pISSN 1226-2587
J. Soc. Cosmet. Sci. Korea eISSN 2288-9507
Vol. 42, No. 3, September 2016, 247-255 http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2016.42.3.247

Gluconobacter uchimurae GYS15 균주로부터 생산되는 Biocellulose의 특성 확인

이 영 선 · 김 재 영 · 차 미 연 · 강 희 철†

(주)지에프씨 생명과학연구원

(2016년 7월 18일 접수, 2016년 8월 29일 수정, 2016년 9월 22일 채택)

Characteristics of Biocellulose by *Gluconobacter uchimurae* GYS15

Young Sun Lee, Jae Young Kim, Mi Yeon Cha, and Hee Cheol Kang†

Life Science Research Institute, GFC Co. Ltd., 1005 Yeongdeo-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 16954, Korea

(Received July 18, 2016; Revised August 29, 2016; Accepted September 22, 2016)

요 약: 화장품 소재로서 천연고분자 물질인 Biocellulose (BC)를 형성하는 균주를 선발하여 초산생성 균주를 선발하였다. SM 배지를 통하여 초산 생성 균주 1종을 선발하고 형태학적인 분석을 통하여 간균형태의 그람 음성균임을 확인하였다. 또한 균주의 동정을 위하여 16S rDNA 유전자 분석을 통하여 계통도를 분석한 결과 *Gluconobacter uchimurae* (*G. uchimurae*)와 높은 상동성을 나타내어 *G. uchimurae* GYS15 균주로 명명하였다. 선발된 균주는 pH 5, 25 ℃ 조건의 환경적 요인에서 14일간 배양하였을 때 가장 높은 생육을 나타내었다. 또한 탄소원으로 glucose 이외에 이당류인 sucrose와 fructose를 첨가 하였을 때 가장 높은 생육활성을 보였고 최적의 염농도와 질소원은 0.5% NaCl과 malto extract로 확인하였다. 확인된 조건 하에서 *G. uchimurae* GYS15 균주를 배양하여 얻어진 BC의 물성을 확인하였다. 전자 주사현미경을 통하여 확인된 표면구조는 높은 표면적을 갖는 초미세망상구조로서 다공성 구조를 나타내었다. 이로 인해 수분의 경우 8.6 ± 0.38배, 유분의 경우 6.6 ± 0.51배까지 재흡수 되는 것으로 확인하였다. 따라서 BC의 이러한 구조적 특성을 이용하여 마스크 팩 등의 다양한 화장품 소재로 활용 가능성을 확인하였다.

Abstract: In order to select a strain that forms a Biocellulose (BC), strain producing acetic acid was selected from commercially available kombucha. Through SM broth it was confirmed that the strain is a gram negative bacteria in the form of rods having no motility through a phase contrast microscope. The result of phylogenetic inference analysis based on 16S rDNA sequence analysis for the identification of strains was most closely related to *Gluconobacter uchimurae* (*G. uchimurae*) and was named *G. uchimurae* GYS15 strain. The strain showed the highest degree of growth when cultured for 14 days under the conditions of pH 5 and 25 ℃. Moreover, it showed the highest degree of growth in a Glucose addition disaccharide as the optimum carbon source sucrose and fructose. Also, 0.5% NaCl, upon the addition of Malto extract, showed the highest degree of growth. Based on investigation by the optimum growth conditions to confirm the physical properties of BC obtained by culturing *G. uchimurae* GYS15 strains. The surface structure was observed through an scanning electron microscope (SEM) showed a high networks structure. It until 8.6 ± 0.38 times when the water holding capacity is re-absorbed and re-absorbed holding oil up to 6.6 ± 0.51 times confirmed. In conclusion, using these material properties, it was possible to confirm the possibility of a variety of cosmetic materials and mask pack materials.

Keywords: *Gluconobacter, G. uchimurae, Biocellulose, nanofibril, cosmetics*

† 주 저자 (e-mail: roka0822@gmail.com)
call: 070)4192-9363

1. 서 론

1886년 *Acetobacter xylinus* 균주에 의해 생산되는 cellulose인 Biocellulose (BC)가 Brown (1886)[1]에 의해 최초로 보고된 이후 다양한 연구를 통해 그 가치를 인정받고 있다. BC는 식물 cellulose에 비하여 순수한 cellulose로만 구성되어 있으며 초미세 망상구조로 높은 물리적 구조, 일반 cellulose에 비하여 자연적으로 분해되는 생분해성, 높은 수분 보유력을 갖는 생체친화적 소재로 훌륭한 화학적 소재로써 활용이 가능하다. 따라서 BC를 이용한 다양한 산업적 연구 개발 및 적용이 주목을 받고 있다[2].

