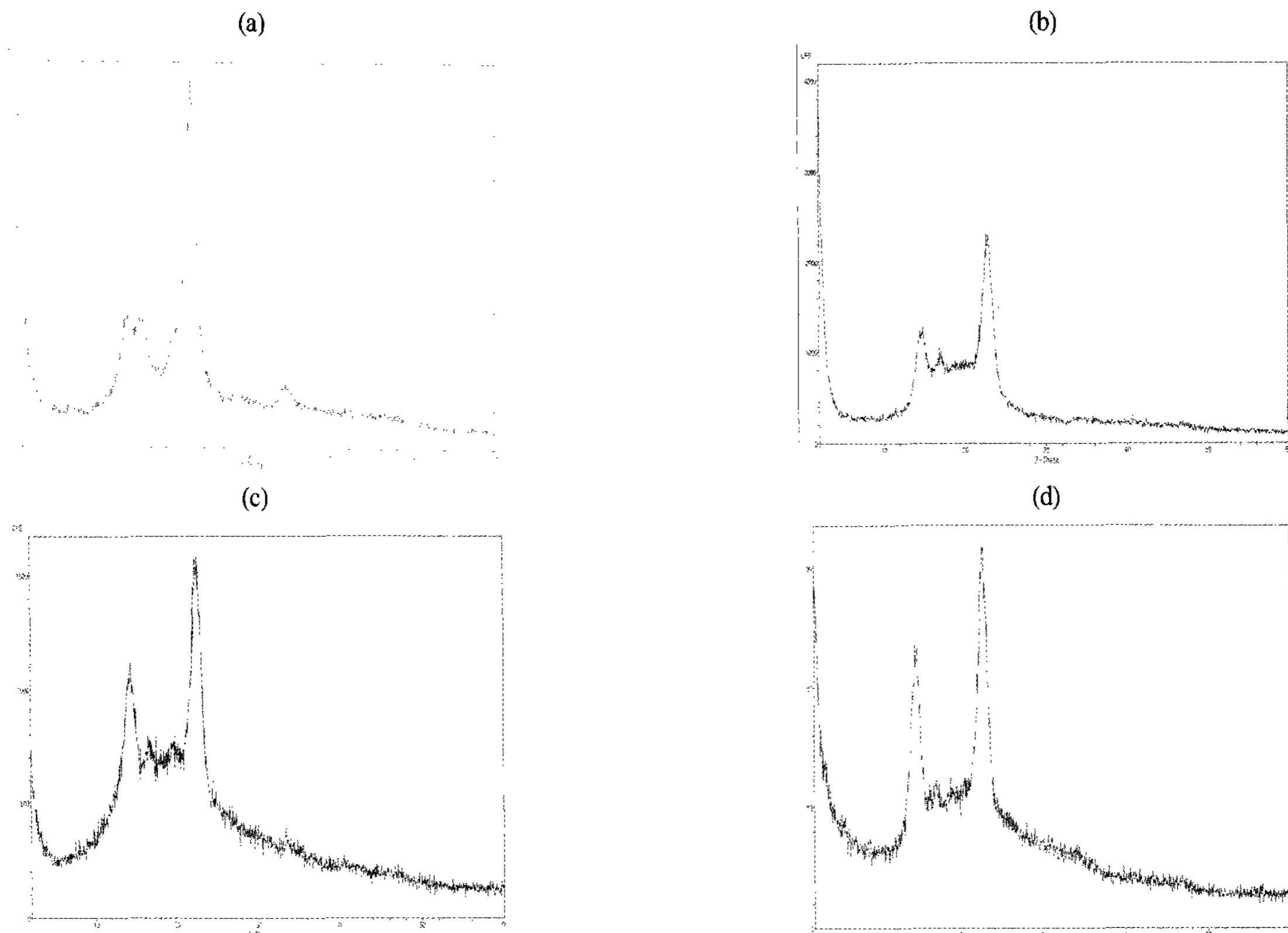


Figure 4. GPC chromatogram of cotton cellulose and bacterial cellulose prepared at various conditions ((a): cotton cellulose, (b): 10 L, (c): 50 L, (d): Static cultivation).

한편, 고분자의 균일성을 나타내는 척도인 polydispersity를 비교해 보면 BC는 1.3~1.5 수준이고, 면섬유소는 2.8 수준으로써 BC의 경우에 균일성이 우수한 것을 알 수 있었다. 이로부터 정치배양한 경우나 공기순환방식으로 제조한 경우에 관계없이 균일성이 우수한 셀룰로오스가 생성된다.



**Figure 5.** X-ray diffractogram of cotton cellulose and bacterial cellulose prepared at various conditions ((a): cotton cellulose, (b): SFW 10 L, (c): SFW 50 L, (d): Static cultivation).

는 것을 알 수 있었다.

### 결정화도

BC의 결정성을 확인하기 위하여 X-선 회절분석을 행하였으며, Fig. 5에 회절도를 나타내었다. Fig.를 보면 CC 및 BC 모두 2-Theta가 14.8, 16.9 및 22.5 부근에서 회절피크를 보이고 있으며, 이로부터 CC 및 BC가 모두 셀룰로오스 I형의 결정구조를 가지는 것을 알 수 있었다.