BC는 미생물에 의하여 탄소와 질소가 포함된 배지 안에서 배양하면서 배양액의 계면에 흰색의 피막이 형성 된다. 생성된 BC의 중첩된 망상구조의 피막은 리본 모양의 섬유화 된 cellulose이며, 그 너비는 100 nm보다 작고 반지름이 2 ~ 4 nm인 무수히 많은 마이크로 섬유로 이루어져 있으며 1600 kg/m^{3}의 밀도를 가진다[3]. BC의 물리적 구조특성에 따라 높은 결정화도(84 ~ 89%)를 나타내며 이는 일반적인 미세 천연 섬유보다도 높으며 탄성률은 유리섬유와 비슷하다[4].

미생물이 생산하는 BC는 생체적합성이 매우 높아 이미 의료용 소재로서 인공연골, 인공혈관, 드레싱제제 및 화상치료제로 활용하고 있다. 대표적으로 Dermafill (Georgia, USA)사 제품이 널리 사용되고 있다. 뿐만 아니라 미용 재료로서 부직포 시트를 대신하여 개발된 하이드로 겔마스크팩에 비하여 천연 소재인 BC는 자극이 적고 나노 사이즈로 구성되어 일반적인 부직포 마스크 팩보다 표면적이 넓고 높은 인장강도를 통해 피부 밀착력이 뛰어나며 10배 이상의 습윤성을 보유하여 피부 흡수율을 높여줄 수 있다[5].

이러한 특성을 나타내는 균주는 식초발효과정이나 양조과정의 오염균으로서 형성된 피막이 BC임이[1] 보고된 후 algae, fungi 등에서도 생산되며 미생물로는 *Acetobacter, Agrovacterium, Pseudomonas, Rhizobium, Alcaligenes* 속 및 *Gluconobacter* 속의 균주들에 의해서도 생산되는 것이 보고되었다[6]. 그중 *Acetobacter* 속의 균주가 산업적으로 매우 중요한 가치를 가지며 다양하게 연구되어 왔다[7,8]. 한편 *Gluconobacter* 속 역시 아세트산 및 숙신산 생성 과정에서 중요한 의의를 갖으며 다양하게 연구되어 지고 있다[9-11]. 또한 *Gluconobacter* 속에 의하여 생산되는 BC의 연구 역시 활발히 이루어지고 있다[12,13].

이러한 다양한 균주를 통해 생산되는 BC는 생체친화도, 결정화도, 탄성률, 인장강도 및 습윤성 등 기존의 식물 유래의 천연 cellulose에 비하여 훌륭한 특성을 나타낸다. 하지만 실용화를 위한 최적 생산 조건 탐색과 생산수율의 증대 또는 정량적 측정 결과를 통한 데이터화는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 민가에서 분양하는 콤부차(kombucha)로부터 *G. uchimurae* GYS15 균주를 분리하였다. 또한 이 균주에서 BC를 생산하기 위한 최적 배양 조건을 확립하고, 생산된 BC의 화장품 소재로서의 가치를 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용 균주 및 배지 조성

본 실험에서 사용한 초산생성균 분리용 배지는 SM 배지(yeast extract 0.5%, glucose 3.0%, $CaCO_3$ 1.0%, agar 2.0% 에탄올 5.0% w/v)[14]를 이용하였으며 초산균 배양용 액체 배지는 LM 배지(yeast extract 0.5%, glucose 0.5%, glycerin 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, 에탄올 5.0%, acetic acid 1.0%)[15]를 사용하였다.

콤부차(kombucha)는 러시아, 중국, 독일, 필리핀 등에서 잘 알려진 발효음료로 acetic acid 및 다양한 유기산을 생성하고 표면에 겔(gel)을 형성한다고 알려져 있다[16]. 본 실험에서 사용한 균주는 민간에서 생산, 시판 중인 콤부차[15]를 분양받아 시료로 사용하였다. 적정배수로 희석된 콤부차를 SM 배지에 도말하고 상온에서 72 h 동안 배양하여 생성된 초산균주의 단일 집락을 동일한 배지에 계대 배양하여 순수 분리한 뒤, 액체배지에 접종하고 정치배양하여 생성된 BC를 이후 실험에 사용하였다.

2.2. 균주의 동정 및 계통분석

BC를 생성하는 균주의 형태학적 관찰을 위하여 SM 배지에 10일간 배양된 균주를 60%에서 100% 에탄올을 5%씩 증가하여 단계적 탈수 과정을 거친 후 위상차 현미경(BX41, TOMORO AcquPro 2005 Live image system, Japan)으로 관찰하였다.

분리된 균주의 계통도를 작성하기 위하여 16S

rDNA 염기서열 분석을 실시하였다. 배양된 균주로부터 genomic DNA를 추출하기 위하여 FastDNA SPIN Kit (MPbio, France)를 사용하였다. 추출된 Chromosomal DNA를 주형으로 하여 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 통하여 DNA polymerase KIT (HotstarTaq, Qiagen, Germany)로 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 94 ℃에서 30 s, 55 ℃에서 30 s, 72 ℃에서 40 s로 하여 총 30 cycles을 반복하였다. 증폭된 유전자는 1% 아가로스 젤 전기영동을 통하여 확인하였다.

반응 생성물의 염기서열 분석은 (주)마크로젠(Korea)에 의뢰하여 분석결과를 도출하였다. 이 결과를 바탕으로 상동성 검사는 National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncib.nlm.nih/gov/ U.S. National Library of Medicine, USA)에서 제공하는 BLAST search를 통하여 수행하였고, 확보된 염기서열간의 다중서열 정렬 분석을 실시하고 이 결과를 바탕으로 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6.0, Megasoftware, USA) 프로그램[18]을 사용하여 neighbor-joining법으로 계통도를 작성하였다.

2.3. 분리 균주의 생육 특성

콤부차로부터 분리된 균주의 생육특성을 확인하기 위하여 LM 배지를 기본으로 하여 다양한 조건에서 생육도를 확인하였다. 환경적 요인을 확인하기 위하여 배양시간 및 배양온도가 미치는 영향을 확인하기 위하여 액체 배지에 전 배양액을 1% (v/v)로 접종하고 14일 동안 24 h 단위로 배양하면서 생육도를 660 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 온도는 10 ~ 40 ℃까지 5 ℃ 단위로 배양하면서 생산량을 확인하였다. pH의 영향을 알아보기 위해 1 M HCl과 3 M NaOH를 이용하여 pH 4 ~ 10으로 조정한 배지에 동일 비율로 접종하고 배양하며 생육도를 확인하였다.

분리균주의 영양적 요인에 따른 생육도를 확인하기 위하여[18] glucose 대신에 다양한 탄소원(fructose, maltose, sucrose, carboxymethyl cellulose)을 배양액에 0.5%가 되도록 첨가하여 14일 동안 배양하면서 분리균주의 생육 특성을 조사하였다. 무기염류에 대한 영향을 확인하기 위하여 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$와 $NaCl_2$를 0.5%까지 첨가하여 배양하였고 질소원은 무기 질소원($(NH_4)_2SO_4$), 유기질소원(beef extract, malt extract)으로 구분지어 0.5% 농도로 첨가하여 배양하였다. 배양조건에 따른 생육도는 모두 660 nm에서 microplate spectrophotometer (Synergy HT, BioTek, USA)를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 균주의 생육도를 측정하여 BC를 가장 활발히 생성하는 조건을 확인하였다.

2.4. Biocellulose (BC)의 물리적 특성 확인

미생물이 생산하는 BC의 표면 구조를 확인하기 위하여 Wharton [19]의 방법을 변형하여 측정하였다.

이전의 실험으로 확립된 최적 배양 조건을 통하여 14 일 간 배양된 BC를 이용하여 −110 ℃ 조건에서 동결건조 하였다. 이 후 48 h 동안 완전히 동결건조된 BC를 carbon tape에 증착하고 ion sputter (Sputter coater 108, Cressington, UK)로 Pt 진공증착 후 전자주사 현미경(JSM-7800F Prime, JEOL Ltd, Japan)으로 관찰하였다.

2.5. 함습력(Water Retention Capacity, WRC) 확인

생성된 BC의 시료를 Bhatty[20]의 방법을 변형하여 함습력 측정에 사용하였다. 먼저 시료 5 g을 정량하여 완전 건조된 BC에 충분한 수분을 첨가한 다음 수분이 흡수된 BC의 무게를 정량하였다. 대조군으로 바이오셀룰로오스 마스크팩에 사용되는 베트남의 생산업체의 제품을 수입하여 사용하였다. 이와 같은 방법으로 수분보유능(시료 건조중량 당 물의 중량)을 측정하였다.

2.6. 보유력(Oil Retention Capacity, ORC) 확인

보유력은 Nuria 등의 방법[21]을 변형하여 측정하였다. 먼저 시료 5 g을 정량하여 완전 건조 후 충분한 soybean oil을 첨가한 다음 soybean oil이 흡수된 BC의 무게를 정량하였다. 대조군으로 바이오셀룰로오스 마스크팩에 사용되는 베트남의 생산업체의 제품을 수입하여 사용하였다. 이상의 방법으로 오일 흡수능(시료 건조중량 당 물의 중량)을 측정하였다.

2.7. 통계 처리

실험결과는 mean ± S.D.로 표기하였으며, GraphPad Prism software (wersion 5.00 for Windows, San Diego, CA, USA) 프로그램의 Student's *t*-test 방식을 이용하여 결과값의 유의성을 분석하였고. 그 결과 $p < 0.1$ 이하일 경우에 한하여 유의성을 인정하였다.