한편, BC의 상대 결정화도를 전술한 Segal 방법으로 결정한 결과, 정치 배양하여 제조한 BC는 87.8%, 당화액 배지를 사용하여 10 L 배양기에서 제조한 BC는 86.2%, 당화액 배지를 사용하여 50 L 배양기에서 제조한 BC는 86.4%를 나타내었다. Moon등(5)에 의하면 Shaking 방식으로 제조한 BC의 Segal 방법으로 결정한 상대 결정화도는 50% 수준을 가진다고 보고하고 있다. 따라서 이와 비교하면 공기순환 방식으로 BC를 제조할 때 배양기를 대형화하여도 BC의 결정성이 거의 변하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

### 인장강도

제조한 BC를 사용하여 부직포 형태로 성형하고, 이를 리본 형태로 잘라 만능시험기로 인장강도를 측정해 보았다. 정치 배양하여 제조한 BC는  $1.72 \text{ kg/mm}^2$ , 당화액 배지를 사용하여 10 L 배양기에서 제조한 BC는  $1.19 \text{ kg/mm}^2$ , 당화액 배지를 사용하여 50 L 배양기에서 제조한 BC는  $1.18 \text{ kg/mm}^2$ 로써 정치배양하여 제조한 BC가 공기순환 방식으로 제조한 BC에 비해 인장강도가 크고, 공기순환법으

로 제조한 BC는 배양기의 대소에 관계없이 인장강도는 비슷하였다. 고분자재료의 역학적 성질은 분자량에 크게 영향을 받는다. 따라서 정치배양한 BC의 인장강도가 큰 것은 전술한 바와 같이 분자량이 큰 것 때문이라고 생각되며, 공기순환 방식으로 제조할 때는 배양기 용량의 대소에 관계가 없다는 것을 확인할 수 있었다.

### 요약

본 연구에서는 음식폐기물을 효소당화액을 BC생산 배지원으로 이용하여, flask정치배양과 50 L로 규모확대한 공기순환배양기에서 BC생산성을 검토하고, 생산된 BC의 제반물성을 조사하였다. 전단력을 낮추기 위해 당화액배지에 agar를 첨가하여 10 L, 50 L 공기순환배양기에서 배양한 결과, 50 L 규모로 scale-up한 반응기에서 5.64 g/L로 10 L 공기순환배양기 (5.84 g/L)에서와 동등한 BC 농도가 얻어져 BC 대량생산에 효과적인 배양방법임이 입증되었다. 50 L 규모로 확대된 공기순환배양기를 이용하는 본 배양 방법은 BC의 저비용 대량생산을 위한 효율적인 생산 방법 중 하나가 되리라 사료된다.

또한, 당화액을 배지로 하여 공기순환 방법으로 제조한 BC의 물성을 정치배양 방법으로 제조한 BC의 물성과 비교 검토한 결과, 공기순환법으로 제조하였을 때 중합도 및 역학적 성질이 약간 저하하였으나 결정성은 비슷하였으며, 배양기 용량의 대소에 따른 물성의 변화는 거의 없었다.

따라서, 본 공기순환배양기를 이용한 BC생산의 scale-up 기술은 BC대량생산의 획기적인 하나의 대안기술이 되리라 사료된다.

## 감 사

본 연구는 환경부의 차세대핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia 21 project)으로 지원받은 과제입니다.

## REFERENCES

1. Klemm, D., D. Schumann, U. Udhard, and S. Marsch (2001), Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery, *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1561-1603.
2. Shibasaki, H., S. Kuga, F. Onabe, and M. Usuda (1993), Bacterial cellulose membrane as separation medium, *J. Appl. Polym. Sci.* **50**, 965-969.
3. Matsuoka, M., T. Tsuchida, K. Matushita, O. Adachi, and F. Yoshinaga (1996), A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 575-579.
4. Naritomi, T., T. Kouda, H. Yan, and F. Yoshinaga (1998), Effect of Lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture, *J. Ferment. Bioeng.* **85**, 89-95.
5. Moon, S-H., J-M. Park, H-Y. Chun, and S-J. Kim (2006), Comparisons of physical properties of bacterial celluloses produced in different culture conditions using saccharified food wastes, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **11**, 26-31.
6. Mandel, M. and D. Sternberg (1976), Recent advances in cellulase technology, *J. Ferment. Technol.* **54**, 267-286.
7. Alexander, W. J. and R. L. Michell (1949), Rapid measurement of cellulose viscosity by nitration methods, *Anal. Chem.* **21**, 1497-1500.
8. Segal, L., J. Creely, A. Martin, and C. Conrad (1959), An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer, *Text. Res. J.* **29**, 786-794.
9. Takehiko, I., M. Mitarai, Y. Sugano, and M. Shoda (2003), Role of water-soluble polyssaccharides in bacterial cellulose production, *Biotechnol. Bioeng.* **83**, 474-478.
10. Shoda, M. and Y. Sugano (2005), Recent advances in bacterial cellulose production, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **10**, 1-8.