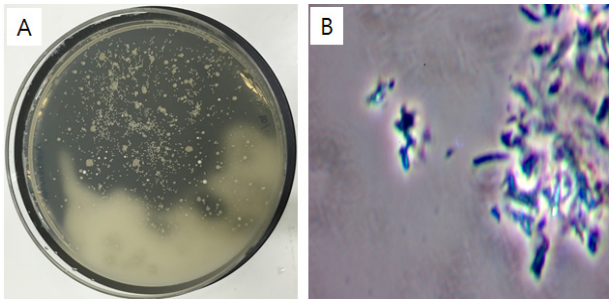

Figure 1. The morphological characteristics of *Gluconobacter* sp. from kombucha. (A) Microorganisms from kombucha grown on LM agar plate. (B) Contrast micrograph of isolated strain *Gluconobacter* sp.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주의 동정

농가에서 분양받은 콤부차를 SM 배지에 도말하여 균주를 분리하였다. 그중 배지의 clear zone을 통하여 유기산 분리를 왕성하게 나타내는 균주를 선별하고 다시 도말하여 clear zone을 확인함으로써 순수 분리를 실시하였다. 그 결과 가장 넓은 clear zone을 갖는 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 LM 배지를 이용하여 액체 배양 후 그 형태를 위상차 현미경을 통하여 관찰하였다. *Gluconobacter* sp. 균주는 그람 음성균으로 운동성이 없는 단일균 형태의 간균으로 Tanasupawat 등의 보고[22]와 유사한 초산 생성 균주의 형태학적 특성이 관찰되었다(Figure 1).

3.2. 균주의 계통분석

선별된 초산 생성 균주의 동정은 16S rDNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI, U.S. National Library of Medicine, USA) genebank에 등록된 염기서열과 비교 분석한 결과, *Gluconobacter* 속 균주들과 높은 상동성을 나타내었으며 그중 *G. uchimurae* ZW160-2 균주와 98%의 상동성을 보였다. 따라서 선발된 균주는 위의 분석결과를 바탕으로 neighbor-joining method를 활용하여 계통도를 작성한 결과, *G. uchimurae*로 판단되어 *G. uchimurae* GYS15으로 동정하였다(Figure 2).

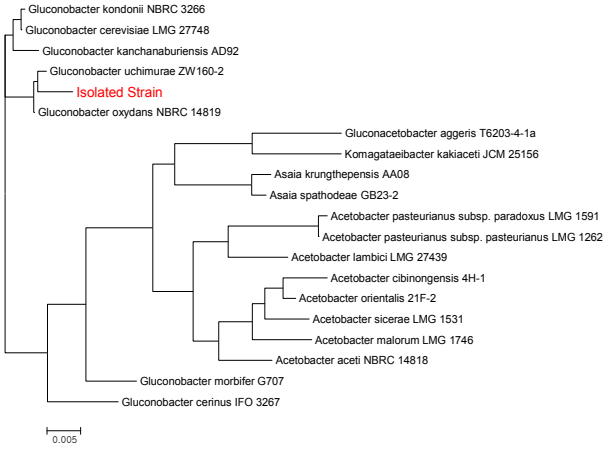

Figure 2. Neighbour-joining phylogenetic tree, based on 16S rDNA gene sequences, showing the relationships between isolated *Gluconobacter* sp. and related taxa. Bar. 0.005 changes per nucleotide position.

3.3. 분리균주의 생육특성

3.3.1 환경적 요인에 의한 생육 특성의 변화

• *G. uchimurae* GYS15의 생육 최적 시간 확인

G. uchimurae GYS15의 생육도는 25 ℃에서 14일 이상 배양하면서 세포 생육도를 확인하였다. 균주는 배양 6일에서부터 10일 사이에 급격한 성장을 나타내었다. 14일 이후에도 계속적인 성장을 이루었으며 이러한 현상은 일반적으로 초산 생성 균주들이 산성 조건에서 생육이 원활히 일어나는[23] 기존의 보고와 일치하며 *G. uchimurae* GYS15 균주 역시 배양이 진행되면서 대사과정에 의하여 생산되는 초산에 의하여 배양액 조건이 산성으로 변화되어 생육도가 높아지는 것으로 사료된다(Figure 3A).

• *G. uchimurae* GYS15의 생육 최적 pH 확인

배양된 *G. uchimurae* GYS15 균주의 최적 배양 pH는 5 ~ 6 사이에서 가장 높은 성장률을 나타내는 것으로 보아 통산호산성(facultative acidophile)으로 확인된다. 또한 알카리 환경인 pH 7 ~ 8 사이에서도 생육이 일어나나 pH 9 이상에서는 그 생육도가 현저하게 줄어들었다. 이러한 이유는 성장과는 별도로 효소와 membrane transfer protein의 활성이 억제되어 세포의 손상을 유발하며 pH 변화에 의해 유도된 이온화 경향의 따라 세포의 물질 흡수 능력이 저해되어 생육도가 저하

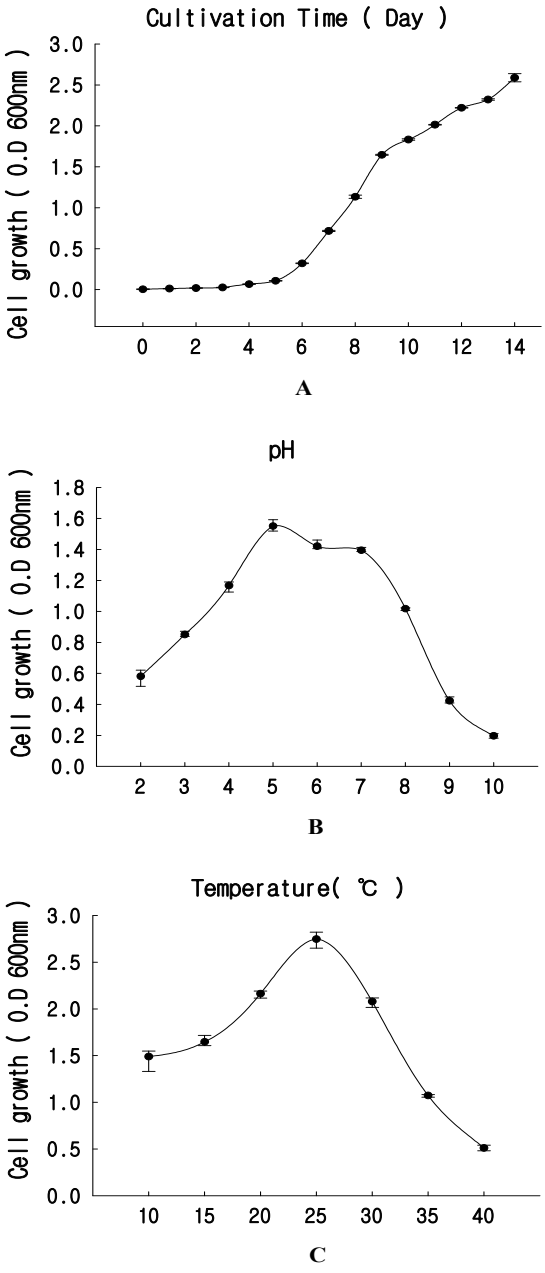

Figure 3. Effect of culture condition on cell growth of *Gluconobacter* sp. (A) cultivation time, (B) pH, (C) temperature.

되는 것으로 사료된다(Figure 3B).

• *G. uchimurae* GYS15의 생육 최적 온도 확인

선발된 *G. uchimurae* GYS15 균주의 최적 배양온도를 확인하기 위해 균주의 생육도에 미치는 배양온도의

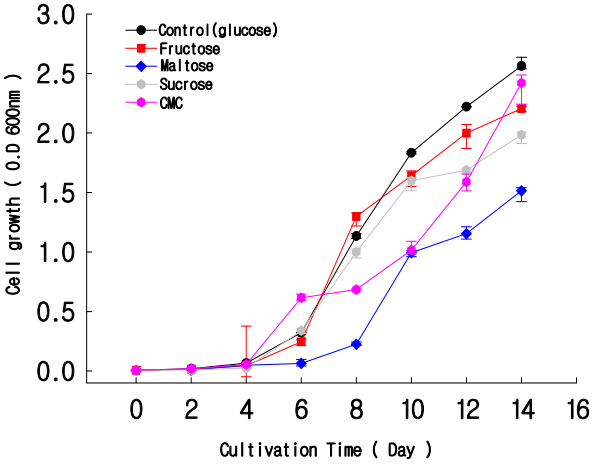

Figure 4. Effect of different carbon sources of cell growth of *Gluconobacter* sp. on LM medium at 25 ℃ using statics culture.

영향을 확인하였으며 10 ~ 40 ℃의 온도 범위에서 14일간 배양하면서 생육도를 확인하였다. 그 결과 *G. uchimurae* GYS15의 생육도는 25 ℃에서 배양 시 가장 높게 나타났으며 이로 인해 최종 *G. uchimurae* GYS15는 중온성균(mesophile)으로 확인 되었다(Figure 3C). 30 ℃ 이상에서는 생육과 관련된 단백질의 변성으로 인해 세포기능이 마비되어 그 생육도가 감소되는 것으로 사료된다.

3.3.2. 영양적 요인에 의한 생육 특성의 변화

• *G. uchimurae* GYS15의 생육 최적 탄소원 확인

Gluconobacter sp.의 성장에 탄소원이 미치는 영향을 확인하기 위하여 LM 배지를 기본 배지로 각 탄소원이 0.5%가 되도록 첨가하여 14일간 배양하여 각 균주의 성장곡선을 흡광도로 측정하였다. 균체의 성장은 단당류인 glucose를 기준으로 하였을 때 6일 이후부터 높은 생육도를 보이며 가장 빠르게 성장하였다. 이와 비슷하게 이당류인 sucrose와 fructose에서 glucose와 비슷한 생육도를 나타내며 성장하였다. 또한 성장속도는 느리지만 14일 경과 시 CMC 처리구에서도 비슷한 생육도를 나타내었다. 반면 maltose의 경우 8일차에 높은 생육도를 나타내었으나 대조군인 glucose 첨가구에 비하여 낮은 생육도를 나타내었다(Figure 4). 이는 Raghunathan의 연구에서 glucose 첨가 시 가장 활발한 생육을 나타냄과 유사한 결과로 확인되었다[24].

Table 1. Effect of Different Salt and Nitrogen Source on Cell Growth by *Gluconobacter* sp. on LM Medium after 14 Day at 25 ℃ Using Statics Culture

Source (0.5%)	Cell growth of *G. uchimurae* GYS15
	O.D. 660 nm
No addition (control)	2.59 ± 0.05
Salt	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.58 ± 0.06
NaCl	2.84 ± 0.04
Nitrogen source	
$(NH_4)_2SO_4$	2.02 ± 0.03
Beef extract	2.73 ± 0.07
Malt extract	3.03 ± 0.02

Each value is mean ± S.D. ($N \geq 3$). Means significant difference between no addition group and addition group by Student's *t*-test ($p < 0.01$)

• *G. uchimurae* GYS15의 생육 최적 염농도 확인

G. uchimurae GYS15의 성장에 염이 미치는 영향을 확인하였다. 배양 환경에서 염의 영향을 확인하기 위하여 기존의 LM 배지의 조성을 확인하여 NaCl을 제외한 나머지 성분으로 구성된 배지를 조제하고 NaCl 양을 0.5%가 되도록 배지를 구성하고 균주를 접종하여 배양하였다. 접종한 후 14일 동안 배양하고 배양된 배양액으로부터 세포 생육도를 흡광도로 확인하였다. 그 결과 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$의 경우 0.5%의 농도에서 생육도의 큰 변화는 보이지 않았다. 반면 NaCl의 경우 상대적인 생육도의 증가를 확인할 수 있었다. 이는 세포막의 안정성 또는 효소의 안정화를 위하여 무기염류에 의한 일정 Na^+ 농도가 반드시 필요할 것으로 사료된다. 이 결과를 바탕으로 *G. uchimurae* GYS15 균주는 호염성균(halophile)로 확인되었다.

• *G. uchimurae* GYS15의 생육 최적 질소원 확인

*G. uchimurae*의 생육도에 대하여 질소원이 미치는 영향을 확인하기 위하여 유기질소원(beef extract, malt extract)과 무기질소원($(NH_4)_2SO_4$)을 이용하여 0.5% 농도로 처리하여 각각의 영향을 확인하였다. 질소원은 미생물 대사증식과정에서 결정적인 영향을 미치는 성분으로 유기 질소원인 malt extract와 beef extract의 경우 대조구에 비하여 모두 상대적으로 높은 생육도를 나타내었다. 반면 무기 질소원인 황산 암모늄($(NH_4)_2SO_4$)을 첨가하여 배양하였을 경우 오히려 생육도가 감소하는 것으로 확인되었다(Table 1).

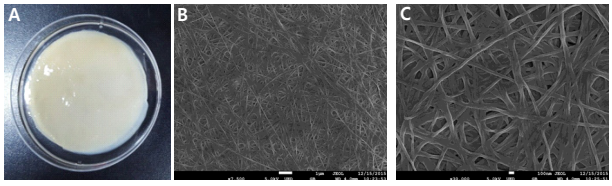

Figure 5. Scanning electron micrograph describing micro structure of BC micro fibrils produced by *Gluconobacter* sp. When cultivated for 14 day. (A) BC formed through static cultivation from Kombucha, (B) × 7,500, (C) × 20,000.

3.4. *G. uchimurae* GYS15의 Biocellulose (BC)의 물성측정

3.4.1. 표면연구

최적조건에서 배양된 *G. uchimurae* GYS15의 BC를 전계방사 주사전자현미경(field emission scanning electron microscope, FE-SEM)으로 관찰하였다(Figure 5). 그 결과 섬유상의 초미세망상구조를 보이며 특히 BC는 막의 형태가 fabric 소재와 같은 형태를 나타내어 섬유패드 제작 시 높은 결합강도를 나타낼 것으로 보인다. 이는 통상 미생물 배양 중 전단력에 의해 섬유형태가 얻어지고 정치배양에서 공기/액체 계면에서 cellulose의 젤라틴 막이 형성되는데 기인하는 것으로 사료된다. 위와 같은 특성은 일반적인 식물 유래의 cellulose와는 구조적으로 다른 형태이며[25] 이러한 차이로 인하여 BC만의 독특한 물리적 특성인 높은 인장강도, 높은 수분,

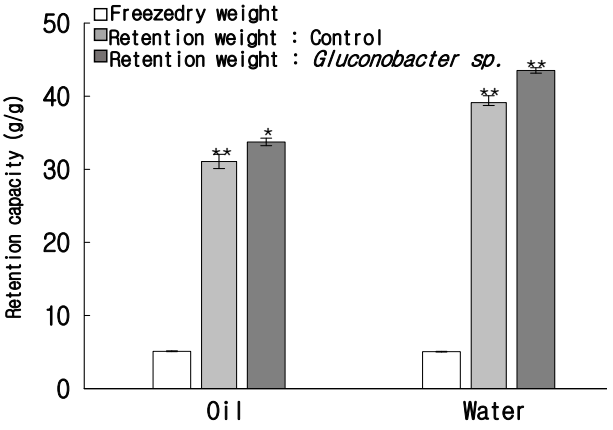

Figure 6. Water retention capacity and oil retention capacity of BC from *Gluconobacter* sp. Data points and bar represent arithmetic mean ± S.D. (n = 3). $^{*}p< 0.1$, $^{**}p < 0.01$ as compared to the freeze dry group.

오일 보유력[26]을 나타내는 것으로 사료된다.

3.4.2. *G. uchimurae* GYS15의 함습력 및 보유력 확인

실험을 통해 정해진 최적 생육 조건을 바탕으로 *G. uchimurae* GYS15가 생산하는 BC의 함습력 및 보유력을 확인하였다. 동결건조를 통하여 완전히 건조된 BC를 정량하고 정제수에 충분히 침지시킨 뒤 다시 시료를 정량하여 함습력, 보유력을 확인하였다(Figure 6). 그 결과 정제수에 침지시킨 샘플을 통해 얻어진 함습력은 건조중량 대비 최대 8.6 ± 0.38배까지 재흡수 되어 5.34 ± 0.23 배의 재흡수능을 보이는 cellulose powder (Sigma, USA)[27] 보다 우수한 함습력을 확인하였다. 또한 보유력 또한 같은 방법을 확인하였을 때 6.6 ± 0.51 배까지 재흡수 되어 상당히 높은 함습 및 보유력을 갖는 것으로 확인되었다. 또한 대조군으로 사용한 시판 바이오셀룰로오스에 비하여 *G. uchimurae* GYS15가 생산하는 바이오셀룰로오스의 함습력은 10.47 ± 0.66%, 보유력은 8.60 ± 0.97%의 증가된 값을 나타내었다. 이러한 재흡수력은 바이오셀룰로오스가 갖는 나노사이즈의 초미세 망상구조에 기인한 것으로 사료된다. 또한 이러한 특성은 식이섬유를 이용한 건강기능식품 또는 의료용 드레싱패드[28] 인공 피부, 자외선에 의한 화상 및 화장품 마스크팩 소재[29] 등 다양한 분야에서 훌륭한 소재로서 활용될 수 있다.

4. 결 론

BC를 형성하는 균주를 선발하기 위하여 미소콤부에서 시판중인 콤부차로부터 초산을 생성하는 균주를 선발하였다. SM 배지를 통하여 초산을 생성하는 균주를 선발하고 위상차 현미경을 통하여 운동성이 없는 간균 형태의 그람 음성균임을 확인하였다. 그리고 균주의 동정을 위하여 16S rDNA 유전자 분석을 통하여 계통도를 분석한 결과 *G. uchimurae*와 높은 상동성을 나타내어 *G. uchimurae* GYS15 균주로 명명하였다.

선발된 균주의 최적 생육 조건을 확인하기 위하여 환경적 요인과 영양적인 요인을 나누어 확인하였다. 그 결과 균주의 성장은 단당류인 glucose를 기준으로 하였을 때 6일 이후부터 14일까지 가장 빠르게 성장하였고 pH 5, 25 ℃ 조건에서 최적 생육을 보이는 중온성균(mesophile)으로 확인하였다. 또한 탄소원으로 glucose 이외에 이당류인 sucrose와 fructose를 첨가하였을 때 가장 높은 생육활성을 보였고 최적의 염농도와 질소원은 0.5% NaCl와 malto extract로 나타났다. NaCl은 세포막의 안정성 또는 효소의 안정화를 위하여 무기염류에 의한 일정 Na+ 농도가 생육에 필수요인 것으로 사료된다. 규명된 최적 생육조건을 바탕으로 *G. uchimurae* GYS15 균주를 배양하여 얻어진 BC의 물성을 전자 주사현미경을 통하여 높은 표면적을 갖는 나노사이즈의 초미세망상구조로 확인하였다. 이는 균주 배양 중 전단력에 의해 섬유형태가 얻어지고 높은 결합강도를 나타내어 일반적인 식물 유래의 cellulose와는 구조적으로 다른 형태를 보였다. 또한 이 BC는 건조중량 대비 최대 8.6 ± 0.38배까지 재흡수 되어 cellulose powder (Sigma, USA)보다 우수한 함습력과 보유력을 나타내었다. 이러한 특성으로 *G. uchimurae* GYS15로부터 생성된 BC는 인공혈관, 드레싱 제제, 마스크팩 등의 다양한 화장품 소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 경제협력권산업 육성사업으로 수행된 연구결과입니다(과제번호: R0005342).

Reference

1. A. J. Brown, XL III. - On an acetic ferment which forms cellulose, *J. Chem. Soc. Trans*., **49**, 432 (1886).
2. S. M. Santos, J. M. Carbajo, E. Quintana, D. Ibarra, N. Gomez, M. Ladero, M. E. Eugenio, and J. C. Villar, Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration, *Carbohyd. Polym*., **116**, 173 (2015).
3. W. Williams and R. Cannon, Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter Xylinum*, *Appl. Environ. Microbiol*., **55**(10), 2448 (1989).
4. W. Czaja, D. Romanovicz, and R. M. Brown, Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture, *Cellulose*, **11**(3-4), 403 (2004).
5. I. F. Almeida, T. Pereira, N. Silva, and F. P. Gomes, Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: an *in vivo* skin compatibility study, *Eur. J. Pharm. Biopharm*., **86**(3), 332 (2014).
6. D. P. Deborah, Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study, *Annu. Rev. Plant Biol*., **50**(1), 245 (1999).
7. P. Ross, H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. D. Vroom, G. A. Van Der Marel, J. H. Van Boom, and M. Benaiman, Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid, *Nature*, **325**, 279 (1987).
8. S. Hestrin and M. Schramm, Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose, *Biochem. J*, **58**(2), 345 (1954).
9. C. Prust, M. Hoffmeister, H. Liesegang, A. Wiezer, W. F. Fricke, A. Ehrenreich, G. Gottschalk, and U. Deppenmeier, Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*, *Nat. Biotechnol*,, **23**(2), 195 (2005).
10. D. Moonmangmee, O. Adachi, Y. Ano, E. Shinagawa, H. Toyama, G. Theeragool, N. Lotong, and K. Matsushita, Isolation and characterization of thermotolerant *Gluconobacter* strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures, *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **64**(11), 2306 (2000).
11. G. N. Qazi, R. Parshad, V. Verma, C. L. Chopra, R. Buse, M. Trager, and U. Onken, Diketo-gluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans*, *Enzyme Microb. Technol*., **13**(6), 504 (1991).
12. A. Retegi, N. Gabilondo, C. Pena, R. Zuluaga, C. Castro, P. Ganan, K. de la Caba, and I. Mondragon, Bacterial cellulose films with controlled microstructure–mechanical property relationships, *Cellulose*, **17**(3), 661 (2010).
13. R. Wu, S. Du, Z. Li, X. Xing, D. Shao, Y. Fan, B. Li, X. Zhang, and L. Bu, Optimization of bacterial cellulose fermentation medium and observation of bacterial cellulose ultra-micro-structure, *Chin. J. Agric. Biotechol*. **24**(6), 1068 (2008).
14. S. W. Lee, J. H. Kwon, S. R. Yoon, S. I. Woo, S. Y. Jang, S. H. Yeo, J. H. Choi, and Y. J. Jeong, Quality characteristics of brown rice vinegar by different yeasts and fermentation condition, *Prev. Nutr. Food Sci*. **39**(9), 1366 (2010).
15. S. W. Kim, J. H. Park, and H. K. Jun, Analysis of optimum condition for production of an onionic vinegar by tow-step fermentation, *J. Life Sci*., **18**(10), 1410 (2008).
16. C. Dufresne and E. Farnworth, Tea, kombucha, and health : a review, *Food Res. Int*., **33**(6), 409 (2000).
17. K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar, MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Genome Biol. Evol*., **30**(12), 2725 (2013).
18. E. A. Hassan, H. M. Abdelhady, S. S. Abd El-Salam, and S. M. Abdullah, The characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* and *Komgataeibacter saccharovorans* under optimized fermentation conditions, *Br. Microbiol. Res. J*., **9**, 3 (2015).
19. D. A. Wharton, Freeze-substitution techniques for reparing nematodes for scanning electron microscopy,

Microsc., **164**(3), 187 (1991).
20. R. S. Bhatty, Physiochemical and functional (breadmaking) properties of hull-less barley fractions, *Cereal. Chem*., **63**(1), 31 (1986).
21. G. Miguel, Nuria, and O. Martín-Belloso, Characterization of dietary fiber from orange juice extraction, *Food Res. Int*., **31**(5), 355 (1998).
22. S. Tanasupawat, J. Kommanee, P, Yukphan, D. Moonmangmee, Y. Muramatsu, Y. Nakagawa, and Y. Yamada, *Gluconobacter uchimurae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the *α-Proteobacteria*, *J. Gen. Appl. Microbiol*., **57**(5), 293 (2011).
23. K. W. Lee, J. M. Sim, K. M. Kim, J. H. Shin, and J. H. Kim, Isolation and characterization of *Acetobacter* species from a traditionally prepared vinegar, *J. Microbiol. Biotechnol*., **43**(3), 220 (2015).
24. D. Raghunathan, Production of microbial cellulose from the new bacterial strain isolated from temple wash waters, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*., **2**(12), 275 (2013).
25. D. Geoffrey and S. I. Duchesne, Revealing the surface ultrastrucure of spruce pulp fibers using field emission-SEM, Swedish University of Agricultural Science (1998).
26. Y. Dahman, Optically transparent nanocomposites reinforced with modified Biocellulose nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci*., **126**(S1), E188 (2012).
27. E. Embuscado, N. BeMiller, and S. Marks, Isolation and partial characterization of cellulose produced by *Acetobacter xylinum*, *Food Hydrocoll*., **10**(1), 75 (1996)
28. E. Lenselink and A. Andriessen, A cohort study on the efficacy of a polyhexanide-containing Biocellulose dressing in the treatment of biofilms in wounds, *J. Wound Care*, **20**(11), 534 (2011).
29. U.S. Patent 13/881,967 (2012).